

**Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus
endophytischen Pilzen**

An den Fachbereich Chemie und Chemietechnik
der Universität-Gesamthochschule Paderborn zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

von
Natalia Root
aus Geburtsort/Russland

Paderborn 2001

Referent:

Prof. Dr. K. Krohn

Korreferent:

Prof. Dr. N. Risch

Eingereicht am:

26.09.01

Mündliche Prüfung:

26.10.01

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1998 bis Oktober 2001 im Fach Organische Chemie des Fachbereichs 13 der Universität Paderborn unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. Krohn angefertigt.

Herrn Prof. Dr. N. Risch danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Meinem Mann und den Kindern danke ich für die Unterstützung.

Weiterhin gilt mein Dank:

- Herrn Dr. W. Wray für die Aufnahme der NMR-Spektren und für die kollegiale Mitarbeit,
- Herrn Dr. P. Schulze und Herrn Dr. Dülcks für die Aufnahme der Massenspektren,
- Herrn Dr. U. Flörke für die Röntgenstrukturanalyse,
- Frau Dr. B. Merla für das unermüdliche Korrekturlesen,
- Herrn Dr. C. Biele für viele fruchtbare Diskussionen,
- Herrn Dr. P. Frese für die fachliche und menschliche Unterstützung,
- Herrn Dr. D. Sielemann, Herrn Dr. A. Walter, Herrn K. Steingröver, Herrn M. Größer, Herrn R. Krelaus, Frau M. Zukowski, Frau J. Delbos-Krampe, Frau A. Kröber sowie den anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Organischen Chemie für das kollegiale und freundliche Arbeitsklima.

Meinem Vater und meiner Mutter
mit Liebe
und Dankbarkeit

1	Einleitung.....	4
1.1	<i>Suche nach neuen Wirkstoffen bei Pilzen.....</i>	4
1.2	<i>Biologische Aspekte von Pilzen.....</i>	5
1.3	<i>Sekundärmetabolite.....</i>	6
1.4	<i>Biogenese der Sekundärmetaboliten.....</i>	7
1.5	<i>Alkaloide.....</i>	9
1.6	<i>Aufgabenstellung.....</i>	10
2	Isolierung und Aufklärung ihrer Struktur der Naturstoffe aus den Pilzextrakten	11
2.1	<i>Der Pilzstamm 4729</i>	11
2.1.1	<i>Isolierung und Charakterisierung der Preussomerine G, H, I, J, K und L.....</i>	11
2.1.2	<i>Strukturaufklärung und Beschreibung der Preussomerine G–L....</i>	13
2.1.2.1	<i>Isolierung und Strukturaufklärung des Preussomerins L.....</i>	14
2.1.2.2	<i>Isolierung und Strukturaufklärung von Preussomerin K.....</i>	23
2.1.2.3	<i>Isolierung und Strukturaufklärung des Preussomerins J.....</i>	29
2.1.2.4	<i>Isolierung und Strukturaufklärung des Preussomerins H.....</i>	32
2.1.2.5	<i>Isolierung und Strukturaufklärung des Preussomerins G.....</i>	36
2.1.2.6	<i>Isolierung und Charakterisierung des Preussomerins I.....</i>	39
2.2	<i>Biologische Aktivität der Naturstoffe G–L.....</i>	41
2.2.1	<i>Mikrobiologische Untersuchungen des Rohextraktes (Braunschweig).....</i>	41
2.2.2	<i>Biologische Aktivität der Reinsubstanzen</i>	42
2.2.3	<i>Pflanzenschutz-Screening-Tests der BASF</i>	43
2.2.4	<i>Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse</i>	45
2.2.5	<i>Bestimmung der absoluten Konfiguration der Preussomerine G–L.....</i>	51
2.3	<i>Beschreibung, Isolierung und Strukturaufklärung der Naturstoffe aus dem Pilzstamm 5049.....</i>	57
2.3.1	<i>Beschreibung des Pilzextraktes</i>	57
2.3.2	<i>Isolierung der Naturstoffe aus dem Pilzextrakt 5049</i>	62

Inhaltsverzeichnis	
2.3.2.1	<i>Isolierung und Strukturaufklärung des Naturstoffes „P“</i> 63
2.3.2.1.1	Die allgemeinen Daten des Sekundärmetaboliten 63
2.3.2.1.2	Die NMR-Daten des Naturstoffes 65
2.3.2.1.3	Analyse der NMR-Daten und des Massenspektrums. 68
2.3.2.1.4	Das Moleköl liegt als Biarylsystem vor 71
2.3.2.1.5	Der aliphatische Teil des Moleküls 72
2.3.2.1.6	Weitere Diskussion der Struktur des aliphatischen Fragments 75
2.3.2.1.7	Diskussion der achsialen Chiralität 80
2.3.2.1.8	Zusammenfassung der Daten des neuen Naturstoffs 81
2.3.2.1.9	Biologische Aktivität 82
2.3.2.2	<i>Beschreibung und Isolierung des Sekundärmetaboliten Cytochalasin L-696.474</i> 84
2.3.2.1.9	Biologische Aktivität 87
2.3.2.3	<i>Isolierung und Beschreibung des Cytochalasins X</i> 88
2.3.2.3.1	Zusammenfassende Beschreibung der Naturstoffe Cytochalasin L und Cytochalasin X 92
2.3.2.4	<i>Isolierung und Beschreibung der 3-Nitropropionsäure</i> 93
2.4	Der Pilzstamm 4295 95
2.4.1	Die 4-(2',3'-Dimethoxy-4'-methyl-phenyl)-4-oxo-Buttersäure 95
2.4.2	Biologische Aktivität 100
3	Zusammenfassung und Ausblick 101
4	Experimenteller Teil 104
4.1	Allgemeines zu den benutzten Analysen und Meßverfahren 104
4.2	Die Synthese des Sekundärmetaboliten 2,6-Dihydroxy-8-methoxy-3-oxo-3,4,5,6-tetrahydronaphthalin-1-carbaldehyd 109
4.3	Die analytischen Daten der Naturstoffe 117
4.3.1	Die analytischen Daten des Preussomerins L 117
4.3.2	Die analytischen Daten des Preussomerins K 118
4.3.3	Die analytischen Daten des Preussomerins I 119
4.3.4	Die analytischen Daten des Preussomerins H 120
4.3.5	Die analytischen Daten des Preussomerins G 121

Inhaltsverzeichnis

4.3.6	Die analytischen Daten des Preussomerins J.....	122
4.3.7	Die analytischen Daten des Naturstoffs P	123
4.3.8	Die analytischen Daten des Diols.....	124
4.3.9	Die analytischen Daten des Cytochalasins L-696.476	125
4.3.10	Die analytischen Daten des Cytochalasins X.....	126
4.3.11	Die analytischen Daten der 3-Nitropropionsäure.....	127
4.3.12	Die analytischen Daten der 4-(2',3'-Dimethoxy-4'-methyl-phenyl)- 4-oxo-Buttersäure	128
4.4	<i>Totalsynthese des Naturstoffes 2,6-Dihydroxy-8-methoxy-3- oxo-3,4,5,6-tetrahydronaphthalin-1-carbaldehyd</i>	129
4.4.1	4-(2',4'-Dimethylphenyl)-4-oxobutansäure 1	129
4.4.2	4-(2',4'-Dimethoxy-3'-methylphenyl)-butansäure 2	130
4.4.3	5,7-Dimethoxy-6-methyl-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on 3	131
4.4.4	(R)-5,7-Dimethoxy-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalin-1-ol 4....	132
4.4.5	5,7-Dimethoxy-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalin-1-ol 4.....	132
4.4.6	5,7-Dimethoxy-6-methyl-1-pivaloyloxy-1,2,3,4- tetrahydronaphthalin 5	133
4.4.7	1,3-Dimethoxy-8-oxo-5-pivaloyoxy-5,6-dihydro-2H-naphthalin-2- carbaldehyd 6.....	134
4.4.8	6,8-Dimethoxy-7-methyl-4-pivaloyloxy-3,4-dihydro-2H- naphthalin-1-on 12	135
4.4.9	6,8-Dimethoxy-7-hydroxymethyl-4-pivaloyloxy-3,4-dihydro-2H- naphthalin-1-on 13	136
4.4.10	1-Hydroxy-3-methoxy-8-oxo-5-pivaloyloxy-5,6-dihydro-7H- naphthalin-2-carbaldehyd 7	136
5	Verzeichnis der Abkürzungen.....	138
6	Literatur.....	139

1 Einleitung

1.1 Suche nach neuen Wirkstoffen bei Pilzen

Seit Jahrtausenden nutzt der Mensch die Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen und Pilzen für seine Zwecke. Die Bier- und Weinherstellung sowie die Brotbereitung mit Hilfe von *Saccharomyces cerevisiae* und die Produktion von Milchprodukten durch *Lactobacteriase* seien hier als Beispiele für klassische Anwendungen genannt.^[1]

Die Leistungsfähigkeit von Pilzen, in der Synthese biologisch aktiver Leitstrukturen, ist bei weitem noch nicht erschlossen. Der Teil des Moleküls, der für die biologische Aktivität verantwortlich ist, wird als "Leitstruktur" bezeichnet. "Am Anfang steht die Leitstruktur" lautet ein Credo der modernen Forschung für Arznei- und Pflanzenschutzmittel.^[1] Die Trends der Leitstrukturforschung lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

- Bis in die achtzige Jahre hinein war die zufällige Entdeckung neuer bioaktiver Verbindungen die Regel. Oft stand die chemische Synthese einzelner Verbindungen im Vordergrund.
- Die rasante Entwicklung der Rechnerleistung der modernen Computer führte zur Anwendung von "Molecular Modeling" bei der Leitstruktur-Optimierung (dreidimensionale Anpassung einer Leitstruktur an das aktive Zentrum eines Rezeptors). Das Verfahren stützt sich auf die Schlüssel-Schloss-Hypothese des deutschen Chemikers Emil Fischer (Nobelpreis 1902). Aber auch heute spielt der Zufall bei der Auffindung neuer Leitstrukturen noch eine Rolle.
- Durch den Vormarsch der kombinatorischen Synthese ist es möglich geworden, tausende von Verbindungen parallel herzustellen. Da die Biochemie immer neue Testsysteme entwickelt, werden sowohl die bekannten Verbindungen als auch die neuen in diese Tests eingeschleust.

Von der Zahl her nimmt die Naturstoffchemie dabei einen bescheidenen Platz ein. Am 15. Juni 2000 erfasste "Chemical Abstracts" ca. 16 827 004 organische und

anorganische Verbindungen. Die Naturstoffdatenbank von Chapman & Hall beinhaltet ca. 145 000 genau analysierte Naturstoffe. Dennoch demonstrieren die nachfolgenden Beispiele die überragende Rolle der Naturstoffchemie in der Pharmazie und im Pflanzenschutz:

- Entdeckung des Penicillins (1928 von Alexander Fleming) und die bis heute ständig weiterentwickelten hochwirksamen β -Lactam-Antibiotika.
- zunehmender Erfolg der aus natürlichen Quellen gewonnenen Antitumormittel (Antracycline, Taxol).
- die bekanntesten Immundepressiva (Cyclosporin, Rapamycin, KF-506) hemmen bei der Transplantations-Chirurgie die Abstoßung der fremden Organe.^[1]

Der Erfolg der Naturstoffe hat zwei Gründe:

1. Die Natur ist in der Lage, mit erstaunlich wenigen Biosynthesewegen eine große Strukturvielfalt herzustellen.
2. Hypothetisch ausgedrückt, hat die Natur im Laufe der Evolution die niedermolekularen Naturstoffe (Sekundärmetabolite) für den Überlebenskampf entwickelt.

Der überwiegende Teil der Mikroorganismen und Pflanzen ist auf ihre Bestandteile noch nicht untersucht.^[1] Pilze zählen zu jenen Organismen, die einen intensiven Stoffwechsel aufweisen. Dabei sind die Produkte ihres sekundären Stoffwechsels von besonderem Interesse.^[2]

Die Sekundärmetabolite sind Stoffe, die nicht für das Wachstum des Produzentenstammes verantwortlich sind, aber den Stoffwechsel anderer Organismen stark beeinflussen können. Auf den Begriff der Sekundärmetaboliten wird im Kapitel 1.3 genauer eingegangen. Beispiele für Sekundärmetabolite sind etwa die zahlreichen von Menschen als Antibiotika, Herbizide, Cytostatika oder Fungizide genutzten Verbindungen.

1.2 Biologische Aspekte von Pilzen

Als Pilze bezeichnet man eine Gruppe chlorophyllfreier, heterotroper, eukaryotischer Organismen. Als Eukaryonten verfügen sie wie Tiere und Pflanzen über einen echten

Zellkern sowie die typischen Zellorganellen im Protoplasma.^[1] Je nach Lebensraum und Ernährungsgrundlage unterscheidet man *saprobiotische, parasitäre und symbiotische* Pilze. *Saprobiotische* Pilze leben auf totem Material wie z.B. abgestorbenen Bäumen, bauen Nährstoffe daraus ab und absorbieren sie. Die *parasitären* Pilze befallen einen lebenden Wirt und nehmen Nährstoffe aus dessen Zellen auf. Die *symbiotischen* Pilze beziehen wie die parasitären Pilze Nährstoffe von ihrem Wirt, sind diesem aber auch in unterschiedlicher Weise nützlich.^[3]

Über die taxonomische Zuordnung der Pilze existieren verschiedene Auffassungen. Man unterteilt die Pilze nach den Unterschieden in den Einzelheiten der Reproduktion in drei Hauptgruppen. Diese Hauptgruppen sind: die *Jochpilze* (Zygomycota), die *Schlauchpilze* (Ascomycota) und die *Ständerpilze* (Basidiomycota). Sie werden wieder in Klassen, Ordnungen, Familien, Gattungen und Arten unterteilt. Auf die Einzelheiten der Definition soll hier nicht näher eingegangen werden.

1.3 Sekundärmetabolite

Den Stoffwechsel (Metabolismus) teilt man in zwei Bereiche, den Primär- und den Sekundärmetabolismus. Der Primärmetabolismus umfaßt alle Stoffwechselvorgänge, die zur direkten Ernährung des jeweiligen Organismus erforderlich sind. Die Grundprinzipien, die Reaktionen und die Produkte des Primärmetabolismus sind bei allen Lebewesen nahezu gleich. Dazu zählt man z. B. die Übersetzung des genetischen Codes in Aminosäuren von Proteinen, die Struktur und Funktion von Proteinen sowie die Organisation, den Ablauf und die Kontrolle wichtiger Stoffwechselzyklen wie etwa den Citronensäurezyklus oder die oxidative Phosphorylierung im Mitochondrium.^[2]

Der Sekundärmetabolismus ist dagegen für den Stamm, die Art und die Gattung charakteristisch. Eine scharfe Trennung zwischen beiden Stoffwechselsystemen ist nicht möglich, da die Synthese der Sekundärmetaboliten vielfach von Primärmetaboliten ausgeht. Die Produktion von Sekundärmetaboliten erfolgt im Allgemeinen nur in Zellen, die sich nicht mehr teilen oder sich durch limitierte Wachstumsraten auszeichnen.^[3] Man unterscheidet daher eine Wachstumsphase (Trophophase), in der der Primärstoffwechsel dominiert, und eine Produktionsphase

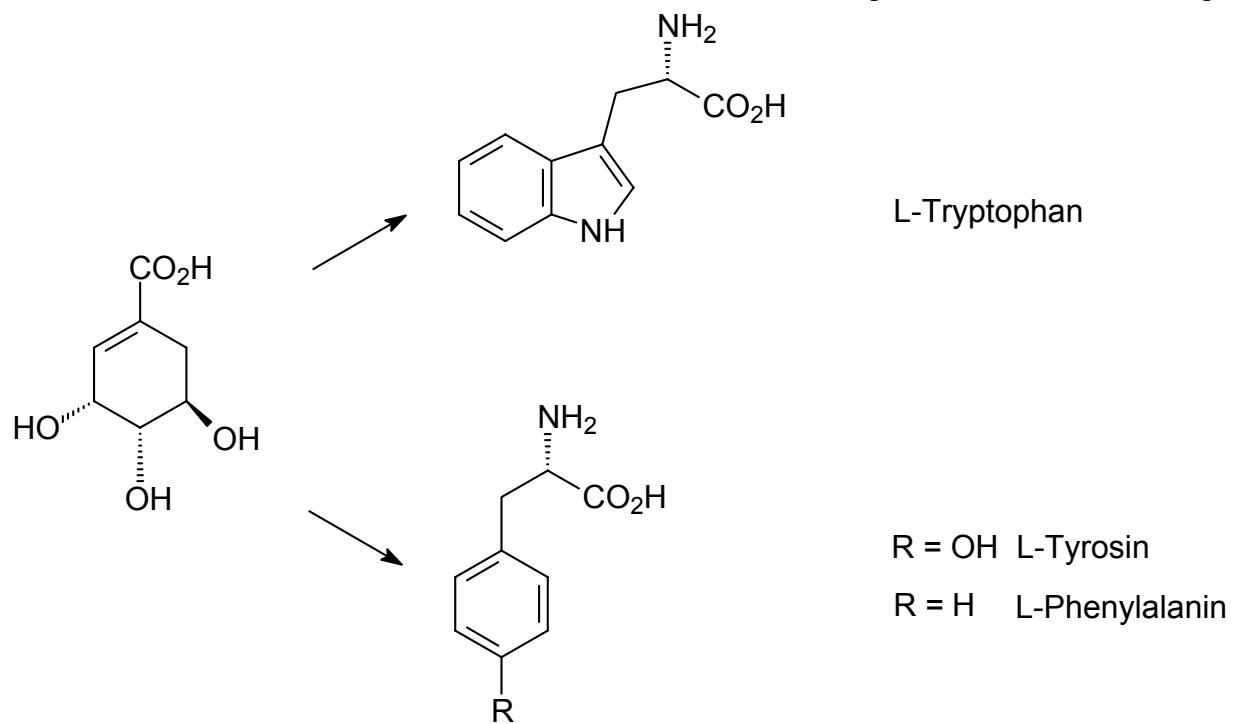
(Idiophase). Unter den zahlreichen Sekundärstoffen finden sich nicht nur Mykotoxine (Gifte), sondern auch für den Menschen nützliche Verbindungen wie organische Säuren oder medizinisch-pharmazeutisch wichtige Produkte (Antibiotika, Ergot-Alkaloide, Cytochalasine, Siderochrome).^[4]

1.4 Biogenese der Sekundärmetaboliten

Die Biogenese der Sekundärmetaboliten ist von der begrenzten Zahl der Primärmetaboliten wie z.B. α -Aminosäuren, Acetyl-Coenzym A, Mevalonsäure und den Derivaten der Shikimisäure abzuleiten. Die Klassifizierung der Sekundärmetaboliten unterscheidet aufgrund der Ausgangsfragmente **isoprenoide** (Terpene, Steroide), **aromatische** und **alkaloide** Verbindungen.^[2]

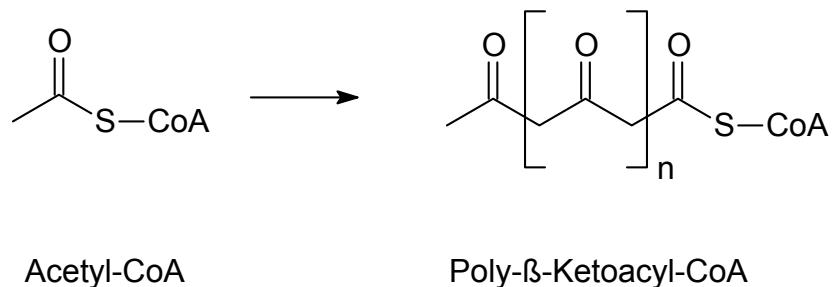
Bereits 1922 vermutete Ruziska, dass sich die Terpene und Steroide aus Isoprenoidmolekülen aufbauen. Die Biosynthese der aromatischen Verbindungen erfolgt überwiegend auf zwei Wegen. Der erste Weg geht aus dem Kohlenhydratstoffwechsel hervor und verläuft über die *Shikimisäure*. Der zweite Weg geht von Fettsäuren aus (*Polyketid-Weg*).

Die *Shikimisäure* wurde 1885 aus der Frucht der Pflanze „Shikimi-no-ki“ „*Illicium refugiosum*“ isoliert. Spätere Untersuchungen verdeutlichten die Rolle der Shikimisäure als Schlüsselintermediat bei der Synthese der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan.



Schema 1: Die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren.

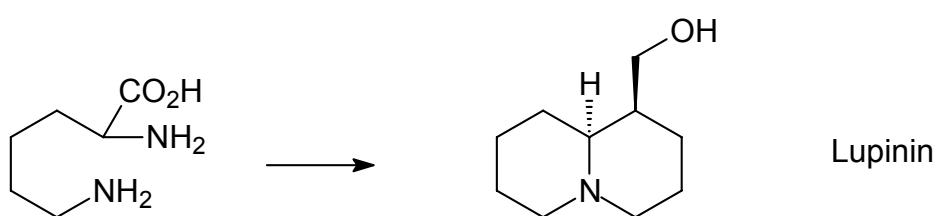
Bei dem Polyketid-Weg werden die Acetateinheiten (ausgehend aus Startmolekülen wie z. B. Acetyl-CoA) nicht reduziert, sondern miteinander verknüpft und anschließend als Polyketo-Verbindungen zu mono- bzw. polyzyklischen aromatischen Verbindungen zyklisiert. Dieser Weg findet nur in Mikroorganismen und höheren Pflanzen statt.



Schema 2: Der Polyketid-Weg der Biosynthese der Aromaten.

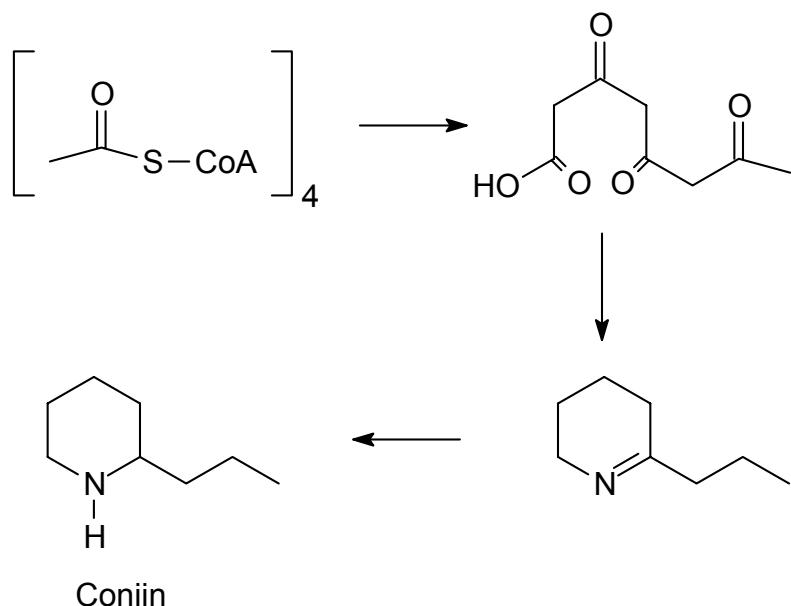
1.5 Alkaloide

Alkaloide (zyklische organische Verbindungen, die ein Stickstoffatom in negativer Oxidationsstufe beinhalten) bilden eine große Gruppe von Sekundärmetaboliten. Sie sind nach ihrer Biosynthese in vier Nebengruppen zu unterteilen. Die erste Nebengruppe umfaßt die stickstoffhaltigen Säuren, deren Stickstoffatom in die Synthese eingeht.



Schema 3: Biosynthese des Lupinins.

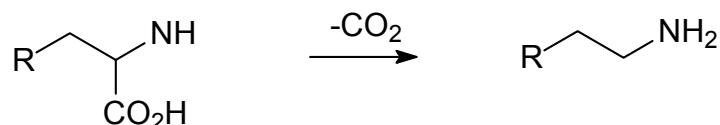
Die zweite Untergruppe wird als „Pseudoalkaloide“ bezeichnet. Im Unterschied zu der ersten ist das Kohlenstoffatomgerüst nicht von Aminosäuren abzuleiten, sondern wird aus isoprenoiden Verbindungen gebildet. Das Stickstoffatom wird oft in Form von NH_3 später ins Molekül eingebaut.



Schema 4: Die schematische Darstellung der Biosynthese des Coniins.

Bei der dritten Untergruppe (Peptidalkaloide) handelt es sich um zyklische Oligopeptide, die 2 bis 20 Aminosäuren umfassen.

Die Decarboxylierungsprodukte der Aminosäuren (Protoalkaloide) und deren Derivate werden einer vierten Untergruppe der Alkaloide zugeordnet. Das Stickstoffatom liegt bei diesen Verbindungen **azyklisch** vor. Die Protoalkaloide sind in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren frei oder gebunden relativ weit verbreitet. In Tieren liegen Derivate der Protoalkaloide als Neurotransmitter vor (Acetylcholin, Serotonin, Catecholamin).^[2]



Schema 5: Die Biosynthese eines Protoalkaloides.

1.6 Aufgabenstellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese von Naturstoffen aus Pilzen. Das Ziel des Projektes ist das Auffinden neuer Leitstrukturen für Pharmazie und Pflanzenschutz.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind chromatographische Trennungen der biologisch aktiven Pilzextrakte und deren Untersuchung. Ziel ist bekannte und neue Naturstoffe auzudecken, zu isolieren, physikochemisch zu charakterisieren und hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung zu untersuchen. Wegen der sich schnell gegen Pflanzenschutzmittel und Antibiotika entwickelnden Resistenzen und der Reduzierung der Nebenwirkungen besteht die ständige Notwendigkeit, nach neuen Wirkstoffen zu suchen.

Die aus der TU Braunschweig kommenden Pilzextrakte stammen aus extremen Bodenproben aus der Braunschweiger Region sowie phytopathogenen und endophytischen Pilzen.

2 Isolierung und Aufklärung ihrer Struktur der Naturstoffe aus den Pilzextrakten

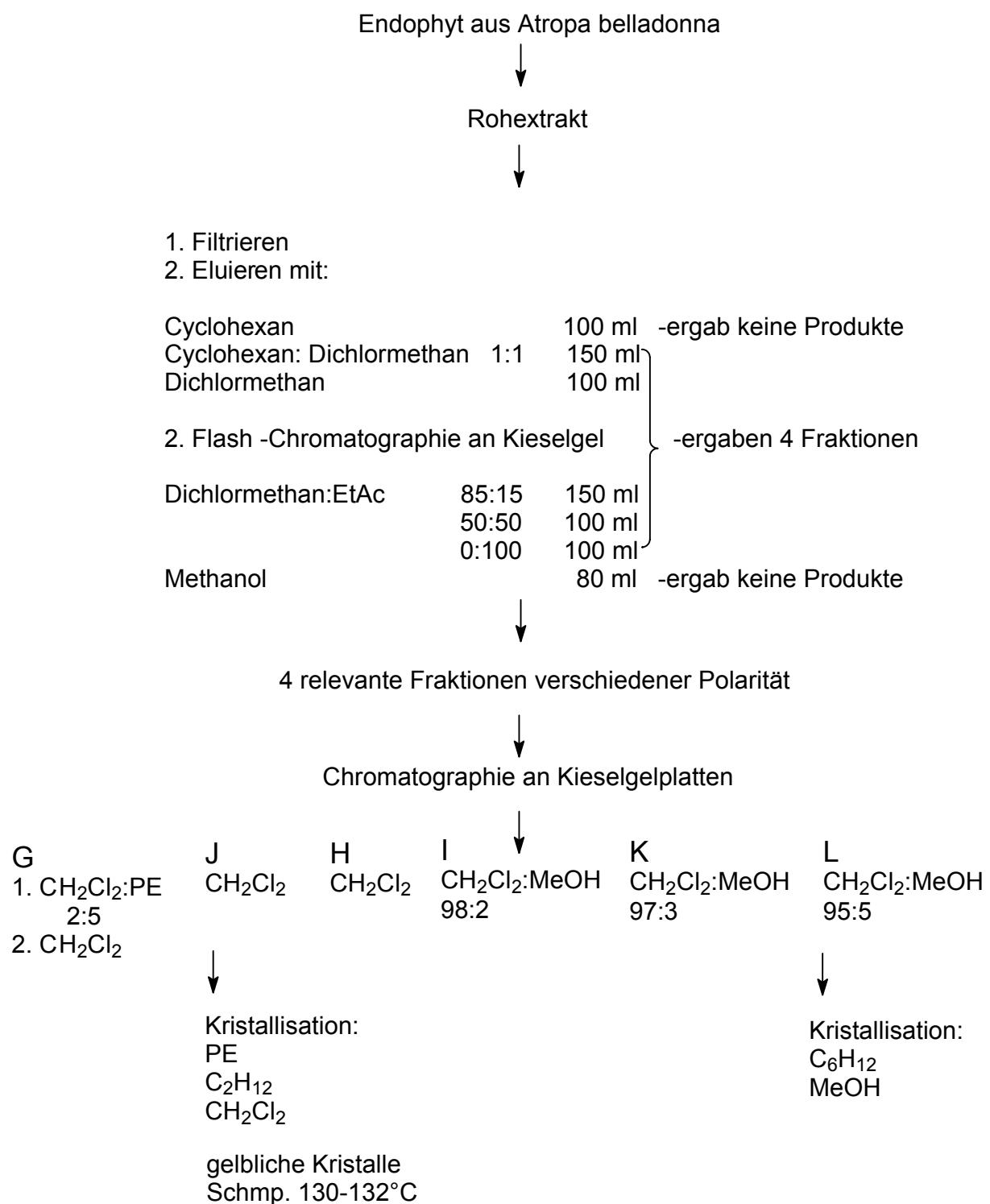
2.1 Der Pilzstamm 4729

Der Pilzstamm 4729 ist ein aus der Wurzel der *Atropa belladonna* isolierter Endophyt (*Mycelia sterilia*). Taxonomisch kann er zur Zeit nicht bestimmt werden.

2.1.1 Isolierung und Charakterisierung der Preussomerine G, H, I, J, K und L

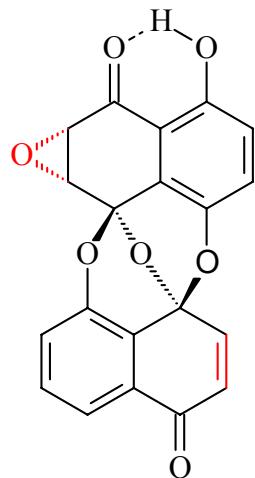
Der Pilz wurde auf zwei verschiedenen Kulturmedien (insgesamt 6000 ml der Biomalz- und Malz-Soja-Weichagarmedien) bei Raumtemperatur 70 Tage lang kultiviert. Anschließend konnte der Rohextrakt nach Homogenisierung durch einmalige Extraktion aus der Pilzkultur mit Petrolether (P) und mehrmalige Extraktion mit Ethylacetat (E) gewonnen werden. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhielt man den Rückstand aus Petrolether und Ethylacetat (ca. 3.3 g), der in ein Gemisch aus Aceton und Methanol (1:1) aufgenommen wurde. Danach wurden Dünnschicht- und Biogramme angefertigt.

Der *Mycelia sterilia*-Endophyt wurde durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (ca. 3.0 g) vorgetrennt. Die unpolarste Fraktion (ca. 2.0 g) bestand aus Fettsäuren und Fettsäureestern. Die Fraktionierung der vier erhaltenen Hauptfraktionen gelang durch mehrmalige präparative Dickschichtchromatographie (Kieselgelplatten 0.25-2.0 mm). Alle oben genannten Naturstoffe G-L gehören zur Klasse der Preussomerine. In Schema 6 ist die Vorgehensweise der Isolierung der Preussomerine veranschaulicht.

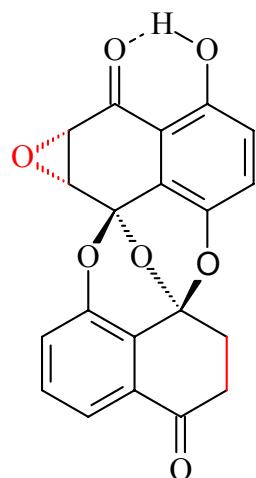


Schema 6 : Die Isolierung der Preussomerine G–L.

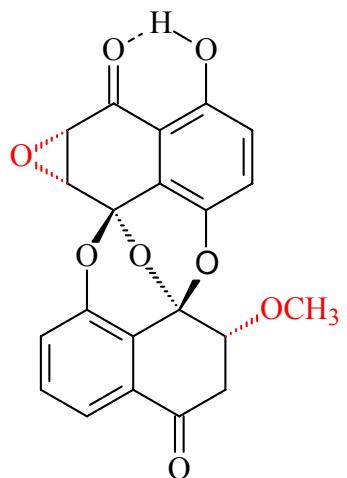
2.1.2 Strukturaufklärung und Beschreibung der Preussomerine G–L



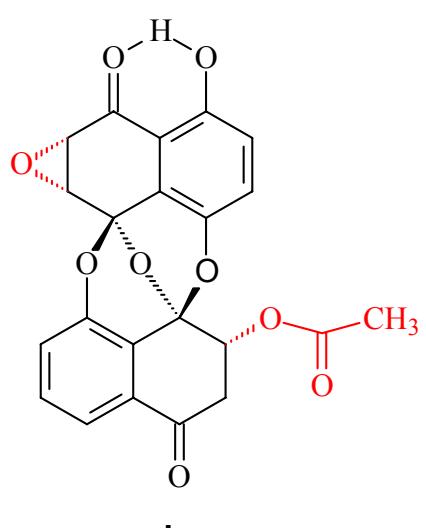
G



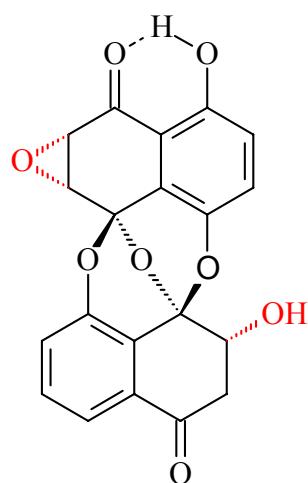
H



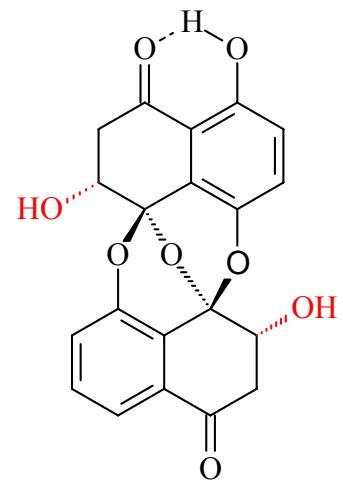
I



J



K



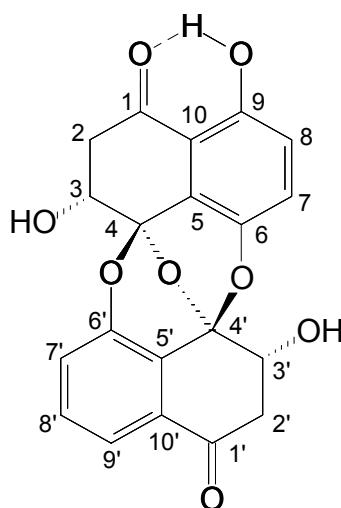
L

Abbildung 1: Die aus dem Pilzstamm 4729 isolierten literaturbekannten (G–I) und neuen (J–L) Preussomerine.

2.1.2.1 Isolierung und Strukturaufklärung des Preussomerins L

$C_{20}H_{14}O_8$

$M_r: 382$



Das in der Literatur nicht bekannte Preussomerin L lag in einer Menge von 3.4 mg zunächst als hellgelbes Öl vor. Im aliphatischen Bereich des 1H -NMR-Spektrums erlaubten mehrere Signale keine sichere Interpretation. Die zahlreichen Versuche, die Probe aufzureinigen, erwiesen sich als schwierig. Aus diesem Grund wurde die Probe mit 3-5 Tropfen kaltem Methanol versetzt und die Lösung in ein anderes Probegläschchen übertragen. Die methanolische Lösung wurde mit 2-3 Tropfen Cyclohexan versetzt. Nach zwei Wochen im Kühlschrank hatten sich Kristalle als farblose Nadeln mit dem Schmelzpunkt 171-173 °C gebildet. Die in Dichlormethan lösliche Fraktion enthielt in größerer Menge ölige Verunreinigungen, die eine Kristallisation verhinderten.

Die Kristalle lösen sich gut in polaren Lösungsmitteln, wie z.B. dem Gemisch Dichlormethan:Methanol = 95:5. Die Substanz hat im Laufmittel $CH_2Cl_2/MeOH$ 95/5 den R_f -Wert 0.61. Der Drehwert des Naturstoffes beträgt $[\alpha]_D = -557^\circ (c = 0.11 \text{ g}/100 \text{ ml, MeOH})$.

Das Massenspektrum ergibt nach hochauflösender Messung des Molekülions bei $m/z = 382.06888$ die Summenformel $C_{20}H_{14}O_8$. Im IR-Spektrum ist die Absorptionsbande bei 1722 cm^{-1} ein Indiz für die Anwesenheit einer

Carbonylgruppe.^[5] Die Bande bei 3382 cm⁻¹ ist für eine chelatisierte Hydroxygruppe charakteristisch.

Im ¹³C-NMR-Spektrum liegt ein doppelter Satz sehr ähnlicher Verschiebungen vor. Es wird im folgenden vom „oberen“ und „unteren“ Teil des Moleküls gesprochen. Die Verbindung enthält insgesamt acht Sauerstoffatome. Die totale Zahl der sp²-hybridisierten Kohlenstoffatome ist 14. Das ¹³C-NMR Spektrum zeigt zwei Signale für zwei Carbonylgruppen und drei Signale für drei sp²-Kohlenstoffatome, die direkt mit Heteroatomen verbunden sind. Acht Kohlenstoffatome liegen im olefinischen bzw. aromatischen Bereich. Charakteristisch sind zwei Spiroacetal-C-Atome bei 95.66 und 95.71 ppm. Zwei sp³-hybridisierte Kohlenstoffatome bei 70.76 und 70.97 ppm sind direkt an ein Heteroatom gebunden. Die zwei übrigen, bei 43.21 und 43.56 ppm liegenden Kohlenstoffatome sind aliphatisch. Sie befinden sich in der Nähe eines Heteratoms und gehören zu einem zyklischen System. Die Daten und Kopplungen der ¹³C- und ¹N-NMR-Spektren sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Das ¹H - NMR-Spektrum zeigt zwei Hauptgruppen (1 und 2) von Signalen (Abbildung 2). Ein scharfes Singulett bei 10.16 ppm (nicht abgebildet) deutet auf ein chelatisiertes phenolisches OH-Proton hin. Die zwei Signale bei 3.33 und bei 4.79 ppm entsprechen den Signalen für Methanol, das dritte Singulett bei 2.18 ppm ist nicht reproduzierbar (eventuell H₂O). Bei der ersten Gruppe um 7-8 ppm handelt es sich um fünf aromatische Protonen. Für die zweite Gruppe um 3-4 ppm sind aliphatische Protonen verantwortlich. In der zweiten Gruppe des ¹H-NMR-Spektrums sind zwei Bereiche der Signale (vier doppelte Dubletts) zu erkennen. Für das erste doppelte Dublett bei 3.59 ppm ist das Proton H-2a (äquatorial) verantwortlich. Das zweite doppelte Dublett liegt um 3.49 ppm und entspricht dem Proton H-2'a. Das axiale Proton H-2b ergibt bei 2.97 ppm das dritte doppelte Dublett. Das Proton H-2'b entspricht dem Dublett bei 2.92 ppm. Die Kopplungskonstanten liegen bei allen vier Dubletts zwischen 3.2 (H-2a, H-2'a) und 2.7 Hz (H-2b,H-2'b). Die Protonen H-2a, H-2b und H-3a (H-2'a, H-2'b und H-3'a) bilden ein ABX-System. Bei allen diesen Signalgruppen beträgt die geminale Kopplungskonstante 18.3 Hz.

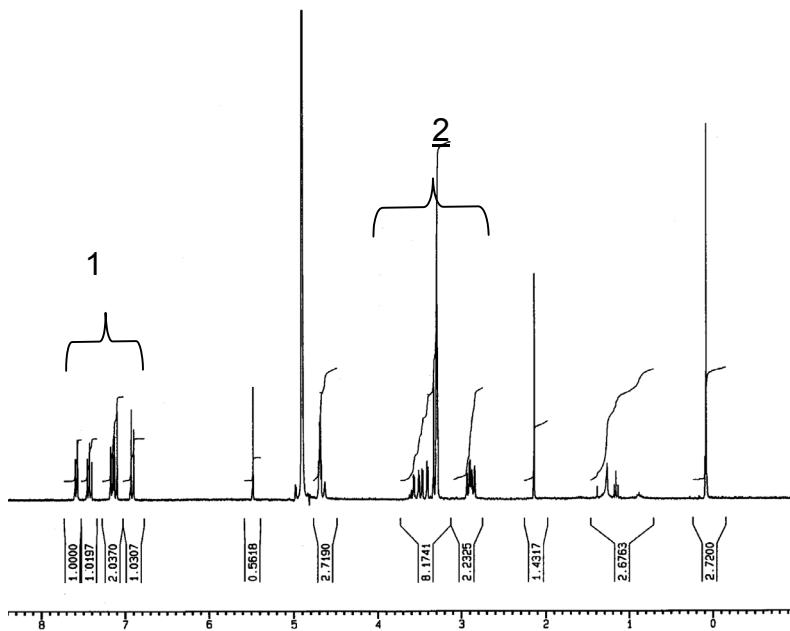


Abbildung 2: Das ^1H -NMR-Spektrum des Preussomerins L.

