

Naturstoffe aus Zell- und Wurzelkulturen von
Triphyophyllum peltatum,
Experimente zur Biosynthese der Naphthylisochinolin-Alkaloide
sowie
Kalluskulturen und Sekundärmetabolite aus *Aloe saponaria*

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

vorgelegt von
Andreas Irmer
aus der Lutherstadt Wittenberg

Würzburg 2012

Eingereicht am: _____

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2006 bis März 2010 am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. G. Bringmann danke ich für die Überlassung der interessanten Themen und die Unterstützung bei der Durchführung interdisziplinärer Arbeiten.

Teile der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse waren bereits Gegenstand eines Patents^[169] und von Publikationen^[24,65,102,146,182,227,230] sowie Posterpräsentationen und internationalen Vorträgen.

INHALTSVERZEICHNIS

ALLGEMEINER TEIL

1	Einleitung	1
2	Pflanzliche Zellkulturen und ihr Potenzial	6
3	Kultur und Vermehrung von <i>Triphyophyllum peltatum</i>	13
3.1	Kenntnisstand	13
3.2	Bewurzelung steriler Sprosse und Transfer ins Gewächshaus	14
3.3	Carnivore Organe bei <i>T. peltatum</i> im Gewächshaus des botanischen Gartens der Universität Würzburg	18
4	Isolierung von Sekundärmetaboliten aus Kalluskulturen von <i>Triphyophyllum peltatum</i>	22
4.1	Kenntnisstand	22
4.2	Änderung der Zusammensetzung des Kulturmediums.....	25
4.3	Extraktion und Isolierung der Verbindungen	27
4.4	Isolierung von Naphthochinonen und Naphthylisochinolin-Alkaloiden.....	28
4.4.1	Dioncochinon A (34) und Dioncochinon B (35)	28
4.4.2	Isolierung von Droseron (10).....	31
4.4.3	Isolierung von 8-Hydroxydroseron (36)	32
4.4.4	Identifizierung von Plumbagin (9).....	32
4.5	Identifizierung dreier <i>O</i> -methylierter Derivate eines 3,5,6,7-Tetraoxy-2-methyl-1,4-naphthochinons.....	33
4.5.1	Dioncochinon C (39).....	34
4.5.2	Dioncochinon D (40)	34

4.5.3	Dioncochinon E (41).....	35
4.6	Isolierung von Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus Kalluskulturen von <i>T. peltatum</i> . 36	
4.6.1	Isolierung von Habropetalin A (27).....	36
4.6.2	Identifizierung von Dioncophyllin A (8).....	36
4.6.3	Isolierung und Identifizierung von 5'- <i>O</i> -Methyldioncophyllin D (<i>P</i> - 42) und <i>epi</i> -5'- <i>O</i> -Methyldioncophyllin D (<i>M</i> - 42).....	37
4.7	Bioaktivitäten von Dioncochinon A (34), B (35) und anderen Naphthochinonen.....	42
4.7.1	Antitumorale Wirkung.....	43
4.7.2	Anti-Infektive Wirkung.....	44
4.8	Naphthochinone in anderen Pflanzen-Arten.....	46
5	Sekundärmetabolite aus Wurzelkulturen von <i>Triphyphyllum peltatum</i>.....	47
5.1	Wurzelkulturen von <i>Triphyphyllum peltatum</i>	47
5.2	Phytochemische Analyse der steril kultivierten Wurzeln.....	47
5.2.1	Extraktion des steril kultivierten Wurzelmaterials.....	47
5.2.2	Fraktionierung des Rohextraktes und Isolierung der Sekundärmetabolite.....	48
5.3	Isolierung und Strukturaufklärung.....	49
5.3.1	4-Methoxy-5-hydroxy-2-naphthoesäuremethylester (51).....	49
5.3.2	<i>P</i> -4,5'-Dimethoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-4',5'-diol (52).....	50
5.3.3	<i>P</i> -4,4'-Dimethoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-5,5'-diol (53).....	51
5.3.4	<i>M</i> -5,5'-Dimethoxy-2,2'-methyl-3,3'-binaphthalin-4,4'-diol (54).....	52
5.3.5	4-Methoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthyl-4',5,5',8'-tetraol (55).....	53
5.3.6	<i>P</i> -4,4'-Dihydroxy-5-methoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthyl-5',6'-dion (56).....	55
5.3.7	5-Hydroxy-2-methylnaphthalin-1,4- <i>O,O</i> -di- β -D-glucosid (57).....	57
5.3.8	Identifizierung von Plumbasid A (58).....	58

5.3.9	<i>P</i> -5,4'-Dihydroxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-4,6''- <i>O,O</i> -di- β -D-glucosid-5'- <i>O</i> - β -D-glucosid (59).....	59
5.3.10	<i>trans</i> -Methyl-1,2,4-trihydroxy-2-methyl-3-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -inden-1-carboxylsäure (60).....	62
5.3.11	<i>cis</i> -Methyl-1,2,4-trihydroxy-2-methyl-3-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -inden-1-carboxylsäure (61).....	64
5.3.12	Überlegungen zur Biosynthese der Indene 60 und 61	65
5.3.13	Bekannte Substanzen in Wurzelkulturen von <i>T. peltatum</i>	68
5.4	Das phytochemische Potenzial von <i>Triphyophyllum peltatum</i> (Dioncophyllaceae)	68
6	Untersuchung der Biosynthese der Naphthylisochinolin-Alkaloide an Kalluskulturen von <i>Triphyophyllum peltatum</i>	71
6.1	Einführung	71
6.2	Fütterungsexperimente mit $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Dihydroisochinolin [$^{13}\text{C}_2$]- 69	74
6.3	Verfütterung des $^{13}\text{C}_2$ -markierten <i>trans</i> -Tetrahydroisochinolins [$^{13}\text{C}_2$]- 70	77
7	Populationsgenetische Untersuchungen an <i>Ancistrocladus</i>-Individuen aus der DR Kongo	82
7.1	Kenntnisstand	82
7.2	Sammlung von Pflanzenmaterial in der DR Kongo	85
7.2.1	Sammlungsgebiet Bamanya, Provinz Equateur, DR Kongo, Afrika	86
7.2.2	Sammelort Djombo, Provinz Equateur, DR Kongo, Afrika	87
7.2.3	Sammlungsgebiet Eala, Provinz Equateur, DR Kongo, Afrika	88
7.2.4	Sammlungsort Bonsolerive, Provinz Equateur, DR Kongo, Afrika	89
7.3	Genetische Untersuchungen der <i>Ancistrocladus</i> -Proben aus der DR Kongo	90
8	Bereitstellung pflanzlicher Zellkulturen zur Untersuchung der Biosynthese von Anthrachinonen	92
8.1	Kenntnisstand	92

8.2	Etablierung von Zellkulturen.....	96
8.2.1	Zellkulturen aus steril herangezogenem Pflanzenmaterial	96
8.2.2	Kalluskulturen aus insteril wachsendem Pflanzenmaterial.....	97
8.2.3	Veränderte Zusammensetzung der Kulturmedien zur Anregung der Anthrachinon-Produktion in <i>Aloe-Zellkulturen</i>	99
8.3	Isolierung von Anthrachinonen aus <i>Aloe saponaria</i>	101
8.3.1	Aloesaponarin I (80)	101
8.3.2	Laccainsäure-D-Methylester (81)	102
8.3.3	Aloesaponol I (79)	102
8.3.4	Asphodelin (82).....	103
8.3.5	10-Hydroxy-10,7'-(chrysophanolanthron)-chrysophanol (83).....	103
8.4	Diskussion zur Biosynthese.....	104
9	Zusammenfassung.....	107
10	Summary	113

EXPERIMENTELLER TEIL

11	Allgemeine Methoden	119
11.1	Verwendete Messgeräte und Apparaturen.....	119
11.2	Chromatographische Methoden.....	120
11.3	Chemikalien.....	122
11.4	Kulturtechniken	123
12	Kultur und Vermehrung von <i>T. peltatum</i>	124
12.1	Medien.....	124
12.2	Bedingungen der Gewächshauskultur	124

12.2.1	Pflanzenschutz	125
13	Isolierung von Sekundärmetaboliten aus Kalluskulturen von <i>T. peltatum</i>	126
13.1	Kalluskultur	126
13.2	Extraktion und Isolierung	127
13.3	Dioncochinon A (34)	128
13.4	Dioncochinon B (35)	129
13.5	Dioncochinon C (39)	131
13.6	Dioncochinon D (40)	132
13.7	Dioncochinon E (41)	133
13.8	8-Hydroxydroseron (36)	134
13.9	Droseron (10)	134
13.10	Habropetalin A (27)	135
13.11	Dioncophyllin A (8)	136
13.12	5- <i>O</i> -Methyldioncophyllin D (42)	137
13.13	Extraktion und Isolierung von Sekundärmetaboliten aus <i>Nepenthes</i> -Arten	140
13.14	Quercetin-3- <i>O</i> - β -D-Glucuronid – Miquelianin (48)	140
13.15	Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-Rhamnopyranosid - Quercitrin (49)	141
13.16	Kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-Rhamnopyranosid (50)	142
14	Sekundärmetabolite aus Wurzelkulturen von <i>Triphyophyllum peltatum</i>	143
14.1	Wurzelkulturen von <i>Triphyophyllum peltatum</i>	143
14.2	Extraktion des Wurzelmaterials und Isolierung der Sekundärmetabolite	143
14.3	4-Methoxy-5-hydroxy-2-naphthoesäuremethylester (51)	145

14.4	<i>P</i> -4,5'-Dimethoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-4',5'-diol (52)	147
14.5	<i>P</i> -4,4'-Dimethoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-5,5'-diol (53)	148
14.6	<i>M</i> -5,5'-Dimethoxy-2,2'-methyl-3,3'-binaphthalin-4,4'-diol (54)	150
14.7	4-Methoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthyl- 4',5,5',6'-tetraol (55).....	151
14.8	<i>P</i> -4,4'-Dihydroxy-5-methoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthyl-5',6'-dion (56)	153
14.9	5-Hydroxy-2-methylnaphthalin-1,4- <i>O,O</i> -di- β -D-glucosid (57).....	155
14.10	Plumbasid A (58).....	157
14.11	<i>P</i> -5,4'-Dihydroxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-4,6''- <i>O,O</i> -di- β -D-diglucosid-5'- <i>O</i> - β - glucosid (59)	157
14.12	<i>trans</i> -Methyl-1,2,4-trihydroxy-2-methyl-3-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -inden-1-carboxylsäure (60)	161
14.13	<i>cis</i> -Methyl-1,2,4-trihydroxy-2-methyl-3-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -inden-1-carboxylsäure (61)	162
15	Fütterungsexperimente an Kalluskulturen von <i>Triphyophyllum</i>	
	<i>peltatum</i>	164
15.1	Kalluskultur	164
15.2	Fütterungsexperimente an Kalluskulturen von <i>Triphyophyllum peltatum</i>	164
15.3	[1,1'- $^{13}\text{C}_2$]-(<i>3R</i>)-3,4-Dihydro-8-hydroxy-1,3-dimethylisochinolin ([$^{13}\text{C}_2$]- 69)	165
15.4	[1,1'- $^{13}\text{C}_2$]-(<i>1R,3R</i>)-8-Hydroxy-1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin ([$^{13}\text{C}_2$]- 70)	165
15.5	[1,1-Me- $^{13}\text{C}_2$]-Habropetalin A ([$^{13}\text{C}_2$]- 27)	166
15.6	[1,1-Me- $^{13}\text{C}_2$]-Dioncophyllin A ([$^{13}\text{C}_2$]- 8)	167
15.7	5'- <i>O</i> -Methyldioncophyllin D ([$^{13}\text{C}_2$]- 42).....	168
16	Bereitstellung pflanzlicher Zellkulturen zur Untersuchung der	
	Biosynthese der Anthrachinone	169

16.1	Etablierung von Zellkulturen aus sterilem Pflanzenmaterial	169
16.2	Kalluskulturen aus insterilem Pflanzenmaterial	171
16.3	Isolierung von Anthrachinonen aus <i>Aloe saponaria</i>	172
16.4	Aloesaponarin I (80)	173
16.5	Laccainsäure-Methylester (81)	173
16.6	Aloesaponol I (79)	174
16.7	Asphodelin (82)	175
16.8	10-Hydroxy-10,7'-(chrysophanolanthron)-chrysophanol (83)	176

ALLGEMEINER TEIL

1 Einleitung

Seit Anbeginn der Menschheit werden Pflanzen als Heilmittel verwendet.^[1,2] Aufzeichnungen darüber existieren zwar erst seit wenigen tausend Jahren, vor allem aus der Antike,^[3,4] es kann aber davon ausgegangen werden, dass die Verwendung von Pflanzen als Medizin nicht erst mit der Entstehung des Menschen einsetzte. Heute weiß man, dass z.B. Menschenaffen unterschiedlichste Pflanzen für kurative Zwecke nutzen.^[5] Und jedem Hundebesitzer ist schon einmal aufgefallen, dass sein Tier gelegentlich Gras frisst. Dies hat nichts mit einer Regenvorhersage zu tun, wie es im Volksmund heißt, sondern es steckt vielmehr ein „medizinischer“ Zweck dahinter. Dieser beruht wohl eher auf physikalischer Wirkung, in den meisten Fällen pflanzlicher Anwendungen aber sind die Inhaltsstoffe wie **1**,^[6] **2**,^[7,8] **3**^[8] und **4**^[9] der Pflanzen Grund für ihre spezielle Wirkung (Abbildung 1).

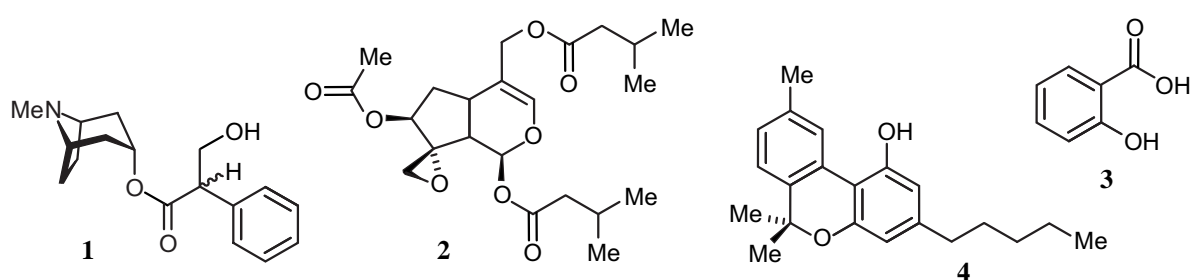
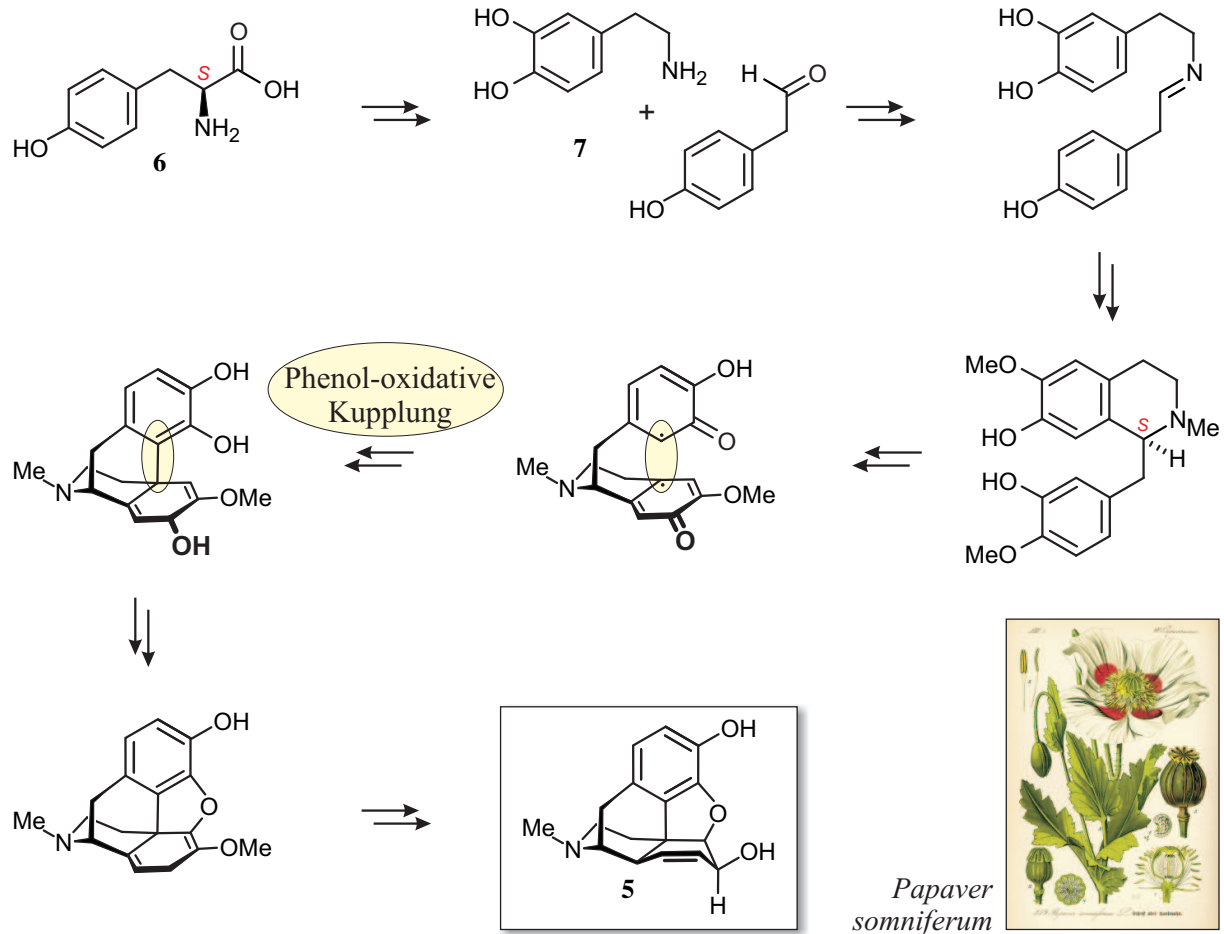


Abbildung 1. Inhaltsstoffe verschiedener seit der Antike bekannter Heil- und Drogenpflanzen: Atropin (**1**) aus der Tollkirsche (*Atropa belladonna*), Didrovaltrat (**2**) aus Baldrian (*Valeria officinalis*), Cannabinol (**4**) aus Hanf (*Cannabis sativa*) und Salicylsäure (**3**) aus der Rinde der Weide (*Salix spec.*).

Derzeit sind mehrere Hunderttausend pflanzliche Inhaltsstoffe bekannt, die jedoch nicht alle für den Menschen nützlich sind oder sogar pharmakologische Wirkung besitzen. Die Naturstoffe werden in verschiedenste Substanzklassen eingeordnet. Eine der wichtigsten Gruppen ist die der Alkaloide. Dieser Begriff wurde zwar bereits 1819 geprägt, eine allumfassende Definition existiert aber bis heute nicht.^[10] In jedem Fall handelt es sich um stickstoffhaltige meist basische Verbindungen, die vor allem (aber nicht nur) von Pflanzen produziert werden.^[11] Vertreter sind beispielsweise die Isochinoline.^[10,12] Sie sind seit den Anfängen der Phytochemie im 19. Jahrhundert bekannt. Bereits 1804 isolierte der deutsche Apotheker Friedrich W. A. Sertürner Morphin (**5** - Schema 1) aus Schlafmohn (*Papaver somniferum*).^[13,14]



Schema 1. Die Biosynthese des Isochinolin-Alkaloids Morphin (5), produziert von der seit langem vom Menschen genutzten Pflanze *Papaver somniferum* (Schlafmohn).

Moderne, heute routinemäßig eingesetzte Methoden der Strukturaufklärung (Massenspektrometrie, 1D- und 2D-Kernspinresonanz-Spektroskopie, Circular dichroismus und Röntgenstrukturanalyse) standen zu dieser Zeit nicht zur Verfügung und so wurde erst 44 Jahre später, 1848, die korrekte Summenformel ermittelt. Erst mehr als ein dreiviertel Jahrhundert später gelang es dann die Struktur des Morphins (5) aufzuklären. Ursache für die frühe und ausgiebige Untersuchung dieses Naturstoffes war die Nutzung des Opiums (getrockneter Milchsaft des Schlafmohns) als Rauschmittel, aber auch als starkes Schmerzmittel in der Medizin, wo es heute noch in einigen Fällen der Schmerztherapie zum Einsatz kommt.

Seitdem sind ca. 2500 weitere Isochinolin-Alkaloide entdeckt worden. Die Biosynthese ist bereits seit langem aufgeklärt. Sie entstehen im Allgemeinen aus der aromatischen Aminosäure L-Tyrosin (6), das wiederum aus dem Shikimisäure-Weg stammt. Tyrosin wird

zu Dopamin (**7**) umgesetzt und eine Reihe weiterer Biosyntheseschritte (u.a. eine phenoxidative Kupplung) folgen, bis z.B. **5** vorliegt (Schema 1).^[15]

Vor einigen Jahren wurden weitere Isochinolin-Alkaloide wie das Dioncophyllin A (**8**) entdeckt,^[16,17] dessen Substitutionsmuster nur mit dem bekannten Biosyntheseweg in Einklang zu bringen war, wenn eine Tyrosin-ähnliche Aminosäure mit anderem Oxygenierungsmuster vorausgesetzt wurde. Viel eher schien eine polyketidische Herkunft dieser Naphthylisochinolin-Alkaloide denkbar, die dann auch experimentell bewiesen wurde (Abbildung 2).^[18]

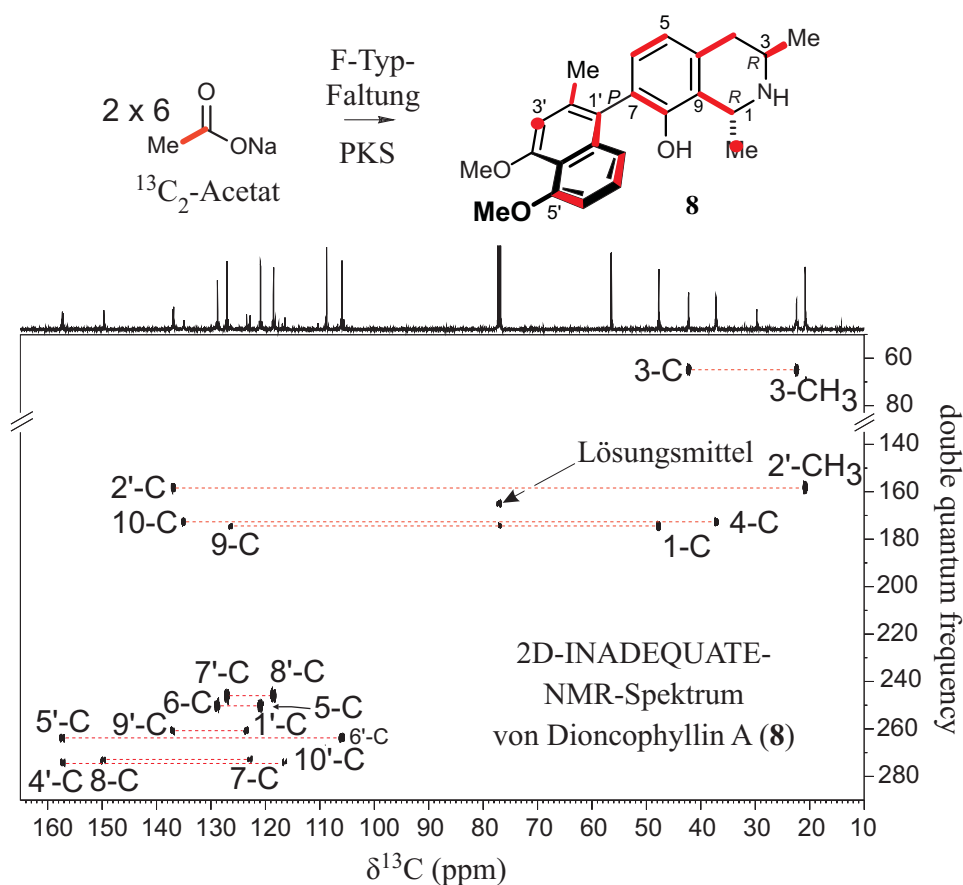


Abbildung 2. Nachweis des polyketidischen Ursprungs von Dioncophyllin A (**8**) durch Fütterungsexperimente mit $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Acetat an *T.peltatum*-Kalluskulturen und Ermittlung des Einbaumusters durch 2D-INADEQUATE-NMR-Spektroskopie.

Entdeckt wurden die Naphthylisochinoline in tropischen Lianen der kleinen Pflanzenfamilien Dioncophyllaceae (Krallenblattgewächse) und Ancistrocladaceae (Hakenastgewächse), die ihr Verbreitungsgebiet in den Paläotropen haben. Die Verfügbarkeit dieser Pflanzen ist bis heute (auch für wissenschaftliche Zwecke) sehr schlecht.^[19,20] Erst durch die enge Kooperation mit Wissenschaftlern aus der Côte d'Ivoire (vor allem

Prof. L. Aké Assi) und anderen tropischen Ländern Afrikas und Asiens wurde die Untersuchung der Naphthylisochinolin-Alkaloide möglich. Derzeit wird eine große Anzahl verschiedener Arten aus der Familie der Ancistrocladaceae bereits im Botanischen Garten der Universität Würzburg kultiviert.

Zur Durchführung von Biosynthese-Experimenten sind insteril im Gewächshaus wachsende Pflanzen oft ungeeignet, da Fütterungsexperimente schwierig durchzuführen sind. Gezielte erfolversprechende Fütterungsexperimente zur Aufklärung der Biosynthese der Naphthylisochinolin-Alkaloide waren erst nach der Etablierung von sterilen Zellkulturen dieser Pflanzen vor allem durch H. Rischer möglich. Vor allem die Naphthylisochinoline-produzierenden Kalluskulturen von *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) waren ein großer Fortschritt.^[21-23] Sie produzierten als einen der Hauptmetabolite Dioncophyllin A (**8**) sowie die Naphthochinone Plumbagin (**9**) und Droseron (**10**). Eine weiterführende phytochemische Untersuchung der Kulturen wurde jedoch nicht vorgenommen. Dennoch waren die Voraussetzungen für Fütterungsexperimente zur Untersuchung der Biosynthese der Naphthylisochinolin-Alkaloide gegeben.

Das auffälligste Strukturmerkmal der Naphthylisochinoline ist eine Biarylachse, die sicher durch die phenoxidative Kupplung aufgebaut wurde. Die Achsen der monomeren und auch dimeren Naphthylisochinoline wie z.B. **11** und anderer dimerer Verbindungen, beispielsweise aus der Substanzklasse der Anthrachinone (am Beispiel **12**), sind in vielen Fällen rotationsgehindert und stellen damit ein auch heute noch oft vernachlässigtes stereogenes Element dar (Abbildung 3).^[24]

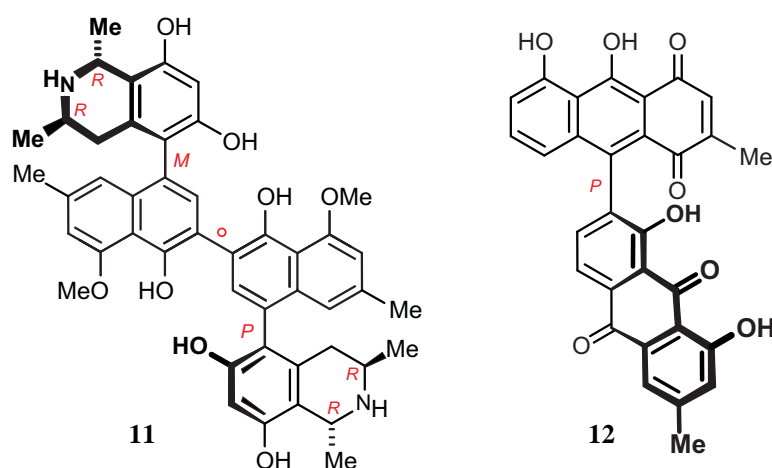


Abbildung 3. Michellamin B (**11**) als dimerer Vertreter der Naphthylisochinolin-Alkaloide mit sogar drei Achsen und das dimere Anthrachinon Abychinone (**12**).

Anthrachinone sind eine lange bekannte Substanzklasse. Sie werden, anders als die ausschließlich pflanzlichen Naphthylisochinolin-Alkaloide, von Organismen der unterschiedlichsten Reichen produziert. Der polyketidische Ursprung der Anthrachinone ist bereits vor mehreren Jahrzehnten aufgeklärt worden.^[25] Dennoch blieben hier Fragen zur Faltung der zugrundeliegenden Polyketidkette offen: Neue Untersuchungen zur Biosynthese des Chrysofanols (**13**) in unserem Arbeitskreis zeigten kürzlich, dass dieses Molekül Organismen-spezifisch auf unterschiedlichen Polyketid-Biosynthesewegen produziert wird.^[26,27] Aloesaponarin II (**14**)^[28] lässt theoretisch sogar sechs Möglichkeiten der Polyketidfaltung zu. **14** wird sowohl von pro- als auch eukaryontische Produzenten gebildet: kürzlich entdeckte Streptomyceten-Stämme^[29,30] und die "Mutterpflanze" der Substanz *Aloe saponaria*. Durch Fütterungen mit ¹³C₂-Acetat ließe sich hier der Faltungstyp der Polyketidkette ermitteln. Damit ließen sich die Ergebnisse zur Polyketidfaltung während der Biosynthese des Chrysofanols verifizieren.

Für die vorliegende Arbeit leiteten sich daraus folgende Aufgabenstellungen ab:

- Produktion von insterilen *T.-peltatum*-Pflanzen für die Gewächshauskultur, ausgehend von sterilen Sprosskulturen
- Phytochemisch Charakterisierung der Zell- und Gewebekulturen von *T. peltatum*,
- Durchführung von Fütterungsexperimenten zur Biosynthese der Naphthylisochinolin-Alkaloide,
- Etablierung von Zellkulturen von *Aloe saponaria* oder anderen Aloesaponarin-II-produzierenden Pflanzen
- Untersuchungen der Metabolite von *Aloe saponaria* und entsprechender Zellkulturen.

2 Pflanzliche Zellkulturen und ihr Potenzial

Pflanzen sind erstaunliche Lebewesen. Sie bildeten und bilden (unter Berücksichtigung der Algen) die Grundlage für das meiste heute bekannte Leben auf unserem Planeten, indem sie die Atmosphäre mit Sauerstoff anreicherten. Im Gegenzug nehmen sie Kohlendioxid auf, um damit und mit der Energie des Sonnenlichtes riesige Mengen Biomasse zu bilden, die wiederum Nahrungsgrundlage für alle höheren und viele niedere Organismen ist.^[31,32] Zudem produzieren Pflanzen eine Fülle von Sekundärmetaboliten, die auch dem Menschen von Nutzen sind.^[8] Einige sehr hochwirksame Naturstoffe wie das Vincristin^[33] aus *Catharanthus roseus* oder Paclitaxel^[34] aus der pazifischen Steineibe (*Taxus brevifolia*) bilden die Grundlage für wichtige Medikamente z.B. gegen Krebs.

Verglichen mit Tieren sind Pflanzen mäßig komplexe Lebewesen. Im Allgemeinen besitzen sie nur drei Organe, die Wurzel, den Spross und das Blatt. Bereits Goethe hat das erkannt (Abbildung 4).^[35] Alle anderen Gebilde (z.B. Blüten) sind aus einem oder mehreren dieser drei Elemente aufgebaut.^[36]



Abbildung 4. Goethe und sein Werk über die Metamorphose der Pflanzen sowie Zeichnungen von ihm zur Organentwicklung.^[37]

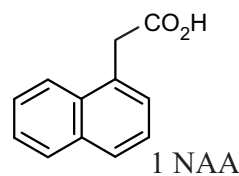
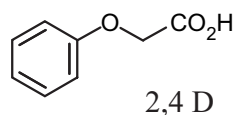
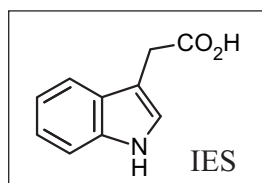
Auch histologisch sind Pflanzen wesentlich weniger komplex als Wirbeltier und Insekten. Die meisten Zellen einer Pflanze sind zwar spezialisiert, aber die so entstandenen Gewebetypen sind weniger zahlreich als bei Tieren.^[38] Außerdem haben Pflanzen keine Nervensysteme zur schnellen Informationsübertragung und interagieren daher oft unbemerkt und langsam, und dennoch effektiv, mit ihrer Umwelt.^[39] Eine Eigenschaft haben Pflanzen aber fast allen anderen höheren Lebewesen voraus. Ihre Zellen sind zu jederzeit ihres Lebens totipotent und unter den richtigen Bedingungen ist im Prinzip jede Zelle in der Lage eine ganze Pflanze zu regenerieren.^[40] Die dafür notwendige Dedifferenzierung einer spezialisierten Zelle ist in der Realität allerdings viel zu aufwendig und wird von vielen

Umweltfaktoren verhindert, so dass zur Regeneration auf von vornherein angelegte, ruhende Meristeme zurückgreifen wird.

Unter Laborbedingungen lässt sich diese Totipotenz aber sehr gut nachweisen und nutzen.^[41] Voraussetzung ist allerdings in allen Fällen ein steriles Umfeld, sonst würden Mikroorganismen die aus ihrem Gewebeverband herausgerissenen, ungeschützten und dedifferenzierten Zellen sofort als Nahrungsressource angreifen und vernichten. Undifferenzierte pflanzliche Zellen haben embryonalen Charakter,^[42] sie bilden mit Nachbarzellen kein Gewebe und sind weder physikalisch (durch eine Cutikula) noch chemisch (durch Sekundärmetabolite) geschützt. Aber sie besitzen die Fähigkeit, sich unbegrenzt zu teilen und sind damit keinem Alterungsprozess unterworfen.^[43]

Dedifferenzierten Zellen existierten zunächst in der Pflanze an einem ganz bestimmten Ort in einem Gewebeverband und eine erfüllten bestimmte Aufgabe, waren also spezialisiert und sind nun in einen embryonalen Zustand zurückversetzt worden. Normaler Weise erhält die Zelle Informationen von Nachbarzellen, die dazu führen, dass der embryonale Charakter aufgegeben wird und ein Gewebe als Teil eines Organs entsteht (Positionseffekt).^[40] Bei Pflanzen werden diese Informationen vor allem durch Phytohormone (Abbildung 5) übertragen.^[44] Zunächst erkannte man fünf Hauptgruppen von Hormonen mit spezifischer (aber auch überlappender) Wirkung.^[41]

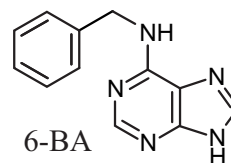
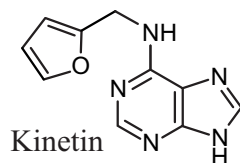
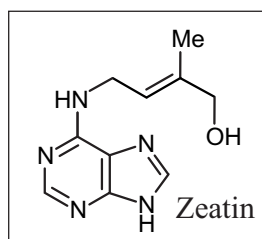
Auxine



Gibberelline

Abscisinsäure

Cytokine



Ethen

Brassinosteroide
Jasmonsäure

Abbildung 5: Die zwei für die pflanzliche Zellkultur wichtigsten Gruppen der Phytohormone: Auxine und die Cytokine. Die natürlichen Vertreter sind umrahmt, daneben künstliche Formen. Rechts sind weitere Hormonklassen genannt. Die Brassinolide und die Jasmonsäure sind erst kürzlich in den Status eines Phytohormons erhoben worden.^[45,46]

Heute kennt man noch mindestens zwei weitere Gruppen von Substanzen, die als Phytohormone angesehen werden. Brassinosteroide und die Jasmonsäure haben eine genauso spezifische Wirkung.^[47,48] Für die Zellkultur bedeutsam sind im Allgemeinen aber nur die Auxine und Cytokinine,^[49,50] von denen nicht nur natürliche Vertreter existieren, sondern auch eine ganze Reihe künstlicher Analoge gefunden wurden.^[51]

Mit dem Wissen um die Hormone war es nun möglich, pflanzliche Zellen in vielerlei Hinsicht zu manipulieren, obwohl dies keine menschliche Erfindung ist. Bakterien, z.B. *Rhizobium spec.* oder *Agrobacterium tumifaciens*, betreiben diese Art der Beeinflussung pflanzlicher Zellen bereits seit Jahrmillionen.^[52] Durch Zugabe von bestimmten Hormonen lassen sich pflanzliche Zellen in einen dem embryonalen Charakter ähnlichen Zustand zurückzusetzen oder zur Entwicklung einzelner Organe anregen (Abbildung 6).^[42] Als Ausgangsmaterial kann im Prinzip jeder Teil einer Pflanze (Explantat) verwendet werden. Durch die Wahl geeigneter Bedingungen lässt sich theoretisch jede Pflanze in Zellkultur nehmen.^[43] Diese Aussage ist außerordentlich verallgemeinernd, denn so einfach ist es nicht.

Nachdem der Prozess der Differenzierung der Pflanzenzelle prinzipiell verstanden wurde, ergab sich die Möglichkeit der *In-vitro*-Propagation von Pflanzen, die sich andernfalls nur schwer oder langsam vermehren lassen und bislang nicht im industriellen Maßstab produziert werden könnten. Nahezu alle Zierpflanzen, aber auch ein Großteil unserer Nutzpflanzen wird heute auf diesem Wege erzeugt.^[53-56] Ein Beispiel für die *In-vitro*-Propagation exotischer Pflanzen wird in dieser Arbeit vorgestellt.

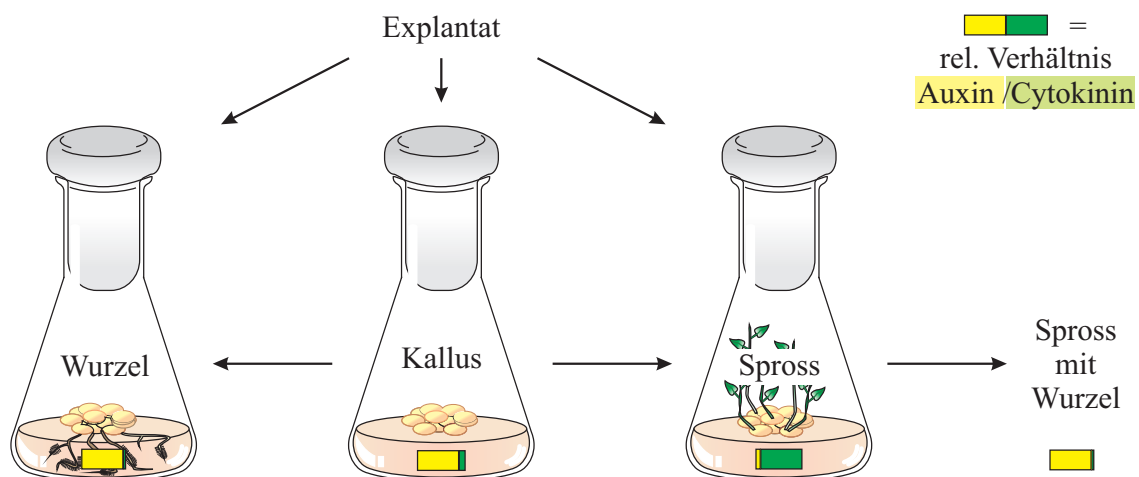


Abbildung 6. Durch geeignete Hormon-Cocktails lassen sich aus pflanzlichen Zellen Kalluskulturen etablieren, aber auch die Spross- oder Wurzelbildung induzieren. Sollen bewurzelte Sprosse produziert werden, ist der Weg zwangsläufig der über die Etablierung von Sprosskulturen.

Die erste und hauptsächliche Anwendung der Kultur von Pflanzen, Pflanzenteilen oder undifferenzierten Zellen war also die Vermehrung, die ursprünglich auch den Anstoß für die Sterilkultur bereits im 19. Jh. gab.^[57,58] Vor allem heute kann die Zellkultur dazu beitragen, Arten (die z.B. Naturstoffe wie das Podophylloxin produzieren) vor dem Aussterben zu bewahren.^[59-62] Die sterile Kultur von Pflanzenzellen bietet aber noch wesentlich mehr als nur die Vermehrung. Heute muss man zudem bedenken, dass die Fläche des zur Verfügung stehenden Bodens für die Produktion von Lebensmitteln nicht unbegrenzt ist, während die zu ernährende Weltbevölkerung unbegrenzt wächst. Die Fläche zur Produktion von Pflanzen für die industrielle oder pharmazeutische Nutzung wird also immer geringer, zugunsten der Lebensmittelproduktion. Da könnten biotechnologische Ansätze, wie eben die Zellkultur, Beiträge zur Abhilfe schaffen.^[49,63]

Pflanzliche Zellkulturen können relativ Jahreszeiten-unabhängig gehalten und genutzt werden, z.B. für die Produktion von Naturstoffen, die anders nicht zur Verfügung stehen würden.^[49] Gründe für die Unzugänglichkeit der Substanzen können sein, dass die produzierende Pflanze selten und ihre Kultur unter künstlichen Bedingungen schlecht oder gar nicht möglich ist. Manche Produzenten wachsen extrem langsam und ihre Sekundärmetabolite sind entsprechend rar.^[34] Es ist aber bei weitem nicht trivial, Sekundärmetabolit-produzierende pflanzliche Zell- oder Organkulturen zu etablieren.^[64] Aber auch wenn diese Zellkulturen nicht den gewünschten Metabolit produzieren, können sie doch evtl. Vorstufen liefern (z.B. Diosgenin), die dann semisynthetisch zum Wirkstoff verarbeitet werden.^[49] In einigen Fällen kann es sogar vorkommen, dass die Zellen Metabolite produzieren, die die intakte Pflanze nicht (oder nur in sehr geringen Mengen) produziert. Ein Beispiel dafür wird in der vorliegenden Arbeit beschrieben (Kapitel 4).^[65]

Mit verschiedensten Mitteln lässt sich die Produktion einiger Metabolite beeinflussen oder elicitieren/induzieren. Vor allem ist natürlich die Wahl des richtigen Mediums mit der passenden Phytohormon-Mischung von Bedeutung. Dann ist es oft hilfreich, verschiedene Zelllinien zu etablieren, denn einzelne Zellen ein und derselben Pflanze können sich hinsichtlich ihrer Produktion massiv voneinander unterscheiden.^[49] Eine solche Prozedur ist langwierig und aufwendig und der Erfolg zu Beginn der Arbeiten ungewiss. Dennoch gelang es, Metabolite wie Berberin (**15**) in *Coptis-japonica*-Kulturen,^[66] Rosmarinsäure (**16**)^[67] aus *Coleus blumeii* und Sanguinarin (**17**) in Zellkulturen von *Papaver somniferum*^[68,69] in großem Maßstab produzieren zu lassen (Abbildung 7).^[64]

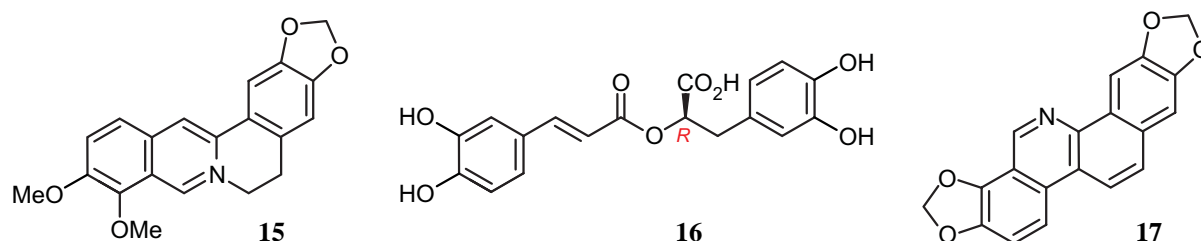


Abbildung 7. Sekundärmetabolite, die in großem Maßstab durch pflanzlichen Zellkulturen produziert werden: Berberin (**15**), Rosmarinsäure (**16**) und Sanguinarin (**17**).

Industriellen Maßstab hat die Produktion pflanzlicher Metabolite in Zellkulturen nur in Ausnahmefällen erreicht. Das prominenteste weil erste Beispiel, die Produktion von Shikonin (**18**)^[70] und Alkannin (**19**), soll im folgenden Absatz kurz vorgestellt werden.^[71] Es sind tief rote Pigmente, die zum Färben verwendet werden. Wichtiger ist aber der Einsatz in der Volksmedizin, der Jahrtausende zurückreicht und auch heute noch haben **18** (aus *Lithospermum erythrorhizon*) und **19** (aus *Alkana tinctoria*) große Bedeutung in der Wundbehandlung.^[72]

Im europäischen Raum wurde bereits von Hippocrates (4. bis 5. Jh. v. Ch.) der Einsatz eines *A.-tinctoria*-Extrakt zur Behandlung von Geschwüren beschrieben.^[73] Die Unterstützende Wirkung bei der Wundheilung allgemein wurde ebenfalls erkannt. Nach dem 17. Jh. ging dieses Wissen wieder verloren. Erst 1976 wurde die Wirkung von *A.-tinctoria*-Auszügen wiederentdeckt und das wirksame Prinzip, das Alkannin (**19**), entschlüsselt.

Ähnlich weit reicht die Geschichte im fernen Osten zurück. Dort wurde *L. erythrorhizon* unter anderem in der Volksmedizin eingesetzt, ebenfalls zur Wundheilung. Für die Wirkung verantwortlich war das *R*-Enantiomer des Alkannins (**19**), das Shikonin (**18**). Der Bedarf in Asien war hoch genug, um ein Interesse an industrieller Produktion zu wecken. Eine einigermaßen rentable Totalsynthese^[74] stand jedoch nicht zur Verfügung und es kostete jahrelange Arbeit diese zu entwickeln. Die pflanzliche Ressource war ebenfalls beschränkt, *Lithospermum* benötigt ca. 5 bis 7 Jahre, um genügend **18** zu produzieren. Daher beschäftigte man sich in Japan, China und Korea ausführlich mit der Zellkultur dieser Pflanze. Es wurde zunächst die Biosynthese aufgeklärt (Abbildung 8).^[75] Letztendlich fand man eine Methode der pflanzlichen Zellkultur für *L. erythrorhizon*, die kommerziell von der Mitsui Petrochemical Company umgesetzt wurde.^[71]

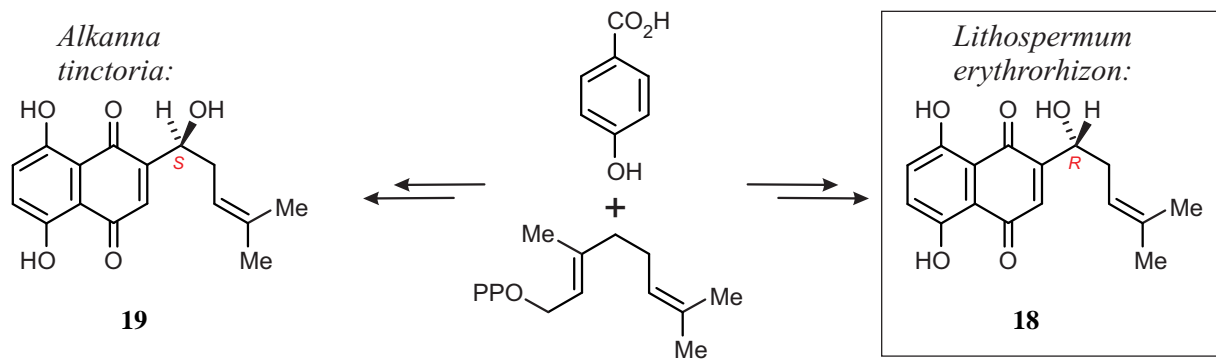


Abbildung 8. Pflanzliche Naphthochinone nicht-polyketidischer Herkunft: Alkannin (**19**) und sein Enantiomer Shikonin (**18**, rechts) entstammen der Kombination des Shikimisäure- und Terpenbiosynthesewegs.

Wenn Zell- oder Kalluskulturen die gewünschten Sekundärmetabolite herstellen, können sie auch für Biosynthese-Untersuchungen genutzt. Da sie keine Barrieren zur Umwelt und keine Abschlussgewebe, also keine Cutikula und keine Epidermis haben, ist die Applikation von Präkursern im Vergleich zur vollständigen Pflanze recht einfach. Einen weiteren Vorteil bringt die sterile Kultur: Es wird sichergestellt, dass der produzierte Metabolit von den Pflanzen selbst gebildet wird und es kann ausgeschlossen werden, dass Mikroorganismen den Präkurser zerstören. Das ist insbesondere bei Fütterungsexperimenten mit Aminosäuren oder Zuckern von großer Bedeutung.

Als letzte mögliche Anwendung pflanzlicher Zellkulturen soll die sogenannte Biotransformation vorgestellt werden.^[76] Aufgrund spezifischer Enzyme ist die Natur der synthetischen Chemie bei regio- und stereoselektiven Reaktionen in einigen Fällen weit voraus. Diesen Umstand kann man sich zunutze machen, um die Umsetzung von billigen, gut verfügbaren Edukten zu schwer zugänglichen und teuren Substanzen durchzuführen, auch wenn weder Edukt noch Produkt zu den natürlichen Metaboliten dieser Pflanzenzellen zählen.^[77] Vor allem Hydroxylierungen, Oxidationen (von Hydroxy-Gruppen), Reduktionen (von Carbonyl-Gruppen), Hydrogenierungen, Glucosidierungen und Hydrolysen sind möglich.^[78] Großes Interesse besteht beispielsweise an der Produktion spezieller Terpene, die in der Nahrungs- und Kosmetikindustrie als Aroma- und Duftstoffe verwendet werden. Ein Beispiel ist das Verbenon (**20** – Abbildung 9),^[79] das von steril kultivierten Zellen der Pflanzen *Psychotria brachyceras* und *Rauvolfia sellowii* nach Zugabe von (-)- α -Pinen (**21**) produziert wird.

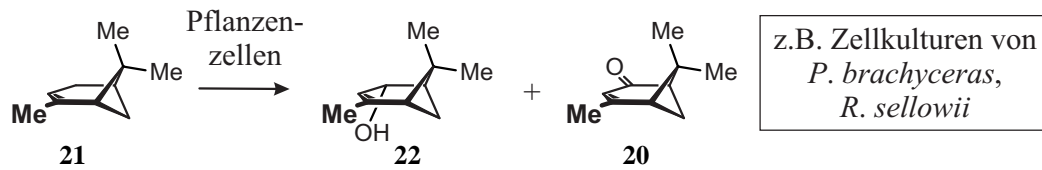


Abbildung 9: Die Umsetzung von (-)- α -Pinen (**21**) durch pflanzliche Zellkulturen zu *trans*-Verbenol (**22**) und (-)-Verbenon (**20**), die beide in der Lebensmittelchemie, aber auch in der pharmazeutischen und chemischen Industrie eingesetzt werden.

Möglich ist auch, durch entsprechende Experimente die Produktion neuer Derivate von bekannten wirksamen Substanzen wie dem Valdecoxib (**23**) zu erreichen, um Bioaktivitäten zu verbessern oder für andere Anwendungen zu erschließen (Abbildung 10).^[80] Dies wurde im Fall des **23** (Handelsname Bextra[®] – Fa. *Pfizer*) nötig, da das Medikament wegen schwerer Nebenwirkungen vom Markt genommen werden musste.^[81]

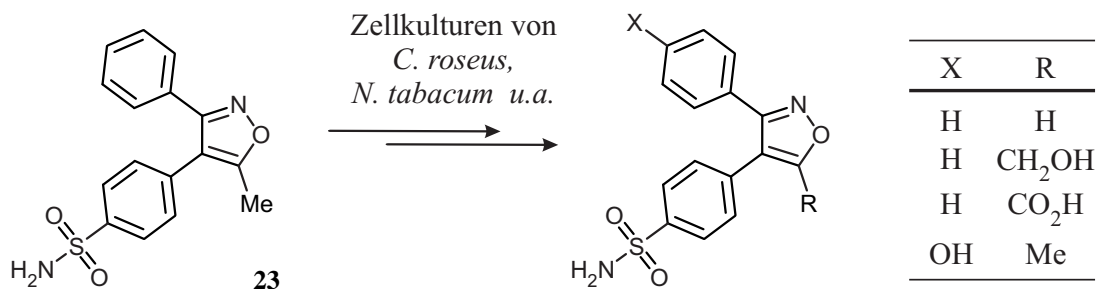


Abbildung 10. Biotransformation des entzündungshemmend wirkenden Valdecoxib (**23**) durch Einsatz von Zellkulturen verschiedener Pflanzenarten, die alle in der Lage waren, diese Substanz auf eine oder mehrere Arten zu derivatisieren.

Solche und andere Biokatalysen können allerdings auch von Mikroorganismen, insbesondere Bakterien und Hefen, durchgeführt werden.

Auf Anwendungen pflanzlicher Zellkulturen im Zeitalter der genetischen Manipulation soll hier nicht im Detail eingegangen werden, obwohl die Biotechnologie fester Bestandteil der Medizinpflanzen-Forschung ist.^[82] Insbesondere im Fall der genetischen Manipulation hat sich ohnehin ein System herausgebildet, dass zwar die spezielle Enzym-Ausstattung der Pflanzenzellen (oder anderer Organismen) für die Biosynthese ganz bestimmter Naturstoffe nutzt, diese aber in gut kultivierbare und leicht transformierbare Mikroorganismen überträgt. Die Methodik der sogenannten kombinatorischen Biochemie ermöglicht es pflanzliche Naturstoffe wie z.B. Flavonoide oder Terpenoide in *E. coli* produzieren zu lassen.^[83,84]

3 Kultur und Vermehrung von *Triphyophyllum peltatum*

3.1 Kenntnisstand

Entdeckt und erstmals beschrieben wurde *T. peltatum* bereits 1928 von den beiden Botanikern Hutchinson und Dalziel.^[85] Sie nahmen zunächst an, dass es sich um eine dritte Art der bereits etablierten Gattung *Dioncophyllum* handelt und veröffentlichten ihre Entdeckung unter dem Namen *D. peltatum*. Die Zuordnung dieser Gattung zu einer bestimmten Pflanzenfamilie fiel viele Jahre lang schwer und es gab immer wieder Umgruppierungen,^[86-88] bis Airy Shaw die selbständige Familie der Dioncophyllaceae definierte, die nun die drei eigenständigen Gattungen *Dioncophyllum*, *Habropetalum* und *Triphyophyllum* mit jeweils nur einer Art enthält.^[89] Taxonomisch wird diese Familie und auch die der nahe verwandten Ancistrocladaceae zu den Caryophyllales und in die Nähe anderer carnivorere Pflanzenfamilien wie den Droseraceae, Drosophyllaceae und Nepenthaceae gestellt (Abbildung 11).^[90] Dabei haben aber abgesehen von *T. peltatum* alle Vertreter der Dioncophyllaceae und auch alle *Ancistrocladus*-Arten die carnivore Lebensweise aufgegeben.

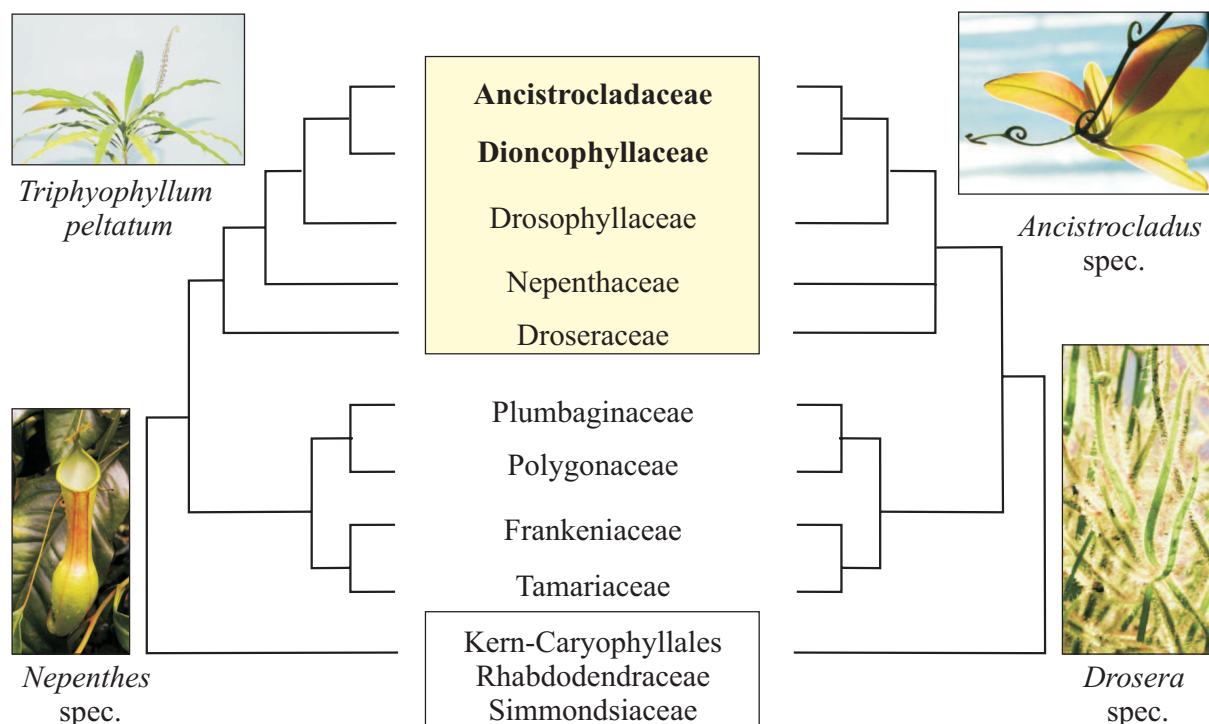


Abbildung 11. Phylogenetische Beziehungen carnivorere Pflanzen innerhalb der Ordnung Caryophyllales, bestimmt durch die single-Gen-Analyse von *matK*. Die beiden Stammbäume wurde mit unterschiedlichen Statistik-Methoden berechnet, führten aber im Wesentlichen zum gleichen Ergebnis. Verändert nach Heubl et al.^[90]

Der Gattungsname *Triphyphyllum* bezieht sich auf die drei verschiedenen Blatt-Typen, die im Laufe des für Pflanzen recht komplexen Lebenszyklus ausgebildet werden. Im Jugendstadium erscheinen lanzettliche Blätter, die spiralig um eine gestauchte, bereits recht früh verholzende Sprossachse angeordnet sind. Diese Phase kann mehrere Jahre andauern, wobei die gesamte Pflanze nicht höher als 50 cm wird. Welche Faktoren dazu führen, dass der zweite Lebensabschnitt durchlaufen wird, ist bislang ungeklärt. In dieser Phase bildet die Pflanze Fangorgane aus, die mit den gestielten Drüsen und ihrem klebrigen Sekret denen der Gattungen *Drosera* und *Drosophyllum* recht ähnlich sehen und ebenso funktionstüchtig sind. So konnte nachgewiesen werden, dass die Drüsen in der Lage sind, Aminosäuren wie z.B. Alanin aufzunehmen.^[91]

Die carnivore Phase dauert nur einige Wochen. Bislang war man davon ausgegangen, dass anschließend unweigerlich eine Verlängerung der Internodien einsetzt und die Pflanze zu einer Liane auswächst,^[92] wobei sie als Kletterhilfe die typischen namensgebenden Krallenblätter bildet, die ihr als Spreizklimmer das Aufsteigen in die Baumkronen erleichtern.^[93]

Kultur und Vermehrung von *T. peltatum* erfolgten bislang kaum. Das lag und liegt vor allem daran, dass bereits die Samen (Abbildung 12) sehr schwer zu bekommen sind. Außerdem verlieren diese, wie für tropische Pflanzen typisch, ihre Keimfähigkeit recht bald, so dass zufällig verfügbare Samen nicht verwendbar sind. Andere effektive Methoden zur Vermehrung dieser faszinierenden "Teilzeitcarnivoren" Liane existieren bislang nicht.

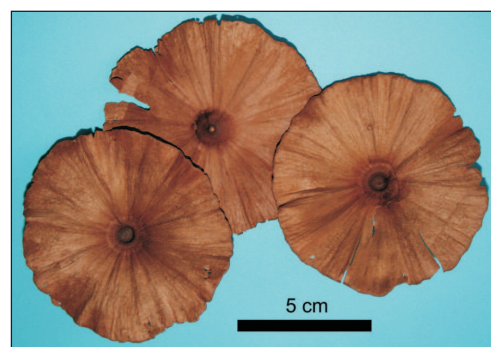


Abbildung 12. Selten zu bekommen: Samen von *Triphyphyllum peltatum*.

3.2 Bewurzelung steriler Sprosse und Transfer ins Gewächshaus

Unserem Arbeitskreis gelang es im Rahmen einer engen Kooperation mit Prof. L. Aké Assi aus der Elfenbeinküste 1997 fertile Samen zu bekommen, von denen ein Teil für die Gewächshaus-Aussaart verwendet wurde. Dies führte im Jahre 2000 zu einer blühenden

Liane,^[94,95] die allerdings den carnivoren Teil des Lebenszyklus übersprang und nach der zweiten Blühphase abstarb. Einige Samen wurden von H. Rischer eingesetzt, um sterile Sprosskulturen anzulegen (Abbildung 13). Diese dienten zum einen als Ausgangsmaterial für die Etablierung von Kalluskulturen, waren aber zugleich auch für die *In-vitro*-Vermehrung verwendbar.^[21,96]

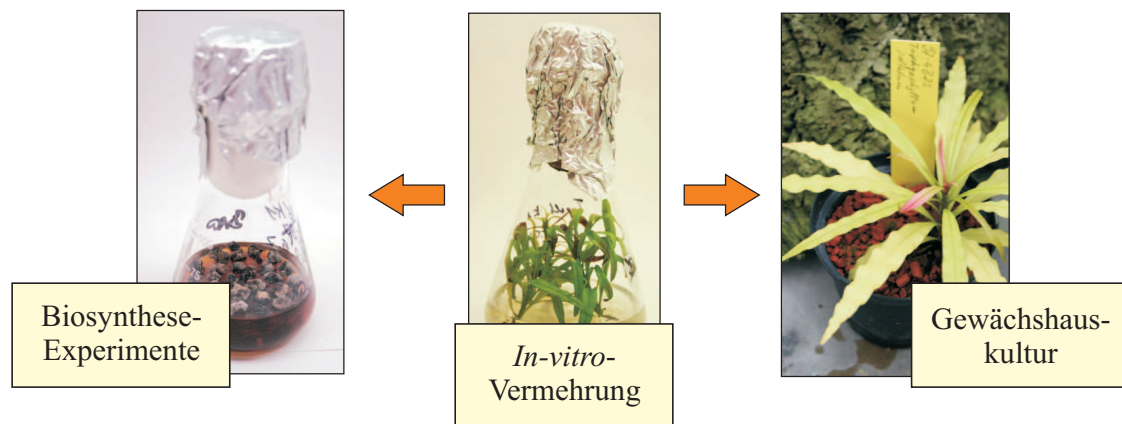


Abbildung 13. Sterile Organkultur von *T. peltatum*: Sprosse mit Blättern des juvenilen Typs als Ausgangsmaterial für die Etablierung von Zellkulturen aber auch für die *In-vitro*-Vermehrung der Pflanze.

Die Bewurzelung der Sprosse war selbst unter Einsatz verschiedenster Phytohormone, wie sie üblicherweise zur Induktion der Wurzelbildung eingesetzt werden, schwierig und gelang nur selten.^[96] Die Wurzelentwicklung erfolgte noch am ehesten in reinem deionisiertem sterilem Wasser. Allerdings bildeten auch hier nur ca. 26% der Sprosse Wurzeln und konnten erfolgreich ins Gewächshaus ausgebracht werden.^[96] Der Rest starb in der Regel ab und war für die Weiterkultur verloren.

Bei dem routinemäßig durchgeführten Transfer der Sprosskulturen auf frisches Anderson-Medium^[97] wurde aber beobachtet, dass es gelegentlich zu einer spontanen Bildung von Wurzeln kam (Abbildung 14). Dies geschah häufiger, wenn die Kulturen nicht, wie von H. Rischer etabliert, in einem vierwöchigen Turnus umgesetzt wurden, sondern für einen längeren Zeitraum von bis zu acht Wochen auf dem zunehmend an Nährstoffen verarmenden Medium gehalten wurden. In der Situation knapper werdender Ressourcen (Wasser und Nährstoffe) bilden Pflanzen sogenannte Suchwurzeln um neue Bodenareale zu erschließen. Ein ähnlicher Effekt hat nun auch bei *T. peltatum* dazu geführt, dass Adventivwurzeln entstehen und damit kleine intakte sterile Pflanzen.

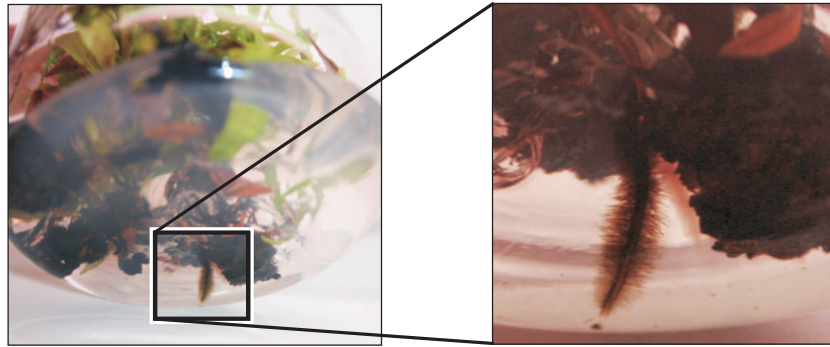


Abbildung 14. Wurzelbildung an steril kultivierten *Triphyophyllum*-Sprossen auf verarmendem Kultur-Medium.

Das Überführen dieser Pflanzen in autoklaviertes Seramis[®], das mit einer Nährlösung getränkt war, die der Zusammensetzung des MS-Mediums^[98] entsprach, jedoch nur 1/5 der Konzentration an Makronährelementen aufwies, erfolgte problemlos. Die unbewurzelten Sprosse wurden wie gewohnt auf frisches Anderson-Medium umgesetzt und konnten weiterkultiviert werden. Dadurch war das Problem des Materialverlusts bei Bewurzelungsversuchen erstmals vollständig behoben worden.

Es war ausreichend, die bewurzelten *T.-peltatum*-Pflänzchen wenige Wochen lang steril unter den Bedingungen weiter zu kultivieren, wie sie für die Sprosskultur eingesetzt wurden. Während dieser Zeit entwickelten sich die jungen Pflanzen weiter und bildeten sowohl neue Blätter als auch weitere Wurzeln. Bereits nach sechs bis acht Wochen war es nicht mehr nötig, die sterilen Bedingungen beizubehalten, und die Gewöhnung an eine insterile Umwelt konnte erfolgen (Abbildung 15).

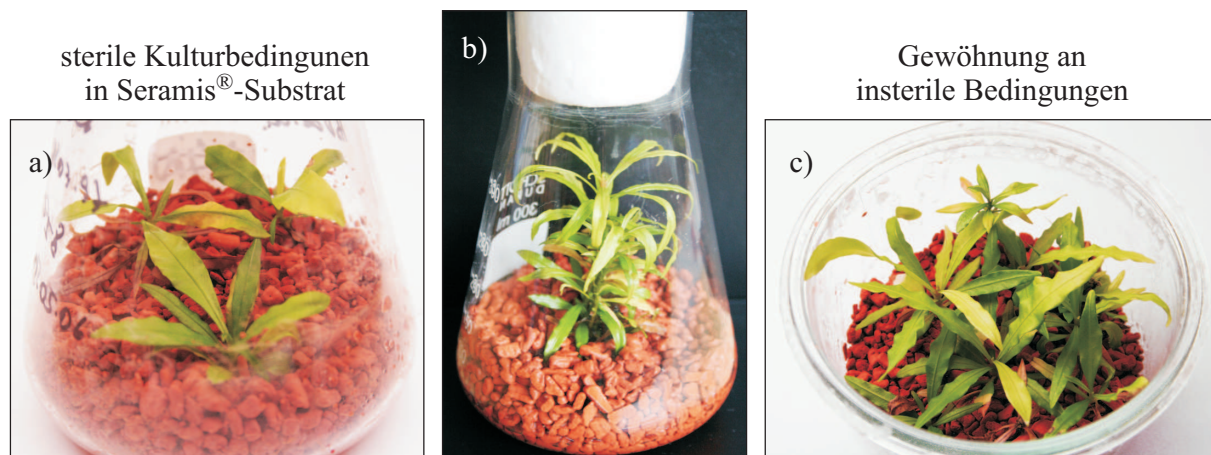


Abbildung 15. *T.-peltatum*-Pflänzchen nach dem Transfer in steriles Seramis: a) wenige Tage nach dem Transfer, b) ca. 8 Wochen später, c) Gewöhnung der Pflänzchen an insterile Bedingungen unter Laborbedingungen.

Die Akklimatisierung im Gewächshaus wurde ca. 3 Monate später vorgenommen. Zu diesem Zeitpunkt waren die einzelnen Blättchen 1.5 bis 2 cm lang. Zunächst wurde weiterhin in Seramis®-Substrat (in normalen gärtnerisch genutzten Pflanztöpfen) im Vermehrungsbeet mit 95 prozentige Luftfeuchte bei ca. 25 °C und Bodenheizung kultiviert (Abbildung 16). Die Belichtung wurde für 12 Stunden pro Tag konstant gehalten, wenn nötig wurde zusätzlich belichtet.^[23] Zur Vermeidung von Salzstress erfolgte in den ersten Monaten keine Düngung, wichtig war zudem das tägliche Gießen mit Regenwasser. In dieser Phase entwickelten sich neue Blätter des juvenilen Typs, die allerdings nicht länger als 4 cm waren. Nach einer ca. dreimonatigen Eingewöhnungszeit im Gewächshaus erfolgte eine Gabe von 0.5 g MannaCote® M6 (ein Langzeitdünger) pro Topf, so dass die Nährstoffversorgung der Pflänzchen gewährleistet war. Dies führte nach kurzer Zeit auch zu neu gebildeten Blättern, die an Länge zunahmen.



Abbildung 16. Junge Pflanzen von *T. peltatum* im Gewächshaus unter insterilen Bedingungen. Die Pflanze vorn rechts wurde bereits ca. ein Jahr zuvor in den Botanischen Garten Würzburg gebracht.

Während des Sommers kam das Wachstum von *T. peltatum* nahezu zum Erliegen. Als unbedingt erforderlich erwies sich eine Schattierung gegen direkte Sonneneinstrahlung, da die Blättchen der jungen Pflanzen bei zu starker Belichtung sofort verbrannten und im schlimmsten Falle die gesamte Pflanze zugrunde ging. Auch scheinen zu hohe Temperaturen (über 35 °C) für längere Zeit ungünstigen Einfluss zu haben. Mit Einsetzen des Herbstes war ein erneuter Wachstumsschub zu beobachten, der zu deutlich größeren Pflanzen mit ebenfalls erheblich längeren (bis 10 cm langen) Blättern führte.

3.3 Carnivore Organe bei *T. peltatum* im Gewächshaus des botanischen Gartens der Universität Würzburg

Einige der neu etablierten *T. peltatum*-Pflanzen im Gewächshaus bildeten bereits ein Jahr nach der Akklimatisierung erstmals (parallel zu einem viel älteren Exemplar in den Botanischen Gärten Bonn) in einem europäischen Gewächshaus carnivore Drüsenblätter. Zuvor war zu beobachten, dass die Blätter dieser Pflanzen eine deutlich kräftigere grüne Farbe aufwiesen, bevor die carnivoren Organe sichtbar erschienen. Alle anderen Jungpflanzen behielten ihre hellgrüne Farbe bei. Bisher geht man davon aus, dass carnivore Pflanzen durch den Verdau und die Aufnahme von organischen Substanzen ihren Stickstoff-Haushalt verbessern.^[99] *Triphyophyllum* investiert aber bereits vor der Bildung carnivorer Fangorgane Stickstoff in die Bildung von Chlorophyll. Dies wiederum dient möglicherweise dazu, genügend Energie für die schnelle Biomasse-Produktion, bereitzustellen. Die Bildung der Drüsenblätter erfolgt in einem relativ kurzen Zeitraum (drei bis vier Wochen) wobei die Organe selbst kaum photosynthetisch aktiv sind.

Die Mittelrippe aller jungen Drüsenblätter waren invers-spiralige eingerollt (Abbildung 17), wie es auch für *Drosophyllum* typisch ist. Die zukünftigen Drüsen waren als kleine grüne Härchen zu erkennen. Während der Entfaltung reiften die Drüsen schnell heran, so dass der bereits gestreckte Teil der Mittelrippe alle drei bekannten Drüsentypen (großköpfig und gestielt, mit kleinem gestieltem Kopf und sitzende Drüsen) besaß, die voll funktionstüchtig waren und bereits ihr schleimiges Sekret^[100] absonderten, obwohl das Organ noch nicht vollständig entwickelt war.

Die blattähnlich verbreiterte Basis (Abbildung 18) erscheint erst zum Ende der Entfaltung oder danach vollständig.

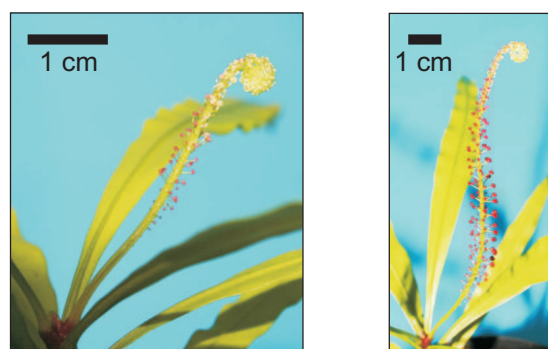


Abbildung 17. Junge carnivore Organe von *T. peltatum*. Bei dem frühen Stadium auf dem linken Bild entwickeln sich die Drüsen gerade. Einige Tage später besitzt das noch immer nicht voll entfaltete Drüsenblatt schon funktionstüchtige Drüsen (rechtes Bild).



Abbildung 18. Variabilität der Blattspreiten-ähnlichen Basis carnivorere Organe von *T. peltatum* im Botanischen Garten Würzburg.

Die Größe und Form des Blattspreiten-ähnlichen Teils des Drüsenblattes variierte bei den einzelnen Organen selbst an ein und derselben Pflanze und lag etwa zwischen 2.0 x 0.5 cm und 8.0 x 2 cm (Länge x Breite). Der laubblattartige Teil umfasste damit ca. 1/6 bis 1/2 der gesamten Länge des Drüsenblattes. Es gab ein reziprokes Verhältnis von Blattbasis zu drüsentragendem Teil: je länger der Blattteil war, desto kürzer fiel der Drüsenteil aus. Die Spitze des Fangblattes wurde von einer Drüse geformt, die ca. 1.5- bis 2-mal größer war, als alle anderen Drüsen (Abbildung 19).

In einigen Fällen gabelte sich das Fangorgan wenige Millimeter unterhalb der Spitze. Auch hier fanden sich unterschiedliche Ausprägungen dieser Erscheinung. Diese reichten von einer zweiten etwas größeren Drüse bis hin zu einer deutlichen Gabelung der verlängerten Mittelrippe. In der Literatur wird diskutiert, ob es sich dabei um einen „Vorgriff“ auf die Morphologie der Hakenblätter handelt, deren Blattspitze ebenfalls gegabelt ist.^[101]

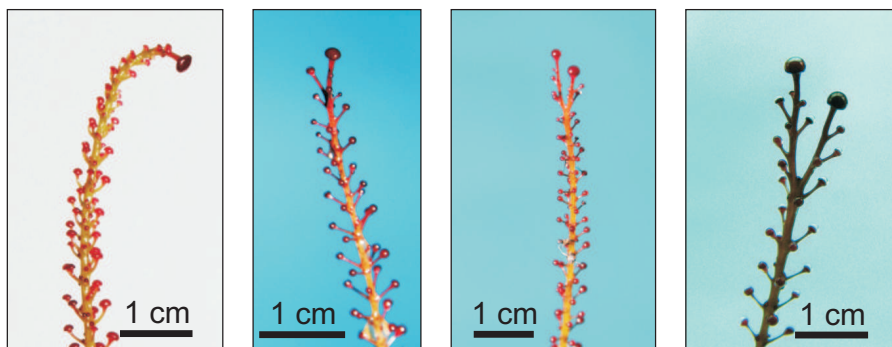


Abbildung 19. Jedes carnivore Organ endete in einer übergroßen Drüse. Gelegentlich kam es vor, dass sich der drüsentragende Teil kurz vor der Spitze in unterschiedlich starkem Maße gabelte.

Mit der ersten vollständig entwickelten Drüse produzierte das Fangorgan ein klebriges Sekret, das dem Festhalten und dem Verdau kleiner Insekten diente. Da im Würzburger Botanischen Garten keine Versuche zur möglichen Größe etwaiger Beutetiere unternommen wurden, verfangen sich lediglich die in einem Gewächshaus üblicherweise vorherrschenden kleinen Insekten (Abbildung 20) wie Trauermücken (Sciaridae) oder Zuck- bzw. Kribbelmücken (Chironomidae). Die Tiere wurden jedoch nicht näher bestimmt. Gelegentlich fanden sich auch die Reste von kleinen Spinnen (Cyphopalpatores, ebenfalls nicht näher bestimmt). Die Körper alle Beutetiere waren nicht größer als 2 bis 3 mm. Viele der betrachteten Beutetiere im Botanischen Garten der Universität Würzburg waren innerhalb weniger Tage zersetzt. Die im Drüsen-Sekret enthaltenen Verdauungsenzyme^[92] arbeiten demnach sehr effektiv. Schwankungen in der Menge des Sekretes konnten häufig beobachtet werden, ließen sich aber auf eine unterschiedlich gute Wasserversorgung zurückführen.

