

**DIE AUFKLÄRUNG DER BIOGENESE  
STRUKTURELL UNGEWÖHNLICHER ALKALOIDE  
AUS *TRIPHYOPHYLLUM* (DIONCOPHYLLACEAE)  
UND *ANTIDESMA* (EUPHORBIACEAE)  
UND  
ENTWICKLUNG UND EINSATZ DER "TRIADE" ZUR  
PHYTOCHEMISCHEN ONLINE-ANALYTIK:  
HPLC-MS/MS, HPLC-NMR UND HPLC-CD**

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES  
DER BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT  
WÜRZBURG**

**vorgelegt von  
Michael Wohlfarth  
aus  
Roding i. d. Opf.**

**Würzburg 2002**

Eingereicht am: \_\_\_\_\_  
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: \_\_\_\_\_  
2. Gutachter: \_\_\_\_\_  
der Dissertation

1. Prüfer: \_\_\_\_\_  
2. Prüfer: \_\_\_\_\_  
der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.03.1998 bis 20.01.2002  
am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. Bringmann danke ich herzlich  
für seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit  
und die mir gewährte wissenschaftliche Freiheit.

Teile der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse waren bereits Gegenstand von  
Publikationen<sup>[38,42,75,119,148,150,154,197,266,271,299,304,306,307]</sup> sowie von Postern und Vorträgen.

Für Annette

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ALLGEMEINER TEIL .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Untersuchung der Biogenese von Sekundärmetaboliten tropischer Pflanzen .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Aufklärung von Biosynthesewegen mit isotoopenmarkierten Vorstufen .....</b>	<b>6</b>
2.1.1 Verwendung des Kohlenstoffisotops $^{13}\text{C}$ bei Biogeneseexperimenten.....	7
2.1.2 Verwendung des Stickstoffisotops $^{15}\text{N}$ bei Biogeneseexperimenten .....	9
<b>2.2 Die Naphthylisochinolin-Alkaloide aus Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen.....</b>	<b>10</b>
2.2.1 Das Postulat der polyketidischen Biogenese der Naphthylisochinolin-Alkaloide....	10
2.2.2 Kenntnisstand der Biogeneseuntersuchungen.....	12
2.2.3 Neue Untersuchungen: Die Biogenese der Naphthylisochinolin-Alkaloide.....	15
2.2.3.1 Verfütterung von $^{13}\text{C}_2$ -NaOAc an Suspensionskulturen von <i>Triphyophyllum peltatum</i> und Isolierung von Droseron ( <b>21</b> ) .....	15
2.2.3.2 Verfütterung von $^{13}\text{C}_2$ -NaOAc an Agarkulturen von <i>Triphyophyllum peltatum</i> und Isolierung von Dioncophyllin A ( <b>6</b> ).....	16
2.2.3.3 Verfütterung von $^{13}\text{C}_1$ -NaOAc an Agarkulturen von <i>Triphyophyllum peltatum</i> und Isolierung von Droseron ( <b>21</b> ) und Dioncophyllin A ( <b>6</b> ) .....	19
<b>2.3 Strukturell ungewöhnliche Alkaloide aus Euphorbiaceen: Antidesmon aus <i>Antidesma membranaceum</i> .....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Isolierung und Versuche zur Strukturaufklärung des neuartigen Isochinolin-Alkaloids Antidesmon ( <b>7</b> ).....	21
2.3.2 Erste Verfütterungsexperimente und Strukturrevision von Antidesmon ( <b>7</b> ) .....	22
2.3.2.1 Verfütterung von $^{13}\text{C}_2$ -NaOAc .....	22
2.3.2.2 Verfütterung von $^{15}\text{N}_2$ - $\text{NH}_4\text{NO}_3$ und $^{15}\text{N}$ - $\text{KNO}_3$ : Aufklärung der Konstitution von Antidesmon ( <b>27</b> ).....	24
2.3.2.3 Einschub: Chemische Derivatisierung und CD-Berechnung der absoluten Konfiguration .....	27
2.3.3 Weitere Untersuchungen zur Biogenese von Antidesmon ( <b>27</b> ).....	29
2.3.3.1 Verfütterung von (D)- $^{13}\text{C}_6$ -Glucose .....	29
2.3.3.2 Verfütterung von (L)- $^{13}\text{C}_4$ -Asparaginsäure und (L)- $^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$ -Alanin.....	29
2.3.3.3 Verfütterung von $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ -Glycin und (L)- $^{13}\text{C}_3$ -Methionin.....	31

<b>3</b>	<b>Anwendung HPLC-gekoppelter Analysemethoden (HPLC-NMR, HPLC-ESI-MS/MS, HPLC-CD) in der Naturstoffchemie.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Vorstellung der "Triade" HPLC-NMR, HPLC-ESI-MS/MS, HPLC-CD .....</b>	<b>36</b>
3.1.1	Grundlagen der HPLC-NMR-Kopplung.....	36
3.1.2	Grundlagen der HPLC-ESI-MS/MS-Kopplung.....	39
3.1.3	Kombinierter Einsatz von HPLC-NMR und HPLC-MS: Die HPLC-NMR-MS-Kopplung.....	42
3.1.4	Grundlagen der HPLC-CD-Kopplung .....	43
3.1.5	Etablierung der "Triade" HPLC-NMR, HPLC-MS/MS und HPLC-CD zur online-Bestimmung der absoluten Stereostruktur unbekannter Naturstoffe in Extrakten: Untersuchung von <i>Habropetalum dawei</i> .....	44
<b>3.2</b>	<b>Implementierte methodische Neuerungen .....</b>	<b>49</b>
3.2.1	Einsatz eines 60- $\mu$ l-Probenkopfes mit z-Gradient: WET-Lösungsmittelunterdrückung und optimierte HPLC-Bedingungen .....	49
3.2.2	Austausch von protonierten und deuterierten Solventien in HPLC-NMR und HPLC-MS/MS .....	53
<b>3.3</b>	<b>Anwendungen der "Triade" HPLC-NMR, HPLC-MS/MS und HPLC-CD.....</b>	<b>58</b>
3.3.1	Phytochemische Untersuchung von <i>Ancistrocladus griffithii</i> .....	58
3.3.1.1	Probenaufsammlung und Dimerenscreening .....	58
3.3.1.2	Detektion und Isolierung von Ancistrogriffithin A ( <b>51</b> ).....	60
3.3.1.3	Detektion und Isolierung von Ancistrogriffin A ( <b>52</b> ) .....	65
3.3.1.4	Detektion von Ancistrogriffin B ( <b>54</b> ).....	67
3.3.1.5	Detektion und Isolierung von Ancistrogriffin C ( <b>57</b> ) .....	70
3.3.1.6	Detektion von Hamatin ( <b>58</b> ) und Ancistrocladin ( <b>15</b> ) .....	74
3.3.1.7	Biologische Aktivität der neuen Alkaloide aus <i>A. griffithii</i> .....	75
3.3.2	Phytochemische Untersuchung des ersten Pfropfversuches ( <i>A. heyneanus</i> / <i>A. abbreviatus</i> ) bei Ancistrocladaceen .....	77
3.3.2.1	Motivation.....	77
3.3.2.2	Phytochemische Untersuchung eines Blattes des Pfropfreises mittels oxidativem Abbau und HPLC-MS/MS.....	79
3.3.2.3	Phytochemische Untersuchung eines Blattes des Pfropfreises mit der "online-Triade" HPLC-MS/MS, HPLC-NMR und HPLC-CD.....	81
3.3.2.4	Nachweis von 3- <i>epi</i> -Ancistrobrevin C ( <b>64</b> ) in <i>A. heyneanus</i> .....	85
3.3.3	Phytochemische Analytik mit synthetischen Standards.....	87
3.3.3.1	Ancistrocladein ( <b>71</b> ) in <i>Ancistrocladus affinis tectorius</i> (Gunung Benom).....	87
3.3.3.2	Jozipeltin A ( <b>77</b> ) und Jozimin D ( <b>78</b> ) .....	89
3.3.3.3	Identifizierung von Murrastifolin-F ( <b>80</b> ) in <i>Murraya koenigii</i> .....	90

---

<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>92</b>
4.1	Die Aufklärung der Biogenese von Dioncophyllin A (6) und Antidesmon (27).	92
4.2	Phytochemische online-Analytik und Isolierung neuer Naphthylisoquinolin-Alkaloide .....	95
<b>5</b>	<b>Summary</b> .....	<b>99</b>
5.1	Elucidation of the Biogenesis of Dioncophylline A (6) and Antidesmone (27) ..	99
5.2	Phytochemical Online-Analysis and Isolation of Novel Naphthylisoquinoline Alkaloids .....	102
<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....		<b>106</b>
<b>1</b>	<b>Allgemeine Methoden</b> .....	<b>106</b>
1.1	Verwendete Meßgeräte .....	106
1.2	Chromatographische Methoden .....	108
1.3	HPLC-gekoppelte Methoden zur online-Analyse .....	109
1.4	Vorbereitung der Versuche .....	111
<b>2</b>	<b>Biogenesestudien</b> .....	<b>112</b>
2.1	Aufklärung der Biogenese von Droseron (21) und Dioncophyllin A (6).....	112
2.1.1	Isolierung und NMR-Analyse von Droseron (21) aus Suspensionskulturen von <i>T. peltatum</i> nach Verfütterung von [ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]-NaOAc.....	112
2.1.2	Isolierung und NMR-Analyse von Dioncophyllin A (6) aus Agarkulturen von <i>T. peltatum</i> nach Verfütterung von [ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]-NaOAc.....	113
2.1.3	Isolierung und NMR-Analyse von Droseron (21) und Dioncophyllin A (6) aus Agarkulturen von <i>T. peltatum</i> nach Verfütterung von [2- <sup>13</sup> C <sub>1</sub> ]-NaOAc.....	115
2.2	Aufklärung der Biogenese von Antidesmon (27).....	117
2.2.1	Allgemeine Vorschrift zur Verfütterung von isotopenmarkierten Vorstufen an Zellkulturen von <i>A. membranaceum</i> und Isolierung von Antidesmon (27).....	117
2.2.2	NMR-Untersuchung von Antidesmon (27) nach Verfütterung von isotopenmarkierten Vorstufen .....	119

<b>3</b>	<b>Methodische Arbeiten im Bereich HPLC-NMR und HPLC-MS..</b>	<b>120</b>
3.1	Etablierung der WET-Lösungsmittelunterdrückung.....	120
3.2	Austausch von protonierten und deuterierten Solventien in HPLC-NMR und HPLC-MS/MS: Untersuchung acider Protonen .....	120
3.2.1	Probenvorbereitung .....	120
3.2.2	HPLC-ESI-MS-Untersuchung acider Protonen von Standardsubstanzen .....	120
3.2.3	HPLC-NMR-Untersuchung eines Zweigextraktes von <i>T. peltatum</i> .....	121
3.2.4	<sup>1</sup> H-NMR-Untersuchung von Standardsubstanzen.....	121
<b>4</b>	<b>Phytochemische Untersuchung von <i>Ancistrocladus griffithii</i>.....</b>	<b>123</b>
4.1	Extraktvorbereitung für Kopplungsanalyse und Isolation.....	123
4.2	HPLC-Parameter für HPLC-ESI-MS/MS, HPLC-NMR und HPLC-CD.....	123
4.3	Ergebnisse der online-Untersuchungen mit der "Triade" .....	124
4.3.1	Ancistrogriffithin A (51) .....	124
4.3.2	Ancistrogriffin A (52) .....	124
4.3.3	Ancistrogriffin B (54) .....	125
4.3.4	Ancistrogriffin C (57) .....	125
4.3.5	Hamatin (58) .....	126
4.3.6	Ancistrocladin (15).....	127
4.4	Gezielte Isolierung neuer Alkaloide aus <i>A. griffithii</i> .....	127
4.4.1	Ancistrogriffithin A (51) .....	128
4.4.2	Ancistrogriffin A (52) .....	129
4.4.3	Ancistrogriffin C (57) .....	130
<b>5</b>	<b>Phytochemische Untersuchung der ersten chimären Ancistrocladaceae nach Pfropfung von <i>A. heyneanus</i> auf <i>A. abbreviatus</i> .....</b>	<b>132</b>
5.1	Untersuchung des Pfropfreises .....	132
5.1.1	HPLC-Parameter für HPLC-ESI-MS/MS, HPLC-NMR und HPLC-CD.....	132
5.1.2	Ancistrocladin (15).....	132
5.1.3	4'-O-Desmethylanastrocladin (63) .....	132
5.1.4	Ancistroheynin A (62).....	133
5.1.5	3- <i>epi</i> -Ancistrobrevin C (64).....	133

---

<b>5.2</b>	<b>HPLC-NMR- und HPLC-CD-Vergleich von Ppropfreis- und <i>A. heyneanus</i>-Blattextrakt</b> .....	<b>134</b>
<b>6</b>	<b>Phytochemische Analytik mit synthetischen Standards</b> .....	<b>135</b>
<b>6.1</b>	<b>Untersuchung von <i>A. affinis tectorius</i> (Gunung Benom), <i>A. tectorius</i> (Johor Bahru) und <i>A. tectorius</i> (Khao Lak)</b> .....	<b>135</b>
6.1.1	HPLC-ESI-MS-Untersuchung von ( <i>P</i> )-Ancistrocladein [( <i>P</i> )-71] .....	135
6.1.2	HPLC-ESI-MS-Untersuchung der Extraktproben .....	135
<b>6.2</b>	<b>Untersuchung von <i>T. peltatum</i>, <i>D. thollonii</i>, <i>H. dawei</i> und <i>A. abbreviatus</i> auf Jozipeltin A (77) und Jozimin D (78)</b> .....	<b>136</b>
6.2.1	Jozipeltin A (77).....	136
6.2.2	Jozimin D (78).....	136
<b>6.3</b>	<b>Untersuchung von <i>Murraya koenigii</i> auf Murrastifolin-F (80)</b> .....	<b>137</b>
6.3.1	Murrastifolin-F (80) .....	137
6.3.2	Murrayafolin-A (79).....	138
<b>A</b>	<b>Erstellte HPLC-NMR-Pulsprogramme</b> .....	<b>139</b>
A 1	WET-ROESY.....	139
A 2	WET-NOESY .....	141
A 3	WET-COSY .....	144
	<b>LITERATUR</b> .....	<b>146</b>

## ALLGEMEINER TEIL

### 1 Einleitung und Zielsetzung

"The use of natural products has been the single most successful strategy for the discovery of new medicines."<sup>[1]</sup> Dieser Satz spiegelt den hohen Stellenwert von Naturstoffen in der pharmazeutischen Entwicklung wider. 60% der Erdbevölkerung benutzen fast ausschließlich Pflanzen oder pflanzliche Produkte zur Medikamentierung.<sup>[1]</sup> Von den 520 Medikamenten, die zwischen 1983 und 1994 durch die US Federal Drug Administration und andere nationale Regulierungsbehörden zugelassen wurden, basieren 39% auf Naturstoffen oder davon abgeleiteten Derivaten. Im Bereich der Antibiotika und Cytostatika betrug dieser Anteil sogar 60-80%.<sup>[2]</sup> Diese große Bedeutung schlägt sich auch kommerziell nieder: Zehn der 25 umsatzstärksten Medikamente des Jahres 1999 basieren auf Naturstoffen und erlösten mehr als 21 Milliarden US\$.<sup>[3]</sup>

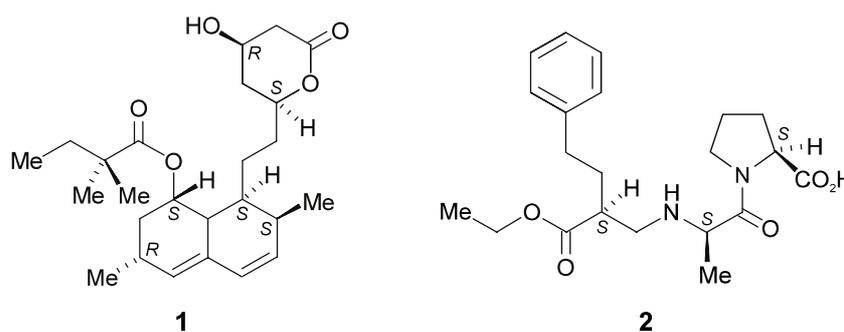


Abb. 1. Blockbuster auf Naturstoffbasis (Markenname, Hersteller und Umsatz 1999 in Klammern angegeben): Simvastatin (**1**) (Zocor<sup>®</sup>, Merck & Co., 4.495 Mrd. US\$), Enalapril (**2**) (Vasotec<sup>®</sup>, Merck & Co., 2.305 Mrd. US\$)

Doch woher kommt dieser herausragende Erfolg? Ein Grund dafür liegt in der scheinbar unerschöpflichen strukturellen Diversität von Naturstoffen, die bei der Suche nach Substraten für neue molekulare Targets (z.B. für Proteine) so wertvoll ist.<sup>[4]</sup> Die Tatsache, daß es sich bei den biologisch aktiven Vertretern oft um kleine, stabile und damit oral verabreichbare Moleküle handelt, stellt einen großen Vorteil in der weiteren pharmazeutischen Verwertung dar. Andere Forschungsansätze, wie z.B. die kombinatorische Chemie, produzieren meist Verbindungen mit geringerer struktureller Vielfalt und Stabilität, so daß deren Nutzen für die Generierung neuer Leitstrukturen in jüngster Zeit zunehmend in Frage gestellt wird.<sup>[5,6]</sup>

Ein Versiegen der terrestrischen und marinen Naturstoff-Quellen (Pflanzen, Mikroorganismen, Insekten, usw.) erscheint auf mittlere Sicht nicht absehbar, ist doch erst ein kleiner Bruchteil der auf der Erde lebenden Spezies untersucht. So wurden erst 10% aller bekannten Pflanzen<sup>[7]</sup> und weniger als 1% aller bekannten Mikroorganismen<sup>[8]</sup> auf biologisch aktive Inhaltsstoffe hin analysiert, wobei in den meisten Fällen von einem umfassenden

Screening mit mehreren Assays nicht die Rede sein kann. Weiterhin wird versucht, durch genetische Manipulation der Produzenten (z.B. der gut handhabbaren Streptomyceten) neue Naturstoffklassen zu erschließen<sup>[9]</sup> oder die Ausbeute an Fermentationsprodukten zu erhöhen.<sup>[10]</sup>

Wieso konnte es aber angesichts dieser Erfolgszahlen passieren, daß die Naturstoffchemie als Lieferant neuer Leitstrukturen in den letzten Jahren einen Teil ihrer Attraktivität einbüßte?<sup>[11]</sup> Ein Grund dafür liegt im verhältnismäßig hohen Zeit- und Kostenaufwand, der die Gewinnung neuer Naturstoffe begleitet. Oft werden die gleichen Substanzen nach längerer Aufarbeitung aus verschiedenen Produzenten isoliert. Naturstoffe sind außerdem z.T. strukturell sehr kompliziert, was hohe Anforderungen an deren Strukturaufklärung und chemische Synthese stellt. Erschwerend kommt hinzu, daß sich die natürlichen Produzenten meist nicht für eine spätere Gewinnung im größeren Maßstab eignen.<sup>[12]</sup> Diese Faktoren verteuern und verlangsamen die naturstoffchemische Leitstrukturgenerierung, lassen sich aber durch die Einführung moderner Technologien überwinden.

Eine Schlüsseltechnologie zur Effizienzsteigerung der Naturstoff-Findung stellt die NMR-Spektroskopie dar. So werden zum Screening von Extrakten und zur Dereplikation\* bekannter Verbindungen sog. "Kopplungsmethoden" ("Hyphenated Methods"), wie die HPLC-UV, HPLC-MS/MS und in jüngerer Zeit auch die HPLC-NMR, eingesetzt. Letztere verspricht einen enormen Vorteil gegenüber den beiden anderen Methoden, da die NMR-Spektroskopie nach wie vor die wertvollste Technik zur strukturellen Charakterisierung organischer Verbindungen darstellt.<sup>[13]</sup> Auch im Bereich der offline-Strukturaufklärung liegen die Vorteile aussagefähiger, zeitsparender NMR-Methoden deutlich auf der Hand. Die NMR-Spektroskopie leistet auch in der Erforschung der Biosynthese von Naturstoffen wertvolle Dienste. Mit Hilfe von NMR-detektierbaren isotonenmarkierten Vorstufen lassen sich metabolische Transformationen von Metaboliten beobachten, die wiederum Aufschluß über die an der Produktion beteiligten Enzyme geben können. Detaillierte Einblicke in die Stoffwechselforgänge der Naturstoff-produzierenden Organismen erlauben damit deren gezielte Nutzung,<sup>[14]</sup> z.B. in Form von biotechnologisch manipulierten Zellkulturen.<sup>[15]</sup>

Tropische Pflanzen bilden ein reiches Reservoir für neue, biologisch aktive Naturstoffe, das zunehmend von Chemikern, Biochemikern und Biologen erschlossen wird. Die Kernresonanzspektroskopie (NMR) ist eines der wichtigen Werkzeuge; sie ist aus der pharmazeutisch orientierten Naturstoffchemie heutzutage nicht mehr wegzudenken. Im Rahmen dieser Arbeit sollte gezeigt werden, wie NMR-Methoden in drei verschiedenen

---

\* Als "Dereplikation" bezeichnet man die Identifizierung (Wiederfindung) von bereits bekannten Substanzen in zuvor nicht untersuchten Extrakten.

Anwendungsbereichen - Naturstoff-Screening, Strukturaufklärung und Biogeneseforschung - wertvolle Dienste leisten und weiter verbessert werden können.

In unserem Arbeitskreis werden seit längerer Zeit intensiv die Pflanzenfamilien der Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen untersucht. Diese in Afrika und Asien beheimateten Lianen produzieren die Naphthylisochinolin-Alkaloide,<sup>[16]</sup> Sekundärmetabolite von ungewöhnlicher Struktur<sup>[17]</sup> und hoher biologischer Aktivität, u.a. gegen die Erreger der Malaria,<sup>[18-20]</sup> Leishmania<sup>[21]</sup> sowie HIV-1 und -2.<sup>[22,23]</sup>

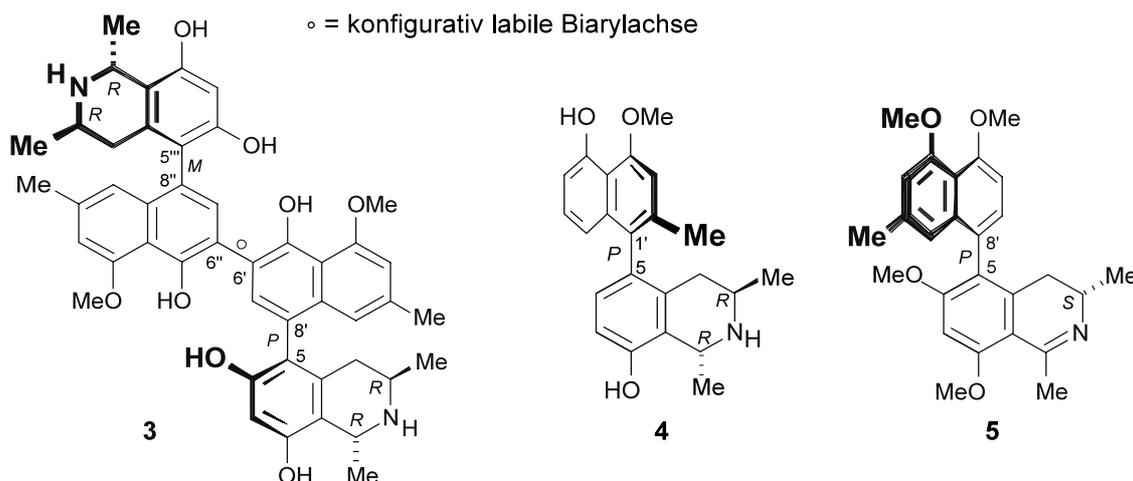


Abb. 2. Typische, bioaktive Vertreter der Naphthylisochinolin-Alkaloide: Michellamin B (3) (anti-HIV-aktiv), Dioncophyllin C (4) (aktiv gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum*) und Ancistroealanin A (5) (aktiv gegen *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania donovani*)

Diese hohe pharmakologische Potenz macht die Naphthylisochinoline für die Naturstoffisolierung und Wirkstoff-Forschung außerordentlich interessant.<sup>[16,20-33]</sup> Um die gezielte Isolierung zu unterstützen, wurden in der Vergangenheit auch moderne online-Methoden wie die HPLC-MS/MS, HPLC-NMR oder HPLC-CD zum Extraktsscreening etabliert, wobei ein besonderes Augenmerk auf der vollständigen online-Strukturaufklärung von neuen Naturstoffen lag.<sup>[34-38]</sup> Der HPLC-NMR kommt in diesem Methodenarsenal eine Schlüsselrolle zu, da die NMR-Spektroskopie die leistungsfähigste Methode der organischen Chemie zur Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen ist.<sup>[39,40]</sup> Die intrinsisch geringere Sensitivität der HPLC-NMR im Vergleich zur HPLC-MS stellt aber immer noch ein schwerwiegendes Hemmnis bei der Nutzung dieser Technik dar, die eine weitere Verbreitung konterkariert. Oberste Priorität bei der Weiterentwicklung der HPLC-NMR besitzt daher die Steigerung der Nachweisempfindlichkeit. Da die HPLC-NMR in einem komplexen Grenzbereich zwischen Chromatographie und Spektroskopie angesiedelt ist, sind ausgewogene Maßnahmen auf beiden Seiten im Hard- und Softwarebereich nötig, um nachhaltige Verbesserungen zu erzielen. Die Weiterentwicklungen im analytischen Bereich

sollten im Rahmen dieser Arbeit bei der Untersuchung neuer Ancistrocladaceen wertvolle Dienste leisten, wobei in eigenen Aufsammlungen in Malaysia und Thailand neues Pflanzenmaterial beschafft wurde.

Neben den Aspekten des Screenings und der offline-Strukturaufklärung der isolierten Alkaloide<sup>[16,33]</sup> verheißt auch die Erforschung ihrer Biogenese interessante Erkenntnisse: Die charakteristischen Strukturmerkmale - zwei Methylsubstituenten an C-1 und C-3, ein *meta*-Dioxygenierungsmuster an C-6 und C-8 (bzw. nur eine Sauerstoff-Funktion an C-8) und eine zumeist stereogene Biarylachse zwischen Naphthalin- und Isochinolinbaustein - legen eine außergewöhnliche, neue polyketidische Biogenese nahe.<sup>[16,24]</sup> Den Naphthylisochinolin-Alkaloiden kommt deshalb im Vergleich zu allen anderen 2500 bekannten, durchwegs auf Aminosäuren basierenden Tetrahydroisochinolin-Alkaloiden<sup>[14]</sup> eine besondere Stellung zu. Leider wurde in der Vergangenheit ein erfolgreicher Abschluß dieser Arbeiten immer durch ungeeignete Untersuchungssysteme (Ganzpflanzen) oder die geringen isolierbaren Mengen von Alkaloiden aus Zellkulturen verhindert. In der Kooperation mit Biologen und Biochemikern in unserem Arbeitskreis, die Pflanzenzellkulturen von Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen zur Verfügung stellten, und mit modernen Isolier- und NMR-Analysentechniken sollten jene Hindernisse in dieser Forschungsarbeit überwunden werden.

Ein weiteres strukturell ungewöhnliches Alkaloid ist das aus afrikanischen *Antidesma*-Arten isolierte Antidesmon, dem die Gruppe von G. Adam *et al.* die Struktur **7** (Abb. 3, unten) zugeordnet hatte.<sup>[41]</sup> Aufgrund seiner hohen anti-trypanosomalen Aktivität<sup>[42]</sup> als potentielle pharmakologische Leitstruktur interessant, blieb dessen Biogenese bisher vollkommen unerforscht. Einzelne Strukturbausteine, wie z.B. die aliphatische Seitenkette, legen eine zumindest teilweise acetogenine Herkunft nahe, während der Ursprung des heterocyclischen Ringes weit weniger offensichtlich schien. Auch hier sollten Verfütterungsexperimente an Zellkulturen und NMR-Untersuchungen die Biogenese dieses strukturell außergewöhnlichen Alkaloids enthüllen.

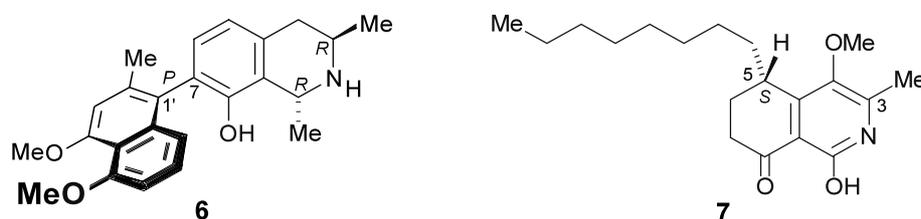


Abb. 3. Das Naphthylisochinolin Dioncophyllin A (**6**) und das *Antidesma*-Alkaloid Antidesmon (**7**): erstmalige Beispiele für acetogenine Tetrahydroisochinolin-Alkaloide?

Sowohl bei den Naphthylisochinolin-, als auch bei den *Antidesma*-Alkaloiden würde eine Aufklärung des Biogeneseweges das Fundament für weitere enzymologische Untersuchungen

bilden. Ein besseres Verständnis der Biosynthese schüfe außerdem die Voraussetzung zu einer biotechnologischen Nutzung der Produzenten, da diese die bioaktiven Alkaloide meist nur in geringen Mengen enthalten.<sup>[41,43,44]</sup>

Damit ergaben sich für diese Dissertation folgende Zielsetzungen:

- Untersuchung der Biogenese der Naphthylisochinolin-Alkaloide und des *Antidesma*-Alkaloids Antidesmon (7) durch Verfütterungsexperimente mit stabilisotopenmarkierten Vorstufen an Pflanzenzellkulturen von *Triphyophyllum peltatum* bzw. *Antidesma membranaceum* und kernresonanzspektroskopische Untersuchung der daraus isolierten Metabolite;
- Einsatz und Weiterentwicklung der "online-Triade" HPLC-MS/MS, HPLC-NMR und HPLC-CD, wobei ein besonderer Schwerpunkt auf der HPLC-NMR mit den Aufgaben der Hardwareimplementierung, Pulsfolgenprogrammierung und Optimierung chromatographischer Methoden lag;
- Online-Analyse der in Thailand auf einer Expedition gesammelten und phytochemisch noch nicht untersuchten Art *Ancistrocladus griffithii*, sowie Identifizierung und Isolierung neuer Alkaloide zum Bioaktivitätsscreening;
- Online-Analyse von weiteren auf dieser Expedition gesammelten, z.T. neuartigen Pflanzenspezies wie *Ancistrocladus affinis tectorius* (Gunung Benom) aus Malaysia mit dem Ziel der botanischen Einordnung und phytochemischen Erstuntersuchung;
- Analytische Unterstützung anderer Arbeitskreismitglieder in verschiedenen Kooperationsprojekten mit der "Triade", z.B. bei der Untersuchung von Inhaltsstoffen in durch Pfropfung entstandenen chimären *Ancistrocladaceen* mit dem Ziel, Informationen über Entstehungsorte, Transport- und Lagerformen der Naphthylisochinolin-Alkaloide zu erhalten.

## 2 Untersuchung der Biogenese von Sekundärmetaboliten tropischer Pflanzen

### 2.1 Aufklärung von Biosynthesewegen mit isotoopenmarkierten Vorstufen

Seit *ca.* 60 Jahren beschäftigen sich Biologen und Chemiker mit der Aufklärung pflanzlicher Biosynthesewege.<sup>[45]</sup> Dabei werden im Allgemeinen drei experimentelle Ansätze unterschieden: Die Verwendung von Enzymsystemen *in vitro*, die *in-vivo*-Untersuchung von Organismen mit durch Mutation selektiv blockierten Biosynthesewegen und die Benutzung von isotoopenmarkierten Verbindungen (Tracern).<sup>[46]</sup> Gerade der letztere Ansatz zeichnet sich durch seinen Variantenreichtum und seine universelle Anwendbarkeit aus. Tracerexperimente nutzen eine Vielzahl von Radio- (z.B.  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ) und Stabilisotopen (z.B.  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ), die mit verschiedensten Methoden (radiographisch, massenspektrometrisch, kernresonanzspektroskopisch) detektierbar sind.<sup>[47]</sup>

Im Prinzip werden bei Tracerexperimenten einem Organismus isotoopenmarkierte Biosynthesevorstufen appliziert und die aus der Vorstufe resultierenden Stoffwechselprodukte anhand dieser Isotoopenmarkierung identifiziert. In früherer Zeit wurden ausschließlich Radioisotopen benutzt, da diese schon damals radiographisch nachweisbar waren. 1920 setzte Hevesy die natürlich vorkommenden radioaktiven Isotopomeren von Blei, Bismut und Thorium für Metabolismusstudien ein. Später nutzte er als erster das künstlich produzierte Radionuklid  $^{32}\text{P}$  und das Stabilisotop  $^2\text{H}$ .<sup>[45]</sup> Calvin verwandte 1948 in seinen Arbeiten zur Photosynthese in Pflanzen das Kohlenstoffisotop  $^{14}\text{C}$ ,<sup>[48]</sup> welches danach noch über Jahrzehnte hinaus das wichtigste Markierungsisotop für Tracerexperimente blieb.

Mit zunehmenden Wissen über die hohen biologischen Aktivitäten vieler pflanzlicher Sekundärmetabolite rückten Alkaloide immer stärker in den Fokus der Biosyntheseforschung.<sup>[49]</sup> Ein oft genutzter Versuchsansatz basiert auf der Verfütterung von  $^{14}\text{C}$ -markierten Aminosäuren oder Aminen, deren  $^{14}\text{C}$ -markierte Metabolite anschließend hochsensitiv radiographisch detektierbar sind. Auf diese Weise ist eine Inkorporation auch bei geringen Metabolitmengen oder niedrigen Einbauraten, wie sie gerade bei verholzten Pflanzen auftreten, noch nachweisbar.<sup>[50-52]</sup> Doch die Radioisotoopenmarkierung besitzt auch Nachteile: Die Information über den Einbauort einer  $^{14}\text{C}$ -Markierung ist nur über chemische Abbaureaktionen des isolierten Stoffwechselproduktes zugänglich, eine oft schwierige und langwierige Aufgabe,<sup>[53]</sup> bei der zudem relativ große Substanzmengen benötigt werden.<sup>[54]</sup> Darüber hinaus erfordert der Umgang mit Radioaktivität besondere Sicherheitsvorkehrungen.<sup>[55]</sup>

Diese Probleme werden mit der Verwendung stabiler, NMR-aktiver Kerne (wie  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  oder  $^{19}\text{F}$ ) elegant vermieden. Der labortechnische Umgang bedarf keiner besonderen Maßnahmen,

und der Einbauort des Isotops im Molekülgerüst ist zerstörungsfrei direkt per NMR lokalisierbar.<sup>[56]</sup> Trotzdem finden Radioisotopentechniken auch heute noch Anwendungen in der Biogeneseforschung, z.B. in Voruntersuchungen bei der Optimierung von Applikationsbedingungen für stabilisotopenmarkierte Tracer, mit denen dann die Hauptuntersuchung durchgeführt wird.<sup>[57,58]</sup>

### 2.1.1 Verwendung des Kohlenstoffisotops $^{13}\text{C}$ bei Biogeneseexperimenten

Eines der wichtigsten in der Biochemie benutzten NMR-detektierbaren Isotopen ist das stabile Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$  (Kernspin  $I = \frac{1}{2}$ ). Aufgrund seines niedrigeren gyromagnetischen Verhältnisses besitzt es jedoch im Vergleich zum Proton eine um den Faktor 62 schlechtere relative NMR-Empfindlichkeit,<sup>[59]</sup> die bei der Durchführung von massenlimitierten Biogeneseexperimenten die Verwendung von möglichst leistungsfähigen Hochfeldspektrometern bedingt. Bei der Verfütterung von  $^{13}\text{C}_1$ -markierten Vorstufen ist für die Versuchsauswertung entscheidend, daß im  $^{13}\text{C}$ -NMR die Anreicherung einzelner Kohlenstoffpositionen - und damit eine Zunahme der Signalintensität - signifikant meßbar und quantifizierbar ist. Im Normalfall geschieht dies durch Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren des  $^{13}\text{C}_1$ -markiertem Biosyntheseproduktes mit denen einer unmarkierten Referenz dieser Substanz. Dabei ist zu beachten, daß sowohl Experiment- als auch Kontrollmessung der Spektren unter identischen Akquisitionsbedingungen erfolgen müssen. Ist dies nicht möglich, so sind zur Auswertung "inverse-gated-decoupled"- $^{13}\text{C}$ -NMR-Experimente erforderlich, die den im protonenkoppelten  $^{13}\text{C}$ -NMR (an sich erwünschten) intensitätssteigernden NOE (Nuclear Overhauser Effect) ausschalten und auf diese Weise integrierbare Spektren mit absoluten Signalintensitäten liefern.<sup>[59]</sup> Beim Vergleich von Proben- und Referenzspektrum lassen sich die relativen Intensitätssteigerungen der Peaks  $^{13}\text{C}$ -angereicherter Positionen im Verhältnis zu nichtangereicherten Positionen leicht feststellen. Zur numerischen Auswertung werden alle Peakintensitäten üblicherweise auf die Intensität eines unmarkierten Kohlenstoffes normiert.<sup>[60,61]</sup> Nachteilig wirkt sich aus, daß es relativ hoher Markierungsgrade (ca. 0.25-1%) bedarf, um eine aussagekräftige Peakflächenzunahme von ca. 25-100% zu erreichen.<sup>[62]</sup> Diese hohen Einbauraten werden selten bei höheren Ganzpflanzen, durchaus aber in Zellkulturen von Pflanzen, Pilzen oder Bakterien erreicht.<sup>[63]</sup>

Weiterhin bietet sich bei der Verwendung von  $^{13}\text{C}_1$ -Markierungen in einzelnen Fällen auch das  $^1\text{H}$ -NMR als das Auswertungsinstrument der Wahl an. Dabei werden die  $^{13}\text{C}$ -Satelliten des Protonensignals an der angereicherten Kohlenstoffposition integriert und in Relation zur Intensität des Zentralsignals gesetzt. Bei Satellitenintensitäten von mehr als 1.11% (natürliche Häufigkeit von  $^{13}\text{C}$ ) der Fläche des Zentralpeaks liegt demnach eine  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung vor.<sup>[64]</sup> Obwohl diese Methode nur noch selten zur Auswertung benutzt wird, da komplizierte

Kopplungsmuster (z.T. auch  $^2J$  und  $^3J$ ), Signalüberlappungen und Fremdpeaks im  $^1\text{H-NMR}$  eine korrekte Auswertung evtl. verhindern,<sup>[65]</sup> bietet sie sich immer noch in Einzelfällen, z.B. bei  $^{13}\text{C}$ -markierten Methoxygruppen, an, da diese Gruppen intensive Singulett mit zumeist gutem Signal/Rausch-Verhältnis liefern.<sup>[66]</sup>

Neben den einfach markierten Vorstufen gewinnt die Verwendung von doppelt oder mehrfach  $^{13}\text{C}$ -markierten Vorstufen immer größere Bedeutung, da die Analyse von  $^1J(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})$ -Kopplungsmustern die Untersuchung des Einbaus intakter Vorstufenbausteine ermöglicht. Dies erlaubt die spektroskopische Verfolgung von Bindungsbrüchen oder Umlagerungen während der Metabolitbildung.<sup>[67]</sup> Gerade bei Untersuchungen zu polyketidischen Naturstoffen gilt die Verfütterung von  $[^{13}\text{C}_2]$ -NaOAc als Methode der Wahl.<sup>[63]</sup>

Die Auswertung solcher Versuche erfolgt bei unkomplizierten  $^{13}\text{C}$ -Spektren über die Beobachtung und Integration von  $^{13}\text{C}$ -Satelliten benachbarter Kohlenstoffpositionen. Nicht- $^{13}\text{C}$ -angereicherte Substrate zeigen unter diesen Bedingungen im  $^{13}\text{C-NMR}$  keine sichtbaren  $^{13}\text{C}$ -Satelliten, da letztere nur eine Intensität von 1.11% des Zentralsignals und damit in den meisten Fällen eine zu niedrige Signal/Rausch-Verhältnis besitzen. Der Einbau von diskreten  $^{13}\text{C}_2$ -Einheiten in das Molekülgerüst führt an den betroffenen Positionen zu erhöhten  $^{13}\text{C}$ -Satelliten und erlaubt so den Nachweis der Inkorporation.<sup>[68]</sup> Die niedrige natürliche Häufigkeit von  $^{13}\text{C}_2$ -Einheiten von 0.012% (= 1.11% von 1.11%) begründet die hohe Empfindlichkeit dieser Methode, da schon niedrigste Markierungsgrade von *ca.* 0.02% genügen, die  $^{13}\text{C}$ -Satelliten-Intensität deutlich zu erhöhen\* und damit eine Inkorporation signifikant nachzuweisen.<sup>[54]</sup>

Neben der Möglichkeit, die intakt eingebauten  $^{13}\text{C}_2$ -Einheiten anhand ihrer Kopplungsmuster zuzuordnen, bietet die moderne NMR-Spektroskopie auch noch Experimente an, die gerade bei komplizierten Spektren mit überlappenden Kopplungsmustern oder bei unzureichender spektraler Auflösung der Satellitensignale aussagekräftige Ergebnisse liefern. Der prominenteste Vertreter ist das INADEQUATE-Experiment (= Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer),<sup>[69]</sup> das direkte  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Konnektivitäten in einem Molekül aufzeigt.<sup>[70]</sup> Da die Empfindlichkeit des INADEQUATE-Experiments intrinsisch gering ist, werden zur Strukturaufklärung große Probenmengen (> 100-200 mg bei einem Molekulargewicht von *ca.* 300 u) benötigt. Dieser Bedarf läßt sich bei Verwendung  $^{13}\text{C}$ -markierter Verbindungen deutlich senken.<sup>[71]</sup> Ein Einbau diskreter  $^{13}\text{C}_2$ -Einheiten ist aufgrund der deutlich erhöhten Signalintensität<sup>[72,73]</sup> je nach Markierungsgrad und Sensitivität des

---

\* Zu beachten bleibt natürlich, daß sowohl das Zentral- als auch die Satellitensignale ein ausreichend gutes Signal/Rausch-Verhältnis aufweisen müssen, damit man die Signalflächen mit geringen Fehlermargen integrieren kann.

verwendeten NMR-Spektrometers mit z.T. nur noch wenigen Milligramm Substanz nachweisbar.<sup>[74,75]</sup>

### 2.1.2 Verwendung des Stickstoffisotops $^{15}\text{N}$ bei Biogeneseexperimenten

Das Stickstoffisotop  $^{15}\text{N}$  ( $I = 1/2$ ) besitzt eine natürliche Häufigkeit von 0.36% und ein gyromagnetisches Verhältnis  $\gamma$  von  $-2.711 \times 10^{-7} \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .<sup>\*</sup> Damit ist  $^{15}\text{N}$  bei natürlicher Häufigkeit *ca.* sechshundvierzigmal schlechter detektierbar als  $^{13}\text{C}$  und sogar um den Faktor  $3.86 \times 10^{-6}$  schlechter als  $^1\text{H}$  (absolute Empfindlichkeiten).<sup>[59]</sup> Aufgrund seines negativen gyromagnetischen Verhältnisses können bei gleichzeitiger Protonenentkopplung (die in Analogie zur  $^{13}\text{C}$ -NMR bei der direkten Beobachtung notwendig wird) außerdem negative NOEs auftreten, die die Signalintensität des  $^{15}\text{N}$ -Signals noch weiter vermindern. Die in der Regel lange Relaxationszeiten bedingen zeitintensive Relaxationsdelays in  $^{15}\text{N}$ -Experimenten.<sup>[76]</sup>

Obwohl die physikalischen Voraussetzungen für die Beobachtung des Stickstoffisotops  $^{15}\text{N}$  bedeutend ungünstiger sind als bei  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ , stellt es neben diesen beiden einen der wichtigsten NMR-detektierbaren Kerne dar. Grund dafür ist die immense Bedeutung, die die Peptid- und Nucleotid-Kernresonanzspektroskopie mittlerweile erlangt hat.  $^{15}\text{N}$  spielt bei der strukturellen Untersuchung dieser aus Aminosäuren aufgebauten Makromoleküle eine wichtige Rolle.<sup>[77]</sup> Da in allen lebenden Organismen stickstoffhaltige Metabolite wichtige Stoffwechselfunktionen übernehmen, besitzt die  $^{15}\text{N}$ -NMR auch im niedermolekularen Bereich einen hohen Stellenwert.<sup>[78]</sup>

Voraussetzung für viele kernresonanzspektroskopische Untersuchungen ist jedoch eine Anreicherung des  $^{15}\text{N}$ -Gehaltes im Molekül, um den Nachteil der niedrigen natürlichen Häufigkeit auszugleichen. Bei Biomolekülen ist es oft möglich (und bei großen Molekülen wie z.B. Proteinen sogar zwingend), diese von Bakterien-, Pflanzen- oder Pilzkulturen, die auf  $^{15}\text{N}$ -haltigen Nährböden gehalten werden, produzieren zu lassen. Als Quelle für  $^{15}\text{N}$  dienen dann relativ billige Substrate wie  $^{15}\text{NH}_4^+$  oder  $^{15}\text{NO}_3^-$ .<sup>[76]</sup> Die  $^{15}\text{N}$ -angereicherten Substanzen lassen sich erheblich sensitiver untersuchen. Weiterhin wurden heteronukleare, protonendetektierte Experimente entwickelt, die den Nachteil der intrinsisch niedrigen Empfindlichkeit von  $^{15}\text{N}$  teilweise ausgleichen können.<sup>[79,80]</sup>

Unter den beschriebenen Voraussetzungen ist es möglich, auch den Einbau und Metabolismus  $^{15}\text{N}$ -markierter Vorstufen im Rahmen von Biosyntheseexperimenten zu beobachten. Als vorteilhaft erweist sich die Analogie zum experimentell "verwandten" Kern  $^{13}\text{C}$ , da sich

<sup>\*</sup> Zum Vergleich:  $^1\text{H}$  (99.99% nat. Häufigkeit,  $\gamma = 26.752 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $^{13}\text{C}$  (1.11%, nat. Häufigkeit,  $\gamma = 0.702 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

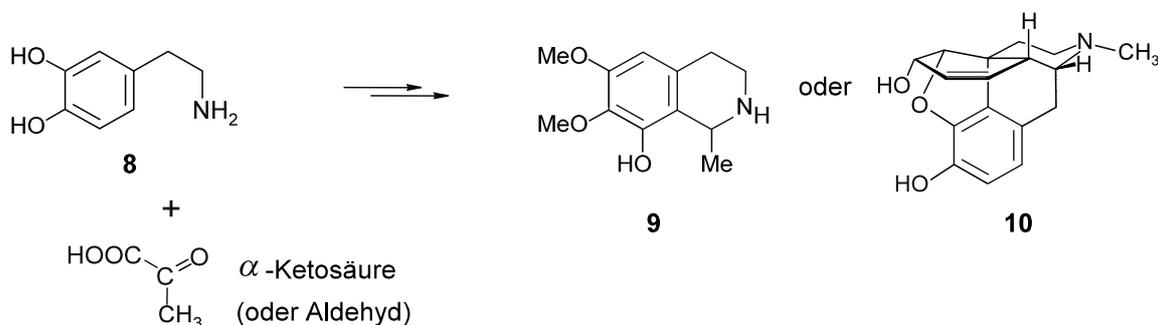
prinzipiell alle auf dem  $^{13}\text{C}$ -Isotop basierenden Versuchsansätze auch mit  $^{15}\text{N}$ -markierten Vorstufen durchführen lassen. Die Verfütterung von einfach  $^{15}\text{N}$ -markierten Vorstufen (v.a. in Form von anorganischen Salzen)<sup>[81]</sup> oder von mehrfach heterokernmarkierten Vorstufen, z.B. mit  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -Markierung, ist weit verbreitet. Gerade  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -bindungsmarkierte Vorstufen eignen sich besonders gut, um den Einbau von stickstoffhaltigen Vorstufen, wie z.B. von Aminosäuren,<sup>[82]</sup> zu verfolgen, da dieselben im Metabolismus oft schnelle Aminierungs-Deaminierungs-Reaktionen durchlaufen<sup>[83]</sup> und so als unspezifische  $^{15}\text{N}$ -Quelle für den zellulären Stickstoffpool dienen.<sup>[84]</sup> Mit Hilfe der bindungsmarkierten Vorstufen können aber die dabei stattfindenden Bindungsbrüche im Verlauf der Biosynthese entdeckt und verfolgt werden.

Zur Auswertung der Fütterungsversuche werden - in Analogie zu den  $^{13}\text{C}$ -basierten Methoden -  $^{15}\text{N}$ -Satelliten im  $^{13}\text{C}$ - oder  $^1\text{H}$ -NMR identifiziert und dort auch entsprechend relativ zum Zentralsignal quantifiziert. Hier erweist sich die niedrige natürliche Häufigkeit von  $^{15}\text{N}$  als Vorteil, da schon niedrige Markierungsgrade ausreichen,<sup>[63]</sup> um eine signifikante Satellitenverstärkung zu beobachten.\*

## 2.2 Die Naphthylisochinolin-Alkaloide aus Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen

### 2.2.1 Das Postulat der polyketidischen Biogenese der Naphthylisochinolin-Alkaloide

Die Tetrahydroisochinolin-Alkaloide stellen eine bedeutende Gruppe von Naturstoffen mit mehr als 2500 bekannten Vertretern<sup>[14]</sup> dar. Unter ihnen befinden sich biologisch hochaktive Verbindungen, von strukturell relativ einfachen Alkyloisochinolininen wie Anhalonidin (**9**)<sup>[86]</sup> bis hin zum Morphin (**10**)<sup>[87]</sup> (Schema 1, unten).

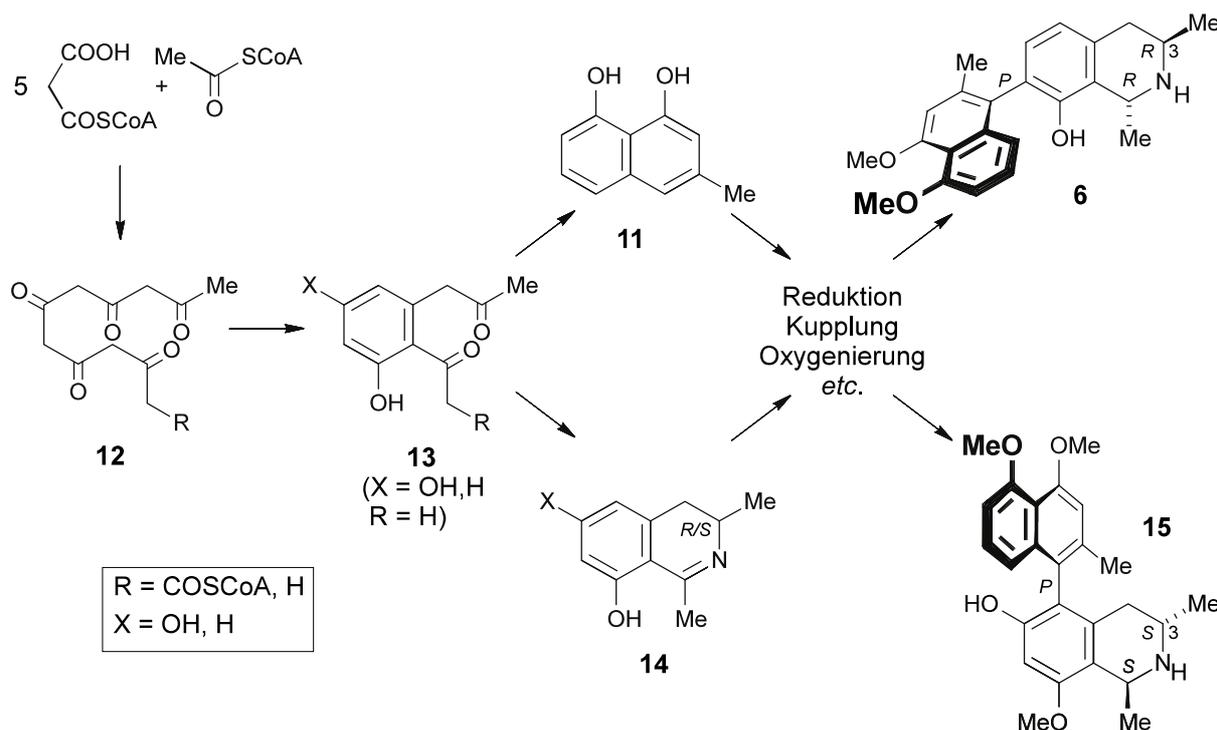


Schema 1. Biogenetischer Ursprung von Tetrahydroisochinolininen wie Anhalonidin (**9**)<sup>[86]</sup> oder Morphin (**10**)<sup>[87]</sup> durch Pictet-Spengler-Reaktion

\* Sowohl im  $^1\text{H}$ - als auch  $^{13}\text{C}$ -NMR von unmarkierten Verbindungen werden gewöhnlich (außer in Fällen mit hoch konzentrierten Proben)<sup>[85]</sup> keine  $^{15}\text{N}$ -Satelliten bei natürlicher Häufigkeit beobachtet.

Bis vor kurzem wurde angenommen, daß sich alle Tetrahydroisochinolin-Alkaloide von aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin ableiten. Durch die Pictet-Spengler-Verknüpfung dieser Aminosäure oder eines Amins wie Dopamin (**8**) mit einem Aldehyd oder einer  $\alpha$ -Ketosäure werden die Tetrahydroisochinolin-Grundkörper gebildet. Die beobachtete Strukturvielfalt<sup>[88,89]</sup> läßt sich aus strukturellen Variationen der beiden Reaktionspartner und aus weiteren metabolischen Modifikationen des Kondensationsproduktes (z.B. Oxidationen, Methylierungen, usw.) erklären.

Dagegen lassen sich die Strukturen der Naphthylisochinolin-Alkaloide, wie z.B. von Dioncophyllin A (**6**) oder Ancistrocladin (**15**), nicht ohne weiteres mit diesem Biosyntheseschema vereinbaren. Bereits Govindachari<sup>[24]</sup> postulierte statt dessen eine polyketidische Biogenese dieser Alkaloide, die von Bringmann später konkretisiert<sup>[16]</sup> (Schema 2, unten) und durch erste biomimetische Synthesen von Naphthalin- und Isochinolinbausteinen aus  $\beta$ -Polyketidvorstufen<sup>[90,91]</sup> untermauert wurde.



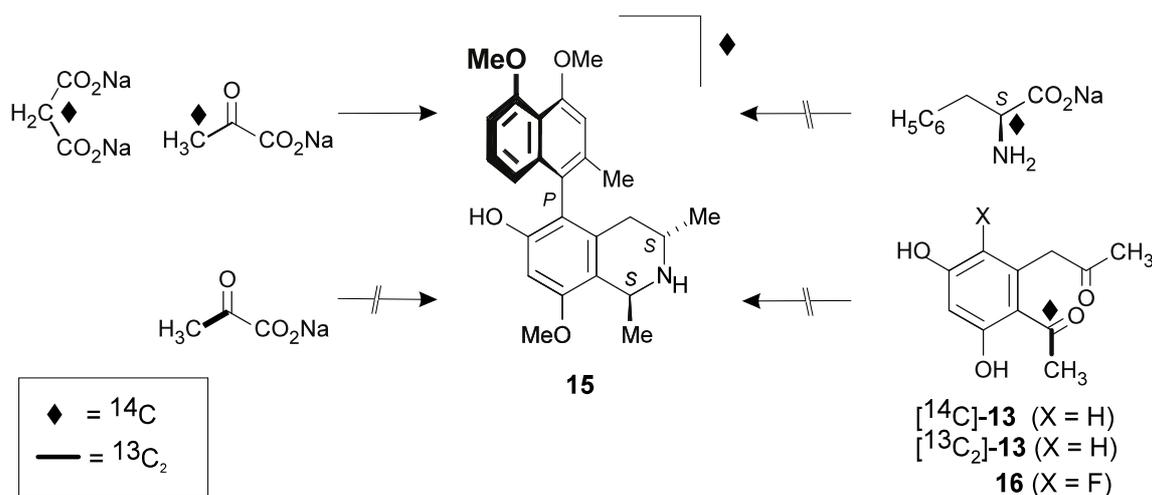
Schema 2. Postuliertes Biogeneseschema der Naphthylisochinolin-Alkaloide

Gemäß dieser Hypothese entspringen sowohl die Naphthalin- als auch die Isochinolinhälften einem gemeinsamen Vorläufer, dem enzymgebundenen, acetogeninen  $\beta$ -Pentaketon **12**. Dieses kann durch Kondensation und Reduktion *via* Diketon **13** zum Naphthalinbaustein **11** cyclisieren, andererseits aber auch durch enzymatische reduktive Aminierung als Vorstufe für einen Dihydroisochinolinbaustein **14** dienen. Das  $\beta$ -Oxygenierungsmuster von **12** plausibilisiert das in den Naphthylisochinolin-alkaloiden gefundene Oxygenierungsmuster an C-6, C-8, C-4' und C-5'. Auch das 1,3-Dimethylierungs-Muster und die Eigenschaft, daß z.T.

artspezifisch (3*S*)- oder (3*R*)-konfigurierte Isochinolinbausteine auftreten, läßt sich mit dem Intermediat **12** zwanglos erklären. Weitere metabolische Schritte, wie z.B. *N*- und *O*-Methylierungen, Reduktionen, Oxidationen und die enzymatische Kupplung von Isochinolin- und Naphthalinbausteinen, ermöglichen eine Vielzahl von Strukturen mit unterschiedlicher Konfiguration, verschiedenen Kupplungstypen oder Hydrierungsgraden. Für dieses "Baukastenprinzip" spricht auch, daß in mehreren Dioncophyllaceen und Ancistrocladaceen das Vorkommen verschiedener monomerer Isochinolinbausteine nachgewiesen wurde.<sup>[20,38,92,93]</sup> Der Naphthalinbaustein **11** wurde zwar noch nie in einer der beiden Pflanzenfamilien, wohl aber in der *Diospyros mollis* (Ebenaceae) in glycosidierter Form gefunden.<sup>[94]</sup>

### 2.2.2 Kenntnisstand der Biogeneseuntersuchungen

Erste Versuche zur Aufklärung der Biogenese der Naphthylisochinolin-Alkaloide wurden Anfang der 80er Jahre in unserem Arbeitskreis<sup>[95]</sup> durchgeführt, nachdem es gelungen war, Ganzpflanzen von *A. heyneanus*, *A. barteri*, *A. abbreviatus* und *T. peltatum* unter Gewächshausbedingungen zu kultivieren.<sup>[96,97]</sup> *A. heyneanus* wurde aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit und des bereits zu diesem Zeitpunkt relativ gut untersuchten Metabolit-spektrums für erste Verfütterungsversuche ausgewählt. Pokorny applizierte [<sup>14</sup>C]-NaOAc, [<sup>14</sup>C]-Natriummalonat und [<sup>14</sup>C]-Phenylalanin an Ganzpflanzen, Wurzel- und Sproßstecklinge von *A. heyneanus* und erzielte mit den beiden ersteren Substraten geringe Einbauraten von bis zu ca. 0.007% in **15** und **18** (Schema 3, unten).<sup>[16]</sup> Dagegen lieferte [<sup>14</sup>C]-Phenylalanin um ca. 2 Größenordnungen kleinere Einbauraten in beiden Metaboliten, was seine Rolle als Vorstufe unwahrscheinlich erscheinen ließ. Leider ergaben anschließende Verfütterungsversuche mit [2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-Natriumpyruvat keine aussagekräftigen Ergebnisse.<sup>[98,99]</sup>



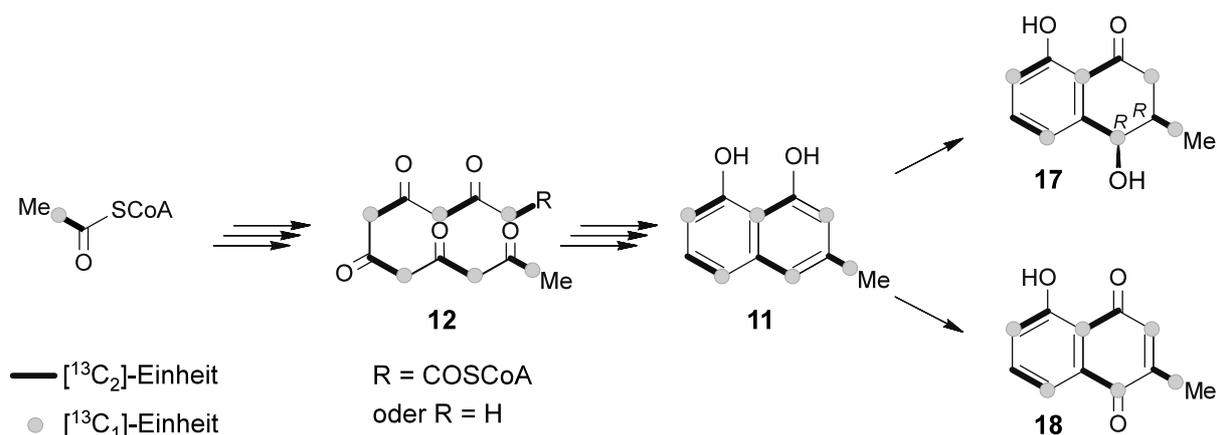
Schema 3. An *A. heyneanus* durchgeführte *in-vivo*-Verfütterungsversuche

Aufbauend auf diesen Befunden verfütterten Wurm und Wenzel das Diketon **13** als möglicherweise spezifischere Vorstufe in  $^{14}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}_2$ -markierter Form<sup>[100]</sup> an Hydrokulturen von *A. heyneanus*, da man sich von dieser Kulturform eine bessere Aufnahmefähigkeit versprach (Schema 3, Seite 12). Doch auch für **13** ergaben sich keine signifikanten Einbautraten.<sup>[101,102]</sup>

Da diese ersten Experimente keine aussagekräftigen Ergebnisse bzgl. der Biogenese der Naphthylisochinolin-Alkaloide erbrachten, wurde von Bringmann und Wenzel eine völlig neue Fütterungsstrategie an *T. peltatum* erprobt.<sup>[103]</sup> Die in Westafrika beheimatete Lianenart durchläuft ein carnivores Jugendstadium,<sup>[104]</sup> in dem sie mit Klebefallen Insekten fängt und verdaut. Die Pflanze wächst nach diesem Stadium als Liane mit Hakenblättern in die Kronenregionen hoher Bäume. Da zu diesem Zeitpunkt keine unter künstlichen Bedingungen außerhalb ihrer natürlichen Klimazone aufgezogene Pflanze dieser Spezies carnivore Eigenschaften gezeigt hatte, wurde (L)- $^{13}\text{C}_2$ -Alanin vor Ort an 24 Pflanzen durch direktes Aufbringen der Aminosäure auf die Klebefallen verfüttert. Mit GC-MS-Untersuchungen wurde eindeutig die Aufnahme des Alanins in die Blätter und die Sprossen nachgewiesen. Weitere markierte Metabolite wurden jedoch nicht gefunden.<sup>[105]</sup>

Die Etablierung von Kallus-Suspensionskulturen von *A. heyneanus*<sup>[75]</sup> schuf die Voraussetzung für einen ersten Durchbruch in der Erforschung der Biogenese der Naphthylisochinolin-Alkaloide. Wie sich zeigte, produzierten diese Kulturen nur verschwindend geringe Mengen von Naphthylisochinolin-Alkaloiden, dafür deutliche Mengen der bereits aus *A. heyneanus* bekannten Metaboliten **18** und **17**.<sup>[93,106-108]</sup> Diese wurden nach Applikation von  $^{13}\text{C}_2$ -NaOAc und  $^{13}\text{C}_1$ -NaOAc aus Kallusmaterial und Medium isoliert und mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR untersucht. Dabei zeigten sich Einbaumuster, die zweifellos deren polyketidische Herkunft belegten (Schema 4, Seite 14).<sup>[75]</sup> Zwar hatten schon frühere Untersuchungen von Zenk mit radioaktiv markierten Vorstufen **18** als acetogeninen Metaboliten in *Plumbago europaea* identifiziert,<sup>[109,110]</sup> es konnten damals allerdings keine Aussagen zur Faltung der intermediären Polyketidkette **12** gemacht werden.

Da Naphthochinone in anderen Pflanzenfamilien aber auch auf alternativen Biosyntheserouten hergestellt werden können<sup>[111]</sup> (z.B. in *Impatiens balsamina* L. über Shikimisäure),<sup>[112]</sup> war diese Bestätigung einer in *Plumbago* und *Ancistrocladus* auf Polyketiden basierenden Biosynthese von **18** eine wichtige Unterstützung der Biogenesehypothese (Kap. 2.2.1, Seite 10). Denn sowohl **18** als auch **17** können formal als Oxidationsprodukte des Naphthalindiols **11** angesehen werden, das der Naphthylhälfte der Naphthylisochinoline entspricht.



Schema 4. Aus Fütterungsexperimenten an *A. heyneanus* abgeleitete Biogenese und Polyketidfaltung von **18** und **17**

Leider produzierten die angelegten Agarkulturen von *A. heyneanus* nur geringe Mengen von Naphthylisochinolin-Alkaloiden, die aber mittels HPLC-MS-Analytik noch nachweisbar waren.<sup>[113]</sup> Die Verfütterung von markierten potentiellen Biogenesevorstufen wie des Tetrahydroisochinolinbausteins [1-CH<sub>3</sub>-,1-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-**20** oder des für *A. heyneanus* "unnatürlichen", monooxygenierten Isochinolinbausteins **19** (Abb. 4, unten), welcher in *H. dawei* spurenanalytisch nachgewiesen<sup>[38]</sup> wurde und in einfach und doppelt *N*-methylierter Form in afrikanischen Ancistrocladaceen vorkommt,<sup>[20,93]</sup> zielte darauf ab, neben Acetat auch spezifischere Vorstufen in Naphthylisochinolin-Alkaloiden zu inkorporieren oder sogar die Alkaloidproduktion durch das Angebot geeigneter "Molekülbausteine" zu stimulieren.<sup>[114]</sup>

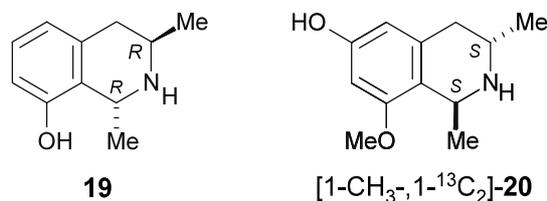


Abb. 4. An Agarkulturen von *A. heyneanus* applizierte Isochinolin-Vorstufen **19** und [1-CH<sub>3</sub>-,1-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-**20**

Nach Abschluß der Experimente jedoch fanden sich in nach einer HPLC-MS/MS-Analyse keine von den Vorstufen abgeleiteten Alkaloide in den Kalluskulturen.<sup>[115]</sup> Ein Grund dafür könnte in der geringen Neigung von Polyketidsynthasen<sup>[116]</sup> liegen, spezifischere Substrate als Malonat oder Pyruvat zu akzeptieren.<sup>[117,118]</sup>

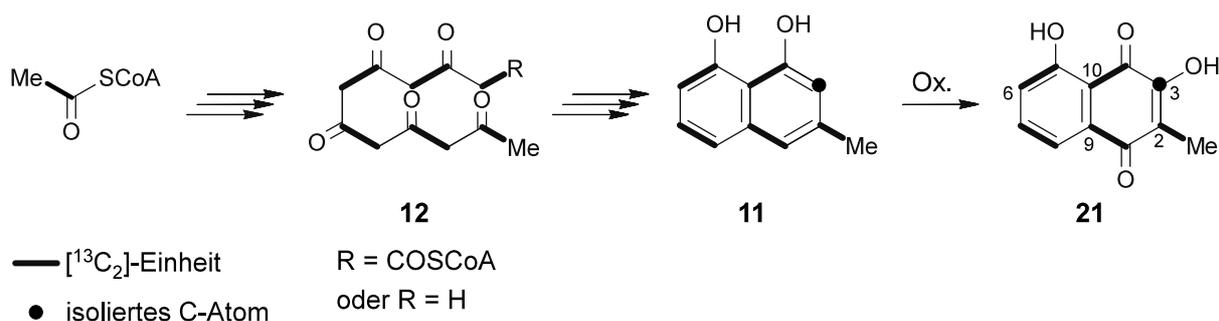
## 2.2.3 Neue Untersuchungen: Die Biogenese der Naphthylisochinolin-Alkaloide

### 2.2.3.1 Verfütterung von [ $^{13}\text{C}_2$ ]-NaOAc an Suspensionskulturen von *Triphyophyllum peltatum* und Isolierung von Droseron (**21**)

Bei der Untersuchung der Zellkulturen von *A. heyneanus* stellten der niedrige Alkaloidgehalt und das Fehlen einer leicht isolierbaren Hauptkomponente<sup>[113,115]</sup> schwerwiegende Hindernisse dar, da aus den langsam wachsenden Kalli nicht genügend Material für NMR-Untersuchungen isolierbar war. Um so vielversprechender erschienen die Perspektiven, als es gelang, Suspensionskulturen der westafrikanischen Art *T. peltatum* anzulegen.<sup>[119]</sup> *T. peltatum* ist eine äußerst vielseitige Quelle von Naphthylisochinolin-Alkaloiden,<sup>[33,43,120-129]</sup> produziert aber das strukturell eingehend untersuchte und leicht isolierbare Dioncophyllin A (**6**)<sup>[106,130-133]</sup> als Hauptalkaloid in deutlichem Überschuß.

Trotz dieser guten Voraussetzung war - analog zu den Erfahrungen bei *A. heyneanus* - nur eine sehr geringer Gehalt von **6** oder anderen Naphthylisochinolin im Kallus zu detektieren. Stattdessen wurde jedoch Droseron (**21**) in signifikanten Mengen gebildet und von den Zellen in das Medium abgegeben. Dieses Hydroxynaphthochinon ist als Metabolit bekannt aus *A. heyneanus*,<sup>[25]</sup> *A. robertsoniorum* (dort wurde es sogar in kristallinen Ablagerungen gefunden)<sup>[134]</sup>, *D. tholloni*<sup>[37]</sup> und verschiedenen Vertretern der Ebenaceae,<sup>[135,136]</sup> Plumbaginaceae,<sup>[137,138]</sup> Nepenthaceae<sup>[139,140]</sup> und Droseraceae.<sup>[141,142]</sup> Strukturell verwandt zu den acetogeninen Metaboliten **18** und **17**, lag eine ähnlich verlaufende Biosynthese nahe.<sup>[75]</sup> Interessanterweise ist **21** in den Ganzpflanzen von *T. peltatum* nicht detektierbar. Offensichtlich wird die Produktion von **21** erst durch die veränderten Kulturbedingungen - im Sinne einer Streßreaktion der Pflanzenzellen - induziert.

Analog zu den Versuchen an *A. heyneanus*<sup>[75]</sup> wurde [ $^{13}\text{C}_2$ ]-NaOAc an die Suspensionskulturen von *T. peltatum* verfüttert; nach acht Tagen isolierte man 0.7 mg **21** aus dem Medium. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum offenbarte  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungsmuster, wie sie in ähnlicher Weise auch schon bei **18** und **17** beobachtet worden waren. Die genauere Analyse der  $^1J(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})$ -Kopplungskonstanten ermöglichte die Identifizierung diskreter, dem Acetat entstammender  $^{13}\text{C}_2$ -Paare (2- $\text{CH}_3$ /C-2, C-1/C-9, C-8/C-7, C-6/C-5 und C-10/C-4), die ohne Bindungsbruch in **21** eingebaut worden waren (Schema 5, Seite 16). Das Verhältnis der Intensitäten von Satelliten- und Zentralsignalen schwankte je nach Position zwischen ca. 97% (C-2) und 218% ( $\text{CH}_3$ -2) (Tab. 4, Seite 113).



Schema 5. In Droseron (**21**) detektierte  $^{13}\text{C}_2$ -Einheiten nach Verfütterung von  $[^{13}\text{C}_2]$ -NaOAc an Suspensionskulturen von *T. peltatum* und abgeleitete Biosyntheseroute

In Analogie zu den bei **18** und **17** beobachteten Einbaumustern<sup>[75]</sup> (Schema 4, Seite 14) zeigte C-3 keine  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplung. Dies ist durch die Decarboxylierung der an C-3 Polyketidsynthase-gebundenen Carboxylfunktion im Laufe der Biosynthese erklärbar. Das beobachtete Einbaumuster offenbarte auch eine zu **18** und **17** identische Faltung der Polyketidvorstufe **12** vor der Cyclisierung zum Naphthalin-Grundgerüst und dokumentiert damit auch die nahe biogenetische Verwandtschaft der drei Metaboliten. Weiterhin wurde **21** offensichtlich aufgrund einer Streßreaktion *de novo* im Kallus gebildet, da ein bloßer Abbau von bereits angelegten Droseron-Depots\* nur unmarkiertes **21** hervorgebracht hätte. Auch wenn keine Alkaloide isoliert werden konnten, zeigte dieser Versuch, daß nun erstmals aktive Zellkulturen von *T. peltatum* mit hoher metabolischer Potenz für weitere Verfütterungsexperimente zur Verfügung standen.

