

**Chemisches Screening von
ausgewählten Actinomyceten
sowie
Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus
Micromonospora sp. und Pflanzen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Karsten Ströch
aus Leverkusen

Göttingen 2003

D7

Referent: Prof. Dr. A. Zeeck

Korreferent: Prof. Dr. L. F. Tietze

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2004

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen in der Zeit von August 2000 bis Dezember 2003 unter Anleitung von Prof. Dr. A. Zeeck durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. A. Zeeck danke ich für die interessante Aufgabenstellung, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für viele wertvolle Diskussionen und Anregungen.

Inhaltsverzeichnis

A. THEORETISCHER TEIL

I. Einleitung	1
1. Pflanzen in der Wirkstoffsuche	1
2. Pharmazeutika aus Mikroorganismen	6
3. Zur Bedeutung von Naturstoffen in der Pharmaforschung	11
4. Aufgabenstellung	13
II. Sekundärmetaboliten aus Actinomyceten der Kilimanjaro-Region	14
1. Die Kilimanjaro-Stämme (K-Stämme)	14
1.1. Allgemeines	14
1.2. Chemisches Screening der K-Stämme	15
1.3. LC-MS-Screening von Rohextrakten der K-Stämme	16
2. <i>Actinomyces</i> sp. Stamm K 8/1	17
2.1. Ferroverdin A (15)	17
3. <i>Actinomyces</i> sp. Stamm K 8/5	18
3.1. <i>O</i> -Acetylgabosine E (16 – 18)	18
3.2. Die Gruppe der Gabosine und Carbazucker	21
4. <i>Actinomyces</i> sp. Stamm K 10/11	24
4.1. Streptazolin (33)	24
4.2. Obscurolid A3 (34)	25
4.3. Chartreusin (35)	25
5. <i>Actinomyces</i> sp. Stamm K 17/2	26
5.1. 2-Aminobenzoyl- α -L-rhamnopyranosid (36)	26
6. <i>Actinomyces</i> sp. Stamm K 17/7	27
6.1. Teleocidin A-2 (37)	28
6.2. 14- <i>O</i> -Acetylteleocidin A-2 (38)	29
6.3. Teleocidin B-3 (39)	31
6.4. 14- <i>O</i> -Acetylteleocidin B-3 (40)	33
6.5. Die Gruppe der Teleocidine	34

7. <i>Actinomyces</i> sp. Stamm K 17/9	38
7.1. Isocoumarine	40
7.1.1. Reticulol (52)	40
7.1.2. 6- <i>O</i> -Methylreticulol (53)	41
7.1.3. 8- <i>O</i> -Methylreticulol (54)	41
7.1.4. 9-Hydroxyreticulol (55)	41
7.2. Diketopiperazine	42
7.2.1. XR330 (56)	42
7.2.2. XR334 (57)	42
7.3. Benzoxazole	43
7.3.1. Antibiotikum UK-1 (58)	43
7.3.2. Demethyl-UK-1 (59)	44
7.3.3. Vermutete Biosynthese der Benzoxazole	44
7.4. Piericidine	45
7.4.1. Piericidin A ₁ (63)	45
7.4.2. IT-143-B (64)	46
7.4.3. 4'-Demethoxy-IT-143-B (65)	47
7.4.4. Die Gruppe der Piericidine	47
7.5. Echinosporeine	49
7.5.1. Echinosporein (75)	49
7.5.2. 7-Desoxyechinosporein (76)	49
7.5.3. Die Biosynthese der Echinosporeine	50
7.6. Benzisoxamid (78)	51
7.6.1. Strukturaufklärung	51
7.6.2. Hypothetische Biosynthese	56
7.7. Zugabe des Enzyminhibitors Glyphosat	57
7.8. Beurteilung der Biosyntheseleistung	59
8. Zur biologischen Aktivität der Metaboliten	60
9. Bewertung des LC-MS-Screenings im Vergleich zum chemischen Screening	60
10. Ausblick	62

III. Charakterisierung von Metaboliten aus	
<i>Micromonospora</i> sp. Tü 6368	63
1. Stammherkunft und taxonomische Bestimmung	63
2. HPLC-DAD-Screening, Produktionsoptimierung und Isolierung	63
3. Strukturaufklärung	65
3.1. Lumichrome	65
3.1.1. 1-Methyllumichrom (87)	65
3.1.2. Lumichrom (88)	66
3.1.3. 1-(α -Ribofuranosyl)-lumichrom (89)	66
3.2. Rabelomycine	69
3.2.1. Dehydrorabelomycin (90)	69
3.2.2. Rabelomycin (91)	69
3.2.3. 3-Desoxyrabelomycin (92)	70
3.3. Galtamycinon (93)	70
3.4. Metabolit 6368J (97)	71
3.5. Metabolit 6368C2 (100)	77
3.6. Metabolit 6368A2 (103)	80
4. Zur biologischen Aktivität der Metaboliten	82
5. Beurteilung der Biosyntheseleistung	82
6. Die Gruppe der Angucycline/Angucyclinone	83
7. Erste Biosyntheseuntersuchungen zum Metaboliten 6368A2 (103) und Ausblick	87
IV. Charakterisierung von Pflanzenmetaboliten	88
1. Metaboliten aus <i>Centranthus longiflorus</i> ssp. <i>longiflorus</i> (Valerianaceae)	88
1.1. Allgemeines	88
1.2. Pflanzenmaterial und Isolierung	88
1.3. Strukturaufklärung	89
1.3.1. Bekannte Phenylpropanoide (117 – 118)	89
1.3.2. Bekannte Iridoide (120 – 122)	90
1.3.3. 4'-Desoxykanokosid A (123)	91
1.3.4. 4'-Desoxykanokosid C (124)	92
1.4. Cytotoxizitätsuntersuchungen	93

2. Metaboliten aus <i>Vitex agnus-castus</i> L. (Verbenaceae)	94
2.1. Allgemeines	94
2.2. Pflanzenmaterial und Isolierung	94
2.3. Strukturaufklärung	95
2.3.1. Bekannte Flavonoide (125 – 128)	95
2.3.2. Myzodendron (129)	96
2.3.3. Bekannte Iridoide (130 – 133)	97
2.3.4. Agnucastosid A (134)	99
2.3.5. Agnucastosid B (135)	100
2.3.6. Agnucastosid C (136)	101
2.4. Zur biologischen Aktivität der Metaboliten	102
3. Metaboliten aus <i>Galium verum</i> ssp. <i>verum</i> (Rubiaceae)	103
3.1. Allgemeines	103
3.2. Pflanzenmaterial und Isolierung	103
3.3. Strukturaufklärung	103
3.3.1. Bekannte Flavonoide (137, 138)	103
3.3.2. Bekannte Iridoide (139 – 145)	105
3.4. Zur biologischen Aktivität der Metaboliten	108
4. Diskussion	108

V. Zusammenfassung der Ergebnisse **109**

1. Sekundärmetaboliten aus Actinomyceten der Kilimanjaro-Region	109
2. Sekundärmetaboliten aus <i>Micromonospora</i> sp. Tü 6368	111
3. Sekundärmetaboliten aus Pflanzen	112

B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Allgemeines **114**

1. Instrumentelle Analytik	114
2. Chromatographische Methoden	115
3. Mikrobiologische Methoden	117
4. Allgemeine Arbeitsvorschriften	118

II. Arbeiten an Actinomyceten aus der Kilimanjaro-Region	119
1. Stammhaltung	119
1.1. Agarplatten	119
1.2. Langzeitkonservierung	119
2. Durchführung des chemischen Screenings	119
3. <i>Actinomyces</i> sp. Stamm K 8/1	120
3.1. Kultivierung und Aufarbeitung	120
3.2. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten	120
4. <i>Actinomyces</i> sp. Stamm K 8/5	121
4.1. Kultivierung und Aufarbeitung	121
4.2. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten	121
5. <i>Actinomyces</i> sp. Stamm K 10/11	123
5.1. Kultivierung und Aufarbeitung	123
5.2. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten	123
6. <i>Actinomyces</i> sp. Stamm K 17/2	125
6.1. Kultivierung und Aufarbeitung	125
6.2. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten	125
7. <i>Actinomyces</i> sp. Stamm K 17/7	127
7.1. Vorkulturen	127
7.2. Variation der Hauptkultur	127
7.3. Standardaufarbeitung von Fermentationsansätzen	127
7.4. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten	128
8. <i>Actinomyces</i> sp. Stamm K 17/9	133
8.1. Vorkulturen	133
8.2. Variation der Hauptkultur	133
8.3. Standardaufarbeitung von Fermentationsansätzen	134
8.4. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten	134
8.5. Zugabe von Glyphosat	147

III. Charakterisierung der Metaboliten aus	
<i>Micromonospora</i> sp. Tü 6368	148
IV. Charakterisierung der Pflanzenmetaboliten	157
1. <i>Centranthus longiflorus</i> ssp. <i>longiflorus</i> (Valerianaceae)	157
2. <i>Vitex agnus-castus</i> L. (Verbenaceae)	162
3. <i>Galium verum</i> ssp. <i>verum</i> (Rubiaceae)	171
C. LITERATURVERZEICHNIS	178

A. THEORETISCHER TEIL

I. Einleitung

1. Pflanzen in der Wirkstoffsuche

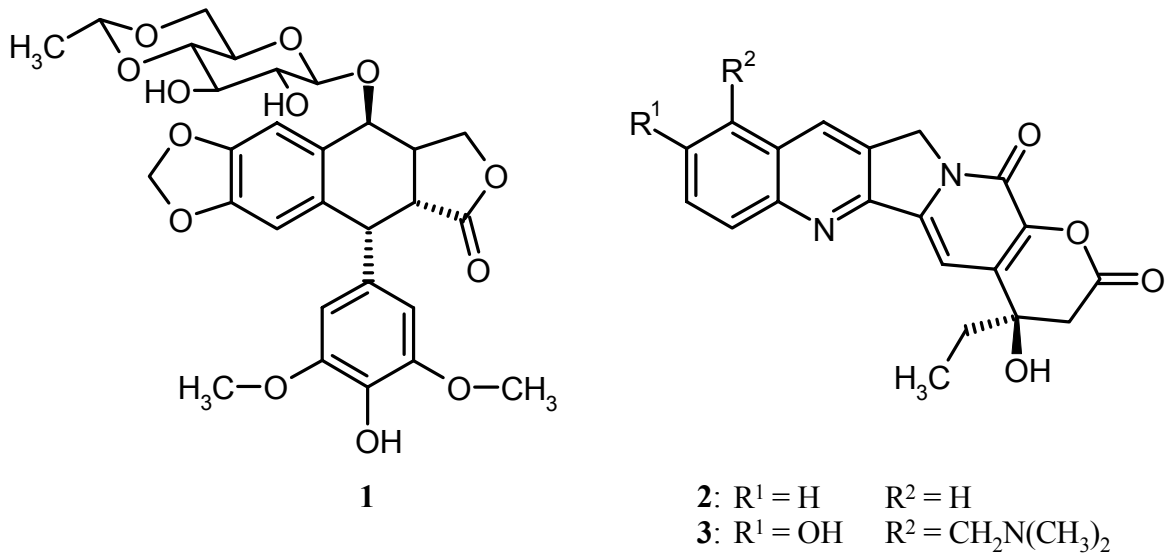
Die Menschheit hat sich für die Erfüllung ihrer Grundbedürfnisse schon immer auf die Natur verlassen, sei es für die Produktion von Nahrungsmitteln, Behausungen, Kleidung, Transportmitteln, Dünger oder Arzneimitteln. Pflanzen haben dabei die Basis für hoch entwickelte traditionelle medizinische Systeme gebildet, die seit mehreren tausend Jahren existieren. Eines der umfangreichsten existiert in China, wo versucht wird, die moderne Medizin mit der traditionellen Medizin zu verbinden.¹ In China gibt es fast 13000 verschiedene Arten von traditionellen Medikamenten, von denen ca. 11000 aus Pflanzen erhalten werden. 1000 dieser medizinischen Pflanzen wurden in dem Zeitraum von 1978 bis 2000 phytochemisch untersucht. Insgesamt konnten ca. 10000 Substanzen isoliert werden, von denen 1300 in der Literatur nicht beschrieben waren.²

Traditionelle medizinische Systeme spielen auch heutzutage eine sehr große Rolle im Gesundheitswesen. Die World Health Organization (WHO) schätzt, dass 80 % der Weltbevölkerung hauptsächlich auf traditionelle Medikamente vertrauen.³ Pflanzeninhaltsstoffe spielen aber auch bei den verbleibenden 20 % der Bevölkerung eine große Rolle. Eine Untersuchung für den Zeitraum von 1959 – 1980 in den USA und Kanada zeigte, dass ca. 25 % der verschreibungspflichtigen Medikamente bioaktive Substanzen enthalten, die aus Pflanzen stammen oder Derivate von Pflanzeninhaltsstoffen sind.⁴ Es werden mindestens 119 Sekundärmetaboliten aus Pflanzen als Medikamente verwendet, 75 % davon haben ähnliche oder identische Anwendung wie die Pflanze in der Volksmedizin, aus der sie isoliert wurden, z.B. Chinin (Behandlung von Malaria), Digitalis (Herzstimulans) und Morphin (Analgetikum).⁵ Diese 119 Sekundärmetaboliten werden hauptsächlich aus 90 Pflanzenarten gewonnen, bei über 250000 bekannten Arten von höheren Pflanzen, von denen erst ein kleiner Prozentsatz systematisch untersucht worden ist.⁶ Diese Zahlen zeigen das ungeheure Potential von Pflanzen auch für die heutige moderne Medizin. Die traditionellen medizinischen Systeme oder Volksmedizinen haben auf viele Medikamente hingewiesen, die heute genutzt werden, und sind gute Indikatoren für bioaktive Substanzen. Dieses Wissen wird bei der Ethnobotanik (Studium der Pflanzen, die von Menschen für Nahrung, Behausungen, Arzneimittel usw. genutzt werden) bzw. Ethnomedizin (Studium der Pflanzen, die von

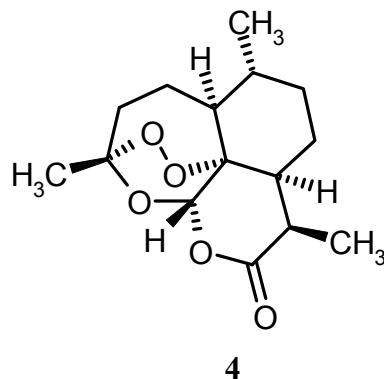
Menschen als Arzneimittel genutzt werden) berücksichtigt. Bei diesen Wissenschaften wird gezielt nach Pflanzen gesucht, die für Menschen eine heilende Wirkung besitzen. Hierbei wird das Wissen von einheimischen Heilern, Schamanen oder Medizinmännern genutzt, um Pflanzen zu sammeln und diese auf ihre biologische Wirksamkeit zu untersuchen. Geschichtlich gesehen haben ethnobotanische Hinweise zu drei verschiedenen Typen von Medikamenten geführt: 1. unmodifizierte Substanzen, bei denen die ethnomedizinische Nutzung auf eine klinische Wirksamkeit hindeuteten (z.B. Digitalis), 2. unmodifizierte Substanzen, bei denen die therapeutische Wirkung nur ansatzweise bekannt war (z.B. Vincristin, Vinblastin) und 3. modifizierte natürliche oder synthetische Produkte, die auf einem Naturstoff beruhen und in der Volksmedizin genutzt wurden (z.B. Aspirin[®]).⁴ Von dem ethnobotanischen Ansatz unterscheidet sich der so genannte Zufallsansatz, bei dem die Untersuchung einer möglichst großen Diversität von Pflanzen angestrebt wird. Die ethnobotanische Betrachtung ist für Krankheiten sinnvoll, die für die einheimischen Heiler ersichtlich sind, wie z.B. Hepatitis, Diarrhö, Wunden, Haut- und Pilzinfektionen usw., also von außen erkennbar sind. Für Krebs hingegen gibt es in den meisten Kulturen gar keinen Ausdruck bzw. der Begriff steht für andere Krankheitsbilder, z.B. als Synonym für schwere, schlecht heilende, oftmals chronische offene Wunden und nicht für langsam wachsende Tumore in inneren Organen. Das gleiche gilt für kardiovaskuläre Krankheiten. Krebs und kardiovaskuläre Krankheiten treten aufgrund der hohen Lebenserwartungen der Menschen hauptsächlich in den Industrienationen auf. Eingeborenenstämme, z.B. im tropischen Regenwald, sind aufgrund ihrer geringeren Lebenserwartung von diesen Krankheiten meistens nicht betroffen. Die Bedeutung dieser Krankheiten in den Industrienationen ist auch an den Forschungsausgaben der pharmazeutischen Industrie zu erkennen, die zu einem großen Prozentsatz für die Erforschung von Krebstherapeutika und kardiovaskuläre Krankheiten investiert werden.⁴

Bei der Suche nach Krebsmedikamenten aus Pflanzen zeigt sich kein Unterschied zwischen dem Zufallsansatz und der ethnobotanischen Betrachtung.⁷ Durch die ethnobotanische Betrachtung konnten die Vinca-Alkaloide Vinblastin und Vincristin aus *Catharanthus roseus*, die ethnomedizinisch zur Behandlung von Diabetes eingesetzt wurden, und das Podophylloxin aus *Podophyllum peltatum*, das eine ethnomedizinische Verwendung bei Hautkrebs und Warzen hat, isoliert werden. Vinblastin und Vincristin sowie die semisynthetischen Derivate Etoposid (**1**) und Teniposid des Podophyllotoxins sind heute in der klinischen Anwendung.⁸ Dem Zufallsansatz folgend konnten das Paclitaxel (Taxol[®]) aus *Taxus brevifolia*, Camptothecin (**2**) aus *Camptotheca acuminata* und Homoharringtonin aus

Cephalotaxus harringtonia ssp. *drupacea* isoliert werden.⁷ Taxol[®] sowie die semisynthetischen Derivate von **2**, das Topotecan (**3**) und Irinotecan, sind ebenfalls in der klinischen Anwendung.⁸

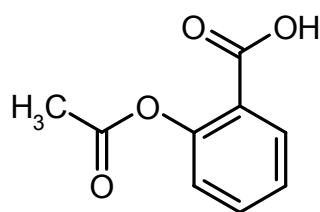


Anders verhält es sich bei Pflanzen, die eine ethnomedizinische Verwendung besitzen. Eine Studie in Brasilien zeigte z.B. für Malariamittel eine Trefferquote von 0.07 % für den Zufallsansatz und 18 % für den ethnomedizinischen Ansatz.⁹ Dies zeigt sich z.B. auch in der Isolierung von Artemisinin (**4**) 1972 aus dem Kraut *Artemisia annua* L. (Asteraceae).¹⁰ Es wird in der traditionellen chinesischen Medizin als Malariamittel und Antipyretikum eingesetzt. Artemisinin zeichnete sich in klinischen Studien durch hohe Wirksamkeit gegen Malaria aus, die durch *Plasmodium falciparum* verursacht wird, ohne dabei ersichtliche Nebenwirkungen zu zeigen. Selbst gegen Chloroquin-resistente Erreger war es aktiv. Seit 1987 wird es für die klinische Behandlung von Malaria eingesetzt.

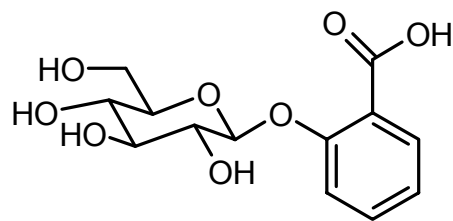


Der ethnobotanische bzw. ethnomedizinische Ansatz ist jedoch nicht neu, sondern erlebt seit ca. 1980 eine Renaissance. Zahlreiche ethnobotanische Studien mit dem Ziel neuer pharmazeutischer Produkte wurden in den letzten Jahren initiiert.¹¹ Ein Grund hierfür sind die heutigen *in vitro* Testsysteme der großen pharmazeutischen Firmen, die zusammen mit dem High-Throughput-Screening (HTS) eine große Anzahl von Proben bewältigen können. Diese Testsysteme sind viel empfindlicher als die früher verwendeten, wodurch die Möglichkeit besteht, dass Pflanzenextrakte, die früher negativ getestet worden sind, heute ein positives Ergebnis liefern könnten. Ein anderer Grund ist sicherlich der Rückgang von neuen Medikamenten (näheres dazu in Kapitel A.I.3.), wodurch wieder verstärkt nach alternativen Quellen für Naturstoffe gesucht wird.

Wenn die Entwicklung von Pharmazeutika betrachtet wird, fällt auf, dass die ersten Medikamente aus diesem Ansatz stammen. Die Isolierungen des Malariamittels Chinin im Jahr 1820 aus der Rinde einer *Cinchona*-Art und des Analgetikums Morphin aus *Papaver somniferum* im Jahr 1806 wurden alle von ethnobotanischen Beobachtungen geleitet. Die Pflanzen wurden von Einheimischen zur Bekämpfung von Fieber (Chinin) bzw. Schmerzen (Morphin) verwendet. Die Isolierungen der Substanzen ist auf das Prinzip des „aktiven Grundbestandteils“ zurückzuführen, d.h. die Idee, dass die Wirkung der Pflanze von einer Substanz hervorgerufen wird. Im 19. Jahrhundert gab es beeindruckende methodische Fortschritte in der Chemie, so dass Pflanzenwirkstoffe isoliert und niedermolekulare Substanzen in ihrer Struktur aufgeklärt werden konnten. Sie wurden aber somit gleichzeitig der chemischen Synthese zugänglich und oftmals wurden die pflanzlichen von den synthetischen Produkten verdrängt. Die Acetylsalicylsäure (Aspirin® (5)) ist hierfür ein sehr gutes Beispiel. In der Volksmedizin wurde die Rinde von Weiden zur Behandlung von Schmerzen eingesetzt. Der Inhaltsstoff der Weidenrinde wurde als Salicin (6) identifiziert, das im Körper zur Salicylsäure metabolisiert wird. Die Salicylsäure besitzt antirheumatische, antipyretische, analgetische und entzündungshemmende Wirkungen, irritiert aber auch stark die Magenschleimhaut. Das Derivat Acetylsalicylsäure (5) brachte eine bessere Verträglichkeit und der Firma Bayer seit ihrer Markteinführung 1899 bis heute einen Verkaufsschlager.



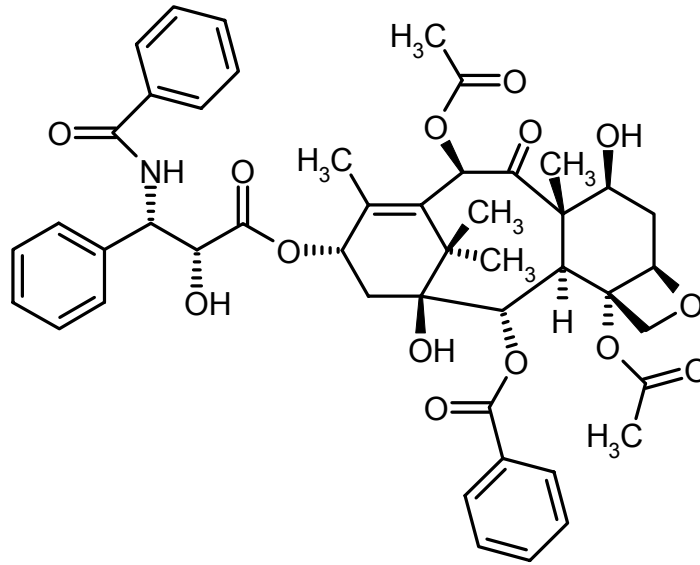
5



6

Ein Problem für die kommerzielle Nutzung bioaktiver Substanzen aus Pflanzen besteht in der Verfügbarkeit und Reproduktion. Die Beschaffung von Pflanzenmaterial gestaltet sich teilweise sehr schwierig, da es oftmals aus schwer zugänglichen Gebieten stammt, z.B. aus dem tropischen Regenwald. Um dieses Problem zu umgehen, besteht die Möglichkeit, die Pflanzen auf Plantagen oder in Gewächshäusern anzubauen. Hierbei ist aber beobachtet worden, dass Pflanzen, die außerhalb ihres natürlichen Ökosystem wachsen, die gesuchten Inhaltsstoffe nicht mehr produzierten, selbst wenn Samen von der ursprünglichen Pflanze verwendet wurden.¹¹ Ein weiteres Problem ist, dass Pflanzen bestimmte Substanzen nur zu bestimmten Zeiten ihrer Wachstumsphasen produzieren, wodurch ein relativ langer Zeitraum zwischen zwei Erntephasen entstehen kann. Weiterhin besteht bei der Nutzung von natürlichen Ressourcen das Problem, dass eine hohe Nachfrage zur Ausrottung von Pflanzenarten führen kann. Ein Beispiel dafür ist das für die Behandlung von Glaukom eingesetzte Pilocarpin. Hierfür werden die Blätter von *Pilocarpus*-Arten gebraucht, die hauptsächlich im Nordosten Brasiliens vorkommen. Durch die hohe Nachfrage kam es zu einer Ausrottung der Bäume in einigen Gebieten, die heute durch Kultivierung auf Plantagen vermieden wird.¹² Ein anderes sehr aktuelles Beispiel ist das Krebsmedikament Paclitaxel (Taxol[®] (7)), das aus der Rinde von *Taxus brevifolia* (Eibe) erstmalig isoliert wurde. 7 ist in der getrockneten Rinde mit nur ca. 0.01 % Gewichtsanteil vertreten. Dieser geringe Gewichtsanteil macht die Aufarbeitung einer sehr großen Menge an Rinde nötig, um den kommerziellen Bedarf zu decken. Eine 100 Jahre alte Eibe ergibt ca. 5 kg getrocknete Rinde.¹³ Allein für die klinischen Testphasen wurden 30000 kg Rinde benötigt,¹⁴ d.h. 6000 Bäume mussten gefällt werden. Bis in die Mitte der 90er Jahre wurden die gesamte Menge an klinisch genutzten Paclitaxel (7) aus der Rinde der Eibe aus dem pazifischen Nordwesten der USA gewonnen, zu Spitzenzeiten waren das ca. 800000 kg jährlich.¹⁵ Hierdurch wurden die Eibenbestände in den Wäldern im starken Maße gefährdet. Mit der Entdeckung des späten Biosynthesevorläufers 10-Desacetylbaaccatin in den Nadeln der Eiben konnte der Nachschub an (7) gewährleistet werden, da es semisynthetisch aus 10-Desacetylbaaccatin hergestellt werden kann. Hierdurch bestand zusätzlich die Möglichkeit zur Synthese von Derivaten, die auf ihre Wirksamkeit getestet werden konnten. So konnte das ebenfalls in der Klinik eingesetzte Docetaxel synthetisiert werden.⁶ Eine Totalsynthese von Paclitaxel (7) ist aufgrund der komplexen Struktur im industriellen Maßstab nicht rentabel. 1993 konnte der Pilz *Taxomyces andreanae* aus der Rinde einer Eibe isoliert werden, der 7 produziert.¹³ Die Produktion von 7 ist aber nur sehr niedrig, sie liegt bei ca. 20 – 50 ng/L. Optimierungen führten zu Ausbeuten von 0.2 – 0.3 µg/L, die aber immer noch viel zu niedrig für eine

kommerzielle Nutzung sind. Mittlerweile wird versucht, mit Zellkulturen von verschiedenen *Taxus*-Arten Paclitaxel (7) zu produzieren, wobei auch schon Erfolge zu verzeichnen sind.¹⁶



7

2. Pharmazeutika aus Mikroorganismen

Mit der Entdeckung des Penicillins aus *Penicillium notatum* 1928 von A. Fleming und dessen Einführung während des 2. Weltkrieges 1941/42 als ein effizientes antibakterielles Therapeutikum bei Wundinfektionen, begann die Ära der Mikroorganismen in der Arzneimittelforschung.¹⁷ Bis zu dieser Zeit waren Mikroorganismen, im Gegensatz zu Pflanzen, nicht dafür bekannt, Sekundärmetaboliten zu produzieren, die als Medikamente in Frage kommen. Ab 1945 rückten die Mikroorganismen als neue Quelle für Wirkstoffe in den Mittelpunkt des Interesses. Ihr Hauptvorteil gegenüber Pflanzen war die Kultivierbarkeit in großen Behältern, wodurch in kurzer Zeit große Mengen der mikrobiellen Sekundärmetaboliten erhalten werden konnten.

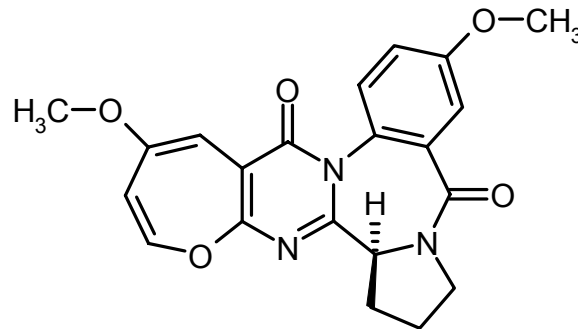
Die Suche nach neuen Wirkstoffen aus Mikroorganismen wurde ein zentraler Gegenstand der Naturstoffforschung. Hierfür können zwei verschiedene Methoden zum Einsatz kommen, das biologische und das chemische bzw. physikochemische Screening. Das biologische Screening beruht auf einer biologischen Testung eines Extraktes bzw. einer Reinsubstanz. Im klassischen Sinne¹⁸ bedeutet dies eine antibakterielle Wirkung im Plattendiffusionstest gegen verschiedene Testkeime. Das zunehmende Verständnis von Krankheiten auf molekularer und genetischer Ebene, das durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms 2001 noch erheblich erhöht wurde,^{19,20} führte zum Target-orientierten Screening, in dem spezifische Wechselwirkungen mit einem molekularen Target (z.B. Enzym, Rezeptor, RNA-/DNA-

Abschnitte) mit dem Ziel einer definierten pharmazeutischen Anwendung untersucht werden. Diese Screening-Methode wird heutzutage hauptsächlich bei dem industriellen High-Throughput-Screening (HTS) eingesetzt.²¹ Das chemische Screening²² dagegen zielt primär auf das Auffinden neuer Verbindungen, die nach der Isolierung zur Untersuchung ihrer potentiellen biologischen Aktivität den verschiedenen Testsystemen zugeführt werden. Als Auswahlkriterien dienen hierbei das Laufverhalten auf Dünnschichtchromatogrammen in verschiedenen Laufmittelsystemen und das chemische Verhalten gegenüber Sprühreagenzien, die auf unterschiedliche Substanzgruppen ansprechen. Erfolgt die Detektion nicht auf chemischen Wege, sondern z.B. über UV-Absorption oder CD-Spektroskopie, so wird vom physikochemischen Screening gesprochen. Hierzu zählt z.B. das HPLC-DAD-Screening,²³ bei dem Rohextrakte über HPLC aufgetrennt und per DAD-Detektion analysiert werden. Aus dem chromatographischen Verhalten und den UV-Spektren kann durch Abgleich mit einer Datenbank die Identität oder in den meisten Fällen zumindestens die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Substanzklasse festgestellt werden. Zunehmend finden auch andere gekoppelte HPLC-Methoden wie HPLC-MS,²⁴ HPLC-CD²⁵ und HPLC-NMR²⁴ in Screeningverfahren ihre Anwendung, wodurch zusätzliche Informationen gewonnen werden können.

Mit Hilfe der vorgestellten Screeningverfahren wurden bisher eine ganze Reihe neuer und interessanter Naturstoffe aus verschiedenen Substanzklassen entdeckt. Die Wahrscheinlichkeit, bekannte Verbindungen zu isolieren, steigt jedoch zunehmend. In Zukunft wird es daher immer mehr von Bedeutung sein, möglichst effizient neue Verbindungen zu finden. Hierzu ist vor allem das Erkennen bekannter Strukturen zu einem möglichst frühen Zeitpunkt im Screening nötig, wofür umfassende Datenbanken benötigt werden.

Es wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um unbekannte Substanzen zu entdecken. Eine Möglichkeit ist die Isolierung neuer Stämme von Actinomyceten oder filamentösen Pilzen, die allgemein als gute Sekundärstoffbildner bekannt sind, aus ungewöhnlichen geographischen Gebieten (Extremophile, marine Organismen) oder bisher wenig untersuchten ökologischen Habitaten (Endosymbioten). Des Weiteren haben Studien gezeigt, dass die Bildung vieler Sekundärstoffe sehr stark von den gewählten Kultivierungsbedingungen abhängig sind.²⁶ Dies kann dazu führen, dass bei standardisierten High-Throughput-Verfahren trotz der Verfügbarkeit geeigneter Produzenten prinzipiell interessante Wirkstoffe übersehen werden. Um einen Überblick bezüglich des Biosynthesepotentials eines Organismus zu erlangen, ist die Variation der Kultivierungsbedingungen somit unumgänglich. Dieser Idee folgt die im Arbeitskreis Zeeck entwickelte OSMAC-Methode (**O**ne **S**train/**M**any **C**ompounds).²⁷ Mit dieser Methode ist es z.B. gelungen, den Schimmelpilz *Aspergillus*

ochraceus (DSMZ-7428) zur Bildung von mehr als 20 verschiedenen Sekundärmetaboliten anzuregen, darunter das strukturell neuartige Asperloxin A (**8**).²⁸

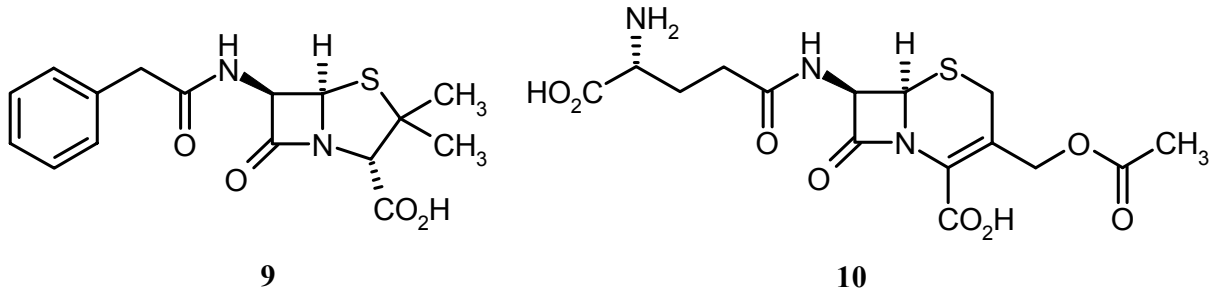


8

Als zu variierende Größen bei der Kultivierung von Mikroorganismen bieten sich die Parameter Temperatur, Belüftung, Sauerstoffpartialdruck, Kultivierungsgefäß, pH-Wert, Belichtung und Nährmedium an. Auch der Einsatz von anorganischen Salzen, Adsorbentmaterialien, Detergenzien, unnatürlichen Biosynthesevorläufern (im Sinne der Vorläufer-dirigierten Biosynthese²⁹) und Enzyminhibitoren kann auf die Bildung von Sekundärmetaboliten Einfluss haben. Der dritte Ansatz auf dem Weg zu neuen Wirkstoffen aus natürlichen Quellen beruht auf der Nutzung der Fortschritte im Bereich der Genetik. Mittlerweile ist es möglich, aus einer Bodenprobe DNA zu isolieren und Fragmente davon in Wirtsorganismen wie *Escherichia coli* zu klonieren.³⁰ Diese Methode ist interessant, da bisher weniger als 1 % der im Boden lebenden Mikroorganismen kultiviert wurden und so auch Wirkstoffe von schwer oder nicht kultivierbaren Organismen erhalten werden können.

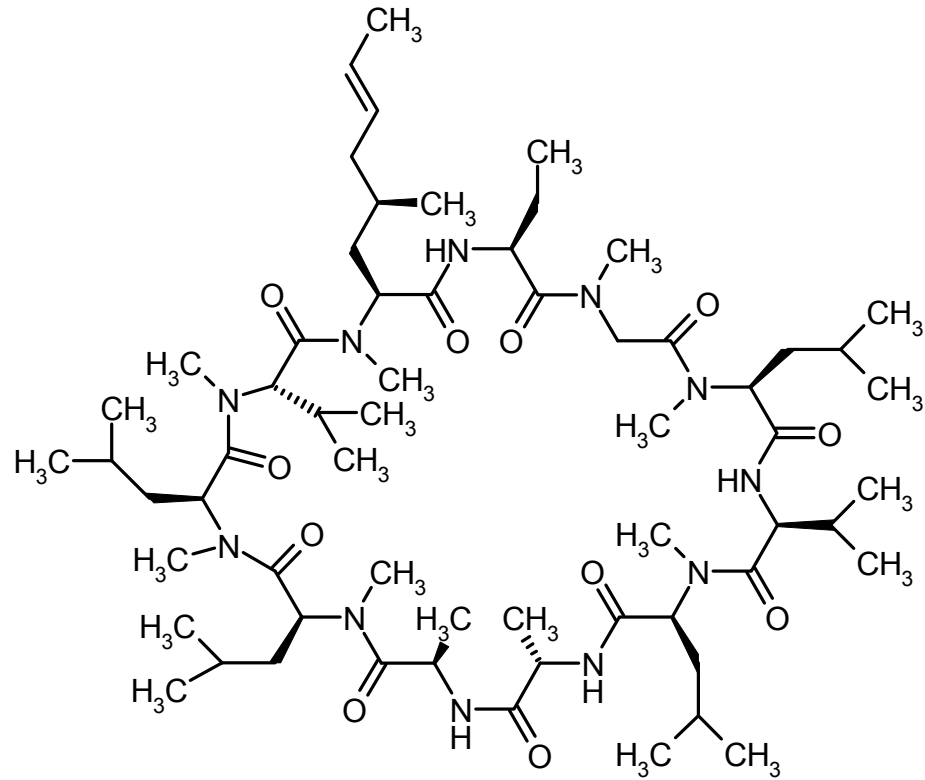
Naturstoffe aus Mikroorganismen haben gezeigt, dass sie eine sehr große strukturelle Diversität besitzen und viele unterschiedliche biologische Aktivitäten aufweisen. Viele von ihnen werden in der Therapie von Krankheiten in der modernen Medizin eingesetzt bzw. dienen als Leitstrukturen für semisynthetische Derivate oder als Modell für totalsynthetisch hergestellte Substanzen, deren Pharmakophor von Naturstoffen abgeleitet wurde. Nachfolgend sollen hierfür Beispiele mit einem großen Einfluss auf die moderne Medizin gegeben werden.

Die β -Lactam-Antibiotika, zu denen die Penicilline (z.B. Penicillin G (**9**)) und die Cephalosporine (z.B. Cephalosporin C (**10**)) gehören, waren die ersten Antibiotika, die kommerziell genutzt wurden.



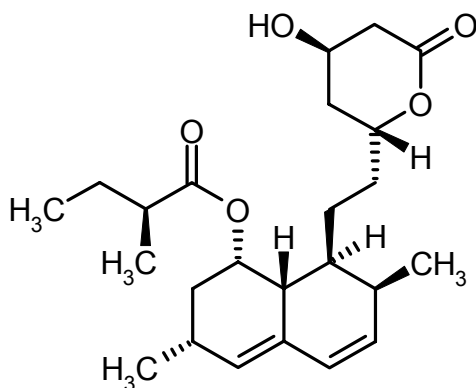
Ein Problem der β -Lactam-Antibiotika besteht aber in der relativ schnellen Resistenzentwicklung. Viele Bakterien besitzen oder erhielten durch Gentransfer β -Lactamasen, die den β -Lactam-Ring öffnen. Dieser kann dann nicht mehr kovalent an das aktive Zentrum der Transpeptidase binden und damit die Peptidoglykan-Synthese nicht mehr hemmen. Die Einführung von β -Lactamase-Inhibitoren wie Clavulansäure konnten hier Verbesserungen bringen. Ein Beispiel für ein Kombipräparat aus einem β -Lactamase-Inhibitor und einem β -Lactam-Antibiotikum ist Augmentin[®]. Weitere Antibiotika-Klassen, die für die medizinische Anwendung einen großen Nutzen hatten und zum größten Teil noch haben sind die Aminoglykoside³¹ (z.B. Streptomycin), die Tetracycline³² (z.B. Chlor-tetracyclin), die Makrolide,³³ für die das Erythromycin beispielhaft steht, sowie die Glykopeptide (z.B. Vancomycin). Die Glykopeptide werden als sogenannte Reserveantibiotika genutzt. Sie sind gegen multiresistente Keime wirksam und werden insbesondere gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme eingesetzt. Aber selbst bei ihnen zeigen sich mittlerweile schon Resistenzen.

Die Einführung des Immunsuppressivums Cyclosporin A (Sandimmun[®] (**11**)) 1983 war ein Meilenstein im medizinischen Nutzen von mikrobiellen Metaboliten.¹⁷ Cyclosporin A (**11**) aus *Trichoderma polysporum* fiel zunächst als Antimykotikum auf, zeigte dann aber bei weitergehenden Tests in Tieren immunsuppressive Wirkungen. Aufgrund dieser Eigenschaft revolutionierte **11** das Gebiet der Organtransplantationen, da Abstoßungsreaktionen gegenüber den Organen unterbleiben, der Körper aber trotzdem gegen bakterielle Infektionen widerstandsfähig bleibt. FK 506 (Tacrolimus[®]) aus *Streptomyces tsukubaensis* und Rapamycin (Sirolimus[®]) aus *Streptomyces hygroscopicus*, die ebenfalls in der klinischen Anwendung sind, sowie Sanglifehrin A aus *Streptomyces flaveolus* sind weitere Metaboliten, die immunsuppressive Wirkungen besitzen.

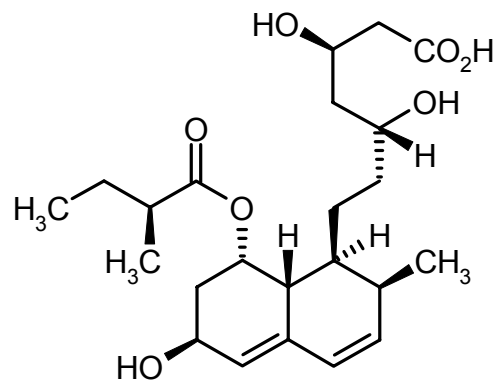


11

Ein weiterer Meilenstein war die Entdeckung von Lovastatin (Mevacor[®] (**12**)) aus *Aspergillus terreus* als selektiven Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase, einem Schlüsselenzym bei der Biosynthese von Cholesterin. Diese Inhibition war ein völlig neuartiges Prinzip, um hohe Blutcholesterinspiegel zu senken, die für Arteriosklerose und koronare Herzkrankheiten verantwortlich sind. Eine höhere Affinität zur HMG-CoA-Reduktase konnte z.B. beim Derivat Pravastatin (Mevalotin[®] (**13**)) erreicht werden.



12



13

3. Zur Bedeutung von Naturstoffen in der Pharmaforschung

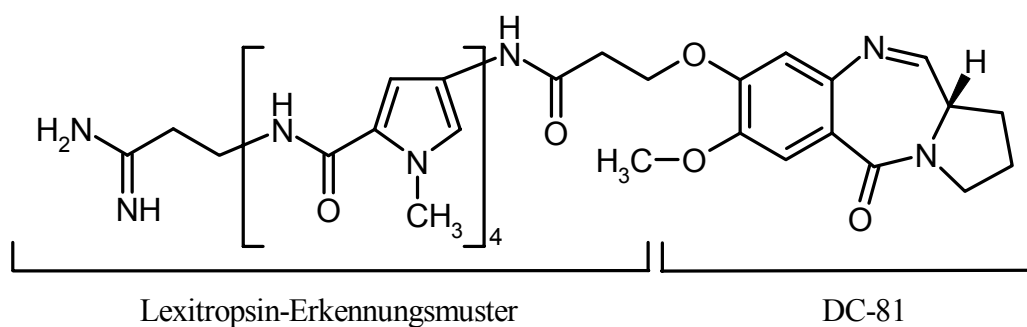
Naturstoffe sind für die Entwicklung von Pharmazeutika unverzichtbar, sei es als direkte Medikamente oder als Leitstrukturen für Syntheseprodukte. Die Entwicklung des High-Throughput-Screenings (HTS) führte zu einem erhöhtem Probendurchsatz und damit zu einer größeren Nachfrage nach Substanzen, die nur durch den Aufbau von großen Substanzbibliotheken zu bewältigen war. Die kombinatorische Chemie und auch das rationale Wirkstoffdesign sind hierfür besser geeignet als Naturstoffe, da die Synthese von Substanzen schneller und einfacher ist als die Isolierung, Aufreinigung, Strukturaufklärung und Produktion von Naturstoffen. Infolgedessen haben viele pharmazeutische Firmen ihre Naturstoffforschung zugunsten der kombinatorischen Chemie eingeschränkt oder sogar ganz aufgegeben. Die erwarteten Erfolge stellen sich jedoch nicht ein. Die Anzahl an neu eingeführten Substanzen (37) erreichte 2001 ein neues 20-Jahres-Tief. Die United States Food and Drug Administration (FDA) verzeichnete 2001 nur 16 neue Applikationen im Vergleich zu 24 im Jahr 2000.⁸ Der Rückgang in der Entwicklung neuer Medikamente durch die pharmazeutischen Industrie wird auf die Flut von Fusionen und Aufkäufen von Firmen, die steigenden Kosten für die Entwicklung von Medikamenten und die Übervorsichtigkeit der FDA bei Neuzulassungen zurückgeführt. Interessanterweise wird die Reduktion der Aktivitäten zur Erforschung von Naturstoffen nicht als möglicher Grund für den mangelnden Erfolg erwähnt.³ Der Vorteil der Naturstoffe zeigt sich in einer statistischen Untersuchung³⁴ zur Strukturkomplementarität von Naturstoffen und synthetischen Substanzen. 40 % der Strukturen von Naturstoffen finden keine Entsprechung in synthetischen Verbindungen. Zusätzlich weisen Naturstoffe im Durchschnitt eine höhere Molekularmasse auf, enthalten weniger Stickstoff-, Halogen- und Schwefelatome, dafür aber etwas häufiger Sauerstoffatome. Außerdem weisen sie einen höheren Anteil an Verbindungen mit sp^3 -hybridisierten Brückenkopfatomem sowie eine höhere Anzahl an Ringen und Chiralitätszentren pro Molekül auf. Sie sind damit statistisch gesehen räumlich komplexer als synthetische Substanzen. Weiterhin besitzen Naturstoffe mehr sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen wie Alkohole, Ketone und Ether im Gegensatz zu den in synthetischen Verbindungen häufiger enthaltenden Aminen und Aromaten.

Bei der Analyse der im Zeitraum 1981 – 2002⁸ neu eingeführten Medikamente zeigt sich, dass ca. 30 % ihren Ursprung in Naturstoffen bzw. ihren semisynthetisch hergestellten Derivaten besitzen. Werden noch die Substanzen dazugerechnet, die zwar synthetisch hergestellt werden, deren Pharmakophor jedoch einem Naturstoff entlehnt ist, so steigt dieser Prozentsatz auf ca. 50 %. Besonders hoch ist dieser Anteil bei Präparaten gegen Infektionskrankheiten,

die neben den Krebstherapeutika zu den wichtigsten Forschungsgebieten der pharmazeutischen Industrie gehören. Bei den Antiinfektiva liegt dieser bei ca. 65 %, in der Klasse der Antibiotika sogar bei ca. 80 %.

Die kombinatorische Chemie allein spielt keine Rolle mehr bei der Entwicklung neuer Medikamente, bei der Variation eines Naturstoffes leistet sie jedoch gute Dienste. Der Trend zur Synthese komplexer Naturstoff-ähnlicher Bibliotheken, bei der die Naturstoffsynthese mit der kombinatorischen Chemie verknüpft wird, ist bemerkenswert.⁸ Ein neueres Konzept ist die Synthese von Naturstoffhybriden.³⁵ Hierbei werden zwei Naturstoffe bzw. deren Pharmakophore miteinander verknüpft, um somit die Eigenschaften der einzelnen Naturstoffe zu kombinieren. Als Beispiel sei hier die Kombination von DC-81 mit dem Erkennungsmuster der Lexitropsine genannt. DC-81 besitzt eine Affinität zu GC-reichen DNA-Sequenzen, während die Lexitropsine eine Affinität zu AT-reichen Regionen besitzen. Die Hybride (z.B. **14**) zeigten im Vergleich zu den einzelnen Naturstoffen teilweise einen drastischen Anstieg in der Wirksamkeit.

Ein interdisziplinärer Ansatz für die Entwicklung und Optimierung neuer Wirkstoffe, der auf das Zusammenspiel von Naturstoffquellen mit der Synthese, der kombinatorischen Chemie, dem rationalen Wirkstoffdesign und der kombinatorischen Biosynthese setzt, ist sicherlich eine der besten Möglichkeiten, um neue Leitstrukturen zu entdecken.



4. Aufgabenstellung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Untersuchung von Mikroorganismen und Pflanzen aus verschiedenen Quellen bezüglich ihrer Sekundärstoffbildung.

Der erste Teil beschäftigt sich mit 35 Actinomyceten-Stämmen aus der Kilimanjaro-Region (Tansania, Mramba Forest, Mwanga District), die im chemischen Screening²² auf ihre Sekundärmetabolitenproduktion hin untersucht werden sollten. Methodisch war dabei wichtig, ob und inwieweit es Übereinstimmungen zwischen dem chemischen Screening und einem LC-MS-Screening gibt. Es fehlte bisher eine Aussage darüber, ob ein LC-MS-Screening routinemäßig zur Suche nach neuen Naturstoffen eingesetzt werden kann, ohne wichtige Komponenten zu übersehen. Stämme mit interessantem Metabolitenprofil sollten im größeren Maßstab fermentiert, die Sekundärstoffe isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Im Sinne der OSMAC-Methode (**O**ne **S**train/**M**any **C**ompounds)²⁷ sollte die biosynthetische Leistungsfähigkeit einiger Produzenten überprüft werden.

In einer Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H.-P. Fiedler (Mikrobiologisches Institut, Universität Tübingen) sollten aus dem Actinomyceten-Stamm *Micromonospora* sp. Tü 6368 isolierte Sekundärmetaboliten in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Diese waren im Rahmen eines HPLC-DAD-Screenings²³ entdeckt worden und standen als Reinsubstanzen zur Verfügung.

Der dritte Teil dieser Arbeit beruht auf einer Zusammenarbeit mit Prof. Dr. L. Ö. Demirezer (Pharmakologisches Institut, Hacettepe Universität Ankara, Türkei). Es sollten die Strukturen von Sekundärmetaboliten aufgeklärt werden, die aus den Arzneipflanzen *Centranthus longiflorus*, *Vitex agnus-castus* und *Galium verum* stammten und als Reinsubstanzen zur Verfügung standen. Zusätzlich sollten die Substanzen auf ihre biologische Aktivität hin untersucht werden.

II. Sekundärmetaboliten aus Actinomyceten der Kilimanjaro-Region

1. Die Kilimanjaro-Stämme (K-Stämme)

1.1. Allgemeines

Die in diesem Kapitel behandelten Mikroorganismen wurden aus Erdproben der Kilimanjaro-Region (Tansania, Mramba Forest, Mwanga District) isoliert,^a wobei die Erdproben in verschiedenen Höhen und in Bereichen unterschiedlicher Bäume entnommen wurden (siehe Tabelle 1). Bei allen Mikroorganismen handelt es sich um Actinomyceten, die taxonomisch nicht weiter zugeordnet wurden.

Reihe	Baum	Anzahl isolierter Stämme (Reihe)	Höhe [m]
1 und 2	<i>Liane</i> (unbekannt)	- (1), 2 (2)	1640
3 und 4	<i>Uvariadendron</i> sp.	1 (3), 3 (4)	1640
5, 6 und 7	<i>Teclea simplicifolia</i>	6 (5), 13 (6), 1 (7)	1640
8 und 9	<i>Terminalia brownii</i>	16 (8), 28 (9)	1640
10 und 11	<i>Boswellia neglecta</i>	11 (10), 13 (11)	820
12 und 13	<i>Haplocoelum foliolosum</i>	13 (12), 16 (13)	820
14 und 15	„Mshira“	15 (14), 10 (15)	820
16 und 17	<i>Commiphora eminii</i>	7 (16), 12 (17)	820
18 und 19	<i>Grewia bicolor</i>	6 (18), 5 (19)	820
20 und 21	<i>Vepris glomerata</i>	15 (20), 11 (21)	820
22 und 23	<i>Maema angolensis</i>	14 (22), 10 (23)	820
24 und 25	<i>Olea capensis</i>	9 (24), 15 (25)	1610
26 und 27	<i>Cantrium siebenlistii</i>	7 (26), 14 (27)	1610
28 und 29	<i>Cenecia syringifolius</i>	14 (28), 11 (29)	1610
30 und 31	<i>Teclea simplicifolia</i>	15 (30), 9 (31)	1610

Tabelle 1: Übersicht über die Bodenproben aus der Kilimanjaro-Region, grau unterlegt sind die in dieser Dissertation bearbeiteten Stämme.

