KOPPLUNGSMETHODEN IN DER NATURSTOFFANALYTIK: UNTERSUCHUNGEN AN *ARABIDOPSIS THALIANA* UND AN *ANCISTROCLADUS*-PFLANZEN

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES DER BAYERISCHEN UNIVERSITÄT WÜRZBURG

vorgelegt von

Inga Kajahn

aus

Neuss

Würzburg 2008

Eingereicht am: _____

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

der Dissertation

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

des Öffentlichen Promotionskolloquium

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquium: _____

Doktorurkunde ausgehändigt: _____

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2003 bis September 2007
am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Gerhard Bringmann danke ich für
die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu können,
die umfassende Unterstützung
und die exzellenten Arbeitsbedingungen.

Teile der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse waren bereits Gegenstand von
Publikationen[22, 34, 49, 65, 84, 133, 145, 158] sowie von Postern und Vorträgen

Meiner Familie

In Worten sei wahrhaft und zuverlässig,
im Handeln gewissenhaft und rücksichtsvoll.
(Konfuzius, ca. 551-479 v. Chr.)

INHALTSVERZEICHNIS

ALLGEMEINER TEIL 1

1 Einleitung 1

2 Die Natur, Apotheke von gestern ? 7

3 Identifizierung und Isolierung der Inhaltsstoffe der Astrinde von *Ancistrocladus cochinchinensis* (Ancistrocladaceae) mittels moderner instrumenteller Analysenmethoden 11

3.1 Kenntnisstand über die Inhaltsstoffe aus *A. cochinchinensis* 13

3.2 Online-Analyse von Astrinden- und Blattextrakten von *A. cochinchinensis* 15

3.3 Isolierung und Strukturaufklärung der Hauptmetabolite aus der Astrinde von *Ancistrocladus cochinchinensis* 19

3.3.1 Extraktion und Aufreinigung der Naphthylisochinolin-Alkaloide 19

3.3.2 Strukturaufklärung von Ancistrocladinium A (**30**; Peak G) 20

3.3.2.1 Spektroskopische Charakterisierung von **30** 20

3.3.2.2 Aufklärung der absoluten Konfiguration von **30** 22

3.3.3 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**; Peak H) 25

3.3.3.1 Spektroskopische Charakterisierung von **31** 25

3.3.3.2 Die absolute Konfiguration von 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) 26

3.3.4 6,4'-*O*-Didemethylancistrocladinium A (**32**) 27

3.3.4.1 Spektroskopische Charakterisierung von **32** 27

3.3.4.2 Absolutkonfiguration von 6,4'-*O*-Didemethylancistrocladinium A (**32**) 28

3.4 Großisolierung der neuen *N*,*C*-gekuppelten Naphthylisochinoline **30** und **31** 29

3.4.1 Anreicherung von **30** und **31** mittels Ionenaustausch-Chromatographie 29

3.4.2 Einsatz der Fast Centrifugal Partitioning Chromatography (FCPC) für die Isolierung von **30** und **31** im 100-mg-Bereich 30

3.5 Analyse des natürlichen Gegenions der *N*,*C*-gekuppelten Alkaloide 32

3.5.1 HPLC-oTOF-MS Untersuchung nach FCPC-Vorfraktionierung zur Bestimmung des Gegenions 32

3.5.2 Analyse der Zellwand-gebundenen Substanzen in *A. cochinchinensis* 33

3.6 Biologische Aktivität der Inhaltstoffe des Astextraktes von *A. cochinchinensis* . 34

3.6.1 Pharmakologische Aktivitäten gegen Tropenkrankheiten 34

3.6.2 Untersuchung der Wirkung von Ancistrocladinium A (**30**) gegen *L. major* 35

3.6.3 Untersuchung der isolierten Verbindungen **30** und **31** auf Phytotoxizität 37

4 Naphthylisochinolin-Alkaloide aus Blättern der botanisch noch nicht vollständig charakterisierten kongolesischen Art *"Ancistrocladus ikela"* 39

4.1 *"Ancistrocladus ikela"* – eine neu Art aus dem Kongobecken? 39

4.2 Phythochemischer Kenntnisstand über *"A. ikela"* 43

4.3 Isolierung und Strukturaufklärung von 8-*O*-Methylancistrogriffin C (**40**) 44

4.3.1 Extraktion und Aufreinigung des Alkaloids **40** 44

4.3.2 Strukturaufklärung von 8-*O*-Methylancistrogriffin C (**40**) 44

4.3.2.1 Spektroskopische Charakterisierung der Verbindung **40** 44

4.3.2.2 Aufklärung der Absolutkonfiguration von **40** 46

4.4 Untersuchungen zur Rotationbarriere und zur Achsenkonfiguration von Ancistrocladinium B (**39**) 47

4.4.1 HPLC-NMR- und HPLC-CD-Messungen von **39** 47

4.4.2 Bestimmung der Rotationsbarriere von Ancistrocladinium B (**39**) 48

4.5 Die biologischen Wirkungen der Substanzen **39** und **40** 50

4.5.1 Aktivität gegen Erreger tropischer Infektionskrankheiten 50

4.5.2 Nähere Analyse der antileishmanialen Wirkung von **39** 51

4.5.3 Allelopathische Aktivität von Ancistocladinium B (**39**) 52

5 Isolierung von Naphthylisochinolinen aus Blättern von *A. heyneanus* Wall. 54

5.1 Kenntnisstand über die Inhaltstoffe aus Blättern von *A. heyneanus* Wall. 54

5.2 Isolierung und Charakterisierung eines Ancistrocladin-Derivates 54

5.2.1 Extraktion und Aufarbeitung des Extraktes 54

5.2.2 Spektroskopische Charakterisierung und Bestimmung der Absolutkonfiguration von **42** 55

6 Suche nach *N,C*-gekuppelten Naphthylisochinolin-Alkaloiden in weiteren *Ancistrocladus*-Arten 57

6.1 Die Familie der Ancistrocladaceae 57

6.2 Auswertung der Untersuchungsergebnisse 58

7 Die Rolle des Phloems bei der Ausbreitung Pathogen-vermittelter Signale: Analyse von chemischen Signalen in *Arabidopsis thaliana* 60

7.1 Kenntnisstand über die Inhaltsstoffe von *Arabidopsis thaliana* 60

7.2 Entwicklung einer nanoliter-tauglichen Glucosinolat-Analytik 62

7.2.1 Untersuchung des Metabolitprofils von *A. thaliana* auf neuartige Sekundärstoffe mittels HPLC-ESI-MS (Ionenfalle) 63

7.2.2 Kapillarelektrophorese (CE) als Trennmethode für Glucosinolate 64

7.2.3 Kopplung von CE und oTOF-MS 68

7.2.4 Bestimmung des Sekundärmetabolitspektrums von *Arabidopsis*-Samen mittels CE-ESI-oTOF-MS und MS/MS-Untersuchungen 68

7.2.5 Metabolit-Untersuchung der Infloreszenzen mit Hilfe der entwickelten CE-ESI-oTOF-MS-Technik 82

7.2.6 Blattinhaltsstoffe von *A. thaliana* 83

7.3 Die Rolle des Phloems bei der Ausbreitung Pathogen-vermittelter Signale 85

7.3.1 Infizierung der Blätter mit verschiedenen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*-Stämmen und Phloemsaftgewinnung 86

7.3.2 Vermessung der gewonnenen Phloemexsudate verschiedenartig infizierter *Arabidopsis*-Pflanzen 88

8 Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus den Bakterienstämmen KC 1030 und AK 671 93

8.1 KC 1030 D (**88**) und KC 1030 G (**89**), zwei polyketidische Sekundärmetabolite aus einem antarktischen Streptomyceten-Stamm 93

8.2 Die strukturelle Diversität des Actinomyceten-Stamms AK 671 95

9 Zusammenfassung 100

10 Summary 106

EXPERIMENTELLER TEIL 111

1 Allgemeine Methoden 111

1.1 Verwendete Messgeräte und Apparaturen 111

1.2 Chromatographische Methoden 113

1.3 Chemikalien 116

2 Untersuchungen an Astrinde und Blättern von *Ancistrocladus cochinchinensis* 117

2.1 *Ancistrocladus cochinchinensis* 117

2.2 Online-Analyse der Pflanzenextrakte 117

2.2.1 6-*O*-Demethylancistrobenomin A (**26**) 118

2.2.2 4'-*O*-Demethylancistrocladin (**28**) 119

2.2.3 5'-*O*-Demethylhamatinin (**29**) 120

2.2.4 Ancistrobenomin A (**27**) 121

2.3 Identifizierung und Isolierung der Hauptalkaloide aus Astrinde von *Ancistrocladus cochinchinensis* 122

2.3.1 Ancistrocladinium A (**30**, Trifluoracetat) 122

2.3.2 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**, Trifluoracetat) 124

2.3.3 6,4'-*O*-Didemethylancistrocladinium A (**32**, Trifluoracetat) 125

2.4 Großisolierung der neuen *N*,*C*-gekuppelten Naphthylisochinoline **30** und **31** ... 126

2.4.1 Anreicherung per Ionenaustauschchromatographie 126

2.4.2 Vorfraktionierung mittels FCPC 128

2.5 Analyse des natürlichen Gegenions der *N*,*C*-gekuppelten Alkaloide 130

2.5.1 HPLC-oTOF-MS Untersuchung nach FCPC-Vorfraktionierung zur Bestimmung des Gegenions 130

2.5.2 Analyse der Zellwand-gebundenen Substanzen in *A. cochinchinensis* 130

2.6 Biologische Aktivität der *N*,*C*-gekuppelten Alkaloide **30** und **31** 131

2.6.1 Untersuchung der isolierten Verbindungen auf Phytotoxizität 131

3 Analyse von *"Ancistrocladus ikela"* – eine neue Art aus dem Kongo? 132

3.1 *"Ancistrocladus ikela"* 132

3.2 Isolierung und Charakterisierung von 8-Methylancistrogriffin C (**40**) 132

3.2.1 8-*O*-Methylancistrogriffin C (**40**) 133

3.3 HPLC-NMR- und HPLC-CD-Analyse von **39** 134

3.3.1 Ancistrocladinium B [(*P*)-**39**] 134

3.3.2 *N*-6'-*epi*-Ancistrocladinium B [(*M*)-**39**] 135

3.4 Untersuchung zur Rotationsbarriere von Ancistrocladinium B (**39**) 136

3.5 Bestimmung der phytotoxischen Aktivität von **39** 138

4 Isolierung eines Alkaloids aus Blättern von *A. heyneanus* Wall. 139

4.1 Extraktion und Isolierung von **42** 139

4.1.1 Charakterisierung von 6-*O*-Methyl-8,4'-*O*-didemethylancistrocladin (**42**) 139

5 Verbreitung der *N,C*-gekuppelten Alkaloide im Genus *Ancistrocladus* 141

5.1 Probenvorbereitung und HPLC-Gradienten für die Online-Analyse der *Ancistrocladus*-Extrakte 141

5.2 In die Analyse einbezogene *Ancistrocladus*-Arten 141

6 Die Rolle des Phloems bei der Ausbreitung Pathogen-vermittelter Signale: Analyse chemischer Signale 143

6.1 Probenaufarbeitung der verschiedenen *A. thaliana*-Pflanzenteile 143

6.2 HPLC-ESI-MS (Ionenfalle) 144

6.3 CE-UV-Messungen vom Samenextrakt 144

6.4 CE-ESI-oTOF-MS und MS/MS Untersuchungen an *A. thaliana* 144

6.5 Infizierung, Phloemsaftexsudat-Sammlung und Probenvorbereitung 145

6.6 Vermessung von Blattextrakten, Infloreszenzextrakten und Phloemsaftexsudaten mittels CE-ESI-oTOF-MS 147

6.6.1 1-Glycero-1-*myo*-inositolphosphat (**87**) 147

7 Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus KC 1030 und AK 671 148

7.1 Isolierung der beiden polyketidischen Metabolite 1030-D (**88**) und 1030-G (**89**) aus dem Bakterienstamm KC-1030 148

7.1.1 Spektroskopische Daten von 1030-D (**88**) 148

7.1.2 Spektroskopische Daten von 1030-G (**89**) 149

7.2 Isolierung der Inhaltstoffe des AK 671 (**96-100**) 150

7.2.1 Juglomycin F (AK 671-P, **96**) 151

7.2.2 Prächrysophanol-8-*O*-β-D-glucuronid (AK 671-O, **97**) 152

7.2.3 Chrysophanol-8-*O*-β-D-glucuronid (AK 671-T, **98**) 153

7.2.4 Bhimamycin A (AK 671-I, **99**) 154

7.2.5 Bhimamycin B (AK 671-S, **100**) 155

LITERATUR UND ANMERKUNGEN 157

ALLGEMEINER TEIL

1 Einleitung

In mehr als vier Millionen Jahren Evolution ist eine immense Vielfalt an Organismen und Überlebensstrategien entstanden. Dabei haben vor allem sessile Lebensformen, wie z.B. Pflanzen, Mikroorganismen und marine Invertebraten, ein großes Arsenal an sogenannten sekundären Naturstoffen, hervorgebracht. Es handelt sich dabei um z.T. sehr komplexe Substanzen, die – wie man vermutet[1] – eine wichtige Rolle in den Überlebensstrategien der verschiedenen sesshaften Organismen spielen.[1] Interaktionen mit anderen Lebensformen sind für sie nur über diese Sekundärstoffe möglich, wobei die Metabolite unter Anderem zur Kommunikation [z.B. Jasmonsäure (**1**) bei Pflanzen[2] oder Bombycol bei Insekten[2]], zur Feindabwehr von Herbivoren oder Pathogenen [z.B. Glucobrassicin (**2**) bei Brassicaceae][3] oder zur Beutejagd [z.B. Conotoxine bei Kegelschnecken][4] genutzt werden. Gestützt wird diese Theorie von der Tatsache, dass einjährige Pflanzen wie z.B. Gräser, die nur eine Vegetationsperiode lang leben, weit weniger Metabolite synthetisieren als mehrjährige Pflanzen, die ihr Überleben über viele Jahre hinweg sichern müssen.[5] Darüber hinaus besitzen Pflanzen und marine Invertebraten kein ausgefeiltes Immunsystem wie Vertebraten und müssen sich bei der Abwehr von Viren auf eine "chemische Kriegsführung" verlassen.[1]

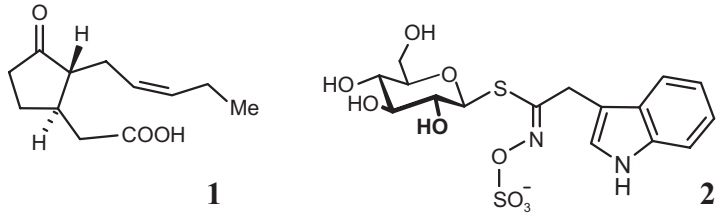


Abbildung 1. Strukturen von Jasmonsäure (**1**) und Glucobrassicin (**2**), zwei für Interaktionen von Pflanzen mit ihrer Umwelt genutzte Sekundärmetabolite.

Da sich die sessilen Organismen im Laufe der Evolution immer neuen Feinden und überlebenswichtigen Herausforderungen gegenübersahen, ist es nicht weiter verwunderlich, dass viele der produzierten Sekundärmetabolite gut an potenzielle Fraßfeinde angepasst wurden und deswegen häufig spezifische physiologische Wirkungen zeigen.

Diese Wirkungen werden schon seit vielen Jahrhunderten in der Medizin zur Heilung von Krankheiten genutzt.

Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Salicylsäure (**3**). Sie wird, ebenso wie die bereits erwähnte Jasmonsäure (**1**), von Pflanzen als Kommunikationssubstanz verwendet. Doch bereits im *Corpus Hippocraticum*, einem medizinischen Standardwerk der Antike, benannt nach dem griechischen Arzt Hippokrates (ca. 460 – 377 v. Chr.), wurde die Verwendung von Weidenrinde als Medikament gegen Schmerzen und Fieber beschrieben.[6,7] Dass Salicylsäure (**3**) das wirksame Agens in Weidenrindenextrakten ist, wurde allerdings erst Anfang des 19. Jh. Aufgeklärt. Auf Grund des unangenehmen Geschmackes und der schlechten Magenverträglichkeit von **3** wurden bald darauf erste Derivate synthetisiert. Eines von ihnen, Acetylsalicylsäure (**4**), kam 1899 unter dem Namen Aspirin® als Schmerzmedikament auf den Markt und ist nach wie vor eines der weltweit erfolgreichsten Arzneimittel.[7]

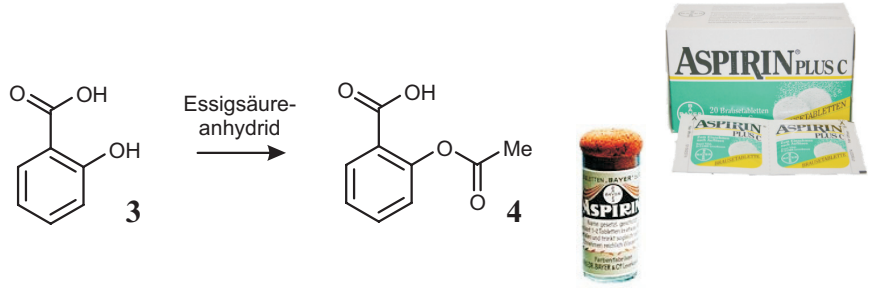


Abbildung 2. Salicylsäure (**3**) und ihr berühmtestes Derivat, die Acetylsalicylsäure (**4**), die seit 110 Jahren unter dem Namen Aspirin® auf dem Markt ist. Das untere Bild zeigt das Aussehen der allerersten Aspirin®-Schachteln,[8] während oben eine aktuelle Verpackung abgebildet ist.

Aber auch heute noch, in Zeiten, in denen kombinatorische Chemie in kurzer Zeit viele neue Strukturen und deren Derivate zugänglich macht und *In-silico*-Methoden Voraussagen und Informationen zur Wirksamkeit dieser Verbindungen liefern, ist die Natur weiterhin das größte Vorbild für neue wirksame Leitsubstanzen.[9] Ganz aktuell dafür ist das Beispiel der Conotoxine zu nennen, die von Kegelschnecken der Gattung *Conus* aus den subtropischen und tropischen Gewässern des Indopazifiks zur Beutejagd auf Fische und Würmer produziert werden.[4] Seit August 2006 ist in Deutschland Ziconotid (Prialt®), ein synthetisches Analogon eines ω-Conotoxins, als Arzneimittel zugelassen. Es wird sehr erfolgreich als nicht-opioides Schmerzmittel in der Therapie starker, chronischer Schmerzen eingesetzt.[10]

Eine Naturstoffklasse, die neben unzähligen Giftstoffen wie z.B. Nicotin (**5**) auch viele, zum Teil sehr potente Wirkstoffe beinhaltet, sind die stickstoffhaltigen Alkaloide (siehe Abbildung 3). Berühmte Beispiele für Alkaloide, die als Medikamente eingesetzt werden, sind Morphin (**6**) aus dem Schlafmohn (*Papaver somniferum*), das bei der Behandlung starker Schmerzen indiziert ist und Chinin (**7**) aus der tropischen Pflanzenart *Cinchona pubescens*, das zur Therapie der Malaria genutzt wird.

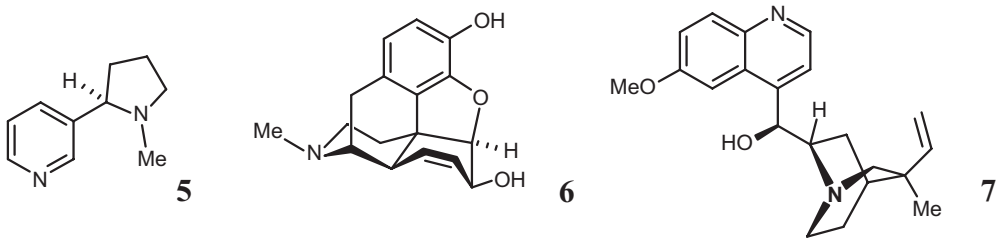


Abbildung 3. Die hochwirksamen Alkaloide Nicotin (**5**), Morphin (**6**) und Chinin (**7**).

Die in den Tropen Afrikas und Asiens beheimateten Pflanzenfamilien der Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae sind ebenfalls ergiebige Quellen vielversprechender Alkaloide, der Naphthylisochinoline. Bisher wurden etwa 120 verschiedene Vertreter dieser Gruppe strukturell und biosynthetisch einzigartiger Biaryle aus Lianen der beiden Pflanzenfamilien isoliert.[11,12] Die Grundstruktur der Naphthylisochinolin-Alkaloide besteht aus zwei Hälften, einem Isochinolin- und einem Naphthalin-Teil, die beide aus sechs Acetat-Einheiten biosynthetisiert und mittels einer phenoloxidativen Kupplung über eine Biarylachse miteinander verknüpft werden.[13-15] Die hohe strukturelle Diversität entsteht einerseits durch die verschiedenen Kupplungspositionen in den beiden Hälften (vier Möglichkeiten im Naphthalin- und zwei im Isochinolin-Teil) und andererseits durch Variationen im Substitutionsmuster der Sauerstoff-Funktionen. Sieben der acht möglichen *C,C*-Kupplungstypen wurden bisher bereits gefunden. Noch weiter vergrößert wurde die Anzahl der denkbaren Verknüpfungstypen durch das kürzlich entdeckte *N,C*-gekuppelte Ancisheynin (**8**; siehe Abbildung 4).[16] Viele dieser Naphthylisochinoline zeigen erfolgversprechende Wirksamkeiten gegen verschiedene tropische Infektionskrankheiten wie z.B. Dioncophyllin C (**9**) gegen Malaria (*in vitro* und *in vivo*)[17] oder Ancistrotanzanin B (**10**) gegen Leishmaniose[18] (siehe Abbildung 4). Deshalb ist die Suche nach weiteren Vertretern dieser Naturstoffklasse in phytochemisch noch nicht untersuchten *Ancistrocladus*-Arten, darunter auch botanisch noch nicht beschriebene, neu entdeckte Arten, sehr vielversprechend. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte daher eingebettet im *Sonderforschungsbereich*

630 ("*Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffe gegen Infektionskrankheiten*") nach neuen, wirksamen Naphthylisochinolin-Alkaloiden, besonders nach weiteren *N*,*C*-verknüpften Substanzen, in verschiedenen Lianen-Arten der Gattung *Ancistrocladus* gesucht werden. Dafür wurde überwiegend die bereits im Arbeitskreis etablierte analytische "Triade" HPLC-MS/MS-NMR-CD[19-21] genutzt.

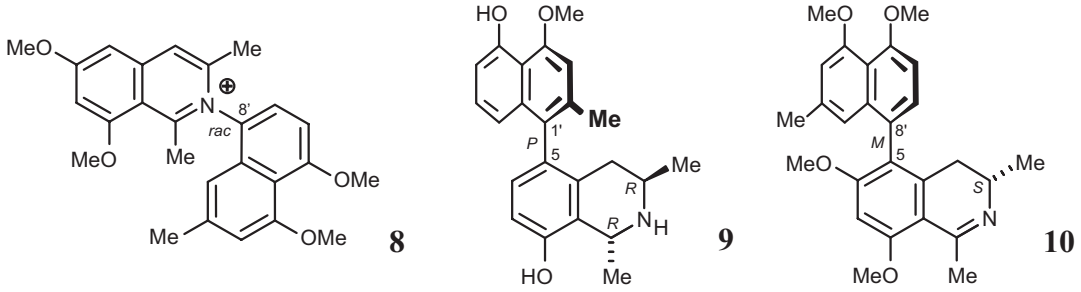


Abbildung 4. Ancisheynin (**8**), Dioncophyllin C (**9**) und Ancistrotanzanin B (**10**) – drei vielversprechende Leitstrukturen gegen Infektionskrankheiten aus der Alkaloidklasse der Naphthylisochinoline.[22]

Des Weiteren sollte mit Hilfe modernster analytischer Kopplungsmethoden eine Fragestellung innerhalb des *Sonderforschungsbereiches 567* ("*Mechanismen der interspezifischen Interaktion von Organismen*") zur Rolle des Phloems bei dem Transport von Langstreckensignalen nach Infektion von *Arabidopsis-thaliana*-Pflanzen mit verschiedenen Bakterien-Stämmen von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* bearbeitet werden. Hauptsächlich wurde dabei analysiert, ob neben elektrophysiologischer Reizweiterleitung auch ein Signaltransport durch kleine chemische Moleküle erfolgt. Hierfür sollte zunächst eine neue Analysenmethode entwickelt werden, mit der man in der Lage ist, auch die sehr geringen Substanzmengen der chemischen Marker im Phloemsaft zu detektieren; mit dieser Methode sollten dann die Phloemsäfte der infizierten Pflanzen vermessen werden. Darüber hinaus wurde in der eingesetzten Pflanzenart *Arabidopsis thaliana* noch nach neuen Metaboliten, die hauptsächlich zur Strukturfamilie der Glucosinolate gehören, gesucht werden.

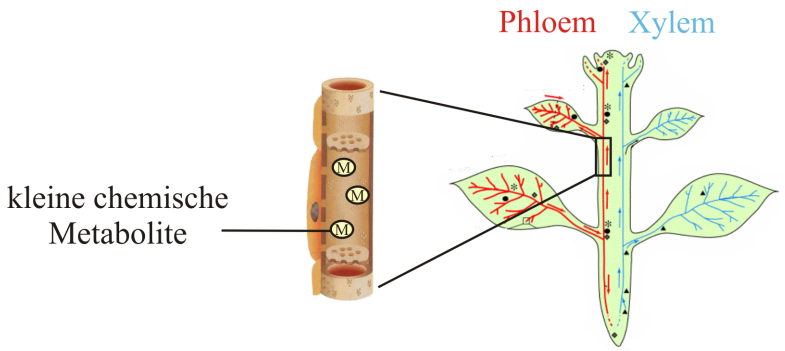


Abbildung 5. Werden im Phloem auch kleine chemische Moleküle als Langstreckensignal nach einer Infektion transportiert?[23]

Außerdem sollte im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-P. Fiedler die Struktur der Sekundärmetabolite der extremophilen Actinomyceten-Stämme KC-1030 und AK-671 mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden.

Zur Beantwortung der naturstoffchemischen Fragestellungen wurden hauptsächlich moderne Methoden der analytischen Chemie angewendet. Von essenzieller Bedeutung war daher vor allem die Etablierung neuer Kopplungsmethoden mit einem oTOF-MS-Gerät zum Nachweis geringer Substanzmengen in kleinen Mengen biologischen Materials und die Verwendung der NMR-Kryoprobenkopftechnologie zur Strukturaufklärung und Identifizierung neuer, vielversprechender Leitsubstanzen in tropischen Heilpflanzen sind dabei hervorzuheben.

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich im Einzelnen folgende Fragestellungen:

I. Phytochemische Untersuchungen an verschiedenen *Ancistrocladus*-Arten:

- Isolierung und Strukturaufklärung neuartiger *N*,*C*-gekuppelter Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus der vietnamesischen Liane *Ancistrocladus cochinchinensis*, einer neuen kongolesischen Pflanzenart *A. ikela* und der indischen Pflanze *A. heyneanus*;

- Analyse der Sekundärmetabolitprofile der Pflanzenfamilie der Ancistrocladaceae mittels der Online-Techniken HPLC-UV und HPLC-MS, vornehmlich im Hinblick auf das Vorkommen neuartiger *N*,C-gekuppelter Naphthylisochinoline.

II. Untersuchung der Rolle des Phloems bei der Ausbreitung Pathogen-vermittelter chemischer Signale:

- Analyse des Metabolitprofils von *Arabidopsis thaliana* mittels LC-MS auf bekannte und neuartige Sekundärmetabolite, vornehmlich aus der Klasse der Glucosinolate;

- Entwicklung einer nl-tauglichen Glucosinolat-Analytik und deren Anwendung auf Pflanzenextrakte und Phloemexsudate von *Arabidopsis thaliana*;

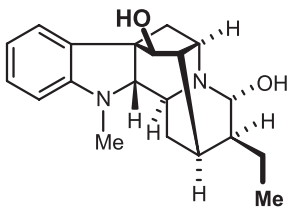
- Vergleichende Analyse der Phloemsäfte infizierter und nicht-infizierter *Arabidopsis*-Pflanzen.

III. Strukturaufklärung von Naturstoffen aus extremophilen Actinomyceten.

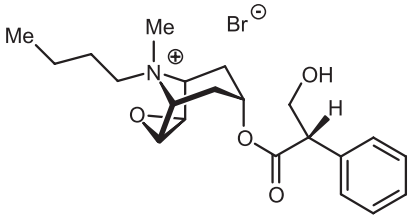
2 Die Natur, Apotheke von gestern ?

Schon die frühen Hochkulturen der Sumerer und Ägypter nutzten überwiegend pflanzliche Arzneimittel zur Heilung von Krankheiten. Erste schriftliche Dokumente über einen Teil der damals üblichen Verschreibungen und Rezepte sind auf Tontafeln aus Mesopotamien (ca. 2600 v. Chr.) und im Papyrus Ebers (ca. 1600 v. Chr.) erhalten geblieben. Die Nutzung pflanzlicher Arzneien setzte sich auch in der Antike weiter fort. Griechische wie auch römische Ärzte kannten eine Vielzahl an Pflanzen, die sich zur Linderung von Beschwerden einsetzen ließen. Neben vielen anderen Überlieferungen wie z.B. der *Historia Naturalis* von Plinius (23-79 n. Chr.) sind als Standardwerke der antiken Medizin das *Corpus Hippocraticum*, das auf den griechischen Arzt Hippokrates (ca. 460-377 v. Chr.) zurückgeht, die fünfbändige *De Materia Medica* von Dioskurides (im 1. Jahrhundert n. Chr.) und das *De Simplicibus* des römischen Arztes Galen (129-199 n. Chr.) zu nennen. Gerade die beiden letzten Publikationen haben die europäische Medizin über 1600 Jahre hinweg geprägt und weitestgehend bestimmt. Zusammen mit dem Kanon der Medizin von Avicenna (980-1037 n. Chr.) und den Werken von Hildegard von Bingen (1098-1179 n. Chr., *Physica*) und Odo Magduensis (um 1100 n. Chr., *Macer floridus*) bildeten sie und die in ihnen erwähnten Arzneipflanzen die Grundlage des medizinischen Wissens im Mittelalter.[6,24]

Wurden bisher zumeist gesamte Pflanzenextrakte oder auch sehr komplexe Mischungen mehrerer Pflanzen genutzt, das griechische Antidot *Mithridaticum* zum Beispiel beinhaltete 54 verschiedene Ingredienzien, setzte sich in der Neuzeit mehr und mehr die Forderung durch, die aktiven Substanzen der Pflanzenextrakte herauszufinden und zu isolieren. Vorreiter dieser Entwicklung war Paracelsus (1493-1541), der als Erster Methoden der Chemie nutzte, um die Entwicklung in der Medizin voranzubringen. Anfang des 19. Jahrhunderts gelang es schließlich E. Merck, den ersten rein isolierten Naturstoff, das Morphin (**6**), auf den Markt zu bringen. Dieser Trend setzte sich bis in die sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts fort. Nahezu alle bis dahin bekannten reinen Arzneistoffe waren Naturstoffe wie z.B. Ajmalin (**11**) oder semi-synthetische Derivate von Naturstoffen wie z.B. *N*-Butylscopolaminiumbromid (**12**), deren Entdeckung meist auf die traditionelle Nutzung der entsprechenden Pflanzen in der Volksmedizin zurückzuführen war.[1,25]



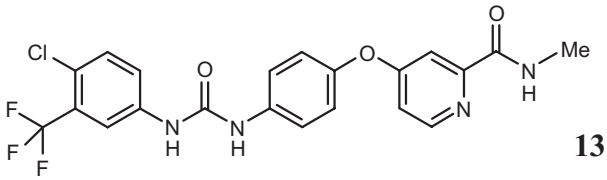
11



12

Abbildung 6. Das Antiarrythmikum Ajmalin (**11**) aus *Rauwolfia serpentina* und *N*-Butylscopolaminiumbromid (**12**), ein semi-synthetisches Derivat des Tropanalkaloids Scopolamin aus dem Bilsenkraut (*Hyoscyamus niger*), zwei bis heute gebräuchliche Naturstoff-abgeleitete Arzneistoffe.

Durch die rapiden Entwicklungen der Methoden auf den Gebieten der kombinatorischen Chemie und des Wirkstoff-Screenings wendete sich die pharmazeutische Industrie im Laufe der 70er und 80er Jahre weitgehend von den Naturstoffen ab. Zu langwierig, teuer und ineffizient erschien nun die Bioaktivitäten-geleitete Fraktionierung und Isolierung von Naturstoffen im Gegensatz zu ausschließlich durch Synthese im Labor hergestellten Substanzen. Viele Tausend verschiedene Strukturen sind in kürzester Zeit durch Anwendung von kombinatorischen Methoden zugänglich und ebenso viele Substanzen können pro Tag von modernen vollautomatischen High-Throughput-Screening-Robotern auf ihr Wirkungsprofil hin getestet werden, die in riesigen Datenbanken verwaltet werden. Aber die Erfolge, die man sich durch die Anwendung der kombinatorischen Chemie auf dem Gebiet der Wirkstofffindung versprochen hatte, blieben aus.[1,9] In den letzten 25 Jahren, in denen fast ausschließlich die kombinatorischen Synthesemethoden zur Arzneimittelentwicklung genutzt wurden, konnte nur ein einziges *De-novo*-Medikament auf den Markt gebracht werden. Es handelt sich dabei um einen Multikinase-Inhibitor der Firma Bayer mit dem Namen Sorafenib (**7**, Nexavar®), der 2005 von der FDA als Antitumor-Medikament zugelassen wurde.[26]



13

Abbildung 7. Sorafenib (**13**, Nexavar®), der bisher einzige Erfolg, den die kombinatorische Chemie in 25 Jahren Wirkstoffforschung zu verzeichnen hat.

Im Gegensatz dazu wurden in den letzten 25 Jahren trotz der Tatsache, dass die Suche nach neuen Naturstoffen von der Industrie immer weiter eingeschränkt wurde, im Schnitt zwei neue Naturstoffe pro Jahr als Medikament zugelassen.[26] Dies entspricht einem Anteil von 5% aller in den Jahren 1981-2006 neu zugelassenen Arzneimittel (siehe auch Abbildung 8; Naturstoffe = Kategorie N). Zählt man dann noch alle Wirkstoffe hinzu, bei denen das Naturstoffgrundgerüst semisynthetisch variiert wurde (Abbildung 8; Kategorie NA), die Substanz zwar totalsynthetisch hergestellt wird, aber der Pharmakophor von einem Naturstoff abstammt (Abbildung 8; Kategorie S*) oder die synthetisch hergestellten Wirkstoffe, die auf von Naturstoffen gewonnenem Wissen basieren (Abbildung 8; Kategorien S/NM und S*/NM), dann haben die Naturstoffe einen Anteil von über 50% an den Neuzulassungen der letzten 25 Jahre. Weitere ca. 20% entfallen auf neue Impfstoffe und biologische Wirkstoffe, darunter versteht man Substanzen, die aus großen, über 45 Reste enthaltenden Peptiden oder Proteinen bestehen. Diese werden meist ebenfalls isoliert oder biotechnologisch produziert. Lediglich 30% der zwischen 1981 und 2006 zugelassenen Medikamente sind rein synthetisch und wurden zufällig bei Screenings oder durch die Modifikation eines bereits bekannten Wirkstoffes entdeckt.

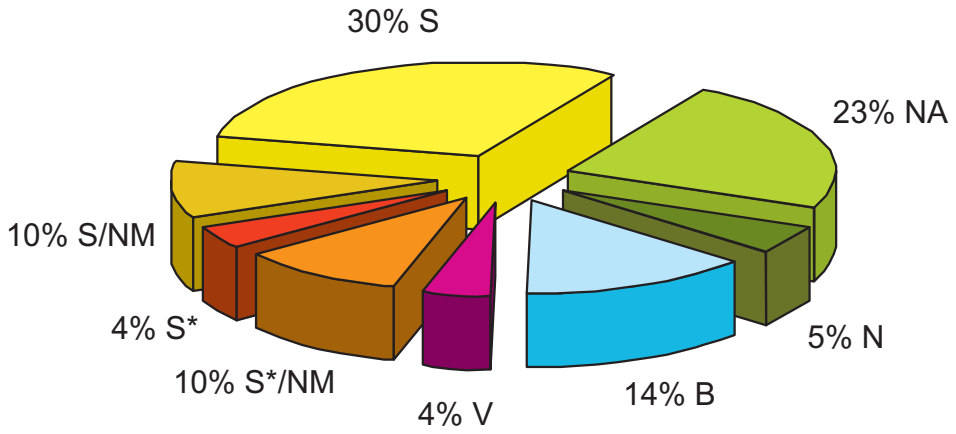


Abbildung 8. Zusammensetzung aller neuen Wirkstoffe von 01/1981 bis 06/2006.[26] Insgesamt wurden 1184 Substanzen neu zugelassen, die in folgende Kategorien eingeteilt sind: NA = Naturstoff-abgeleitet, N = Naturstoff, B = Biologisch; große (> 45 Reste) Peptide oder Proteine, I = Impfstoff, S* = durch Totalsynthese hergestellt, aber der Pharmakophor ist von einem Naturstoff abgeleitet, S = Vollsynthetisch. Die Kategorien S* und S enthalten noch NM = Naturstoff-mimetisch, d.h. synthetische Produkte, die auf durch Naturstoffe gewonnenem Wissen basieren, als Unterkategorie.

Diese Zahlen belegen deutlich, dass die Natur nicht als "Apotheke von gestern" abgestempelt werden sollte, denn sie ist immer noch der wichtigste Lieferant für neue Medikamente und Leitstrukturen, die nach wie vor dringend benötigt werden.

Ein Indikationsbereich, der zwingend auf die Entdeckung und Entwicklung neuer hochwirksamer und dabei gut verträglicher sowie gleichzeitig herstellungsgünstiger Wirkstoffe angewiesen ist, sind die Infektionskrankheiten. Als Beispiele zu nennen sind hier Malaria, Afrikanische Schlafkrankheit, Leishmaniose oder Tuberkulose, aber auch AIDS. Alle Infektionskrankheiten zusammengenommen sind mit rund 33% der Todesfälle pro Jahr immer noch weltweit Todesursache Nummer 1.[27] Wieder ansteigende Infektionsraten lassen vermuten, dass dies auch in den nächsten Jahrzehnten so bleiben wird. Neben noch nicht heilbaren Infektionskrankheiten wie z.B. AIDS sind es die sich immer stärker verbreitenden Resistenzen von Erregern gegenüber den bisher genutzten, gut wirksamen Medikamenten (z.B. Resistenz von *Plasmodium falciparum* gegen Chloroquin),[28] die einen hohen Bedarf an neuen Medikamenten verursachen.

Alarmierend erweist sich dieser Trend vor allem im Hinblick darauf, dass es auf Grund des zwar weit verbreiteten, aber eher erfolglosen Einsatzes der kombinatorischen Chemie zur Entwicklung neuer Arzneistoffe und des Einstellens der Suche nach neuen Naturstoffen als Wirkstoff oder Leitstruktur von Seiten der Industrie, im letzten Jahrzehnt zu einem steten Rückgang der Neuzulassungen gekommen ist. Der Tiefpunkt war das Jahr 2004 mit gerade einmal 25 neu zugelassenen Medikamenten. Ein Schritt in die richtige Richtung ist der seit Kurzem verfolgte Einsatz von kleinen Datenbanken, die naturstoffähnliche Substanzen enthalten, anstelle der großen, unselektiven kombinatorischen Datenbanken.[26]

Auch die Natur, mit ihrer Vielzahl an verschiedenen Organismen und Lebensräumen, die in vielen Millionen Jahren von der Evolution bereits optimiert wurden, sollte als Quelle neuer Leitstrukturen und Wirkstoffe weiter – und vor allem wieder mehr – erforscht werden, denn ihr Potenzial ist noch lange nicht ausgeschöpft.

3 Identifizierung und Isolierung der Inhaltsstoffe der Astrinde von *Ancistrocladus cochinchinensis* (Ancistrocladaceae) mittels moderner instrumenteller Analysenmethoden

Fußten in der Antike die Erkenntnisse über die Wirkung von Pflanzen auf rein empirischen Beobachtungen, so sind seit der Zeit der Aufklärung die Bemühungen forciert worden, den Grund der Wirksamkeit dieser Pflanzen zu ermitteln. Einer der ersten großen Erfolge der damals noch jungen Disziplin der analytischen Chemie auf dem Sektor der Naturstoffisolierung war sicherlich die Reindarstellung des Morphins (**6**, siehe Abbildung 3) aus Schlafmohn (*Papaver somniferum*) im Jahr 1806 von Friedrich Sertürner (1783-1841). Der Schlafmohn wurde bereits seit der Antike als Schmerzmittel genutzt. Die Veröffentlichung der korrekten Strukturformel ließ allerdings noch 120 Jahre auf sich warten.[29]

Waren früher zeitaufwendige Derivatisierungen, partielle Abbaureaktionen und Totalsynthesen nötig, um die Struktur von isolierten Naturstoffen aufzuklären, so kann diese heutzutage durch moderne Analysetechniken in kurzer Zeit bestimmt werden. Die Entwicklung effizienter Trennmethoden [z.B. Dünnschichtchromatographie (DC), Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Kapillarelektrophorese (CE)] und physikalischer Verfahren zur Strukturaufklärung [z.B. UV/VIS-Spektroskopie, Massenspektrometrie (MS), Kernresonanzspektrometrie (NMR)] Anfang des 20. Jahrhunderts hat wesentlich dazu beigetragen, dass die Auftrennung von Extrakten und die korrekte Aufklärung der Struktur der einzelnen isolierten Substanzen meist in kurzer Zeit möglich ist.[30] Die direkte Kopplung der Trennmethoden mit den Analysemethoden (z.B. HPLC-NMR oder CE-MS) Ende des letzten Jahrhunderts haben die Zeitspanne, die zur Strukturaufklärung einzelner Substanzen aus komplexen Matrices nötig ist, noch einmal verkürzt.[31]

Auch aktuell schreitet die Entwicklung in der Analytik rasant voran. Zu nennen ist hier vor allem die Weiterentwicklung von Pulsfrequenzen in der Kernresonanzspektrometrie, die es möglich macht, ein immer lückenloseres Bild der Molekülstrukturen aufzunehmen.[32] Darüber hinaus wird auch das technische Equipment verfeinert. So ermöglicht z.B. die Entwicklung von sensitiveren NMR-Kryoprobenköpfen eine höhere Messempfindlichkeit.[33] Ein weiteres Beispiel der Verfeinerung der Online-Strukturaufklärung ist die vor wenigen Jahren eingeführte Technik der kleinen orthogonalen Time-of-Flight-Massendetektoren (oTOF-MS), welche, gekoppelt mit chromatographischen Methoden, in der Lage sind, exakte Massen direkt aus dem Extrakt zu bestimmen.[34] Neben den neuen Möglichkeiten der

Strukturaufklärung hat sich aber auch das Repertoire der Trennmethoden vergrößert. Durch die Neuentwicklung von monolithischem Säulenmaterial[35,36] oder neuem technischem Equipment [Ultra-Performance-Flüssigkeitschromatographie (UPLC)][37] sind gleiche oder sogar bessere Trennleistungen bei noch kürzeren Analysenzeiten möglich. Auf dem Gebiet der Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie sind durch Einführung der Fast-Centrifugal-Partioning-Chromatographie (FCPC) ebenfalls Neuerungen zu verzeichnen.[38,39]

Die in unserem Arbeitskreis bereits vorhandenen modernen Online-Analysenmethoden, bestehend aus der Kopplung von HPLC-UV, -MS/MS, -NMR und -CD,[19,20] konnten im Rahmen dieser Arbeit erweitert und erfolgreich zur Beantwortung der Fragestellungen eingesetzt werden. Im Detail zu nennen sind hier die erfolgreiche Etablierung der Kopplung einer HPLC mit einem oTOF-MS-Detektor, die eine Bestimmung der exakten Masse und des Isotopenmusters ermöglicht und so einen direkten Zugang zur Summenformel der einzelnen Peaks im Rohextrakt schafft. Daneben gelang auch die Verfeinerung der HPLC-NMR-Analytik durch die Etablierung des Einsatzes einer Durchflusszelle für einen Probenkopf mit neuer Kryotechnologie an unserem Institut.

Außerdem wurde im Verlauf der Arbeit das methodische Arsenal durch den Einsatz von CE-UV- und CE-oTOF-MS-Kopplungen erweitert. Vor allem auf die erstmalige erfolgreiche Anwendung einer Kopplung von Kapillarelektrophorese und eines Time-of-Flight-Massendetektors zur Analyse kleiner geladener Moleküle wird in Kapitel 7 noch genauer eingegangen.

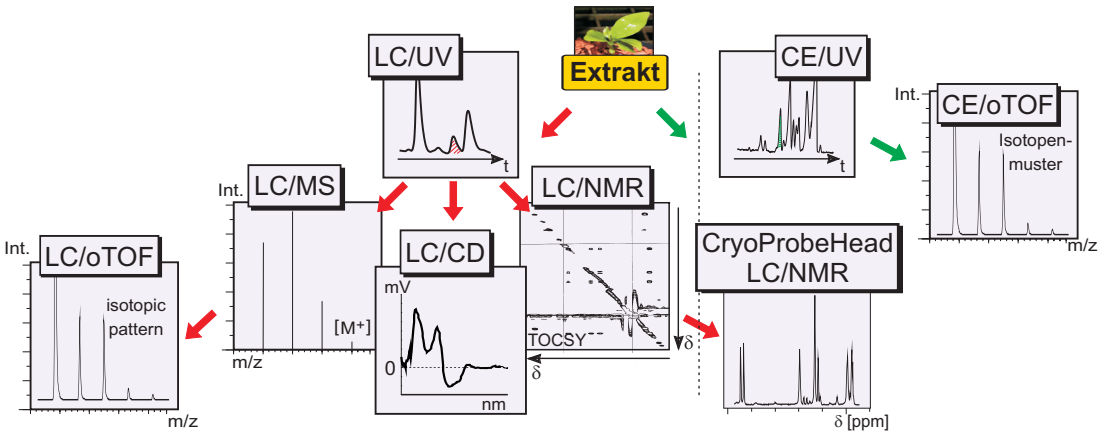


Abbildung 9. Erweiterung und Verfeinerung der analytischen "Triade" durch den Einsatz neuer Technologien.

3.1 Kenntnisstand über die Inhaltsstoffe aus *A. cochinchinensis*

Ancistrocladus cochinchinensis ist eine in Vietnam beheimatete Unterart der Lianen-Species *Ancistrocladus tectorius*.[40] Sie gehört zur paläotropischen Pflanzenfamilie der Ancistrocladaceae und klettert mit Hilfe von spiralig angeordneten hölzernen hakenartigen Fortsätzen, die an kleinen Seitenästen wachsen, bis ins Regenwalddach. Die Familie der Ancistrocladaceae beinhaltet lediglich eine Gattung (*Ancistrocladus*) mit gegenwärtig 17 eindeutig klassifizierten Arten, die in den Regenwäldern Asiens und Afrikas beheimatet sind.[40,41] Volksmedizinisch wird *A. cochinchinensis* als Diuretikum und Antiphlogistikum in Vietnam eingesetzt.[42]

Im Rahmen einer ersten phytochemischen Untersuchung Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts konnten eine Reihe von Naphthylisochinolin-Alkaloiden und Tetralonen aus den Blättern von *Ancistrocladus cochinchinensis* isoliert werden. Aus der Substanzklasse der Naphthochinon-Derivate wurden neben Plumbagin (**14**) noch (+)-Isoshinanolon (**15**), Lupeol, Betulin, 3,3'- und 8,8'-Biplumbagin sowie (2*R*,4*S*)-4,5-Dihydroxy-2-methyltetralon (**16**), (2*R*,4*R*)-4,5-Dihydroxy-2-methyltetralon (**17**) und (3*R*,4*S*)-3,4,8-Trihydroxy-3-methyltetralon (**18**) in den Blattextrakten nachgewiesen.[43] Darüber hinaus identifizierte man in dieser Pflanze die Naphthylisochinolin-Alkaloide 6-*O*-Methylhamatein (**19**), Ancistrocladinin (**20**), Hamatinin (**21**), 6-*O*-Methylhamatinin (**22**), 6-*O*-Demethyl-7-*epi*-ancistrobrevin D (**23**), 7-*epi*-Ancistrobrevin D (**24**) und 6-*O*-Demethyl-8-*O*-methyl-7-*epi*-ancistrobrevin D (**25**).[42]

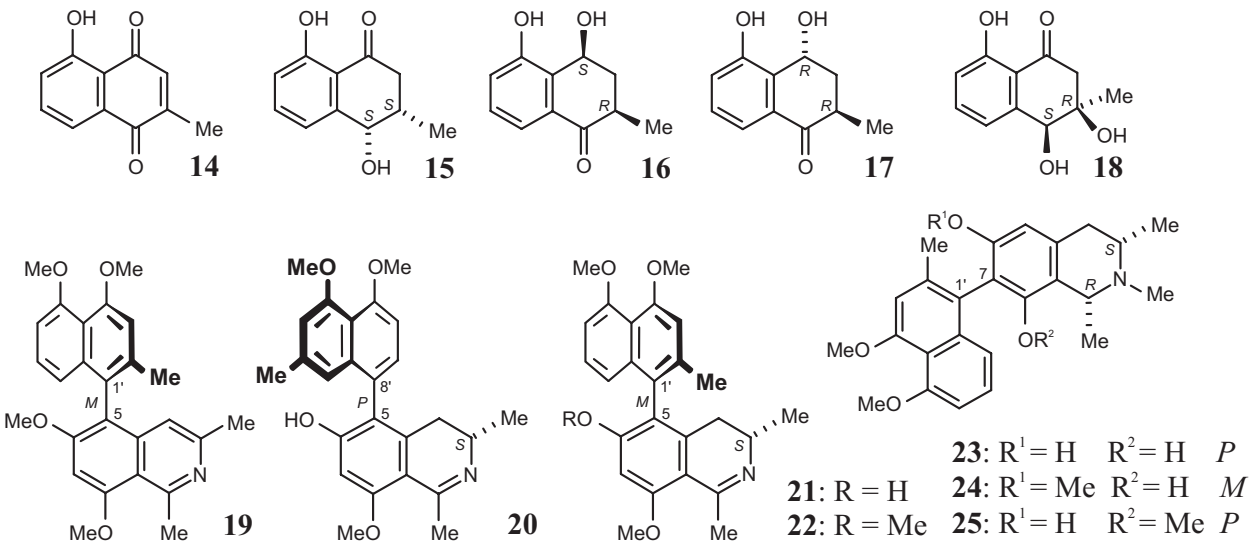


Abbildung 10. Aus einer früheren Isolierarbeit bekannte Naphthochinon-Derivate und Naphthylisochinoline aus Blattextrakten von *Ancistrocladus cochinchinensis*.[42,43]

Da es sich bei den Naphthylisochinolin-Alkaloiden um eine strukturell, biosynthetisch und pharmakologisch interessante Klasse von Naturstoffen handelt und es in den letzten Jahren in phytochemisch noch nicht vollständig charakterisierten[44] wie auch in botanisch neu beschriebenen *Ancistrocladus*-Arten,[41,45] immer wieder zum Fund neuer vielversprechender Alkaloidstrukturen gekommen war, schien es lohnenswert, sich auch *Ancistrocladus cochinchinensis* noch einmal in einer phytochemischen Untersuchung zuzuwenden. Denn außer über die Inhaltsstoffe in den Blättern dieser Lianenart war zu Beginn dieser Arbeit noch nichts bekannt über die Metabolite in anderen Pflanzenteilen, weshalb damit begonnen wurde Astrinden-Extrakte dieser Pflanze systematisch zu untersuchen. Das in dieser Analyse genutzte Pflanzenmaterial war im Jahr 2004 von Dr. Michael Dreyer[46] aus unserem Arbeitskreis in der südvietnamesischen Provinz Da Nang gesammelt worden. Neben getrocknetem Astrinden- und vorextrahiertem Blattmaterial wurden auch zwei lebende Setzlinge von *A. cochinchinensis* nach Deutschland gebracht. Die beiden Setzlinge wurden erfolgreich im Botanischen Garten der Universität Würzburg ausgepflanzt und aufgezogen.

Abbildung 11. Angezogener Setzling von *Ancistrocladus cochinchinensis* im Botanischen Garten der Universität Würzburg a) kurz nach dem Auspflanzen im Frühjahr 2004 (Bild links) und b) nach 3-jähriger Aufzucht im Frühjahr 2007 (Bild rechts).

3.2 Online-Analyse von Astrinden- und Blattextrakten von *A. cochinchinensis*

Mit Hilfe der bereits erwähnten modernen Online-Analysenverfahren wurde eine erste Untersuchung der Astrinden-Extrakte von *Ancistrocladus cochinchinensis* durchgeführt. Dabei sollte zunächst geklärt werden, ob in diesem Pflanzenextrakt interessante neue Strukturen zu finden waren oder ob dieser sich ausschließlich aus bereits bekannten Alkaloiden zusammensetzte.

Zunächst ermöglichte der Einsatz eines neuen kleinen orthogonalen Time-of-Flight-Massendetektors, gekoppelt an ein HPLC-Gerät, die zügige Bestimmung der Summenformeln der einzelnen Peaks direkt aus dem Rohextrakt. Diese neue Generation von Massendetektoren ist in der Lage, Isotopenmuster und exakte Massen mit einer Genauigkeit von < 5 ppm zu messen. Durch den Vergleich zwischen gemessenem und mittels eines speziellen Algorithmus'[47] berechneten Isotopenmusters kann so sehr schnell die elementare Zusammensetzung und damit die Summenformel der vermessenen Substanzen bestimmt werden. Abbildung 12 zeigt die extrahierten Ionenspuren der acht Hauptalkaloide, die im Astrinden-Extrakt von *A. cochinchinensis* zu finden waren. Da die Metabolite per ESI (Elektrospray-Ionisation) ionisiert wurden, entsprachen die Summenformeln entweder dem $[M+H]^+$- oder dem $[M]^+$-Massenpeak.

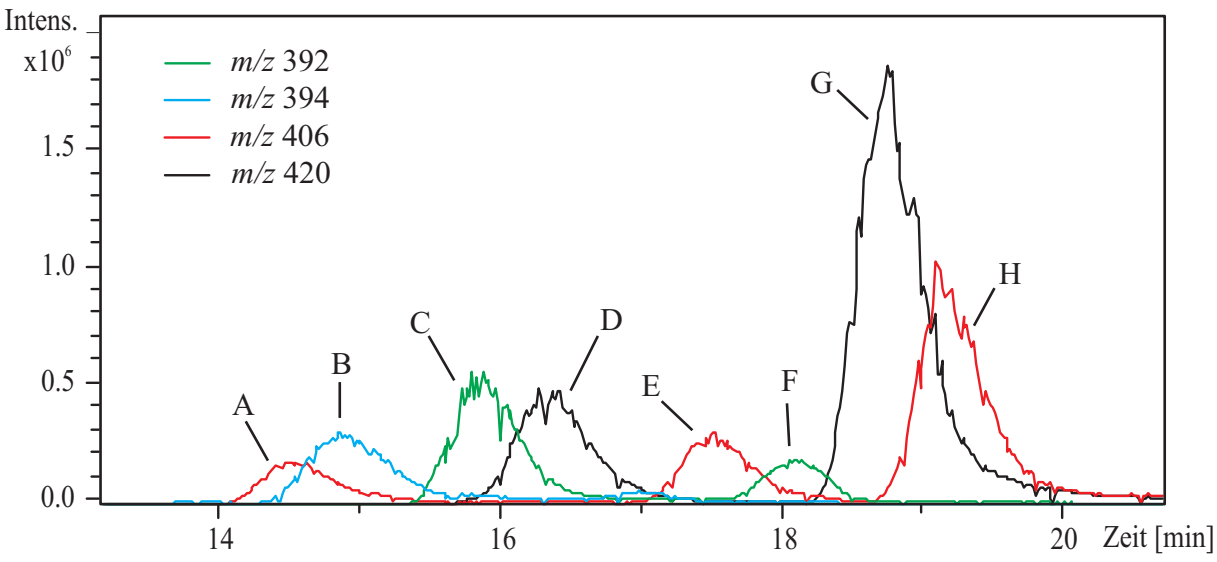


Abbildung 12. Die ermittelten Ionenspuren der Hauptmetabolite von *A. cochinchinensis*.

Aus den gemessenen Isotopenmustern und den exakten Massen ergaben sich dabei die folgenden Summenformeln für die einzelnen Peaks: Peak A (*m/z* 406.1635) = $C_{24}H_{24}NO_5^+$, Peak B (*m/z* 394.2002) = $C_{24}H_{28}NO_4^+$, Peak C (*m/z* 392.1850) = $C_{24}H_{26}NO_4^+$, Peak D (*m/z* 420.1813) = $C_{25}H_{26}NO_5^+$, Peak E (*m/z* 406.1998) = $C_{25}H_{28}NO_4^+$, Peak F (*m/z* 392.1845) = $C_{24}H_{26}NO_4^+$, Peak G (*m/z* 420.2163) = $C_{26}H_{30}NO_4^+$ und Peak H (*m/z* 406.2009) = $C_{25}H_{28}NO_4^+$.

Anhand der bisher gewonnenen Daten über die Lage der UV-Maxima und der Summenformeln konnten erste Aussagen über die Struktur der Verbindungen getroffen werden.

Bei den Peaks A und D war diese Vorauswahl besonders aussagekräftig, da das Vorkommen eines zusätzlichen UV-Maximums und das gleichzahlige Verhältnis von Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen auf zwei vollständig dehydrierte Verbindungen hinwies. Darüber hinaus besaßen diese beiden Substanzen ein Sauerstoffatom mehr als die meisten anderen bekannten Alkaloide. Das führte dazu, dass es mit diesen Massen und den entsprechenden Summenformeln jeweils nur ein bekanntes Naphthylisochinolin gab. Peak A korrelierte dabei mit der Summenformel von 6-*O*-Demethylancistrobenomin A (**26**; Struktur siehe Abbildung 13) und Peak D mit der von Ancistrobenomin A (**27**; Struktur siehe Abbildung 13), zwei vollaromatischen Alkaloiden aus der in Malaysia verbreiteten neu-entdeckten Pflanzenart *Ancistrocladus benomensis*.[45]

Um die Annahme zu beweisen, dass es sich bei den Peaks A und D wirklich um die beiden bekannten Alkaloide aus *A. benomensis* handelt, führte man im Anschluss eine HPLC-NMR-Analyse durch. Dafür wurde ein Teil des Extraktes in Acetonitril gelöst und mittels einer *Bruker*-Peak-Sampling-Unit (BPSU) vorfraktioniert, bevor man die einzelnen Peaks in die Durchflusszelle des Kryoprobenkopfes transferierte.

Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten die Peaks A und D tatsächlich zweifelsfrei als 6-*O*-Demethylancistrobenomin A (**26**) bzw. Ancistrobenomin A (**27**) identifiziert werden (siehe Abbildung 13). Sämtliche aus der Literatur bekannte ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Signale wurden übereinstimmend detektiert.[45]

Ein Vergleich der per HPLC-CD-Messung gewonnenen CD-Spektren der beiden Alkaloide **26** und **27** mit den in der Literatur[45] veröffentlichten CD-Spektren für Ancistrobenomin A (**27**) und sein 6-*O*-Demethyl-Derivat (**26**) ergab eine gute Übereinstimmung. Dies lies den Schluss zu, dass die Absolutkonfigurationen der Naturstoffe **26** und **27** identisch sind mit denen, die in einer früheren Arbeit für die Alkaloide 6-*O*-Demethylancistrobenomin A (**26**) und Ancistrobenomin A (**27**) aus *A. benomensis* bestimmt wurden.

Bei dem im LC-UV als schlecht trennbaren "Doppelpeak" auftretenden Peak B wiesen beide "Spitzen" eine identische Masse von *m/z* 394 für $[M+H]^+$ auf. Unter Berücksichtigung der für Naphthylisochinolin-Alkaloide üblichen Lage[11,12] der UV-Maximas bei 233 nm und 306 nm wurde auf ein Tetrahydroisochinolin-Derivat geschlossen. Die Position der Signale zweier Methylgruppen im ^{1}H-NMR-Spektrum der Substanz korrelierte mit den typischen chemischen Verschiebungen für die Methylgruppen an C-1 und C-3[11,12,48]; die Aufspaltung des Wasserstoffatoms an C-3 untermauerte diese These. Das Multiplett des Wasserstoffatoms an C-1 konnte im ^{1}H-NMR leider nicht beobachtet werden, da es im Rauschen des sehr breiten Wassersignals an dieser Stelle verschwand. Die Befunde verschiedener 2D-NMR-Experimente (z.B. COSY oder HMBC) ließen allerdings den Schluss zu, dass sich an C-1 ein Wasserstoffatom befindet. Die verschiedenen NMR-Daten legten dabei nahe, dass es sich bei Peak B um das bereits aus *A. tectorius* bekannte 4'-*O*-Demethylancistrocladin (**28**; Struktur siehe Abbildung 13) handelte.[48] Das ermittelte online-CD-Spektrum für Peak B stützte diesen Befund, da es mit den in der Literatur für **28** beschriebenen Daten gut übereinstimmte.

Die im UV-Spektrum auftretende "Doppelpeak"-Struktur von Peak B ist wahrscheinlich mit dem zusätzlichen Vorhandensein des Atropdiastereomers 4'-*O*-Demethylhamatin zu

erklären. Hamatin- und Ancistrocladin-Derivate wurden bereits auch in anderen *Ancistrocladus*-Pflanzen als – oftmals nur schwer trennbare – Atropdiastereomeren-Paare identifiziert.[42,48] Leider konnte von der zweiten "Spitze" des Doppelpeaks kein aussagekräftiges NMR-Spektrum aufgenommen werden.

Peak C zeigte ebenfalls die typischen UV-Maxima[11,12] von Naphthylisochinolinen. Die Masse *m/z* 392 gepaart mit der Summenformel $C_{24}H_{26}NO_4^+$ wies auf ein Dihydroisochinolin-Alkaloid hin. Da das ^{1}H-NMR-Spektrum im aromatischen Bereich ein Triplett und zwei Dubletts zeigte, musste dieses Alkaloid im Naphthalin-Teil entweder an Position 1' oder an Position 3' gekuppelt sein. Auf Grund der chemischen Verschiebung des Protons an C-8' konnte C-1' als Kupplungsposition bestimmt werden. Die Verschiebungen der Protonen an C-4 und der Methoxygruppe an C-8 wiesen im online-^{1}H-NMR-Spektrum bereits darauf hin, dass die Kupplungsposition im Isochinolinteil C-5 war. Nach Bestimmung des Oxigenierungsmusters wurde Peak C als 5'-*O*-Demethylhamatinin (**29**, siehe Abbildung 13) bestimmt.[49] Dieses war bereits aus Wurzelextrakten von *A. "ikela"*, einer botanisch noch nicht eindeutig charakterisierten kongolesischen Pflanzenart, isoliert worden. Auch in diesem Fall passten die Daten der Circulardichroismus-Untersuchung gut zu den bereits veröffentlichten Daten[49] der postulierten Struktur und erhärteten diese somit.