Mit Hilfe der 2D-NMR-Spektren (HMQC, HMBC) kann für das aliphatische Fragment des ^1H -NMR-Spektrums ein Cyclohexenon-Ring konstruiert werden, der in Abbildung 3 dargestellt ist. Im HMBC-NMR-Spektrum (long-range-Spektrum) ist die direkte Kopplung zwischen dem C-Atom-3', dem Proton H-3' und dem C-Atom-2' sowie den Protonen H-2'a/H-2'b nicht unterdrückt worden. Daraus geht hervor, dass die Kopplung zwischen dem C-3' (70.76/70.97 ppm, hat ein Sauerstoffatom als elektronegativen Nachbarn) und den Methylenprotonen H-2'a und H-2'b eine geminale Kopplung ist. Das Methylen-C-Atom-2', dessen chemische Verschiebung (43.56 ppm) auf ein zyklisches System hindeutet, zeigt genau so im HMBC-NMR-Spektrum eine 3J -Kopplung zu dem Proton 3'-OH. Das Acetal-C-Atom-4' koppelt zum Proton 3'-OH. Die Nachbarschaft des Carbonyl-C-Atoms-1' zu den Protonen H-2'a/b und 3'-OH wird durch das Signal im HMBC-NMR-Spektrum bestätigt. Außerdem koppelt das Carbonyl-C-Atom-1' zu den aromatischen Protonen H-7', H-8', H-9', die im H-H-COSY untereinander eine *meta*- bzw. *ortho*-Kopplung zeigen. Die chemische Verschiebung des quartären C-Atoms-6' (152.33 ppm), das mit den

Isolierung und Strukturaufklärung

Protonen H-7', H-8', H-9' koppeln, weist auf ein Sauerstoffatom als Substituenten am Aromaten hin.

Tabelle 1: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten des Preussomerins L (gemessen in CDCl_3).

Atom. Nr.:	^{13}C -NMR	HMBC	^1H -NMR	H,H-COSY
1	202.24	3, 8	10-OH s 10.16	-
1'	195.98	9', 3', 2'a,2'b	-	-
9	158.10	7.8	-	-
6'	152.33	7',8'	-	-
6	144.41	7, 8	-	-
10'(5')	132.22	7',8',9'	-	-
5'(10')	132.12	2'a,2'b	-	-
7	126.89	8	7 d 7.16	8
7'	122.63	8', 9'	7' dd 7.21	9', 8'
8'(9')	121.65	7', 8',(9')	8' t 7.48	7',9'
9'(8')	121.55	9', (8')	9' dd 7.63	7',8'
8	121.08	7	8 d 6.97	7
5	119.55	8	-	-
10	114.15	7	-	-
4'	95.71	3', 2'a,2'b	-	-
4	95.66	3	-	-
3(3')	70.97	-	3/3' dd 4.75 3'-OH 3.68	2a,2b/ 2a',2b' -
3'(3)	70.76	-	3-OH s 3.39	-
2(2')	43.56	-	2a dd 3.59 2b dd 2.97	2b,3 2a,3
2'(2)	43.21	-	2'a dd 3.49 2'b dd 2.92	2'b,3' 2'a,3'

Der Torsionswinkel zwischen den Protonen H-2'a/2'b und dem Proton H-3' liegt aufgrund der 3J -Kopplungskonstanten (3.2, 2.7 Hz) um 60° . In der Tabelle 1 sind die NMR-Daten aufgelistet.

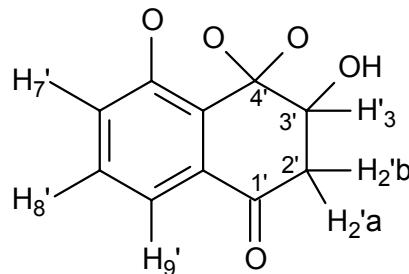


Abbildung 3: Das „untere“ Tetralonfragment des Preussomerins L.

Das „obere“ Fragment sieht dem „unteren“ sehr ähnlich. Der Unterschied ist aber aus den 1H -und ^{13}C -MMR-Spektren sofort zu erkennen. Die chemische Verschiebung des quartären C-Atoms-1 bei 202.24 ppm spricht für eine Carbonylgruppe mit stärkerer Entschirmung als bei dem quartären C-Atom-1' (195.98 ppm). Das kann durch die Chelatisierung der Carbonylgruppe mit einem in günstiger Position stehenden Proton (9-OH, phenolisches Proton) erklärt werden (Abb. 4b). Die Kopplung des Carbonylkohlenstoffatoms C-1 mit den aromatischen Protonen H-8 und H-7 ist zu erkennen. Die 3J -Kopplungskonstante zwischen den Protonen H-7 und H-8 beträgt 9.2 Hz. Beide zeigen im H,H-COSY keine Kopplungen mit anderen Protonen. Das spricht für einen hochsubstituierten Aromaten (Abb. 4a). Die in Abbildung 4 a-d abgebildeten Teilstrukturen a, b, c und d wurden aufgrund der NMR-Daten konstruiert. Die übrigen aliphatischen Signale fallen sehr dicht mit entsprechenden Signalen für das „untere“ Fragment zusammen.

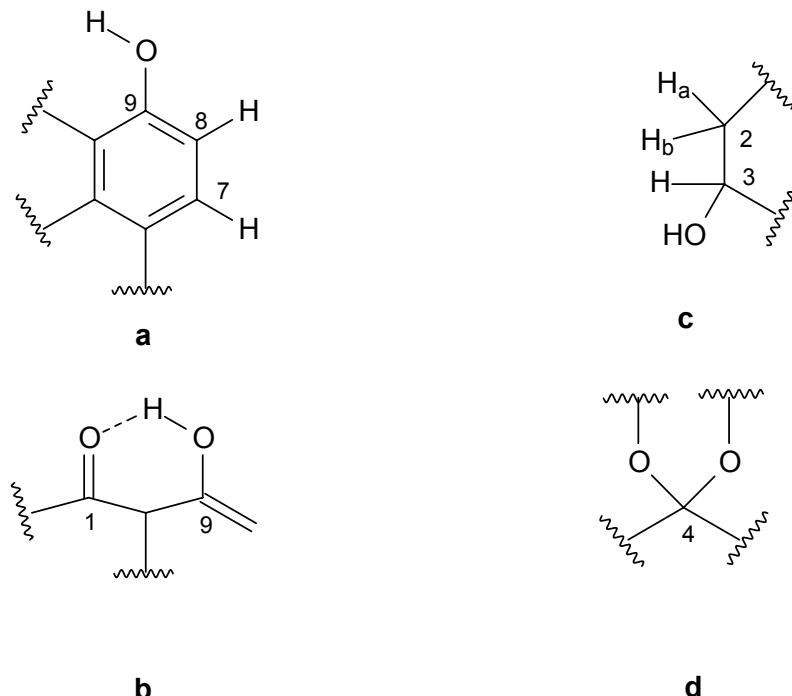


Abbildung 4: Die Fragmente des „oberen“ Teils des Preussomerins L.

Der Befund, dass das Carbonyl-C-Atom-1 mit den aromatischen Protonen H-7 und H-8 koppelt, erlaubt die Verknüpfung der Fragmente **a** und **b**.

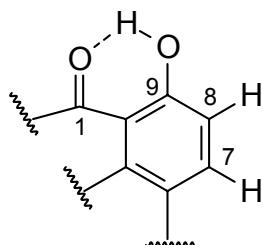


Abbildung 5: Die Kombination I der Fragmente **a** und **b** von Preussomerin L.

Der weitere Aufbau des Moleküls gelingt dank der Fernkopplungen des Spiroacetal-C-Atoms-4 mit den Protonen H-3, H-2a, H-2b. Es gibt zwei Möglichkeiten, die Fragmente **b** und **c** zu verknüpfen. Diese Möglichkeiten sind in der Abbildung 6 vorgestellt.

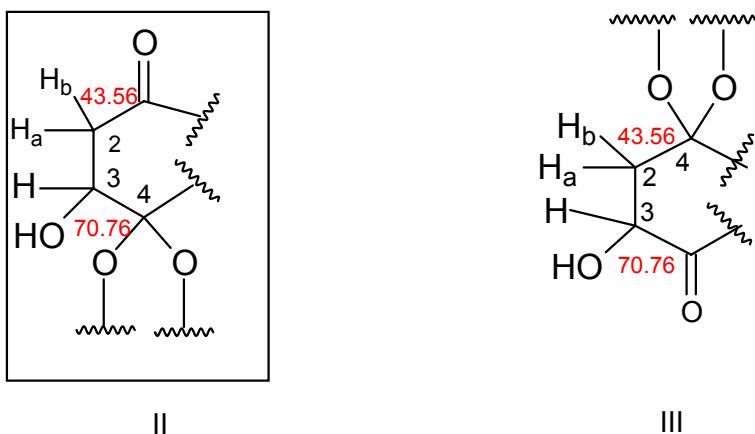


Abbildung 6: Mögliche Verknüpfung der Fragmente **c** und **d** aus Abbildung 4.

Folgende Argumente sprechen für das Fragment II:

Die chemische Verschiebung des C-Atoms-3 (70.8 ppm, es trägt die Protonen H-3 und 3-OH) deutet nicht auf eine direkte Nachbarschaft zu der chelatisierten Carbonylgruppe.

Der Methinkohlenstoff C-2 kann sich aufgrund seiner chemischen Verschiebung (43.56 ppm) nicht in direkter Nachbarschaft zu dem Acetalfragment befinden.

Die Ähnlichkeit der chemischen Verschiebungen der „oberen“ und „unteren“ Teile deutet auf den ähnlichen Aufbau der jeweiligen Fragmente.

Aus all diesen Überlegungen folgt, dass sich zwischen C-Atom-1 und dem Proton H-3 das C-Atom-2 (ein Träger der Protonen H-2a und H-2b) befindet. Die long-range-Kopplungen von zwei aromatischen quartären C-Atomen-10 und C-5 mit den Protonen H-7 und H-8 und mit dem Proton 3-H unterstützen die in Abbildung 6 dargestellte Variante II.

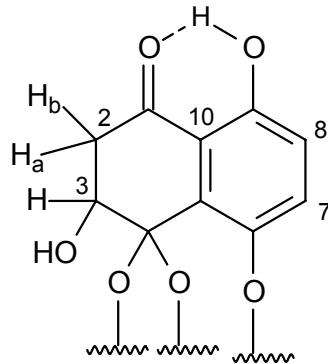


Abbildung 7: Das „obere“ Fragment des Preussomerins L.

Da von der Substanz ein Einkristall gezüchtet wurde, ist eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt worden.

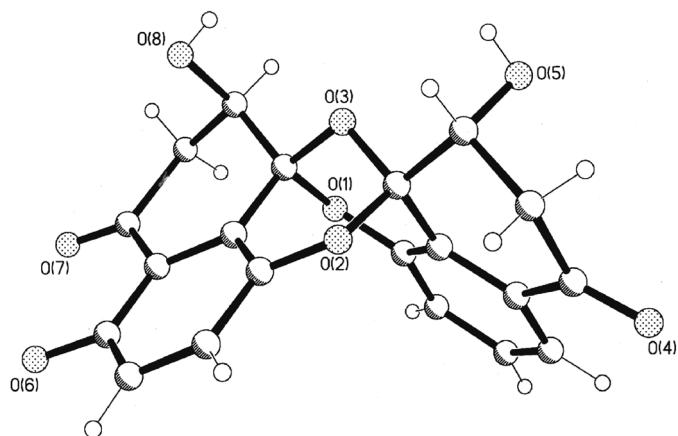
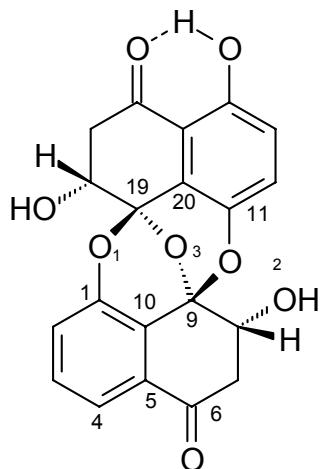
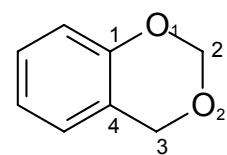


Abbildung 8: Die Röntgenstruktur des Preussomerins L.

Die aus der Röntgenstrukturanalyse entnommenen Werte der Bindungslängen und Bindungswinkel des Naturstoffs 1 (in Lösung) sind mit den berechneten Werten für 4H-Benzo-[1,3]-dioxine als Vergleichssubstanz (Programm *Spartan 5.1, MMFF94b* im Vakuum) verglichen worden. Sie zeigen trotz der Verdrehung der Spiroacetalringe des Preussomerins L eine gute Übereinstimmung (Tabelle 2). Die Numerierung des Gerüstes entspricht den Daten der RSA des Preussomerins L.



Preussomerin L



4H-Benzo-[1,3]-dioxin

Abbildung 9: Die Strukturen des Preussomerins L und 4H-Benzo-[1,3]-dioxin.

Tabelle 2: Die gefundenen und berechneten Bindungswinkel und Bindungslängen von Preussomerin L und 4H-Benzo-[1,3]-dioxin.

Preussomerin L, Winkel in °A			4H-Benzo-[1,3]-dioxin Winkel in ° A	
gefunden		berechnet	berechnet	
C ₁ -O ₁ -C ₁₉	115.1	114.14	C ₁ -O ₁ -C ₂	115.20
C ₁₉ -O ₃ -C ₉	111.3	107.73	O ₁ -C ₂ -O ₂	114.07
O ₃ -C ₉ -C ₁₀	109.2	110.51	O ₂ -C ₃ -C ₄	115.28
O ₁ -C ₁₉ -C ₁₀	109.7	114.14	C ₂ -O ₂ -C ₃	107.65
O ₃ -C ₉ -O ₂	110.0	113.91		
O ₂ -C ₁₁ -C ₂₀	121.0			
Preussomerin L, Bindungslänge °A			4H-Benzo-[1,3]-dioxin	
gefunden		berechnet	Bindungslänge °A	berechnet
O ₁ -C ₁	1.35	1.37	C ₁ -O ₁	1.37
O ₁ -C ₁₉	1.47	1.43	O ₁ -C ₂	1.43
C ₁₉ -O ₃	1.42	1.43	C ₂ -O ₂	1.42
O ₃ -C ₉	1.42	1.43	O ₂ -C ₃	1.42
C ₉ -O ₂	1.47	1.44		
O ₂ -C ₁₁	1.38	1.43		

2.1.2.2 Isolierung und Strukturaufklärung von Preussomerin K

$C_{20}H_{12}O_8$

Mr: 380

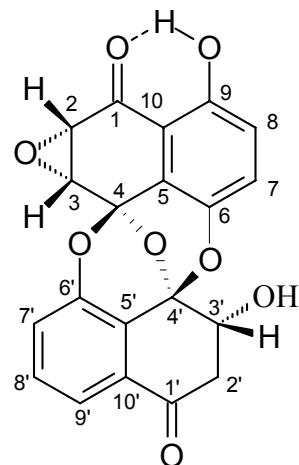


Abbildung 10: Die Struktur und Numerierung des Sekundärmethaboliten Preussomerin K.

Das literaturunbekannte Preussomerin K ist eine hellgelbe ölige Substanz, die weniger polar als Preussomerin L ist. Der R_f -Wert des Naturstoffes in CH_2Cl_2 beträgt 0.17. Die Substanz löst sich gut in Dichlormethan. Preussomerin K hat bei der Konzentration $c = 0.41$ g/100 ml den Drehwert $[\alpha]^{25}_D = -150$ °. Die IR- und UV-Spektren der Probe sind denen des Naturstoffs L sehr ähnlich. Die exakte Masse wurde durch HREIMS bestimmt und beträgt 380.05347 g/mol. Daraus ergibt sich unter Berücksichtigung der NMR-Daten und der Zahl der Doppelbindungsäquivalente ($R+DB = 16$) die Summenformel $C_{20}H_{12}O_8$. In Abbildung 11 ist ein Ausschnitt des 1H -NMR-Spektrums ($CDCl_3$) dargestellt. Der aromatische Teil des Spektrums sieht dem Spektrum des Naturstoffs L sehr ähnlich; im aliphatischen Bereich findet man jedoch zwei gravierende Unterschiede.

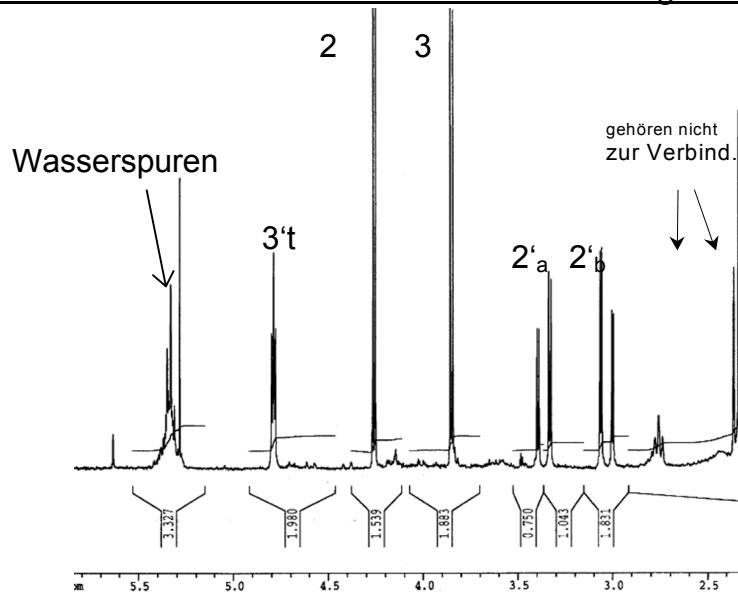


Abbildung 11: Der Ausschnitt des ^1H -MNR-Spektrums des Preussomerins K (CDCl_3).

Für zwei neue Doublets bei 3.84 ppm (Abbildung 11 Signal Nr. 3) und bei 4.26 ppm (Signal Nr. 2) sind die Protonen H-2 und H-3 an einem Epoxidring verantwortlich.

Die Signale der diastereotopen Protonen haben sich deutlich vereinfacht. Im Vergleich zu dem Spektrum des Preussomerins L ist nur die Hälfte der Signale zu sehen. Die diastereotopen Protonen H-2'a und H-2'b zeigen eine geminale Kopplung; sie beträgt $^2J = 18.3$ Hz. Neben der vicinalen Kopplung (2.7/3.2 Hz) beider Protonen H-2'a und H-2'b mit dem Proton H-3' beobachtet man ein doppeltes Doublet (ABX-Signal). Diese Kopplungskonstanten spiegeln sich beim Triplet bei 4.84 ppm wieder (Signal 3'). Aus den Kopplungskonstanten folgt, dass die Protonen H-2a'/2b' nicht antiperiplanar zu dem Proton H-3' stehen.

In der Tabelle 3 sind die spektroskopischen Daten des Naturstoffes K zusammengefasst.

Isolierung und Strukturaufklärung

Tabelle 3: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten des Preussomerins K (CDCl_3).

Atom. Nr.:	^{13}C -NMR	HMBC	^1H -NMR	H,H-COSY
1	202.24	3, 8	10-OH s 10.16	-
1'		9',3', 2'a,2'b	-	-
9	158.10	7,8	-	-
6'	152.33	7',8'	-	-
6	144.41	7, 8	-	-
10'(5')	132.22	7',8',9'	-	-
5'(10')	132.12	2'a,2'b	-	-
7	126.89	8	7 d 7.16	8
7'	122.63	8', 9'	7' dd 7.21	9', 8'
8'(9')	121.65	7', 8',(9')	8' t 7.48	7',9'
9'(8')	121.55	9', (8')	9' dd 7.63	7',8'
8	121.08	7	8 d 6.97	7
5	119.55	8	-	-
10	114.15	7	-	-
4'	95.71	3', 2'a,2'b	-	-
4	95.66	3	-	-
3(3')	70.97	-	3/3' dd 4.75 3'-OH 3.68	2a,2b/ 2a',2b' -
3'(3)	70.76	-	3-OH s 3.39	-
2(2')	43.56	-	2a dd 3.59 2b dd 2.97	2b,3 2a,3
2'(2)	43.21	-	2'a dd 3.49 2'b dd 2.92	2'b,3' 2'a,3'

Die Zuordnung der Signale gelingt aufgrund der 1D- und 2D-NMR-Daten. Aus den HMBC-Spektren ergeben sich die C-Atome-2 (53.67 ppm) und C-3 (52.17 ppm) als Träger der Protonen H-2 und H-3. Die chemische Verschiebung der Protonen H-2 und H-3 deutet auf die Nachbarschaft zu einem Sauerstoffatom hin. Die Kohlenstoffatome C-2 und C-3 zeigen im long-range-Spektrum keine Kopplungen mit

anderen Protonen. Das C-Atom-4 (93.58 ppm, typisch chemische Verschiebung für ein Acetal) kennzeichnet sich durch eine 3J -Kopplung mit dem Proton H-2. Außerdem zeigt das Carbonyl-C-Atom-1 im long-range-Spektrum eine Kopplung mit den Protonen H-3 und 9-OH. Im 1H -NMR-Spektrum taucht bei tieferem Feld (10.12 ppm) ein Singulett auf. Die Chelatisierung eines OH-Protons durch die benachbarte Carbonylgruppe C-1 ist offensichtlich.

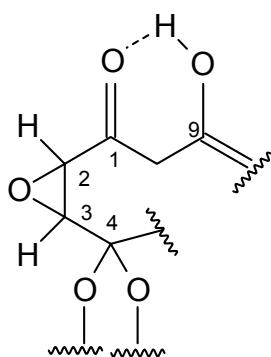


Abbildung 12: Das Fragment I des Preussomerins K.

Das C-Atom-9, an das die phenolische Hydroxygruppe gebunden ist, zeigt außer Kopplungen mit dem Proton H-1, den aromatischen Protonen H-7 und H-8 keine weiteren protonischen Kopplungen. Daraus folgt als ein weiteres Fragment:

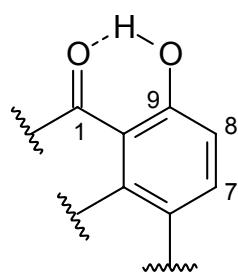


Abbildung 13: Das Fragment II des Preussomerins K.

Die in Abbildung 12 und 13 abgebildeten Fragmente I und II können verknüpft werden. Sie bilden einen Teil des Moleküls, wie es auch bei den literaturbekannten Preussomerinen G, H, I vorkommt.

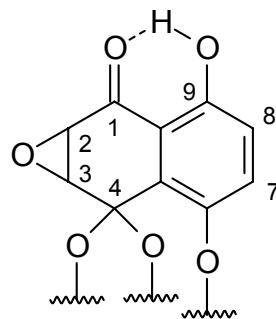


Abbildung 14: Die Kombination A der Fragmente I und II für den „oberen“ Teil des Preussomerins K.

Der andere Teil des Moleküls kann aufgrund aller zur Verfügung stehenden spektroskopischen Daten ermittelt werden. Es gelten die gleichen Überlegungen wie für den Naturstoff Preussomerin L.

In Analogie zum Preussomerin L unterscheiden sich die beiden Carbonylgruppen C-1 und C-1' (entsprechende Kohlenstoffatome bei 195.64 ppm und 193.39 ppm) in der chemischen Verschiebung nicht eindeutig (Preussomerin L: C-Atom-1 bei 202.24 ppm, C-Atom-1' bei 195.98 ppm). Der kleine Überschuss der positiven Ladung am Kohlenstoffatom C-1, der durch die Chelatisierung am Ort entsteht, wird durch den Einfluss des Epoxidringes ausgeglichen. Im aromatischen Bereich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums für den zweiten Teil des Moleküls sind insgesamt die 3 Protonen H-7', H-8' und H-9' zu erkennen, mit denen das Carbonyl-C-Atom-1' koppelt.

Oben wurde schon erwähnt, dass im aliphatischen Fragment des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums die Zahl der Signale der diastereotopen Protonen auf die Hälfte reduziert wird. Das Kopplungsmuster bleibt aber erhalten. Eine Hydroxygruppe 3'-OH und das Proton H-3' bilden am C-Atom-3' (79.28 ppm) ein stereogenes Zentrum aus. Das entsprechende „untere“ Fragment ist in Abbildung 15, das aufgrund der spektroskopischen Daten konstruiert wurde, dargestellt.

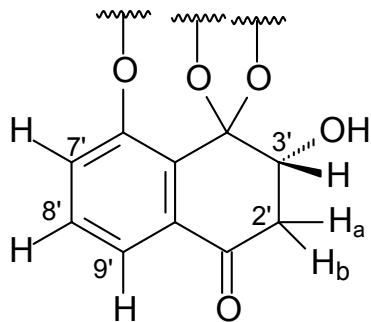


Abbildung 15: Das untere Fragment B des Preussomerins K.

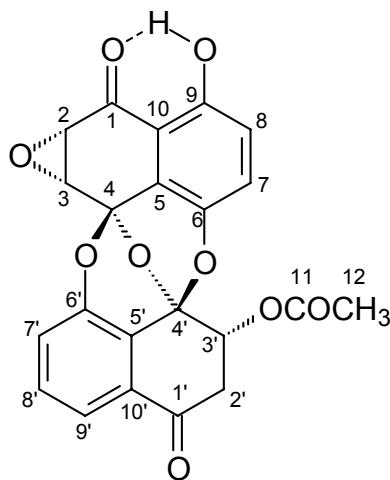
Es liegt die Vermutung nahe, dass die Stereochemie am C-Atom-3' mit derjenigen des Naturstoffs L übereinstimmt, da er aus demselben Pilzstamm isoliert worden ist und ein biosynthetisches Folgeprodukt sein könnte (durch Reduktion des Epoxidringes).^[6] Man findet eine gute Übereinstimmung zwischen dem Wert der Kopplungskonstante an dem Stereozentrum C-3' des Preussomerins L ($^3J = 2.7$ Hz) einerseits und andererseits dem des Preussomerins K ($^3J = 3.3$ Hz). Die absolute Konfiguration der Preussomerine wird später genauer dargestellt (Kapitel 2.1.8).

Die Verknüpfung der Teile A und B kann, wie beim Naturstoff L beschrieben, vorgenommen werden. Die Summenformel des Moleküls ergibt $C_{20}H_{12}O_8$. Für den Aufbau des ersten Teils werden zehn Kohlenstoffatome, fünf Protonen und sechs Sauerstoffatome benötigt. Der zweite Teil des Moleküls besteht ebenso aus zehn Kohlenstoffatomen, sieben Protonen und fünf Sauerstoffatomen. Drei der Sauerstoffatome bilden folglich einen Spiroacetalring.

2.1.2.3 Isolierung und Strukturaufklärung des Preussomerins J

 C₂₂H₁₄O₈

Mr: 422



Der in der Literatur nicht bekannte Naturstoff Preussomerin I wurde zusammen mit einem anderen Vertreter der Preussomerine, dem literaturbekannten Preussomerin J, aus demselben Pilzstamm in einer Menge von 1.7 mg isoliert. Preussomerin I lag im Gemisch mit Preussomerin J als Hauptprodukt vor. Wegen Substanzmangels wurden die Naturstoffe nicht voneinander getrennt. Es war möglich, die zum Preussomerin I gehörenden Signale von Signalen des Preussomerins J aufgrund ihrer unterschiedlichen Intensität (I/J = 3/1) zu unterscheiden.

Beide Naturstoffe zeigen bei 254 nm eine intensive UV-Absorption und bei 354 nm eine charakteristische Fluoreszenz. Beim Besprühen mit Dinitrophenylhydrazin erkennt man eine Carbonylgruppe. Die IR- und UV-Spektren liefern den Preussomerinen L und K ähnliche Absorptionsbanden. Mit Molybdänphosphorsäure (DC-Sprühreagenz) entwickelt sich eine dunkelbraune Färbung wie bei allen Preussomerinen.^[7] Im Dünnschichtchromatogramm laufen die zwei Substanzen nahe zusammen. Die R_f-Werte der Substanzen I und J in reinem Dichlormethan sind 0.43 für I und 0.51 für J.

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie (EI) liefern die Molekülionen bei *m/z* = 422 und *m/z* = 394. Die hochauflösende Messung der Molekülionen ergibt die Summenformeln C₂₂H₁₄O₉ (Preussomerin I) bzw. C₂₁H₁₄O₈ (Preussomerin J). Die Summenformeldifferenz besteht aus einem CO-Fragment. Im Massenspektrum sind auch die Fragmente bei *m/z* = 43 (entspricht dem Fragment CH₃CO⁺) und *m/z* = 380 (Fragment C₂₀H₁₁O₈⁺) zu finden. Die α -Spaltung zur Carbonylgruppe liefert das

stabile Molekülion bei $m/z = 43$; das andere $m/z = 379$ wird möglicherweise durch die Anlagerung eines Protons stabilisiert.^[8] Die Strukturaufklärung des Naturstoffes J wird später erläutert (s. Kapitel 2.1.2.6).

Beim Betrachten der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren findet man die charakteristischen Signale eines Preussomeringerüstes, hier mit einem Epoxidring, über die schon bei den Substanzen L und K mit Hilfe von Röntgenstrukturanalyse, HMBC, HMQC, ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren berichtet wurde. Das im ^{13}C -NMR-Spektrum neu erscheinende Signal für C-11 (bei 169.40 ppm), das im long-range-Spektrum mit einer Methylgruppe 12 (bei 1.99 ppm) koppelt (C-12 bei 20.94 ppm), spricht für eine Acetoxyeinheit im Molekül. Dabei verschiebt sich das Signal für das Kohlenstoffatom 3' von 79.27 ppm (bei dem Naturstoff J) zu 70.62 (Preussomerin I). Durch den Austausch einer Hydroxygruppe gegen eine Acetoxygruppe verschiebt sich das Signal im ^1H -NMR des H-Atoms-3' von 4.75/4.78 ppm (bei den Preussomerinen L/K) auf 5.93 ppm. Das Kopplungsmuster des C-Atoms-3' bleibt mit dem Kopplungsmuster der Naturstoffe L und K identisch (koppelt im long-range-Spektrum mit den diastereotopen Protonen H-2'a und H-2'b). Die Werte der Kopplungskonstanten für das entsprechende Fragment zeigen gute Übereinstimmung. Ein Teil des Moleküls ist unten dargestellt.

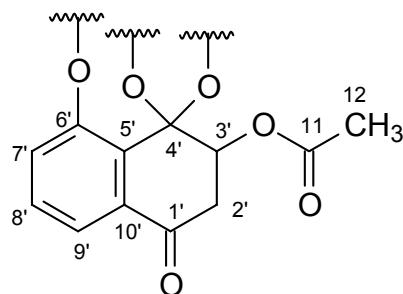


Abbildung 16: Der „untere“ Teil des Preussomerins I.

Die NMR-Daten sind in der Tabelle 4 aufgelistet.

Isolierung und Strukturaufklärung

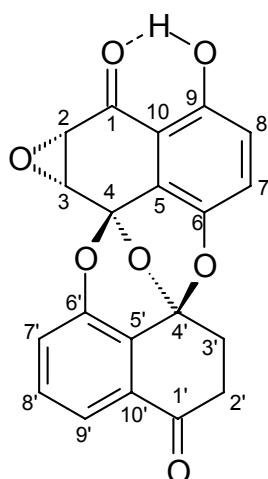
Tabelle 4: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten des Preussomerins I (CDCl_3).

Atom. Nr.:	^{13}C -NMR	HMBC	^1H -NMR	H,H-COSY
1	195.58	2	-	10-OH
1'	192.42	9', 2'a/b	-	-
11	169.40	12	-	-
9	156.40	10-OH, 7, 8	-	-
6'	149.66	7', 8'	-	-
6	142.49	7, 8	-	-
10'	131.14	-	-	-
7	126.43	-	7 d 7.05	8
8'	121.76	9'	8' t 7.44	7'
8	121.46	-	8 d 6.95	7
7'	120.89	8'	7' dd 7.09	8', 9'
9'	120.74	-	9' dd 7.68	7', 8'
5'	119.75	9'	-	-
5	115.69	7, 8	-	-
10	110.20	10-OH, 8	10-OH s 10.12	-
4	93.08	-	-	-
4'	92.20	2'a, 2'b	-	-
3'	70.62	2'a, 2'b	3' t 5.93	2'a, 2'b
2	53.48	3	2 d 4.23	-
3	52.07	2	3 d 3.82	3
2'	40.26	-	2'a dd 3.47 2'b dd 3.05	3', 2'b 3', 2'a
12	20.94	12	12 s 1.99	-

2.1.2.4 Isolierung und Strukturaufklärung des Preussomerins H

$C_{20}H_{12}O_7$

Mr. 364



Ein weiterer Vertreter aus der Reihe der Preussomerase, das literaturbekannte Preussomerase H, wurde von S. Singh und D. L. Zink (1994) isoliert und beschrieben.^[6] Sie berichteten über die mäßige Aktivität dieses Preussomerasins gegen Ras Farnesyl-Protein Transferase ($IC_{50} = 12 \mu M$).^[9] Ras Farnesyl-Protein Transferase ist ein dimeres Enzym, dessen Inhibition die Entstehung des Pankreaskarzinoms hemmt.

Der Naturstoff wurde als hellgelbes Öl isoliert. Die Substanz besitzt in reinem Dichlormethan einen R_f - Wert von 0.5 und ist in Dichlormethan gut löslich. Der Drehwert des Naturstoffes beträgt bei der Konzentration $c = 0.04$ g/100 ml in Dichlormethan bei $[\alpha]_D^{20} = -233^\circ$. Die IR- und UV- Daten sind den oben beschriebenen Preussomerinen sehr ähnlich. Die hochauflösende Masse des Moleküliions bei $m/z = 364$ ergibt die Summenformel $C_{20}H_{12}O_7$. Man erkennt in den 1H -und ^{13}C -NMR-Spektren das charakteristische Gerüst eines Preussomerins mit einem chelatisierten Proton, fünf aromatischen Protonen, zwei Protonen direkt an einem Epoxidring und vier aliphatische Protonen. Alle spektroskopischen Daten der Substanz stimmen mit dem in der Literatur beschriebenen Preussomerin H überein.^[9] Da die Signale der aliphatischen Protonen in der Literatur nicht ausführlich beschrieben sind, wird hier darauf genauer eingegangen.

Die spektroskopischen Daten des Preussomerins H sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die Interpretation der Signale der Protonen an Position 2' und 3' ist schwierig, weil ein komplexes Muster mit 32 Linien auftritt. So ein Muster spricht für zwei prochirale

Gruppen mit vier diastereotopen Protonen. Jedes Proton in dem AB-System hat 3 verschiedene Kopplungspartner.

Den 2D-NMR-Daten ist zu entnehmen, dass den vier Protonen H-2'a, H-2'b, H-3'a und H-3'b vier Gruppen von Signalen (bei 3.26 ppm, 2.88 ppm, 2.81 ppm und 2.51 ppm) entsprechen. Diese Signal-Gruppen sind paarweise angeordnet. Zwei Gruppen der Signale können für die zwei axial stehenden Protonen, zwei andere für die zwei äquatorialen Protonen verantwortlich sein. Die Zuordnung der Protonen gelingt mit der Hilfe der HMQC-Spektren. Man sieht deutlich, dass die Protonen H-2'a (äquatorial, 3.26 ppm) und H-2'b (axial, 2.88 ppm) an das C-Atom-2' (33.67 ppm) direkt und die Protonen 3'a (äquatorial) und 3'b (axial) an das C-Atom 3' (32.70 ppm) gebunden sind. Außerdem nehmen die Protonen H-2'b und H-3'b aufgrund der Größe der Kopplungskonstanten ($^3J = 1.8$ Hz, $^3J = 5.5$ Hz) keine axiale Position ein. Die Halb-Sessel-Konformation am Cyclohexenongerüst ist durch die Spiroacetalringe und durch die Chelatisierung des phenolischen Protons 9-OH festgelegt. Der Anisotropieeffekt der Carbonylgruppe müßte sich für die Protonen H-2/H-2' unterschiedlich auswirken. Der Effekt macht sich in den NMR-Spektren bemerkbar. Dafür findet man in den ^1H -NMR-Spektren eine eindeutige Bestimmung der Position der Protonen H-2'a und H-2'b, genau so wie der Protonen H-3'a und H-3'b. Aus der Karplus-Kurve ergibt sich ein Torsionswinkel von 60° zwischen H-3'b äquatorial und H-2' axial (gauche-Konformation).

Der Theorie nach sind in einem Sechsring mit sterisch fixierter Sesselkonformation äquatorial stehende Protonen im Vergleich zu den axialen um ca. 0.1-0.7 ppm zu tiefem Feld verschoben. Der Grund dafür ist der Anisotropieeffekt der C₃-C₄ (C₅-C₆) σ -Bindung, der aber deutlich kleiner als der Anisotropieeffekt der π -Elektronen ist. Dank dieses Effektes liegt das äquatoriale Proton innerhalb der Entschirmungszone einer Kugel.^[10] Die schematische Darstellung zeigt Abbildung 17.

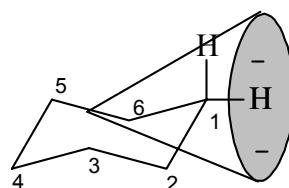


Abbildung 17: Die theoretische Darstellung des Anisotropieeffektes einer σ -Bindung im Cyclohexanring.

Im Fall des Preussomerins H handelt es sich um einen Sechsring mit 3 sp^2 -Zentren mit einer Carbonylgruppe. Der Anisotropieeffekt der Carbonylgruppe führt wegen der π -Elektronen zu einer stärkeren Entschirmung beider Protonen. Der Effekt zeigt sich besonders deutlich für das Proton H-2b (axial, 3.26 ppm), weil die nichtbindenden π -Orbitale des Sauerstoffatoms am sp^2 -hybridisierten Carbonylkohlenstoff C-1' parallel zu der Verbindungsleitung 2'C-H-2'b ausgerichtet sind. Das Proton H-2'a hat eine chemische Verschiebung von 2.88 ppm.

Die Protonen H-3'a (äquatorial, 2.81 ppm) und H-3'b (axial, 2.51 ppm) sind im Gegensatz zu den Protonen H-2'a und H-2'b zu höherem Feld verschoben. Die Nachbarschaft der zwei Sauerstoffatome, die aber mit einem sp^3 -hybridisierten C-Atom-4' direkt gebunden sind, kann man nicht mit dem Effekt der Carbonylgruppe und dem Hybridisierungszustand des in α -Position stehenden C-Atoms-1' vergleichen. Wegen der größeren Entfernung dieser Protonen vom C-Atom-1' steht der Anisotropieeffekt der C₃-C₄ σ -Bindung (s. Abb. 17) wieder im Vordergrund. Angesichts der Konformation am Hexenonring (wird im Kapitel über die absolute Konfiguration genauer dargestellt) ist die Größe der Kopplungskonstante für die Protonen H-3'b und H-2'b von $^3J = 1,8$ Hz ein Beweis, dass sie nicht bisaxial stehen. Die Kopplungskonstante zwischen dem Proton H-2'b (axial) und Proton H-3'a (äquatorial) beträgt 5.5 Hz und liegt schon an der Obergrenze der Werte für einen Cyclohexanring. Die Nachbarschaft (insgesamt drei Sauerstoffatome) und der Hybridisierungszustand des C-Atoms-1' erklären die höheren Werte der Kopplungskonstanten.

Da die Struktur des Naturstoffs gesichert ist und man eine große Übereinstimmung aller spektroskopischer Daten mit der literaturbekannten Substanzen findet, werden die restlichen Fragmente der Struktur hier nicht weiter diskutiert.

Isolierung und Strukturaufklärung

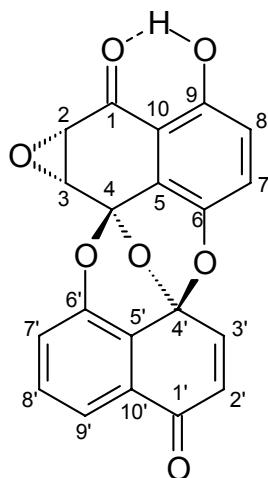
Tabelle 5: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten des Preussomerins H (CDCl_3).