### 2.2.3.2 Verfütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ -NaOAc an Agarkulturen von *Triphyophyllum peltatum* und Isolierung von Dioncophyllin A (**6**)

Da die Suspensionskulturen nur geringe Mengen Naphthylisochinoline produzierten, wurden weitere Experimente an neu etablierten Agarkulturen unternommen. Tatsächlich zeugten erste orientierende HPLC-UV- und DC-Voruntersuchungen von einem deutlich höheren Alkaloidgehalt als in allen anderen bisher untersuchten Kalluskulturen. Dioncophyllin A (**6**) wurde chromatographisch als Hauptalkaloid identifiziert.

Zur Verfütterung von  $[^{13}\text{C}_2]$ -NaOAc wurde eine sterile wäßrige Lösung von  $[^{13}\text{C}_2]$ -NaOAc auf die Agarkulturen aufgetropft. Nach zweimonatiger Applikation von insgesamt 250 mg  $[^{13}\text{C}_2]$ -NaOAc wurde nach mehreren chromatographischen Schritten (Umkehrphasen-MPLC, Normalphasen-MPLC, chirale Normalphasen-HPLC) insgesamt 1.7 mg noch leicht verunreinigtes **6** isoliert. Diese Probe zeigte in ersten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experimenten bereits

\* Eine denkbare Lagerform wäre z.B. das aus *Drosera rotundifolia* bekannte 5-O- $\beta$ -Glucosid von **21**.<sup>[143]</sup>

deutliche Hinweise auf einen Einbau von intakten  $^{13}\text{C}_2$ -Einheiten. Allerdings reichte die Empfindlichkeit des vorhandenen DMX-600-NMR-Gerätes nicht aus, um alle Signale mit ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis zu detektieren. Die Auswertung wurde zusätzlich durch eine starke Linienverbreiterung der Signale des heterocyclischen Isochinolinringes im  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR erschwert, die eine eindeutige Auswertung für alle Positionen des Kohlenstoffgerüsts verhinderte. Vermutlicher Auslöser dieser Linienverbreiterung war eine intensiv gelbe, im NMR nicht identifizierbare Substanz, die als Spurenbestandteil in der Probe vorlag. Um die Substanzmenge für weitere Trennversuche besser handhabbar zu machen, wurden unter NMR-Kontrolle 2.5 mg unmarkiertes **6** der Probe zugegeben und anschließend die "verdünnte" Mischung auf Kieselgel ein weiteres mal chromatographisch gereinigt. Dabei gelang es, den Farbstoff abzutrennen, so daß nach der Trocknung *ca.* 4 mg reines **6** erhalten wurden.

Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen (protonenkoppeltes  $^{13}\text{C}$ -NMR und 2D-INADEQUATE) wurden schließlich auf einem DRX-500-NMR-Spektrometer der Fa. *Bruker Spektrospin* durchgeführt, welches mit einem Prototypen eines  $^{13}\text{C}$ -sensitiven Dual-Kryoprobekopfes ausgerüstet war.\* Bei der Kryoprobentechnik werden alle Hochfrequenzbauteile (incl. des Vorverstärkers) mit flüssigem Helium auf *ca.* 5 K abgekühlt.<sup>[144,145]</sup> Dies vermindert erheblich das elektrische Störgeräusch in den elektronischen Komponenten, und führt so zu einer Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses und damit zu einer deutlich verbesserten Sensitivität. Im Vergleich zu der in Würzburg vorhandenen Gerätekonfiguration wurde die Meßempfindlichkeit *ca.* um den Faktor 2-3 gesteigert.<sup>[146]</sup>

Das mit der Tieftemperaturtechnik erhaltene 2D-INADEQUATE-Spektrum der isolierten Probe von **6** (Abb. 5, Seite 18) zeigte ausschließlich paarweise auftretende C-C-Korrelationen (3-CH<sub>3</sub>/C-3, C-4/C-10, C-5/C-6, C-7/C-8, C-9/C-1, 2'-CH<sub>3</sub>/C-2', C-4'/C-10', C-5'/C-6', C-7'/C-8' und C-1'/C-9'), die den Einbau intakter  $^{13}\text{C}_2$ -markierter Acetat-Einheiten ohne Bindungsbruch in **6** bewiesen. Somit leiten sich beide Molekülhälften von **6** ausschließlich aus Acetat ab.

Begleitende  $^{13}\text{C}$ -Messungen bestätigten aufgrund der paarweise übereinstimmenden  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungskonstanten diese Zuordnung. Die große Aussagekraft des INADEQUATE-Experimentes zeigt sich vor allem bei komplizierteren Spektren. So war im  $^{13}\text{C}$ -Experiment die Ermittlung der  $^1J(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})$ -Kopplungskonstanten von C-2 und C-9 nicht möglich, da sich die beiden Signale überlappten. Im 2D-INADEQUATE waren die jeweiligen Kopplungspartner eindeutig ermittelbar. Als kritisch erwiesen sich im 1D- $^{13}\text{C}$ -NMR auch die fast identischen Verschiebungen von 2'-CH<sub>3</sub> und 1-CH<sub>3</sub>. Nach der Analyse des 2D-

---

\* Ich danke Dr. M. Grüne für die Durchführung der  $^{13}\text{C}$ -Messungen in Fällanden (Schweiz).

INADEQUATE-Spektrums zeigte dieses jedoch eindeutig, daß 2'-CH<sub>3</sub> mit C-2 koppelte und 1-CH<sub>3</sub> (neben C-3') keinen Kopplungspartner besaß. Dagegen wiesen auch 3-CH<sub>3</sub> und C-3 in beiden Experimenten eine starke gegenseitige Kopplung auf.

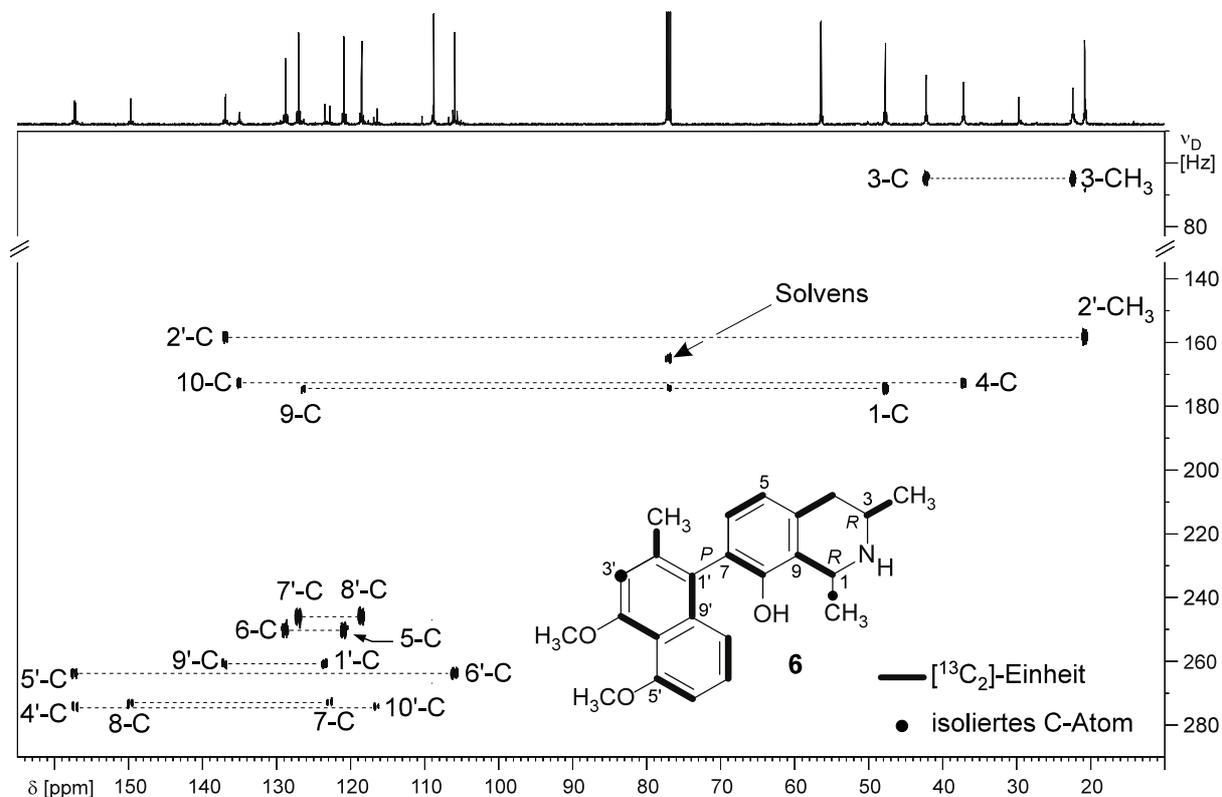
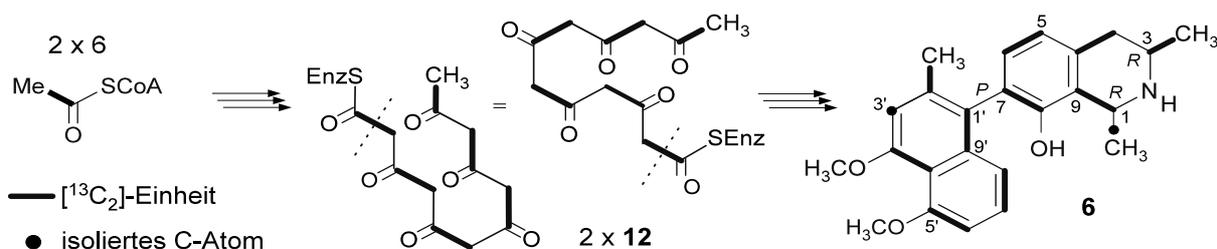


Abb. 5. 2D-INADEQUATE-Spektrum von **6** (in CDCl<sub>3</sub>) nach Verfütterung von [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-NaOAc

Das beobachtete Einbaumuster läßt somit den Schluß zu, daß der Naphthalin- und der Isochinolinbaustein - im Hinblick auf die beiden einander entsprechenden isocyclischen Ringe - ein identisches Polyketidfaltungsmuster aufweisen. Vermutlich finden auch in beiden Molekülhalften Decarboxylierungen an homologen Positionen des Polyketidprecursors **12** statt, so daß im resultierenden Zielmolekül **6** die Kohlenstoffatome 1-CH<sub>3</sub> und C-3' ohne entsprechenden Kopplungspartner zurückbleiben (Schema 6, unten).



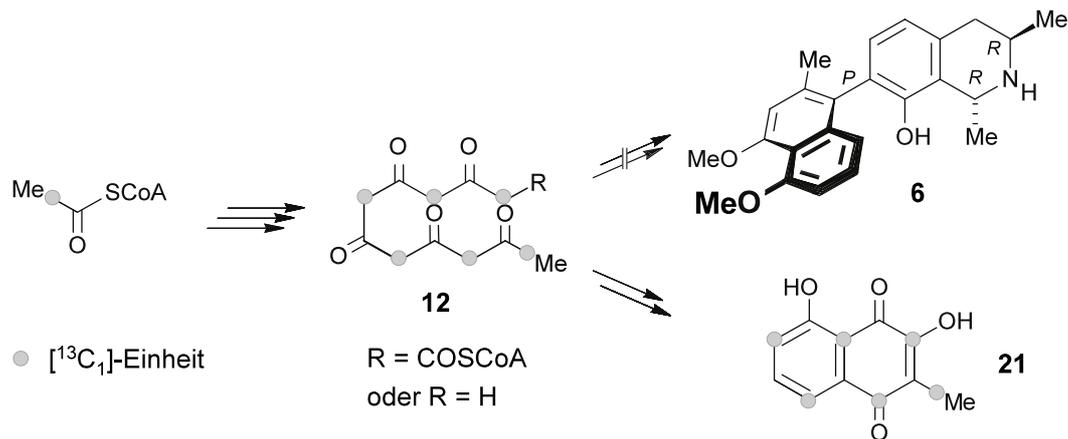
Schema 6. Faltung der Polyketidvorstufen und Decarboxylierung der Enzymreste in der Naphthylisochinolin-Biosynthese

Die gefundenen  $^{13}\text{C}_2$ -Einbaumuster beweisen damit eindeutig das im Vorfeld formulierte Biosynthese-Postulat<sup>[16,24]</sup> eines acetogeninen Ursprungs dieser Alkaloide. Der acetogenine Ursprung der Kohlenstoffatome C-3' und 1-CH<sub>3</sub> - obgleich sehr plausibel - kann bei strenger Sichtweise leider nicht aus dem hier beschriebenen Experiment direkt abgeleitet werden. Nach der Verfütterung von [2- $^{13}\text{C}_1$ ]-NaOAc legten jedoch die in Isoshinanolon (**17**) und Plumbagin (**18**) gefundenen  $^{13}\text{C}$ -Inkorporationsmuster<sup>[75]</sup> (Schema 4, Seite 14) diesen Schluß nahe.

### 2.2.3.3 Verfütterung von [2- $^{13}\text{C}_1$ ]-NaOAc an Agarkulturen von *Triphyophyllum peltatum* und Isolierung von Droseron (**21**) und Dioncophyllin A (**6**)

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel erwähnt, erlaubte die Verfütterung von [ $^{13}\text{C}_2$ ]-NaOAc keinen Rückschluß auf die Quelle der C-Atome 1-CH<sub>3</sub> und C-3'. Demzufolge besteht hier die hypothetische Möglichkeit, daß beide Kohlenstoffatome im Laufe der Biogenese aus anderen Quellen angefügt werden, wobei dieser Verlauf unter Einbeziehung der Ergebnisse bei den verwandten Metaboliten **17** und **18** als sehr unwahrscheinlich einzustufen ist. Um diesen Sachverhalt trotzdem näher zu überprüfen, wurde [2- $^{13}\text{C}_1$ ]-NaOAc an Agarkulturen von *T. peltatum* unter identischen experimentellen Bedingungen wie in der [ $^{13}\text{C}_2$ ]-NaOAc-Verfütterung appliziert. Aufgrund eines größeren Kulturansatzes und einer optimierten, HPLC-gestützten Aufarbeitungsroutine konnten 2.2 mg reines **6** (ohne Zugabe von unmarkiertem Material) aus diesem Ansatz isoliert werden. Ein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Vergleich der isolierten Probe mit einer Referenzprobe des reinen **6** zeigte jedoch leider an keiner Kohlenstoffposition in **6** eine meßbare Signalerhöhung, und damit auch keinen nachweisbaren [2- $^{13}\text{C}_1$ ]-NaOAc-Einbau in **6**.

Als Erklärung für diesen unerwünschten Verlauf dient eine alternative Metabolisierung der applizierten Vorstufe. Tatsächlich wurden im Laufe der Isolierung von **6** eine signifikante Menge von Droseron (**21**) erhalten, das schon bei den Suspensionskulturen als Streß-induzierbarer Metabolit aufgefallen war. Interessanterweise war diese übermäßige Droseronbildung bei dem erfolgreichen [ $^{13}\text{C}_2$ ]-NaOAc-Experiment mit Agarkulturen nicht zu beobachten gewesen. Eine  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experiment an dieser Probe von **21** enthüllte einen deutlichen Einbau von [2- $^{13}\text{C}_1$ ]-NaOAc mit starken Signalerhöhungen (ca. 400-500% relativ zum unmarkierten Standard) an 2-CH<sub>3</sub>, C-3, C-6, C-8 und C-10 (Schema 7, Seite 20). Damit zeigt **21** ein zu **18** und **17** völlig übereinstimmendes Polyketidfaltungs- und Decarboxylierungsmuster.



Schema 7. Darstellung der Verfütterung von [ $2\text{-}^{13}\text{C}_1$ ]-NaOAc an *T.-peltatum*-Agarkulturen

Obwohl alle kontrollierbaren Versuchsparemeter des Verfütterungsversuches im Vergleich zum erfolgreichen vorhergehenden Experiment konstant gehalten wurden, scheinen unbekannte Einflußfaktoren (z.B. Temperaturschwankungen oder physiologische Eigenschaften des Kallusmaterials) den Acetat-Metabolismus in die Richtung einer Naphthochinon-Synthese verschoben zu haben. Da bis zum heutigen Zeitpunkt keine weiteren Zellkulturen verfügbar waren, steht die endgültige Klärung dieser Frage noch aus.

## 2.3 Strukturell ungewöhnliche Alkaloide aus Euphorbiaceen: Antidesmon aus *Antidesma membranaceum*

### 2.3.1 Isolierung und Versuche zur Strukturaufklärung des neuartigen Isochinolin-Alkaloids Antidesmon (7)

*Antidesma membranaceum* Müll. Arg. aus der Familie der Euphorbiaceen ist in den offenen Regenwäldern oder Küstenbergregenwäldern Äquatorialafrikas beheimatet. Die Wuchsform variiert zwischen strauch- und baumartig bis zu 20 m Höhe. In früheren phytochemischen Untersuchungen wurden nur zwei Vertreter cyclopeptidartiger Alkaloide (neben mehreren Steroiden und Polyphenolen) aus verschiedenen Vertretern der Gattung *Antidesma* isoliert.<sup>[44]</sup>

Neuere Isolierarbeiten, die sich gezielt mit den beiden Spezies *A. membranaceum* und *A. venosum* befaßten, förderten neben einer größeren Anzahl von neuen Benzopyranonen und Ferulasäurederivaten<sup>[147]</sup> auch ein strukturell neuartiges Alkaloid zutage.<sup>[41]</sup> NMR- und MS-Messungen postulierten als Strukturbausteine eine an einen Cyclohexenon-Ring gebundene aliphatische Octylkette in pseudo-axialer Stellung zur Carbonylfunktion und ein *N*-C(CH<sub>3</sub>)=C(OCH<sub>3</sub>)-Fragment als Teil eines ungesättigten, an den Cyclohexenon-Baustein annelierten Ringes, der den MS-Daten zufolge noch eine weitere Sauerstoff-Funktion tragen sollte (Abb. 6a, unten). Die geringe vorhandene Menge des Naturstoffes verhinderte eine eindeutige Aufklärung der Konnektivität der beiden Ringe durch HMBC- und ROESY-Experimente. Die Isochinolinstruktur **7** wurde jedoch durch GC-MS-Untersuchungen plausibilisiert, in denen nach Reduktion von **7** mit LiAlH<sub>4</sub> und Derivatisierung mit B(OMe)<sub>3</sub> der verbrückte Methylboronsäureester **22** detektiert wurde (Abb. 6b, unten). Die Messung von CD-Spektren und computerchemische CD-Simulationen ergaben schließlich eine (5*S*)-Konfiguration für das Isochinolin **7**.<sup>[41]</sup>

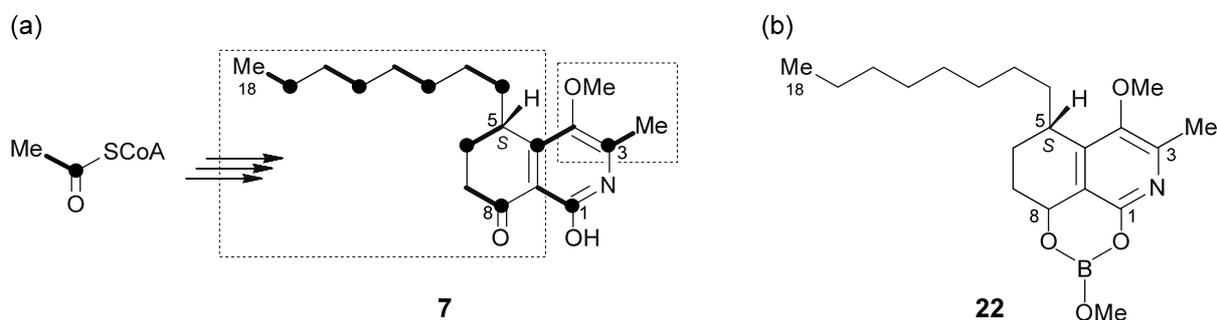


Abb. 6. (a) Postulierte Struktur des neuartigen, vermutlich acetogeninen Isochinolin-Alkaloids **7** (Die mit NMR und MS identifizierten Strukturelemente sind durch gestrichelte Kästen markiert.); (b) Postulierte Struktur des per GC-MS identifizierten, verbrückten Methylboronsäure-Esters **22**

Die ungewöhnliche Isochinolinstruktur dieses Moleküles initiierte - auch im Hinblick auf die erst kurz zuvor bewiesene Acetat-basierte Biogenese der Naphthylisochinolin-Alkaloide<sup>[148]</sup> - Spekulationen bzgl. einer ebenfalls polyketidischen Herkunft des *n*-Octylrestes von **7** und des Isochinolinbausteins. Demnach sollte das Gesamtmolekül aus zwei Polyketidvorstufen entstehen (Abb. 6a, Seite 21), wobei über die genaue Art dieser Vorstufen (z.B. bzgl. ihrer Kettenlänge oder Carbonylorientierung) keine genauere Vorhersage möglich war. Nachdem jedoch Bringmann\* Samen von *A. membranaceum* in Kenia gesammelt hatte, gelang Rischer<sup>[149,150]</sup> aus denselben die Etablierung von Alkaloid-produzierenden Kalluskulturen. Diese ermöglichten eine Untersuchung der Biogenese von Antidesmon (**7**) mittels Verfütterung von stabilisotopenmarkierten Vorstufen.

### 2.3.2 Erste Verfütterungsexperimente und Strukturrevision von Antidesmon (**7**)

#### 2.3.2.1 Verfütterung von [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-NaOAc

Wie bereits im vorigen Kapitel diskutiert, legten Teile der Struktur **7**, wie z.B. der lange C<sub>8</sub>-Rest, eine zumindest teilweise polyketidische Biosynthese nahe. Aus diesem Grund wurde in einem ersten Experiment [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-NaOAc an *A. membranaceum* verfüttert und nach zweiwöchiger Inkubationszeit das zu untersuchende Alkaloid<sup>†</sup> daraus isoliert. Erste <sup>13</sup>C-NMR-Experimente deuteten bereits durch das Auftreten der typischen "Triplettsignale" (Zentralpeak mit zwei <sup>13</sup>C-Satelliten) auf einen erfolgreichen Einbau von [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-NaOAc hin. Die Spektren wiesen allerdings auch komplizierte Überlappungsmuster im aliphatischen Bereich auf, die eine eindeutige Auswertung erschwerten. Zudem bereitete die eindeutige Zuordnung der Kopplungskonstanten bei den Signalen des Heterocyclus Schwierigkeiten, was zu diesem Zeitpunkt einer unzureichenden Frequenzauflösung bzw. den z.T. niedrigen Signalintensitäten zugeschrieben wurde.

Zur Überwindung dieser Probleme wurde ein 2D-INADEQUATE-Experiment durchgeführt, da dieses Experiment überlappende <sup>13</sup>C-Signale wesentlich besser aufzulösen vermag (Abb. 7, Seite 23). Die Analyse der Korrelationspaare im aliphatischen Bereich (C-11/C-12, C-13/C-14, C-15/C-16, C-17/C-18) bestätigte die Vermutung bzgl. eines acetogeninen Ursprungs der *n*-Octylkette. Gleiches galt für die Kohlenstoffpaare C5/C-6 und C-7/C-8 des isocyclischen Ringes. Zwar konnte das Signal von C-10 aufgrund seiner zu geringen Intensität nicht detektiert werden, die Zuordnung als Kopplungspartner von C-9 gelang jedoch durch Extrapolation nach Abzug der chemischen Verschiebung des gut sichtbaren Signals von C-9 von der Doppelquantenfrequenz der gemeinsamen Spur in F1 (Zeitdomäne).<sup>[69]</sup> Damit war

\* Ich danke Prof. Dr. G. Bringmann für die Bereitstellung von *A.-membranaceum*-Samen.

† Ich danke Dr. A. Buske für eine Referenzprobe.<sup>[41]</sup>

auch der Ursprung der beiden Brückenkopfatome im Ring aus einer gemeinsamen C<sub>2</sub>-Einheit gesichert. Hingegen war zwischen C-3 und 3-CH<sub>3</sub> (Schema 8, Seite 24) keine Korrelation zu beobachten, was einen nicht-acetogenen Ursprung dieser C<sub>2</sub>-Einheit nahelegte.

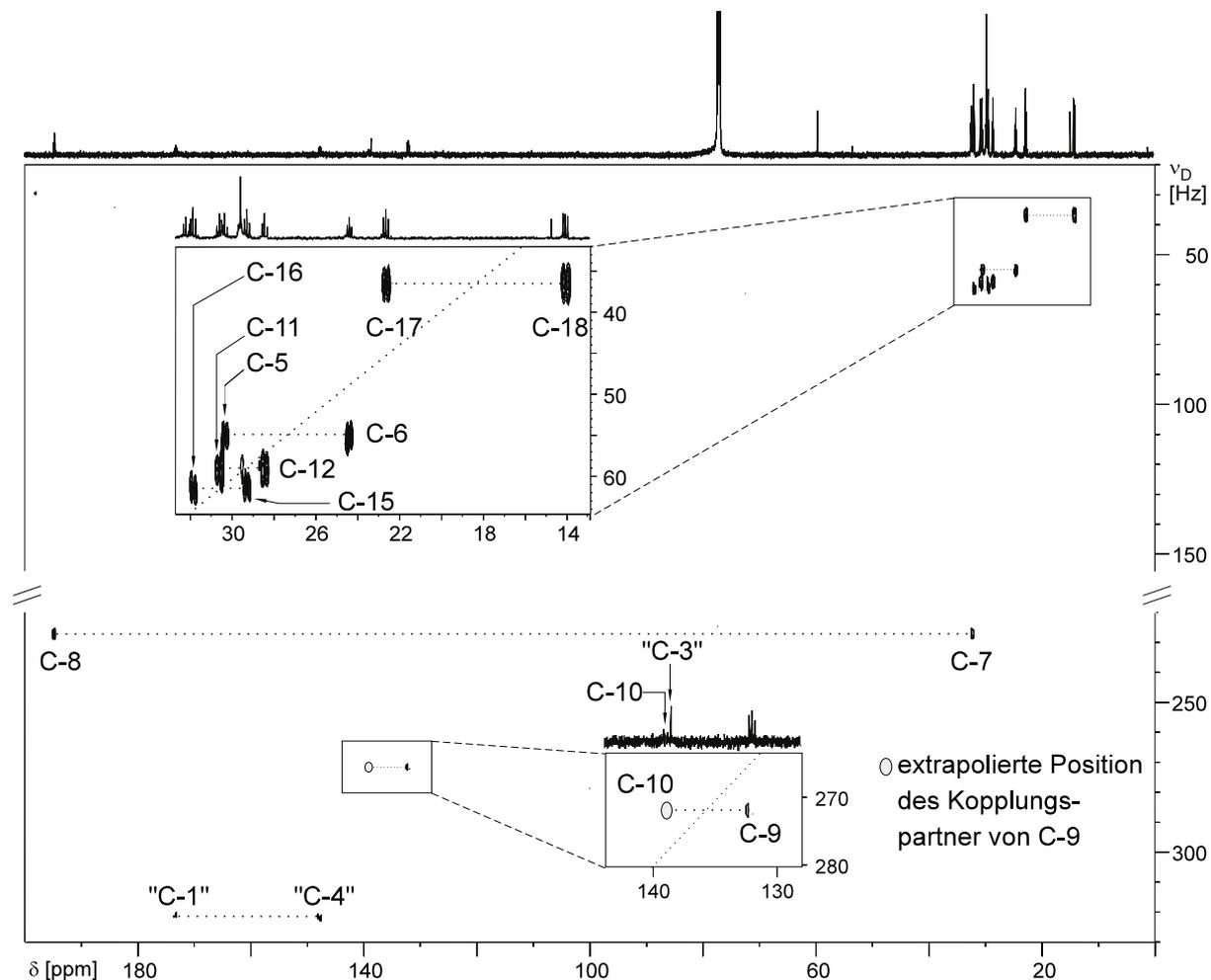
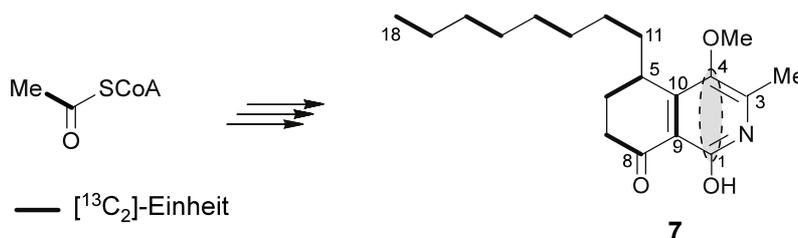


Abb. 7. 2D-INADEQUATE von Antidesmon (**7**) nach Verfütterung von [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-NaOAc (Vergrößerte Teilausschnitte sind in Kästen abgebildet. Die Position von C-10 wurde anhand der Doppelquantenfrequenzbedingung<sup>[69]</sup> extrapoliert.)

Überraschenderweise wurde auch eine gut sichtbare Korrelation der beiden Sauerstoffsubstituierten Kohlenstoffatome des heterocyclischen Ringes, "C-1" und "C-4", ( $\delta_C$  147.6 und 173.4 ppm) beobachtet. Da das INADEQUATE-Experiment lediglich auf die Detektion von  $^1J(^{13}C, ^{13}C)$ -Korrelationen ausgelegt war, stand diese Entdeckung im entschiedenen Gegensatz zur postulierten Struktur von **7**. Weitere Langzeit-<sup>13</sup>C-Experimente, bei denen für beide Kohlenstoffatome übereinstimmende Kopplungskonstanten in der Größenordnung von *ca.* 65 Hz gemessen wurden, bestätigten den Befund einer direkten Verknüpfung der beiden Kohlenstoffatome und widerlegten entschieden Struktur **7** (Schema 8, Seite 24).



Schema 8. Im 2D-INADEQUATE identifiziertes [ $^{13}\text{C}_2$ ]-Markierungsmuster der durch die "Korrelation" zwischen "C-1" und "C-4" (durch graue Schattierung angedeutet) widerlegten Struktur **7**

Im Licht dieser Ergebnisse wurden die vorhandenen NMR- und MS-Daten einer gründlichen Überprüfung unterzogen, welche die Struktur und Zuordnung des isocyclischen Bausteines (C-5 bis C-10) *incl.* der *n*-Octylkette bestätigte. Als problematischer erwies sich der heterocyclische Baustein mit den Positionen C-1 bis C-4, C-9 und C-10. Der durch HMBC und ROESY ausreichend abgesicherte Baustein C(OMe)=C(Me) wurde durch die neue C-C-Korrelation zum Fragment C(OH)-C(OMe)=C(Me) erweitert. Unklar war jedoch die Position des Stickstoffs und die Orientierung des heterocyclischen Bausteines, wodurch sich mehrere denkbare Strukturalternativen (**23**, **24**, **25** und **26**) für Antidesmon ergaben (Abb. 8, unten).

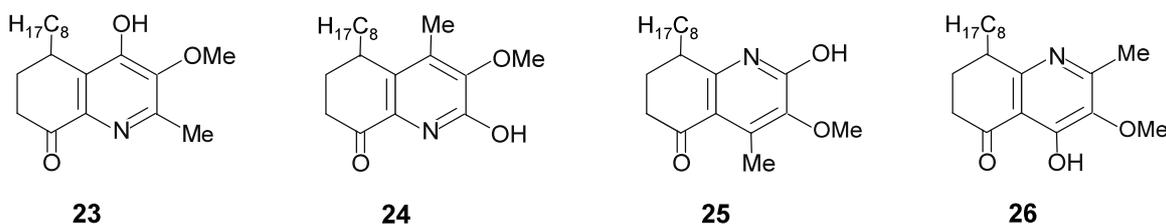


Abb. 8. Mögliche Strukturalternativen von Antidesmon nach Einbau von [ $^{13}\text{C}_2$ ]-NaOAc: **23**, **24**, **25** und **26**

Leider gelang keine Unterscheidung der vier Strukturhypothesen mit verschiedenen  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - und  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Korrelationsexperimenten (ROESY, NOESY, TOCSY, HMBC), da in keinem Fall Wechselwirkungen - wohl auch aufgrund der geringen vorhandenen Substanzmenge - zwischen dem heterocyclischen Ringteil und dem homocyclischen Ring beobachtet wurden.

### 2.3.2.2 Verfütterung von [ $^{15}\text{N}_2$ ]- $\text{NH}_4\text{NO}_3$ und [ $^{15}\text{N}$ ]- $\text{KNO}_3$ : Aufklärung der Konstitution von Antidesmon (**27**)

Ein eleganter Weg zur Strukturaufklärung lag in der Ausnutzung der Stickstoff-Funktion für weitergehende NMR-Experimente. Das Isotop  $^{15}\text{N}$  - wie bereits in Kap. 2.1.2 (Seite 9) erwähnt - eignet sich in aufgrund seiner niedrigen Empfindlichkeit und natürlichen Häufigkeit nur bedingt zur Kernresonanzspektroskopie. Die zur Verfügung stehende Menge von Antidesmon von nur wenigen Milligramm reichte bei weitem auch für die empfindlicheren

$^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Korrelationsexperimente nicht aus. Wie bereits diskutiert, basiert ein in der Protein- und Nucleotid-NMR<sup>[151]</sup> verbreiteter, aber in der Chemie niedermolekularer Naturstoffe nur äußerst selten<sup>[152]</sup> genutzter Ansatz auf der Anreicherung des Analyten mit  $^{15}\text{N}$ , z.B. durch Verfütterung von  $^{15}\text{N}$ -markierten Substraten an die jeweiligen Produzenten.

Um diese Anreicherung auch in den Pflanzenzellen zu erzielen, ersetzte man die im Kulturmedium als Stickstoffquellen vorhandenen Salze  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  und  $\text{KNO}_3$  durch die entsprechenden  $^{15}\text{N}$ -markierten Analoga. Ein weiterer Fortschritt bestand in der Etablierung von Flüssigkulturen. Eine HPLC-Analyse zeigte, daß die Kalluszellen das produzierte Antidesmon in nennenswerten Konzentrationen (*ca.* 2 mg/l) in das Medium ausschütteten. Dies ermöglichte eine "Batch"-Produktion von Antidesmon, indem das  $^{15}\text{N}$ -angereicherte Medium alle neun Tage über einen Zeitraum von zwei Monaten ausgewechselt und das darin enthaltene Antidesmon unter Erhalt der Zellkulturen gewonnen wurde. Diese nachhaltige Ausnutzung der Kalluskulturen besaß zudem den Vorteil, daß der zelleigene Stickstoffpool kontinuierlich mit  $^{15}\text{N}$  (zugunsten eines höheren Markierungsgrades im isolierten Alkaloid) angereichert wurde.

Bereits in ersten  $^1\text{H}$ -NMR-Experimenten konnte ein erfolgreicher Einbau der  $^{15}\text{N}$ -Markierung in Antidesmon nachgewiesen werden. Das Protonensignal der benzyllischen Methylgruppe zeigt deutliche Satellitensignale mit einer Aufspaltung von *ca.* 2.9 Hz, wie sie im Falle einer  $^3J(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -Kopplung zu erwarten gewesen wären (Abb. 9a, Seite 26). Der Markierungsgrad von  $^{15}\text{N}$  wurde aufgrund der Intensitätsverhältnisse (Anteil der Satellitenflächen an der Gesamtsignalfläche) im  $^1\text{H}$ -NMR-Experiment zu *ca.* 70% berechnet. Damit waren die Strukturen **24** und **25** (Abb. 8, Seite 24) als Alternativen ausgeschlossen, da in diesem Falle eine  $^5J$ -Kopplung mit kleinerer Kopplungskonstante zwischen  $^{15}\text{N}$  und der benzyllischen Methylgruppe vorgelegen hätte.<sup>[77]</sup>

Der sehr hohe Anreicherungsgrad ermöglichte schließlich auch die Durchführung von 2D- $^{15}\text{N}$ -HMBC-Experimenten (Abb. 9b, Seite 26). Dabei zeigten sich drei signifikante Korrelationen: eine sehr starke  $^{15}\text{N}$ -Wechselwirkung ( $^3J$ ) der aromatischen Methylgruppe an C-2, eine sehr schwaches Signal ( $^5J$ ) von der weiter entfernten Methoxygruppe an C-3 und eine Korrelation mittlerer Intensität von 7- $\text{H}_{\text{eq}}$  ( $\delta$  2.59 ppm), die auf eine relativ kurze Distanz zwischen C-7 und  $^{15}\text{N}$  hindeutete. Damit erschien aber eine *peri*-Position des Stickstoffes zur Carbonylgruppe an C-8 wahrscheinlicher als eine Positionierung *peri* zu 5-H (welches im übrigen keine Korrelation im  $^{15}\text{N}$ -HMBC zeigte). Zudem wies die chemische Verschiebung des Stickstoffes mit *ca.* -252 ppm deutlich auf die tautomere Chinolonstruktur **27** im Gegensatz zu der Hydroxyisochinolinstruktur **23** hin, da für letztere eine  $^{15}\text{N}$ -Verschiebung im Bereich von -100 ppm zu erwarten gewesen wäre.<sup>[77]</sup>

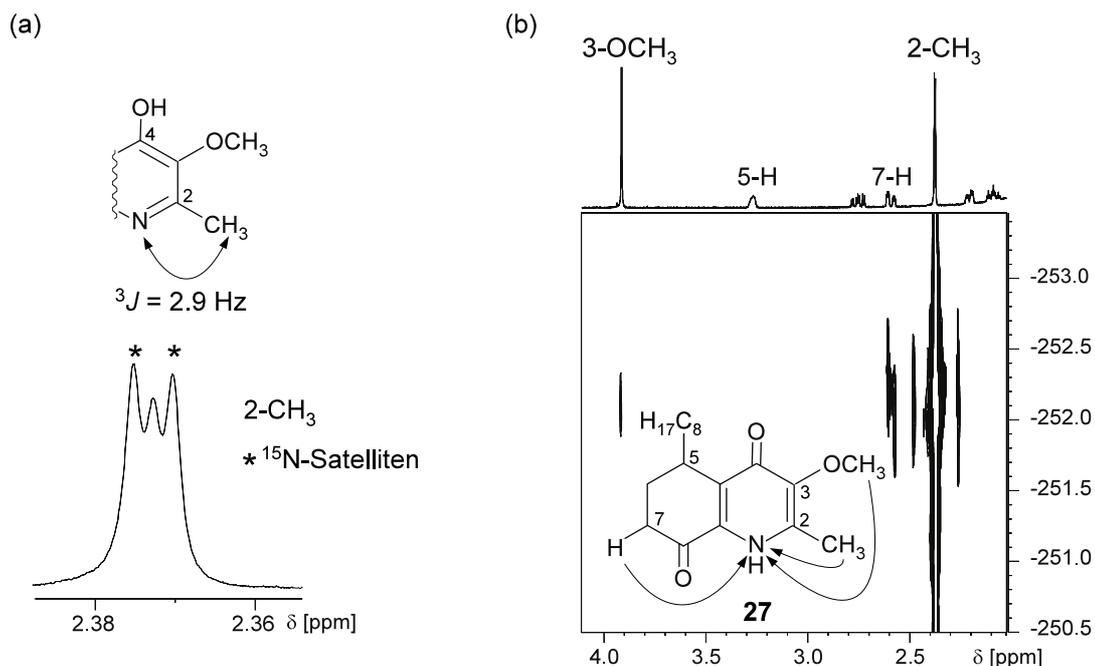


Abb. 9. (a) Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR von  $^{15}\text{N}$ -angereicherten Antidesmon und Identifikation des  $\text{N}=\text{CH}_3\text{-C}(\text{OCH}_3)=\text{C}(\text{OH})$ -Strukturelementes nach Zuordnung einer  $^3J(\text{N},\text{H})$ -Kopplung zwischen 2- $\text{CH}_3$  und  $^{15}\text{N}$ ; (b)  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMBC-Korrelationen favorisieren die Pyridonstruktur **27**

Der endgültige Beweis für die Struktur **27** gelang durch ein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experiment. Bedingt durch den hohen  $^{15}\text{N}$ -Markierungsgrad zeigten die Signale von C-2 und C-9 deutliche  $^{15}\text{N}$ -Satelliten mit einer Kopplungskonstante von 16.2 bzw. 14.6 Hz (Abb. 10, unten). Dabei entsprach die Größe der Aufspaltung ( $> 11$  Hz) eindeutig einer  $^1J$ -Kopplung. Dieser Befund war glücklich, da in vereinzelt Fällen (z.B. in Pyridin)  $^2J(^{13}\text{C}, ^{15}\text{N})$ -Kopplungen eine größere Aufspaltung zeigen als  $^1J(^{13}\text{C}, ^{15}\text{N})$ -Kopplungen, nie jedoch den Wert von *ca.* 11. Hz überschreiten.<sup>[77]</sup> Auf Grund der Größe waren in diesem Fall jedoch beide Kopplungen von C-9 und C-2 als  $^1J(^{13}\text{C}, ^{15}\text{N})$ -Kopplung zweifelsfrei identifizierbar.<sup>[153]</sup>

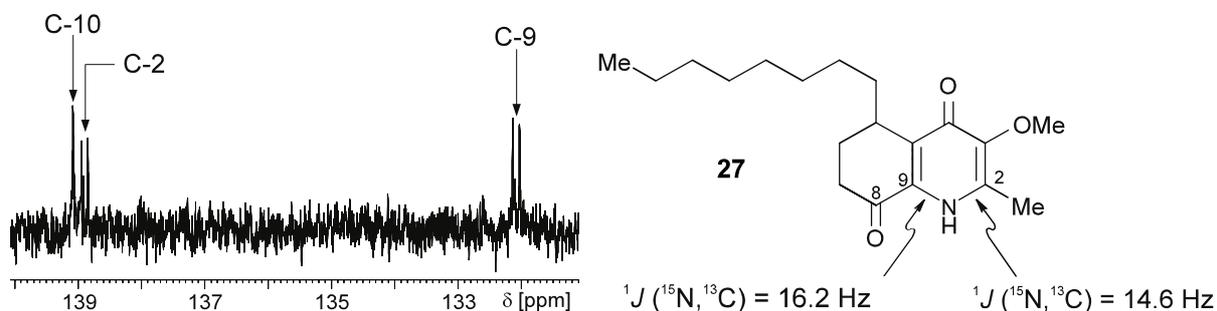


Abb. 10.  $^{15}\text{N}$ -Satelliten der zum Chinolonstickstoff benachbarten Kohlenstoffe C-9 und C-2 im  $^{13}\text{C}$ -NMR und revidierte Struktur von Antidesmon (**27**)

Auf diese Weise gelang nicht nur eine Identifizierung des  $\text{N}-\text{CH}_3=\text{C}(\text{OCH}_3)-\text{C}(\text{OH})$ -Strukturelementes, sondern auch die Bestimmung der Konnektivität zwischen der Stickstoff-

Funktion und C-9, so daß Antidesmon unzweifelhaft die Struktur **27** zugeordnet und die Alternativstruktur **26** (Abb. 8, Seite 24) verworfen wurde.

### 2.3.2.3 Einschub: Chemische Derivatisierung und CD-Berechnung der absoluten Konfiguration

Die oben beschriebenen Arbeiten wurden von Buske<sup>[44]</sup> zum Anlaß genommen, die Strukturrevision durch neuerliche NMR-Untersuchungen an **27** und seinen synthetisch hergestellten methylierten Derivaten nachzuvollziehen.<sup>[44,154]</sup> Die Voraussetzung dafür schuf er mit der Isolierung von *ca.* 9 mg **27** aus der Art *A. venosum*, die einen wesentlich höheren Alkaloidgehalt als *A. membranaceum* aufweist. Long-range-HMBC-Experimente mit einem speziellen, hochsensitiven Mikroprobenkopf deckten schließlich eine weitreichende Korrelation zwischen 5-H und C-4 (Abb. 11, unten) auf, die die zuerst publizierte Struktur **7**<sup>[41]</sup> eindeutig widerlegte. Diese Wechselwirkung war von ihm in früheren Versuchen nicht beobachtet worden.

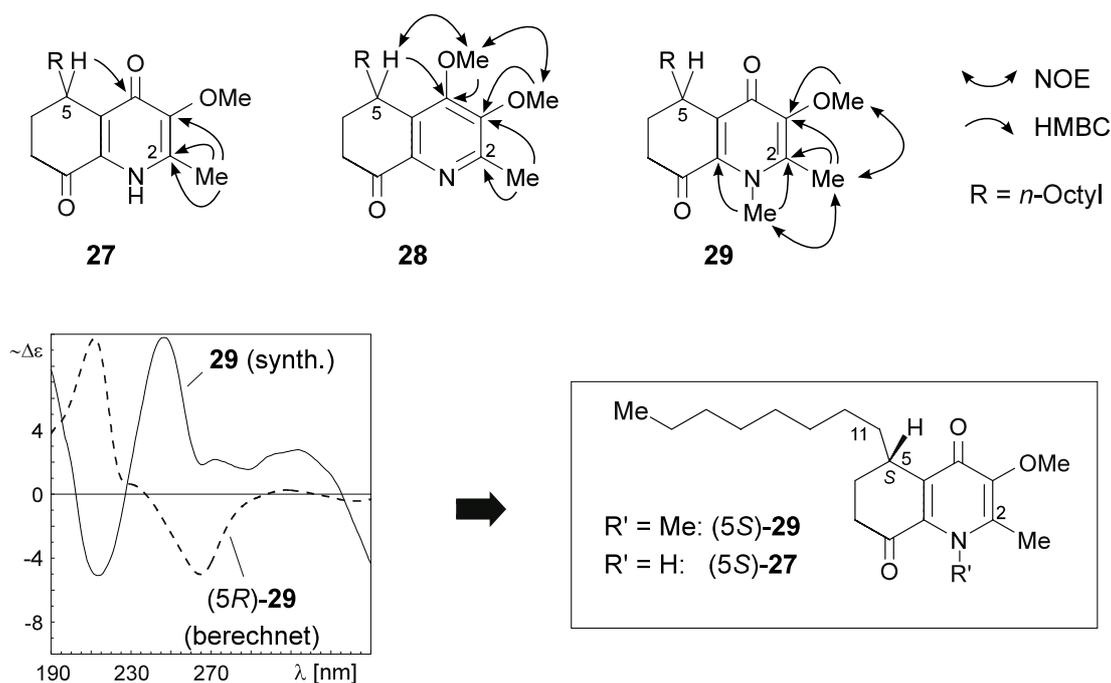


Abb. 11. Strukturbestätigende NMR-Untersuchungen an **27** und den *O*- und *N*-Methyl-Derivaten **28** und **29**; MD-basierte CD-Berechnungen (an **29**) bestimmten die absolute Konfiguration zu (5*S*) für Antidesmon (**27**)

Zum vollständigen Strukturbeweis auf diesem alternativen Weg wurden nach Vorschlag aus unserer Gruppe durch Methylierung von **27** mit Diazomethan die *O*- und *N*-Methyl-Derivate **28** und **29** hergestellt. ROESY- und HMBC-Experimente ermöglichten daraufhin eine eindeutige Zuordnung des heterocyclischen Grundgerüsts innerhalb des Gesamtmoleküls

(Abb. 11, Seite 27). Die durch die Inkorporationsexperimente erzielte Strukturaufklärung wurde durch diese Arbeiten bestätigt.

Einen großen Wert besaßen die synthetisch hergestellten Derivate jedoch zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von **27**, die von Mühlbacher durchgeführt wurde.<sup>[41]</sup> Da der CD-Einfluß des Hydroxypyridin-Pyridon-Tautomerengleichgewichts von **27** mit Hilfe der benutzten MD-Simulationstechnik<sup>[155]</sup> nicht zufriedenstellend berechenbar war, wurden stattdessen die CD-Spektren der beiden Enantiomere des *N*-Methylderivates **29** computerchemisch simuliert. Ein Vergleich mit dem experimentell gemessenen CD-Spektrum zeigte eine (*S*)-Konfiguration an C-5 für **29**, und damit auch für **27** und **28** (Abb. 11, Seite 27).

Diese Ergebnis wirft die interessante Fragestellung nach der absoluten Konfiguration anderer Antidesmonalkaloide aus südamerikanischen Arten auf (Abb. 12, unten). Tinto *et al.* isolierten aus *Hyeronima alchorneoides* (Euphorbiaceae) ein an C-8 zum Alkohol reduziertes Derivat von **27**, nämlich Hyeronimon (**30**) und dessen 8-Monoacetat **31**,<sup>[156]</sup> ohne jedoch eine stereochemische Aussage zu machen. Desweiteren fanden Zani *et al.* in *Hyeronima oblonga* (Euphorbiaceae) ebenfalls **27**, ordneten dem Alkaloid jedoch zuerst die inkorrekte Isochinolin-Struktur **32** zu und benannten es Hyeronin A.<sup>[157]</sup> Ein Vergleich authentischer Referenzen von "Hyeronin A" und Antidesmon (**27**) zeigte jedoch, daß beide Naturstoffe identische chromatographische und physikalische Eigenschaften aufwiesen.<sup>[44]</sup> Daraufhin wurde die Struktur **32** revidiert. Die Struktur eines kürzerkettigen Analogons von **32**, nämlich von Hyeronin B (**33**), muß im Licht dieser Ergebnisse ebenfalls in Frage gestellt werden. Tatsächlich dürfte es sich bei Hyeronin B ebenfalls um ein Antidesmon-Derivat handeln.

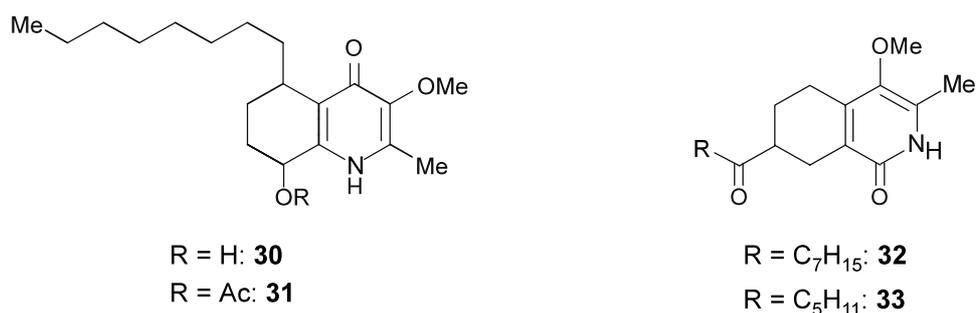


Abb. 12. Weitere Vertreter der Antidesmon-Klasse: Hyeronimon (**30**) und sein 8-Monoacetat **31** aus *Hyeronima alchorneoides*, und die inkorrekten Strukturen **32** und **33** aus *Hyeronima oblonga*

Eine abschließende Strukturuntersuchung zu den von Zani *et al.* gefundenen Alkaloiden bzw. Untersuchungen zur absoluten Konfiguration könnte interessante Informationen bzgl. einer enantiospezifischen Produktion dieser Alkaloidklasse liefern.

### 2.3.3 Weitere Untersuchungen zur Biogenese von Antidesmon (27)

#### 2.3.3.1 Verfütterung von (D)-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Glucose

Die Verfütterung von [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-NaOAc hatte eine weitgehend acetogenine Herkunft von **27** bewiesen. Im Molekülgerüst zeigten lediglich die Atome C-2 und 2-CH<sub>3</sub> keinerlei Isotopenmarkierung (Abb. 13a, unten). Zur genaueren Untersuchung der Herkunft dieses Molekülfragments wurde eine andere universelle Vorstufe, nämlich uniform markierte (D)-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Glucose, an die Zellkulturen verfüttert. <sup>13</sup>C-NMR-Spektren des daraus erhaltenen **27** offenbarten ein im Vergleich zum Acetat-Versuch weitgehend identisches Einbaumuster schwächerer Intensität (Abb. 13b, unten).

Im Gegensatz zur Acetat-Verfütterung zeigten jedoch auch die Signale von C-2 und 2-CH<sub>3</sub> <sup>13</sup>C-Satelliten, stammten also aus einer gemeinsamen Vorstufe, die wiederum aus Glucose gebildet worden war. Die Intensität der <sup>13</sup>C-Satelliten an den beiden Positionen war wiederum geringer als die aller anderen, Acetat-markierten Kohlenstoffatome im Molekül, wie z.B. von C-18. Offensichtlich diente Glucose in diesem Experiment sowohl als Ausgangspunkt für Acetat bzw. Malonat als auch für die immer noch unbekanntene Vorstufe zu C-2 und 2-CH<sub>3</sub>.

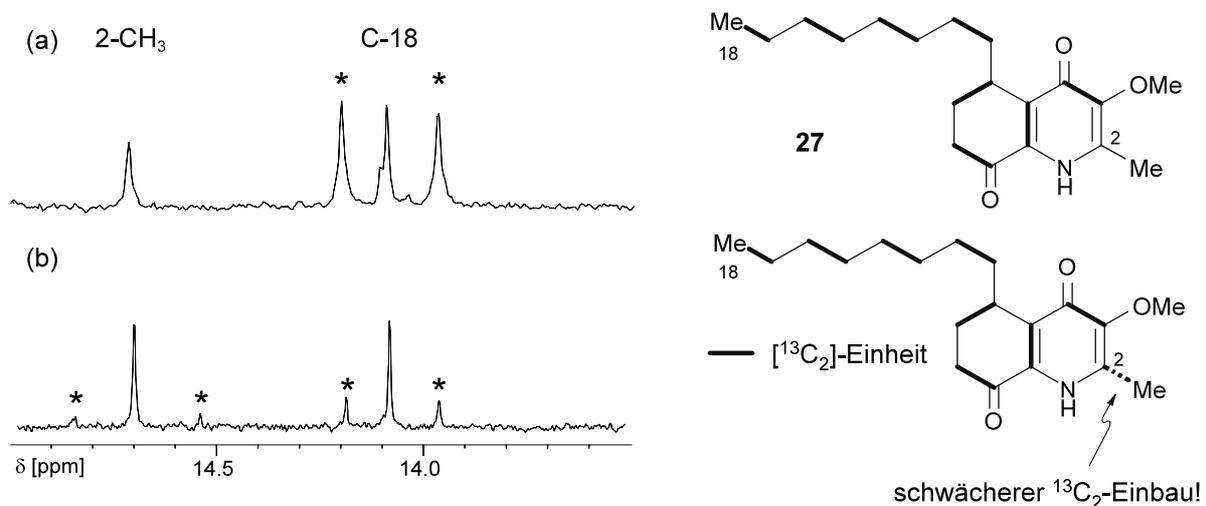
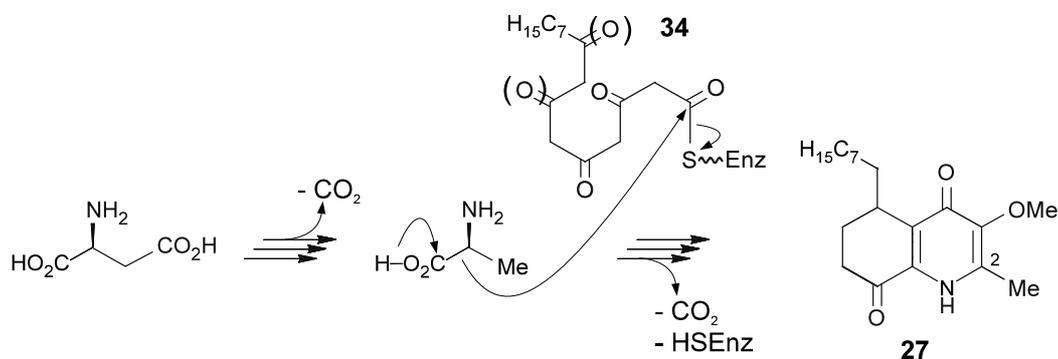


Abb. 13. Ausschnitte des <sup>13</sup>C-NMR-Spektrums von **27** und gefundene <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Markierungsmuster nach Verfütterung von (a) [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-NaOAc und (b) (D)-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Glucose (<sup>13</sup>C-Satelliten sind mit \* gekennzeichnet.)

#### 2.3.3.2 Verfütterung von (L)-[<sup>13</sup>C<sub>4</sub>]-Asparaginsäure und (L)-[<sup>13</sup>C<sub>3</sub>, <sup>15</sup>N]-Alanin

Da die C-2/2-CH<sub>3</sub>-Einheit nicht-acetogenen Ursprungs war, sich aber gleichzeitig in direkter Nachbarschaft der Stickstoff-Funktion von **27** befand, lag die Vermutung des Einbaus einer intakten C<sub>2</sub>N-Einheit, z.B. aus einer Aminosäure, nahe. Im Lichte der Glucose-Verfütterung

erschieden die glucogene Aminosäure Alanin oder ein carboxyliertes Alanin-Analogon wie Asparaginsäure als mögliche Vorstufen geeignet (Schema 9, unten).



Schema 9. Denkbare Vorstufen der C<sub>2</sub>N-Einheit in Antidesmon (**27**): Asparaginsäure oder Alanin

Demnach könnte ein C<sub>2</sub>-Baustein (der nach Decarboxylierung entweder Asparaginsäure oder Alanin entstammte) das Polyketid **34** nucleophil angreifen, die Enzymfunktion abspalten und anschließend einen Teil des Heterocyclus bilden. Ein mechanistisch verwandte Reaktion findet bei der Pyridoxalphosphat-assistierten Biosynthese von  $\delta$ -Aminolävulinsäure statt.<sup>[83]</sup> Dabei wird formal Glycin decarboxyliert und der entstehende C<sub>1</sub>N-Baustein nucleophil an Succinyl-CoA addiert.

Tatsächlich ließen sich nach der Verfütterung von (L)-[<sup>13</sup>C<sub>4</sub>]-Asparaginsäure von eingebauten <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Einheiten hervorgerufene <sup>13</sup>C-Satelliten sowohl im acetogeninen Teil als auch im C-2/2-CH<sub>3</sub>-Baustein identifizieren, ein Befund, der prinzipiell eine Herkunft des C<sub>2</sub>N-Bausteines aus Alanin stützt (Abb. 14a, unten).

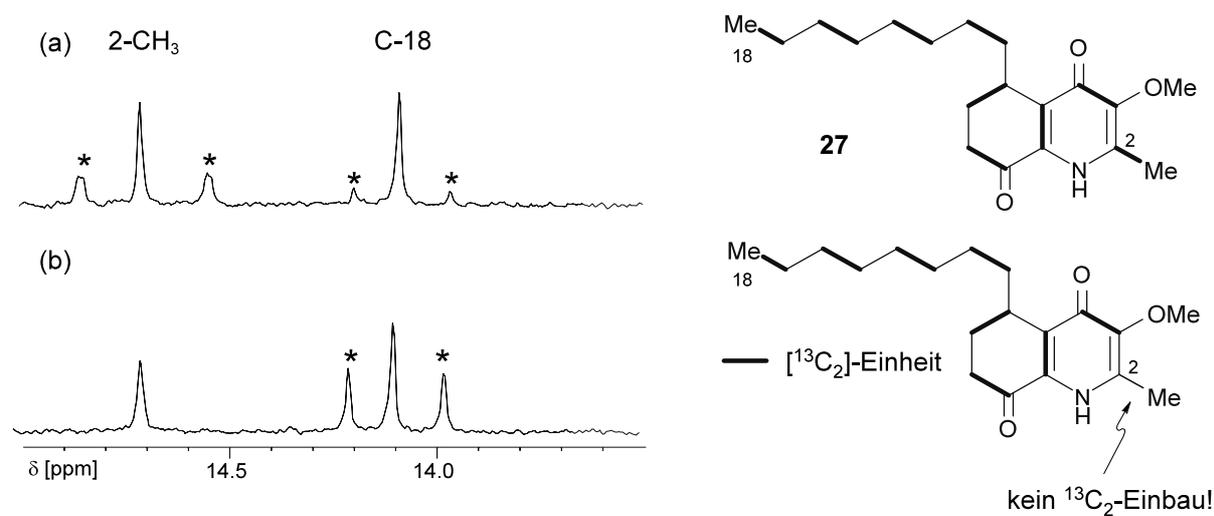


Abb. 14. Ausschnitte des <sup>13</sup>C-NMR-Spektrums von **27** und gefundene <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Markierungsmuster nach Verfütterung von (a) (L)-[<sup>13</sup>C<sub>4</sub>]-Asparaginsäure und (b) (L)-[<sup>13</sup>C<sub>3</sub>, <sup>15</sup>N]-Alanin (<sup>13</sup>C-Satelliten sind mit \* gekennzeichnet.)

Die Verfütterung von (L)-[ $^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$ ]-Alanin selbst jedoch widerlegte diese Hypothese: Wider Erwarten zeigte **27** zwar ein Acetateinbaumster (vermutlich über Pyruvat), aber keinen  $^{13}\text{C}_2$ -Einbau innerhalb der  $\text{C}_2\text{N}$ -Einheit (Abb. 14b, Seite 30).

Weiterhin wurde in vergleichenden  $^{15}\text{N}$ -HMBC-Experimenten nur eine schwache Anreicherung von  $^{15}\text{N}$  gefunden, die aufgrund mangelnder Auflösung im  $^1\text{H}$ -NMR nicht einmal quantifizierbar war. Offensichtlich diente Alanin über eine Desaminierung als Acetat- (via Pyruvat) und Stickstoff-Quelle, wurde jedoch nicht als direkte Vorstufe für die  $\text{C}_2\text{N}$ -Einheit metabolisiert.

Im Lichte dieser Ergebnisse mußte die Rolle von Asparaginsäure als Vorstufe für Alanin revidiert werden. Auch ließen sich keine Hinweise auf die Beteiligung eines Alanin-verwandten  $\text{C}_3$ -Intermediates finden. Allerdings waren die Satellitensignale an C-2 und 2- $\text{CH}_3$  intensitätsstärker als die im acetogeninen Teil des Moleküls, so daß Asparaginsäure eindeutig als spezifische Vorstufe für die nicht-acetogenine  $\text{C}_2$ -Einheit in **27** diente.

### 2.3.3.3 Verfütterung von [ $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ ]-Glycin und (L)-[O- $^{13}\text{CH}_3$ ]-Methionin

Leider gab das Asparaginsäure-Experiment keinen Aufschluß darüber, welcher Teil des  $\text{C}_4$ -Bausteins tatsächlich in die  $\text{C}_2$ -Einheit Eingang gefunden hatte, und ob überhaupt eine  $\text{C}_2\text{N}$ -Einheit *in toto* in **27** einbaut worden war. Als noch spezifischere (und konsequent kleinste denkbare) Vorstufe bot sich die Aminosäure Glycin an. Bei der Verfütterung von [ $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ ]-Glycin wurde tatsächlich Glycin als intakte  $\text{C}_2\text{N}$ -Einheit in **27** eingebaut (Abb. 15, unten).

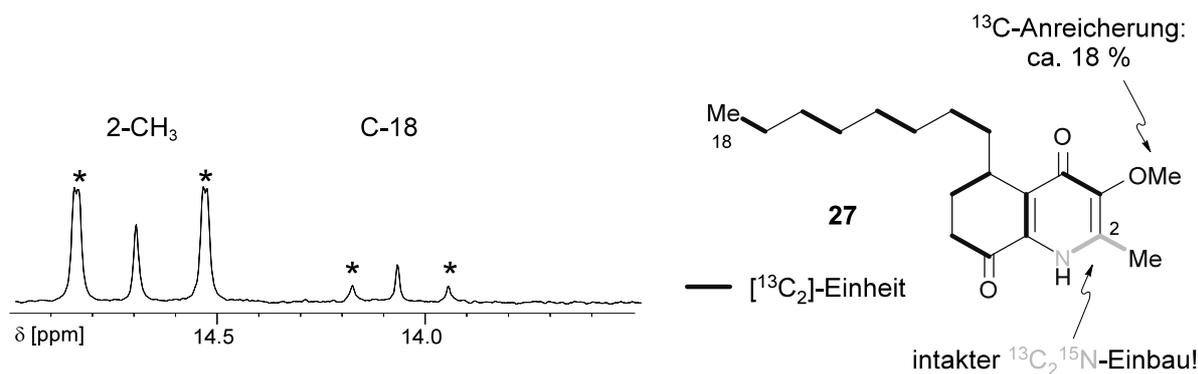


Abb. 15. Ausschnitt des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums von **27** und gefundenes  $^{13}\text{C}$ -Markierungsmuster nach Verfütterung von [ $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ ]-Glycin ( $^{13}\text{C}$ -Satelliten sind mit \* gekennzeichnet.)

Der  $\text{C}_2\text{N}$ -Einbau wurde durch die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analyse des Signals von 2- $\text{CH}_3$  belegt. Dieses zeigte im protonenentkoppelten  $^{13}\text{C}$ -NMR zwei  $^{13}\text{C}$ -Satelliten mit Dublettstruktur: Die größere Kopplung mit 46.5 Hz entsprang der direkten  $^1J(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung mit C-2, während die kleinere Aufspaltung der  $^{13}\text{C}$ -Satelliten mit 1.5 Hz einer  $^2J(^{13}\text{C}, ^{15}\text{N})$ -Kopplung zugeordnet

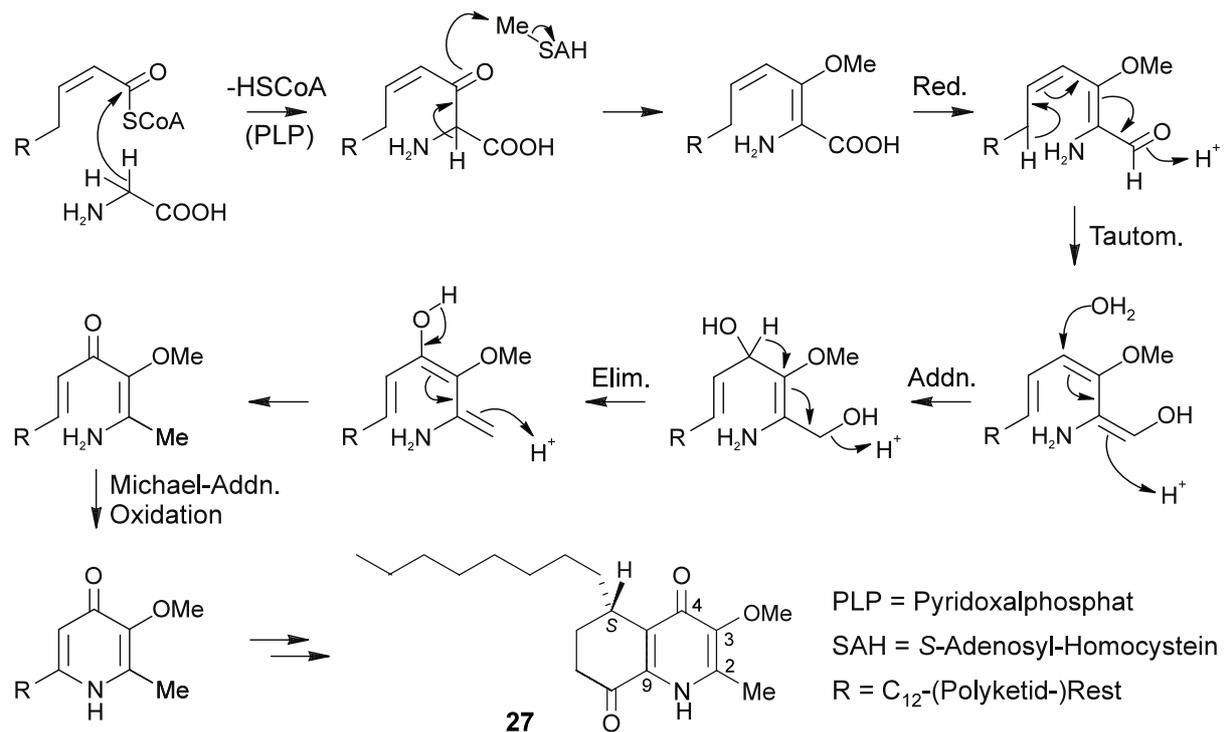
wurde. Das C-2-Signal wies ebenfalls eine  $^1J(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})$ -Kopplung mit 46.4 Hz und eine  $^1J(^{13}\text{C}, ^{15}\text{N})$ -Kopplung mit 14.9 Hz auf. Die Existenz der  $(^{13}\text{C}, ^{15}\text{N})$ -Kopplungen bestätigte ein  $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}\}$ -entkoppeltes  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experiment, in dem alle durch die  $^{15}\text{N}$ -Markierung verursachten Dubletts als Singulets erschienen.

Entscheidend für die Analyse war die Form des Aufspaltungsmusters, eines Dubletts von Dubletts mit dem Intensitätsverhältnis 1:1:1:1, das nur nach einem intakten Einbau der  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -Einheit, nicht aber nach einem C-N-Bindungsbruch mit anschließendem statistischem  $^{15}\text{N}$ -Einbau möglich ist. Der intakte, sehr starke Einbau\* der  $\text{C}_2\text{N}$ -Einheit bewies die Rolle von Glycin als direkte Vorstufe für **27**. Der in diesem Fragment erzielte  $^{13}\text{C}_2$ -Einbau bei Verfütterung von (D)- $^{13}\text{C}_6$ -Glucose und (L)- $^{13}\text{C}_4$ -Asparaginsäure erklärt sich damit über intermediär gebildetes Glycin. Zwar findet Asparaginsäure als Quelle für Glycin in der Fachliteratur keine gesonderte Erwähnung, jedoch ist die Umwandlung gut vorstellbar, da alle dafür notwendigen Enzyme (z.B. Aminotransferase, Malat-Dehydrogenase, Malat-Synthase) in Pflanzen bekannt sind.<sup>[150]</sup>

Damit besteht der Schlüsselschritt der Biogenese des Antidesmons (**27**) wahrscheinlich in der Kondensation eines  $\text{C}_{16}$ -Polyketidkörpers **34** (vermutlich in Form des Thioesters, Schema 9, Seite 30) mit der C-2-Funktion von Glycin. Diese Reaktion könnte unter Beteiligung von Pyridoxalphosphat enzymatisch katalysiert ablaufen (Schema 10, Seite 33).

Der Pyridongrundkörper von Antidesmon (**27**) würde schließlich - nach einer Reihe von Transformationen, wie der *O*-Methylierung an C-3, der Oxygenierung an C-4 und weiteren Tautomerisierungs-, Eliminierungs- und Reduktionsschritten - durch einen oxidativen Ringschluß zwischen der Aminofunktion und dem späteren Kohlenstoff C-9 von **27** gebildet. Die initiale Synthese des Pyridon-Grundkörpers und die sich erst dann anschließende Bildung des carbocyclischen Ringes wird auch durch das Auftreten strukturell ähnlicher Naturstoffe mit 3-Methoxy-2-methyl-1,4-pyridon-Baustein gestützt (Abb. 16, Seite 33).

\* Sogar im  $^1\text{H}$ -NMR waren  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Satelliten von  $2\text{-CH}_3$  mit einem Markierungsgrad von ca. 25% detektierbar.



Schema 10. Hypothetischer mechanistischer Verlauf der Biosynthese der heterocyclischen Ringe von Antidesmon (27)

Weitere Alkaloide mit einem ähnlichen Pyridonbaustein (Abb. 16, unten) wurden auch in *Melochia*-Arten gefunden. Spiteller *et al.* isolierten aus *M. pyramidata* (Sterculiaceae) die Alkaloide **35**, **36** und **37** der Melochinin-Gruppe.<sup>[158,159]</sup> Diese gelten als die Ursache der Rinderlähmung bei Weidetieren. Vorher hatten schon Yasue und Kawamura das glycosylierte Pyridon Innovanim (**38**) in *Evodiopanax innovans* (Araliaceae) gefunden.<sup>[160]</sup> Gerade bei der Melochinin-Gruppe wäre aufgrund des langen aliphatischen, offensichtlich acetogeninen Restes eine Cyclisierung zu einem Antidesmon-artigen Alkaloid denkbar. Daß auch mehrere annelierte Ringe auftreten können, demonstriert das Beispiel des Chinolon-Alkaloids Melochinon (**39**) aus *M. tormentosa*, für das eine Entstehung aus Anthranilsäure und Pyruvat postuliert wurde.<sup>[161]</sup> Leider wurden bei keinem dieser Naturstoffe die Biogenese untersucht.

