

**ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG VON
SEKUNDÄRMETABOLITEN AUS ENDOPHYTISCHEN
PILZEN UND VERSUCHE ZUR SYNTHESE DES
PSEUDOANGUILLOSPORINS A**

Von der Fakultät für Naturwissenschaften

Department Chemie

der Universität Paderborn

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Ines Kock

aus Kassel

Paderborn 2005

Eingereicht am:

26. Januar 2005

Mündliche Prüfung am:

03. März 2005

Referent:

Prof. Dr. Karsten Krohn

Korreferent:

PD Dr. Hans Egold

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1. Juli 2001 bis zum 31. Dezember 2004 im Fach Organische Chemie der Fakultät für Naturwissenschaften, Department Chemie der Universität Paderborn unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Karsten Krohn angefertigt.

Herrn Prof. K. Krohn möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Arbeit unter seiner Leitung anzufertigen. Ich habe durch die gemeinsame Arbeit an diesem Projekt mehr gelernt, als ich im Rahmen dieser Arbeit wiedergeben kann.

Herrn PD Dr. H. Egold danke ich für die Übernahme des Korreferats und für die Messung der NMR-Spektren.

Frau Dr. Dai Jingqiu möchte ich für die gute Zusammenarbeit im Labor und für viele anregende Diskussionen danken.

Bei Frau M. Zukowski und Herrn H. Weber möchte ich mich für die Messung der Massenspektren bedanken.

Frau K. Stolte und Herrn D. Gehle danke ich für die Messung der NMR-Spektren.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. U. Flörke für die Messung der Röntgenstrukturen sowie Herrn Prof. S. Antus und Herrn Dr. T. Kurtán für die Messung der CD-Spektren.

Frau Dr. B. Elsässer danke ich für die Berechnung der CD-Spektren.

Des weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Arbeitskreises für ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit danken.

Hänge Dein Herz an kein vergänglich Ding.

Die Wahrheit richtet sich nicht nach uns, sondern wir müssen uns nach ihr richten.

(Matthias Claudius, 1740-1815)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	WAS SIND PILZE?	1
1.2	DIE BESONDERE LEBENSWEISE VON ENDOPHYTEN	3
1.3	SEKUNDÄRMETABOLITE AUS ENDOPHYTEN ALS PFLANZENSCHUTZMITTEL.....	7
1.4	AUFGABENSTELLUNG	11
2	ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG.....	12
2.1	STAMM 5948	12
2.2	STAMM 6282	17
2.3	STAMM 6651	22
2.4	STAMM 6577	36
2.5	STAMM 7067	45
2.6	STAMM 6754	63
2.7	STAMM 6579	65
2.8	STAMM 6586	70
2.9	STAMM 7165	75
2.10	BIOLOGISCHE AKTIVITÄT DER ROHEXTRAKTE UND REINSUBSTANZEN.....	83
3	VERSUCHE ZUR SYNTHESE DES PSEUDOANGUILLOSPORINS A	87
3.1	MOTIVATION	87
3.2	SYNTHESEPLAN	87
3.3	DURCHFÜHRUNG.....	89
4	ZUSAMMENFASSUNG	92
5	MATERIAL UND METHODEN	96
5.1	ANALYTISCHE UND PRÄPARATIVE CHROMATOGRAPHIE	96
5.2	INSTRUMENTELLE ANALYTIK	97
5.3	MIKROBIOLOGISCHE ARBEITEN	98
6	PHYSIKALISCHE DATEN DER NATURSTOFFE	100
6.1	NATURSTOFFE AUS STAMM 5948	100
6.2	NATURSTOFFE AUS STAMM 6282	104
6.3	NATURSTOFFE AUS STAMM 6651	107
6.4	NATURSTOFFE AUS STAMM 6577	114
6.5	NATURSTOFFE AUS STAMM 7067	117
6.6	NATURSTOFF AUS STAMM 6754.....	124
6.7	NATURSTOFF AUS STAMM 6579.....	125
6.8	NATURSTOFFE AUS STAMM 6586.....	127
6.9	NATURSTOFFE AUS STAMM 7165	129

7	SYNTHESEVORSCHRIFTEN UND PHYSIKALISCHE DATEN.....	134
7.1	DARSTELLUNG VON 3-METHOXY-PENT-2-ENSÄUREMETHYLESTER.....	134
7.2	DARSTELLUNG VON (1,3-DIMETHOXYPENTA-1,3-DIENYLOXY)-TRIMETHYLSILAN.....	134
7.3	DARSTELLUNG VON 3-CHLORPENT-2-ENDISÄUREDIMETHYLESTER	135
7.4	DARSTELLUNG VON PENTA-2,3-DIENDICARBONSÄUREDIMETHYLESTER.....	136
7.5	DARSTELLUNG VON 4,6-DIMETHOXY-2-(2-METHOXY-2-OXOETHYL)-3-METHYL- BENZOSÄUREMETHYLESTER UND 6-HYDROXY-4-METHOXY-2-(2-METHOXY-2-OXOETHYL)-3- METHYL-BENZOSÄUREMETHYLESTER.....	136
7.6	DARSTELLUNG VON 2-(CARBOXYMETHYL)-4,6-DIMETHOXY-3-METHYL-BENZOSÄURE.....	138
7.7	DARSTELLUNG VON 4,6-DIMETHOXY-2-(2-METHOXY-2-OXOETHYL)-3-METHYL-BENZOSÄURE	139
7.8	DARSTELLUNG VON 2-(3,5-DIMETHOXY-2,6-DIMETHYLPHENYL)-ESSIGSÄURE-METHYLESTER.....	140
7.9	DARSTELLUNG VON 6,8-DIMETHOXY-5-METHYL-4 <i>H</i> -ISOCHROMEN-1,3-DION.....	142
7.10	VERSUCHE ZUR DARSTELLUNG VON 3-BUTYL-3,4-DIHYDRO-3-HYDROXY-6,8-DIMETHOXY-5- METHYLISOCHROMEN-1-ON.....	143
7.11	VERSUCH ZUR DARSTELLUNG VON 3-HEPTYL-6,8-DIMETHOXY-5-METHYL-1 <i>H</i> -ISOCHROMEN-1-ON	143
8	ABKÜRZUNGEN	145
9	LITERATUR.....	146

THEORETISCHER TEIL

1 EINLEITUNG

1.1 Was sind Pilze?

Pilze lassen sich weder dem Reich der Flora noch dem der Fauna eindeutig zuordnen, denn sie weisen Gemeinsamkeiten mit Vertretern beider Reiche auf. Da sie keine Plastiden besitzen, welche die Pflanzen zur Photosynthese befähigen, sind sie kohlenstoffheterotroph und ihre Zellen enthalten einen Zellkern. Damit werden die Pilze zu der Gruppe der Eukaryoten gezählt, zu der auch Tiere gehören. Aber eine Pilzzelle weist ebenso wie die pflanzliche Zelle eine feste Zellwand auf, die bei den meisten Pilzen aus Chitin, einem Polymer des N-Acetylglucosamins mit 1,4-glycosidischer Verknüpfung, besteht. Auf Grund dieser Schwierigkeiten bei der Zuordnung werden die Pilze in einem eigenen Reich zusammengefaßt.^[1]

Das Reich der Pilze besteht aus vier Abteilungen: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota und Basidiomycota.^[2] Jede dieser Abteilungen wird in Klassen unterteilt, die ihrerseits verschiedene Ordnungen beinhalten. Darauf folgen die weiteren Unterteilungen in Familie, Tribus, Gattung und Art. Die Pilze erhalten nach ihrer Klassifizierung einen Namen, der aus der Gattung und der Art zusammengesetzt ist und dem noch ein Kürzel nachgestellt wird, das den Namen des Mykologen wiedergibt, der den Pilz identifiziert und klassifiziert hat.

Die Kohlenstoffheterotrophie der Pilze läßt drei verschiedene Ernährungsweisen als Saprobionten, Parasiten oder Symbionten zu. Saprobionten besiedeln bevorzugt abgestorbene Pflanzenteile, sowie die Ausscheidungen und Kadaver von Tieren. Sie erfüllen damit eine wichtige Rolle im Kreislauf der Natur, da sie die organischen Verbindungen wieder in ihre anorganische Ausgangsform zurückführen und diese somit den Pflanzen erneut zur Verfügung stellen. Alle Organismen, die tote Biomasse verwerten und abbauen, werden als Destruenten bezeichnet.^[3]

Doch Pilze können auch lebende Pflanzen und Tiere besiedeln und sich von ihnen ernähren, wobei sie zu Parasiten oder Symbionten werden. Der Unterschied zwischen Parasiten und Symbionten liegt in der Wirkung, die der Pilze auf den Wirt hat. Erwächst dem Wirt aus der Besiedlung kein Nutzen, so ist der Pilz ein Parasit, liefert er dem Wirt jedoch wichtige Metabolite, so ist er ein Symbiont. Für ein Leben als Symbiont sind Pilze in der Lage, Nährstoffe bereitzustellen und im Rahmen ihres Sekundärmetabolismus z.B.

wachstumsfördernde Substanzen für den Wirt zu produzieren. Die Symbiose kann soweit gehen, daß es zu einer gegenseitigen Abhängigkeit der Partner kommt. Das wohl bekannteste Beispiel ist die Symbiose von Orchideen und den Mykorrhiza, welche die Wurzeln von Pflanzen besiedeln und ohne die eine Orchidee nicht gedeihen kann. Die Grenzen zwischen der parasitischen und symbiotischen Lebensweise sind jedoch fließend.

Um sich zu ernähren, können Pilze Exoenzyme produzieren. Diese Enzyme werden ausgeschieden und zersetzen außerhalb der Zelle das Substrat. Anschließend können die gewonnenen Nährstoffe in gelöster Form die Zellwand passieren. Zu diesem Zweck bildet der Pilz in der Phase des vegetativen Wachstums (Trophophase) Substratmycel, das in engem Kontakt mit dem Substrat steht und dieses meistens vollständig durchzieht. Die Trophophase ist durch den Primärmetabolismus gekennzeichnet, durch den alle Substanzen gebildet werden, die zum Aufbau weiterer Biomasse nötig sind. Durch Verarmung des Substrats an Nährstoffen wird bei dem Pilz der Wechsel in die Idiophase ausgelöst, in der der Pilz Luftmycel und Sporen ausbildet, also an die Oberfläche des Substrats tritt und sich auf die Vermehrung vorbereitet. Die Idiophase wird durch den Sekundärmetabolismus gekennzeichnet, bei dem eine große Vielfalt von Substanzen gebildet wird, die man als Sekundärmetaboliten bezeichnet und die eine große Anzahl von Funktionen erfüllen können.^[4] Sekundärmetaboliten können dazu dienen, andere Mikroorganismen und somit Nahrungskonkurrenten abzutöten, sie können für Fraßfeinde giftig sein und im Falle einer Symbiose wachstumsfördernd für den Wirt.

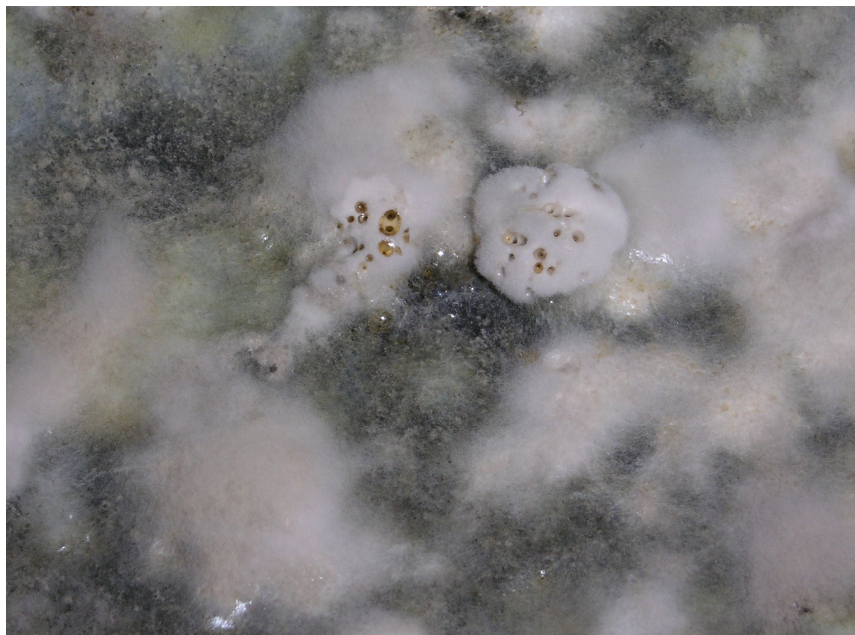
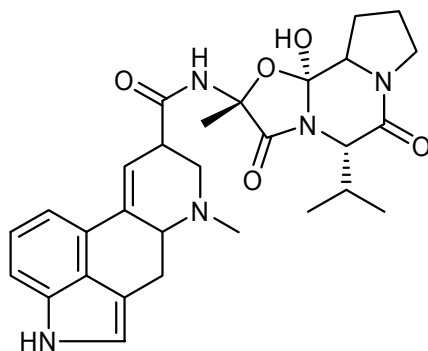


Abbildung 1: Pilz 7165 auf Biomalz-Festagar mit ausgebildetem Luftmycel

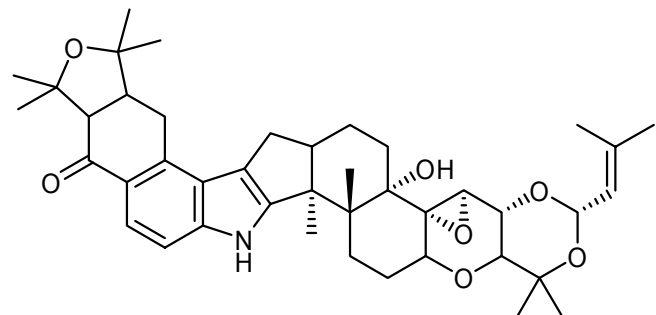
1.2 Die besondere Lebensweise von Endophyten

Endophyten sind Pilze oder Bakterien, die ihr gesamtes Leben oder wenigstens einen Teil ihres Lebenszyklus in einer Pflanze verbringen. Dabei können sie das Gewebe der Pflanze intra- oder interzellulär besiedeln. Ebenso kann die Besiedlung lokal oder systemisch sein und je nach Ort der Besiedlung unterschiedliche Effekte bei der Pflanze hervorrufen.^[5] Typischerweise verursachen die Endophyten keine Krankheitssymptome bei der Pflanze; ist diese jedoch geschwächt, können Infektionen auftreten. Häufiger sind jedoch die für die Pflanze positiven Effekte, die ein Endophyt bewirken kann. Dazu gehören Wachstumsförderung, Widerstandsfähigkeit gegen Umwelteinflüsse und der Schutz vor Phytopathogenen und Fraßfeinden.^[6]

Die symbiotische Gemeinschaft zwischen Gräsern und den *Epichloë*-Arten bewirkt bei den Gräsern eine wesentliche Verbesserung der Stresstoleranz gegenüber Trockenheit, Phytopathogenen, Herbivoren und Nematoden. Damit verschafft der endophytische Pilz seinem Wirt einen Wettbewerbsvorteil gegenüber Pflanzen, die nicht in Symbiose mit einem Pilz leben. Der Schutz vor Fraßfeinden läßt sich bei diesen endophytischen Pilzen auf die Wirkung von Sekundärmetaboliten zurückführen^[7]. Es handelt sich dabei um Alkaloide, wie z.B. Ergovalin^[8] (1) und Lolitrem B^[9] (2, Abbildung 2).



Ergovalin (1)



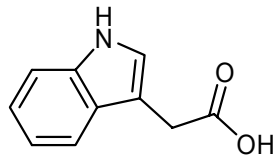
Lolitrem B (2)

Abbildung 2: Gräser, die Wirte der *Epichloë*-Arten sind, werden durch Ergovalin und Lolitrem B vor Fraßfeinden geschützt

Ergovalin wirkt hauptsächlich gegen Wirbeltiere, zeigt aber auch insektizide Wirkung.^[10] Bei Säugetieren verursacht der Verzehr von Gräsern, die Ergovalin enthalten, eine erhöhte Körpertemperatur und geringere Gewichtszunahme. Es wirkt sich außerdem negativ auf die Fruchtbarkeit und Milchproduktion aus.^[11]

Andere endophytische Pilze produzieren Phytohormone, wie 3-Indolessigsäure^[12] (3, Abbildung 3), die das Wachstum der Pflanzen beschleunigen. Ein beschleunigtes Wachstum

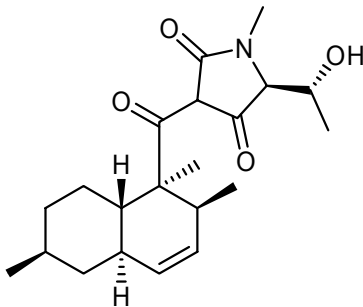
kann auch mit der erhöhten Aufnahme von Nährstoffen wie Stickstoff und Phosphor zusammenhängen, die der endophytische Pilz bewirkt.^[13]



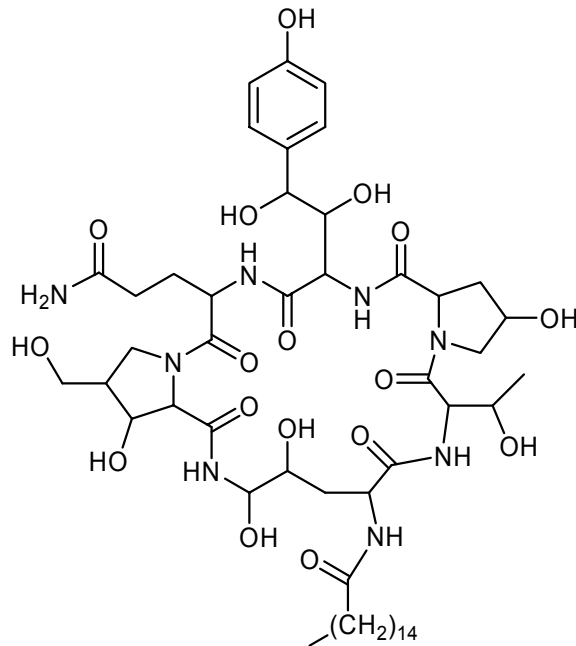
3-Indolessigsäure (3)

Abbildung 3: 3-Indolessigsäure ist ein Phytohormon, welches das Wachstum der Pflanzen fördert

Aus dem endophytischen Pilz *Cryptosporiopsis cf. quercina* konnte Cryptocin^[14] (4, Abbildung 4) isoliert werden, das den Wirt des Pilzes vor dem Befall durch *Pyricularia oryzae* und anderen Phytopathogenen schützt. Ein weiterer fungizider Sekundärmetabolit dieses Pilzes ist das Cryptocandin^[15] (5), bei dem es sich um ein zyklisches Peptid handelt.



Cryptocin (4)



Cryptocandin (5)

Abbildung 4: Substanzen, die den Wirt von *Cryptosporiopsis cf. quercina* vor dem Befall durch Phytopathogene schützen

Schließlich sind noch endophytische Pilze, wie die *Phyllosticta* sp. bekannt, die ihren Wirt vor dem Befall durch Larven schützen. Aus diesem Pilz konnten Heptelidinsäure (6, Abbildung 5) und Hydroheptelidinsäure (7) isoliert werden, die für Tannentriebwickler-Larven (*Choristoneura fumiferana*) giftig sind.^[16]

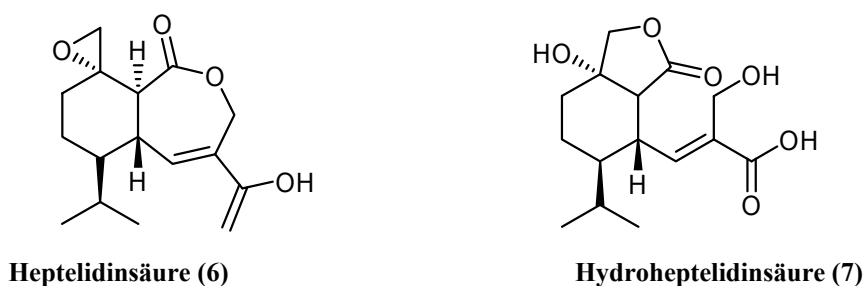


Abbildung 5: Naturstoffe aus *Phyllosticta* sp., die für Tannentriebwickler-Larven giftig sind

Die Palette der produzierten Sekundärmetabolite umfaßt jedoch nicht nur Substanzen, deren biologische Wirkung an die Bedürfnisse der Wirtspflanzen angepaßt ist. Im Laufe der Jahre wurden Sekundärmetabolite mit den unterschiedlichsten Wirkungen isoliert. Dabei wurde in der Forschung ein besonderes Augenmerk auf in der Humanmedizin einsetzbare Substanzen gelegt. Dies liegt hauptsächlich an der Entwicklung von Resistenzen bei Mikroorganismen wie z.B. *Staphylococcus aureus*. Außerdem gibt es nur wenige Antimykotika, weshalb systemische Pilzinfektionen schwer zu behandeln sind. In der heutigen Zeit nehmen aber gerade die Pilzinfektionen beim Menschen in dem Maße zu, wie die Zahl der Patienten, deren Immunsystem durch AIDS oder die Einnahme von Immunsuppressiva nach Organtransplantationen geschwächt ist.^[17] Aus den genannten Gründen ist die Suche nach neuen Wirkstoffen unumgänglich.

Unter den isolierten Verbindungen sind cytotoxische Substanzen wie die Leptosine G^[18] (8) und E^[19] (9, Abbildung 6) zu finden, die von *Leptosphaeria* sp. produziert werden, der mit der Alge *Sargassum tortile* assoziiert ist. Aber auch Substanzen mit Antimalaria-Aktivität, wie das aus *Aigialus parvus* isolierte Aigialomycin D (10), das Aktivität gegen *Plasmodium falciparum* zeigt.^[20]

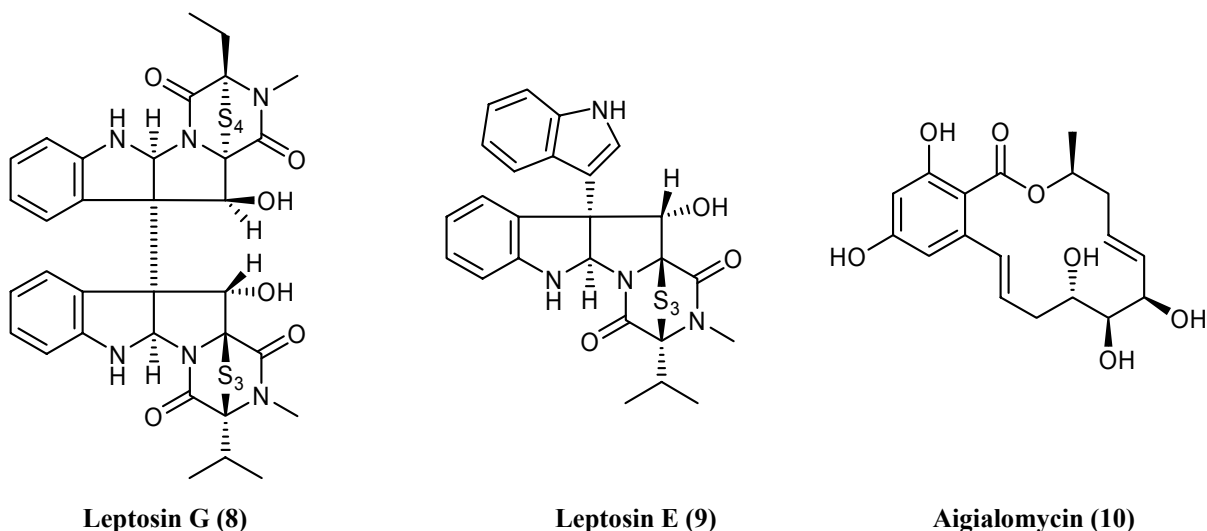


Abbildung 6: Die cytotoxischen Substanzen Leptosin G und E aus *Leptosphaeria* sp. und Aigialomycin aus *Aigialus parvus*, das gegen Malaria aktiv ist

Eines der interessantesten Krebstherapeutika ist das Taxol (**11**, Abbildung 7), welches erstmals aus der pazifischen Eibe isoliert wurde.^[21] Es weist einen zur Zeit der Entdeckung neuartigen Wirkmechanismus auf. Anstatt die Bildung von Microtubuli zu unterdrücken, wie das bei den Vincaalkaloiden^[22] geschieht, stabilisiert das Taxol die Microtubuli und verhindert deren Abbau. In beiden Fällen wird die Mitose unterbrochen. In den letzten Jahren wurden immer wieder neue Wirkungen des Taxols entdeckt und der Bedarf steigt ständig an. Aus den seltenen und langsam wachsenden Eiben kann der Bedarf an Taxol nicht gedeckt werden. Zur Zeit wird die Hauptmenge an Taxol semisynthetisch aus Baccatin III hergestellt^[23], das aus den Nadeln der europäischen Eibe gewonnen wird.

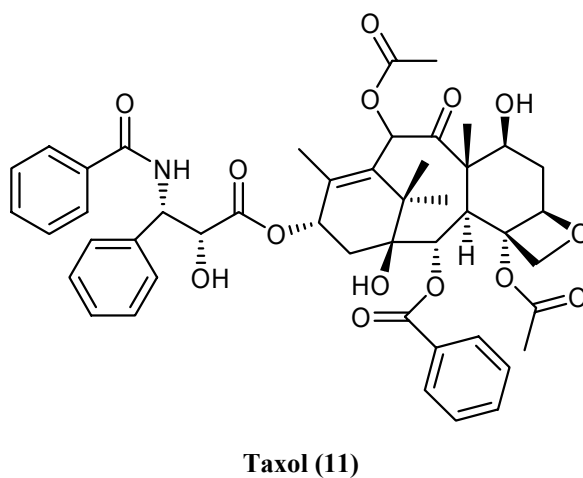
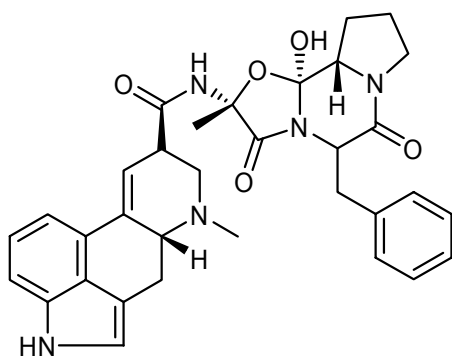


Abbildung 7: Das aus der pazifischen Eibe isolierte Taxol ist ein Antitumorwirkstoff, der Microtubuli stabilisiert und zur Zeit semisynthetisch aus Baccatin III dargestellt wird

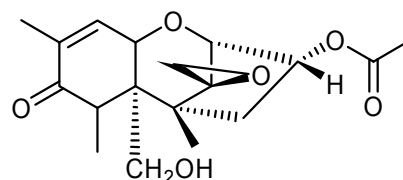
Parallel zu der Suche nach synthetischen Wegen zum Taxol begann eine Suche nach neuen Quellen für den begehrten Naturstoff. Dabei boten sich endophytische Pilze als Ausgangspunkt für die Suche an, denn sie haben vermutlich die Fähigkeit, Gene mit ihren Wirten auszutauschen. Diese Möglichkeit wurde zuerst an dem phytopathogenen Pilz *Gibberella fujikuroi* untersucht, dessen Biosyntheseweg der Gibberellinsäure mit dem der Pflanzen identisch ist.^[24,25] Der Austausch von Genen erfordert jedoch eine sehr starke Assoziation der Zellen des Wirts mit dem Pilz. Deshalb wurde die pazifische Eibe auf endophytische Pilze untersucht. Tatsächlich gelang es taxolproduzierende Pilze zu isolieren.^[26] Bislang sind die Mengen an produziertem Taxol jedoch noch zu gering um kommerziell genutzt zu werden. Trotzdem bleiben die endophytischen Pilze mit ihren speziellen Lebensgewohnheiten und den daraus resultierenden Eigenschaften nicht nur für die Suche nach Taxolproduzenten ein vielfältiges Forschungsgebiet.

1.3 Sekundärmetabolite aus Endophyten als Pflanzenschutzmittel

Die Probleme des Pflanzenschutzes existieren bereits seit die Menschen sesshaft wurden und die ersten Monokulturen anlegten. Wegen der Abhängigkeit der Menschen von einer erfolgreichen Ernte konnten Pflanzenschädlinge Hungersnöte und Massenvergiftungen auslösen.^[27] Zu den am meisten gefürchteten Phytopathogenen gehörten im Mittelalter die Pilze *Fusarium graminearum* und *Claviceps purpurea*, die verschiedene Getreidearten befallen. Der Verzehr von kontaminierten Mehl führt zu schweren Vergiftungen, die im Falle des *Claviceps purpurea* von den Mutterkornalkaloiden ausgelöst werden.^[28] Zu den isolierten und identifizierten Mutterkornalkaloiden zählt das Ergotamin (**12**, Abbildung 8), das heute in der Humanmedizin gegen Migräne eingesetzt wird.^[29] Als Hauptmetabolit des *Fusarium graminearum* konnte das Trichothecen **13** identifiziert werden.^[30]



Ergotamin (**12**)



3-Acetyldeoxynivalenol (**13**)

Abbildung 8: Die Sekundärmetabolite von *Claviceps purpurea* und *Fusarium graminearum* waren im Mittelalter für schwere Massenvergiftungen durch kontaminiertes Mehl verantwortlich

Um Pflanzen vor Phytopathogenen und Fraßfeinden zu schützen gibt es zwei grundsätzlich verschiedene Maßnahmen. Die biotechnische Schädlingsbekämpfung verwendet Bakterien und Pilze, die der Pflanze ihrerseits keinen Schaden zufügen und den Befall durch Schädlinge reduzieren. Die Verwendung von lebenden Organismen für den Pflanzenschutz hat den Vorteil, daß das Auftreten von Resistenzen minimiert wird, da die Organismen immer ein Gemisch von vielen verschiedenen bioaktiven Substanzen produzieren. Der Umgang mit lebenden Organismen erfordert allerdings Fachkenntnis und das Spektrum der produzierten, aktiven Verbindungen unterliegt natürlichen Schwankungen.^[31] Die zweite Möglichkeit ist die chemische Bekämpfung von Schädlingen. Sie erfolgt durch die Verwendung von Pflanzenschutzmitteln. Diese sind gemäß §2, IX des Pflanzenschutzgesetzes^[32] „Stoffe, die dazu bestimmt sind,

- a. Pflanzen oder Pflanzenerzeugnisse vor Schadorganismen zu schützen,
- b. Pflanzen oder Pflanzenerzeugnisse vor Tieren, Pflanzen oder Mikroorganismen zu schützen, die nicht Schadorganismen sind,
- c. die Lebensvorgänge von Pflanzen zu beeinflussen, ohne ihrer Ernährung zu dienen (Wachstumsregler),
- d. das Keimen von Pflanzenerzeugnissen zu hemmen,

ausgenommen sind Wasser, Düngemittel im Sinne des Düngemittelgesetzes und Pflanzenstärkungsmittel; als Pflanzenschutzmittel gelten auch Stoffe, die dazu bestimmt sind, Pflanzen abzutöten oder das Wachstum von Pflanzen zu hemmen oder zu verhindern, ohne daß diese Stoffe unter Buchstabe a oder c fallen“.

Der Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln ist gegenüber den biotechnischen Verfahren leichter zu handhaben, dafür treten aber verstärkt Resistenzen auf. Dieser Problematik kann nur durch das Auffinden neuer, aktiver Verbindungen entgegengewirkt werden.

Die ersten organischen Substanzen, die als Pflanzenschutzmittel eingesetzt wurden, waren das Herbizid 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (**14**, Abbildung 9) und das Insektizid DDT (**15**).^[33] Später stellte sich heraus, daß DDT eine hohe Halbwertszeit hat und sich verstärkt im Fettgewebe der Tiere anreichert, die in der Nahrungskette oben stehen.^[34,35]

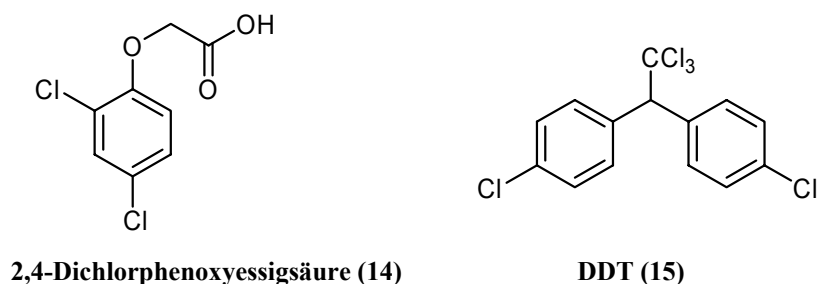


Abbildung 9: Die ersten organischen Pflanzenschutzmittel; DDT hat eine hohe Halbwertszeit und reichert sich im Fettgewebe an

Um ähnliche Probleme mit den neuen Pflanzenschutzmitteln zu vermeiden, wird das chemische Verhalten der Substanzen (Wirkmechanismus), ihre möglichen Abbauprodukte, Transportwege in der Umwelt und die Wirkung auf Lebewesen, die mit den Substanzen in Kontakt kommen werden, untersucht.^[36] Die Anforderungen, die dabei an ein chemisches Pflanzenschutzmittel gestellt werden, sind die gleichen, die auch ein Medikament in der Humanmedizin erfüllen muß. Es muß selektiv auf den Zielorganismus wirken, existierende Resistenzen überwinden können und darf sich nicht in der Umwelt anreichern.

Um ein neues Pflanzenschutzmittel zu entwickeln und seine Zulassung zu erreichen sind heute ca. 8-10 Jahre Forschung nötig. Deshalb ist die einzige Möglichkeit der Resistenzbildung rechtzeitig entgegenzuwirken, die ständige Suche nach neuen, aktiven Substanzen. Eine häufig genutzte Strategie zum Auffinden neuer Leitstrukturen ist die Suche nach ungewöhnlichen und bislang unbeachteten Quellen für Naturstoffe. Unter der Berücksichtigung der bereits geschilderten Eigenschaften der Endophyten, liegt es nahe, die Sekundärmetabolite von endophytischen Mikroorganismen auf neue Leitstrukturen zu untersuchen, was verstärkt seit etwa zwanzig Jahren geschieht.^[37] Dabei hat es sich gezeigt, daß die unveränderten Naturstoffe manchmal nicht stabil genug oder zu giftig sind, um direkt einsetzbar zu sein. Zwei Beispiele jüngeren Datums sind das Strobilurin A^[38], aus dem die Fungizide Kresoxim-methyl (**16**, Abbildung 10) und Azoxystrobin^[39] (**17**) hervorgegangen sind, und das Nicotin, welches für die Insektizide Nitenpyram (**18**) und Imidacloprid^[40] (**19**) Pate stand.

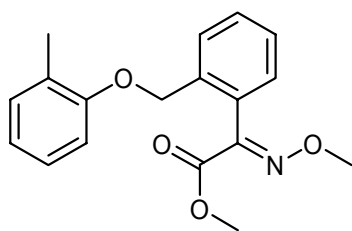
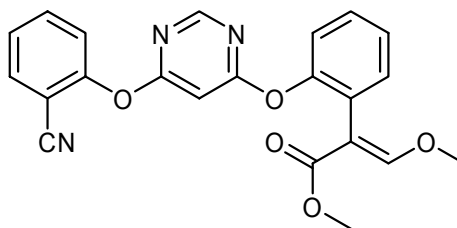
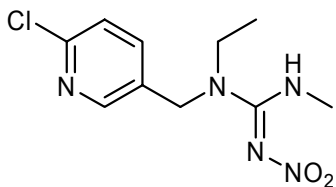
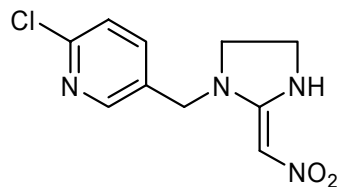
**Kresoxim-methyl (16)****Azoxystrobin (17)****Nitenpyram (18)****Imidacloprid (19)**

Abbildung 10: Pflanzenschutzmittel, die durch chemische Veränderung aus den Naturstoffen Strobilurin A bzw. Nicotin hervorgegangen sind

Auch die Wasserlöslichkeit, starke Nebenwirkungen und mäßige Wirksamkeit können Gründe für eine Derivatisierung sein. Andere Naturstoffe hingegen können in unveränderter Form eingesetzt werden. Zu diesen Substanzen zählt das Avermectin A_{1a}^[41] (**20**), das durch Fermentation gewonnen wird, da seine komplexe Struktur eine Synthese unwirtschaftlich macht.

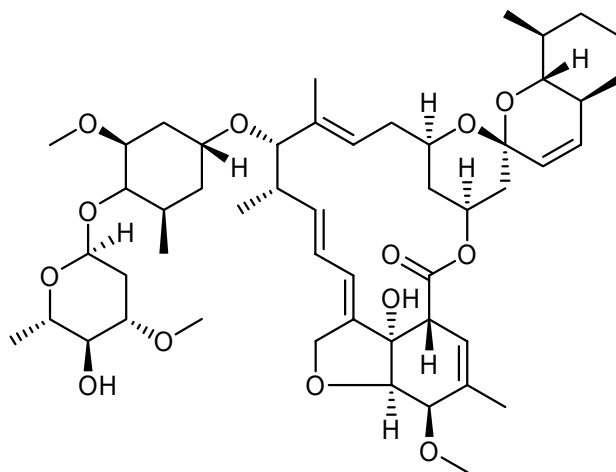
**Avermectin A_{1a} (20)**

Abbildung 11: Avermectin A_{1a} wird durch Fermentation gewonnen

Die Vielfalt der organischen Verbindungen in der Natur sollte in den kommenden Jahrzehnten keinen Mangel an neuen Leitstrukturen aufkommen lassen.^[36] Pilze stellen dabei eine immer

noch weitgehend unerforschte Quelle dar, denn von den geschätzten 1 Millionen Pilzen, die auf unserem Planeten existieren, sind erst ca. 10 % isoliert und beschrieben worden.^[42]

1.4 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Projektes „Endophytische Pilze aus Algen und Pflanzen verschiedener Meeresbiotope“ durchgeführt und hatte die Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus endophytischen Pilzen sowie die Untersuchungen zur Synthese aktiver Verbindungen zur Aufgabe. Dazu wurden endophytische Pilze in der Arbeitsgruppe von Prof. Aust und PD Dr. B. Schulz an der TU Braunschweig isoliert und kultiviert. Die Auswahl der Pilze erfolgte anhand der von der BASF AG und der Arbeitsgruppe von Prof. Aust und PD Dr. B. Schulz durchgeführten Aktivitätstest und nach den Ergebnissen des eigenen chemischen Screenings. Die isolierten Reinsubstanzen wurden anschließend durch Agardiffusionstests (AG Prof. Aust & PD Dr. Schulz) und in-vitro-Tests (BASF AG) auf ihre fungizide, antibiotische, herbizide und insektizide Wirkung untersucht.

2 ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG

2.1 Stamm 5948

Bei dem Stamm 5948 handelt es sich um *Coniothyrium* sp., der aus *Fucus* sp. aus der Nordsee vor Helgoland isoliert wurde. Der Stamm wurde für 14 Tage in einer Biomalz-Flüssigkultur fermentiert und anschließend mit Ethylacetat extrahiert.

2.1.1 Isolierung der Naturstoffe

Der Rohextrakt wurde durch Mitteldruckchromatographie an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten in 6 Fraktionen aufgetrennt. Aus Fraktion 4 konnten durch eine weitere Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol als Laufmittel die Naturstoffe 59484e (**21**) und 59484e2 (**22**) gewonnen werden. Fraktion 5 wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol gereinigt und lieferte Naturstoff 59485a (**23**).

2.1.2 Naturstoff 59484e

Der Naturstoff 59484e wurde als farbloses Öl erhalten, das in Methanol löslich ist. Auf dem DC (R_f -Wert 0.40, Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) ist die Substanz durch eine rotbraune Färbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure zu detektieren. Aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren ist zu entnehmen, daß der Naturstoff aus einer Methylgruppe, einer CH_2 -Gruppe und fünf CH-Gruppen besteht. Das ESI-Massenspektrum zeigt eine Molmasse von 144 g/mol an, was zusammen mit den NMR-Spektren auf eine Summenformel von $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_3$ schließen läßt. Die chemischen Verschiebungen von vier der fünf CH-Gruppen im Bereich von 54.7 bis 68.6 ppm zeigen eine Sauerstoffs substitution an. Zwei der CH-Gruppen bilden ein Epoxid, dessen Protonen im Vergleich zu denen an einer freien Hydroxygruppe einer höheren Abschirmung ausgesetzt sind und somit eine niedrigere chemische Verschiebung von 54.7 und 58.0 ppm haben. Aus dem $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY lassen sich die in Abbildung 12 gezeigten Kopplungen entnehmen, was zu der Struktur eines 3-Methyl-7-oxa-bicyclo[4.1.0]heptan-2,5-diol führt.

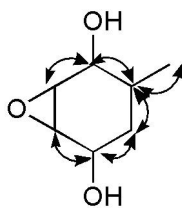
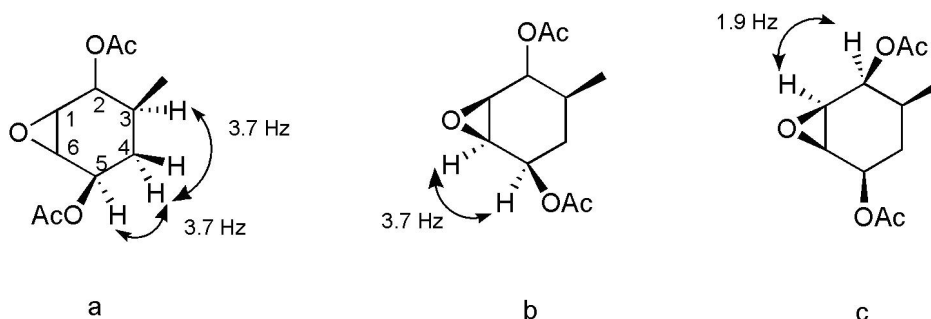


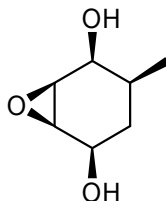
Abbildung 12: Kopplungen aus dem H,H-COSY des Naturstoff 59484e

Zur Bestimmung der relativen Konfiguration des Naturstoffs mußten die Kopplungskonstanten der einzelnen Protonen bestimmt werden. Da das ^1H -NMR-Spektrum des ursprünglichen Naturstoffs wegen der Überlagerung der Signale und der hohen Linienbreite zu diesem Zweck ungeeignet war, wurden die beiden freien Hydroxygruppen acetyliert, was das Lösungsverhalten verbessert und die Stabilität der Substanz erhöht. Durch die Änderung der chemischen Verschiebung und die geringere Signalbreite konnten die Kopplungskonstanten der Protonen an den Kohlenstoffatomen 1, 4 und 6 des acetylierten Naturstoffs bestimmt werden. Es zeigt sich, daß eines der beiden Protonen der CH_2 -Gruppe zu beiden benachbarten Protonen eine äquatorial-axial-Kopplung von 3.7 Hz aufweist, somit müssen die Methylgruppe am Kohlenstoffatom 3 und die Hydroxygruppe am Kohlenstoffatom 5 auf der gleichen Seite des Moleküls liegen (Abbildung 13, a).

Abbildung 13: Relative Stereochemie des acetylierten Naturstoffs aus den ^1H -NMR-Kopplungen

Bei dem Signal des Protons am Kohlenstoffatom 6 handelt es sich um ein Triplett. Die Kopplung von 3.7 Hz zeigt auch hier eine äquatorial-axial-Position der Protonen an (Abbildung 13, b). Das Signal des Protons am Kohlenstoffatom 1 weist eine Kopplung von 3.7 Hz und eine von 1.9 Hz auf, woraus auch hier wieder auf eine äquatorial-axial-Stellung der beiden benachbarten Protonen zu schließen ist (Abbildung 13, c). Somit ergibt sich für den Naturstoff 59484e die Struktur **21** (Abbildung 14). Eine Recherche in den Chemical Abstracts zeigte, daß der Naturstoff 59484e bisher in der Literatur nicht beschrieben ist. Ihm wurde der Name Coniol gegeben. Da die Substanz eine so große Ähnlichkeit mit dem

ebenfalls isolierten, literaturbekannten (+)-Epoxydon hat, daß sie vermutlich auf dem gleichen Biosyntheseweg produziert wird, sollte die absolute Konfiguration des Coniols der des Epoxydons (Naturstoff 59485a, **23**, Abbildung 17) entsprechen. In diesem Fall würde die Abbildung 14 nicht nur die relative, sondern auch die absolute Konfiguration wiedergeben.



Coniol (21)

Abbildung 14: Ein literaturunbekannter Naturstoff aus *Coniothyrium* sp.

2.1.3 Naturstoff 59484e2

Der Naturstoff 59484e2 wurde als farbloses Öl erhalten, das sich gut in polaren Lösungsmitteln wie Methanol löst. Auf dem DC ist die Substanz, die einen R_f -Wert von 0.46 (Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) hat, durch UV-Löschung bei 254 nm detektierbar. Das ^{13}C -NMR-Spektrum weist zehn Signale zwischen 113.3 und 157.1 ppm auf, von denen vier zu quartären Kohlenstoffatomen gehören. Weiterhin zeigt das Spektrum noch zwei sauerstoffsubstituierte und eine aliphatische CH_2 -Gruppe an. Aus den Kopplungen der Signale des ^1H -NMR-Spektrums ergibt sich, daß die aliphatische CH_2 -Gruppe bei 2.61 ppm mit der sauerstoffsubstituierten CH_2 -Gruppe bei 3.58 ppm verbunden ist. Außerdem stellen die Signale der CH_2CH_2 -Einheit echte Triplets und das der einzelnen CH_2 -Gruppe bei 4.42 ppm ein Singulettsignal dar. Damit kann keine der CH_2 -Gruppen Bestandteil eines Ringsystems sein, da die Protonen jeder einzelnen CH_2 -Einheit chemisch äquivalent sind. Anhand der chemischen Verschiebungen von 157.1 und 155.4 ppm erweisen sich zwei der quartären Kohlenstoffatome ebenfalls als sauerstoffsubstituiert. Somit ergeben sich als Substituenten für ein aromatisches System eine $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -Einheit, eine CH_2O -Einheit und zwei Sauerstoffatome.

Es gibt zwei mögliche aromatische Ringsysteme, die zehn Kohlenstoffsignale aufweisen. Das erste ist ein Naphthalin-Grundgerüst, das zweite mögliche Ringsystem besteht aus zwei einzelnen Benzol-Ringen, von denen einer C_2 -symmetrisch ist. Da es unmöglich ist, die vier Substituenten auf ein Naphthalin-Grundgerüst zu verteilen, weil nur vier quartäre Kohlenstoffatome vorhanden sind, muß das zweite mögliche Ringsystem vorliegen. Das CI-Massenspektrum bestätigt dies mit einem Molekülpeak bei 245 $[\text{M}+\text{H}^+]$, was einer

Summenformel von $C_{15}H_{16}O_3$ entspricht. Aus dem HMBC-Spektrum lassen sich die in Abbildung 15 dargestellten Fragmente A und B erkennen.

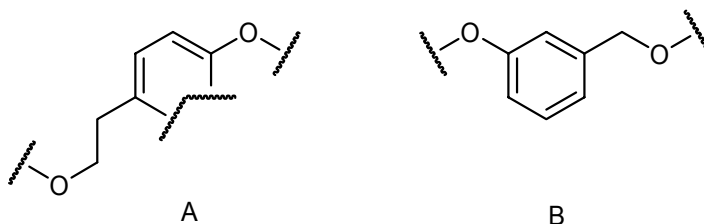
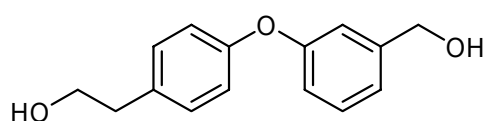


Abbildung 15: Fragmente aus dem HMBC-Spektrum von Naturstoff 59484e2

Unter Berücksichtigung der relativen Intensität der aromatischen Protonensignale läßt sich Fragment A in Abbildung 15 zu einem *para*-substituierten Benzolring vervollständigen. Die chemische Verschiebung der beiden Kohlenstoffe der sauerstoffs-substituierten CH_2 -Gruppen von 63.7 und 63.2 ppm deutet auf eine Substitution mit freien Hydroxygruppen hin. Ebenso spricht die sehr hohe Stabilität der Substanz gegen das Vorhandensein von freien phenolischen Hydroxygruppen, so daß auf eine Verknüpfung der beiden Benzolringe über ein Sauerstoffatom geschlossen werden kann. Damit ergibt sich die achirale Struktur **22** (Abbildung 16), deren chemische Bezeichnung 2-(4-(3-(Hydroxymethyl)phenoxy)phenyl)-ethanol lautet. Diese Struktur wird noch zusätzlich durch das Massenspektrum bestätigt, in dem ein Peak bei 121 zu erkennen ist. Dieser entspricht dem Fragment, das durch Spaltung der Etherbrücke entsteht und eine $Ar-CH_2CH_2OH$ -Einheit repräsentiert. Eine Recherche in den Chemical Abstracts ergab, daß es sich bei Naturstoff 59484e2 um eine bisher literaturunbekannte Substanz handelt, der der Name Coniothyren gegeben wird.



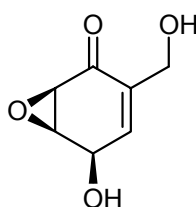
Coniothyren (22)

Abbildung 16: Ein literaturunbekannter Naturstoff aus *Coniothyrium* sp.