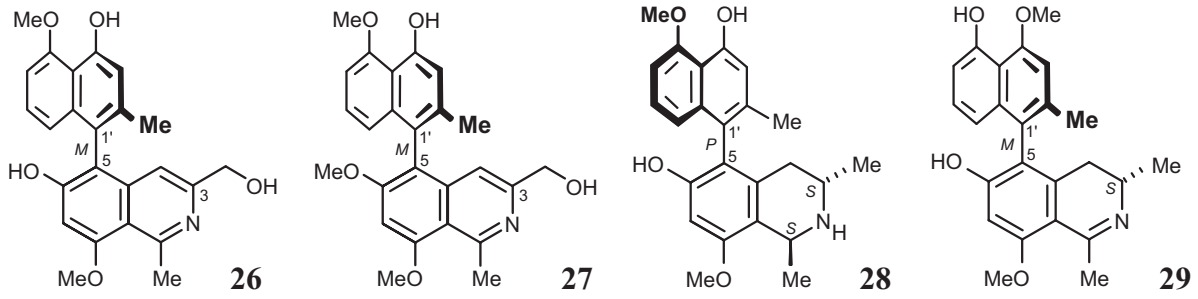


Abbildung 13. Die Strukturen der bereits aus anderen *Ancistrocladus*-Arten bekannten Alkaloide im Astrinden-Extrakt von *Ancistrocladus cochinchinensis*.

Die Peaks F, G und H zeigten neben einer ungewöhnlich langen Retentionszeit auch noch ein untypisch bathochrom verschobenes zweites Maximum. Anstatt wie üblich bei ca. 306 nm lag in diesen Fällen das zweite Maximum bei ca. 340 nm. Äußerst ungewöhnlich waren auch die ^{1}H-Spektren der Verbindungen. Alle Substanzen wiesen sechs anstelle der in den meisten

Fällen üblichen fünf aromatischen Protonen auf. Ihre Substitutionsmuster passten ebenfalls zu keiner bisher bekannten Verbindung.

Es erschien deswegen lohnenswert, die Metabolite F-H für eine Strukturaufklärung zu isolieren. Da Peak G und H die Hauptkomponenten des Extraktes darstellten, während Peak F nur in sehr geringen Konzentrationen im Extrakt vorlag, wurden zunächst die Verbindungen G und H isoliert und strukturell charakterisiert.

Abschließend wurde, um Hinweise über die Absolutkonfiguration der Stereozentren der im Astextrakt von *A. cochinchinensis* vorkommenden Naphthylisochinoline zu bekommen, das im Arbeitskreis vorher bereits etablierte Ruthenium-katalysierte oxidative Abbauverfahren[50] auf den Gesamtextrakt angewendet. Dazu wurde die im Arbeitskreis bestehende Infrastruktur genutzt.[51] Da dabei ausschließlich (*S*)-Aminobuttersäure entstand, konnte man daraus schließen, dass bei sämtlichen Alkaloiden im Extrakt die Stereozentren an C-1 und C-3 *S*-konfiguriert sein mussten.

Eine ebensolche Online-Analyse wurde auch mit Blattextrakten von *Ancistrocladus cochinchinensis* durchgeführt. Zum einen Teil waren diese bereits in Vietnam hergestellt worden und zum anderen Teil wurden sie aus frischen Blättern gewonnen, die von den Pflanzen im Botanischen Garten in Würzburg stammten. Dabei stellte man fest, dass das Metabolit-Muster in Blattextrakten vollständig mit dem in Astextrakten übereinstimmte.

3.3 Isolierung und Strukturaufklärung der Hauptmetabolite aus der Astrinde von *Ancistrocladus cochinchinensis*

3.3.1 Extraktion und Aufreinigung der Naphthylisochinolin-Alkaloide

Luftgetrocknetes Astrinden-Material wurde zerkleinert und über Nacht bei Raumtemperatur unter Rühren mit Methanol extrahiert. Das Volumen des methanolischen Extraktes wurde im Vakuum reduziert, daraufhin mit Wasser versetzt und zur Abtrennung von Fetten gegen *n*-Hexan ausgeschüttelt. Die so erhaltene Methanol-Wasser-Mischung engte man dann erneut im Vakuum auf ein geringes Volumen ein und extrahierte die Alkaloide mit

Dichlormethan. Die Dichlormethan-Phase wurde zur Trockene eingeengt und der Rückstand mit einer geringen Menge Methanol wieder aufgenommen. Nach Filtration durch einen PTFE-Spritzenvorsatzfilter konnten die Peaks G und H mittels präparativer HPLC an einer RP_{18}-Säule rein isoliert werden.

3.3.2 Strukturaufklärung von Ancistrocladinium A (30; Peak G)

3.3.2.1 Spektroskopische Charakterisierung von 30

Wie bereits erwähnt überraschte Peak G nicht nur durch eine ungewöhnlich lange Retentionszeit an RP_{18}-HPLC-Säulenmaterial, sondern auch durch ein bathochrom verschobenes zweites UV-Maximum,[22] des ansonsten für Naphthylisochinoline typisch verlaufenden UV-Spektrums.[11,12] Noch überraschender war der Befund, resultierend aus hochauflösender Masse und der Anzahl der Signale im ^{13}C-NMR-Spektrum, dass es sich bei dieser Substanz um eine kationische Verbindung mit der Summenformel $C_{26}H_{30}NO_4^+$ (*m/z* 420.2163) handelte. Vergleichbare strukturelle Daten waren bislang nur für das *N,C*-gekuppelte Ancisheynin (**8**) beobachtet worden.[16]

Auf Grund der typischen Tieffeld-Verschiebung und der Multiplizität (Singulet) der Methylgruppe an C-1 (δ 2.52 ppm) im ^{1}H-NMR-Spektrum und wegen der Verschiebung des C-1-Signals (δ 179.6 ppm) im ^{13}C-NMR-Spektrum konnte auf ein Naphthyl-1,3-dimethyldihydroisochinolin-Alkaloid geschlossen werden. Übereinstimmend dazu fehlte das H-1-Quartett bei δ 4, das beim Vorliegen eines 1,3-Dimethyltetrahydroisochinolines aufgetreten wäre.[11,12]

Im aromatischen Bereich des ^{1}H-NMR-Spektrums wurden sechs Signale beobachtet, d.h. ein Signal mehr, als es bisher für Naphthyldi- oder Naphthyltetrahydroisochinoline mit vier Sauerstofffunktionen in der Literatur beschrieben wurde.[11,12] Zwei dieser Protonen (δ 6.97 und 7.46 ppm) spalteten zu einem Dublett auf, während die anderen vier Protonen (δ 6.74, 6.77, 6.98 und 7.08 ppm) als Singuletts vorlagen. Diese Anordnung der Protonensignale legte nahe, dass die Kupplungsposition der Biarylachse in der Naphthalinhälfte des Alkaloids im Methylgruppen-freien Ring zu finden war. Diese These wurde unterstützt durch die 'normale' Verschiebung des CH_3-2'-Signals (δ 2.50 ppm). NOE-Korrelationen zwischen dem Proton H-6' (δ 6.97 ppm) und den Protonen der

Methoxygruppe an C-5' (OCH_3-5' δ 4.01 ppm) wiesen auf eine Lokalisierung der Biarylachse an C-8' des Naphthalin-Teils hin. Diese Zuordnung wurde verfestigt durch eine zusammenhängende Reihe von NOESY-Wechselwirkungen von H-1' – CH_3-2' – H-3' – OCH_3-4' und durch die Tatsache, dass H-1' wie auch H-6' ^3J-HMBC-Kopplungen zum quartären C-Atom C-8' zeigten.

Die beiden noch nicht zugeordneten aromatischen Protonen wurden auf Grund von NOE-Korrelationen der zusammenhängenden Reihe CH_3-1 – OCH_3-8 – H-7 – OCH_3-5 – H-5 – H_{eq}-4 – CH_3-3 an C-5 (H-5 δ 6.74 ppm) und C-7 (H-7 δ 6.77 ppm) lokalisiert. Diese Zuordnung wurde auch von den HMBC-Kopplungen von H_{eq}-4 und H-7 zu C-5 und H-5 zu C-7 unterstützt. Dies ließ lediglich N-2 als mögliche Kupplungsposition für die Biarylachse im Isochinolinteil zu, was auch die kationische Struktur im Massenspektrum erklärte (siehe Abbildung 14).

Auf Grund all dieser NMR-Daten konnte der Substanz die Konstitution **30** (siehe Abbildung 14) zugeordnet werden. Es handelte sich dabei um das erste *N*,8'-gekuppelte Naphthyldihydroisochinolin-Alkaloid. Diesem wurde – in Anlehnung an die kationische Isochinolinium-Substruktur – der Trivialname Ancistrocladinium A (**30**) gegeben.[22]

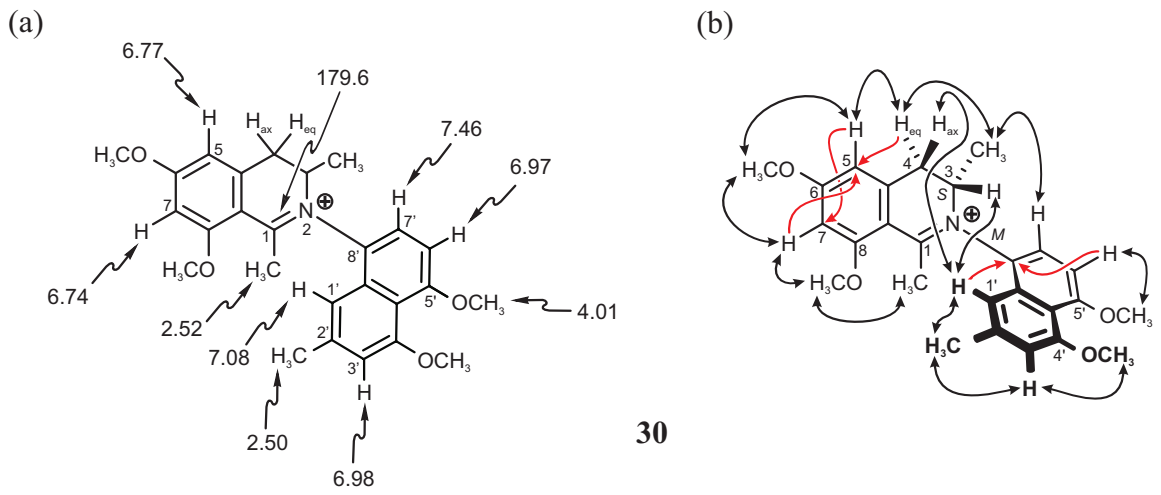


Abbildung 14. Ausgewählte NMR-Daten von Ancistrocladinium A (**30**): (a) wichtige ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Verschiebungen (δ in ppm) und (b) HMBC- (rote Pfeile) und NOE- (Doppelpfeile) Korrelationen, die zur Bestimmung der relativen Konfiguration beigetragen haben.[22]

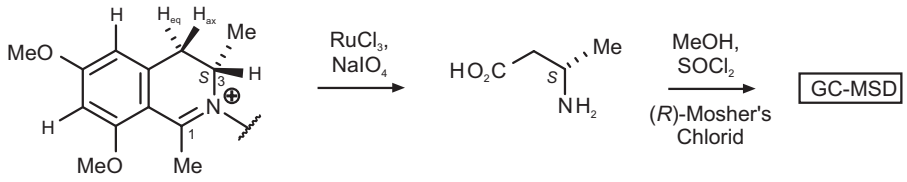
Betrachtet man die Struktur von **30**, so scheint das HPLC-Laufverhalten dieser Substanz überraschend, da dieses permanent geladene Molekül bei Einsatz eines Reversed-Phase-

Säulenmaterials schneller, d.h. im polareren Bereich laufen sollte. Erklärt werden konnte dieses untypische Verhalten durch die Ausbildung eines neutralen unpolareren Ionenpaares zwischen dem Trifluoressigsäure-Anion, das dem Laufmittel obligatorisch zur Peakformverbesserung zugesetzt wird, und dem kationischen *N*,C-gekuppelten Ancistrocladinium A (**30**).[52]

3.3.2.2 Aufklärung der absoluten Konfiguration von 30

Ancistrocladinium A (**30**) besitzt zwei verschiedene stereogene Elemente: zum einen das Stereozentrum an C-3 und zum anderen die Imminiumarylachse zwischen dem Isochinolin- und dem Naphthalinteil des Moleküls.

Die absolute Konfiguration an C-3 wurde durch ein in unserem Arbeitskreis bereits früher entwickelten Ruthenium-katalysierten oxidativen Abbauverfahren[50] bestimmt. Unter Erhalt des Stereozentrums wird dabei der aromatische Ring des Isochinolinteils in Fragmente gespalten, die entstehenden Aminosäuren nach methanolischer Veresterung und Derivatisierung mit dem *R*-Enantiomer des Mosher's Chlorids gaschromatogaphisch getrennt und mittels Massenspektrometrie analysiert (siehe Schema 1).[50] Dabei wurde die im Arbeitskreis bestehende Infrastruktur genutzt.[53]



Schema 1. Oxidativer Abbau von Ancistrocladinium A (**30**) zur Bestimmung der Absolutkonfiguration an C-3 (MSD = Massen-sensitive Detektion).[22,53]

Durch die Bildung von (*S*)-Aminobuttersäure wurde eindeutig bewiesen, dass das Stereozentrum von Ancistrocladinium A (**30**) an C-3 *S*-konfiguriert ist.[22]

Anhand von NMR-Korrelationen konnte man die Konfiguration an der Achse in Relation zum bereits eindeutig bestimmten Stereozentrum aufklären. NOE-Wechselwirkungen zwischen H-1' und H-3 bzw. H_{ax}-4 oberhalb der Isochinolin-Ebene und spezifische

Interaktionen zwischen H-7' und den Protonen der Methylgruppe an C-3 unterhalb der Ebene wiesen auf eine *M*-Konfiguration der Achse hin (siehe Abbildung 14).

Die absolute Achsenkonfiguration sollte durch CD-Studien (CD = Circulardichroismus) weiter erhärtet werden. Da Ancistrocladinium A (**30**) das erste N,8'-gekuppelte Naphthyldihydroisochinolin-Alkaloid war, konnte das gemessene CD-Spektrum nicht mit den CD-Kurven ähnlicher Naphthylisochinoline verglichen werden. Zur Konfigurationsbestimmung wurden deswegen von Dr. M. Reichert in unserer Gruppe quantenchemische CD-Berechnungen genutzt.[54-56] In zwei unabhängigen Ansätzen führte er mittels der semi-empirischen PM3[57]-Methode eine Konformationsanalyse für das (*M*,3*S*)- und das (*P*,3*S*)-Atropdiastereomer von **30** durch. Die daraus resultierenden Minimumgeometrien wurden anschließend noch durch DFT-Berechnungen auf B3LYP[58-60]/6-31G*[61]-Niveau verfeinert und führten zu je vier Minimumstrukturen für die beiden Diastereomere. Durch Nutzung des TDDFT (B3LYP/TZVP)[62,63]-Verfahrens konnten für diese globalen Minimumstrukturen CD-Spektren simuliert werden. Anschließendes Aufsummieren entsprechend der Boltzmann-Statistik ergab ein gemitteltes Spektrum, das nach UV-Korrektur mit der gemessenen CD-Kurve von Ancistrocladinium A (**30**) verglichen wurde (siehe Abbildung 15). Dabei zeigte sich eine gute Übereinstimmung der berechneten Kurve für das (*M*,3*S*)-Atropdiastereomer mit dem gemessenen Spektrum von Verbindung **30** (siehe Abbildung 15, links), während das simulierte CD-Spektrum für das (*P*,3*S*)-Atropdiastereomer im Vergleich zum gemessenen Spektrum ein gegensätzlichen CD-Verhalten im Wellenlängenbereich von 250 bis 350 nm zeigte (siehe Abbildung 15, rechts).

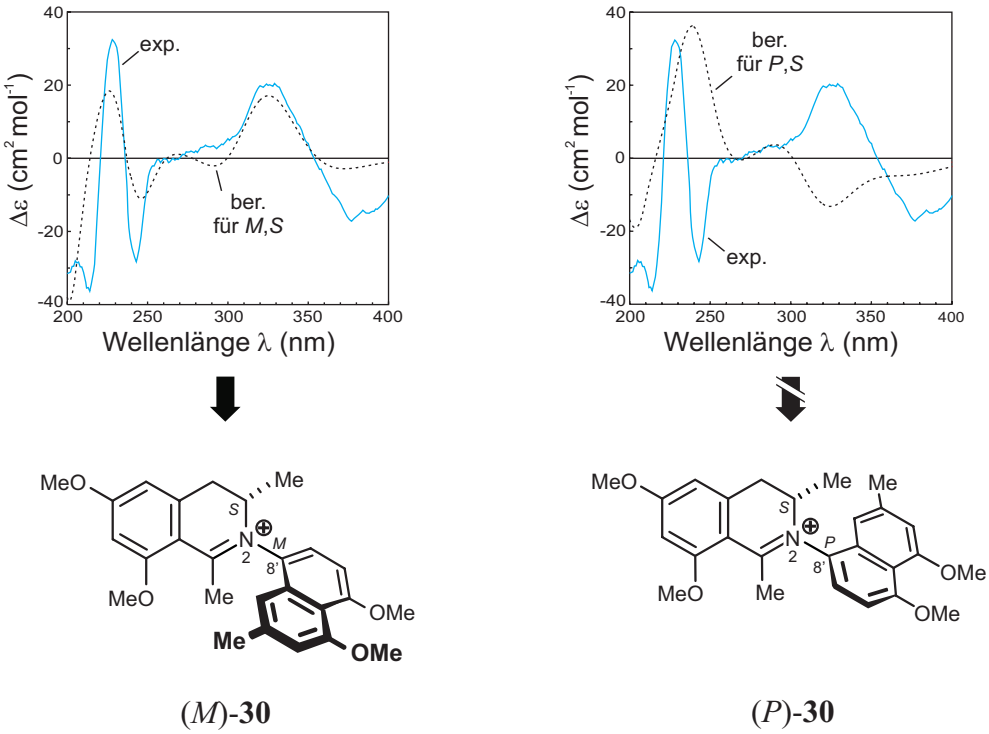


Abbildung 15. Aufklärung der Absolutkonfiguration an der Biarylachse mittels Vergleich zwischen den für das (*M*,3*S*)- und das (*P*,3*S*)-Atropdiastereomer berechneten CD-Spektren und dem gemessenem CD-Spektrum von Ancistrocladinium A [(*M*)-**30**].[22,64]

Die bereits durch NOE-Korrelationen getroffene Zuordnung der Achse in Relation zum eindeutig bestimmten Stereozentrum an C-3 konnte mit Hilfe der CD-Untersuchungen bestätigt werden. Ancistrocladinium A (**30**) ist folglich *M*,3*S*-konfiguriert.[22,64]

Da in den NMR-Spektren immer geringe Mengen des *P*,3*S*-Atropdiastereomeres zu beobachten waren (Verhältnis *M*:*P* 10:1), wurde der Versuch unternommen, für eine separate spektroskopische Charakterisierung diese Minderkomponente per HPLC rein zu isolieren. Trotz intensiver Bemühungen unter Benutzung mehrerer verschiedener Eluentensysteme (Acetonitril/Wasser, Methanol/Wasser, Isopropanol/*n*-Hexan) und des Einsatzes vieler unterschiedlicher Säulenmaterialien (verschieden modifizierte RP-C_{18}-Säulen, RP-C_8 und chirale Säulenmaterialien) wurde leider keine Trennung der beiden Atropdiastereomere erreicht. Ohne eine Auftrennung der beiden Epimere konnte die Stabilität der Achsenkonfiguration nicht mittels HPLC überprüft werden. Deswegen wurde das Verhältnis von *M* zu *P* durch Messung von ^{1}H-NMR-Spektren nach verschiedenen Zeitpunkten (1 Std., 1 Tag, 1 Woche) überprüft. Dabei stellte man keinerlei Änderung des Verhältnisses

(*M*:*P* 10:1) fest. Um zu überprüfen, ob das beobachtete Verhältnis von *M*:*P* (10:1) dem thermodynamischen Gleichgewicht entspricht oder ob die Achsenkonfiguration stabil ist, wurde Ancistrocladinium A (**30**) auch aus anderen Pflanzenteilen und anderen *Anicstrocladus*-Arten isoliert und das Verhältnis der beiden Epimere in so gewonnenem Material von **30** gemessen. Für diese Untersuchungen wurde **30** aus Blättern von *Ancistrocladus cochinchinensis* (Verhältnis *M*:*P* 3:1) und aus Blättern einer anderen in Vietnam gesammelten Pflanzenart – *A. tectorius* – gewonnen. Das Verhältnis *M*:*P* von Ancistrocladinium A (**30**) betrug – unabhängig aus welcher *Ancistrocladus*-Art dieses *N*,C-gekuppelte Alkaloid gewonnen worden war, in Blattextrakten stets 3:1. Auch hier konnte bei den Messreihen über die Dauer einer Woche keine Veränderung im Atropdiastereomeren-Verhältnis beobachtet werden. Folglich besitzt Ancistrocladinium A (**30**) eine stabile $N_{Imminium}$-C_{Aryl} Achse.[22]

3.3.3 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (31; Peak H)

3.3.3.1 Spektroskopische Charakterisierung von 31

Das UV-Spektrum des etwas unpolareren Peaks H zeigte ebenfalls das bathochrom verschobene zweite Maximum. Die Auswertung des LC-oTOF-MS Spektrums ergab mit der Summenformel $C_{25}H_{28}NO_4^+$ (*m/z* 406.2009), eine um 14 u kleinere Masse als im Fall von Ancistrocladinium A (**30**), was auf ein *O*-Demethylanalogon schließen ließ. Bis auf einige kleine Unterschiede in den Verschiebungen und dem Fehlen des Hochfeld-verschobenen Methoxygruppensignals stimmten auch die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren von Substanz **31** mit denen von Ancistrocladinium A (**30**) überein. Zusammenhängende NOE-Korrelationen in der Reihenfolge CH_3-1 – OCH_3-8 – H-7 – OCH_3-5 – H-5 – H_{eq}-4 – CH_3-3 belegten klar, dass eine Methoxygruppe im Naphthalin-Teil fehlen musste, und bestätigten zugleich, dass die Kupplungsposition in der Isochinolin-Hälfte erneut an *N*-2 lokalisiert war. Das Aufspalten der Protonen an C-6' und C-7' zu Dubletts und NOE-Wechselwirkungen zwischen OMe-5' – H-6' – H-7' einerseits und H-3' – Me-2' – H-1' andererseits führten zur Aufklärung der Kupplungsposition im Naphthalinteil von **31** an C-8' und zeigten deutlich das Fehlen der Methoxygruppe an C-4', zu der es im Fall von Ancistrocladinium A (**30**) eine NOESY-Korrelation von H-3' gegeben hatte (siehe Abbildung 16).

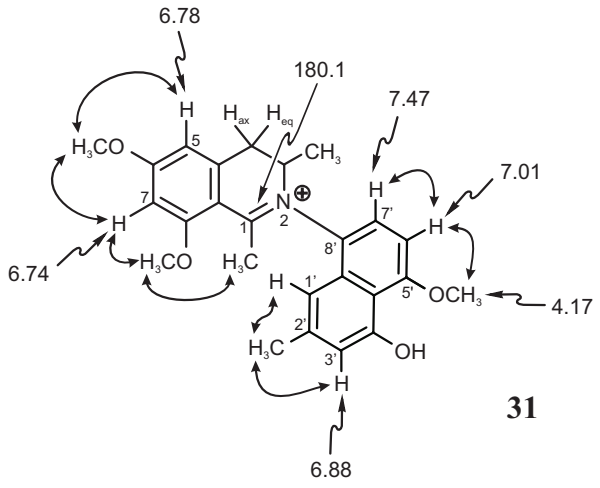


Abbildung 16. Wichtige ^{1}H-Verschiebungen (δ in ppm) und NOE-Wechselwirkungen (Doppelpfeile), die zur Aufklärung der Konstitution von **31** beigetrugen.

Da es sich bei Substanz **31** um ein *O*-Demethylderivat des neuen *N*,C-gekuppelten Dihydronaphthylisochinolin-Alkaloids Ancistrocladinium A (**30**) handelte, wurde die Verbindung 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) genannt.[65]

3.3.3.2 Die absolute Konfiguration von 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (31)

Wie auch schon Ancistrocladinium A (**30**) besaß 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) zwei stereogene Elemente mit dem Stereozentrum an C-3 und der axial-chiralen Biarylachse. Die Konfiguration des Stereozentrums an C-3 wurde durch die Ruthenium-katalysierte, oxidative Abbaureaktion[50] bestimmt und ergab für **31** ebenfalls eine *S*-Konfiguration an C-3.[53]

Relativ zum Stereozentrum konnte auch im Fall von Verbindung **31** mittels NMR-Wechselwirkungen eine erste Zuordnung der Achsenkonfiguration vorgenommen werden. Da auch hier NOE-Korrelationen von H-1' mit H-3 und H_{ax}-4 oberhalb der Ebene und Interaktionen zwischen H-7' und den Protonen der Methylgruppe an C-3 unterhalb der Ebene beobachtet wurden, lag auch bei 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) eine *M*-Konfiguration der Heterobiarylachse vor. Diese vorläufige Zuordnung wurde durch Circulardichroismus-Untersuchungen von **31** überprüft (siehe Abbildung 17).

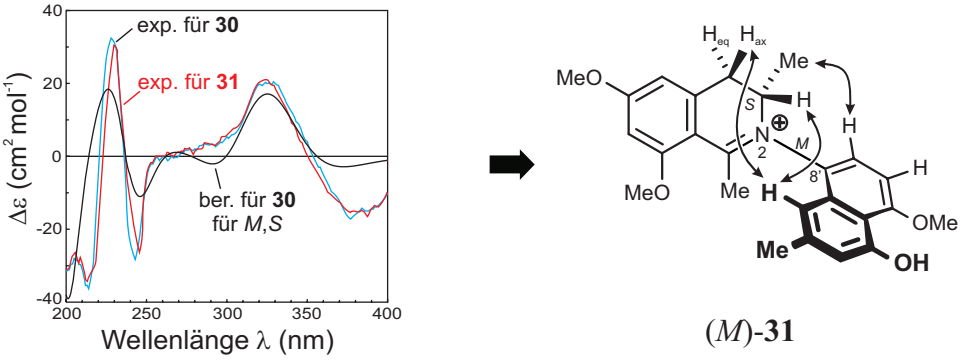


Abbildung 17. Vergleich des berechneten[64] und des gemessenen CD-Spektrums von Ancistrocladinium A [(*M*)-**30**] mit dem gemessenen CD-Spektrum von 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**). Die Doppelpfeile zeigen die NOESY-Korrelationen über die Achse, die die Bestimmung der Absolutkonfiguration unterstützt haben.

Der Vergleich der CD-Spektren zeigte deutlich, dass die mittels NMR getroffene Achsenzuordnung richtig war und dass auch 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) eine *M*-konfigurierte Achse besaß.[65] Diese Achsenkonfiguration erwies sich auch in diesem Fall als stabil. Für die in Kapitel 3.3.2.2. bereits beschriebenen Tests wurde Verbindung **31** aus Ast- (Verhältnis *M*:*P* 10:1) wie auch aus Blattextrakten (Verhältnis *M*:*P* 3:1) von *A. cochinchinensis* isoliert.

3.3.4 6, 4'-*O*-Didemethylancistrocladinium A (32)

3.3.4.1 Spektroskopische Charakterisierung von 32

Peak F war im Astextrakt von *Ancistrocladus cochinchinensis* nur in sehr geringen Mengen enthalten und zeigte bei der HPLC-Trennung ein etwas polareres Laufverhalten als die Substanzen **30** und **31**. Auch bei dieser Verbindung war das zweite Maximum bathochrom verschoben und die exakte Masse (*m/z* 392.1845) betrug 28 u weniger als im Fall von Ancistroladinium A (**30**) und 14 u weniger als im Fall von 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**), was auf ein Di-*O*-demethyl-Derivat hinwies. Die Summenformel wurde dazu passend als $C_{24}H_{26}NO_4^+$ bestimmt und auch die Verschiebungen und Korrelationen im ^{1}H-NMR-Spektrum erhärteten diese These.

Der Naphthalin-Teil zeigte annähernd identische Verschiebungen wie bei Verbindung **31** und sämtliche bei **31** vorkommende NOE-Wechselwirkungen. In der Isochinolin-Hälfte

waren die Signale der Protonen an C-5 und C-7 Hochfeld-verschoben und besaßen keinerlei NOE-Interaktionen mit der funktionellen Gruppe an C-6, während dies bei den Verbindungen **30** und **31**, bei denen an dieser Position eine Methoxygruppe saß, der Fall war. Dies legte den Schluss nahe, dass Verbindung **32** an Position C-6 im Vergleich zu **31** eine Hydroxygruppe anstatt einer Methoxyfunktion besaß.

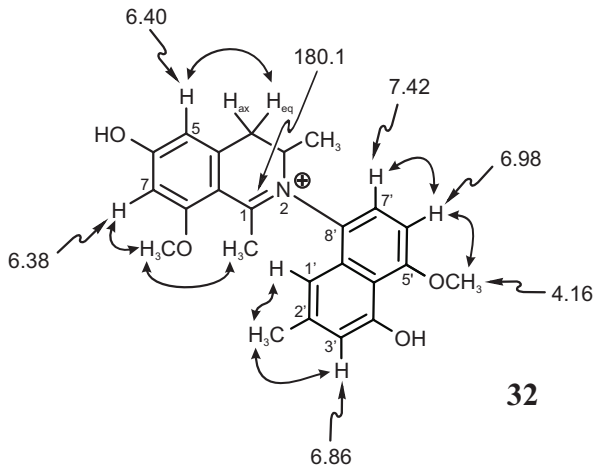


Abbildung 18. Wichtige chemische Verschiebungen (δ in ppm) und NOE-Korrelationen (Dopppelpfeile) für die Strukturaufklärung von Verbindung **32**.

Dieses Di-*O*-demethyl-Derivat wurde deswegen 6,4'-*O*-Didemethylancistrocladinium A (**32**) genannt.[65]

3.3.4.2 Absolutkonfiguration von 6,4'-*O*-Didemethylancistrocladinium A (32)

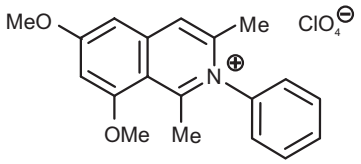
Das Ruthenium-katalysierte oxidative Abbauverfahren[50,51] zeigte, dass auch bei der Verbindung 6,4'-*O*-Didemethylancistrocladinium A (**32**) das Stereozentrum an C-3 *S*-konfiguriert war. Das mittels HPLC-CD-Messung bestimmte CD-Spektrum von **32** wies einen ähnlichen Kurvenverlauf auf wie das CD-Spektrum von Ancistrocladinium A [(*M*)-**30**], was – untermauert von NOE-Korrelationen – die Schlussfolgerung zuließ, dass **32** eine *M*-konfigurierte Biarylachse besitzt. Somit war auch 6,4'-*O*-Didemethylancistrocladinium A (**32**) 3*S*,*M*-konfiguriert.[65]

3.4 Großisolierung der neuen *N,C*-gekuppelten Naphthylisochinoline 30 und 31

Da die beiden neuartigen *N,C*-gekuppelten Naphthylisochinolin-Alkaloide Ancistrocladinium A (**30**) und 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) bei ersten Untersuchungen *in vitro* sehr vielversprechende Wirkungen zeigten (ausführliche Beschreibung siehe Kapitel 3.6), wurden für weiterführende Tests größere Substanzmengen benötigt. Eine präparative Gewinnung mittels HPLC wäre sehr aufwendig und langwierig gewesen, weshalb nach Methoden gesucht wurde, die *N,C*-gekuppelten Alkaloide erst einmal im Rohextrakt anzureichern. Dies wurde auf zwei Wegen versucht: (a) mittels Ionenaustausch-Chromatographie und (b) mittels FCPC.

3.4.1 Anreicherung von 30 und 31 mittels Ionenaustausch-Chromatographie

Zunächst wurde ein Ansatz zur Anreicherung der *N,C*-gekuppelten Alkaloide **30** und **31** mittels Ionenaustausch-Chromatographie[66,67] verfolgt. Hierfür wurden drei verschiedene Kationenaustauscher-Materialien (Amberlyst®, Amberlite IR-120®, Sephadex C-25®) ausprobiert. Zur Testung der genannten Adsorber-Harze, im Hinblick auf eine mögliche Bindung und Elution *N,C*-gekuppelter Alkaloide, wurden zunächst Versuche mit der stark fluoreszierenden Modellsubstanz *N*-Phenyl-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinolinium-perchlorat[68,69] (**33**, siehe Abbildung 19) durchgeführt.



33

Abbildung 19. Struktur der von Dipl.-Chem T. Gulder synthetisch hergestellten[68] Modellsubstanz *N*-Phenyl-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinolinium-perchlorat (**33**).[69]

Dazu wurde eine methanolische Lösung der Modellsubstanz **33** auf eine geringe Menge der verschiedenen Ionenaustauscher-Materialien gegeben, eine Zeit lang stehen gelassen und die Färbung bzw. Entfärbung des Überstandes beobachtet. Danach untersuchte man das Verhalten der Substanz **33** beim Spülen der Ionenaustauscher mit verschiedenen Eluenten (z.B. MeOH, NaCl-Lösung, HCl, TFA; siehe Tabelle 10, Experimentalteil).

Man konnte dabei beobachten, dass **33** zwar am besten an das Amberlite IR-120®-Material gebunden wurde, von diesem aber nicht vollständig wieder eluiert werden konnte. Die besten Ergebnisse hinsichtlich Bindung und Elution wurden mit Amberlyst® erzielt. An dieses Material konnte die Vergleichssubstanz **33** zufriedenstellend gebunden, die Säule ohne Verlust von **33** zum Abtrennen von möglichen Begleitstoffen mit Methanol gespült und mit konzentrierter NaCl-Lösung, die 0.5% TFA enthielt, gut wieder freigesetzt werden. Durch eine weitere Elution mit Methanol wurde **33** fast vollständig von der Säule wiedergewonnen.

Der oben beschriebenen Methode folgend, gelang es auch Ancistrocladinium A (**30**) an das Ionenaustauscherharz zu binden und mit einer Ausbeute von 95 % unter Anwendung von konzentrierter Natriumchlorid-Lösung versetzt mit 0.5% Trifluoressigsäure und Methanol wieder freizusetzen.

Die Anwendung dieser Methode für die Anreicherung von Ancistrocladinium A (**30**) und 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) aus Rohextrakten wie z.B. aus einem Astextrakt von *A. cochinchinensis* lieferte bedauerlicherweise keine befriedigenden Ergebnisse. Nach Bindung an den Adsorber-Harz und Elution wie oben beschrieben befanden sich in der erhaltenen Fraktion neben den erwünschten *N*,*C*-gekuppelten Alkaloiden auch andere *C*,*C*-verknüpfte Naphthylisochinoline.

Zusammenfassend musste man feststellen, dass diese Methode zwar sehr schnell und effizient zur Abtrennung von z.B. Chlorophyll oder Gerbstoffen und damit zur Aufreinigung der Gesamtextrakte verwendet werden konnte, die erwünschte Anreicherung der *N*,*C*-gekuppelten Alkaloide **30** und **31** war aber leider nicht möglich. Auch Veränderungen des pH-Wertes brachten diesbezüglich keine Verbesserung.

3.4.2 Einsatz der Fast Centrifugal Partitioning Chromatography (FCPC) für die Isolierung von 30 und 31 im 100-mg-Maßstab

Bei der parallel zur Ionenaustauscher-Methode ausprobierten Fast Centrifugal Partitioning Chromatography (FCPC) wurde eine Verteilung der Substanzen des eingesetzten Extraktes zwischen zwei miteinander nicht mischbaren Lösungsmittel-Phasen vorgenommen. Die mobile Phase fließt dabei durch die stationäre Phase, die in einem schnell drehenden Rotor mit vielen diskreten Trennkammern zurückgehalten wird. Ein Maß für die Trennleistung und die Retentionszeit der einzelnen Substanzen ist der Verteilungskoeffizient K

($K = c_{stationäre\ Phase} / c_{mobile\ Phase}$), der für eine sinnvolle Retentionszeit ungefähr zwischen 0.8 und 4.5 liegen sollte. Ist der Verteilungskoeffizient größer, beträgt die Retentionszeit mehr als drei Stunden. Ist K kleiner, eluieren die Substanzen sofort nach der Injektion, also bereits im "Einspritzpeak".[38,70]

Da für *N*,*C*-gekuppelte Naphthylisochinolin-Alkaloide noch kein Lösungsmittelsystem etabliert war, musste zuerst ein geeignetes zweiphasiges Gemisch gefunden werden. Dafür wurde etwas Astextrakt von *A. cochinchinensis* in verschiedenen zweiphasigen Lösungsmittelgemischen verteilt (siehe Tabelle 1). Anschließend wurde die Konzentration der einzelnen Substanzen in den beiden verschiedenen Phasen mittels HPLC bestimmt und der Verteilungskoeffizient berechnet (Tabelle 1).

Tabelle 1. Verteilungskoeffizienten K der Peaks A-H in verschiedenen Lösungsmittelsystemen für die FCPC.

Lösungsmittel-system	K von Peak A	K von Peak B	K von Peak C	K von Peak D	K von Peak E	K von Peak F	K von Peak G	K von Peak H
$CHCl_3$:EA:MeOH:H_2O 5:3:5:3[a]	0.72	4.20	2.14	0.25	0.94	0.73	1.07	1.04
CH_2Cl_2:EA:MeOH:H_2O 6:4:6:4	0.35[a] 2.88[b]	0.14[a] 6.84[b]	0.44[a] 2.27[b]	1.80[a] 0.56[b]	0.64[a] 1.56[b]	0.94[a] 1.06[b]	1.41[a] 0.88[b]	0.89[a] 1.21[b]
n-Hexan:EA:MeOH:H_2O 8:2:8:2[b]	0.40	0.60	1.06	1.16	1.81	1.58	2.31	2.39
$CHCl_3$:EA:*i*-Prop:H_2O 6:4:6:4[b]	3.51	0.85	1.75	9.95	2.64	4.14	2.62	1.19
n-Hexan:EA:*i*-Prop:H_2O 4:6:4:6[a]	1.81	1.84	1.85	1.83	1.89	2.14	1.71	1.62

$CHCl_3$ = Chloroform; EA = Ethylacetat; MeOH = Methanol; *i*-Prop = Isopropanol
[a] Organische Phase = stationäre Phase
[b] Organische Phase = mobile Phase

Die beste Trennleistung bezüglich der *N*,C-gekuppelten Alkaloide **30** und **31** erbrachte das Lösungsmittelsystem 1 bestehend aus Chloroform:Ethylacetat:Methanol:Wasser (5:3:5:3), das bereits in früheren Arbeiten erfolgreich zur Auftrennung von Naphthylisochinolin-Alkaloiden genutzt worden war.[71] Ancistrocladinium A (**30**, Peak G, K = 1.07) und 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**, Peak H, K = 1.04) besaßen in diesem System einen deutlich anderen Verteilungskoeffizienten K als die anderen im Pflanzenextrakt vorkommenden Substanzen **26-29** (Peaks A-E) und **32** (Peak F), so dass eine Anreicherung von **30** und **31** in einigen Fraktionen mit Hilfe dieses Lösungsmittelsystems erwartet wurde.

In der Tat gelang es, per FCPC, mit Hilfe des o.g. Lösungsmittelsystems, aus einem Astextrakt von *A. cochinchinensis* einige Fraktionen zu erhalten, die nur Ancistrocladinium A (**30**) und 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) enthielten.

Unter Einsatz eines 10-minütigen isokratischen Gradienten konnten mittels präparativer HPLC aus diesen angereicherten Fraktionen, die Alkaloide **30** und **31** erfolgreich in genügend großer Menge, und bei vertretbarem Zeitaufwand für die weiterführenden pharmakologischen Tests isoliert werden.

3.5 Analyse des natürlichen Gegenions der *N,C*-gekuppelten Alkaloide

Bei den *N,C*-gekuppelten Naphthylisochinolinen stellte sich auf Grund ihrer kationischen Struktur die Frage, welches Anion in der Natur als Gegenion fungiert. In der Literatur werden für andere permanent kationische Alkaloide neben Gallussäure-Derivaten und Catechingerbstoffen hauptsächlich organische Pflanzensäuren wie Zitronen-, Wein-, Mecon-, Chelidon-, Chlorogen- oder Chinasäure diskutiert. Außerdem gibt es in der Literatur einige Hinweise, dass auch die Zellwand als Gegenion fungieren kann.[72-74]

Ob eines dieser genannten Ionen als Gegenion für die Substanzen **30** und **31** in Frage kam, sollte mit Hilfe von HPLC-oTOF-MS Messungen überprüft werden.

3.5.1 HPLC-oTOF-MS Untersuchung nach FCPC-Vorfraktionierung zur Bestimmung des Gegenions

Zunächst wurde ein Teil des Astextraktes von *Ancistrocladus cochinchinensis* mittels eines flüssig-flüssig-chromatographischen FCPC-Trennlaufs vorfraktioniert. Dabei benutzte man das bereits beschriebene Lösungsmittelsystem bestehend aus Chloroform:Ethylacetat (5:3) als stationärer Phase und Methanol:Wasser (5:3) als mobiler Phase. Die so gewonnene Fraktion von **30** und **31** wurde im Vakuum zur Trockene eingeengt und in wenig Methanol wieder aufgenommen.

Diese Fraktion wurde einmal direkt in den Massendetektor injiziert sowie in einem zweiten Ansatz über eine RP_{18}-Säule per HPLC aufgetrennt und im Anschluss an die Trennung in den Detektor eingebracht.

Leider konnte an Hand dieser Methode keines der in der Literatur[72-74] für permanent geladene Alkaloide beschriebenen Gegenionen gefunden werden.

3.5.2 Analyse der Zellwand-gebundenen Substanzen in *A. cochinchinensis*

Für diese Untersuchung wurden der Literatur folgend zunächst aus frischem Blattmaterial saubere Zellwände isoliert.[75] Dazu wurden die gesammelten Blätter zerkleinert und mit verschiedenen Lösungsmitteln (Methanol, Wasser, 0.5% Natriumdodecylsulfat-Lösung, 1 M Natriumchlorid-Lösung, 1 M NaCl-Lösung + 0.5% Trifluoressigsäure, Wasser, Methanol, Aceton, *n*-Hexan und Ameisensäure) gewaschen.

Ein Teil dieser aufgereinigten Zellwände wurde unter Stickstoffatmosphäre mit 1 M Natronlauge versetzt und für 24 h bei 80° gerührt. In diesem Extrakt, der nur Zellwand-gebundene Substanzen enthalten sollte, konnten die *N*,*C*-gekuppelten Alkaloide mittels einer HPLC-oTOF-MS-Messung zweifelsfrei identifiziert werden (siehe Abbildung 20).

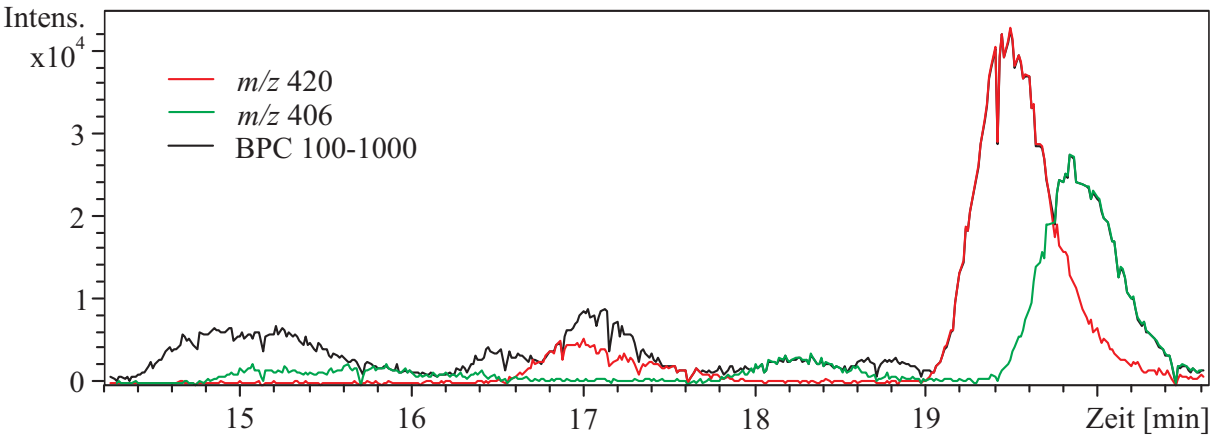


Abbildung 20. Base-Peak-Chromatogramm des Zellwand-Extraktes. Zusätzlich sind die Massenspur für Ancistrocladinium A (**30,** rot) und 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**, grün) eingezeichnet.

Dabei wurde eine deutliche Anreicherung der *N*,*C*-gekuppelten Naphthylisochinoline gegenüber den *C*,*C*-gekuppelten Alkaloiden, die in diesem Zellwandaufschluss nur in Spuren nachweisbar waren, beobachtet. Vermutlich funktioniert diese kovalente Bindung der Isochinolinium-Salze an die Zellwand über einen Pseudobasen-Mechanismus. Dieser ist für die Substanzen *in vitro* bereits nachgewiesen[52,76] und auch für andere Alkaloide

(z.B. Sanguinarine)[77,78] in der Literatur beschrieben worden. Zusätzlich wurden auch die verschiedenen Waschfraktionen mittles HPLC-MS untersucht. Außer in den ersten methanolischen Fraktionen konnten keine Alkaloide bei den verschiedenen Waschgängen isoliert werden.

Zumindest ein Teil der *N,C*-gekuppelten Alkaloide lag also an die Zellwand gebunden vor. Da allerdings eine größere Substanzmenge von **30** und **31** bereits mit Methanol aus dem Pflanzenmaterial extrahiert werden konnte, handelt es sich bei der Zellwand offensichtlich nicht um das gesuchte Gegenion.

Zusammenfassend muss man bedauerlicherweise feststellen, dass das natürliche Gegenion bisher nicht identifiziert werden konnte.

3.6 Biologische Aktivität der Inhaltstoffe des Astextraktes von *A. cochinchinensis*

3.6.1 Pharmakologische Aktivitäten gegen Tropenkrankheiten

Aufgrund der vielversprechenden pharmakologischen Aktivitäten einiger bereits bekannter Naphthylisochinolin-Alkaloide,[79-81] wie z.B. Dioncophyllin C[17,82] gegen Malaria oder Ancistrotanzanin B[18] gegen Leishmaniose, wurden die neu isolierten Verbindungen **30** und **31** im Schweizerischen Tropeninstitut im Arbeitskreis von Prof. Brun auf ihre Aktivität gegen Pathogene der Gattungen *Plasmodium*, *Leishmania* und *Trypanosoma* mittels eines standardisierten Verfahrens[83] untersucht.

Tabelle 2. Biologische Aktivitäten und Zytotoxizität der Verbindungen **30** und **31** in IC_{50}-Werten [µg/mL] im Vergleich zum Standard des jeweiligen Testsystems.[22]

	30	Index[a]	**31**	Index[a]
P. falciparum (Stamm: K1)	0.25	102	0.275	101
Standard: Chloroquin 0.086				
T. cruzi (Stamm: Tulahuen C4)	>30	< 0.85	0.0175	1600
Standard: Benznidazol 0.68				
T. b. rhodesiense (Stamm: STIB 900)	0.075	340	0.139	201
Standard: Melarsoprol 0.0032				
L. donovani Axen.(Stamm: MHOM-ET-67/L82)	0.038	671	0.06	466
Standard: Miltefosin 0.0785				
L. donovani inf. Mac. (Stamm: MHOM-ET-67/L82	0.722	35	0.97	28
Standard: Miltefosin 0.7				
Zytotoxizität (Stamm: Ratten Myoblasten L-6)	25.5		28	
Standard: Podophyllotoxin 0.003				

[a] Therapeutischer Index = IC_{50} Zytotoxizität / IC_{50} Aktivität gegen Erreger

Während die Substanzen **30** und **31** gegen *Plasmodium falciparum* nur eine moderate Wirkung zeigten, war die Aktivität gegen die Erreger der Leishmaniose bei beiden Verbindungen gut. Außerdem war Ancistrocladinium A (**30**) zusätzlich aktiv gegen *Trypanosoma brucei* und 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) wirkte sehr gut gegen *Trypanosoma cruzi*. Auf Grund dieser vielversprechenden pharmakologischen Eigenschaften der beiden *N*,*C*-gekuppelten Naphthylisochinoline **30** und **31** gegen die Erreger der Kala-Azar, der Afrikanischen Schlafkrankheit und der Chagas-Krankheit und einer nur moderat ausgeprägten Zytotoxizität, wurden für diese Erreger erste *In-vivo*-Tests mit entsprechend infizierten Mäusen durchgeführt. Leider verliefen diese Tierexperimente erfolglos, denn die infizierten Mäuse konnten im Verlauf des Experimentes nicht geheilt werden und verstarben nach etwa einer Woche.

3.6.2 Untersuchung der Wirkung von Ancistrocladinium A (30) gegen *L. major*

Parallel zu den oben genannten Untersuchungen der pharmakologischen Aktivität der neu isolierten Alkaloide wurde im Rahmen des *SFBs 630* in der Arbeitsgruppe von Prof. Moll und Prof. Ponte-Sucre auch die Wirkung von *N*,*C*-gekuppelten Naphthylisochinolinen – unter ihnen Ancistrocladinium A (**30**) – gegen *Leishmania major*, den Erreger der Orientbeule, analysiert. Neben dem Einfluß auf Promastigoten des protozoischen Pathogens wurden auch die Toxizitäten gegen verschiedene Zelllinien untersucht.

Tabelle 3. Aktivität von **30** gegen *L. major* und verschiedene Zelllinien.[84]

	IC_{50} Ancistrocladinium A (**30**)
L. major Promastigoten Standard: Amphotericin B (2.51 ± 1.36 µM)	4.90 ± 2.93 µM (Index: 6.48)
Makrophagen Zelllinie J774.1 Standard: Amphotericin B (n.n.)	31.76 ± 4.75 µM
Frisch isolierte peritoneale Makrophagen Standard: Amphotericin B (n.n.)	41.68 ± 13.13 µM
Dendritische Zellen (aus Knochenmark) Standard: Amphotericin B (n.n.)	36.01 ± 13.23 µM

n.n. = nicht nachweisbar

Die Aktivität von Ancistrocladinium A (**30**) gegen *Leishmania major* lag – ähnlich wie die des Standards Amphotericin B – im niedrigen mikromolaren Bereich, während die Toxizität gegen die verschiedenen menschlichen Zelllinien deutlich höher ausfiel.

Auf Grund dieser vielversprechenden Wirksamkeit testete man im Arbeitskreis von Prof. Moll anschließend den Einfluss von **30** auf die intrazellular vorliegende amastigote Form von *L. major*. Hierfür wurden frisch isolierte peritoneale Makrophagen für 24 h mit den Erregern infiziert und danach über 48 Std. mit ansteigenden Konzentrationen der Substanz behandelt. Das Überleben der Makrophagen wurde dabei erst bei Substanzkonzentrationen von **30** beeinflusst, die deutlich über der lag, die für eine Abnahme der Infektionsrate (EC_{50} 1.31 ± 0.50 μM) nötig war (siehe Abbildung 21).

Die zur 50 prozentigen Senkung der Infektionsrate der Makrophagen benötigte Dosis lag – bei geringer therapeutischer Breite – für **30** dabei deutlich höher (ca. 17-fach) als für den Goldstandard Amphotericin B (EC_{50} 0.075 ± 0.019 μM), weshalb mit dieser Substanz keine weiteren Tests mehr durchgeführt wurden.

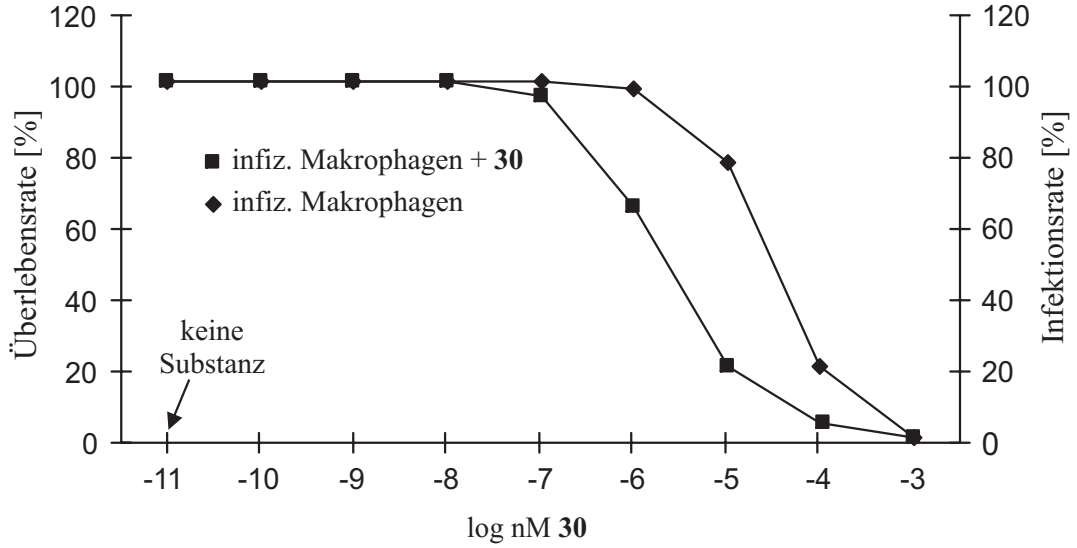


Abbildung 21. Dosis-Wirkungs-Beziehung des Einflusses von Ancistrocladinium A (**30**) auf das Überleben und die Infektionsrate von frisch isolierten peritonealen Makrophagen.[84]

Nichts desto trotz ermutigten die Ergebnisse der pharmakologischen Test dazu, einen synthetischen Zugang zu diesen interessanten Biaryl-Naturstoffen zu etablieren. Durch die Synthese von Strukturvarianten – begleitet durch QSAR-Rechnungen – sollten die Strukturen hinsichtlich der Wirksamkeit und der Toxizität optimiert werden.[52,85]

3.6.3 Untersuchung der isolierten Verbindungen 30 und 31 auf Phytotoxizität

Da Pflanzen sekundäre Metabolite zu ihrem eigenen Vorteil synthetisieren,[5] sollte neben der Analyse der pharmakologischen Eigenschaften auch eine mögliche allelopathische Aktivität der *N*,*C*-gekuppelten Naphthylisochinoline in Bezug auf andere Pflanzen analysiert werden.[86] Als Testorganismus wurde – wie vielfach in der Literatur[87-89] beschrieben – Gartenkresse (*Lepidium sativum*) verwendet, deren Keimungsrate und Wachstum bei unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle untersucht wurde. Dafür bestimmte man zunächst ungefähr die physiologische Konzentration (0.9 mM / Blatt) der Alkaloide Ancistrocladinium A (**30**) und 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) in frisch hergestellten Blattextrakten von *A.-cochinchinensis*-Pflanzen aus dem Botanischen Garten Würzburg, um sinnvolle Konzentrationen (0.05 mM, 0.07 mM, 0.1 mM, 0.7 mM, 1 mM) für die Messreihe zu ermitteln.[65]

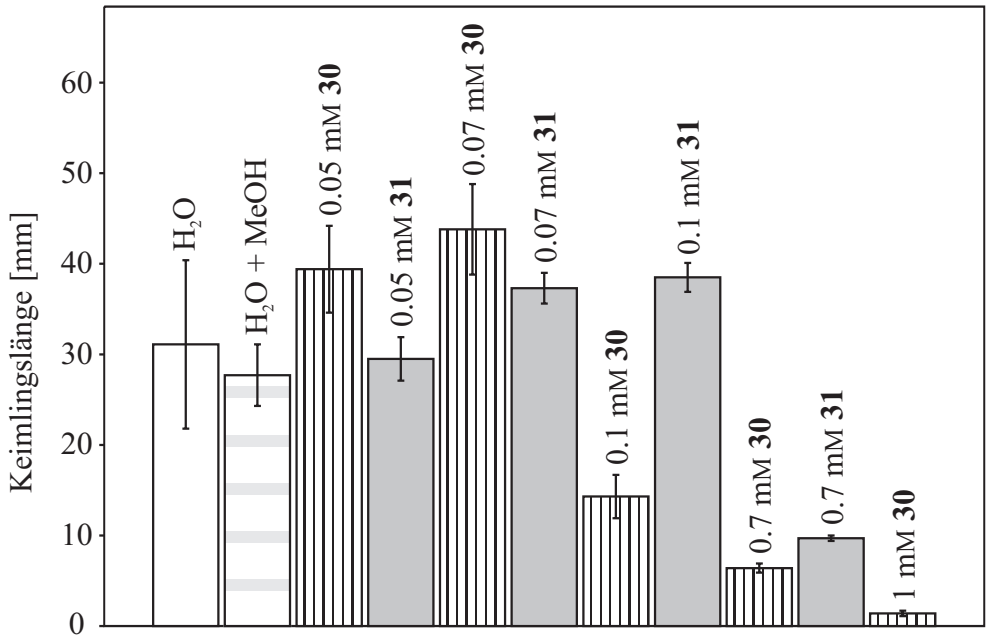


Abbildung 22. Allelopathische Wirkung der *N*,*C*-gekuppelten Naphthylisochinoline.

In geringen Konzentrationen wurde das Keimlingswachstum der Gartenkresse von Ancistrocladinium A (**30**) und 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) nicht gehemmt. Es konnte sogar eine leichte, aber nicht signifikante Wachstumsinduktion beobachtet werden. Erst als die Substanzen in Konzentrationen von 0.7 mM und 1 mM – also in Konzentrationen nahe des physiologischen Wertes – vorlagen, entwickelten sich die *Lepidium-sativum-*

Keimlinge nicht mehr gut und zeigten ein deutlich reduziertes Längenwachstum (siehe Abbildung 22) und eine verminderte Wurzelhaarausbildung. Außerdem konnte bei der höchsten Konzentration unter dem Mikroskop eine gelb-orangene Färbung der Wurzelepithelzellen und der Zellen des Leitbündels beobachtet werden. Dieses Experiment bewies, dass die beiden Naphthylisochinolin-Alkaloide **30** und **31** eine phytotoxische Wirkung auf Gartenkresse-Keimlinge hatten[65] und deswegen möglicherweise von den Pflanzen im Kampf um den eigenen Lebensraum im Regenwald genutzt werden. *C*,*C*-verknüpfte Naphthylisochinoline wie z.B. Dioncophyllin A zeigten dagegen in einer früheren Untersuchung keine allelopathische Aktivität.[89]

4 Naphthylisochinolin-Alkaloide aus Blättern der noch nicht vollständig charakterisierten kongolesischen Art *"Ancistrocladus ikela"*

4.1 *"Ancistrocladus ikela"* – eine neue Art aus dem Kongobecken?

Bei Forschungsreisen von Prof. V. Mudogo[90] in die Sumpfregion des Regenwaldes Yeteto, nahe der Stadt Ikela (siehe Abbildung 24), die in der Zentralregion (Equateur) der Demokratischen Republik Kongo liegt, wurde Material einer botanisch noch nicht vollständig charakterisierten *Ancistrocladus*-Art – mit dem Arbeitsnamen *"Ancistrocladus ikela"* – gesammelt. Neben getrocknetem Pflanzenmaterial wurde auch eine lebende Pflanze (00-70-B-10) in den Botanischen Garten Würzburg exportiert, wo sie im Jahr 2004 erstmals blühte.

Die Pflanze hat bisher eine Größe von etwa 5 m erreicht und besitzt einen Stammdurchmesser von ca. 2 cm. Die Stammrinde ist gräulich-braun gefärbt, während jüngere Äste grünlich-braun sind. Die abzweigenden Äste sind ca. 25 cm lang und tragen mehrere der Gattungsnamen-gebenden (Ancistrocladus = Hakenast), spiraligen, hakenartigen Fortsätze (umgeformte Sprossenden; ∅ 10.0-15.0 mm). Die kleinen Seitenäste tragen ebenfalls die quirlig sitzenden Blattrosetten mit durchschnittlich vier eiförmig-lanzettlichen, ganzrandigen, ledrigen Blättern (siehe Abbildung 23 a). Diese haben eine Länge von 15.5-29.0 cm und eine Breite von 5.8-9.3 cm, was einem Länge-Breite-Verhältnis von 2.7-3.6 entspricht. Beiderseits der zum Blattgrund hin immer prominenter hervorstehenden Mittelrippe verteilen sich gleichmäßig 14 Drüsen mit rötlichem Inhalt (siehe Abbildung 23 b). Die netznervigen Blätter besitzen 12-18 Nervenpaare 2. Ordnung und ein fein-verästeltes Netz dünner Nerven höherer Ordnung (siehe Abbildung 23 c). Desweiteren gibt es Blätter, die direkt am Stamm sitzen. Diese sind deutlich kleiner (Länge ca. 8 cm; Breite ca. 4 cm; Länge-Breite-Verhältnis 2) als die Blätter der Seitenäste und besitzen auch eine andere Form (rundlich-leicht eiförmig). Die Infloreszenzen dieser Art entspringen seitlich der Blattrosette (siehe Abbildung 23 a, b), besitzen einen Stiel von 5.5-15.0 cm, einen dichotom verzweigten Infloreszenzkopf von 2.5-7.0 × 4.0-12.0 cm Größe und weisen am Ende der dichotomen Verzweigungen jeweils eine kugelige Knospe auf (siehe Abbildung 23 b). Die fünf grünlich-weißen Sepalen sind 6.0-8.0 × 4.0-5.0 mm groß, eiförmig-rund und tragen auf der Außenseite drei bräunliche Drüsen (siehe Abbildung 23 d). Nach Öffnen der Blüte rollen sich die Sepalen nach unten ein und geben den Blick frei auf fünf ovale, überlappend-angeordnete,

cremefarben-gelbliche Petalen, deren Größe 2.6-3.4 × 2.6-3.4 mm beträgt. Die Blüten besitzen zehn gleichgroße Stamina, die kreisförmig um das Gynoceum angeordnet und am Fuß miteinander verwachsen sind. Die Filamente sind weiß, etwa 1.5 mm lang, weisen keinen Dimorphismus auf und münden in die orange-rötlichbraunen ca. 0.8 mm langen Antheren. Die drei hellgelben Stigmas mit einer Länge von etwa 0.4 mm sitzen auf dem 1.8-2.5 mm langen Stylus (siehe Abbildung 23 d).