^a Herrn Dr. Claus (Göttingen) danke ich für die Isolierung und Bereitstellung der Mikroorganismen.

1.2. Chemisches Screening der K-Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die aus den Reihen K 5 (Stämme 2, 3, 5 und 6), K 8 (Stämme 1 – 8), K 10 und K 17 isolierten Mikroorganismen untersucht (in Tabelle 1 grau unterlegt). Dazu wurden die Stämme in vier verschiedenen Nährmedien (M2, Soja/Mannit, Haferkleie, SGG) in Schüttelkolben kultiviert und die Kulturbrühen standardisiert aufgearbeitet (siehe Kapitel B.II.2.). Das chemische Screening der jeweiligen Rohextrakte (Kulturfiltrat und Myzel), bei dem anhand von Anfärbereaktionen mit Sprühreagenzien (Anisaldehyd, Orcin und Ehrlich) und Laufverhalten auf Dünnschichtchromatogrammen mit zwei verschiedenen Laufmittelsystemen (siehe Kapitel B.II.2.) ausgewählt wird, ermöglicht die Entscheidung, welche Stämme weiterbearbeitet werden sollen. Diese Methode geht auf H. Umezawa³⁶ zurück und wurde in den Arbeitsgruppen von H. Zähler³⁷ und A. Zeeck^{22,38} weiter entwickelt. Von den 35 kultivierten Stämmen zeigten 18 ein interessantes Metabolitenspektrum. Diese Stämme wurden im 1 L-Maßstab in Schüttelkolben in einem geeigneten Nährmedium fermentiert und wiederum standardisiert aufgearbeitet (siehe Kapitel B.II.3.1.). Nur 10 von diesen Stämmen lieferten reproduzierbare Ergebnisse mit ausreichender Metabolitenproduktion für die Strukturaufklärung. Insgesamt konnten aus diesen 10 Stämmen 29 verschiedene Metaboliten isoliert werden, von denen die interessantesten in den folgenden Kapiteln A.II.2. – A.II.7. beschrieben werden, darunter sieben neue (**16 – 18, 38, 40, 54 und 78**). Die jeweiligen säulenchromatographischen Aufreinigungsschritte und Ausbeuten sind in den Kapiteln B.II.3. – B.II.8. niedergelegt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Tabelle 2.

Reihe	Anzahl ausgewählter Stämme	produzierende Stämme (Stamm-Nr.)	Anzahl der isolierten Verbindungen	Substanzen
K 5	2 von 4	-	0	-
K 8	5 von 8	K 8/1	1	Ferroverdin A (15)
		K 8/5	3	Gabosine (16 – 18)
		K 8/7	1	Streptazolin (33)
K 10	3 von 11	K 10/11	3	Streptazolin, Obscurolid A3, Chartreusin (33 – 35)
K 17	8 von 12	K 17/1	2	Daidzein, Genistein
		K 17/2	1	2-Aminobenzoyl- α -L-rhamnopyranosid (36)
		K 17/7	4	Teleocidine (37 – 40)
		K 17/9	14	Isocoumarine (52 – 55), Diketopiperazine (56, 57), Benzoxazole (58, 59), Piericine (63 – 65), Echinosporine (75, 76), Benzisoxamid (78)
		K 17/11	1	Streptazolin (33)
		K 17/12	1	Adenosin

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse für die K-Stämme.

1.3. LC-MS-Screening von Rohextrakten der K-Stämme

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob Übereinstimmungen zwischen dem oben beschriebenen chemischen Screening und einem LC-MS-Screening gefunden werden können. Hierzu wurden die Kulturfiltrat- und Myzelextrakte der Screening-Ansätze (100 mL) und der Kultivierungen im 1 L-Maßstab der nach dem chemischen Screening ausgewählten 18 Stämme jeweils in 2 mL bzw. 20 mL Methanol gelöst und mit Hilfe eines Membranfilters (Porengröße 0.45 μ m) von Schwebeteilchen befreit. Von diesen Lösungen wurden LC-MS-Experimente mit einem Standardprogramm im negativen und positiven ESI-Modus durchgeführt, wobei eine Einspritzmenge von 10 μ L gewählt wurde. Zusätzlich wurden von einigen im chemischen Screening als besonders interessant eingestuften Stämmen die Fraktionen der Rohextraktsäulen mit LC-MS untersucht, um zu verifizieren, ob und wo die in den Rohextrakten als interessant angesehenen Substanzen wieder gefunden werden können. Gesucht wurde in den LC-MS-Chromatogrammen nach intensiven Massensignalen und/oder

UV-Signalen. Um Nährmedienbestandteile von Sekundärmetaboliten unterscheiden zu können, wurden die im Screening verwendeten vier Nährmedien (M2, Soja/Mannit, Haferkleie, SGG) ebenfalls 72 h bei 180 U/min und 28 °C geschüttelt und wie die Kulturbrühen der K-Stämme aufgearbeitet. Dabei stellte sich das Nährmedium SGG als problematisch heraus, da es von sich aus schon sehr viele Substanzen in der Massendetektion aufweist.

Bei den LC-MS-Messungen der Fraktionen der Rohproduktsäulen, die durch chemische Anfärbereaktionen separiert wurden, konnten sehr häufig die vorher in den Rohextrakten beobachteten Massen nicht mehr wieder gefunden werden. Aufgrund dieser nicht zufrieden stellenden Ergebnisse und der fehlenden Erfahrung mit dem LC-MS-Screening erfolgten die weiteren Aufreinigungsschritte anhand der chemischen Anfärbbarkeit der Substanzen.

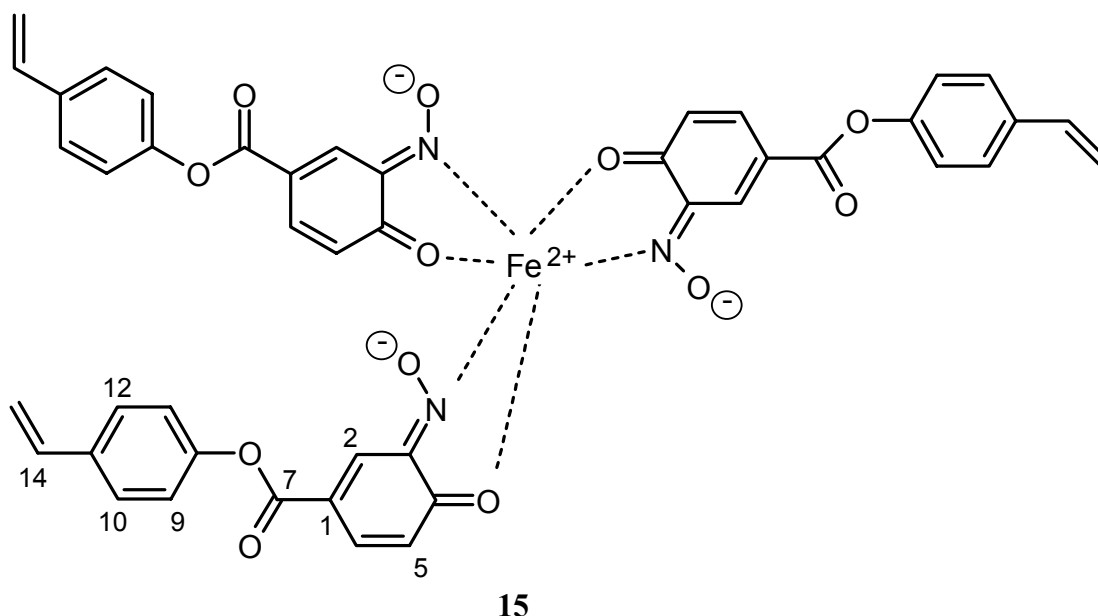
Eine abschließende Bewertung des LC-MS-Screenings und der Vergleich zum chemischen Screening wird ausführlich im Kapitel A.II.9. diskutiert.

2. *Actinomyces* sp. Stamm K 8/1

2.1. Ferroverdin A (15)

Der Stamm K 8/1 fiel im chemischen Screening durch seinen grünen Myzelextrakt und durch eine grüne Zone bei $R_f = 0.2$ (Kieselgel, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1) auf dem Dünnschichtchromatogramm auf. Aus einer Kultivierung im 1 L-Maßstab konnten 1.5 mg/L **15** isoliert werden.

Die grüne Substanz **15** zeigt im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zehn H-Atome, die alle im aromatischen bzw. olefinischen Bereich liegen. Anhand der Kopplungskonstanten konnten ein *para*-substituierter Aromat ($\delta_{\text{H}} = 7.16$: d, $J = 8.5$ Hz, 2H, 9-H, 13-H und $\delta_{\text{H}} = 7.48$: d, $J = 8.5$ Hz, 2H, 10-H, 12-H), eine endständige Doppelbindung ($\delta_{\text{H}} = 5.23$: dd, $J = 11.0, 1.0$ Hz, 1H, 15-H_A; $\delta_{\text{H}} = 5.76$: dd, $J = 18.0, 1.0$ Hz, 1H, 15-H_B und $\delta_{\text{H}} = 6.74$: dd, $J = 18.0, 11.0$ Hz, 1H, 14-H) und ein 1,3,4-trisubstituierter Aromat ($\delta_{\text{H}} = 7.19$: d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 5-H; $\delta_{\text{H}} = 7.90$: d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 2-H und $\delta_{\text{H}} = 8.18$: dd, $J = 9.0, 2.0$ Hz, 1H, 6-H) identifiziert werden. Eine Suche in AntiBase³⁹ führte zum Ferroverdin A (**15**), einem trimeren Eisenchelat-Komplex und Inhibitor des Cholesterylester-Transfer-Proteins. Das ESI-Massenspektrum zeigt ein Ion bei $m/z = 860$ [M], das ESI-MS/MS-Experiment eine für **15** charakteristische Abspaltung von $m/z = 268$ [Monomereinheit]. Literaturdaten^{40,41} bestätigen, das Ferroverdin A (**15**) isoliert wurde.



3. *Actinomyces* sp. Stamm K 8/5

3.1. *O*-Acetylgabosine E (16 – 18)

Der Stamm K 8/5 zeigte im chemischen Screening auf dem Dünnschichtchromatogramm eine in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 5:1:4 bei 254 nm UV-löschende Zone ($R_f = 0.2$), die in der Wärme mit Anisaldehyd dunkelbraun und mit Orcin rotbraun anfärbte. Aus einer 1 L-Kultivierung konnte ein Gemisch aus den drei Substanzen **16 – 18** (Ausbeute 40 mg/L) isoliert werden.

Das DCI-Massenspektrum gibt ein Ion höchster Intensität bei $m/z = 234$ ($[M+NH_4]^+$). Im 1H -NMR-Spektrum (siehe Abbildung 1) sind zwei Bereiche ($\delta_H = 2.1 - 2.2$ und $6.8 - 7.0$) zu erkennen, die vermuten lassen, dass es sich bei dieser Fraktion um ein Gemisch von drei Isomeren (**16 – 18**) im ungefähren Verhältnis von 2:1:1 handelt, die sich säulenchromatographisch an Kieselgel, Sephadex[®] LH-20 und RP-Material nicht weiter auftrennen ließen. Der eine Bereich zeigt Verschiebungen von $\delta_H = 6.87$ (dt, $J = 5.5, 2.0$ Hz, 2H), 6.92 und 7.00 (jeweils dt, $J = 6.0, 2.0$ Hz, 1H) und der zweite Signale bei $\delta_H = 2.10$ (s, 6H), 2.13 (s, 3H) und 2.16 (s, 3H).

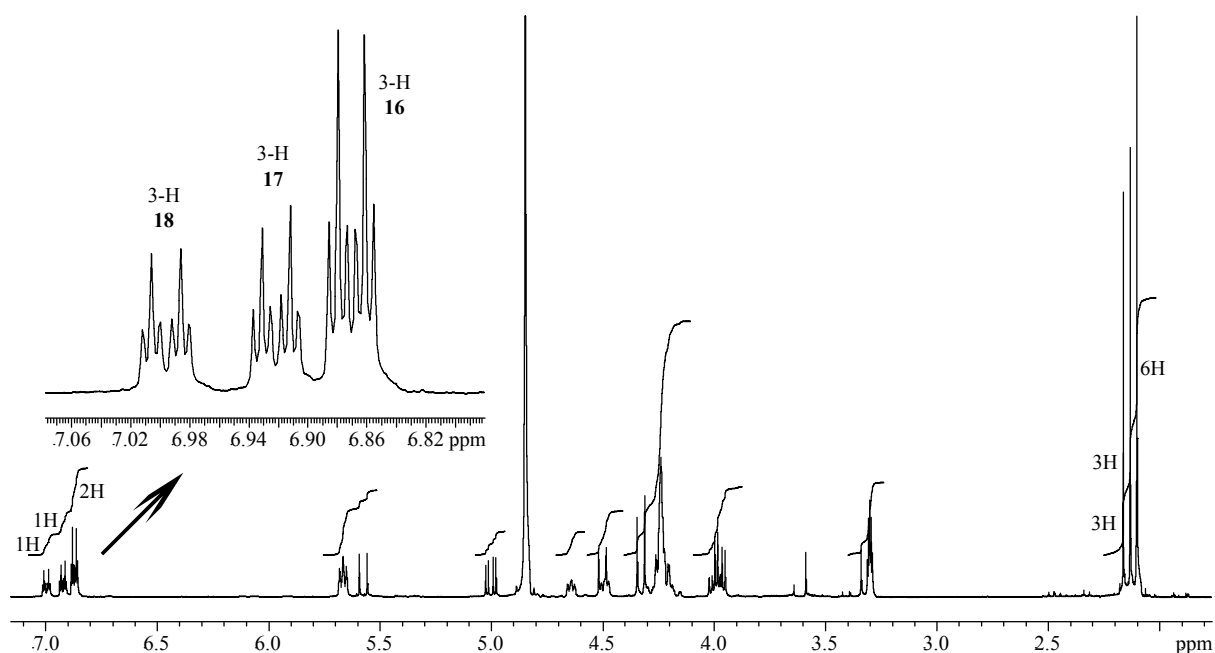
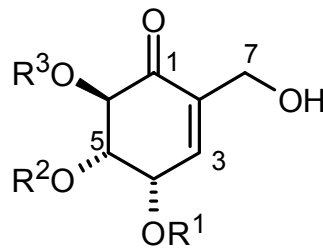
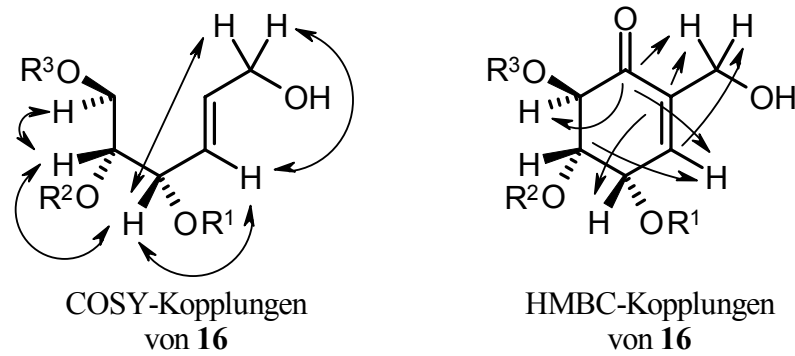


Abbildung 1: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, Methanol) des Isomerengemisches **16** – **18**.

Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum sind drei Ketocarboxyle ($\delta_{\text{C}} = 194.3, 198.2$ und 198.8), Ester-carboxyle ($\delta_{\text{C}} = 172.2$), sechs C-Atome im Doppelbindungsbereich ($\delta_{\text{C}} = 137 - 142$), neun oxygenierte Methingruppen ($\delta_{\text{C}} = 65 - 76$), oxygenierte Methylengruppen ($\delta_{\text{C}} = 59.3$) und drei Methylgruppen ($\delta_{\text{C}} = 20.7, 20.8$ und 20.9) zu erkennen. Aufgrund der Verschiebungen der Methylgruppen und der Ester-carboxyle können drei *O*-Acetylgruppen vermutet werden. Da die Isomeren alle die gleiche Molmasse ($M = 216$ g/mol) besitzen, kann eine Summenformel von $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_6$ für jedes Isomer bestimmt werden. Hieraus lassen sich vier Doppelbindungsäquivalente berechnen. Neben den beiden Carbonylgruppen und der Doppelbindung muss also noch ein Ringschluss erfolgen. Es ergibt sich ein Cyclohexenon-gerüst, in dem das Keton aufgrund seiner chemischen Verschiebung im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum α,β -ungesättigt vorliegt. Mit Hilfe von 2D-NMR-Experimenten ($^1\text{H},^1\text{H-COSY}$, HSQC und HMBC, siehe Abbildung 2) konnten die Signale den einzelnen Isomeren zugeordnet und für **16** – **18** Strukturvorschläge erstellt werden. Hiernach gehören **16** – **18** zur Gruppe der Gabosine (Ketocarbazucker), die in unserer Arbeitsgruppe schon häufiger isoliert worden sind.^{42,43,44,45,46} Eine kurze Übersicht über die Strukturklasse der Gabosine wird im folgenden Kapitel gegeben.



- 16:** R¹ = Acetyl R² = H R³ = H
17: R¹ = H R² = Acetyl R³ = H
18: R¹ = H R² = H R³ = Acetyl

Abbildung 2: Wichtige ¹H,¹H-COSY- und HMBC-Kopplungen von **16** sowie Strukturen der Gabosine **16 – 18**.

Die relative Stereochemie konnte für alle drei Verbindungen über die ³J_{H,H}-Kopplungskonstanten bestimmt werden. Zwischen 5-H und 6-H ist eine große diaxiale Kopplung zu beobachten ($J = 10.0 - 11.0$ Hz), zwischen 4-H und 5-H eine Kopplungskonstante von $J = 4.0$ Hz, wodurch eine pseudo-äquatoriale Stellung von 4-H zu 5-H angenommen wird. Damit gibt es nur noch zwei Möglichkeiten (siehe Abbildung 3) für das Cyclohexenongerüst: A (4*S*,5*S*,6*R*) und B (4*R*,5*R*,6*S*).

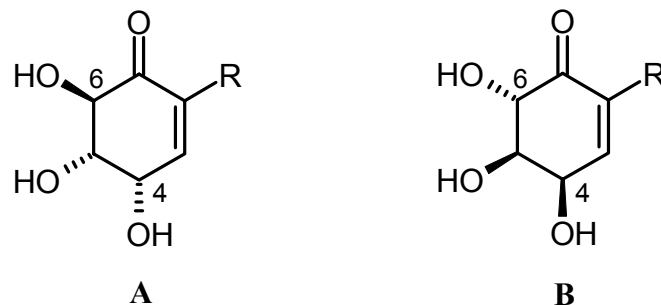


Abbildung 3: Möglichkeiten A und B für die Stereochemie des Cyclohexenongerüsts der isolierten Gabosine **16 – 18**.

Die Stereochemie des Cyclohexenengerüsts von A besitzen die Gabosine D (**19**) und E (**20**), die von B das Gabosin A (**21**).⁴⁷ Unterscheidbar sind diese Enantiomere durch ihre Drehwerte, die gegensinnig zueinander sind. **20** besitzt einen Wert von $+148^\circ$ ($c = 0.95$, Methanol), **21** hingegen von -132° ($c = 1$, Methanol). Eine Messung des Drehwertes des Gemisches aus **16** – **18** ergab einen Drehwert von $+173^\circ$ ($c = 0.1$, Methanol), aufgrund dessen die Isomere als 4-*O*-Acetylgabosin E (**16**), 5-*O*-Acetylgabosin E (**17**) und 6-*O*-Acetylgabosin E (**18**) charakterisiert wurden. **16** – **18** sind neu, 7-*O*-Acetylgabosin E (= **19**) konnte interessanterweise aus dem Stamm K 8/5 nicht isoliert werden.

3.2. Die Gruppe der Gabosine und Carbazucker

Gabosine sind hydroxylierte, substituierte Cyclohexanonderivate, die ein C_7 -Grundgerüst besitzen.⁴⁷ Die meisten bekannten Gabosine sind α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen, es sind aber auch gesättigte Gabosine beschrieben. Als Dihydrogabosine werden die an der Carbonylfunktion reduzierten Derivate bezeichnet.⁴³ Bei den Gabosinen fällt die große strukturelle Ähnlichkeit zu Monosacchariden in deren Pyranoseform auf, wobei das Ringsauerstoffatom durch eine Carbonylgruppe ersetzt ist. McCasland führte den Begriff Pseudozucker⁴⁸ für Substanzen ein, bei denen das Ringsauerstoffatom eines cyclischen Monosaccharids durch eine Methylengruppe ersetzt ist. Suami und Ogawa beschrieben sie mit dem Begriff Carbazucker,⁴⁹ der mittlerweile gebräuchlich ist. Gabosine sind hiernach als Ketocarbazucker zu bezeichnen,⁴² ihre Nomenklatur erfolgte alphabetisch in der Reihenfolge ihrer Entdeckung und beschreibt daher keine strukturellen Verwandtschaftsverhältnisse.

Bisher sind 21 Gabosine bekannt,^{43,44,46,47,50} darunter die Gabosine G – I (**22** – **24**), Gabosin L (**25**) sowie 4-*O*- und 5-*O*-Acetylgabosin A (**26** und **27**). In neuerer Zeit wurde das zu den Gabosinen verwandte Parasitenon (**28**)⁵¹ isoliert, das an den Positionen 5 und 6 über ein Epoxid verbrückt ist. Aus *Phyllosticta* sp. wurde 1971 das 6(*S*)-Acetoxy-4(*R*),5(*R*)-dihydroxy-2-hydroxymethyl-2-cyclohexenon (**29**) isoliert,⁵² das Enantiomer zu 6-*O*-Acetylgabosin E (**18**), das aber nie als Gabosin bezeichnet wurde. Phyllosinol (**30**)⁵² ist wie **28** ebenfalls an den Positionen 5 und 6 über ein Epoxid verbrückt, hat aber die Hydroxymethylengruppe an Position 2 und eine andere Stereochemie. Ausgewählte bekannte Gabosine mit einem Cyclohexenengerüst sind in Abbildung 4 dargestellt.

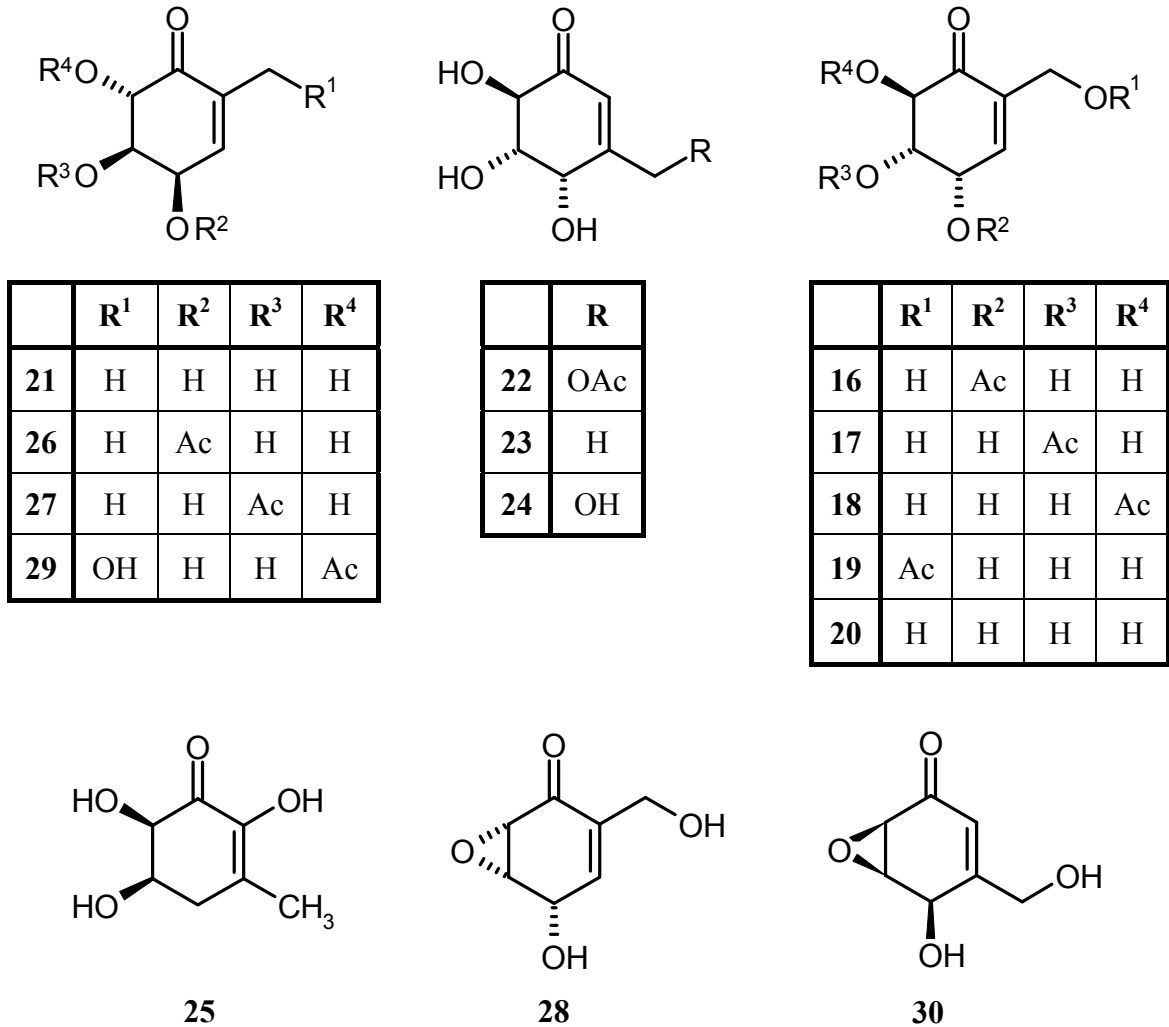
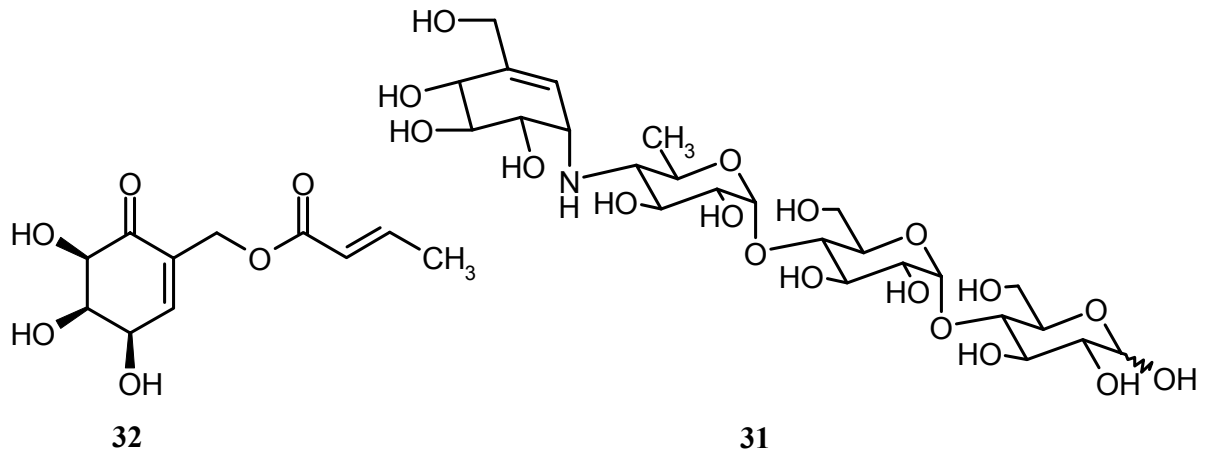


Abbildung 4: Ausgewählte Gabosine mit einem Cyclohexenongerüst, Ac = Acetyl.

Carbazucker und Carbazucker-enthaltende Verbindungen werden häufig als Sekundärmetaboliten gefunden und zeigen ein breites biologisches Wirkspektrum. Sie wirken als Antibiotika,⁵³ Antitumormittel,⁵⁴ Herbizide,⁵⁵ Fungizide,⁵⁶ Pflanzenwachstumsregulatoren⁵⁷ und spezifische Enzyminhibitoren.^{58,59} Es wird angenommen, dass die strukturelle Ähnlichkeit der Carbazucker mit natürlichen Monosacchariden für die Aktivität verantwortlich ist. Biologische Systeme erkennen die Carbazucker, weitere Reaktionsschritte werden jedoch gehemmt. Die Acarbose (**31**)^{60,61} ist ein aus Mikroorganismen isolierter α -Glucosidase-Inhibitor, der in der Therapie von Diabetes mellitus angewendet wird. Ein weiteres Beispiel ist COTC (**32**),⁶² das als Grundgerüst das Gabosin C besitzt und als Glyoxylase-I-Inhibitor wirkt.



Die Biosynthese⁶³ der Gabosine wurde mit Hilfe von Fütterungsexperimenten mit isotopenmarkierten Vorläufern aufgeklärt. Sie läuft über den Pentosephosphatweg und nicht über den zuerst vermuteten Shikimisäureweg. Eine Transketolase katalysiert den Transfer eines C₂-Fragments von Fructose-6-phosphat auf Glycerinaldehyd-3-phosphat. Das daraus resultierende Xylulose-5-phosphat (X-5-P) kann durch Isomerisierung und Epimerisierung in Ribose-5-phosphat (R-5-P) umgewandelt werden. Danach findet, katalysiert durch eine Transaldolase, ein zweiter C₂-Fragment-Transfer von X-5-P zu R-5-P statt, der zu Sedoheptulose-7-phosphat (S-7-P) führt. Der vermutete Cyclisierungsmechanismus von S-7-P zum Grundgerüst der Gabosine ist an die bekannte Cyclisierung von 3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat (DAHP) zu Shikimat angelehnt (siehe Abbildung 5).

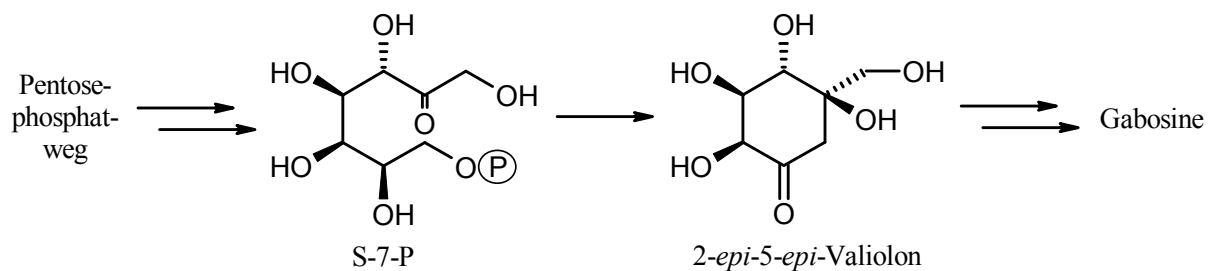


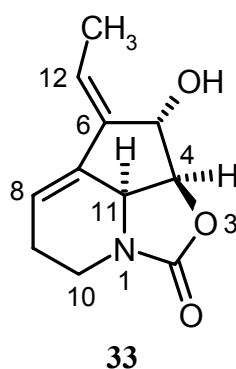
Abbildung 5: Biosyntheseweg der Gabosine.

4. *Actinomyces* sp. Stamm K 10/11

Im chemischen Screening fiel der Stamm K 10/11 durch eine gelbe Zone ($R_f = 0.4$), die im UV-Licht (366 nm) intensiv blau fluoresziert, und eine mit Anis in der Wärme braun anfärbende Substanz ($R_f = 0.6$) auf. Die LC-MS-Messungen der Rohextrakte einer Kultivierung im 1 L-Maßstab zeigten im Myzelextrakt eine stark UV-absorbierende Substanz (**35**), die eine Molmasse von 640 g/mol besitzt, und zwei UV-absorbierende Substanzen (**33** und **34**) im Kulturfiltratextrakt, denen aber keine eindeutige Masse zuzuordnen war. Die aus der 1 L-Fermentation isolierten Substanzen **33** – **35** (Ausbeuten: **33** = 35 mg/L, **34** = 5 mg/L und **35** = 100 mg/L) wurden ebenfalls von O. Schlörke in seiner Diplomarbeit⁶⁴ aus dem Stamm K 11/8 isoliert, der vom gleichen Baum wie K 10/11 stammt. Daher ist zu vermuten, dass diese Stämme gleich sind oder zumindest eine große Ähnlichkeit zueinander haben.

4.1. Streptazolin (**33**)

Im EI-Massenspektrum zeigt **33** ein Ion höchster Intensität bei $m/z = 207 [M]^+$. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt eine Methylgruppe bei $\delta_H = 1.86$ (d, $J = 7.5$ Hz), zwei Methylen-gruppen sowie fünf Methingruppen. Die Quartett-Aufspaltung von $\delta_H = 6.12$ (q, $J = 7.5$ Hz, 1H) spricht für eine benachbarte Methylgruppe ($\delta_H = 1.86$), gleichzeitig kann das Doppelbindungsproton keinen anderen Kopplungspartner besitzen. Zusammen mit der Molmasse und dem letztgenannten Strukturelement wurde eine Suche in AntiBase³⁹ durchgeführt. Die Substanz konnte als Streptazolin (**33**) identifiziert werden.⁶⁵

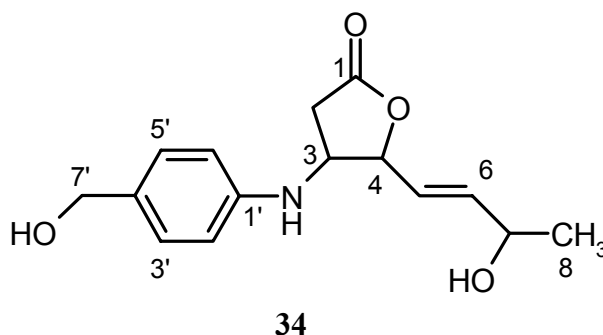


33 ist ein ungewöhnlicher Tricyclus mit einer Urethan-Einheit, die äußerst selten in der Natur vorkommt. Deshalb war es interessant für Biosyntheseuntersuchungen, die 1993 veröffentlicht wurden.⁶⁶ Aufgrund seines Dien-Charakters kann **33** für Diels-Alder-Reaktionen verwendet werden. Bei der Reaktion mit Naphthochinonen konnten Substanzen

isoliert werden, die bakterizide, fungizide und cytotoxische Wirkungen zeigten,⁶⁷ **33** selbst zeigt jedoch nur geringe antimikrobielle Aktivitäten.

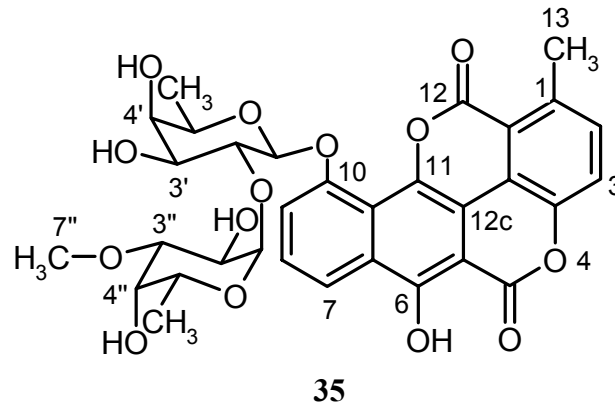
4.2. Obscurolid A3 (**34**)

Die Substanz **34** zeigt im EI-Massenspektrum ein Ion höchster Masse bei $m/z = 277 [M]^+$, eine anschließende Hochauflösung ergab die Summenformel $C_{15}H_{19}NO_4$. Im 1H -NMR-Spektrum finden sich zwei Signale ($\delta_H = 6.61$ und 7.14), die für je zwei Protonen integrieren und eine typische Kopplungskonstante für benachbarte aromatische Protonen zeigen ($J = 8.5$ Hz). Außerdem ist eine oxygenierte Methylengruppe ($\delta_H = 4.44$) zu erkennen. Mit diesen Strukturteilen und der Molmasse führte die Recherche in AntiBase³⁹ zu Obscurolid A3 (**34**),⁶⁸ welches ein Hemmstoff der Phosphodiesterase ist. Im ^{13}C -NMR-Spektrum fallen die aufgespaltenen Signale für C-4 bis C-8 auf. Es wird vermutet, dass es sich hierbei entweder um eine partielle Racemisierung an C-7 oder verschiedene Konformere handelt, die z.B. durch Rotation um die Bindungen der NH-Gruppe zustande kommen können.⁶⁹ Die Biosynthese wurde bisher noch nicht untersucht, es kann aber vermutet werden, dass die Kohlenstoffatome C-1 bis C-8 aus Acetat stammen und der aromatische Teil auf dem Shikimisäureweg aufgebaut wird.



4.3. Chartreusin (**35**)

Der gelbe Feststoff **35** fällt auf dem Dünnschichtchromatogramm ($R_f = 0.4$) durch seine intensive Fluoreszenz bei 366 nm auf. Die Löslichkeit in Methanol ist schlecht, in Pyridin und DMSO jedoch gut. Aufgrund des R_f -Wertes im Dünnschichtchromatogramm, der Eigenfarbe und des Löslichkeitsverhaltens wurde vermutet, dass es sich um Chartreusin handelt, einen schon häufiger in unserer Arbeitsgruppe gefundenen Metaboliten.^{44,64} Ein 1H -NMR- und ESI-MS-Experiment ($m/z = 639 [M-H]^+$) bestätigten diese Vermutung.



Chartreusin (**35**) wurde erstmals 1953 aus *Streptomyces chartreusis* isoliert⁷⁰ und durch chemischen Abbau^{71,72,73,74} in seiner Struktur aufgeklärt. **35** zeigt Antitumoraktivität,⁷⁵ die durch die Hemmung der Biosynthese von DNA, RNA und Proteinen verursacht wird,⁷⁶ und induziert zusammen mit reduzierenden Agentien Doppelstrangbrüche.⁷⁷ Für den klinischen Einsatz ist es jedoch trotz seiner starken Aktivität ungeeignet, da es bei oraler Gabe nur langsam über den Dünndarm resorbiert und bei intravenöser Gabe schnell über die Galle ausgeschieden wird.⁷⁵

Biosyntheseuntersuchungen ergaben, dass das Aglykon aus elf Acetateinheiten aufgebaut wird, wobei drei Kohlenstoffatome durch oxidative Bindungsspaltung als CO₂ verloren gehen und sich durch anschließende Lactonbildung das Aglykon bildet.⁷⁸

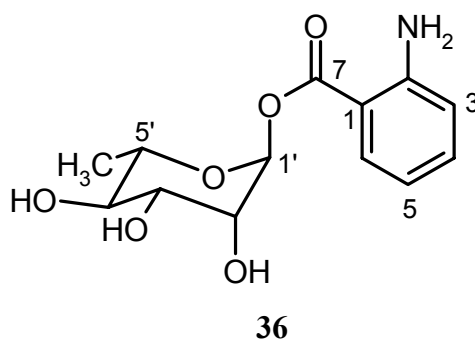
5. *Actinomyces* sp. Stamm K 17/2

5.1. 2-Aminobenzoyl- α -L-rhamnopyranosid (**36**)

Das Dünnschichtchromatogramm des Stammes K 17/2 zeigte im chemischen Screening eine bei 254 nm löschende und bei 366 nm fluoreszierende Zone ($R_f = 0.3$), die mit Anisaldehyd in der Wärme gelb-braun anfärbte. **36** konnte aus einer 1 L-Fermentation in einer Ausbeute von 3.5 mg/L isoliert werden.

Das DCI-Massenspektrum zeigt für **36** ein Ion höchster Masse bei $m/z = 301$ $[M+NH_4]^+$. Im ¹³C-NMR-Spektrum sind 13 C-Atome zu erkennen, davon eines im Esterbereich ($\delta_C = 167.4$), sechs im aromatischen Bereich ($\delta_C = 110 - 153$) und sechs für einen Zucker stehende Kohlenstoffatome ($\delta_C = 18.1, 71.4, 72.4, 72.5, 73.6$ und 95.0). Der Zucker konnte durch die ¹³C-Verschiebungen als Rhamnose identifiziert werden, das ¹H-NMR-Spektrum zeigt für das

anomere Proton ($\delta_{\text{H}} = 6.15$) eine Kopplungskonstante von $J = 2.0$ Hz, die typisch für eine α -Konfiguration ist. Die Kopplungskonstanten der verbleibenden Protonen des Zuckers bestätigen das Vorliegen einer α -L-Rhamnose. Über ein $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Experiment konnten die vier aromatischen Protonen einem Spinsystem zugeordnet werden, es handelt sich um einen 1,2-disubstituierten Aromaten. Eine Suche in AntiBase³⁹ führte zu 2-Aminobenzoyl- α -L-rhamnopyranosid (**36**). **36** konnte von S. Grond⁷⁹ in ihrer Doktorarbeit durch Vorläufer-dirigierte Biosynthese mit *Streptomyces griseovirdis* (Tü 3634) erhalten werden, wobei als Vorläufer 2-Aminobenzoesäure eingesetzt wurde. Untersuchungen zur Biosynthese zeigten, dass der Benzoesäurebaustein auf dem Shikimisäureweg aufgebaut wird, die Rhamnose geht aus Glucose hervor.⁸⁰



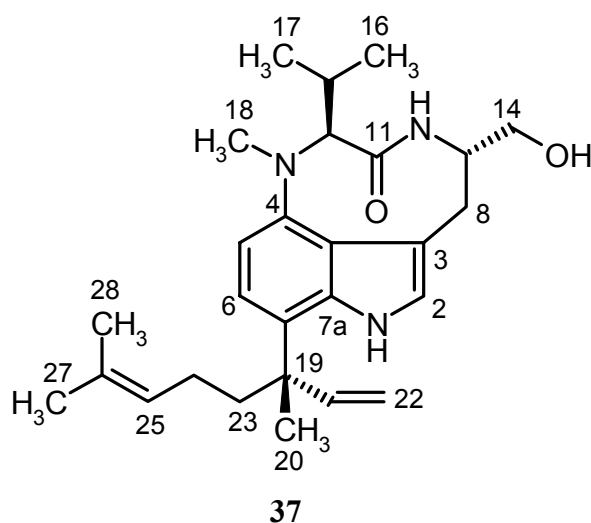
6. *Actinomyces* sp. Stamm K 17/7

Im chemischen Screening fiel der Stamm K 17/7 durch eine im Myzelextrakt enthaltene bei 254 nm UV-löschende und mit Anisaldehyd in der Wärme braun-violett anfärbende Zone ($R_f = 0.6$) auf. Die LC-MS-Untersuchung des Myzelextraktes aus der 1 L-Fermentation ergab drei Substanzen mit starker UV-Absorption, wobei das mittlere Signal eine Aufspaltung zeigte. Die dazugehörigen Massenionen lagen bei $m/z = 460$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (**37**), 474 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (**39**), 502 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (**38**) und 516 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (**40**). Aus der 1 L-Fermentation konnte aus dem Myzelextrakt jedoch nur **37** isoliert werden. Daraufhin wurden weitere Fermentationen mit dem Nährmedium Haferkleie im größeren Maßstab durchgeführt (siehe Kapitel B.II.7.2.), wobei verschiedene Fermenter gewählt wurden, um somit gleichzeitig auch die OSMAC-Methode²⁷ (One Strain/Many Compounds) anzuwenden. Es wurden Kultivierungen im 10 L-Airlift-Fermenter bei Normaldruck, 10 L-Airlift-Fermenter mit 5 bar Überdruck und 10 L als Ruhefermentation (P-Kolben) durchgeführt. Aus dem Myzelextrakt des Airlift-Fermenters bei Normaldruck konnten neben **37** drei weitere Substanzen (**38** – **40**) isoliert werden, von denen **38** und **40** in der Literatur bisher nicht beschrieben sind. **37** – **40** waren

ebenfalls in dem Airlift-Fermenter mit 5 bar Überdruck und in der Ruhefermentation in P-Kolben enthalten Die Aufarbeitung der jeweiligen Fermenter bis zu den Rohextrakten ist im Kapitel B.II.7.3. angegeben.

6.1. Teleocidin A-2 (37)

Das DCI-Massenspektrum von **37** zeigt ein Ion höchster Masse bei $m/z = 438 [M+H]^+$, das auf eine ungerade Anzahl von Stickstoffatomen schließen lässt. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind charakteristische Signale für zwei benachbarte aromatische Protonen ($\delta_{\text{H}} = 6.47$ und 6.96 , $J = 8.0$ Hz), eine endständige Doppelbindung ($\delta_{\text{H}} = 6.21$: dd, $J = 17.5$, 11.0 Hz; $\delta_{\text{H}} = 5.26$: dd, $J = 11.0$, 1.0 Hz; $\delta_{\text{H}} = 5.30$: dd, $J = 17.5$, 1.0 Hz), zwei diastereomere Methylengruppen ($\delta_{\text{H}} = 3.06/3.14$: $J_{\text{A,B}} = 17.5$ Hz; $\delta_{\text{H}} = 3.57/3.74$: $J_{\text{A,B}} = 11.0$ Hz), fünf C-Methylgruppen und eine N-Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 2.90$) zu erkennen. Eine Auffälligkeit im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum besteht durch die teilweise vorhandenen Doppelsignale (z.B. bei den Methylgruppen), die auf Konformere zurückzuführen sein könnten. Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum tritt das gleiche Phänomen auf, fast alle Signale kommen als Paare vor. Mit der Molmasse und den oben genannten Strukturelementen wurde eine Suche in AntiBase³⁹ durchgeführt, die zu den Strukturen von Teleocidin A-1 (= Lyngbyatoxin A) und A-2 (**37**) führte. Teleocidin A-1 und **37** unterscheiden sich nur in der Stereochemie an C-19: bei Teleocidin A-1 liegt eine *R*-Konfiguration vor, bei **37** eine *S*-Konfiguration.⁸¹ Zu unterscheiden sind die beiden Stereoisomere hauptsächlich durch geringe Unterschiede im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum an den Positionen 5 ($\Delta\delta_{\text{C}} = 0.5$), 7 ($\Delta\delta_{\text{C}} = 0.5$), 20 ($\Delta\delta_{\text{C}} = 0.6$), 21 ($\Delta\delta_{\text{C}} = 0.6$) und 23 ($\Delta\delta_{\text{C}} = 0.6$), die jeweiligen Verschiebungen sind in der Tabelle 3 gezeigt. Durch den Vergleich der $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten konnte **37** als Teleocidin A-2 identifiziert werden.



Das Indolactamgerüst der Teleocidine kann in zwei Konformationen vorliegen, der sogenannten Twist-Form (A, *cis*-Amidbindung) und der Sofa-Form (B, *trans*-Amidbindung).^{82,83} Diese beiden Konformere lassen sich sowohl im ¹H- als auch im ¹³C-NMR-Spektrum unterscheiden, besonders gut sind im ¹³C-NMR-Spektrum die doppelten Signalsätze zu erkennen. Die stärksten Veränderungen finden sich für das Indolactamgerüst im ¹H-NMR-Spektrum (Chloroform) an den Positionen 12 (A: $\delta_{\text{H}} = 4.3$, B: $\delta_{\text{H}} = 3.0$) und 16 (A: $\delta_{\text{H}} = 0.7$, B: $\delta_{\text{H}} = 1.3$), im ¹³C-NMR-Spektrum (Chloroform) an der Position 12 (A: $\delta_{\text{C}} = 71$, B: $\delta_{\text{C}} = 77$).⁸⁴ Diese Veränderungen können auch in den Spektren von **37** wiedergefunden werden. Bei **37** liegt das Verhältnis von Konformer A (Twist) zu Konformer B (Sofa) bei ca. 6:1.

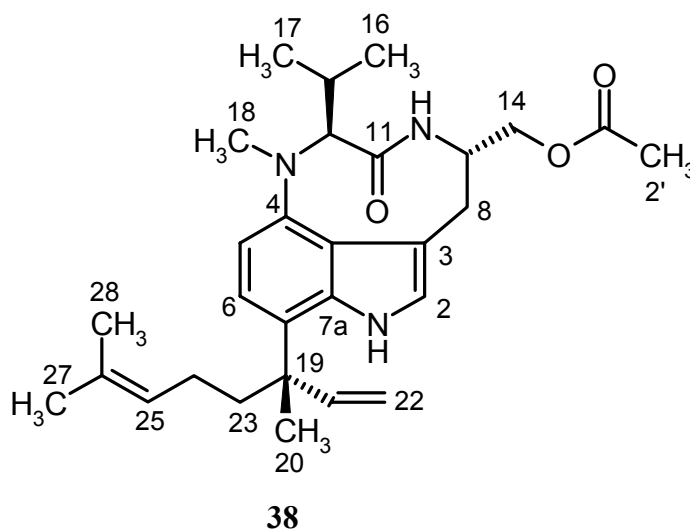
Nr.	37		TA1 ⁸⁵		TA2 ⁸⁵		38		14-O-Ac-TA1 ⁸⁶	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
3a	118.5	-	118.7	-	118.5	-	118.4	-	127.7	-
5	106.0	6.47	106.5	6.47	106.0	6.47	106.1	6.50	107.5	6.50
6	120.3	6.96	120.0	6.97	120.3	6.97	120.3	6.98	120.1	6.98
7	121.0	-	121.6	-	121.1	-	121.2	-	113.2	-
20	24.8	1.45	24.2	1.47	24.8	1.45	24.7	1.45	17.5	1.44
21	149.0	6.21	148.4	6.17	149.0	6.20	148.8	6.20	148.4	6.21
22	112.1	5.26 5.30	112.4	5.28 5.30	112.1	5.26 5.30	112.2	5.27 5.31	112.5	5.31 5.36
23	38.0	1.80 1.94	38.6	1.87	38.0	1.90	37.9	1.80 1.93	38.5	k.A.

Tabelle 3: Vergleich der wichtigsten ¹³C- und ¹H-NMR-Daten (Chloroform) der Twist-Form von **37** und **38** im Vergleich mit Literaturdaten von Teleocidin A-1 (TA1), A-2 (TA2) und 14-O-Acetylteleocidin A-1 (14-O-Ac-TA1); Verschiebungen in ppm; k.A. = keine Angabe.

6.2. 14-O-Acetylteleocidin A-2 (**38**)

Die hellgelbe ölige Substanz **38** zeigt im DCI-Massenspektrum ein Ion höchster Masse bei $m/z = 480$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, eine HRESI-MS-Messung ergab die Summenformel $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_3$, die durch die ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren bestätigt wird. Wie bei **37** sind im ¹³C-NMR-Spektrum doppelte Signalsätze sowie das C-12-Atom der Sofa-Form ($\delta_{\text{C}} = 77.2$) zu erkennen, im ¹H-NMR-Spektrum finden sich die Signale bei $\delta_{\text{H}} = 1.25$ (16-H) und 2.98 (12-H).

Zusätzlich treten in den 1D-Spektren Signale für eine Acetylgruppe auf (C-1': $\delta_C = 171.1$; C-2': $\delta_C = 20.8$; 2'-H₃: $\delta_H = 2.09$), die durch die Massendifferenz von $\Delta m/z = 42$ und einer zusätzlichen Esterbande im IR bei 1742 cm^{-1} bestätigt wird. Die Verknüpfung ist durch eine Tieffeldverschiebung der Protonen an C-14 von $\delta_H = 3.57/3.74$ (**37**) auf $3.98/4.18$ (**38**) gegeben. Durch Vergleich der ¹³C-NMR-Daten von **38** mit denen von **37** und Teleocidin A-1 (siehe Tabelle 3) konnte **38** als 14-*O*-Acetylteleocidin A-2 charakterisiert werden. Das Verhältnis von Twist- zu Sofa-Form beträgt bei **38** ca. 3:1.



38 ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. 2000 wurde die Struktur von 14-*O*-Acetyllyngbyatoxin A (= 14-*O*-Acetylteleocidin A-1) veröffentlicht.⁸⁶ Die Zuordnung der ¹³C-NMR-Verschiebungen von C-3a, C-7 und C-20 (siehe Tabelle 3) muss jedoch im Vergleich zu den bekannten Metaboliten der Teleocidin-Reihe als zweifelhaft angesehen werden, insbesondere im Vergleich mit den chemischen Verschiebungen von Teleocidin A-1. Die ¹³C-Verschiebungen von C-2 bis C-5 und C-7a des Indolactamgerüsts in der Twist-Form sind bei allen Metaboliten der Teleocidin-Reihe fast konstant ($\Delta\delta_C$ max. 3 ppm), bei 14-*O*-Acetylteleocidin A-1 weichen sie für C-3 um 9 ppm und für C-7 um 8 ppm ab. Zusätzlich zeigt sich eine Diskrepanz von fast 7 ppm bei der C-20-Methylgruppe, die nicht zu erklären ist. Die ¹H-NMR-Daten sind jedoch übereinstimmend mit denen von Teleocidin A-1, **37** und **38**.