Atom. Nr.:	^{13}C -NMR	HMBC	HMQC	^1H -NMR	H,H-COSY
1	195.40	3, 7	-	-	-
1'	194.51	8', 9'	-	-	-
9	156.96	9-OH, 7, 8	-	9-OH s 10.12	-
6'	148.25	7'	-	-	-
6	143.65	7, 8	-	-	-
8'	131.09	8'	8'	8' t 7.39	7', 9'
10'	130.76	8'	-	-	-
7	126.34	7	7	7 d 7.03	8
7'	121.89	7'	7'	7' dd 7.06	8', 9'
8	121.42	7	8	8 d 6.93	7
9'	121.38	7',8'	9'	9' dd 7.64	7', 8'
5'	120.95	7'	-	-	-
5	115.43	7, 8	-	-	-
10	109.97	9-OH, 8	-	-	-
4'	93.88	3'a, 3'b	-	-	-
4	93.00	-	-	-	-
2	53.65	2	2	2 d 4.21	3
3	52.14	3	3	3 d 3.82	2
2'	33.67	3'a, 3'b	2'a, 2'b	2'b m 3.26 2'a m 2.88	2'b, 3'a, 3'b 2'a, 3'a, 3'b
3'	32.70	2'a,2'b	3'a, 3'b	3'a m 2.81 3'b m 2.51	2'a, 2'b, 3'b 2'a, 2'b, 3'a

2.1.2.5 Isolierung und Strukturaufklärung des Preussomerins G

C₂₀H₁₀O₇

Mr: 362



Das literaturbekannte Preussomerin G liegt als hellgelber Feststoff vor und hat einen R_f - Wert von 0.62 (CH₂Cl₂). Die Isolierung des Sekundärmetaboliten erfolgte mittels präparativer Chromatographie (Dickschichtplatten) mit dem unpolaren Laufmittelgemisch (PE:CH₂Cl₂ = 2:5). Die IR- und UV-Spektren der Substanz sind den spektroskopischen Daten der Naturstoffe L, K, I und H sehr ähnlich. Die hochauflösende Messung des Molekülions bei *m/z* = 362 ergibt die Summenformel C₂₀H₁₀O₇. Preussomerin G wurde von Gloer et al. isoliert und charakterisiert.^[11, 12] Die Daten des ¹H-NMR-Spektrums deuten auf insgesamt 5 aromatische und zusätzlich 2 olefinische Protonen hin. Zwei aromatische *ortho*-koppelnde Protonen gehören zu einem 1,2,3,4-tetrasubstituierten Aromaten, drei sind in der Position eines 1,2,3-trisubstituierten aromatischen Ringes. Aus den ¹H- und ¹³C-NMR-Daten erkennt man wieder das Gerüst eines Preussomerins mit den charakteristischen Spiroacetaleinheiten und einem Epoxidring. Der Unterschied zu den schon beschriebenen Preussomerinen besteht aus zwei zusätzlichen olefinischen Protonen H-2' und H-3' (anstelle einer Methoxygruppe beim Preussomerin K). Diese Unterschiede sind der Abbildung 18 zu entnehmen.

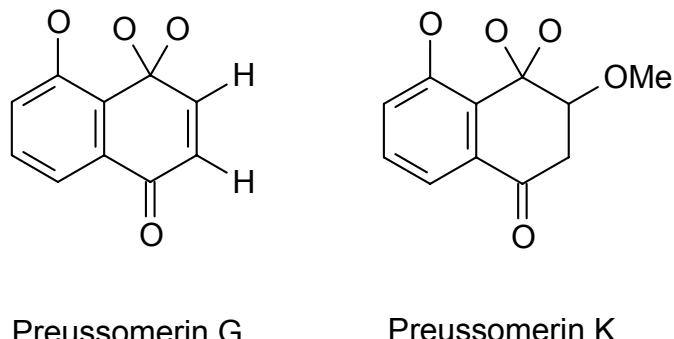


Abbildung 18: Die strukturellen Unterschiede der Preussomerine G und K.

Die in der Literatur angegebenen spektroskopischen Daten stimmen mit unseren sehr gut überein außer der Position des C-Atoms-10 im ^{13}C -NMR. Das quartäre C-Atom-10 korreliert (HMBC) eindeutig zu den Protonen H-8 und 9-OH und hat eine chemische Verschiebung von 115.21 ppm (Lit.: 109.74 ppm). Die Position des anderen quartären C-Atoms-5 bei 109.82 ppm (Lit.: 109.74 ppm) kann durch die Korrelation (HMBC) zu den Protonen H-2 und H-7 festgelegt werden. Die Lage beider Kohlenstoffatome sollte sich aufgrund der Chelatisierung der OH-Gruppe deutlich unterscheiden, was sie in unseren gemessenen Spektren auch tut.

In Tabelle 6 sind die spektroskopischen Daten des Preussomerins zusammengefasst.

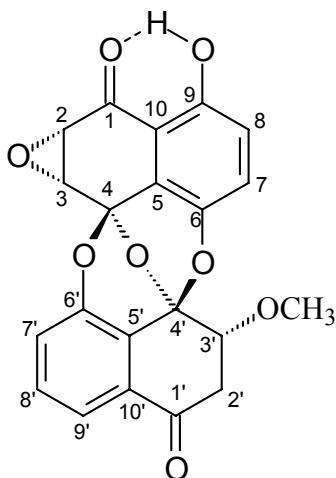
Tabelle 6: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten des Preussomerins G (CDCl_3).

Atom. Nr.:	^{13}C -NMR	HMBC	^1H -NMR	H,H-COSY
1	195.45	3, 7	-	-
1'	183.73	8', 9'	-	-
9	156.11	1, 7, 8	9-OH s 10.22	-
6'	148.76	7'	-	-
6	143.39	7, 8	-	-
3'	140.73	3	3' d 6.59	7
2'	133.57	7	2' d 6.95	3'
8'	131.15	7'	8' d 7.24	7', 9'
10'	130.32	2', 7'	-	-
7	126.73	7	7 d 7.05	8
8	121.31	9-OH, 8	8 d 7.03	7
7'	120.86	7'	7' t 7.41	8', 9'
9'	120.70	7', 8'	9' dd 7.62	7', 8'
5'	120.59	9'	-	-
10	115.21	9-OH, 2, 8	-	-
5	109.82	9-OH, 3, 7	-	-
4	93.96	-	-	-
4'	89.98	2'	-	-
2	53.70	9-OH, 2	2 d 3.84	3
3	52.17	3	3 d 4.26	2

2.1.2.6 Isolierung und Charakterisierung des Preussomerins I

C₂₁H₁₄O₈

Mr: 394



Der nächste Vertreter aus der Klasse der Preussomerine, das literaturbekannte Preussomerin I (farblose Kristalle, Schmp. 130-132° C) wurde per Dickschichtplatte (2.0 mm, SiO₂, Macherey-Nagel) isoliert und mit dem Lösungsmittelgemisch CH₂Cl₂ (5 Tropfen), Petrolether (1-2 Tropfen) und Cyclohexan (5-6) Tropfen kristallisiert. Der Naturstoff wurde von Singh et al. 1994 isoliert und beschrieben.^[9] Das Massenspektrum liefert das Molekülion bei *m/z* = 394. Die hochauflösende Messung des Molekülions ergibt die Summenformel C₂₁H₁₄O₈. Der Vergleich der ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren mit anderen Preussomerinen deutet auf ein Gerüst mit einem Epoxidring und einer Methoxygruppe (das C-Atom-3' bei 79.27 ppm) hin. Das Singulett um 3.53 ppm im ¹H-NMR-Spektrum (-OCH₃), die Daten des ¹³C-NMR-Spektrums und besonders die long-range-Kopplungen (HMBC, C-Atom-3' koppelt mit den Protonen 3'OCH₃) zeigen die Gegenwart einer Methoxygruppe im Molekül an. Die chemische Verschiebung des Carbonylkohlenstoffatoms C-1' zum tieferen Feld von 183.73 ppm (Preussomerin G) auf 193.39 ppm erfolgt durch die Anwesenheit der Methoxygruppe.

Im ¹H-NMR-Spektrum sind bei 3.53 und 3.05 ppm zwei Doppel-Dubletts zu erkennen. Die Kopplungskonstante von ²J = 18.3 Hz spricht für die geminale Kopplung zwischen den Protonen H-2'a und H-2'b. Außerdem koppeln beide Protonen vicinal (³J = 3.05 Hz) mit dem Proton H-3'. Die Abnahme des Wertes der ³J-Kopplungskonstanten von 5.50 Hz (Preussomerin H) auf 3.05 Hz wird durch den elektronegativen Substituenten (Methoxygruppe) bewirkt. Man findet eine gute

Übereinstimmungen der Werte der vicinalen Kopplungskonstanten mit Verbindungen, die einen elektronegativen Substituenten enthalten. [Preussomerine K (3.3 Hz), L (3.2 Hz), und I (3.3 Hz)].^[13, 14]

Tabelle 7: ¹H- und ¹³C-NMR Daten des Preussomerins I (CDCl₃).

Atom. Nr.:	¹³ C-NMR	HMBC	HMQC	¹ H-NMR	H,H-COSY
1	195.64	9-OH	-	-	-
1'	193.39	-	-	-	-
9	156.06	9-OH,7	-	9-OH s 10.12	-
6	149.73	-	-	-	-
6'	142.50	8'	-	-	-
7'	131.15	7'	7''	7' t 7.39	8', 9'
8	130.85	-	7	8 d 6.94	8
7	126.46	-	8	7 d 7.02	7
8'	121.58	9'	8'	8' dd 7.05	7', 9'
10'	120.32	-	-	-	-
9'	120.13	-	9'	9' dd 7.65	7', 8', 9'
5'	119.23	8', 9'	-	-	-
10	115.44	9-OH	-	-	-
5	110.26	-	-	-	-
4'	94.38	2'b	-	-	-
4	93.58	-	-	-	-
3'	79.27	3'OCH ₃	-	3' t 4.33	2'a, 2'b
3'OCH ₃	59.38	3'OCH ₃	3'OCH ₃	3'-H s 3.53	-
2	53.67	-	2	2 d 4.29	3
3	52.17	-	3	3 d 3.84	2
2'	40.41	-	2'a, 2'b	2'a dd 3.35 2'b dd 3.05	2'b, 3' 2'a, 3'

2.2 Biologische Aktivität der Naturstoffe G–L

2.2.1 Mikrobiologische Untersuchungen des Rohextraktes (Braunschweig)

Der Rohextrakt des Pilzstammes 4729 zeigte eine gute Wirkung gegen das gram-positive Bakterium *Basilis megaterium*. Gegen den Pilz *Fusarium repens* und das gram-positive Bakterium *Mycotyphamicrospora* sind der Petroletherextrakt und auch der Essigesterextrakt nicht aktiv. Insbesondere der Essigesterextrakt zeigt eine mäßige fungizide Wirkung gegen die Pilze *Ustilago violacea* und *Eurotium repens*.

In Diagramm 1 sind die Untersuchungen der biologischen Aktivität graphisch dargestellt. Die Petrolether- und Essigesterextrakte verhalten sich unterschiedlich. Mit den Polaritäten der isolierten Naturstoffe können die im Diagramm 1 aufgeführten Ergebnisse erklärt werden, da die Naturstoffe entweder mittelpolar oder polar sind.

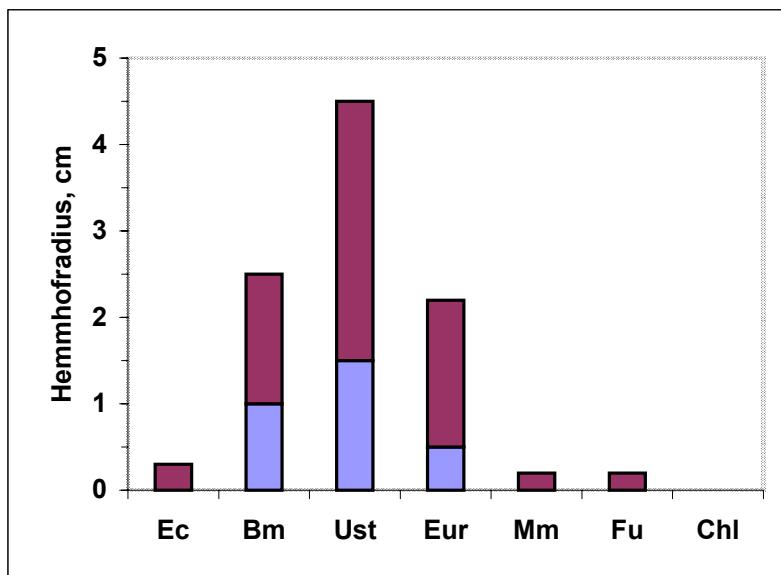


Diagramm 1: Die biologische Aktivität des Rohextraktes vom Stamm 4729.

Ec: *Escherichia coli* – gram-negatives Bakt.

Bm: *Basillus megaterium* - gram-positives Bakt.

Ust: *Ustilago violacea* - Pilz

Eur: *Eurotium repens* - Pilz

Mm: *Mycotypha microspora*-Pilz

Fu: *Fusarium oxysporum*-Pilz

Chl: *Chlorella fusca* - Alge

2.2.2 Biologische Aktivität der Reinsubstanzen

Die von den Biologen aus der Technischen Universität Braunschweig (AK Prof. Dr. Aust, Fr. Dr. Schulz, Fr. Hu) durchgeführten Aktivitätstests für die Substanzen L, K, I, J, H, G sind in Diagramm 2 dargestellt. Die Substanzen wurden in Aceton/Methanol (1:1) 10 mg / 1 ml gelöst und anschließend auf algizide, fungizide und bakterizide Wirkung getestet. Bei angegebenen Konzentrationen zeigen alle Sekundärmetabolite mäßige Aktivität gegen die Pilze *Ustilago violacea* und *Eurotium repens*.

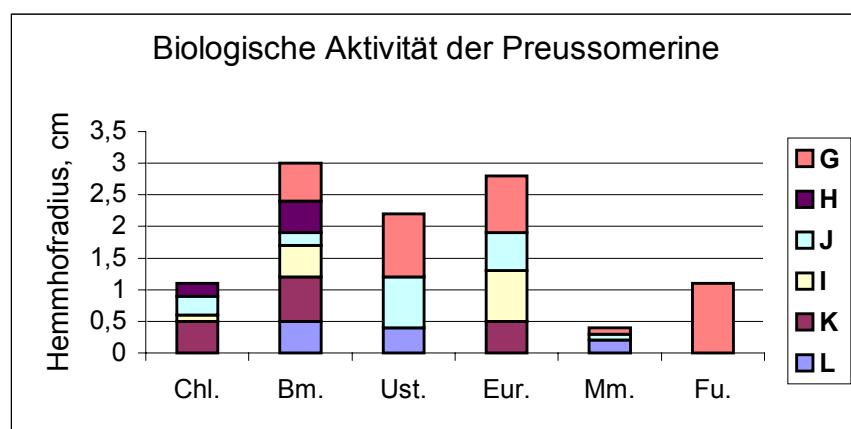


Diagramm 2: Biologische Aktivität der isolierten Preussomerine.

*Abkürzungen sind auf der Seite 38 erläutert

Alle Naturstoffe sind auch gegen das gram-positive Bakterium *Basillius megaterium* wirksam.^[13, 14] Außerdem sind für die Preussomerine J, H und G pharmakologische Tests durchgeführt worden. Sie erweisen sich (besonders Preussomerin G) als wirksame Hemmer der FPTase.^[9] FPTase ist ein dimeres Enzym, das die Umsetzung der Farnesylgruppe zu Cystein katalysiert. Dieser Prozess ist eine

notwendige Bedingung für den Transport und die Assoziation des Ras-Peptides zur Plasmamembran, was die Entstehung von Tumoren fördert. Ganz offensichtlich führt die Hemmung des FPTase zu einem Antitumoreffekt. Der IC₅₀-Wert beträgt für Preussomerin G 1,2 µM, H – 12 µM, J -17 µM.^[9] Die hohe biologische Aktivität basiert vermutlich auf der Michael-Akzeptoreinheit, die von einem Nukleophil angegriffen werden kann.^[9, 15]

2.2.3 Pflanzenschutz-Screening-Tests der BASF

Im Pharma-Grundscreening wurden die Preussomerine K, L, I, J und G bei der Knoll-AG getestet. Aus Substanzmangel konnte Preussomerin H nicht getestet werden. Es konnten in den Pharma-Tests keine verfolgenswerten Wirkungen beobachtet werden. Die Preussomerine G, I, J, K und L zeigen im Mikrotest (Pflanzenschutz) gegen die Pilze *Phytophthora* und *Pyriculria* eine gute Wirkung. Besonders fällt im Mikrotest das Preussomerin G auf. Die in Abbildung 19 aufgeführten Abkürzungen haben folgende Bedeutungen:

Phytin – *Phytophthora infestans* – der Erreger der Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffeln und Tomaten.

Botrci: *Botrytis cinerea* – Grauschimmel an Erdbeeren.

Pyrior: *Pyricularia oryzae* – Reisblast-Erreger.

In Abbildung 19 sind die Aktivitäten abgebildet.

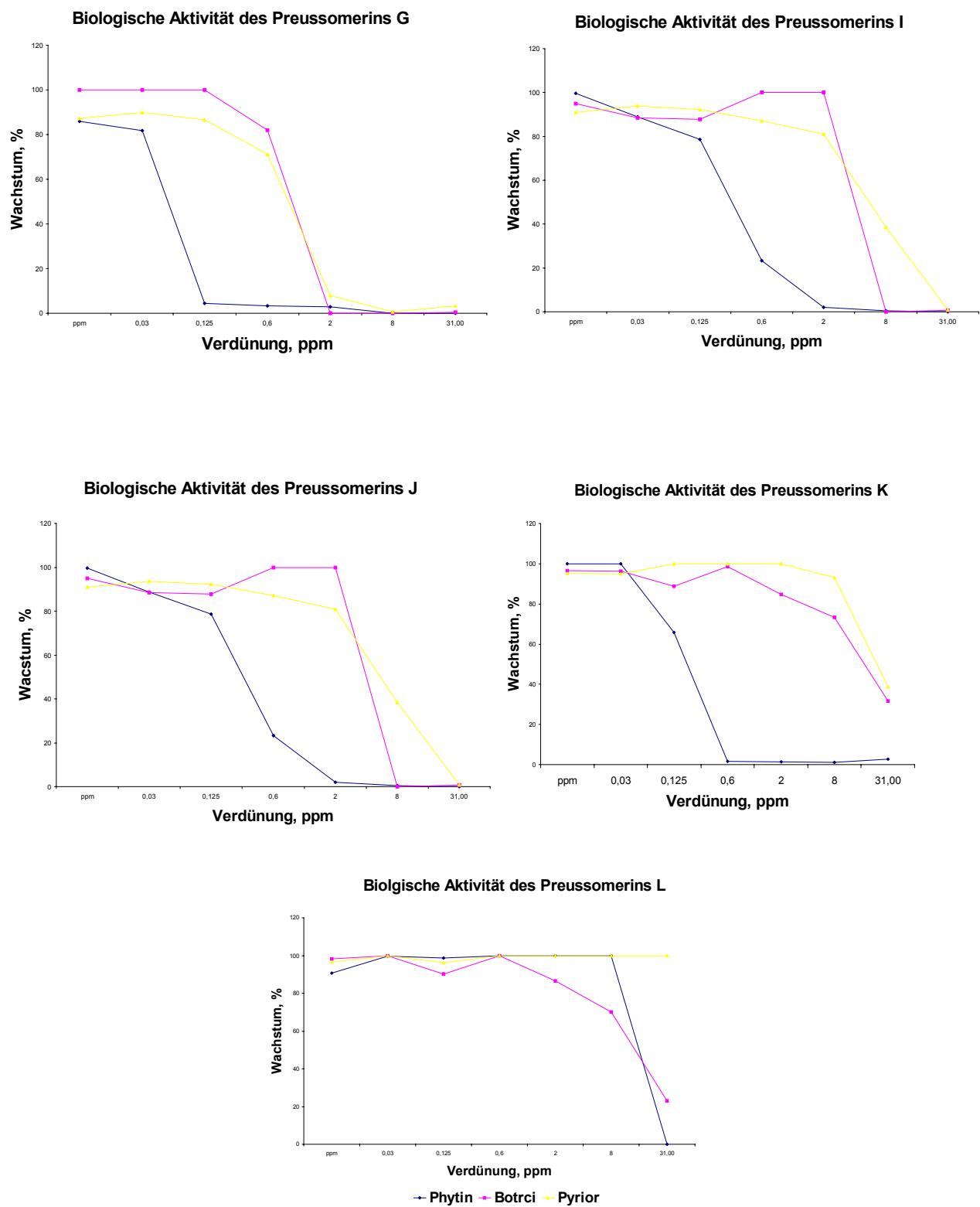


Abbildung 19: Die Ergebnisse der Pflanzenschutz-Screening-Tests der Preussomerine G–L.

2.2.4 Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Die ersten Vertreter der Klasse Preussomerine A-F wurden von Gloer et al. 1990 isoliert und charakterisiert.^[11,°12,°16] Gloer wies auf die antibakteriellen und antifungischen Eigenschaften dieser Naturstoffklasse hin.^[17,°16,°18,°5, 19,°20,°21] Die Arbeitsgruppe von S. Singh berichtete 1993 über die Preussomerine als neue Inhibitoren der FPTase.^[9] Das Preussomerin G wird im Pflanzenschutz (BASF) als wirksames antifungalisches Mittel getestet.^[19, 20, 21]

Die Verbindungen aus der Klasse Preussomerine zeigen in den IR- und UV-Spektren große Ähnlichkeiten. Die Analyse der Spektren zeigt, dass alle sechs Preussomerine G–L mit verschiedenen Intensitäten und mit geringen Abweichungen einen analogen Satz an Banden besitzen. Die Bande um 750 cm^{-1} im IR-Spektrum verweist auf einen trisubstituierten aromatischen Ring, die Bande um 810 cm^{-1} für einen tetrasubstituierten aromatischen Ring, und für die Bande um 1740 cm^{-1} ist eine Carbonylgruppe verantwortlich.

Die UV-Spektren sind durch drei Hauptbanden charakterisiert:

250–260 nm: α -Bande eines Aromaten, schwache Intensität

230–240 nm: β -Bande eines Aromaten, mittlere Intensität

190 nm: γ -Bande, größere Intensität

Singh et al. haben am Beispiel des Naturstoffes Preussomerin G die Hydrierungsreaktionen untersucht. In Abbildung 20 sind die einzelnen Schritte der palladiumkatalysierten Hydrierung im Lösungsmittelgemisch Ethylacetat-Methanol abgebildet.^[9]

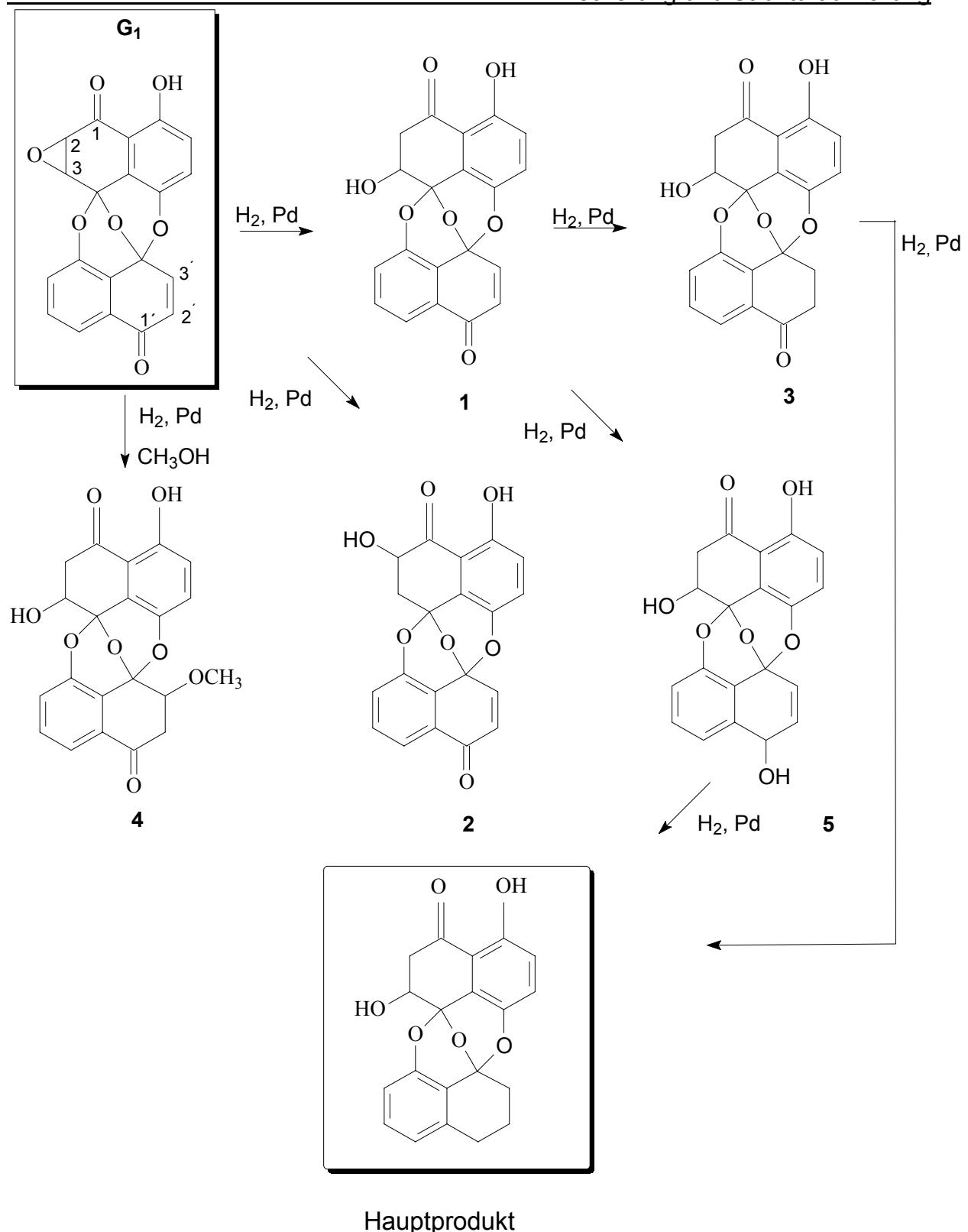


Abbildung 20: Die Hydrierungsreaktionen der Preussomerine nach S. Singh.^[9]

Drei Befunde dieser Reaktion:

- Der Epoxidring wird bei hoher Regioselektivität (Regiosomere 1/2 = 4.0/0.1) in einem protischen Lösungsmittel reduktiv geöffnet.
- Die benzylische Carbonylgruppe an C-1 wird nicht hydriert
- Das Spiroacetalfragment wird ebenfalls nicht hydrogenolytisch gespalten.^[9,°11,°12,°22]

Die Massenspektren einer Rohprobe der Preussomerine liefern die Molekülpeaks bei $m/z = 366, 396, 384, 424$. Die Differenz zu den entsprechenden Molmassen der Preussomerine H (364), J (394), L (382), I (422) besteht aus zwei Protonen. Es könnte sich hier angesichts der Hydrierungsreaktionen der Preussomerine um Reduktionen entweder am Epoxidring, an der Doppelbindung im Cyclohexenonring, oder an der Carbonylgruppe C-1' handeln.

Der gesamte Überblick über die isolierten und vorläufig bestimmten Strukturen ist in Abbildung 21 dargestellt. Die blau gezeichneten Strukturen sind isoliert worden, die schwarz gezeichneten werden aufgrund der Daten der Massenspektren unter Berücksichtigung der Hydrierungsreaktionen hypothetisch eingeführt.

Die Existenz der Struktur mit $m/z = 366$ und $m/z = 396$ (Abb. 21) ist sehr wahrscheinlich, da sie mit den synthetisch hergestellten Verbindungen 3 und 4 (Abb. 20) identisch sind. Die Struktur mit $m/z = 424$ (Abb. 21) ist den Verbindungen 3 und 4 (Abb. 21) analog. Schließlich ist noch die Struktur mit $m/z = 384$ zu erwähnen. Die Hydrierung der Carbonylgruppe an C-1' wurde bei der chemischen Hydrierung im Produkt 5 (Abb. 20) festgestellt.

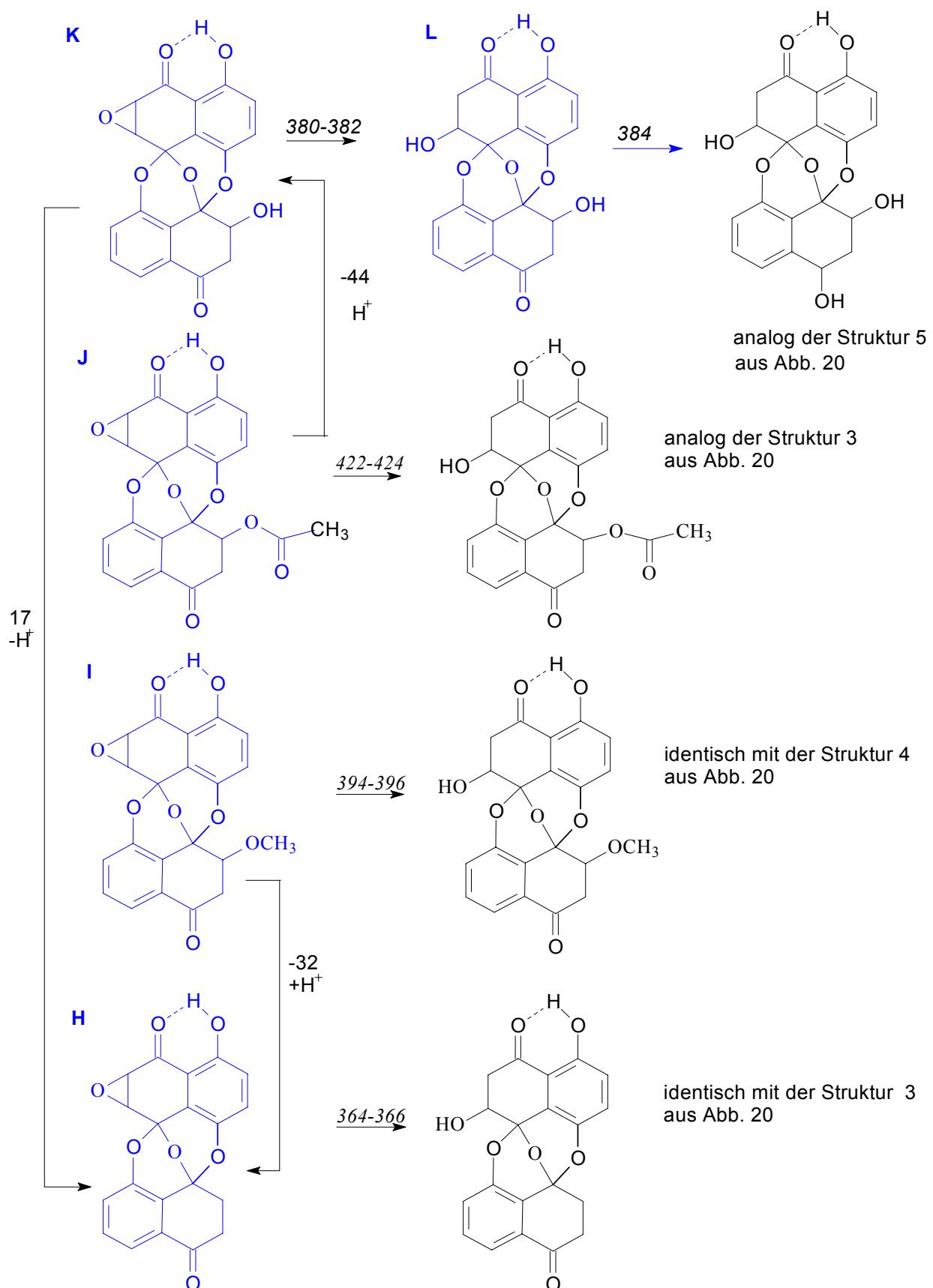


Abbildung 21: Überblick über die isolierten und hypothetisch eingeführte Preussomerine.

Der Vergleich mit Massenspektren analoger Verbindungen legt nahe, dass bei der Fragmentierung eines Preussomerins folgende Prozesse ablaufen:

m/z 191 $C_{10}H_7O_4$

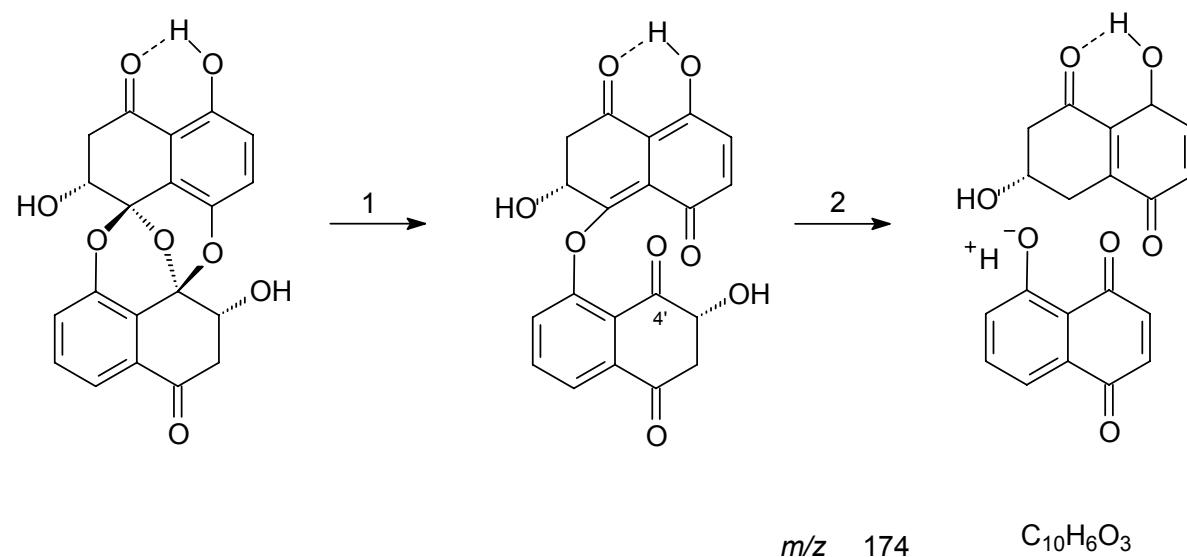


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Fragmentierungsprozesse des Preussomerins.^[6]

Der Massenpeak bei $m/z = 191$ entspricht einem Fragment der Struktur, das vier Sauerstoffatome enthält. Im Schritt 2 wird die zu der Carbonylgruppe C-4' *ortho*-ständige Hydroxygruppe wegen elektronischer Abstoßung abgespalten. Das ergibt einen Massenpeak bei $m/z = 174$. Die Intensität des Peaks bei $m/z = 191/189$ bzw. $m/z = 174$ beträgt etwa 30-50 %. Bei der Fragmentierung aller epoxidhaltigen Preussomerine ist das Molekülion bei $m/z = 188/189$ (entspricht dem Fragment mit der Summenformel $C_{10}H_5O_4$) zu erkennen, was vermutlich auf das Epoxidfragment hindeutet. Die Hauptfragmentierungen der Preussomerine G-L sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

Isolierung und Strukturaufklärung

Tabelle 8: Fragmentierungen im Massenspektrum der Preussomerine nach EI-MS.

MS 382 L	MS 380 K	MS 422 I	MS 364 H	MS 362 G	MS 394 J
191 $C_{10}H_7O_4$	191 $C_{10}H_7O_4$	191 $C_{10}H_7O_4$	189 $C_{10}H_5O_4$	188 $C_{10}H_4O_4$	189 $C_{10}H_5O_4$
192 $C_{10}H_8O_3$	188 $C_{10}H_4O_4$				206 $C_{11}H_{10}O_4$
174 $C_{10}H_6O_3$	174 $C_{10}H_6O_3$	174 $C_{10}H_6O_3$	174(5) $C_{10}H_7O_3$	174 $C_{10}H_6O_3$	-

2.2.5 Bestimmung der absoluten Konfiguration der Preussomerine G–L

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration der aus dem Pilzstamm 4729 isolierten Preussomerine G–L (Abb. 1) wurde anhand der Messung der optischen Aktivität, der Röntgenstrukturanalyse (RSA, Dr. U. Flörke), der NMR-Spektroskopie (Dr. W. Wray), der Konformationsberechnungen (Herr K. Steingrüber, AK Prof. Dr. K. Krohn) und der CD-Spektren (Prof. Dr. F. Zsilie, Budapest) durchgeführt.

Die Preussomerine G–L sind chirale Moleküle mit einem überbrückten Bispiroacetatfragment. Sie haben an den Positionen 4/4' ein asymmetrisch substituiertes Zentrum. Je nach Substitutionen an den Hexenonringen kommen neue Stereozentren an den Positionen 2/2' und auch an den Positionen 3/3' hinzu. Abbildung 23 zeigt die Stereozentren eines Preussomerins.

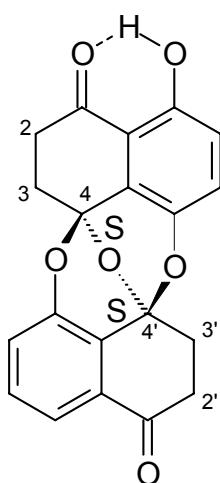


Abbildung 23: Die Stereozentren eines Preussomerins.

Die relative Konfiguration eines Preussomerins an den stereogenen Zentren ($4S^*, 4'S^*$) kann aus den Daten der Röntgenstrukturanalyse (Preussomerin G und L) entnommen werden.^[18] Beide Decalineinheiten stehen fast senkrecht zueinander. Die Spiroacetalringe weisen C-O-C-Bindungswinkel auf von 109.7° bis 121.0° (O-C-C) (Röntgenstrukturanalyse des Preussomerins L). Die Kombination der aromatischen Ringe und des Bispiroacetalsystems dürften für eine relativ große Energiebarriere zwischen verschiedenen Konformationen der Hexenonringe verantwortlich sein.^[16, 23]

Die NMR-Daten der Protonen H-2a/2a', H-2b/2b', H-3/3' (ohne Epoxidring siehe Abb. 1 Seite 12) der Preussomerine I, J, K und L könnten aufgrund der Ähnlichkeit der Kopplungskonstanten ($^3J_{2a/2'a-3/3'} = 3.2$ Hz, $^3J_{2b/2'b-3/3'} = 2.7$ Hz) und der Werte der chemischen Verschiebungen (siehe NMR-Daten der Naturstoffe) für die gleiche Konformation des Hexenonringes dieser Naturstoffe sprechen (siehe Röntgenstruktur in Abbildung 8 S. 20). Der Torsionswinkel zwischen den Protonen 2-H und 3-H ergibt sich aus der Karplus-Kurve und beträgt ca. 70-80°. Bei der anderen Halb-Sessel-Konformation betrüge der Torsionswinkel um 180°.

Gloer et al. haben am Beispiel des Preussomerins A die absolute Konfiguration der Preussomerine untersucht^[21, 24]; deswegen haben sie das Ketal hydrolytisch gespalten. Sie haben festgestellt, dass das Ketal bei Raumtemperatur recht säurestabil ist. Erst bei 100°C in 6 M HCl - Aceton (1:1, 12 h) konnte (–)-Regiolon außer anderen Nebenprodukten als Hauptprodukt isoliert werden. Die absolute Konfiguration des gewonnenen Regiolons (4S) wurde aufgrund der chemischen Korrelation mit dem isolierten (–)-Regiolon festgelegt.^[24]

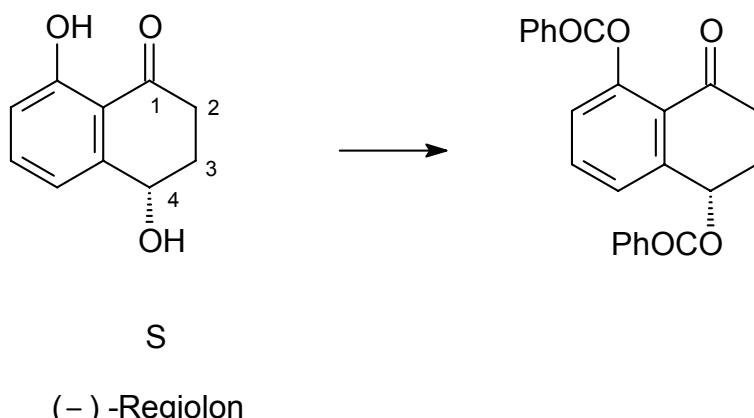


Abbildung 24: Die absolute Konfiguration (S) des (–)-Regiolons.^[24]

Zum ersten Mal wurde die absolute Konfiguration des (–)-Regiolons von S. K. Talapatra et al. festgelegt.^[24] Sie haben das Abbauprodukt der Preussomerine (–)-Regiolon aus der Pflanze *Juglans regia L* (aus Indien und Nepal) isoliert und anhand der „aromatic chirality method“ die absolute Konfiguration bestimmt. Zu den Zweck wurde das Regiolon in sein Dibenzoat-Derivat übergeführt und die Linkshändigkeit des Moleküls postuliert (Abb 25). Für das natürlich vorkommende Regiolon sind die

gemessenen Daten: der Drehwert $[\alpha]_D = -3.3^\circ$, $c = 0.077$, EtOH; die CD-Spektren: negativer Cotton-Effekt bei 228 nm, $\Delta\epsilon = -44.33$.^[24] Damit wurde die absolute Konfiguration des Preussomerins A auf (1S, 4S, 4'S) festgelegt. Die für Regiolon und die Preussomerine A, E, G, H sowie für Deoxypreussomerin A aufgenommenen CD-Spektren zeigen negative Cotton-Effekte.^[9, 12, 24] Die Oxidation des Preussomerins A (an den Positionen 1/1' jeweils eine Hydroxygruppe) mit PCC liefert das mit dem Preussomerin G (Abb. 1) identische Diketon.^[6]

Die von den Preussomerinen G–L im Bereich von 200–380 nm aufgenommenen CD-Spektren sind um 217 nm durch einen negativen Cotton-Effekt gekennzeichnet. Die experimentellen Daten aus den CD-Spektren der diskutierten Preussomerine sind in Tabelle 9 aufgelistet. Das Vorzeichen des Cotton-Effektes ist von der Konfiguration einer Verbindung und von der Konformation der Verbindung in der Nähe des Chromophors abhängig. Zeigen zwei (mehrere) konstitutionell vergleichbare Verbindungen einen Cotton-Effekt gleichen Vorzeichens, so ist ihre Konfiguration dann gleich, wenn die Konformation in der Umgebung des Chromophors gleich ist.^[25] Diese Bedingung ist bei den Preussomerinen erfüllt.