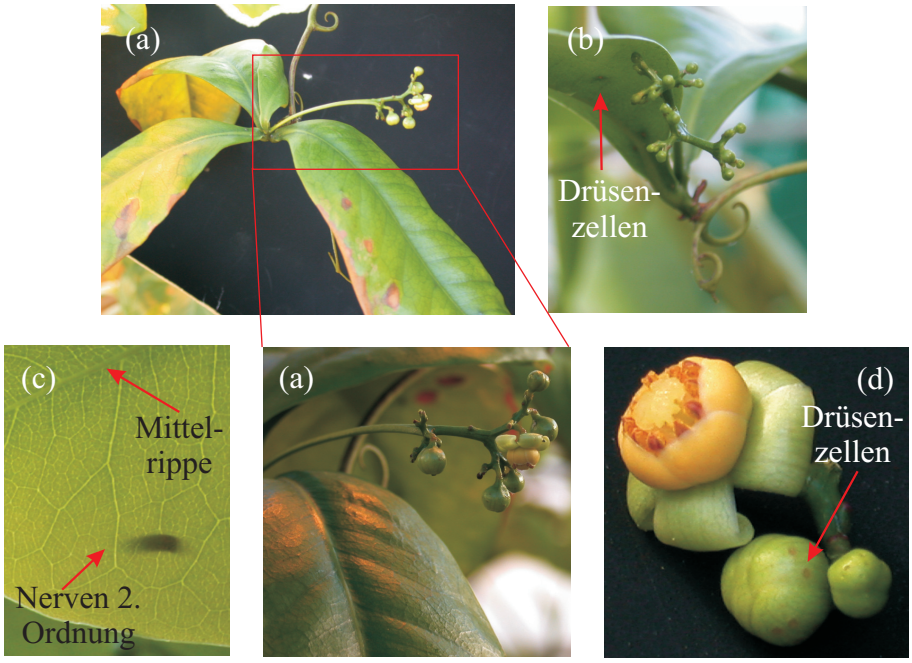


Abbildung 23. Fotos der botanisch noch nicht eindeutig charakterisierten kongolesischen Pflanzenart *"Ancistrocladus ikela"*: (a) Hakenast mit Blattrosette und Infloreszenz, (b) Drüsenzellen der Blätter; Dichotomie der Infloreszenz, (c) Nervatur der Blätter, (d) Blütenaufbau und Drüsen auf der Außenseite der Sepale.

Bei einer vergleichenden Analyse der Morphologie der vermutlich neuen Art *"A. ikela"* mit den bekannten kongolesischen *Ancistrocladus*-Arten *A. ealaensis*, *A. likoko* und *A. congolensis*[40,91] konnte *A. congolensis* ganz klar ausgeschlossen werden, da es vor allem in der – für die Bestimmung von Arten – sehr wichtigen Anatomie der Blüte frapierende Unterschiede gab, wie z.B. die unterschiedliche Anzahl der Styli.[91,92]

Mit *A. likoko* und *A. ealaensis* hatte die neue Pflanzenart zwar einige Gemeinsamkeiten im Aufbau der Blüten, allerdings stimmten auch bei diesen beiden Arten die Größe und Farbe der Blüten wie auch die Größe und Nervatur der Blätter nicht vollständig mit den entsprechenden Pflanzenteilen von *"A. ikela"* überein.[91]

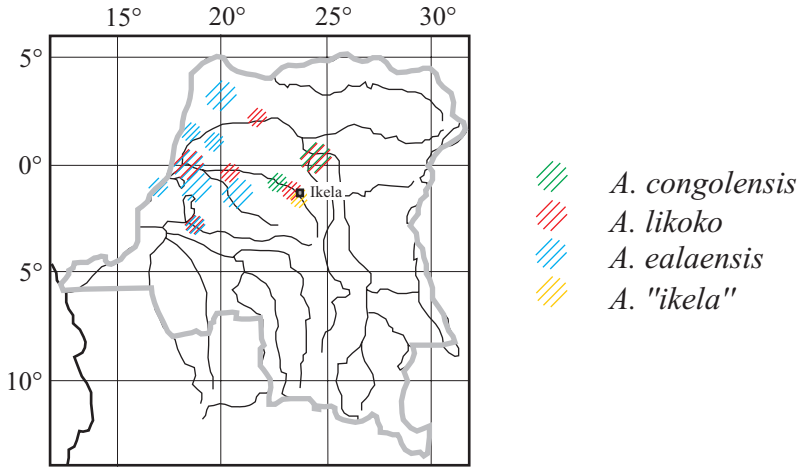


Abbildung 24. Fundorte der verschiedenen kongolesischen *Ancistrocladus*-Species in der Demokratischen Republik Kongo.

Die Fundorte (siehe Abbildung 24) der verschiedenen kongolesischen *Ancistrocladus*-Arten wurden ebenfalls als Vergleichskriterium herangezogen. Die Sumpfregion nahe der Stadt Ikela, in der die vermutlich "neue" Pflanzenart gefunden wurde, lag in direkter Nachbarschaft zu den in der Literatur beschriebenen Fundorten von *A. likoko* und *A. congolensis*.[91] Da die Morphologie von *A. likoko* mit der von *"A. ikela"* durchaus Übereinstimmungen aufwies, könnte es sich im Fall der noch nicht genau identifizierten Art auch um eine natürliche Varietät von *A. likoko* handeln.

Um der Frage der Zugehörigkeit der Art weiter nachzugehen, wurde als weiteres Kriterium eine Analyse der chemischen Zusammensetzung der Pflanzenextrakte durchgeführt. Hierbei wurden ausschließlich Naphthylisochinolin-Alkaloide untersucht, da diese als phytochemische Marker dieser Lianenarten fungieren.[71] Die erhaltenen HPLC-UV-Chromatogramme der Blattextrakte der verschiedenen Arten zeigten, dass das Metabolitspektrum der botanisch noch nicht charakterisierten Art mit keinem der anderen drei kongolesischen Arten vollkommen identisch war. Zum Beispiel kamen einzig im Extrakt von *"A. ikela"* zwei Peaks vor, deren UV-Spektren darauf hinwiesen, dass es sich um volldehydrierte Naphthylisochinoline handelte.[45] Auch im Bezug auf die im Extrakt gut erkennbaren *N*,*C*-gekuppelten Dihydroisochinolin-Alkaloide (deutlich längere Retentionszeit als *C*,*C*-verknüpfte Substanzen; bathochrom verschobene Maxima) wurden Unterschiede festgestellt. *A. likoko* zum Beispiel wies überhaupt keine *N*,*C*-gekuppelten Naphthylisochinolin-Alkaloide in seinem Extrakt auf, während in *"A. ikela"* mit Ancistrocladinium A (**30**) und B (**39**) zwei *N*,*C*-verknüpfte Alkaloide vorkamen.

Die meisten Übereinstimmungen gab es bei der phytochemischen Untersuchung der Blattextrakte überraschenderweise mit *A. congolensis*, obwohl zu dieser Art eklatante morphologische Unterschiede, vor allem im Blütenaufbau, vorhanden waren. Jedoch muß man bei der Interpretation der phytochemischen Ergebnisse Vorsicht walten lassen, da auch ein und die selbe Art durch jahreszeitliche Schwankungen oder verschiedene Boden- bzw. Nährstoffzusammensetzungen unterschiedliche Metabolitprofile aufweisen kann.

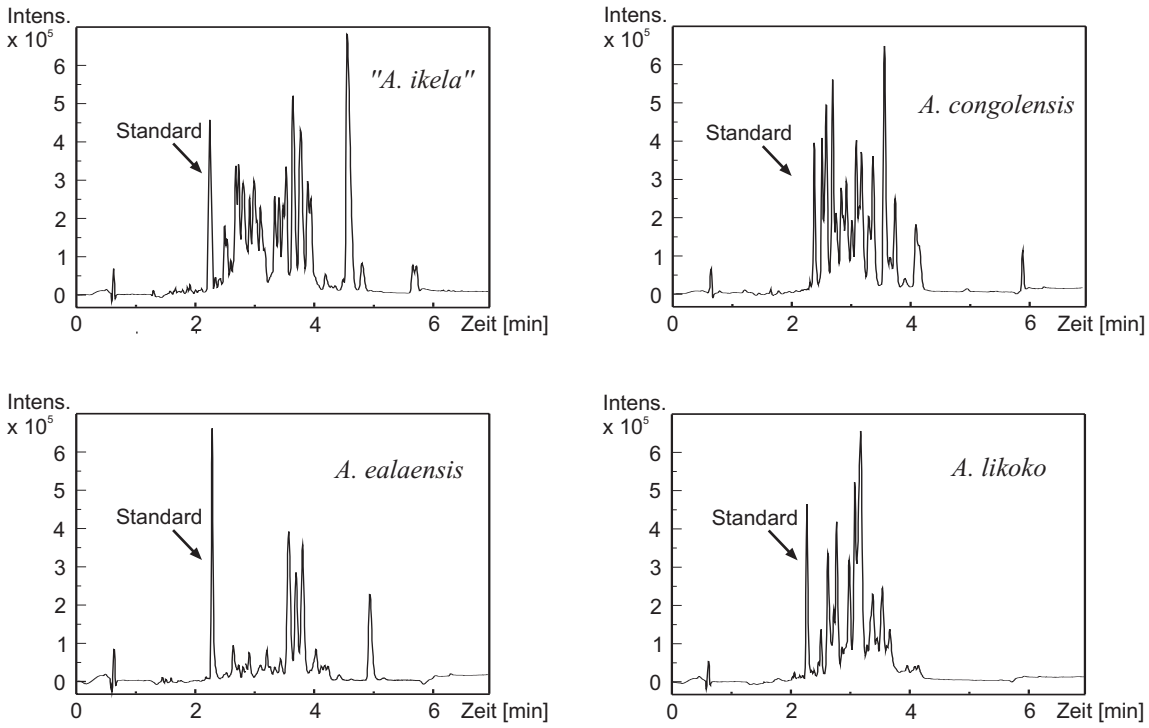


Abbildung 25. HPLC-UV-Metabolitprofile von *"A.ikela"*, *A. conglensis*, *A. ealaensis* und *A. likoko* (Standard: 2-Methoxy-4-methylbenzoesäure).

Diese Befunde erhärteten die These, dass es sich bei *"Ancistrocladus ikela"* um eine neue Art handeln könnte. Um dies zweifelsfrei zu beweisen, laufen zur Zeit noch ITS-Sequenzanalysen[93,94] im Arbeitskreis von Prof. Heubl.

4.2 Phytochemischer Kenntnisstand über *"A. ikela"*

Über die Inhaltsstoffe der noch nicht vollständig botanisch charakterisierten Art *"Ancistrocladus ikela"* wurden bislang zwei phytochemische Arbeiten angefertigt.[22,49] Eine dieser Arbeiten[49] beschreibt die erschöpfende Analyse der Wurzelextrakt-Metabolite. Hier konnten neben acht bereits bekannten Naphthylisochinolinen (Ancistrocladinium A (**30**), 6-*O*-Demethylancistrobrevin A, Hamatin, Ancistrocladin, Hamatinin, 6-*O*-Methylhamatin, 6-*O*-Methylhamatinin und Ancistroealain A) sechs strukturell neue Alkaloide und ein verwandtes Benzopyranon isoliert und aufgeklärt werden. Bei allen neu isolierten Verbindungen [5'-*O*-Demethylhamatin (**34**), 5'-*O*-Demethylhamatinin (**29**), 6-*O*-Demethylancistroealain A (**35**), 6,5'-*O*,*O*-Didemethylancistroealain A (**36**), 5-*epi*-6-*O*-Methylancistrobertsonin A (**37**), 5-*epi*-4'-*O*-Demethylancistrobertsonin C (**38**); siehe Abbildung 26] handelt es sich ausschließlich um *C*,*C*-gekuppelte Naphthylisochinoline, die nur sehr moderate Wirkungen gegen Erreger von Tropenkrankheiten zeigten.[49]

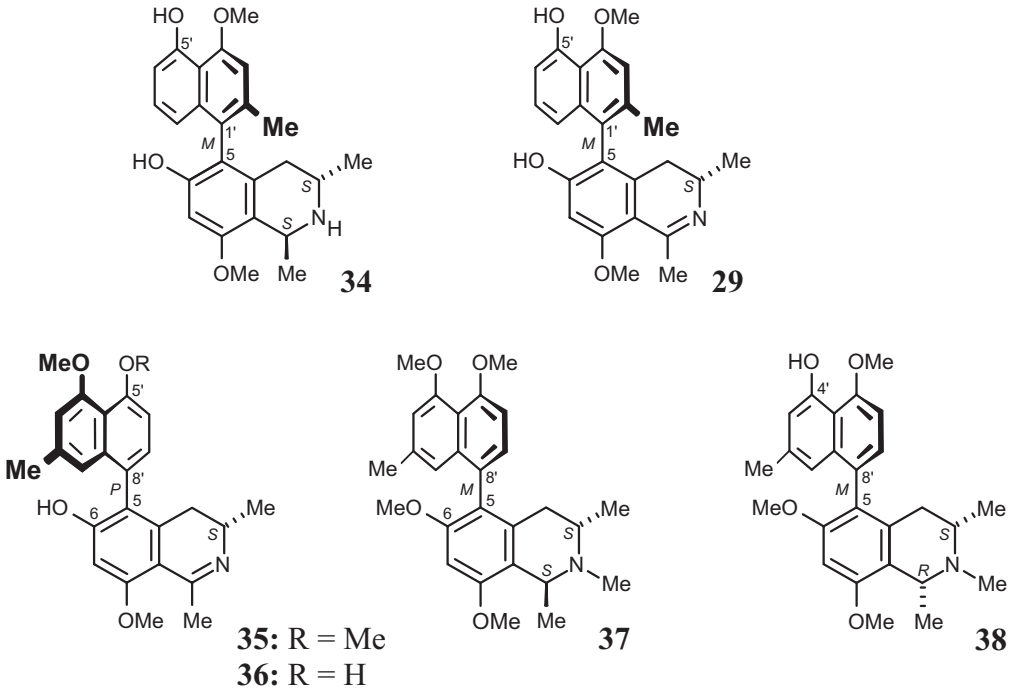


Abbildung 26. Neue, aus Wurzelextrakten von *"A. ikela"* stammende Naphthylisochinoline.[49]

Eine weitere Arbeit aus unserem Arbeitskreis[22] beschreibt die Ergebnisse zu Alkaloiden aus Blattextrakten von *"A. ikela"*. Daraus wurden bisher nur zwei Naphthylisochinoline isoliert, weshalb eine weitere phytochemische Untersuchung der Blätter vorgenommen wurde. Bei den veröffentlichten Verbindungen handelte es sich um das *N*,8'-gekuppelte

Ancistrocladinium A (**30**) und um das ebenfalls *N*,*C*-verknüpfte Ancistrocladinium B (**39**), bei dem die Biarylachse im Naphthalinteil an C-6' lokalisiert ist. Ancistrocladinium B (**39**) ist der erste Vertreter dieses neuen Kupplungstyps.[22] In Kapitel 4.4 wird auf dieses Alkaloid noch näher eingegangen.

4.3 Isolierung und Strukturaufklärung von 8-*O*-Methylancistrogriffin C (40)

4.3.1 Extraktion und Aufreinigung des Alkaloids 40

Mittels präparativer HPLC an verschiedenen Säulenmaterialien (Symmetry®C_{18}, XTerra®) konnte aus dem methanolischen Blattextrakt von *"Ancistrocladus ikela"* eine Verbindung isoliert werden, deren UV-Chromatogramm die für Naphthylisochinonlin-Alkaloide typischen Maxima[11,12] bei 233 nm und 306 nm zeigte. Eine LC-MS-Messung ergab, dass die Substanz eine Masse von *m*/*z* 407 hatte. Anhand dieser Daten ließen sich schon erste Vermutungen über den Hydrierungsgrad der Isochinolin-Hälfte treffen; so ist eine Masse von *m*/*z* 407 charakteristisch für ein Tetrahydroisochinolin.[11,12]

4.3.2 Strukturaufklärung von 8-*O*-Methylancistrogriffin C (40)

4.3.2.1 Spektroskopische Charakterisierung der Verbindung 40

Die chemische Verschiebung, die Multiplizität und die Anzahl der Signale des ^{1}H-NMR-Spektrums untermauerten die These, dass es sich im Fall der isolierten Substanz um ein Naphthyltetrahydroisochinolin-Alkaloid handelt. Vor allem die Anwesenheit des Protons an C-1 (Quartett bei 4.76 ppm) und die des Multipletts für H-3 bei 3.92 ppm in Kombination mit den Hochfeld-verschobenen Signalen von zwei Methylgruppen (C-1 δ = 1.66 ppm und C-3 δ = 1.53 ppm) belegten, dass der Isochinolin-Teil vollständig hydriert vorlag. Die beiden diastereotopen Protonen an C-4 wiesen eine "normale" chemische Verschiebung auf (2.92 und 3.26 ppm), was auf eine Kupplung der Isochinolin-Hälfte an C-7 hindeutete.[95] Im Falle eines an C-5 gekuppelten, und damit räumlich deutlich näheren Naphthalin-Teils wäre durch den Ringstromeffekt eine Hochfeld-Verschiebung der oben genannten Protonen an C-4 zu erwarten. Darüber hinaus wurden ROESY-Korrelationen zwischen H-5 und H-4_{ax} bzw. H-4_{eq} und eine HMBC-Wechselwirkung von H-5 mit C-4 beobachtet, was bewies, dass C-5 nicht

die Kupplungsposition sein konnte. Eine ROESY-Wechselwirkung von H-5 mit der Hochfeld-verschobenen Methoxygruppe an C-6 (3.63 ppm) sowie ROESY-Korrelationen der beiden Methoxygruppen an C-6 und C-8 (3.14 ppm) über die Biarylachse mit dem Naphthalinteil des Moleküls (6-OMe – H-1'; 8-OMe – H-7') bestätigten C-7 als Kupplungsposition. Des Weiteren konnte eine HMBC-Wechselwirkung über die Achse von H-7´ mit C-7 beobachtet werden.

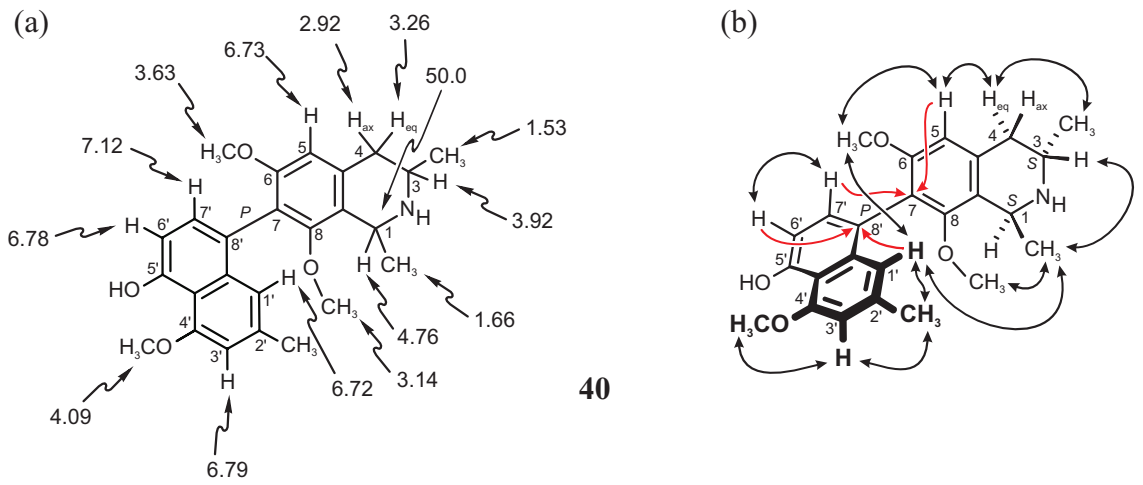


Abbildung 27. (a) Ausgewählte chemische Verschiebungen (δ in ppm), (b) HMBC- (rote Pfeile) und NOESY-Wechselwirkungen (Doppelpfeile), die zur Strukturaufklärung von 8-*O*-Methyl-ancistrogriffin C (**40**) maßgeblich beitrugen.

ROESY-Korrelationen der Serie H-1' – CH_3-2' – H-3' – OCH_3-4' sowie H-6' – H-7' ließen C-8' als einzige mögliche Kupplungsposition für die Biarylachse im Naphthalinteil des Moleküls zu. Untermauert wurde diese These durch HMBC-Wechselwirkungen von H-1' und H-6' mit dem quartären C-8'-Atom. Außerdem besaßen H-1' und H-7' ROEs über die Achse zu den Methoxygruppen an C-6 und C-8 (siehe oben).

Somit lag ein 7,8'-gekuppeltes Naphthylisochinolin-Alkaloid der Struktur **40** vor, welches große Ähnlichkeiten mit dem bekannten Ancistrogriffin C (**41**; siehe Abbildung 28) aufwies.[21] Daher wurde der neue Naturstoff 8-Methylancistrogriffin C (**40**) genannt.

Die relative Konfiguration an C-1 versus C-3, also die Stellung der entsprechenden beiden Methylgruppen des Isochinolin-Teils konnte anhand von ROESY-Wechselwirkungen von H-1 und H-3 als *trans* bestimmt werden.

4.3.2.2 Aufklärung der Absolutkonfiguration von 40

Zur Bestimmung der Absolutkonfiguration wurde zunächst durch die Nutzung der vorhandenen Infrastruktur das im Arbeitskreis etablierte Ruthenium-kataysierte oxidative Abbauverfahren[50] angewendet, um die Konfiguration der beiden Stereozentren an C-1 und C-3 zu bestimmen.[53] Dabei wurde festgestellt, dass – wie auch schon bei Ancistrogriffin C (**41**, Struktur siehe Abbildung 28) selbst – beide Stereozentren von 8-*O*-Methylancistrogriffin C (**40**) *S*-konfiguriert waren.

Desweiteren wurden die CD-Spektren von Substanz **40** und von Ancistrogriffin C (**41**) verglichen, dessen Absolutkonfiguration (1*S*,3*S*,*P*) bereits in einer früheren Arbeit bestimmt worden war.[21,96] Bei diesen beiden Kurven konnte ein gegensätzliches CD-Verhalten der beiden Alkaloide **40** und **41** beobachtet werden (siehe Abbildung 28). Auf Grund der veränderten Prioritäten im 8-*O*-Methylderivat **40** wurde die Biarylachse ebenfalls als *P*-konfiguriert identifiziert. Somit war 8-*O*-Methylancistrogriffin C (**40**) 1*S*,3*S*,*P*-konfiguriert, was auch von der relativen Konfiguration der Stereozentren an C-1 und C-3 und der NOESY-Korrelation zwischen der Methylgruppe C-1 und des H-Atoms an 1' gestützt wird.

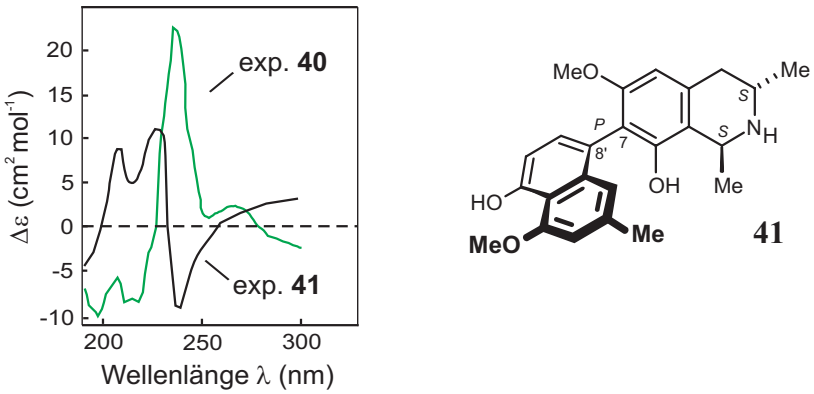


Abbildung 28. Struktur des bereits bekannten Ancistrogriffin C (**41**)[21] und der Vergleich der beiden CD-Kurven von 8-*O*-Methylancistrogriffin C (**40**) und **41** zur Bestimmung der Achsenkonfiguration von Substanz **40**.

4.4 Untersuchungen zur Rotationbarriere und zur Achsenkonfiguration von Ancistrocladinium B (39)

Die Konstitution von Ancistrocladinium B (**39**), dem ersten Vertreter des neuen *N*,6'-Kupplungstyps, war von Dipl.-Pharm. Sarah Pedersen und Dr. Michael Dreyer in früheren Arbeiten aufgeklärt worden.[71,97] Im Zuge dieser ersten Untersuchungen von **39**, welches im HPLC-Chromatogramm eine charakteristische Doppelpeakstruktur aufwies, wurde festgestellt, dass es sich bei den beiden Peaks um Atrop-Diastereomere handelte, die sich nach Isolierung bei Raumtemperatur wieder ineinander umwandelten. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden Beiträge zur vollständigen Trennung der beiden Atropdiastereomere mittels HPLC geleistet. Daraus resultierend konnten saubere LC-NMR- und LC-CD-Spektren gemessen werden, die die aus dem Gemisch bestimmten Strukturen bestätigten und so die Absolutkonfiguration untermauerten. Außerdem wurde durch die saubere Auftrennung der beiden Isomere von **39** die Bestimmung der Aktivierungsenergie der Rotation um die konfigurativ semistabile Biarylachse möglich.[22]

4.4.1 HPLC-NMR- und HPLC-CD-Messungen von 39

Nach der Etablierung eines HPLC-Systems bestehend aus Methanol und Wasser versetzt mit Trifluoressigsäure, durch das eine Basislinien-Trennung der beiden Peaks von Ancistocladinium B (**39**, Verhältnis im Gleichgewichtszustand 46:54) erreicht wurde, nahm man zunächst HPLC-NMR-Spektren der beiden Isomere mit Hilfe des Cryofit®-Einsatzes auf. Durch die sauber erhaltenen Spektren konnten die Zuordnungen[71,97] der einzelnen Signale, die anhand der verschiedenen NMR-Spektren (^{1}H, ^{13}C, COSY, NOESY, HMBC, HMQC) des Isomerengemisches von **39** im Vorfeld vorgenommen wurden, bestätigt werden.[22]

Die These, dass Ancistrocladinium B (**39**) aus einem Gemisch zweier Atrop-Diastereomere besteht, wurde durch die Aufnahme zwei verschiedener online-CD-Spektren für die beiden Peaks erhärtet. Diese beiden im stop-flow-Modus[19] gemessenen Kurven waren komplett gegensätzlich, was auf eine unterschiedliche Achsenkonfiguration schließen ließ. Wie bei den "normalen", *C*,*C*-gekuppelten Naphthylisochinolinen[98,99] wurde davon ausgegangen, dass das Heterobiarylsystem mit seinem charakteristischen dihedralen Winkel zwischen den Chromophoren, das CD-Verhalten maßgeblich beeinflusst.

Da es sich auch in diesem Fall – wie schon bei Ancistrocladinium A (**30**) – um einen neuen Kupplungstyp handelte, waren keinerlei Vergleichsspektren verfügbar und quantenchemische CD-Rechnungen[54-56] mussten von Dr. Matthias Reichert aus unserem Arbeitskreis für die Zuordnung der Absolutkonfiguration angefertigt werden. Die errechneten CD-Spektren verglich man im Anschluss mit den gemessenen CD-Kurven der beiden Peaks von Ancistrocladinium B (**39**). Dabei stimmte das experimentelle CD-Spektrum von Peak A, dem schneller eluierenden Peak, gut überein mit der für (*P*,3*S*)-**39** berecheneten Kurve, während das CD-Spektrum des langsamer eluierenden Peaks B zu dem berechneten für (*M*,3*S*)-**39** passte. Diese Zuordnung der Absolutkonfiguration wurde auch durch die mittels NMR-NOESY-Spektroskopie gemessenen Korrelationen unterstützt.

Auch bei der LC-CD-Analyse stimmten die früheren Ergebnisse mit denen überein, die unter Verwendung des optimierten Eluentensystems gewonnen worden waren.

4.4.2 Bestimmung der Rotationsbarriere von Ancistrocladinium B (39)

In Anlehnung an das bisher einzige andere Naphthylisochinolin-Alkaloid, Diocophyllin E (Kupplungstyp: 7,3'; *C*,*C*-verknüpft),[95] das eine konfigurativ semistabile Biarylachse besitzt, die eine langsame Rotation der beiden Molekülhälften um diese Achse zulässt, wurde für **39** die für diese Rotation benötigte Aktivierungsenergie bestimmt.

Die bei Raumtemperatur sehr langsam verlaufende Umwandlung der beiden Atrop-Diastereomere ineinander wurde mittels HPLC-Messreihen bei vier verschiedenen Temperaturen (55°C, 65°C, 75°C und 85°C) verfolgt. Die Atropisomerisierungs-Raten von Ancistrocladinium B [(*P*)-**39**] und seinem Diastereomer (*M*)-**39** bestimmte man für beide Reaktionen bei den verschiedenen Temperaturen aus kurz vorher sauber isolierten Fraktionen von **39** (siehe Abbildung 29).

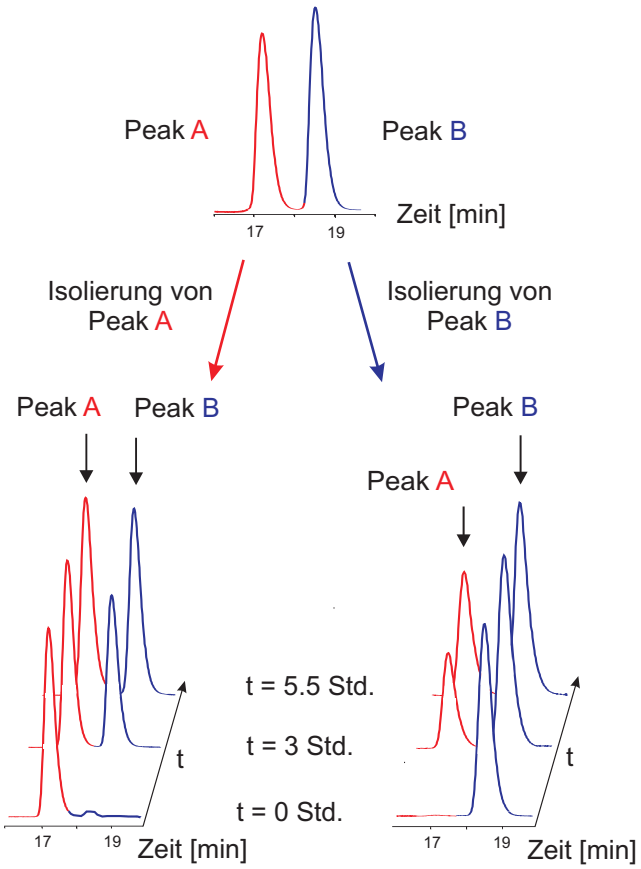


Abbildung 29. Bestimmung der Atropisomerisierung von Ancistrocladinium B [(*P*)-**39**] und seinem Epimer (*M*)-**39** mittels HPLC-Trennung der beiden Diastereomere (Peak A und Peak B) an einer achiralen RP_{18}-Phase. Dargestellt ist die Rückkehr zum Gleichgewichtszustand in einem Methanol/Wasser-Gemisch bei 65°C.

Aus der Steigung der Geraden des aufgetragenen Eyring-Plots (siehe Experimentalteil; Kapitel 3.4) konnte die Aktivierungsenergie für (*P*)-**39** von $\Delta G^{\neq}_1$ = 105.8 kJ/mol und für (*M*)-**39** von $\Delta G^{\neq}_2$ = 105.7 kJ/mol bestimmt werden.[22] Die so erhaltene Rotationsbarriere lag gerade über der definierten Energiebarriere für gut separierbare, stabile Isomere.[100] Dies stand im Einklang mit der bei Raumtemperatur nur sehr langsamen Umwandlung der beiden Atropisomere ineinander.[101]

Die gefundene Aktivierungsenergie für die Rotation um die Biarylachse stimmte auch gut mit der vorher mittels DFT (B3LYP/6-31G*) von Dr. M. Reichert berechneten überein, die für die Isomerisierung von (*P*)- zu (*M*)-**39** einen Wert von $\Delta G^{\neq}_1$ = 112.6 kJ/mol und für die Isomerisierung von (*M*)- zu (*P*)-**39** einen Wert von $\Delta G^{\neq}_2$ = 113.9 kJ/mol ergab. Auch die leichte Präferenz des (*M*)-Atropisomers von 54:46 (*M*:*P*), die bei Raumtemperatur im Gleichgewichtszustand vorlag, wurde von den Ergebnissen widergespiegelt. Die kleinen Unterschiede zwischen den berechneten und den experimentell bestimmten Werten für die

Aktivierungsenergie konnten durch die Tatsache erklärt werden, dass die Berechnung der Rotationsbarriere *in vacuo* durchgeführt wurde, während man bei den Experimenten natürlich in Lösungsmitteln arbeitete.[22,102]

4.5 Die biologischen Wirkungen der Substanzen 39 und 40

4.5.1 Aktivität gegen Erreger tropischer Infektionskrankheiten

Die beiden neuen Naphthylisochinoline aus *"Ancistrocladus ikela"* wurden am Schweizerischen Tropeninstitut im Arbeitskreis von Prof. Brun auf Aktivitäten gegen Erreger von tropischen Infektionskrankheiten der Gattungen *Plasmodium*, *Leishmania* und *Trypanosoma* mittels eines standardisiert-ablaufenden Verfahrens[83] getestet.

Tabelle 4. Biologische Aktivität und Zytotoxizität in IC_{50}-Werten der Verbindungen (*M*/*P*)-**39** und **40** [µg/mL] im Vergleich zum Standard des jeweiligen Testsystems.[22]

	(*M*/*P*)-**39**	Index[a]	**40**	Index[a]
P. falciparum (Stamm: K1) Standard: Chloroquin 0.087	0.86	2.42	2.85	17.23
T. cruzi (Stamm: Tulahuen C4) Standard: Benznidazol 0.32	1.24	1.68	4.24	11.58
T. b. rhodesiense (Stamm: STIB 900) Standard: Melarsoprol 0.003	0.39	5.33	1.08	45.46
L. donovani Axen.(Stamm: MHOM-ET-67/L82) Standard: Miltefosin 0.21	1.1	1.89	29.5	1.66
Zytotoxizität (Stamm: Ratten Myoblasten L-6) Standard: Podophyllotoxin 0.007	2.08		49.1	

[a] Therapeutischer Index = IC_{50} Zytotoxizität / IC_{50} Aktivität gegen Erreger

Gegen die in dieser Testreihe untersuchten Erreger *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* und *Leishmania donovani* zeigten beide Substanzen bedauerlicherweise nur sehr moderate Wirksamkeiten. Die Aktivität von Ancistrocladinium B (**39**) war dabei zwar deutlich stärker ausgeprägt als die des *C*,*C*-verknüpften Alkaloids 8-*O*-Methylancistrogriffin C (**40**), was aber auch für die Toxizität gegen L-6-Ratten-Myoblasten der Fall war.

4.5.2 Nähere Analyse der antileishmanialen Wirkung von 39

Im Rahmen des *SFBs 630* wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Moll und Prof. Ponte-Sucre auch die Wirkung von Ancistrocladinium B (**39**) gegen *Leishmania major*, den Erreger der Orientbeule, untersucht. Neben der Aktivität gegen Promastigoten des protozoischen Pathogens wurden auch die Toxizitäten gegen verschiedene Zelllinien und der Einfluss von **39** auf die Sekretion von proinflammatorischen Cytokinen untersucht.

Tabelle 5. Aktivität von **39** gegen *L. major* und verschiedene Zelllinien.[84]

	IC_{50} Ancistrocladinium B [(*M*/*P*)-**39**]
L. major Promastigoten Standard: Amphotericin B (2.51 ± 1.36 µM)	1.24 ± 0.15 µM (Index: 9.04)
Makrophagen Zelllinie J774.1 Standard: Amphotericin B (n.n.)	11.21 ± 2.09 µM
Frisch isolierte peritoneale Makrophagen Standard: Amphotericin B (n.n.)	16.93 ± 5.10 µM
Dendritische Zellen (aus Knochenmark) Standard: Amphotericin B (n.n.)	20.10 ± 3.51 µM
Fibroblasten Zelllinie NIH 3T3 Standard: Amphotericin B (n.n.)	10.62 ± 0.42 µM

n.n. = nicht nachweisbar

Ancistrocladinium B (**39**) wies gegen *Leishmania major* eine ähnliche Wirksamkeit im mikromolaren Bereich wie der Standard Amphotericin B auf. Die Toxizität gegen die verschiedenen menschlichen Zelllinien wie Makrophagen, dendritische Zellen aus dem Rückenmark und Fibroblasten fiel zwar deutlich höher aus, trotzdem ermutigte ein akzeptabler therapeutischer Index dazu auch die Aktivität der Substanz gegen amastigote Formen des Erregers in Makrophagen zu testen.

Die für einen 50-prozentigen Rückgang der Infektion der Makrophagen benötigte Konzentration von **39** betrug 0.05 ± 0.02 µM und lag somit in der gleichen Region wie der Goldstandard Amphotericin B (EC_{50} 0.075 ± 0.019 µM).[84]

Auf Grund dieser vielversprechenden Aktivität gegen die amastigote Form von *L. major* wurden weiterführende Tests zur Klärung des Wirkmechanismus von Ancistrocladinium B (**39**) durchgeführt. Es sollte dabei überprüft werden, ob die Substanz einen direkten antileishmanialen Effekt aufweist oder ob die Wirkung auf einer Modulation der Produktion proinflammatorischer Zytokine und von NO in den Makrophagen beruht. Diese Modulation wurde bereits für andere antileishmanial wirksame Substanzklassen beobachtet.[103]

Bei der Untersuchung von **39** konnten jedoch keinerlei Änderungen des Niveaus der analysierten Zytokine – Interleukin 1β (IL-1β), IL-6, TNF-α – oder ein Anstieg der NO-Produktion gemessen werden. Dies ließ den Schluss zu, dass Verbindung **39** keinen direkten Einfluss auf die Produktion von proinflammatorsichen Cytokinen besaß. Allerdings wurde bei Zugabe von bakteriellem Lipopolysaccharin oder γ-Interferon, zwei starken Cytokinstimulatoren für Makrophagen,[84] ein deutlicher Rückgang der Sekretion von TNF-α und IL-6 beobachtet. Ancistrocladinium B (**39**) scheint folglich in der Lage zu sein, mit der Zellantwort auf starke Stimulatoren wechselzuwirken, was zu einer Senkung der inflammatorischen Antwort und damit zu einer verbesserten Homöostasis der Makrophagen führt.

4.5.3 Allelopathische Aktivität von Ancistocladinium B (39)

In Anlehnung an die bereits für Ancistrocladinium A (**30**) und 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) durchgeführte Testung auf allelopathische Aktivität wurde auch Ancistrocladinium B (**39**) im Hinblick auf toxische Wirkungen auf andere Pflanzen mit Hilfe des seit Langem etablierten Testsystems Gartenkresse (*Lepidium sativum*) [87-89] untersucht.

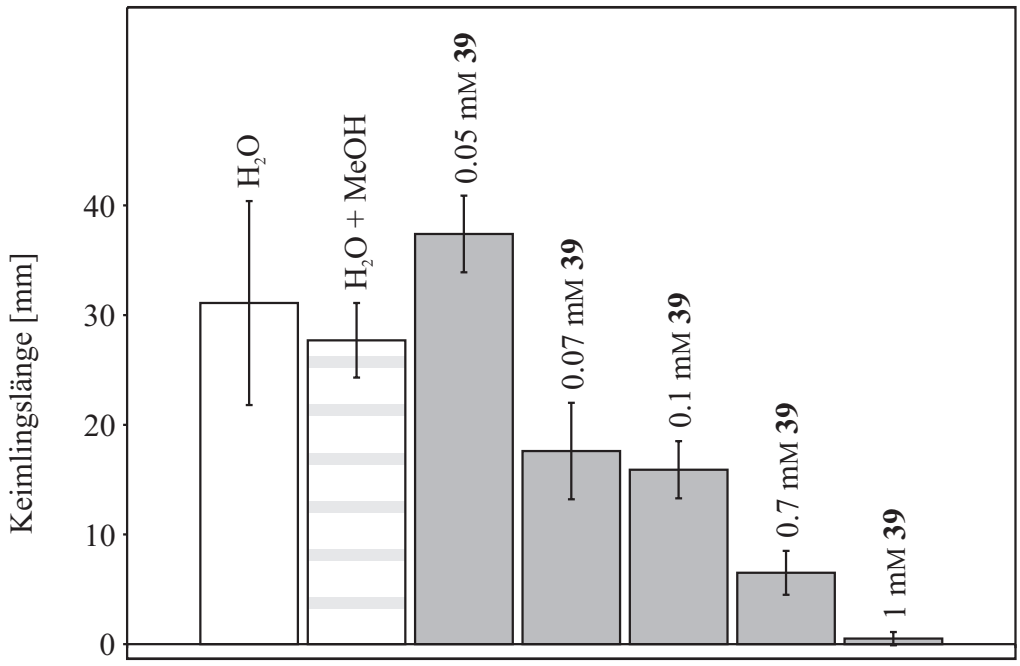


Abbildung 30. Allelopathische Wirkung von Ancistrocladinium B (**39**).

Wie auch schon bei den anderen beiden *N*,*C*-verknüpften Naphthyldihydroisochinolinen **30** und **31**, ließ sich, bei geringer Konzentration der Testlösung von Ancistrocladinuim B (**39**), eine leichte, aber nicht signifikante Wachstumsinduktion beobachten. Ein Anstieg der Konzentration führte zu einem steten Rückgang der Keimlingslänge (siehe Abbildung 30) und der Wurzelhaarausbildung. Allerdings setzte diese verkürzte Keimlingslänge bereits bei einer Konzentration von 0.07 mM von **39** ein, während von **30** und **31** mindesten 0.1 mM Lösungen nötig waren, um eine solche Reaktion hervorzurufen. Bei 1 mmolaren Lösungen wurde eine gelb-orange Färbung der Wurzelepithelzellen und der Zellen des Leitbündels unter dem Mikroskop beobachtet. Dieses Experiment legte folglich nahe, dass Ancistrocladinium B (**39**), wie auch schon Ancistrocladinium A (**30**) und sein 4'-*O*-Demethylderivat (**31**), eine phytotoxische Wirkung auf Gartenkresse-Keimlinge hatte und deswegen möglicherweise von den Lianen zur Verteidigung des eigenen Lebensraumes gegen Überwucherung durch andere Pflanzenarten genutzt wird.

5 Isolierung von Naphthylisochinolinen aus Blättern von *A. heyneanus* Wall.

5.1 Kenntnisstand über die Inhaltstoffe aus Blättern von *A. heyneanus* Wall.

Blätter dieser indischen *Ancistrocladus*-Art wurden erstmals 2001 einer phytochemischen Untersuchung unterzogen. Dabei konnten das bereits bekannte Ancistrocladidin und zwei neue Naphthylisochinolin-Alkaloide (Ancistroheynin B und Ancistrotanzanin C) isoliert werden.[44,71] Im Jahr 2003 schloss sich dann die Entdeckung des ersten *N*,*C*-gekuppelten Naphthylisochinolines, Ancisheynin (**8**; siehe Abbildung 4), von Butler *et al*. aus dieser Pflanzenart an.[16] Da in dieser Veröffentlichung Ancisheynin (**8**) "flach", d.h. ohne Angabe der korrekten Stereostruktur publiziert wurde, sollte durch einen totalsynthetischen Ansatz (von Dipl.-Chem. T. Gulder) und durch eine Nachisolierung aus Blättern Material von **8** gewonnen werden, um die fehlende stereochemische Analyse durchzuführen. Ancisheynin (**8**) konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht nachisoliert werden, aber dafür wurde ein bisher unbekanntes Naphthylisochinolin entdeckt. Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden in Kooperation mit Dipl.-Chem.T. Gulder (Dissertation) erarbeitet.

5.2 Isolierung und Charakterisierung eines Ancistrocladin-Derivates

5.2.1 Extraktion und Aufarbeitung des Extraktes

Die im Zuge der Großisolierung von Ancistrocladinium A (**30**) entwickelte Ionenaustauschermethode (siehe Kapitel 3.4.2) wurde zur Aufreinigung des methanolischen Blattextraktes herangezogen.

Aus dem aufgereinigten Extrakt konnte durch präparative HPLC an einem RP_{18}-Säulenmaterial Ancisheynin (**8**) im Rahmen dieses Isolierungsversuches leider nur angereichert und nicht für die Untersuchungen der Stereochemie des Naturstoffes rein gewonnen werden. Dafür wurde aber genügend Substanz von **42** – einem bisher unbekannten Ancistrocladin-Dervat – isoliert und dessen Struktur im Anschluss aufgeklärt.

5.2.2 Spektroskopische Charakterisierung und die Bestimmung der Absolutkonfiguration von 42

Der Peak bei ca. 18 min zeigte in der Ionenfalle eine ESI-Masse von *m/z* 394 und ein für die meisten *C,C*-gekuppelten Naphthylisochinoline typisches UV-Verhalten.[11,12] Anzahl, Multiplizität und Verschiebung der beobachteten ^{1}H-NMR-Signale wiesen auf das Vorliegen eines Tetrahydroisochinolins hin. Besonders das Vorkommen des Signals (δ = 4.76 ppm; Quartett) eines Protons an C-1 und die beiden Dubletts der Methylgruppen an C-1 (δ = 1.64 ppm) und C-3 (δ = 1.21 ppm) stützten diesen Befund. Beobachtete NOE-Korrelationen zwischen der Methylgruppe an C-1 und dem Proton an C-3 bewiesen außerdem, dass Me-1 und Me-3 *trans* zueinander standen. HMBC-Wechselwirkungen (H-7 – C-5; H-4$_{ax/eq}$ – C-5), NOE-Korrelationen (H-4$_{ax/eq}$ – H-3 – Me-1; H-7 – OMe-6) sowie die Hochfeldverschiebung der diastereotopen Protonen an C-4 ließen nur C-5 als Kupplungsposition im Isochinolinteil der beiden Molekülhälften zu. Im Naphthalingerüst wurde die Biarylachse durch folgende NMR-Korrelationen an C-1' lokalisiert: die Aufspaltungmuster der Protonen an C-6', C-7' und C-8' sowie durch die NOESY-Wechselwirkungen der Serie (H-8' – H-7' – H-6' – OMe-5'). Außerdem schied C-3' als Kupplungsposition aus, da NOE-Korrelationen von H-3' zu Me-2', wie auch HMBC-Wechselwirkungen von H-3' zu C-1' beobachtbar waren. Somit handelte es sich um ein 5,1'-verknüpftes Tetrahydroisochinolin mit zueinander *trans* stehenden Methylgruppen an C-1 und C-3 und zwei Methoxy-Gruppen an C-6 und C-5' (siehe Abbildung 31).

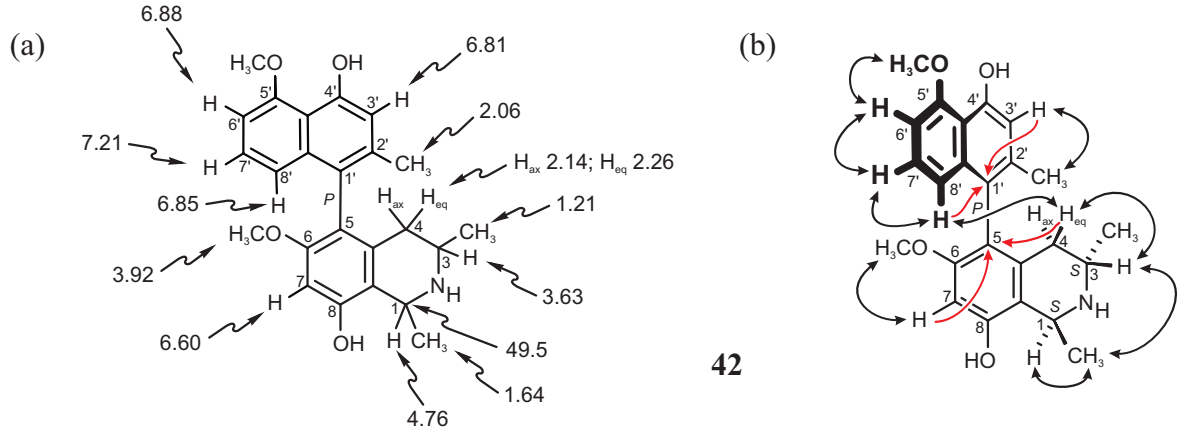
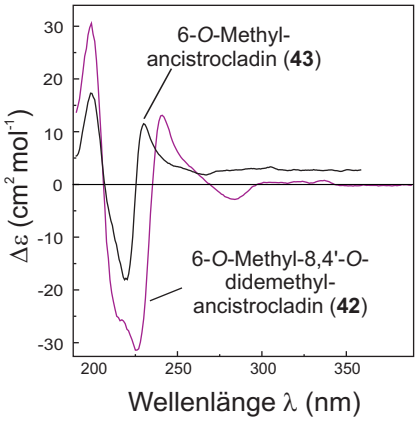


Abbildung 31. Für die Strukturaufklärung von Substanz **42** wichtige chemische Verschiebungen in ppm (a) und HMBC- (rote Pfeile) sowie NOESY-Wechselwirkungen (Doppelpfeile; b).

Des Weiteren konnte eine NOE-Korrelation zwischen H-8' und den oberhalb der Molekülebene stehenden Protonen H-4_{eq} und H-3 beobachtet werden. Daraus wurde geschlossen, dass sich auch der große Teil der Naphthalinhälfte oberhalb der Molekülebene.

Die Absolutkonfiguration der beiden Stereozentren an C-1 und C-3 wurde mit dem bereits beschriebenen, im Arbeitskreis entwickelten Ruthenium-katalysierten Abbauverfahren als *S* bestimmt.[50,53] Durch einen Vergleich der CD-Spektren des bekannten 6-*O*-Methylancistrocladins (**43**) und der neu isolierten Substanz **42** wurde überprüft, ob die relative Konfigurationszuordung der Achse auf Grund von beobachteten NMR-Wechselwirkungen die absolute Achsenkonfiguration unterstützte (siehe Abbildung 32). Die gewonnenen Erkenntnisse machten deutlich, dass die Biarylachse *P*-konfiguriert ist. Daher wurde der Naturstoff **42** 6-*O*-Methyl-8,4'-*O*-didemethylancistrocladin (**42**, 1*S*,3*S*,*P*) genannt.



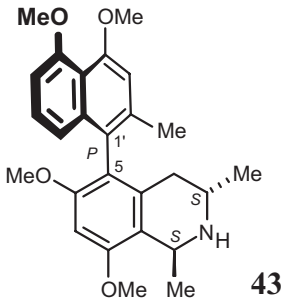


Abbildung 32. Bestimmung der absoluten Achsenkonfiguration von **42** durch den Einsatz der CD-Spektroskopie.

6 Suche nach *N,C*-gekuppelten Naphthylisochinolin-Alkaloiden in weiteren *Ancistrocladus*-Arten

6.1 Die Familie der Ancistrocladaceae

Die Familie der Ancistrocladaceae (Hakenastgewächse) besitzt eine einzige Gattung (*Ancistrocladus* Wall.) mit bisher 17 vollständig botanisch beschriebenen (elf afrikanischen und sechs asiatischen) Arten. Vertreter der Ancistrocladaceae sind in den tropischen Regenwäldern Afrikas und Südostasiens beheimatet. Die Artenvielfalt dieser interessanten Pflanzenfamilie könnte aber durchaus größer sein als bisher angenommen, da es einige Beispiele gibt, bei denen nach wie vor diskutiert wird, ob es sich um eigenständige Arten oder Unterarten bereits bekannter *Ancistrocladus*-Species handelt (z.B. *Ancistrocladus cochinchinensis* versus *Ancistrocladus tectorius ssp. cochinchinensis*).[40,93,104] Bemerkenswert ist die morphologische Eigenart, dass sie ihren Lebenszykus als selbstversorgende monopodiale Keimlinge beginnen und dann zu sympodialen Lianen werden, die mit Hilfe ihrer spiralig geformten, hölzernen Haken an den Urwaldriesen emporklettern.[40] Zur Ordnung der Caryophyllales gehörend gibt es engere verwandtschaftliche Verbindungen zu der derselben Ordnung angehörenden, zum Teil carnivoren Familie der Dioncophyllaceae, mit der die Ancistrocladaceae die biosynthetisch, strukturell und pharmakologisch interessanten Naphthylisochinolin-Alkaloide gemeinsam haben.[11,12] Trotz langjähriger phytochemischer Untersuchung dieser ungewöhnlichen Biarylnaturstoffe der verschiedenen *Ancistrocladus*-Arten wurde erst in jüngerer Zeit die strukturell neuartige Gruppe der *N,C*-gekuppelten Naphthylisochinolin-Alkaloide gefunden.[16,22] Um herauszufinden, ob diese *N,C*-verknüpften Alkaloide in den *Ancistrocladus*-Arten weitverbreitet sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine phytochemische Analyse von *Ancistrocladus*-Pflanzen, die von verschiedenen Standorten in Südostasien, West-, Zentral- und Ostafrika stammten, mittels HPLC-UV und -MS durchgeführt.

In die Analysen wurde neben einem Großteil der bereits botanisch beschriebenen *Ancistrocladus*-Arten[40] (nur Pflanzenmaterial von *A. grandiflorus*, *A. attenuatus*, *A. letestui* und *A. abbreviatus ssp. lateralis* war nicht verfügbar) auch einige nicht vollständig charakterisierte Arten – vor allem aus der DR Kongo[90] – eingeschlossen (siehe Tabelle 16, Experimentalteil). Darüber hinaus wurde auch ein Vertreter der Dioncophyllaceae – *Triphyophyllum peltatum* – in die Untersuchung einbezogen.

6.2 Auswertung der Untersuchungsergebnisse

Fast alle in die Untersuchung eingeschlossenen asiatischen Arten (lediglich *A. attenuatus* fehlte) beinhalteten *N*,*C*-gekuppelte Naphthylisochinoline. Nur in Extrakten von *A. hamatus* konnten keine UV-Spektren und Massen gefunden werden, die auf ein Vorkommen der neuen Strukturklasse hindeuteten.

Ebenso zeigten die Extrakte der beiden ostafrikanischen Arten *A. robertsoniorum* und *A. tanzaniensis* keinerlei Anzeichen für das Vorkommen von *N*,*C*-verknüpften Alkaloiden.

Unter den zentral- und westafrikanischen *Ancistrocladus*-Arten gab es jedoch wieder einige Vertreter, die die neuartigen Isochinolinium-Salze als Sekundärmetabolite produzierten. Diese Gruppe bestand aus *A. congolensis*, *A. ealaensis* und *A. guineensis*. Bei der Lianenart *A. barteri* enthielten nur frische Blätter aus dem Botanischen Garten *N*,*C*-verknüpfte Naphthylisochinoline, während diese in getrocknetem Pflanzenmaterial derselben Art nicht nachweisbar waren. Auch die botanisch noch nicht vollständig charakterisierten zentralafrikanischen Arten mit den momentanen Arbeitsnamen *"A. bambange"*, *"A. ikela"* und *"A. nkele"* enthielten Vertreter der gesuchten Alkaloidklasse.

Die im westafrikanischen Raum beheimatete Dioncophyllaceae-Art *Triphyophyllum peltatum*, die ebenfalls in diese Untersuchung eingeschlossen wurde, produziert hingegen keine *N*,*C*-gekuppelten Naphthylisochinoline.

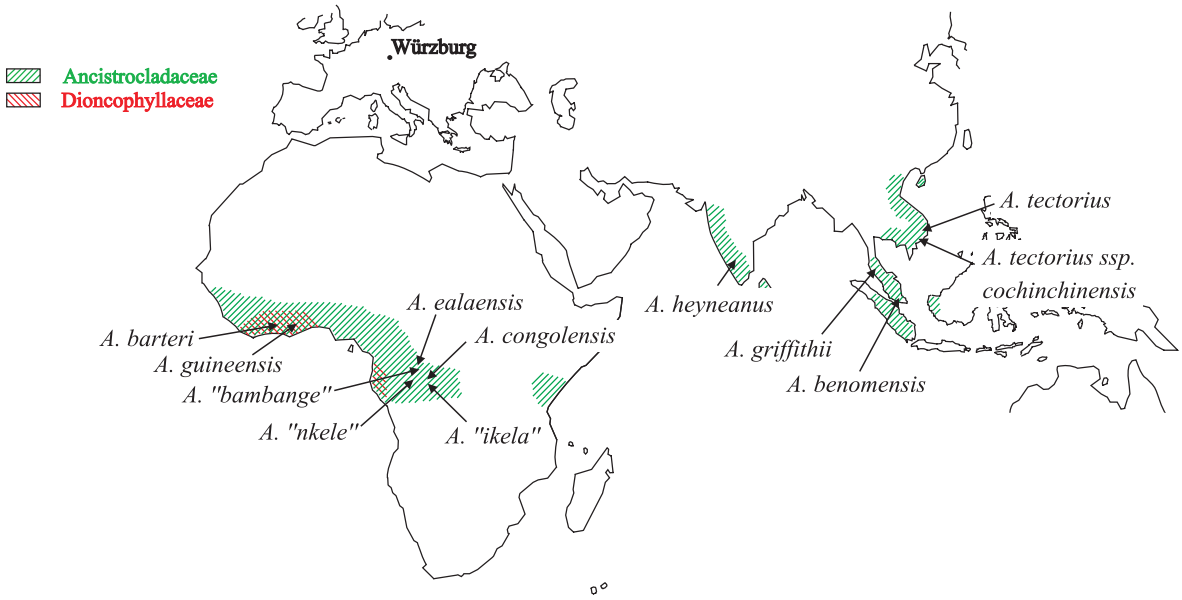


Abbildung 33. Verbreitung der Isochinolinium-Salz-haltigen *Ancistrocladus*-Arten.

Diese Untersuchung der verschiedenen Lianen-Arten Afrikas und Südost-Asiens zeigte sehr deutlich, dass die strukturell neuartigen *N*,*C*-gekuppelten Naphthylisochinolin-Alkaloide im Genus *Ancistrocladus* ubiquitär vorkommen. Das Ergebnis überraschte, da *Ancistrocladus*-Arten bereits seit Anfang der 1970er Jahre Gegenstand einer ganzen Reihe von phytochemischen Untersuchungen waren und es doch bis zum Jahr 2003 dauerte, bis das erste *N*,*C*-verknüpfte Alkaloid aufgeklärt wurde.

7 Die Rolle des Phloems bei der Ausbreitung Pathogen-vermittelter Signale: Analyse von chemischen Signalen in *Arabidopsis thaliana*

7.1 Kenntnisstand über die Inhaltsstoffe von *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana, deren deutscher Name *Acker-Schmalwand* lautet, ist eine kleine, krautige, bis zu 30 cm hohe Blütenpflanze mit einer typischen Blattrosette (siehe Abbildung 34), die in den gemäßigten Klimazonen auf der ganzen Welt verbreitet ist. Sie gehört zur Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae), zu der z.B. auch Raps oder Brokkoli gehören, hat aber selber keinerlei Bedeutung in der Landwirtschaft. Allerdings hat sie sich aus mehreren Gründen in den letzten Jahrzehnten als Modellorganismus für pflanzenphysiologische und genetische Fragestellungen in der Biologie etabliert. *A. thaliana* besitzt mit nur fünf Chromosomenpaaren das kleinste bisher bekannte Pflanzengenom, dessen vollständige Sequenzierung im Jahre 2000 abgeschlossen wurde, was genetische Manipulationen vereinfacht. Trotzdem repräsentiert sie gut die Physiologie höherer Pflanzen. Darüber hinaus sind bereits eine Vielzahl an Knock-out-Mutanten für unterschiedliche Fragestellungen (z.B. *coi1*, *etr1* oder *npr1*, in denen die verschiedenen Signalwege über Jasmonsäure, Salicylsäure bzw. Ethylen ausgeschaltet sind)[3] in "Stock-Centern" erhältlich. Mit einem kurzen Generationszyklus von nur sechs Wochen und ihrer problemlosen Kultivierbarkeit auch auf kleinstem Raum lässt sie sich leicht handhaben.[105]

Die Hauptmetabolite von *A. thaliana* gehören zur Klasse der Glucosinolate (Senfölglucoside), die eine wichtige Gruppe von schwefelhaltigen, anionischen Naturstoffen mit ca. 120 verschiedenenVertretern darstellt. Sie kommen hauptsächlich in der Ordnung der Capparales, und dort vor allem in der Familie der Brassicaceae vor und besitzen eine einheitliche Grundstruktur bestehend aus einer β-Thioglucose-Einheit und einem (*Z*)-*N*-Hydroxyiminosulfat-Rest. Charakterisiert werden die unterschiedlichen Glucosinolate durch ihre sehr variable Seitenkette, die aliphatisch (z.B. Sinigrin, **44**), aromatisch (Sinalbin, **45**) oder heteroaromatisch (Glucobrassicin, **2**) sein kann (siehe Abbildung 34).[106-108]

Die enorme Variabilität der Seitenkette entsteht durch die Nutzung unterschiedlicher Aminosäuren während der Biosynthese. Aliphatische Glucosinolate entstehen aus Alanin, Leucin, Isoleucin, Methionin oder Valin, aromatische Glucosinolate aus Phenylalanin oder Tyrosin und heteroaromatische Glucosinolate aus Tryptophan. Durch eine Vielzahl an möglichen Transformationsreaktionen (z.B. Kettenverlängerung, Hydroxylierung, *O*-Methylierung oder Acylierung) wird die strukturelle Diversität weiter erhöht.[108]

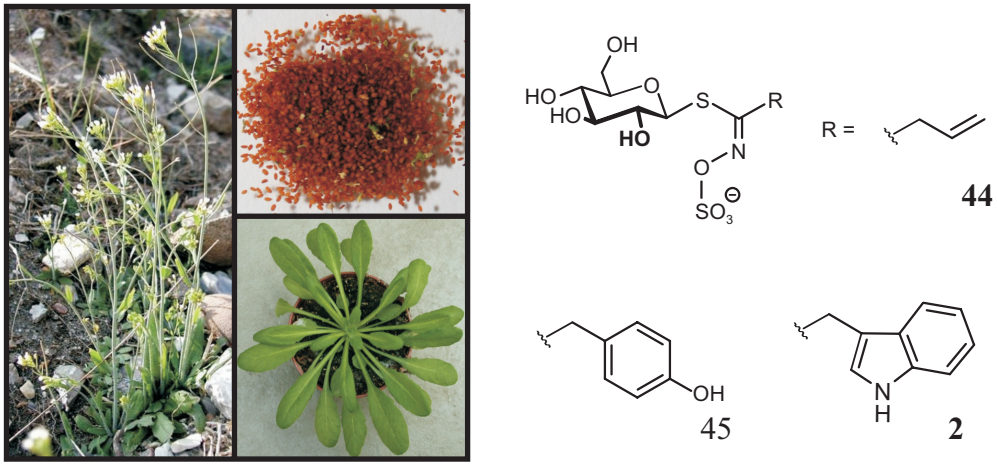


Abbildung 34. *Arabidopsis thaliana*: Aussehen der Ganzpflanze,[109] der Samen[110] und der Blattrosette[110] und chemische Grundstruktur ihrer Hauptinhaltsstoffe, der Glucosinolate, mit drei Beispielen für das Aussehen der sehr variablen Seitenkette.[34,108]

Zusammen mit dem Enzym Myrosinase (β-Thioglucosidase) spielen Glucosinolate für die Pflanzen eine herausragende Rolle bei der Abwehr von Herbivoren oder Pathogenen. Treffen diese beiden Pflanzeninhaltsstoffe nach Zellwandverletzungen durch z.B. Insektenfraß aufeinander wird Glucose durch die Myrosinase abgespalten und das entstehende instabile Aglycon unterliegt verschiedenen Umlagerungsreaktionen zu Isothiocyanaten, Nitrilen und anderen Produkten, die für die Wirkung gegen Insekten, Bakterien und Pilze verantwortlich sind. Der Wirkmechanismus der Toxizität dieser Inhaltsstoffe konnte allerdings bisher leider nicht geklärt werden.[108]

Wie häufig bei Stoffen, die der Pflanzenabwehr dienen, zu beobachten ist, gibt es auch hier einige spezialisierte Herbivore wie z.B. *Athalia rosae*, die gerade von den Glucosinolaten angezogen werden und die bevorzugt Glucosinolat-haltige Pflanzen fressen. *Athalia rosae* nutzt dabei die aufgenommenen Glucosinolate zur Selbstverteidigung gegen die eigenen Fraßfeinde.[111]

Im letzten Jahrzehnt wurde auch die Wirkung einiger Glucosinolate (z.B. 4-Methylsulfinyl-*n*-butylglucosinolat aus Brokkoli) auf den Menschen diskutiert. Dabei konnte vor allem den Isothiocyanat-Derivaten eine präventive Wirkung gegen Krebserkrankungen nachgewiesen werden. Die Isothiocyanate scheinen durch Blockade der Zellzyklen und durch Forcierung der Apoptose eine Hemmung des Tumorwachstums herbeizuführen.[112-114] Andere Hydrolyseprodukte dagegen scheinen die Bildung von Phase-II-Detoxifikationsenzymen (z.B. Glutathion-*S*-Transferase) anzuregen.