2.1.4 Naturstoff 59485a

Der Naturstoff 59485a wurde als farbloses Öl erhalten, das nach einiger Zeit eine Braunfärbung aufweist. Die Substanz hat einen spezifischen Drehwinkel von $+109.1^\circ$ auf, ist gut in Methanol löslich und auf dem DC (R_f -Wert 0.41, Laufmittel $CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1) durch Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar. Im Agardiffusionstest zeigte der Naturstoff Aktivität gegen *Bacillus megaterium* und *Chlorella fusca*. Aus den NMR-Spektren

sind vier CH-Gruppen und eine CH₂-Gruppe sowie zwei quartäre Kohlenstoffatome erkennbar. Die chemischen Verschiebungen der CH₂-Gruppe von 4.21 ppm und der drei CH-Gruppen bei 3.44, 3.83 und 4.76 ppm deuten auf eine Sauerstoffs substitution hin. Das quartäre Kohlenstoffatom bei 194.3 ppm gehört zu einer Carbonylgruppe und die beiden verbleibenden Kohlenstoffatome bilden eine Doppelbindung, deren chemische Verschiebungen von 134.7 und 141.1 ppm einen die Doppelbindung polarisierenden Substituenten anzeigen. Somit ergibt sich ein α,β -ungesättigtes Keton. Wie bei Naturstoff 59484e deuten auch in diesem Fall die chemischen Verschiebungen zweier CH-Gruppen von 53.5 und 54.3 ppm auf ein Epoxid hin. Die Kopplungen aus dem H,H-COSY-Spektrum zeigen eine Verknüpfung eines Protons der Epoxid-Einheit mit der dritten sauerstoffs substituierten CH-Gruppe an, die wiederum mit der CH-Gruppe der Doppelbindung verknüpft ist. Daraus ergibt sich die Struktur **23** (Abbildung 17), die nach einer Recherche in den Chemical Abstracts als das bereits 1966 von A. Clossé^[43] beschriebene (+)-Epoxydon identifiziert werden konnte. Ein Vergleich der ¹H-NMR-Daten mit den Literaturwerten ergab eine vollständige Übereinstimmung. In einer Veröffentlichung von 1999 wurde Epoxydon als wirksam gegen eine als Kohlhernie bekannte Pflanzenkrankheit beschrieben.^[44] Diese Krankheit wird durch den Pilz *Plasmodiophora brassicae* ausgelöst und befällt die Wurzeln kreuzblütiger Kulturpflanzen wie Kohl oder Raps. Dabei tritt ein ungesteuertes Wachstum der Zellen in den Wurzeln auf, wodurch die Funktion der Wurzeln gestört wird und die Pflanze abstirbt.



(+)-Epoxydon (**23**)

Abbildung 17: Ein literaturbekanntes Epoxid, das erstmals von 1966 von Clossé et al. isoliert wurde

Der Versuch, den Naturstoff zu acetylieren, führte statt zu dem gewünschten Acetylierungsprodukt zu dem aromatischen, vierfach acetylierten Produkt **23a** (Abbildung 18). Die Labilität von Epoxydon gegenüber Basen ist bekannt^[45], so daß das entstandene Acetylierungsprodukt als zusätzlicher Hinweis auf die Struktur gelten kann.

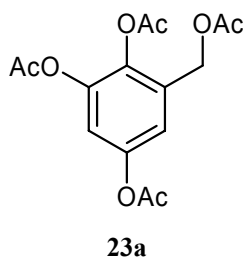


Abbildung 18: Die Labilität von Epoxydon gegenüber Basen führt zu der Bildung des aromatischen Acetylierungsprodukts

2.2 Stamm 6282

Bei dem Stamm 6282 handelt es sich um *Phoma* sp., der aus *Fucus serratus* vor Helgoland isoliert wurde. Der Stamm wurde 28 Tage auf Biomalz-Festagar fermentiert, lyophilisiert und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt zeigte antibiotische Aktivität gegen *Bacillus megaterium*, *Microbotryum violaceum* und *Chlorella fusca*.

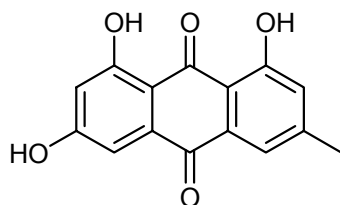
2.2.1 Isolierung der Naturstoffe

Der gewonnene Rohextrakt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol in 6 Fraktionen aufgetrennt. Aus Fraktion 2 konnte durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan und einer weiteren Reinigung an Sephadex LH 20 der Naturstoff 62822b4a (**24**) gewonnen werden. Fraktion 3 lieferte nach Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 den Naturstoff 62823b (**25**). Fraktion 4 enthielt neben Epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22^E-dien-3 β -ol die Naturstoffe 62824a1b (**26**) und 62824a2 (**27**), die durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 und Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol isoliert wurden.

2.2.2 Naturstoff 62822b4a

Der Naturstoff 62822b4a kristallisiert in orangen Nadeln (Smp.: 250–254 °C) aus Dichlormethan/Methanol und ist gut löslich in Aceton. Auf dem DC (R_f -Wert 0.65, Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH 9:1) ist die Substanz bei Tageslicht durch ihre orange Farbe erkennbar. Ein Behandeln des Dünnschichtchromatogramms mit Natronlauge führt zu einer Rotfärbung der Substanz, was für ein Hydroxyanthrachinon spricht. Im ¹H-NMR-Spektrum zeigen sich vier Signale im Aromaten-Bereich mit der relativen Intensität 1 und ein Signal bei 2.50 ppm mit der relativen Intensität 3, sowie eine freie und zwei chelierte Hydroxygruppen.

Das ^{13}C -NMR weist zwölf Signale im Aromatenbereich, ein Methylgruppensignal und zwei Ketonsignale bei 181.7 und 191.3 ppm auf. Daraus ergibt sich als Grundgerüst ein vierfach substituiertes Anthrachinon, bei dem sich zwei der Hydroxygruppen in Nachbarschaft zu einer Carbonylgruppe befinden müssen. Die Kopplung zweier Signale von 2.4 Hz und die fehlenden Kopplungen der restlichen zwei Signale im ^1H -NMR-Spektrum läßt auf eine Substitution in Metaposition an beiden aromatischen Ringen schließen. Unter Berücksichtigung der sehr unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der beiden Ketogruppen ergibt sich für die Stellung der zwei chelierten Hydroxygruppen die 1,8-Position. Damit handelt es sich bei Naturstoff 62822b4a um Emodin (**24**, Abbildung 19), das unter anderem auch von T. R. Kelly^[46] isoliert wurde. Ein Vergleich der Literaturdaten der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren ergab eine vollständige Übereinstimmung.



Emodin (**24**)

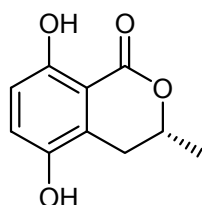
Abbildung 19: Ein literaturbekannter Naturstoff mit Aktivität gegen Moskitolarven

In einer Veröffentlichung von Y.-C. Yang, M.-Y. Lim und H.-S. Lee aus dem Jahr 2003 wurde die Aktivität von *Cassia obtusifolia* gegen Moskitolarven untersucht.^[47] Die Autoren schrieben die Aktivität dem enthaltenen Emodin zu und bestimmten die LC_{50} -Werte von durchschnittlich 2 mg/L für die Larven dreier verschiedener Moskitosarten. Außerdem wird in einer zweiten Veröffentlichung von 2003 die Wirkung von Emodin als Antioxidans^[48] beschrieben.

2.2.3 Naturstoff 62823b

Der Naturstoff 62823b bildet farblose Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 228–231 °C und ist gut löslich in Methanol. Auf dem DC (R_f -Wert 0.67, Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) ist die Substanz durch UV-Löschung bei 254 nm detektierbar. Im ^1H -NMR-Spektrum sind zwei aromatische Protonen erkennbar, deren Kopplung von 9.1 Hz miteinander auf eine *ortho*-Stellung hinweist. Des weiteren ist ein Methylsignal erkennbar, das zu einem Dublett aufspaltet, was für eine Verknüpfung mit einer CH-Gruppe spricht. Die chemische Verschiebung von 4.73 ppm des ebenfalls erkennbaren CH-Signals spricht für eine

Sauerstoffsubstitution. Schließlich sind noch zwei getrennte Signale einer CH₂-Gruppe bei 2.65 und 3.22 ppm zu erkennen, die jeweils außer der geminalen Kopplung noch eine weitere Dublettaufspaltung zeigen, was auf eine Verknüpfung mit der CH-Gruppe schließen läßt. Außerdem bedeutet die Aufspaltung der CH₂-Gruppe in zwei Signale, daß das beschriebene Fragment Teil eines Ringsystems sein muß. Das ¹³C-NMR-Spektrum zeigt noch fünf quartäre Kohlenstoffatome an, von denen eines zu der Carbonylgruppe eines Esters gehört und zwei weitere zu sauerstoffsubstituierten aromatischen Kohlenstoffatomen. Die chemische Verschiebung der tertiären Kohlenstoffatome deutet darauf hin, daß sich in *ortho*-Stellung zu beiden CH-Gruppen die sauerstoffsubstituierten Kohlenstoffatome befinden. Daraus ergibt sich für den Naturstoff 62823b die Struktur **25** (Abbildung 20), die erstmals von M. A. DeAlvarenga^[49] aus dem Holz von pilzinfizierter *Virola caducifolia* isoliert wurde. Ein Vergleich mit den Literaturdaten^[50] des ¹H-NMR-Spektrums zeigte eine völlige Übereinstimmung.



(3*R*)-5-Hydroxymellein (**25**)

Abbildung 20: Dieser Naturstoff wurde erstmals aus dem Holz von pilzinfizierter *Virola caducifolia* isoliert

2.2.4 Naturstoff 62824a1b

Der Naturstoff 628241b wurde in Form eines weißen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 105–107 °C erhalten, der sich gut in Dichlormethan löst, auf dem DC durch Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar ist und einen R_F-Wert von 0.56 (Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH 9:1) hat. Die NMR-Spektren zeigen, daß die Substanz aus sechs CH-Gruppen und einer CH₃-Gruppe besteht. Die chemischen Verschiebungen von vier Kohlenstoffatomen zwischen 123.3 und 153.8 ppm gehören zu zwei Doppelbindungen, von denen eine durch Sauerstoffsubstitution polarisiert sein muß. Die chemischen Verschiebungen von 73.9 und 86.3 ppm sprechen für eine Sauerstoffsubstitution der beiden verbleibenden CH-Gruppen. Anhand des H,H-COSY-Spektrums läßt sich das in Abbildung 21 dargestellte Fragment erkennen.

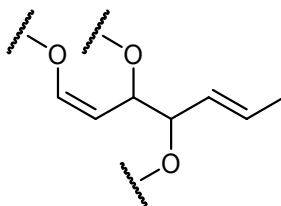
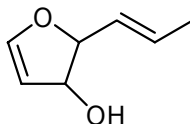


Abbildung 21: Fragment aus dem H,H-COSY-Spektrum von Naturstoff 62824a1b

Sowohl die vergleichsweise geringe Polarität als auch die chemische Verschiebung der sauerstoffsubstituierten Kohlenstoffatome, die für eine offenkettige Verbindung zu hoch ist, sprechen für ein Dihydrofuran. Außerdem bestätigt das CI-Massenspektrum eine Molekülmasse von 126. Damit ergibt sich für den Naturstoff 62824a1b die Struktur **26** (Abbildung 22), die sich nach einer Recherche in den Chemical Abstracts als literaturunbekannt erwies und den Namen Phomafuranol bekam.



Phomafuranol (26)

Abbildung 22: Ein unbekanntes Dihydrofuran aus *Phoma* sp.

Die Kopplungskonstante der beiden aliphatischen Protonen beträgt 6.6 Hz. Ein Vergleich mit den Kopplungskonstanten einiger synthetischer Produkte^[51,52] (Abbildung 23) legt die Vermutung nahe, daß die relative Konfiguration einer *trans*-Stellung der Protonen entspricht. Auf Grund des geringen Unterschieds der *trans*- und *cis*-Kopplungen in einem Dihydrofuransystem ist es jedoch nicht möglich dies mit Sicherheit zu sagen. Die Aufnahme eines NOE-Spektrums war auf Grund der geringen Substanzmenge von 1.7 mg nicht möglich.

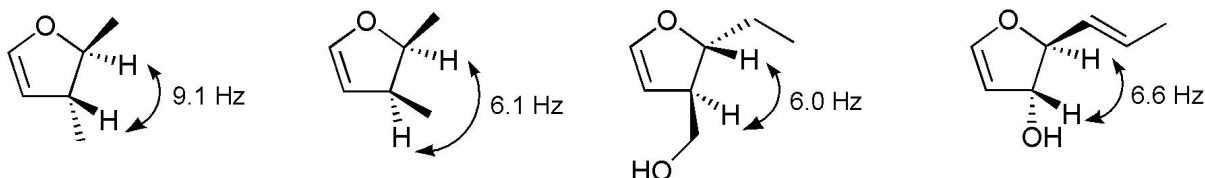


Abbildung 23: Kopplungskonstanten in Dihydrofuranen im Vergleich mit Phomafuranol

2.2.5 Naturstoff 62824a2

Die Substanz wurde als farbloses Öl erhalten, das sich gut in Dichlormethan löst. Die Substanz ist auf dem DC (R_f -Wert 0.58, Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) durch Anfärbung mit

Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar und zeigte im Hemmhoftest Aktivität gegen *Microbotryum violaceum*, *Bacillus megaterium* und *Chlorella fusca*. Die NMR-Spektren weisen große Ähnlichkeit mit denen des Naturstoff 62824a1b auf. Die Substanz besteht genau wie der Naturstoff 62824a1b aus einer Methylgruppe und sechs CH-Gruppen, jedoch zeigt sich im ^{13}C -NMR-Spektrum ein weiteres Signal, das auf Grund seiner chemischen Verschiebung von 164.4 ppm zu einer Estergruppe gehört. Die Kopplungen aus dem H,H-COSY-Spektrum der Verbindung führen zu der gleichen Verknüpfung der Kohlenstoffatome, wie sie bereits in Abbildung 21 dargestellt wurde. Die chemischen Verschiebungen der Z-Doppelbindung von 122.6 und 145.8 ppm sprechen für eine weniger ausgeprägte Polarisierung der Doppelbindung, so daß eine Verknüpfung mit der Estergruppe nahe liegt. Daraus ergibt sich das in Abbildung 24 dargestellte Fragment.

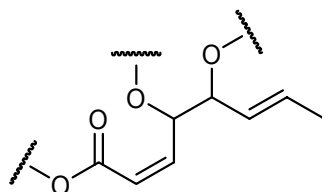


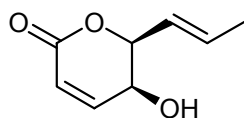
Abbildung 24: Fragment des Naturstoff 62824a2 aus den NMR-Spektren abgeleitet

Auch in diesem Fall spricht die Polarität der Substanz und die chemische Verschiebung der sauerstoffs substituierten CH-Gruppen für das Vorliegen einer cyclischen Verbindung. Die möglichen Strukturen sind in Abbildung 25 dargestellt.



Abbildung 25: Mögliche Strukturen von Naturstoff 62824a2

Eine Recherche in den Chemical Abstracts führt zu einer Veröffentlichung von T. Fukushima^[53], der beide Strukturen aus *Nigrospora sacchari* isolierte. Ein Vergleich der Literaturdaten beider Verbindungen ergab, daß es sich um (5*S*,6*S*)-5-Hydroxy-6-[(*E*)-1-propenyl]-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-on handelte (**27**, Abbildung 26), das erstmals 1969 von R. H. Evans^[54] isoliert wurde und den Namen (+)-Phomalacton bekam.



Phomalacton (27)

Abbildung 26: Ein literaturbekannter Naturstoff mit nematozider Wirkung gegen *Meloidogyne incognita*

Die biologische Aktivität von Phomalacton wurde ausgiebig untersucht und es wurde über eine nematozide Wirkung gegen *Meloidogyne incognita* berichtet, wobei im Vergleich mit Aldicarb^[55,56] eine geringere nematozide Wirkung gefunden wurde und eine vergleichbare Wirkung für die Unterdrückung des Wurzelbefalls.^[57] Ebenso wurden herbizide,^[53] fungizide und bakteriozide^[58] Wirkungen gefunden.

2.3 Stamm 6651

Bei dem Pilz 6651 handelt es sich um *Ascochyta* sp., der aus *Melilotus dentatus* in der Nähe von Ahrenshoop an der Ostsee isoliert wurde. Der Stamm war im Agardiffusionstest aktiv gegen *Microbotryum violaceum*, *Chlorella fusca*, *Septoria tritici* und *Phytophthora infestans*, wurde für 28 Tage auf Biomalz-Festagar angezüchtet und anschließend mit Ethylacetat extrahiert.

2.3.1 Isolierung der Naturstoffe

Der gewonnene Rohextrakt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel in 7 Fraktionen aufgetrennt. Aus Fraktion 1 konnte durch Kristallisation aus Dichlormethan der Naturstoff 66511b (**28**) gewonnen werden. Die Fraktionen 2 und 3 wurden nachträglich wieder vereint und enthielten zwei zweifach ungesättigte Fettsäuren sowie die Naturstoffe 66512a (**29**) und 66512b (**30**), die durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 und präparative Schichtchromatographie isoliert werden konnten. Aus Fraktion 4 konnte durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 der Naturstoff 66514a (**31**) gewonnen werden. Fraktion 5 lieferte den Naturstoff 66515a (**32**) nach Kristallisation aus Diethylether.

2.3.2 Naturstoff 66511b

Der Naturstoff 66511b kristallisiert aus Dichlormethan in Form von farblosen Plättchen und hat einen Schmelzpunkt von 186–187 °C. Er ist sehr gut in Dichlormethan löslich und auf

dem DC (R_f -Wert 0.69, Laufmittel CH_2Cl_2) unter UV-Licht (254 nm) durch Fluoreszenzlöschung des Indikators detektierbar. Mit Anisaldehyd/Schwefelsäure färbt der Naturstoff zunächst gelb, bei weiterem Erhitzen violett an. Im Agardiffusionstest erwies sich die Substanz als aktiv gegen *Chlorella fusca* und *Microbotryum violaceum*. In vitro zeigte sich Aktivität gegen *Pyricularia oryzae*. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt ein Aldehyd-Proton bei 10.15 ppm sowie zwei chelierte Hydroxygruppen bei 11.65 und 12.55 ppm.

Unter Einbeziehung der ^{13}C - und DEPT-NMR-Spektren zeigt sich, daß die Substanz aus einer Methylgruppe, einer CH-Gruppe, einer CH_2 -Gruppe, einer sp^2 -hybridisierten CH-Gruppe, sechs quartären, sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen sowie zwei Carbonylgruppen besteht, von denen eine zu einer Aldehydgruppe gehört und die andere zu einem Ester. Das hochauflösende Massenspektrum ergab die Summenformel $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_5$. Anhand der chemischen Verschiebung des Kohlenstoffatoms der CH_2 -Gruppe von 98.3 ppm und der geminalen Kopplungskonstante der beiden Protonen von 2.3 Hz läßt sich eine endständige Doppelbindung erkennen, die mit einem Sauerstoffatom substituiert ist. Somit läßt sich aus den vorhandenen acht sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen ein Benzolring und eine Doppelbindung formulieren. Die chemische Verschiebung der sp^2 -hybridisierten CH-Gruppe von 103.9 ppm spricht für eine Sauerstoffsstitution in *ortho*-Position auf beiden Seiten. Aus dem Kopplungsmuster des Methylgruppensignals (Dublett, 7.2 Hz) läßt sich schließen, daß die Methylgruppe mit der sp^3 -hybridisierten CH-Gruppe verknüpft ist. Damit ergeben sich die in Abbildung 27 dargestellten Fragmente A–E.

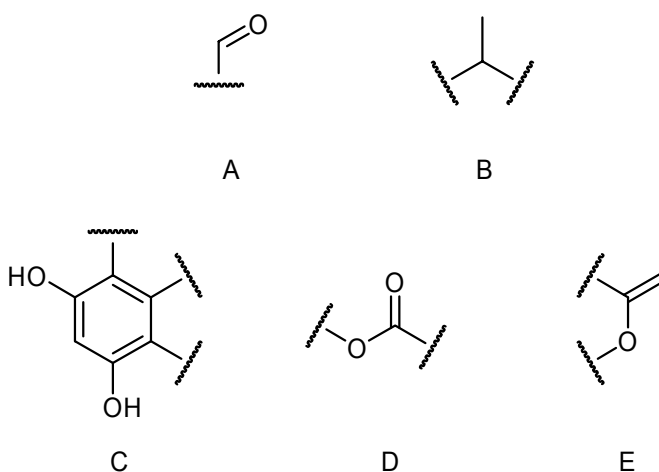


Abbildung 27: Aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren erkennbare Fragmente des Naturstoffs 66511b

Aus den Kopplungen im HMBC- und H,H -COSY-Spektrum ergibt sich die in Abbildung 28 dargestellte Verknüpfung der einzelnen Fragmente.

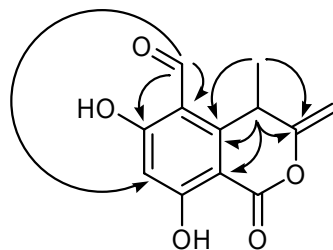


Abbildung 28: Kopplungen aus dem HMBC von Naturstoff 66511b

Zur Bestätigung wurde die Röntgenstruktur (Abbildung 29) von Naturstoff 66511b gemessen. Diese zeigte eindeutig, daß die Substanz mit ihrem spezifischen Drehwert von 308.2° enantiomerenrein vorliegt.

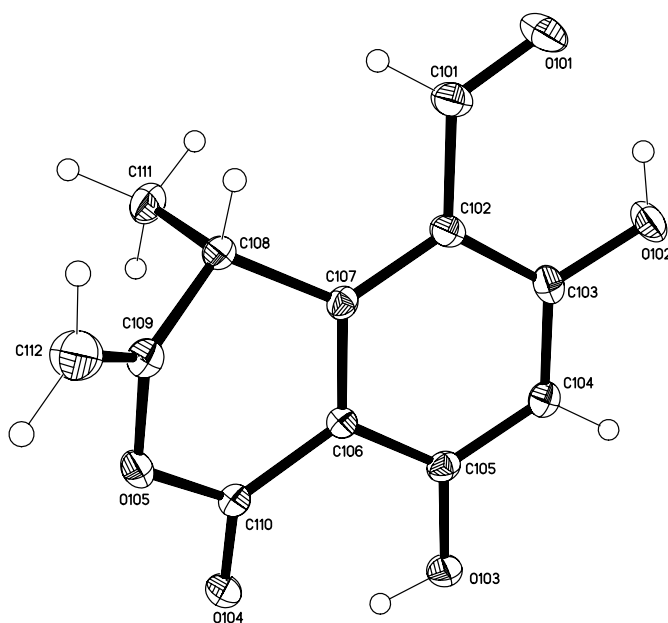


Abbildung 29: Röntgenstruktur von Naturstoff 66511b

2.3.2.1 Bestimmung der absoluten Konfiguration

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration kann der Circular dichroismus herangezogen werden. Dieser ist definiert als die Differenz $\Delta\epsilon$ der Absorptionskoeffizienten von rechts und links circular-polarisierten Lichtwellen.

$$\Delta\epsilon = \epsilon_R - \epsilon_L$$

In chiralen Medien bewegen sich rechts und links circular-polarisierte Lichtwellen nicht nur unterschiedlich schnell, sie werden auch unterschiedlich stark geschwächt. Der aus der

Überlagerung der Vektoren E_R und E_L resultierende Vektor E durchläuft nach Durchqueren des chiralen Mediums eine Ellipse.^[59] Wird die Ellipse im Uhrzeigersinn durchlaufen, spricht man von einem positiven im anderen Fall von einem negativen Circular dichroismus.^[60]

Die CD-Spektren sind für einen gegebenen Chromophor charakteristisch. Im Fall von Enantiomeren sind diese an der X-Achse gespiegelt, daher läßt sich von dem CD-Spektrum auf die absolute Konfiguration schließen, insofern Vorhersagen über das CD-Spektrum eines der beiden Enantiomere eines Chromophors gemacht werden können.

Zu diesem Zweck wird das CD-Spektrum eines Enantiomers berechnet und mit dem experimentellen CD-Spektrum verglichen.

Da die räumliche Struktur des Moleküls Auswirkungen auf das CD-Spektrum hat, wird zunächst eine Konformationsanalyse mit Hilfe des Programms Spartan SGI Version 5.3 durchgeführt. Für jedes der energetisch günstigsten Konformere (bis 12 kJ Unterschied) wird dann mit Hilfe des Programmpakets BDZDO/MCDSPD, welches von Downing entwickelt und von Fleischhauer modifiziert wurde^[61], ein CD-Spektrum berechnet. Anschließend wird mit Hilfe der Boltzmann-Statistik eine Gewichtung der einzelnen CD-Spektren durchgeführt und diese mit ihrer jeweiligen Gewichtung zu dem endgültigen Spektrum addiert.

Ein Vergleich von berechnetem und gemessenem Spektrum kann zu drei möglichen Ergebnissen führen:

1. das berechnete Spektrum ist mit dem gemessenen Spektrum identisch
2. das berechnete Spektrum ist ein genaues Spiegelbild des gemessenen Spektrums
3. das berechnete Spektrum zeigt keine ausreichende Ähnlichkeit mit dem gemessenen Spektrum.

Im ersten Fall ist die Konfiguration beider Moleküle identisch. Im zweiten Fall ist die Konfiguration der Substanz spiegelbildlich zu der für die Berechnung angenommenen. In beiden Fällen kann so eine Aussage über die absolute Konfiguration eines Moleküls gemacht werden.

Im dritten Fall führen die für die Berechnung angewendeten Näherungen zu deutlichen Abweichungen zwischen dem gemessenen und dem berechneten Spektrum, so daß keine Aussage über die absolute Konfiguration des Moleküls getroffen werden kann.

Die vorliegenden berechneten CD-Spektren wurden im Arbeitskreis von Professor Krohn von Brigitta Elsässer durchgeführt, die experimentellen Spektren wurden im Arbeitskreis von Professor Antus von Dr. Tibor Kurtán aufgenommen.

Wie in Abbildung 30 dargestellt, weisen der Kurvenverlauf des berechneten und des gemessenen CD-Spektrums gewisse Ähnlichkeiten auf. Beide zeigen einen ausgeprägten

positiven Cotton-Effekt, weisen aber eine Differenz von 60 nm auf. Deshalb kann keine eindeutige Aussage über die absolute Konfiguration des Moleküls gemacht werden. Die mögliche Ursache für die Abweichungen ist in der Komplexizität des Chromophors zu suchen, da sowohl die endständige Doppelbindung als auch der Aldehyd-Substituent am Benzolring den Cotton-Effekt beeinflussen. Es wurde vermutet, daß das Programm diese Einflüsse bei der Berechnung nicht berücksichtigen kann.^[62]

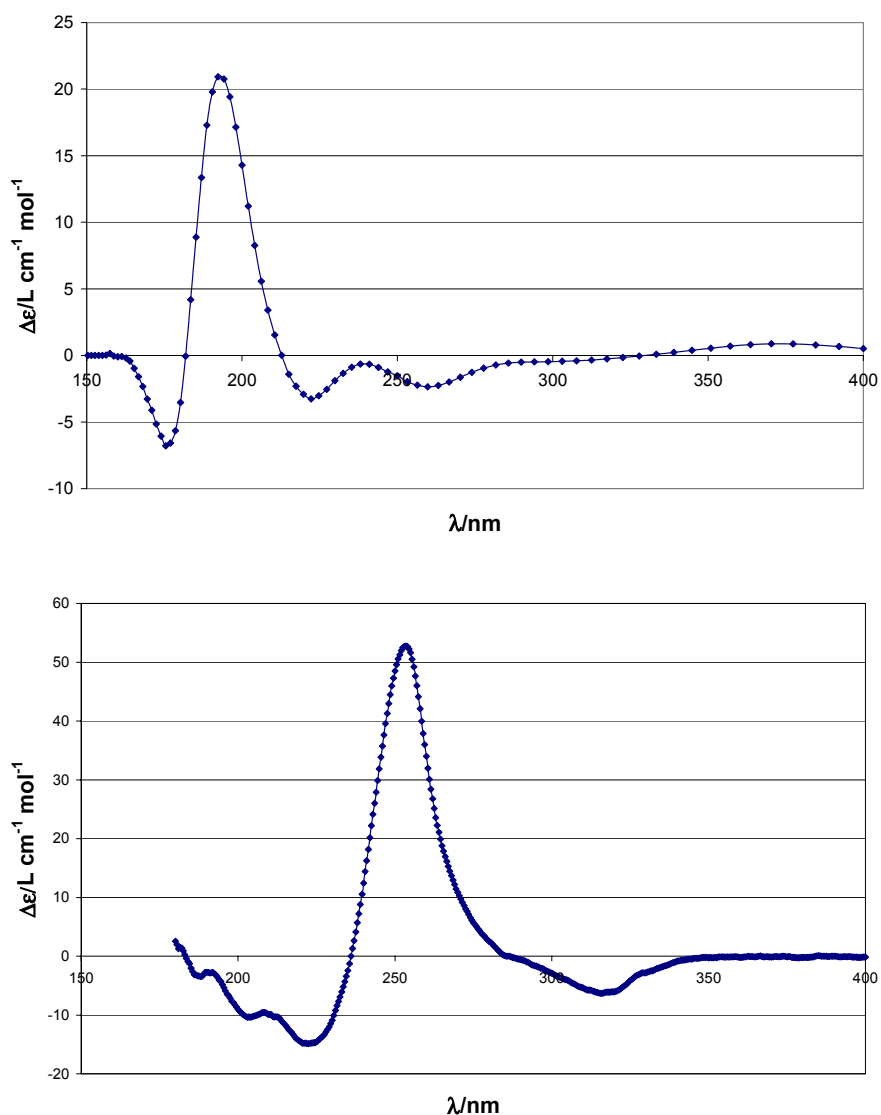


Abbildung 30: Berechnetes (oben) und gemessenes (unten) CD-Spektrum von Naturstoff 66511b

Um die absolute Konfiguration dennoch zu bestimmen, war es erforderlich, den Chromophor den ausführlich untersuchten Dihydroisocoumarinen anzugleichen^[63,64]. Dazu wurde eine kleine Menge des Naturstoffs hydriert. Da die Methylgruppe in der Nachbarstellung zu der endständigen Doppelbindung eine sterische Hinderung für den Angriff von dieser Seite darstellt, sollte wie in Abbildung 31 gezeigt bei der Hydrierung mit Palladium/Kohlenstoff je

nach Konfiguration des Eduktes überwiegend das 3*R*,4*R*- oder 3*S*,4*S*-Produkt gebildet werden.

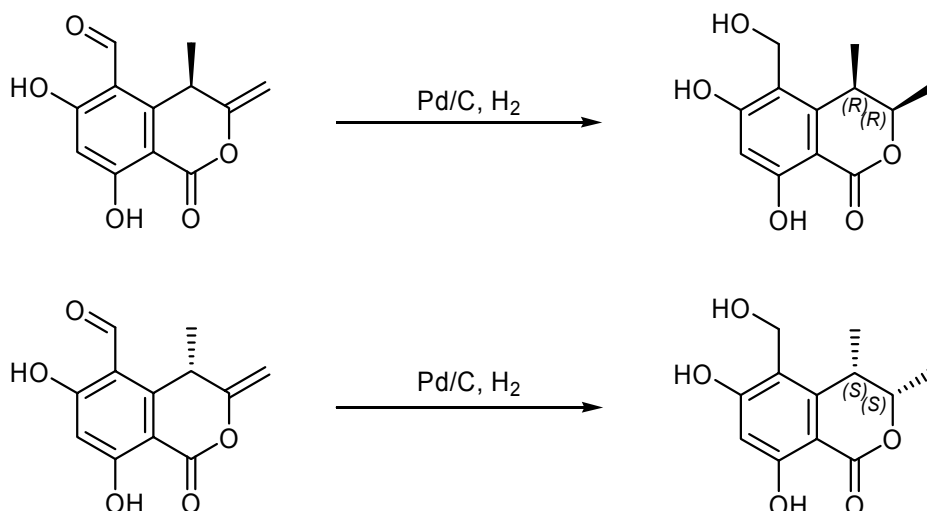


Abbildung 31: Bildung des bevorzugten Diastereomers bei der Hydrierung mit Pd/C

Nach der Aufarbeitung und Reinigung des Hydrierungsproduktes durch präparative Schichtchromatographie konnte anhand der Kopplungskonstanten aus dem $^1\text{H-NMR}$ gezeigt werden, daß tatsächlich nur eines von zwei möglichen Diastereomeren gebildet wird. Das Hydrierungsprodukt hat also die erwartete 3*R*,4*R*- oder 3*S*,4*S*-Konfiguration.

Von dem Hydrierungsprodukt wurde nun ebenfalls ein CD-Spektrum gemessen. Es zeigt sich ein ausgeprägter, negativer Cotton-Effekt bei 218 nm (−6.8).

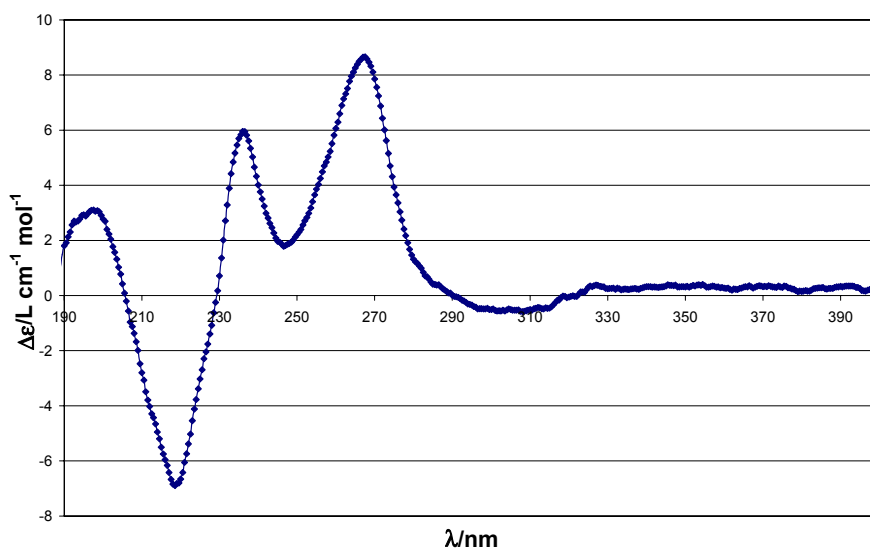


Abbildung 32: Gemessenes CD-Spektrum des 6,8-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-3,4-dimethyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-on

Das Vorzeichen des Cotton-Effekts für den $n\text{-}\pi^*$ -Übergang bei 218 nm (−6.8) kann zur Bestimmung der absoluten Konfiguration herangezogen werden. Die Helizitätsregel besagt,

daß bei einem Dihydroisocoumarin, welches in einer Halbsesselkonformation mit einem pseudoaxialen Substituenten am Kohlenstoffatom 3 vorliegt, ein negativer Cotton-Effekt durch M-Helizität entsteht. Ein positiver Cotton-Effekt tritt bei P-Helizität auf.^[64] Das 6,8-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-3,4-dimethyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-on muß also eine M-Helizität aufweisen, bei der der Substituent am Kohlenstoffatom 3 pseudoäquatorial und der am Kohlenstoffatom 4 pseudoaxial orientiert sind (Abbildung 33). Dies wird durch die Konformationsanalyse bestätigt. Daraus folgt die 3*R*,4*R*-Konfiguration des untersuchten Moleküls.

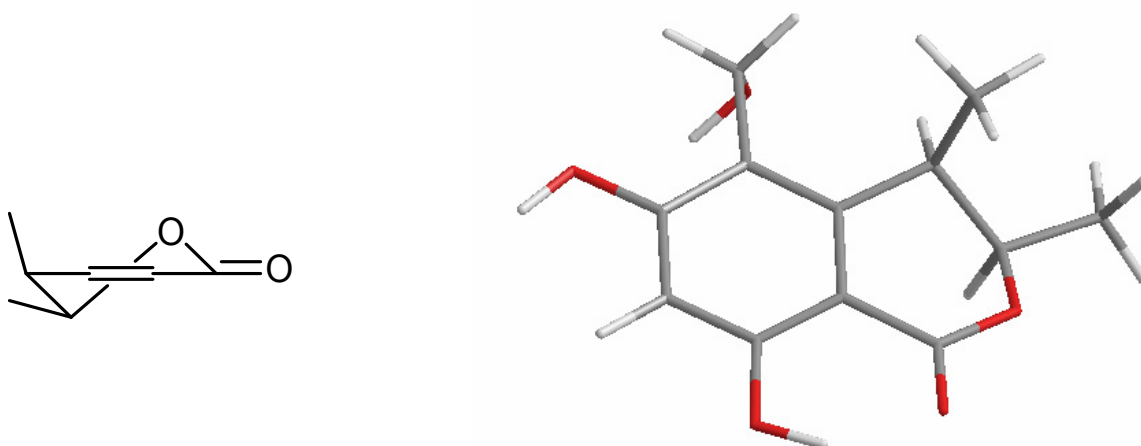


Abbildung 33: M-Helizität (links) des 6,8-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-3,4-dimethyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-ons und berechnete Konformation (rechts)

Ein Vergleich mit dem berechneten CD-Spektrum des 3*R*,4*R*-Enantiomers (Abbildung 34) ergibt eine gute Übereinstimmung zwischen dem berechneten und dem gemessenen Spektrum. Das berechnete CD-Spektrum zeigt einen ausgeprägten, negativen Cotton-Effekt bei 200 nm (−18.0). Die Abweichung der Extrempunkte der beiden Kurven liegt zwischen 3 und 18 nm. Die große Ähnlichkeit des Verlaufs beider Kurven und der Lage der Extrempunkte läßt den Schluß zu, daß die Konfiguration der gemessenen Substanz mit der des berechneten Moleküls identisch ist.

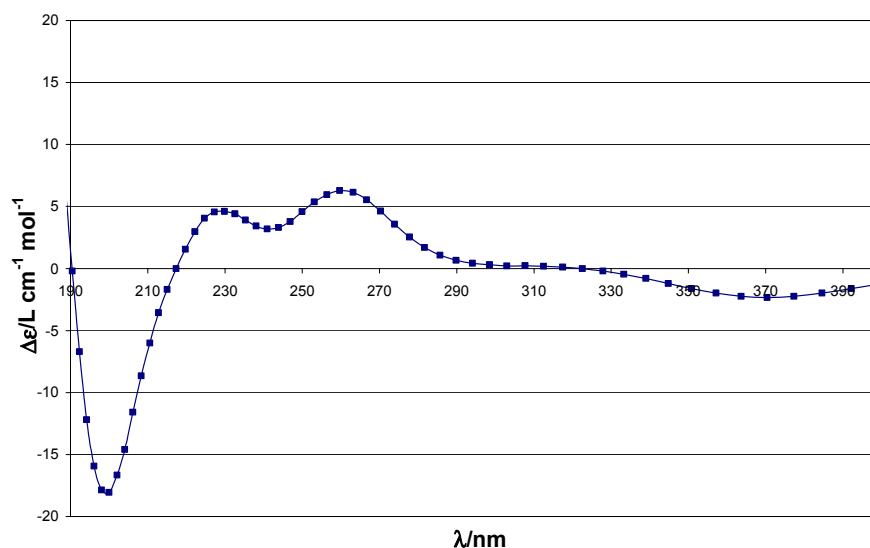
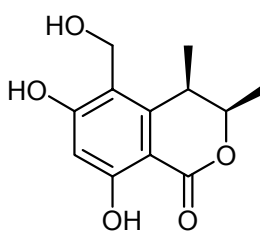


Abbildung 34: Berechnetes CD-Spektrum des Hydrierungsprodukts von Naturstoff 66511b

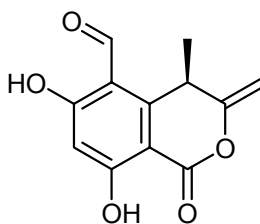
Damit kann das Hydrierungsprodukt als (3*R*,4*R*)-6,8-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-3,4-dimethyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-on (**28a**, Abbildung 35) identifiziert werden.



28a

Abbildung 35: Hydrierungsprodukt des Naturstoffs 66511b

Da eine Isomerisierung am Stereozentrum während der Reaktion ausgeschlossen werden kann, muß es sich bei dem Naturstoff 66511b um (4*R*)-6,8-Dihydroxy-4-methyl-3-methylen-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-5-carbaldehyd (**28**, Abbildung 36) handeln, dem hiermit der Name Ascochin gegeben werden soll.



Ascochin (28)

Abbildung 36: Ein literaturunbekannter Naturstoff aus *Ascochyta* sp.

2.3.3 Naturstoff 66512a

Der Naturstoff 66512a wurde als farbloses Öl erhalten, das sich gut in Chloroform und Dichlormethan löst und auf dem DC (R_f -Wert 0.54, Laufmittel CH_2Cl_2) durch Anfärben mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektiert werden kann. Aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren lassen sich zwei Methylgruppen erkennen, eine Ketogruppe, eine CH-Gruppe und sechs CH_2 -Gruppen. Die Multiplizität des einen Methylsignals (Dublett, 6.9 Hz) bei 1.05 ppm läßt darauf schließen, daß die Methylgruppe mit der CH-Gruppe verknüpft ist. Die chemische Verschiebung der zweiten Methylgruppe und der CH-Gruppe von 2.11 und 2.47 ppm zeigt die Verknüpfung mit der Carbonylgruppe an. Die Multiplizität des CH-Signals (tq, 6.9 Hz) deutet darauf hin, das die CH-Gruppe direkt an eine CH_2 -Gruppe geknüpft ist. Da die CH_2 -Gruppen eine aliphatische Kette bilden, ergibt sich das in Abbildung 37 dargestellte Fragment.

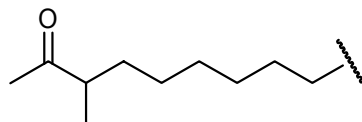
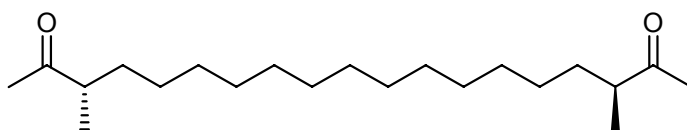


Abbildung 37: Aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren abgeleitetes Fragment des Naturstoff 66512a

Das EI-Massenspektrum der Substanz zeigt einen Molekülpeak bei 324. Das in Abbildung 37 dargestellte Fragment ergibt jedoch nur eine Molekülmasse von 155. Da das ^{13}C -NMR-Spektrum keine anderen Signale enthält, muß das Molekül symmetrisch aufgebaut sein. Zwei der Fragmente ergäben wiederum eine Molekülmasse von 310. Daher muß das Molekül noch eine zusätzliche CH_2 -Gruppe enthalten, deren ^{13}C -Signal mit einem der anderen zusammenfällt. Das HR-EIMS bestätigt die Summenformel von $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_2$, so daß es sich bei Naturstoff 66512a um 3,17-Dimethylnonadecan-2-18-on handelt, dem der Name Ascoketon (**29**, Abbildung 38) gegeben wird.

Das Vorhandensein einer optischen Aktivität mit einem spezifischen Drehwert von $+19.8^\circ$ ($c = 0.44$, CH_2Cl_2) schließt das Vorliegen der Substanz in der *meso*-Form aus. Die absolute Konfiguration konnte jedoch nicht ermittelt werden.



Ascoketon (**29**)

Abbildung 38: Ein literaturunbekannter Naturstoff aus *Ascochyta* sp.

2.3.4 Naturstoff 66512b

Die Substanz wurde als farbloses Öl erhalten, welches sich gut in Dichlormethan und Chloroform löst. Auf dem DC ist die Substanz durch ihre gelbe Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar und hat einen R_f -Wert von 0.49 (Laufmittel CH_2Cl_2). Der spezifische Drehwinkel des Naturstoffs beträgt -36.6° ($c = 0.9$, CH_2Cl_2). Aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren läßt sich entnehmen, daß die Substanz aus drei Methylgruppen, sechs CH_2 -Gruppen, einer CH -Gruppe, einer Carbonylgruppe und vier quartären Kohlenstoffatomen besteht. Aus den chemischen Verschiebungen von drei der vier quartären Kohlenstoffatome und einer der CH_2 -Gruppen zwischen 109.2 und 162.1 ppm lassen sich zwei Doppelbindungen erkennen, von denen eine endständig ist. Außerdem zeigt sich noch eine Polarisierung der zweiten Doppelbindung, die daher mit der Carbonylgruppe konjugiert sein muß. Die Zuordnung der Protonen-Signale zu den dazugehörigen Kohlenstoff-Signalen erfolgte mit Hilfe des HMQC-Spektrums. Die Daten der ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Chemische Verschiebungen und Kopplungen des Naturstoff 66512b

Atomnummer	^{13}C -NMR	^1H -NMR	H,H-COSY	HMBC
1	128.8	-	-	-
2	199.1	-	-	-
3	33.8	2.42/2.54	4	1, 2, 4, 4a
4	37.5	1.78	3	3, 4a, 5, 10
4a	35.8	-	-	-
5	41.9	1.46/1.73	6	4a, 6, 7, 10
6	26.9	1.65/1.73	5, 7	7
7	45.9	2.07	6	-
8	32.9	2.07/2.76	-	1, 4a, 6, 7, 8a, 11
8a	162.1	-	-	-
9	10.9	1.8	-	1, 8a
10	22.5	1.25	-	4, 5, 8a
11	149.2	-	-	-
12	109.2	4.8	-	7, 11, 13
13	20.7	1.81	-	12, 11

Zusammen mit dem H,H-COSY -Spektrum lassen sich die in Abbildung 39 dargestellten Fragmente A–D erkennen.

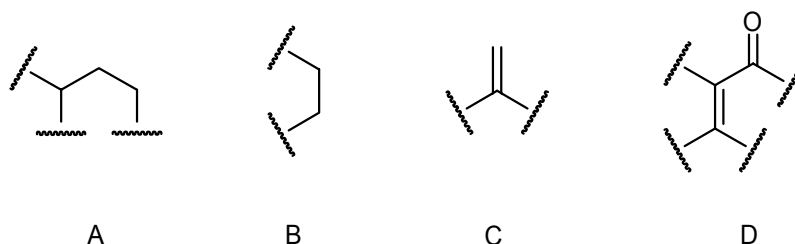
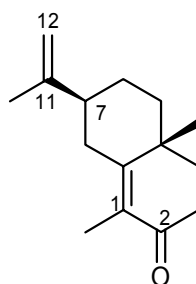


Abbildung 39: Aus den ^1H -, ^{13}C - und H,H-COSY-Spektren abgeleitete Fragmente des Naturstoff 66512b

Die Auswertung des HMBC-Spektrums ergab die Struktur **30** (Abbildung 40) und eine Suche in den Chemical Abstracts führte zu dem α -Cyperon. Der Vergleich der Literaturdaten der ^{13}C -Verschiebungen^[65] ergab eine völlige Übereinstimmung. Der spezifische Drehwinkel^[66] des α -Cyperons zeigte jedoch einen entgegengesetzten Drehsinn, woraufhin der Naturstoff 66512b als ent- α -Cyperon identifiziert werden konnte, das erstmals 1990 von Yoshinori Asakawa^[67] isoliert wurde.



ent- α -Cyperon (**30**)

Abbildung 40: Ein literaturbekannter Naturstoff, der erstmals von Y. Asakawa isoliert wurde

2.3.5 Naturstoff 66514a

Der Naturstoff bildet schwach gelbe Kristalle (Smp.: 108–110 °C) und ist gut löslich in Dichlormethan und Methanol. Im DC ist er durch seine UV-Löschung bei 254 nm detektierbar und hat einen R_f -Wert von 0.36 (Laufmittel CH_2Cl_2). Die Substanz hat einen spezifischen Drehwinkel von -39.2° ($c = 0.25$, MeOH) und zeigt im Agardiffusionstest Aktivität gegen *Bacillus megaterium*, *Microbotryum violaceum* und *Chlorella fusca*. Aus den NMR-Spektren lassen sich eine Methylgruppe, zwei sp^3 -hybridisierte CH-Gruppen, drei sp^2 -hybridisierte CH-Gruppen sowie drei quartäre, sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome und eine Carbonylgruppe erkennen, deren chemische Verschiebung von 169.9 ppm für das Strukturelement eines Esters spricht. Die Multiplizität und die Kopplungskonstante der Methylgruppe bei 1.58 ppm spricht für eine Verknüpfung mit der CH-Gruppe bei 4.70 ppm,

deren Kopplungsmuster (dq) eine Verknüpfung mit der zweiten CH-Gruppe anzeigt. Die chemischen Verschiebungen beider CH-Gruppen von 4.57 und 4.70 ppm zeigen eine Sauerstoffsstitution an. Das Kopplungsmuster der aromatischen Protonen zeigt eine *ortho*-Stellung der drei CH-Gruppen im Aromaten an. Die Verschiebung eines der quartären Kohlenstoffatome von 162.3 ppm und einer CH-Gruppe von 118.7 ppm spricht für eine Sauerstoffsstitution in *ortho*-Stellung zu dieser CH-Gruppe. Folglich besteht die Substanz aus den in Abbildung 41 gezeigten Fragmenten A–C.