6.3. Teleocidin B-3 (39)

Das DCI-Massenspektrum der hellgelben Substanz **39** zeigt ein Ion höchster Masse bei $m/z = 452 [M+H]^+$, die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren zeigen die typischen Indolactamsignale von Metaboliten der Teleocidin-Reihe. Eine HRESI-MS-Messung ergab die Summenformel $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_2$. Im ^{13}C -NMR-Spektrum sind wiederum doppelte Signalsätze zu erkennen (siehe Abbildung 7) sowie das Signal für C-12 ($\delta_{\text{C}} = 76.6$) der Sofa-Form. Eine Suche in AntiBase³⁹ mit der Molmasse und dem Indolactamgerüst ergab, dass es sich bei **39** um ein Teleocidin der B-Reihe handeln muss. Die Teleocidine B-1 bis B-4 (**41**, **42**, **39**, **43**) unterscheiden sich in der Stereochemie an C-19 und C-25, die Strukturen sind in Abbildung 8 dargestellt.

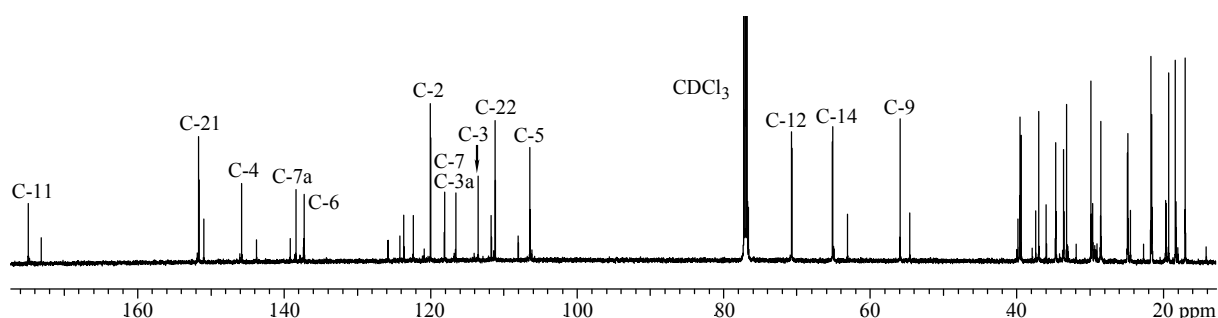
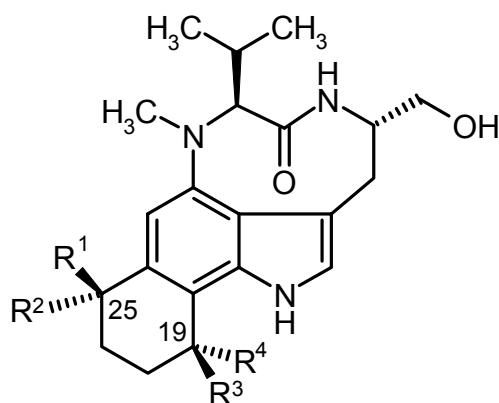


Abbildung 7: ^{13}C -NMR-Spektrum (150.8 MHz, Chloroform) von **39**, angegeben sind ausgewählte C-Atome der Twist-Form.

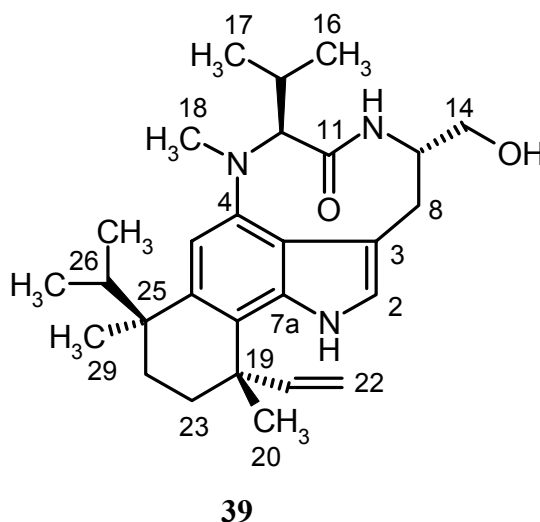


	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
41	<i>iso</i> -Propyl	CH ₃	Vinyl	CH ₃
42	CH ₃	<i>iso</i> -Propyl	CH ₃	Vinyl
39	<i>iso</i> -Propyl	CH ₃	CH ₃	Vinyl
43	CH ₃	<i>iso</i> -Propyl	Vinyl	CH ₃

Abbildung 8: Teleocidine der B-Reihe.

Die Teleocidine der B-Reihe können ebenso wie die Teleocidine A-1 und A-2 (**37**) anhand ihrer ^{13}C -NMR-Daten voneinander unterschieden werden. **41** und **42** können durch die chemischen Verschiebungen von C-20 ($\Delta\delta_{\text{C}} = 4.0 - 5.0$), C-21 ($\Delta\delta_{\text{C}} = 3.0 - 4.0$), C-22 ($\Delta\delta_{\text{C}} = 2.0 - 3.0$), C-24 ($\Delta\delta_{\text{C}} = 1.0 - 1.5$) und C-29 ($\Delta\delta_{\text{C}} = 1.0 - 1.5$) von **39** und **43** unterschieden

werden (siehe Tabelle 4). Aufgrund dieser Daten muss die Substanz entweder Teleocidin B-3 (**39**) oder B-4 (**43**) sein. **39** und **43** lassen sich wiederum durch kleine Unterschiede in den chemischen Verschiebungen von C-6 ($\Delta\delta_C = 0.6$), C-25 ($\Delta\delta_C = 0.6$), C-26 ($\Delta\delta_C = 0.9$) und C-29 ($\Delta\delta_C = 0.7$) voneinander unterscheiden. Demnach ist **39** identisch mit Teleocidin B-3. Das Verhältnis von Twist- und Sofa-Form beträgt für **39** ca. 5:1.



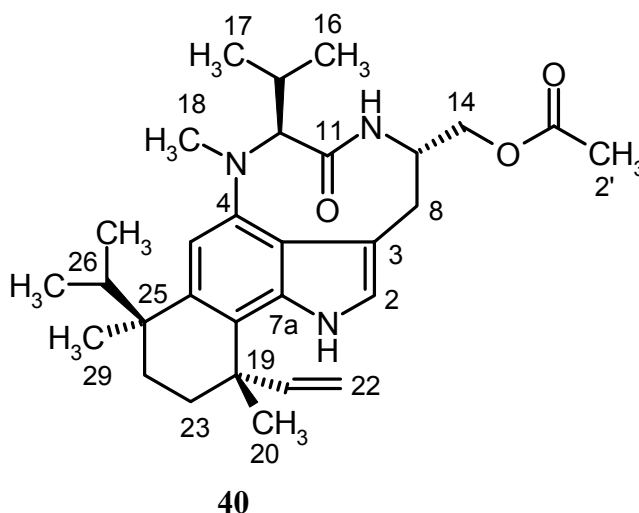
Nr.	39		41 ⁸⁷	42 ⁸⁷	TB3 ^{87,88}		43 ^{87,88}		40	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_C	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
6	137.2	-	137.9	137.6	137.3	-	137.9	-	137.2	-
20	21.7	1.49	26.5	25.4	21.6	1.46	21.7	1.51	21.6	1.50
21	151.6	6.24	147.6	148.3	151.6	6.22	151.9	6.16	151.4	6.22
22	111.1	5.27 5.40	113.2	112.8	111.1	5.24 5.37	111.2	5.25 5.41	111.2	5.27 5.40
24	24.9	1.44 1.93	26.1	26.7	24.9	k.A.	25.0	k.A.	24.8	1.40 1.90
25	39.6	-	40.2	40.1	39.6	-	40.1	-	39.5	-
26	37.0	2.29	37.2	38.2	37.0	2.27	37.9	2.25	36.9	2.26
29	29.8	1.33	27.8	27.9	29.8	1.30	29.1	1.35	29.8	1.30

Tabelle 4: Vergleich der wichtigsten ¹³C- und ¹H-NMR-Daten (Chloroform) der Twist-Form von **39** und **40** im Vergleich mit Literaturdaten von **41**, **42**, Teleocidin B-3 (TB3) und **43**; Verschiebungen in ppm; k.A. = keine Angabe.

6.4. 14-*O*-Acetylteleocidin B-3 (40)

Die ölige Substanz **40** zeigt im DCI-Massenspektrum ein Ion höchster Masse bei $m/z = 494$ $[M+H]^+$ und in den 1D-NMR-Spektren eine fast vollständige Übereinstimmung mit **39**. Eine HRESI-MS-Messung ergab die Summenformel $C_{30}H_{43}N_3O_3$, die Massendifferenz zwischen **39** und **40** beträgt wie bei **37** und **38** $\Delta m/z = 42$. Außerdem ist im IR wieder eine zusätzliche Esterbande bei 1742 cm^{-1} zu erkennen. Dies lässt wiederum auf eine zusätzliche Acetylgruppe schließen, die Signale hierfür sind in den 1D-Spektren vorhanden (C-1': $\delta_C = 171.1$, C-2': $\delta_C = 20.8$; 2'-H₃: $\delta_H = 2.10$). Die Verknüpfung ist wie bei **38** an der Position 14, das durch den Tieffeldshift der Protonen von $\delta_H = 3.62/3.79$ auf $4.02/4.19$ gezeigt wird. Zusammen mit den ^{13}C -NMR-Verschiebungen (siehe Tabelle 4) kann **40** als 14-*O*-Acetylteleocidin B-3 charakterisiert werden, das als Naturstoff neu ist, jedoch als Zwischenstufe bei der Totalsynthese von **39** schon beschrieben wurde.⁸⁸ Das Verhältnis von Twist- und Sofa-Form beträgt ca. 2:1.

Auffällig ist, dass die Acetylierung an Position 14 das Indolactamgerüst mehr in die Sofa-Form zu zwingen scheint, das Verhältnis von Twist- und Sofa-Form geht von 6:1 (**37**) auf 3:1 (**38**) sowie von 5:1 (**39**) auf 2:1 (**40**) zurück.



6.5. Die Gruppe der Teleocidine

Die Metaboliten der Teleocidin-Gruppe sind Indolalkaloide und besitzen als Baustein (-)-Indolactam V (**44**), das in zwei, nicht voneinander zu trennenden Konformeren vorkommt, der Twist- und der Sofa-Form.⁸³ Substitutionen mit verschiedenen Monoterpenoideinheiten an Position 7 oder 6 und 7 führt zu den Teleocidinen. Der erste isolierte Metabolit war das namensgebende Teleocidin, das 1960 von einer japanischen Arbeitsgruppe isoliert wurde.⁸⁹ Es zeigte hohe Toxizität gegenüber im Wasser lebenden Organismen, Nematoden und Säugetieren (Maus, Kaninchen). Außerdem wurden Hautirritationen bei Säugetieren beobachtet, es konnte jedoch keine Inhibierung von Mikroorganismen festgestellt werden.⁹⁰ 1962 wurde aus einem Streptomycesstamm das Teleocidin B isoliert, wodurch das zuvor isolierte Teleocidin in Teleocidin A umbenannt wurde.⁹¹ Das 1979 aus *Lyngbya majuscula* (ein Cyanobakterium) isolierte Lyngbyatoxin A zeigt in seiner Struktur große Ähnlichkeit zu Teleocidin B und ist Verursacher der sogenannten Seegrass-Dermatitis.⁹² Die absolute Konfiguration von Teleocidin B wurde 1984 bestimmt.⁹³ Etwas später konnten aus dem Stamm *Streptomyces mediocidius* vier Metaboliten (Teleocidine B-1 bis B-4: **41**, **42**, **39** und **43**) isoliert werden,⁸⁷ die alle die Struktur von Teleocidin B aufweisen, jedoch eine unterschiedliche Stereochemie an C-19 und C-25 besitzen. Dem ursprünglichen Teleocidin B wurde die Struktur B-4 (**43**) zugeordnet. Aus demselben Stamm konnten die Teleocidine A-1 (**45**) und A-2 (**37**) isoliert werden,⁸¹ wobei sich herausstellte, dass **45** mit Lyngbyatoxin A übereinstimmt. Ebenfalls zu der Gruppe der Teleocidine gehören die Lyngbyatoxine B und C aus *Lyngbya majuscula*,^{92,94} die Olivoretine aus *Streptomyces olivoreticuli*^{95,96} und die Blastmycetine aus *Streptomyces blastmyceticum*.^{97,98,99,100,101,102,103,104}

Neben den oben erwähnten biologischen Wirkungen sind die Metaboliten der Teleocidin-Reihe als Tumorpromotoren beschrieben.¹⁰⁵ Sie zeigen Wirkungen ähnlich zu denen von 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-*O*-acetat (TPA), z.B. die Inhibierung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF),¹⁰⁶ mitogene Effekte auf Lymphozyten¹⁰⁷ und die irreversible Aggregation von Blutplättchen,¹⁰⁸ obwohl sie strukturell völlig unterschiedlich aufgebaut sind (siehe Abbildung 9). Bei Untersuchungen mit synthetisierten und in ihrer Konformation festgelegten Indolactamen konnte festgestellt werden, dass die bevorzugte Twist-Form der Teleocidine auch die biologisch aktive Konformation ist.^{109,110}

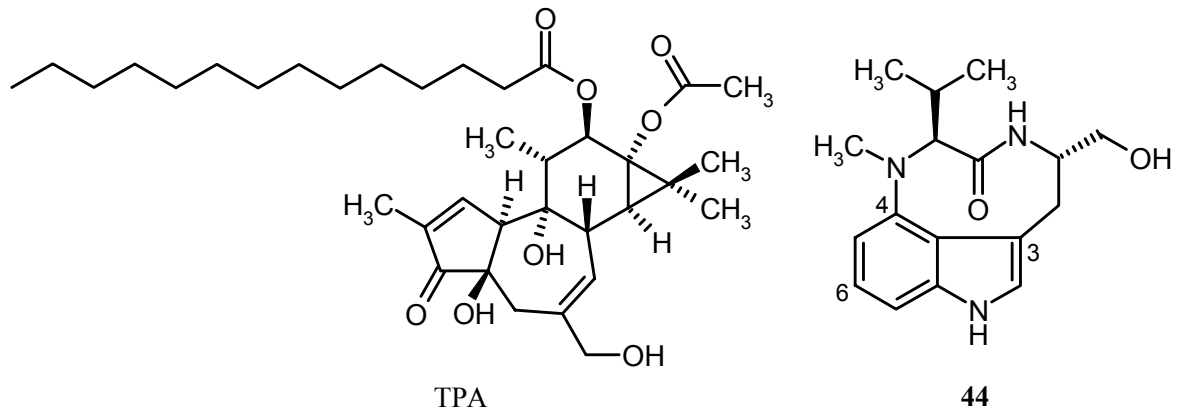


Abbildung 9: Strukturvergleich von TPA und dem Indolactamgerüst (**44**) der Teleocidine.

Aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Aktivitäten sowie der ungewöhnlichen Struktur waren die Teleocidine Ziel von Biosyntheseuntersuchungen, die mit dem Stamm *Streptomyces blastmyceticum* durchgeführt wurden. Es konnte festgestellt werden, dass das (-)-Indolactam V (**44**) aus L-Tryptophan, L-Valin und S-Methylmethionin ([CH₃]) über N-Methyl-L-valyl-L-tryptophanol (**46**) aufgebaut wird.¹¹¹ Es wurde vermutet, dass die Monoterpenoideinheit über den Mevalonat-Weg gebildet wird, jedoch wurden die entsprechenden markierten Vorläufer nicht eingebaut.¹¹² In der Arbeitsgruppe von M. Rohmer konnte gezeigt werden, dass in Bakterien ein weiterer Biosyntheseweg existiert, der sogenannte Nicht-Mevalonat-Weg,¹¹³ bei dem Isoprenoide aus Kohlenhydraten hervorgehen. Ausgehend von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA-3-P), die aus dem Kohlenhydratstoffwechsel stammen, werden die Terpenbausteine Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) aufgebaut. 1998 konnte für die Teleocidine aus dem Stamm *Streptomyces blastmyceticum* durch Fütterung von D-[1-¹³C]Glucose gezeigt werden, dass der Nicht-Mevalonat-Weg für die Biosynthese der Monoterpenoideinheit genutzt wird.¹¹⁴ In einer anderen Arbeit wurde festgestellt,¹¹² dass Deuterium-markiertes Teleocidin A-1 (**45**) in Teleocidin B-4 (**43**) und Olivoretin A (**47**) eingebaut wurde. Die eine lineare Monoterpenoideinheit besitzende Teleocidine der A-Reihe sind daher vermutlich Vorläufer der Teleocidine der B-Reihe, die eine cyclisierte Monoterpenoideinheit besitzen. Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass das in der B-Reihe zusätzlich vorhandene Kohlenstoffatom C-29 aus S-Methylmethionin ([CH₃]) stammt.

Die bei diesen Untersuchungen isolierten Blastmycetine D (**48**) und E (**49**) stellen ebenfalls wahrscheinliche Vorläufer von Metaboliten der Teleocidin-Gruppe dar. Diese Vermutung konnte durch chemische Reaktionen mit den beiden Metaboliten bekräftigt werden. Die Behandlung von **48** mit Phosphorsäure für 20 h bei Raumtemperatur lieferte **47**. **49** lässt

vermuten, dass die Monoterpenoideinheit über (-)-1-*N*-Nerylindolactam V (**49**) durch eine Aza-Claisen-Umlagerung an Position 7 eingeführt wird. Die Einführung der C-29-Methylgruppe muss auf der Stufe von **45** oder **49** geschehen. Dass der Einbau der zusätzlichen Methylgruppe auf verschiedenen Stufen der Biosynthese erfolgen kann, beweist **49**. Es besitzt trotz noch nicht erfolgter Aza-Claisen-Umlagerung bereits die C-29-Methylgruppe, die jedoch an Position 26 anstelle von Position 25 eingeführt wurde. Außerdem ergab die Behandlung von **49** mit 1 %iger Essigsäure in Methanol/Wasser 1:1 bei 70 °C Des-*O*-methylolivoretin E (**50**), was die Vorläuferrolle bestätigt. Die aufgrund dieser Untersuchungen vorgeschlagenen Biosynthesewege sind in Abbildung 10 dargestellt.

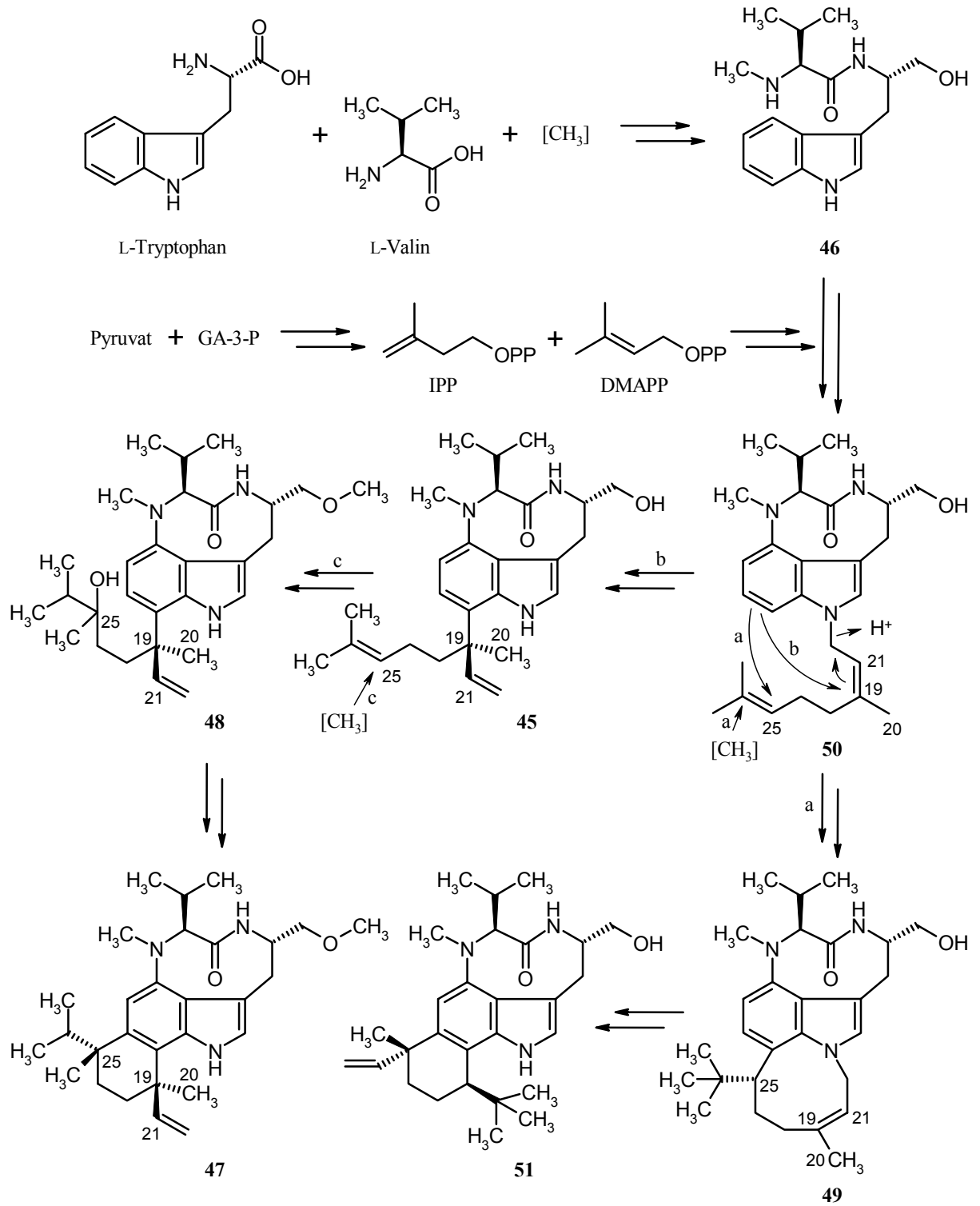


Abbildung 10: Vermutete Biosynthesewege der Teleocidine.

7. *Actinomyces* sp. Stamm K 17/9

Der Stamm K 17/9 fiel im chemischen Screening durch eine im Kulturfiltratextrakt enthaltene bei 254 nm UV-löschende und mit Anisaldehyd in der Wärme stark violett anfärbende Zone ($R_f = 0.3$) auf. Im LC-MS-Screening zeigte der Kulturfiltratextrakt zwei UV-aktive Substanzen mit den Molmassen 222 g/mol und 223 g/mol und der Myzelextrakt ebenfalls zwei UV-aktive Substanzen, denen aber keine eindeutige Molmasse zugeordnet werden konnte. Aus einer 1 L-Kultivierung konnten die Substanzen **52**, **56**, **58**, **65** und **75** isoliert werden. Diese fünf Metaboliten haben alle unterschiedliche Grundgerüste. Um das Biosynthesepotential dieses Stammes weiter zu untersuchen, wurden im Sinne der OSMAC-Methode²⁷ (One Strain/Many Compounds) die Kultivierungsbedingungen variiert. Es wurden Fermentationen im 4 L-Maßstab (Biostat B, Blattrührfermenter), 10 L bei Normaldruck (Airlift-Fermenter, Umwurfffermenter), 10 L mit 5 bar Überdruck (Airlift-Fermenter) und 10 L als Ruhefermentation (P-Kolben) durchgeführt (siehe Kapitel B.II.8.2.). Die Aufarbeitung der erhaltenen Kulturbrühen bis zu den Rohextrakten ist im Kapitel B.II.8.3. angegeben. Eine Übersicht über die Ausbeuten der isolierten Substanzen aus den verschiedenen Kultivierungsansätzen ist in Tabelle 5 gegeben.

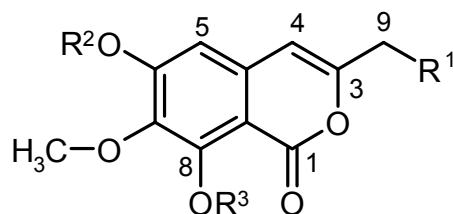
Insgesamt konnten aus allen Kultivierungsvariationen 14 verschiedene Sekundärmetaboliten isoliert werden, von denen **54**, **65** und **78** bisher nicht in der Literatur beschrieben worden sind.

	SK (1 L) [mg/L]	BB (4 L) [mg/L]	AL1 (10 L) [mg/L]	AL2 (10 L) [mg/L]	PK (10 L) [mg/L]
52	7.0	23.0	21.0	17.5	14.0
53	-	-	1.0	1.5	3.5
54	-	-	-	0.1	0.3
55	-	0.5	0.2	-	-
56	2.0	4.0	2.0	2.5	1.5
57	-	5.5	0.5	1.0	1.5
58	10.0	21.5	5.5	5.5	4.5
59	14.0*	-	-	-	-
63	-	-	0.8	-	-
64	-	-	0.3	0.1	-
65	-	7.0	5.5	2.0	1.0
75	1.5	15.0	10.0	13.0	-
76	-	-	-	0.2	-
78	-	-	-	1.0	-

Tabelle 5: Übersicht über die Ausbeuten der isolierten Substanzen aus den verschiedenen Kultivierungen des Stammes K 17/9 (SK = Schüttelkolben, BB = Biostat B, AL1 = Airlift-Fermenter bei Normaldruck, AL2 = Airlift-Fermenter mit 5 bar Überdruck, PK = P-Kolben, * 59 wurde aus Schüttelkolben (1 L) mit Soja/Mannit als Nährmedium isoliert).

7.1. Isocoumarine

Aus den verschiedenen Kultivierungsvariationen des Stammes K 17/9 konnten die vier Isocoumarine **52** – **55** isoliert werden.



	R ¹	R ²	R ³
52	H	H	H
53	H	CH ₃	H
54	H	H	CH ₃
55	OH	H	H

7.1.1. Reticulol (**52**)

Die weiße mit Anisaldehyd in der Wärme stark violett anfärbende Substanz **52** zeigt im ¹H-NMR-Spektrum sechs Signale, von denen eines einer Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 2.25$), eines einer Methoxygruppe ($\delta_{\text{H}} = 4.02$), zwei Methingruppen ($\delta_{\text{H}} = 6.18$ und 6.40) und zwei mit D₂O austauschbaren Protonen ($\delta_{\text{H}} = 6.51$ und 11.30) zugeordnet werden können. Die Verschiebung von $\delta_{\text{H}} = 11.30$ weist auf eine Carbonsäure oder eine chelatisierte Hydroxygruppe hin. Das ¹³C-NMR-Spektrum zeigt insgesamt elf C-Atome, von denen sieben quartär sind. Ein HREI-Massenspektrum führte zur Summenformel C₁₁H₁₀O₅. Eine Suche in AntiBase³⁹ führte zum Reticulol (**52**),^{115,116} einem Inhibitor der cyclischen Nukleotid-Phosphodiesterasen.¹¹⁷ Die Zuordnung der quartären C-Atome konnte durch ein HMBC-Experiment bestimmt werden (siehe Abbildung 11).

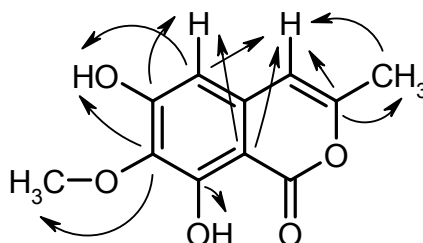


Abbildung 11: Wichtige HMBC-Kopplungen von **52**.

Die Biosynthese von **52** wurde 1977 untersucht.¹¹⁶ Eine Polyketidsynthase vom Typ II baut aus fünf Acetateinheiten eine Pentaketidkette auf. Durch Cyclisierung, Aromatisierung und Lactonbildung entsteht **52**. Die Herkunft der 7-*O*-Methylgruppe aus *S*-Methylmethionin konnte durch Fütterungsexperimente mit markiertem Methionin bewiesen werden.

7.1.2. 6-*O*-Methylreticulol (**53**)

Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von **52** und dem weißen mit Anisaldehyd in der Wärme ebenfalls violett anfärbenden **53** stimmen fast vollständig überein. Auffälligster Unterschied ist das Fehlen des Signals für die Hydroxygruppe bei $\delta_{\text{H}} = 6.40$, an deren Stelle bei **53** eine Methoxygruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.89$ tritt. Eine HREI-MS-Messung bestätigte die angenommene Summenformel C₁₂H₁₂O₅, bei **53** handelt es sich um 6-*O*-Methylreticulol.¹¹⁵

7.1.3. 8-*O*-Methylreticulol (**54**)

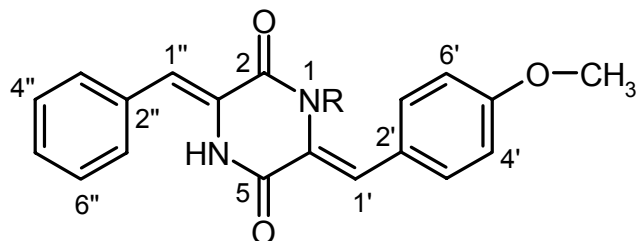
Die weiße mit Anisaldehyd in der Wärme violett anfärbende Substanz **54** zeigt wiederum fast vollständige Übereinstimmung in den 1D-NMR-Spektren mit **52** und **53**. Im ¹H-NMR-Spektrum sind wie bei **53** zwei Methoxygruppen zu erkennen, jedoch fehlt das Signal für die chelatisierte Hydroxygruppe bei $\delta_{\text{H}} = 11.04$, dafür ist die Hydroxygruppe bei $\delta_{\text{H}} = 6.39$ zu erkennen. Das EI-Massenspektrum zeigt ein Ion höchster Masse bei $m/z = 236$ [M]⁺. Zusammen mit dem ¹³C-NMR-Spektrum ergibt sich daraus die gleiche Summenformel (C₁₂H₁₂O₅) wie bei **53**. Daher wurde **54** als 8-*O*-Methylreticulol charakterisiert, das in der Literatur bisher nicht beschrieben worden ist.

7.1.4. 9-Hydroxyreticulol (**55**)

55 ist ein weißer mit Anisaldehyd in der Wärme braun anfärbender Feststoff, der in den 1D-NMR-Spektren starke Ähnlichkeiten zu den oben charakterisierten Substanzen **52** – **54** zeigt. Auffälligster Unterschied im ¹H-NMR-Spektrum zu dem von **52** ist das Fehlen der Methylgruppe bei $\delta_{\text{H}} = 2.25$, an deren Stelle eine oxygenierte Methylengruppe bei $\delta_{\text{H}} = 4.34$ tritt. Das EI-Massenspektrum zeigt ein Ion höchster Masse bei $m/z = 238$ [M]⁺, das zusammen mit dem ¹³C-NMR-Spektrum die Summenformel C₁₁H₁₀O₆ ergibt. Durch zusätzlichen Vergleich mit Literaturdaten¹¹⁸ konnte **55** als 9-Hydroxyreticulol identifiziert werden.

7.2. Diketopiperazine

Unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen des Stammes K 17/9 konnten die zwei unten abgebildeten Diketopiperazine **56** und **57** isoliert werden.



56: R = CH₃

57: R = H

7.2.1. XR330 (**56**)

Die auf dem Dünnschichtchromatogramm gelbe, UV-löschende (254 nm) und bei 366 nm gelb fluoreszierende Substanz **56** zeigt im EI-Massenspektrum ein Ion höchster Intensität und Masse bei $m/z = 334$ [M]⁺. Zusammen mit dem ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum ergab eine HREI-MS-Messung die Summenformel C₂₀H₁₈N₂O₃. Im ¹H-NMR-Spektrum sind eine *N*-Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 2.98$), eine Methoxygruppe ($\delta_{\text{H}} = 3.83$), elf Protonen im aromatischen bzw. olefinischen Bereich ($\delta_{\text{H}} = 7.0 - 7.4$) und ein mit D₂O austauschbares Proton ($\delta_{\text{H}} = 8.05$) zu erkennen. Im ¹³C-NMR-Spektrum fallen vier Signale auf, deren Intensitäten jeweils zwei chemisch äquivalente C-Atome anzeigen, in diesem Fall von einem einfach- und einem *para*-substituierten Aromaten. Eine Datenbanksuche in AntiBase³⁹ und Vergleich mit Literaturdaten¹¹⁹ führte zum Diketopiperazin XR330 (**56**).

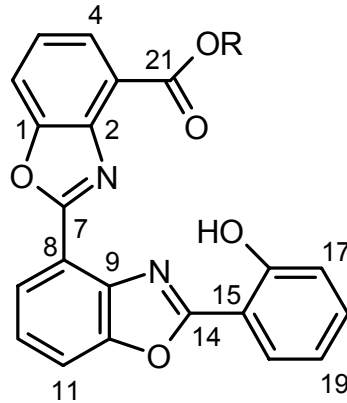
7.2.2. XR334 (**57**)

Der gelbe Feststoff **57** zeigt in den 1D-NMR-Spektren fast vollständige Übereinstimmung mit den Spektren von **56**. Einziger Unterschied zu **56** besteht in dem Fehlen der *N*-Methylgruppe bei $\delta_{\text{H}} = 2.83$. Eine HREI-MS-Messung bestätigte die vermutete Summenformel C₁₉H₁₆N₂O₃. Bei **57** handelt es sich um das Diketopiperazin XR334.¹¹⁹

Die Diketopiperazine **56** und **57** fielen in einem Screeningprogramm für Inhibitoren der PAI-1-Aktivität (plasminogen activator inhibitor-1) auf, einem physiologischen Regulator der Fibrinolyse.¹¹⁹

7.3. Benzoxazole

Unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen konnten zwei Benzoxazole (**58** und **59**) aus dem Stamm K 17/9 isoliert werden.



58: R = CH₃

59: R = H

7.3.1. Antibiotikum UK-1 (**58**)

Der hellgelbe Feststoff **58** absorbiert auf Dünnschichtchromatogrammen UV-Licht bei 254 nm und zeigt eine gelbe Fluoreszenz bei 366 nm. Im EI-Massenspektrum findet sich ein Ion höchster Masse bei $m/z = 386 [M]^+$. Im ¹³C-NMR-Spektrum sind 22 C-Atome zu erkennen, im ¹H-NMR-Spektrum eine Methoxygruppe ($\delta_H = 4.17$), zehn aromatische Protonen ($\delta_H = 7.0 - 8.1$) und ein mit D₂O austauschbares Proton ($\delta_H = 11.96$). Durch ein ¹H,¹H-COSY-Experiment konnten drei verschiedene aromatische Spinsysteme bestimmt werden (siehe Abbildung 12), wobei es sich um zwei 1,2,3-trisubstituierte und einen 1,2-disubstituierten Aromaten handelt.

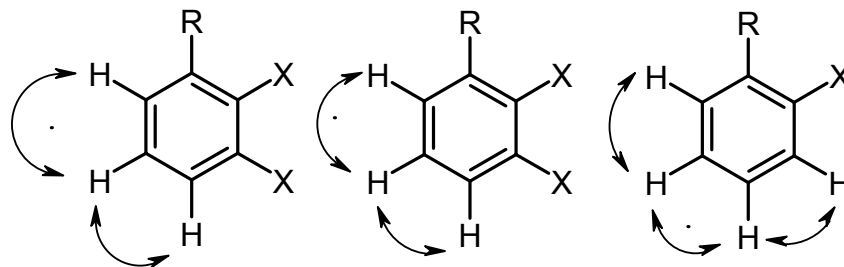


Abbildung 12: ¹H,¹H-COSY-Fragmente von **58**, X = Heteroatom, R = C-Atom.

Mit diesen Strukturteilen, der Molmasse und der Anzahl der C-Atome wurde eine Suche in AntiBase³⁹ durchgeführt, die zum Antibiotikum UK-1 (**58**) führte, einem dimeren Benzoxazol-Derivat. Ein Vergleich mit den Literaturdaten^{120,121} bestätigte die Zuordnung.

7.3.2. Demethyl-UK-1 (59)

Die 1D-NMR-Spektren des gelben Feststoffs **59** stimmen fast vollständig mit denen von **58** überein. Einziger Unterschied ist das Fehlen der Ester-Methoxygruppe bei $\delta_{\text{H}} = 4.17$. Das $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Experiment zeigte wiederum die drei aromatischen Spinsysteme. Daher konnte **59** als Demethyl-UK-1 identifiziert werden.¹²¹

58 zeigt keine antibakterielle oder antifungische Aktivität, ist jedoch cytotoxisch und inhibiert die menschliche Topoisomerase II.^{120,122} **59** hingegen besitzt antibakterielle¹²³ und das 16-O-Methyl-UK-1 wiederum antifungische Aktivität.¹²⁴

7.3.3. Vermutete Biosynthese der Benzoxazole

Die Biosynthese von **58** und **59** verläuft höchstwahrscheinlich über den Shikimisäureweg. Als Bausteine werden Methyl-3-hydroxyanthranilsäure (**60**), 3-Hydroxyanthranilaldehyd (**61**) und Salicylaldehyd (**62**) angenommen. Der vorgeschlagene Weg ist in Abbildung 13 dargestellt.¹²¹

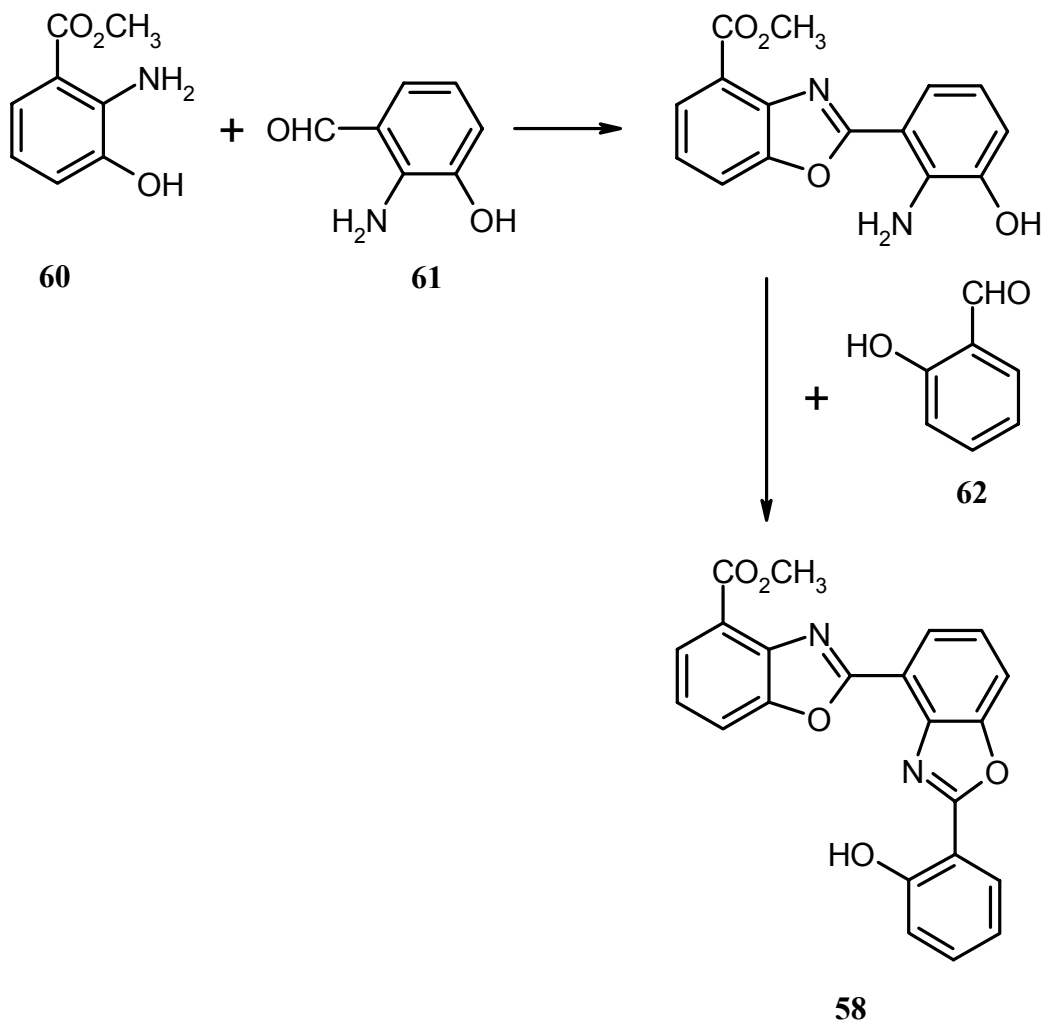


Abbildung 13: Vorgeschlagener Biosyntheseweg für UK-1 (**58**).

7.4. Piericidine

7.4.1. Piericidin A₁ (63)

63 liefert im DCI-Massenspektrum ein Ion höchster Intensität bei $m/z = 416 [M+H]^+$ und im ^{13}C -NMR-Spektrum 25 Kohlenstoffatome. Die ungerade Molmasse ($M = 415 \text{ g/mol}$) deutet auf mindestens ein Stickstoffatom im Molekül hin. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt Signale von sechs Methylgruppen ($\delta_{\text{H}} = 0.8 - 2.1$), zwei Methoxygruppen ($\delta_{\text{H}} = 3.84$ und 3.93), zwei Methylengruppen ($\delta_{\text{H}} = 2.77$ und 3.37) und sieben Methingruppen. Im ^{13}C -NMR-Spektrum können insgesamt acht quartäre C-Atome erkannt werden, die alle im aromatischen bzw. olefinischen Bereich liegen. Durch die Kopplungskonstanten des ^1H -NMR-Spektrums und eines $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Experimentes konnten die in Abbildung 14 gezeigten Fragmente aufgestellt werden.

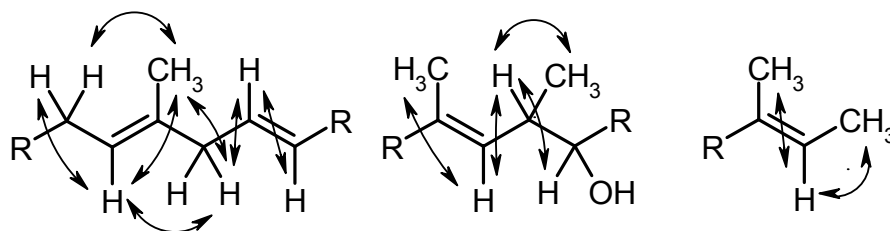
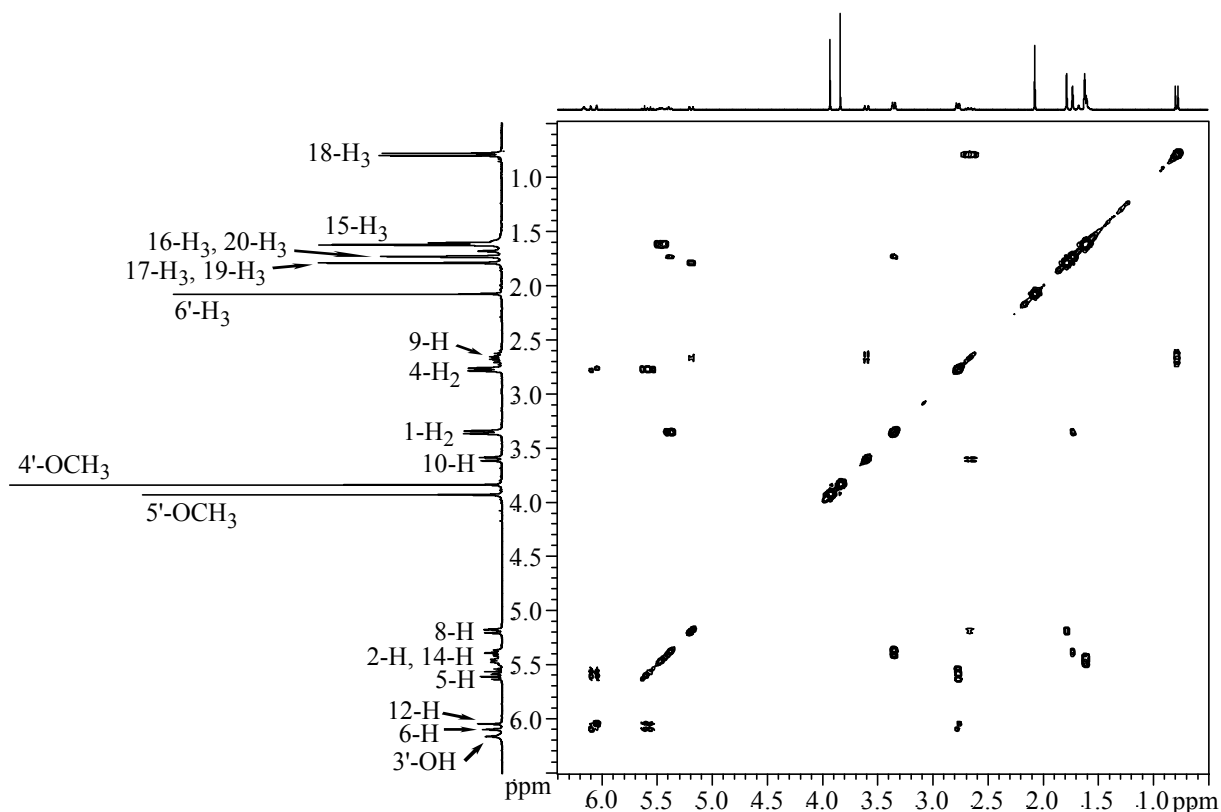
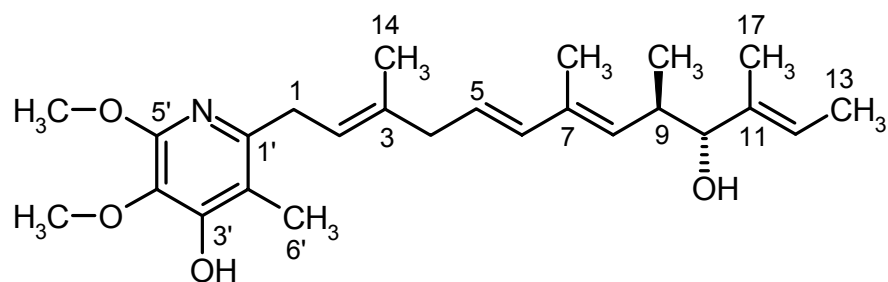


Abbildung 14: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (300 MHz, Chloroform) von **63** und daraus abgeleitete Strukturfragmente.

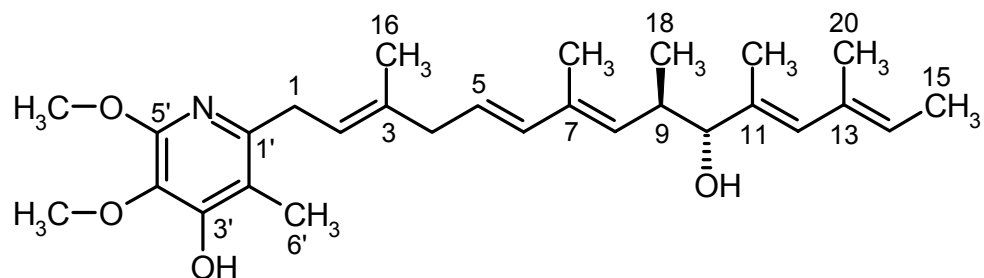
Eine daran anschließende Datenbankrecherche in AntiBase³⁹ mit diesen Fragmenten, der Molmasse und der Anzahl der C-Atome führte zu Piericidin A₁ (**63**).¹²⁵

**63**

Piericidin A₁ (**63**) fiel 1963¹²⁶ in einem Screeningprogramm als Insektizid auf. Die Konstitution wurde in den folgenden Jahren durch Abbaureaktionen und Vergleich mit synthetisierten Verbindungen^{127,128,129} sowie Biosynthesestudien¹³⁰ aufgeklärt, die Stereochemie an C-9 und C-10 konnte erst 1983 endgültig geklärt werden.¹³¹ Bei weitergehenden biologischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass **63** ein Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette ist,¹³² 1998 wurde die 49-kDa-Untereinheit der NADH/Ubichinon-Oxidoreduktase als Bindungsstelle identifiziert.¹³³

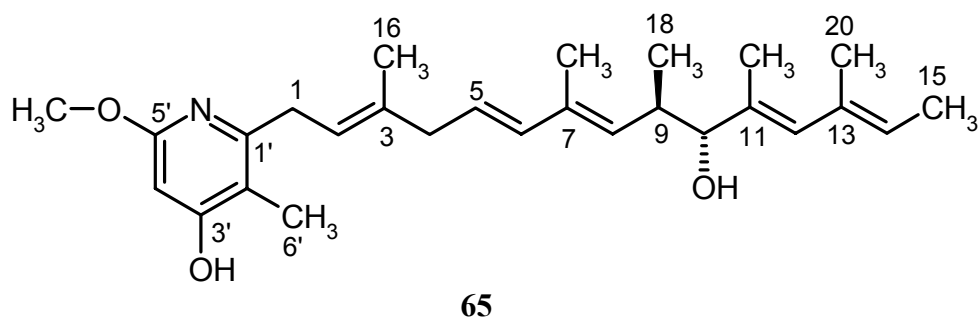
7.4.2. IT-143-B (**64**)

Das DCI-Massenspektrum von **64** zeigt ein Ion höchster Masse bei $m/z = 456$ $[M+H]^+$. Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren zeigen im Vergleich zu **63** drei zusätzliche Signale, eine Methylgruppe ($\delta_H = 1.73$, $\delta_C = 16.6$), eine Methingruppe ($\delta_H = 5.39$, $\delta_C = 124.7$) und ein quartäres C-Atom ($\delta_C = 133.0$). Dies wird durch die Massendifferenz von $\Delta m/z = 40$ bestätigt. Die Signale des Pyridinringes und der Seitenkette von **63** können in den Spektren von **64** wiedergefunden werden. Es handelt sich hierbei um eine Propionateinheit verlängertes Piericidin A₁-Derivat. Durch Vergleich mit Literaturdaten¹³⁴ konnte **64** als IT-143-B identifiziert werden. Die Stereochemie an C-9 und C-10 ist in Anlehnung an **63** dargestellt.

**64**

7.4.3. 4'-Demethoxy-IT-143-B (65)

Im ESI-Massenspektrum von **65** ist ein Ion bei $m/z = 424 [M-H]^-$ zu sehen, die 1D-NMR-Spektren sind denen von **64** sehr ähnlich. Im ^{13}C -NMR-Spektrum sind 27 C-Atome zu erkennen, im ^1H -NMR-Spektrum fehlt gegenüber **64** das Signal für eine Methoxygruppe, dafür ist ein zusätzliches Methinproton bei $\delta_{\text{H}} = 5.86$ zu erkennen. Die Massendifferenz von $\Delta m/z = 30$ zwischen **64** und **65** bestätigt dieses Ergebnis. Die Signale der Seitenkette von **64** sind in den 1D-NMR-Spektren von **65** wiederzufinden. Der Vergleich mit Mer-A2026B¹³⁵ (**66**, siehe Abbildung 15), das den gleichen Pyridinring wie **65** besitzt, bestätigt das Fehlen der Methoxygruppe an C-4', die NMR-Daten des Pyridinringes stimmen mit denen von **65** überein. Daher konnte **65** als 4'-Demethoxy-IT-143-B charakterisiert werden, das bisher in der Literatur nicht beschrieben worden ist. Die Stereochemie an C-9 und C-10 ist in Anlehnung an **63** dargestellt. Außer den Piericidinen Mer-A2026A und Mer-A2026B (**66**) ist **65** das einzige Piericidin-Derivat, das keine Methoxygruppe an C-4' besitzt.



7.4.4. Die Gruppe der Piericidine

Mittlerweile sind mehr als 20 Piericidine bekannt, allein aus *Streptomyces pactum*^{125,136} konnten insgesamt 16 isoliert werden, unter anderem A₁ (**63**), B₁ (**67**), C₁ (**68**) und D₁ (**69**), die sich nur in der Seitenkette unterscheiden. Der Pyridinring ist gleich und besitzt die Konstitution von **63**. 1987 konnten die Glucopiericidine A (**70**) und B isoliert werden, die antimikrobielle Aktivitäten zeigen und die Bildung von Antikörpern inhibieren.¹³⁷ Die Wirkungen der Glucopiericidine sind stärker als die von **63**, die akute Toxizität in Mäusen jedoch geringer, was darauf hinweist, dass der Zuckerbaustein wichtig für die Regulierung der physiologischen Aktivität ist. In den darauf folgenden Jahren konnten weitere Glycopiericidine isoliert werden: Glucopiericidinole A₁ (**71**) und A₂ (cytotoxische Aktivität),¹³⁸ 13-Hydroxyglucopiericidin A (**72**),¹³⁹ 3'-Rhamnopericidin A₁,¹⁴⁰ 7-Demethyl-3'-rhamnopericidin A₁¹⁴¹ und 3'-Desoxytalopericidin A₁.¹⁴² Weitere Metaboliten der Piericidin-Reihe sind 7-Demethylpericidin A₁ (**73**),¹⁴¹ Piericidin B₁ N-Oxid (**74**) (ein

Phosphatidylinositol-Turnover-Inhibitor),¹⁴³ Piericidin B₅ und B₅ N-Oxid,¹⁴⁴ Mer-A2026A und Mer-A2026B (**66**) (Vasodilatoren)^{135,145} sowie IT-143-A und IT-143-B (**64**).¹³⁴ Eine kurze Übersicht ist in Abbildung 15 gegeben.