Für den Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* (Columbia-0), der in der vorliegenden Arbeit bearbeitet wurde, sind bisher 26 verschiedene Glucosinolate bekannt, deren Zusammensetzung und Konzentration in den verschiedenen Pflanzenorganen und Entwicklungsstufen variiert.[115] In den entsprechenden Kapiteln wird darauf näher eingegangen.

7.2 Entwicklung einer Nanoliter-tauglichen Glucosinolat-Analytik

Um die Hauptfragestellung dieses Projektes, welche Rolle das Phloem bei der Ausbreitung Pathogen-vermittelter Signale spielt und ob dabei kleine Moleküle als chemische Signale dienen, beantworten zu können, musste erst einmal eine nanoliter-taugliche Glucosinolat-Analytik etabliert werden, da bei den Analysen nur sehr geringe Mengen Phloemsaft zur Verfügung stehen würden. Die bisher etablierten Analysenmethoden[115,116] sind nicht darauf ausgelegt, mit geringen Mengen Probenmaterial auszukommen. Darüber hinaus beinhalten sie eine zeitaufwendige und komplexe Aufarbeitung mittels Desulfatierung der an einen Ionenaustauscherharz gebundenen Glucosinolate, auf die verzichtet werden sollte. Neben der Zeitersparnis wurde so die Gefahr einer möglichen Artefaktbildung und der Verlust von kostbarem Probenmaterial umgangen.

Als mögliche Trennmethoden wurden hierfür Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) und Kapillarelektrophorese (CE) in Betracht gezogen. Detektiert wurde mittels verschiedener Massendetektoren (Ionenfalle, oTOF).

Ob die permanent negativ geladenen Glucosinolate mittels Kapillarelektrophorese ausreichend gut getrennt werden können, wurde in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. U. Holzgrabe durch erste CE-UV-Messungen geklärt. Da sich viele der Glucosinolat-UV-Spektren sehr ähneln, wurde nach erfolgreicher CE-Trennung, die mittels UV überwacht wurde, zur genaueren Identifizierung der Glucosinolate in sehr enger Zusammenarbeit mit Prof. Dr. C. Neusüß eine CE-Trennmethode im Hinblick auf eine zuverlässige Ionisierung der Moleküle in einem ESI-oTOF-Massendetektor entwickelt und die verschiedenen Extrakte und Phloemexsudate mittels CE-ESI-oTOF-MS vermessen.

7.2.1 Untersuchung des Metabolitprofils von *A. thaliana* auf neuartige Sekundärstoffe mittels HPLC-ESI-MS (Ionenfalle)

Für das erste Screening extrahierte man *Arabidopsis-thaliana*-Samen zweimal mit 80% Methanol, zentrifugierte die erhaltenen Extrakte, engte die vereinigten Überstände im Vakuum zur Trockene ein und nahm diese für die HPLC-MS-Analyse mit hochreinem Wasser wieder auf. Eine weitere Probenaufarbeitung durch Desulfatierung der Glucosinolate zur Herabsetzung ihrer hohen Polarität und Eliminierung ihrer permanenten negativen Ladung für eine bessere chromatographische Trennbarkeit an einer *RP*-Umkehrphase (Reversed-Phase-System) wurde bewusst unterlassen. Statt dessen sezte man Trifluoressigsäure (TFA) in einer Konzentration von 0.05% dem Laufmittelsystem (Wasser / Acetonitril) zu, um eine Peakverbreiterung durch starke Interaktionen der polaren Glucosinolate mit den Silanolgruppen des Säulenmaterials zu unterbinden.[117] Es sollte so überprüft werden, ob man auf die zeitaufwendigen Aufarbeitungsmaßnahmen verzichten konnte.

Diese Strategie führte zum Teil zum gewünschten Erfolg, da bei der Vermessung der Spektren eine hohe Auflösung und Schärfe der Peaks erreicht wurde (siehe Abbildung 35). Neben einem UV-Detektor (Wellenlänge: 229 nm) identifizierte man die einzelnen Peaks mittels einer Ionenfalle.[34]

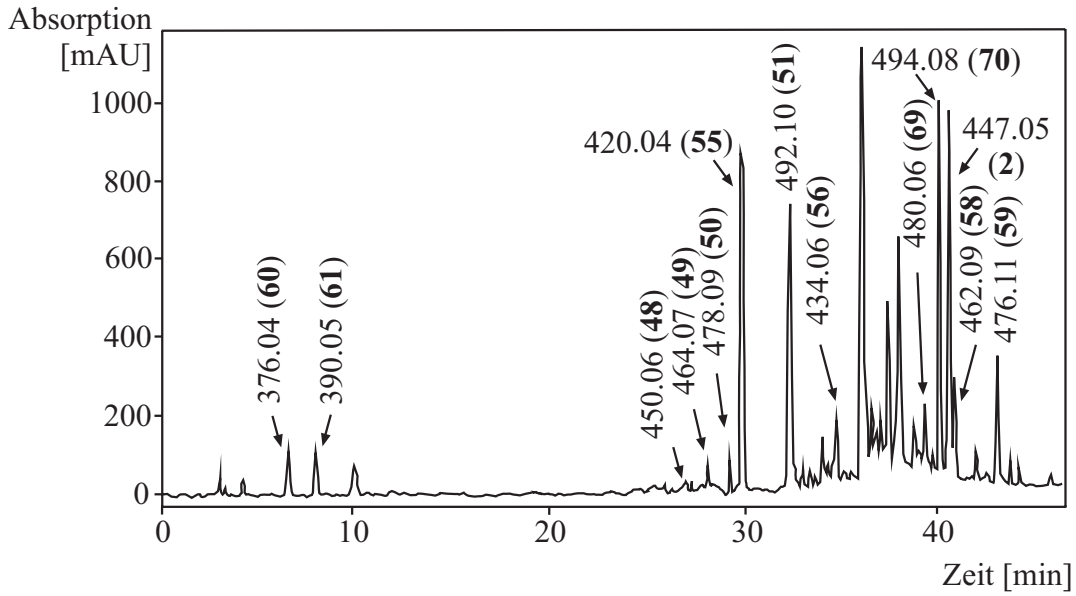


Abbildung 35. HPLC-UV-Chromatogramm (λ = 229 nm) eines Samenextraktes von *Arabidopsis thaliana* Col-0. Die einzelnen Peaks sind mit den gemessenen Massen (Ionenfalle) bezeichnet und korrespondieren mit den folgenden Glucosinolat-Strukturen: *m/z* 376 (**60**): R = 3-Hydroxy-*n*-propyl-, *m/z* 390 (**61**): R = 4-Hydroxy-*n*-butyl-, *m/z* 450 (**48**): R = 5-Methylsulfinyl-*n*-pentyl-, *m/z* 464 (**49**): R = 6-Methylsulfinyl-*n*-hexyl-, *m/z* 478 (**50**): R = 7-Methylsulfinyl-*n*-heptyl-, *m/z* 420 (**55**):

R = 4-Methylthio-*n*-butyl-, *m/z* 492 (**51**): R = 8-Methylsulfinyl-*n*-octyl-, *m/z* 434 (**56**): R = 5-Methylthio-*n*-pentyl-, *m/z* 480 (**69**): R = 3-Benzoyloxy-*n*-propyl-, *m/z* 494 (**70**): R = 4-Benzoyloxy-*n*-butyl-, *m/z* 447 (**2**): R = Indol-3-ylmethyl-, *m/z* 462 (**58**): R = 7-Methylthio-*n*-heptyl-, *m/z* 476 (**59**): R = 8-Methylthio-*n*-octyl-glucosinolat.[34] Die Strukturen der Seitenkette sind in Tabelle 6 abgebildet und die Grundstruktur ist in Abbildung 34 zu sehen.

Zusätzlich zu den durch diese verkürzte Methode identifizierten Glucosinolaten wurden bei Brown *et al.*[115] noch folgende fünf weitere Glucosinolate für Samenextrakte von *A. thaliana* Col-0 beschrieben: 3-Methylsulfinyl-*n*-propyl- (**46**), 4-Methylsulfinyl-*n*-butyl- (**47**), 3-Methylthio-*n*-propyl- (**54**), 2-Phenylethyl- (**67**) und 4-Hydroxyindol-3-ylmethyl-Glucosinolat (**74**). Darüber hinaus wurden für *Arabidopsis-thaliana*-Col-0-Extrakte auch 6-Methylthio-*n*-hexyl- (**57**), 5-Benzoyloxy-*n*-pentyl-, 6-Benzoyloxy-*n*-hexyl- und drei Glucosinolat-Derivate mit Modifikationen am Zuckerrest erwähnt, wobei bei diesen nicht klar ist, aus welchem Pflanzenteil sie isoliert wurden.[118]

Die restlichen Peaks im HPLC-UV-Chromatogramm (Abbildung 35) entsprechen weiteren Pflanzeninhaltsstoffen wie z.B. Camalexin oder diversen Flavonoiden,[119] die nicht näher bestimmt wurden, da das Hauptaugenmerk auf den Glucosinolaten lag.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit dieser verkürzten HPLC-Methode recht gute Ergebnisse erzielt wurden, da fast alle für *Arabidopsis*-Samen bekannte Glucosinolate nachgewiesen werden konnten. Neue Sekundärmetabolite aus der Klasse der Glucosinolate wurden allerdings nicht entdeckt und die Auswertung der Chromatogramme gestaltete sich schwierig, da viele andere Pflanzeninhaltstoffe durch diese Methode ebenfalls extrahiert und detektiert wurden, die zum Teil die Glucosinolatpeaks überdeckten (siehe Abbildung 35). Aus diesem Grund wurde die zweite mögliche Trennmethode – die Kapillarelektrophorese – für die Analyse des Glucosinolatmusters in Pflanzenproben ausprobiert.

7.2.2 Kapillarelektrophorese (CE) als Trennmethode für Glucosinolate

Aufgrund der exzellenten Wasserlöslichkeit der Glucosinolate, ihrer hohen Polarität und der daraus resultierenden niedrigen Affinität zu den meisten *RP*-Umkehrphasen-Säulenmaterialien und ihrer permanenten negativen Ladung, stellt die Kapillarelektrophorese eine attraktive Alternative zur HPLC-Trennung von Glucosinolaten dar.[120] Darüber hinaus

bietet die Kapillarelektrophorese weitere Vorteile, wie z.B. ein problemloses Aufgeben von wenigen Nanolitern Probenvolumen auf die Kapillare.[121] Außerdem kommt es bei der Kapillarelektrophorese kaum zu Verdünnungseffekten durch den Puffer, da aufgrund eines anderen Trennprinzipes als bei der HPLC nur ein sehr geringer Flüssigkeitsstrom durch die Kapillare entsteht. Die Trennung erfolgt hierbei hauptsächlich durch die unterschiedliche Migration der elektrisch geladenen Teilchen in einer Elektrolytlösung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes und nicht wie bei der HPLC durch Verteilung und Adsorption zwischen mobiler und stationärer Phase.[122] Eine Besonderheit bei der kapillarelektrophoretischen Trennung ist die Ausbildung des elektroendoosmotischen Flusses (EOF), der durch die Ausbildung einer Doppelschicht zwischen der Pufferlösung und der Oberfläche der Kapillarwand entsteht. Da die Innenwand der verwendeten Quarzglaskapillaren aufgrund von dissoziiert vorliegenden Silanolgruppen negativ geladen ist, werden von ihr positive Ionen aus der Flüssigkeit angezogen. Die so entstandene positiv geladene Flüssigkeitssäule bewegt sich in Richtung der negativ geladenen Kathode. Die Front des elektroendoosmotischen Flusses ist im Vergleich zur parabolisch geformten Front eines hydrodynamischen Flusses sehr flach. Daher kommt es beim EOF nicht zu einer Peakverbreiterung. Das Vorkommen des EOFs ist stark pH-Wert-abhängig. Bei niedrigem pH-Wert (< 4) ist dieser Effekt fast gar nicht vorhanden und liegt bei ansteigendem pH-Wert immer stärker ausgeprägt vor. Die Konsequenz eines vorliegenden elektroendoosmotischen Flusses ist eine veränderte Wanderungsgeschwindigkeit der verschiedenen Ionen. Während die der positiv geladenen Ionen vom EOF gar nicht beeinflusst wird, da sie sich schneller bewegen als der EOF, wandern neutrale Teilchen mit dem EOF mit. Negativ geladene Teilchen werden von der positiv geladenen Flüssigkeitssäule angezogen und ihre Bewegung zur Anode wird durch den EOF überkompensiert, so dass sie sich nur langsam zur Kathode hinbewegen.[122]

Obwohl normalerweise die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) die Methode der Wahl zur Analyse von permanent geladenen Molekülen ist, wurden für Glucosinolate bisher ausschließlich Trennsysteme basierend auf mizellarer elektrokinetischer Kapillar-chromatographie (MEKC) genutzt.[120] Ein Grund hierfür war offensichtlich, dass ihre Trennleistung überwiegend auf Polaritätsunterschieden und nicht auf Unterschieden bei den pK-Werten, wie bei der CZE, beruht. Die pK-Werte für die Glucosinolate sind nicht nur niedrig, sondern vor allem auch aufgrund des starken Einflusses der Sulfatgruppe sehr ähnlich. Zusätzlich können diese Sulfatgruppen noch mit den Silanol-Gruppen der für

gewöhnlich benutzten Quarzglas-Kapillaren interagieren und eine gute Trennung weiter erschweren. Durch bei der MEKC zugesetzte Mizellbildner wie das Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) können diese Wechselwirkungen erfolgreich unterdrückt werden, da die CTAB-Moleküle die negativ geladenen Silanolgruppen der Quarzglas-Kapillarwand abschirmen. Außerdem werden auch die negativ-geladenen Glucosinolate teilweise in die CTAB-Mizellen inkorporiert und migrieren mit diesen durch die Kapillare.[120] Allerdings ist die MEKC eben aufgrund dieser Mizellbildung leider nicht über Elektrospray-Ionisation (ESI) mit einem Massendetektor koppelbar, so dass die Aufgabe darin bestand, eine funktionierende CZE-Methode für die Glucosinolate zu entwickeln.

Kapillarzonenelektrophorese (CZE) ist bereits mehrfach sehr erfolgreich als Trennmethode für geladene Moleküle u.a. für Alkaloide,[123] organische Säuren, Aminosäuren und Proteine, anorganische Ionen und andere anionischen Substanzen eingesetzt worden.[124] Darüber hinaus ist die CZE sehr gut über ESI mit einem Massendetektor koppelbar und ist so in der Lage, die Vorteile einer einfachen und schnellen Probenvorbereitung, kleiner Einspritzvolumina, schneller Analysezeiten und der Effizienz von CZE-Trennungen mit der hohen Selektivität und Sensitivität eines ESI-MS-Detektors zu verbinden.[125]

7.2.3 Kopplung von CE und oTOF-MS

Bei in dieser Arbeit präsentierten Trennproblem gelang eine der ersten Anwendungen, bei der eine Kapillarelektrophorese über ein geerdetes Sheath-Liquid-Interface und eine Elektrospray-Ionisationseinheit erfolgreich mit einem orthogonalen Time-of-Flight-Massendetektor (oTOF-MS) gekoppelt wurde.

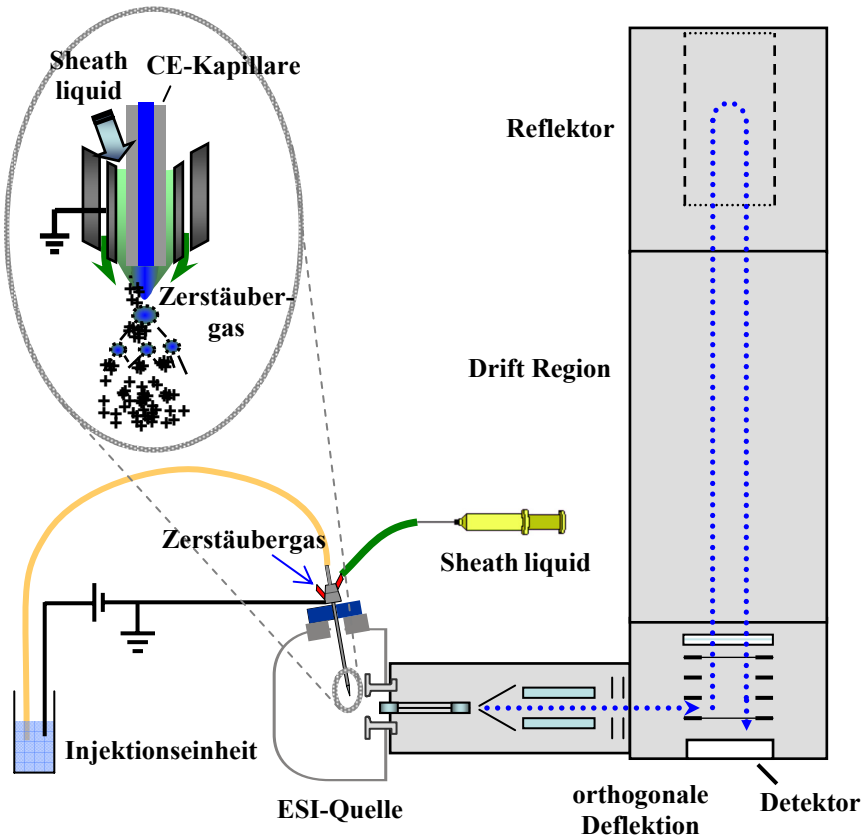


Abbildung 36. Aufbau einer CE-oTOF-Kopplung (nach Bruker Application Note ET-05–oTOF-Series).[126]

Die Sheath-Liquid wird über eine Spritzenpumpe in Flussraten von 1-4 µL/min in das Interface transportiert und ermöglicht durch Schließen des Stromkreises eine schnelle und verlässliche CE-Trennung. Die ESI-Spannung wird am Ende der Transferkapillare in das MS-Gerät angelegt. Die Sprayernadel ist dabei geerdet. Der Fluss des Zerstäubergases reicht aus, um selbst bei anodischen Trennsystemen einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom durch die Kapillare zu gewährleisten, so dass kein Sheath-Liquid in die Kapillare eindringen kann.

So ist es möglich, neben den vielen Vorteilen der CZE wie z.B. die hohe Trenneffizienz und kurze Analysenzeiten, auch noch die Messung von exakten Massen mit einer Genauigkeit von < 5 ppm wahrzunehmen. Durch den Vergleich zwischen gemessenem und berechnetem Isotopenmuster ist man dann in der Lage die elementare Zusammensetzung und damit die Summenformel der einzelnen Glucosinolate zu bestimmen.[47]

7.2.4 Bestimmung des Sekundärmetabolitspektrums von *Arabidopsis*-Samen mittels CE-ESI-oTOF-MS- und MS/MS-Untersuchungen

Zu Beginn der Entwicklung des CZE-Systems für die Trennung von Glucosinolaten – die in Zusammenarbeit mit Stefanie Schmitt aus dem Arbeitskreis von Prof. Holzgrabe stattfand – wurden verschieden konzentrierte Ammoniumacetat-Puffer (75, 100 und 125 mM) bei gleich bleibendem pH-Wert (pH = 5.4) ausprobiert und die Glucosinolate mittels UV-Adsorption detektiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine hohe Pufferkonzentration zu unakzeptierbar langen Migrationszeiten und einer sehr breiten Peakform führte. Trennungen, die mit 100 mM Pufferlösung erfolgten, ergaben dagegen eine gute Auflösung, die auch durch die Verwendung von weniger konzentrierten Puffern nicht weiter verbessert werden konnte. Danach wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Trennung der Glucosinolate untersucht. Bei einer verwendeten Elektrolytkonzentration von 100 mM war hiebei nach schrittweiser Erniedrigung des pH-Wertes von 8.0 bis 5.2 eine stete Peakverbreiterung und eine Verlängerung der Migrationszeit messbar. Die höchste Selektivität bei einer annehmbaren Migrationszeit von < 15 min wurde bei pH 5.4 beobachtet. Als nächstes wurde die Auswirkung von organischen Zusätzen wie z.B. Acetonitril (MeCN), Methanol (MeOH) oder Isopropanol auf die Auflösung der Peaks untersucht. Die Zusätze wurden dabei in Konzentrationen zwischen 10-40% eingesetzt. Bei Zugabe von 20-30% Methanol oder Acetonitril wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt, allerdings war die Reproduzierbarkeit bezüglich Auflösung und Migrationszeit bei der Nutzung von Acetonitril etwas besser (siehe Abbildung 37).[34,127]

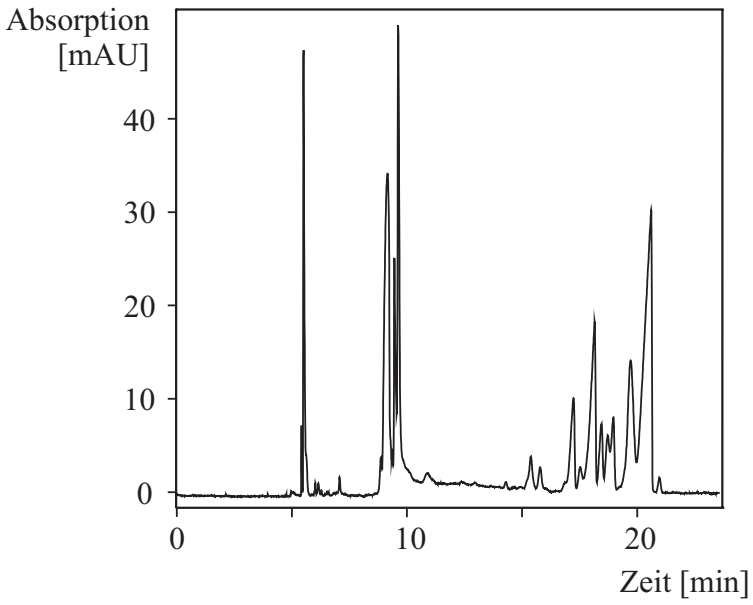


Abbildung 37. Elektropherogramm mit UV-Detektion (BGE = 100 mM NH_4OAc mit 30% MeCN; pH = 5.4; λ = 225 nm) eines Samenextraktes von *A. thaliana*, wobei die Glucosinolat-Fraktion zwischen 15 und 22 min von der Kapillare eluiert wurde.

Die besten Ergebnisse bei der Trennung der Glucosinolate wurden also mit einem Elektrolytsystem bestehend aus 100 mM Ammoniumacetat-Lösung bei pH 5.4 mit 30% Acetonitril als organischem Zusatz erzielt. Diese Bedingungen wurden deshalb als Ausgangspunkt für die CE-oTOF-MS-Messungen der Glucosinolatprofile in Samen-, Infloreszenz- und Blattextrakten von *A. thaliana* genutzt.[34]

Leider stellte sich aber bei der ersten Kopplung an den Massendetektor heraus, dass die oben genannten Bedingungen zu einer schlechten Ionisierung der Glucosinolate im Massenspektrometer führten. In Zusammenarbeit mit Prof. Christian Neusüß (TH Aalen) wurden deswegen erneut verschiedene Elektrolyte in Verbindung mit verschiedenen Sheath-Liquid-Zusammensetzungen getestet. Dazu wurden Trennsysteme basierend auf Ameisen- oder Essigsäure bei verschiedenen pH-Werten (eingestellt mit NH_4OH) und mit unterschiedlichen Konzentrationen an MeCN oder Isopropanol als organischen Zusätzen ausprobiert. Je acider das Elektrolytsystem wurde, d.h. je geringer die Konzentration an NH_4^+-Ionen war, desto intensiver wurden die Signale der Glucosinolate im Massendetektor, was den Schluss zuließ, dass es zu einer Ausbildung stabiler, ungeladener Ionenpaare zwischen den positiv geladenen Ammoniumionen und den permanent negativ geladenen Glucosinolaten kam. Da allerdings die anionischen Glucosinolate bei einem niedrigen pH-Wert aufgrund des reduzierten elektroendoosmotischen Flusses (EOF) nicht mehr an der Kathode nachweisbar waren, wurde für diese stark sauren Pufferlösungen eine anodische Auftrennung (angelegte Spannung: -25 kV; entspricht ca. 38 µA) ausprobiert. Der EOF betrug so annähernd Null und die Glucosinolate konnten ohne weitere Modifikation der Quarzglaskapillare an der Anode detektiert werden. Da der EOF derartig stark herabgesetzt war, bestand die Gefahr des Einströmens von Sheath-Liquid in die Kapillare. Der Einfluss des Zerstäubergases war aber glücklicherweise stark genug, um einen kleinen Flüssigkeitsstrom durch die Kapillare zu gewährleisten und so das System zu stabilisieren. Ein Eindringen von Sheath-Liquid in die Kapillare konnte nicht beobachtet werden.[34]

Untermauert wurden die Ergebnisse, dass Glucosinolate mit Ammoniumionen ungeladene Ionenpaare ausbilden und so schlechter ionisierbar sind, durch den starken Effekt

verschiedenartiger Zusätze zum Sheath-Liquid auf die Ionisations-Effizienz. Der Zusatz von Ammoniak führte zu einem drastischen Rückgang der Signalintensität und erhöhte das Hintergrundrauschen, während die Zugabe von 0.2% Ameisensäure das Signal-Rausch-Verhältnis durch Verringerung von Addukten und Hintergrundrauschen deutlich verbesserte. Neben einer besseren Ionisierung der Glucosinolate, da sie keine ungeladenen Ionenpaare ausbilden konnten, wurde so auch indirekt die Effizienz der Detektion erhöht. Der niedrige pH-Wert des Trennsystems verursachte keinerlei Probleme bei der Ionisierung der Glucosinolate, wie man zunächst erwartet hatte, da dies von ähnlichen Trennsystemen für Carbonsäuren bekannt war.[34]

Unerwartet gute Trennergebnisse wurden letztendlich mit einem Puffer bestehend aus 1 M Ameisensäure erreicht, wie er bisher nur sehr selten zur Trennung von Anionen genutzt wurde. Die erfolgreiche Analyse der intakten Glucosinolate ist erklärbar durch die Tatsache, dass sie ihre elektrophoretische Mobilität auch unter diesen stark sauren Bedingungen des genutzten Puffersystems behalten und als Anionen migrieren, die im negativen Ionenmodus nach Elektrospary-Ionisation gut nachweisbar sind. Darüber hinaus ist durch den niedrigen pK-Wert der Sulfatgruppe der Glucosinolate eine sehr selektive Detektion möglich, da andere acide Verunreinigungen in Rohextrakten wie z.B. Pflanzensäuren (Benzoesäure, Zimtsäure, usw.) bei den angewendeten aciden Bedingungen nicht dissoziiert vorliegen. Außer den pflanzlichen Sulfaten sollten bei diesem CZE-System nur noch eventuell vorkommende Phosphate dissoziiert sein und daraus resultierend eine elektrophoretische Beweglichkeit besitzen.

Abbildung 38 zeigt das erhaltene Base-Peak-Elektropherogramm (BPE) des Rohextraktes aus Samen von *Arabidopsis thaliana*. Die Glucosinolate wurden zwischen 16-19 min detektiert, ohne dass andere Ionen in dieser Region gestört hätten. Ionen mit einer niedrigeren elektrophoretischen Mobilität wurden nicht nachgewiesen. Der kleine Kasten in Abbildung 38 zeigt die Hauptkomponenten des vermessenen Extraktes.[34]

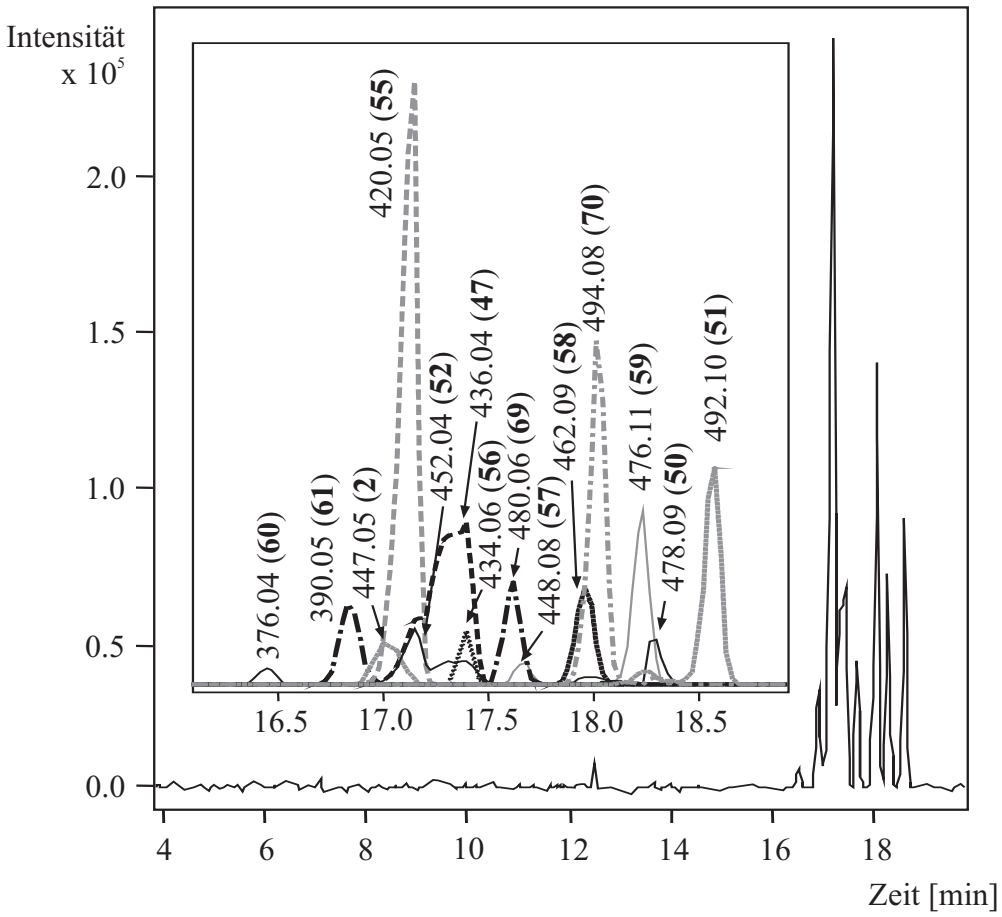


Abbildung 38. Mittels CE-ESI-oTOF-MS vermessenes BPE des Rohextraktes von Samen von *A. thaliana*. Das Fenster zeigt detailliert die Elektropherogramme der extrahierten Ionenspuren (*m/z* Werte; für Strukturen siehe Tabelle 6 und Abbildung 34) der Hauptkomponenten des Samenextraktes.[34]

Da die Trennung der Glucosinolate mit dem gewählten Puffersystem in einem Zeitfenster von < 3 min stattfindet, ist die Gefahr gegeben, dass die Trennung durch diverse co-migrierende Substanzen limitiert wird. Glücklicherweise war dies nicht der Fall und es gelang sogar die erfolgreiche Auftrennung von Serien strukturell sehr ähnlicher Glucosinolate. Dies ist in Abbildung 39 beispielhaft für die Glucosinolate gezeigt, deren Seitenketten aus einer homologen Reihe von Methylthioalkylresten (Alkyl = *n*-Butyl bis *n*-Octyl) besteht.[34]

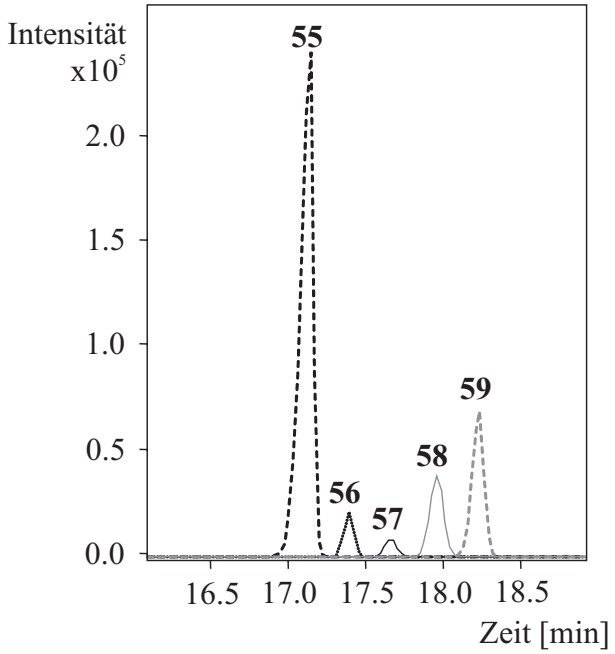


Abbildung 39. Extrahierte Ionenspuren der aufgetrennten homologen Serie von Glucosinolaten mit folgenden Seitenketten: R = 4-Methylthio-*n*-butyl (**55**, *m/z* 422.05; $C_{12}H_{22}NO_9S_3$), R = 5-Methylthio-*n*-pentyl (**56**, *m/z* 434.06; $C_{13}H_{24}NO_9S_3$), R = 6-Methylthio-*n*-hexyl (**57**, *m/z* 448.08; $C_{14}H_{26}NO_9S3$), R = 7-Methylthio-*n*-heptyl (**58**, *m/z* 462.09; $C_{15}H_{28}NO_9S_3$), R = 8-Methylthio-*n*-octyl-glucosinolat (**59**, *m/z* 476.11; $C_{16}H_{30}NO_9S_3$). Die Glucosinolat-Grundstruktur ist in Abbildung 34 abgebildet und die Struktur der Seitenketten in Tabelle 6.

Zur Auswertung der detektierten Massenspektren verifizierte man die spezifizierte Massengenauigkeit von < 5 ppm mittels der bekannten Vergleichssubstanzen. Der verwendete Such-Algorithmus schloss nur Glucosinolat-ähnliche Strukturen ein und wurde reduziert auf mindestens eine SO_4-Gruppe, die als Ladung tragende Gruppe zwingend nötig ist, da sonst die beobachtete CE-Migration und das Isotopenmuster nicht passen würde. Außerdem wurden noch maximal drei Schwefel- und zwei Stickstoffatome angenommen, während die Anzahl von Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen offen gelassen wurde. Trotzdem gab es fast immer mehrere Substanzen, die im festgelegten 5-ppm-Fenster zu dem Such-Algorithmus passten. Um dieses Problem zu lösen, wurde das vom oTOF-Gerät ermittelte wahre Isotopenmuster (True Isotopic Pattern - TIP™, Bruker Daltonik)[47] als zusätzliches analytisches Suchkriterium genutzt. Die gemessene Isotopenverteilung wurde dabei jeweils mit den ersten beiden berechneten möglichen elementaren Zusammensetzungen verglichen, was in Abbildung 40 beispielhaft an Glucoraphanin (**47**) dargestellt ist.

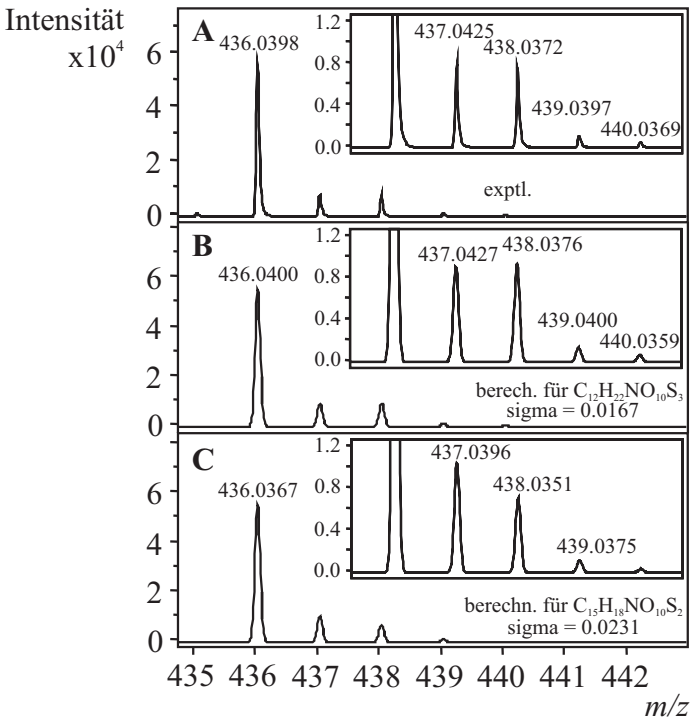


Abbildung 40. Vergleich des gemessenen Spektrums (A) von Glucoraphanin (**47**) mit zwei berechneten potenziellen Elementarzusammensetzungen (B, C), die innerhalb des 5-ppm-Fensters lagen. Der Sigma-Wert™ verdeutlicht dabei, dass das gemessene Spektrum besser zum errechneten Spektrum B passt und so Spektrum C klar ausgeschlossen werden kann.[34]

Unter Berücksichtigung der Massenpositionen und der relativen Intensitäten der einzelnen Isotopen wurde dem gemessenen Spektrum die Summenformel $C_{12}H_{22}NO_{10}S_2$ (Glucoraphanin, **47**) zugeordnet. Die zweite mögliche Summenformel $C_{15}H_{18}NO_{10}S_3$ konnte aufgrund des sogenannten Sigma-Wertes™ klar ausgeschlossen werden. Dieser Sigma-Wert™ ist ein auf dem wahren Isotopenmuster basierender berechneter Parameter, der die Differenzen der Isotopenmassen und ihrer Intensitäten wiedergibt. Im Falle des Glucoraphanin-Beispiels war der Unterschied zwischen den Abständen der Isotopenmassen und den Intensitätsverhältnissen von C_3 im Vergleich zu SH_4 ausschlaggebend.[34]

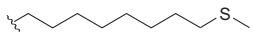
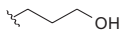
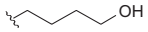
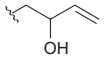
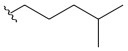
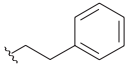
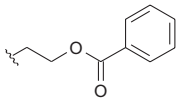
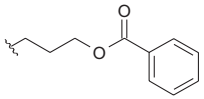
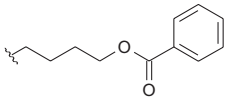
Durch die Nutzung dieser neu etablierten CE-MS-Trennmethode gelang es nicht nur, die zuvor in der Literatur[115,118] für *Arabidopsis thaliana* beschriebenen Glucosinolate, bis auf Glucoiberverin (**54**) und Gluconasturtiin (**67**), nachzuweisen, sondern darüber hinaus auch noch welche, die bisher nur für andere Pflanzen der Familie der Brassicaceae beschrieben wurden.[128] Außerdem wurden neue, bislang unbekannte Glucosinolate detektiert. Diese lagen vor allem in der Massenregion > 500 Dalton und hatten einen ungeraden $[M-H]^-$-Wert

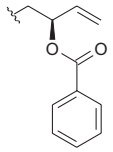
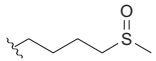
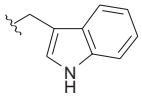
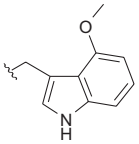
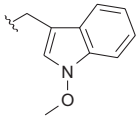
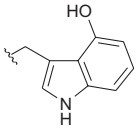
und ein Isotopenmuster, das zu zwei oder drei Schwefelatomen im Molekül passen würde. Daraus ließ sich schließen, dass es sich sehr wahrscheinlich um Glucosinolate mit zwei Stickstoffatomen handelte, die allerdings eine signifikant größere Masse als die bisher bekannten Indolderivate mit zwei N-Atomen[107] (z.B. Glucobrassicin, **2**) hatten. Darüber hinaus konnten die bisher unbekannten Derivate 8-Methylsulfonyl-*n*-octyl-, 2-Hydroxy-4-methylsulfinyl-*n*-butyl-, 2-Hydroxy-4-methylsulfonyl-*n*-butyl- und 4-Hydroxybenzoyloxy-methylglucosinolat identifiziert werden.

Alle mittels dieser CE-ESI-oTOF-MS-Methode aufgeklärten Glucosinolate sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6. Substanzen, die mittels CE-MS und HPLC-MS in *Arabidopsis-thaliana*-Samenextrakten identifiziert wurden.

Systematischer Name (- glucosinolat)[a]	Trivialname	Summen-formel[b]	Berechnete Masse[b]	Experimentelle Masse[b]	Massen-unterschied [ppm]	Retentions-Zeit HPLC [min]	Struktur[a] R =
3-Methylsulfinyl-*n*-propyl-[c]	Glucoiberin	$C_{11}H_{20}NO_{10}S_3$	422.0255	422.0234	+4.9	-	
4-Methylsulfinyl-*n*-butyl-[c]	Glucoraphanin	$C_{12}H_{22}NO_{10}S_3$	436.0411	436.0398	+3.0	-	
5-Methylsulfinyl-*n*-pentyl-[c]	Glucoalyssin	$C_{13}H_{24}NO_{10}S_3$	450.0568	450.0563	+1.1	28.07	
6-Methylsulfinyl-*n*-hexyl-[c]	Glucohesperin	$C_{14}H_{26}NO_{10}S_3$	464.0724	464.0709	+3.2	29.19	
7-Methylsulfinyl-*n*-heptyl-[c]	Glucoibarin	$C_{15}H_{28}NO_{10}S_3$	478.0881	478.0864	+3.4	30.21	
8-Methylsulfinyl-*n*-octyl-[c]	Glucohirsutin	$C_{16}H_{30}NO_{10}S_3$	492.1037	492.1031	+1.2	33.05	
4-Methylsulfonyl-*n*-butyl-[c]	Glucoerysolin	$C_{12}H_{22}NO_{11}S_3$	452.0360	452.0342	+4.1	-	
8-Methylsulfonyl-*n*-octyl-[c]		$C_{16}H_{30}NO_{11}S_3$	508.0986	508.0953	+3.0	-	
3-Methylthio-*n*-propyl-[c]	Glucoiberverin	$C_{11}H_{20}NO_9S_3$	406.0306	-	-	-	
4-Methylthio-*n*-butyl-[c]	Glucoerucin	$C_{12}H_{22}NO_9S_3$	420.0462	420.0445	+4.1	31.18	
5-Methylthio-*n*-pentyl-[c]	Glucoberteroin	$C_{13}H_{24}NO_9S_3$	434.0619	434.0597	+5.1	35.02	
6-Methylthio-*n*-hexyl-[c]	Glucolesquerellin	$C_{14}H_{26}NO_9S_3$	448.0775	448.0762	+3.0	-	
7-Methylthio-*n*-heptyl-[c]		$C_{15}H_{28}NO_9S_3$	462.0932	462.0920	+2.5	40.45	

Systematischer Name (- glucosinolat)[a]	Trivialname	Summen-formel[b]	Berechnete Masse[b]	Experimentelle Masse[b]	Massen-unterschied [ppm]	Retentions-Zeit HPLC [min]	Struktur[a] R =
8-Methylthio-*n*-octyl-[c]		$C_{16}H_{30}NO_9S_3$	476.1088	476.1079	+1.9	43.34	
3-Hydroxy-*n*-propyl-[c]		$C_{10}H_{18}NO_{10}S_2$	376.0378	376.0374	+0.8	7.03	
4-Hydroxy-*n*-butyl-[c]		$C_{11}H_{20}NO_{10}S_2$	390.0534	390.0523	+2.9	8.25	
3-Butenyl- [d]	Gluconapin	$C_{11}H_{18}N_1O_9S_2$	372.0428	372.0412	+4.4	-	
2(*R/S*)-2-Hydroxy-3-butenyl-[c, f]	(Epi)Progoitrin	$C_{11}H_{18}N_1O_{10}S_2$	388.0378	388.0366	+3.1	-	
4-Methylpentyl-[c]		$C_{13}H_{24}N_1O_9S_2$	402.0898	402.089	+1.5	-	
iso-Hexyl- [e, g]		$C_{14}H_{26}N_1O_9S_2$	416.1054	416.1040	+3.4	-	unbekannt
iso-Heptyl- [e, g]		$C_{15}H_{28}N_1O_9S_2$	430.1211	430.1195	+3.7	-	unbekannt
2-Phenylethyl-[c]	Gluconasturtiin	$C_{16}H_{20}NO_9S_2$	434.0585	-	-	-	
2-Benzoyloxyethyl-[c, f]		$C_{16}H_{20}N_1O_{11}S_2$	466.0483	466.0481	+0.6	-	
3-Benzoyloxy-*n*-propyl-[c]	Glucomalcomiin	$C_{17}H_{22}NO_{11}S_2$	480.0640	480.0622	+3.7	38.30	
4-Benzoyloxy-*n*-butyl-[c]		$C_{18}H_{24}NO_{11}S_2$	494.0796	494.0780	+3.2	39.58	

Systematischer Name (- glucosinolat)[a]	Trivialname	Summen-formel[b]	Berechnete Masse[b]	Experimentelle Masse[b]	Massen-unterschied [ppm]	Retentions-Zeit HPLC [min]	Struktur[a] R =
2(*S*)-2-Benzoyloxy-3-butenyl- [d]		$C_{18}H_{22}N_1O_{11}S_2$	492.0640	492.0628	+2.3	-	
6´-Benzoyl-4-methyl-sulfinylbutyl- [d]		$C_{19}H_{26}N_1O_{10}S_3$	524.0724	524.0704	+3.9	-	 (und 6´-Benzoyloxy anstelle des 6´-OHs)
Indol-3-ylmethyl- [c]	Glucobrassicin	$C_{16}H_{19}N_2O_9S_2$	447.0537	447.0521	+3.8	40.32	
Methoxyindol-3-ylmethyl- [b, f]	Methoxy-Glucobrassicin	$C_{17}H_{22}N_2O_{10}S_2$	477.0643	477.0628	+4.6	-	 or 
4-Hydroxyindol-3-ylmethyl-[c, f]	Hydroxy-Glucobrassicin	$C_{16}H_{19}N_2O_{10}S_2$	463.0487	463.0465	+3.1	-	
R = C_9H_9O [f]		$C_{16}H_{20}N_1O_{10}S_2$	450.0534	450.0518	+3.8	-	unbekannt
R = $C_{13}H_8O_3S$		$C_{20}H_{19}N_1O_{12}S_3$	561.0075	561.0062	+2.2	-	unbekannt
R = $C_8H_7O_3$		$C_{15}H_{18}N_1O_{12}S_2$	468.0276	468.0270	+1.3	-	unbekannt
R = $C_5H_{11}O_3S$ [f]		$C_{12}H_{22}N_1O_{12}S_3$	468.0310	468.0300	+2.0	-	unbekannt
R = $C_{13}H_{14}NO_3$ [f]		$C_{20}H_{25}N_2O_{12}S_2$	549.0854	549.0835	+3.5	-	unbekannt

Systematischer Name (- glucosinolat)[a]	Trivialname	Summen-formel[b]	Berechnete Masse[b]	Experimentelle Masse[b]	Massen-unterschied [ppm]	Retentions-Zeit HPLC [min]	Struktur[a] R =
R = $C_{17}H_8NS$ [c]		$C_{24}H_{19}N_2O_9S_3$	575.0258	575.0254	+0.7	-	unbekannt
R = $C_{17}H_8NOS$ [f]		$C_{24}H_{19}N_2O_{10}S_3$	591.0207	591.0199	+1.4	-	unbekannt

Die gestrichelten Linien unterteilen die verschiedenen Glucosinolat-Strukturklassen.

[a] Der Rest R entspricht der Glucosinolatgrundstruktur aus Abbildung 34.

[b] Angegeben als $[M-H]^-$ in Dalton.

[c] In der Literatur beschrieben als Inhaltsstoffe aus *A.-thaliana*-Samen.[113,127]

[d] In der Literatur beschrieben als Inhaltsstoffe aus anderen Pflanzenteilen von *A.thaliana.*[113,127]

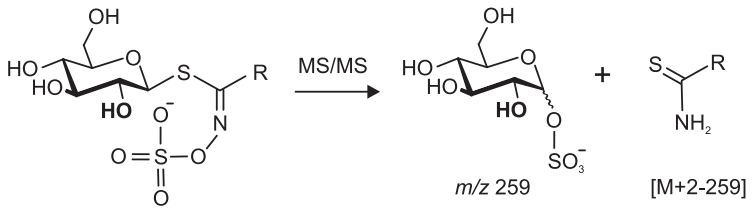
[e] In der Literatur als Inhaltsstoffe aus *Armoracia lapathifolia*[126] beschrieben.

[f] Aufgrund von niedriger Signalintensität und /oder überlappendem Isotopenmuster nur unter Vorbehalt identifiziert.

[g] Zusätzlich durch die Migrationszeit bestätigt.

Zunächst mittels einer Ionenfalle und später mittels eines micrOTOF-Q-Gerät als MS-Detektor wurden MS/MS-Spektren der CZE-getrennten Glucosinolate gemessen, um die durch oTOF-MS-Messungen zugeordneten Glucosinolat-Strukturen zu verifizieren. Ausserdem sollte geprüft werden, ob die Möglichkeit besteht, die Strukturen der detektierten, unbekannten Glucosinolate mittels MS/MS-Experimenten aufzugeklären. Die Nutzung eines Time-of-Flight-Detektors, der mit einer Quadropol-Einheit versehen war (mircOTOF-Q von *Bruker*), ermöglichte es, die kapillarelektrophoretisch getrennten Glucosinolate nicht nur zu fragmentieren, sondern auch von den erhaltenen Fragmenten die exakten Massen und die Isotopenmuster zu bestimmen.

Aus allen in dieser Untersuchung eingeschlossenen Glucosinolaten entstanden dabei als charakteristische Fragmente der Grundstruktur die Sulfatgruppe (*m/z* 97, HSO_4), der Thioglucoserest (*m/z* 195, $C_6H_{11}O_5S$), ein umgelagertes Zuckersulfat (*m/z* 259, $C_6H_{11}O_9S$; siehe Abbildung 41) samt korrespondierendem Seitenketten-Fragment und zwei Fragmente, die ebenfalls auf eine umgelagerte, bisher unbekannte Zuckersulfatstruktur hinwiesen (*m/z* 275, $C_6H_{11}O_8S_2$ und *m/z* 291, $C_6H_{11}O_9S_2$).[129]



Grundstruktur umgelagerte Fragmente

Abbildung 41. Umlagerung der Glucosinolat-Grundstruktur zum Zuckersulfat- und dem korrespondierenden Seitenketten-Fragment. Allerdings ist bei diesem postulierten Mechanismus unklar, woher das Reduktionsäquivalent für den *N*,*O*-Bindungsbruch kommt.

Die Seitenketten der Glucosinolate fragmentieren im Gegensatz zur Grundstruktur weit weniger gut. Nur einige der verschiedenen Seitenketten-Typen (aliphatisch, aromatisch oder heteroaromatisch) gaben charakteristische Fragmente, die zur Identifizierung der Struktur genutzt werden konnten. Zum Beispiel zeigten Seitenketten mit einer Methylsulfinyl-*n*-alkyl-Struktur nach Fragmentierung ein typisches Fragment $[M-64]^-$, das bei der Abspaltung einer CH_4SO-Gruppe (*m/z* 64) entsteht. Auch beim Subtyp der Methylthio-*n*-alkyl-Seitenketten entstand durch den Verlust eines C_2H_6S-Restes (*m/z* 62) ein charakteristisches Fragment $[M-62]^-$, welches Rückschlüsse auf die Struktur der Seitenkette zuließ.[129] Aromatische und heteroaromatische Seitenketten-Typen ergaben leider keine

charakteristischen Fragmente, an Hand derer man die Struktur der Seitenkette beweisen konnte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei MS/MS-Experimenten von Glucosinolaten die meisten der entstehenden Fragmente lediglich einen Hinweis darauf liefern, dass es sich um ein Glucosinolat handelt, da hauptsächlich Teile der Glucosinolat-Grundstruktur sichtbare Fragmente liefern. Zu beweisen, um welches Glucosinolat es sich handelt, funktioniert leider nur bei einigen wenigen der aliphatischen Seitenketten-Strukturtypen, da die meisten Seitenkettenstrukturen keine charakteristischen Fragmente zeigen. Bei diesen war eine genaue Identifizierung der Struktur der einzelnen Glucosinolate anhand der erhaltenen MS/MS-Daten nicht möglich, da eventuell existierende Isobaren (= Moleküle mit der gleichen Masse, aber einer unterschiedlichen elementaren Zusammensetzung, wie z.B. $SH_4 \triangleq C_3$) nicht unterscheidbar waren.[34]

Deswegen wurden zur Strukturaufklärung überwiegend die durch CZE-oTOF-MS gewonnenen Daten herangezogen. Mithilfe der exakten Massen konnten sogar auftauchende Isobaren, wie z.B. die von *m/z* 492, identifiziert werden. Wie Abbildung 42 zeigt, erwiesen sich die Isobaren der Masse *m/z* 492 als Glucohirsutin (**51**, $C_{16}H_{30}NO_{10}S_3$), ein Isomer ($C_{16}H_{30}NO_{10}S_3$) und ein Glucosinolat mit der Elementarzusammensetzung $C_{18}H_{22}NO_{11}S_2$ [(2*S*)-2-Benzoyloxy-3-butenylglucosinolat, **71**].

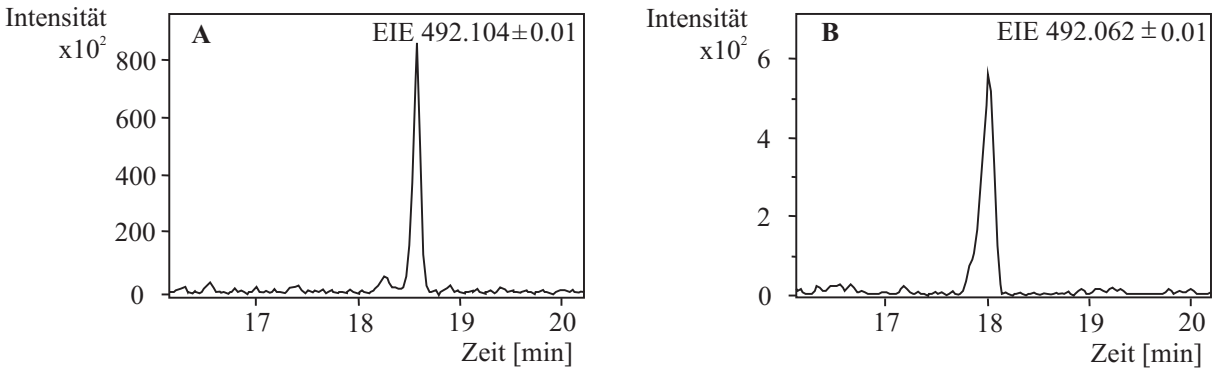


Abbildung 42. EIE der Massenspuren *m/z* 492.104 ± 0.01 (A) und *m/z* 492.062 ± 0.01 (B), die zu den Glucosinolaten mit den Summenformeln $C_{16}H_{30}NO_{10}S_3$ bzw. $C_{18}H_{22}NO_{11}S_2$ gehören.[34]

Trotz der Messbarkeit von exakten Massen und der Möglichkeit, Isotopenmuster zu vergleichen, ist eine Trennung der zu untersuchenden Substanzen immer noch nötig für eine sichere Identifizierung und Quantifizierung, denn anders kann das Problem von überlappenden Isotopenmustern der verschiedenen Substanzen, die die Massenpositionen

verfälschen, nicht vermieden werden. Dass dabei allerdings selbst die geringste Antrennung bereits für eine erfolgreiche Identifizierung ausreicht, zeigt eindrucksvoll das Beispiel von Glucolesquerellin und Glucoalyssin (siehe Abbildung 43). Abgebildet sind die extrahierten Ionenspur-Elektropherogramme (EIE) von *m/z* 448.076 ± 0.01 (Glucolesquerellin, **57**) und von *m/z* 450.057 ± 0.01 (Glucoalyssin, **48**) zusammen mit den Massenspektren der Zeitfenster A, B und C. Der erste Peak (Zeitfenster A) wurde als Isobare von Glucoalyssin ($C_{16}H_{20}NO_{10}S_2$, **48**) identifiziert, während im Zeitfenster B lediglich Glucolesquerellin ($C_{14}H_{26}NO_9S_3$, **57**) aufklärbar war, obwohl die Ionenspur von *m/z* 450.057 dort ebenfalls ein Maximum besitzt. Die leichte Antrennung in Zeitfenster C dagegen ließ auch eine korrekte Identifizierung von Glucoalyssin ($C_{13}H_{24}NO_{10}S_3$, **48**) zu, da das Isotopenmuster von **57** dort nur noch einen kleinen Einfluss auf die Isotopenverteilung besitzt.[34]

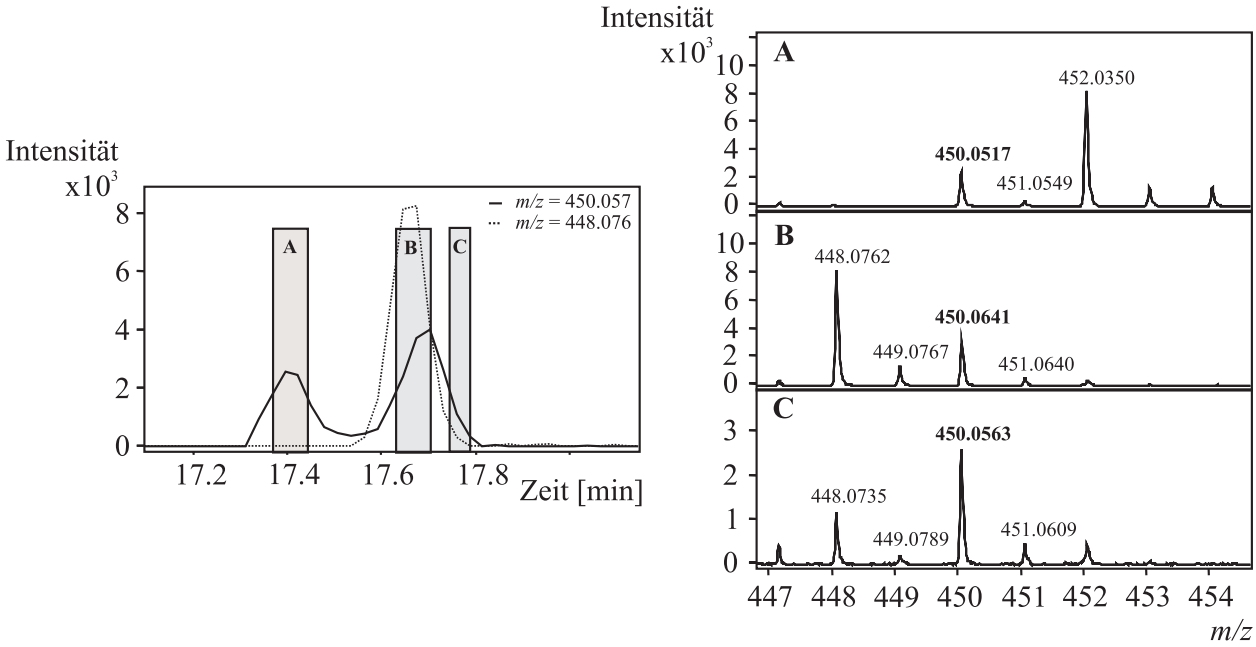


Abbildung 43. Identifizierung von Glucolesquerellin (**57**) und Glucoalyssin (**48**) durch leichte Antrennung der Massenspuren im Zeitfenster C.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese neu entwickelte Methode zur Trennung von intakten Glucosinolaten mittels CE in einem stark sauren Elektrolytsystem sehr empfindlich, effizient und selektiv ist. Sie eröffnet die Möglichkeit, ohne zeitaufwendige Aufarbeitung Glucosinolat-Strukturen sogar in komplexen biologischen Matrices zu detektieren und sicher zu identifizieren.

7.2.5 Metabolit-Untersuchung der Infloreszenzen mit Hilfe der entwickelten CE-ESI-oTOF-MS-Technik

Um sicher zu stellen, dass die neu entwickelte ESI-oTOF-MS-Methode auch auf beliebige andere Glucosinolate-enthaltene Extrakte anwendbar ist, wurden im Folgenden auch noch die Metabolitmuster von Infloreszenz- und Blattextrakten untersucht und mit den dafür vorhandenen Literaturangaben verglichen.[115] Die Infloreszenzen von *Arabidopsis thaliana* wurden dazu genauso wie vorher der Samen extrahiert und aufgearbeitet.

In der Literatur wurden für die Infloreszenzen von *A. thaliana* insgesamt 15 verschiedene Glucosinolate beschrieben. Neben kleinen Mengen verschiedener Substanzen mit aliphatischer, aromatischer oder heteroaromatischer Struktur der Seitenkette kommen vor allem größere Mengen Glucoiberin (**46**) und Glucobrassicin (**2**) vor. Glucoraphanin (**47**) bildet mit Abstand den Hauptmetaboliten dieser Extrakte.

Diese Literaturangaben konnten mittels der neuen Messmethode im Großen und Ganzen reproduziert werden. Wie bei den Samenextrakten variiert dabei auch hier ein wenig die Zusammensetzung der Nebenprodukte. Außerdem konnten zusätzlich einige noch nicht beschriebene Inhaltsstoffe identifiziert werden. Es handelte sich dabei um dieselben Derivate, die schon in den Blättern als unbekannt identifiziert wurden.