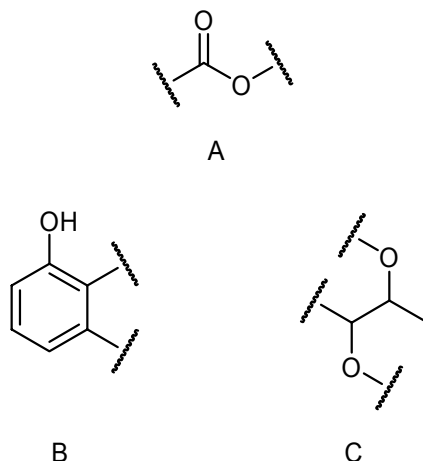
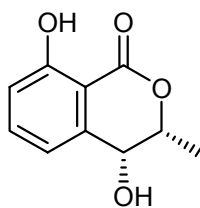


Abbildung 41: Aus den NMR-Spektren zu erkennende Fragmente des Naturstoff 66514a

Unter Berücksichtigung der im ^1H -NMR-Spektrum erkennbaren, chelierten Hydroxygruppe, ergibt sich als einzig sinnvolle Verknüpfung die Struktur **31** (Abbildung 42). Die relative Konfiguration der beiden Stereozentren wurde aus der Größe der Kopplung der beiden Protonen von 2.1 Hz geschlossen, die für eine axial-äquatorial-Position spricht. Eine Suche in den Chemical Abstracts führte zu den beiden Enantiomeren des 4-Hydroxymelleins. Diese Struktur wurde durch einen Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten mit den Literaturdaten bestätigt. Die absolute Konfiguration konnte durch einen Vergleich des gemessenen spezifischen Drehwinkels von -39.2° mit den Literaturdaten^[68] ($[\alpha]_D^{20} = -31^\circ$) ermittelt werden. Somit handelt es sich bei Naturstoff 66514a um (3*R*,4*R*)-4-Hydroxymellein, das erstmals 1971 von Richard J. Cole^[69] aus *Aspergillus ochraceus* isoliert wurde. Die Substanz wird von vielen Pilzen produziert und wurde bereits mehrfach im Arbeitskreis von Prof. Krohn gefunden. G. König et al. isolierten diese Substanz aus *Microsphaeropsis* sp. und wiesen im Agardiffusionstest Aktivität gegen *Eurotium repens* und *Ustilago violacea* nach.^[70]



(3*R*,4*R*)-4-Hydroxymellein (31)

Abbildung 42: Ein bekannter Naturstoff aus *Aspergillus ochraceus* mit fungizider Wirkung

2.3.6 Naturstoff 66515a

Der Naturstoff 66515a kristallisiert aus Dichlormethan in weißen Nadeln und hat einen Schmelzpunkt von 101–102 °C. Auf dem DC (R_f -Wert: 0.51, Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) ist die Substanz durch Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar und im Agardiffusionstest zeigt sie Aktivität gegen *Microbotryum violaceum* und *Bacillus megaterium*. In vitro ist die Substanz schwach aktiv gegen *Septoria tritici*. Das ^1H -NMR-Spektrum in Abbildung 43 zeigt drei sauerstoffs substituierte CH-Gruppen und eine Methylgruppe.

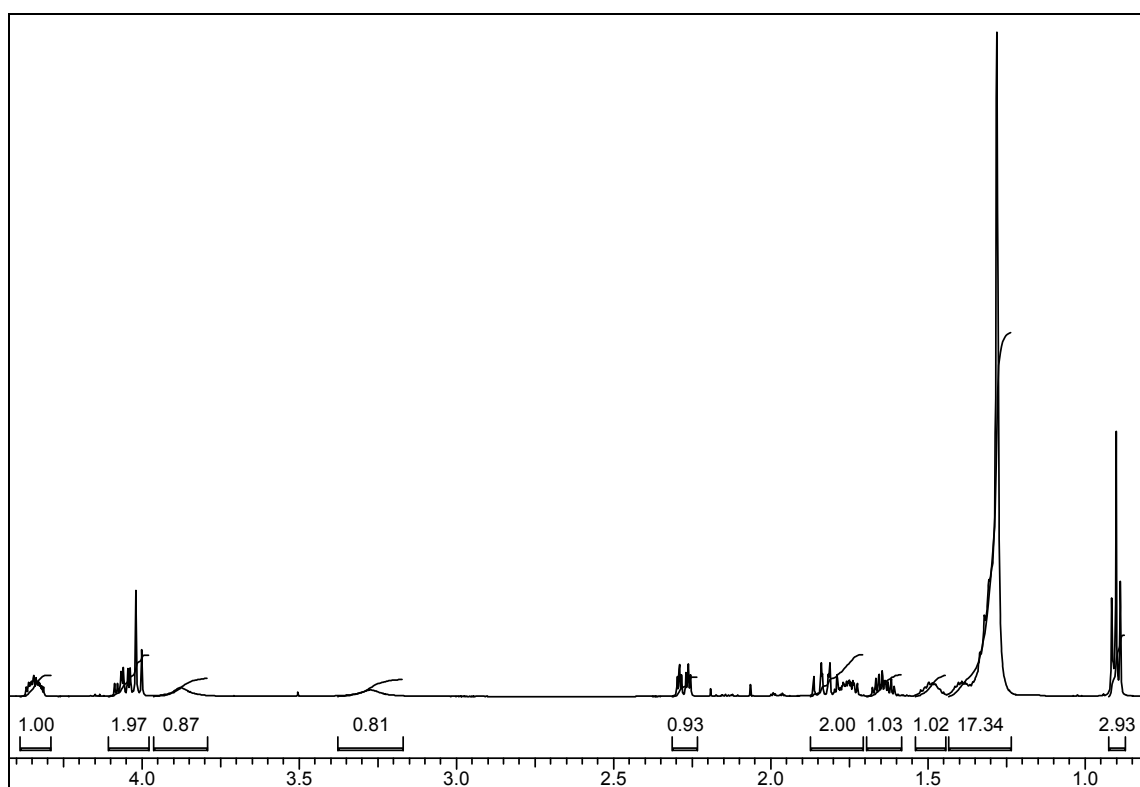


Abbildung 43: ^1H -NMR-Spektrum des Naturstoff 66515a in CDCl_3 bei 500 MHz

Mit Hilfe des ^{13}C -NMR- (Abbildung 44) und des DEPT-Spektrums können die weiteren Protonensignale als elf CH_2 -Gruppen identifiziert werden. Auf Grund ihrer sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen müssen neun dieser CH_2 -Gruppen einer aliphatischen Kette zugeordnet werden. Außerdem ist im ^{13}C -NMR-Spektrum noch ein Carbonylgruppensignal zu erkennen, welches zu einer Estergruppe gehört. Das hochauflösende Massenspektrum ergibt eine Summenformel von $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_4$.

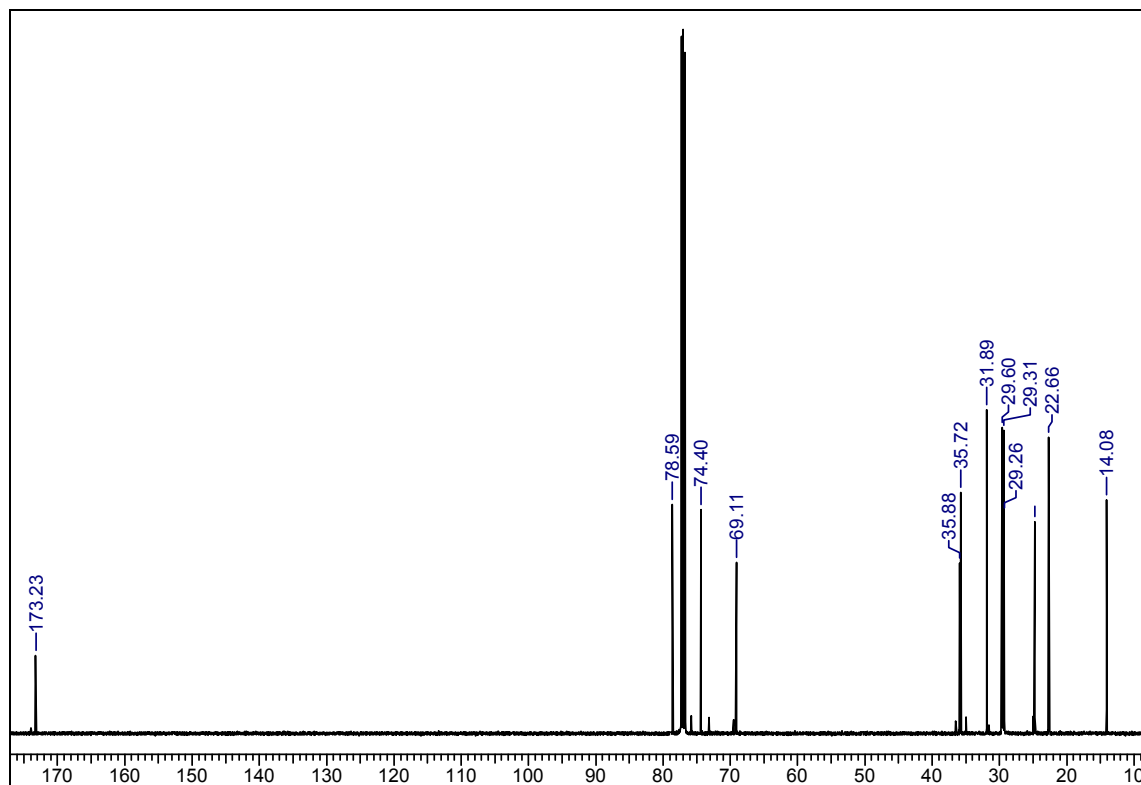


Abbildung 44: ^{13}C -NMR-Spektrum des Naturstoff 66515a in CDCl_3 bei 500 MHz

Die Kopplungen aus dem H,H -COSY-Spektrum führen zu dem in Abbildung 45 dargestellten Fragment.

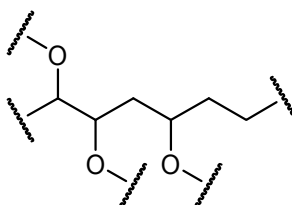


Abbildung 45: Fragment aus dem H,H -COSY-Spektrum von Naturstoff 66515a

Das HMBC-Spektrum zeigt eine Verknüpfung der Carbonylgruppe mit der ersten CH -Gruppe des in Abbildung 45 dargestellten Fragmentes. Außerdem läßt sich die Verknüpfung der aliphatischen Kette mit der bereits im Fragment enthaltenen CH_2 -Gruppe am Ende der Kette

erkennen. Für einen Ringschluß ist nur das Sauerstoffatom in der Mitte des Fragments geeignet, woraus sich für den Naturstoff 66515a die Struktur **32** (Abbildung 47) ergibt. Die relative Konfiguration der Substanz konnte aus den Kopplungskonstanten der Protonen abgeleitet werden. Wie in Abbildung 46 gezeigt, deutet die Kopplung von 9.7 Hz auf eine axial-axial-Stellung der Protonen an den Kohlenstoffatomen 3 und 4 hin, wohingegen die Protonen an den Kohlenstoffatomen 4 und 6 zu dem gleichen Proton der CH₂-Gruppe eine äquatorial-axial-Kopplung aufweisen.

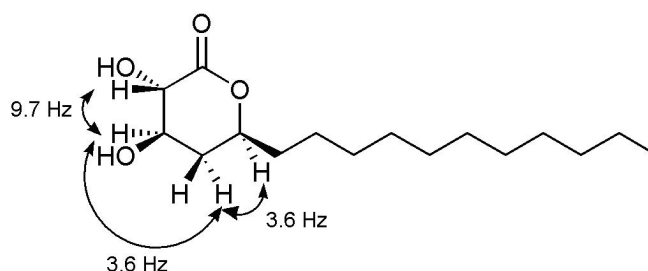
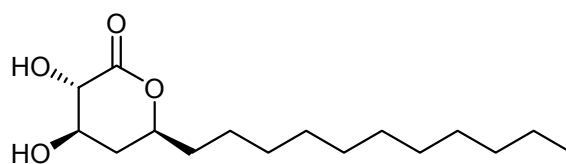


Abbildung 46: Relative Konfiguration des Naturstoff 66515a aus den Protonen-Kopplungen

Eine Recherche in den Chemical Abstracts blieb erfolglos. Jedoch wurde das Lacton mit einer um zwei Kohlenstoffatome kürzeren Seitenkette bereits von H. Toshima und H. Sato^[71] aus *Seiridium unicorne* isoliert. Die Autoren haben die absolute Konfiguration dieser Substanz durch Synthese des Enantiomers aus D-Glucose ermittelt. Ein Vergleich des Drehwerts von Naturstoff 66515a ($[\alpha]_D^{20} = -37.1^\circ$) mit dem des literaturbekannten Lactons ($[\alpha]_D^{20} = -35.0^\circ$) ergab eine Übereinstimmung. Bei dem Naturstoff 66515a handelt es sich somit um das literaturunbekannte (3*S*,4*R*,6*S*)-3,4-Dihydroxy-6-undecyltetrahydro-2*H*-pyran-2-on, dem der Name Ascolacton (Abbildung 47) gegeben wird.



Ascolacton (**32**)

Abbildung 47: Ein literaturunbekannter Naturstoff aus *Ascochyta* sp.

2.4 Stamm 6577

Der Stamm 6577, *Pseudoanguillospora* sp. wurde aus der Rotalge *Polyides rotundus* aus der Ostsee bei Ahrenshoop isoliert, 21 Tage auf Biomalz-Festagar kultiviert und anschließend mit

Ethylacetat extrahiert. Der Rohextrakt zeigte im Agardiffusionstest Aktivität gegen *Microbotryum violaceum* und *Bacillus megaterium*.

2.4.1 Isolierung der Naturstoffe

Der Rohextrakt wurde mit Hexan gewaschen und der hexanunlösliche Teil in Dichlormethan aufgenommen. Die Dichlormethanphase wurde ebenfalls vom unlöslichen Teil getrennt. Durch Kristallisation aus der Dichlormethanphase konnte zunächst der Naturstoff 65772 (**33**) gewonnen werden. Die Mutterlauge wurde anschließend durch Säulenchromatographie in 5 Fraktionen aufgetrennt. Aus Fraktion 3 konnte durch präparative Schichtchromatographie (PSC) der Naturstoff 6577c3 (**34**) isoliert werden. Der in Dichlormethan unlösliche Teil des Rohextraktes wurde noch einmal mit Methanol gewaschen und die Methanolphase ebenfalls an Kieselgel chromatographiert und in 4 Fraktionen aufgetrennt. Aus Fraktion 4 konnte der Naturstoff 6577m4 (**35**) durch PSC an RP-Kieselgel isoliert werden. Der Verlauf der Isolierung ist in Abbildung 48 schematisch dargestellt.

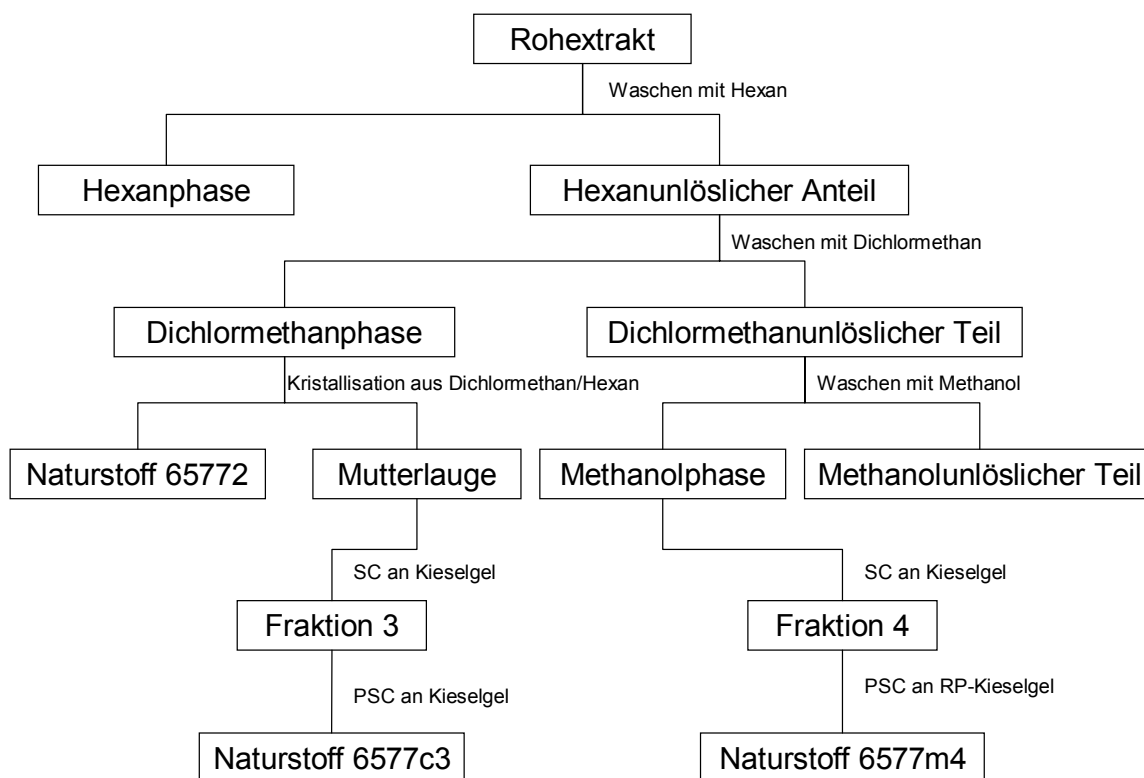


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Isolierung aus Stamm 6577

2.4.2 Naturstoff 65772

Der Naturstoff 65772 ist gut löslich in Dichlormethan und fällt durch Zugabe von Hexan in Form eines gelben, amorphen Feststoffes aus (Zers.: $>180\text{ }^{\circ}\text{C}$). Auf dem DC (R_f -Wert 0.49, Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) ist der Naturstoff durch seine gelbe Farbe und durch die Dunkelfärbung unter Licht und Sauerstoffeinfluß leicht detektierbar. Im Agardiffusionstest zeigte die Substanz Aktivität gegen *Bacillus megaterium* und *Microbotryum violaceum*. In-vitro zeigte sich eine Wirkung gegen *Phytophthora infestans*. Das ^1H -NMR-Spektrum weist ein Signal mit der relativen Intensität 3 bei 1.44 ppm, ein weiteres Signal mit der relativen Intensität 2 bei 2.70 ppm sowie sechs Signale mit der relativen Intensität 1 auf, von denen zwei im Aromatenbereich liegen. Drei der Signale sind Hydroxygruppen zuzuordnen, von denen eine cheliert ist. Das letzte Signal bei 4.51 ppm deutet auf ein sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffatom hin, das mit einem Sauerstoffatom verknüpft ist. Die Multiplizität der Signale bei 1.44 und 2.70 ppm läßt auf eine Verknüpfung der Methylgruppe mit der sp^3 -hybridisierten CH-Gruppe schließen, die ihrerseits mit der CH_2 -Gruppe verknüpft ist. Das ^{13}C -NMR-Spektrum weist zehn Signale im Aromatenbereich, ein Carbonylsignal bei 198.9 ppm und drei Signale im Aliphatenbereich auf. Die Auswertung der HMQC- und HMBC-Spektren ergibt das in Abbildung 49 dargestellte Fragment.

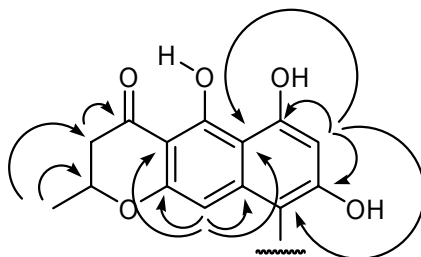


Abbildung 49: HMBC-Kopplungen für Naturstoff 65772

Das Vorhandensein eines Molekülpeaks im EI-Massenspektrum mit der Masse von 518.3 läßt darauf schließen, daß es sich bei dem Naturstoff 65772 um ein Dimer des in Abbildung 49 dargestellten Fragments handelt. Eine Recherche in den Chemical Abstracts führte zu dem bekannten Naturstoff Cephalochromin (**33**, Abbildung 50), dessen Struktur erstmals von G. Tertzakian et al.^[72] beschrieben wurde. Ein Vergleich mit den Literaturdaten^[73] der ^1H -NMR-Spektren bestätigte die Identität der Substanz mit dem Naturstoff Cephalochromin.

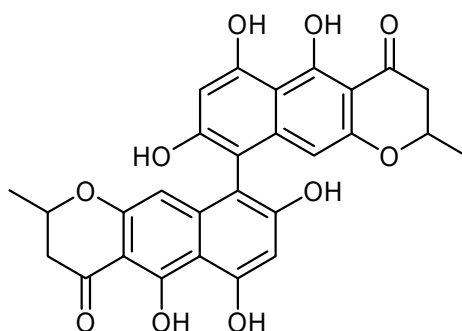
**Cephalochromin (33)**

Abbildung 50: Ein literaturbekannter Naturstoff, der erstmals von G. Tertzakian et al. isoliert wurde

2.4.2.1 Bestimmung der Konformation der chiralen Achse

In der Literatur konnten keine Angaben über die Konfiguration der Stereozentren oder die Konformation der chiralen Achse gefunden werden. Daher sollte der Versuch unternommen werden, diese zu bestimmen. Dazu kann wie im Falle des Ascochins (Kapitel 2.3.2.1) der Vergleich der gemessenen und berechneten CD-Spektren herangezogen werden. Im Falle des Cephalochromins gilt jedoch zu beachten, daß es sich nach der Einteilung der Chromophore nach Moscovitz^[74,75] in inhärent dissymmetrische und inhärent symmetrische, aber dissymmetrisch gestörte Chromophore bei 1,1'-Bisnaphthyl-Verbindungen um einen inhärent dissymmetrischen Chromophor handelt^[76]. Um den Chromophor genauer zu beschreiben, werden die zu untersuchenden Moleküle in Sphären aufgeteilt. Dabei bildet der Chromophor die erste Sphäre. Ein Ring, der den Chromophor beinhaltet, bildet die zweite Sphäre und Substituenten am Ring die Dritte. Für Größe und Vorzeichen des Cotton-Effekts ist die Chiralität der Sphäre entscheidend, die dem Chromophor am nächsten steht.^[77] Daraus muß für das Cephalochromin geschlossen werden, daß der Beitrag der chiralen Zentren in der zweiten Sphäre die Form des CD-Spektrums nicht wesentlich beeinflußt. Daher kann aus dem Vergleich der gemessenen und berechneten CD-Spektren nur die Konformation der chiralen Achse bestimmt werden, nicht aber die absolute Konfiguration der chiralen Zentren. Für die Berechnung des CD-Spektrums wurde die Konfiguration der Stereozentren willkürlich festgelegt. Eine Konformationsanalyse lieferte für die *aR*-Konformation des Moleküls einen Winkel von 88.34° als energetisch günstigstes Konformer. Für dieses Konformer wurde das in Abbildung 51 dargestellte CD-Spektrum berechnet und mit dem gemessenen verglichen. Die Berechnung der CD-Spektrums wurde von Brigitta Elsässer durchgeführt. Das experimentelle CD-Spektrum wurde von Dr. Tibor Kurtán im Arbeitskreis von Professor Sándor Antus gemessen.

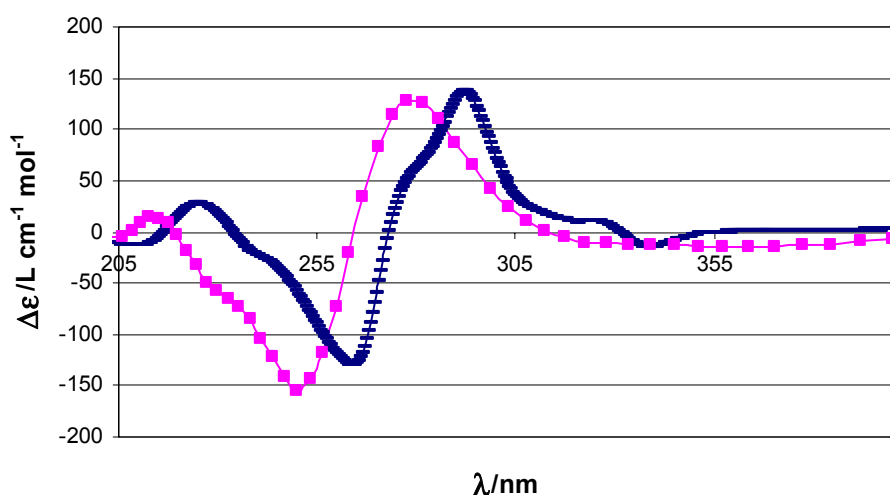


Abbildung 51: Berechnetes (■) und gemessenes (—) CD-Spektrum von Cephalochromin

Wie der Vergleich in Abbildung 51 zeigt, ist die Form der CD-Spektren fast identisch, woraus die *aR*-Konformation für das Cephalochromin folgt (33, Abbildung 52).

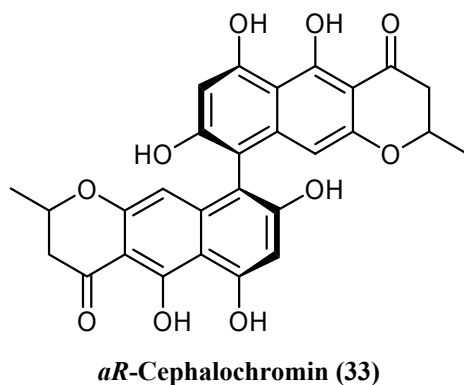


Abbildung 52: Absolute Konfiguration der chiralen Achse des Cephalochromins

2.4.3 Naturstoff 6577c3

Der Naturstoff 6577c3 wurde als gelblicher Feststoff (Smp.: 46–48 °C) erhalten, der sich gut in Methanol löst und auf dem DC (R_f -Wert 0.64, Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) durch seine UV-Löschung bei 254 nm und seine charakteristische gelbe Anfärbung mit dem Sprühreagenz Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar ist. Die Substanz zeigte Aktivität gegen *Chlorella fusca*, *Bacillus megaterium*, *Microbotryum violaceum*, *Pyricularia oryzae* und *Septoria tritici*. Aus den NMR-Spektren ist zu erkennen, daß die Substanz aus einem penta-substituierten Benzolring, zwei Methyl- und acht CH_2 -Einheiten sowie einer CH-Einheit besteht. Das

HREIMS bestätigt die Summenformel von $C_{17}H_{26}O_3$. Abbildung 53 zeigt das 1H -NMR-Spektrum gemessen in deuteriertem Methanol.

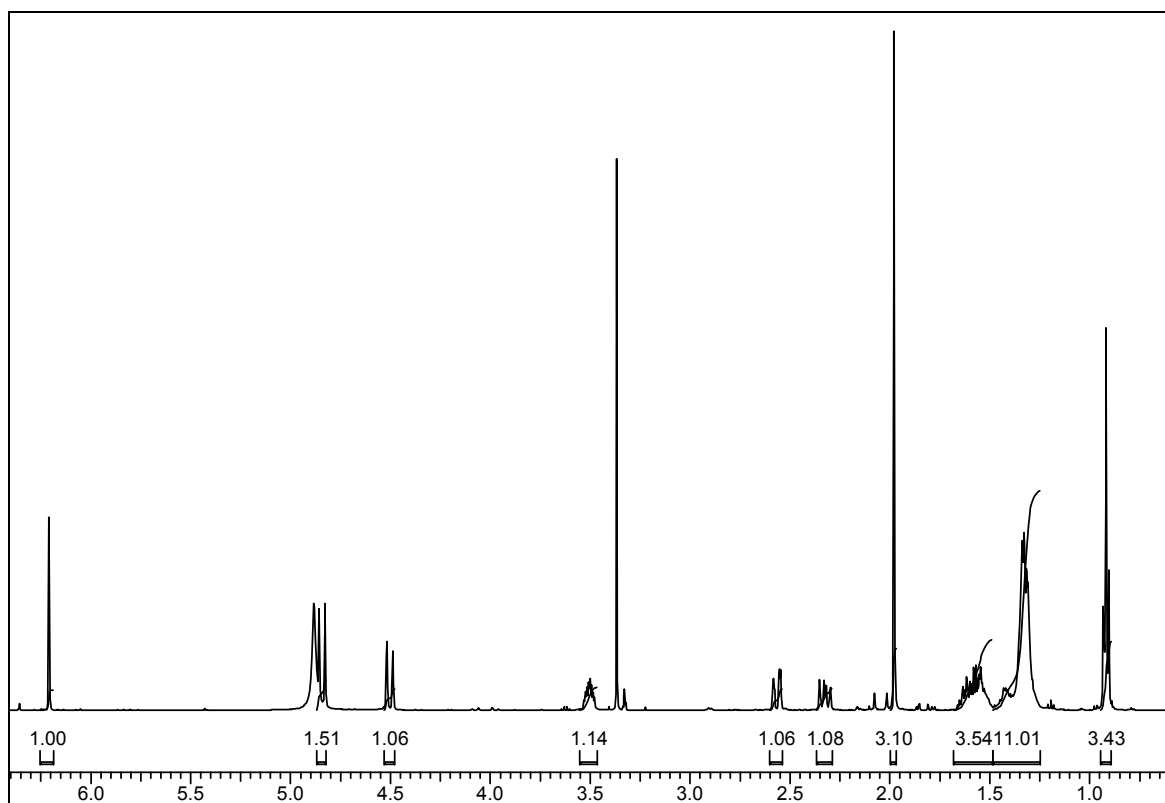


Abbildung 53: 1H -NMR-Spektrum des Naturstoff 6577c3 in $MeOH-d_4$ bei 500 MHz

Die chemische Verschiebung des aromatischen Protons von 6.21 ppm sowie des dazugehörigen Kohlenstoffatoms von 99.7 ppm deuten auf zwei sauerstoffsubstituierte Kohlenstoffatome in *ortho*-Stellung zu der CH-Gruppe hin. Des weiteren zeigt eine der Methylgruppen die charakteristische Verschiebung von 1.98 ppm für eine Verknüpfung mit einem Aromaten. Ebenso sprechen die Verschiebungen von 2.33 und 2.57 ppm für eine CH_2 -Gruppe, die mit einem Aromaten verknüpft ist. Die chemische Verschiebung einer zweiten CH_2 -Gruppe von 4.51 und 4.85 ppm spricht für eine Sauerstoffsubstitution und die Verknüpfung mit dem Aromaten. Die Aufspaltung der CH_2 -Gruppen in getrennte Signale für jedes Proton läßt darauf schließen, daß beide CH_2 -Gruppen zu einem annellierten Ring gehören. Die chemische Verschiebung der CH-Gruppe von 3.50 ppm spricht ebenfalls für eine Sauerstoffsubstitution. Die verbleibenden sechs CH_2 -Gruppen bilden mit der zweiten Methylgruppe eine aliphatische Kette. Daraus ergeben sich die in Abbildung 54 dargestellten Fragmente A–C.

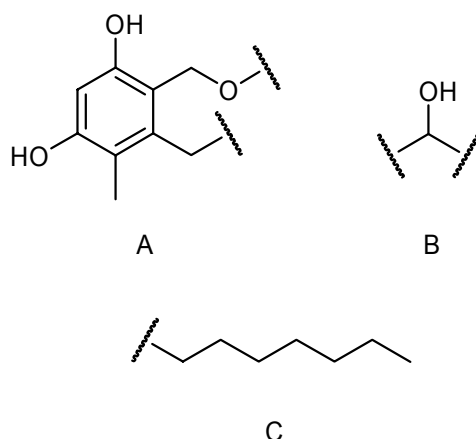


Abbildung 54: Fragmente aus dem ^1H - und ^{13}C -NMR sowie dem DEPT135

Mit Hilfe des H,H-COSY -Spektrums lässt sich eine Verknüpfung der aliphatischen Kette mit der CH -Gruppe erkennen, die ihrerseits mit der CH_2 -Gruppe des aromatischen Fragments verknüpft ist. Daraus ergibt sich unter Berücksichtigung der erforderlichen Ringstruktur für die CH_2 -Gruppen am Aromaten, die in Abbildung 55 dargestellte Struktur. Die Substanz erwies sich nach einer Suche in den Chemical Abstracts als literaturunbekannt und erhielt den Namen Pseudoanguillosporin A (**34**, Abbildung 58).

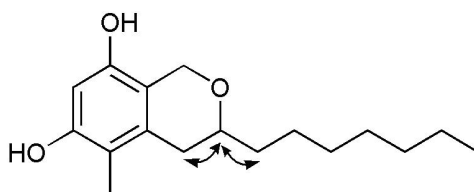


Abbildung 55: Kopplung aus dem H,H-COSY -Spektrum von Naturstoff 6577c3

2.4.3.1 Bestimmung der absoluten Konfiguration

Die absolute Konfiguration des Naturstoffes, der einen spezifischen Drehwert von -724.6° aufweist, konnte mit Hilfe des CD-Spektrums ermittelt werden, das in Abbildung 56 dargestellt ist.

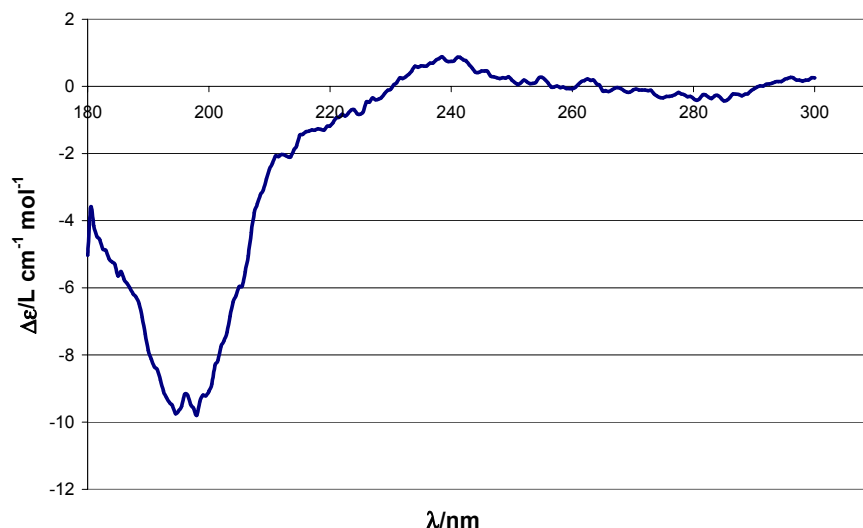


Abbildung 56: Gemessenes CD-Spektrum von Naturstoff 6577c3

Es zeigt sich ein ausgeprägter Cotton-Effekt bei 198 nm (-9.7). Die Helizitätsregel für den Benzol-Chromophor von chiralen Tetralinderivaten kann auch auf Isochromanderivate angewendet werden, wenn diese Substituenten mit einem starken Dipolmoment tragen.^[64] Aus einem negativen Cotton-Effekt im 1L_b -Band läßt sich auf M-Helizität des Moleküls schließen. Der Substituent am Kohlenstoffatom 3 liegt dabei in einer äquatorialen Position vor (Abbildung 57).

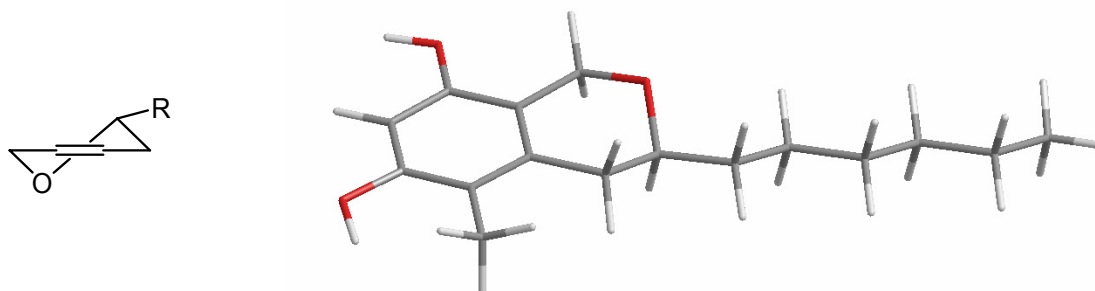
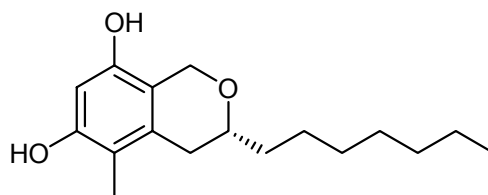


Abbildung 57: M-Helizität des Naturstoffs 6577c3 ($R = C_7H_{15}$) und berechnete Konfiguration

Damit muß es sich bei dem vorliegenden Molekül um (3*R*)-3-Heptyl-5-methyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-6,8-diol (Abbildung 58) handeln. Die Aufnahme des CD-Spektrums und Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde von Dr. Tibor Kurtán durchgeführt.



Pseudoanguillosporin A (34)

Abbildung 58: Absolute Konfiguration des neuen Naturstoffs aus *Pseudoanguillospora* sp.

2.4.4 Naturstoff 6577m4

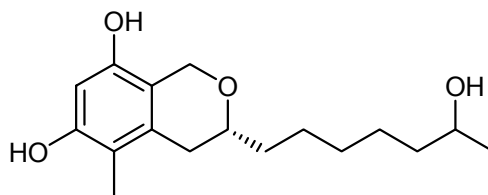
Der Naturstoff wurde als gelbes Öl erhalten, das sich gut in Methanol löst und auf dem DC (R_f -Wert 0.40, Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) durch seine UV-Löschung bei 254 nm und seine charakteristische, gelbe Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure leicht detektierbar ist. Im Agardiffusionstest zeigte die Substanz eine wachstumshemmende Wirkung gegen *Bacillus megaterium* und *Microbotryum violaceum*. Die NMR-Spektren weisen eine große Ähnlichkeit mit denen des Pseudoanguillosporins A (34, Abbildung 58) auf. In Tabelle 2 sind die chemischen Verschiebungen der Protonen zum Vergleich gegenübergestellt.

Tabelle 2: Chemische Verschiebungen der Protonen der Naturstoffe 6577c3 und 6577m4

Naturstoff 6577c3	Naturstoff 6577m4
6.21 s	6.21 s
4.51 d/4.85 d	4.50 d/4.84 d
-	3.73 m
3.50 m	3.51 m
2.33 dd/2.57 dd	2.33 dd/2.59 dd
1.98 s	1.98 s
1.31-1.66 m ($6 \times \text{CH}_2$)	1.27-1.70 m ($5 \times \text{CH}_2$)
0.92 t	1.17 d

Die wichtigsten Unterschiede sind die chemische Verschiebung und die Multiplizität (Dublett) der Methylgruppe in der Seitenkette sowie die CH-Gruppe bei 3.73 ppm, deren chemische Verschiebung auf eine Sauerstoffsstitution schließen läßt. Des weiteren sind im ^{13}C -NMR-Spektrum nur sieben statt acht CH_2 -Gruppen zu erkennen und das hochauflösende Massenspektrum ergibt eine Summenformel von $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_4$. Daraus läßt sich auf eine Sauerstoffsstitution am Kohlenstoffatom 14 der Seitenkette schließen. Es handelt sich bei

dem Naturstoff 6577m4 somit um die Struktur **35** (Abbildung 59), der der Name Pseudoanguillosporin B gegeben wird.



Pseudoanguillosporin B (35)

Abbildung 59: Ein literaturunbekannter Naturstoff aus *Pseudoanguillospora* sp.

Die absolute Konfiguration des Pseudoanguillosporins B am Kohlenstoffatom 3 wurde aus dem Vergleich der spezifischen Drehwerte von Pseudoanguillosporin A und B (A: $[\alpha]_D^{20} = -625.0^\circ$, B: $[\alpha]_D^{20} = -724.6^\circ$) abgeleitet. Über die Konfiguration am Kohlenstoffatom 9 kann keine Aussage gemacht werden.

2.5 Stamm 7067

Der Stamm 7067, *Coniothyrium* sp. aus der Pflanze *Carpobrotus edulis* von Gomera, wurde für 28 Tage auf Biomalz-Festagar kultiviert und mit Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt zeigte im Agardiffusionstest Aktivität gegen *Microbotryum violaceum*, *Chlorella fusca*, *Septoria tritici* und *Phytophthora infestans*.

2.5.1 Isolierung der Naturstoffe

Der gewonnene Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten in 7 Fraktionen aufgeteilt. Fraktion 4 lieferte nach einer Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 durch Kristallisation aus Dichlormethan den Naturstoff 70674a (**36**). Aus Fraktion 5 konnten mittels Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 und Kieselgel sowohl der Naturstoff 70675b (**37**) als auch der Naturstoff 70675c (**39**), der nochmals mittels präparativer Schichtchromatographie gereinigt wurde, isoliert werden. Die Fraktion 7 wurde durch eine weitere Säulenchromatographie an Kieselgel in 8 Unterfraktionen aufgeteilt, von denen die sechste nach Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 und Kieselgel den Naturstoff 70677c (**40**) lieferte. Aus der achten Unterfraktion konnte durch Säulenchromatographie an Sephadex und anschließender Kristallisation der Naturstoff 70677d (**42**) gewonnen werden. Die Mutterlauge wurde einer weiteren Säulen-

chromatographie an Kieselgel unterzogen und lieferte den Naturstoff 70677e (**43**), der noch einmal durch Säulenchromatographie gereinigt wurde. Der Verlauf der Isolierung ist in Abbildung 60 schematisch dargestellt.

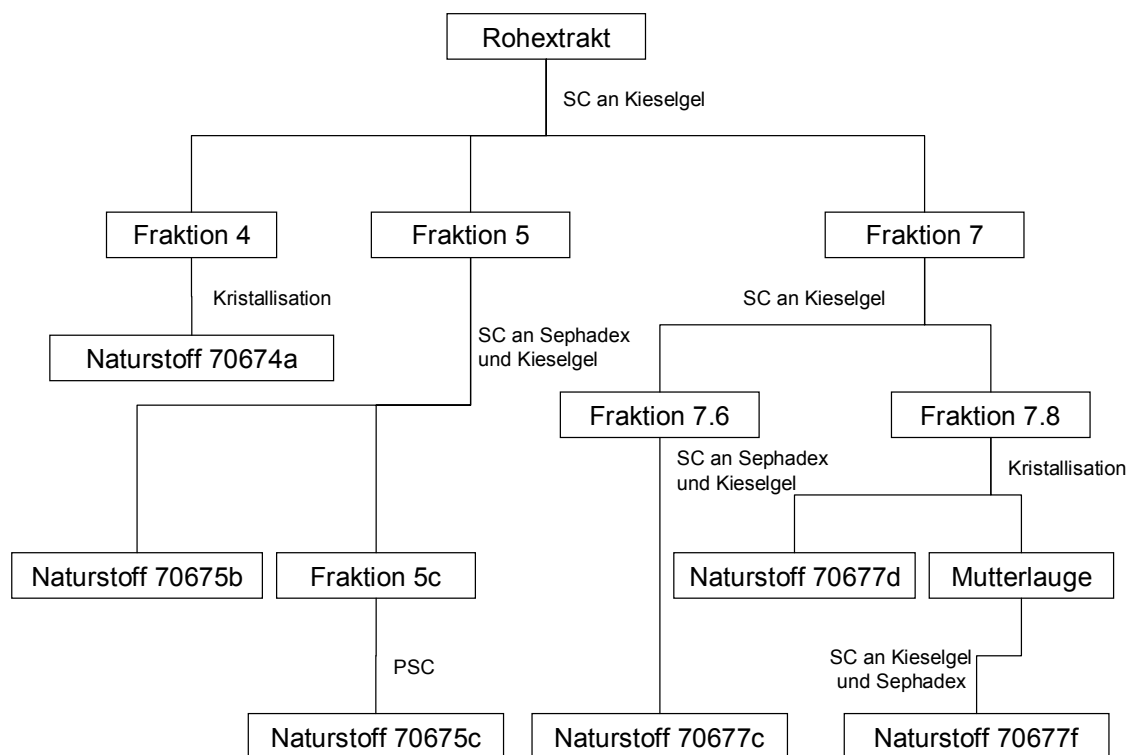


Abbildung 60: Schematische Darstellung der Isolierung aus 7067

2.5.2 Naturstoff 70674a

Der Naturstoff 70674a kristallisiert aus Dichlormethan in farblosen Plättchen aus (Smp.: 232–234 °C) und ist in fast allen Lösungsmitteln außer DMSO schwerlöslich. Die Substanz hat einen R_f -Wert von 0.88 (Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) und ist auf dem DC durch UV-Löschung bei 254 nm und Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar. Das ^1H -NMR-Spektrum weist ein Methylgruppensignal auf, zwei Methoxysignale und drei Signale, die zu aromatischen Protonen gehören, von denen zwei in meta-Stellung zueinander stehen. Außerdem sind zwei Hydroxygruppen zu erkennen, von denen eine cheliert ist. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt zwölf aromatische Kohlenstoffsignale, von denen neun zu quartären Kohlenstoffatomen gehören, und ein Carbonylsignal, das zu einer Estergruppe gehört. Des weiteren sind noch ein Methylgruppensignal und zwei Methoxygruppensignale zu

erkennen. Unter der Annahme, daß die zwölf aromatischen Kohlenstoffatome zwei Benzolringe bilden, besteht der Naturstoff 70674a aus den in Abbildung 61 gezeigten Fragmenten A–H.

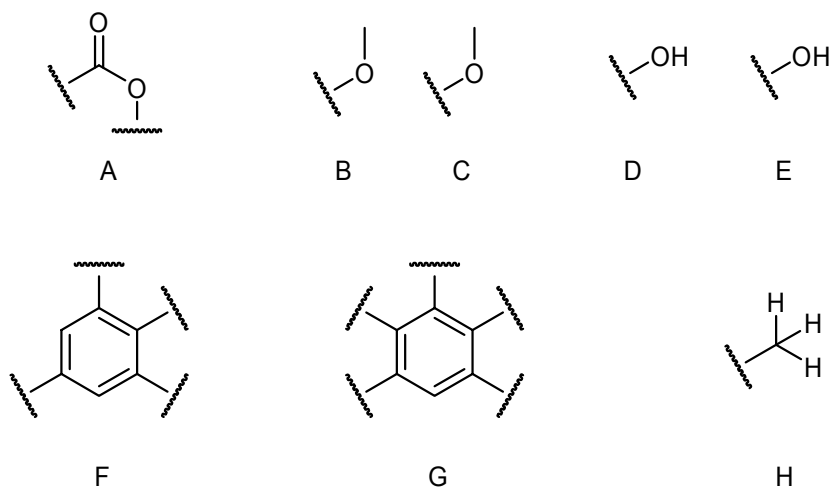


Abbildung 61: Fragmente des Naturstoff 70674a

Da für die beiden Benzolringe insgesamt maximal sieben Substituenten vorhanden sind, müssen diese miteinander verknüpft sein, um auf neun quartäre Kohlenstoffatome zu kommen. Aus dem gleichen Grund muß die Estergruppe mit beiden Ringen verbunden sein, anstatt mit einer Methoxygruppe einen Methylester zu bilden. Unter Berücksichtigung der chelierten Hydroxygruppe, kann als nächstes das in Abbildung 62 dargestellte Benzochromenon-Grundgerüst formuliert werden.

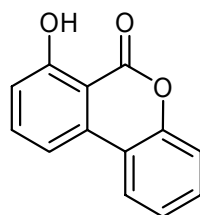


Abbildung 62: Grundgerüst des Naturstoff 70674a

Die verhältnismäßig hohen chemischen Verschiebungen von zwei der sauerstoffs substituierten Kohlenstoffatome von 165.3 und 166.7 ppm sprechen für eine *meta*-Stellung der Sauerstoffs substituenten zueinander, wohingegen die relativ niedrigen chemischen Verschiebungen von 138.6, 141.3 und 148.8 ppm eine *ortho*-Stellung der verbleibenden sauerstoffs substituierten Kohlenstoffatome anzeigen. Weiterhin läßt die chemische Verschiebung eines der aromatischen Protonen von 6.51 ppm auf die Position zwischen den

beiden Sauerstoffsubstituenten schließen. Da dieses Proton eine *meta*-Kopplung aufweist, ergeben sich die in Abbildung 63 dargestellten Substitutionsmuster A–C.

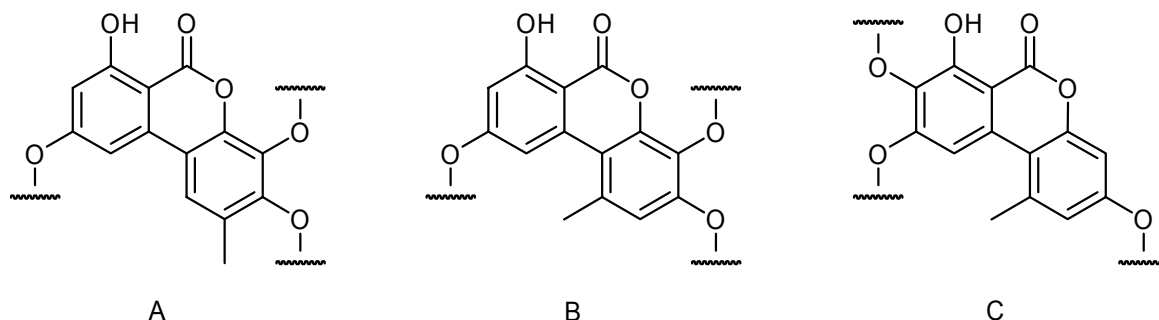


Abbildung 63: Mögliche Substitutionsmuster für Naturstoff 70674a

Eine Recherche in den Chemical Abstracts führte zu der Struktur **36** (Abbildung 64). Die Substanz wurde 1997 von Takao Tanahashi^[78] aus einer Flechte isoliert. Ein Vergleich mit den Literaturdaten bewies die Identität des Naturstoffs 70674a mit dem literaturbekannten Graphislacton A.