Nach der Klassifikation von Moffitt und Moscowitz können chirale Moleküle „solchen Gruppen, die einen inhärent chiralen Chromophor (z.B. C-4/4') enthalten“ zugeordnet werden.^[25, 17] Diese Gruppe hat eine erheblich größere Rotationsstärke (proportional der Amplitude im Cotton-Effekt) als Moleküle mit achiralem Chromophor (C-1/1').^[25, 17]

Bei Wechselwirkung zweier Aromaten (Chromophor) durch chirale O-C-O-Funktionen (Chromophor) kann es im Falle geeigneter Geometrie der beiden (beide Decalineinheiten stehen quasi senkrecht zueinander) zu besonders großen Werten von $\Delta\epsilon$ ($\Delta\epsilon = -54.81$, Preussomerin L) für die $n-\pi^*/\pi-\pi^*$ -Übergänge kommen. Grund dafür ist die chirale Überlappung der p-Orbitale der π -Bindungen eines Aromaten mit dem chiralen p-Orbital des Chromophors (O-C-O). Dadurch wird das elektrische Übergangsmoment μ deutlich vergrößert. Das elektrische (μ) und das magnetische (m) Übergangsmoment sind ein Maß für die Rotationsstärke $R = m\mu\cos(m\mu)$. Die erwähnte Regel ist als Helizitätsregel bekannt.^[24]

Für die Berechnung der CD-Spektren des Preussomerins L wurden die zwei Enantiomeren (RSSR) und (SRRS) herangezogen, die nach RSA noch möglich sind.

In Abbildung 25 sind die theoretisch berechneten CD-Kurven der Enantiomeren des Preussomerins L der tatsächlich gemessenen CD-Kurve gegenübergestellt.

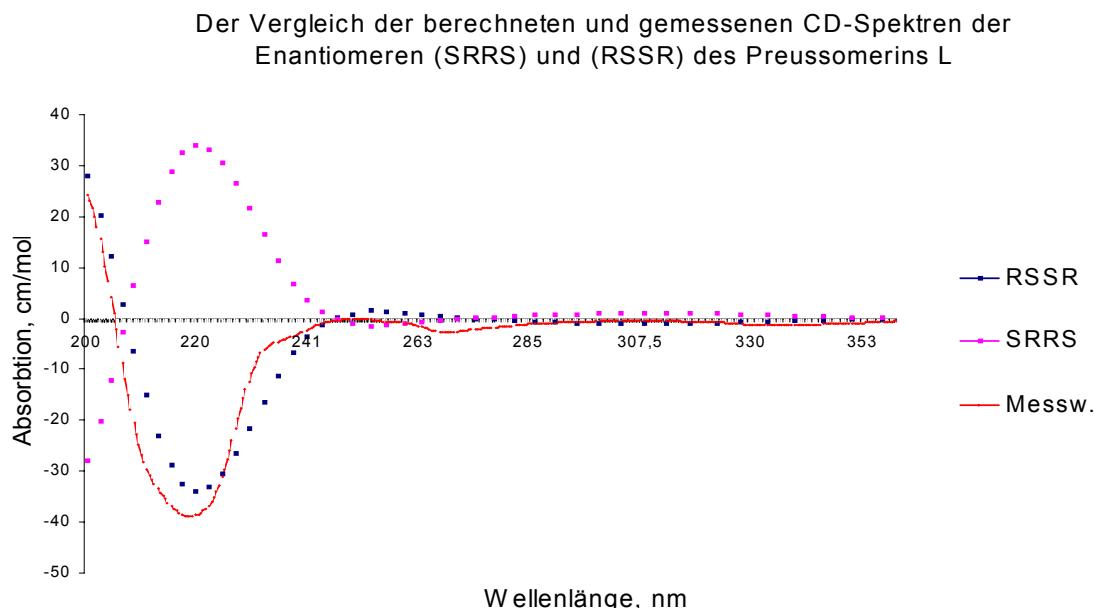


Abbildung 25: Die CD-Spektren der Enantiomeren des Preussomerins L.

Aus dem Vergleich der gemessenen und berechneten CD-Kurven des Preussomerins L wird auf die Konfiguration (RSSR) geschlossen.

Das gleiche Verfahren wurde auf die Preussomerine G, H, I, J und K (Abb. 1) angewandt. Die Preussomerine G–K enthalten im „oberen“ Teil des Moleküls einen Epoxidring. Der Epoxidring bedingt an den Positionen 2 und 3 zwei Stereozentren und führt zu zwei Enantiomeren ($2S,3R$) und ($2R,3S$). In kleinem Dreiring sind aus Gründen auftretender extremer Ringspannungen nur relative Konfigurationen ($2S,3R$) oder ($2R,3S$) möglich. Aus Röntgenstrukturanalysen (RSA) der Preussomerine L, G, und H kann zusätzlich die Stellung des Epoxidringes „hinter“ dem Hexenonring ermittelt werden.

Eine interessante Arbeit von Singh et al. (Merck Laboratories) trägt für die Klärung der absoluten Konfiguration wichtige Information bei. Die Autoren haben die **Preussomerine D, G–I**, die **Palmarumycine C₂** (Desoxypreussomerin A) und CP₂ (Desoxypreussomerin B) aus einem Pilzstamm isoliert.^[9] Dementsprechend wurde

ein biosynthetischer Zusammenhang zwischen den Preussomerinen (Spirobisnaphthalingerüst mit 3 Sauerstoffbrücken) und den Palmarumycinen (Spirobisnaphthalingerüst mit 2 Sauerstoffbrücken) angenommen. Die Desoxypreussomerine A und B zeigen genauso wie die Preussomerine G–L einen negativen Cotton-Effekt.^[6] Die Untersuchung der absoluten Konfiguration des Desoxypreussomerins A (Palmarumycin C₂) gelang der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Krohn (Dr. K. Beckmann).^[22, 26]

Sie hat die absolute Konfiguration am Epoxidring durch den Vergleich der berechneten CD-Spektren der Enantiomeren (2S,3R) und (2R,3S) mit dem gemessenen Spektrum als **2S,3R** ermittelt. Die gemessene CD-Kurve zeigt um 195 nm einen negativen Cotton-Effekt. Interessant ist der negative Cotton-Effekt um 220 nm, was mit unseren Daten gut übereinstimmt. Aufgrund der guten Übereinstimmung der literaturbekannten Daten und der von uns gemessenen und berechneten CD-Spektren, der Daten der RSA sowie des wahrscheinlichen biosynthetischen Zusammenhangs zwischen den Preussomerinen (G–K) und dem Palmarumycin C₂ kann die Stereochemie am Epoxidring für die Preussomerine G–H als **2S,3R** angenommen werden. Die absolute Konfiguration des Preussomerins L kann mit **3R, 4S, 3'R, 4'S** als festgelegt gelten.

Die in Tabelle 9 aufgelisteten Werte der CD-Kurve ($\Delta\epsilon$ in Abhängigkeit von der Wellenlänge) belegen die gleiche absolute Konfiguration der Naturstoffe G–L.

Die sechs isolierten Preussomerine G–L zeigen in Dichlormethan bei angegebener Konzentration (g/100 ml) genauso wie das Regiolon negative Drehwerte (L $[\alpha]_D = -557^\circ$ c 0.11, K $[\alpha]_D = -150$ c 0.04, I $[\alpha]_D = -218^\circ$ c 0.08, J $[\alpha]_D = -37^\circ$ c 0.006, G $[\alpha]_D = -173^\circ$ c 0.03, H $[\alpha]_D = -233^\circ$ c 0.04).^[11]

Isolierung und Strukturaufklärung

Tabelle 9: Die gemessenen CD-Spektren der Preussomerinen G-L.

Preussomerin G		Preussomerin H		Preussomerin I	
λ (nm)	$\Delta\epsilon$ ($M^{-1}cm^2$)	λ (nm)	$\Delta\epsilon$ ($M^{-1}cm^2$)	λ (nm)	$\Delta\epsilon$ ($M^{-1}cm^2$)
368,5	-2,75	331	-3,44	331,5	-5,62
317,5	-4,62	276	-2,87	276,5	-4,92
264s	-4,79	261,5	0,43	262	0,11
244	-23,38	236s	-7,7	237.5s	-10,22
217	-50,15	217,5	-37,95	218	-71,63

Preussomerin J		Preussomerin K		Preussomerin L	
λ (nm)	$\Delta\epsilon$ ($M^{-1}cm^2$)	λ (nm)	$\Delta\epsilon$ ($M^{-1}cm^2$)	λ (nm)	$\Delta\epsilon$ ($M^{-1}cm^2$)
331	-3,94	331	-3,35	334	-1,37
274,5	-2,72	275,5	-3,19	268,5	-2,73
236.5s	-12,67	240s	-6,53	236.5s	-4,31
217,5	-54,81	217,5	-51,16	219	-38,82

2.3 Beschreibung, Isolierung und Strukturaufklärung der Naturstoffe aus dem Pilzstamm 5049

2.3.1 Beschreibung des Pilzextraktes

Die Pilzkultur wurde in der Technischen Universität (Braunschweig) auf zwei verschiedenen Medien (insgesamt 6.000 ml Biomalz- und Malz-Soja-Flüssigkultur) angesetzt. Sie wurde bei Raumtemperatur 70 Tage lang kultiviert, anschließend wurden die Kulturen im Waringblender homogenisiert und das Homogenat einmal mit Petrolether und dann dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, der Rückstand bis auf 250 ml eingeengt und mit 5 ml eines Aceton/Methanol-Gemisches (1:1) aufgenommen. Danach wurde er auf biologische Aktivität (Plättchen-, Lemma-, Kresse-Tests) sowie chromatographisch (DC) getestet. Die DC-Analytik zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der vom Nährmedium abhängigen Einzelextrakte.

Die Rohextrakte dieses Pilzstammes (Essigsäureextrakt **E** und Petroletherextrakt **P**) zeigen die in den verschiedenen Plättchentests im Diagramm 3 dargestellten Aktivitäten. Die Zahlenwerte geben den Durchmesser der jeweiligen Hemmhöfe in cm an. Unter den Abkürzungen **Bio** und **MS** sind folgende Begriffe zu verstehen: **Bio**: Biomalzweichagar-Nährmedium, **MS**: Mais-Sojaextraktweichagar-Nährmedium.

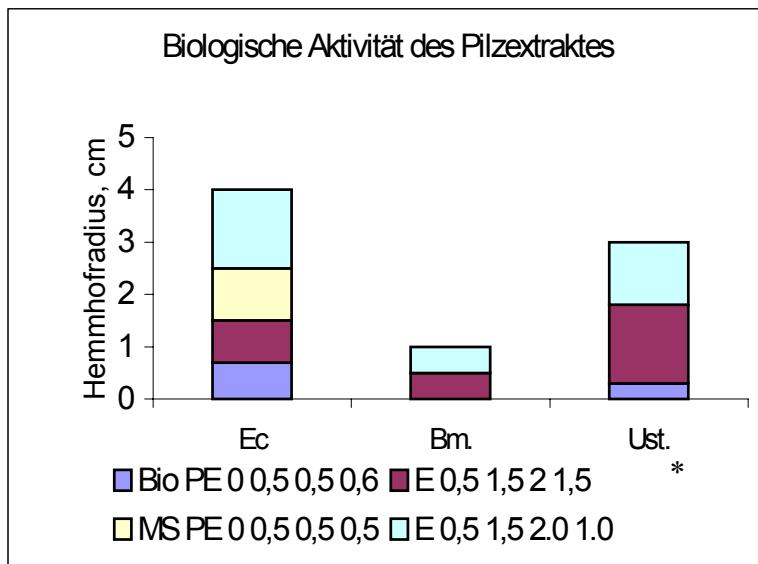


Diagramm 3: Der Plättchentest des Pilzextraktes 5049.

*- die Abkürzungen der biologischen Tests sind im Teil "Biologische Aktivität" erläutert.

Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass der Pilzextrakt eine mäßige Wirkung gegen den Pilz *Ustilago violacea* sowie auch gegen das gram-positive Bakterium *Bacillus megaterium* zeigt. Die Petrolether- und Essigesterextrakte beider Nährmedien lassen unterschiedliche biologische Aktivitäten erkennen. Die aus diesem Pilzstamm isolierten Sekundärmetabolite sind entweder mittelpolar (Naturstoff „P“, Cytochalasin L, X) oder polar (3-Nitropropionsäure). Die höhere biologische Aktivität der Essigsäureextrakte kann durch die Polarität der isolierten Stoffe erklärt werden. Für den Lemnatest (zeigt die Wachstumshemmung der Testpflanzen) wurden 6.75 ml steriles Wasser und 0.25 ml der Probe (10 mg Substanz in 1 ml des Gemisches Aceton/Methanol 1/1) in eine Petrischale pipettiert und mit einem Filterpapier bedeckt. In jede Glasp Petrischale wurden 4 Lemna-Pflanzen gelegt. Nach einem und sieben Tagen erfolgte über die Beurteilung des Wachstums der Pflanzen und des allgemeinen Zustandes der Blätter im Vergleich zu einem parallel angesetzten Referenztests die Auswertung des Tests. Die Rohextrakte dieses Pilzstammes (Petroletherextrakt **P** und Essigesterextrakt **E**) zeigten folgende Aktivitäten:

Tabelle 10: Wirkung des Pilzextraktes 5049 im Lemnatest.

Versuchsmedien Kontrolle	Blätterzahl	1 Tag Zahl der Blätter	6-7 Tage Zahl der Blätter
1.1 Aceton/MeOH Versuchsmedium	8	8 grün	30 grün
Probe Bio P	7	7 grün	21 grün
E	8	4 weiß 4 aufgelöst	6 weiß
Probe MS P	7	7 grün	16 grün
E	8	4 weiß 4 aufgelöst	5 weiß

Versuchsmedium – 2.50 ml steriles Wasser

Der Lemna-Test zeigte bereits nach einem Tag einen völligen Stillstand des Pflanzenwachstums der Ethylacetatextrakte sowohl der Biomalzweichagar- als auch der Mais-Sojaweichagar-Kulturen. Nach 6-7 Tage waren sämtliche Blätter der Testorganismen weiß gefärbt, so dass von einer 100 %-igen Wachstumshemmung gesprochen werden kann.

In der Tabelle 11 sind die Ergebnisse des Kressetests dargestellt. Sie demonstrieren die Fähigkeit der Petroletherextrakte beider Nährmedien, das Wachstum der Kressesamen zu hemmen.

Tabelle 11: Wirkung des Pilzextraktes 5049 im Kressetest. Als Testorganismus diente *Lepidium sativum* (Kresse).

Versuchsdauer	1 Tag	6-7 Tage
Kontrolle 1	15 von 15 Samen zeigen Wachstum	4 Samen gehemmt
Kontrolle 2	14 von 15 Samen zeigen Wachstum	4 Samen gehemmt
Probe Bio PE	3 von 15 Samen zeigen Wachstum	15 Samen gehemmt
E	0 von 15 Samen zeigen Wachstum	0 Samen gehemmt
MS PE	5 von 15 Samen zeigen Wachstum	13 Samen gehemmt
E	8 von 15 Samen zeigen Wachstum	0 Samen gehemmt

Zur Kontrolle wurden 2 Lösungen getestet :

Kontrolle 1 - 0.25 ml (1:1 Aceton / Methanol) + 2.25 ml steriles Wasser

Kontrolle 2 - 2.25 ml steriles Wasser

Die Proben (jeweils 0.25 ml des Extraktes, entspricht 10 mg des Extraktes) wurden in 2.25 ml sterilem Wasser aufgelöst und in Petrischale pipettiert. Darauf wurden 15 Kressesamen in die Schalen gegeben und mit Filterpapier bedeckt. Die Auswertung der Tests erfolgte nach dem ersten und dem sechsten Tag durch Beurteilung des Wachstums der Pflanzen und des allgemeinen Zustandes der Blätter im Vergleich zu einem parallel angesetzten Referenztest. Die Extrakte aus Petrolether zeigten im Vergleich zu denen aus Ethylacetat stark herbizide Eigenschaften. Die Ergebnisse des Plättchentests deuten aber auch auf eine herbizide Wirksamkeit des Ethylacetatextraktes hin.

Aufgrund der Ähnlichkeit der biologischen Wirkungen wurden sämtliche Teilextrakte (**P+E** der Bio- und MS-Nährmedien) zu einem Rohextrakt (von ca. 3.0 g) als Lösung (Dichlormethan/Methanol 98/2) vereinigt, über einem Glasfilter filtriert und, wie bei der Isolierung der Preussomerine beschrieben (Schema 1), fraktioniert. Bei der säulenchromatographischen Aufarbeitung trat das Problem auf, dass die Probe empfindlich auf die Verwendung von 4-5%-igem Methanol reagierte. Aus diesem Grund wurden Petrolether- und Ethylacetatextrakte des Biomalz-Mediums (ca. 2.5 g) zusammen mit 5-6 ml Petrolether, 10 ml Hexan und 1 ml Chloroform 1 Stunde lang gerührt und anschließend abdekantiert. Der Rohextrakt löste sich im angegebenen Lösungsmittel nicht vollständig und bildete zwei Phasen (dunkelbraunes Öl und hell-gelbe Flüssigkeit). Die Flüssigkeit wurde abdekantiert und über Nacht stehen gelassen. Es fielen Kristalle aus, die mit Diethylether gewaschen wurden. Sie entsprechen einem literaturunbekannten **Naturstoff-P**.

Der *dunkelbraune* ölige Rückstand 1 (ca. 2.3 g) der ersten Fraktion wurde ebenfalls mit 6-8 ml Chloroform 2 Stunden lang gerührt und dekantiert. Die Feintrennung des Rückstandes 1 lieferte zwei Sekundärmetaboliten: das literaturbekannte **Cytochalasin L** (10.0 mg) und das literaturunbekannte **Cytochalasin X** (2.0 mg).^[27]

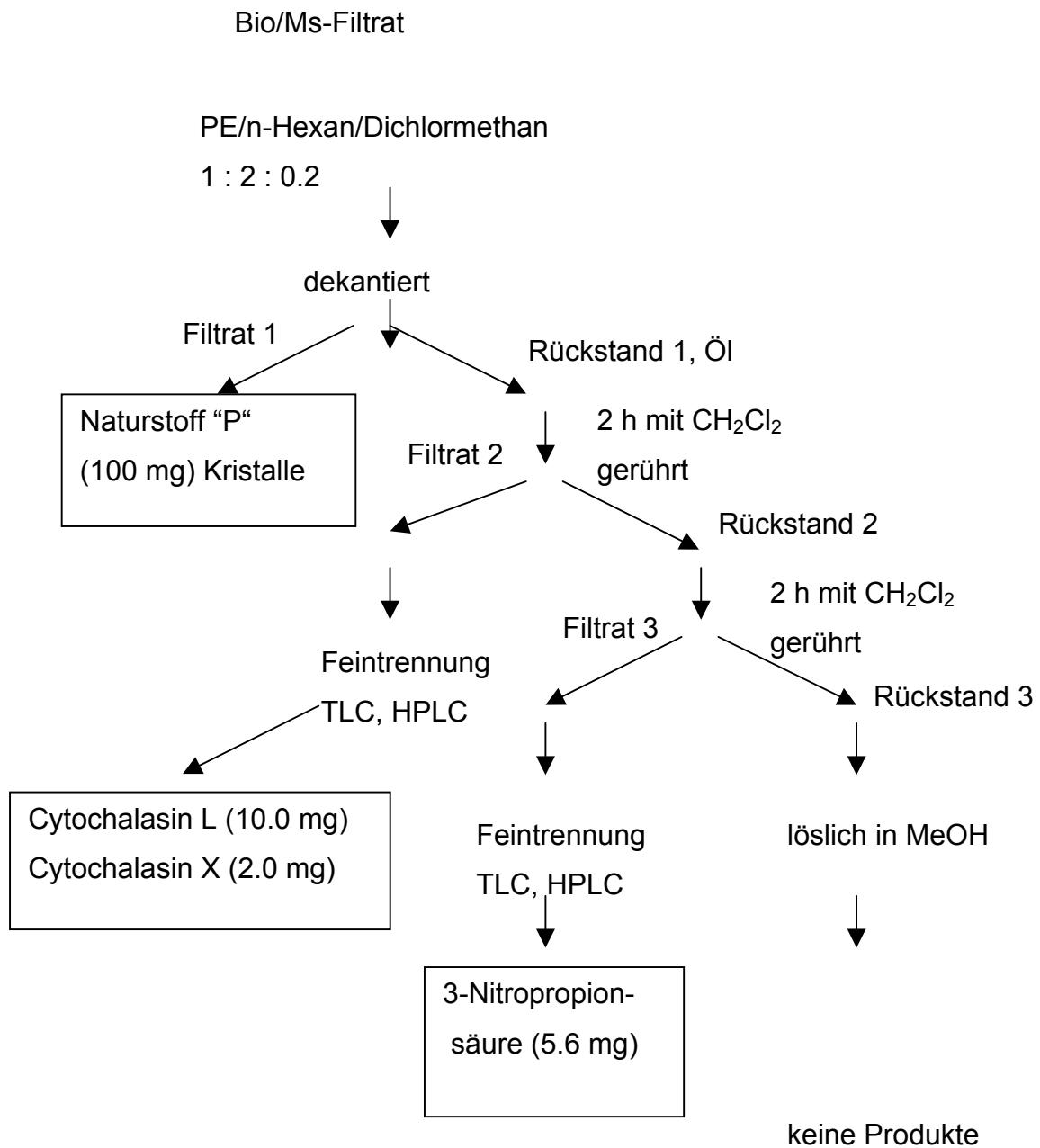
Isolierung und Strukturaufklärung

Der *schwarze ölige Rückstand 2* (ca. 1.7 g) der zweiten Fraktion wurde mit 8-10 ml Dichlormethan 2 Stunden gerührt und abgesaugt. Die Feintrennung des Rückstandes 2 lieferte 5.6 mg der **3-Nitropropionsäure**.

Der *in Methanol gut lösliche* schwarze ölige Rückstand 3 (ca. 1.0 g) der dritten Fraktion enthielt keine niedermolekularen Produkte.

Auf diese einfache Weise wurde der Pilzextrakt vorfraktioniert. Für die Feintrennung wurden präparative chromatographische Verfahren (Dickschichtplatten 0.25 – 2.0 mm Kieselgel Si 60, PR 18; präparative Säule Kieselgel 60, SPE) und HPLC (Kieselgel 60, RP-18) angewandt.^[29]

2.3.2 Isolierung der Naturstoffe aus dem Pilzextrakt 5049



Schema 7: Isolierung der Naturstoffe aus dem Pilzextrakt 5049.

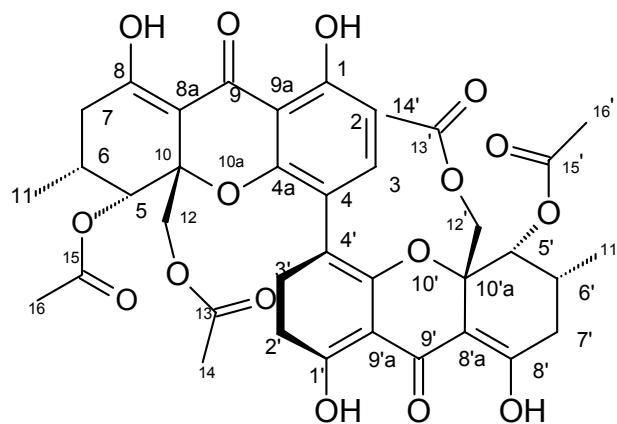
Im Schema 7 ist das Vorgehen zur Isolierung der vier Naturstoffe aus dem Pilzextrakt 5049 dargestellt. Zwei davon (3-Nitropropionsäure und Cytochalasin L) sind literaturbekannt, die anderen (Cytochalasin X und „P“) sind literaturunbekannt.

2.3.2.1 Isolierung und Strukturaufklärung des Naturstoffes „P“

$\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{O}_{16}$

Mr.: 750.21

$$R+DB=20$$



R+DB – Zahl der Doppelbindungen und Ringe im Molekül, ermittelt aus den Daten des Massenspektrums.

Abbildung 26: Die Struktur des Sekundärmetaboliten.

2.3.2.1.1 Die allgemeinen Daten des Sekundärmetaboliten

Der literaturunbekannte Naturstoff **P** wurde in Form gelber Kristalle in einer Menge von 100 mg direkt durch Kristallisieren aus dem Rohextrakt gewonnen. Der R_f -Wert der Substanz in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98/2 beträgt 0.32. Die Substanz hat auf dem DC (Kieselgel 60) eine charakteristische, schwach gelbe Farbe und konnte im UV-Licht bei 254 nm sowie mit dem Sprühreagenz "Cer (IV)-ammoniummolybdat" detektiert werden.^[30] Das IR-Spektrum der Substanz deutet auf die Anwesenheit von zwei verschiedenen Carbonylgruppen, auf ein aliphatisches Fragment sowie auf einen aromatischen Teil im Molekül hin.

Die Probe wurde durch 1D- (^1H -NMR, ^{13}C -NMR) und 2D-NMR-Spektren (H,H-COSY, HMBC, HMQC, 600 MHz, CDCl_3), IR-, UV- und Massenspektroskopie (EI) charakterisiert. Die hochauflösende Messung des Molekülpeaks ließ mit m/z = 750.21463 (Intensität des Peaks: 55%) mehrere Summenformeln als möglich

erscheinen, von denen angesichts der NMR-Spektren die Formel $C_{38}H_{38}O_{16}$ die sinnvollste war. Die hochauflösende Messung des Basispeaks bei $m/z = 677.19290$ (Intensität des Peaks ist 100%) ergibt die Summenformel $C_{35}H_{33}O_{14}$. Die Differenz zwischen den beiden Molekülionen spricht für die Abspaltung einer Methylen-Acetoxygruppe ($CH_3CO_2CH_2$). In Anbetracht von $m/z = 677$ fallen drei Abspaltungen der Masse $m/z = 60$ (möglicherweise Essigsäure) auf. Zum MS-Spektrum dieses Naturstoffes ist noch zu bemerken, dass bei $m/z = 242$ und $m/z = 302$ doppelt geladene Ionen auftreten, was auf ein sehr stabiles (und großes) konjugiertes bzw. aromatisches System hindeutet. Das Signal bei $m/z = 377$ (entspricht etwa 20% der Intensität des Molekülions) könnte dafür sprechen, dass die Hälfte des Moleküls zwei zusätzliche Protonen $[M+2H]^+$ aufweist.

Im Massenspektrum taucht ein Peak bei $m/z = 121$ auf, das vermutlich aus einem Hydroxyphenylcarbonylderivat-Fragment stammt.

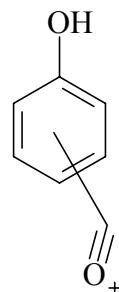


Abbildung 27: Hydroxyphenylcarbonylfragment $m/z = 121$.

2.3.2.1.2 Die NMR-Daten des Naturstoffes

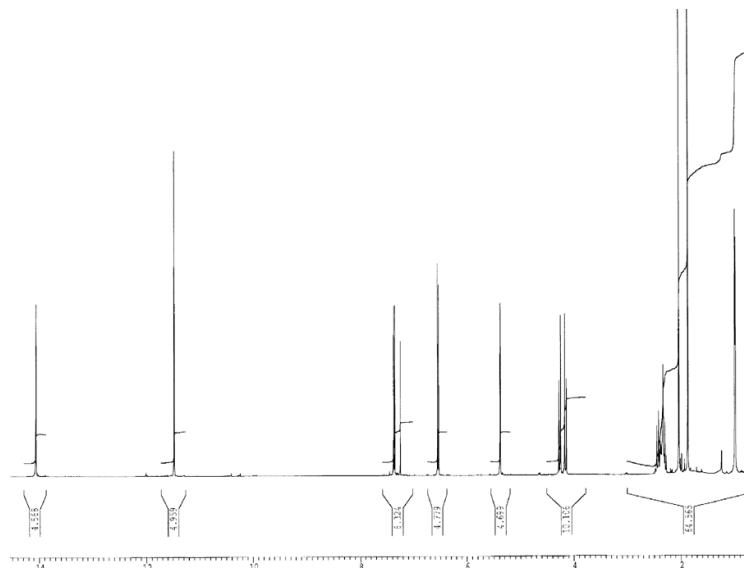


Abbildung 28: Das ^1H -NMR-Spektrum des Sekundärmethaboliten.

Die NMR-Daten (^1H -, ^{13}C -NMR) ergeben zahlmäßig genau die Hälfte der Zahlen der C- und H-Atome der hochaufgelösten Masse. Folglich besteht das Molekül aus zwei identischen Hälften mit einer C_2 -Symmetriearchse.^[31, 32, 33, 34, 35] Es wird im Weiteren in Bezug auf die NMR-Daten nur über eine Hälfte des Moleküls gesprochen. Die Integration der Signale im ^1H -NMR-Spektrum deutet auf genau 19 Protonen. Im aromatischen Bereich des ^1H -NMR-Spektrums erkennt man zwei Signale für zwei miteinander koppelnde Protonen. Die Kopplungskonstante von $^3J = 9.0$ Hz deutet auf eine *ortho*-Stellung der Protonen hin. Daraus ist abzuleiten, dass das Molekül ein *tetra*-substituiertes aromatisches System besitzt.

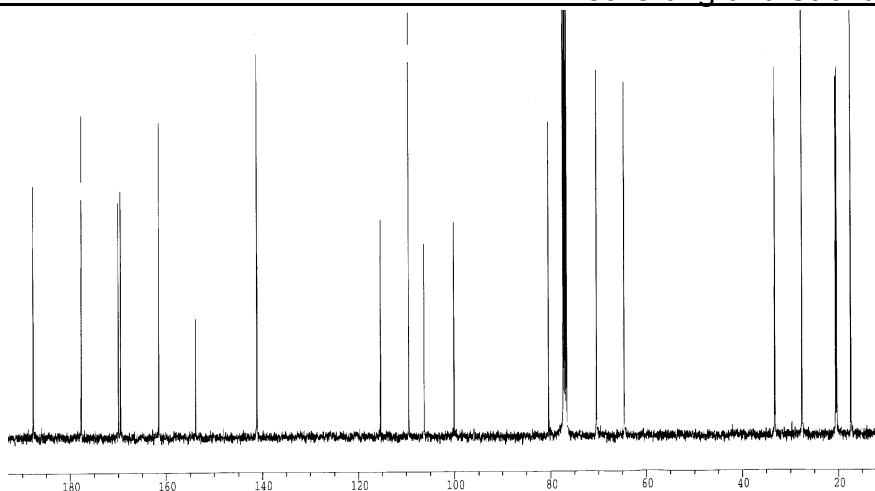


Abbildung 29: Das ^{13}C -NMR-Spektrum der Substanz.

Nach der Analyse des ^{13}C -NMR-Spektrums liegen 19 C-Atome vor. Davon liegen vier C-Atome im Bereich von 188.16 ppm bis 169.99 ppm und können als C-Atome einer Carbonylfunktion bzw. als deren Enolform betrachtet werden. Dem aromatischen Bereich sind sechs C-Atome zuzuordnen; zwei davon sind sekundär (C_3 -141.56 und C_2 -109.91 ppm); die restlichen vier sind quartär. Das C-Atom-1 bei 161.93 ppm ist ein phenolisches Kohlenstoffatom. Die chemische Verschiebung des zweiten quartären C-Atoms-4a (154.25 ppm) deutet ebenso auf Bindung an ein Sauerstoffatom hin. Das dritte C-Atom-9_a (115.78 ppm) koppelt im long-range-Spektrum mit beiden aromatischen Protonen H-2 und H-3. Das vierte aromatische Kohlenstoffatom ist das quartäre C-Atom-4 (106.67 ppm), weil es mit dem aromatischen Proton H-2 koppelt.

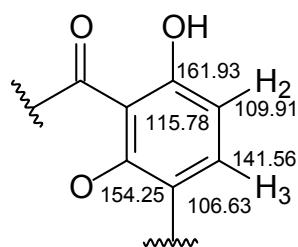


Abbildung 30: Der aromatische Teil des Moleküls.

Das Kohlenstoffatom C-8_a (100.53 ppm) kann entweder als Acetalfragment oder als Enolform vorliegen. Alle drei C-Atome [C-10a bei 80.78 ppm (quartär), C-5 bei 70.77

Isolierung und Strukturaufklärung

ppm (tertiär) und C-12 bei 64.99 ppm (sekundär)] haben ein Sauerstoffatom als Nachbarn. Die NMR-Daten des Naturstoffs sind in der Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Die NMR-Daten des Naturstoffs P (CDCl_3).

Atom. Nr.:	^{13}C -NMR	HMBC	HMBC	^1H -NMR	H,H-COSY
9	188.16 s	-	-	-	-
8	178.08 s	-	8-OH	8-OH s 14.07	-
13	170.47 s	-	12a, 12b, 14	-	-
15	169.99 s	-	5, 16	-	-
1	161.93 s	-	1-OH, 2, 3	-	-
4a	154.25 s	-	2	-	-
3	141.57 d	3	-	d 7.43	2
9a	115.78 s	-	2, 3	-	-
2	109.92 d	2	1-OH	d 6.56	3
4	106.67 s	-	1-OH, 2	-	-
8a	100.53 s	-	8-OH, 5, 12a, 12b, 7a, 7b	-	-
10a	80.78 s	-	5, 12a,	-	-
5	70.77 d	5	6, 11, 12a, 12b	s 5.41	-
12	64.99 t	12a, 12b	-	d 4.27 d 4.16	12b 12a
7	32.80 t	7a, 7b	8-OH, 5, 6, 7a, 7b, 11	m 2.37	-
6	27.98 d	6	5, 7a, 7b, 11	m 2.3	11
16	21.07 q	16	16	s 2.04	-
14	20.84 q	14	14	s 1.98	-
11	17.91 q	11	11, 5	d 0.99	6

2.3.2.1.3 Analyse der NMR-Daten und des Massenspektrums.

(Bestimmung der Funktionalitäten, die die Protonen H-1 und H-8 tragen)

Der Summenformel $C_{38}H_{38}O_{16}$ ist zu entnehmen, dass das Molekül ein hochoxidiertes System ist (es enthält 16 Sauerstoffatome). Deshalb können mit den 2D-NMR-Spektren (HMQC und C-H-COSY) nicht alle Strukturelemente sicher aufgeklärt werden. Das andere 2D-NMR-Verfahren (HMBC) liefert keine exakte Zahl der Bindungen. Außerdem ist es nicht immer möglich, nur aufgrund der chemischen Verschiebungen alle Signale bestimmten Funktionalitäten zuzuordnen. [36, 37]

Im 1H -NMR-Spektrum sind zwei Singulette für jeweils zwei Protonen bemerkenswert. Beide sind zum tiefen Feld [bei 14.07 ppm (8-OH) und 11.48 ppm (1-OH)] verschoben. Sie sind entweder durch die Chelatisierung mit einer in *ortho*-Position stehenden Carbonylgruppe sehr stark entschirmt oder das Signal bei 11.98 ppm könnte z. B. zu einer freien Carbonsäure gehören. Das Proton 1-OH ist mit großer Wahrscheinlichkeit ein phenolisches Proton, das durch eine benachbarte Carbonylgruppe chelatisiert ist. Als Bestätigung findet man im ^{13}C -NMR bei 161.93 ppm ein Signal, das im long-range-Spektrum mit dem 1-OH Proton eine Kopplung zeigt. Das chelierte phenolische Proton 1-OH ist fest gebunden. Es ändert bei der Zugabe von Pyridin seine chemische Verschiebung nicht. Mit Diazomethan wird die Phenolgruppe nicht methyliert.

Das zweite Proton 8-OH (bei 14.07 ppm ein Proton einer Säuregruppe oder ein Proton eines Enols) konnte allein aufgrund der NMR-Daten nicht sicher zugeordnet werden. Bei Beachtung der oben besprochenen Fragmente des Moleküls muß man sieben von acht Sauerstoffatomen der einen Hälfte des Moleküls zuordnen. Wenn angenommen wird, dass das Molekül eine *Säurefunktion* enthält, *stimmt die Zahl der Sauerstoffatome mit der Summenformel nicht überein*. Anstatt auf acht Sauerstoffatome kommt man auf neun (drei Kohlenstoffatome sind im aromatischen Fragment beteiligt, vier Kohlenstoffatome sind für zwei Acetoxyfragmente erforderlich). Die 1H - und ^{13}C -NMR-Daten (^{17}O -NMR war nicht möglich), IR- und UV-Spektroskopie sind nicht ausreichend, um die chemische Umgebung des zweiten, zu

tiefem Feld verschobenen Protons zu identifizieren. Deswegen war es nicht möglich, die entsprechende Gruppe sicher zu bestimmen.

Aus diesem Grund wurden mit dem Naturstoff zwei chemische Reaktionen durchgeführt. Bei der ersten Reaktion handelte es sich um eine säurekatalysierte Veresterung. Eine Säurefunktion ließe sich mit TMSCl in Methanol innerhalb von 2h verestern. Diese Reaktion ist besonders gut für Systeme mit freien Säurefunktionen geeignet.^[38, 39] Sie verlangt keine aufwendige Aufarbeitung und verläuft unter milden Bedingungen. Die DC-Analyse des Reaktionsproduktes ergab einen interessanten Befund: das Produkt ist polarer ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98/2, R_f -Wert - 0.6). Das Reaktionsprodukt wurde per SPE (RP-18 Octadecyl), TLC RP-18 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95/5) gereinigt. Das Massenspektrum des Reaktionsproduktes ergab einen Molekülpeak bei $m/z = 582$, dessen hochauflösende Messung die Summenformel $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_{12}$ liefert. Die Summenformeldifferenz zwischen dem Edukt und dem Reaktionsprodukt ist 168, was einer Summenformel von $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ entspricht. Beim Vorliegen einer dimeren Struktur sollte sich jede Hälfte des Moleküls um das Fragment von $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2$ verkleinern. Hierbei bleibt die C_2 -Symmetriearchse im Molekül erhalten. Die NMR-Daten des Produktes sind in der Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Die NMR-Daten des Reaktionsproduktes (CDCl_3).

Atom. Nr.:	^{13}C -NMR	HMBC	^1H -NMR	H,H-COSY
9	188.03	-	-	-
8	179.70	7a, 7b, 8-OH	8-OH s 14.01	-
1	161.98	1-OH, 2, 3	1-OH s 11.55	-
4a	154.17	3	-	-
3	139.23	3	d 7.27	2
9a	116.25	2, 3	-	-
2	110.85	2, 1-OH	d 6.60	3
4	107.14	1-OH, 2	-	-
8a	100.72	8-OH	-	-
10a	84.41	5, 12a	-	-
5	68.87	5, 12a, 7b, 11	d 4.29	6

12	64.37	-	a d 3.84 b d 3.39	12b 12a
7	32.80	5, 8-OH, 11	a dd 2.50 b dd 2.33	6 6
6	28.48	7a, 7b, 11	m 2.11	5, 7, 11
11	17.77	5, 7a, 11	d 1.14	5, 7a

Aus dem ^1H -NMR-Spektrum ist zu erkennen, dass die Protonen 8-OH und 1-OH bei 14.07 ppm und bei 11.55 ppm wieder erscheinen. Im Bereich um 4.0 ppm sind deutlich verschobene Signale zu erkennen: Das Singulett für das Proton H-5 hat seine Lage von 5.41 auf 4.29 ppm geändert. Ferner fehlen zwei Singulette für zwei Methylgruppen bei 2.04 und 1.98 ppm. Die Acetoxyfragmente sind also abgespalten worden. Die Abspaltung beider Acetoxyfragmente wird auch durch die Hochfeld-Verschiebung des doppelten Dubletts (AB-Signal H-12a und H-12b) von 4.16 und 4.20 ppm auf 3.84 und 3.39 ppm bestätigt. Die erhöhte Polarität der Verbindung, die Ergebnisse des Massenspektrums und die 1D-, 2D-NMR-Daten führen zu dem Schluss, dass eine Umesterung stattgefunden hat. Aus zwei Acetoxygruppen sind unter Säurekatalyse zwei Hydroxygruppen und Essigsäuremethylester entstanden.

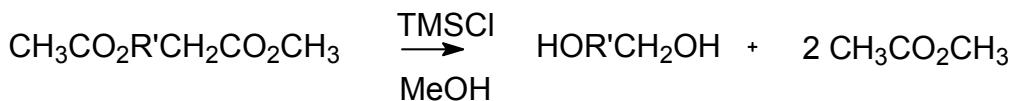


Abbildung 31: Der schematische Verlauf der Reaktion mit TMSCl anhand eines Fragments.

Beim Betrachten des ^1H -NMR-Spektrums erkennt man, auf das Proton H-5 bezogen, eine kleine Aufspaltung des Signals mit der Kopplungskonstanten von 0.7 Hz. Das H,H-COSY-Spektrum deutet auf die Kopplung zwischen den Protonen H-5 und H-6 hin, die im Bisacetoxymolekül nicht zu sehen war. Im ^1H -NMR-Spektrum sind die Signale der diastereotopen Protonen H-7a (2.50 ppm) und H-7b (2.33 ppm) im Verseifungsprodukt von dem Signal des Protons H-6 (2.11 ppm) deutlich zu unterscheiden.

Die NMR-Daten, die Massenspektroskopie und die Ergebnisse der oben genannten chemischen Versuche lassen sich durch eine Enolform mit ^{13}C -NMR-Signalen bei

188.16, 178.08 ppm, 100.5 pmm) erklären. Das entsprechende Fragment ist in Abbildung 32 dargestellt.

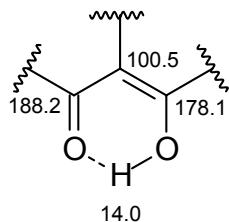


Abbildung 32: Das Enolfragment des Naturstoffs.