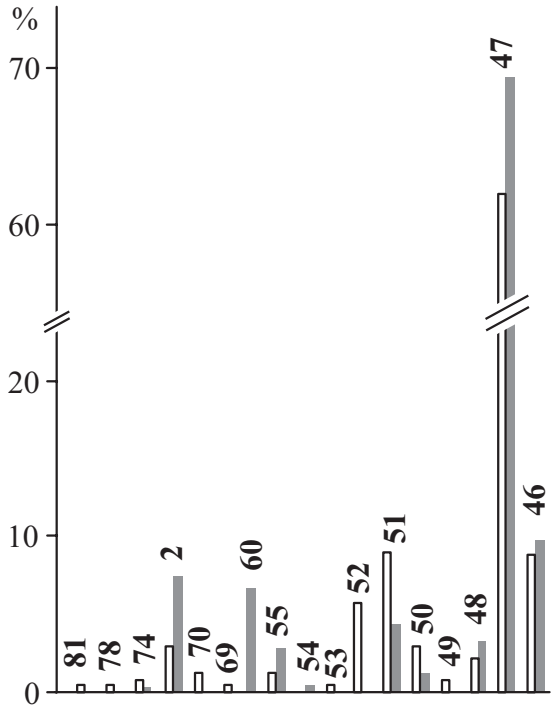


Abbildung 44. Prozentuale Zusammensetzung der verschiedenen Glucosinolate in Infloreszenz-Extrakten von *Arabidopsis thaliana*. Die schwarzen Balken entsprechen den Literaturdaten[115] und die weißen Balken den mittels CE-MS ermittelten Werten (siehe Tabelle 6 für Seitenkettenstruktur und Abbildung 34 für Grundstruktur der Glucosinolate).

7.2.6 Blattinhaltsstoffe von *A. thaliana*

Blattextrakte von *Arabidopsis thaliana* wurden analog zu den oben bereits beschriebenen Samenextrakten hergestellt und die Inhaltsstoffe mittels der neu entwickelten CE-MS-Methode bestimmt. Im Hinblick auf die weitere Aufgabenstellung, die Vermessung von Blattphloem-Exsudaten, wurden diese Extrakte nicht zur Vermessung mit purem Milipore-Wasser gelöst, sondern mit einer Sinigrin-Lösung. Die Konzentration des internen Standards Sinigrin (2-Propenylglucosinolat, **44**) betrug dabei 1 ng/µl. Untersucht wurden die Rosettenblätter einer einen Monat alten Pflanze und die einer drei Monate alten Pflanze, also dem Alter, in dem die Pflanzen auch in den späteren Versuchen infiziert wurden.

Dabei konnten ebenfalls fast alle literaturbekannten Glucosinolate[115] in den Extrakten nachgewiesen werden. Lediglich zwei der angegebenen Substanzen, 6-Methylsulfinyl-*n*-hexyl- (**49**) und Hydroxyindol-3-ylmethylglucosinolat (**74**), konnten nicht detektiert werden. Dafür wurden aber eine Reihe bis dato noch nicht für *Arabidopsis-thaliana*-Blätter nachgewiesene Glucosinolate identifiziert – 3-Methylsulfonyl-*n*-propyl, 4-Methylsulfonyl-*n*-butyl, 8-Methylsulfonyl-*n*-octyl-, 7-Methylthio-*n*-heptyl-, 8-Methylthio-*n*-octyl, 4-Benzoyloxy-*n*-butyl- und 5-Benzoyloxy-*n*-pentyl-glucosinolat – zusammen mit einigen neuartigen Summenformeln, die ebenfalls ein Glucosinolat-ähnliches Isotopenmuster besaßen.

Auch die kleinen Unterschiede in der Glucosinolat-Zusammensetzung und in der Konzentration der einzelnen Glucosinolate zwischen jungen und älteren Blättern konnten mit Hilfe unserer neu entwickelten Methode analog zu den Literaturdaten[115] reproduziert werden.

Tabelle 7. Inhaltsstoffe aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* (drei Monate alt / einen Monat alt).

Formel-nummer	Systematischer Name (- glucosinolat) [a]	Trivialname	Summen-formel[a]	Berechnete Masse[b]	Experimentelle Masse[b]	Massen-unterschied [ppm]
44	2-Propenyl-	Sinigrin	$C_{10}H_{16}NO_9S_2$	358.0272	358.0270 / 358.0269	+0.6 / +0.9
46	3-Methylsulfinyl-*n*-propyl-[c]	Glucoiberin	$C_{11}H_{20}NO_{10}S_3$	422.0255	422.0254 / 422.0265	+0.1 / +4.1
47	4-Methylsulfinyl-*n*-butyl-[c]	Glucoraphanin	$C_{12}H_{22}NO_{10}S_3$	436.0411	436.0415 / 436.0409	-0.8 / +0.8
48	5-Methylsulfinyl-*n*-pentyl-[c]	Glucoalyssin	$C_{13}H_{24}NO_{10}S_3$	450.0568	450.0556 / 450.0550	+2.6 / +3.9
49	6-Methylsulfinyl-*n*-hexyl-[c]	Glucohesperin	$C_{14}H_{26}NO_{10}S_3$	464.0724	464.0733 / -	-1.8 / -
50	7-Methylsulfinyl-*n*-heptyl- [c]	Glucoibarin	$C_{15}H_{28}NO_{10}S_3$	478.0881	478.0879 / 478.0859	+0.3 / +4.6
51	8-Methylsulfinyl-*n*-octyl-[c]	Glucohirsutin	$C_{16}H_{30}NO_{10}S_3$	492.1037	492.1031 / 492.1029	+1.4 / +1.7
82	3-Methylsulfonyl-*n*-propyl-[d]	Glucocheirolin	$C_{11}H_{20}NO_{11}S_3$	438.0204	438.0211 / 438.0224	-1.7 / -4.5
52	4-Methylsulfonyl-*n*-butyl-[d]	Glucoerysolin	$C_{12}H_{22}NO_{11}S_3$	452.0360	452.0354 / 452.0352	+1.4 / +2.0
53	8-Methylsulfonyl-*n*-octyl-[d]		$C_{16}H_{30}NO_{11}S_3$	508.0986	508.0983 / 508.0974	+0.7 / +2.4
55	4-Methylthio-*n*-butyl-[c]	Glucoerucin	$C_{12}H_{22}NO_9S_3$	420.0462	420.0440 [f]/ 420.0451	+5.2 / +2.7
58	7-Methylthio-*n*-heptyl-[d]		$C_{15}H_{28}NO_9S_3$	462.0932	- / 462.0913	- / +4.0
59	8-Methylthio-*n*-octyl-[c]		$C_{16}H_{30}NO_9S_3$	476.1088	- / 476.1068	- / +4.2
62	3-Butenyl-[d]	Gluconapin	$C_{11}H_{18}N_1O_9S_2$	372.0428	372.0422 / 372.0419	+ 1.7 / +2.4
64	4-Methylpentyl-[c]		$C_{13}H_{24}N_1O_9S_2$	402.0898	402.0881 / 402.0892	+4.2 / +1.6

Formel-nummer	Systematischer Name (- glucosinolat) [a]	Trivialname	Summen-formel[a]	Berechnete Masse[b]	Experimentelle Masse[b]	Massen-unterschied [ppm]
65	*i*-Hexyl- [d]		$C_{14}H_{26}N_1O_9S_2$	416.1054	- / 416.1042	- / +3.0
67	2-Phenylethyl-[c]	Gluconasturtiin	$C_{16}H_{20}NO_9S_2$	434.0585	- / 434.0569	- / +3.6
70	4-Benzoyloxy-*n*-butyl-[d]		$C_{19}H_{26}N_1O_{11}S_2$	494.0796	- / 494.0812	- / -3.3
83	5-Benzoyloxy-*n*-pentyl-[e]		$C_{16}H_{20}N_1O_{11}S_2$	508.0953	- / 508.0971	- / -3.6
2	Indol-3-ylmethyl-[c]	Glucobrassicin	$C_{16}H_{19}N_2O_9S_2$	447.0537	447.0530 / 447.0523	+1.7 / +3.2
73	Methoxyindol-3-ylmethyl-[c]	Methoxy-glucobrassicin	$C_{17}H_{22}N_2O_{10}S_2$	477.0643	477.0634 / 477.0625	+1.8 / +3.7
74	4-Hydroxyindol-3-ylmethyl-[c]	Hydroxy-glucobrassicin	$C_{16}H_{19}N_2O_{10}S_2$	463.0465	-	-
78	R = $C_5H_{11}O_3S$[f]		$C_{12}H_{22}N_1O_{12}S_3$	468.0310	468.0305 / 468.0296	+0.9 / +4.0
84	R = $C_{11}H_7O_3$[f]		$C_{18}H_{18}N_1O_{12}S_2$	504.0276	504.0286 / 504.0266	-2.1 / +1.9
85	R = $C_9H_{19}O_3S$[f]		$C_{16}H_{30}N_1O_{12}S_3$	524.0936	524.0925 / 524.0932	+2.0 / +0.6
86	R = $C_{12}H_{19}O_3S$[f]		$C_{19}H_{30}N_1O_{12}S_3$	560.0936	560.0919 / 560.0913	+3.0 / +4.0

Die gestrichelten Linien unterteilen die verschiedenen Glucosinolat-Strukturklassen.

[a] Die Glucosinolatgrundstruktur entspricht der aus Abbildung 34; die Seitenkettenstrukturen denen aus Tabelle 6.
[b] Angegeben als $[M-H]^-$ in Dalton.
[c] In der Literatur beschrieben als Inhaltsstoffe aus *A.-thaliana*-Blätter.[115]
[d] In der Literatur beschrieben als Inhaltsstoffe aus anderen Pflanzenteilen von *A.thaliana.*[115,130]
[e] In der Literatur als Inhaltsstoffe aus *Armoracia lapathifolia*[128] beschrieben.
[f] Aufgrund von niedriger Signalintensität und /oder überlappendem Isotopenmuster nur unter Vorbehalt identifiziert.

7.3 Die Rolle des Phloems bei der Ausbreitung Pathogen-vermittelter Signale

Das Phloem, bestehend aus Siebröhrenelementen und Geleitzellen, spielt als Fernleitsystem der Pflanzen einerseits bei der Verteilung von Assimilaten und andererseits bei der Signalweiterleitung von lokalen oder systemischen Abwehrreaktionen gegen Pathogene

eine große Rolle. Damit Pflanzen in der Lage sind, systemisch auf einen Pathogenangriff zu antworten, müssen lokale Signale erst einmal in ein mobiles Signal übersetzt werden. Dabei werden neben einer elektrischen Potenzial- oder hydraulischen Leitfähigkeitsänderung[131] entlang der Leitgefäße auch chemische Substanzen, wie z.B. Jasmonsäure, Salicylsäure oder Ethylen,[132] als Erzeuger vor allem Phloem-transportabler Signale diskutiert. Diese lösen dann ihrerseits in noch nicht befallenen Sprossbereichen die Synthese von PR-Genen (pathogenesis-related) aus. Das bislang gefundene Spektrum von Geleitzell- und Mesophyll-spezifischen mRNAs weist auf lokale und systemische Signale verschiedener Struktur hin.[133]

Das dazugehörige Profil charakteristischer chemischer Verbindungen sollte anhand von Phloem-Exsudaten mittels moderner Online-Techniken wie HPLC-UV, -MS und -NMR im Rahmen des Teilprojektes B8 des *Sonderforschungsbereiches 567* ("*Mechanismen der interspezifischen Interaktion von Organismen*") ermittelt werden. Innerhalb dieses Teilprojektes wurde eng mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Hedrich zusammengearbeitet. Hierbei ist besonders die Bereitstellung des Pflanzenmaterials durch Dr. P. Ache und der Phloem-Exsudate durch Dr. R. Deeken und T. Latz zu nennen.

7.3.1 Infizierung der Blätter mit verschiedenen *Pseudomonas-syringae*-pv.-*tomato*-Stämmen und Phloemsaftgewinnung

Um der Frage, inwiefern kleine Moleküle als chemische Signale nach einer Infektion mit Pathogenen von Pflanzen genutzt werden, auf den Grund zu gehen, wurden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen mit verschiedenen *Pseudomonas-syringae*-pv.-*tomato*-Stämmen infiziert. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* gehört zur Familie der Pseudomonaceae, bei denen es sich um gramnegative, gerade Stäbchenbakterien handelt. Sie besitzen polar angeordnete Geißeln und sind nicht zur Sporenbildung fähig. Außerdem handelt es sich bei Vertretern der Pseudomonaceae um obligate Aerobier, die neben einigen menschenpathogenen Keimen (*Pseudomonas aeruginosa*) vor allem als Erreger von Pflanzenkrankheiten in der Natur weit verbreitet sind.[134] *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* verursacht u.a. bei Tomaten- und *Arabidopsis*-Pflanzen die sogenannte Blattfleckenkrankheit, bei der es nach einer Infektion zu einem Absterben der befallen Blattbereiche und damit zu gut sichtbaren, bräunlichen Nekrosen kommt.

Bei einer Infektion von *A.-thaliana*-Blättern mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* folgt eine sehr komplexen Reaktion der Pflanze auf das Pathogen, die noch nicht in allen Einzelheiten geklärt ist.[135] Man weiß aber bereits, dass es dabei zu einem leichten Konzentrationsanstieg bei den Glucosinolaten im Gesamtblattextakt kommt.[136] *In vitro* antibakteriell wirksam – also ein potenzieller Schutz für die Pflanzen gegen Pathogene – sind dabei die Abbauprodukte (Isothiocyanate und Nitrile) der Glucosinolate, vor allem 4-Methylsulfinyl-butylisothiocyanat, das Abbauprodukt von Glucoraphanin (**47**), dem Hauptmetabolit in *A. thaliana*, ist hervorzuheben.[135,137] Untersuchungen an gentechnisch veränderten Pflanzen, in denen das Glucosinolatprofil entsprechend moduliert wurde, untermauern diese *in-vitro*-Ergebnisse.[138] Vor allem aber kommt es im Verlauf der pflanzlichen Reaktion auf den Bakterienbefall zu einem Anstieg von indolischen Sekundärmetaboliten, die z.T. im Cytoplasma gelöst (z.B. Tryptophan, Camalexin, Derivate der Indol-3-carboxylsäure[75,139] und indolische Glucosinolate[140,141]) und z.T. an der Zellwand-gebunden (z.B. Indol-3-carboxylsäure) vorliegen.[75,139] Dieser Konzentrationsanstieg wird durch Jasmonate vermittelt, deren Konzentration bei biotischem Stress ebenfalls rasch ansteigt. Auch in Phloemexsudaten von befallenen Blättern ist diese initiale Akkumulation von Jasmonaten nachgewiesen worden, was darauf hin deutet, dass sie neben den lokalen Effekten auch eine systemische Funktion bei der Pathogenabwehr übernehmen.[141,142]

Für die hier beschriebenen Untersuchungen der Phloemsaft-Zusammensetzung wurden ein virulenter und ein avirulenter Stamm des Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* sowie eine 10 mM $MgCl_2$-Lösung als Blindprobe infiltriert. Zum Vergleich wurde auch Phloemsaft von gänzlich unbehandelten Pflanzen gesammelt und vermessen.

Die Infiltration wie auch die Phloemexsudatsammlung wurden von Dr. R. Deeken und T. Latz optimiert und durchgeführt.[143] Daher wird hier nur zum besseren Verständnis eine kurze Zusammenfassung dieses Prozederes gegeben:

Um eine Infektion mit den verschiedenen Bakterien-Stämmen hervorzurufen, wurden ca. 55 Blätter einer drei Monate alten *Arabidopsis*-Pflanze die entsprechende Bakteriensuspension vorsichtig mit Hilfe einer Einmal-Spritze in die Atemhöhlen auf der Blattunterseite infiltriert. Dieses Prozedere wurde analog mit der $MgCl_2$-Lösung durchgeführt.

Die derartig behandelten Pflanzen wurden daraufhin fünf Stunden lang in einem belichteten Gehäuse, dessen Atmosphäre mittels einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung mit

CO_2 und H_2O gesättigt war, inkubiert. Danach wurden die infizierten Blätter kurz oberhalb der Blattachse abgetrennt und in eine Haltevorrichtung (siehe Abbildung 45) eingespannt. Die Schnittstellen wurden sofort mit 100 mL 5 mM EDTA-Lösung gewaschen, um mögliche Verunreinigungen durch die verletzen, umliegenden Zellen wegzuspülen. Außerdem sollte so die Wundpropfbildung durch Komplexierung der dafür notwendigen Calciumionen verhindert werden.

Abbildung 45. Abgebildet ist die eigens im Arbeitskreis von Prof. Hedrich entwickelte Haltevorrichtung für die infizierten *Arabidopsis-thaliana*-Blätter zur Phloemsaftgewinnung.[133,143]

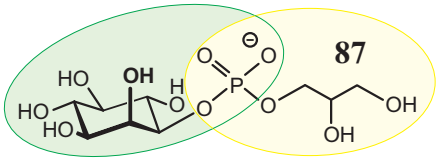
Nach einer weiteren Inkubationszeit von eineinhalb Stunden im belichteten Gehäuse mit gesättigter (CO_2 und H_2O) Atmosphäre wurde der in die EDTA-Lösung ausgeblutete Phloemsaft gesammelt, bei -42°C tiefgefroren und bis zur weiteren Analyse gelagert.[143]

7.3.2 Vermessung der gewonnenen Phloem-Exsudate verschiedenartig infizierter *Arabidopsis*-Pflanzen

Zunächst wurden die gewonnenen Phloem-Exsudate gänzlich unbehandelter, d.h. nicht infiltrierter *Arabidopsis*-Pflanzen mittels der eigens entwickelten CE-ESI-oTOF-MS-Methode vermessen. Dabei konnte lediglich Methoxyglucobrassicin (**73**, *m/z* 477) und ein unbekannter Peak mit einer Masse von *m/z* 333, dessen Isotopenmuster keinen Schwefel aufwies, im Phloemsaft nachgewiesen werden. Chen et al.[144] beschrieben in ihrer Untersuchung von Phloemsäften von *A. thaliana* neben Methoxyglucobrassicin (**73**) auch noch Glucobrassicin (**2**), Hydroxyglucobrassicin (**74**), Glucoiberin (**46**), Glucoraphanin (**47**), Glucoalyssin (**48**) und Glucohirsutin (**51**), also fast alle Hauptmetabolite der Gesamtblattextrakte (Strukturen siehe Abbildung 34 und Tabelle 6). Da bei den verschiedenen Pflanzenextrakten die Literaturangaben[115,116,118] mit Hilfe der neu entwickelten CE-MS-Methode sehr gut

reproduziert wurden, überraschte dieser Unterschied zunächst. Sehr wahrscheinlich ist er aber durch die Optimierung der Methode der Phloemexsudat-Gewinnung zurückzuführen. Im Arbeitskreis von Prof. Hedrich wurden mit diesen Phloem-Exsudaten Experimente zur RNA-Zusammensetzung im Phloem durchgeführt. Da dabei auch sehr kleine Kontaminationen einen großen Messfehler verursachen würden, verbesserte man dort die Phloemexsudat-Gewinnung im Hinblick auf die Vermeidung von zellulären Verunreinigungen des Nachbargewebes deutlich.[133] Bei Chen et al. wurde nicht auf eine solche Vermeidung von Kontaminationen geachtet, was sehr wahrscheinlich zu dem Unterschied im Metabolitmuster führte. Diese Annahme ließ sich durch ein exaktes Nachvollziehen der Literaturmethode zur Phloemsaft-Gewinnung[144] bestätigen.

Durch das entwickelte, besonders Verunreinigungs-arme Verfahren der Phloemsaftgewinnung und der neuartigen Kupplung von CE und oTOF-MS gelang es, ein bisher noch nie im Phloem beschriebenes Phosphat (*m/z* 333) – das 1-Glycero-1-*myo*-inositolphosphat (**87**) – aufzuklären. Die Identifizierung dieser bereits aus anderen Organismen bekannten Substanz[145] gelang durch die genaue Analyse des Fragmentierungsmusters. Dabei war es mit den verwendeten Geräten sogar möglich exakte Massen der einzelnen Fragmente zu bestimmen und so auch deren Summenformel zu bestimmen. Vor allem Fragment 1 (gelb; siehe Abbildung 46) und Fragment 2 (grün; siehe Abbildung 46) enthielten dabei die maßgebliche Information in welcher Abfolge die einzelnen Substrukturen im Molekül angeordnet sind. In anderweitig gewonnenen Phloemexsudaten[144] wurde der Phosphat-Peak vollständig vom Glucoraphanin- Peak (**47**; *m/z* 436) verdeckt.



$C_9H_{18}O_{11}P^-$ *m/z* 333.0705

Fragment 1: $C_6H_{10}O_8P^-$ *m/z* 241.0125

Fragment 2: $C_3H_8O_6P^-$ *m/z* 171.0082

Fragment 3 = Fragment 2 - H_2O:

$C_3H_6O_5P^-$ *m/z* 152.9973

Abbildung 46. Die mittels MS/MS-Untersuchungen, exakter Masse und Isotopenmustervergleichs aufgeklärte Struktur des 1-Glycero-1-*myo*-inositolphosphats (**87**).[145,146]

1-Glycero-1-*myo*-inositolphosphat (**87**) ist ein Abbauprodukt des ebenfalls für die Pathogenabwehr von Pflanzen sehr wichtigen Phospholipid-Signalweges.[147-150] Ob und wenn

welche Bedeutung es für die Pflanze besitzt und warum es im Phloem transportiert wird, ist noch nicht geklärt.

Als nächstes wurden die Phloemexsudate der mit $MgCl_2$-Lösung infiltrierten *Arabidopsis*-Pflanzen vermessen. In diesen Exsudaten konnte neben Glucobrassicin (**2**) und Hydroxyglucobrassicin (**74**), Glucoiberin (**46**), Glucoraphanin (**47**), Glucoalyssin (**48**), Glucoibarin (**50**), Glucohirsutin (**51**) und Glucoerysolin (**52**) identifiziert werden. Dieses Metabolitspektrum entspricht bis auf das Fehlen von Glucoerucin (**55**) den Hauptmetaboliten von *Arabidopsis-thaliana*-Blattextrakten.

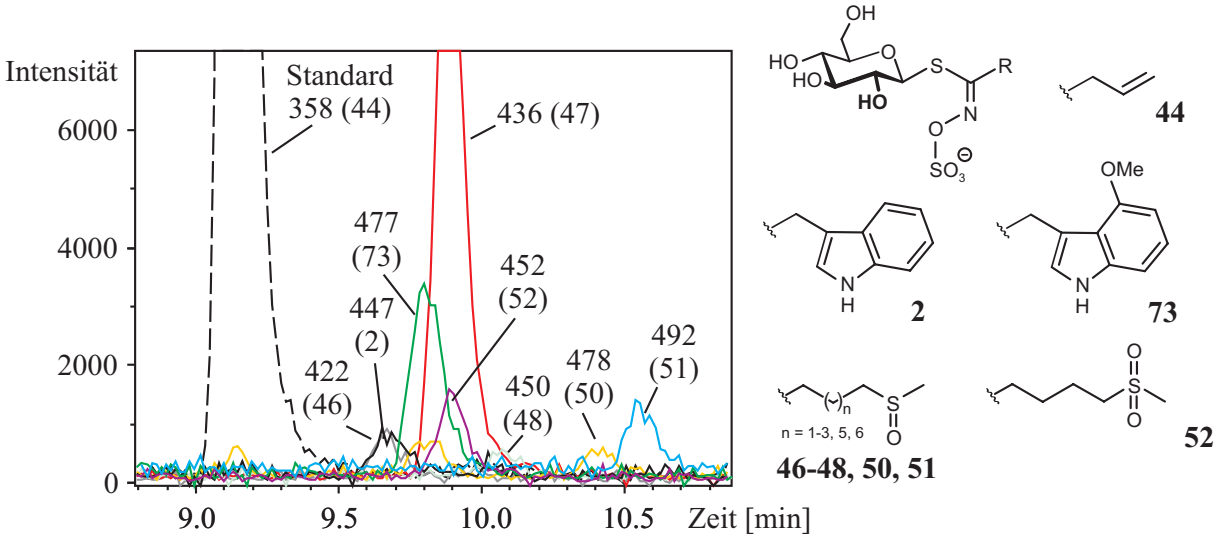


Abbildung 47. Elektropherogramm von Phloemexsudaten, die aus mit $MgCl_2$-Lösung infiltrierten Blättern gewonnen wurden. Auf der rechten Seite sind die Seitenkettenstrukturen der gefundenen Metabolite abgebildet (Glucosinolat-Grundstruktur; siehe Abbildung 34).

Diese deutliche Änderung zwischen dem Metabolitspektrum im Phloemsaft unbehandelter und mit $MgCl_2$-Lösung infiltrierter Blätter zeigt, dass bereits die leichte mechanische Reizung durch den Prozess der Infiltration einen starken Effekt auf die Phloemsaft-Zusammensetzung hat.[146]

Im Anschluss wurden die Exsudate der mit den verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen (virulent/avirulent) infiltrierten Pflanzen analysiert. Dabei wurde im Vorfeld erwartet, dass die Reaktion der Pflanzen auf die Infiltration mit avirulenten Bakterien stärker ausfällt als die auf virulente Bakterien. Durch eine unterschiedliche Oberflächenantigen-Struktur können

avirulente, im Gegensatz zu virulenten, Bakterien von den Pflanzen sofort als Eindringlinge erkannt werden und lösen über einen Calcium- und Sauerstoffradikal-Anstieg eine hypersensitive Immunantwort aus. Diese gipfelt in einer Apoptose-Induktion der befallenen Zellen, welche die Ausbreitung der Infektion unterbindet. D.h. die Metabolit-Zusammensetzung sollte im Phloemsaft von Pflanzen, die mit virulentem *Pseudomonas*-Stamm infiltriert wurden, dem Muster des Phloemsaftes von Pflanzen, die mit $MgCl_2$-Lösung infiltriert wurden, ähneln. Bei Pflanzen die mit avirulentem *Pseudomonas*-Stamm infiltriert wurden, erwartete man eine Änderung in der Phloemsaft-Zusammensetztung.[139]

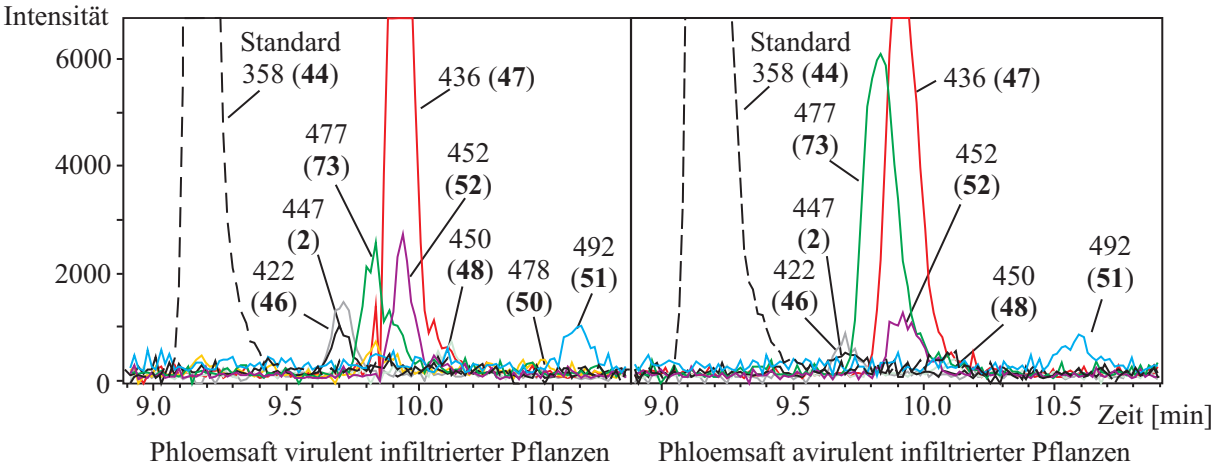


Abbildung 48. Elektropherogramme der Metabolitspektren in Phloem-Exsudaten von *Arabidopsis*-Pflanzen, die mit einem virulenten und einem avirulenten *Pseudomonas*-Stamm infiziert wurden.[146]

Die in Abbildung 48 dargestellten Elektropherogramme zeigen, dass es in der Zusammensetzung der Metabolite im Phloemsaft nach Infizierung mit den verschiedenen Stämmen (virulent/avirulent) und nach einer Inkubationszeit von eineinhalb Stunden keinen signifikanten Unterschied gibt. Das Glucosinolat-Spektrum entspricht hierbei genau dem Spektrum, welches auch durch die Infiltration mit $MgCl_2$ in Blättern hervorgerufen wurde. Einzig ein leichter Konzentrationsanstieg an Methoxyglucobrassicin (**73**) nach Infiltration mit avirulenten Bakterien konnte im Phloemsaft festgestellt werden (siehe Abbildung 48). Dieser Befund passte durchaus zu den für Gesamtblattextrakte von *Arabidopsis thaliana* nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in der Literatur beschriebenen Metabolitänderungen.[75,139,141,142]

Das in *A. thaliana* erstmals entdeckte 1-Glycero-1-*myo*-inositolphosphat (**87**) wurde ebenfalls in den Phloemexsudaten der verschiedenartig infiltrierten *A.-thaliana*-Pflanzen gefunden. Einen Konzentrationsunterschied beobachtete man dabei aber nicht.[146]

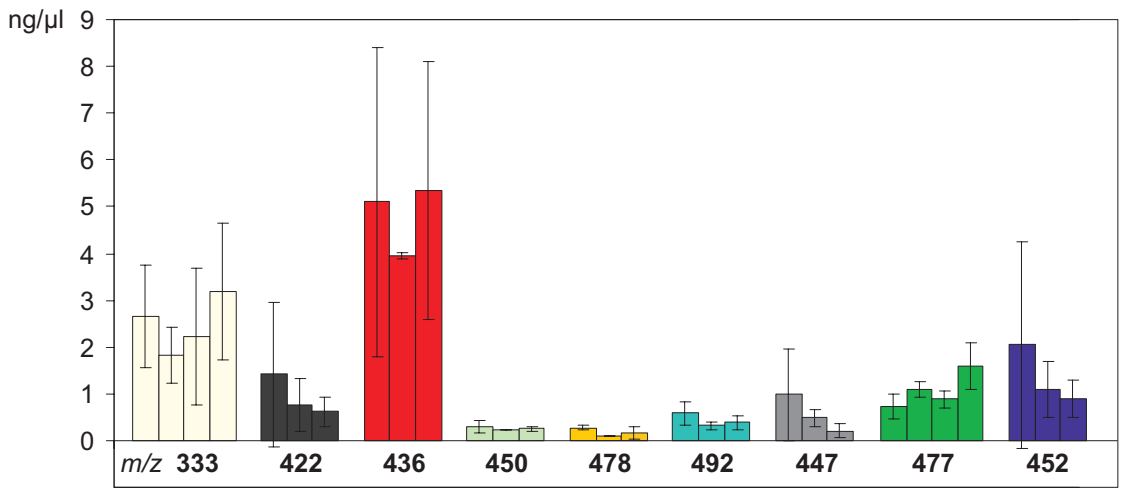


Abbildung 49. Konzentration der identifizierten Glucosinolate in den verschiedenen Phloemexsudaten.[146]

Dieser leichte Konzentrationsanstieg von **73** könnte aber auch ein Artefakt sein, entstanden durch die Auswirkung der mechanischen Reizung während des Infiltrationsvorganges. Umgekehrt könnten andere kleine Unterschiede im Metabolitspektrum der Phloemsäfte durch die starke Reaktion der Pflanzen auf die Infiltration überlagert sein. Daher sollen diese Experimente nach der Entwicklung eines anderen Infektionsverfahrens (z.B. Aufsprühen oder Aufstreichen) noch einmal wiederholt werden.

8 Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus den Bakterienstämmen KC 1030 und AK 671

Sämtliche in diesem Kapitel beschriebenen Strukturaufklärungen wurden in Zusammenarbeit mit Dipl.-Chem. T. A. M. Gulder durchgeführt. Die schon vollständig aufgereinigten Bakterienisolate und die z.T. vorfraktionierten Bakterienextrakte wurden von Prof. Dr. H.-P. Fiedler (Tübingen) zur Verfügung gestellt.[151]

8.1 KC 1030 D (88) und KC 1030 G (89), zwei polyketidische Sekundärmetabolite aus einem antarktischen Streptomyceten-Stamm

Aus dem antarktischen Streptomyceten-Stamm KC 1030 wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Fiedler (Tübingen) zwei interessante polyketidische Sekundärmetabolite, KC 1030 D (**88**) und KC 1030 G (**89**, siehe Abbildung 50) isoliert und im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt. In früheren Arbeiten wurden aus diesem Stamm bereits diverse bekannte Verbindungen (Fridamycin E, Urdamycin A und B und Dehydrorabelomycin) und ein neuartig verbrücktes Angucyclin (AK 1030 B) isoliert.[70]

Mittels der Anzahl der Signale im ^{13}C-NMR-Spektrum und der Auswertung der exakten Masse wurde für KC 1030 D (**88**)$C_{27}H_{31}NO_8$ und für KC 1030 G (**89**)$C_{27}H_{29}NO_6$ als Summenformel bestimmt. Die ^{1}H-NMR-Spektren wiesen ebenfalls bereits darauf hin, dass es sich um sehr ähnliche Strukturen handelte. Auspaltungsmuster und Verschiebung der Protonensignale deuteten bei **88** daraufhin, dass es sich um ein aromatisches System mit einem Zuckerrest und einer linearen Seitenkette handelte. Die Auswertung der verschiedenen 2-D-NMR-Spekten (COSY, HMBC, HMQC, ROESY) bestätigte diese ersten, aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum gewonnenen Erkenntnisse. Bei dem Grundkörper von **88** handelte es sich um 1,5-Dihydroxyanthrachinon, bei dem an C-2 ein 3-Hydroxy-3-methylbuttersäurerest lokalisiert ist und an C-6 ein Aminozucker hing (siehe Abbildung 50). Das Anthrachinongrundgesrüst zusammen mit dem Buttersäurerest an C-2 entspricht dem Litertur-bekannten Fridamycin E (**90**)[152], welches allerdings keinen Zuckerrest an C-6 besitzt. Bei der Substanz KC 1030 D (**88**) handelt es sich also um ein unbekanntes Fridamycin E Derivat. **88** hat dabei eine große Ähnlichkeit mit dem bereits bekannten Fridamycin A (**91**)[153] – ebenfalls ein Fridamycin E-Derivat, welches lediglich an C-6 einen anderen

Zuckerrest (Fridamycin A = Zucker mit 4',5'-*trans*-Glykol-Struktur; KC 1030 D = der Aminodeoxyzucker Ossamin) bestitzt als KC 1030 D (**88**, siehe Abbildung 50).

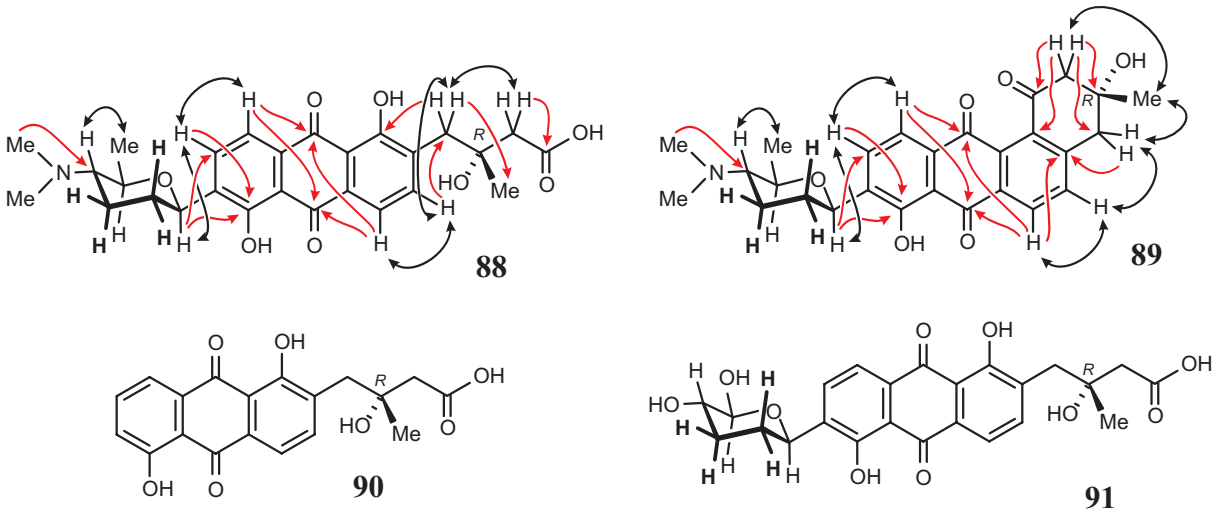


Abbildung 50. Strukturen der Literatur-bekannten Substanzen Fridamycin E (**90**) und Fridamycin A (**91**) zusammen mit den aus dem Streptomyceten-Stamm KC 1030 isolierten Substanzen KC 1030 D (**88**) und Frigocyclinon (**89**, schwarze Doppelpfeile entsprechen den wichtigen NOESY-Korrelationen und die roten Einfach-Pfeile den relevanten HMBC-Wechselwirkungen).[154]

Bei der zweiten isolierten Substanz (**89**) wiesen die HMBC- und NOESY-Korrelationen darauf hin, dass es sich im Gegensatz zu **88** um eine tetracyclische Verbindung handelte (siehe Abbildung 50). Vor allem die NOESY-Wechselwirkung zwischen H-4 und H-5 und die HMBC-Korrelationen zwischen H-2 und C-12b und H-5 und C-1 bewiesen, dass das bereits von Substanz **88** bekannte Anthrachinon-Grundgerüst um einen nicht-aromatischen Ring erweitert war und KC 1030 G (**89**) somit zur Klasse der Angucyclinone gehörte. Ein Vergleich der Verschiebungen, der Aufspaltungsmuster und der 2-D-Korrelationen der Zuckerrest-Signale ergaben, dass der Zucker von **89** identisch war mit dem bereits von Substanz **88** bekannten Aminozucker Ossamin (siehe Abbildung 50). Durch einen Abgleich mit Literaturangaben konnte die Verbindung **89** als das bereits bekannte, antibiotisch wirksame Frigocyclinon (**89**) identifiziert werden.[154]

Beide aus dem antarktischen Streptomyceten-Stamm isolierten Substanzen gehören zur Klasse der Polyketide, was nicht weiter verwunderlich ist, da der überwiegende Anteil der Sekundärmetabolite aus *Streptomyces*-Arten polyketidischer oder cyclopeptidischer Natur sind.[155] Viele dieser Sekundärmetabolite besitzten antibiotische oder antitumorale Eigenschaften - als berühmte Vertreter dieser beiden Strukturklassen aus Streptomyceten sind

z.B. das Polyketid Tetracyclin[155] und das Cyclopeptid Vancomycin[156] zu nennen. Beide Substanzen werden schon seit einigen Jahren erfolgreich als Antibiotika in der Humanmedizin eingesetzt. Trotz der Tatsache, dass gut wirksame Antibiotika auf dem Markt sind, ist die Suche nach neuen antibiotisch wirksamen Substanzen notwendig, da sich immer schneller multiresistente Erregerstämme ausbreiten, gegen die keines der bekannten Medikamente mehr hilft.

8.2 Die strukturelle Diversität des Actinomyceten-Stamms AK 671

Der Actinomyceten-Stamm AK 671 wurde im Vorfeld aus Bodenproben eines Kiefernwaldes in Großbritannien von der Arbeitsgruppe von Prof. M. Goodfellow isoliert. Es handelt sich dabei um einen gut manipulierbaren OSMAC-Stamm (OSMAC = one strain many compounds[157]), der je nach eingestellten Fermentationsparametern eine große Bandbreite an verschiedenen aromatischen Polyketiden produziert.

Bisher wurden bei einer früheren Untersuchung in unserem Arbeitskreis vier interessante Metabolite aufgeklärt. Dabei handelte es sich um das Diketon **92**, das schon länger als Biosynthese-Intermediat postuliert worden war,[158-160] und dessen Glucuronid **93**. Des weiteren wurden noch der bereits bekannte[161] Naturstoff 3,8-Dihydroxy-1-methylanthrachinon-2-carbonsäure (DMAC, **94**) und der neue Sekundärmetabolit 2-Methyl-4-oxo-4-H-chromen-5-yl-essigsäure (**95**) isoliert (siehe Abbildung 51).[162]

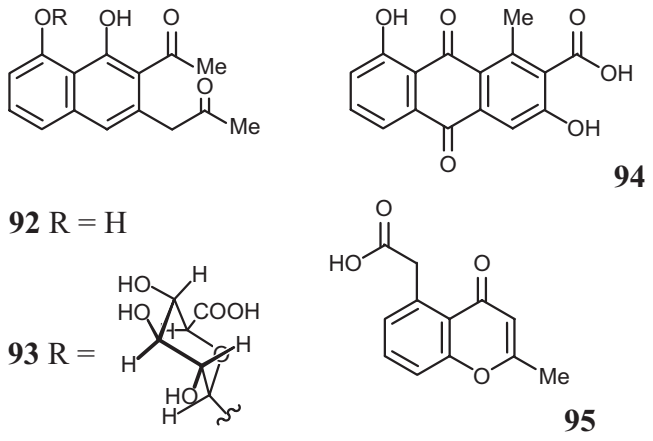


Abbildung 51. Bereits in einer früheren Arbeit aufgeklärte Inhaltsstoffe des Stammes AK 671.[163]

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es in Zusammenarbeit mit Dipl. Chem. T. A. M. Gulder, die Strukturen einer Reihe weiterer interessanter polyketidischer Metabolite des AK 671 aufzuklären. Darunter waren die bereits bekannten Metabolite Juglomycin F (**96**),[164] Bhimamycin A (**99**) und Bhimamycin B (**100**).[165] Darüber hinaus wurden noch die beiden bisher unbekannten 8-*O*-β-D-Glucuronide von Prächrysophanol (**97**) und von Chrysophanol (**98**) aufgeklärt. Die Absolutkonfigurationen der Substanzen wurden von Dipl.-Chem. T. A. M. Gulder in Zusammenarbeit mit Dr. T. Bruhn aufgeklärt.

Durch eine hochauflösende Massenanalyse wurde die Summenformel von Substanz **96** (Arbeitsname AK-671-P) zu $C_{13}H_{10}O_5$ bestimmt. Die chemische Verschiebung und die Multiplizität der ^{1}H-NMR-Signale wiesen daraufhin, dass es sich um ein aromatisches System mit einer Methylen- und einer Methylgruppe handelte. Die Auswertung der ^{13}C-NMR-Spektren ergab ausserdem, dass diese Verbingung drei Ketogruppen enthielt. Durch Analyse der HMBC-Korrelationen wurde ein bizyclisches Antrachinon-Grundgerüst identifiziert, welches in drei und in fünf Position eine Hydroxylgruppe und an Position zwei eine Methylengruppe, die mit einem Acetylrest verbunden war, als Substituenten trug (siehe Abbildung 52). Durch Literaturrecherche konnte Verbindung **96** eindeutig als Juglomycin F bestimmt werden.[164]

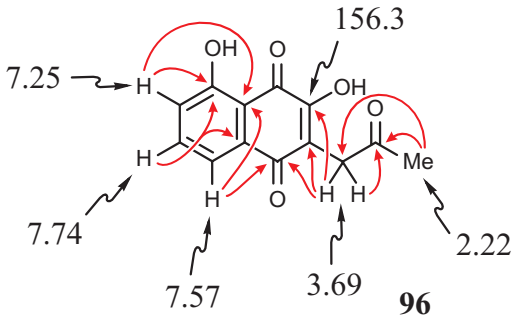


Abbildung 52. Wichtig chemische Verschiebungen und HMBC-Wechselwirkungen (rote Pfeile), die zur Aufklärung der Struktur von Juglomycin F (**96**) beigetragen haben.

Analog zum bereits oben beschriebenen Prozedere wurde die Summenformel von Verbindung **97** (Arbeitsname AK-671-O) mittels HRESI-MS zu $C_{21}H_{21}O_{10}$ ermittelt. Das ^{1}H-NMR-Spektrum gab erste Hinweise darauf, dass erneut ein aromatisches System vorlag. Ausserdem waren die Signale eines β-verknüpften Zuckerrestes, einer aliphatischen Methylgruppe und zweier aliphatischer diastereotoper Methyleneinheiten vorhanden. Im

^{13}C-Spektrum konnten darüber hinaus noch eine Ketogruppe, eine Säurefunktion und mehrere Heteroatom-substituierte Kohlenstoffe identifiziert werden. Durch Auswertung der COSY-, NOESY- und HMBC-Wechselwirkungen konnte die Konstitution von **97** aufgeklärt werden (siehe Abbildung 53). Es handelt sich dabei um einen neuen Naturstoff mit dem Namen Prächrysophanol-8-*O*-Glucuronsäure (**97**).

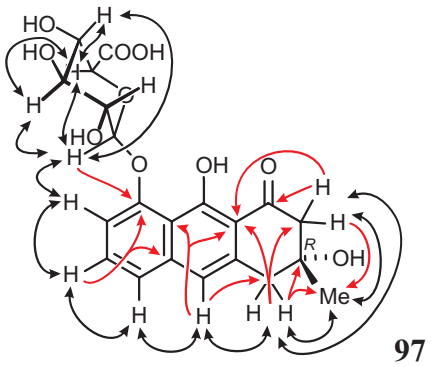


Abbildung 53. HMBC-Wechselwirkungen (rote Pfeile) und NOESY-Korrelationen (schwarze Doppelpfeile), die zur Aufklärung der Struktur von Prächrysophanol-8-*O*-Glucuronsäure (**97**) beigetragen haben.

Bei Verbindung **98** (Arbeitsname AK-671-T) wurde erneut zunächst die Summenformel ($C_{21}H_{16}O_{10}Na$) mittels HRESI-MS ermittelt. Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren ließen die Identifizierung eines tricyclischen Anthrachinongrundgerüstes zu. Ausserdem konnte wieder eine β-verknüpfte Zuckereinheit beobachtet werden. Da das ^{13}C-Spektrum eine Säurefunktion aufwies und die Verschiebungen des Zuckerrestes fast identisch mit denen von Verbindung **97** waren, lag die Vermutung nahe, dass es sich ebenfalls um eine *O*-glycosidisch gebundene Glucuronsäure-Einheit handelte. Darüber hinaus zeigte sich noch das Signal einer aromatischen Methylgruppe in den NMR-Spektren. Unter Zurhilfenahme der COSY-, NOESY- und HMBC-Wechselwirkungen konnte Verbindung **98** als Chrysophanol identifiziert werden, dass an Position acht eine *O*-glycosidisch gebundene Glucuronsäure trug (siehe Abbildung 54). Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen bisher nicht in der Literatur beschriebenen Naturstoff.

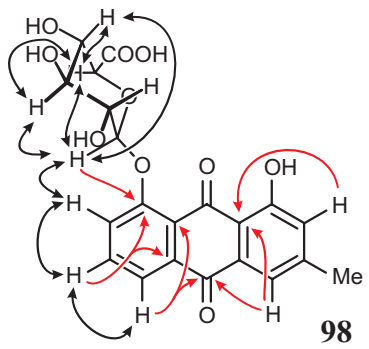


Abbildung 54. Wichtig chemische Verschiebungen und HMBC-Wechselwirkungen (rote Pfeile), die zur Aufklärung der Struktur von Chrysophanol-8-*O*-Glucuronsäure (**98**)beigetragen haben.

Außer den Metaboliten **96** - **98** wurden noch zwei weitere Substanzen (**99**; Arbeitsname AK-671-I und **100**; AK-671-B) aus dem Streptomyceten-Stamm AK 671 isoliert. Durch HRESI-MS-Analysen konnten ihre Summenformeln zu $C_{15}H_{13}O_5$ und $C_{15}H_{11}O_5$ bestimmet werden. Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren dieser beiden Verbindungen legten schon früh den Schluß nah, dass es sich um sehr ähnliche Strukturen handelte. Beide wiesen ein aromatisches Grundgerüst mit Ketofunktionen und drei Resten auf. Substanz **99** wie auch Substanz **100** trugen je eine Hydroxyl- und eine Methylgruppe. Unterschiede gab es nur bei dem dritten Rest. Dieser bestand bei **100** aus einer Acetyleinheit während **99** die dazu analoge reduzierten Alkoholgruppe trug. Die Verknüpfung und Lokalisierung der einzelnen Strukturelemente wurde durch Auswertung der HMBC- und COSY-Korrelationen durchgeführt (siehe Abbildung 55). Durch Vergleich mit den Literaturangaben konnte Verbindung **99** zweifelsfrei als Bhimamycin A und Verbindung **100** als Bhimamycin B identifiziert werden.

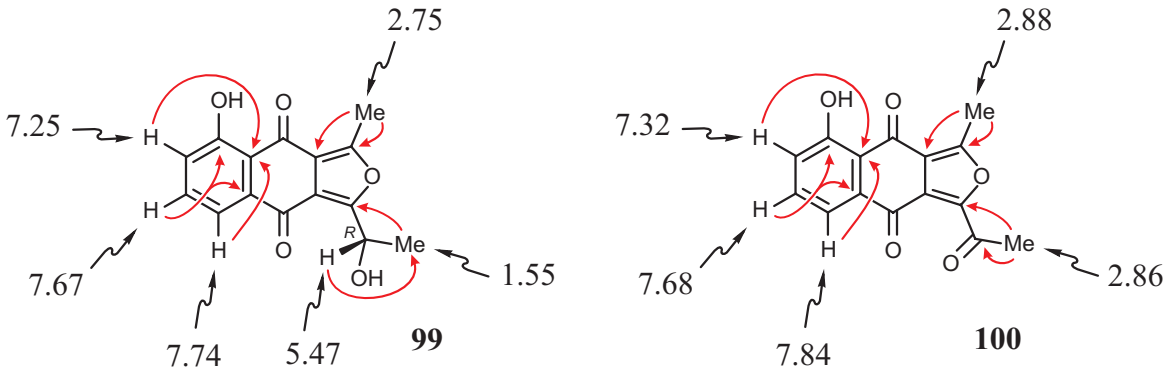


Abbildung 54. HMBC-Wechselwirkungen (rote Pfeile) und wichtige chemische Verschiebungen der Substanzen Bhimamycin A (**99**) und Bhimamycin B (**100**). Die Absolutkonfiguration des Stereozentrums von **99** wurde von Dipl.-Chem. T.A.M. Gulder und Dr. T. Bruhn durchgeführt.[166]

Alle aus AK 671 isolierten Substanzen sind polyketidischer Natur und zeigen eine enge biosynthetische Verwandschaft. Theoretisch wäre für alle die Biosynthese aus einer bicyclischen Vorstufe – dem Harris-Franck-Keton (**92**) – denkbar.

Wie schon für die Substanzen aus dem Stamm KC 1030 erwähnt, zeigen viele Polyketide antibiotische Wirkungen. Dies galt für die aus AK 671 isolierten Substanzen aber leider nicht. Nichtsdestotrotz ist dieser Stamm äußerst interessant für weitere Untersuchungen. Neben biosynthetischen Studien zur Produktion des Chrysophanols[167], bei dem es sich um einen Inhaltsstoff, der auch in Pflanzen vorkommt handelt, ist auch die interessante Strukturvielfalt ausgelöst durch unterschiedliche Kultivierungsbedinungen bemerkens- und untersuchenswert.[157]

9 Zusammenfassung

Eine Vielzahl an erfolgreichen Arzneimitteln sind von Naturstoffen abgeleitete Substanzen oder Naturstoffe, die z.T. schon seit Jahrtausenden zur Heilung von Krankheiten genutzt werden.[6,26] Eine sehr ergiebige Unterklasse stellen dabei die Alkaloide dar,[1] denen auch die stukturell, biosynthetisch und pharmakologisch interessanten Naphthylisochinoline-Alkaloide aus den beiden phylogenetisch verwandten paläotropischen Lianenfamilien der Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae angehören.[11,12]

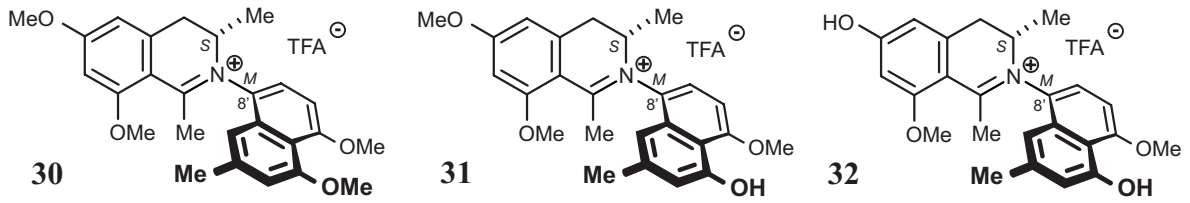
In der vorliegenden Arbeit wurden Pflanzen von zwei bekannten und einer botanisch noch nicht vollständig charakterisierten *Ancistrocladus*-Art phytochemisch genauer untersucht. Dabei wurden insgesamt fünf neue (drei davon gehören zum neuartigen *N*,*C*-Kupplungstyp)[16] und fünf bekannte Naphthylisochinoline identifiziert. Insbesondere die neuen *N*,*C*-verknüpften Alkaloide zeichnen sich durch exzellente antiinfektive Wirksamkeiten aus. Ein weiteres Projekt im Rahmen dieser Arbeit beschäftigte sich mit Studien zur Rolle des Phloems bei der Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, wobei auch die Identifizierung neuer Glucosinolate und eines Phosphates gelang. Außerdem wurden noch die Strukturen einiger interessanter Bakterienmetabolite aus den Stämmen KC 1030 und AK 671 erfolgreich aufgeklärt.

Im Rahmen dieser Disseration wurden im Einzelnen folgende Ergebnisse erzielt:

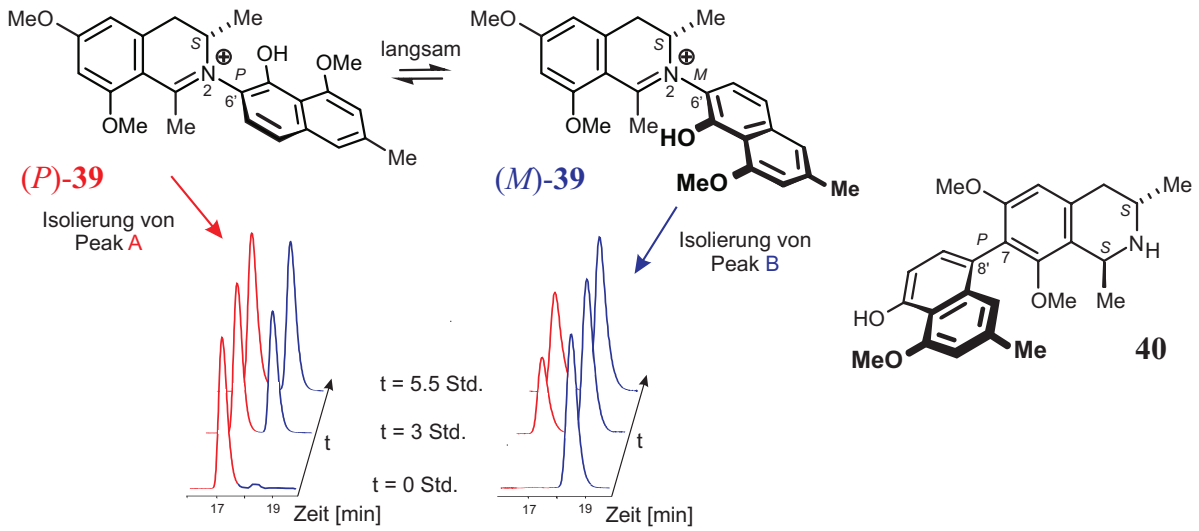
A. Isolierung und Strukturaufklärung von Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus verschiedenen *Ancistrocladus*-Spezies:

- Die bisher noch nicht phytochemisch untersuchten Rindenextrakte der vietnamesischen Unterart *Ancistrocladus tectorius ssp. cochinchinensis* wurden im Hinblick auf ihre Sekundärmetabolite analysiert. Dabei identifizierte man mittels verschiedener gekoppelter online-Methoden wie HPLC-UV, -oTOF-MS, -NMR und -CD vier bereits bekannte und drei neuartige Naphthylisochinoline-Alkaloide. Die Strukturen dieser drei Metabolite wurden nach Isolierung unter Verwendung diverser 2D-NMR-Techniken aufgeklärt. Die entdeckten Substanzen – Ancistrocladinium A (**30**) und seine beiden *O*-Demethylderivate **31** und **32** – waren die drei ersten Vertreter des neuartigen *N*,8'-Naphthyldihydroisochinolin-

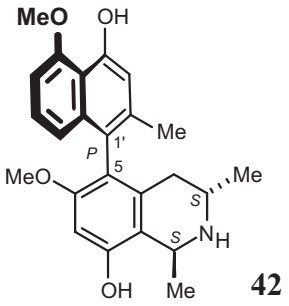
Kupplungstyps. Diese Naturstoffe verfügen über vielversprechende pharmakologische Wirkungen – vor allem gegen den Erreger der Leishmaniose.



- Die botanisch noch nicht vollständig charakterisierte Lianenart *"A. ikela"*, die aus der Demokratischen Republik Kongo stammt, wurde im Laufe der Arbeit morphologisch und phytochemisch untersucht und beschrieben. Zur definitiven Klärung, ob es sich dabei um eine neue Pflanzenart handelt, laufen derzeit noch ITS-Sequenzanalysen im Arbeitskreis von Prof. G. Heubl (München). Neben den beiden *N*,*C*-verknüpften Naphthylisochinolinen Ancistrocladinium A (**30**) und Ancistrocladinium B [(*M*/*P*)-**39**] wurde bei der phytochemischen Analyse ein neuartiges *C*,*C*-gekuppeltes Alkaloid – 8-*O*-Methylancistrogriffin C (**40**) – isoliert. Des weiteren wurde ein Gradient entwickelt, der die vollständige Trennung der beiden Atrop-Diastereomere von **39** und dadurch HPLC-NMR- und HPLC-CD-Analysen der einzelen Epimere ermöglichte. Mit Hilfe dieses Gradienten wurde eine kleine Menge der beiden Epimere von **39** isoliert. Diese reinen Fraktionen wurden dazu genutzt, die Rotationsbarriere der bei Raumtemperatur langsam drehenden Biarylachse durch HPLC-UV-Untersuchungen zu bestimmen [(*P*)-**39** von $\Delta G^{\neq}_1$ = 105.8 kJ/mol und für (*M*)-**39** von $\Delta G^{\neq}_2$ = 105.7 kJ/mol].



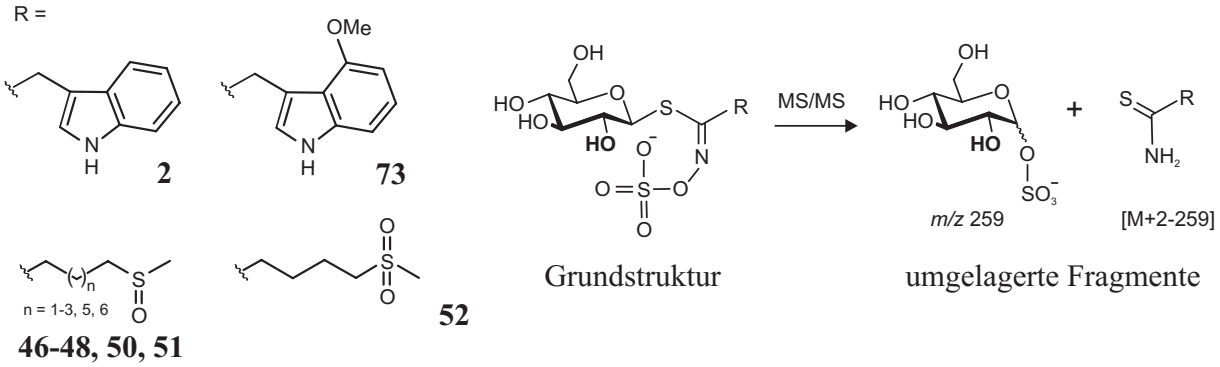
- Aus Blättern der bereits gut untersuchten indischen *Ancistrocladus*-Art *A. heyneanus* wurde mit 6-*O*-Methyl-8,4'-*O*-didemethylancistrocladin (**42**) ein weiteres neues Naphthylisochinolin-Alkaloid isoliert.



- Eine phytochemische Untersuchung der Familie der Ancistrocladaceae auf das Vorkommen von *N,C*-verküpften Naphtylisochinolinen ergab, dass diese strukturell außergewöhnlichen Alkaloide in diesen Lianen weit verbreitet sind. Nur in der asiatischen Art *Ancistrocladus hamatus*, den ostafrikanischen Vertretern *A. robertsoniorum* und *A. tanzaniensis* und den westafrikanischen Spezies *A. abbreviatus*, *A. korupensis* und *A. likoko* kamen diese neuartigen Sekundärmetabolite in allen bisher bekannten und phytochemisch untersuchten Arten dieser Familie vor. Darüber hinaus konnten sie auch in einigen noch nicht vollständig botanisch charakterisierten Arten des Kongobeckens identifiziert werden.

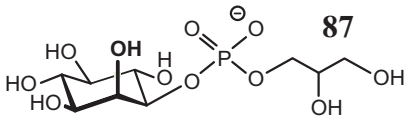
B: Die Rolle des Phloems bei der Pathogen-vermittelten Ausbreitung von Signalen:

- Im Rahmen des Teilprojektes B8 des *SFBs 567* wurden Untersuchungen zur Rolle des Phloems bei der Weiterleitung von Langstreckensignalen nach Infektion von *Arabidopsis-thaliana*-Pflanzen mit virulenten oder avirulenten Stämmen von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* durchgeführt. Zunächst wurde dazu eine im nL-Maßstab anwendbare Analysenmethode für die Hauptmetabolite von *A. thaliana* – die Glucosinolate – entwickelt. Dafür koppelte man erfolgreich ein Kapillarelektrophorese-Gerät mit einem Time-of-Flight-Massendetektor und konnte so die Glucosinolate ohne aufwendige Aufarbeitung direkt aus dem Pflanzenextrakt oder den Phloemexsudaten vermessen. Mit Hilfe dieser empfindlichen Methode wurden in Pflanzenextrakten von *A. thaliana* viele bekannte und einige neue Glucosinolate (8-Methylsulfonyl-*n*-octyl-, 2-Hydroxy-4-methylsulfinyl-*n*-butyl-, 2-Hydroxy-4-methylsulfonyl-*n*-butyl- und 4-Hydroxy-benzoyloxymethylglucosinolat) identifiziert. Des weiteren wurden MS/MS-Analysen der Glucosinolate durchgeführt, bei denen neben mehreren typischen Fragmenten für die Thiozucker-Einheit auch einige charakteristische Fragmente für die unterschiedlichen Seitenketten (z.B. Methylsulfinyl-*n*-alkyl- oder Methylthio-*n*-alkyl-Struktur) detektiert wurden. Leider ergaben vor allem die aromatischen und heteroaromatischen Seitenketten-Typen kein typisches Fragmentierungs-muster.