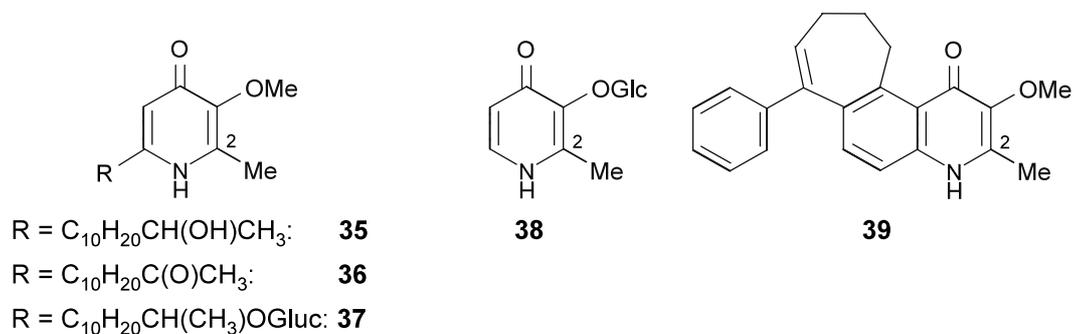
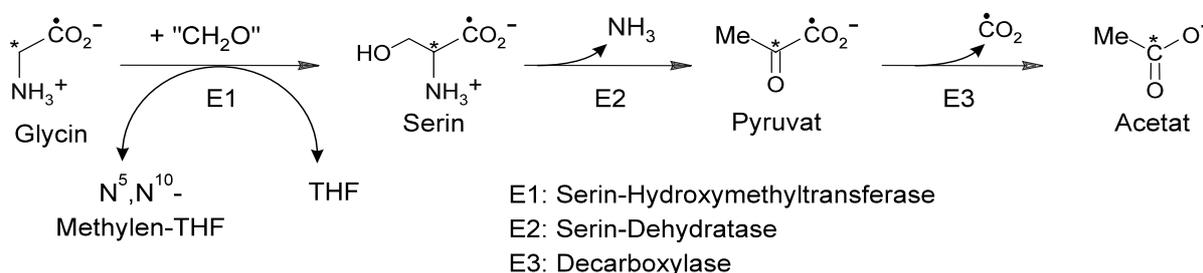


Abb. 16. Dem Antidesmon (27) strukturell ähnliche Naturstoffe mit 3-Methoxy-2-methyl-1,4-pyridon-Baustein

Bemerkenswert erscheint in der Biosynthese von **27** auch die "formale" Reduktion\* der Carboxylgruppe des Glycins zur 2-Methylgruppe (Schema 10, Seite 33). Allerdings ist dieser Vorgang durch Beispiele plausibilisierbar. So wiesen Reichling *et al.* für Phenylpropanoide in *Pimpinella anisum* nach, daß die Carboxylgruppe des Eduktes (L)-Phenylalanin über mehrere Tautomerisierungs- bzw. Reduktionsschritte in eine Methylgruppe umgewandelt wird.<sup>[162]</sup> Leider erbrachte eine Verfütterung von [1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-Glycin an *A. membranaceum*, die an der 2-Methylgruppe <sup>13</sup>C-markiertes **27** hätte liefern sollen, kein signifikantes Ergebnis, so daß diese Reduktion weiterhin als Hypothese behandelt werden muß, welche allerdings durch den intakten Glycin-Einbau nachhaltig unterstützt wird.

Weiterhin diene Glycin in diesem Verfütterungsexperiment auch als Methyl-Quelle für die Methoxyfunktion Gruppe an C-3. Eine <sup>13</sup>C-Anreicherung war aufgrund der prominenten <sup>13</sup>C-Satelliten im <sup>1</sup>H-NMR (18% Satellitenintensität relativ zum Zentralpeak) belegbar. Die Rolle von Glycin als potentiellm Kohlenstoffdonor für das (mutmaßliche) Methylierungagens (*S*)-Adenosyl-Methionin (SAM) über den Tetrahydrofolat-C<sub>1</sub>-Stoffwechsel ist in der wissenschaftlichen Literatur hinreichend dokumentiert.<sup>[83]</sup> Daß Methionin an der Methylierung der Sauerstoff-Funktion an C-3 tatsächlich beteiligt war (s.o.), belegte ein im Anschluß durchgeführtes Verfütterungsexperiment mit (L)-[O-<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]-Methionin, bei dem nach der Isolierung von **27** eine ca. 15proz. <sup>13</sup>C-Anreicherung der 3-OMe-Gruppe per <sup>1</sup>H-NMR nachgewiesen wurde.

Überraschenderweise zeigten sich im acetogeninen Teil des Moleküls typische <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Einbaumuster, welche sich nur durch eine direkte Umwandlung der C<sub>2</sub>-Einheit des Glycins in die C<sub>2</sub>-Einheit einer Acetat-Vorstufe erklären ließen. Allerdings ist diese Transformation nicht ohne weiteres mit dem bekannten oxidativen Abbau von Glycin zu Acetat zu erklären (Schema 11, unten).

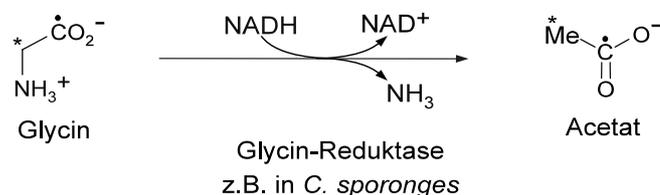


Schema 11. Konventioneller oxidativer Abbau von Glycin zu Acetat unter Beteiligung von Tetrahydrofolat (THF) (Die dem Glycin entstammenden Acetat-Kohlenstoffatome sind mit \* und • gekennzeichnet.)

\* Dabei handelt es sich natürlich nicht um eine direkte Reduktion der Carboxylgruppe zur Methylgruppe, sondern vielmehr um eine komplexe Abfolge verschiedener chemischer Reaktionen (Reduktion, Tautomerisation, Wasseraddition und -eliminierung, usw.) (Schema 10, Seite 33).

In diesem "konventionellen" Glycin-Abbau stammt nur eines der beiden Kohlenstoffatome des resultierenden Acetats aus dem Edukt Glycin, während die Acetat-Methylgruppe dem C<sub>1</sub>-Tetrahydrofolat-Stoffwechsel entspringt.<sup>[83,163]</sup> Im aktuellen Verfütterungsexperiment würde bei diesem Verlauf daher die <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-Bindung des markierten Glycins gespalten, und als Produkt würde [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-Acetat entstehen, das eingebaut keine <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-Kopplungsmuster hervorrufen könnte. Allerdings ist zu beachten, daß auch die aus dem C<sub>1</sub>-Stoffwechsel an Glycin angefügte Hydroxymethylgruppe aus Glycin entstehen kann. Demnach wäre es theoretisch möglich, daß "uniform" <sup>13</sup>C-markiertes Serin aus zwei Molekülen [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>,<sup>15</sup>N]-Glycin, das in unphysiologisch hohen Konzentrationen im Verfütterungsversuch vorlag, aufgebaut wurde. Die Bildung von [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-Acetat wäre damit erklärbar. Trotzdem kann dieser Weg nicht ohne weiteres als plausibel angesehen werden, da prinzipiell die Verknüpfung von zwei markierten Vorstufen auf zwei verschiedenen (!) metabolischen Wegen eine relativ geringe Wahrscheinlichkeit besitzt, so daß über hypothetische Alternativrouten nachgedacht werden sollte.

Im Gegensatz zu Pflanzen<sup>[163]</sup> sind in anaeroben Bakterien mehrere Metabolismuswege bekannt, bei denen Glycin durch eine Glycin-Reduktase ohne Bindungsbruch zu Acetat (bzw. Acetat-Phosphat) umgesetzt wird. Bei der nach Stickland benannten Reaktion in *Clostridium sporonges*<sup>[164]</sup> liefert die Reduktion von einem Mol Glycin zu Acetat-Phosphat jeweils ein Äquivalent NAD<sup>+</sup> und ATP unter Abspaltung von Ammoniak.



Schema 12. Reduktive Desaminierung von Glycin zu Acetat nach Stickland

Andere Bakterienarten benutzen Glycin nicht nur als Energie- (= ATP-), sondern auch als Kohlenstoff- bzw. Acetat-Quelle. Nach Dürre und Andreesen<sup>[165]</sup> fermentiert das Bakterium *Clostridium purinolyticum* Glycin als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle, wobei 1 Mol Glycin vollständig zu CO<sub>2</sub> oxidiert wird und 3 Mol Glycin unter Ammoniakabspaltung zu Acetat reduziert werden. Dieser Metabolismusweg von Glycin zu Acetat wäre in Einklang mit dem in 27 gefundenen Einbaumuster. Ob dieser Metabolismusweg auch in *A. membranaceum* (oder vielleicht auch nur in deren Zellkulturen) beschrieben wird, bleibt ohne nähere enzymologische Untersuchungen und Verfütterungsexperimente unklar.

### **3 Anwendung HPLC-gekoppelter Analysemethoden (HPLC-NMR, HPLC-ESI-MS/MS, HPLC-CD) in der Naturstoffchemie**

#### **3.1 Vorstellung der "Triade" HPLC-NMR, HPLC-ESI-MS/MS, HPLC-CD**

Die folgenden Kapitel sollen dem Leser dieser Dissertationsschrift kurz in die fachlichen Grundlagen der hier benutzten Analysemethoden einführen und ihm das Verständnis für die beschriebenen Experimente erleichtern. Ein umfassender fachlicher Überblick jedoch würde den Umfang dieser Dissertationsschrift um ein Vielfaches übersteigen. Für ein vertieftes Studium der jeweiligen analytischen Techniken möchte ich den geeigneten Leser auf die in den entsprechenden Teilkapiteln zitierten Literaturstellen, Übersichtsartikel und Bücher verweisen.

##### **3.1.1 Grundlagen der HPLC-NMR-Kopplung**

Die HPLC-NMR-Kopplung wurde vor *ca.* 20 Jahren zeitgleich von Watanabe<sup>[166,167]</sup> und Bayer<sup>[168]</sup> eingeführt und findet ihre Anwendung heutzutage v.a. im Bereich der Polymeranalytik,<sup>[169]</sup> von pharmakologischen Metabolituntersuchungen,<sup>[170]</sup> der Charakterisierung von Peptidbibliotheken,<sup>[171]</sup> der Untersuchung dynamischer Phänomene,<sup>[172]</sup> der Umweltanalytik,<sup>[173]</sup> der Lebensmittelanalytik<sup>[174,175]</sup> und der Naturstoffchemie.<sup>[176-179]</sup> Ein HPLC-NMR-System besteht aus einem HPLC-Baustein, d.h. einer möglichst pulsationsfreien, wenigstens ternären HPLC-Pumpe, einem Injektionsventil, einer HPLC-Säule und einem Detektorsystem (UV, DAD oder MS), und dem NMR-Baustein, einem leistungsfähigen Hochfeldspektrometer,<sup>[180,181]</sup> das mit einem speziellen Flußprobenkopf bestückt ist. Letzterer ähnelt im Bau einer Glaskapillaren, die innerhalb der Radiofrequenzspule des Probenkopfes im Magneten positioniert ist. Die aktiven Volumina der Meßzellen bewegen sich im Bereich von 30-240 µl für die analytische HPLC-NMR und 200-400 nl für die Kapillar-HPLC-NMR (cHPLC-NMR).<sup>[182]</sup> PEEK-Kapillaren und eine Ventilschalteneinheit, die im Falle des Stillstandes der Pumpe den Zugang zum Flußprobenkopf verschließt und so die Diffusion in den Kapillaren vermindert, verbinden den UV-Detektor mit dem NMR-Probenkopf (Abb. 17, Seite 37).<sup>[39,40,183]</sup>

Nach ihrer Injektion werden die Bestandteile der Probe auf der HPLC-Säule getrennt, eluieren sequentiell in die UV-Zelle und anschließend in den Probenkopf. Dabei kann das NMR-Spektrometer im continuous-flow-Modus durch kontinuierliche Spektrenaufnahme als HPLC-Detektor dienen. Alternativ steht die Probe im stop-flow-Modus über Stunden hinweg im Probenkopf isoliert für Experimente zur Verfügung. Letztere Vorgehensweise ermöglicht

zeitintensivere 2D-Hochauflösungs-Experimente (COSY,<sup>[184]</sup> ROESY,<sup>[36]</sup> NOESY,<sup>[185]</sup> TOCSY<sup>[186]</sup>) mit dem Ziel der Strukturaufklärung oder -bestätigung. Diffusion und dadurch verursachte Probleme wie Peakverbreiterung treten wegen der niedrigen Kapillardurchmesser und der Ventilschalteneinheit nicht in nennenswertem Umfang auf.

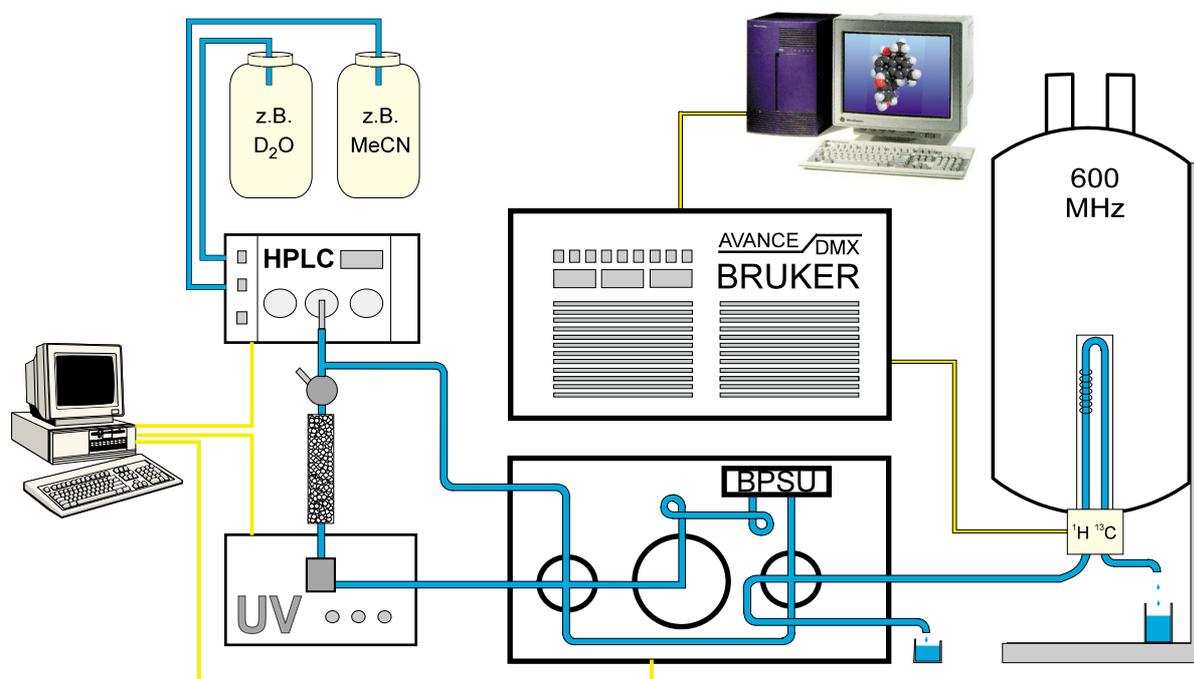


Abb. 17. Schematischer Aufbau einer HPLC-NMR-Anlage

Analog zur offline-NMR sind auch Heterokern-Experimente möglich, allerdings in manchen Fällen mit Abstrichen bzgl. der Sensitivität. Dies resultiert aus der Bauart der Probenköpfe, die zumeist für Protonenexperimente optimiert sind. Beispielsweise ist eine direkte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Beobachtung nur im Falle von  $^{13}\text{C}$ -angereicherten Verbindungen sinnvoll.<sup>[187]</sup> Dagegen können sensitivere indirekte Heterokernexperimente, wie z.B.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC oder  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC,<sup>[188]</sup> oder die schlichte Beobachtung von  $^{13}\text{C}$ -Satelliten mit der HPLC- $^1\text{H}$ -NMR,<sup>[189]</sup> zum gewünschten Ergebnis führen. Die HPLC- $^{19}\text{F}$ -NMR findet dagegen umfangreichere Anwendungen in der Metabolismusforschung.<sup>[190]</sup> Da  $^{19}\text{F}$  ein empfindliches NMR-Isotop ist, welches gleichzeitig in den meisten Organismen als Substituent in organischen Molekülen nicht vorkommt, können Metabolite mit  $^{19}\text{F}$ -Markierung leicht in biologischen Gemischen aufgespürt und strukturelle Transformationen untersucht werden.<sup>[191]</sup> Weitere Heterokernexperimente, wie die direkte on-flow-HPLC- $^{13}\text{P}$ -NMR<sup>[192]</sup> oder die on-flow-HPLC-Deuterium-NMR<sup>[193]</sup>, die zumeist an Urinproben nach der Applikation von synthetischen Vorstufen durchgeführt werden, besitzen nur eine geringe Bedeutung.

Um die bestmögliche Leistungsfähigkeit eines HPLC-NMR-Systems zu erreichen, spielen auch die HPLC-Bedingungen eine große Rolle. Zwar wurde auch bereits über Arbeiten mit Normalphasen-HPLC ("normal phase"),<sup>[194]</sup> Größenausschluß-HPLC ("size exclusion"),<sup>[195,196]</sup> Ionenaustausch-HPLC ("ion exchange")<sup>[197,198]</sup> oder auch chiraler HPLC<sup>[199]</sup> berichtet, durchgesetzt hat sich jedoch im Alltagsgebrauch die Verwendung von C<sub>18</sub>-Umkehrphasen-Säulen ("reversed phase") mit H<sub>2</sub>O, MeCN oder MeOH als Eluenten.<sup>[200]</sup> Jedes dieser Lösungsmittel führt zu intensiven Lösungsmittelpeaks im NMR-Spektrum, die Analytsignale überdecken können. Im Extremfall reicht die dynamische Breite des Analog-Digital-Wandlers des NMR-Spektrometers nicht aus, intensive Solvens-Signale und niedrige Analytsignale in gleicher Weise zu erfassen.<sup>[201]</sup> Letztere werden dann im FID diskriminiert und sind anschließend im Spektrum nicht sichtbar.

Aus diesem Grund werden in der HPLC-NMR-Spektroskopie deuterierte Lösungsmittel wie D<sub>2</sub>O benutzt. Da bei kommerziell erhältlichem D<sub>2</sub>O der Gehalt an Restprotonen normalerweise nur *ca.* 0.01% beträgt, wird auf diese Weise die Intensität des Restwassersignals stark vermindert. Dies beinhaltet gleichzeitig den positiven Nebeneffekt, daß D<sub>2</sub>O als deuterierte Lock-Komponente fungieren kann. Allerdings bedingen selbst diese kleinen Gehalte an Restprotonen in D<sub>2</sub>O noch ein intensives "HOD"-Signal. Damit die NMR-Signale der Analyten in Gegenwart der viel intensiveren Lösungsmittelsignale detektierbar sind, werden die letzteren mit Hilfe von Lösungsmittelunterdrückungs-Sequenzen wie "double presaturation",<sup>[202]</sup> WATERGATE,<sup>[203]</sup> WET,<sup>[204]</sup> oder "excitation sculpting"<sup>[205]</sup> auf ein Minimum reduziert. Im übrigen ist es ratsam, zugesetzte Modifier wie Trifluoressigsäure (TFA), die zur Erreichung eines chromatographisch akzeptablen Ergebnisses oft notwendig sind, ebenfalls in deuterierter Form zuzugeben. Deuterierte organische Eluenten wie CD<sub>3</sub>OD oder CD<sub>3</sub>CN sind dagegen aufgrund ihres vergleichsweise hohen Preises in der analytischen HPLC-NMR wenig verbreitet.

In jüngerer Zeit läßt sich in der HPLC-NMR-Spektroskopie ein Trend zur Miniaturisierung der HPLC- und NMR-Komponenten beobachten.<sup>[206]</sup> So verbraucht die Kapillar-HPLC nur wenige µl Lösungsmittel pro Minute.<sup>[207]</sup> Dies ermöglicht die ökonomische Verwendung von volldeuterten Lösungsmitteln. Folglich entfällt in den Pulsprogrammen die Lösungsmittelunterdrückung, was zu einer erheblichen Zeitersparnis und verbesserter Spektrenqualität beiträgt. Weiterhin zeigen die für die cHPLC-NMR-Kopplung durch die Verkleinerung von Kapillar- und Spulendurchmesser entwickelten Flußprobenköpfe erheblich verbesserte Füllfaktoren,<sup>[208]</sup> die sich aus dem Verhältnis von Meßzellenvolumen zu Spulenvolumen ergeben. Im Falle eines solenoidalen Probenkopfes<sup>[209,210]</sup> wird die Radiofrequenzspule direkt auf die Flußkapillare aufgebracht.<sup>[211]</sup> Dies führt zu exzellenten Nachweisempfindlichkeiten im Pikomolbereich.<sup>[212]</sup>

Ein weiterer Vorteil der cHPLC-NMR-Kopplung liegt auf chromatographischem Gebiet. Die geringeren Durchmesser der cHPLC-Säulen erhöhen die Anzahl theoretischer Trennböden und führen so zu erhöhter Trenneffizienz. Dies schlägt sich in höheren Peakkonzentrationen nieder. Als Faustregel gilt, daß sich die maximale Peakkonzentration umgekehrt proportional zum Quadrat des Säulendurchmessers verhält (Tab. 1, unten).<sup>[213]</sup>

Tab. 1. Typische HPLC-Säulenparameter und resultierende Peakkonzentrationen bei 1 nmol Analyt<sup>[213]</sup>

Säulendurchmesser [mm] und HPLC-Modus	Flußrate [ $\mu\text{l}/\text{min}$ ]	Peakvolumen [ $\mu\text{l}$ ]	Peakkonzentration [mM]
4.6 (analytisch)	1000	200	0.005
1 (Microbore)	30	10	0.1
0.32 (Kapillar)	3	1	1
0.18 (Kapillar)	1	0.3	3

Bei der Umstellung von HPLC auf cHPLC kann demnach die Konzentration des Analyten um zwei Größenordnungen gesteigert werden - ein immenser Gewinn an Spektrenqualität und Meßzeiteinsparung bei identischem Probenverbrauch. Allerdings ist zu beachten, daß diese Vorteile nur in vollem Maße wirksam werden, falls das Meßzellenvolumen des Probenkopfes und die beobachteten Peakvolumina (Peakbreiten) aufeinander abgestimmt sind, d.h. möglichst die gleiche Größe besitzen.<sup>[214]</sup>

### 3.1.2 Grundlagen der HPLC-ESI-MS/MS-Kopplung

Im Gegensatz zur HPLC-NMR stellt die HPLC-MS seit mehr als zwei Jahrzehnten eine leistungsfähige Routinemethode zur Untersuchung polarer, nichtflüchtiger und z.T. auch thermolabiler Substanzen in komplexen Matrizen dar.<sup>[215-218]</sup> Die fast universelle Anwendbarkeit der HPLC-MS wird zum größten Teil durch zwei bei Atmosphärendruck arbeitende Ionisierungstechniken, der APCI- (atmospheric pressure chemical ionization) <sup>[219,220]</sup> und der ESI-Methode (electrospray ionization),<sup>[221,222]</sup> garantiert, wobei letztere sich immer weitere Anwendungsbereiche<sup>[223]</sup> erschließt. Weiterhin gibt es mittlerweile eine große Auswahl an MS-Detektoren, die sich über ein Interface mit einer HPLC-Anlage koppeln lassen.<sup>[224]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich die Elektrospray-Ionisierung in Verbindung mit einem Tandem-Quadrupol-Massenspektrometer (ESI-MS/MS) benutzt. Die weitere Beschreibung wird sich daher auf diese Gerätekombination beschränken.

Ein HPLC-ESI-MS/MS-System besteht im Prinzip aus drei Komponenten: Die HPLC erlaubt die Trennung von Substanzgemischen und die anschließende sequentielle Zuführung der

Analyten im Flüssigkeitsstrom zum Interface, in dem sie ionisiert und dem Massenspektrometer zugeführt werden. Als kritisch erweist sich dabei der Druckgradient zwischen dem Ausgang der HPLC-Kapillaren (*ca.* 1 bar, Atmosphärendruck) und dem Eingang des Massenspektrometers (*ca.*  $10^{-5}$  bar, Hochvakuum). Der Druckgradient wird aufrechterhalten, indem das Lösungsmittel schnell fein verteilt, verdampft und das Gas abgepumpt wird. Bei der ESI wird dieser Vorgang mit einer Potentialspannung von *ca.* 2-7 kV eingeleitet, die an der Eingangskapillaren im Interface anliegt. Durch die induzierte Oberflächenladung zerstiebt die in das Interface geleitete mobile Phase in feine Tröpfchen und ermöglicht einen schnellen Übergang des Lösungsmittels in die Gasphase. Unterstützt wird dieser Verdampfungsvorgang durch einen Gasstrom (zumeist  $N_2$ ), der durch das Interface geführt wird (pneumatically assisted electrospray), und auch durch Erhitzung der verwendeten Eingangskapillare auf bis zu 250°C. Diese Methode erlaubt die Verwendung von HPLC-Flußraten bis hinauf zu 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  und damit HPLC-Anwendungen im "narrow bore"-Bereich (2.0 mm I.D.). Am Ende des Desolvatisierungsvorganges, bei dem die gebildeten Lösungsmitteltröpfchen aufgrund der Coulomb-Ladung immer weiter zerplatzen, entsteht aus den ladungstragenden Analytsubstanzen ein Ionengas, welches mit Hilfe mehrerer elektrostatisch aufgeladener "Linsen" auf den Eingang des Massenspektrometers fokussiert wird. Im Massenspektrometer schließlich werden die einfallenden Ionen in Abhängigkeit ihres Masse/Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) detektiert.<sup>[223-225]</sup>

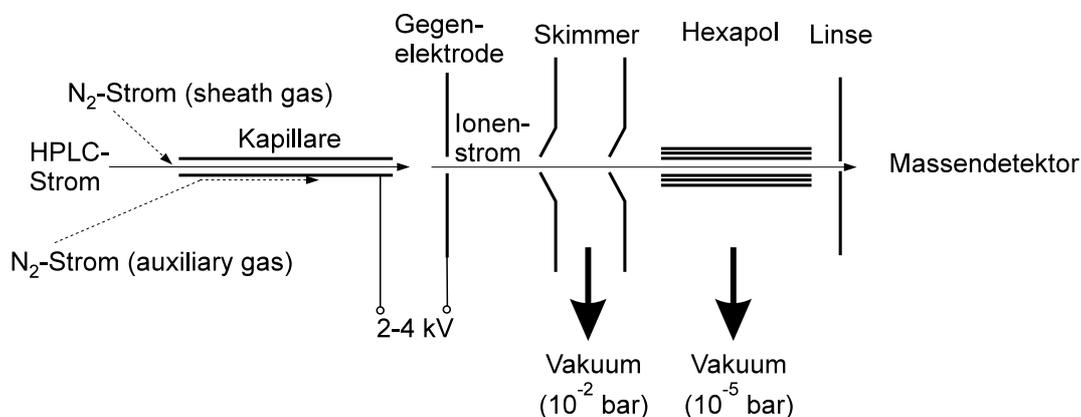


Abb. 18. Schematischer Aufbau einer ESI-Quelle

Da die Eingangskapillare wahlweise positiv oder negativ geladen werden kann, besteht die Wahl zwischen positiver oder negativer Ionisierung der Analyten. So werden basische Moleküle (z.B. Amine) ohnehin leicht vom Lösungsmittel protoniert und deshalb bevorzugt im positiven Modus ionisiert, während acide Verbindungen (z.B. Carbonsäuren) leicht deprotonierbar und damit auch leicht negativ ionisierbar sind. Der Ionisierungsprozeß kann zudem durch die Zugabe geeigneter volatiler Puffer (z.B. Trifluoressigsäure, Ameisensäure, Ammoniumacetat) oder von Spuren komplexierender Ionen (z.B.  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cs^+$ )<sup>[226,227]</sup> zum

Laufmittel unterstützt werden. Da die Analyten schon in der Lösung, d.h. ohne Belastung durch elektrische Entladung oder hohe Temperaturen, gebildet werden, erweist sich die Elektrospray-Ionisierung als ideal zur Detektion von Molekülonen von labilen oder auch schwer verdampfbaren, großen Molekülen, wie z.B. Proteinen.<sup>[223]</sup>

Gleichzeitig limitiert die Art des Ionisierungsprozesses die Auswahl der Lösungsmittel auf möglichst polare Mischungen, wie z.B. MeCN/H<sub>2</sub>O oder MeOH/H<sub>2</sub>O. Reines H<sub>2</sub>O erweist sich aufgrund seiner hohen Viskosität als ungünstig im Zerstäubungsprozeß, desgleichen Lösungsmittel mit zu hohem Salzgehalt. Dagegen können auch unpolare Solventien wie THF oder Aceton benutzt werden, solange kleine Restgehalte an H<sub>2</sub>O (oder unter Umständen auch MeOH) vorhanden sind.<sup>[223]</sup>

Da ESI eine sehr schonende Ionisierungsmethode ist, wird man in den erhaltenen ESI-MS-Massenspektren von Analyten praktisch nur geladene Molekülonen bzw. deren Addukte, selten jedoch Molekülfragmente detektieren, die zur Strukturaufklärung und -verifizierung wichtige Informationen liefern. Die ESI-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) schließt diese Lücke. Dabei werden dem bereits in der ESI-MS benutzten "Detektions-Quadrupol" (Q3) zwei weitere Quadrupole (Q1 und Q2) vorgeschaltet, in denen bei Bedarf Ionen selektiert (Q1) und durch Kollision (collision induced fragmentation, CID) mit einem hochenergetischen Stoßgas (z.B. Ar) in Q2 zertrümmert werden können (Abb. 19, unten).

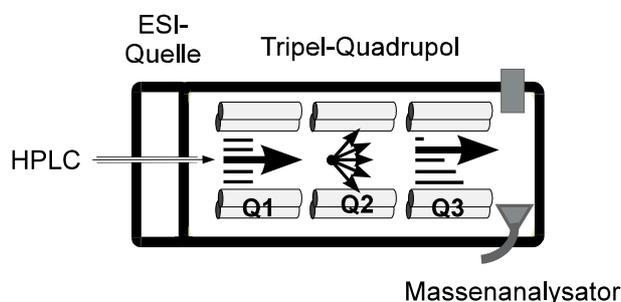


Abb. 19. Schematischer Aufbau eines Tripel-Quadrupol-Massenspektrometers im Tochterionen-Modus

Die Fragmentionen werden anschließend in Q3 ausgelesen, und man erhält ein Fragmentmassenspektrum des in Q1 anhand seiner Masse selektierten Analyten.

Ein weiterer wichtiger Modus, welcher Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer zu beliebigen Werkzeugen in pharmakokinetischen und toxikologischen Studien macht, ist das SRM-Experiment (selected reaction monitoring). Dabei wird eine spezifische Molekülmasse in Q1 selektiert, der Analyt in Q2 zertrümmert und nur eine spezifische Fragmentmasse in Q3 ausgelesen. Als Resultat erhält man einen hochempfindlichen und gleichzeitig durch den doppelten Massenfilter in Q1 und Q3 hochspezifischen Detektionsmodus, der sich (durch die Abtrennung aller störenden Fremdanalyten und -fragmente) exzellent für Quantifizierungs-

anwendungen eignet. Der Massenfilter kompensiert auch eine Herabsetzung der HPLC-Trennleistung nach Verminderung der HPLC-Analysenzeit, was z.T. extrem hohe Probendurchsätze (> 1100 Proben in 12 Stunden)<sup>[228]</sup> im pharmazeutischen Hochdurchsatz-Screening ermöglicht.<sup>[229]</sup>

### **3.1.3 Kombiniertes Einsatz von HPLC-NMR und HPLC-MS: Die HPLC-NMR-MS-Kopplung**

Es ist offensichtlich, daß bei der Untersuchung unbekannter Verbindung oft weder die HPLC-NMR- noch die HPLC-MS-Kopplung alleine zu einer vollständige Strukturaufklärung führen. Beide Techniken werden gemeinsam zur Akquisition komplementärer Strukturinformationen benötigt. So ist z.B. die HPLC-MS nicht in der Lage, Diastereomere oder Positionsisomere von bestimmten Substituenten innerhalb eines Moleküles zu unterscheiden, während dieses Problem durch die HPLC-NMR leicht lösbar sein kann. Als besonders wertvoll erwies sich in diesem Zusammenhang auch die Einführung des ROESY-Experiments in die LC-NMR-Kopplung.<sup>[36]</sup> Auf diesem Wege gelang es in unserem Arbeitskreis Rückert<sup>[113]</sup> erstmals, relative Konfigurationen von Naturstoffen zu untersuchen. Allerdings vermag auch die HPLC-NMR-Methode nicht alle Fragen zu beantworten. Sind z.B. nicht-NMR-detektierbare Gruppen (z.B. Sulfat- oder Phosphat-Ester) im Molekül vorhanden, werden massenspektrometrische Daten unverzichtbar.<sup>[230,231]</sup>

Aus Kostengründen werden immer noch die meisten HPLC-NMR- und HPLC-MS-Untersuchungen mit zwei getrennten Geräten durchgeführt. In diesen Fällen ermöglicht zumeist ein in beiden Geräten vorhandener UV-Detektor den Vergleich der aufgenommenen NMR- und MS-Chromatogramme.<sup>[178]</sup> Stehen allerdings zeitökonomische Aspekte im Vordergrund (z.B. bei der kommerziellen Arzneimittelforschung), so bietet sich eine direkte HPLC-NMR-MS-Kopplung an, wie sie schon vor längerer Zeit eingeführt wurde.<sup>[232]</sup> Technisch handelt es sich dabei nicht um eine sequentielle Detektorschaltung, die zu einem untolerierbaren Druckanstieg im NMR-Flußprobenkopf führen würde. Vielmehr werden durch ein Split-Ventil das Massen- und das NMR-Spektrometer im Anschluß an die UV-Detektorzelle parallel geschaltet. Der Wert dieser Methode wurde bereits in mehreren Publikationen im Bereich der pharmazeutischen Metabolismusforschung<sup>[198,233,234]</sup> und Naturstoff-Chemie<sup>[235,236]</sup> demonstriert.

### 3.1.4 Grundlagen der HPLC-CD-Kopplung

Trotz der enormen Möglichkeiten, die HPLC-NMR und HPLC-MS zur Aufklärung von Konstitution und relativer Konfiguration von unbekanntem Verbindungen bieten, besitzen sie nicht das Potential zur Bestimmung der absoluten Konfiguration, da dies die Verwendung chiraler Trenntechniken und die Verfügbarkeit enantiomerenreiner Standards bedingt.<sup>[199]</sup> Die absolute Konfiguration übt aber oft entscheidenden Einfluß auf die biologische Aktivität eines Naturstoffes. So wirkt z.B. das (*M*)-Isomer des Biaryl-naturstoffes Gossypol spezifisch spermizid, während das (*P*)-Enantiomer eine allgemein cytotoxische Aktivität aufweist.<sup>[237]</sup> Eine online-Analytik, die bei bekannter Konstitution und relativer Konfiguration (aus LC-NMR- und LC-MS/MS-Versuchen) auch die Bestimmung der absoluten Konfiguration eines untersuchten Analyten ermöglichte, stellte demnach eine wichtige Bereicherung des Methodenspektrums dar.

Zur Charakterisierung chiraler Verbindungen bieten sich sowohl die optische Rotationsdispersion (ORD) als auch der Circular dichroismus (CD) an. Ersterer Effekt basiert auf der Beobachtung, daß zueinander enantiomere Substanzen für rechts und links zirkular polarisiertes Licht unterschiedliche Brechungsindizes aufweisen, während der CD-Effekt auf unterschiedliche Absorptionskoeffizienten des zirkular polarisierten Lichtes zurückzuführen ist.\* Die Circular dichrometrie wird schon seit längerem zur konformativen Analyse von Proteinen und Biopolymeren benutzt, findet aber in neuerer Zeit ein schnell wachsendes Anwendungsgebiet bei der Enantiomerenanalytik.<sup>[239]</sup> CD-Spektren, die die Abhängigkeit des CD-Effektes von der eingestrahlten Wellenlänge beschreiben, können nur bei Vorhandensein eines Chromophores im Molekül gemessen werden. Dies macht ihre Interpretation einfacher als die von auf dem dispersiven ORD-Effekt beruhenden Daten, da bei letzterem die Einzelbeiträge der Cotton-Effekte genau berücksichtigt werden müssen. In Verbindung mit empirischen Regeln, dem Vergleich mit CD-Spektren strukturell ähnlicher Verbindungen<sup>[240]</sup> oder quantenmechanischen Simulationen<sup>[199]</sup> erlaubt die Circular dichrometrie die Bestimmung der absoluten Konfiguration eines chiralen Analyten.

Anders als ORD-Detektoren eignen sich CD-Detektoren sehr gut für die Kopplungen mit flüssigchromatographischen Trenntechniken, da sie auch unter Gradientenbedingungen verwendbar sind.<sup>[241]</sup> So wurde die HPLC-Kopplung eines CD-Detektors (HPLC-CD) nicht nur unter chiralen Normalphasen-Bedingungen zur Bestimmung der Elutionsreihenfolge chiraler Aminosäuren<sup>[242,243]</sup> oder von Syntheseprodukten<sup>[244]</sup> herangezogen, sondern auch zur Untersuchung von Modellmischungen kleiner Proteine unter achiralen Bedingungen mittels Gel-<sup>[245]</sup> oder Umkehrphasen-Chromatographie.<sup>[246]</sup> Letztere ermöglicht auch die effiziente

\* Für eine ausführlichere Betrachtung der theoretischen Grundlagen des Elektronen-Circular dichroismus (ECD) sei auf Lit.<sup>[238]</sup> verwiesen.

Auftrennung komplexer Substanzgemische, wie sie z.B. in pflanzlichen Rohextrakten vorliegen. Ist der sogenannte  $g$ -Faktor der untersuchten Verbindung, d.h. der Quotient aus CD- und UV-Absorption, bekannt, so erlaubt die simultane CD/UV-Detektion auch die Bestimmung der Enantiomerenreinheit ohne "chirale Trennung".<sup>[247]</sup> Dies wurde z.B. bei der Untersuchung des natürlichen Enantiomerenverhältnisses von ( $\pm$ )-Hyoscyamin in *Scopolia*-Extrakten an achiraler Phase demonstriert.<sup>[248]</sup>

In all diesen CD-Untersuchungen zur Aufklärung der absoluten Konfiguration eines Analyten waren dessen Struktur und relative Konfiguration schon im Vorfeld bekannt. Eine eindeutige Zuordnung des chromatographische Signals im HPLC-CD erfolgte mit entsprechenden isolierten oder synthetischen Referenzproben.<sup>[242,244,248]</sup> Dies bedeutete aber gleichzeitig, daß jede HPLC-CD-Untersuchung mit zeitraubenden und materialintensiven Vorarbeiten erst vorbereitet werden mußte, die zudem meist konventionelle offline-NMR- und offline-MS-Versuche beinhalteten. Aufgrund der Expertise unseres Arbeitskreises auf dem Gebieten der online-Strukturaufklärung mit der HPLC-NMR- und HPLC-MS/MS-Kopplung<sup>[34-37]</sup> erschien es als logischer Schritt, diese offline-Techniken durch leistungsfähige online-Methoden zu ersetzen. Als Ziel wurde angestrebt, mit online-Techniken unbekannte Naturstoffen in Extrakten bis hin zur absoluten Konfiguration vollständig strukturell aufzuklären. Diese Überlegung bildet die Triebfeder für die Entwicklung einer innovativen Methodenkombination: der Verknüpfung der HPLC-NMR-, HPLC-MS/MS- und HPLC-CD-Kopplung zur "online-Triade".

### **3.1.5 Etablierung der "Triade" HPLC-NMR, HPLC-MS/MS und HPLC-CD zur online-Bestimmung der absoluten Stereostruktur unbekannter Naturstoffe in Extrakten: Untersuchung von *Habropetalum dawei***

Da die Trennung bei den etablierten Kopplungsmethoden HPLC-NMR und HPLC-MS/MS zumeist auch auf einer Umkehrphasen-Chromatographie basiert, erschien eine komplementäre Verwendung der HPLC-CD-Kopplung mit diesen beiden Techniken als wichtige Innovation, um auch stereochemische Aspekte von strukturell unbekanntem Sekundärmetaboliten in Rohextrakten zu untersuchen.

Seine erste Anwendung fand dieses neue Konzept bei der phytochemischen Untersuchung der tropischen Liane *Habropetalum dawei* (Sierra Leone).<sup>[38]</sup> Ein on-flow-HPLC-NMR-Experiment lieferte <sup>1</sup>H-NMR-Spektren, die auf die Existenz der bereits aus *T. peltatum*<sup>[33]</sup> und *A. abbreviatum*<sup>[249]</sup> bekannten Naphthylisochinolin-Alkaloide **6**, **40** und **41** und des Tetralons **17** hindeuteten (Abb. 20, Seite 45).

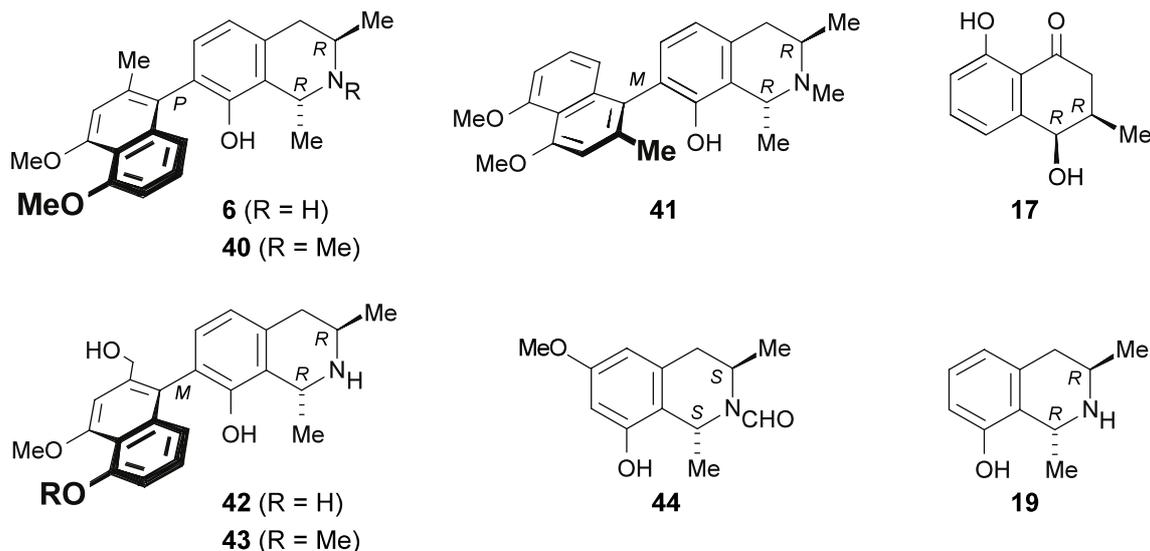


Abb. 20. Im Zuge der Analyse von *H. dawei* untersuchte Verbindungen

Ein sich anschließendes HPLC-MS/MS-Screening, in dem auch Vergleichs- und Koelutionsexperimente mit verfügbaren Referenzen von **6**, **40**, **41** und **17** durchgeführt wurden, bestätigte deren übereinstimmende Konstitutionen und relative Konfigurationen mit den im Extrakt gefundenen Analyten. Die absolute Konfigurationen der detektierten Moleküle war mit diesen LC-MS- und LC-NMR-Methoden jedoch nicht bestimmbar. Demnach hätten in *H. dawei* prinzipiell auch die Enantiomeren von **6**, **40**, **41** und **17** vorliegen können. Im Falle von **6** wurde diese Fragestellung erstmalig online-analytisch mit der HPLC-CD-Kopplung geklärt.

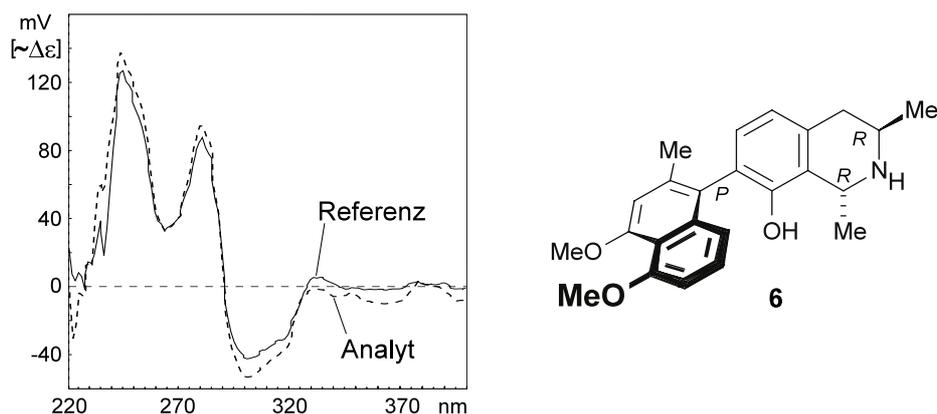


Abb. 21. Vergleich der stop-flow-HPLC-CD-Spektren ( $C_{18}$ -Phase, Laufmittel MeCN/H<sub>2</sub>O) einer isolierten Referenz von **6** mit (1*R*,3*R*,7*P*)-Konfiguration und dem in *H. dawei* detektierten Analyten mit gleicher Konstitution und relativer Konfiguration wie **6**

Das stop-flow-CD-Spektrum einer isolierten Referenz von **6** mit (1*R*,3*R*,7*P*)-Konfiguration zeigte sich absolute identisch zu dem in einem Extrakt von *H. dawei* gemessenen Spektrum (Abb. 21, oben). Dies bewies die Existenz von **6** in *H. dawei* und widerlegte die seines

Enantiomers, *ent*-**6**. Diese Anwendung demonstriert exemplarisch, wie chirale Metaboliten mit bekannter relativer Konfiguration innerhalb einer komplexen Matrix ohne Isolierung durch die kombinierte Benutzung der HPLC-NMR-, HPLC-MS/MS- und HPLC-CD-Kopplung vollständig strukturell charakterisierbar sind.

Diese Beispiel weist aber gleichzeitig auch auf bestimmte Einschränkungen hin, denen die HPLC-CD-Methode unterworfen ist. So muß zur Aufnahme eines stop-flow-CD-Spektrums die weitgehende Reinheit des untersuchten Analytpeaks überprüft werden, am schnellsten und sichersten mit HPLC-NMR- und HPLC-MS-Spektroskopie. Eine Anwendung der HPLC-CD-Kopplung auf die nahezu gemeinsam eluierenden Atropdiastereomere **40** und **41** war deshalb nicht möglich. Das Tetralon **17** war aufgrund der zu niedrigen Intensität seines CD-Signals im Extrakt nicht untersuchbar.

Daß nicht immer die Aufnahme eines vollständigen CD-Spektrums im Extrakt notwendig ist, wurde am Beispiel von **19** demonstriert. Dessen Grundstruktur mit der relativen *trans*-Anordnung der Methylgruppen an C-1 und C-3 wurde aus stop-flow-NMR-Spektren und einem LC-MS-Vergleich mit synthetischem **19**<sup>[115]</sup> abgeleitet. Leider lieferte die HPLC-CD-Analyse des Extrakts kein taugliches CD-Spektrum des fraglichen Analyten, da dessen CD-Effekt aufgrund der geringen Konzentration von **19** und des fehlenden Naphthylchromophores äußerst schwach war. Ein Vergleich der strukturell ähnlichen synthetischen Referenzen **19** und **44** zeigte jedoch, daß ein starker CD-Effekt bei 266 nm dem Einfluß der absoluten Konfiguration an den *trans*-ständigen Methylgruppen zuzuordnen war (Abb. 22, unten).

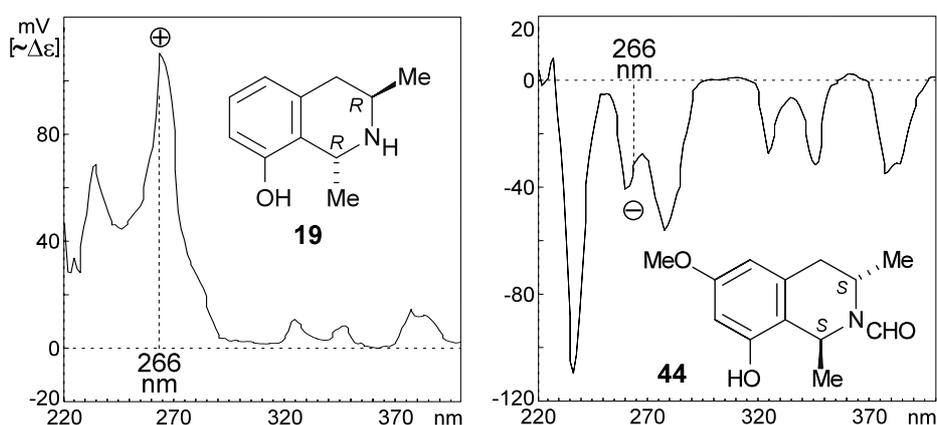


Abb. 22. CD-Spektren (unter Umkehrphasen-Bedingungen) von synthetischen Referenzen von **19** und **44**

Während bei (1*R*,3*R*)-Konfiguration der CD-Effekt bei 266 nm stark positiv ausfiel, führte die (1*S*,3*S*)-Konfiguration zum genau entgegengesetzten Bild. Folgerichtig wurde deshalb ein CD-Chromatogramm des Extraktes bei 266 nm aufgenommen (Abb. 23, Seite 47).

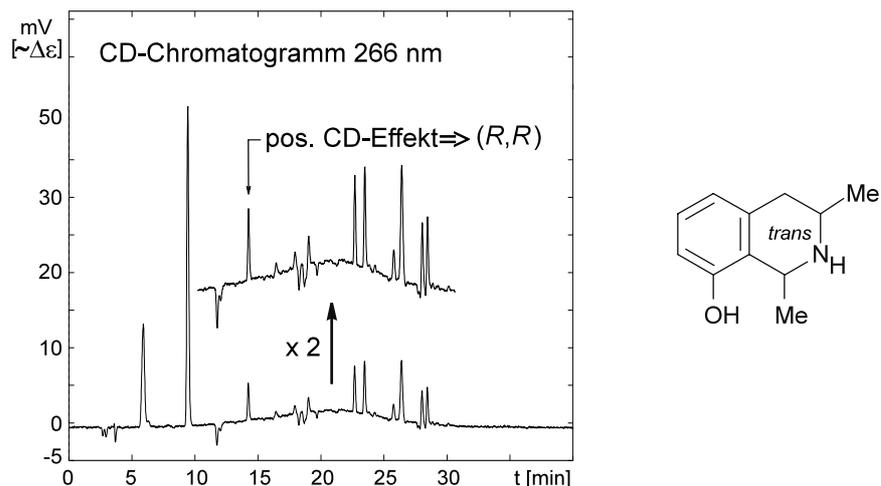


Abb. 23. CD-Chromatogramm (266 nm) des Extraktes von *H. dawei*

Im CD-Chromatogramm bei 266 nm zeigte der untersuchte Analyt einen deutlich positiven CD-Effekt, wie er auch für das synthetische (1*R*,3*R*)-konfigurierte (+)-Phyllin (**19**) gemessen wurde. Demzufolge ist der Inhaltsstoff in *H. dawei* ganz eindeutig **19** und nicht *ent*-**19**.

Auch bei konstitutionell neuen Verbindungen, für die keine homo- oder enantiomeren Referenzmaterialien zur Verfügung stehen, leistet die HPLC-CD-Kopplung wertvolle Hilfe. Mittels stop-flow-HPLC-NMR-Messungen und HPLC-MS/MS-Experimenten wurde die Grundstruktur des neuen Naphthylisochinolin-Alkaloids Habropetalin A (5'-*O*-Methyldioncopeltin A, **43**) identifiziert. HPLC-ROESY-Messungen zeigten eine *trans*-Anordnung der Methylgruppen an C-1 und C-3, es waren jedoch keine achsenrelevanten long-range-Wechselwirkungen zur Bestimmung der relativen Achsenkonfiguration beobachtbar. Diese wurde jedoch absolut durch Aufnahme und Vergleich von LC-CD-Spektren einer zu **43** strukturell verwandten Substanzen, nämlich von **42**, bestimmt (Abb. 24, unten).

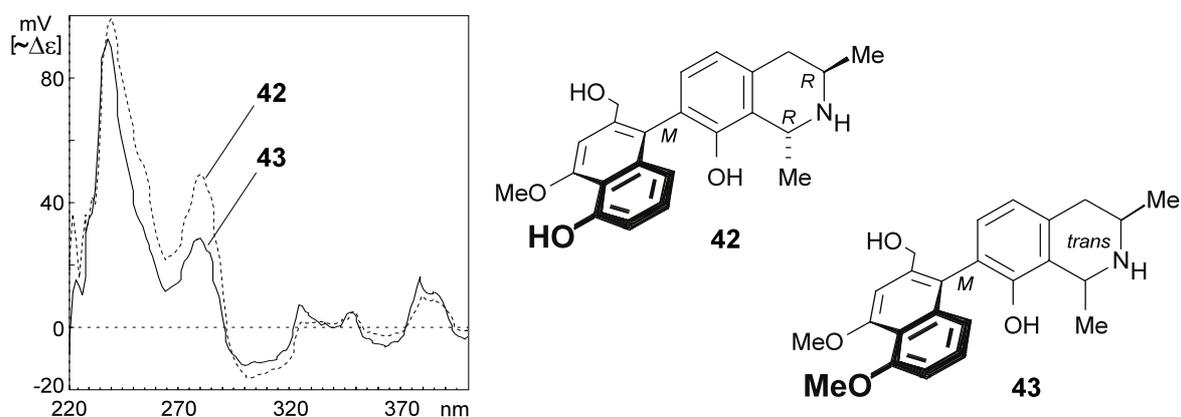


Abb. 24. Bestimmung der Achsenkonfiguration von **43** (nach online-Strukturaufklärung per HPLC-NMR und HPLC-MS/MS) durch HPLC-CD-Vergleich mit der Referenz **42**

Analyt- und Referenzspektrum zeigten eine sehr gute Übereinstimmung, womit **43** eine *M*-Achsenkonfiguration zugewiesen werden konnte. Leider ließen die verwendeten online-Methoden keine Aussage über die absolute Konfiguration an den Stereozentren an C-1 und C-3 zu. Der im Arbeitskreis etablierte Ruthenium-katalysierte oxidative Abbau<sup>[250]</sup> einer Extraktprobe lieferte chirale Abbauprodukte, die ausschließlich auf die Existenz (3*R*)-konfigurierter Tetrahydroisochinoline hinwiesen. Aufgrund der aus den NMR-Experimenten bekannten *trans*-Anordnung der Methylgruppen wurde **43** eine (1*R*,3*R*,7*M*)-Konfiguration zugewiesen (Abb. 43, Seite 68).

Die phytochemische Untersuchung von *H. dawei* demonstriert eindrucksvoll das Potential der "online-Triade" HPLC-NMR/HPLC-MS/HPLC-CD, durch deren Einsatz das bekannte Alkaloid **6** und die neuen Naturstoffe **19** und **43** strukturell und stereochemisch direkt aus dem Rohextrakt vollständig charakterisiert wurden. Allerdings wurden auch Verbesserungsmöglichkeiten für jede der benutzten Methoden deutlich. Im HPLC-CD-Bereich verhinderte die (für ein optisches System) geringe Nachweisempfindlichkeit des CD-Detektors die Aufnahme eines vollen CD-Spektrums im Falle von **19**. Weiterhin ist eine Design-Optimierung der Flußwege zum turbulenzarmen Analytransport erforderlich, um eine Verringerung der im CD/UV-Detektor registrierten Peakbreiten zu erreichen. Da sich das verwendete System (*Jasco*) aber erst seit kurzer Zeit auf dem Markt befindet, dürfte es für Verbesserungen (z.B. Miniaturisierung) durchaus noch große Spielräume geben.

Im HPLC-MS/MS-Segment erscheint das System (*Finnigan* TSQ 7000) ausgereift, wenn auch mittlerweile nicht mehr auf dem neuesten Stand. Andere Massenspektrometer erreichen mittlerweile deutlich bessere Leistungswerte im Bezug auf Nachweisempfindlichkeit und Massengenauigkeit oder bieten sogar die Möglichkeit für MS<sup>n</sup>-Experimente zur Strukturaufklärung.<sup>[218]</sup>

Auch im Bereich der HPLC-NMR-Kopplung spielt die (mangelnde) Nachweisempfindlichkeit eine bedeutende Rolle. So hätte sich im Falle von **43** ein Extraktabbau erübrigt, falls die online-Beobachtung achsenrelevanter ROE-Wechselwirkungen gelungen wäre. Eine vollständige Aufklärung der relativen Konfiguration eines Analyten ist eine unabdingbare Voraussetzung, um die absolute Konfiguration anschließend per CD-Messung bestimmen zu können. Dies gelingt aber nur mit Hilfe leistungsfähiger HPLC-NMR-Methoden, wie sie nun im Rahmen dieser Arbeit erarbeitet werden sollten.

### 3.2 Implementierte methodische Neuerungen

#### 3.2.1 Einsatz eines 60- $\mu$ l-Probenkopfes mit z-Gradient: WET-Lösungsmittelunterdrückung und optimierte HPLC-Bedingungen

Im HPLC-NMR-Bereich erschloß der Austausch des seit 1995 benutzten Probenkopfes bemerkenswerte Leistungsreserven. 1998 wurde der veraltete, invers konstruierte  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ -120- $\mu$ l-Flußprobenkopf (4 mm I.D.) durch einen modernen  $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ -60- $\mu$ l-Flußprobenkopf (3 mm I.D.) mit aktiv abgeschirmter z-Gradientenspule ersetzt. Der neue Probenkopf besitzt eine Reihe von technischen Vorteilen und ermöglichte dementsprechend auch methodische Verbesserungen.

Ein großer Vorteil des 60- $\mu$ l-Probenkopfes besteht in seiner erheblich höheren Sensitivität, bedingt durch die verkleinerten Meßzelle. Hoult und Richards<sup>[251]</sup> beschreiben die theoretische Sensitivität einer Sattel-Spule (die im Flußprobenkopf benutzt wird) wie folgt:

$$\text{Sensitivität} \approx \frac{n\mu_0\sqrt{3}}{\pi} \left[ \frac{2dh}{(d^2 + h^2)^{3/2}} + \frac{2h}{d\sqrt{d^2 + h^2}} \right]$$

wobei  $n$  die Zahl der Spulenwindungen,  $\mu_0$  die Permeabilität des freien Raums,  $d$  der Spulendurchmesser und  $h$  die Länge der Spule ist. Demnach erhöht sich die Sensitivität mit abnehmendem Spulendurchmesser und steigender Spulenlänge. Nimmt man (rein theoretisch) an, daß bei einer Verkleinerung des Spulendurchmessers (der gleich dem Kapillardurchmesser sein soll, also bei optimalen Füllfaktor) von 4 mm auf 3 mm alle anderen Größen konstant bleiben, so ergibt sich ein Sensitivitätsgewinn um einen Faktor von *ca.* 2. In der Realität ist diese Gleichung natürlich nicht ohne weiteres anwendbar, da sich die Qualität eines Probenkopfes aus einer Vielzahl von (oftmals auch schlecht quantifizierbaren) Faktoren wie Bauart, verwendeten Materialien, Spulengüte, usw. ableitet. Nach Angaben des Herstellers *Bruker* besitzt aber das neue Modell tatsächlich eine um einen Faktor von *ca.* 2 höhere Sensitivität.<sup>[146]</sup>

Neben der Bauart-bedingten Sensitivitätssteigerung offerierte die neuartige z-Gradientenspule eine darüber hinaus gehende Leistungssteigerung, da sie die Verwendung moderner Pulsprogramme, insbesondere von gradientenunterstützten Lösungsmittelunterdrückungssequenzen, wie z.B. WATERGATE,<sup>[203]</sup> WET<sup>[204]</sup> oder "excitation sculpting"<sup>[205]</sup> erlaubt. Vor allem die WET-Sequenz (Water Suppression Enhanced by T<sub>1</sub> Relaxation), die mit einer Vielzahl von ein- und zweidimensionalen Pulsprogrammen kombinierbar ist,<sup>[204]</sup> findet für die HPLC-NMR-Spektroskopie weitere Verbreitung.<sup>[177,184,252-254]</sup> Bei der WET-Sequenz werden die Lösungsmittelsignale von HOD und MeCN durch sog. "Shape"-Pulse (also "weiche" Pulse mit geringer Frequenzbreite) angeregt und anschließend gradientenunterstützt

dephasiert (Abb. 25a, unten). Bei der Verwendung von Binomialpulsen (z.B. von "shifted-laminar"-Pulsen) ist es auch möglich, zwei oder mehrere Lösungsmittelsignale mit nur einem Frequenzkanal zu unterdrücken. Auf dem zweiten Frequenzkanal kann entsprechend eine  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung (z.B. WALTZ oder GARP) eingestrahlt werden, so daß die  $^{13}\text{C}$ -Satelliten des Modifiers in den Zentralpeak (d.h. in das Protonensignal von  $^{12}\text{CH}_3\text{CN}$ ) kollabieren und mit niedriger Bandbreite (bis 20 Hz) ebenfalls unterdrückt werden (Abb. 26a, Seite 51).

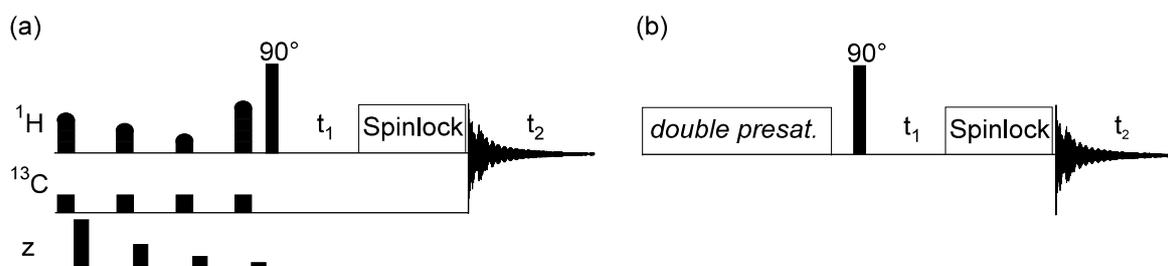


Abb. 25. Lösungsmittelunterdrückungs-Sequenzen in der HPLC-NMR-Spektroskopie: ROESY-Sequenz mit (a) moderner  $z$ -Gradienten-unterstützter WET-Unterdrückung und (b) veralteter "double-presaturation"-Unterdrückung

Dagegen benutzt die ältere "double-presaturation"-Methode (Abb. 25b, oben) NOESY-artige Pulszüge, die auf die Lösungsmittelsignale eingestrahlt werden und so deren Resonanzfrequenzen absättigen. Dabei wird pro Lösungsmittelsignal ein Spektrometerkanal belegt, so daß bei zwei Lösungsmitteln eine  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung nicht mehr möglich ist und die nicht unterdrückten Satelliten des MeCN-Signals das NMR-Spektrum in der Gegend von 2 ppm in einem Bereich von *ca.* 140 Hz verdecken. Das Beispiel von Ancistrocladin (**15**) (Abb. 26b, Seite 51) zeigt exemplarisch, wie das Signal der 2'-Methyl-Gruppe im WET-Spektrum gut sichtbar ist, während es bei einer Unterdrückung mit "double presaturation" vollständig unter einem der  $^{13}\text{C}$ -Satelliten verschwindet. Zudem treten um die Einstrahlbereiche oft Basislinienverzerrungen auf.

Die geringe Tendenz zur Basislinienverzerrung bei WET wirkt sich v.a. bei der Aufnahme und Prozessierung von 2D-Spektren stark qualitätsfördernd aus. Weiterhin ist WET bedeutend weniger zeitintensiv als die ältere "double-presaturation"-Methode (Faktor 5-10) und damit deutlich zeitökonomischer.<sup>[13]</sup>

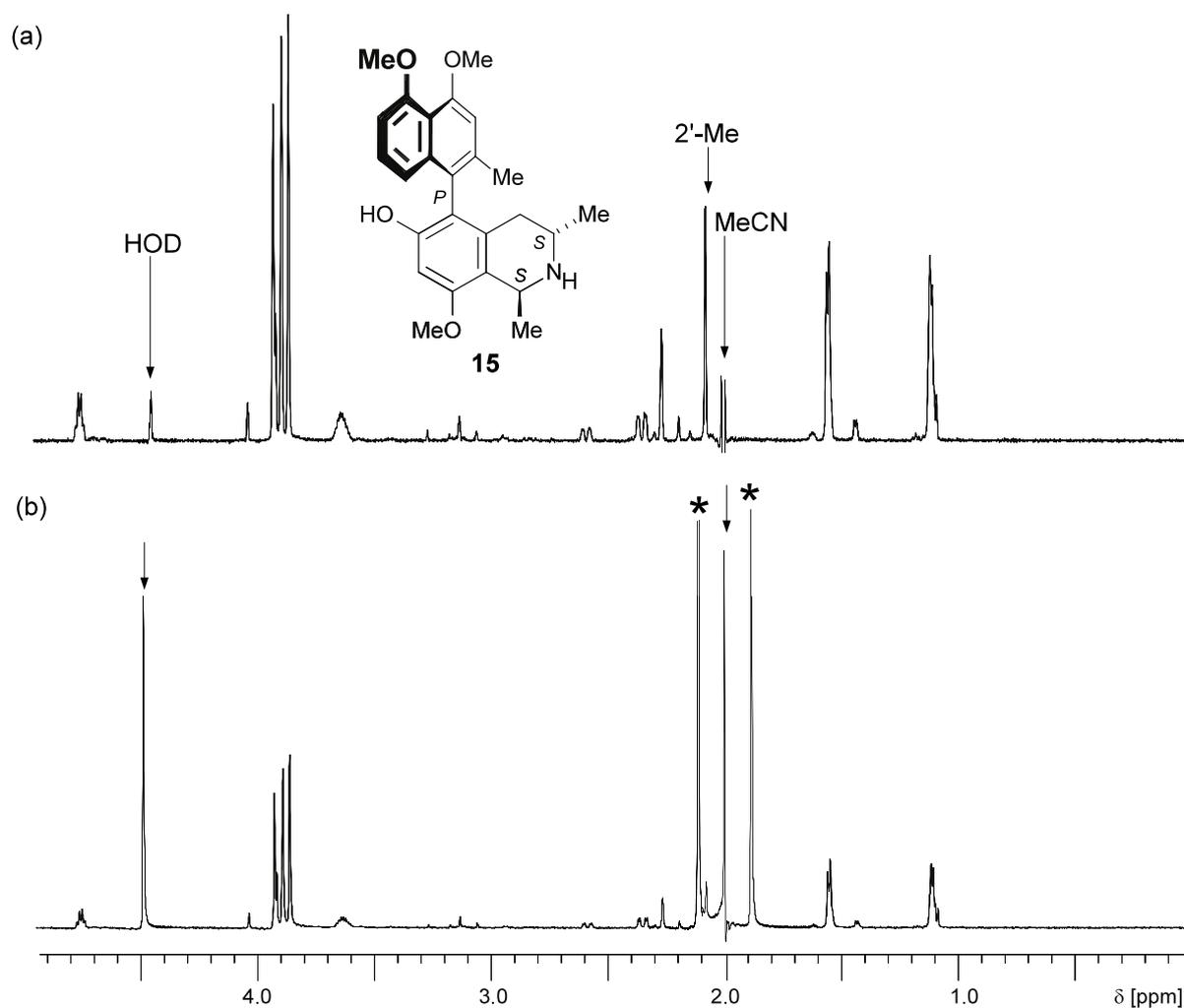


Abb. 26. Ausschnittsvergleich von HPLC-NMR-Spektren einer Standardprobe von Ancistrocladin (**15**), aufgenommen mit (a) der WET-Unterdrückung und (b) "double presaturation" (Die  $^{13}\text{C}$ -Satellitensignale von MeCN sind mit \* markiert.)

Da die von *Bruker* entwickelten HPLC-NMR-Pulsprogramme im Kern auf der veralteten "presaturation"-Sequenz beruhen, beinhaltete die vorhandene Softwarebibliothek (XWIN-NMR 2.0) lediglich ein einfaches  $^1\text{H}$ -NMR-Experiment mit WET-Solvensunterdrückung. Um die Vorzüge dieser Methode auf dem vorhandenen *Bruker* DMX 600 im 2D-Bereich voll ausschöpfen zu können, mußten die entsprechenden COSY-, ROESY- oder NOESY-Programme mit der von Keifer *et al.*<sup>[204]</sup> beschriebenen Sequenz versehen werden (vgl. Anhang A, Seite 139). Die Umprogrammierung wurde mit einem UNIX-Editor durchgeführt, wobei die WET-Sequenz dem Hauptexperiment vorangestellt wurde. Es erwies sich im weiteren Verlauf als günstiger, als Ausgangspunkt für die Programmierung Pulsprogramme ohne jegliche Unterdrückungssequenz zu benutzen, anstatt die "presaturation"-Codezeilen in den vorhandenen HPLC-NMR-Experimenten durch die WET-Sequenz zu ersetzen. Nach einigen Testläufen mit Referenzproben wie **15** (vgl. Abb. 26, oben) wurden die neuen Pulsprogramme anschließend in den weiteren Untersuchungen eingesetzt. Damit wurde diese

moderne Methode in unserer Gruppe zum ersten Mal auf der Basis der *Bruker*-Hardware etabliert.\*

Im Bestreben, eine möglichst leistungsfähige HPLC-NMR-Anlage zu konfigurieren, wird oft einseitig der NMR-Detektor betrachtet, jedoch weniger Wert auf die chromatographischen Parameter gelegt. Dabei können im HPLC-Bereich oft große Fortschritte mit einem Bruchteil der Kosten (z.B. im Vergleich zu einem neuen Hochfeld-Spektrometer) erzielt werden. In der Tat ist ein leistungsfähiger und auf das Spektrometer abgestimmter HPLC-Aufbau die Grundvoraussetzung für das erfolgreiche Gelingen von HPLC-NMR-Experimenten.

Die in der analytischen HPLC (4.6 mm I.D., 1 ml/min Flußrate) gewöhnlich erreichten chromatographische Peakbreiten betragen teilweise *ca.* 30 s und mehr. Der Inhalt einer 120- $\mu$ l-Flußzelle wird unter diesen Bedingungen allerdings in *ca.* 7.2 s ausgetauscht, bei 60  $\mu$ l Volumen sind es sogar nur noch *ca.* 3.6 s. Dies bedeutet, daß nur ein Drittel bis ein Zehntel des Peakvolumens tatsächlich zur Beobachtung genutzt wird. Idealerweise wird der chromatographische Peak zwar eine gaussförmige Konzentrationsverteilung aufweisen, so daß im Idealfall der "Hochkonzentrationsbereich" in der Zelle eingefangen wird. Trotzdem ist es gerade in massenlimitierten Anwendungen nicht tolerierbar, einen großen Teil des eingespritzten Analyten ungenutzt zu lassen.

Durch eine Verringerung der chromatographischen Peakbreiten (bei gleichbleibender Probenaufgabemenge) erhöht sich die Peakkonzentration des Analyten und macht so eine höhere Stoffmenge in der Meßzelle verfügbar. Einen wichtigen Anteil daran trägt natürlich der Einsatz aufeinander abgestimmter Bauteile, z.B. von Kapillaren mit geringen Durchmessern oder von verwirbelungsarmen Verbindungstücken. Fundamental bietet sich auch eine Miniaturisierung der HPLC-Bedingungen an. Wie schon in Kap. 3.1.1 (Seite 36) angesprochen, erhöht sich die maximal erreichbare Peakkonzentration bei Verwendung niedrigerer Säulendurchmesser, bei gleichzeitig sinkendem Peakvolumen.<sup>[213]</sup> (Tab. 1, Seite 39). Dabei ist es optimal, ein Peakvolumen vergleichbar zum Meßzellenvolumen zu erreichen.<sup>[214]</sup> Um diesem Ziel Rechnung zu tragen, wurden die HPLC-Bedingungen auf Säulen mit 3 mm Innendurchmesser bei 0.5 ml/min Flußrate umgestellt. Dieses Vorgehen erbrachte bei späteren Untersuchungen (Kap. 4.3.1, Seite 124) einen deutlichen Sensitivitätszuwachs. Eine geplante Umstellung auf 2 mm Innendurchmesser (bei 0.2 ml/min Flußrate) wurde nicht realisiert, da die verwendete Pumpe (*Bruker* LC 22) in diesem Flußbereich nicht mehr pulsationsarm betrieben werden konnte.

---

\* Die von der Fa. *Varian* entwickelten HPLC-NMR-Programme basieren schon seit längerem auf der WET-Sequenz.

### 3.2.2 Austausch von protonierten und deuterierten Solventien in HPLC-NMR und HPLC-MS/MS

Obwohl die im vorigen Kapitel angesprochenen technischen Modifikationen die Leistungsfähigkeit der HPLC-NMR entschieden verbesserten, mußten in einigen Bereichen immer noch Abstriche gegenüber der konventionellen offline-NMR gemacht werden. So ist es z.B. weit verbreitet, unter Anwendung von Lösungsmittelunterdrückungs-Sequenzen Experimente in protischen Lösungsmitteln wie H<sub>2</sub>O durchzuführen, um so wertvolle Informationen über die Positionen und Korrelationen austauschbarer Protonen (z.B. N-H oder O-H) zu erhalten. Diese Techniken sind gerade bei der Untersuchung von Proteinen und Peptiden von großem Wert.<sup>[77]</sup> Auch in der HPLC-NMR-Kopplung gab es bereits erste Versuche, diese Techniken für die "Fingerprint"-Analyse von Protein-Gemischen zu nutzen,<sup>[197]</sup> welche jedoch nicht zur Hochauflösungs-Strukturaufklärung unbekannter Substanzen tauglich waren. Dabei sind einige 2D-NMR-Experimente wie ROESY<sup>[255,256]</sup> oder TOCSY<sup>[257,258]</sup> in hervorragender Weise geeignet, wichtige Informationen über die Art und die Position einer protischen Gruppe in einem Molekül zu liefern. Dies ist umso verwunderlicher, als das "umgekehrte" Prinzip, der Austausch von H<sub>2</sub>O gegen D<sub>2</sub>O, in der HPLC-MS schon seit langem für die Bestimmung der Anzahl der austauschbaren Protonen eines Moleküls benutzt wird.<sup>[259,260]</sup>

In einem ersten Schritt zur Etablierung einer solchen neuen Technik für die HPLC-NMR-Kopplung wurde ein H/D-Austauschexperiment an den Modellalkaloiden Dioncophyllin A (**6**), *N*-Methyldioncophyllin A (**40**) (Abb. 20, Seite 45), Korupensamin A (**45**), Ajmalicin-Hydrochlorid (**46**·HCl) und (-)-Nicotin (**47**) durchgeführt (Abb. 27, unten), um deren Protonierungsgrad bzw. die Anzahl austauschbarer Protonen unter sauren Bedingungen (pH 3) zu bestimmen.