In den Botanischen Gärten Bonn vorgenommene Beuteversuche mit einer nicht näher bestimmten Schmeißfliege (Calliphoridae) zeigten, dass Insekten dieser Größe von den Tentakeln kaum festgehalten werden können und somit wahrscheinlich nicht zum Beuteschema von *T. peltatum* gehören. Allerdings konnte in Bonn mit diesem Experiment bewiesen werden, dass es sich bei den Klebefallen von *Triphyphyllum* um passive Fallen handelt, die keinerlei Tentakelbewegung oder gar Blattkrümmung nach Beutekontakt zeigten, was durch eigene Beobachtungen bestätigt wurde. Auch die Rotfärbung der Drüsen wird nicht durch den physikalischen oder chemischen Reiz eines gefangenen Beutetiers hervorgerufen. Wie bei *Drosera*- oder *Drosophyllum*-Arten sind die Drüsenköpfe und ein Teil des Stielchens von Beginn an rot.

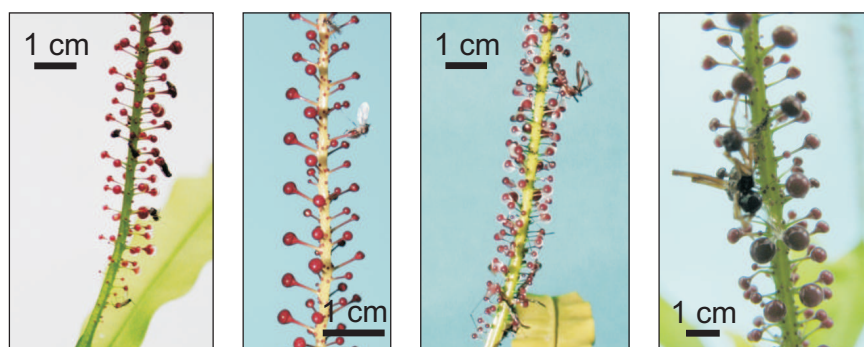


Abbildung 20. Drüsenblätter mit Beutetieren: Vor allem Trauermücken aber auch kleine Spinnen zählten zum Beutespektrum.

Die einzelnen Drüsenblätter benötigten ca. 3 bis 4 Wochen für ihre volle Entwicklung und überdauerten anschließend noch einmal einen solchen Zeitraum, bevor sie sehr schnell

abstarben (innerhalb von 2 bis 5 Tagen war das gesamte Drüsenblatt einschließlich des laubblattähnlichen Teils vertrocknet) und von der Pflanze abgestoßen wurden. Darin unterscheiden sich die Fangorgane von den Jungendblättern. Diese verbleiben u.U. noch länger an der Pflanze, bevor sich durch äußere Einflüsse mechanisch entfernt werden.

Nach Beendigung der carnivoren Phase, in der pro Pflanze zwei bis fünf Fangblätter gebildet wurden, fielen alle Pflanzen im botanischen Garten Würzburg aber auch in Bonn wieder in das juvenile Stadium zurück und bildeten erneut lanzettliche Blätter. Demnach ist der Übergang von der Carnivorie in das Lianenstadium nicht obligatorisch. Zieht man in Betracht, dass Jahre zuvor, eine durch Aussaat erhaltene Pflanze direkt vom frühen Stadium mit lanzettlichem Laub zur Liane auswuchs, ohne jemals Fangorgane gebildet zu haben, kann man nun davon ausgehen, dass dem Lebenszyklus von *T. peltatum* kein starres genetisches Programm zugrunde liegt. Das Erreichen und Durchlaufen unterschiedlicher Entwicklungsstufen hängt von vielen, noch immer unbekanntem Faktoren ab und kann den gegebenen Bedingungen entsprechend angepasst werden kann.^[102]

4 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus Kalluskulturen von *Triphyophyllum peltatum*

4.1 Kenntnisstand

Aus der Familie der Dioncophyllaceae ist *Triphyophyllum peltatum* die phytochemisch am besten untersuchte Art.^[19,20] Die ersten Ergebnisse wurden von der Forschergruppe um Bruneton veröffentlicht, die das Alkaloid Triphyophyllin isolierten.^[16] Die Konstitution dieses Alkaloids wurde zwar vollständig und richtig ermittelt, die Biarylachse als stereogenes Element blieb aber unbeachtet und die Stereozentren im Isochinolin-Teil wurden nur unzureichend aufgeklärt. In unserer Arbeitsgruppe untersuchte man diese Verbindung erneut und 2D-NMR-Experimente, CD-Spektroskopie, Röntgenstrukturanalyse sowie Totalsynthese führten zur vollständigen Aufklärung der Struktur,^[17,103-106] die daraufhin in Dioncophyllin A (**8**) umbenannt wurde. Zudem konnten viele weitere Alkaloide dieses Struktur-Typs (ein Isochinolin gekuppelt mit einem Naphthalin) aus *T. peltatum* isoliert werden.^[107] Die Achse der Naphthylisochinolin-Alkaloide ist in vielen Fällen rotationsgehindert und damit ein zusätzliches stereogenes Element. Insgesamt sind, bei Zugrundelegung einer Phenoxidativen Kupplung acht verschiedene Möglichkeiten einer C,C-Verknüpfung denkbar (an C-5 oder C-7 im Isochinolin und C-1, C-3, C-6 und C-8 im Naphthalin-Teil).^[108] Entsprechend dieser Achsen-Position erfolgt die Klassifizierung des Biarylkupplungstyps. Im Dioncophyllin A (**8**) sind die Teile des Moleküls 7,1'-gekuppelt.^[17] Neben diesem wurden auch Naphthylisochinoline mit einer 7,6'-Verknüpfung wie beispielsweise Dioncophyllin B (**24**),^[109] einer 5,1'-Kupplung wie im Dioncophyllin C (**25**)^[110] oder mit einer Biarylachse zwischen C-7 und C-8' wie im Dioncophyllin D (**26**) gefunden.^[111] Die Struktur des Naturstoffs **26** musste jedoch revidiert und als der bereits bekannter Kupplungstyp B, beschrieben werden.^[112] Seitdem existiert die Verbindung **26** lediglich als synthetisch hergestellte Substanz.^[113] Zusätzlich zu den Dioncophyllinen wurden aus *T. peltatum* weitere Naphthylisochinolin-Alkaloide, wie beispielsweise Dioncopeltin A oder Habropetalin A (**27**) isoliert.^[114,115] Erstmals nachgewiesen und strukturell vollständig aufgeklärt wurde **27** allerdings bereits zuvor durch Anwendung der analytischen Triade (HPLC-MS/MS, HPLC-NMR, HPLC-CD) in *Habropetalum dawei*.^[116] Aus *H. dawei* wurde zudem ein weiteres Dioncophyllin mit einer 7,3'-Verknüpfung isoliert, das damit dem Kupplungstyp E (**28**) entspricht (Abbildung 21).^[117]

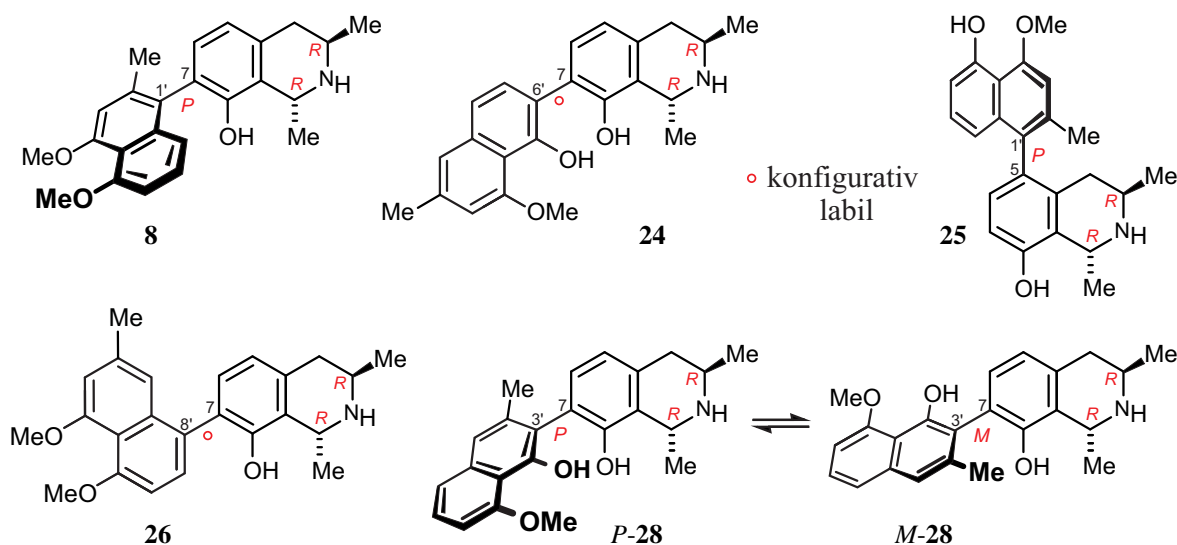


Abbildung 21. Vertreter der verschiedenen Kupplungstypen der Naphthylisochinolin-Alkaloide: Dioncophyllin A (8), Dioncophyllin B (24), Dioncophyllin C (25), das bislang nur synthetische Dioncophyllin D (26) und das Dioncophyllin E (P-28 und M-28) mit semi-stabiler Achsenkonfiguration.

Heute sind über 130 Naphthylisochinolin-Alkaloide bekannt, deren Mehrzahl allerdings aus Arten der den Dioncophyllaceae nahestehenden Gattung *Ancistrocladus* (Ancistrocladaceae) isoliert wurden. Die Alkaloide beider Pflanzen-Familien gehören zur selben Strukturklasse. Nach heutigem Kenntnisstand werden aber von den Dioncophyllaceae nur Isochinoline mit *R*-Konfiguration an C-3 und fehlender Oxygenierung an C-6 produziert und diese dementsprechend als Naphthylisochinoline des Dioncophyllaceae-Typs bezeichnet (Abbildung 22). Strukturen diesen Typs wurden später aber auch in Vertretern der Gattung *Ancistrocladus* gefunden. Für Naphthylisochinoline des Ancistrocladaceae-Typs sind eine *S*-Konfiguration an C-3 und eine 6-Oxygenierung charakteristisch. Zudem konnten auch Strukturen identifiziert werden, die Hybride beider Typen (mit *R*-Konfiguration an C-3 und oxygeniertem C-6 oder *S*-Konfiguration an C-3 mit fehlender Oxygenierung an C-6) sind und daher auch als Hybrid- bzw. inverser Hybrid-Typ bezeichnet werden.^[118-120] Daneben gibt es noch eine Unterklasse der Naphthylisochinolin-Alkaloide. Dieser besitzt keine *C,C*-Biarylachse, sondern eine *N,C*-Verknüpfung der beiden Molekülhälften, als Beispiel sei *Ancistrocladinium* A (29) genannt (Abbildung 22). Vertreter dieses Typs sind bislang aber nur in der Gattung *Ancistrocladus* gefunden worden.^[121,122]

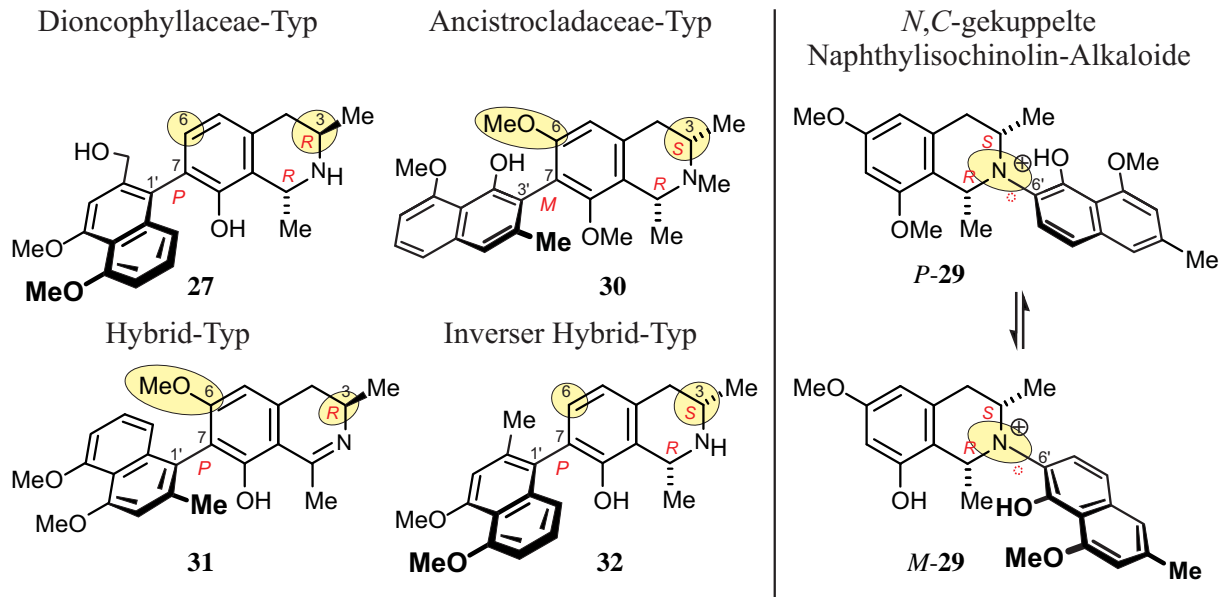


Abbildung 22. Je ein Vertreter der vier Typen der C,C-verknüpften Naphthylisochinolin-Alkaloide: Habropetalin A (**27**), Ancistroretorin (**30**), Ancistrobrevin C (**31**) und Dioncolin A (**32**). Außerdem Ancistrocladinium A (*P-29* und *M-29*) als Beispiel für die neue Unterklasse der N,C-gekuppelten Alkaloide.

Aus Ancistrocladaceae- und Dioncophyllaceae-Pflanzen wurden aber nicht nur Alkaloide isoliert, sondern auch einige sehr ubiquitär vorkommende Naphthochinone wie Plumbagin (**9**) und Drosereon (**10**).^[21,123] Man geht derzeit davon aus, dass die Naphthylisochinolin-Alkaloide eine evolutionär relativ junge Klasse pflanzlicher Sekundärmetabolite sind, deren Biosynthese in den Pflanzen durch jegliche Form von (biotischem und abiotischem) Stress unterdrückt werden kann.^[124] Wahrscheinlich ist es der Stickstoffeinbau, der in der Stresssituation blockiert wird. Dies kann bedeutsam sein, da Pflanzen allgemein, besonders aber auf den nährstoffarmen Böden der Tropen und erst recht in Notsituationen, sparsam mit Stickstoff umgehen müssen. Unter Stress wird dann, so die Annahme, der „altbewährte“ Weg der Produktion von Abwehrsubstanzen beschritten und es entstehen Naphthochinone wie **9** und **10** oder Tetralone wie **33** (Abbildung 23).

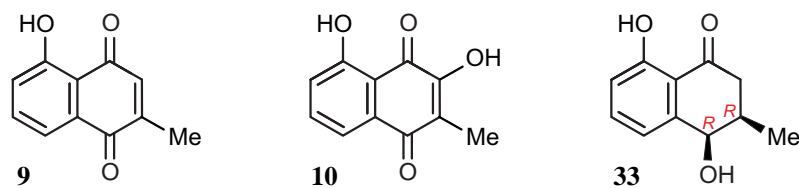


Abbildung 23. Die Naphthochinone Plumbagin (**9**) und Drosereon (**10**) sowie das Tetralon Isoshinanolon (**33**), deren Vorkommen bereits für *T. peltatum* beschrieben wurde.

Die von H. Rischer in unserem Arbeitskreis etablierten und in flüssigem Medium kultivierten Zellkulturen von *T. peltatum* (aber auch von *Ancistrocladus abbreviatus*) produzierten große Mengen Droseron (**10**), aber keine Naphthylisochinoline.^[21] Die Existenz der Zellen in flüssigem Kulturmedium unter sterilen Bedingungen verursacht offenbar eine starke chemisch und (durch die permanente Bewegung der Kulturen) auch physikalisch Stresssituation, die das Sekundärmetabolite-Spektrum im Vergleich zur intakten Pflanze beeinflusst. Die Kultur auf solidem Medium schien dann die Stressauswirkungen soweit zu mildern, dass die Zellen nun nicht mehr ausschließlich die Naphthochinone **9** und **10** bildeten, sondern auch isolierbare Mengen an Dioncophyllin A (**8**).^[18] Dies war vor allem für die Biosynthese-Forschung ein wichtiger Fortschritt. Allerdings hatte das System noch einen (zunächst rein praktischen) Nachteil. Als ungünstig für die Arbeit mit den von H. Rischer etablierten Zellkulturen erwies sich die sehr weiche, nahezu gelartige Konsistenz des Kulturmediums. Dies führte dazu, dass das Medium innerhalb eines kurzen Zeitraums (1 bis 3 Wochen Kalluskultur) einen zähflüssigen Zustand annahm oder sogar vollständig flüssig wurde und die Zellkulturen versanken. Die Handhabung der Kulturen wurde dadurch erschwert und die Zellen gerieten unter Sauerstoffmangel, der dafür sorgte, dass das phytochemische Potenzial der Zellen nicht ausgeschöpft wurde.

4.2 Änderung der Zusammensetzung des Kulturmediums

Der Sauerstoffmangel durch das Einsinken war ein weiterer, vermeidbarer Stressfaktor für die kultivierten Zellen. Bislang wurde für die Kultur von *T. peltatum* ein Medium nach der Vorschrift von Murashige und Skoog^[98] (MS-Medium) verwendet, dessen Makro-Nährelemente auf 1/5 der originalen Konzentration reduziert wurden, darunter fallen auch Calcium- und Magnesium-Ionen. Als Geliermittel kam Gelrite[®] (als Gellan Gum bezeichnet) zum Einsatz, ein Polysaccharid,^[125,126] das Ca- und Mg-Ionen benötigt, um eine stabile Matrix zu bilden (Abbildung 24).^[127] Die Festigkeit des Gels hängt von der Konzentration des Geliermittels, vor allem aber von der Menge mono- und divalenter Kationen ab. Durch den geringen Anteil dieser Ionen in der abgewandelten Formulierung des Mediums konnte die Gelierfähigkeit von Gelrite kaum ausgenutzt werden. Zudem standen die Zellkulturen nun in Konkurrenz um Ca²⁺ und Mg²⁺ mit dem Geliermittel. Der Entzug dieser Ionen aus dem Medium durch die Aufnahme in die Zellen führte in kurzer Zeit zum Zusammenbruch der Matrix mit der Folge, dass das Medium flüssig wurde und es zum Einsinken der Kulturen kam.

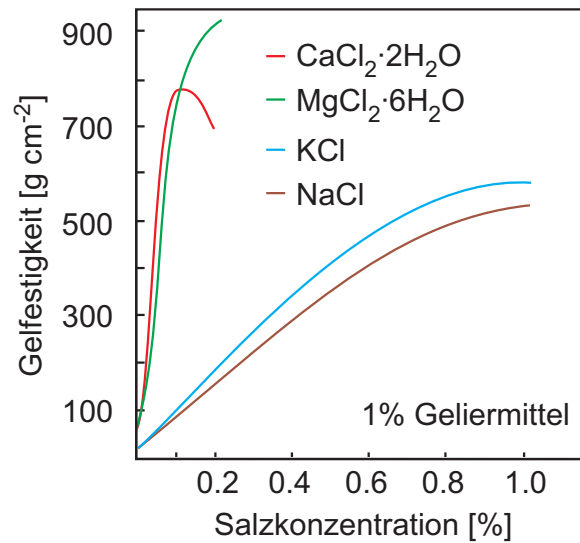


Abbildung 24. Abhängigkeit der Gelfestigkeit von der Konzentration mono- und divalenter Kationen bei Verwendung von Gelrite (1%ig) als Geliermittel für Kulturmedien (nach Kang *et al.*^[125] verändert).

Möglicher Weise war die Versorgung der Kalli mit Calcium und Magnesium, die beide vielfältige Funktionen in den Zellen besitzen,^[128] gestört und war neben dem Sauerstoffmangel ein weiterer Stressfaktor. Die vorsichtige Erhöhung des Calcium- und Magnesium-Gehaltes von 1/5 auf 1/4 der Original-Formulierung war eine sinnvolle Lösung des praktischen Problems. Von einer weiteren Erhöhung des Gehalts dieser Ionen im Kulturmedium wurde abgesehen, da insbesondere ein Übermaß an Calcium auch toxische Effekte (aufgrund seiner Aufgabe bei Signaltransduktionen) haben kann. Neben der höheren Festigkeit des Medium ergab sich als weitere Folge ein positiver Einfluss auf das Spektrum gebildeter Sekundärmetabolite. Zum einen war die produzierte Menge an Dioncophyllin A (**8**) im Vergleich zu früheren Untersuchungen^[129] (um bis zu 20%) höher. Zum anderen zeigte das Chromatogramm (HPLC) des Rohextraktes Peaks, die keiner bekannten Substanz zugeordnet werden konnten (Abbildung 25). Die UV-Spektren ließen aber annehmen, dass sie der Klasse der Naphthochinone zugeordnet werden mussten. Das NMR-Spektrum der Dioncophyllin-A-Fraktion (**8**, coeluiert üblicherweise mit seinen *O*-Demethyl-Varianten) zeigte zudem den Signalsatz eines unbekanntes Naphthylisochinolin-Alkaloids.

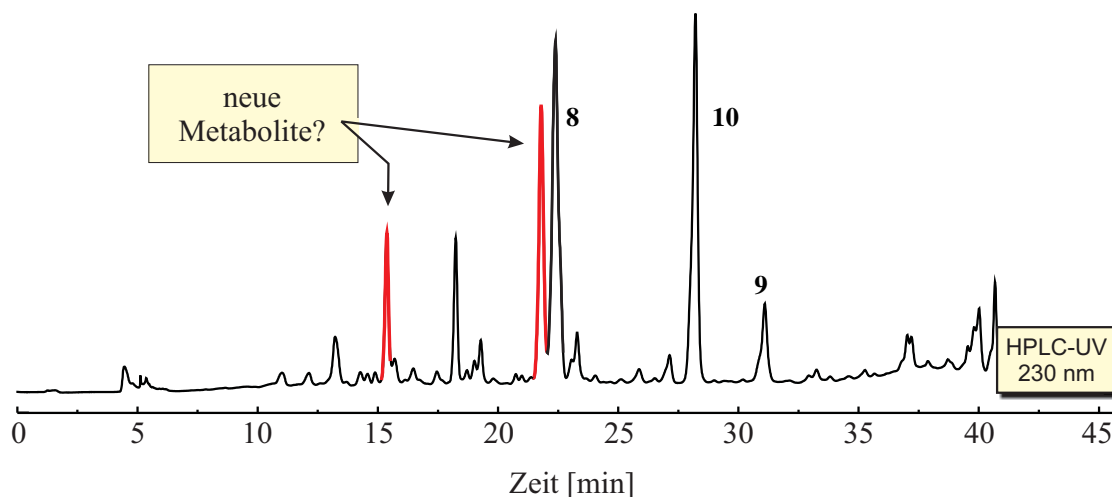


Abbildung 25. Chromatogramm des Rohextraktes aus Kalluskulturen von *T. peltatum*. Neben bekannten Substanzen wie Dioncophyllin A (**8**), Droseron (**10**) und Plumbagin (**9**) traten Peaks auf, die bislang unbekannt waren (rot markiert).

Neben der Durchführung von Untersuchungen zur Biosynthese der Naphthylisochionolin-Alkaloide (Kapitel 6) war auch eine phytochemische Charakterisierung der Zellkulturen und die Identifizierung bislang unbekannter Hauptmetabolite nötig.

4.3 Extraktion und Isolierung der Verbindungen

Die dunkelbraunen Kalli wurden von dem Medium gesammelt und lyophilisiert. Die trockenen Zellkulturen wurden zu einem feinen Pulver verrieben und mit Dichlormethan/Methanol (1:1) erschöpfend extrahiert. Der erhaltene Rohextrakt wurde zur Trockne eingengt. Zur Analyse, aber auch zur späteren Isolierung der einzelnen Komponenten löste man den so erhaltenen dunkelbraunen Rückstand in Methanol. Zum Schutz der HPLC-Anlagen und -säulen empfahl es sich, den Extrakt durch einen PTFE-Spritzenaufsatz-Filter (Porengröße 2 μm) zu passieren. Die Trennung und Aufreinigung der Substanzen erfolgte mittels präparativer HPLC an einer RP18-Phase (Waters Symmetry 19x300 mm, 7 μm). Lagen einzelne Substanzen anschließend noch nicht in Reinform vor, wurden diese Fraktionen mit einem angepassten Gradienten ein weiteres Mal der Trennung mittels präparativer HPLC unterzogen.

4.4 Isolierung von Naphthochinonen und Naphthylisochinolin-Alkaloiden

Im Chromatogramm des Rohextraktes konnten anhand des typischen UV-Profiles zunächst die Peaks der Naphthylisochinolin-Alkaloide identifiziert werden. Außerdem war Droseron (**10**) enthalten, das durch Coelutions-Experimente eindeutig identifiziert wurde. Plumbagin (**9**) war vermutlich nur in geringen Mengen vorhanden. Bereits während der Gefriertrocknung des Zellmaterials und dem Entfernen von Lösungsmitteln nach der Extraktion, also immer wenn mit reduzierten Drücken gearbeitet wurde, sublimierte ein Teil des Plumbagins (**9**), so dass der Rohextrakt nur noch geringe Anteile enthielt. Zusätzlich zeigte das Chromatogramm aber weitere, nicht identifizierbare Peaks, die ein komplexeres UV-Profil aufwiesen als Naphthylisochinoline oder Plumbagin (**9**). Das UV-Spektrum war vielmehr mit dem von Droseron (**10**) vergleichbar. Die Isolierung und Identifizierung erfolgte gemeinsam mit S. Rüdener.

4.4.1 Dioncochinon A (**34**) und Dioncochinon B (**35**)

Auf die Isolierung und Strukturaufklärung soll an dieser Stelle nur zusammenfassend eingegangen werden. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in der Dissertations-Schrift von S. Rüdener.^[130]

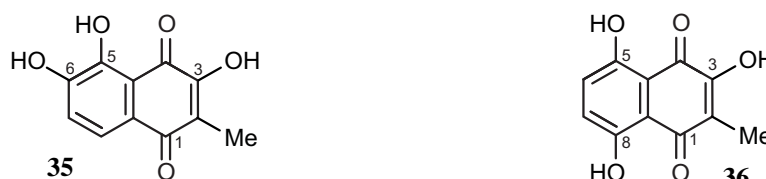
Eine der polarsten Komponenten des Rohextraktes war eine gelbe kristalline Substanz, die nur in Wasser und DMSO gut löslich war. Die zweite, später eluierende Verbindung war vor allem in polaren organischen Lösungsmitteln wie Methanol löslich. Die nach Entfernen des Lösungsmittels zurückbleibenden nadelförmigen Kristalle waren von kräftiger roter Farbe.

Von beiden Substanzen wurden 1D- und 2D-NMR-Spektren aufgenommen, denen zu entnehmen war, dass es sich in beiden Fällen um 2-Methyl-3-Hydroxy-1,4-Naphthochinone handelte (Abbildung 26). Bedeutend schwieriger war die Aufklärung des Substitutionsmusters am aromatischen Ring der Verbindungen **34** und **35**. Aus den NMR- und den Massenspektren war bekannt, dass zwei weitere Sauerstofffunktionen im Molekül enthalten waren. Allerdings war die Zuordnung des Substitutionsmusters (5,6- oder 5,8-Substitution) allein aus den NMR-Spektren nicht zweifelsfrei möglich. Bei dem möglichen 3,5,8-Hydroxy-2-Methyl-1,4-Naphthochinon (**36**) handelte es sich zwar um eine Literaturbekannte Substanz, Vergleichsmaterial fehlte jedoch.

Zur Klärung des Sachverhaltes wurden von Dr. T. Bruhn quantenchemische Berechnungen der für diese Verbindung zu erwartenden ^1H - und ^{13}C -NMR-Verschiebungen

vorgenommen.^[131] Der Vergleich der quantenchemisch berechneten Werte für Verbindung **35** mit den experimentellen Daten zeigte eine gute Übereinstimmung. Die durchschnittliche Abweichung betrug lediglich 1.1 ppm, damit war sie deutlich geringer als die mittlere Abweichung (7.7 ppm) der Werte der Verbindung **36** (Tabelle 1).

Tabelle 1. Experimentelle und quantenchemisch für die Verbindungen **35** und **36** berechnete ¹³C-NMR-Werte im Vergleich und die daraus resultierende mittlere Abweichung (RMSE = root mean square error).



Position	35			36		
	exp.	ber.	ber. – exp.	exp.	ber.	ber. – exp.
1	183.4	183.9	0.5	183.4	187.9	4.5
2	122.7	123.2	0.5	122.7	123.9	1.2
3	152.3	151.9	-0.4	152.3	153.4	1.1
4	185.0	186.6	1.6	185.0	180.4	-4.6
5	147.9	146.9	-1.0	147.9	158.6	10.7
6	149.6	150.0	0.4	149.6	125.3	5.0
7	120.4	117.7	-2.7	120.4	132.2	10.9
8	121.3	120.9	-0.4	121.3	157.8	8.2
9	124.3	124.7	0.4	124.3	110.3	-3.1
10	113.4	114.6	1.2	113.4	109.7	-14.6
RMSE			1.0			7.7

Ähnliches ergab der Vergleich der experimentellen ¹H-NMR-Verschiebungen von Dioncochinon B (**35**) und 8-Hydroxy-Droseron (**36**).^[132-143] Die mittlere Abweichung zwischen dem experimentellen Datensatz und den rechnerisch ermittelten Werten für **35** war mit 0.3 wiederum deutlich geringer als die mittlere Abweichungen von 3.1 der für **36** berechneten Verschiebungen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Experimentelle und quantenchemisch für die Verbindungen **35** und **36** berechnete ^1H -NMR-Werte im Vergleich und die daraus resultierende mittlere Abweichung (RMSE = root mean square error).



Position	35			36		
	exp.	ber.	ber. – exp.	exp.	ber.	ber. – exp.
6	-	-	-	7.20	7.62	0.42
7	7.2	7.35	0.15	7.65	7.42	-0.23
8	7.65	8.09	0.44	-	-	-
3-OH	7.04	7.25	0.21	7.04	7.55	0.51
5-OH	11.22	11.85	0.63	11.22	12.08	0.86
6-OH	6.04	6.08	0.04	-	-	-
8-OH	-	-	-	6.04	13.59	7.55
2-CH ₃	2.10	2.16	0.06	2.10	2.22	0.12
RMSE			0.3			3.1

Die polarere der beiden Verbindungen (**34**) zeigte im ^1H -NMR-Spektrum zusätzlich eine Region komplexer Signale. Das Elektronen-Stoß-Ionisations-Massenspektrum (EI-MS) zeigte als Signal ein Fragment von m/z 220.1. Dies in Verbindung mit den Informationen aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren ließ auf einen Hexose-Rest schließen, der mit der bereits identifizierten Naphthochinon-Teilstruktur verbunden war. Ein literaturbekanntes Beispiel eines solchen Naphthochinon-Glucosids ist das 8-Hydroxyroseron-5-*O*- β -Glucosid^[144], dessen ^1H -NMR-Werte denen der zu identifizierenden Struktur sehr ähnlich waren. Die Annahme einer Glucose-Einheit wurde durch HMBC und COSY-Wechselwirkungen erhärtet. Das 1-H' der Glucose zeigte eine große Kopplungskonstante von 7.4 Hz und erlaubte dadurch die Zuordnung der Konformation des Zuckerrestes als β -Anomer. Außerdem besaß dieses Proton HMBC-Korrelationen mit dem zu tiefem Feld verschobenen Kohlenstoff bei 150.0 ppm (Abbildung 26). Damit war sicher, dass der Glucose-Rest mit dem aromatischen Ring

des Aglycons verbunden war, und zwar über den Sauerstoff, dessen Funktionalität zuvor nicht festgelegt werden konnte.

Die enzymatische Spaltung der Substanz **34** mit einer β -Glucosidase oder die Hydrolyse mit halbkonzentrierter Salzsäure setzte das weniger polare Aglycon frei, das durch Überschichtung der Mischung mit Dichlormethan aus der Mischung entfernt wurde. Die wasserhaltige Fraktion wurde getrocknet und ergab einen weißen Feststoff, dessen Charakteristika (Schmelzpunkt, Drehwert, $^1\text{H-NMR}$) mit dem einer Probe käuflicher D-Glucose übereinstimmten. Das Aglycon war nach Entfernen des Dichlormethans nun in allen spektroskopischen, physikalischen und chromatographischen Eigenschaften identisch mit Verbindung **35**.

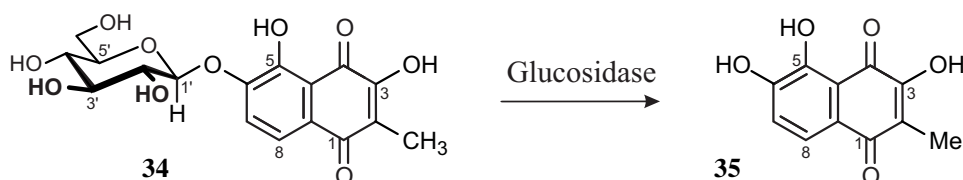


Abbildung 26. Dioncochinon A (**34**) und sein Aglycon Dioncochinon B (**35**).

Die isolierten Verbindungen wurden damit als 6-Hydroxydroseron-6-*O*- β -glucosid (**34**) sein Aglycon (**35**) identifiziert. Bei beiden Naphthochinonen handelte es sich um Naturstoffe, die bislang nicht literaturbekannt waren. Die Benennung dieser Substanzen als Dioncochinon A (**34**) und B (**35**) erfolgte daher in Anlehnung an die Pflanzenfamilie Dioncophyllaceae, der *Triphyphyllum peltatum* angehört.^[65]

4.4.2 Isolierung von Droseron (10)

Das Chromatogramm (HPLC) des Rohextraktes von *T.-peltatum*-Kalluskulturen zeigte einen weiteren Haupt-Peak, dessen zugehöriges UV-Profil ebenfalls auf ein Naphthochinon schließen ließ, das jedoch deutlich unpolarer war als die beiden zuvor isolierten und identifizierten neuen Verbindungen. Die Substanz bildete bei Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer gelbe nadelförmige Kristalle. Dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum war zu entnehmen, dass drei aromatische und zwei austauschbare Protonen vorhanden waren. Zudem musste eine Methylgruppe vorhanden sein. Das ^{13}C -Spektrum wies auch auf das Vorhandensein der beiden für Naphthochinone typischen Carbonylfunktionen hin und bestätigte die Annahme

zweier OH-Gruppen. Diese Fakten und der Vergleich mit literaturbekannten Verbindungen identifizierten diese Substanz als Droseron (**10**).^[145]

4.4.3 Isolierung von 8-Hydroxydroseron (**36**)

Ebenfalls aus den Kalluskulturen wurde eine Substanz isoliert, die bei der HPLC-Analyse bereits vor Droseron (**10**) eluierte, das typische UV-Spektrum eines Naphthochionons besaß und sowohl in Lösung als auch in kristalliner Form kräftig orangefarben war. Die exakte Masse von m/z 219.0299 $[M-H]^-$ legte die gleiche Summenformel ($C_{11}H_8O_5$) wie für Dioncochinon B (**35**) nahe. Die im 1H -NMR-Spektrum vorhandenen zwei aromatischen Protonen zeigten jedoch andere Verschiebungen. Weitere 1D- und 2D-NMR-Experimente offenbarten, dass es sich bei der Substanz um das bereits aus anderen Pflanzen bekannte 8-Hydroxydroseron (**36**) handelte.^[144]

Durch die Isolierung und Identifizierung von **36** wurde nun auch sehr schön an authentischem Material veranschaulicht, dass Dioncochinon B (**35**) und 8-Hydroxydroseron (**36**) sich sowohl im UV- als auch im 1H -NMR-Spektrum deutlich unterschieden. Dies erbrachte noch einmal ein Beweis für die Richtigkeit der Struktur von **35**.

4.4.4 Identifizierung von Plumbagin (**9**)

Die unpolarste Substanz, die im Extrakt aus Kalluskulturen von *T. peltatum* identifiziert wurde, zeigte ein UV-Spektrum, das im Vergleich zu denen der zuvor isolierten Naphthochionone deutlich simpler war, dennoch aber dieser Substanzklasse zugeordnet werden musste. Das Entfernen des Lösungsmittels nach präparativer HPLC-Trennung am Rotationsverdampfer machte eine weitere Eigenschaft der Substanz deutlich. Drücke um ca. 100 mbar reichten aus, um die Substanz sublimieren zu lassen, so dass die Annahme nahe lag, dass es sich um Plumbagin (**9**) handelte. HPLC-Coelutions-Experimente bestätigten diese Annahme und führten zur eindeutigen Identifizierung. Als zusätzlicher Beweis wurden LC-NMR-spektroskopische Daten gewonnen, die mit den literaturbekannten Werten für Plumbagin (**9**) vollständig übereinstimmten.^[123]

4.5 Identifizierung dreier *O*-methylierter Derivate eines 3,5,6,7-Tetraoxy-2-methyl-1,4-naphthochinons

Die Entdeckung der beiden aus *T. peltatum*-Kallus isolierten Naphthochinone **34** und **35** sowie Beobachtungen im Rahmen anderer Projekte machten eine erneute Untersuchung der Sterilkulturen lohnend. Besonderes Augenmerk wurde nun auf die Minderkomponenten gelegt. Es empfahl sich daher, nicht sofort Isolierungsversuche durch den Einsatz der präparativen HPLC zu beginnen, sondern zunächst eine Anreicherung interessanter Metabolite zu erlangen. In Zusammenarbeit mit G. Zhang wurde zu diesem Zwecke der aus Kalluskulturen hergestellte Rohextrakt nach etablierter Methode mittels Ionentauscher-Chromatographie von kationischen Substanzen (z.B. Naphthylisochinolin-Alkaloide) befreit. Eine weitere Fraktionierung wurde durch die Anwendung der Säulenchromatographie an Kieselgel erreicht. Als mobile Phase wurde ein Gradient aus Chloroform, Methanol und Ameisensäure (1:0:0, 1:0:0.005, 1:0:0.008, 1:0.05:0.008, 1:0.1:0.01, 1:0.15:0.01) verwendet. Dieser Gradient sorgte für eine hervorragende Eluierung der Metabolite und eine Anreicherung interessanter Substanzen in einer Fraktion, die nun von den vorherrschenden Naphthochinonen Droseron (**10**), Dioncochinon A (**34**) und B (**35**) weitgehend befreit war. Mit dieser, vor allem Minderkomponenten enthaltenden Fraktion wurde daraufhin eine weitere Auftrennung mittels präparativer HPLC begonnen. Neben dem bereits bekannten 8-Hydroxydroseron (**36**) wurden drei weitere, bislang unbekannte Naphthochinone entdeckt.^[146]

Den ¹H-NMR-Spektren der drei Verbindungen war zu entnehmen, dass alle drei Substanzen nur ein aromatisches Proton aufwiesen. Desweiteren gab es eine Methylgruppe, jeweils mindestens eine Methoxyfunktion und eine chelatisierte Hydroxygruppe, wie sie auch von allen zuvor isolierten Naphthochinonen bekannt war. Die ¹³C-NMR-Spektren zeigte für jede der Substanzen zwei Signale mit einer Tieffeld-Verschiebung (184 bis 186 ppm), wie sie für Carbonylfunktionen von 1,4-Naphthochinonen typisch waren. Außerdem gab es jeweils vier quartäre Kohlenstoffatome, deren Verschiebung auf das Vorhandensein von Hydroxy- oder Methoxygruppen schließen ließ. Die Naphthochinone trugen also eine Sauerstofffunktion mehr als beispielsweise **35**. HMBC-Wechselwirkungen des einzigen aromatischen Protons mit der Ketofunktion an C-1 belegten die 3,5,6,7-oxygenierte Grundstruktur. Nun blieben lediglich die Positionen der *O*-Methylgruppen zu bestimmen.

4.5.1 Dioncochinon C (39)

Das ^1H -NMR-Spektrum der ersten Verbindung zeigte zwei Methoxygruppen (4.01 und 4.05 ppm). HMBC-Wechselwirkungen einer der OMe-Funktion und der Methylgruppe an C-2 machten die Zuordnung der Position an C-3 (157.1 ppm) leicht. Ebenfalls durch HMBC- (4.01 und 7.26 zu 151.3 ppm) und auch durch NOESY-Interaktionen (4.01 mit 7.26 ppm) wurde die Position der zweiten Methoxyfunktion bestimmt (Abbildung 27). Es handelte sich um das 5,6-Dihydroxy-3,7-dimethoxy-2-methyl-1,4-naphthochinon, dem, in Fortsetzung der mit Dioncochinonen A und B begonnene Reihe, der Trivialname Dioncochinon C (**39**) gegeben wurde.^[146]

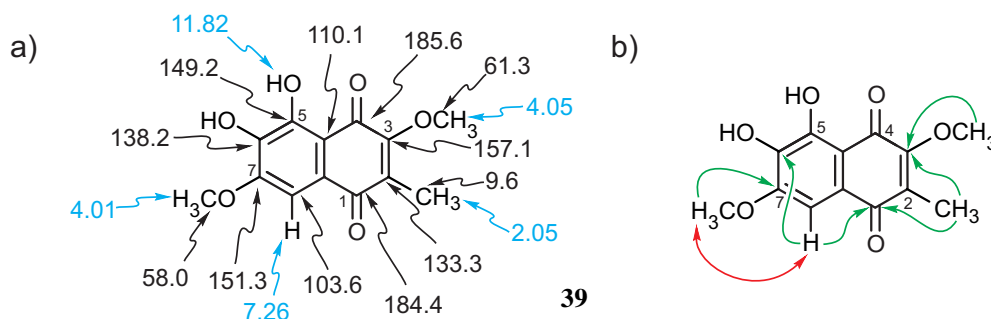


Abbildung 27. Ausgewählte NMR-Daten von Dioncochinon C (**39**): a) ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen [ppm] sowie b) für die Strukturaufklärung wichtige HMBC- (grüne einfache Pfeile) und NOESY-Wechselwirkungen (roter Doppelpfeil).

4.5.2 Dioncochinon D (40)

Ähnlich gestaltete sich die Situation bei dem zweiten Naphthochinon. Dieses war deutlich polarer als **39** und daher nur gering in CDCl_3 löslich, so dass die NMR-Spektren in MeOD aufgenommen wurden. Entsprechend dem ^1H -NMR-Spektrum und der HRESIMS (m/z 249.0404 [M-H] $^-$) besaß dieses Naphthochinon lediglich eine Methoxygruppe. NOESY-Wechselwirkungen zwischen H-8 und der Methoxygruppe fehlten. Das Proton an C-8 besaß jedoch HMBC-Interaktionen mit C-6 (139.7 ppm), das seinerseits eine Korrelation mit der einzigen Methoxygruppe besaß und so die Position der OMe-Funktion bestimmte (Abbildung 28). Damit handelte es sich um das 3,5,7-Trihydroxy-6-methoxy-2-methyl-1,4-naphthochinon, das Dioncochinon D (**40**) genannt wurde.^[146]

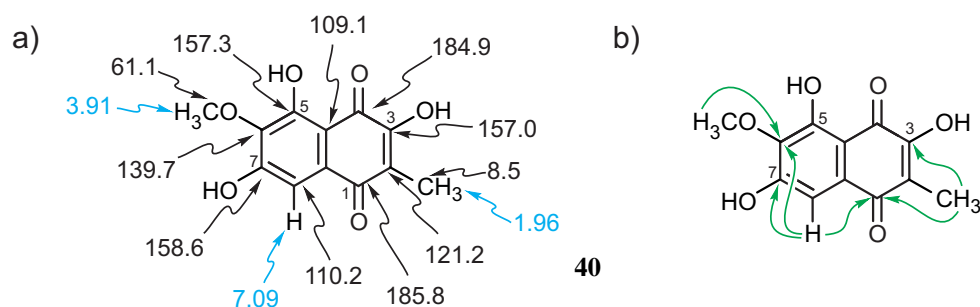


Abbildung 28. Dioncochinon D (**40**) mit a) ausgewählten ¹H- und ¹³C-NMR-Daten und b) für die Aufklärung der Struktur-relevanten HMBC-Wechselwirkungen.

4.5.3 Dioncochinon E (**41**)

Die dritte der unbekanntenen Verbindungen besaß ebenfalls nur eine Methoxygruppe, deren Position nicht C-3 oder C-5 sein konnte. Nicht eindeutig ausgeschlossen werden konnten C-6 und C-7. Diese Substanz war sehr polar und ließ sich ebenfalls nicht in Chloroform lösen. Daher wurden alle NMR-Spektren in deuteriertem Aceton aufgenommen. HMBC-Wechselwirkungen der Methoxygruppe (4.01 ppm) zu einem quartären Kohlenstoff (153.6 ppm) und NOESY-Korrelationen zum einzigen aromatischen Proton an C-8 legten ihre Position an C-7 fest, die durch HMBC-Interaktionen des 8-H (7.27 ppm) zu dem selben Kohlenstoff bestätigt wurden (Abbildung 29). Die Positionen 3, 5 und 6 trugen in dieser Verbindung Hydroxyfunktionen. Es handelte sich also um das 3,5,6-Trihydroxy-7-methoxy-2-methyl-1,4-naphthochinon, das den Trivialnamen Dioncochinon E (**41**) erhielt.^[146]

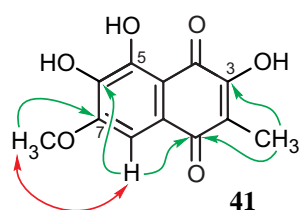


Abbildung 29. Relevante HMBC- (einfache grüne Pfeile) und NOESY-Wechselwirkungen (roter Doppelpfeil) in Dioncochinon E (**41**).

Unbeantwortet bleiben musste aber zunächst die Frage, ob es sich bei den Verbindungen um echte Naturstoffe handelte oder um Artefakte, die aus einem hypothetischen 3,5,6,7-Tetrahydroxy-2-methyl-1,4-naphthochinon durch *O*-Methylierungen nach Zerstörung der Zellstruktur und Aufhebung der Kompartimentierung hervorgegangen sind. Vollkommen ausgeschlossen ist dies nicht, natürliche Vertreter derartiger, hochgradig oxygenierter

Naphthochinone sind bereits gefunden worden, z.B. bei Seegurken aus dem Roten Meer^[147] und weitere wurden semi-synthetisch aus anderen Naturstoffen gewonnen.^[148,149]

4.6 Isolierung von Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus Kalluskulturen von *T. peltatum*

Neben den Naphthochinonen produzierten die Kalluskulturen aber auch Substanzen mit einem UV-Spektrum, wie es für Naphthylisochinolin-Alkaloide typisch ist.

4.6.1 Isolierung von Habropetalin A (27)

Das erste, mäßig polare Naphthylisochinolin-Alkaloid war nach Entfernen des Lösungsmittels ein beigefarbener bis hellbrauner Feststoff. Das Ergebnis der HRESIMS m/z 394.2013 ließ auf eine Summenformel von $C_{24}H_{27}NO_4$ [ber. m/z 394.2013 $[M+H]^+$] schließen und damit auf ein Naphthylisochinolin, das im Vergleich zum Dioncophyllin A (**8**) ein Sauerstoffatom mehr enthielt. Die Protonen- und Kohlenstoff-NMR-Spektren bestätigten die ermittelte Summenformel und deuteten ebenfalls auf eine zusätzliche Sauerstoff-Funktion hin sowie auf eine CH_2 -Gruppe (4.40 ppm im 1H -NMR, für zwei Protonen integrierend). Zusätzlich wiesen HMBC- und NOESY-Wechselwirkungen eine 7,1'-Kupplung aus. Die chemischen Verschiebungen der Protonen an C-1 und C-3 waren typisch für eine relative *trans*-Konfiguration im Tetrahydroisochinolin-Teil, die auch durch entsprechende NOESY-Kreuzsignale bestätigt wurde. Die gewonnenen Kenntnisse wurden mit bereits literaturbekannten Naphthylisochinolin-Alkaloiden verglichen, die die erarbeiteten Strukturmerkmale aufwiesen. So konnte die vorliegende Verbindung eindeutig als das bereits aus *Habropetalum dawei* isolierte Habropetalin A (**27**) identifiziert werden.^[114]

4.6.2 Identifizierung von Dioncophyllin A (8)

Der Hauptmetabolit des Extraktes zeigte ebenfalls das typische UV-Spektrum eines Naphthylisochinolin-Alkaloids. Bereits nach der ersten Analyse (Abgleich mit einer AK-internen HPLC-Datenbank) war zu vermuten, dass es sich bei dieser Verbindung um Dioncophyllin A (**8**) handelte. Zudem war **8** bereits als Hauptmetabolit in allen Organen (Wurzel, Spross und Blatt) von *Triphyophyllum peltatum* gefunden worden.

Die Aufnahme von 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren und die exakte Masse (m/z 378.2063 $[M+H]^+$) sowie ein Vergleich der experimentellen Werte mit den literaturbekannten Daten

bestätigten die Annahme, dass es sich um Dioncophyllin A (**8**) handelte. Verifiziert wurde dieses Ergebnis zudem noch durch ein HPLC-Coelutions-Experiment mit im AK vorhandenem authentischem Vergleichsmaterial.^[17,103,105,106]

4.6.3 Isolierung und Identifizierung von 5'-*O*-Methyldioncophyllin D (*P*-42) und *epi*-5'-*O*-Methyldioncophyllin D (*M*-42)

Wie unter 4.6.2 beschrieben wurde Dioncophyllin A (**8**) aus Kalluskulturen von *T. peltatum* isoliert. Erste ¹H-NMR-Experimente der durch präparative HPLC aufgereinigten Dioncophyllin-A-Fraktion, die zu über 90% **8** enthalten sollte, zeigte einen zusätzlichen Signalsatz. Die Fraktion enthielt zu ca. 50% eine weitere Substanz, die jedoch keiner der *O*-Demethyl-Varianten von **8** entsprach. Die Bestimmung der exakten Masse ergab lediglich den für **8** erwartete Wert von m/z 378.2063 $[M+H]^+$. Auch das UV-Spektrum der Substanzmischung entsprach dem des Dioncophyllins A (**8**), also dem eines normalen *C,C*-gekuppelten Naphthylisochinolin-Alkaloids. Eine weitere chromatographische Aufreinigung und Trennung der zwei Substanzen (beide etwa im Verhältnis 1:1) war nicht möglich, selbst im analytischen Maßstab war mit verschiedensten Säulenmaterialien (RP, NP, chirale Phasen) keine Isolierung zu erzielen. Veränderungen im Gradienten führten lediglich zu einer verschobenen Retentionszeit und/oder zu einer starken Verbreiterung des Peaks. Da chromatographische Verfahren nicht erfolgreich einsetzbar waren, wurden Kristallisationsversuche durchgeführt, um beide Substanzen zu trennen.

In früheren Versuchen zur Löslichkeit von **8** in wässrigen Lösungsmittelgemischen fiel auf, dass Dioncophyllin A (**8**), solange es mit seinen Mono-*O*-Demethyl-Varianten im Gemisch vorlag, recht gut wasserlöslich war (bis zu 75% Wasseranteil im MeOH). Lösungen von 0.5 bis 1 mg mL⁻¹ waren problemlos herstellbar. Wurde stattdessen reines **8** verwendet, führte dies bereits bei geringem Wassergehalt des Lösungsmittels (von > 20%) zur Präzipitation eines Großteils der Substanz. Dieser Umstand sollte hier ausgenutzt werden. Das vorliegende Substanzgemisch (das u.a. auch die beiden *O*-Demethyl-Derivate des Dioncophyllins A enthielt) wurde dazu in warmem Methanol aufgenommen. Nach dem Abkühlen gab man H₂O_{dest} dazu, bis ein Mischungsverhältnis von ca. 1:1 erreicht war. Die Aufbewahrung der Lösung für mindestens 48 h bei 4 °C förderte die Präzipitation eines weißen Feststoffes. Der anfallende Niederschlag wurde durch Zentrifugation vom Überstand getrennt. Da der Erfolg der Trennung chromatographisch nicht überprüfbar war, machte erst ein ¹H-NMR-Spektrum sichtbar, dass in der Mutterlauge Dioncophyllin A (**8**) und im Präzipitat das bislang

unbekannte Naphthylisochinolin stärker angereicherter vorlag, im Verhältnis 1:2 bis 1:5. Abhängig vom Verhältnis der beiden Substanzen nach der ersten Kristallisation war eine weitere Präzipitation mit einem Methanol-Wasser-Gemisch im Verhältnis von 1:1 bis 2:1 nötig. Wurde das Lösungsmittelverhältnis richtig gewählt, lag das bislang unbekannte Naphthylisochinolin-Alkaloid bereits nach diesem zweiten Kristallisationsschritt in reiner Form vor, andernfalls musste dieser Schritt wiederholt werden.

Dem Protonen-Spektrum war zu entnehmen, dass das unbekannte Naphthylisochinolin-Alkaloid drei Methylgruppen (1.52, 1.71 und 2.29 ppm) und zwei Methoxyfunktionen (bei 3.92 und 3.95 ppm) besaß. Auch alle erwarteten nicht-aromatischen Protonen des heterozyklischen Rings des Isochinolins waren vorhanden (2.92, 3.22, 3.90 und 4.85). HMBC- und vor allem NOESY-Wechselwirkungen (3-Me \rightarrow 3-H \rightarrow 1-Me \rightarrow 1-H) machten zudem deutlich, dass es sich um ein *trans*-Tetrahydroisochinolin handeln musste (Abbildung 30). Außerdem war durch HMBC-Kreuzkupplungen der aromatischen Protonen an C-5 und C-6 des Isochinolins sicher, dass die Achse, wie im Dioncophyllin A (**8**), am Isochinolin in Position 7 ansetzte. Der auffälligste Unterschied zum Naphthalinteil von **8** war, dass das Proton an C-7' (7.22 ppm) COSY-Wechselwirkungen lediglich zu einem benachbarten Proton besaß. HMBC-Wechselwirkungen gaben einen weiteren Hinweis darauf, dass die Kupplungsposition nicht C-1' war. Das 7'-Proton besaß eine Korrelation zum C-7, also der Kupplungsposition am Isochinolin, die bei einer 7,1'-Kupplung kaum zu erwarten gewesen wäre. Zudem war dem Kohlenstoff in Position 1' (118.7 ppm) ein Proton (6.78 ppm) zuzuordnen und das 6-H zeigte deutliche Interaktionen mit dem quartären C-8'.

Da alle weiteren Signale und Wechselwirkungen ebenfalls eindeutig waren, konnte die Struktur als ein 7,8'-gekuppeltes Naphthylisochinolin-Alkaloid identifiziert werden. Es handelte sich um das 5'-*O*-Methyl-Derivat **42** des bislang nur synthetisch bekannten Dioncophyllins D (**26**).^[112,113] Bereits S. Rüdener hatte diese Struktur vorhergesagt, nachdem er die Identifizierung der Komponenten des Gemisches aus **8**, dessen *O*-Demethyl-Varianten und **42** vornahm. Eine sichere Strukturaufklärung war damals jedoch auf Grund von Überlagerungen der Signale der beiden Diastereomere von **42** und mit denen des Dioncophyllins A (**8**) nicht möglich.

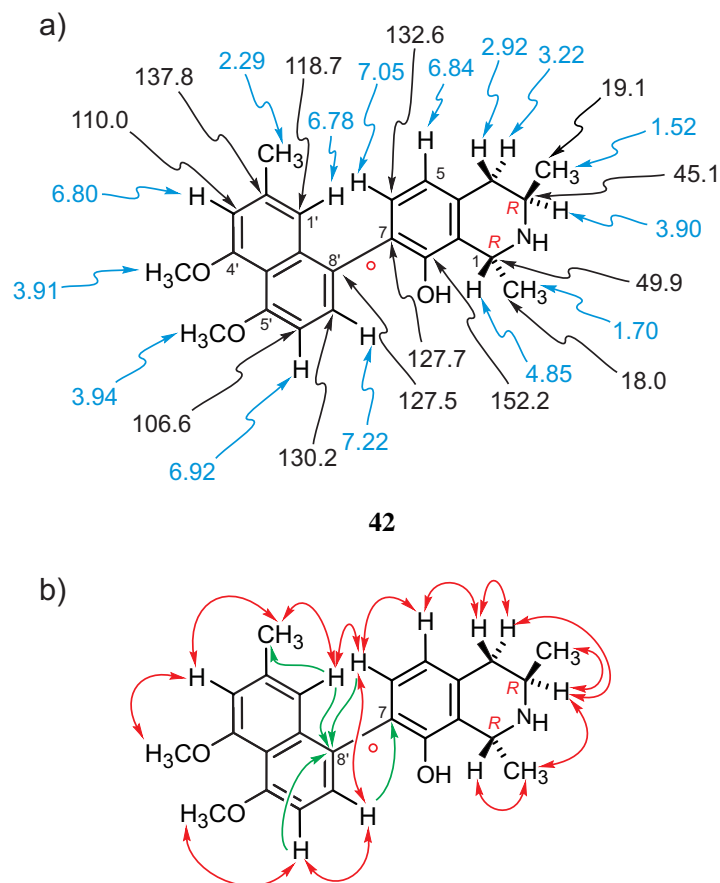


Abbildung 30. 5'-*O*-Methyldioncophyllin D (**42**) mit (a) ausgewählten ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen (einfache Pfeile) und (b) relevanten NOESY- und COSY-Wechselwirkungen (rote Doppelpfeile) sowie wichtigen HMBC-Interaktionen (einfache grüne Pfeile).

Untersuchungen mittels HPLC und HPLC-CD lieferten die Erklärung der Aufspaltung einiger NMR-Signale aromatischer Protonen (und auch einiger ^{13}C -Signale). Aufgereinigtes **42** lieferte schon an achiraler Phase zwei Peaks, die ein annähernd spiegelbildliches CD-Spektrum besaßen. Da auch die NMR-Daten gegen eine Mischung von Isochinolinen mit unterschiedlich konfigurierten Stereozentren an C-1 und C-3 sprachen, musste es sich um 5'-*O*-Methyldioncophyllin D (*P*-**42**) und sein Atrop-Diastereomer *epi*-5'-*O*-Methyldioncophyllin D (*M*-**42**) handeln. Diese liegen im Verhältnis 1:1 vor. Die Aufnahme von online-CD-Spektren und der Vergleich dieser mit dem des Dioncophyllins A (**8**) zeigten, dass der erste der beiden Peaks das *P*-Diastereomer, *P*-**42** und der zweite das *M*-Diastereomer, *M*-**42** repräsentierte (Abbildung 31). Ein solcher Vergleich war auf Grund der fast identischen Chromophore von **8** und **42** zulässig. Der einzige Unterschied war die Position der Methylgruppe des Naphthalin-Teils, was die Eigenschaft des Naphthalins als Chromophor jedoch nicht beeinflussen sollte.

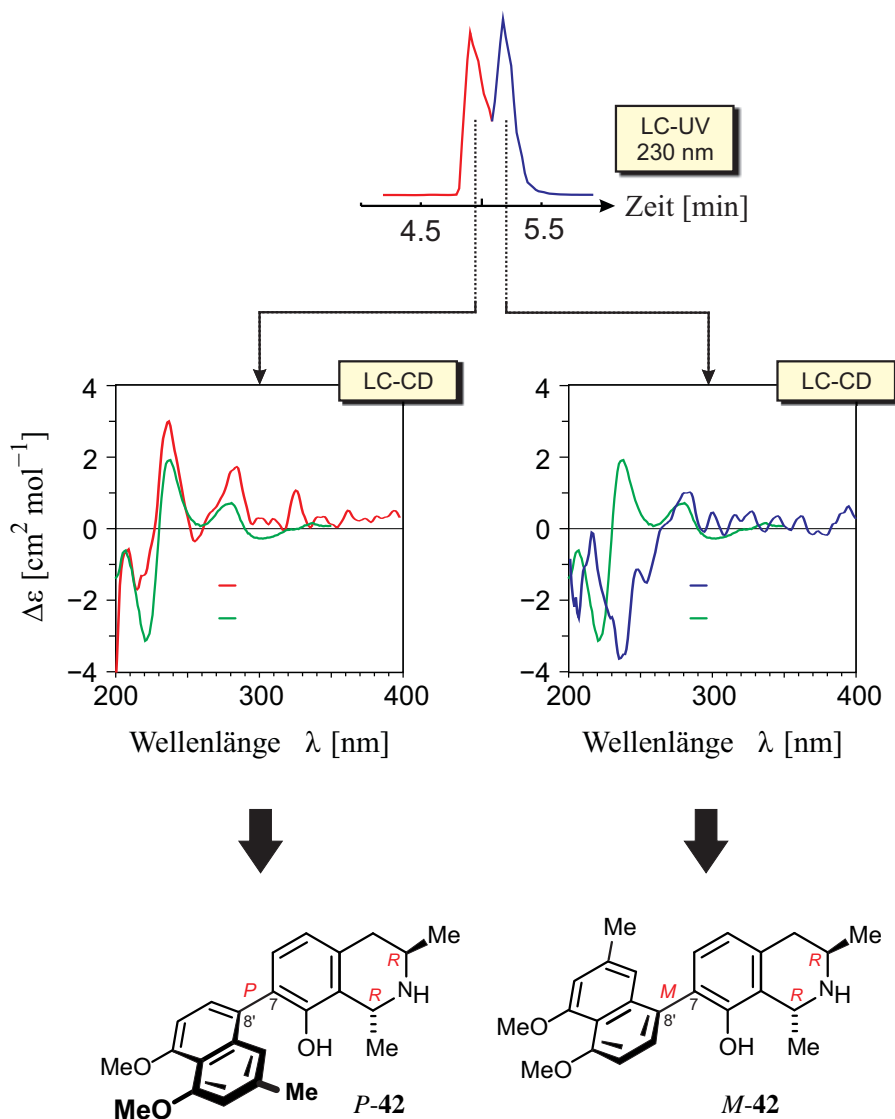


Abbildung 31. Experimentelle online-CD-Spektren von *P*-42 und *M*-42 im Vergleich zu dem von Dioncophyllin A (**8**).

Die Bestimmung der Konfiguration der beiden Stereozentren an C-1 und C-3 erfolgte mittels Ruthenium-katalysiertem oxidativem Abbau,^[150-152] der den aromatische Ring des Isochinolin-Teils in bekannte Fragmente spaltete, ohne die Stereozentren an C-1 und C-3 zu zerstören. Die entstehenden Aminosäuren werden methanolisch verestert und mit dem *R*-Enantiomer des Mosher's Säurechlorids derivatisiert. Dadurch werden die Aminosäuren gaschromatographisch trennbar und können mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Durch den Nachweis der *R*-Aminobuttersäure wurde das Stereozentrum an C-3 als *R*-konfiguriert identifiziert. NOESY-Korrelationen zu 1-H wiesen so auch für das Zentrum an C-1 die *R*-Konfiguration nach.

Nun ließ sich auch die chromatographische Untrennbarkeit von **42** und Dioncophyllin A (**8**) erklären: **8** eluierte genau zwischen den beiden Epimeren des 5'-O-Methyldioncophyllins D, *P*-**42** und *M*-**42** (Abbildung 32).

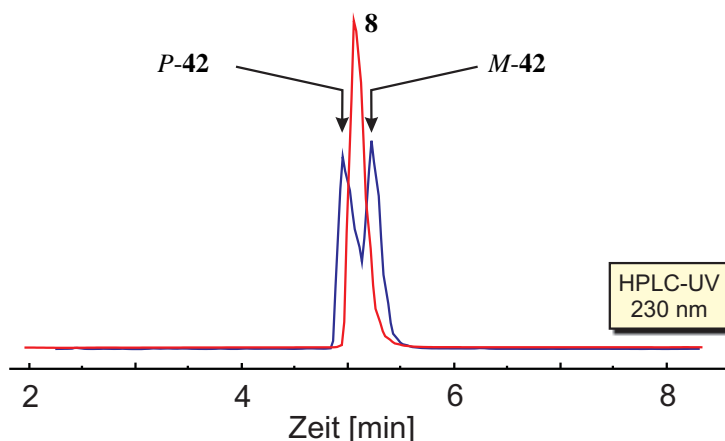


Abbildung 32. Chromatographisches Verhalten von **42** und **8**. Liegen diese Substanzen in Mischung vor, kann selbst im analytischen Maßstab keine Trennung mittels HPLC erreicht werden.

Bereits von M. Rübenacker war aus Blattmaterial von *T. peltatum* eine Substanz isoliert worden, die als Dioncophyllin D identifiziert wurde.^[107,111] Eine Totalsynthese des vermeintlichen Naturstoffs durch C. Günther bewies jedoch, dass diese Substanz eine 7,6'-Kupplung aufwies, und damit Dioncophyllin B, entsprach.^[112,113] Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde aus einem Vertreter der Dioncophyllaceae, aus Kalluskulturen aber auch aus Wurzelkulturen von *T. peltatum*, ein Derivat des also bislang nur synthetisch hergestellten Dioncophyllins D (**26**) isoliert und dessen Struktur aufgeklärt. Auch wenn z.B. aus *Ancistrocladus abbreviatus* bereits das 7,8'-gekuppelte Ancistrobrevin A und aus *A. benomensis* das Dioncophyllein D bekannt sind,^[104,118,153,154] handelte es sich bei der Identifizierung von **42** um das erste Alkaloid dieses Kupplungstyps in Pflanzen der Familie der Dioncophyllaceae und um den zweiten Nachweis eines 7,8'-gekuppelten Naphthylisochinolin-Alkaloids des Dioncophyllaceae-Typs. Wie auch bei Ancistrobrevin A, dem Dioncophyllein D und dem synthetische Dinocophyllin D war die Biarylachse konfiguratív labil.^[153,154] Im analytischen Maßstab an achiraler Phase wurde zwar eine Trennung der beiden Diastereomere sichtbar, eine Isolierung gelang aber nicht.

4.7 Bioaktivitäten von Dioncochinon A (34), B (35) und anderen Naphthochinononen

Naphthochinone sind im Pflanzenreich sehr verbreitete Metabolite, die z.T. als Phytoalexine, also bedarfsgerecht, aber auch als allgemeine „Abwehrsubstanzen“ prophylaktisch (also permanent) produziert werden.^[155] Da es sich also ‚im Sinn der Pflanzen‘ um bioaktive Sekundärmetabolite handelt, liegt die Vermutung nahe, dass diese Verbindungen auch für den Menschen nützliche Wirkungen aufweisen könnten. In Indien nutzt man beispielsweise seit jeher Extrakte verschiedener *Plumbago*-Arten (der dem Plumbagin namensgebenden Pflanzengattung) zur Behandlung von Infektionskrankheiten und Krebs. In Afrika wird *Plumbago* für die Heilung parasitär hervorgerufener Hautkrankheiten eingesetzt.^[156,157] Nach eingehender wissenschaftlichen Untersuchungen wurden tatsächlich antitumorale aber auch antiplasmodiale Eigenschaften beschrieben.^[158-161] So zeigen Plumbagin (**9**) (Abbildung 33), Droseron (**10**) und 2-Methylnaphthazarin (**43**) ausgeprägte Aktivitäten gegen verschiedene Stämme von *Plasmodium falciparum*, weitere, synthetische Naphthochinone zudem auch gegen Trypanosomen und *Leishmania donovani*.^[162-164] Gegen Krebszellen zeigt Plumbagin (**9**), genauso wie das ebenfalls lange bekannte Juglon (**44**), hohe Wirksamkeit, allerdings kombiniert mit einer sehr hohen allgemeine Toxizität.^[157,165,166]

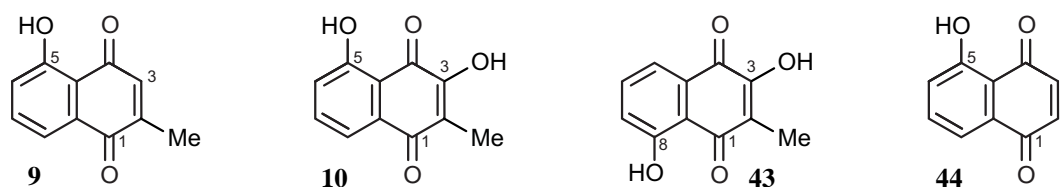


Abbildung 33. Bekannte bioaktive Naphthochinone, die jedoch oft auch hohe Toxizität aufweisen.

Die Dioncochinone A und B (**34** und **35**), aber auch eine ganze Reihe anderer Naphthochinone, wurden daher im Rahmen einer Kooperation mit der Abteilung für Hämatologie (Innere Medizin II) des Universitätsklinikums Würzburg auf ihre Wirksamkeit gegen hochmaligne B-Zell-Lymphome getestet. Außerdem erfolgten Bioaktivitäts-Tests am Schweizerischen Tropeninstitut in Basel, im Arbeitskreis von Prof. R. Brun, sowie im Rahmen des SFB 630 (Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten) gegen Erreger tropischer Infektionskrankheiten (*Plasmodium*, *Leishmania* und *Trypanosomas*).

4.7.1 Antitumorale Wirkung

B-Zell-Lymphome wie das hochmaligne B-Zell-Lymphom und das Multiple Myelom, sind Erkrankungen, bei denen multiple genetische Veränderungen in den B-Zellen bzw. deren Stammzellen dazu führen, dass bösartige, vergrößerte Plasmazellen gebildet werden. Bei B-Zellen handelt es sich um Leukozyten, die beim Menschen im Knochenmark entstehen und zum adaptiven Immunsystem zählen. Nach Antigen-Kontakt differenzieren diese B-Zellen im Normalfall zu Plasmazellen und produzieren spezifische Antikörper, dies geht mit umfangreichen Umlagerungen im Genom der Zellen einher.^[167] Bei genetischen Defekten, die während ihrer Entwicklung auftreten können, bilden sie jedoch vergrößerte Plasmazellen (Myelomzellen), die sich unkontrolliert vermehren. Diese Mutationen können zu verschiedenen Zeitpunkten der Zellentwicklung auftreten und so verschiedene Lymphome auslösen. Heutzutage ist zwar bei frühzeitiger Erkennung und durch geeignete Medikation oder Knochenmark-Transplantation eine Verlängerung des Überlebens von bis zu 8 Jahren möglich, eine Chance auf Heilung gibt es derzeit aber nicht.^[168]

In der Arbeitsgruppe von Prof. R. Bargou wurden an Zell-Linien des hochmalaginen B-Zell-Lymphoms (SU-DHL-4 und DOHH-2) und des Multiplen Myeloms (INA-6 und RPMI8226) die antitumoralen Eigenschaften der Dioncochinone und andere Naphthochinone getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die Dioncochinone A (**34**) und B (**35**) deutliche Aktivitäten gegen alle getesteten tumoralen Zelllinien zeigten. Die EC₅₀-Werte von **34** waren 32 µM (SU-DHL-4) und 37 µM (DOHH-2) und 29 µM (INA-6) und 58 µM (RPMI8226). Für **35** waren die EC₅₀-Werte noch etwas besser und lagen bei 7.6 µM (SU-DHL-4) und 9.4 µM (DOHH-2) bei Zellen des Aggressiven B-Zell-Lymphoms und bei 11 µM (INA-6) und 18 µM (RPMI8226) bei den Myelom-Zellen und (Abbildung 34).^[169]

Üblicherweise zeigen eine ganze Reihe von Naphthochinonen neben ihrer Aktivität gegen Erreger oder entartete Zellen auch eine sehr hohe Toxizität gegen normale Körperzellen (z.B. β -Lapachon oder 2-Methylnaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dion)^[170,171] und müssen daher teilweise als sehr giftig eingestuft werden (z.B. **9**). Im Gegensatz dazu verhielten sich Dioncochinon A und B (**34** und **35**) nahezu vollkommen untoxisch gegenüber normalen, peripheren mononukleären Blutzellen, so dass es nicht möglich war, einen IC₅₀-Wert für diese Verbindungen zu ermitteln.

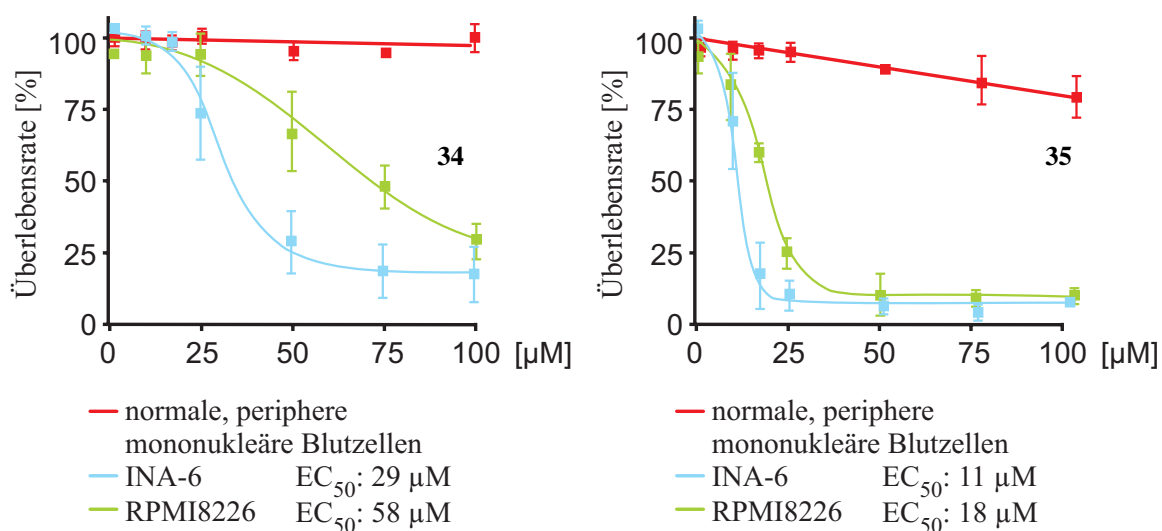
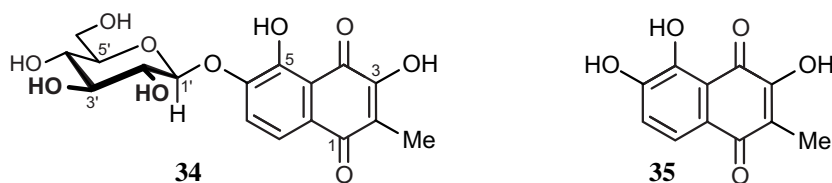


Abbildung 34. Antitumorale Wirkung der Dioncochinone A (**34**, links) und B (**35**, rechts): Die Proliferation maligner Tumorzellen zweier Zell-Stämme (INA-6, RPMI8226) des Multiplen Myeloms wurde gehemmt, ohne dass messbare Toxizität gegenüber normalen peripheren Blutzellen auftrat.

Damit sind **34** und **35** im Gegensatz zu den ebenfalls gegen das Multiple Myelom aktiven β -Lapachon oder 2-Methylnaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dion hervorragende Kandidaten für die Entwicklung neuer therapeutischer Anwendungen, die bereits existierende nebenwirkungsreiche Chemotherapeutika wie Lenalidomid, Melphalan, Bortezomib und Thalidomid, sowie Kombinationen daraus, sinnvoll ergänzen könnten.

4.7.2 Anti-Infektive Wirkung

Im Schweizerischen Tropeninstitut in Basel **34** und **35** auf Aktivität gegen *Plasmodium falciparum* (tödliche *Malaria tropica*), *Trypanosoma cruci* (Chagas-Krankheit) und *Leishmania donovani* getestet (Tabelle 3). *L. donovani* ist der Erreger der visceralen Leishmaniose, die im unbehandelten Fall unweigerlich zum Tode führt. Die beiden Dioncochinone **34** und **35** zeigten vielversprechende und selektive Aktivitäten gegen *L. donovani*.

Tabelle 3. Aktivitäten der beiden Naphthochinone **34** und **35** gegen protozoische Erreger tropischer Infektionskrankheiten.

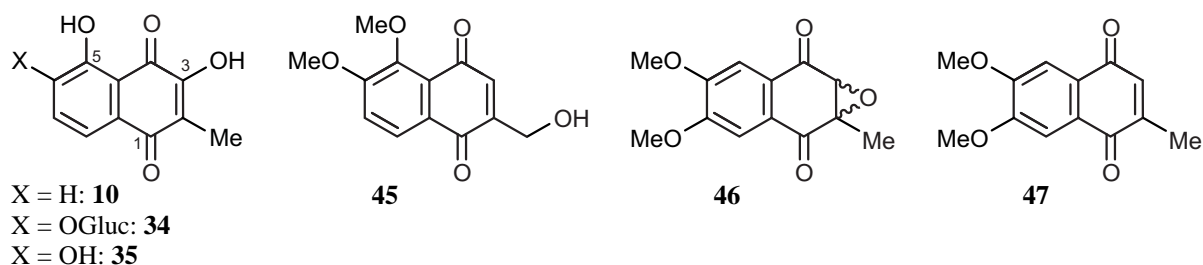
Verbindung	Wachstumsinhibierung [%] bei $c = 0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$		
	<i>P. falciparum</i> (K1-Stamm)	<i>T. cruzi</i>	<i>L. donovani</i>
	Artemisinin ^[a] 75.2	Benznidazol ^[b] 57.6	Miltefosin ^[c] 53.0
34	0.0	2.5	49.6
35	1.1 ^[d]	3.8	79.2

^[a] $0.003 \mu\text{g mL}^{-1}$, ^[b] $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, ^[c] $0.22 \mu\text{g mL}^{-1}$, ^[d] 97.4% bei einer Konzentration von $4.8 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Im Rahmen des SFB 630 testete man diese und andere Naphthochinone gegen weitere Erreger tropischer Infektionskrankheiten (Tabelle 4).