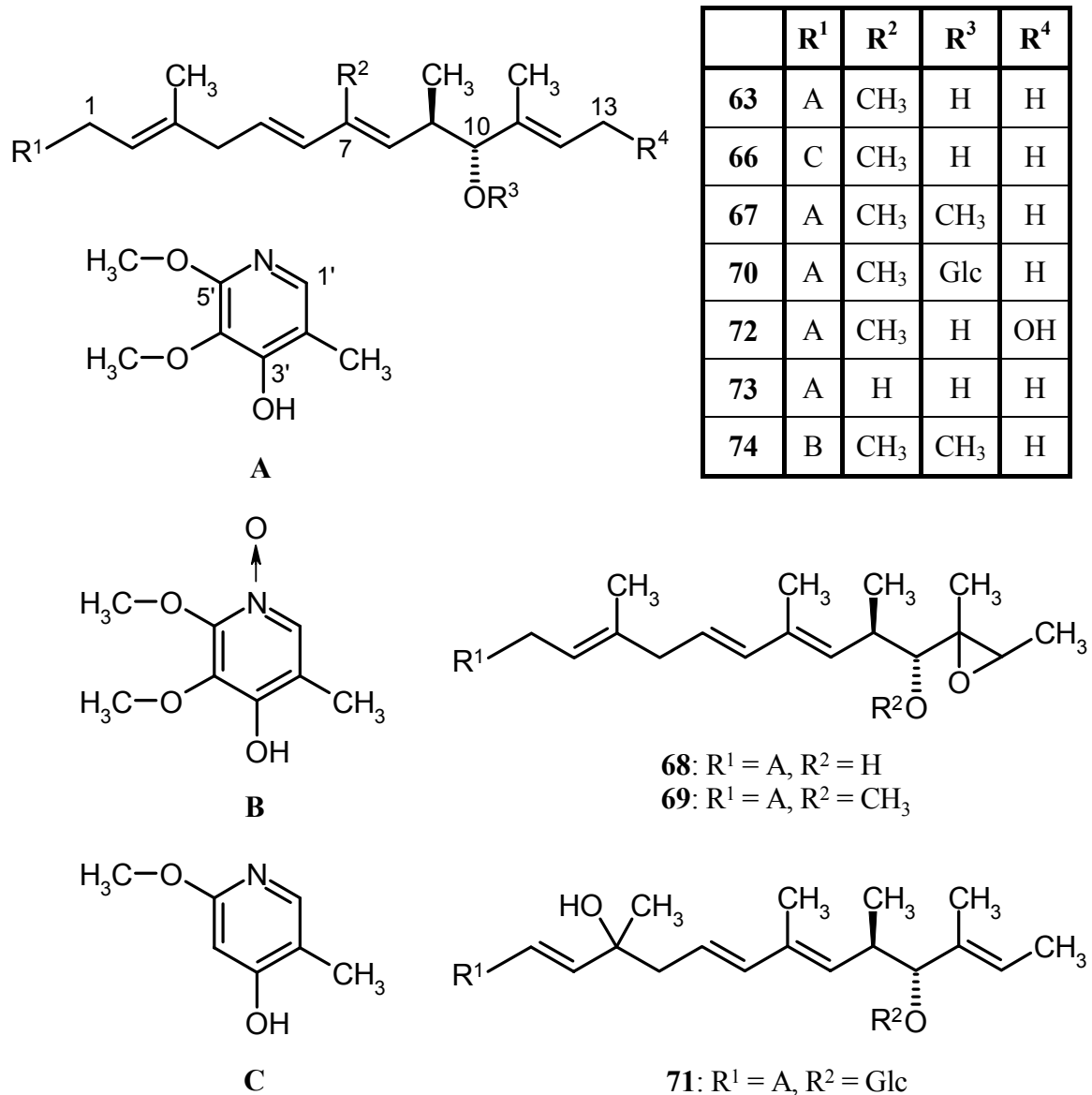
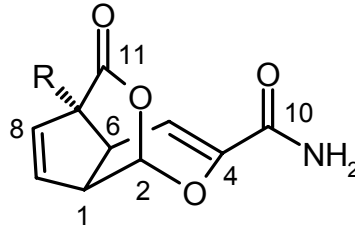


Abbildung 15: Ausgewählte Metaboliten der Piericidin-Reihe; Glc = Glucose.

Biosynthetisch werden die Piericidine über eine Typ I Polyketidsynthese aufgebaut. Untersuchungen fanden mit markierten Vorläufern bei Piericidin A₁ (**63**) und B₁ (**67**) statt, wobei festgestellt wurde, dass sie aus vier Acetat- und fünf Propionateinheiten aufgebaut werden und dann ein Stickstoff am Ende der Kette eingeführt wird. Danach findet die Cyclisierung zum Pyridinring statt. Die Methoxygruppen stammen von *S*-Methylmethionin.^{146,147,148}

7.5. Echinosporine

Aus verschiedenen Kulturen des Stammes K 17/9 konnten die Echinosporine **75** und **76** isoliert werden.



75: R = OH

76: R = H

7.5.1. Echinosporin (75)

Die mit Anisaldehyd in der Wärme stark violett anfärbende Substanz **75** zeigt im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 246$ $[M+Na]^+$ und im 1H -NMR-Spektrum sechs Methingruppen: zwei aliphatische ($\delta_H = 3.04$ und 3.17) und vier olefinische ($\delta_H = 6.0 - 6.5$). Zusammen mit dem ^{13}C -NMR-Spektrum konnte die Summenformel $C_{10}H_9NO_5$ aufgestellt werden. Im ^{13}C -NMR-Spektrum sind zwei Carbonylgruppen ($\delta_C = 165.1$ und 173.6) zu erkennen, deren chemischen Verschiebungen im Ester- bzw. Amidbereich liegen. Eine Suche in AntiBase³⁹ zeigte, dass Echinosporin (**75**) vorliegt.¹⁴⁹

75 wurde erstmals 1982¹⁵⁰ aus *Streptomyces echinosporus* isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt. Durch eine Röntgenstrukturanalyse¹⁵¹ konnte die relative Stereochemie bestimmt werden. Eine Totalsynthese¹⁵² ermöglichte die Bestimmung der absoluten Stereochemie. Echinosporin (**75**) ist in der Literatur als schwach antibakteriell und cytotoxisch beschrieben.¹⁵³

7.5.2. 7-Desoxyechinosporin (76)

76 zeigt im DCI-Massenspektrum ein Ion höchster Intensität bei $m/z = 225$ $[M+NH_4]^+$. Die 1D-NMR-Spektren sind zu denen von **75** sehr ähnlich, auffälligster Unterschied ist eine zusätzliche aliphatische Methingruppe bei $\delta_H = 3.41$. Die Massendifferenz von $\Delta m/z = 16$ spricht für das Fehlen eines Sauerstoffatoms. Dieses kann durch das ^{13}C -NMR-Spektrum

bestätigt werden, das Signal von C-7 hat sich von $\delta_C = 85.3$ (**75**) auf 51.7 verschoben. Daher konnte **76** als 7-Desoxyechinosporin identifiziert werden.¹⁵⁴

7.5.3. Die Biosynthese der Echinospirine

Untersuchungen zur Biosynthese¹⁵⁵ von **75** mit ^{13}C -markierten Vorläufer zeigten, dass es auf dem Shikimisäureweg entsteht, durch eine bislang unbekannte Abzweigung vom Chorismat (**77**), dem Vorläufer für aromatische Aminosäuren. **75** entsteht aus zwei Molekülen Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-phosphat (E-4-P). Der Einbau eines zweiten PEP impliziert, dass Chorismat (**77**) ein spätes Intermediat in der Biosynthese ist. Die Umwandlung von **77** in **76**, dem direkten Vorläufer von **75**, erfolgt durch eine Umlagerung mit einer Ringkontraktion, deren vermuteter Mechanismus in Abbildung 16 zu sehen ist.

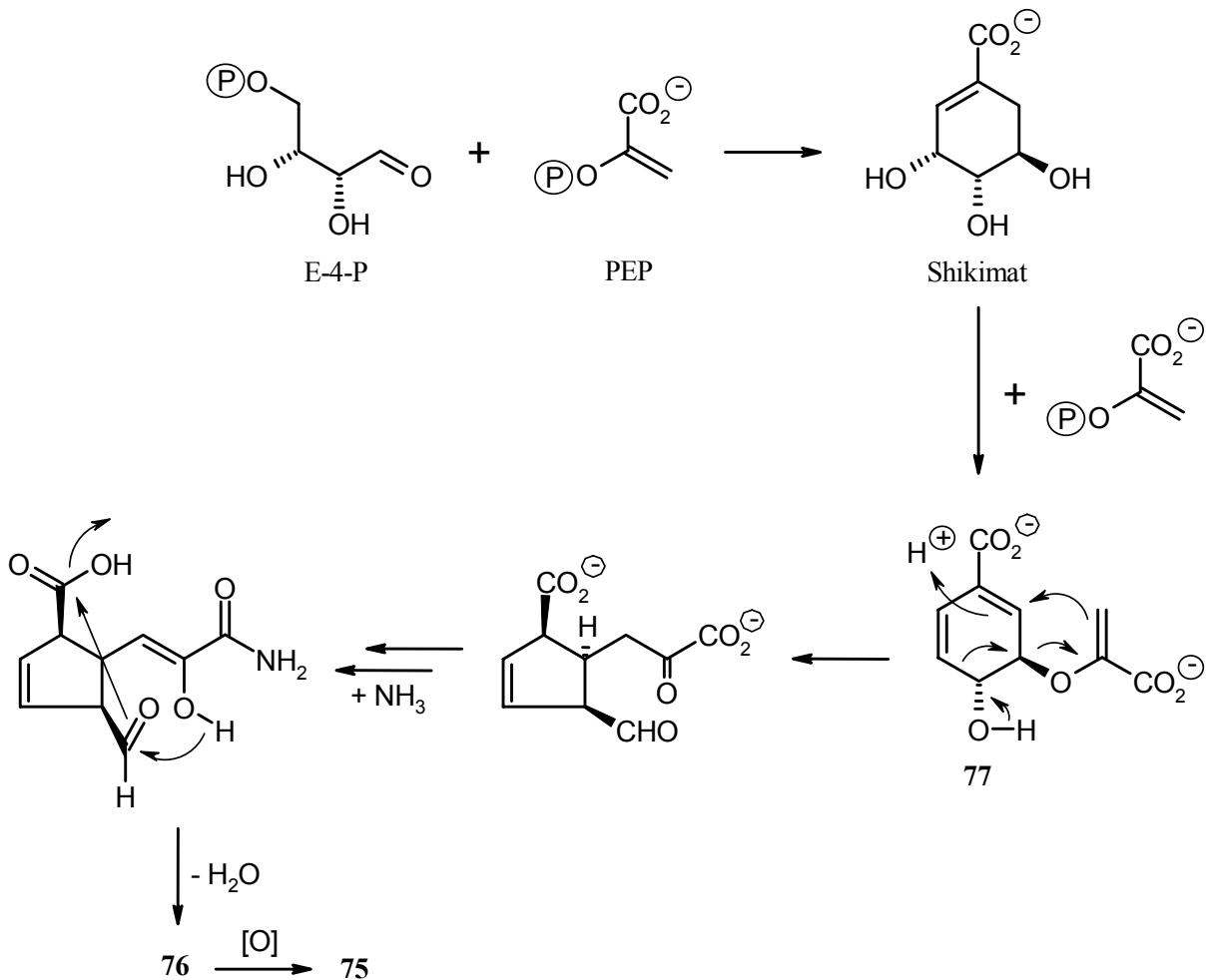


Abbildung 16: Biosynthese von **75** und **76**.

7.6. Benzisoxamid (78)

7.6.1. Strukturaufklärung

Die auf Dünnschichtchromatogrammen bei 254 nm UV-löschende und bei 366 nm hellblau fluoreszierende Substanz **78** zeigt im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 441 [M+Na]^+$ und im ^{13}C -NMR-Spektrum 20 C-Atome. Aus einer HRESI-MS-Messung^b ergab sich die Summenformel $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6$. Im ^1H -NMR-Spektrum sind zwei Methylgruppen ($\delta_{\text{H}} = 0.97$ und 1.43), drei aromatische Protonen ($\delta_{\text{H}} = 6.72, 6.95$ und 7.05), die zu einem Spinsystem gehören, fünf mit D_2O austauschbare Protonen ($\delta_{\text{H}} = 7.57, 8.00, 8.27, 9.35$ und 11.72) und zwölf aliphatische Protonen ($\delta_{\text{H}} = 1.6 - 4.9$) zu erkennen. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt vier Signale, die für Carbonylgruppen von Estern bzw. Amiden ($\delta_{\text{C}} = 165 - 174$) sprechen und sechs Signale im Aromaten- bzw. Olefinbereich ($\delta_{\text{C}} = 110 - 148$). Im IR-Spektrum sind Banden von Amiden ($1680, 1666, 1650, 1636 \text{ cm}^{-1}$) zu erkennen, aber keine Esterbanden, die bei Wellenzahlen von über 1700 cm^{-1} liegen müssten. Das UV-Spektrum zeigt typische Absorptionen ($207, 255$ und 316 nm) für Aromaten, die langwellige Bande verschiebt sich im sauren und alkalischen Milieu bathochrom. Mit Hilfe eines $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Experimentes konnten die in Abbildung 17 gezeigten Strukturelemente abgeleitet werden. Durch ein nachfolgendes HMBC-Experiment (siehe Abbildung 18) war es möglich, die gefundenen Fragmente zu verknüpfen, wobei aber noch Fragen offen blieben.

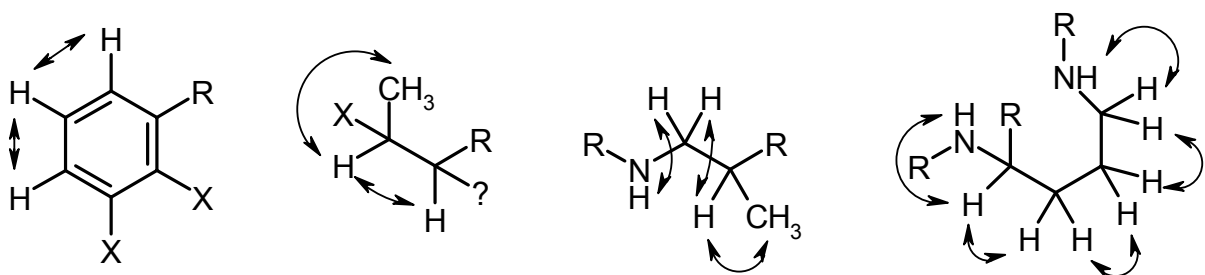


Abbildung 17: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Fragmente von **78**, X = Heteroatom, R = C-Atom, ? = Verknüpfung unsicher.

^b Herrn Dr. M. Witt (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) danke ich für die Durchführung der HRESI-MS-Messung.

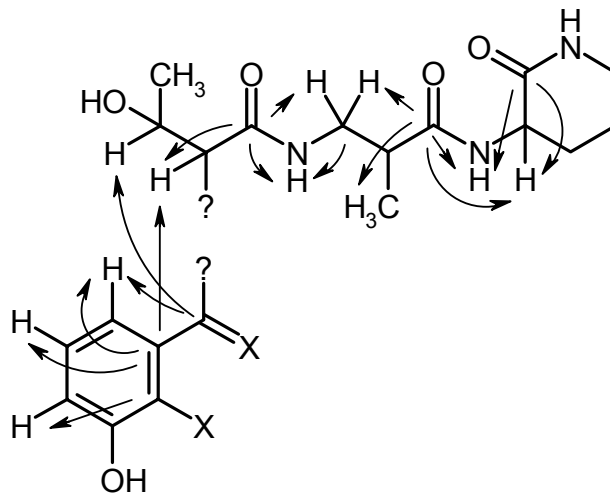
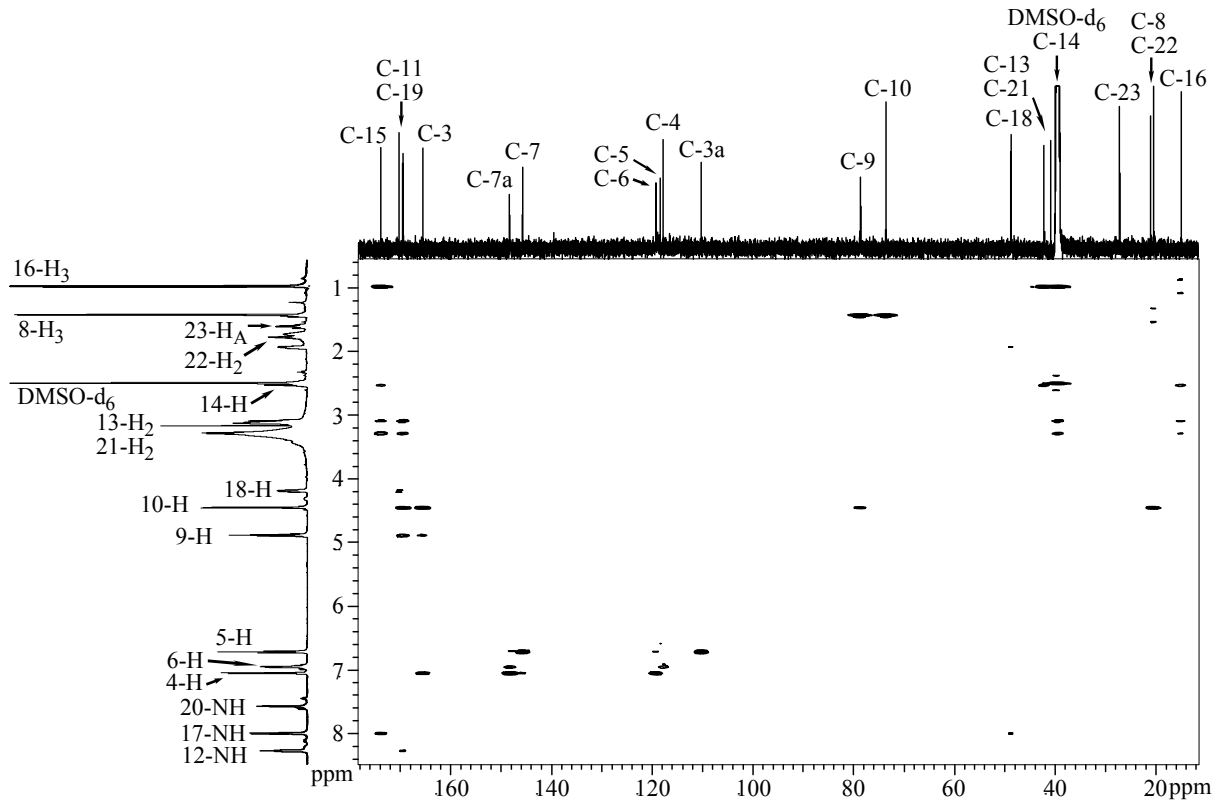
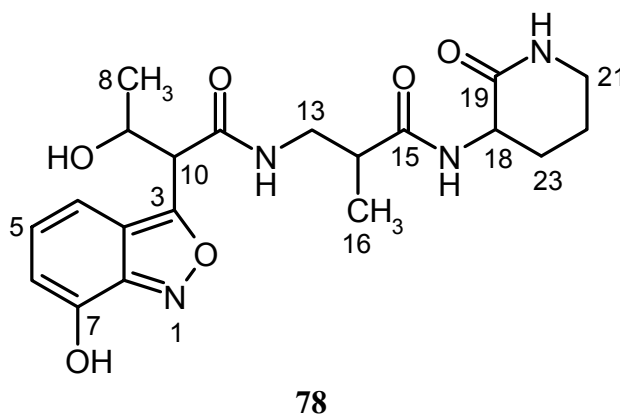


Abbildung 18: HMBC-Spektrum (600 MHz, Dimethylsulfoxid) von **78** und daraus abgeleitete Verknüpfungen der Strukturfragmente; X = Heteroatom, ? = Verknüpfung unsicher.

Aufgrund der Summenformel blieben für die letzten offenen Stellen nur noch ein Sauerstoff- und ein Stickstoffatom übrig. Eine vierte Amidbindung kann durch die Ergebnisse aus den HMBC- und $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Experimenten ausgeschlossen werden. Die drei vorhandenen NH-Gruppen geben scharfe Signale ($\delta_{\text{H}} = 7.57, 8.00$ und 8.27), die zwei Hydroxygruppen

breite Signale ($\delta_{\text{H}} = 9.35$ und 11.72) im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, d.h. die NH-Gruppe eines vierten Amides sollte ebenfalls ein scharfes Signal geben und sichtbar sein. Ebenfalls gegen eine vierte Amidbindung sprechen die HMBC-Kopplungen von C-3a ($\delta_{\text{C}} = 110.2$) zu 10-H ($\delta_{\text{H}} = 4.45$) und von C-3 ($\delta_{\text{C}} = 165.6$) zu 9-H ($\delta_{\text{H}} = 4.89$). Diese sollten beim Vorliegen eines Amides nicht zu erkennen sein, denn es wären 4J -Kopplungen über ein Heteroatom hinweg. Als Möglichkeit bleibt daher nur noch ein heteroaromatischer Fünfring übrig, was zu folgendem Strukturvorschlag führte.



Das cyclisierte Ornithin (C-18 bis C-23) konnte durch einen Vergleich mit Sollasin B¹⁵⁶ bestätigt werden. Für das heteroaromatische Ringsystem sind vier Möglichkeiten A – D denkbar (siehe Abbildung 19), die Benzisoxazole (A = 1,2-Benzisoxazol, B = 2,1-Benzisoxazol) und die Benzoxazole (C und D), wie sie z.B. in dem im Kapitel A.II.8.3. charakterisiertem UK-1 (**58**) vorliegen.

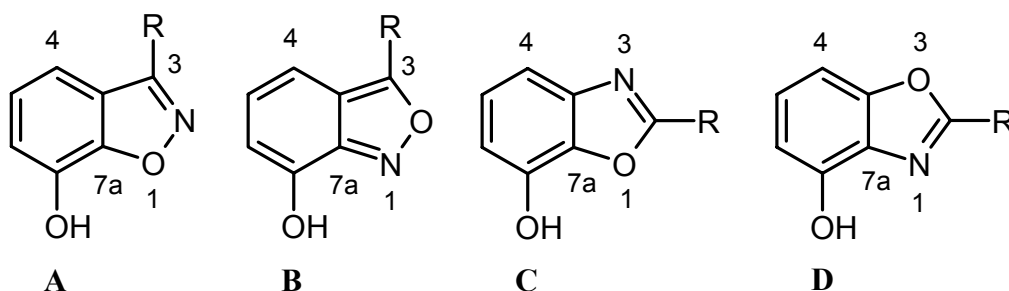


Abbildung 19: Möglichkeiten A – D für das heteroaromatische Ringsystem von **78**.

Die Benzoxazole können aufgrund der $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten und des HMBC-Experimentes ausgeschlossen werden. Das Benzoxazol-Gerüst besitzt an den Positionen C-3a und C-7a ^{13}C -Werte von $\delta_{\text{C}} = 140$ und 150 , im Fall von **78** liegen diese bei $\delta_{\text{C}} = 110.2$ (C-3a) und 148.3 (C-7a). Hinzu kommen die beobachteten Kopplungen im HMBC-Experiment von C-3a ($\delta_{\text{C}} = 110.2$) zu 10-H ($\delta_{\text{H}} = 4.45$) und von C-3 ($\delta_{\text{C}} = 165.6$) zu 4-H ($\delta_{\text{H}} = 7.05$), die im Falle

der Benzoxazole 4J -Kopplungen über ein Heteroatom hinweg sein müssten, genauso wie die oben beim Ausschluss der Amide beschriebenen Kopplungen. In der Literatur konnten keine ^{13}C -NMR-Daten für an Position 7 hydroxylierte Benzisoxazole gefunden werden. Die ^{13}C -NMR-Werte für C-3, C-3a und C-7a (siehe Tabelle 6) von nicht hydroxylierten und an Position 3 C-substituierten Benzisoxazolen^{157,158} weisen auf Möglichkeit B (2,1-Benzisoxazol) als die wahrscheinliche Struktur des heteroaromatischen Ringsystems hin, wenn für die Hydroxygruppe die Inkrementverschiebung für die *ortho*-Position (-12.6)¹⁵⁹ berücksichtigt wird.

Um den Strukturvorschlag zu verifizieren wurden zusätzlich ESI-MSⁿ-Experimente (negative Ionen) durchgeführt, die Fragmentierungen (siehe Abbildung 20) bestätigen den Strukturvorschlag für **78**. Die Stereochemie an C-9, C-10, C-14 und C-18 konnte bisher nicht bestimmt werden.

Recherchen in SciFinder,¹⁶⁰ Chapman & Hall¹⁶¹ und AntiBase³⁹ zeigten, dass **78** ein für Naturstoffe neuartiges Gerüst besitzt, das bisher nicht beschrieben worden ist. **78** besitzt verschiedene ungewöhnliche Strukturteile, die miteinander verknüpft sind: ein 2,1-Benzisoxazol, eine β -Hydroxybuttersäure, ein α -Methyl- β -alanin (eine β -Aminosäure) und ein cyclisiertes Ornithin (eine α -Aminosäure). Auf die hypothetische Biosynthese von **78** wird im nachfolgenden Kapitel eingegangen.

	C-3	C-3a	C-7a
1,2-BI* ¹	157.1	120.5	163.9 (-12.6)
2,1-BI* ¹	163.5	115.7	157.4 (-12.6)
78 * ²	165.6	110.2	148.3
78 * ³	168.2	111.9	146.8

Tabelle 6: Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten von 1,2-Benzisoxazol (1,2-BI), 2,1-Benzisoxazol (2,1-BI) und **78**; *¹ CDCl_3 , *² DMSO-d_6 , *³ CD_3OD ; Verschiebungen in ppm.

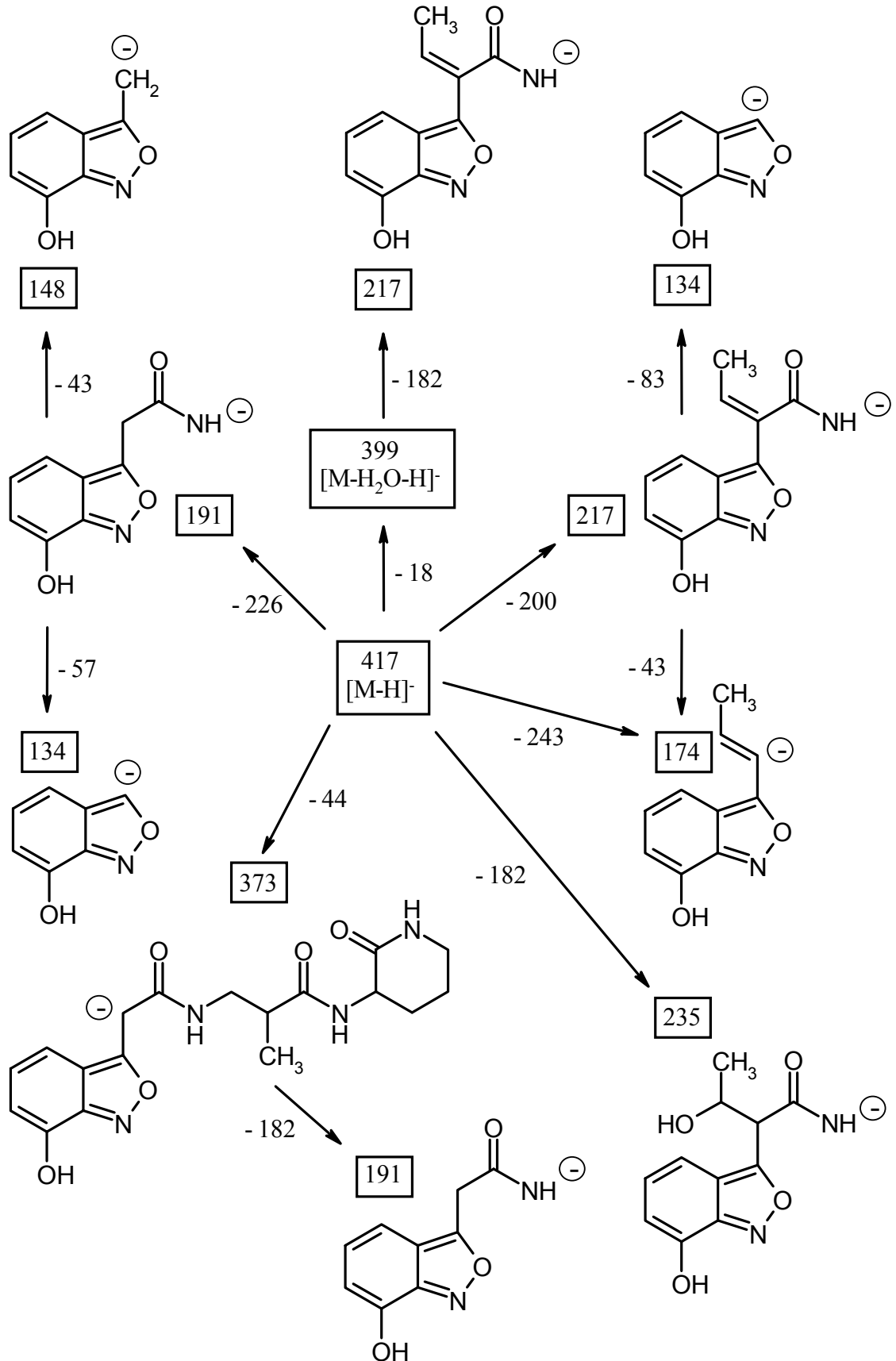


Abbildung 20: Fragmentierungsmuster der ESI-MSⁿ-Experimente von **78**; alle aufgeführten Massen wurden beobachtet.

7.6.2. Hypothetische Biosynthese

Biosyntheseuntersuchungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden, es kann jedoch ein Vorschlag für den Verlauf der Biosynthese gemacht werden. Vermutlich wird **78** aus 3-Hydroxyanthranilsäure (**79**), aus der das 2,1-Benzisoxazol entsteht, β -Hydroxybuttersäure (**80**), α -Methyl- β -alanin (**81**) und Ornithin (**82**) gebildet (siehe Abbildung 21).

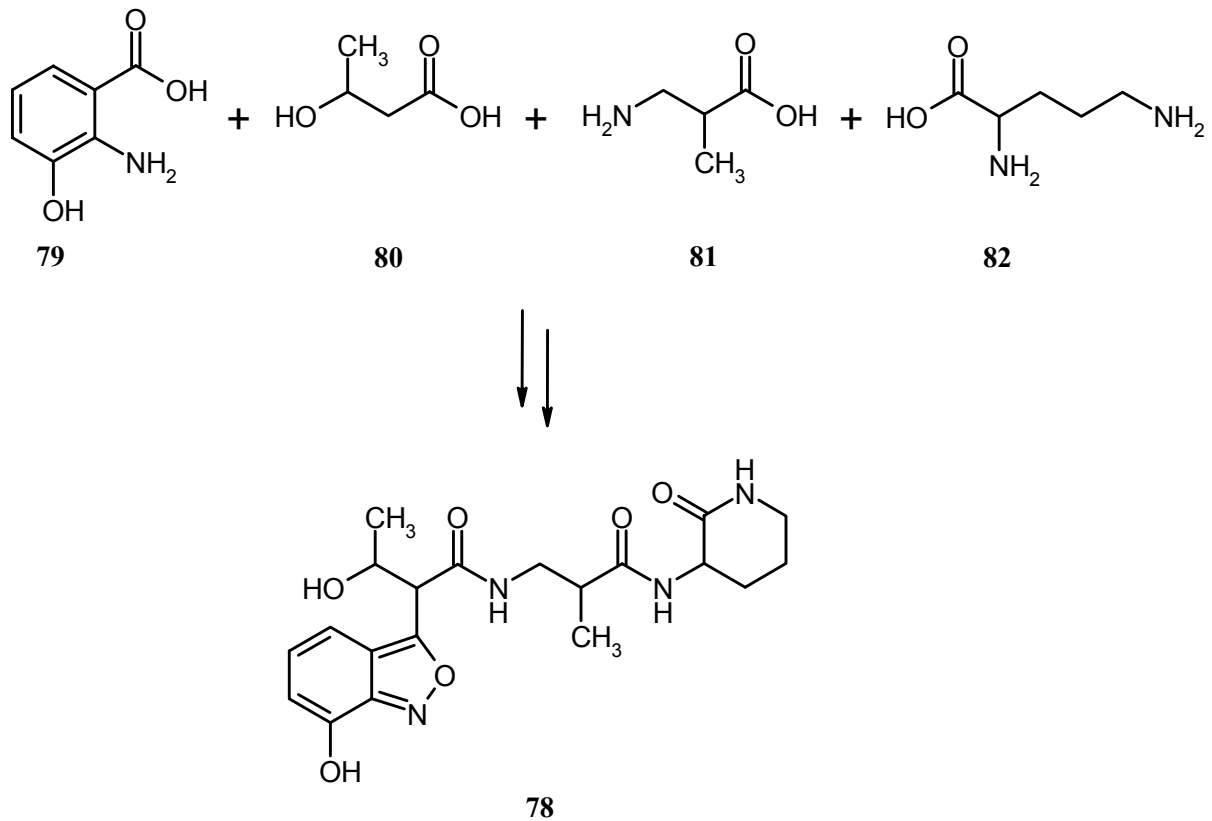


Abbildung 21: Hypothetische Biosynthese von **78**.

Diese vier Bausteine entstammen unterschiedlichen Biosynthesepools, es liegt also ein kombinierter Biosyntheseweg vor. **79** entsteht auf dem Shikimisäureweg und ist auch Vorläufer für UK-1 (**58**) (siehe Kapitel A.II.8.3.3.). **80** wird aus zwei Acetateinheiten von einer Polyketidsynthase Typ I oder einer Fettsäuresynthase aufgebaut. Anstatt der Acetateinheiten könnte auch Homothreonin (= γ -Hydroxynorvalin (**83**)) als hypothetischer Vorläufer für **80** fungieren, indem es durch eine Transaminase (*TA*) zu einer α -Keto-carbonsäure (**84**) umgewandelt wird und dann durch oxidative Decarboxylierung **80** entsteht (siehe Abbildung 22). Dieser Weg ist bei der Startereinheit von Myxothiazol beschrieben, bei dem Leucin in Isovaleriansäure umgewandelt wird.¹⁶² Bei dieser Möglichkeit würde **78** aus

Bausteinen gebildet, die nur zwei verschiedenen Biosynthesepools entstammen: dem Kohlenhydrat- und dem Aminosäurepool, und nicht aus drei verschiedenen Stoffwechselwegen wie bei der ersten Möglichkeit.

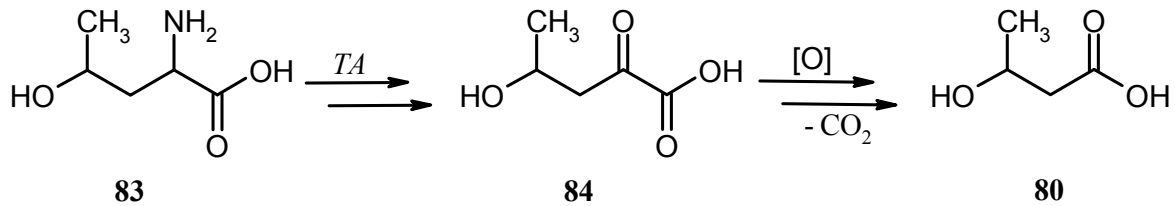


Abbildung 22: Umwandlung von Homothreonin (**83**) zur β -Hydroxybuttersäure (**80**).

80, **82** und die nicht proteinogene Aminosäure **81** werden vermutlich durch eine nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) verknüpft. **81** wird ebenfalls als Vorläufer bei der Biosynthese von Vicenistatin angenommen, einem Makrolactam-Antibiotikum.¹⁶³ Fütterungsexperimente mit isotope markierten Glutamat führten zu einem Einbaumuster, dass durch eine Umwandlung von Glutamat (**85**) durch die Glutamatmutase (*GM*) in 3-Methylaspartat (3-MA) und anschließender Decarboxylierung zu 3-Amino-2-methylpropionat (= α -Methyl- β -alanin (**81**)) zu erklären ist (siehe Abbildung 23).

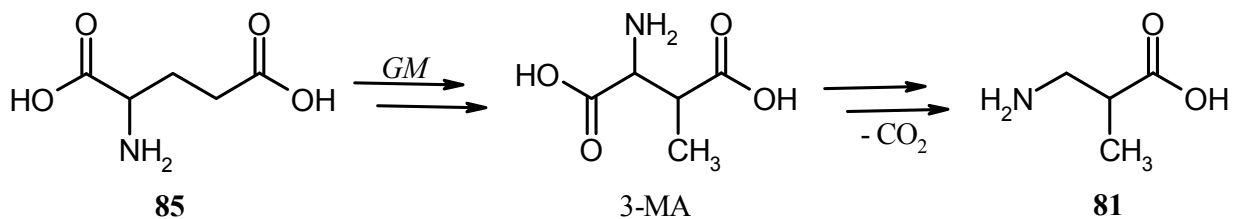


Abbildung 23: Umwandlung von Glutamat zu α -Methyl- β -alanin (**81**).

7.7. Zugabe des Enzyminhibitors Glyphosat

Glyphosat (**86**) ist ein Inhibitor der EPSP-Synthase (*EPSP-S*), die die Umwandlung von Shikimat-3-phosphat (S-3-P) zu 5-Enoylpyruvylshikimat-3-phosphat (EPSP) katalysiert, welches durch die Chorismat-Synthase (*C-S*) weiter zu Chorismat (**77**) umgesetzt wird (siehe Abbildung 24).¹⁶⁴ Es wird im Pflanzenschutz als Totalherbizid (Markenname u.a. Roundup[®]) eingesetzt, wobei die Aufnahme ausschließlich über grüne Pflanzenteile erfolgt, aber nicht über die Wurzel.¹⁶⁵ Bei Pflanzen wird eine Inhibierung des Shikimisäurewegs bei Konzentrationen von < 1 mM erreicht, bei Bakterien bei ca. 2 mM. Es sind aber auch Mikroorganismen beschrieben, die eine höhere Toleranz gegenüber Glyphosat aufweisen.

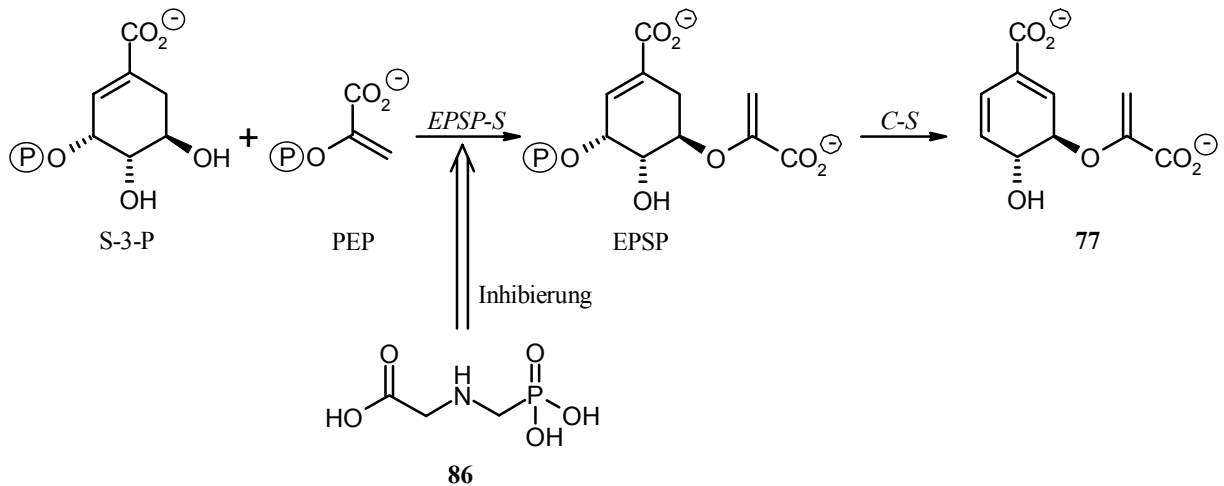


Abbildung 24: Enzymatische Reaktionen von S-3-P zu 77 über EPSP.

Aufgrund der Tatsache, dass Chorismat (77) ein Intermediat in der Biosynthese von Echinospirin (75) und wahrscheinlich auch UK-1 (58) ist, sollte durch Glyphosat-Zugabe die Ausbeute an 75 und 58 stark bis vollständig zurückgehen. P. Krastel¹⁵⁴ führte in seiner Doktorarbeit Versuche mit Glyphosat-Zugabe (0.01 mM, 0.06 mM, 0.6 mM und 3 mM) beim Echinospirin-Produzenten *Streptomyces erythraeus* Tü 4015 durch, wobei er bei einer Konzentration von 0.06 mM sogar eine Erhöhung der Ausbeute um fast 100 % feststellte. Die Gründe hierfür konnten bisher nicht geklärt werden. Bei allen Glyphosat-Konzentrationen veränderte sich das Wachstumsverhalten des Stammes nicht, was auf eine Toleranz des Stammes gegenüber Glyphosat hindeutet.

Das gleiche Experiment wurde auch mit dem Stamm K 17/9 in Schüttelkulturen durchgeführt. Die Zugabe von Glyphosat erfolgte erst 30 h nach der Inokulation, um die Bildung von essentiellen aromatischen Aminosäuren im Primärmetabolismus über den Shikimisäureweg zu ermöglichen. Nach der Aufarbeitung der Schüttelkolben mit den verschiedenen Glyphosat-Konzentrationen konnte jedoch auf Dünnschichtchromatogrammen keine Veränderung bei Ausbeuten und Metabolitenmuster erkannt werden. K 17/9 scheint wie Tü 4015 gegenüber Glyphosat tolerant zu sein.

7.8. Beurteilung der Biosyntheseleistung

Der Stamm K 17/9 besitzt ein vielseitiges Metabolitenspektrum. Es konnten aus verschiedenen Kultivierungsansätzen insgesamt 14 Sekundärmetaboliten isoliert werden, darunter das Benzisoxamid (**78**). Letzteres ist als Naturstoff aufgrund seines Benzisoxazolgerüsts einzigartig. Selbst synthetisch sind an Position 7 hydroxylierte 2,1-Benzisoxazole nicht sehr häufig beschrieben. Zusätzlich besitzt **78** eine α - und eine β -Aminosäure.

Die Substanzen lassen sich aus biosynthetischer Sicht anhand ihrer Biogenesequellen (Kohlenhydrat-, Carbonsäure- und Aminosäurepool) in drei unterschiedliche Gruppen einteilen.¹⁶⁶ Nach einem von B. Bethe¹⁶⁷ ausgearbeiteten Konzept zur Klassifizierung von Mikroorganismen aufgrund ihrer Biosyntheseleistung im Sekundärstoffwechsel darf der Stamm K 17/9 als „vielseitig, verweigt und komplex“ eingestuft werden.

Bei den Isocoumarinen (**52 – 55**) und Piericidinen (**63 – 65**) handelt es sich um Polyketide, wobei erstere über eine Polyketidsynthase Typ II und letztere über eine Polyketidsynthase Typ I aufgebaut werden. Die Benzoxazole (**58** und **59**) und Echinospirine (**75** und **76**) werden über den Shikimisäureweg und die Diketopiperazine (**56** und **57**) durch eine Kondensation von Aminosäuren gebildet. Das Benzisoxamid (**78**) könnte auf einem kombinierten Biosyntheseweg mit Substraten aus dem Shikimisäureweg (Bildung des Benzisoxazols), Polyketid-Stoffwechsel (Bildung von β -Hydroxybuttersäure (**80**)) und Aminosäurepool (α -Methyl- β -alanin (**81**) bzw. Glutamat (**85**) und Ornithin (**82**)) oder mit Substraten aus dem Shikimisäureweg (Benzisoxazol) und Aminosäurepool (Homothreonin (**83**), **81** bzw. **85** und **82**) aufgebaut werden (siehe Kapitel A.II.7.6.).

8. Zur biologischen Aktivität der Metaboliten

Die isolierten Substanzen wurden auf antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* untersucht. Dabei bewirkten nur Chartreusin (**35**) und Demethyl-UK-1 (**59**) Hemmhöfe bei *Bacillus subtilis* (**35**: Ø = 26 mm, **59**: Ø = 20 mm) und *Staphylococcus aureus* (**35**: Ø = 12 mm, **59**: Ø = 12 mm), alle anderen Tests fielen negativ aus.

Cytotoxizitätsuntersuchungen werden zur Zeit von W. Beil (Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt, die Ergebnisse lagen bis zur Abgabe der Arbeit noch nicht vor.

9. Bewertung des LC-MS-Screenings im Vergleich zum chemischen Screening

Die in den vorangegangenen Kapiteln A.II.3. – A.II.7. beschriebenen Sekundärmetaboliten wurden aufgrund der fehlenden Erfahrung mit dem LC-MS-Screening anhand der chemischen Anfärbbarkeit der Substanzen separiert und isoliert.

Um das LC-MS-Screening mit dem chemischen Screenings zu vergleichen, wurden am Ende dieser Arbeit nochmals die LC-MS-Chromatogramme untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die durch das chemische Screening gefundenen Metaboliten **15** (Stamm K 8/1), **16 – 18** (Stamm K 8/5), **36** (Stamm K 17/2) sowie **54**, **55**, **76** und **78** (Stamm K 17/9) in den LC-MS-Chromatogrammen nicht auftraten, darunter das neuartige Benzisoxamid (**78**). Die Metaboliten **33** und **34** des Stammes K 10/11 wurden anhand ihrer UV-Absorption im UV-Chromatogramm erkannt, jedoch konnte ihnen nicht die korrekte Molmasse zugeordnet werden. **35** (Stamm K 10/11) und **37 – 40** (Stamm K 17/7) waren aus den jeweiligen Rohextrakten sowohl anhand ihrer UV-Absorption als auch durch ihre Massenspektren erkennbar. Beim Stamm K 17/7 zeigten die vermessenen Fraktionen der Rohproduktsäule ebenfalls die im Rohextrakt gefundenen Molmassen für **37 – 40**. Von den 14 isolierten Metaboliten aus K 17/9 fielen nur **52**, **58**, **63** und **75** in den Rohextrakten durch ihre starke UV-Absorption auf. Eindeutige Molmassen konnten jedoch nur **52** (222 g/mol) und **75** (223 g/mol) zugeordnet werden. Die anderen Metaboliten aus K 17/9 (**53**, **56**, **57**, **59**, **64**, **65**) wurden bei nachträglichen Suchen mit den Molmassen der Substanzen in den LC-MS-Chromatogrammen der Rohextrakte gefunden, die Signale hatten jedoch eine sehr geringe Intensität.

Die oben angeführten Beispiele zeigen, dass durch die Auswahl der K-Stämme mit Hilfe des chemischen Screenings mehr Sekundärmetaboliten isoliert wurden, als es wahrscheinlich durch die Auswahl anhand des LC-MS-Screenings der Fall gewesen wäre. Hierbei muss jedoch auch beachtet werden, dass jedes Verfahren ein eigenes Screening-Fenster hat, wodurch schon eine gewisse Vorauswahl getroffen wird. Ein kritischer Punkt beim LC-MS-Screening ist das Lösungsverhalten von Substanzen in Methanol, das als Lösungsmittel und Laufmittel verwendet wird. In Methanol sehr schlecht lösliche Substanzen (z.B. **56** und **57** aus dem Stamm K 17/9) werden aus dem Rohextrakt nur in geringer Konzentration oder gar nicht gelöst, weshalb sie dann trotz hoher UV-Aktivität im UV- und Massenchromatogramm nicht zu sehen sind. Als weiterer Punkt ist die relativ schlechte Ionisation von unpolaren im Vergleich zu polaren Substanzen im ESI-Verfahren zu nennen, was ebenfalls zur Nichterkennung von Substanzen im Rohextrakt führen kann. Oftmals können auch Molmassen nicht durch Vergleich der Massenspektren im positiven und negativen ESI-Modus bestätigt werden, da viele Substanzen (z.B. **58** aus dem Stamm K 17/9) nur in einem Fall ionisiert werden. Bei sehr polaren Substanzen (z.B. **16** – **18** aus dem Stamm K 8/5) besteht das Problem, dass sie durch die bei den LC-MS-Messungen verwendete RP-18-Säule innerhalb der ersten zwei Minuten mit anderen polaren Komponenten, z.B. aus dem Nährmedium, von der Säule eluiert werden und dadurch in den Rohextrakten ebenfalls schlecht erkannt werden können.

Trotz dieser Probleme ist das LC-MS-Verfahren eine gute Methode zur Erkennung von bekannten Substanzen in Rohextrakten. Für den routinemäßigen Einsatz des LC-MS-Screenings zur Entdeckung neuer Naturstoffe müssten jedoch Datenbanken angelegt werden, um bekannte Metaboliten schnell identifizieren zu können. Moderne Software ermöglicht es inzwischen, sogenannte ionenabhängige Scans durchzuführen, mit denen es möglich ist, MS/MS-Messungen während einer LC-MS-Messung durchzuführen. Hierbei werden die bei einem Full Scan detektierten intensivsten zwei Signale fragmentiert. Diese Fragmentierungsmuster können in einer Datenbank abgelegt werden. Eine zusätzliche Hilfe wäre ein Diodenarraydetektor, der mit einer UV-Datenbank gekoppelt ist. Durch Vergleich und Kombination von Retentionszeiten, UV-Spektren, Molmassen und Fragmentierungsmustern könnten aus Rohextrakten viele bekannte Substanzen schnell identifiziert werden.

10. Ausblick

Die Stereochemie an C-9, C-10, C-14 und C-18 des Benzisoxamids (**78**) konnte bisher nicht bestimmt werden. Bei genügender Menge an **78** sollte eine Derivatisierung mit 2-Brombenzoesäure und anschließend Kristallisationsversuche durchgeführt werden. Eine Röntgenstrukturanalyse könnte den Strukturvorschlag bestätigen und die absolute Stereochemie klären. Versuche zur Reproduktion von **78** werden zur Zeit durchgeführt.

Die Untersuchung der Biosynthese (hypothetische Biosynthese siehe Kapitel A.II.8.6.2.) des Benzisoxamids (**78**) wäre ebenfalls sehr reizvoll, da es sich um einen Metaboliten handelt, der aus Bausteinen verschiedener Biosynthesepools aufgebaut wird. Für Biosyntheseuntersuchungen müsste zuerst genauer untersucht werden, ob **78** nur im Airlifter bei 5 bar Überdruck oder auch in Schüttelkolben und/oder in 1 L-Fermentern produziert wird. Zusätzlich müsste eine Produktionsoptimierung durchgeführt werden, da die Ausbeute von **78** bei nur 1.0 mg/L lag. Als Biosynthesevorläufer kommen isotopenmarkierte Vorläufer des Shikimisäurewegs (z.B. Glycerin, Shikimat, Anthranilsäure, 3-Hydroxyanthranilsäure (**79**)), des Polyketidwegs (Acetat, Malonat) und die isotopenmarkierten Aminosäuren Homothreonin (**83**), α -Methyl- β -alanin (**81**), Glutamat (**85**) und Ornithin (**82**) sowie markierte β -Hydroxybuttersäure (**80**) in Frage. Hierdurch könnte auch geklärt werden, ob **80** aus dem Polyketid- oder Aminosäurestoffwechsel stammt. Ebenso ist die Frage der Startereinheit zu klären. Vermutlich handelt es sich um **79**, die als Benzisoxazol oder einem Vorläufer davon mit **80** verknüpft wird. Der Mechanismus dieser Verknüpfung wäre ebenfalls zu klären.

Durch die vielfältigen Biosynthesewege (siehe Kapitel A.II.8.8) des Stammes K 17/9 ist dieser sicherlich interessant für genetische Untersuchungen. Insbesondere die Sequenzierung des Genclusters für die Biosynthese des Benzisoxamids (**78**) könnte interessante Einblicke in die biosynthetischen Möglichkeiten von Actinomyceten liefern.