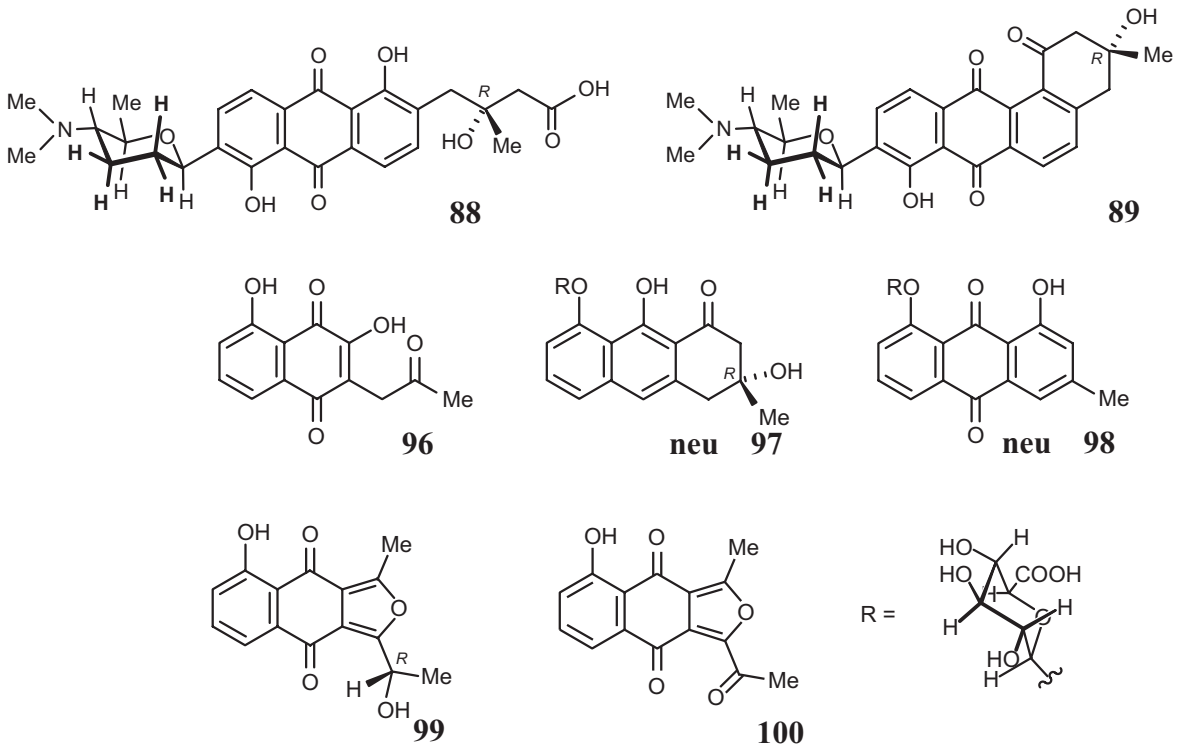
- Bei der Analyse der Phloemexsudate konnte in Phloemsäften von unbehandelten Pflanzen neben Methoxyglucobrassicin (**73**) ein für Pflanzen neuartiges Phosphat **87** (1-Glycero-1-*myo*-inositolphosphat) identifiziert werden. In den Phloemsäften der unterschiedlich behandelten Pflanzen (infiltriert mit $MgCl_2$, einem virulentem oder einem avirulentem *Pseudomonas*-Stamm) kamen sämtliche Hauptmetabolite der Blätter vor. Lediglich ein leichter, nicht signifikanter Konzentrationsanstieg

von Methoxyglucobrassicin (**73**) wurde im Phloemsaft von mit avirulenten Pathogenen infizierten Pflanzen festgestellt. Dieser Anstieg muss aber kritisch betrachtet werden, da er auch ein Artefakt des starken mechanischen Reizes des Infiltrationsprozesses sein könnte. Andere kleine Konzentrationsänderungen könnten außerdem durch das starke "Grundrauschen" der Infiltration überlagert werden.



C: Strukturaufklärung polyketidischer Sekundärmetabolite aus Mikroorganismen:

- Zwei niedermolekulare Naturstoffe aus dem extremophilen Streptomyceten-Stamm KC 1030, die in der Arbeitsgruppe von Prof. H.-P. Fiedler (Universität Tübingen) isoliert worden waren, wurden strukturell aufgeklärt. Bei dem einen handelt es sich um das bereits bekannte Frigocyclinon (**89**), bei dem anderen um ein neues Angucyclinon **88** mit Fridamycin-E-Grundkörper. Darüber hinaus wurden aus einem weiteren Streptomyces-Stamm (AK 671) zwei neue (**97**, **98**) und drei (**96**, **99**, **100**) bekannte biosynthetisch interessante Sekundärmetabolite mit folgender Struktur gefunden:



Durch die Nutzung verschiedener analytischer Methoden konnten im Rahmen dieser Arbeit die Strukturen einer Reihe pflanzlicher und bakterieller Sekundärmetabolite aufgeklärt werden. Hervorzuheben sind hierbei vor allem die neuen Vertreter der *N*,*C*-gekuppelten Naphthylisochinolin-Alkaloide. Die Verwendung der neuartigen Kopplung von HPLC oder CE an einen orthogonalen TOF-MS-Detektor erwies sich bei der Analyse komplexer Metabolitmuster als besonders hilfreiche Erweiterung der bereits bestehenden analytischen "Triade" HPLC-MS/MS-NMR-CD.

10 Summary

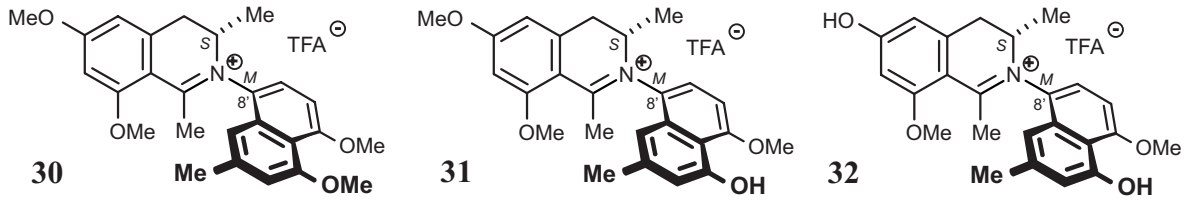
A broad variety of successful drugs are derived from natural products or are natural products themselves. Some of these natural products have already been used for thousands of years for the treatment of diseases.[6,26] A very potent subclass of active metabolites are the alkaloids,[1] which also comprises the structurally, biosynthetically, and pharmacologically interesting naphthylisoquinoline alkaloids produced by two phylogenetically related, palaeotropic plant families Ancistrocladaceae and Dioncophyllaceae.[11,12]

In the course of the research projects presented here, plants of two known and of one botanically not yet entirely characterized *Ancistrocladus* species were phytochemically investigated. Summarizing, five new (three of them belonging to the new *N*,*C*-coupling type)[16] and five already known compounds were identified. Especially the new *N*,*C*-coupled alkaloids are distinguished by their excellent antiinfective activities. An additional project within this work was engaged in studies of the role of the phloem in interactions between *Arabidopsis thaliana* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, which also led to the identification of some new glucosinolates and one phosphate. Furthermore, the structures of some interesting bacterial metabolites from the strains KC 1030 and AK 671 were successfully elucidated.

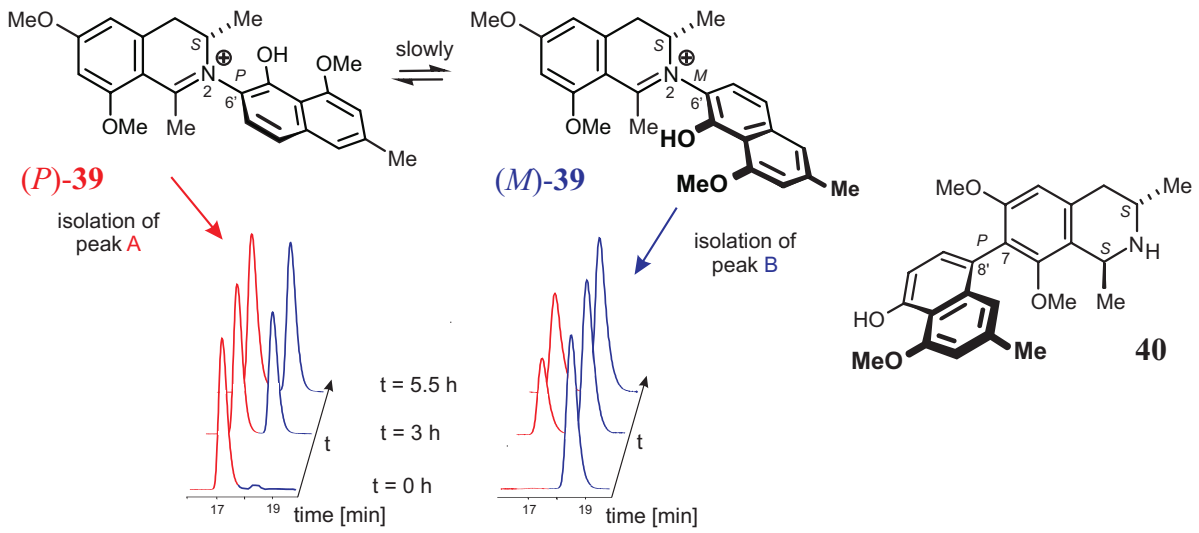
In detail, the following results were achieved during this doctoral thesis:

A: Isolation and structural elucidation of naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus* species:

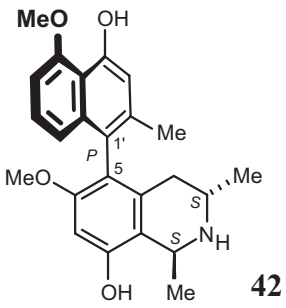
- The not yet phytochemically investigated bark extracts of the Vietnamese subspecies *Ancistrocladus tectorius ssp. cochinchinensis* were analyzed. Employing different online methods like HPLC-UV, -oTOF-MS, -NMR, and -CD, four already kown naphthylisoquinolines and three unknown alkaloids were identified. The three new metabolites were isolated and structurally elucidated by the use of different 2D NMR techniques. The defined structures – ancistrocladinium A (**30**) and its two *O*-demethyl derivatives **31** and **32** – are the first representatives of the new *N*,8'-naphthyl dihydroisoquinoline coupling type. These natural products exhibit promising biological activities – above all against the pathogen of leishmaniasis.



- The botanically not yet fully characterized liana species *"A. ikela"*, which was collected in the Congo Basin (Democratic Republic Congo), was morphologically and phytochemically investigated and described botanically. To fully elucidate whether this *Ancistrocladus* plant constitutes a new species, ITS sequencial analyses are in progress in the group of Prof. G. Heubl (Munich). Besides the two *N*,*C*-coupled naphthylisoquinolines, ancistrocladinium A (**30**) and ancistrocladinium B [(*M*/*P*)-**39**], a new *C*,*C*-coupled alkaloid – 8-*O*-methylancistrogriffine C (**40**) – was isolated. Furthermore, by establishing a gradient system for the baseline separation of both atropodiastereomers of **39** HPLC-NMR and HPLC-CD analyses of the individual two purified epimers were performed. Applying this gradient system, small amounts of the pure diastereomers were collected. These pure fractions of the two diastereomers were used to define the rotational barrier of the biaryl axis, which slowly rotates at room temperature, by HPLC-UV investigations [(*P*)-**39** of $\Delta G^{\neq}_1$ = 105.8 kJ/mol and for (*M*)-**39** of $\Delta G^{\neq}_2$ = 105.7 kJ/mol].



- From the leaves of the already well-investigated Indian *Ancistrocladus* species *A. heyneanus*, 6-*O*-methyl-8,4'-*O*-didemethylancistrocladine (**42**), a hitherto unknown naphthylisoquinoline alkaloid, was isolated.

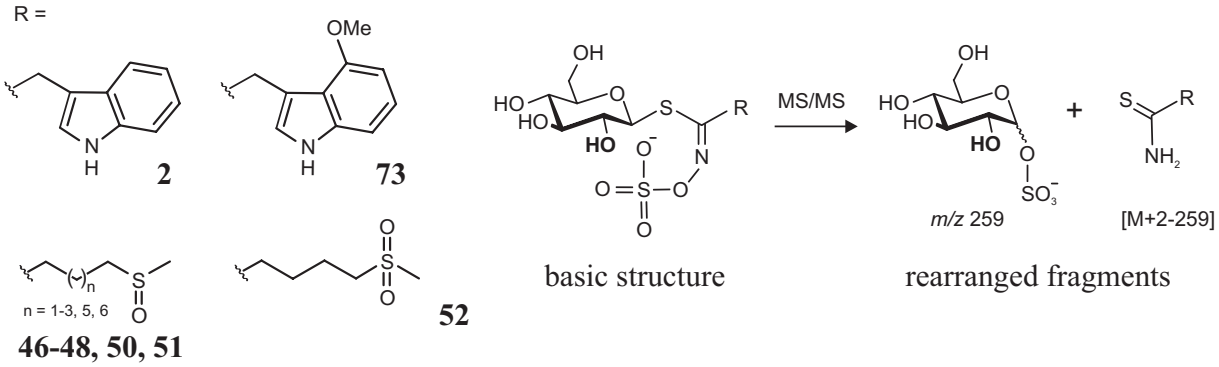


- A phytochemical investigation of the plant family of the Ancistrocladaceae with respect to the occurrence of *N*,*C*-coupled naphtylisoquinolines proved that these structurally exceptional alkaloids are quite common in this liana family. Despite the Asian liana *Ancistrocladus hamatus*, the East-African species *A. robertsoniorum* and *A. tanzaniensis* and the West-African species *A. abbreviatus*, *A. korupensis*, and *A. likoko* these new secondary metabolites were found to occur in all other known *Ancistrocladus* species. Furthermore, they were identified in some botanically not yet entirely characterized species from the Congo Bassin.

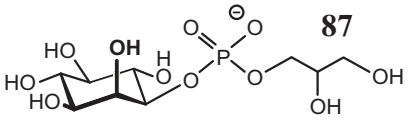
B: The role of the phloem during the propagation of pathogen-mediated signals:

- Within the scope of the project B8 of the *SFB 567*, investigations on the role of the phloem during the propagation of long-distance signals after infection of plants of *Arabidopsis thaliana* with virulental or avirulental strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* were carried out. For this purpose initially an analytical method for the main metabolites – the glucosinolates – of *A. thaliana* applicable at a nL-scale was developed. For that a successful coupling of a capillary electrophoresis device and a time-of-flight mass detector was set up and the glucosinolates were measured without any complicated work-up procedure directly from the crude plant extract or the phloem exudates. Using this sensitive method, many known but also some new glucosinolates (8-methylsulfonyl-*n*-octyl-, 2-hydroxy-4-methylsulfinyl-*n*-butyl-, 2-hydroxy-4-methylsulfonyl-*n*-butyl-, and 4-hydroxy-benzoyloxymethyl-glucosinolate) were identified in plant extracts of

A. thaliana. Furthermore, MS/MS analyses of the glucosinolates were carried out to verify their structures. Next to some typical fragments of the thiosugar moiety a few characteristic fragments of the different side chain structures (*e.g.* methylsulfinyl-*n*-alkyl- or methylthio-*n*-alkyl structure) were detected. Unfortunately, not all of the different types of side chaines led to typical fragmentation pattern.

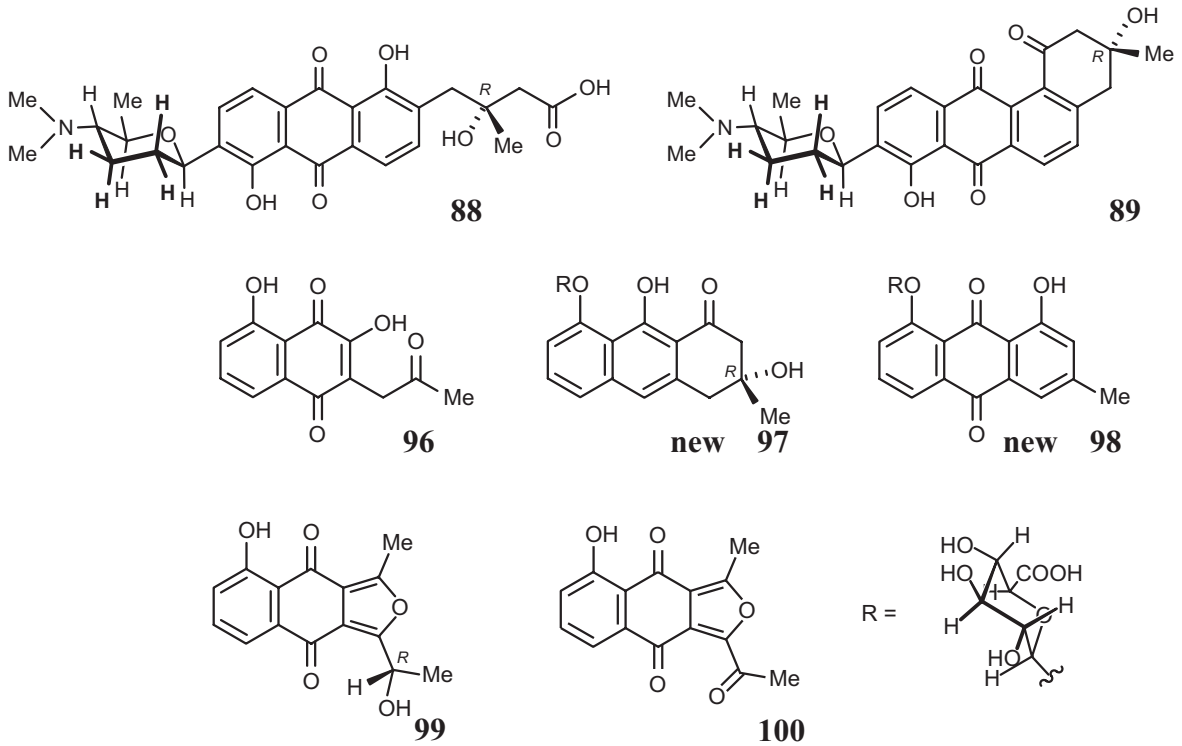


- In the phloem sap of entirely untreated plants, only methoxyglucobrassicin (**73**) and a phosphate **87** (1-glycero-1-*myo*-inositolphosphate), which was not kown so far to be located in plants, were identified in the course of the analysis of the phloem exudates. In the phloem saps of all the differently treated plants (infiltrated with $MgCl_2$, virulental or avirulental *Pseudomonas* strain) all of the main leaf metabolites occurred. Solely a slight but not significant increase of the concentration of methoxyglucobrassicin (**73**) was measured in the phloem exudates of plants infected with avirulental pathogens. One has to be extremely careful with respect to the observed increase since it is possible that the enhanced glucosinolate concentration was the result of the strong mechanical stimulus of the infiltration procedure. Furthermore, slight changes in the concentration of other metabolites could be superimposed by signals caused by the infiltration procedure.



C: Structural elucidation of polyketidic secondary metabolites from microorganisms

- The structures of two low-molecular natural products isolated in the working group of Prof. H.-P. Fiedler (University of Tübingen) from the extremophilic *Streptomyces* strain KC 1030 were elucidated. One of them was the already known frigocyclinone (**89**) and the other one was the new angucyclinone **88** with a fridamycine E core structure. Moreover, from the *Streptomyces* strain AK 671, two new (**97**, **98**) and three known (**96**, **99**, **100**) biosynthetically interesting secondary metabolites with the following structures were isolated:



Within this work it was possible to elucidate the structures of a number of herbal and bacterial secondary metabolites by the use of different analytical methods. In this context, especially the new representatives of the *N*,*C*-coupled naphthylisoquinoline alkaloids have to be mentioned. Application of the novel coupling of an HPLC or CE with an orthogonal TOF-MS detector turned out to be an exeptional helpful enlargement of the already known analytical "triade" HPLC-MS/MS-NMR-CD.

EXPERIMENTELLER TEIL

1 Allgemeine Methoden

1.1 Verwendete Messgeräte und Apparaturen

Zerkleinerung des Pflanzenmaterials: Luftgetrocknetes Pflanzenmaterial wurde mit einer IKA-Universal Mühle M20 der Fa. *IKA Labortechnik* gemahlen während gefriergetrocknetes Material aus dem Botanischen Garten meist mit Mörser und Pistill zerkleinert wurde.

Gefriertrocknung: Frisches Pflanzenmaterial aus dem Botanischen Garten sowie wässrige Fraktionen wurden mit Hilfe einer Alpha-1-4-Gefriertrocknungsanlage (Fa. *Christ*), die an eine vacUUbrand-RD-8-Hochvakuumpumpe der Fa. *Brand* angeschlossen wurde, getrocknet.

Schmelzpunkte: Die Messung aller Schmelzpunkte erfolgte mit einem Thermovar-Kofler-Heiztisch-Mikroskop der Firma *Reichert-Jung/Leica-Microsystems AG*. Die angegebenen Werte sind nicht korrigiert.

Infrarotspektren (IR): Die Infrarotspektren wurden mit einem *Jasco*-FT-*410* Spektrometer aufgenommen. $\tilde{\nu}$ bezeichnet hierbei die Wellenzahl. Die Intensität der Absorptionsbanden ist gekennzeichnet durch s = stark, m = mittel, w = schwach und br = breit. Die IR-Spektren wurden bei Raumtemperatur und mit Hilfe einer Natriumchlorid-Platte, die mit einer Dichlormethan Lösung der entsprechenden Substanzen überzogen wurde, oder eines Kaliumbromid-Presslings vermessen.

Ultraviolettspektren (UV): UV-Spektren wurden bei Raumtemperatur mit einem *Varian* CARY-50-Conc-UV-vis-Spektrophotometer im jeweils angegebenen Lösungsmittel gemessen. Die Wellenlänge (λ) und die Absorptionsmaxima (log ε) sind angegeben.

Kernresonanzspektren (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR): Die ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern Avance 400 und DMX 600 (400 bzw. 600 MHz und 100 bzw. 150 MHz) der Fa. *Bruker*, bei Raumtemperatur, aufgenommen. Zum Teil wurde zur Vermessung der Spektren am Gerät DMX 600 ein Kryoprobenkopf (Fa. *Bruker*) verwendet. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ-Skala angegeben und beziehen sich auf δ_{TMS} = 0. Zur Kalibrierung der ^{1}H-NMR-Spektren dienten die Resonanzsignale der Restprotonen der verwendeten deuterierten Lösungsmittel als interner Standard [z.B. $\delta(CDCl_3)$ = 7.26; $\delta(CD_3OD)$ = 3.31] und bei den ^{13}C-NMR-Spektren die entsprechenden ^{13}C-Resonanzsignale der Lösungsmittel [z.B. $\delta(CDCl_3)$ = 77.0; $\delta(CD_3OD)$ = 49.15]. Die Messung und die Auswertung der Spektren erfolgte mit der XWin-NMR- (Avance 400) und der TopSpin-Software (DMX 600; beide von *BrukerBiospin*). Die Signalmultiplizitäten sind folgendermaßen abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, *dd* = Doppeldublett, t = Triplett, dt = Doppeltriplett, q = Quartett and m = Multiplett. Die Angabe der Kopplungskonstanten *J* erfolgte in Hertz (Hz). In der Schreibweise ^nJ gibt n die Anzahl der dazwischen liegenden Bindungen an. Zur Aufnahme von HPLC-NMR-Spektren wurde ein inverser (^{1}H, ^{13}C)-60-µl-Durchflussprobenkopf mit z-Gradientenspule bzw. ein Cryofit-Durchflusseinsatz für den Kryoprobenkopf der Fa. *BrukerBiospin* verwendet.

Massenspektren (MS): Elektronenstoß-Massenspektren (EI-MS) und hochauflösende Elektronenstoß-Massenspektren (HREIMS) wurden mit einem *Finnigan*-MAT-8200-Spektrometer, bei einem Ionisationspotential von 70 eV, aufgenommen. Die in Klammern gesetzten Zahlen geben die Intensität der Signale, bezogen auf den Basispeak (I = 100%), an.

Zur Aufnahme von Elektrospray-Ionisations-Massenspektren (ESI-MS) wurde entweder eine Ionenfalle 1100-SL der Fa. *Agilent*, eine Ionenfalle Esquire 3000plus der Fa. *Bruker Daltonik*, ein orthogonal betriebener Time-of-Flight-Massendetektor (mircOTOF; *Bruker Daltonik*) oder ein micrOTOF-Q Gerät (ebenfalls von *Bruker Daltonik*) verwendet. Alle ESI-Massendetektoren wurden wahlweise zur Direktinjektion von Reinsubstanzen, wie auch gekoppelt mit einem HPLC- oder einem CE-System zur Vermessung von Rohextrakten verwendet (Stickstoff wurde als Hilfsgas angewendet, Kapillartemperatur und ESI-Spannung sind in den entsprechenden Kapiteln angegeben).

Drehwert: Drehwerte wurden mit einem P-1020-Polarimeter der Fa. *Jasco* direkt bei der Natrium-D-Linie (λ = 589 nm) ermittelt.

$$[\alpha] = \frac{\alpha \times 100}{c \times d}$$

α: gemessener Wert; c: Konzentration [g/100 mL]; d: Schichtdicke [dm].

Die Angabe der Drehwerte erfolgt in Grad [°].

Circulardichroismus (CD): Offline-Messungen wurden an einem *Jasco* J-715 Spektropolarimeter bei Raumtemperatur durchgeführt und mit der *Jasco*-Borwin-Software ausgewertet. Die Scangeschwindigkeit betrug 200 nm/min bei einer Bandbreite von 1 nm. Die differentiellen Absorptionskoeffizienten $\Delta\varepsilon$ [cm^2/mol^{-1}] wurden bei einer bestimmten Wellenlänge λ [nm] im entsprechend angegebenen Lösungsmittel vermessen. Das Lösungsmittelspektrum wurde von den gemessenen Spektren zur Korrektur abgezogen.

1.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Aluminiumfolien mit Kieselgel-60-F_{254}-Beschichtung der Fa. *Merck* verwendet. Als Fließmittelgemische wurden Dichlormethan:Methanol (90:10) und wasserfreie Ameisensäure:Wasser:Ethylmethylketon:Ethylacetat (10:10:30:50) genutzt. Zur Detektion der Substanzen wurde die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, die Anregung der Eigenfluoreszenz bei 366 nm sowie das Färbeverhalten gegenüber Dragendorff-Reagenz oder Diphenylboryloxyethylamin genutzt.

Säulenchromatographie (SC): Als Säulenfüllmaterialien wurden die Ionenaustauschermaterialien Amberlyst-15 der Firma *Fluka*, Amberlite-IR-120-(H) (Fa. Supelco), SP-Sephadex-C25 und DEAE-Sephadex-A25 sowie Sephadex-LH20-Material der Firma *Amersham* zur Gelchromatographie verwendet.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC): Das analytisch genutzte HPLC-System bestand aus einer Pumpe PU-1580, einem Degasser DG-2080-54, einem Mischer LG 2080-04, einem Autosampler AS-2055 Plus, einem Säulenofen und einem Diodenarraydetektor MD-2010 Plus der Firma *Jasco*. Darüber hinaus wurde ein Fluoreszenzdetektor RF-535 von *Shimadzu* und ein *Sedere*-Lichtstreudetektor (ELSD) Sedex-75, zur adäquaten Detektion aller Substanzen, in Reihe geschaltet. Zur Auswertung wurde die *Jasco*-Borwin-Software verwendet. Die verschiedenen benutzen Lösungsmittelsysteme und Säulen sind in den entsprechenden Kapiteln detaillierter aufgeführt.

Präparative Trennungen wurden ebenfalls mit einem HPLC-System der Firma *Jasco* durchgeführt [zwei Pumpen (PU-2087Plus), Mischer, *Rheodyne*-Injektionsventil (7725i), DAD-Detektor (MD 2010Plus), Borwin-Software]. Die Entgasung des Lösungsmittels wurde hierbei durch stetes Einleiten von Helium erreicht. Die hierbei verwendeten Lösungsmittelsysteme und Säulen sind ebenfalls in den entsprechenden Kapitel aufgeführt.

Die durch präparative HPLC gewonnenen produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und der Acetonitril- bzw. Methanol-Anteil im Vakuum abgedampft. Die wässrigen Fraktionen wurden gegen Dichlormethan ausgeschüttelt und die so erhaltenen produkthaltigen Dichlormethan-Fraktionen ebenfalls im Vakuum zur Trockene eingeengt.

HPLC-MS-Kopplung: Für die Kopplungen der HPLC an die verschiedenen Massendetektoren [Ionenfalle (*Agilent* 1100-SL), OTOF (*Bruker Daltonik* micrOTOF)] wurde ein *Agilent*-1100-Series-HPLC-System verwendet. Zur Vermessung der Proben wurde die in dem entsprechenden Kapiteln beschriebenen Gradientensysteme verwendet, allerdings wurde hierbei 0.2% Ameisensäure (FA) anstatt 0.05% TFA den Lösungsmitteln zugesetzt, um die störenden Trifluoressigsäure-Massenpeaks zu vermeiden. Zur Steuerung des Systems und zur Auswertung der Spektren wurde das ChemStation-Softwarepaket der Fa. *Agilent* oder die HyStar Software der Fa. *Bruker* genutzt.

HPLC-NMR-Kopplung: Das HPLC-System bestand ebenfalls aus einer 1100-Series-HPLC-Anlage der Firma *Agilent* und wurde über eine *Bruker* Peak Sampling Unit (BPSU) mit einem der Durchflussprobenköpfe für das DMX-600-NMR-Gerät verbunden. Das Computerprogramm HyStar 3.1 der Firma *BrukerBiospin* steuerte HPLC und BPSU. Die NMR-Messungen wurden mit der TopSpin-Software (ebenfalls von *BrukerBiospin*)

durchgeführt und ausgewertet. Es wurden überwiegend die Standard-Pulsprogramme und Automationsroutinen der Fa. *BrukerBiospin* verwendet, die mit einer WET-Lösungsmittel-unterdrückung[168] arbeiten. Hierbei wurde für die Trennungen eine Symmetry-C_{18}-Säule mit verschiedenen Gradienten-Systemen (sind im jeweiligen Kapitel genauer aufgeführt) genutzt, in denen Wasser durch deuteriertes Wasser ersetzt wurde.

HPLC-CD-Kopplung: Für die HPLC-CD-Kopplungen wurde ein *Jasco* HPLC-System, bestehend aus einer Pumpe PU-1580, einem Degasser DG-2080-53, einem Säulenofen, einem Mischer LG-980-02S, einem Injektionsventil 7725i der Fa. *Rheodyne* und einem ERC-7215 UV-Detektor von *Erma* mit dem oben erwähnten J-715-Spektropolarimeter, ebenfalls von der Firma *Jasco*, verbunden. Das Spektropolarimeter war mit einer 5-mm-Standard-durchflusszelle (Fa. *Jasco*), die durch ein *Besta*-Motorventil 7010 kontrolliert wurde, ausgestattet. Säule und Lösungsmittel wurden dem Trennproblem entsprechend ausgesucht. Die Messung der Online-CD-Spektren erfolgte im Stop-flow-Modus mit drei Wiederholungen von 200 nm bis 400 nm, einer Scangeschwindigkeit von 500 nm min^{-1}, einer Antwortzeit von 0.5 sec und einer Bandbreite von 0.5 nm. Die Basislinienkorrektur wurde nachträglich durch Subtraktion des ebenfalls gemessenen Spektrums des Lösungsmittelgemischs durchgeführt; die Spektren wurden leicht geglättet (Smooth = 5).

Kapillarelektrophorese (CE): Für die kapillarelektrophoretischen Messungen wurden ein HP^{3D}-CE-Gerät von *Agilent* und eine Anlage der Firma *Prince* benutzt, das entweder mit einem Diodenarraydetektor oder einem der bereits beschriebenen Massendetektoren (Ionenfalle, oTOF) verbunden war und von der ChemStation Software 08.03 (*Agilent*) gesteuert wurde. Die zur Trennung verwendeten beschichteten Kieselgel-Kapillaren wurden von der Firma *Polymicro Technologies* geliefert, hatten einen Innendurchmesser von 50 µm und eine Länge von 60, 75 oder 88 cm. Vor, zwischen und nach den Läufen wurden die Kapillaren mit 1 M Natriumhydroxidlösung konditioniert und 10 min lang mit der entsprechenden Pufferlösung gespült.

CE-MS-Kopplung: Für die Kopplung des CE-Gerätes an die verschiedenen Massendetektoren wurde ein geerdetes coaxiales Sheath-Liquid Interface (*Agilent*) genutzt. Das Sheath-Liquid wurde von einer Spritzenpumpe (*Cole Palmer*) mit einer Flussrate von 4 µl/min über das Interface an die Sprüheinheit abgegeben und bestand aus

Wasser/Isopropanol 1:1 (v/v) mit verschiedenen Zusätzen wie z.B. Ameisensäure, Essigsäure oder Ammoniak.

Fast Centrifugal Partition Chromatographie (FCPC): Für die Flüssig-flüssig-Chromatographie wurde ein FCPC-System der Fa. *Kromaton*[39] eingesetzt, welches mit einem 200-mL-Rotor ausgestattet war. Als Pumpe nutze man eine P-400 (*Latek*) und als UV-Detektor ein Pro Star 320 (Fa. *Varian*) mit einer SuperPrep-Dualflusszelle (4 mm und 0.15 mm). Die Probe wurde über ein 3725i-Probenventil (*Rheodyne*) mit einer 20-mL-Stahlprobenschleife aufgegeben. Die Fraktionen sammelte man mit einem Fraktionssammler FC-1 (*Dynamax*).

Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie (MPLC): Hierfür wurden eine *Knauer*-Pumpe-64 und ein *Rheodyne*-5020-Low-Pressure-Probenaufgabeventil mit 10-mL-Probenschleife verwendet. Die Trennung erfolgte mittels einer Lobar-Fertigsäule (25 x 310 mm; LiChroprep RP-18, 40-63 µm, Größe B) der Fa. *Merck* und einer selbstgefüllten 3 m langen Sephadex-LH20 Säule.

1.3 Chemikalien

Lösungsmittel: Wasser (H_2O) für die HPLC wurde über eine Milli-Q-Anlage der Fa. *Millipore* gereinigt und entionisiert. Acetonitril und Methanol für die HPLC (MeCN bzw. MeOH, HPLC Gradient Grade), Methanol (MeOH, Uvasolv) und Ethanol (EtOH, Uvasolv) für UV, CD und Drehwertbestimmung sowie Trifluoressigsäure (TFA) und Ameisensäure (FA) wurden gekauft und ohne weitere Reinigung verwendet. Sämtliche anderen Lösungsmittel, die zur Anwendung kamen, wie z. B. Methanol (MeOH), Dichlormethan (CH_2Cl_2), Chloroform ($CHCl_3$), Isopropanol (*iso*-PrOH) und *n*-Hexan wurden vor der Verwendung destilliert.

Sonstige Chemikalien: Für die Desulfatierungen der Glucosinolate wurde Sulfatase vom Typ H1 aus *Helix pomatia* verwendet und als Standard nutzte man Sinigrin. Beide Substanzen wurden über die Fa. *Sigma* bezogen. Als Standard für den Screening-Versuch wurde 2-Methoxy-4-methylbenzoesäure (*Aldrich*) verwendet.

2 Untersuchungen an Astrinde und Blättern von *Ancistrocladus cochinchinensis*

2.1 *Ancistrocladus cochinchinensis*

Das Pflanzenmaterial von *Ancistrocladus cochinchinensis* wurde von Dr. Michael Dreyer im Jahr 2004 in der vietnamesischen Provinz Da Nang gesammelt. Neben getrocknetem Astrinden- und Blattmaterial konnten auch zwei lebende Setzlinge (04-96-B-20, 04-97-B-20) erfolgreich im Botanischen Garten in Würzburg etabliert werden. Die Hinterlegung eines Herbarexemplars im Herbarium Bringmann erfolgte unter der Nummer 63.

2.2 Online-Analyse der Pflanzenextrakte

Für die Online-Analysen der Massen mittels HPLC-ESI-Ionenfalle und HPLC-ESI-oTOF wurden 5 g gemahlenes Astmaterial zweimal mit 50 mL Methanol über Nacht mazeriert, der gewonnene Extrakt im Vakuum auf ca. 5 mL eingeengt und über eine *Waters*-C_{18}-Spritzenvorsäule und einen PTFE-Filter vorgereinigt. 100 mg des getrockneten Rückstandes der bereits in Vietnam extrahierten Blätter wurden in 10 mL Methanol gelöst und wie oben beschrieben vorgereinigt. Zum Vergleich wurden auch Blätter der im Botanischen Garten angezogenen Setzlinge nach oben beschriebener Methode extrahiert und vorgereinigt. Durch Vermessung dieser Frischpflanzen-Extrakte wurde überprüft, ob es bei der Trocknung, der Extraktion oder der Lagerung des Pflanzenmaterials zu Artefaktbildungen gekommen war. Alle drei Extrakte zeigten das gleiche Metabolitmuster.

Jeweils 1 mg des Ast- oder Blattextraktes wurden danach in 1 mL Methanol gelöst und 10 µL davon in die verschiedenen Systeme eingespritzt. Ebenso wurde bei der Vermessung der Online-CD-Spektren verfahren. Zur Aufnahme von HPLC-NMR-Daten wurden 10 mg der beiden Extrakte in 1 mL MeCN gelöst und 75 µL eingespritzt. Bei allen Analysen wurde eine Symmetry®-C_{18}-Säule der Firma *Waters* (4.6 × 250 mm; 5 µm) verwendet. Das Gradientensystem bestand aus Wasser (A) und Acetonitril (B), jeweils versetzt mit 0.05% TFA, in folgender Zusammensetzung: 0 min 10% B, 30 min 70% B, 35 min 100% B, 40 min 100% B, 41 min 5% B und 46 min 5% B. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Im Falle der HPLC-NMR-Analyse wurde deuteriertes Wasser als Eluent A genutzt. Die einzelnen Peaks wurden bei diesen NMR-Untersuchungen zunächst mit Hilfe einer BPSU (*Bruker* Peak Sampling Unit) der Firma *Bruker Biospin* aufgefangen und danach einzeln in den Probenkopf des Spektrometers überführt.

Zur besseren Übersicht ist in Abbildung 53 ein HPLC-UV-Chromatogramm eines Astrinden-Extraktes von *Ancistrocladus cochinchinensis* dargestellt.

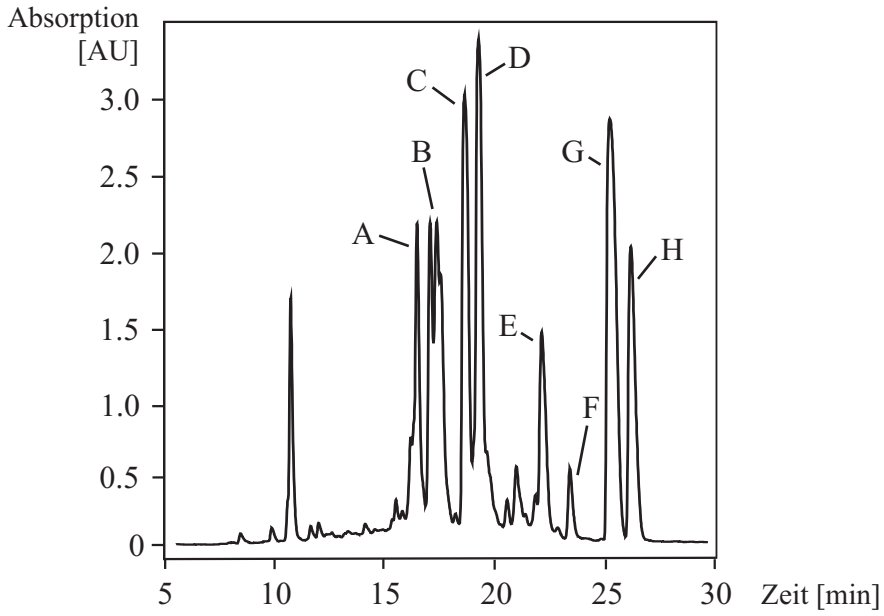
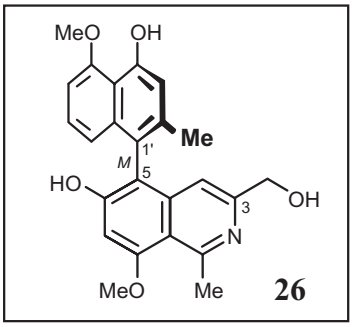


Abbildung 53. HPLC-UV-Chromatogramm eines Astextraktes von *A. cochinchinensis*. Analog hierzu sahen HPLC-Chromatogramme von Blattextrakte dieser Pflanze aus. Lediglich in der Konzentration der einzelnen Peaks konnte ein kleiner Unterschied festgestellt werden.

Die Peaks A-D konnten bei der Online-Analyse der Pflanzenextrakte als bereits bekannte Verbindungen identifiziert werden.

2.2.1 6-*O*-Demethylancistrobenomin A (26)

Peak A (R_t = 17.1 min) identifizierte man anhand der gewonnenen Online-Daten als vollständig dehydrierte Verbindung 6-*O*-Demethylancistrobenomin A (**26**). Dieses wurde zuerst aus Pflanzenmaterial von *Ancistrocladus benomensis*, einer ebenfalls asiatischen Lianen-Art, isoliert und aufgeklärt.[45]



UV (Acetonitril/Wasser, 56:44, v/v): λ_{max} = 231 (0.44), 259 (0.23), 307 (0.07), 335 (0.07), 359 (0.05) nm.

CD (Acetonitril/Wasser, 56:44, v/v): Δε = 207 (-27.9), 212 (-9.5), 217 (-13.2), 236 (+22.3) nm.

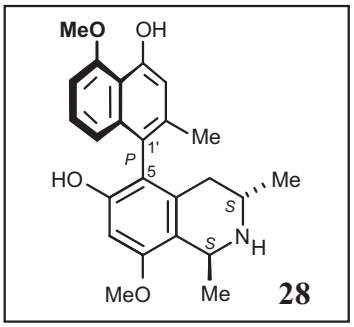
^{1}H-NMR (600 MHz, CH_3CN/D_2O, 56:44, v/v): δ = 3.11 (s, 3 H, 1-CH_3), 3.98 (s, 3 H, 5'-OCH_3), 4.02 (s, 3 H, 8-OCH_3), 4.49 (s, 2 H, 3-CH_2OH), 6.55 (d, $^3J_{H,H}$ = 8.3 Hz, 1 H, 8'-H), 6.79 (s, 1 H, 3'-H), 6.84 (d, $^3J_{H,H}$ = 7.6 Hz , 1 H, 6'-H), 6. 86 (s, 1 H, 4-H), 6.93 (s, 1 H, 7-H), 7.10 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.6, 8.3 Hz, 1 H, 7'-H). Das Signal der Methylgruppe an C-2' liegt normalerweise bei ca. δ = 2 ppm und ist in diesem Fall nicht detektierbar, da dort das Acetonitrilsignal durch das genutzte WET-Pulsprogramm[168] unterdrückt wird.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): *m/z* 406.6 $[M+H]^+$.

HRESI-MS: *m/z* 406.1635 $[M+H]^+$ (*m/z* 406.1649 $[M+H]^+$ berechnet für $C_{24}H_{24}NO_5^+$).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur gut überein.[45] Die Identität wurde darüber hinaus noch in einem Koelutionsexperiment erfolgreich überprüft.

2.2.2 4'-*O*-Demethylancistrocladin (28)



Durch die Online-Daten konnte Peak B (R_t = 17.6 min) als 4'-*O*-Demethylancistrocladin (**28**), das bereits aus *A. tectorius* bekannt war, identifiziert werden.[48]

UV (Acetonitril/Wasser, 55:45, v/v): λ_{max} = 227 (1.27), 307 (0.21), 335 (0.17) nm.

CD (Acetonitril/Wasser, 55:45, v/v): Δε = 212 (-11.4), 239 (+8.2) nm.

^{1}H-NMR (600 MHz, CH_3CN/D_2O, 55:45, v/v): δ = 0.96 (d, $^3J_{H,H}$ = 6.3 Hz, 3 H, 3-CH_3), 1.25 (d, $^3J_{H,H}$ = 6.3 Hz, 3 H, 1-CH_3), 3.10 (m_c, 1 H, 3-H), 3.71 (s, 3 H, 8-OCH_3), 4.12 (s, 3 H, 5'-OCH_3), 4.24 (q, 1 H, 1-H), 6.60 (s, 1 H, 7-H), 6.79 (d, $^3J_{H,H}$ = 8.3 Hz, 1 H, 6'-H), 6.88 (s, 1 H, 3'-H), 6.92 (d, $^3J_{H,H}$ = 7.6 Hz , 1 H, 8'-H), 7.20 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.6, 8.3 Hz, 1 H, 7'-H).
Das Signal der Methylgruppe an C-2' liegt normalerweise bei ca. δ = 2 ppm und ist in diesem Fall nicht detektierbar, da dort das Acetonitrilsignal durch das genutzte WET-

Pulsprogramm[168] unterdrückt wird. Außerdem liegen bei **28** die Signale der beiden diastereotopen Protonen an C-4 in diesem Bereich und können deswegen ebenfalls nicht beobachtet werden.

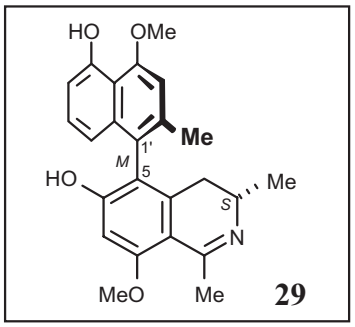
ESI-MS (pos. Ionenmodus): *m/z* 394.4 $[M+H]^+$.

HRESI-MS: *m/z* 394.2002 $[M+H]^+$ (*m/z* 394.2013 $[M+H]^+$ berechnet für $C_{24}H_{28}NO_4^+$).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur gut überein.[48]

2.2.3 5'-*O*-Demethylhamatinin (29)

Peak C (R_t = 19.1 min) wurde durch die Online-Analyse als 5'-*O*-Demethylhamatinin (**29**) identifiziert. Diese Verbindung war in einer früheren Isolierarbeit bereits in *A. "ikela"*, einer noch nicht vollständig charakterisierten kongolesischen *Ancistrocladus*-Species entdeckt worden.[49]



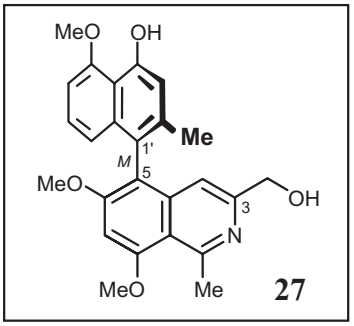
UV (Acetonitril/Wasser, 52:48, v/v): λ_{max} = 227 (3.36), 311 (1.18), 335 (1.13) nm.

CD (Acetonitril/Wasser, 52:48, v/v): $\Delta\varepsilon$ = 212 (-11.4), 239 (+8.2) nm.

^{1}H-NMR (600 MHz, CH_3CN/D_2O, 52:48, v/v): δ = 1.18 (d, $^3J_{H,H}$ = 6.3 Hz, 3 H, 3-CH_3), 2.25 (dd, $^3J_{H,H}$ = 17.0, 10.6 Hz , 1 H, 4_{ax}-H), 2.45 (dd, $^3J_{H,H}$ = 16.9, 5.6 Hz , 1 H, 4_{eq}-H), 2.63 (s, 3 H, 1-CH_3), 3.65 (m_c, 1 H, 3-H), 3.91 (s, 3 H, 8-OCH_3), 4.02 (s, 3 H, 4'-OCH_3), 6.60 (s, 1 H, 7-H), 6.72 (d, $^3J_{H,H}$ = 8.3 Hz, 1 H, 8'-H), 6.79 (s, 1 H, 3'-H), 6.84 (d, $^3J_{H,H}$ = 7.6 Hz , 1 H, 6'-H), 7.18 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.6, 8.3 Hz, 1 H, 7'-H). Das Signal der Methylgruppe an C-2' liegt normalerweise bei ca. δ = 2 ppm und ist in diesem Fall nicht detektierbar, da dort das Acetonitrilsignal durch das genutzte WET-Pulsprogramm[168] unterdrückt wird.
ESI-MS (pos. Ionenmodus): *m/z* 392.1 $[M+H]^+$.
HRESI-MS: *m/z* 392.1850 $[M+H]^+$ (*m/z* 392.1856 $[M+H]^+$ berechnet für $C_{24}H_{26}NO_4^+$).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur gut überein.[49]

2.2.4 Ancistrobenomin A (27)



Peak D (R_t = 19.8 min) wurde als vollständig dehydrierte Verbindung Ancistrobenomin A (**27**) aufgeklärt. In einer früheren Isolierarbeit war dieses bereits in Pflanzenmaterial der malaysischen Lianenart *Ancistrocladus benomensis* identifiziert worden.[45]

UV (Acetonitril/Wasser, 50:50, v/v): λ_{max} = 231 (4.7), 259 (2.9), 307 (0.7), 323 (0.7), 335 (0.8), 359 (0.5) nm.

CD (Acetonitril/Wasser, 50:50, v/v): $\Delta\varepsilon$ = 205 (-20.7), 215 (-8.1), 217 (-15.9), 259 (+18.2) nm.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.95 (s, 3 H, 2'-CH_3), 3.32 (s, 3 H, 1-CH_3), 3.89 (s, 3 H, 6-OCH_3), 4.10 (s, 3 H, 5'-OCH_3), 4.22 (s, 3 H, 8-OCH_3), 4.57 (s, 2 H, 3-CH_2OH), 6.49 (d, $^3J_{H,H}$ = 8.3 Hz, 1 H, 8'-H), 6.75 (d, $^3J_{H,H}$ = 7.6, 1 H, 6'-H), 6.79 (s, 1 H, 4-H), 6.93 (s, 2 H, 7-H, 3'-H), 7.10 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.6, 8.3 Hz, 1 H, 7'-H), 9.52 (s, 1 H, 4'-OH).

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ = 20.2 (2'-CH_3), 22.7 (1-CH_3), 56.2 (5'-OCH_3), 56.3 (8-OCH_3), 56.5 (6-OCH_3), 62.9 (3-CH_2OH), 96.1 (C-7), 103.6 (C-6'), 113.0 (C-3'), 113.9 (C-9), 118.6 (C-8'), 126.5 (C-7'), 135.7 (C-9'), 138.1 (C-2'), 140.7 (C-10), 145.1 (C-3), 154.7 (C-4'), 156.6 (C-5'), 158.5 (C-1), 165.4 (C-8), 165.5 (C-6).

ESI-MS (pos. Ionenmodus): *m/z* 420.6 $[M+H]^+$.

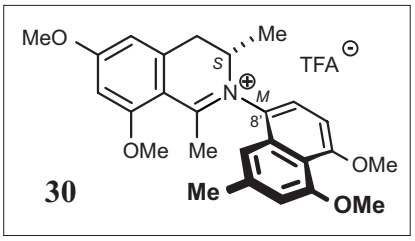
HRESI-MS: *m/z* 420.2175 $[M]^+$ (*m/z* 420.2175 $[M]^+$ berechnet für $C_{26}H_{30}NO_4^+$).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.[45] Die Identität wurde darüber hinaus noch in einem Coelutionsexperiment erfolgreich überprüft.

2.3 Identifizierung und Isolierung der Hauptalkaloide aus Astrinde von *Ancistrocladus cochinchinensis*

100 g des fein pulverisierten, getrockneten Rindenmaterials wurden zweimal mit 500 mL Methanol jeweils über Nacht bei Raumtemperatur extrahiert. Zunächst wurde nun das Volumen des Extraktes im Vakuum auf ca. 100 mL reduziert und mit ca. 10 mL Wasser versetzt. Danach wurde zur Entfettung des Extraktes gegen *n*-Hexan ausgeschüttelt und die Methanol-Wasser Phase erneut im Vakuum auf ein Volumen von etwa 15 mL reduziert. Die Alkaloide wurden daraufhin mit Dichlormethan aus der wässrigen Phase extrahiert. Den im Vakuum zur Trockene eingeengte Rückstand (ca. 15.8 g vorgereinigter Extrakt) der Dichlormethan-Phase nahm man mit 10 mL Methanol auf und reinigte ihn über eine mit Wasser und Methanol vorkonditionierte *Waters*-C_{18}-Spritzenvorsäule für die weitere Bearbeitung vor. Zur Isolierung der Hauptmetabolite mittels präparativer HPLC injizierte man den so gewonnenen Extrakt in 600-µL-Portionen durch einen 0.2-µm-PTFE-Filter (Fa. *Whatman*) auf eine *Waters*-SymmetryPrep®-C_{18}-Säule (19 × 300 mm, 7 µm). Mit dem folgenden Gradientensystem konnten die Metabolite **27** (Peak D, R_t = 19.8 min, 10.1 mg), **32** (Peak F, R_t = 23.5 min, 3.4 mg), **30** (Peak G, R_t = 25.4 min, 12.5 mg) und **31** (Peak H, R_t = 26.8 min, 10.2 mg) isoliert werden: 0 min 35% B, 18 min 70% B, 19 min 100% B, 23 min 100% B, 24 min 35% B. Als Eluenten wurden Wasser (A) und Acetonitril (B), beide versetzt mit 0.05% TFA, mit einer Flussrate von 12 mL/min benutzt. Die Entfernung des Acetonitrils aus den Produktfraktionen erfolgte unter vermindertem Druck. Die zurückbleibende wässrige Phase schüttelte man gegen Dichlormethan aus und erhielt die reinen Produkte nach Einengen des Dichlormethans zur Trockene im Vakuum.

2.3.1 Ancistrocladinium A (30, Trifluoracetat)[169]



Nach Umkristallisation aus Methanol blassgelbe, nadelartige Kristalle (12.5 mg).

Schmp. ≥ 230 °C (Zersetzung).

$[\alpha]_D^{20}$ = - 6 (c = 0.05; MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} = 231 (2.67), 335 (1.38) nm.

CD (MeOH): $\Delta\varepsilon$ = 377 (-17.2), 325 (+19.9), 243 (-28.3), 228 (+32.4), 214 (-36.3) nm.

Tabelle 8. NMR-Daten von Ancistrocladinium A (**30**) in MeOD; die Kopplungskonstanten *J* [Hz] stehen in Klammern; die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben; ^{1}H-NMR bei 400 MHz und ^{13}C-NMR bei 100 MHz.

	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR	HMBC (^{3}J - ^{5}J)	ROESY/NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	179.6	-	-	-	-
3	61.3	4.25 *m*	1, 10	3-Me, 4_{ax}, 4_{eq}, 1'	3-Me, 4_{ax}, 4_{eq}
4_{ax}	36.7	3.83 *dd*	3-Me, 5, 9, 10	3, 3-Me, 4_{eq}, 1'	4_{eq} (17.4), 3 (6.2)
4_{eq}	36.7	3.13 *dd*	3-Me, 5, 9, 10	3, 3-Me, 4_{ax}, 5	4_{ax} (17.4), 3 (2.5)
5	111.1	6.77 *s*	4, 7, 9	4_{eq}, 6-OMe	-
6	172.4	-	-	-	-
7	100.7	6.74 *s*	5, 9	6-OMe, 8-OMe	-
8	168.1	-	-	-	-
9	113.8	-	-	-	-
10	143.9	-	-	-	-
1'	114.8	7.08 *s*	2'-Me, 3', 8', 10'	2'-Me, 1-Me, 3, 4_{ax}	-
2'	143.7	-	-	-	-
3'	112.9	6.98 *s*	1', 2'-Me, 10'	2'-Me, 4'-OMe	-
4'	161.5	-	-	-	-
5'	162.7	-	-	-	-
6'	106.6	6.97 *d*	8', 10'	7', 5'-OMe	7' (8.5)
7'	128.9	7.46 *d*	5', 9	1-Me, 3-Me, 6'	6' (8.5)
8'	119.7	-	-	-	-
9'	133.8	-	-	-	-
10'	131.6	-	-	-	-
1-Me	26.5	2.52 *s*	1	8-OMe, 1', 7'	-
2'-Me	24.00	2.50 *s*	1', 3'	1', 3'	-
3-Me	17.2	1.30 *d*	4	3, 4_{ax}, 4_{eq}, 7'	3 (7.1)
4'-OMe	58.7	3.97 *s*	4'	3'	-
5'-OMe	58.6	4.01 *s*	5'	6'	-
6-OMe	58.8	4.03 *s*	6	5, 7	-
8-OMe	58.9	4.04 *s*	8	1-Me, 7	-

IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ = 3250 (w), 2955 (m), 2925 (m), 2848 (m), 1682 (s), 1609 (m) 1585 (m), 1458, (m) 1438 (s), 1417 (s), 1312 (br), 1278 (br), 1259 (br), 1204 (s), 1176 (m), 1130 (s), 1040 (br) 836 (br), 801(m) cm^{-1}.

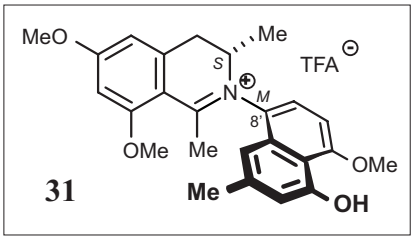
ESI-MS (pos. Ionenmodus): *m/z* 420.5 $[M]^+$.

EI-MS: *m/z* (%) 420.2 $[M]^+$ (12.3), 419.2 $[M-H]^+$ (27.9), 404.1 $[M-CH_4]^+$ (100).

HRESI-MS: *m/z* 420.2175 $[M]^+$ (*m/z* 420.2175 $[M]^+$ berechnet für $C_{26}H_{30}NO_4^+$).

2.3.2 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (31, Trifluoracetat)[170]

Blassgelbe Kristallnadeln (10.2 mg; umkristallisiert aus Methanol).



Schmp. ≥ 230 °C (Zersetzung).

$[\alpha]_D^{20}$ = - 5.5 (*c* = 0.05; MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} = 231 (2.04), 335 (1.06) nm.

CD (MeOH): Δε = 377 (-17.2), 325 (+19.9), 243 (-28.3), 228 (+32.4), 214 (-36.3) nm.

Tabelle 9. NMR-Daten von 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) in MeOD; die Kopplungskonstanten *J* [Hz] stehen in Klammern; die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben; ^{1}H-NMR bei 400 MHz und ^{13}C-NMR bei 100 MHz.

	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR	HMBC (^3J - ^5J)	ROESY/NOESY	COSY
1	180.1	-	-	-	-
3	61.8	4.26 *m*	-	3-Me, 4_{ax}, 4_{eq}, 1'	3-Me, 4_{ax}, 4_{eq}
4_{ax}	37.4	3.82 *dd*	3, 3-Me, 5, 10	3, 4_{eq}, 1'	4_{eq} (17.4), 3 (6.2)
4_{eq}	37.4	3.13 *dd*	5, 9, 10	3, 3-Me, 4_{ax}, 5	4_{ax} (17.4), 3 (2.5)
5	111.8	6.78 *s*	4, 6, 7, 9	4_{eq}, 6-OMe	-
6	173.1	-	-	-	-
7	101.3	6.74 *s*	5, 6, 8, 9	6-OMe, 8-OMe	-
8	168.8	-	-	-	-
9	113.6	-	-	-	-
10	144.4	-	-	-	-
1'	114.5	7.02 *s*	2'-Me, 3', 8', 10'	2'-Me, 1-Me, 3, 4_{ax}	-
2'	145.6	-	-	-	-
3'	117.8	6.88 *s*	1', 2'-Me, 4', 10'	2'-Me	-
4'	159.5	-	-	-	-
5'	162.2	-	-	-	-
6'	105.9	7.01 *d*	5', 8', 10'	7', 5'-OMe	7' (8.7)
7'	129.2	7.47 *d*	5'	1-Me, 3-Me, 6'	6' (8.7)
8'	133.4	-	-	-	-
9'	133.9	-	-	-	-
10'	117.5	-	-	-	-
1-Me	27.1	2.53 *s*	1, 9	8-OMe, 1', 7'	-
2'-Me	24.4	2.46 *s*	1', 2', 3'	1', 3'	-
3-Me	17.9	1.31 *d*	4	3, 4_{ax}, 4_{eq}, 7'	3 (7.5)
4'-OH[a]	-	9.23 *s*	-	-	-
5'-OMe	59.9	4.17 *s*	5'	6'	-
6-OMe	59.4	4.03 *s*	6	5, 7	-
8-OMe	59.5	4.05 *s*	8	1-Me, 7	-

[a] gemessen in $CDCl_3$

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3350 (w), 2945 (w), 2848 (w), 1724 (s), 1656 (s), 1582 (w), 1449, (m), 1388 (s), 1310 (m), 1281 (m), 1213 (s), 1134 (m), 1086 (w), 834 (w), 798 (w), 720 (w), 673 (w) cm^{-1}.

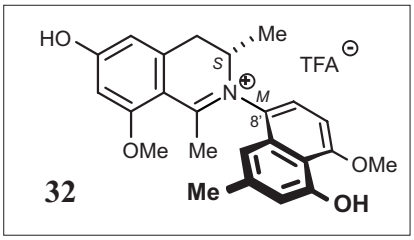
ESI-MS (pos. Ionenmodus): *m/z* 406.5 $[M]^+$.

EI-MS: *m/z* (%) 406.2 $[M]^+$ (10), 405.1 $[M-H]^+$ (28), 390.2 $[M-CH_4]^+$ (100).

HRESI-MS: *m/z* 406.2020 $[M]^+$ (*m/z* 406.2013 $[M]^+$ berechnet für $C_{25}H_{28}NO_4^+$).

2.3.3 6, 4'-*O*-Didemethylancistrocladinium A (32, Trifluoracetat)

Gelbes Öl (3.4 mg).



$[\alpha]_D^{20}$ = -4.4 (*c* = 0.014; MeOH)

UV (Acetonitril/Wasser, 42:58, v/v): λ_{max} = 231 (0.39), 335 (0.17) nm.

CD (Acetonitril/Wasser, 42:58, v/v): $\Delta\varepsilon$ = 328 (+2.7), 241 (-2.9), 227 (+5.9), 211 (-4.8) nm.

Tabelle 10. NMR-Daten von 6,4'-*O*-Didemethylancistrocladinium A (**32**) in MeOD; die Kopplungskonstanten *J* [Hz] stehen in Klammern; die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben; ^{1}H-NMR bei 400 MHz und ^{13}C-NMR bei 100 MHz.