Erstaunlicher Weise zeigten die Dioncochinone hier nur mäßige bis keine Aktivität, waren allerdings auch nie toxisch. Nach diesen Ergebnissen scheinen die beiden Dioncochinonen (**34** und **35**) spezifische Bioaktivitäten gegen *L. donovani* zu besitzen. Spannend wird es sein, die Resultate zukünftiger *In-vivo*-Versuche zu diskutieren.

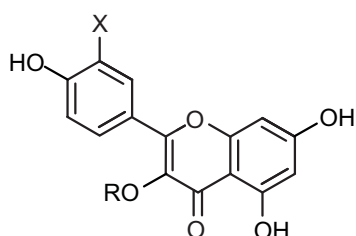
Tabelle 4. Bioaktivitäten der im SFB 630 getesteten Naphthochinone.



	10	34	35	45	46	47
	IC ₅₀ [μM]					
<i>L. major</i>	8.5	> 100	> 100	9.1	8.9	> 100
293T	-	-	-	-	3.3	-
<i>T. brucei</i>						
48 h	8.76	> 40	17.17	2.8	4.28	11.9
72 h	14.18	> 40	33.66	3.43	7.6	16.66
Makrophagen (Toxizität)	1.85	> 98	> 100	7.8	8.8	42

4.8 Naphthochinone in anderen Pflanzen-Arten

Naphthochinone sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Viele Pflanzen sind dahingehend bereits gut untersucht, dies gilt auch für die Gattung *Nepenthes* (Nepenthaceae),^[161,172,] die in die nähere Verwandtschaft der Dioncophyllaceae gerückt wird.^[90] Meist wurden aber die Wurzeln für phytochemische Analysen herangezogen. Aussagen über Sekundärmetabolite in den Fangorganen gibt es zwar,^[173] Angaben zu Inhaltsstoffen in Blättern und Sprossen sind in der Literatur aber nicht zu finden. Das Pflanzenmaterial der drei Arten: *Nepenthes alata*, *N. intermedia* und *N. khasiana* stammte aus dem Botanischen Garten der Universität Würzburg. Die HPLC-UV-VIS-Analysen der Rohextrakte der luftgetrockneten oberirdischen Teile aller drei Arten waren im Metabolit-Profil identisch. *N. alata* besaß den höchsten Substanzgehalt, so dass die weiteren Arbeiten mit dieser Art durchgeführt wurden. Die UV-Spektren zeigten jedoch, dass es sich bei den Substanzen wahrscheinlich nicht um Naphthochinone handelte. Die Isolierung der Metabolite und deren Strukturaufklärung mittels 1D- und 2D-NMR-Experimente identifizierte sie dementsprechend als Flavonoide (Quercitin und Kaempferol-Derivate **48-50**, Abbildung 35), die zudem allesamt literaturbekannt waren.^[174-177] Quercitin und Kaempferol selbst sind zwar auch bereits in der Gattung *Nepenthes* gefunden worden, allerdings gab es bislang keine Beschreibung ihrer Glucuronide/Rhamnoside.^[178,179]



	X	R
48	OH	β -D-Glucuronid
49	OH	α -L-Rhamnopyranosid
50	H	α -L-Rhamnopyranosid

Abbildung 35. Die aus *N. alata* isolierten Flavonoide Miquelianin (**48**), Quercitrin (**49**) und Kaempferol- α -L-Rhamnopyranosid (**50**).

5 Sekundärmetabolite aus Wurzelkulturen von *Triphyophyllum peltatum*

5.1 Wurzelkulturen von *Triphyophyllum peltatum*

Von Frau Dr. K. Fester wurden unserem Arbeitskreis Wurzelkulturen von *T. peltatum* zur weiteren Kultur und phytochemischen Analyse übergeben. Die Kultur erfolgte in abgewandeltem Gamborg-B5-Medium^[180] (G5S2-Medium). Es enthielt neben anorganischen Salzen (Mikro- und Makronährstoffe) und Saccharose auch Casein-Hydrolysat, das vorwiegend als zusätzliche Stickstoffquelle (in Form von Aminosäuren) diente. Vervollständigt wurde das Medium mit dem gering konzentrierten (0.2 mg L^{-1}) Phytohormon NAA (1-Naphthylessigsäure). Auxine sind Phytohormone, die vorwiegend wachstumsfördernde Wirkungen auf Pflanzenzellen haben. Sie fördern die Zellteilung und Zellstreckung. Im Wurzelbereich werden dabei bestimmte Zellnester im Perizykel aktiviert und damit die Seiten- und Adventivwurzelbildung gefördert. Das Wachstum der Wurzelkulturen wurde ohne genetische Manipulation erreicht. Bei regelmäßigem Austausch des Kulturmediums alle drei bis vier Wochen, entwickelten sich die Wurzeln sehr gut. Interessant war nun die Frage nach den Sekundärmetaboliten.

5.2 Phytochemische Analyse der steril kultivierten Wurzeln

Die Analyse der Kalluskulturen hatte deutlich gemacht, dass diese ein interessantes Spektrum an Sekundärmetaboliten bildeten. Dabei befanden sich die Zellen im Kallus in einer dem embryonalen Zustand ähnlichen Situation, in der es vor allem auf die Zellteilung und das Wachstum ankam und die Bildung von Sekundärmetaboliten nicht im Vordergrund stand. Daher war es nun schon unter diesem Aspekt spannend, zu untersuchen, ob steril kultivierte, vollständige Organe mit ausdifferenzierten Geweben ein ähnliches oder sogar noch reicheres Metabolit-Spektrum bilden.

5.2.1 Extraktion des steril kultivierten Wurzelmaterials

Das getrocknete und pulverisierte Wurzelmaterial wurde nach bewährtem Verfahren mit einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Dichlormethan ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) im Verhältnis 1:1 dreimal extrahiert. Bereits eine erste Analyse des Rohextrakts zeigte, dass sich das Sekundärmetabolit-Spektrum der Wurzelkulturen deutlich von dem der Kalluskulturen unterschied. Während bei den Kalli vor allem Naphthochinone im Chromatogramm

vorherrschten, fanden sich im Rohextrakt der Wurzeln hauptsächlich Metabolite mit dem UV-Profil von Verbindungen, die einen Naphthalin-Anteil besaßen, wie es beispielsweise bei den Naphthylisochinolin-Alkaloiden der Fall ist. Neben den Naphthochinonen wären vor allem Naphthylisochinoline zu erwarten. Die Identifizierung der einzelnen Komponenten sollte jedoch zeigen, dass es sich dabei nicht nur um Alkaloide handelte.

5.2.2 Fraktionierung des Rohextraktes und Isolierung der Sekundärmetabolite

Für die anschließende Isolierung wurden zunächst verschiedene Methoden zur Herstellung von Fraktionen angewendet, durch die bestimmte Verbindungen angereichert wurden. Der Rohextrakt wurde der Kationen-Austausch-Chromatographie (IES – Ion Exchange Chromatographie) an Amberlyst®15 unterzogen. Dass diese Methode hervorragend zur Anreicherung der Naphthylisochinolin-Alkaloide geeignet ist, hatte bereits I. Kajahn in ihrer Dissertation nachgewiesen.^[181] Das Säulenmaterial adsorbierte positiv geladene Verbindungen, alle anderen Substanzen, z.B. die Naphthochinone, ließen sich leicht mit Methanol von der Säule waschen. Die kationischen Naphthylisochinoline mussten dann durch stärkere Ionen (in diesem Fall Na^+) vom Säulenmaterial verdrängt und (durch NaCl-Lösung) eluiert werden. Die Kationen-enhaltende Fraktion zeigte im HPLC-Chromatogramm zwei Haupt- und mehrere Nebenpeaks, die allesamt das UV-Spektrum der Naphthylisochinolin-Alkaloide aufwiesen. Die "nicht-kationische" Fraktion enthielt einige Substanzen mit dem typischen UV-Spektrum von Naphthochinonen. Daneben waren aber auch Verbindungen enthalten, die dem UV-Profil entsprechend eher den Naphthylisochinolin zuzuordnen wären. Eine positive Ladung (wie die Naphthylisochinoline) schienen diese aber nicht zu tragen. Dabei handelte es sich vor allem um Komponenten, die sehr polar - sehr früh eluierend (RP-HPLC) - oder sehr unpolar (sehr spät eluierend) waren. Im "Mittelfeld" des Chromatogramms fanden sich solche Verbindungen nicht. Zur weiteren Anreicherung wurde die "nicht-kationische" Fraktion mit *n*-Hexan gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend außerdem mit Chloroform extrahiert. Neben Naphthochinonen gingen auch einige Substanzen mit unbekanntem UV-Spektrum in das organische Lösungsmittel über. Übrig blieb die wässrige Phase, in der Substanzen mit Naphthylisochinolin -ähnlichem UV-Profil enthalten waren.

Alle so erhaltenen Fraktionen wurden mittels präparativen HPLC und jeweils angepasstem Lösungsmittel-Gradienten (s. Experimententeil) isoliert.

5.3 Isolierung und Strukturaufklärung

5.3.1 4-Methoxy-5-hydroxy-2-naphthoesäuremethylester (51)

Aus der Chloroform-Fraktion wurde eine Substanz isoliert, die anhand des UV-Spektrums keiner Substanzklasse zugeordnet werden konnte. Eine HR-ESI-MS-Messung ergab eine Masse von m/z 255.0665 $[M+Na]^+$. Diesen Daten entsprechend musste eine Verbindung mit der Summenformel $C_{13}H_{12}O_4$ (ber. m/z 255.0633) vorliegen.

Dem 1H -NMR-Spektrum war zu entnehmen, dass es drei aromatische Protonen gab, die Kopplungen zueinander zeigten (7.32, 7.31 und 6.82 ppm) sowie zwei Signale (7.27 und 8.0 ppm), die als schwach gespaltene Dubletts auftraten und eine 4J -Kopplung (1.4 Hz) zueinander zeigten. Zudem waren zwei Methoxygruppen (4.02 und 3.85 ppm) vorhanden. Dem ^{13}C -Spektrum zufolge besaß das Molekül drei Sauerstofffunktionen. Neben den beiden Methoxygruppen gab es auch eine Hydroxygruppe. Die Lage der OMe-Gruppen wurde durch HMBC- und NOESY-Wechselwirkungen eindeutig festgelegt. Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei einer der OMe-Funktionen um einen Methylester an C-2 handelte. Die Protonen an C-1 und C-3 wiesen beide HMBC-Interaktionen mit der Carbonylfunktion auf, genauso wie die zugehörige CH_3 -Gruppe (3.85 ppm) des Methylesters. Die Position der zweiten Methoxygruppe wurde durch deren NOESY-Wechselwirkungen zu dem Proton an C-3 (7.27 ppm) bestimmt und durch entsprechende HMBC-Korrelationen der OMe-Gruppe als auch des 3-H zu C-4 (159.3 ppm) bestätigt. Der zweite Ring des Systems wurde durch die COSY- und HMBC-Wechselwirkungen identifiziert (Abbildung 36). Demnach handelte es sich um den 4-Methoxy-5-Hydroxy-2-Naphthoesäuremethylester (**51**).^[182]

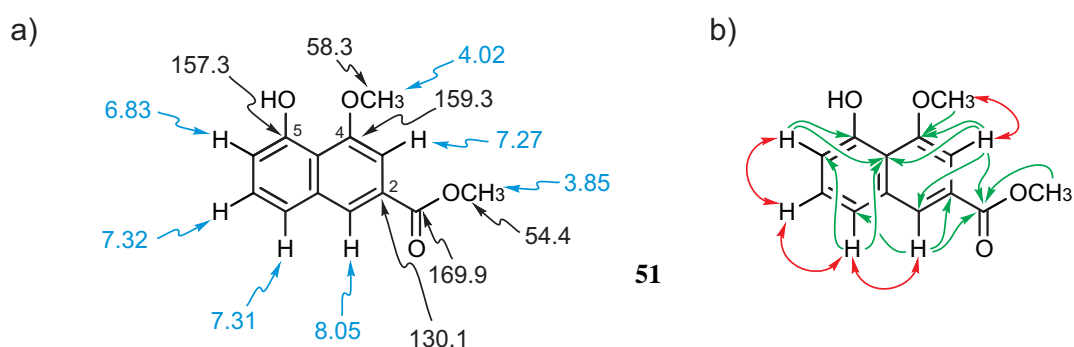


Abbildung 36. NMR-Verschiebungen von **51**: a) 1H - und ^{13}C -NMR-Daten und b) relevante HMBC- (einfache grüne Pfeile) und NOESY-Wechselwirkungen (rote Doppelpfeile).

Naphthoesäure-Derivate sind bereits aus *Ancistrocladus ealaensis* isoliert worden.^[183] Der erste Vertreter dieses Strukturtyps war aber die Eleutherolsäure, die bereits 1950 als

synthetisches Abbauprodukt des Eleutherols erhalten wurde.^[184] Von diesen Naphthoesäuren unterscheidet sich **51** durch die Derivatisierung der Säuregruppe zum Methylester.

5.3.2 *P*-4,5'-Dimethoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-4',5-diol (**52**)

Die HR-ESI-MS-Messung (m/z 375.1596 $[M+H]^+$) legte die Summenformel $C_{24}H_{23}O_4$ (ber. m/z 375.1591) nahe. Die Auswertung des 1H -NMR-Experiments ergab, dass es sich um eine Verbindung handelte, die acht aromatische Protonen, zwei Methoxy- und zwei Methylgruppen besaß. Zudem hatte die Substanz ein UV-Spektrum, wie es für Naphthaline üblich war. Bereits dies ließ annehmen, dass es sich hier um ein dimeres Naphthalin handeln müsste. Außerdem war durch ^{13}C -Signale mit typischer Verschiebung (154.3 und 154.4 ppm) das Vorhandensein von zwei weiteren Hydroxyfunktionen belegt. Die Konstitution der beiden Naphthaline wurde aus den HSQC- und HMBC-Spektren ermittelt. Neben den HMBC-Wechselwirkungen gaben die NOESY-Kreuzsignale Sicherheit bezüglich der Lage der Biarylachse. Es musste sich um eine 1,1'-Kupplung handeln, da die Methylgruppen an C-2 und C-2' Interaktionen mit 8-H bzw. 8'-H der jeweils anderen Naphthalinhälfte aufwiesen (Abbildung 37). Die Festlegung der Position der OMe-Gruppen an C4 und C5' erfolgte zweifelsfrei durch die Zuordnung von NOESY- und HMBC-Korrelationen.

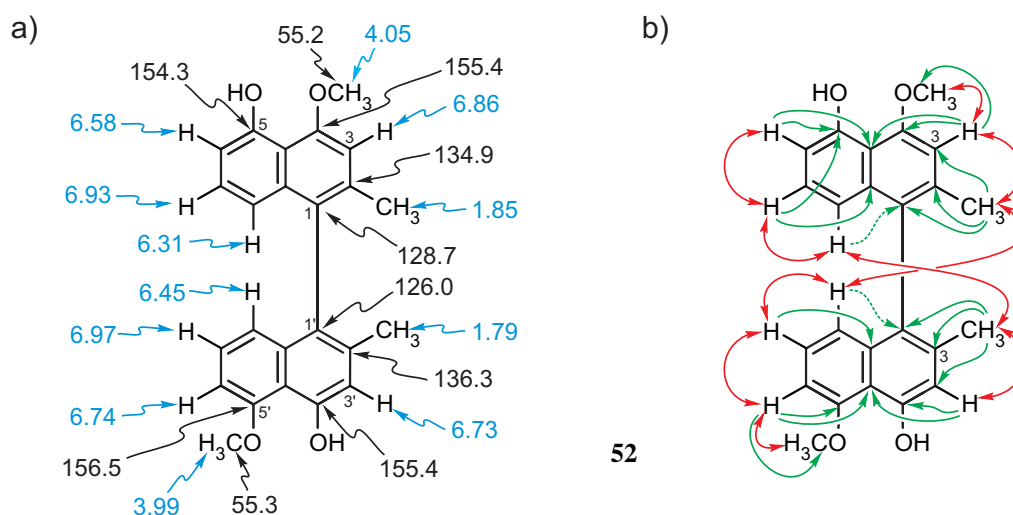


Abbildung 37. NMR-Daten von **52**: a) ausgewählte 1H - und ^{13}C -Verschiebungen sowie b) relevante HMBC- (grüne einfache Pfeile) und COSY- und NOESY-Wechselwirkungen (rote Doppelpfeile).

Die Verbindung **52** wurde somit als 4,5'-Dimethoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-5,4'-diol identifiziert. Vor der Ermittlung der Konfiguration der Biarylachse wurde die Enantiomeren-Reinheit zunächst mittels HPLC-Analyse an chiraler Phase (Phenomenex[®] lux

Cellulose-1) geprüft. Die Auswertung des daraufhin "offline" aufgenommenen CD-Spektrums unter Anwendung der Exciton-Chirality-Methode ergab die *P*-Konfiguration der Achse.

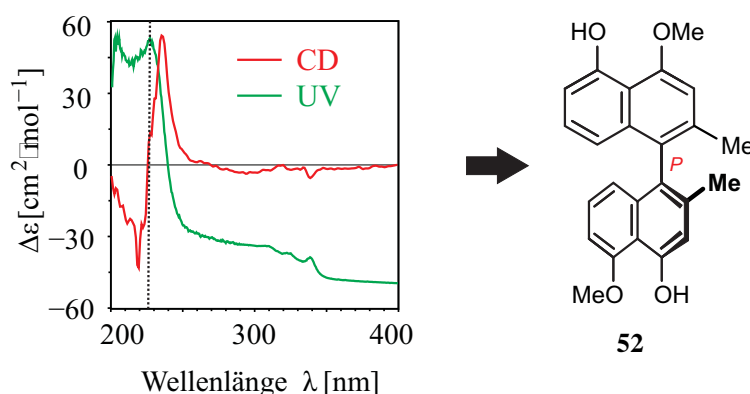


Abbildung 38. Bestimmung der Achsenkonfiguration durch Anwendung der CD-Spektroskopie in Verbindung mit der Exciton-Chirality-Methode.

Die Exciton-Chirality-Methode ist immer dann einsetzbar, wenn die zu untersuchende Verbindung zwei gleiche oder mindestens sehr ähnliche Chromophore besitzt, deren relative Anordnung zueinander bekannt ist. Die beiden Naphthalinhälften von **52** entsprachen dieser Voraussetzung. Eine weitere (ebenfalls erfüllte) Bedingung ist zudem, dass das UV-Profil der Verbindung ein Maximum an der Stelle aufweist, an der der Graph des CD-Spektrums einen Wendepunkt besitzt. Das Couplet zeigte (von rechts nach links gelesen) einen positiven und dann einen negativen Cottoneneffekt (Abbildung 38) und bewies damit die *P*-Konfiguration.^[182]

5.3.3 *P*-4,4'-Dimethoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-5,5'-diol (**53**)

Ein weiteres Naphthalin besaß in allen NMR-Spektren den einfachen Signalsatz eines monomeren Naphthalins. Dass es sich um ein Dimer handeln musste, wurde aber durch das Messen der exakten Masse (m/z 373.1445 [M-H]⁻) deutlich, die die Summenformel C₂₄H₂₁O₄ (ber. m/z 373.1440) nahe legte. Die genaue Konstitution des Moleküls wurde ähnlich wie schon zuvor beschrieben, durch die Auswertung aller 1D- und 2D-NMR-Spektren bestimmt. Das quartäre Kohlenstoff-Atom mit einer Verschiebung von 129.9 ppm markierte die Position der Achse wiederum an C-1. Die Position der Methoxygruppen wurde durch HMBC-Kreuzsignale zu C-4 (bzw. C-4') und NOESY-Wechselwirkungen zu 3-H bestimmt.

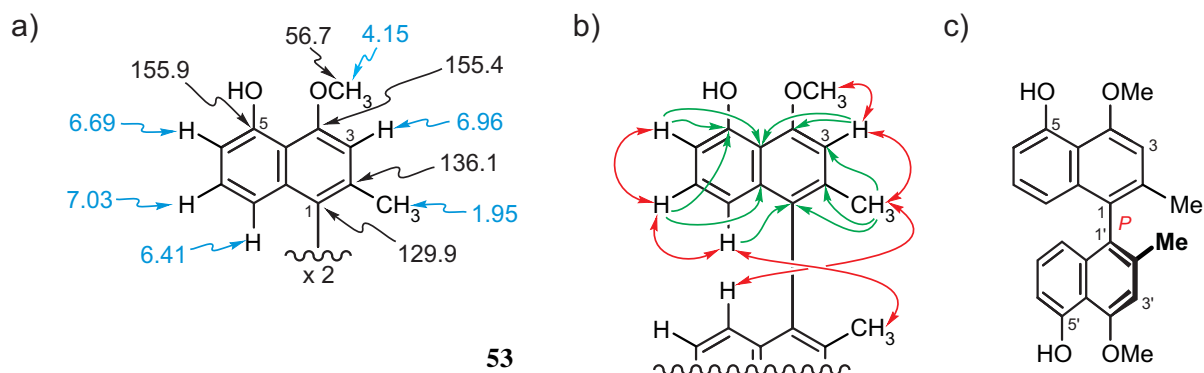


Abbildung 39. Ausgewählte NMR-Daten von **53**: a) ¹H- und ¹³C-NMR-Werte sowie b) HMBC- (grüne Pfeile) und NOESY-/COSY-Korrelationen (rote Doppelpfeile); c) räumliche Darstellung nach Aufklärung der absoluten Achsenkonfiguration.

Damit war die Struktur der Verbindung aufgeklärt, es handelte sich um den ebenfalls neuen Naturstoff 4,4'-Dimethoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-5,5'-diol (**53**) und wie zuvor ergab die Auswertung des CD-Spektrums, dass die Biarylachse *P*-konfiguriert war (Abbildung 39).^[182]

5.3.4 *M*-5,5'-Dimethoxy-2,2'-methyl-3,3'-binaphthalin-4,4'-diol (**54**)

Die NMR-Spektren einer weiteren Substanz waren denen des zuvor isolierten und identifizierten **53** sehr ähnlich. Es gab nur einen Signalsatz, aber auch diesmal ergab die HR-ESI-MS-Messung (m/z 375.1586 $[M+H]^+$) sofort, dass es sich um ein dimeres Naphthalin mit der Summenformel $C_{24}H_{23}O_4$ (ber. m/z 375.1518) handelte. Jede Naphthalin-Hälfte trug eine Hydroxy-, eine Methoxy- sowie eine Methylgruppe, deren Positionen wie bei den vorhergehenden Binaphthalinen bestimmt wurden. Überraschend waren die NOESY-Wechselwirkungen des *peri*-Protons an C-8 zu einem weiteren Proton (7.26 ppm), das an Position 1 sitzen musste. Auch dies wurde durch entsprechende HMBC-Wechselwirkungen bestätigt. Außerdem zeigte dieser 1-Wasserstoff eine weitere Interaktion zu einem quartären Kohlenstoff (bei 121.3 ppm). Bei diesem handelte es sich um C-3 und markierte die Position der Achse (Abbildung 40). Die Enantiomeren-reine Substanz (nachgewiesen durch Analyse mittels chirale HPLC) wies nach Auswertung des „offline“ CD-Spektrums durch die Exciton-Chirality-Methode eine *M*-Konfiguration auf (s. Abbildung 40).

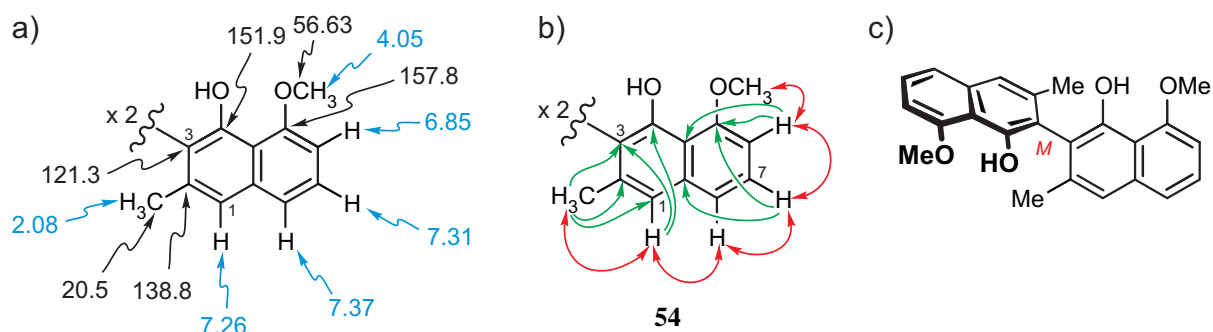


Abbildung 40. Die ¹H- und ¹³C-Daten von **54** (a) und die für die Strukturaufklärung bedeutenden HMBC- (grüne Pfeile) und COSY-/NOESY-Korrelationen (rote Doppelpfeile) (b), c) zeigt die vollständige Struktur mit *M*-konfigurierter Achse.

Bei diesem Naphthalin-Dimer handelte es sich also um das bereits von G. Zhang in unserer Arbeitsgruppe aus *T. peltatum*-Kalluskulturen isolierte 5,5'-Dimethoxy-2,2'-methyl-3,3'-binaphthalin-4,4'-diol (**54**).^[182]

5.3.5 4-Methoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthyl-4',5,5',8'-tetraol (**55**)

Das Protonen-Spektrum dieser Verbindung zeigte weniger aromatische Protonen als die zuvor identifizierten Binaphthaline. Im ¹³C-NMR-Spektrum fielen dementsprechend sofort fünf Signale mit einer deutlichen Tieffeld-Verschiebung auf (bisher waren es stets nur zwei oder vier), wie sie für Sauerstoffsubstitutionen üblich sind (153.1, 156.4, 157.8, 162.9 und 163.2 ppm). Nur bei einer dieser Funktionen konnte es sich um eine Methoxygruppe (4.15 ppm) handeln.

Durch die Auswertung aller 2D-NMR-Spektren analog zu den zuvor identifizierten Binaphthalinen wurde der nördliche Teil der Verbindung aufgeklärt. Die Methoxygruppe (4.15 bzw. 56.8 ppm) befand sich an C-4 (157.8 ppm), da es deutliche NOE-Korrelationen zum 3-H (6.9 ppm) gab und entsprechende HMBC-Wechselwirkungen zu C-4 existierten. Dieser Teil des Moleküls war somit als ein 4-Methoxy-2-methylnaphthalin-5-ol zu beschreiben, das über eine Biarylachse an C-1 mit einem weiteren Naphthalin verbrückt war. Im südlichen System gab es drei aromatische Protonen, wobei eines als Singulett (7.12 ppm) auftrat, das sehr wenige Interaktionen mit seiner Umgebung zeigte. Es gab HMBC-Wechselwirkungen zu den Brückenkohlenstoffen C-9' und C-10' sowie zu der Methylgruppe (21.2 ppm) an C-2'. Diese wiederum (1.87 ppm) zeigte Wechselwirkungen zu C-3' (123.3 ppm) sowie zum eigenen Kohlenstoff (C-2') und zwei weiteren quartären Kohlenstoff-Atomen, deren Verschiebungen einmal für die Substitution mit einer Hydroxygruppe (153.1

ppm) und im anderen Fall für die Position der Achse (135.6 ppm) sprachen. Bei der Aufklärung der Konstitution im linken Ring der Südhälfte war es zunächst nicht möglich, sicher zwischen einer 5',6'- und eine 5',8'-Disubstitution zu unterscheiden. Hilfreich war jedoch die Betrachtung der Kopplungskonstanten der beiden Protonen, die mit >8 Hz zum einen darauf hinwies, dass diese Protonen benachbart waren, zum anderen aber auch dafür sprach, dass sich eines der Protonen in *peri*-Stellung befand. Außerdem wäre bei einer 5',8'-Disubstitution zu erwarten, dass der Unterschied der chemischen Verschiebung beider Protonen deutlich geringer ausfiel. Dieser Umstand sollte durch zusätzliche NMR-Experimente zur Ermittlung weiterer HMBC- und NOESY-Wechselwirkungen untersucht werden. Während der Probenvorbereitung oder der Messung zersetzte sich die Substanz jedoch vollständig. Nach bisherigem Befund war die Verbindung als 4-Methoxy-2,2'-methyl-1,1'-binaphthalin-4',5,5',6'-tetraol (**55**) zu beschreiben, dessen Konfiguration an der Achse nicht mehr zu ermitteln war. Die Aufklärung der Struktur eines weiteren Metabolits (**56**) lieferte aber wertvolle Hinweise, die den Vorschlag für die Verbindung **55** untermauerten.

Die Instabilität dieses Binaphthalins **55** lässt sich sicher auf den hohen Oxygenierungsgrad des südlichen Ringsystems zurückführen. Beispiele für Naturstoffe mit einer solchen Triol-ähnlichen Partialstruktur, wie das antibiotisch wirksame Atrovenetin aus *Penicillium atrovenetum* oder *P. herquei* finden sich auch äußerst selten.^[185,186]

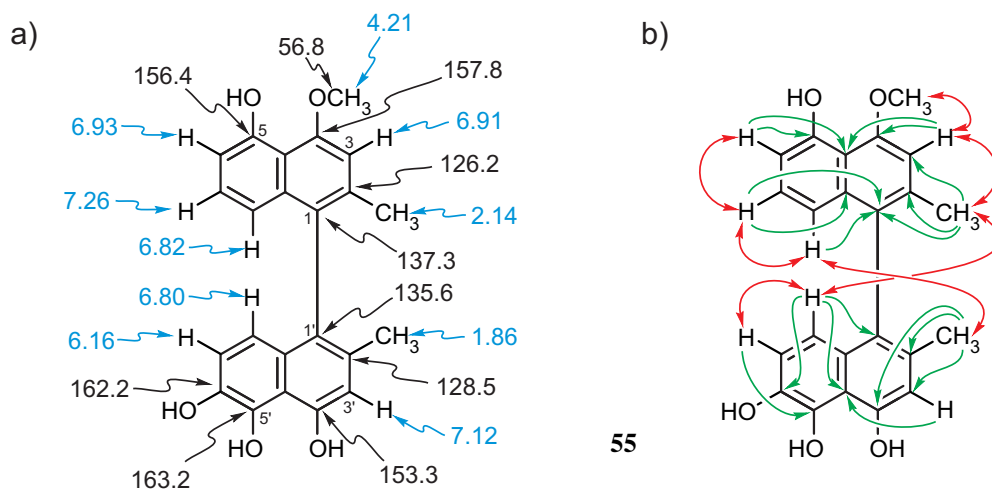


Abbildung 41. **55** mit a) wesentlichen ^1H - und ^{13}C -Daten sowie b) für die Aufklärung der Struktur relevanten HMBC- (grüne einfache Pfeile) und COSY-/NOESY-Korrelationen (rote Doppelpfeile).

Die Substanz **55** war aber bereits im Rohextrakt nachweisbar und dort auch relativ stabil. Dies gilt ebenso für die bereits aufkonzentrierten Fraktionen des Wurzelextrakts. Selbst wenn

der Rohextrakt oder die entsprechende Fraktion mehrere Tage ohne besondere Vorkehrungen gelagert wurde (RT, Luftsauerstoff), ließ sich der zu **55** zugehörige Peak im Chromatogramm noch immer finden. Möglicherweise war das NMR-Röhrchen unbeabsichtigt für längere Zeit dem Sonnenlicht ausgesetzt, so dass die Zersetzung der Substanz beschleunigt wurde.

5.3.6 *P*-4,4'-Dihydroxy-5-methoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthyl-5',6'-dion (**56**)

Des UV-Spektrums von **56** war im Bereich zwischen 200 und 350 nm deckungsgleich mit den UV-Profilen aller zuvor identifizierten Binaphthaline, es gab jedoch ein zusätzliches kleines Maximum bei ca. 440 nm, das von chinoiden Strukturen wie beispielsweise dem Elliptinon her bekannt war.^[187] Die exakte Masse (HR-ESI-MS) betrug m/z 397.1046 und legte die Summenformel $C_{23}H_{18}NaO_5$ (ber. m/z 397.1052) nahe. Im ^{13}C -NMR-Spektrums fanden sich zwei Signale mit einer für Carbonylfunktionen typischen Tieffeld-Verschiebung von 182.1 und 183.2 ppm. Abgesehen von den beiden Carbonylgruppen ähnelten alle anderen Verschiebungen, sowohl der Signale im 1H - als auch im ^{13}C -Spektrum, stark denen von **55**. Damit könnte **56** eine korrespondierende chinoide Struktur zu **55** haben. Der nördliche Teil der Verbindung wurde als ein 5-Methoxy-2-Methylnaphthalin-4-ol mit einer Biarylachse an C-1 identifiziert.

Die beiden oben bereits erwähnten Carbonylfunktionen mussten nun Bestandteil des südlichen Ringsystems, genauer, des linken, achsenfernen Rings sein, der außerdem zwei Protonen (6.16 und 6.80 ppm) trug. Die HMBC-Wechselwirkungen vor allem des stärker Tieffeld-verschobenen Protons (6.80 ppm) in Kombination mit den deutlichen NOE-Korrelationen zwischen diesem Proton und der Methylgruppe an C-2 der nördlichen Hälfte ließen nur die Annahme einer *ortho*-Substitution der Carbonylgruppen am linken südlichen Ring zu (Abbildung 42). Bei allen zuvor beschriebenen dimeren Naphthalinen gab es nie NOESY-Signale zwischen der Methylgruppe der einen Hälfte mit dem 7-H der anderen, stets war es nur 8-H, das solche Interaktionen aufwies. Demnach lag ein 4,4'-Dihydroxy-5-methoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthyl-5',6'-dion vor.

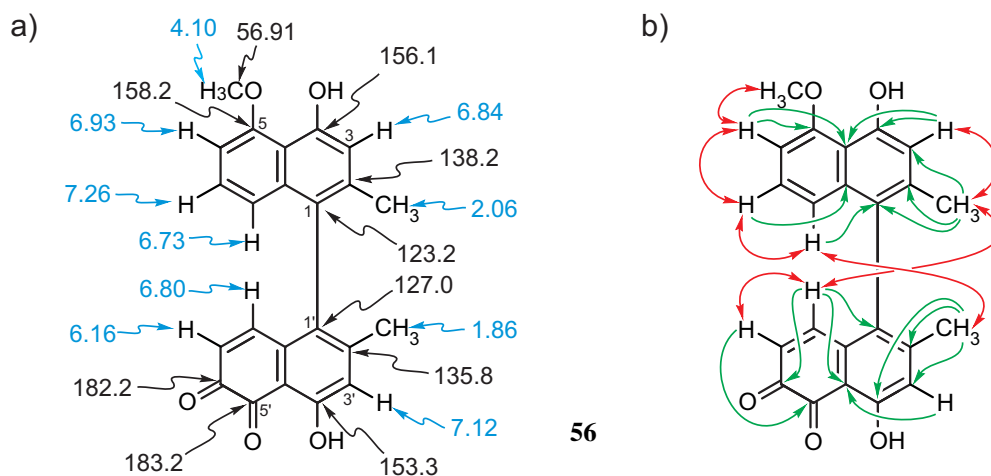


Abbildung 42. Die Struktur von **56** mit a) den wichtigsten ¹H- und ¹³C-NMR-Daten sowie b) den maßgeblichen HMBC- (grüne einfache Pfeile) und COSY- und NOESY-Korrelationen (rote Doppelpfeile).

Die Anwendung der Exciton-Chirality-Methode zur Bestimmung der Konfiguration an der Biarylachse war in diesem Falle unsicher, da sich die Chromophore unterschieden. Daher wurden von A. Schaumlöffel sowohl UV- als auch CD-Spektren für die beiden Enantiomere *M*-**56** und *P*-**56** berechnet (TD B3LYP/6-31G**/B3LYP/TZVP; shift 12 nm) und mit den experimentellen Daten verglichen (Abbildung 43).^[132-134, 138,142,143, 188-191]

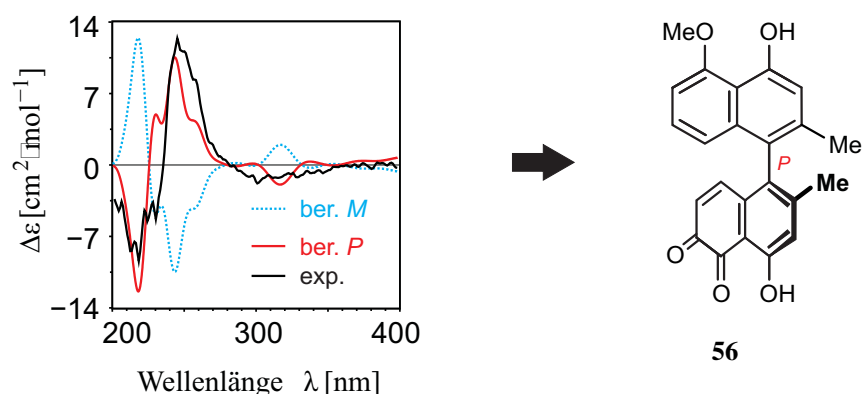


Abbildung 43. Ermittlung der Absolutkonfiguration der Biarylachse von **56** durch Berechnung der CD-Spektren mittels TD B3LYP/6-31G**/B3LYP/TZVP (shift 12 nm) und Vergleich mit den experimentell gewonnenen Daten.

So war die Achsenorientierung auch hier eindeutig als *P*-konfiguriert festgelegt. Aufgeworfen werden musste die Frage, ob es sich bei der Verbindung um einen echten Naturstoff handelte, der so auch von der Pflanze produziert wurde, oder ob es eher ein Artefakt war, das möglicherweise aus **55**-ähnlichen Verbindungen entstand. Allerdings war auch in diesem Fall bereits im Rohextrakt der entsprechende Peak zu finden.^[182]

5.3.7 5-Hydroxy-2-methylnaphthalin-1,4-*O,O*-di- β -D-glucosid (57)

Der wasserlösliche Metabolit **57** besaß ebenfalls ein ähnliches UV-Spektrum wie die bisher identifizierten Naphthalin-Verbindungen **52-56**. Die Messung der exakten Masse (ESI) m/z 537.1578 $[M+Na]^+$ in Kombination mit Protonen- und Kohlenstoff-NMR-Spektren legte eine Verbindung mit der Summenformel $C_{23}H_{30}O_{13}$ (als Na-Adukt ber. m/z 537.1578 $[M+Na]^+$) nahe. Dem 1H -NMR-Spektrum war zu entnehmen, dass die Verbindung vier aromatische Protonen besaß, von denen eines als Singulett (7.12 ppm) auftrat. Das ^{13}C -Spektrum wies u.a. drei quartäre Kohlenstoff-Signale auf, deren Tieffeld-Verschiebung für das Vorhandensein von Sauerstofffunktionen sprach, von denen sich entsprechend den HMBC-Korrelationen eine am linken und zwei am rechten Ring (in 1- und in 4-Position) befanden. Es handelte sich also wieder um eine Naphthalin-Grundstruktur mit einer 1,4,5-Trioxo-Substitution.

Die hohe Masse sowie eine Region komplexer Signale im 1H -NMR ließen auf das Vorhandensein von zwei Zuckerresten schließen. Durch NOESY-Wechselwirkungen der Methylgruppe (an C-2) mit dem anomeren Proton (4.89 ppm) von einem der Zucker und die Interaktionen zwischen 3-H und dem anomeren Proton eines zweiten Zucker-Restes (5.24 ppm) legte die Position der Zucker-Einheiten fest. Zudem gab die Dublett-Aufspaltung der beiden anomeren Protonen mit einer Kopplungskonstante von 7.7 Hz darüber Auskunft, dass es sich um eine *O*- β -glycosidische Bindung handelte. Etwas herausfordernder war die Zuordnung der Protonen-Signale der beiden Zucker, die sich überlagerten. Erst die vollständige Auswertung der 2D-NMR-Spektren (HMBC, HSQC, COSY und NOESY) ließ die Zuordnung aller Signale zweifelsfrei zu. Die Zucker-Reste, bei denen es sich entsprechend der NMR-Daten um Glucose handeln musste, wurden enzymatisch durch den Einsatz einer β -Glucosidase von dem Naphthalin-Kern abgespalten. Das Naphthalin oxidierte spontan zum Plumbagin. Dieses und die Glucose wurden durch DC-Vergleich mit authentischem käuflichem Material identifiziert. Die Absolutkonfiguration der Glucose wurde durch Bestimmung des Drehwertes im Vergleich zu authentischem Material ermittelt. Es handelte sich bei **57** also um das 5-Hydroxy-2-methylnaphthalin-1,4-*O,O*-di- β -D-glucosid.^[182]

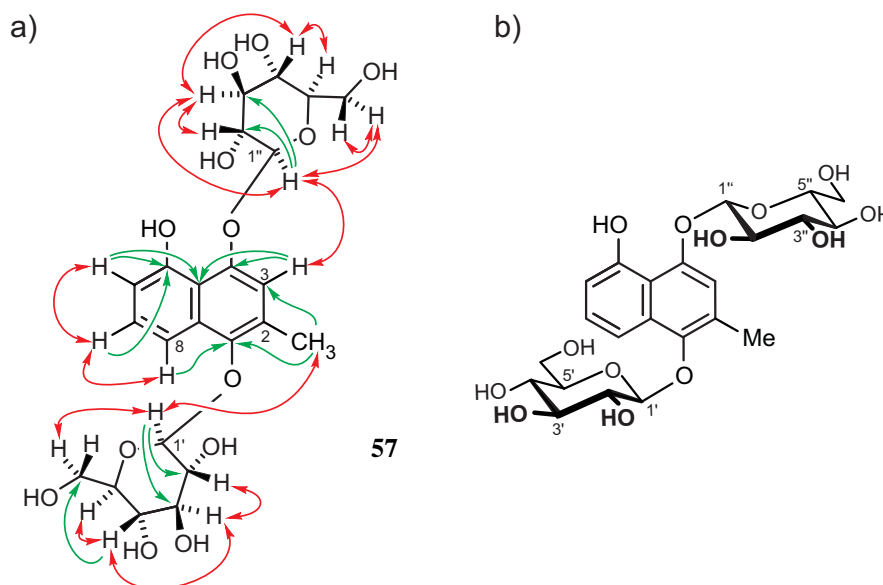


Abbildung 44. HMBC- (grüne Pfeile) und COSY- und ROESY-Korrelationen (rote Doppelpfeile) bei **57**. Um die Übersichtlichkeit der Abbildung zu erhalten wurden die Zuckerreste flach abgebildet (a) und die Struktur gesondert (b) räumlich wiedergegeben.

5.3.8 Identifizierung von Plumbasid A (**58**)

Eine weitere Verbindung (**58**) aus den Wurzelkulturen von *T. peltatum* wies die exakte Masse von m/z 375.1050 auf. Dies entsprach der Masse von **57**, dem ein Glucose-Rest fehlte, so dass die Summenformel $C_{17}H_{20}O_8$ (als Na-Addukt m/z 375.10504 $[M+Na]^+$) angenommen werden konnte. Auch das 1H -NMR-Spektrum war dem von **57** sehr ähnlich, gleiches galt für das ^{13}C -Spektrum. Nach der Entdeckung und Aufklärung des neuen Naturstoffs **57** war die Substanz **58** problemlos als 2-Methyl-1,5-dihydroxynaphthalin-4- β -*O*-D-glucosid zu identifizieren, das zudem bereit als Plumbasid A literaturbekannt war. Bei Betrachtung der Struktur fällt sofort auf, dass nach Abspaltung des Zucker-Restes und einfacher Oxidation das sehr weit verbreitete Naphthochinon Plumbagin (**9**) entstehen kann. Dies geschieht in der Natur evtl. Enzym-gesteuert beispielsweise nach Verletzungen der Zellen. Bei dem isolierten **58** geschah diese Reaktion sogar spontan. Plumbagin (**9**) sublimiert sehr leicht und hat die unangenehme (schon fast spezifische) Eigenschaft, sich in Plastik (Beispielsweise einem Stopfen, mit dem der Kolben verschlossen wurde) festzusetzen. Ein Coelutions-Experiment mit authentischem **9** identifizierte das entstandene Plumbagin eindeutig (Abbildung 45). Die hydrolytische Spaltung setzte auch den Zuckerrest frei, der durch vergleichende DC-Analyse und Drehwert-Bestimmung als D-Glucose identifiziert wurde.

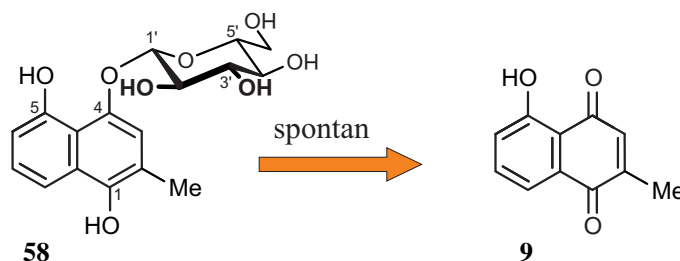


Abbildung 45. Spontane Umsetzung von Plumbasid A (**58**) zu Plumbagin (**9**).

Das Vorkommen von Plumbasid A (**58**) ist für viele Pflanzen beschrieben worden, u.a. finden sich auch carnivore Gattungen (*Nepenthes*, *Drosophyllum*, *Drosera* und *Dionea*),^[144,192-194] also solche aus der nahen Verwandtschaft der Dioncophyllaceae. Für *Triphyophyllum* selbst ist dies die Erstbeschreibung und unterstreicht die Verwandtschaft zu anderen carnivoren Pflanzenfamilien noch einmal.

Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei Plumbasid A (**58**), aber auch bei **57** um eine Speicher- oder Transportform des selbst für Pflanzenzellen toxischen Plumbagins (**9**).

5.3.9 *P*-5,4'-Dihydroxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-4,6''-*O,O*-di- β -D-glucosid-5'-*O*- β -D-glucosid (**59**)

Ein weitaus komplexeres Protonen-Spektrum als die beiden Verbindungen zuvor wies die Substanz **59** auf. Das UV-Profil ließ erneut ein Naphthalin erwarten und nach der ersten Auswertung sowohl der ^1H - und ^{13}C - als auch aller 2D-NMR-Spektren war der Kern der Verbindung als ein 1,1'-gekoppeltes Naphthalin-Dimer identifiziert. Die hohe exakte Masse von m/z 855.2699 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ sowie eine Region extrem komplexer Signale im ^1H -NMR-Spektrum ließen vermuten, dass das dimere Naphthalin drei Zuckerreste trug ($\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{NaO}_{19}$, ber. m/z 855.2682 $[\text{M}+\text{Na}]^+$). Tatsächlich gab es im nördlichen Naphthalin-Teil ROESY-Interaktionen zwischen dem Singulett-Proton an C-3 (7.40 ppm) zu dem anomeren Protonen ($1''\text{-H}$ – 5.24 ppm) eines Zuckerrestes. Zusätzliche HMBC-Wechselwirkungen desselben anomeren Wasserstoffs zu C-4 (155.1 ppm) legten fest, dass der Zuckerrest *O*-glycosidisch an C-4 gebunden war. Auf gleiche Weise erfolgte die Zuordnung der Position eines zweiten Zuckerrestes am südlichen Naphthalin-Teil. Die großen Kopplungskonstanten von 7.8 Hz der anomeren Protonen gaben darüber Auskunft, dass es sich erneut um β -glycosidische Bindungen handelte.

Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte aber noch ein drittes anomeres Proton (4.39 ppm), das jedoch weder HMBC- noch ROESY-Interaktionen mit dem Binaphthalin zeigte. Stattdessen

ergaben sich im ROESY-Spektrum Wechselwirkungen mit einer CH_2 -Gruppe (3.91 und 4.23 ppm), die einem der beiden Zucker-Reste gehörte (Abbildung 46 und 47).

Die vollständige Zuordnung der einzelnen sich stark überlagernden Signale der Zucker-Protonen allein durch die Auswertung von HMBC-, HSQC- und COSY-, ROESY- bzw. NOESY-Spektren war nicht möglich. Zwar konnten für jede Zucker-Einheit große Teile identifiziert werden. Die klare Zuordnung aller Signale und damit die Identifizierung der Zucker als Glucose-Reste war aber erst durch die Aufnahme von TOCSY-Spektren möglich (Abbildung 47). Ähnlich wie beim COSY werden ^1H - ^1H -Korrelationen detektiert. Ausgehend von einem Signal mit bekannter Verschiebung (z.B. den anomeren Protonen eines solchen Zuckers) werden nicht nur geminale und vicinale, sondern auch long-range-Kopplungen innerhalb eines Spin-Systems (wie beispielsweise einer Glucose-Einheit) sichtbar. Die Identifizierung der Zucker erfolgte wie zuvor durch die hydrolytische Spaltung mit anschließender Co-Chromatographie.

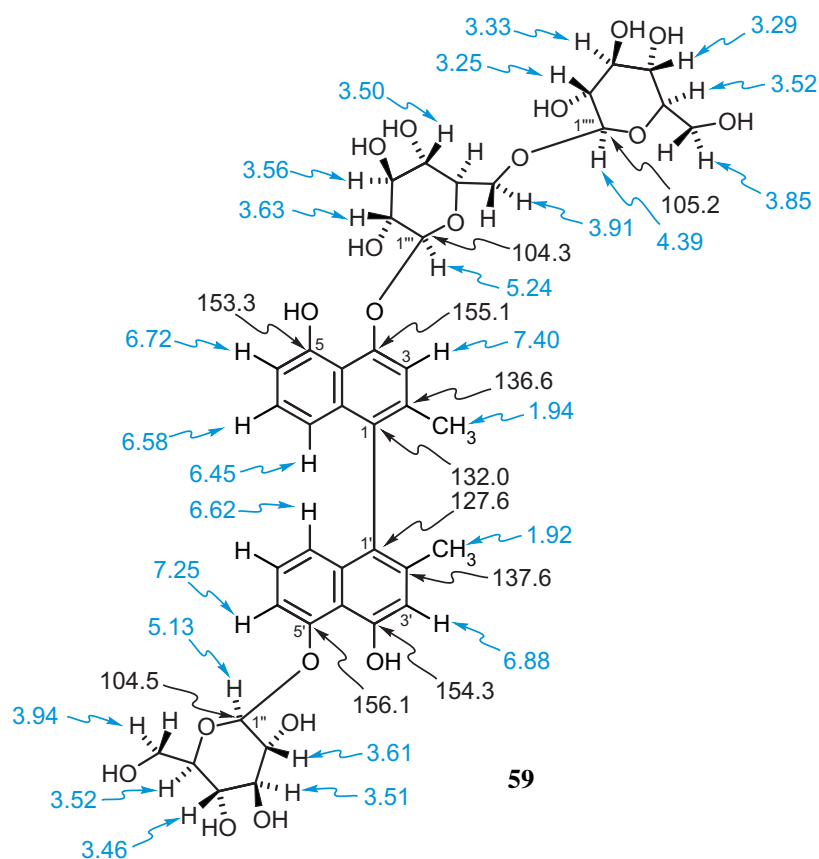


Abbildung 46. Das dreifach glucosidierte Binaphthalin **59** mit den wichtigsten ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Glucose-Reste flach dargestellt.

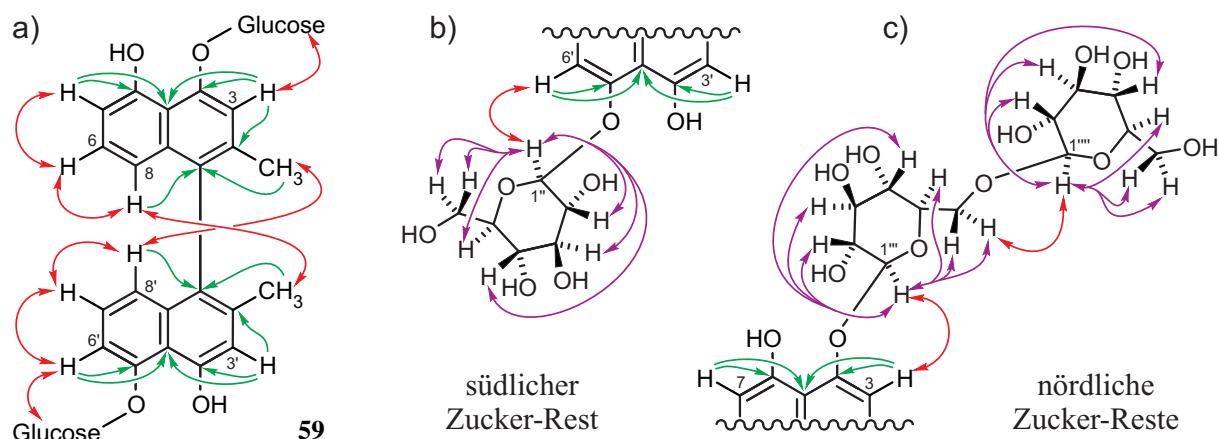


Abbildung 47. Für die Strukturaufklärung der einzelnen Einheiten wichtige Korrelationen: a) HMBC- (grüne, einfache Pfeile) bzw. COSY/ROESY-Interaktionen (rote Doppelpfeile) des Binaphthalin-Kerns, b) 2D-TOCSY-Signale der Glucosereste des nördlichen und c) des südlichen Naphthalinteils.

Die Konfiguration der Biarylachse wurde durch die Auswertung von CD-Spektren bestimmt. Der positive Cottoneneffekt (237 nm) legte eine *P*-konfigurierte Achse nahe. Da jedoch aufgrund der vielen Glucose-Einheiten nicht sicher war, ob die Exciton-Chirality-Methode uneingeschränkt anwendbar war, wurden von Anu Schaumlöffel semi-empirische Berechnungen vorgenommen. Die Konformationsanalyse wurde mit der PM3-Methode^[195] durchgeführt, um darauf hin das UV- und CD-Spektrum mit ZINDO/S-CI^[196] zu berechnen. Tatsächlich ergab sich ein berechnetes CD-Spektrum, das mit dem experimentell ermittelten nahezu deckungsgleich war und die Achse als *P*-konfiguriert auswies. Bei der Substanz **59** handelte es sich also um das 5,4'-Dihydroxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-3,6''-*O,O*-di- β -D-glucosid-5'-*O*- β -D-glucosid mit *P*-konfigurierter Biarylachse.^[182]

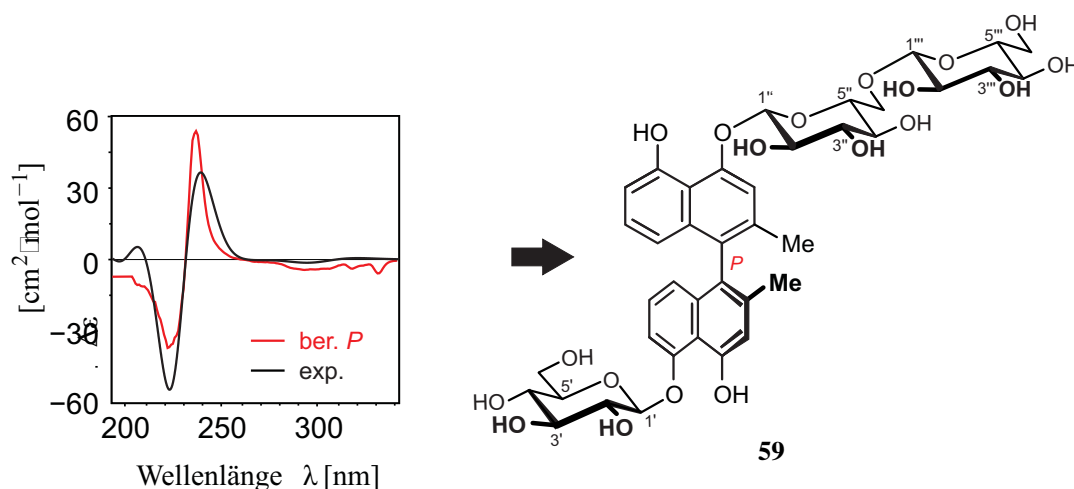


Abbildung 48. Vergleich der berechneten und experimentell ermittelten CD-Spektren von **59**.

Erstaunlicher Weise sind Binaphthaline selten als Naturstoffe entdeckt worden. Eine der wenigen Quellen scheint die Gattung *Diospyros* zu sein.^[197-203] Das erste dieser dimeren Naphthaline war das Diospyrol, das zunächst als 3,3'-gekoppeltes Naphthalin publiziert worden war, später musste die Struktur aber als 6,6'-gekuppelt berichtigt werden.^[198,199] Aus Vertretern dieser Gattung sind auch dimere Naphthochinone und Naphthochinon-gekuppelte Naphthaline isoliert worden.^[200-202] In keinem Fall aber ist eine mögliche stereochemische Hinderung der Achsenrotation in Betracht gezogen worden. Obwohl in Asien eine ganze Reihe dieser Pflanzen in der Volksmedizin eingesetzt werden, finden sich kaum Bioaktivitäts-Werte solcher Verbindungen.^[200,203]

5.3.10 *trans*-Methyl-1,2,4-trihydroxy-2-methyl-3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-carboxylsäure (**60**)

Die Verbindung **60** besaß ein UV-Spektrum, das keiner der bisher beschriebenen Substanzklassen zugeordnet werden konnte. Der Wert der exakten Masse (HRESIMS) m/z 251.05322 $[M-H]^-$ ließ auf die Summenformel $C_{12}H_{11}O_6$ (ber. m/z 251.0561 $[M-H]^-$) schließen. Das 1H -NMR-Spektrum zeigte drei aromatische Protonen, die klar getrennte Signale ergaben und allesamt benachbart waren. Dem HMBC-Spektrum war zu entnehmen, dass sich an diesem aromatischen Ring noch eine Hydroxygruppe befand. Zudem gab es eine Methoxygruppe (3.61 ppm) sowie eine Methylgruppe (1.32 ppm), die Struktur schien also derjenigen der zuvor isolierten Naphthaline ähnlich zu sein. Bereits das ^{13}C -Spektrum ließ daran aber Zweifel aufkommen. Es gab ein ungewöhnlich stark Tieffeld-verschobenes Kohlenstoff-Atom bei 205.3 ppm und ein weiteres bei 173.6 ppm. Letzteres sprach für das Vorhandensein einer Carbonsäure oder eines Carbonsäurederivates. Dass es sich dabei um einen Methylester handelte, wurde durch HMBC-Wechselwirkungen der Methoxygruppe (3.61 ppm) zu dem Kohlenstoff bei 173.6 ppm bestätigt. Dieser zeigte weitere Interaktionen zu einem Hochfeld-verschobenen Kohlenstoff bei 84.4 ppm (C-1). Die weiterhin vorhandene Methylgruppe (1.32 ppm) besaß ebenfalls HMBC-Wechselwirkungen zu diesem und einem weiteren Hochfeld-verschobenen C-Atom (85.6 ppm). Außerdem zeigte die CH_3 -Gruppe Interaktionen mit dem sehr stark Tieffeld-verschobenen Kohlenstoff bei 205.3 ppm (C-3). Die Methylgruppe und der Methylester mussten also relativ nahe beieinander stehen und außerdem war eine Carbonylfunktion in unmittelbarer Nachbarschaft zur Methylgruppe vorhanden, alles in einem fünf-gliedrigen Ringsystem. Die ^{13}C -Signale von C-1 und C-2 waren allerdings nicht soweit Hochfeld-verschoben, wie es für solche Systeme zu erwarten

wäre.^[204] Die einzige Erklärung für diesen shift war das Vorhandensein weiterer Sauerstofffunktionen. Die einfachste und chemisch sinnvollste Erklärung wäre die Substitution mit je einer Hydroxygruppe. Diese Annahme ließ eine *trans*-Stellung von Me- und OMe-Gruppe zu, bei der es keine NOESY-Wechselwirkungen geben kann.

Klarheit bringen sollten NMR-Spektren, aufgenommen in DMSO, indem auch die Wechselwirkungen der Protonen der OH-Gruppen sichtbar waren. Tatsächlich fanden sich drei OH-Gruppen (Protonensignale mit den Verschiebungen von 9.97, 5.89 und 5.72 ppm). Durch HMBC- und NOESY-Kreuzsignale konnte die Konstitution der Struktur noch einmal bestätigt werden. Die Methylgruppe wies die bereits erwähnten HMBC-Wechselwirkungen auf, zeigte aber nun auch deutliche NOESY-Korrelationen zu den Protonen der beiden OH-Gruppen (bei 5.72 und 5.89 ppm). Diese Hydroxygruppen besaßen NOESY-Interaktionen untereinander. HMBC-Wechselwirkungen wiesen darauf hin, dass sich in unmittelbarer Nachbarschaft der Methyl ester befand. Weitere HMBC- und NOESY-Wechselwirkungen der beiden OH-Gruppen, aber auch des Methyl esters und der Methylgruppe untermauerten den bereits erarbeiteten Strukturvorschlag weiter. Nicht vorhanden waren NOESY-Korrelationen zwischen 2-Me und 1-COOMe. Da diese fehlten, musste eine *trans*-Stellung der beiden OH-Funktionen vorliegen, so dass es sich bei **60** um die *trans*-Methyl-1,2,4-trihydroxy-2-methyl-3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indene-1-carboxylsäure handelt.

Vermutlich liegen die Enantiomere in einem nahezu racemischen Gemisch vor, so dass die Aufnahme von CD- oder ORD-Spektren nicht möglich war. Trennungsversuche an chiraler Phase führten bislang zu keinem Erfolg. Für weitere Untersuchungen stand nicht genügend Substanz zur Verfügung.

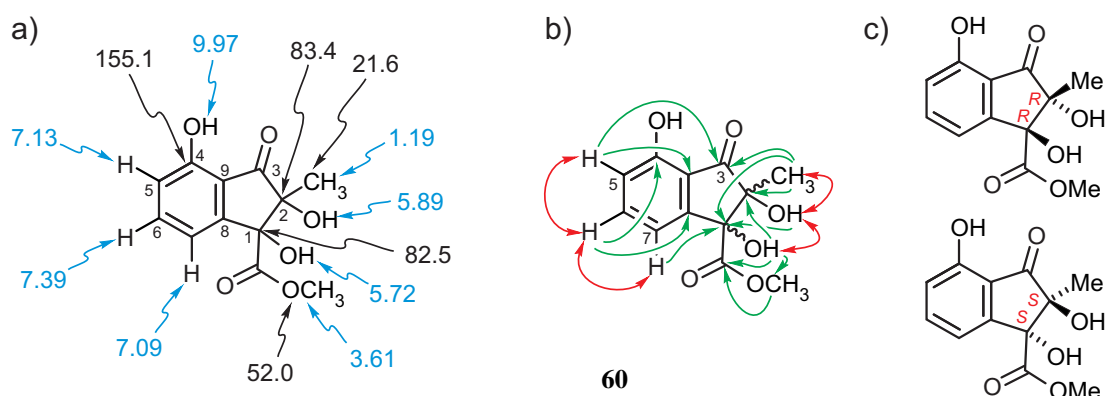


Abbildung 49: Die für die Strukturaufklärung von **60** wichtigsten a) Verschiebungen der ¹H- und ¹³C-NMR-Signale sowie b) die HMBC- (grüne einfache Pfeile) und COSY/NOESY-Korrelationen (rote Doppelpfeile).

5.3.11 *cis*-Methyl-1,2,4-trihydroxy-2-methyl-3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-carboxylsäure (**61**)

Von **60** an achiraler RP-Phase problemlos trennbar war eine weitere Substanz, die im UV-Profil, aber vor allem auch in den 1D- und 2D-NMR-Spektren große Ähnlichkeit mit **60** zeigte. Die HRESIMS-Werte waren identisch, so dass wahrscheinlich die gleiche Konstitution vorlag. Bereits dies deutete darauf hin, dass hier die Diastereomere von **60** isoliert wurden. Während bei der vorhergehenden Verbindung die *trans*-Stellung der Methyl- und der Methylestergruppe herausgearbeitet wurde, musste es sich nun um die *cis*-Form handeln. Bei **61** gab es im Gegensatz zu **60** NOESY-Kreuzsignale zwischen 2-Me und 1-COOMe, die die *cis*-Anordnung dieser beiden Gruppen zueinander bestätigten (Abbildung 50).

Damit wurde diese Substanz als *cis*-Methyl-1,2,4-trihydroxy-2-methyl-3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indene-1-carboxylsäure identifiziert (**61**), die vermutlich ebenfalls in nahezu racemischem Enantiomergemisch vorlag.

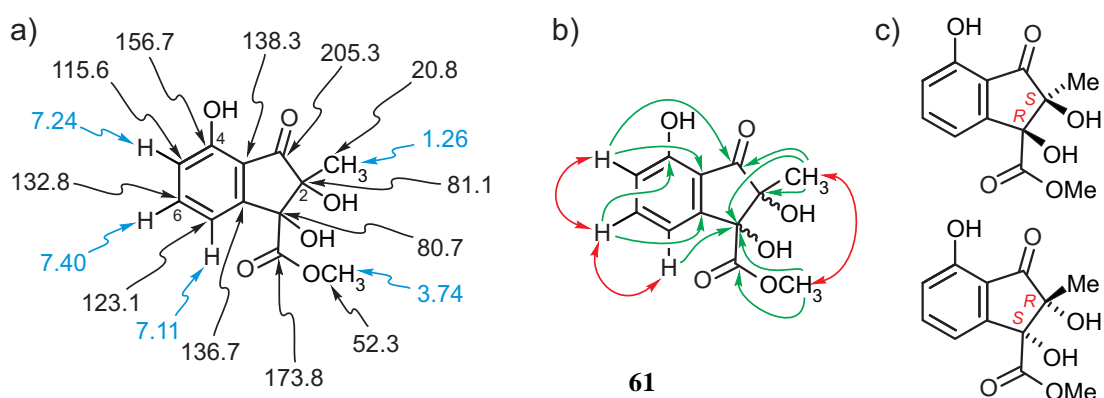


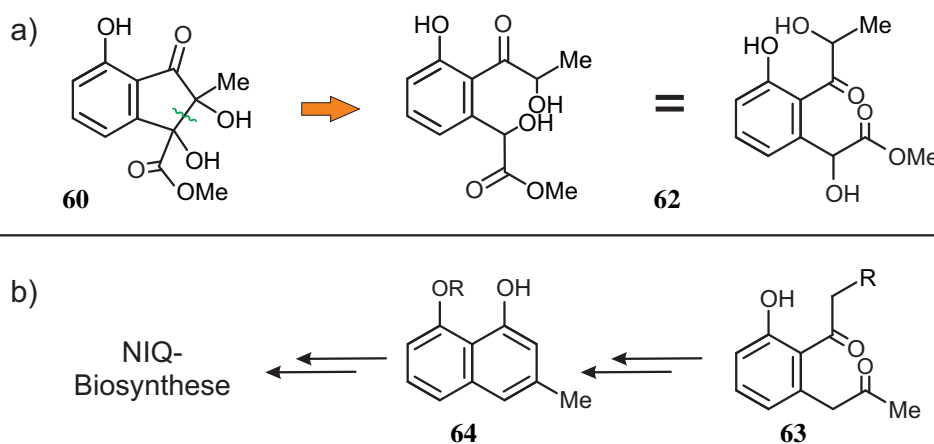
Abbildung 50: Die Verschiebungen und Korrelationen von **61**, a) ^1H - und ^{13}C -Daten und b) HMBC- (grüne Pfeile) und COSY-/NOESY-Wechselwirkungen (rote Doppelpfeile).

Indanon-Strukturen sind in der Natur selten. Interessanterweise wurde aber offenbar aus Campher-Öl eine ähnliche Struktur isoliert.^[205] Leider stand von der entsprechenden Publikation (in chinesischer Sprache) nur der Abstract in englischer Sprache und die Einträge in der Sci-finder-Datenbank zur Verfügung. In der Literatur finden sich vor allem synthetische oder semi-synthetisch produzierte Verbindungen, die eine ähnliche Grundstruktur haben, sich aber stets deutlich von **60** und **61** unterscheiden.^[161,206] In Japan wurden synthetische Indanone und Indene als Wachstumsregulatoren für Pflanzen untersucht. Sie blieben aber allesamt hinter der Wirksamkeit bereits bekannter Phytohormone zurück.^[207]

5.3.12 Überlegungen zur Biosynthese der Indene **60** und **61**

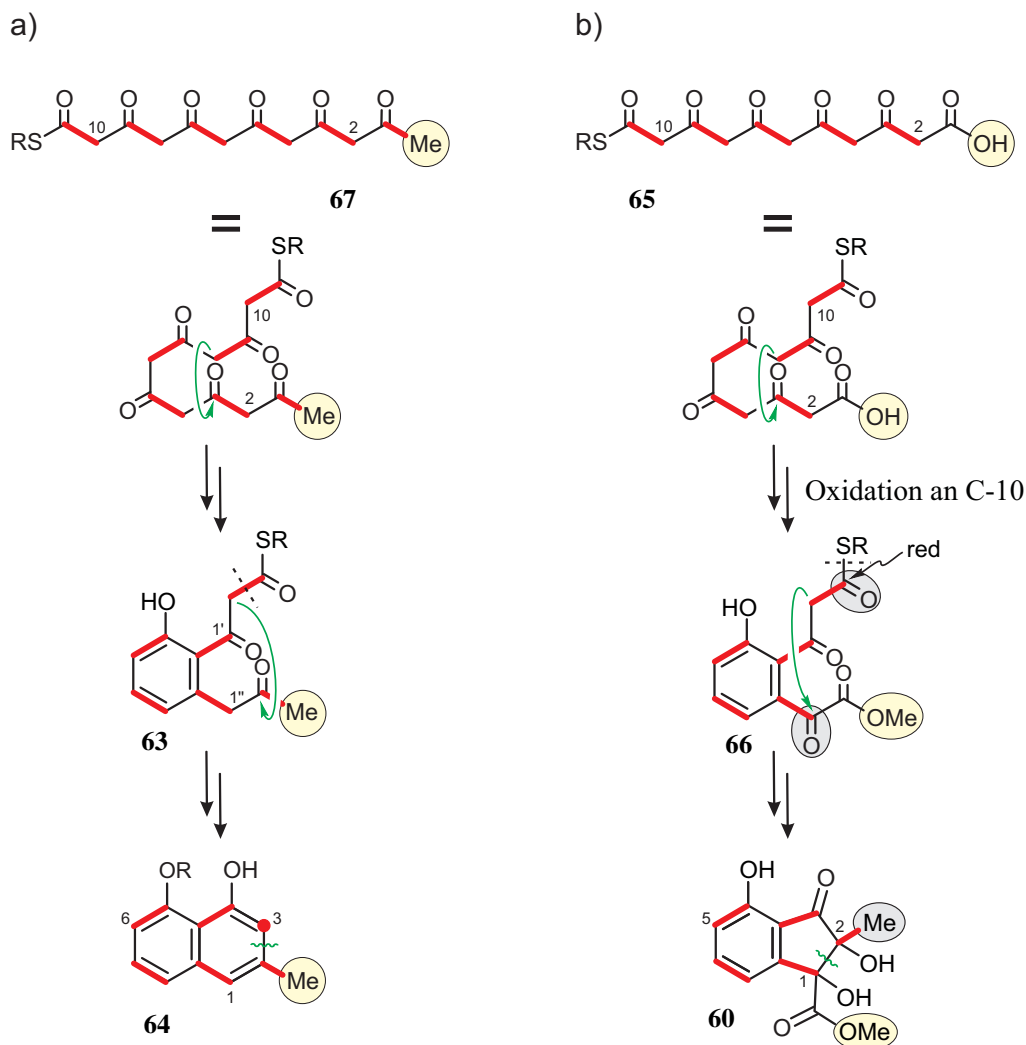
Von besonderem Interesse war die Frage nach der Biosynthese von **60** und **61**. Handelt es sich um Polyketide? Spaltet man die C,C-Bindung zwischen C-1 und C-2, erhält man eine Struktur **62**, die auf den ersten Blick sehr an ein monocyclisches Diketon **63** erinnerte, wie es für die Biosynthese der Naphthylisochinolin-Alkaloide postuliert wird (Schema 2). Verläuft die Biosynthese über eine solche Diketo-Zwischenstufe? Chemisch ist das schwer nachvollziehbar und bereits zu Beginn der Biosynthese hätte ein Fehler im Aufbau der 'normalen' Polyketidkette unterlaufen müssen. Möglicherweise hat die Verknüpfung mit der Starter-Acetat-Einheit (wie sie bei der Biosynthese der Naphthylisochinolin-Alkaloide stattfinden musste)^[208] nicht funktioniert oder es wurde direkt Malonat verwendet.

Wenn Malonyl-CoA die erste Einheit bildet,^[209] würde das dazu führen, dass statt einer beginnenden Methylgruppe eine Hydroxygruppe existiert, die im Verlauf der weiteren Biosynthese *O*-methyliert worden ist. Dies würde die Seitenkette an C-1 von **60** und **61** ergeben können. Prinzipiell könnte aber auch mit Malonat als Starter-Einheit eine Kette mit sechs Carbonylfunktionen entstehen (Schema 3).



Schema 2: Überlegungen der „Retro-Biosynthese“ der Indene (a) und im Vergleich ein Ausschnitt aus der Naphthylisochinolin-Biosynthese (b).

Der erste Ringschluss zum monocyclischen Diketon würde in beiden Fällen (Acetyl- oder Malonyl-CoA als Starter) identisch ablaufen. Aus chemischer Sicht schwieriger zu erklären sind die Reaktionen, die den zweiten Ringschluss zum Inden herbeiführen. Dafür wäre eine Oxidation an C-10 der Kette nötig (dem späteren C-1" der monozyklischen Verbindung **66**) sowie eine Reduktion der Carbonylfunktion am SCoA-Ende, um letztlich zu dem fünfgliedrigen Ring der Indene **60** und **61** zu gelangen (Schema 3).

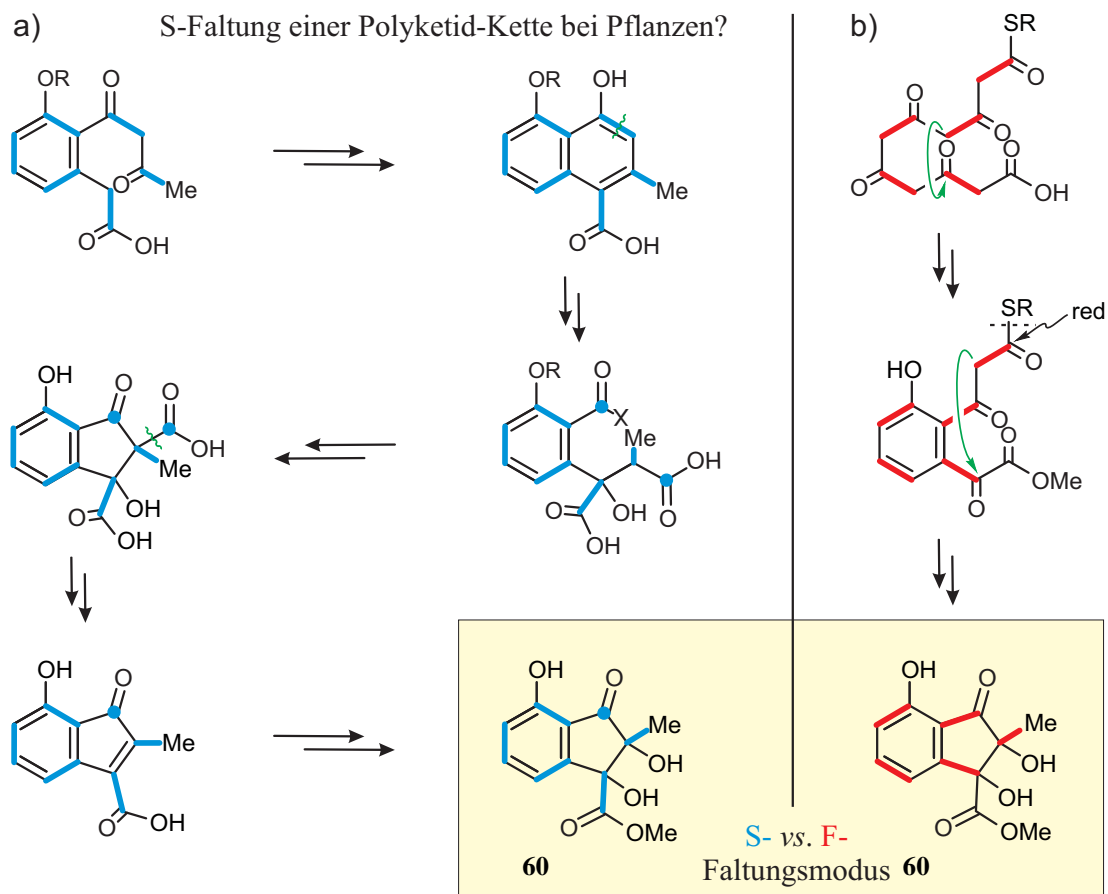


Schema 3. Die Zwischenprodukte der a) normalen und der b) gestörten Polyketid-Biosynthese könnten sich bis zum monocyclischen Diketon (**63** und **66**) sehr ähnlich sein. Erfolgt bei b) der zweite Ringschluss wie üblich, erhält man das bereits zuvor beschriebene **51**.

Eine chemisch plausible Erklärung ist in Schema 4 (links) gezeigt. Hier würde eine Ozonolyse-ähnliche Spaltung eines Naphthalins mit anschließender Dieckmann-Kondensation zu einem fünfgliedrigen Ring führen, der an C-2 noch eine Decarboxylierung erfahren muss, um ebenfalls die Strukturen der Indene **60** und **61** zu ergeben.