III. Charakterisierung von Metaboliten aus *Micromonospora* sp. Tü 6368

1. Stammherkunft und taxonomische Bestimmung

In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von H.-P. Fiedler^c wurde das Metabolitenmuster des Stammes Tü 6368 untersucht. Der Stamm wurde dazu von N. Tóth während ihrer Doktorarbeit kultiviert. Die aus den gewonnenen Extrakten isolierten Substanzen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit in ihrer Struktur aufgeklärt.

Der Stamm Tü 6368 wurde aus einer Erdprobe isoliert, die in Rety, Rumänien, gesammelt worden war. Die Erdprobe wurde mit trockener Hitze behandelt (40 min bei 60 °C). Anschließend konnten Actinomyceten von einem Stärke-Casein-Agar isoliert werden, der Cycloheximid, Nystatin, Nalidixinsäure und Novobiocin enthält.

Das Luftmyzel des Stammes Tü 6368 zeigt eine orange Farbe während die Sporen schwarz sind. Durch die chemotaxonomischen Untersuchungen konnte der Stamm Tü 6368 aufgrund von DL-Diaminopimelinsäure, Menachinonen MK-9 (H₆, H₈), gesättigten iso-, anteiso- und ungesättigten Fettsäuren sowie Galaktose und Arabinose als Zellwandzucker der Gattung *Micromonospora* sp. zugeordnet werden. Eine partielle 16S rRNA-Sequenzierung bestätigte mit 99.6 % Identität diese Einordnung.

2. HPLC-DAD-Screening, Produktionsoptimierung und Isolierung

Neben dem im Kapitel A.II.1.2. angesprochenen chemischen Screening ist das HPLC-DAD-Screening²³ eine weitere Methode zur Bewertung des Metabolitenprofils von Mikroorganismen. Es wird anhand von UV-Spektren und Retentionszeiten einzelner Substanzen entschieden, bei welchen Mikroorganismen die weitere Bearbeitung lohnt.

Bei einer HPLC-DAD-Analyse zeigte der Stamm Tü 6368 in einer 100 mL-Kultivierung in Schüttelkolben eine Reihe von Sekundärmetaboliten, deren UV-VIS-Spektren nicht mit der HPLC/UV-VIS-Datenbank (ca. 750 Einträge) der Arbeitsgruppe Fiedler identifiziert werden konnten. Mit Hilfe einer LC-MS-Untersuchung konnten zusätzlich die Molmassen bestimmt werden (siehe Tabelle 7). Eine anschließende Suche in kommerziellen Datenbanken führte aufgrund fehlender Übereinstimmungen zu der Annahme, dass der Stamm Tü 6368 neue Sekundärmetaboliten produziert.

^c Herrn Prof. Dr. H.-P. Fiedler und Frau Dipl.-Biol. N. Tóth (Mikrobiologisches Institut, Universität Tübingen) danke ich für die Überlassung der Substanzen sowie für die gute Zusammenarbeit.

Als bestes Produktionsmedium stellte sich nach verschiedenen Optimierungsversuchen die Nährlösung MMM heraus (Glucose 10 g/L, Stärke 20 g/L, Hefeextrakt 5 g/L, Caseinpepton 5 g/L, CaCO₃ 1 g/L, pH = 7.6). Der Zusatz von Amberlite® XAD-16 zum Nährmedium während der Fermentation führte zu einer Produktionssteigerung und zu einer Variation im Sekundärmetabolitenprofil. Daraufhin wurden zwei Fermentationen im 10 L-Maßstab (10 L Blattrührfermenter, *New Brunswick*, Belüftung 0.5 vvm, 200 U/min, 28 °C, 168 h) durchgeführt, einmal ohne und einmal mit XAD-16-Zusatz.

Das Kulturfiltrat der Fermentation ohne XAD-16-Zusatz wurde über XAD-16 gegeben, mit Methanol eluiert, das Eluat mit Ethylacetat extrahiert und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Durch weitere Chromatographie an Kieselgel, Sephadex® LH-20 und präparativer HPLC (RP-18) konnten drei Substanzen erhalten werden: 1-Methylumichrom (**87**, 5.0 mg/L), Lumichrom (**88**, 0.3 mg/L) und 1-(α -Ribofuranosyl)-lumichrom (**89**, 1.0 mg/L). **89** wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Bei der Fermentation mit XAD-16-Zusatz wurde das Myzel zusammen mit dem XAD-16 mit Aceton extrahiert, der Extrakt im Vakuum konzentriert, das Konzentrat mit Ethylacetat extrahiert (pH = 7) und dieses im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Eine Chromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂/MeOH 9:1) führte zu drei Fraktionen, die anschließend über Sephadex® LH-20, Fraktogel TSK HW-40 und präparativer HPLC (RP-18) weiter aufgetrennt wurden. Es konnten sieben Substanzen erhalten werden, von denen sich die Metaboliten 6368J (**97**, 2.0 mg/L), 6368C2 (**100**, 3.0 mg/L) und 6368A2 (**103**, 130 mg/L) als neue Naturstoffe erwiesen, die anderen vier [Dehydrorabelomycin (**90**, 5.0 mg/L), Rabelomycin (**91**, 2.0 mg/L), 3-Desoxyrabelomycin (**92**, 2.0 mg/L), und Galtamycinon (**93**, 15.0 mg/L)] waren bekannt.

Substanz	87	88	89	90	91	92	93	97	100	103
R _t [min]	12.3	9.4	8.0	21.1	13.3	16.9	20.6	22.6	18.1	9.6
M [g/mol]	256	242	374	320	338	322	450	836	1475	328

Tabelle 7: Retentionszeiten und Molmassen der Substanzen aus Tü 6368.

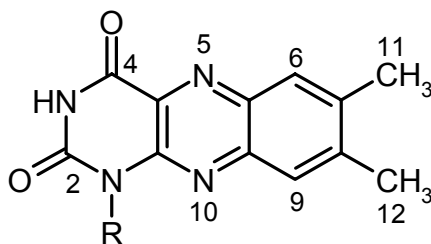
3. Strukturaufklärung

3.1. Lumichrome

Die mit Anisaldehyd in der Wärme gelb anfärbenden Substanzen **87**–**89** sind gelbe Feststoffe, die auf Kieselgel-DC-Platten bei 254 nm UV-Licht löschen und bei 366 nm blau fluoreszieren. **87** und **88** zeigen identische UV-Spektren mit Maxima (Methanol, neutral) bei 220, 250, 260, 340 und 385 nm, **89** hingegen zeigt jeweils nur ein Maximum bei 255 nm (anstatt 250 und 260 nm) und 340 nm (anstatt 340 und 385 nm). Der Vergleich mit der oben genannten HPLC/UV-VIS-Datenbank der Arbeitsgruppe Fiedler zeigt für **87** und **88** eine Übereinstimmung mit 3-Methylumichrom und Lumichrom (**88**), für **89** konnte keine Übereinstimmung gefunden werden.

3.1.1. 1-Methylumichrom (**87**)

Mit Hilfe der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten sowie eines HREI-Massenspektrums ergab sich für **87** die Summenformel $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt zwei aromatische Methinprotonen bei $\delta_{\text{H}} = 7.81$ (s) und 8.04 (s), eine Methylgruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.79$ (d, $J = 1.0$ Hz), zwei Methylgruppen bei $\delta_{\text{H}} = 2.28$ (s) und 2.35 (s) sowie ein breites Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 14.10$. Diese Ergebnisse und der Vergleich mit Literaturdaten^{168,169} bestätigte das von der HPLC/UV-VIS-Datenbank vorgeschlagene 3-Methylumichrom. Denkbar wäre aber auch eine Substitution an Position 1, wodurch sich die ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen nicht sehr stark verändern würden. Um die Substitution an Position 3 zu bestätigen, wurde ein HMBC-Experiment durchgeführt. Im HMBC-Spektrum können von $\delta_{\text{C}} = 146.8$ und 150.9 Kopplungen auf die *N*-Methylgruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.79$ beobachtet werden. Das Signal bei $\delta_{\text{C}} = 150.9$ kann der C-2-Carbonylgruppe, das Signal bei $\delta_{\text{C}} = 146.8$ C-10a zugeordnet werden. Dies beweist die Substitution an Position 1 und nicht an 3, denn für eine Substitution an Position 3 müssten Kopplungen von $\delta_{\text{C}} = 150.9$ (C-2) und 160.5 (C-4) auf die *N*-Methylgruppe beobachtet werden. Entsprechend liegt 1-Methylumichrom (**87**) vor.¹⁷⁰



87: R = CH₃

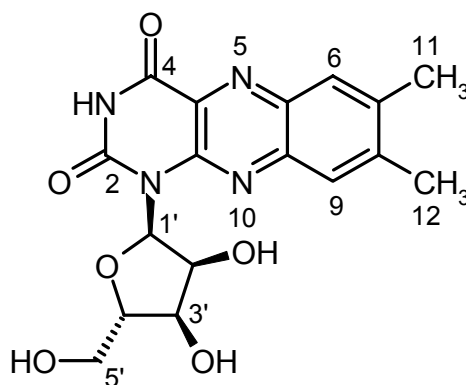
88: R = H

3.1.2. Lumichrom (88)

Die Substanz **88** zeigt im EI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 242 [M]^+$, im Vergleich zu **87** eine Differenz von $\Delta m/z = 14$. Im ¹H-NMR-Spektrum fehlt das Signal für die *N*-Methylgruppe, dafür integriert das breite Singulett bei $\delta_H = 13.95$ für zwei Protonen. Zusammen mit dem UV-Spektrum und einem ¹³C-NMR-Spektrum konnte Lumichrom (**88**) identifiziert werden.¹⁷¹

3.1.3. 1-(α -Ribofuranosyl)-lumichrom (89)

Eine HRESI-MS-Messung ergab zusammen mit dem ¹³C-NMR-Spektrum für **89** die Summenformel C₁₇H₁₈N₄O₆. Der Vergleich des ¹³C-NMR-Spektrums mit dem von **88** zeigt, dass bei **89** wiederum ein Lumichrom-Grundgerüst vorliegt. Im ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum treten aber zusätzliche Zuckersignale auf, die durch ein ¹H,¹H-COSY-Experiment einer Pentofuranose zugeordnet werden können. Um zu klären, ob die Pentofuranose an Position 1 oder 3 über Stickstoff verknüpft ist, wurde wie bei **87** ein HMBC-Experiment durchgeführt. Es können jedoch nur Kopplungen von C-2 ($\delta_C = 157.0$) auf 1'-H ($\delta_H = 6.61$) und 2'-H ($\delta_H = 5.13$) gefunden werden, aber keine Kopplung von C-10a auf 1'-H. Es wird dennoch angenommen, dass der Furanosylrest in Position 1 steht.



89

Für die Struktur der Pentofuranose gibt es vier Möglichkeiten, die als β -D-Pentofuranosen in Abbildung 25 dargestellt sind: Ribofuranose (A), Arabinofuranose (B), Xylofuranose (C) und Lyxofuranose (D).

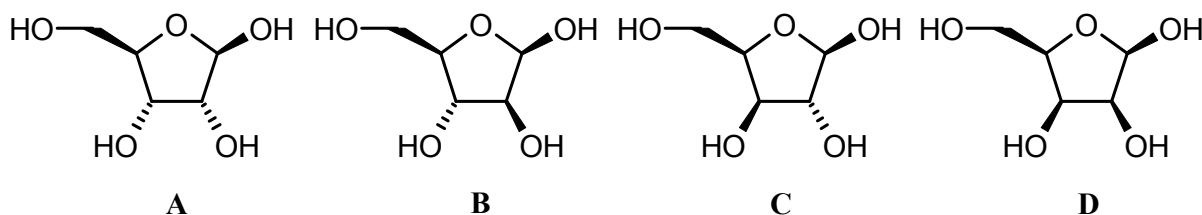


Abbildung 25: β -D-Pentofuranosen, A = Ribose, B = Arabinose, C = Xylose, D = Lyxose.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum koppeln $1'\text{-H}$, $2'\text{-H}$ und $3'\text{-H}$ jeweils mit 5.5 Hz, zwischen $3'\text{-H}$ und $4'\text{-H}$ beträgt die Kopplung 9.0 Hz. Auffällig ist auch die relativ starke Tieffeldverschiebung von $2'\text{-H}$, dessen Signal bei $\delta_{\text{H}} = 5.13$ liegt. Das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum zeigt für die Pentofuranose folgende Verschiebungen: $\delta_{\text{C}} = 89.8$ (C-1'), 79.4 (C-2'), 71.6 (C-3'), 80.9 (C-4') und 60.9 (C-5'). Auffällig ist hier die fast gleiche Verschiebung von C-2' und C-4', die beide bei ungefähr 80 ppm liegen. Aufgrund dieser NMR-Daten ist es nicht möglich, den Zuckerbaustein eindeutig zu bestimmen. Daher wurden selektive NOE-Experimente durchgeführt. Einstrahlungen bewirken NOE-Korrelationen von $1'\text{-H}$ ($\delta_{\text{H}} = 6.61$) auf $2'\text{-H}$ ($\delta_{\text{H}} = 5.13$) und von $2'\text{-H}$ auf $3'\text{-H}$ ($\delta_{\text{H}} = 4.18$). Eine Einstrahlung auf $3'\text{-H}$ führte zu keinem Erfolg, da die Signale für $3'\text{-H}$ und $4'\text{-H}$ ($\delta_{\text{H}} = 4.22$) für ein NOE-Experiment zu dicht beieinander liegen und eine selektive Anregung nicht möglich ist. Aufgrund dieser NOE-Korrelationen bleiben nur noch vier Möglichkeiten für die Pentofuranose übrig, die in Abbildung 26 dargestellt sind: α -D- und α -L-Ribofuranose (a und b) sowie β -D- und β -L-Lyxofuranose (c und d).

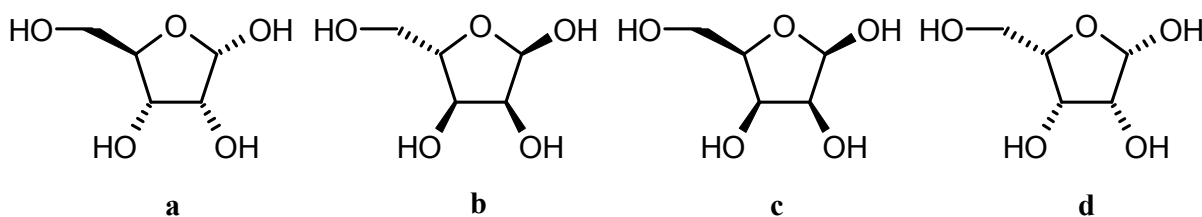


Abbildung 26: Möglichkeiten für die Pentofuranose von **89** nach den NOE-Experimenten.

Nach Methanolyse und anschließender Silylierung von **89** und den Referenzpentosen D(-)-Ribose und D(-)-Lyxose konnte der Zuckerbaustein von **89** mit GC-MS als Methyl-2,3,5-tris-*O*-trimethylsilylderivat bestimmt werden. Er zeigt in den Retentionszeiten (siehe Abbildung 27) und dem Fragmentierungsmuster Übereinstimmungen zur Ribose. Damit bleibt als Möglichkeit nur noch die α -D- oder α -L-Ribofuranose übrig, was nicht unterschieden werden konnte. Somit liegt ein 1-(α -Ribofuranosyl)-lumichrom (**89**) vor, das in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde. Bei mikrobiellen Sekundärstoffen kommen Zucker

hauptsächlich in der β -D- und α -L-Konfiguration vor, was hier für eine L-Ribose sprechen würde.

In der Literatur ist 1-(β -D-Ribofuranosyl)-lumichrom bekannt, das aus der Umsetzung von 2,4-Bis(trimethylsiloxy)-lumichrom mit 1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranose entsteht, zusammen mit dem 3-(β -D-Ribofuranosyl)-lumichrom und dem 1,3-Di-(β -D-Ribofuranosyl)-lumichrom, die als Minderkomponenten auftraten.¹⁷¹ Die Position 1 des Lumichroms scheint somit zumindestens für chemische Reaktionen zugänglicher zu sein.

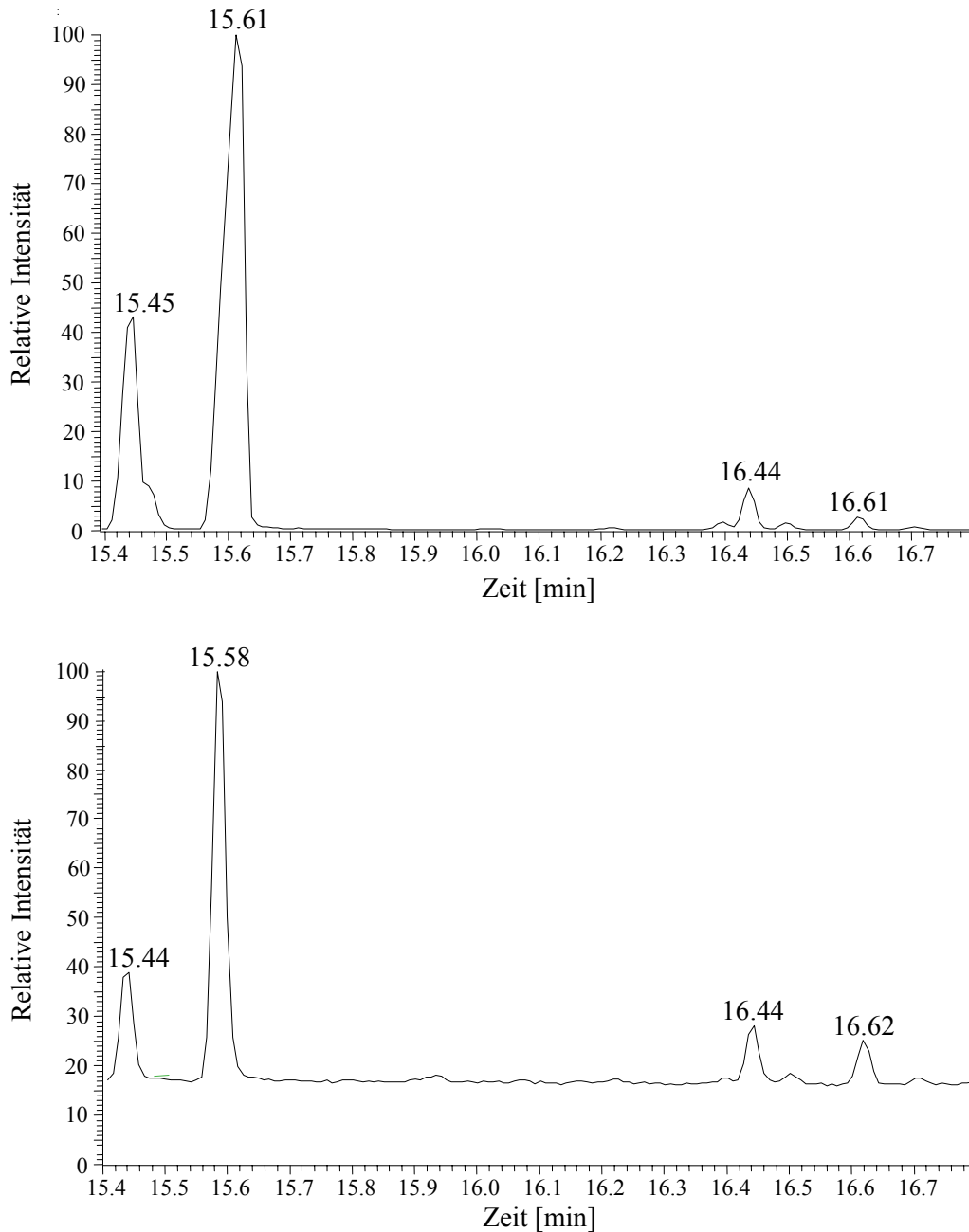
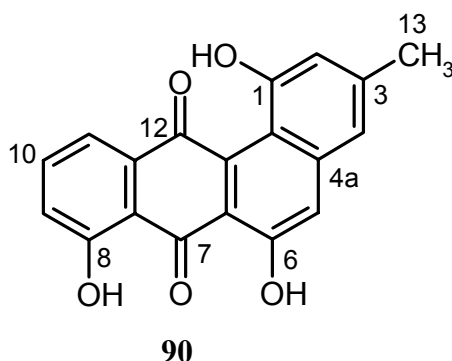


Abbildung 27: Vergleich der Retentionszeiten des silylierten Zuckerbausteins von **89** (oben) und silylierter Ribose (unten).

3.2. Rabelomycine

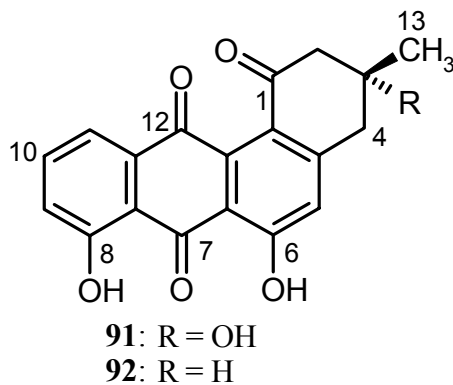
3.2.1. Dehydrorabelomycin (90)

Die Substanz **90** ist ein grau-grüner Feststoff, der mit Anisaldehyd in der Wärme braun anfärbt. Der Vergleich des UV-Spektrums mit der oben genannten HPLC/UV-VIS-Datenbank zeigt eine Übereinstimmung mit Dehydrorabelomycin (= 6-Hydroxytetrangulol). Dies konnte mit Hilfe eines HREI-MS- und eines $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums sowie durch Vergleich mit Literaturdaten¹⁷² bestätigt werden.



3.2.2. Rabelomycin (91)

Eine HREI-MS-Messung ergab zusammen mit dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum für den gelben und mit Anisaldehyd in der Wärme braun anfärbenden Feststoff **91** eine Summenformel von $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_6$. Der Vergleich mit dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **90** zeigt dasselbe Anthrachinon-Grundgerüst, jedoch fehlen zwei aromatische Protonen (2-H und 4-H) und das Signal für die chelierte Hydroxygruppe an C-1, dafür treten zwei zusätzliche aliphatische Methylengruppen sowie eine Verschiebung der Methylgruppe (13- CH_3) von $\delta_{\text{H}} = 2.40$ auf 1.46 auf. Eine Suche in AntiBase³⁹ und der Vergleich mit Literaturdaten¹⁷³ führte zur Identifizierung von **91** als Rabelomycin.



3.2.3. 3-Desoxyrabelomycin (92)

Die mit Anisaldehyd in der Wärme violett anfärbende Substanz **92** zeigt dieselben UV-Spektren wie **91**. Eine HREI-MS-Messung ergab zusammen mit dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eine Summenformel von $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_5$. Der Vergleich zu **91** zeigt, dass in **92** ein Sauerstoffatom fehlt, dies wird auch durch das Auftreten eines zusätzlichen aliphatischen Methinprotons im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ($\delta_{\text{H}} = 2.39$) bestätigt. Aufgrund dieser Ergebnisse und durch Vergleich mit Literaturdaten¹⁷⁴ konnte **92** als 3-Desoxyrabelomycin identifiziert werden.

3.3. Galtamycinon (93)

Das UV-Spektrum der Substanz **93** zeigt beim Vergleich mit der HPLC/UV-VIS-Datenbank Übereinstimmung mit dem Antibiotikum SS-228R (**94**), einem linearen Angucyclin, das durch eine Umlagerung aus SS-228Y (**95**) entsteht, die photolytisch und auch thermolytisch induziert werden kann.^{175,176}

Das ESI-Massenspektrum von **93** zeigt ein Ion bei $m/z = 449$ $[\text{M-H}]^-$ und im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum sind 25 C-Atome zu erkennen. Der Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Daten von **93** und **94** zeigt, dass bei **93** zusätzliche Signale im Zuckerbereich auftreten, die durch ein $^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}$ -Experiment einem 2,6-Didesoxyzucker (D-Olivoose) zugeordnet werden können, der C-glykosidisch (C-1': $\delta_{\text{C}} = 72.2$) mit dem Aglykon verknüpft ist. Durch Vergleich mit Literaturdaten¹⁷⁷ konnte **93** als Galtamycinon identifiziert werden. **93** entsteht z.B. durch eine Umlagerung aus Aquayamycin (**96**), das mit Bariumhydroxid bei Raumtemperatur oder thermolytisch (220°C) behandelt wurde (siehe Abbildung 28).¹⁷⁸

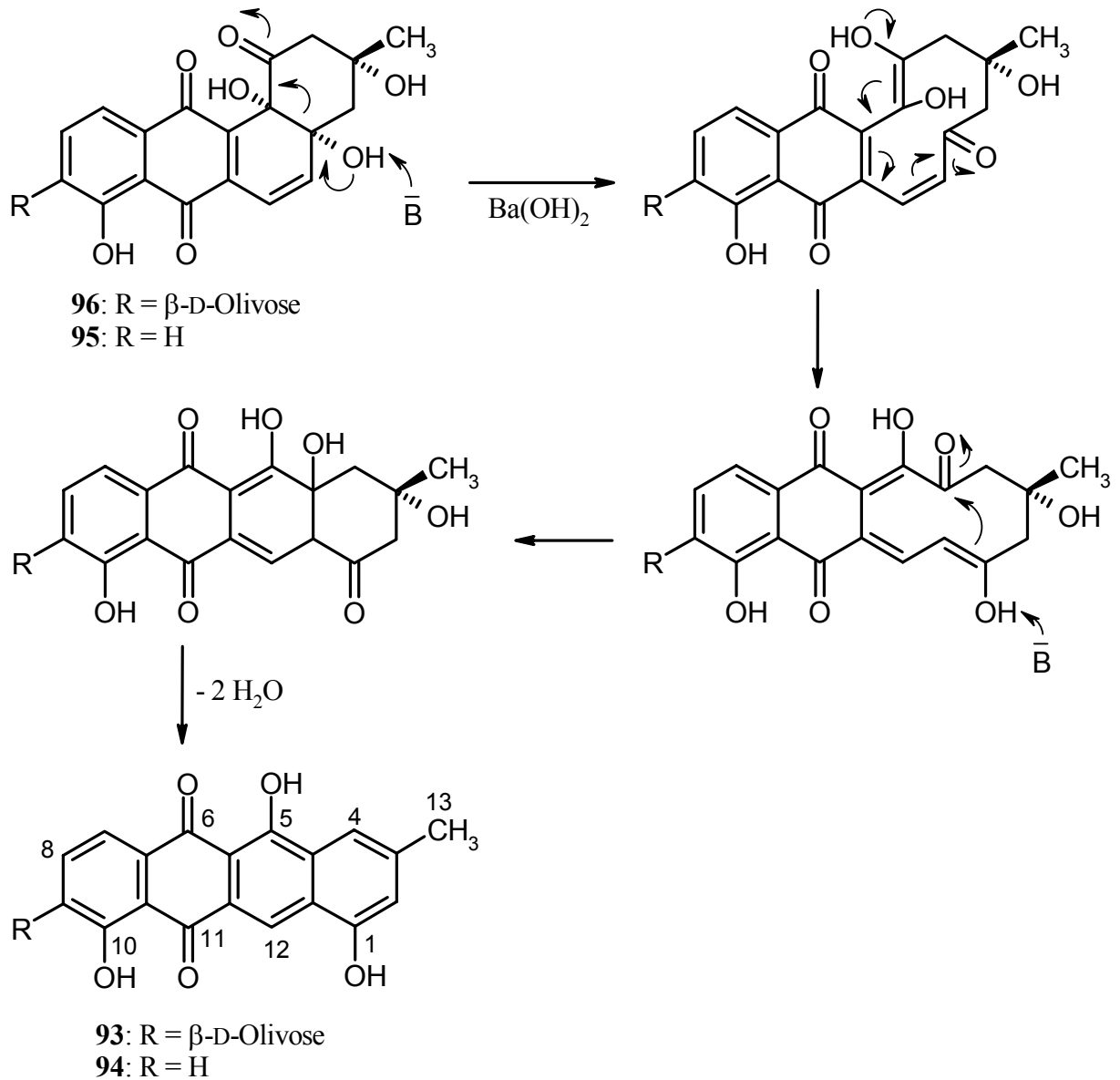
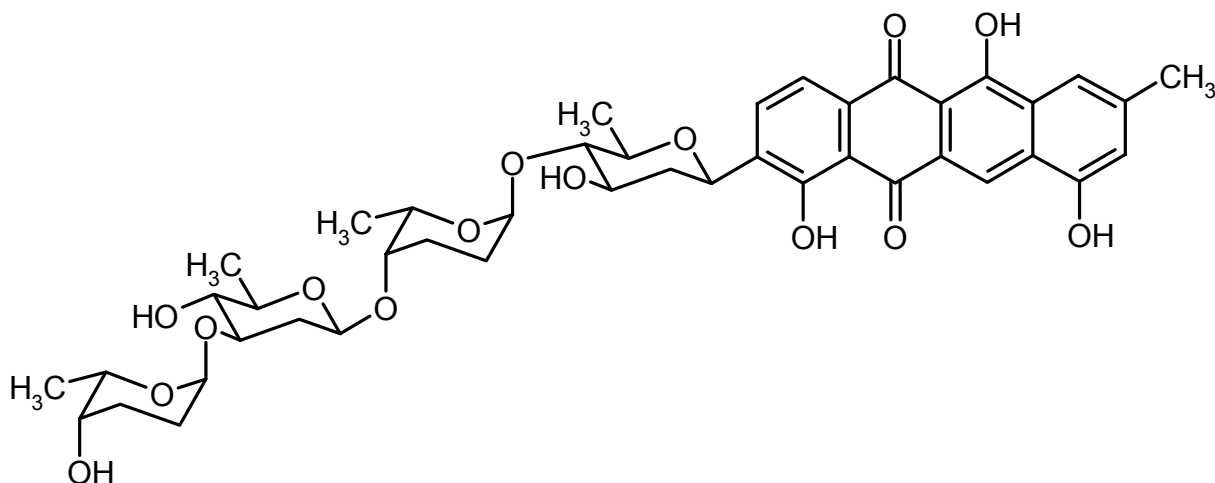


Abbildung 28: Umlagerungsschritte von **96** und **95** zu **93** und **94** bei der Behandlung mit Bariumhydroxid, B = Base.

3.4. Metabolit 6368J (**97**)

Das UV-Spektrum von **97** zeigt ebenso wie das von **93** beim Vergleich mit der HPLC/UV-VIS-Datenbank Übereinstimmung mit SS-228R (**94**). Die LC-MS-Analyse von **97** zeigte bei einer noch nicht vollständig aufgereinigten Fraktion ein Ion bei $m/z = 803$ $[M-H]^-$, das ESI-Massenspektrum der Reinsubstanz jedoch ein Ion bei $m/z = 835$ $[M-H]^-$, also eine Differenz von 32 Masseneinheiten. Eine HRESI-MS-Messung ergab zusammen mit dem ^{13}C -NMR-Spektrum die Summenformel $\text{C}_{44}\text{H}_{52}\text{O}_{16}$. Eine ähnliche Summenformel besitzt auch das 1986 erstmalig beschriebene Galtamycin (**98**),^{179,180} das neben der C-glykosidisch

gebundenen D-Olivose noch drei weitere, an der D-Olivose über C-4' *O*-glykosidisch gebundene Zuckerbausteine besitzt, zwei L-Rhodinosen und eine D-Olivose.



98

Durch den Vergleich des ^{13}C -NMR-Spektrums mit dem von **93** kann das Galtamycinon-Grundgerüst für **97** bestätigt werden, es treten zusätzliche Signale für eine Ketogruppe ($\delta_{\text{C}} = 207.6$), eine Methoxygruppe ($\delta_{\text{C}} = 57.1$), drei anomere C-Atome ($\delta_{\text{C}} = 99.6, 100.0, 100.6$), drei Methylgruppen ($\delta_{\text{C}} = 14.9, 16.1$ und 17.2), sieben oxygenierte Methingruppen und vier Methylengruppen auf. Die komplette Auswertung des ^1H -NMR-Spektrums sowie der 2D-NMR-Experimente konnte aufgrund von sehr breiten Signalen im ^1H -NMR-Spektrum und der geringen Substanzmenge nicht durchgeführt werden. Die ^{13}C -Signale deuten auf drei Desoxyzucker hin, die für Angucycline typisch sind. Die am häufigsten vorkommenden Zucker in Angucyclinen sind 2,6-Didesoxyzucker (D-Olivose), 2,3,6-Tridesoxyzucker (L-Rhodinose, L-Amicetose) sowie L-Aculose und L-Cinerulose A, letztere besitzen beide eine Ketogruppe an Position 4. Die Differenz zwischen der gefundenen Masse ($M = 836$ g/mol) und **93** ($M = 450$ g/mol) beträgt $\Delta m/z = 386$, hierfür konnten aber keine drei Zuckerbausteine gefunden werden, auf die die Massendifferenz und die ^{13}C -NMR-Daten zutreffen. Wird jedoch von der ursprünglich bei der LC-MS-Analyse gefundenen Masse ausgegangen ($M = 804$ g/mol, $\text{C}_{43}\text{H}_{48}\text{O}_{15}$), beträgt die Massendifferenz $\Delta m/z = 354$, für die eine eindeutige Lösung möglich ist. Demnach muss die verbliebende Trisaccharidkette aus einem 2,3,6-Tridesoxy- (entweder L-Rhodinose oder L-Amicetose), einem 2,6-Didesoxyzucker (D-Olivose) und einer L-Aculose bestehen.

Die Differenz ($\Delta m/z = 32$) zwischen der ursprünglich vermessenen Substanz und **97** ist dann dadurch zu erklären, dass sich während der Aufarbeitung bzw. Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Methanol bei leicht sauren Bedingungen Methanol an die

L-Aculose (A) addiert hat und sich somit eine 2-Methoxycinerulose A (B) gebildet hat (siehe Abbildung 29). Diese Reaktion wurde bei der milden Hydrolyse (0.1 M Salzsäure/Methanol) von Vineomycin A₁¹⁸¹ und bei Derivatisierungen der Saquayamycine A und B¹⁸² mit Alkoholen ebenfalls beobachtet.

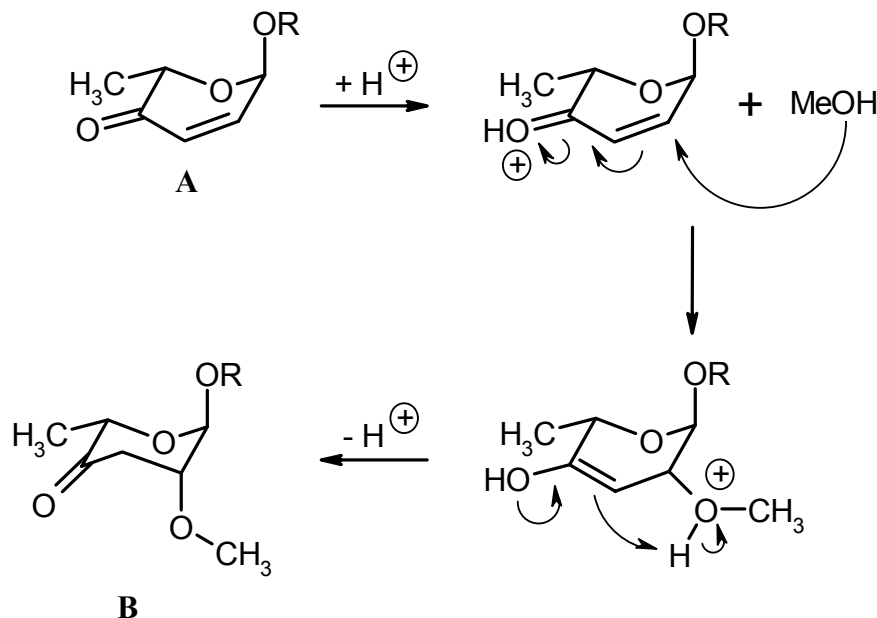


Abbildung 29: Reaktion von L-Aculose mit Methanol bei leicht sauren Bedingungen.

Somit bleibt nur noch die Frage nach der Reihenfolge der Zucker, ob es sich bei einem der Zucker um eine Rhodiose oder eine Amicetose handelt sowie die Frage nach den Positionen der *O*-glykosidischen Verknüpfungen der Olivosen (entweder C-3 oder C-4) offen. Aufgrund der ¹³C-NMR-Daten und eines Vergleichs mit Literaturdaten ist die *C*-glykosidisch gebundene Olivose an Position 4 ($\delta_C = 89.5$) mit der Trisaccharidkette verknüpft. Wenn sie über Position 3 verknüpft wäre, müsste eine Verschiebung von $\delta_C = 82$ zu finden sein, was nicht der Fall ist. Die zweite Olivose hingegen ist wie bei Landomycin A¹⁸³ über ihr C-3 *O*-glykosidisch (siehe Tabelle 8) verknüpft ($\delta_C = 78.9$).

Nr.	β -D-Olivose, C-Glykosyl, 3-O-glykosyliert, δ_C	β -D-Olivose, C-Glykosyl, 4-O-glykosyliert, δ_C	β -D-Olivose, O-Glykosyl, 3-O-glykosyliert δ_C	β -D-Olivose, O-Glykosyl, 4-O-glykosyliert, δ_C
1	71.1	71.1	100.8	101.4
2	37.5	38.9	37.0	38.2
3	81.8	71.3	75.3	72.3
4	76.0	89.4	80.2	88.4
5	76.1	74.4	69.2	70.8
6	18.4	18.4	17.8	17.8

Tabelle 8: Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten (Chloroform) von 3-O- und 4-O-glykosylierten Olivosen, Verschiebungen in ppm.

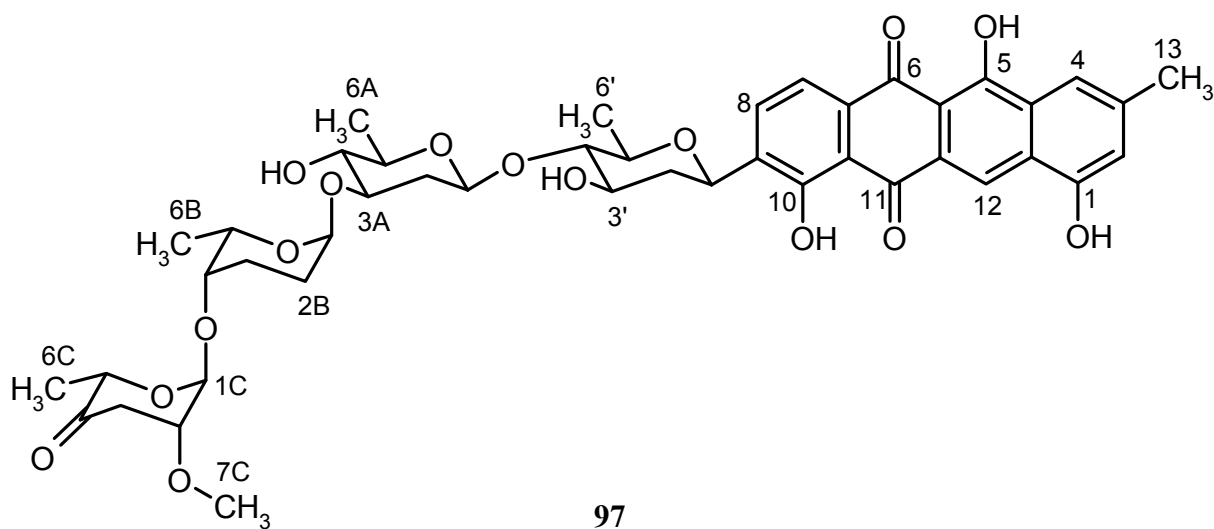
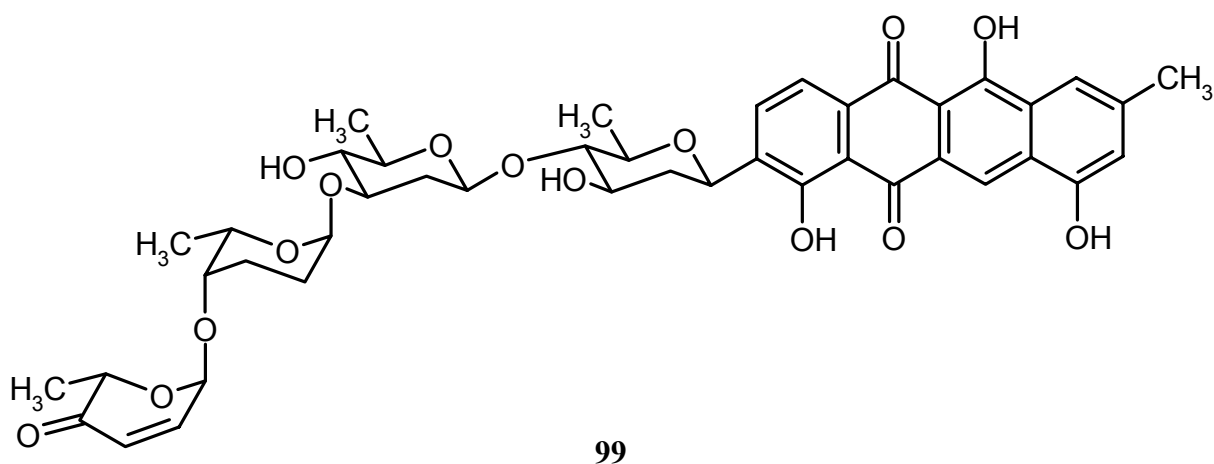
Bezüglich des 2,3,6-Tridesoxyzuckers sprechen die ^{13}C -NMR-Daten eher für eine Rhodinose, da zwei Signale Verschiebungen von $\delta_C = 24.5$ (C-3) und 24.6 (C-2) haben, eine Amicetose müsste an diesen Positionen Verschiebungen von $\delta_C = 25$ und 31 besitzen (siehe Tabelle 9).

Nr.	α -L-Rhodinose, O-Glykosyl, 4-O-glykosyliert, δ_C^{*1}	α -L-Rhodinose, O-Glykosyl, δ_C^{*1}	α -L-Amicetose, O-Glykosyl, 4-O-glykosyliert, δ_C^{*2}	α -L-Amicetose, O-Glykosyl, δ_C^{*1}
1	97.7	97.4	96.9	98.1
2	25.4	24.4	24.7	27.6
3	25.0	24.0	31.2	30.0
4	75.7	67.7	81.0	72.0
5	67.7	67.0	75.5	73.0
6	17.0	17.9	18.6	17.8

Tabelle 9: Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten von L-Rhodinosen und L-Amicetosen, Verschiebungen in ppm; $^{*1} \text{CDCl}_3$, $^{*2} \text{CD}_3\text{OD}$.

Aufgrund der oben angeführten Punkte wird folgende Struktur vorgeschlagen: Es liegt das Galtamycinon-Grundgerüst vor, dessen C-Glykosid eine D-Olivose ist. Die ^{13}C -NMR-Daten sprechen für eine weitere D-Olivose, eine L-Rhodinose und eine L-2-Methoxycinerulose A. Aufgrund von ESI-MSⁿ-Experimenten (siehe Abbildung 30) kann folgender Vorschlag für die Tetrasaccharidkette gemacht werden: D-Olivose-(4→1)-D-Olivose-(3→1)-L-Rhodinose-(4→1)-L-2-Methoxycinerulose A, für die ursprüngliche Substanz also D-Olivose-(4→1)-

D-Olivose-(3→1)-L-Rhodinose-(4→1)-L-Aculose. Damit liegt die gleiche Trisaccharideinheit (D-Olivose-(4→1)-D-Olivose-(3→1)-L-Rhodinose) wie beim Landomycin A vor, an die noch eine L-Aculose geknüpft ist, die typisch für die Saquamycine ist.¹⁸⁴ Diese Ergebnisse führen somit für **97** und für die ursprüngliche Substanz mit der Molmasse 804 (**99**) zu den hier dargestellten Strukturvorschlägen. Beide Strukturen wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben.



Ebenso wie **97** besitzen die aufgrund ihrer Antitumor- und thrombolytischen Aktivitäten 1990 patentierten Antibiotika der Q-1043-Reihe¹⁸⁵ die oben gezeigte Trisaccharideinheit, an die noch eine Olivose und eine Cinerulose B geknüpft sind. Die Urdamycine¹⁸⁶ hingegen besitzen eine andere Reihenfolge des Trisaccharids (D-Olivose-(3→1)-L-Rhodinose-(4→1)-D-Olivose), ebenso das Galtamycin (**98**),^{179,180} das noch eine zusätzliche Rhodinose enthält (D-Olivose-(4→1)-L-Rhodinose-(4→1)-D-Olivose-(3→1)-L-Rhodinose).

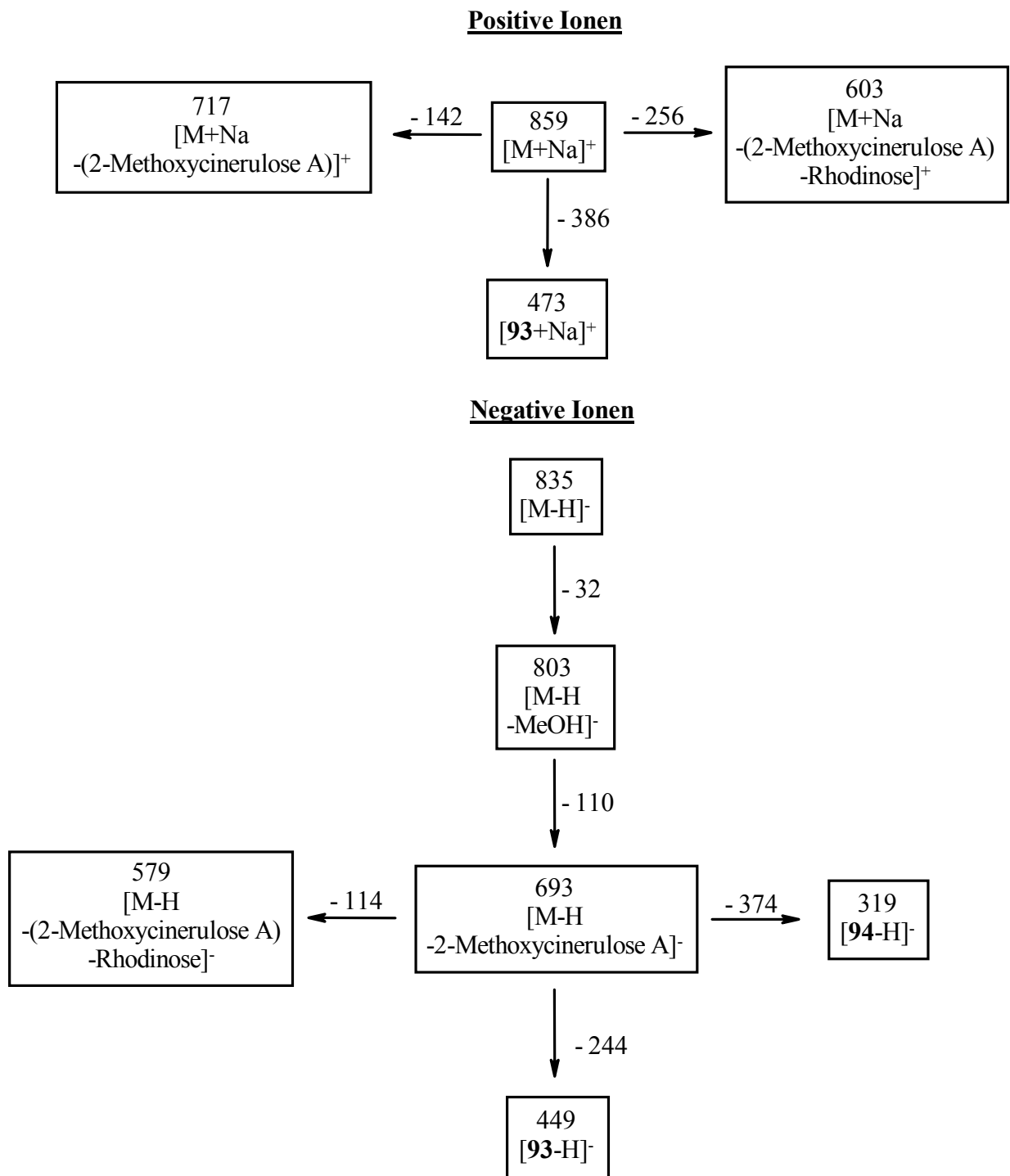
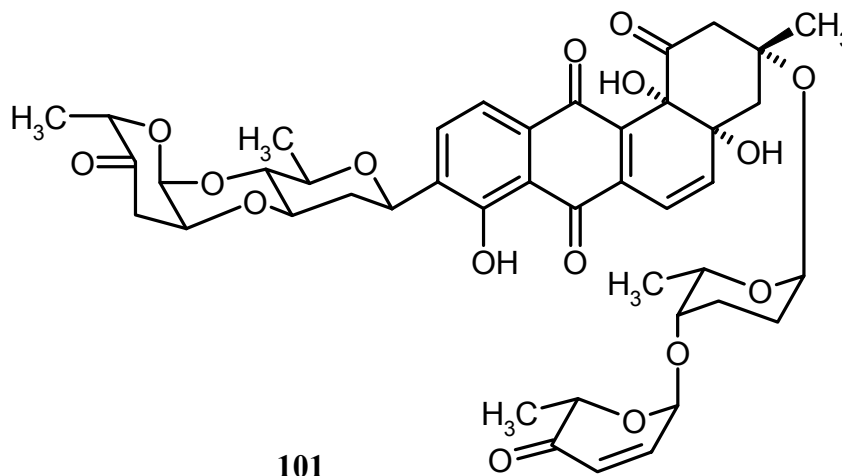


Abbildung 30: Wichtige Fragmentierungen der ESI-MSⁿ-Experimente von **97**.

3.5. Metabolit 6368C2 (100)

Beim Vergleich des UV-Spektrums von **100** mit der HPLC/UV-VIS-Datenbank wurde eine Übereinstimmung mit Saquayamycin B (**101**) gefunden.



Eine erste LC-MS-Analyse einer noch nicht vollständig aufgereinigten Fraktion ergab ein Ion bei $m/z = 1465$ $[M+Na]^+$, die ESI-MS-Messung der Reinsubstanz jedoch ein Ion bei $m/z = 1497$ $[M+Na]^+$. Durch die Molmasse und dem ^{13}C -NMR-Spektrum von letzterer konnte die Summenformel $C_{74}H_{106}O_{30}$ abgeleitet werden. Die Differenz der beiden Massen beträgt wie bei **97** $\Delta m/z = 32$, was auch hier für eine Anlagerung von Methanol an die ursprüngliche Substanz (**102**) spricht. Durch die Übereinstimmung des UV-Spektrums mit dem von **101** wurden die ^{13}C -NMR-Daten der Aglyka (d.h. mit C-Glykosid) von **100** und **101**¹⁸⁴ miteinander verglichen, sie zeigen eine vollständige Übereinstimmung. Neben dem Aglykon sind im ^{13}C -NMR-Spektrum acht anomere C-Atome identifizierbar ($\delta_C = 92.6 - 101.4$), eine Ketogruppe ($\delta_C = 207.5$), eine Methoxygruppe ($\delta_C = 57.0$) und acht Methylgruppen ($\delta_C = 14.8 - 18.0$), die wiederum für typische Desoxyzucker von Angucyclinen sprechen. Die Ketogruppe und die Methoxygruppe haben die gleichen Verschiebungen wie bei **97**, daher kann vermutet werden, dass **100** die gleiche Trisaccharidkette aufweist. Dies wird wiederum durch das ^{13}C -NMR-Spektrum von **100** bestätigt, in dem alle Verschiebungen der Trisaccharidkette von **97** gefunden werden. Die restlichen fünf Zuckerbausteine sind über das C-3-Sauerstoffatom an das Aglykon geknüpft, was durch die Verschiebung von C-3 ($\delta_C = 82.3$) bewiesen ist, die mit den Saquayamycinen übereinstimmt. Auf die komplette Auswertung des 1H -NMR-Spektrums sowie auf Messung weiterer 2D-NMR-Experimente wurde aufgrund der geringen Substanzmenge verzichtet. Für die fünf Zuckerbausteine bleibt eine Massendifferenz von $m/z = 603$, die durch drei Tridesoxy- und zwei Didesoxyzucker ausgefüllt werden kann. Aufgrund der ^{13}C -NMR-Daten ist zu vermuten, dass drei

L-Rhodosen und zwei D-Olivosen vorliegen (siehe Tabellen 8 und 9), die D-Olivosen scheinen über das jeweilige C-3-Sauerstoffatom verknüpft zu sein.

Die Reihenfolge der Zuckerbausteine des Pentasaccharids und der Tetrasaccharidkette konnte durch ESI-MS/MS-Experimente bestimmt bzw. bestätigt werden, die Fragmentierungen sind in Abbildung 31 dargestellt.