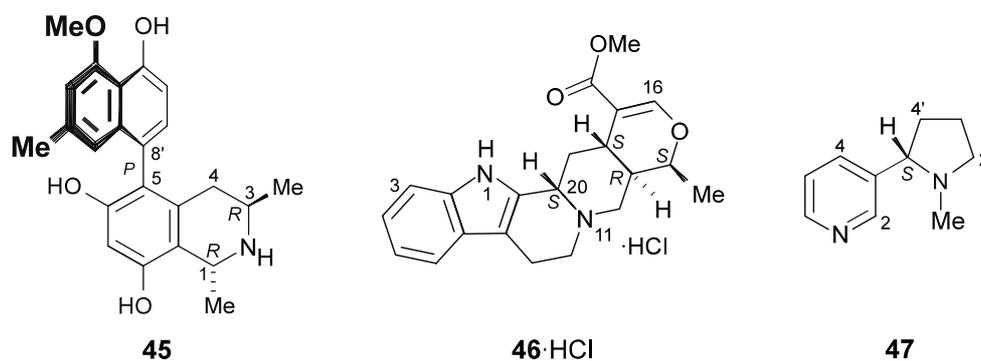


Abb. 27. Für H/D-Austauschexperimente benutzte Modellalkaloide Korupensamin A (**45**), Ajmalicin-Hydrochlorid (**46**·HCl) und (-)-Nicotin (**47**) (**6** und **40** nicht abgebildet; s. Abb. 20, Seite 45)

Die Substanzen wurden jeweils in D<sub>2</sub>O/MeCN (+ d<sup>1</sup>-TFA) bzw. H<sub>2</sub>O/MeCN (+ TFA) gelöst und deren [M<sub>H</sub> + H]<sup>+</sup>- und [M<sub>D</sub> + D]<sup>+</sup>-Pseudomolekülonen-Massen mit ESI-MS-Loopinjektionen in H<sub>2</sub>O/MeCN bzw. D<sub>2</sub>O/MeCN als Lösungsmittel bestimmt (Tab. 2, unten).

Die ESI-MS-Daten zeigten eindeutig, daß alle Verbindungen in saurerer Lösung als einfach protonierte bzw. deuterierte Spezies vorlagen und daß in D<sub>2</sub>O alle austauschbaren Gruppen (d.h. Hydroxy- und Aminofunktionen) deuteriert waren. Dies führte bei **47** zu einer Massenzunahme von lediglich +1 u, da nur das ionisierende Proton in D<sub>2</sub>O ausgetauscht wurde, während im Extremfall **45**, mit drei phenolischen Hydroxygruppen und einer Aminogruppe, einen Massenshift von +5 u im deuterierten Milieu aufwies.

Tab. 2. Bestimmung des Masse/Ladungsverhältnisses  $m/z$  der protonierten oder deuterierten Pseudomolekülonen der Verbindungen **6**, **40**, **45**, **46**, **47** (M<sub>H</sub> und M<sub>D</sub> bezeichnen jeweils die protonierte oder deuterierte Molekülspezies.)

Verbindung	$m/z$ [M <sub>H</sub> + H] <sup>+</sup>	$m/z$ [M <sub>D</sub> + D] <sup>+</sup>	austauschbare Protonen <sup>a</sup>
<b>6</b>	378	381	3
<b>40</b>	392	394	2
<b>45</b>	380	385	5
<b>46</b>	353	355	2
<b>47</b>	163	164	1

<sup>a</sup> inklusive ionisierende Protonen oder Deuteronen.

Nach diesen positiven Befunden wurden erste orientierende HPLC-NMR-Experimente an **6** durchgeführt, bei denen die WET-Sequenz zum Einsatz kam. Dabei wurde eine Standardlösung von **6** in D<sub>2</sub>O/MeCN direkt in den Durchflußprobenkopf eingespritzt und ein <sup>1</sup>H-WET-Spektrum aufgenommen (Abb. 28a, unten).

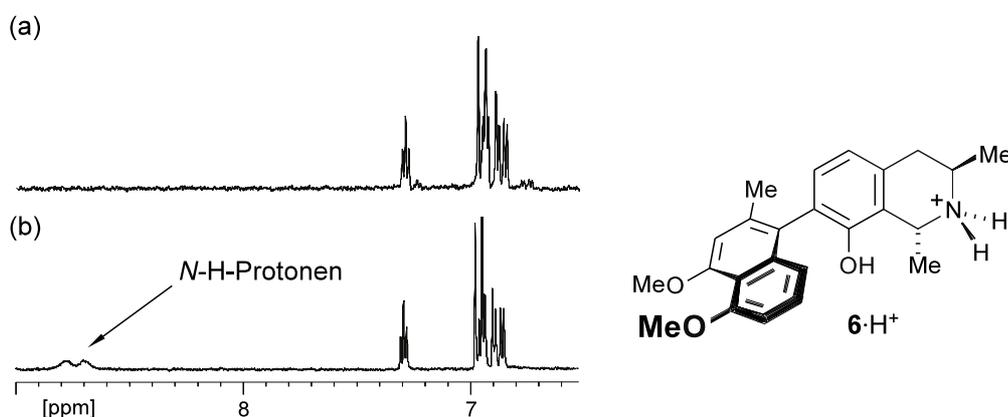


Abb. 28. (a) <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Referenzalkaloid **6** (200 µg ml<sup>-1</sup> in D<sub>2</sub>O/MeCN 1:2 (v/v), direkt in die Flußzelle injiziert, 8 Scans); (b) stop-flow-HPLC-NMR-Spektrum von **6**·H<sup>+</sup> in einem Zweigextrakt von *Triphyophyllum peltatum* ( $t_R = 23.7$  min, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O/MeCN 56.7:5:38.3 (v/v), 32 Scans)

Unter "normalen" HPLC-NMR-Bedingungen wies **6** im Bereich zwischen 6.5-9 ppm erwartungsgemäß nur die Signale von sechs aromatischen Protonen auf (Abb. 28a, Seite 54). Ein anschließend zum Vergleich untersuchter Zweigextrakt von *T. peltatum* beinhaltete ebenfalls **6** als Hauptalkaloid. Dabei kam ein modifizierter, ternärer Lösungsmittelgradient zur Anwendung, in dem D<sub>2</sub>O größtenteils gegen H<sub>2</sub>O ausgetauscht war und der ein Minimum von 5% (v/v) D<sub>2</sub>O im Gradienten konstant enthielt, um das Locksignal zu gewährleisten. Bei der in HPLC-Vorexperimenten für **6** festgestellten Retentionszeit von 23.7 min wurde der Solvensfluß angehalten und ein HPLC-NMR-Spektrum mit 32 Scans aufgenommen (Abb. 28b, Seite 54). Dabei tauchten neben den aromatischen Protonen zwei verbreiterte Signale im Bereich zwischen 8.7 und 8.8 ppm auf, die mit gleicher Intensität zu insgesamt zwei Protonen integrierten. Art und Verschiebung der beiden Signale waren im Einklang mit der Existenz zweier diastereotoper, (langsam) austauschender Aminoprotonen einer quarternären Stickstoff-Funktion.<sup>[59]</sup>

Weitere <sup>1</sup>H-NMR-Experimente an der Modellsubstanz **45** unter HPLC-NMR-Bedingungen in saurerer H<sub>2</sub>O/MeCN-Lösung dienten dazu, die Natur der neuen Signale zu bestätigen. Wieder wurden im Bereich von 8.5 ppm zwei Signale gleicher Intensität detektiert. In einem sich anschließenden TOCSY Experiment zeigten diese beiden Signale Korrelationen zu allen anderen Protonen des gesättigten Tetrahydroisochinolin-Ringes (Abb. 29, unten).

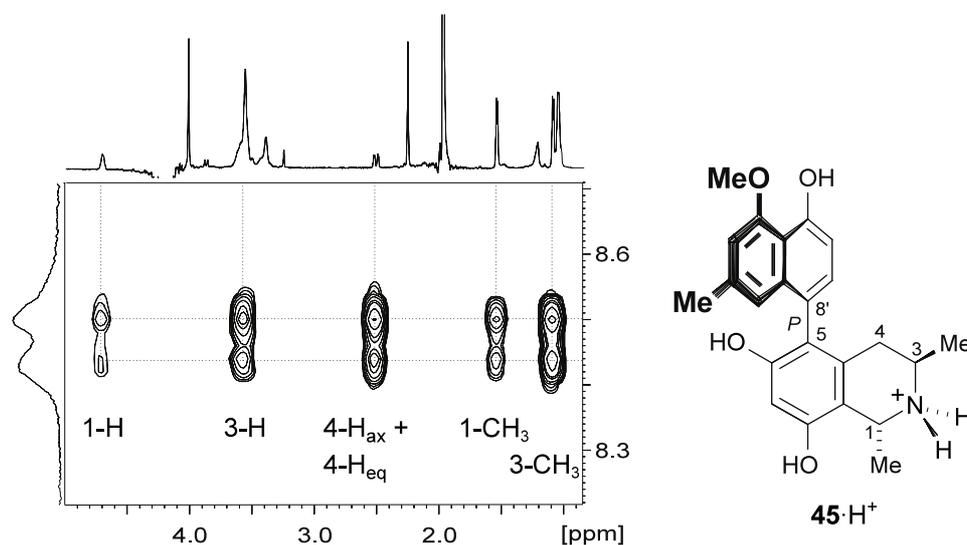


Abb. 29. 2D-TOCSY-Spektrum von **45**<sup>+</sup> (0.5 mg/ml in D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O/MeCN, 5:45:50 v/v, pH 3, direkt in Flußzelle injiziert, 16 Scans, 256 Inkremente in F1, totale Akquisitionszeit 9.5 h)

Diese Beobachtung identifizierte sie eindeutig als die Ammonium-Protonen der in saurer Lösung vorliegenden Spezies **45**<sup>+</sup>. Damit war es auch möglich, den gesamten CH(CH<sub>3</sub>)-NH-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-Strukturteil des Tetrahydroisochinolinringes anhand von TOCSY-Daten zuzuordnen. Unter konventionellen, "deutierten" HPLC-NMR-Bedingungen waren bisher

immer nur die beiden Einzelkonnektivitäten CH(CH<sub>3</sub>) und CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub> aus TOCSY-Daten ableitbar, da eine deuterierte Stickstoff-Funktion den Hartmann-Hahn-Transfer<sup>[257]</sup> zwischen 1-H und 3-H unterbricht.

Dieser neue experimentelle Ansatz ist nicht nur auf die Detektion skalarer Kopplungen beschränkt, sondern läßt sich auch auf die Beobachtung dipolarer Kohärenztransfers erweitern, wie am Beispiel von Ajmalicin (**46**) demonstriert wurde (Abb. 30, unten).

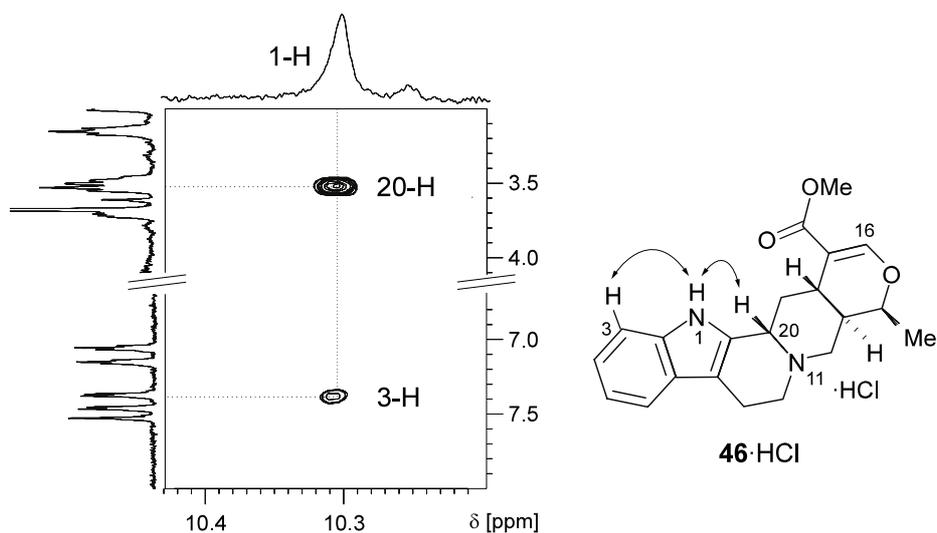


Abb. 30. WET-NOESY-Spektrum von Ajmalicin (**46**) (0.5 mg/ml in D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O/MeCN, 5:45:50 v/v, pH 3, direkt in Flußzelle injiziert, 48 Scans, 256 Inkremente in F1, totale Akquisitionszeit 9.5 h)

Obwohl das Molekül zwei Stickstoff-Funktionen besitzt, trug es den ESI-MS-Daten zufolge in acider Lösung nur ein ionisierendes Proton (Tab. 2, Seite 54). Im HPLC-NMR-Experiment erschien im Vergleich der <sup>1</sup>H-Daten unter protonierten und deuterierten Bedingungen nur ein neues Signal bei *ca.* 10.3 ppm, das theoretisch entweder 1-H oder einem ionisierenden Proton an N-11 zuordenbar war. Da das Signal keine skalare Kopplung zu einem Nachbarproton zeigte, war seine Identität im TOCSY-Experiment nicht aufklärbar. Im WET-NOESY Experiment gelang jedoch die eindeutige Identifizierung des austauschbaren Protons (Abb. 30, oben) durch die Beobachtung dipolarer Wechselwirkungen zwischen 1-H und dessen benachbarten Protonen 3-H und 20-H.

Diese Untersuchungen demonstrierten erstmals, daß es mit der HPLC-NMR möglich ist, austauschende Protonen durch den Vergleich von "D<sub>2</sub>O-Spektren" mit "H<sub>2</sub>O-Spektren" zu identifizieren. Dabei sind mit TOCSY-oder NOESY-Experimenten auch unterschiedliche austauschende Protonen tragende Gruppen unterscheidbar. Zudem können die Positionen der aciden Protonen im Molekül genau identifiziert werden, wie die NMR-Analyse von **46** bewies. Interessanterweise zeigte sich in letzterem Fall kein zweites Proton an N-11.

Dieses Verhalten tertiärer Stickstoff-Funktionen konnte auch am Beispiel von (-)-Nicotin (**47**) beobachtet werden. Obwohl das vorbereitende LC-MS-Experiment eine Massenzunahme von +1 u bei Verwendung von D<sub>2</sub>O als Solvens verzeichnete (Tab. 2, Seite 54), tauchten im NMR-Experiment unter aciden protischen Bedingungen keine austauschenden Protonen auf. Auch beim *N*-Methyl-Analogon von **6**, *N*-Methyldioncophyllin A (**40**), war trotz Massenshift kein *N*-H-Proton detektierbar.

Eine Erklärung für diesen Befund ist wahrscheinlich in der Geschwindigkeit des chemischen Austausches der Protonen zu suchen. Die vorbereitenden LC-MS-Untersuchungen lieferten deutliche Hinweise auf einen schnellen Verlauf des H/D-Austausches, da bereits unmittelbar nach dem Vorbereiten der deuterierten Probe keine M<sub>H</sub>-Signale mehr detektierbar waren. Im Falle eines schnellen H/D-Austausches wird zwar ein kurzzeitig am Stickstoff gebundenes Proton durch den NMR-Puls angeregt, aber vor der Akquisitionsphase chemisch ausgetauscht und ist deshalb als solches nicht detektierbar. Dabei ist die H/D-Austauschgeschwindigkeit stark vom pH-Wert der Lösung abhängig, wie am Beispiel von amidischen Protonen in Proteinen gezeigt wurde.<sup>[261,262]</sup> Die bei entsprechenden NMR-Untersuchungen herrschenden pH-Werte schwankten zwischen 3 und 5.<sup>[261,262]</sup> Obwohl die verwendeten Alkaloidstandards sich strukturell stark von solchen Makromolekülen unterscheiden, scheint ein pH-Wert von *ca.* 3 für die Untersuchung von sekundären Aminen geeignet zu sein. Offensichtlich zeigen deren Aminoprotonen unter diesen Bedingungen einen langsamem H/D-Austausch bzgl. der NMR-Zeitskala.

Ein ähnliches Phänomen spielt vermutlich auch bei den in den Standardalkaloiden vorhandenen aliphatischen und phenolischen *O*-H-Funktionen eine Rolle. In keinem Falle konnte eine Hydroxylproton durch Spektrenvergleich oder 2D-Experimente detektiert werden. Der Grund dafür könnte in einer zufällige Überlappung des Signals mit dem verbleibenden HOD-Lösungsmittelpeak und damit in einer Unterdrückung durch die WET-Sequenz liegen. Protonen von aliphatischen Hydroxylfunktionen wurden unter ähnlichen Bedingungen bei Verwendung von optimierten Lösungsmittelunterdrückungssequenzen bereits detektiert.<sup>[263]</sup> Diese Protonen zeigten jedoch keine intramolekularen Korrelationen, wohl aber intermolekulare Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel.

Ein experimenteller Ansatz, der unter Umständen die Beobachtung "problematischer" Signale wie von Hydroxylprotonen ermöglichen sollte, basiert auf der Herabsetzung der Geschwindigkeit des H/D-Austausches. Als geeignete Maßnahmen dafür böten sich die Herabsetzung der Proben temperatur oder die Zugabe von viskosen Lösungsmitteln, wie z.B. von Glycerin<sup>[264]</sup>, an. Eine konsequente Fortführung dieser Studien verspricht in der Zukunft einen deutlich erweitertes Leistungsspektrum für die HPLC-NMR-Spektroskopie.

### 3.3 Anwendungen der "Triade" HPLC-NMR, HPLC-MS/MS und HPLC-CD

#### 3.3.1 Phytochemische Untersuchung von *Ancistrocladus griffithii*

##### 3.3.1.1 Probenaufsammlung und Dimerenscreening

*Ancistrocladus griffithii* ist eine in Thailand beheimatete Liane, die erstmalig 1849 von Planchon beschrieben wurde.<sup>[265]</sup> In den letzten 150 Jahren fand keine weitere wissenschaftliche Beschreibung oder Aufsammlung dieser Pflanze statt. Erst im Frühjahr 2000 wurde *A. griffithii* wieder im Rahmen einer eigenen botanischen Exkursion (zusammen mit H. Rischer aus unserem Arbeitskreis) im Chong Tone Nationalpark (Thailand) wiedergefunden und kleine Mengen Pflanzenmaterial als Herbarbeleg und für phytochemische Untersuchungen gesammelt. Morphologisch\* unterscheidet sich *A. griffithii* deutlich von dem in dieser Region ebenfalls wachsenden *A. tectorius*, so daß eine nähere phytochemische Untersuchung aussichtsreich erschien.

Zusätzliches Interesse für *A. griffithii* wurde durch eine photometrische Screeningmethode geweckt, die von Schlauer in unserem Arbeitskreis etabliert wurde und hier erstmals zur Anwendung kam.<sup>[266]</sup> Diese Methode ist dazu geeignet, das Vorkommen dimerer Naphthylisochinolin-Alkaloide in rohen Pflanzenextrakten ohne großen experimentellen Aufwand anzuzeigen. Dimere Naphthylisochinolin-Alkaloide sind eine pharmakologisch interessante Stoffgruppe, da einige ihrer Vertreter, wie z.B. Michellamin B (**3**) (Abb. 31, unten), gute anti-HIV-Aktivität<sup>[22,23]</sup> aufweisen. Ein erst vor kurzem entdecktes Heterodimer, Korundamin A (**48**), zeigt zusätzlich eine vielversprechende antiplasmodiale Aktivität.<sup>[267]</sup>

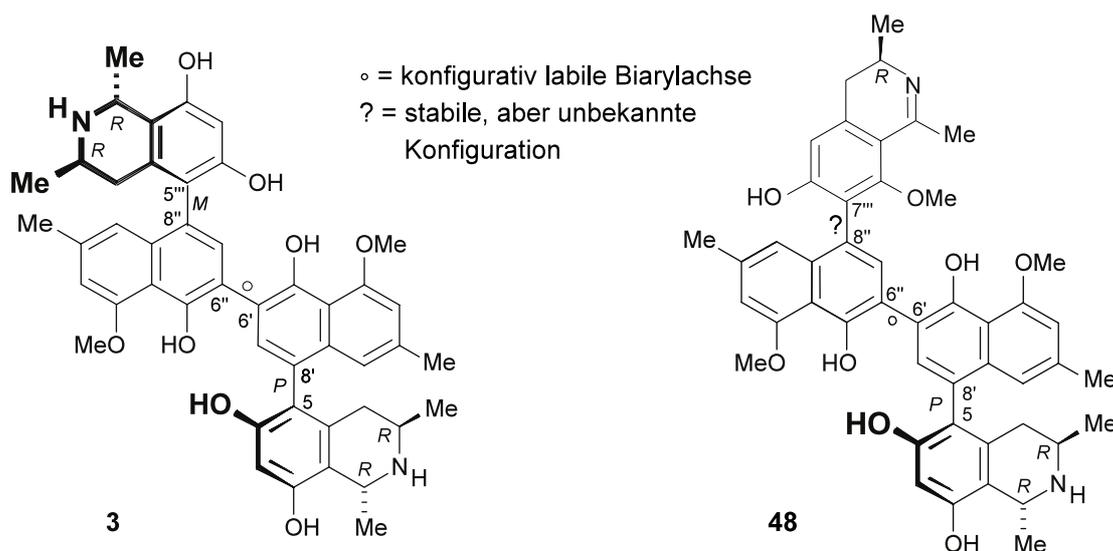
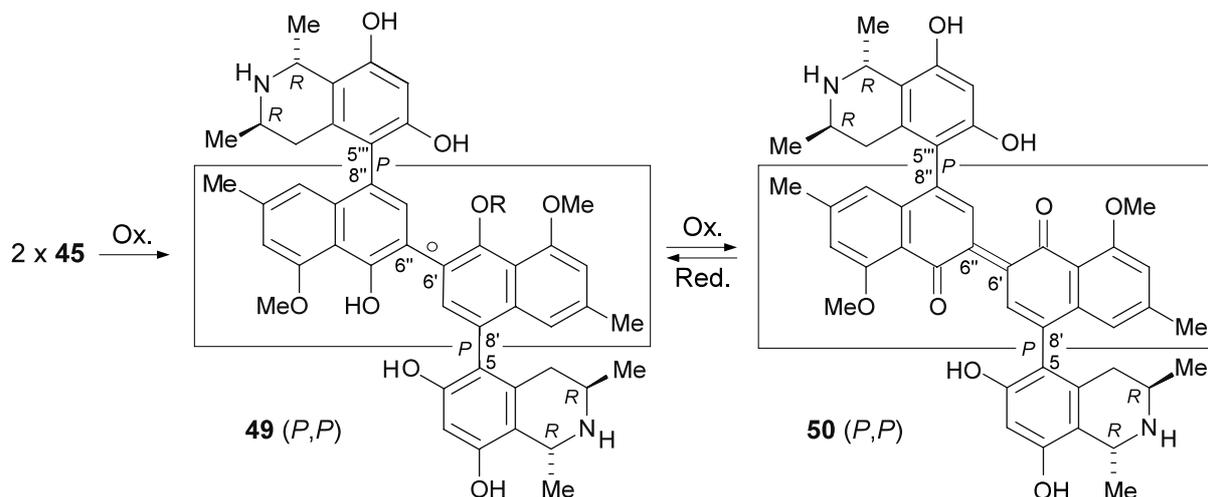


Abb. 31. Von pharmakologischem Interesse: Dimere Naphthylisochinolin-Alkaloide wie Michellamin B (**3**) oder Korundamin A (**48**)

\* Für eine ausführliche botanische Beschreibung von *A. griffithii* sei auf Lit.<sup>[149]</sup> verwiesen.

Der neue Dimerentest basiert auf der Möglichkeit, Moleküle mit einem binaphtholischen Zentralbaustein (wie z.B. in den Michellaminen vorhanden) durch Anwendung von Oxidationsmitteln in die intensiv farbigen Chinone zu überführen (Schema 13, unten). Erkannt wurde diese Reaktivität bei den ersten Michellamin-Totalsynthesen.<sup>[268]</sup> Diese basierten auf der biomimetischen<sup>[269]</sup> phenoloxidativen Dimerisierung der jeweiligen *O*-benzylierten und *N*-formylierten Monomerbausteine. Dabei kam es zur Überoxidation der erwünschten Syntheseprodukte zu den Chinonen, die allerdings durch eine milde Reduktion, z.B. mit NaBH<sub>4</sub>, leicht wieder rückgängig gemacht werden konnte.<sup>[270]</sup> Die Verwendung milder Oxidationsmittel, z.B. von Pb(OAc)<sub>4</sub>, ermöglichte seit kurzem auch die Dimerisierung von ungeschützten Monomervorstufen, wie z.B. von Korupensamin A (**45**) (Abb. 27, Seite 53).<sup>[271]</sup> Bei der Synthese entstand das überoxidierte, intensiv blau-violett gefärbte chinoiden Intermediat **50**, welches anschließend unter milden Bedingungen zum Michellamin A (**49**) reduziert wurde.<sup>[271]</sup>



Schema 13. Oxidative Dimerisierung von **45** zum chinoiden Intermediat **50** und anschließende Reduktion zu **49** (eingehrahmt die für die Farbreaktion des Dimeren-Tests entscheidende Strukturelemente)

Diese Überoxidation zum Chinon funktioniert auch in Extrakt-Matrizes und läßt sich nicht nur photometrisch, sondern durch den intensiven Farbumschlag bei nur schwach gefärbten Extrakten oft sogar mit bloßem Auge überwachen. Im Rahmen dieses Screenings wurde für den *A.-griffithii*-Blattextrakt eine äußerst intensive Absorption beobachtet, die in einer Testreihe mit 18 Arten nur von *A. korupensis* übertroffen wurde.<sup>[266]</sup> Allerdings läßt der Test natürlich keine näheren Strukturaussagen zu, weswegen die Anwendung spezifischerer Analysemethoden wie HPLC-NMR- und HPLC-MS/MS-Kopplung nötig wurde.

### 3.3.1.2 Detektion und Isolierung von Ancistrogriffithin A (51)

Als Ausgangspunkt der phytochemischen Untersuchungen von *A. griffithii* wurden kleine Mengen Blattmaterial (ca. 1 g Trockengewicht) in H<sub>2</sub>O/MeCN sauer mazeriert und der resultierende Extrakt per HPLC-UV untersucht (Abb. 32, unten). Dabei zeigten sich unter Umkehrphasen-Bedingungen (C<sub>18</sub>, H<sub>2</sub>O/MeCN mit TFA als Puffer) bei 254 nm zwei gut separierbare Hauptsignale.

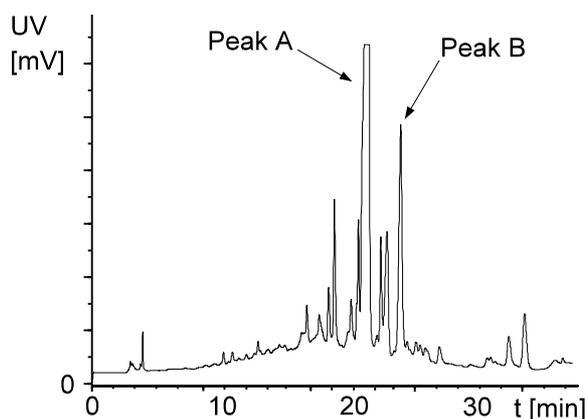


Abb. 32. Vorbereitendes HPLC-UV-Chromatogramm eines Blattextraktes von *A. griffithii* mit den beiden Hauptpeaks A und B (254 nm)

Als Mittel der Wahl zur Detektion und Charakterisierung dimerer Naphthylisochinolin-Alkaloide bot sich die HPLC-ESI-MS/MS-Spektrometrie an (Abb. 33, Seite 61). Wie am Beispiel der Michellamine in der Vergangenheit demonstriert wurde,<sup>[34]</sup> liegen diese in saurer Lösung in einem Gleichgewicht sowohl in mono- als auch in diprotonierter Form vor - im Gegensatz zu ihren monomeren Bausteinen, den Korupensaminen, die mit nur einer Stickstoff-Funktion naturgemäß nur monoprotioniert auftreten. Damit lassen sich Dimere mit der HPLC-MS leicht von den Monomeren unterscheiden, selbst bei schlechter chromatographischer Auflösung.

Die anschließende HPLC-MS-Untersuchung zeigte eindeutig das Vorliegen zweier Hauptkomponenten an. Die schneller eluierende Substanz ("Peak A") wies bei gleicher Retention zwei Ionensignale bei  $m/z$  785.4 und 393.3 auf. Dieser Befund deutete auf die Existenz eines Naphthylisochinolin-Dimers mit der Summenformel C<sub>48</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> hin, welches sowohl in monoprotionierter ([M + H]<sup>+</sup>) als auch diprotonierter ([M + 2H]<sup>2+</sup>) Form in Lösung vorlag (Abb. 33a - c, Seite 61). Diese Vermutung bestätigte sich nach einem MS/MS-Tochterionenexperiment (Abb. 33d, Seite 61). Das Precursorion mit  $m/z$  393.4 lieferte dabei Fragmente bis zu einer Größe von  $m/z$  742.4, welche sich nur durch das Vorliegen eines mehrfach geladenen Precursorions erklären ließen. Dabei entspricht  $m/z$  742.4 der theoretischen Masse eines monoprotionierten Fragments [M + H - C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N]<sup>+</sup>, welches nach der Retro-Diels-Alder-Fragmentierung eines dimeren, in beiden Hälften 6,8-dioxygenierten

Naphthylisochinolin-Alkaloids entsteht.<sup>[34]</sup> Die Strukturvermutung wurde durch weitere Fragmente mit  $m/z$  384.8 ( $[M + 2H - NH_3]^{2+}$ ) und 371.7 ( $[M + 2H - C_2H_5N]^{2+}$ ) gestützt.

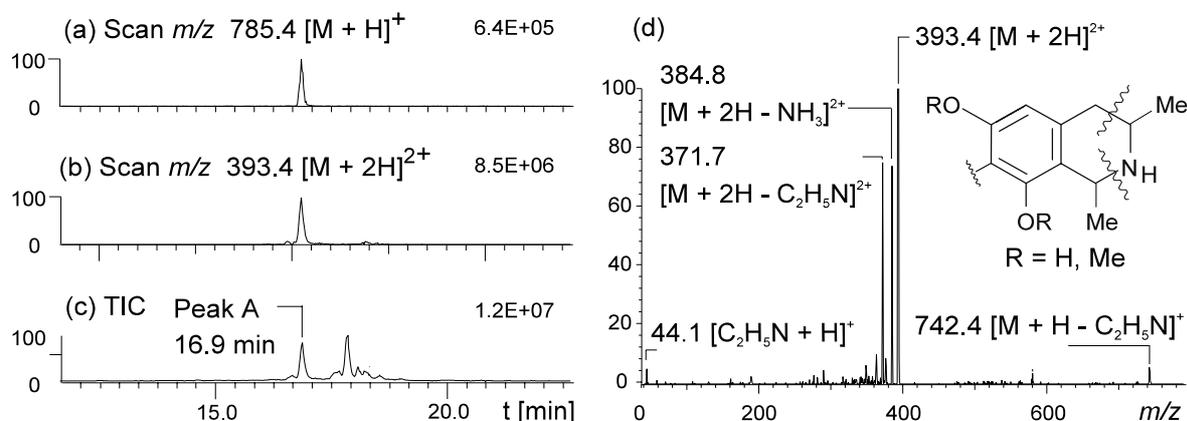


Abb. 33. HPLC-ESI-MS/MS Untersuchung eines Blattextraktes von *A. griffithii*: (a) rekonstruiertes Ionenchromatogramm von  $m/z$  785.4; (b) rekonstruiertes Ionenchromatogramm von  $m/z$  393.4; (c) rekonstruiertes Totalionenchromatogramm; (d) Produktionenspektrum ( $m/z$  393.4) von Peak A

Da Summenformel und Massenspektrum der neuen Verbindung mit keinem bekannten Naphthylisochinolin-Dimer in Einklang zu bringen waren,<sup>[22,23,267]</sup> bot sich zur weiteren Strukturaufklärung die HPLC-NMR-Kopplung an. Die Untersuchung von "Peak A" im stop-flow-Modus lieferte ein  $^1H$ -NMR-Spektrum mit einem typischen Naphthylisochinolin-Signalmuster, welches aber nur zwölf Protonensignale aufwies (Abb. 34, unten), nicht 24, wie aufgrund der Summenformel in Analogie zu Michellamin B (**3**) (Abb. 31, Seite 58) zu erwarten gewesen wäre.

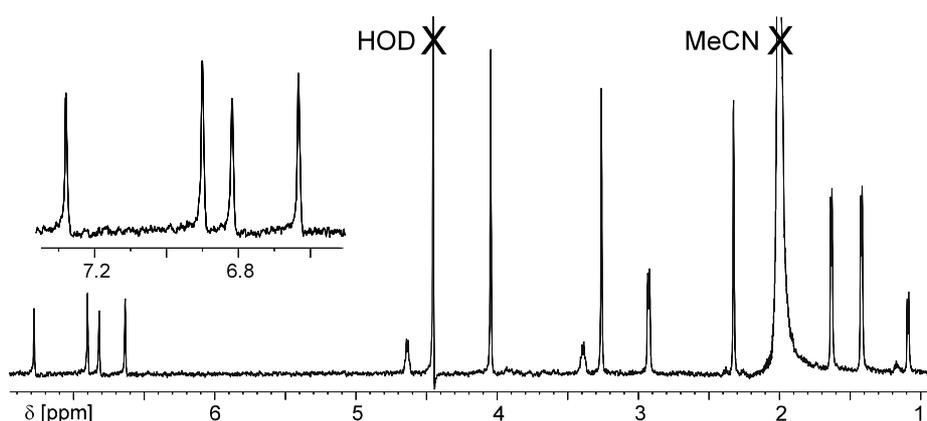


Abb. 34. Stop-flow- $^1H$ -NMR-Spektrum eines Blattextraktes von *A. griffithii* bei  $t_R = 19.7$  min ("Peak A", 32 Scans, WET-Solvensunterdrückung)

Als Grund für die Halbierung des Signalsatzes kam nur eine magnetischen Äquivalenz der beiden monomeren Hälften des neuen Dimers Ancistrogriffithin A (**51**) in Frage, wie sie z.B. auch im  $C_2$ -symmetrischen Michellamin A (**49**) besteht. Eine Analyse der

Kopplungskonstanten und ein HPLC-TOCSY-Experiment ermöglichten die Identifikation einzelner Spinsysteme und Strukturelemente. So wurden im aliphatischen Signalbereich die Signale bei  $\delta_{\text{H}}$  1.41, 3.39 und 2.92 ppm den Protonen an 3-CH<sub>3</sub>, 3-H und den sich überlappenden Protonen an 4-H zugeordnet. Das Dublett bei  $\delta_{\text{H}}$  1.63 ppm zeigte eine skalare Kopplung zu einem Quartett bei  $\delta_{\text{H}}$  4.63 ppm (1-H). Weiterhin wurde 5-H bei  $\delta_{\text{H}}$  6.63 ppm durch eine TOCSY-Korrelation zu 4-H identifiziert. Folgerichtig mußte der Isochinolinbaustein in 7-Position an die Naphthalin-Hälfte gekuppelt sein. Das Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  7.27 ppm zeigte im Vergleich zu den anderen aromatischen Protonen eine für 7'-H typische Tieffeldverschiebung, die mit der *meta*-ständigen Sauerstoff-Funktion an C-5' erklärbar ist.

Ein HPLC-ROESY-Experiment ermöglichte schließlich weitere Strukturaussagen bezüglich Konnektivität und relativer Konfiguration (Abb. 35, unten).

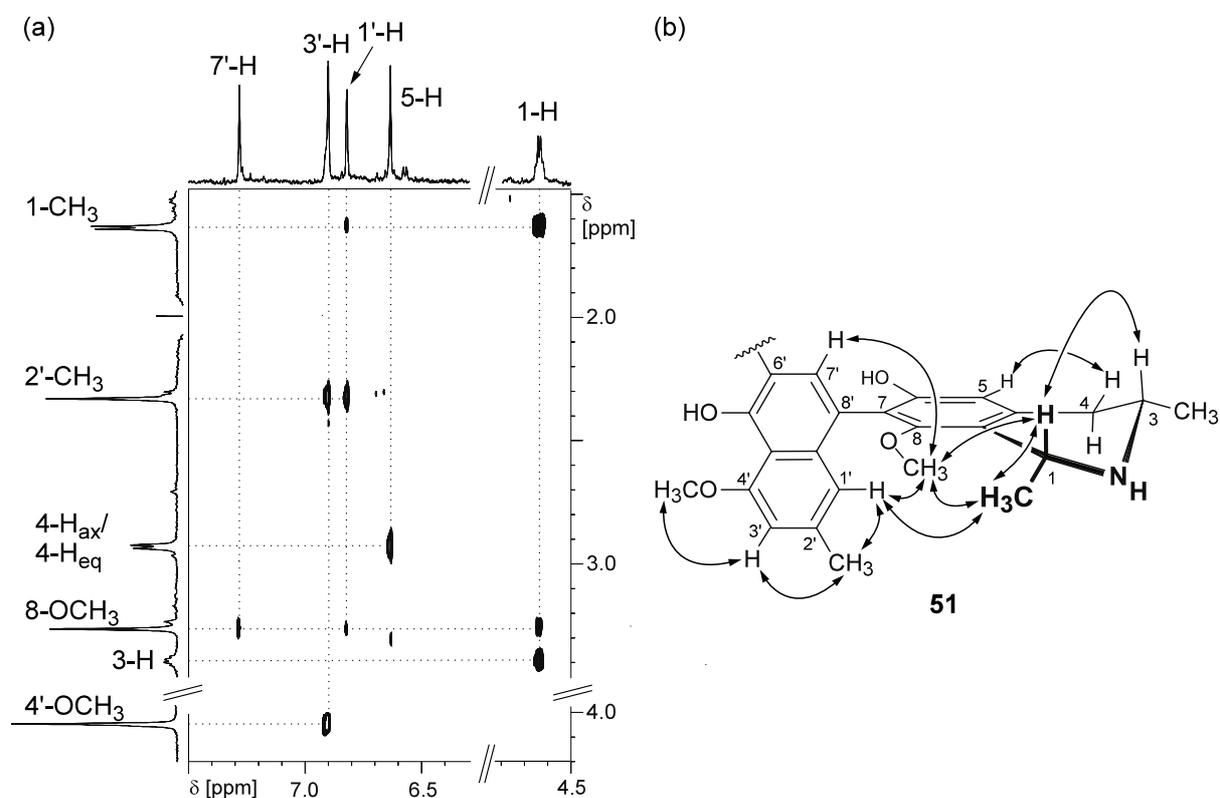


Abb. 35. (a) WET-ROESY-Spektrum von **51** (72 Scans, 359 Inkremente in F1, totale Akquisitionszeit 17 h); (b) Ausgewählte WET-ROESY-Korrelationen von **51** zur Bestimmung der relativen Konfiguration der Stereozentren und an der Achse (Die absolute Konfiguration ist willkürlich dargestellt.)

Die Methoxygruppe bei  $\delta_{\text{H}}$  3.26 ppm zeigte eine ROE-Korrelation zu 1-H und 1-CH<sub>3</sub> und mußte deshalb an C-8 positioniert sein. Weiterhin ordnete eine Korrelations-Sequenz mit  $\{\delta_{\text{H}}$  4.04  $\leftrightarrow$  6.90  $\leftrightarrow$  2.33  $\leftrightarrow$  6.81 ppm $\}$  die entsprechenden Protonen als  $\{4'-\text{OCH}_3 \leftrightarrow 3'-\text{H} \leftrightarrow 2'-\text{CH}_3 \leftrightarrow 1'-\text{H}\}$  zu. Korrelationen der beiden Naphthalinprotonen 1'-H und 7'-H zu 8-OCH<sub>3</sub> belegten zweifelsfrei den 7,8'-Kupplungstyp der beiden identischen Hälften von **51**.

Folgerichtig mußten die beiden Hälften des Dimers **51** an der letzten, "unbelegten" Position C-6' miteinander verknüpft sein, was zu einem 7,8'-6',6"-8",7"'-Kopplungstyp im Gesamtmolekül führte (Abb. 35, Seite 62).

Die Beobachtung dieser "Zangen"-ROE-Wechselwirkung zwischen 7'-H, 8-OCH<sub>3</sub> und 1'-H stellt ein sehr schönes Beispiel dafür dar, wie methodische Modifikationen (in diesem Fall der Einsatz eines Probenkopfes mit einem verringerten Zellvolumen von 60 µl und die WET-Solvensunterdrückung) deutlich verbesserte Ergebnisse hervorbringen können. So waren in früheren Arbeiten<sup>[35,36,38]</sup> in keinem Fall LC-ROESY-Wechselwirkungen über die Biarylachse hinweg beobachtet worden.

Bezüglich der relativen Konfiguration von **51** offenbarte eine starke ROE-Korrelation zwischen 1-H und 3-H eine *cis*-Anordnung der Methylgruppen im Molekül (Abb. 35, Seite 62). Noch bedeutender erschien eine schwache, aber signifikante Korrelation zwischen 1'-H und 1-CH<sub>3</sub>, da long-range-Korrelationen dieser Art zur Aufklärung der relativen Achsenkonfiguration geeignet sein können.<sup>[26,272]</sup> Damit wurde erstmals ein derart weitreichender ROE-Effekt über die Biarylachse beobachtet. Im konkreten Fall wurde dies auf eine weitere Optimierung des experimentellen Aufbaus, d.h. auf die Verwendung von 3.0-mm-Säulen (anstatt der üblichen 4.6 mm), zurückgeführt. Wie in Kap. 3.2.1 (Tab. 1, Seite 39) besprochen kann eine Verringerung des Säulendurchmessers zu einer Erhöhung der Analytkonzentration im chromatographischen Peak führen. In älteren Messungen an einer gleichartigen Probe waren mit dem alten 4.6-mm-Aufbau diese weitreichende Wechselwirkung nicht erkennbar.

Aufgrund dieses Ergebnisses war die gesamte relative Konfiguration von **51** mit Hilfe der HPLC-NMR-Kopplung bestimmt, und es galt nun, dem neuen Dimeren die korrekte absolute Konfiguration zuzuweisen, d.h. eine Auswahl zwischen den beiden verbliebenen Möglichkeiten (1*S*,3*R*,7*P*) und (1*R*,3*S*,7*M*) zu treffen.

Daß beide monomere Hälften bei Raumtemperatur stabile Achsenkonfigurationen an 7,8' aufwiesen, wurde auch durch HPLC-CD-Spektren bestätigt (Abb. 36, Seite 64). Diese zeigten im Bereich von 200 bis 300 nm intensive  $\pi, \pi^*$ -Banden, wie sie im Falle chiraler, biarylischer  $\pi$ -Chromophore zu erwarten sind.<sup>[38]</sup>

Leider war es zur Ermittlung der absoluten Konfiguration nicht möglich, eine CD-Spektren-Vorhersage für **51** mit Hilfe von quantenchemischen Berechnungen zu treffen. Grund dafür dürfte die relativ große konformative Flexibilität von **51** sein, das neben den zwei stabilen "äußeren Monomerachsen" auch noch eine labile, "innere Dimerachse" aufweist. Ersatzweise wurden jeweils kleine Mengen Blatt- und Zweigextrakt von *A. griffithii* dem rutheniumkatalysierten, oxidativen Abbau<sup>[250]</sup> unterworfen, der sich in unserem Arbeitskreis

zur Bestimmung der absoluten Konfiguration an C-3 von Naphthylisochinolin-Alkaloiden,<sup>[16]</sup> auch im Extrakt,<sup>[38]</sup> bewährt hat.

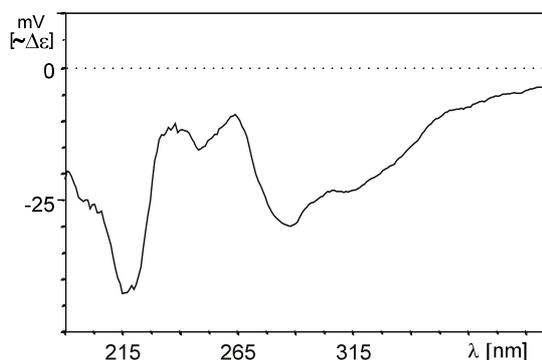


Abb. 36. HPLC-CD-Spektrum von **51** im Blattextrakt von *A. griffithii* ( $t_R = 19.5$  min)

In der GC-MSD-Analyse wurden nur die veresterten Mosher-Derivate von (3*S*)-3-Aminobuttersäure und (3*S*)-3-*N*-Methylaminobuttersäure im Blatt- und Zweigextrakt detektiert. Dies bedeutet, daß alle in *A. griffithii* in nennenswerten Mengen vorkommenden Naphthylisochinolin-Alkaloide, und damit auch das im Blattextrakt als Hauptalkaloid vorliegende **51**, (3*S*)-Konfiguration aufweisen, da der SIM-Modus auch geringste Restmengen von (*R*)-konfigurierten Abbauprodukten anzeigen würde. Damit war die absolute Konfiguration von Ancistrogriffithin A (**51**) (Abb. 37, unten) eindeutig als (1*R*,3*S*,7*M*) bestimmt.

Mit Hilfe der erhaltenen HPLC-MS- und HPLC-NMR-Daten war es später möglich, **51** auch im wäßrig-sauerem Zweigextrakt von *A. griffithii* zu detektieren. Um genügend Material für biologische Testungen (Kap.3.3.1.7, Seite 75) zu erhalten und um die zuvor in der HPLC-NMR getroffenen Strukturaussagen zu bestätigen, wurde **51** daraus in mehreren chromatographischen Schritten isoliert. Die offline-NMR-Daten bestätigten alle bereits in der HPLC-NMR gemachten strukturellen Aussagen, inklusive der relativen Konfiguration.

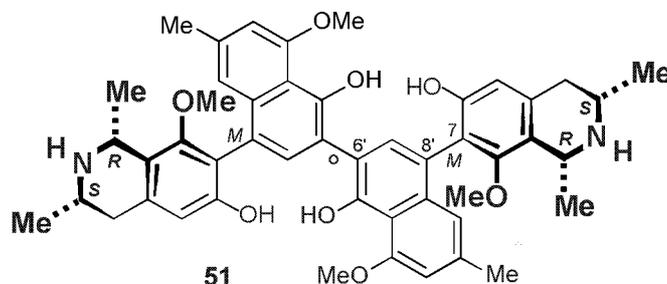


Abb. 37. Ancistrogriffithin A (**51**), das erste dimere Naphthylisochinolin-Alkaloid aus einer asiatischen Spezies, *A. griffithii*

### 3.3.1.3 Detektion und Isolierung von Ancistrogriffin A (52)

Wie bereits im vorigen Kapitel erwähnt, lag neben **51** im Blattextrakt noch eine zweite, langsamer eluierende Hauptkomponente ("Peak B") vor (Abb. 38a, unten). Diese zeigte in der HPLC-MS/MS-Analyse ein ausschließlich monoprotoniertes Pseudomolekülion  $[M + H]^+$  mit  $m/z$  408.3. Tochterionenspektren produzierten Fragmente mit  $m/z$  351.4 (-57 u), die sich mit der Retro-Diels-Alders-Fragmentierung eines einfach *N*-methylierten und zweifach *O*-methylierten, 6,8-dioxygenierten Tetrahydronaphthylisochinolines in Einklang bringen ließen (Abb. 38b, unten).

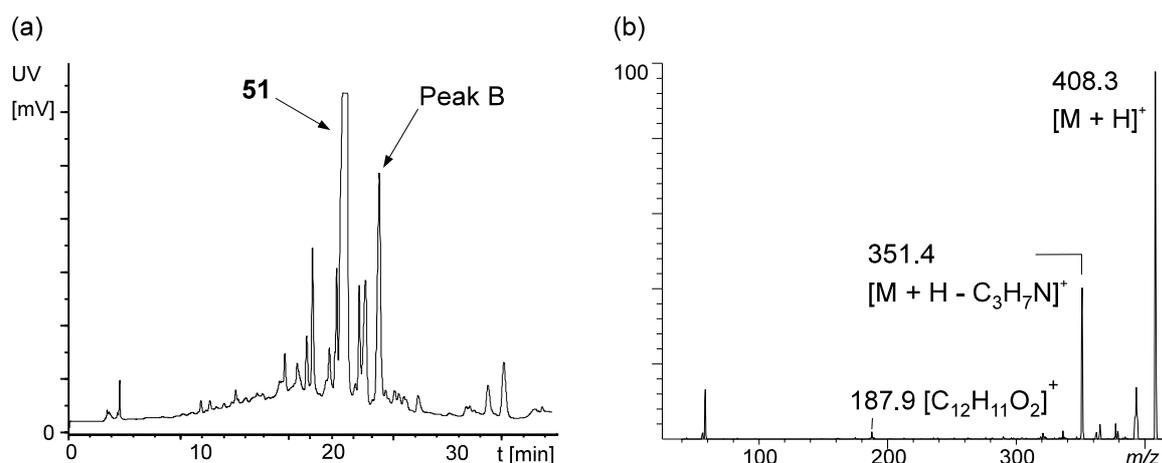


Abb. 38. (a) HPLC-UV-Chromatogramm des Blattextraktes von *A. griffithii* bei 254 nm; (b) HPLC-MS/MS-Tochterionenspektrum von Peak B ( $t_R = 17.8$  min, 25 eV)

Da anhand der vorliegenden Daten noch keine Identifikation möglich war, wurden HPLC-NMR-Experimente durchgeführt, die auch TOCSY- und ROESY-Experimente beinhalteten (Abb. 39, Seite 66). Das  $^1\text{H}$ -NMR bestätigte die Identität eines neuen Naphthylisochinolin-Alkaloids, welches Ancistrogriffin A (**52**) benannt wurde. Neben den beiden Methoxyfunktionen bei  $\delta_{\text{H}}$  3.17 und 4.06 ppm trat noch ein Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  2.73 ppm auf, welches zu drei Protonen integrierte und deshalb der *N*-Methyl-Gruppe zugeordnet wurde. Dies wurde auch bestätigt durch ROE-Korrelationen zwischen *N*-Methyl und 3- $\text{CH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  1.42 ppm) bzw. 1-H ( $\delta_{\text{H}}$  4.58 ppm). Das Proton 3-H zeigte weiterhin einen deutlichen ROE-Effekt zu 1- $\text{CH}_3$  bei  $\delta_{\text{H}}$  1.60 ppm, der eine *trans*-Stellung der Methylgruppen im Isochinolin-Ring belegte.

Zur Aufklärung des Kupplungstyps erwies sich im Fall von **52** das TOCSY-Experiment als besonders wertvoll (Abb. 39, Seite 66). Während zwischen 4-H und 5-H nur eine äußerst schwache ROESY-Korrelation bestand, war im TOCSY eine deutliche skalare Kopplung sichtbar. Damit wurde C-5 als Kupplungsposition ausgeschlossen, genauso wie C-1' und C-3', da 2'- $\text{CH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.24 ppm) TOCSY-Korrelationen zu zwei benachbarten aromatischen Protonen, 1'-H und 3'-H ( $\delta_{\text{H}}$  6.65 und 6.71 ppm) zeigte. Eine über die Biarylachse reichende Korrelationssequenz von {5'- $\text{OCH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  4.06 ppm)  $\leftrightarrow$  6'-H ( $\delta_{\text{H}}$  6.97 ppm)  $\leftrightarrow$  7'-H ( $\delta_{\text{H}}$  7.27

ppm)  $\leftrightarrow$  8-OCH<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  3.17ppm)  $\leftrightarrow$  1-H} legte schließlich die Identität der beiden Methoxyfunktionen und den 7,8'-Kupplungstyp von **52** eindeutig fest.

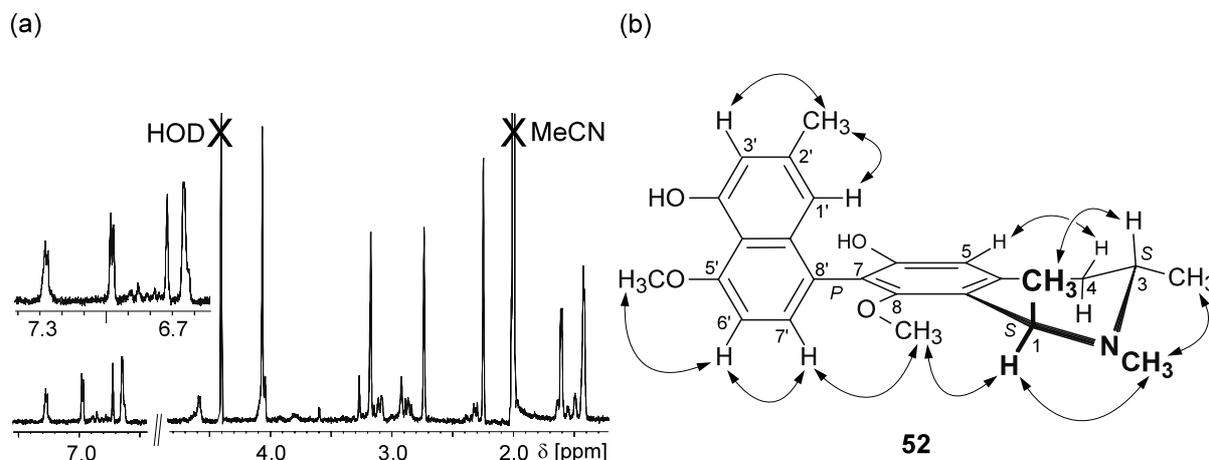


Abb. 39. (a) HPLC-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Peak bei  $t_{\text{R}} = 23.5$  min; (b) Strukturell bedeutende ROESY-Korrelationen aus TOCSY- und ROESY-Experimenten von Ancistrogriffin A (**52**) (absolute Konfiguration und relative Achsenkonfiguration willkürlich gewählt)

Anders als bei **51** war in diesem Fall in der online-NMR keine achsenkonfigurationsrelevante ROE-Wechselwirkung zu beobachten. Aus diesem Grund wurde die HPLC-CD-Spektroskopie zur Bestimmung der absoluten Achsenkonfiguration herangezogen. Beim Vergleich der CD-Spektren von **52** (in H<sub>2</sub>O/MeCN) und dem von Zagst<sup>[273]</sup> isolierten, strukturell sehr ähnlichen 6-*O*-Desmethylanastrobrevin A (**53**) zeigt sich eine deutliche Übereinstimmung des CD-Effektes, besonders im für die  $\pi, \pi^*$ -Banden entscheidenden, achsenrelevanten Bereich von 200-250 nm (Abb. 40, unten). Da in früheren Arbeiten gezeigt worden war, daß ein CD-Vergleich von strukturell ähnlichen Verbindungen in verschiedenen polaren Lösungsmitteln wie EtOH und H<sub>2</sub>O/MeCN zulässig ist,<sup>[38]</sup> wurde **52** in Übereinstimmung mit **53** eine (*P*)-Konfiguration an der Achse zugeordnet.

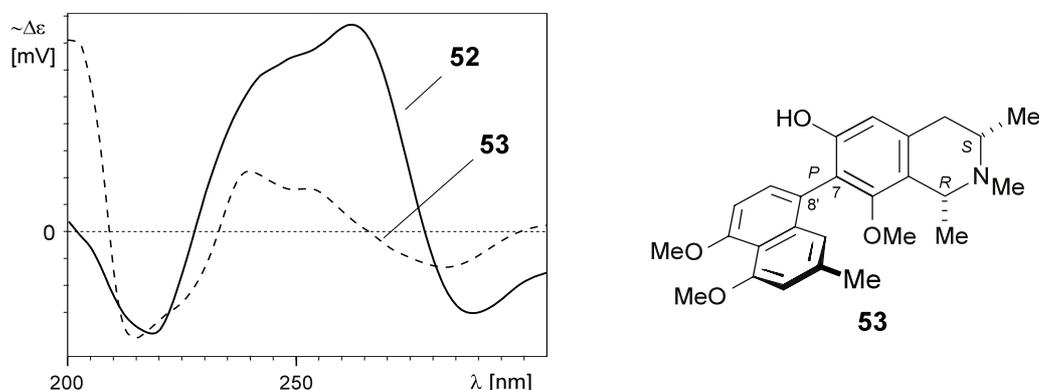


Abb. 40. HPLC-CD-Spektrum von **52** ( $t_{\text{R}} = 24.0$  min) und offline-Vergleichsspektrum von 6-*O*-Desmethylanastrobrevin A (**53**) (in EtOH)<sup>[16,273]</sup>

Zur Bestimmung der Konfiguration der Stereozentren an C-1 und C-3 wurde schließlich auf die Ergebnisse des in Kap. 3.3.1.2 (Seite 60) beschriebenen Extraktabbaus zurückgegriffen. Da demnach an C-3 eine (*S*)-Konfiguration vorlag und ein WET-ROESY-Experiment eine *trans*-Stellung der Methylgruppen anzeigte, wurde die gesamte absolute Konfiguration von Ancistrogriffin A (**52**) zu (1*S*,3*S*,7*P*) bestimmt (Abb. 41a, unten).

Nach der gezielten Isolierung von **52** aus dem Blattextrakt wurde die Strukturaussage mittels offline-NMR überprüft. Dabei enthüllte das NOESY-Experiment zwei weitere Korrelationen zwischen 8-OCH<sub>3</sub> und 1'-H bzw. 1-CH<sub>3</sub> und 1'-H, die den 7,8'-Kupplungstyp untermauerten (Abb. 41b, unten). Als besonders strukturelevant erwies sich dabei die letztere Korrelation, da mit ihrer Hilfe auch die im HPLC-CD-Experiment gemachte Vorhersage zur (*P*)-Achsenkonfiguration von **52** ihre Bestätigung fand.

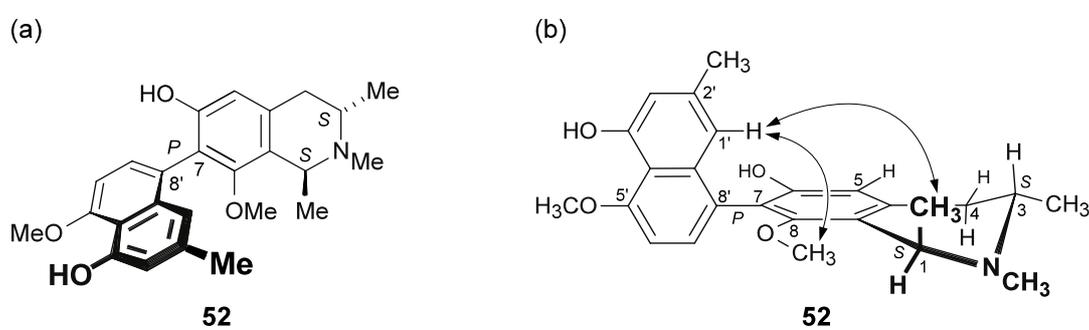


Abb. 41. (a) Absolute Stereostruktur von Ancistrogriffin A (**52**) aus *A. griffithii*; (b) zusätzliche, im offline-NMR beobachtete, strukturbestätigende ROESY-Wechselwirkungen

### 3.3.1.4 Detektion von Ancistrogriffin B (**54**)

Im Laufe der Isolierung von **51** aus dem Zweigextrakt von *A. griffithii* fielen während der säulenchromatographischen Vorfraktionierung des Extraktes über Kieselgel mehrere Fraktionen unterschiedlicher Polarität an, die ebenfalls mit HPLC-MS und HPLC-NMR untersucht wurden. In einer sehr kleinen (*ca.* 4 mg), relativ polaren Fraktion zeigte sich der Peak eines Minderalkaloids ("Peak C") (Abb. 42a, Seite 68), das auf C<sub>18</sub>-Phase mit relativ kurzer Retentionszeit eluierte.

Das HPLC-MS/MS-Spektrum von Peak C (Abb. 42, Seite 68) zeigte bei *m/z* 394.2 das typische Fragmentierungsmuster eines Tetrahydroisochinolin-Alkaloids, erkennbar an den Fragmenten mit *m/z* 377.3 (-16.9 u, [M + H - NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>) und *m/z* 350.9 (-43.3 u, [M + H - C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N]<sup>+</sup>). Desweiteren zeigte sich ein prominenter Peak bei *m/z* 201.9 [C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup>, der auf einen zweifach methoxylierten Naphthalinbaustein hinwies. Aufgrund der Gesamtmasse

ließ dies die Vermutung zu, daß der Isochinolinbaustein weder *O*- noch *N*-methyliert vorliegen sollte.

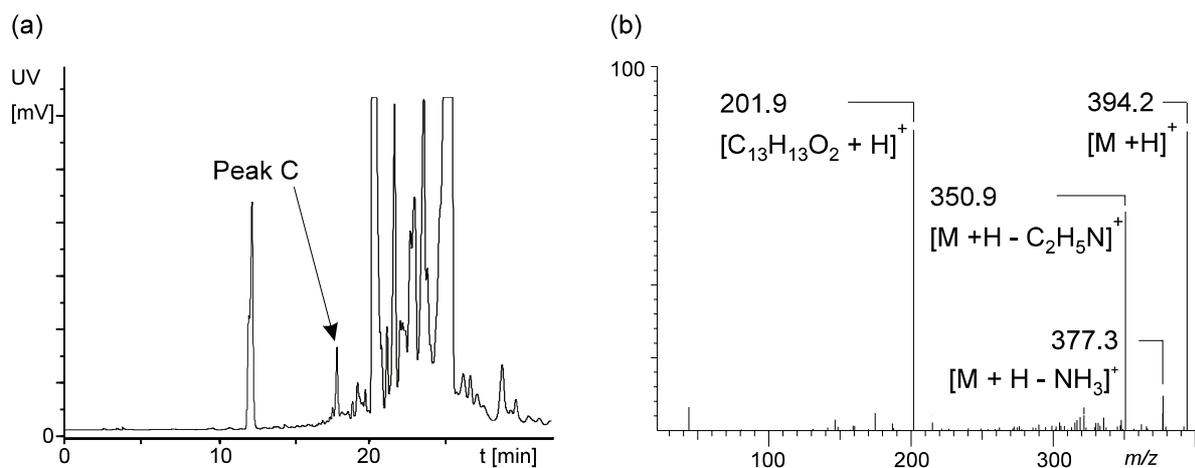


Abb. 42. (a) HPLC-UV-Chromatogramm einer polaren Zweigextraktfraktion nach Säulenchromatographie über Kieselgel (254 nm,  $t_R = 17.6$  min); (b) HPLC-MS/MS-Spektrum von "Peak C" ( $t_R = 16.0$  min, 35 eV)

In diesem Falle demonstrierte die HPLC-NMR ihre hervorragenden Fähigkeiten im Bereich der massenlimitierten Analytik. Obwohl nur eine geringe Menge Extrakt vorhanden war, und das HPLC-UV-Chromatogramm zahlreiche andere, intensiv UV-aktive Verbindungen aufzeigte, gelang die Aufnahme eines  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums (Abb. 43a, unten), welches die ursprünglichen Vermutungen aus dem LC-MS-Experiment bestätigte. Da aufgrund der deutlichen Aufspaltungsmuster im Bereich der aromatischen Protonen ein TOCSY-Experiment nicht notwendig war, wurde auf ein deutlich zeitsparenderes, neu programmiertes phasensensitives COSY-Experiment zurückgegriffen, welches mit einer WET-Lösungsmittelunterdrückung ausgestattet wurde (Abb. 43b, unten).

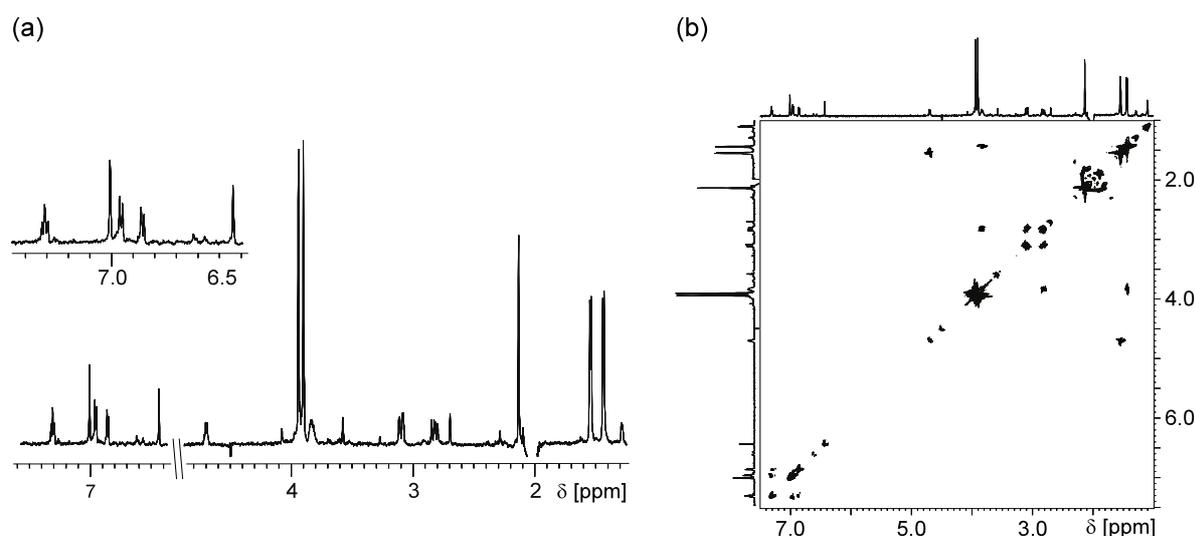


Abb. 43. (a) HPLC- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von "Peak C" im Zweigextrakt von *A. griffithii*; (b) WET-COSY-Spektrum von Peak C (32 Scans, 256 Spuren in F1, 56 min)

Das  $^1\text{H-NMR}$  bestätigte den Strukturvorschlag bezüglich eines zweifach methoxylierten Tetrahydroisochinolin-Alkaloids, welches Ancistrogriffin B (**54**) benannt wurde. Im COSY-Spektrum waren Kopplungen zwischen 1- $\text{CH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  1.54 ppm) und 1-H ( $\delta_{\text{H}}$  4.70 ppm) sichtbar, weiterhin zwischen 3- $\text{CH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  1.44 ppm), 3-H ( $\delta_{\text{H}}$  3.83 ppm) und den gut separierten diastereotopen Protonen 4- $\text{H}_{\text{ax}}$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.82 ppm) und 4- $\text{H}_{\text{eq}}$  ( $\delta_{\text{H}}$  3.10 ppm). Im aromatischen Bereich war eine skalare Kopplung zwischen 3 benachbarten Protonen erkennbar, die demzufolge 6'-H ( $\delta_{\text{H}}$  6.95 ppm), 7'-H ( $\delta_{\text{H}}$  7.31 ppm) und 8'-H ( $\delta_{\text{H}}$  6.85 ppm) zugeordnet wurde. Diese Konstellation ließ nur noch C-1' oder C-3' als Kupplungspositionen zu.

Ein HPLC-ROESY-Experiment löste schließlich einen großen Teil der ausstehenden Fragen zu Struktur von **54** (Abb. 44a, unten).

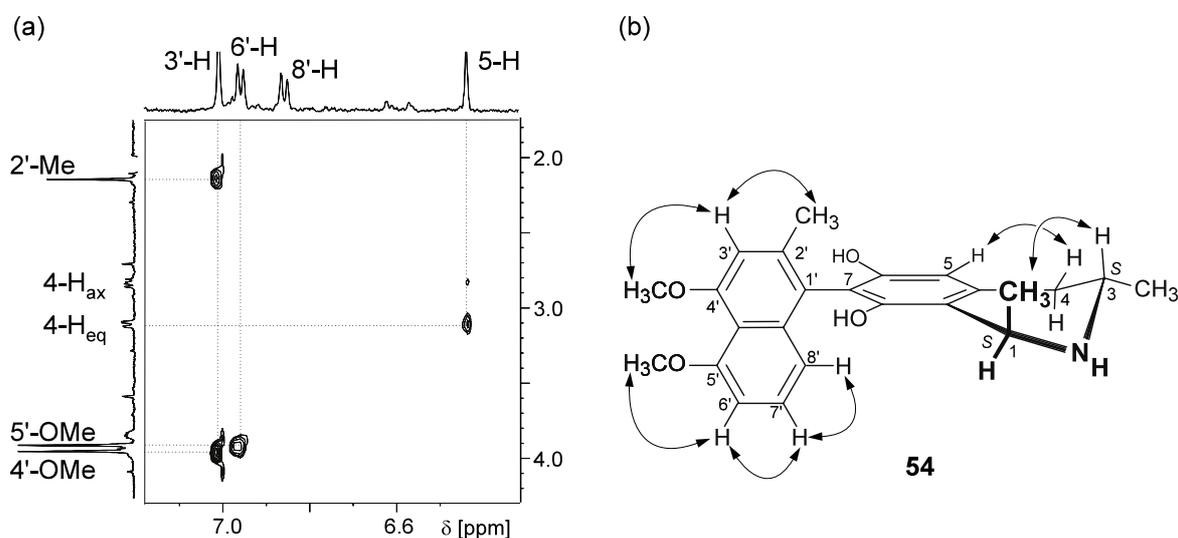


Abb. 44. (a) HPLC-ROESY-Spektrumsausschnitt von Ancistrogriffin B (**54**) aus dem Zweigextrakt von *A. griffithii* (72 Scans, 208 Inkremente in F1, Akquisitionszeit 16 h); (b) Wichtige WET-ROESY-Korrelationen von **54** (absolute Konfiguration und relative Achsenkonfiguration willkürlich dargestellt)

Das ROESY-Spektrum schloß eine 3'-Kupplung des Naphthalinbausteins aus, indem es eine Korrelationssequenz von {2'- $\text{CH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.13 ppm)  $\leftrightarrow$  3'-H ( $\delta_{\text{H}}$  7.00 ppm)  $\leftrightarrow$  4'- $\text{OCH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  3.94 ppm)} offenbarte. Auch die Frage nach der Position der zweiten Methoxygruppe wurde durch eine deutliche Korrelation von 6'-H nach 5'- $\text{OCH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  3.90 ppm) zweifelsfrei beantwortet. Zwei weitere Korrelationen von 5-H ( $\delta_{\text{H}}$  6.44 ppm) nach 4- $\text{H}_{\text{eq}}$  und zwischen 3-H und 1- $\text{CH}_3$  definierten endgültig den 7,1'-Kupplungstyp von **54** und die relative *trans*-Stellung der Methylgruppen im Isochinolinteil. Es konnten in diesen Falle keine achsenübergreifenden ROE-Effekte beobachtet werden. Die absolute Konfiguration der Achse wurde deshalb wiederum mit der HPLC-CD-Kopplung untersucht (Abb. 45, Seite 70).

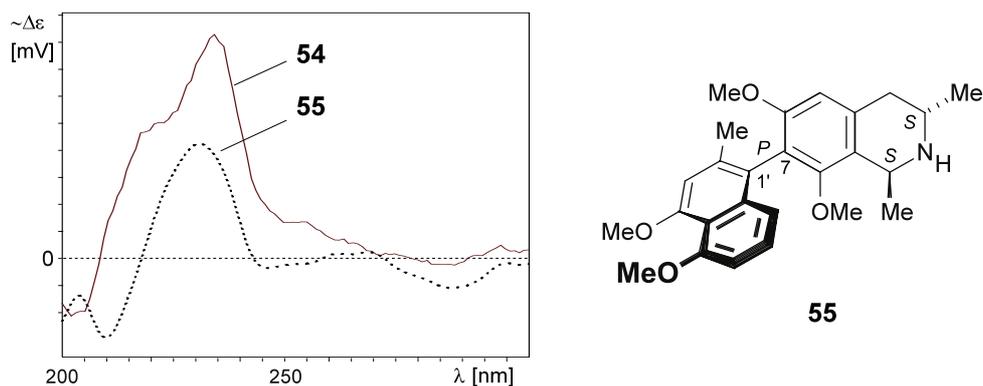


Abb. 45. HPLC-CD-Spektren von Ancistrogriffin B (**54**) ( $t_R = 15.1$  min) und CD-Vergleich mit dem synthetischen *trans*-1,2-Dihydroancistrocladisin (**55**) (in EtOH)<sup>[274]</sup>

Beide Kurven zeigen einen qualitativ identischen Verlauf, der übereinstimmende Achsenkonfigurationen für **51** und für das synthetische Vergleichsalkaloid *trans*-1,2-Dihydro-Ancistrocladisin (**55**)<sup>[274]</sup> nahelegte. Weiterhin ergab der in Kap. 3.3.1.2 (Seite 60) angesprochene Extraktabbau des Zweigextraktes ausschließlich (*S*)-konfigurierte Abbauprodukte, womit als Schlußfolgerung die absolute Konfiguration von Ancistrogriffin B (**54**) zu (1*S*,3*S*,7*P*) aufgeklärt wurde (Abb. 46, unten). Aufgrund der geringen vorhandenen Menge von Extrakt und Pflanzenmaterial wurde auf einen Isolierungsversuch verzichtet.