	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR	HMBC (^3J - ^5J)	ROESY/NOESY	COSY
1	180.1	-	-	-	-
3	61.8	4.11 *m*	-	3-Me, 4_{ax}, 4_{eq}, 1'	3-Me, 4_{ax}, 4_{eq}
4_{ax}	37.4	3.70 *dd*	3, 3-Me, 5, 10	3, 4_{eq}, 1'	4_{eq} (17.4), 3 (6.2)
4_{eq}	37.4	2.96 *dd*	5, 9, 10	3, 3-Me, 4_{ax}, 5	4_{ax} (17.4), 3 (2.5)
5	111.8	6.40 *s*	4, 6, 7, 9	4_{eq}	-
6	173.1	-	-	-	-
7	101.3	6.38 *s*	5, 6, 8, 9	8-OMe	-
8	168.8	-	-	-	-
9	113.6	-	-	-	-
10	144.4	-	-	-	-
1'	114.5	7.01 *s*	2'-Me, 3', 8', 10'	2'-Me, 1-Me, 3, 4_{ax}	-
2'	145.6	-	-	-	-
3'	117.8	6.86 *s*	1', 2'-Me, 4', 10'	2'-Me	-

4'	159.5	-	-	-	-
5'	162.2	-	-	-	-
6'	105.9	6.98 *d*	5', 8', 10'	7', 5'-OMe	7' (8.5)
7'	129.2	7.42 *d*	5'	3-Me, 6'	6' (8.5)
8'	133.4	-	-	-	-
9'	133.9	-	-	-	-
10'	117.8	-	-	-	-
1-Me	27.1	2.45 *s*	1, 9	1'	-
2'-Me	24.4	2.42 *s*	1', 2', 3'	1', 3'	-
3-Me	17.9	1.23 *d*	4	3, 4_{ax}, 4_{eq}	3 (7.1)
4'-OH	-	-	-	-	-
5'-OMe	59.8	4.16 *s*	5'	6'	-
6-OH	-	-	-	-	-
8-OMe	59.5	3.94 *s*	8	7	-

ESI-MS (pos. Ionenmodus): *m/z* 392.5 $[M]^+$.

HRESI-MS: *m/z* 392.1845 $[M]^+$ (*m/z* 392.1856 $[M]^+$ berechnet für $C_{24}H_{26}NO_4^+$).

2.4 Großisolierung der neuen *N,C*-gekuppelten Naphthylisochinolin-Alkaloide 30 und 31

2.4.1 Anreicherung per Ionenaustausch-Chromatographie

Für die Anreicherung der Alkaloide **30** und **31** mittels Ionenaustausch-Chromatographie[66,67] wurden zuerst drei verschiedene Kationenaustauscher-Materialien (Amberlyst®, Amberlite IR-120®, Sephadex C-25®) auf ihre Eigenschaften hinsichtlich der Bindung und Elution von *N*,C-gekuppelten Substanzen getestet. Dazu wurde das stark fluoreszierende *N*-Phenyl-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinolinium-Perchlorat (**33**) als Modellsubstanz eingesetzt, da es wegen seiner Fluoreszenz sehr einfach detektierbar war.[69]

Zunächst wurden geringe Mengen der verschiedenen Ionenaustauscher-Materialien in Eppendorf-Caps gefüllt. Das kugelartige Amberlyst®- und Amberlite-IR-120®-Material wusch man mehrfach mit Methanol und Wasser, während das Sephadex-C-25®-Material über Nacht in Wasser zum Quellen stehen gelassen wurde. Danach wurden 10 µL einer methanolischen Lösung der Modellsubstanz (**33**) auf die Adsorber-Harze aufgegeben, eine Zeit lang stehen gelassen und die Färbung bzw. Entfärbung des Überstandes beobachtet. Daraufhin untersuchte man das Verhalten der Substanz **33** beim Spülen der Ionenaustauscher-

Harze mit Methanol und verschiedenen anderen Eluenten (ges. NaCl + 0.5% TFA, 0.1 M H_2SO_4,
1 M H_2SO_4, 0.1 M HCl, 0.1 M TFA, 1 M TFA; siehe Tabelle 10). Dabei wurde festgestellt, dass **33** am besten an das Amberlite IR-120®-Material gebunden wurde, von diesem aber nicht vollständig wieder eluiert werden konnte. Als geeignetsten stellte sich die Verwendung von Amberlyst® heraus. An diesen Adsorber konnte die Vergleichssubstanz **33** zufriedenstellend gebunden und mit konz. NaCl-Lösung, die mit 0.5% TFA versetzt war, gut wieder freigesetzt werden. Durch Nachspülen mit Methanol ließ sich, die Modellsubstanz zu 95% wiederzugewinnen.

Tabelle 11. Elutionsstärke der verschiedenen Lösungsmittel an den unterschiedlichen Adsorbern.

		Amberlyst®	Amberlite IR 120®	Sephadex C-25®
	Vorspülen mit MeOH	-	-	++
1. × Spülen	ges. NaCl + 0.5% TFA	++	++	++
	0.1 M H_2SO_4	-	-	++
	1 M H_2SO_4	++	±	++
	0.1 M HCl	++	++	++
	0.1 M TFA	±	-	++
	1 M TFA	+	+	++
2. × Spülen	ges. NaCl + 0.5% TFA	++	++	-
	0.1 M H_2SO_4	-	-	-
	1 M H_2SO_4	±	-	-
	0.1 M HCl	++	±	-
	0.1 M TFA	-	-	-
	1 M TFA	±	-	-
3. × Spülen	ges. NaCl + 0.5% TFA	-	-	-
	0.1 M H_2SO_4	-	-	-
	1 M H_2SO_4	-	-	-
	0.1 M HCl	±	-	-
	0.1 M TFA	-	-	-
	1 M TFA	-	-	-
	Nachspülen mit MeOH	++	++	-

- = keine Elution; ± = schwache Elution;
+ = mittel-starke Elution; ++ = starke Elution

Analog zu dieser ersten Untersuchung des Bindungs- und Elutionsverhaltens von *N*,*C*-gekuppelten Alkaloiden wurde ein weiterer Vorversuch mit dem Amberlyst®-Material durchgeführt. Hierbei sollte das Verhalten von isoliertem Anistrocladinium A (**30**) gegenüber dem Ionenaustauscher untersucht werden. Dazu füllte man eine kleine Säule (∅ ca. 1.2 cm; Füllhöhe 1.5 cm) mit dem Adsorberharz und wusch dieses so lange mit Methanol, bis die Waschflüssigkeit farblos blieb. Im Anschluss wurde die Säule erschöpfend mit Wasser gespült und 0.17 mg von Substanz **30** aufgegeben. Nach kurzer Einwirkzeit wurde die Säule mit je 10 mL Wasser und Methanol gespült, wobei – wie erwartet – keine Elution von

Ancistrocladinium A (**30**) zu beobachten war. Als nächstes wurde Ancistrocladinium A (**30**) mit 2 × 5 mL konz. NaCl-Lösung + 0.5% TFA von der Ionenaustauschersäule gelöst und durch Nachspülen mit 10 mL Methanol vollständig von der Säule gewaschen. Die vereinigten Substanz enthaltenen Fraktionen wurden mit wenig Wasser versetzt und gegen Dichlormethan ausgeschüttelt. In der zur Trockene eingeengten Dichlormethan-Phase konnte fast die komplette eingesetzte Menge von **30** mittels HPLC nachgewiesen werden (Ausbeute ~95%).

Nachdem nun bewiesen war, dass man authentische *N*,C-gekuppelte Naphthylisochinolin-Alkaloide an das Säulenmaterial binden und hinterher wieder vollständig eluieren konnte, wurde ein erster Versuch mit einem Astextrakt von *A. cochinchinensis* zur Anreicherung der Alkaloide **30** und **31** unternommen. Dazu wurde der Extrakt auf eine etwas größere Ionenaustauscher-Säule (∅ 3 cm; Füllhöhe 10 cm) aufgegeben und mit entsprechend höheren Lösungsmittelmengen dem oben beschriebenen Prozedere unterworfen. In der so gewonnenen Dichlormethan-Fraktion befanden sich allerdings nun sämtliche im Extrakt vorkommende Naphthylisochinoline – und nicht nur die *N*,C-gekuppelten Vertreter.

2.4.2 Vorfraktionierung mittels FCPC

Da für die Isolierung von Ancistrocladinium A (**30**) und 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) bisher noch kein Lösungsmittelsystem etabliert war, musste zunächst ein geeignetes System gefunden werden. Dafür wurden 100 µL Astextrakt von *A. cochinchinensis* in verschiedenen zweiphasigen Lösungsmittelgemischen (1 mL pro Phase) verteilt (siehe Tabelle 11). Die Konzentration der einzelnen Substanzen in den beiden verschiedenen Phasen bestimmte man anschließend per HPLC, um den Verteilungskoeffizienten zu berechnen.

Tabelle 12. Verteilungskoeffizienten K der Peaks A-H in verschiedenen Lösungsmittelsystemen für die FCPC.

Lösungsmittel-system	stat. Phase	K von Peak A	K von Peak B	K von Peak C	K von Peak D	K von Peak E	K von Peak F	K von Peak G	K von Peak H
$CHCl_3$:EA:MeOH:H_2O	Org.	0.72	4.20	2.14	0.25	0.94	0.73	1.07	1.04
5:3:5:3	H_2O	1.39	0.24	0.47	4.07	1.06	1.36	0.93	0.96
CH_2Cl_2:EA:MeOH:H_2O	Org.	0.35	0.14	0.44	1.80	0.64	0.94	1.41	0.89
6:4:6:4	H_2O	2.88	6.84	2.27	0.56	1.56	1.06	0.88	1.21
CH_2Cl_2:EA:MeOH:H_2O	Org.	0.25	0.08	0.16	1.37	0.46	0.34	0.32	0.28
4:6:4:6	H_2O	3.98	12.55	6.35	0.73	2.16	2.95	3.12	3.56
CH_2Cl_2:EA:MeOH:H_2O	Org.	0.25	0.06	0.19	1.37	0.54	0.49	0.54	0.42
5:5:5:5	H_2O	3.99	15.57	5.18	0.73	1.85	2.06	1.84	2.39

CH_2Cl_2:EA:MeOH:H_2O	Org.	0.80	0.70	0.98	1.03	0.94	1.31	1.27	0.96
8:2:8:2	H_2O	1.26	1.43	1.02	0.97	1.06	0.76	0.79	1.04
CH_2Cl_2:EA:MeOH:H_2O	Org.	9.40	19.40	4.20	6.29	1.49	3.17	9.13	-
2:8:2:8	H_2O	0.11	0.05	0.24	0.16	0.67	0.32	0.11	-
n-Hexan:EA:MeOH:H_2O	Org.	2.48	1.67	0.94	0.86	0.55	0.63	0.43	0.42
8:2:8:2	H_2O	0.40	0.60	1.06	1.16	1.81	1.58	2.31	2.39
n-Hexan:EA:MeOH:H_2O	Org.	0.38	0.03	0.11	0.23	0.17	-	-	-
2:8:2:8	H_2O	2.66	31.14	8.99	4.39	5.81	-	-	-
n-Heptan:EA:MeOH:H_2O	Org.	0.14	0.02	0.06	0.08	-	-	-	-
2:8:2:8	H_2O	7.10	61.97	16.19	12.41	-	-	-	-
$CHCl_3$:ACN:MeOH:H_2O	Org.	2.50	2.10	4.22	4.12	7.23	8.75	11.19	-
5:3:5:3	H_2O	0.40	0.48	0.24	0.24	0.14	0.11	0.09	-
$CHCl_3$:ACN:MeOH:H_2O	Org.	3.17	2.45	4.60	4.13	8.89	7.33	9.94	-
6:4:6:4	H_2O	0.32	0.41	0.22	0.24	0.11	0.14	0.10	-
$CHCl_3$:ACN:MeOH:H_2O	Org.	1.13	1.28	1.33	1.25	1.32	1.22	1.25	1.37
4:6:4:6	H_2O	0.89	0.78	0.75	0.80	0.76	0.82	0.80	0.73
$CHCl_2$:ACN:MeOH:H_2O	Org.	0.46	0.44	0.30	0.29	0.21	0.17	0.16	0.15
6:4:6:4	H_2O	2.16	2.28	3.36	3.40	4.74	5.80	6.41	6.49
$CHCl_2$:ACN:MeOH:H_2O	Org.	0.58	0.63	0.45	0.46	0.34	0.29	0.23	0.29
4:6:4:6	H_2O	1.72	1.59	2.21	2.17	2.92	3.46	4.28	3.39
n-Heptan:ACN:MeOH:H_2O	Org.	2.24	2.95	2.42	2.33	2.54	2.50	2.55	2.43
2:8:2:8	H_2O	0.45	0.34	0.41	0.43	0.39	0.40	0.39	0.41
$CHCl_3$:EA:*i*-Prop:H_2O	Org.	0.31	0.79	0.51	0.39	0.55	0.40	0.43	0.75
5:3:5:3	H_2O	3.21	1.27	1.95	2.56	1.80	2.52	2.31	1.32
$CHCl_3$:EA:*i*-Prop:H_2O	Org.	0.28	1.18	0.57	0.10	0.38	0.24	0.38	0.84
6:4:6:4	H_2O	3.51	0.85	1.75	9.95	2.64	4.14	2.62	1.19
$CHCl_3$:EA:*i*-Prop:H_2O	Org.	0.54	0.79	0.58	0.18	0.43	0.31	0.46	0.30
4:6:4:6	H_2O	1.86	1.27	1.74	5.42	2.30	3.17	2.16	3.37
$CHCl_3$:EA:*i*-Prop:H_2O	Org.	1.15	2.05	1.59	0.65	1.21	1.19	1.67	1.56
2:8:2:8	H_2O	0.87	0.49	0.63	1.53	0.83	0.84	0.60	0.64
$CHCl_2$:EA:*i*-Prop:H_2O	Org.	1.98	2.91	1.62	0.67	1.43	1.09	1.69	1.36
6:4:6:4	H_2O	0.50	0.34	0.62	1.50	0.70	0.92	0.59	0.73
$CHCl_2$:EA:*i*-Prop:H_2O	Org.	0.78	0.46	0.85	0.46	0.77	0.49	0.87	0.43
4:6:4:6	H_2O	1.28	2.18	1.18	2.16	1.30	2.05	1.15	2.32
n-Hexan:EA:*i*-Prop:H_2O	Org.	5.87	8.74	6.68	3.42	5.91	5.73	9.04	10.71
6:4:6:4	H_2O	0.17	0.11	0.15	0.29	0.17	0.17	0.11	0.09
n-Hexan:EA:*i*-Prop:H_2O	Org.	1.81	1.84	1.85	1.83	1.89	2.14	1.71	1.62
4:6:4:6	H_2O	0.55	0.54	0.54	0.55	0.53	0.47	0.58	0.62
Heptan:EA:*i*-Prop:H_2O	Org.	0.12	0.04	0.00	0.65	0.11	-	-	-
2:8:2:8	H_2O	8.60	26.58	215.96	1.55	8.97	-	-	-

$CHCl_3$ = Chloroform; EA = Ethylacetat; MeOH = Methanol; *i*-Prop = Isopropanol; ACN = Acetonitril; Org. = Organische Phase; H_2O = wässrige Phase

Nach bereits beschriebener Methode wurden ca. 80 g des Astmaterials von *Ancistrocladus cochinchinensis* mit Methanol extrahiert und der erhaltene Rohextrakt einem FCPC-Trennlauf unterworfen, bei dem das grau hinterlegte Lösungsmittelsystem eingesetzt wurde. Wie erwartet, konnten so einige Fraktionen erhalten werden, die nur Ancistrocladinium A (**30**) und 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) enthielten.

Mit einem 10 Minuten langen isokratischen Gradienten (50% Acetonitril + 0.05% TFA, 50% Wasser + 0.05% TFA; Flußrate:12 mL) wurden die beiden Alkaloide **30** und **31** in der erforderlichen Menge mittels präparativen HPLC (SymmetryPrep®-C_{18}-Säule; 19 × 300 mm, 7 µm; *Waters*) isoliert. Für die *In-vivo*-Bioaktivitätstest im Schweizerischen Tropeninstitut in Basel benötigte man je 60 mg der Substanzen **30** und **31**. Desweiteren wurden 30 mg von **30** für weiterführende antileishmaniale Tests im Rahmen des *SFBs 630* gefordert.

2.5 Analyse des natürlichen Gegenions der *N,C*-gekuppelten Alkaloide

2.5.1 HPLC-oTOF-MS Untersuchung nach FCPC-Vorfraktionierung zur Bestimmung des Gegenions

Der Astextrakt von *Ancistrocladus cochinchinensis* wurde zunächst mittels eines FCPC-Laufs aufgetrennt. Durch den Einsatz des bereits etablierten FCPC-Trennsystems (siehe Kapitel 2.4.1) bestehend aus Chloroform/Ethylacetat/Methanol/Wasser (5:3:5:3) konnten einige saubere Fraktionen von Ancistrocladinium A (**30**) und 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) gewonnen werden. Nach Einengen der Fraktionen im Vakuum zur Trockene wurde der Rückstand in 1 mL Methanol wiederaufgenommen und einer HPLC-ESI-oTOF-MS-Messung unterworfen. Die analytische Trennung führte man dabei mit einer *Waters* Symmetry-C_{18}-Säule (4.6 × 250 mm; 5 µm) durch. Das Gradientensystem bestand aus Wasser (A) und Acetonitril (B), jeweils versetzt mit 0.05% Ameisensäure (FA), in folgender Zusammensetzung: 0 min 10% B, 30 min 70% B, 35 min 100% B, 40 min 100% B, 41 min 5% B und 46 min 5% B. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Der Time-of-Flight-Massendetektor wurde bei dieser Untersuchung im negativen Ionenmodus betrieben und mittels Natriumformiat-Clustern kalibriert.

Es konnte so keines der in der Literatur beschriebenen Gegenionen (hauptsächlich organische Pflanzensäuren wie Zitronen-, Wein-, Mecon-, Chelidon-, Chlorogen- oder Chinasäure) [72-74] identifiziert werden.

2.5.2 Analyse der Zellwand-gebundenen Substanzen in *A. cochinchinensis*

Frisches Blattmaterial von *Ancistrocladus cochinchinensis* war zunächst mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren, zerkleinert und anschließend getrocknet worden. Danach wurden 1.7 g Blattmaterial in 50% Methanol (25 mL) 15 min lang bei Raumtemperatur geschüttelt

und im Anschluss 15 min bei 4000 *g* zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde abdekantiert und der Rückstand nacheinander je 2 × mit 25 mL der folgenden Solventien gewaschen: Methanol, Wasser, 0.5% Natriumdodecylsulfat-Lösung, 1 M Natriumchlorid-Lösung, 1 M NaCl-Lösung + 0.5% Trifluoressigsäure, Wasser, Methanol, Aceton, *n*-Hexan und Ameisensäure. Dabei wurde wie oben beschrieben erst 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt und dann 15 min bei 4000 *g* zentrifugiert. Das daraus resultierende Zellwandmaterial tocknete man bei 40° C im Vakuum.

12.5 mg der gereinigten Zellwände gab man in verstärkte Schraubdeckelgläschen und versetzte diese unter Stickstoff mit 1.5 mL einer 1 M Natiumhydroxid-Lösung. Danach wurde für 24 h unter Lichtausschluss bei 80°C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde dann mit konzentrierter Salzsäure auf pH 3 acidifiziert und die wässrige Phase 3 × mit je 3 mL Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei 40°C unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt.[75]

Die Rückstände wurden dann in 1 mL Methanol gelöst und mittels analytischer HPLC (Gradientensystem und Säule siehe Kapitel 2.5.1) untersucht. Als Detektor fungierte ein oTOF-MS-Gerät, das im positiven wie auch im negativen Ionenmodus betrieben wurde.

Dabei konnten die *N*,*C*-gekuppelten Alkaloide Ancistrocladinium A (**30**) und 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) – deutlich gegenüber den *C*,*C*-gekuppelten Naphthylisochinolinen des Gesamtextraktes angereichert – nachgewiesen werden.

2.6 Biologische Aktivität der *N*,*C*-gekuppelten Alkaloide 30 und 31

2.6.1 Untersuchung der isolierten Verbindungen auf Phytotoxizität

Anhand eines in der Literatur bekannten Phytotoxizitätstest[87,88] sollten die *N*,C-gekuppelten Naphthylisochinolin-Alkaloide auf eine eventuell vorhandene allelopathische Wirksamkeit untersucht werden.

Zunächst wurde dazu die physiologische Konzentration der Alkaloide **30** und **31** in einem Blattextrakt mittels HPLC bestimmt. Als internen Standard verwendete man dafür 2-Methoxy-4-methylbenzoesäure. *Lepidium sativum* (Gartenkresse) wurde als Test-organismus genutzt und je 20 Kressesamen auf einer Petrischale ausgebracht. Danach pipettierte man in jede Petrischale 10 mL der verschiedenen wässrigen Testlösungen. Beide Alkaloide wurden dazu in wenigen Tropfen Methanol gelöst und mit Wasser auf die

entsprechende Konzentration (0.05 mM, 0.07 mM, 0.1 mM, 0.7 mM, 1 mM) verdünnt. Anschließend inkubierte man die Kressesamen bei 20 °C fünf Tage lang. Nach dieser Zeit wurde die Keimungsrate bestimmt und das Keimlingswachstum vermessen.

3 Analyse von *"Ancistrocladus ikela"* – eine neue Art aus dem Kongo?

3.1 *"Ancistrocladus ikela"*

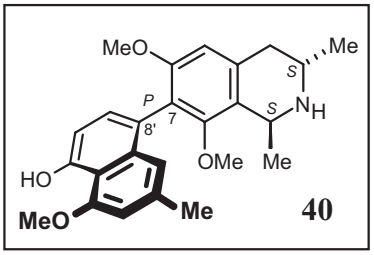
Die noch nicht vollständig botanisch charakterisierte kongolesische *Ancistrocladus*-Art mit dem Arbeitsnamen *"Ancistrocladus ikela"* wurde von Prof. V. Mudogo[90] und B. Loleko im November 2003 in der Sumpfregion des Regenwaldes Yeteto in der Nähe der Stadt Ikela gesammelt. Ein Exemplar dieser Pflanze wurde im Herbarium Bingmann unter der Nummer 62 dokumentiert. Neben getrocknetem Pflanzenmaterial konnte auch von einer früheren Sammelreise bereits eine lebende Pflanze (00-70-B-10) im Botanischen Garten Würzburg angezogen werden, die sehr wahrscheinlich ebenfalls dieser neuen Art angehört. Zur Zeit noch laufende ITS-Sequenzanalysen[93,94] im Arbeitskreis von Prof. Heubl sollen dies noch zweifelsfrei beweisen.

3.2 Isolierung und Charakterisierung von 8-Methylancistrogriffin C (40)

15 g frisches Blattmaterial (00-70-B-10) aus dem Botanischen Garten wurde umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert. Anschließend zerkleinerte man die gefriergetrockneten Blätter und extrahierte sie für 24 Std mit Methanol. Der nach Filtration und Lösungsmittelreduktion erhaltene Rückstand (1.01 g) wurde in wenig Methanol aufgenommen und man reinigte diesen mittels oben beschriebener Methode (Kapitel 2.4.2) an einem Kationenaustauscher-Harz auf. Die gereinigte Alkaloid-Fraktion wurde im Anschluss in Methanol gelöst und durch einen 0.2-µm-PTFE-Spritzenvorsatzfilter in 200-µL-Injektionen in die präparative HPLC injiziert. Unter Verwendung einer *Waters*-SymmetryPrep®-C_{18}-Säule (19 × 300 mm, 7 µm) und des folgenden Gradientensystems wurde Substanz **40** (R_t = 6.2 min) in noch nicht sauberer Form und Verbindung **39** (R_t = 12.5 min, 12.3 mg) gewonnen: Eluenten = Wasser + 0.05% TFA (A) und Acetonitril + 0.05% TFA (B); Gradient: 0 min 45% B, 15 min 55% B, 16 min 100% B, 18 min 100% B, 19 min 45% B, 24 min 45% B; Flußrate 12 mL/min. Anschließend wurde das Alkaloid **40** noch mittels präparativer HPLC

an einem basenstabilen Säulenmaterial (XTerra®RP$_{18}$; 19 × 300 mm, 7 µm) und durch Benutzung eines basischen Fließmittelsystems bestehend aus Wasser (A) und Acetonitril (B), jeweils versetzt mit 8 mM Ammoniak-Lösung (25%), aufgereinigt. Mit Hilfe des folgenden Gradientensystems konnten 3.98 mg von **40** isoliert werden: 0 min 60% A, 36 min 0% A; Flussrate 12 mL/min.

3.2.1 8-Methylancistrogriffin C (40)



Gelblicher amorpher Feststoff (3.98 mg).

Schmp. 171 °C (Nach Umkristallisierung aus MeOH).

$[\alpha]_D^{20}$ = +14.6 (c = 0.23; MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} = 203 (0.99), 227 (1.00), 307 (0.21).

CD (MeOH): Δε = 197 (-10.2), 204 (-5.9), 210 (-8.1), 231 (+22.6), 248 (+0.9), 261 (+2.5), 285 (-2.5).

Tabelle 13. NMR-Daten von 8-Methylancistrogriffin C (**40**) in MeOD; die Kopplungskonstanten J [Hz] stehen in Klammern; ^{1}H-NMR bei 600 MHz und ^{13}C-NMR bei 150 MHz.

	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR	HMBC (^3J-^5J)	ROESY/NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	50.0	4.76 *q*	3, 8, 9, 10, 1-Me	1-Me, 8-OMe	1-Me (6.3)
3	45.2	3.92 *m*	4, 1-Me	4_{ax}, 4_{eq}, 1-Me, 3-Me	4_{ax}, 4_{eq}, 3-Me
4_{ax}	35.0	2.92 *dd*	3, 5, 9, 10, 3-Me	3, 4_{eq}, 5, 3-Me	3 (10.8), 4_{eq} (17.2)
4_{eq}	35.0	3.26 *dd*	3, 5, 9, 10, 3-Me	3, 4_{ax}, 5, 3-Me	3 (4.6), 4_{ax} (17.2)
5	107.3	6.73 *s*	4, 7, 9	4_{ax}, 4_{eq}, 6-OMe	-
6	160.0	-	-	-	-
7	122.0	-	-	-	-
8	157.0	-	-	-	-
9	110.1	-	-	-	-
10	133.0	-	-	-	-
1'	119.7	6.72 *s*	3', 2'-Me, 8', 10'	2'-Me, 6-OMe	2'-Me
2'	137.0	-	-	-	-
3'	107.3	6.79 *s*	1', 2', 10'	2', 4'-OMe	-
4'	158.0	-	-	-	-
5'	156.0	-	-	-	-
6'	110.0	6.78 *d*	8', 10'	7'	7' (8.5)
7'	131.0	7.12 *d*	7, 5', 6', 8', 9'	6', 8-OMe	6' (8.5)
8'	122.2	-	-	-	-
9'	136.5	-	-	-	-
10'	114.0	-	-	-	-
1-Me	19.4	1.66 *d*	1, 9	1, 3, 8-OMe	1 (6.0)
2'-Me	22.2	2.31 *s*	1', 2', 3'	1', 3'	-

3-Me	19.2	1.53 *d*	3, 4	3, 4_{ax}, 4_{eq}	3 (6.9)
4'-OMe	56.8	4.09 *s*	4'	3'	-
6-OMe	56.3	3.63 *s*	6	5, 1'	-
8-OMe	61.0	3.14 *s*	8	1, 7', 1-Me	-

IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ = 3405 (br), 2942 (w), 2852 (w), 1673 (m), 1616 (m), 1589 (m), 1463 (s), 1433 (m), 1403 (m), 1358 (m), 1333 (w), 1259 (m), 1201 (m), 1131 (m), 1105 (m), 1045 (w), 1019 (w) cm^{-1}.

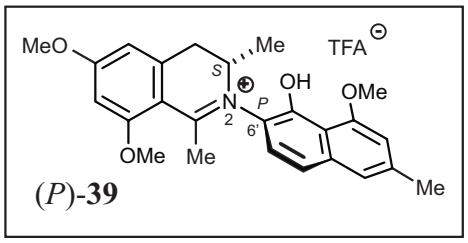
ESI-MS (pos. Ionenmodus): *m/z* 408.5 $[M+H]^+$.

HRESI-MS: *m/z* 407.2038 $[M]^+$ (*m/z* 407.2091 $[M]^+$ berechnet für $C_{25}H_{29}NO_4^+$).

3.3 HPLC-NMR und HPLC-CD Analyse von 39

Für die unterschiedlichen Analysen wie HPLC-NMR, HPLC-CD und die Bestimmung der Rotationsbarriere (siehe Kapitel 3.4) probierte man zunächst verschiedene Säulenmaterialien (C_{18}, C_8, XTerra) und verschiedene Eluenten (Acetonitril, Methanol, Wasser) bei unterschiedlichen pH-Werten aus. Die beste Trennung erhielt man an einer Symmetry®-C_{18}-Säule der Firma *Waters* (4.6 × 250 mm; 5 µm), die auf 10 °C heruntergekühlt wurde, unter isokratischen Bedingungen. Das Laufmittelgemisch bestand dabei aus 40% Wasser, wobei dem Wasser 10% Methanol zugesetzt wurden bzw. aus 60% Methanol, dem analog 10% Wasser untergemischt wurde. Beide Eluenten wurden mit 0.05% TFA angesäuert und die Flussrate betrug 0.8 mL/min. Die beiden Atropdiastereomere lagen bei diesem System Basislinien-getrennt vor bei Retentionszeiten von 16.2 min für (*P*)-**39** und 18.4 min für (*M*)-**39**. Mit Hilfe dieses Gradientensystems gelang es, in geringen Mengen, Ancistrocladinium B [(*P*)-**39**] und *N*-6'-*epi*-Ancistrocladinium B [(*M*)-**39**] in reiner Form darzustellen, u.a. für Drehwertmessungen. Bei den HPLC-NMR Messungen wurde das oben beschriebene Eluentensystem mit deuteriertem Wasser betrieben.

3.3.1 Ancistrocladinium B [(*P*)-39, Trifluoracetat]



Gelbes Öl (1.50 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ = -11.3 (*c* = 0.04; MeOH).

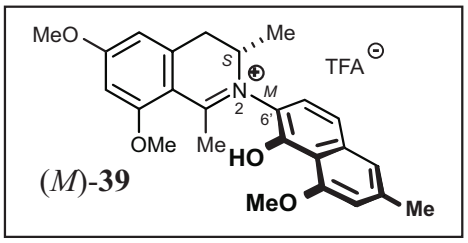
CD (MeOH-H_2O 60:40, v/v; bestimmt mittels LC-CD): Δε = 311 (-4.4), 238 (+2.3), 230 (-3.5), 214 (+6.4).

^{1}H-NMR (600 MHz, MeOH/D_2O, 60:40, v/v): δ = 1.11 (d, ^3J = 6.9 Hz, 3 H, CH_3-3), 2.47 (s, 3 H, CH_3-2'), 2.56 (s, 3 H, CH_3-1), 3.93 (s, 3 H, OCH_3-6), 3.95 (s, 3 H, OCH_3-8), 4.04 (s, 3 H, OCH_3-4'), 6.59 (s, 1 H, H-7), 6.62 (s, 1 H, H-5), 6.94 (s, 1 H, H-3'), 7.29 (s, 1 H, H-1'), 7.35 (d, 1 H, ^3J = 8.9 Hz, H-8'), 7.42 (d, 1 H, ^3J = 8.9 Hz, H-7') ppm.

Die Signale der diastereotopen Protonen an C-4 liegen offline gemessen zwischen δ = 3.1 und 3.7 ppm, waren in diesem Fall online jedoch nicht detektierbar, da genau in diesem Bereich das Methanolsignal durch das benutzte WET-Pulsprogramm[168] unterdrückt wurde. Außerdem konnte das Signal von H-3 bei 4.5 ppm nicht beobachtet werden, da dieses von dem breiten Restprotonensignal des D_2O überlagert wurde.

Die LC-NMR-Spektren stimmten gut mit den offline gemessenen Daten des Gemischs[22] überein. Außerdem waren die LC-CD Spektren identisch zu denen, die mit einem Gradienten gemessen wurden, der nicht zu einer vollständigen Trennung der beiden Atropdiastereomere führte.[97] Die vorher genannten Untersuchungen wurden von Dipl.-Pharm. S. Pedersen (offline-NMR des Gemisches)[97] während ihrer Diplomarbeit und Dipl.-Chem. Ta. Gulder (LC-CD mit nicht Basislinien-separierten Diastereomeren) durchgeführt.

3.3.2 *N*-6'-*epi*-Ancistrocladinium B [(*M*)-39, Trifluoracetat]



Gelbes Öl (1.8 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ = -4.5 (*c* = 0.04, MeOH).

CD (MeOH-H_2O 60:40, v/v; bestimmt mittels LC-CD): $\Delta\varepsilon$ = 322 (+3.6), 239 (-6.4), 228 (+5.2),
215 (-7.7).

^{1}H-NMR (600 MHz, MeOH/D_2O, 60:40, v/v): δ = 1.21 (d, ^3J = 6.9 Hz, 3 H, CH_3-3), 2.49 (s, 3 H, CH_3-2'), 2.52 (s, 3 H, CH_3-1), 3.98 (s, 3 H, OCH_3-6), 3.99 (s, 3 H, OCH_3-8), 4.05 (s, 3 H, OCH_3-4'), 6.63 (s, 1 H, H-7), 6.69 (s, 1 H, H-5), 6.96 (s, 1 H, H-3'), 7.25 (d, 1 H, ^3J = 8.9 Hz, H-8'), 7.33 (s, 1 H, H-1'), 7.42 (d, 1 H, ^3J = 8.9 Hz, H-7') ppm.

Wie bereits oben beschrieben wurden auch bei diesem Atropdiastereomer die Signale der diastereotopen Protonen an C-4 durch das genutzte WET-Pulsprogramm[168] zur Lösungsmittelunterdückung überlagert. Das Signal von H-3 bei 4.4 ppm konnte ebenfalls nicht detektiert werden, da das breite Restprotonensignal des D_2O in diesem Bereich zu Störungen führte.

Auch hier stimmten die offline[22] und online gemessenen NMR-Daten gut überein. Genauso waren die LC-CD Spektren sind identisch zu denen, die bei früheren Untersuchungen gemessen wurden.[97] Die genannten Untersuchungen wurden von Dipl.-Pharm. S. Pedersen (offline-NMR des Gemisches) während ihrer Diplomarbeit und Dipl.-Chem. T. Gulder (LC-CD mit nicht vollständig getrennten Diastereomeren) durchgeführt.

3.4 Untersuchung zur Rotationsbarriere von Ancistrocladinium B (39)

Das bei der Isolierung von 8-Methylgriffin C (**40**, siehe Kapitel 3.2) ebenfalls gewonnene Atrop-Diastereomerengemisch (Verhältnis 46:54) von **39** wurde mittels HPLC (für Gradient siehe Kapitel 3.3) auf Reinheit (> 99%) überprüft und für die Untersuchung der Rotationsbarriere genutzt.

Durch den Einsatz des neu entwickelten isokratischen Systems wurden aus diesem Material von **39** die beiden Atropdiastereomere von Ancistrocladinium B (**39**) isoliert. Während des Isolierungsprozesses bewahrte man die einzelnen Fraktionen bei -72°C auf und schüttelte diese im Anschluss zügig gegen Dichlormethan aus. Die Alkaloid-haltigen organischen Phasen wurden im Vakuum zur Tockene eingeengt. Direkt nach der Isolierung der beiden Isomere Ancistrocladinium B [(*P*)-**39**; Reinheit 98%] und *N*-6'-*epi*-Ancistrocladinium B [(*M*)-**39**; Reinheit 99%] wurden die einzelnen Messreihen zur Bestimmung der Rotationsbarriere durchgeführt.

Für die Messung der Rotationsbarriere wurden 1.5 mL der entsprechenden Alkaloid-Lösungen jeweils bei 55˚C, 65˚C, 75˚C oder 85˚C gerührt. Zu definierten Zeitpunkten entnahm man ein Probenvolumen von 50 µL, kühlte dieses ab und vermaß im Anschluss das Verhältnis *M*:*P* per HPLC mittels des oben beschriebenen Gradientensystems. Dazu wurden die Flächenverhältnisse der beiden chromatographisch getrennten Peaks in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt und die Ergebnisse in Zeit-Zusammensetzungs-Kurven aufgetragen.

Dabei wurde ein exponentieller Abfall der jeweiligen Konzentration beobachtet, was charakteristisch ist für eine reversible Reaktion 1. Ordnung. Deswegen wurden die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 durch die folgende Gleichung (Gl. 1) definiert:

$$(P)\text{ - }\mathbf{39} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} (M)\text{ - }\mathbf{39} \qquad \text{(Gl. 1)}$$

Für alle vier Temperaturen bestimmte man die Gleichsgewichtskonstante $K_{eq} = k_1/k_2 = [M_{eq}]/[P_{eq}]$ (siehe Tabelle 13), aus der man dann im Anschluss mittels Gleichung 2 die individuellen Umwandlungsraten – k_1 und k_2 – errechnete, hier exemplarisch für das (*P*)-Isomer aufgestellt.

$$\left(k_1 + k_2\right)t = \ln\left(\frac{\left[P_0\right]-\left[P_{eq}\right]}{\left[P(t)\right]-\left[P_{eq}\right]}\right) \qquad \text{(Gl. 2)}$$

$[P_0]$ korrespondiert dabei mit der Konzentration des (*P*)-Atropisomers von **35** zum Zeitpunkt 0, $[P(t)]$ mit der Konzentration zu einem beliebigen Zeitpunkt *t* und $[P_{eq}]$ mit der Konzentration nach Erreichen des Gleichgewichtszustands.

Tabelle 14. Ermittelte Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten für die Atropisomerisierung von (*P*)-**39** zu (*M*)-**39** bei vier verschiedenen Temperaturen.

	Temperatur (K)			
	328	338	348	358
[a] k_1	2.981×10^{-5}	7.775×10^{-5}	1.594×10^{-4}	3.588×10^{-4}
[a] k_2	2.752×10^{-5}	7.177×10^{-5}	1.414×10^{-4}	3.056×10^{-4}
K_{eq}	1.083	1.083	1.127	1.174

[a] *k* in 1/s

Die entsprechende Aktivierungsenergie ($\Delta G^{\neq}_1$ und $\Delta G^{\neq}_2$) wurde mit Hilfe der Eyring-Gleichung (Gl. 3) aus den Werten für k_1 und k_2 bei den vier verschiedenen Temperaturen (siehe Tabelle 13) berechnet.

$$\ln\left(k/T\right) = -\Delta H^{\neq}/RT + \ln\left(k_b/h\right) + \Delta S^{\neq}/R \qquad \text{(Gl. 3)}$$

In Gleichung 3 ist k die entsprechende Geschwindigkeitskonstante, T die absolute Temperatur, $\Delta H^{\neq}$ und $\Delta S^{\neq}$ die Aktivierungsenthalpie bzw. die Aktivierungsentropie, R die Gaskonstante, k_b die Boltzmann-Konstante und h das Plancksche Wirkungsquantum.[101] In Abbildung 54 ist der erhaltene Eyring-Plot graphisch dargestellt.

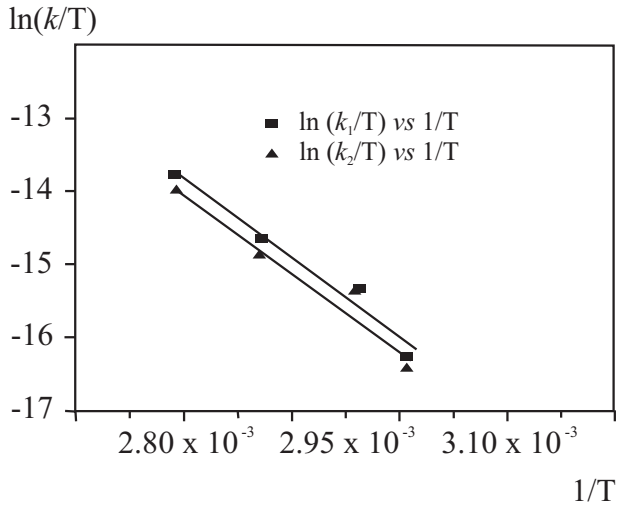


Abbildung 54. Eyring-Plot bei vier verschiedenen Temperaturen (55 ˚C, 65 ˚C, 75 ˚C und 85°C): Dargestellt sind die Ausgleichsgeraden für die Atropisomerisierungsreaktion von (*P*)-**39** zu (*M*)-**39** (■) und die für die Rückreaktion von (*M*)-**39** zu (*P*)-**39** (▲); die Steigung der Geraden entspricht ($-\Delta H^{\neq}/R$).

Bei 25˚C betrug die Gibbs-Aktivierungsenergie für die Isomerisierungsreaktion von (*P*)-**35** zu (*M*)-**35** $\Delta G^{\neq}_1$ = 105.7 kJ/mol, während für die Rückreaktion eine Rotationsbarriere von $\Delta G^{\neq}_2$ = 105.8 kJ/mol erhalten wurde.

3.5 Bestimmung der phytotoxischen Aktivität von 39

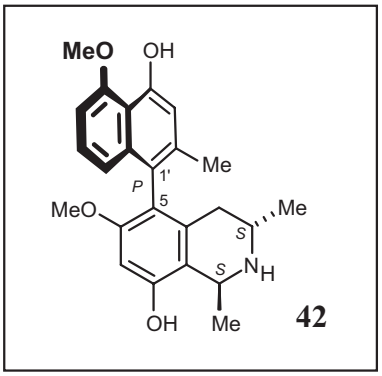
Zur Untersuchung der allelopathischen Aktivität von Ancistrocladinium B (**39**) wurde die bereits im Kapitel 2.6.1 beschriebende Methode verwendet.[87,88]

4 Isolierung eines Alkaloids aus Blättern von *A. heyneanus* Wall.

4.1 Extraktion und Isolierung von 42

Frisches Blattmaterial von *Ancistrocladus heyneanus* Wall. wurde gefriergetrocknet, anschließend zerkleinert und mit Methanol über Nacht mazeriert. Im Anschluss engte man den Extrakt auf ca. 10 mL ein und gab diesen auf eine Säule bestehend aus Amberlyst®-Ionenaustauscherharz. Nach oben (Kapitel 2.4.2) beschriebener Methode wurde die Alkaloidfraktion aufgereinigt und mittels HPLC-UV an einer Symmetry®-C_{18}-Säule (4.6 × 250 mm; 5 µm) der Firma *Waters* analysiert. Der dazu verwendete Gradient bestand aus Wasser + 0.05% TFA (A) und Acetonitril + 0.05% TFA (B) und lautete: 0 min 5% B, 30 min 70% B, 35 min 100% B; Flussrate 1 mL/min. Die präparative Gewinnung der Substanz **42** (R_t = 18.1 min, 6.75 mg) erfolgte mit einem identischen Gradienten an einer *Waters*-SymmetryPrep®-C_{18}-Säule (19 × 300 mm, 7 µm). Die Flussrate betrug hierbei 12 mL/min.

4.1.1 Charakterisierung von 6-*O*-Methyl-8,4'-*O*-didemethylancistrocladin (42)



Weißer Feststoff (6.75 mg).

Schmp. 256 °C (Nach Umkristallisierung aus MeOH).

$[\alpha]_D^{20}$ = -18.1 (c = 0.05; MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} = 200 (1.22), 219 (0.86), 227 (1.03), 303 (0.17), 315 (0.14), 319 (0.14).

CD (MeOH): Δε = 198 (+31.2), 218 (-24.9), 225 (-30.4), 243 (+14.1), 281 (-2.3).

Tabelle 15. NMR-Daten von 6-*O*-Methyl-8,4'-*O*-didemethylancistrocladin (**42**) in MeOD; die Kopplungskonstanten *J* [Hz] stehen in Klammern; die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben; ^{1}H-NMR bei 600 MHz und ^{13}C-NMR bei 150 MHz.

	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR	HMBC (^{3}J-^{5}J)	ROESY/NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	49.5	4.76 *q*	3, 9, 10, 1-Me	1-Me	1-Me (5.6)
3	44.9	3.63 *m*	1, 4, 3-Me	4_{ax}, 4_{eq}, 1-Me, 3-Me	4_{ax}, 4_{eq}, 3-Me
4_{ax}	33.1	2.14 *dd*	3, 9, 10, 3-Me	3, 4_{eq}, 3-Me	3 (12.0), 4_{eq} (20.0)
4_{eq}	33.1	2.26 *dd*	5, 9, 10	3, 4_{ax}, 3-Me, 8'	3 (6.7), 4_{ax} (20.0)
5	118.5	-	-	-	-
6	157.7	-	-	-	-
7	98.8	6.60 *s*	5, 6, 8, 9	6-OMe	-
8	157.1	-	-	-	-
9	114.4	-	-	-	-
10	133.0	-	-	-	-
1'	123.3	-	-	-	-
2'	138.8	-	-	-	-
3'	113.7	6.81 *s*	1', 2'-Me, 4', 10'	2'	-
4'	155.4	-	-	-	-
5'	158.1	-	-	-	-
6'	104.8	6.88 *d*	1', 5', 8', 10'	7', 5'-OMe	7' (8.6)
7'	127.5	7.21 *t*	5', 9'	6', 8'	6' (8.6), 8' (8.6)
8'	119.4	6.85 *d*	6', 9', 10'	4_{eq}, 3, 7'	7' (8.6)
9'	137.1	-	-	-	-
10'	115.2	-	-	-	-
1-Me	18.7	1.64 *d*	1, 9	1, 3	1 (5.6)
2'-Me	20.1	2.06 *s*	1', 2', 3'	3'	-
3-Me	19.2	1.21 *d*	3, 4	3, 4_{ax}, 4_{eq}	3 (5.6)
5'-OMe	56.8	4.08 *s*	5'	6'	-
6-OMe	56.1	3.92 *s*	6	7	-

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2935 (w), 2850 (w), 1688 (s), 1613 (s), 1443 (m), 1432 (m), 1397 (m), 1361 (m), 1208 (s), 1139 (s), 836 (m), 806 (m) cm^{-1}.

ESI-MS (pos. Ionenmodus): *m/z* 394.3 $[M+H]^+$.

HRESI-MS: *m/z* 393.1948 $[M]^+$ (*m/z* 393.1934 $[M]^+$ berechnet für $C_{24}H_{27}NO_4^+$).

5 Verbreitung der *N,C*-gekuppelten Alkaloide in der Gattung *Ancistrocladus*

5.1 Probenvorbereitung und HPLC-Gradienten für die Online-Analyse der *Ancistrocladus*-Extrakte

Frisches Pflanzenmaterial der verschiedenen *Ancistrocladus*-Arten aus dem Botanischen Garten wurde zunächst gefriergetrocknet. Kleine Portionen (ca. 20 g) der bereits vorher luftgetrockneten Pflanzenteile sowie des gefriergetrockneten Materials wurden im Anschluss im Mörser zerkleinert und 24 Std. lang mit ca. 250 mL Methanol auf einer Schüttelmaschine mazeriert. Danach filtrierte man die Pflanzenrückstände ab und engte den Überstand auf ca. 10 mL im Vakuum ein. Die so erhaltenen Rohextrakte wurden auf ein Ionenaustauscherharz aufgetragen und nach oben beschriebender Ionenaustauscher-Methode aufgearbeitet. Die gereinigten Alkaloidfraktionen löste man anschließend in 1 mL Methanol, filtrierte diese durch einen PTFE-Filter (0.22 µm) der Firma *Waters* in ein HPLC-Gläschen und spritzte jeweils 10 µL davon in die HPLC ein. Zur analytischen Auftrennung der verschiedenen Naphthylisochinoline wurden zwei unterschiedliche Gradientensysteme und Säulen genutzt. Zunächst wurden alle Extrakte mit einer monolithischen Säule (Chromolith®; *Waters*; 4.6 × 100 mm) vermessen. Die Eluenten waren in diesem Fall Wasser + 0.05% TFA und Acetonitril + 0.05% TFA in folgender Zusammensetzung: 0 min 10% B 3 mL/min, 0.5 min 10% B 5 mL/min, 5 min 50% B 5 mL/min, 9 min 100% B 5 mL/min, 9.5min 100% B 6 mL/min, 11.5 100% B 6 mL/min, 12 min 10% B 6 mL/min, 14.5 min 10% B 3 mL/min, 15 min 10% B 3 mL/min. Alle Extrakte, bei denen die einzelnen Peaks durch den Einsatz des Chromolithen® nicht adäquat voneinander getrennt wurden, vermaß man ein zweites Mal. Jedoch wurde dazu eine Symmetry®-C_{18}-Säule der Firma *Waters* (4.6 × 250 mm; 5 µm) eingesetzt. Dieses zweite Gradientensystem bestand aus Wasser + 0.05% TFA und Methanol + 0.05% TFA und war folgendermaßen zusammengesetzt: 0 min 20% B, 30 min 100% B, 31 min 100% B, 32 min 20% B, 35 min 20% B; Flussrate 0.7 mL/min.

5.2 In die Analyse einbezogene *Ancistrocladus*-Arten

In die Untersuchungen wurde neben fast allen anerkannten *Ancistrocladus*-Arten[40] auch einige nicht vollständig charakterisierte Arten – vor allem aus der DR Kongo[90] – eingeschlossen (siehe Tabelle 16). Wo verfügbar nutzte man neben bereits länger gelagertem,

luftgetrocknetem Material auch frische, gefriergetrocknete Pflanzenteile aus dem Botanischen Garten Würzburg, um Artefaktbildungen ausschließen zu können.

Tabelle 16. In die Analyse eingeschlossene *Ancistrocladus*-Arten.

Art	Luftgetrocknetes Material	Frisches Material
Ancistrocladus abbreviatus ssp. abbreviatus	Blätter, Äste, Stammrinde, Wurzelrinde	Blätter, Infloreszenzen
Ancistrocladus "bambange"	Blätter, Äste, Stammrinde, Wurzelrinde	Blätter, Infloreszenzen
Ancistrocladus barteri	Blätter, Äste, Astrinde, Stammrinde	Blätter
Ancistrocladus "bolonga"	Blätter, Stammrinde	-
Ancistrocladus congolensis[a]	Blätter, Äste, Astrinde, Stammrinde, Wurzelrinde, Infloreszenz	Blätter
Ancistrocladus ealaensis	Blätter, Äste, Stammrinde, Wurzelrinde	-
Ancistrocladus guineensis	Blätter, Äste	-
Ancistrocladus "ikela"	Blätter, Äste, Stammrinde	Blätter
Ancistrocladus "itafa"	Blätter, Äste, Stammrinde, Wurzelrinde	-
Ancistrocladus "leeke"	Blätter, Stammrinde, Wurzelrinde	-
Ancistrocladus likoko	Blätter, Stammrinde, Wurzelrinde	-
Ancistrocladus korupensis	-	Blätter, Äste
Ancistrocladus "nkele"	Blätter, Äste, Stammrinde, Wurzelrinde	-
Ancistrocladus robertsoniorum	Blatt, Wurzeln	-
Ancistrocladus tanzaniensis	Blätter, Stammrinde, Wurzelrinde	-
Ancistrocladus benomensis	Blätter	Blätter, Infloreszenzen
Ancistrocladus griffitii	Blätter, Äste	-
Ancistrocladus hamatus	Blätter, Stammrinde	-
Ancistrocladus heyneanus	Blätter, Äste, Frucht, Wurzelrinde	Blätter
Ancistrocladus tectorius[a]	Blätter, Äste	Blätter
Ancistrocladus tectorius ssp. cochinchinensis	Blätter, Astrinde	Blätter
Triphyophyllum peltatum	Blätter, Äste, Astrinde, Wurzeln, Wurzelrinde	Blätter

"Name" = botanisch nicht eindeutig charakterisierte Arten

[a] Material dieser Art wurde an mehreren verschiedenen Orten gesammelt.

6 Die Rolle des Phloems bei der Ausbreitung Pathogen-vermittelter Signale: Analyse von chemischen Signalen

6.1 Probenaufarbeitung der verschiedenen *A. thaliana*-Pflanzenteile

50 mg der verschiedenen gefriergetrockneten Pflanzenteile (Samen, Rosettenblätter, Infloreszenzen) wurden in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill fein gemahlen. Das erhaltene Pulver wurde in 5mL 80% Methanol aufgenommen, auf 5 Eppendorf-Caps aufgeteilt und 10 min lang im 70 °C warmen Wasserbad extrahiert. Die methanolischen Extrakte wurden in einer Microspin-12S-Zentrifuge der Firma *Sorvall* 10 min lang bei 6 °C mit 12 500 × *g* zentrifugiert. Die Überstände wurden daraufhin abgenommen und auf Eis gelagert, während die Rückstände erneut wie oben beschrieben extrahiert wurden. Alle erhaltenen Überstände wurden dann vereinigt und im Vakuum zur Trockene eingeengt.[34] Für die Analysen mittels HPLC-ESI-MS, CE-UV und CE-ESI-oTOF-MS wurden die extrahierten Rückstände in 1.5 mL Millipore-Wasser aufgenommen und durch einen PTFE-Spritzenvorsatzfilter filtriert. Für die CE-ESI-oTOF-MS-Messungen wurden vor der Filtration noch 10 ng/µL Sinigrin als interner Standard zugegeben.

Zur Überprüfung der Literaturangaben[115,118,144] wurde zu Beginn der Arbeiten die Desulfatierungsmethode der Literatur nachvollzogen: Zur Desulfatierung wurden die verschiedenen Pflanzenextrakte auf 0.1 g DEAE-Sephadex-A25, ein Anionenaustauscherharz, aufgetragen. Das Anionenaustauschermaterial quoll dazu über Nacht in 0.5 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.0) und wurde anschließend in eine kleine Pasteurpipette mit Glaswolle als Frittenersatz gefüllt. Danach wurden überschüssige Acetat-Ionen mit 5 × 2 mL Millipore-Wasser ausgewaschen. Nach Aufgabe der Proben wurden die Säulen erneut mit 5 × 2 mL Millipore-Wasser und mit 2 × 2 mL 0.02 M wässriger Essigssäure (pH 5) gespült. Für die Desulfatierungs-Reaktion wurden 2.5 mg *Helix-pomatia*-Sulfatase in 0.02 M wässriger Essigsäure gelöst und je 0.4 mL davon auf die Anionenaustauscher-Säulen aufgegeben. Nach einer Nacht Einwirkzeit wurden die entstandenen Desulfoglucosinolate mit 5 × 1 mL Millipore-Wasser eluiert und im Vakuum zur Trockene eingeengt. Für die Vermessungen der Desulfoglucosinolate wurde der erhaltenen Rückstand in 100 µL Millipore-Wasser wieder aufgenommen.[118,144,171,172] Die so aufgearbeiteten Proben wurden, wie in Kapitel 6.2 beschrieben, vermessen.

6.2 HPLC-ESI-MS (Ionenfalle)

Für die Trennung der Glucosinolate wurde eine Symmetry®-C_{18}-Säule (*Waters*; 4.6 × 250 mm; 5 µm) genutzt. Das Laufmittelsystem bestand aus Wasser (A) und Acetonitril (B) jeweils versetzt mit 0.05% Trifluoressigsäure (TFA) in folgender Zusammensetzung: 0 min 1.5% B; 12 min 5% B, 19 min 7% B, 29 min 21% B, 34 min 29% B, 44 min 57% B, 45 min 100% B, 49 min 100% B, 50 min 1.5% B, 55 min 1.5% B. Die Flussrate betrug 0.8 mL/min und die Peaks wurden, zusätzlich zur Massendetektion, bei einer Wellenlänge von 229 nm, mit einem UV-Detektor aufgezeichnet. Die ESI-Massenspektren wurden im negativen Ionenelektrospray-Modus detektiert. Die Kapillarspannung der Ionisationseinheit betrug dabei +4.3 kV und Stickstoff wurde als Zerstäuber- (50 psi) und als Trockengas (10 L/min, 250 °C) verwendet.[34]

Für die Vermessung der desulfatierten Glucosinolate wurde ein Eluentengemisch bestehend aus Wasser (A) und Acetonitril (B) ohne Zusätze genutzt und der Fluss betrug 1 mL/min. Der Gradient setzte sich folgendermaßen zusammen: 0 min 1.5% B; 6 min 5% B; 8 min 7% B; 17 min 21% B; 22 min 29% B; 36 min 57% B; 37 min 100% B; 40 min 100% B; 41 min 1.5% B und 46 min 1.5% B. Neben der Detektion im positiven Ionenmodus der Falle wurden die verschiedenen Peaks auch mittels UV bei einer Wellenlänge von 229 nm aufgezeichnet.[118]

6.3 CE-UV-Messungen vom Samenextrakt

Für die Entwicklung einer CE-Trennmethode wurde eine 60 cm lange Kapillare mit einer effektiven Länge von 51.5 cm genutzt. Als bestes Elektrolyt-System für die Messungen stellte sich ein 100 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 5.4) mit 30% (v/v) Acetonitril heraus. Der pH-Wert wurde mit Essigsäure eingestellt. Die Proben wurden per Druckinjektion (50 mbar für 0.17 min) auf die Kapillare aufgegeben und die UV-Spektren bei 225 nm aufgenommen. Die CE-UV-Messungen wurden bei 30 °C und +25 kV anliegender Spannung an der Kapillare durchgeführt.[34,127]

6.4 CE-ESI-oTOF-MS und MS/MS Untersuchungen an *A. thaliana*

Für die Optimierung einer Elektrospray-Ionisation-tauglichen CE-Trennmethode wurde eine 70 cm und für die Messungen eine 88 cm lange Kapillare genutzt. Bei allen Untersuchungen betrug die anliegende Kapillarspannung -25 kV. Die Ionenfalle (Esquire

3000plus; *Bruker Daltonik*) wurde mit einem ESI-Potential von +4.3 kV im Vollscan- (*m*/*z* 50-600) wie auch im datenabhängigen MS/MS-Modus bei negativer ESI-Detektion betrieben. Der oTOF-Detektor (micrOTOF; *Bruker Daltonik*) wurde mit einem ESI-Potential von +4.5 kV im Massenbereich von *m*/*z* 50-800 und einer Trigger-Zeit von 55 µs verwendet. Bei durchschnittlich 30 000 gemessenen Massenspektren war die Zeitauflösung auf 1.65 s festgesetzt. Bei beiden Geräten wurde ein Druck von 0.15 bar für das Zerstäubergas genutzt.

Für die weiterführenden MS/MS-Untersuchungen, wie auch für die Vermessung der Phloemexsudate und Blattextrakte wurde ein micrOTOF-Q-Massendetektor der Firma *Bruker Daltonik* eingesetzt. Sämtliche Einstellungen wie z.B. das ESI-Potential oder der Zerstäubergasdruck wurden hierbei analog zu den oben bereits genannten gewählt.

Die externe Kalibrierung erfolgte durch Vermessung von Natriumformiat-Clustern, deren Massen sich immer um 68 Da ($NaCHO_2$) unterschieden. Zur Erzeugung der Cluster wurde eine 5 mM Natriumhydroxidlösung [Wasser/Isopropanol (1:1, v/v)], die zusätzlich mit 0.2% Ameisensäure versetzt war, genutzt. Auf Grund der Kompensation des Temperatur-Effekts in den oTOF-Geräten (micrOTOF und micrOTOF-Q) war die externe Kalibrierung für die CE-Läufe ausreichend, auf eine interne Kalibrierung mittels Dual-Sprayer-Setup konnte verzichtet werden. Während der Optimierung der Sheath-Liquid-Zusammensetzung wurden dem Wasser/Isopropanol-Gemisch (1:1, v/v) unter anderem Ameisensäure, Essigsäure und Ammoniak zugesetzt.[34,133]

6.5 Infizierung, Phloemsaftexsudat-Sammlung und Probenvorbereitung

Die Infiltration und Phloemsaftgewinnung fand im Arbeitskreis von Prof. Hedrich durch T. Latz statt. Das Verfahren wird hier nur kurz zum besseren Verständnis zusammengefasst.[143] Zuerst infiltrierte man pro Probenreihe ca. 55 Blättern etwa drei Monate alter *Arabidopsis-thaliana*-Pflanzen, die bei kontrollierten Bedingungen im Phytotron gewachsen waren, entweder eine 10 mM $MgCl_2$-Lösung oder eine *Pseudomonas-syringae*-pv.-*tomato*-Lösung eines avirulenten bzw. eines virulenten Stammes vorsichtig in die Atemhöhlen der Blattunterseite. Die Konzentration der Bakteriensuspension wurde vor der Infiltration mittels Messung der Optischen Dichte mit einem Spektralphotometer bestimmt. Danach wurden die Pflanzen 5 Std. lang in einem belichteten Gehäuse, dessen Atmosphäre mittels einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung mit CO_2 und H_2O gesättigt worden war, stehen gelassen. Die infiltrierten Blätter wurden dann nahe der Blattachse abgeschnitten, in die Sammelvorrichtung (siehe auch Kapitel 3.4.1, Allgemeiner Teil) eingespannt und die

Schnittflächen sofort mit 100 mL 5 mM EDTA-Lösung gespült, um Verunreinigungen durch den Schneidevorgang auszuschließen und das Entstehen eines Wundpfropfens zu vermeiden. Als nächstes wurden die Blätter in 2 mL 5 mM EDTA-Lösung in der Sammelvorrichtung stehend wieder 1 ½ Std. lang in die mit Natriumhydrogencarbonat gesättigte Plexiglasbox zum bluten gestellt. Die Phloemsaftexsudate wurden im AK Hedrich hergestellt, bis zur weiteren Aufarbeitung bei -42 °C tiefgefroren und aufbewahrt.

Tabelle 17. Genaue Probendaten der Phloemexsudate.

Probe (Datum)	Pflanzen gesät am	Infiltriert mit	Frischgewicht der Blätter [g]	Anzahl der Blätter	Menge EDTA [mL][b]
I-1 $MgCl_2$ (09.01.07)	18.09.06	10 mM $MgCl_2$	4.23	57	3.0
I-1 vir (10.01.07)	18.09.06	virulent (OD[a] 0.208)	4.04	52	3.0
I-1 avir (11.01.07)	18.09.06	avirulent (OD[a] 0.201)	3.97	62	3.0
I-2 $MgCl_2$ (16.01.07)	16.10.06	10 mM $MgCl_2$	4.30	64	2.8
I-2 vir (17.01.07)	16.10.06	virulent (OD[a] 0.200)	4.20	60	3.0
I-2 avir (18.01.07)	16.10.06	avirulent (OD[a] 0.196)	4.01	58	3.0
I-3 $MgCl_2$ (23.01.07)	02.10.06	10 mM $MgCl_2$	4.60	59	2.8
I-3 vir (24.01.07)	02.10.06	virulent (OD[a] 0.208)	5.36	58	2.6
I-3 avir (25.01.07)	02.10.06	avirulent (OD[a] 0.205)	5.93	61	3.0
I-Test 1 (30.01.07)	30.10.06	Nicht infiltriert!	4.81	58	2.8
I-Test 2 (17.04.07)	05.02.07	Nicht infiltriert!	4.52	47	2.5
I-Test 3 (18.04.07)	05.02.07	Nicht infiltriert!	4.61	49	2.9
I-Test 4 (19.04.07)	28.02.07	Nicht infiltriert!	4.23	52	3.2
I-4 $MgCl_2$ (29.05.07)	12.03.07	10 mM $MgCl_2$	6.90	46	2.8
I-4 vir (13.06.07)	26.03.07	virulent (OD[a] 0.204)	6.87	45	2.6
I-4 avir (13.06.07)	26.03.07	avirulent (OD[a] 0.204)	6.20	42	3.2

[a] OD = Optische Dichte. [b] Angabe nur ungefähr, da mit 5-mL-Spritze gemessen.