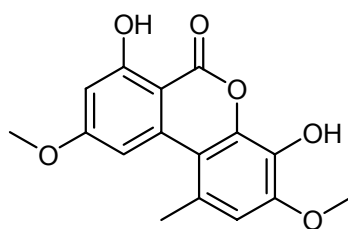


Abbildung 64: Ein literaturbekannter Naturstoff, der erstmals aus einer Flechte isoliert wurde

2.5.3 Naturstoff 70675b

Der Naturstoff 70675b wurde in Form eines gelben Öls erhalten, das sich gut in Dichlormethan löst. Die Substanz ist auf dem DC (R_f -Wert 0.65, Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) durch ihre gelbe Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar und zeigte im Agardiffusionstest Aktivität gegen *Septoria tritici*. Aus den NMR-Spektren sind eine Methylgruppe, fünf CH-Gruppen, zwei CH_2 -Gruppen und drei quartäre Kohlenstoffatome zu erkennen. Eines der quartären Kohlenstoffatome gehört zu einer Estergruppe. Die Zuordnung der Protonensignale zu den entsprechenden Kohlenstoffsignalen mit Hilfe eines HMQC-Spektrums zeigte eine CH_2 -Gruppe, die mit einer chemischen Verschiebung von 89.6 ppm zu einer endständigen Doppelbindung gehören muß. Außerdem läßt sich auf eine starke Polarisierung dieser Doppelbindung schließen, was für eine

Sauerstoffsubstitution spricht. Auf Grund ihrer chemischen Verschiebungen zwischen 4.17 und 5.63 ppm müssen vier der fünf CH-Gruppen ebenfalls sauerstoffsubstituiert sein. Die Multiplizität und Kopplungskonstante des fünften CH-Signals (q, 7.1 Hz) bei 1.95 ppm zeigt eine Verknüpfung mit der Methylgruppe an. Das H,H-COSY-Spektrum weist Korrelationen zwischen der endständigen Doppelbindung und einer der sauerstoffsubstituierten CH-Gruppen auf. Ebenso zeigt sich die Verknüpfung der aliphatischen CH₂-Gruppe mit einer weiteren sauerstoffsubstituierten CH-Gruppe, die ihrerseits mit der dritten CH-Gruppe verknüpft ist. Damit besteht der Naturstoff 70675b aus den in Abbildung 65 gezeigten Fragmenten A–D, einer weiteren sauerstoffsubstituierten CH-Gruppe und einem quartären Kohlenstoffatom.

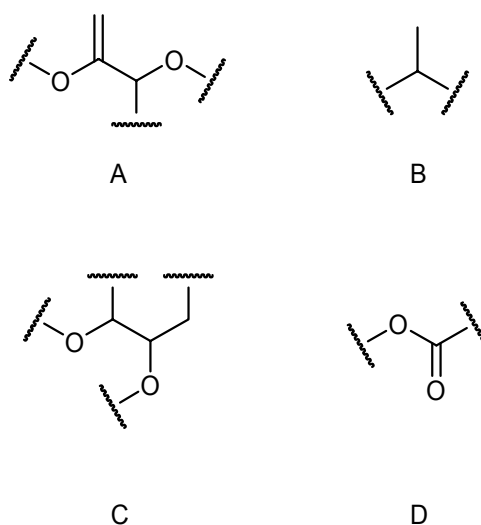


Abbildung 65: Fragmente des Naturstoffs 70675a

Mit Hilfe des HMBC-Spektrums ist eine Verknüpfung des Fragmentes B aus Abbildung 65 mit der verbliebenen CH-Gruppe und mit dem quartären Kohlenstoffatom erkennbar. Weiterhin muß das quartäre Kohlenstoffatom mit der CH-Gruppe aus Fragment A und der CH-Gruppe aus Fragment C verbunden sein. Eine weitere Verknüpfung der CH₂-Gruppe aus Fragment C mit der CH-Gruppe, die bereits mit Fragment B verknüpft ist, führt zu einem Ringschluß. Damit ergibt sich das in Abbildung 66 dargestellte Fragment E.

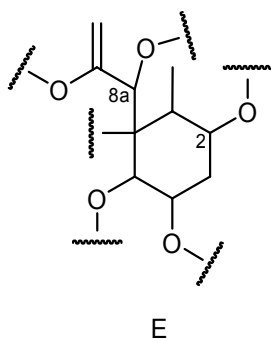
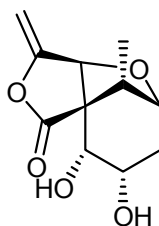


Abbildung 66: Fragment des Naturstoffs 70675a abgeleitet aus dem HMBC-Spektrum

Das Einfügen des Esters am quartären Kohlenstoffatom und der Umstand das eine endständige Doppelbindung mit einer freien Hydroxygruppe einer Tautomerie unterliegen würde, führt zu einer Spiroverbindung. Außerdem läßt die vorhandene Kopplung zwischen den Kohlenstoffatomen 2 und 8a auf eine Sauerstoffbrücke zwischen diesen schließen. Damit ergibt sich für den Naturstoff 70675a die Struktur **37** (Abbildung 67).



Massarilacton A (37)

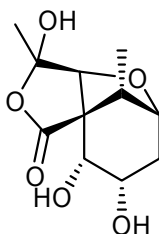
Abbildung 67: Ein literaturbekannter Naturstoff, der erstmals aus *Massarina tunicata* isoliert wurde

Eine Recherche in den Chemical Abstracts führte zu dem literaturbekannten Massarilacton A. Der Vergleich mit den Literaturdaten bestätigte die Identität des Naturstoff 70675a mit dem Massarilacton A, das von J. B. Gloer et al.^[79] aus *Massarina tunicata* isoliert wurde und im Agardiffusionstest eine antibiotische Wirkung gegen *Bacillus subtilis* aufwies.

2.5.3.1 Chemisches Verhalten von Massarilacton A

Durch eine Wartezeit für eine NMR-Messung wurde das Massarilacton A für 48 Stunden in Chloroform gelöst stehengelassen. Die anschließende NMR-Messung ergab ein anderes Spektrum als erwartet. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte eine nahezu vollständige Umsetzung des Massarilactons A zu einem einheitlichen Produkt, dessen Struktur im folgenden aufgeklärt wurde. Die Substanz wurde als gelbes Öl erhalten und ist auf dem DC (*R_F*-Wert 0.52, Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH 9:1) durch eine gelbe Anfärbung mit

Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar. Ein Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von Massarilacton A und der veränderten Substanz zeigt das Fehlen der endständigen Doppelbindung. Eine zusätzliche Methylgruppe bei 1.57 ppm und ein Kohlenstoffsignal bei 108.7 ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum, das zu einem quartären, zweifach sauerstoffs substituierten Kohlenstoffatom gehört, läßt auf eine Addition von Wasser an die endständige Doppelbindung schließen. Damit ergibt sich die literaturunbekannte Struktur **38** (Abbildung 68). Die Reaktion wurde vermutlich durch kleine Mengen an HCl katalysiert, die in Chloroform unter Lichteinfluß gebildet werden. Eine vergleichbare Reaktion einer endständigen Doppelbindung, die sauerstoffs substituiert und in ein sechsgliedriges Lacton eingebunden ist, wurde in der Literatur beschrieben.^[80] Die Addition von Wasser an die Doppelbindung wurde in diesem Fall durch Schwefelsäure katalysiert.



Hydroxymassarilacton (38)

Abbildung 68: Semisynthetische Substanz, die aus Massarilacton A durch säurekatalysierte Addition von Wasser an die Doppelbindung entstanden ist

Die Kohlenstoffverknüpfungen werden durch das in Abbildung 69 dargestellte INADEQUATE-Spektrum bestätigt.

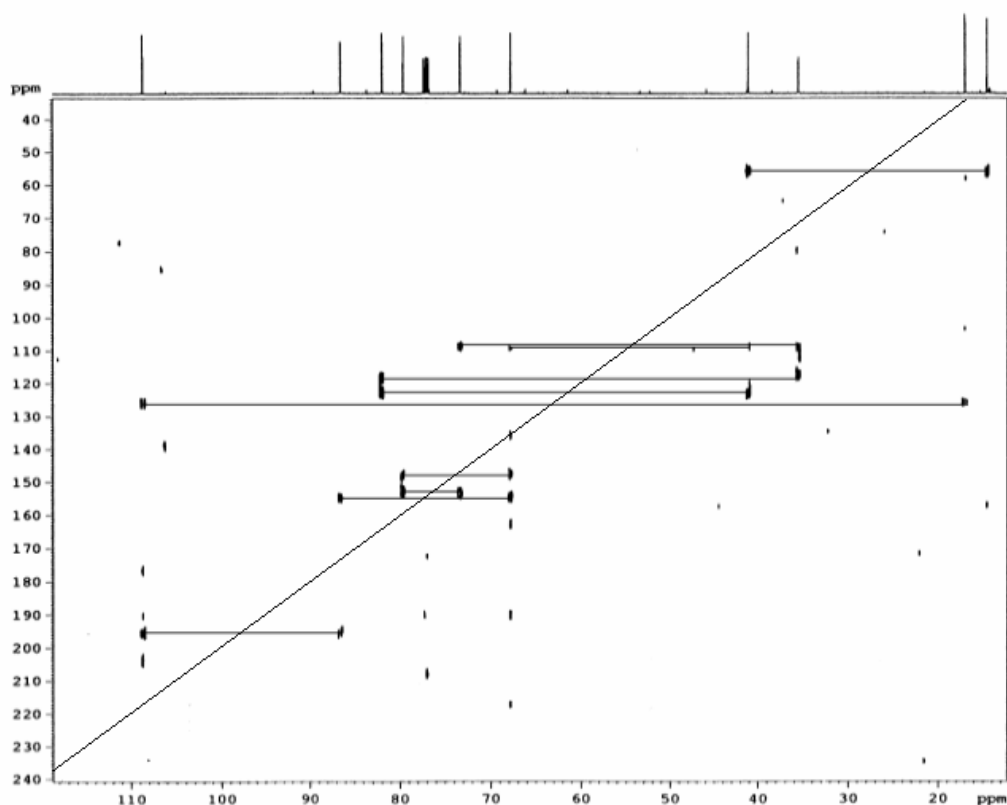


Abbildung 69: INADEQUATE-Spektrum des Hydroxymassarilactons

2.5.4 Naturstoff 70675c

Der Naturstoff 70675c wurde als gelbes Öl erhalten, das sich gut in Dichlormethan löst. Auf dem DC ist die Substanz, die einen R_f -Wert von 0.58 (Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) hat, durch ihre auffällige gelbe Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar. Die NMR-Spektren weisen große Ähnlichkeit mit denen des Massarilactons A auf. Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome von Massarilacton A und Naturstoff 70675c sind in Tabelle 3 vergleichend dargestellt. Die Bestimmung von primären, sekundären, tertiären und quartären Signalen erfolgte anhand der DEPT- und HMQC-Spektren.

Tabelle 3: Vergleich der ^{13}C -Verschiebungen (ppm) von Massarilacton A und Naturstoff 70675c

Massarilacton A	Naturstoff 70675c
14.2 (CH ₃)	15.1 (CH ₃)
-	28.7 (CH ₃)
38.5 (CH ₂)	38.2 (CH ₂)
46.0 (CH)	45.7 (CH)
-	52.3 (CH ₃)
61.5 (C _q)	64.5 (C _q)
66.3 (CH)	66.4 (CH)
69.4 (CH)	73.6 (CH)
76.8 (CH)	81.1 (CH)
83.8 (CH)	81.5 (CH)
89.6 (CH ₂)	-
156.6 (C _q)	-
171.8 (C _q)	170.8 (C _q)
-	206.9 (C _q)

Wie der Tabelle 3 zu entnehmen ist, fehlt die endständige Doppelbindung in Naturstoff 70675c und es sind zwei zusätzliche CH₃-Gruppen erkennbar, von denen eine zu einer Methoxygruppe gehört. Das HREIMS zeigt eine Summenformel von C₁₂H₁₈O₆ an. Weiterhin enthält der Naturstoff 70675c eine Ketogruppe, die im Massarilacton A ebenfalls nicht vorhanden ist. Die ausgeprägte Ähnlichkeit der gegenübergestellten Spektren läßt darauf schließen, daß das in Abbildung 70 dargestellte Fragment aus Massarilacton A auch Bestandteil des Naturstoff 70675c ist.

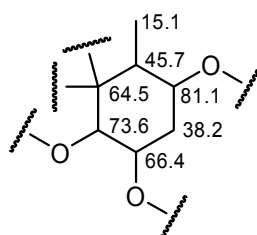
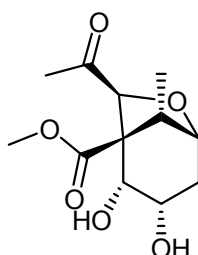


Abbildung 70: Fragment aus Naturstoff 70675c abgeleitet aus dem Vergleich mit Massarilacton A

Das HMBC-Spektrum bestätigt dieses Fragment. Außerdem lassen sich die Verknüpfungen des quartären Kohlenstoffatoms mit der verbliebenen CH-Gruppe bei 81.5 ppm und mit der Estergruppe erkennen. Diese ist ihrerseits mit der Methoxygruppe verknüpft. Weiterhin zeigt sich eine Verknüpfung der CH₃-Gruppe bei 28.7 ppm mit der Ketogruppe, die wiederum mit

der CH-Gruppe bei 81.5 ppm verbunden ist. Eine Kopplung zwischen den beiden CH-Gruppen bei 81.5 und 81.1 ppm läßt auf eine Etherverknüpfung schließen. Damit ergibt sich für den Naturstoff 70675c die Struktur **39** (Abbildung 71). Auf Grund der Ähnlichkeit der Struktur mit dem Massarilacton A (**37**, Abbildung 67) erfolgt die Darstellung beider Naturstoffe mit hoher Wahrscheinlichkeit auf dem gleichen Biosyntheseweg. Die Substanz könnte auch durch Umesterung des Lactons in methanolischer Lösung und anschließender Tautomerisierung der endständigen Doppelbindung direkt aus dem Massarilacton A entstanden sein. Deshalb konnte die absolute Konfiguration nach einem Vergleich der Drehwerte von Massarilacton A^[79] und Naturstoff 70675c vom Massarilacton A abgeleitet werden. Dem literaturunbekannten Naturstoff wurde der Name Massarilacton C gegeben.



Massarilacton C (**39**)

Abbildung 71: Ein literaturunbekannter Naturstoff aus *Coniothyrium* sp.

2.5.5 Naturstoff 70677c

Der Naturstoff 70677c wurde in Form von farblosen Kristallen erhalten, die sich gut in Methanol lösen und einen Schmelzpunkt von 84–88 °C haben. Die Substanz hat einen R_f -Wert von 0.38 (Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) und ist auf dem DC durch Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar. Aus den NMR-Spektren ist eine tetrasubstituierte und eine disubstituierte Doppelbindung zu erkennen, wobei die tetrasubstituierte Doppelbindung stark polarisiert ist. Daraus ergibt sich eine Sauerstoffsstitution am einen Ende und eine Verknüpfung mit einer Carbonylgruppe am anderen Ende der Doppelbindung. Weiterhin sind drei sauerstoffs substituierte CH-Gruppen, zwei Methylgruppen und ein quartäres Kohlenstoffatom erkennbar. Mit Hilfe des H,H-COSY -Spektrums lassen sich die in Abbildung 72 gezeigten Fragmente A und B formulieren.

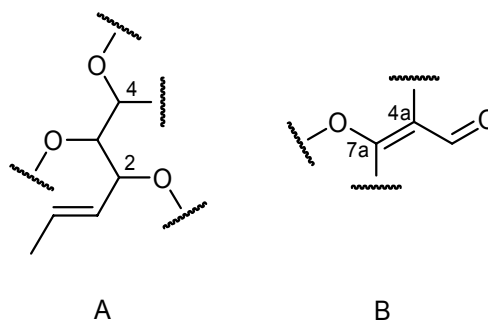


Abbildung 72: Fragment aus den ^1H -, ^{13}C - und H,H-COSY-Spektren von Naturstoff 70677c

Unter Einbeziehung des HMBC-Spektrums kann eine Verknüpfung des Kohlenstoffatoms 4 des Fragmentes A mit dem Kohlenstoffatom 4a des Fragmentes B (Abbildung 72) bestimmt werden. Eine weitere Kopplung der Kohlenstoffatome 2 und 7a aus Abbildung 72 zeigt eine Etherbrücke zwischen den beiden Kohlenstoffatomen an. Weiterhin muß eine Verknüpfung des quartären Kohlenstoffatoms mit der verbleibenden Methylgruppe und mit dem Kohlenstoffatom 7a von Fragment B vorliegen. Damit ergibt sich das in Abbildung 73 dargestellte Fragment C.

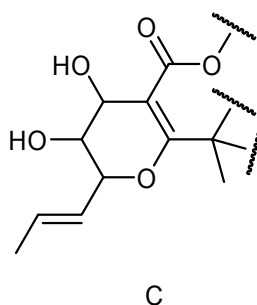
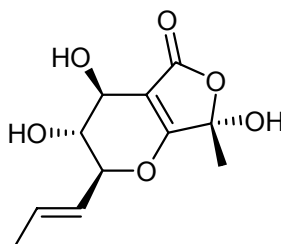


Abbildung 73: Fragment des Naturstoff 70677c aus dem HMBC-Spektrum

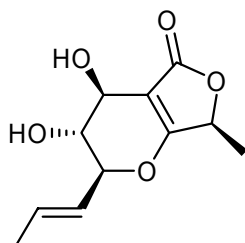
Die chemische Verschiebung der Carbonylgruppe läßt auf eine Verknüpfung mit dem quartären Kohlenstoffatom zu einem Ester schließen. Die chemische Verschiebung des quartären Kohlenstoffatoms von 101.2 ppm deutet auf eine weitere Sauerstoffs substitution hin. Das CI-Massenspektrum weist einen Molekülpeak bei 243 auf. Somit ergibt sich für den Naturstoff 70677c die Struktur **40** (Abbildung 74).



Massarilacton D (40)

Abbildung 74: Ein unbekannter Naturstoff aus *Coniothyrium* sp., mit großer Ähnlichkeit zu dem Massarilacton B (41)

Damit weist die literaturunbekannte Substanz große Ähnlichkeit mit dem Massarilacton B (41, Abbildung 75) auf, das ebenfalls von J. B. Gloer et al.^[79] aus *Massarina tunicata* isoliert wurde.



Massarilacton B (41)

Abbildung 75: Ein literaturbekannter Naturstoff aus *Massarina tunicata*

Die absolute Stereochemie des Naturstoffs 70677c wurde nach einem Vergleich des Drehwertes ($[\alpha]_D^{20} = -116.1^\circ$) mit dem von Massarilacton B ($[\alpha]_D^{20} = -109^\circ$) aus dessen absoluter Stereochemie abgeleitet, die von den Autoren mittels der Röntgenstruktur des *p*-Brombenzoats ermittelt wurde. Der Naturstoff 70677c erhielt den Namen Massarilacton D.

2.5.6 Naturstoff 70677d

Der Naturstoff 70677d wurde nach Kristallisation aus Dichlormethan/Methanol als weißer Feststoff (Smp.: 283–285 °C) erhalten, der sich in Methanol löst. Der Naturstoff ist auf dem DC (R_f -Wert 0.31, Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) durch seine Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar. Aus den NMR-Spektren, von denen das ^1H -NMR-Spektrum in Abbildung 76 zu sehen ist, lassen sich vier Methylgruppen, sechs CH_2 -Gruppen, sieben CH -Gruppen und fünf quartäre Kohlenstoffatome erkennen. Das HREIMS bestätigte eine Summenformel von $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_6$.

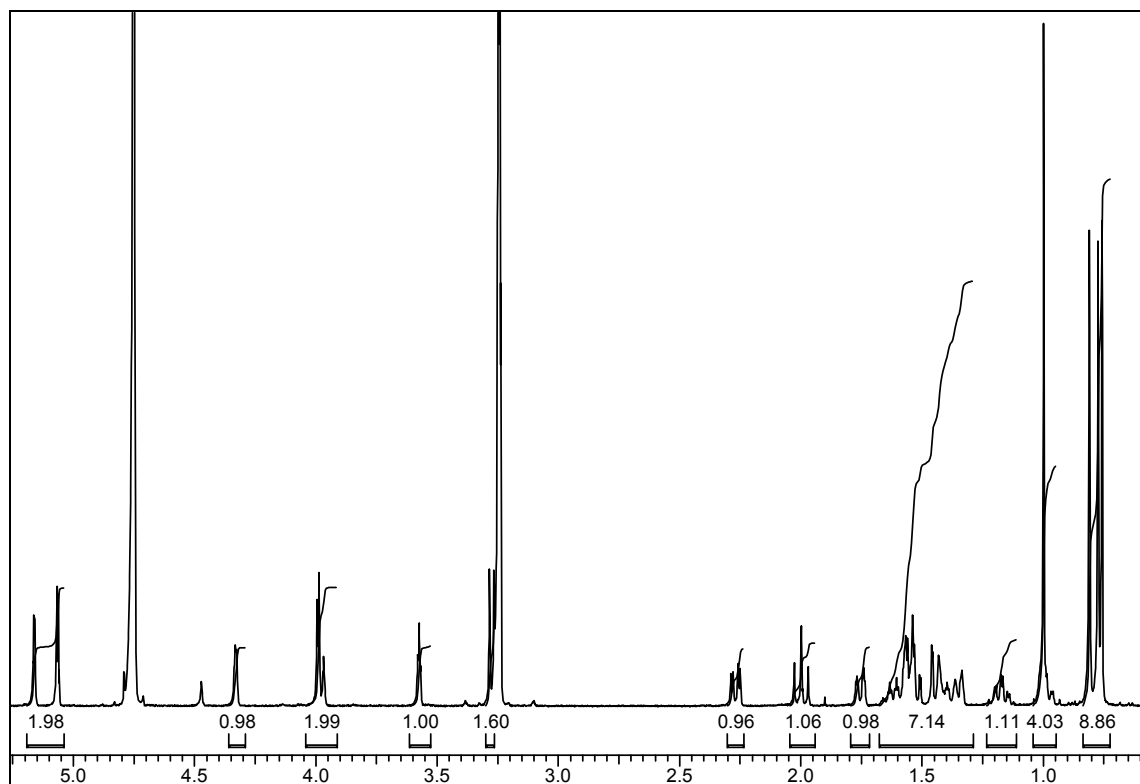


Abbildung 76: ^1H -NMR-Spektrum des Naturstoff 70677d in Methanol-d_4 bei 500 MHz

Die Zuordnung der ^1H -NMR-Signale zu den jeweiligen ^{13}C -NMR-Signalen erfolgte unter Zuhilfenahme des HMQC-Spektrums und ist in Tabelle 4 aufgeführt. Wie der chemischen Verschiebung der CH_2 -Gruppe 17 von 103.6 ppm zu entnehmen ist, handelt es sich um eine endständige Doppelbindung. Weiterhin lassen sich noch fünf sauerstoffsubstituierte CH-Gruppen zwischen 3.27 und 4.33 ppm erkennen.

Tabelle 4: Chemische Verschiebungen und Kopplungen des Naturstoff 70677d

Atomnummer	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	H,H-COSY	HMBC	NOESY
1	39	0.99/1.58	2	13	-
2	18.2	1.43/1.58	1, 3	-	-
3	41.9	1.17/1.35	2	-	-
4	32.3	-	-	-	-
4a	47.5	1.43	5	5	-
5	26.1	1.58/1.76	4a, 6	6, 6a	-
6	74.1	3.57	5	4a, 6a	-
6a	77.5	-	-	-	-
7a	75.5	3.99	8	8, 9, 11	8, 11, 12a
8	68.9	4.33	7a, 17	-	7a, 10
9	147.9	-	-	-	-
10	71.3	3.99	11, 17	-	8
11	78.8	3.27	10	12	7a, 12-H ^a
11a	71.6	-	-	-	-
12	30	1.58/1.99	12a	7a	-
12a	42.1	2.27	12	1, 6a	4a, 12-H ^a , 16
12b	36.8	-	-	-	-
13	14.3	0.77	-	1, 4a, 12a, 12b	-
14	32.1	0.81	-	3, 4, 4a, 15	-
15	20.3	0.76	-	3, 4, 4a	-
16	23.1	1	-	6, 7a, 12a	4a, 6, 12-H ^a
17	103.6	5.06/5.16	8, 10	8, 9, 10	-

Die Auswertung des H,H-COSY-Spektrums, dessen Kopplungen ebenfalls in Tabelle 4 aufgelistet sind, führt zu den in Abbildung 77 gezeigten Fragmenten A–D.

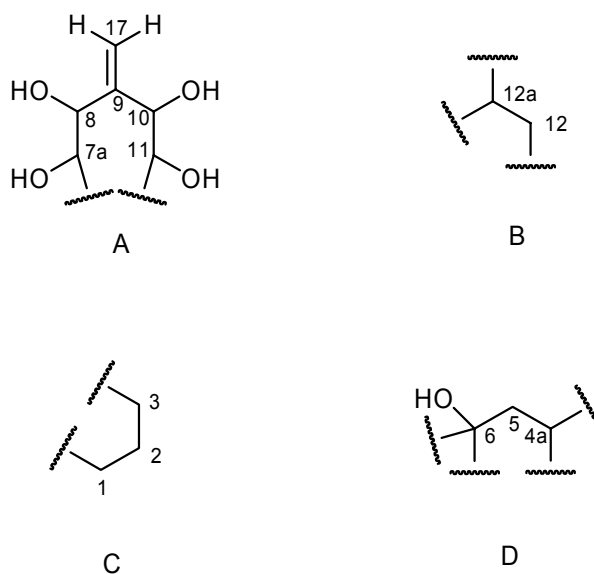


Abbildung 77: Fragmente aus dem H,H-COSY-Spektrum von Naturstoff 70677d

Mit Hilfe des HMBC-Spektrums können die Fragmente B, C und D zusammen mit den quartären Kohlenstoffatomen 4a, 6a und 12b, sowie den Methylgruppen 13, 14 und 15 zu dem in Abbildung 78 dargestellten Fragment E zusammengefügt werden. Damit besteht die Substanz aus den Fragmenten A und E, sowie dem quartären, sauerstoffs substituierten Kohlenstoffatom 11a, das in Abbildung 78 als Fragment F bezeichnet wird.

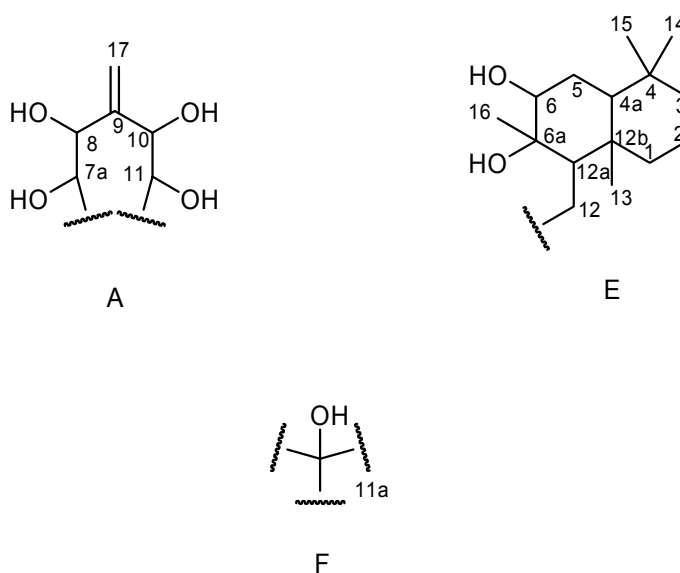
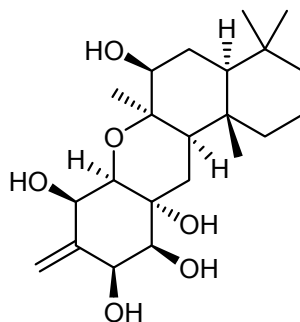


Abbildung 78: Verknüpfung der Fragmente aus dem H,H-COSY-Spektrum mit Hilfe des HMBC-Spektrums von Naturstoff 70677d

Für die Verknüpfung der Fragmente A, E und F aus Abbildung 78 gibt es nur eine sinnvolle Möglichkeit, bei der das Kohlenstoffatom 11a mit den Kohlenstoffatomen 7a, 11 und 12

verbunden ist. Dabei ist jedoch noch die eingeschränkte Rotation der CH₂-Gruppe 12 zu beachten, die für das Vorliegen eines vierten Ringes spricht. Dieser entsteht durch eine Etherbrücke zwischen den Kohlenstoffatomen 6a und 7a. Für den Naturstoff 70677d ergibt sich somit die Struktur **42** (Abbildung 79), die sich bei einer Suche in den Chemical Abstracts als literaturunbekannt erwies. Dem Naturstoff wurde der Name Coniothyrenol gegeben.



Coniothyrenol (42)

Abbildung 79: Ein literaturunbekannter Naturstoff aus *Coniothyrium* sp.

Um die relative Konfiguration des Naturstoffs zu bestimmen, wurde zunächst ein NOESY-Spektrum in deuteriertem Methanol gemessen. Aus den in Tabelle 4 aufgelisteten NOESY-Kopplungen lies sich die relative Konfiguration der tertiären Kohlenstoffatome feststellen. Wie in Abbildung 80 dargestellt, gibt es am Kohlenstoffatom 11a ein Stereozentrum über dessen Konfiguration anhand des NOESY-Spektrums keine Aussage gemacht werden kann.

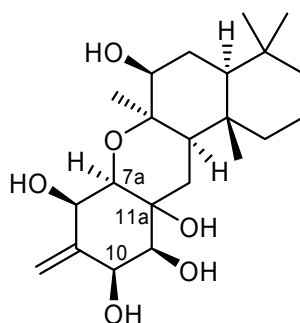


Abbildung 80: Relative Konfiguration aus dem NOESY-Spektrum von Naturstoff 70677d

Um die relative Konfiguration des Kohlenstoffatoms 11a zu bestimmen wurde durch Herrn PD Dr. H. Egold ein DPGFSE-NOE-Spektrum in deuteriertem DMSO gemessen. Die zentrale Pulssequenz wirkt dabei ähnlich wie ein normales Spin Echo-Experiment mit einem selektiven 180°-Puls. Dadurch wird nur das Proton detektiert, welches im Frequenzbereich dieses Pulses liegt. Anschließend folgt die gewohnte Pulssequenz des NOE-Spektrums, die um einen zusätzliche Feldgradienten erweitert ist. Detektiert werden auf diese Weise nur das

selektierte Signal (in anti-Phase) und die Signale, die einen NOE zeigen.^[81] Für das vorliegende Spektrum wurde das Multiplett bei 3.99 ppm gewählt, das zu den Protonen an den Kohlenstoffatomen 7a und 10 gehört. Da beide Protonen auf die gleiche Seite des Moleküls zeigen, kann bei einer Übertragung der Anregung auf die Hydroxygruppe von beiden Protonen aus auf die gleiche Konfiguration geschlossen werden. Das gemessene DPGSE-NOE-Spektrum zeigt eine Übertragung der Anregung auf alle fünf Hydroxygruppen des Moleküls. Da die Protonen der Hydroxygruppen untereinander schneller austauschen als das Spektrum aufgenommen werden kann, ist es unmöglich, ein einzelnes Proton einer Hydroxygruppe anzuregen. Dennoch kann die Konfiguration des Kohlenstoffatoms 11a bestimmt werden, da wie in Abbildung 80 bereits gezeigt, vier der Hydroxygruppen räumlich zu weit von den angeregten Protonen entfernt sind. Die ursprünglich angeregte Hydroxygruppe kann also nur noch die am Kohlenstoffatom 11a sein, die somit in die gleiche Richtung zeigen muß, wie das Proton am Kohlenstoffatom 7a. Daraus ergibt sich die in Struktur **42** (Abbildung 79) gezeigte relative Konfiguration des Moleküls.

2.5.7 Naturstoff 70677f

Der Naturstoff 70677f wurde als farbloses Öl erhalten, das sich gut in Methanol löst. Auf dem DC ist die Substanz durch ihre gelbe Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar und hat einen R_f -Wert von 0.06 (Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8:2). Aus dem ^1H -NMR-Spektrum lassen sich eine disubstituierte Doppelbindung mit einer *cis*-Kopplung, vier CH-Gruppen, von denen zwei sauerstoffs substituiert sind, und eine Methylgruppe erkennen. Im ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt sich zusätzlich ein Carbonylgruppensignal bei 176.9 ppm. Das H,H -COSY-Spektrum weist die in Abbildung 81 durch Pfeile symbolisierten Kopplungen auf.

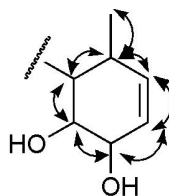


Abbildung 81: Kopplungen aus dem H,H -COSY-Spektrum

Unter Berücksichtigung des CI-Massenspektrums, das eine Molekülmasse von 172.1 anzeigt, läßt sich als Substituent für die letzte freie Position eine Carbonsäuregruppe bestimmen. Auf die relative Konfiguration des Naturstoffs kann anhand der Größe der Kopplungskonstanten geschlossen werden. Das Proton der CH-Gruppe 6 weist eine axial-äquatorial-Kopplung zu

dem Proton der CH-Gruppe 5 auf (Abbildung 82, a), wohingegen die Kopplung zu der CH-Gruppe 1 einer axial-axial-Position der beiden Protonen entspricht. Das Proton der CH-Gruppe 1 zeigt seinerseits noch eine axial-axial-Kopplung zu dem Proton der CH-Gruppe 2 (Abbildung 82, b).

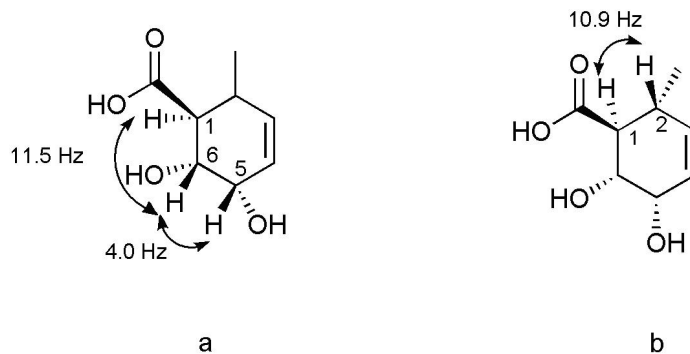
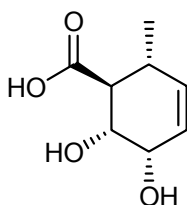


Abbildung 82: Herleitung der relativen Konfiguration des Naturstoffs anhand der Kopplungen

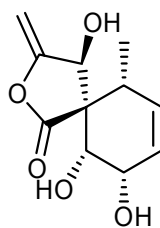
Ein Vergleich mit dem bereits isolierten Massarilacton A läßt vermuten, daß beide Substanzen auf dem gleichen Biosyntheseweg produziert werden und somit die gleiche absolute Konfiguration haben sollten. Damit ergibt sich für Naturstoff 70677f die Struktur **43** (Abbildung 83), die vermutlich auch die absolute Konfiguration des Naturstoffs wiedergibt.



Massarigenin E (43)

Abbildung 83: Ein literaturunbekannter Naturstoff aus *Coniothyrium* sp.

Der literaturunbekannte Naturstoff weist damit eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Massarigenin A (**44**, Abbildung 84) auf, das ebenfalls von J. B. Gloer et al.^[82] aus *Massarina tunicata* isoliert wurde und seinerseits von dem Massarilacton A (**37**, Abbildung 67) abgeleitet werden kann. Auf Grund der Abstammung wird dem Naturstoff 70677f (**43**, Abbildung 83) der Name Massarigenin E gegeben.



Massarigenin A (44)

Abbildung 84: Ein bekannter Naturstoff aus *Massarina tunicata*

2.6 Stamm 6754

Der nicht identifizierte Stamm 6754, aus *Trifolium dubium* bei Wustrow an der Ostsee, wurde für 28 Tage in einer Dinkel-Gerste-Kultur bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mit Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt zeigte im Agardiffusionstest Aktivität gegen *Bacillus megaterium*, *Microbotryum violaceum*, *Chlorella fusca*, *Septoria tritici*, *Botrytis cinerea* und *Phytophthora infestans*.

2.6.1 Isolierung des Naturstoffs

Der gewonnene Rohextrakt, wurde auf Grund des außergewöhnlich hohen Fettanteils mit Hexan extrahiert und die Hexanphase verworfen. Der entfettete Rohextrakt wurde mittels einer Säulenchromatographie an Kieselgel in 5 Fraktionen aufgeteilt. Fraktion 5 lieferte durch Kristallisation aus Dichlormethan/Methanol den Naturstoff 67545 (**45**).

2.6.2 Naturstoff 67545

Der Naturstoff 67545 wurde in Form farbloser Kristalle erhalten, die sich gut in Methanol lösen und einen Schmelzpunkt von 128–130 °C haben. Auf dem DC (R_f -Wert 0.16, Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) ist die Substanz ausschließlich durch ihre schwach gelbe Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure zu detektieren. Das ^1H -NMR-Spektrum weist neben einem Methylsignal bei 2.10 ppm vier Signale zwischen 3.81 und 4.40 ppm auf. Zwei der Signale zeigen eine geminale Kopplung und bilden jeweils ein Doppeldublett, das dritte ist ein Dublett und das vierte zeigt drei verschiedene Kopplungen. Daraus ergibt sich das in Abbildung 85 dargestellte Fragment.

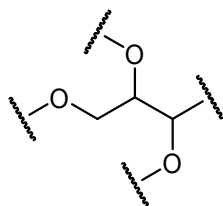
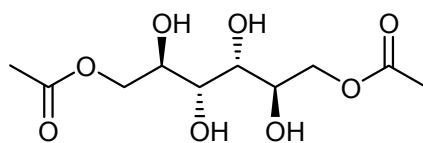


Abbildung 85: Fragment des Naturstoffs 67545 anhand des Kopplungsmusters

Das ^{13}C -NMR-Spektrum weist neben den vier erwarteten sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffsignalen ein Carbonylgruppensignal bei 171.9 ppm auf. Zusammen mit dem Methylsignal bei 19.5 ppm ergibt sich eine Acetylgruppe, die an eine der Hydroxygruppen gebunden sein muß, wobei die chemische Verschiebung der beiden Protonen der CH_2 -Gruppe von 4.19 und 4.40 ppm für eine Verknüpfung mit dem Sauerstoff an der CH_2 -Gruppe spricht. Da das CI-Massenspektrum eine Molekülmasse von 266.2 anzeigt und das ermittelte Fragment eine Molekülmasse von 133.1 hat, handelt es sich bei Naturstoff 67545 um die symmetrische Struktur **45** (Abbildung 86).



1,6-Di-O-acetyl-D-mannitol (**45**)

Abbildung 86: Ein Naturstoff aus einem nicht identifizierten Pilz, der bislang nur als Syntheseprodukt bekannt ist

Um die relative Konfiguration zu ermitteln, wurde die Röntgenstruktur eines Kristalls gemessen. Wie aus Abbildung 87 zu erkennen ist, befinden sich die zwei äußeren Hydroxygruppen in anti-Position zueinander, die zwei mittleren stehen in syn-Position.

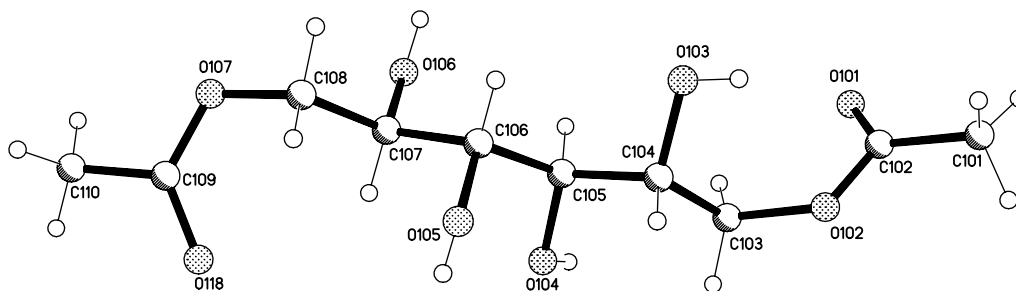


Abbildung 87: Röntgenstruktur von Naturstoff 67545

Damit handelt es sich bei dem zugrunde liegenden Hexitol um Mannitol. Ein Vergleich des spezifischen Drehwinkels von $+10.5^\circ$ mit denen von 1,6-Di-*O*-benzoyl-D-mannitol ($+12.0^\circ$)^[83] und 1,6-Di-*O*-(2-isocyano-3-methylcrotonyl)-D-mannitol ($+16.0^\circ$)^[84], führt zu dem Schluß, daß es sich bei Naturstoff 67545 um 1,6-Di-*O*-acetyl-D-mannitol handelt. Der Naturstoff 67545 ist somit bislang nur aus der Synthese bekannt^[85], nicht jedoch als Sekundärmetabolit eines Pilzes.

2.7 Stamm 6579

Der Stamm 6579, *Ulocladium* sp. aus der Rotalge *Polysiphonia* sp. aus der Ostsee bei Ahrenshoop, wurde auf Dinkel-Gerste-Medium 28 Tage bei Raumtemperatur kultiviert. Anschließend wurde die Kultur lyophilisiert und das Lyophilisat mit Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt zeigte im Agardiffusionstest Aktivität gegen *Bacillus megaterium*, *Microbotryum violaceum* und *Chlorella fusca*.

2.7.1 Isolierung des Naturstoffs

Der Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten in 4 Fraktionen aufgetrennt. Fraktion 3 lieferte nach einer weiteren Säulenchromatographie an Kieselgel den Naturstoff 65793a (46).

2.7.2 Naturstoff 65793a

Der Naturstoff 65793a wurde in Form eines gelben Öls erhalten, das sich gut in Dichlormethan löst. Die Substanz hat einen R_f -Wert von 0.93 (Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) und ist auf dem DC durch ihre intensive, gelbe Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar. Aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren lassen sich sieben CH_3 -Gruppen, drei CH_2 -Gruppen, elf CH -Gruppen und fünf quartäre Kohlenstoffatome erkennen. In Tabelle 5 sind die chemischen Verschiebungen und alle eindeutig zuzuordnenden Kopplungen aus den 2D-NMR-Spektren aufgeführt. Das EI-Massenspektrum zeigt einen Molekülpeak bei 429.3 und läßt somit auf eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen im Molekül schließen. Außerdem kann errechnet werden, daß die Struktur noch zusätzlich vier Sauerstoffatome enthalten muß, woraus sich eine Summenformel von $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{NO}_4$ ergibt.

Tabelle 5: Kopplungen aus den 2D-NMR-Spektren von Naturstoff 65793a

Atomnummer	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	H,H-COSY	HMBC	INADEQUATE
1	35.1	4.17	2, 8a	2, 4a, 8a, 9, 12, 21	-
2	51.4	2.33	1	2, 3, 4, 9, 21, 22, 23	1, 3, 21
3	125.1	5.26	4, 2	1, 2, 4a, 21	-
4	133.7	5.73	2, 3, 4a	2, 4a, 8a	3, 4a
4a	39.9	2	3, 5	-	-
5	37.6	1	4a	4, 4a, 6	-
6	33.2	1.4	-	-	5
7	37.8	1.64	-	-	-
8	37.7	1.21	-	7	-
8a	41.8	2.14	1	4a	-
9	190.1	-	-	-	1
11	173.5	-	-	-	-
12	103.8	-	-	-	-
13	194.0	-	-	-	-
14	69.8	3.6	16	11, 13, 16, 17, 19	-
15	26.6	2.87	-	11, 14	-
16	35.7	1.88	14, 17, 19	13, 14, 19	14, 19
17	25.1	1.49/1.64	18	14, 18	16, 18
18	12.4	0.9	17	-	-
19	13.9	0.76	16	14, 16	16
21	62.9	-	-	-	-
22	58.6	2.73	-	2, 21, 24	21

Aus dem H,H-COSY-Spektrum konnten die in Abbildung 88 dargestellten Fragmente A und B ermittelt werden.

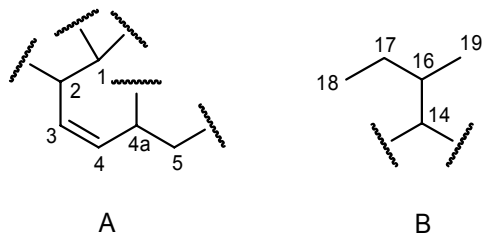


Abbildung 88: Fragmente aus dem H,H-COSY-Spektrum

Das zweidimensionale INADEQUATE-Spektrum ermöglicht die Erweiterung des Fragmentes A zu dem Fragment C aus Abbildung 89. Weiterhin kann auf Grund der chemischen Verschiebung des Kohlenstoffatoms 14 aus Fragment B in Abbildung 88 auf eine Sauerstoff- oder Stickstoffsubstitution geschlossen werden. Damit enthält die Substanz die in Abbildung 89 dargestellten Fragmente.

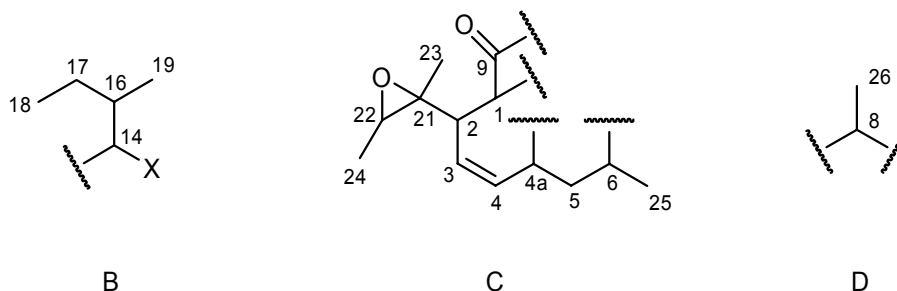


Abbildung 89: Fragmente aus dem INADEQUATE-Spektrum

Mit Hilfe des HMBC-Spektrums lässt sich das Fragment C mit dem Fragment D und den Kohlenstoffatomen 7 und 12 zu dem Fragment E aus Abbildung 90 verknüpfen. Unter der Berücksichtigung der chemischen Verschiebung des Kohlenstoffatoms 15 von 26.6 ppm, die für eine Stickstoffsubstitution spricht, lässt sich Fragment B aus Abbildung 89 zu dem Fragment F aus Abbildung 90 erweitern. Damit besteht die Struktur aus den in Abbildung 90 gezeigten Fragmenten E und F, sowie zwei weiteren Sauerstoffatomen.

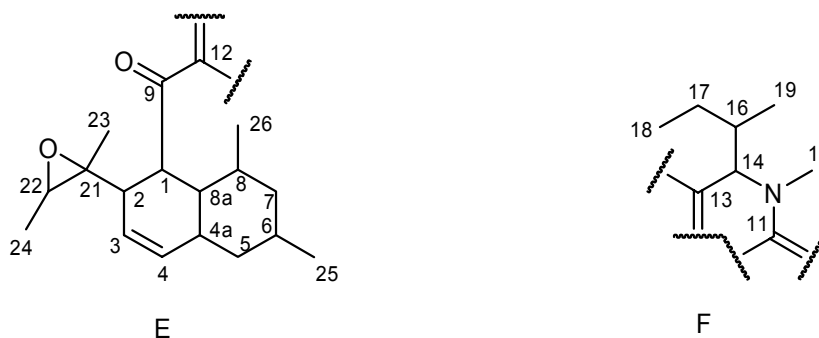
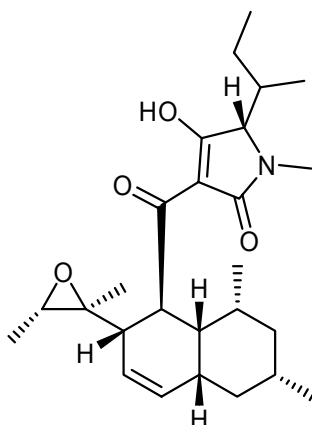


Abbildung 90: Fragmente aus dem HMBC-Spektrum

Als einzige Möglichkeit ergibt sich eine Verknüpfung des Kohlenstoffatoms 12 aus Fragment E (Abbildung 90) mit den Kohlenstoffatomen 11 und 13 zu einem Fünfring. Die beiden Kohlenstoffatome 11 und 13 müssen außerdem noch sauerstoffs substituiert sein. Damit ergeben sich zwei mögliche Strukturen, bei denen die Doppelbindung entweder zwischen den Kohlenstoffatomen 12 und 13 oder zwischen 11 und 12 liegt. Auf Grund der geringen Stabilität eines gemischten *N,O*-Ketenacetals muß das Kohlenstoffatom 11 jedoch eine

Carbonylgruppe sein. Somit ergibt sich für den Naturstoff 65793a die Struktur **46** (Abbildung 91).



46

Abbildung 91: Der literaturbekannte Naturstoff (5*S*)-3-({(1*S*,2*R*,4*aR*,6*S*,8*R*,8*aR*)-2-[(2*S*,3*S*)-2,3-Dimethyloxiran-2-yl]-6,8-dimethyl-1,2,4*a*,5,6,7,8,8*a*-octahydronaphthalin-1-yl}carbonyl)-5-*sec*-butyl-4-hydroxy-1-methyl-1,5-dihydro-2*H*-pyrrol-2-on hat fungizide und insektizide Wirkung

Eine Suche in den Chemical Abstracts ergibt, daß es sich um eine fungizide und insektizide Substanz handelt, die 1996 in den USA patentiert wurde.^[86] Das Patent wurde in der Zwischenzeit jedoch aufgegeben.

Betrachtet man die Struktur des Fünfringes, so fällt auf, daß theoretisch noch ein Tautomer dieser Substanz existiert, bei dem sich die Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 9 und 12 befindet. Beide Strukturen sollten sich miteinander im Gleichgewicht befinden.