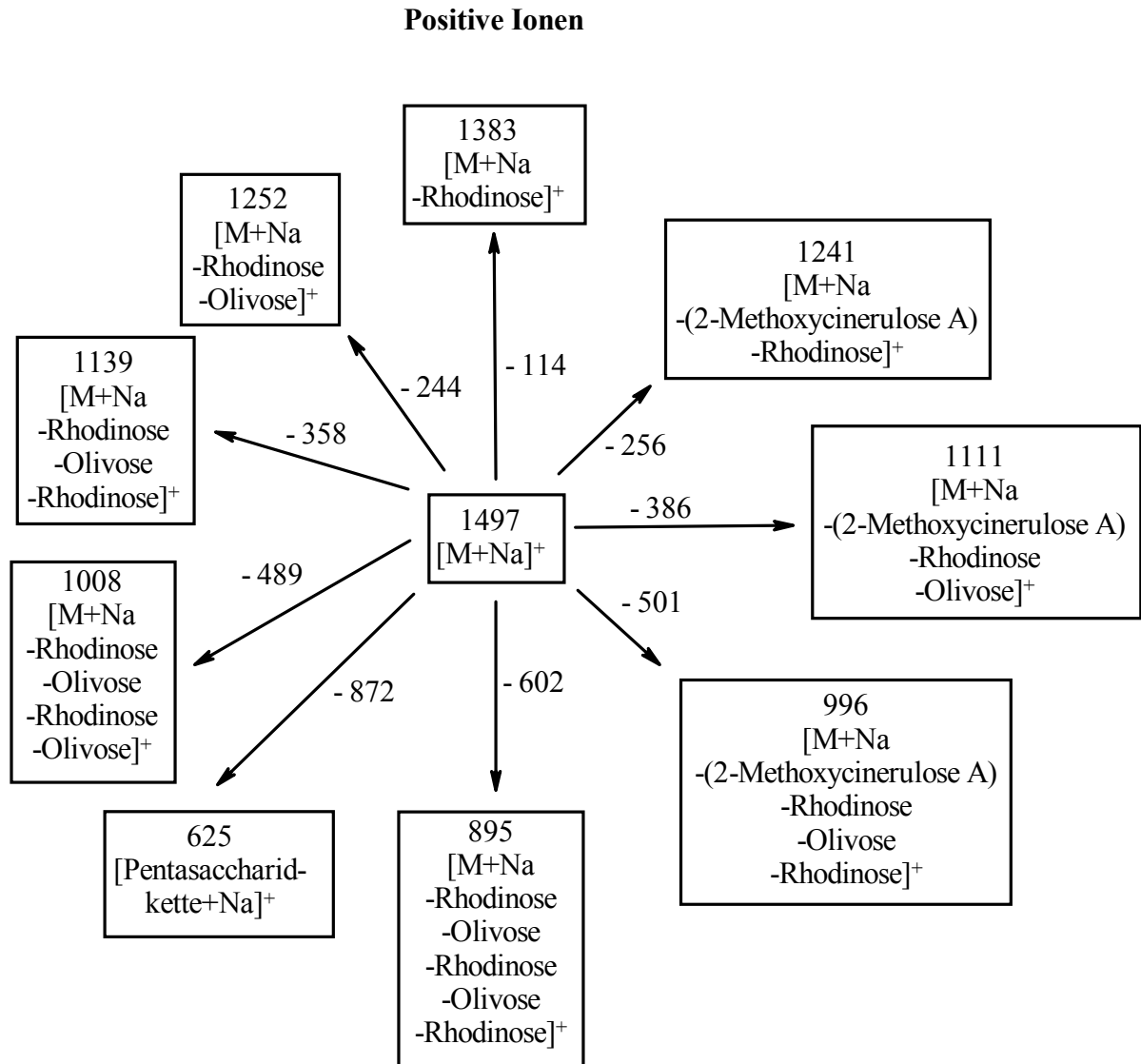
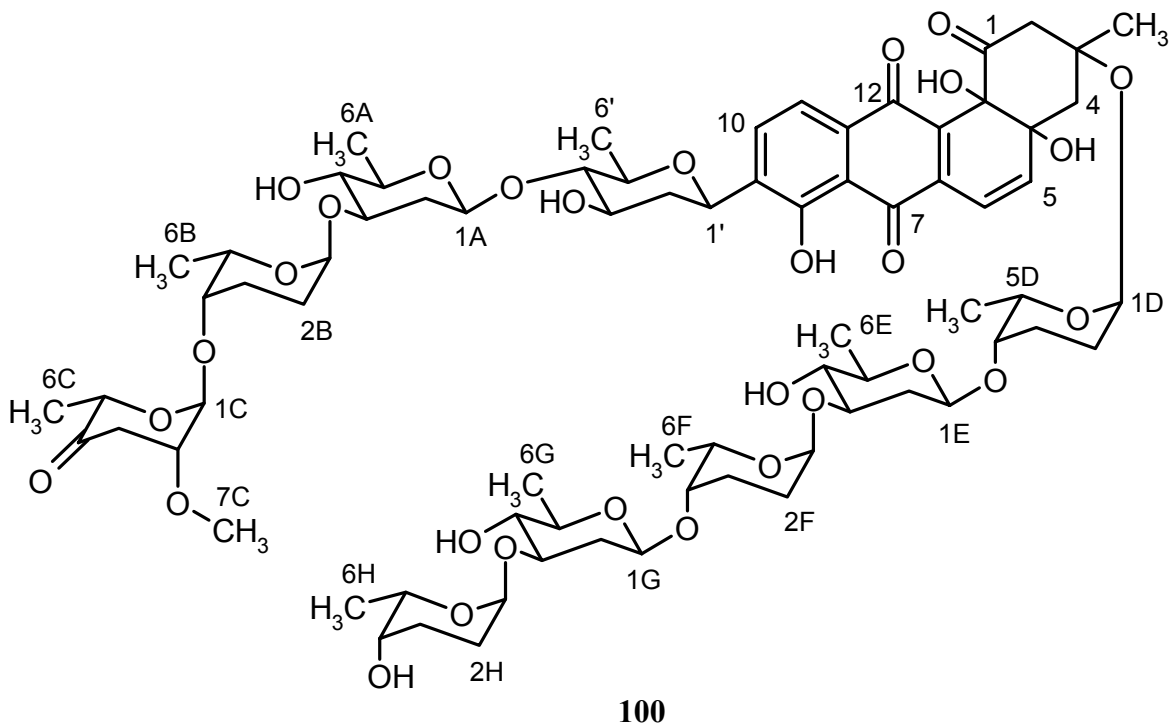
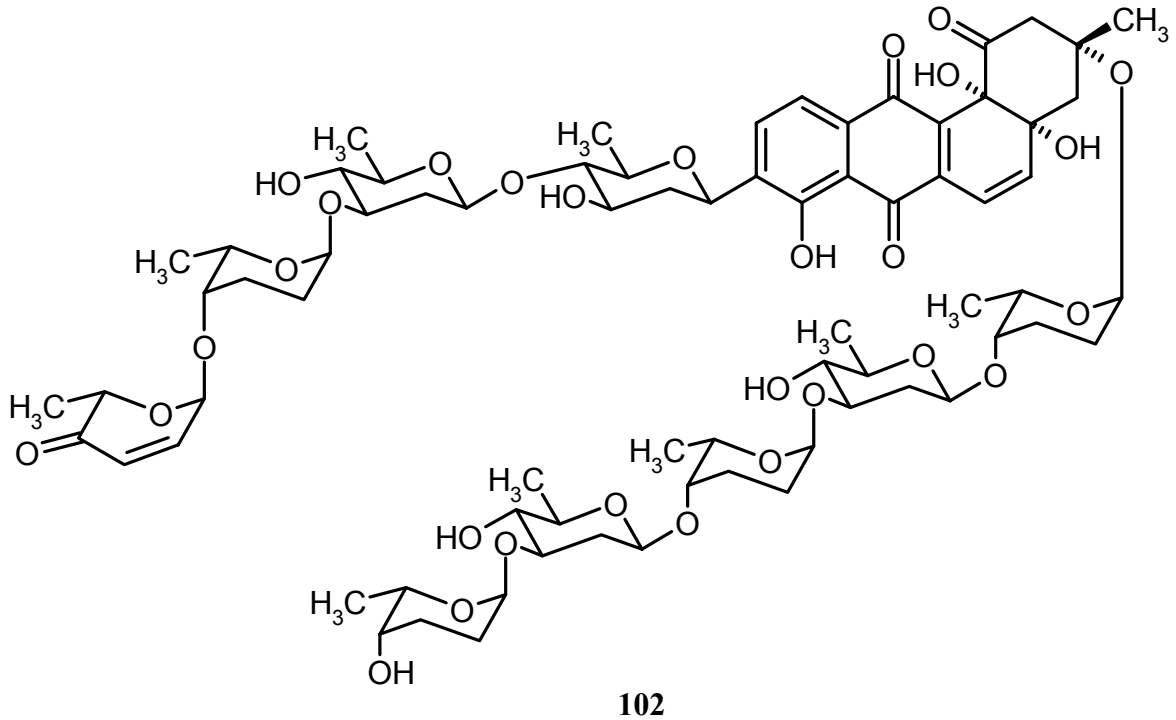


Abbildung 31: ESI-MS/MS-Fragmentierungen von **100**.

Aufgrund dieser Ergebnisse werden für **100** und **102** die hier aufgeführten Strukturvorschläge gemacht, die zu neuen Verbindungen führen. Die Stereochemie an C-3, C-4a und C-12b sind in Anlehnung an bekannte Angucycline¹⁸⁷ dargestellt. Insgesamt besitzt **100** neun Zuckerbausteine mit den wahrscheinlichen Sequenzen für die Tetrasaccharidkette von D-Olivose-(4→1)-D-Olivose-(3→1)-L-Rhodosen-(4→1)-L-2-Methoxycinerulose A sowie für die Pentasaccharidkette L-Rhodosen-(4→1)-D-Olivose-(3→1)-L-Rhodosen-(4→1)-D-Olivose-(3→1)-L-Rhodosen. Für **102** (M = 1443 g/mol, C₇₃H₁₀₂O₂₉) gilt damit für die

Tetrasaccharidkette das gleiche wie für **97**, statt der L-2-Methoxycinerulose A ist eine L-Aculose enthalten.

100 bzw. **102** ist das bisher größte Angucyclin. Landomycin A und D¹⁸³ (M = 1087 bzw. 1071 g/mol) und PI-080¹⁸⁸ (= PI-6621, M = 1049 g/mol) waren bisher die größten mit jeweils insgesamt sechs Zuckerbausteinen.



3.6. Metabolit 6368A2 (103)

Der gelben mit Anisaldehyd in der Wärme orange-gelb anfärbenden Substanz **103** konnte mit Hilfe des ^{13}C -NMR-Spektrums und einer HRESI-MS-Messung^d die Summenformel $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_6$ ($M = 328 \text{ g/mol}$) zugewiesen werden. Aus dem ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren sind Resonanzen für eine Methylgruppe ($\delta_{\text{C}} = 21.8$), zwei Methylengruppen ($\delta_{\text{C}} = 43.6$ und 47.4), eine aliphatische ($\delta_{\text{C}} = 31.4$) und fünf aromatische Methingruppen sowie neun quartäre C-Atome zu erkennen. Von den quartären C-Atomen sind zwei oxygenierten aliphatischen C-Atomen ($\delta_{\text{C}} = 78.4$ und 80.4), eines einer Ketogruppe ($\delta_{\text{C}} = 209.3$) und eines einer zweiten Carbonylfunktion ($\delta_{\text{C}} = 176.8$) zuzuordnen. Aufgrund der Ähnlichkeiten in den Spektren mit denen der vorher genannten Rabelomycine (**90** – **92**) lag die Vermutung nahe, das auch **103** ein Angucyclinon ist. Der Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums mit dem von 3-Desoxy-rabelomycin (**92**) zeigt eine Übereinstimmung für die Ringe A und D, d.h. bei **103** liegt ebenfalls die 2,3,5-substituierte Cyclohexanoneinheit und ein 1,2,3-substituierter Aromat vor, die durch ein $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Experiment bestätigt werden konnten. Aufgrund des ^{13}C -NMR-Spektrums ist aber auffällig, das bei **103** kein Chinon vorliegen kann, denn es fehlt das dritte Carbonyl-C-Atom. Der Ring B kann ebenfalls nicht aromatisch vorliegen, denn es fehlen zwei aromatische C-Atome, an deren Stelle C-Atome mit den Verschiebungen von $\delta_{\text{C}} = 78.4$ und 80.4 treten. Außerdem gibt es zwei neue Signale bei $\delta_{\text{C}} = 146.3$ und 162.1 , die für oxygenierte aromatische C-Atome stehen. Aufgrund der charakterisierten Strukturteile und der gefundenen Summenformel bleiben für den Ring C nur noch eine Carbonylfunktion und ein Sauerstoffatom übrig. Mit Hilfe eines HMBC-Experiments konnten die Strukturteile eindeutig miteinander verknüpft werden (siehe Abbildung 32).

^d Herrn Dr. M. Witt (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) danke ich für die Durchführung der HRESI-MS-Messung.

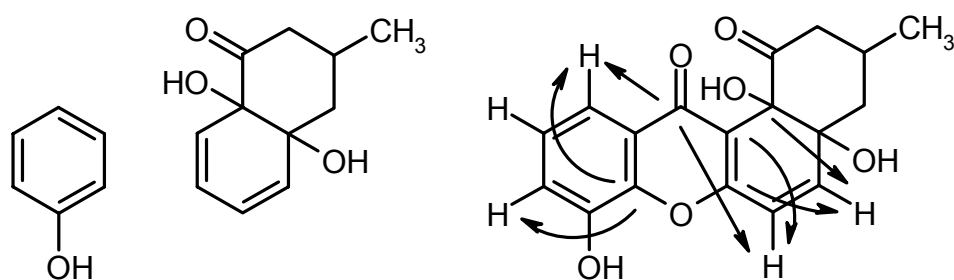
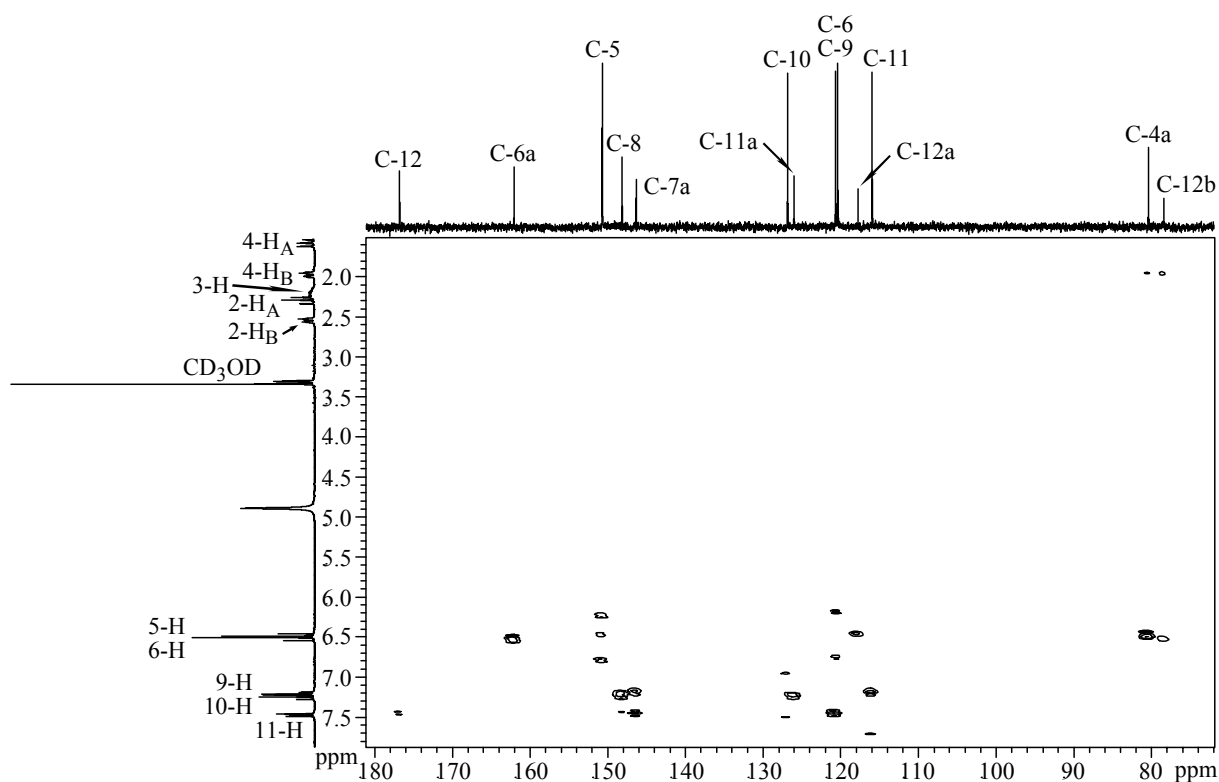
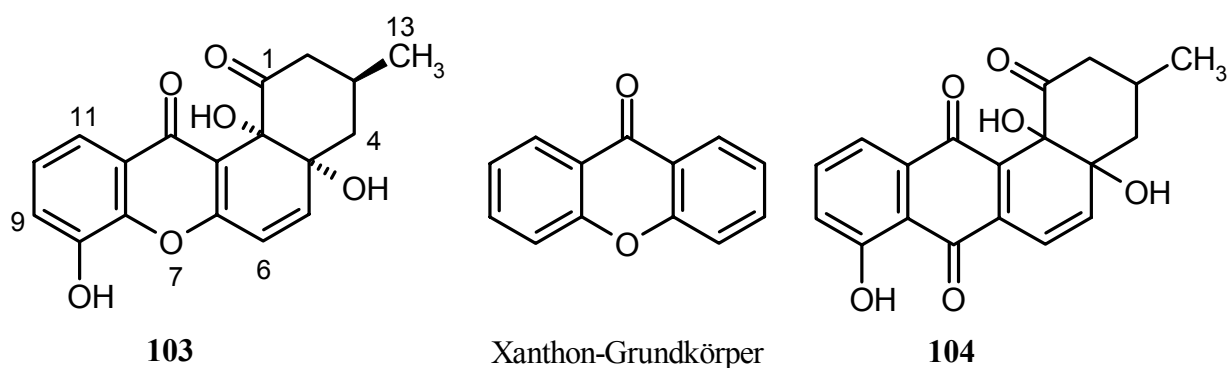
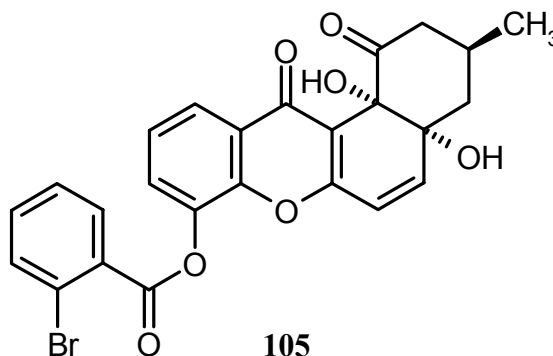


Abbildung 32: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum (300 MHz, Methanol) von **103** und daraus abgeleitete Verknüpfungen der Strukturteile.

Die Stereochemie von **103** an C-3, C-4a und C-12b ist in Anlehnung an bekannte Angucycline/Angucyclinone¹⁸⁷ dargestellt. Struktursuchen in kommerziellen Datenbanken blieben erfolglos, die nächsten Verwandten sind Xanthone und Ochracenomicin A (**104**).¹⁸⁹



Um die Stereochemie von **103** zu bestätigen wurde die Substanz an der C-8-Hydroxygruppe mit 2-Brombenzoesäure verestert. Ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum und ein DCI-Massenspektrum mit Ionen höchster Intensität bei $m/z = 528$ $[\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{O}_7^{79}\text{Br}+\text{NH}_4]^+$ und 530 $[\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{O}_7^{81}\text{Br}+\text{NH}_4]^+$ bestätigten die Umsetzung von **103** zum Ester **105**. Versuche zur Kristallisation von **105** werden zur Zeit durchgeführt.



4. Zur biologischen Aktivität der Metaboliten

Die isolierten Substanzen wurden auf antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* untersucht. Dabei zeigten nur Dehydrorabelomycin (**90**, $\text{Ø} = 8$ mm), Rabelomycin (**91**, $\text{Ø} = 30$ mm), 3-Desoxyrabelomycin (**92**, $\text{Ø} = 20$ mm) und der Metabolit 6368C2 (**100**, $\text{Ø} = 18$ mm) Hemmhöfe gegenüber *Bacillus subtilis*.

Außerdem werden **87**, **93** und **103** von W. Beil (Medizinische Hochschule Hannover) gegen die Krebszelllinien HM02 (Magenadenocarcinom), HepG2 (Lebercarcinom) und MCF7 (Mammacarcinom) getestet. Die Ergebnisse lagen bis zur Abgabe der Arbeit noch nicht vor.

5. Beurteilung der Biosyntheseleistung

Aus dem Stamm *Micromonospora* sp. Tü 6368 konnten aus zwei Kultivierungsansätzen (siehe Kapitel A.III.2.) insgesamt 10 Sekundärmetaboliten isoliert werden, die zu den Klassen der Lumichrome (**87 – 89**) und Angucyclin(on)e (**90 – 93**, **97**, **100** und **103**) gehören. Dabei zeigt der Stamm bei den Angucyclin(on)en eine breite Variation des Grundgerüsts. Er produziert sowohl lineare (**93** und **97**), angulare (**90 – 92** und **100**) als auch im Chinonring oxidierte (**103**) Aglyka. Des Weiteren besitzt der Stamm C- und O-Glykosyltransferasen, letztere glykosylieren regioselektiv am C-4'- (Trisaccharidkette, **97** und **100**) und am C-3-Sauerstoffatom (Pentasaccharidkette, **100**). **100** ist das bisher größte Angucyclin mit

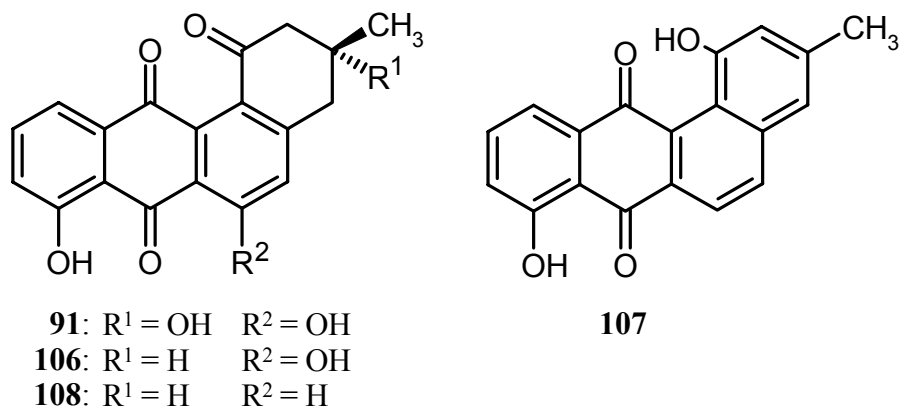
insgesamt neun Zuckerbausteinen, **103** gehört zu einer seltenen Klasse von Angucyclinonen, die im Chinonring oxidiert werden.

Nach dem Konzept von B. Bethe¹⁶⁷ kann der Stamm damit als „vielseitig, verzweigt und komplex“ eingestuft werden.

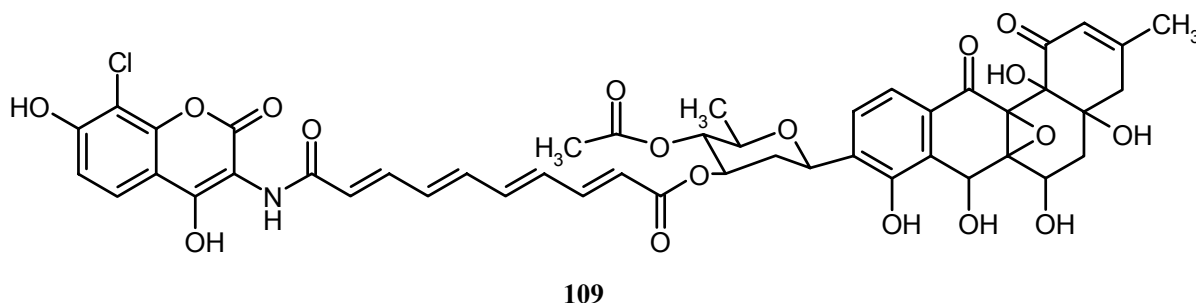
6. Die Gruppe der Angucycline/Angucyclinone

Die aus der Fermentation von Tü 6368 mit XAD-16-Zusatz isolierten Substanzen gehören alle zur Gruppe der Angucycline/Angucyclinone, deren Klassifizierung 1986 vorgeschlagen wurde.¹⁸⁶ Als Angucyclinone gelten Naturstoffe, die eine angulare tetracyclische (Benz[*a*]anthracen) Grundstruktur besitzen oder daraus hervorgehen (z.B. durch Umlagerung) und keine hydrolysierbaren Zuckerbausteine besitzen (*C*-Glykoside sind aber möglich). Biosynthetisch entstehen sie über den Polyketidweg (Typ II) aus einer Decaketidkette, die wiederum aus einer Acetyl-CoA-Startereinheit und neun Malonyl-CoA-Verlängerungseinheiten aufgebaut wird. Der Begriff Angucycline beinhaltet diejenigen Naturstoffe, die zusätzlich zum oben genannten Grundgerüst noch hydrolysierbare Zuckerbausteine enthalten. Aufgrund dieser Einteilung gehören Dehydrorabelomycin (**90**), Rabelomycin (**91**), 3-Desoxyrabelomycin (**92**) und Galtamycinon (**93**) zu den Angucyclinonen sowie die Metaboliten 6368J (**97**) und 6368C2 (**100**) zu den Angucyclinen, der Metabolit 6368A2 (**103**) ist ein Angucyclinon, das im Chinonteil verändert wurde.

Die Angucyclin(on)-Gruppe besteht mittlerweile aus weit mehr als einhundert Sekundärmetaboliten,^{187,190} die alle mikrobiellen Ursprungs sind. Sie besitzen vielfältige biologische Aktivitäten, die von Enzyminhibition (z.B. Aquayamycin (**96**)) über Thrombozytenaggregationshemmung (z.B. Antibiotika der PI-080-Serie) bis zu cytostatischen (z.B. Grincamycin), antibiotischen (z.B. Vineomycin A₁) und antiviralen Wirkungen (z.B. SM 196 B) reichen. Als erste Mitglieder dieser Gruppe wurden Tetrangomycin (**106**), Tetrangulol (**107**), Ochromycinon (**108**), Rabelomycin (**91**) und Aquayamycin (**96**) beschrieben, die alle in den Jahren von 1965 – 1970 entdeckt wurden.



Neuere, von der Struktur sehr ungewöhnliche Angucyclinone sind die Simocyclinone.^{191,192,193} Simocyclinon D8 (**109**) wird aus vier unterschiedlichen Einheiten aufgebaut, einem angucyclischen Polyketidgerüst, einer Didesoxyhexose (D-Olivose), einer Tetraenseitenkette und einem halogenierten Aminocoumarin.



Die Biosynthese der Angucyclin(on)e wurde durch Fütterungsexperimente mit verschiedenen Vorläufern (1-¹³C-Acetat, 2-¹³C-Acetat, 1,2-¹³C₂-Acetat, 1-¹³C¹⁸O₂-Acetat, ¹⁸O₂ und 1-¹³C-Glucose) aufgeklärt. Detaillierte Untersuchungen wurden hauptsächlich an den Vineomycinen, Urdamycinen, Landomycinen, Kinamycinen und Jadomycinen durchgeführt. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind in den Abbildungen 33 und 34 dargestellt und sollen den allgemeinen Biosyntheseweg der Angucyclin(on)e sowie einen hypothetischen Biosyntheseweg zu **103** erläutern, die Bildung der Xanthon-Struktur ist in Anlehnung an vorgeschlagene Mechanismen^{194,195} dargestellt (siehe Abbildung 33). Das Intermediat UWM6¹⁹⁶ (**110**) konnte bei Untersuchungen zum Cyclisierungsmechanismus von **91** charakterisiert werden, die Zwischenstufen (**111** – **116**) sind hypothetischer Natur, deren Existenz aber durch sogenannte Shunt-Produkte unterstützt wird.^{197,198}

Für die Biosynthese von **103** sind zwei Wege denkbar, Weg 1 würde über die bekannten und vermuteten Intermediate der Urdamycine laufen, wobei am Ende das Xanthon gebildet wird. Der Weg 2 hingegen würde über das bekannte Tetrangomycin (**106**) mit anschließender Xanthonbildung und Einführung der Hydroxygruppen an C-4a und C-12b führen.

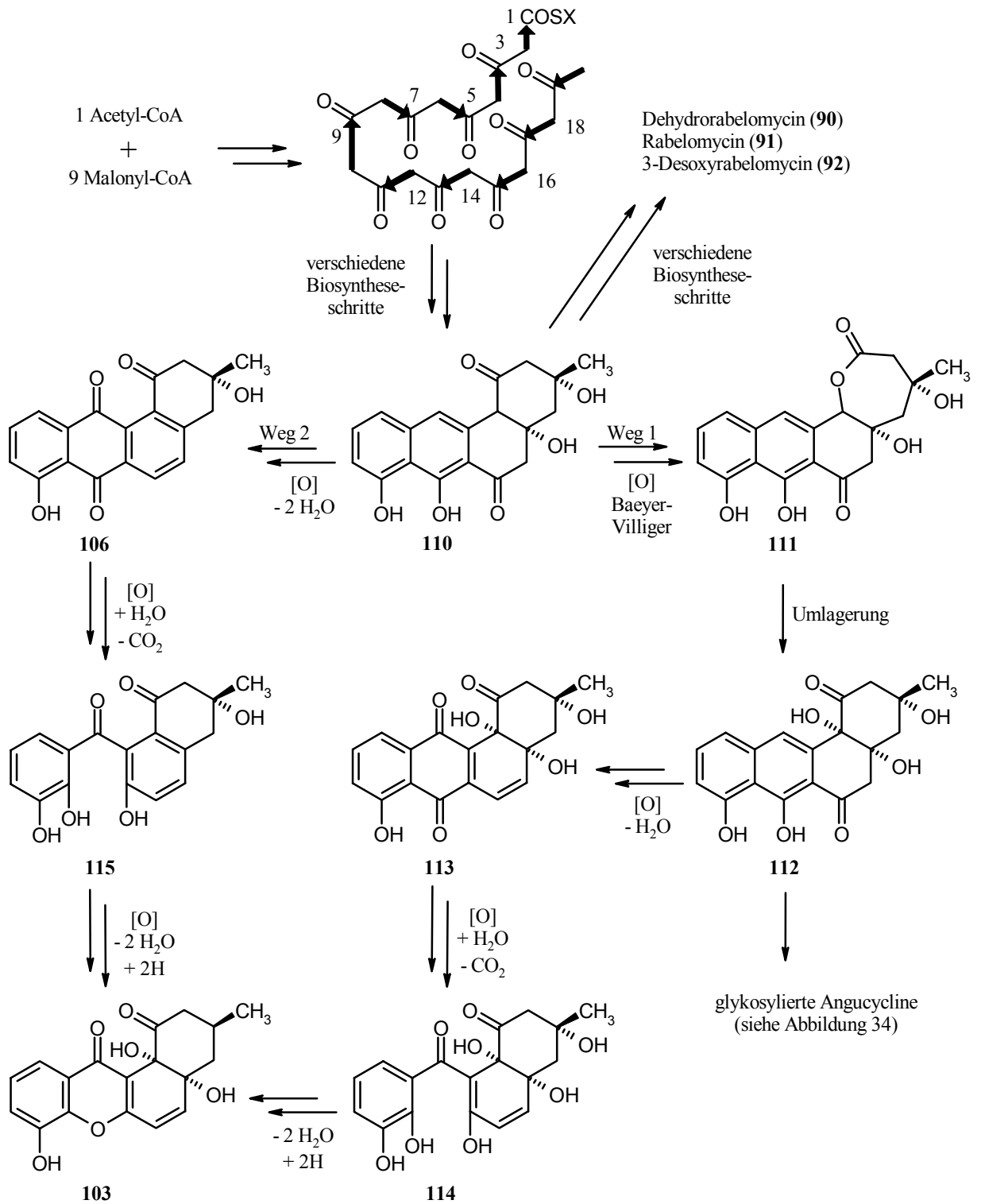


Abbildung 33: Hypothetischer Biosyntheseweg von 103.

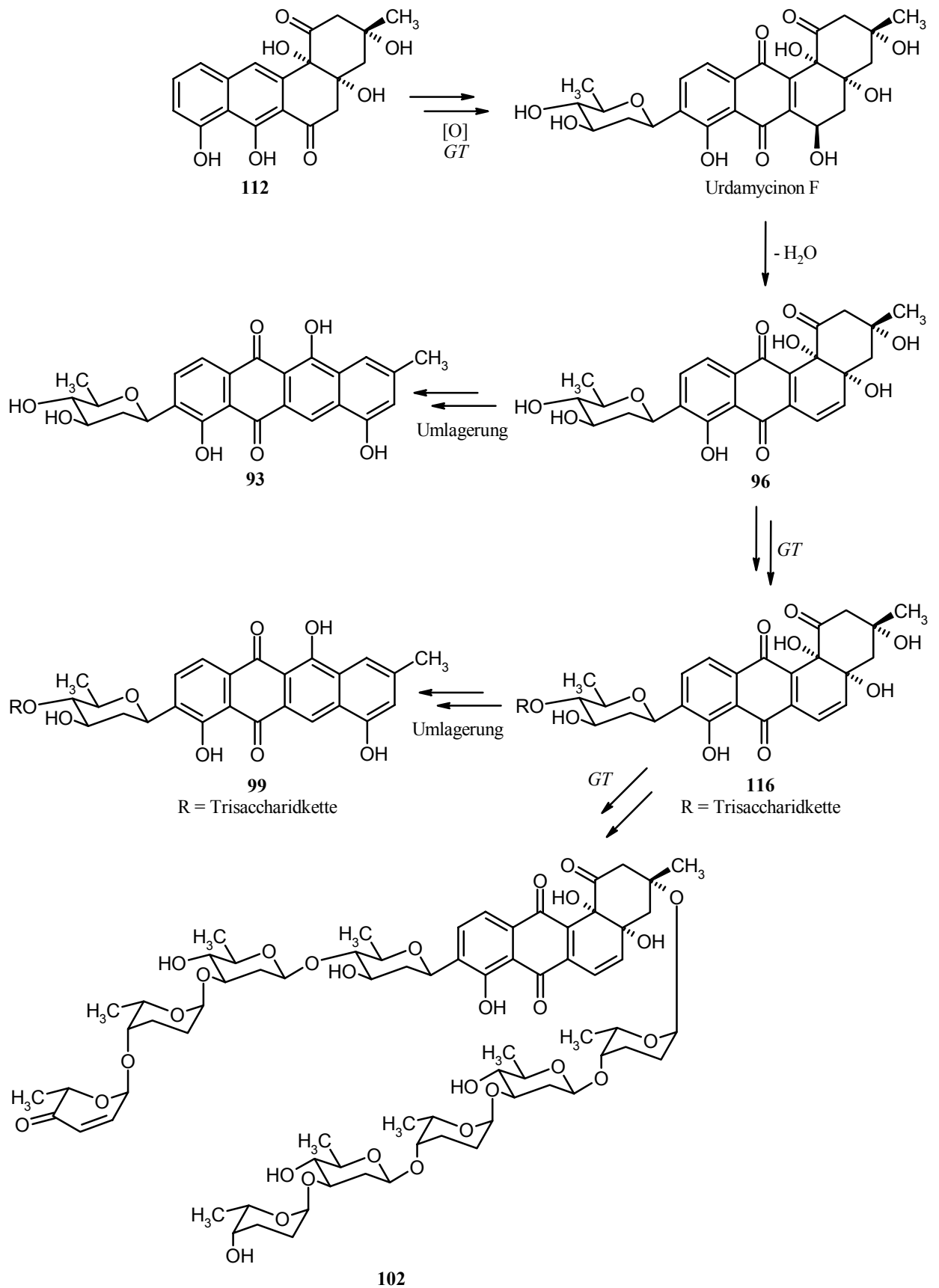


Abbildung 34: Biosyntheseschritte zu 93, 99 und 102, GT = Glycosyltransferasen.

7. Erste Biosyntheseuntersuchungen zum Metaboliten 6368A2 (103) und Ausblick

Die Aufklärung der Biosynthese von **103** konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Es sind zwei Biosynthesewege denkbar (siehe Kapitel A.III.5., Abbildung 33), die zu **103** führen. Diese könnten durch Fütterungsexperimente mit markierten Vorläufern überprüft werden. Als Vorläufer würden sich $[1-^{13}\text{C}^{18}\text{O}_2]\text{Acetat}$, $^{18}\text{O}_2$ und H_2^{18}O eignen. Hierdurch könnte überprüft werden, ob das Sauerstoffatom an C-4a aus Acetat stammt oder aus Luftsauerstoff über eine Monooxygenase (Einbau von einem ^{18}O -Atom plus Wasseraddition) oder eine Dioxygenase (Einbau von zwei ^{18}O -Atomen) eingebaut wird.

Erste Experimente von N. Tóth in Tübingen mit Zufütterung von unmarkiertem Acetat zu Produktionsbeginn zeigten keine Produktion von **103**, obwohl in der Kontrollfermentation **103** gebildet wurde.¹⁹⁹ Anscheinend wird die Produktion von **103** durch die Zugabe von Natriumacetat zur Kulturbrühe gehemmt. Die Hemmung der Polyketidproduktion durch Zugabe von Acetat ist auch von anderen Stämmen bekannt. Bei Biosyntheseuntersuchungen an Simocyclinon D8 (**109**) mit *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 wurde die Produktion von **109** ebenfalls gehemmt, jedoch konnte durch Zufütterung von Malonat und zusätzliche Gabe von Vitamin B₁₂ wieder eine stabile Produktion erreicht werden.¹⁹³ Dieses soll auch mit dem Stamm Tü 6368 versucht werden, entsprechende Experimente werden zur Zeit durchgeführt.

IV. Charakterisierung von Pflanzenmetaboliten

1. Metaboliten aus *Centranthus longiflorus* ssp. *longiflorus* (Valerianaceae)

1.1. Allgemeines

Der Genus *Centranthus* gehört zu den Valerianaceae und ist in der Flora der Türkei mit drei Arten vertreten. Pflanzen dieser Familie sind bekannt für ihre beruhigende Wirkung und *Centranthus longiflorus* ssp. *longiflorus* wird in der türkischen Volksmedizin aufgrund ihrer beruhigenden und antispastischen Wirkung geschätzt. In früheren Veröffentlichungen wurde die Isolierung von Cyclopentanmonoterpenen, Valepotriaten, Anthocyaninpigmenten und Glycerinsäuren beschrieben.²⁰⁰ In einer früheren Zusammenarbeit von L. Ö. Demirezer und A. Zeeck wurden aus dem methanolischen Extrakt der oberirdischen Teile von *Centranthus longiflorus* ssp. *longiflorus* ein neues Iridolacton (Longifloron) sowie Valtrathydrine B8, Patrinosid, Kanokosid A, Oleanolsäure, Sitosterol und Rutin isoliert.²⁰¹ Die in Wasser gelösten Iridoide (100 mg/kg) zeigten beruhigende, krampflösende und antidepressive Wirkungen, gleichzusetzen mit der Wirkung von Diazepam (5 mg/kg) bei Ratten und Mäusen.²⁰²

1.2. Pflanzenmaterial und Isolierung

In Zusammenarbeit mit L. Ö. Demirezer^e wurden aus den Wurzeln von *Centranthus longiflorus* ssp. *longiflorus* Substanzen isoliert und im Rahmen dieser Doktorarbeit in ihrer Struktur aufgeklärt. Das Pflanzenmaterial wurde im Juli 2000 in Ostanatolien (Erzurum) in 1960 m Höhe gesammelt und von Y. Kaya²⁰³ identifiziert. Ein Musterexemplar (HUEF 96022) wurde im Herbarium der Hacettepe Universität²⁰⁴ hinterlegt.

Die getrockneten und gepulverten Wurzeln (350 g) wurden zweimal mit jeweils 3.5 L Methanol bei 40 – 60 °C extrahiert und der Methanolextrakt im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand (80 g) wurde in Wasser aufgelöst und mit Chloroform extrahiert. Die Wasserphase wurde im Vakuum eingeeengt und der Rückstand (47 g) auf eine Sephadex[®] LH-20 Säule (MeOH) gegeben. Fraktionen, die Iridoide enthielten, wurden an einer Kieselgelsäule (CHCl₃/MeOH 9:1→1:1) chromatographiert. Durch weitere Chromatographie an Kieselgel, Sephadex[®] LH-20 und RP-18 konnten sieben Substanzen erhalten werden. 4'-Desoxykanokosid A (**123**, 48 mg) und 4'-Desoxykanokosid C (**124**, 15 mg) wurden bisher in der

^e Frau Prof. Dr. L. Ö. Demirezer und Frau Dr. A. Kuruüzüm-Uz (Hacettepe Universität, Ankara, Türkei) danke ich für die Überlassung der Substanzen sowie für die gute Zusammenarbeit.

Literatur nicht beschrieben, des Weiteren konnten Coniferin (**117**, 27 mg), Isoconiferinosid (**118**, 35 mg), Kanokosid A (**120**, 169 mg), Kanokosid C (**121**, 70 mg) und Valerosidatum (**122**, 38 mg) isoliert werden.

1.3. Strukturaufklärung

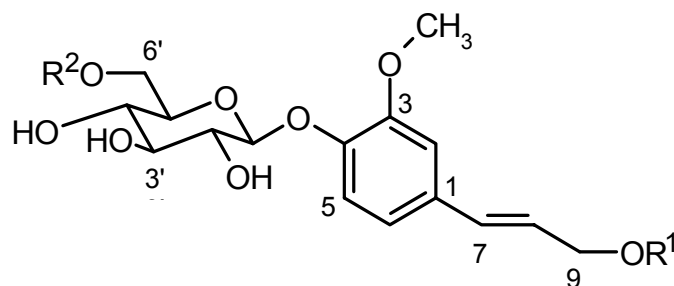
1.3.1. Bekannte Phenylpropanoide (**117**, **118**)

Coniferin (**117**)

Die Substanz **117** färbt in der Wärme mit Vanillin/H₂SO₄ lila an und zeigt im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 365 [M+Na]^+$ sowie im ¹³C-NMR-Spektrum 16 C-Atome. Durch das ¹H-NMR-Spektrum konnte ein 1,2,4-trisubstituierter Aromat als Strukturelement identifiziert werden. Bei einer Suche in Chapman & Hall²⁰⁵ mit der Molmasse, dem Strukturelement des Aromaten und der Anzahl der C-Atome als Suchparameter blieben fünf Möglichkeiten übrig. Durch den Vergleich mit Literaturdaten²⁰⁶ konnte **117** als Coniferin identifiziert werden.

Isoconiferinosid (**118**)

Die in der Wärme mit Vanillin/H₂SO₄ blau anfärbende Substanz **118** zeigt im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 527 [M+Na]^+$ und die ¹H- und ¹³C-NMR-Daten zeigen Ähnlichkeiten zu **117**, wobei die Massendifferenz ($\Delta m/z = 162$) und die ¹³C-NMR-Daten auf einen zusätzlichen Zucker schließen lassen. Durch eine Datenbankrecherche in Chapman & Hall²⁰⁵ mit den gleichen Suchparametern wie bei **117** blieben nur noch Isoconiferinosid (**118**) und Coniferinosid (**119**) als Möglichkeiten. Durch Vergleich mit Literaturdaten²⁰⁶ konnte **118** als Isoconiferinosid identifiziert werden.



- | | |
|---|------------------------------|
| 117 : R ¹ = H | R ² = H |
| 118 : R ¹ = β-D-Glucose | R ² = H |
| 119 : R ¹ = H | R ² = β-D-Glucose |

1.3.2. Bekannte Iridoide (120 – 122)

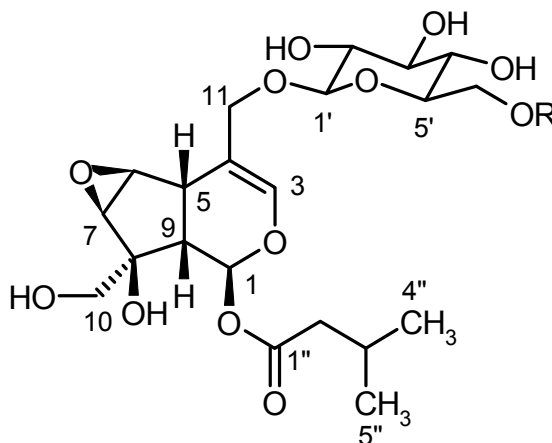
Aufgrund des Anfärbeverhaltens (braun) der Substanzen **120 – 122** mit Vanillin/H₂SO₄ in der Wärme wurde vermutet, dass es sich bei den Substanzen um Iridoide handelt. Mit Hilfe der ¹H- und ¹³C-NMR-Daten sowie den Massenspektren konnten in Chapman & Hall²⁰⁵ Datenbankrecherchen durchgeführt werden, die zur Identifizierung der Metaboliten **120 – 122** führten.

Kanokosid A (120)

Die Substanz **120** zeigt im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 499 [M+Na]^+$ und im ¹³C-NMR-Spektrum 21 C-Atome. Mit diesen Angaben und der zusätzlichen Einschränkung auf Iridoide gab es nur einen Treffer in der Datenbank, Kanokosid A (**120**). Durch Vergleich mit den Literaturdaten^{207,208} konnte **120** eindeutig als Kanokosid A identifiziert werden.

Kanokosid C (121)

Das ESI-Massenspektrum von **121** zeigt ein Ion bei $m/z = 661 [M+Na]^+$ und das ¹³C-NMR-Spektrum 27 C-Atome. Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von **120** und **121** sind sehr ähnlich. Bei **121** treten zusätzliche Signale im Zuckerbereich auf, was durch die Massendifferenz von $\Delta m/z = 162$ bestätigt wird. Mit der gleichen Suchstrategie wie bei **120** gab es ebenfalls nur einen Treffer, Kanokosid C (**121**). Der Vergleich mit Literaturdaten^{207,208} bestätigte dies.

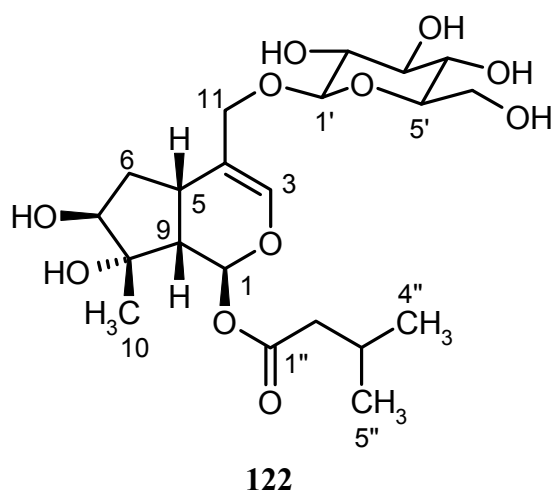


120: R = H

121: R = β-D-Glucose

Valerosidatum (122)

122 zeigt 21 C-Atome im ^{13}C -NMR-Spektrum, ebenso wie **120**, aber ein Ion im ESI-Massenspektrum von $m/z = 485$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Bei der Datenbankrecherche mit den gleichen Suchparametern wie bei **120** und **121** wurden drei Verbindungen gefunden: Patrinosid, 8-*epi*-Patrinosid und Valerosidatum (**122**). Aufgrund der Literaturdaten^{209,210,211,212} konnte letzteres identifiziert werden.

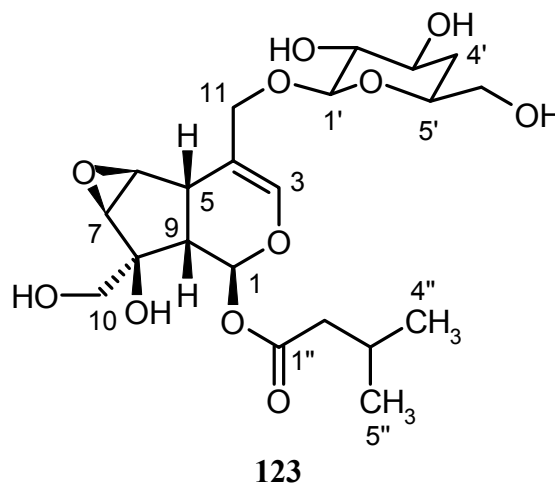


122 weist im Vergleich mit **120** und **121** eine andere Stereochemie an C-8 auf, was für Substanzen, die aus der gleichen Pflanze isoliert werden, sehr ungewöhnlich ist. Daher wurden selektive NOE-Experimente für 1-H, 7-H, 9-H und 10-H₃ durchgeführt, um die Stereochemie zu bestätigen. Die Einstrahlungen zeigen Korrelationen von 10-H₃ zu 1-H, 7-H und 9-H, von 9-H zu 1-H, 5-H und 10-H₃, von 7-H zu 6-H₂ und 10-H₃ sowie von 1-H zu 9-H und 10-H₃. Zusammen mit den Kopplungskonstanten $J_{1,9} = 4.0$ Hz und $J_{6,7} = 3.5$ Hz, die für die Konformation des Iridoidskeletts wichtig sind, und durch Vergleich mit ^{13}C -NMR-Daten von 2',3'-Diacetylvalerosidatum²¹³ und 8-*epi*-Valerosidatum²¹⁴ konnte die Stereochemie bestätigt werden. Über die Isolierung von **122** zusammen mit Patrinosid und den Kanokosiden A – D aus Valerian-Wurzeln wurde bereits früher berichtet.²⁰⁷

1.3.3. 4'-Desoxykanokosid A (123)

Der mit Vanillin/H₂SO₄ in der Wärme braun anfärbenden Substanz kann aufgrund des ESI-Massenspektrums ($m/z = 483$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$) und mit Hilfe der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren die Summenformel C₂₁H₃₂O₁₁ zugeordnet werden. Beim Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten mit denen von **120** wurde eine fast vollkommene Übereinstimmung gefunden. Unterschiede treten bei vier Zuckersignalen an den Positionen 3', 4', 5' und 6' auf. Die signifikanteste Änderung war das Fehlen einer Methingruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.27$. An deren Stelle

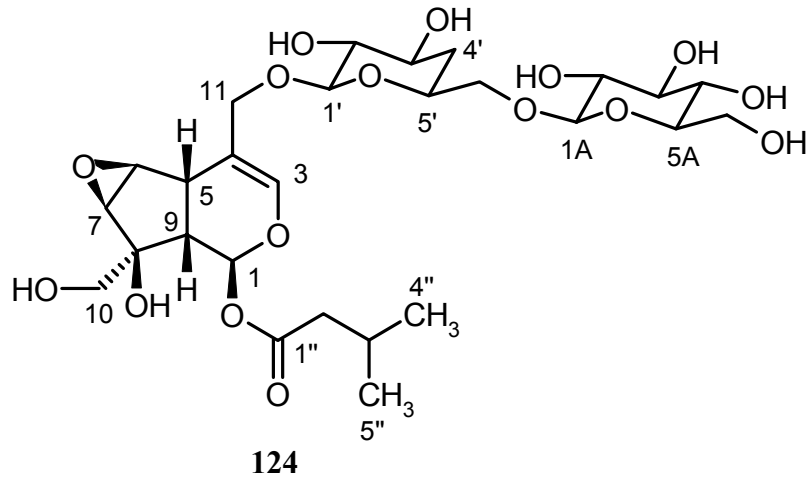
tritt eine diastereomere Methylengruppe bei $\delta_{\text{H}} = 1.35$ und 1.91 ($J_{\text{A,B}} = 12.5$ Hz), die für ein desoxygeniertes C-Atom im Zucker spricht. Außerdem wird im Vergleich zu **120** eine Massendifferenz von $\Delta m/z = 16$ beobachtet, die diese Annahme unterstützt. Das ^{13}C -NMR-Spektrum bestätigt diese Vermutung: Die Signale für C-3' ($\Delta\delta_{\text{C}} = 6$), C-4' ($\Delta\delta_{\text{C}} = 35$) und C-5' ($\Delta\delta_{\text{C}} = 4$) sind ins Hochfeld verschoben, C-6' ($\Delta\delta_{\text{C}} = 3$) hingegen ins Tieffeld, was auf die Abwesenheit der Hydroxygruppe an C-4' hinweist. Ein Vergleich mit den ^{13}C -Werten von 4-Desoxy- β -D-glucose [$\delta_{\text{C}} = 97.1$ (C-1), 76.9 (C-2), 71.3 (C-3), 35.1 (C-4), 73.2 (C-5), 64.5 (C-6)]²¹⁵ unterstützt dieses ebenfalls. Zusammen mit den ^1H , ^1H -COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren konnte **123** als 4'-Desoxykanokosid A abgeleitet werden. **123** ist bisher nicht



beschrieben worden und ist ein seltenes Beispiel für Naturstoffe mit einem 4-Desoxyzucker.