2.3.2.1.4 Das Molekül liegt als Biarylsystem vor

Die Analyse der Massenspektren, der ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR-, HMQC- und HMBC-Spektren ergibt, dass das Molekül unter Berücksichtigung der C_2 -Symmetriearchse als Dimer zu bestimmen und ein Biarylsystem besitzt. Die chemischen Verschiebungen von aromatischen Kohlenstoffatomen geben keinen eindeutigen Hinweis auf die Verknüpfungsstelle im Molekül. Von sechs aromatischen Kohlenstoffatomen sind zwei (C-Atom-2 und C-Atom-3) tertiär. Das C-Atom-1 (161.93 ppm) ist ein phenolisches Kohlenstoffatom. Die Chelatisierung des Protons 1-OH im ^1H -NMR-Spektrum, das Signal bei 188.16 ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum und der Peak bei $m/z = 121$ im Massenspektrum deuten zweifellos auf die β -Stellung einer Carbonylfunktion zur phenolischen Gruppe hin (s. Abb. 34).

Die Verknüpfung der Carbonylgruppe mit dem Aromaten mögen die C-Atome-4 (106.67 ppm) und C-Atom-9a (115.78 ppm) übernehmen. Beide Kohlenstoffatome müssen einen elektronegativen Partner haben. Bei der Anwesenheit des C-Atoms-4a (154.3 ppm, verbunden mit einem Sauerstoffatom) kann das C-Atom-4 diese Position eher nicht belegen. Die chemische Verschiebung des C-Atoms-9a sowie die long-range-Korrelationen zu den aromatischen Protonen H-2 und H-3 bestätigen seine direkte Nachbarschaft zur Carbonylfunktion. Außerdem trägt die Chelatisierung des enolischen Protons 1-OH zur Hochfeldverschiebung bei.

Das Kohlenstoffatom C-10a (80.78 ppm) der Seitenkette des C-Atoms C-4a zeigt im long-range Spektrum weitere Kopplungen mit den aliphatischen Protonen. Daraus folgt, dass am C-Atom-4a keine Verknüpfung der C_2 -symmetrischen Fragmente

möglich ist. Die Verknüpfungsstelle ist höchstwahrscheinlich am C-Atom-4 (die C₄-C_{4'}-Bindung). In Abbildung 33 ist das Biarylsystem dargestellt.

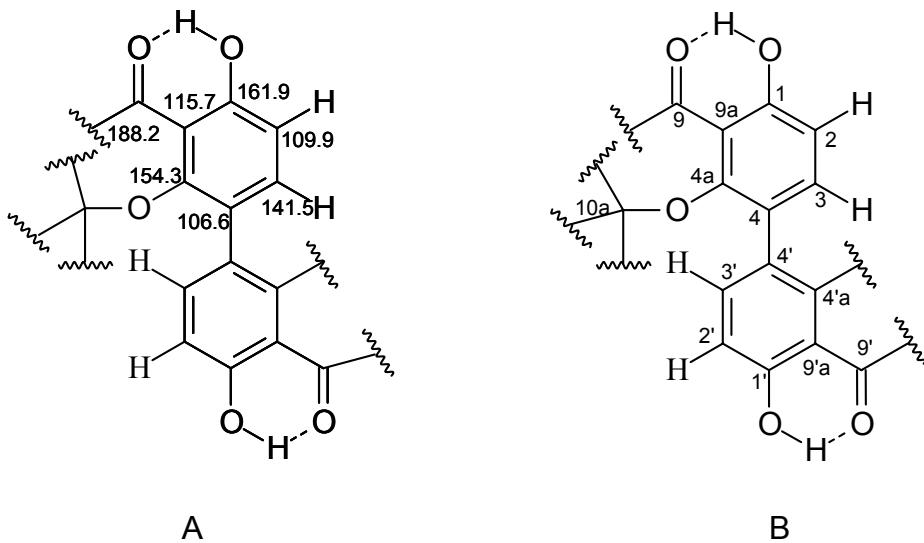


Abbildung 33: Das Biarylsystem des Naturstoffs (A: ¹³C-NMR-Verschiebungen, B: Numerierung).

2.3.2.1.5 Der aliphatische Teil des Moleküls

Die Zuordnung der Signale für die 12 aliphatischen Protonen (drei CH₃-Gruppen, zwei Methylenprotonen, ein Methinproton) gelingt mit Hilfe der 2D-Experimente. Die Annahmen wurden durch die entsprechenden Signale im ¹³C-NMR-Spektrum bestätigt (3 primäre C-Atome bei 17.91, 20.84 ppm und 21.07 ppm, ein sekundäres C-Atom bei 33.6 ppm und ein tertiäres bei 27.98 ppm). Zwei der drei erwähnten Methylgruppen gehören zu zwei Acetoxygruppen (C-Atome C-13 bei 170.47 ppm und C-15 bei 169.99 ppm). Abbildung 34 zeigt oben besprochene Fragmente.

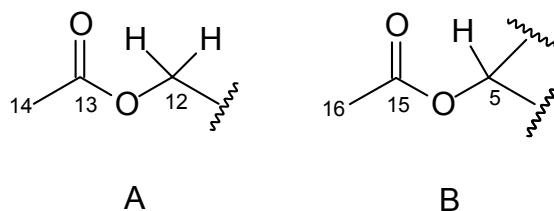


Abbildung 34: Zwei Acetoxyfragmente A und B des Sekundärmetaboliten.

Die Anordnung der Carbonylatome C-13 und C-15 (chemische Verschiebung von 170.08 ppm und 169.99 ppm) kann mit Hilfe der 2D-NMR-Daten ermittelt werden. Im long-range-Spektrum zeigen beide Kohlenstoffatome ihre Korrelationen mit zwei Methylprotonen H-16 und H-14. Außerdem korreliert C-Atom-13 mit zwei Methylenprotonen H-12a und H-12b (doppeltes Dublett bei 4.27 ppm), die im C,H-COSY-Spektrum mit dem C-Atom-12 (64.99 ppm) koppeln. Andererseits deutet die chemische Verschiebung des C-Atoms-13 auf die direkte Nachbarschaft zum Sauerstoffatom (Fragment A Abb.34) hin.

Die gleichen Argumente gelten für das C-Atom-15. Es koppelt im long-range-Spektrum mit einem Methinproton H-5 (Singulett bei 5.41 ppm) und korreliert im C,H-COSY-Spektrum mit dem C-Atom-5 (70.77 ppm Abb.34).

Die long-range-Korrelation der Methylenprotonen H-12a/H-12b mit dem Methin-C-Atom 5 (bei 64.99 ppm) und umgekehrt die Korrelation des Methin-C-Atoms 5 zu den Methylenprotonen H-12a/H-12b zeigen deutlich, dass die beiden Fragmente zusammengehören (Abb. 35).

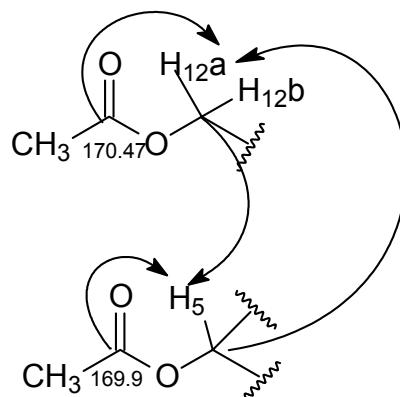
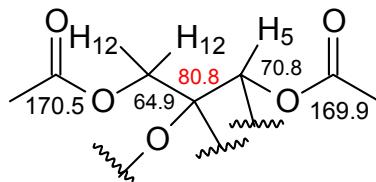


Abbildung 35: Die long-range-Korrelationen beider Acetoxyfragmente.

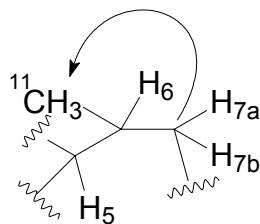
Aus den 2D-NMR-Daten ist abzuleiten, dass die abgebildeten Fragmente über ein quartäres C-Atom verknüpft sind. In Abbildung 35 ist die Verknüpfung von zwei Acetoxyfragmenten über ein quartäres C-Atom-10a (80.78 ppm) dargestellt. Als eine andere Verknüpfungsmöglichkeit käme das quartäre C-Atom-8a (100.53 ppm) in Betracht, weil dieses im long-range-Spektrum zu den in Abbildung 35 dargestellten Protonen H-12a/H-12b und dem Proton H-5 Konnektivitäten zeigt. Wenn aber die in Abbildung 32 dargestellte Vermutung stimmt, kann nur das C-Atom-10a (80.78 ppm) diese Position belegen.



D

Abbildung 36: Das Fragment D des Naturstoffes.

Das Dublett im Protonenspektrum bei 0.99 ppm mit der Kopplungskonstanten von ${}^3J = 6.0$ Hz und dessen Integration spricht für die dritte CH_3 -Gruppe 11, die das Proton H-6 als Kopplungspartner hat (Abb. 37). Die Kopplung des Protons 6-H (nach ${}^{13}\text{C}$ -NMR-Daten ein Methinproton) mit der Methylgruppe sollte ein Quartett ergeben, das mit den Signalen der Protonen H-7a und H-7b bestätigen. Die zwei diastereotopen Protonen H-7a und H-7b sollten zwei doppelte Dublette ergeben, die unter dem Multiplett mit der Kopplungskonstanten von ${}^2J = 11.0$ Hz zu erkennen sind. Das Proton H-7a zeigt mit der Kopplungskonstante von ${}^3J = 3.0$ Hz eine vicinale Kopplung mit dem Proton H-6. Daraus folgt, dass die Protonen H-7a und H-6 nicht antiperiplanar zueinander stehen. Eine weitergehende Analyse des Multipletts scheint nicht mehr möglich zu sein.



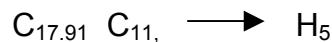
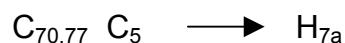
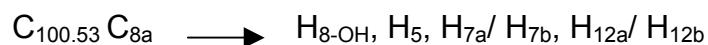
C

Abbildung 37: Das aliphatische Fragment C des Sekundärmetaboliten.

Das Doppelresonanzexperiment (NOE) liefert wegen der Entkopplung von benachbarten Protonen zu stark verbreiterte Signale, die nicht zur Strukturaufklärung beitragen. Zu diesem Fragment ist noch zu konstatieren, dass das Proton H-5 ein scharfes Singulett (s. Tabelle 12) ergibt. Der Torsionswinkel zwischen den Protonen H-6 und dem Proton H-5 ergibt sich aus der Karplus-Kurve und beträgt 90° .

2.3.2.1.6 Weitere Diskussion der Struktur des aliphatischen Fragments

Der weitere Aufbau des aliphatischen Fragments kann durch detaillierte Analyse der Fernkopplungen bestimmt werden. Fünf Kohlenstoffatome (C-8a, C-10a, C-5, C-7, C-6, das C-Atom-11 trägt eine Methylgruppe) zeigen im long-range-Spektrum Konnektivitäten zu den aliphatischen Protonen H-5, H-6, H-7. Das Methinkohlenstoffatom C-5 zeigt im long-range-Spektrum eine eindeutige Korrelation zu dem Protonensignal H-7a (2.37 ppm). Das quartäre C-Atom-8a koppelt sowohl mit dem Proton 8-OH als auch mit dem Methinproton H-5.



Unten sind die Verknüpfungsvarianten laut 2D-NMR-Verfahren aufgeführt.

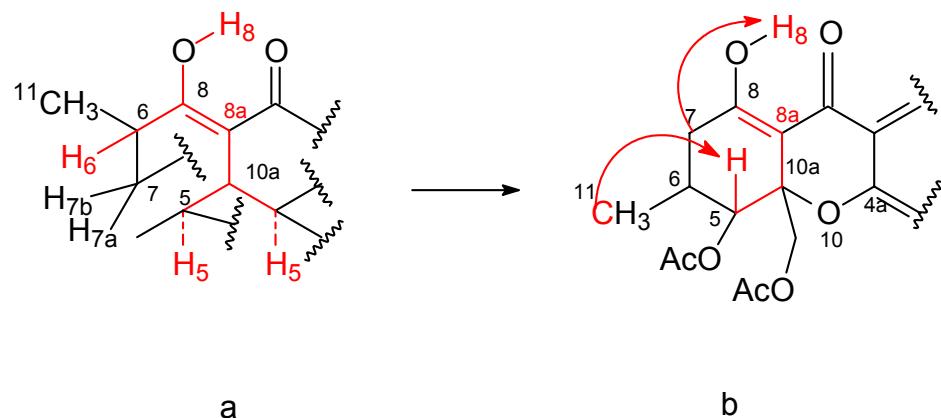


Abbildung 38: Die 3J -Kopplungen des C-Atoms-8a mit den Protonen 8-OH, H-5, H-7a, H-7b.

Man sieht, dass es strukturell mindestens zwei Möglichkeiten gibt (Abb. 38 **a** und **b**), das Molekül gemäß der Entfernung des C-Atoms-8a von den Protonen 8-OH, H-5 sowie H-7a und H-7b aufzubauen, die den 2D-NMR-Daten entspricht. Zwei Punkte sind bei der Diskussion zu erwähnen:

Für die Variante **a** muß der Sechsring so geschlossen werden, dass die Methylenprotonen H-7a und H-7b am Sechsring zwei Kopplungspartner, nähmlich die Protonen H-5 und H-6, oder nur einen Kopplungspartner, nähmlich das Proton H-6, haben. Aber das scharfe Singulett bei 5.41 ppm im ¹H-NMR-Spektrum deutet entweder darauf hin, dass kein Kopplungspartner vorliegt, oder der Torsionswinkel zwischen dem Proton H-5 und nur einem hypothetischen Nachbarn etwa 90° beträgt. Das hieße, dass die Orbitale der Protonen orthogonal zueinander stehen.^[10] Auf Grund der long-range-Kopplung zwischen dem C-Atom-11 und dem Proton H-5 erscheint Variante **b** am plausibelsten.

Die long-range-Kopplung des C-Atoms-7 mit Proton 8-OH und die long-range-Kopplung des C-Atoms-11 mit Proton H-5 legen die Struktur des aliphatischen Fragmentes **b** fest.

Da alle Signale zugeordnet sind, wird das Fragment als ein Sechsring vorliegen.

Andererseits gibt es noch eine Variante, deren NMR-Daten und 2D- Korrelationen nicht in Widerspruch zu der in der Abbildung 38 **b** dargestellten Struktur stehen. Diese können unterschiedliche Ringgröße (des Siebenringes s. Abb. 39) sowie Positionen am Ring des Protons H-5 bzw. des AcOCH₂-Fragments zulassen.

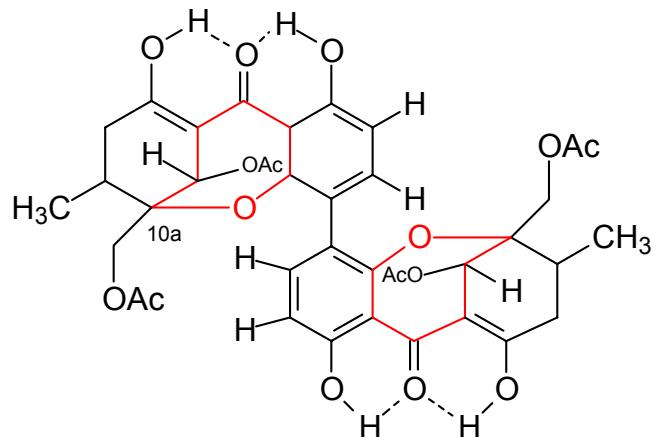


Abbildung 39: Eine mögliche Variante des unbekannten Naturstoffes

Der wichtigste Punkt bei der Beurteilung dieser Möglichkeit, außer dem schon oben Besprochenen, ist die chemische Verschiebung des quartären C-Atoms C-10a (80.78 ppm). Die Anwesenheit eines elektronegativen Substituenten reicht nicht aus,

um eine so starke Tieffeldverschiebung zu erreichen. Die nähere Position C-10a zur Doppelbindung entspräche dieser Bedingung besser.

Die zwei anderen Arbeitshypothesen **a** und **b** (Abb. 40) zur Frage der Verknüpfung beider Molekülfragmente sind unten dargestellt.

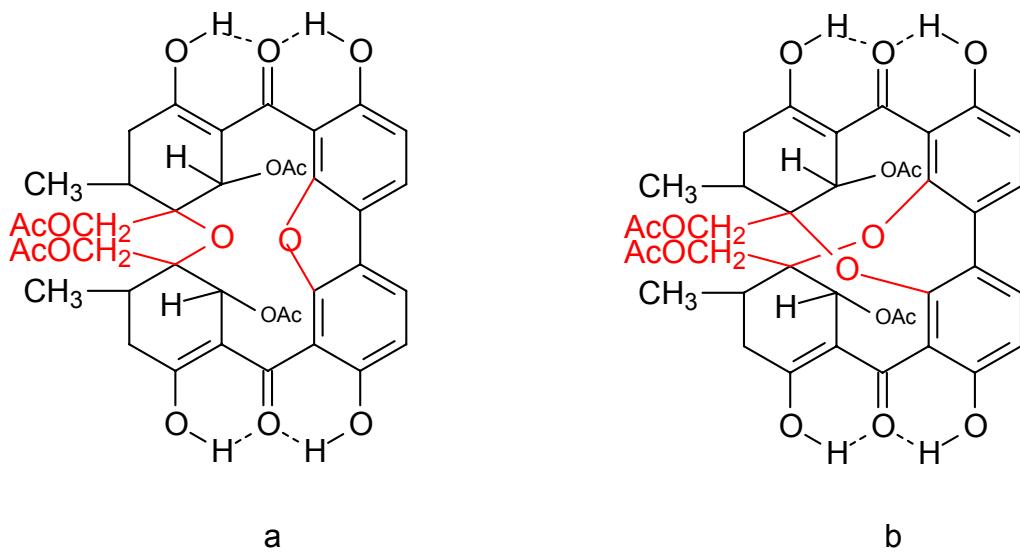


Abbildung 40: Die als Arbeitshypothese betrachteten Strukturen des Naturstoffs.

Diese Moleküle sind aber nicht mehr C_2 -symmetrisch und über drei Bindungen miteinander verknüpft. Diese Annahmen sind kaum haltbar, da im Massenspektrum ein Peak mit der Intensität von ca. 20 % bei $m/z = 377$ $[1/2M+2]^+$ erscheint. Dazu müssten bei der Elektronenspray-Ionisation drei Verknüpfungen gleichzeitig gespalten werden, was sehr selten beobachtet wird. Fernerhin besäße die Variante **a** einen 14-Ring, die Variante **b** zwei verbrückte 10-Ringe. Gleichartige Ringsysteme erscheinen in der Natur relativ selten.

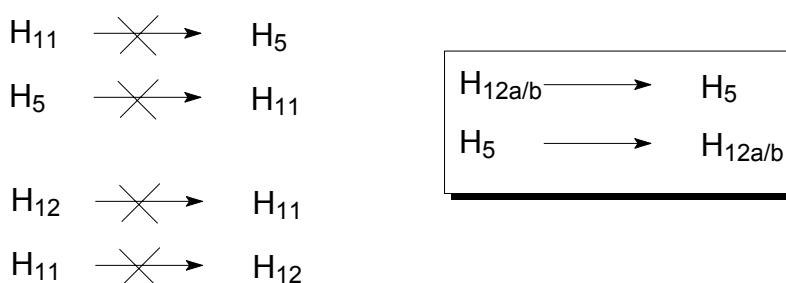
Für die Aufklärung der Struktur wurden die NOE-Experimente mit dem Gedanken herangezogen, die räumliche Umgebung der Protonen H-5, H-6 und H-12 aufzuklären. In der Tabelle 14 sind die Ergebnisse der NOE-Differenzspektroskopie aufgelistet.

Tabelle 14: NOE-Differenzspektroskopie.

Gesättigte Resonanz	Signalintensität der Atome							
	$H_{12a/12b}$	H_5	$H_6 + H_{7a/7b}$	$^{16}CH_3-$	$^{14}CH_3-$	$^{11}CH_3-$	H_{2-}	H_{3-}
$H_{12a/12b}$	-	+50.3	+24.4	+17.2		-	+10.3	+22.7
H_5	+39.7	-	+2.8	-	-	-	-	+41.7
$^{11}CH_3$	-		+26.4	+42.4	+52.6	-	-	-

 - keine Nachbarschaft

Die Auswertung der NOE-Differenzspektren führt zu dem eindeutigen Ergebnis, dass die Protonengruppen H-5 und H-11 *trans* zueinander stehen. Ebenfalls sind die Protonengruppen H-11 und H-12 nicht in einer Ebene. Die Steigerung der Signalintensität bei Sättigung des Signals von Proton H-5 sowie umgekehrt die Steigerung von H-12 bei Sättigung von H-12 spricht für die gleiche räumliche Anordnung dieser Gruppen. Logischerweise sollte die Methylgruppe 11 der Methylengruppe 12 entgegengesetzt sein.



Erklärbar ist die Vergrößerung der Signalintensität beider Methylprotonen H-16 und H-14 der Acetoxyfragmente bei Sättigung des Signals H-11 durch die behinderte Drehbarkeit der beiden. Interessant ist die deutliche Intensitätsteigerung des aromatischen Protons H-3 bei Absättigung des Protons H-5, die auf den ersten Blick ungewöhnlich erscheint. Eine Erklärung kann nur bei Beachtung des Biarylsystems im Molekül gegeben werden. Die gegenseitige räumliche Nähe der beiden wird dadurch ermöglicht, dass sie nicht um die Biarylachse drehebar sind.

Die in Abbildung 41 dargestellte Struktur erscheint auf Grund aller Daten am plausibelsten.

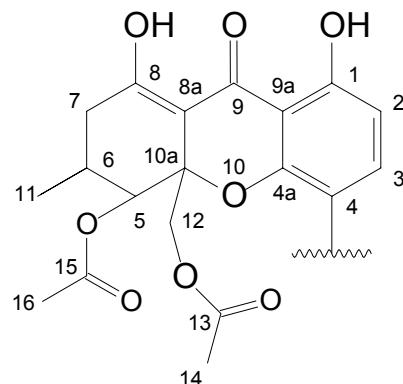


Abbildung 41: Die „Halbstruktur“ des Naturstoffs.

Die gesammte Struktur des Moleküls ist in Abbildung 26 wiedergegeben. Die Struktur des Umesterungsproduktes mit Numerierung zeigt in Abbildung 42.

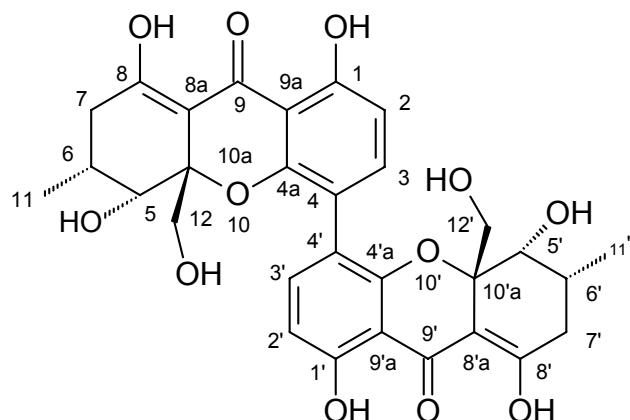


Abbildung 42: Das Umesterungsprodukt

Die Umkristallisation des Naturstoffs aus dem PE/Et₂O/CH₂Cl₂ liefert hellgelbe Plättchen-Kristalle. Die Röntgenstrukturanalyse der Substanz ist in Abbildung 43 dargestellt.

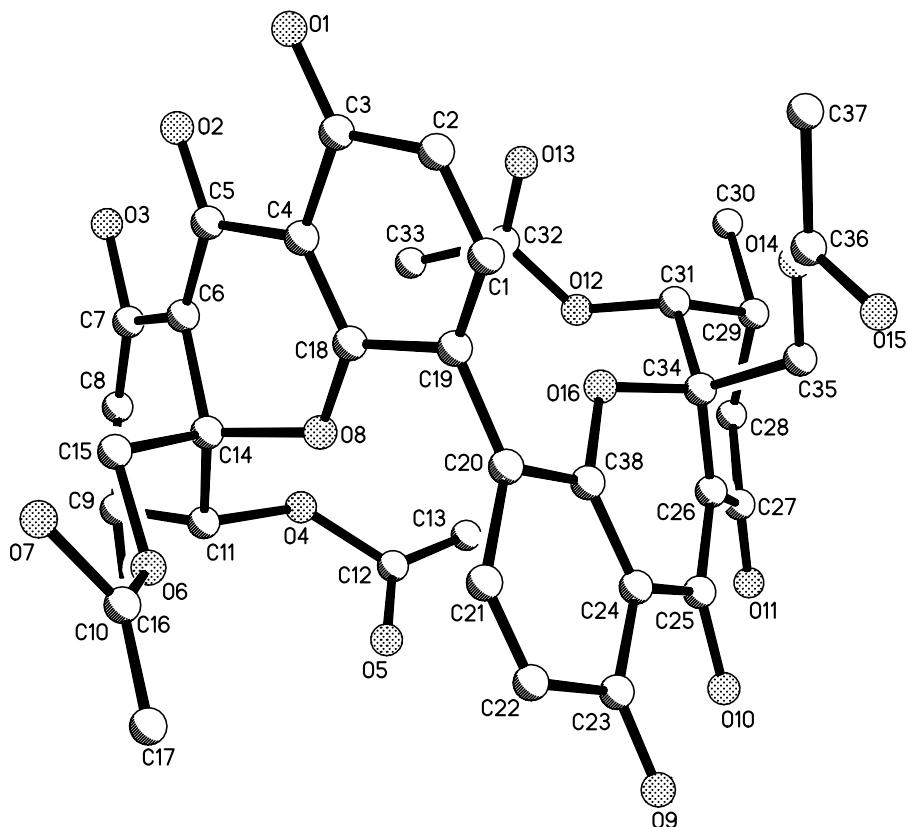


Abbildung 43: Die Röntgenstrukturanalyse des unbekannten Naturstoffs.

Man findet eine Identität der in Abbildung 26 gezeigten Struktur mit der Abbildung aus der Röntgenstrukturanalyse.

2.3.2.1.7 Diskussion der achsialen Chiralität

Aus den NMR-Daten (CDCl_3 , RT) der Substanz geht hervor, dass das Molekül als ein Dimer vorliegt und eine C_2 -Symmetriechse besitzt. Die hochsubstituierte Biphenyleinheit des Moleküls besitzt eine axiale Chiralität. Die NOE-Daten deuten ebenso auf eine Verhinderung der Drehbarkeit der Biphenyleinheit. Die plausibelste Erklärung dafür wäre die Höhe der Rotationsbarriere bei der Racemisierung der Atropisomere.

2.3.2.1.8 Zusammenfassung der Daten des neuen Naturstoffs

Der Naturstoff gehört zur Klasse der Anthranoiden, die vom Anthracen abgeleitete, natürlich vorkommende Verbindungen sind. Durch die Anwesenheit des chromogenen trizyklischen Ringsystems mit Chinon-Struktur sowie der auxochromen Hydroxy-Gruppen kann die gelbe Färbung der Verbindung erklärt werden.^[40]

Der biosynthetische Vorläufer des Naturstoffs ist die Secalonsäure A (Ergochrome A).^[41] Im Römpf-Lexikon "Naturstoffchemie" sind 15 Secalonsäuren beschrieben worden.^[40] Alle Secalonsäuren sind Dimere von verschiedenen Xanton-Monomeren.

Die Verknüpfung erfolgt in 2/2'-Position. Die Bildung der Secalonsäure A ($C_{32}H_{30}O_{14}$, Mr 638.1635) ist durch die enzymatische oxidative Ringöffnung von Emodin (einem tricyclischen Chinonderivat) erklärbar (Abb. 44).^[41, 42, 43] Die Säure liegt als Dimer vor, die Verknüpfungsstelle ist allerdings am C-Atom-2. Im Unterschied zur Secalonsäure besitzt der Naturstoff an der Position 10a statt einer Methylestergruppe eine Methylenactetoxygruppe. Es sind fünf Diastereoisomere der Säure (A, B, C, D, F, G) isoliert und beschrieben worden, deren Konfiguration an den Positionen 5,5'/6,6'/10,10' unterschiedlich ist.^[40] Diese Säure ist dem Naturstoff P am nächsten, dessen Derivate aus *Aspergillus ochraceus* (secalonic acid A), *A. aculeatus* (D und F), *Pyrenophaeta terrestis* (A, B und G) und *Penicillium oxalicum* (D) isoliert worden sind.^[40]

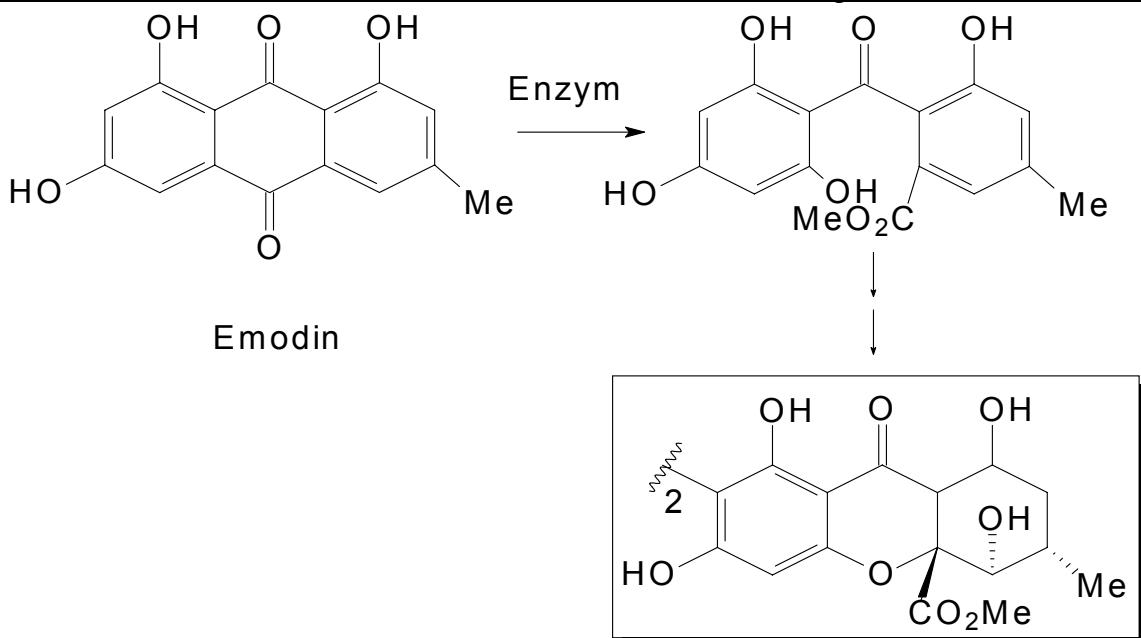


Abbildung 44: Der Metabolismus der Secalonsäure.

Der Vergleich der NMR-Daten der Secalonsäure G (Signale für die Protonen 5',6') mit dem unbekannten Naturstoff P lässt den Torsionswinkel um 90° C unberührt.^[20]

2.3.2.1.9 Biologische Aktivität

Die Secalonic-Säure A zeigt mäßige antimikrobielle Wirkung gegen das gram-positive Bakterium *Bacillus megaterium*, sonstige toxische Effekte sind nicht bekannt.^[41] Die mikrobiologische Wirkung des Naturstoffs P wurde in der Technischen Universität Braunschweig getestet. Die Substanz wurde in einem 1:1-Gemisch Aceton/Methanol mit 1mg/1ml bzw. 10mg/1ml gelöst und anschließend auf algizide, fungizide und bakterizide Wirkung getestet. Die unten aufgelisteten Ergebnisse deuten auf eine mäßige bakterizide Wirkung gegen das gram-positive Bakterium *Bacillus megaterium* (*B.m*) sowie eine starke Wirkung gegen den Pilz *Ustilago violacea* (*Ust.*).

Tabelle 15: Biologische Aktivität des Sekundärmetaboliten.

Subst.	Chl.	Bm.	Ust.

1mg/1ml	-	0.3-0.6	-
10mg/1ml	0,2	2-3-4	0.5-0.8

Von den dimeren Anthrachinonen sind andere natürlich vorkommende Vertreter bekannt; deren Verknüpfungsstellen sind allerdings entweder am C-Atom-4 oder C-Atom-10. Als Beispiele dafür können die Naturstoffe 4,4'-Bichrysophanol ($C_{30}H_{18}O_8$) und 5,5'-Bichrysophanol ($C_{30}H_{18}O_8$) genannt werden.^[44]

Das Umesterungsprodukt wurde ebenfalls in der TU Braunschweig auf biologische Wirksamkeit getestet, zeigte aber keine interessanten Eigenschaften.

Pflanzenschutz-Screening (BASF)

Der Naturstoff „P“ zeigt im Pflanzenschutz-Screening (Mikrotest, BASF) starke fungizide Aktivität. Die Ergebnisse der Tests bei angegebener Konzentration (Wachstum in %) sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Die Ergebnisse des Pflanzenschutz-Screenings.

ppm	Phytin.*	Botrci.	Pyrior.	Septtr.
125	2.2	8.8	0.0	0.9
31	0.4	8.7	0.5	0.3
8	99.2	8.0	0.1	0.4
2	100.0	73.3	42.3	68.5

*Phytin.: *Phytophthora infestans* – der Erreger der Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffeln und Tomaten.

Botrci.: *Botrytis cinerea* – Grauschimmel an Erdbeeren.

Pyrior.: *Pyricularia oryzae* – Reisblast-Erreger.

2.3.2.2 Beschreibung und Isolierung des Sekundärmetaboliten Cytochalasin L-696.474.

$C_{30}H_{39}O_4N$

Mr.: 477.29

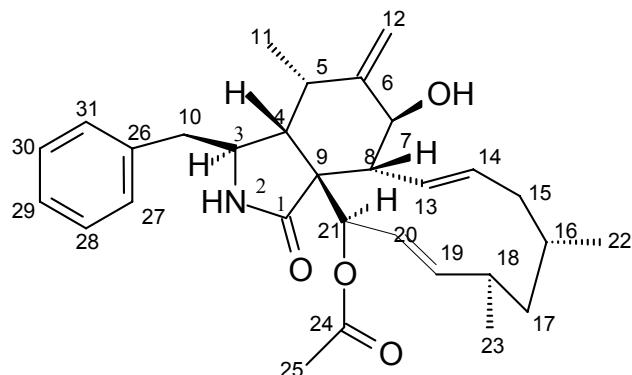


Abbildung 45: Die Struktur und die Numerierung des Cytochalasins L-696.476.

Der literaturbekannte Naturstoff Cytochalasin L wurde nach Vortrennung (s. Schema 7) mittels präparativer Chromatographie (Dickschichtplatten, Si 60) gewonnen.^[45] Die Feintrennung gelang mittels HPLC (RP-18, column 4.6 mm×25 cm, Acetonitril 100%, 2.0 ml/min, 20° C).^[46, 47] Die Substanz konnte mit UV-Licht (254 nm) detektiert werden. Der Naturstoff hat einen Schmelzpunkt von 204-207° C (Lit.: 210° C).^[48] Der R_f -Wert in $CH_2Cl_2/MeOH$ 97/3 beträgt 0.43. Der Sekundärmetabolit löst sich gut in mittelpolaren Lösungsmitteln (Chloroform, Dichlormethan) sowie in Methanol. In Wasser ist die Verbindung nicht löslich.

Die IR-Banden deuten auf zwei Carbonylfunktionen (eine Estergruppe bei 1741 cm^{-1} und eine Ketogruppe bei 1691 cm^{-1}) im Molekül hin. Die stark ausgeprägte charakteristische Valenzschwingung der C-O-Gruppe bei 1230 cm^{-1} bestätigt die Vermutung, dass das Molekül eine Estergruppe besitzt. Die zweite Bande spricht für die Valenzschwingung einer Amidfunktion; beide Carbonylfunktionen könnten aufgrund der Differenz zwischen den Absorptionsbanden von 50 cm^{-1} aber auch zu einer 1,3-Dicarbonylverbindung gehören. Außerdem deuten die mittelintensiven Banden um 2921 cm^{-1} auf einen aliphatischen Teil des Moleküls hin. Die Banden um 1454 , 1383 und um 904 cm^{-1} charakterisieren den aromatischen Teil des Moleküls, den man findet im Spektrum die mittelintensive Bande für die Ringdeformationsschwingung bei 700 cm^{-1} . Wegen der mittelstarken Absorption bei 966 cm^{-1} ist ein olefinischer Teil im Molekül nicht auszuschließen.

Die DCI-Massenspektren der Probe deuten auf ein Molekül der Masse $m/z = 477$ hin (positiv: $[M+H]^+$ bei $m/z = 478$, negativ: $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, $[M+Br]^-$ bei $m/z = 476$, $m/z = 512$, $m/z = 556$). Das EI-Spektrum zeigt das Molekülion bei $m/z = 477$ sowie eine Reihe von Fragmenten: $m/z : 418 = M-59$ entspricht der Abspaltung einer Acetoxygruppe ($\text{CH}_3\text{-COO}-$), $m/z : 386 = 477-91$ lässt eine benzylische Struktur erkennen ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2-$), zumal $m/z = 91$ auch im Spektrum zu sehen ist. Der Peak bei $m/z = 326$ zeigt die Abspaltung beider funktionellen Gruppen, obwohl man rechnerisch nur auf $m/z = 327$ kommt. Durch die Abspaltung eines Protons zur Stabilisierung der Essigsäure kann die Massendifferenz erklärt werden.

Ausgehend von den NMR-Daten und der Summenformel des Moleküls, kommt man über eine Literaturrecherche in der Chapman-Hall-Datenbank auf den Namen des literaturbekannten Naturstoffes – Cytochalasin L-696,474.^[45] Die NMR-Daten der Verbindung stehen mit ihren Literaturdaten in guter Übereinstimmung. Die von uns gemessenen Werte der chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 17 aufgelistet. Die vicinalen Kopplungskonstanten der olefinischen Protonen H-13 und H-14 sowie der Protonen H-20 und H-19 ($^3J = 16.4$ Hz) erlauben es, eine *trans*-Anordnung der Doppelbindungen anzunehmen. Die Werte der vicinalen Kopplungskonstanten stehen in guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten.^[45]

Tabelle 17: Die NMR-Daten des Cytochalasins L (CDCl_3).

Atom. Nr.:	$^{13}\text{C-NMR}$	HMBC	HMBC	$^1\text{H-NMR}$ ppm	H,H-COSY
1	174.31 s	-	8, 4	-	-
2	-	-	-	5.45 s	-
3	53.76 d	3	2, 10a, 10b	3.24 m	4, 10a, 10b
4	50.70 d	4	2, 3, 10a, 10b, 11	2.12 t	3, 5
5	33.01 d	5	3, 4, 11, 12a, 12b	2.87 m	4, 11
6	148.17 s	-	4, 11, 12a.		-

Isolierung und Strukturaufklärung

7	69.60 d	7	5, 7, 8, 12a, 12b	3.82 d	8
8	47.34 d	8	12a, 13, 14, 21	2.88 dd	7, 13
9	51.86 s	-	2, 8, 14, 21	-	-
10	45.74 t	10a 10b	4, 27/31	2.64 dd 2.60 dd	3
11	14.31 q	26	-	0,92d	5
12	113.89 t	12a 12b	12	5.10 s 5.35 s	12b 12a
13	127.51 d	13	8, 15a, 15b	5.76 m	8, 14
14	138.43 d	14	8, 15a	5.3 m	13, 15
15	42.55 t	15a 15b	13, 14, 17, 22	1.96 dd	14, 15b
16	33.42 d	16	14, 15a, 15b, 22	1.75 dd 1.38 br.s	14, 15a, 16 15, 17, 22
17	48.44 t	17a 17b	15a, 15b, 22/23	1.60 m 1.36 m	17b, 18 17a
18	34.27 d	18	19, 20, 23/22	2.08 dd	17, 19, 23
19	135.91 d	19	21, 23	5.70 m	18, 20, 21
20	125.49 d	20	21	5.96 dd	19, 21
21	78.62 d	21	4, 8, 19, 20	5.54 dd	19, 20
22	22.13 q	22	22	1.01 d	18
23	25.30 q	23	23	1.00 d	17
24	170.13 s	-	25	-	-
25	20.90 q	25	25	2.21 s	-
26	137.56 s	-	10a, 10b, 28/30	-	-
27,31	128.99 d	27,31	10a, 27/31	7.33 dd	27, 28, 30, 31
28,30	129.04 d	28,30	10a, 10b, 28/30	7.13 dd	27, 28, 30, 31

Isolierung und Strukturaufklärung

29	127.10 d	29	28/30, 27/31	7.22 m	27, 28, 30, 31
----	----------	----	--------------	--------	----------------

2.3.2.1.9 Biologische Aktivität

Die biologische Aktivität des Cytochalasins L-696.476 wurde ebenfalls in der Technischen Universität Braunschweig getestet. Die Probe wurde in Aceton/Methanol (1:1) mit 1mg/1ml bzw 5mg/1ml gelöst und anschließend auf algizide, fungizide und bakterizide Wirkung getestet. Die Ergebnisse des Plättchentests von Cytochalasin L-696,474 zeigen schwache Aktivitäten gegen die aufgelisteten Mikroorganismen.

Tabelle 18: Die Ergebnisse des Plättchentests bei Cytochalasin L.

Subst.	Chl.	Bm	Ec	Ust	Eur	Mm	Fu
1mg/1ml	0,1	0	0,1	0	0	0	0
5mg/1ml	0,7	0,1	-	0,2	-	-	-

*Zahlenangaben in cm des Hemmhofradius.