Die Spaltung aromatischer Ringsysteme kommt in der Natur durchaus vor, wie z.B. im Verlaufe der Biosynthese des Gilvocarcins V.^[210] Diese Ringöffnungen finden sich aber vor allem bei Pilzen und Bakterien und führen dann meist zu einem Heterocyclus.^[211-215] Für Pflanzen sind diese Reaktionen sehr selten beschrieben^[216] und beziehen sich vor allem auf Abbauprozesse.^[217]

Allerdings würde der Biosyntheseweg über eine Ringöffnung eine Kettenfaltung entsprechend dem S-Typ verlangen, im Gegensatz zu dem zuvor diskutierten Biosyntheschema (Schema 4, rechts), das im Einklang mit dem bei Pflanzen zu erwartenden F-Faltungstyp steht. Der S-Faltungsmodus ist bislang nur für Prokaryonten nachgewiesen und wird für diese als spezifisch angesehen.



Schema 4. Gegenüberstellung der beiden diskutierten Biosynthesewege, über die die Indene **60** und **61** entstanden sein könnten. Links (a) eine chemisch erklärable Route, die den falschen Faltungstyp (S-Faltung) voraussetzt, rechts (b) ein Biosynthese-Vorschlag, der dem richtigen Faltungstyp folgen würde, aber chemisch schwer zu erklären ist.

Damit ist es sehr unwahrscheinlich, dass diese Variante der Polyketidketten-Faltung von *T. peltatum* realisiert wurde. Des Weiteren ließe sich keine der bekannten Strukturen aus den Blättern, Wurzeln oder Zellkulturen mit diesem Biosyntheseweg in Einklang bringen.

Die Aufstellung einer Theorie zur biosynthetischen Herkunft wird erst nach Durchführung von Fütterungsexperimenten mit $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Acetat an Wurzelkulturen von *T. peltatum* möglich sein. So ließe sich der tatsächliche Faltungstyp feststellen, aber vor allem werden

aus dem Markierungsmuster des Fünfrings entsprechende chemisch fundierte Reaktionssequenzen zu seiner Entstehung ableitbar sein.

5.3.13 Bekannte Substanzen in Wurzelkulturen von *T. peltatum*

Neben den bislang unbekanntem Verbindungen wurden eine Reihe weiterer, bereits bekannter und für Dioncophyllaceae typische Verbindungen durch Coelutions-Experimente per HPLC und die Aufnahme von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren identifiziert. Die Wurzelkulturen produzierten Naphthochinone wie Droseron (**10**), Plumbagin (**9**) und 8-Hydroxydroseron (**36**).^[65,124,132,145] Interessanter Weise fanden sich aber bisher weder Dioncochinon A (**34**) noch Dioncochinon B (**35**). Diese scheinen spezifisch von den Kalluskulturen produziert zu werden.

Die Wurzelkulturen produzierten auch eine Reihe verschiedener Naphthylisochinolin-Alkaloide und erwartungsgemäß wurde Dioncophyllin A (**8**) als einer der Hauptmetabolite identifiziert,^[17,104,106,107] der, wie bei den Kalluskulturen, mit seinen *O*-Demethyl-Varianten und dem neu entdeckten 5'-*O*-Methyldioncophyllin D (**42**) eluierte. Als weitere Naphthylisochinolin-Alkaloide wurden Habropetalin A (**27**) und Dioncopeltin A (durch Coelutions-Experimente) identifiziert.^[115]

5.4 Das phytochemische Potenzial von *Triphyphyllum peltatum* (Dioncophyllaceae)

Bereits in früheren Arbeiten^[218] wurden eine ganze Reihe interessanter Sekundärmetabolite, vor allem Naphthylisochinolin-Alkaloide aus *T. peltatum* isoliert. In der Wurzelrinde fand M. Rübenacker neben Dioncopeltin A und Dioncolacton A auch die Dioncophylline A (**8**) B (**24**) und C (**25**).^[17,109,110] Diese Reihe wurde durch die vorliegende Arbeit um das Dioncophyllin-D-Derivat **42** erweitert (Abbildung 51). Damit werden alle Kupplungs-Möglichkeiten am Naphthalin-Teil, unter Berücksichtigung von Dioncophyllin E (**28**), aus *Habropetalum dawei*,^[117] von den Dioncophyllaceae realisiert.

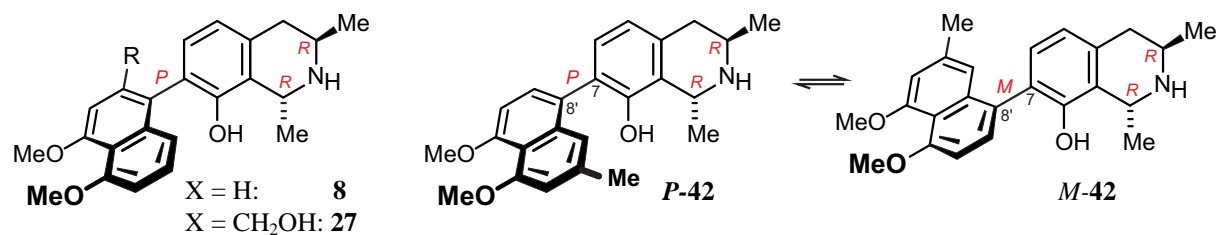


Abbildung 51: Die Naphthylisochinolin-Alkaloide Dinocophyllin A (**8**), Habropetalin A (**27**) und die als Naturstoff entdeckten Dioncophyllin-D-Derivate *P*-42 und *M*-42, die allesamt in Kallus- und Wurzelkulturen von *Triphyphyllum* gefunden wurden.

Die Biosynthese der Naphthylisochinoline ist offenbar sehr störanfällig. Unter Stresseinfluss, wenn also u.a. der Stickstoffeinbau gestört ist, kann eine andere Klasse bioaktiver Substanzen, die der Naphthochinone, produziert werden. Es ist seit langem bekannt, dass *T. peltatum* Plumbagin (**9**) und Droseron (**10**) produziert.^[21,23,123,124] Die Möglichkeiten, die dieser Pflanze zur Verfügung stehen, sind damit aber nicht ausgeschöpft. Es kann zu einer weitaus höheren Oxygenierung kommen als bei **10**. So wurden das bereits aus anderen Pflanzen bekannte 8-Hydroxydroseron (**36**), aber auch neue Naphthochinone, die Dioncochinone A - E (**34**, **35** und **39** - **41**) isoliert (Abbildung 52).

Bei diesen Verbindungen handelt es sich nicht nur um neue Naturstoffe, sondern auch um z.T. hochspezifische anti-infektive und anti-cancerogene Substanzen. Außerdem fanden sich glucosidierte Lager- und Transportformen **57** und **58** des selbst für Pflanzenzellen toxischen Plumbagins.

	X ¹	X ²	X ³	X ⁴
9	H	H	H	H
10	OH	H	H	H
34	OH	<i>O</i> -β-D-Glucose	H	H
35	OH	OH	H	H
36	OH	H	H	OH
39	OMe	OH	OMe	H
40	OH	OMe	OH	H
41	OH	OH	OMe	H

R = β-*O*-Gluc: **57**
 R = H: **58**

Abbildung 52. *Triphyphyllum* produziert vor allem in Kallus-, aber auch in Wurzelkulturen einen reichen Fundus hochoxygenerter Naphthochinone und deren Transportformen.

Mit den Naphthochinonen war die Palette der Sekundärmetabolite jedoch noch immer nicht erschöpft. Dass *Triphyphyllum* monomere Naphthaline produziert, war nicht unerwartet. Zusätzlich konnten aber dimere Naphthaline, z.T. mehrfach glucosidiert (**59**) oder mit

verschiedenen *O*-Methylierungsmustern (**52-54**) isoliert werden (Abbildung 53). Sogar ein Naphthalin-Naphthochinon-Heterodimer **56** wurde identifiziert.

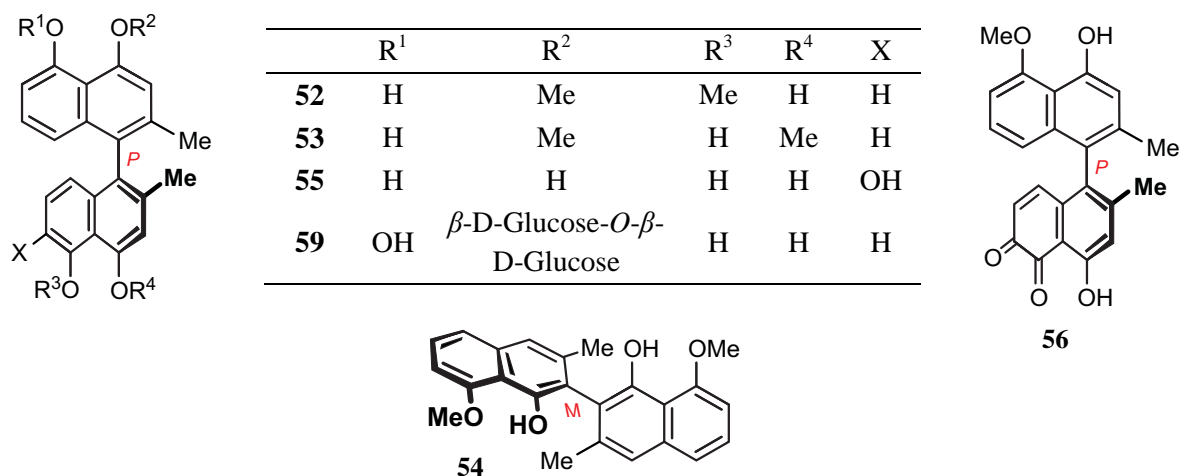


Abbildung 53. Die enzymatische Maschinerie von *T. peltatum* ist auch in der Lage eine stattliche Anzahl dimerer Naphthaline oder daraus hervorgegangener Verbindungen zu produzieren.

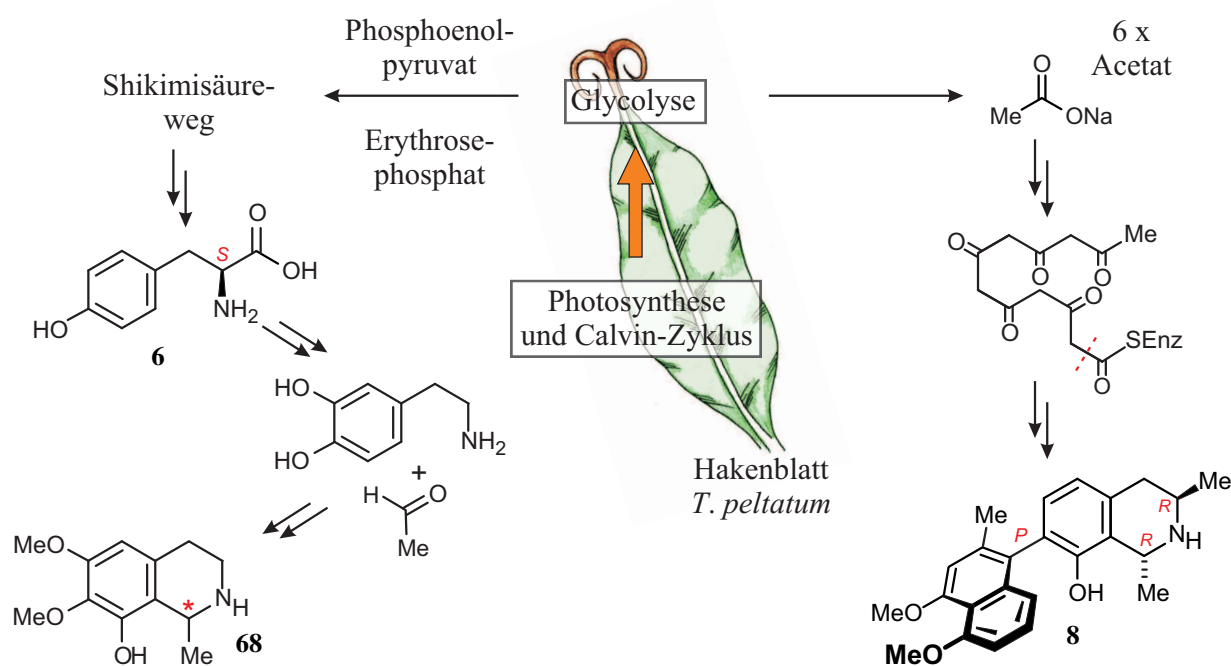
Vollkommen unerwartet waren zwei Metabolite, die ebenfalls einer polyketidischen Biosynthese entspringen könnten, die Indene **60** und **61**.

Insgesamt gelang der eindrucksvolle Beweis, dass *T. peltatum* als Pflanze oder in Form steriler Organ- und Zellkulturen ein sehr flexibles, biosynthetisches Multitalent ist. In diesem Kapitel wurde die Herkunft einiger (ungewöhnlicher) Metabolite bereits diskutiert. Im folgenden Kapitel (6) soll nun auch die Naphthylisochinolin-Biosynthese untersucht werden.

6 Untersuchung der Biosynthese der Naphthylisochinolin-Alkaloide an Kalluskulturen von *Triphyophyllum peltatum*

6.1 Einführung

Naphthylisochinolin-Alkaloide sind, wie schon mehrfach erwähnt, Strukturen, die aus einem Isochinolin und einem Naphthalin zusammengesetzt sind. Dabei handelt es sich in den einfachsten Fällen um ein 2-Methyl-4,5-Dioxynaphthalin und ein 1,3-Methyl-8-Oxyisochinolin, das bei Verbindungen des Ancistrocladaceae-Typs an C-6 eine weitere Sauerstoff-Funktion trägt. Damit unterscheidet sich das Substitutionsmuster im Isochinolin-Teil der Naphthylisochinolin-Alkaloide von dem anderer Isochinoline wie z.B. Anhalonidin (**68**) oder Morphin (**5**), deren Biosynthese bekanntermaßen auf aromatische Aminosäuren zurückgeht (Schema 5).^[219] Um das Oxygenierungsmuster der Naphthylisochinolin-Alkaloide hervorzubringen, müsste es eine dem Tyrosin (**6**) vergleichbare aromatische Aminosäure mit einer 6,8-Oxygenierung geben. Eine polyketidische Herkunft wäre aber viel eher in Betracht zu ziehen.



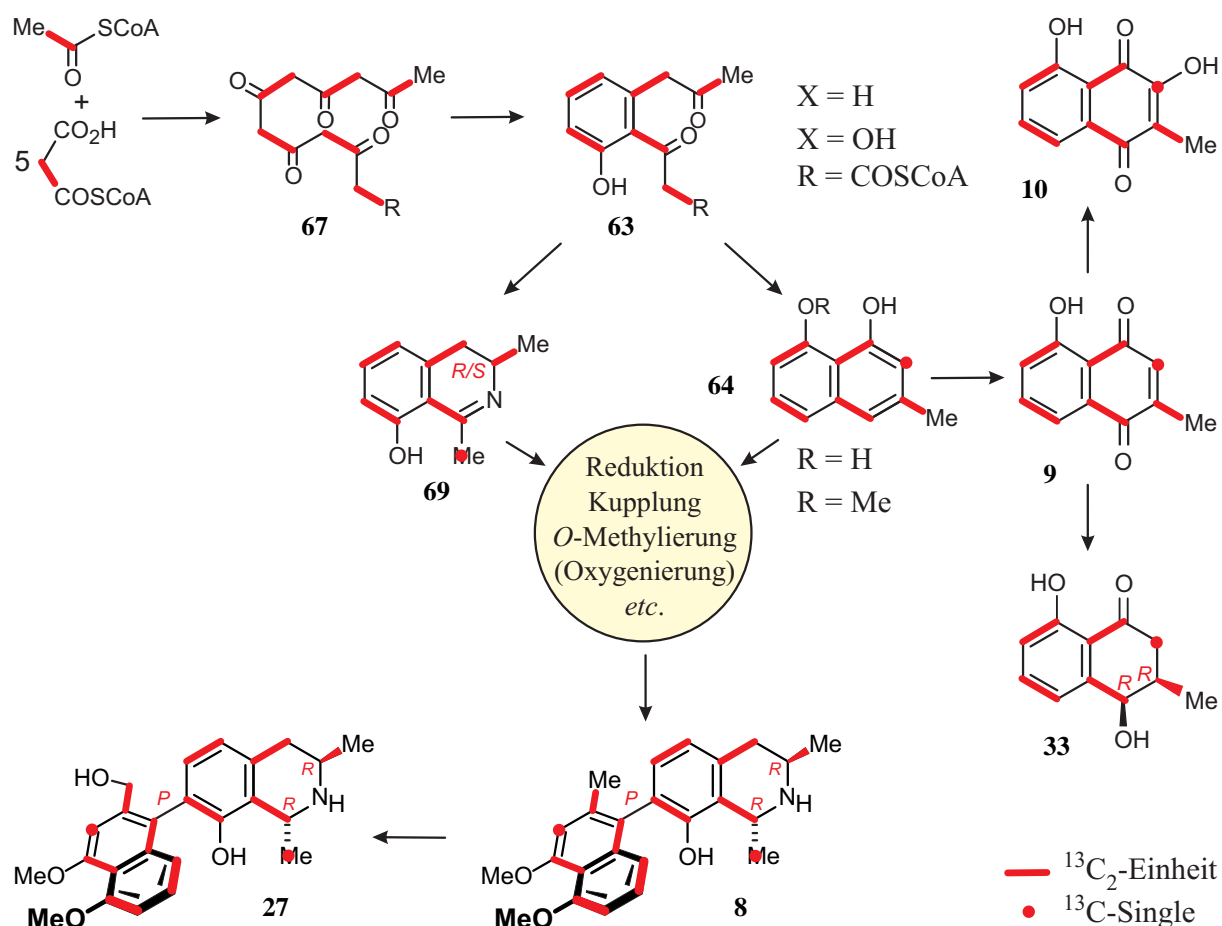
Schema 5. Gegenüberstellung der Biosynthese Thyrosin-abgeleiteter Isochinoline am Beispiel des Anhalonidins **68** (links) und die des Dioncophyllins A (**8**) als Vertreter der polyketidischen Naphthylisochinolin-Alkaloide (rechts).

Um der Polyketid-Hypothese nachzugehen, wurden bereits Untersuchungen mit ^{14}C -markiertem Acetat durchgeführt, das an *Ancistrocladus hamatus*-Pflanzen in unsteriler Form appliziert wurde. Tatsächlich konnte damals ein schwacher Einbau in Ancistrocladin nachgewiesen werden.^[220] Ein ähnliches Experiment mit ^{13}C -markiertem Acetat, das über die Wurzeln in steriler *A. heyneanus*-Pflanzen verabreicht wurde, scheiterte jedoch.^[221] Möglicherweise wurden große Teile des gefütterten Materials bereits durch im Pflanzsubstrat lebende Mikroorganismen vernichtet.

Da damals noch keine Sterilkulturen zur Verfügung standen, fanden weitere Experimente mit unsterilen *A. heyneanus*-Pflanzen statt, die genauso erfolglos verliefen.^[222,223] Ein deutlicher Schritt nach vorn war die keimfreie Anzucht von *Ancistrocladus*-Pflanzen, die auf Medium kultiviert wurden, das $^{13}\text{C}_2$ -markiertes Acetat enthielt.^[224] Zwar war auch dieses Mal kein signifikanter Einbau nachweisbar, allerdings kamen erstmals Sterilkulturen zum Einsatz. Der nächste Schritt, die Etablierung steriler Kalluskulturen von *A. heyneanus*,^[123] *A. abbreviatus*^[224] und *Triphyophyllum peltatum*^[21] sollte dann zum Erfolg führen. Die Kulturen der *Ancistrocladus*-Vertreter produzierten zwar in Kallusform kaum oder keine Naphthylisochinoline, nach Optimierung der *In-vitro*-Bedingungen wurde aber in den *T. peltatum*-Zellkulturen Dioncophyllin A (**8**) nachgewiesen. Damit stand nun ein System zur Untersuchungen der Biosynthese der Naphthylisochinolin-Alkaloide durch Fütterungsexperimente mit markierten Vorstufen zur Verfügung. Die Applikation von $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Acetat an diese Kalluskulturen führte zu einem deutlichen Einbau der C_2 -Einheiten in **8**. Dabei fanden sich die Markierungen nicht nur im Isochinolin-Teil, sondern auch in der Naphthalin-Hälfte. Demnach sind sogar beide Teilstrukturen der Naphthylisochinoline polyketidischen Ursprungs (Schema 6). Die C_2 -Einheiten waren nicht wahllos oder zufällig eingebaut worden, sondern entsprechend eines strikten Musters, bei dem u.a. der erste gebildete Ring zwei vollständige Acetat-Einheiten erhielt.^[18] Später wurde, nach Ausarbeitungen von R. Thomas zur Polyketid-Biosynthese bei Bakterien und Pilzen,^[225] dieses Einbaumuster als F-Faltungstyp klassifiziert. Das Acetat-Fütterungsexperiment an *T. peltatum* deckte also nicht nur einen alternativen Biosyntheseweg zu Isochinolinen auf, sondern erbrachte auch den ersten Nachweis des F-Faltungstyps bei der Polyketidbiosynthese in Pflanzen.

Die Hälften der Naphthylisochinolin-Alkaloide müssten dem Einbaumuster entsprechend identische Vorstufen besitzen. Sinnvollerweise wäre dies eine Diketo-Verbindung **63** polyketidischen Ursprungs. Ausgehend von einer bis **63** konvergenten Biosynthese divergiert der Weg an dieser Stelle: Erfolgt eine weitere Aldolkondensation entsteht ein Naphthalin **64**;

geschieht der zweite Ringschluss unter Stickstoff-Einbau, erhält man den Isochinolin-Teil **69**.^[124] Eine phenoloxidative Kupplung führt dann direkt zu einem „Ur-Naphthylisochinolin“, das anschließend weitere Reaktionen (vor allem *O*-Methylierungen) durchläuft, um Strukturen wie Dioncophyllin A (**8**) zu ergeben. Auch der Kupplungs-Schritt scheint hoch koordiniert und damit Enzym-katalysiert abzulaufen.^[226] Dafür spricht, dass in vielen Arten der Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae nur ganz bestimmte Kupplungstypen gefunden werden und die Kupplung oft atrop-stereoselektiv erfolgt. Würde die Kupplung unkontrolliert ablaufen, wäre zu erwarten, dass alle Kupplungsvarianten rein zufällig auftreten bzw. nur solche gefunden werden, die aus chemischer Sicht besonders favorisiert sind. Vor allem müssten monomere Naphthaline und Isochinoline in größeren Mengen zu finden sein und häufig auch als Homodimere auftreten.



Schema 6. Theoretischer Verlauf der polyketidischen Biosynthese der Naphthylisochinolin-Alkaloide und Naphthochinone/Tetralone in *T. peltatum*.

Abgesehen von der bewiesenen polyketidischen Herkunft der Naphthylisochinolin-Alkaloide war der Verlauf der Biosynthese (alle Intermediate zwischen Acetat und **8**) zu Beginn dieser Arbeit hypothetisch.

6.2 Fütterungsexperimente mit $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Dihydroisochinolin [$^{13}\text{C}_2$]-**69**

Wie bereits beschrieben, könnte ein hypothetischer Diketo-Präkursor **63** unter Stickstoff-Einbau den Isochinolin-Teil der Naphthylisochinolin-Alkaloide ergeben könnte. Während der reduktiven Aminierung wird unter Mitwirkung einer Transaminase auch das Stereozentrum an C-3 aufgebaut, so dass letztlich das Dihydroisochinolin **69** als erstes Stickstoff-haltiges Intermediat auftreten sollte. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde von S. Rüdener in Zusammenarbeit mit J. Mutanyatta-Comar **69** in $^{13}\text{C}_2$ -markierter Form synthetisiert.^[227] Wenn dieser Präkursor tatsächlich aufgenommen und in Naphthylisochinoline eingebaut würde, sollte dies im ^{13}C -NMR-Spektrum durch charakteristische Dubletts für C-1 und 1- CH_3 deutlich werden. Diese Kopplung ließe sich zudem durch ein INADEQUATE-NMR-Spektrum gut messen.

Das synthetisch gewonnene $^{13}\text{C}_2$ -markierte Dihydroisochinolin [$^{13}\text{C}_2$]-**69** wurde für die Durchführung der Fütterungsexperimente in einem Wasser/Ethanol-Gemisch (15:2) aufgenommen. In diesem Lösungsmittelgemisch war die Löslichkeit ausreichend gut, um eine Konzentration von 1 mg mL^{-1} zu gewährleisten, ohne dass der Ethanol-Anteil die Zellkulturen beeinträchtigte. Die steril-filtrierte Lösung (Whatman[®] Rotrand $0.2\ \mu\text{m}$) gab man direkt auf die Zellkulturen von *T. peltatum*. Zum Einsatz kamen zwölf Kulturen, die zwei Tage zuvor auf frisches Medium umgesetzt worden waren. Durch die große Anzahl an Kulturen war sichergestellt, dass anschließend ausreichende Mengen der Sekundärmetabolite isolierbar sein würden. Kultiviert wurde nach der Fütterung unter den auch zuvor eingesetzten Bedingungen bei $24\ \text{°C}$, $51\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 14:10 Stunden. Zwei weitere Applikationen erfolgten in gleicher Weise, je im Abstand von drei Wochen. Nach insgesamt neun Wochen Inkubation brach man das Experiment ab und begann mit der Untersuchung der Inhaltsstoffe. Dazu wurden die Kalli vom Kulturmedium abgesammelt, lyophilisiert und mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) extrahiert. Die Analyse des Rohextraktes und die Isolierung der Sekundärmetabolite erfolgten mittels HPLC.

Die polarste Komponente ergab eine Fraktion, die neben dem eingesetzten Präkursor ein weiteres Isochinolin enthält. Zu deren Trennung war ein zusätzlicher Chromatographie-Schritt nötig, woraufhin das als Präkursor verwendete [$^{13}\text{C}_2$]-Dihydroisochinolin [$^{13}\text{C}_2$]-**69** und

das [$^{13}\text{C}_2$]-*trans*-Tetrahydroisochinolin [$^{13}\text{C}_2$]-**70** in Reinform erhalten wurden (Abbildung 54). Weiterhin wurden drei Naphthylisochinoline isoliert: Habropetalin A (**27**) und Dioncophyllin A (**8**), letzteres eluierte gemeinsam mit 5'-*O*-Demethyldioncophyllin A und wurde ebenfalls erst durch erneute HPLC-Chromatographie als Reinsubstanz erhalten.

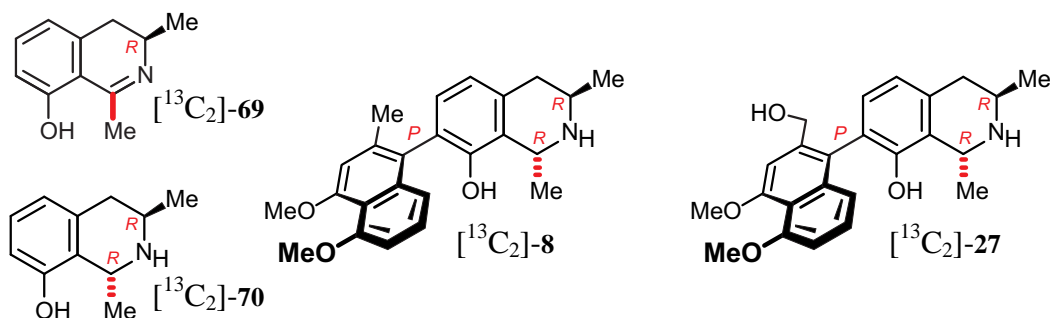
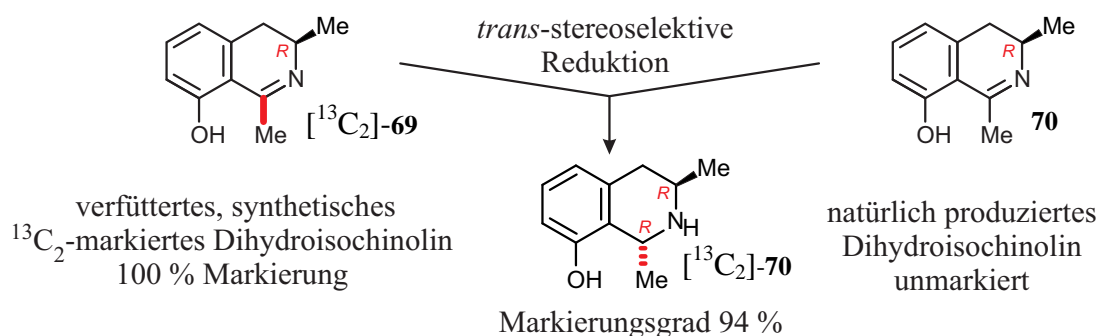


Abbildung 54: Die relevanten, nach dem Fütterungsexperiment aus *T.-peltatum*-Zellkulturen isolierte Verbindungen: Dihydroisochinolin [$^{13}\text{C}_2$]-**69**, *trans*-Tetrahydroisochinolin [$^{13}\text{C}_2$]-**70**, [$^{13}\text{C}_2$]-Dioncophyllin A ([$^{13}\text{C}_2$]-**8**) und [$^{13}\text{C}_2$]-Habropetalin A ([$^{13}\text{C}_2$]-**27**).

Die Identifizierung erfolgte durch 1D- und 2D-NMR-Experimente, UV, HRESIMS sowie IR, Schmelzpunkt und Drehwert. Die erhaltenen Werte stimmten mit denen in der Literatur überein.

Der Markierungsgrad wurde jeweils anhand der ^{13}C -NMR-Spektren bestimmt. Dabei zeigte sich, dass das isolierte Dihydroisochinolin [$^{13}\text{C}_2$]-**69** einen Markierungsgrad von über 98,5 % aufwies also im Rahmen der Messbarkeit als vollständig markiert angesehen werden musste. Damit handelte es sich um den eingesetzten Präkursor. Als weitaus spannender stellte sich die Analyse des [$^{13}\text{C}_2$]-**70** dar, das unter normalen Bedingungen in Zellkulturen nicht nachweisbar war. Die Einbaurate betrug hier 94 % (Schema 7). Der hohe Markierungsgrad ließ zunächst ablesen, dass das eingesetzte [$^{13}\text{C}_2$]-**69** Zugang zu reduktiven Enzymen der Zelle gefunden hatte. Bei einer enzymatisch unkontrollierten Reduktion hätte vor allem die *cis*-Form des Tetrahydroisochinolins entstehen müssen. Stattdessen erfolgte die *trans*-selektive Reduktion, die auch im Labor nur schwierig und unter speziellen Reaktionsbedingungen durchführbar war.^[228] Der hohe aber nicht vollständige Markierungsgrad von 94 % verriet zudem, dass das Tetrahydroisochinolin [$^{13}\text{C}_2$]-**70** kein artifizielles Produkt war sondern von den Pflanzenzellen selbst, also als authentisches Naturprodukt, gebildet wurde. Die Reduktion erfolgte also nicht, um das zugeführte [$^{13}\text{C}_2$]-**69** zu „entgiften“ oder weil es anderen zu reduzierenden Verbindungen zu ähnlich war.



Schema 7. Die Verdünnung des Markierungsgrades des isolierten $^{13}\text{C}_2$ -**70** durch die Mischung des reduzierten gefütterten Präkursors $^{13}\text{C}_2$ -**69** und des natürlich entstandenen **70**.

Offen war bislang noch die eigentliche Frage, ob ein Dihydroisochinolin mit der Struktur **69** Teil des Biosynthese-Weges der Naphthylisochinolin-Alkaloide war. Zur Klärung wurden die Metabolite $^{13}\text{C}_2$ -Habropetalin A ($^{13}\text{C}_2$ -**27**) und $^{13}\text{C}_2$ -Dioncophyllin A ($^{13}\text{C}_2$ -**8**) untersucht. Im Falle des $^{13}\text{C}_2$ -**27** wurde mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie ein eindeutiger Einbau der doppelt markierten Acetat-Einheit an der zu erwartenden Position nachgewiesen. Die durch die eingeführte ^{13}C -Markierung hervorgerufene Aufspaltung der Kohlenstoff-Signale von C-1 (Zentralsignal 50.0 ppm) und 1-Me (Zentralsignal 18.1 ppm) wies den intakten Einbau eindeutig nach. Die Dubletts überragten das Zentralsignal des natürlichen ^{13}C deutlich und die Integration führte zur Bestimmung einer Einbaurrate von mindestens 4 %. Allerdings führte die NMR-Untersuchung, durchgeführt in CDCl_3 , zur Zersetzung der Probe, so dass kein 2D-INADEQUATE-Spektrum von $^{13}\text{C}_2$ -**27** aufgenommen werden konnte. Auch Dioncophyllin A ($^{13}\text{C}_2$ -**8**) wurde NMR-spektroskopisch untersucht, obwohl dieses mit dem 5'-*O*-Demethyldioncophyllin A (ca. 10 %) verunreinigt war. Im ^{13}C -NMR (beider Verbindungen) ließ sich eine Minimum-Einbaurrate von 4 % bestimmen. Das 2D-INADEQUATE-Spektrum belegte deutlich, dass es sich tatsächlich um die von S. Rüdener synthetisch in das Dihydroisochinolin $^{13}\text{C}_2$ -**69** eingeführte $^{13}\text{C}_2$ -Einheit handelte (Abbildung 55). Eine anschließende chromatographische Aufreinigung des $^{13}\text{C}_2$ -**8** per HPLC und darauffolgende ^{13}C - und 2D-INADEQUATE-Experimente führten zu dem gleichen Ergebnis. Allerdings war die erhaltene Menge an aufgereinigtem 5'-*O*-Demethyldioncophyllin A für eine Charakterisierung zu gering.

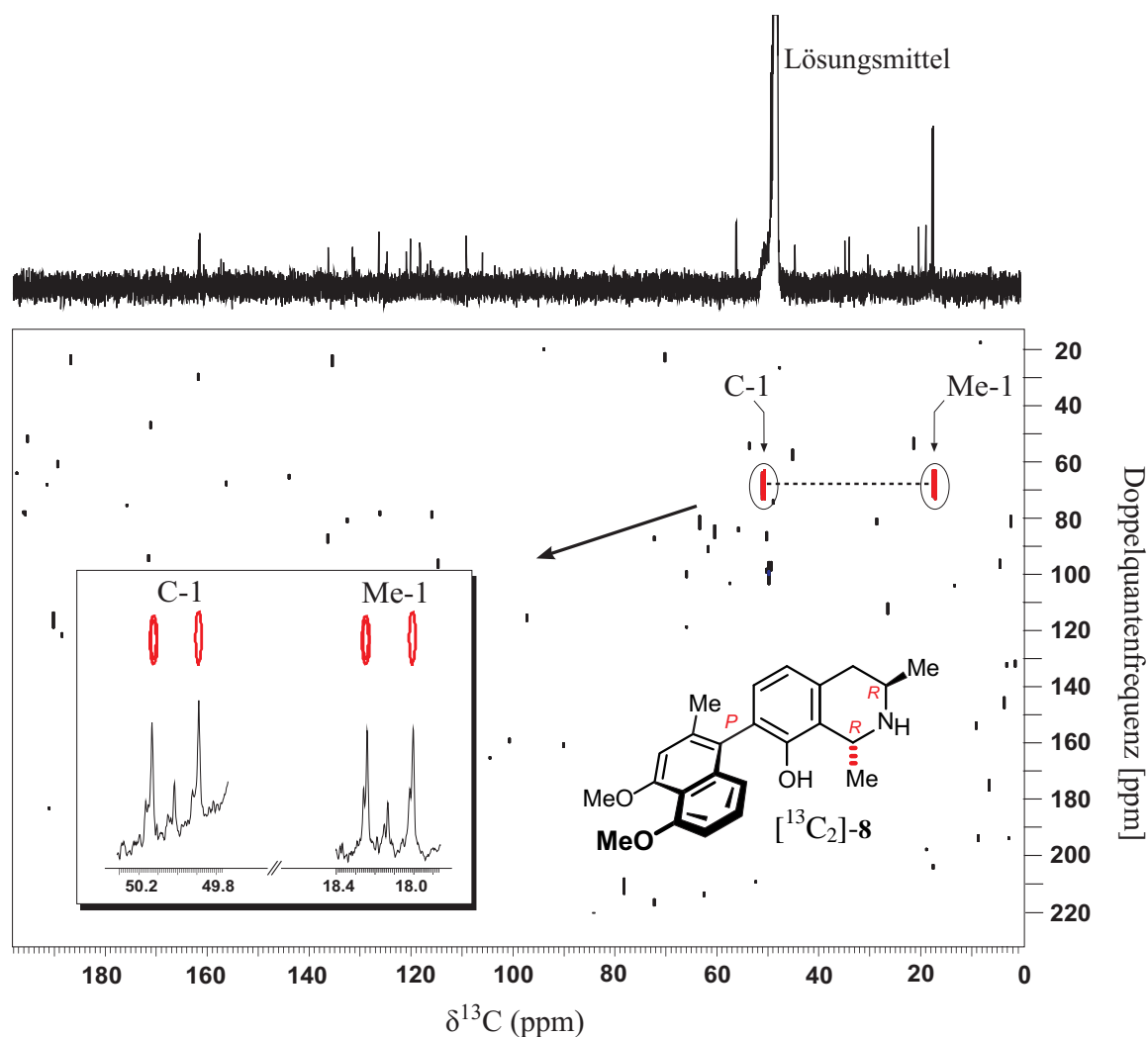


Abbildung 55. 2D-INADEQUATE-Spektrum von $[^{13}\text{C}_2]$ -Dioncophyllin A ($[^{13}\text{C}_2]$ -**8**), isoliert aus *T. peltatum*-Zellkulturen nach der Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ -**69**. Im Fenster links unten sind die durch die inkorporierten $^{13}\text{C}_2$ -Einheiten entstandenen Dubletts von C-1 und 1-Me dargestellt.

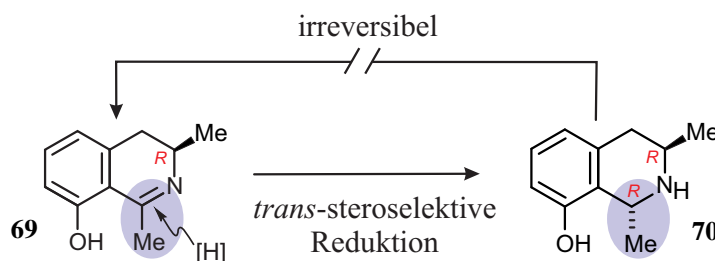
Damit durfte davon ausgegangen werden, dass **69** Bestandteil des Biosynthese-Weges der Naphthylisochinolin-Alkaloide war. Die Ergebnisse dieses Experimentes hatten einen Präkursor identifiziert, warfen aber zugleich die Frage auf, ob das ebenfalls hochgradig markiert isolierte $[^{13}\text{C}_2]$ -*trans*-Tetrahydroisochinolin $[^{13}\text{C}_2]$ -**70** ein weiteres Intermediat der Biosynthese darstellte.

6.3 Verfütterung des $^{13}\text{C}_2$ -markierten *trans*-Tetrahydroisochinolins $[^{13}\text{C}_2]$ -**70**

In *Triphyphyllum peltatum* wurde bislang nur ein Dihydroisochinolin-haltiges Naphthylisochinolin-Alkaloid, das 5'-*O*-Demethyl-8-*O*-1,2-didehydro-7-*epi*-dioncophyllin A

gefunden.^[107] Bei der Mehrzahl der isolierten Naphthylisochinolin-Alkaloide handelte es sich um solche mit einem *trans*-konfigurierten Tetrahydroisochinolin-Rest. Fraglich ist allerdings, ob die phenoxidative Kupplung bereits mit dem Dihydro- oder erst auf der Stufe des Tetrahydroisochinolins erfolgt. Das bisher durchgeführte Experiment konnte darüber keine Auskunft geben. Um also dieser Frage nachzugehen, wurde von S. Rüdener^[130] auch das *trans*-Tetrahydroisochinolin [¹³C₂]-**70** in doppelt ¹³C-markierter Form synthetisiert. Dabei entsprach die Position der ¹³C₂-Einheit der im zuvor verwendeten Dihydroisochinolin [¹³C₂]-**69**, also der Markierung an C-1 und 1-Me. Die Fütterungsbedingungen waren mit denen im vorhergehenden Experiment identisch.

Die polarste Komponente war erneut der Präkursor ([¹³C₂]-**70**). Die Analyse des Markierungsgrades (93 %) machte auch hier deutlich, dass eine Verdünnung der ¹³C₂-Markierung durch natürlich produziertes *trans*-Tetrahydroisochinolin **70** stattgefunden hatte. Dies lieferte erneut einen Hinweis darauf, dass **70** eine natürliche Substanz ist, die nicht als Artefakt, hervorgerufen durch die Fütterungsexperimente, entstanden war. Das in großen Mengen von außen zugeführte [¹³C₂]-**70** verdrängte das normalerweise in den Zellkulturen unter der Nachweisgrenze vorhandene unmarkierte **70**, so dass dieses in den künstlich geschaffenen Pool gelangte, der zu groß war um sofort von der Pflanze verbraucht zu werden. Ein Dihydroisochinolin (z.B. **69**) konnte bei diesem Experiment nicht gefunden werden. Die Reduktion des Dihydroisochinolins scheint somit irreversibel zu erfolgen (Schema 8), wie es nach literaturbekannten Versuchen zur schwierigen Re-Oxidation von *trans*-Tetrahydroisochinolinen zu erwarten war.^[229] Dennoch musste es im Verlauf der Biosynthese ein Dihydroisochinolin **69** geben, wie die Fütterungsversuche dazu bewiesen hatten, auch wenn die normale, physiologische Konzentration in den Zellen so gering ist, dass ein Nachweis oder gar eine Isolierung bislang nicht möglich war.



Schema 8: Die irreversible *trans*-selektive Reduktion an C-1, die von **69** zu **70** führt, dem möglichen Substrat der phenoxidativen Kupplung.

Wie auch schon bei dem Fütterungsexperiment zuvor wurde die Einbaurrate (und das Einbaumuster) von $[^{13}\text{C}_2]$ -**70** in die isolierten Naphthylisochinoline $[^{13}\text{C}_2]$ -**8**, $[^{13}\text{C}_2]$ -**27** aber auch in das $[^{13}\text{C}_2]$ -5'-*O*-Methyldioncophyllin D ($[^{13}\text{C}_2]$ -**42**) untersucht. In allen Fällen gab es eine deutliche Einbaurrate von ca. 8 %. Die durch die $^{13}\text{C}_2$ -Markierung an C-1 und 1-Me hervorgerufen Wechselwirkungen wurden auch dieses Mal anhand eines 2D-INADEQUATE-Spektrums demonstriert, das von $[^{13}\text{C}_2]$ -Habropetalin A ($[^{13}\text{C}_2]$ -**27**), aber auch von $[^{13}\text{C}_2]$ -**42** aufgenommen wurde (Abbildung 56).^[230]

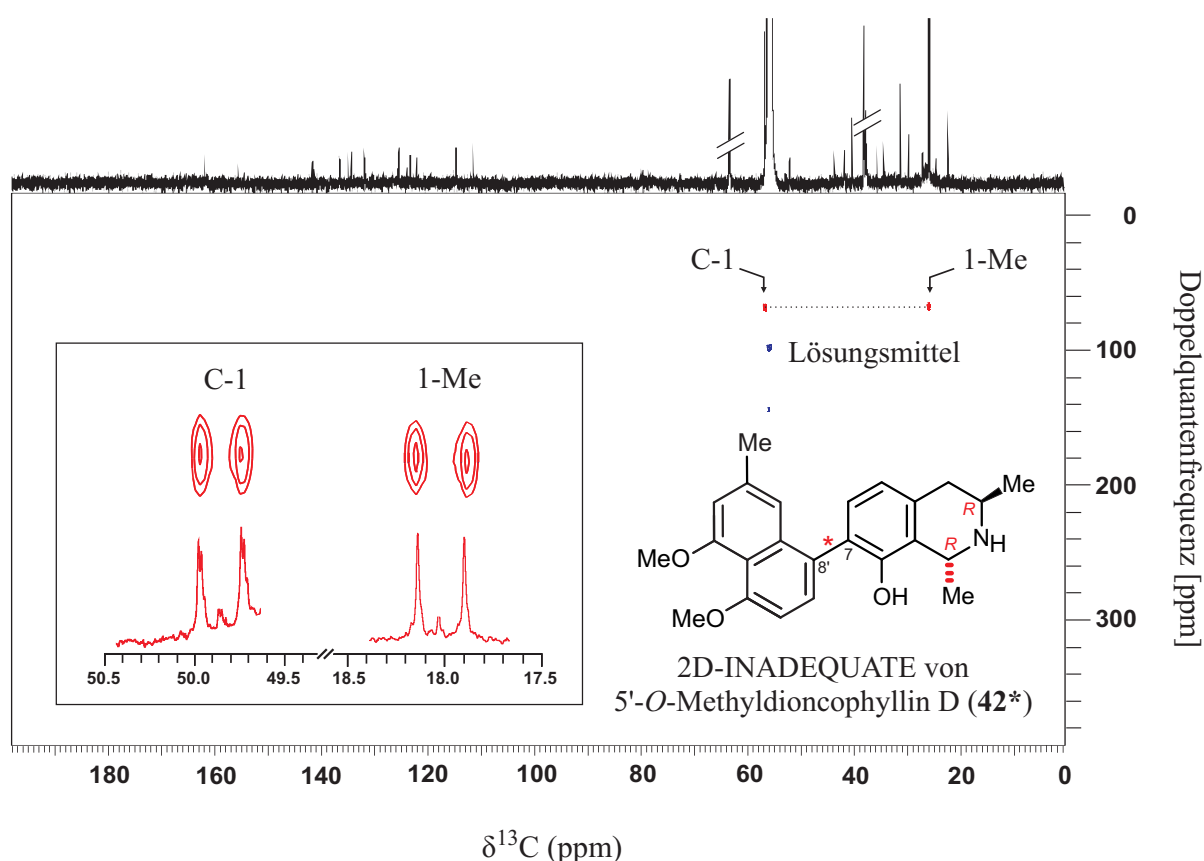
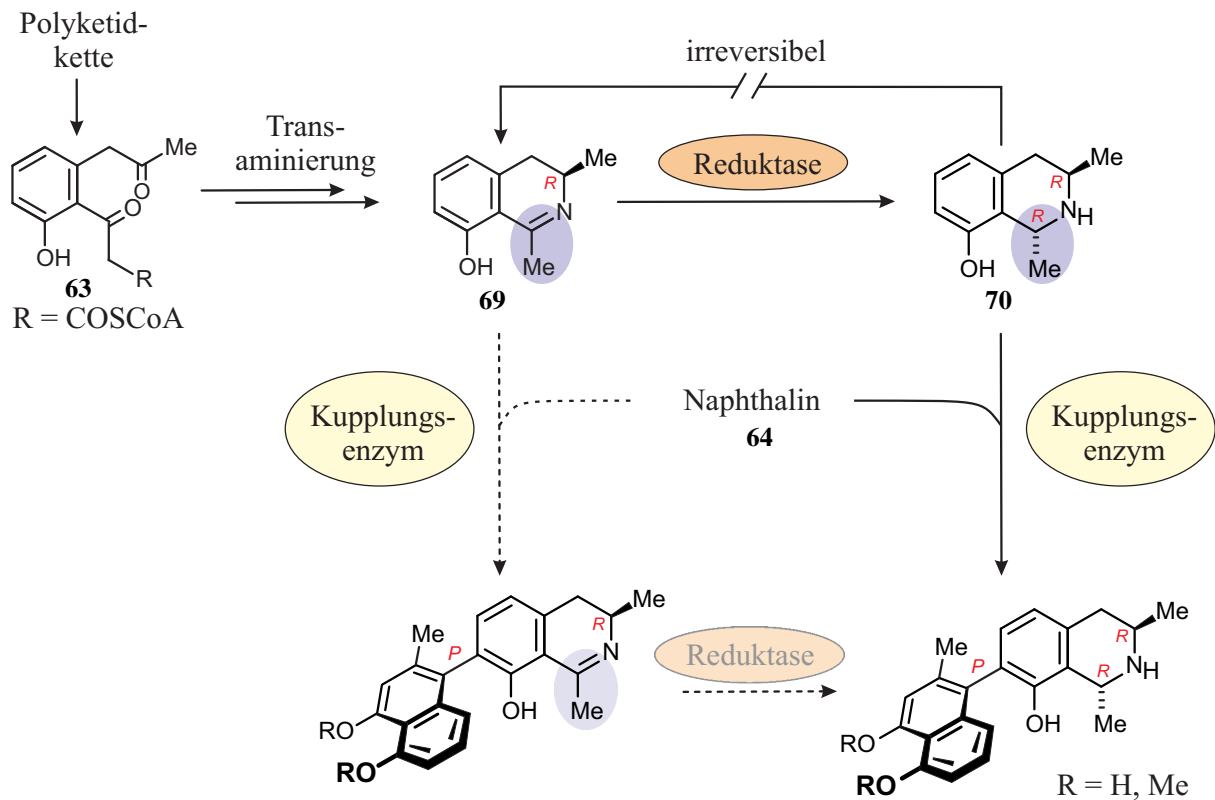


Abbildung 56: Deutlicher Einbaunachweis des 1,1'- $[^{13}\text{C}_2]$ -*trans*-Tetrahydroisochinolins $[^{13}\text{C}_2]$ -**70** durch die Aufnahme eines 2D-INADEQUATE-NMR-Spektrums von $[^{13}\text{C}_2]$ -5'-*O*-Methyldioncophyllin D ($[^{13}\text{C}_2]$ -**42**). Links unten wurde die durch die Markierung hervorgerufene Aufspaltung der Signale für C-1 und 1-Me vergrößert dargestellt.

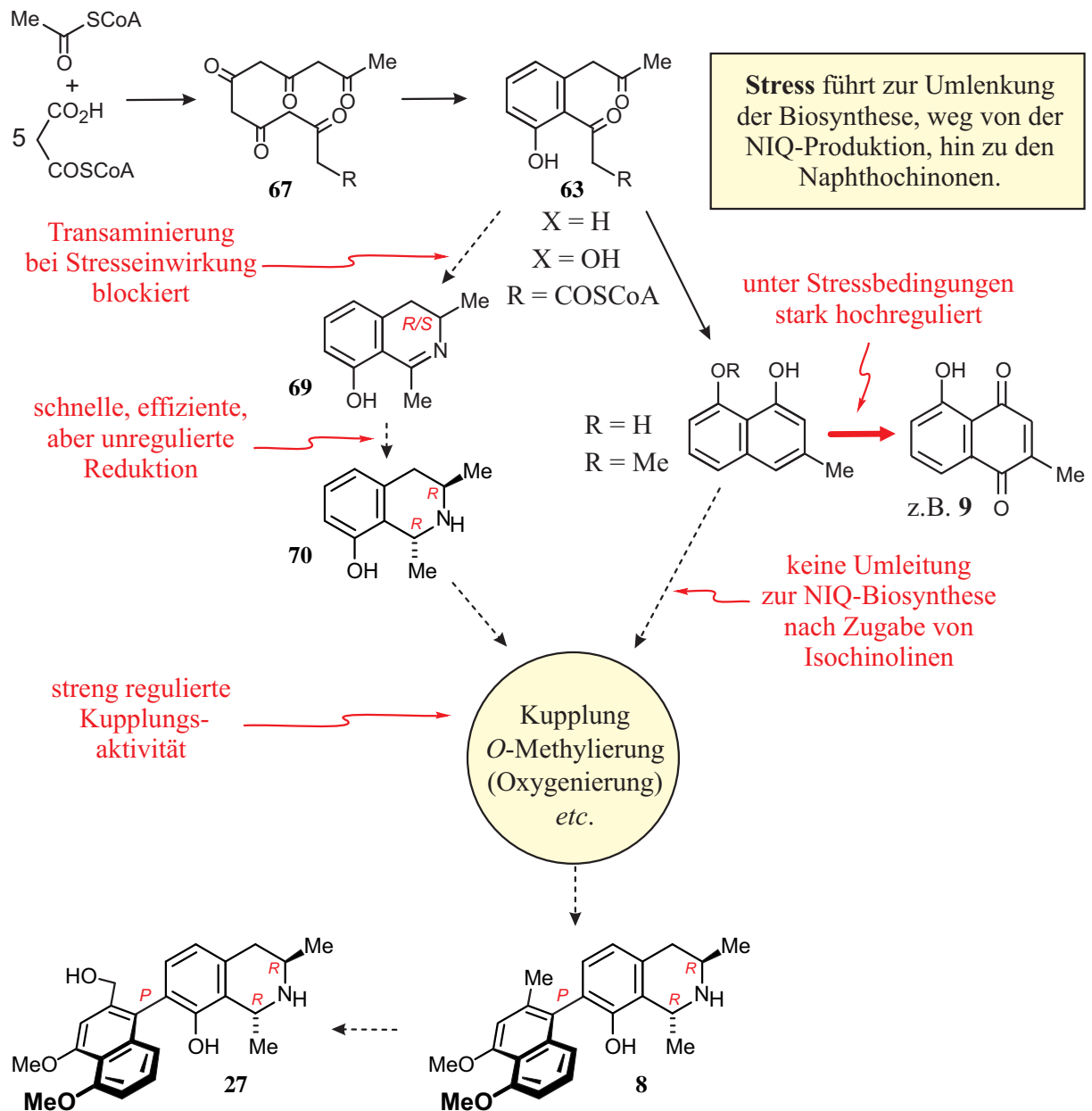
Bei allen isolierten Naphthylisochinolin-Alkaloiden war also eine Inkorporation mit der (im Vergleich zur Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ -**69**) weitaus höheren Einbaurrate von 8% nachweisbar. Insgesamt ließ sich schlussfolgern, dass im Normalfall erst auf der Stufe des reduzierten Isochinolins gekuppelt wird, das Kupplungsenzym also sehr spezifisch das reduzierte **70** als Substrat akzeptiert (Schema 9). Die Isolierung des 5'-*O*-Demethyl-8-*O*-methyl-1,2-didehydro-7-*epi*-dioncophyllins A aus *T. peltatum* durch M. Rübenacker^[107] gab aber Grund zu der

Annahme, dass in geringem Umfang auch ein Dihydroisochinolin als Kupplungssubstrat akzeptiert werden kann.



Schema 9. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Fütterungsexperimente. Durch Transaminierung des Diketons **63** entstand **69**, das sofort selektiv zum *trans*-Tetrahydroisochinolin **70** reduziert wurde und erst anschließend erfolgte die phenoxidative Kupplung.

Die Produktion von **69** war ein langsam ablaufender Prozess. Die Umsetzung zu **70** in den Zellen erfolgte aber offenbar sehr effizient und zu schnell, um einen natürlichen Pool von **69** aufzubauen. Dies würde die Annahme stützen, dass die Einführung des Stickstoffs im Verlaufe der Biosynthese ein schwieriger Schritt war (Schema 10), der nur langsam oder hochgradig reguliert durchgeführt wurde. Nahezu unreguliert folgte anschließend die Reduktion, was zur Poolbildung des [$^{13}\text{C}_2$]-*trans*-Tetrahydroisochinolins [$^{13}\text{C}_2$]-**70** führte.



Schema 10. Veränderungen im Verlauf der Biosynthese bei *T. peltatum* unter Stresseinwirkung. Die Naphthylisochinolin-Biosynthese wird vermutlich an mehreren Stellen (Transaminierung, Naphthalin-Verfügbarkeit und evtl. Kupplungsleistung) zugunsten der Naphthochinon-Produktion blockiert.

Die Verfütterung unphysiologisch hoher Mengen des [¹³C₂]-Dihydroisochinolins [¹³C₂]-**69** zeigte, dass es in viel größerem Umfang stereoselektiv zum [¹³C₂]-*trans*-Tetrahydroisochinolin [¹³C₂]-**70** reduziert werden konnte, als es in den Zellen normaler Weise nötig gewesen wäre. Beigetragen hatte dazu offenbar auch eine ebenfalls langsam und wahrscheinlich stark reguliert ablaufende phenoloxidative Kupplung. Für eine strenge Regulierung auch dieses Schritts sprach, dass eine verstärkte Produktion von

Naphthylisochinolin-Alkaloiden nach Zuführung eines überreichen Isochinolin-Angebotes durch die Fütterung von **69** und **70** nicht beobachtet wurde. Die im Übermaß vorhandenen Isochinolin-Bausteine wurden nicht zusätzlich, sondern stattdessen von den Pflanzenzellen verwendet. Genügend große Mengen von Naphthalin-Vorstufen waren endogen vorhanden, wurden aber zu den verschiedenen Naphthochinonen umgesetzt. Die Tansaminierung war bei der Umschaltung unter Stressbedingungen von der Naphthylisochinolin-Produktion hin zur Naphthochinon-Biosynthese nicht der einzige limitierende Schritt. Hier wurde sicher "absichtlich" die Biosynthese der einen Substanzklasse zugunsten einer anderen herunter reguliert.

Es kann davon ausgegangen werden, dass es in Stresssituationen zur Umgestaltung des gesamten Biosynthese-Weges kommt, und damit scheint es, als ob die Pflanze unter Stress überhaupt "kein Interesse" hat in die Produktion der Naphthylisochinolin-Alkaloide als Abwehrsubstanzen zu investieren. Sie dienen damit möglicher Weise „nur“ als „Prophylaxe“ gegen äußere Angriffe durch Fraßfeinde oder Phytopathogene. Im Ernstfall wird auf das altbewährte Waffenarsenal der Naphthochinone zurückgegriffen. Der Stickstoff kann somit an anderer Stelle sinnvoll eingesetzt werden.

7 Populationsgenetische Untersuchungen an *Ancistrocladus*-Individuen aus der DR Kongo

7.1 Kenntnisstand

Die den Dioncophyllaceae am nächsten verwandte Familie ist die der Ancistrocladaceae (Hakenastgewächse). *Ancistrocladus* ist die einzige Gattung der Familie der Ancistrocladaceae. Die Angaben über die Anzahl der Arten schwanken von Quelle zu Quelle zwischen 17 und 20.^[231,232] H. Rischer hat 2002 in seiner Dissertationsschrift alle bis dahin beschriebenen *Ancistrocladus*-Arten aufgelistet und kam sogar auf die stattliche Zahl von 30 Arten.^[23] Für den afrikanischen Raum waren damals 13 Arten (*A. abbreviatus*, *A. barteri*, *A. congolensis*, *A. ealaensis*, *A. grandiflorus*, *A. guineensis*, *A. korupensis*, *A. letestui*, *A. likoko*, *A. pachyrrhachis*, *A. robersonianorum*, *A. tanzaniensis* und *A. uncinatus*) beschrieben und sogar 17 für die Tropen Asiens. Ein 2005 veröffentlichter Bestimmungsschlüssel führte dann nach gründlicher Revision insgesamt nur noch 16 Arten (11 in Afrika und 6 in Asien). Heute darf man für jeden Kontinent eine weitere Art hinzufügen, die in Kooperation unseres Arbeitskreises mit der Arbeitsgruppe um Prof. Heubl (LMU München) kürzlich neu entdeckt

wurden (*A. ileboensis* in Afrika und *A. benomensis* in Asien).^[233,234] Augenfälligstes Merkmal der Ancistrocladaceae sind uhrfederartig gekrümmte Haken (Abbildung 57), denen diese Gattung ihren Namen zu verdanken hat (griech. Ankistron = Haken, Klados = Ast). *Ancistrocladus* weist ein sympodiales Wachstum auf und die Haken bilden jeweils den Abschluss eines Sprosses. Das Wachstum wird anschließend aus einer Seitenknospe heraus fortgesetzt.



Abbildung 57. Hakenäste von *A. abbreviatus* im Gewächshaus des Botanischen Gartens der Universität Würzburg.

Die verholzenden Lianen zählen zu den Spreizklimmern, das heißt sie bilden nahezu waagerechte Seitentriebe, die sich in das Geäst von Sträuchern und Bäumen legen und dafür sorgen, dass der Hauptspross nach oben emporwachsen kann. Durch die Haken bleiben diese Seitentriebe in den Zweigen der sie tragenden Pflanzen hängen und dienen so als Kletterhilfe.

Wie bei fast allen Pflanzen sind die Blüten und Früchte meist das sicherste Bestimmungsmerkmal (Abbildung 58). Da *Ancistrocladus* aber nach wie vor eine schlecht untersuchte Gattung ist, fehlen ausreichend gute Beschreibungen in vielen Fällen.

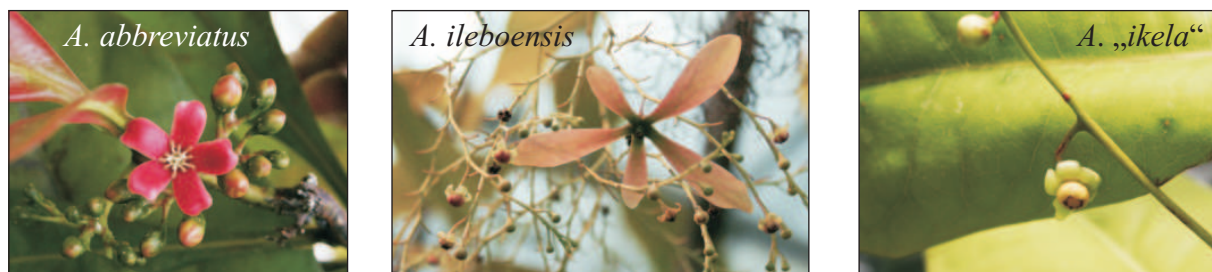


Abbildung 58. Infloreszenzen verschiedener afrikanischer *Ancistrocladus*-Arten: a) von *A. abbreviatus* mit vergleichsweise großen Blüten, b) von *A. ileboensis* mit Blüten und unreifer Frucht sowie c) von *A. „ikela“*, einer ungenügend bestimmten kongolesischen Art.

Die Unterscheidung der einzelnen Arten ist relativ schwierig. Die Blätter sind wie bei fast allen Pflanzen ein unsicheres Bestimmungsmerkmal, da sich Form und Größe, abhängig vom Entwicklungsstand, stark unterscheiden können. Für eine grobe Einteilung sind sie aber dennoch heranziehbar (Abbildung 59).

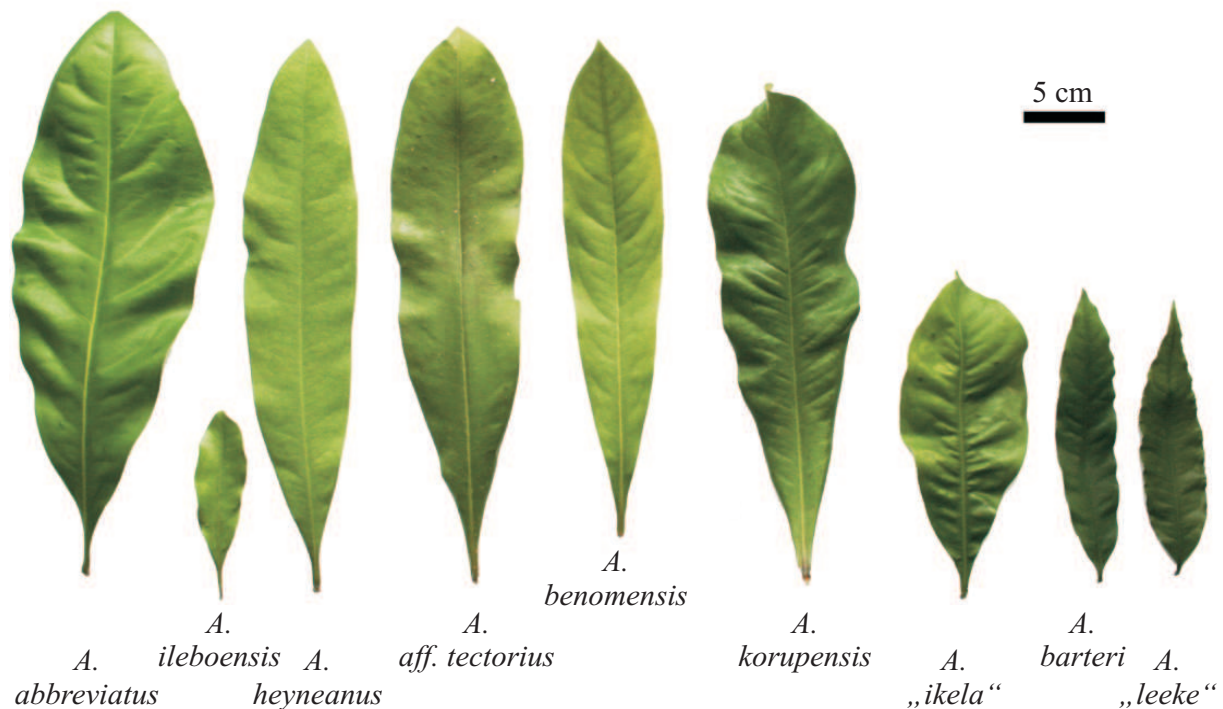


Abbildung 59. Die unterschiedlichen Blattformen der *Ancistrocladus*-Arten, die im Botanischen Garten der Universität Würzburg kultiviert werden. Da die Größe und Form sehr abhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanze sind, können sicher Hinweise auf die Art gewonnen werden, aber zur genauen Bestimmung sind sie nicht dienlich (Artnamen in " " sind Arbeitsnamen für ungenügend bestimmte Pflanzen).

Selbst Typus-Belege, die auch heute noch Grundlage der aktuellen *Ancistrocladus*-Taxonomie sind, bestehen nicht selten aus sterilen Pflanzenteilen (Abbildung 60). Es muss wohl davon ausgegangen werden, dass die Beschreibungen bisheriger Arten nicht immer zuverlässig sind und so gibt es noch reichlich Potential, neue Arten zu entdecken.

Noch schlechter untersucht als die Taxonomie ist der Ursprung der Gattung, über Wanderungen und Artenentwicklung ist sehr wenig bekannt. Dieser Umstand sollte nun in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Heubl durch Materialsammlungen in der DR Kongo im Rahmen eines DFG-geförderten Projektes (Molekulare Phylogenie und Chemotaxonomie der Familie der *Ancistrocladaceae*) geändert werden.

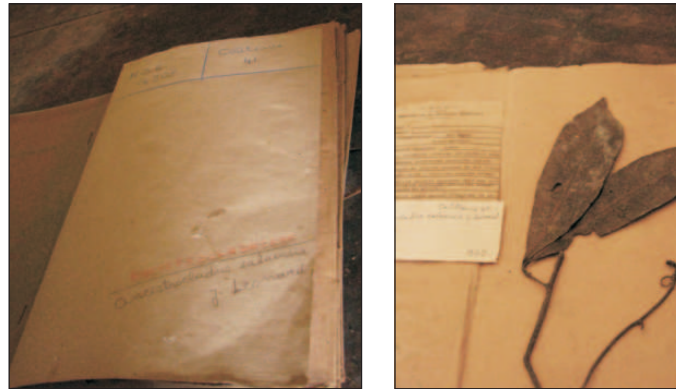


Abbildung 60. Herbarbeleg von *A. ealaensis*, angelegt von J. Léonard, aufbewahrt im Herbarium des Botanischen Gartens Eala (DR Kongo). Ob es sich um den Typus-Beleg handelt, war nicht zu ermitteln, es darf aber angenommen werden. Blüten fehlten auch bei diesem Beleg.

7.2 Sammlung von Pflanzenmaterial in der DR Kongo

Die bisherigen Sammlungen erfolgten meist an weit voneinander entfernten Standorten mit nur ein oder zwei Individuen, vor allem in der DR Kongo.^[235] Im August/September 2008 bot sich die Möglichkeit, gemeinsam mit Claudia Steinert aus unserem Arbeitskreis, in Zusammenarbeit mit der Universität Kinshasa Aufsammlungen in einem kleinen Gebiet der Tropen nord-östlich von Kinshasa in der DR Kongo vorzunehmen. Sammelgebiet war die Region um die Stadt Mbandaka (Hauptstadt der Provinz Equateur, Abbildung 61).

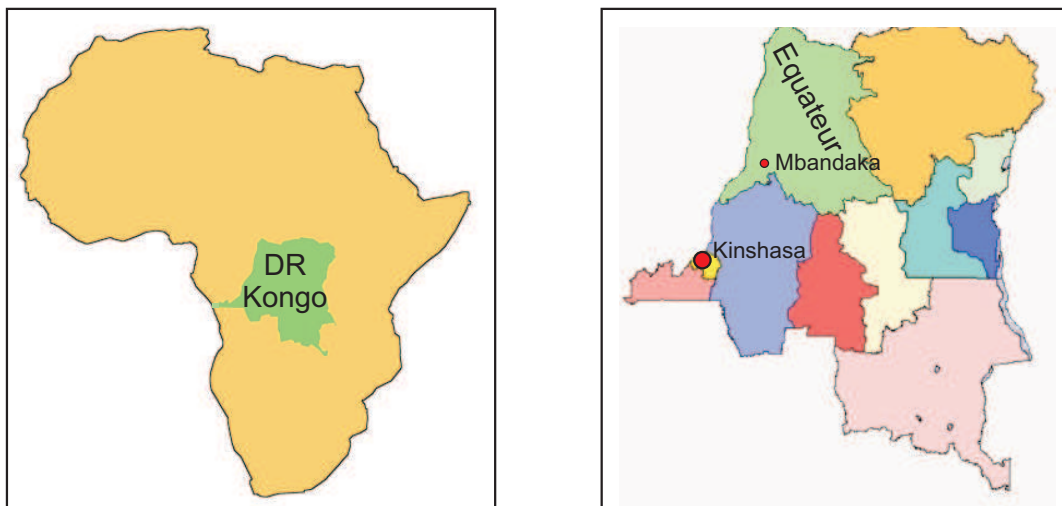


Abbildung 61. Die Demokratischen Republik Kongo im Herzen Afrikas (links) und die Unterteilung des Landes in Provinzen (rechts). Sammelungsgebiet war ein Areal um Mbandaka, der Hauptstadt der Provinz Equateur im Nord-Osten der DR Kongo.

Ziel war es auf kleinem Raum so viele Individuen wie möglich zu beproben. Neben neuem Material für phytochemische Untersuchungen in unserem Arbeitskreis wurden von allen gefundenen *Ancistrocladus*-Pflanzen Blattproben für populationsgenetische Untersuchungen gesammelt. Diese Proben wurden aus Gründen der Konservierung sofort in Trockenmittel (Silicagel Orange – Fa. Roth) verpackt. Für jedes gefundene Individuum wurden Standortdaten (GPS und Beschaffenheit – s. Anhang) erhoben um später ein umfassendes Bild abgeben zu können.

Die Bestimmung der einzelnen Arten vor Ort war trotz Bestimmungsschlüssel^[231] nicht möglich. Zwar hatten einige Exemplare Blüten und/oder junge Früchte, diese waren aber mit Hilfe die Literatur nicht zuzuordnen. Da ohnehin viele Pflanzen keine Blüten/Früchte hatten (Jungpflanzen) oder diese nicht erreichbar waren, wurden alle Proben als *Ancistrocladus spec.* aufgenommen und mit einer fortlaufenden Nummer registriert. Im Folgenden sollen die Sammlungsorte kurz beschrieben werden.

7.2.1 Sammlungsgebiet Bamanya, Provinz Equateur, DR Kongo, Afrika

Das Sammlungsgebiet um das Dorf und den Konvent Bamanya wurde am 27. August 2008 besammelt. Das Areal lag ca. 310 m über dem Meeresspiegel und erstreckte sich von 00° 00' N bis 00°02' N und 018° 14' bis 018° 19' E. Es war vorwiegend ein nasses Gebiet (Abbildung 62). Der Boden war mit einer Schicht Laubstreu bedeckt, in der sich immer wieder größere Wasserlachen fanden, obwohl die Regenzeit nun schon mehrere Monate vorbei war. Der Bewuchs bestand vor allem aus Gebüsch bzw. jungem Sekundärwald (ca. 4 m hoch), der nur an wenigen Stellen durch kleine Gebiete mit hohem Baumbewuchs unterbrochen war.



Abbildung 62. Bewuchs im Sammelgebiet: vorwiegend niedriger Sekundärwald, der Boden des Gebietes war nahezu überall nass und mit Pfützen und Tümpeln durchsetzt.

Hier wurden die Proben Nr. 001 bis 013 gesammelt. Von den Pflanzen 002 (Abbildung 63) und 005 (Beleg 80 bis 82 im Herbar Bringmann) wurde zudem Material für phytochemische Untersuchungen (Blätter, Zweige und Wurzelrinde) entnommen.



Abbildung 63. Infloreszenz mit Blütenknospen (links) und unreife Früchte der als Probe 002 besammelten Pflanze.

7.2.2 Sammelort Djombo, Provinz Equateur, DR Kongo, Afrika

Am 28. August 2008 wurde ca. 5 km östlich von Mbandaka, links und rechts entlang der Straße von Mbandaka nach Djombo (00° 00' N und 018° 016' E, 294 bis 311 m NN), gesammelt. Auch hier bestand der Bewuchs aus niedrigem Gebüsch, durchsetzt mit Palmen und mehreren kleinen Bäumen mit Mangroven-ähnlichen Stelzwurzeln, alles max. 4 m hoch und sehr licht, höhere Bäume fanden sich äußerst selten (Abbildung 64).



Abbildung 64. Seerosen in einem Wasserloch im Sammelgebiet um Djombo (links). *Ancistrocladus* in niedrigem Gebüsch (mitte), seltene größeren Bäumen im Sekundärwald (rechts).

Der Boden war wiederum nass und mit sehr vielen kleinen Wasserlöchern durchsetzt. Insgesamt machte das Gebiet eher den Eindruck einer großen seichten Wasserfläche, die durch Inseln liegendegebliebenen Laubes um die Stelzwurzeln herum unterbrochen wurde. Der Boden gab beim Darauftreten mehrere Dezimeter nach, oft trat Wasser hervor.

In diesem Gebiet erfolgte die Sammlung der Proben 014 bis 023, wobei 014 bis 016, 018 bis 020 und 023 mit je einem Herbarexemplar (Nr.85 bis 91 Herbar Bringmann) belegt wurden. Für phytochemische Untersuchungen wurde die Pflanze 015 vollständig abgeerntet. Besonders interessant waren die Blüten der Pflanze Nr. 018 (Abbildung 65), die denen von *A. congolensis* bzw. der im Würzburger Botanischen Garten unter dem Arbeitsnamen „*A. ikela*“ geführten Pflanze ähnelten.



Abbildung 65. Blütenstand einer *Ancistrocladus*-Pflanze aus dem Gebiet um Djombo (links), rechts eine der seltenen offenen Blüten, die denen von „*A. ikela*“ ähnlich waren.

7.2.3 Sammlungsgebiet Eala, Provinz Equateur, DR Kongo, Afrika

Am 29. August 2008 war der Botanische Garten Eala (00° 03' N und 018° 10' E, 308 m NN) Ziel der Expedition. Bereits kurz vor den Toren des Gartens wurde die erste Probe (024) gesammelt. Der Boden hier war noch feucht, aber offene Wasserflächen fehlten. Gleiches galt für den Sammlungsort innerhalb des botanischen Gartens. Der Bewuchs bestand vor allem aus höheren, relativ dicht stehenden Bäumen eines Sekundärwaldes.

Innerhalb des Botanischen Gartens Eala wurden keine älteren *Ancistrocladus*-Pflanzen gefunden, alle Exemplare waren max. 2 bis 4 m hoch. Bei diesen handelte es sich um wild aufgekommene Sämlinge, ob aber deren Mutterpflanze nicht gezielt im botanischen Garten angepflanzt wurde, konnte nicht festgestellt werden. Nach Aussage der Führer durch den Garten wurde das Gebiet einmal im Jahr überschwemmt und so ist es durchaus möglich, dass es sich um eine natürliche junge Population handelte.

Außerhalb des Gartens ($00^{\circ} 02' N$ und $018^{\circ} 19' E$, 301 m NN) wurde ein weiteres Exemplar beprobt. Der Standort war eher trocken und mit höheren (ca. 10 – 20 m hohen) Bäumen bestanden. Allerdings fanden sich hier auch nach längerem Suchen keine weiteren *Ancistrocladus*-Pflanzen.

7.2.4 Sammlungsort Bonsolerive, Provinz Equateur, DR Kongo, Afrika

Eine letzte Sammlung fand am 30. August 2008 in einem Gebiet zwischen dem Dorf Bonsolerive und dem Fluss Sole statt ($00^{\circ} 06' S$ und $018^{\circ} 20' E$, 300 bis 314 m NN). Das Areal war vorwiegend trocken (Abbildung 66), nur an wenigen Stellen gab es kleine Wasserlachen, allerdings wird der mäßig hohe Sekundärwald einmal im Jahr für ein bis zwei Monate kräftig überflutet (Aussage der lokalen Bevölkerung). Der Boden war lehmig und nur mit wenig Laubstreu bedeckt.



Abbildung 66. Die Umgebung von Bonsolerive war vorwiegend trocken. Der lichte Wald bestand vor allem aus jungen Bäumen. Die Schicht aus Laubstreu war recht dünn (<10 cm).

In Dorf-Nähe fanden sich unzählige Jungpflanzen zwischen wenigen größeren Exemplaren, die aber allesamt einen maximalen Stammdurchmesser von 1-3 cm aufwiesen, also noch nicht sehr alt waren. Kräftigere Exemplare, von denen auch eines für die phytochemische Analyse gesammelt wurde (049), fanden sich einige hundert Meter weiter in Richtung Fluss. Herbarbelege wurden von den Pflanzen 032, 038, 045, 046, 048, 049 und 051 angelegt (Nr. 93 bis 99 Herbar Bringmann). Auch hier fanden sich nur an einem Exemplar Blüten, die sich in der Form deutlich von den zuvor gefundenen unterschieden (Abbildung 67). Früchte verschiedener Form fanden sich häufiger, waren aber stets unreif.



Abbildung 67. Die Blüten des Exemplars 032, die sich in ihrer Form von den zuvor gefundenen unterschieden. Außerdem unreife Früchte unterschiedlicher *Ancistrocladus*-Individuen, die auf engem Raum (wenige hundert Quadratmeter) gefunden wurden.