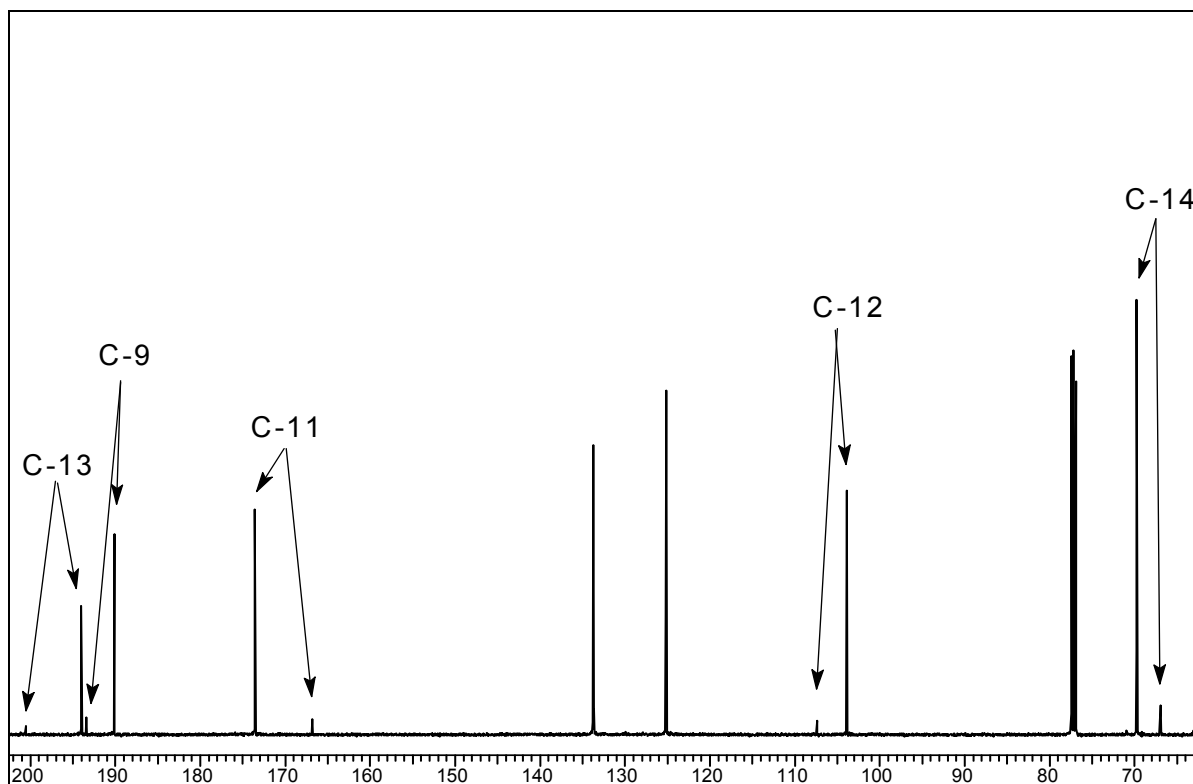
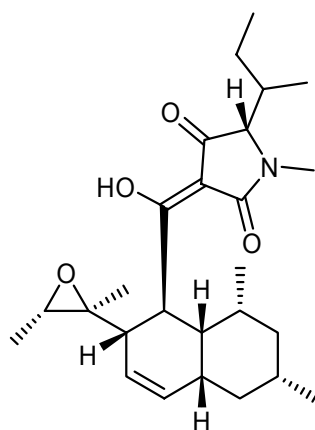


Abbildung 92: Ausschnitt aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum von Substanz 65793a, die zueinander gehörenden Signale der beiden Tautomere sind mit Pfeilen gekennzeichnet

Tatsächlich weisen die NMR-Spektren der Substanz eine Nebenkomponte auf, die von der Hauptkomponente nicht trennbar ist. Wie in Abbildung 92 gezeigt wird, befindet sich in der Nähe der Signale der Kohlenstoffatome 9, 11, 12, 13 und 14 jeweils ein leicht verschobenes Signal, welches für das Vorhandensein des Tautomers **47** (Abbildung 93) spricht.



Antibiotikum PF 1052 (47)

Abbildung 93: Tautomer des Naturstoffs 65793a, das in Japan für seine antibiotische Wirkung patentiert wurde

Das Tautomer **47** wurde in Japan patentiert und ihm wurde eine antibiotische Wirkung nachgewiesen.^[87]

2.8 Stamm 6586

Bei dem Stamm 6586 handelt es sich um *Acremonium* sp., der aus *Enteromorpha linza* bei Ahrenshoop an der Ostsee isoliert wurde. Der Stamm wurde für 21 Tage bei Raumtemperatur auf Biomalz-Festagar angezüchtet und nach Ablauf dieser Zeit tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurde die Kultur filtriert. Das Filtrat und die Biomasse wurden mit Ethylacetat extrahiert. Der Rohextrakt zeigte im Agardiffusionstest Aktivität gegen *Microbotryum violaceum*, *Bacillus megaterium* und *Chlorella fusca*.

2.8.1 Isolierung der Naturstoffe

Der resultierende Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel in sieben Fraktionen aufgetrennt. Fraktion 3 enthielt den Naturstoff 65863a (**48**), der durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 gewonnen wurde. Aus Fraktion fünf wurden durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 der Naturstoff 65865a (**49**) und durch anschließende Kristallisation der zweiten Fraktion der Gelchromatographie der Naturstoff 65865b (**50**) isoliert.

2.8.2 Naturstoff 65863a

Der Naturstoff 65863a wurde in Form eines schwach gelben Öls erhalten, das sich gut in Dichlormethan und Chloroform löst. Auf dem DC ist die Substanz durch Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar und hat einen R_f -Wert von 0.61 (Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). Im ^1H -NMR-Spektrum sind fünf Protonen im Bereich zwischen 5.67 und 6.70 ppm zu erkennen, wovon zwei mit ihren chemischen Verschiebungen von 5.67 und 6.29 ppm und der Kopplungskonstante von 9.7 Hz zu einer disubstituierten Doppelbindung in Z-Konfiguration gehören. Das Kopplungsmuster der verbleibenden drei Signale weist ein Doppeldublett mit einer *ortho*- und einer *meta*-Kopplung und zwei Dubletts auf, von denen eines eine *ortho*- und das zweite eine *meta*-Kopplung zeigt. Daraus ergibt sich ein aromatischer Ring mit einer 1,2,4-Substitution. Zuletzt ist noch ein Signal bei 1.44 ppm mit der relativen Intensität 6 zu erkennen, das zu zwei Methylgruppen gehört. Das ^{13}C -NMR-Spektrum weist zusätzlich zu den CH_3 - und CH-Signalen noch die Signale von zwei

sauerstoffsubstituierten, aromatischen Kohlenstoffatomen, einem quartären, aromatischen Kohlenstoffatom und einem quartären, sauerstoffsubstituierten Kohlenstoffatom auf. Die beiden sauerstoffsubstituierten Kohlenstoffatome müssen in *para*-Position angeordnet sein, da die *meta*-Position der beiden Sauerstoffe am Ring eine Verschiebung des Protonensignals des mittleren Protons zu höherem Feld und eine *ortho*-Position der beiden Sauerstoffe eine Verschiebung der beiden sauerstoffsubstituierten Kohlenstoffe zu höherem Feld bedingen würde. Die Verknüpfung der Methylgruppen mit dem quartären Kohlenstoffatom stellt die einzige Möglichkeit dar, zwei chemisch identische Methylgruppen zu erhalten. Somit besteht die Substanz aus den in Abbildung 94 dargestellten Fragmenten A–C.

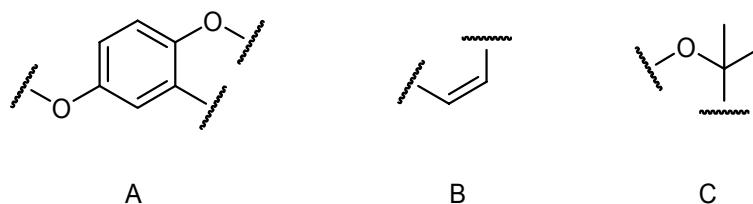
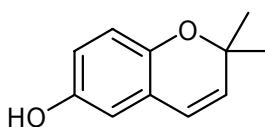


Abbildung 94: Fragmente des Naturstoff 65863a

Unter Berücksichtigung der nicht sehr großen Polarität der Substanz, ergibt sich eine Verknüpfung zweier sauerstoffsubstituierter Kohlenstoffatome über ein Sauerstoffatom. Dies führt zu der Struktur **48**, als einzig mögliche Verknüpfung.



2,2-Dimethylchromen-6-ol (**48**)

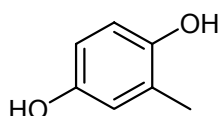
Abbildung 95: Ein bekannter Naturstoff, der von B. M. Howard isoliert wurde

Eine Recherche in den Chemical Abstracts ergab, daß die Substanz bereits 1979 von B.M. Howard isoliert wurde.^[88] Der Vergleich mit den Literaturdaten des ¹H-NMR-Spektrums ergab eine völlige Übereinstimmung.

2.8.3 Naturstoff 65865a

Der Naturstoff 65865a bildet farblose Kristalle (Smp.: 118–122 °C), die sich gut in mittelpolaren Lösungsmitteln wie Aceton lösen und sich unter Licht- und Sauerstoffeinwirkung schwarz färben. Die Substanz hat einen *R_f*-Wert von 0.42 (Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH 9:1) und läßt sich auf dem DC mit Anisaldehyd/Schwefelsäure orange-braun

anfärben. Das ^1H -NMR-Spektrum weist im Aromatenbereich das gleiche Kopplungsmuster wie Naturstoff 65863a (**48**) auf, woraus sich wieder auf einen 1,2,4-trisubstituierten Aromaten schließen läßt. Weiterhin zeigt sich noch ein Methylgruppensignal, das auf Grund der chemischen Verschiebung direkt mit dem Aromaten verknüpft sein muß. Aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum läßt sich ebenso wie im Fall des Naturstoffs 65863a auf eine Sauerstoffsstitution zweier aromatischer Kohlenstoffatome schließen. Damit ergibt sich für den Naturstoff 65865a die Struktur **49**, deren chemischer Name 1,4-Dihydroxy-2-methylbenzol lautet, und die unter anderem unter dem Namen Toluquinol in der Literatur^[89] zu finden ist. Ein Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten ergab eine völlige Übereinstimmung.



Toluquinol (49)

Abbildung 96: Ein bekannter Naturstoff, der bereits 1979 von S. T. Carey isoliert wurde

2.8.4 Naturstoff 65865b

Der Naturstoff 65865b wurde in Form eines weißen Feststoffs erhalten, der sich gut in Dichlormethan löst und einen Schmelzpunkt von 223–226 °C hat. Die Substanz hat einen R_f -Wert von 0.50 (Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) und ist auf dem DC durch eine blaue Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar. Das ^1H -NMR-Spektrum weist die Signale von acht Methylgruppen, drei sp^2 -hybridisierten CH-Gruppen, zwei sauerstoffs substituierten, sp^3 -hybridisierten CH-Gruppen sowie vierzehn weiteren Protonen auf, deren Signale durch die starke Überlagerung nur mit Hilfe des HMQC-Spektrums weiteren vier CH- und fünf CH_2 -Gruppen zugeordnet werden können. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt zusätzlich zu den acht Methyl-, neun CH- und fünf CH_2 -Gruppensignalen noch fünf Carbonyl-, drei quartäre, sp^2 -hybridisierte und drei quartäre, aliphatische Kohlenstoffsignale. Die chemischen Verschiebungen der Protonen und Kohlenstoffatome, sowie ihre Zuordnung und Kopplungen aus den ^1H -COSY- und HMBC-Spektren sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten und Kopplungen aus den H,H-COSY- und HMBC-Spektren von Naturstoff 65865b

Atomnummer	^{13}C -NMR	^1H -NMR	H,H-COSY	HMBC
1	157.3	7.33	2	3, 5, 6, 9, 10
2	127.8	5.89	1	-
3	201.4	-	-	-
4	40.4	2.8	5, 18	3, 5, 18
5	47.2	2.28	4	3, 7, 10, 18, 22
6	73.8	5.25	-	5, 8, 10
7	208.8	-	-	-
8	52.7	-	-	-
9	41.7	2.62	11	8, 10, 19
10	38.2	-	-	-
11	23.9	1.57/2.00	9, 12	-
12	25.9	1.85/2.50	11, 13	-
13	49.4	2.62	12	8
14	46.6	-	-	-
15	40.7	1.94/2.28	-	13, 14, 16, 17
16	73.5	5.89	-	-
17	147.7	-	-	-
18	13.1	1.3	4	3, 4, 5
19	168.9	-	-	-
20	20.7	2.13	-	19
21	18.3	1.2	-	8, 9, 14
22	27.5	1.47	-	1, 5, 10
23	17.9	0.95	-	8, 13, 14, 15
24	170.2	-	-	-
25	20.5	1.97	-	24
26	174.1	-	-	-
27	130.4	-	-	-
28	28.6	2.5	-	-
29	28.3	2.09	28, 30	-
30	122.8	5.13	29, 31, 33	-
31	132.9	-	-	-
32	25.7	1.71	30	30, 31
33	17.8	1.63	30	30, 31

Die chemischen Verschiebungen von zwei Carbonylgruppen von 201.4 und 208.8 ppm gehören zu Ketonen, bei den verbleibenden drei Carbonylgruppen handelt es sich um zwei Ester- und eine Säuregruppe. Die sechs sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatome bilden eine di-, eine tri- und eine tetrasubstituierte Doppelbindung, wobei die chemischen Verschiebungen der disubstituierten Doppelbindung von 127.8 und 157.3 ppm für eine Polarisierung durch die Konjugation mit einer Carbonylgruppe sprechen. Die Auswertung des H,H-COSY-Spektrums führte zu den in Abbildung 97 dargestellten Fragmenten A–D.

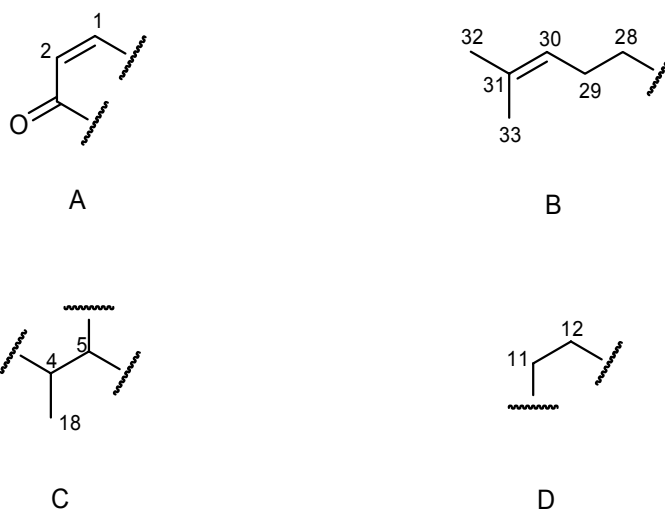


Abbildung 97: Fragmente aus den ^1H -, ^{13}C - und H,H-COSY-Spektren von Naturstoff 65865b

Mit Hilfe des HMBC-Spektrums konnten die Fragmente A, C und D aus Abbildung 97 zusammengefügt und zu dem in Abbildung 98 dargestellten Fragment E vergrößert werden. Damit besteht der Naturstoff 65865b aus den Fragmenten B, E und F.

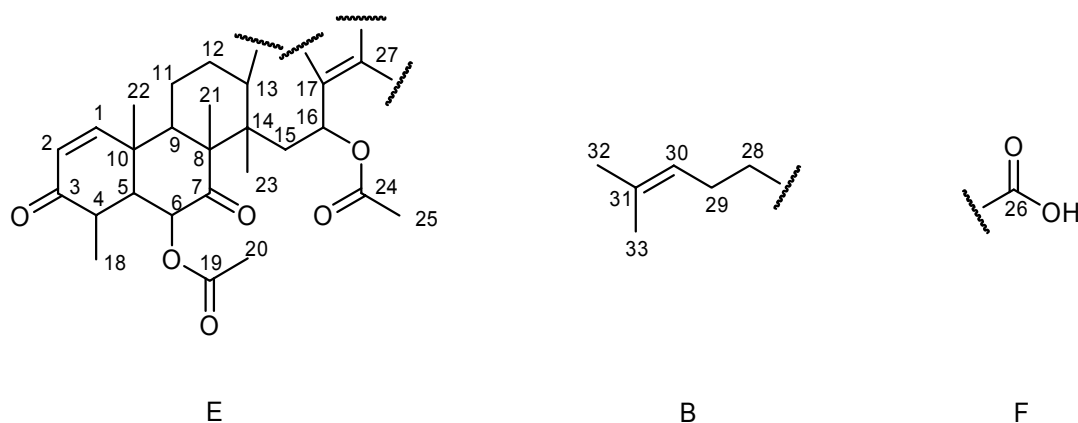
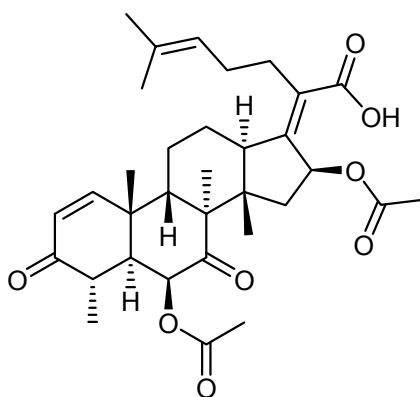


Abbildung 98: Fragmente aus dem HMBC-Spektrum von Naturstoff 65865b

Die chemischen Verschiebungen der tetrasubstituierten Doppelbindung von 130.4 und 147.7 ppm weisen ebenfalls auf eine Polarisierung der Doppelbindung hin, weshalb die

Fragmente E und F aus Abbildung 98 über das Kohlenstoffatom 27 verknüpft werden können. Außerdem sprechen die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome 13, 14, 15 und 16 (siehe Tabelle 6) aus Abbildung 98 für das Vorliegen eines Fünfringes, woraus sich eine Verknüpfung der Kohlenstoffatome 13 und 17 ergibt. Damit müssen die Fragmente B und E über die Kohlenstoffatome 27 und 28 miteinander verbunden werden. Auf diese Weise ergibt sich für den Naturstoff 65865b die Struktur **50** (Abbildung 99), die als Helvolinsäure bekannt ist und bereits 1943 von Waksman et al.^[90] unter dem Namen Fumigacin isoliert wurde. Später konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem isolierten Fumigacin um eine Mischung aus Gliotoxin und der damals unbekannten, antibiotisch wirksamen Helvolinsäure handelte.^[91]



Helvolinsäure (**50**)

Abbildung 99: Ein bereits sein 1943 bekannter Naturstoff, der von Waksman et al. isoliert wurde

2.9 Stamm 7165

Bei dem Stamm 7165 handelt es sich um *Nigrospora* sp., der aus *Viburnum rigidum* von Gomera isoliert wurde. Der Pilz wurde 28 Tage auf Biomalz-Festagar angezüchtet und mit Ethylacetat extrahiert. Der Rohextrakt zeigte gute fungizide, algizide und antibakterielle Aktivität und eine mittelmäßige herbizide Wirkung.

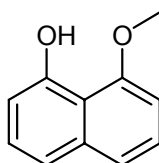
2.9.1 Isolierung der Naturstoffe

Der Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel in 5 Fraktionen aufgetrennt. Aus Fraktion 1 kristallisierte der Naturstoff 71651b (**52**) aus Dichlormethan/Hexan. Aus der Mutterlauge konnten mittels einer weiteren Säulenchromatographie an Kieselgel die Naturstoffe 71651a (**51**) und 71651c (**53**) isoliert

werden. Fraktion 2 lieferte nach Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 die Naturstoffe 71652a (**54**) und 71652b (**55**).

2.9.2 Naturstoff 71651a

Der Naturstoff 71651a wurde in Form eines weißen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 51–52 °C erhalten, der sich gut in unpolaren Lösungsmitteln wie Dichlormethan und Hexan löst. Auf dem DC (R_f -Wert 0.91, Laufmittel CH_2Cl_2) ist die Substanz durch UV-Löschung bei 254 nm und ihre leuchtend blaue Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure zu detektieren. Das ^1H -NMR-Spektrum weist sechs aromatische Protonen im Bereich von 6.73 bis 7.56 ppm, eine schwach chelierte Hydroxygruppe bei 9.49 ppm sowie eine Methoxygruppe bei 3.97 ppm auf. Von den sechs aromatischen Protonen sind zwei hochfeldverschoben, was auf eine Nachbarschaft zu einem sauerstoffs substituierten Kohlenstoffatom hindeutet. Das ^{13}C -NMR-Spektrum weist im Einklang dazu zwei tieffeldverschobene Signale bei 155.1 und 156.6 ppm auf. Insgesamt lassen sich aus dem ^{13}C -NMR- und dem DEPT-Spektrum zehn aromatische Kohlenstoffatome erkennen, von denen vier quartär sind. Daraus läßt sich auf ein zweifach sauerstoffs substituiertes Naphthalin-Grundgerüst schließen. Die chemische Verschiebung der beiden nicht-sauerstoffs substituierten, quartären Kohlenstoffatome von 115.6 und 137.3 ppm deutet darauf hin, daß beide Sauerstoffs substitutionen in *ortho*-Stellung zu dem Kohlenstoffatom bei 115.6 ppm und in *meta*-Stellung zu dem bei 137.3 ppm stehen müssen. Damit ergibt sich eine 1,8-Substitution für das Naphthalin-Grundgerüst. Es handelt sich bei Naturstoff 71651a somit um 8-Methoxynaphthalen-1-ol (**51**, Abbildung 100), das bereits 1995 von H. Anke isoliert wurde.^[92]



8-Methoxynaphthalen-1-ol (51)

Abbildung 100: Ein bekannter Naturstoff, der schwache Aktivität gegen *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea* und *Septoria tritici* zeigt

Die Substanz erwies sich bei den in-vitro-Aktivitätstests, die an einer vorher im Arbeitskreis von Prof. Krohn von Dr. Dai Jingqiu isolierten Probe durchgeführt wurden, als schwach aktiv gegen *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea* und *Septoria tritici*.

2.9.3 Naturstoff 71651b

Der Naturstoff 71651b wurde in Form farbloser Nadeln mit einem Schmelzpunkt von 154–157 °C erhalten, die sich gut in Dichlormethan lösen. Die Substanz hat einen R_f -Wert von 0.80 (Laufmittel CH_2Cl_2) und ist auf dem DC durch UV-Löschung bei 254 nm und eine leuchtend blaue Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren zeigen eine Methoxygruppe, drei CH-Gruppen und drei quartäre Kohlenstoffatome. Die chemische Verschiebung eines der drei quartären Kohlenstoffatome von 157.5 ppm spricht für eine Sauerstoffs substitution und die Lage der Signale einer CH-Gruppe von 106.6 ppm für das Kohlenstoffatom und 6.90 ppm für das Proton zeigen die Nachbarschaft zu dem sauerstoffs substituierten Kohlenstoffatom an. Die Multiplizität dieses Protonensignals mit einer *ortho*- und einer *meta*-Kopplung führt schließlich zu dem in Abbildung 101 dargestellten Fragment.

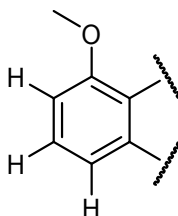
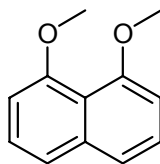


Abbildung 101: Fragment des Naturstoff 71651b aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren

Die chemischen Verschiebungen der beiden verbleibenden quartären Kohlenstoffatome von 137.8 und 118.0 ppm schließen eine weitere Heteroatoms substitution aus. Deshalb bleibt nur die Möglichkeit, daß es sich um ein symmetrisches Molekül handelt. Damit ergibt sich für den Naturstoff 71651b die Struktur des 1,8-Dimethoxynaphthalins (**52**, Abbildung 102), das 1995 zusammen mit dem 8-Methoxynaphthalen-1-ol isoliert wurde.^[92]

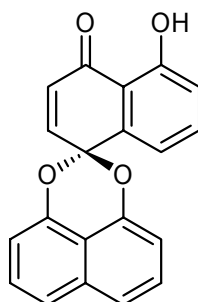


1,8-Dimethoxynaphthalin (**52**)

Abbildung 102: Ein bekannter Naturstoff, der von H. Anke zusammen mit dem 8-Methoxynaphthalen-1-ol isoliert wurde

Das 1,8-Dihydroxynaphthalin, das den Naturstoffen **51** und **52** zugrunde liegt, stellt einen Baustein zur Biosynthese der Palmarumycine dar. In Abbildung 103 ist das einfachste, bekannte Palmarumycin dargestellt. Die Palmarumycine zählen zu den Spirobisnaphthalinen

und werden wahrscheinlich durch oxidative Kupplung der einzelnen Bausteine gebildet.^[93] Trotz des Vorhandenseins der Bausteine konnten jedoch keine Dimere aus dem untersuchten Pilz isoliert werden.



Palmarumycin CP₁ (52a)

Abbildung 103: Der einfachste Vertreter der Gruppe der Palmarumycine

2.9.4 Naturstoff 71651c

Der Naturstoff 71651c wurde in Form eines schwach gelben Öls erhalten, das sich in unpolaren Lösungsmitteln wie Dichlormethan und Hexan löst. Die Substanz ist durch eine orangerote Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure auf dem DC (R_f -Wert 0.85, Laufmittel CH_2Cl_2) detektierbar. Im ^1H -NMR-Spektrum sind eine Methylgruppe, eine CH_2 -Gruppe, eine CH-Gruppe, drei aromatische Protonen und eine chelierte Hydroxygruppe zu erkennen. Die Multiplizität des CH_3 -Gruppensignals (Dublett) mit einer Kopplungskonstante von 6.3 Hz läßt auf eine Verknüpfung mit der CH-Gruppe schließen. Bei dem Signal der CH-Gruppe handelt es sich um ein Multiplett mit sieben Linien, so daß die CH-Gruppe ihrerseits mit der CH_2 -Gruppe verknüpft sein muß. Gleichzeitig zeigt die chemische Verschiebung des Protons der CH-Gruppe eine Sauerstoffsubstitution an. Die drei aromatischen Protonen zeigen ausschließlich *ortho*-Kopplungen, wobei zwei der Signale Dubletts sind und das dritte Signal ein Triplett darstellt. Weiterhin läßt die chemische Verschiebung der beiden Dubletts mit 6.42 und 6.48 ppm auf Nachbarschaft zu einem sauerstoffsubstituierten Kohlenstoffatom schließen. Dies wird durch das ^{13}C -NMR-Spektrum bestätigt, das zwei sauerstoffsubstituierte, aromatische Kohlenstoffatome bei 162.1 und 162.4 ppm zeigt. Die selbst für sauerstoffsubstituierte Kohlenstoffatome sehr starke Tieffeldverschiebung spricht für eine *meta*-Stellung der beiden Sauerstoffatome. Zusammen mit der im ^{13}C -NMR-Spektrum ebenfalls zu erkennenden Ketogruppe bei 198.9 ppm ergeben sich die in Abbildung 104 gezeigten Fragmente A–C.

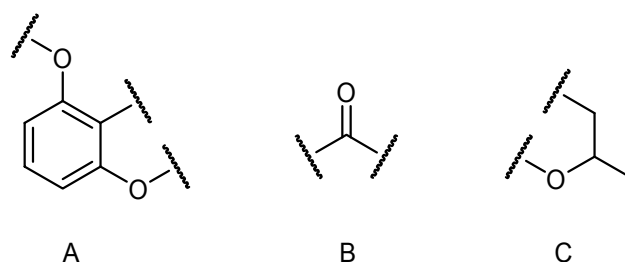


Abbildung 104: Fragmente des Naturstoffs 71651c

Da das ^1H -NMR-Spektrum eine chelierte Hydroxygruppe anzeigt, muß die Ketogruppe direkt mit dem aromatischen Ring verknüpft sein. Außerdem sollte das Fragment A mit dem Fragment C über eine Etherbrücke verbunden sein. Ein Ringschluß zwischen der Ketogruppe und der CH_2 -Gruppe führt schließlich zu der Struktur **53** (Abbildung 105).

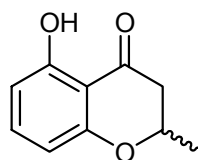
5-Hydroxy-2-methylchroman-4-on (**53**)

Abbildung 105: Ein bekannter Naturstoff, der zu den Polyketiden gehört und aus 5 Acetat-Einheiten gebildet wird

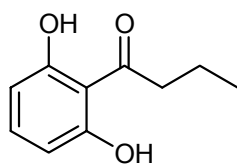
Somit handelt es sich bei Naturstoff 71651c um 5-Hydroxy-2-methylchroman-4-on, das bereits 1960 im Rahmen einer Untersuchung zu den Biosynthesewegen von *Daldinia concentrica*^[94] isoliert wurde. Ein Vergleich mit Literaturdaten^[95] der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten belegt die Identität der Substanz. Die vorliegende Probe weist keine optische Aktivität auf, woraus geschlossen werden kann, daß der Naturstoff 71651c als racemisches Gemisch gebildet wird.

Die Substanz erwies sich bei den in-vitro-Tests, die mit einer von Dr. Dai Jingqiu im Arbeitskreis von Professor Krohn isolierten Probe durchgeführt worden, als schwach aktiv gegen *Phytophthora infestans* und *Pyricularia oryzae*.

2.9.5 Naturstoff 71652a

Der Naturstoff 71652a wurde in Form von farblosen Kristallen (Smp.: 112–114 °C) erhalten, die sich gut in Dichlormethan lösen. Die Substanz hat einen R_f -Wert von 0.73 (Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) und ist auf dem DC durch eine rote Anfärbung mit

Anisaldehyd/Schwefelsäure zu detektieren. Im ^1H -NMR-Spektrum sind eine Methylgruppe, zwei CH_2 -Gruppen, drei aromatische Protonen, von denen zwei chemisch identisch sind, sowie zwei Hydroxygruppen zu erkennen. Die Multiplizitäten der CH_3 - (t) und CH_2 -Gruppen (tq und t) zwischen 1.03 und 3.16 ppm lassen eine Verknüpfung der drei Gruppen zu einem *n*-Propylrest erkennen. Das Kopplungsmuster der aromatischen Protonen weist große Ähnlichkeit mit dem des Naturstoffs 71651c (**53**, Abbildung 105) auf. Daher handelt es sich um ein identisches Substitutionsmuster wie in Abbildung 104. Im ^{13}C -NMR-Spektrum lässt sich ebenso wie bei Naturstoff 71651c eine Ketogruppe bei 208.5 ppm erkennen. Zusammen ergibt sich daraus für Naturstoff 71652a die Struktur **54** (Abbildung 106).



2,6-Dihydroxybutyrophenon (54)

Abbildung 106: Ein bekannter Naturstoff, der die Vorstufe auf dem Biosyntheseweg von Naturstoff 71651c darstellt

Die Substanz wurde ebenso wie Naturstoff 71651c (**53**, Abbildung 105) im Rahmen einer Studie über die Biosynthesewege von *Daldinia concentrica*^[94] isoliert.

2.9.6 Naturstoff 71652b

Der Naturstoff 71652b wurde in Form farbloser Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 69–72 °C erhalten, die sich gut in Dichlormethan lösen. Die Substanz ist auf dem DC (R_f -Wert 0.89, Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) durch ihre braune Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure detektierbar. Das ^1H -NMR-Spektrum weist die Signale von fünf Methylgruppen und drei CH-Gruppen auf, von denen eine zu einem sp^2 -hybridisierten und die andere zu einem sauerstoffsubstituierten Kohlenstoffatom gehört. Bei dem Methylgruppensignal bei 0.99 ppm handelt es sich um ein Dublett, dessen Kopplungskonstante zu dem Signal der aliphatischen CH-Gruppe bei 2.72 ppm paßt. Mit Hilfe des H,H-COSY -Spektrums läßt sich das in Abbildung 107 dargestellte Fragment erkennen.

Stereozentren bestimmen. Wie in Abbildung 110 gezeigt, spricht eine Kopplung von 11.3 Hz für eine axial-axial-Position der beiden Protonen und damit für eine 5*R*,6*S*- oder 5*S*,6*R*-Konfiguration des Moleküls. Die absolute Konfiguration des Naturstoffs konnte nicht bestimmt werden.

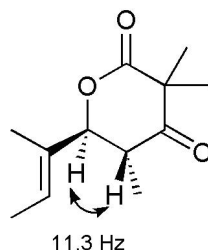


Abbildung 110: Ableitung der relativen Konfiguration aus der Größe der Kopplungskonstante der beiden Protonen an den Stereozentren von Naturstoff 71652b

Der literaturunbekannte Naturstoff weist große Ähnlichkeit mit den beiden von J. B. Gloer et al.^[96] isolierten Naturstoffen Helicascolid A (**55a**, Abbildung 111) und B (**55b**) auf, weshalb ihm der Name Helicascolid C gegeben wird.

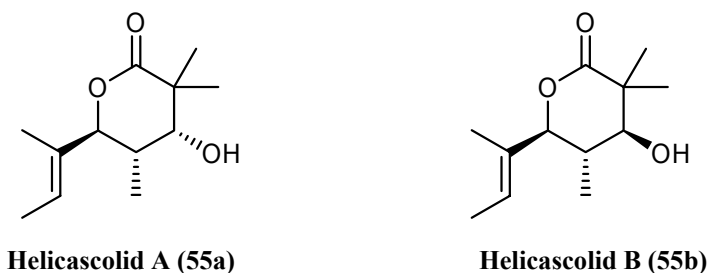


Abbildung 111: Die bekannten Naturstoffe wurden von J. B. Gloer et al. isoliert

2.9.7 Biosynthese der Naturstoffe aus Stamm 7165

D. C. Allport und J. D. Bu'Lock^[94] haben im Jahre 1960 durch Fütterungsversuche mit ¹⁴C-makiertem Acetat an verschiedenen Mutanten von *Daldinia concentrica* bewiesen, daß 2,6-Dihydroxyacetophenon aus vier Acetat-Einheiten aufgebaut wird. In einer Mutante wurde eine fünfte Acetat-Einheit eingebaut, was zu der Bildung von 2,6-Dihydroxybutyrophenon (**54**, Abbildung 106) führte. Dieses wurde hauptsächlich weiter zu 5-Hydroxy-2-methylchroman-4-on (**53**, Abbildung 105) und 5-Hydroxy-2-methyl-4*H*-chromen-4-on umgesetzt. Eine weitere Mutante von *Daldinia concentrica* bildete 1,8-Dihydroxynaphthalin, das dann in die Mono- und Dimethylether (**51**, Abbildung 100 & **52**, Abbildung 102) übergeführt wurde.

2.10 Biologische Aktivität der Rohextrakte und Reinsubstanzen

Die Aktivitätstests wurden im Arbeitskreis von Prof. Aust und PD Dr. Schulz an der TU Braunschweig und von der BASF AG durchgeführt. Zur Bestimmung der Aktivität gibt es zwei Methoden. Bei den Agardiffusionstests wird die Substanz auf ein Zellstoffplättchen aufgetragen und auf eine Agarplatte gelegt, auf die der Testorganismus überimpft wird. Während der Inkubationszeit diffundiert die Substanz von dem Zellstoffplättchen in den Agar und hemmt im Falle einer Aktivität das Wachstum des Testorganismus. Dadurch entsteht ein kreisförmiger Bereich in dem kein Wachstum stattfindet. Außerhalb dieses Kreises wächst der Testorganismus ungehemmt. Der Bereich in dem kein Wachstum stattfindet, wird als Hemmhof bezeichnet. Da durch die Diffusion der Testsubstanz ein Konzentrationsgradient entlang des Hemmhofradius entsteht, ist seine Größe ein direktes Maß für die Aktivität der untersuchten Substanz. Der Hemmhofradius wird abzüglich des Radius des Zellstoffplättchens angegeben.

Bei einem in-vitro-Test mit Mikroorganismen wird eine Nährlösung auf einer Mikrotiterplatte oder in einem Reagenzglas mit den Testsubstanzen versetzt und anschließend mit dem Testorganismus angeimpft. Nach der Inkubationszeit wird das Wachstum der Proben mit einer Blindprobe (ohne Testsubstanz) verglichen. Da die Konzentration der Testsubstanz in der Lösung einheitlich ist (nicht wie beim Agardiffusionstest), werden mehrere Tests mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Angegeben wird das Wachstum des Testorganismus in Prozent relativ zu der Blindprobe. Nach Angaben der BASF AG wurde ein Wachstumswert von weniger als 90 Prozent bei einer Konzentration von 2 ppm als gute Aktivität eingestuft.

Tabelle 7: Biologische Aktivität der untersuchten Rohextrakte im Agardiffusionstest (Hemmhofradius in mm, WH = Wachstumshemmung)

Stammnummer	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Microbotryum violaceum</i>	<i>Chlorella fusca</i>	<i>Septoria tritici</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
6282	30	33	50	-	-	-
6651	0.6 WH	27	15	17	0	27
6577	9	8	6 WH	-	-	-
7067	7	7	8	7+15 WH	8	19
6754	8	21	15	14	8	35
6579	20	12	7.5	-	-	-
6586	10	13	7.5	-	-	-
7165	12	15	15	11	7	12

Tabelle 8: Biologische Aktivität der isolierten Reinsubstanzen im Agardiffusionstest (Hemmhofradius in mm)

Substanznummer	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Microbotryum violaceum</i>	<i>Chlorella fusca</i>	<i>Septoria tritici</i>
59485a (1 mg/mL)	0	0	0	-
59485a (5 mg/mL)	6	0	5	-
62824a2 (1 mg/mL)	5	0	0	-
62824a2 (5 mg/mL)	15	6	8	-
65772 (1 mg/mL)	0	0	5 WH	-
65772 (5 mg/mL)	0	5	5	-
6577c3 (1 mg/mL)	7 WH	5 WH	7	-
6577c3 (5 mg/mL)	7 + 6 WH	9	13	-
6577m4 (1 mg/mL)	0	0	0	-
6577m4 (5 mg/mL)	6 WH	7 WH	0	-
66511b (10 mg/mL)	7 WH	10	10	-
66514a (10 mg/mL)	25	12	12	-
66515a (10 mg/mL)	7	13	5 WH	-
70675b (5 mg/mL)	0	0	0	5

Tabelle 9: Ergebnisse der in-vitro-Testung der Reinsubstanzen (Werte in %-Wachstum)

Substanznummer	ppm	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pyricularia oryzae</i>	<i>Septoria tritici</i>
6577c3	125	5.3	0.2	0	3.9
	31	2.4	0.2	0.3	0.4
	8	58.5	42	0	0
	2	100	83.6	0	68.6
	0.5	100	82.3	87	100
	0.125	100	83.2	100	100
65772	125	2.6	50.3	5.8	10.9
	31	1.6	55.9	74.1	29.1
	8	6.3	75.2	87.4	61.5
	2	82.3	77.9	86.4	65.4
	0.5	100	81.5	85.4	72.8
	0.125	100	77.3	84.5	74
6577m4	125	42.6	90.7	100	100
	31	85.1	85.6	92	100
	8	99.5	76	89.5	99.3
	2	95.2	79.8	88.9	90.4
	0.5	100	80.7	91.2	86.1
	0.125	99.9	81.4	89.7	85.3
66511b	125	16	70.1	0	48.4
	31	59.4	86.4	0.8	88
	8	90.4	97.7	76.8	98.2
	2	98.7	96.3	82.2	100
	0.5	94.6	100	92.8	100
	0.125	100	99.4	97.1	100
66514a	125	31.6	87.5	62.3	76.8
	31	86.9	94.4	100	100
	8	100	100	100	100
	2	100	94.1	100	100
	0.5	100	100	98.7	100
	0.125	100	100	100	100

66515a	125	67.2	84.5	92.7	0
	31	96.9	93.8	93.8	100
	8	100	97.1	97.1	100
	2	97.7	100	100	100
	0.5	100	100	100	100
	0.125	97.6	100	100	100
71651a*	125	76.9	79.6	90.9	78.1
	31	95.9	82.1	93.6	84.5
	8	93.9	98.3	92.2	87.1
	2	100	96.2	91.4	83.2
	0.5	94.6	92.6	92.2	83.8
	0.125	98.9	92.9	93	84.4
71651c*	125	7.2	5.7	0	0
	31	6.6	43.9	0	64.9
	8	82.1	41.3	51.7	81
	2	93.4	76.5	86.6	82.5
	0.5	100	89.1	91.6	84.1
	0.125	100	93.3	96	89
71652a*	125	0	0	0	0
	31	2.4	31	0	9.1
	8	65.7	47.5	20.5	75.9
	2	100	72.6	74.4	86.1
	0.5	100	82.5	93.2	91.2
	0.125	100	84.6	94.7	99.5

* Die Testresultate stammen von Proben, die bereits im Arbeitskreis von Professor Krohn von Dr. Dai Jingqiu isoliert wurden.

3 VERSUCHE ZUR SYNTHESE DES PSEUDOANGUILLOSPORINS A

3.1 Motivation

Pseudoanguillosporin A (**34**, Abbildung 58) wurde aus dem Pilz 6577, *Pseudoanguillospora* sp., isoliert und wies im in-vitro-Test gute Aktivität gegen *Pyricularia oryzae* und *Septoria tritici* auf (s. Kapitel 2.4.3). Deshalb schien es von Interesse, eine größere Menge der Substanz für weitere Tests zur Verfügung zu stellen.

3.2 Syntheseplan

Bei dem Grundgerüst des Pseudoanguillosporins A handelt es sich um einen pentasubstituierten Benzolring mit zwei Hydroxygruppen in *meta*-Position. Um das ungewöhnliche Substitutionsmuster des aromatischen Rings aufzubauen, bietet sich eine Diels-Alder-Reaktion mit den passenden Ausgangsverbindungen **58** (Abbildung 112) und **61** (Abbildung 113) an, deren Synthese^[97,98,99] und Einsatz in einer Diels-Alder-Reaktion^[100] in der Literatur beschrieben ist. Eine analoge Synthesesequenz wurde im Arbeitskreis von Professor Krohn bereits durch Herrn Dr. Vitz^[101] durchgeführt, bei der durch die Diels-Alder-Reaktion der 4,6-Dimethoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-benzoesäuremethylester dargestellt wurde und durch Verseifung und selektive Veresterung der aliphatischen Carbonsäure in das Edukt für eine selektive Reduktion der Benzoessäuregruppe übergeführt wurde. Durch den Austausch des ursprünglichen 1,3-Dimethoxybuta-1,3-dienyloxy)-trimethylsilans durch 1,3-Dimethoxypenta-1,3-dienyloxy)-trimethylsilan kann die zusätzliche Methylgruppe in 3-Position eingeführt werden (Abbildung 112).

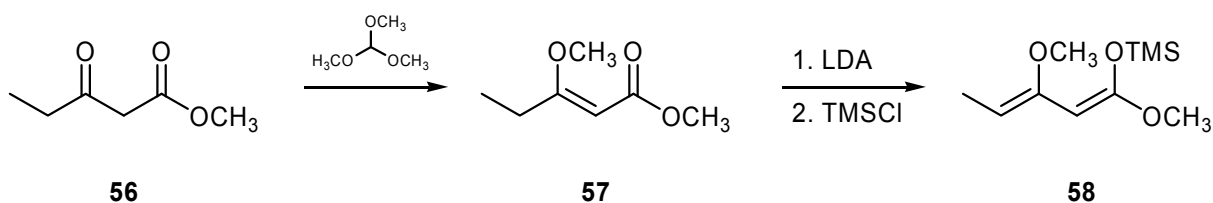


Abbildung 112: Synthese des 1,3-Dimethoxypenta-1,3-dienyloxy)-trimethylsilans

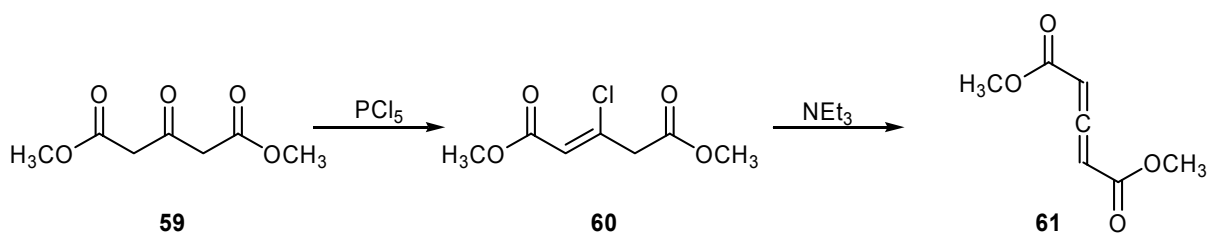


Abbildung 113: Synthese des Penta-2,3-diendicarbonsäuredimethylesters

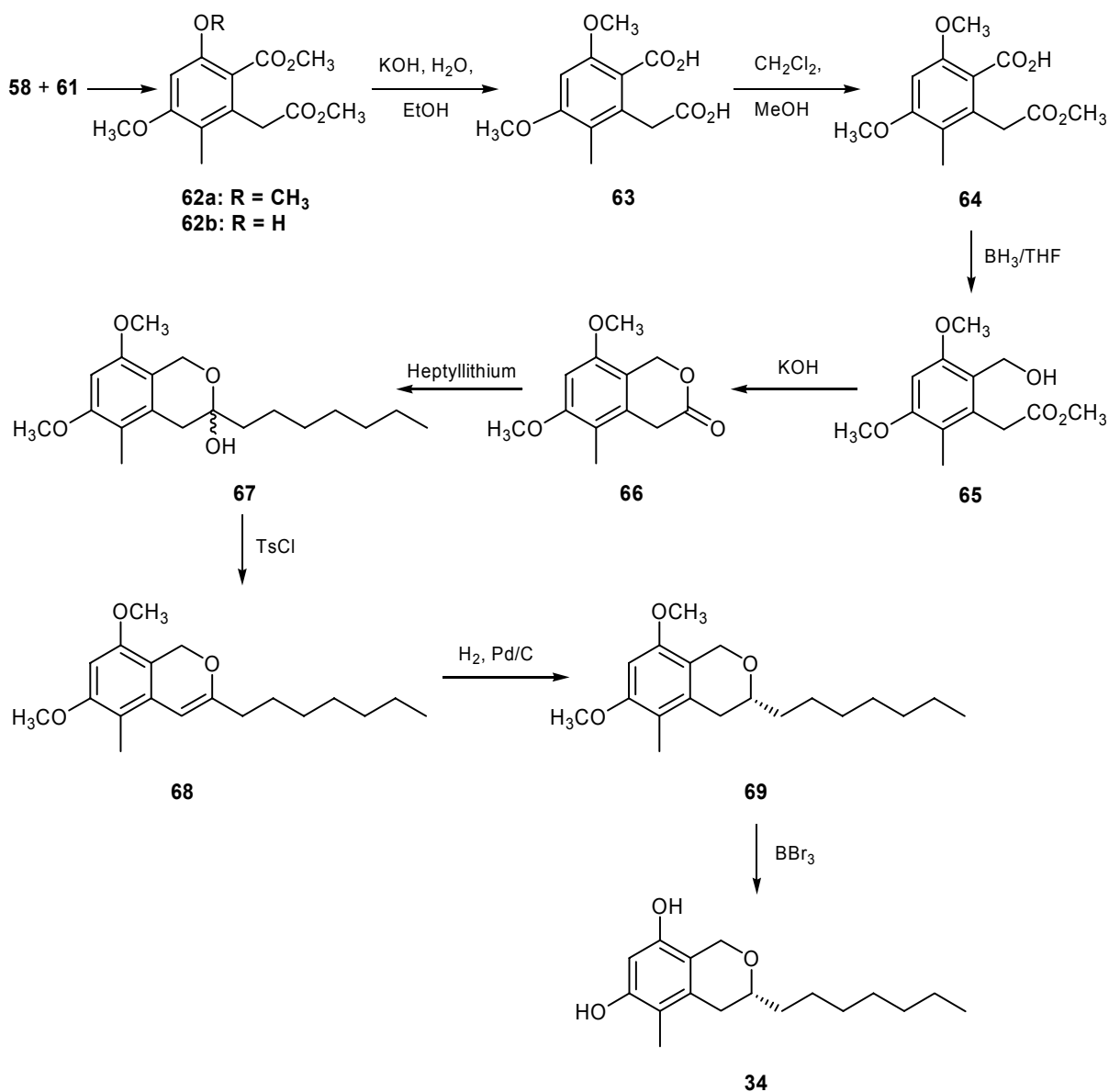


Abbildung 114: Syntheseplan für Pseudoanguillosporin A

Nach der selektiven Reduktion des Monoesters **64** soll eine Lactonisierung und die Addition der Heptyl-Seitenkette in Form eines Lithiumorganyls, sowie die Eliminierung der Hydroxygruppe folgen. Eine stereoselektive Hydrierung und das Entschützen der Hydroxygruppen am Benzolring führt zu dem Pseudoanguillosporin A (**34**). In Abbildung 114 ist der vollständige Synthesepfad dargestellt.

3.3 Durchführung

Das Dien für die Diels-Alder-Reaktion wurde aus 3-Oxovaleriansäure (**56**) durch Umsetzung mit Orthoameisensäuremethylester zu 3-Methoxypent-2-ensäuremethylester (**57**), der wiederum mit Lithiumdiisopropylamid und Trimethylsilylchlorid in das Ketenacetal **58** (Abbildung 112) übergeführt wurde, dargestellt. Das Allen für die Diels-Alder-Reaktion wurde aus 3-Oxopentandisäuredimethylester (**59**) durch Reaktion mit Phosphorpentachlorid zu dem 3-Chlorpent-2-endisäuredimethylester (**60**) dargestellt, der durch β -Eliminierung zu dem Allen **61** (Abbildung 113) umgesetzt wurde. Mit den Edukten **58** und **61** wurde die Diels-Alder-Reaktion bei 0 °C durchgeführt, bei der ein Gemisch aus 4,6-Dimethoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-methyl-benzoesäuremethylester (**62a**) und 6-Hydroxy-4-methoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-methyl-benzoesäuremethylester (**62b**) im Verhältnis 7:2 entstanden ist. Der Benzoessäuremethylester **62a** wurde mit Kaliumhydroxid in wässriger Lösung verseift und mit Methanol und *p*-Toluolsulfonsäure selektiv zu dem Monoester **64** umgesetzt. Die Reaktion mit BH_3 in THF führte jedoch nicht zu dem erwarteten Produkt **65**, sondern zu dem 2-(3,5-dimethoxy-2,6-dimethylphenyl)-essigsäuremethylester (**70**, Abbildung 115).