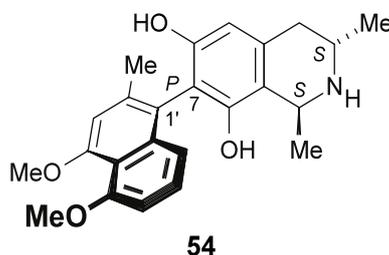


Abb. 46. Ancistrogriffin B (**54**), ein Minderalkaloid aus *A. griffithii*

### 3.3.1.5 Detektion und Isolierung von Ancistrogriffin C (**57**)

Obwohl das Dimer **51** offensichtlich eine Hauptkomponente im Blattextrakt darstellte, war es überraschenderweise nicht möglich, dort per HPLC-MS dessen monomere Hälfte **56** mit  $m/z$  394.4 zu finden. Im Zweigextrakt dagegen war ein möglicher Kandidat mit sehr ähnlicher Retentionszeit auf  $C_{18}$ -Phase detektierbar ("Peak D", Abb. 47, Seite 71). Im Zuge der Isolierung von **51** wurde nach Chromatographie auf Kieselgel eine relativ unpolare Fraktion erhalten, die nach HPLC-MS-Analyse vermutlich das Monomer **56** (gewissermaßen ein "semi-Ancistrogriffithin A"), nicht aber das Dimer **51** enthielt.

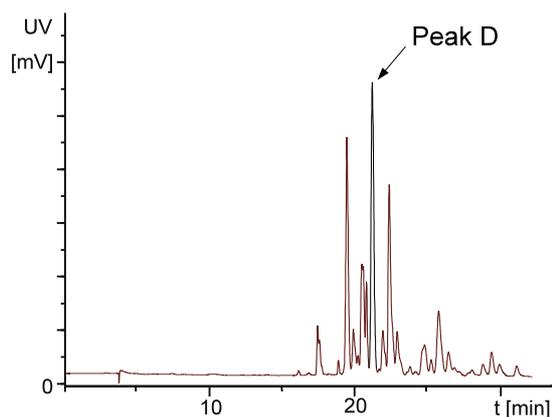


Abb. 47. HPLC-Diagramm einer Fraktion des Zweigextraktes nach Säulenchromatographie an Kieselgel und vermutete Monomervorstufe zu **51** (Peak D)

Ein HPLC- $^1\text{H}$ -Spektrum (Abb. 48, unten) von Peak D erbrachte weitere Indizien für das Vorliegen einer Monomervorstufe **56**, so z.B. die Existenz zweier Methoxygruppen bei  $\delta_{\text{H}}$  3.86 und 4.04 ppm und zweier aromatischer Protonensignale mit Dublettstruktur ( $\delta_{\text{H}}$  6.84 und 7.12 ppm), die auf eine 6'- oder 8'-Kupplung des Naphthalinbausteins hinwiesen.

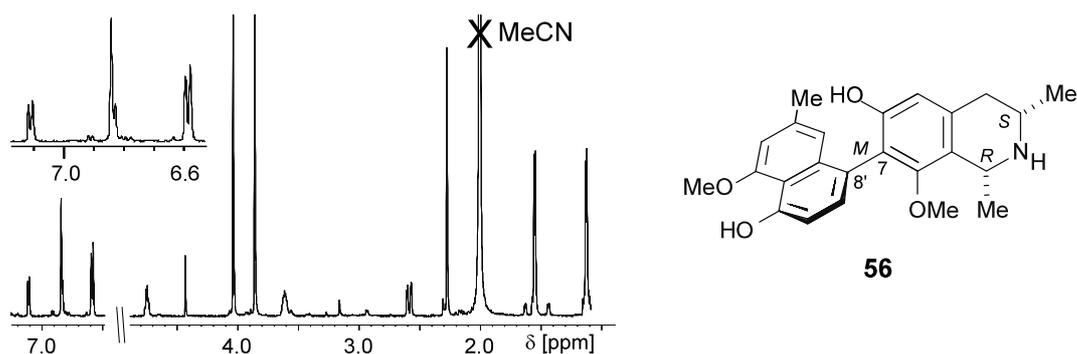


Abb. 48. HPLC- $^1\text{H}$ -NMR-Untersuchung von Peak D mit dem Protonenspektrum des mutmaßlichen Monomerbausteins **56**

Erste HPLC-ROESY-Experimente widerlegten jedoch Strukturvorschlag **56**. So zeigte sich durch eine Korrelation von 1- $\text{CH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  1.54 ppm) zu 3-H ( $\delta_{\text{H}}$  3.61 ppm) eine *trans*-Stellung der Methylgruppen im Isochinolinbaustein (Abb. 49, Seite 72). Weiterhin lokalisierte eine Korrelationssequenz {4- $\text{H}_{\text{eq}}$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.03 ppm)  $\leftrightarrow$  5-H ( $\delta_{\text{H}}$  6.59 ppm)  $\leftrightarrow$  6- $\text{OCH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  3.86 ppm)} eine Methoxygruppe in 6-Position, während in **51** C-8 methoxyliert war. In Übereinstimmung mit **51** wurde eine 7-Kupplung des Isochinolin-Bausteines und eine Korrelationssequenz {1'-H ( $\delta_{\text{H}}$  6.61 ppm)  $\leftrightarrow$  2'- $\text{CH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.27 ppm)  $\leftrightarrow$  3'-H ( $\delta_{\text{H}}$  6.85 ppm)  $\leftrightarrow$  4'- $\text{OCH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  4.04 ppm)} in der Naphthylhälfte gefunden. Leider waren keine long-range-Korrelationen sichtbar, die ebenfalls eine genaue Zuordnung der Kupplungsposition (6' oder 8') des Naphthalinbausteines offenbart hätten.

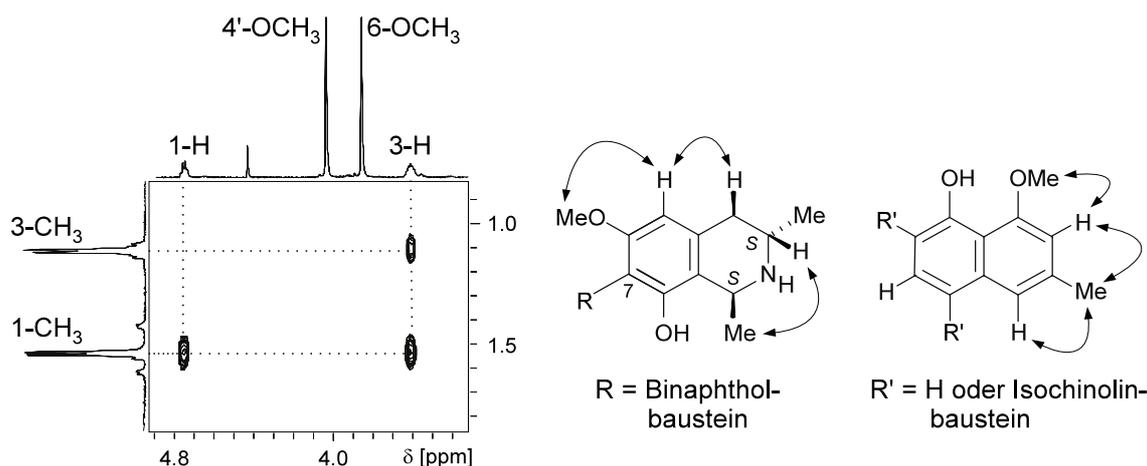


Abb. 49. HPLC-ROESY-Untersuchung von "Peak D" und identifizierbare Strukturelemente des neuen Alkaloids **57** mit relevanten Korrelationen

Da die online-Untersuchungen an dieser Stelle keine weiteren Strukturaussagen ermöglichten, wurde das unbekannte Alkaloid, nun Ancistrogriffin C (**57**) genannt, im präparativen Maßstab in mehreren Schritten isoliert (SC, HPLC) und mittels offline-NMR untersucht (Abb. 50, Seite 73). Leider wiesen die Signale des aliphatischen Isochinolin-Ringes bei reinem **57** in CDCl<sub>3</sub> Peakverbreiterungen sowohl im <sup>1</sup>H- als auch im <sup>13</sup>C-NMR auf. Weiterhin überlappten die Protonensignale von 4-H<sub>ax</sub> und 4-H<sub>eq</sub>, die gerade für die Aufklärung von Achsenkonfigurationen einen großen Wert besitzen, und erschwerten so die Auswertung. Interessanterweise hatten Spektren, die kurz nach dem letzten Reinigungsschritt, einer HPLC-Chromatographie über Chiralcel OD mit *n*-Hexan/*i*-PrOH als Laufmittel und 0.1% NEt<sub>3</sub> als Puffer, aufgenommen worden waren, diese Peakverbreiterung und -überlappung nicht gezeigt.

Nach Durchsicht dieser älteren Spektren ergab sich, daß auf dieser Reinigungsstufe noch ein Restgehalt von *ca.* einem Moläquivalent NEt<sub>3</sub> (bezogen auf **57**) in der Probe vorgelegen hatte, der im weiteren Verlauf durch Trocknung im Hochvakuum entfernt worden war. Da die NEt<sub>3</sub>-Signale bei  $\delta_H$  1.37 und 3.05 ppm nicht mit den Signalen von **57** überlappten, wurden alle 2D-Experimente (z.B. ROESY, HMQC, HMBC, Abb. 51, Seite 73) mit einer NEt<sub>3</sub>-enthaltenden Probe von **57** durchgeführt, die deutlich schärfere Signale und damit auch ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis zeigte.

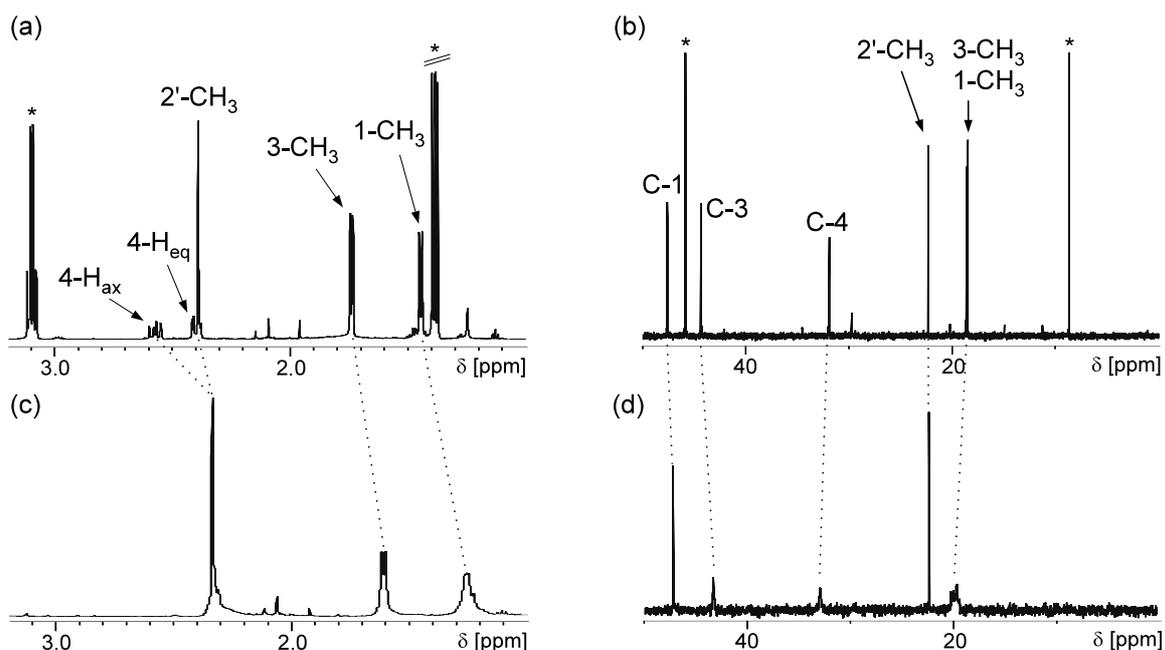


Abb. 50. Ausschnitte von (a)  $^1\text{H}$ - und (b)  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von **57** ohne  $\text{NEt}_3$ -Zusatz und Ausschnitte von (c)  $^1\text{H}$ - und (d)  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von **57** mit  $\text{NEt}_3$ -Zusatz ( $\text{NEt}_3$ -Signale mit \* markiert)

Das offline-HMBC-Experiment (Abb. 51, unten) schaffte Klarheit über die Art des Kupplungstyps, indem es zwei  $^3J$ -Korrelationen von 5'-OH ( $\delta_{\text{H}}$  9.52 ppm) zu den benachbarten Kohlenstoffpositionen C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  109.3 ppm) und C-9' ( $\delta_{\text{C}}$  135.9 ppm) aufzeigte. Da C-6' laut HMQC ein aromatisches Proton tragen mußte, schloß dies die Möglichkeit einer 7,6'-Kupplung aus. Dies wurde weiterhin untermauert durch eine Reihe von  $^3J$ -Korrelationen zu den beiden Brückenkopfatom C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  117.2 ppm) und C-8' ( $\delta_{\text{C}}$  109.5 ppm). Letzteres zeigte  $^3J$ -Korrelationen zu 6'-H ( $\delta_{\text{H}}$  6.85 ppm) und 1'-H ( $\delta_{\text{H}}$  6.76 ppm) und sogar eine  $^4J$ -Kopplung in die Isochinolinhälfte zu 5-H ( $\delta_{\text{H}}$  6.51 ppm). Darüber hinaus wies C-7  $^3J$ -Korrelationen zu 5-H und eine  $^4J$ -Korrelation zu 7'-H ( $\delta_{\text{H}}$  7.18 ppm) auf.

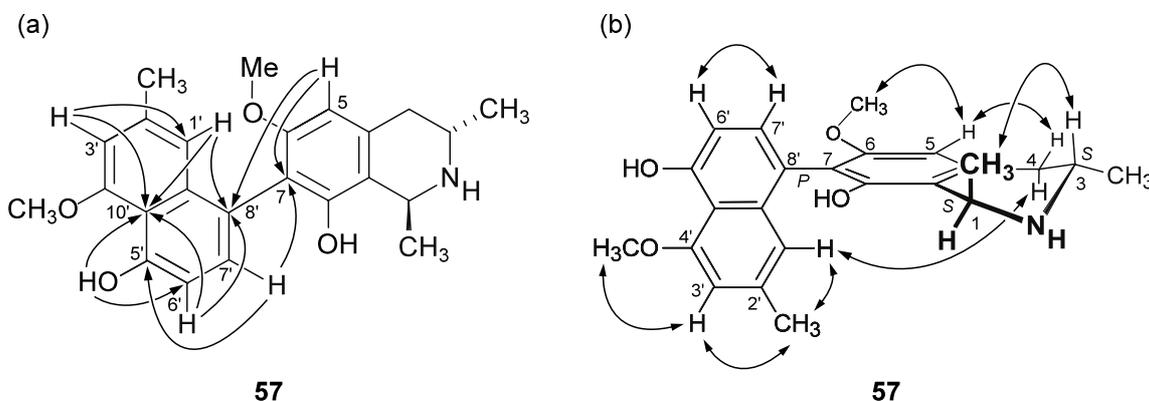


Abb. 51. Strukturrelevante (a) HMBC- und (b) ROESY-Korrelationen von **57**

ROESY-Messungen erbrachten weitere wichtige Strukturinformationen (Abb. 51b, Seite 73). Neben einer Reihe von Korrelationen, die sich schon im HPLC-ROESY-Experiment gezeigt hatten, wurde auch eine long-range-Korrelation zwischen 4-H<sub>ax</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  2.57 ppm) und 1'-H sichtbar, die zum einen den 7,8'-Kupplungstyp bestätigte, und desweiteren eine Aussage über die relative Achsenkonfiguration zuließ. In Kombination mit dem im oxidativen Abbau erzielten Resultat einer (3*S*)-Konfiguration wurde deshalb die absolute Konfiguration von **57** zu (1*S*,3*S*,7*P*) bestimmt (Abb. 52, unten).

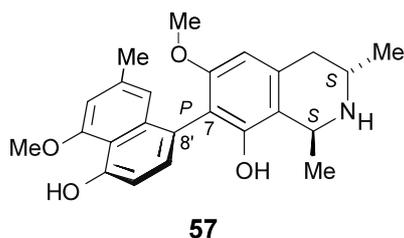


Abb. 52. Ancistrogriffin C (**57**) aus *A. griffithii*

### 3.3.1.6 Detektion von Hamatin (**58**) und Ancistrocladin (**15**)

Neben Ancistrogriffin C (**57**) fiel in derselben Zweigextraktfraktion noch ein weiterer prominenter UV-Peak ("Peak E") mit einer etwas kürzeren Retentionszeit von *ca.* 19.5 min auf, gefolgt von einem wesentlich kleineren Peak ("Peak F") mit  $t_{\text{R}} = 20$  min (Abb. 53a, unten).

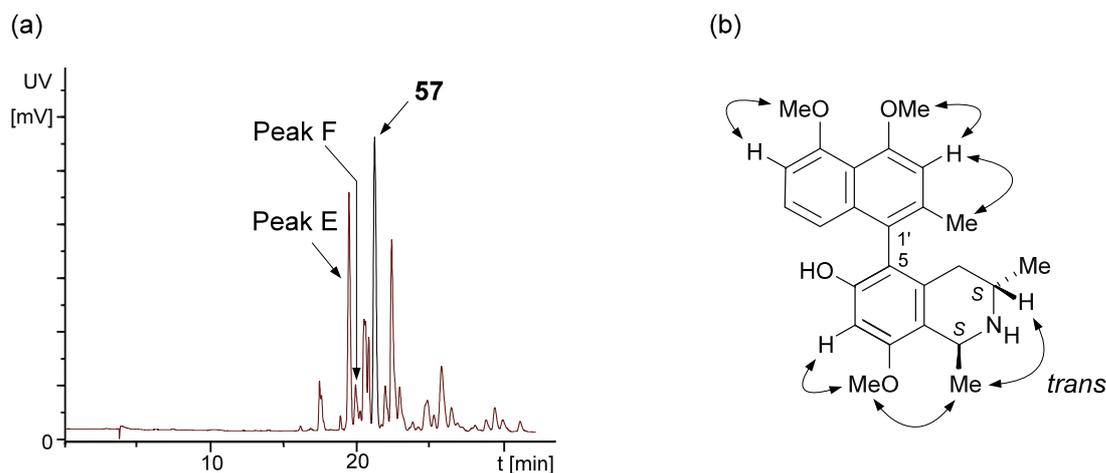


Abb. 53. (a) HPLC-Chromatogramm einer Zweigextraktfraktion von *A. griffithii*; (b) Strukturvorschlag für "Peak" E nach HPLC-MS/MS- und HPLC-NMR-Untersuchungen (ausgesuchte WET-ROESY-Korrelationen sind mit Pfeilen angedeutet)

Beide Signale zeigten in der HPLC-MS/MS eine Pseudomolekülionenmasse  $[M + H]^+$  mit  $m/z$  408.4 und das Fragmentierungsmuster eines dreifach methoxylierten Tetrahydroisochinolin-Alkaloids. HPLC-NMR-Untersuchungen lieferten schließlich für "Peak E" ein  $^1\text{H-NMR}$ -

Spektrum und ROESY-Korrelationen, die sich gut mit der Struktur des bekannten Ancistrocladaceae-Alkaloids Ancistrocladin (**15**)<sup>[17,24]</sup> (Abb. 53b, Seite 74) vereinbaren ließen, zumal der oxidative Extraktabbau für *A. griffithii* eine (3*S*)-Konfiguration aller Naphthylisochinolin-Alkaloide offenbart hatte. "Peak F" zeigte ein zu "Peak E" identisches Massenspektrum, war aber leider aufgrund seiner geringen Konzentration und der Existenz von Störanalyten in der Meßzelle einer HPLC-NMR-Untersuchung nicht zugänglich.

Ein Versuch, "Peak E" mittels eines HPLC-Koelutionsversuches als **15** zu identifizieren, brachte eine überraschende Wendung: Anstatt mit "Peak E" zu koeluiieren, wies die Referenzprobe von **15** die gleiche Retentionszeit auf wie der kleinere "Peak F". Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen, analysierte man die Extraktprobe mit der HPLC-CD-Methode bei 254 nm. Dabei zeigte "Peak E" einen negativen CD-Ausschlag, während "Peak F" einen positiven CD-Signal wie **15** lieferte und mit letzterem koeluierte. Damit mußte sich bei "Peak E" um das Atropisomer von **15**, nämlich Hamatin (**58**),<sup>[25]</sup> handeln (Abb. 54, unten).

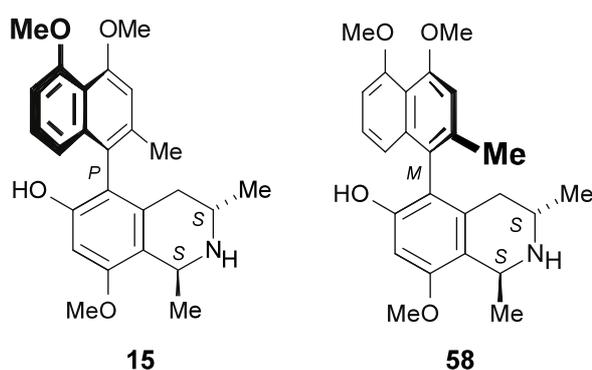


Abb. 54. Ancistrocladin (**15**) und Hamatin (**58**), online detektiert im Zweigextrakt von *A. griffithii*

Koelutionsexperimente mit einem genuinen Standard von **58** bestätigten diese Vermutung. Legt man die Integration der UV-Peaks von **15** und **58** zu Grunde, was angesichts der quasi identischen UV-Spektren der beiden Atropisomere einen vernachlässigbaren Fehler zur Folge hat, so liegen **15** und **58** im Zweigextrakt im Verhältnis von *ca.* 1:10 vor. Interessanterweise ist in anderen Spezies, z.B. in *A. hamatus*,<sup>[275]</sup> **15** das dominierendere Alkaloid.

### 3.3.1.7 Biologische Aktivität der neuen Alkaloide aus *A. griffithii*

Zur Testung der biologischen Aktivitäten von isolierten Naturstoffen bestehen in unserem Arbeitskreis Kooperationen mit externen Forschergruppen. Die aus *A. griffithii* isolierten Alkaloide **51**, **52** und **57** wurden am Schweizerischen Tropeninstitut in Basel auf Wirksamkeit gegen die Erreger verschiedener Tropenkrankheiten wie Malaria (*Plasmodium falciparum*),

Leishmaniose (*Leishmania donovani*), Schlaf- und Chagas-Krankheit (*Trypanosoma brucei rhodesiense* bzw. *T. cruzi*) getestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 (unten) aufgelistet.

Tab. 3. Ergebnisse der *in-vitro*-Aktivitätstest von **51**, **52** und **57** gegen verschiedene Erreger tropischer Krankheiten und des Cytotoxizitäts-Tests

IC <sub>50</sub> [µg/ml]	Standard	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>57</b>
<i>P. falciparum</i> (K1)	0.065 <sup>a</sup>	0.035	0.074	0.419
<i>T. cruzi</i> (Tulahuen C4)	0.382 <sup>b</sup>	13.6	17.1	41.2
<i>T. b. rhodesiense</i> (STIB 900)	0.0035 <sup>c</sup>	0.90	2.17	2.97
<i>L. donovani</i> (MHOM-ET-67/L82)	47.2 <sup>d</sup>	n.b. <sup>e</sup>	3.1	18.3
Cytotoxizität (L6)	2.1 <sup>f</sup>	5.8	14.2	35.8

<sup>a</sup> Chloroquin. <sup>b</sup> Benznidazol. <sup>c</sup> Melarsoprol. <sup>d</sup> Pentostam/TDR 8366. <sup>e</sup> nicht bestimmt wegen hoher Cytotoxizität. <sup>f</sup> Mefloquin.

Im Test gegen einen Chloroquin-resistenten Stamm von *P. falciparum* (K1) zeigten **51** und **52** gute *in-vitro*-Aktivitäten, die durchaus vergleichbar waren mit denen des Standards Chloroquin. Anicistrogrieffithin A (**51**) zeigte eine im Vergleich zum Standard doppelt so starke antiplasmodiale Aktivität und ist damit das wirksamste natürliche Naphthylisochinolin-Dimer mit einer um den Faktor von *ca.* 20 höheren Aktivität als Korundamin A (**48**)<sup>[267]</sup> (Abb. 31, Seite 58). Nur unnatürliche Dimere, wie das synthetische Jozimin A (IC<sub>50</sub> = 0.0062 µg/ml)<sup>[276]</sup> wirken bei niedrigeren Konzentrationen. **51** besitzt gegenüber **52** allerdings den Nachteil einer höheren Cytotoxizität in Säugerzellen (L6).

Weiterhin wies **52** die beste bisher an einem Naphthylisochinolin-Alkaloid beobachtete Wirksamkeit gegenüber den Leishmania-Erreger *L. donovani* auf. Der gemessene IC<sub>50</sub>-Wert lag mit 3.1 µg/ml sogar knapp unter dem des bisherigen "Spitzenreiters" Ancistroealanin A (**5**) (IC<sub>50</sub> = 4.1 µg/ml) (Abb. 2, Seite 3)<sup>[21]</sup> allerdings mit einer *ca.* sechsfach höheren Cytotoxizität gegenüber Säugerzellen. Den Standard Pentostam übertraf **52** in der Wirksamkeit sogar um den Faktor 15. Da **52** ansonsten nur moderate antitrypanosomale Aktivitäten aufwies (so wie auch **57**), stellt dies eine interessante Selektivität hinsichtlich *L. donovani* dar.

Bemerkenswert erscheinen auch die deutlich unterschiedlichen Aktivitäten der ansonsten strukturell sehr ähnlichen Verbindungen **52** und **57**. Dieser Befund deutet auf einen geringeren Einfluß der Kupplungsart hin und unterstreicht vielmehr die Bedeutung des OH- vs. OMe-Substitutionsmusters, das einen entscheidenden Einfluß auf wichtige pharmakologische Faktoren wie Lipophilie und Stabilität ausübt. Weitergehende Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Naphthylisochinolin-Alkaloide könnten in der

Zukunft mehr Klarheit über diese Sachverhalt bringen. Zwei der neuen Naturstoffe (**52** und **51**), die *A. griffithii* produziert, besitzen damit beachtliche antiprotozoale Aktivitäten.

### 3.3.2 Phytochemische Untersuchung des ersten Pfropfversuches (*A. heyneanus* / *A. abbreviatus*) bei Ancistrocladaceen

#### 3.3.2.1 Motivation

Während die polyketidbasierte Biogenese der Naphthylisochinoline experimentell belegt wurde,<sup>[148]</sup> blieben die Fragen nach dem Bildungsort der Alkaloide in der Pflanze oder nach potentiellen Lager- und Speicherformen immer noch unbeantwortet. Bereits Rückert hatte mit HPLC-MS/MS-Messungen Xylemsaftproben von *A. heyneanus* auf der Suche nach Glycosyl- oder Sulfat-Derivaten analysiert, allerdings mit negativem Ergebnis.<sup>[113]</sup> Später verfütterte Wolf Trifluoacetat an Ganzpflanzen von *A. abbreviatus* und verfolgte mittels *in-vivo*-<sup>19</sup>F-NMR den Transport in der Pflanze, fand allerdings keine Metabolite oder Hinweise auf Orte mit metabolischer Aktivität.<sup>[277]</sup>

Ein bisher noch nicht beschrittener experimenteller Weg zur Klärung dieser offenen Fragen nutzt die Familien-spezifischen strukturellen Eigenschaften der Naphthylisochinolin-Alkaloide.<sup>[16]</sup> Asiatische Ancistrocladaceen produzieren (3*S*)-konfigurierte Alkaloide mit einem 6,8-dioxygenierten Isochinolinbaustein, wie z.B. in Ancistrocladin (**15**) oder Ancistrocladisin (**60**), während die in Afrika beheimateten Dioncophyllaceen nach heutigem Wissensstand ausschließlich (3*R*)-konfigurierte, 8-monooxygenierte Isochinoline, wie bei Dioncophyllin A (**6**) oder Dioncophyllin C (**4**), hervorbringen.<sup>[16]</sup> Einige afrikanische Ancistrocladaceen, so z.B. *A. abbreviatus* oder *A. barteri*, sind in der Lage, sowohl Ancistrocladaceae-<sup>[278-281]</sup> als auch Dioncophyllaceae-typische<sup>[249,279]</sup> Alkaloide zusammen mit weiteren "Hybridformen" (z.B. Ancistrobrevin C (**61**)<sup>[32,282]</sup> oder Dioncolin A (**61**)<sup>[283]</sup>) zu produzieren (Abb. 55, Seite 78).

## Ancistrocladaceae-typisch

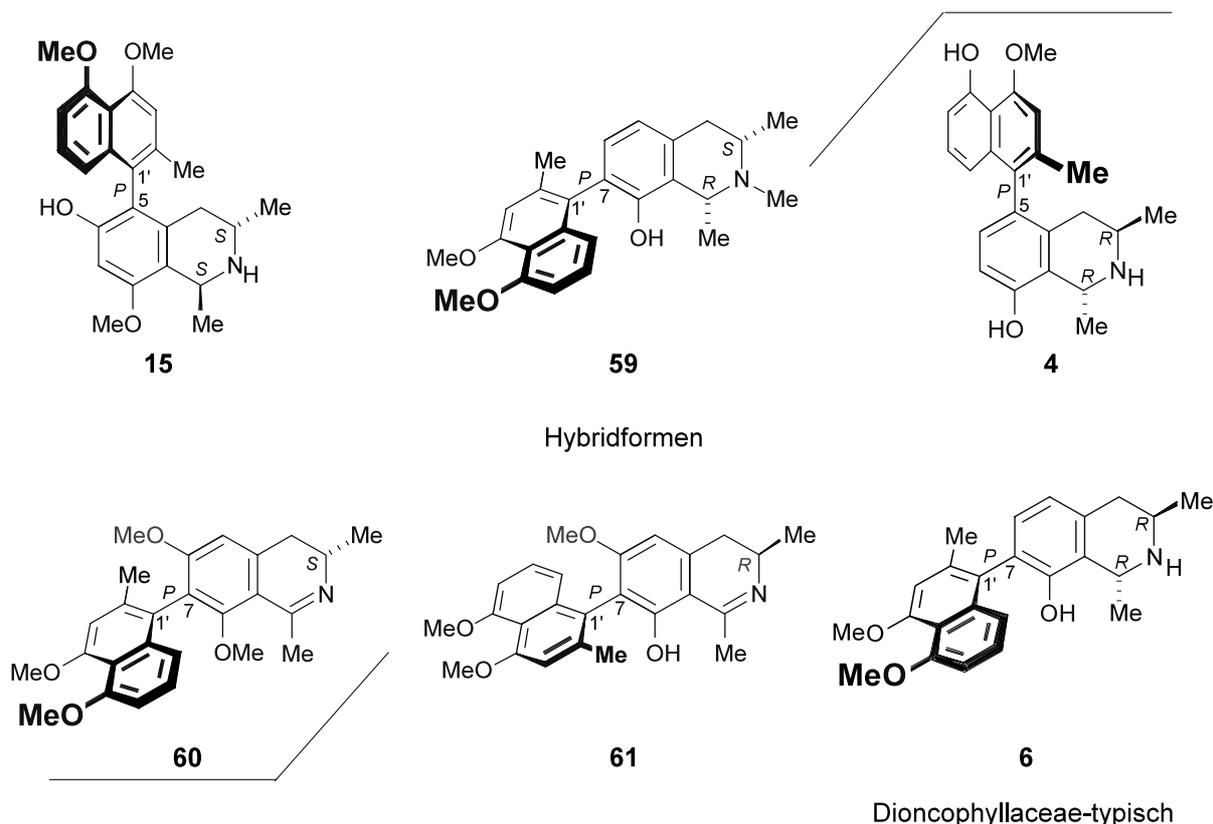


Abb. 55. "Fließende Grenzen" zwischen Ancistrocladaceen- und Dioncophyllaceen-Alkaloiden: Ancistrocladin (**15**), Ancistrocladisin (**60**), Dioncolin A (**59**), Ancistrobrevin C (**61**), Dioncophyllin C (**4**) und Dioncophyllin A (**6**)

Während in konventionellen Biosyntheseversuchen meist isotopenmarkierte Vorstufen eingesetzt und anhand ihrer Markierung verfolgt werden, bietet sich bei den Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen die Einschleusung von Naphthylisochinolinen an, die natürlich in der jeweiligen Spezies nicht vorkommen, d.h. eine artverschiedene absolute Konfiguration oder einen abweichenden Oxygenierungsgrad aufweisen. Ein gedanklich ähnlicher Ansatz wurde bereits bei Verfütterungsexperimenten des Isochinolinbausteins **19**<sup>[115]</sup> an Zellkulturen von *A. heyneanus* verfolgt. Damals konnten allerdings keine für *A. heyneanus* unnatürlichen Metabolite der Vorstufe detektiert werden.

Im aktuellen Experiment wurden zwei verschiedene Ancistrocladaceen-Arten durch Pfropfung miteinander "vermischt",<sup>[149]</sup> mit dem Ziel, den Austausch bzw. Transport von Alkaloiden zwischen Pfropfreis und Wurzelstock zu verfolgen. Die benutzten Pflanzen entstammten dem Botanischen Garten in Würzburg. Als Unterlage wurde die schnellwüchsige afrikanische Art *A. abbreviatus* gewählt, die sowohl Ancistrocladaceae- als auch Dioncophyllaceae-typische Alkaloide produziert, während als Pfropfreis die Ancistrocladaceae-typische indische Art *A. heyneanus* diente (Abb. 56, Seite 79).

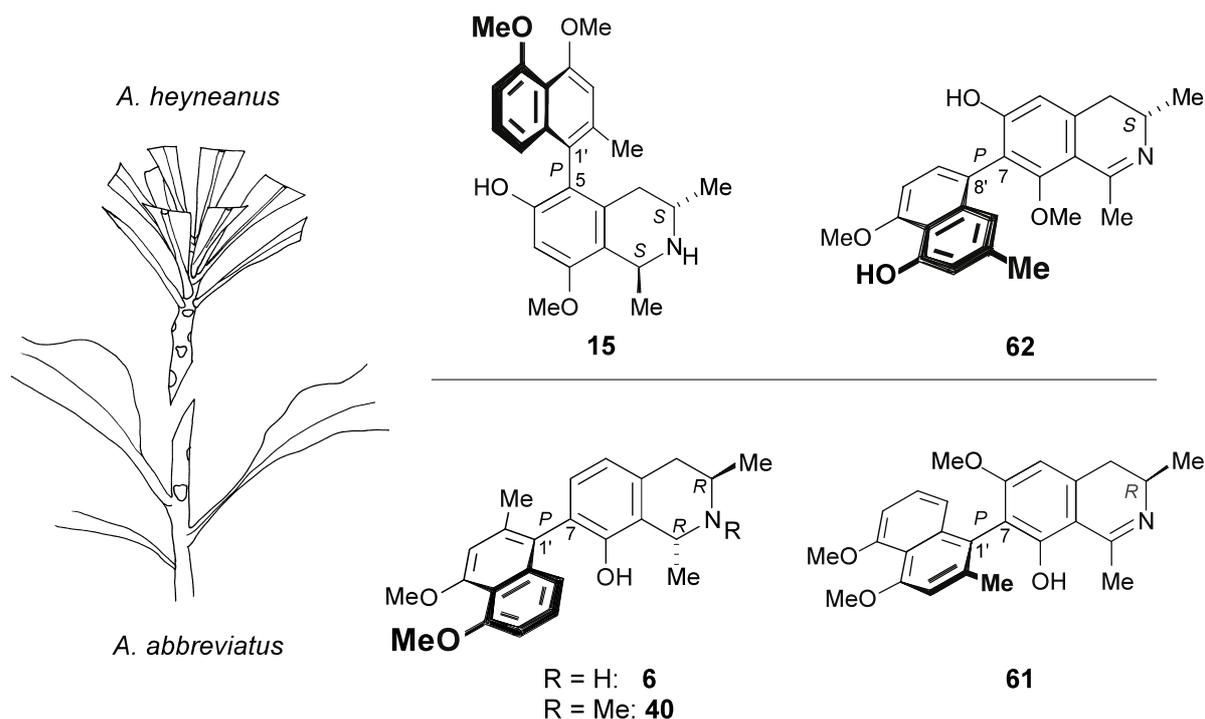


Abb. 56. Schema\* des von Rischer durchgeführten Pfropfexperimentes<sup>[149]</sup> mit *A. abbreviatus* als Unterlage und *A. heyneanus* als Pfropfreis und bekannte Hauptmetabolite<sup>[17,26,32,249,279,282,284]</sup> der beiden Spezies

Bisherige Untersuchungen ergaben, daß *A. heyneanus* ausschließlich (3*S*)-konfigurierte, 6,8-dioxygenierte Naphthylisochinoline wie Ancistrocladin (**15**) oder Ancistroheynin A (**62**) produziert,<sup>[17,26,284]</sup> während *A. abbreviatus* sowohl (3*R*)- und (3*S*)-konfigurierte als auch mono- und dioxygenierte Alkaloide enthält,<sup>[279]</sup> wobei typische Dioncophyllaceae-Alkaloide wie **6** und **40** in bedeutender Menge vorliegen.<sup>[249]</sup> Würden letztere dann im Pfropfreis auftauchen (z.B. im leicht zugänglichem Blattmaterial), so wäre dies nur durch einen Transport aus der Unterlage in den Pfropfreis plausibel erklärbar. Dagegen würde ein Transport in die Unterlage nur schwerlich erkannt werden. Da sich eine Probenahme am unteren Teil der gepfropften Pflanze, z.B. aus der Astrinde oder aus dem Wurzelbereich, aufgrund der Empfindlichkeit der Pflanze aber von vornherein verbot, spielte diese Möglichkeit bei diesem innovativen experimentellen Ansatz nur eine untergeordnete Rolle.

### 3.3.2.2 Phytochemische Untersuchung eines Blattes des Pfropfrees mittels oxidativem Abbau und HPLC-MS/MS

Eine Schwierigkeit bei der phytochemischen Untersuchung des Blattmaterials bestand in der geringen zugänglichen Probenmenge. Erst nach einem Jahr konnte dem angewachsenen Pfropfreis zum ersten Mal ein neugebildetes Blatt abgenommen und daraus nach wäßrig-

\* Ich danke H. Rischer für die freundliche Erlaubnis zur Benutzung der in Abb. 56 abgebildeten Pflanzenskizze.

saurer Mazeration *ca.* 120 mg Rohextrakt gewonnen werden - eine geringe Menge, die sich nicht für eine klassische Aufarbeitung durch Isolierung eignet. Allerdings wurden in den letzten Jahren äußerst sensitive Methoden zur Charakterisierung und Strukturaufklärung der Naphthylisochinoline entwickelt. Der von God *et al.*<sup>[250]</sup> etablierte Ruthenium-katalysierte oxidative Abbau eignet sich hervorragend zur Bestimmung der absoluten Konfiguration an C-3 und kommt mit geringen Mengen (*ca.* 1 mg Extrakt) aus. Dabei eignet er sich gleichermaßen für Reinstoffe als auch für rohe Pflanzenextrakte.<sup>[38,266]</sup> Im Falle eines Transportes von **6** oder **40** in das Blattmaterial sollten aufgrund der äußerst sensitiven GC-MS-Detektion im SIM-Modus auch Spuren der (3*R*)-konfigurierten Fremdkaloide (in Form ihrer Mosher-derivatisierten Abbauprodukte) nachweisbar sein.

Nach dem Abbau\* wurden jedoch in der GC-MS-Analyse ausschließlich Abbauprodukte von (3*S*)-konfigurierten Naphthylisochinolininen gefunden (Abb. 57, unten). Ein *A.-heyneanus*-Blattextrakt, der als Parallelkontrolle fungierte, zeigte keinerlei Unterschiede im GC-MS.

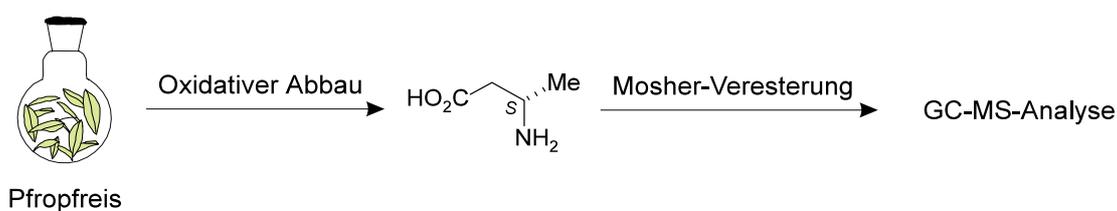


Abb. 57. Oxidativer, Ruthenium-katalysierter Abbau eines Blattextraktes des Pfropfreises

Dieses Ergebnis deutete bereits darauf hin, daß, wenn überhaupt, nur winzigste Spuren von Dioncophyllaceae-Alkaloiden in den Pfropfreis gelangt sein konnten. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurde der Extrakt mittels HPLC-MS/MS auf typische Pseudomolekülionenmassen von Dioncophyllaceae-typischen, 6-monooxygenierten Naphthyltetrahydroisochinolininen untersucht.

Durch das Fehlen der Sauerstoff-Funktion vermindert sich die Masse eines 8-monooxygenierten Tetrahydroisochinolin-Alkaloids um 16 u gegenüber einem entsprechenden 6,8-dioxygenierten Vertreter mit äquivalentem Derivatisierungsmuster (z.B. mit der gleichen Anzahl an methylierten *O*-H- und *N*-H-Funktionen). Damit weisen die Dioncophyllaceae-Tetrahydroisochinoline theoretisch Pseudomolekülionen  $[M + H]^+$  mit *m/z* 350, 364, 378, 392 oder 406 auf. In allen Massenspuren (bis auf *m/z* 350) können 6,8-dioxygenierte Dihydroisochinoline mit geringerem Methylierungsgrad zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Durch ein MS/MS-Experiment sind jedoch die Tetrahydroisochinoline aufgrund ihrer

\* Ich danke M. Michel für die Durchführung des oxidativen Abbaus.

typischen Diels-Alder-Fragmentierung<sup>[285]</sup> leicht von den - in diesem Fall störenden - Dihydroisochinolininen zu unterscheiden

Gegenüber dem Abbauxperiment besaß dieser analytische Ansatz den Vorteil, auch invers-hybride, *abbreviatus*-eigene Alkaloide wie das (3*S*)-konfigurierte Dioncolin A (**59**) (Abb. 55, Seite 78) oder dessen 7-Epimer nachweisen zu können. Dagegen würden dioxygenierte, (3*R*)-konfigurierte *A.-abbreviatus*-Alkaloide wie Ancistrobrevin C (**61**) nicht vom MS-Screening erfaßt.

In den ersten orientierenden Scanläufen wurden Signale mit den gesuchten Massen zwischen  $m/z$  364 und 406 detektiert, nicht jedoch von  $m/z$  350. Nach den folgenden MS/MS-Experimenten wurde aus den Massenspektren jedoch deutlich, daß es sich bei diesen Analyten nicht um Tetrahydroisochinoline handelte. Damit wurden nach dem Abbauversuch auch mit dieser Screeningmethode keine Dioncophyllaceae-typischen Naphthylisochinolin-Alkaloide im Pfropfreis nachgewiesen.

### 3.3.2.3 Phytochemische Untersuchung eines Blattes des Pfropfreises mit der "online-Triade" HPLC-MS/MS, HPLC-NMR und HPLC-CD

Nachdem die in Kap. 3.3.2.2 beschriebenen schnellen Screening-Ansätze keinen Hinweis auf einen Alkaloidtransport erbrachten, wurde der Pfropfreis-Blattextrakt in der zweiten Phase der Untersuchung eingehend mit der "online-Triade" analysiert. Neben dem Nachweis potentieller *A.-abbreviatus*-entstammter Naphthylisochinoline lag das besondere Augenmerk auch auf der Detektion potentiell neugebildeter Metabolite. Zu diesem Zweck wurden auch Blattextrakte von *A. heyneanus* und *A. abbreviatus* in HPLC-UV- und HPLC-MS-Experimenten untersucht und die Metabolitprofile der Proben miteinander verglichen (Abb. 58, Seite 82).

Bereits ein visueller Vergleich der Metabolitprofile bekräftigte die nach den Vorexperimenten geäußerten Vermutungen. Das HPLC-Chromatogramm des Pfropfreises ähnelte sehr stark dem des *A.-heyneanus*-Blattextraktes, während der *A.-abbreviatus*-Extrakt ein deutlich abweichendes Bild bot. Im letzteren wurden durch HPLC-Koelution die bereits daraus bekannten Alkaloide Dioncophyllin A (**6**) und Ancistrocladin (**15**) detektiert (Abb. 58, Seite 82). Ancistrocladin (**15**) war auch in den beiden anderen Extrakten vertreten.

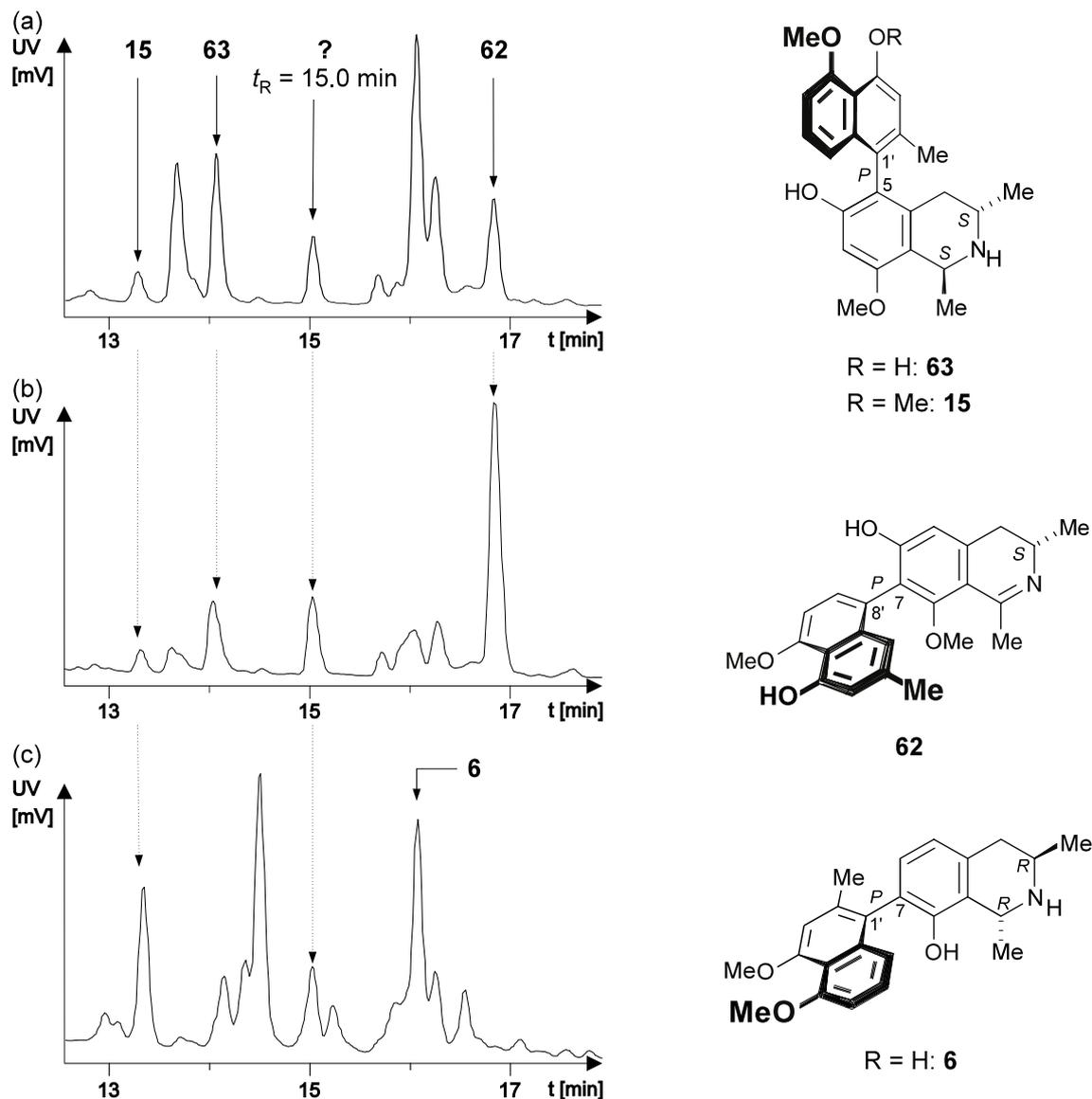


Abb. 58. HPLC-UV-Profile (254 nm) von Blattextrakten (a) von *A. heyneanus*, (b) des Pflöpfreises und (c) von *A. abbreviatus* nebst daraus identifizierten Naphthylisochinolin-Alkaloide

Durch HPLC-NMR- und HPLC-MS/MS-Untersuchungen wurden schließlich die aus *A. heyneanus* bekannten Alkaloide 4'-*O*-Desmethylanastrocladin (**63**)<sup>[113]</sup> und Ancistroheynin (**62**)<sup>[26]</sup> im Pflöpfreis-Extrakt identifiziert. Der Vergleich mit <sup>1</sup>H-NMR-Literaturdaten<sup>[113]</sup> ermöglichte die Zuordnung von **63**. Dabei wurde die für **63** von Rückert geäußerte Strukturvermutung<sup>[113]</sup> eines demethylierten Analogons von **15** durch HPLC-CD-Messungen bestätigt. Ein HPLC-CD-Spektrum von **63** zeigte einen fast identischen Verlauf zu einem Referenzspektrum von **15**, so daß auch **63** eine *P*-Achsenkonfiguration zugeschrieben wurde. Im Falle von **62** legten HPLC-NMR-Experimente (<sup>1</sup>H, ROESY und TOCSY) die Struktur eines 7,8'-gekuppelten Dihydronaphthylisochinolines mit Methoxygruppen an C-8 und C-5'

nahe. Die Identität von **62** wurde anschließend durch HPLC-MS/MS-Koelutionsexperimente mit einer authentischen Referenz von **62** bestätigt.

Ein weiterer interessanter Peak, der sich in jedem der drei Extrakte bei  $t_R = 15.0$  min wiederfand, wies nach ersten HPLC-NMR- und HPLC-MS/MS-Versuchen die Struktur eines dreifach methoxylierten Dihydronaphthylisochinolines mit der Pseudomolekülionenmasse  $m/z$  406.4 auf, die sich mit dem aus *A. abbreviatus* bekannten Ancistrobrevin C (**61**)<sup>[32]</sup> vereinbaren ließ (Abb. 59, unten).

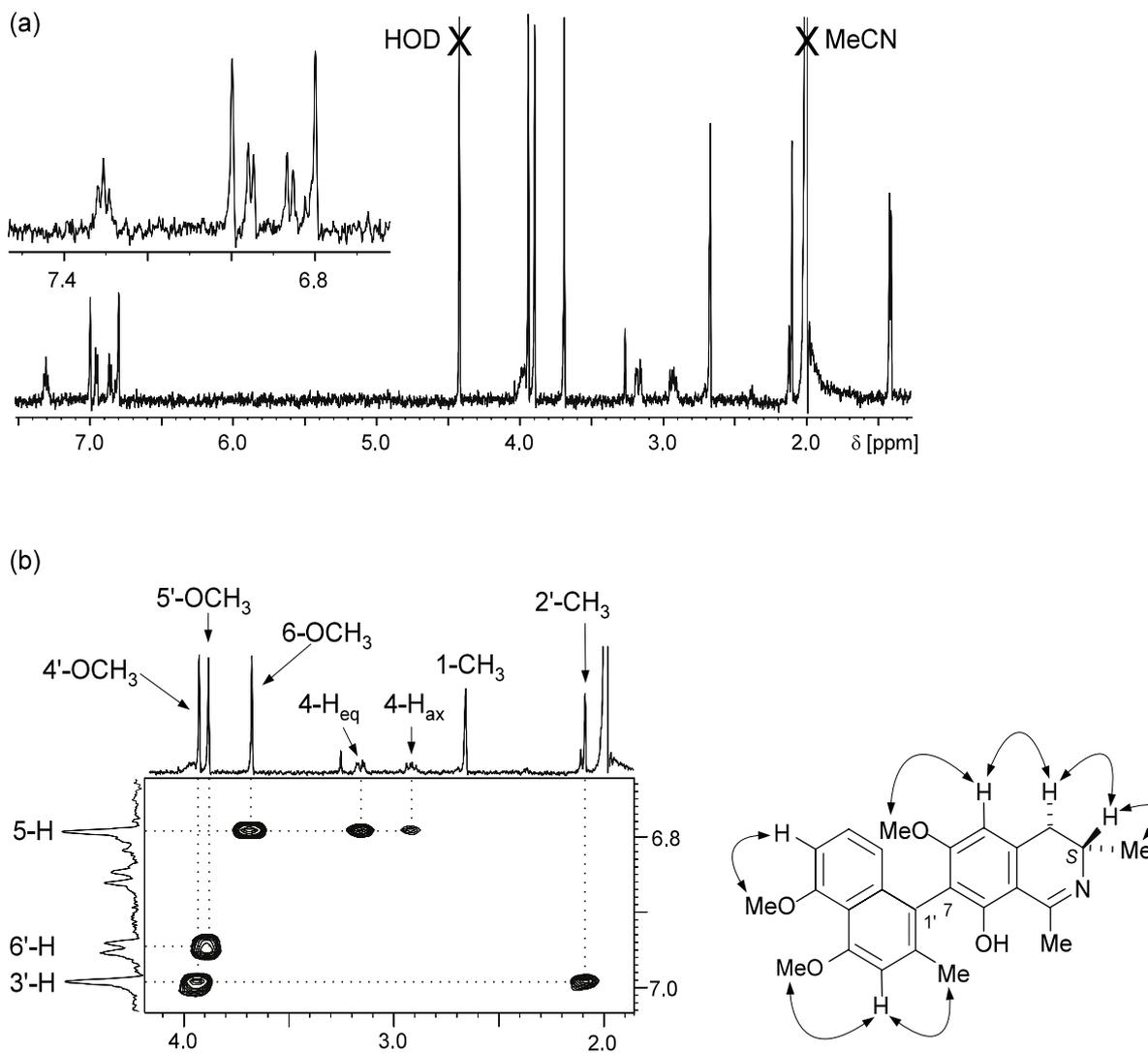


Abb. 59. Molekülstruktur eines Alkaloids mit Ancistrobrevin-C-Grundgerüst aus dem Pfropfreis-Blattextrakt nach (a) HPLC-<sup>1</sup>H-NMR und (b) HPLC-ROESY [(3*R*)-Konfiguration durch oxidativem Abbau ausgeschlossen]

Das HPLC-NMR-Experiment offenbarte ein für ein Dihydronaphthylisochinolin-Alkaloid typisches <sup>1</sup>H-NMR Spektrum (Abb. 59a, oben). Im aliphatischen Bereich unter 2 ppm war nur ein Dublettsignal einer CH<sub>3</sub>-Gruppe sichtbar, die 3-CH<sub>3</sub> zugeordnet wurde. Das Signal von 1-CH<sub>3</sub> war dagegen auf einen Wert von δ<sub>H</sub> 2.67 ppm tieffeldverschoben. Der relative eng

begrenzte Bereich der Lösungsmittelunterdrückung erlaubte auch die Beobachtung der bei  $\delta_{\text{H}}$  2.10 ppm liegenden 2'-CH<sub>3</sub>-Gruppe. Im Bereich zwischen  $\delta_{\text{H}}$  3.6-4.0 ppm waren drei Methoxygruppen sichtbar. Weiterhin zeigten sich im aromatischen Bereich drei Protonen, von denen zwei (6'-H und 8'-H) als Dubletts vorlagen und eines (7'-H) zu einem Dublett von Dubletts aufspaltete. Das WET-ROESY-Experiment (Abb. 59b, Seite 83) erlaubte anschließend die genaue Zuordnung der Verschiebungen. Zwei Korrelationssequenzen im Naphthalinbaustein {8'-H ( $\delta_{\text{H}}$  6.86 ppm)  $\leftrightarrow$  7'-H ( $\delta_{\text{H}}$  7.31 ppm)  $\leftrightarrow$  6'-H ( $\delta_{\text{H}}$  6.95 ppm)  $\leftrightarrow$  5'-OCH<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  3.90 ppm)} und {4'-OCH<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  3.97 ppm)  $\leftrightarrow$  3'-H ( $\delta_{\text{H}}$  7.00 ppm)  $\leftrightarrow$  2'-CH<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  2.10 ppm)} lokalisierten zwei der Methoxygruppen und definierten eine Kupplungsposition an C-1'. Im Isochinolinbaustein identifizierte die Korrelationskette {3-CH<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  1.41 ppm)  $\leftrightarrow$  3-H ( $\delta_{\text{H}}$  4.02 ppm)  $\leftrightarrow$  4-H<sub>eq</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  2.92 ppm)  $\leftrightarrow$  5-H ( $\delta_{\text{H}}$  6.80 ppm)  $\leftrightarrow$  6-OCH<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  3.69 ppm)} die Position der dritten Methoxygruppe und den 7,1'-Kupplungstyp des Alkaloids.

Da der Extraktabbau im Vorfeld das Vorhandensein (3*R*)-konfigurierter Alkaloide praktisch ausgeschlossen hatte, mußte es sich bei dem neuen Alkaloid **64** um ein Diastereomer, vielleicht sogar um das Enantiomer von **61** handeln. Ein HPLC-CD-Experiment erschloß schließlich die Achsenkonfiguration von **64** (Abb. 60, unten).

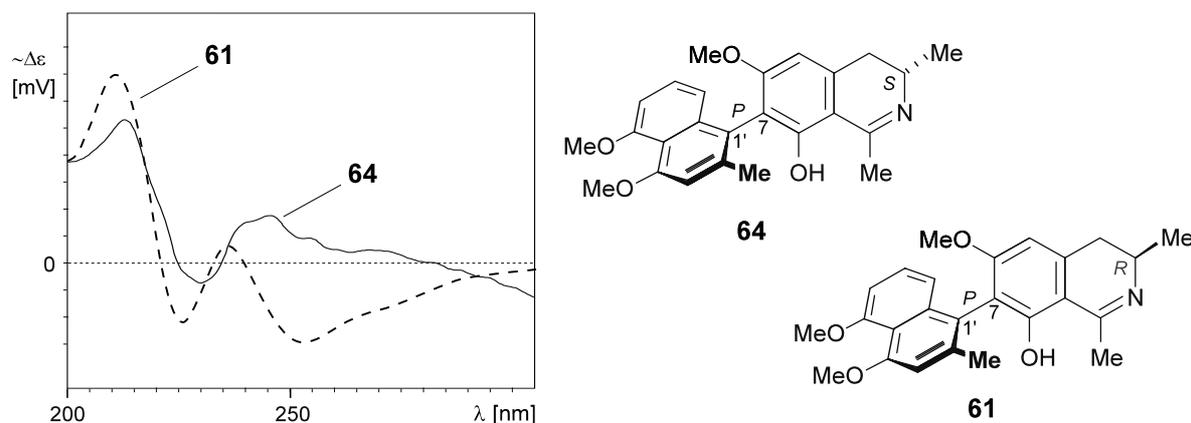


Abb. 60. Bestimmung der Achsenkonfiguration (und damit der gesamten absoluten Konfiguration) des neuen Ancistrobrevin-C-Epimeren **64** ( $t_{\text{R}} = 25.2$  min) nach Vergleich mit dem CD-Spektrum von Ancistrobrevin C (**61**) (in EtOH)

Der CD-Verlauf des neuen Alkaloids glich qualitativ dem von Ancistrobrevin C (**61**). Dies bedeutete, daß **64** und **61** identische Achsenkonfigurationen besitzen mußten. Dies bewies, daß sich bei **64** um das 3-Epimer von **61** handelte. Schon Pokorny<sup>[32]</sup> hatte im Rahmen der Isolierung von **61** aus *A. abbreviatus* Hinweise auf die Existenz von **64** gefunden. Allerdings mißlingen in den damaligen Arbeiten alle Versuche zur Isolierung und Charakterisierung von **64**, welches sich als empfindlich in der Aufarbeitung erwies und nur in geringen Mengen vorlag. Die Labilität von **64** ist wahrscheinlich auf die freie Hydroxylgruppe an C-8 zurückzuführen. Das strukturell sehr ähnliche, 7-epimere Ancistrocladisin (**60**)<sup>[117]</sup> (Abb. 55,

Seite 78) aus *A. heyneanus* wird durch die vollständige *O*-Methylierung relativ stabil und leichter isolierbar. Mit Hilfe der substanzschonenden online-Analytik war die Charakterisierung von **64** nun aber letztendlich möglich.

### 3.3.2.4 Nachweis von 3-*epi*-Ancistrobrevin C (**64**) in *A. heyneanus*

Für die Auswertung des Pfropfexperiments war abschließend die Frage nach einem Vorkommen von **64** in *A. heyneanus* zu klären. Das Fehlen von **64** in *A. heyneanus* hätte bedeutet, daß es neugebildet worden oder, unter Einbezug der Ergebnisse von Pokorny,<sup>[32]</sup> tatsächlich aus der *A. abbreviatus*-Unterlage in den Pfropfreis transportiert worden wäre. Zu diesem Zweck wurden vergleichende HPLC-NMR und HPLC-CD-Messungen an Blattextrakten von *A. heyneanus* und des Pfropfrees durchgeführt (Abb. 61, unten).

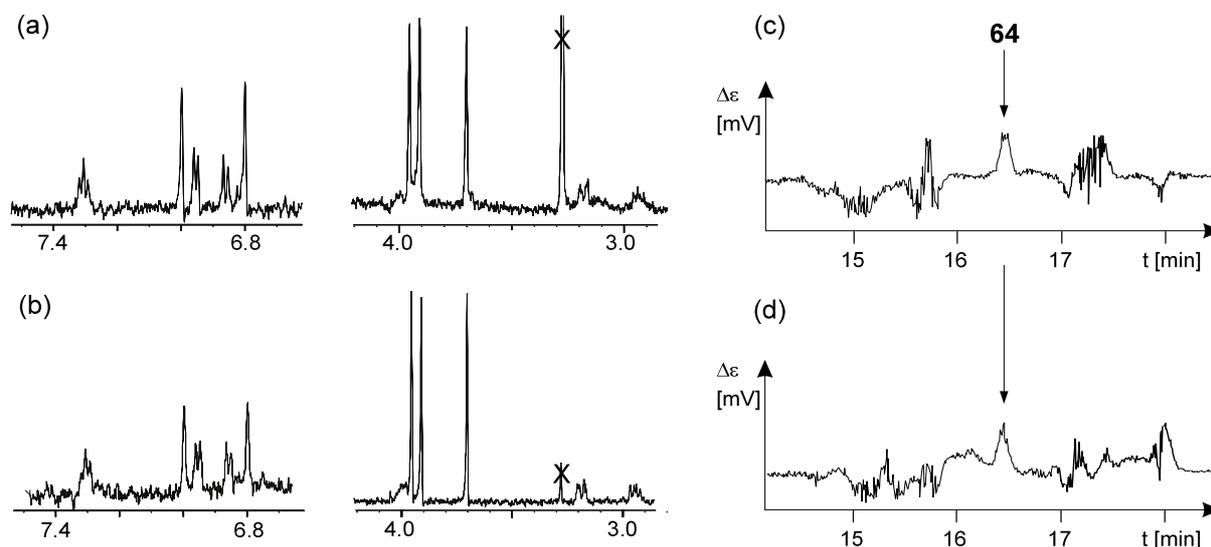


Abb. 61. Vergleich von HPLC-NMR-Spektren (ausgewählte Bereiche) von (a) *A. heyneanus*- und (b) Pfropfreis-Blattextrakten ( $t_R = 15.0$  min) und Vergleich von HPLC-CD-Chromatogrammen (213 nm) von (c) *A. heyneanus*- und (d) Pfropfreis-Blattextrakten (mit **64** bei  $t_R = 16.5$  min)

Die HPLC-<sup>1</sup>H-NMR-Spektren von **64** (im Pfropfreis) und des in *A. heyneanus* bei gleicher Retention auftretenden Alkaloids stimmten detailgetreu überein (Abb. 61a und b, oben). Dies bewies die identische Konstitution und relative Konfiguration beider Analyten. Weiterhin zeigten beide Analytpeaks übereinstimmende CD-Signalvorzeichen, so daß die Existenz eines Enantiomers von **64** ausgeschlossen und das Vorkommen von **64** auch in *A. heyneanus* zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Da gleichzeitig durch den Extraktabbau und durch frühere Arbeiten eine (3*S*)-Konfiguration aller Alkaloide in *A. heyneanus* bewiesen worden war, stützt diese Untersuchung gleichzeitig die im vorhergehenden Kapitel vorgenommene online-Strukturaufklärung von **64**.

Da **64** ein natürlich vorkommendes Alkaloid in *A. heyneanus* darstellt, kann - auch unter Einbeziehung der Ergebnisse des oxidativen Abbaus und des HPLC-MS-Screenings - nicht von einem Transport von Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus den Wurzeln in die Blätter ausgegangen werden. Diese ersten experimentellen Indizien erhöhen aber gleichzeitig die Plausibilität einer Alkaloidproduktion in den Blättern. Untersuchungen mit anderen "Pfropfkombinationen" werden nötig sein, weitergehende Erkenntnisse über den Ort der Biosynthese und den Transport der Naphthylisochinolin-Alkaloide zu liefern.

### 3.3.3 Phytochemische Analytik mit synthetischen Standards

#### 3.3.3.1 Ancistrocladein (71) in *Ancistrocladus affinis tectorius* (Gunung Benom)

Die asiatische Art *A. tectorius* zeichnet sich den wissenschaftlichen Berichten zufolge durch ein äußerst breites Spektrum an Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus (Abb. 62, unten).<sup>[27,31,92,286-290]</sup>

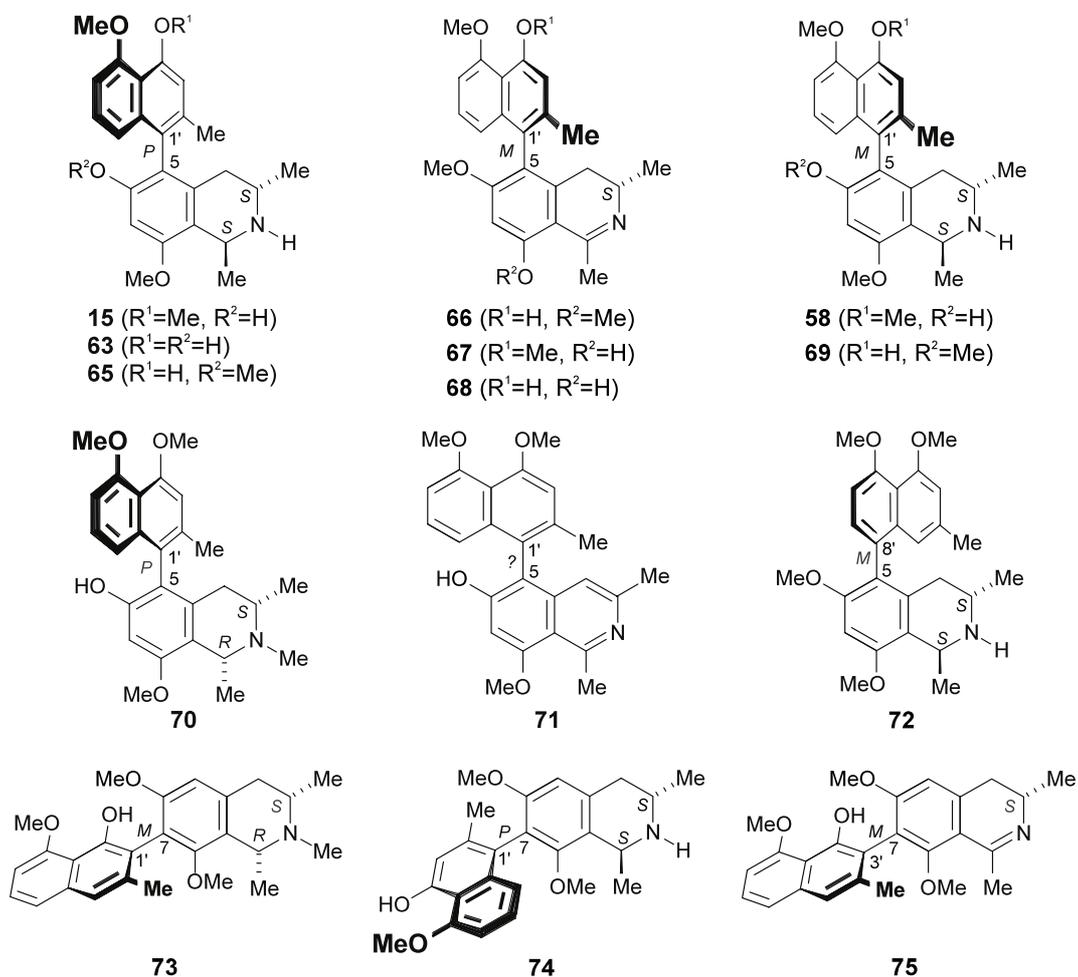
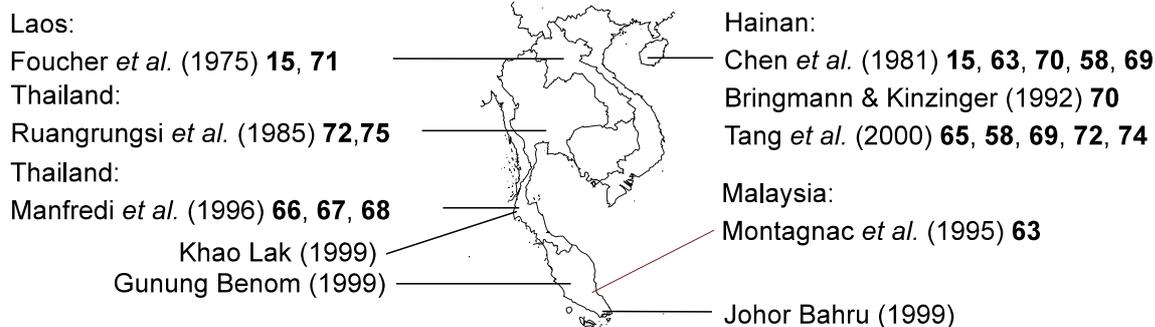


Abb. 62. Übersicht über frühere Funde von Naphthylisochinolin-Alkaloiden in "*A. tectorius*" und Aufsammlungsorte der Exkursion im Frühjahr 1999\*

\* Ich danke H. Rischer für die freundliche Erlaubnis zum Abdruck der Übersichtsdarstellung in Abb. 62.

Neuere Untersuchungen,<sup>[149]</sup> auch mit Hilfe der DNS-Analyse,<sup>[291]</sup> legen jedoch die Vermutung nahe, daß in der wissenschaftlichen Literatur versehentlich z.T. verschiedene, morphologisch ähnliche Arten behandelt wurden. Für eine sichere Neuuntersuchung von *A. tectorius* wurde deshalb die Verfügbarkeit von eindeutig bestimmtem und dokumentiertem Pflanzenmaterial notwendig. Auf der bereits in Kap. 3.3.1.1 (Seite 58) erwähnten Exkursion durch Westmalaysia und Thailand wurde deshalb die Gelegenheit genutzt, an mehreren Standorten (Khao Lak/Thailand, Gunung Benom/Malaysia und Johor Bahru/Malaysia) die asiatische Art *A. tectorius* zu sammeln (Abb. 62, Seite 87).\*

Bereits der Fundort der Gunung-Benom-Probe auf einer Höhe von *ca.* 1000 m unterschied sich deutlich von den beiden anderen Fundorten in Khao Lak und Johor Bahru, die annähernd auf Meereshöhe lagen. Der Verdacht, daß es sich bei der ersteren Probe um eine neue Varietät handeln könnte, wurde anschließend mit HPLC-MS/MS-Untersuchungen erhärtet (Abb. 63, unten). Dafür wurden die Extrakte einem Vergleichsscreening unterzogen, in dem die rekonstruierten Massenspuren von theoretisch möglichen Naphthylisochinolin-Spezies (d.h. alle möglichen Variationen bzgl. Methylierungs- und Hydrierungsgrad) miteinander verglichen wurden. Es zeigte sich dabei in der am Gunung Benom gefundenen Spezies bei *m/z* 404 ein Minderalkaloid mit  $t_R = 18.8$  min, das sich nicht im Extrakt der beiden anderen Aufsammlungen wiederfand.