7.3 Genetische Untersuchungen der *Ancistrocladus*-Proben aus der DR Kongo

Die gesammelten Blätter wurden bereits Vorort durch die Aufbewahrung in Plastikbeuteln, die mit Silicagel Orange (Fa. Roth) befüllt waren, getrocknet. Durch den schnellen Trocknungsprozess vermied man, dass die DNA durch Abbauprozesse während des Absterbens der Gewebe beschädigt oder gar zerstört und die Proben damit unbrauchbar wurden. Zur genetischen Untersuchung wurde das gesammelte Blattmaterial von 53 verschiedenen Individuen an die Arbeitsgruppe Heubl (TU München) übergeben. Dort wurde die gesamtgenomische DNA isoliert und restringiert. Doppelsträngige Oligonucleotid-Adapter mit bekannter Sequenz ligierten enzymatisch an die entstandenen Fragmente und mittels passender Primer durch PCR amplifizierbar wurden. Für die Untersuchungen wurden Mikrosatelliten-Sequenzen herangezogen. Dabei handelt es sich um DNA-Sequenzen, die nichtcodierend sind und aus sich mehrfach wiederholenden (10- bis 100-fach) kurzen (2 bis 4 Nukleotide umfassenden) repetitiven Motiven bestehen. Als Satellit wird diese DNA bezeichnet, weil sie bei der CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation genomischer DNA neben der Hauptbande eine Neben- also Satelliten-Bande (etwa 5 % der Gesamt-DNA) bildet. Vereinfacht betrachtet ist der unterschiedliche G-C-Gehalt dieser DNA dafür verantwortlich. Für Genanalysen sind diese Sequenzen geeignet, da sie sich zwischen Individuen einer Art in der Länge der Sequenzen unterscheiden.

Aus dem Gemisch der DNA-Fragmente von *Ancistrocladus* wurden Mikrosatelliten selektiert, indem man Sonden mit dem gewünschten repetitiven Komplementärbasenmotiv an die Fragmente hybridisieren ließ. Die Komplementär-Sequenzen trugen eine Biotin-Markierung, die das „Herausfischen“ ermöglichte. Mit diesen Mikrosatelliten-haltigen Fragmenten wurde eine Bibliothek aufgebaut, die nun genutzt werden konnte, um die Sequenzierung einzelner Abschnitte durchzuführen. Hinzugefügt werden muss, dass diese

Methode bei *Ancistrocladus* zwar funktionierte, jedoch bei weitem keinen zufriedenstellenden Wirkungsgrad hatte.

Für die flankierenden DNA-Regionen der Sequenzen, die tatsächlich Mikrosatelliten enthielten, wurden Primer designet, die anschließend auch auf alle anderen *Ancistrocladus*-Arten passen sollten. Diese Primer wurden Fluoreszenz-markiert und in einer PCR mit gesamtgenomischer DNA eingesetzt. Die Auswertung der basengenauen Auftrennung des Amplifikates erfolgte durch Laser-gestützte Vermessung der Fragmentlängen (im Vergleich mit einem Fragmentlängen-Standard). Manuell wurden Matrizen der Peak-Muster aufgestellt, die in das Datenverarbeitungs-Programm NTSYSpc^[236] importiert wurden, um nach Nei und Li^[237] genetische Distanzen mittels UPGMA-Clusteranalyse^[238] zu berechnen und Dendrogramme zu erstellen.

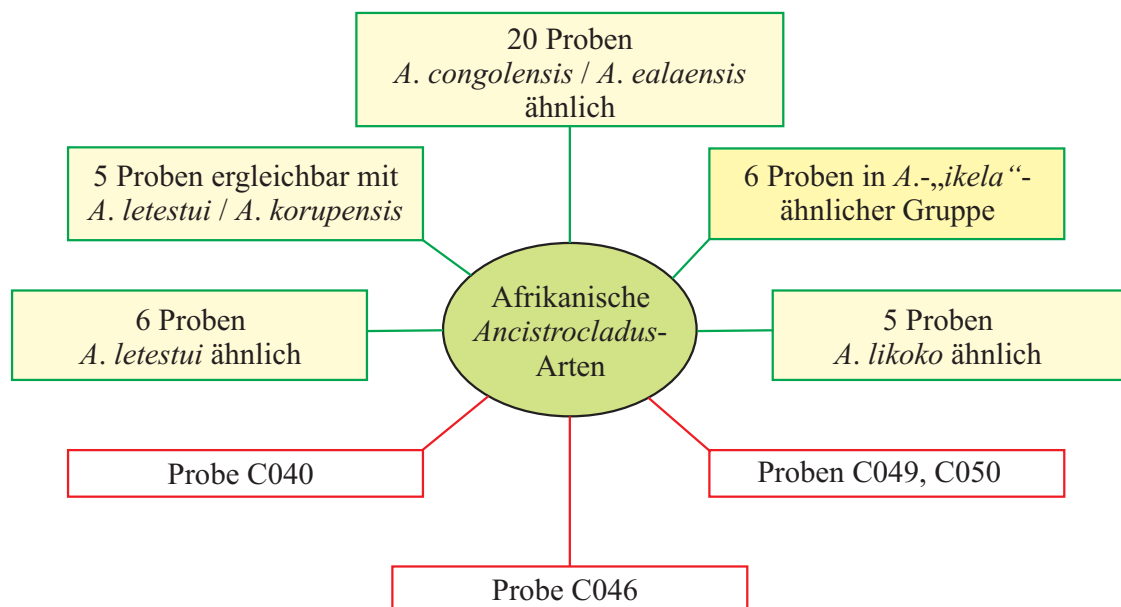


Abbildung 68. Die bisherige – vorläufige – Eingruppierung der gesammelten *Ancistrocladus*-Proben aus dem Kongo, basierend auf den genetischen Analysen. Vier dieser Proben ließen sich bislang keiner bekannten Art zuordnen. Erst weitere Mikrosatelliten-Analysen werden Klarheit schaffen können.

Derzeit ist die Ergebnislage jedoch noch in einem sehr frühen Stadium, so dass keine Aussagen über Abstammung und Entwicklung getroffen werden konnten. Wahrscheinlich war aber, dass das gesammelte Probenmaterial viele der für Zentralafrika beschriebenen Arten umfasste, was an sich schon erstaunlich ist, wenn man das kleine, wenige Quadratkilometer umfassende Sammelgebiet betrachtete.

8 Bereitstellung pflanzlicher Zellkulturen zur Untersuchung der Biosynthese von Anthrachinonen

8.1 Kenntnisstand

Eine weitere Substanzklasse mit polyketidischem Ursprung ist die der Anthrachinone. Darunter fallen so einfache Vertreter wie das Emodin (**71**)^[239] und eine Fülle weiterer tricyclischer monomerer Verbindungen. Ebenfalls seit langem bekannt, vor allem aus der Gattung *Aloe*, sind dimere Anthrachinone, mehr oder weniger symmetrische Verbindungen. Interessanter Weise ist oft die Aufklärung der Konfiguration der Stereoelemente komplett vernachlässigt worden, wie bei den interessanten Scutianthrachinonen (z.B. **72**, Abbildung 69).^[240] Neuere Entdeckungen sind heterodimere Anthrachinone wie Knipholon (**73**) und eine ganze Reihe seiner Derivate.^[241] Diese wurden allerdings vorwiegend aus anderen Gattungen der Familie der Asphodelaceae, aus *Kniphofia*- oder *Bulbine*-Arten, isoliert. Diese Strukturen können noch einmal miteinander verknüpft werden, wie mit der Entdeckung des Joziknipholons^[241] (**74**) belegt, und nun zeichnet sich ab, dass auch diese zu noch höheren Strukturen verbunden sein können.

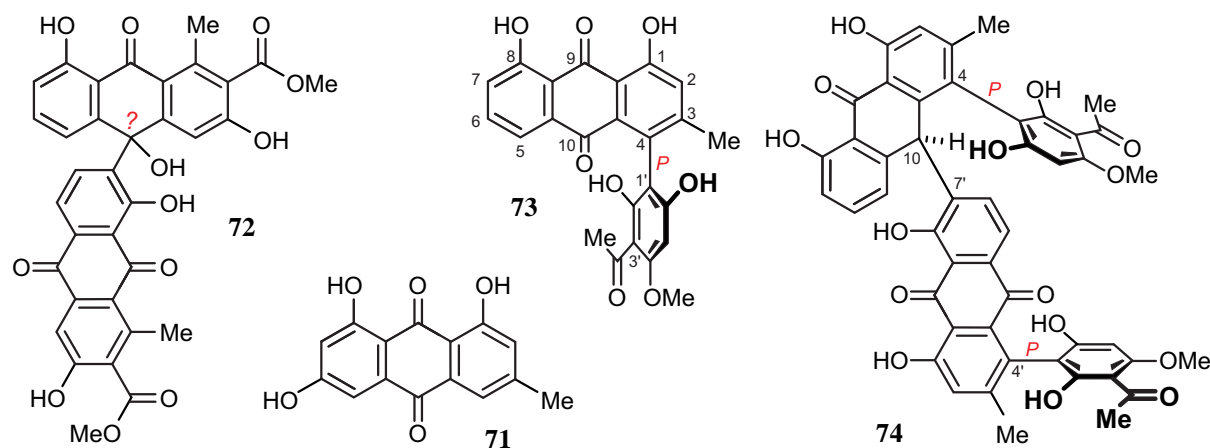
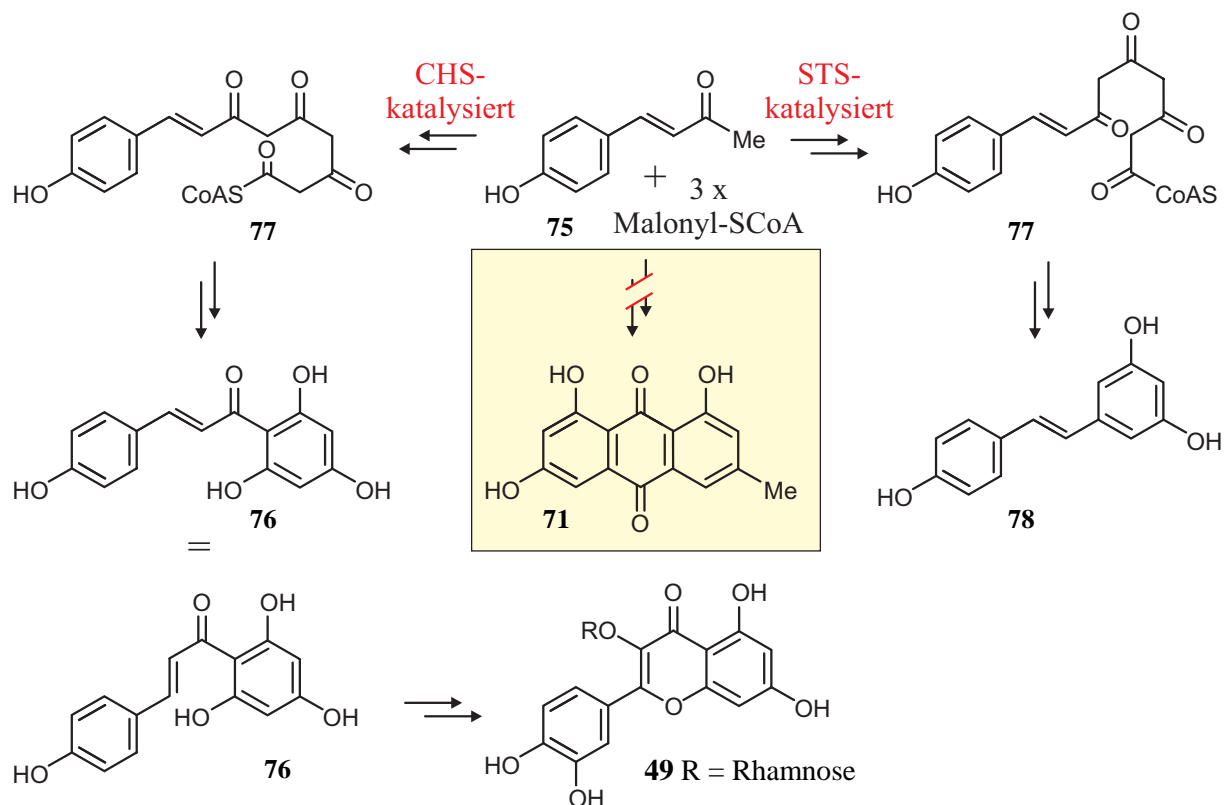


Abbildung 69. Bekannte pflanzliche Anthrachinone: Scutianthraquinon C (**72**) Emodin (**71**), Knipholon (**73**) und Joziknipholon (**74**).

Anthrachinone und andere aromatische Polyketide findet man aber nicht nur bei Pflanzen. Auch im Reich der Bakterien und Pilze sind solche Verbindungen sehr weit verbreitet.^[242] Da einige pharmakologisch sehr wichtige Substanzen darunter fallen (als Beispiel sei das Antibiotikum Tetracyclin genannt)^[243] ist die biosynthetische Herkunft und Vielfalt der Polyketide in diesen Organismengruppen intensiv untersucht worden.^[249,244] Dies schließt sowohl mechanistische Untersuchungen durch Fütterungsexperimente, als auch

molekularbiologische Erkenntnisse ein. Daher gibt es reichhaltige zusammenfassende Literatur, die sich mit den Polyketidsynthesen (PKS) vor allem des Typs I und des Typs II befasst.^[245-248] Aus dem Pflanzenreich wurden die Chalkonsynthasen (CHS) und die Stilbensynthasen (STS) erfolgreich untersucht, die den Typ III der PKS repräsentieren. Mit diesen konnte aber nicht das gesamte Spektrum der gefundenen pflanzlichen Polyketide erklärt werden. Chalkonsynthasen (wie auch Stilbensynthasen) nutzen als Startereinheiten Moleküle wie Cumaryl-CoA (**75**), an das daraufhin Malonyl-CoA-Reste angehängt werden und so die namensgebenden Chalcone (z.B. **76**) produziert werden. Die können wiederum zu der großen Gruppe der Flavonoide (beispielsweise **49**) umgesetzt werden (s Schema 11).^[249,250,251]



Schema 11. Biosynthese des Resveratrols (**78**) durch Stilbensynthasen (STS) und von Chalconen wie **76** und Flavonoiden, z.B. Quercetin (**49**), durch Chalkonsynthasen (CHS).

Es wird davon ausgegangen, dass Enzyme, die die Biosynthese nicht-Chalcon-abgeleiteter Polyketide durchführen, der Form nach ebenfalls zu den PKS vom Typ III zu zählen sind. Diese nutzen dann allerdings Startereinheiten wie Acetat oder Malonat. Ausführliche Literatur über diesen "Sonderfall" der Chalkonsynthasen findet man bislang aber wenig.^[209,252,253] Genauso dünn gesät sind Veröffentlichungen zum mechanistischen Ablauf dieser

Biosynthesewege in Pflanzen, also darüber, wie und woraus die Polyketid-Kette entsteht und wie sie gefaltet werden muss, damit aromatische Verbindungen wie das Chrysophanol (**13**), das Knipholon (**73**) oder die Naphthylisochinolin-Alkaloide entstehen können. Die Arbeiten dazu erfolgten nahezu allesamt in unserer Arbeitsgruppe, im Falle der Naphthylisochinoline gelang sogar der erste Nachweis des F-Faltungsmodus in Pflanzen überhaupt.^[18,26,27,254] Dafür gibt es derartige Untersuchungen an Bakterien (vor allem Streptomyceten) und Pilzen so reichlich, dass R. Thomas 2001 eine Klassifizierung der unterschiedlichen Polyketidketten-Faltungen in einen S- und einen F-Typ vornehmen konnte.^[225] Die Bezeichnungen des jeweiligen Faltungstyps leiteten sich von den Organismen-Gruppen ab, für die sie damals nachgewiesen waren: beim S-Modus (vor allem bei Streptomyceten) erhält der erste gebildete Ring des Metabolits drei intakte Acetat-Einheiten; bei Pilzen (engl.: fungi) wird die Kette so gefaltet, dass der erste Ring nur zwei vollständige Acetat-Einheiten besitzt. Diese Faltungstyp wurde als F-Modus bezeichnet. Das System von R. Thomas wurde nie an ein und derselben Substanz bewiesen sondern lediglich im Vergleich ähnlicher Metabolite aufgestellt. In unserem Arbeitskreis wurde das F- und S-Faltungsmodus-System des Chrysophanols (**13**) untersucht. Hier gelang erstmals der Nachweis, dass die Biosynthese ein und des selben Metabolits in Pro- und Eukaryonten unterschiedliche (insgesamt sogar drei verschiedene) Wege beschreiten kann. (Abbildung 70).^[26,27]

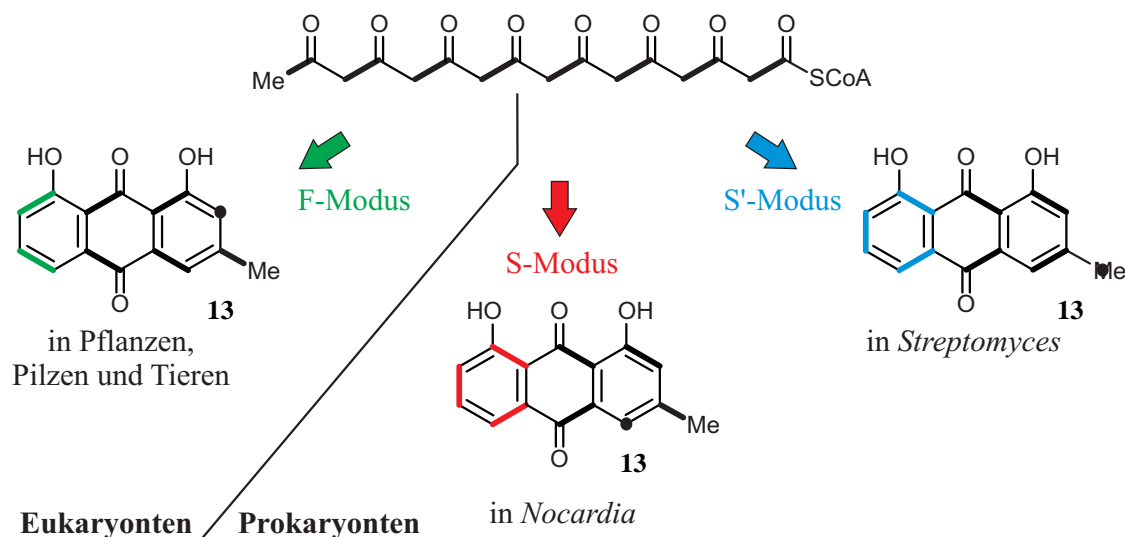


Abbildung 70. Konvergente Biosynthese: Chrysophanol (**13**) wird von Eukaryonten im F-Modus gebildet (links, grün), bei Prokaryonten wurden zwei verschiedene Wege (S und S') entdeckt (rechts, rot und blau).

Diese Ergebnisse könnten an einem weiteren Molekül verifiziert werden, das dem Chrysophanol (**13**) auf den ersten Blick sehr ähnlich sieht. Bei genauerem Hinsehen offenbart

Aloesaponarin II (**14**)^[28] aber, dass theoretisch sogar noch mehr Faltungs-Varianten einer zugrundeliegenden Oktaketid-Kette existieren.

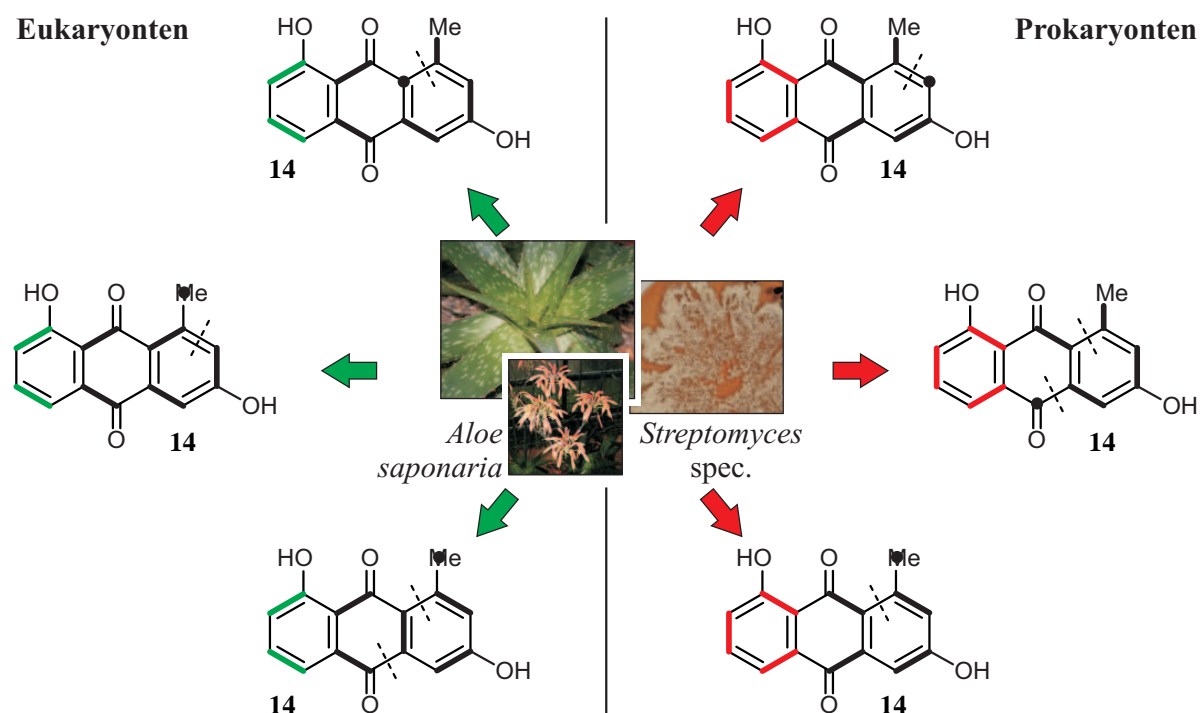


Abbildung 71. Sechs Faltungsmodi, die zu Aloesaponarin II (**14**) führen könnten: jeweils drei Varianten sind in Pflanzen (links, grün) und in Streptomyceten (rechts, rot) denkbar.

Natürlich sind aus chemischer Sicht mehrere dieser Faltungsmöglichkeiten wenig wahrscheinlich. Dennoch wäre **14** ein ideales Molekül, um die Ergebnisse, die man mit Chrysophanol (**13**) erzielte, zu untermauern. Vor wenigen Jahren wurden wildtypische *Streptomyces*-Stämme entdeckt, die Aloesaponarin II (**14**) produzierten.^[29,30] Dass **14** in Pflanzen wie der namensgebenden *Aloe saponaria* (u.a. aber auch einer Reihe anderer *Aloe*-Arten) produziert wird, ist bereits seit nahezu einem halben Jahrhundert bekannt.^[260] Bezieht man alle aus *Aloe saponaria* isolierten monomeren Verbindungen in die Betrachtung ein, werden solche Untersuchungen sogar noch spannender. Für Aloesaponarin I wurde von Yagi *et al.* eine Biosynthese vorgeschlagen, die auf einer Polyketidkette beruht die dem S-Typ entsprechend gefaltet sein muss, was jedoch der bisherigen Ansicht zur Polyketidfaltung in Pflanzen widersprechen würde.^[255] Um entsprechende Biosynthese-Experimente durchführen zu können, war nun nötig, entsprechende Zellkulturen von *Aloe saponaria* oder anderen **14**-produzierenden Pflanzen zu etablieren.

8.2 Etablierung von Zellkulturen

Der übliche Weg, zu sterilen pflanzlichen Zellkulturen zu gelangen, verläuft über die Aussaat der Pflanzen unter sterilen Bedingungen. Parallel dazu kann aber auch (fast) jedes pflanzliche Gewebe als Ausgangsmaterial verwendet werden.

8.2.1 Zellkulturen aus steril herangezogenem Pflanzenmaterial

Dieser Ansatz wurde mit verschiedenen Pflanzenarten verfolgt. Für die Aussaat wurde käufliches Saatgut von *Aloe saponaria* und einer ganzen Anzahl weiterer Arten verwendet, für die Aloesaponarin II (**14**) nachgewiesen war (Tabelle 5).^[256-259]

Tabelle 5. Aloesaponarin-II-produzierende Pflanzen, die für die Etablierung steriler Zellkulturen verwendet wurden.

Pflanzenart	Keimungsrate [%]
<i>Aloe ferox</i>	31
<i>A. graminicola</i>	6
<i>A. saponaria</i>	28
<i>Asphodelus fistulosus</i>	4
<i>A. racemosus</i>	4
<i>Hemerocallis minor</i>	95
<i>H. nana</i>	35
<i>H. lilioasphodelus</i>	0
<i>H. citreum</i>	4
<i>Lomatophyllum citreum</i>	37

Die Samen wurden für ca. 1 Minute mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in eine 1-proz. Benzalkoniumchlorid-Lösung gegeben. Im Gegensatz zu NaOCl ist Benzalkoniumchlorid ein relativ mildes Mittel zur chemischen Oberflächensterilisation, das sogar in Augentropfen Anwendung findet. Die Sterilisations-Lösung ließ man 5 (bei größeren Samen bis 10) Minuten einwirken, bevor das Saatgut dreimal mit klarem sterilem deionisiertem Wasser gewaschen wurde. Die so behandelten Samen legte man einzeln auf hormonfreiem halbkonzentriertem MS-Kulturmedium (MS/2) aus und stellte die Petrischalen zur Keimung bei 24 °C +/- 2°C auf. Nach ca. zwei bis drei Wochen zeigten sich die ersten Keimlinge von *H. nana*, die nach dem Erscheinen des Keimblattes in Erlenmeyerkolben mit

MS/2-Medium überführt wurden. Ebenso wurde mit den Keimlingen aller anderen Arten verfahren. Die Überlebensrate der Keimlinge war bei allen Pflanzen (bis auf *H. nana*) gering und lag bestenfalls bei 10%. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass es sich bei all diesen Pflanzen um Xerophyten handelte und diese daher nicht für feuchte Substrate geeignet waren (die Kulturmedien sind im Wesentlichen Matrix-stabilisiertes Wasser). Dieser Umstand stellte sich auch bei den überlebenden Pflanzen immer wieder als negativ heraus. Trotz dieser Misserfolge konnten von den wichtigsten Arten (*A. saponaria* und *L. citreum*) sterile Pflanzen etabliert werden, die auf Grund des „nassen“ Pflanzsubstrates (MS/2-Kulturmedium) allerdings nur geringe Wurzelbildung zeigten. Bislang wurden die interessanten Verbindungen (u.a. **14**) aber vor allem aus Wurzeln oder dem kurzen unterirdischen Stamm der Pflanzen isoliert.^[28,256,259-262,277] Von diesen Teilen stellten die sterilen Pflanzen aber nur wenig Material für die Etablierung von Zellkulturen zur Verfügung. Zudem waren die Gewebe der keimfrei gezogenen *A. saponaria* so schwach, dass nur an wenigen Explantaten eine sehr geringe Kallusbildung zu beobachten war. Auch die Versuche zur Herstellung von Wurzelkulturen von *A. saponaria* mussten erfolglos abgebrochen werden.

war in der Literatur zu finden.

Trotz des geringen zur Verfügung stehenden keimfreien Materials von *L. citreum* gelang es nach einem Protokoll zur Etablierung von Kalluskulturen aus *Aloe saponaria* von dieser Pflanze Zellkulturen anzulegen.^[263] Nachdem die Kulturen einmal etabliert waren zeigten diese Wachstumsraten wie die Kulturen aus insterilem Material von *A. saponaria* (Kapitel 8.2.2).

8.2.2 Kalluskulturen aus insteril wachsendem Pflanzenmaterial

Einen weiteren Ansatz zur Etablierung von sterilen Kalluskulturen bot die Verwendung von insterilem Pflanzenmaterial von *Aloe saponaria* und *A. bulbifera* aus dem Botanischen Garten der Universität Würzburg.^[264] Es wurden junge Blätter bzw. der Stamm genutzt. Die Verwendung von Wurzeln war nicht möglich. Zum einen lässt die Oberflächenstruktur junger Wurzeln (Wurzelhaare und dünne Rhizodermis) dies nicht zu, zum anderen verursacht der Bodenkontakt der Wurzeln eine wesentlich höhere Kontamination mit Pilzen und Bakterien, so dass eine sterile Oberfläche kaum zu erreichen ist.

Die Oberflächensterilisation folgte dem oben erwähnten Protokoll. Allerdings wurde nicht auf die Einwirkzeit des Desinfektionsmittels geachtet, sondern auf die Entfärbung der Gewebe an den Schnittstellen der Explantate, die nach wenigen Minuten eintrat und andeutete, dass

bereits das Pflanzengewebe Schaden nahm. Diese Bereiche wurden später entfernt, so dass frische Schnittstellen entstanden (die Kallusbildung erfolgt stets am ehesten dort, wo die eingesetzten Gewebe Verletzungen aufweisen). Die Blätter wurden in ca. 1 cm breite Streifen geschnitten die wiederum noch einmal zu halbieren waren. Mit den Stamm-Segmenten wurden ähnlich verfahren. Zunächst erfolgte die Entfernung der ausgeblichenen Gewebeteile und der Stamm-Epidermis mit dem Skalpell. Der verbliebene Stamm wurde nun ebenfalls in ca. 0.5 bis 1.0 cm breite Scheiben geschnitten und diese wiederum geviertelt. Für die Kallusinduktion kamen feste Kulturmedien zum Einsatz, die auf MS/2-Medium basierten. Verwendet wurden verschiedene Konzentrationen an Phytohormonen. Zum einen folgte man den Angaben in der Literatur, es wurden aber auch abweichende Hormongemische eingesetzt (Tabelle 6). Die Kultur erfolgte unter Lichtausschluss. Am größten war die Zuwachsrate auf dem literaturbekannten Medium, das mit *AloeIV* bezeichnet wurde, ähnlich waren die Erfolge auf dem Medium *AloeII*. Hingegen konnte *AloeI* als Kulturmedium ausgeschlossen werden, da die Explantate so gut wie keinerlei Wachstum zeigten und abstarben. Festzustellen war, dass die Kalli sehr weich waren und über 99 vol% Wasser enthielten.

Tabelle 6. Die für die Etablierung von Kalluskulturen verwendeten Kulturmedien (auf MS/2-Medium basierend).

Bezeichnung des Kulturmediums	1-NAA [mg L ⁻¹]	2,4-D [mg L ⁻¹]	6-BA [mg L ⁻¹]
<i>AloeI</i>	0.3	-	2
<i>AloeII</i>	6		2
<i>AloeIII</i>		0.5	2
<i>AloeIV</i>	3.7		1.8

Nach ca. 1 Woche war sowohl an den Blattstücken als auch an den Stammsegmenten unkontrollierte Zellvermehrung makroskopisch sichtbar (Abbildung 72). Nach vier Wochen konnten die ersten Kalli vom Muttergewebe entfernt und separat kultiviert werden. Allgemein ließ sich feststellen, dass die Verdopplung der Zellmasse alle sechs bis acht Wochen erfolgte.

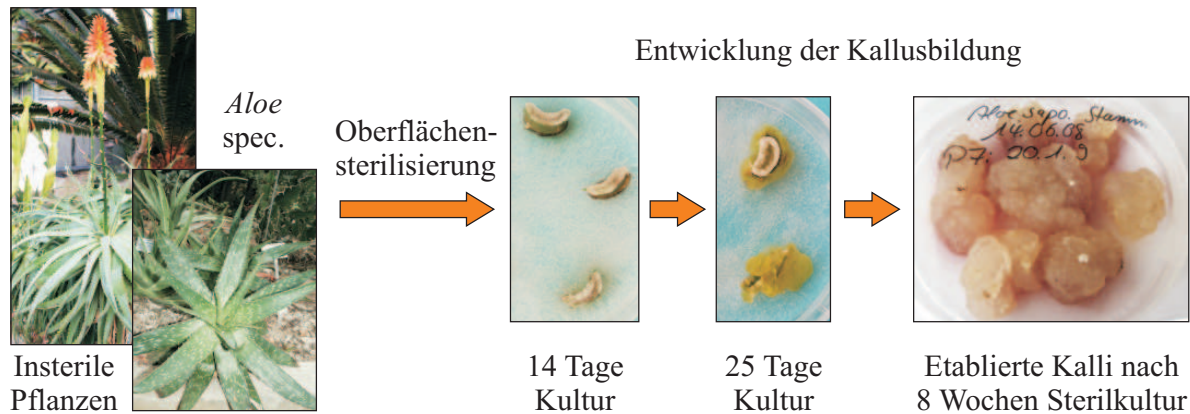


Abbildung 72. Die Etablierung permanenter Kalluskulturen von *A. saponaria* aus insterilem Pflanzenmaterial.

8.2.3 Veränderte Zusammensetzung der Kulturmedien zur Anregung der Anthrachinon-Produktion in *Aloe*-Zellkulturen

Ziel war es aber nicht nur rasch wachsende Zellkulturen zu etablieren, sondern diese auch zur Produktion von Sekundärmetaboliten anzuregen. Problematisch war zunächst das rasch einsetzende und für viele Pflanzenzell-Kulturen immer wieder beschriebene ‚Browning‘. Dabei zeigen die Gewebe- und Zellkulturen eine Braun- bis Schwarzfärbung, die vermutlich auf die Aktivität von Phenoloxidasen zurückzuführen ist und im Prinzip dem Vorgang entspricht, der abläuft, wenn ein Apfel angeschnitten wurde. Dieser Effekt wirkt sich nachteilig auf das Wachstum der Zellkulturen und deren Produktion von Sekundärmetaboliten aus. Es gibt eine ganze Reihe von Versuchen zur Verringerung oder gar Vermeidung dieses Problems. Am aussichtsreichsten sind offenbar stets die Beimischungen von Antioxidantien oder Substanzen, die polyphenolische Verbindungen "abfangen" können. Der Zusatz von 0.1 g L^{-1} GSH (Gluthathionsulfat) und 5 g L^{-1} PPVP (Polyvinylpolypyrrolidon) verhinderte sowohl bei den Zellkulturen aus *A. saponaria* als auch bei *L. citreum* das Browning fast vollständig. Für feste Kulturmedien zur Induktion von *A.-saponaria*-Zellkulturen waren diese Zusätze noch nicht beschrieben, Cho et al. ^[263] empfahlen lediglich einen Polyvinylpyrrolidon-Anteil von 0.5% vor allem in Flüssigmedien.

Außerdem war eine Veränderung der Hormonzusammensetzung in den Kulturmedien nötig. Bei Verwendung eines Mediums (abgeleitet von *AloeII* → *AloeII.4*) mit gleichbleibendem 1-Naphthyllessigsäure-Anteil (6 mg L^{-1}) und verringerter 6-Benzylaminopurin-Konzentration (0.5 mg L^{-1}) zeigte sich ein etwa um ein Drittel reduziertes

Wachstum, aber die Anthrachinon-Produktion erfuhr eine erhebliche Steigerung (Abbildung 73).

Einige derjenigen Verbindungen, die zuvor bereits nachweisbar waren, traten um das ca. Sieben- bis Zehnfache erhöht auf. Bei einem der Hauptmetabolite handelte es sich um Aloesaponol I (**79**). Der Nachweis erfolgte durch HPLC-Coelutions-Experimente. Hinzu kamen neue Peaks, die Anthrachinone und mögliche Präkursoren repräsentierten. Aloesaponarin II (**14**) war allerdings nicht nachweisbar. Für die *Lomatophyllum*-Kulturen galt ähnliches, wenn auch nicht so stark ausgeprägt.

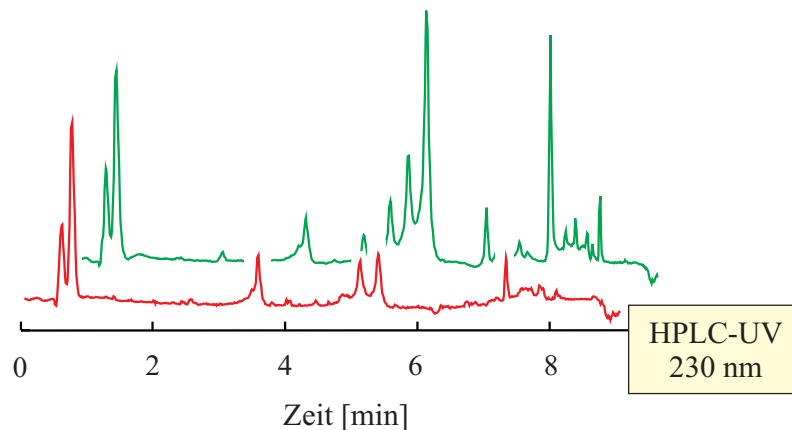


Abbildung 73. Chromatographischer Vergleich der Sekundärmetabolit-Produktion der Kalluskulturen von *A. saponaria* (rot: Kulturen auf literaturbeschriebenen Medien;^[263] grün: nach Veränderung der Medien-Zusammensetzung).

Nach den bisherigen Erkenntnissen wäre ein zweistufiges Protokoll zur Kultur der *Aloe*- oder *Lomatophyllum*-Zellkulturen angebracht: Einsatz des Mediums *AloeIV* zur Bildung größerer Mengen Biomasse und darauffolgend ein Transfer der Kalli auf *AloeII.4*, das die Produktion von Anthrachinonen fördert. Eine weitere Optimierung der Medienzusammensetzung und ggf. eine gezielte Elicitierung würde sicher zu einer erneuten Steigerung der Anthrachinonbildung führen. Dem Einsatz dieser Zellkulturen sollte aber eine phytochemische Charakterisierung vorhergehen. Um Referenzsubstanzen dafür zu erhalten, wurden die nicht für die Zellkulturetablierung verwendeten Pflanzenteile der *A.-saponaria*-Mutterpflanze aus dem Botanischen Garten extrahiert und daraus die Hauptsekundärmetabolite isoliert.

8.3 Isolierung von Anthrachinonen aus *Aloe saponaria*

Alle Teile (Blätter, Stamm und Wurzeln) der *Aloe saponaria* aus dem Botanischen Garten, die nicht zur Etablierung von Zellkulturen verwendbar waren, wurden genutzt um Sekundärmetabolite zu isolieren. Die Suche nach Aloesaponarin II stand hierbei im Vordergrund. Dabei wurden die einzelnen Organe der Pflanze voneinander getrennt untersucht. Das getrocknete, zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde mit Ethylacetat extrahiert. Die chromatographische Untersuchung der so erhaltenen Rohextrakte sowohl mittels HPLC als auch durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel ergab, dass die Blätter keine Anthrachinone enthielten, die Weiterbearbeitung lohnte also nicht. Dahingegen war der Wurzel-, aber auch der Stamm-Extrakt vielversprechend. Allerdings ließen die HPLC-Chromatogramme keinerlei Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Aloesaponarin II (**14**) zu (eine geringe Menge Vergleichssubstanz stand zur Verfügung).^[265]

Der Rohextrakt wurde mit Methanol gewaschen. Die so erhaltene Fraktion bestand aus relativ polaren Verbindungen, die mittels präparativer HPLC (unter Standardbedingungen) getrennt wurden, der Rückstand enthielt vor allem dimere Anthrachinone, die nur noch durch präparative Dünnschichtchromatographie aufzureinigen waren, da sie in den Lösungsmitteln für präparative HPLC (RP, präparative NP-Säulen standen nicht zur Verfügung) nicht löslich waren. So konnten eine Reihe mono- und dimerer Anthrachinone isoliert und deren Struktur aufgeklärt werden. Vorweggenommen sei, dass kein Aloesaponarin II darunter war.

8.3.1 Aloesaponarin I (**80**)

Diese Verbindung wies ein für monomere Anthrachinone durchaus typisches UV-Profil auf, zeigte aber in der LC/MS eine etwas höhere Masse (m/z 311 $[M-H]^-$, vgl. Chrysophanol mit m/z 255 $[M+H]^+$) als erwartet. Das 1H -NMR belegte das Vorhandensein von vier aromatischen Protonen, von denen drei benachbart waren, sowie eine Methoxy- (3.93 ppm) und eine Methylgruppe (2.71 ppm). Dass sich die Me-Gruppe (2.71 ppm) tatsächlich an C-1 und nicht wie bei Chrysophanol C-3 befand, wurde durch fehlende NOESY-Korrelationen zu dem Proton an C-4 deutlich, die beispielsweise bei Chrysophanol und seinen Dimeren stets vorhanden sind.^[266] Dem ^{13}C -NMR-Spektrum war zudem zu entnehmen, dass das Molekül zwei Hydroxy- und zwei Carbonyl-Gruppen enthielt. Allerdings gab es ein zusätzliches, stark Hochfeld-verschobenes ^{13}C -Signal (167.9 ppm). Nach Auswertung aller 2D-NMR-Spektren

wurde die Substanz als das bereits seit langem bekannte Aloesaponarin I (**79**) identifiziert (Abbildung 74). Alle Werte stimmten mit denen in der Literatur überein.^[260]

8.3.2 Laccainsäure-D-Methylester (**81**)

Aus der Methanol-löslichen Fraktion wurde eine weitere, ganz ähnliche Verbindung isoliert. Die Untersuchung per LC/MS zeigte jedoch, dass es eine zusätzliche OH-Gruppe geben musste (m/z 327 $[M-H]^-$). Dementsprechend wies das 1H -NMR-Spektrum im aromatischen Bereich ein Signal weniger auf und sämtliche Protonen erschienen als Singulett. Die Verschiebungen waren denen von **80** aber sehr ähnlich. Damit war sicher, dass es sich um die literaturbekannte Substanz Laccainsäure-D-Methylester (**81**) handelte, die bereits von Yagi *et al.* aus *A. saponaria* isoliert worden war (Abbildung 74).^[260]

8.3.3 Aloesaponol I (**79**)

Noch einmal zwei aromatische Protonen weniger besaß die Verbindung **79**. Stattdessen traten aber fünf z.T. zu Multipletts aufgespaltene Signale im nichtaromatischen Bereich auf. Außerdem fehlten die ^{13}C -Signale für die sonst so typischen Carbonyl-Funktionen (zwischen 180 und 195 ppm). Es existierte ein sehr Tieffeld-verschobenes Signal bei 204.3 ppm. Vor allem HMBC-, aber auch COSY- und NOESY-Spektren führten zu der Erkenntnis, dass es sich bei **79** um eine Struktur handelte, die **81** sehr ähnlich war, in der der linke (also der erste gebildete) Ring nicht aromatisch war (s. Abbildung 74).^[28,260]

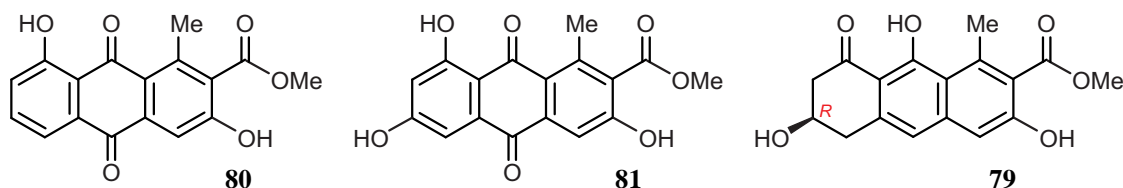


Abbildung 74. Die aus *A. saponaria* isolierte Aloesaponarin-II-ähnliche Verbindungen **79**, **80** und **81**. Über mögliche Biosynthetische Zusammenhänge wird am Ende des Kapitels diskutiert.

8.3.4 Asphodelin (82)

Bereits das ^1H - und das ^{13}C -NMR-Spektrum der Substanz **82** aus der Methanol-unlöslichen Fraktion zeigten, dass es sich um ein nicht symmetrisches Dimer handeln musste. Das Dimer besaß vier Hydroxy-, vier Carbonyl- und zwei Methyl-Gruppen. Die Auswertung der 1D- und 2D-NMR-Spektren sowie der CD-Daten machte deutlich, dass die Verbindung aus zwei Chrysophanol-Untereinheiten bestand, die durch eine 4,7'-verknüpfte *P*-konfigurierte Achse verbunden sind. Eine Literaturrecherche identifizierte die Substanz als das bereits aus Vertretern der Asphodelaceae bekannte Asphodelin (**82** – Abbildung 75).^[260,261,268]

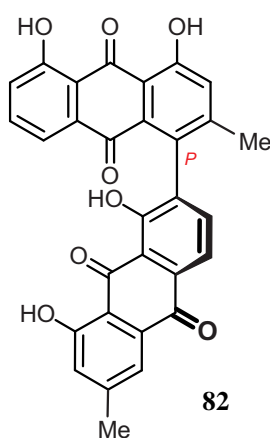


Abbildung 75. Das u.a. aus *Bulbine*-Arten bekannte Asphodelin (**82**).

8.3.5 10-Hydroxy-10,7'-(chrysophanolanthron)-chrysophanol (83)

Ein weiteres dimeres unsymmetrisch gekuppeltes Anthrachinon wurde sowohl aus den Wurzeln als auch aus dem Stamm isoliert. Die Konstitution der Verbindung war ebenfalls bereits seit langem bekannt, so dass nach Auswertung der 1D- und 2D-NMR-Spektren in Verbindung mit der exakten Masse (HRESIMS m/z 507.1080 $[\text{M}-\text{H}]^-$, ber. m/z 507.1085 $[\text{M}-\text{H}]^-$) die Verbindung als 10-Hydroxy-10,7'-(Chrysophanolanthron)-Chrysophanol (auch als 10,7'-Bichrysophanol bezeichnet) zu identifizieren war.^[269] Der Vergleich mit Literaturangaben (^1H - und ^{13}C -NMR, MS) stellte die Richtigkeit der ermittelten Struktur sicher. Allerdings fehlten Daten über die Konfiguration am Stereozentrum (C-10). Die Enantiomerenreinheit von **83** wurde durch die Messung des Drehwertes und per HPLC an chiraler Phase (Phenomenex[®] lux Cellulose-1) überprüft. Die CD-Spektren wurden offline aufgenommen. Für den Vergleich mit berechneten Spektren wurde von Y. Hemberger aus unserem Arbeitskreis zunächst die Konformationsanalyse mit DFT B3LYP/6-31G*^[133,134,138] durchgeführt und anschließend für die zwei relevanten Konformere ($<3 \text{ kcal mol}^{-1}$) die CD-

Spektren berechnet (TDA B3LYP/SVP mit COSMO).^[270,271] So konnte ermittelt werden, dass das Stereozentrum an C-10 *R*-konfiguriert war und es sich bei **83** um *R*-10,7'-Bischrysophanol handelte (Abbildung 76).

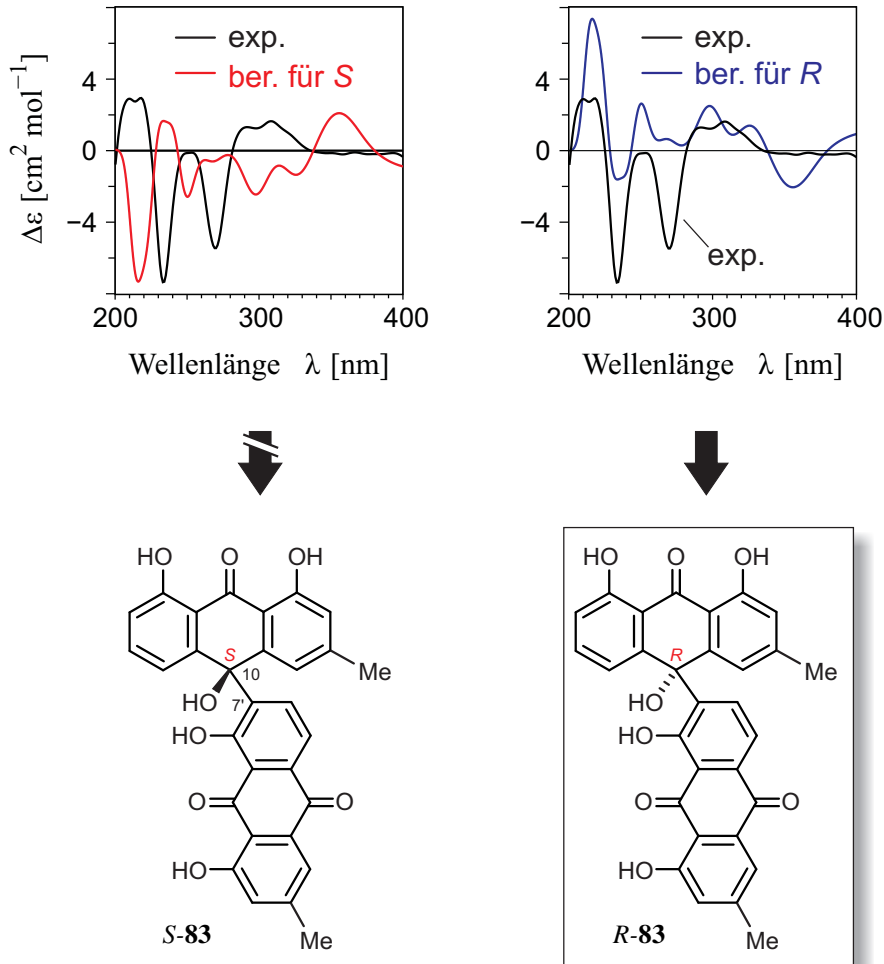
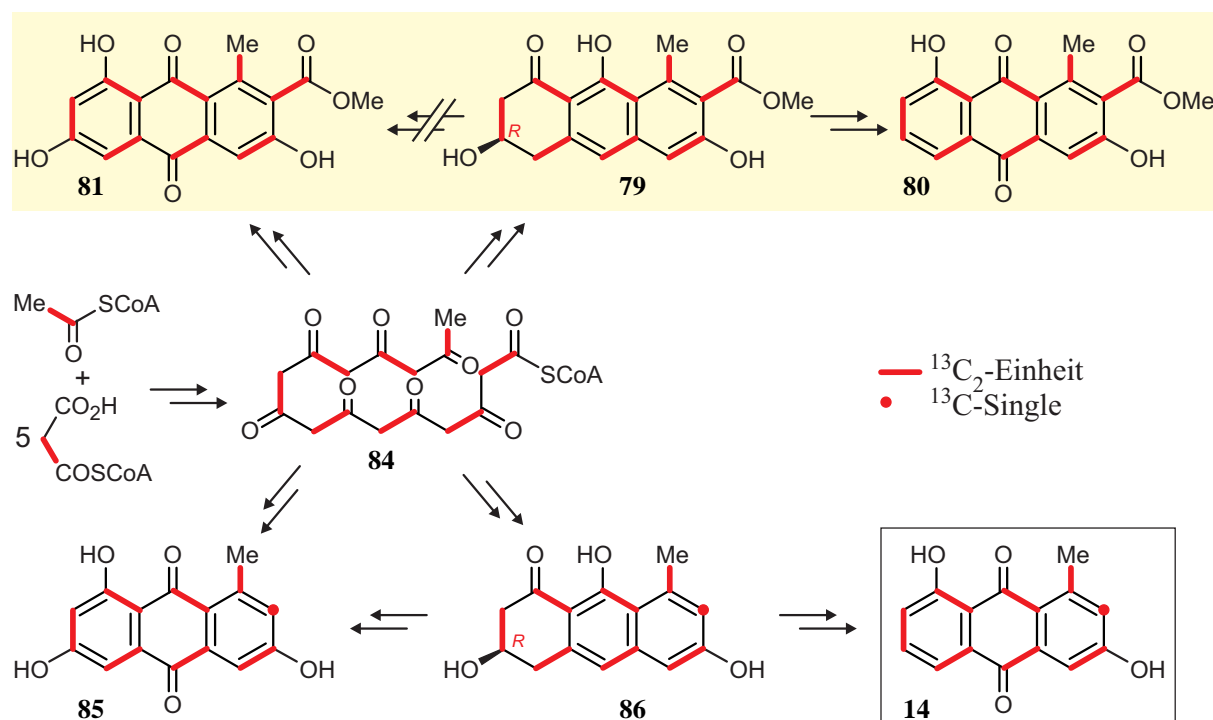


Abbildung 76: Ermittlung der *R*-Konfiguration des Stereozentrums von **83** durch den Vergleich von experimentell gewonnenen und von Y. Hemberger quantenchemisch berechneten CD-Spektren.

8.4 Diskussion zur Biosynthese

Aus *Aloe saponaria* wurden mehrere mono- und dimere Anthrachinone sowie ein dimeres Pre-anthrachinon isoliert. Die biosynthetische Herkunft von Aloesaponarin II (**14**) soll nun unter Berücksichtigung dieser und anderer aus *A. saponaria* bekannter Verbindungen diskutiert werden. Bereits zuvor (Kapitel 8.1, Abbildung 71) wurde erwähnt, dass **14** theoretisch sechs verschiedene Faltungsmöglichkeiten der zugrundeliegenden Polyketidkette zulässt. Betrachtet man weitere Verbindungen, wie das Aloesaponarin I (**80**) oder sehr ähnliche Strukturen wie **86**, könnte **80** ein Präkursor von **14** sein. Dann ließe dies aber nur

eine Faltungsmöglichkeit zu. Die Polyketidkette muss dann im S-Modus gefaltet worden sein. Das stünde den Erkenntnissen zur Biosynthese von Chrysophanol in Pflanzen vollständig entgegen. Bereits Yagi *et al.* machte mehrfach Vorschläge zum biosynthetischen Zusammenhang der isolierten Verbindungen aus *A. saponaria*. Mit der Herkunft von **14** und **85** aus der Vorstufe **86** befasste er sich nur theoretisch. Durch Inkorporationsexperimente mit ^{14}C -markiertem Acetat erbrachte er aber Hinweise auf die polyketidische Herkunft der Anthrachinone in *A. saponaria* (ohne dabei jedoch ein Einbaumuster zu ermitteln). Zudem stellte er fest, dass Aloesaponol I (**79**) ein Vorläufer des Aloesaponarins I (**80**) aber nicht für den Laccainsäure-D-Methylester (**81**) war (Schema 12).^[28,255] Er leitete aus all den Aloesaponarin-ähnlichen Verbindungen auch die Polyketidkette **84** ab, auf die diese Metabolite zurückzuführen sein müssten. Die Kette unterlag dann aber zwangsläufig dem S-Faltungsmodus.

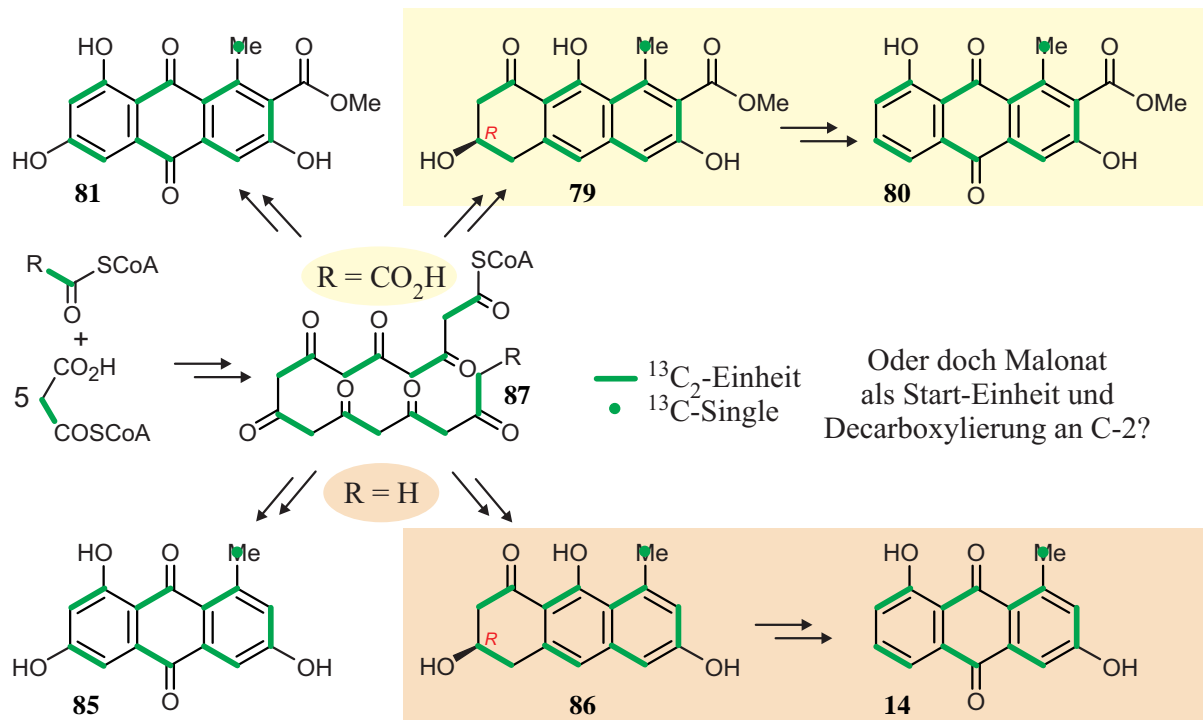


Schema 12. Der Teil der Biosynthese-Route von Aloesaponarin I (**80**), wie sie von Yagi *et al.* bewiesen wurde (oben, gelb hinterlegt). Über die Herkunft des Aloesaponarins II (**14**) stellte er lediglich Vermutungen an (unten). In beiden Fällen wurde eine S-Modus-gefaltete Polyketidkette zugrundegelegt.

Folgte man den Annahmen von Yagi *et al.*, käme man aber bereits ohne die Durchführung von Fütterungsexperimenten zu dem Schluss, dass Aloesaponarin II (**14**) *via* S-Faltungsmodus produziert worden sein muss. Dies wiederum widerspräche zunächst einmal den Ergebnissen

um das Chrysophanol und wäre eine klare Ausnahme des Einteilungssystems von R. Thomas.^[225]

Alle Aloesaponarin-ähnlichen Metabolite in einem Biosyntheseweg zu vereinen und dabei zu berücksichtigen, dass die Polyketidfaltung dem F-Modus folgen soll, lässt eigentlich nur eine Biosynthese-Variante möglich erscheinen. Zunächst muss die Starteinheit Malonyl-CoA an Stelle von Acetyl-CoA sein, das würde den Methyl ester an C-2 erklären können. Decarboxyliert werden muss dann an dem Ende, an dem schlussendlich die Methylgruppe (1-Me) am Aloesaponarin II (**14**) und allen anderen ähnlichen Verbindungen sein wird, und noch einmal an der Malonyl-Starteinheit. Damit wäre den oben genannten sechs theoretischen Biosynthesemöglichkeiten, die allesamt von Acetyl-CoA als Starter ausgehen (s. Abbildung 71), eine siebente hinzuzufügen.



Schema 13. Werden **14** und **80** auf zwei parallel ablaufenden Biosynthesewegen mit unterschiedlicher Starter-Einheit: Acetyl-CoA (oben, gelb) vs. Malonyl-CoA (unten, orange) produziert? Oder haben alle Metabolite einen gemeinsamen Ursprung?

Es wird also nicht nur interessant sein, den Faltungsmodus in Aloesaponarin II (**14**) zu ermitteln, mindestens genauso spannend sollte die Analyse des Inkorporationsmusters in Aloesaponarin I (**80**) oder seinen Derivaten werden und diese werden bereits jetzt von den *Aloesaponaria*-Zellkulturen produziert.

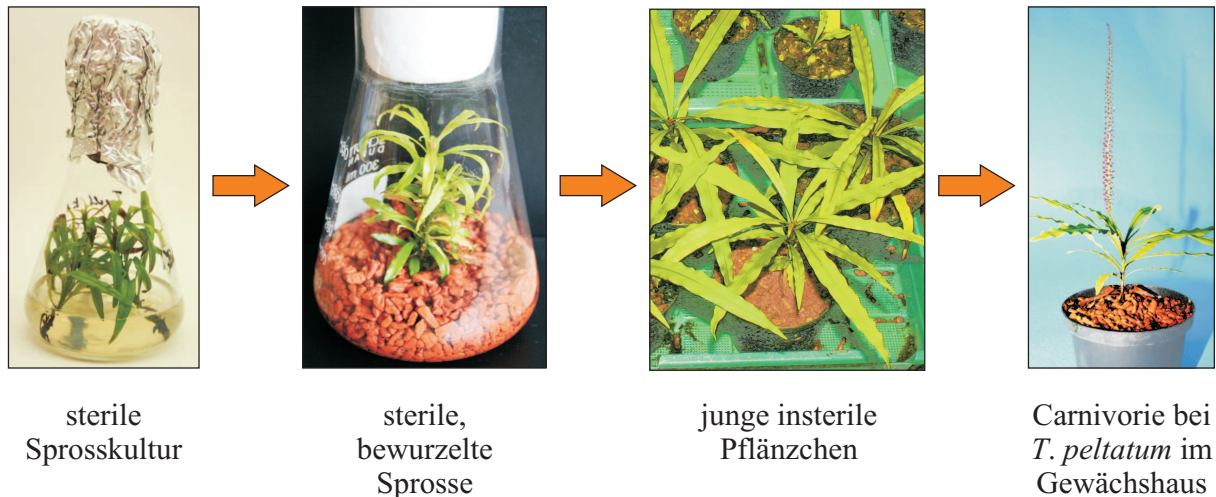
9 Zusammenfassung

Pflanzen und deren Sekundärmetabolite sind in allen Kulturen seit jeher Grundlage der traditionellen Medizin. Neue und vielversprechende pflanzliche Naturstoffe sind die Naphthylisochinolin-Alkaloide. Sie sind wegen ihres pharmakologischen Potenzials interessant, aber auch aus chemischer Sicht faszinierende. Im Gegensatz zu allen anderen bekannten Isochinolinen, die aus aromatischen Aminosäuren entstehen, haben die Naphthylisochinoline eine polyketidische Herkunft. Ziele dieser Arbeit waren die Untersuchung der Biosynthese der Naphthylisochinolin-Alkaloide unter Verwendung von pflanzlichen Zellkulturen von *Triphyophyllum peltatum*. In diesem Zusammenhang wurden die Sekundärmetabolite dieser Kalluskulturen analysiert. Außerdem wurden Beiträge zum besseren Verständnis der Biologie von *T. peltatum* erbracht und Grundlagen für erste populationsgenetische Untersuchungen der Gattung *Ancistrocladus* geschaffen.

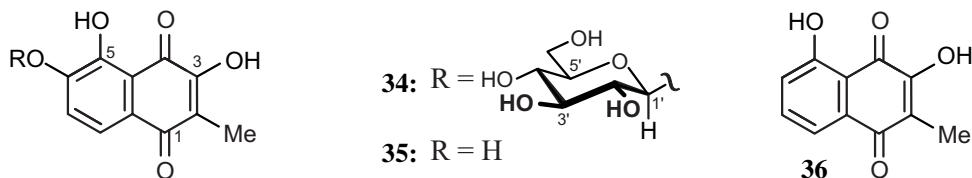
Parallel wurden durch die Etablierung von Zellkulturen von *Aloe saponaria* die Voraussetzungen für die Durchführung von Biosynthese-Experimenten zur polyketidischen Herkunft von Anthrachinonen geschaffen.

Die einzelnen Ergebnisse im Detail:

- Es wurde ein Verfahren entwickelt, das es ermöglichte, aus sterilen Sprosskulturen wieder *Triphyophyllum*-Pflanzen zu regenerieren, obwohl die Bewurzelung der keimfrei wachsenden Sprosse ein schwieriger Prozess ist. Die Wurzelentwicklung begann auf verarmendem Anderson-Kulturmedium. Nach der Bewurzelung folgte eine kurze Kultur in Tongranulat-Substrat unter sterilen Bedingungen, die das Wachstum weiter förderte. Unbewurzelte Triebe wurden auf frisches Anderson-Medium überführt, so dass ein Verlust an Pflanzenmaterial vermieden wurde. Die anschließende Akklimatisierung der Jungpflanzen an insterile Bedingungen in den Gewächshäusern des botanischen Gartens der Universität Würzburg verlief problemlos. Obwohl die Kultur von *T. peltatum* nicht trivial ist, gingen einige der Jungpflanzen in die selten in Kultur beobachtete carnivore Phase über.



- Die Analyse der Sekundärmetabolite der Zellkulturen von *T. peltatum* in Kooperation mit S. Rüdener führten zur Entdeckung des Naphthochinonen-Glucosids Dioncochinon A (**34**) und seines Aglycons, des Dioncochinons B (**35**). In *In-vitro*-Tests waren beide Naphthochinone spezifisch aktiv gegen *Leishmania donovani*, den Erreger der visceralen Leishmaniose und zeigten bemerkenswerte antikanzerogene Wirksamkeit. Vor allem Dioncochinon B (**35**) war aktiv gegen das aggressive B-Zell-Lymphom und das Multiple Myelom, ohne cytotoxisch gegen nicht entartete Zellen zu wirken.



35: Multiples Myelom: INA-6

Aggressives B-Zell-Lymphom: SU-DHL-4

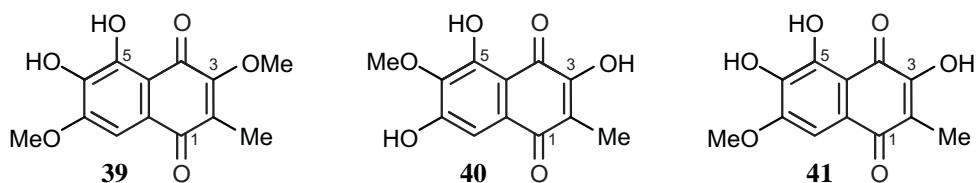
Zytotoxizität

EC₅₀: 11 μM

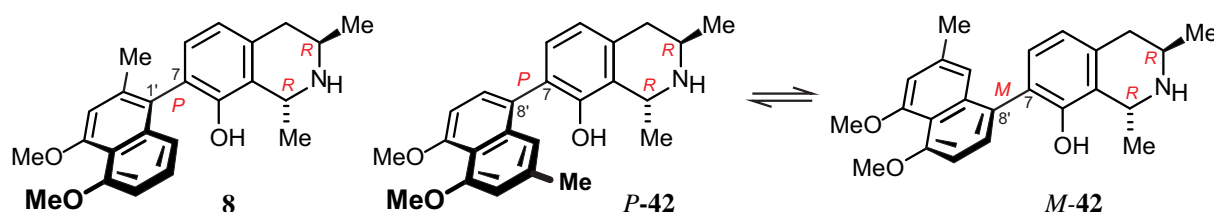
EC₅₀: 7.6 μM

IC₅₀: nicht erreicht

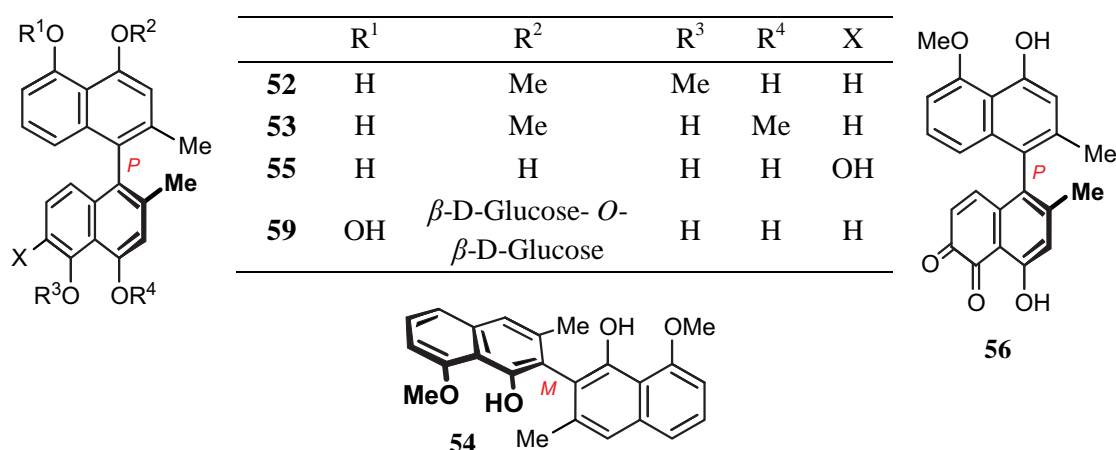
Neben den Dioncochinonen A (**34**) und B (**35**) und dem bereits bekannten 8-Hydroxydroseron (**36**) wurden drei weitere, hoch oxygenierte Naphthochinone aus Kalluskulturen von *T. peltatum* isoliert. Die Dioncochinone C (**39**), D (**40**) und E (**41**) waren ebenfalls neue Naturstoffe, die interessante Bioaktivitäten versprochen.



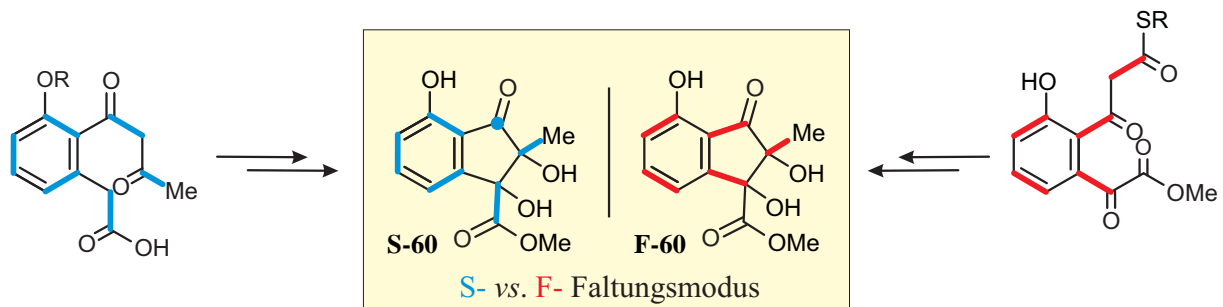
- Nachdem die Struktur des Dioncophyllins D revidiert werden musste, war das nun entdeckte 5'-*O*-Methyldioncophyllin D (**42**) das erste 7,8'-gekoppelte Naphthylisochinolin-Alkaloid, das aus einem Vertreter der Dioncophyllaceae (oder daraus gewonnenen Zellkulturen) isoliert wurde. 5'-*O*-Methyldioncophyllin D (*P*-**42**) und sein Epimer (*M*-**42**), im Chromatogramm repräsentiert durch zwei dicht aufeinander folgenden Peaks, eluierten gemeinsam mit Dioncophyllin A (**8**). Die Trennung der Substanzen war chromatographisch nicht möglich und erst durch Kristallisation zu erreichen. Wie bei allen bisher bekannten 7,8'-gekoppelten Naphthylisochinolinen war die Biarylachse von **42** konfiguratv instabil.



- Aus Wurzelkulturen von *T. peltatum* (von K. Fester am Danforth Plant Science Center, St. Louis, USA, etabliert) wurden neben bekannten Naphthochinonen und einigen Naphthylisochinolin-Alkaloiden eine ganze Reihe bisher unbekannter Naturstoffe, darunter das Naphthalin-Glucoside **59** und die axial-chiralen Binaphthaline **52–55** isoliert. Bislang wurde davon ausgegangen, dass miteinander gekoppelte Naphthaline bei den Dioncophyllaceae und Ancistrocladaceae selten vorkommen.

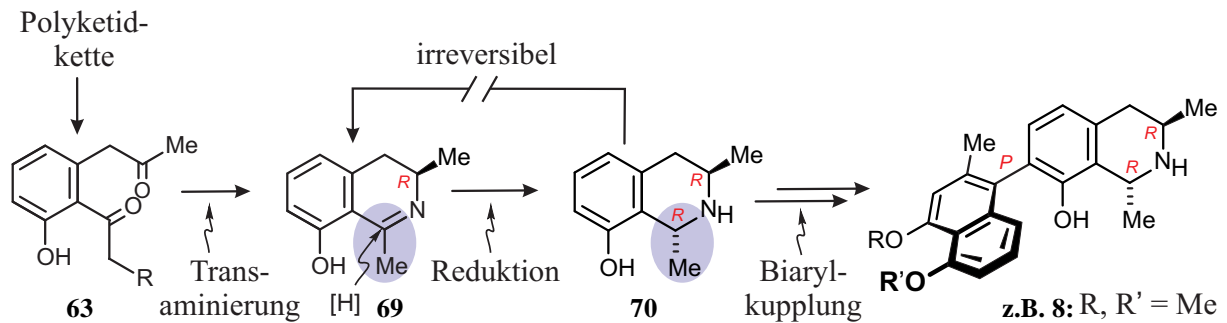


Die biosynthetische Herkunft der ebenso aus den Wurzelkulturen isolierten Indanone **60** und **61** könnten ebenfalls aus dem Polyketid-Biosyntheseweg stammen, der dem F-Modus folgt. Dieser ließ sich chemisch schwer erklären, war aber in gewissem Maße mit dem Biosyntheseweg aller anderen polyketidischen Sekundärmetabolite in Einklang zu bringen. Andererseits ist eine aus chemischer Sicht überzeugender Biosynthese vorstellbar, die eine Ringöffnungs-Reaktion einschließt, aber dem für Pflanzen unerwarteten S-Faltungsmodus folgen würde.

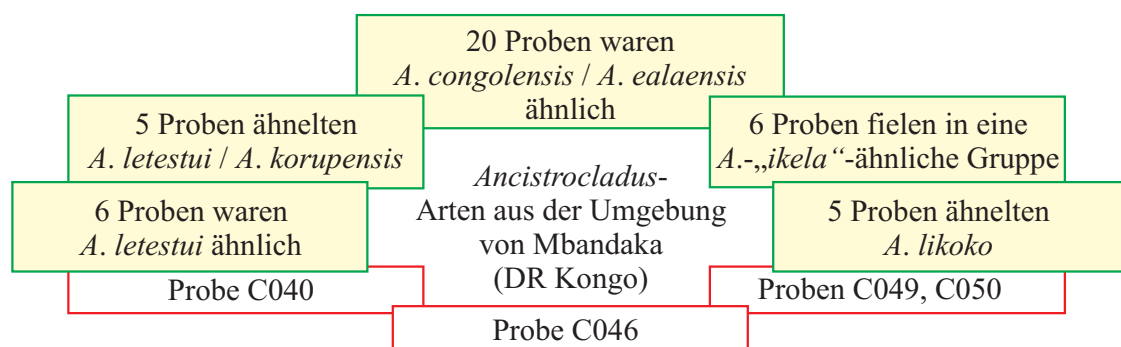


- Fütterungsexperimente mit dem von S. Rüdener und J. Mutanyatte-Comar synthetisch hergestellten $^{13}\text{C}_2$ -markierten Isochinolin-Präkursor [$^{13}\text{C}_2$]-**69** wurden an den Kalluskulturen von *T. peltatum* durchgeführt. Die Analyse der nach der Fütterung isolierten Naphthylisochinolin-Alkaloide Dioncophyllin A (**8**) und Habropetalin A (**27**) zeigten eine Einbaurrate von 4 %. Mit 94 % viel höher war der Markierungsgrad des ebenfalls isolierten *trans*-Tetrahydroisochinolins [$^{13}\text{C}_2$]-**70**. Es musste aus einer effizienten *trans*-stereoselektiven Reduktion aus [$^{13}\text{C}_2$]-**69** hervorgegangen sein, die Markierung wies darauf hin, dass **69** Zugang zu reduktiven Enzymen der Pflanzenzellen hatte. Die unvollständige Markierung zeigte auch, dass **70** ein natürlicher Metabolit war. Die Rolle von **70** im Biosyntheseweg der Naphthylisochinoline wurde durch die Fütterung von [$^{13}\text{C}_2$]-**70** (wiederum in Kooperation mit S. Rüdener) untersucht. Der Markierungsgrad der isolierten Alkaloide, darunter auch das 5'-O-Methyldioncophyllin D (**42**), war mit 8 % doppelt so hoch wie nach dem vorhergehenden Fütterungsexperiment mit [$^{13}\text{C}_2$]-**69**. Sehr wahrscheinlich war **70** das Substrat für das Kupplungsenzyme. Ein Dihydroisochinolin, markiert oder unmarkiert, war nicht nachzuweisen. Die *trans*-selektive Reduktion des **69** erfolgte nicht nur effizient, sondern auch irreversibel und verlief offenbar weitgehend unreguliert, da deutlich mehr **69** zu **70** umgesetzt wurde, als in die Naphthylisochinolin-Biosynthese einging.

Folgende Annahmen zur Naphthylisochinolin-Biosynthese können nun gemacht werden: Durch eine störungsanfällige Transaminierung entsteht aus einem hypothetischen Diketo-Präkursor zunächst das Dihydroisochinolin **69**, das irreversibel, *trans*-stereoselektiv und offenbar sehr effizient zu **70** reduziert wird. Die Enzymunterstützte phenoloxidative Kupplung des Isochinolins mit einem Naphthalin führt dann zu einer Fülle verschiedener Naphthylisochinolin-Alkaloide.

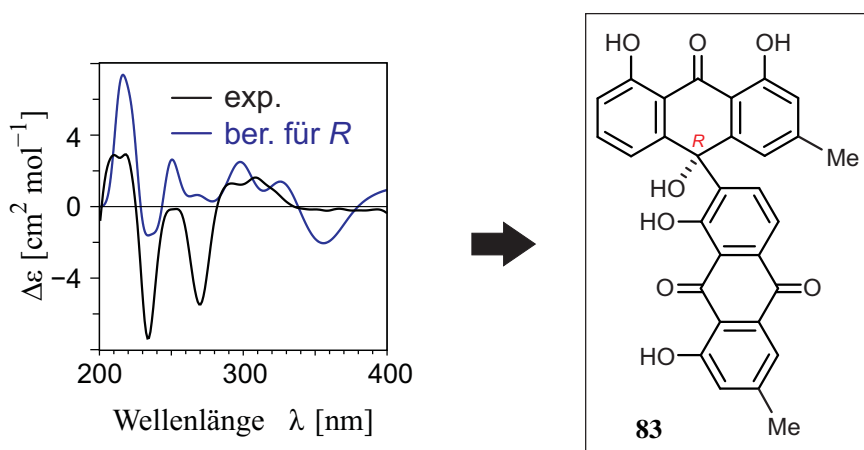


- Für populationsgenetische Untersuchungen der Ancistrocladaceae im Kongo-Becken wurden erstmals gezielt innerhalb eines begrenzten Areals in der DR Kongo Proben von über 50 Individuen der Gattung *Ancistrocladus* gesammelt. F. Turini aus dem AK Heubl (LMU München) untersuchte das Pflanzenmaterial anhand von Mikrosatelliten-DNA-Sequenzen. Vorläufig kann davon ausgegangen werden, dass in dem wenige Quadratkilometer großen Sammlungsgebiet Vertreter aller zentralafrikanischen *Ancistrocladus*-Arten vorkommen. Zusätzlich gab es aber auch Sequenzen, die bislang nicht zugeordnet werden konnten und möglicherweise neue Arten repräsentieren.