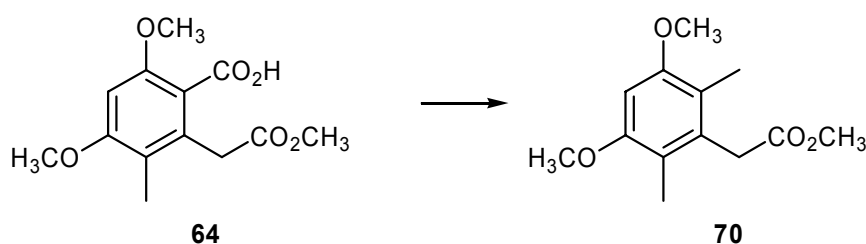


Abbildung 115: Ergebnis der Reaktion von 4,6-Dimethoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-methylbenzoessäure mit BH_3 in THF

Um die Reduktion der Benzoessäuregruppe zu umgehen, sollte in einem ersten Versuch das Anhydrid der Dicarbonsäure **63** durch Addition von Butyllithium und anschließender Eliminierung der Hydroxygruppe in das Isochromenon **73** (Abbildung 116) übergeführt werden.

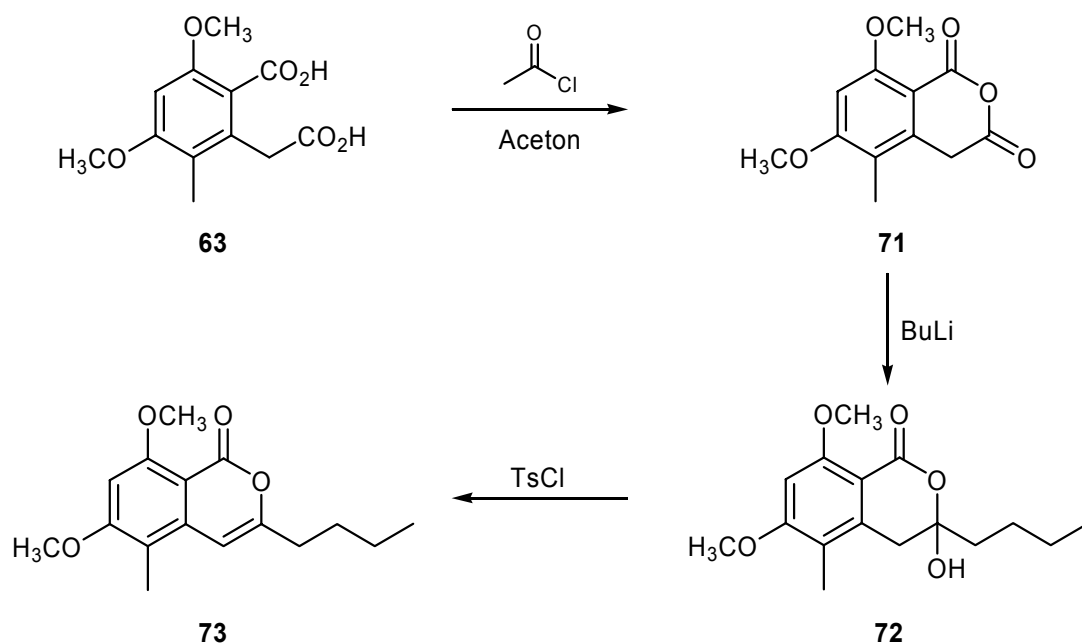


Abbildung 116: Synthesepfad für das 3-Butyl-6,8-dimethoxy-5-methyl-1H-isochromen-1-on

Das Anhydrid **71** wurde durch Rühren mit Acetylchlorid in Aceton^[102] dargestellt. Der Versuch Butyllithium zu addieren, blieb jedoch erfolglos, was vermutlich auf die Acidität der benzyllischen CH₂-Gruppe zurückzuführen ist. Anstatt an die Carbonylgruppe zu addieren, fungiert das Butyllithium als Base und deprotoniert die CH₂-Gruppe des Anhydrids **71**.

Um die Nukleophilie des metallorganischen Reagenzes zu erhöhen, wurde Butyllithium mit trockenem Cerchlorid umgesetzt. Das in-situ erzeugte Cerorganyl^[103,104] wurde direkt mit dem Anhydrid **71** versetzt. Es konnte jedoch wieder kein Produkt isoliert werden.

In der Literatur^[105,106,107] ist die Reaktion von 2-(Carboxymethyl)-4,6-dimethoxybenzoesäure mit Dodecanoylchlorid zu dem 6,8-Dimethoxy-3-undecyl-1H-isochromen-1-on beschrieben. Daher wurde die analoge Reaktion mit der Dicarbonsäure **63** und Octanoylchlorid durchgeführt (Abbildung 117).

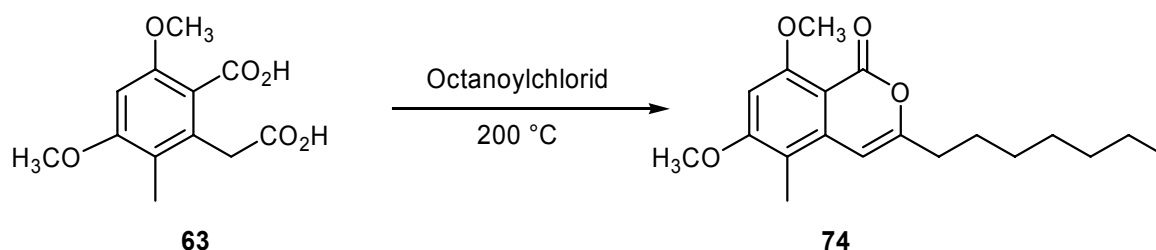


Abbildung 117: geplante Reaktion zum Aufbau des 3-Heptyl-6,8-dimethoxy-5-methyl-1H-isochromen-1-ons

Dazu wurde die Dicarbonsäure **63** mit einem vierfachen Überschuß an Octanoylchlorid versetzt und für vier Stunden auf 200 °C erhitzt. Das gewünschte Produkt konnte jedoch nicht isoliert werden. Ein DC-Vergleich zeigte, daß lediglich kleine Mengen an Anhydrid **71** gebildet wurden.

4 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus neun endophytischen Pilzen, die aus Algen and Pflanzen mariner Habitate stammen, durchgeführt.

Aus dem Pilz 5948, *Coniothyrium* sp., konnten drei Naturstoffe isoliert und deren Struktur bestimmt werden. Bei zwei der Substanzen handelt es sich um die literaturunbekannten Naturstoffe Coniol (**21**, Abbildung 14) und Coniothyren (**22**, Abbildung 16). Der Naturstoff Coniol weist eine große Ähnlichkeit mit dem dritten isolierten Naturstoff, dem literaturbekannten Epoxydon^[43] (**23**, Abbildung 17) auf, das sich im Agardiffusionstest als aktiv gegen *Bacillus megaterium* und *Chlorella fusca* erwies. In der Literatur wird außerdem über die fungizide Aktivität von Epoxydon gegen den Pilz *Plasmodiophora brassicae* berichtet, der die Wurzeln von kreuzblütigen Pflanzen befällt und dort ein unkontrolliertes Wachstum auslöst.^[44]

Der Stamm 6282, *Phoma* sp., lieferte vier Naturstoffe, von denen einer der literaturunbekannte Naturstoff Phomafuranol (**26**, Abbildung 22) war. Bei den literaturbekannten Substanzen handelte es sich um Emodin (**24**), das zu den Polyketiden zählt und in der Literatur als aktiv gegen Larven verschiedener Moskitoarten^[47] beschrieben wird. Ein weiteres Polyketid, das isoliert werden konnte, ist das ebenfalls literaturbekannte (3*R*)-5-Hydroxymellein^[49] (**25**, Abbildung 20), das zu den Isocoumarinen gehört. Der vierte Naturstoff weist strukturelle Ähnlichkeit mit dem Phomafuranol auf und ist aus der Literatur als Phomalacton^[54] (**27**, Abbildung 26) bekannt. Er zeigte im Agardiffusionstest Aktivität gegen *Microbotryum violaceum*, *Bacillus megaterium* und *Chlorella fusca*. Außerdem wurde ihm von verschiedenen Autoren eine nematizide^[57], herbizide^[53], fungizide und bakteriozide^[58] Wirkung nachgewiesen.

Aus dem Pilz 6651, *Ascochyta* sp., konnten fünf Naturstoffe isoliert werden, von den drei literaturunbekannt waren. Von dem literaturunbekannten Naturstoff Ascochin (**28**, Abbildung 36) konnte eine Röntgenstruktur gemessen werden. Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde der Naturstoff hydriert und das CD-Spektrum des Produktes gemessen. Durch den Vergleich mit dem von Brigitta Elsässer berechneten CD-Spektrum konnte die absolute Konfiguration bestimmt werden. Die Substanz bewies im Agardiffusionstest

Aktivität gegen *Bacillus megaterium* und *Microbotryum violaceum*. Weiterhin konnten die literaturunbekannten Naturstoffe Ascoketon (**29**, Abbildung 38) und Ascolacton (**32**, Abbildung 47) isoliert werden. Bei letzterem konnte die relative Konfiguration anhand der Kopplungskonstanten aufgeklärt werden. Die absolute Konfiguration ergab sich nach Vergleich der Literaturdaten^[71] mit einem strukturverwandten Naturstoff. Die Substanz war im Agardiffusionstest aktiv gegen *Bacillus megaterium* und *Microbotryum violaceum*. Von den literaturbekannten Naturstoffen ent- α -Cyperon^[67] (**30**, Abbildung 40) und (3*R*,4*R*)-4-Hydroxymellein^[69] (**31**, Abbildung 42) war letzteres im Agardiffusionstest aktiv gegen *Microbotryum violaceum*, *Bacillus megaterium* und *Chlorella fusca*.

Der Pilz 6577, *Pseudoanguillospora* sp., lieferte drei Naturstoffe, von denen zwei literaturunbekannt waren. Bei der ersten literaturunbekannten Substanz handelt es sich um Pseudoanguillosporin A (**34**, Abbildung 58), dessen absolute Konfiguration mit Hilfe des CD-Spektrums aufgeklärt werden konnte. Die Substanz zeigte in-vitro Aktivität gegen *Pyricularia oryzae* und *Septoria tritici*. Pseudoanguillosporin B (**35**, Abbildung 59) zeigt das gleiche Grundgerüst wie Pseudoanguillosporin A, ist jedoch in der Seitenkette sauerstoffs substituiert. Der dritte isolierte Naturstoff ist das literaturbekannte Cephalochromin^[72] (**33**, Abbildung 50), bei dem die Konformation der chiralen Achse durch Berechnen des CD-Spektrums bestimmt werden konnte. Die Rechnung ergab einen Diederwinkel von 88.34° und die *aR*-Konformation.

Aus dem Pilz 7067, *Coniothyrium* sp., konnten sechs Naturstoffe isoliert werden, von denen vier literaturunbekannt waren. Bei den literaturbekannten Naturstoffen handelt es sich um Graphislacton A^[78] (**36**, Abbildung 64) und Massarilacton A^[79] (**37**, Abbildung 67), das im Agardiffusionstest Aktivität gegen *Septoria tritici* zeigte. Der erste, literaturunbekannte Naturstoff war das Massarilacton C (**39**, Abbildung 71), das formal durch Umesterung des Lactons aus dem Massarilacton A zum Methylester und anschließende Tautomerisierung der sauerstoffs substituierten, endständigen Doppelbindung zum Methylketon entsteht. Der zweite, literaturunbekannte Naturstoff war das Massarilacton D (**40**, Abbildung 74), das sich von dem bekannten Massarilacton B^[79] (**41**, Abbildung 75) durch eine zusätzliche Sauerstoffs substitution am Kohlenstoffatom 3 unterscheidet. Bei beiden Molekülen wurde die absolute Konfiguration nach Vergleich der spezifischen Drehwerte von den literaturbekannten Naturstoffen abgeleitet. Der dritte, unbekannte Naturstoff war das Coniothyrenol (**42**, Abbildung 79), das mit den anderen isolierten Substanzen keine strukturellen Ähnlichkeiten

aufweist. Die relative Konfiguration des Moleküls wurde anhand eines NOESY-Spektrums und eines DPGSE-NOE-Spektrums bestimmt. Der letzte, literaturunbekannte Naturstoff war das Massarigenin E (**43**, Abbildung 83), das auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit zu dem Massarigenin A^[82] (**44**, Abbildung 84) entweder eine Vorstufe in der Biosynthese der Massarigene und der Massarilactone darstellt oder ein Abbauprodukt derselben ist.

Der nicht identifizierte Pilz 6754 lieferte den Naturstoff 1,6-Di-*O*-acetyl-D-mannitol (**45**, Abbildung 86), dessen relative Konfiguration durch eine Röntgenstruktur bestimmt werden konnte. Die absolute Konfiguration ergab sich durch einen Vergleich der spezifischen Drehwinkel verschiedener Mannitol-Derivate. Die Substanz ist als Syntheseprodukt^[85] bekannt, wurde aber noch nie als Naturstoff isoliert.

Aus dem Pilz 6579, *Ulocladium* sp., konnte der Naturstoff 65793a (**46**, Abbildung 91) isoliert werden, der in einem Tautomeriegleichgewicht vorliegt. Die Substanz weist fungizide und insektizide Wirkung auf und wurde deshalb 1996 in den USA patentiert.^[86]

Der Pilz 6586, *Acremonium* sp., lieferte drei literaturbekannte Naturstoffe, von denen zwei die strukturelle Gemeinsamkeit eines 1,2,4-trisubstituierten Benzolringes aufweisen. Bei den beiden Naturstoffen handelt es sich um 2,2-Dimethylchromen-6-ol^[88] (**48**, Abbildung 95) und Toluquinol^[89] (**49**, Abbildung 96). Bei der dritten Substanz handelt es sich um Helvolinsäure (**50**, Abbildung 99), die bereits 1943 von Waksman et al.^[90] isoliert wurde.

Aus dem Pilz 7165, *Nigrospora* sp., konnten fünf Naturstoffe isoliert werden, von denen einer literaturunbekannt war. Bei den vier literaturbekannten Substanzen handelt es sich um 8-Methoxynaphthalen-1-ol^[92] (**51**, Abbildung 100), 1,8-Dimethoxynaphthalen^[92] (**52**, Abbildung 102), 5-Hydroxy-2-methylchroman-4-on^[94] (**53**, Abbildung 105) und 2,6-Dihydroxy-butyrophenon^[94] (**54**, Abbildung 106). Im Rahmen einer Studie zur Biosynthese wurden alle vier Substanzen aus verschiedenen Mutanten von *Daldinia concentrica* isoliert. Die Autoren konnten zeigen, daß das 2,6-Dihydroxybutyrophenon aus einem Polyketid aus fünf Acetat-Einheiten aufgebaut wird und die Vorstufe zu dem 5-Hydroxy-2-methylchroman-4-on darstellt.^[94] Bei der fünften Substanz handelt es sich um das literaturunbekannte Helicascolid C (**55**, Abbildung 109), das seinen Namen von den literaturbekannten Helicascoliden A und B^[96] erhielt, von denen es sich durch die formale Oxidation einer Hydroxygruppe zu einer Carbonylgruppe unterscheidet.

Im synthetischen Teil wurden Versuche zur Synthese des Pseudoanguillosporins A (**34**) unternommen. Der Naturstoff **34** zeigte in-vitro eine gute Aktivität gegen *Pyricularia oryzae* und *Septoria tritici*, weshalb es erstrebenswert schien, eine größere Menge der Substanz für weitere Aktivitätstest und Derivatisierung zur Verfügung zu stellen. Es gelang, das ungewöhnliche Substitutionsmuster des aromatischen Rings mit zwei *meta*-positionierten Hydroxygruppen in 6,8-Position und einer Methylgruppe in 5-Position durch eine Diels-Alder-Reaktion zwischen dem Dienophil Penta-2,3-diendicarbonsäuredimethylester (**61**, Abbildung 113) und dem Dien (1,3-Dimethoxypenta-1,3-dienyloxy)-trimethylsilan (**58**, Abbildung 112) aufzubauen. Die Vollendung der Synthese scheiterte bislang jedoch an der Überreaktion des Homophthalsäuremonoesterderivats **64** zu dem defunktionalisierten Phenylelessigsäureesterderivat **70** (Abbildung 115). Um die Reduktion der Benzoessäure zu umgehen, wurde das Anhydrid **71** dargestellt und in einer Testreaktion mit Butyllithium umgesetzt. Die erhoffte Addition des Butyllithiums an die Carbonylgruppe konnte jedoch nicht beobachtet werden. Auch der Versuch ein Cerorganyl an die Carbonylgruppe zu addieren führte nicht zum Erfolg. Zuletzt wurde versucht, die in der Literatur beschriebene Reaktion zwischen 2-(Carboxymethyl)-4,6-dimethoxybenzoessäure und Dodecanoylchlorid zu dem 6,8-Dimethoxy-3-undecyl-1*H*-isochromen-1-on^[105] mit der Dicarbonsäure **63** und Octanoylchlorid nachzuvollziehen (Abbildung 117). Bei dieser Reaktion konnte jedoch nur die Bildung kleiner Mengen des Anhydrids **71** beobachtet werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Analytische und präparative Chromatographie

Analytische Dünnschichtchromatographie (DC):

Die analytische Dünnschichtchromatographie wurde mit Kieselgel-Fertigfolien (Kieselgel 60, F₂₅₄) der Fa. E. Merck AG, Darmstadt durchgeführt. Die Detektion der Substanzen erfolgte mit UV-Licht bei 254 und 366 nm und durch Verwendung folgender Sprühreagenzien:

Anisaldehyd/Schwefelsäure (Universalreagenz):

Zu 100 ml einer Stammlösung aus 85 ml Ethanol, 14 ml Eisessig und 1 ml Schwefelsäure fügt man 1 ml Anisaldehyd hinzu. Das Reagenz ist ca. 7 Tage haltbar. Nach dem Besprühen der DC-Folie wird diese erhitzt.

2,4-Dinitrophenylhydrazin für Aldehyde und Ketone:

Zu einer Lösung von 1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 1 L Ethanol werden 5 ml konz. Schwefelsäure hinzugefügt. Beim Erwärmen des Dünnschichtchromatogramms bilden Aldehyde und Ketone gelbe bis orangerote Flecken.

Säulenchromatographie an Kieselgel:

Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 (230-400 mesh, 0.040-0.063 mm) der Fa. Merck AG, Darmstadt.

Säulenchromatographie an Sephadex LH 20:

Als stationäre Phase diente Sephadex LH 20 der Firma Pharmacia LKB, Uppsala (Schweden). Die Säule wurde auf das Laufmittel Dichlormethan/Methanol im Verhältnis 3:2 eingestellt.

Präparative Schichtchromatographie (PSC):

Für die präparative Schichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 bzw. RP-18 beschichtete Fertigplatten der Fa. Macherey und Nagel verwendet. Die Schichtdicken variierten zwischen 0.5 und 2 mm und wurden nach Substanzmenge ausgewählt.

5.2 Instrumentelle Analytik

Schmelzpunktbestimmung:

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren mit einer Schmelzpunktbestimmungsgaratur der Fa. Büchi gemessen und sind nicht korrigiert.

Massenspektrometrie:

Die Aufnahme der Massenspektren und die Bestimmung der Feinmassen erfolgte durch Frau Mariola Zukowski und Herrn Dr. Heinz Weber an einem Finnigan MAT 8200. Die relativen Intensitäten, bezogen auf den Basispeak, sind hinter den Massen in Klammern angegeben.

Röntgenstrukturanalyse:

Die Röntgenstrukturanalyse wurde von Herrn Dr. Ulrich Flörke durchgeführt.

UV/VIS-Spektroskopie:

Die UV/VIS-Spektren wurden mit dem Spektrometer UV-2101 PC der Firma Shimadzu gemessen. Das verwendete Lösungsmittel ist in Klammern angegeben.

Infrarotspektroskopie:

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgt mit dem FT/IR-Spektrometer 510 p der Firma Nicolet. Die verwendete Probenmatrix wird in Klammern angegeben.

Optische Rotation:

Die Drehwerte wurden mit dem Polarimeter 241 MC der Firma Perkin-Elmer in einer nicht thermostatisierten Standardküvette ($d = 10\text{ cm}$) unter Verwendung einer Natriumlampe (D-Linie, $\lambda = 589\text{ nm}$) bestimmt. Das verwendete Lösungsmittel und die Konzentration sind in Klammern angegeben.

CD-Spektroskopie:

Die CD-Spektren wurden von Herrn Dr. Tibor Kurtán in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. Sándor Antus, Debrecen, Ungarn gemessen.

NMR-Spektroskopie:

Die Kernresonanzspektren wurden an einem Bruker ARX 200- bzw. AVANCE 500-Spektrometer aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ wurden auf das jeweils verwandte deuterierte Lösungsmittel als inneren Standard bezogen und sind in ppm angegeben. Die Abkürzungen der Multiplizitäten lauten:

- (s) Singulett
- (br. s) breites Singulett
- (d) Dublett
- (br. d) breites Dublett

(dd)	Doppeldublett
(ddd)	Dublett von einem Doppeldublett
(dt)	Dublett von einem Triplet
(dq)	Dublett von einem Quartett
(t)	Triplet
(tq)	Triplet von einem Quartett
(ps. t)	Pseudotriplet
(q)	Quartett
(m)	Multiplett
(C _q)	quartäres Kohlenstoffatom
(CH)	tertiäres Kohlenstoffatom
(CH ₂)	sekundäres Kohlenstoffatom
(CH ₃)	primäres Kohlenstoffatom

Die Aufnahme der NMR-Spektren am AVANCE 500-Spektrometer erfolgte durch Herrn PD Dr. Hans Egold, Frau Karin Stolte und Herrn Dietmar Gehle.

5.3 Mikrobiologische Arbeiten

Nährmedien:

Biomalz-Festagar:

50 g Biomalz werden in einem Liter Leitungswasser gelöst. Anschließend wird der pH-Wert auf 5.6 eingestellt und 15 g Agar hinzugefügt.

Biomalz-Flüssigmedium:

In 1000 ml Wasser werden 50 g Malzextrakt (Biomalt der Firma Villa Natura Gesundprodukte, Kirn) gelöst und 5 g Natriumchlorid versetzt.

Dinkel-Gerste:

200 g Perlgrauen, 200 g Dinkelflocken (Vollkorn) und 2 g Sojapepton werden gemischt und mit 1 mL MnCl₂-Lösung (20 g/L) und 250 mL dest. Wasser versetzt.

Isolierung und Bestimmung:

Die Isolierung der Pilze wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Aust und Frau PD Dr. Schulz durchgeführt und ihre Bestimmung erfolgte durch Herrn Dr. S. Dräger im Institut für Mikrobiologie der TU Braunschweig.

Anzucht:

Die Anzucht der Stämme auf Biomalz-Festagar und Dinkel-Gerste-Feststoffmedium erfolgte ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Aust und Frau PD Dr. Schulz an der TU Braunschweig.

Für die Anzucht der Stämme in Biomalz-Schüttelkulturen wurden neun Schikanekolben mit je 500 mL Nährmedium befüllt und im Autoklaven sterilisiert. Nach dem Abkühlen wurden die Pilze überimpft und für 14 Tage bei Raumtemperatur und 180 rpm auf einem Rundschüttler inkubiert.

Pilzauswahl:

Die Auswahl der zu bearbeitenden Pilze erfolgte anhand von Dünnschichtchromatogrammen kleiner Extraktproben, die mittels UV-Detektion und den zuvor erwähnten Sprühreagenzien ausgewertet wurden. Dazu wurden die Extraktproben in Dichlormethan/Methanol (99:1) gelöst und auf eine DC-Karte aufgetragen. Das DC wurde dann mit Dichlormethan/Methanol (9:1) entwickelt und unter UV-Licht (254 und 366 nm) begutachtet. Die UV-aktiven Substanzen wurden markiert und das DC anschließend mit Anisaldehyd/Schwefelsäure angesprüht. Dabei wurden jene Stämme als besonders interessant eingestuft, die sich deutlich von den anderen unterschieden und/oder besondere Anfärbungen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure und 2,4-Dinitrophenylhydrazin zeigten. Als besondere Anfärbungen gelten die orange Anfärbung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, was für Aldehyde selektiv ist, sowie eine rote, orange, gelbe oder grün-gelbe Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure. Eine grau-blaue bis blaue Anfärbung spricht für das Vorhandensein von Steroiden und eine violett bis tiefblaue Anfärbung zeigt Fette und Fettsäuren an, insbesondere wenn diese Substanzen nicht UV-aktiv sind. Auf Grund dieser Auswertung wurden Extrakte, die hauptsächlich blau-graue und violette Anfärbungen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure zeigten, von einer zukünftigen Bearbeitung ausgeschlossen.

6 PHYSIKALISCHE DATEN DER NATURSTOFFE

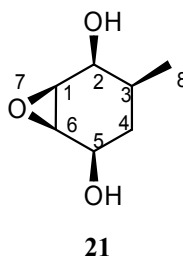
6.1 Naturstoffe aus Stamm 5948

6.1.1 Anzucht, Extraktion und Isolierung

Bei dem Stamm 5948 handelt es sich um *Coniothyrium* sp., der aus *Fucus* sp. aus der Nordsee vor Helgoland isoliert wurde. Der Stamm wurde für 14 Tage bei Raumtemperatur in einer 1 L-Biomalz-Flüssigkultur auf einem Rundschüttler bei 180 rpm fermentiert. Anschließend wurde die Kultur über Celite filtriert, Filtrat und Biomasse wurden je dreimal mit Ethylacetat extrahiert und am Rotationsverdampfer eingengt. Es resultierten 1.3 g Rohextrakt.

Der Rohextrakt wurde durch Mitteldruckchromatographie an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (100:0 bis 90:10) in 6 Fraktionen aufgetrennt. Aus Fraktion 4 konnten durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (99:1) als Laufmittel die Naturstoffe 59484e (**21**, 5.5 mg) und 59484e2 (**22**, 6.0 mg) isoliert werden. Fraktion 5 lieferte nach Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (96:4) als Laufmittel den Naturstoff 59485a (**23**, 40 mg).

6.1.2 Coniol (Naturstoff 59484e)



Summenformel: C₇H₁₂O₃.–

Molmasse: 144.17 g/mol.–

R_f-Wert: 0.40 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -30.5^\circ$ (c = 0.28, CH₂Cl₂).–

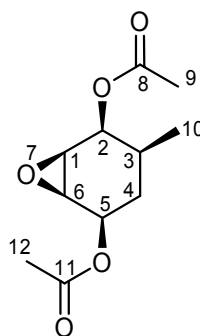
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 0.95 (d, $J_{8,3} = 7.0$ Hz, 3 H, 8-H), 1.31 (dt, $J_{\text{gem}} = 14.4$ Hz, $J_{4a,3} = J_{4a,5} = 2.8$ Hz, 1 H, 4-H^a), 1.61 (ddd, $J_{\text{gem}} = 14.4$ Hz, $J_{4,3} = 11.0$ Hz, $J_{4,5} = 5.3$ Hz, 1 H,

4-H^b), 1.93 (m, 1 H, 3-H), 2.40 (br. s, 2 H, OH), 3.39 (m, 1 H, 1-H), 3.44 (m, 1 H, 6-H), 4.08 (br. s, 1 H, 2-H), 4.16 (br. s, 1 H, 5-H).–

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 16.3 (CH₃, C-8), 26.4 (CH, C-3), 32.4 (CH₂, C-4), 54.7 (CH, C-6), 58.0 (CH, C-1), 64.1 (CH, C-5), 68.6 (CH, C-2).–

ESIMS (200 °C): m/z = 145.0 [$M^+ + H^+$] (4.4), 127.1 [$M^+ - H_2O$] (4.3), 109.1 [$M^+ - 2H_2O$] (1.3).–

6.1.2.1 5-(Acetyloxy)-3-methyl-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-2-ylacetat



21a

Darstellung:

Zu einer Lösung von Naturstoff 59484e (6 mg, 0.042 mmol) in Pyridin (0.1 mL) wird Acetylchlorid (0.1 mL, 1.4 mmol) getropft und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionsmischung mit Eis versetzt und weitere 10 min gerührt. Anschließend wird die Mischung mit Diethylether (2 × 5 mL) extrahiert und die organische Phase mit 1 mol/L HCl-Lösung (10 mL) und Wasser (10 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt durch präparative Schichtchromatographie gereinigt. Es resultiert 5-(Acetyloxy)-3-methyl-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-2-ylacetat (7.2 mg, 0.032 mmol, 76.2 %) in Form eines farblosen Öls.

Summenformel: C₁₁H₁₆O₅.–

Molmasse: 228.24 g/mol.–

R_f-Wert: 0.85 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 0.91 (d, $J_{10,3}$ = 7.0 Hz, 3 H, 10-H), 1.45 (dt, J_{gem} = 14.6 Hz, $J_{4a,3}$ = $J_{4a,5}$ = 3.7 Hz, 1 H, 4-H^a), 1.69 (m, 2 H, 3-H, 4-H^b), 2.15 (br. s, 6 H, 9-H, 12-H), 3.29

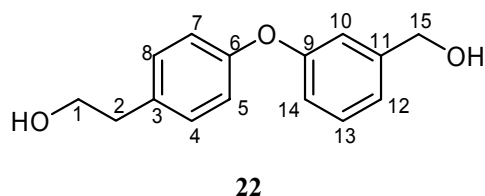
(dd, $J_{1,6} = 3.7$ Hz, $J_{1,2} = 1.9$ Hz, 1 H, 1-H), 3.48 (t, $J_{6,1} = J_{6,5} = 3.7$, 1 H, 6-H), 5.26 (m, 2 H, 2-H, 5-H).–

^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3): $\delta = 15.9$ (CH_3 , C-10), 21.3 (CH_3 , C-9)*, 21.5 (CH_3 , C-12)*, 26.1 (CH, C-3), 29.6 (CH_2 , C-4), 51.8 (CH, C-6), 54.0 (CH, C-1), 67.3 (CH, C-5), 70.5 (CH, C-2), 170.8 (C_q , C-8)**, 171.2 (C_q , C-8)**.–

Die Zuordnung der mit * und ** gekennzeichneten Signale ist vertauschbar.

ESIMS (200 °C): $m/z = 229$ [$\text{M}+\text{H}^+$] (1.4), 169 [$\text{M}+\text{H}^+-\text{COCH}_3$] (0.4), 109 [$\text{M}+\text{H}^+-2 \times \text{COCH}_3$] (2.6).–

6.1.3 Coniothyren (Naturstoff 59484e2)



Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$.–

Molmasse: 244.29 g/mol.–

R_f -Wert: 0.46 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1).–

UV (MeOH): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 276.5 (6.52).–

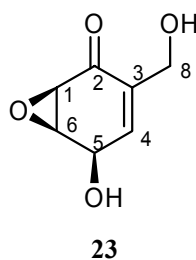
^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 2.61$ (t, $J_{2,1} = 7.2$ Hz, 2 H, 2-H), 3.58 (t, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, 2 H, 1-H), 4.42 (s, 2 H, 15-H), 6.58 (m, 1 H, 14-H), 6.60 (d, $J_{5,4} = 8.5$ Hz, 2 H, 5-H, 7-H), 6.70 (m, 2 H, 10-H, 12-H), 6.92 (d, $J_{4,5} = 8.5$ Hz, 2 H, 4-H, 8-H), 7.03 (t, $J_{13,12} = J_{13,14} = 8.0$ Hz, 1 H, 13-H).–

^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): $\delta = 38.0$ (CH_2 , C-2), 63.2 (CH_2 , C-1), 63.7 (CH_2 , C-15), 113.3 (CH, C-10)*, 113.7 (CH, C-14), 114.7 (CH, 2 C, C-5, C-7), 117.7 (CH, C-12)*, 128.9 (CH, C-13), 129.5 (CH, 2 C, C-4, C-8), 129.6 (C_q , C-3), 142.9 (C_q , C-11), 155.4 (C_q , C-6), 157.2 (C_q , C-9).–

* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

CIMS (*iso*-Butan, 150 °C): m/z (%) = 245 [$\text{M}+\text{H}^+$] (3.3), 227 [$\text{M}+\text{H}^+-\text{H}_2\text{O}$] (7.9), 163 (22.0), 121 (67.4).–

6.1.4 (+)-Epoxydon (Naturstoff 59485a)



Summenformel: C₇H₈O₄.–

Molmasse: 156.14 g/mol.–

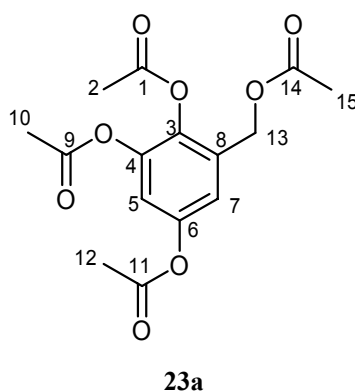
R_f-Wert: 0.41 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +109.1^\circ$ (c = 0.31, MeOH) Lit.: $[\alpha]_D^{20} = +93^\circ$ (c = 0.29, MeOH).–

¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD): δ = 3.44 (d, *J*_{1,6} = 4.0 Hz, 1 H, 1-H), 3.83 (m, 1 H, 6-H), 4.21 (m, 2 H, 8-H), 4.76 (t, *J*_{5,4} = *J*_{5,6} = 2.3, 1 H, 5-H), 6.52 (m, 1 H, 4-H).–

¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OD): δ = 53.5 (CH, C-1), 54.3 (CH, C-6), 58.5 (CH₂, C-8), 64.9 (CH, C-5), 134.7 (C_q, C-3), 141.1 (CH, C-4), 194.3 (C_q, C-2).–

6.1.4.1 Essigsäure-2,4-(diacetyloxy)-6-(acetyloxymethyl)-phenylester



Darstellung:

Zu einer Lösung von Epoxydon (12 mg, 0.077 mmol) in Pyridin (0.1 mL) wird Acetylchlorid (0.1 mL, 1.4 mmol) getropft und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionsmischung mit Eis versetzt und weitere 10 min gerührt. Anschließend wird die Mischung mit Diethylether (2 × 5 mL) extrahiert und die organische Phase mit 1 mol/L HCl-Lösung (10 mL) und Wasser (10 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das

Rohprodukt durch präparative Schichtchromatographie gereinigt. Es resultiert Essigsäure-2,4-(diacetyloxy)-6-(acetyloxymethyl)-phenylester (19.4 mg, 0.060 mmol, 78 %) in Form eines schwach gelben Öls.

Summenformel: $C_{15}H_{16}O_8$.–

Molmasse: 324.28 g/mol.–

R_f -Wert: 0.85 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1).–

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.10 (s, 3 H, 15-H), 2.30 (s, 3 H, 2-H)*, 2.32 (s, 3 H, 10-H)*, 2.34 (s, 3 H, 12-H)*, 5.08 (s, 2 H, 13-H), 7.09 (d, $J_{5,7}$ = 2.7 Hz, 1 H, 5-H), 7.14 (d, $J_{7,5}$ = 2.7 Hz, 1 H, 7-H).–

* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

^{13}C -NMR (50 MHz, $CDCl_3$): δ = 20.7 (CH_3 , C-15), 21.1 (CH_3 , C-2)*, 21.2 (CH_3 , C-10)*, 21.5 (CH_3 , C-12)*, 61.1 (CH_2 , C-13), 117.6 (CH, C-5), 120.5 (CH, C-7), 131.0 (C_q , C-8), 138.5 (C_q , C-3), 143.2 (C_q , C-4), 148.3 (C_q , C-6), 168.1 (C_q , C-1)**, 168.3 (C_q , C-9)**, 169.2 (C_q , C-11)**, 170.9 (C_q , C-14).–

Die Zuordnung der mit * und ** gekennzeichneten Signale ist vertauschbar.

6.2 Naturstoffe aus Stamm 6282

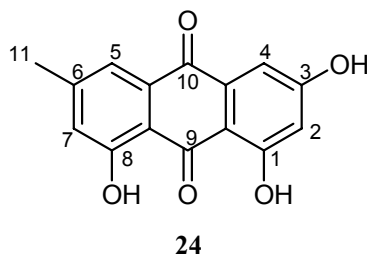
6.2.1 Anzucht, Extraktion und Isolierung

Bei dem Stamm 6282 handelt es sich um *Phoma* sp., der aus *Fucus serratus* vor Helgoland isoliert wurde. Der Pilz wurde 28 Tage bei Raumtemperatur in einer 5 L-Kultur auf Biomalz-Festagar mit 3.3 % Meersalz kultiviert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mit Ethylacetat übergossen und mit einem Pürierstab zerkleinert. Anschließend wurde viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatphasen ergaben nach dem Einengen am Rotationsverdampfer 2.2 g Rohextrakt.

Der so gewonnene Rohextrakt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Gradienten von reinem Dichlormethan bis Dichlormethan/Methanol (9:1) in 6 Fraktionen aufgetrennt. Aus Fraktion 2 konnte durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan und einer weiteren Reinigung durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 der Naturstoff 62822b4a (**24**, 1.3 mg) gewonnen werden. Fraktion 3 lieferte nach Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 den Naturstoff 62823b (**25**, 2.6 mg). Fraktion 4

enthält neben Epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22^E-dien-3 β -ol die Naturstoffe 62824a1b (**26**, 1.7 mg) und 62824a2 (**27**, 40 mg), die durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 und Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (95:5) isoliert wurden.

6.2.2 Emodin (Naturstoff 62822b4a)



Summenformel: C₁₅H₁₀O₅.–

Molmasse: 270.24 g/mol.–

Schmelzpunkt: Smp. = 250–254 °C (Lit.: 260–263 °C).–

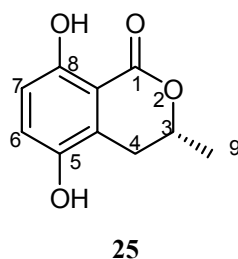
R_f-Wert: 0.65 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

¹H-NMR (200 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 2.50 (s, 3 H, 11-H), 6.70 (d, $J_{7,5}$ = 2.4 Hz, 7-H), 7.18 (s, 1 H, 2-H), 7.29 (d, $J_{5,7}$ = 2.4 Hz, 5-H), 7.60 (s, 1 H, 4-H), 10.19 (br. s, 1 H, 3-OH), 12.10 (s, 1 H, OH), 12.22 (s, 1 H, OH).–

¹³C-NMR (50 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 21.5 (CH₃, C-11), 108.4 (CH, C-2), 109.1 (CH, C-4), 110.0 (C_q, C-9a), 114.0 (C_q, C-8a), 121.0 (CH, C-5), 124.5 (CH, C-7), 133.8 (C_q, C-4a), 136.2 (C_q, C-10a), 149.1 (C_q, C-6), 162.8 (C_q, C-8), 165.7 (C_q, C-1)*, 165.8 (C_q, C-3)*, 181.7 (C_q, C-10), 191.3 (C_q, C-9).–

* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

6.2.3 (3R)-5-Hydroxymellein (Naturstoff 62823b)



Summenformel: C₇H₁₀O₂.–

Molmasse: 126.15 g/mol.–

Schmelzpunkt: Smp. = 228–231 °C (Lit.: 234–237 °C).–

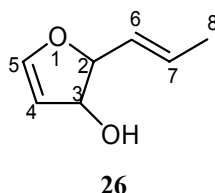
R_f-Wert: 0.67 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -81.5^\circ$ (c = 0.26, MeOH) Lit.: $[\alpha]_D^{20} = -72^\circ$.–

¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD): δ = 1.54 (d, $J_{9,3} = 6.3$ Hz, 3 H, 9-H), 2.65 (dd, $J_{\text{gem}} = 16.9$ Hz, $J_{4a,3} = 11.3$ Hz, 1 H, 4-H^a), 3.22 (dd, $J_{\text{gem}} = 16.9$ Hz, $J_{4b,3} = 3.5$ Hz, 1 H, 4-H^b), 4.73 (m, 1 H, 3-H), 6.74 (d, $J_{7,6} = 9.1$ Hz, 1 H, 7-H), 7.06 (d, $J_{6,7} = 9.1$ Hz, 1 H, 6-H).–

¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OD): δ = 20.1 (CH₃, C-9), 28.4 (CH₂, C-4), 76.7 (CH, C-3), 108.2 (C_q, C-8a), 115.5 (CH, C-7), 124.0 (CH, C-6), 124.8 (C_q, C-4a), 146.0 (C_q, C-5), 155.4 (C_q, C-8), 170.8 (CO, C-1).–

6.2.4 Phomafuranol (Naturstoff 62824a1b)



Summenformel: C₇H₁₀O₂.–

Molmasse: 126.15 g/mol.–

Schmelzpunkt: Smp. = 105–107 °C.–

R_f-Wert: 0.56 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -12.9^\circ$ (c = 0.17, CH₂Cl₂).–

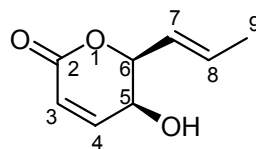
UV (CH₂Cl₂): λ_{max} (log ε) = 272 (5.02).–

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 1.78 (d, $J_{8,7} = 6.6$ Hz, 3 H, 8-H), 4.22 (m, 1 H, 2-H), 5.03 (br. d, $J_{3,2} = 5.9$ Hz, 1 H, 3-H), 5.54 (ddd, $J_{6,7} = 15.3$ Hz, $J_{6,2} = 7.3$ Hz, $J_{6,3} = 1.4$ Hz, 1 H, 6-H), 5.91 (dq, $J_{7,6} = 15.3$ Hz, $J_{7,8} = 6.6$ Hz, 1 H, 7-H), 6.22 (m, 1 H, 4-H), 7.46 (d, $J_{5,4} = 5.8$ Hz, 1 H, 5-H).–

^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3): δ = 18.3 (CH_3 , C-8), 73.9 (CH , C-2), 86.3 (CH , C-3), 123.3 (CH , C-4), 127.7 (CH , C-6), 132.2 (CH , C-7), 153.8 (CH , C-5).–

CIMS (*iso*-Butan, 150 °C): m/z (%) = 127 [$\text{M}+\text{H}^+$] (2.2).–

6.2.5 (+)-Phomalacton (Naturstoff 62824a2)



27

Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_3$.–

Molmasse: 154.06 g/mol.–

R_f -Wert: 0.58 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +64.0^\circ$ ($c = 0.07$, CHCl_3) Lit.: $[\alpha]_D^{20} = +174.0^\circ$ ($c = 0.1$, CHCl_3).–

^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 1.79 (d, $J_{9,8} = 6.1$ Hz, 3 H, 9-H), 3.52 (br. s, 1 H, OH), 4.17 (br. s, 1 H, 5-H), 4.78 (br. d, $J_{6,7} = 7.0$ Hz, 1 H, 6-H), 5.75 (m, 1 H, 7-H), 5.92 (m, 1 H, 8-H), 6.05 (dd, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, $J_{3,5} = 1.3$ Hz, 1 H, 3-H), 6.98 (ddd, $J_{4,3} = 9.7$ Hz, $J_{4,5} = 5.3$ Hz, $J_{4,6} = 1.6$ Hz, 1 H, 4-H).–

^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3): δ = 18.4 (CH_3 , C-9), 63.4 (CH , C-5), 82.1 (CH , C-6), 122.6 (CH , C-3), 124.6 (CH , C-7), 133.1 (CH , C-8), 145.8 (CH , C-4), 164.6 (C_q , C-2).–

6.3 Naturstoffe aus Stamm 6651

6.3.1 Anzucht, Extraktion und Isolierung

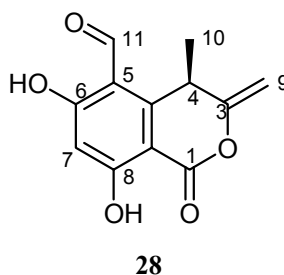
Bei dem Pilz 6651 handelt es sich um einen *Ascochyta* sp., der aus *Melilotus dentatus* in der Nähe von Ahrenshoop an der Ostsee isoliert wurde. Der Stamm wirkte im Agardiffusionstest fungizid und wurde für 28 Tage bei Raumtemperatur in einer 12 L-Kultur auf Biomalz-Festagar angezüchtet.

Die Kulturen wurden nach Ablauf der 28 Tage für 3 Tage eingefroren und nach dem Auftauen von der wässrigen Phase durch Filtration getrennt. Die wässrige Phase und die Biomasse

wurden getrennt jeweils sechsmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatphasen ergaben nach Einengen am Rotationsverdampfer 29 g Rohextrakt.

Der gewonnene Rohextrakt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Gradienten aus Dichlormethan/Methanol (0–10 % in 1 %-Schritten von je 500 mL) in 7 Fraktionen aufgetrennt. Aus Fraktion 1 konnte durch Kristallisation aus Dichlormethan der Naturstoff 66511b (**28**, 1.6 g) gewonnen werden. Fraktionen 2 und 3 wurden nachträglich wieder vereint und enthielten zwei zweifach ungesättigte Fettsäuren sowie die Naturstoffe 66512a (**29**, 89 mg) und 66512b (**30**, 9.0 mg), die durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 und präparativer Schichtchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan isoliert werden konnten. Aus Fraktion 4 konnte durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 der Naturstoff 66514a (**31**, 527 mg) gewonnen werden. Fraktion 5 lieferte den Naturstoff 66515a (**32**, 413 mg) nach Kristallisation aus Diethylether.

6.3.2 Ascochin (Naturstoff 66511b)



Summenformel: C₁₂H₁₀O₅.–

Molmasse: 234.05 g/mol.–

Schmelzpunkt: Smp. = 186–187 °C.–

R_f-Wert: 0.69 (CH₂Cl₂).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +287.9^\circ$ (c = 0.28, CH₂Cl₂).–

CD (CH₃CN): λ ($\Delta\epsilon$) = 223 (–14.9), 236 (0.0), 254 (52.7), 286 (0.0), 316 (–6.3).–

UV (CH₂Cl₂): λ_{\max} (log ϵ) = 358 (6.09), 317 (6.85), 272 (7.36).–

IR (KBr): ν (cm^{–1}) = 3126, 2981, 2931, 1703, 1664, 1626, 1597, 1452, 1419, 1365, 1338, 1288, 1271, 1227, 1107, 1063, 1024, 876, 864, 802, 783, 762, 586, 534.–

Kristallsystem: Monoklin.–

Raumgruppe: $P 2_1$.–

Dimensionen der Zelle: $a = 6.4068(4)$
 $b = 25.767(1)$ $\beta = 91.563(1)$
 $c = 12.8166(8)$

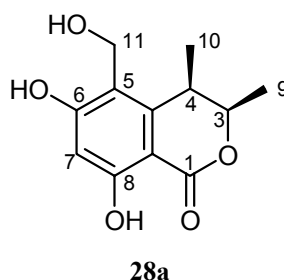
$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.63$ (d, $J_{10,4} = 7.2$ Hz, 3 H, 10-H), 4.36 (q, $J_{4,10} = 7.2$ Hz, 1 H, 4-H), 4.75 (d, $J_{\text{gem}} = 2.3$ Hz, 1 H, 9-H^a), 4.96 (d, $J_{\text{gem}} = 2.3$ Hz, 1 H, 9-H^b), 6.44 (s, 1 H, 7-H), 10.15 (s, 1 H, 11-H), 11.65 (s, 1 H, 6-OH), 12.55 (s, 1 H, 8-OH).–

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): $\delta = 25.4$ (CH_3 , C-10), 33.2 (CH, C-4), 98.3 (CH_2 , C-9), 100.7 (C_q , C-8a), 103.9 (CH, C-7), 109.9 (C_q , C-5), 152.1 (C_q , C-4a), 155.0 (C_q , C-3), 165.9 (C_q , C-1), 168.8 (C_q , C-8), 170.3 (C_q , C-6), 191.6 (CH, C-11).–

EIMS (70 eV, 175 °C): m/z (%) = 234 [M^+] (100), 217 (13.8), 191 (9.1), 174 (31.9), 164 (39.7), 69 (10.1).–

HREIMS: ber.: 234.05282
gef.: 234.05253

6.3.2.1 (3*R*,4*R*)-6,8-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-3,4-dimethyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-on (66511bH)



Darstellung:

Eine Lösung von Ascochin (**28**, 40 mg, 0.17 mmol) in trockenem THF (10 ml) wurde mit einer katalytischen Menge Palladium/Kohlenstoff (5 Mol-%) versetzt. Anschließend wurde unter Wasserstoff-Atmosphäre bei Raumtemperatur ca. 2 Stunden gerührt. Der Fortgang der Reaktion wurde mittels DC-Kontrolle verfolgt. Nach Abschluß der Reaktion wurde die Reaktionslösung über Celite filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch

präparative Schichtchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (95:5) gereinigt. Es resultierte (3*R*,4*R*)-6,8-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-3,4-dimethyl-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-on (**28a**, 32 mg, 0.13 mmol, 80 %) in Form eines weißen Feststoffes.