Die in der Literatur publizierten Pharmakologischen Tests der Substanz weisen auf hohe Wirksamkeit gegen HIV -1 hin.^[49, 50]

2.3.2.3 Isolierung und Beschreibung des Cytochalasins X

C₂₈H₃₇O₃

Mr: 435.28

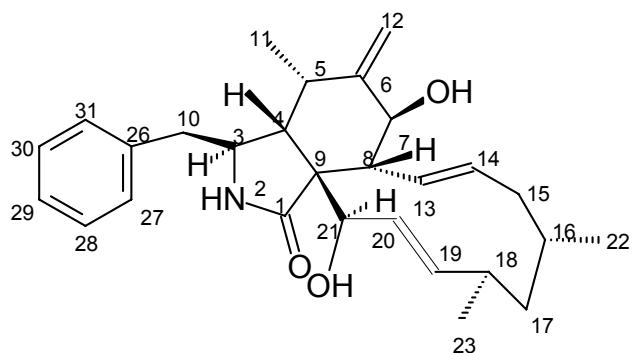


Abbildung 46: Der Sekundärmetabolit Cytochalasin X.

Der literaturunbekannte Naturstoff mit der Molmasse $435.27 \text{ g mol}^{-1}$ ist dem Cytochalasin L hinsichtlich seiner NMR- und IR-Daten sehr ähnlich. Der Sekundärmetabolit wurde in einer Menge von 1.3 mg per DC (Kieselgel 60) isoliert und mittels HPLC (RP 18, flow 1ml/min, MeOH, 25° C) gereinigt. Die Substanz ist im Vergleich zum Cytochalasin L-696.476 polarer. Die Messung des Molekülpeaks bei $m/z = 435$ ergibt bei Berücksichtigung der Zahl der Doppelbindungen und der Ringe als sinnvollste Summenformel C₂₈H₃₇O₃N. Aus dem Vergleich der NMR- und IR-Daten sowie auch aus dem Massenspektrum (der Unterschied zwischen den Summenformeln beider Cytochalasine besteht aus dem Fragment C₂H₂O) folgt, dass der unbekannte Naturstoff keine Acetoxygruppe enthält. Stattdessen muss er eine Hydroxygruppe besitzen, weil die chemische Verschiebung des C-Atoms-21 keine starke Änderung erkennen lässt und die Lage des Protons H-21 (4.17 ppm) ebenso auf einen elektronegativen Nachbarn hindeutet. Der Befund spiegelt sich im IR-Spektrum wider. Die bei 1741 cm^{-1} fehlende Bande und die starke Bande bei 3373 cm^{-1} sprechen ebenfalls für das Fehlen der Acetoxygruppe. In Tabelle 19 sind die NMR-Daten des literaturunbekannten Naturstoffes aufgelistet.

Isolierung und Strukturaufklärung

Tabelle 19: Die NMR-Daten des Sekundärmetaboliten Cytochalasin X (CDCl_3).

Atom. Nr.:	^{13}C -NMR	HMQC	HMBC	^1H -NMR	H,H-COSY
1	175.81 s	-	3, 4, 8	-	-
2	-	-	-	5.45 s	-
3	53.87 d	3	4, 5, 10a, 10b	3.27 m	4, 10a, 10b
4	50.18 d	4	2, 3, 4, 5, 10a, 10b, 11	2.61 m	3, 5
5	33.10 d	5	3, 4, 11, 12a, 12b, 15a, 15b	2.91 m	3, 4, 12a, 12b
6	148.66 s	6	4, 8, 11	-	-
7	69.79 d	7	8, 12, 14	3.82 d	8, 12a, 12b
8	46.16d	8	4, 13, 14	2.81 t	7, 13
9	53.13 s	9	4, 8	-	-
10	45.76 t	10a	4, 25/29	a dd 2.92	3
11	14.22 q	11	4, 11	1.06 d	5
12	113.65 t	12a	7	a 5.33 s	12b
13	127.08 d	13	8, 15a, 15b	5.76 dd	8, 14
14/24	137.81 d	14	8, 15a, 15b	5.25 m	13, 15a, 15b
15	42.33 t	15a	13, 14, 22	a 1.97 m	13, 14, 15b
16	33.52 d	16	-	1.37 m	15, 17,22
17	48.33 t	17a	15a, 15b, 23	a m 1.72	17b, 18, 23
18	34.17 d	18	23	2.15 m	17a, 17b, 19,
19	134.32 d	19	20, 23	5.90 dd	20, 21
20	131.23 d	20	19, 21	6.19 dd	19, 21
21	77.26 d	21	4, 8, 19, 20	4.17 br.s	20
22	22.47	22	15, 22	0.98 d	18
23	25.22 q	23	23	1.01 d	16
24,18	137.81 s	24	3, 4, 10a, 10b, 26, 28	-	-
25,29	128.94 d	25/29	10a, 10b, 26/28, 27	7.30 d	26/ 28
26,28	129.15 d	26/28	3, 10a, 10b, 25/29, 27	7.45 m	25/29, 27
27	128.04 d	27	25/29, 27	7.23 t	26, 27

Die Unterschiede zwischen den NMR-Daten beider Naturstoffe sind unten dargestellt. In den ^{13}C -NMR-Spektren sind folgende durch HMQC-Spektren bestätigte Signale angedeutet:

	Cytochalasin L	Cytochalasin X
C ₂₁	77.26 ppm	78.62 ppm
C ₁₉	135.91 ppm	134.32 ppm
C ₂₀	125.49 ppm	131.23 ppm
C ₁	175.81 ppm	174.31 ppm
C ₂₄	170.13 ppm	-
C ₂₅	20.90 ppm	-

Im ^1H -NMR-Spektrum findet man entsprechend für die Protonen H-21 und H-25 folgende Signale:

	Cytochalasin L	Cytochalasin X
H ₂₁	dd 5.54 ppm	br. s 4.17 ppm
H ₂₅	s 2.21 ppm	-

Das fehlende Fragment ist in Abbildung 47 in der Struktur des Cytochalasins X noch einmal abgebildet.

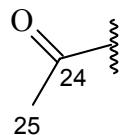


Abbildung 47: Das fehlende Fragment des Cytochalasins X.

Dementsprechend kann die gesamte Struktur des Sekundärmetaboliten X in der Abbildung 46 dargestellt werden. Die Konfiguration an den Stereozentren C-3, C-4, C-5, C7, C-8, C-16, C-18, C-21 des Moleküls wird sich aufgrund der Ähnlichkeit der Kopplungskonstanten von dem Cytochalasin L-696.476 nicht unterscheiden.

Der Drehwert (gemessen in Dichlormethan) ist dem des Cytochalasins L-696.476 sehr ähnlich.

2.3.2.3.1 Zusammenfassende Beschreibung der Naturstoffe Cytochalasin L und Cytochalasin X

Die Cytochalasine sind aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Wirkungen interessant. Sie hemmen reversibel die Cytoplasmateilung (Cytokinese), aber nicht die Kernteilung (Mitose). Cytochalasine können zu vielkernigen Riesenzellen oder bei höherer Konzentration zum Austritt des Kerns aus der Zelle führen. Sie hemmen in Säugetierzellen Bewegungsvorgänge, die mit der Mikrotubuli-Aggregation und Actin-Filamenbildung zusammenhängen (z.B. Blutgerinnung durch Blutplättchen). Sie hemmen die Phagozytose, die Pinozytose bei Makrophagen, die Fortbewegung von Fibroblasten und Amöben, aber nicht die Muskelkontraktion. Weitere biologische Wirkungen sind antibiotische Eigenschaften.^[40]

Cytochalasin X könnte als Hydrolyseprodukt von Cytochalasin L betrachtet werden. Bei der Untersuchung an der TU Braunschweig der fungiziden, algiziden und bakteriziden Aktivitäten des Cytochalasins L (Cytochalasin X wurde aus Substanzmangel nicht getestet) wurden keine interessanten Ergebnisse festgestellt. Im Mikrotest (Pflanzenschutz, BASF) zeigte sich der Cytochalasin L im Pflanzenschutz-Screening als ein mittelstarker Wirkstoff.

2.3.2.4 Isolierung und Beschreibung der 3-Nitropropionsäure

$C_3H_5O_4N$

Mr.:119.08

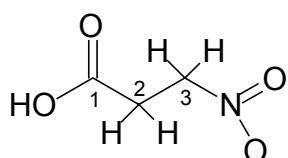


Abbildung 48: Die Struktur der 3-Nitropropionsäure.

Die in Gestalt farbloser Kristalle isolierte Verbindung erwies sich als polarer Naturstoff mit dem R_f -Wert = 0.70 ($CDCl_3/MeOH$ 95/5). Die Gewinnung des Stoffes erfolgte mittels präparativer RP-18 Dickschichtplatten (Merck). Als Laufmittel wurde das Gemisch $MeOH/Acetonitril$ 10/90 verwendet. Der Naturstoff ist in Methanol gut löslich. Auf dem Dünnschichtchromatogramm zeigt sich bei 254 nm eine intensive UV-Lösung und mit Bromkresolgrün auf dem blauen Hintergrund eine intensive gelbe Anfärbung. Im IR-Spektrum ist die Bande einer OH-Valenzschwingung bei $\nu = 3396\text{ cm}^{-1}$ zu sehen; weitere charakteristische Banden finden sich bei $\nu = 1728\text{ cm}^{-1}$ ($C=O$) und bei $\nu = 1556 / 1259\text{ cm}^{-1}$ (die asymmetrische/symmetrische Valenzschwingung der Nitrogruppe). Das Massenspektrum lässt unter EI-Bedingungen kein Molekülion erkennen. Im negativen DCI-Spektrum ist ein Peak bei $m/z = 119$ zu sehen. Ein weiteres charakteristisches Fragment tritt unter Abspaltung von NO_2 bei $m/z = 73$ ($C_3H_5O_2$) hervor. Eine Suche über *Library Possible Matches for Scan SI: 679* führt zu 3-Nitropropanoic acid.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum sind nur drei Signale zu erkennen. Das Signal bei $\delta = 174.92\text{ ppm}$ weist auf ein Kohlenstoffatom einer Carbonsäure auf. Das zweite Signal bei $\delta = 69.66\text{ ppm}$ deutet auf Nachbarschaft zur Nitrogruppe hin. Das dritte Signal bei $\delta = 31.09\text{ ppm}$ weist die Nachbarschaft einer Carbonsäuregruppe aus. Die Zuordnung der Protonen zu den Kohlenstoffsignalen und die Verknüpfung der Fragmente wurde durch die Auswertung der zweidimensionalen heteronuklearen Korrelationsexperimente (HMQC) bestätigt. Abbildung 49 zeigt die C-H-Korrelationen der 3-Nitropropionsäure und die Struktur des Moleküls.

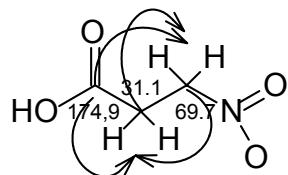


Abbildung 49: Die C-H-Korrelationen in 3-Nitropropionsäure.

Die NMR-Daten der 3-Nitropropionsäure sind in der Tabelle 20 aufgelistet (CD_6OD).

Tabelle 20: Die NMR-Daten der 3-Nitropropionsäure.

Atom. Nr.:	^{13}C -NMR	HMQC	^1H -NMR	3J [Hz]
1	174.96 s	2,3	-	-
2	69.66 t	3	4.72 t	6.0, 6.1
3	31.09 t	2	3.09 t	6.0, 6.1

Die 3-Nitropropionsäure ist ein toxischer Metabolit von Leguminosen, der auch von Pilzen der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* produziert wird. Sie kommt bei Pflanzen sowohl in freier Form als auch mit Glucose verestert vor.^[40] Die Säure wurde bereits von mehreren Naturstoffchemikern isoliert und auf biologische Aktivität untersucht. Sie zeigt sich als wirksames Mittel gegen *Mycobacterium tuberculosis*.^[48]

2.4 Der Pilzstamm 4295

2.4.1 Die 4-(2',3'-Dimethoxy-4'-methyl-phenyl)-4-oxo-Buttersäure

Mr.: 252.10

C₁₃H₁₆O₅

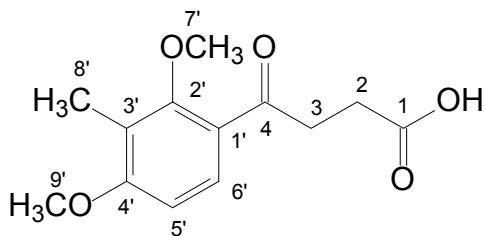


Abbildung 50: Die Struktur der Buttersäure.

Der literaturunbekannte Sekundärmetabolit wurde aus dem Pilzextrakt 4295 in der Menge von 1.4 mg als fester, gelber Stoff gewonnen. Die Substanz ist in polaren Lösungsmitteln wie Methanol und Wasser gut löslich, in Dichlormethan ist sie schlecht löslich. Der Naturstoff lässt sich mittels Sprühreagens "Bromkresolgrün" als eine Säure (gelber Fleck auf blauem Hintergrund) erkennen. Die Polarität der Verbindung (Kieselgel 60, R_f = 0.71, Dichlormethan/Methanol 95/5) macht sich durch den erhöhten R_f-Wert bemerkbar. Die Substanz ist durch UV-Licht (254 nm) detektierbar.

Die Interpretation der IR-Spektren führt zu dem Ergebnis, dass das Molekül eine aliphatische Kette (intensive Bande bei 2918 cm⁻¹) sowie eine aromatische Einheit und zwei Carbonylfunktionen (Absorptionsbanden bei 1669 und 1703 cm⁻¹) besitzt. Die Lage der Carbonylgruppen ist wegen ihrer Neigung zu intra- und intermolekularen Wechselwirkungen sehr variabel. Die relativ kurzwellige Absorbtion der Carbonylfunktionen kann durch Konjugation mit dem Aromaten erklärt werden. Die sehr breite Bande bei 3389 cm⁻¹ könnte für die Valenzschwingung einer OH-Gruppe in einer Wasserstoffbrücke sprechen. Zwei Absorptionsbanden unterschiedlicher Intensität eines Carboxylations bei 1595 (intensiv) und bei 1414 cm⁻¹ (schwach) sind ebenfalls zu finden.

Die Annahme, dass eine aromatische Verbindung vorliegt, wird durch die drei Absorptionsbanden bei 246 nm, 237 nm und 194 nm im UV-Spektrum bestätigt.

Das Massenspektrum liefert unter EI-Bedingungen (70 eV) ein Molekülpeak bei $m/z = 252$. Die hochauflösende Messung ergibt die Summenformel $C_{13}H_{16}O_5$. Als Basispeak tritt der Peak bei $m/z = 179$ auf. Die Summenformeldifferenz zwischen dem Molekülion und dem Basispeak erklärt sich durch Abspaltung des Fragments $C_3H_5O_2$ (Abb. 51). Vermutlich liegt eine α -Spaltung zu einem Heteroatom vor. Eine α -Bindung wird bevorzugt gespalten, wobei die Ladung durch das Heteroatom stabilisiert wird.

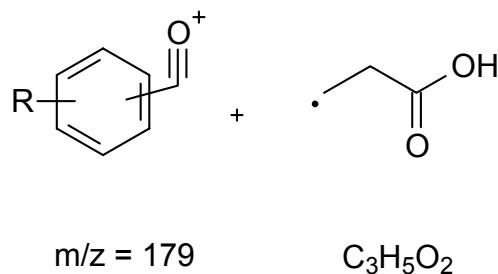


Abbildung 51: Die Erklärung des Basispeaks.

Die weitere Fragmentierung ($m/z = 91$) zeigt eine benzyliche Struktur. Der Peak bei $m/z = 149$ könnte durch die Abspaltung einer Methoxygruppe $[CH_3O+H]^+$ von dem Ion mit $m/z = 179$ erklärt werden. Allein aufgrund des Massenspektrums und des IR-Spektrums kann man einige Rückschlüsse auf die Struktur des Moleküls ziehen: Das Molekül enthält einen mehrfach substituierten Aromaten, eine aliphatische Kette, eine Säurefunktion und eine Carbonylfunktion.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum findet man 13 Signale für acht sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome, die übrigen Kohlenstoffatome sind sp^3 -hybridisiert. Zu den acht sp^2 -hybridisierten C-Atomen ist zu bemerken, dass 2 davon einer Carbonyl- und Carboxylfunktion entsprechen. Die sp^3 -hybridisierten C-Atome sind ebenso aufgrund ihrer chemischen Verschiebung in zwei Gruppen zu unterteilen: Zwei C-Atome haben ein Sauerstoffatom als Nachbarn, die drei übrigen nicht. Die NMR-Daten des Naturstoffes sind in Tabelle 21 aufgelistet.

Tabelle 21: Die NMR-Daten des Sekundärmetaboliten.

Atom. Nr.:	¹³ C-NMR	HMQC	¹ H-NMR	H,H-COSY
1	177.36	2, 3, 6'	1-OH s 12.48	
2	28.48	2 *, 3	t 2.75	3
3	36.95	2, 3 *	t 3.32	2
4	199.10	2, 3, 6'	-	
1'	124.86	6'	-	-
2'	163.36	1', 5', 6', 7', 9'	-	-
3'	120.39	6', 9'	-	-
4'	159.36	5', 6', 8', 9'	-	-
5'	102.02	5' *, 9'	d 6.67	6'
6'	128.90	6' *, 9'	d 7.62	5'
7'	61.95	7' *	s 3.87	-
8'	8.99	5', 9' *	s 2.16	-
9'	55.84	8' *	s 3.75	-

*- nicht unterdrückte direkte Kopplung

Die Chelatisierung des Säureprotons H-1 geht aus dem ¹H-NMR-Spektrum (12.48 ppm) hervor. Das ¹H-NMR-Spektrum erlaubt es, die direkte Nachbarschaft der Protonen H-5' und H-6' am Aromaten zu bestimmen (zwei Dublette bei 7.62 und 6.67 ppm mit der vicinalen Kopplungskonstante von $^3J = 8.7$ Hz). Die Substitution des Aromaten durch eine Methylgruppe (Singulett bei 2.16 ppm) stimmt mit dem Massenspektrum ($m/z = 91$) gut überein. Charakteristisch ist die Lage der zwei Methoxygruppen bei 3.87 und 3.75 ppm (spricht für eine direkte Substitution am sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatom).^[51] Als Fragment des Moleküls kann die unten abgebildete Struktur angenommen werden.

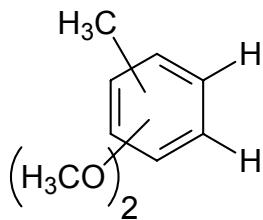


Abbildung 52: Das aromatische Fragment des Moleküls.

Zwei Triplette (3.32 und 2.75 ppm) mit der Kopplungskonstanten von ${}^3J = 6.5$ Hz sprechen für zwei benachbarte Methylengruppen. Die chemische Umgebung beider Methylengruppen kann die relative Tieffeldverschiebung erklären. Die weitere Aufdeckung des Molekülaufbaus gelingt mittels der 2D-NMR-Spektren (HMBC). Die long-range-Kopplungen der Carbonyl- und Carboxylkohlenstoffatome mit den Methylengruppen führen zum in Abbildung 53 dargestellten Fragment.

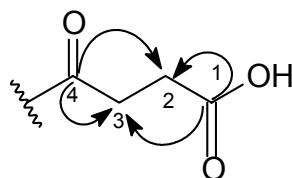


Abbildung 53: Der aliphatische Teil der Struktur.

Aussagen über die Verknüpfung der aliphatischen Kette mit dem Aromaten gelingen dank der heteronuklearen Fernkopplungen (HMBC, Abb. 54).

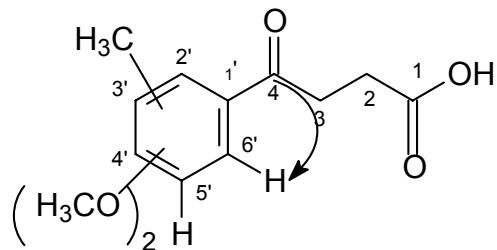


Abbildung 54: Die heteronuklearen Fernkopplungen der Substanz.

Der nächste Schritt ist die Zuordnung von zwei Methoxy- und einer Methylgruppe am Aromaten. Die drei möglichen Regioisomere sind nachstehend abgebildet.

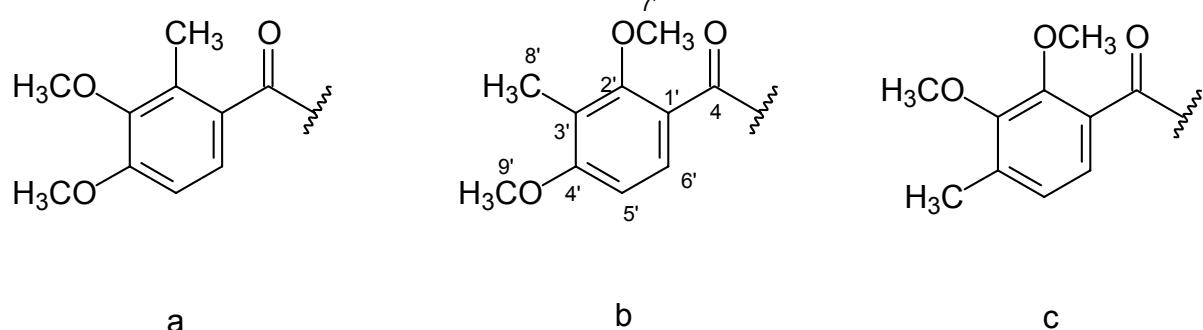


Abbildung 55: Drei mögliche Regioisomere des Naturstoffes.

Die quartären Kohlenstoffatome, an denen sich die Methoxygruppen befinden, zeigen eine chemische Verschiebung von 163.36 ppm (C-2') und 159.36 ppm (C-4'). Diejenige Methoxygruppe, die der Carbonylgruppe (C-4) am nächsten steht, sollte die Tieffeldverschiebung aufweisen.

Die Position der zweiten Methoxygruppe 9' kann nicht nur aufgrund von Fernkopplungen ermittelt werden. Die Kohlenstoffatome C-3' und C-4' weisen ähnliche Korrelationen zu den Protonen H-5', H-6', H-7'/H-8', H-9' auf. Logischerweise kann man annehmen, dass die Methoxygruppe 7' (61.95 ppm) wegen der Tendenz zur Tieffeldverschiebung des C-Atoms-2' mit dem Kohlenstoffatom C-2' direkt verknüpft ist. Die long-range-Korrelation zwischen C-Atom-2' und der Methoxygruppe 7' und diejenige zwischen dem C-Atom-4' (159.36 ppm) und der Methoxygruppe 9' (55.84 ppm) könnten eher für die Variante **b** in Abbildung 57 sprechen. Dennoch reicht diese Information nicht für eine sichere Lagebestimmung der Methoxygruppen aus. Einen wichtigen Beitrag zur Lösung dieser Frage leistet die heteronukleare Kopplung des C-Atoms-8' der Methylgruppe mit dem aromatischen Proton H-5' sowie auch die Kopplung des C-Atoms-5' mit den Methylprotonen H-8'.

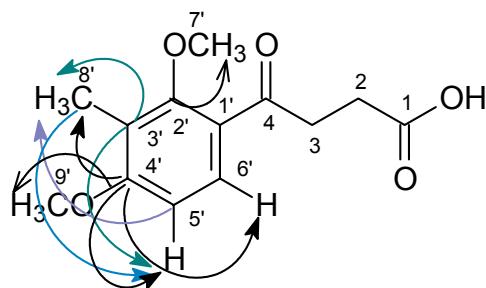


Abbildung 56: Die zu diskutierende Variante der Molekülstruktur und ihre relevanten Kopplungen.

Der entscheidende Punkt ist aber die chemische Verschiebung des C-Atoms C-5' (102.02 ppm). Diese signalisiert die direkte Nachbarschaft zu einer Methoxygruppe. Die Abbildung 57 zeigt die plausibelste Bauvariante mit den chemischen Verschiebungen aller C-Atome.

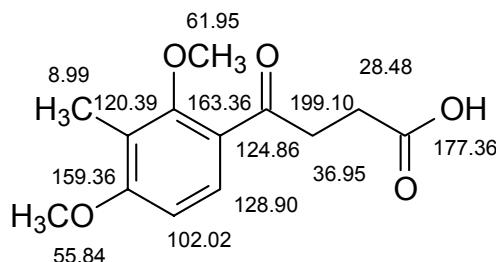


Abbildung 57: Die Struktur der aromatischen Säure mit Eintragungen der chemischen Verschiebungen.

2.4.2 Biologische Aktivität

Wegen Substanzmangels (1.4 mg) wurde der Naturstoff in der Technischen Universität Braunschweig nicht auf fungizide, algizide und bakterizide Wirkung getestet. Im übrigen zeigte der Pilzextrakt in biologischen Tests keine interessanten Eigenschaften.

3 Zusammenfassung und Ausblick

Die Dissertation beschäftigt sich mit der Isolierung von Naturstoffen aus Pilzextrakten und der Synthese von biologisch aktiven Naturstoffen.

Bei der Isolierung der Naturstoffe wurden insgesamt vier Pilzstämme bearbeitet.

Der erste Pilzstamm 4729 ist ein aus *Atropa Belladonna* isolierter Endophyt. Taxonomisch konnte der Pilzstamm nicht identifiziert werden. Aus diesem Pilzstamm konnten insgesamt sechs Sekundärmetabolite isoliert und identifiziert werden. Bei allen Substanzen handelt es sich um Vertreter der in der Literatur beschriebenen Klasse der Preussomerine. Drei der isolierten Preussomerine (Preussomerine J, K und L) sind literaturunbekannt. Die isolierten Preussomerine G–L wurden auf ihre fungizide, bakterizide und algizide Wirkung in der mikrobiologischen Abteilung der TU Braunschweig getestet. Alle Naturstoffe sind gegen das gram-positive Bakterium *Basillius megaterium* wirksam. Im Pharma-Grundscreening (BASF) konnten keine verfolgenswerten Wirkungen der oben genannten Preussomerine beobachtet werden. Die Preussomerine G, I, J, K und L zeigen im Mikrotest (Pflanzenschutz) gegen die Pilze *Phytophthora* und *Pyriculria* eine gute Wirkung. Besonders fällt im Mikrotest das Preussomerin G auf. Es wird auf Patentfähigkeit geprüft. In der Literatur sind bereits die pharmakologischen Wirkungen der Preussomerine G, H und J beschrieben. Sie erwiesen sich, besonders das Preussomerin G, als wirksame Hemmer der FTPase, können also die Entstehung von Tumoren hemmen.

Der zweite bearbeitete Pilzstamm 5049 konnte ebenfalls nicht taxonomisch bestimmt werden. Hieraus konnten insgesamt vier Sekundärmetaboliten isoliert werden. Einer hiervon, die 3-Nitropropionsäure, wurde bereits 1946 isoliert. Zwei weitere Naturstoffe, Cytochalasin L und X, gehören zu der Klasse der Cytochalasine. Das Cytochalasin L wurde schon in der Literatur beschrieben. Das Cytochalasin X kann als Hydrolyseprodukt von Cytochalasin L angesehen werden. Die Cytochalasine sind aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Eigenschaften interessant. Sie hemmen reversibel die Cytoplasmateilung (Cytokinese), aber nicht die Kernteilung (Mitose).

Zusammenfassung und Ausblick

Cytochalasine können zu vielkernigen Riesenzellen oder in höheren Konzentrationen zum Austritt des Kerns aus der Zelle führen. Sie hemmen in Säugetierzellen Bewegungsvorgänge, die mit der Mikrotubuli-Aggregation und der Actin-Filamenbildung zusammenhängen (z.B. Blutgerinnungsbildung durch Blutplättchen). Sie hemmen Phagozytose, Pinozytose bei Makrophagen, die Fortbewegung von Fibroblasten und Amöben, aber nicht die Muskelkontraktion. Weitere Wirkungen sind antibiotischer Natur.

Bei der Untersuchung des Cytochalasins L auf seine fungiziden, algiziden und bakteriziden Aktivitäten in der TU Braunschweig wurden keine interessanten Ergebnisse festgestellt (Cytochalasin X wurde aus Substanzmangel nicht getestet). Im Mikrotest (Pflanzenschutz, BASF) zeigte sich das Cytochalasin L als ein mittelstarkes Mittel gegen Phytophthora. Der letzte isolierte Sekundärmetabolit ist der Naturstoff „P“. Er ist strukturell besonders interessant, da er als Dimer vorliegt. Der Naturstoff gehört zu der Klasse von Anthraoiden, die von natürlich vorkommenden Anthracenen abgeleitet sind. Der Naturstoff zeigt im Pflanzenschutz-Screening (Mikrotest, BASF) starke fungizide Aktivität. Die Strukturaufklärung des Naturstoffes fordert eine chemische Umsetzung zu einem Veresterungsprodukt. Es entstand ein Diol, welches ebenfalls in der mikrobiologischen Abteilung der TU Braunschweig auf fungizide, algizide und bakterizide Wirkung getestet wurde. Es zeigte aber keine einschlägigen Aktivitäten.

Der dritte bearbeitete Pilzstamm 4295 konnte nicht taxonomisch bestimmt werden. Es wurden keine interessanten biologische Wirkungen des Pilzextraktes beobachtet. Aus diesem Pilz konnte aber ein Sekundärmetabolit isoliert werden: die literatur-unbekannte 4-(2',3'-Dimethoxy-4'-methyl-phenyl)-4-oxo-buttersäure. Da nur sehr geringe Substanzmengen isoliert wurden, konnte sie nicht auf seine biologische Aktivität getestet werden.

Der vierte und letzte bearbeitete Pilzstamm 4729 enthielt keine Sekundärmetaboliten und ist nicht biologisch aktiv.

Neben der Isolierung der Naturstoffe wurde die Synthese des Sekundärmetaboliten 8 optimiert. Eine Herstellung im Gramm-Maßstab ist möglich. Der Naturstoff 8 weist im

Zusammenfassung und Ausblick

pharmakologischen Grundscreening eine interessante biologische Aktivität als ICE-Inhibitor (interleukin-converting-enzyme) auf.

4 **Experimenteller Teil**

4.1 **Allgemeines zu den benutzten Analysen und Meßverfahren**

Die analytische Dünnschichtchromatographie wurde mit Kieselgel-Fertigfolien (Kieselgel 60) mit Fluoreszenzindikator (254 nm) oder mit RP-18-Octadecyl-modifizierten Phasen einer Schichtdichte von 0.2 bis 2.0 mm der Firma E. Merck AG, Darmstadt, durchgeführt. Die Detektion der Substanzen wurde durch UV-Licht (Löschung der Fluoreszenz des Indikators bei $\lambda = 254$ nm oder Anregung der Eigenfluoreszenz bei $\lambda = 366$ nm), durch Anwendung der Sprühreagentzien ermöglicht:

1. Cer (IV)-Molybdatophosphorsäure (Universalreagens):
Eine Lösung aus 10 g Cer-(IV)-sulfat, 25 g Molybdatophosphorsäure in 60 ml konz. H_2SO_4 und 940 ml H_2O .
2. 2,4-Dinitrophenylhydrazin für Aldehyde und Ketone:
1 g des 2,4-Dinitrophenylhydrazins wurden in 1000 ml Ethanol mit 5 ml H_2SO_4 (98%) aufgelöst. Aldehyde und Ketone bilden beim Erwärmen gelbe bis braune Flecken.
3. Bromkresolgrün für Säuren:
Eine 0.04 %ige Lösung von Bromkresolgrün in Isopropanol (Merck) entwickelt Säuren, die als intensiv gelber Fleck auf einem blauen Hintergrund erscheinen.
4. Eisen(III)-chlorid-Lösung in Ethanol:
Die Lösung wurde für die Anfärbung der Phenole (blaue Einfärbung der Substanz) bzw. der chelatisierten Hydroxygruppe (braune Einfärbung) benutzt.
5. Ninhydrin für Aminofunktionen:
Eine 0.2 %ige Lösung des Ninhydrins in Ethanol detektiert Aminogruppen.

Präparative Schichtchromatographie (PSC):

Für die präparative Schichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 und RP 18 beschichtete Fertigplatten der Schichtdicke von 0.2 bis 2.0 mm der Firmen Merck oder Schleicher & Schüll (20×20cm) verwendet.

Säulenchromatographie

Für die präparative Säulenchromatographie diente Kieselgel 60 (Korngröße 0.040–0.063 mm) der Firmen Merck KGaA oder Macherey-Nagel als stationäre Phase. Die Zusammensetzung von Laufmittelgemischen ist in den Vorschriften angegeben; alle Lösungsmittel wurden zuvor destilliert.

Solid Phase Extraktion (SPE)

Bei kleinen Substanzmengen (2-5 mg) und relativ großen Unterschieden der R_f -Werte wurden die fertigen SPE PR 18 Octadecyl-Säulen der Firma Merck AG, Darmstadt, angewendet. Die Säulen wurden je nach der Polarität und dem hydrophoben Charakter der Substanz entweder mit einem polaren Lösungsmittel (Methanol) oder einem unpolaren Lösungsmittel (Dichlormethan) konditioniert. Die Zusammensetzung der Lösungsmittel ist in den Vorschriften angegeben.

HPLC

Zur Lösung schwieriger Trennprobleme kam eine HPLC-Anlage der Fa. Merck/Hitachi zum Einsatz. Die Anlage besteht aus einer L-6000 Intelligent Pump, einem L-3000 Photo Diode Array Detektor, einem LC-Organizer 885-5931 mit dem Rheodyne 6-Wegeventil 7125 und dem Chromatographintegrator D 2000. Für die HPLC-Anlage wurden folgenden Fertigsäulen der Fa. Merck benutzt:

Hibar-Fertigsäule RT (250-25) LiChrosorb Si 60 (7 μ m)

Macherey-Nagel CC 125/4 Nucleosik 100-5 C-1

LiChrosorb Si 60 (5 μ m), Cat. 1.50388

LiChrosorb Si 60 (7 μ m), Cat. 50935

LiChrosorb Si 60 (7 μ m), Cat. 51435

Lichrospher 60 RPSelect B (10 μ m)

Alle Lösungsmittel wurden zusätzlich im Ultraschallbad (Lobson 200) entgast.

NMR-Spektroskopie

Zur Messung der NMR-Spektren dienten folgende NMR-Spektrometer:

Bruker DMX-600, ARX-400, AM-300 der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH Braunschweig

Bruker AMX-300, ARX-200 der Universität Paderborn

Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben und auf das TMS-Signal als inneren Standard bezogen. Die Abkürzungen für die Multiplizitäten lauten:

- (s) Singulett bzw. quartäres Kohlenstoffatom
- (d) Dublett bzw. tertiäres Kohlenstoffatom
- (t) Triplette bzw. sekundäres Kohlenstoffatom
- (q) Quartett bzw. primäres Kohlenstoffatom
- (m) Multiplett

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. Wray (GBF, Braunschweig) besonders für die Aufnahme der vielen NMR-Spektren und für ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Massenspektroskopie

Die Aufnahme der Massenspektren sowie die Bestimmung der Feinmassen erfolgte durch Herrn Dr. Schulze und Herrn Dr. Dülcks von der Universität Bielefeld an einem Finigan MAT 8200 (70 eV). Alle relativen Intensitäten sind auf den Basispeak bezogen (ist jeweils in Klammern angeben).

Den genannten Personen sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Röntgenstrukturanalyse

Die Röntgenstrukturanalysen erfolgten durch Herrn Dr. U. Flörke (Uni Paderborn), dem ich hiermit herzlich danke.

UV/VIS-Spektroskopie

Die UV-Spektren wurden mit einem Shimazu UV-2101 PC UV-VIS-Spektralphotometer gemessen.

Optische Rotation

Experimenteller Teil

Die Drehwerte wurden unter Verwendung einer Natriumlampe (D-Linie, $\lambda = 589$ nm) in einer nichtthermostatisierten Standardküvette ($d = 1$ dm) bestimmt. Dafür wurde das Polarimeter 241 der Fa. Perkin-Elmer benutzt. Für die angegebenen Drehwerte wurden die verwendeten Lösungsmittel und ihre Konzentration benannt.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren mit einer Schmelzpunktbestimmungsapparatur der Fa. Gallenkamp bestimmt und sind unkorrigiert.

Mikrobiologische Arbeitsmethoden

Die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Aust, Institut für Mikrobiologie der TU Braunschweig, fertigte die Rohextrakte der Pilzstämme an. An dieser Stelle möchte ich für die geleistete Arbeit Frau Dr. Schulz, Frau Qunxiu Hu und Herrn Dr. S. Dräger meinen besonderen Dank aussprechen.

Anzucht der Pilzstämme

Die ausgewählten Pilzstämme wurden entweder auf einem Biomalzweichagar- oder Malzextraktweichagar-Nährmedium kultiviert. Für diese Zwecke wurden 200 oder 250 ml des Mediums in Fernbachkolben bei ca. 120 °C und 2 bar sterilisiert. Anschließend wurde der Pilz von einer Schrägagarkultur überimpft und bis zu 122 Tage lang inkubiert.

Zusammenfassung der Aktivitätstests

Für die Beurteilung der biologischen Aktivität der untersuchten Pilzextrakte wurden verschiedene biologische Aktivitätstests durchgeführt:

das Biogramm

der Agardiffusionstest

der Keimlingstest

Als Erstes wird für den Pilzextrakt ein **Biogramm** erstellt. Dazu werden verschiedene Dünnschichtchromatogramme (unterschiedliche Laufmittel) mit einer Suspension des

Testorganismus (*Cladosporium cucumernum*) besprüht (6%ige Biomalzlösung) und in einer Feuchtkammer zwei bis drei Tage lang inkubiert. Die schwarze Einfärbung des DCs zeigt die Produktion und den Ort fungizider Substanzen noch vor der präparativen Trennung an.

Unter dem **Agardiffusionstest**/Plättchentest versteht man die Untersuchung des Pilzextraktes oder der Reinsubstanzen auf fungizide, bakterizide und algizide Aktivität. Die benötigte Konzentration der untersuchten Probe in Methanol oder Aceton beträgt gewöhnlich 1mg/ml oder 10 mg/ml. Für die Untersuchung werden Filterplättchen mit dem Kulturfiltrat getränkt und auf die Oberfläche von Hartagarplatten gelegt. Diese werden mit einer Suspension der Testorganismen besprüht.

Tabelle 22: Testorganismen für das Screening.

Bakterien	Pilze	Algen
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Ustilago maydis</i>	<i>Chlorella fusca</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Eurotium repens</i>	
<i>Mycothypha microspora</i>		
<i>Fusarium oxysporum</i>		

Die zu untersuchenden Substanzen diffundieren ins Agar und hemmen je nach der Aktivität der Substanz das Wachstum der Testorganismen. Bei den Bakterien und Pilzen können die Ergebnisse nach zwei bis drei Tagen, bei Algen der Art *Chlorella fusca* nach sieben Tagen abgelesen werden. Dabei ist die Größe des Hemmhofs von Bedeutung.

Für den **Keimlingstest** werden die Pflanzen *Medicago sativa* (Luzerne) und *Lepidium sativum* (Gartenkresse) genommen. 0.75 ml der zu testenden Substanz werden in 6.75 ml Wasser aufgenommen, auf eine Petrischale pipettiert und mit Filterpapier bedeckt. Auf das Filterpapier werden die Samen der Pflanzen gelegt. Die Beurteilung des Testes erfolgt anhand der Zahl der gekeimten Samen, sowie der Länge der Keimlinge im Vergleich zu einer Referenzplatte (ohne Testsubstanz).

4.2 Die Synthese des Sekundärmetaboliten 2,6-Dihydroxy-8-methoxy-3-oxo-3,4,5,6-tetrahydronaphthalin-1-carbaldehyd

Der Sekundärmetabolit **8** besitzt ein Tetralongerüst. Der Naturstoff **8** weist im pharmakologischen „Grundscreening“ gute Werte als ICE-Inhibitor auf.^[52] Die Stereochemie des Naturstoffs konnte wegen der geringen Substanzmenge nicht bestimmt werden. Die Analyse der NMR-Daten deutet nur auf die axiale Anordnung der Hydroxygruppe am Cyclohexenonring. Der Naturstoff ist optisch aktiv und besitzt einen Drehwert von $[\alpha]^{20}_D = - 28.6^\circ$ ($c = 0.1$; CH_2Cl_2).^[24] Die Synthese des Sekundärmetaboliten wurde am Beispiel eines Racemates nach einem von Dr. K. Beckmann eingeführten Schema dahingehend optimiert, dass nun präparative Darstellung im größeren Maßstab möglich ist. Das retrosynthetische Schema ist in Abbildung 58 dargestellt.