- Für die Untersuchung möglicher weiterer konvergenter Biosynthesewege zu Anthrachinonen wurden Zellkulturen von *Aloe saponaria* (aus in sterilem Material) und *Lomatophyllum citreum* (aus keimfrei angezogenen Pflanzen) etabliert. Zehn auf MS-Medium basierende und sich im Phytohormon-Gehalt unterscheidende Nährböden

wurden getestet. Dabei stellte sich ein Medium *AloeIV* als besonders geeignet für die Vermehrung der Kulturen heraus, während *AloeII.4* die Produktion von Anthrachinonen des Aloesaponarintyps (Me an C-1) unterstützte. Obwohl das gewünschte Aloesaponarin II (**14**) nicht gefunden wurde, versprechen Biosynthese-Experimente dennoch interessante Ergebnisse, da die Zellkulturen Aloesaponol I (**79**) produzierten. Die Mutterpflanze der *A.-saponaria*-Kulturen wurde parallel auf das Vorhandensein Aloesaponarin-ähnlicher Verbindungen hin untersucht. Gefunden wurden bereits in der Literatur beschriebene Substanzen, darunter auch das 10,7'-Bischrysophanol (**83**). Dessen Konstitution war lange bekannt. Die Konfiguration am Stereozentrum an C-10 wurde aber erst jetzt durch CD-spektroskopische Untersuchungen in Kombination mit quantenchemischen Berechnungen (durch Y. Hemberger) als *R*-konfiguriert identifiziert.



Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse zur Biosynthese der Naphthylisochinoline erbracht, aber auch Beiträge zum Verständnis der Ökologie und Populationsgenetik der sie produzierenden Pflanzen geleistet. Zudem wurden grundlegende Arbeiten zur Biosynthese-Untersuchung pflanzlicher Anthrachinone geleistet. Weitere Experimente zur Identifizierung des Biosyntheseweges sowohl der Naphthylisochinolin-Alkaloide als auch der Anthrachinone können auf den vorliegenden Ergebnissen aufbauen. Zudem wurden neue Naturstoffe isoliert, deren pharmakologische Wirkung Anlass zu weiterer Forschungsarbeit gibt.

10 Summary

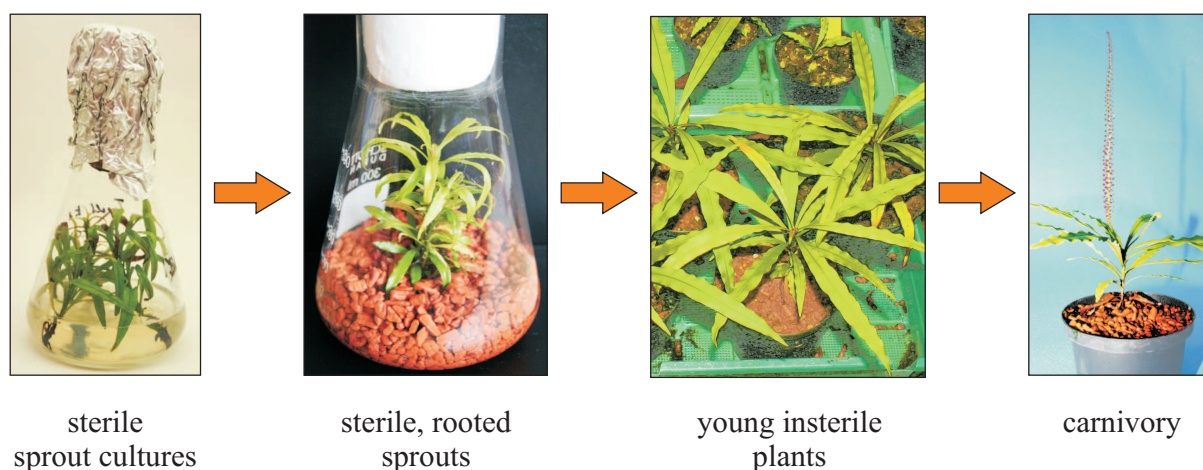
Plants and their secondary metabolites form the basis of traditional medicine. Naphthylisoquinoline alkaloids constitute a new and promising class of natural products from plants. These compounds are interesting because of their pharmacological potential. Nevertheless, they are also fascinating from the chemical point of view. Additionally, the naphthylisoquinolines are produced *via* a polyketidic biosynthetic pathway, in contrast to all other known isoquinolines, which originate from aromatic amino acids.

One goal of the work was the investigation of the biosynthesis of the naphthylisoquinoline alkaloids based on plant cell cultures of *Triphyophyllum peltatum*. In parallel, the secondary metabolites produced by these cell cultures were analyzed. Furthermore, contributions for a better understanding of the biology of *T. peltatum* were adduced and basic work done to investigate population genetics of the genus *Ancistrocladus*.

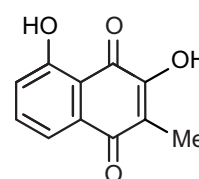
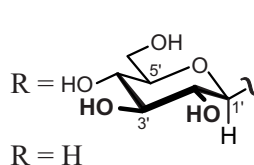
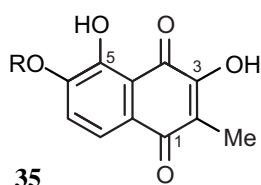
Finally, the groundwork for the investigation on the biosynthetic origin of anthraquinones was made by establishing cell cultures of *Aloe saponaria*.

In detail, the following results were obtained:

- The rooting of aseptic growing sprouts of *T. peltatum* is a difficult process. However, a new procedure to regenerate *Triphyophyllum*-plants from sterile shoot cultures was developed. First, roots were generated on depleting Anderson medium followed by a short period of cultivation in solid substrate under aseptic conditions to stimulate further growth. Vigorously growing young plants were transferred to the greenhouses of the botanical garden of the University of Würzburg, where some of the raised plants developed – otherwise rarely observed – carnivorous organs.



- The analysis of the secondary metabolites of cell cultures of *T. peltatum*, in cooperation with S. Rüdener, led to the discovery of the naphthoquinone glycoside dioncoquinone A (**34**) and its aglycon dioncoquinone B (**35**). Both exhibited promising pharmacological potential. The two naphthoquinones were selectively active against *Leishmania donovani*, the pathogen of visceral leishmaniasis, and showed remarkable anti-carcinogenic properties, especially against the aggressive B-cell lymphoma and the multiple myeloma, without showing cytotoxic effects on normal blood cells.



multiple myeloma: INA-6

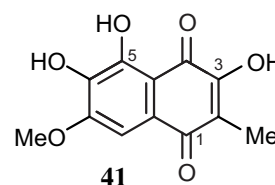
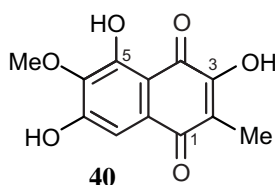
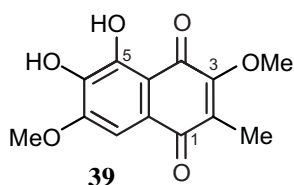
aggressive B-cell lymphoma: SU-DHL-4
cytotoxicity

EC₅₀: 11 μM

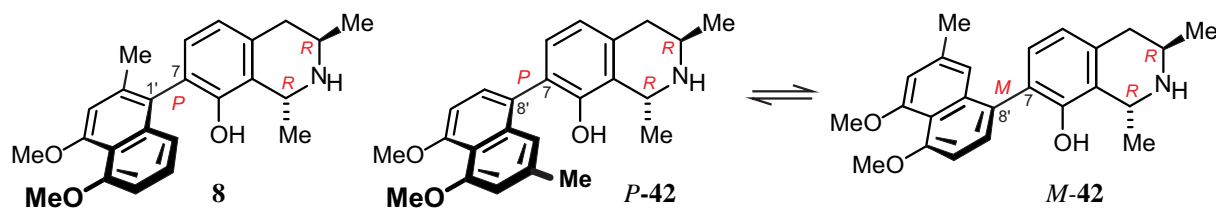
EC₅₀: 7.6 μM

IC₅₀: not reached

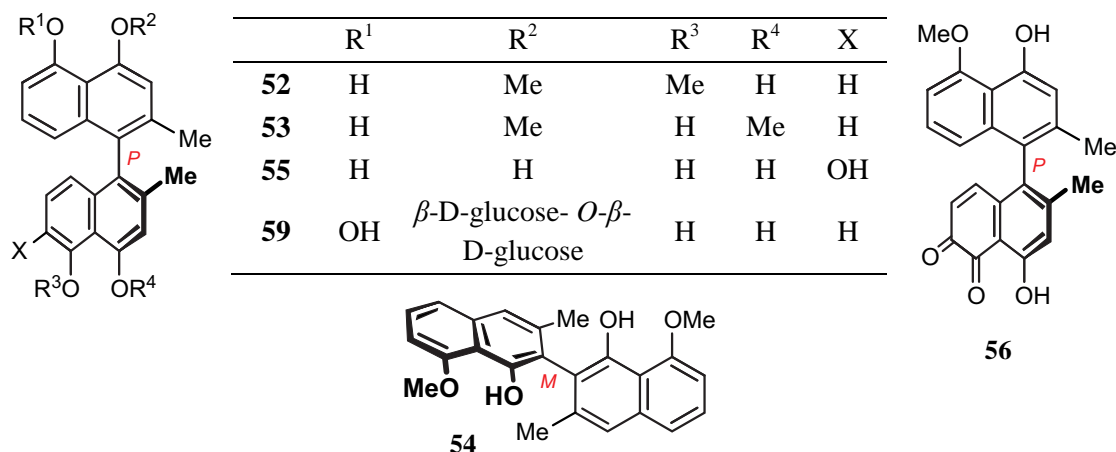
Beside the dioncoquinones A and B (**34** and **35**) and the long-known 8-hydroxy-droserone (**36**), three more highly oxygenated naphthoquinones were isolated from cell cultures of *T. peltatum*. The dioncoquinones C (**39**), D (**40**), and E (**41**) are also new natural products with promising bioactivities.



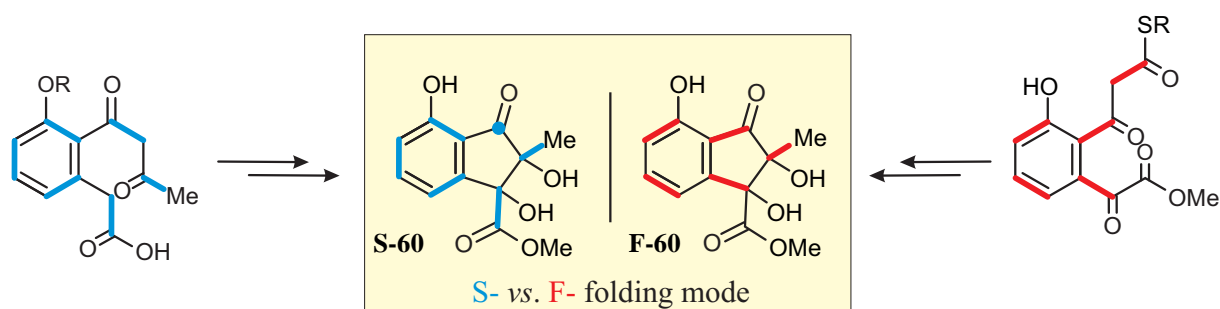
- After the structure of dioncophylline D was revised and identified as dioncophylline B (**24**), the now discovered 5'-*O*-methyldioncophylline D (**42**) was the first genuine 7,8'-coupled naphthylisoquinoline alkaloid isolated from a Dioncophyllaceae plant (or cell cultures thereof). The new compound occurred in the two diastereomeric forms *M*-**42** and *P*-**42**, coeluting with dioncophylline A (**8**). Resolution of these alkaloids, which were not separable chromatographically, succeeded by crystallization. The biaryl axis of **42** was found to be configurationally unstable, comparable to compounds with a similar structure, e.g., dioncophylline D.



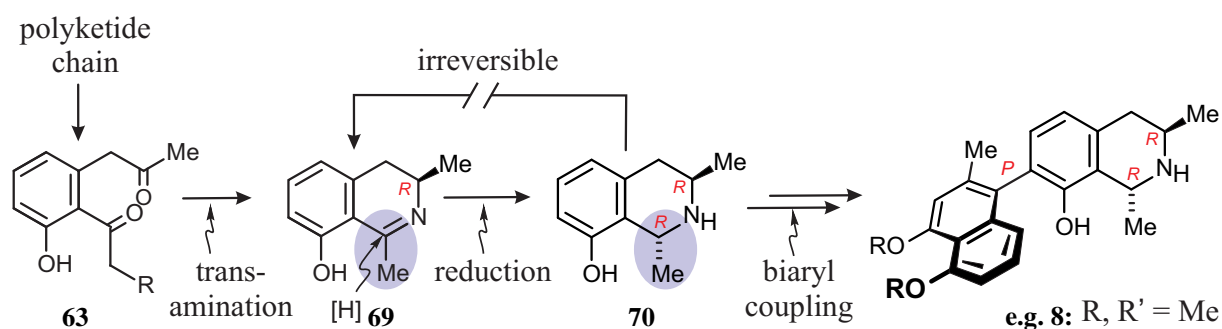
- New natural compounds of a different class of structures were discovered in root cultures of *T. peltatum* (established by K. Fester). Beside known naphthoquinones and naphthylisoquinoline alkaloids, the root cultures produced a variety of naphthalene glycosides (e.g., **59**) and axially chiral binaphthalines (**52** - **55**). It had been assumed that naphthalene dimers are rarely produced in Dioncophyllaceae and Ancistrocladaceae. Now, at least for *T. peltatum*, it has been shown that the binaphthalines were indeed produced in lower quantities than the naphthylisoquinolines, but in a huge structural variety.



The origin of the indanones **60** and **61** also isolated from root cultures of *T. peltatum* was discussed. They could be derived from a polyketidic biosynthesis following the F-mode. Chemically this would be difficult to explain, but the route would have parallels with the biosynthetic pathway of other polyketidic metabolites of *T. peltatum*. On the other hand, a chemically more convincing biosynthesis would include a rarely seen ring cleavage, requiring an S-mode folded polyketide chain, which is highly unexpected in plants.



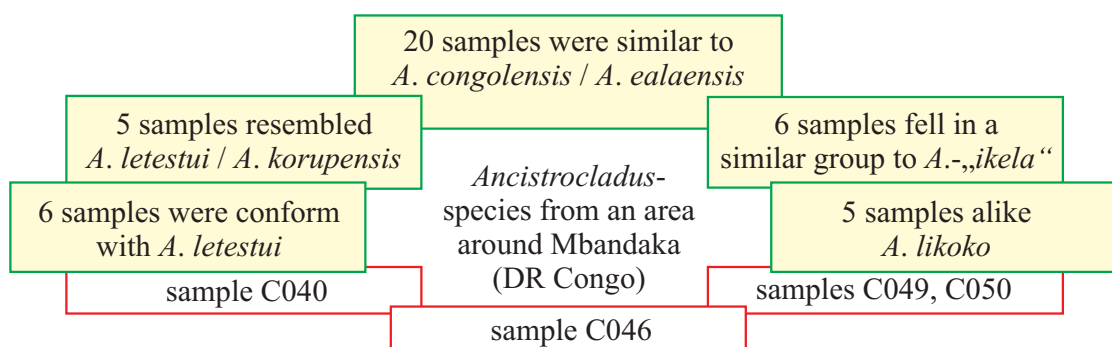
- Feeding experiments with the $^{13}\text{C}_2$ -labelled isoquinoline precursor **69**, performed on callus cultures of *T. peltatum*, exhibited a significant incorporation of 4% into the alkaloids dioncophylline A (**8**) and habropetaline A (**27**). *Trans*-tetrahydroisoquinoline [$^{13}\text{C}_2$]-**70**, which had also been isolated showed a labeling degree of 94%. The results indicated that *trans*-selective acting reductive enzymes of the plant cells accepted the dihydroisoquinoline **69** as a substrate. Since much more **69** was reduced to **70** than necessary for the biosynthesis of the naphthylisoquinolines, the reduction probably ran without major regulation. The labeling degree below 100% demonstrated that **70** is a natural metabolite of the plant cells but also raised the question of its role in the biosynthesis of the naphthylisoquinoline alkaloids. This was investigated by feeding experiments with [$^{13}\text{C}_2$]-**70** (again in cooperation with S. Rüdener). The labeling degree of the now isolated alkaloids, among them the newly discovered 5'-*O*-methyldioncophylline D (**42**), was 8 %, and thus, twofold higher compared to the feeding of [$^{13}\text{C}_2$]-**69**. Certainly, **70** is the direct substrate for the coupling enzyme. A dihydroisoquinoline, labeled or unlabeled, was not found. Consequently, the *trans*-selective reduction had to be irreversible.



The two experiments gave a detailed insight into the biosynthesis of the naphthylisoquinoline alkaloids, especially regarding the isoquinoline moiety: A slow transamination of a hypothetical diketo precursor delivered the dihydroisoquinoline **69**,

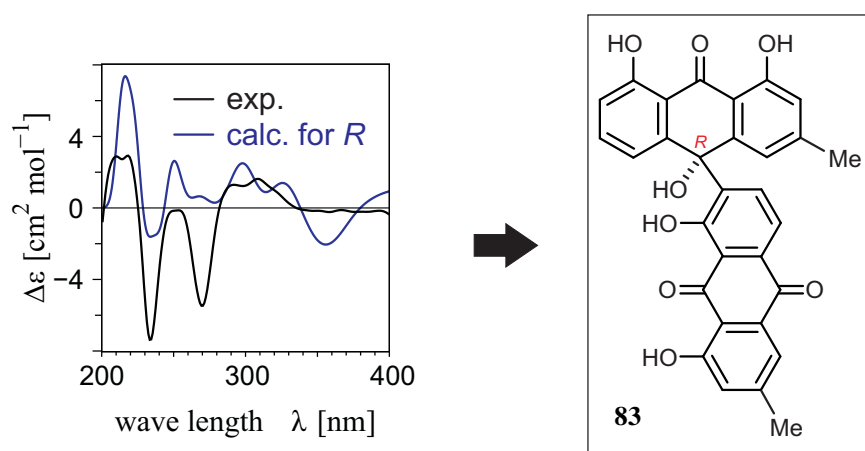
which was immediately reduced to tetrahydroisoquinoline **70**. The formation proceeded in a *trans*-selective, irreversible and nearly unregulated way. The direct enzyme-guided coupling with a naphthalene followed by further modifications resulted in the huge variety of naphthylisoquinoline alkaloids.

- For genetic investigations of populations of the Ancistrocladaceae, samples of more than 50 individuals of the genus *Ancistrocladus* were collected in a small area in the Congo basin. F. Turini (AK Heubl, LMU Munich) analyzed the micro satellite DNA sequences of the plant material. Preliminary results showed that nearly all Central African *Ancistrocladus* species were represented in the few square kilometers of the collecting site. Additionally, some *Ancistrocladus* individuals did not fit into the established system of known micro satellite sequences, perhaps hinting at new, as yet unidentified species.



- Cell cultures of *Aloe saponaria* (from infertile material) and *Lomatophyllum citreum* (from sterile cultivated plants) were established for the investigation of more convergent biosynthetic pathways towards anthraquinones. Ten different culture media, based on MS medium, were tested. It was found that one (*AloeIV*) was efficient for the propagation of the cell cultures and another one (*AloeII.4*) supported the production of aloesaponarin-type anthraquinones (Me at C-1). Thus, a two-step protocol is proposed: first cultivation on *AloeIV* medium and then production of anthraquinones and feeding experiments on *AloeII.4*-medium. The production of aloesaponol I (**79**) in the cell cultures promises interesting biosynthetic results, although the desired aloesaponarin II (**14**) was not found. In parallel, the secondary metabolites of the mother plant of the *Aloe saponaria* cultures were analyzed. Only known compounds were identified, among them 10,7-bischrysophanol (**83**). The constitution of **83** was already well known. CD spectroscopic

investigations in combination with quantum chemical calculations (by Y. Hemberger) now identified the stereocenter at C-10 of **83** to be *R*-configured.



In the course of this thesis, important insight into the biosynthesis the naphthylisoquinoline alkaloids was gained and contributions for the understanding of ecology and population genetics regarding the producing plants were made. Additionally, basic work was done for biosynthetic investigation on anthraquinones of plants. Based on the results further experiments can be performed in order to identify the biosynthetic pathway of naphthylisoquinolines as well as the anthraquinones can. Finally, new, pharmacological active natural products were isolated giving reasons for further scientific investigations.

EXPERIMENTELLER TEIL

11 Allgemeine Methoden

11.1 Verwendete Messgeräte und Apparaturen

Gefriertrocknung: Zur Trocknung wasserhaltiger Proben wurde das Gerät Alpha 1-4 der Fa. *Christ* mit einer Vacuubrand-RD-8-Pumpe der Firma *Brand* verwendet.

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

Homogenisator: Die Zerkleinerung von pflanzlichem Material (z.B. *Aloe*-Wurzeln) wurde mit einem Ultra-TURRAX T25 (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG IKA-Labortechnik, Deutschland) durchgeführt.

Autoklav: Kulturmedien und Geräte für sterile Arbeiten wurden mit einem Variklav 500 E (Fa. *H+P Labortechnik GmbH*, Oberschleißheim) bei 121°C, 20 min sterilisiert.

Schmelzpunkte (Schmp.): Sämtliche Schmelzpunkte wurden an einem Thermovar-Kofler-Heiztisch-Mikroskop der Fa. *Reichert-Jung/Leica Microsystems AG* bestimmt. Die angegebenen Werte sind nicht korrigiert.

Infrarotspektren (IR): Die Aufnahme der Infrarotspektren erfolgte mit einem *Jasco*-FT-410-Spektrometer. Die Wellenzahl ist mit ν bezeichnet. Die Intensitäten der Absorptionsbanden sind gekennzeichnet durch: s = stark, m = mittel, w = schwach und br = breit.

Ultraviolettspektren (UV): Die Messung der UV-Spektren wurde an einem CARY-50-Conc-UV-Vis-Spektrophotometer der Fa. *Varian* in dem jeweils angegebenen Lösungsmittel durchgeführt. Die Wellenlängen (λ) und Intensitäten ($\log \epsilon$) der Absorptionsmaxima sind angegeben.

Kernresonanzspektren (¹H-NMR, ¹³C-NMR): ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur an den Spektrometern AMX 400 und DMX 600 (400/100 und 600/150 MHz) der Fa. *Bruker* aufgenommen. Die chemische Verschiebung der Signale ist in ppm angegeben. Als interner Standard dienten die Resonanzsignale der Restprotonen der verwendeten deuterierten Lösungsmittel bei ¹H-NMR-Spektren [δ (CDCl₃) = 7.26 ppm, δ (Methanol-d₄) = 3.31 ppm, δ (DMSO-d₆) = 2.50 ppm, δ (Aceton-d₆) = 2.05 ppm], oder ihre ¹³C-Resonanzsignale bei ¹³C-NMR-Spektren [δ (CDCl₃) = 77.01 ppm, δ (Methanol-d₄) =

49.15 ppm, δ (DMSO- d_6) = 39.43 ppm, δ (Aceton- d_6) = 29.84 ppm]. Die Auswertung der Spektren erfolgte entweder mit XWIN-NMR- oder der TopSpin-Software (beide Fa. *Bruker*). Die Multiplizität der Signale wird durch folgende Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, sext = Sextett, m = Multiplett. Die Angabe der Kopplungskonstanten J erfolgte in Hertz (Hz). In der Schreibweise nJ gibt n die Anzahl der dazwischen liegenden Bindungen wieder. Beim Vorliegen ${}^{13}\text{C}$ -markierter Verbindungen wurden die Kopplungen durch Angabe von $J_{\text{H,H}}$ und $J_{\text{H,C}}$ entsprechend zugeordnet.

Massenspektren (MS): Elektronenstoß-Massenspektren (EI) und hochauflösende Elektronenstoß-Massenspektren (HREIMS) wurden mit den Spektrometern *Finnigan MAT 8200* und *Finnigan MAT 90* bei einem Ionisationspotenzial von 70 eV aufgenommen. Die in Klammern gesetzten Zahlen geben die Intensität bezogen auf den Basispeak ($I = 100\%$) an. Hochauflösende Elektrospray-Massenspektren (HRESIMS) erhielt man durch Messung an einem *Bruker*-microTOF-Spektrometer.

Drehwerte: Zur Ermittlung der optischen Aktivitäten diente ein P-1020-Polarimeter der Fa. *Jasco*. Bei einer Spaltbreite von 1 mm wurden die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ bei der Natrium-D-Linie ($\lambda = 589$ nm) gemessen. Die Angabe der ermittelten Drehwerte erfolgt in $^\circ$ und die gemessenen Konzentrationen sind in mg mL^{-1} angegeben.

Circulardichroismus (CD): CD-Spektren wurden an einem J-715-Spectropolarimeter (Fa. *Jasco*) aufgenommen und mit der zugehörigen Software verarbeitet. Die Scangeschwindigkeit betrug 200 nm min^{-1} bei einer Bandbreite von 1 nm. Die differentiellen Absorptionskoeffizienten $\Delta\epsilon$ [$\text{cm}^2 \text{ mol}^{-1}$] bei einer bestimmten Wellenlänge λ [nm] wurden im angegebenen Lösungsmittel bestimmt. Das Lösungsmittelspektrum wurde jeweils von den gemessenen Spektren subtrahiert.

11.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Es wurden Kieselgel-DC-Aluminiumfolien 60 F₂₅₄ der Fa. *Merck* verwendet. Zur Detektion der Substanzen wurden die Anregung der Eigenfluoreszenz bei 366 nm, die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm sowie das Färbeverhalten gegenüber verschiedenen Sprühreagenzien [„Methanolische Kaliumhydroxid-Lösung“: Kaliumhydroxid (6 g) in Methanol (94 mL) gelöst; „Ninhydrin-Lösung“: 0.3 g Ninhydrin in

100 mL Butanol und 3 mL Eisessig gelöst; „Dragendorf-Sprühreagenz“: 1 mL Lösung A (0,85 g Bismutoxidnitrat gelöst in 10 mL konz. Essigsäure und 40 mL Wasser), 1 mL Lösung B (8 g Kaliumiodid gelöst in 20 mL Wasser) gemischt, 4 mL konz. Essigsäure zugefügt und mit Wasser auf 20 mL aufgefüllt] oder Ammoniak-Dampf verwendet.

Präparative Dünnschichtchromatographie (PSC): Es wurden 20 x 20 cm PSC-Fertigplatten beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄ (Fa. Merck) mit Konzentrierungszone und den Anforderungen entsprechend mit einer Schichtdicke von 1 oder 2 mm eingesetzt.

Säulenchromatographie (SC) und Säulenfiltration (SF): Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel der Korngröße 0.063 – 0.2 mm oder 0.032 – 0.064 mm der Fa. Merck verwendet. Die Säulen wurden nass befüllt und die Angabe der Fließmittelzusammensetzung erfolgt in Volumenprozent. Weiterhin wurde SephadexTM LH-20 (Fa. GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala) eingesetzt, das man in den jeweiligen Laufmittelzusammensetzungen 24 Stunden quellen ließ. Ein weiteres verwendetes Säulenmaterial für die Kationenaustauscher-Chromatographie war Amberlit[®] 15 der Fa. Aldirch. Das Material wurde vor dem ersten Einsatz 24 Stunden zum Quellen und Spülen in Methanol gegeben. Mit dem so vorbereiteten Säulenmaterial wurde die Säule befüllt. Wenn nichts anderes angegeben wurde, fanden Glassäulen (Füllhöhe 35 cm x Ø 4.5 cm) Verwendung.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC): Das analytisch genutzte HPLC-System bestand aus einer computergesteuerten Anlage der Fa. Jasco (Entgasungseinheit DG-1580, Mischer LG-1580, Pumpe PU-1580, Säulenofen CO-1560, Probenwechsler AS-1555, Diodenarraydetektor MD-1510). Zur Auswertung wurde die Jasco-Borwin- oder Jasco-Chrompass-Software verwendet.

Standardmäßig wurde für die analytische HPLC eine Chromolith[®]-Performance-RP-18-Säule (100 x 4.6 mm) der Fa. Merck eingesetzt. Allgemein wurde der folgende Lösungsmittel-Gradient verwendet: Wasser + 0.05 % TFA (A) und MeCN + 0.05 % TFA (B); Fluss 3 mL min⁻¹; 0 min 10 % B, 5 min 50 % B, 7 min 97 % B, 8 min 97 % B Fluss 5 mL min⁻¹, 8.5 min 10 % B Fluss 5 mL min⁻¹, 9.5 min 10 % B Fluss 5 ml min⁻¹, 10 min 10 % B Fluss 3 mL min⁻¹. Für die präparative Trennung wurde ebenfalls ein HPLC-System der Firma Jasco, bestehend aus zwei Waters-600E-Pumpen PU-2087plus, Mischer, einem Rheodyne-7725i-Injektor und einem Waters-996-Diodenarraydetektor MD-2010plus eingesetzt. Die Steuerung und die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Jasco-Borwin-Software. Die benutzten Lösungsmittelsysteme, Gradienten und Säulen sind in den entsprechenden Kapiteln

angegeben. Andernfalls wurde eine Chromolith SemiPrep-Säule RP-18 (100 x 10 mm, Fa. Merck) mit dem folgende Standard-Gradient eingesetzt: Wasser + 0.05% TFA (A) und MeCN + 0.05% TFA (B); Fluss 10 mL min⁻¹; 0 min 10% B, 10 min 50% B, 12 min 97% B, 14 min 97% B Fluss 12 mL min⁻¹, 15 min 10% B Fluss 12 mL min⁻¹, 17 min 10% B Fluss 12 mL min⁻¹, 10 min 10% B Fluss 10 mL min⁻¹.

HPLC-CD-Kopplung: Das HPLC-System der Fa. Jasco bestand aus einer PU-1580-Pumpe, einem DG-2080-53-Degaser und einem LG-980-02S Gradientenmischer und war weiterhin ausgestattet mit einem Autosampler (AS-2055) sowie einem Diodenarraydetektor (MD-2010plus). Als CD-Detektor wurde ein J-715-Spektralpholarimeter (Jasco) verwendet, das mit einem über ein Motorventil 7010 (Fa. Besta) geschalteten 5-mm-Standard-Flusszelle der Fa. Jasco betrieben wurde. Die Steuerung der gesamten Anlage erfolgte mit der Jasco-Chrompass-Software. Säulen, Lösungsmittel und Gradienten wurden bedarfsgerecht angepasst und sind in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt. Die Messung der Online-Spektren erfolgte im Stopp-Flow-Modus mit drei Wiederholungen im angegebenen Wellenlängen-Bereich, bei einer Scan-Geschwindigkeit von 200 nm min⁻¹, einer Antwortzeit von 0.5 s und einer Bandbreite von 0.5 nm. Das aus diesen Messungen gemittelte Spektrum wurde durch Subtraktion des CD-Spektrums des jeweiligen Lösungsmittels basislinienkorrigiert und geglättet (mit einem Smoothing-Faktor von 5 – 9).

11.3 Chemikalien

Lösungsmittel: Alle verwendeten Lösungsmittel (Methanol, Aceton Dichlormethan, Trichlormethan, Ethylacetat, *n*-Hexan und Petrolether 40-60°C) wurden nach Standard-Methoden^[272] destilliert. Wasser für die HPLC wurde über eine Milli-Q-Anlage der Fa. Millipore gereinigt und entionisiert. Acetonitril und Methanol für die HPLC, UV, CD und Drehwertbestimmung sowie Trifluoressigsäure wurden mit entsprechenden Reinheitsgrad gekauft (Fa. Sigma-Aldrich) und ohne weitere Reinigung verwendet. Für die Zubereitung von Kulturmedien wurde deionisiertes Wasser genutzt.

Sonstige Chemikalien: Die für die Zubereitung der Kulturmedien verwendeten anorganischen Salze wurden (wenn nichts anderes angegeben) bei der Firma Sigma-Aldrich gekauft, die organischen Zusätze (Phytohormone, Vitamine, Gelrite etc.) bezog man von der Firma Carl Roth (Karlsruhe).

11.4 Kulturtechniken

Allgemeine Geräte und Prozesse: Die Arbeiten unter sterilen Bedingungen wurden an einer Laminar-Flow-Bench (Biohazard Laminar Flow Class II, Fa. *UniEquip Laborgerätebau*) durchgeführt. Alle mehrfach verwendeten Geräte (Pinzetten, Skalpell, Schere, Pipetten) wurden während jeder Anwendung mehrfach abgeflammt und in regelmäßigen Abständen autoklaviert. Als Kulturgefäße fanden 100-mL- oder 300-mL-Erlenmeyerkolben Verwendung. Der Verschluss der Kolben erfolgte mit Zellulose-Stopfen (Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg), die zusätzlich mit einer Aluminium-Kappe abgedeckt waren. Die Sterilität wurde wiederum durch Autoklavieren erreicht. Für Kulturen in Petrischalen wurden sterile Einweg-Petrischalen (Ø 9 cm, mit Nocken) der Fa. *Greiner-bio-one* verwendet. In diesem Falle wurden die Medien vor dem Einfüllen in die Petrischalen autoklaviert und die Kulturplatten unter sterilen Bedingungen gegossen. Verschlossen wurden diese Platten mit Parafilm-Streifen.

Temperatur und Licht: Der Kulturraum wurde permanent auf 24 ± 2 °C temperiert. Im Winter wurde dies durch eine Thermostat-geregelte Zusatzheizung gewährleistet. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Beleuchtung der Kulturen mit photosynthetisch aktiver Strahlung (Leuchtstoffröhren) von $51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 14:10 Stunden.

Medien: Alle Medien wurden unter normalen Laborbedingungen zubereitet und anschließend bei 120 °C und 1.5 bar autoklaviert. Die verwendeten Chemikalien waren von analysenreiner Qualität (*pa*). Das demineralisierte Wasser stammte aus der hauseigenen Anlage. Für die *in-vitro*-Kultur kamen veränderte Rezepturen des Murashige & Skoog-Mediums,^[98] aber auch Rhododendron-Medium nach Anderson^[97] sowie eine Abwandlung von Gamborgs B5-Medium^[180] zum Einsatz, jeweils mit 30g L^{-1} Saccharose versetzt. Als Geliemittel diente, wenn nichts anderes angegeben, Gelrite. Der pH-Wert wurde je nach Notwendigkeit mit NaOH oder HCl auf 5.8 eingestellt. Die genaue Zusammensetzung der Kulturmedien ist in den entsprechenden Kapiteln angegeben.

Wurden den Medien thermolabile Zusätze zugefügt, erfolgte dies durch Sterilfiltration der Lösungen durch aseptische Spritzenaufsatz-Einwegfilter ($0.22 \mu\text{m}$ Porengröße, Fa. *Whatman GmbH*, Dassel).

Sterilisation von Pflanzenmaterial: Zur Oberflächensterilisation von pflanzlichen Organen (Blätter und Stängel), wurde 5-proz. NaOCl-Lösung verwendet. Die Lösung wurde aus 12-proz. käuflicher NaOCl-Lösung (Fa. *Roth*, Karlsruhe) jeweils frisch hergestellt. Die

Pflanzenteile wurden zunächst für wenige Sekunden in 70-proz. EtOH getaucht und anschließend sofort in die NaOCl-Lösung überführt. Die Dauer der Behandlung war abhängig von der Robustheit des Pflanzenmaterials, lag aber im Allgemeinen zwischen 5 und 10 min. Die Sterilisations-Lösung entfernte man daraufhin durch mehrmaliges Spülen der Pflanzenteile mit deionisiertem autoklaviertem Wasser. Die ausgeblichenen Schnittstellen der Explantate wurden mit dem Skalpell entfernt. Für sehr feine oder weiche Pflanzenteile wurde auf 1-proz. Benzalkoniumchlorid-Lösung zurückgegriffen. Der Ablauf der Prozedur änderte sich dabei nicht.

12 Kultur und Vermehrung von *T. peltatum*

12.1 Medien

Für die sterile Kultur der *T.-peltatum*-Sprosse kam modifiziertes Anderson-Rhododendron-Medium zum Einsatz (Tabelle 7).^[23,97] Der pH-Wert wurde auf 5.8 eingestellt. Als Geliermittel wurden 2 g L⁻¹ Gelrite[®] zugesetzt.

12.2 Bedingungen der Gewächshauskultur

Die Akklimatisierung und Kultur der Pflanzen erfolgte in einem Vermehrungsbeet. Zu akklimatisierende Pflanzen wurden in Seramis (Mars GmbH, Verden) getopft. Die Topfgröße betrug 9 cm. Nach dreimonatiger Kultur wurde dem Substrat 0.5 g pro Topf Langzeitdünger MannaCote M6 (*Wilhelm Haug GmbH & Co KG*, Ammerbach) zugesetzt. Das tägliche Gießen erfolgte stets mit Regenwasser von oben.

Bei entsprechender Größe der Pflanzen wurde in 11-cm-Töpfe umgetopft. Dabei kam Vulkamineral 0/19 (Fa. *Vulcatec*), ein anorganisches Pflanzsubstrat, zum Einsatz. Auch hier wurde der Langzeitdünger zugegeben.

Die Temperatur im Vermehrungsbeet wurde mittels Bodenheizung konstant bei 25 °C gehalten, die Luftfeuchte betrug zwischen 80 und 90 %. In den Sommermonaten erfolgte keine Zusatzbelichtung, im Winter wurde die Lichtmenge mittels Natriumdampflampen für 12 h konstant bei ca. 340 klx h⁻¹ gehalten.

Tabelle 7. Zusammensetzung des Anderson-Rhododendron-Mediums, wie es für die sterile Kultur von *T.-peltatum*-Sprossen verwendet wurde.

		Anderson-Medium [mg L ⁻¹]
Anorganische Makronährstoffe	KNO ₃	480
	NH ₄ NO ₃	399
	KH ₂ PO ₄	330
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	332
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	180
Eisenquelle	FeSO ₄ 7 H ₂ O	55.7
	Na ₂ EDTA	74.6
Anorganische Mikronährstoffe	KJ	0.83
	MnSO ₄ x H ₂ O	16.9
	H ₃ BO ₃	6.2
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	10.59
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.25
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.025
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0.025
Organische Bestandteile	Nikotinsäure	0.5
	ThiaminHCl	250
	PyridoxolHCl	0.5
	myo-Inositol	100
	Glycin	2
	Saccharose	30000

12.2.1 Pflanzenschutz

Pflanzenschutz mit chemischen Mitteln war nicht nötig. Allgemein wurde der Befall mit Wollläusen durch eine im Gewächshaus etablierte Population von australischen Marienkäfern (*Cryptolaemus montrouzieri*, Fa. Katz) in Grenzen gehalten. Die Jungpflanzen von *T. peltatum* zeigten keinen Befall.

13 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus Kalluskulturen von *T. peltatum*

13.1 Kalluskultur

Für die sterile Kultur der *T.-peltatum*-Kalli kam modifiziertes MS-Medium zum Einsatz, dessen Makronährstoffe auf 1/5 der Originalformulierung reduziert wurden (Tabelle 7).^[23,98] Der pH-Wert wurde mit NaOH oder HCl auf 5.8 eingestellt. Als Geliermittel wurden 3 g L⁻¹ Gelrite[®] zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte in 100-mL-Erlenmeyer-Kolben, das Überführen der Kalli auf frisches Medium geschah alle 4 bis 6 Wochen.

Tabelle 8. Zusammensetzung des abgewandelten Murashige & Skoog-Mediums (MS-Medium), wie es für die sterile Kultur von *T.-peltatum*-Kalli zum Einsatz kam.

		Abgewandeltes MS-Medium [mg L ⁻¹]
Anorganische Makronährstoffe	KNO ₃	380
	NH ₄ NO ₃	330
	KH ₂ PO ₄	34
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	101
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	85
Eisenquelle	FeSO ₄ 7 H ₂ O	27.8
	Na ₂ EDTA	37.3
Anorganische Mikronährstoffe	KI	0.83
	MnSO ₄ x H ₂ O	16.9
	H ₃ BO ₃	6.2
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	10.59
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.25
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.025
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0.025
Organische Bestandteile	Nicotinsäure	0.5
	Thiamin HCl	250
	Pyridoxol HCl	0.5
	myo-Inositol	100
	Glycin	2
Phytohormone	Saccharose	30000
	BAP	2
	NAA	0.5

13.2 Extraktion und Isolierung

Die Kalluskulturen wurden vom Kulturmedium abgesammelt und lyophilisiert. Anschließend wurde das Trockengewicht bestimmt (6.87 g). Das mit Mörser und Pistill gemahlene Kallusmaterial wurde dreimal 24 h lang durch Rühren in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) extrahiert. Nach dem Abfiltrieren wurde entfernte man das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es verblieb ein Rohextrakt von 1.49 g (nach Trocknen an der Hochvakuum-Pumpe). Zur Auftrennung und Isolierung der Metabolite wurde der Extrakt in MeOH aufgenommen und nach Filtration über einen PTFE-Spritzenaufsatz-Filter (0.2 μm) der präparativen HPLC zugeführt. Verwendet wurde eine SymmetryPrep-C18-Säule (7 μm , 19 x 300 mm der Fa. Waters) mit dem folgenden Gradienten: Wasser + 0.05% TFA (A), MeCN + 0.05% TFA (B); Fluss 10 mL min^{-1} ; 0 min 5% B, 30 min 70% B, 35 min 100% B, 40 min 100% B, 41 min 5% B, 46 min 5% B. Im Falle von *T. peltatum* wurden Dioncochinon A (**34**, 18.5 mg) und Dioncochinon B (**35**, 9.6 mg), 8-Hydroxydroseron (**36**, 2.6 mg) und Habropetalin A (**27**, 4.1 mg) als Reinstoffe erhalten.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden 35.2 g Kallusmaterial (Trockenmasse) verwendet, um genügend Pflanzenmaterial für die Isolierung von Minderkomponenten zu haben. Dazu wurde das Material der bereits zuvor beschriebenen Extraktionsmethode unterzogen, die zu 6.6 g Rohextrakt führte. Den Rohextrakt unterzog man der Kationentauscher-Chromatographie an Amberlist[®]15.^[181] Nach Auftragen des Extraktes und kurzer Inkubationszeit (10 min) wurden alle ungeladenen Verbindungen mit Methanol vom Säulenmaterial herunter gewaschen. Die Naphthylisochinolin-haltige Fraktion eluierte man mit einem Säulenvolumen gesättigter NaCl-Lösung (+ 0.5% TFA) und anschließender Methanol-Spülung. Die Fraktion der ungeladenen Substanzen wurde der Säulenchromatographie an Kieselgel unterzogen und durch Anwendung eines Lösungsmittelgradienten (Chloroform, Methanol und Ameisensäure, 1:0:0, 1:0:0.005, 1:0:0.008, 1:0.05:0.008, 1:0.1:0.01, 1:0.15:0.01) in fünf Fraktionen geteilt. Die erste (Plumbagin) und zweite (Droseron) sowie die vierte (Dioncochinon B) und fünfte (Dioncochinon A) enthielten bekannte Naphthochinone. Die dritte Fraktion war angereichert mit Substanzen, die dem UV-Profil entsprechend zur Substanzklasse der Naphthochinone gehören mussten, aber keiner der bekannten Verbindungen zugeordnet werden konnten. Präparative HPLC [Symmetry RP-18 (19 x 300 mm, 7 μm); Wasser (A) / Methanol (B) (jeweils mit 0.05% TFA), 0 min 47% B, 35 min 80% B, 37 min 95% B, 42 min 95% B, 43

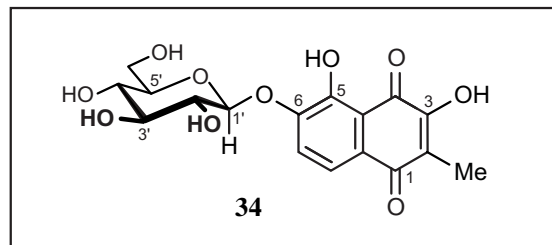
min 47% B, 48 min 47% B;] führte zur Isolierung von 1.6 mg Dioncochinon C (**39**), 1.0 mg Dioncochinon D (**40**) und 0.8 mg Dioncochinon E (**41**).

13.3 Dioncochinon A (**34**)

Gelbe Kristalle (MeOH, 18.5 mg).

Schmp.: 189 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = +67.2$ ($c = 0.05$, DMSO/MeOH 1:1).



UV (MeOH): $\lambda_{\max} = 206$ (1.72), 255 (1.37), 295 (0.75), 413 (0.34) nm.

IR (KBr): $\nu = 3405$ (br, m), 2923 (m), 2853 (w), 1638 (s), 1458 (m), 1365 (w), 1262 (m), 1074 (s), 842 (w), 641 (w) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 1.91$ (s, 3H, 2- CH_3), 3.18 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1 H, 4'-H), 3.29-3.31 (m, 1 H, 5'-H), 3.30-3.32 (m, 1 H, 2'-H), 3.38 (dd, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, 1 H, 3'-H), 3.47 (dd, $^2J = 11.9$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz, 1 H, 6'-H), 3.68 (dd, $^2J = 11.9$ Hz, $^3J = 1.9$ Hz, 1 H, 6'-H), 5.07 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 1 H, 1'-H), 7.43 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 1 H, 7-H), 7.45 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 1 H, 8-H), 10.89 (s, 1 H, 3-OH), 11.42 (s, 1 H, 5-OH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.7$ (2-Me), 60.4 (C-6'), 69.4 (C-4'), 73.0 (C-5'), 76.5 (C-2'), 77.2 (C-3'), 99.8 (C-1'), 114.0 (C-10), 118.8 (C-7), 119.7 (C-8), 120.7 (C-2), 125.0 (C-9), 150.0 (C-6), 150.3 (C-5), 155.1 (C-3), 183.4 (C-4), 184.4 (C-1) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 220.1 [M-Glc] $^+$ (100), 192.1 [$\text{M-Glc-H}_2\text{O}$] $^+$ (24), 163.1 (19), 146.1 (25).

HRMS (ESI) berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_{10}$:	381.0827 [M-H] $^-$;
gemessen:	381.0827 [M-H] $^-$.

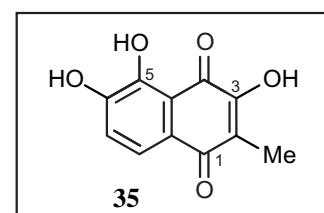
Tabelle 9: NMR-Daten von Dioncochinon A (**34**) in DMSO-d₆.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	COSY (J _{HH} [Hz])
1	184.4			
2	120.7			
3	155.1			
4	183.4			
5	150.3			
6	150.0			
7	118.8	7.43, <i>d</i>	5, 6, 9	8 (8.6)
8	119.7	7.45, <i>d</i>	1, 6, 10	7 (8.6)
9	125.0			
10	114.0			
1'	99.8	5.07, <i>d</i>	6, 2', 3'	2' (7.4)
2'	76.5	3.30-3.32, <i>m</i>	1', 2'	
3'	77.2	3.38, <i>dd</i>	1', 5'	2' (7.6), 5' (1.9)
4'	69.4	3.18, <i>d</i>	2', 3', 6'	5' (8.5)
5'	73.0	3.29-3.31, <i>m</i>	1', 3', 6'	
6'	60.4	α 3.47, <i>dd</i> β 3.68, <i>dd</i>	3', 4' 3', 4'	5' (5.8), 6' β (11.9) 5' (1.9), 6' α (11.9)
2-Me	8.7	1.91 <i>s</i>	1, 2, 3	
3-OH		10.89, <i>s</i>	2, 3, 4	
5-OH		11.42, <i>s</i>	4, 5, 6, 10	

13.4 Dioncochinon B (**35**)

Rote Nadeln (CDCl₃, 9.6 mg).

Schmp.: 218 °C (CDCl₃).



UV (MeOH): λ_{max} = 215 (1.57), 269 (1.12), 317 (0.67), 416 (0.33) nm.

IR (KBr): ν = 3408 (br, m), 2922 (m), 2853 (w), 1618 (s), 1459 (m), 1297 (s), 1209 (w), 1105 (m), 430 (w) cm⁻¹.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.09$ (s, 3 H, 2- CH_3), 6.03 (s, 1 H, 6-OH), 7.02 (s, 1 H, 3-OH), 7.18 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1 H, 7-H), 7.64 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1 H, 8-H), 11.20 (s, 1 H, 5-OH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.9$ (2-Me), 113.4 (C-10), 120.4 (C-7), 121.3 (C-8), 124.3 (C-9), 126.5 (C-2), 142.8 (C-5), 148.0 (C-6), 149.3 (C-3), 184.7 (C-4), 185.0 (C-1) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 220.1 $[\text{M}]^+$ (46), 192.1 $[\text{M-H}_2\text{O}]^+$ (15), 163.1 (13), 146.1 (12).

HRMS (ESI) berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{O}_5$: 219.0299 $[\text{M-H}]^-$;
gemessen: 219.0203 $[\text{M-H}]^-$.

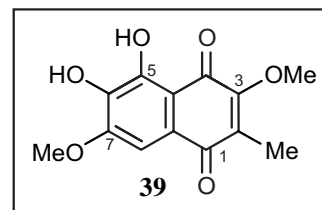
Tabelle 10. NMR-Daten von Dioncochinon B (**35**) in CDCl_3 .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	COSY (J_{HH} [Hz])
1	185.0			
2	126.5			
3	149.3			
4	184.7			
5	142.8			
6	148.0			
7	120.4	7.18, <i>d</i>	5, 6, 9	8 (8.6)
8	121.3	7.64, <i>d</i>	1, 6, 10	7 (8.6)
9	124.3			
10	113.4			
2-Me	8.9	2.09 <i>s</i>	1, 2, 3	
3-OH		7.02, <i>s</i>	2, 3, 4	
5-OH		11.20, <i>s</i>	4, 5, 6, 10	
6-OH		6.03, <i>s</i>		

13.5 Dioncochinon C (39)

Gelber kristalliner Feststoff (MeOH, 1.6 mg).

Schmp.: > 340 °C (MeOH).

UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 270$ (1.96), 300 (1.52), 425 (0.76) nm. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.05$ (s, 3H, 2- CH_3), 4.01 (s, 3H, 7- OCH_3), 4.05 (s, 3H, 3- OCH_3), 7.26 (s, 1H, 8-H), 11.82 (s, 1H, 5-OH) ppm. ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 9.6$ (2- CH_3), 58.0 (7- OCH_3), 61.3 (3- OCH_3), 103.6 (C-8), 110.1 (C-10), 124.4 (C-9), 133.3 (C-2), 138.2 (C-6), 149.2 (C-5), 151.3 (C-7), 157.1 (C-3), 184.4 (C-1), 185.6 (C-4) ppm.MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 264 $[\text{M}]^+$ (43), 247 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (21), 233 $[\text{M}-\text{CH}_3\text{OH}]^+$ (11), 217 (6), 146.1 (10).

HRMS (ESI) berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_6$: 263.0556 $[\text{M}-\text{H}]^-$,
 gemessen: 263.0561 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

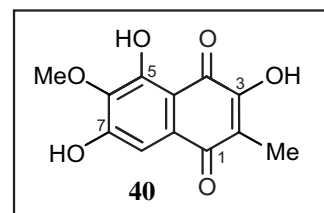
Tabelle 11. NMR-Daten von Dioncochinon C (**39**) in CDCl_3 .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	NOESY
1	184.4			
2	133.3			
3	157.1			
4	185.6			
5	149.2			
6	138.2			
7	151.3			
8	103.6	7.26, s	1, 6	7-OMe
9	124.4			
10	110.1			
2-Me	9.6	2.05, s	1, 3	
3-OMe	61.3	4.05, s	3	
5-OH		11.82, s		
7-OMe	58.0	4.01, s	7	

13.6 Dioncochinon D (40)

Gelber Feststoff (MeOH, 1.0 mg).

Schmp.: > 340 °C (MeOH).

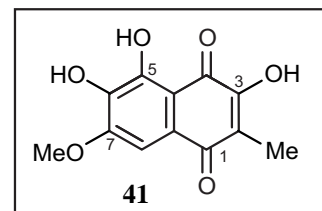
UV (MeOH): λ_{\max} = 250 (2.26), 300 (1.89), 405 (1.48) nm. ^1H NMR (600 MHz, MeOH- d_4): δ = 1.96 (s, 3H, 2-CH₃), 3.91 (s, 3H, 6-OCH₃), 7.09 (s, 1H, 8-H) ppm. ^{13}C NMR (150 MHz, MeOH- d_4): δ = 8.5 (2-CH₃), 61.1 (6-OCH₃), 109.1 (C-10), 110.2 (C-8), 121.2 (C-2), 130.2 (C-9), 139.7 (C-6), 157.0 (C-3), 157.3 (C-5), 158.6 (C-7), 184.9 (C-4), 185.8 (C-1) ppm.MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 259 [M]⁺ (53), 233 [M-H₂O]⁺ (27), 220 (5), 204 (9), 144 (6).HRMS (ESI) berechnet für C₁₂H₉O₆⁻ 249.0399 [M-H]⁻,
gemessen: 249.0404 [M-H]⁻.Tabelle 12. NMR-Daten von Dioncochinon D (**40**) in MeOH- d_4 .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC
1	185.8		
2	121.2		
3	157.0		
4	184.9		
5	157.3		
6	139.7		
7	158.6		
8	110.2	7.09, <i>s</i>	1, 6, 7
9	130.2		
10	109.1		
2-Me	8.5	1.96, <i>s</i>	1, 3
6-OMe	61.1	3.91, <i>s</i>	6

13.7 Dioncochinon E (41)

Gelber Feststoff (MeOH, 0.8 mg).

Schmp.: > 340 °C (MeOH).

UV (MeOH): λ_{\max} = 255 (2.17), 305 (1.78), 425 (1.11) nm. ^1H NMR (600 MHz, MeOH- d_4): δ = 1.97 (s, 3H, 2- CH_3), 3.99 (s, 1H, 7- OCH_3), 7.29 (s, 1H, 8-H) ppm. ^{13}C NMR (150 MHz, MeOH- d_4): δ = 8.6 (2- CH_3), 56.9 (7- OCH_3), 105.1 (C-8), 110.3 (C-10), 121.5 (C-2), 125.5 (C-9), 140.0 (C-6), 151.2 (C-5), 154.0 (C-7), 156.4 (C-3), 185.7 (C-4 or C-1), 185.8 (C-1 or C-4) ppm. ^1H NMR (600 MHz, Aceton- d_6): δ = 1.98 (s, 3H, 2- CH_3), 4.01 (s, 1H, 7- OCH_3), 7.27 (s, 1H, 8-H) ppm. ^{13}C NMR (150 MHz, Aceton- d_6): δ = 8.6 (2- CH_3), 56.8 (7- OCH_3), 104.8 (C-8), 109.8 (C-10), 121.0 (C-2), 125.3 (C-9), 139.4 (C-6), 150.5 (C-5), 153.6 (C-7), 154.8 (C-3), 184.2 (C-1), 185.1 (C-4) ppm.Tabelle 13. NMR-Daten von Dioncochinon D (**41**) in Aceton- d_6 .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	NOESY
1	184.2			
2	121.0			
3	154.8			
4	185.1			
5	150.5			
6	139.4			
7	153.6			
8	104.8	7.27, <i>s</i>	1, 6	7-OMe
9	125.3			
10	109.8			
2-Me	8.6	1.98, <i>s</i>	1, 3	
7-OMe	56.8	4.01, <i>s</i>	7	8

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 250 $[M]^+$ (47), 233 $[M-H_2O]^+$ (23), 220 (7), 204 (5), 144 (9).

HRMS (ESI) berechnet für $C_{12}H_9O_6^-$: 249.0399 $[M-H]^-$;

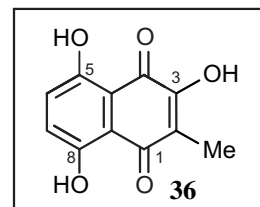
gemessen: 249.0405 $[M-H]^-$.

13.8 8-Hydroxydroseron (36)

Orangefarbene Kristalle ($CDCl_3$, 2.8 mg).

Schmp.: 195 °C ($CDCl_3$);

Lit.^[273] 192-193 °C (Aceton).



UV (MeOH): λ_{max} = 200 (1.51), 215 (0.81), 235 (1.21), 291 (0.52), 497 (0.42), 487 (0.41) nm.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.09 (s, 3 H, 2- CH_3), 7.27 (dd, 1 H, 7-H), 7.16 (dd, 1 H, 6-H), 7.27 (br, s, 1 H, 3-OH), 11.47 (d, 1 H, 5-OH), 12.81 (d, 1H, 8-OH) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.5 (2-Me), 110.4 (C-10), 111.0 (C-9), 121.7 (C-2), 127.7 (C-6), 131.7 (C-7), 154.0 (C-3), 157.3 (C-8), 157.8 (C-5), 182.2 (C-4), 189.1 (C-1) ppm.

HRMS (ESI) berechnet für $C_{11}H_7O_5$: 219.0299 $[M-H]^-$;

gemessen: 219.0230 $[M-H]^-$.

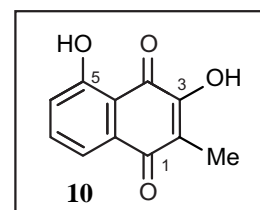
Alle physikalischen und spektroskopischen Daten waren im Einklang mit den in der Literatur angegebenen Werten.^[144,273]

13.9 Droseron (10)

Gelbe, transparente Prismen (MeOH, 11.0 mg).

Schmp.: 178-180 °C (MeOH);

Lit.^[21] 179-181 °C (MeOH).



1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.10 (s, 3 H, 2- CH_3), 7.19 (s, 1 H, 3-OH), 7.19 (dd, 3J = 8.1 Hz, 4J = 1.5 Hz, 1 H, H-8), 7.60-7.67 (m, 2 H, H-6 und H-7), 11.09 (s, 1 H, 5-OH) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.8 (2- CH_3), 117.0 (C-10), 119.7 (C-6), 121.8 (C-2), 123.2 (C-8), 132.7 (C-9), 137.5 (C-7), 152.8 (C-3), 161.2 (C-5), 184.5 (C-4), 190.0 (C-1) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 204.1 $[M]^+$ (100), 176.1 (24), 147.1 (36), 121.1 (29).

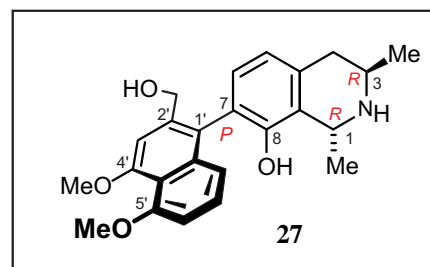
Alle Daten stimmten mit denen in der Literatur überein.^[65145]

13.10 Habropetalin A (27)

Brauner Feststoff (MeOH, 4.1 mg);

Schmp.: 224 °C (MeOH);

Lit.^[114] 225 °C (MeOH).



$[\alpha]_D^{20} = -15.5$ ($c = 0.1$, MeOH).

Lit.^[114] -16.5 ($c = 0.1$, MeOH).

UV (MeOH): $\lambda_{\max} = 233$ (1.21), 304 (0.42) nm.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.52$ (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3 H, 3- CH_3), 1.69 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3 H, 1- CH_3), 2.93 (dd, $^2J = 17.3$ Hz, $^3J = 11.8$ Hz, 1 H, H-4_{eq}), 3.22 (dd, $^2J = 17.7$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, 1 H, H-4_{ax}), 3.92 (s, 3 H, OCH_3), 3.93 (m, 1 H, H-3), 4.00 (s, 3 H, OCH_3), 4.40 (s, 2 H, CH_2OH), 4.90 (m, 1 H, H-1), 6.84 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1 H, H-5), 6.86 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1 H, H-6), 6.91 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, H-6'), 6.96 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, H-8'), 7.19 (dd, $^3J = 8.2$ Hz, $^3J = 8.0$ Hz, 1 H, H-7'), 7.24 (s, 1 H, H-3') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 18.1$ (1- CH_3), 19.4 (3- CH_3), 34.6 (C-4), 45.3 (C-1), 50.0 (C-1), 56.9 (5'- OCH_3), 57.1 (4'- OCH_3), 63.2 (CH_2OH), 107.0 (C-3'), 107.9 (C-6'), 118.7 (C-4'a), 119.8 (C-8'), 121.5 (C-5), 124.8 (C-7), 125.2 (C-1'), 127.8 (C-7'), 132.9 (C-8a), 133.0 (C-6), 138.3 (C-4a), 140.4 (C-8'a), 148.9 (C-2'), 152.6 (C-8), 159.0 (C-4'), 159.2 (C-5') ppm.

HRMS (ESI) berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{NO}_4$: 394.2013 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

gemessen: 394.2013 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Alle physikalischen und spektroskopischen Daten stimmten mit den Angaben in der Literatur überein.^[114]

13.11 Dioncophyllin A (8)

Weißer Feststoff (MeOH, 4.9 mg).

Schmp.: 212 °C (MeOH);

Lit.^[103] 214 °C (CHCl₃).

$[\alpha]_D^{20} = -12.6$ ($c = 0.1$, CHCl₃);

Lit.^[103] -14.9 ($c = 1.0$, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{\max} = 231$ (1.05), 306 (0.31) nm.

IR (KBr): $\nu = 3415$ (br. m), 2951 (m), 2921 (w), 1601 (s), 1452 (m), 1355 (w), 1288 (m), 1261 (w), 1223 (m), 1204 (m), 1132 (m), 811 (w) cm⁻¹.

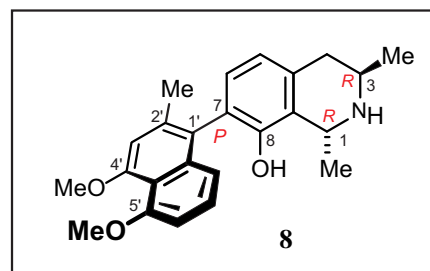
¹H-NMR (400 MHz, MeOH-d₄): $\delta = 1.26$ (d, ³ $J = 6.3$ Hz, 3 H, 3-CH₃), 1.47 (d, ³ $J = 6.7$ Hz, 3 H, 1-CH₃), 2.14 (s, 3 H, 2'-CH₃), 2.57 (dd, ² $J = 116.6$ Hz, ³ $J = 11.1$ Hz, 1 H, 4-H_{eq}), 2.83 (dd, ² $J = 16.6$ Hz, ³ $J = 4.1$ Hz, 1 H, 4-H_{ax}), 3.33-3.42 (m, 1 H, 3-H), 3.89 (s, 3 H, OCH₃), 3.95 (s, 3 H, OCH₃), 4.42 (q, ³ $J = 6.7$ Hz, 1 H, 1-H), 6.71-6.76 (m, 2 H, 5-H und 6'-H), 6.82 (d, ³ $J = 6.9$ Hz, 1 H, 6-H), 6.88 (s, 3 H, 3'-H), 6.89 (dd, ³ $J = 8.3$ Hz, ⁴ $J = 0.9$ Hz, 1 H, 8'-H), 7.16 (dd, ³ $J = 7.7$ Hz, ³ $J = 7.7$ Hz, 1 H, 7'-H) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-d₄): $\delta = 20.5$ (1-CH₃), 20.8 (3-CH₃), 22.3 (2'-CH₃), 36.4 (C-4), 43.0 (C-1), 50.1 (C-1), 56.8 (5'-OCH₃), 56.9 (4'-OCH₃), 107.0 (C-7), 110.0 (C-1'), 110.4 (C-6), 119.9 (C-8'), 121.4 (C-5), 124.8 (C-3'), 126.9 (C-7'), 127.3 (C-6'), 128.1 (C-10), 130.4 (C-9), 135.7 (C-10'), 137.5 (C-9'), 138.6 (C-2'), 152.0 (C-8), 157.8 (C-5'), 158.4 (C-4') ppm.

HRMS (ESI) berechnet für C₂₄H₂₈NO₃: 378.2069 [M+H]⁺;

gemessen: 378.2063 [M+H]⁺.

Alle physikalischen Werten standen im Einklang mit den in der Literatur angegebenen Daten.^[103]

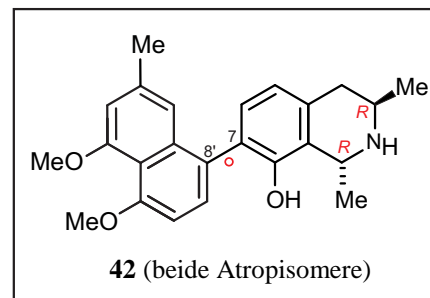


13.12 5-O-Methyldioncophyllin D (42)

Weißer Feststoff (MeOH, 4.5 mg).

Schmp.: 179 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -31.0$ ($c = 0.02$, MeOH).



UV (MeOH) $\lambda_{\max} = 231$ (1.05), 306 (0.31) nm.

IR (ATM): $\nu = 3441$ (br, m), 3128 (w), 3035 (br, m), 2852 (w), 1665 (s), 1589 (m), 1434 (m), 1401 (s), 1263 (m), 1188 (s), 1131 (s), 1093 (s), 836 (m), 799 (s), 752 (w), 721 (s) cm^{-1} .

Atropisomer *M*-**428**:

CD (MeOH): $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon) = 284$ (1.79), 256 (-0.329), 237 (3.11), 2.15 (-1.75), 208 (-0.63).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 1.52$ (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3 H, 3- CH_3), 1.73 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3 H, 1- CH_3), 2.31 (s, 3 H, 2'- CH_3), 2.89 - 2.94 (dd, $^2J = 17.6$ Hz, $^3J = 12.3$ Hz, 1 H, 4- H_{ax}), 3.23 (dd, $^2J = 17.6$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, 1 H, 4- H_{eq}), 3.85-3.98 (m, 1 H, 3-H), 3.92 (s, 3 H, 4- OCH_3), 3.94 (s, 3 H, 5- OCH_3), 4.83 (q, $^3J = 6.8$ Hz, 1 H, 1-H), 6.80 (s, 1 H, 1'-H), 6.80 (s, 1 H, 3'-H), 6.84 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1 H, 5-H), 6.92 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, 6'-H), 7.06 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1 H, 6-H), 7.21 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, 7'-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 18.0$ (1- CH_3), 19.3 (3- CH_3)¹⁾, 22.05 (2'- CH_3), 34.4 (C-4)¹⁾, 45.2 (C-3), 49.89 (C-1), 56.7 (5- OCH_3), 56.9 (4- OCH_3), 106.6 (C-6'), 109.92 (C-3'), 117.4 (C-10'), 118.88 (C-1'), 121.98 (C-9), 121.99 (C-5), 127.5 (C-8')¹⁾, 127.7 (C-7), 130.2 (C-7'), 132.30 (C-10), 132.6 (C-6')¹⁾, 137.3 (C-9'), 137.8 (C-2'), 152.1 (C-8), 158.6 (C-4'), 158.7 (C-5')¹⁾ ppm.

Atropisomer *P*-**42**:

CD (MeOH): $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon) = 281$ (0.99), 252 (-1.50), 234 (-3.65), 205 (-2.36).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 1.52$ (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3 H, 3- CH_3), 1.68 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3 H, 1- CH_3), 2.28 (s, 3 H, 2'- CH_3), 2.89 - 2.94 (dd, $^2J = 17.6$ Hz, $^3J = 12.3$ Hz, 1 H, 4- H_{ax}), 3.23 (dd, $^2J = 17.6$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, 1 H, 4- H_{eq}), 3.85-3.98 (m, 1 H, 3-H), 3.91 (s, 3 H, 4- OCH_3), 3.95 (s, 3 H, 5- OCH_3), 4.88 (q, $^3J = 6.8$ Hz, 1 H, 1-H), 6.76 (s, 1 H, 1'-H), 6.79 (s, 1 H, 3'-H),

¹⁾ Wegen zu geringer Auflösung der HSQC- und HMBC-Spektren konnten die Daten der beiden Isomere nicht getrennt zugeordnet werden.

6.85 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, 5-H), 6.93 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, 6'-H), 7.05 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1 H, 6-H), 7.23 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, 7'-H) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 18.0$ (1- CH_3), 19.3 (3- CH_3)²⁾, 22.02 (2'- CH_3), 34.4 (C-4)²⁾, 45.1 (C-3), 49.91 (C-1), 56.7 (5- OCH_3), 56.9 (4- OCH_3), 106.6 (C-6'), 109.90 (C-3'), 117.4 (C-10'), 118.77 (C-1'), 121.95 (C-5), 127.5 (C-8')²⁾, 127.6 (C-7), 130.2 (C-7'), 132.32 (C-10), 132.6 (C-6)²⁾, 137.7 (C-2'), 152.2 (C-8), 158.6 (C-4'), 158.7 (C-5')²⁾ ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 377 $[\text{M}]^+$ (34), 376 (69), 362 $[\text{M-Me}]^+$ (100), 346 $[\text{M-OMe}]^+$ (10), 334 (16), 307 (7), 245 (5), 202 (10), 181 (12).

HRMS (ESI) berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{NO}_3$:	378.2069 $[\text{M+H}]^+$,
gemessen:	378.2063 $[\text{M+H}]^+$.

²⁾ Wegen zu geringer Auflösung der HSQC- und HMBC-Spektren konnten die Daten der beiden Isomere nicht getrennt zugeordnet werden.

Tabelle 14. NMR-Daten von *M-42* in MeOH-*d*₄.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	COSY (<i>J</i> _{HH} [Hz])	NOESY
1	49.9	4.83, <i>q</i>	1-Me, 3, 10,	1-Me (6.8)	
2					
3	45.2	3.85-3.98, <i>m</i>	3-Me, 4	4 _{ax}	
4 _{ax}	34.4	2.89 - 2.94, <i>dd</i> ,	3-Me, 3, 9, 10	3 (12.3), 4 _{eq} (17.6)	5
4 _{eq}		3.23, <i>dd</i>	3, 5, 9	3 (4.8), 4 _{ax} (17.6)	5
5	121.99	6.84, <i>d</i>	4, 7, 9	6 (7.7)	
6	132.6	7.06, <i>d</i>	8, 9, 10	5 (7.7)	
7	127.7				
8	152.1				
9	121.98				
10	132.30				
1'	118.88	6.80, <i>s</i>	2'-Me, 8', 10'		6, 2'-Me, 1-Me ³⁾
2'	137.8				
3'	109.92	6.80, <i>s</i>	2'-Me, 1', 4, 10		2'-Me, 4'-OMe
4'	158.6				
5'	158.7				
6'	106.6	6.92, <i>d</i>	5, 8, 10	7' (7.9)	5'-OMe
7'	130.2	7.21, <i>d</i>	7, 5', 6'	6' (7.9)	6
8'	127.5				
9'	137.3				
10'	117.4				
1-Me	18.0	1.73, <i>d</i>	1, 9	1	3, 1'
3-Me	19.3	1.52, <i>d</i>	3, 4, 10	3	
2'-Me	22.05	2.31, <i>s</i>	1', 2', 3'		1', 3'
4'-OMe	56.9	3.91, <i>s</i>	3', 4'		3'
5'-OMe	56.7	3.94, <i>s</i>	5', 6'		6'

³⁾ nur bei *M-42*.

13.13 Extraktion und Isolierung von Sekundärmetaboliten aus *Nepenthes*-Arten

Aus dem botanischen Garten der Universität Würzburg wurde frisches Pflanzenmaterial (Sprosse mit Blättern) von *Nepenthes alata*, *N. intermedia* und *N. khashiama* bezogen. Die Extraktion des zuvor luftgetrockneten und pulverisierten Materials erfolgte mit dem standardmäßig verwendeten Methanol/Dichlormethan-Gemisch (1:1), dem 0.01 vol% HCl_{konz} zugesetzt wurde, um die Löslichkeit hochgradig hydroxylierter Naphthochinone zu erhöhen. Der Rohextrakt wurde am Rotations evaporator vom Lösungsmittel befreit und anschließend in MeOH aufgenommen und der HPLC-Analyse (Chromolith-RP18-Säule mit Standardgradient) unterzogen. Die drei Pflanzenextrakte verursachten besaßen identische Chromatogramme, die sich lediglich in der Konzentration der drei Hauptmetabolite unterschieden. Daher wurde mit dem Extrakt von *N. alata* weitergearbeitet. Hier war der Gehalt an Sekundärmetaboliten am höchsten. Auf Grund des andersartigen UV-Spektrums der Metabolite konnte es sich nicht um Naphthochinone handeln. Selbst das üblicherweise erfolgreiche Ausschütteln der Rohextrakte mit alkalischen wässrigen Lösungen führt zu keiner Anreicherung von Naphthochinonen, konzentrierte allerdings die drei Hauptmetabolite in der wässrigen (5-proz.) NaHCO_3 -Phase. Nach dem Neutralisieren der NaHCO_3 -Fraktion mit HCl_{konz} und der Extraktion mit EtOAc wurde die organische Phase zur Trockne eingedunstet und der Rückstand der Säulenchromatographie mit Sephadex LH-20 unterzogen (mobile Phase: Methanol). Dies führte zur Isolierung der bekannten, für *Nepenthes* aber bislang nicht beschriebenen Flavonoide Miquelianin (**48**), Quercitrin (**49**) und Kaempferol-3-*O*- α -L-Rhamnopyranosid (**50**).

13.14 Quercetin-3-*O*- β -D-Glucuronid – Miquelianin (**48**)

Gelbes amorphes Pulver (MeOH, 22.4 mg)

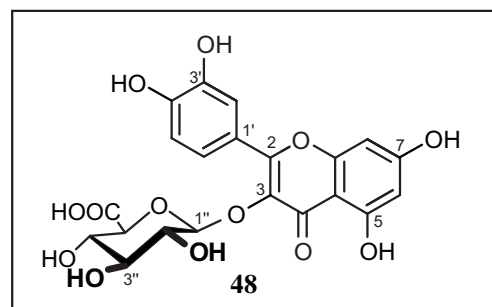
Schmp.: 158 °C (MeOH);

Lit.^[174] 190-192 °C.

$[\alpha]_D^{20} = -90.3$ ($c = 0.92$, MeOH),

Lit.^[176] -24.3 (MeOH).

UV(MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 203$ (4.09), 258 (1.35), 360 (1.08) nm.



^1H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 3.3 (m, 2H, 3'', 5''-H), 3.4 (m, 1H, 2''-H), 3.58 (m, 1H, 4''-H)⁴⁾, 5.50 (d, 3J = 7.3 Hz, 1H, 1''-H), 6.22 (d, 4J = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 6.43 (d, 4J = 2.0 Hz, 1H, 8-H), 6.84 (d, 3J = 8.4 Hz, 1H, 5'-H), 7.53 (d, 4J = 2.1 Hz, 1H, 2'-H), 7.61 (dd, 3J = 8.4 Hz, 4J = 2.1 Hz, 1H, 6'-H), 9.26 (s, 1H), 9.81 (s, 1H), 10.97 (s, 1H), 12.56 (s, 1H, 5-OH) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 71.4 (C-2''), 73.8 (C-3''), 76.0 (C-5''), 76.1 (C-4''), 93.7 (C-8), 98.8 (C-6), 101.1 (C-1''), 103.9 (C-10), 115.3 (C-5'), 116.0 (C-2'), 120.9 (C-1'), 121.8 (C-6'), 133.1 (C-3), 145.0 (C-3'), 148.7 (C-4'), 156.2 (C-2 or 9), 156.3 (C-9 or 2), 161.2 (C-5), 164.3 (C-7), 169.8 (C-6''), 177.2 (C-4) ppm.

HRMS (ESI) berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{Na}_2\text{O}_{13}$: 523.0465 $[\text{M}+\text{Na}_2]^+$,
gemessen 523.0465 $[\text{M}+\text{Na}_2]^+$.

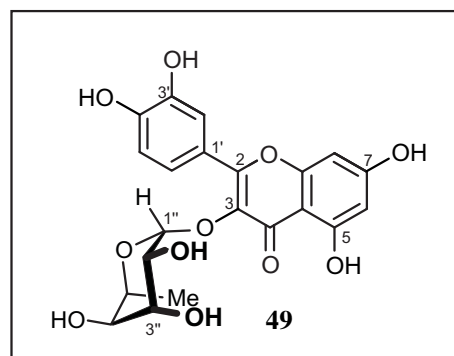
Die Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten gut überein.^[176]

13.15 Quercetin-3-O- α -L-Rhamnopyranosid - Quercitrin (49)

Gelbes amorphes Pulver (MeOH, 7.0 mg).

Schmp.: 166 °C (MeOH);

Lit.^[274] 175 -177 °C.



UV (MeOH): λ_{max} = 203 (1.56), 256 (0.70), 354 (0.52) nm.

$[\alpha]_D^{20}$ = -258.1 (c = 0.50, CH_3OH);

Lit.^[274] -144,95.