Summenformel: C₁₂H₁₄O₅.–

Molmasse: 238.24 g/mol.–

Schmelzpunkt: Zers. = 200 °C.–

R_f-Wert: 0.63 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

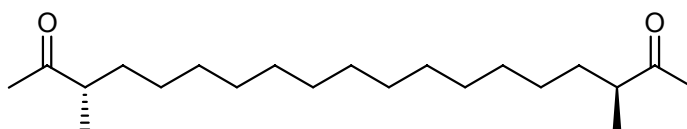
CD (CH₃CN): λ (Δε) = 218.5 (–6.9), 236.0 (6.0), 247.5 (1.8), 267.5 (8.7), 308.0 (–0.6).–

¹H-NMR (200 MHz, CD₃OH): δ = 1.19 (d, *J*_{10,4} = 7.1 Hz, 3 H, 10-H), 1.49 (d, *J*_{9,3} = 6.5 Hz, 3 H, 9-H), 3.26 (dq, *J*_{4,10} = 7.1 Hz, *J*_{4,3} = 2.5 Hz, 1 H, 4-H), 4.61 (d, *J*_{gem} = 11.8 Hz, 1 H, 11-H^a), 4.70 (m, 1 H, 3-H), 4.69 (d, *J*_{gem} = 11.8 Hz, 1 H, 11-H^b), 6.32 (s, 1 H, 7-H).–

¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OH): δ = 12.7 (CH₃, C-10), 16.9 (CH₃, C-9), 33.6 (CH, C-4), 54.3 (CH₂, C-11), 77.9 (CH, C-3), 99.3 (C_q, C-8a), 101.0 (CH, C-7), 116.2 (C_q, C-5), 148.8 (C_q, C-4a), 164.2 (C_q, C-8)*, 164.3 (C_q, C-6)*, 171.1 (C_q, C-1).–

* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

6.3.3 Ascoketon (Naturstoff 66512a)



Summenformel: C₂₁H₄₀O₂.–

Molmasse: 324.54 g/mol.–

R_f-Wert: 0.54 (CH₂Cl₂).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +19.8^\circ$ (c = 0.44, CH₂Cl₂).–

IR (Film): ν (cm^{–1}) = 3460, 2925, 2854, 1712, 1460, 1356.–

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 1.05 (d, $J_{20,3}$ = 6.9 Hz, 6 H, 20-H, 21-H), 1.23 (s, 22 H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H, 10-H, 11-H, 12-H, 13-H, 14-H, 15-H), 1.32 (m, 2 H, 4-H^a, 16-H^a), 1.62 (m, 2 H, 4-H^b, 16-H^b), 2.11 (s, 6 H, 1-H, 19-H), 2.47 (tq, $J_{3,20} = J_{3,4} = 6.9$, 2 H, 3-H, 17-H).–

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 16.1 (CH_3 , 2 C, C-20, C-21'), 27.2 (CH_2 , 2 C, C-5, C-15), 27.9 (CH_3 , 2 C, C-1, C-19), 29.4 (CH_2 , 2 C, C-7, C-13)*, 29.5 (CH_2 , 3 C, C-9, C-10, C-11)*, 29.5 (CH_2 , 2 C, C-8, C-12)*, 29.6 (CH_2 , 2 C, C-6, C-14)*, 32.9 (CH_2 , 2 C, C-4, C-16), 47.2 (CH , 2 C, C-3, C-17), 212.7 (C_q , 2 C, C-2, C-18).–

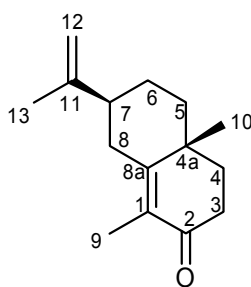
* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

EIMS (70 eV, 175 °C): m/z (%) = 324 [M^+] (7), 253 (21), 85 (14), 72 (100), 43 (56).–

HREIMS: ber.: 324.30283

gef.: 324.30268

6.3.4 (-)- α -Cyperon (Naturstoff 66512b)



30

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}$.–

Molmasse: 218.33 g/mol.–

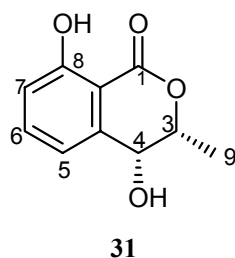
R_f -Wert: 0.49 (CH_2Cl_2).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -36.6^\circ$ (c = 0.9, CH_2Cl_2) Lit.: $[\alpha]_D^{20} = -92.2^\circ$ (c = 2.04).–

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 1.25 (s, 3 H, 9-H), 1.46 (m, 1 H, 5-H^a), 1.65 (m, 1 H, 6-H^a), 1.73 (m, 2 H, 6-H^b, 5-H^b), 1.78 (m, 2 H, 4-H), 1.80 (s, 3 H, 10-H), 1.81 (d, $J_{13,12} = 1.1$ Hz, 3 H, 13-H), 2.07 (m, 2 H, 8-H^a, 7-H), 2.42 (ddd, $J_{\text{gem}} = 16.9$ Hz, $J_{3a,4a} = 4.5$ Hz, $J_{3a,4b} = 3.5$ Hz, 1 H, 3-H^a), 2.54 (ddd, $J_{\text{gem}} = 16.9$ Hz, $J_{3b,4a} = 13.8$ Hz, $J_{3b,4b} = 5.8$ Hz, 1 H, 3-H^b), 2.76 (m, 1 H, 8-H^b), 4.80 (d, $J_{12,13} = 1.1$ Hz, 2 H, 12-H).–

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 10.9 (CH_3 , C-10), 20.7 (CH_3 , C-13), 22.5 (CH_3 , C-9), 26.9 (CH_2 , C-6), 32.9 (CH_2 , C-8), 33.8 (CH_2 , C-3), 35.8 (C_q , C-4a), 37.5 (CH_2 , C-4), 41.9 (CH_2 , C-5), 45.9 (CH , C-7), 109.2 (CH_2 , C-12), 128.8 (C_q , C-1), 149.2 (C_q , C-11), 162.1 (C_q , C-8a), 199.1 (C_q , C-2).–

6.3.5 (3*R*,4*R*)-4-Hydroxymellein (Naturstoff 66514a)



Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$.–

Molmasse: 194.18 g/mol.–

Schmelzpunkt: Smp. = 108–110 °C (Lit.: 112–117 °C).–

R_f -Wert: 0.36 (CH_2Cl_2).–

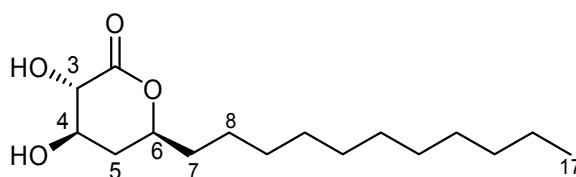
Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -39.2$ ($c = 0.25$, MeOH) Lit.: $[\alpha]_D^{20} = -31^\circ$ (MeOH).–

^1H -NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 1.58 (d, $J_{9,3} = 6.6$ Hz, 3 H, 9-H), 4.57 (d, $J_{4,3} = 2.1$ Hz, 1 H, 4-H), 4.70 (dq, $J_{3,9} = 6.6$ Hz, $J_{3,4} = 2.1$ Hz, 1 H, 3-H), 6.93 (d, $J_{7,6} = 7.4$ Hz, 1 H, 7-H)*, 6.99 (dd, $J_{5,6} = 8.4$ Hz, $J_{5,7} = 0.9$ Hz, 1 H, 5-H)*, 7.52 (dd, $J_{6,5} = 8.4$ Hz, $J_{6,7} = 7.4$ Hz, 1 H, 6-H), 10.93 (br. s, 1 H, 8-OH).–

* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ = 16.4 (CH_3 , C-9), 67.5 (CH , C-3), 78.8 (CH , C-4), 107.2 (C_q , C-8a), 118.7 (C_q , C-7)*, 118.9 (C_q , C-5)*, 137.2 (CH , C-6), 141.0 (C_q , C-4a), 162.3 (C_q , C-8), 169.7 (C_q , C-1).–

* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

6.3.6 Ascolacton (Naturstoff 66515a)**32**Summenformel: C₁₆H₃₀O₄.–

Molmasse: 286.41 g/mol.–

Schmelzpunkt: Smp. = 101–102 °C.–

R_f-Wert: 0.51 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -37.1^\circ$ (c = 0.8, CH₂Cl₂).–IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3440, 2954, 2920, 2850, 1755, 1722, 1469, 1385, 1227, 1122, 1092, 1070, 872, 721.–

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 0.90 (t, $J_{17,16}$ = 6.9 Hz, 3 H, 17-H), 1.28 (s, 16 H, 8 x CH₂), 1.39 (m, 1 H, 8-H^a), 1.48 (m, 1 H, 8-H^b), 1.64 (m, 1 H, 7-H^a), 1.77 (m, 1 H, 7-H^b), 1.83 (dt, J_{gem} = 13.6 Hz, $J_{5a,4}$ = $J_{5a,6}$ = 11.7 Hz, 1 H, 5-H^a), 2.28 (dt, J_{gem} = 13.6 Hz, $J_{5b,4}$ = $J_{5b,6}$ = 3.6 Hz, 1 H, 5-H^b), 3.27 (br. s, 1 H, OH), 3.88 (br. s, 1 H, OH), 4.01 (d, $J_{3,4}$ = 9.7 Hz, 1 H, 3-H), 4.06 (m, 1 H, 4-H), 4.34 (m, 1 H, 6-H).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 14.1 (CH₃, C-17), 22.7 (CH₂, C-16), 24.8 (CH₂, C-8), 29.3 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 31.9 (CH₂, C-15), 35.7 (CH₂, C-7)*, 35.9 (CH₂, C-5)*, 69.1 (C_q, C-4), 74.4 (C_q, C-3), 78.6 (C_q, C-6), 173.2 (C_q, C-2).–

* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

EIMS (70 eV, 200 °C): m/z (%) = 286 (3), 223 (7), 211 (9), 193 (5), 180 (4), 166 (4), 137 (5), 123 (7), 111 (9), 95 (17), 69 (17), 60 (100), 43 (23).–

HREIMS: ber.: 286.21442

gef.: 286.21405

6.4 Naturstoffe aus Stamm 6577

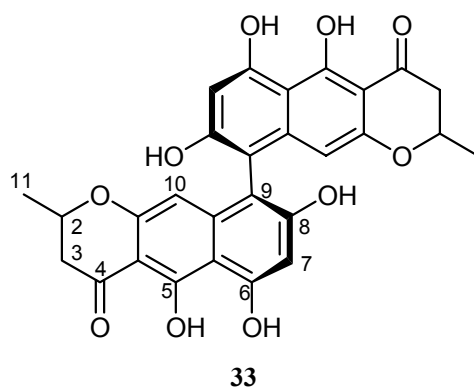
6.4.1 Anzucht, Extraktion und Isolierung

Der Stamm 6577, *Pseudoanguillospora* sp. wurde aus der Rotalge *Polyides rotundus* aus der Ostsee bei Ahrenshoop isoliert und 21 Tage bei Raumtemperatur in einer 5 L-Kultur auf Biomalz-Festagar kultiviert.

Die Agarplatten wurden für 3 Tage eingefroren und nach dem Auftauen durch Filtration vom flüssigen Anteil getrennt. Filtrat und Mycel wurden jeweils viermal mit Ethylacetat extrahiert. Nach Einengen der vereinigten Ethylacetatphasen resultierten 18 g Rohextrakt.

Der Rohextrakt wurde mit Hexan gewaschen und die Hexanphase verworfen. Anschließend wurde der hexanunlösliche Teil in Dichlormethan aufgenommen und die Dichlormethanphase erneut vom unlöslichen Teil getrennt. Durch Kristallisation aus der Dichlormethanphase konnte zunächst der Naturstoff 65772 (**33**, 14.9 g) gewonnen werden. Die Mutterlauge wurde anschließend durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Gradienten von reinem Dichlormethan bis zu einem Gemisch aus Dichlormethan und Methanol (9:1) in 5 Fraktionen aufgetrennt. Aus Fraktion 3 konnte durch präparative Schichtchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (93:7) der Naturstoff 6577c3 (**34**, 1.5 g) isoliert werden. Der in Dichlormethan unlösliche Teil des Rohextraktes enthielt eine größere Menge des Abbauproduktes von Naturstoff 65772 und wurde deshalb noch einmal mit Methanol gewaschen. Die Methanolphase wurde ebenfalls an Kieselgel chromatographiert und mit einem Gradienten von reinem Dichlormethan bis zu einem Gemisch aus Dichlormethan/Methanol (9:1) in 4 Fraktionen aufgetrennt. Aus Fraktion 4 konnte der Naturstoff 6577m4 (**35**, 222 mg) durch PSC an RP-Kieselgel mit Methanol/Wasser (1:1) isoliert werden.

6.4.2 Cephalochromin (Naturstoff 65772)



Summenformel: $C_{28}H_{22}O_{10}$ —

Molmasse: 518.12 g/mol.–

Schmelzpunkt: Zers. = 180 °C (Lit.: >300 °C).–

R_f -Wert: 0.49 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +618.2^\circ$ (c = 0.11, Dioxan) Lit.: $[\alpha]_D^{20} = +727^\circ$ (c = 0.19, Dioxan).–

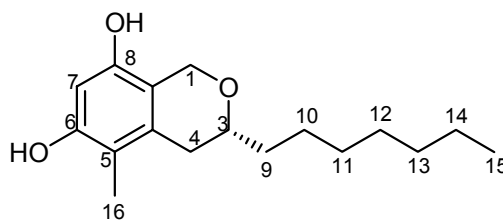
¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD): δ = 1.44 (d, $J_{11,2} = 6.1$ Hz, 6 H, 11-H, 11'-H), 2.70 (d, $J_{3,2} = 7.4$ Hz, 4 H, 3-H, 3'-H), 4.51 (m, 2 H, 2-H, 2'-H), 5.94 (s, 2 H, 10-H, 10'-H), 6.17 (br. s, 2 H, 8-OH, 8'-OH), 6.53 (s, 2 H, 7-H, 7'-H), 9.63 (s, 2 H, 6-OH, 6'-OH), 14.98 (s, 2 H, 5-OH, 5'-OH).–

¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OD): δ = 21.3 (CH₃, 2 C, C-11, C-11'), 43.6 (CH₂, 2 C, C-3, C-3'), 73.7 (CH, 2 C, C-2, C-2'), 100.0 (CH, 2 C, C-10, C-10'), 100.3 (CH, 2 C, C-7, C-7'), 102.7 (C_q, 2 C, C-9, C-9')*, 102.8 (C_q, 2 C, C-4a, C-4a')*, 105.8 (C_q, 2 C, C-5a, C-5a'), 142.6 (C_q, 2 C, C-9a, C-9a'), 156.7 (C_q, 2 C, C-10a, C-10a'), 160.5 (C_q, 2 C, C-8, C-8'), 161.1 (C_q, 2 C, C-6, C-6'), 164.8 (C_q, 2 C, C-5, C-5'), 198.9 (C_q, 2 C, C-4, C-4').–

*Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

EIMS (70 eV, 200 °C): m/z (%) = 518 [M⁺] (27.6), 194 (8.8), 166 (9.5), 149 (14.3), 125 (10.6), 111 (13.3), 97 (21.3), 83 (27.3), 69 (36.3), 57 (64.4), 43 (100), 28 (95.6).–

6.4.3 Pseudoanguillosporin A (Naturstoff 6577c3)



34

Summenformel: C₁₇H₂₆O₃.–

Molmasse: 278.39 g/mol.–

Schmelzpunkt: Smp. = 46–48 °C.–

R_f -Wert: 0.64 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -724.6^\circ$ ($c = 0.65$, MeOH).–

CD (CH₃CN): λ ($\Delta\epsilon$) = 198 (–9.8), 231 (0.0), 238 (0.7), 254 (0.0), 282 (–0.5).–

UV (CH₃CN): λ ($\log \epsilon$) = 283 (3.42), 201 (4.72).–

IR (Film): ν (cm^{–1}) = 3437, 3330, 2952, 2922, 2852, 1604, 1462, 1452, 1254, 1105, 1043.–

¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD): δ = 0.92 (t, $J_{15,14} = 6.8$ Hz, 3 H, 15-H), 1.33 (m, 8 H, 11-H, 12-H, 13-H, 14-H), 1.42 (m, 1 H, 10-H^a), 1.60 (m, 3 H, 9-H, 10-H^b), 1.98 (s, 3 H, 16-H), 2.33 (dd, $J_{\text{gem}} = 16.4$ Hz, $J_{4a,3} = 10.8$ Hz, 1 H, 4-H^a), 2.57 (dd, $J_{\text{gem}} = 16.4$ Hz, $J_{4b,3} = 2.6$ Hz, 1 H, 4-H^b), 3.50 (m, 1 H, 3-H), 4.51 (d, $J_{\text{gem}} = 14.7$ Hz, 1 H, 1-H^a), 4.85 (d, $J_{\text{gem}} = 14.7$ Hz, 1 H, 1-H^b), 6.21 (s, 1 H, 7-H).–

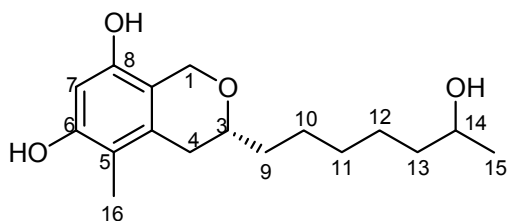
¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ = 9.1 (CH₃, C-16), 13.2 (CH₃, C-15), 22.4 (CH, C-14), 25.4 (CH₂, C-10), 29.1 (CH₂, C-12)**, 29.5 (CH₂, C-11)**, 31.7 (CH₂, C-13), 32.3 (CH₂, C-4), 36.0 (CH₂, C-9), 64.7 (CH₂, C-1), 75.0 (CH, C-3), 99.7 (CH, C-7), 112.7 (C_q, C-5)*, 112.8 (C_q, C-8a)*, 133.4 (C_q, C-4a), 150.8 (C_q, C-8), 153.5 (C_q, C-6).–

Die Zuordnung der mit * und ** gekennzeichneten Signale ist vertauschbar.

EIMS (70 eV, 200 °C): m/z (%) = 278 [M⁺] (20), 179 (9), 150 (78), 99 (26), 86 (58), 57 (27), 44 (100), 28 (31).–

HREIMS: ber.: 278.18819
gef.: 278.18869

6.4.4 Pseudoanguillosporin B (Naturstoff 6577m4)



35

Summenformel: C₁₇H₂₆O₄.–

Molmasse: 294.18 g/mol.–

R_f-Wert: 0.40 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -625.0^\circ$ ($c = 0.76$, MeOH).–

UV (MeOH): λ_{\max} ($\log \epsilon$) = 427 (4.64), 338 (5.39), 286 (6.36).–

IR (Film): ν (cm^{-1}) = 3383, 2931, 2858, 1606, 1462, 1335, 1259, 1107, 1045.–

^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): δ = 1.17 (d, $J_{15,14} = 6.2$ Hz, 3 H, 15-H), 1.49 (m, 10 H, 9-H, 10-H, 11-H, 12-H, 13-H), 1.98 (s, 3 H, 16-H), 2.33 (dd, $J_{\text{gem}} = 16.6$ Hz, $J_{4a,3} = 10.8$ Hz, 1 H, 4-H^a), 2.59 (dd, $J_{\text{gem}} = 16.6$ Hz, $J_{4b,3} = 2.2$ Hz, 1 H, 4-H^b), 3.51 (m, 1 H, 3-H), 3.73 (m, 1 H, 14-H), 4.50 (d, $J_{\text{gem}} = 14.7$ Hz, 1 H, 1-H^b), 4.84 (d, $J_{\text{gem}} = 14.7$ Hz, 1 H, 1-H^a), 6.21 (s, 1 H, 7-H).–

^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): δ = 9.0 (CH_3 , C-16), 22.2 (CH_3 , C-15), 25.3 (CH_2 , C-12)***, 25.5 (CH_2 , C-10)***, 29.5 (CH_2 , C-11), 32.3 (CH_2 , C-4), 35.8 (CH_2 , C-9), 38.8 (CH_2 , C-13), 64.6 (CH_2 , C-1), 67.3 (CH, C-14), 74.9 (CH, C-3), 99.6 (CH, C-7), 112.7 (C_q , C-5)*, 112.8 (C_q , C-8a)*, 133.4 (C_q , C-4a), 150.8 (C_q , C-8), 153.5 (C_q , C-6).–

Die Zuordnungen der mit * und ** gekennzeichneten Signale sind untereinander vertauschbar.

EIMS (70 eV, 200 °C): m/z (%) = 294 [M^+] (2), 279 (3), 177 (5), 143 (13), 111 (7), 97 (11), 71 (18), 56 (32), 45 (62), 31 (100).–

HREIMS: ber.: 294.18311
gef.: 294.18316

6.5 Naturstoffe aus Stamm 7067

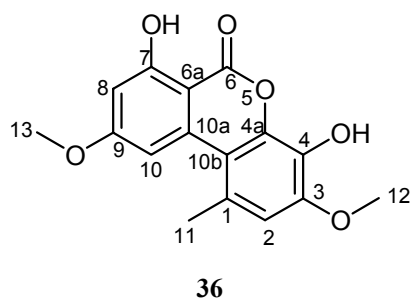
6.5.1 Anzucht, Extraktion und Isolierung

Bei dem Stamm 7067 handelt es sich um *Coniothyrium* sp. aus der Pflanze *Carpobrotus edulis* von Gomera. Der Stamm wurde für 28 Tage in einer 12 L Kultur auf Biomalz-Festagar bei Raumtemperatur kultiviert. Die Agarplatten wurden für drei Tage bei -10°C eingefroren und nach dem Auftauen filtriert. Filtrat und Biomasse wurden je fünfmal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen eingengt. Es resultierten 27.8 g Rohextrakt.

Der Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0–10% in 1 %-Schritten von je 500 mL) in 7 Fraktionen aufgeteilt. Fraktion 4 lieferte nach einer Säulenchromatographie an Sephadex

LH 20 durch Kristallisation aus Dichlormethan den Naturstoff 70674a (**36**, 52.8 mg). Aus Fraktion 5 konnten mittels Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 und Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (9:1) sowohl der Naturstoff 70675b (**37**, 1.03 g) als auch der Naturstoff 70675c (**39**, 32.7 mg), der nochmals mittels präparativer Schichtchromatographie (Laufmittel Dichlormethan/Methanol, 92:8) gereinigt wurde, isoliert werden. Die Fraktion 7 wurde durch eine weitere Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (95:5) in 8 Unterfraktionen aufgeteilt, von denen die sechste nach Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 und Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (98:2) den Naturstoff 70677c (**40**, 134.5 mg) lieferte. Aus der achten Unterfraktion konnte durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 und anschließender Kristallisation aus Dichlormethan/Methanol (3:2) der Naturstoff 70677d (**42**, 8.2 mg) gewonnen werden. Die Mutterlauge wurde einer weiteren Säulenchromatographie an Kieselgel unterzogen und lieferte den Naturstoff 70677f (**43**, 3.1 mg), der noch einmal durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 gereinigt wurde.

6.5.2 Graphislacton A (Naturstoff 70674a)



Summenformel: C₁₆H₁₄O₆.–

Molmasse: 302.28 g/mol.–

Schmelzpunkt: Smp. = 232–234 °C (Lit.: 236–237 °C).–

R_f-Wert: 0.88 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz): δ = 2.61 (s, 3 H, 11-H), 3.87 (s, 3 H, 12-H)*, 3.88 (s, 3 H, 13-H)*, 6.51 (d, *J*_{8,10} = 1.9 Hz, 1 H, 8-H), 6.83 (s, 1 H, 2-H), 7.07 (br. s, 1 H, 10-H), 9.17 (s, 1 H, OH), 11.89 (s, 1 H, OH).–

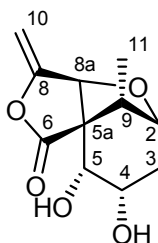
* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 50 MHz): δ = 25.5 (CH₃, C-11), 56.5 (CH₃, C-12)*, 56.8 (CH₃, C-13)*, 99.2 (C_q, C-6a), 100.1 (CH, C-8), 104.4 (CH, C-10), 111.2 (C_q, C-10b), 113.6 (CH, C-2),

126.9 (C_q, C-1), 133.1 (C_q, C-10a), 138.6 (C_q, C-4), 141.3 (C_q, C-3), 148.8 (C_q, C-4a), 164.8 (C_q, C-6)**, 165.3 (C_q, C-7)**, 166.7 (C_q, C-9).–

Die Zuordnung der mit * und ** gekennzeichneten Signale ist vertauschbar.

6.5.3 Massarilacton A (Naturstoff 70675b)



37

Summenformel: C₁₁H₁₄O₅.–

Molmasse: 226.23 g/mol.–

R_f-Wert: 0.65 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

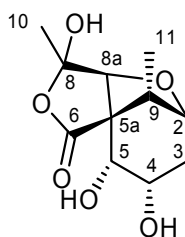
Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +15.5^\circ$ (c = 0.35, CH₂Cl₂) Lit.: $[\alpha]_D^{20} = +8.7^\circ$ (c = 0.3, CH₂Cl₂).–

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1.07 (d, $J_{11,9} = 7.1$ Hz, 3H, 11-H), 1.78 (ddd, $J_{\text{gem}} = 15.6$ Hz, $J_{3a,4} = 6.0$ Hz, $J_{3a,2} = 1.9$ Hz, 1 H, 3-H^a), 1.95 (q, $J_{9,11} = 7.1$ Hz, 1 H, 9-H), 2.18 (dd, $J_{\text{gem}} = 15.6$ Hz, $J_{3b,2} = 3.0$ Hz, 1 H, 3-H^b), 4.17 (m, 3 H, 2-H, 4-H, 5-H), 4.52 (dd, $J_{\text{gem}} = 2.7$ Hz, $J_{10a,8a} = 2.2$ Hz, 1 H, 10-H^a), 4.71 (d, $J_{\text{gem}} = 2.7$ Hz, 1 H, 10-H^b), 5.63 (t, $J_{8a,10a} = 2.2$ Hz, 1 H, 8a-H).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 14.2 (CH₃, C-11), 38.5 (CH₂, C-3), 46.0 (CH, C-9), 61.5 (C_q, C-5a), 66.3 (CH, C-4)*, 69.4 (CH, C-5)*, 76.8 (CH, C-8a), 83.8 (CH, C-2), 89.6 (CH₂, C-10), 156.6 (C_q, C-8), 171.8 (C_q, C-6).–

* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

6.5.3.1 Hydroxymassarilacton



38

Summenformel: $C_{11}H_{16}O_6$.–

Molmasse: 244.24 g/mol.–

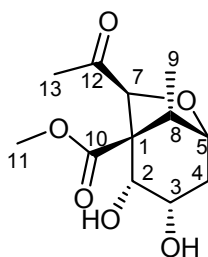
R_f -Wert: 0.52 (CH_2Cl_2 /MeOH 9:1).–

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ = 0.89 (d, $J_{11,9}$ = 6.9 Hz, 3 H, 11-H), 1.57 (s, 3 H, 10-H), 1.62 (dd, J_{gem} = 14.6 Hz, $J_{3Ha,4}$ = 5.7 Hz, 1 H, 3-H^a), 1.86 (m, 1 H, 9-H), 2.41 (dd, J_{gem} = 14.6 Hz, $J_{3b,4}$ = 2.2 Hz, 1 H, 3-H^b), 4.21 (m 2 H, 2-H, 4-H), 4.56 (d, $J_{8a,5}$ = 2.0 Hz, 1 H, 8a-H), 4.71 (dd, $J_{5,4}$ = 4.4 Hz, $J_{5,8a}$ = 2.0 Hz, 1 H, 5-H).–

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ = 14.5 (CH_3 , C-11), 17.0 (CH_3 , C-10), 35.6 (CH_2 , C-3), 41.2 (CH, C-9), 67.8 (C_q , C-5a), 73.4 (CH, C-4), 79.7 (CH, C-5), 82.0 (CH, C-2), 86.6 (CH, C-8a), 108.7 (C_q , C-8), 174.1 (C_q , C-6).–

EIMS (70 eV, 200 °C): m/z (%) = 226 (6.5), 166 (94.9), 139 (21.2), 93 (28.4), 43 (100.0).–

6.5.4 Massarilacton C (Naturstoff 70675c)



39

Summenformel: $C_{12}H_{18}O_6$.–

Molmasse: 258.27 g/mol.–

R_f -Wert: 0.58 (CH_2Cl_2 /MeOH 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +51.1^\circ$ (c = 0.7, CH₂Cl₂).–

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 3446, 2949, 1732, 1720, 1271, 1248, 1111, 1093, 1070, 1014.–

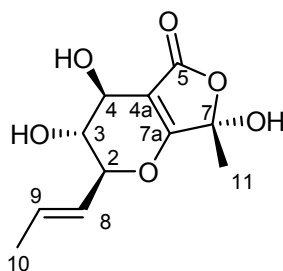
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1.01 (d, $J_{9,8}$ = 7.0 Hz, 3 H, 9-H), 1.79 (ddd, J_{gem} = 15.5 Hz, $J_{4a,3}$ = 5.7 Hz, $J_{4a,5}$ = 1.2 Hz, 1 H, 4-H^a), 1.86 (q, $J_{8,9}$ = 7.0 Hz, 1 H, 8-H), 2.16 (s, 3 H, 13-H), 2.20 (dd, J_{gem} = 15.5 Hz, $J_{4b,5}$ = 3.8 Hz, 1 H, 4-H^b), 3.69 (s, 3 H, 11-H), 4.11 (d, $J_{2,3}$ = 5.5 Hz, 1 H, 2-H), 4.14 (m, 1 H, 3-H), 4.18 (m, 1 H, 5-H), 5.07 (s, 1 H, 7-H).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 15.1 (CH₃, C-9), 28.7 (CH₃, 13-C), 38.2 (CH₂, C-4), 45.7 (CH, C-8), 52.3 (CH₃, C-11), 64.5 (C_q, C-1), 66.4 (CH, C-3), 73.6 (CH, C-2), 81.1 (CH, C-5), 81.5 (CH, C-7), 170.8 (C_q, C-10), 206.9 (C_q, C-12).–

EIMS (70 eV, 200 °C): m/z (%) = 258 (1.3) [M⁺], 227 (6.0) [M⁺-OCH₃], 215 (47.1) [M⁺-COCH₃], 183 (100.0), 153 (27.8), 137 (26.0).–

HREIMS: ber.: 258.11035
gef.: 258.10992

6.5.5 Massarilacton D (Naturstoff 70677c)



40

Summenformel: C₁₁H₁₄O₆.–

Molmasse: 242.23 g/mol.–

Schmelzpunkt: Smp. = 84–88 °C.–

R_f-Wert: 0.38 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -116.1^\circ$ (c = 0.56, MeOH).–

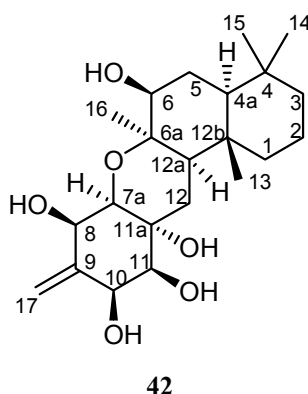
IR (Film): ν (cm⁻¹) = 3404, 2918, 1747, 1678, 1441, 1308, 1209, 1140, 1051, 1024, 966, 930, 903.–

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ = 1.63 (s, 3 H, 11-H), 1.77 (dd, $J_{10,9}$ = 6.5 Hz, $J_{10,8}$ = 1.3 Hz, 3 H, 10-H), 3.82 (t, $J_{3,2}$ = $J_{3,4}$ = 4.2 Hz, 1 H, 3-H), 4.31 (d, $J_{4,3}$ = 4.2 Hz, 1 H, 4-H), 4.85 (dd, $J_{2,8}$ = 7.9 Hz, $J_{2,3}$ = 4.2 Hz, 1 H, 2-H), 5.79 (m, 1 H, 8-H), 5.95 (m, 1 H, 9-H).–

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ = 16.6 (CH₃, C-10), 21.8 (CH₃, C-11), 62.9 (CH, C-4), 71.2 (CH, C-3), 84.9 (CH, C-2), 99.9 (C_q, C-4a), 101.2 (C_q, C-7), 125.2 (CH, C-8), 131.7 (CH, C-9), 170.1 (C_q, C-5), 174.2 (C_q, C-7a).–

CIMS (*iso*-Butan, 150 °C): m/z (%) = 485 [2M+H⁺] (73.1), 243 [M+H⁺] (100.0), 225 [M-H₂O+H⁺] (11.5), 181 (18.3).–

6.5.6 Coniothyrenol (Naturstoff 70677d)



Summenformel: C₂₂H₃₆O₆.–

Molmasse: 396.52 g/mol.–

Schmelzpunkt: Smp. = 283–285 °C.–

R_f-Wert: 0.31 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +11.1° (c = 0.19, MeOH).–

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ = 0.76 (s, 3 H, 15-H), 0.77 (s, 3 H, 13-H), 0.81 (s, 3 H, 14-H), 0.99 (m, 1 H, 1-H^a), 1.00 (s, 3 H, 16-H), 1.17 (dt, J_{gem} = $J_{3\text{Ha},2\text{Ha}}$ = 13.3 Hz, $J_{3\text{Ha},2\text{Hb}}$ = 3.9 Hz, 1 H, 3-H^a), 1.35 (br. d, J_{gem} = 13.3 Hz, 1 H, 3-H^b), 1.43 (m, 2 H, 2-H^a, 4a-H), 1.58 (m, 4 H, 1-H^b, 2-H^b, 5-H^a, 12-H^a), 1.76 (dt, J_{gem} = 13.1 Hz, $J_{5\text{Hb},6}$ =

$J_{5\text{Hb},4a} = 2.6$ Hz, 1 H, 5-H^b), 1.99 (t, $J_{\text{gem}} = J_{12\text{Hb},12a} = 14.4$ Hz, 1 H, 12-H^b), 2.27 (dd, $J_{12a,12\text{Hb}} = 14.3$ Hz, $J_{12a,12\text{Ha}} = 4.4$, 1 H, 12a-H), 3.27 (d, $J_{11,10} = 9.6$ Hz, 1 H, 11-H), 3.57 (t, $J_{6,5\text{Hb}} = J_{6,5\text{Ha}} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 3.99 (m, 2 H, 7a-H, 10-H), 4.33 (d, $J_{8,17\text{Ha}} = 2.0$ Hz, 1 H, 8-H), 5.06 (q, $J_{\text{gem}} = J_{17\text{Ha},8} = J_{17\text{Ha},10} = 2.0$ Hz, 1 H, 17-H^a), 5.16 (t, $J_{\text{gem}} = J_{17\text{Hb},10} = 2.0$ Hz, 1 H, 17-H^b).–

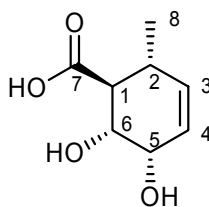
¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): $\delta = 14.3$ (CH₃, C-13), 18.2 (CH₂, C-2), 20.3 (CH₃, C-15), 23.1 (CH₃, C-16), 26.1 (CH₂, C-5), 30.0 (CH₂, C-12), 32.1 (CH₃, C-14), 32.3 (C_q, C-4), 36.8 (C_q, C-12b), 39.0 (CH₂, C-1), 41.9 (CH₂, C-3), 42.1 (CH, C-12a), 47.5 (CH, C-4a), 68.9 (CH, C-8), 71.3 (CH, C-10), 71.6 (C_q, C-11a), 74.1 (CH, C-6), 75.5 (CH, C-7a), 77.5 (C_q, C-6a), 78.8 (CH, C-11), 103.6 (CH₂, C-17), 147.9 (C_q, C-9).–

EIMS (70 eV, 200 °C): m/z (%) = 396 (4.1) [M⁺], 378 (12.2) [M⁺-H₂O], 360 (38.3) [M⁺-2 H₂O], 331 (34.9), 293 (100.0), 189 (35.0), 177 (40.9), 123 (93.1).–

HREIMS: ber.: 396.25119

gef.: 396.25116

6.5.7 Massarigenin E (Naturstoff 70677f)



43

Summenformel: C₈H₁₂O₄.–

Molmasse: 172.18 g/mol.–

R_f-Wert: 0.06 (CH₂Cl₂/MeOH 8:2).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +58.1^\circ$ (c = 0.16, MeOH).–

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): $\delta = 1.07$ (d, $J_{8,2} = 7.0$ Hz, 3 H, 8-H), 2.40 (ps. t, $J_{1,2} \approx J_{1,6} \approx 10.9$ Hz, 1 H, 1-H), 2.49 (m, 1 H, 2-H), 3.78 (dd, $J_{6,1} = 11.3$ Hz, $J_{6,5} = 4.0$ Hz, 1 H, 6-H), 4.03 (ps. t, $J_{5,4} \approx J_{5,6} \approx 4.7$ Hz, 1 H, 5-H), 5.69 (dd, $J_{3,4} = 9.9$ Hz, $J_{3,2} = 1.9$ Hz, 1 H, 3-H), 5.80 (ddd, $J_{4,3} = 9.9$ Hz, $J_{4,5} = 5.3$ Hz, $J_{4,2} = 2.6$ Hz, 1 H, 4-H).–

^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz): δ = 18.4 (CH_3 , C-8), 35.2 (CH , C-2), 50.5 (CH , C-1), 65.0 (CH , C-5), 70.8 (CH , C-6), 125.3 (CH , C-4), 135.0 (CH , C-3), 176.9 (C_q , C-7).–

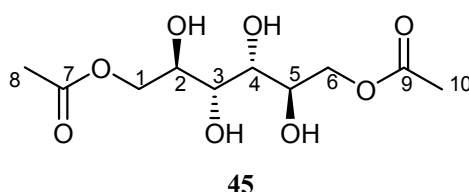
CIMS (*iso*-Butan, 150 °C): m/z (%) = 173 [$\text{M}+\text{H}^+$] (3.1), 155 [$\text{M}+\text{H}^+-\text{H}_2\text{O}$] (4.6), 137 [$\text{M}+\text{H}^+-2\text{H}_2\text{O}$] (1.6).–

6.6 Naturstoff aus Stamm 6754

6.6.1 Anzucht, Extraktion und Isolierung

Der noch nicht identifizierte Stamm 6754, aus *Trifolium dubium* bei Wustrow an der Ostsee, wurde für 28 Tage in einer 12 L Kultur auf Dinkel-Gerste-Medium bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde fünfmal mit je 3 L Ethylacetat extrahiert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Es resultierten 44.4 g Rohextrakt, die auf Grund des außergewöhnlich hohen Fettanteils mit 250 mL Hexan extrahiert wurden. Die verbleibenden 8.4 g entfetteten Rohextrakts wurden mittels einer Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0–12 % Methanol in 1 %-Schritten von je 300 mL) in 5 Fraktionen aufgeteilt. Fraktion 5 lieferte durch Kristallisation aus Dichlormethan/Methanol (88:12) den Naturstoff 67545 (**45**, 956.9 mg).

6.6.2 1,6-Di-*O*-acetyl-D-mannitol (Naturstoff 67545)



Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_8$.–

Molmasse: 266.25 g/mol.–

Schmelzpunkt: Smp. = 128–130 °C (Lit.: 129 °C).–

R_f -Wert: 0.16 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +10.5^\circ$ ($c = 0.62$, MeOH).–

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3357, 2949, 2920, 2482, 1741, 1400, 1365, 1242, 1082, 1043, 931, 897, 750, 604, 553, 480, 407.–

Kristallsystem: Triklin.–

Raumgruppe: P 1.–

Dimensionen der Zelle:	$a = 7.249(3)$	$\alpha = 77.48(1)$
	$b = 7.326(3)$	$\beta = 87.80(1)$
	$c = 11.974(5)$	$\gamma = 86.67(1)$

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ = 2.10 (s, 6 H, 8-H, 10-H), 3.81 (d, $J_{3,2} = 8.8$ Hz, 2 H, 3-H, 4-H), 3.89 (ddd, $J_{2,3} = 8.8$ Hz, $J_{2,1a} = 6.1$ Hz, $J_{2,1b} = 2.5$ Hz, 2 H, 2-H, 5-H), 4.19 (dd, $J_{\text{gem}} = 11.5$ Hz, $J_{1a,2} = 6.1$ Hz, 2 H, 1-H^a, 6-H^a), 4.40 (dd, $J_{\text{gem}} = 11.5$ Hz, $J_{1b,2} = 2.5$ Hz, 2 H, 1-H^b, 6-H^b).–

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ = 19.5 (CH₃, 2 C, C-8, C-10), 66.6 (CH₂, 2 C, C-1, C-6), 68.9 (CH, 2 C, C-2, C-5)*, 69.2 (CH, 2 C, C-3, C-4)*, 171.9 (C_q, C-7, C-9).–

* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

CIMS (*iso*-Butan, 150 °C): m/z (%) = 267 [M+H⁺] (52.8), 249 [M+H⁺-H₂O] (100.0), 231 [M+H⁺-2H₂O] (18.2).–

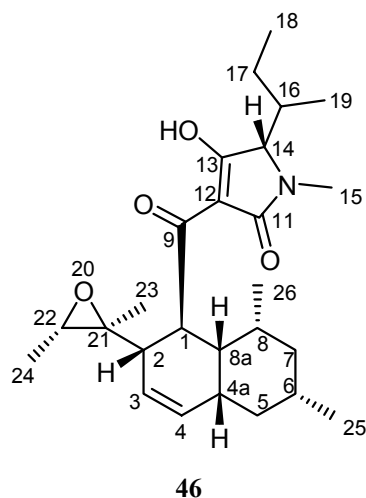
6.7 Naturstoff aus Stamm 6579

6.7.1 Anzucht, Extraktion und Isolierung

Der Stamm 6579, *Ulocladium* sp. aus der Rotalge *Polysiphonia* sp. aus der Ostsee bei Ahrenshoop, wurde in einer 12 L-Kultur auf Dinkel-Gerste-Medium 28 Tage bei Raumtemperatur kultiviert. Anschließend wurde die Kultur lyophilisiert und das Lyophilisat fünfmal mit Ethylacetat extrahiert. Es resultierten 11.4 g Rohextrakt.

Der Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0–10 % Methanol in 1 %-Schritten von je 300 ml) in 4 Fraktionen aufgetrennt. Fraktion 3 lieferte nach einer weiteren Säulenchromatographie an Kieselgel mit reinem Dichlormethan als Laufmittel den Naturstoff 65793a (**46**, 866.8 mg).

6.7.2 (5*S*)-3-({(1*S*,2*R*,4*aR*,6*S*,8*R*,8*aR*)-2-[(2*S*,3*S*)-2,3-Dimethyloxiran-2-yl]-6,8-dimethyl-1,2,4*a*,5,6,7,8,8*a*-octahydronaphthalin-1-yl}carbonyl)-5-*sec*-butyl-4-hydroxy-1-methyl-1,5-dihydro-2*H*-pyrrol-2-on (Naturstoff 65793a)



Summenformel: C₂₆H₃₉NO₄.–

Molmasse: 429.59 g/mol.–

R_f-Wert: 0.93 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +36.7^\circ$ (c = 0.42, CH₂Cl₂).–

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 0.76 (dd, $J_{19,16} = 6.9$ Hz, $J_{19,14} = 2.1$ Hz, 3 H, 19-H), 0.82 (d, $J_{26,8} = 7.3$ Hz, 3 H, 26-H), 0.90 (m, 6 H, 18-H, 25-H), 1.00 (m, 2 H, 5-H), 1.09 (d, $J_{23,22} = 2.9$ Hz, 3 H, 23-H), 1.21 (m, 4 H, 8-H, 24-H), 1.40 (m, 1 H, 6-H), 1.49 (m, 1 H, 17-H^a), 1.64 (m, 3 H, 7-H, 17-H^b), 1.88 (m, 1 H, 16-H), 2.00 (m, 1 H, 4a-H), 2.14 (m, 1 H, 8a-H), 2.33 (br. d, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, 1 H, 2-H), 2.73 (m, 1 H, 22-H), 2.87 (d, $J_{15,14} = 2.5$ Hz, 3 H, 15-H), 3.60 (m, 1 H, 14-H), 4.17 (m, 1 H, 1-H), 5.26 (d, $J_{3,2} = 9.9$ Hz, 1 H, 3-H), 5.73 (m, 1 H, 4-H).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 12.1 (CH₃, C-23), 12.4 (CH₃, C-18), 13.9 (CH₃, 2 C, C-19, C-24), 20.4 (CH₃, C-26), 22.2 (CH₃, C-25), 25.1 (CH₂, C-17), 26.6 (CH₃, C-15), 33.2 (CH, C-6), 35.1 (CH, C-1), 35.7 (CH, C-16), 37.6 (CH₂, C-5), 37.7 (CH, C-8), 37.8 (CH₂, C-7), 39.9 (CH, C-4a), 41.8 (CH, C-8a), 51.4 (CH, C-2), 58.6 (CH, C-22), 62.9 (C_q, C-21), 69.8 (CH, C-14), 103.8 (C_q, C-12), 125.1 (CH, C-3), 133.7 (CH, C-4), 173.5 (C_q, C-11), 190.1 (C_q, C-9), 194.0 (C_q, C-13).–

EIMS (70 eV, 200 °C): m/z (%) = 429 [M^+] (13.5), 411 [$M^+ - H_2O$] (39.4), 393 [$M^+ - 2H_2O$] (11.8), 358 (15.7), 196 (100.0), 169 (38.6).–

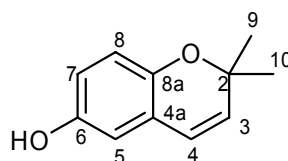
6.8 Naturstoffe aus Stamm 6586

6.8.1 Anzucht, Extraktion und Isolierung

Bei dem Stamm 6586 handelt es sich um *Acremonium* sp., der aus *Enteromorpha linza* bei Ahrenshoop an der Ostsee isoliert wurde. Der Stamm wurde in einer 12 L-Kultur für 21 Tage bei Raumtemperatur auf Biomalz-Festagar angezüchtet und nach Ablauf dieser Zeit bei -17°C tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurde die Kultur filtriert und das Filtrat und die Biomasse jeweils viermal mit Ethylacetat extrahiert. Nach dem Einengen der Ethylacetatphase resultierten 11.4 g Rohextrakt.

Der resultierende Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0–7 % Methanol in 1 %-Schritten von je 300 mL) in sieben Fraktionen aufgetrennt. Fraktion 3 enthielt den Naturstoff 65863a (**48**, 11.9 mg), der durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 gewonnen wurde. Aus Fraktion fünf wurde durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 der Naturstoff 65865a (**49**, 27.7 mg) und durch anschließende Kristallisation der zweiten Fraktion der Gelchromatographie aus Methanol der Naturstoff 65865b (**50**, 13.5 mg) isoliert.

6.8.2 2,2-Dimethylchromen-6-ol (Naturstoff 65863a)



48

Summenformel: $C_{11}H_{12}O_2$.–

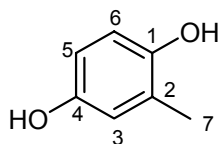
Molmasse: 176.21 g/mol.–

R_f -Wert: 0.61 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1).–

$^1\text{H-NMR}$ ($CDCl_3$, 200 MHz): δ = 1.44 (s, 6 H, 9-H, 10-H), 5.67 (d, $J_{4,3}$ = 9.7 Hz, 1 H, 4-H), 6.29 (d, $J_{3,4}$ = 9.7 Hz, 1 H, 3-H), 6.53 (d, $J_{5,7}$ = 2.8 Hz, 1 H, 5-H), 6.61 (dd, $J_{7,8}$ = 8.6 Hz, $J_{7,5}$ = 2.8 Hz, 1 H, 7-H), 6.70 (d, $J_{8,7}$ = 8.6 Hz, 1 H, 8-H).–

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ = 28.0 (CH_3 , C-9, C-10), 76.2 (C_q , C-2), 113.2 (CH , C-5), 115.9 (CH , C-7), 117.3 (CH , C-8), 122.5 (C_q , C-4a), 122.6 (CH , C-4), 132.3 (CH , C-3), 147.0 (C_q , C-8a), 150.0 (C_q , C-6).–

6.8.3 Toluquinol (Naturstoff 65865a)



49

Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$.–

Molmasse: 124.14 g/mol.–

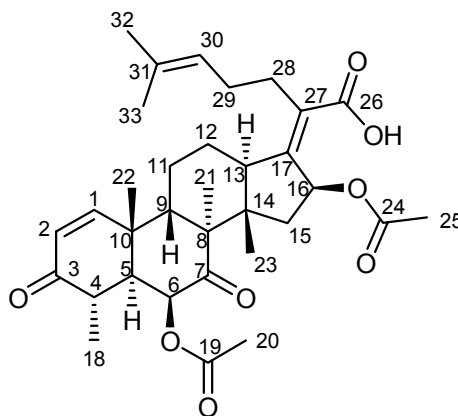
Schmelzpunkt: Smp. = 118–122 °C (Lit.: 123–124 °C).–

R_f -Wert: 0.42 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1).–

^1H -NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 2.14 (s, 3 H, 7-H), 6.47 (dd, $J_{5,6}$ = 8.3 Hz, $J_{5,3}$ = 3.0 Hz, 1 H, 5-H), 6.59 (m, 2 H, 3-H, 6-H).–

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ = 16.4 (CH_3 , C-7), 113.3 (CH , C-5), 115.8 (CH , C-3), 117.7 (CH , C-6), 125.8 (C_q , C-2), 148.2 (C_q , C-1), 149.8 (C_q , C-4).–

6.8.4 Helvolinsäure (Naturstoff 65865b)



50

Summenformel: $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{O}_8$.–

Molmasse: 568.70 g/mol.–

Schmelzpunkt: Smp. = 223–226 °C (Lit.: 230 °C).–

R_f-Wert: 0.50 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -111.9^\circ$ (c = 0.68, CHCl₃) Lit.: $[\alpha]_D^{20} = -88.9^\circ$ (c = 1, CHCl₃).–

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 0.95 (s, 3 H, 23-H), 1.20 (s, 3H, 21-H), 1.30 (d, $J_{18,4} = 6.9$ Hz, 18-H), 1.47 (s, 3 H, 22-H), 1.57 (m, 1 H, 11-H^a), 1.63 (s, 3 H, 33-H), 1.71 (s, 3 H, 32-H), 1.85 (m, 1 H, 12-H^a), 1.94 (d, $J_{\text{gem}} = 14.8$ Hz, 1 H, 15-H^a), 1.97 (s, 3 H, 25-H), 2.00 (m, 1 H, 11-H^b), 2.09 (m, 2 H, 29-H), 2.13 (s, 3 H, 20-H), 2.28 (m, 2 H, 5-H, 15-H^b), 2.50 (m, 3 H, 12-H^b, 28-H), 2.62 (m, 2 H, 9-H, 13-H), 2.80 (m, 1 H, 4-H), 5.13 (m, 1 H, 30-H), 5.25 (s, 1 H, 6-H), 5.89 (m, 2 H, 2-H, 16-H), 7.33 (d, $J_{1,2} = 10.1$ Hz, 1 H, 1-H).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 13.1 (CH₃, C-18), 17.8 (CH₃, C-33), 17.9 (CH₃, C-23), 18.3 (CH₃, C-21), 20.5 (CH₃, C-25), 20.7 (CH₃, C-20), 23.9 (CH₂, C-11), 25.7 (CH₃, C-32), 25.9 (CH₂, C-12), 27.5 (CH₃, C-22), 28.3 (CH₂, C-29), 28.6 (CH₂, C-28), 38.2 (C_q, C-10), 40.4 (CH, C-4), 40.7 (CH₂, C-15), 41.7 (CH, C-9), 46.6 (C_q, C-14), 47.2 (CH, C-5), 49.4 (CH, C-13), 52.7 (C_q, C-8), 73.5 (CH, C-16), 73.8 (CH, C-6), 122.8 (CH, C-30), 127.8 (CH, C-2), 130.4 (C_q, C-27), 132.9 (C_q, C-31), 147.7 (C_q, C-17), 157.3 (CH, C-1), 168.9 (C_q, C-19), 170.2 (C_q, C-24), 174.1 (C_q, C-26), 201.4 (C_q, C-3), 208.8 (C_q, C-7).–

6.9 Naturstoffe aus Stamm 7165

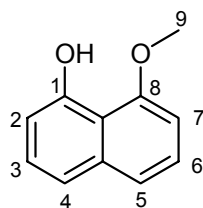
6.9.1 Anzucht, Extraktion und Isolierung

Bei dem Stamm 7165 handelt es sich um *Nigrospora* sp., der aus *Viburnum rigidum* von Gomera isoliert wurde. Der Pilz wurde für 28 Tage bei Raumtemperatur in einer 12 L-Kultur auf Biomalz-Festagar angezüchtet, anschließend in kleine Stücke geschnitten, mit Ethylacetat überschichtet und für 24 h stengelassen. Nach 24 Stunden wurde das Ethylacetat abdekantiert, der Pilz mit frischem Ethylacetat überschichtet und dieser Vorgang fünfmal wiederholt. Die vereinigten Ethylacetatphasen ergaben 10.9 g Rohextrakt.