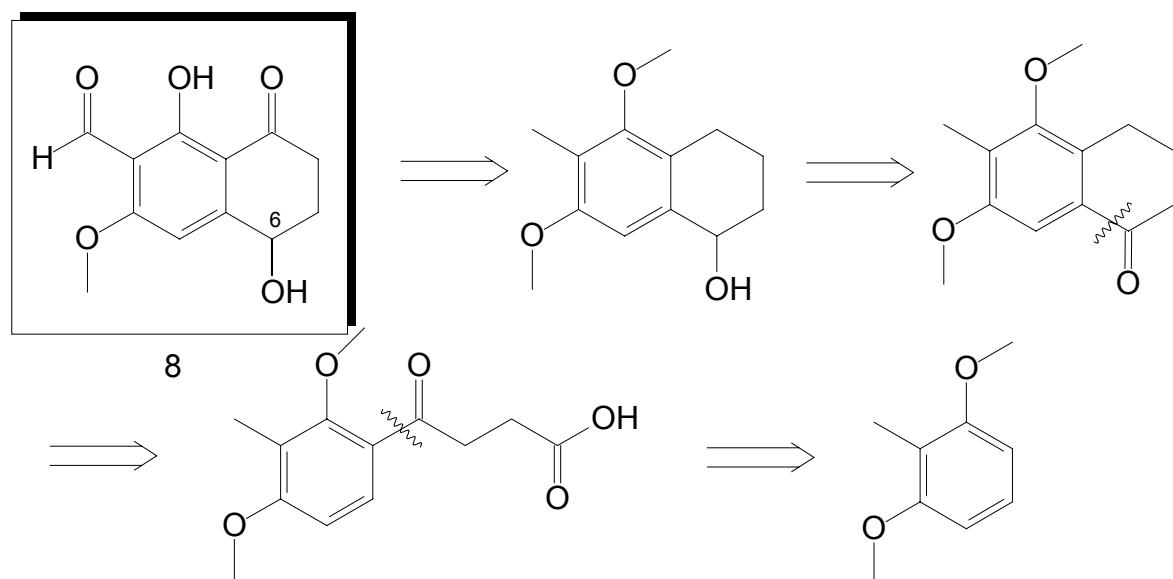
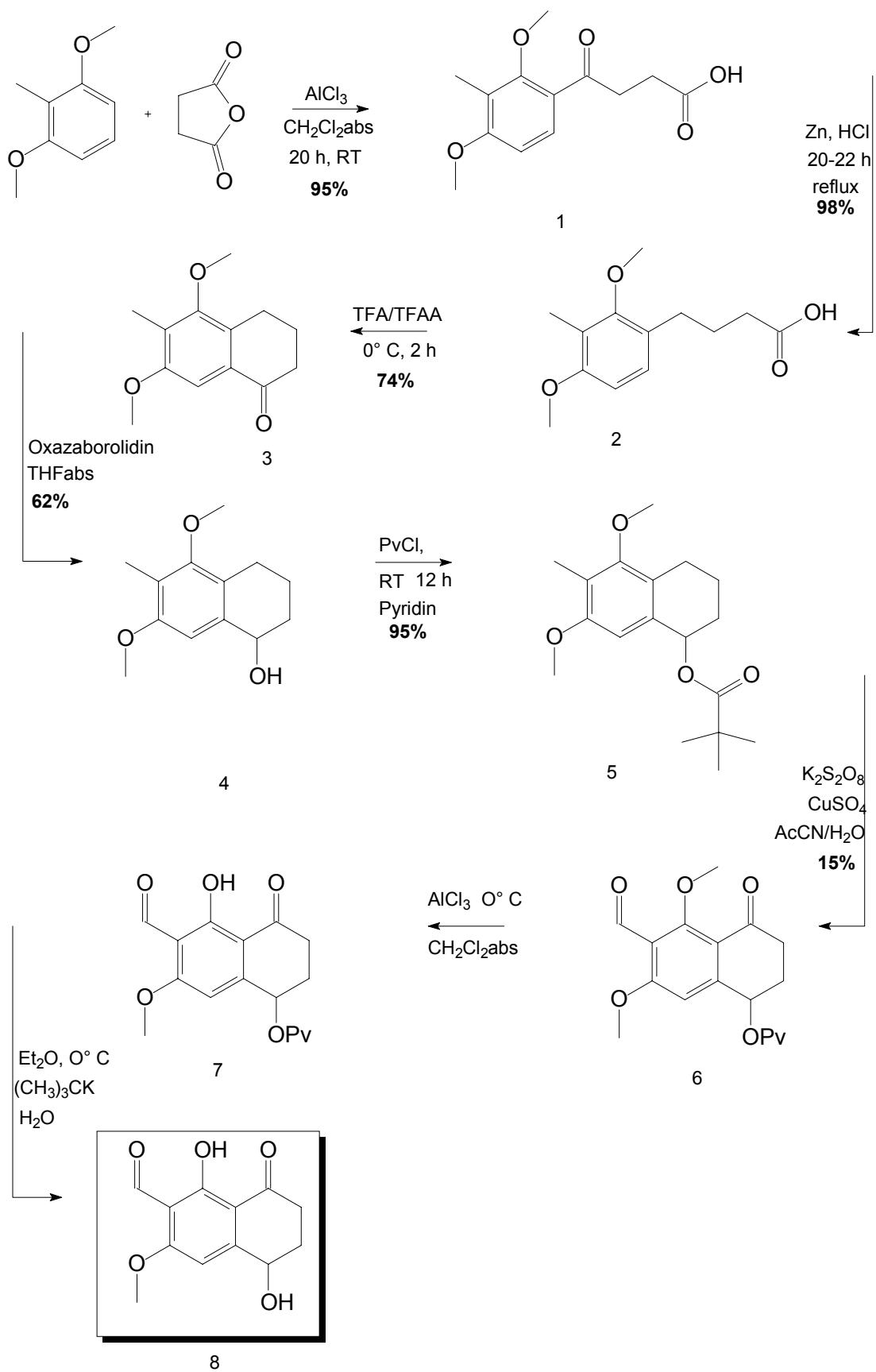


Abbildung 58: Die Retrosynthese des Sekundärmetaboliten.

Die Vorteile dieses Syntheseplans sind :

- Geringe Zahl der Stufen
- Die überwiegende Zahl der Reaktionen ist klassisch und liefert gute Ausbeuten.



Schema 8: Die Synthese des Sekundärmetaboliten **8** mit Ausbeuten.

Die Synthese der 4-Oxobuttersäure **1** (Schema 8) gelingt mit quantitativen Ausbeuten von 95% über die Friedel-Crafts-Acyllierung. Ausgehend vom käuflichen 2,6-Dimethoxytoluol und von Bernsteinsäureanhydrid kann man in $\text{CH}_2\text{Cl}_{2\text{abs}}$ nach 20-stündigem Röhren bei RT die Säure **1** erhalten. Die Desoxygenierung nach Clemmensen zur Verbindung **2** muss unter Kontrolle der Menge der HCl_{konz} durchgeführt werden. Die Salzsäure soll portionsweise nach 1-2 Stunden zugetropft werden. Wichtig ist dabei die vorherige Amalgamierung des Zn mit $\text{HgCl}_2/\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$. Die Reaktion verläuft im wäßrigen Medium unter Rückfluß innerhalb von 20 bis 22 Stunden (Ausbeute: 99%). Bei Überdosierung der Salzsäure tritt oft als Nebenreaktion die sauerkatalysierte Abspaltung einer der Methoxygruppen auf. Dieser Schritt wird bei dem Ringschluss mit TFA/TFAA als O-Acyllierung (Abb. 59) deutlich.

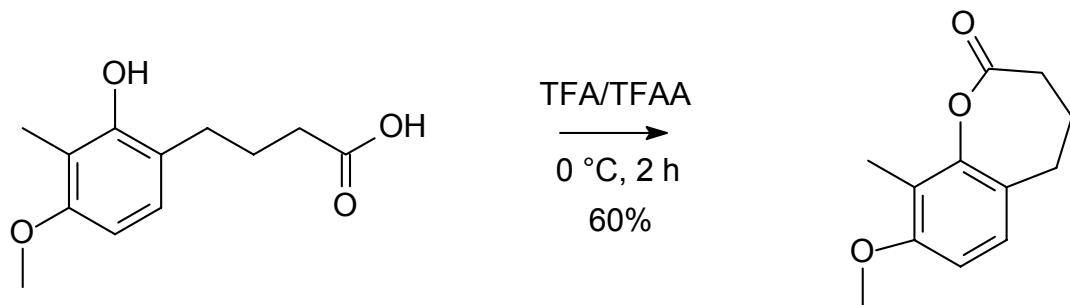


Abbildung 59: Der schematische Verlauf der O-Acyllierung als Nebenreaktion.

Das Auftreten dieser Reaktion kann aber bei richtiger Dosierung der Salzsäure unter DC- und ^1H -NMR-Reaktionskontrolle vermieden werden. Der Ringschluss von **2** zum Tetralon **3** verläuft unter saurer Katalyse mit TFA/TFAA und führt zu 74 % chemischer Ausbeute.

Da die absolute Konfiguration des Sekundärmetaboliten nicht bestimmt worden ist, wurde die Synthese aus Kostengründen am Beispiel des (*R*)-Alkohols durchgeführt. Die enantioselektive Reduktion des Tetralons **3** zum Tetralol **4** (*R*) erfolgt mit dem von Corey et al. entwickelten Oxazaborolidin **12** (CBS-Methode, Abb. 60).^[6, 53, 54] Der chirale Katalysator kann erhalten werden, wenn man vom käuflichen (*S*)-(—)- α -Diphenylprolinol (1.5 eq) ausgeht und es mit Trimethylboroxine (1.0 eq) in Toluol nach dem in Abbildung 60 dargestellten Mechanismus umsetzt.^[54] Die enantioselektive Reduktion des prochiralen Ketons **3** (Schema 8) erfolgt erst bei der

Zugabe des Diborans (in THF, Abb. 60-61) zum Pyrrolidin **11**. Infolgedessen ist die entstehende Verbindung **12** (ein CBS-Katalysator, Corey, Bakshi, Shibata) in der Lage, wegen der Voraktivierung mit $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ eine Hydridübertragung zu starten (Abb. 60). Der andere Vorteil dieses Katalysators ist seine Stabilität bei RT.^[55, 6] Corey wies auf die gleichen ee-Werte bei der TR und bei tieferen Temperaturen (-80° C) hin. Die Reaktionszeiten dauern bei RT von 5 bis 20 min.^[53, 54, 56, 57, 58, 59, 60]

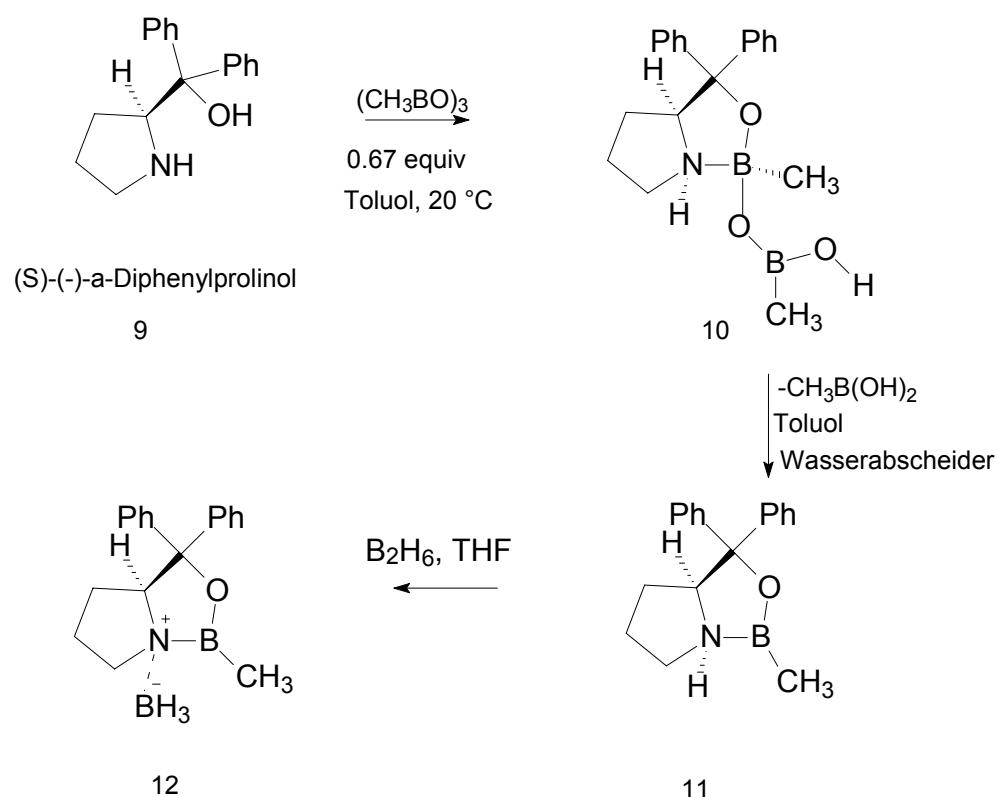


Abbildung 60: Der Mechanismus der Oxaborolidinons-Synthese **12** (CBS-Katalysator).^[61]

Das Zwischenprodukt **10** wurde nicht isoliert. Die zweimalige azeotrope Destillation des Zwischenproduktes **10** in Toluol bei 130° C lieferte unter Abspaltung der in Wasser gut löslichen Methylboronsäure die Verbindung **12**.^[62] Das verbrückte bicyclische chirale Fünfringsystem und die Chelatisierung des Sauerstoffatoms durch das B-Atom sorgen für die Enantioselektivität der Reaktion. Die Reduktion eines prochiralen Ketons zu Enantiomeren reinem (R)-Alkohol unter Mitwirkung des

chiralen CBS-Katalysators ist in der Literatur am Beispiel der aromatischen Ketone ausführlich beschrieben.^[63]

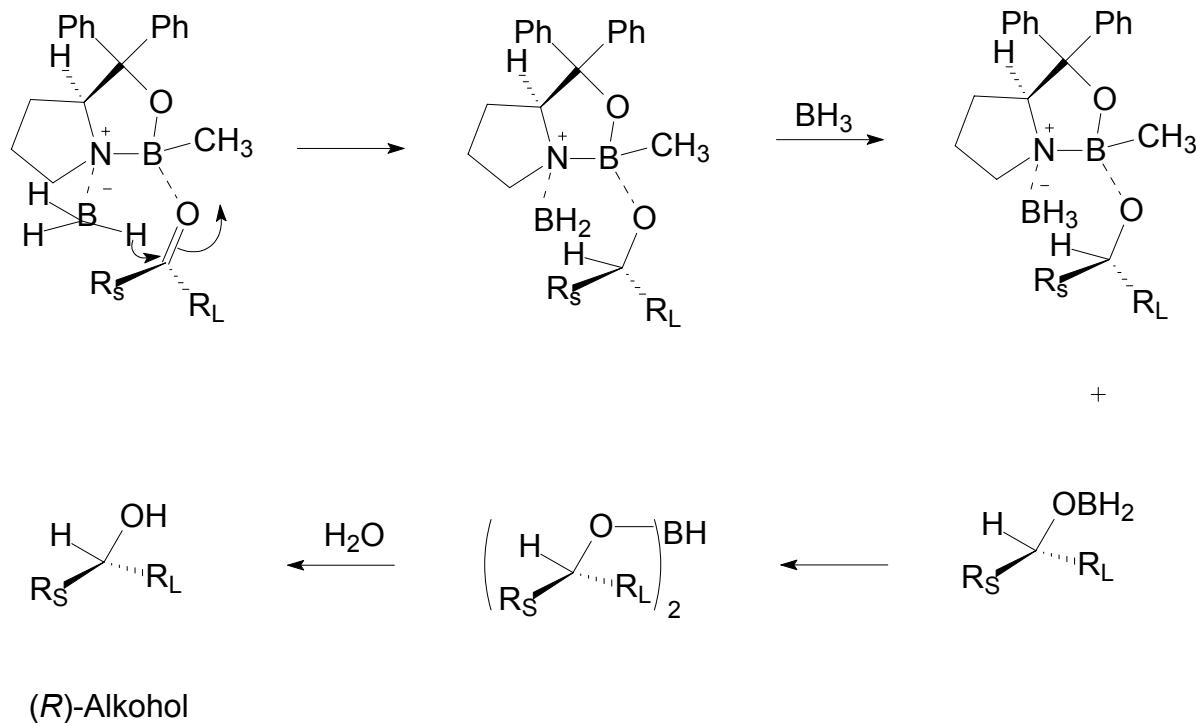


Abbildung 61: Die enantioselektive Reduktion des prochiralen Ketons unter CBS-Katalyse.^[42]

Die nach Abbildung 60 und 61 durchgeführte Reduktion des Ketons 3 führte zu 72 % chemischer Ausbeute. Der ee-Wert konnte mit chiraler Hydrodексäule nicht bestimmt werden. Der Drehwert des Alkohols wurde mit $[\alpha]^{20}_D = 0$ ($c = 0.07$; CH_2Cl_2) bestimmt. Möglicherweise muß die Reduktion bei tieferen Temperaturen ausprobiert werden. Die weitere Reduktion des Tetralons 3 wurde mit $LiAlH_4$ durchgeführt.

Nach der Reduktion des Tetralons 3 zum Alkohol 4 wird dieser mit Pivaloylchlorid zum geschützten Produkt 5 weiterentwickelt. Die Oxidation der beiden nichtfunktionalisierten benzylischen Stellen zum Aldehyd 6 ist in der ganzen Synthese wegen der zahlreichen Nebenprodukte und schlechten Ausbeuten der schwierigste Schritt.^[52, 64] Die Oxidation der beiden benzylischen Stellen wurde von Dr. K. Beckmann mehrmals durchgeführt. Aus der großen Zahl der Oxidationsmöglichkeiten wurde die radikalische Oxidation mit Kaliumperoxodisulfat unter der Katalyse von $Cu(II)SO_4$ ausgewählt, weil diese Reaktion die besten Ausbeuten lieferte (30%).^[52] Alle Variationen der Menge des Oxidationsmittels und des Katalysators sowie der Temperatur und der Reaktionszeiten brachten als

Ergebnis, dass sich als Hauptprodukt das Keton **13** (Ausbeute 30-40%) bildet (Abb. 62).

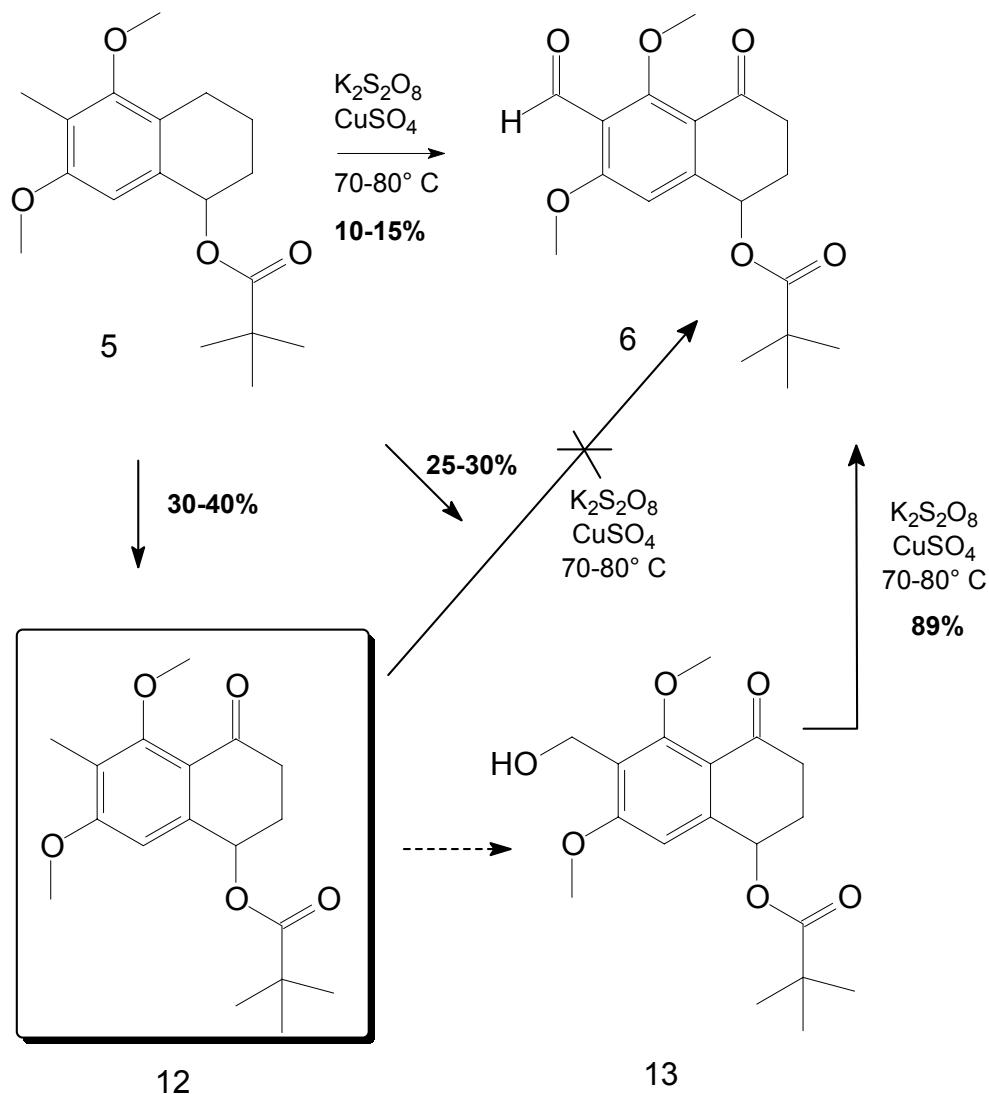


Abbildung 62: Die Oxidation des geschützten Alkohols 5 zum Aldehyd 6.

Für den Fall, dass die Ausbeuten beim Schritt **5** nach **6** nicht verbessert werden können, muss das retrosynthetische Schema geändert werden. Der Mechanismus der radikalischen Oxidation mit $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{Cu}(\text{II})$ verläuft in folgenden Schritten:^[65]

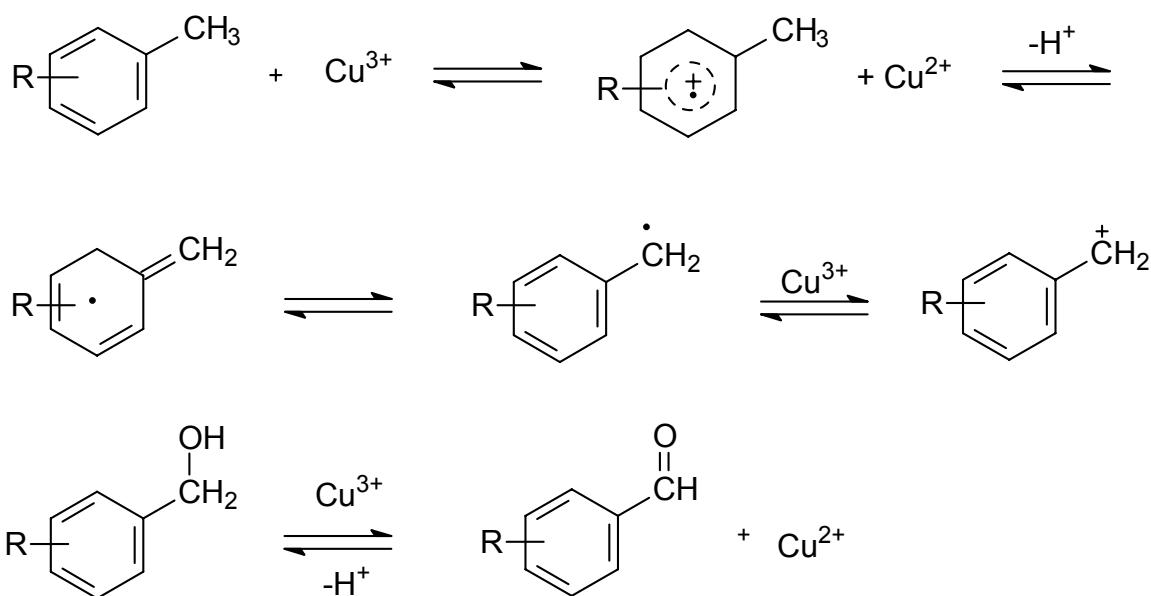


Abbildung 63: Der Mechanismus der radikalischen Oxidation.^[65]

Der Mechanismus zeigt, dass die Reaktion in mehreren Stufen verläuft. Die Annahme, dass die Reaktion von der Verbindung **5** über **12** zur Verbindung **6** abläuft (Abb. 62), hat sich nicht bestätigt. Daher wurden nach Feststellung der Verbindung **12** im Reaktionsgemisch der Oxidationsmittel (4 eq.) und ein Katalysator (0.40 eq) zusätzlich zugegeben. Die Reaktion dauerte bei 70-80° C bis zu 17 Stunden (Lit.: 2-3 h).^[65] Es wurde keine Steigerung der Ausbeute beobachtet.

Die Isolierung aus dem Reaktionsgemisch des Alkohols **13** erklärt der in Abbildung 62 dargestellte Mechanismus. Die Umsetzung des Alkohols **13** zum Aldehyd **6** mit 2 eq. des Oxidationsmittels und 0.10 eq. des Katalysators liefert das gewünschte Produkt **6** in sehr guten Ausbeuten. Dadurch kann die gesamte Ausbeute des Aldehyds **6** bis auf 40-45 % gesteigert werden.

Die durch die Behandlung von **6** mit der Lewis-Säure AlCl_3 ($\text{CH}_2\text{Cl}_{2\text{abs}}$) bewirkte selektive Methyletherspaltung an der Position C-8 liefert das Phenol **7**.^[66] Der Grund für die Regioselektivität der Spaltung liegt wahrscheinlich in dem stabileren Übergangszustand des AlCl_3 -Komplexes, der von zwei Sauerstoffatomen komplexiert

wird. Die Durchführung der Reaktion mit 5 eq. von AlCl_3 bei RT (4 Tage) liefert das Phenol **7** (Schema 8) in einer chemischen Ausbeute von 60 %.

Die Entschützung des Esters **7** mit sensibler Aldehydfunktion wurde nach dem Verfahren durchgeführt, das sich besonders für sterisch gehinderte Ester bewährt hat. Die Reaktionszeiten der Verseifung sind unterschiedlich (2-48 h).^[65,67] Die Verseifung von **7** (1 mol) mit Kalium-*tert*-Butylat (8 mol) und Wasser (2 mol) in THF_{abs} zeigt nach 5 h keine Umsetzung; bei längeren Zeiten wurde die Destruktion des Eduktes beobachtet. Der Reaktionsschritt soll weiter optimiert werden.

Die Zusammenfassung der Synthese:

1. Die präparative Herstellung des Naturstoffs **8** in größerem Maßstab ist bei Optimierung des letzten Schrittes möglich.
2. Die Durchführung der Oxidation unter Berücksichtigung des Alkohols **13** führt zum gewünschten Aldehyd in einer Gesamtausbeute von 40-45 %.
3. Die enantioselektive Reduktion des prochiralen Ketons soll bei tieferen Temperaturen durchgeführt werden.

4.3 Die analytischen Daten der Naturstoffe

4.3.1 Die analytischen Daten des Preussomerins L

Der systematische Name ist in der Literatur durch einen trivialen Namen ersetzt.

R_f -Wert = 0.61 (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5).-

Schmelzpunkt: 171-173 °C.-

Drehwert: $[\alpha]^{25}_D = -557$ °, (c 0.11, CH₂Cl₂).-

IR (KBr) ν = 3382, 2925, 2851, 1722, 1649, 1434, 1044, 870 cm⁻¹.-

UV (CH₂Cl₂): λ_{max} (lg ε) = 359 (2.96), 315 (2.89), 258 (3.52), 226 (3.61), 194 (2.92) nm.-

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 2.99 (dd, 1H, J = 18.3 Hz, J = 2.7 Hz, 2b'-H), 2.97 (dd, 1H, J = 18.3 Hz, J = 2.7 Hz, 2b-H), 3.39 (s, 1H, 3'-OH), 3.49 (dd, 1H, J = 3.2 Hz, J = 18.3 Hz, 2a'-H), 3.59 (dd, 1H, J = 3.2 Hz, J = 18.3 Hz, 2a-H), 3.68 (s, 1H, 3'-OH), 4.75 (dd, 2H, 3,3'-H), 6.97 (d, 1H, J = 9.2 Hz, 8-H), 7.16 (d, 1H, J = 9.2 Hz, 7-H), 7.21 (dd, 1H, J = 8.2 Hz, J = 1.0 Hz, 7'-H), 7.48 (t, 1H, 8'-H), 7.63 (dd, 1H, J = 7.8 Hz, J = 1.0 Hz, 9'-H), 10.16 (s, 1H, 10-OH).-

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 43.21 (t, C-2/C-2'), 43.56 (t, C-2'/C-2), 70.76 (d, C-3/C-3'), 70.97 (d, C-3'/C-3), 95.66 (s, C-4), 95.71 (s, C-4'), 114.15 (s, C-10), 119.55 (s, C-5), 121.08 (d, C-8), 121.55 (d, C-9'/C-8'), 121.65 (d, C-8'/C-9'), 122.63 (d, C-7'), 126.89 (d, C-7), 132.12 (s, C-5'/C-10'), 132.22 (s, C-10'/C-5'), 144.41 (s, C-6), 152.33 (s, C-6'), 158.10 (s, C-9), 195.98 (s, C-1'), 202.24 (s, C-1)

Summenformel: C₂₀H₁₄O₈

Molmasse: 382.07 g mol⁻¹.-

HRMS(EI): (*m/z*) = 382.06795
382.06888

berechnet
gefunden.-

4.3.2 Die analytischen Daten des Preussomerins K

R_f -Wert = 0.17 (SiO₂, CH₂Cl₂).-

Schmelzpunkt: wegen öliger Konsistenz kein Schmelzpunkt bestimmbar.-

Drehwert: $[\alpha]^{25}_D = -150$ °, (c 0.04, CH₂Cl₂).-

IR ν = 3415, 2924, 2846, 1708, 1465, 1419, 1274, 1025, 932 cm⁻¹ .-

UV (CH₂Cl₂): λ_{max} (lg ε) = 363 (1.11), 314 (1.23), 250 (1.64), 260 (1.45), 230 (1.86) nm.-

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.03 (dd, 1H, J = 2.7 Hz, J = 18.3 Hz, H-2'_b), 3.37 (dd, 1H, J = 3.3 Hz, J = 18.3 Hz 2'a-H), 3.84 (d, 1H, J = 4.0 Hz, 3-H), 3.53 (s, 1H, 3'-OH), 4.26 (d, 1H, J = 4.0 Hz, 2-H), 4.84 (t, 1H, J = 3.3 Hz, J = 2.7 Hz, 3'-H), 6.94 (d, 1H, J = 9.2 Hz, 8-H), 7.02 (d, 1H, J = 9.2 Hz, 7-H), 7.05 (dd, 1H, J = 8.1 Hz, J = 1.0 Hz, 7'-H), 7.39 (t, 1H, 8'-H), 7.65, (dd, 1H, J = 7.7, J = 1.0 Hz, 9'-H), 10.12 (s, 1H, 9-OH).-

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 41.30 (t, C-2'), 52.17 (d, C-3), 53.67 (d, C-2), 70.28 (d, C-3'), 93.58 (s, C-4), 94.38 (s, C-4'), 110.26 (s, C-10), 115.04 (s, C-5), 119.81 (s, C-5'), 121.13 (d, C-9'), 120.32 (d, C-7), 121.52 (d, C-7'), 126.46 (d, C-8), 130.85 (d, C-10'), 131.15 (d, C-8'), 142.52 (s, C-6), 149.73 (s, C-6'), 156.06 (s, C-9), 193.39 (s, C-1'), 195.64 (s, C-1).-

Summenformel: C₂₀H₁₂O₈

Molmasse: 380.05 g mol⁻¹ .-

HRMS(EI) (*m/z*): = 380.05347
380.05322

gefunden
berechnet.-

4.3.3 Die analytischen Daten des Preussomerins I

R_f -Wert = 0.43 (SiO₂, CH₂Cl₂).-

Drehwert: $[\alpha]^{25}_D = -218^\circ$, (c 0.08, CH₂Cl₂), für ein Gemisch aus den Preussomerinen I und J.-

IR-Daten: $\nu = 3389, 2919, 2852, 1734, 1641, 1263, 1098, 1031, 922, 798 \text{ cm}^{-1}$.-

UV-Daten(CH₂Cl₂): $\lambda (\lg \epsilon) = 360 (2.14), 319 (2.14), 253 (2.70), 228 (2.85) \text{ nm}.$ -

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.99$ (s, 3H, 12-H), 3.05 (dd, 1H, $J = 18.8 \text{ Hz}$, $J = 2.9 \text{ Hz}$, 2'b-H), 3.47 (dd, 1H, $J = 18.8 \text{ Hz}$, $J = 3.3 \text{ Hz}$, 2'a-H), 3.82 (d, 1H, $J = 4.0 \text{ Hz}$, 3-H), 4.23 (d, 1H, $J = 4.0 \text{ Hz}$, 2-H), 5.93 (t, 1H, 3'-H), 6.95 (d, 1H, $J = 9.1 \text{ Hz}$, 8-H), 7.05 (d, 1H, $J = 9.14 \text{ Hz}$, 7-H), 7.09 (dd, 1H, $J = 8.2 \text{ Hz}$, $J = 1.0 \text{ Hz}$, 7'-H), 7.44 (t, 1H, 8'-H), 7.68 (dd, 1H, $J = 7.9 \text{ Hz}$, $J = 1.0 \text{ Hz}$, 9'-H), 10.12 (s, 1H, 10-OH).-

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 20.94$ (q, C-12), 40.26 (t, C-2'), 52.07 (d, C-3), 53.48 (d, C-2), 70.62 (d, C-3'), 92.20 (s, C-4'), 93.08 (s, C-4), 110.20 (s, C-10), 115.69 (s, C-5), 119.75 (s, C-5'), 120.74 (d, C-9'), 120.89 (d, C-7'), 121.46 (d, C-8), 121.76 (d, C-8'), 126.43 (d, C-7), 131.14 (s, C-10'), 142.49 (s, C-6), 149.66 (s, C-6'), 156.40 (s, C-9), 169.40 (s, C-11), 192.42 (s, C-1'), 195.58 (s, C-1).-

Summenformel: C₂₂H₁₄O₈ Molmasse: 422.06 g mol⁻¹.-

HRMS(EI) : (m/z) = 422.06320	gefunden
422.06378	berechnet.-

4.3.4 Die analytischen Daten des Preussomerins H

R_f -Wert = 0.5 (SiO₂, CH₂Cl₂).-

Drehwert: $[\alpha]^{25}_D = -233^\circ$ (c 0.04, CH₂Cl₂, 20° C) Lit.: -371° (c 0.07, CH₂Cl₂)^[1].-

IR (KBr) ν = 3394; 2919; 2851; 1729; 1667; 1470; 1020; 956 cm⁻¹.-

UV (CH₂Cl₂): λ (lg ϵ) = 371 (3.27), 310 (3.19), 250 (3.78), 229 (3.79) nm.-

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.51 (m, 1H, ²J = 18.7 Hz, ³J = 13.6 Hz, ³J = 5.5 Hz, 3b'-H), 2.81 (m, 1H, ²J = 18.7 Hz, ³J = 5.5 Hz, ³J = 1.8 Hz, 3'a-H), 2.88 (m, 1H, ²J = 18.7 Hz, ³J = 5.5 Hz, ³J = 1.8 Hz, 2'b-H), 3.26 (m, 1H, ²J = 18.7 Hz, ³J = 13.6 Hz, ³J = 5.5 Hz, 2'a-H), 3.82 (d, 1H, J = 4.0 Hz, 3-H), 4.21 (d, 1H, J = 4.0 Hz, 2-H), 6.93 (d, 1H, J = 9.2 Hz, 8-H), 7.03 (d, 1H, J = 9.2 Hz, 7-H), 7.06 (dd, 1H, J = 7.4 Hz, J = 1.0 Hz, 7'-H), 7.39 (t, 1H, J = 7.7 Hz, J = 7.4 Hz, 8'-H), 7.64 (dd, 1H, J = 7.7, J = 1.0 Hz, 9'-H), 10.12 (s, 1H, 1-H).-

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 32.70 (t, C-3'); 33.67 (t, C-2'); 52.14 (d, C-3); 53.65 (d, C-2); 93.58 (s, C-4); 93.88 (s, C-4'); 109.97 (s, C-10); 115.43 (s, C-5); 120.95 (s, C-5'); 121.38 (d, C-9'); 121.42 (d, C-8); 121.89 (d, C-7'); 126.34 (d, C-7); 130.76 (d, C-10'); 131.09 (d, C-8'); 143.65 (s, C-6); 148.25 (s, C-4); 155.96 (s, C-9); 194.51 (s, C-1'); 195.40 (s, C-1).-

Summenformel: C₂₀H₁₂O₇ Molmasse: 364.06 g mol⁻¹.-

HRMS(EI) (*m/z*) = 364.05829 berechnet
364.05750 gefunden.-

4.3.5 Die analytischen Daten des Preussomerins G

R_f -Wert = 0.62 (SiO₂, CH₂Cl₂).-

Schmelzpunkt: 221-226 °C Lit.: 222-225° C.-

Drehwert: $[\alpha]^{25}_D = -173$ °, (c=0.03, CH₂Cl₂) Lit.: -688 °, (c=0.66, CH₂Cl₂)^[1].-

IR (KBr) ν = 3395, 2919, 2851, 1740, 1662, 1470, 900, 810, 750 cm⁻¹.-

UV-Daten (CH₂Cl₂): λ (lg ε) = 367 (3.05), 309 (2.96), 255 (3.56), 232 (3.46), 196 (2.93) nm.-

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.84 (d, 1H, J = 4.0 Hz, 2-H), 4.24 (d, 1H, J = 4.0 Hz, 3-H), 6.59 (d, 1H, J = 10.1 Hz, 3'-H), 6.95 (d, 1H, J = 9.2 Hz, 8-H), 7.03 (d, 1H, J = 7.9 Hz, 8'-H), 7.05 (d, 1H, J = 9.2 Hz, 7-H), 7.24 (d, 1H, J = 10.1 Hz, 2'-H), 7.41 (t, 1H, J = 7.9 Hz, J = 7.9 Hz, 7'-H), 7.62, (dd, 1H, J = 7.9, J = 1.2 Hz, 9'-H), 10.22 (s, 1H, 1-H).-

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 52.17 (d, C-3), 53.70 (d, C-2), 89.98 (s, C-4'), 93.96 (s, C-4), 109.82 (s, C-5), 115.21 (s, C-10), 120.59 (s, C-5'), 120.70 (d, C-9'), 120.86 (d, C-7'), 121.31 (d, C-8), 126.73 (d, C-7), 130.32 (d, C-10'), 131.15 (d, C-8'), 133.57 (d, C-2'), 140.73 (d, C-3'), 143.39 (s, C-6), 148.76 (s, C-6'), 156.11 (s, C-9), 183.73 (s, C-1'), 195.45 (s, C-1).-

Summenformel: C₂₀H₁₀O₇ Molmasse: 362.04 g mol⁻¹.-

HRMS (EI) (*m/z*) = 362.04266 berechnet
362.04158 gefunden.-

4.3.6 Die analytischen Daten des Preussomerins J

R_f -Wert = 0.71 (CH_2Cl_2).-

Schmelzpunkt: 130-132 °C, farblose Kristalle.-

Drehwert: $[\alpha]^{25}_D = -37^\circ$, ($c = 0.006$, CH_2Cl_2).-

IR (KBr) $\nu = 3417, 2920, 2854, 2515, 1734, 1648, 1445, 1258, 1040, 918, 813, 750 \text{ cm}^{-1}$.-

UV (CH_2Cl_2): $\lambda(\lg \varepsilon) = 366 (1.59); 315 (1.52); 290 (1.62); 250 (2.15); 240 (2.15); 228 (2.21) \text{ nm.}$ -

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.05$ (dd, H, $^3J = 3.1 \text{ Hz}$, $^2J = 18.3 \text{ Hz}$, 2'b-H); 3.35 (dd, 1H, $^2J = 18.3 \text{ Hz}$, $^2J = 3.1 \text{ Hz}$, 2'a-H); 3.84 (d, 1H, $J = 4.1 \text{ Hz}$, 3-H), 3.53 (s, 3H, 3'OCH₃); 3.29 (d, 1H, $J = 4.1 \text{ Hz}$, 2-H); 4.33 (t, 1H, $J = 3.1 \text{ Hz}$, $J = 3.1 \text{ Hz}$ 3'-H); 6.94 (d, 1H, $J = 9.2 \text{ Hz}$, 8-H); 7.02 (d, 1H, $J = 9.2 \text{ Hz}$, 7-H); 7.05 (dd, 1H, $J = 8.2 \text{ Hz}$, $^4J = 1.0 \text{ Hz}$, 7'-H); 7.39 (t, 1H, $J = 7.7 \text{ Hz}$, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 8'-H); 7.65 (dd, 1H, $J = 7.7 \text{ Hz}$, $^4J = 1.0 \text{ Hz}$, 9'-H); 10.12 (s, 1H, 1-H).-

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 40.41$ (t,C-2'); 52.17 (d, C-2); 53.67 (d, C-3); 59.38 (d, C-3'OCH₃); 79.28 (d, C-17); 93.58 (s, C-4); 94.38 (s, C-4'); 110.26 (s, C-5); 115.44 (s, C-10); 119.23 (s, C-5'); 120.13 (d, C-9'); 120.32 (s, C-10'); 121.58 (d, C-8'); 126.46 (d, C-7); 130.85 (d, C-8); 131.15 (d, C-7'); 142.50 (s, C-6'); 149.73 (s, C-6); 155.06 (s, C-9); 193.39 (s, C-1'); 195.64 (s, C-1).-

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{O}_8$.-

Molmasse: $394.07 \text{ g mol}^{-1}$.-

HRMS(EI) (m/z) = 394.06888
394.06855

berechnet
gefunden.-

4.3.7 Die analytischen Daten des Naturstoffs P

R_f -Wert = 0.43 (SiO₂, CH₂Cl₂).-

Schmelzpunkt: 201-203° C.-

Drehwert: $[\alpha]^{25}_D = +36^\circ$ C, (c 0.3, CH₂Cl₂).-

IR-Daten: $\nu = 3060; 2969; 1747; 1614; 1585; 1469; 1220; 1045; 917 \text{ cm}^{-1}$.-

UV-Daten(CH₂Cl₂): $\lambda (\lg \epsilon) = 345 (78), 325 (86), 270 (47) \text{ nm}$.-

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.99$ (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, 11-H), 1.98 (s, 3H, 14-H), 2.04 (s, 3H, 16-H), 2.33 (m, 2H, 6-H), 2.37 (m, 1H, 7-H), AB-Signal ($\Delta\delta = 0.11$, $\delta_A = 4.27$, d, 1H, $^2J = 12.76$, 12a-H, $\delta_B = 4.16$, d, 1H, $^2J = 12.76$ Hz, 12b-H), 5.41 (s, 1H, 5-H), 6.56 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, 2-H), 7.43 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, 3-H), 11.48 (s, 1H, 1-OH), 14.07 (s, 1H, 8-OH).-