^1H NMR (400 MHz, MeOH-d_4): δ = 0.94 (d, 3J = 6.0 Hz, 3H, 6''-H), 3.34 (m, 1H, 4''-H), 3.41 (m, 1H, 5''-H), 3.75 (dd, 3J = 9.3, 4J = 3.4 Hz, 1H, 3''-H), 4.22 (dd, 4J = 3.5, 1.8 Hz, 1H, 2''-H), 5.35 (d, 3J = 1.6 Hz, 1H, 1''-H), 6.20 (d, 4J = 2.1 Hz, 1H, 6-H), 6.37 (d, 4J = 2.1 Hz, 1H, 8-H), 6.91 (d, 3J = 8.4 Hz, 1H, 5'-H), 7.30 (dd, 3J = 8.0, 4J = 2.1 Hz, 1H, 6'-H), 7.32 (d, 4J = 2.1 Hz, 1H, 2'-H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, MeOH-d_4): δ = 17.8 (C-6''), 72.1 (C-2''), 72.2 (C-5''), 72.3 (C-3''), 73.4 (C-4''), 94.9 (C-8), 100.0 (C-6), 103.7 (C-1''), 106.1 (C-10), 116.5 (C-5'), 117.1 (C-2'), 123.0

⁴⁾ von anderen Signalen überlagert

(C-6'), 123.1 (C-1'), 136.4 (C-3), 146.6 (C-3'), 150.0 (C-4'), 158.7 (C-9), 159.5 (C-2), 163.4 (C-5), 166.0 (C-7), 179.8 (C-4) ppm.

HRMS (ESI) berechnet für $C_{21}H_{20}NaO_{11}$: 471.0898 $[M+Na]^+$,
gemessen: 471.0903 $[M+Na]^+$.

Die ermittelten Daten stimmten mit denen in der Literatur gut überein.^[274]

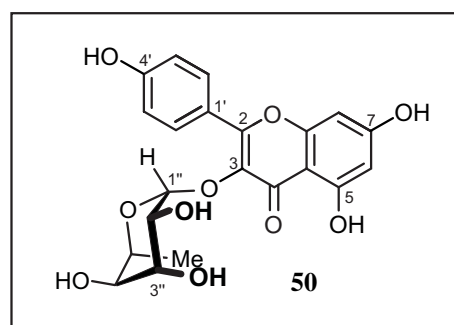
13.16 Kaempferol-3-O- α -L-Rhamnopyranosid (50)

Gelbes amorphes Pulver (MeOH, 3.2 mg).

Schmp.: 168 °C (MeOH);

Lit^[175] 164-166 °C.

UV (MeOH): λ_{max} = 203 (1.34), 267 (0.31), 347 (0.09)
nm.



1H NMR (600 MHz, MeOH- d_4): δ = 0.92 (d, 3J = 5.8 Hz, 3H, 6''-H), 3.3 (m, 2H, 4'', 5''-H), 3.7 (m, 1H, 3''-H), 4.22 (dd, 4J = 3.2 Hz, 4J = 1.6 Hz, 1H, 2''-H), 5.37 (d, 3J = 6.8 Hz, 4J = 1.8 Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.77 (dd, 3J = 6.8 Hz, 4J = 1.8 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, MeOH- d_4): δ = 72.1 (C-2''), 17.8 (C-6''), 72.2 (C-5''), 72.3 (C-3''), 73.3 (C-4''), 94.9 (C-8), 100.0 (C-6), 103.7 (C-1''), 106.1 (C-10), 116.7 (C-2', C-6'), 122.8 (C-1'), 132.1 (C-3', C-5'), 136.4 (C-3), 158.7 (C-9), 161.8 (C-4'), 159.5 (C-2), 163.4 (C-5), 166.1 (C-7), 179.8 (C-4) ppm.

HRMS (ESI) berechnet für $C_{21}H_{20}NaO_{11}$: 471.0903 $[M+Na]^+$,
gemessen: 471.0897 $[M+Na]^+$.

Die ermittelten Daten stimmten mit denen in der Literatur gut überein.^[176,274]

14 Sekundärmetabolite aus Wurzelkulturen von *Triphyophyllum peltatum*

14.1 Wurzelkulturen von *Triphyophyllum peltatum*

Unter der Leitung von Frau Dr. K. Fester wurden am Danforth Plant Science Centre in St. Louise Wurzelkulturen von *T. peltatum* in Flüssigmedium etabliert. Das Ausgangsmaterial waren Organkulturen aus Würzburg, die für gemeinsame Biosynthese-Untersuchungen überlassen wurden. Verwendung fand Gamborgs B5-Medium,^[180] das mit Saccharose, Casein-Hydrolysat und NAA komplettiert wurde (Tabelle 15).

Für die Regeneration der Wurzeln auf festem Kulturmedium wurden der Rezeptur 3 g L⁻¹ Gelrite® als Geliermittel zugesetzt. Der pH-Wert wurde auf 5.6 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium in sterile Petrischalen gegossen.

Die Kulturen wurden bei 24 °C unter ständigem Schütteln (130 upm) ohne Licht in 300-mL-Erlenmeyerkolben kultiviert und regelmäßig alle vier Wochen mit neuem Kulturmedium versorgt. Die verwendete Menge an Kulturmedium richtete sich nach der Biomasse. Diese sollte im Stillstand zu ca. 2/3 von Flüssigkeit bedeckt sein. Im Allgemeinen entsprach dies ca. 80 – 100 mL Flüssigmedium. War die Wurzelmasse zu groß geworden, wurde sie auf zwei sterile Kolben aufgeteilt.

14.2 Extraktion des Wurzelmaterials und Isolierung der Sekundärmetabolite

Für die phytochemischen Untersuchungen wurden die Wurzeln lyophilisiert und zerkleinert. Es ergaben sich 9.2 g (Trockengewicht) Pflanzenmaterial. In CH₂Cl₂/MeOH (1:1) erfolgte eine erschöpfende Extraktion. Die Filtrate der Extraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der so gewonnene Rohextrakt (2.65 g) wurde für die weiteren Arbeiten in Methanol aufgenommen und zunächst einer ersten HPLC-Analyse unterzogen.

Das komplexe Chromatogramm machte deutlich, dass eine Vorfraktionierung ratsam und für die zu verwendenden HPLC-Säulen (präparative HPLC) schonender war. Die Kationentauscher-Chromatographie entfernte zunächst die Naphthylisochinolin-Alkaloide. Als Säulenmaterial fand Amberlyst® 15 (*Fluka*) Verwendung (Säule: d ca. 8 cm, 25 cm Füllhöhe), das nach Beladung mit der Hälfte des Rohextraktes ca. 10 min Einwirkzeit erhielt.^[181] Anschließend wusch man die Säule mit 2 bis 3 Säulenvolumen Methanol. Diese Fraktion enthielt vor allem Naphthochinone oder Naphthaline.

Tabelle 15. Zusammensetzung des abgewandelten Gamborg B5-Mediums (B5C2).

		Gamborg B5C2 [mg L ⁻¹]
Anorganische Makronährstoffe	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	195
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	150
	(NH ₄) ₂ SO ₄	134
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	250
	KNO ₃	2500
Eisenquelle	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	25.6
	Na ₂ EDTA	38
Anorganische Mikronährstoffe	KJ	0.75
	MnSO ₄ x H ₂ O	10
	H ₃ BO ₃	3
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	3
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.25
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.25
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0.25
Organische Bestandteile	Nikotinsäure	1
	ThiaminHCl	10
	PyridoxolHCl	1
	<i>myo</i> -Inositol	100
	Casein-Hydrolysat	1000
	Saccharose	20000
Phytohormon	NAA	0.2

Das Eluieren der Naphthylisochinolin-Alkaloide vom Ionentauscher-Material geschah mit ca. 1- bis 1.5-fachem Säulenvolumen gesättigter NaCl-Lösung (+ 0.5% TFA). Anschließend wurde erneut mit 2 bis 3 Volumen Methanol gespült, um alle Substanzen aus der Säule herauszuwaschen (das Säulenmaterial konnte daraufhin für weitere Anwendungen regeneriert werden). Diese methanolhaltige Fraktion wurde zunächst separat aufgefangen, das Methanol im Vakuum weitestgehend entfernt und der verbleibende Wasserrest mit der NaCl-Fraktion vereinigt. Das Ausschütteln gegen Dichlormethan führte dazu, dass alle Naphthylisochinoline sich in der organischen Phase befanden. Auch diese Fraktion wurde zur Trockne eingengt.

Für die „nicht-Kationen“-haltige (also die erste gewonnene) Fraktion schien eine weitere Unterteilung sinnvoll. Sehr unpolare Substanzen wurden durch das Waschen mit *n*-Hexan entfernt. Mäßig polare Metabolite fanden sich nach dem Ausschütteln der verbleibenden wasserhaltigen Phase im CH₂Cl₂ (Fraktion CHCl₂), so dass die wässrige Phase (Fraktion H₂O) nun nur noch polare Substanzen enthielt. Die Hexan-Phase enthielt große Mengen

Naphthochinone, vor allem Droseron (**10**) und Plumbagin (**9**). Um **9** und **10** zu entfernen, wurde die Hexan-Fraktion (HxA) gegen alkalisches Wasser (pH 8) ausgeschüttelt (HxC). Die Wasser-Phase wurde daraufhin neutralisiert und mit CH₂Cl₂ re-extrahiert (HxB). Die ursprüngliche Hexan-Fraktion wurde also in drei Unterfraktionen (A, B und C) geteilt.

Zur weiteren Aufreinigung und Isolierung der Substanzen musste nun die präparative HPLC genutzt werden. Zum Einsatz kam die Chromolith-SemiPrep-Säule RP-18e (100 x 10 mm, Fa. Merck) mit den in Tabelle 2 aufgeführten, an die Fraktionen angepassten Gradienten (Wasser + 0.05 % TFA (A) und MeCN + 0.05% TFA (B); Fluss 10 mL min⁻¹).

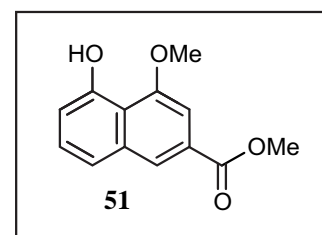
Tabelle 16. Für die Isolierungsarbeiten aus *T.-peltatum*-Wurzelkulturen verwendete Gradienten.

Fraktionen	Zeit und Anteil (%B)					
	0 min	10 min	16 min	18 min	19 min	25 min
H ₂ O	5%	40%	100%	100%	5%	5%
CH ₂ Cl ₂	10%	70%	100%	100%	10%	10%
Hexan-A	30%	70%	100%	100%	30%	30%
Hexan-B	30%	65%	100%	100%	30%	30%
Hexan-C	0%	25%	100%	100%	0%	0%

14.3 4-Methoxy-5-hydroxy-2-napthoesäuremethylester (**51**)

Hellbrauner Feststoff (MeOH, 6.8 mg).

Schmp.: 81 °C (MeOH);



UV (MeCN): λ_{\max} = 215 (1.62), 243 (2.01), 299 (0.31), 359 (0.38) nm.

IR (ATM): ν = 3410 (br, m), 3019 (m), 2497 (w), 2368 (w), 2158 (m), 2028 (m), 1716 (s), 1612 (m), 1585 (m), 1511 (w), 1455 (m), 1432 (m), 1395 (m), 1369 (m), 1317 (s), 1249 (s), 1223 (s), 1130 (w), 1107 (s), 1078 (s), 999 (m), 970 (m), 899 (w), 871 (w), 854 (w), 802 (w), 759 (s), 700 (m), 667 (m), 629 (w), 619 (w), 608 (w) cm⁻¹.

¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ = 3.85 (s, 3 H, Me-Ester), 4.02 (s, 3 H, 4-OCH₃), 6.82 (d, ³J = 5.9 Hz, 6-H), 7.27 (s, 1 H, 3-H), 7.31 (d, ³J = 6.31 Hz, 8-H), 7.32 (d, ³J = 3.14 Hz, 7-H), 8.05 (s, 1 H, 1-H) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, MeOH- d_4): δ = 54.4 (Me-Ester), 58.6 (4-OCH₃), 105.2 (C-6), 115.2 (C-3), 119.4 (C-10), 122.9 (C-8), 127.3 (C-1), 131.2 (C-7), 138.5 (C-9), 157.4 (C-5), 159.3 (C-4), 169.8 (CO₂Me) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 232 [M]⁺ (100), 217 [M-CH₃]⁺ (31), 201 (11), 189 (14), 173 (13), 159 (12).

HRMS (ESI) berechnet für C₁₃H₁₂NaO₄: 255.0633 [M+Na]⁺
gemessen 255.0665 [M+Na]⁺;

Tabelle 17. NMR-Daten von **51** in MeOH- d_4 .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	COSY (J_{HH} [Hz])	NOESY
1	127.3	8.05, <i>s</i>	3, 8, 9, 10, CO ₂ Me		8
2	130.1				
3	115.2	7.27, <i>s</i>	1, 4, 10, CO ₂ Me		4-OMe
4	159.3				
5	157.4				
6	105.2	6.82, <i>m</i>	5, 8, 10	7	
7	131.2	7.32, <i>d</i> ⁵⁾	5, 9	6 (6.81)	
8	122.9	7.31, <i>d</i> ⁵⁾	1, 10		8
9	138.5				
10	119.4				
CO ₂ Me	169.8				
4-OMe	58.6	4.02, <i>s</i>	5		3
Me-Ester	54.4	3.85, <i>s</i>	CO ₂ Me		

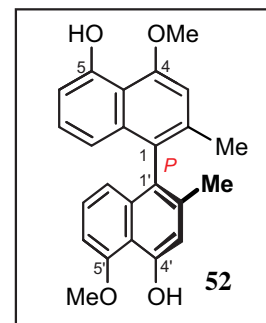
⁵⁾ Eine sichere COSY-Zuordnung war nicht möglich, da sich die Signale z.T. überlagerten.

14.4 *P*-4,5'-Dimethoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-4',5-diol (52)

Brauner Feststoff (MeOH, 1.2 mg).

Schmp.: 155 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = +27.1$ ($c = 0.05$, MeOH).



UV (MeOH): $\lambda_{\max} = 227$ (1.39), 307 (0.35), 323 (0.24), 335 (0.22) nm.

CD (MeOH): $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon) = 339$ (-5.44), 320 (0.21), 294 (-3.59), 235 (56.57), 219 (-44.56).

IR (ATM): $\nu = 3399$ (br, w), 2973 (w), 2927 (w), 2512 (br, m), 2159 (s), 2026 (s), 1974 (s), 1683 (w), 1610 (w), 1511 (w), 1428 (w), 1361 (w), 1180 (w), 1124 (w), 1085 (w), 833 (w), 802 (w) 742 (m), 617 (w) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 1.79$ (s, 3 H, 2'-CH₃), 1.85 (s, 3 H, 2-CH₃), 3.99 (s, 3 H, 5'-OCH₃), 4.05 (s, 3 H, 4-OCH₃), 6.31 (dd, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, 1 H, 8-H), 6.45 (dd, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, 1 H, 8'-H), 6.58 (dd, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.05$ Hz, 1 H, 6-H), 6.74 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, 6'-H), 6.74 (s, 1 H, 3'-H), 6.86 (s, 1 H, 3-H), 6.93 (dd, $^3J = 7.7$ Hz, $^3J = 8.9$ Hz, 1 H, 7-H), 6.97 (dd, $^3J = 7.8$ Hz, $^3J = 8.6$ Hz, 1 H, 7'-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 18.6$ (2'-CH₃), 18.8 (2-CH₃), 55.2 (4-OCH₃), 55.3 (5'-OCH₃), 103.1 (C-6'), 106.2 (C-3), 108.7 (C-6), 112.0 (C-3'), 113.4 (C-10'), 113.6, (C-10), 116.2 (C-8), 118.8 (C-8'), 125.8 (C-7'), 126.1 (C-1'), 127.1 (C-7), 128.7 (C-1), 134.9 (C-2), 135.7 (C-9'), 136.0 (C-9), 136.1 (C-2'), 154.5 (C-5), 154.7 (C-4'), 155.4 (C-4), 156.5 (C-5') ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 374 [M]⁺ (100), 360 [M-CH₃]⁺ (3), 344 (7), 327 (9), 301 (5), 255 (3), 226 (3), 187 [M/2]⁺ (3), 172 [M/2 - CH₃]⁺ (5), 164 (2).

HRMS (ESI) berechnet für C₂₄H₂₃O₄: 375.1591 [M+H]⁺;
gemessen: 375.1596 [M+H]⁺.

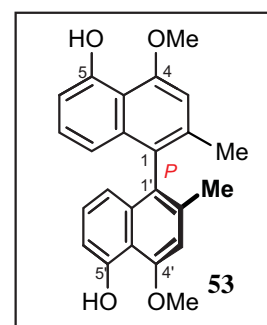
Tabelle 18. NMR-Daten von **52** in MeOH-d₄.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	COSY (<i>J</i> _{HH} [Hz])	NOESY
1	128.7				
2	134.9				
3	106.2	6.86, <i>s</i>	1, 4, 5, 2-Me, 4-OMe		4-OMe
4	155.4				
5	154.5				
6	108.7	6.58, <i>dd</i>	5, 8, 10	7 (7.6)	2'-Me
7	127.1	6.93, <i>dd</i>	5, 9	6 (7.7), 8 (8.6)	
8	116.2	6.31, <i>dd</i>	6, 1	7 (8.4)	
9	136.0				
10	113.6				
1'	126.1				
2'	136.1				
3'	112.0	6.73, <i>s</i>	1', 4', 10'		
4'	154.7				
5'	156.5				
6'	103.1	6.74, <i>d</i>	5', 7', 8', 10'	7 (7.8)	5'-OMe
7'	125.8	6.97, <i>s</i>	5', 9'	6 (7.8), 8 (8.6)	
8'	118.8	6.45, <i>dd</i>	1', 6', 10'	7 (8.5)	2-Me
9'	135.7				
10'	113.4				
2-Me	18.8	1.85, <i>s</i>	1, 2, 3		8'
2'-Me	18.6	1.70, <i>s</i>	1', 2', 3'		8
4-OMe	55.2	4.05, <i>s</i>	4		3
5'-OMe	55.3	3.99, <i>s</i>	5'		6'

14.5 *P*-4,4'-Dimethoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-5,5'-diol (**53**)

Weißer kristalliner Feststoff (MeOH, 3.0 mg).

Schmp.: 152 °C (MeOH).



$[\alpha]_D^{20} = +64.4$ ($c = 0.05$ MeOH).

UV (MeOH): $\lambda_{\max} = 227$ (1.29), 307 (0.28), 323 (0.26), 335 (0.24) nm.

CD (MeOH): $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon) = 294$ (-3.59), 234 (56.57), 218 (-44.56).

IR (ATM): $\nu = 3659$ (br, w), 3409 (br, w), 2979 (s), 2361 (m), 2161 (br, w), 2029 (br, w), 1716 (w), 1656 (w), 1607 (s), 1457 (m), 1425 (m), 1379 (s), 1361 (s), 1245 (s), 1228 (s), 1118 (s), 1083 (s), 953 (m), 827 (m), 812 (m), 755 (s), 700 (w), 667 (w), 647 (w), 621 (w), 607 (m) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 1.95$ (s, 3 H, 2- CH_3), 4.15 (s, 3 H, 4- OCH_3), 6.41 (dd, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, 1 H, 8-H), 6.69 (dd, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.03$ Hz, 1 H, 6-H), 6.96 (s, 1 H, 3-H), 7.03 (dd, $^3J = 7.6$ Hz, $^3J = 8.4$ Hz, 1 H, 7-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 20.3$ (2- CH_3), 56.7 (4- OCH_3), 108.0 (C-3), 110.7 (C-6), 115.0 (C-10), 117.8 (C-8), 128.6 (C-7), 129.9 (C-1), 136.1 (C-2), 137.4 (C-9), 155.9 (C-5), 156.9 (C-4) ppm.

Tabelle 19. NMR-Daten von **53** in MeOH- d_4 .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	COSY (J_{HH} [Hz])	NOESY
1	129.9				
2	136.1				
3	108.0	6.96, <i>s</i>	1, 2, 4, 10, 2-Me		2-Me, 4-OMe
4	156.9				
5	155.9				
6	110.7	6.69, <i>dd</i>	5, 8, 10	7 (7.6)	
7	128.6	7.03, <i>dd</i>	5, 9	6 (7.6), 8 (8.4)	
8	117.8	6.41, <i>dd</i>	1, 6, 9, 10	7 (8.5)	2-Me
9	137.4				
10	115.0				
2-Me	20.3	1.95, <i>s</i>	1, 2, 3		8
4-OMe	56.7	4.15, <i>s</i>	4		3

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 374 $[M]^+$ (100), 359 $[M-CH_3]^+$ (5), 344 (10), 327 (10), 301 (5), 284 (2), 255 (2), 187 $[M/2]^+$ (6), 172 $[M/2 - CH_3]^+$ (11).

HRMS (ESI) berechnet für $C_{24}H_{21}O_4$: 373.1440 $[M-H]^-$;
gemessen: 373.1445 $[M-H]^-$.

14.6 *M*-5,5'-Dimethoxy-2,2'-methyl-3,3'-binaphthalin-4,4'-diol (54)

Brauner Feststoff (MeOH, 1.7 mg).

Schmp.: 106 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -30.4$ ($c = 0.05$, MeOH).

UV (MeOH): $\lambda_{max} = 239$ (0.73), 303 (0.09), 319 (0.10), 335 (0.12) nm.

CD (MeOH): $\lambda_{max} (\Delta\epsilon) = 224$ (+39.0), 242 (-25.1), 291 (+2.7), 336 (-8.6).

1H -NMR (600 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 2.08$ (s, 3 H, 2- CH_3), 4.05 (s, 3 H, 5-O CH_3), 6.75 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.26 (s, 1 H, 1-H), 7.31 (dd, $^3J = 7.6$ Hz, $^3J = 8.4$ Hz, 1 H, 7-H), 7.37 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 1 H, 8-H) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 20.5$ (2- CH_3), 56.6 (5-O CH_3), 104.5 (C-6), 114.8 (C-10), 119.8 (C-1), 121.3 (C-3), 122.1 (C-8), 126.6 (C-7), 137.6 (C-9), 138.9 (C-2), 151.9 (C-4), 157.8 (C-5) ppm.

IR (ATM): $\nu = 3613$ (br, w), 3363 (w), 2921 (m), 2852 (w), 2524 (br, m), 2159 (s), 2026 (s), 1974 (s), 1737 (w), 1658 (w), 1633 (w), 1452 (w), 1357 (w), 1180 (w), 1143 (w), 1089 (w), 835 (w), 800 (w), 624 (w) cm^{-1} .

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 375 (16), 374 $[M]^+$ (9), 373 (17), 362 $[M - Me]^+$ (93), 361 $[M - 2Me]^+$ (12), 346 (9), 334 (10), 318 (6), 181 (16).

HRMS (ESI) berechnet für $C_{24}H_{23}O_4$: 375.1518 $[M+H]^+$;
gemessen: 375.1586 $[M+H]^+$.

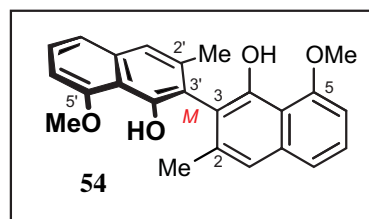


Tabelle 20. NMR-Daten von **54** in MeOH-d₄.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	COSY (<i>J</i> _{HH} [Hz])	NOESY
1	119.8	7.26, <i>s</i>	2, 2-Me, 3, 4		8, 2-Me
2	138.9				
3	121.3				
4	151.9				
5	157.8				
6	104.5	6.75, <i>d</i>	5, 8, 10	7 (7.6)	5-OMe
7	126.6	7.31, <i>dd</i>	5, 9	6 (7.6), 8 (8.4)	
8	122.1	7.37, <i>d</i>	1, 6, 10	7 (8.4)	1
9	137.6				
10	114.8				
2-Me	20.5	2.08, <i>s</i>	1, 2, 3		1
5-OMe		4.05, <i>s</i>	4, 5, 6, 10		6

14.7 4-Methoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthyl-4',5,5',6'-tetraol (**55**)

Brauner Feststoff (MeOH, 1.3 mg).

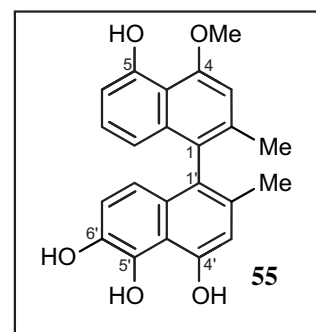
Schmp.: 124 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20}$ = nicht messbar da sich die Substanz zersetzte.

UV (MeOH): λ_{\max} = 227 (1.10), 307 (0.18), 335 (0.13) nm.

IR (ATM): ν = 3399 (br, w), 2923 (m), 2852 (w), 2518 (br, m), 2159 (s), 2026 (s), 1974 (s), 1735 (w), 1662 (w), 1608 (w), 1511 (w), 1455(w), 1361 (w), 1180 (w), 1118 (w), 1085 (w), 831 (w), 802 (w), 752 (w), 719 (w), 649 (w), 626 (w) cm⁻¹.

¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ = 1.86 (s, 3 H, 2'-CH₃), 2.13 (s, 3 H, 2-CH₃), 4.15 (s, 3 H, 4-OCH₃), 6.16 (d, ³*J* = 10.3 Hz, 1 H, 7'-H), 6.58 (dd, ³*J* = 8.4 Hz, ⁴*J* = 1.06 Hz, 1 H, 8-H), 6.77 (dd, ³*J* = 7.7 Hz, ⁴*J* = 1.05 Hz, 1 H, 6-H), 6.80 (d, ³*J* = 10.3 Hz, 1 H, 8'-H), 6.97 (s, 1 H, 3-H), 7.13 (s, 1 H, 3'-H), 7.22 (dd, ³*J* = 7.6 Hz, ³*J* = 8.3 Hz, 1 H, 7-H) ppm.



^{13}C -NMR (150 MHz, MeOH- d_4): δ = 20.6 (2-CH₃), 21.2 (2'-CH₃), 56.8 (4-OCH₃), 107.7 (C-3), 111.2 (C-6), 114.9 (C-10), 115.1 (C-10'), 117.1 (C-8), 123.3 (C-3'), 126.0 (C-9), 126.2 (C-2), 127.7 (C-2'), 128.4 (C-7'), 129.7 (C-7), 134.6 (C-9'), 135.4 (C-1'), 137.3 (C-1), 143.9 (C-8'), 153.0 (C-4'), 156.4 (C-5), 157.9 (C-4), 162.9 (C-6'), 163.3 (C-5') ppm.

Tabelle 21. NMR-Daten von **55** in MeOH- d_4 .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	COSY (J_{HH} [Hz])	NOESY
1	137.3				
2	126.2				
3	107.7	6.97, <i>s</i>	2, 5, 2-Me		2-Me
4	157.9				
5	156.4				
6	111.2	6.77, <i>dd</i>	8, 9	7 (7.7)	
7	129.7	7.22, <i>dd</i>	1, 5	6 (7.6), 8 (8.3)	
8	117.1	6.58, <i>dd</i>	6, 9, 10	7 (8.4)	2'-Me
9	126.0				
10	114.9				
1'	135.4				
2'	127.7				
3'	123.3	7.13, <i>s</i>	9', 10', 2'-Me		2'-Me
4'	153.0				
5'	163.3				
6'	162.9				
7'	128.4	6.16, <i>d</i>	9'	8' (10.3)	
8'	143.9	6.80, <i>d</i>	1', 10'	7' (10.3)	2-Me
9'	134.6				
10'	115.1				
2-Me	20.6	2.13, <i>s</i>	1, 2, 3		3, 8'
2'-Me	21.2	1.86, <i>s</i>	1', 2', 3', 4'		3', 8
4-OMe	56.8	4.15, <i>s</i>	4		3
5-OH					
4'-OH					
5'-OH					
6'-OH					

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = aufgrund der Zersetzung nicht messbar.

HRMS (ESI) berechnet für $C_{23}H_{20}O_5$: 376.1311 $[M]^+$,
gemessen: nicht messbar.

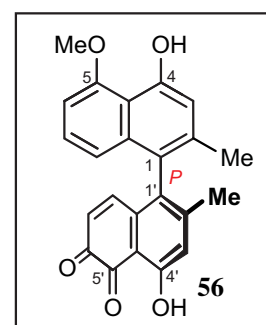
Die Charakterisierung dieser Verbindung konnte nicht abgeschlossen werden, da sich die Substanz im Verlaufe der Arbeiten zersetzte.

14.8 *P*-4,4'-Dihydroxy-5-methoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthyl-5',6'-dion (56)

Hellbrauner Feststoff (MeOH, 1.4 mg).

Schmp.: 163 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -324,5$ ($c = 0.02$, MeOH).



UV (MeOH): $\lambda_{\max} = 227$ (0.89), 307 (0.15), 319 (0.13), 331 (0.10), 443 (0.08) nm.

CD (MeOH): $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon) = 244$ (13.22), 217 (-10.04).

IR (ATM): $\nu = 3401$ (br, w), 2975 (w), 2925 (w), 2854 (w), 2524 (br, m), 2159 (s), 2026 (s), 1974 (s), 1718 (w), 1671 (w), 1631 (w), 1430 (w), 1386 (w), 1353 (w), 1267 (w), 1178 (w), 1081 (w), 871 (w), 806 (w), 742 (m), 613 (w) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 1.86$ (s, 3 H, 2'- CH_3), 2.06 (s, 3 H, 2- CH_3), 4.10 (s, 3 H, 5- OCH_3), 6.16 (d, $^3J = 10.3$ Hz, 1 H, 7'-H), 6.73 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 1 H, 8-H), 6.80 (d, $^3J = 10.4$ Hz, 1 H, 8'-H), 6.84 (s, 1 H, 3-H), 6.93 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1 H, 6-H), 7.12 (s, 1 H, 3'-H), 7.26 (dd, $^3J = 7.5$ Hz, $^3J = 8.3$ Hz, 1 H, 7-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 20.5$ (2- CH_3), 21.1 (2'- CH_3), 56.9 (5- OCH_3), 105.1 (C-6), 113.4 (C-3), 114.9 (C-10), 115.1 (C-10'), 119.6 (C-8), 123.2 (C-3'), 123.7 (C-1), 127.9 (C-2'), 128.3 (C-7), 128.4 (C-7'), 134.8 (C-9'), 135.8 (C-1'), 137.1 (C-9), 138.2 (C-2), 143.9 (C-8'), 153.4 (C-4'), 156.1 (C-4), 158.2 (C-5), 182.1 (C-6'), 183.2 (C-5') ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 414 $[\text{M}+\text{K}^+]^+$ (57), 374 $[\text{M}]^+$ (2), 324 (53), 281 (19), 266 (12), 190 $[\text{M-Naphthalin}]^+$ (3), 178 $[\text{M-Naphthochinon}]^+$ (3).

HRMS (ESI) berechnet für C₂₃H₁₈NaO₅: 397.1052 [M+Na]⁺;
 gemessen: 397.1046 [M+Na]⁺.

Tabelle 22. NMR-Daten von **56** in MeOH-d₄.

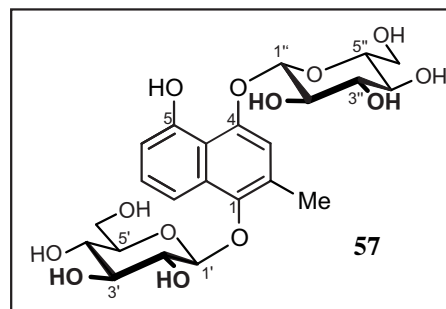
Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	COSY (<i>J</i> _{HH} [Hz])	NOESY
1	123.7				
2	138.2				
3	113.4	6.84, <i>s</i>	1, 2, 4, 10		2-Me
4	156.1				
5	158.2				
6	105.1	6.93, <i>d</i>	5, 8, 10	7 (7.5)	5-OMe
7	128.3	7.26, <i>dd</i>	5, 9	6 (8.3), 8 (7.5)	
8	119.6	6.73, <i>d</i>	1, 6, 10	7 (8.4)	2'-Me
9	137.1				
10	114.9				
1'	135.8				
2'	127.9				
3'	123.2	7.12, <i>s</i>	1', 9'		2'-Me
4'	153.4				
5'	183.2				
6'	182.1				
7'	128.4	6.16, <i>d</i>	6'	8' (10.3)	
8'	143.9	6.80, <i>d</i>	1', 2', 5', 10'	7' (10.4)	2-Me
9'	134.8				
10'	115.1				
2-Me	20.5	2.06, <i>s</i>	1, 2, 3		3, 8'
2'-Me	21.1	1.86, <i>s</i>	1', 3', 4'		8
5-OMe	56.9	4.10, <i>s</i>	5		6

14.9 5-Hydroxy-2-methylnaphthalin-1,4-*O,O*-di- β -D-glucosid (57)

Hellbrauner Feststoff (MeOH, 13 mg).

Schmp.: 164 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -230.1$ ($c = 0.2$, MeOH).



UV (MeOH): $\lambda_{\max} = 227$ (1.01), 303 (0.18), 319 (0.14), 331 (0.11) nm.

IR (ATM): $\nu = 3332$ (br, m), 2921 (s), 2510 (br, m), 2362 (w), 2159 (s), 2026 (s), 1974 (s), 1617 (m), 1508 (w), 1428 (w), 1390 (w), 1365 (m), 1317 (w), 1236 (m), 1070 (s), 1039 (s), 929 (w), 900 (w), 875 (m), 833 (w), 808 (m), 750 (m) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): $\delta = 2.42$ (s, 3 H, 2- CH_3), 3.15-3.19 (m, 1 H, 5'-H), 3.63-3.66 (m, 2 H, 6'-H, 6''-H), 3.49-3.52 (m, 1 H, 4'-H), 3.49-3.52 (m, 1-H, 4''-H), 3.51-3.54 (m, 1 H, 3'-H), 3.58-3.61 (m, 1 H, 3''-H), 3.61-3.64 (m, 1 H, 5''-H), 3.69-3.71 (m, 1 H, 2''-H), 3.73-3.79 (m, 1 H, 2'-H), 3.74 (1 H, 6'' α -H), 3.92 (dd, $^2J = 12.60$ Hz, $^3J = 2.30$ Hz, 1 H, 6'' β -H), 4.84 (d, $^3J = 7.89$ Hz, 1 H, 1'-H), 5.24 (d, $^3J = 7.92$ Hz, 1 H, 1''-H), 6.88 (d, $^3J = 7.61$ Hz, 1 H, 6-H), 7.12 (s, 1 h, 3-H), 7.41 (dd, $^3J = 7.80$ Hz, $^3J = 8.30$ Hz, 1 H, 7-H), 7.82 (d, $^3J = 8.40$ Hz, 1 H, 8-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O): $\delta = 19.1$ (2- CH_3), 62.7 (C-6'), 63.0 (C-6''), 71.7 (C-4'), 71.8 (C-4''), 75.5 (C-2''), 76.4 (C-2'), 78.27 (C-3''), 78.29 (C-3'), 78.5 (C-5'), 79.0 (C-5''), 104.8 (C-1''), 106.4 (C-1'), 113.2 (C-6), 116.8 (C-8), 117.1 (C-10), 130.4 (C-7), 131.2 (C-2), 131.3 (C-3), 133.3 (C-9), 147.2 (C-1), 152.5 (C-4), 154.8 (C-5) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 190 [$\text{M} - 2$ Glucose] $^+$ (100), 174 [$\text{M} - 2$ Glucose, OH] $^+$ (17), 144 (9), 115 (8).

HRMS (ESI) berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_{13}\text{Na}$: 537.1578 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$;
gemessen: 537.1578 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

Die Verbindung wurde enzymatisch durch eine β -Glucosidase aus Mandeln (*Fluka*) und in einem parallelen Ansatz durch Zugabe halbkonzentrierter HCl deglucosidiert. Durch Ausschütteln mit Ethylacetat wurde das Aglycon Plumbagin (**9**) aus der Reaktionsmischung entfernt und durch Coelution per HPLC identifiziert. Die Glucose wurde durch Co-Chromatografie (DC – Laufmittel $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 9/6/1) identifiziert. Die

Absolutkonfiguration der D-Glucose wurde durch Bestimmung des Drehwertes (+49° [H₂O] im Vergl. zu authentischem Material +52°[H₂O]) ermittelt.

Tabelle 23. NMR-Daten von **57** in D₂O.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	COSY (<i>J</i> _{HH} [Hz]) ⁶⁾	NOESY
1	147.2				
2	131.3				
3	131.3	7.12, <i>s</i>	1, 2, 3, 9		1"
4	152.5				
5	154.8				
6	113.2	6.88, <i>d</i>	5, 8, 9	7 (7.61)	
7	130.4	7.41, <i>dd</i>	5, 6, 10	6 (7.80), 8 (8.30)	
8	116.8	7.82, <i>d</i>	1, 5, 6, 9, 10	7 (8.40)	1'
9	133.3				
10	117.1				
1'	106.4	4.84, <i>d</i>	3'	2' (7.89)	8
2'	76.4	3.79-3.73, <i>m</i>	1', 3'	1', 3'	
3'	78.29	3.51-3.54, <i>m</i>	6'	2',	
4'	71.7	3.49-3.52, <i>m</i>	3'	5'	
5'	78.5	3.15-3.19, <i>m</i>		4', 6'	
6'	62.7	3.63-3.66, <i>m</i>	4', 5'	6'	
1"	104.8	5.24, <i>d</i>	2", 3", 5"	2" (7.96)	3
2"	75.5	3.69-3.71, <i>m</i>	1", 3"	1", 3"	
3"	78.27	3.58-3.61, <i>m</i>	2", 4"	2", 4"	
4"	71.8	3.49-3.52, <i>m</i>	3", 6"	3", 5"	
5"	79.0	3.61-3.64, <i>m</i>		4", 6"β	
6"	63.0	α 3.74, <i>dd</i> , β 3.92, <i>dd</i>	4"	6"β, 6"α (12.59)	
2-Me	19.1	2.42, <i>s</i>	1, 2, 3, 4		3

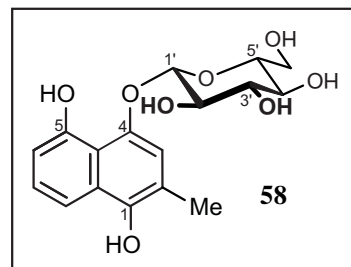
⁶⁾ Die Angabe aller Kopplungskonstanten war nicht möglich, da die Überlagerungen zu stark waren.

14.10 Plumbasid A (58)

Gelbbrauner Feststoff (MeOH, 5.6 mg).

Schmp.: 155 °C (MeOH).

Lit^[65145,183,275] 160 °C (MeOH).



¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ = 2.34 (s, 3 H, 2-CH₃), 3.41 (m, 1 H, 4'-H), 3.47 (m, 2 H, 3'-H, 5'-H), 3.52 (m, 1 H, 2'-H), 3.74 (dd, ²J = 12.4 Hz, ³J = 6.0 Hz, 1 H, 6'-H), 3.94 (dd, ²J = 12.08 Hz, ³J = 2.32 Hz, 1 H, 6'-H), 4.99 (d, ³J = 7.7 Hz, 1 H, 1'-H), 6.73 (d, ³J = 7.58 Hz, 1 H, 6-H), 7.19 (s, 1 H, 3-H), 7.24 (dd, ³J = 7.6 Hz, ³J = 8.5 Hz, 1 H, 7-H), 6.62 (d, ³J = 8.5 Hz, 1 H, 8-H) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ = 16.6 (2-CH₃), 62.6 (C-6'), 71.5 (C-4'), 75.2 (C-2'), 78.2 (C-3'), 78.8 (C-5'), 105.3 (C-1'), 110.9 (C-6), 114.1 (C-8), 116.0 (C-3), 116.4 (C-10), 119.8 (C-2), 127.3 (C-7), 129.8 (C-9), 146.7 (C-1), 148.9 (C-4), 154.8 (C-5) ppm.

HRMS (ESI) berechnet für C₁₇H₂₀O₈Na: 375.10504 [M+Na]⁺;
gemessen: 375.10504 [M+Na]⁺.

Die Umsetzung von Plumbasid **58** zu Plumbagin **9** und Glucose erfolgte durch Zugabe halbkonzentrierter HCl. So konnte das Aglycon mittels Coelutions-Experiment als **9** identifiziert werden. Die Glucose wurde durch Co-DC identifiziert.

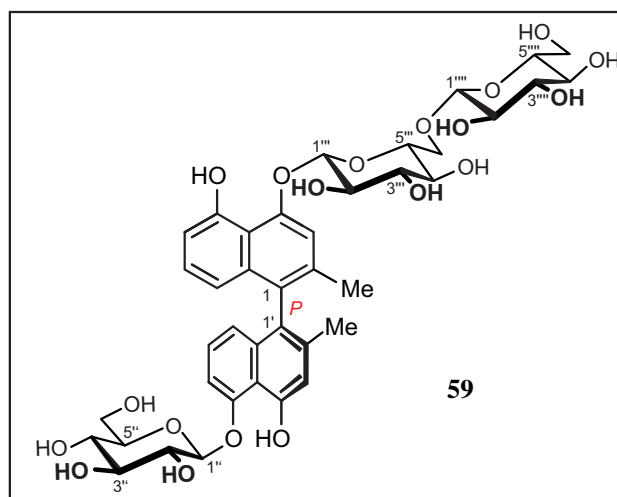
Alle physikalischen und spektroskopischen Daten waren zudem im Einklang mit den in der Literatur angegebenen Werten.^[65145,183,275]

14.11 P-5,4'-Dihydroxy-2,2'-dimethyl-1,1'-binaphthalin-4,6''-O,O-di-β-D-diglucosid-5'-O-β-glucosid (59)

Hellbrauner Feststoff (MeOH, 10.5 mg).

Schmp.: 215 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20}$ = - 206.7° (c = 0.2, MeOH).



CD (MeOH): $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon) = 236 (60.81), 221 (-41.2)$.

UV (MeOH): $\lambda_{\max} = 227 (0.85), 307 (0.16), 335 (0.11) \text{ nm}$.

IR (ATM): $\nu = 3370 (\text{br, m}), 2973 (\text{w}), 2518 (\text{s, br}), 2159 (\text{s}), 2026 (\text{s}), 1974 (\text{s}), 1673 (\text{w}), 1427 (\text{w}), 1357 (\text{w}), 1178 (\text{m}), 1139 (\text{w}), 1056 (\text{m}), 829 (\text{w}), 759 (\text{w}), 607 (\text{w}) \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): $\delta = 1.92 (\text{s, 3 H, 2'-CH}_3), 1.94 (\text{s, 3 H, 2-CH}_3), 3.25 (\text{m, 1 H, 2''''-H}), 3.29 (\text{m, 1 H, 4''''-H}), 3.33 (\text{m, 1 H, 3''''-H}), 3.46 (\text{m, 1 H, 4''-H}), 3.50 (\text{m, 1 H, 4'''-H}), 3.51 (\text{m, 1 H, 3''-H}), 3.52 (\text{m, 1 H, 5''-H}), 3.52 (\text{m, 1-H, 5''''-H}), 3.56 (\text{m, 1 H, 3'''-H}), 3.61 (\text{m, 1 H, 2''-H}), 3.63 (\text{m, 1 H, 2'''-H}), 3.63 (\text{m, 1 H, 6''''}), 3.75 (\text{dd, } ^2J = 12.2 \text{ Hz, } ^3J = 6.4 \text{ Hz, 1 H, 6''-H}), 3.85 (\text{m, 1 H, 6''''-H}), 3.86 (\text{m, 1 H, 5'''-H}), 3.91 (\text{m, 1 H, 6'''-H}), 3.94 (\text{m, 1 H, 6''-H}), 4.23 (\text{dd, } ^2J = 11.73 \text{ Hz, } ^3J = 2.0 \text{ Hz, 1 H, 6'''-H}), 4.39 (\text{d, } ^3J = 7.72 \text{ Hz, 1 H, 1''''-H}), 5.13 (\text{d, } ^3J = 7.87 \text{ Hz, 1 H, 1''-H}), 5.24 (\text{d, } ^3J = 7.79 \text{ Hz, 1 H, 1'''-H}), 6.45 (\text{d, } ^3J = 8.5 \text{ Hz, 1 H, 8-H}), 6.62 (\text{d, } ^3J = 8.75 \text{ Hz, 1 H, 8'-H}), 6.72 (\text{d, } ^3J = 7.7 \text{ Hz, 1 H, 6-H}), 6.88 (\text{s, 1 H, 3'-H}), 7.03 (\text{dd, } ^3J = 8.3 \text{ Hz, } ^3J = 7.7 \text{ Hz, 1 H, 7-H}), 7.05 (\text{dd, } ^3J = 8.5 \text{ Hz, } ^3J = 7.8 \text{ Hz, 1 H, 7'-H}), 7.25 (\text{d, } ^3J = 7.8 \text{ Hz, 1 H, 6'-H}), 7.40 (\text{s, 1 H, 3-H}) \text{ ppm}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O): $\delta = 20.2 (2'-\text{CH}_3), 20.5 (2-\text{CH}_3), 62.5 (\text{C-6''}), 62.8 (\text{C-6''''}), 70.5 (\text{C-6'''}), 71.3 (\text{C-4''}), 71.5 (\text{C-4''''}), 75.1 (\text{C-2''}), 75.1 (\text{C-2''''}), 75.2 (\text{C-2'''}), 77.7 (\text{C-5'''}), 78.0 (\text{C-4''''}), 78.07 (\text{C-3''''}), 78.1 (\text{C-3''''}), 78.1 (\text{C-5''''}), 78.2 (\text{C-3''}), 78.8 (\text{C-5''}), 104.3 (\text{C-1''}), 104.5 (\text{C-1''}), 105.2 (\text{C-1''''}), 110.9 (\text{C-6}), 113.1 (\text{C-6'}), 114.2 (\text{C-3''}), 114.3 (\text{C-3}), 115.6 (\text{C-10}), 115.9 (\text{C-10'}), 118.0 (\text{C-8}), 122.1 (\text{C-8'}), 127.2 (\text{C-7'}), 127.6 (\text{C-1'}), 128.5 (\text{C-7}), 132.0 (\text{C-1}), 136.6 (\text{C-2}), 137.1 (\text{C-9'}), 137.5 (\text{C-9}), 137.6 (\text{C-2'}), 153.3 (\text{C-5}), 154.3 (\text{C-4'}), 155.1 (\text{C-4}), 156.1 (\text{C-5'}) \text{ ppm}$.

MS (EI, 70 eV): $m/z (\%) = 391 (1), 327 (56), 278 (1), 235 (1), 188 (6), 174 (9)$.

HRMS (ESI) berechnet für $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{NaO}_{19}$: 855.2682 $[\text{M}+\text{Na}]^+$;
gemessen: 855.2699 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Tabelle 24. NMR-Daten des Binaphthalin-Kerns von **59** in D₂O.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	COSY (<i>J</i> _{HH} [Hz])	ROESY
1	132.0				
2	136.6				
3	114.3	7.40, <i>s</i>	1, 2, 4, 2-Me		2-Me, 1'''
4	155.1				
5	153.3				
6	110.9	6.72, <i>d</i>	5, 8, 10	7 (7.7)	
7	128.5	7.03, <i>dd</i>	5, 9	6 (8.3), 8 (7.7)	
8	118.0	6.45, <i>d</i>	1, 6, 10	7 (8.5)	
9	137.5				
10	115.6				
1'	127.6				
2'	137.6				
3'	114.2	6.88, <i>s</i>	1', 4', 10, 2'-Me		2'-Me
4'	154.3				
5'	156.1				
6'	113.1	7.25, <i>d</i>	5', 8', 10'	7 (7.8)	1''
7'	127.2	7.05, <i>dd</i>	5', 9'	6 (7.8), 8 (8.5)	
8'	122.1	6.62, <i>d</i>	1', 6', 10,'	7 (8.5)	
9'	137.1				
10'	115.9				
2-Me	20.5	1.94, <i>s</i>	1, 2		3, 8'
2'Me	20.2	1.92 <i>s</i>	1', 2'		3', 8

Tabelle 25. NMR-Daten des südlichen Glucoserestes von **59** in D₂O.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	COSY (J_{HH} [Hz])	ROESY
1''	104.5	5.13, <i>d</i>	2''	2'' (7.8), 5'', 6a'', 6b''	6'
2''	75.1	3.61, <i>m</i>	1'', 3''	1'', 3''	
3''	78.2	3.51, <i>m</i>	2'', 4''	2'', 4''	
4''	71.3	3.46, <i>m</i>	3''	3'', 5''	
5''	78.8	3.52, <i>m</i>		1'', 4'', a6''	
6''	62.5	α 3.75, <i>dd</i> , β 3.94, <i>dd</i>	5''	6 β (12.24) 5'' 6 α	

Tabelle 26. NMR-Daten des ersten nördlichen Glucoserestes von **59** in D₂O.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	COSY (J_{HH} [Hz])	ROESY
1'''	104.3	5.24, <i>dd</i>	2'''	2''' (7.8), 5''', 6'''	3
2'''	75.1	3.63, <i>m</i>	1''', 3'''	1''', 3''', 5'''	
3'''	78.1	3.56, <i>m</i>	2''', 4'''	2'''	
4'''	71.5	3.50, <i>m</i>	3'''	5'''	
5'''	77.7	3.86, <i>m</i>		4''', 6a''', 6b'''	
6'''	70.5	3.91, <i>dd</i> , 4.23, <i>dd</i>	5'''	1''', 5'''	1'''

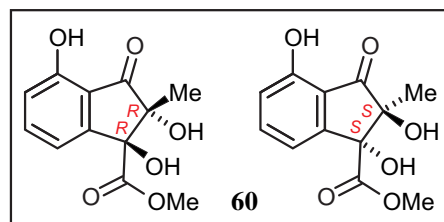
Tabelle 27. NMR-Daten des dritten, nördlichsten Glucoserestes von **59** in D₂O.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	COSY (J_{HH} [Hz])	ROESY
1''''	105.2	4.39, <i>d</i>	2''''	2'''' (11.73), 6''''	6''''
2''''	75.2	3.25, <i>m</i>	1'''' , 3''''	1'''' , 3''''	
3''''	78.07	3.33, <i>m</i>	2'''' , 4''''	2''''	
4''''	78.0	3.29, <i>m</i>	3''''	5''''	
5''''	78.1	3.52, <i>m</i>		1'''' , 4'''' , 6''''	
6''''	6.28	3.63, <i>dd</i> , 3.85, <i>dd</i>	5''''	1'''' , 5''''	

14.12 *trans*-Methyl-1,2,4-trihydroxy-2-methyl-3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-carboxylsäure (60)

Beigefarbener kristalliner Feststoff (MeOH, 2.8 mg).

Schmp.: 103 °C (MeOH).



UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 223$ (1.0), 259 (0.35), 311 (0.15) nm.

IR (ATM): $\nu = 3388$ (br, w), 2926 (m), 2559 (w), 1966 (m), 1725 (s), 1599 (s), 1466 (m), 1367 (m), 1268 (s), 1196 (s), 1136 (s), 1028 (m), 1007 (m), 947 (w), 883 (m), 815 (m), 755 (s), 695 (w), 676 (w), 660 (w), 647 (m), 634 (m), 621 (m), 606 (m) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 1.32$ (s, 3 H, 2- CH_3), 3.61 (s, 3 H, 1'- OCH_3), 7.25 (d, $^3J = 7.5$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, 1 H, 5-H), 7.09 (d, $^3J = 8.0$, $^4J = 0.9$ Hz, 1 H, 7-H), 7.39 (dd, $^3J = 7.6$, $^3J = 8.1$, 1 H, 6-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 22.3$ (2- CH_3), 53.2 (1'- OCH_3), 84.4 (C-1), 85.6 (C-2), 123.1 (C-7), 132.5 (C-5), 135.9 (C-9), 137.4 (C-8), 156.6 (C-4), 173.6 (C-1'), 205.3 (C-3) ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 1.19$ (s, 3 H, 2- CH_3), 3.49 (s, 3 H, 1'- OCH_3), 5.72 (s, 1 H, 1-OH), 5.89 (s, 1 H, 2-OH), 7.13 (d, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 0.7$ Hz, 1 H, 5-H), 7.09 (d, $^3J = 7.5$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, 1 H, 7-H), 7.35 (dd, $^3J = 7.7$ Hz, $^3J = 8.5$ Hz, 1 H, 6-H), 9.97 (s, 1 H, 4-OH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 21.6$ (2- CH_3), 52.0 (1'- OCH_3), 82.5 (C-1), 83.4 (C-2), 113.4 (C-5), 122.1 (C-7), 131.1 (C-6), 135.8 (C-9), 135.9 (C-8), 155.1 (C-4), 172.0 (C-1'), 203.9 (C-3) ppm.

MS (ESI positiv): $m/z = 252$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (5), 234 (16), 209 (8), 202 (9), 193 (100), 175 (19), 163 (2), 149 (15), 147 (10), 121 (9).

HRMS (ESI) berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_6$:	251.0561 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$;
gemessen:	251.0532 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$.

Tabelle 28. NMR-Daten von **60** in DMSO.

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	COSY (J_{HH} [Hz])	NOESY
1	82.5				
2	83.4				
3	203.9				
4	155.1				
5	113.4	7.13, d	3, 4, 6, 7, 9	6 (7.5)	
6	131.1	7.35, <i>dd</i>	3, 5, 8	5 (7.7), 7 (8.5)	
7	122.1	7.09, <i>d</i>	1, 4, 5, 9	6 (8.0)	1-OH,
8	135.9				
9	135.8				
1'	172.0				
2-Me	21.6	1.19, <i>s</i>	1, 2, 3		1-OH, 2-OH
1-OH		5.72, <i>s</i>	1, 2, 1'		2-Me
2-OH		5.89, <i>s</i>	1, 2		2-Me
4-OH		9.97, <i>s</i>	4, 9		5
1'-OMe	52.0	3.49, <i>s</i>	1'		

14.13 *cis*-Methyl-1,2,4-trihydroxy-2-methyl-3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-carboxylsäure (**61**)

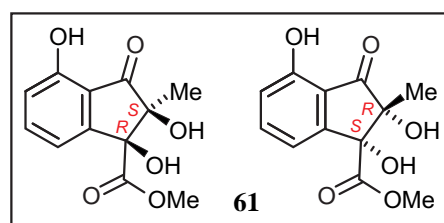
Beigefarbener kristalliner Feststoff (MeOH, 2.3 mg).

Schmp.: 127 °C (MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} = 223 (1.2), 259 (0.7), 311 (0.3) nm.

IR (ATM): ν = 3735 (br, w), 3309 (br, w), 2921 (m), 2849 (m), (2360 (s), 2341 (s), 2032 (br, w), 1729 (s), 1601 (m), 1455 (m), 1300 (s), 1202 (s), 1082 (m), 922 (m), 759 (s), 669 (m), 640 (m), 617 (m) cm^{-1} .

^1H -NMR (600 MHz, MeOH- d_4): δ = 1.26 (s, 3 H, 2- CH_3), 3.74 (s, 3 H, 1'- OCH_3), 7.24 (dd, 3J = 7.6 Hz, 4J = 0.9 Hz, 1 H, 5-H), 7.11 (dd, 3J = 8.2, 4J = 0.9 Hz, 1 H, 7-H), 7.40 (dd, 3J = 7.6 Hz, 3J = 8.3 Hz, 1 H, 6-H) ppm.



^{13}C -NMR (150 MHz, MeOH- d_4): δ = 20.8 (2-CH₃), 52.3 (1'-OCH₃), 80.7 (C-1), 81.1 (C-2), 115.6 (C-5), 123.1 (C-7), 132.8 (C-6), 136.5 (C-8), 138.3 (C-9), 156.7 (C-4), 173.8 (C-1'), 205.8 (C-3) ppm.

MS (ESI positiv): m/z = 252 [M+H]⁺ (5), 234 (16), 209 (8), 202 (9), 193 (100), 175 (19), 163 (2), 149 (15), 147 (10), 121 (9).

HRMS (ESI) berechnet für C₁₂H₁₂O₆: 251.0561 [M-H]⁻;
gemessen: 251.0532 [M-H]⁻.

Tabelle 29. NMR-Daten von **61** in MeOH- d_4 .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	COSY (J_{HH} [Hz])	NOESY
1	80.7				
2	81.1				
3	205.3				
4	156.7				
5	115.6	7.24, <i>dd</i>	3, 4, 6, 7, 9	6 (7.6), 7 (0.9)	
6	132.8	7.40, <i>dd</i>	4, 5, 7, 8	5 (7.6), 7 (8.3)	
7	123.1	7.11, <i>dd</i>	1, 4, 5, 9	5 (0.9), 6 (8.2)	
8	136.5				
9	138.3				
1'	173.8				
2-Me	20.8	1.26, <i>s</i>	1, 2, 3		1'-OMe
1'-OMe	52.3	3.74, <i>s</i>	1, 1'		2-Me

15 Fütterungsexperimente an Kalluskulturen von *Triphyophyllum peltatum*

15.1 Kalluskultur

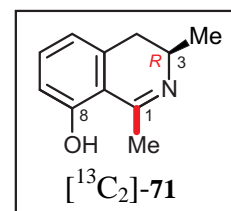
Für die Durchführung der Fütterungsexperimente wurden Kulturen verwendet, die 1 bis 2 Tage vor der Fütterung der entsprechenden Präkursoren auf frisches Medium transferiert worden waren. Die Bedingungen der Kultur wurden jedoch nicht verändert und entsprachen den in Kapitel 13.1 angegebenen.

15.2 Fütterungsexperimente an Kalluskulturen von *Triphyophyllum peltatum*

Die zu verfütternden Präkursoren [$^{13}\text{C}_2$]-**69** und [$^{13}\text{C}_2$]-**70** wurden von S. Rüdener, z.T. in Kooperation mit Dr. Joan Mutanyatta-Comar, $^{13}\text{C}_2$ -markiert hergestellt. Die jeweiligen [1,1'- $^{13}\text{C}_2$]-markierten Präkursoren wurden in gelöster Form (Konzentration 1.0 mg mL^{-1} , in EtOH/H₂O 1:16) nach Sterilfiltration verfüttert. Verwendet wurden jeweils zwölf Kulturen (5.84 g Trockengewicht zur Fütterung von **69** und 6.87 g für **70**), an die jeweils 1 mL der sterilen Lösung appliziert wurden. Dem einleitenden Fütterungsereignis folgten zwei weitere im Abstand von je drei Wochen, bei denen jeweils die gleiche Substanzmenge verfüttert wurde, so dass für jedes Fütterungsexperiment insgesamt 36 mg markierter Substanz eingesetzt wurde. Nach neun Wochen Gesamt-Fütterungszeit sammelte man alle Kalli vom Medium ab und lyophilisierte sie. Die Extraktion erfolgte dann durch Rühren des pulverisierten Zellmaterials mit CH₂Cl₂/MeOH (1:1). Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Alle daraus hervorgegangenen Fraktionen vereinigte man und entfernte das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck. Zur Isolierung der Sekundärmetabolite aus dem Rohextrakt wurde die präparative HPLC eingesetzt [SymmetryPrep-C18-Säule (Waters; 19 x 300 mm, 7 μm) mit dem folgenden Lösungsmittelgradienten: Wasser + 0.05% TFA (A), MeCN + 0.05% TFA (B); Fluss 10 mL min^{-1} ; 0 min 5% B, 30 min 70% B, 35 min 100% B, 40 min 100% B, 41 min 5% B, 46 min 5% B]. Die Trennung des Tetrahydroisochinolins [$^{13}\text{C}_2$]-**70** von seinem Dihydro-Analog [$^{13}\text{C}_2$]-**69** wurde an einer semipräparativen Chromolith-RP-Säule (100 x 10 mm) durch Anwendung des Standardgradienten (Kapitel 11.2) erreicht.

Der Markierungsgrad aller isolierten Verbindungen (min. 4 % nach Fütterung von [$^{13}\text{C}_2$]-**69** und 8 % nach Applikation von [$^{13}\text{C}_2$]-**70**) wurde durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie ermittelt. Die C,C-Kopplungen der Markierungen wurden durch 2D-INADEQUATE-Spektren nachgewiesen.

15.3 [1,1'-¹³C₂]-(*3R*)-3,4-Dihydro-8-hydroxy-1,3-dimethylisochinolin
 ([¹³C₂]-**69**)



Gelbe Kristalle (MeOH, 81 mg).

Schmp.: 195-197 °C (CH₂Cl₂/MeOH, Zersetzung).

$[\alpha]_D^{20} = +67.0$ ($c = 0.1$, MeOH).

IR (KBr): $\nu = 2924$ (w), 1685(s), 1606 (m), 1465(m), 1205 (s), 1135 (m), 800 (w) cm⁻¹.

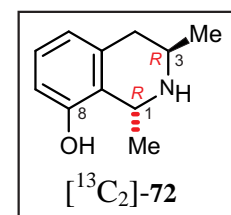
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.45$ (d, ³ $J = 6.7$ Hz, 3 H, 3-CH₃), 2.87 (dd, ² $J = 16.4$ Hz, ³ $J = 11.5$ Hz, 1 H, H_{ax}-4), 3.11 (dd, ² $J = 16.4$ Hz, ³ $J = 5.2$ Hz, 1 H, H_{eq}-4), 2.85 (dd, ¹ $J_{H,C} = 131.0$ Hz, ² $J_{H,C} = 6.2$ Hz, 3 H, 1-CH₃), 3.93-4.05 (m, 1 H, H-3), 6.86 (d, ³ $J = 7.0$ Hz, 1 H, H-5 oder H-7), 6.93 (d, ³ $J = 8.9$ Hz, 1 H, H-5 oder H-7), 7.53 (dd, ³ $J = 8.9$ Hz, ³ $J = 7.0$ Hz, 1 H, H-6) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 18.0$ (3-CH₃), 24.8 (d, $J_{C,C} = 40.1$ Hz, 1-CH₃), 34.6 (C-4), 50.2 (C-3), 117.6 (C-7 und C-9), 120.6 (C-5), 139.8 (C-6), 140.3 (C-10), 163.0 (C-8), 178.3 (d, $J_{C,C} = 40.4$ Hz, C-1) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 177.2 (100) [M]⁺, 162.2 (44) [M-CH₃]⁺, 148.2 (43).

HRMS (ESI) berechnet für [¹³C₂]-C₁₁H₁₄NO: 178.1143 [M+H]⁺;
 gemessen: 178.1138 [M+H]⁺.

15.4 [1,1'-¹³C₂]-(*1R,3R*)-8-Hydroxy-1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin
 ([¹³C₂]-**70**)



Hellgelbes Öl (MeOH, 7.0 mg).

$[\alpha]_D^{20} = -3.0$ ($c = 0.08$, MeOH).

IR (KBr): $\nu = 3854$ (br, m), 2924 (w), 2853 (w), 1677 (s), 1205 (m), 1139 (m) cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 1.46$ (d, ³ $J = 6.4$ Hz, 3 H, 3-CH₃), 1.79 (ddd, ¹ $J_{H,C} = 130.0$ Hz, ² $J_{H,C} = 4.4$ Hz, ³ $J = 6.7$ Hz, 3 H, 1-CH₃), 2.80 (dd, ² $J = 17.6$ Hz, ³ $J = 11.7$ Hz, 1 H, H_{ax}-4), 3.11 (dd, ² $J = 17.6$ Hz, ³ $J = 4.6$ Hz, 1 H, H_{eq}-4), 3.77-3.82 (m, 1 H, H-3), 4.89-4.95 und 4.53-

4.59 (m, $^1J_{\text{H,C}} = 146.4$ Hz, 1 H, H-1), 6.68 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, H-5 oder H-7), 6.69 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1 H, H-5 oder H-7), 7.10 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, H-6) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): $\delta = 17.9$ (d, $J_{\text{C,C}} = 36.3$ Hz, 1- CH_3), 19.2 (3- CH_3), 34.4 (C-4), 45.3 (C-3), 49.5 (d, $J_{\text{C,C}} = 36.3$ Hz, C-1), 107.8 (C-7), 114.1 (C-5), 120.7 (C-9), 130.0 (C-6), 132.9 (C-10), 155.2 (C-8) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%): 177.2 (100) $[\text{M}]^+$, 162.2 (44) $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, 148.2 (43).

HRMS (ESI) berechnet für $[\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}]$: 180.1299 $[\text{M} + \text{H}]^+$;
gemessen: 180.1297 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

15.5 [1,1-Me- $^{13}\text{C}_2$]-Habropetalin A ($[\text{C}_2$]-27)

Brauner Feststoff (MeOH, 4.1 mg).

Schmp.: 224 °C (MeOH),

Lit.^[114] 225 °C (MeOH).

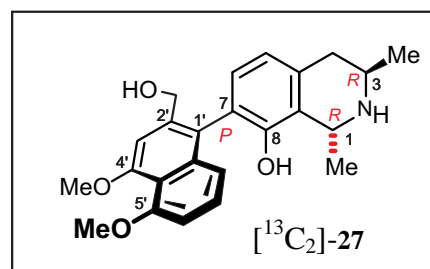
$[\alpha]_D^{20} = -15.5$ ($c = 0.1$, MeOH),

Lit.^[114] -16.5 ($c = 0.1$, MeOH).

UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 233$ (1.21), 304 (0.42) nm.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.52$ (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3 H, 3- CH_3), 1.69 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3 H, 1- CH_3), 2.93 (dd, $^2J = 17.3$ Hz, $^3J = 11.8$ Hz, 1 H, H-4_{eq}), 3.22 (dd, $^2J = 17.7$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, 1 H, H-4_{ax}), 3.92 (s, 3 H, OCH_3), 3.93 (m, 1 H, H-3), 4.00 (s, 3 H, OCH_3), 4.40 (s, 2 H, CH_2OH), 4.86-4.94 (m, 1 H, H-1), 6.84 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1 H, H-5), 6.86 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1 H, H-6), 6.91 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, H-6'), 6.96 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, H-8'), 7.19 (dd, $^3J = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, 1 H, H-7'), 7.24 (s, 1 H, H-3') ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 18.1$ (1- CH_3 , d, $J_{\text{C,C}} = 35.6$ Hz, 4 bzw. 8 % Markierungsgrad), 19.4 (3- CH_3), 34.6 (C-4), 45.3 (C-1), 50.0 (C-1, d, $J_{\text{C,C}} = 35.6$ Hz, 4 bzw. 8 % Markierungsgrad), 56.9 (5'- OCH_3), 57.1 (4'- OCH_3), 63.2 (CH_2OH), 107.0 (C-3'), 107.9 (C-6'), 118.7 (C-10'), 119.8 (C-8'), 121.5 (C-5), 124.8 (C-7), 125.2 (C-1'), 127.8 (C-7'), 132.9 (C-9), 133.0 (C-6), 138.3 (C-10), 140.4 (C-9'), 148.9 (C-2'), 152.6 (C-8), 159.0 (C-4'), 159.2 (C-5') ppm.



HRMS (ESI) berechnet für $C_{24}H_{28}NO_4$: 394.2013 $[M + H]^+$;
gemessen: 394.2013 $[M + H]^+$.

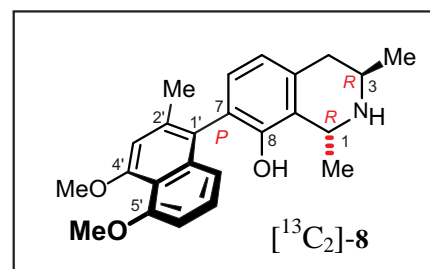
Alle ermittelten Werten standen im Einklang mit den in der Literatur angegebenen Daten.^[114]

15.6 [1,1-Me- $^{13}C_2$]-Dioncophyllin A ($[^{13}C_2]$ -8)

Weißer Feststoff (MeOH, 4.9 mg).

Schmp.: 212 °C (MeOH),

Lit.^[103] 214 °C (CHCl₃).



$[\alpha]_D^{20} = -12.6$ ($c = 0.1$, CHCl₃),

Lit.^[103] -14.9 ($c = 1.0$, CHCl₃).

UV (MeOH): $\lambda_{max} = 231$ (1.05), 306 (0.31) nm.

1H -NMR (400 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 1.26$ (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3 H, 3-CH₃), 1.47 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, 1-CH₃), 2.14 (s, 3 H, 2'-CH₃), 2.57 (dd, $^2J = 116.6$ Hz, $^3J = 11.1$ Hz, 1 H, 4-H_{eq}), 2.83 (dd, $^2J = 16.6$ Hz, $^3J = 4.1$ Hz, 1 H, 4-H_{ax}), 3.33-3.42 (m, 1 H, 3-H), 3.89 (s, 3 H, OCH₃), 3.95 (s, 3 H, OCH₃), 4.42 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, 1-H), 6.71-6.76 (m, 2 H, 5-H und 6'-H), 6.82 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 1 H, 6-H), 6.88 (s, 3 H, 3'-H), 6.89 (dd, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, 1 H, 8'-H), 7.16 (dd, $^3J = 7.7$ Hz, $^3J = 7.7$ Hz, 1 H, 7'-H) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 20.5$ (1-CH₃, d, $J_{C,C} = 35.6$ Hz, 5 % bzw. 8 % Markierungsgrad), 20.8 (3-CH₃), 22.3 (2'-CH₃), 36.4 (C-4), 43.0 (C-1), 50.1 (C-1, d, $J_{C,C} = 35.6$ Hz, 5 % bzw. 8 % Markierungsgrad), 56.8 (OCH₃), 56.9 (OCH₃), 107.0 (C-7), 110.0 (C-1'), 110.4 (C-6), 119.9 (C-8'), 121.4 (C-5), 124.8 (C-3'), 126.9 (C-7'), 127.3 (C-6'), 128.1 (C-10), 130.4 (C-9), 135.7 (C-10'), 137.5 (C-9'), 138.6 (C-2'), 152.0 (C-8), 157.8 (C-5'), 158.4 (C-4') ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 204.1 $[M]^+$ (100), 176.1 (24), 147.1 (36), 121.1 (29).

HRMS (ESI) berechnet für $C_{24}H_{28}NO_3$: 378.2069 $[M + H]^+$;
gemessen: 378.2063 $[M + H]^+$.

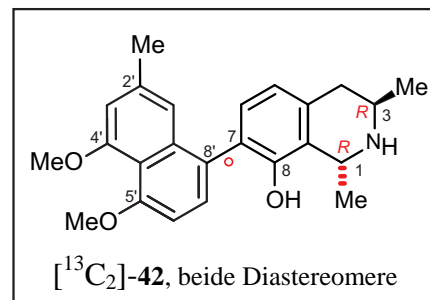
Die Identifizierung erfolgte zudem durch HPLC-Koelutions-Experimente mit authentischem Material. Alle experimentell ermittelten Werten standen im Einklang mit den in der Literatur angegebenen Daten.^[103]

15.7 5'-*O*-Methyldioncophyllin D (¹³C₂-42)

Weißer Feststoff (MeOH, 4.5 mg).

Schmp.: 179 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -31.0$ ($c = 0.021$, MeOH).



UV (MeOH): $\lambda_{\max} = 231$ (1.05), 306 (0.31) nm.

¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): $\delta = 1.52$ (d, ³ $J = 6.3$ Hz, 3 H, 3-CH₃), 1.68 + 1.73 (d, ³ $J = 6.8$ Hz, 3 H, 1-CH₃), 2.28 + 2.31 (s, 3 H, 2'-CH₃), 2.89 - 2.94 (dd, ² $J = 17.6$ Hz, ³ $J = 12.3$ Hz, 1 H, 4-H_{ax}), 3.23 (dd, ² $J = 17.6$ Hz, ³ $J = 4.8$ Hz, 1 H, 4-H_{eq}), 3.85-3.98 (m, 1 H, 3-H), 3.92 (s, 3 H, 4-OCH₃), 3.94 (s, 3 H, 5-OCH₃), 4.83 (q, ³ $J = 6.8$ Hz, 1 H, 1-H), 6.80 (s, 1 H, 1'-H), 6.80 (s, 1 H, 3'-H), 6.84 (d, ³ $J = 7.7$ Hz, 1 H, 5-H), 6.92 (d, ³ $J = 7.9$ Hz, 1 H, 6'-H), 7.06 (d, ³ $J = 7.7$ Hz, 1 H, 6-H), 7.21 (d, ³ $J = 7.9$ Hz, 1 H, 7'-H) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-d₄): $\delta = 18.2$ (1-CH₃, d, $J_{C,C} = 35.6$ Hz, 8 % Markierungsgrad), 19.3 (3-CH₃), 22.01 (2'-CH₃), 34.4 (c-4), 45.1 (C-3), 49.9 (C-1, d, $J_{C,C} = 35.6$ Hz, 8 % Markierungsgrad), 56.7 (5-OCH₃), 56.9 (4-OCH₃), 106.6 (C-6'), 109.9 (C-3'), 117.4 (C-10'), 118.7 (C-1'), 121.0 (C-5), 127.5 (C-8'), 127.7 (C-7), 130.2 (C-7'), 132.3 (C-10), 132.6 (C-6), 137.8 (C-2'), 152.1 (C-8), 158.6 (C-4'), 158.7 (C-5') ppm.

HRMS (ESI) berechnet für [¹³ C ₂]-C ₂₄ H ₂₈ NO ₃ :	380.2136 [M+H] ⁺ ,
gemessen:	380.2112 [M+H] ⁺ .

16 Bereitstellung pflanzlicher Zellkulturen zur Untersuchung der Biosynthese der Anthrachinone

16.1 Etablierung von Zellkulturen aus sterilem Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial für die Etablierung der Zellkulturen pflanzlicher Aloesaponarin-II-Produzenten sollten keimfrei wachsende Pflanzen herangezogen werden. Dazu wurden Samen von *Aloe saponaria* und *Lomatophyllum citreum* oberflächensterilisiert (vgl. Kapitel 11.4) und unter sterilen Bedingungen auf MS-Medium mit halbkonzentrierten Makronährelementen (MS/2) ausgesät. Nach der Keimung wurden die Sämlinge auf frisches MS/2-Medium in Erlenmeyerkolben transferiert, dies wurde je nach Entwicklung der Pflanzen alle 4 bis 6 Wochen erneut notwendig. Für die Entnahme von Explantaten zur Zellkultur-Etablierung waren die Pflanzen nach ca. 6 bis 8 Monaten bereit. Unter sterilen Bedingungen wurden sowohl Blatt- als auch Wurzelstücke von der Pflanze abgetrennt und auf MS/2-abgeleiteten Medien (*AloeI-AloeIV*, Tabelle 30 und Tabelle 31) ausgelegt.

Zunächst wurden vier verschiedene Hormonzusammensetzungen getestet (*AloeI-AloeIV*, Tabelle 31). Zur Unterscheidung wurden die Medien mit dem Namen der Zielpflanze bezeichnet und mit römischen Ziffern nummeriert.

Tabelle 30. Zusammensetzung des MS/2-Mediums als Grundlage für die Etablierung von *A.-saponaria* und *L.-citreum*-Zellkulturen.

		Abgewandeltes MS-Medium [mg L ⁻¹]
Anorganische Makronährstoffe	KNO ₃	950
	NH ₄ NO ₃	825
	KH ₂ PO ₄	85
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	220
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	185
Eisenquelle	FeSO ₄ 7 H ₂ O	27.8
	Na ₂ EDTA	37.3
Anorganische Mikronährstoffe	KI	0.83
	MnSO ₄ x H ₂ O	16.9
	H ₃ BO ₃	6.2
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	10.59
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.25
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.025
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0.025
Organische Bestandteile	Nicotinsäure	0.5
	Thiamin HCl	250
	Pyridoxol HCl	0.5
	<i>myo</i> -Inositol	100
	Glycin	2
	Saccharose	30000
Weitere Zusätze	PVPP	5000
	Glutathion	100
Phytohormone	s. Tabelle 31	

Tabelle 31. Phytohormon-Mischungen, die in einem ersten Ansatz verwendet wurden.

Phytohormone	<i>AloeI</i>	<i>AloeII</i>	<i>AloeIII</i>	<i>AloeIV</i>
1-NAA [mg L ⁻¹]	0.3	6		3.7
2,4-D [mg L ⁻¹]			0.5	
6-BA [mg L ⁻¹]	2	2	2	1.8

Da die Wachstumsrate insgesamt schlecht war und viele Explantate nach wenigen Wochen abstarben, wurde als paralleler Ansatz die Etablierung von Kalluskulturen aus in sterilem Pflanzenmaterial durchgeführt.

16.2 Kalluskulturen aus insterilem Pflanzenmaterial

Einer im Topf unter Gewächshausbedingungen gezogene *A.-saponaria*-Pflanze wurden Blätter und Stammstücke entnommen. Die Oberflächensterilisierung erfolgte entsprechend dem in Kapitel 11.4 angegebenen Protokoll. Die so erhaltenen Explantate von 0.5 bis 1 cm Stärke wurden auf den zuvor angegebenen Medien (Kapitel 16.1) ausgelegt. Die Kallusbildung war bei diesem Ansatz schon nach 14 d für das bloße Auge sichtbar. Nach weiteren zwei bis drei Wochen konnten die Kalli vom Muttergewebe getrennt und selbstständig kultiviert werden, ohne dass die Gefahr des Absterbens gegeben war. Die Medienzusammensetzung wurde dabei zunächst beibehalten.

Da das Medium mit der Bezeichnung *AloeI* von Beginn an unbefriedigende Ergebnisse erbrachte, wurde dieses verworfen. Ausgehend von den verbleibenden drei Kompositionen wurden weitere Varianten mit reduziertem 6-BA-Gehalt erarbeitet.

Tabelle 32. Veränderter Phytohormon-Gehalt weiterer Varianten der Medienzusammensetzung.

Phytohormone	<i>AloeIIa</i>	<i>AloeIIb</i>	<i>AloeIIIa</i>	<i>AloeIIIb</i>	<i>AloeIVa</i>	<i>AloeIVb</i>
1-NAA [mg L ⁻¹]	6	6			3.7	3.7
2,4-D [mg L ⁻¹]			0.5	0.5		
6-BA [mg L ⁻¹]	1	0.5	0.5	0.2	0.5	0.2

Der Austausch von GSH gegen Cystein HCl brachte keinerlei Verbesserung und wurde daher nicht weiter verfolgt.