Die erhaltenen Probenmengen wurden zur weiteren Aufarbeitung in mehrere Portionen eingeteilt. 100 µL der jeweiligen Probe wurden als Rückstell-Exemplar unbearbeitet wieder

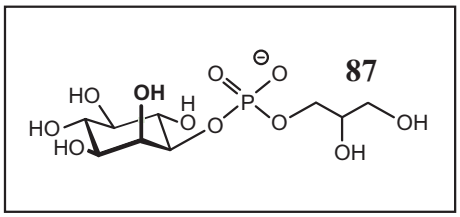
tiefgefroren und bei -42 °C gelagert. Der Rest wurde im Vakuum zur Trockene eingeengt und in 100 µL Standardlösung (wässrige Sinigrin-Lösung; 10 ng/µL Standard) für die CE-oTOF-MS-Messungen wieder aufgenommen.[133,146]

6.6 Vermessung von Blattextrakten, Infloreszensextrakten und Phloemsaft-Exsudaten mittels CE-ESI-oTOF-MS

Für die kapillarelektophoretische Vermessung der aufgearbeiteten Blatt- und Infloreszenz-Extrakte (siehe Kapitel 5.1, Experimenteller Teil) sowie der Phloemsaftproben (siehe Kapitel 5.5, Experimenteller Teil) wurde eine 75 cm lange Kapillare benutzt, deren Durchmesser 50 µm betrug. Die Proben wurden per Druckinjektion (25 mbar für 0.1 min) auf die Kapillare aufgegeben. Als Puffer wurde 0.5 M Ameisensäure und ein Isopropanol/Wasser-Gemisch (1:1, v/v) ohne Zusätze als Sheath-Liquid benutzt.[133,146]

6.6.1 1-Glycero-1-*myo*-inositolphosphat (87)

MS (HRMS-ESI): $C_9H_{18}O_4P^-$: berechnet = 333.0592; gefunden = 333.0605.



Prominente Fragmente:

$C_6H_{10}O_8P^-$: berechnet = 241.0119; gefunden = 241.0125.

$C_3H_8O_6P^-$: berechnet = 171.0064; gefunden = 171.0082.

$C_3H_6O_5P^-$: berechnet = 152.9958; gefunden = 152.9973.

7 Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus KC 1030 und AK 671

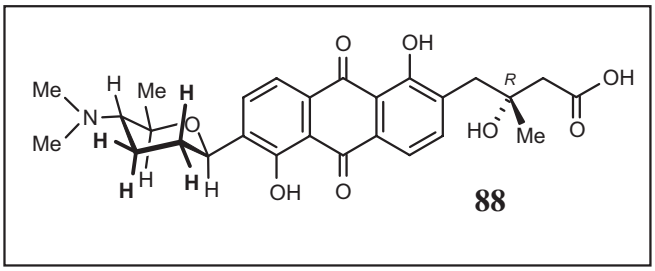
7.1 Isolierung der beiden polyketidischen Metabolite 1030-D (88) und 1030-G (89) aus dem Bakterienstamm KC-1030

Die Auftrennung der Substanzen 1030-D (**88**) und 1030-G (**89**) aus dem Kulturfiltrat des Stammes KC-1030 fand im Arbeitskreis von Prof. H.-P. Fiedler (Tübingen) statt. Dazu isolierte man sie zunächst durch Adsoprtion an Amberlite-XAD-16-Harz. Die Substanzen wurden danach mit 80% Methanol wieder vom XAD-Harz gewaschen und mit Butanol extrahiert. Anschließend wurde eine Auftrennung der einzelnen Komponenten durch Säulenchromatographie mittels Methanol an Sephadex LH-20 und Toyopearl HW-40F erreicht.

7.1.1 Spektroskopische Daten von 1030-D (88)

Oranger, amorpher Feststoff (7.7 mg).

Schmp.: 225 °C (MeOH); Lit.[173,174] Fridamycin A 243-248 °C (MeOH).



UV (MeOH): λ_{max} 212 (0.08), 230 (0.22), 245 (0.08), 258 (0.15), 291 (0.05), 308 (0.01), 425 (0.07).

Tabelle 18. NMR-Daten der Substanz 1030-D (**88**); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 20 °C); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 20 °C); die chemischen Verschiebungen sind in ppm und die Kopplungskonstanten *J* in Hz angegeben.

Position	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR	HMBC ($^{3}J - {}^{5}J$)	NOESY (in MeOD)	COSY
1	159.6	-	-	-	-
2	138.5	-	-	-	-
3	130.7	7.65 *d*	1, 4a, 11	4, 11	4 (7.8)
4	120.2	7.91 *d*	2, 9a, 10	3	3 (7.8)
4a	133.3	-	-	-	-
5	158.9	-	-	-	-
6	136.5	-	-	-	-
7	133.1	7.85 *d*	5, 8a, 1'	8, 1'	8 (8.1)
8	119.2	7.75 *d*	6, 9, 10a	7	7 (8.0)
8a	133.1	-	-	-	-

9	181.8	-	-	-	-
10	188.8	-	-	-	-
10a	115.7	-	-	-	-
11	40.1	3.54, *dd*	1, 3, 12, 12-Me, 13	3, 11, 12-Me	11 (16.8, 1.8)
12	90.1	-	-	-	-
13	45.2	2.91, *q*,	11, 12, 12-Me, 14	12-Me	-
14	172.1	-	-	-	-
1'	64.7	5.15, *dd*	5, 7	2', 3', 5'-Me	2' (11.3, 2.0)
2'	31.1	2.32, *dd*	-	1', 2', 3'	2', 3' (12.6, 2.1)
3'	20.9	2.21, *dd*	-	2', 3', 4'	2', 3', 4' (12.6, 2.1)
4'	65.0	3.42, m_c	3', 5', 5'-Me	5', 5'-Me	3', 5'
5'	69.1	4.71, m_c	1', 3', 5'-Me	2', 4'	4'
12-OH	-	4.55, *br*	-	-	-
12-Me	27.3	1.63, *s*	11, 12, 13	11, 13	-
5'-Me	12.9	1.55, *d*	4', 5'	1', 3', 5'	5' (6.5)
N-Me	42.1	2.78, *s*	N-Me, 4'	-	-
N-Me	42.1	2.78, *s*	N-Me, 4'	-	-

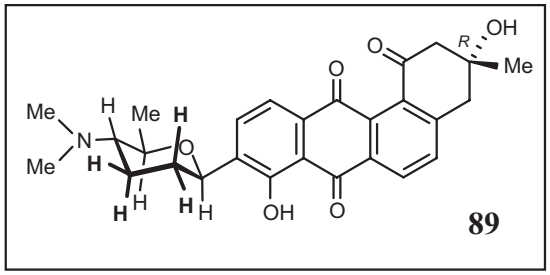
MS (ESI positiv): *m/z* = 480.6 $[M-H_2O]^+$.

MS (HRMS-ESI): $C_{27}H_{30}NO_7^+$ $[M-H_2O]^+$: berechnet = 480.2017; gefunden = 480.2057.

7.1.2 Spektroskopische Daten von Frigocyclinon (1030-G; 89)

Orange-brauner, amorpher Feststoff (4.2 mg).

UV (MeOH): λ_{max} 239 (0.17), 269 (0.45), 310 (0.03), 408 (0.08).



CD (MeOH): $\Delta\varepsilon$ = 355 (-0.2), 325 (+0.5), 269 (-21.1), 218(+5.0).

Tabelle 19. NMR-Daten von Frigocyclinon (**89**); ^{1}H-NMR (600 MHz, MeOD, 20 °C); ^{13}C-NMR (150 MHz, MeOD, 20 °C).

Position	^{13}C	^{1}H	HMBC ($^3J - {}^5J$)	NOESY (in MeOD)	COSY
1	199.6	-	-	-	-
2	54.3	3.10 *d*	1, 3, 4, 12, 12b	3-Me	2 (14.4)
3	73.1	-	-	-	-
4	44.8	3.25 *d*	2, 3, 4a, 5, 12, 12b	3-Me, 5	4 (17.0)
4a	150.4	-	-	-	-
5	135.6	7.68 *d*	1, 4, 4a, 6a, 12b	4, 6	6 (8.1)
6	130.3	8.33 *d*	4a, 7, 12, 12a	5	5 (8.0)
6a	134.5	-	-	-	-

7	189.1	-	-	-	-
7a	116.2	-	-	-	-
8	159.5	-	-	-	-
9	137.9	-	-	-	-
10	134.7	7.86 *d*	7a, 8, 11a, 12, 1'	11, 1', 2', 5'	11 (7.5)
11	119.9	7.61 *d*	7, 7a, 9, 12	10	10 (7.9)
11a	135.4	-	-	-	-
12	184.4	-	-	-	-
12a	137.2	-	-	-	-
12b	136.8	-	-	-	-
1'	65.6	5.15 *dd*	8, 10	10, 2', 3', 5'	2' (11.5, 2)
2'	32.1	2.37 *m*	1', 3', 4'	10, 1', 3'	1', 2', 3'
3'	21.6	2.30 *m*	1', 2'	2', 4'	2', 3', 4'
4'	65.7	3.47 *m*	2', 5'	3', 5'	3', 5'
5'	69.6	4.72 *m*	1', 3'	10, 1', 4'	4', 5'-Me
3-Me	29.9	1.45 *s*	1, 2, 3, 4, 4a	2, 4	-
5'-Me	12.1	1.51 *d*	4', 5'	5'	5'
N-Me	42.5	2.94 *s*	-	-	-
N-Me	42.5	2.94 *s*	-	-	-
3-OH	-	4.60 *br*	-	-	-

MS (ESI positiv): *m/z* = 464.5 $[M]^+$.

MS (HRMS-ESI): $C_{27}H_{30}NO_6^+$: berechnet = 464.2073; gefunden = 464.2052.

Die spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen aus der Literatur überein.[154]

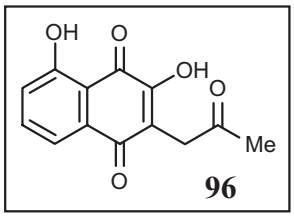
7.2 Isolierung der Inhaltstoffe des AK 671 (96-100)

Der Bakterienstamm AK 671 wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. M. Goodfellow aus einer Bodenprobe eines Kiefernwaldes bei Hamsterley Forest, Durham County, Großbritannien isoliert und zur Verfügung gestellt. Aus dem Kulturfiltrat des Actinomyceten-Stammes AK 671 wurden nach Fermentation weitere Substanzen (**96-100**) mittels verschiedener Aufarbeitungsmethoden isoliert. Zu den Aufarbeitungsschritten zählte u.a. die Adsorbtion der Metabolite an Amberlite XAD-16 Harz mit anschließernder methanolischer Elution, das Ausschütteln gegen verschiedene organische Lösungsmittel (z.B. Ethylacetat, *n*-Butanol) bei bestimmten pH-Werten, die Auftrennung der einzelnen Komponenten durch Säulenchromatographie mittels Methanol an Sephadex LH-20 oder Toyopearl HW-40F sowie präparative HPLC an RP_{18}-Phasen. Die Fermentation des Bakterienstammes und die Auftrennung der Inhaltsstoffe fand zum überwiegenden Teil im Arbeitskreis von Prof. H.-P.

Fiedler (Tübingen) statt.[175] Die Absolutkonfiguration der folgenden Substanzen wurde von Dipl.-Chem. T.A.M. Gulder in Zusammenarbeit mit Dr. T. Bruhn aufgeklärt.

7.2.1 Juglomycin F (AK 671-P; 96)

Gelb-brauner, amorpher Feststoff.



Schmp.: 145 °C (EtOAc); Lit.[164] 148 °C (CH_2Cl_2/PE).

UV (MeOH): λ_{max} = 209 (0.50), 227 (0.28), 246 (0.24), 262 (0.95), 290 (0.24), 319 (0.10), 409 (0.93) nm.

Tabelle 20. NMR-Daten von Juglomycin F (AK 671-P; **96**) in MeOD; die Kopplungskonstanten *J* [Hz] stehen in Klammern und die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben; ^{1}H-NMR bei 400 MHz und ^{13}C-NMR bei 100 MHz.

	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR	HMBC (^3J - ^5J)	COSY
1	187.1	-	-	-
2	118.9	-	-	-
3	163.3	-	-	-
4	216.1	-	-	-
4a	115.1	-	-	-
5	162.5	-	-	-
6	123.9	7.15 *dd* (1.1, 8.3)	4a, 5, 8	7
7	138.3	7.62 *t* (7.5)	5, 8a	6, 8
8	119.8	7.53 *dd* (1.1, 7.5)	1, 4a, 6	8
8a	135.0	-	-	-
9	39.4	3.67 *s*	1, 2, 3, 10	-
10	209.6	-	-	-
11	29.7	2.22 *s*	9, 10	-
3-OH	-	9.93[a]	-	-
5-OH	-	11.32[a]	-	-

[a] Verschiebungen gemessen in Aceton d-6

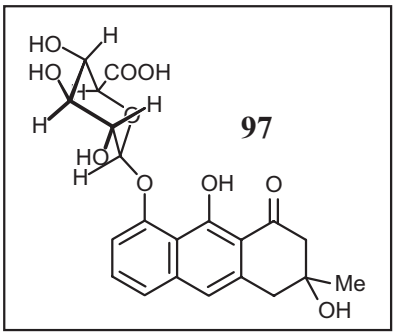
MS (ESI positiv): *m/z* = 248.2 $[M+2H]^+$.

EI-MS: *m/z* (%) 248.0 $[M+2H]^+$ (12), 247.0 $[M+H]^+$ (5), 206.0 $[M-C_2H_3O]^+$ (100).

HRESI-MS: *m/z* 248.1150 $[M+2H]^+$ (*m/z* 248.0679 $[M+2H]^+$ berechnet für $C_{13}H_{12}O_5$).

Die spektroskopischen Daten stimmten gut mit denen aus der Literatur überein.[164]

7.2.2 Prächrysophanol-8-*O*-β-D-glucuronid (AK 671-O; 97)



Orange-farbener, amorpher Feststoff.

Schmp. 158 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20}$ = - 19.3 (*c* = 0.04; MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} = 208 (3.98), 210 (3.82), 221 (3.82), 259 (3.01), 289 (2.67), 404 (2.14) nm.

CD (MeOH): $\Delta\varepsilon$ = 315 (-0.4), 280 (+0.3), 255 (-3.1), 245(-0.3), 220 (-2.7), 200 (+0.2).

Tabelle 21. NMR-Daten vom Prächrysophanol-8-*O*-β-D-glucuronid (AK 671-O; **97**) in MeOD; die Kopplungskonstanten *J* [Hz] stehen in Klammern und die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben; ^{1}H-NMR bei 400 MHz und ^{13}C-NMR bei 100 MHz.

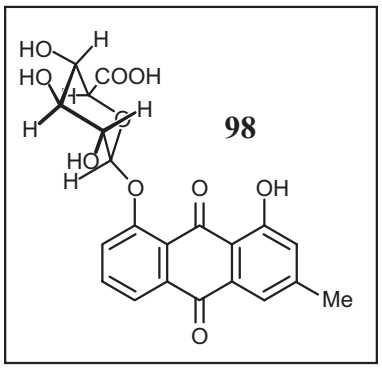
	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR	HMBC (^3J - ^5J)	NOESY	COSY
1	205.9	-	-	-	-
1a	112.8	-	-	-	-
2	52.9	2.81 *d*	1, 1a, 3, 4, 3-Me	4, 3-Me	15.9
2	52.9	2.88 *d*	1, 1a, 3, 4, 3-Me	4, 3-Me	16.1
3	71.4	-	-	-	-
4	44.2	3.14 *d*	1a, 2, 3, 4a, 10, 3-Me	2, 10, 3-Me	10 (17.2)
4	44.2	3.07 *d*	1a, 2, 3, 4a, 10, 3-Me	2, 10, 3-Me	10 (17.2)
4a	138.3	-	-	-	-
5	123.5	7.40 *d*	5a, 7, 8, 8a, 9, 10	6, 10	6 (7.6)
5a	141.6	-	-	-	-
6	132.2	7.51 *t*	5a, 7, 8, 8a	5, 7	5, 7 (8.0)
7	113.7	7.23 *d*	5, 8, 8a, 9	7, 1', 5'	6 (7.8)
8	158.6	-	-	-	-
8a	116.8	-	-	-	-
9	165.1	-	-	-	-
10	119.5	7.11 *s*	1, 1a, 4, 5a, 5, 8, 8a, 9	4, 5	4
1'	104.7	5.02 *d*	8, 2', 3'	7, 3', 4', 5'	2' (7.6)
2'	75.1	3.72 *t*	1', 3', 5'	3'	1', 3' (9.1)7.9
3'	77.0	3.56 *t*	1', 2', 4'	2', 5'	2', 4' (9.1)
4'	73.1	3.70 *t*	3', 5', 6'	1', 5'	3', 5' (9.9)
5'	77.1	4.03 *d*	1', 2', 4', 6'	3', 4'	4' (9.7)
6'	172.5	-	-	-	-
3-Me	22.1	1.40 *s*	2, 3, 4		-

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3420 (br), 2105 (w), 1643 (m), 1122 (m), 479 (s), 421 (s) cm^{-1}.

MS (ESI positiv): *m/z* = 435.2 $[M+H]^+$.

HRESI-MS: *m/z* 433.1159 $[M-H]^-$ (*m/z* 433.1140 $[M-H]^-$ berechnet für $C_{21}H_{21}O_{10}$).

7.2.3 Chrysophanol-8-*O*-β-D-glucuronid (AK 671-T; 98)



Gelber, amorpher Feststoff.

Schmp. 164 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20}$ = + 47.2 (*c* = 0.04; MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} = 218 (3.83), 253 (3.73), 280 (3.43), 400 (3.20) nm.

CD (MeOH): Δε = 320 (+0.2), 250 (-0.5), 198 (-2.8).

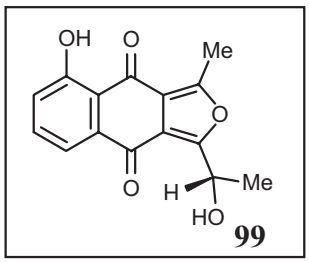
Tabelle 22. NMR-Daten vom Chrysophanol-8-*O*-β-D-glucuronid (AK 671-T; **98**) in MeOD; die Kopplungskonstanten *J* [Hz] stehen in Klammern und die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben; ^{1}H-NMR bei 400 MHz und ^{13}C-NMR bei 100 MHz.

	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR	HMBC (^3J - ^5J)	ROESY/NOESY	COSY
1	163.9	-	-	-	-
1a	115.5	-	-	-	-
2	125.5	7.12 *s*	1a, 3-Me, 4	3-Me	-
3	149.7	-	-	-	-
4	121.1	7.56 *s*	1a, 2, 10	3-Me	-
4a	134.1	-	-	-	-
5	123.3	8.00 *d*	6, 7, 8a, 10	6	6 (7.7)
5a	136.8	-	-	-	-
6	137.1	7.80 *t*	5, 5a, 8	5, 7	5 (7.7), 7 (8.3)
7	125.2	7.73 *d*	5, 6, 8, 8a	6	6 (8.3)
8	159.7	-	-	-	-
8a	123.3	-	-	-	-
9	212.8	-	-	-	-
10	183.8	-	-	-	-
1'	103.5	5.18 *d*	8, 3'		2' (7.6)
2'	74.7	3.75 *dd*	1', 3'		1' (7.6), 3' (9.1)
3'	77.2	3.58 *dd*	2', 4'		2' (9.1), 4' (8.9)
4'	73.1	3.69 *dd*	5', 6'		3' (8.9), 5' (9.7)
5'	76.9	4.05 *d*	1', 3', 4', 6'		4' (9.7)
6'	172.9	-	-	-	-
3-Me	22.2	2.44 *s*	2, 3, 4	2, 4	-

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3434 (br), 1642 (m), 1206 (w), 449 (s), 437 (s), 422 (s), 405 (s) cm^{-1}.

HRESI-MS: *m/z* 451.0640 $[M-2H+Na]^-$ (*m/z* 451.0641 $[M-2H+Na]^-$ berechnet für $C_{21}H_{16}O_{10}Na$).

7.2.4 Bhimamycin A (AK 671-I; 99)



Brauner, amorpher Feststoff.

$[\alpha]_D^{20}$ = + 49.3 ° (*c* = 0.45; $CHCl_3$); Lit.[165] +55.6 ° (*c* = 0.45; $CHCl_3$).

UV (MeOH): λ_{max} = 244 (4.45), 302 (3.62), 384 (4.02) nm.

Tabelle 23. NMR-Daten von Bhimamycin A (AK 671-I; **99**) in MeOD; die Kopplungskonstanten *J* [Hz] stehen in Klammern und die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben; ^{1}H-NMR bei 400 MHz und ^{13}C-NMR bei 100 MHz.

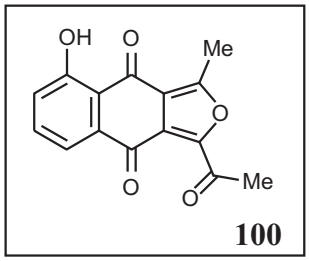
	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR	HMBC (^3J - ^5J)	COSY
1	160.3	-	-	-
3	163.0	-	-	-
3a	118.2	-	-	-
4	188.1	-	-	-
4a	119.2	-	-	-
5	164.5	-	-	-
6	125.2	7.25 *d*	4a, 8	7 (8.2, 1.4)
7	137.6	7.67 *d*	5, 8a	6, 8 (8.1)
8	120.2	7.74 *d*	4a, 6, 9	7 (7.8, 1.3)
8a	137.6	-	-	-
9	181.2	-	-	-
9a	117.8	-	-	-
10	63.4	5.47 *q*	10-Me	10-Me (6.7)
3-Me	13.9	2.75 *s*	1, 3a	-
10-Me	21.4	1.55 *d*	1, 10	10 (6.7)

MS (ESI positiv): *m/z* = 273.5 $[M+H]^+$.

HRESI-MS: *m/z* 273.0782 $[M+H]^+$ (*m/z* 273.0758 $[M+H]^+$ berechnet für $C_{15}H_{13}O_5$).

Die spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen aus der Literatur überein.[165]

7.2.5 Bhimamycin B (AK 671-S; 100)



Braun-oranger, amorpher Feststoff.

UV (MeOH): λ_{max} = 224 (4.35), 284 (3.82), 390 (3.94) nm.

Tabelle 24. NMR-Daten von Bhimamycin B (AK 671-S; **100**) in MeOD; die Kopplungskonstanten *J* [Hz] stehen in Klammern und die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben; ^{1}H-NMR bei 400 MHz und ^{13}C-NMR bei 100 MHz.

	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR	HMBC (^{3}J - ^{5}J)	COSY
1	161.9	-	-	-
3	148.9	-	-	-
3a	118.6	-	-	-
4	186.1	-	-	-
4a	116.9	-	-	-
5	162.9	-	-	-
6	124.6	7.32 *d*	4a, 8	7 (8.2, 1.4)
7	136.6	7.68 *d*	5, 8a	6, 8 (8.1)
8	120.2	7.84 *d*	4a, 6, 9	7 (7.8, 1.3)
8a	135.8	-	-	-
9	178.3	-	-	-
9a	123.2	-	-	-
10	187.4	-	-	-
3-Me	14.9	2.88 *s*	1, 3a	-
10-Me	29.4	2.86 *s*	1, 10	10

MS (ESI positiv): *m/z* = 271.4 $[M+H]^+$.

HRESI-MS: *m/z* 271.0634 $[M+H]^+$ (*m/z* 271.0601 $[M+H]^+$ berechnet für $C_{15}H_{11}O_5$).

Die spektroskopischen Daten stimmten gut mit denen aus der Literatur überein.[165]

LITERATUR UND ANMERKUNGEN

[1] D. J. Newman, G. M. Cragg, D. G. I. Kingston, *Natural Products As Pharmaceuticals And Sources For Lead Structures*, in *The Practice of Medicinal Chemistry* (Herausg.: C. G. Wermuth), Academic Press, Amsterdam, **2003**, S. 91-109.

[2] P. Nuhn, *Naturstoffchemie*, 3. Ausg., S. Hirzel Verlag, Stuttgart, **1997**.

[3] I. Mewis, J. G. Tokuhisa, J. C. Schultz, H. M. Appel, C. Ulrichs, J. Gershenzon, Gene expression and glucosinolate accumulation in *Arabidopsis thaliana* in response to generalist and specialist herbivores of different feeding guilds and the role of defense signaling pathways, *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2450-2462.

[4] D. Mebs, *Gifttiere*, 2. Ausg., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, **2000**, S. 70-74.

[5] D. H. Williams, M. J. Stone, P. R. Hauck, S. K. Rahman, Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?, *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 1189-1208.

[6] F. Chast, *A Brief History Of Drugs: From Plant Extracts To DNA Technology*, in *The Practice of Medicinal Chemistry* (Herausg.: C. G. Wermuth), Academic Press, Amsterdam, **2003**, S. 3-28.

[7] G. Weissmann, *Aspirin: alte und neue Erkenntnisse*, in *Pharmaforschung* (Herausg.: E. Singer), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1995**, S. 28-36.

[8] www. bayer.de, Quelle des Fotos der ersten Aspirinschachtel; Foto neue Verpackung I. Kajahn.

[9] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981 - 2002, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037.

[10] E. Mutschler, Neue Arzneimittel, *DAZ* **2006**, *12*.

[11] G. Bringmann, F. Pokorny, *The Naphthylisoquinoline Alkaloids*, in *The Alkaloids, Vol. 46* (Herausg.: G. A. Cordell), Academic Press, New York, **1995**, S. 127-271.

[12] G. Bringmann, D. Feineis, *The Naphthylisoquinoline Alkaloids*, in Vorbereitung.

[13] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Grüne, J. Schlauer, A new biosynthetic pathway to alkaloids in plants: acetogenic isoquinolines, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 1464-1466.

[14] G. Bringmann, D. Feineis, Stress-related polyketide metabolism of Dioncophyllaceae and Ancistrocladaceae, *J. Exp. Bot.* **2001**, *52*, 2015-2022.

[15] G. Bringmann, J. Mutanyatta-Comar, M. Greb, S. Rüdenauer, T. F. Noll, A. Irmer, Biosynthesis of naphthylisoquinoline alkaloids: synthesis and incorporation of an advanced $^{13}C_2$-labeled isoquinoline precursor, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1755-1761.

[16] L.-K. Yang, R. P. Glover, K. Yoganathan, J. P. Sarnaik, A. J. Godbole, D. D. Soejarto, A. D. Buss, M. S. Butler, Ancisheynine, a Novel Naphthylisoquinolinium Alkaloid from *Ancistrocladus heyneanus*, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5827-5829.

[17] G. François, G. Timperman, W. Eling, L. A. Assi, J. Holenz, G. Bringmann, Naphthylisoquinoline alkaloids against malaria: evaluation of the curative potentials of dioncophylline C and dioncopeltine A against *Plasmodium berghei* in vivo, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 2533-2539.

[18] G. Bringmann, M. Dreyer, J. H. Faber, P. W. Dalsgaard, D. Stærk, J. W. Jaroszewski, H. Ndangalasi, F. Mbago, R. Brun, M. Reichert, K. Maksimenka, S. B. Christensen, Ancistrotanzanine A, the first 5,3'-coupled naphthylisoquinoline alkaloid, and two further, 5,8'-linked related compounds from the newly described species *Ancistrocladus tanzaniensis*, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1159-1165.

[19] G. Bringmann, K. Messer, M. Wohlfarth, J. Kraus, K. Dumbuya, M. Rückert, HPLC-CD On-Line Coupling in Combination with HPLC-NMR and HPLC-MS/MS for the Determination of the Full Absolute Stereostructure of New Metabolites in Plant Extracts, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2678-2686.

[20] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Heubes, W. Saeb, S. Diem, M. Herderich, J. Schlauer, A Photometric Screening Method for Dimeric Naphthylisoquinoline Alkaloids and Complete On-Line Structural Elucidation of a Dimer in Crude Plant Extracts, by the LC-MS/LC-NMR/LC-CD Triad, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2571-2577.

[21] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, J. Schlauer, R. Brun, Extract screening by HPLC coupled to MS-MS, NMR, and CD: a dimeric and three monomeric naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus griffithii*, *Phytochemistry* **2002**, *61*, 195-204.

[22] G. Bringmann, I. Kajahn, M. Reichert, S. E. H. Pedersen, J. H. Faber, T. Gulder, R. Brun, S. B. Christensen, A. Ponte-Sucre, H. Moll, G. Heubl, V. Mudogo, Ancistrocladinium A and B, the First *N*,*C*-Coupled Naphthylisoquinoline Alkaloids, from a Congolese *Ancistrocladus* Species, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9348-9356.

[23] Abbildung nach http://sps.k12.ar.us./massengale/plant_structure_bi1.htm.

[24] J. G. Mayer, K. Goehl, *Kräuterbuch der Klostermedizin*, 1. Ausg., Reprint Verlag, Leipzig, **2003**.

[25] P. A. Cox, M. J. Balick, *Neue Medikamente durch ethnobotanische Forschung*, in *Pharmaforschung* (Herausg.: E. Singer), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1995**, S. 20-26.

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

[27] WHO, The world health report : The state of world health, **1996**.

[28] M. Schlitzer, Malaria Chemotherapeutics Part I: History of Antimalaria Drug Development, Currently Used Therapeutics, and Drugs in Clinical Development, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 944-986.

[29] S. Grabley, G. Pohnert, *Wirkstoffe aus der Natur - eine unendliche Geschichte*, in *Vorbild Natur* (Hersg.: G. Kreysa, S. Dieter), DECHEMA e.V., Frankfurt, **2007**, S. 9-13.

[30] G. Schwedt, *Analytische Chemie*, 1. Ausg., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**.

[31] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 6. Ausg., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2002**.

[32] S. Berger, S. Braun, *200 and more NMR experiments - a practical course*, 3. Ausg., Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.

[33] D. Moskau, C. Ritcher, H. Kovaks, M. Salzmann, L. Baselgia, M. Haeberli, D. Marek, O. Schett, Highest sensitivity for cutting-edge NMR applications: 600 MHz CryoProbes, *Spectra Analysis* **2003**, *32*, 39-41.

[34] G. Bringmann, I. Kajahn, C. Neusüß, M. Pelzing, S. Laug, M. Unger, U. Holzgrabe, Analysis of the glucosinolate pattern of *Arabidopsis thaliana* seeds by capillary zone electrophoresis coupled to electrospray ionization-mass spectrometry, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1513-1522.

[35] B. Bidlingmaier, K. K. Unger, N. von Doehren, Comparative study on the column performance of microparticulate 5-mm C_{18}-bonded and monolithic C_{18}-bonded reversed-phase columns in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **1999**, *832*, 11-16.

[36] P. Izquierdo, M. Roses, E. Bosch, Polarity parameters of the Symmetry C_{18} and Chromolith Performance RP-18 monolithic chromatographic columns, *J. Chromatogr. A* **2006**, *1107*, 96-103.

[37] H. U. Kuffner, The Ultraperformance liquid chromatography (UPLC), *Österr. Chem. Zeitschr.* **2004**, *105*, 4-7.

[38] T. Pfeiffer, Rapid isolation of substances from natural product extracts and reaction mixtures, *GIT Labor-Fachzeitschrift* **2004**, *48*, 1008-1010.

[39] www.kromaton.com.

[40] C. M. Taylor, R. E. Gereau, G. M. Walters, Revision of *Ancistrocladus* Wall. (Ancistrocladaceae), *Ann. Missouri. Bot. Gard.* **2005**, *92*, 360-399.

[41] H. Rischer, G. Heubl, H. Meimberg, M. Dreyer, H. A. Hadi, G. Bringmann, *Ancistrocladus benomensis* (Ancistrocladaceae): A new species from Peninsula Malaysia, *Blumea* **2005**, *50*, 357-365.

[42] N. H. Anh, A. Porzel, H. Rippberger, G. Bringmann, M. Schäffer, R. God, T. V. Sung, G. Adam, Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus cochinchinensis*, *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1287-1291.

[43] N. H. Anh, H. Rippberger, A. Porzel, T. V. Sung, G. Adam, Tetralones from *Ancistrocladus cochinchinensis*, *Phytochemistry* **1996**, *44*, 549-551.

[44] G. Bringmann, M. Dreyer, M. Michel, F. S. K. Tayman, R. Brun, Ancistroheynine B and two further 7,3'-coupled naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus heyneanus* Wall., *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2903-2907.

[45] G. Bringmann, M. Dreyer, H. Rischer, K. Wolf, H. A. Hadi, R. Brun, H. Meimberg, G. Heubl, Ancistrobenomine A, the First Naphthylisoquinoline Oxygenated at Me-3, and Related 5,1'-Coupled Alkaloids, from the "New" Plant Species *Ancistrocladus benomensis*, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2058-2062.

[46] Dr. Michael Dreyer danke ich für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials von *A.cochinchinensis*.

[47] M. Pelzing, C. Neusüß, M. Macht, Accurate Mass and TIP^{TM}: Two Dimensions for Elemental Composition Determination: mircoTOF^{TM} Featuring Unique TIP^{TM}, *Recent Appl. LC-MS* **2004**, *17*, 38-39.

[48] A. Montagnac, H. A. Hadi, F. Remy, M. Païs, Isoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus tectorius*, *Phytochemistry* **1995**, *39*, 701-704.

[49] G. Bringmann, J. Spuziak, J. H. Faber, T. Gulder, I. Kajahn, M. Dreyer, G. Heubl, R. Brun, V. Mudogo, Six naphthylisoquinoline alkaloids and a related benzopyranone from a Congolese *Ancistrocladus* species related to *Ancistrocladus congolensis*, *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1065-1075.

[50] G. Bringmann, R. God, M. Schäffer, An improved degradation procedure for determination of the absolute configuration in chiral isoquinoline and β-carboline derivatives, *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1393-1403.

[51] Ich danke Manuela Michel für die Durchführung des oxidativen Abbaus.

[52] T. Gulder, Neuartige Wirkstoffe gegen Infektionskrankheiten: *N*,*C*-gekuppelte Naphthylisochinolin-Alkaloide, (Würzburg), **2007**.

[53] Ich danke Michaela Schraut für die Durchführung des oxidativen Abbaus.

[54] G. Bringmann, J. Mühlbacher, M. Reichert, M. Dreyer, J. Kolz, A. Speicher, Stereochemistry of Isoplagiochin C, A Macrocyclic Bisbibenzyl from Liverworts, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9283-9290.

[55] F. Bracher, W. J. Eisenreich, J. Mühlbacher, M. Dreyer, G. Bringmann, Saludimerines A and B, Novel-Type Dimeric Alkaloids with Stereogenic Centers and Configurationally Semistable Biaryl Axes, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8602-8608.

[56] G. Bringmann, S. Busemann, *The quantum chemical calculation of CD spectra: the absolute configuration of chiral compounds from natural or synthetic origin*, in *Natural Products Analysis* (Hersg.: P. Schreier, M. Herderich, H. U. Humpf), Vieweg, Wiesbaden, **1998**, S. 195-211.

[57] J. J. P. Stewart, Optimization of parameters for semiempirical methods. I. Method, *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 209-264.

[58] A. D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.

[59] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.

[60] P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski, M. J. Frisch, Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623-11627.

[61] P. C. Hariharan, J. A. Pople, Influence of polarization functions on MO hydrogenation energies, *Theor. Chim. Acta* **1973**, *28*, 213-222.

[62] A. Schäfer, H. Horn, R. Ahlrichs, Fully optimized contracted Gaussian basis sets for atoms lithium to krypton, *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 2571-2577.

[63] A. Schäfer, C. Huber, R. Ahlrichs, Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr, *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 5829-5835.

[64] Dr. Matthias Reichert danke ich für die Berechnung der CD-Spektren.

[65] G. Bringmann, M. Xu, I. Kajahn, R. Brun, Two new *N*,8'-coupled naphtyldihydroisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus cochinchinensis Phythochem.* **2007**, in Vorbereitung.

[66] X.-G. Qin, Y.-J. Yuan, J.-C. Wu, Enhanced Extraction of Alkaloids from *Sophora alopecuroides* L. by Ion Exchange at Reduced Pressure, *J. Chem. Engin. Jap.* **2004**, *37*, 106-108.

[67] C. O. Björling, B. Willman-Johnson, The Elution of Alkaloids from SE-Sephadex, *Acta Chem. Scan.* **1963**, *17*, 2638-2643.

[68] T. Gulder, Untersuchungen zur Biosynthese acetogeniner Naturstoffe und Totalsynthese von Ancisheynin, dem ersten *N*,8'-gekuppelten Naphthylisochinolin-Alkaloid, Diplomarbeit (Würzburg), **2004**.

[69] Ich danke Dipl.-Chem. Ta. Gulder für die zur Verfügung gestellte Modellsubstanz *N*-Phenyl-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinolinium-Perchlorat (**33**).

[70] G. Lang, Isolierung und Charakterisierung neuer Naturstoffe aus Schwamm-assoziierten Mikroorganismen, Dissertation (Würzburg), **2004**.

[71] M. Dreyer, Isolierung, Charakterisierung und stereochemische Analyse von Naphthylisochinolin-Alkaloiden und anderen Naturstoffen, Dissertation (Würzburg), **2004**.

[72] M. Hesse, *Alkaloids*, 1. Ausg., **2002**.

[73] H. Wagner, *Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe*, 6. Ausg., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1999**, S. 251.

[74] Hänsel, Sticher, *Pharmakognosie, Phytopharmazie*, 1. Ausg., **2007**.

[75] J. Tan, P. Bednarek, J. Liu, B. Schneider, A. Svatos, K. Hahlbrock, Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 691-699.

[76] Persönliche Mitteilung von Ta. Gulder.

[77] J. Dostal, R. Marek, J. Slavik, E. Taborska, M. Potacek, V. Sklenar, Sanguinarine pseudobase: re-examination of NMR assignments using gradient-enhanced spectroscopy, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 869-872.

[78] Z. Dvorak, V. Simanek, Metabolism of Sanguinarine: The Facts and The Myths, *Curr. Drug Metab.* **2007**, *8*, 173-176.

[79] G. Bringmann, *From topical lianas to novel antiplasmodial agents: the naphthylisoquinoline alkaloids*, in *Guidelines and issue for the discovery and drug development against tropical diseases* (Hersg.: H. Vial, A. Fairlamb, R. Ridley), World Health Organisation, Genf, **2003**, S. 145-152.

[80] G. Bringmann, V. Hoerr, U. Holzgrabe, A. Stich, Antitrypanosomal naphthylisoquinoline alkaloids and related compounds, *Pharmazie* **2003**, *58*, 343-346.

[81] Y. F. Hallock, K. P. Manfredi, J.-R. Dai, J. H. Cardellina, II., R. J. Gulakowski, J. B. McMahon, M. Schäffer, M. Stahl, K.-P. Gulden, G. Bringmann, G. François, M. R. Boyd, Michellamines D-F, new HIV-inhibitory dimeric naphthylisoquinoline alkaloids, and korupensamine E, a new antimalarial monomer, from *Ancistrocladus korupensis*, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 677-683.

[82] G. François, G. Timperman, J. Holenz, L. A. Assi, T. Geuder, L. Maes, J. Dubois, M. Hanocq, G. Bringmann, Naphthylisoquinoline alkaloids exhibit strong growth-inhibiting activities against *Plasmodium falciparum* and *P. berghei* in vitro - structure-activity relationships of dioncophylline C, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1996**, *90*, 115-123.

[83] G. Bringmann, A. Hamm, C. Günther, M. Michel, R. Brun, V. Mudogo, Ancistroealaines A and B, Two New Bioactive Naphthylisoquinolines, and Related Naphthoic Acids from *Ancistrocladus ealaensis*, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1465-1470.

[84] A. Ponte-Sucre, J. H. Faber, T. Gulder, I. Kajahn, S. E. H. Pedersen, M. Schultheis, G. Bringmann, H. Moll, Activities of Naphthylisoquinoline Alkaloids and Synthetic Analogs against *Leishmania major*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 188-194.

[85] G. Bringmann, T. Gulder, F. Meyer, Total Synthesis of Ancistrocladinium A-D and Tetrahydroancistrocladinium A, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, in Vorbereitung.

[86] D. Schlee, *Ökologische Biochemie*, 1. Ausg., Springer Verlag, Berlin, **1986**.

[87] I. Czerniawska-Kusza, T. Ciesielczuk, G. Kusza, A. Cichon, Comparison of the Phythotoxkit Microbiotest and Chemical Variables for Toxicity Evaluation of Sediments, *Envirom. Toxicol.* **2006**, 367-372.

[88] W.-D. Jülich, R. Ohme, N. Alhitari, V. Adrian, T. von Woedtke, A. Kramer, Synthese, antimikrobielle Wirksamkeit und Verträglichkeit neuer Strukturen von Harnstoff, Wasserstoffperoxid und Tensiden, *Pharmazie* **1999**, *54*, 171-178.

[89] H. Rischer, Acetogenine Sekundärmetabolite und ihre Produzenten: Physiologie und Botanik ausgewählter Vertreter der Ancistrocladaceae, Dioncophyllaceae und Nepenthaceae sowie von *Antidesma* (Euphorbiaceae), Dissertation (Würzburg), **2002**.

[90] Prof. Dr. Virima Mudogo danke ich herzlich für den unermüdlichen Einsatz beim Pflanzenmaterial-Sammeln im kongolesischen Regenwald.

[91] J. Léonard, Ancistrocladaceae, *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* **1949**, *82*, 27-40.

[92] Persönliche Mitteilung von Prof. G. Heubl.

[93] G. Heubl, G. Bringmann, H. Meimberg, Molecular phylogeny and character evolution of carnivorous plant families in Caryophyllales – revisited, *Plant Biol.* **2006**, *8*, 821-830.

[94] H. Meimberg, P. Dittrich, G. Bringmann, J. Schlauer, G. Heubl, Molecular phylogeny of Caryophyllidae s.I. based on matK sequences with special emphasis on carnivorous taxa, *Plant Biol.* **2000**, *2*, 218-228.

[95] G. Bringmann, K. Messer, K. Wolf, J. Mühlbacher, M. Grüne, R. Brun, A. M. Louis, Dioncophylline E from *Dioncophyllum thollonii*, the first 7,3'-coupled dioncophyllaceous naphthylisoquinoline alkaloid, , *Phytochemistry* **2002**, *60*, 389-397.

[96] J. Mühlbacher, Molecular Modelling und Chiralität: Aufklärung der absoluten Konfiguration von Natur- und Wirkstoffen mit ungewöhnlichem Circular-Dichroismus, Dissertation (Würzburg), **2003**.

[97] S. E. H. Pedersen, Isolation of naphthylisoquinoline alkaloids from the leaves of "*Ancistrocladus ikela*" , Diplomarbeit (Würzburg/Kopenhagen), **2005**.

[98] G. Bringmann, F. Teltschik, M. Michel, S. Busemann, M. Rückert, R. Haller, S. Bär, A. Robertson, R. Kaminsky, Ancistrobertsonines B, C, and D as well as 1,2-didehydroancistrobertsonine D from *Ancistrocladus robertsoniorum*, *Phytochemistry* **1999**, *52*, 321-332.

[99] G. Bringmann, K.-P. Gulden, Y. F. Hallock, K. P. Manfredi, J. H. Cardellina, II., Circular dichroism of michellamines: independent assignment of axial chirality by calculated and experimental CD spectra, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7807-7813.

[100] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry*, Ausg., Oxford University Press, Oxford, **2001**, S.450.

[101] S. E. Boiadjiev, D. A. Lightner, Atropisomerism in monopyrroles, *Tetrahedron: Asymm.* **2002**, *13*, 1721-1732.

[102] Für die Berechnung der Rotationsbarriere danke ich Dr. M. Reichert.

[103] A. Ponte-Sucre, R. Vicik, M. Schultheis, T. Schirmeister, H. Moll, Aziridine-2,3-dicarboxylates: peptidomimetic cycsteine protease inhibitors with antileishmanial activity, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2439-2447.

[104] H. Meimberg, Molekular-Systematische Untersuchungen an den Familien Nepenthaceae und Ancistrocladaceae sowie verwandter Taxa aus der Unterklasse der Caryophyllidae s.l., Dissertation (München), **2002**.

[105] www.de.wikipedia.org.

[106] B. A. Halkier, *Glucosinolates*, in *Naturally Occurring Glycosides: Chemistry Distribution and Biological Properties* (Herausg.: R. Ikan), John Wiley & Sons, Chichester, **1999**, S. 193-223.

[107] J. W. Fahey, A. T. Zalcmann, P. Talalay, The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants, *Phytochemistry* **2001**, *56*, 5-51.

[108] B. A. Halkier, J. Gershenzon, Biology and biochemistry of glucosinolates, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 303-333.

[109] Bildquelle: www.arabidopsis.org.

[110] Bildquelle: I.Kajahn.

[111] L. Vlieger, P. M. Brakefield, C. Mueller, Effectiveness of the defence mechanism of the turnip sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera: Tenthredinidae), against predation by lizards, *Bull. Entomol. Res.* **2004**, *94*, 283-289.

[112] P. J. Thornalley, Isothiocyanates: mechanism of cancer chemopreventive action, *Anti-cancer Drugs* **2002**, *13*, 331-338.

[113] E. Lund, Non-nutritive bioactive constituents of plants: dietary sources and health benefits of glucosinolates, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2003**, *73*, 135-143.

[114] J. S. Keum, W. S. Jeong, A. N. T. Kong, Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2004**, *555*, 191-202.

[115] P. D. Brown, J. G. Tokuhisa, M. Reichelt, J. Gershenzon, Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*, *Phytochemistry* **2003**, *62*, 471-481.

[116] B. L. Petersen, S. Chen, C. H. Hansen, C. E. Olsen, B. A. Halkier, Composition and content of glucosinolates in developing *Arabidopsis thaliana*, *Planta* **2002**, *214*, 562-571.

[117] R. N. Bennett, F. A. Mellon, P. A. Kroon, Screening Crucifer Seeds as Sources of Specific Intact Glucosinolates Using Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 428-438.

[118] M. Reichelt, P. D. Brown, B. Schneider, N. J. Oldham, E. Stauber, J. G. Tokuhisa, D. J. Kliebenstein, T. Mitchell-Olds, J. Gershenzon, Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from *Arabidopsis thaliana*, *Phytochemistry* **2002**, *59*, 663-671.

[119] J. C. D'Auria, J. Gershenzon, The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2005**, *8*, 308-316.

[120] A. Karcher, Z. El Rassi, Capillary electrophoresis of glucosinolates and their degradation products, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3181-3189.

[121] X. Zhu, P. N. Shaw, J. Pritchard, J. Newbury, E. J. Hunt, D. A. Barrett, Amino acid analysis by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection: Application to nanolitre-volume biological samples from *Arabidopsis thaliana* and *Myzus persicae*, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 911-919.

[122] M. Otto, *Analytische Chemie*, 3. Ausg., Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.

[123] M. Unger, M. Dreyer, S. Specker, S. Laug, M. Pelzing, C. Neusüß, U. Holzgrabe, G. Bringmann, Analytical Characterisation of crude extracts from an African *Ancistrocladus* species using high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis coupled to ion trap mass spectrometry, *Phytochem. Anal.* **2004**, *15*, 21-26.

[124] T. Soga, M. Imaizumi, Capillary electrophoresis method for the analysis of inorganic anions, organic acids, amino acids, nucleotides, carbohydrates and other anionic compounds, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3418-3425.

[125] P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger, Capillary electrophoresis - mass spectrometry: 15 years of developments and applications, *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3837-3867.

[126] C. Neusüß, M. Pelzing, Capillary Electrophoresis-ESI-TOF MS: Combining separation efficiency with the mass accuracy of the microTOF^{TM}, *Bruker Appl. Notes* **2004**, *ET-05 - OTOF Series*, www.bdal.de.

[127] Stefanie Schmitt danke ich für die Messung der CE-UV-Spektren.

[128] K. Grob, P. Matile, Compartmentation of ascorbic acid in vacuoles of horseradish root cells. Note on vacuolar peroxidase, *Phytochemistry* **1980**, *19*, 1789-1793.

[129] N. Fabre, V. Poinsot, L. Debrauwer, C. Vigor, J. Tulliez, I. Fourasté, C. Moulis, Characterisation of glucosinolates using electrospray ion trap and electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Phytochemical Analysis* **2007**, *18*, 306-319.

[130] D. J. Kliebenstein, J. Gershenzon, T. Mitchell-Olds, Comparative Quantitative Trait Loci Mapping of Aliphatic, Indolic and Benzylic Glucosinolate Production in *Arabidopsis thaliana* Leaves and Seeds, *Genetics* **2001**, *159*, 359-370.

[131] B. Stankovic, E. Davies, Intercellular communication in plants:electrical stimulation of proteinase inhibitor gene expression in tomato, *Planta* **1997**, *202*, 402-406.

[132] J. Ton, M. De Vos, C. Robben, A. Buchala, J. P. Metraux, L. P. Van Loon, C. M. J. Pieterse, Characterization of *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants that are affected in systemically induced resistance, *Plant Journal* **2002**, *29*, 11-21.

[133] R. Deeken, P. Ache, I. Kajahn, J. Klinkenberg, G. Bringmann, R. Hedrich, Identification of *Arabidopsis thaliana* phloem RNAs provides a search criterion for

phloem-based transcripts hidden in complex data sets of micro array experiments, *Plant Journal* **2008**, in Revision.

[134] E. Reinhard, W. Kreis, H. Rimpler, *Pharmazeutische Biologie*, 5. Ausg., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1995**, S.416.

[135] D. J. Kliebenstein, Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses, *Plant, Cell and Environment* **2004**, *27*, 675.684.

[136] M. B. Traw, J. Kim, S. Enright, D. F. Cipollini, J. Bergelson, Negative cross-talk between salicylate- and jasmonate-mediated pathways in the Wassilewskija ecotype of *Arabidopsis thaliana*, *Mol. Ecol.* **2003**, *12*, 1125-1135.

[137] K. F. M.-J. Tierens, B. P. H. J. Thomma, M. Brouwer, J. Schmidt, K. Kistner, A. Prozel, B. Mauch-Mani, B. P. A. Cammue, W. F. Broekaert, Study of the Role of Antimicrobial Glucosinolate-Derived Isothiocyanates in Restistance of *Arabidopsis* to Microbial Pathogens, *Plant Phys.* **2001**, *125*, 1688-1699.

[138] G. Brader, M. D. Mikkelsen, B. A. Halkier, E. T. Palva, Altering glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants, *Plant Journal* **2006**, *46*, 758-767.

[139] J. Hagemeier, B. Schneider, N. J. Oldham, K. Hahlbrock, Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains, *Plant Biol.* **2001**, *98*, 753-758.

[140] G. Brader, E. Tas, E. T. Palva, Jasmonate-Dependent Induction of Indole Glucosinolates in *Arabidopsis* by Culture Filtrates of the Nonspecific Pathogen *Erwinia carotovora*, *Plant Phys.* **2001**, *126*, 849-860.

[141] Y. Sasaki-Sekimoto, N. Taki, T. Obayashi, M. Aono, F. Matsumoto, N. Sakurai, H. Suzuki, M. Y. Hirai, M. Noji, K. Saito, T. Masuda, K. Takamiya, D. Shibata, H. Ohta, Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*, *Plant Journal* **2005**, *44*, 653-668.

[142] W. Truman, M. H. Bennett, I. Kubigsteltig, C. Turnbull, M. Grant, *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates, *PNAS* **2007**, *104*, 1075-1080.

[143] Ich danke Dr. Rosalia Deeken und Tina Latz aus dem AK Prof. Hedrich für die Bereitstellung der Phloemexsudate.

[144] S. Chen, B. L. Petersen, C. E. Olsen, A. Schulz, B. A. Halkier, Long-Distance Phloem Transport of Glucosinolates in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **2001**, *127*, 194-201.

[145] P. Lamosa, L. G. Goncalves, M. V. Rodrigues, L. O. Martins, N. D. H. Raven, H. Santos, Occurence of 1-Glyceryl-1-*myo*-Inosityl Phosphate in Hyperthermophiles, *Appl. Environm. Microbiol.* **2006**, *72*, 6169-6173.

[146] P. Ache, R. Deeken, I. Kajahn, C. Neusuess, J. Klinkenberg, S. Michel, G. Bringmann, R. Hedrich, Detection of mobile and stationary signals in the phloem of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal*, in Vorbereitung.

[147] D. Corda, C. Iurisci, C. P. Berrie, Biological activities and metabolism of the lysophosphoinositides and glycerophosphoinositols, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1582*, 52-69.

[148] T. Munnik, R. F. Irvine, A. Musgrave, Phospholipid signalling in plants, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1389*, 222-272.

[149] A. J. E. Van Bel, F. Gaupels, Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem, *Mol. Plant Pathology* **2004**, *5*, 495-504.

[150] A. M. Maldonado, P. Doerner, R. A. Dixon, C. J. Lamb, R. K. Cameron, A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*, *Nature* **2002**, *419*, 399-403.

[151] Ich danke Prof. Dr. H.-P. Fiedler für die gute Zusammenarbeit und die zur Verfügung gestellten Bakterienisolate.

[152] B. J. Ueberbacher, I. Osprian, S. F. Mayer, K. Faber, A Chemoenzymatic, Enantioconvergent, Asymmetric Total Synthesis of (*R*)-Fridamycin E, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1266-1270.

[153] G. Bringmann, G. Lang, K. Maksimenka, A. Hamm, T. A. M. Gulder, A. Dieter, A. T. Bull, J. E. M. Stach, N. Kocher, W. E. G. Mueller, H.-P. Fiedler, Gephyromycin, the first bridged angucyclinone, from *Streptomyces griseus* strain NTK 14, *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1366-1373.

[154] C. Bruntner, T. Binder, W. Pathom-aree, M. Goodfellow, A. T. Bull, O. Potterat, C. Puder, S. Hörer, A. Schmid, W. Bolek, K. Wagner, G. Mihm, H.-P. Fiedler, Frigocyclinone, a Novel Angucyclinone Antibiotic Produced by a *Streptomyces griseus* Strain from Antarctica, *J. Antibiot.* **2005**, *58*, 346-349.

[155] M. Dewick, *Medicinal Natural Products*, Ausg., Jon Wiley & Sons, New York, **1997**.

[156] W. Fairbrother, B. L. Williams, To new antibiotics. Antibacterial activity of novobiocin and vancomycin, *Lancet* **1956**, *271*, 1177-1178.

[157] H.-J. Schiewe, A. Zeeck, Cineromycins, γ-Butyrolactones and Aamycins by Analysis of the Secondary Metabolite Pattern Created by a Single Strain of *Streptomyces*, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 635-642.

[158] B. Franck, A. Stange, Detection of a Bicyclic Intermediate of Anthraquinone Biosynthesis, *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 2106-2116.

[159] T. M. Harris, A. D. Webb, C. M. Harris, P. J. Wittek, T. P. Murray, Biogenetic-type Syntheses of Emodin and Chrysophanol, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 6065-6067.

[160] T. M. Harris, C. M. Harris, Synthesis of Polyketide -Type Natural Products by Biogenetically Modelled Routes, *Tetrahedron* **1977**, *33*, 2159-2185.

[161] T. Taguchi, Y. Ebizuka, D. A. Hopwood, K. Ichinose, Identification of a Novel Shunt Product Produced by a Disruptant of the ActVI-ORFA Gene Involved in the Biosynthesis of Actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5253-5256.

[162] G. Bringmann, T. A. M. Gulder, I. Kajahn, A. Hamm, H.-P. Fiedler, Metabolic Diversity of the *Actinomyces*-Strain AK 671, *J. Antibiot.*, in Vorbereitung.

[163] A. Hamm, Isolierung, Strukturaufklärung und Totalsynthese von Naturstoffen aus tropischen Heilpflanzen und Bodenorganismen, Dissertation, Universität Würzburg (Würzburg), **2003**.

[164] H. Lessmann, J. Krupa, H. Lackner, P. G. Jones, New juglomycins, *Zeitschrift fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences* **1989**, *44*, 353-363.

[165] S. Fotso, R. P. Maskey, I. Grün-Wollny, K.-P. Schulz, M. Munk, H. Laatsch, Bhimamycin A~E and Bhimanone: Isolation, Structure Elucidation and Biological Activity of Novel Quinone Antibiotics from a Terrestrial Streptomycete, *J. Antibiot.* **2003**, *11*, 931-941.

[166] Ich danke Tobias Gulder und Torsten Bruhn für die Aufklärung der Absolutkonfiguration.

[167] G. Bringmann, T. A. M. Gulder, A. Hamm, A. Dieter, M. Goodfellow, H.-P. Fiedler, Multiple Convergence in Polyketide Biosynthesis: A Third Folding Mode to the Anthraquinone Chrysophanol via a Novel Bicyclic Diketone, *Angew. Chem., Int. Ed.*, in Vorbereitung.

[168] R. J. Ogg, P. B. Kingsley, J. S. Taylor, WET, a T_1- and B_1-insensitive water-suppression method for *in vivo* ^{1}H NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1994**, *104*, 1-10.

[169] Alle Daten von Ancistrocladinium A (**30**) wurden aus einem 10:1-Diastereomerengemisch gewonnen.

[170] Alle Daten von 4'-*O*-Demethylancistrocladinium A (**31**) wurden aus einem 10:1-Diastereomerengemisch gewonnen.

[171] N. Agerbirk, B. L. Petersen, C. E. Olsen, B. A. Halkier, J. K. Nielsen, 1,4-Dimethoxyglucobrassicin in *Barbarea* and 4-Hydroxyglucobrassicin in *Arabidopsis* and *Brassica*, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1502-1507.

[172] B. L. Petersen, E. Andréasson, S. Bak, N. Agerbirk, B. A. Halkier, Characterization of transgenic *Arabidopsis thaliana* with metabolically engineered high levels of *p*-hydroxybenzylglucosinolate, *Planta* **2001**, *212*, 612-618.

[173] M. C. de la Torre, M. A. Sierra, Comments on recent achievements in biomimetic organic synthesis, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *116*, 162-184.

Dank

Für ihre Unterstützung und Freundschaft in den letzten Jahren möchte ich mich – in beliebiger Reihenfolge – herzlich bedanken bei ...

- den Mitgliedern des Ruderklubs "1. FC Galeere Moskau" (Tanja und Tobi Gulder, Dr. Michael Dreyer, Dr. Torsten Noll, Dr. Gerhard Lang, Andreas Irmer, Daniel Götz und Michael Knauer; Ehrenvorsitzende Dr. Doris Feineis) für ihre Freundschaft, ihre offenen Ohren, ihre Hilfe in jeder Lebenslage, ihre Einführung in die höheren Weihen der Analytik und einfach alles. Ohne Euch wären die letzten Jahre nicht halb so schön, amüsant und erfolgreich gewesen!
- den fleißigen Korrekturlesern Doris, Tanja, Tanja, Tobi und Norbert.
- Michaela Schraut und Stefanie Schmitt für ihren heldhaften Einsatz im Labor, der einen Teil dieser Arbeit maßgebliche bestimmt hat und natürlich die vielen netten Stunden.
- der "Mittagsessenscrew" für viel Muskelkater in den Lachmuskeln, angenehme Stimmung und tiefere Einblicke in so manche Themen, die mir vorher verwehrt waren☺
- meinen Mädels Tanja, Melli und Sylvi für viele schöne Abende und sportliche Zerstreuung.
- den Kollegen/innen Tanja Gulder, Christian Gampe, Michael "Foxi – die Katze" Knauer und Frank Meyer für die hervorragende Stimmung im Labor.
- meinen F-Praktikanten Kai Abersfelder und vor allem Barbara Hertlein für ihren kompetenten und kreativen Einsatz bei der Isolierung neuer Naturstoffe.
- der Service-Abteilung des Instituts bestehend aus Dr. Mattias Grüne (NMR), Elfi Ruckdeschel (NMR), Dr. Michael Büchner (MS) und Bernd Brunner (Technik jeder Art) für ihre Geduld und dir viele Zeit, die sie für mich beim Aufbau neuer Geräte übrig hatten.
- meinen internen Kooperationspartner Tanja und Tobi Gulder, Dr. Matthias Reichert und Sarah Pedersen.
- allen externen Kooperationspartnern Prof. Christian Neusüß, Dr. Peter Ache, Dr. Rosalia Deeken, Tina Latz, Prof. Ulrike Holzgrabe, Prof. Rainer Hedrich und Prof. Günther Heubl.

- meinen Eltern Hedy und Peter Kajahn für ihre stete allumfassende Unterstützung meiner Entscheidungen ohne die Studium und Promotion sicher nicht so ohne weiteres möglich gewesen wären.
- meiner "großen" Schwester Tanja für ihre moralische Unterstützung in allen Lebenslagen und die vielen schönen Ausflüge rund um Würzburg mit Lisza, Lena und Emma.
- meinem kleinen Wüstenfüchschen Sarah für ihre unnachahmlich drollige Art ihre Alltagshürden zu schildern, was jedes Mal unweigerlich einen deutlichen Anstieg der Stimmungs- und Motivationskurve zur Folge hat. Mausi, möge die Kuh immer mit Dir sein!
- und "last but not least" meinem Schatzi Daniel für seine Liebe und dafür, das "Schreibdrama" daheim im letzten Jahr mit stoischer Ruhe ertragen zu haben!

Lebenslauf

Inga Kajahn

* 20.10.1977 in Neuss

Familienstand:

ledig

Schule

1984 – 1988	Grundschule in Dormagen
1988 – 1997	Gymnasium mit Abitur in Dormagen

Studium

04/1998 – 04/2002	Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
04/2002	Abschluss der universitären Ausbildung mit dem 2. Staatsexamen

Berufstätigkeit

10/1997 – 04/1998	WGZ-Bank Düsseldorf
05/2002 – 12/2002	1. Hälfte des Praktischen Jahres in der Sonnen-Apotheke Dormagen
12/2002 – 05/2003	2. Hälfte des Praktischen Jahres bei der Janssen-Cilag GmbH in Neuss
07/2003	Abschluss der praktischen Ausbildung mit dem 3. Staatsexamen
08/2003	Erteilung der Approbation als Apothekerin durch die Apothekerkammer Nordrhein

Promotion

seit 09/2003	Dissertation bei Prof. Dr. Dr. h.c. Gerhard Bringmann am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg mit dem Titel "Kopplungsmethoden in der Naturstoffanalytik: Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* und *Ancistrocladus*-Pflanzen"
ab 10/2007	Anstellung als Naturstoffchemikerin am IFM-Geomar, Kiel

Kiel, den 01. 03. 2008