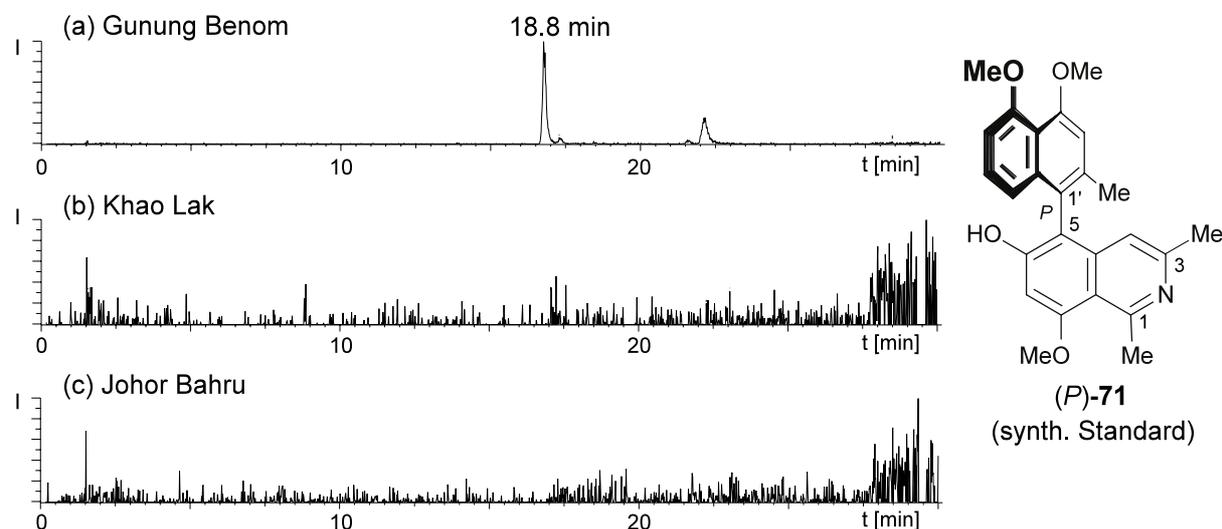


Abb. 63. Rekonstruierte Ionenchromatogramme mit *m/z* 404 der *Ancistrocladus*-Proben von (a) Gunung Benom, (b) Khao Lak und (c) Johor Bahru nebst dem für Koelutionsexperimente verwendeten synthetischen Standard (*P*)-71 mit  $t_R = 18.8$  min

Masse und Fragmentierungsmuster ließen sich mit der Struktur eines trimethoxylierten vollaromatischen Naphthylisochinolins in Einklang bringen. Wie sich aus Abb. 62 (Seite 87)

\* Für botanische Details, siehe Lit.<sup>[149]</sup>

entnehmen läßt, wurde ein derartiges Alkaloid, Ancistrocladein (**71**), bereits von Foucher beschrieben, allerdings ohne genaue Spezifizierung der absoluten Konfiguration.<sup>[286]</sup>

Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden HPLC-MS/MS-Koelutionsexperimente mit synthetisch hergestelltem (*P*)-**71** durchgeführt. Die Standardsubstanz zeigte sich in Retention und Fragmentierung identisch zu dem unbekanntem Alkaloid in *A. aff. tectorius* (Gunung Benom), so daß von einer konstitutionellen Übereinstimmung ausgegangen werden kann. Da die Experimente auf achiraler Phase durchgeführt wurden, kann jedoch keine Aussage bzgl. der absoluten Konfiguration des Alkaloids im Extrakt gemacht werden. HPLC-CD-Experimente scheiterten an der geringen Konzentration des Alkaloids, welches in dem relativen komplexen Extrakt mit anderen, nicht identifizierten Analyten koeluiert.

Die neue Substanz mit der allgemeinen Konstitution **71** spielt damit eine wichtige Rolle als "Markerstruktur" für *A. aff. tectorius* (Gunung Benom), die offensichtlich auch ohne genaue Kenntnis der absoluten Konfiguration zur Abgrenzung verschiedener Arten dienen kann. Dieser phytochemisch offenbarte Unterschied zwischen den Arten *A. aff. tectorius* (Gunung Benom) und *A. tectorius* wurde auch durch DNS-Analysen bestätigt.<sup>[291]</sup> Damit wurde in unserem Arbeitskreis zum ersten Mal eine neue *Ancistrocladus*-Art gesammelt und als solche phytochemisch untersucht bzw. charakterisiert.

### 3.3.3.2 Jozipeltin A (**77**) und Jozimin D (**78**)

Wie bereits beschrieben, besitzen dimere Naphthylisochinolin-Alkaloide vielversprechende Bioaktivitäten, die sie zu lohnenden Zielmolekülen für die organische Synthese machen.<sup>[269,270,292-294]</sup> Dabei ist auch die Synthese bisher nicht in der Natur beobachteter Strukturen erstrebenswert.<sup>[276,295-301]</sup> So wurden z.B. in Dioncophyllaceen noch nie dimere Alkaloide gefunden, obwohl z.B. *T. peltatum* die zur biochemischen Dimerisierung notwendigen Oxidasen aufweist.<sup>[268]</sup> Bislang als Naturstoffe unbekannt dimere Dioncophyllaceae-Alkaloide könnten im Vergleich zu den bekannten Dimeren aus Ancistrocladaceae völlig andere biologische Aktivitäten besitzen und wären auch von chemotaxonomischem Interesse, da die Verfügbarkeit von synthetischen Standards die Suche nach vielleicht nur in Spuren vorhandenen Dimeren in verschiedenen Pflanzen erheblich erleichtert.

Saeb gelang vor kurzem die Synthese der unnatürlichen Dimeren Jozipeltin A (**77**)<sup>[299]</sup> und Jozimin D (**78**)<sup>[271]</sup> aus den Monomerbausteinen Dioncopeltin A (**42**)<sup>[124]</sup> und Dioncophyllin B (**76**)<sup>[126]</sup> (Abb. 64, Seite 90). Da sowohl **42** als auch **76** aus *T. peltatum* bekannt sind, erschien ein Auftreten von **77** und **78** in *T. peltatum* denkbar, und sei es nur im Spuren. Parallel sollten auch noch andere potentielle Produzenten, nämlich *D. thollonii*, *H. dawei* und *A. abbreviatus*

untersucht werden. Als Methode der Wahl bot sich die HPLC-MS/MS-Kopplung an, die Nachweisempfindlichkeiten für Naphthylisochinoline bis in den Picogramm-Bereich hinab erreicht.<sup>[113]</sup>

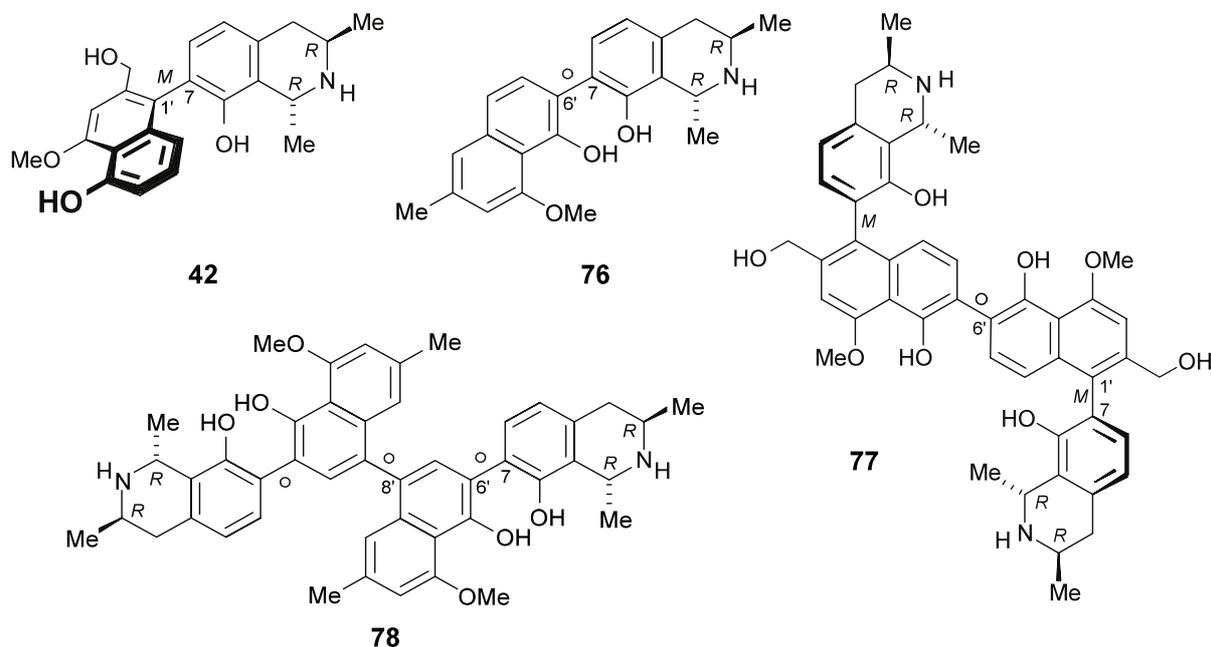


Abb. 64. Unnatürliche Naphthylisochinolin-Dimere der Dioncophyllaceae-typischen Monomerbausteinen **42** und **76**: Jozipeltin A (**77**) und Jozimin D (**78**)

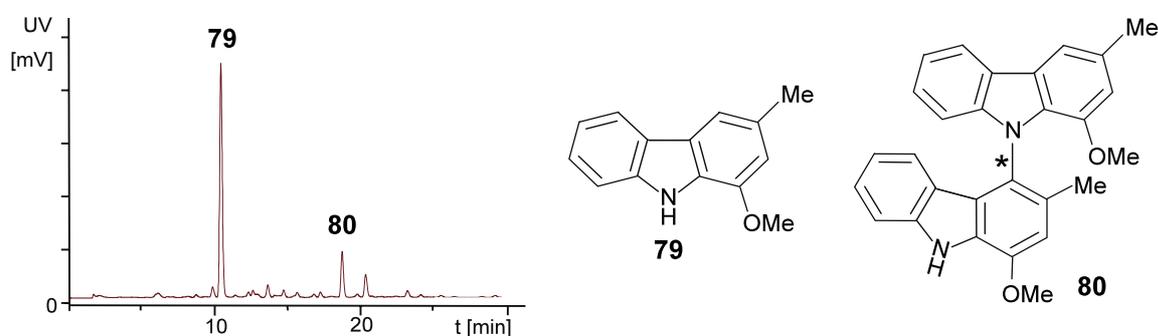
Die Suche in den Rohextrakten wurde im hochsensitiven SRM-Modus durchgeführt. Dazu wurden im Vorfeld von den Referenzverbindungen **77** und **78** Tochterionenspektren akquiriert und intensive Fragmentierungswege ausgewählt ( $m/z$  379.4  $\rightarrow$  352.7 für **77** und  $m/z$  363.4  $\rightarrow$  354.8 für **78**). Unter diesen Bedingungen ergaben sich exzellente Nachweisempfindlichkeiten für beide Standards bis in den *sub*-Nanogramm-Bereich.

Trotz der optimierten experimentellen Bedingungen wurde jedoch in keinem der vier Rohextrakte eine Spur der Dimeren **77** und **78** gefunden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß es zur Dimerisierung Enzyme mit besonderer Spezifität bedarf, die in diesen Spezies nicht vorkommen, oder daß die vorhandenen Enzyme - im Gegensatz zu ausgewählten chemischen Oxidationsmitteln - nicht in der Lage sind, die im Vergleich zu Ancistrocladaceae-typischen Alkaloiden niedriger oxygenierten Vorstufen **42** und **76** oxidativ zu dimerisieren.

### 3.3.3.3 Identifizierung von Murrastifolin-F (**80**) in *Murraya koenigii*

Murrastifolin-F (**80**), ein dimeres Carbazolalkaloid, wurde 1993 zum ersten Mal aus *Murraya koenigii* isoliert.<sup>[302]</sup> Obwohl dieser Naturstoff eine chirale Biarylachse aufweist, wurde seine

absolute Achsenkonfiguration bei der Strukturaufklärung nicht bestimmt, ja nicht einmal ein Drehwert gemessen. Nachdem es Tasler gelungen war, in seinen Arbeiten zur atropisomerenreinen Synthese von Biscarbazol-Alkaloiden<sup>[303]</sup> das Monomer Murrayafolin-A (**79**) oxidativ zu **80** zu dimerisieren, führte er auch Untersuchungen zur Axialchiralität von **80** durch. Er erhielt nach *O*-Demethylierung, Derivatisierung mit Mosher-Reagenz, präparativer chiraler HPLC und anschließender Esterhydrolyse von racemischem **80** die beiden Enantiomeren in reiner Form. Durch NMR-Untersuchungen der Mosher-Ester gelang es ihm auch, die absolute Konfiguration an der Biarylachse zu bestimmen.<sup>[304]</sup> Die erstmalige Verfügbarkeit optisch reiner Referenzen ermöglichte Untersuchungen zur Enantiomerenreinheit von **80** im Produzenten *M. koenigii*. Zu diesem Zweck wurde eine geringe Menge Wurzelmaterial unter milden Bedingungen extrahiert, auf Kieselgel



fraktioniert und mit HPLC-gekoppelten Methoden analysiert (Abb. 65, unten).

Abb. 65. HPLC-UV-Chromatogramm (254 nm) einer Wurzelextrakt-Fraktion von *M. koenigii* und die identifizierten Metaboliten **79** und **80**

Die eindeutige Identifizierung von **80** gelang mit HPLC-NMR- und HPLC-MS/MS-Experimenten an achiraler Phase, die auch Koelutionsversuche mit einem synthetischen Racemat von **80** einschlossen. Neben **80** bei  $t_R = 18.5$  min wurde durch den Vergleich von HPLC-NMR- mit offline-Referenzspektren die ebenfalls aus *M. koenigii* bekannte Verbindung **79** bei  $t_R = 10.5$  min nachgewiesen. Die eindeutige Identifizierung von **80** im Extrakt und die per HPLC-NMR und HPLC-MS/MS überprüfte Peakreinheit, d.h. das Fehlen jeglicher mit **80** koelulierender Störanalyte, stellte die Grundlage für weitere HPLC-CD-Messungen an achiraler und chiraler Phase dar, die Messer<sup>[304,305]</sup> durchführte. Im Lauf dieser Untersuchungen wurde ein leichter Enantiomerenüberschuß von (*M*)-**80** im Extrakt festgestellt, welcher auf eine - zumindest teilweise - enzymatisch katalysierte Synthese von **80** in *M. koenigii* hindeutet.<sup>[304]</sup>

## 4 Zusammenfassung

Die Naturstoffchemie spielt in der Wirkstoff-Forschung eine bedeutende Rolle. Neben den klassischen Aufgaben der Isolierung und Synthese neuer Naturstoffe treten in jüngerer Zeit auch andere Teilgebiete wie die Naturstoffanalytik oder Biosyntheseuntersuchungen in den Vordergrund. Ein wertvolles Werkzeug in all diesen Bereichen stellt die Kernresonanzspektroskopie dar, sei es zur konventionellen Strukturaufklärung, als Detektor in der HPLC-gekoppelten online-Analytik oder zum Nachweis des Einbaus von stabilisotopenmarkierten Substanzen in Biogenesestudien.<sup>[13]</sup>

Pflanzen gelten als wertvolle Quellen biologisch aktiver Sekundärmetaboliten. Im Rahmen dieser Dissertation wurden mehrere tropische Arten unter verschiedenen naturstoffchemischen Gesichtspunkten bearbeitet. Einen Schwerpunkt bilden in unserem Arbeitskreis die tropischen Lianenfamilien der Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen. Diese produzieren die Naphthylisochinolin-Alkaloide,<sup>[16]</sup> Biaryl-naturstoffe mit faszinierenden strukturellen und pharmakologischen Eigenschaften. In diesen Arbeiten gelang es erstmals, die Biogenese dieser Alkaloide am Beispiel von Dioncophyllin A (**6**) aus *Triphyophyllum peltatum* aufzuklären.<sup>[148]</sup> Im analytischen Bereich standen der Einsatz und die methodische Verbesserung der online-"Triade" HPLC-MS/MS, HPLC-NMR und HPLC-CD im Vordergrund.<sup>[38]</sup> Diese neuen Techniken dienten im Anschluß der phytochemischen Untersuchung verschiedener Pflanzen. Nach der erstmaligen Analyse von *Ancistrocladus griffithii*<sup>[266]</sup> wurden auch neue Alkaloide daraus isoliert.<sup>[306]</sup>

Als weiteres Forschungsobjekt diente das strukturell und biogenetisch hochinteressante Pyridon-Alkaloid Antidesmon (**27**) aus *Antidesma membranaceum*.<sup>[41]</sup> Untersuchungen zur Biogenese von **27** führten nicht nur zur Entdeckung eines neuen Biogeneseweges,<sup>[150]</sup> sondern auch zur Strukturrevision des ursprünglich publizierten, falschen Strukturvorschlages **7**,<sup>[154]</sup> wobei ein eleganter, auf Stabilisotopenverfütterung basierender experimenteller Weg beschritten wurde.

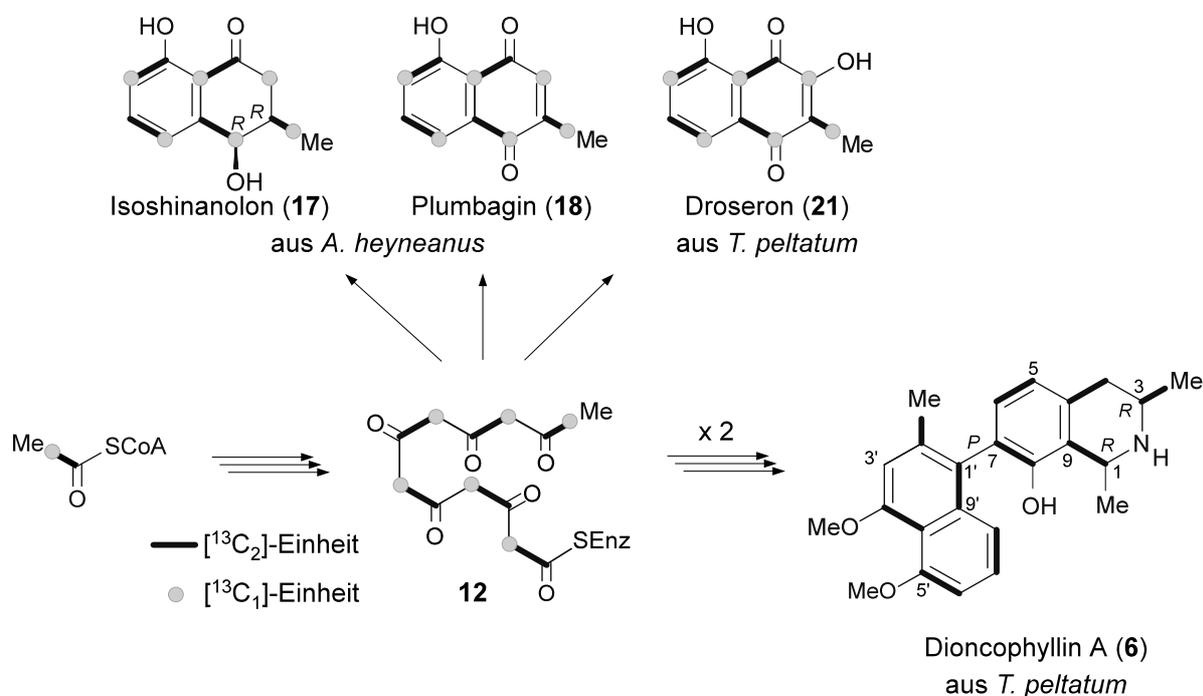
Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

### 4.1 Die Aufklärung der Biogenese von Dioncophyllin A (**6**) und Antidesmon (**27**)

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Einbaustudien mit stabilisotopenmarkierten Vorstufen bewiesen erstmals die polyketidbasierte Biogenese der Naphthylisochinolin-Alkaloide. Die Grundlage dieses Erfolgs bildete eine interdisziplinäre Zusammenarbeit mit Biologen und Biochemikern in unserem Arbeitskreis. Nachdem es H. Rischer erstmals gelungen war, Alkaloid-produzierende Zellkulturen von *T. peltatum* zu etablieren, folgten

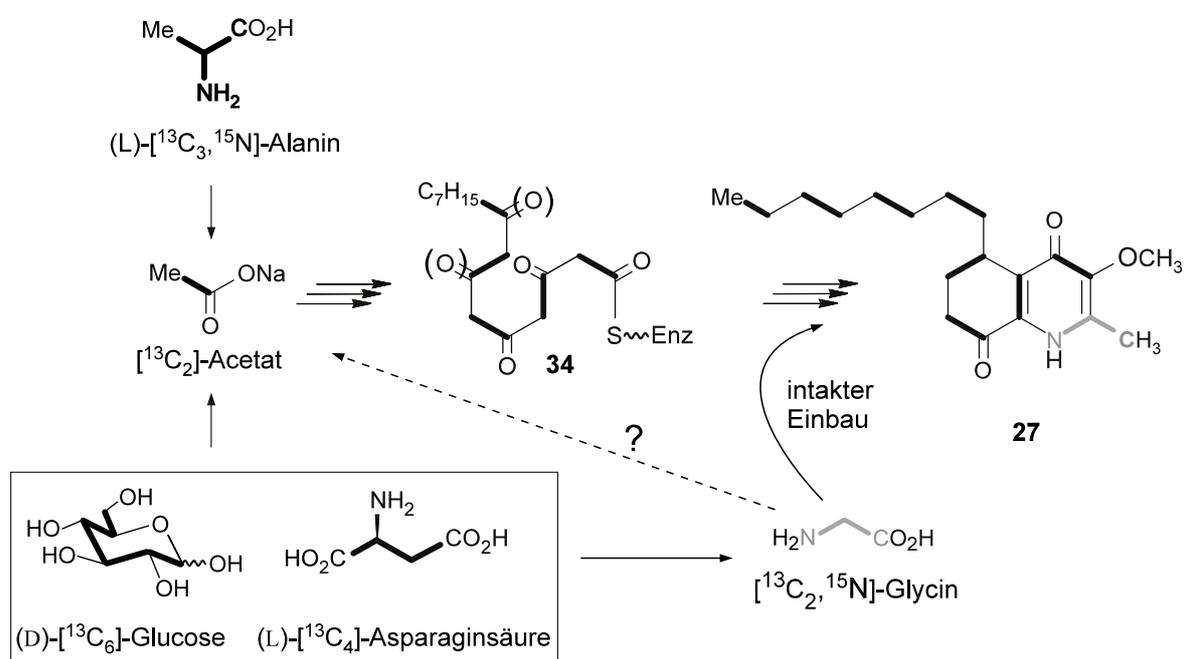
Verfütterungsversuche mit  $[^{13}\text{C}_2]$ -NaOAc. Die Isolierung des Hauptalkaloids Dioncophyllin A (**6**) aus nur wenigen Hundert Milligramm Kallusmaterial ermöglichte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Untersuchungen, die aufgrund der geringen verfügbaren Probenmenge mit einem speziellen, hochsensitiven Kryprobenkopf durchgeführt wurden. Die NMR-Analyse von **6** deckte  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungsmuster auf, die zwingend einen Einbau von intakten  $^{13}\text{C}_2$ -Einheiten belegten (Schema 14, unten).<sup>[148]</sup> Demnach entsteht **6** biosynthetisch aus zwei identischen, hexaketidischen  $\beta$ -Polycarbonylvorstufen **12**, die als Vorstufen sowohl für den Isochinolin- als auch für den Naphthalin-Baustein fungieren. Die beiden Hälften könnten anschließend durch phenoxidative Kreuzkupplung verknüpft werden. Die Naphthylisochinoline sind damit die einzigen bekannten Tetrahydroisochinolin-Alkaloide acetogeninen Ursprungs.

Aus Flüssigkulturen von *T. peltatum*, die ebenfalls H. Rischer zur Verfügung stellte, wurde nach Verfütterung von  $[^{13}\text{C}_2]$ - und  $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -NaOAc auch das Naphthochinon Droseron (**21**) isoliert.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Untersuchungen wiesen ebenfalls einen Einbau von intakten  $^{13}\text{C}_2$ -Einheiten und damit eine polyketidische Herkunft von **21** nach.<sup>[119]</sup> Das Inkorporationsmuster und die daraus gefolgerte Faltung des Polyketids entsprechen dabei denen der bereits aus *Ancistrocladus heyneanus* bekannten acetogeninen Metaboliten Plumbagin (**18**) und Isoshinanolon (**17**) (Schema 14, unten).<sup>[75]</sup> Damit ist die Biogenese der drei wichtigsten Stickstoff-freien Streßmetabolite aus Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen eindeutig geklärt.



Schema 14. Nachweis des acetogeninen Ursprungs des Dioncophyllins A (**6**) und der biogenetisch verwandten Metabolite **21**, **18** und **17** nach Verfütterung von  $[^{13}\text{C}_2]$ - und  $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -NaOAc an Zellkulturen von *T. peltatum*.

Weiterhin wurde die Biogenese des strukturell ungewöhnlichen Alkaloids Antidesmon durch Verfütterung von  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten Vorstufen an Zellkulturen von *A. membranaceum* untersucht. Die nach einer  $^{13}\text{C}_2$ -NaOAc-Verfütterung beobachteten  $^{13}\text{C}_2$ -Einbaumuster widersprachen der ursprünglich von G. Adam *et al.* publizierten Isochinolinstruktur **7**<sup>[41]</sup> und führten zu umfangreichen Neuuntersuchungen.<sup>[154]</sup> Dazu wurden  $^{15}\text{N}$ -markierte Vorstufen an die Suspensionskulturen von *A. membranaceum* verfüttert. Die so erzielte isotopische Anreicherung des produzierten Alkaloids war hoch genug, um trotz der geringen Probenmengen mittels NMR weitreichende Strukturaussagen zu ermöglichen.  $^{15}\text{N}$ -Heterokernexperimente an  $^{15}\text{N}$ -angereichertem Antidesmon (**27**) erlaubten schließlich eine eindeutige Zuordnung der korrekten 1,4-Pyridonstruktur.<sup>[150]</sup>



Schema 15. Aufklärung von Struktur und Biogenese des Pyridon-Alkaloids Antidesmon (**27**) nach Verfütterung von isotoenmarkierten Vorstufen

Im Anschluß wurden Einbauexperimente mit weiteren mehrfach markierten Vorstufen wie (D)-[ $^{13}\text{C}_6$ ]-Glucose, (L)-[ $^{13}\text{C}_4$ ]-Asparaginsäure, (L)-[ $^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$ ]-Alanin und [ $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ ]-Glycin durchgeführt. Diese Versuche bewiesen, daß **27** in den Zellkulturen ausschließlich aus Acetat und Glycin aufgebaut wurde, d.h. aus der Kondensation eines polyketidischen  $\text{C}_{16}$ -Grundkörpers mit der Aminosäure. Bemerkenswert an dieser Biogenese sind v.a. zwei Vorgänge: Zum einen die vermutliche formale Reduktion der Carboxylgruppe von Glycin zur 2-Methylgruppe von **27**, zum anderen der intakte Einbau von Glycin als  $\text{C}_2$ -Donor in die acetogenine  $\text{C}_{16}$ -Polyketidkette.<sup>[150]</sup> Der letztere metabolische Schritt ist in dieser Form in Pflanzen noch nie beobachtet worden und verdient deshalb weiteres Interesse. Mit Antidesmon (**27**) wurde erstmals die Biogenese eines Vertreters der biologisch hochaktiven<sup>[42,158]</sup> Naturstoffklasse der 1,4-Pyridon-Alkaloide aufgeklärt.

## 4.2 Phytochemische online-Analytik und Isolierung neuer Naphthylisochinolin-Alkaloide

Mehrere Projekte zur Leistungs- und Qualitätssteigerung der HPLC-NMR-Methode fanden im Rahmen dieser Dissertation ihren Abschluß. Der Beschaffung eines modernen Flußprobenkopfes (60 µl, z-Gradient) folgte eine umfangreiche Implementierung von neuen Pulsprogrammen. Dafür wurden die vorhandenen *Bruker*-Standardpulsprogramme mit der wesentlich leistungsfähigeren WET-Sequenz<sup>[204]</sup> zur Lösungsmittelunterdrückung ausgestattet. Zur Anpassung der chromatographischen Parameter an das geringere Meßzellenvolumen wurde die HPLC-Analytik auf kleinere Säulendurchmesser und Flußraten (3 mm I.D., 0.5 ml/min) umgestellt. Dies führte zu einer weiteren Erhöhung der Meßempfindlichkeit.

Die Etablierung von HPLC-MS/MS- und HPLC-NMR-Experimenten zur Detektion austauschbarer Protonen erweiterte deutlich das analytische Potential beider Methoden zur online-Strukturaufklärung. Dazu wurden jeweils Massen- und NMR-Spektren sowohl mit deuterierten als auch protonierten Lösungsmitteln (D<sub>2</sub>O bzw. H<sub>2</sub>O) vermessen und anschließend verglichen. Anhand der per HPLC-MS gemessenen Massenzunahme beim Übergang von H<sub>2</sub>O nach D<sub>2</sub>O ließ sich die Anzahl der chemisch austauschbaren Protonen eines Moleküls ableiten. Diese aciden Protonen waren z.T. mit der HPLC-NMR-Kopplung durch Verwendung von H<sub>2</sub>O als Laufmittel detektierbar, so daß ihre Position im Molekül durch 2D-Experimente bestimmbar war.<sup>[307]</sup>

Die auf einer botanischen Sammelreise in Thailand gefundene Art *Ancistrocladus griffithii* wurde zum ersten Mal phytochemisch untersucht. Sechs Naphthylisochinolin-Alkaloide wurden mit der "online-Triade" identifiziert. Die absoluten Stereostrukturen der neuen monomeren Alkaloide Ancistrogriffin A (**52**) und Ancistrogriffin B (**54**) sowie des neuen dimeren Naphthylisochinolins Ancistrogriffithin A (**51**)<sup>[266]</sup> wurden ausschließlich per online-Kopplung (HPLC-NMR, HPLC-MS/MS, HPLC-CD)<sup>[38]</sup> und Extraktabbau ohne vorherige Isolierung aufgeklärt. Ein weiteres neues Alkaloid, Ancistrogriffin C (**57**), wurde mit der "Triade" weitgehend charakterisiert und nach seiner gezielten Isolierung strukturell vollständig zugeordnet (Abb. 66, Seite 96). Weiterhin wurden die bereits bekannten Alkaloide Ancistrocladin (**15**) und Hamatin (**58**) (Abb. 54, Seite 75) identifiziert. Für Bioaktivitätstests wurden **52** und **51** anschließend auch isoliert.<sup>[306]</sup> Beide Naturstoffe zeigten gute Wirkung in *in-vitro*-Untersuchungen gegen *P. falciparum* bzw. *L. donovani*.

Mehrere technische Verbesserungen (Benutzung eines 60-µl-Flußprobenkopfes, Einführung der WET-Unterdrückung, Optimierung der HPLC-Parameter) führten bei der Untersuchung

von *A. griffithii* zu deutlichen Fortschritten in den Bereichen Sensitivität und Spektrenqualität. In zwei Fällen (**52** und **51**) gelang es, weitreichende ROESY-Korrelationen über die Biarylachse hinweg zu beobachten. Bei **51** wurde sogar eine long-range-Korrelation  $\{1'-H \leftrightarrow 1-CH_3\}$  detektiert, die geeignet war, die relative Achsenkonfiguration online zu bestimmen. Die beschriebenen Modifikationen erlaubten damit einen Vorstoß in Leistungsbereiche, die vormals nur der hochauflösenden offline-NMR vorbehalten gewesen waren.<sup>[266]</sup>

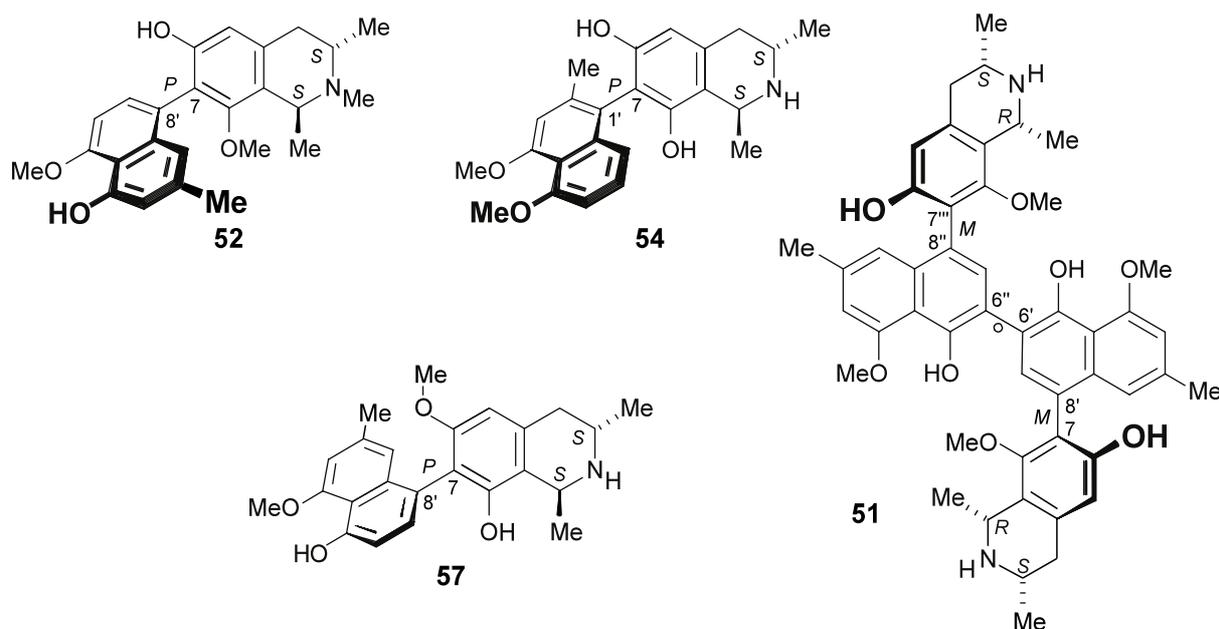


Abb. 66. Neue Alkaloide aus *Ancistrocladus griffithii*: Ancistrogriffin A (**52**), B (**54**) und C (**57**), sowie das erste "asiatische", 7,8'-gekuppelte Homodimer, Ancistrogriffithin A (**51**)

*A. griffithii* ist eine im phytochemischen Sinne facettenreiche Art, produziert sie doch Naphthylisochinolin-Alkaloide mit nicht weniger als drei verschiedenen Kupplungstypen (7,8', 7,1' und 5,1'). Darüber hinaus enthält sie als erste asiatische Art ein dimeres Naphthylisochinolin-Alkaloid, Ancistrogriffithin A (**51**). Dieses stellt das einzige bekannte Homodimer mit 7,8'-Kopplungstyp und einer Ancistrocladaceae-typischen (3*S*)-Konfiguration dar.

Zur Untersuchung der Produktionsorte und Transportwege der Naphthylisochinolin-Alkaloide in ihren Produzenten wurde ein Blattextrakt eines *A.-heyneanus*-Pfropfreeses, der auf eine *A.-abbreviatus*-Unterlage gepfropft worden war, mit der "Triade" analysiert. Ein HPLC-MS/MS-Screening offenbarte keine Dioncophyllaceae-typisch oxygenierten Alkaloide im Pfropfrees. Weiterhin erbrachte ein oxidativer Abbau des Blattextraktes keinen Hinweis auf das Auftreten von (3*R*)-konfigurierten Alkaloiden im Pfropfrees, so daß ein unselektiv stattfindender Transport von Alkaloiden aus dem Wurzelbereich in die Blattregion im Licht dieser Ergebnisse praktisch ausgeschlossen werden kann.

Nach einer genaueren online-Analyse des Pflöpfreises und einem Vergleich mit "reinen" *A. heyneanus*- und *A. abbreviatus*-Extrakten ergab sich, daß die Metabolitprofile von Pflöpfreis und *A. heyneanus* qualitativ übereinstimmten, während große Unterschiede zu *A. abbreviatus* zu verzeichnen waren. So gelang im Pflöpfreis der Nachweis der bekannten, *heyneanus*-typischen Alkaloide **15**, **63** und **62**, wobei im Falle von **63** HPLC-CD-Messungen den von Rückert<sup>[113]</sup> angestellten Strukturvorschlag bzgl. einer (*P*)-Achsenkonfiguration experimentell belegten. Weiterhin wurde ein neues Alkaloid, 3-*epi*-Ancistrobrevin C (**64**), im Pflöpfreis durch HPLC-MS/MS-, HPLC-NMR- und HPLC-CD-Experimente strukturell aufgeklärt (Abb. 67, unten) und auch in *A. heyneanus* detektiert. Letzteres Beispiel demonstriert sehr schön den enormen Wert von online-Techniken zur Untersuchung empfindlicher Verbindungen im Spurenbereich, da **64** in früheren Untersuchungen von Pokorny<sup>[32]</sup> mit konventionellen Methoden nicht hatte charakterisiert werden können.

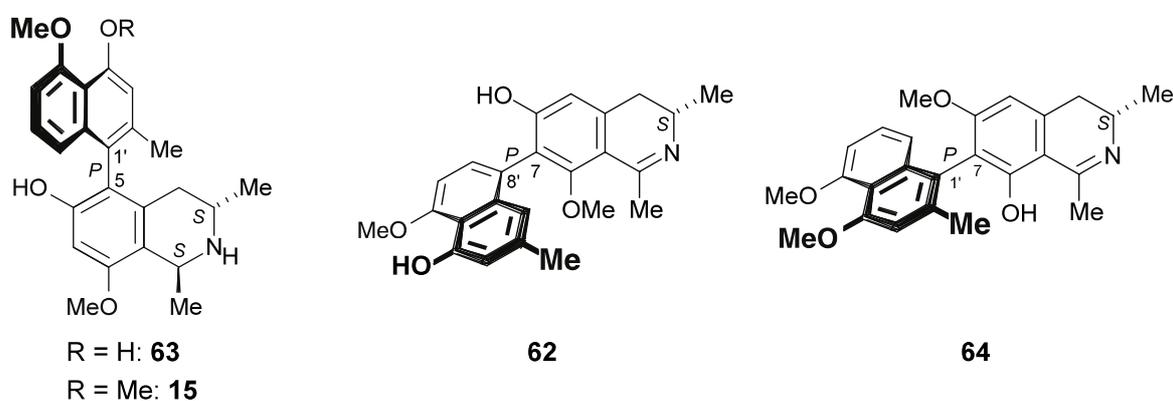


Abb. 67. Im Rahmen des Pflöpfexperiments detektierte Alkaloide: Ancistrocladin (**15**), 4-*O*-Desmethylanastrocladin (**63**), Ancistroheynin A (**62**) und das bisher noch nicht charakterisierte 3-*epi*-Ancistrobrevin C (**64**)

Die am Modellsystem des Pflöpfes *A. heyneanus* auf *A. abbreviatus* gemachten Beobachtungen widersprechen einem Transport von Alkaloiden aus den unteren in die oberen Pflanzenbereiche. Dies läßt sich damit auch als Hinweis darauf werten, daß sich die Produktion der Naphthylisochinolin-Alkaloide nicht im Wurzelbereich abspielt. Zukünftige Experimente mit der "Pflöpf-Methode" könnten weitere Erkenntnisse über diesen Sachverhalt liefern.

In Zusammenarbeit mit H. Rischer in Thailand und Malaysia aufgesammelte *Ancistrocladus*-Proben wurden auf phytochemische Unterschiede hin analysiert. In HPLC-MS/MS-Messungen wurde dabei in einer Aufsammlung (Gunung Benom, Malaysia) ein Minderalkaloid mit Ancistrocladein-Konstitution (**71**) entdeckt, welches in den beiden anderen Pflanzenproben nicht detektierbar war (Abb. 63, Seite 88). Dadurch konnte diese Spezies chemotaxonomisch von den beiden anderen abgegrenzt werden. Spätere DNA-Analysen bestätigten diesen

Befund.<sup>[291]</sup> Damit wurde zum ersten Mal in unserem Arbeitskreis eine neue *Ancistrocladus*-Spezies gefunden und phytochemisch identifiziert.

Im Rahmen des Dimerenscreenings wurden die Arten *T. peltatum*, *D. thollonii*, *H. dawei* und *A. abbreviatus* auf das Vorkommen der synthetischen, unnatürlichen Dimeren Jozipeltin A (**77**) und Jozimin D (**78**) (Abb. 64, Seite 90) hin untersucht.<sup>[271,299]</sup> Mit der HPLC-MS/MS-Kopplung im SRM-Modus wurde jedoch keines dieser Dimeren in einer der genannten Pflanzen detektiert, obwohl zumindest *T. peltatum* die potentiellen Monomervorstufen **42** und **76** (Abb. 64, Seite 90) in signifikanten Mengen produziert. Damit kann ein natürliches Vorkommen von **77** und **78** *de facto* ausgeschlossen werden.

In Zusammenarbeit mit S. Tasler und K. Messer wurde *Murraya koenigii* (Rutaceae) auf die Existenz des axialchiralen, dimeren Carbazolalkaloids Murrastifolin-F (**80**) (Abb. 65, Seite 91) hin online-analytisch untersucht. Die eindeutige Identifizierung von **80** im Extrakt schuf die Voraussetzung für weitere chiroptische Analysen. Nachdem mit der HPLC-NMR- und HPLC-MS/MS-Kopplung auch die Koelution jeglicher Störanalyten mit **80** ausgeschlossen worden war, gelang K. Messer die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von (*M*)- und (*P*)-**80** im Extrakt mit Hilfe der HPLC-CD-Methode.<sup>[304]</sup>

## 5 Summary

Natural Product Chemistry plays an important role in pharmaceutical research. Besides classical tasks like the isolation and synthesis of new natural products, other fields of research like natural product analysis or biosynthetic investigations have been emerging recently. Nuclear magnetic resonance spectroscopy is a valuable tool in all of these areas. It is used for conventional structure analysis, as a detection device within HPLC-coupled online-analysis, and provides evidence of the incorporation of stable isotope labelled substances in biogenesis studies.<sup>[13]</sup>

Tropical plants are generally considered as valuable sources of biologically active secondary metabolites. Within the framework of this thesis, several tropical species were investigated from various phytochemical points of view. In our research group, an emphasis is put on the tropical liana families of Ancistrocladaceae and Dioncophyllaceae. These produce naphthylisoquinoline alkaloids,<sup>[16]</sup> biaryl natural products with fascinating structural and pharmacological features. In this work the biogenesis of the naphthylisoquinoline alkaloids, exemplified by dioncophylline A (**6**) from *Triphyophyllum peltatum*,<sup>[148]</sup> was elucidated for the first time. Regarding the analytical field, the main focus was on the usage and methodical improvement of the "online-triad" HPLC-MS/MS, HPLC-NMR, and HPLC-CD.<sup>[38]</sup> Subsequently, these novel techniques were used for the phytochemical investigation of different plants. After the first analysis of *Ancistrocladus griffithii*<sup>[266]</sup> new alkaloids were isolated from it.<sup>[306]</sup>

The structurally and biogenetically highly interesting pyridone alkaloid antidesmone (**27**) from *Antidesma membranaceum*<sup>[41]</sup> served as another research target. Investigations regarding the biogenesis of **27** led not only to the discovery of a new biosynthetical pathway, but also to the structural revision of the originally published, incorrect structure proposal **7**, pursuing an elegant experimental concept based on stable isotope feeding.

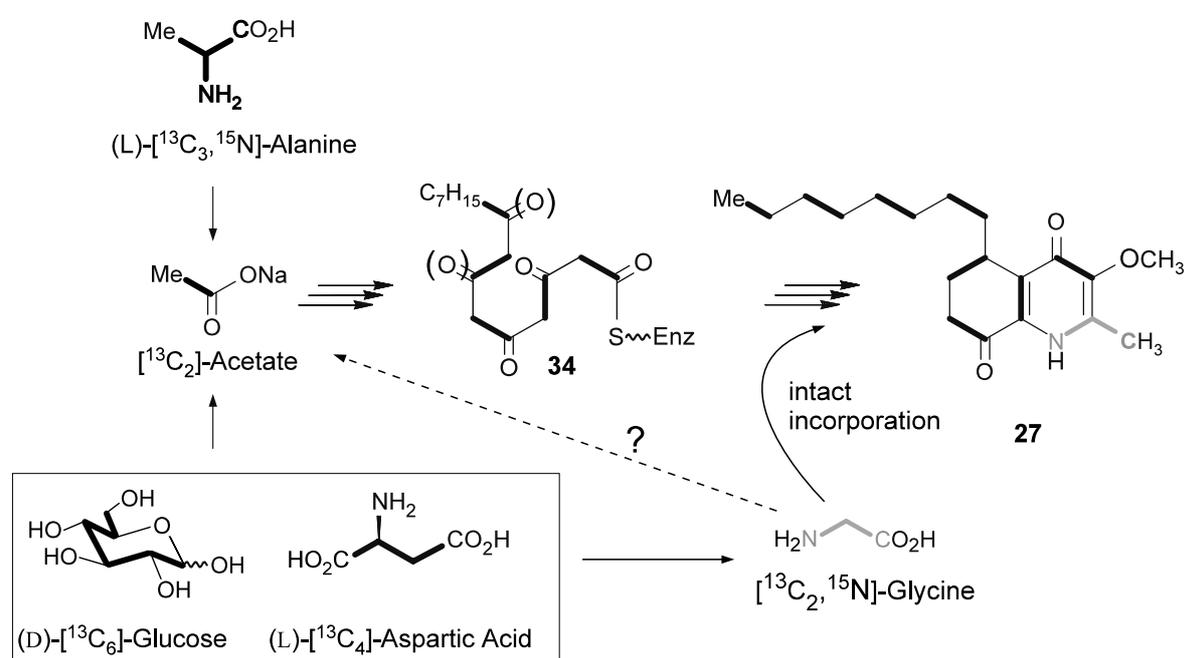
In detail, the following results were achieved:

### 5.1 Elucidation of the Biogenesis of Dioncophylline A (**6**) and Antidesmone (**27**)

The incorporation studies described in this thesis, which were carried out with stable isotope labelled precursors, proved for the first time the polyketide based biogenesis of the naphthylisoquinoline alkaloids. The key of this success was an interdisciplinary cooperation with biologists and biochemists in our research group. After H. Rischer had successfully established alkaloid producing plant cell cultures of *T. peltatum*, feeding experiments were



Moreover, the biogenesis of the structurally uncommon alkaloid antidesmone was investigated by the administration of  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ -labelled precursors to cell cultures of *A. membranaceum*. The feeding of  $^{13}\text{C}_2$ -NaOAc revealed  $^{13}\text{C}_2$ -incorporation patterns which were in contrast to the structure originally published by G. Adam *et al.*<sup>[41]</sup> and led to extensive reinvestigations.<sup>[154]</sup>  $^{15}\text{N}$ -labelled precursors were fed to suspension cultures of *A. membranaceum*. This approach yielded an isotopic enrichment of the produced alkaloid which was sufficient to achieve far reaching structural assignments by NMR despite the small amounts of sample. Finally,  $^{15}\text{N}$ - and  $^{13}\text{C}$ -heteronuclear experiments on  $^{15}\text{N}$  enriched antidesmone (**27**) allowed an unambiguous proof and correct assignment of the 1,4-pyridone structure (Scheme 17, p. 101).<sup>[150]</sup>



Scheme 17. Elucidation of structure and biogenesis of the pyridone alkaloid antidesmone (**27**) after the feeding of isotopically labelled precursors

Subsequently incorporation experiments were conducted with more multilabelled precursors such as (D)-[ $^{13}\text{C}_6$ ]-glucose, (L)-[ $^{13}\text{C}_4$ ]-aspartic acid, (L)-[ $^{13}\text{C}_3$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-alanine, and [ $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-glycine. These experiments proved the formation of **27** in cell cultures exclusively from glycine and acetate, *i.e.* from the condensation of a polyketidic basic structure with an amino acid. This biogenesis exhibits two extraordinary features: On the one hand the presumably formal reduction of the carboxylic group of glycine to the 2-methyl group of **27**, on the other hand the intact incorporation of glycine as a  $\text{C}_2$ -donor for the acetogenic  $\text{C}_{16}$ -polyketide chain.<sup>[150]</sup> The latter metabolic step has not been observed in plants yet and deserves further attention in the future. With antidesmone (**27**) the biogenesis of a representative of the biologically highly active<sup>[42,158]</sup> natural product class of 1,4-pyridone alkaloids has been elucidated for the first time.

## 5.2 Phytochemical Online-Analysis and Isolation of Novel Naphthylisoquinoline Alkaloids

Within this thesis several projects concerning the increase of the performance and quality of the HPLC-NMR-method were completed. The procuring of a modern flow probe (60  $\mu$ l, z-gradient) was followed by an extensive implementation of new puls programmes. Thus the available *Bruker* standard puls programmes were equipped with the much more powerful WET-sequence<sup>[204]</sup> for solvent suppression. The analytical HPLC method was adjusted to smaller column diameters and lower flow rates (3 mm i.d., 0.5 ml/min) to adapt the chromatographical parameters to the reduced flow probe volume. These actions led to a further enhancement of the measurement sensitivity.

The introduction of HPLC-NMR and HPLC-MS/MS experiments for the detection of exchangeable protons significantly increased the analytical capability of both methods for online structural elucidation. For this purpose, MS and NMR spectra were measured with deuterated and protonated solvents ( $D_2O$  and  $H_2O$ , respectively) and compared thereafter. The number of chemically exchangeable protons of a molecule was deduced from the mass increase measured by HPLC-MS when switching from  $H_2O$  to  $D_2O$ . In some cases these acidic protons were detectable by HPLC-NMR when  $H_2O$  was used as the eluent. This allowed the determination of their position in the molecule by 2D-experiments.<sup>[307]</sup>

The species *Ancistrocladus griffithii*, which had been found during a botanical excursion in Thailand, was phytochemically investigated for the first time. Six naphthylisoquinoline alkaloids were identified by the "online-triad". The absolute stereostructures of the new monomeric alkaloids ancistrogriffine A (**52**) and ancistrogriffine B (**54**), as well as of the new dimeric naphthylisoquinoline ancistrogriffithine A (**51**),<sup>[266]</sup> were elucidated solely by online-hyphenation (HPLC-NMR, HPLC-MS/MS, HPLC-CD)<sup>[38]</sup> and extract degradation without prior isolation. Another new alkaloid, ancistrogriffine C (**57**), was characterized to a far degree by the "triad". It was structurally fully assigned after its directed isolation (Fig. 68, p. 103). Furthermore, the already known alkaloids ancistrocladine (**15**) and hamatine (**58**) were identified (Fig. 54, p. 75). For bioactivity tests **52** and **51** were isolated as well.<sup>[306]</sup> Both natural products exhibited good bioactivities against *P. falciparum* and *L. donovani*, respectively, in *in-vitro*-tests.

During the investigation of *A. griffithii*, several technical improvements (the use of a 60- $\mu$ l-flow-probe, the introduction of the WET solvent suppression, and the optimization of HPLC parameters) led to a significant progress in terms of sensitivity and spectra quality. In two

cases (**52** and **51**) the observation of long-range ROESY correlations was possible across the biaryl axis. In the case of **51** a long-range correlation  $\{1\text{'-H} \leftrightarrow 1\text{-CH}_3\}$  was detected, which was even suited to determine online the relative configuration at the axis. Thus, these modifications pushed the HPLC-NMR technique into an area of performance which had been hitherto reserved only for high-resolution offline NMR.<sup>[266]</sup>

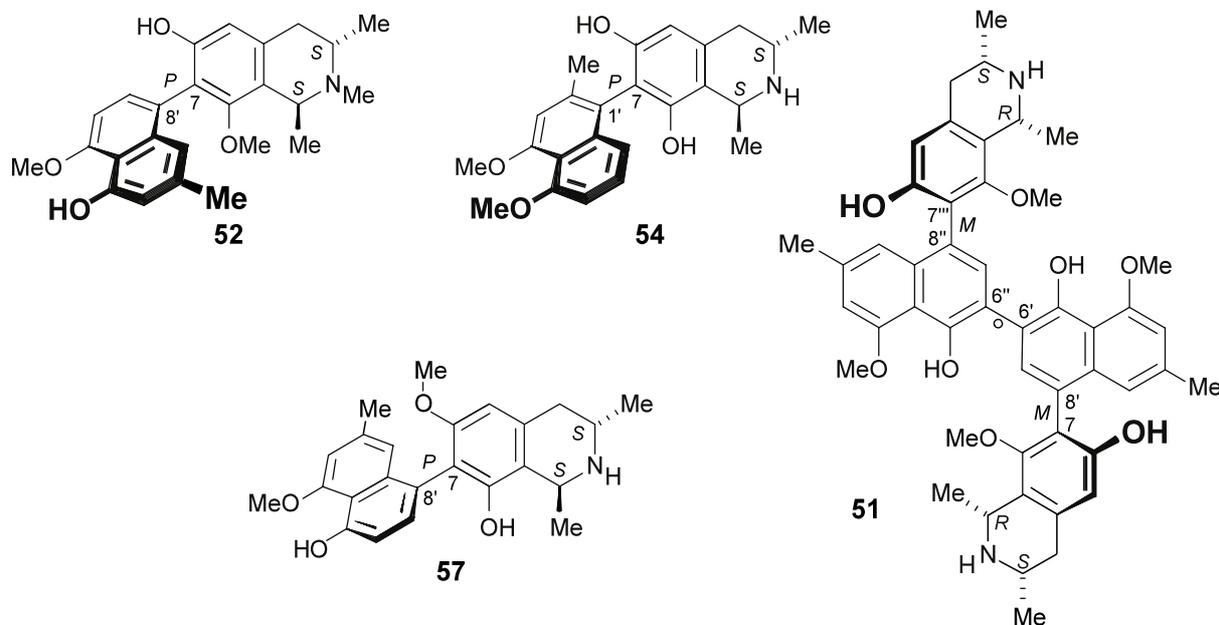


Fig. 68. New alkaloids from *Ancistrocladus griffithii*: Ancistrogriffine A (**52**), B (**54**), and C (**57**), as well as the first "Asian", 7,8'-coupled homodimer, ancistrogriffithine A (**51**)

From a phytochemical point of view, *A. griffithii* appears as a very diverse species. It produces naphthylisoquinoline alkaloids with not less than three different coupling types (7,8', 7,1' and 5,1'). Furthermore, it is the first Asian species that contains a dimeric naphthylisoquinoline alkaloid, namely ancistrogriffithine A (**51**). This is the only known homodimer with a 7,8'-coupling type and an Ancistrocladaceae-typical (3S)-configuration.

To investigate the production sites and transport paths of the naphthylisoquinoline alkaloids within their producers, a leaf extract of an *A. heyneanus* scion, which had been grafted on an *A. abbreviatus* rootstock, was analyzed by the triad. An HPLC-MS/MS screening disclosed no Dioncophyllaceae-type oxygenated alkaloids in the scion. The oxidative degradation of the leaf extract did not hint at the occurrence of (3R)-configured alkaloids in the scion. These results practically ruled out any unselective transport mechanism of alkaloids from the roots into the leaves.

After a thorough online analysis of the graft and a comparison with "pure" *A. heyneanus* and *A. abbreviatus* extracts it was shown that the metabolic profiles of the scion and *A. heyneanus* were in good agreement, whereas *A. abbreviatus* differed substantially. Furthermore, the well known, *A. heyneanus* typical alkaloids **15**, **63** and **62** were detected in the scion. In the case of **63** HPLC-CD experiments proved the (*P*)-configuration at the axis, in compliance with Rückert's<sup>[113]</sup> original structural proposal. Moreover, a new alkaloid, 3-*epi*-ancistrobrevine C (**64**), was structurally elucidated in the scion by HPLC-MS/MS, HPLC-NMR, and HPLC-CD-experiments (Fig. 69, p. 104), and also detected in *A. heyneanus*. The latter is a fine example of the capabilities of online techniques if it comes to the trace analysis of labile substances, since Pokorny<sup>[32]</sup> had not managed to characterize **64** with conventional methods in earlier investigations.

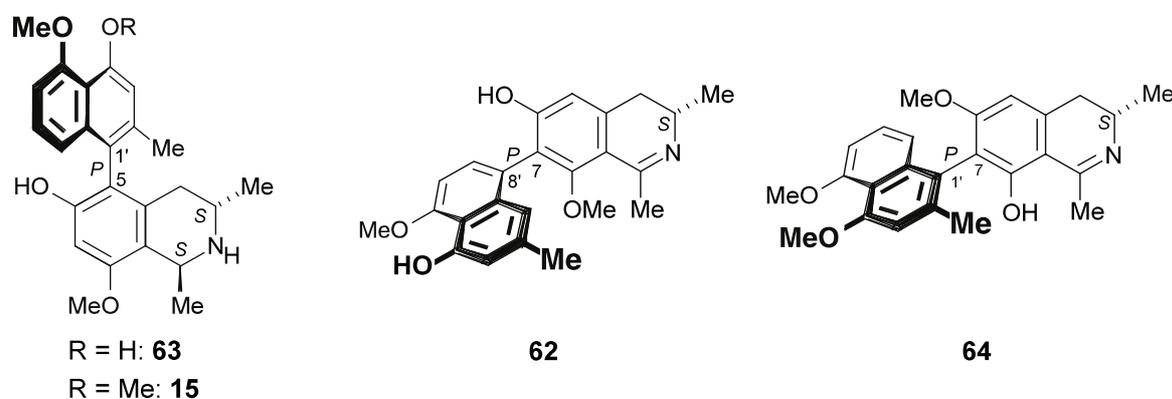


Fig. 69. Alkaloids detected in the grafting experiment: Ancistrocladine (**15**), 4-*O*-demethylancistrocladine (**63**), ancistroheynine A (**62**) and the hitherto not characterized 3-*epi*-ancistrobrevine C (**64**)

These observations made on the model system *A. heyneanus* scion / *A. abbreviatus* rootstock clearly contradict the idea of an alkaloid transport from the lower into the upper parts of the plant. This result may also be interpreted in terms of a not root-located alkaloid production. Future experiments that should follow the established grafting-method, could deliver further insights into this area.

Several samples of *Ancistrocladus*, which had been collected in cooperation with H. Rischer in Thailand and Malaysia, were examined for phytochemical differences. A minor alkaloid with the constitution of ancistrocladine (**71**) was discovered in only one plant sample (Gunung Benom, Malaysia) by HPLC-MS/MS. Thus, this species was clearly distinguishable from the two others. Subsequent DNA-analyses confirmed this finding.<sup>[291]</sup> This is the first time a novel *Ancistrocladus* species was discovered and phytochemically identified by our research group.

Within our dimer screening project the species *T. peltatum*, *D. thollonii*, *H. dawei* and *A. abbreviatus* were investigated for the occurrence of the synthetic, as yet unnatural dimers jozipeltine A (**77**) and jozimine D (**78**) (Fig. 64, p. 90).<sup>[271,299]</sup> Although at least *T. peltatum* produces the potential monomeric precursors **42** and **76** (Fig. 64, p. 90) in significant quantities, none of the dimers was detected in any of the aforementioned plants. Thus a natural existence of both **77** and **78** can be *de facto* excluded.

In cooperation with S. Tasler and K. Messer the Rutaceae species *Murraya koenigii* was online-analytically investigated regarding the occurrence of the axially chiral, dimeric carbazole alkaloid Murrastifoline-F (**80**) (Fig. 65, p. 91). The unambiguous identification provided the basis for subsequent chiroptical analyses. After the coelution of any interfering analytes had been excluded with the help of the HPLC-NMR and HPLC-MS/MS coupling, K. Messer achieved the determination of the enantiomeric ratio of (*M*)- and (*P*)-**80** in the extract.<sup>[304]</sup>

## EXPERIMENTELLER TEIL

### 1 Allgemeine Methoden

#### 1.1 Verwendete Meßgeräte

*Schmelzpunkte:* Sämtliche Schmelzpunkte wurden an einem Kofler-Heiztisch-Mikroskop der Fa. *Reichert* bestimmt. Die angegebenen Werte sind nicht korrigiert.

*Infrarotspektren (IR):* Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit einem *Perkin-Elmer-1420*-Spektrometer.  $\tilde{\nu}$  bezeichnet die Wellenzahl. Die Intensitäten der Absorptionsbanden sind gekennzeichnet durch: s = stark, m = mittel, w = schwach und br = breit.

*Kernresonanzspektren:*  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden bei Raumtemp. an den Spektrometern WM 400, Avance 400 und DMX 600 der Fa. *Bruker* aufgenommen. In einem Fall\* wurden  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen an einem DRX 500 mit speziellem Kryoprobenkopf durchgeführt (*Bruker Spectrospin*, Fällanden). Die chemische Verschiebung ist in ppm angegeben. Als interner Standard dienten die Resonanzsignale der Restprotonen der verwendeten deuterierten Lösungsmittel bei  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren [ $\delta(\text{CHCl}_3) = 7.26$  ppm,  $\delta(\text{MeOH}) = 3.31$  ppm] bzw. die  $^{13}\text{C}$ -Signale bei  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren [ $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.01$  ppm,  $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 49.01$  ppm]. Für inverse  $^{15}\text{N}$ -Experimente wurden die  $^{15}\text{N}$ -Verschiebungen gegen eine Probe von Formamid (90% v/v) in  $d^6$ -DMSO extern kalibriert [ $\delta^{15}\text{N}(\text{HCONH}_2) = -267.6$  ppm]. Die Multiplizität der Signale wird durch folgende Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett und br = breit. Die Kopplungskonstanten  $J$  sind in Hertz (Hz) angegeben. Alle benutzten Pulsprogramme wurden der *Bruker*-Standardbibliothek entnommen.

Zur Strukturaufklärung isolierter neuer Alkaloide wurden neben eindimensionalen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren ( $^{13}\text{C}$  mit Protonenentkopplung, DEPT) auch zweidimensionale Experimente (COSY, ROESY, NOESY, HMQC, HMBC) durchgeführt.

*Untersuchung von isotoopenmarkierten Substanzen:* Zur Untersuchung von  $^{13}\text{C}$ -isotoopenmarkierten Verbindungen wurden  $^1\text{H}$ -NMR- und protonenentkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren aufgenommen, wobei die Relaxationszeit D1 von 1 s auf 5 s verlängert wurde. Die spektrale Breite betrug typischerweise ca. 32 kHz bei einer Punktdichte von 128 K. Bei überlagernden Signalen wurden auch 1D- und 2D-INADEQUATE-Experimente mit D1 = 5 s durchgeführt. 2D-INADEQUATE-Rohdaten wurden mit 320 Scans pro Inkrement in einer 160 x 2048-Matrix aufgenommen, mit einem "zero filling" von 4K in F1 und F2. Die Evolutionszeit wurde auf  $^1J(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C}) = 50$  Hz, im Falle aliphatischer Kohlenstoffgerüste auf

\* Ich danke Dr. M. Grüne für die Durchführung der  $^{13}\text{C}$ -Messungen in Fällanden (Schweiz).

40 Hz optimiert. Bei  $^{15}\text{N}$ -angereicherten Proben wurden neben  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren auch  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}\}$ -Experimente zur eindeutigen Identifizierung von  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -Kopplungen durchgeführt. Weiterhin wurden  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HMBC-Experimente zur Strukturabsicherung und Abschätzung des  $^{15}\text{N}$ -Markierungsgrades eingesetzt.

*Auswertung von Markierungsversuchen:* Im Falle von  $^{13}\text{C}_1$ -markierten Vorstufen ( $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -NaOAc,  $[1\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -Glycin) wurden protonenentkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von der aus dem Verfütterungsansatz isolierten Substanz (Probe P) und einer strukturell identischen, jedoch unmarkierten Referenzsubstanz (Referenz R) unter identischen Bedingungen aufgenommen. In beiden Spektren wurde jeweils das gleiche Signal eines Kohlenstoffatoms als Bezugspunkt definiert und dessen Intensität auf 1.0 normiert. Anschließend wurden die Intensitäten aller anderen Signale relativ zum Normsignal bestimmt. Für jedes Kohlenstoffatom wurden die relativen Signalintensitäten der Probe ( $I_P$ ) und der Referenzsubstanz ( $I_R$ ) miteinander verglichen, indem der Quotient  $I_P/I_R$  als Maß für eine Signalverstärkung nach  $^{13}\text{C}_1$ -Einbau errechnet wurde. In Einzelfällen (z.B. bei  $^{15}\text{N}$ - oder  $O\text{-}^{13}\text{CH}_3$ -Markierung) wurde der Markierungsgrad im  $^1\text{H}$ -NMR nach Bestimmung der Intensitäten der  $^{15}\text{N}$ - bzw.  $^{13}\text{C}$ -Satelliten errechnet.

Bei  $^{13}\text{C}_2$ -markierten Substanzen wurde das Intensitätsverhältnis  $I_s$  der im  $^{13}\text{C}$ -NMR beobachteten  $^{13}\text{C}$ -Satelliten relativ zum zugehörigen Zentralpeak in Prozent angegeben.  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Konnektivitäten wurden nach Auswertung der aus dem  $^{13}\text{C}$ -NMR oder 1D-INADEQUATE erhaltenen Kopplungskonstanten oder durch 2D-INADEQUATE-Messungen bestimmt.

*Massenspektren:* Zur Aufnahme der EIMS- und HREIMS-Spektren wurden die Geräte MATCH 7 der Fa. *Varian* und MAT 2000 der Fa. *Finnigan* verwendet. Die Aufnahme von HRESIMS-Spektren erfolgte an einem FT-ICR-MS Apex III der Fa. *Bruker Daltonics*. Die in Klammern gesetzten Zahlen geben die Intensität der Signale bezogen auf den Basispeak ( $I = 100\%$ ) an.

*Drehwerte:* Zur Ermittlung der optischen Aktivitäten diente ein Polarimeter der Fa. *Perkin-Elmer*. Bei einer Spaltbreite von 1 mm wurden die spezifischen Drehwerte  $[\alpha]_D$  bei den Wellenlängen  $\lambda = 546$  nm und  $\lambda = 579$  nm der Quecksilberdampfampe bestimmt. Dann wurde mit Hilfe der Drude-Gleichung<sup>[308]</sup> auf die Natrium-D-Line ( $\lambda = 589$  nm) extrapoliert:

$$\alpha_{589} = \frac{\alpha_{579} \times 3.199}{4.199 - \frac{\alpha_{579}}{\alpha_{546}}} \quad [\alpha] = \frac{\alpha \times 100}{c \times d}$$

$\alpha$ : gemessener Drehwert; c: Konzentration [g/100ml]; d: Schichtdicke [dm].

*Circulardichroismus (CD):* CD-Spektren wurden an einem J-715-Spectropolarimeter (Fa. *Jasco*) aufgenommen und mit der dazugehörigen Software verarbeitet. Die differentiellen

Absorptionskoeffizienten  $\Delta\epsilon$  [ $\text{cm}^2/\text{mol}$ ] bei einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$  [nm] wurden in Ethanol als Lösungsmittel bestimmt. Die Länge der Meßzelle betrug 0.2 mm. Standardmäßig wurden abhängig von der Probenkonzentration 3-6 Scans pro Spektrum mit einer Scangeschwindigkeit von 100 nm/min akkumuliert. In jedem Falle wurde ein Lösungsmittelspektrum unter identischen Bedingungen erstellt und vom Analytspektrum subtrahiert.

## 1.2 Chromatographische Methoden

*Dünnschichtchromatographie (DC)*: Es wurden Kieselgel-DC-Aluminiumfolien 60 F<sub>254</sub> der Fa. Merck verwendet. Zur Detektion der Substanzen wurden die Fluoreszenzlösung bei 254 nm, die Anregung der Eigenfluoreszenz bei 366 nm sowie das Färbeverhalten gegenüber Ioddampf (phenolische Substanzen) und Ammoniak (Naphthochinone) benutzt. Für die Chromatographie stickstoffhaltiger Substanzen wurde die DC-Platte vorher mit Ammoniak desaktiviert.

*Säulenchromatographie (SC) und Säulenfiltration (SF)*: Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel 0.063-0.2 mm der Fa. Merck (desaktiviert mit 7.5 ml konz.  $\text{NH}_3/100\text{g}$ ) benutzt. Die Säulen wurden naß befüllt.

*Analytische HPLC-PDA*: Für die analytische HPLC mit Photodiodenarraydetektion wurde eine Jasco-Anlage, bestehend aus einem online-Entgaser DG-1580-53, einer ternären Niederdruckmischeinheit LG-1580-02, einer Kolbenpumpe Pu-1580, einem temperierbaren Säulenkompartment CO-1560 und einem Photodiodenarraydetektor MD-1510, benutzt. Die verwendete Software bestand aus dem Borwin-Programmpaket der Fa. Jasco. Die Probe wurde über ein Rheodyne-Ventil mit 20- $\mu\text{l}$ -Probenscheife injiziert. Als stationäre Phasen dienten präparative RP-Säulen der Fa. Waters (Symmetry C<sub>18</sub>) oder chirale NP-Säulen der Fa. Chiralcel (Chiralcel OD).

*Präparative HPLC*: Für die präparative HPLC wurde eine Waters-Anlage, bestehend aus einer Waters-Pumpe 600, einem Photodiodenarraydetektor 996 und einem Controller 600 benutzt. Die verwendete Software bestand aus dem Millennium-Programmpaket V. 2.10. Abhängig von der injizierten Menge wurde eine Probenschleife mit 250 oder 500  $\mu\text{l}$  Volumen benutzt. Als stationäre Phasen dienten präparative RP-Säulen der Fa. Waters (Symmetry C<sub>18</sub>) oder chirale NP-Säulen (OD) der Fa. Chiralcel.

*Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie (MPLC)*: Die verwendete Anlage bestand aus einer Pumpe P400 (isokratischer Betrieb) und einem VISI-6-Spektralphotometer (beides Fa. Latak).

### 1.3 HPLC-gekoppelte Methoden zur online-Analyse

*HPLC-NMR*: Das HPLC-System bestand aus einer Niederdruckgradientenpumpe LC22 (Fa. Bruker), einem Rheodyne-Injektor 7725i mit 250- $\mu$ l-Probenschleife und einem Lambda-1000-UV-Detektor (Fa. Bischoff). Die UV-Meßzelle (0.1 cm Strahlengang) war über eine ca. 3 m lange Kapillarleitung (PEEK, 0.25 mm I.D.) direkt über das Interface BPSU (Bruker Peak Sampling Unit) mit dem NMR-Durchflußprobenkopf verbunden. Das HPLC-System und das BPSU-Interface wurde von den Programmen ChromStar und BPSU-12 (Fa. Bruker) simultan angesteuert und kontrolliert. Alle HPLC-NMR-Experimente wurden an einem DMX-600-Spektrometer ( $B_0 = 14.09$  T) durchgeführt. Als Probenkopf wurde für alle Gradientenexperimente ein invers konstruierter ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-60- $\mu$ l-Kopf mit 3-mm-Durchflußzelle und  $z$ -Gradientenspule benutzt. In Einzelfällen wurde das Vorgängermodell, ein nicht gradiententauglicher, invers konstruierter ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-120- $\mu$ l-Kopf mit 4-mm-Durchflußzelle benutzt. Datenaufnahme und Prozessierung erfolgte mit der Software XWinNMR von Bruker. Alle NMR-Spektren sind in ppm ( $\delta$ -Skala) angegeben.

*Pulsprogramme*: Eindimensionale HPLC-Protonenspektren wurden mit dem Bruker-Standardprogramm *lc1wetdc* in 32 K Datenpunkten und mit einer spektralen Breiten von 12 kHz aufgenommen. Es wurden  $90^\circ$ -Pulse mit einer Akquisitionszeit von 1.36 s und einem Relaxationsdelay von 1 s benutzt. Pro Spektrum wurden typischerweise 32 Scans akkumuliert. Die Lösungsmittelsignale von MeCN und HOD wurden mit einer WET-Pulsfolge<sup>[204]</sup> und mit simultaner  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung unterdrückt. Vor der Fourier-Transformation wurde der FID mit einer Exponentialfunktion mit einem Linienbreitenfaktor von 0.5 Hz prozessiert. Zur Referenzierung wurde im stop-flow-Modus ein "One-Scan"-Vorbereitungsspektrum ohne Lösungsmittelunterdrückung aufgenommen und das MeCN-Signal auf 2.0 ppm referenziert. Der so erhaltene Referenzierungswert (SR) relativ zur Frequenz des Deuteriumsignals wurde anschließend zur Referenzierung des lösungsmittelunterdrückten Spektrums benutzt.

Phasensensitive ROESY-Spektren wurden nach Modifizierung einer Bruker-Sequenz (*roesytp*) mit WET-Solvensunterdrückung und  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung mit dem Pulsprogramm *wetroesytp* (Anlage A 1, Seite 139) aufgenommen. 2D-Spektren wurden mit 2 K Datenpunkten in F2 pro Inkrement mit einer spektralen Breite von 12 kHz in beiden Dimensionen akquiriert. Es wurden  $90^\circ$ -Pulse mit einer Akquisitionszeit von 0.122 s und einem Relaxationsdelay von 2 s verwendet. Die Mischzeit betrug 700 ms. Die Daten wurden mit einer quadratischen  $\pi/2$ -verschobenen Sinusfunktion in beiden Dimensionen prozessiert. Zur Verbesserung der Auflösung in F1 wurde eine "linear-prediction"-Funktion mit 1 K Datenpunkten benutzt.

Phasensensitive gradientenselektierte NOESY-Spektren wurden nach Modifizierung einer Bruker-Sequenz (*noesygtp*) mit WET-Solvensunterdrückung und  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung mit dem

Pulsprogramm *wetnoesygtp* (Anlage A 2, Seite 141) aufgenommen. Die Mischzeit betrug 500 ms. Alle anderen Akquisitions- und Prozessierungsparameter glichen denen der ROESY-Spektroskopie.