¹³C-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 17.91$ (q, C-11), 20.84 (q, C-14), 21.07 (q, C-16), 27.98 (d, C-6), 33.60 (t, C-7), 64.99 (t, C-12), 70.77 (d, C-5), 80.78 (s, C-10a), 100.53 (s, C-8a), 106.67 (s, C-4), 109.92 (d, C-2), 115.78 (s, C-9a), 141.57 (d, C-3), 154.25 (s, C-4a), 161.93 (s, C-1), 169.99 (s, C-15), 170.47 (s, C-13), 178.08 (s, C-8), 188.16 (s, C-9).-

Summenformel: C₂₁H₁₄O₈.-

Molmasse: 394.07 g mol⁻¹.-

HRMS(EI) (*m/z*) = 750.21599
750.21463

berechnet
gefunden.-

4.3.8 Die analytischen Daten des Diols

R_f -Wert = 0.53 (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95/5).-

Schmelzpunkt: Öl.-

Drehwert: $[\alpha]^{25}_D = -31^\circ$, (c 0.13, CH₂Cl₂).-

IR ν = 3429, 2956, 2876, 1731, 1644, 1463, 1434, 1387, 1272, 1033 cm⁻¹ .-

UV (CH₂Cl₂): λ_{max} (lg ε) = 329 (4.0), 269 (3.65) nm.-

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.14 (d, 3H, J = 6.7 Hz, 11-H), 2.11 (m, 1H, J = 6.3, Hz, J = 11.0 Hz, 6-H), 2.33 (dd, 1H, J = 11.0 Hz, J = 19.2 Hz, 7a-H), 2.50 (dd, 1H, J = 6.3 Hz, J = 19.2 Hz, 7b-H), AB-Signal ($\Delta\delta$ = 0.45, δ_A = 3.84, d, 1H, 2J = 13.0 Hz, 12a-H, δ_B = 3.39, d, 1H, 2J = 13.0 Hz, 12b-H), 5.29 (d, 1H, J = 0.7 Hz, 5-H), 6.60 (d, 1H, J = 8.6 Hz, 2-H); 7.27 (d, 1H, J = 8.6 Hz, 3-H); 11.55 (s, 1H, 1-OH); 14.01 (s, 1H, 8-OH).-

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 17.77 (q, C-11), 28.48 (d, C-6), 32.80 (t, C-7), 64.37 (t, C-12), 68.87 (d, C-5), 84.41 (s, C-10a); 100.72 (s, C-8a), 107.14 (s, C-4); 110.85 (d, C-2), 116.25 (s, C-9a), 139.23 (d, C-3), 154.17 (s, C-4a), 161.98 (s, C-1), 179.70 (s, C-8), 188.03 (s, C-9).-

Summenformel: C₃₀H₃₀O₁₂

Molmasse: 582.17 g mol⁻¹.-

HRMS(EI) (*m/z*) = 582.17404
582.17373

gefunden
berechnet.-

4.3.9 Die analytischen Daten des Cytochalasins L-696.476

R_f -Wert = 0.43 (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 97/3).-

Schmelzpunkt: 204-207° C.-

Drehwert: $[\alpha]^{25}_D = +9^\circ$, (c 0.58, CH₂Cl₂).-

IR-Daten: $\nu = 2950, 2921, 1741, 1691, 1454, 1230, 1027, 966, 700 \text{ cm}^{-1}$.-

UV-Daten(CH₂Cl₂): $\lambda (\lg \epsilon) = 269 (35) \text{ nm}$.-

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.92$ (d, 3H, $J = 7.0 \text{ Hz}$, H-11), 1.00 (d, 3H, $J = 7.0 \text{ Hz}$, H-23), 1.01 (d, 3H, $J = 7.0 \text{ Hz}$, H-22), 1.38 (m, 1H, H-16), 1.36 (m, 1H, H-17b), 1.60 (m, 1H, H-17a), AB-Signal ($\delta = 0.21, 1.96$, dd, 1H, $J = 11.0 \text{ Hz}$, $J = 4.9 \text{ Hz}$, H-15a, $J = 11.0 \text{ Hz}$, $J = 10.9 \text{ Hz}$, H-15b), 2.08 (m, 1H, H-18), 2.12 (t, 1H, $J = 4.0 \text{ Hz}$, H-4), 2.21 (s, 3H, H-25), AB-Signal ($\Delta\delta = 0.04$, $\delta_a = 2.64$, dd, 1H, $J = 13.4 \text{ Hz}$, $J = 4.3 \text{ Hz}$, H-10a, $\delta_b = 2.60$ dd, 1H, $J = 13.4 \text{ Hz}$, $J = 10.0 \text{ Hz}$, H-10b), 2.87 (m, 1H, H-5), 2.88 (m, 1H, $J = 10.1 \text{ Hz}$, $J = 10.5 \text{ Hz}$, H-8), 3.24 (m, 1H, $J = 4.3 \text{ Hz}$, $J = 4.0 \text{ Hz}$, $J = 10.0 \text{ Hz}$, H-3), 3.82 (d, 1H, $J = 10.5 \text{ Hz}$, H-7), 5.10 (s, 1H, H-12a), 5.30 (m, 1H, $J = 16.4 \text{ Hz}$, $J = 10.9 \text{ Hz}$, $J = 4.9 \text{ Hz}$, H-14), 5.35 (s, 1H, H-12b), 5.45 (s, 1H, H-2), 5.54 (d, 1H, $J = 2.4 \text{ Hz}$, H-21), 5.70 (m, 1H, $J = 16.4 \text{ Hz}$, $J = 5.2 \text{ Hz}$, $J = 2.1 \text{ Hz}$, H-19), 5.76 (m, 1H, $J = 16.4 \text{ Hz}$, $J = 10.5 \text{ Hz}$, $J = 1.0 \text{ Hz}$, H-13), 5.96 (dd, 1H, $J = 16.4 \text{ Hz}$, $J = 2.4 \text{ Hz}$, H-20), 7.13 (dd, 2H, $J = 7.1 \text{ Hz}$, $J = 1.4 \text{ Hz}$, H-28/30), 7.22 (t, 1H, H-29), 7.33 (dd, 2H, $J = 7.1 \text{ Hz}$, $J = 2.2 \text{ Hz}$, H-27/31).-

¹³C-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 14.31$ (q, C-11), 20.90 (q, C-25), 22.13 (q, C-22), 25.30 (q, C-23), 33.01 (d, C-5), 33.42 (d, C-16), 34.27 (d, C-18), 42.55 (t, C-15), 45.74 (t, C-10), 47.34 (d, C-8), 48.44 (t, C-17), 50.70 (d, C-4), 51.86 (s, C-9), 53.76 (d, C-3), 69.60 (d, C-7), 78.62 (d, C-21), 113.89 (t, C-12), 125.49 (d, C-20), 127.10 (d, C-29), 127.51 (d, C-13), 128.99 (d, C-27/31), 129.04 (d, C-28/30), 135.91 (d, C-19), 137.56 (s, C-26), 138.43 (d, 14), 148.17 (s, C-6), 170.13 (s, C-24), 174.31 (s, C-1).-

Summenformel: C₃₀H₃₉O₄N Molmasse: 477.29 g mol⁻¹.

HRMS(EI) (*m/z*) = 477.28790 berechnet
477.28972 gefunden.-

4.3.10 Die analytischen Daten des Cytochalasins X

R_f-Wert = 0.36 (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95/5).--

Schmelzpunkt: 132-134° C.-

Drehwert: $[\alpha]^{25}_D = +16^\circ$, (c 0.4, CH_2Cl_2). -

IR-Daten: $\nu = 3373, 2948, 2921, 1684, 1436, 1028, 970, 700 \text{ cm}^{-1}$ -

UV-Daten(CH_2Cl_2): λ ($\lg \varepsilon$) = 283 (25), 280 (25) nm.-

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.98 (d, 3H, J = 7.0 Hz, H-22), 1.01 (d, 3H, J = 7.0 Hz, H-23), 1.06 (d, 3H, J = 6.7 Hz, H-11), 1.37 (m, 1H, H-16), AB-Signal (Δδ = 0.31, δ_a = 1.72, m, 1H, H-17a, δ_b = 1.41, m, 1H, H-17b), AB-Signal (Δδ = 0.21, δ_a = 1.97, m, 1H, H-15a, δ_b = 1.76, m, 1H, H-15b), 2.15 (m, 1H, H-18),), AB-Signal (Δδ = 0.34, δ_a = 2.92, dd, 1H, J = 13.4 Hz, J = 10.4 Hz H-10a, δ_b = 2.58, dd, 1H, J = 13.4 Hz, J = 3.7 Hz, H-10b), 2.61 (dd, 1H, J = 4.7 Hz, J = 2.4 Hz, H-4), 2.81 (t, 1H, H-8), 2.91 (m, 1H, H-53.27 (m, 1H, H-3), 3.82 (d, 1H, J = 11.0 Hz, H-7), 4.17 (br. s, 1H, H-21), 5.10 (s, 1H, H-12b), 5.25 (m, 1H, J = 15.5 Hz, J = 11.0 Hz, J = 4.7 Hz, H-14), 5.33 (s, 1H, H-12a), 5.45 (s, 1H, H-2), 5.76 (dd, 1H, J = 15.5 Hz, J = 10.0 Hz, H-13), 5.90 (m, 1H, J = 16.4 Hz, J = 6.5 Hz, J = 2.2 Hz, H-19), 6.19 (dd, 1H, J = 16.4 Hz, J = 2.7 Hz, H-20), 7.23 (t, 1H, J = 6.6 Hz, J = 1.4 Hz, H-27), 7.30 (m, 2H, J = 7.4 Hz, J = 1.4 Hz, H-25/29), 7.45 (m, 2H, H-26/28).-

¹³C-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 14.22 (q, C-11), 22.47 (q, C-22), 25.22 (q, C-23), 33.10 (d, C-5), 33.52 (d, C-16), 34.17 (d, C-18), 42.33 (t, C-15), 45.76 (t, C-10), 46.16 (d, C-8), 48.33 (t, C17), 50.18 (d, C-4); 53.13 (s, C-9), 53.87 (d, C-3), 69.79 (d, C-7), 77.26 (d, C-21), 113.63 (t, C-12), 131.23 (d, C-20), 128.94 (d, C-29/25), 127.08 (d, C-13), 128.04 (d, C-27), 129.15 (d, C-28/26), 134.32 (d, C-19), 137.81 (s, C-24/18), 137.81 (d, 14), 148.6 (s, C-6), 175.81 (s, C-1).-

Summenformel: C₂₈H₃₇O₃N Molmasse: 435.28 g mol⁻¹.-

HRMS(EI) (*m/z*) = 435.27734 berechnet
435.27701 gefunden.-

4.3.11 Die analytischen Daten der 3-Nitropropionsäure

R_f-Wert = 0.70 (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95/5).-

Schmelzpunkt: 62-64° C Lit.: 64-65° C.-

IR-Daten: ν = 3396, 2917, 1727, 1556, 1259 cm⁻¹.-

UV-Daten(CH₂Cl₂): λ (lg ϵ) = 360 (2.14), 319 (2.14), 253 (2.70), 228 (2.85) nm.-

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.09 (t, 2H, *J* = 6.1 Hz, H-3), 4.72 (t, 2H, *J* = 6.1 Hz, *J* = 6.0 Hz, H-2).-

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 174.96 (q, C-1), 69.66 (t, C-3), 31.09 (t, C-3).-

Summenformel: C₃H₅O₄N Molmasse: 119.08 mol⁻¹.-

4.3.12 Die analytischen Daten der 4-(2',3'-Dimethoxy-4'-methyl-phenyl)-4-oxo-Buttersäure

R_f -Wert = 0.71 (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95/5).-

IR (KBr) ν = 3321, 2918, 2844, 1709, 1662, 1595, 1454, 1424, 1266, 1111, 1024, 809 cm⁻¹.-

UV-Daten (CH₂Cl₂): λ (lg ϵ) = 246 (3.39), 237 (3.35), 194 (0.57).-

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.16 (s, 3H, 8'-H), 2.75 (t, 2H, J = 6.5 Hz, 2-H), 3.32 (t, 2H, J = 6.5 Hz, 3-H), 3.75 (s, 3H, 9'-H), 3.87 (s, 3H, 7'-H), 6.67 (d, 1H, J = 8.7 Hz, 5'-H), 7.67 (d, 1H, J = 8.7 Hz, 6'-H).-

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 8.99 (q, C-8'), 28.48 (t, C-2), 36.95 (t, C-3), 55.84 (q, C-9'), 61.95 (q, C-7'), 102.02 (d, C-5'), 120.39 (s, C-3'), 124.86 (s, C-1'), 128.90 (d, C-6'), 159.36 (s, C-4'), 163.36 (s, C-2'), 177.36 (s, C-1), 199.10 (s, C-4).-

Summenformel : C₁₃H₁₆O₅

Molmasse : 252.10.-

HRMS(EI) (m/z) = 252.09977

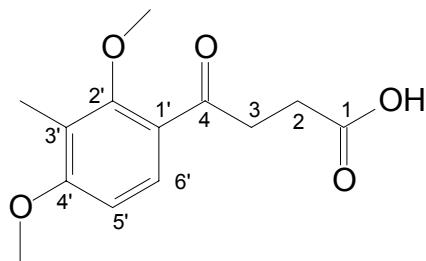
berechnet

252.10028

gefunden.-

4.4 Totalsynthese des Naturstoffes 2,6-Dihydroxy-8-methoxy-3-oxo-3,4,5,6-tetrahydronaphthalin-1-carbaldehyd

4.4.1 4-(2',4'-Dimethylphenyl)-4-oxobutansäure 1



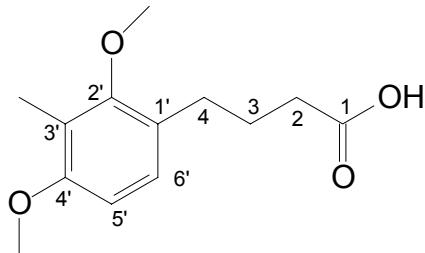
1

2,6-Dimethoxytoluol (20.00 g, 0.13 mol) und Bernsteinsäureanhydrid (13.01 g, 0.13 mol) werden mit AlCl_3 (34.658 g, 0.26 mol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_{2\text{abs}}$ bei 0° C portionsweise versetzt. Die Mischung wird 20 Stunden lang bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch die Zugabe von HCl/Eiswasser abgebrochen. Für die Aufarbeitung soll der pH-Wert auf 1 gestellt werden. Die organische Phase wird mehrmals mit Wasser extrahiert und über MgSO_4 getrocknet. Nach dem Einengen erhält man ein hellgelbes Öl. Ausbeute: 31.122 g (95%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.65$ (d, 1H, $^3J = 8.85$ Hz, H-6'), 6.71 (d, 1H, $^3J = 8.85$, H-5'), 3.90 (s, 3H, H-7'), 3.78 (s, 3H, H-9'), 3.35 (t, 2H, $^3J = 6.10$ Hz, H-3), 2.79 (t, 2H, $^3J = 6.10$ Hz, H-2), 2.18 (s, 3H, H-8').-

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 199.40$ (s, C-4), 162.69 (s, C-2'), 159.69 (s, C-4'), 129.39 (s, C-1'), 125.18 (d, C-6'), 120.72 (s, C-3'), 106.44 (d, C-5'), 62.35 (q, C- OCH_3), 56.22 (q, C- OCH_3), 37.28 (t, C-3), 28.96 (t, C-2), 9.4 (q, C- CH_3).-

4.4.2 4-(2',4'-Dimethoxy-3'-methylphenyl)-butansäure 2



Zink (10.4 g, 0.16 mol) wird mit HgCl₂ (0.005 g, 0.0002 mol) in Wasser/HCl durch Ultraschallbad 5 min aktiviert.

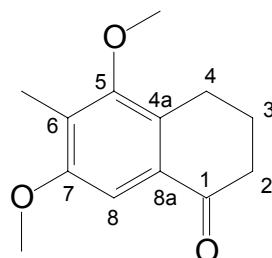
Zu 20.0 g (0.08 mol) Buttersäure **2** wird die Suspension aus Zn und HgCl₂ in Wasser gegeben. Das Gemisch wird unter Rückfluss 20-22 Stunden lang gekocht und nach jeder Stunde portionsweise mit HCl (2 ml, 0.004 mol) versetzt. Die heiße Mischung wird filtriert; das Zn wird mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach Abkühlen wird das Filtrates mehrmals mit CH₂Cl₂ extrahiert. Falls die Ausbeuten nicht befriedigend sind, wird es mit CH₂Cl₂ zusätzlich einige Stunden lang gerührt. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und eingeengt. Das Produkt liegt als hellgelbes Öl vor.

Ausbeute: 19.60 g (98 %)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.00 (d, 1H, ³J = 8.40 Hz, H-6'), 6.63 (d, 1H, ³J = 8.40 Hz, H-5'), 3.84 (s, 3H, H-OCH₃), 3.75 (s, 3H, H-OCH₃), 2.68 (t, 2H, ³J = 7.47 Hz, H-2), 2.43 (d, 2H, ³J = 7.47 Hz, H-4), 2.19 (s, 3H, H-CH₃), 1.97 (t, 2H, ³J = 7.47 Hz, H-3).-

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 181.21 (s, C-1), 157.34 (s, C-2'/4'), 157.67 (s, C-4'/2'), 127.45 (s, C-1'), 126.64 (d, C-6'), 120.03 (s, C-3'), 106.57 (d, C-5'), 61.08 (q, C-OCH₃), 61.03 (q, C-OCH₃), 34.45 (t, C-2), 29.30 (t, C-4), 26.34 (t, C-3), 9.63 (q, C-CH₃).-

4.4.3 5,7-Dimethoxy-6-methyl-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on 3



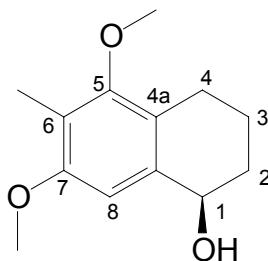
3

Die Butansäure **2** (20.00 g, 0.08 mol) wird bei 0° C in TFA aufgenommen und eine Stunde lang gerührt. Nach einer Stunde wird 1.0 eq TFAA (25.02 ml, 0.08 mol) zugetropft und 1 Stunde lang bei 0° C weiter gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in eine gesättigte Eisswasser-Natriumhydrogencarbonatlösung gegossen. Die wäßrige Mischung wird mehrmals mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mittels 5%iger NaOH gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wird mit Hilfe von PS (Petrolether/Dichlormethan 1/99) gereinigt.

Ausbeute: 14.73 g (74%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.36$ (s, 1H, H-8), 3.90 (s, 3H, H- OCH_3), 3.76 (s, 3H, H- OCH_3), 2.95 (t, 2H, $^3J = 6.07$ Hz, H-2), 2.67 (t, 2H, $^3J = 6.51$ Hz, H-4), 2.25 (s, 3H, H- CH_3), 2.11 (dd, 2H, $^3J = 6.07$ Hz, $^3J = 6.51$ Hz, H-3).-

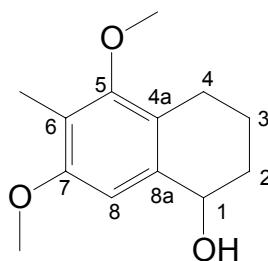
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 198.57$ (s, C-1), 157.48 (s, C-5/7), 156.78 (s, C-7/5), 131.80 (s, C-8a), 131.10 (s, C-4a), 127.07 (s, C-6), 103.61 (d, C-8), 60.60 (q, C- OCH_3), 56.12 (q, C- OCH_3), 39.35 (t, C-2), 23.54 (t, C-3/4), 23.49 (t, C-4/3), 10.10 (q, C- CH_3).-

4.4.4 (R)-5,7-Dimethoxy-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalin-1-ol **4**

4

Das Tetralon **3** (10 mg, 0.045 mol) wird in THF_{abs} aufgenommen. Zu dieser Lösung wird unter Schutzgasatmosphäre eine Lösung aus 0.05 eq. des Pyrrolidinons **11** (0.1 mg, 0.023 mmol) und B₂H₆*THF (1.5 Mol in THF, 0.0014 mmol, 0.92 ml) innerhalb von wenigen Minuten getropft. Nach 15-20 Minuten wird die Reaktion mit 0.5 N HCl in MeOH gequencht, mit CH₂Cl₂ extrahiert, abgetrennt und über MgSO₄ getrocknet. Der Alkohol liegt in Form eines farblosen Feststoffes vor.

Ausbeute: 6.2 mg (62 %), $[\alpha]^{20}_D = 0^\circ$, kein R-Alkohol.

4.4.5 5,7-Dimethoxy-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalin-1-ol **4**

4

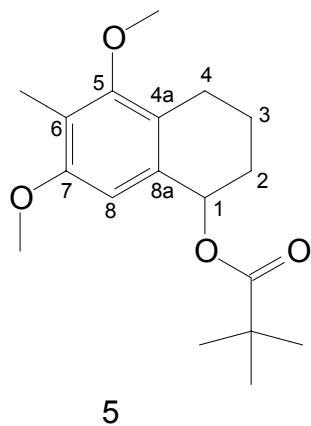
Zur Lösung aus **3** (1.00 g, 0.0048 mol) in THF_{abs} wird unter Schutzgasatmosphäre rasch ½ eq. von LiAlH₄ (0.091 g, 0.0024 mol) gegeben. Die erhaltene Suspension wird bei RT 2 h gerührt und anschliessend mit 2 N HCl hydrolisiert bis keine Wasserstoffentwicklung mehr beobachtet werden kann. Das Reaktionsgemisch wird mehrmals mit CH₂Cl₂ extrahiert und über MgSO₄ getrocknet.

Ausbeute: 0.75 g (75 %), farbloses Öl.

¹H-NMR (CDCL₃): δ = 6.79 (s, 1H, H-8), 4.72 (t, 1H, ³J = 4.65 Hz, H-1), 3.84 (s, 3H, H-OCH₃), 3.76 (s, 3H, H-OCH₃), 2.70 (m, 2H, H-4), 2.16 (s, 3H, H-CH₃), 1.85 (m, 4H, H-2, 3).-

¹³C-NMR (CDCL₃): δ = 157.28 (s, C-5/7), 156.95 (s, C-7/5), 137.90 (s, C-8a), 123.01 (s, C-4a), 119.35 (s, C-6), 106.30 (d, C-8), 68.88 (d, C-1), 60.16 (q, C-OCH₃), 56.02 (q, C-OCH₃), 32.84 (t, C-4), 23.51 (t, C-2), 19.11 (t, C-3), 9.37 (q, C-CH₃).-

4.4.6 5,7-Dimethoxy-6-methyl-1-pivaloyloxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalin 5



5

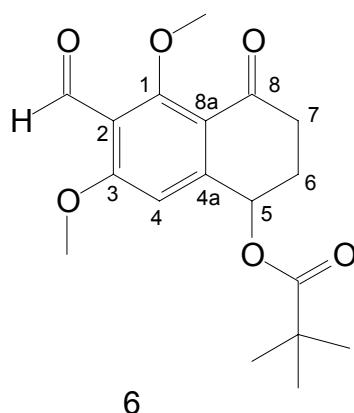
Tetralol **4** (0.745 g, 0.0034 mol) wird in Pyridin_{abs} bei 0° C gelöst. Zu dieser Lösung gibt man 1.2 eq. (0.61 ml, 0.0041 mol) des Pivaloylchlorids. Die Mischung lässt man bei RT 12 h röhren. Das Reaktionsgemisch wird anschließend mit 2 N HCl angesäuert und mehrmals mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit NH₄Cl_{ges} und Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Ausbeute: 0.99 g (95%).

¹H-NMR (CDCL₃): δ = 6.52 (s, 1H, H-1), 5.91 (dd, 1H, ³J = 4.1 Hz, H-1), 3.76 (s, 3H, H-OCH₃), 3.70 (s, 3H, H-OCH₃), 2.90-2.55 (m, 2H, H-2), 2.18 (s, 3H, H-CH₃), 2.04-1.82 (m, 4H, H-3,4), 1.21 (s, 9H, H-C(CH₃)₃).-

¹³C-NMR (CDCL₃): δ = 178.61 (s, C-CO₂-), 157.10 (s, C-5), 157.00 (s, C-7), 133.88 (s, C-8a), 123.96 (s, 4a), 119.84 (s, C-6), 106.57 (s, C-8), 70.36 (d, C-1), 60.11 (q, C-

OCH₃), 55.86 (q, C-OCH₃), 39.22 (s, C-C(CH₃)₃), 27.49 (t, C-4), 26.89 (q, C-(CH₃)₃), 23.31 (t, C-2), 19.24 (t, C-3), 9.37 (q, C-CH₃).-

4.4.7 1,3-Dimethoxy-8-oxo-5-pivaloyoxy-5,6-dihydro-2H-naphthalin-2-carbaldehyd 6



Zur Lösung aus **5** (0.172 g, 0.00056 mol) und Acetonitril wird eine Lösung aus Kaliumperoxodisulfat (0.626 g, 0.0023 mol), Kupfersulfat (37 mg, 0.00023 mol) in Wasser gegeben. Das erhaltene Gemisch wird über Nacht bei RT gerührt und 3 Studen auf 70-80° C erhitzt. Im Laufe der Reaktion entstehen mehrere Produkte. Drei davon (**6**, **12** und **13**, Abb. 62) wurden isoliert und charakterisiert. Das gewünschte Produkt **6** wurde per Platte (Si 60, CH₂Cl₂/MeOH 98/2) in der Menge von 0.026 g aus dem Reaktionsgemisch isoliert. Insgesamt dauert die Reaktion 17 Stunden.

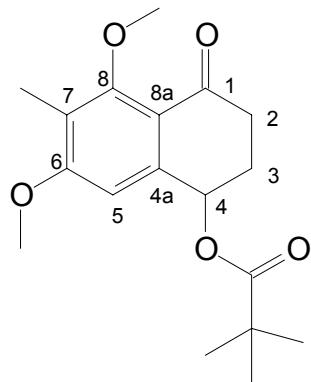
Ausbeute: Produkt **6**: 26 mg (15%), Nebenprodukt **12**: 69 mg (40 %), Nebenprodukt **13**: 52 mg (30 %).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 10.43 (s, 1H, H-CHO), 6.79 (s, 1H, H-4), 6.03 (m, 1H, H-5), 3.95 (s, 3H, H-OCH₃), 3.94 (s, 3H, H-OCH₃), 2.77 (m, 2H, H-7), 2.31 (m, 2H, H-6), 1.24 (s, 9H, H-C(CH₃)₃).-

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 193.91 (d, C-8), 189.31 (s, C-CHO), 178.03 (s, C-CO₂-), 165.21 (s, C-1/3), 164.29 (s, C-3/1), 150.47 (s, C-4a), 120.44 (s, C-8a), 119.56 (s, C-2),

106.59 (d, C-4), 69.85 (d, C-5), 64.62 (q, C-OCH₃), 56.78 (q, C-OCH₃), 39.45 (s, C-C(CH₃)₃), 36.28 (t, C-7), 28.14 (t, C-6), 27.47 (q, C-(CH₃)₃).-

4.4.8 6,8-Dimethoxy-7-methyl-4-pivaloyloxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on 12

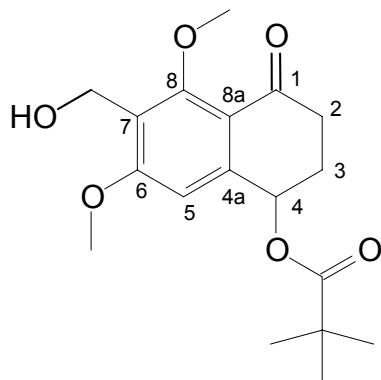


6'

¹H-NMR (CDCL₃): δ = 6.70 (s, 1H, H-5), 6.02 (m, 1H, H-4), 3.90 (s, 3H, H-C₈OCH₃), 3.81 (s, 3H, H-C₆OCH₃), 2.74 (m, 2H, H-2), 2.27 (m, 2H, H-3), 2.17 (s, 3H, H-CH₃), 1.25 (s, 9H, H-C(CH₃)₃).-

¹³C-NMR (CDCL₃): δ = 195.14 (s, C-1), 178.30 (s, C-CO₂-), 162.74 (s, C-6/8), 142.44 (s, C-4a), 122.40 (s, C.8a), 105.63 (d, C-4), 70.28 (d, C-5), 61.60 (q, C-OCH₃), 56.16 (q, C-OCH₃), 39.42 (s, C-C(CH₃)₃), 36.17 (t, C-2), 28.04 (t, C-3), 27.50 (q, C-C(CH₃)₃), 8.84 (q, C-CH₃).-

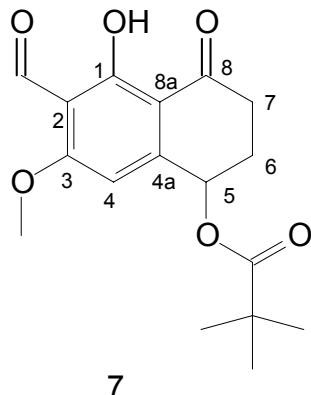
4.4.9 6,8-Dimethoxy-7-hydroxymethyl-4-pivaloyloxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on 13



¹H-NMR (CDCl₃): δ = 6.76 (s, 1H, H-5), 6.02 (dd, 1H, ³J = 3.82 Hz, ³J = 3.82 Hz, H-4), 4.80 (s, 2H, H-CH₂OH), 3.94 (s, 3H, H-OCH₃), 3.91 (s, 3H, H-OCH₃), 2.96-2.57 (m, 2H, H-2), 2.49-2.14 (m, 2H, H-3), 1.26 (s, 9H, H-C(CH₃)₃).-

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 194.90 (s, C-1), 178.23 (s, C-CO₂-), 162.59 (s, C-8), 160.97 (s, C-6), 145.19 (s, C-4a), 124.56 (s, C-8a), 119.35 (s, C-7), 106.35 (s, C-5), 70.07 (d, C-4), 63.29 (t, C-CH₂OH), 56.39 (q, C-OCH₃), 54.96 (q, C-OCH₃), 39.43 (s, C-C(CH₃)₃), 36.09 (t, C-2), 28.38 (t, C-3), 27.42 (q, C-(CH₃)₃).-

4.4.10 1-Hydroxy-3-methoxy-8-oxo-5-pivaloyloxy-5,6-dihydro-7H-naphthalin-2-carbaldehyd 7



24 mg (0.00007 mol) der Substanz **6** werden in CH₂Cl₂abs unter Schutzgasatmosphäre mit 10 eq. (0.133 g) AlCl₃ versetzt. Die Suspension wird bei

Experimenteller Teil

RT 4 Tage gerührt, anschließend mit Eiswasser/HCl-Lösung gequencht, abgetrennt und über MgSO₄ getrocknet. Das organische Produkt liegt in Form hellgelben Öls vor. Das Produkt wurde mittels PC gereinigt.

Ausbeute: 14 mg (60%).

¹H-NMR (CDCL₃): δ = 13.83 (s, 1H, H-OH), 10.52 (s, 1H, H-CHO), 6.54 (s, 1H, H-4), 6.02 (dd, 1H, ³J = 3.90 Hz, H-5), 4.01 (s, 3H, H-OCH₃), 3.03-2.68 (m, 2H, H-7), 2.47-2.12 (m, 2H, H-6), 1.29 (s, 9H, H-C(CH₃)₃).-

¹³C-NMR (CDCL₃): δ = 201.89 (s, C-8), 188.43 (s, C-CHO), 177.97 (s, C-CO₂-), 167.51 (s, C-3/1), 167.07 (s, C-3/1), 150.51 (s, C-4a), 112.92 (s, C-8a/2), 111.15 (s, C-2/8a), 101.76 (d, C-4), 69.07 (d, C-5), 56.81 (q, C-OCH₃), 39.46 (s, C-C(CH₃)), 34.73 (t, C-7), 28.14 (t, C-6), 28.48 (q, C-(CH₃)₃).-

5 Verzeichnis der Abkürzungen

CI	Chemische Ionisation
DCI	Direkte chemische Ionisation
EI	Elektronenstoß-Ionisation
HRMS	High Resolution Mass Spektrometry
COSY	Correlation Spektroskopie
HMBC	Heteronuclear Multibond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
NOE	Nuclear Overhausen Effect
SC	Säulenchromatographie
PSC	Präparative Schicht-Chromatographie
DC	Dünnschichtchromatographie
SPE	Solid Phase Extraktion
P	Petrolether
E	Ethylacetat

6 Literatur

- [1] K. Krohn, *ForschungsForum Paderborn*, **2001**, 88-92.
- [2] M. John, Dissertation, Paderborn, **1990** .
- [3] C. Biele, Dissertation, Paderborn, **1989**.
- [4] H. G Schiegel in: *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1992**, Bd. 7, S. 12-14.
- [5] H. Günter, H. Heise in: *IR-Spektroskopie*, VCH, Stuttgart, **1977**.
- [6] E. Corey, J. Link, *Tetrahedron Letters*, **1989**, 30, 6275-6278.
- [7] Funk, Fischer, Wimmer in: *Dünnschicht-Chromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden*, VCH, Bd. 1, S. 279-397.
- [8] W. Benz in: *Massenspektrometrie Organischer Verbindungen*, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main, **1969**.
- [9] S. B. Singh, L. Deborah R. G. Ball et al., *J. Org. Chem.*, **1994**, 56, 6296-6302.
- [10] D. Williams, I. Flemming in: *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, London, **1995**, S. 83.
- [11] H. A. Weber, N. C. Baenziger, J. Gloer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 6718-6719.
- [12] H. A. Weber, J. B. Gloer, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 4355-4360.
- [13] E. D. Weinberg, *Dev. ind. Microbiol.*, **1974**, 70, 15.
- [14] J. Polischook, A. Dombrowski, N. Tsou, *Mykologia*, **1993**, 85(1), 62-64.
- [15] H. Böhm, C. Klebe, H. Kubinyj in: *Wirkstoffdesign*, Spektrum, **1996**.
- [16] B. Testa in: *Grundlagen der Organischen Stereochemie*, VCH, Weinheim, **1983**.
- [17] G. Snatzke, *Chemie in unserer Zeit*, **1981**, 15, 78-87.
- [18] L. McDonald, D. Abbanat, L. Barbieri, *Tetrahedron Letters*, **1999**, 40, 2489-2492.
- [19] J. Ragot, Prime M., S. Archibald, *Organic Letters*, **2000**, 2, 1613-1616.
- [20] S. Chi, C. Heathcock, *Organic Letters*, **1999**, 1, 3-5.
- [21] A. Soman, J. Gloer, B. Koster, *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 659-661.
- [22] K. Krohn., K. Beckmann, U. Flörke, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 3101-3110.
- [23] S. Hauptmann, G. Mann in: *Stereochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1996**.
- [24] S. Talapatra, B. Karmacharya, *Phytochemistry*, **1988**, 27, 3929-3932.
- [25] G. Snatzke, *Chemie in unserer Zeit*, **1982**, 16, 160-168.
- [26] K. Krohn, A. Michel, U. Flörke, *Liebigs Ann. Chem.*, **1994**, 1093-1907.
- [27] D. Wagman, R. Cooper in: *Natural products isolation*, Elsevier, Amsterdam, **1989**, Bd. 43.

[28] G. Habermehl, P. Hammann in: *Naturstoffchemie*, Springer-Verlag, Heidelberg, **1992**.

[29] K. Unger in: *Handbuch der HPLC*, GIT Verlag, **1989**, Bd. 1.

[30] *Anfärbereagenzien für Dünnschicht und Papierchromatographie*, Hrsg.: E. Merck, Darmstadt, **1970**.

[31] T. Clerc, E. Pretsch in: *Kernresonanzspektroskopie*, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main, **1973**, Bd. 1.

[32] H. Günter in: *NMR-Spektroskopie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1977**.

[33] L. Ernst in: *13-C-NMR-Spektroskopie*, UTB Steinkopff, Darmstadt, **1980**.

[34] D. Williams, J. Flemming in: *Strukturaufklärung in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, **1991**.

[35] H. Günter in: *NMR-Spektroskopie*, Thieme, Stuttgart, **1983**.

[36] H. Friebolin in: *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 2 Aufl., Weinheim, **1992**.

[37] R. Silverstein, G. Bassler in: *Spectrometric identification of organic compounds*, John Wiley and Sons, New York, **1991**.

[38] M. Gerspacher, H. Rapoport, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 3700-3706.

[39] M. Brook, T. Chan, *Communications*, **1983**, March, 201-205.

[40] W. Steglich, B. Fugmann, S. Lang-Fugmann, *Römpf Lexikon Naturstoffe*, 10. Aufl., **1997**.

[41] R. Cole, R. Cox in: *Spectrometric identification of organic compounds*, Academic Press, New York, **1981**.

[42] Nuhn in *Naturstoffchemie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2 Aufl., Stuttgart, **1990**, S. 23.

[43] G. Krauss in: *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*, WILEY-VCH, Weinheim, **1997**.

[44] S. Colegate, R. Molyneux in: *Bioaktive Natural Products*, CRC Press, London, **1993**.

[45] J. Ondeyka et al., *J. Antibiot.*, **1992**, 42, 679-686.

[46] R. Kaiser, E. Oelrich in: *Optimierung in der HPLC*, Hüthig, Heidelberg, **1979**.

[47] G. Schwedt in *Chromatographische Trennmethoden*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1979**.

[48] L. Wise, H. Dewald, E. Hawkins, *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 688-691.

[49] R. Thompson in: *Naturally Occuring Quinones*, Chapman and Hall, **1987**, Bd. III.

[50] W. Dauben, J. Cogen, V. Behar, *Tetrahedron Letters*, **1990**, 31, 3241.

[51] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh in: *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, Thieme Verlag, 4 Aufl., Stuttgart, **1991**.

[52] K. Beckmann, Dissertation, Paderborn, **1997**.

[53] E. Corey, H. Ensley, *J. Org. Chem.*, **1975**, 38, 3178-3189.

[54] M. Periasamy, B. Kanth, *Tetrahedron*, **1994**, 50, 6411-6416.

[55] J. Corey, L. Wu, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 9327-9328.

[56] T. Jones, J. Mohan, L. Xavier, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 763-769.

[57] E. Corey, R. Bakshi, *Tetrahedron Letters*, **1990**, 106, 611-614.

[58] E. Corey, R. Bakshi, S. Shibata, *J. Am. Soc.*, **1987**, 109, 5551-5553.

[59] E. Corey, R. Bakshi, S. Shibata, *J. Am. Soc.*, **1987**, 109, 7925-7926.

[60] E. Corey, J. Link, *Tetrahedron Letters*, **1992**, 33, 4141-4144.

[61] T. Capson, C. Poulter, *Tetrahedron Letters*, **1984**, 25, 3515-3518.

[62] T. Li, Y. Wu, *American Chemical Society*, **1981**, 103, 7007-7009.

[63] D. Seebach et. al., *Angew. Chem.*, **1977**, 16, 321.

[64] D. Mathre, T. Jones, L. Xavier, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 751-762.

[65] M. V. Bhatt, P. T. Perumal, *Tetrahedron Letters*, **1981**, 22, 2605-2608.

[66] K. Parker, J. Petraitis, *Tetrahedron Letters*, **1981**, 22, 397-400.

[67] R. Brückner in: *Reaktionsmechanismen*, Spektrum, Heidelberg, **1996**.

[68] H. Laatsch, *Database for rapid structure identification of microbial metabolites*, **1997**, 2.

[69] F. L. Stetter, *Angew. Chem.*, **2000**, 112, 1792-1812.

[70] A. Meijere, Vorlesungen, Paderborn.

[71] H. Kakeya, M. Morishata, C. Onozawa, *J. Nat. Prod.*, **1997**, 60, 669-672.

[72] E. Merifield, E. Thomas, *J. Chem. Soc.*, **1999**, 1, 3269-3283.

[73] N. Burrea, U. Premachandran, *The Journal of Antibiotics*, **1992**, 45, 1367-1369.

[74] M. Beno, R. Cox, J. Wells, *Journal of the American Chemical Society*, **1977**, 8, 4123-4130.

[75] E. Thomas, J. Watts, *J. Chem. Soc.*, **1999**, 1, 3285-3290.

[76] M. Beno et al., *J. A. C. S.*, **1977**, 99, 4123.

[77] N. Burres et al., *J. Antibiot.*, **1992**, 45, 1367.

[78] P. Kleinwächter, Dissertation.

[79] G. Blaschke, *Angew. Chem.*, **1980**, 92, 14-25.

[80] S. Gilbertson, C. Challener, *Tetrahedron Letters*, **1988**, 292, 4795-4798.

[81] J. Hendrickson, R. Bergeron, *Tetrahedron Letters*, **1973**, 46, 4607-4610.

[82] J. McMurry, W. Scott, *Tetrahedron Letters*, **1983**, 24, 979-982.

[83] R. Baxter et. al., *J. C. S.*, **1992**, 1, 2495.

[84] R. Arnold, S. Kulenovic, *Synthetic Communications*, **1977**, 7(3), 223-232.

[85] C. Omer, A. Kral, R. Diehl, *Biochemistry*, **1993**, 32, 5167-5176.

[86] H. Kakeya, M. Morishita, *J. Nat. Prod.*, **1997**, 60, 669-672.

[87] E. Merifield, J. Thomas, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1999**, 1, 3269-3283.

[88] N. Burres, U. Premachandran, *The Journal of Antibiotics*, **1992**, *40*, 1376-1369.