Der Einfluss der am Kulturmedium vorgenommenen Änderungen auf das Sekundärmetabolit-Spektrum wurde durch standardisierte Extraktion und Aufbereitung eines Teils der Kalluskulturen untersucht. Dazu wurden die Kalli vom Medium abgesammelt. Zur Reduzierung des Wassergehaltes erfolgte zunächst eine Zentrifugation, bei der die Zellen präzipitierten. Der sich ergebende wässrige Überstand wurde mit Ethylacetat extrahiert um sicherzugehen, dass keine Anthrachinone enthalten waren. Die wässrige Phase konnte daraufhin verworfen werden. Das Zellmaterial wurde zweifach mit Aceton extrahiert und der erhaltene Rohextrakt zur Trockne eingengt. Um Zucker, Aminosäuren und Salze zu entfernen, wurde der Rückstand noch einmal in Wasser aufgenommen und gegen Dichlormethan extrahiert. Dabei gingen alle Anthrachinone in die organische Phase über.

Die Extrakte wurden mittels analytischer HPLC (Standardbedingungen s. Kapitel 11.2) untersucht. Um den Gehalt an Anthrachinonen direkt an Hand der Chromatogramme der

einzelnen Kulturen vergleichen zu können wurden die HPLC-Proben so hergestellt, dass die Konzentration der Proben von der eingesetzten Kallusmenge (TG) abhängig war. Bezogen auf die Anthrachinon-Produktion stellte sich das Medium *AloeIIB* als das Effektivste heraus. Das Wachstum der Kulturen war aber auf *AloeIV* nach wie vor am besten.

16.3 Isolierung von Anthrachinonen aus *Aloe saponaria*

Diejenigen Teile der *A.-saponaria*-Mutterpflanze, die nicht für die Zellkultur-Etablierung dienten, wurden genutzt, um Sekundärmetabolite daraus zu isolieren. Die einzelnen Organe der Pflanze (Blätter, Stamm und Wurzel) wurden getrennt voneinander untersucht. Die Blätter enthielten keine Anthrachinone und wurden daher nicht ausführlicher untersucht.

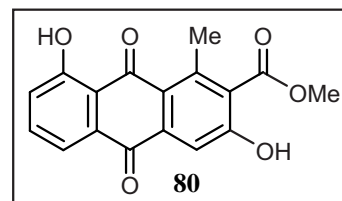
Das getrocknete Pflanzenmaterial (16.0 g Stamm- und 21.6 g Wurzelmaterial) wurde zerkleinert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert, so dass sich nach Entfernen des Lösungsmittels 1.8 g (Stamm) und 2.3 g (Wurzel) Rohextrakt (TG) als öliges Rückstand ergaben. Das Waschen dieses Rückstands mit Methanol führte zu einer braunen methanolischen Lösung. Nach Entfernen des Methanols blieb ein orangefarbener Rückstand im Kolben, der nur in unpolareneren Lösungsmitteln gut löslich war. Beide Fraktionen wurden per HPLC untersucht und enthielten Anthrachinone. Die Sekundärmetabolite aus der Methanolfraktion wurden durch präparative HPLC isoliert. Dabei handelte es sich ausschließlich um Monomere und Präanthrachinone. Da die zweite Fraktion Methanol-unlöslich war, wurde hier auf die Methode der präparativen Dünnschichtchromatographie (PSC) auf vorbereiteten PSC-Platten der Firma *Merck* zurückgegriffen. Die Trennung über Kieselgelsäulen erwies sich nicht als effektiv. Als Laufmittel kam ein mit einem Tropfen Ameisensäure versetztes Gemisch aus Ethylacetat und Petrolether (1:2) zum Einsatz. Auf diesem Wege wurden dimere Anthrachinone isoliert.

16.4 Aloesaponarin I (80)

Gelblich-brauner Feststoff (MeOH, 12.0 mg).

Schmp.: 190 °C (MeOH),

Lit.^[276] 199-200 °C (keine Angabe).



UV (MeOH): λ_{\max} = 215 (1.96), 275 (1.75), 407 (0.41) nm.

¹H-NMR (600 MHz, Aceton-d₆): δ = 2.71 (3 H, 1-CH₃), 3.93 (3 H, 2-Me-Ester), 7.31 (d, ³J = 8.06 Hz, 1 H, 5-H), 7.70 (d, ³J = 7.55 Hz, 1 H, 7-H), 7.73 (dd, ³J = 8.06 Hz, ³J = 7.55 Hz, 1 H, 6-H), 7.76 (d, ³J = 7.55 Hz, 1 H, 4-H), 12.91 (8-OH) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, Aceton-d₆): δ = 20.3 (1-CH₃), 52.7 (2-Me-Ester), 112.9 (C-4), 117.9 (C-12), 119.2 (C-7), 124.2 (C-13), 125.1 (C-5), 130.8 (C-2), 133.8 (C-11), 136.8 (C-6), 138.8 (C-14), 142.7 (C-1), 159.9 (C-3), 162.9 (C-8), 167.9 (2-COOME), 182.8 (C-10), 190.7 (C-9) ppm.

HRMS (ESI) berechnet für C₁₇H₁₂NaO₆: 335.0532 [M + Na]⁺;

gemessen: 335.0526 [M + Na]⁺.

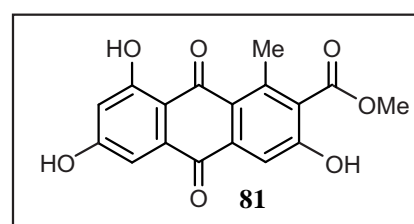
Alle ermittelten Werten standen im Einklang mit den in der Literatur angegebenen Daten.^[260,276]

16.5 Laccainsäure-Methylester (81)

Gelblich-brauner Feststoff (MeOH, 10.5 mg).

Schmp.: 285 °C (Aceton),

Lit.^[277] 282-284 °C (Aceton).



UV (MeOH): λ_{\max} = 215 (1.96), 275 (1.75), 407 (0.41) nm.

¹H-NMR (600 MHz, Aceton-d₆): δ = 2.66 (3 H, 1-CH₃), 3.92 (3 H, 2-Me-Ester), 6.62 (d, ⁴J = 2.26 Hz, 1 H, 7-H), 7.13 (d, ⁴J = 2.24 Hz, 1 H, 5-H), 7.67 (s, 1 H, 4-H) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, Aceton-d₆): δ = 20.2 (1-CH₃), 52.6 (2-Me-Ester), 108.1 (C-5), 109.3 (C-7), 111.5 (C-12), 113.1 (C-4), 124.0 (C-13), 130.9 (C-2), 135.3 (C-11), 137.9 (C-14), 142.2

(C-1), 159.2 (C-3), 165.1 (C-6), 166.1 (C-8), 168.1 (2-COOMe), 182.7 (C-10), 189.2 (C-9) ppm.

HRMS (ESI) berechnet für $C_{17}H_{11}O_7$: 327.0505 [M-H]⁻;
gemessen: 327.0510 [M-H]⁻.

Alle ermittelten Werten standen im Einklang mit den in der Literatur angegebenen Daten.^[260,277]

16.6 Aloesaponol I (79)

Gelblich-brauner Feststoff (MeOH, 11.3 mg).

Schmp.: 285 °C (Aceton),

1) Lit.^[277] 282-284 °C (Aceton).⁷

UV (MeOH): λ_{\max} = 223 (0.75), 275 (2.05), 315 (0.38), 379 (0.51) nm.

$[\alpha]_D^{20}$ = -4.5 (c = 0.01, Aceton),

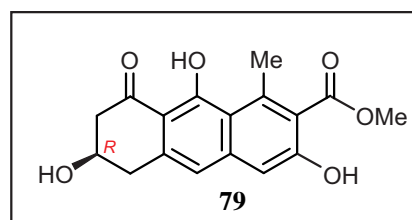
Lit^[260] = -45 (c = 0.1, Aceton).

¹H-NMR (600 MHz, Aceton-d₆): δ = 2.79 (s, 3 H, 1-CH₃), 3.81 (s, 3 H, 2-Me-Ester), 2.75 (dd, ²J = 16.8 Hz, ³J = 7.12 Hz, 1 H, H-7_{eq}), 2.98 (d, ²J = 16.8 Hz, 1 H, H-7_{ax}), 3.00 (d, ²J = 15.9 Hz, 1 H, H-5_{eq}), 3.21 (d, ²J = 15.9 Hz, 1 H, H-5_{ax}), 4.41-4.37 (m, 1-H, H-6), 6.90 (s, 1 H, H-10), 6.99 (s, 1 H, H-4) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, Aceton-d₆): δ = 21.1 (1-CH₃), 38.8 (C-5), 47.6 (C-7), 52.3 (2-Me-Ester), 66.0 (C-6), 108.5 (C-4), 111.4 (C-12), 117.2 (C-13), 117.6 (C-10), 126.2 (C-2), 138.2 (C-11), 138.6 (C-14), 142.2 (C-1), 155.9 (C-3), 167.0 (C-9), 169.1 (2-COOMe), 204.3 (C-8) ppm.

HRMS (ESI) berechnet für $C_{17}H_{15}O_6$: 315.0869 [M-H]⁻;
gemessen: 315.0866 [M-H]⁻.

Alle ermittelten Werten standen im Einklang mit den in der Literatur angegebenen Daten.^[260,277]



⁷ An dem verwendeten Instrument konnte keine höhere Konzentration gemessen werden. Da der Drehwert Konzentrationsabhängig ist, ergibt sich rechnerisch ein $[\alpha]_D^{20}$ -Wert, der identisch mit den Literaturangaben war.

16.7 Asphodelin (82)

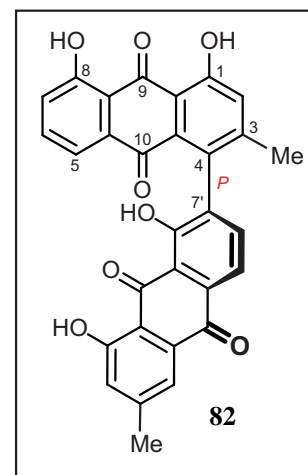
Orange-gelber Feststoff (Aceton, 11.3 mg).

Schmp.: 278 °C (Aceton),

Lit.^[278] 274-294°C (Aceton).

$[\alpha]_D^{20} = +99$ ($c = 0.024$, Aceton),

Lit.^[261] $= +90$ ($c = 0.05$, CHCl₃).



CD (MeOH): $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon) = 461 (4.93), 283 (-4.62), 262 (5.83), 225 (-17.97), 221 (-6.79), 215 (-10.26), 211 (-4.39), 208 (-9.29), 202 (29.15)$.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 2.14$ (s, 3 H, 3-CH₃), 2.49 (s, 3 H, 3'-CH₃), 7.12 (s, 1 H, 2'-H), 7.27 (d⁸, 1 H, 7-H), 7.30 (s, 1 H, 2-H), 7.39 (d, ³J = 7.6 Hz, 1 H, 6'-H), 7.57 (d, ³J = 7.7 Hz, 1 H, 5-H), 7.60 (dd, ³J = 7.7 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1 H, 6-H), 7.71 (s, 1 H, 4'-H), 7.96 (d, ³J = 7.6 Hz, 1 H, 5'-H), 12.01 (s, 1 H, 1'-OH), 12.03 (s, 1 H, 8'-OH), 12.39 (s, 1 H, 8'-OH), 12.58 (s, 1 H, 1-OH) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 21.4$ (3-CH₃), 22.2 (3'-CH₃), 114.8 (C-13), 114.0 (C-13), 115.4 (C-12), 115.7 (C-12'), 120.0 (C-5), 120.3 (C-5), 121.3 (C-4'), 124.1 (C-7), 124.3 (C-2'), 125.5 (C-2), 130.3 (C-4), 131.0 (C-14'), 132.6 (C-11'), 133.5 (C-14), 134.0 (C-11), 135.9 (C-6'), 137.1 (C-6), 137.2 (C-7'), 149.1 (C-3), 149.4 (C-3'), 159.6 (C-8'), 162.0 (C-8), 162.7 (C-1'), 162.9 (C-1), 181.9 (C-10'), 182.4 (C-10), 192.8 (C-9, C-9') ppm.

HRMS (ESI) berechnet für C₃₀H₁₇O₈: 505.0923 [M-H]⁻;

gemessen: 505.0928 [M-H]⁻.

Alle ermittelten Werten standen im Einklang mit den in der Literatur angegebenen Daten.^[261,278]

⁸ Signal war zur Hälfte vom Lösungsmittelpeak verdeckt, so dass keine Kopplungskonstante gemessen werden konnte.

16.8 10-Hydroxy-10,7'-(chrysophanolanthron)-chrysophanol (83)

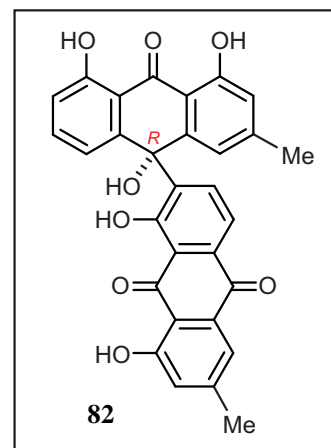
Orange-gelber Feststoff (Aceton, 6.8 mg).

Schmp.: 221 °C (Aceton),

Lit.^[269] 225-227°C (Aceton).

$[\alpha]_D^{20} = -27$ ($c = 0.043$, Aceton),

Lit^[261] = -30 ($c = 0.03$, Dioxan).



UV (MeOH): $\lambda_{\max} = 223$ (1.27), 263 (0.72), 291 (0.39), 387 (0.37), 431 (0.32) nm.

CD (MeOH): $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon) = 308$ (1.33), 270 (-3.95), 257 (-0.35), 234 (-5.81), 217 (4.46).

¹H-NMR (600 MHz, Aceton-d₆): $\delta = 2.24$ (s, 3 H, 3-CH³), 2.46 (s, 3 H, 3'-CH³), 6.75 (s, 1 H, 4-H), 6.76 (s, 1 H, 2-H), 6.88 (d, ³J = 7.7 Hz, 1 H, 5-H), 6.91 (d, ³J = 8.3 Hz, 1 H, 7-H), 7.12 (s, 1 H, 2'), 7.49 (dd, ³J = 7.7 Hz, ³J = 8.3 Hz, 1 H, 6-H), 7.60 (s, 1 H, 4'-H), 7.98 (d, ³J = 7.9 Hz, 1 H, 5'-H), 8.80 (d, ³J = 7.9 Hz, 1 H, 6'-H), 12.35 (Ar-OH), 12.33 (Ar-OH) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, Aceton-d₆): $\delta = 22.04$ (3'-CH₃), 22.06 (3-CH₃), 70.1 (C-10), 113.3 (C-13), 114.6 (C-13'), 115.4 (C-12), 116.6 (C-12'), 117.5 (C-7), 117.8 (C-2), 119.8 (C-5'), 120.2 (C-5), 121.4 (C-4), 121.5 (C-4'), 124.7 (C-2'), 133.8 (C-6'), 137.5 (C-6), 142.7 (C-11'), 148.5 (C-11), 150.6 (C-3'), 159.4 (C-7'), 162.7 (C-8'), 162.9 (C-8), 163.2 (C-1), 163.5 (C-1'), 182.0 (C-10'), 193.6 (C-9'), 194.2 (C-9) ppm.

HRMS (ESI) berechnet für C₃₀H₁₉O₈: 507.1085 [M-H]⁻;

gemessen: 507.1080 [M-H]⁻.

Alle ermittelten Werten standen im Einklang mit den in der Literatur angegebenen Daten.^[261,269] Die Enantiomeren-Reinheit wurde mittels HPLC an chiraler Phase einer Lux-Cellulose-1-Säule (Fa. *Phenomenex*) und isokratischen Bedingungen (Wasser + 0.05 % TFA (A) und MeCN + 0.05 % TFA (B); 10 % A, Fluss 0.75 mL min⁻¹) festgestellt.

LITERATUR UND ANMERKUNGEN

- [1] A. De Pasquale; Pharmacognosy: The Oldest Modern Science; *J. Ethnopharmacol.* **1984**, *11*, 1-16.
- [2] M. Heinrich; *Ethnopharmazie und Ethnobotanik (Eine Einführung)*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2002**.
- [3] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader; The Influence of Natural Products Upon Drug Discovery; *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 215-234.
- [4] F. Chast; A Brief History of Drugs: From Plant Extracts to DNA Technology; in *The Practice of Medicinal Chemistry* (Hrsg.: C. G. Wermuth), Academic Press, Amsterdam, **2003**, S. 3-28.
- [5] M. A. Huffman; Current Evidence for Self-Medication in Primates: A Multidisciplinary Perspective; *Am. J. Phys. Anthropol.* **1997**, *104*, 171-200.
- [6] M. Wink; A Short History of Alkaloids; in *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications* (Hrsg.: M. F. Roberts), Plenum Press, New York, **1998**, S. 11-44.
- [7] R. Upton; *Valeriana officinalis*; *J. Altern. Compl. Med.* **2001**, *7*, 15-17.
- [8] L. Roth, M. Daunderer, K. Kormann; *Giftpflanzen - Pflanzengifte*; 4. Aufl., Nikol Verlagsgesellschaft, Hamburg, **1996**.
- [9] G. Keil, C. Leitz, J. F. Quack, J. Stephan, E. Strouhal, U. Weser; Papyrus Ebers und die Antike Heilkunde, Akten der Tagung vom 15.-16.3.2002; in *Papyrus Ebers und die Antike Heilkunde* (Hrsg.: H.-W. Fischer-Elfert), Harrassowitz Verlag, Leipzig, **2005**.
- [10] T. M. Kutchan; Alkaloid Biosynthesis - The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants; *Plant Cell* **1995**, *7*, 1059-1070.
- [11] E. Breitmaier; *Alkaloide - Betäubungsmittel, Halluzinogene und andere Wirkstoffe, Leitstrukturen aus der Natur*, Verlag B. G. Teubner, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden, **2002**.
- [12] K. W. Bentley; *The Isoquinoline Alkaloids*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, **1998**.
- [13] P. J. Hanzlik; 125th Anniversary of the Discovery of Morphine by Sertürner; *J. Am. Pharm. Assoc.* **1929**, *18*, 375-384.
- [14] U. Holzgrabe; 200 Years of Morphine. New Developments from Research; *Pharm. Ztg.* **2005**, *150*, 32-38.

- [15] J. Ziegler, P. J. Facchini, R. Geißler, J. Schmidt, C. Ammer, R. Kramell, S. Voigtländer, A. Gesell, S. Pienkny, W. Brandt; Evolution of Morphine Biosynthesis in Opium Poppy; *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1696-1707.
- [16] J. Bruneton, A. Bouquet, A. Fournet, A. Cavé; La Triphyophylline, Nouvel Alcaloïde Isolé du *Triphyophyllum peltatum*; *Phytochemistry* **1976**, *15*, 817-818.
- [17] G. Bringmann, M. Rübenacker, J. R. Jansen, D. Scheutzow, L. Aké Assi; On the Structure of the Dioncophyllaceae Alkaloids Dioncophylline A ("Triphyophylline") and "O-Methyl-Triphyophylline"; *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 639-642.
- [18] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Grüne, J. Schlauer; A New Biosynthetic Pathway to Alkaloids in Plants: Acetogenic Isoquinolines; *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1523-1525; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 1464-1466.
- [19] G. Bringmann, F. Pokorny; The Naphthylisoquinoline Alkaloids; in *The Alkaloids, Bd. 46* (Hrsg.: G. A. Cordell), Academic Press, New York, **1995**, S. 127-271.
- [20] G. Bringmann, G. François, L. Aké Assi, J. Schlauer; The Alkaloids of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae); *Chimia* **1998**, *52*, 18-28.
- [21] G. Bringmann, H. Rischer, M. Wohlfarth, J. Schlauer, L. Aké Assi; Droserone from Cell Cultures of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) and its Biosynthetic Origin; *Phytochemistry* **2000**, *53*, 339-343.
- [22] H. Rischer, Diplomarbeit, Sekundärmetabolismus von Ancistrocladaceen und Dioncophyllaceen in vitro und in vivo, Universität Würzburg, **1998**.
- [23] H. Rischer; Acetogenine Sekundärmetabolite und ihre Produzenten: Physiologie und Botanik ausgewählter Vertreter der Ancistrocladaceae, Dioncophyllaceae und Nepenthaceae sowie von *Antidesma* (Euphorbiaceae); Dissertation, Universität Würzburg, **2002**.
- [24] G. Bringmann, C. Günther, M. Ochse, O. Schupp, S. Tasler; Biaryls in Nature: A Multi-Faceted Class of Stereochemically, Biosynthetically, and Pharmacologically Intriguing Secondary Metabolites; in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Bd. 82* (Hrsg.: W. Herz, H. Falk, G. C. Kirby, R. E. Moore), Springer, Wien, New York, **2001**.
- [25] G. Bringmann, A. Irmer; Acetogenic Anthraquinones: Biosynthetic Convergence and Chemical Evidence of Enzymatic Cooperation in Nature; *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 499-511.

- [26] G. Bringmann, T. F. Noll, T. A. M. Gulder, M. Grüne, M. Dreyer, C. Wilde, F. Pankewitz, M. Hilker, G. D. Payne, A. L. Jones, M. Goodfellow, H.-P. Fiedler; Different Polyketide Folding Modes Converge to an Identical Molecular Architecture; *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 429-433.
- [27] G. Bringmann, T. A. M. Gulder, A. Hamm, M. Goodfellow, H.-P. Fiedler; Multiple Convergence in Polyketide Biosynthesis: A Third Folding Mode to the Anthraquinone Chrysophanol; *Chem. Commun.* **2009**, 6810-6812.
- [28] A. Yagi, M. Kenji, I. Nishioka; Studies on the Constituents of *Aloe saponaria* Haw. I. The Structure of Tetrahydroanthracene Derivatives and the Related Anthraquinones; *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, *22*, 1159-1166.
- [29] H. Cui, K. Shaaban, M. Schiebel, S. Qin, H. Laatsch; New Antibiotic with Typical Plant Anthraquinone Structure Obtained Studying Terrestrial and Marine Streptomycetes; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 419-421.
- [30] 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 Streptomyces; *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 931-941.
- [31] U. Lüttge, M. Kluge, G. Bauer; *Botanik*; 4. Aufl., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2002**, S. 1-20.
- [32] W. Larcher; *Ökophysiologie der Pflanzen*; 6. Aufl., Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart **2001**, S 16.
- [33] A. K. Mukherjee, S. Basu, N. Sarkar, A. C. Ghosh; Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products; *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1467-1486.
- [34] E. Wall Monroe, C. Wani Mansukh; Paclitaxel: From Discovery to Clinic; in *Taxane Anticancer Agents*, Bd. 583, American Chemical Society, Washington, DC, **1994**, S. 18-30.
- [35] J. W. v. Goethe; *Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu erklären*, Ettingersche Buschhandlung, Gotha, **1790**.
- [36] P. Sitte, H. Ziegler, F. Ehrendorf, A. Bresinsky; Morphologie und Anatomie der Sprosspflanzen; in *Strassburger - Lehrbuch der Botanik*, 34. Aufl., Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, **1999**, S. 143-204.

- [37] <http://www.goethehaus-frankfurt.de/goethemuseum/raum-8>, <http://www.duits.de/literatuur/auteurs/goethe>, <http://www.zvab.com/buch-suchen/titel/die-metamorphose-der-pflanzen/autor/goethe>.
- [38] L. Taiz, E. Zeiger; Pflanzen- und Zellaufbau; in *Physiologie der Pflanzen*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, **2000**, S. 1-34.
- [39] U. Kutschera; Interaktionen Pflanze - Tierwelt: Sekundärmetabolite; in *Prinzipien der Pflanzenphysiologie, 2. Auflage*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, **2002**, S. 277-290.
- [40] L. Taiz, E. Zeiger; Wachstum, Entwicklung und Differenzierung; in *Physiologie der Pflanzen*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, **2000**, S. 445-486.
- [41] D. Heß; *Pflanzenphysiologie; 10. Aufl.*, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, **1999**, S. 316-323, 342-371.
- [42] D. Heß; *Biotechnologie der Pflanzen*, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, **1992**, S. 48-55.
- [43] M. H. Zenk; Pflanzliche Zellkulturen in der Arzneimittelforschung; *Naturwissenschaften* **1982**, *69*, 534-536.
- [44] D. Alabadí, M. A. Blázquez, J. Carbonell, C. Ferrándiz, M. A. Pérez-Amador; Instructive Roles for Hormones in Plant Development; *Int. J. Dev. Biol.* **2009**, *53*, 1597-1608.
- [45] S. Seeta Ram Rao, B. Vidya Vardhini, E. Sujatha, S. Anuradha; Brassinosteroids – A New Class of Phytohormones; *Curr. Sci. India* **2002**, *82*, 1239-1245.
- [46] C. Wasternack, B. Hause; Stressabwehr und Entwicklung: Jasmonate - Chemische Signale in Pflanzen; *Biol. unserer Zeit* **2000**, *30*, 312-320.
- [47] S. D. Clouse, J. M. Sasse; Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development; *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, *49*, 427-451.
- [48] A. J. K. Koo, G. A. Howe; The Wound Hormone Jasmonate; *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1571-1580.
- [49] S. Ramachandra Rao, G. A. Ravishankar; Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Secondary Metabolites; *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 101-153.
- [50] T. Werner, V. Motyka, M. Strnad, T. Schmülling; Regulation of Plant Growth by Cytokinin; *PNAS* **2001**, *98*, 10487-10492.
- [51] T. Gaspar, C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. Reid, T. Thorpe; Plant Hormones and Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture; *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **1996**, *32*, 272-289.

- [52] S. B. Gelvin; *Agrobacterium* in the Genomics Age; *Plant Physiol.* **2009**, *150*, 1665-1676.
- [53] P. K. Pati, S. P. Rath, M. Sharma, A. Sood, P. S. Ahuja; *In vitro* Propagation of Rose - A Review; *Biotech. Adv.* **2006**, *24*, 94-114.
- [54] G. R. Rout, A. Mohapatra, S. M. Jain; Tissue Culture of Ornamental Pot Plant: A Critical Review on Present Scenario and Future Prospects; *Biotech. Adv.* **2006**, *24*, 531-560.
- [55] V. Kumar, M. Madhava Naidu, G. Ravishankar; Developments in Coffee Biotechnology - In Vitro Plant Propagation and Crop Improvement; *Plant Cell, Tiss. Organ Cul.* **2006**, *87*, 49-65.
- [56] D. C. W. Brown, T. A. Thorpe; Crop Improvement Through Tissue Culture; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *11*, 409-415.
- [57] S. Chugh, S. Guha, I. U. Rao; Micropropagation of Orchids: A Review on the Potential of Different Explants; *Scientia Horticulturae* **2009**, *122*, 507-520.
- [58] D. Jones, B. Tisserat; Clonal Propagation of Orchids; in *Plant Cell Tissue Cult., Bd. 6*, Humana Press, Clifton, **1990**, S. 181-191.
- [59] F. Engelmann; Use of Biotechnologies for Conserving Plant Biodiversity; *Acta Hort.* **2009**, *812*, 63-82.
- [60] N. V. Ket, E. J. Hahn, S. Y. Park, D. Chakrabarty, K. Y. Paek; Micropropagation of an Endangered Orchid *Anoectochilus formosanus*; *Biologia Plantarum* **2004**, *48*, 339-344.
- [61] A. Koulman, A. C. Beekman, N. Pras, W. J. Quax; The Bioconversion Process of Deoxypodophyllotoxin with *Linum flavum* Cell Cultures; *Planta Med.* **2003**, *69*, 739-744.
- [62] S. M. K. Rates; Plants as Source of Drugs; *Toxicon* **2001**, *39*, 603-613.
- [63] M. Y. Khan, S. Aliabbas, V. Kumar, S. Rajkumar; Recent Advances in Medicinal Plant Biotechnology; *Ind. J. Biotechnol.* **2009**, *8*, 9-22.
- [64] K.-M. Oksman-Caldentey, D. Inzé; Plant Cell Factories in the Post-Genomic Era: New Ways to Produce Designer Secondary Metabolites; *Trends Plant Sci.* **2004**, *9*, 433-440.
- [65] G. Bringmann, S. Rüdener, A. Irmer, T. Bruhn, R. Brun, T. Heimberger, T. Stühmer, R. Bargou, M. Chatterjee; Antitumoral and Antileishmanial Dioncoquinones and Ancistroquinones from Cell Cultures of *Triphyophyllum peltatum*

- (Dioncophyllaceae) and *Ancistrocladus abbreviatus* (Ancistrocladaceae); *Phytochemistry* 2008, 69, 2501-2509.
- [66] M. Koichi, K. Shigekazu, Y. Toshihiro, M. Teijiro, F. Yasuhiro, Y. Yasuyuki; High Density Culture of *Coptis japonica* Cells Increases Berberine Production; *J. Chem.Technol. Biotechnol.* **1989**, 46, 61-69.
- [67] M. Petersen, M. S. J. Simmonds; Rosmarinic Acid; *Phytochemistry* **2003**, 62, 121-125.
- [68] S. D. Cline, C. J. Coscia; Stimulation of Sanguinarine Production by Combined Fungal Elicitation and Hormonal Deprivation in Cell Suspension Cultures of *Papaver bracteatum*; *Plant Physiol.* **1988**, 86, 161-165.
- [69] U. Eilert, W. G. W. Kurz, F. Constable; Stimulations of Sanguinarine Accumulation in *Papaver somniferum* Cell Cultures by Fungal Elicitors; *J. Plant Physiol.* **1985**, 119, 65-76
- [70] X. Chen, L. Yang, N. Zhang, J. A. Turpin, R. W. Buckheit, C. Osterling, J. J. Oppenheim, O. M. Z. Howard; Shikonin, a Component of Chinese Herbal Medicine, Inhibits Chemokine Receptor Function and Suppresses Human Immunodeficiency Virus Type 1; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 2810-2816.
- [71] V. P. Papageorgiou, A. N. Assimopoulou, E. A. Couladouros, D. Hepworth, K. C. Nicolaou; The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products; *Angew. Chem.* **1999**, 111, 280-311; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, 38, 270-301.
- [72] Q. Lu, W. Liu, J. Ding, J. Cai, W. Duan; Shikonin Derivatives: Synthesis and Inhibition of Human Telomerase; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1375-1378.
- [73] Hippocrates; On Ulcers; **400 v. Chr.**; Übersetzung von F. Adams, einsehbar bei *Internet Classics Archive*, <http://classics.mit.edu/Hippocrates/ulcers.4.4.html>.
- [74] K. C. Nicolaou, H. David; Concise and Efficient Total Syntheses of Alkannin and Shikonin; *Angew. Chem.* **1998**, 110, 864-866; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, 37, 839-841.
- [75] M. Tabata; The Mechanism of Shikonin Biosynthesis in *Lithospermum* Cell Cultures; *Plant Tiss. Cult. Lett.* **1996**, 13, 117-125.
- [76] A. Giri, V. Dhingra, C. C. Giri, A. Singh, O. P. Ward, M. L. Narasu; Biotransformations Using Plant Cells, Organ Cultures and Enzyme Systems: Current Trends and Future Prospects; *Biotech. Adv.* **2001**, 19, 175-199.

-
- [77] T. Suga, T. Hirata; Biotransformation of Exogenous Substrates by Plant Cell Cultures; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2393-2406.
- [78] K. Ishihara, H. Hamada, T. Hirata, N. Nakajima; Biotransformation Using Plant Cultured Cells; *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2003**, *23*, 145-170.
- [79] R. Pereira Limberger, A. Mendes Aleixo, A. G. Fett-Neto, A. T. Henriques; Bioconversion of (+)- and (-)- α -Pinene to (+)- and (-)-Verbenone by Plant Cell Cultures of *Psychotria brachyceras* and *Rauvolfia sellowii*; *Electron. J. Biotechnol.* **2007**, *10*, 500-507.
- [80] V. Molmooori, K. Srisailam, V. Ciddi; Biotransformation of Valdecoxib by Plant Cell Cultures; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, *144*, 201-212.
- [81] www.fda.gov
- [82] M. Y. Khan, S. Aliabbas, V. Kumar, S. Rajkumar; Recent Advances in Medicinal Plant Biotechnology; *Ind. J. Biotechnol.* **2009**, *8*, 9-22.
- [83] S. Horinouchi; Combinatorial Biosynthesis of Plant Medicinal Polyketides by Microorganisms; *Curr. Opin. Chem. Bio.* **2009**, *13*, 197-204.
- [84] I. Miyahisa, N. Funa, Y. Ohnishi, S. Martens, T. Moriguchi, S. Horinouchi; Combinatorial Biosynthesis of Flavones and Flavonols in *Escherichia coli*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71*, 53-58.
- [85] J. Hutchinson, J. M. Dalziel; Tropical African Plants: Flacourtiaceae; *Bull. Misc. Inf., Kew* **1928**, *1*, 30-32.
- [86] H. Baillon; Observations Sur Quelques Nouveaux Types du Congo; *Bull. Soc. Linn., Paris* **1890**, *109*, 865-872.
- [87] E. Gilg; Flacourtiaceae Africanæ; *Engl. Bot. Jahrb.* **1908**, *40*, 486.
- [88] O. Warburger; Die natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigen Arten insbesondere den Nutzpflanzen; in *Flacourtiaceae* (Hrsg.: A. Engler, K. Prantl), Verlag Wilhelm Engelmann, Leipzig, **1895**.
- [89] H. K. Airy Shaw; On the Dioncophyllaceae, A Remarkable New Family of Flowering Plants; *Kew Bull* **1951**, *6*, 327-347.
- [90] G. Heubl, G. Bringmann, H. Meimberg; Molecular Phylogeny and Character Evolution of Carnivorous Plant Families in Caryophyllales - Revisited; *Plant Biol.* **2006**, *8*, 821-830.

- [91] G. Bringmann, M. Wenzel, H. P. Bringmann, J. Schlauer; Uptake of the Amino Acid Alanine by Digestive Leaves: Proof of Carnivory in the Tropical Liana *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae); *Carniv. Pl. Newsl.* **2001**, 30, 15-21.
- [92] S. Green, T. L. Green, Y. Heslop-Harrison; Seasonal Heterophylly and Leaf Gland Features in *Triphyophyllum* (Dioncophyllaceae), a New Carnivorous Plant Genus; *Bot. J. Linn. Soc.* **1979**, 78, 99-116.
- [93] S. Porembski, W. Barthlott; Dioncophyllaceae; in *The Families and Genera of Vascular Plants, Bd. 5* (Hrsg.: K. Kubitzki, C. Bayer), Springer, Heidelberg, **2002**, S. 178-181.
- [94] G. Bringmann, J. Schlauer, K. Wolf, H. Rischer, U. Buschbom, A. Kreiner, F. Thiele, M. Duschek, L. Aké Assi; Cultivation of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae), the Part-Time Carnivorous Plant; *Carniv. Pl. Newsl.* **1999**, 28, 7-13.
- [95] G. Bringmann, H. Rischer, J. Schlauer, K. Wolf, A. Kreiner, M. Duschek; The Tropical Liana *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae): Formation of Carnivorous Organs is Only a Facultative Prerequisite for Shoot Elongation; *Carniv. Pl. Newsl.* **2002**, 31, 44-52.
- [96] G. Bringmann, H. Rischer; In Vitro Propagation of the Alkaloid-Producing Rare African Liana, *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae); *Plant Cell Rep.* **2001**, 20, 591-595.
- [97] W. C. Anderson; Tissue Culture Propagation of Red and Black Raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*; *Act. Hort.* **1980**, 112, 13-20.
- [98] T. Murashige, F. Skoog; A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures; *Physiol. Plant.* **1962**, 15, 473-497.
- [99] W. Barthlott, S. Porembski, R. Seine, I. Theisen; *Karnivoren - Biologie und Kultur Fleischfressender Pflanzen*, Eugen Ulmer, Stuttgart, **2004**.
- [100] J. E. Marburger; Glandular Leaf Structure of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae): A "Fly-Paper" Insect Trapper; *Am. J. Bot.* **1979**, 66, 404-411.
- [101] R. Schmid; Die Systematische Stellung der Dioncophyllaceae; *Bot. Jahrb. Syst.* **1964**, 83, 1-56.
- [102] K. Rembold, A. Irmer, H. Rischer, S. Poppinga, G. Bringmann; Propagation of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) and Observations on its Carnivory; *Carniv. Pl. Newsl.* **2010**, 71-77.

- [103] G. Bringmann, J. R. Jansen, H. Reuscher, M. Rübenacker, K. Peters, H. G. von Schnering; First Total Synthesis of (-)-Dioncophylline A ("Triphyophylline") and of Selected Stereoisomers: Complete (Revised) Stereostructure; *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 643-646.
- [104] G. Bringmann, D. Koppler, D. Scheutzow, A. Porzel; Determination of Configuration at the Biaryl Axes of Naphthylisoquinoline Alkaloids by Long-Range NOE Effects; *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35*, 297-301.
- [105] G. Bringmann, J. Mühlbacher, C. Reppes, J. Fleischhauer; MD-Based CD Calculations for the Assignment of the Absolute Axial Configuration of the Naphthylisoquinoline Alkaloid Dioncophylline A; *J. Comp. Chem.* **2001**, *22*, 1273-1278.
- [106] G. Bringmann, W. Saeb, K. Peters, E.-M. Peters; The Absolute Stereostructure of Dioncophylline A by Anomalous X-Ray Dispersion of a 5-Bromo Derivative; *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1283-1285.
- [107] M. Rübenacker; Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese von Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus *Triphyophyllum peltatum*; Dissertation, Universität Würzburg, **1991**.
- [108] Die Nummerierung der Naphthaline erfolgt (entgegen der IUPAC-Nomenklatur) durchgehend so, dass ein 2-Methyl-4,5-dioxygenierungsmuster resultiert; dies ermöglicht eine klarere Vergleichbarkeit der Kupplungstypen der Naphthylisochinolin-Alkaloide.
- [109] G. Bringmann, M. Rübenacker, T. Geuder, L. Aké. Assi; Dioncophylline B, a Naphthylisoquinoline Alkaloid with a New Coupling Type from *Triphyophyllum peltatum*; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3845-3847.
- [110] G. Bringmann, M. Rübenacker, R. Weirich, L. Aké Assi; Dioncophylline C from the Roots of *Triphyophyllum peltatum*, the First 5,1'-Coupled Dioncophyllaceae Alkaloid; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 4019-4024.
- [111] G. Bringmann, M. Wenzel, M. Rübenacker, M. Schäffer, M. Rückert, L. Aké Assi; Dioncophylline D and 8-O-Methyldioncophylline D, 7,8'-Coupled Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Triphyophyllum peltatum*; *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1151-1155.
- [112] G. Bringmann, C. Günther, W. Saeb, J. Mies, R. Brun, L. Aké Assi; 8-O-Methyldioncophyllinol B and Revised Structures of Other 7,6'-Coupled

- Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae); *Phytochemistry* **2000**, *54*, 337-346.
- [113] C. Günther; Totalsynthese von Naphthylisochinolininen sowie Isolierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen aus tropischen Heilpflanzen und Mikroorganismen; Dissertation, Universität Würzburg, Würzburg, **1999**.
- [114] G. Bringmann, K. Messer, B. Schwöbel, R. Brun, L. Aké Assi; Habropetaline A, an Antimalarial Naphthylisoquinoline Alkaloid from *Triphyophyllum peltatum*; *Phytochemistry* **2003**, *62*, 345-349.
- [115] G. Bringmann, M. Rübenacker, P. Vogt, H. Busse, L. Aké Assi, K. Peters, H. G. von Schnering; Dioncopeltine A and Dioncolactone A: Alkaloids from *Triphyophyllum peltatum*; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1691-1696.
- [116] G. Bringmann, K. Messer, M. Wohlfarth, J. Kraus, K. Dumbuya, M. Ruckert; 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.
- [117] 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.
- [118] G. Bringmann, F. Pokorny, H. Reuscher, D. Lisch, L. Aké Assi; Novel Ancistrocladaceae and Dioncophyllaceae Type Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus abbreviatus*: A Phylogenetic Link Between the Two Families?; *Planta Med.* **1990**, *56*, 469-497.
- [119] G. Bringmann, F. Pokorny, M. Stäblein, M. Schäffer, L. Aké Assi; Ancistrobrevine C from *Ancistrocladus abbreviatus*: The First Mixed "Ancistrocladaceae/Dioncophyllaceae-Type" Naphthylisoquinoline Alkaloid; *Phytochemistry* **1993**, *33*, 1511-1515; Errata; *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1663-1663.
- [120] G. Bringmann, R. Zagst, D. Lisch, L. Aké Assi; Dioncoline A and its Atropisomer: "Inverse Hybrid Type" Ancistrocladaceae/Dioncophyllaceae Alkaloids from *Ancistrocladus abbreviatus*; *Planta Med.* **1992**, *58* (Suppl. 1), 702-703.
- [121] 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.

- [122] G. Bringmann, I. Kajahn, M. Reichert, S. E. H. Pedersen, J. H. Faber, T. Gulder, R. Brun, S. B. Christensen, A. Ponte-Sucré, H. Moll, G. Heubl, V. Mudogo; Ancistrocladinium A and B, the First *N,C*-Coupled Naphthyldihydroisoquinoline Alkaloids, from a Congolese *Ancistrocladus* Species; *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9348-9356.
- [123] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Rückert, J. Schlauer; The Polyketide Folding Mode in the Biogenesis of Isoshinanolone and Plumbagin from *Ancistrocladus heyneanus* (Ancistrocladaceae); *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8445-8448.
- [124] G. Bringmann, D. Feineis; Stress-Related Polyketide Metabolism of Dioncophyllaceae and Ancistrocladaceae; *J. Exp. Bot.* **2001**, *52*, 2015-2022.
- [125] K. S. Kang, G. T. Veeder, P. J. Mirrasoul, T. Kaneko, I. W. Cottrell; Agar-Like Polysaccharide Produced by a *Pseudomonas* Species: Production and Basic Properties; *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *43*, 1086-1091.
- [126] M. A. O'Neill, R. R. Selvendran, V. J. Morris; Structure of the Acidic Extracellular Gelling Polysaccharide Produced by *Pseudomonas elodea*; *Carbohydr. Res.* **1983**, *124*, 123-133.
- [127] J. N. Shah; Gellan Gum and Its Applications – A Review; *Pharm. Rev.* **2007**, *5*, www.pharmainfo.net/e-journal.
- [128] B. F. Trump, I. K. Berezsky, T. Sato, K. U. Laiho, P. C. Phelps, N. DeClaris; Cell Calcium, Cell Injury and Cell Death; *Environ. Health Perspect.* **1984**, *57*, 281-287.
- [129] Persönliche Mitteilung Tanja Gulder, Stefan Rüdener.
- [130] S. Rüdener; Naphthylisochinolin-Alkaloide: Totalsynthese und Biosyntheseuntersuchungen; Dissertation, Universität Würzburg, 2008.
- [131] Ermittlung der Minimum-Konformere der vermuteten Struktur #35 und der Alternativ-Struktur #36 (B3LYP/6-31G*-Level-optimiert) und darauf aufbauende NMR-Berechnungen der ¹³C- (B3LYP/6-31G*-Level-optimiert) und ¹H-Verschiebungen (B3LYP/6-31G*-Level-optimiert) (MP2/TZVP-optimierte Strukturen), die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 zusammengefasst.
- [132] Gaussian 03, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.

- E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, Gaussian 03, Gaussian Inc., Wallingford CT, **2004**.
- [133] A. D. Becke; Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange; *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.
- [134] 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.
- [135] J. T. H. Dunning; Gaussian Basis Sets for Use in Correlated Molecular Calculations. I. The Atoms Boron Through Neon and Hydrogen; *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 1007-1023.
- [136] R. A. Kendall, J. T. H. Dunning, R. J. Harrison; Electron Affinities of the First-Row Atoms Revisited. Systematic Basis Sets and Wave Functions; *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 6796-6806.
- [137] M. M. Francl, W. J. Pietro, W. J. Hehre, J. S. Binkley, M. S. Gordon, D. J. DeFrees, J. A. Pople; Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XXIII. A Polarization-Type Basis Set for Second-Row Elements; *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 3654-3665.
- [138] P. C. Hariharan, J. A. Pople; The Influence of Polarization Functions on Molecular Orbital Hydrogenation Energies; *Theor. Chim. Acta* **1973**, *28*, 213-222.
- [139] T. Clark, J. Chandrasekhar, G. W. Spitznagel, P. von Ragué Schleyer; Efficient Diffuse Function-Augmented Basis Sets for Anion Calculations. III. The 3-21+G Basis Set for First-Row Elements, Li-F; *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 294-301.
- [140] C. Møller, M. S. Plesset; Note on an Approximation Treatment for Many-Electron Systems; *Phys. Rev. B* **1934**, *46*, 618.
- [141] M. Head-Gordon, J. A. Pople, M. J. Frisch; MP2 Energy Evaluation by Direct Methods; *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *153*, 503-506.
- [142] A. Schäfer, H. Horn, R. Ahlrichs; Fully Optimized Contracted Gaussian Basis Sets for Atoms Li to Kr; *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 2571-2577.

- [143] 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.
- [144] J. Budzianowski; Naphthoquinone Glucosides of *Drosera gigantea* from In Vitro Cultures; *Planta Med.* **2000**, *66*, 667-669.
- [145] B. Kreher, A. Neszmélyi, H. Wagner; Naphthoquinones from *Dionaea muscipula*; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 605-606.
- [146] G. Bringmann, G. Zhang, A. Hager, M. Moos, A. Irmer, R. Bargou, M. Chatterjee; Anti-Tumoral Activities of Dioncoquinones B and C and Related Naphthoquinones Gained from Total Synthesis or Isolation from Plants; *Eu. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5778-5789.
- [147] R. Amarowicz, J. Synowiecki, F. Shahidi; Sephadex LH-20 Separation of Pigments from Shells of Red Sea Urchin (*Strongylocentrotus franciscanus*); *Food Chem.* **1994**, *51*, 227-229.
- [148] H. Brockmann, A. Zeeck; Rubromycine, III. Die Konstitution von α -Rubromycin, β -Rubromycin, γ -Rubromycin und γ -iso-Rubromycin; *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 1709-1726.
- [149] N. P. Mishchenko, S. A. Fedoreev, V. P. Glazunov, V. A. Denisenko, N. P. Krasovskaya, L. I. Glebko, L. G. Maslov, P. S. Dmitrenok, V. L. Bagirova; Isolation and Identification of Impurities in the Parent Substance of Echinochrome and in the Drug Histochrome; *Pharm. Chem. J.* **2004**, *38*, 50-53.
- [150] Ich danke Frau M. Michel für die Durchführung des oxidativen Abbaus.
- [151] G. Bringmann, T. Geuder, M. Rübenacker, R. Zagst; A Facile Degradation Procedure for Determination of Absolute Configuration in 1,3-Dimethyltetra- and Dihydroisoquinolines; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2067-2070.
- [152] G. Bringmann, R. God, M. Schäfer; An Improved Degradation Procedure for Determination of the Absolute Configuration in Chiral Isoquinoline and β -Carboline Derivatives; *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1393-1403.
- [153] M. Dreyer; Isolierung, Charakterisierung und stereochemische Analyse von Naphthylisochinolin-Alkaloiden und anderen Naturstoffen; Dissertation, Universität Würzburg, **2004**.
- [154] G. Bringmann, M. Dreyer, H. Kopff, H. Rischer, M. Wohlfarth, H. A. Hadi, R. Brun, H. Meimberg, G. Heubl; *Ent*-Dioncophylleine A and Related Dehydrogenated Naphthylisoquinoline Alkaloids, the First Asian Dioncophyllaceae-Type Alkaloids,

- from the "New" Plant Species *Ancistrocladus benomensis*; *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 686-690.
- [155] P. H. Raven, R. F. Evert, S. E. Eichhorn; *Biologie der Pflanzen*; 2. Auflage, De Gruyter, Berlin, **2000**.
- [156] R. H. Thomson; Naphthoquinones; in *Naturally Occurring Quinones III* (Hrsg.: Chapman & Hall), University Press, Cambridge, **1997**, S. 112-298.
- [157] B. Hazra, R. Sarkar, S. Bhattacharyya, P. K. Ghosh, G. Chel, B. Dinda; Synthesis of Plumbagin Derivatives and their Inhibitory Activities Against Ehrlich Ascites Carcinoma In Vivo and *Leishmania donovani* Promastigotes In Vitro; *Phytother. Res.* **2002**, *16*, 133-137.
- [158] P. U. Devi, F. E. Solomon, A. C. Sharada; Plumbagin, A Plant Naphthoquinone with Antitumor and Radiomodifying Properties; *Pharm. Biol.* **1999**, *37*, 231-236.
- [159] A. Morello, M. Pavani, J. A. Garbarino, M. C. Chamy, C. Frey, J. Mancilla, A. Guerrero, Y. Repetto, J. Ferreira; Effects and Mode of Action of 1,4-Naphthoquinones Isolated from *Calceolaria sessilis* on Tumoral Cells and *Trypanosoma* parasites; *Comp. Biochem. Physiol.* **1995**, *112C*, 119-128.
- [160] G. J. Kapadia, V. Balasubramanian, H. Tokuda, T. Konoshima, M. Takasaki, J. Koyama, K. Tagahaya, H. Nishino; Anti-Tumor Promoting Effects of Naphthoquinone Derivatives on Short Term Epstein-Barr Early Antigen Activation Assay and in Mouse Skin Carcinogenesis; *Cancer Lett.* **1997**, *113*, 47-53.
- [161] K. Likhitwitayawuid, R. Kaewamatawong, N. Ruangrunsi, J. Krungkrai; Antimalarial Naphthoquinones from *Nepenthes thorelii*; *Planta Med.* **1998**, *64*, 237-241.
- [162] E. Davioud-Charvet, S. Delarue, C. Biot, B. Schwobel, C. C. Boehme, A. Mussigbrodt, L. Maes, C. Sergheraert, P. Grellier, R. H. Schirmer, K. Becker; A Prodrug Form of a *Plasmodium falciparum* Glutathione Reductase Inhibitor Conjugated with a 4-Anilinoquinoline; *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4268-4276.
- [163] L. Salmon-Chemin, A. Lemaire, S. De Freitas, B. Deprez, C. Sergheraert, E. Davioud-Charvet; Parallel Synthesis of a Library of 1,4-Naphthoquinones and Automated Screening of Potential Inhibitors of Trypanothione Reductase from *Trypanosoma cruzi*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 631-635.
- [164] L. Salmon-Chemin, E. Buisine, V. Yardley, S. Kohler, M.-A. Debreu, V. Landry, C. Sergheraert, S. L. Croft, R. L. Krauth-Siegel, E. Davioud-Charvet; 2- and 3-Substituted 1,4-Naphthoquinone Derivatives as Subversive Substrates of

- Trypanothione Reductase and Lipoamide Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and Correlation between Redox Cycling Activities and In Vitro Cytotoxicity; *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 548-565.
- [165] P. Srinivas, G. Gopinath, A. Banerji, A. Dinakar, G. Srinivas; Plumbagin Induces Reactive Oxygen Species, Which Mediate Apoptosis in Human Cervical Cancer Cells; *Mol. Carcinog.* **2004**, *40*, 201-211.
- [166] S. Sugie, K. Okamoto, K. M. W. Rahman, T. Tanaka, K. Kawai, J. Yamahara, H. Mori; Inhibitory Effects of Plumbagin and Juglone on Azoxymethane-Induced Intestinal Carcinogenesis in Rats; *Cancer Lett.* **1998**, *127*, 177-183.
- [167] J. Neumann; *Immunbiologie - Eine Einführung*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2008**.
- [168] Informationsbroschüre „The Lymphomas“, Hrsg. The Leukemia & Lymphoma Society, White Planes, NY – USA, **2006**.
- [169] G. Bringmann, S. Rüdener, A. Irmer, R. Brun, R. Bargou, M. Chatterjee; Dioncochinone, Ancistrochinone und davon abgeleitete Verbindungen, Verfahren zu ihrer Herstellung, sie enthaltende Arzneimittel und deren Verwendung; Deutsche Patentanmeldung, eingereicht 06.02.2008.
- [170] D. Gupta, K. Podar, Y.-T. Tai, B. Lin, T. Hideshima, M. Akiyama, R. LeBlanc, L. Catley, N. Mitsiades, C. Mitsiades, D. Chauhan, N. C. Munshi, K. C. Anderson; β -Lapachone, a Novel Plant Product, Overcomes Drug Resistance in Human Multiple Myeloma Cells; *Exp. Hemat.* **2002**, *30*, 711-720.
- [171] J. C. Desmond, H. Kawabata, C. Mueller-Tidow, E. Simamura, D. Heber, K.-I. Hirai, P. H. Koeffler; The Synthetic Furanonaphthoquinone Induces Growth Arrest, Apoptosis and Differentiation in a Variety of Leukaemias and Multiple Myeloma Cells; *Brit. J. Haem.* **2005**, *131*, 520-529.
- [172] M. A. Rizzacasa, M. V. Sargent; The Structure and Synthesis of Nepenthone-A, a Naphthoquinone from *Nepenthes rafflesiana*; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 2017 - 2022.
- [173] H. Eilenberg, S. Pnini-Cohen, Y. Rahamim, E. Sionov, E. Segal, S. Carmeli, A. Zilberstein; Induced Production of Antifungal Naphthoquinones in the Pitchers of the Carnivorous Plant *Nepenthes khasiana*; *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*, 911-922.
- [174] Y. Kashiwada, A. Aoshima, Y. Ikeshiro, Y.-P. Chen, H. Furukawa, M. Itoigawa, T. Fujioka, K. Mihashi, L. M. Cosentino, S. L. Morris-Natschke, K.-H. Lee; Anti-HIV Benzylisoquinoline Alkaloids and Flavonoids from the Leaves of *Nelumbo nucifera*,

- and Structure-Activity Correlations with Related Alkaloids; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 443-448.
- [175] S. Marquina, J. Bonilla-Barbosa, L. Alvarez; Comparative Phytochemical Analysis of four Mexican *Nymphaea* Species; *Phytochemistry* **2005**, *66*, 921-927.
- [176] B.-S. Min, S.-Y. Lee, J.-H. Kim, J.-K. Lee, T.-J. Kim, D.-H. Kim, Y.-H. Kim, H. Joung, H.-K. Lee, N. Nakamura, H. Miyashiro, M. Hattori; Anti-Complement Activity of Constituents from the Stem-Bark of *Juglans mandshurica*; *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 1042-1044.
- [177] T. Nakanishi, N. Iida, Y. Inatomi, H. Murata, A. Inada, J. Murata, F. A. Lang, M. Iinuma, T. Tanaka; Neolignan and Flavonoid Glycosides in *Juniperus communis* var. *depressa*; *Phytochemistry* **2004**, *65*, 207-213.
- [178] M. Jay, P. Lebreton; The Flavonoids of the Sarraceniaceae, Nepenthaceae, Droseraceae and Cephalotaceae; a Critical Study of the Order Sarraceniales; *Naturaliste Canad.* **1972**, *99*, 607-613.
- [179] J. H. Adam, R. Omar, C. C. Wilcock; Phytochemical Screening of Flavonoids in Three Hybrids of *Nepenthes* (Nepenthaceae) and their Putative Parental Species from Sarawak and Sabah; *J. Biol. Sci.* **2002**, *2*, 623-625.
- [180] O. L. Gamborg, R. A. Miller, K. Ojima; Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells; *Exp. Cell Res.* **1968**, *50*, 151-158.
- [181] I. Kajahn; Kopplungsmethoden in der Naturstoffanalytik: Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* und an *Ancistrocladus*-Pflanzen; Dissertation, Universität Würzburg, **2008**.
- [182] G. Bringmann, A. Irmer, T. P. Büttner, G. Zhang, K. Fester; Isolation of Dimeric Naphthalenes and Naphthalene Glycosides from *Triphyophyllum peltatum* Root and Cell Cultures; *in Vorbereitung*.
- [183] A. P. Hamm, Isolierung, Strukturaufklärung und Totalsynthese von Naturstoffen aus tropischen Heilpflanzen und Bodenorganismen, *Dissertation*, Universität Würzburg, Würzburg **2003**.
- [184] H. Schmid, T. M. Meijer, A. Ebnöther; Über die Konstitution des Eleutherols. (Inhaltsstoffe aus *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.); *Helv. Chim. Act.* **1950**, *33*, 595-608.
- [185] N. Narasimhachari, L. C. Vining; Studies on the Pigments of *Penicillium herquei*; *Can. J. Chem.* **1963**, *41*, 641-648.

- [186] G. Büchi, J. C. Leung; Total Syntheses of Atrovenetin and Scleroderodione; *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4813-4818.
- [187] K. Yoshihira, M. Tezuka, P. Kanachanapee, S. Natori; Diospyrol and the Related Naphthoquinones from *Diospyra mollis* GRIFF; *Chem. Pharm. Bull.* **1971**, *19*, 2271-2277.
- [188] W. J. Hehre, R. Ditchfield, J. A. Pople; Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules; *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 2257-2261.
- [189] S. Grimme; Improved Second-Order Møller-Plesset Perturbation Theory by Separate Scaling of Parallel- and Antiparallel-Spin Pair Correlation Energies; *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 9095-9102.
- [190] F. Neese, G. Olbrich; Efficient Use of the Resolution of the Identity Approximation in Time-Dependent Density Functional Calculations with Hybrid Density Functionals; *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *362*, 170-178.
- [191] F. Neese, F. Wennmohs, A. Hansen, U. Becker; Efficient, Approximate and Parallel Hartree-Fock and Hybrid DFT Calculations. A 'Chain-of-Spheres' Algorithm for the Hartree-Fock Exchange; *Chem. Phys.* **2009**, *356*, 98-109.
- [192] H. Rischer, A. Hamm, G. Bringmann; *Nepenthes insignis* Uses a C2-Portion of the Carbon Skeleton of L-Alanine Acquired *via* its Carnivorous Organs, to Build up the Allelochemical Plumbagin; *Phytochemistry* **2002**, *59*, 603-609.
- [193] J. Budzianowski, A. Budzianowska, K. Kromer; Naphthalene Glucoside and Other Phenolics from the Shoot and Callus Cultures of *Drosophyllum lusitanicum*; *Phytochemistry* **2002**, *61*, 421-425.
- [194] T. Tokunaga, A. Dohmura, N. Takada, M. Ueda; Cytotoxic Antifeedant from *Dionaea muscipula* Ellis: A Defensive Mechanism of Carnivorous Plants against Predators; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2004**, *77*, 537-541.
- [195] J. J. P. Stewart; Optimization of Parameters for Semiempirical Methods II. Applications; *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 221-264.
- [196] M. C. Zerner; Semiempirical Molecular Orbital Methods; in *Rev. Comput. Chem. Bd. 2* (Hrsg.: K. B. Lipkowitz, D. B. Boyd), VCH, New York, Weinheim, Cambridge, **1991**, S. 313.

- [197] T. Tanaka, M. Furusawa, T. Ito, I. Iliya, M. Oyama, M. Iinuma, N. Tanaka, J. Murata; Phenolic Constituents of Leaves of *Diospyros montana*; *Nat. Prod. Commun.* **2007**, *2*, 55-59.
- [198] J. W. Loder, S. Mongolsuk, A. Robertson, W. B. Whalley; Diospyrol, a Constituent of *Diospyros mollis*; *J. Chem. Soc.* **1957**, 2233-2237.
- [199] K. Yoshihira, S. Natori, K. Panida; The Structure of Diospyrol, the Principle from the Fruit of *Diospyros mollis*; *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 4857-4860.
- [200] H. G. Sen, B. S. Joshi, P. C. Parthasarathy, V. N. Kamat; Anthelmintic Efficacy of Diospyrol and its Derivatives; *Arzneim.-Forsch.* **1974**, *24*, 2000-2003.
- [201] A. V. B. Sankaram, V. V. Narayana Reddy; Structure of Ebenone, a Possible Biogenetic Precursor of Elliptinone, from *Diospyros ebenum*; *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2039-2042.
- [202] B. C. Maiti, O. C. Musgrave; New Naphthoquinones and Binaphthylquinones from Macassar Ebony; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1986**, 675-681.
- [203] E. Okuyama, M. Homma, Y. Satoh, H. Fujimoto, M. Ishibashi, M. Yamazaki, M. Satake, A. B. A. Ghazali; Monoamine Oxidase Inhibitory Naphthoquinone and/or Naphthalene Dimers from Lemuni Hitam (*Diospyros* sp.), a Malaysian Herbal Medicine; *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1473-1476.
- [204] E.-I. Negishi, C. Copéret, S. Ma, T. Mita, T. Sugihara, J. M. Tour; Palladium-Catalyzed Carbonylative Cyclization of 1-Iodo-2-alkenylbenzenes; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5904-5918.
- [205] G. Zhang; Analysis of Essential Oils in Rhizoma of *Kaempferia galanga* L. and *K. marginata* Carey. by GC-MS; *Shizhen Guoyi Guoyao* **2008**, *19*, 1124-1126.
- [206] A. Osuka, H. Suzuki, K. Maruyam; Photochemical Reaction of Epoxynaphthoquinones with Alcohols. An Ionic Trapping of Carbonyl Ylides; *Chem. Lett.* **1981**, *10*, 201-204.
- [207] T. Fujita, K. Kawazu, T. Mitsui, M. Katsumi; Structure/Activity Relationship of AC-Alkyl-Hydro-1-Naphthoic Acids and Related Compounds; *Phytochemistry* **1967**, *6*, 889-897.
- [208] M. Wohlfarth; Die Aufklärung der Biogenese strukturell ungewöhnlicher Alkaloide aus *Triphyophyllum* (Dioncophyllaceae) und *Antidesma* (Euphorbiaceae) und Entwicklung und Einsatz der "Triade" zur phytochemischen online-Analytik: HPLC-MS/MS, HPLC-NMR und HPLC-CD; Dissertation, Universität Würzburg, Würzburg, **2002**.

- [209] I. Abe, Y. Utsumi, S. Oguro, H. Morita, Y. Sano, H. Noguchi; A Plant Type III Polyketide Synthase that Produces Pentaketide Chromone; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1362-1363.
- [210] T. Liu, C. Fischer, C. Beninga, J. Rohr; Oxidative Rearrangement Processes in the Biosynthesis of Gilvocarcin V; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12262-12263.
- [211] I. Fujii, Y. Ebizuka, U. Sankawa; A Novel Anthraquinone Ring Cleavage Enzyme from *Aspergillus terreus*; *J. Biochem.* **1988**, *103*, 878-883.
- [212] L. Le Texier, S. Roy, C. Fosse, M. Neuwels, R. Azerad; A Biosynthetic Microbial Ability Applied for the Oxidative Ring Cleavage of Non-Natural Heterocyclic Quinones; *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4135-4137.
- [213] U. Rix, C. Wang, Y. Chen, F. M. Lipata, L. L. Remsing Rix, L. M. Greenwell, L. C. Vining, K. Yang, J. Rohr; The Oxidative Ring Cleavage in Jadomycin Biosynthesis: A Multistep Oxygenation Cascade in a Biosynthetic Black Box; *ChemBioChem* **2005**, *6*, 838-845.
- [214] A. Ciegler, R. W. Detroy, E. B. Lillehoj; Patulin, Penicillic Acid, and Other Carcinogenic Lactones; in *Microbial Toxins, Aufl. 6* (Hrsg.: A. Ciegler), Academic Press, New York, London, **1971**, S. 409-434.
- [215] C. Fosse, L. Texier, S. Roy, M. Delaforge, S. Grégoire, M. Neuwels, R. Azerad; Parameters and Mechanistic Studies on the Oxidative Ring Cleavage of Synthetic Heterocyclic Naphthoquinones by *Streptomyces* Strains; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *65*, 446-456.
- [216] S. Irmeler, G. Schröder, B. St-Pierre, N. P. Crouch, M. Hotze, J. Schmidt, D. Strack, U. Matern, J. Schröder; Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*: New Enzyme Activities and Identification of Cytochrome P450 CYP72A1 as Secologanin Synthase; *Plant J.* **2000**, *24*, 797-804.
- [217] T. Higuchi; Lignin Biochemistry: Biosynthesis and Biodegradation; *Wood Sci. Technol.* **1990**, *24*, 23-63.
- [218] M. Rübenacker; Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese von Naphthylisochinolin-Alkaloiden aus *Triphyophyllum peltatum*; Dissertation, Universität Würzburg, **1991**.
- [219] P. M. Dewick; *Medicinal Natural Products*, John Wiley & Sons, Inc., Weinheim, **2002**.

- [220] G. Bringmann, Habilitationsschrift, Biomimetische Totalsynthese acetogener Isochinolin-Alkaloide, Wilhems-Universität Münster, **1984**.
- [221] H. Reuscher; Regio- und stereoselektive Totalsynthese wahlweise beider Atropisomere des Naphthylisochinolin-Alkaloids Ancistrocladisin und chemotaxonomische Untersuchungen an *Ancistrocladus abbreviatus* Airy Shaw; Dissertation, Universität Würzburg, **1991**.
- [222] M. Wenzel; *In-vivo*-Untersuchungen zur Biosynthese der Naphthylisochinolin-Alkaloide und Darstellung eines vereinfachten Michellamin-Analogons; Dissertation, Universität Würzburg, **1999**.
- [223] M. Wohlfarth; Synthese von Stabilisotopen-markierten Naphthylisochinolin-Alkaloid-Vorstufen und Biogeneseexperimente an Zellkulturen von *Ancistrocladus heyneanus*, Diplomarbeit, Universität Würzburg, **1997**.
- [224] G. Bringmann, H. Rischer, J. Schlauer, L. Aké Assi; In Vitro Propagation of *Ancistrocladus abbreviatus* Airy Shaw (Ancistrocladaceae); *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **1999**, 57, 71-73.
- [225] R. Thomas; A Biosynthetic Classification of Fungal and Streptomycete Fused-Ring Aromatic Polyketides; *ChemBioChem* **2001**, 2, 612-627.
- [226] J. Schlauer, M. Rückert, B. Wiesen, M. Herderich, L. Aké Assi, R. D. Haller, S. Bär, K.-U. Fröhlich, G. Bringmann; Characterization of Enzymes from *Ancistrocladus* (Ancistrocladaceae) and *Triphyophyllum* (Dioncophyllaceae) Catalyzing Oxidative Coupling of Naphthylisoquinoline Alkaloids to Michellamines; *Archiv. Biochem. Biophys.* **1998**, 350, 87-94.
- [227] G. Bringmann, J. Mutanyatta-Comar, M. Greb, S. Rüdener, T. F. Noll, A. Irmer; Biosynthesis of Naphthylisoquinoline Alkaloids: Synthesis and Incorporation of an Advanced ¹³C₂-Labeled Isoquinoline Precursor; *Tetrahedron* **2007**, 63, 1755-1761.
- [228] G. Bringmann, J. R. Jansen, H.-P. Rink; Regioselective and Atropisomeric-Selective Aryl Coupling to Give Naphthyl Isoquinoline Alkaloids: The First Total Synthesis of (-)-Ancistrocladine; *Angew. Chem.* **1986**, 98, 917-919; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1986**, 25, 913-915.
- [229] G. Bringmann, R. Weirich, H. Reuscher, J. R. Jansen, L. Kinzinger, T. Ortmann; The Synthesis of All Possible Isomeric 6,8-Dioxygenated 1,3-Dimethyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline Methyl Ethers - Useful Chiral Building Blocks for Naphthylisoquinoline Alkaloids; *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 1993, 877-888.

- [230] G. Bringmann, A. Irmer, S. Rüdener and J. Mutanyatta-Comar; 5'-O-Methylidioncophylline D and the Biosynthesis of the Isoquinoline Moiety, in *Vorbereitung*.
- [231] C. M. Taylor, R. E. Gereau, G. M. Walters; Revision of *Ancistrocladus* Wall. (Ancistrocladaceae); *Ann. Missouri Bot. Gard.* **2005**, *92*, 360-399.
- [232] M. Cheek; A Synoptic Revision of *Ancistrocladus* (Ancistrocladaceae) in Africa, with a New Species from Western Cameroon; *Kew Bull.* **2000**, *55*, 871-882.
- [233] G. Heubl, F. Turini, V. Mudogo, I. Kajahn, G. Bringmann; *Ancistrocladus ileboesis* (D.R. Congo), a New Liana with Unique Alkaloids; *Plant Ecol. Evol.* **2010**, *in press*.
- [234] H. Rischer, G. Heubl, H. Meimberg, M. Dreyer, H. A. Hadi, G. Bringmann; *Ancistrocladus benomensis* (Ancistrocladaceae): A New Species from Peninsular Malaysia; *Blumea* **2005**, *50*, 357-365.
- [235] Sammlungen durchgeführt von Prof. Dr. V. Mudogo, Universität Kinshasa, DR Kongo.
- [236] F. J. Rohlf; NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.20. Exeter Publishing Ltd., Setauket, New York, **2008**.
- [237] M. Nei, W. H. Li; Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, *76*, 5269-5273.
- [238] R.R. Sokal, C.D. Michener; A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* **1958**, *38*, 1409-1438.
- [239] I. Izhaki; Emodin - A Secondary Metabolite with Multiple Ecological Functions in Higher Plants; *New Phytol.* **2002**, *155*, 205-217.
- [240] Y. Hou, S. Cao, P. J. Brodie, M. W. Callmander, F. Ratovoson, E. A. Rakotobe, V. E. Rasamison, M. Ratsimbason, J. N. Alumasa, P. D. Roepe, D. G. I. Kingston; Antiproliferative and Antimalarial Anthraquinones of *Scutia myrtina* from the Madagascar Forest; *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2871-2876.
- [241] G. Bringmann, J. Mutanyatta-Comar, M. Knauer, B. M. Abegaz; Knipholone and Related 4-Phenylanthraquinones: Structurally, Pharmacologically, and Biosynthetically Remarkable Natural Products; *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 696-718.
- [242] R. H. Thomas; *Naturally Occuring Quinones VI*, Chapman & Hall, London, **1997**.

- [243] W. Dürckheimer; Tetracyclines: Chemistry, Biochemistry, and Structure-Activity Relations; *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 751-764; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1975**, *14*, 721-734.
- [244] C. Hertweck; The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4782-4811; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688-4716.
- [245] J. Staunton, K. J. Weissman; Polyketide Biosynthesis: A Millennium Review; *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380-416.
- [246] B. J. Rawlings; Type I Polyketide Biosynthesis in Bacteria (Teil B); *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 231-281.
- [247] H. Jenke-Kodama, E. Dittmann; Evolution of Metabolic Diversity: Insights from Microbial Polyketide Synthases; *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1858-1866.
- [248] C. Hertweck, A. Luzhetsky, Y. Rebets, A. Bechthold; Type II Polyketide Synthases: Gaining a Deeper Insight into Enzymatic Teamwork; *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 162-190.
- [249] B. Shen; Biosynthesis of Aromatic Polyketides; in *Topics in Current Chemistry*, *Bd. 209*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2000**, S. 1-51.
- [250] I. J. Flores-Sanchez, R. Verpoorte; Plant Polyketide Synthases: A Fascinating Group of Enzymes; *Plant Physiol. Biochem.* **2009**, *47*, 167-174.
- [251] K. Watanabe, A. P. Praseuth, C. C. C. Wang; A Comprehensive and Engaging Overview of the Type III Family of Polyketide Synthases; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 279-286.
- [252] A. Jindaprasert, K. Springob, J. Schmidt, W. De-Eknamkul, T. M. Kutchan; Pyrone Polyketides Synthesized by a Type III Polyketide Synthase from *Drosophyllum lusitanicum*; *Phytochemistry* **2008**, *69*, 3043-3053.
- [253] I. Abe, S. Oguro, Y. Utsumi, Y. Sano, H. Noguchi; Engineered Biosynthesis of Plant Polyketides: Chain Length Control in an Octaketide-Producing Plant Type III Polyketide Synthase; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12709-12716.
- [254] G. Bringmann, T. F. Noll, T. Gulder, M. Dreyer, M. Grüne, D. Moskau; Polyketide Folding in Higher Plants: Biosynthesis of the Phenylanthraquinone Knipholone; *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3247-3252.
- [255] A. Yagi, M. Yamanouchi, I. Nishioka; Biosynthetic Relationship Between Tetrahydroanthracene and Anthraquinone in *Aloe saponaria*; *Phytochemistry* **1978**, *17*, 895-897.

- [256] B.-E. Van Wyk, A. Yenesew, E. Dagne; Chemotaxonomic Survey of Anthraquinones and Pre-Anthraquinones in Roots of *Aloe* Species; *Biochemi. Syst. Ecol.* **1995**, 23, 267-275.
- [257] H. Abd El-Fattah; Chemistry of *Asphodelus fistulosus*; *Pharmaceut. Biol.* **1997**, 35, 274-277.
- [258] Y.-L. Huang, F.-H. Chow, B.-J. Shieh, J.-C. Ou, C.-C. Chen; Two New Anthraquinones from *Hemerocallis fulva*; *Chin. Pharm. J.* **2003**, 55, 83-86.
- [259] B.-E. Van Wyk, A. Yenesew, E. Dagne; The Chemotaxonomic Significance of Root Anthraquinones and Pre-Anthraquinones in the Genus *Lomatophyllum* (Asphodelaceae); *Biochem. Syst. Ecol.* **1995**, 23, 805-808.
- [260] A. Yagi, K. Makino, I. Nishioka; Studies on Constituents of *Aloe saponaria* Haw II. Structures of Tetrahydroanthracene Derivatives, Aloesaponol-III and Aloesaponol-IV; *Chem. Pharmaceut. Bull.* **1977**, 25, 1764-1770.
- [261] A. Yagi, K. Makino, I. Nishioka; Studies on the Constituents of *Aloe saponaria* Haw. IV. The Structure of Bianthraquinoid Pigments; *Chem. Pharmaceut. Bull.* **1978**, 26, 1111-1116.
- [262] A. Yenesew, J. A. Ogur, H. Duddeck; (R)-Prechrysophanol from *Aloe graminicola*. *Phytochemistry* **1993**, 34, 1442-1444.
- [263] K. H. Cho, J. H. Lee; Preparation of Anthraquinones by *Aloe saponaria* Callus Cultures, KR 1995-7075; 15.10.1998.
- [264] Ich danke den Gärtnern des Botanischen Gartens Würzburg für die Überlassung der *Aloe*-Pflanzen.
- [265] Dank Prof. Laatsch (Univ. Göttingen) stand eine geringe Menge Aloesaponarin II (#14) zur Verfügung.
- [266] Zu Absicherung wurde ein entsprechendes Spektrum von Chrysophanol aufgenommen. Außerdem wurden NOESY-Spektren von weiteren Anthrachinon-Dimeren (mit mindestens einem Chrysophanol-Teil), die aus *Aloe saponaria* isoliert wurden, in dieser Arbeit aber nicht enthalten sind, zum Vergleich herangezogen.
- [267] A. G. Gonzalez, R. Freire, Hernande.R, J. A. Salazar, E. Suarez; Asphodelin and Microcarpin, Two New Bianthraquinones from *Asphodelus microcarpus*; *Chem. Ind. (London)* **1973**, 851-852.

- [268] M. Reichert; Quantenchemische Berechnungen des Circular-Dichroismus' zur Strukturaufklärung chiraler Natur- und Wirkstoffe; Dissertation, Universität Würzburg, Würzburg **2006**.
- [269] M. A. Qhotsokoane-Lusunzi, P. Karuso; Secondary Metabolites from Basotho Medicinal Plants. II. *Bulbine capitata*; *Aust. J. Chem.* **2001**, *54*, 427-430.
- [270] S. Sinnecker, A. Rajendran, A. Klant, M. Diedenhofen, F. Neese; Calculation of Solvent Shifts on Electronic g-Tensors with the Conductorlike Screening Model (COSMO) and its Self-Consistent Generalization to Real Solvents (Direct COSMO-RS); *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 2235-2245.
- [271] A. Klant; *COSMO-RS: From Quantum Chemistry to Fluid Phase Thermodynamics and Drug Designs*; Elsevier, Amsterdam, **2005**.
- [272] J. Leonard, B. Lygo, G. Procter; *Praxis der Organischen Chemie*; VHC Verlag, Weinheim, **1996**.
- [273] J. Cannon, V. Lojanapiwatna, C. Raston, W. Sinchai, A. White; The Quinones of *Nepenthes rafflesiana*; *Aust. J. Chem.* **1980**, *33*, 1073-1093.
- [274] L. Hörhammer, H. Wagner, H.-G. Arndt, R. Dirscherl, L. Farkas; Über die Synthese von Quercetin-3-Glykosiden, I. Synthese und Strukturbeweis von Isoquercitrin, Hyperosid und Quercitrin; *Chem. Ber.* **1968**, *101*, 450-453.
- [275] J. Budzianowski; Naphthohydroquinone Glucosides of *Drosera rotundifolia* and *D. intermedia* from In Vitro Cultures; *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1145-1147.
- [276] W. Mammo, E. Dagne, W. Steglich; Quinone Pigments from *Araliorhamnus vaginata*; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3577-3581.
- [277] E. Dagne, I. Casser, W. Steglich; Aloechryson, a Dihydroanthracenone from *Aloe berhana*; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1791-1793.
- [278] M. Adinolfi, R. Lanzetta, C. E. Marciano, M. Parrilli, A. De Giulio; A New Class of Anthraquinone-Anthrone-C-Glycosides from *Asphodelus ramosus* Tubers; *Tetrahedron* **1991**, *47*, 4435-4440.

Danksagung

Um allen, die mich bei dieser Arbeit direkt oder indirekt unterstützt haben, zu danken und keinen zu benachteiligen, möchte ich mich bei all denen herzlich bedanken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit anzufertigen und abzufassen, ohne Namen und Personen im einzelnen aufzuführen.

Danke!