Gradientenselektierte COSY-Spektren wurden nach Modifizierung einer *Bruker*-Sequenz (*cosygp*) mit WET-Solvensunterdrückung und  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung mit dem Pulsprogramm *wetcosygp* (Anlage A 3, Seite 144) aufgenommen. Die Akquisitions- und Prozessierungsparameter glichen denen der ROESY-Spektroskopie.

TOCSY-Spektren mit binomialer Lösungsmittelunterdrückung und  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung wurden mit dem *Bruker*-Pulsprogramm *LCMLCWPS* aufgenommen. Typischerweise wurden 2 K Datenpunkte in F2 pro Inkrement mit einer spektralen Breite von 12 kHz in beiden Dimensionen akquiriert. Es wurden  $90^\circ$ -Pulse mit einer Akquisitionszeit von 0.122 s und einem Relaxationsdelay von 2 s benutzt. Der MLEV-Pulszug dauerte 65 ms. Die Daten wurden mit einer quadratischen  $\pi/2$ -verschobenen Sinusfunktion in beiden Dimensionen prozessiert. Zur Verbesserung der Auflösung in F1 wurde eine "linear-prediction"-Funktion mit 1 K Datenpunkten benutzt.

*HPLC-ESI-MS/MS*: Die HPLC-MS-Experimente wurden an einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer TSQ 7000 mit pneumatisch unterstütztem Elektrosprayinterface der Fa. *Finnigan* durchgeführt. Die HPLC-Anlage bestand aus einer Spritzenpumpe 140 b von *Applied Biosystems* und einem *Rheodyne*-Injektor 7725i mit 5- $\mu\text{l}$ -Probenschleife. Als Hilfsgas wurde Stickstoff und als Kollisionsgas Argon (1.8 Torr) eingesetzt. Die Kapillartemperatur betrug  $200^\circ\text{C}$ . Die ESI-Spannung wurde auf 3 kV gesetzt. Es wurde ausschließlich im positiven Modus detektiert. Gescannt wurde typischerweise im Massenbereich 150-800 u mit 1 s Scanzeit. Die Kollisionsenergie in den MS/MS-Experimenten schwankte abhängig von der Stabilität des Analyten zwischen 10 und 45 eV. Dabei wurden je nach Molekülgröße Fragmente zwischen 20 u und 400-800 u gescannt. Massenspektrometer und Datenauswertung wurden von einer Personal DECstation 5000/33 (*Digital Equipment*) mit der Software ICIS 8.1 (*Finnigan*) kontrolliert. Alle Massenspektren wurden im Profile-Modus aufgenommen. Die angegebenen relativen Intensitäten sind auf den Basispeak ( $I = 100\%$ ) normiert.

*HPLC-CD-Kopplung*: Das chromatographische System bestand aus einer PU-1580 HPLC-Pumpe der Fa. *Jasco*, einem online-Entgaser der Fa. *Gastorr* und einem Gradientenmischer LG-980-02S (Fa. *Jasco*). Als CD-Detektor wurde ein J-715-Spectropolarimeter (Fa. *Jasco*) verwendet, das mit einer über ein *Besta*-Motorventil verbundenen Standard-Flußzelle (5 mm Zellenlänge) betrieben wurde. Als Chromatographie-Software diente das Programm *Jasco-Borwin* Version 1.50, die Visualisierung und Bearbeitung der CD-Spektren erfolgte mit dem mitgelieferten Programmpaket der Fa. *Jasco*. HPLC-CD-Chromatogramme wurden bei

definierter Wellenlänge akquiriert und das relative Vorzeichen des CD-Signales der Analyten im Vergleich zur chromatographischen Basislinie bestimmt. Zur Aufnahme eines CD-Spektrums (Scanmodus) wurden abhängig von der Probenkonzentration 3-6 Scans pro Spektrum mit einer Scangeschwindigkeit von 100 nm/min akkumuliert. Parallel wurde ein Lösungsmittelspektrum (Blankspektrum) unter identischen Bedingungen erstellt und vom Analytspektrum subtrahiert.

#### 1.4 Vorbereitung der Versuche

*Lösungsmittel:* Für die HPLC-Analytik wurden nur hochreine Lösungsmittel und Reagenzien benutzt. Wasser wurde mit einer Milli-Q-Anlage der Fa. *Millipore* demineralisiert. D<sub>2</sub>O (99.9 Atomprozent Deuterium) wurde von *Promochem* (Wesel), MeCN (Pestanal-Qualität) von *Riedel-de Haën* (Seelze) und Trifluoressigsäure (TFA) von *Merck* (Darmstadt) bezogen.

Alle nicht gekauften Lösungsmittel wurden nach Standardmethoden getrocknet und gereinigt. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurde über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> destilliert. MeOH wurde über Magnesiumspänen zum Sieden erhitzt und abdestilliert. Petrolether, *n*-Hexan, Triethylamin und *iso*-Propanol wurden fraktioniert destilliert.

*Isotopenmarkierte Substanzen:* [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-NaOAC, [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-NaOAC, (D)-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Glucose, (L)-[<sup>13</sup>C<sub>4</sub>]-Asparaginsäure, (L)-[<sup>13</sup>C<sub>3</sub>, <sup>15</sup>N]-Alanin, [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N]-Glycin, [1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-Glycin, (L)-[O-<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]-Methionin, [<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> und [<sup>15</sup>N]-KNO<sub>3</sub> (alle mit mindestens 99% Isotopenanreicherung) wurden von *Promochem* (Wesel) gekauft.

*Referenzsubstanzen:* Ajmalicin-Hydrochlorid (**46**•HCl) und (-)-Nicotin (**47**) wurden von *Merck* gekauft. Alle anderen benutzten Referenzsubstanzen wurden im Arbeitskreis nach Isolierung oder Synthese charakterisiert.

## 2 Biogenesestudien

### 2.1 Aufklärung der Biogenese von Droseron (21) und Dioncophyllin A (6)

#### 2.1.1 Isolierung und NMR-Analyse von Droseron (21) aus Suspensionskulturen von *T. peltatum* nach Verfütterung von [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-NaOAc

[<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-NaOAc wurde in einer Konzentration von 0.05 M und unmarkiertes NaOAc in einer Konzentration von 0.01 M in H<sub>2</sub>O gelöst (pH 5.8, HOAc) und sterilfiltriert. Anschließend wurden zu 50 ml frischem Medium (nach Linsmaier und Skoog) 0.25 ml der [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-NaOAc-Lösung und 2 ml der NaOAc-Lösung gegeben.\*

Nach 8 d wurde das Medium abdekantiert und filtriert. Nach Zugabe von 0.2 ml 0.1 N HCl zu dem leicht basischen Medium wurde ein Farbumschlag von dunkelrot nach gelb beobachtet, der für Hydroxynaphthochinone charakteristisch ist.<sup>[309]</sup> Nach erschöpfender Extraktion mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurde die organische Phase i. Vak. entfernt und der Rückstand in MeOH gelöst. Anschließend wurde **21** mittels MPLC (Lobar B RP-18, MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30 + 0.1% TFA v/v, 5 ml/min) isoliert. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man 0.7 mg eines gelben Feststoffes, der nach einem Vergleich (NMR, DC, HPLC) mit authentischem Referenzmaterial<sup>†</sup> als **21** identifiziert wurde.

Droseron (**21**):

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.10 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 7.20 (dd, *J* = 1.6, 8.3 Hz, 1H, 7-H), 7.63 (dd, *J* = 7.6, 8.2 Hz, 1H, 6-H), 7.66 (dd, *J* = 1.2, 7.4 Hz, 1H, 8-H).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.8 (2-CH<sub>3</sub>), 112.9 (C-10), 119.7 (C-8), 121.2 (C-2), 123.2 (C-6), 132.7 (C-9), 137.5 (C-7), 152.8 (C-3), 161.2 (C-5), 184.2 (C-1), 184.5 (C-4).

Die Bestimmung der Kopplungskonstanten der einzelnen Kohlenstoffsignale erfolgte mit <sup>13</sup>C-NMR- und 1D-INADEQUATE-Experimenten (Tab. 4, Seite 113).

\* Ich danke H. Rischer für die Durchführung der Verfütterungen. Für nähere Details bzgl. der Kulturbedingungen, siehe Lit.<sup>[149,119]</sup>

† Ich danke Dr. F. Teltschik für eine Referenzprobe von **21**.<sup>[310]</sup>

Tab. 4.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von **21** nach Verfütterung von  $[^{13}\text{C}_2]$ -NaOAc

C-Atom	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	2-CH <sub>3</sub>
$^1J(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})$ [Hz]	51.3 <sup>a</sup>	44.4 <sup>b</sup>	n.b. <sup>c</sup>	56.5 <sup>d</sup>	66.1	66.6	54.8	54.8	52.7	57.4	44.4
$I_s$ [%]	167 <sup>a</sup>	97 <sup>b</sup>	n.b. <sup>c</sup>	122 <sup>d</sup>	131	145	138	134	129	114	218

<sup>a</sup> Überlappung mit C-4. <sup>b</sup> Niedrige Signalintensität, "line broadening" = 4 Hz. <sup>c</sup> n.b. = nicht bestimmt. <sup>d</sup> Überlappung mit C-1.

### 2.1.2 Isolierung und NMR-Analyse von Dioncophyllin A (**6**) aus Agarkulturen von *T. peltatum* nach Verfütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ -NaOAc

$[^{13}\text{C}_2]$ -NaOAc wurde in einer Konzentration von 0.05 M in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst (pH 5.8, HOAc) und sterilfiltriert. Über einen Zeitraum von 2 Monaten wurden in Form dieser Lösung insgesamt 250 mg  $[^{13}\text{C}_2]$ -NaOAc an Agarkulturen von *T. peltatum* (832 mg Kallus-Trockengewicht) appliziert.\*

Nach ihrer Gefriertrocknung wurden die Kalli zweimal in je 50 ml MeOH (+ 1% 0.1 N HCl v/v) mazeriert. Der MeOH-Extrakt wurde mit 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt, mit  $\text{NH}_3$  neutralisiert und die wäßrige Lösung mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die organische Phase wurde i. Vak. getrocknet und sukzessive mit Umkehrphasen-MPLC (Lobar B C-18, MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  7:3 + 0.01% TFA v/v), Normalphasen-MPLC (Lobar Si-60,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH 9:1 + 1%  $\text{NEt}_3$  v/v) und präparativer chiraler HPLC (Chiralcel OD 250 x 7.8 mm I.D.; Isokrat, 7 ml/min; *n*-Hexan/*i*-PrOH 8:2 + 0.1%  $\text{NEt}_3$  v/v) aufgearbeitet. Die Trocknung der Dioncophyllin-A-haltigen Fraktion ergab 1.7 mg noch leicht verunreinigtes **6**. Daraufhin wurde die Probe mit weiteren 2.5 mg unmarkiertem, isoliertem<sup>[130]</sup> **6** vermischt<sup>†</sup> und einer weiteren säulenchromatographischen Reinigung ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  8:2 v/v) unterzogen. Nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. wurden 4.0 mg **6** als weißer Feststoff erhalten.

Dioncophyllin A (**6**):

$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.31 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 1.54 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 3H, 1-CH<sub>3</sub>), 2.20 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>), 2.55 (dd,  $J$  = 11.0, 16.2 Hz, 1H, 4-H<sub>ax</sub>), 2.83 (dd,  $J$  = 4.0, 16.7 Hz, 1H, 4-H<sub>eq</sub>), 3.39 (m, 1H, 3-H), 3.96 (s, 3H, 5'-OCH<sub>3</sub>), 4.00 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 4.45 (q,  $J$  = 6.7

\* Ich danke H. Rischer für die Durchführung der Verfütterungen. Für nähere Details bzgl. der Kulturbedingungen, siehe Lit.<sup>[148,149]</sup>

† Die kontrollierte, "portionierte" Zumischung von unmarkiertem **6** wurde per  $^1\text{H}$ -NMR verfolgt und lieferte gleichzeitig einen Beweis für die Identität der aus den Kulturen isolierten Probe von **6**. Ich danke Dr. W. Saeb für eine Referenzprobe von **6**.<sup>[130]</sup>

Hz, 1H, 1-H), 6.67 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, 5-H), 6.81 (s, 1H, 3'-H), 6.83 (d,  $J = 7.5$  Hz, 6'-H), 6.86 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, 6-H), 6.96 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, 8'-H), 7.23 (dd,  $J = 8.2, 8.1$  Hz, 1H, 7'-H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 20.71$  (1- $\text{CH}_3$ ), 20.74 (2'- $\text{CH}_3$ ), 22.36 (3- $\text{CH}_3$ ), 37.13 (C-4), 42.21 (C-3), 47.70 (C-1), 56.38 (5'- $\text{OCH}_3$ ), 56.46 (4'- $\text{OCH}_3$ ), 105.89 (C-6'), 108.74 (C-3'), 116.38 (C-10'), 118.48 (C-8'), 120.89 (C-5), 122.78 (C-7), 123.44 (C-1'), 126.33 (C-9), 127.00 (C-7'), 128.78 (C-6), 134.95 (C-10), 136.85 (C-2'), 136.97 (C-9'), 149.69 (C-8), 157.13 (C-4'), 157.26 (C-5').

Da die Empfindlichkeit des am Institut für Organische Chemie vorhandenen *Bruker*-DMX-600-Spektrometers nicht zur Aufnahme eines 2D-INADEQUATE-Spektrums ausreichte und folglich kein befriedigendes Signal-Rausch-Verhältnis für die intensitätsschwachen Satellitensignale lieferte, wurde die Probe an einem DRX-500-Spektrometer mit Dualkryoprobekopf der Fa. *Bruker* *Spektrospin* vermessen.

Tab. 5.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von **6** nach Verfütterung von  $[^{13}\text{C}_2]$ -NaOAc

C-Atom	$^1J(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})$ [Hz]	$I_s$ [%]	Korrelation mit C- <sup>a</sup>	C-Atom	$^1J(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})$ [Hz]	$I_s$ [%]	Korrelation mit C- <sup>a</sup>
1- $\text{CH}_3$	-	-	-	5	57.4	33	6
2'- $\text{CH}_3$	44.7	n.b. <sup>b</sup>	2'	7	67.1	n.b. <sup>c</sup>	8
3- $\text{CH}_3$	38.2	59	3	1'	56.4	n.b. <sup>c</sup>	9'
4	41.7	38	10	9	n.b. <sup>c</sup>	n.b. <sup>c</sup>	1
3	37.5	52	3- $\text{CH}_3$	7'	59.3	47	8'
1	44.0	48	9	6	57.0	39	5
5'- $\text{OCH}_3$	-	-	-	10	43.1	n.b. <sup>c</sup>	4
4'- $\text{OCH}_3$	-	-	-	2'	44.7	n.b. <sup>d</sup>	2'- $\text{CH}_3$
6'	70.8	45	5'	9'	56.4	n.b. <sup>d</sup>	1'
3'	-	-	-	8	65.5	40	7
10'	66.8	n.b. <sup>c</sup>	4'	4'	67.5	48	10'
8'	60.0	47	7'	5'	71.4	37	6'

<sup>a</sup> Direkte Konnektivität im 2D-INADEQUATE bestimmt. <sup>b</sup> Nicht bestimmbar wegen Signalüberlappung mit 1- $\text{CH}_3$ . <sup>c</sup> Nicht bestimmbar wegen zu niedriger Signalintensität. <sup>d</sup> Nicht bestimmbar wegen Signalüberlappung von C-2' und C-9'.

### 2.1.3 Isolierung und NMR-Analyse von Droseron (**21**) und Dioncophyllin A (**6**) aus Agarkulturen von *T. peltatum* nach Verfütterung von [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-NaOAc

[2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-NaOAc wurde in einer Konzentration von 0.05 M in H<sub>2</sub>O gelöst (pH 5.8, HOAc) und sterilfiltriert. Über einen Zeitraum von 2 Monaten wurden in dieser Lösung insgesamt 250 mg [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-NaOAc an Agarkulturen von *T. peltatum* (3.7 g Kallustrockengewicht) appliziert.\*

Das gefriergetrocknete Kallusmaterial wurde wie bei der Isolierung von **6** (Kap. 2.1.2, Seite 113) mazeriert und säulenchromatographisch über desaktiviertes Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2 v/v) vorgereinigt. Bei diesem Schritt fielen neben einer Dioncophyllin-A-haltigen Fraktion (ca. 7 mg) auch eine bereits weitgehend reine Fraktion von **21** (ca. 5mg) an. Letztere Fraktion wurde per präparativer Umkehrphasen-HPLC [Waters Symmetry C<sub>18</sub> 19 x 150 mm I.D.; binärer Gradient, 11 ml/min; Laufmittel (A) MeCN, Laufmittel (B) H<sub>2</sub>O + 0.05% TFA v/v: t = 0 min 20% (A), t = 10 min 60% (A)] nochmals gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. erhielt man ca. 4 mg **21**.

Die das Alkaloid **6** enthaltende Fraktion wurde mittels präparativer Umkehrphasen-HPLC [Symmetry C<sub>18</sub> 19 x 150 mm I.D.; binärer Gradient, 9 ml/min; Laufmittel (A) MeCN, Laufmittel (B) H<sub>2</sub>O + 0.05% TFA v/v: t = 0 min 5% (A), t = 10 min 20% (A), t = 18 min 60% (A)] und präparativer chiraler HPLC (Chiralcel OD 21 x 250 mm I.D.; 8 ml/min; Hexan/*i*-PrOH 8:2 + 0.8 % NEt<sub>3</sub> v/v) weiter aufgereinigt. Nach Trocknung der Fraktionen i. Vak. wurden ca. 2 mg **6** erhalten.

Die isolierten Proben von **21** (Tab. 6, unten) und **6** (Tab. 7, Seite 116) wurden anschließend mittels <sup>13</sup>C-NMR auf die relative Erhöhung einzelner Signale nach Einbau von [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-NaOAc untersucht.

Tab. 6. <sup>13</sup>C-NMR-Daten (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) von **21** nach Verfütterung von [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-NaOAc

C-Atom	1	2	3	4	5 <sup>a</sup>	6	7	8	9	10	2-CH <sub>3</sub>
rel. I <sub>P</sub>	2.3	0.7	2.8	0.8	1.0	6.2	1.1	5.8	0.7	2.2	5.1
rel. I <sub>R</sub>	0.4	0.7	0.7	0.6	1.0	1.4	1.0	1.3	0.7	0.6	1.3
I <sub>P</sub> /I <sub>R</sub>	5.8	1.0	4.0	1.3	1.0	4.4	1.1	4.5	1.0	3.7	3.9

<sup>a</sup> C-5 normiert auf relative Intensität 1.0.

\* Ich danke H. Rischer für die Durchführung der Verfütterungen. Für nähere Details bzgl. der Kulturbedingungen, siehe Lit.<sup>[148,149]</sup>

Tab. 7.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von **6** nach Verfütterung von  $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -NaOAc

C-Atom	$I_P$	$I_R$	$I_P/I_R$	C-Atom	$I_P$	$I_R$	$I_P/I_R$
1-CH <sub>3</sub>	1.2	1.4	0.9	5	0.8	1.0	0.8
2'-CH <sub>3</sub>	1.2	1.1	1.1	7	0.5	0.5	1.0
3-CH <sub>3</sub>	1.3	1.4	0.9	1'	0.5	0.5	1.0
4	1.2	1.3	0.9	9	n.b. <sup>a</sup>	0.5	-
3	1.1	1.3	0.8	7'	1.1	1.0	1.1
1	1.2	1.1	1.1	6 <sup>b</sup>	1.0	1.0	1.0
5'-OCH <sub>3</sub>	1.4	1.2	1.2	10	0.5	0.5	1.0
4'-OCH <sub>3</sub>	1.2	1.1	1.1	2'	0.6	0.5	1.2
6'	1.1	1.0	1.1	9'	0.4	0.4	1.0
3'	1.2	1.0	1.2	8	0.5	0.6	0.8
10'	0.4	0.5	0.8	4'	0.4	0.5	0.8
8'	0.9	1.0	0.9	5'	0.4	0.5	0.8

<sup>a</sup> Nicht bestimmt wegen Überlappung mit Fremdpeak. <sup>b</sup> C-6 normiert auf relative Intensität 1.0.

## 2.2 Aufklärung der Biogenese von Antidesmon (27)

### 2.2.1 Allgemeine Vorschrift zur Verfütterung von isotonenmarkierten Vorstufen an Zellkulturen von *A. membranaceum* und Isolierung von Antidesmon (27)

Zur Verfütterung von isotonenmarkierten Vorstufen an Kalluskulturen wurden die jeweiligen Substanzen mit definierter Konzentration in H<sub>2</sub>O gelöst (pH 5.8, HCl) und sterilfiltriert. Jeweils 0.5 ml dieser Lösung wurde während des Fütterungszeitraumes im Abstand von je 2 d direkt auf die Kalluskulturen aufgetropft. Im Falle der Verfütterung von K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> und <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>15</sup>NO<sub>3</sub> wurde das im Flüssigmedium vorhandene K<sup>14</sup>NO<sub>3</sub> und <sup>14</sup>NH<sub>4</sub><sup>14</sup>NO<sub>3</sub> durch die <sup>15</sup>N-markierten Isotopomeren ersetzt.\*

Tab. 8. Zeit- und Mengenparameter der Verfütterungsversuche an *A. membranaceum*

Vorstufe(n)	Fütterungszeitraum	ausgebrachte Menge	Frischgewicht Kallus	Trockengewicht	Ausbeute 27
[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]-NaOAc	13 d	64 mg	129.7 g	9.7 g	1.6 mg
(D)-[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]-Glucose	38 d	1.161 g	134.2 g	35.8 g	1.3 mg
[ <sup>15</sup> N]KNO <sub>3</sub> + [ <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	63 d, alle 9 d wechselt	2.185 g K <sup>15</sup> NO <sub>3</sub> + 1.898 g <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> <sup>15</sup> NO <sub>3</sub> <sup>a</sup>	1.05 l Medium (54.4 g) <sup>b</sup>	- (2.8 g) <sup>c</sup>	2.1 mg
(L)-[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> , <sup>15</sup> N]-Alanin	21 d	200 mg	112.7 g	6.0 g	1.9 mg
(L)-[ <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ]-Asparaginsäure	25 d	100 mg	83.4 g	5.4 g	1.8 mg
[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N]-Glycin	23 d	70 mg	75.0 g	4.1 g	1.1 mg
(L)-[O <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> ]-Methionin	14 d	70 mg			
[1- <sup>13</sup> C <sub>1</sub> ]-Glycin	35 d	137 mg	89.2 g	5.6 g	1.0 mg

<sup>a</sup>Medium enthielt kein K<sup>14</sup>NO<sub>3</sub> oder <sup>14</sup>NH<sub>4</sub><sup>14</sup>NO<sub>3</sub>. <sup>b</sup>Trockengewicht des Mediums. <sup>c</sup>Trockengewicht des CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extraktes.

Das gefriergetrocknete Kallusmaterial wurde zermahlen und mit MeOH extrahiert. Nach Filtration des Rohextraktes wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Extrakt mittels semipräparativer HPLC [*Waters* Symmetry C<sub>18</sub> 7.8 x 300 mm I.D.; binärer Gradient, 4 ml/min; Laufmittel (A) MeCN, Laufmittel (B) H<sub>2</sub>O + 0.05% TFA v/v: t = 0 min 40% (A), t = 10 min 90% (A)] aufgereinigt.

\* Ich danke H. Rischer für die Durchführung der Verfütterungen. Für nähere Details bzgl. der Kulturbedingungen, siehe Lit.<sup>[149,150]</sup>

Die Medienflüssigkeit wurde erschöpfend mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert, die organische Phase i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der erhaltene Rohextrakt mit semipräparativer HPLC wie oben beschrieben aufgereinigt.

Nach Gefriertrocknung der HPLC-Fractionen erhielt man **27** als gelbes Öl,<sup>\*</sup> welches anschließend kernresonanzspektroskopisch untersucht wurde (vgl. Kap. 2.3.2, Seite 22). Die Ausbeuten der jeweiligen Verfütterungsversuche sind in Tab. 8 (Seite 117) aufgelistet. Das aus den Zellkulturen gewonnene **27** stimmte in allen physikalischen und chromatographischen Eigenschaften mit dem aus *A. membranaceum* isolierten **27** überein.<sup>[154]</sup>

Antidesmon (**27**):

$[\alpha]_D^{25} = -76.1^\circ$  ( $c = 0.12$  in  $\text{CHCl}_3$ ).

CD (EtOH):  $\Delta\epsilon_{212} -4.38$ ,  $\Delta\epsilon_{246} +5.63$ ,  $\Delta\epsilon_{279} +1.87$ ,  $\Delta\epsilon_{315} +2.36$ ,  $\Delta\epsilon_{354} -3.19$ .

IR (NaCl):  $\nu_{\text{max}}$  3180, 2900, 2815, 1775, 1595, 1535, 1385, 1260, 1190, 1025, 790, 715  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.88$  (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 1.2-1.4 (6H, 13-H, 14-H, 15-H, überlappend), 1.27 (2H, 16-H, überlappend), 1.29 (2H, 17-H, überlappend), 1.43 (1H, 11-H, überlappend), 1.45 (2H, 12-H, überlappend), 1.76 (m, 2H, 11-H), 2.12 (m, 1H, 6-H), 2.21 (m, 1H, 6-H), 2.41 (s, 3H, 2- $\text{CH}_3$ ), 2.54 (m, 1H, 7-H), 2.76 (m, 1H, 7-H), 3.28 (m, 1H, 5-H), 3.90 (s, 3H, 3- $\text{OCH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 14.1$  (C-18), 14.7 (2- $\text{CH}_3$ ), 22.7 (C-17), 24.5 (C-6), 28.5 (C-12), 29.3 (C-15), 29.6 (C-13), 29.7 (C-14), 30.3 (C-5), 30.6 (C-11), 31.9 (C-16), 32.2 (C-7), 59.4 (3- $\text{OCH}_3$ ), 131.9 (C-9), 137.9 (C-2), 139.1 (C-10), 147.6 (C-3), 173.4 (C-4), 194.9 (C-8).

EIMS (70 eV);  $m/z$  (%): 319.2  $[\text{M}]^+$  (4), 318.2  $[\text{M} - \text{H}]^+$  (3), 291 (24), 234  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_{13}]^+$  (24), 207.1  $[\text{M} - \text{C}_8\text{H}_{16}]^+$  (100), 206.1  $[\text{M} - \text{C}_8\text{H}_{17}]^+$  (35).

HREIMS (70 eV);  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{NO}_3$   $[\text{M} - \text{H}]^+$ : Ber. 318.2069 Gef. 318.2071

\* Ich danke Dr. J. Schlauer für die Isolierung von **27**.<sup>[150]</sup>

## 2.2.2 NMR-Untersuchung von Antidesmon (27) nach Verfütterung von isotopenmarkierten Vorstufen

Alle NMR-Experimente wurden wie in Kap. 1.1 (Seite 106) beschrieben durchgeführt.

Tab. 9. NMR-Daten von **27** nach Applikation isotopenmarkierter Vorstufen

C-Atom	$^1J(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})$ [Hz] <sup>a</sup>	$I_s$ [%] <sup>b</sup>					$I_p/I_R$
		[ $^{13}\text{C}_2$ ]- Acetat	(D)-[ $^{13}\text{C}_6$ ]- Glucose	(L)-[ $^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$ ]- Alanin	(L)-[ $^{13}\text{C}_4$ ]- Asparaginsr.	[ $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ ]- Glycin	
2	46.4 <sup>c</sup>	-	n.b. <sup>d</sup>	-	n.b. <sup>d</sup>	n.b. <sup>e</sup>	1.1
3	64.9	177	n.b. <sup>d</sup>	97	n.b. <sup>d</sup>	n.b. <sup>d</sup>	0.8
4	65.8	111	n.b. <sup>d</sup>	98	n.b. <sup>d</sup>	n.b. <sup>d</sup>	1.0
5	33.6	141	50	91	29	60	1.0
6	33.4	163	58	91	23	72	1.1
7	42.9	132	56	91	21	68	1.1
8	42.7	131	58	91	n.b. <sup>d</sup>	n.b. <sup>d</sup>	1.0
9	64.2 <sup>f</sup>	n.b. <sup>d</sup>	n.b. <sup>d</sup>	98	n.b. <sup>d</sup>	n.b. <sup>d</sup>	0.9
10	64.8 <sup>f</sup>	n.b. <sup>d</sup>	n.b. <sup>d</sup>	106	n.b. <sup>d</sup>	n.b. <sup>d</sup>	1.2
11	34.3	162	50	102	32	65	1.1
12	34.6	151	38	107	30	60	1.0
13 <sup>c</sup>	n.b. <sup>e</sup>	n.b. <sup>e</sup>	n.b. <sup>e</sup>	n.b. <sup>e</sup>	n.b. <sup>e</sup>	n.b. <sup>e</sup>	n.b. <sup>e</sup>
14 <sup>c</sup>	n.b. <sup>e</sup>	n.b. <sup>e</sup>	n.b. <sup>e</sup>	n.b. <sup>e</sup>	n.b. <sup>e</sup>	n.b. <sup>e</sup>	n.b. <sup>e</sup>
15	34.6	126	40	100	16	55	1.1
16	34.6	129	41	91	25	66	1.0
17	34.6	162	58	101	19	63	1.0
18	34.6	198	52	111	23	78	1.0 <sup>g</sup>
2-CH <sub>3</sub>	46.5 <sup>c</sup>	-	20	-	90	454	1.1
OCH <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	18 <sup>h</sup>	-

<sup>a</sup> Kopplungskonstanten entstammen der Auswertung der [ $^{13}\text{C}_2$ ]-NaOAc-Verfütterung.

<sup>b</sup> Intensitätsverhältnis der  $^{13}\text{C}$ -Satelliten im Verhältnis zur Intensität des Zentralsignals. <sup>c</sup> Werte nach Verfütterung von [ $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ ]-Glycin. <sup>d</sup> Nicht bestimmt wegen zu schwacher Signalintensität. <sup>e</sup> Nicht bestimmt wegen Signalüberlappung. <sup>f</sup> Werte nach Verfütterung von (L)-[ $^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$ ]-Alanin. <sup>g</sup> C-18 normiert auf relative Intensität 1.0. <sup>h</sup> 3-OCH<sub>3</sub> zeigte einen Markierungsgrad von ca. 18%  $^{13}\text{C}$  im  $^1\text{H}$ -NMR.

### 3 Methodische Arbeiten im Bereich HPLC-NMR und HPLC-MS

#### 3.1 Etablierung der WET-Lösungsmittelunterdrückung

Zur Etablierung der WET-Lösungsmittelunterdrückung in verschiedenen 2D-NMR-Experimenten wurde die von Keifer *et al.*<sup>[204]</sup> beschriebene WET-Sequenz aus dem *Bruker*-Standardpulsprogramm *lc1wetdc* in die *Bruker*-Programme *cosygp*, *noesygptp* und *roesytp* mit Hilfe eines UNIX-Editors eingefügt (s. Anhang A, Seite 139). Für die notwendige Kalibrierung der Unterdrückungspulse wurden die in XWinNMR 2.5 enthaltenen Makros *lcprep*, *lcsetup*, *lcwetset* und *lcwetcalc* benutzt.

#### 3.2 Austausch von protonierten und deuterierten Solventien in HPLC-NMR und HPLC-MS/MS: Untersuchung acider Protonen

##### 3.2.1 Probenvorbereitung

Die reinen Referenzsubstanzen\* Dioncophyllin A (**6**), *N*-Methyldioncophyllin A (**40**), Korupensamin A (**45**), Ajmalicin-Hydrochlorid (**46**•HCl) und (-)-Nicotin (**47**) wurden jeweils in D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O/MeCN (5:45:50 v/v, pH 3 mit TFA) und D<sub>2</sub>O/MeCN (1:1 v/v, pH 3 mit d<sup>1</sup>-TFA) gelöst. Die Konzentrationen betragen 0.2 mg/ml für **6**, **40** und **46**•HCl, 0.5 mg/ml für **45** und 0.1 mg/ml für **47**. Für die HPLC-MS wurden die Referenzlösungen auf 20 ng/ml mit dem jeweiligen Lösungsmittelgemisch verdünnt.

Zur Extraktanalyse wurden 5 g zerkleinertes Zweigmaterial von *T. peltatum* in H<sub>2</sub>O/MeCN (8:2 v/v, pH 2 mit TFA) im Ultraschallbad für 2 h mazerisiert. Nach der Filtration über einen Papierfilter wurde die Extraktlösung lyophilisiert und 4.5 mg des resultierenden Rückstandes in 300 µl D<sub>2</sub>O/MeCN (8:2 v/v, pH 3 mit d<sup>1</sup>-TFA) wieder aufgenommen und über einen Membranfilter (0.2 µm) von Schwebstoffen befreit. Die resultierende Lösung wurde direkt für HPLC-NMR-Untersuchungen benutzt.

##### 3.2.2 HPLC-ESI-MS-Untersuchung acider Protonen von Standardsubstanzen

Für die HPLC-ESI-MS-Untersuchungen der Reinsubstanzen wurden jeweils 5 µl der verdünnten Referenzlösung ohne Chromatographie injiziert. Laufmittel (A) war 0.01% TFA in D<sub>2</sub>O, Laufmittel (B) 0.01% TFA in H<sub>2</sub>O und Laufmittel (C) MeCN. Für die Massenbestimmung unter protonierenden Bedingungen wurde als Laufmittel eine Mischung aus (B) und (C) (1:1 v/v) benutzt. Für die Analyse unter deuterierenden Bedingungen wurde (B) durch (A) ersetzt. Die Flußrate betrug 0.2 ml/min.

\* Ich danke Dr. W. Saeb für Referenzproben von **6**,<sup>[130]</sup> **40**<sup>[249]</sup> und **45**.<sup>[20]</sup>

Alle Pseudomolekülionenmassen wurden im Scan-Modus vermessen. Die Differenz der unter protonierten und deuterierten Bedingungen ermittelten Massenzahlen ( $M_D - M_H$ ) ergab die Anzahl der austauschbaren Protonen im Molekül, abzüglich des ionisierenden Protons oder Deuterons (Tab. 2, Seite 54).

### 3.2.3 HPLC-NMR-Untersuchung eines Zweigextraktes von *T. peltatum*

Für die HPLC-NMR-Kopplung wurde eine *Waters*-Symmetry- $C_{18}$ -Säule (250 x 4.6 mm I.D.) bei einer Flußrate von 1 ml/min benutzt. Das Einspritzvolumen betrug 100  $\mu$ l. Laufmittel (A) war 0.01% TFA in  $D_2O$ , Laufmittel (B) 0.01% TFA in  $H_2O$  und Laufmittel (C) MeCN. Der ternäre HPLC-Gradient zur Beobachtung acider Protonen im Extrakt war: t = 0 min 10% (C), t = 12 min 25% (C), t = 19 min 35% (C), t = 25 min 45% (C), t = 30 min 65% (C). (A) wurde über den gesamten Gradienten konstant auf 5% gehalten.

Für die HPLC-NMR-Messungen mit rein deuterierten Lösungsmitteln wurde (B) durch (A) ersetzt.

Dioncophyllin A (**6**),  $t_R = 23.7$  min:

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $H_2O/D_2O/MeCN$  56.7:5:38.3 v/v):  $\delta = 1.45$  (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, 3- $CH_3$ ), 1.59 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, 1- $CH_3$ ), 2.10 (s, 3H, 2'- $CH_3$ ), 2.89 (dd,  $J = 11.3, 16.3$  Hz, 1H, 4- $H_{ax}$ ), 3.15 (dd,  $J = 4.7, 16.7$  Hz, 1H, 4- $H_{eq}$ ), 3.82 (m, 1H, 3-H), 3.89 (s, 3H, 4'- $OCH_3$ ), 3.92 (s, 3H, 5'- $OCH_3$ ), 4.78 (q,  $J = 6.7$  Hz, 1H, 1-H), 6.85 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, 8'-H), 6.88 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, 5-H), 6.93 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, 6'-H), 6.94 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, 6-H), 6.97 (s, 1H, 3'-H), 7.28 (dd,  $J = 7.7, 8.4$  Hz, 1H, 7'-H), 8.68 (s, 1H, N-H), 8.76 (s, 1H, N-H).

Die Zuordnung der Signale erfolgte in Anlehnung an Literaturdaten.<sup>[113]</sup>

### 3.2.4 $^1H$ -NMR-Untersuchung von Standardsubstanzen

Für die offline- $^1H$ -NMR-Untersuchung der Reinsubstanzen wurden die Referenzlösungen direkt mit einer Spritze in den Durchflußprobenkopf injiziert (Verbrauch *ca.* 0.6 ml). Zur Detektion der Signale der austauschbaren Protonen eines Analyten wurden die  $^1H$ -NMR-Spektren im Dual-Betrachtungsmodus von XWinNMR verglichen.

Der Austausch von  $D_2O$  gegen  $H_2O$  hatte - abgesehen von einer allgemeinen Verschlechterung der Auflösung, die durch die Verringerung der deuterierten Lock-Komponente bedingt war - keinen Einfluß auf die chemische Verschiebung nicht-acider Protonen.

*N*-Methyldioncophyllin A (**40**):

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O/MeCN 45:5:50 v/v): δ = 1.44 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 1.65 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 1-CH<sub>3</sub>), 2.11 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>), 2.77 (s, 3H, *N*-CH<sub>3</sub>), 2.93 (dd, *J* = 11.5, 18.3 Hz, 1H, 4-H<sub>ax</sub>), 3.15 (dd, *J* = 4.8, 18.3 Hz, 1H, 4-H<sub>eq</sub>), 3.83 (m, 1H, 3-H), 3.90 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.94 (s, 3H, 5'-OCH<sub>3</sub>), 4.69 (q, *J* = 6.0 Hz, 1H, 1-H), 6.86 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, 8'-H), 6.93 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, 5-H), 6.94 (d, *J* = 7.7, 1H, 6'-H), 6.98 (s, 1H, 3'-H), 6.99 (d, *J* = 7.9, 1H, 6-H), 7.29 (dd, *J* = 8.0, 8.1 Hz, 1H, 7'-H).

Die Zuordnung der Signale erfolgte in Anlehnung an Literaturdaten.<sup>[113]</sup>

Korupensamin A (**45**):

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O/MeCN 45:5:50 v/v): δ = 1.12 (d, *J* = 5.9 Hz, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 1.56 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 1-CH<sub>3</sub>), 2.28 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>), 2.53 (dd, *J* = 4.1, 18.3 Hz, 1H, 4-H<sub>eq</sub>), 3.58 (m, 1H, 3-H), 4.03 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 4.73 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H, 1-H), 6.44 (s, 1H, 7-H), 6.63 (s, 1H, 1'-H), 6.81 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, 6'-H), 6.82 (s, 1H, 3'-H), 7.09 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, 7'-H), 8.44 (s, 1H, *N*-H), 8.50 (s, 1H, *N*-H).

Die Zuordnung der Signale erfolgte in Anlehnung an Literaturdaten.<sup>[113]</sup>

Ajmalicin-Hydrochlorid (**46**•HCl):

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O/MeCN 45:5:50 v/v): δ = 1.12 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 1-CH<sub>3</sub>), 1.47 (m, 1H, 19-H), 2.23 (m, 1H, 13-H), 2.79 (m, 1H, 18-H), 2.99 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, 9-H), 3.15 (m, 2H, 9-H und 12-H), 3.50 (m, 12-H, 3H, 19-H und 20-H), 3.67 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.70 (m, 1H, 10-H), 4.50 (m, 1H, 14-H), 4.64 (m, 1H, 10-H), 7.06 (dd, *J* = 7.1, 7.4, 1H, 5-H), 7.16 (dd, *J* = 6.7, 7.4 Hz, 1H, 4-H), 7.37 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, 3-H), 7.46 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, 6-H), 7.53 (s, 1H, 16-H), 10.31 (s, 1H, *N*-H).

Die Zuordnung der Signale erfolgte in Anlehnung an Literaturdaten.<sup>[311]</sup>

(-)-Nicotin (**47**):

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O/MeCN 45:5:50 v/v): δ = 1.75 (m, 1H, 3'-H), 1.82 (m, 1H, 4'-H), 1.89 (m, 1H, 4'-H), 2.06 (s, 3H, *N*-CH<sub>3</sub>), 2.18 (m, 1H, 3'-H), 2.31 (m, 1H, 5'-H), 3.12 (m, 1H, 2'-H), 3.19 (m, 1H, 5'-H), 7.41 (m, 1H, 5-H), 7.79 (d, *J* = 7.2, 1H, 4-H), 8.41 (m, 2H, 2-H und 6-H).

Die Zuordnung der Signale erfolgte in Anlehnung an Literaturdaten.<sup>[312]</sup>

## 4 Phytochemische Untersuchung von *Ancistrocladus griffithii*

### 4.1 Extraktvorbereitung für Kopplungsanalyse und Isolation

*Blattmaterial:* 1 g luftgetrocknete, zermahlene Blätter wurden bei Raumtemp. mit ca. 40 ml H<sub>2</sub>O/MeCN (8:2 v/v, pH 2 mit TFA) für 2 h im Ultraschallbad mazerisiert. Nach Filtration und Gefriertrocknung des Filtrates erhielt man ca. 30 mg Blattrohextrakt, von dem ca. 5 mg in 500 µl D<sub>2</sub>O/MeCN (8:2 v/v) gelöst wurden. Nach Filtration über einen Membranfilter (0.2 µm) wurde die Lösung ohne weitere Behandlung eingesetzt.

*Zweigmaterial:* 25 g luftgetrocknetes, zermahlendes Zweigmaterial wurde bei Raumtemp. zweimal mit je 300 ml H<sub>2</sub>O/MeCN (2:1 v/v, pH 2 mit TFA) mazerisiert. Nach Filtration und Gefriertrocknung des Filtrates erhielt man ca. 2.9 g Rohextrakt. Dieser wurde über NH<sub>3</sub>-desaktiviertes Kieselgel vorfraktioniert (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2 v/v). Die Säulenchromatographie lieferte mehrere Fraktionen steigender Polarität, die **57** (ca. 150 mg), **54** (ca. 4 mg) und **51** (ca. 27 mg) enthielten. Für die Kopplungsanalyse wurde von jeder Fraktion eine Lösung in D<sub>2</sub>O/MeCN (8:2 v/v) mit einer Konzentration von ca. 3 mg/ml hergestellt. Die Proben wurden über einen Membranfilter (0.2 µm) filtriert und ohne weitere Behandlung eingesetzt.

### 4.2 HPLC-Parameter für HPLC-ESI-MS/MS, HPLC-NMR und HPLC-CD

Alle chromatographischen Trennungen wurden mit Symmetry-C<sub>18</sub>-Säulen (*Waters*) durchgeführt. Für die HPLC-NMR-Kopplung war Laufmittel (A) 0.01% TFA in D<sub>2</sub>O und Laufmittel (B) MeCN. Der binäre HPLC-Gradient war wie folgt: t = 0 min 5% (B), t = 15 min 25% (B), t = 30 min 30% (B). Für die HPLC-MS- und HPLC-CD-Messungen wurde D<sub>2</sub>O durch H<sub>2</sub>O ersetzt.

Der Fluß für die HPLC-NMR-Kopplung betrug 1.0 ml/min bei Verwendung von Säulen mit 250 x 4.6 mm Innendurchmesser. Im Falle von **51** kamen auch Säulen mit 150 x 3.0 mm I.D. bei 0.5 ml/min Fluß zum Einsatz. Die Probenaufgabemenge betrug im Regelfall 100 µl.

HPLC-MS-Messungen wurden mit C<sub>18</sub>-Säulen (150 x 2.1 mm I.D.) bei einem Fluß von 0.2 ml/min durchgeführt. Die Probenaufgabemenge betrug im Regelfall 5 µl.

HPLC-CD-Messungen wurden standardmäßig mit C<sub>18</sub>-Säulen (250 x 4.6 mm I.D.) bei einem Fluß von 1.2 ml/min durchgeführt. Im Falle von **52** betrug der Fluß 1.1 ml/min. Die Probenaufgabemenge betrug im Regelfall 20 µl.

### 4.3 Ergebnisse der online-Untersuchungen mit der "Triade"

#### 4.3.1 Ancistrogriffithin A (51)

HPLC-<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,  $t_R = 19.7$  min):  $\delta = 1.41$  (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 1.63 (d,  $J = 5.9$  Hz, 3H, 1-CH<sub>3</sub>), 2.33 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>), 2.92 (2H, 4-H<sub>eq</sub> & 4-H<sub>ax</sub>, überlappt), 3.26 (s, 3H, 8-OCH<sub>3</sub>), 3.39 (m, 1H, 3-H), 4.04 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 4.63 (q,  $J = 5.9$  Hz, 1H, 1-H), 6.63 (s, 1H, 5-H), 6.81 (s, 1H, 1'-H), 6.90 (s, 1H, 3'-H), 7.27 (s, 1H, 7'-H).

Für die Ergebnisse des WET-ROESY-Experimentes, s. Tab. 11 (Seite 129).

HPLC-ESI-MS (Scan,  $t_R = 16.9$  min);  $m/z$  (%): 393.4 [M + 2H]<sup>2+</sup> (100), 785.4 [M + H]<sup>+</sup> (8).

HPLC-ESI-MS/MS (DAU, 20 eV);  $m/z$  (%): 742.4 [M + H - C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N]<sup>+</sup> (10), 393.4 [M + 2H]<sup>2+</sup> (100), 384.8 [M + 2H - NH<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> (70), 371.7 [M + 2H - C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N]<sup>2+</sup> (72), 44.1 [C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N + H]<sup>+</sup> (4).

HPLC-CD (254 nm,  $t_R = 19.5$  min): positives CD-Signal.

HPLC-CD (Scan,  $t_R = 19.5$  min):  $\Delta\epsilon_{215} -42.8$ ,  $\Delta\epsilon_{238} -10.5$ ,  $\Delta\epsilon_{248} -15.4$ ,  $\Delta\epsilon_{264} -8.8$ ,  $\Delta\epsilon_{288} -30.1$ ,  $\Delta\epsilon_{307} -23.2$ .

#### 4.3.2 Ancistrogriffin A (52)

HPLC-<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,  $t_R = 23.5$  min):  $\delta = 1.42$  (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 1.60 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, 1-CH<sub>3</sub>), 2.24 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>), 2.73 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.86 (dd,  $J = 14.1, 19.2$  Hz, 1H, 4-H<sub>ax</sub>), 3.09 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1H, 4-H<sub>eq</sub>), 3.17 (s, 3H, 8-OCH<sub>3</sub>), 4.06 (m, 1H, 3-H), 4.06 (s, 3H, 5'-OCH<sub>3</sub>), 4.58 (q, 1H, 1-H), 6.64 (s, 1H, 5-H), 6.65 (s, 1H, 1'-H), 6.71 (s, 1H, 3'-H), 6.97 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, 6'-H), 7.27 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, 7'-H).

Für die Ergebnisse des WET-ROESY-Experimentes, s. Tab. 12 (Seite 130)

HPLC-ESI-MS (Scan,  $t_R = 17.8$  min);  $m/z$  (%): 408.4 [M + H]<sup>+</sup> (100).

HPLC-ESI-MS/MS (DAU, 25 eV);  $m/z$  (%): 408.0 [M + H]<sup>+</sup> (100), 351.1 [M + H - C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N]<sup>+</sup> (60), 58.5 [C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N + H]<sup>+</sup> (15).

HPLC-CD (254 nm,  $t_R = 23.9$  min): positives CD-Signal.

HPLC-CD (Scan,  $t_R = 23.9$  min):  $\Delta\epsilon_{207} -5.2$ ,  $\Delta\epsilon_{218} -13.7$ ,  $\Delta\epsilon_{236} +12.2$ ,  $\Delta\epsilon_{245} +19.0$ ,  $\Delta\epsilon_{263} +23.6$ ,  $\Delta\epsilon_{287} -9.8$ ,  $\Delta\epsilon_{352} +3.6$ .

### 4.3.3 Ancistrogriffin B (54)

HPLC-<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,  $t_R = 17.6$  min):  $\delta = 1.44$  (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 1.54 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, 1-CH<sub>3</sub>), 2.13 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>), 2.82 (dd,  $J = 11.9, 17.9$  Hz, 1H, 4-H<sub>ax</sub>), 3.10 (dd,  $J = 4.1, 17.6$  Hz, 1H, 4-H<sub>eq</sub>), 3.83 (m, 1H, 3-H), 3.90 (s, 3H, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.94 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 4.70 (q,  $J = 6.6$  Hz, 1H, 1-H), 6.44 (s, 1H, 5-H), 6.85 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, 8'-H), 6.95 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, 6'-H), 7.00 (s, 1H, 3'-H), 7.31 (dd,  $J = 7.8, 8.1$  Hz, 1H, 7'-H).

Tab. 10. WET-ROESY-Korrelationen von **54**

H-Atom	WET-ROESY-Korrelation mit
3-CH <sub>3</sub>	3-H, 4-H <sub>ax</sub>
1-CH <sub>3</sub>	3-H, 1-H
2'-CH <sub>3</sub>	3'-H
4-H <sub>ax</sub>	3-CH <sub>3</sub> , 4-H <sub>eq</sub>
4-H <sub>eq</sub>	4-H <sub>ax</sub> , 3-H, 5-H
3-H	3-CH <sub>3</sub> , 1-CH <sub>3</sub> , 4-H <sub>eq</sub>
5'-OCH <sub>3</sub>	6'-H
4'-OCH <sub>3</sub>	3'-H
1-H	1-CH <sub>3</sub>
5-H	4-H <sub>eq</sub>
8'-H	7'-H
6'-H	5'-OCH <sub>3</sub> , 7'-H
3'-H	2'-CH <sub>3</sub> , 4'-OCH <sub>3</sub>
7'-H	8'-H, 6'-H

HPLC-ESI-MS (Scan,  $t_R = 16.0$  min);  $m/z$  (%): 394.2 [M + H]<sup>+</sup> (100).

HPLC-ESI-MS/MS (DAU, 35 eV);  $m/z$  (%): 394.0 [M + H]<sup>+</sup> (95), 377.3 [M + H - NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (10), 350.9 [M + H - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N]<sup>+</sup> (70), 201.9 [C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup> (100).

HPLC-CD (254 nm,  $t_R = 15.1$  min): positives CD-Signal.

HPLC-CD (Scan,  $t_R = 15.1$  min):  $\Delta\epsilon_{202} -3.8$ ,  $\Delta\epsilon_{219} +8.3$ ,  $\Delta\epsilon_{233} +14.6$ ,  $\Delta\epsilon_{253} +2.3$ ,  $\Delta\epsilon_{285} -0.5$ .

### 4.3.4 Ancistrogriffin C (57)

HPLC-<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,  $t_R = 21.2$  min):  $\delta = 1.12$  (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 1.54 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, 1-CH<sub>3</sub>), 2.27 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>), 2.58 (dd,  $J = 11.6, 17.9$  Hz, 2H, 4-H<sub>ax</sub>), 3.61 (m, 1H, 3-H), 3.86 (s, 3H, 6-OCH<sub>3</sub>), 4.04 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 4.75 (q,  $J = 6.9$  Hz, 1H, 1-H), 6.59 (s,

1H, 5-H), 6.61 (s, 1H, 1'-H), 6.85 (s, 1H, 3'-H), 6.85 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, 6'-H oder 8'-H), 7.12 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, 7'-H).

Für die Ergebnisse des WET-ROESY-Experimentes siehe Tab. 13 (Seite 131). Die Zuordnung des Protons bei 6.85 ppm (6'-H oder 8'-H) war nicht mit HPLC-NMR-, sondern erst nach offline-NMR-Messungen möglich.

HPLC-ESI-MS (Scan,  $t_R = 17.1$  min);  $m/z$  (%): 394.4  $[M + H]^+$  (100).

HPLC-ESI-MS/MS (DAU, 25 eV);  $m/z$  (%): 394.2  $[M + H]^+$  (100), 377.1  $[M + H - NH_3]^+$  (12), 351.1  $[M + H - C_2H_4N]^+$  (90), 188.2  $[C_{12}H_{11}O_2 + H]^+$  (30).

Da zu diesem Zeitpunkt die Struktur nicht eindeutig bestimmt war, wurde auf die Aufnahme eines HPLC-CD-Spektrums verzichtet.

#### 4.3.5 Hamatin (58)

HPLC- $^1H$ -NMR (600 MHz,  $t_R = 19.5$  min):  $\delta = 1.11$  (d,  $J = 5.5$  Hz, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 1.55 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, 1-CH<sub>3</sub>), 2.06 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>), 2.35 (dd,  $J = 4.2, 17.2$  Hz, 1H, 4-H<sub>eq</sub>), 3.64 (m, 1H, 3-H), 3.87 (s, 3H, 8-OCH<sub>3</sub>), 3.90 (s, 3H, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.92 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 4.77 (q,  $J = 6.5, 1H, 1-H$ ), 6.61 (s, 1H, 7-H), 6.73 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, 8'-H), 6.93 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, 6'-H), 7.00 (s, 1H, 3'-H), 7.27 (dd,  $J = 8.1, 8.3$  Hz, 1H, 7'-H).

HPLC-ESI-MS (Scan,  $t_R = 16.3$  min);  $m/z$  (%): 408.4  $[M + H]^+$  (100).

HPLC-ESI-MS/MS (DAU, 30 eV);  $m/z$  (%): 408.2  $[M + H]^+$  (60), 365.1  $[M + H - C_2H_4N]^+$  (100), 202.0  $[C_{13}H_{13}O_2 + H]^+$  (40).

In einem HPLC-MS/MS-Koelutionsexperiment zeigte der Peak bei 16.3 min ein identisches Retentions- und Fragmentierungsverhalten wie eine authentischen Referenz von **58**.\*

HPLC-CD (254 nm,  $t_R = 17.1$  min): negatives CD-Signal.

HPLC-CD (Scan,  $t_R = 17.1$  min):  $\Delta\epsilon_{200} -25.8$ ,  $\Delta\epsilon_{228} -12.3$ ,  $\Delta\epsilon_{246} -19.1$ ,  $\Delta\epsilon_{261} -17.0$ ,  $\Delta\epsilon_{283} -22.6$ .

\* Ich danke Dr. F. Teltschik für eine Referenzprobe von **58**.<sup>[274]</sup>

#### 4.3.6 Ancistrocladin (15)

Da **15** als Minderkomponente im Extrakt neben **58** vorlag, konnten keine eindeutig auswertbaren, "sauberen" HPLC-NMR-Spektren erhalten werden.

HPLC-ESI-MS (Scan,  $t_R = 16.5$  min);  $m/z$  (%): 408.4  $[M + H]^+$  (100).

HPLC-ESI-MS/MS (DAU, 30 eV);  $m/z$  (%): 408.2  $[M + H]^+$  (55), 365.1  $[M + H - C_2H_4N]^+$  (100), 201.9  $[C_{13}H_{13}O_2 + H]^+$  (50).

In einem HPLC-MS/MS-Koelutionsexperiment zeigte der Peak bei  $t_R = 16.5$  min ein identisches Retentions- und Fragmentierungsverhalten wie eine authentischen Referenz von **15**.\*

HPLC-CD (254 nm,  $t_R = 17.5$  min): positives CD-Signal.

In einem HPLC-CD-Koelutionsexperiment zeigte der Peak bei  $t_R = 16.5$  min eine identische Retention und einen identischen CD-Effekt wie eine authentischen Referenz von **15**.\*

#### 4.4 Gezielte Isolierung neuer Alkaloide aus *A. griffithii*

*Isolierung von 52 aus Blattmaterial:* 10 g luftgetrocknete, zermahlene Blätter wurden bei Raumtemp. zweimal mit je 300 ml H<sub>2</sub>O/MeCN (2:1 v/v, pH 1-2 mit TFA) mazerisiert. Nach Filtration und Gefriertrocknung des Filtrates erhielt man ca. 1.5 g Blattrohextrakt. Dieser wurde in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (3:1 v/v) gelöst und mit dem gleichen Lösungsmittel über NH<sub>3</sub>-desaktiviertes Kieselgel filtriert. Nach Abziehen des Lösungsmittels erhielt man ca. 800 mg vorfraktionierten Extrakt. Dieser wurde weiter säulenchromatographisch (desaktiviertes Kieselgel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v) gereinigt und daraufhin eine mit **52** angereicherte, unpolare Fraktion erhalten. Nach Endreinigung mit präparativer HPLC [*Waters* Symmetry C<sub>18</sub> 150 x 19 mm I.D.; binärer Gradient, 12 ml/min; Laufmittel (A) MeCN, Laufmittel (B) H<sub>2</sub>O + 0.05% TFA: t = 0 min 5% (A), t = 15 min 25% (A), t = 30 min 30% (A)] wurden 9 mg **52** als farbloser Feststoff erhalten.

*Isolierung von 51 und 57 aus Zweigmaterial:* Zur weiteren Isolierung wurden die beiden größeren der Kopplungsanalyse unterworfenen Zweigextrakt-Fractionen (Kap. 4.1, Seite 123) herangezogen.

Aus der **57**-haltigen Fraktion wurden nach einer weiteren säulenchromatographischen Reinigung (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/*n*-Hexan 8:2 → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2 v/v) ca. 30 mg einer mit **57**

\* Ich danke Dr. W. Saeb für eine Referenzprobe von **15**.<sup>[310]</sup>

angereicherten Fraktion erhalten. Nach weiterer Aufreinigung mit semipräparativer HPLC [*Waters Symmetry C<sub>18</sub>* 300 x 7.8 mm I.D.; binärer Gradient, 4 ml/min; Laufmittel (A) MeCN, Laufmittel (B) H<sub>2</sub>O + 0.05% TFA: t = 0 min 5% (A), t = 15 min 25% (A), t = 30 min 30% (A)] und chiraler HPLC [*Daicel Chiralcel OD* 250 x 7.8 mm I.D.; Isokrat, 7 ml/min; Laufmittel *n*-Hexan/*i*-PrOH 1:1 + 0.1% NEt<sub>3</sub> v/v] wurden schließlich 3 mg **57** als leicht gelblicher Feststoff erhalten.

Aus der **51**-haltigen Fraktion wurden nach präparativer Chromatographie [*Waters Symmetry C<sub>18</sub>* 150 x 19 mm I.D.; binärer Gradient, 12 ml/min; Laufmittel (A) MeCN, Laufmittel (B) H<sub>2</sub>O + 0.05% TFA: t = 0 min 5% (A), t = 15 min 25% (A), t = 30 min 30% (A)] 6 mg **51** als leicht gelblicher Feststoff erhalten.

#### 4.4.1 Ancistrogriffithin A (**51**)

Schmp. 230°C (Zers.).

$[\alpha]_D^{25} = +73.5^\circ$  ( $c = 0.30$  in MeOH).

CD (MeOH):  $\Delta\epsilon_{214} -3.8$ ,  $\Delta\epsilon_{222} -1.7$ ,  $\Delta\epsilon_{245} +5.1$ ,  $\Delta\epsilon_{252} +3.7$ ,  $\Delta\epsilon_{265} +7.1$ ,  $\Delta\epsilon_{291} -4.6$ .

IR (NaCl):  $\nu_{\max}$  3390 (m), 3010 (m), 2970 (m), 2390 (m), 1690 (s), 1600 (m), 1430 (m), 1375 (m), 1350 (w), 1220 (s), 1085 (m), 875 (w) cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 1.49$  (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 1.72 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, 1-CH<sub>3</sub>), 2.35 (d,  $J = 0.6$  Hz, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>), 2.39 (2H, 4-H<sub>eq</sub> und 4-H<sub>ax</sub>, überlappt), 3.29 (s, 3H, 8-OCH<sub>3</sub>), 3.47 (m, 1H, 3-H), 4.08 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 4.67 (q,  $J = 6.5$  Hz, 1H, 1-H), 6.58 (s, 1H, 5-H), 6.83 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, 3'-H), 6.90 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, 1'-H), 7.18 (s, 1H, 7'-H).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 18.8$  (3-CH<sub>3</sub>), 20.6 (1-CH<sub>3</sub>), 22.2 (2'-CH<sub>3</sub>), 35.2 (C-4), 51.1 (C-3), 52.4 (C-1), 57.0 (4'-OCH<sub>3</sub>), 60.9 (8-OCH<sub>3</sub>), 107.8 (C-3'), 111.8 (C-5), 115.1 (C-10'), 118.4 (C-9), 120.0 (C-1'), 120.1 (C-6'), 121.8 (C-7), 121.9 (C-8'), 134.7 (C-10), 135.1 (C-7'), 136.4 (C-9'), 137.1 (C-2'), 152.6 (C-5'), 157.3 (C-6), 157.9 (C-4'), 158.6 (C-8).

Tab. 11. Korrelationen von **51** in HMBC- und ROESY-Experimenten (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

H-Atom	Korrelationen im	
	HMBC	ROESY <sup>a</sup>
3-CH <sub>3</sub>	C-4, C-3	4-H <sub>eq</sub> /4-H <sub>ax</sub> , 3-H
1-CH <sub>3</sub>	C-1, C-9	8-OCH <sub>3</sub> , 1-H, 1'-H
2'-CH <sub>3</sub>	C-1', C-3', C-2'	1'-H, 3'-H
4-H <sub>eq</sub> /4-H <sub>ax</sub>	3-CH <sub>3</sub> , C-3, C-5, C-9, C-10	3-CH <sub>3</sub> , 3-H, 5-H
8-OCH <sub>3</sub>	C-8	1-CH <sub>3</sub> , 1-H, 1'-H, 7'-H
3-H	3-CH <sub>3</sub>	3-CH <sub>3</sub> , 4-H, 1-H
4'-OCH <sub>3</sub>	C-4'	3'-H
1-H	1-CH <sub>3</sub> , C-9, C-10	1-CH <sub>3</sub> , 3-H, 8-OCH <sub>3</sub>
5-H	C-4, C-9, C-7, C-6	4-H <sub>eq</sub> /4-H <sub>ax</sub>
1'-H	2'-CH <sub>3</sub> , C-3', C-10', C-8', C-9'	1-CH <sub>3</sub> , 2'-CH <sub>3</sub> , 8-OCH <sub>3</sub>
3'-H	2'-CH <sub>3</sub> , C-10', C-1', C-4'	2'-CH <sub>3</sub> , 4'-OCH <sub>3</sub>
7'-H	C-6', C-7, C-9', C-5'	8-OCH <sub>3</sub>

<sup>a</sup> Alle Korrelationen auch online (WET-ROESY) beobachtet (vgl. Kap. 4.3.1, Seite 124).

ESIMS (20 eV); *m/z* (%): 393 [M + 2H]<sup>2+</sup> (100), 785 [M + H]<sup>+</sup> (8).

HRESIMS; C<sub>48</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [M + 2H]<sup>2+</sup>: Ber. 393.1935 Gef. 393.1939.

#### 4.4.2 Ancistrogriffin A (**52**)

Schmp. 148°C.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +26.0° (*c* = 0.40 in MeOH).

CD (EtOH): Δε<sub>209</sub> -3.0, Δε<sub>235</sub> +4.4, Δε<sub>246</sub> +1.2, Δε<sub>257</sub> +2.0, Δε<sub>282</sub> -1.4.

IR (NaCl): ν<sub>max</sub> 3394 (m), 2987 (m), 2946 (m), 1673 (s), 1588 (m), 1416 (m), 1389 (m), 1200 (s), 1132 (s), 1089 (s), 842 (w), 720 (w) cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.40 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 1.60 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 1-CH<sub>3</sub>), 2.26 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>), 2.65 (d, *J* = 3.1 Hz, 3H, *N*-CH<sub>3</sub>), 2.71 (1H, 4-H<sub>ax</sub>, überlappt mit *N*-CH<sub>3</sub>), 2.91 (dd, *J* = 4.8, 18.3 Hz, 1H, 4-H<sub>eq</sub>), 3.06 (s, 3H, 8-OCH<sub>3</sub>), 3.88 (m, 1H, 3-H), 4.02 (s, 3H, 5'-OCH<sub>3</sub>), 4.54 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, 1-H), 6.55 (s, 1H, 5-H), 6.63 (s, 1H, 1'-H), 6.72 (s, 1H, 3'-H), 6.74 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 6'-H), 7.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 7'-H).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 16.7 (3-CH<sub>3</sub>), 19.6 (1-CH<sub>3</sub>), 21.9 (2'-CH<sub>3</sub>), 30.0 (C-4), 33.1 (*N*-CH<sub>3</sub>), 48.0 (C-3), 56.1 (5'-OCH<sub>3</sub>), 58.3 (C-1), 60.5 (8-OCH<sub>3</sub>), 102.9 (C-6'), 109.7 (C-5), 113.3 (C-3'), 113.6 (C-10'), 115.6 (C-1'), 116.6 (C-9), 118.5 (C-7), 121.9 (C-9), 129.2 (C-7'), 130.8 (C-10), 135.1 (C-8'), 139.3 (C-2'), 154.6 (C-6), 154.7 (C-4'), 156.5 (C-8), 157.0 (C-5').

Tab. 12. Korrelationen von **52** in HMBC- und ROESY-Experimenten

H-Atom	Korrelationen im	
	HMBC	ROESY
3-CH <sub>3</sub>	C-4, <i>N</i> -CH <sub>3</sub> , C-3	<i>N</i> -CH <sub>3</sub> <sup>a</sup> , 3-H <sup>a</sup>
1-CH <sub>3</sub>	C-1, C-9	3-H <sup>a</sup> , 8-OCH <sub>3</sub> , 1-H <sup>a</sup> , 1'-H
2'-CH <sub>3</sub>	C-3', C-1', C-2'	3'-H <sup>a</sup> , 1'-H <sup>a</sup>
<i>N</i> -CH <sub>3</sub>	C-1	3-CH <sub>3</sub> <sup>a</sup> , 1-H <sup>a</sup>
4-H <sub>ax</sub>	C-5, C-9, C-10	4-H <sub>eq</sub> <sup>a</sup> , 5-H
4-H <sub>eq</sub>	3-CH <sub>3</sub> , C-3, C-9, C-10	3-H <sup>a</sup> , 4-H <sub>ax</sub> <sup>a</sup> , 5-H <sup>a</sup>
8-OCH <sub>3</sub>	C-8	1-CH <sub>3</sub> , 1-H <sup>a</sup> , 1'-H, 7'-H <sup>a</sup>
3-H	3-CH <sub>3</sub> , <i>N</i> -CH <sub>3</sub>	1-CH <sub>3</sub> <sup>a</sup> , 3-CH <sub>3</sub> <sup>a</sup> , 4-H <sub>eq</sub> <sup>a</sup>
5'-OCH <sub>3</sub>	C-5'	6'-H <sup>a</sup>
1-H	1-CH <sub>3</sub> , <i>N</i> -CH <sub>3</sub> , C-3, C-9, C-10, C-8	1-CH <sub>3</sub> <sup>a</sup> , <i>N</i> -CH <sub>3</sub> <sup>a</sup> , 8-OCH <sub>3</sub> <sup>a</sup>
5-H	C-4, C-9, C-7, C-6	4-H <sub>ax</sub> , 4-H <sub>eq</sub> <sup>a</sup>
1'-H	2'-CH <sub>3</sub> , C-3', C-10', C-9', C-8'	1-CH <sub>3</sub> , 2'-CH <sub>3</sub> <sup>a</sup> , 8-OCH <sub>3</sub>
3'-H	2'-CH <sub>3</sub> , C-10', C-1', C-4'	2'-CH <sub>3</sub> <sup>a</sup>
6'-H	C-10', C-9', C-5'	5'-OCH <sub>3</sub> <sup>a</sup> , 7'-H <sup>a</sup>
7'-H	C-6', C-7, C-8', C-5'	8-OCH <sub>3</sub> <sup>a</sup> , 6'-H <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Korrelation auch online (WET-ROESY) beobachtet (vgl. Kap. 4.4.2, Seite 129).

EIMS (70 eV); *m/z* (%): 407 [M]<sup>+</sup> (1), 392 [M - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100).

HREIMS (70 eV); C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>N [M - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>: Ber. 392.1863      Gef. 392.1862.

#### 4.4.3 Ancistrogriffin C (**57**)

Schmp. 165°C.

$[\alpha]_D^{25} = +13.8^\circ$  (*c* = 0.25 in MeOH).

CD (EtOH):  $\Delta\epsilon_{209} +8.7$ ,  $\Delta\epsilon_{214} +5.1$ ,  $\Delta\epsilon_{227} +10.8$ ,  $\Delta\epsilon_{238} -8.7$ .

IR (NaCl):  $\nu_{\max}$  3382 (m), 2943 (m), 2678 (m), 2471 (m), 1588 (s), 1445 (s), 1361 (s), 1333 (s), 1259 (s), 1110 (s), 834 (m) cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.28 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 1.64 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 1-CH<sub>3</sub>), 2.36 (2H, 4-H<sub>ax</sub> & 4-H<sub>eq</sub>, überlappen mit 2'-CH<sub>3</sub>), 2.37 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>), 3.40 (m, 1H, 3-H), 3.86 (s, 3H, 6-OCH<sub>3</sub>), 4.07 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 4.68 (q, *J* = 6.0 Hz, 1H, 1-H), 6.50 (s, 1H, 5-H), 6.66 (s, 1H, 3'-H), 6.76 (s, 1H, 1'-H), 6.87 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 6'-H), 7.20 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 7'-H), 9.52 (s, 1H, 5'-OH).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 19.5 (1-CH<sub>3</sub>), 19.8 (3-CH<sub>3</sub>), 22.2 (2'-CH<sub>3</sub>), 33.0 (C-4), 43.5 (C-3), 47.5 (C-1), 55.3 (6-OCH<sub>3</sub>), 56.3 (4'-OCH<sub>3</sub>), 96.5 (C-5), 107.4 (C-3'), 109.5 (C-6'),

113.5 (C-10'), 114.0 (C-9), 117.3 (C-7), 118.4 (C-1'), 120.5 (C-8'), 130.7 (C-7'), 133.3 (C-10), 136.0 (C-9'), 137.6 (C-2'), 154.0 (C-8), 155.5 (C-5'), 156.3 (C-4'), 156.6 (C-6).

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , + 1 Moläquiv.  $\text{NEt}_3$ ):  $\delta$  = 1.44 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 1.73 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, 1- $\text{CH}_3$ ), 2.38 (s, 3H, 2'- $\text{CH}_3$ ), 2.39 (dd,  $J$  = 4.4, 17.7 Hz, 1H, 4- $\text{H}_{\text{eq}}$ ), 2.57 (dd,  $J$  = 11.6, 17.8 Hz, 1H, 4- $\text{H}_{\text{ax}}$ ), 3.51 (m, 1H, 3-H), 3.84 (s, 3H, 6- $\text{OCH}_3$ ), 4.05 (s, 3H, 4'- $\text{OCH}_3$ ), 4.81 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, 1-H), 6.51 (s, 1H, 5-H), 6.65 (s, 1H, 3'-H), 6.76 (s, 1H, 1'-H), 6.85 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, 6'-H), 7.18 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, 7'-H), 9.52 (s, 1H, 5'-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , + 1 Moläquiv.  $\text{NEt}_3$ ):  $\delta$  = 18.4 (1- $\text{CH}_3$ ), 18.5 (3- $\text{CH}_3$ ), 22.2 (2'- $\text{CH}_3$ ), 31.8 (C-4), 44.2 (C-3), 47.5 (C-1), 55.3 (6- $\text{OCH}_3$ ), 56.2 (4'- $\text{OCH}_3$ ), 96.8 (C-5), 107.5 (C-3'), 109.3 (C-6'), 113.9 (C-10'), 114.5 (C-9), 117.2 (C-7), 118.4 (C-1'), 120.2 (C-8'), 130.4 (C-7'), 132.3 (C-10), 135.9 (C-9'), 137.9 (C-2'), 154.0 (C-8), 155.4 (C-5'), 156.1 (C-4'), 156.4 (C-6).