Der gewonnene Rohextrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0–10 % Methanol in 1 %-Schritten von je 500 mL) in 5 Fraktionen aufgetrennt. Aus Fraktion 1 kristallisierte der Naturstoff 71651b (**52**, 185.6 mg) aus Dichlormethan. Aus der Mutterlauge konnten mittels einer weiteren

Säulenchromatographie an Kieselgel mit reinem Dichlormethan die Naturstoffe 71651a (**51**, 219.7 mg) und 71651c (**53**, 135.5 mg) isoliert werden. Fraktion 2 lieferte nach Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 die Naturstoffe 71652a (**54**, 10.7 mg) und 71652b (**55**, 43.5 mg).

6.9.2 8-Methoxynaphthalin-1-ol (Naturstoff 71651a)



51

Summenformel: $C_{11}H_{10}O_2$.–

Molmasse: 174.20 g/mol.–

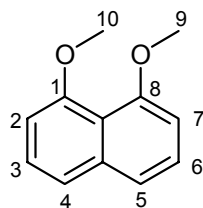
Schmelzpunkt: Smp. = 51–52 °C (Lit.: 55–56 °C).–

R_f -Wert: 0.91 (CH_2Cl_2).–

1H -NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ = 3.97 (s, 3 H, 9-H), 6.75 (d, $J_{7,6}$ = 7.6 Hz, 1 H, 7-H), 7.07 (dd, $J_{2,3}$ = 7.1 Hz, $J_{2,4}$ = 1.6 Hz, 1 H, 2-H), 7.43 (m, 4 H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H), 9.49 (s, 1 H, OH).–

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ = 56.4 (CH_3 , C-9), 104.4 (CH, C-2), 110.9 (CH, C-7), 115.6 (C_q , C-8a), 119.4 (CH, C-4), 122.3 (CH, C-5), 126.2 (CH, C-6), 128.2 (CH, C-3), 137.3 (C_q , C-4a), 155.1 (C_q , C-8), 156.6 (C_q , C-1).–

6.9.3 1,8-Dimethoxynaphthalin (Naturstoff 71651b)



52

Summenformel: $C_{12}H_{12}O_2$.–

Molmasse: 188.22 g/mol.–

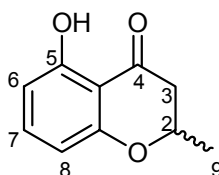
Schmelzpunkt: Smp. = 154–157 °C (Lit.: 158–161 °C).–

R_f -Wert: 0.80 (CH₂Cl₂).–

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 4.03 (s, 6 H, 9-H, 10-H), 6.90 (dd, $J_{2,3}$ = 6.6 Hz, $J_{2,4}$ = 2.3 Hz, 2 H, 2-H, 7-H), 7.40 (m, 4 H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ = 56.9 (CH₃, 2 C, C-9, C-10), 106.6 (CH, 2 C, C-2, C-7), 118.0 (C_q, C-8a), 121.3 (CH, 2 C, C-4, C-5), 126.8 (CH, 2 C, C-3, C-6), 137.8 (C_q, C-4a), 157.5 (C_q, 2 C, C-1, C-8).–

6.9.4 5-Hydroxy-2-methylchroman-4-on (Naturstoff 71651c)



53

Summenformel: C₁₀H₁₀O₃.–

Molmasse: 178.19 g/mol.–

R_f -Wert: 0.85 (CH₂Cl₂).–

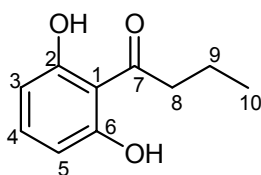
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = 0° (c = 0.1, CH₂Cl₂).–

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 1.51 (d, $J_{9,2}$ = 6.3 Hz, 3 H, 9-H), 2.68 (m, 2 H, 3-H), 4.55 (m, 1 H, 2-H), 6.42 (dd, $J_{6,7}$ = 8.3 Hz, $J_{6,8}$ = 0.6 Hz, 1 H, 6-H)*, 6.48 (dd, $J_{8,7}$ = 8.3 Hz, $J_{8,6}$ = 0.6 Hz, 1 H, 8-H)*, 7.34 (t, $J_{7,6}$ = $J_{7,8}$ = 8.3 Hz, 1 H, 7-H), 11.73 (s, 1 H, OH).–

* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ = 21.2 (CH₃, C-9), 44.2 (CH₂, C-3), 74.2 (CH, C-2), 107.7 (CH, C-6)*, 108.4 (C_q, C-4a), 109.5 (CH, C-8)*, 138.5 (CH, C-7), 162.1 (C_q, C-5)**, 162.5 (C_q, C-8a)**, 198.9 (C_q, C-4).–

Die Zuordnungen der mit * und ** gekennzeichneten Signale sind vertauschbar.

6.9.5 2,6-Dihydroxybutyrophenon (Naturstoff 71652a)**54**Summenformel: C₁₀H₁₂O₃.–

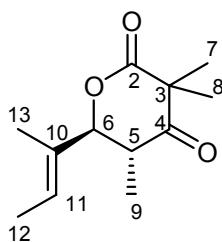
Molmasse: 180.20 g/mol.–

Schmelzpunkt: Smp. = 112–114 °C (Lit. 116–118 °C).–

R_f-Wert: 0.73 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5).–

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 1.03 (t, *J*_{10,9} = 7.4, 3 H, 10-H), 1.78 (tq, *J*_{9,10} = *J*_{9,8} = 7.4 Hz, 2 H, 9-H), 3.16 (t, *J*_{8,9} = 7.4 Hz, 2 H, 8-H), 6.43 (d, *J*_{3,4} = 7.8 Hz, 2 H, 3-H, 5-H), 7.25 (t, *J*_{4,3} = *J*_{4,5} = 7.8 Hz, 1 H, 4-H), 10.06 (br. s, 2 H, OH).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ = 14.3 (CH₃, C-10), 18.2 (CH₂, C-9), 47.1 (CH₂, C-8), 108.7 (CH, 2 C, C-3, C-5), 110.6 (C_q, C-1), 136.1 (CH, C-4), 161.8 (C_q, 2 C, C-2, C-6), 208.5 (C_q, C-7).–

6.9.6 Helicasolid C (Naturstoff 71652b)**55**Summenformel: C₁₂H₁₈O₃.–

Molmasse: 210.27 g/mol.–

Schmelzpunkt: Smp. = 69–72 °C.–

R_f-Wert: 0.89 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +35.0^\circ$ (c = 0.1, CH₂Cl₂).–

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 2979, 2935, 2864, 1745, 1716, 1466, 1387, 1346, 1302, 1271, 1157, 1119, 1011, 995, 854, 764.–

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 0.99 (d, $J_{9,5}$ = 6.8 Hz, 3 H, 9-H), 1.43 (s, 6 H, 7-H, 8-H), 1.70 (m, 6 H, 12-H, 13-H), 2.72 (dq, $J_{5,6}$ = 11.3 Hz, $J_{5,9}$ = 6.8 Hz, 1 H, 5-H), 4.48 (d, $J_{6,5}$ = 11.3 Hz, 1 H, 6-H), 5.64 (m, 1 H, 11-H).–

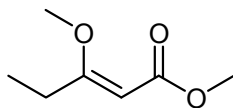
¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 9.7 (CH₃, C-13), 9.9 (CH₃, C-9), 13.3 (CH₃, C-12), 23.5 (CH₃, C-7), 23.6 (CH₃, C-8), 43.8 (CH, C-5), 51.6 (C_q, C-3), 85.0 (CH, C-6), 128.4 (CH, C-11), 130.4 (C_q, C-10), 174.4 (C_q, C-2), 208.5 (C_q, C-4).–

EIMS (70 eV, 200 °C): m/z (%) = 210 [M⁺] (7.2), 182 (8.9), 126 (13.2), 96 (33.5), 70 (100.0).–

HREIMS: ber.: 210.12559
 gef.: 210.12543

7 SYNTHESSEVORSCHRIFTEN UND PHYSIKALISCHE DATEN

7.1 Darstellung von 3-Methoxy-pent-2-ensäuremethylester



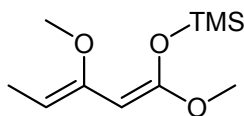
57

Eine Lösung von 3-Oxovaleriansäuremethylester (50.0 g, 0.38 mol) und Orthoameisensäuretrimethylester (40.8 g, 0.38 mol) in Methanol (50 mL) wird mit konz. H_2SO_4 (15 Tropfen) versetzt und 4 Tage gerührt. Anschließend wird der Ansatz 3 h unter Rückfluß erhitzt, Ameisensäuremethylester und Methanol werden abdestilliert und das zurückbleibende Rohprodukt wird im Vakuum fraktionierend destilliert. Der Enolether wird in Form einer farblosen Flüssigkeit erhalten (49.4 g, 0.34 mol, 90 %, Sdp. 119–122 °C/165 mbar).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 1.04 (t, $J_{5,4}$ = 7.5 Hz, 3 H, 5-H), 2.69 (q, $J_{4,5}$ = 7.5 Hz, 2 H, 4-H), 3.56 (s, 3 H, OCH_3), 3.59 (s, 3 H, OCH_3), 4.90 (s, 1 H, 2-H).–

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ = 12.0 (CH_3 , C-5), 25.7 (CH_2 , C-4), 50.8 (CH_3 , OCH_3), 55.6 (CH_3 , OCH_3), 89.7 (CH, C-2), 168.2 (C_q , C-3), 178.3 (C_q , C-1).–

7.2 Darstellung von (1,3-Dimethoxypenta-1,3-dienyloxy)-trimethylsilan



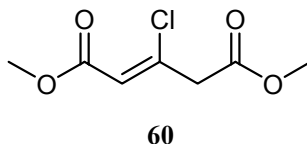
58

Zu einer auf –10 °C gekühlten Lösung aus Diisopropylamin (22 mL, 156 mmol) in trockenem THF (100 mL) wird unter Ar-Atmosphäre langsam *n*-Butyllithium-Lösung (62 mL, 156 mmol) getropft. Die Lösung wird 20 min bei dieser Temperatur gehalten. Anschließend wird auf –78 °C abgekühlt und tropfenweise mit 3-Methoxy-pent-2-ensäuremethylester (20 g, 139 mmol) in THF (20 mL) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei –78 °C gerührt und anschließend mit einer Lösung aus TMSCl (23 mL, 182 mmol) in THF (20 mL) versetzt. Nach 30 min wird das Gemisch auf RT erwärmt und das THF am Rotationsverdampfer größtenteils entfernt. Der Rückstand wird in Hexan aufgenommen, filtriert und erneut eingengt. Das Produkt wird als blaßgelbes Öl erhalten (28.6 g, 132 mmol, 95 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 0.26 (s, 12 H, TMS), 1.66 (d, $J_{5,4}$ = 6.9 Hz, 3 H, 5-H), 3.54 (s, 3 H, OCH_3), 3.59 (s, 3 H, OCH_3), 4.03 (s, 1 H, 2-H), 4.88 (q, $J_{4,5}$ = 6.9 Hz, 1 H, 4-H).–

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ = 0.7 (CH_3 , TMS), 10.7 (CH_3 , C-5), 55.3 (CH_3 , OCH_3), 57.8 (CH_3 , OCH_3), 74.7 (CH, C-2), 104.7 (CH, C-4), 151.8 (C_q , C-3), 158.2 (C_q , C-1).–

7.3 Darstellung von 3-Chlorpent-2-endisäuredimethylester

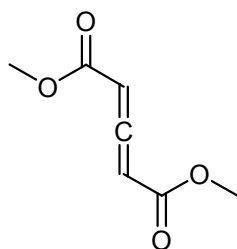


In einen trockenen 500 mL Dreihalskolben mit Stopfen, Gaseinlass und Trockenrohr wird 3-Oxopentandisäuredimethylester (60 g, 297 mmol) gegeben und unter stetiger Schutzgaszufuhr Phosphorpentachlorid (65 g, 313 mmol) in kleinen Portionen über einen Zeitraum von einer halben Stunde hinzugegeben. Nach beendeter Zugabe wird die Reaktionsmischung im Wasserbad für eine halbe Stunde auf 40 °C erwärmt, anschließend in einem Eisbad gekühlt, auf 100 g Eis gegeben und für 15 min gerührt. Nach Abtrennen der organischen Phase, wird die wäßrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert (je 100 mL) und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das erhaltene rote Öl wird in einem 500 mL Rundhalskolben mit trockenem Methanol (300 mL) und konzentrierter Schwefelsäure (20 mL) versetzt und für 18 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt und das erhaltene gelbe Öl auf Wasser (100 mL) gegeben und mit NaCl gesättigt. Die Mischung wird mit Ether extrahiert (8×100 mL) und die vereinigten organischen Phasen nacheinander mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung (150 mL) und NaCl-Lösung (150 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Destillation im Vakuum wird der Ester als farbloses Öl erhalten (24.3 g, 126 mmol, 43 %, Sdp.: 70–77 °C/0.9 mbar)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 3.74 (s, 3 H, OCH_3), 3.76 (s, 3 H, OCH_3), 4.12 (s, 2 H, 4-H), 6.28 (s, 1 H, 2-H).–

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ = 41.7 (CH_2 , C-4), 52.2 (CH_3 , OCH_3), 52.8 (CH_3 , OCH_3), 122.0 (CH, C-2), 147.5 (C_q , C-3), 165.0 (C_q , C-1), 168.7 (C_q , C-5).–

7.4 Darstellung von Penta-2,3-diendicarbonsäuredimethylester



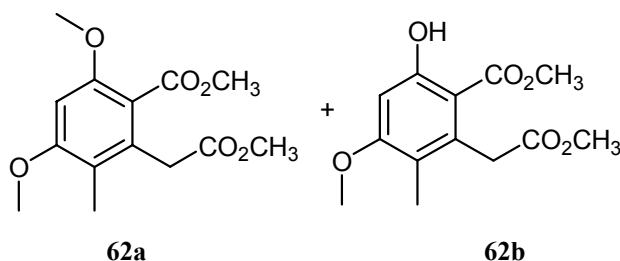
61

Zu einer Lösung von 3-Chlorpenta-2-endicarbonsäuredimethylester (24.3 g, 126 mmol) in trockenem THF (100 mL) wird unter Schutzgasatmosphäre bei 0 °C langsam Triethylamin (20 ml, 145 mmol) getropft. Das Reaktionsgemisch wird 18 Stunden bei 0–5 °C gerührt und anschließend der entstandene Feststoff durch eine Vakuumfiltration entfernt und mit Ether (3 × 75 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden mit HCl-Lösung (1 mol/L, 3 × 75 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (3 × 75 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Allen wird als gelbes, viskoses Öl erhalten (19.2 g, 123 mmol, 98 %).

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 3.78 (s, 6 H, 2 x OCH₃), 6.05 (s, 2 H, 2-H, 4-H).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ = 52.9 (CH₃, 2 C, 2 x OCH₃), 92.5 (CH, 2 C, C-2, C-4), 164.1 (C_q, 2 C, C-1, C-5), 220.1 (C_q, C-3).–

7.5 Darstellung von 4,6-Dimethoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-methylbenzoesäuremethylester und 6-Hydroxy-4-methoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-methylbenzoesäuremethylester



62a

62b

Bei 0 °C wird unter Rühren und Schutzgasatmosphäre (1,3-Dimethoxypenta-1,3-dienyloxy)-trimethylsilan (28.6 g, 132 mmol) zu dem vorgelegten Penta-2,3-diendicarbonsäuredimethylester (19.2 g, 123 mmol) gegeben. Das sich unter Reaktion dunkel verfärbende Gemisch wird 5 h bei 0–5 °C gerührt und anschließend unter Kühlung mit methanolischer

HCl (1.54 mmol/L) versetzt bis ein Farbumschlag nach gelborange eintritt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt chromatographisch gereinigt. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel (Hexan/Dichlormethan 1:1) werden die Substanzen 4,6-Dimethoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-methyl-benzoesäuremethylester (15.7 g, 55.6 mmol, 45 %, Smp.: 76 °C) und 6-Hydroxy-4-methoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-methyl-benzoesäure-methylester (4.2 g, 15.6 mmol, 13 %, Smp.: 63–64 °C) erhalten (Gesamtausbeute 58 %).

4,6-Dimethoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-methyl-benzoesäuremethylester (62a):

Summenformel: C₁₄H₁₈O₆.–

Molmasse: 282.29 g/mol.–

R_f-Wert: 0.86 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

UV (CH₂Cl₂): λ (log ε) = 289 (6.7).–

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3010, 2956, 2900, 2846, 1741, 1728, 1599, 1469, 1442, 1431, 1317, 1267, 1221, 1203, 1169, 1149, 1088, 991, 964, 945, 820.–

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2.08 (s, 3 H, 3-CH₃), 3.64 (s, 2 H, 2-CH₂), 3.65 (s, 3 H, OCH₃), 3.80 (s, 3 H, OCH₃), 3.82 (s, 3 H, OCH₃), 3.84 (s, 3 H, OCH₃), 6.41 (s, 1 H, 5-H).–

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 11.7 (CH₃, 3-CH₃), 36.0 (CH₂, 2-CH₂), 52.0 (CH₃, OCH₃), 52.1 (CH₃, OCH₃), 55.6 (CH₃, 4-OCH₃), 56.1 (CH₃, 6-OCH₃), 94.4 (CH, C-5), 116.4 (C_q, C-1), 118.5 (C_q, C-3), 132.4 (C_q, C-2), 156.1 (C_q, C-6), 159.5 (C_q, C-4), 168.5 (C_q, CO) 171.0 (C_q, CO).–

EIMS: *m/z* (%) = 282 (33.1), 250 (42.5), 222 (100.0), 207 (68.9).–

HREIMS: ber.: 282.11034

gef.: 282.11048

6-Hydroxy-4-methoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-methyl-benzoesäuremethylester (62b):

Summenformel: C₁₃H₁₆O₆.–

Molmasse: 268.26 g/mol.–

R_f -Wert: 0.88 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

UV (CH₂Cl₂): λ (log ϵ) = 311 (6.8), 272 (6.7).–

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3437, 3020, 2989, 2956, 2885, 1730, 1651, 1603, 1433, 1367, 1333, 1286, 1240, 1200, 1151, 1117, 1066, 1016, 982, 947, 837, 810, 775.–

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2.05 (s, 3 H, 3-CH₃), 3.66 (s, 3 H, OCH₃), 3.78 (s, 3 H, OCH₃), 3.82 (s, 3 H, OCH₃), 3.84 (s, 3 H, OCH₃), 3.90 (s, 2 H, 2-CH₂), 6.37 (s, 1 H, 5-H), 11.34 (s, 1 H, OH).–

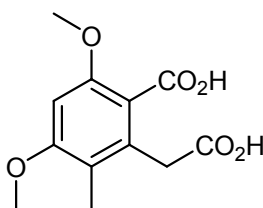
¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 11.7 (CH₃, 3-CH₃), 37.6 (CH₂, 2-CH₂), 52.1 (CH₃, 2 C, 2 \times OCH₃), 55.9 (CH₃, 4-OCH₃), 98.7 (CH, C-5), 105.5 (C_q, C-1), 119.6 (C_q, C-3), 135.6 (C_q, C-2), 163.0 (C_q, C-6), 163.4 (C_q, C-4), 171.6 (C_q, CO), 172.1 (C_q, CO).–

EIMS: m/z (%) = 268 (52.6), 236 (61.0), 208 (100.0), 193 (79.6), 165 (47.3).–

HREIMS: ber.: 268.09469

gef.: 268.09463

7.6 Darstellung von 2-(Carboxymethyl)-4,6-dimethoxy-3-methylbenzoesäure



63

Zu einer Lösung von 4,6-Dimethoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-methylbenzoesäuremethylester (10.0 g, 39 mmol) in Ethanol (100 mL) und Wasser (100 mL) wird KOH (8 g) gegeben und die Lösung 48 h unter Rückfluß erhitzt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle) wird das Reaktionsgemisch mit HCl (1 mol/L) angesäuert und das Ethanol im Vakuum entfernt. Die 2-(Carboxymethyl)-4,6-dimethoxy-3-methylbenzoesäure (9.1 g, 35.8 mmol, 91 %, Smp.: 200–201 °C) fällt als weißer Feststoff aus.

Summenformel: C₁₂H₁₄O₆.–

Molmasse: 254.24 g/mol.–

R_f-Wert: 0.05 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

UV (CH₃OH): λ (log ε) = 290 (6.6), 269 (6.3).–

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3419, 3105, 3020, 2956, 2850, 1716, 1693, 1595, 1469, 1437, 1321, 1290, 1236, 1159, 1119, 1090, 1012, 935, 833.–

¹H-NMR (CD₃OD, 200 MHz): δ = 2.12 (s, 3 H, 3-CH₃), 3.76 (s, 2 H, 2-CH₂), 3.88 (s, 3 H, OCH₃), 3.90 (s, 3 H, OCH₃), 6.63 (s, 1 H, 5-H).–

¹³C-NMR (CD₃OD, 50 MHz): δ = 10.3 (CH₃, 3-CH₃), 35.9 (CH₂, 2-CH₂), 55.3 (CH₃, OCH₃), 55.6 (CH₃, OCH₃), 94.6 (CH, C-5), 117.3 (C_q, C-1)*, 118.5 (C_q, C-3)*, 132.8 (C_q, C-2), 156.4 (C_q, C-6), 159.9 (C_q, C-4), 171.1 (C_q, COOH), 173.4 (C_q, COOH).–

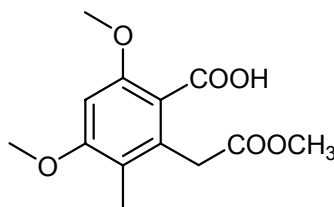
* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

EIMS: *m/z* (%) = 254 (32.8), 236 (100.0), 208 (64.7), 192 (89.4) 134 (77.5).–

HREIMS: ber.: 254.07904

gef.: 254.07886

7.7 Darstellung von 4,6-Dimethoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-methylbenzoesäure



64

Eine Lösung von 2-(Carboxymethyl)-4,6-dimethoxy-3-methylbenzoesäure (8.7 g, 34 mmol) in CH₂Cl₂ (140 mL) und Methanol (25 mL) wird mit *p*-Toluolsulfonsäure (20 mg) für 5 h unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Methanol (30 mL) aufgenommen und die Lösung 24 h unter Rückfluß erhitzt, um die Veresterung zu vervollständigen. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt

und der Rückstand durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt. Der Monoester (4.1 g, 15 mmol, 44 %, Smp.: 133–134 °C) wird als weißer Feststoff erhalten.

Summenformel: C₁₃H₁₆O₆.–

Molmasse: 268.26 g/mol.–

R_f-Wert: 0.55 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

UV (CH₂Cl₂): λ (log ε) = 295 (6.7), 268 (6.4).–

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3122, 3024, 2981, 2954, 2848, 2636, 2536, 1724, 1664, 1591, 1481, 1468, 1439, 1331, 1269, 1219, 1173, 1119, 1093, 1009, 933, 850, 822, 760, 739, 658.–

¹H-NMR (CD₃OD, 200 MHz): δ = 2.10 (s, 3 H, 3-CH₃), 3.69 (s, 3 H, OCH₃), 3.79 (s, 2 H, 2-CH₂), 3.88 (s, 3 H, OCH₃), 3.90 (s, 3 H, OCH₃), 6.64 (s, 1 H, 5-H).–

¹³C-NMR (CD₃OD, 50 MHz): δ = 10.4 (CH₃, 3-CH₃), 35.7 (CH₂, 2-CH₂), 51.5 (CH₃, OCH₃), 55.3 (CH₃, OCH₃), 55.6 (CH₃, OCH₃), 94.6 (CH, C-5), 117.5 (C_q, C-1)*, 118.4 (C_q, C-3)*, 132.4 (C_q, C-2), 156.3 (C_q, C-6), 159.9 (C_q, C-4), 171.1 (C_q, COOH), 172.1 (C_q, COOCH₃).–

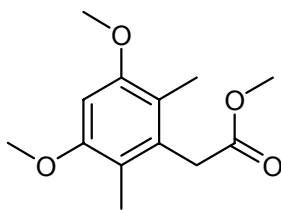
* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

EIMS: *m/z* (%) = 268 (89.8), 222 (100.0), 208 (98.3), 193 (67.5), 165 (37.6).–

HREIMS: ber.: 268.09469

gef.: 268.09483

7.8 Darstellung von 2-(3,5-dimethoxy-2,6-dimethylphenyl)-essigsäuremethylester



70

Zu einer Lösung von 4,6-Dimethoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-methylbenzoesäure (100 mg, 0.4 mmol) in THF (7 mL) wird unter Schutzgasatmosphäre bei 0 °C eine BH₃/THF-

Lösung (1 mol/L, 0.6 mL) langsam zugetropft und der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach beendeter Reaktion wird mit verdünnter HCl (2 mol/L) angesäuert und die wäßrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan gereinigt. Es resultierten 83 mg (0.35 mmol, 83 %, Smp.: 60–61 °C)

Summenformel: $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_4$.–

Molmasse: 238.28 g/mol.–

R_f -Wert: 0.90 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1).–

UV (CH_2Cl_2): λ (log ϵ) = 288 (6.6).–

IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 2999, 2958, 2933, 2831, 1730, 1601, 1491, 1471, 1435, 1306, 1236, 1200, 1151, 1105, 1018, 993, 804.–

^1H -NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 2.19 (s, 6 H, 2- CH_3 , 6- CH_3), 3.72 (s, 3 H, OCH_3), 3.77 (s, 2 H, 1- CH_2), 3.86 (s, 6 H, 3- OCH_3 , 5- OCH_3), 6.49 (s, 1 H, 4-H).–

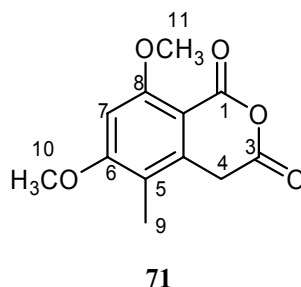
^{13}C -NMR (CDCl_3 , 50 MHz): δ = 12.0 (CH_3 , 2 C, 2- CH_3 , 6- CH_3), 36.0 (CH_2 , 1- CH_2), 52.3 (CH_3 , OCH_3), 56.3 (CH_3 , 3- OCH_3 , 5- OCH_3), 95.5 (CH, C-4), 118.2 (C_q , C-2, C-6), 133.9 (C_q , C-1), 156.5 (C_q , C-3, C-5), 172.2 (C_q , CO).–

EIMS: m/z (%) = 238 (67.6), 178 (43.7), 165 (100.0).–

HREIMS: ber.: 238.12051

gef.: 238.12091

7.9 Darstellung von 6,8-Dimethoxy-5-methyl-4*H*-isochromen-1,3-dion



Zu einer Suspension von 4,6-Dimethoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3-methylbenzoesäure (1 g, 3.9 mmol) in trockenem Aceton (30 mL) wird Acetylchlorid (20 g, 70 mmol) getropft. Die Reaktionsmischung wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wird mit Hexan gewaschen und anschließend aus Hexan/Dichlormethan (1:1) kristallisiert. Es resultieren 808 mg 6,8-Dimethoxy-5-methyl-4*H*-isochromen-1,3-dion (3.4 mmol, 87 %, Smp.: 215–217 °C) in Form eines weißen Feststoffs.

Summenformel: C₁₂H₁₂O₅.–

Molmasse: 236.22 g/mol.–

R_f-Wert: 0.83 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).–

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 2.10 (s, 3 H, 9-H), 3.93 (s, 2 H, 4-H), 3.99 (s, 3 H, 10-H)*, 4.03 (s, 3 H, 11-H)*, 6.50 (s, 1 H, 7-H).–

* Die Zuordnung der Signale ist vertauschbar.

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ = 10.9 (CH₃, C-9), 33.5 (CH₂, C-4), 56.3 (CH₃, C-10)*, 56.7 (CH₃, C-11)*, 94.6 (CH, C-7), 104.0 (C_q, C-8a), 116.1 (C_q, C-5), 135.9 (C_q, C-4a), 159.0 (C_q, C-1), 163.1 (C_q, C-6)**, 164.2 (C_q, C-8), 166.0 (C_q, C-3).–

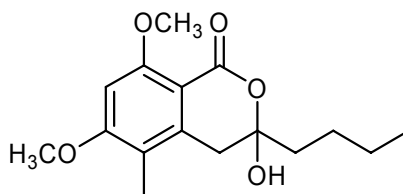
Die Zuordnung der mit * und ** gekennzeichneten Signale ist vertauschbar.

EIMS: *m/z* (%) = 236 (100.0), 192 (91.7), 134 (79.4).–

HREIMS: ber.: 236.06847

gef.: 236.06859

7.10 Versuche zur Darstellung von 3-Butyl-3,4-dihydro-3-hydroxy-6,8-dimethoxy-5-methylisochromen-1-on



72

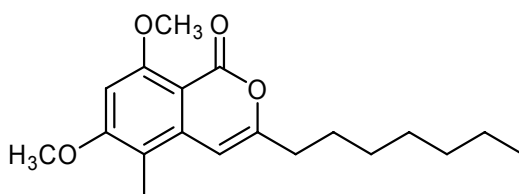
Versuch 1:

Zu einer Lösung von 6,8-Dimethoxy-5-methyl-4*H*-isochromen-1,3-dion (140 mg, 0.6 mmol) in trockenem THF wird unter Schutzgasatmosphäre bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ Butyllithium in Hexan (0.4 mL, 1.353 mol/L) getropft. Die Reaktionsmischung wird 2 h bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und dann langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 1 mol/L HCl angesäuert, mit Dichlormethan extrahiert und über MgSO_4 getrocknet. Es konnte kein Produkt isoliert werden.

Versuch 2:

Wasserfreies Cerchlorid (0.42 mmol, 103.5 mg) wird bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Rühren mit trockenem THF versetzt und für 18 h bei Raumtemperatur unter Schutzgas gerührt. Anschließend wird die Suspension auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt, n-Butyllithium (0.27 mL, 0.42 mmol) zugetropft und für 1.5 h gerührt. Nach Ablauf dieser Zeit wird eine Lösung von 6,8-Dimethoxy-5-methyl-4*H*-isochromen-1,3-dion (100 mg, 0.42 mmol) in THF (5 mL) zugetropft, erneut über Nacht gerührt und nach Beendigung der Reaktion wasserhaltiges NaSO_4 hinzugegeben und 1 h weitergerührt. Anschließend wird das Salz abfiltriert, mit Methanol gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es konnte kein Produkt isoliert werden.

7.11 Versuch zur Darstellung von 3-Heptyl-6,8-dimethoxy-5-methyl-1*H*-isochromen-1-on



74

Eine Mischung aus 2-(Carboxymethyl)-4,6-dimethoxy-3-methyl-benzoesäure (100 mg, 0.39 mmol) und Octanoylchlorid (256 mg, 0.27 ml, 1.6 mmol, 4 Äquiv.) wird unter Rühren für 4 h auf 200 °C erhitzt. Es konnte kein Produkt isoliert werden.

8 ABKÜRZUNGEN

Ac	Acetyl
CIMS	Chemische Ionisation Massenspektrometrie
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
CD ₃ OD	deuteriertes Methanol
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPFGSE	Double Pulsed Field Gradient Spin Echo
EIMS	Elektronenstoß-Ionisation Massenspektrometrie
ESIMS	Electron Spray Ionisation Mass Spectroscopy
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
H,H-COSY	Proton Correlation Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multibond Correlation
HSQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
Hz	Hertz
INADEQUATE	Incredible Natural Abundance Double Quantum Transition Experiment
MeOH	Methanol
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spektroskopie
ppm	parts per million
PSC	präparative Schichtchromatographie
RP	Reversed Phase
rpm	rotations per minute
SC	Säulenchromatographie
THF	Tetrahydrofuran
TMSCl	Trimethylsilylchlorid

9 LITERATUR

- [1] Schwantes, H. O.; *Biologie der Pilze*, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, **1996**, S. 10 ff.
- [2] Bugni, T. S.; Ireland, C. M.; *Nat. Prod. Rep.*, **2004**, *21*, 143–163.
- [3] Schwantes, H. O.; *Biologie der Pilze*, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, **1996**, S. 300–301.
- [4] Schwantes, H. O.; *Biologie der Pilze*, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, **1996**, S. 106–137.
- [5] Boyle, C.; Götz, M.; Dammann-Tugend, U.; Schulz, B.; *Symbiosis*, **2001**, *31*, 259–281.
- [6] Azevedo, J. L.; Maccheroni Jr., W.; Pereira, J. O.; Luiz de Araújo, W.; *Electr. J. Biotech.*, **2000**, *3*, 40–65.
- [7] Bush, L. P.; Wilkinson, H. H.; Schardl, C. L.; *Plant Physiol.*, **1997**, *114*, 1–7.
- [8] Brunner, R.; Stuetz, P. L.; Tschertter, H.; Stadler, P. A.; *Can. J. Chem.*, **1979**, *57*, 1638–1641.
- [9] Mantle, P. G.; Weedon, C. M.; *Phytochemistry*, **1994**, *36*, 1209–1217.
- [10] Siegel, M. R.; Bush, L. P.; *Recent Adv. Phytochem.*, **1996**, *30*, 81–120.
- [11] Strickland, J. R.; Bailey, E. M.; Abney, L. K.; Oliver, J. W.; *J. Animal Sci.*, **1996**, *74*, 1664–1671.
- [12] Lu, H.; Zou, W. X.; Meng, J. C.; Hu, J.; Tan, R. X.; *Plant Science*, **2000**, *151*, 67–73.
- [13] Gasoni, L.; De Gurfinkel, B. S.; *Mycol. Res.*, **1997**, *101*, 867–870.
- [14] Li, J. Y.; Strobel, G.; Harper, J.; Lobkovsky, E.; Clardy, J.; *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 767–770.
- [15] Strobel, G. A.; Miller, R. V.; Martinez-Miller, C.; Condron, M. M.; Teplow, D. B.; Hess, W. M.; *Microbiology*, **1999**, *145*, 1919–1926.
- [16] Calhoun, L. A.; Findlay, J. A.; Miller, J. D.; Whitney, N. J.; *Mycol. Res.*, **1992**, *96*, 281–286.
- [17] Strobel, G. A.; *Microbes and Infection*, **2003**, *5*, 535–544.
- [18] Takahashi, C.; Takai, Y.; Kimura, Y.; Numata, A.; Shigematsu, N.; Tanaka, H.; *Phytochemistry*, **1995**, *38*, 155–158.
- [19] Takahashi, C.; Numata, A.; Ito, Y.; Matsumura, E.; Araki, H.; Iwaki, H.; Kushida, K.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1994**, 1859–1864.
- [20] Isaka, M.; Suyarnsestakorn, C.; Tanticharoen, M.; Kongsaree, P.; Thebtaranonth, Y.; *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 1561–1566.
- [21] Wani, M. C.; Taylor, H. C.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 2325–2327.
- [22] Lobert, S.; Vulevic, B.; Correia, J. J.; *Biochemistry*, **1996**, *35*, 6806–6814.
- [23] Ojima, I.; Habus, I.; Zhao, M.; George, G. I.; Jayasinghe, L. R.; *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 1681–1683.
- [24] Stowe, B. B.; Yamaki, T.; *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **1957**, *8*, 181–216.
- [25] Lang, A.; *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **1970**, *21*, 537–570.
- [26] Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D.; Grothaus, P.; Bignami, G.; *J. Nat. Prod.*, **1995**, *58*, 1315–1324.
- [27] Müller, U.; *Pure Appl. Chem.*, **2002**, *74*, 2241–2246.
- [28] Denkow, W.; *Gifte der Natur*, Weltbild Verlag, Augsburg, **2004**, S. 160–162.
- [29] Silberstein, S. D.; McCrory, D. C.; *Headache*, **2003**, *37*, 144–166.
- [30] Greenhalgh, R.; Hanson, A. W.; Miller, J. D.; Taylor, A.; *J. Agric. Food Chem.*, **1984**, *32*, 945–948.
- [31] Warrior, P.; *Pest Manag. Sci.*, **2000**, *56*, 681–687.

- [32] Veröffentlicht in BGBl. I, **1998**, 971, berichtigt am 18. Juni 1998, BGBl. I, **1998**, 1527 und am 27. November 1998, BGBl. I, **1998**, 3512.
- [33] Wheeler, W. B., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 4151–4155.
- [34] Kiflom, W. G.; Wandiga, S. O.; Namau, G. N., *Pure Appl. Chem.*, **2001**, 73, 1907–1916.
- [35] Sleicher, C. A.; Hopcraft, T. J., *Environ. Sci. Technol.*, **1984**, 18, 514–518.
- [36] Stetter, J.; Lieb, F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 1724–1744.
- [37] Tan, R. X.; Zou, W. X., *Nat. Prod. Rep.*, **2001**, 18, 448–459.
- [38] Anke, T.; Oberwinkler, F.; Steglich, W.; Schramm, G., *J. Antibiot.*, **1977**, 30, 806–810.
- [39] Sauter, H.; Steglich, W.; Anke, T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 1328–1349.
- [40] Yamamoto, I., *Reviews in Toxicology*, 1998, 2, 61–69.
- [41] Burg, R. W.; Miller, B. M.; Baker, E. E.; Birnbaum, J.; Currie, S. A.; Hartman, R.; Kong, Y.-L.; Monaghan, R. L.; Olson, G., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1979, 15, 361–367.
- [42] Hawksworth, D. C.; Rossman, A. Y., *Phytophath.*, 1987, 87, 888–891.
- [43] Closse, A.; Mauli, R.; Sigg, H. P., *Helv. Chim. Acta*, **1966**, 49, 204–213.
- [44] Arie, T.; Kobayashi, Y.; Kono, Y.; Gen, O.; Yamaguchi, I., *Pestic. Sci.*, **1999**, 55, 602–604.
- [45] Corey, E. J.; Hopkins, P. B.; Munroe, J. E.; Marfat, A.; Hashimoto, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 7987–7988.
- [46] Kelly, T. R.; Chandrakumar, N. S.; Walters, N.; Blancaflor, J., *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 3573–3574.
- [47] Yang, Y.-C.; Lim, M.-Y.; Lee, H.-S., *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 7629–7631.
- [48] Ng, T. B.; Liu, F.; Lu, Y.; Cheng, C. H. K.; Wang, Z., *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, **2003**, 136C, 109–115.
- [49] De Alvarenga, M. A.; Braz Fo, R.; Gottlieb, O. R.; De P. Dias, J. P.; Magalhaes, A. F.; Magalhaes, E. G.; De Magalhaes, G. C.; Magalhaes, M. T.; Maia, J. G. S., *Phytochemistry*, **1978**, 17, 511–516.
- [50] Venkatasubbaiah, P.; Chilton, W. S., *J. Nat. Prod.*, **1990**, 53, 1628–1630.
- [51] Paquette, L. A.; Lanter, J. C.; Johnston, J. N., *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 1702–1712.
- [52] Le Ménez, P.; Fargeas, V.; Berque, I.; Poisson, J.; Ardisson, J., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 3592–3599.
- [53] Fukushima, T.; Tanaka, M.; Gohbara, M.; Fujimori, T., *Phytochemistry*, **1998**, 48, 625–630.
- [54] Evans, R. H. Jr.; Ellestad, G. A.; Kunstmann, M. P., *Tetrahedron Lett.*, **1969**, 10, 1791–1794.
- [55] Fava, L.; Bottoni, B.; Crobe, A.; Caracciolo, A. B.; Funari, E., *Pest Manag. Sci.*, **2001**, 57, 1135–1141.
- [56] Woodham, D. W.; Edwards, R. R.; Reeves, R. G.; Schutzmann, R. L., *J. Agric. Food Chem.*, **1973**, 21, 303–307.
- [57] Khambay, B. P. S.; Bourne, J. M.; Cameron, S.; Kerry, B. R.; Zaki, M. J., *Pest Manag. Sci.*, **2000**, 56, 1098–1099.
- [58] Guiraud, P.; Steiman, R.; Seigle-Murandi, F.; Bartoli, M. H., *Pharmazie*, **1994**, 49, 279–281.
- [59] Snatzke, G., *Angew. Chem.*, **1968**, 80, 15–26.
- [60] Hesse, M.; Meier, H.; Zeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 6. Aufl., Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, **2002**, S. 24–29.
- [61] BDZDO/MCDSPD Program Paket Version Z-07A von J. W. Downing, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, USA; modifiziert von J. Fleischauer, W. Schlecker und B. Kramer; und DZDO Programm Version 4.23, ZDO Programm Version of 22.06.2001

- [62] Elsässer, B., *Dissertation*, Universität Paderborn, **2004**.
- [63] Krohn, K.; Bahramsari, R.; Flörke, U.; Ludewig, K.; Kliche-Spory, C.; Michel, A.; Aust, H.-J.; Draeger, S.; Schulz, B.; Antus, S., *Phytochemistry*, **1997**, *45*, 313–320.
- [64] Antus, S.; Snatzke, G.; Steinke, I., *Liebigs Ann. Chem.*, **1983**, 2247–2261.
- [65] Huffman, J. W.; Swain, W. E.; Jacobus, J.; McPhail, A. T., *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*, 3088–3096.
- [66] Zhabinskii, V. N.; Minnaard, A. J.; Wijnberg, J. B. P. A.; de Groot, A., *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 4022–4027.
- [67] Asakawa, Y.; Tori, M.; Masuya, T.; Frahm, J. P., *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 1577–1584.
- [68] Assante, G.; Locci, R.; Camarda, L.; Merlini, L.; Nasini, G., *Phytochemistry*, **1977**, *16*, 243–247.
- [69] Cole, R. J.; Moore, J. H.; Davis, N. D.; Kirksey, J. W.; Diener, U. L., *J. Agric. Food Chem.*, **1971**, *19*, 909–911.
- [70] Höller, U.; König, G. M.; Wright, A. D., *J. Nat. Prod.*, **1999**, *62*, 114–118.
- [71] Toshima, H.; Watanabe, A.; Sato, H.; Ichihara, A., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 9223–9226.
- [72] Tertzakian, G.; Haskins, R. H.; Slater, G. P.; Nesbitt, L. R., *Proc. Chem. Soc.*, **1964**, June, 195–196.
- [73] Matsumoto, M.; Minato, H.; Kondo, E.; Mitsugi, T.; Katagiri, K., *J. Antibiot.*, **1975**, *28*, 602–604.
- [74] Moscovitz, A., *Tetrahedron*, **1961**, *13*, 48–56.
- [75] Moscovitz, A.; Mislow, K.; Glass, M. A. W.; Djerassi, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, *84*, 1945–1955.
- [76] Lightner, D. A.; Gurst, J. E., *Organic Conformational Analysis and Stereochemistry from Circular Dichroism Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, **2000**, S. 415–418.
- [77] Snatzke, G., *Angew. Chem.*, **1979**, *91*, 380–393.
- [78] Tanahashi, T.; Kuroishi, M.; Kuwahara, A.; Nagakura, N.; Hamada, N., *Chemical & Pharmaceutical Bull.*, **1997**, *45*, 1183–1185.
- [79] Oh, H.; Swenson, D. C.; Gloer, J. B.; Shearer, C. A., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 975–977.
- [80] Blay, G.; Cardona, L.; García, B.; Lahoz, L.; Pedro, J. R., *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 2145–2151.
- [81] Claridge, T. D. W., *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo, **1999**, S. 320–321, 355–356.
- [82] Oh, H.; Swenson, D. C.; Gloer, J. B.; Shearer, C. A., *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 73–79.
- [83] Bhaskar, V. K.; Duggan, P. J.; Humphrey, D. G.; Krippner, G. Y.; McCarl, V.; Offermann, D., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **2001**, 1098–1102.
- [84] Wuest, H. H.; Bardenhagen, J.; Schoellkopf, U., *Liebigs Ann. Chem.*, **1985**, *9*, 1825–1837.
- [85] Mella, M.; Fagnoni, M.; Albin, A., *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 555–561.
- [86] Manker, D. C.; Rosendahl, C. N.; Heide, M.; Bachmann, T. L.; Nielsen, R. I., *U.S.*, **1996**, 10 pp. Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 901,369, abandoned.
- [87] Sasaki, T.; Takagi, M.; Yaguchi, M.; Nishiyama, K.; Yaguchi, T.; Koyama, M., *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, **1992**, 6 pp.
- [88] Howard, B. M.; Clarkson, K.; Bernstein, R. L., *Tetrahedron Lett.*, **1979**, *20*, 4449–4452.
- [89] Carey, S. T.; Nair, M. S. R., *J. Nat. Prod.*, **1979**, *42*, 231.
- [90] Waksman, S. A.; Horning, E. S.; Spencer, E. L., *J. Bact.*, **1943**, *45*, 233–248.
- [91] Cram, D. J.; Allinger, N. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, *78*, 5275–5284.

-
- [92] Anke, H.; Stadler, M.; Mayer, A.; Sterner, O., *Can. J. of Botany*, **1995**, *73*, 932–939.
- [93] Krohn, K.; Michel, A.; Flörke, U.; Aust, H.-J.; Draeger, S.; Schulz, B., *Liebigs Ann. Chem.*, **1994**, *11*, 1099–1108.
- [94] Allport, D. C.; Bu'Lock, J. D., *J. Chem. Soc. Abstracts*, **1960**, 654–662.
- [95] Gray, L. E.; Gardner, H. W.; Weisleder, D.; Leib, M., *Phytochemistry*, **1999**, *50*, 1337–1340.
- [96] Poch, G. K.; Gloer, J. B., *J. Nat. Prod.*, **1989**, *52*, 257–260.
- [97] Bryson, T. A.; Dolak, T. M., *Org. Synth.*, **1977**, *57*, 62–65.
- [98] Brynes, S. D.; Fedor, L. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 7016–7019.
- [99] Midland, M. M.; Koops, R. W., *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 5058–5065.
- [100] Roush, W. R.; Murphy, M., *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 6622–6629.
- [101] Vitz, J., *Dissertation*, Universität Paderborn, **2004**.
- [102] Tamura, Y.; Fukata, F.; Sasho, M.; Teruhisa, T.; Kita, Y., *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 2273–2277.
- [103] Mudryk, B.; Shook, C. A.; Cohen, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 6389–6391.
- [104] Imamoto, T.; Takiyama, N.; Nakamura, K.; Hatajima, T.; Kamiya, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 4392–4398.
- [105] Saeed, A., *Helv. Chim. Acta*, **2003**, *86*, 377–383.
- [106] Nozawa, K. K.; Yamada, M.; Tsuda, Y.; Kawai, K. I.; Nakajima, S., *Chem. Pharm. Bull.*, **1981**, *29*, 2491–2495.
- [107] Nozawa, K. K.; Yamada, M.; Tsuda, Y.; Kawai, K. I.; Nakajima, S., *Chem. Pharm. Bull.*, **1981**, *29*, 3486–3493.