Tab. 13. Korrelationen von **57** in HMBC- und ROESY-Experimenten (mit  $\text{NEt}_3$ )

H-Atom	Korrelationen im	
	HMBC	ROESY
3- $\text{CH}_3$	C-4, C-3	4- $\text{H}_{\text{eq}}$ , 4- $\text{H}_{\text{ax}}$ <sup>a</sup> , 3- $\text{H}$ <sup>a</sup>
1- $\text{CH}_3$	C-1, C-9	3- $\text{H}$ <sup>a</sup> , 1- $\text{H}$ <sup>a</sup>
2'- $\text{CH}_3$	C-3', C-1', C-2'	1'- $\text{H}$ <sup>a</sup> , 3'- $\text{H}$ <sup>a</sup>
4- $\text{H}_{\text{eq}}$	C-9, C-10	3- $\text{CH}_3$ , 4- $\text{H}_{\text{ax}}$ <sup>a</sup> , 3- $\text{H}$ <sup>a</sup> , 5- $\text{H}$ <sup>a</sup>
4- $\text{H}_{\text{ax}}$	3- $\text{CH}_3$ , C-3, C-9, C-10, C-8	3- $\text{CH}_3$ <sup>a</sup> , 4- $\text{H}_{\text{eq}}$ <sup>a</sup> , 3- $\text{H}$ <sup>a</sup> , 1'- $\text{H}$
3- $\text{H}$	-	3- $\text{CH}_3$ <sup>a</sup> , 1- $\text{CH}_3$ <sup>a</sup> , 4- $\text{H}_{\text{eq}}$ <sup>a</sup> , 4- $\text{H}_{\text{ax}}$ <sup>a</sup>
6- $\text{OCH}_3$	C-6	5- $\text{H}$ <sup>a</sup>
4'- $\text{OCH}_3$	C-4'	3'- $\text{H}$ <sup>a</sup>
1- $\text{H}$	1- $\text{CH}_3$ , C-3, C-9, C-10, C-8	1- $\text{CH}_3$ <sup>a</sup>
5- $\text{H}$	C-9, C-10, C-8, C-6, C-8'	6- $\text{OCH}_3$ <sup>a</sup> , 4- $\text{H}_{\text{eq}}$ <sup>a</sup>
3'- $\text{H}$	C-10', C-1', C-4', 2'- $\text{CH}_3$	2'- $\text{CH}_3$ <sup>a</sup> , 4'- $\text{OCH}_3$ <sup>a</sup>
1'- $\text{H}$	2'- $\text{CH}_3$ , C-3', C-10', C-8'	4- $\text{H}_{\text{ax}}$ , 2'- $\text{CH}_3$ <sup>a</sup>
6'- $\text{H}$	C-10', C-8', C-5', C-4'	7'- $\text{H}$ <sup>a</sup>
7'- $\text{H}$	C-5', C-7, C-6', C10'	6'- $\text{H}$ <sup>a</sup>
5'-OH	C-5', C-6', C-10'	-

<sup>a</sup>Korrelation auch online (WET-ROESY) beobachtet (vgl. Kap. 4.3.4, Seite 125).

EIMS (70 eV);  $m/z$  (%): 393  $[\text{M}]^+$  (6), 378  $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$  (100).

HREIMS (70 eV);  $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N} [\text{M} - \text{CH}_3]^+$ : Ber. 378.1700 Gef. 378.1705.

## 5 Phytochemische Untersuchung der ersten chimären *Ancistrocladaceae* nach Pfropfung von *A. heyneanus* auf *A. abbreviatus*

### 5.1 Untersuchung des Pfropfreises

#### 5.1.1 HPLC-Parameter für HPLC-ESI-MS/MS, HPLC-NMR und HPLC-CD

Alle chromatographischen Trennungen wurden mit Symmetry-C<sub>18</sub>-Säulen (*Waters*) durchgeführt. Für die HPLC-NMR-Kopplung war Laufmittel (A) 0.01% TFA in D<sub>2</sub>O und Laufmittel (B) MeCN. Der binäre HPLC-Gradient verlief wie folgt: t = 0 min 5% (B), t = 12 min 20% (B), t = 23 min 32% (B), t = 27 min 40% (B), t = 30 min 60% (B). Für die HPLC-MS- und HPLC-CD-Kopplung wurde D<sub>2</sub>O durch H<sub>2</sub>O ersetzt.

Der Fluß für die HPLC-NMR betrug 1.0 ml/min bei Verwendung von Säulen mit 250 x 4.6 mm Innendurchmesser. Die Probenaufgabemenge betrug im Regelfall 100 µl.

HPLC-MS-Messungen wurden mit C<sub>18</sub>-Säulen (150 x 2.1 mm I.D.) bei einem Fluß von 0.2 ml/min durchgeführt. Die Probenaufgabemenge betrug im Regelfall 5 µl.

HPLC-CD-Messungen wurden mit C<sub>18</sub>-Säulen (250 x 4.6 mm I.D.) bei einem Fluß von 1.0 ml/min durchgeführt. Die Probenaufgabemenge betrug im Regelfall 20 µl.

#### 5.1.2 Ancistrocladin (15)

HPLC-ESI-MS (Scan,  $t_R = 18.1$  min);  $m/z$  (%): 408.4 [M + H]<sup>+</sup> (100).

In einem HPLC-PDA-Koelutionsexperiment zeigte der Peak identische Retention und ein identisches UV-Spektrum zu einer authentischen Referenz von **15**.\*

#### 5.1.3 4'-O-Desmethylanastrocladin (63)

HPLC-<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,  $t_R = 16.9$  min):  $\delta = 1.18$  (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 1.60 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, 1-CH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>), 3.60 (m, 1H, 3-H), 3.89 (s, 3H, 8-OCH<sub>3</sub>), 4.07 (s, 3H, 5'-OCH<sub>3</sub>), 4.78 (q,  $J = 6.7$  Hz, 1H, 1-H), 6.63 (s, 1H, 7-H), 6.85 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, 8'-H), 6.89 (s, 1H, 3'-H), 6.96 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, 6'-H), 7.31 (dd,  $J = 8.1, 8.1$  Hz, 1H, 7'-H).

Die Zuordnung der Signale erfolgte in Anlehnung an Literaturdaten.<sup>[113]</sup>

HPLC-ESI-MS (Scan,  $t_R = 19.0$  min);  $m/z$  (%): 394.2 [M + H]<sup>+</sup> (100).

\* Ich danke Dr. W. Saeb für eine Referenzprobe von **15**.<sup>[310]</sup>

HPLC-ESI-MS/MS (DAU, 25 eV);  $m/z$  (%): 394.3  $[M + H]^+$  (100), 377.1  $[M + H - NH_3]^+$  (20), 351.2  $[M + H - C_2H_4N]^+$  (64), 187.9  $[C_{12}H_{11}O_2 + H]^+$  (28).

HPLC-CD (254 nm,  $t_R = 24.2$  min): positives CD-Signal.

HPLC-CD (Scan,  $t_R = 24.2$  min):  $\Delta\epsilon_{202} +22.0$ ,  $\Delta\epsilon_{226} -9.3$ ,  $\Delta\epsilon_{238} +16.9$ ,  $\Delta\epsilon_{268} +5.2$ ,  $\Delta\epsilon_{282} +3.4$ .

#### 5.1.4 Ancistroheynin A (62)

HPLC- $^1H$ -NMR (600 MHz,  $t_R = 22.5$  min):  $\delta = 1.43$  (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 2.72 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>), 2.90 (dd,  $J = 11.1, 16.5$  Hz, 1H, 4-H<sub>ax</sub>), 3.11 (dd,  $J = 5.2, 16.7$  Hz, 1 H, 4-H<sub>eq</sub>), 3.97 (m, 1H, 3-H), 3.41 (s, 3H, 8-OCH<sub>3</sub>), 4.07 (s, 3H, 5'-OCH<sub>3</sub>), 6.81 (s, 1H, 5-H), 6.97 (d,  $J = 6.2$  Hz, 1H, 6'-H), 6.89 (s, 1H, 1'-H oder 3'-H), 7.38 (s, 1H, 1'-H oder 3'-H), 7.45 (d,  $J = 6.2$  Hz, 1H, 7'-H).

HPLC-ESI-MS (Scan,  $t_R = 22.5$  min);  $m/z$  (%): 392.2  $[M + H]^+$  (100).

HPLC-ESI-MS/MS (DAU, 25 eV);  $m/z$  (%): 392.2  $[M + H]^+$  (100), 377.1  $[M + H - CH_3]^+$ .

In einem HPLC-MS/MS-Koelutionsexperiment zeigte der Peak bei  $t_R = 22.5$  min ein identisches Retentions- und Fragmentierungsverhalten wie eine authentischen Referenz von **62**.\*

HPLC-CD (254 nm,  $t_R = 28.5$  min): positives CD-Signal.

#### 5.1.5 3-*epi*-Ancistrobrevin C (64)

HPLC- $^1H$ -NMR (600 MHz,  $t_R = 17.6$  min):  $\delta = 1.41$  (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>), 2.67 (s, 3H, 1-CH<sub>3</sub>), 2.92 (dd,  $J = 10.7, 16.6$  Hz, 1H, 4-H<sub>ax</sub>), 3.16 (dd,  $J = 5.2, 16.5$  Hz, 1 H, 4-H<sub>eq</sub>), 3.69 (s, 3H, 6-OCH<sub>3</sub>), 3.90 (s, 3H, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.97 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 4.02 (m, 1H, 3-H), 6.80 (s, 1H, 5-H), 6.86 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, 8'-H), 6.95 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, 6'-H), 7.00 (s, 1H, 3'-H), 7.31 (dd,  $J = 7.9, 8.1$  Hz, 1H, 7'-H).

\* Ich danke Dr. M. Rückert für eine Referenzprobe von **62**.<sup>[26]</sup>

Tab. 14. WET-ROESY-Korrelationen von **64**

H-Atom	WET-ROESY-Korrelation mit
3-CH <sub>3</sub>	4-H <sub>ax</sub> , 3-H
2'-CH <sub>3</sub>	3'-H
1-CH <sub>3</sub>	-
4-H <sub>ax</sub>	4-H <sub>eq</sub> , 3-CH <sub>3</sub> , 5-H
4-H <sub>eq</sub>	4-H <sub>ax</sub> , 5-H
6-OCH <sub>3</sub>	5-H
5'-OCH <sub>3</sub>	6'-H
4'-OCH <sub>3</sub>	3'-H
3-H	3-CH <sub>3</sub>
5-H	4-H <sub>eq</sub> , 4-H <sub>ax</sub> , 6-OCH <sub>3</sub>
8'-H	7'-H
6'-H	5'-OCH <sub>3</sub> , 7'-H
3'-H	2'-CH <sub>3</sub> , 4'-OCH <sub>3</sub>
7'-H	6'-H, 8'-H

HPLC-ESI-MS (Scan,  $t_R = 20.1$  min);  $m/z$  (%): 406.4  $[M + H]^+$  (100).

HPLC-ESI-MS/MS (DAU, 25 eV);  $m/z$  (%): 406.3  $[M + H]^+$  (100), 391.3  $[M + H - CH_3]^+$  (10).

HPLC-CD (254 nm,  $t_R = 25.2$ ): positives CD-Signal.

HPLC-CD (Scan,  $t_R = 25.2$  min):  $\Delta\epsilon_{213} +12.5$ ,  $\Delta\epsilon_{229} -0.8$ ,  $\Delta\epsilon_{244} +4.8$ ,  $\Delta\epsilon_{253} +3.0$ ,  $\Delta\epsilon_{269} +1.7$ ,  $\Delta\epsilon_{308} -2.3$ .

## 5.2 HPLC-NMR- und HPLC-CD-Vergleich von Ppropfreis- und *A. heyneanus*-Blattextrakt

Die HPLC-NMR-Messungen an einem Blattextrakt von *A. heyneanus* wurden mit den in Kap. 5.1.1 (Seite 132) beschriebenen Methoden und Parametern durchgeführt. Die für **64** in *A. heyneanus* ermittelten <sup>1</sup>H-NMR-Daten stimmten mit denen in Kap. 5.1.1 überein.

Die HPLC-CD-Messungen wurden mit C<sub>18</sub>-Säulen (250 x 4.6 mm I.D.) bei einem Fluß von 1.1 ml/min durchgeführt. Laufmittel (A) war 0.01% TFA in H<sub>2</sub>O, Laufmittel (B) MeCN. Der binäre HPLC-Gradient war wie folgt:  $t = 0$  min 5% (B),  $t = 20$  min 55% (B). Die Probenaufgabemenge betrug 20 µl.

Pfropfreis: HPLC-CD (254 nm,  $t_R = 16.5$  min): positives CD-Signal.

*A. heyneanus*: HPLC-CD (254 nm,  $t_R = 16.5$  min): positives CD-Signal.

## 6 Phytochemische Analytik mit synthetischen Standards

### 6.1 Untersuchung von *A. affinis tectorius* (Gunung Benom), *A. tectorius* (Johor Bahru) und *A. tectorius* (Khao Lak)

Jeweils 1 g Zweigmaterial der *Ancistrocladus*-Aufsammlungen von Gungung Benom, Johor Bahru (beide Malaysia) und Khao Lak (Thailand) wurden 2 h bei Raumtemp. in 50 ml MeCN/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) bei pH 3 (TFA) mazerisiert. Nach Filtration und Gefriertrocknung erhielt man jeweils ca. 30 mg Rohextrakt, von dem jeweils 1 mg in MeCN/H<sub>2</sub>O (1:9 v/v) gelöst wurde. Nach Filtration über Membranfilter (0.2 µm) wurde die Probe ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

Ein synthetischer Standard von (*P*)-**71**\* wurde in MeCN/H<sub>2</sub>O (1:9 v/v) in einer Konzentration von 5 µg/ml gelöst und nach Filtration über Membranfilter (0.2 µm) ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

HPLC-MS-Messungen wurden mit C<sub>18</sub>-Säulen (250 x 4.6 mm I.D.) bei einem Fluß von 0.2 ml/min durchgeführt. Laufmittel (A) war 0.01% TFA in D<sub>2</sub>O und Laufmittel (B) MeCN. Der binäre HPLC-Gradient war wie folgt:  $t = 0$  min 10% (B),  $t = 15$  min 25% (B),  $t = 25$  min 28% (B). Die Probenaufgabemenge betrug 5 µl.

#### 6.1.1 HPLC-ESI-MS-Untersuchung von (*P*)-Ancistrocladein [(*P*)-**71**]

HPLC-ESI-MS (Scan,  $t_R = 18.8$  min);  $m/z$  (%): 404.4 [M + H]<sup>+</sup> (100).

HPLC-ESI-MS/MS (DAU, 30 eV);  $m/z$  (%): 404.4 [M + H]<sup>+</sup> (100), 388.9 [M + H - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>.

#### 6.1.2 HPLC-ESI-MS-Untersuchung der Extraktproben

*A. aff. tectorius* (Johor Bahru): HPLC-ESI-MS (Scan,  $t_R = 18.8$  min);  $m/z$  (%): 404.4 [M + H]<sup>+</sup> (100).

In einem HPLC-MS/MS-Koelutionsexperiment zeigte der Peak bei  $t_R = 18.8$  min ein identisches Retentions- und Fragmentierungsverhalten wie eine Referenzprobe von (*P*)-**71**.

\* Ich danke J. Mies und Dr. W. Saeb für eine Referenzprobe von (*P*)-**71**.<sup>[313]</sup>

In den Extrakten der in Khao Lak und Johor Bahru aufgesammelten Proben wurde mit HPLC-MS kein Peak mit  $m/z$  404.4 beobachtet (vgl. Abb. 63, Seite 88).

## 6.2 Untersuchung von *T. peltatum*, *D. thollonii*, *H. dawei* und *A. abbreviatus* auf Jozipeltin A (77) und Jozimin D (78)

Jeweils 5 g Zweigmaterial von *T. peltatum*, *D. thollonii*, *H. dawei* und *A. abbreviatus* wurden 2 h bei Raumtemp. in 100 ml MeCN/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) bei pH 3 (TFA) mazerisiert. Nach Filtration und Gefriertrocknung erhielt man zwischen 200 und 500 mg Rohextrakt, von denen jeweils 2 mg in MeCN/H<sub>2</sub>O (1:9 v/v) gelöst wurden. Die Lösungen wurden nach Filtration über Membranfilter (0.2 µm) ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

Synthetische Standards von Jozipeltin A (77) und Jozimin D (78)\* wurden in MeCN/H<sub>2</sub>O (1:9 v/v) in einer Konzentration von 5 µg/ml gelöst und nach Filtration über Membranfilter (0.2 µm) ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

HPLC-MS-Messungen wurden mit C<sub>18</sub>-Säulen (150 x 2.1 mm I.D.) bei einem Fluß von 0.2 ml/min durchgeführt. Laufmittel (A) war 0.01% TFA in D<sub>2</sub>O und Laufmittel (B) MeCN. Der binäre HPLC-Gradient war wie folgt: t = 0 min 10% (B), t = 25 min 50% (B). Die Probenaufgabemenge betrug 5 µl. Die Untersuchung der Extrakte erfolgte im SRM-Modus.

### 6.2.1 Jozipeltin A (77)

HPLC-ESI-MS (Scan,  $t_R$  = 15.3 min);  $m/z$  (%): 379.4 [M + 2H]<sup>2+</sup> (100).

HPLC-ESI-MS/MS (DAU, 20 eV);  $m/z$  (%): 379.4 [M + 2H]<sup>2+</sup> (100), 361.3 [M + 2H - 2H<sub>2</sub>O]<sup>2+</sup> (40), 352.7 [M + 2H - 2H<sub>2</sub>O - NH<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> (50).

Im SRM-Experiment (20 eV, 379.4 → 352.7) waren 25 ng einer Referenzprobe von 77 mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von ca. 350 detektierbar. In den getesteten Extrakten wurde 77 im SRM-Modus nicht gefunden.

### 6.2.2 Jozimin D (78)

HPLC-ESI-MS (Scan,  $t_R$  = 17.6 min);  $m/z$  (%): 363.4 [M + 2H]<sup>2+</sup> (100).

HPLC-ESI-MS/MS (DAU, 20 eV);  $m/z$  (%): 682.2 [M + H - C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N]<sup>+</sup> (16), 363.2 [M + 2H]<sup>2+</sup> (100), 354.5 [M + 2H - NH<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> (64), 341.9 [M + 2H - C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N]<sup>2+</sup> (14).

\* Ich danke Dr. W. Saeb für Referenzproben von 77<sup>[271]</sup> und 78.<sup>[299]</sup>

Im SRM-Experiment (20 eV, 363.4 → 354.5) waren 25 ng einer Referenzprobe von **78** mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von *ca.* 1500 detektierbar. In den getesteten Extrakten wurde **78** im SRM-Modus nicht gefunden.

### 6.3 Untersuchung von *Murraya koenigii* auf Murrastifolin-F (80)

*Ca.* 1 g Wurzelmaterial von *Murraya koenigii* wurde nach Gefriertrocknung mit Aceton im Ultraschallbad bei Raumtemp. unter Lichtausschluß extrahiert. Nach einer Filtration über Papierfilter wurde das Lösungsmittel i. Vak. bei Raumtemp. entfernt und der erhaltene Rohextrakt an Kieselgel (Petrolether/Diethylether 3:1 v/v) vorfraktioniert. Nach DC-Kontrolle erhielt man 8.9 mg einer Murrastifolin-F-haltigen Fraktion, die in 8.9 ml MeCN gelöst und nach Filtration über Membranfilter (0.2 µm) zur Analyse eingesetzt wurde.\*

Alle chromatographischen Trennungen wurden mit Symmetry-C<sub>18</sub>-Säulen (*Waters*) durchgeführt. Für die HPLC-NMR war Laufmittel (A) 0.01% TFA in D<sub>2</sub>O und Laufmittel (B) MeCN. Der binäre HPLC-Gradient war wie folgt: t = 0 min 60% (B), t = 10 min 80% (B). Für die HPLC-MS wurde D<sub>2</sub>O durch H<sub>2</sub>O ersetzt.

Der Fluß für die HPLC-NMR betrug 1.0 ml/min bei Verwendung von C<sub>18</sub>-Säulen (250 x 4.6 mm I.D.). Die Probenaufgabemenge betrug im Regelfall 100 µl.

HPLC-MS-Messungen wurden mit C<sub>18</sub>-Säulen (150 x 2.1 mm I.D.) bei einem Fluß von 0.2 ml/min durchgeführt. Die Probenaufgabemenge betrug im Regelfall 5 µl.

#### 6.3.1 Murrastifolin-F (80)

HPLC-<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, *t<sub>R</sub>* = 18.5 min): δ = 2.54 (s, 3H, 3'-CH<sub>3</sub>), 4.11 (s, 3H, 1-OCH<sub>3</sub>), 6.00 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 5-H), 6.57 (dd, *J* = 7.3, 7.6 Hz, 1H, 6-H), 6.71 (m, 1H, 8'-H), 6.81 (s, 1H, 2'-H), 7.06 (s, 1H, 2-H), 7.20 (dd, *J* = 7.3, 7.6 Hz, 1H, 7-H), 7.22 (m, 2H, 6'-H und 7'-H), 7.48 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 8-H), 7.74 (s, 1H, 4'-H), 8.22 (m, 1H, 5'-H).

Die Zuordnung der Signale erfolgte in Anlehnung an Literaturdaten.<sup>[303,304]</sup>

HPLC-ESI-MS (Scan, *t<sub>R</sub>* = 14.8 min); *m/z* (%): 421.4 [M + H]<sup>+</sup> (100).

HPLC-ESI-MS/MS (DAU, 30 eV); *m/z* (%): 421.4 [M + H]<sup>+</sup> (12), 406.0 [M + H - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (18), 390.9 [M + H - 2 CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (16), 210.2 [C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>NO]<sup>+</sup> (78), 181.9 (100).

\* Ich danke Dr. S. Tasler für einen Rohextrakt von *M. koenigii*. Für Details zur Extraktvorbereitung siehe Lit.<sup>[303]</sup>

In einem HPLC-MS/MS-Koelutionsexperiment zeigte der Peak bei  $t_R = 14.8$  min ein identisches Retentions- und Fragmentierungsverhalten wie eine Referenzprobe von **80**.\*

### 6.3.2 Murrayafolin-A (79)

HPLC- $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $t_R = 10.5$  min):  $\delta = 2.49$  (s, 3H, 3-CH<sub>3</sub>), 3.98 (s, 3H, 1-OCH<sub>3</sub>), 6.84 (s, 1H, 2-H), 7.16 (dd,  $J = 7.3, 7.4$  Hz, 1H, 6-H), 7.39 (dd,  $J = 7.3, 7.3$  Hz, 1H, 7-H), 7.50 (m, 2 H, 4-H und 8-H), 8.01 (d,  $J = 7.3$ , 1 H, 5-H).

Die Zuordnung der Signale erfolgte in Anlehnung an Literaturdaten.<sup>[303]</sup>

---

\* Ich danke Dr. S. Tasler für eine Referenzprobe von **80**.<sup>[304]</sup>

**A Erstellte HPLC-NMR-Pulsprogramme****A 1 WET-ROESY**

```
;wetroesytp.lcz  
;avance-version  
;2D ROESY with cw spinlock for mixing  
;phase sensitive using TPPI  
;WET solvent suppression with shape pulse  
; and 13C decoupling on f2 during WET and AQ  
;M. Wohlfarth, M.Heubes  
; feat. A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson 63, 207-213 (1985)
```

```
#include <Avance.incl>
```

```
#include <Grad.incl>
```

```
define delay WETWAIT
```

```
"d0=3u"
```

```
"d11=30m"
```

```
"d12=20u"
```

```
"d13=3u"
```

```
"d16=2m"
```

```
"WETWAIT=10m-d16-d12"
```

```
1 ze
```

```
  d11 p12:f2
```

```
2 d1 do:f2
```

```
  50u UNBLKGRAD
```

```
  d12 p10:f1
```

```
  d13 cpd2:f2
```

```
  (p11:sp7 ph5):f1
```

```
  4u
```

```
  p16:gp1
```

```
  d16 p10:f1
```

```
  (p11:sp8 ph6):f1
```

```
  4u
```

```
  p16:gp2
```

```
  d16 p10:f1
```

```
  (p11:sp9 ph6):f1
```

```
  4u
```

```
  p16:gp3
```

```
  d16 p10:f1
```

```
  (p11:sp10 ph6):f1
```

```
  4u do:f2
```

```
  p16:gp4
```

```
  d16
```

```

WETWAIT pl1:f1
d12 BLKGRAD
3 d12 pl1:f1
  p1 ph1
  d0
  d12 pl11:f1
  p15 ph2
  go=2 ph31 cpd2:f2
  d11 wr #0 if #0 id0 ip1 zd do:f2
  lo to 3 times td1
exit

```

```

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph2=0 2 0 2 1 3 1 3
ph5=0
ph6=1
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

```

```

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p111: f1 channel - power level for ROESY-spinlock
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p12: f2 channel - power level for decoupling
;p15: f1 channel - pulse for ROESY spinlock
;sp1: f1 channel - shaped pulse
;      powerlevel for 90 degree pulse
;sp7: f1 channel - shaped pulse
;sp8: f1 channel - shaped pulse
;sp9: f1 channel - shaped pulse
;sp10:f1 channel - shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse           [2msec]
;d0 : incremented delay (2D)             [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O                 [30msec]
;d12: delay for power switching          [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery [2msec]
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;in0:  $1/(2 * SW) = DW$ 
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 32
;td1: number of experiments
;MC2: TPPI

;use gradient ratio:  gp1 : gp2 : gp3 : gp4
;                      80 : 40 : 20 : 10

```

**A 2 WET-NOESY**

```
; wetnoesygptp
; avance-version
; 2D homonuclear correlation via dipolar coupling
; dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange.
; phase sensitive using TPPI
; with gradient pulses in mixing time
; solvent suppression using WET
; Michael Wohlfarth, 1999
; J. Jeener, B.H. Meier, P. Bachmann & R.R. Ernst, J. Chem. Phys. 71,
; 4546-4553 (1979)
; R. Wagner & S. Berger, J. Magn. Reson. 123 A, 229-232 (1996)
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
```

```
define delay WETWAIT
```

```
"d11=30m"
```

```
"d12=20u"
```

```
"d13=3u"
```

```
"d16=2m"
```

```
"d0=3u"
```

```
"d20=d8*0.5-p16-d16"
```

```
"WETWAIT=10m-d16-d12"
```

```
1 ze
```

```
  d11 p12:f2
```

```
2 d1 do:f2
```

```
  50u UNBLKGRAD
```

```
  d12 p10:f1
```

```
  d13 cpd2:f2
```

```
  (p11:sp7 ph5):f1
```

```
  4u
```

```
  p16:gp1
```

```
  d16 p10:f1
```

```
  (p11:sp8 ph6):f1
```

```
  4u
```

```
  p16:gp2
```

```
  d16 p10:f1
```

```
  (p11:sp9 ph6):f1
```

```
  4u
```

```
  p16:gp3
```

```
  d16 p10:f1
```

```
  (p11:sp10 ph6):f1
```

```
  4u do:f2
```

```
  p16:gp4
```

```
  d16
```

```

WETWAIT p1:f1
d12 BLKGRAD
3 d12 p1:f1
p1 ph1
d0
p1 ph2
d20 UNBLKGRAD
p22:gp5
d16
3u
(p2 ph4):f1
3u
p22:gp6
d16
d20 BLKGRAD
p1 ph3
go=2 ph31
d1 wr #0 if #0 id0 ip1 zd
lo to 2 times td1
exit

```

```

ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2 1 1 3 3
ph4=0
ph5=0
ph6=1
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3

```

```

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p112 : f2 channel - power level for decoupling
;sp1: f1 channel - shaped pulse
;      powerlevel for 90 degree pulse
;sp7: f1 channel - shaped pulse
;sp8: f1 channel - shaped pulse
;sp9: f1 channel - shaped pulse
;sp10:f1 channel - shaped pulse
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p22: homospoil/gradient pulse          [1 msec]
;d0 : incremented delay (2D)           [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d8 : mixing time
;d13: short delay
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d20: d8*0.5 - p16 - d16
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 2

```

---

```
;NS: 2 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: TPPI

;use gradient ratio:  gp1 : gp2 : gp3 : gp4
;                   80 : 40 : 20 : 10

;use gradient ratio:  gp 5 : gp 6
;                   40 : -40

;for z-only gradients:
;gpz1: 40%
;gpz2: -40%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
```

**A 3 WET-COSY**

```
;wetcosygp (cosygp mit WET)
;M. Wohlfarth
;avance-version
;2D homonuclear shift correlation
;using gradient pulses for selection
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
```

```
define delay WETWAIT
```

```
"d0=3u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=3u"
"d16=4m"
```

```
"WETWAIT=10m-d16-d12"
```

```
1 ze
  d11 p12:f2
2 d1 do:f2
  50u UNBLKGRAD
  d12 p10:f1
  d13 cpd2:f2
  (p11:sp7 ph5):f1
  4u
  p16:gp1
  d16 p10:f1
  (p11:sp8 ph6):f1
  4u
  p16:gp2
  d16 p10:f1
  (p11:sp9 ph6):f1
  4u
  p16:gp3
  d16 p10:f1
  (p11:sp10 ph6):f1
  4u do:f2
  p16:gp4
  d16
  WETWAIT p11:f1
  d12 BLKGRAD
3 d12 p11:f1
  p1 ph1
  d0
  50u UNBLKGRAD
  p22:gp5
  d16
  p0 ph2
```

```
d13
p22:gp6
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d1 wr #0 if #0 id0 zd
lo to 2 times td1
exit

ph1=0 2
ph2=0 0 2 2
ph5=0
ph6=1
ph31=0 2

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p0 : f1 channel - 20 to 90 degree high power pulse
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p12: powerlevel for decoupling
;sp1: f1 channel - shaped pulse
;      powerlevel for 90 degree pulse
;sp7: f1 channel - shaped pulse
;sp8: f1 channel - shaped pulse
;sp9: f1 channel - shaped pulse
;sp10:f1 channel - shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p22: homospoil/gradient pulse
;d0 : incremented delay (2D)                [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d13: short delay                            [3 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;in0:  $1/(1 * SW) = 2 * DW$ 
;nd0: 1
;NS: 1 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: QF

;use gradient ratio:  gp1 : gp2 : gp3 : gp4
;                      80 : 40 : 20 : 10
;use gradient ratio:  gp 5 : gp 6
;                      10 : 10
;for z-only gradients:
;gpz1: 10%
;gpz2: 10%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
```

## LITERATUR

- [1] L. Harvey, *Drug Discovery Today* **2000**, *5*, 294-299.
- [2] G. M. Cragg, D. J. Newman, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 52-60.
- [3] *Pharma Business* **2000**, *5*, 58-71.
- [4] T. Henkel, R. M. Brunne, H. Müller, R. Reichel, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 688-691; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 643-647.
- [5] R. Lahana, *Drug Discovery Today* **1999**, *4*, 447-448.
- [6] P. L. Myers, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 701-707.
- [7] R. Verpoorte, *Drug Discovery Today* **1998**, *3*, 232-238.
- [8] J. Davies, *Trends Genet.* **1999**, *15*, M2-M5.
- [9] A. Roessner, A. L. Scott, *Annu. Rev. Microbiol.* **1996**, *50*, 467-490.
- [10] L. Tang, S. Shah, L. Chung, J. Carney, L. Katz, C. Khosla, B. Julien, *Science* **2000**, *287*, 640-642.
- [11] L. Harvey, P. G. Waterman, *Curr. Opin. Drug Discov.* **1998**, *1*, 71-76.
- [12] W. Strohl, *Drug Discovery Today* **2000**, *5*, 39-41.
- [13] P. A. Keifer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 34-41.
- [14] T. M. Kutchan, H. Dittich, D. Bracher, M. H. Zenk, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5945-5954.
- [15] H. Becker, M. Sauerwein in *Secondary Products from Plant Tissue Culture*, Bd. 30 (Hrsg.: B.V. Charlwood, M.J.C. Rhodes), Clarendon Press, Oxford, **1990**, S. 43-57.
- [16] G. Bringmann, F. Pokorny in *The Alkaloids*, Bd. 46 (Hrsg.: G.A. Cordell), Academic Press, New York, **1995**, S. 127-171.
- [17] T. R. Govindachari, P. C. Parthasarathy, *Tetrahedron* **1971**, *27*, 1013-1026.
- [18] G. François, G. Timperman, T. Steenackers, L. Aké Assi, J. Holenz, G. Bringmann, *Parasitol. Res.* **1997**, *83*, 673-679.
- [19] G. François, G. Bringmann, J. D. Phillipson, L. Aké Assi, C. Dochez, M. Rübenacker, C. Schneider, M. Wéry, D. C. Warhurst, G. C. Kirby, *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1461-1464.
- [20] Y. F. Hallock, K. P. Manfredi, J. W. Blunt, J. H. Cardellina II, M. Schäffer, K.-P. Gulden, G. Bringmann, A. Q. Lee, J. Clardy, G. François, M. R. Boyd, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6349-6355.

- [21] G. Bringmann, A. Hamm, C. Günther, M. Michel, R. Brun, V. Mudogo, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1465-1470.
- [22] 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, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1740-1745.
- [23] 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, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 677-683.
- [24] T. R. Govindachari, P. C. Parthasarathy, *Heterocycles* **1977**, *7*, 661-684.
- [25] H. K. Desai, D. H. Gawad, T. R. Govindachari, B. S. Joshi, N. Kamat, J. D. Modi, P. C. Parthasarathy, J. Radhakrishnan, M. N. Shanbhag, A. R. Sidhaye, N. Wiswanathan, *Indian J. Chem.* **1973**, *11*, 840-842.
- [26] G. Bringmann, D. Koppler, B. Wiesen, G. François, A. S. Sankara Narayanan, M. R. Almeida, H. Schneider, U. Zimmermann, *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1405-1410.
- [27] K. P. Manfredi, M. Britton, V. Vissieche, L. K. Pannell, *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 854-859.
- [28] N. H. Anh, A. Porzel, H. Rippberger, G. Bringmann, M. Schäffer, R. God, T. V. Sung, G. Adam, *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1287-1291.
- [29] G. Bringmann, C. Günther, S. Busemann, M. Schäffer, J. Olowokudejo, *Phytochemistry* **1998**, *47*, 37-43.
- [30] G. Bringmann, C. Günther, W. Saeb, J. Mies, A. Wickramasinghe, V. Mudogo, R. Brun, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1333-1337.
- [31] C.-P. Tang, Y.-P. Yang, Q.-X. Zhong, H.-M. Wu, Y. Ye, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1384-1387.
- [32] G. Bringmann, F. Pokorny, M. Stäblein, M. Schäffer, L. Aké Assi, *Phytochemistry* **1993**, *33*, 1511-1515.
- [33] G. Bringmann, G. François, L. Aké Assi, J. Schlauer, *Chimia* **1998**, *52*, 18-28.
- [34] G. Bringmann, M. Rückert, J. Schlauer, M. Herderich, *J. Chromatogr. A* **1998**, *810*, 231-236.
- [35] G. Bringmann, M. Rückert, W. Saeb, V. Mudogo, *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37*, 98-102.
- [36] G. Bringmann, C. Günther, J. Schlauer, M. Rückert, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2805-2811.
- [37] G. Bringmann, M. Rückert, K. Messer, O. Schupp, A. M. Louis, *J. Chromatogr. A* **1999**, *837*, 267-272.

- [38] G. Bringmann, K. Messer, M. Wohlfarth, J. Kraus, K. Dumbuya, M. Rückert, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2678-2686.
- [39] K. Albert, *J. Chromatogr. A* **1995**, *703*, 123-147.
- [40] K. Albert, *J. Chromatogr. A* **1999**, *856*, 199-211.
- [41] A. Buske, S. Busemann, J. Mühlbacher, J. Schmidt, A. Porzel, G. Adam, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1079-1086.
- [42] G. Bringmann, J. Schlauer, H. Rischer, M. Wohlfarth, R. Haller, S. Bär, R. Brun, *Pharm. Pharmacol. Lett.* im Druck.
- [43] G. Bringmann, M. Rübenacker, R. Weirich, L. Aké Assi, *Phytochemistry* **1992**, *31*, 4019-4024.
- [44] A. Buske in *Phytochemische Untersuchungen der Afrikanischen Euphorbiaceen Antidesma membranaceum und Antidesma venosum*, Rhombos-Verlag, Berlin, **2000**.
- [45] G. Wolf in *Isotopes in Biology* (Hrsg.: H. Booker, D.A. Bromley, N. DeClaris, W. Magnus, A. Nason, A. Shenitzer), Academic Press, New York, **1963**.
- [46] E. A. Adelberg, *Bacteriol. Rev.* **1953**, *17*, 253-267.
- [47] S. A. Brown, L. A. Wetter, *Progr. Phytochem.* **1972**, *3*, 1-45.
- [48] M. Calvin, M. M. Benson, *Science* **1948**, *107*, 476-480.
- [49] E. Leete, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *98*, 6321-6325.
- [50] E. Leete, K. N. Juneau, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 5614-5641.
- [51] V. Banthorpe, B. B. Charlwood, M. J. O. Francis, *Chem. Rev.* **1972**, *72*, 115-155.
- [52] H. G. Floss, J. M. Beale, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 147-179; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 146-178.
- [53] E. Leete, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3438-3441.
- [54] E. Leete, *Rev. Latinoamer. Quim.* **1980**, *11*, 8-16.
- [55] H. Ziegler, W. Koelzer in *Strahlen und Strahlenschutz*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, **1987**.
- [56] U. Séquin, I. A. Scott, *Science* **1974**, *186*, 101-107.
- [57] E. Leete, G. B. Bodem, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 6321-6325.
- [58] U. H. Maier, W. Rödl, B. Deus-Neumann, M. H. Zenk, *Phytochemistry* **1999**, *52*, 373-382.
- [59] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh in *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, 4. Aufl., Thieme-Verlag, Stuttgart, **1991**.

- [60] J. Sonnenbichler, I. Sonnenbichler, D. Schwarz, *Phytochemistry* **1997**, *44*, 267-269.
- [61] J. Kobayashi, T. Kubota, T. Endo, M. Tsuda, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 134-142.
- [62] R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, V. Wray, G. Höfle, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 309-313.
- [63] J. C. Vederas, *Nat. Prod. Rep.* **1987**, 277-337.
- [64] M. Tanabe, H. Seto, L. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 2157-2158.
- [65] G. McInnes, D. G. Smith, L. C. Vining, J. L. C. Wright, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1968**, 1669-1670.
- [66] M. Gill, A. Gimenez, A. G. Jhingran, N. M. Milanovic, A. R. Palfreyman, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3431-3436.
- [67] E. de Jesus, R. M. Horak, P. S. Steyn, R. Vleggaar, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 716-718.
- [68] E. Leete, A. Muir, G. H. N. Towers, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 2635-2638.
- [69] A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2102-2104.
- [70] J. Buddrus, H. Bauer, *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 642-659; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1987**, *26*, 625-640.
- [71] N. E. Mackenzie, R. L. Baxter, A. I. Scott, P. E. Fagerness, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, *3*, 145-147.
- [72] W. Eisenreich, E. Kupfer, W. Weber, A. Bacher, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 867-874.
- [73] P. J. Keller, L. V. Quang, A. Bacher, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2505-2507.
- [74] J. K. Chan, R. N. Moore, T. T. Nakashima, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3334-3336.
- [75] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Rückert, J. Schlauer, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8445-8448.
- [76] J. Mason, *Chemistry in Britain* **1983**, 654-658.
- [77] S. Berger, S. Braun, H.-O. Kalinowski in *NMR Spectroscopy of the Non-Metallic Elements*, John Wiley & Sons, Chichester, **1999**.
- [78] K. Kanamori, J. Roberts, *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 35-41.
- [79] K. A. Farley, G. S. Walker, G. E. Martin, *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35*, 671-679.
- [80] R. E. Hurd, B. K. John, *J. Magn. Reson.* **1991**, *91*, 648-653.
- [81] F. Mesnard, N. Azaroual, D. Marty, M. A. Fliniaux, R. J. Robinds, G. Vermersch, J.-P. Monti, *Planta* **2000**, *210*, 446-453.

- [82] A. Iwanow, R. E. Hill, B. G. Sayer, I. D. Spenser, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1840-1841.
- [83] D. Voet, J. G. Voet in *Biochemie* (Hrsg.: A. Maelicke, W. Müller-Esterl), Wiley VCH, Weinheim, **1994**.
- [84] A. Römer, R. B. Herbert, *Z. Naturforsch. C* **1982**, *37*, 1070-1074.
- [85] S. R. Maple, A. Allerhand, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 56-61.
- [86] J. Staunton, *Planta Med.* **1979**, *36*, 1-20.
- [87] J. M. Gulland, R. Robinson, *J. Chem. Soc.* **1923**, 980-998.
- [88] K. W. Bentley, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 367-388.
- [89] K. W. Bentley, *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 341-362.
- [90] G. Bringmann, J. R. Jansen, *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, *11*, 2116-2125.
- [91] G. Bringmann, J. R. Jansen, *Heterocycles* **1986**, *24*, 2407-2410.
- [92] A. Montagnac, A. Hadi, A. Hamid, F. Remy, M. Pais, *Phytochemistry* **1995**, *39*, 701-704.
- [93] G. Bringmann, C. Schneider, L. Aké Assi, *Planta Med. (Suppl. 2)* **1991**, *57*, 10.
- [94] L. Borsub, Y. Thebtaranoth, C. Sadavongvivad, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *2*, 105-108.
- [95] G. Bringmann, *Habilitationsschrift*, Universität Münster, **1984**.
- [96] G. Bringmann, C. Schneider, F. Pokorny, H. Lorenz, H. Fleischmann, A. S. Sankaranarayanan, M. R. Almeida, T. R. Govindachari, L. Aké Assi, *Planta Med. (Suppl.)* **1993**, *59*, 623-624.
- [97] G. Bringmann, J. Schlauer, K. Wolf, H. Rischer, U. Buschbom, A. Kreiner, F. Thiele, M. Duschek, L. Aké Assi, *Carniv. Pl. Newslett.* **1999**, *28*, 7-13.
- [98] G. Bringmann, F. Pokorny, M. Stäblein, T. R. Govindachari, M. R. Almeida, S. M. Ketkar, *Planta Med. (Suppl. 2)* **1991**, *57*, 98.
- [99] G. Bringmann, M. Rückert, M. Wenzel, C. Günther, K. Wolf, J. Holenz, J. Schlauer, *Pharm. Pharmacol. Lett.* **1998**, *8*, 5-7.
- [100] G. Bringmann, F. Pokorny, M. Wenzel, K. Wurm, C. Schneider, *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **1996**, *39*, 29-38.
- [101] K. Wurm, *Diplomarbeit*, Universität Würzburg, **1993**.
- [102] M. Wenzel, *Dissertation*, Universität Würzburg, **1999**.
- [103] G. Bringmann, M. Wenzel, H. Bringmann, J. Schlauer, L. Aké Assi, *Der Palmengarten* **1996**, *60*, 32-37.

- [104] G. Bringmann, H. Rischer, J. Schlauer, K. Wolf, A. Kreiner, A. Duschek, L. Aké Assi, *Carniv. Pl. Newslett.*, im Druck.
- [105] G. Bringmann, M. Wenzel, H. Bringmann, L. Aké Assi, F. Haas, J. Schlauer, *Carniv. Pl. Newslett.* **2001**, *30*, 15-21.
- [106] J. Bruneton, A. Bouquet, A. Fournet, A. Cavé, *Phytochemistry* **1976**, *15*, 817-818.
- [107] M. Lavault, J. Bruneton, *Planta Med. (Suppl.)* **1980**, 17-21.
- [108] S. W. Hanson, M. Crawford, D. P. J. Thanasingh, *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1162-1164.
- [109] R. Durand, M. H. Zenk, *Tetrahedron Lett.* **1971**, 3009-3012.
- [110] R. Durand, M. H. Zenk, *Phytochemistry* **1974**, *13*, 1483-1492.
- [111] R. Hegnauer, *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1519-1535.
- [112] M. H. Zenk, E. Leistner, *Z. Naturforsch. B* **1967**, *22*, 460.
- [113] M. Rückert in *Entwicklung von Verfahren zur Charakterisierung komplexer Stoffgemische mittels HPLC-NMR und HPLC-ESI-MS/MS am Beispiel tropischer Lianen*, Tectum Verlag, Marburg, **1998**.
- [114] R. Thiericke, J. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 265-289.
- [115] M. Wohlfarth, *Diplomarbeit*, Universität Würzburg, **1997**.
- [116] W. Carreras, R. Pieper, C. Khosla in *Topics in Current Chemistry* Bd. 188 (Hrsg.: J. Rohr), Springer Verlag, Berlin, **1997**, S. 86-126.
- [117] G. E. Evans, J. Staunton, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1988**, 755-761.
- [118] A. Townsend, S. B. Christensen, K. Trautwein, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3868-3869.
- [119] G. Bringmann, H. Rischer, M. Wohlfarth, J. Schlauer, L. Aké Assi, *Phytochemistry* **2000**, *53*, 339-343.
- [120] G. Bringmann, M. Rübenacker, J. R. Jansen, T. Geuder, L. Aké Assi, *Planta Med.* **1990**, *56*, 495-496.
- [121] G. Bringmann, T. Ortmann, M. Rübenacker, L. Aké Assi, *Planta Med. (Suppl. 2)* **1991**, *57*, 96.
- [122] G. Bringmann, W. Koch, D. Koppler, M. Rübenacker, L. Aké Assi, *Planta Med. (Suppl.)* **1993**, *59*, 621-622.
- [123] G. Bringmann, T. Ortmann, R. Zagst, B. Schöner, L. Aké Assi, C. Burschka, *Phytochemistry* **1992**, *31*, 4015-4018.

- [124] G. Bringmann, M. Rübenacker, P. Vogt, H. Busse, L. Aké Assi, K. Peters, H. G. von Schnering, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1691-1696.
- [125] G. Bringmann, M. Rübenacker, W. Koch, D. Koppler, T. Ortman, M. Schäffer, L. Aké Assi, *Phytochemistry* **1994**, *36*, 1057-1061.
- [126] G. Bringmann, M. Rübenacker, T. Geuder, L. Aké Assi, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3845-3847.
- [127] G. Bringmann, C. Günther, W. Saeb, J. Mies, R. Brun, L. Aké Assi, *Phytochemistry* **2000**, *54*, 337-346.
- [128] G. Bringmann, W. Saeb, R. God, M. Schäffer, G. François, K. Peters, E.-M. Peters, P. Proksch, K. Hostettmann, L. Aké Assi, *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1667-1673.
- [129] G. Bringmann in *African Genetic Resources for the Development of Pharmaceuticals and Agrochemicals* (Hrsg.: B.M. Abegaz, J.D. Connolly, M.H.H. Nkunya), University of Dar es Salaam Publications, Dar es Salaam, **1998**, S. 9-32.
- [130] G. Bringmann, M. Rübenacker, J. R. Jansen, D. Scheutzow, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 639-642.
- [131] G. Bringmann, J. R. Jansen, H. Reuscher, M. Rübenacker, K. Peters, H. G. von Schnering, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 643-646.
- [132] G. Bringmann, J. R. Jansen, H. Busse, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 803-809.
- [133] G. Bringmann, R. Zagst, B. Schöner, H. Busse, M. Hemmerling, C. Burschka, *Acta Cryst. C* **1991**, *47*, 1703-1705.
- [134] G. Bringmann, C. Kehr, U. Dauer, K.-P. Gulden, R. D. Haller, S. Bär, M. A. Isahakia, S. A. Robertson, K. Peters, *Planta Med. (Suppl.)* **1993**, 622-623.
- [135] M. Higa, K. Himeno, S. Yogi, K. Hokama, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 4366-4367.
- [136] G. S. Sidhu, A. V. B. Sankaram, S. M. Ali, *Indian J. Chem.* **1973**, *11*, 507-508.
- [137] B. Dinda, S. K. Das, A. K. Hajra, *Indian J. Chem.* **1995**, *34*, 525-528.
- [138] V. B. Sankaram, A. Srinivasarao, G. S. Sidhu, *Phytochemistry* **1976**, *15*, 237-238.
- [139] R. Cannon, V. Lojanapiwatna, C. L. Raston, W. Sinchai, A. H. White, *Aust. J. Chem.* **1980**, *33*, 1073-1093.
- [140] K. Likhitwitayawuid, R. Kaemawatawong, N. Ruangrunsi, J. Krungkrai, *Planta Med.* **1998**, *64*, 237-241.
- [141] M. Asano, J. Hase, *J. Pharm. Soc. Japan* **1943**, *63*, 410-411.
- [142] B. Kreher, A. Neszmely, H. Wagner, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 605-606.
- [143] T. Schölly, I. Kapetanidis, *Planta Med.* **1989**, *55*, 237-239.

- [144] P. Styles, N. F. Soffe, *J. Magn. Reson.* **1984**, *60*, 397-404.
- [145] P. Styles, N. F. Soffe, C. A. Scott, *J. Magn. Reson.* **1989**, *84*, 376-378.
- [146] M. Grüne, persönliche Mitteilung.
- [147] A. Buske, J. Schmidt, A. Porzel, G. Adam, *Phytochemistry* **1997**, *46*, 1385-1388.
- [148] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Grüne, J. Schlauer, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1253-1255; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1464-1466.
- [149] H. Rischer, *Dissertation*, Universität Würzburg, in Vorbereitung.
- [150] G. Bringmann, H. Rischer, M. Wohlfarth, J. Schlauer, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9905-9910.
- [151] F. Lottspeich, H. Zorbas in *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1998**.
- [152] M. Nadzan, K. L. Rhinehart Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4647-4654.
- [153] M. Kainosho, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 1031-1032.
- [154] G. Bringmann, J. Schlauer, H. Rischer, M. Wohlfarth, J. Mühlbacher, A. Buske, A. Porzel, J. Schmidt, G. Adam, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3691-3695.
- [155] G. Bringmann, C. Günther, J. Mühlbacher, M. D. L. P. Gunathilake, A. Wickramasinghe, *Phytochemistry* **2000**, *53*, 409-416.
- [156] W. F. Tinto, G. Blyden, W. F. Reynolds, S. McLean, *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1309-1313.
- [157] T. M. A. Alves, C. L. Zani, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 205-208.
- [158] E. Medina, G. Spiteller, *Chem. Ber.* **1979**, *112*, 376-383.
- [159] E. Medina, G. Spiteller, *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 538-545.
- [160] M. Yasue, N. Kawamura, *Chem. Pharm. Bull.* **1966**, *14*, 1444-1445.
- [161] J. Kapadia, B. D. Paul, J. V. Silverton, H. M. Fales, E. A. Sokolski, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6814-6820.
- [162] J. Reichling, R. Martin, B. Kemmerer, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* **1995**, *43*, 131-136.
- [163] J. Bourguignon, F. Rébeillé, R. Douce in *Serine and Glycine metabolism in higher plants* (Hrsg.: B.K. Singh), Marcel Dekker, Inc., New York, **1999**, S. 111-147.
- [164] L. H. Stickland, *Biochem. J.* **1934**, *28*, 1746-1759.
- [165] P. Dürre, J. R. Andreesen, *J. Gen. Microbiol.* **1982**, *128*, 1457-1466.
- [166] N. Watanabe, E. Niki, *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **1978**, *54*, 194-199.
- [167] N. Watanabe, E. Niki, S. Shimizu, *JEOL News* **1979**, *15A*, 2-5.

- [168] E. Bayer, K. Albert, M. Nieder, E. Grom, T. Keller, *J. Chromatogr.* **1979**, *186*, 497-507.
- [169] T. Kitayama, M. Janco, K. Ute, R. Niimi, K. Hatada, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1518-1522.
- [170] J. C. Lindon, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, *J. Chromatogr. B* **2000**, *748*, 233-258.
- [171] M. J. Shapiro, J. S. Gounarides, *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *35*, 153-200.
- [172] J. C. Lindon, J. K. Nicholson, J. R. Everett, *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* **1999**, *38*, 2-88.
- [173] A. Preiss, U. Sanger, N. Karfich, K. Levsen, *Anal. Chem.* **2000**, *73*, 992-998.
- [174] A. Ramos, H. Santos, *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* **1999**, *37*, 179-202.
- [175] A. Lommen, M. Godejohann, D. P. Venema, P. C. H. Hollmann, M. Spraul, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1793-1797.
- [176] S. C. Bobzin, S. Yang, T. P. Kasten, *J. Chromatogr. B* **2000**, *748*, 259-267.
- [177] J.-R. Ioset, J.-L. Wolfender, A. Marston, M. P. Gupta, K. Hostettmann, *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 137-142.
- [178] J.-L. Wolfender, K. Ndjoko, K. Hostettmann, *Current Org. Chem.* **1998**, *2*, 575-596.
- [179] J.-L. Wolfender, S. Rodriguez, K. Hostettmann, *J. Chromatogr. A* **1998**, *794*, 299-316.
- [180] U. G. Sidelmann, E. M. Lenz, M. Spraul, M. Hofmann, J. Troke, P. N. Sanderson, J. C. Lindon, I. D. Wilson, J. K. Nicholson, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 106-110.
- [181] U. G. Sidelmann, U. Braumann, M. Hofmann, M. Spraul, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, S. H. Hansen, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 607-612.
- [182] G. Schlotterbeck, L.-H. Tseng, H. Händel, U. Braumann, K. Albert, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1421-1425.
- [183] K. Albert, M. Dachtler, T. Glaser, H. Händel, T. Lackner, G. Schlotterbeck, S. Strohschein, L.-H. Tseng, U. Braumann, *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, *22*, 135-143.
- [184] K. Ndjoko, J.-L. Wolfender, E. Röder, K. Hostettmann, *Planta Med.* **1999**, *65*, 562-566.
- [185] K. Vogler, I. Klaiber, G. Roos, C. U. Walter, W. Hiller, P. Sandor, W. Kraus, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 175-178.
- [186] K. Pusecker, K. Albert, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* **1999**, *836*, 245-252.
- [187] E. Bayer, K. Albert, *J. Chromatogr.* **1984**, *312*, 91-97.
- [188] E. Garo, J.-L. Wolfender, K. Hostettmann, W. Hiller, S. Antus, S. Mavi, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 754-763.
- [189] B. Schmitt, B. Schneider, *Phytochemistry* **1999**, *52*, 45-53.

- [190] J. P. Shockcor, S. E. Unger, P. Savina, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *J. Chromatogr. B* **2000**, *748*, 269-279.
- [191] U. G. Sidelmann, A. W. Nicholls, P. E. Meadows, J. W. Gilbert, J. C. Lindon, I. D. Wilson, J. K. Nicholson, *J. Chromatogr. A* **1996**, *728*, 377-385.
- [192] J. D. Foxall, E. M. Lenz, J. C. Lindon, G. H. Neild, I. D. Wilson, J. K. Nicholson, *Ther. Drug Monit.* **1996**, *18*, 498-505.
- [193] D.R. Farrant, B. C. Cupid, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *16*, 1-5.
- [194] E. Bäcker, S. Thorbert, O. Rakotonirainy, E. C. Hallberg, A. Olling, M. Gustavsson, B. E. Samuelsson, B. Soussi, *Glycoconj. J.* **1999**, *16*, 45-58.
- [195] U. Koichi, R. Niimi, S. Hongo, H. Koichi, *Polym. J.* **1998**, *30*, 439-443.
- [196] M. Ludlow, D. Louden, A. Handley, S. Taylor, B. Wright, I. D. Wilson, *J. Chromatogr. A* **1999**, *857*, 89-96.
- [197] M. Rückert, M. Wohlfarth, G. Bringmann, *J. Chromatogr. A* **1999**, *840*, 131-135.
- [198] J. Dear, R. S. Plumb, B. C. Sweatman, P. S. Parry, A. D. Roberts, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, I. M. Ismail, *J. Chromatogr. B* **2000**, *748*, 295-309.
- [199] N. Mistry, A. D. Roberts, G. E. Tranter, P. Francis, I. Baryliski, I. M. Ismail, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2828-2843.
- [200] S. Strohschein, G. Schlotterbeck, J. Richter, M. Pursch, L.-H. Tseng, H. Händel, K. Albert, *J. Chromatogr. A* **1997**, *765*, 207-214.
- [201] D. Derome in *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Pergamon Press, Oxford, **1987**.
- [202] M. Spraul, M. Hofmann, P. Dvortsak, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 327-330.
- [203] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661-666.
- [204] S. Smallcombe, S. L. Patt, P. A. Keifer, *J. Magn. Reson. A* **1995**, *117*, 295-303.
- [205] T. Parella, P. Adell, F. Sanchez-Ferrando, A. Virgili, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 245-249.
- [206] B. Behnke, G. Schlotterbeck, U. Tallarek, S. Strohschein, L.-H. Tseng, T. Keller, K. Albert, E. Bayer, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1110-1115.
- [207] K. Albert, G. Schlotterbeck, L.-H. Tseng, U. Braumann, *J. Chromatogr. A* **1996**, *750*, 303-309.
- [208] P. Gfrörer, J. Schewitz, K. Pusecker, E. Bayer, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 315A-321A.

- [209] N. Wu, T. L. Peck, A. W. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3849-3857.
- [210] T. L. Peck, R. L. Magin, P. C. Lauterbur, *J. Magn. Reson. B* **1995**, *108*, 114-124.
- [211] R. Subramanian, W. P. Kelley, P. D. Floyd, Z. J. Tan, A. G. Webb, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5335-5339.
- [212] M. E. Lacey, Z. J. Tan, A. G. Webb, J. V. Sweedler, *J. Chromatogr. A* **2001**, *922*, 139-149.
- [213] M. E. Lacey, R. Subramanian, D. L. Olson, A. G. Webb, J. V. Sweedler, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3133-3152.
- [214] L. Griffiths, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4091-4095.
- [215] C. Horning, D. I. Carroll, I. Dzdic, K. D. Haegele, M. G. Horning, R. N. Stillwell, *J. Chromatogr.* **1974**, *99*, 13-21.
- [216] D. Zakett, R. G. Cooks, W. J. Fies, *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 129-133.
- [217] E. De Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant in *Mass Spectrometry, Principles and Application*, Paris, **1996**.
- [218] W. M. A. Niessen, *J. Chromatogr. A* **1999**, *856*, 179-197.
- [219] E. Huang, T. Wachs, J. Conboy, J. D. Henion, *Anal. Chem.* **1990**, *54*, 713A-725A.
- [220] P. Bruins, *Mass. Spectrom. Rev.* **1991**, *10*, 53-78.
- [221] B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Mass. Spectrom. Rev.* **1990**, *9*, 37-70.
- [222] W. M. A. Niessen, *J. Chromatogr. A* **1998**, *794*, 407-435.
- [223] R. B. Cole in *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, New York, **1997**.
- [224] C. Dass, *Current Org. Chem.* **1999**, *3*, 193-209.
- [225] R. D. Voyksner in *Electrospray Ionization Mass Spectrometry - Fundamentals, Instrumentation & Applications* (Hrsg.: R.B. Cole), 1. Aufl., John Wiley & Sons, New York, **1997**, S. 323-342.
- [226] E. Bayer, P. Gfrörer, C. Rentel, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1046-1049; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 938-942.
- [227] S. Strohschein, C. Rentel, T. Lacker, E. Bayer, K. Albert, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1780-1785.
- [228] J. Zweigenbaum, K. Heinig, S. Steinborner, T. Wachs, J. Henion, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2294-2300.

- [229] B. Tomer, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 297-328.
- [230] D. Wilson, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 534A-552A.
- [231] B. Scarfe, I. D. Wilson, M. Spraul, M. Hofmann, U. Braumann, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *Anal. Commun.* **1997**, *34*, 37-39.
- [232] S. Pullen, A. G. Swanson, M. J. Newman, D. S. Richards, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1003-1006.
- [233] I. Burton, J. R. Everett, M. J. Newman, F. S. Pullen, D. S. Richards, A. G. Swanson, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 1903-1912.
- [234] J. Dear, R. S. Plumb, B. C. Sweatman, J. Ayrton, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, I. M. Ismail, *J. Chromatogr. B* **2000**, *748*, 281-293.
- [235] S. H. Hansen, A. G. Jensen, C. Cornett, I. Bjornsdottir, S. Taylor, B. Wright, I. D. Wilson, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5235-5241.
- [236] D. Wilson, E. D. Morgan, R. Lafont, J. P. Shockcor, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, B. Wright, *Chromatographia* **1999**, *49*, 374-378.
- [237] G. Bringmann, C. Günther, M. Ochse, O. Schupp, S. Tasler in *Axially Chiral Biaryls, a Multi-Faceted Class of Stereochemically, Biosynthetically, and Pharmacologically Intriguing Secondary Metabolites*, Bd. 182 (Hrsg.: W. Herz, H. Falk, G.W. Kirby, R.E. Moore, C. Tamm), **2001**, im Druck.
- [238] A. Koslowski, N. Sreerama, R. W. Woody in *Circular Dichroism - Principles and Application* (Hrsg.: N. Berova, K. Nakanishi, R.W. Woody), 2. Aufl., Wiley VCH, New York, **2000**, S. 55-95.
- [239] E. Zubritsky, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 545A-550A.
- [240] H. Nobuyuki in *Circular Dichroism - Principles and Applications* (Hrsg.: N. Berova, K. Nakanishi, R.W. Woody), 2. Aufl., Wiley VCH, New York, **2000**, S. 431-458.
- [241] P. Salvadori, L. Di Bari, G. Pescitelli in *Circular Dichroism - Principles and Applications* (Hrsg.: N. Berova, K. Nakanishi, R.W. Woody), 2. Aufl., Wiley VCH, New York, **2000**, S. 797-814.
- [242] J. Kobayashi, K. Kanzaki, S. Katayama, K. Ohashi, H. Okada, S. Ikegami, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 1410-1415.
- [243] K. Takatori, S. Toyama, S. Fujii, M. Kajiwara, *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1797-1799.
- [244] S. Z. Szarvas, G. Y. Szokan, M. Hollosi, L. Kiss, S. Antus, *Enantiomer* **2000**, *5*, 535-543.

- [245] T. Takakuwa, Y. Kurosu, N. Sakayanagi, F. Kaneuchi, N. Takeuchi, A. Wada, M. Senda, *J. Liquid. Chromatogr.* **1987**, *10*, 2759-69.
- [246] Y. Kurosu, T. Sasaki, T. Takakuwa, N. Sakayanagi, K. Hibi, M. Senda, *J. Chromatogr.* **1990**, *515*, 407-414.
- [247] K. Kudo, K. Ajima, M. Sakamoto, M. Saito, *Chromatography* **1998**, *19*, 138-139.
- [248] K. Kudo, K. Iwaya, C. Yomota, S. Morris, M. Saito, *Enantiomer* **2000**, *5*, 369-375.
- [249] G. Bringmann, D. Lisch, H. Reuscher, L. Aké Assi, K. Günther, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1307-1310.
- [250] G. Bringmann, R. God, M. Schäffer, *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1393-1403.
- [251] I. Hoult, R. E. Richards, *J. Magn. Reson.* **1976**, *24*, 71-85.
- [252] Sandvoss, L. H. Pham, K. Levsen, A. Preiss, C. Mügge, G. Wünsch, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1253-1262.
- [253] T. Renukappa, G. Roos, I. Klaiber, B. Vogler, W. Kraus, *J. Chromatogr. A* **1999**, *847*, 109-116.
- [254] S. X. Peng, B. Borah, R. L. M. Dobson, D. Liu, S. Pikul, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *20*, 75-89.
- [255] A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. Lee, C. D. Warren, R. W. Jeanloz, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 811-813.
- [256] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985**, *63*, 207-213.
- [257] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521-528.
- [258] G. Davis, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2820-2821.
- [259] P. Shockcor, S. E. Unger, I. D. Wilson, P. J. Foxall, J. K. Nicholson, C. L. Lindon, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4431-4435.
- [260] M. A. Olsen, P. G. Cummings, S. Kennedy-Gabb, B. M. Wagner, G. R. Nicol, B. Munson, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5070-5078.
- [261] S. W. Englander, L. Mayne, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 243-256.
- [262] S. W. Englander, R. Staley, *J. Mol. Biol.* **1969**, *45*, 277-295.
- [263] C. Dalvit, G. Shapiro, J.-M. Böhlen, T. Parella, *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37*, 7-14.
- [264] B. Calhoun, S. W. Englander, *Biochemistry* **1985**, *24*, 2095-2100.
- [265] J.-E. Planchon, *Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. 3* **1849**, *13*, 316-320.
- [266] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Heubes, W. Saeb, S. Diem, M. Herderich, J. Schlauer, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2571-2577.

- [267] Y. F. Hallock, J. H. Cardellina II, M. Schäffer, G. Bringmann, G. François, M. R. Boyd, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1729-1734.
- [268] 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, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9643-9648.
- [269] J. Schlauer, M. Rückert, B. Wiesen, M. Herderich, L. Aké Assi, R. D. Haller, S. Bär, K.-W. Fröhlich, G. Bringmann, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *350*, 87-94.
- [270] G. Bringmann, R. Götz, S. Harmsen, J. Holenz, R. Walter, *Liebigs Ann. Chem.* **1996**, 2045-2058.
- [271] G. Bringmann, W. Saeb, J. Mies, K. Messer, M. Wohlfarth, R. Brun, *Synthesis* **2000**, 1843-1847.
- [272] G. Bringmann, D. Koppler, D. Scheutzow, A. Porzel, *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35*, 297-301.
- [273] G. Bringmann, R. Zagst, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [274] G. Bringmann, F. Teltschik, M. Michel, S. Busemann, M. Rückert, R. D. Haller, S. Bär, S. A. Robertson, R. Kaminsky, *Phytochemistry* **1999**, *52*, 321-332.
- [275] T. R. Govindachari, P. C. Parthasarathy, T. G. Rajagopalan, H. K. Desai, K. S. Ramachandran, E. Lee, *Indian J. Chem.* **1975**, *13*, 641-643.
- [276] G. Bringmann, W. Saeb, D. Koppler, G. François, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13409-13418.
- [277] K. Wolf, *Dissertation*, Universität Würzburg, **2000**.
- [278] G. Bringmann, R. Weirich, D. Lisch, L. Aké Assi, *Planta Med. (Suppl. 1)* **1992**, *58*, 703-704.
- [279] G. Bringmann, F. Pokorny, H. Reuscher, D. Lisch, L. Aké Assi, *Planta Med* **1990**, *56*, 496-497.
- [280] G. Bringmann, R. Zagst, L. Aké Assi, *Planta Med. (Suppl. 2)* **1991**, *57*, 96-97.
- [281] G. Bringmann, R. Zagst, H. Reuscher, L. Aké Assi, *Phytochemistry* **1992**, *31*, 4011-4014.
- [282] G. Bringmann, F. Pokorny, M. Stäblein, L. Aké Assi, *Planta Med. (Suppl. 2)* **1991**, *57*, 97-98.
- [283] G. Bringmann, R. Zagst, D. Lisch, L. Aké Assi, *Planta Med. (Suppl. 1)* **1992**, *58*, 702-703.
- [284] G. Bringmann, L. Kinzinger, T. Ortmann, N. J. DeSouza, *Phytochemistry* **1994**, *35*, 259-261.
- [285] B. Gutsche, M. Herderich, *J. Chromatogr. A* **1997**, *767*, 101-106.

- [286] P. Foucher, J. L. Pousset, A. Cavé, *Phytochemistry* **1975**, *14*, 2699-2702.
- [287] Z. Chen, B. Wang, K. Qin, B. Zhang, Q. Su, Q. Lin, *Yaoxue Xuebao* **1981**, *16*, 519-23.
- [288] N. Ruangrunsi, V. Wongpanich, P. Tanitvatana, H. J. Cowe, P. J. Cox, S. Funayama, G. A. Cordell, *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 529-535.
- [289] G. Bringmann, L. Kinzinger, H. Busse, C. Zhao, *Planta Med. (Suppl. 1)* **1992**, *58*, 704.
- [290] G. Bringmann, L. Kinzinger, *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3297-3299.
- [291] H. Meimberg, G. Heubl, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [292] G. Bringmann, R. Götz, P. A. Keller, R. Walter, M. R. Boyd, R. Lang, A. Garcia, J. J. Walsh, I. Tellitu, K. V. Bhaskar, T. R. Kelly, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1090-1097.
- [293] D. Hobbs, U. Velaparthi, J. Liu, D. J. Pollart, D. W. Thomas, M. I. Dawson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1996**, *8*, 923-924.
- [294] T. R. Hoye, M. Chen, B. Hoang, L. Mi, O. P. Priest, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7184-7201.
- [295] G. Bringmann, R. Götz, G. François, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13419-13426.
- [296] G. Bringmann, W. Saeb, J. Kraus, R. Brun, G. François, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3523-3531.
- [297] G. Bringmann, M. Wenzel, T. R. Kelly, M. R. Boyd, R. J. Gulakowski, R. Kaminsky, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1731-1740.
- [298] V. Upender, D. J. Pollart, J. Liu, P. D. Hobbs, C. Olsen, W. Chao, B. Bowden, J. L. Crase, D. W. Thomas, A. Pandey, J. A. Lawson, M. I. Dawson, *J. Heterocyclic Chem.* **1996**, *33*, 1371-1384.
- [299] G. Bringmann, W. Saeb, K. Messer, M. Wohlfarth, R. Brun, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5871-5875.
- [300] H. Zhang, D. E. Zembower, Z. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2687-2690.
- [301] B. de Koning, J. P. Michael, W. A. L. van Otterlo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 799-811.
- [302] C. Ito, Y. Thoyama, M. Omura, I. Kajiura, H. Furukawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 2096-2100.
- [303] S. Tasler, *Dissertation*, Universität Würzburg, **2000**.
- [304] G. Bringmann, S. Tasler, H. Endress, J. Kraus, K. Messer, M. Wohlfarth, W. Lobin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2703-2711.
- [305] K. Messer, *Dissertation*, Universität Würzburg, in Vorbereitung.

- [306] G. Bringmann, M. Wohlfarth, J. Schlauer, H. Rischer, *Phytochemistry*, eingereicht.
- [307] G. Bringmann, M. Wohlfarth, M. Heubes, *J. Chromatogr. A* **2000**, *904*, 243-249. (Anon. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 125A.)
- [308] J. Flügge in *Grundlagen der Polarimetrie*, Zeiss Verlag, Oberkochen, **1965**.
- [309] J. Bertram in *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis* (Hrsg.: E. Nürnberg, P. Sturm), 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin, **1991**, Bd. 2, S. 143-168.
- [310] G. Bringmann, F. Teltschik, M. Schäffer, R. Haller, S. Bär, M. A. Robertson, M. Isahakia, *Phytochemistry* **1998**, *47*, 31-35.
- [311] R. Stahl, H.-J. Borschberg, *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 1331-1345.
- [312] M. Shibagaki, H. Matsushita, S. Shibata, A. Saito, Y. Tsujino, H. Kaneko, *Heterocycles* **1982**, *19*, 1641-45.
- [313] W. Saeb, *Dissertation*, Universität Würzburg, **2001**.

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren während meiner Doktorarbeit begleitet, mich unterstützt und wiederaufgerichtet, sich mit mir gefreut und mit mir gelacht haben. Falls ich einen Namen hier aus Schusseligkeit unterschlage, verzeiht es mir, ich werde Euch in keinem Fall vergessen.

Besonders möchte ich danken

- meinen engsten "Mitstreitern" Heiko, Markus und Kim für ihre Freundschaft und stete Hilfsbereitschaft
- Robert, Michael, Thorsten, Gerhard und dem Rest der Feierabendbiercrew - folgt dem Junimond, ihr seid nicht allein!
- Kristina für's Zuhören und immer hilfsbereit sein
- Doris für ein offenes Ohr, Rat und Tat
- den "Engeln in Weiß" Manu, Petra, Heike, Micha und Jan
- Matthias und Elfi, ohne die ich am NMR ziemlich dumm aus der Wäsche geguckt hätte
- Markus, Jan, Christian, Michael, Stefan, Wael, Thomas, Frieder und all den anderen "Altmeistern", von denen ich viel lernen durfte
- der gesamten Besatzung des 3. Stocks für Computerhilfe, Gaudi und Bier
- dem AK Diederichsen und besonders Markus für meine schöne Zeit als "Gastarbeiter" im 1. Stock
- Steffi, Markus und all den anderen Lemis für Unterstützung und viel Spaß
- noch einmal Heiko dafür, daß er mich an einem Stück lebendig durch SO-Asien brachte
- und meinen Korrekturlesern Markus, Heiko, Kim, Robert, Miriam und Sven.

Am allerallerwichtigsten allerdings war in den letzten Jahren für mich meine Annette, ohne deren Unterstützung, Nachsichtigkeit, Stärke und Liebe ich das alles nicht geschafft hätte.

**Euch allen sage ich: Danke!**

## Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die Dissertation "Die Aufklärung der Biogenese strukturell ungewöhnlicher Alkaloide aus *Triphyophyllum* (Dioncophyllaceae) und *Antidesma* (Euphorbiaceae) und Entwicklung und Einsatz der "Triade" zur phytochemischen online-Analytik: HPLC-MS/MS, HPLC-NMR und HPLC-CD" selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

(Michael Wohlfarth)

## Lebenslauf

- 17.02.1972 Geboren als Sohn von Michael und Waltraud Wohlfarth, geb. Zettner, in Roding i. d. Opf.
- 09/1978 - 07/1982 Besuch der Grundschule Rötz
- 09/1982 - 07/1991 Besuch des Joseph-von-Fraunhofer-Gymnasiums Cham
- 08/1991 - 10/1992 Zivildienst beim Malteser Hilfsdienst Rötz
- 11/1992 Immatrikulation an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Diplomstudiengang Chemie
- 10/1994 Diplom-Vorprüfung
- 03/1996 - 07/1996 F-Praktikum am Institut für Organische Chemie der Heriot-Watt-University Edinburgh (GB)
- 15.12.1997 Abschluß des Diplomstudiengangs Chemie mit der Diplomarbeit "Synthese von Stabilisotopen-markierten Naphthylisochinolin-Alkaloid-Vorstufen und Biogeneseexperimente an Zellkulturen von *Ancistrocladus heyneanus*" unter Anleitung von Prof. Dr. G. Bringmann
- 01.03.1998 Beginn der vorliegenden Arbeit
- 04/1998 - 09/1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im SFB 251
- 10/1998 - 12/2000 Stipendiat der Stiftung Stipendien-Fonds im Verband der Chemischen Industrie
- 07/2000 - 09/2000 Industriepraktikum bei der Bayer Corp. (West Haven, USA)
- 01/2001 - 09/2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im SFB 347
- seit 01.10.2001 Anstellung bei der BASF AG in Ludwigshafen