1.3.4. 4'-Desoxykanokosid C (**124**)

Das ESI-Massenspektrum ($m/z = 645$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺) ergibt, zusammen mit den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren, für die mit Vanillin/ H_2SO_4 in der Wärme braun anfärbende Substanz eine Summenformel von $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_{16}$. Aufgrund der Verwandtschaft zu **121** ($\Delta m/z = 16$, ein Sauerstoffatom weniger) wurden die spektroskopischen Daten mit denen von **121** und 4'-Desoxykanokosid A (**123**) verglichen. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt die erwarteten Protonen für das Iridoidskelett und die Isovalerylgruppe. Die Kopplungskonstanten von $J = 8.0$ Hz der anomeren Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 4.34$ und 4.37 stimmen mit einer β -Konfiguration beider Zucker überein. Mit den zusätzlich durchgeführten 2D-NMR-Experimenten kann auf eine 4-Desoxygentiobiose als Zuckereinheit geschlossen werden. Aus diesen Daten lässt sich **124** als 4'-Desoxykanokosid C ableiten. Damit gehört **124** wie auch **123** zu den seltenen Naturstoffen mit einem 4-Desoxyzucker und wurde bisher ebenfalls nicht beschrieben. Ein ähnliches Iridoid, Serrulatosid,²¹⁶ wurde aus *Penstemon serrulatus* (Scrophulariaceae) isoliert.



1.4. Cytotoxizitätsuntersuchungen

Die Substanzen wurden von W. Beil^f gegen die Krebszelllinien HM02 (Magenadenocarcinom), HepG2 (Lebercarcinom) und MCF7 (Mammacarcinom) getestet. Sie zeigten bis zu einer Konzentration von 10 µg/mL nur Wachstuminhibierungen von 50 % (GI₅₀), jedoch keine komplette Inhibierung des Wachstums (TGI) oder cytotoxische Aktivitäten (LC₅₀).

Substanz	HM02		HepG2		MCF7	
	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI
117	3.6	9.5	7.2	> 10	2.6	> 10
118	5.2	7.9	7.5	> 10	3.8	> 10
120	8.5	> 10	4.9	> 10	2.5	> 10
121	3.5	7.5	6.5	> 10	1.3	> 10
122	7.0	> 10	9.9	> 10	3.2	> 10
123	6.8	> 10	5.8	> 10	1.3	> 10
124	5.8	9.9	8.7	> 10	1.0	> 10

Tabelle 10: Ergebnisse der Cytotoxizitätstests, alle Angaben in µg/mL, GI₅₀: Growth Inhibition 50 %, TGI: Total Growth Inhibition.

^f Herrn Prof. Dr. W. Beil (Institut für Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover) danke ich für die Durchführung der Cytotoxizitätstests.

2. Metaboliten aus *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae)

2.1. Allgemeines

Vitex agnus-castus L. (Verbenaceae) ist ein kleiner Baum bzw. Busch, der an der anatolischen Küstenlinie weit verbreitet ist. Die Pflanze hat gute medizinische Eigenschaften und wird aufgrund ihrer hormonähnlichen Wirkweise speziell zur Behandlung von premenstrualen Problemen und Hyperprolaktinämie verwendet. In der anatolischen Volksmedizin wird *Vitex agnus-castus* zur Verdauungsförderung, als Harntreibmittel und Antimykotikum verwendet sowie bei Angstzuständen, Frühgeburten und Bauchschmerzen eingesetzt. Bisher isolierte Metaboliten aus *Vitex agnus-castus* gehören in die Substanzgruppen der Iridoide, Flavonoide, Diterpenoide und Ketosteroide.²¹⁷

2.2. Pflanzenmaterial und Isolierung

In Zusammenarbeit mit L. Ö. Demirezer⁸ wurden die Stängel (Blüten, Blätter und Zweige) von *Vitex agnus castus* L. untersucht und die isolierten Substanzen im Rahmen dieser Doktorarbeit in ihrer Struktur aufgeklärt. Das Pflanzenmaterial wurde im Juni 2001 in Fethiye (Muğla, Türkei) gesammelt und von A. Kuruüzüm-Uz identifiziert. Ein Musterexemplar (HUEF 01031) wurde im Herbarium der Hacettepe Universität²⁰⁴ hinterlegt.

Das getrocknete und gepulverte Pflanzenmaterial (700 g) wurde dreimal mit jeweils 3.5 L Methanol bei 45 °C extrahiert und der Methanolextrakt im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand (300 g) wurde in Wasser aufgelöst und zuerst mit Chloroform (36 g) und dann mit *n*-Butanol (74 g) extrahiert und im Vakuum eingeeengt. Ein Teil des *n*-Butanol-Rückstandes (25 g) wurde an einer Kieselgelsäule (CHCl₃/MeOH 9:1→1:1) chromatographiert. Fraktionen, die Iridoide und Flavonoide enthielten, wurden weiter an Kieselgel (1. EtOAc/MeOH/H₂O 100:5:2→100:17:13, 2. CHCl₃/MeOH/H₂O 90:10:1→60:40:4), Sephadex[®] LH-20 (MeOH) und RP-18 (MeOH/H₂O-Gradienten) chromatographiert. Es konnten insgesamt zwölf Substanzen erhalten werden, von denen Agnucastosid A (**134**, 5 mg), Agnucastosid B (**135**, 6 mg) und Agnucastosid C (**136**, 26 mg) in der Literatur bisher nicht beschrieben wurden. Des Weiteren konnten Isoorientin (**125**, 67 mg), 2''-(*E*)-Caffeoylisoorientin (**126**, 17 mg), 6''-(*E*)-Caffeoylisoorientin (**127**, 7 mg), Luteolin-7-*O*-glucosid (**128**, 5 mg), Myzodendron (**129**, 6 mg), Aucubin (**130**, 14 mg), Agnusid (**131**, 130 mg), Mussaenosinsäure (**132**, 52 mg) und 6'-*O*-*p*-Hydroxybenzoylmussaenosinsäure (**133**, 78 mg) isoliert werden.

⁸ Frau Prof. Dr. L. Ö. Demirezer und Frau Dr. A. Kuruüzüm-Uz (Hacettepe Universität, Ankara, Türkei) danke ich für die Überlassung der Substanzen sowie für die gute Zusammenarbeit.

2.3. Strukturaufklärung

2.3.1. Bekannte Flavonoide (125 – 128)

Die Eigenfarbe und das Anfärbeverhalten (gelb) in der Wärme mit Vanillin/H₂SO₄ der Substanzen **125 – 128** deutete darauf hin, dass es sich bei ihnen um Flavonoide handelt. Mit Hilfe der ¹H- und ¹³C-NMR-Daten sowie den Massenspektren konnten in Chapman & Hall²⁰⁵ Datenbankrecherchen durchgeführt und die Metaboliten **125 – 128** identifiziert werden.

Isoorientin (125)

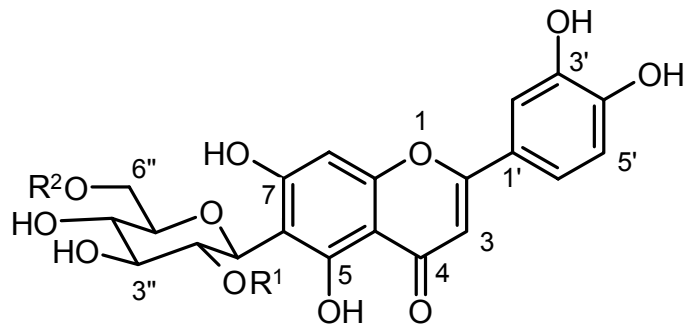
Die Substanz **125** zeigt im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 471 [M+Na]^+$ und im ¹³C-NMR-Spektrum 21 C-Atome. Mit diesen Angaben und der zusätzlichen Einschränkung auf Flavonoide sowie einem 3,4-Dihydroxyphenylring gab es 32 Treffer in der Datenbank. Aufgrund des Vorhandenseins eines C-glykosidisch gebundenen Zuckerbausteins (C-1'': $\delta_C = 75.3$, $\delta_H = 4.90$) kamen nur noch acht Strukturen in Frage. Durch Vergleich mit den Literaturdaten²¹⁸ konnte **125** als Isoorientin identifiziert werden.

2''-O-(E)-Caffeoylisoorientin (126)

Das ESI-Massenspektrum von **126** zeigt ein Ion bei $m/z = 633 [M+Na]^+$ und das ¹³C-NMR-Spektrum 30 C-Atome. Die NMR-Spektren (¹H und ¹³C) von **125** und **126** sind sehr ähnlich, bei **126** treten zusätzliche Signale im aromatischen Bereich auf. Mit der gleichen Suchstrategie wie bei **125** konnte **126** als 2''-O-(E)-Caffeoylisoorientin identifiziert werden.²¹⁹

6''-O-(E)-Caffeoylisoorientin (127)

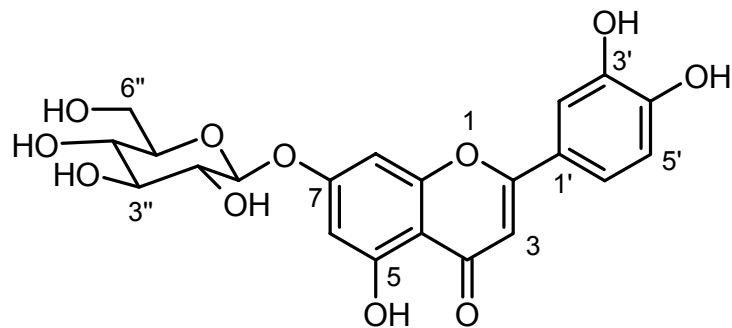
127 zeigt das gleiche Ion im ESI-Massenspektrum ($m/z = 633 [M+Na]^+$) und die gleiche Anzahl von C-Atomen (30) wie **126**. Auffälligste Unterschiede sind im ¹H-Spektrum die Verschiebungen von 2''-H (**126**: $\delta_H = 5.66$, **127**: $\delta_H = 4.23$) und 6''-H₂ (**126**: $\delta_H = 3.79/3.92$, **127**: $\delta_H = 4.34/4.52$) sowie im ¹³C-Spektrum von C-2'' (**126**: $\delta_C = 73.8$, **127**: $\delta_C = 72.4$) und C-6'' (**126**: $\delta_C = 62.8$, **127**: $\delta_C = 65.0$). Daraus ergibt sich, dass **127** im Gegensatz zu **126** an C-6'' und nicht an C-2'' des Zuckers verestert ist. Durch Literaturvergleich²¹⁹ konnte **127** als 6''-O-(E)-Caffeoylisoorientin bestätigt werden.



- 125:** R¹ = H R² = H
126: R¹ = (*E*)-Caffeoyl R² = H
127: R¹ = H R² = (*E*)-Caffeoyl

Luteolin-7-*O*-glucosid (128)

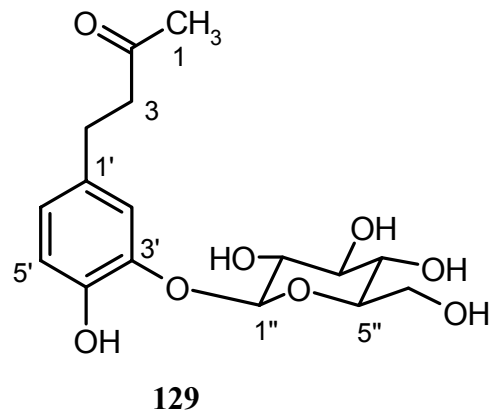
Das DCI-Massenspektrum von **128** zeigt ein Ion bei $m/z = 449$ $[M+H]^+$ und das ^{13}C -NMR-Spektrum 21 C-Atome, damit also die gleiche Masse und C-Atomzahl wie **125**. Unterschiede bestehen jedoch in der Verschiebung von C-1'' (**125**: $\delta_{\text{C}} = 75.3$, **128**: $\delta_{\text{C}} = 99.9$) und im Auftreten von einem zusätzlichen aromatischen Methinprotonen bei $\delta_{\text{H}} = 6.43$, die für ein *O*-Glykosid bei **128** anstelle eines *C*-Glykosides wie bei **125** sprechen. Durch die anschließende Datenbankrecherche mit den gleichen Suchparametern wie bei **125** konnte **128** als Luteolin-7-*O*-glucosid identifiziert werden.²²⁰



128

2.3.2. Myzodendron (129)

Die mit Vanillin/H₂SO₄ in der Wärme blau-lila anfärbende Substanz zeigt im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 365$ $[M+Na]^+$ und das ^{13}C -NMR-Spektrum 16 C-Atome. Durch eine Suche in Chapman & Hall²⁰⁵ und Vergleich mit Literaturdaten^{221,222} konnte **129** als Myzodendron bestimmt werden.



2.3.3. Bekannte Iridoide (130 – 133)

Aufgrund der Anfärbeverhalten der Substanzen **130** und **131** mit Vanillin/H₂SO₄ (braun) in der Wärme wurde vermutet, dass es sich bei den Substanzen um Iridoide handelt. Mit Hilfe der ¹H- und ¹³C-NMR-Daten sowie den Massenspektren konnten in Chapman & Hall²⁰⁵ Datenbankrecherchen durchgeführt und die Metaboliten **130** und **131** identifiziert werden.

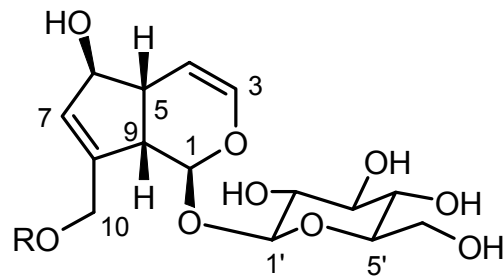
Die beiden Substanzen **132** und **133** färben in der Wärme mit Vanillin/H₂SO₄ im Vergleich zu **130** und **131** rosa an. Durch die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren konnte aber festgestellt werden, dass es sich bei ihnen ebenfalls um Iridoide handelt. Sie zeigen typische Iridoidskelett- und Zuckersignale. Sie wurden ebenfalls durch Datenbankrecherchen in Chapman & Hall²⁰⁵ identifiziert.

Aucubin (130)

Die Substanz **130** zeigt im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 369 [M+Na]^+$. Mit dieser Angabe und der zusätzlichen Einschränkung auf Iridoide gab es 19 Treffer in der Datenbank. Durch Vergleich der ¹H-NMR-Daten mit den Literaturdaten konnte **130** als Aucubin bestimmt werden.^{223,224}

Agnusid (131)

Das ESI-Massenspektrum von **131** zeigt ein Ion bei $m/z = 489 [M+Na]^+$ und das ¹³C-NMR-Spektrum 22 C-Atome. Die ¹H-NMR-Spektren von **130** und **131** sind sehr ähnlich, bei **131** treten zusätzliche Signale im Aromatenbereich auf. Auffällig ist die unterschiedliche Verschiebungen von 10-H₂ (**130**: $\delta_H = 4.15/4.34$, **131**: $\delta_H = 4.86/5.08$), die für eine Veresterung von **131** an C-10 sprechen. Mit der Molmasse und der Anzahl der C-Atome gab es vier Treffer in der Datenbank und **131** konnte als Agnusid identifiziert werden.²²⁵



130: R = H

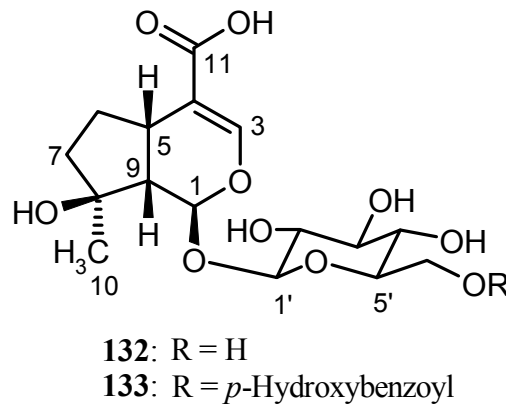
131: R = *p*-Hydroxybenzoyl

Mussaenosinsäure (**132**)

132 zeigt einen ESI-Massenpeak von $m/z = 399 [M+Na]^+$ und insgesamt 16 C-Atome. Eine Schwierigkeit bei dieser Substanz besteht darin, dass nicht alle C-Atome im ^{13}C -NMR-Experiment sichtbar werden. Die Werte für C-4 ($\delta_C = 116.2$) und C-11 ($\delta_C = 173.0$) konnten nur durch ein HMBC-Experiment bestimmt werden. Sie zeigen jeweils eine Korrelation mit dem 1H -Signal bei $\delta_H = 7.26$, das der Position 3 zugeordnet wird. Durch die Suchparameter Iridoide, Molmasse und Anzahl der C-Atome gab es für **132** noch 13 Möglichkeiten. Durch Vergleich mit Literaturdaten²²⁶ konnte **132** als Mussaenosinsäure identifiziert werden.

6'-*O*-*p*-Hydroxybenzoylmussaenosinsäure (**133**)

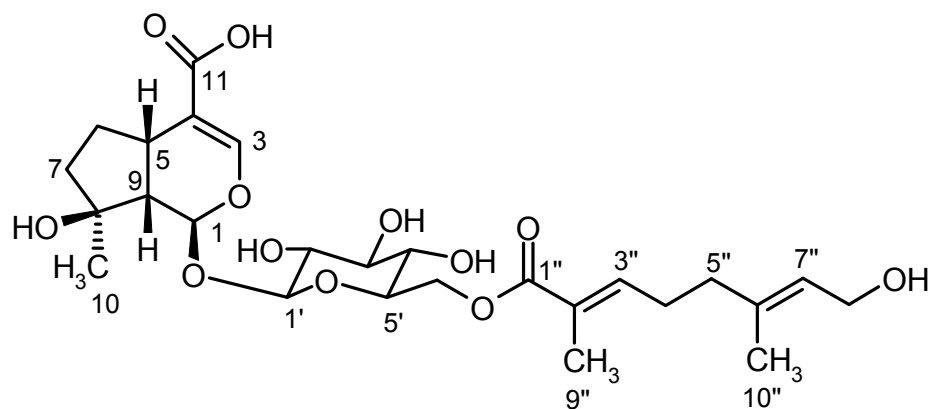
133 zeigt im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 519 [M+Na]^+$ sowie 23 C-Atome im ^{13}C -NMR-Spektrum. Die 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von **132** und **133** zeigen starke Ähnlichkeiten zueinander, wobei in den Spektren von **133** zusätzliche Signale im Aromatenbereich zu erkennen sind. Die ^{13}C -Signale für C-4 und C-11 sind im Gegensatz zu **132** vorhanden, die Intensitäten sind aber gering. Die Massendifferenz zwischen **132** und **133** beträgt $\Delta m/z = 120$, die gleiche Differenz wie zwischen **130** und **131**. Die zusätzlichen aromatischen Signale im 1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum stimmen mit den Signalen überein, die bei **131** zur *para*-Hydroxybenzoyleinheit gehören. Es ist möglich die Veresterungsposition über den Vergleich der 1H - und ^{13}C -NMR-Daten mit denen von **132** zu bestimmen. Aus der Verschiebung der Signale von 6'-H₂ (**132**: $\delta_H = 3.63/3.89$, **133**: $\delta_H = 4.41/4.62$) und C-6' (**132**: $\delta_C = 62.9$, **133**: $\delta_C = 64.4$) folgt die Verknüpfung der *para*-Hydroxybenzoyleinheit über das C-6'-Sauerstoffatom des Zuckers. Durch Vergleich mit Literaturdaten²²⁷ konnte **133** als 6'-*O*-*p*-Hydroxybenzoylmussaenosinsäure bestätigt werden.



2.3.4. Agnucastosid A (134)

Der mit Vanillin/H₂SO₄ in der Wärme lila anfärbenden Substanz konnte durch das ESI-Massenspektrum ($m/z = 565$ [M+Na]⁺) und den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren die Summenformel C₂₆H₃₈O₁₂ zugeordnet werden. Die UV- und IR-Spektren zeigen typische konjugierte Enol-Ether-Systeme von Iridoiden (UV: 220 nm, IR: 1650 und 1703 cm⁻¹). Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren zeigen wiederum Ähnlichkeiten zu denen von **132** und **133**. Weiterhin ist wie bei **133** eine Verschiebung von 6'-H₂ (**132**: δ_H = 3.63/3.89, **134**: δ_H = 4.27/4.49) und C-6' (**132**: δ_C = 62.9, **134**: δ_C = 64.3) zu beobachten. Diese sprechen für eine Veresterung am C-6'-Sauerstoffatom des Zuckers. Von den verbleibenden 10 C-Atomen kann eines einer Carbonylgruppe bzw. Estergruppe zugeordnet werden, vier davon liegen im olefinischen und fünf im aliphatischen Bereich. Die restlichen Protonen können zwei Methylgruppen, drei Methylengruppen und zwei olefinischen Methingruppen zugeordnet werden. Durch ¹H,¹H-COSY-, HSQC- und HMBC-Experimente sowie Vergleich mit Literaturdaten²²⁷ konnte für diese Signale eine Übereinstimmung mit einer Foliamenthoyl-einheit gefunden werden. Außerdem kann die Veresterung an der 6'-Hydroxygruppe bestätigt werden, da es HMBC-Korrelationen zwischen C-1'' und 6'-H₂, 3''-H sowie 9''-H₃ gibt. Dadurch konnte **134** als 6'-*O*-Foliamenthoylmussaenosinsäure (Agnucastosid A) charakterisiert werden, einem bisher noch nicht bekannten Naturstoff.

Aufgrund der geringen Menge an **134** war es nicht möglich, die Konfiguration der 6'',7''-Doppelbindung zu bestimmen. Als eine allgemeine Regel²²⁸ für die 6,7-Doppelbindung in Foliamenthinsäure wird angenommen, dass bei einer Differenz von mehr als 20 ppm zwischen C-5 und C-10 eine (*E*)-Konfiguration und bei weniger als 10 ppm eine (*Z*)-Konfiguration vorliegt. Bei **134** liegt eine Differenz von 23 ppm zwischen C-5 und C-10 vor, so dass auf eine (*E*)-Konfiguration geschlossen wird.

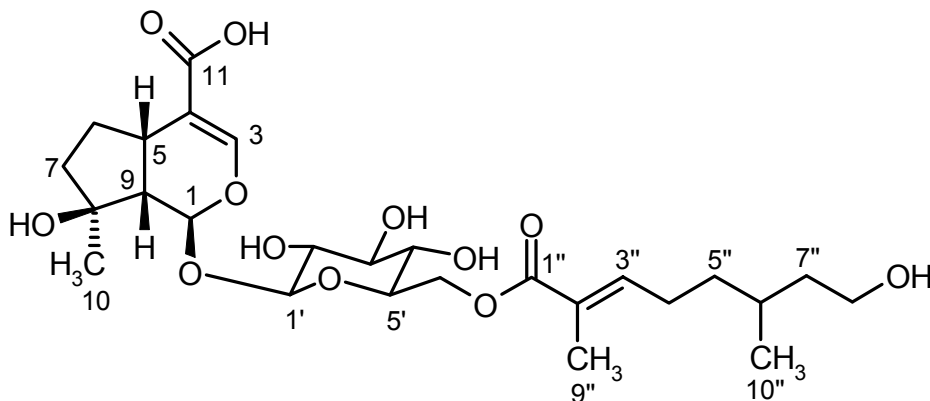


134

2.3.5. Agnucastosid B (135)

Das ESI-Massenspektrum ($m/z = 567 [M+Na]^+$) und die 1D- und 2D-NMR-Daten von **135** (rosa Anfärbereaktion in der Wärme mit Vanillin/ H_2SO_4) zeigen starke Übereinstimmungen mit denen von **134**. Die Substanz hat ebenfalls 26 C-Atome und zusammen mit dem 1H -NMR- und dem Massenspektrum konnte ihr die Summenformel $C_{26}H_{40}O_{12}$ zugeordnet werden. Die Unterschiede zu **134** zeigen sich in den ^{13}C -NMR-Spektren an den Positionen C-6'' und C-7''. Anstelle von zwei olefinischen C-Atomen (C-6'': $\delta_C = 138.3$, C-7'': $\delta_C = 125.8$) treten bei **135** zwei aliphatische C-Atome auf (C-6'': $\delta_C = 30.6$, C-7'': $\delta_C = 40.6$). Die Verschiebungen in den 1H -NMR-Spektren von $\delta_H = 5.38$ (br t, $J = 6.5$ Hz, 1H, 7''-H) in **134** und $\delta_H = 1.62$ (m, 1H, 6''-H) sowie 1.36/1.60 (m, 2H, 7''-H₂) in **135** bestätigen dieses. Damit liegt in **135** eine gesättigte ($\Delta^{6,7}$)-Foliamenthoyleinheit vor und die Verbindung kann als 6'-O-(6,7-Dihydrofoliamenthoyl)-mussaenosinsäure (Agnucastosid B) charakterisiert werden, die bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurde.

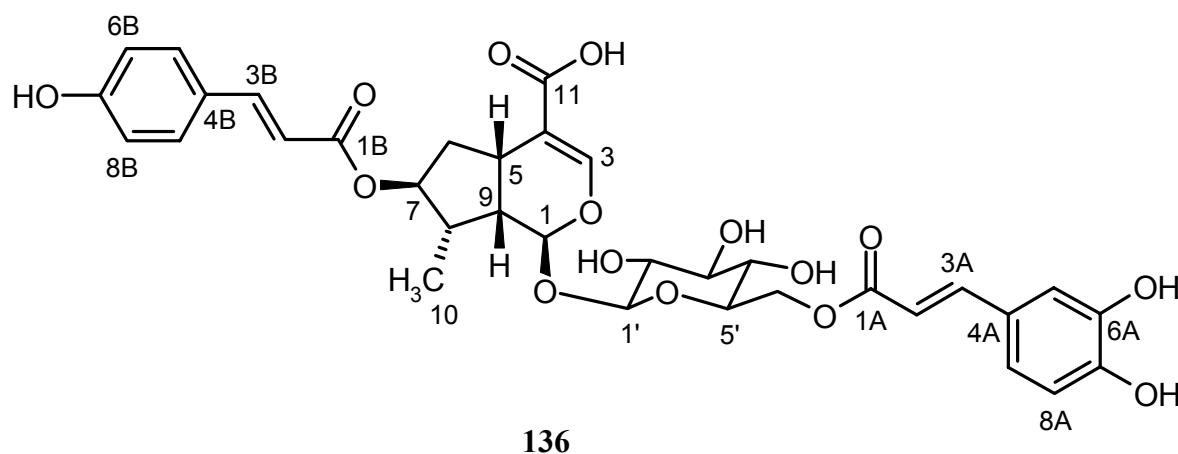
Die Stereochemie an C-6'' konnte aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht näher bestimmt werden. Bisher wurden die meisten Verbindungen mit einer 6,7-Dihydrofoliamenthinsäureeinheit wie in **135** mit der 6(*S*)-Konfiguration²²⁸ beschrieben.



135

2.3.6. Agnucastosid C (136)

Die Substanz färbt in der Wärme mit Vanillin/H₂SO₄ rosa an und zeigt im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 707$ $[M+Na]^+$. Zusammen mit den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren konnte als Summenformel C₃₄H₃₆O₁₅ bestimmt werden. Die UV- und IR-Spektren zeigen wiederum typische Signale für ein konjugiertes Enol-Ether-System von Iridoiden (UV: 219 nm, IR: 1634 und 1694 cm⁻¹). Im ¹³C-NMR-Spektrum sind 34 Signale zu sehen, 16 von diesen können dem Iridoidgrundgerüst von 8-*epi*-Logansäure^{229,230} zugeordnet werden, von den 18 verbleibenden Signalen liegen 16 im Aromaten- bzw. Doppelbindungsbereich ($\delta_C = 115 - 160$) und zwei im Carbonyl- bzw. Esterbereich ($\delta_C = 169.0$). Diese können durch ein ¹H,¹H-COSY-Experiment und Vergleich mit Literaturdaten einer Coumaroyl²³¹ und einer Caffeyoleinheit^{232,233} zugeordnet werden. Die Verknüpfungspunkte der Coumaroyl- und Caffeyoleinheiten sind durch Verschiebungen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren gut zu erkennen. Ein Verknüpfungspunkt ist an C-7 und der andere an C-6' (Tiefeldverschiebungen von $\Delta\delta_C = 4.2$ sowie $\Delta\delta_H = 0.80$ an C-7 und $\Delta\delta_C = 1.4$ sowie $\Delta\delta_H = 0.70$ an C-6' gegenüber 8-*epi*-Logansäure).



Aufgrund der identischen chemischen Verschiebung der Ester-carbonylgruppen (C-1A und C-1B) bei $\delta_C = 169.0$ war es trotz 2D-NMR-Experimenten nicht möglich zu bestimmen, über welches Sauerstoffatom die Coumaroyl- bzw. Caffeyoleinheit verknüpft ist. Um dieses Problem zu lösen, wurden ESI-MSⁿ-Experimente durchgeführt (siehe Abbildung 35). Die Fragmentierung des Ions bei $m/z = 707$ $[M+Na]^+$ resultiert in vier Hauptfragmente bei $m/z = 689$ $[M+Na-H_2O]^+$, 663 $[M+Na-CO_2]^+$, 543 $[M+Na-F1]^+$ und 365 $[M+Na-F2]^+$. Eine zweite Fragmentierung des Ions bei $m/z = 543$ führt zu drei Fragmenten bei $m/z = 525$ $[M+Na-F1-H_2O]^+$, 499 $[M+Na-F1-CO_2]^+$ und 365 $[M+Na-F1-F3]^+$. Dieses Fragmentierungsmuster ist nur möglich, wenn die Coumaroyleinheit über das Sauerstoffatom an C-7 und die

Caffeoyleinheit über das Sauerstoffatom an C-6' des Zuckers verknüpft ist. Hierdurch konnte **136** als 7-*O*-(*E*)-Coumaroyl-6'-*O*-(*E*)-caffeoyl-8-*epi*-logansäure (Agnucastosid C) identifiziert werden. Dieser Naturstoff wurde wie **134** und **135** bisher nicht beschrieben.

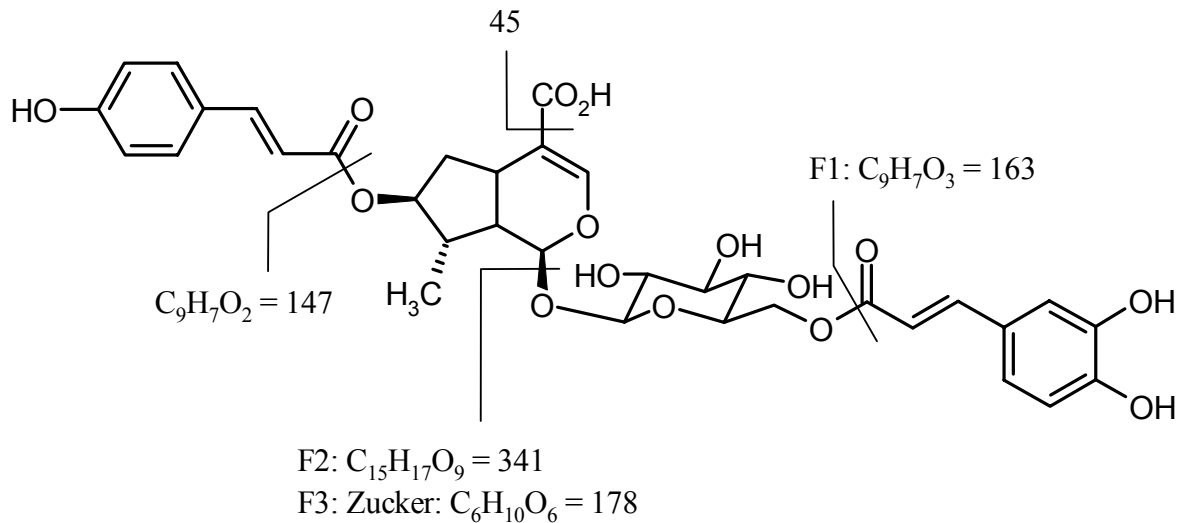


Abbildung 35: Fragmentierungsmuster von **136**, F1 – F3: Fragmente.

2.4. Zur biologischen Aktivität der Metaboliten

Die Metaboliten wurden in Plattendiffusionstest auf antimikrobielle Aktivität gegen die Stämme *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* getestet, sie zeigten jedoch keine Aktivität.

Des Weiteren wurden die Substanzen **125** – **127**, **129**, **130** und **132** - **136** von W. Beil^h gegen die Krebszelllinien HM02 (Magenadenocarcinom), HepG2 (Lebercarcinom) und MCF7 (Mammacarcinom) getestet. Dabei zeigten sie bis 10 µg/mL keine Wirkungen gegenüber den oben genannten Zelllinien, die Ergebnisse für **125** – **127** lagen bis zur Abgabe der Arbeit noch nicht vor.

^h Herrn Prof. Dr. W. Beil (Institut für Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover) danke ich für die Durchführung der Cytotoxizitätstests.

3. Metaboliten aus *Galium verum* ssp. *verum* (Rubiaceae)

3.1. Allgemeines

Die Gattung *Galium* (Rubiaceae) ist mit ungefähr 100 Arten in der Flora der Türkei vertreten.²³⁴ *Galium*-Arten werden in der türkischen Volksmedizin als Diuretika sowie gegen Rheuma und Krämpfe eingesetzt. In bisherigen phytochemischen Studien wurden als Hauptkomponenten Iridoidglycoside, Flavonoide und Anthrachinone identifiziert.^{235,236}

3.2. Pflanzenmaterial und Isolierung

In Zusammenarbeit mit L. Ö. Demirezerⁱ wurden die oberirdischen Teile von *Galium verum* ssp. *verum* untersucht und die daraus isolierten Substanzen im Rahmen dieser Doktorarbeit in ihrer Struktur aufgeklärt. Das Pflanzenmaterial wurde im Juni 2001 in Fethiye (Muğla, Türkei) gesammelt. Ein Musterexemplar (HUEF 01032) wurde im Herbarium der Hacettepe Universität²⁰³ hinterlegt.

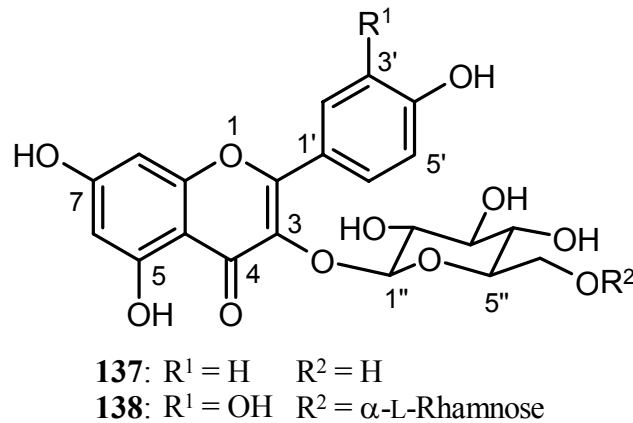
Das getrocknete Pflanzenmaterial (750 g) wurde dreimal mit je 2.5 L Methanol extrahiert und der Methanolextrakt im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgelöst und mit Chloroform (fünfmal mit je 2.5 L) und *n*-Butanol (5 L) extrahiert und im Vakuum eingengt. Der *n*-Butanol-Rückstand (33 g) wurde an einer Kieselgelsäule (CHCl₃/MeOH 9:1→MeOH) chromatographiert. Durch weitere Chromatographie an Kieselgel, Sephadex[®] LH-20 und RP-18 mit verschiedenen Laufmittelsystemen konnten neun Substanzen erhalten werden: Astragalin (**137**, 12 mg), Rutin (**138**, 29 mg), Asperulosinsäure (**139**, 34 mg), 6-*O*-*epi*-Acetylscandosid (**140**, 5 mg), Asperulosid (**141**, 7 mg), Daphyllosid (**142**, 6 mg), Desacetyldaphyllosid (**143**, 5 mg), Desacetylasperulosinsäure (**144**) und Monotropein (**145**).

3.3. Strukturaufklärung

3.3.1. Bekannte Flavonoide (**137**, **138**)

Die gelbe Eigenfarbe und das Anfärbeverhalten (gelb) in der Wärme mit Vanillin/H₂SO₄ der Substanzen **137** und **138** deutete darauf hin, dass es sich um Flavonoide handelt. Mit Hilfe der ¹H- und ¹³C-NMR-Daten sowie den Molmassen konnten in Chapman & Hall²⁰⁵ Datenbankrecherchen durchgeführt und die Metabolite **137** und **138** identifiziert werden.

ⁱ Frau Prof. Dr. L. Ö. Demirezer und Frau F. Gürbüz (Hacettepe Universität, Ankara, Türkei) danke ich für die Überlassung der Substanzen sowie für die gute Zusammenarbeit.



Astragalin (137)

137 zeigt im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 471 [M+Na]^+$ und im ^{13}C -NMR-Spektrum 19 C-Atome, von denen sechs eindeutig einer β -D-Glucose zuzuordnen sind und zwei Signale ($\delta_C = 116.1$ und 132.2) für zwei C-Atome integrieren, was wiederum für einen *para*-substituierten Aromaten spricht. Dieses wird durch zwei Signale im 1H -NMR-Spektrum bei $\delta_H = 6.87$ und 8.04 bestätigt. Die restlichen Signale liegen im aromatischen Bereich. Im Vergleich zu an Position 3 unsubstituierten Flavonoiden findet sich das Signal von C-3 bei einer Verschiebung von $\delta_C = 135.4$, normalerweise liegt dieses Signal zwischen $\delta_C = 103 - 106$. Mit Hilfe der oben genannten Strukturteile, der Molmasse, der Anzahl der C-Atome und der Einschränkung auf Flavonoide wurde eine Suche in Chapman & Hall²⁰⁵ durchgeführt und es konnte **137** durch Vergleich mit Literaturdaten²²⁰ als Astragalin identifiziert werden.

Rutin (138)

Das ESI-Massenspektrum von **138** zeigt ein Ion bei $m/z = 609 [M-H]^-$ und das ^{13}C -NMR-Spektrum eine starke Ähnlichkeit zu dem von **137**. Insgesamt sind 27 C-Atome zu erkennen, sechs davon können wiederum eindeutig einer β -D-Glucose zugeordnet werden, sechs einer α -L-Rhamnose und die verbleibenden 15 C-Atome einem aromatischen System. Das 1H -NMR-Spektrum zeigt im Vergleich mit **137**, dass kein *para*-substituierter, sondern ein 1,3,4-substituierter Aromat vorliegt. Mit der gleichen Suchstrategie wie bei **137** konnte **138** als Rutin identifiziert werden.²³⁷

3.3.2. Bekannte Iridoide (139 – 145)

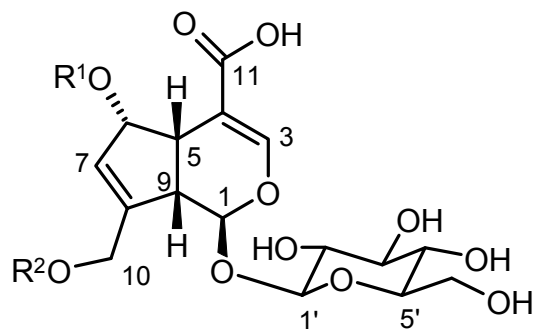
Die Substanzen **139** – **145** färben in der Wärme mit Vanillin/H₂SO₄ blau an. Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren der Substanzen ähneln sich sehr stark und zeigen typische Signale für Iridoide, speziell die Verschiebungen von C-1 ($\delta_{\text{H}} = 5.03 - 5.95$, $\delta_{\text{C}} = 93.3 - 101.3$), C-3 ($\delta_{\text{H}} = 7.29 - 7.65$, $\delta_{\text{C}} = 150.3 - 155.4$), C-5 ($\delta_{\text{H}} = 3.01 - 3.64$, $\delta_{\text{C}} = 37.5 - 43.2$) und C-9 ($\delta_{\text{H}} = 2.54 - 3.29$, $\delta_{\text{C}} = 45.3 - 46.9$) des Iridoidskeletts. Des Weiteren können in den NMR-Spektren eindeutig die Signale von β -D-Glucose erkannt werden. Auffällig sind auch die Verschiebungen von C-7 ($\delta_{\text{H}} = 5.60 - 6.01$, $\delta_{\text{C}} = 126.9 - 133.2$), die auf eine Doppelbindung im Fünfring hinweisen.

Asperulosinsäure (139)

139 zeigt im ESI-Massenspektrum ein Ion bei $m/z = 455$ [M+Na]⁺ und im ¹³C-NMR-Spektrum 18 C-Atome. Eine Recherche in der Datenbank Chapman & Hall²⁰⁵ mit den Suchparametern Molmasse, Anzahl der C-Atome und Iridoide ergab nur zwei Treffer, durch Vergleich mit Literaturdaten²³⁸ konnte **139** als Asperulosinsäure identifiziert werden.

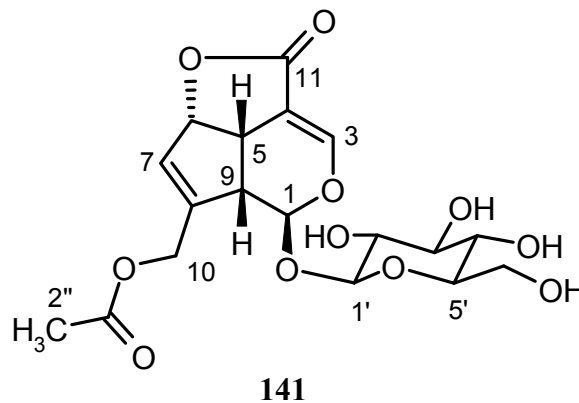
6-O-*epi*-Acetylscandosid (140)

Die Substanz **140** zeigt im ESI-Massenspektrum das gleiche Ion ($m/z = 455$ [M+Na]⁺) und die gleiche Anzahl von C-Atomen wie **139**. Aufgrund der Unterschiede in den Verschiebungen von C-6 (**139**: $\delta_{\text{H}} = 4.90$, $\delta_{\text{C}} = 75.4$; **140**: $\delta_{\text{H}} = 5.58$, $\delta_{\text{C}} = 83.7$) und C-10 (**139**: $\delta_{\text{H}} = 4.85/4.94$, $\delta_{\text{C}} = 63.8$; **140**: $\delta_{\text{H}} = 4.19/4.35$, $\delta_{\text{C}} = 60.9$) kann darauf geschlossen werden, dass die in **139** an C-10 sitzende Acetylgruppe an C-6 vorzufinden ist. Der Vergleich mit Literaturdaten²³⁹ konnte **140** als 6-O-*epi*-Acetylscandosid bestätigen.



Asperulosid (141)

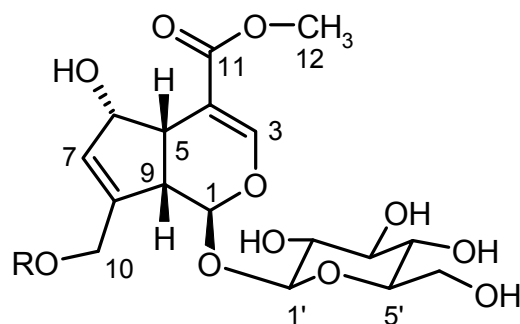
141 zeigt im Vergleich zu **139** eine Massendifferenz von $\Delta m/z = 18$ (ESI-MS: $m/z = 437$ $[M+Na]^+$), bei gleicher Anzahl von C-Atomen. Dies spricht für eine Abspaltung von Wasser. Die auffälligsten Unterschiede in den 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren sind die Verschiebungen für C-6. Während **139** Signale bei $\delta_H = 4.90$ und $\delta_C = 75.4$ aufweist, sind die Werte bei **141** tieffeldverschoben ($\delta_H = 5.56$, $\delta_C = 86.3$). Dies weist auf eine Veresterung der 6-Hydroxygruppe hin. Da aber alle anderen Hydroxygruppen von **139** vorhanden sind, bleibt nur noch eine Veresterung durch die sich im Molekül befindliche Carboxylgruppe übrig. Der dadurch gebildete Fünfring hat ebenfalls Auswirkungen auf die Konformation des Iridoidskeletts, speziell auf die Verschiebungen von C-5 (**139**: $\delta_H = 3.02$, $\delta_C = 42.6$; **141**: $\delta_H = 3.64$, $\delta_C = 37.5$) und C-1 (**139**: $\delta_H = 5.05$, $\delta_C = 101.1$; **141**: $\delta_H = 5.95$, $\delta_C = 93.3$). Dies konnte durch eine Datenbankrecherche mit den gleichen Suchparametern wie bei **139** und Literaturvergleich²⁴⁰ bestätigt werden. Bei der Substanz **141** handelt es sich um Asperulosid.

Daphyllosid (142)

Bei der Substanz **142** können im ^{13}C -NMR-Spektrum 19 C-Atome erkannt werden. Im ESI-Massenspektrum ist ein Ion bei $m/z = 469$ $[M+Na]^+$ zu erkennen. Im Vergleich zu **139** treten in den 1D-NMR-Spektren zusätzliche Signale bei $\delta_H = 3.74$ (s, 3H) und $\delta_C = 51.8$ auf, die Massendifferenz beträgt $\Delta m/z = 14$ und die Carboxylgruppe ist um $\Delta\delta_C = 3.2$ verschoben. Diese Ergebnisse weisen auf einen Methylester an C-11 hin. Der Vergleich mit den in der Literatur²³⁸ gefundenen Daten bestätigt dieses, bei **142** handelt es sich um Daphyllosid.

Desacetyldaphyllosid (143)

Im ESI-Massenspektrum von **143** findet sich ein Ion bei $m/z = 427 [M+Na]^+$. Aufgrund der Massendifferenz ($\Delta m/z = 42$), des Fehlens des Signals der Acetylgruppe bei $\delta_H = 2.08$ und der Hochfeldverschiebung von 10-H₂ im Vergleich zu **142** (**142**: $\delta_H = 4.80/4.94$, **143**: $\delta_H = 4.20/4.45$) wurde **143** als Desacetyldaphyllosid charakterisiert.²³⁸

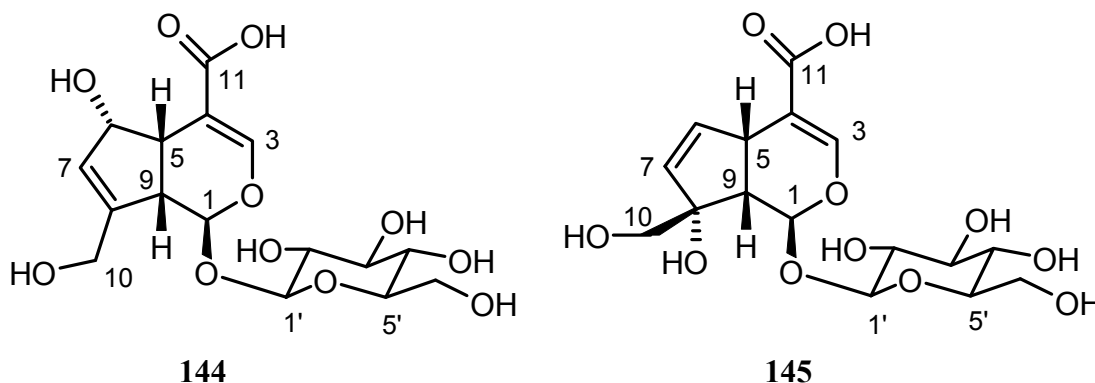


142: R = COCH₃

143: R = H

Desacetylasperulosinsäure (144) und Monotropein (145)

Die Substanzen **144** und **145** wurden aus Mischspektren identifiziert. Im ¹³C-NMR-Spektrum sind insgesamt 32 C-Atome zu erkennen. Ein Großteil dieser C-Atome kommt in Paaren bei gleichen Verschiebungen vor, nur sechs C-Atome haben keinen ähnlichen Partner. Es handelt sich hierbei um die Signale von C-6 (**144**: $\delta_C = 75.6$, **145**: $\delta_C = 138.5$), C-8 (**144**: $\delta_C = 151.5$, **145**: $\delta_C = 86.4$) und C-10 (**144**: $\delta_C = 61.8$, **145**: $\delta_C = 68.5$). Durch ¹H,¹H-COSY- und HSQC-Experimente konnten die ¹H- und ¹³C-Signale den jeweiligen Iridoidskeletten zugeordnet werden, die Zuckersignale sind für beide Substanzen fast identisch. Die Ergebnisse der NMR-Experimente weisen auf eine unterschiedliche Lage der Doppelbindung in den Fünfringen der Iridoidskelette von **144** und **145** hin, außerdem scheint eine Hydroxygruppe verschoben zu sein. Mit Hilfe eines HMBC-Experiments konnten diese Vermutungen bestätigt werden und **144** als Desacetylasperulosinsäure sowie **145** als Monotropein identifiziert werden.^{238,241}



144

145

3.4. Zur biologischen Aktivität der Metaboliten

Die Metaboliten **137**, **138** und **140 – 143** wurden in Plattendiffusionstest auf antimikrobielle Aktivität gegen die Stämme *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* getestet, sie zeigten jedoch keine Aktivität.

Des Weiteren werden sie von W. Beil (Medizinische Hochschule Hannover) gegen die Krebszelllinien HM02 (Magenadenocarcinom), HepG2 (Lebercarcinom) und MCF7 (Mammacarcinom) getestet, die Ergebnisse lagen bis zum Abschluß dieser Arbeit noch nicht vor.

4. Diskussion

Aus den drei in der türkischen Volksmedizin verwendeten Pflanzen *Centranthus longiflorus*, *Vitex agnus-castus* und *Galium verum* konnten insgesamt 28 Substanzen isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden, von denen fünf (**123**, **124**, **134 – 136**) neu waren. Von diesen 28 Sekundärmetaboliten stellt die Klasse der Iridoide mit 19 Substanzen den Hauptanteil (ca. 70 %), am zweithäufigsten vertreten waren die Flavonoide mit sechs Substanzen. Der hohe Anteil der Iridoide unter den isolierten Substanzen resultiert aus der Fokussierung der Arbeitsgruppe von L. Ö. Demirezer auf die methanolischen Extrakte von Pflanzen. Die Iridoide sind mit ca. 1000 Verbindungen²⁰⁵ im Vergleich zu den Flavonoiden zwar eine relativ kleine Substanzklasse, die Wahrscheinlichkeit ein bekanntes Iridoid zu isolieren, ist mittlerweile allerdings relativ hoch. Obwohl die Pflanzen schon in früheren Studien gut untersucht worden sind, konnten fünf neue Iridoide gefunden werden, von denen zwei seltene Beispiele für Naturstoffe mit 4-Desoxyzuckern sind (**123** und **124**). Dies zeigt, dass die Inhaltsstoffe von Pflanzen oftmals mit dem Standort, der Wachstumsphase und dem betrachteten Pflanzenteil variieren. Sie besitzen zwar meistens die gleichen Grundgerüste, sind jedoch unterschiedlich derivatisiert. Der Anteil an neuen Verbindungen liegt mit ca. 20 % in ähnlicher Höhe wie bei den Sekundärmetaboliten aus den K-Stämmen (ca. 25 %), während der Anteil bei dem Stamm *Micromonospora* sp. Tü 6368 mit 40 % deutlich höher liegt, was jedoch auch eher die Ausnahme als die Regel darstellt.

Aufgrund der großen Artenvielfalt von Pflanzen sind sicherlich noch viele neue Substanzen zu entdecken, wodurch eine weitere Bearbeitung lohnenswert erscheint. Allerdings sollte die Isolierungsstrategie nicht nur auf die methanolischen Extrakte abzielen, da durch diesen Ansatz die Möglichkeit zur Entdeckung neuer Leitstrukturen stark eingeschränkt wird.

V. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Sekundärmetaboliten aus Actinomyceten der Kilimanjaro-Region

- 1) Aus dem Myzelextrakt des Stammes K 8/1 wurde das literaturbekannte Ferroverdin A (**15**) isoliert.
- 2) Der Stamm K 8/5 erwies sich als Gabosin-Produzent. Aus einem Mischspektrum konnten die drei neuen Gabosin-Derivate 4-*O*-Acetyl-, 5-*O*-Acetyl- und 6-*O*-Acetylgabosin E (**16** – **18**) identifiziert werden, die durch Chromatographie an Kieselgel, Sephadex[®] LH-20 und HPLC-RP-Material nicht weiter aufzutrennen waren.
- 3) Die Extrakte des Stammes K 10/11 enthielten die bekannten Verbindungen Streptazolin (**33**), Obscuroid A3 (**34**) und Chartreusin (**35**).
- 4) Das literaturbekannte 2-Aminobenzoyl- α -L-rhamnopyranosid (**36**) wurde aus dem Kulturfiltratextrakt des Stammes K 17/2 erhalten.
- 5) Der Stamm K 17/7 wurde nach dem OSMAC-Ansatz in vier verschiedenen Fermentationsgefäßen kultiviert. Aus den Myzelextrakten konnten die bekannten Verbindungen Teleocidin A-2 (**37**) und B-3 (**39**) sowie die als Naturstoffe noch nicht beschriebenen Substanzen 14-*O*-Acetylteleocidin A-2 (**38**) und 14-*O*-Acetylteleocidin B-3 (**40**) isoliert werden.
- 6) Der Stamm K 17/9 wurde nach dem OSMAC-Ansatz in fünf verschiedenen Fermentationsgefäßen kultiviert. Aus diesen Kultivierungen konnten insgesamt 14 verschiedene Sekundärmetaboliten isoliert und identifiziert werden, die zu sechs verschiedenen Stoffklassen gehören.
 - a) Isocoumarine: Aus den Kulturfiltratextrakten konnten das noch nicht in der Literatur beschriebene 8-*O*-Methylreticulol (**54**) und die bekannten Metaboliten Reticulol (**52**), 6-*O*-Methylreticulol (**53**) und 9-Hydroxyreticulol (**55**) isoliert werden.
 - b) Diketopiperazine: Die Myzelextrakte enthielten die in der Literatur bekannten Diketopiperazine XR330 (**56**) und XR334 (**57**).
 - c) Benzoxazole: Die bekannten Antibiotika UK-1 (**58**) und Demethyl-UK-1 (**59**) konnten aus den Myzelextrakten erhalten werden.

-
- d) Piericidine: Neben dem neuen 4'-Demethoxy-IT-143-B (**65**) konnten die bekannten Metaboliten Piericidin A₁ (**63**) und IT-143-B (**64**) aus den Myzelextrakten isoliert werden.
- e) Echinosporeine: Aus den Kulturfiltratextrakten konnten die in der Literatur beschriebenen Metaboliten Echinospurin (**75**) und 7-Desoxyechinospurin (**76**) isoliert werden.
- f) Benzisoxamid: Bei einer Kultivierung im 10 L-Airlift-Fermenter bei 5 bar Überdruck wurde das neuartige Benzisoxamid (**78**) aus dem Kulturfiltratextrakt isoliert. Es besitzt ein für Naturstoffe bisher nicht beschriebenes 2,1-Benzisoxazolgrundgerüst, das mit einer β -Hydroxybuttersäure kondensiert ist, an die peptidisch α -Methyl- β -alanin und cyclisiertes Ornithin gebunden sind. Eine hypothetische Biosynthese von **78** wurde aufgestellt.
- g) Da einige Metaboliten des Stammes auf dem Shikimisäureweg entstehen, wurde Glyphosat, ein Inhibitor der 5-Enoylpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase, in verschiedenen Konzentrationen den wachsenden Kulturen zugesetzt. Es konnten jedoch keine Veränderungen im Metabolitenmuster erkannt werden, was auf eine Toleranz des Stammes K 17/9 gegenüber Glyphosat hindeutet.
- h) Aufgrund der aus den verschiedenen Fermentationsansätzen erhaltenen Metaboliten wurde das Biosynthesepotential des Stammes diskutiert und beurteilt.
- 7) Die aus den Kilimanjaro-Stämmen isolierten Metaboliten wurden in Plattendiffusionstests auf ihre antibakterielle Aktivität hin untersucht. Für **35** und **59** wurden Wirkungen gegenüber *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* beobachtet.
- 8) Die Ergebnisse des durchgeführten LC-MS-Screenings wurden mit denen des chemischen Screenings verglichen und bewertet.

2. Sekundärmetaboliten aus *Micromonospora* sp. Tü 6368

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H.-P. Fiedler (Mikrobiologisches Institut, Universität Tübingen), wurden als Reinsubstanzen vorliegende Verbindungen mit Hilfe spektroskopischer Methoden in ihrer Struktur aufgeklärt. Es handelt sich um Sekundärmetaboliten aus *Micromonospora* sp. Tü 6368, der einmal ohne und einmal mit XAD-16-Zusatz im 10 L-Maßstab kultiviert worden war.

- 1) Aus dem Kulturfiltratextrakt der Fermentation ohne XAD-16-Zusatz konnten neben dem bisher noch nicht beschriebenen 1-(α -Ribofuranosyl)-lumichrom (**89**) die Metaboliten 1-Methyllumichrom (**87**) und Lumichrom (**88**) in ihrer Struktur bestimmt werden.
- 2) Der Myzelextrakt der Fermentation mit XAD-16-Zusatz enthielt die bekannten Verbindungen Dehydrorabelomycin (**90**), Rabelomycin (**91**), 3-Desoxyrabelomycin (**92**) und Galtamycinon (**93**). Des Weiteren konnten die bisher nicht beschriebenen Metaboliten 6368J (**97**), 6368C2 (**100**) und 6368A2 (**103**) bestimmt werden. Bei **97** handelt es sich um ein Galtamycin-Derivat, während **100** das bisher größte isolierte Angucyclin ist, das den Grundkörper der Saquayamycine aufweist und insgesamt neun Zuckerbausteine besitzt. **103** besitzt als Grundgerüst ein angulares Xanthon, d.h. die C-7-Carbonylgruppe ist durch ein Sauerstoffatom ersetzt. Für Kristallisationsversuche wurde der 2-Brombenzoesäureester von **103** hergestellt. Eine mögliche Biosynthese von **103** wird diskutiert.
- 3) Die Metaboliten aus dem Stamm *Micromonospora* sp. Tü 6368 wurden in Plattendiffusionstests auf ihre antibakterielle Aktivität hin untersucht. Hierbei zeigten **90 – 92** und **100** Hemmhöfe gegenüber *Bacillus subtilis*.
- 4) Aufgrund der aus den verschiedenen Fermentationsansätzen erhaltenen Metaboliten wurde das Biosynthesepotential des Stammes diskutiert und beurteilt.

3. Sekundärmetaboliten aus Pflanzen

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit Prof. Dr. L. Ö. Demirezer (Pharmakologisches Institut, Hacettepe Universität, Ankara, Türkei) wurden als Reinsubstanzen vorliegende Verbindungen mit Hilfe spektroskopischer Methoden in ihrer Struktur aufgeklärt. Es handelt sich um Sekundärmetaboliten aus drei verschiedenen Pflanzen, die in der türkischen Volksmedizin genutzt werden.

- 1) *Centranthus longiflorus*: Es konnten insgesamt sieben Metaboliten in ihrer Struktur aufgeklärt werden, die aus den Wurzeln der Pflanze isoliert wurden. Bei den bekannten Verbindungen handelte es sich um die Phenylpropanoide Coniferin (**117**) und Isoconiferinosid (**118**) sowie die Iridoide Kanokosid A (**120**), Kanokosid C (**121**) und Valerosidatum (**122**). Des Weiteren konnten die bisher nicht beschriebenen Iridoide 4'-Desoxykanokosid A (**123**) und 4'-Desoxykanokosid C (**124**) bestimmt werden, bei denen es sich um seltene Beispiele für Naturstoffe mit 4-Desoxyzuckern handelt. **117 – 124** wurden auf ihre cytotoxischen Wirkungen gegenüber den Krebszelllinien HM02, HepG2 und MCF7 getestet. Sie zeigten bis zu einer Konzentration von 10 µg/mL nur Wachstuminhibierungen von 50 % (GI₅₀), jedoch keine komplette Inhibierung des Wachstums (TGI) oder cytotoxische Aktivitäten (LC₅₀).
- 2) *Vitex agnus-castus*: Zwölf Verbindungen, die aus den Stängeln der blühenden Pflanze isoliert wurden, konnten identifiziert werden. Neben den bisher in der Literatur nicht beschriebenen Iridoiden Agnucastosid A (**134**), B (**135**) und C (**136**) wurden die bekannten Iridoide Aucubin (**130**), Agnusid (**131**), Mussaenosinsäure (**132**) und 6'-*O-p*-Hydroxybenzoylmussaenosinsäure (**133**), die Flavonoide Isoorientin (**125**), 2''-*O-(E)*-Caffeoylisoorientin (**126**), 6''-*O-(E)*-Caffeoylisoorientin (**127**) und Luteolin-7-*O*-glucosid (**128**) sowie das Myzodendron (**129**) bestimmt. Die Metaboliten wurden in Plattendiffusionstests auf ihre antibakteriellen Aktivität hin untersucht, zeigten jedoch keine Wirkungen. Des Weiteren wurden **125 – 127**, **129**, **130** und **132 – 136** auf ihre cytotoxischen Wirkungen gegenüber den Krebszelllinien HM02, HepG2 und MCF7 getestet. Dabei zeigten sie bis 10 µg/mL keine Wirkungen, die Ergebnisse für **125 – 127** lagen bis zum Abschluß der Arbeit noch nicht vor.

-
- 3) *Galium verum*: Es konnten insgesamt neun bekannte Verbindungen bestimmt werden, die aus den oberirdischen Teilen der Pflanzen isoliert wurden. Bei ihnen handelt es sich um die Flavonoide Astragalin (**137**) und Rutin (**138**) sowie um die Iridoide Asperulosinsäure (**139**), 6-*O*-*epi*-Acetylscandosid (**140**), Asperulosid (**141**), Daphyllosid (**142**), Desacetyldaphyllosid (**143**), Desacetylasperulosinsäure (**144**) und Monotropein (**145**). **144** und **145** wurden aus einem Mischspektrum bestimmt. **137**, **138** und **140 – 143** wurden in Plattendiffusionstests auf ihre antibakterielle Aktivität hin untersucht, zeigten jedoch keine Wirkungen.
- 4) Das Potential der untersuchten Pflanzen als Sekundärstoffbildner wurde diskutiert und bewertet.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Allgemeines

1. Instrumentelle Analytik

Massenspektren: **EI-MS:** *Finnigan* MAT 95, 70 eV, Hochauflösungen wurden mit Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz gemessen, die relativen Intensitäten beziehen sich auf den Basispeak ($I = 100\%$) und sind in Klammern angegeben. **DCI-MS:** *Finnigan* MAT 95, 200 eV, Reaktandgas NH_3 . **ESI-MS:** *Finnigan* LC-Q. **HR-ESI-MS:** *Bruker* Apex-Q III, 7 Tesla.

Infrarotspektren (IR): Alle IR-Spektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer der Fa. *Perkin-Elmer* Modell 1600 als KBr-Preßlinge gemessen, sh = Schulter.

Elektronenspektren (UV): Alle Elektronenspektren wurden mit einem Spektrometer der Fa. *Varian* Modell Cary 3E gemessen. Die Wellenlänge λ ist in [nm] angegeben, der molare Extinktionskoeffizient ϵ hat die Dimension [$1000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$], sh = Schulter; Methanol/HCl bzw. Methanol/NaOH: Zu 2 ml methanolischer Lösung wurde jeweils ein Tropfen 1 M HCl bzw. 1 M NaOH gegeben.

Drehwerte: Alle Drehwerte wurden mit einem Polarimeter der Fa. *Perkin-Elmer* Modell 343 bestimmt, die Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ sind in [$10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ g}^{-1}$] angegeben, die Konzentrationen c in [$10^{-2} \text{ g ml}^{-1}$].

Circulardichroismus-Spektren (CD): *Jasco* J 500 mit *Jasco* IF 500 A/D-Wandler und *BMC* IF 800 Personalcomputer als Prozessor, die molaren Elliptizitäten θ sind in [$10^{-1} \text{ grad cm}^2 \text{ mol}^{-1}$] angegeben, br = breit.

¹H-NMR-Spektren: *Varian* Inova-600 (600 MHz), *Varian* Inova-500 (500 MHz), *Varian* Mercury-300 (300 MHz), *Varian* Unity-300 (300 MHz), *Bruker* AMX 300 (300 MHz). Chemische Verschiebungen in δ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard; Kopplungskonstanten (J) in Hertz (Hz).

Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett, ddt = Dublett vom Dublett vom Triplet, dt = Dublett vom Triplet, t = Triplet, td = Triplet vom Dublett, q = Quartett, qd = Quartett vom Dublett, quint = Quintett, m = Multiplet, br = breit.

Alle ¹H-NMR-Spektren wurden näherungsweise als Spektren erster Ordnung interpretiert.

¹³C-NMR-Spektren: *Varian* Inova-600 (150.8 MHz), *Varian* Inova-500 (125.7 MHz), *Varian* Mercury-300 (75.5 MHz), *Varian* Unity-300 (75.5 MHz), *Bruker* AMX-300 (75.5 MHz). Chemische Verschiebungen in δ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard.

APT (Attached Proton Test): CH und CH₃ stehen nach oben, C und CH₂ stehen nach unten.

¹³C-¹H-Multiplizitäten sind aus HSQC-Experimenten in Verbindung mit APT-Experimenten ableitbar. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett.

2D-NMR-Spektren: ¹H,¹H-COSY (¹H,¹H-Correlated Spectroscopy), **HSQC** (Heteronuclear Singular Quantum Coherence), **HMBC** (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity), **HMQC** (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), **NOESY** (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), **TOCSY** (Total Correlation Spectroscopy).

2. Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): *Merck* HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄: 10 x 10 cm, Schichtdicke 0.2 mm; *Merck* DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄: 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm; *Merck* DC-Alufolien RP-18 F_{254s}: 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm. Angegeben sind R_f-Werte (Laufhöhe relativ zur Laufmittelfront).

Sprühreagenzien: Nach *Merck*, Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie.²⁴²

Die DC-Platten wurden nach dem Ansprühen auf ca. 120 °C erwärmt.

Anisaldehyd (Anis, Nr. 21): 1.0 mL Anisaldehyd wird in eine Lösung aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konz. Schwefelsäure gegeben.

Ehrlichs Reagenz (Ehrlich, Nr. 91): 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in einer Mischung von 25 mL Salzsäure (36 %) und 75 mL Methanol gelöst.

Orcin-Sprühreagenz (Orcin, Nr. 120 – 122): 1 g Eisen(III)-chlorid wird in 100 mL Schwefelsäure gelöst und zu gleichen Anteilen mit einer Orcinlösung (6 % in Ethanol) gemischt.

Vanillin-Schwefelsäure (Vanillin, Nr. 322): 1 g Vanillin wird in 100 mL konz. Schwefelsäure gegeben.

Säulen- und Gelchromatographie: *ICN* Kieselgel 60 (KG), 32 – 63 µm, *Fluka* Sephadex[®] LH-20.

Adsorberharze: *Serva* Amberlite[®] XAD-2.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC):

LC-MS: Pumpe: *Flux Instruments* Rheos 4000; Autosampler: *Jasco* AS-851 (0 – 100 µL variable Aufgabschleife); UV-Detektor: *Linear* UVIS-205; Massendetektor: *Finnigan* LC-Q; Entgaser: *Flux Instruments* ERC-3415α; Steuersoftware HPLC: *Flux Instruments* Janeiro; Datensystem: *Finnigan* Xcalibur; Vorsäule: *Grom* Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 µm, 10 x 2 mm; Säule: *Grom* Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 µm, 100 x 2 mm.

Programm: von 20 % Methanol auf 100 % Methanol in 20 min, 5 min 100 % Methanol, Flussrate: 300 µL/min; UV-Detektion: 254 nm, Massendetektion: positive und negative Ionen.

Semipräparative HPLC: Pumpe: *Jasco* PU-1587; UV-Detektor: *Jasco* UV 1575; manuelles Probenaufgabsventil: *Rheodyne* mit 2.0 mL Aufgabschleife; Chromatographiesoftware: *Jasco* Borwin; Steuersoftware: *Jasco* Borwin HSS-1500; Säule: *Jasco* Nucleosil 100 C18, 5µm, 250 x 8 mm.

Programm 1: isokratisch 60 % AcCN mit 0.1 % TFA und 40 % H₂O mit 0.1 TFA; Flussrate: 2.6 mL/min; UV-Detektion: 254 nm.

Programm 2: isokratisch 70 % AcCN mit 0.1 % TFA und 30 % H₂O mit 0.1 % TFA; Flussrate: 2.7 mL/min; UV-Detektion: 254 nm.

Gas Chromatography (GC):

GC-MS: Gaschromatograph: *ThermoFinnigan* Trace GC; Massendetektor: *ThermoFinnigan* Trace MS (EI-Ionisierung); Autosampler: *ThermoFinnigan* AS2000; Datensystem: *ThermoFinnigan* Xcalibur; Säule: *J & W* DB-5MS, 25 m x 0.25 mm, Filmdicke 0.25 µm. Programm: 2 min bei 40 °C, von 40 °C auf 280 °C in 24 min, 4 min bei 280 °C; Flussrate Trägergas: 1 mL/min Helium; Split Flow: 25 mL/min.

Lösungsmittel: Die Lösungsmittel für die Säulenchromatographie wurden zuvor destilliert. Für die HPLC wurden nur analysenreine Lösungsmittel und bidestilliertes Wasser verwendet. Lösungsmittel für die semipräparative HPLC wurden im Ultraschallbad (10 min) und anschließend durch Durchleiten von Helium (10 min) entgast.

3. Mikrobiologische Methoden

Nährmedienbestandteile: Malzextrakt, D-Glucose, Stärke, Caseinpepton und CaCO₃ wurden von der Fa. *Merck* bezogen. Hefeextrakt stammt von der Fa. *Oxoid*, Cornsteep Powder von der Fa. *Marcor*, D(-)-Mannit von der Fa. *Riedel-deHaën*, Haferkleie mit Keim von der Fa. *Quickvital*, Sojamehl fettarm von der Fa. *Henselwerk GmbH* und BiTek Agar von der Fa. *Difco*.

Nährmedien: Für alle Nährmedien wurde demineralisiertes Wasser verwendet und der pH-Wert vor dem Autoklavieren mit 0.5 N NaOH bzw. 0.5 N HCl eingestellt. Die Nährmedien wurden durch Autoklavieren (feuchte Hitze, 121 °C, 1 bar Überdruck, 30 min) sterilisiert.

M2: Malzextrakt 10 g/L, Hefeextrakt 4 g/L, Glucose 4 g/L, pH = 7.0;

für die Stammhaltung Zusatz von Agar 20 g/L.

Soja/Mannit (SM): entfettetes Sojamehl 20 g/L, Mannit 20 g/L, pH = 7.0.

Hafer (Ha): Haferkleie 20 g/L, pH = 7.0.

SGG: Glucose 10 g/L, Glycerin 10 g/L, Stärke 10 g/L, Cornsteep Powder 2.5 g/L, Caseinpepton 5 g/L, Hefeextrakt 2 g/L, NaCl 1 g/L, CaCO₃ 3 g/L, pH = 7.0.

Schüttler und Fermenter: *Braun* Inkubationsschüttelschrank BS4, *Braun* Certomat RM, *Braun* Biostat B (5 L), 10 L-Airlift-Fermenter, gebaut: *Uni Dortmund*, *Fischer & Porter* Gasflowmeter (45711M), *The Analytical Development Co Ltd*. CO₂-Analysator, *Ingold* O₂-Elektrode.

Plattendiffusionstest: Auf die mit den verschiedenen Testkeimen angeimpfte Agarplatte wurden Filterplättchen (Durchmesser: 6 mm, Dicke: 0.5 mm) gelegt, die mit 15 µL Substanzlösung (in Methanol oder Chloroform gelöst, $c = 1 \text{ mg/mL}$) getränkt und vor dem Auflegen unter sterilen Bedingungen getrocknet worden waren. Als Testkeime dienten *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, und *Candida albicans*. Die Agarplatten wurden 24 h bei 25 °C (*C. albicans*) bzw. 37 °C (*B. subtilis*, *E. coli* und *S. aureus*) inkubiert.

Zusammensetzung der Nährböden für die Plattendiffusionstests:

B. subtilis und *E. coli*: 5 g/L Glucose, 0.5 g/L Trinatriumcitrat x 2 H₂O, 3 g/L KH₂PO₄, 7 g/L K₂HPO₄, 0.1 g/L MgSO₄ x 7 H₂O, 1 g/L (NH₄)₂SO₄ und 15 g/L Agar, keine pH-Einstellung.

S. aureus: 8 g/L Bacto Nutrient Broth, 5 g/L NaCl und 15 g/L Agar, keine pH-Einstellung.

C. albicans: 4 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Malzextrakt, 4 g/L Glucose und 15 g/L Agar, pH = 5.5.

Zum Ansetzen der Testplatten-Medien wurde demineralisiertes Wasser verwendet. Die Glucose wurde erst nach der 30 minütigen Sterilisation hinzugegeben.

4. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: Methanolische Salzsäure:

7.1 mL (0.1 mol) Acetylchlorid (Fa. Merck) wurde bei 0 °C langsam in 25 mL Methanol gelöst. Die so hergestellte Lösung war 4 M.

AAV 2: Methanolyse und Silylierung

Ca. 0.3 mg der jeweiligen Substanzen wurden in Schmelzpunktsröhrchen (l = 80 mm, Ø = 2 mm) gegeben, mit methanolischer Salzsäure (siehe AAV 1) versetzt (Füllhöhe: 30 mm) und 15 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden die Proben im Vakuum bis zur Trockne eingengt und mit 25 %iger TSIM-Lösung (Fa. Aldrich, N-(Trimethylsilyl)imidazol in Dimethylformamid) versetzt (Füllhöhe: 30 mm). Die Schmelzpunktsröhrchen wurden zugeschmolzen und für eine Stunde auf 65 °C erhitzt.

II. Arbeiten an Actinomyceten aus der Kilimanjaro-Region

1. Stammhaltung

1.1. Agarplatten

Die Haltung der K-Stämme erfolgte auf Petrischalen mit M2 (2 % Agar). Sie wurden bei 28 °C 7 – 10 Tage inkubiert und bei 4 °C maximal drei Monate gelagert.

1.2. Langzeitkonservierung

Aus einer gut bewachsenen Agarplatte wurden mit einseitig zugeschweißten und mit einem Bleistück beschwerten sterilen Halmen aus Polypropylen Agarstückchen ausgestanzt, bis der Halm gefüllt war. Dieser wurde in einen zweiten äußeren Halm gesteckt, der mit einer ausgeglühten Tiegelzange an beiden Seiten zugeschmolzen wurde. Die Halme wurden in einem Dewar über flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

2. Durchführung des chemischen Screenings

Die Kultivierung der zu untersuchenden Stämme erfolgte in vier verschiedenen Medien (M2, SM, Ha und SGG) in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die jeweils mit 50 mL Nährlösung gefüllt waren. Die Kolben wurden jeweils mit einem 1 cm² großem Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft und 72 h bei 28 °C und 180 U/min inkubiert. In die vereinigten Kulturbrühen (100 mL) wurde Celite gegeben und filtriert. Das Myzel wurde 15 min im Ultraschallbad mit 100 mL Aceton extrahiert, das Myzel durch Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Kulturfiltrat wurde an Amberlite[®] XAD-2 (30 mL) adsorbiert, das Adsorberharz mit 100 mL Wasser gewaschen und mit 100 mL Methanol eluiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt. Die so erhaltenen Extrakte (Kulturfiltrat und Myzel) wurden in 2 mL MeOH/H₂O 1:1 gelöst und 5 µL dieser Lösung auf eine HPTLC-Kieselgelplatte aufgetragen. Die Dünnschichtchromatogramme wurden in CHCl₃/MeOH 9:1 und *n*-BuOH/Eisessig/H₂O 5:1:4 entwickelt. Die Analyse des Metabolitenmusters erfolgte durch UV-Licht (254 und 366 nm), Eigenfarbe und mit Hilfe von Sprühreagenzien (Anis, Orcin und Ehrlich).

3. *Actinomyces* sp. Stamm K 8/1

3.1. Kultivierung und Aufarbeitung

Der Stamm K 8/1 wurde wie unter B.II.2. beschrieben in Schüttelkolben (1 L, 20 x 50 mL) in Ha-Medium kultiviert und aufgearbeitet, wobei jeweils gleiche Volumina an Lösungsmitteln, im Vergleich zu den Volumina der Kulturbrühen, und für das Kulturfiltrat ca. 250 mL XAD-2 je Liter Kulturbrühe verwendet wurden.

3.2. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Myzelextrakt wurde an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1→3:1) und Sephadex[®] LH-20 (CH₂Cl₂/MeOH 1:1) chromatographiert. Es wurden 1.5 mg/L **15** erhalten.

Ferroverdin A (15)

C₄₆H₃₀N₃O₁₂Fe (860.59)

grüner Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: violett (Anis).

R_f = 0.18 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

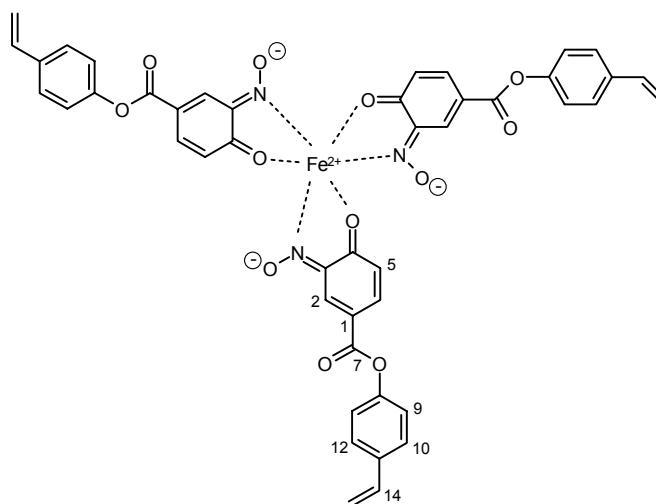
R_t = 19.0 min (LC-MS).

ESI-MS: m/z = 860 [M]⁻.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 276 (4.79), 300 (sh), 435 (3.91) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3446, 1720, 1706, 1652, 1634, 1624, 1596, 1543, 1504, 1428, 1402, 1384, 1282, 1198, 1166, 1103 cm⁻¹.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 5.23 (dd, *J* = 11.0, 1.0 Hz, 3H, 15-H_A), 5.76 (dd, *J* = 18.0, 1.0 Hz, 3H, 15-H_B), 6.74 (dd, *J* = 18.0, 11.0 Hz, 3H, 14-H), 7.16 (d, *J* = 8.5 Hz, 6H, 9-H, 13-H), 7.19 (d, *J* = 9.0 Hz, 3H, 5-H), 7.48 (d, *J* = 8.5 Hz, 6H, 10-H, 12-H), 7.90 (d, *J* = 2.0 Hz, 3H, 2-H), 8.18 (dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz, 3H, 6-H) ppm.



4. *Actinomyces* sp. Stamm K 8/5

4.1. Kultivierung und Aufarbeitung

Der Stamm K 8/5 wurde wie unter B.II.2. beschrieben in Schüttelkolben (1 L, 20 x 50 mL) in Ha-Medium kultiviert und analog B.II.3.1. aufgearbeitet.

4.2. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Kulturfiltratextrakt wurde an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 11:1→3:1) und Sephadex[®] LH-20 (CH₂Cl₂/MeOH 1:1) chromatographiert. Es wurden insgesamt 40 mg/L eines nicht weiter trennbaren Gemisches von **16**, **17** und **18** (2:1:1) erhalten.

4-O-Acetylgabosin E (16)

C₉H₁₂O₆ (216.19)

farbloser Feststoff

schwach UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: braun (Anis).

R_f = 0.19 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

R_t = 1.0 min (LC-MS).

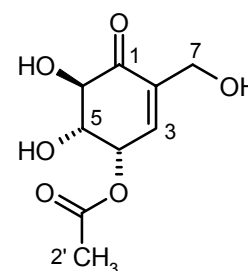
ESI-MS: m/z = 239 [M+Na]⁺, 455 [2M+Na]⁺.

DCI-MS: m/z = 234 [M+NH₄]⁺, 450 [2M+NH₄]⁺.

[α]_D²⁰ = +173° (Gemisch, c = 0.1, MeOH).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 2.10 (s, 3H, 2'-H₃), 3.97 (dd, *J* = 10.0, 4.0 Hz, 1H, 5-H), 4.23 (m, 2H, 7-H₂), 4.33 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, 6-H), 5.66 (ddt, *J* = 5.0, 4.0, 1.0 Hz, 1H, 4-H), 6.87 (dt, *J* = 5.0, 2.0 Hz, 1H, 3-H) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 20.8 (q, C-2'), 59.3 (t, C-7), 69.6 (d, C-4), 72.2 (d, C-5), 75.4 (d, C-6), 137.0 (d, C-3), 142.2 (s, C-2), 172.2 (s, C-1'), 198.8 (s, C-1) ppm.



5-O-Acetylgabosin E (17)**C₉H₁₂O₆** (216.19)

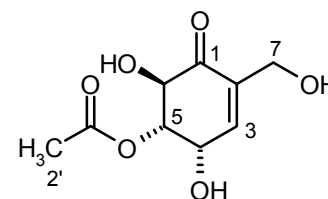
farbloser Feststoff

schwach UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: braun (Anis).**R_f** = 0.19 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).**R_t** = 1.0 min (LC-MS).**ESI-MS:** m/z = 239 [M+Na]⁺, 455 [2M+Na]⁺.**DCI-MS:** m/z = 234 [M+NH₄]⁺, 450 [2M+NH₄]⁺.**[α]_D²⁰** = +173° (Gemisch, c = 0.1, MeOH).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 2.13/2.16* (s, 3H, 2'-H₃), 4.23 (m, 2H, 7-H₂), 4.50 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, 6-H), 4.64 (br t, *J* = 5.0 Hz, 1H, 4-H), 5.00 (dd, *J* = 10.5, 4.0 Hz, 1H, 5-H), 6.92 (dt, *J* = 6.0, 2.0 Hz, 1H, 3-H) ppm; * Signale konnten aufgrund des Mischspektrums nicht eindeutig zugeordnet werden.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 20.7/20.9* (q, C-2'), 59.3 (t, C-7), 64.8 (d, C-4), 72.3 (d, C-6), 75.5 (d, C-5), 140.2/140.3* (s, C-2), 141.1 (d, C-3), 172.2 (s, C-1'), 198.2 (s, C-1) ppm; * Signale konnten aufgrund des Mischspektrums nicht eindeutig zugeordnet werden.

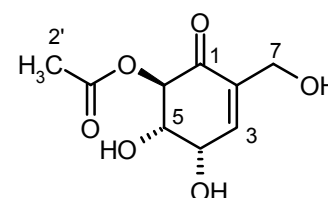
**6-O-Acetylgabosin E (18)****C₉H₁₂O₆** (216.19)

farbloser Feststoff

schwach UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: braun (Anis).**R_f** = 0.19 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).**R_t** = 1.0 min (LC-MS).**ESI-MS:** m/z = 239 [M+Na]⁺, 455 [2M+Na]⁺.**DCI-MS:** m/z = 234 [M+NH₄]⁺, 450 [2M+NH₄]⁺.**[α]_D²⁰** = +173° (Gemisch, c = 0.1, MeOH).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 2.13/2.16* (s, 3H, 2'-H₃), 4.21 (m, 2H, 7-H₂), 3.99 (dd, *J* = 11.0, 4.0 Hz, 1H, 5-H), 4.48 (dd, *J* = 6.0, 4.0 Hz, 1H, 4-H), 5.57 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, 6-H), 7.00 (dt, *J* = 6.0, 2.0 Hz, 1H, 3-H) ppm; * Signale konnten aufgrund des Mischspektrums nicht eindeutig zugeordnet werden.



$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): $\delta = 20.7/20.9^*$ (q, C-2'), 59.3 (t, C-7), 66.9 (d, C-4), 70.9 (d, C-5), 76.6 (d, C-6), 140.2/140.3^{*} (s, C-2), 141.9 (d, C-3), 172.2 (s, C-1'), 194.3 (s, C-1) ppm; ^{*} Signale konnten aufgrund des Mischspektrums nicht eindeutig zugeordnet werden.

5. *Actinomyces* sp. Stamm K 10/11

5.1. Kultivierung und Aufarbeitung

Der Stamm K 10/11 wurde wie unter B.II.2. beschrieben in Schüttelkolben (1 L, 20 x 50 mL) in SM-Medium kultiviert und analog B.II.3.1. aufgearbeitet.

5.2. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Myzelextrakt wurde in Methanol suspendiert und filtriert. Aus dem Rückstand wurden durch Umkristallisation aus 40 °C heißem CH_2Cl_2 100 mg/L **35** erhalten. Der Kulturfiltrat-extrakt wurde an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 → 3:1) chromatographiert, wodurch 35 mg/L **33** und nach einer weiteren Sephadex[®] LH-20-Säule (MeOH) 5 mg/L **34** erhalten wurden.

Streptazolin (33)

$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ (207.23)

hellbrauner Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: braun (Anis).

$R_f = 0.64$ (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1).

$R_t = 5.8$ min (LC-MS).

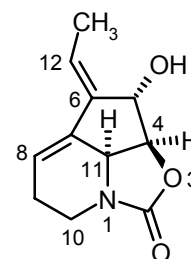
EI-MS: m/z (%) = 207 (100) $[\text{M}]^+$.

$[\alpha]_D^{20} = +43^\circ$ (c = 1.38, CHCl_3).

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 252 (3.67) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3410, 2963, 1732, 1449, 1397, 1353, 1221, 1096, 1038$ cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.86$ (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, 13- H_3), 2.16 (m, 1H, 9- H_A), 2.47 (m, 1H, 9- H_B), 2.76 (br s, 1H, 5-OH), 3.38 (m, 2H, 10- H_2), 4.25 (br d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 11-H), 4.70 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 4-H), 4.82 (br s, 1H, 5-H), 5.99 (dt, $J = 7.0, 3.5$ Hz, 1H, 8-H), 6.12 (q, $J = 7.5$ Hz, 1H, 12-H) ppm.



Obscuroid A3 (34)**C₁₅H₁₉NO₄** (277.32)

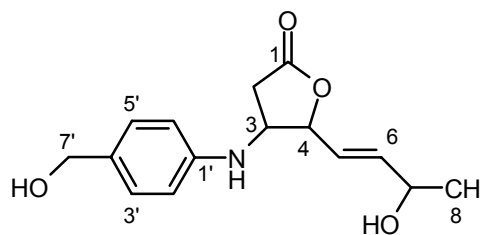
hellgelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: braun (Anis).**R_f** = 0.36 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).**R_t** = 5.3 min (LC-MS).**EI-MS:** m/z (%) = 277 (28) [M]⁺, 176 (68) [M-C₅H₉O₂]⁺, 149 (100) [M-C₆H₈O₃]⁺.**HREI-MS:** 277.1314 gefunden wie berechnet für C₁₅H₁₉NO₄.**[α]_D²⁰** = +45° (c = 0.20, MeOH).**UV** (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 295 (3.34), 253 (4.28) nm.**IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3384, 3032, 2972, 2928, 2877, 1767, 1615, 1524, 1413, 1369, 1318, 1265, 1207, 1181, 1144, 1063 cm⁻¹.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 1.22* (d, J = 6.5 Hz, 3H, 8-H₃), 2.43* (dd, J = 17.5, 4.5 Hz, 1H, 2-H_A), 3.05 (dd, J = 17.5, 7.5 Hz, 1H, 2-H_B), 4.08 (dt, J = 7.5, 4.5 Hz, 1H, 3-H), 4.28 (m, 1H, 7-H), 4.44 (s, 2H, 7'-H₂), 4.81 (m, 1H, 4-H), 5.86 (m, 1H, 6-H), 5.88 (m, 1H, 5-H), 6.61 (dd, J = 8.5, 1.0 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.14 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 3'-H, 5'-H) ppm; * aufgespaltener Peak, δ-Wert für den Hauptpeak.

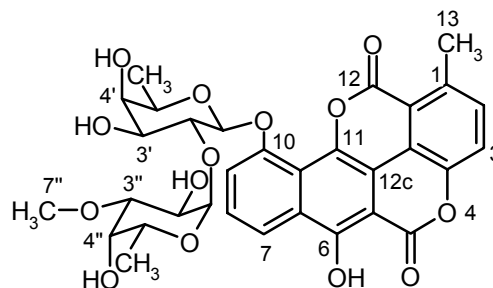
¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 23.3* (q, C-8), 35.8 (t, C-2), 56.4 (d, C-3), 65.2 (t, C-7'), 68.1* (d, C-7), 86.6* (d, C-4), 114.4 (d, C-2', C-6'), 126.1* (d, C-5), 129.8 (d, C-3', C-5'), 131.8 (s, C-4'), 139.9* (d, C-6), 147.7 (s, C-1'), 178.0 (s, C-1) ppm; * aufgespaltener Peak, δ-Wert für den Hauptpeak.

**Chartreusin (35)****C₃₂H₃₂O₁₄** (640.60)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

blau fluoreszierend (366 nm)

Anfärbeverhalten: gelb (Anis).**R_f** = 0.37 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).**R_t** = 15.5 min (LC-MS).**ESI-MS:** m/z = 663 [M+Na]⁺, 1303 [2M+Na]⁺.**[α]_D²⁰** = -27° (c = 0.33, MeOH).

UV (MeOH): λ_{\max} ($\lg \epsilon$) = 235 (4.59), 264 (4.57), 333 (3.80), 400 (4.15), 422 (4.19) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3437, 1732, 1634, 1501, 1449, 1374, 1250, 1148, 1070 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Pyridin- d_5): δ = 1.56 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 6'-H₃), 1.57 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 6''-H₃), 2.75 (s, 3H, 13-H₃), 3.35 (s, 3H, 7''-H₃), 3.85 (dd, J = 10.0, 3.0 Hz, 1H, 3''-H), 4.12 (m, 2H, 5'-H, 4''-H), 4.21 (d, J = 3.5 Hz, 1H, 4'-H), 4.32 (dd, J = 9.5, 3.5 Hz, 1H, 3'-H), 4.54 (dd, J = 10.0, 4.0 Hz, 1H, 2''-H), 5.00 (q, J = 6.5 Hz, 1H, 5''-H), 5.06 (dd, J = 9.5, 8.0 Hz, 1H, 2'-H), 5.82 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 6.52 (d, J = 4.0 Hz, 1H, 1''-H), 7.31 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 2-H), 7.44 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 3-H), 7.64 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 8-H), 7.76 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 7-H), 8.36 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 9-H) ppm.

6. *Actinomyces* sp. Stamm K 17/2

6.1. Kultivierung und Aufarbeitung

Der Stamm K 17/2 wurde wie unter B.II.2. beschrieben in Schüttelkolben (1 L, 20 x 50 mL) in M2-Medium kultiviert und analog B.II.3.1. aufgearbeitet.

6.2. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Kulturfiltratextrakt wurde zweimal an Kieselgel chromatographiert (1. $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1→1:1, 2. $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 19:1). **36** konnte in einer Ausbeute von 3.5 mg/L erhalten werden.

2-Aminobenzoyl- α -L-rhamnopyranosid (36)

$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_6$ (283.28)

farbloser Feststoff

UV-löschend (254 nm)

hellblau fluoreszierend (366 nm)

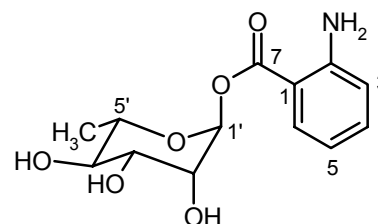
Anfärbeverhalten: gelb-braun (Anis).

R_f = 0.28 (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1).

R_t = 5.7 min (LC-MS).

DCI-MS: m/z = 284 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 301 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

$[\alpha]_D^{20}$ = -76° (c = 0.1, MeOH).



UV (MeOH): λ_{\max} ($\lg \epsilon$) = 219 (4.25), 249 (3.72), 341 (3.55) nm;

(MeOH, HCl): λ_{\max} ($\lg \epsilon$) = 221 (4.06), 246 (sh), 274 (sh), 343 (3.19) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{\max} ($\lg \epsilon$) = 219 (4.24), 248 (3.69), 342 (3.49) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3368, 2931, 1696, 1684, 1667, 1652, 1620, 1592, 1560, 1488, 1455, 1290, 1242, 1158, 1143, 1096, 1052 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ = 1.28 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 6'-H₃), 3.49 (t, J = 9.5 Hz, 1H, 4'-H), 3.74 (dd, J = 9.5, 6.5 Hz, 1H, 5'-H), 3.82 (dd, J = 9.5, 3.5 Hz, 1H, 3'-H), 3.92 (dd, J = 3.5, 2.0 Hz, 1H, 2'-H), 6.15 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 1'-H), 6.57 (ddd, J = 8.0, 7.5, 1.0 Hz, 1H, 5-H), 6.75 (dd, J = 8.5, 1.0 Hz, 1H, 3-H), 7.26 (ddd, J = 8.5, 7.5, 1.5 Hz, 1H, 4-H), 7.77 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H, 6-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CD_3OD): δ = 18.1 (q, C-6'), 71.4 (d, C-2'), 72.4 (d, C-3'), 72.5 (d, C-5'), 73.6 (d, C-4'), 95.0 (d, C-1'), 110.1 (s, C-1), 116.6 (d, C-5), 117.9 (d, C-3), 131.9 (d, C-6), 135.7 (d, C-4), 153.5 (s, C-2), 167.4 (s, C-7) ppm.

7. *Actinomyces* sp. Stamm K 17/7

7.1. Vorkulturen

Die Kultivierung von Vorkulturen erfolgte analog zu dem in B.II.2. beschriebenen Verfahren in Ha-Nährmedium. Sie wurden 48 h bei 28 °C und 180 U/min inkubiert.

7.2. Variation der Hauptkultur

Variation A: Kultivierung in Schüttelkolben

Die Kultivierung in Schüttelkolben (1 L, 20 x 50 mL) erfolgte mit Ha-Nährmedium analog zu dem in B.II.2. beschriebenen Verfahren.

Variation B: Kultivierung im Airlift-Fermenter bei Normaldruck

Die Fermentation im 10 L-Airlift-Fermenter, befüllt mit 9.2 L Ha-Nährmedium und 800 mL Vorkultur, wurde unter Normaldruck bei 28 °C und einer Belüftung von 4 vvm durchgeführt.

Variation C: Kultivierung im Airlift-Fermenter bei 5 bar Überdruck

Die Fermentation im 10 L-Airlift-Fermenter, befüllt mit 9.2 L Ha-Nährmedium und 800 mL Vorkultur, erfolgte bei 28 °C, 5 bar Überdruck und einer Belüftung von 4 vvm.

Variation D: Kultivierung in P-Kolben

Die Ruhekultivierung in P-Kolben (10 L, 10 x 1 L) erfolgte bei 28 °C. Die P-Kolben wurden jeweils mit 900 mL Ha-Nährmedium gefüllt und mit 100 mL Vorkultur angeimpft.

7.3. Standardaufarbeitung von Fermentationsansätzen

Die in B.II.7.2. genannten Variationen A – C wurden jeweils nach 72 h und die Variation D nach 28 d nach dem in B.II.3.1. beschriebenen Verfahren aufgearbeitet, die Kulturfiltrate wurden nicht weiter bearbeitet. Für die Extraktion des Myzels bei den Variationen B – D wurde anstelle des Ultraschallbades der Ultraturax verwendet. Die erste Aufreinigung der Myzelextrakte erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1→3:1).

7.4. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Teleocidin A-2 (37)

37 konnte aus den Myzelextrakten der Variationen A – D (siehe B.II.7.2.) durch weitere Säulenchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 49:1 \rightarrow 19:1) und semipräparativer HPLC (Programm 1) in Ausbeuten von 3.0 – 6.0 mg/L erhalten werden.

C₂₇H₃₉N₃O₂ (437.62)

hellgelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau-violett (Anis).

R_f = 0.55 (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1);

0.47 (RP-18, Aceton/ H_2O 4:1).

R_t = 20.5 min (LC-MS).

DCI-MS: m/z = 438 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

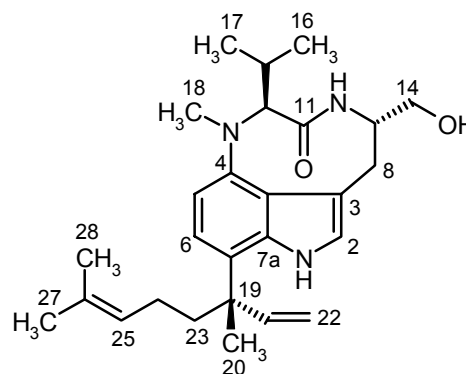
$[\alpha]_D^{20}$ = -135° (c = 0.1, MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 231 (4.36), 289 (3.81), 301 (sh) nm.

CD (MeOH): λ_{max} ($[\theta]^{20}$) = 308 (+5686), 238 (-43409), 227 (-57649) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3449, 3372, 2959, 2928, 2869, 1720, 1704, 1651, 1638 (sh), 1596, 1544, 1508, 1446, 1412, 1367, 1348, 1259, 1069, 1045 cm^{-1} .

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (Hauptkonformer) = 0.60 (d, J = 6.0 Hz, 3H, 16-H₃), 0.91 (d, J = 6.0 Hz, 3H, 17-H₃), 1.39 (br s, 3H, 27-H₃), 1.45 (br s, 3H, 20-H₃), 1.63 (br s, 3H, 28-H₃), 1.80 (td, J = 12.0, 4.5 Hz, 1H, 23-H_A), 1.90 (m, 2H, 24-H₂), 1.94 (dd, J = 12.0, 4.5 Hz, 1H, 23-H_B), 2.55 (m, 1H, 15-H), 2.90 (s, 3H, 18-H₃), 3.06 (br dd, J = 17.5, 3.5 Hz, 1H, 8-H_A), 3.14 (br d, J = 17.5 Hz, 1H, 8-H_B), 3.57 (br dd, J = 11.0, 8.5 Hz, 1H, 14-H_A), 3.74 (br dd, J = 11.0, 2.5 Hz, 1H, 14-H_B), 4.35 (d, J = 10.0 Hz, 1H, 12-H), 4.35 (m, 1H, 9-H), 5.07 (br t, J = 7.0 Hz, 1H, 25-H), 5.26 (dd, J = 11.0, 1.0 Hz, 1H, 22-H_A), 5.30 (dd, J = 17.5, 1.0 Hz, 1H, 22-H_B), 6.21 (dd, J = 17.5, 11.0 Hz, 1H, 21-H), 6.47 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 6.82 (br s, 1H, 2-H), 6.96 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 6-H), 7.70 (br s, 1H, 10-NH), 8.53 (br s, 1H, 1-NH) ppm; 14-OH nicht eindeutig zuzuordnen.



$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3): δ (Hauptkonformer) = 17.3 (q, C-27), 19.4 (q, C-16), 21.6 (q, C-17), 23.1 (t, C-24), 24.8 (q, C-20), 25.6 (q, C-28), 28.5 (d, C-15), 33.0 (q, C-18), 34.0 (t, C-8), 38.0 (t, C-23), 43.3 (s, C-19), 55.8 (d, C-9), 65.1 (t, C-14), 71.0 (d, C-12), 106.0 (d, C-5), 112.1 (t, C-22), 114.1 (s, C-3), 118.5 (s, C-3a), 120.3 (d, C-6), 121.0 (d, C-2), 121.0 (s, C-7), 124.6 (d, C-25), 131.4 (s, C-26), 137.5 (s, C-7a), 146.5 (s, C-4), 149.0 (d, C-21), 174.7 (s, C-11) ppm.

14-O-Acetylteleocidin A-2 (38)

Bei den Variationen B – D (siehe B.II.7.2.) konnte aus den Myzelextrakten durch weitere Säulenchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2), Sephadex[®] LH-20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1) und semipräparativer HPLC (Programm 2) **38** in Ausbeuten von 2.5 – 3.0 mg/L erhalten werden.

$\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_3$ (479.66)

hellgelbes Öl

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau-violett (Anis).

$R_f = 0.69$ (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 19:1);

0.39 (RP-18, Aceton/ H_2O 4:1).

$R_t = 21.1$ min (LC-MS).

DCI-MS: $m/z = 480$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

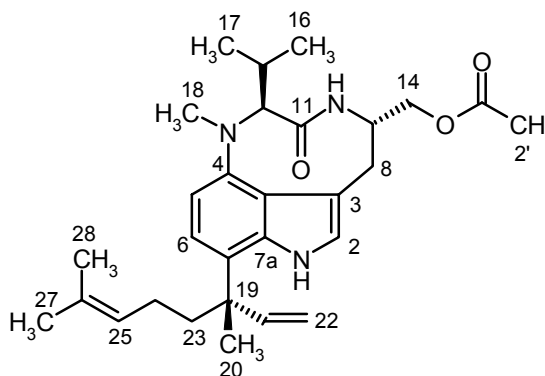
HRESI-MS: 502.30361 gefunden wie berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$.

$[\alpha]_D^{20} = -81^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 229 (4.41), 288 (sh), 297 (3.93) nm.

CD (MeOH): λ_{max} ($[\theta]^{20}$) = 307 (+8167), 256 (-29197), 224 (-36603) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3446, 2961, 2927, 2869, 1742, 1665, 1595, 1544, 1508, 1450, 1415, 1365, 1237, 1042 \text{ cm}^{-1}$.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (Hauptkonformer) = 0.62 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 16- H_3), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 17- H_3), 1.39 (s, 3H, 27- H_3), 1.45 (s, 3H, 20- H_3), 1.63 (s, 3H, 28- H_3), 1.80 (m, 1H, 23- H_A), 1.93 (m, 3 H, 23- H_B , 24- H_2), 2.09 (s, 3H, 2'- H_3), 2.55 (m, 1H, 15-H), 2.92 (s, 3H, 18- H_3), 3.10 (dd, $J = 17.5, 4.0$ Hz, 1H, 8- H_A), 3.22 (br d, $J = 17.5$ Hz, 1H, 8- H_B), 3.98 (dd, $J = 11.0, 8.5$ Hz, 1H, 14- H_A), 4.18 (dd, $J = 11.0, 4.0$ Hz, 1H, 14- H_B), 4.33 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, 12-H), 4.55 (m, 1H, 9-H), 5.08 (br t, $J = 6.0$ Hz, 1H, 25-H), 5.27 (dd, $J = 11.0, 1.0$ Hz, 1H, 22- H_A), 5.31 (dd, $J = 17.5, 1.0$ Hz, 1H, 22- H_B), 6.20 (dd, $J = 17.5, 11.0$ Hz, 1H, 21-H), 6.44 (br s, 1H, 10-NH), 6.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 5-H), 6.83 (br d, $J = 1.0$ Hz, 1H, 2-H), 6.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 6-H), 8.56 (br s, 1H, 1-NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ (Hauptkonformer) = 17.3 (q, C-27), 19.4 (q, C-16), 20.8 (q, C-2'), 21.6 (q, C-17), 23.1 (t, C-24), 24.7 (q, C-20), 25.6 (q, C-28), 28.5 (d, C-15), 33.0 (q, C-18), 34.4 (t, C-8) 37.9 (t, C-23), 43.3 (s, C-19), 53.0 (d, C-9), 65.9 (t, C-14), 71.1 (d, C-12), 106.1 (d, C-5), 112.2 (t, C-22), 113.1 (s, C-3), 118.4 (s, C-3a), 120.3 (d, C-6), 121.2 (d, C-2), 121.2 (s, C-7), 124.5 (d, C-25), 131.4 (s, C-26), 137.4 (s, C-7a), 146.2 (s, C-4), 148.8 (d, C-21), 171.1 (s, C-1'), 173.4 (s, C-11) ppm.

Teleocidin B-3 (39)

Durch weitere Säulenchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 49:1 \rightarrow 19:1) und semipräparativer HPLC (Programm 1) konnte **39** aus den Myzelextrakten der Variationen B – D (siehe B.II.7.2.) in Ausbeuten von 2.0 – 4.0 mg/L erhalten werden.

$\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_2$ (451.65)

hellgelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rot-violett (Anis).

R_f = 0.56 (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1);

0.43 (RP-18, Aceton/ H_2O 4:1).

R_t = 21.0 min (LC-MS).

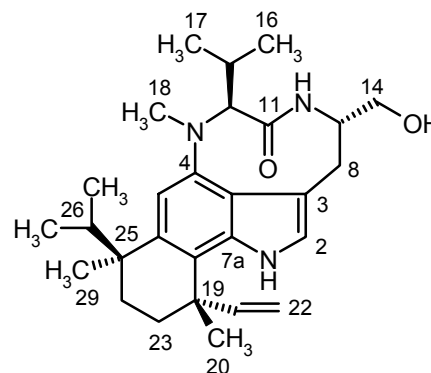
DCI-MS: $m/z = 452$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HRESI-MS: 474.30951 gefunden wie berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$.

$[\alpha]_D^{20} = -163^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 232 (4.45), 286 (3.92), 297 (sh) nm.

CD (MeOH): λ_{max} ($[\theta]^{20}$) = 310 (+10449), 241 (-30360), 227 (-34286) nm.



IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3451, 2958, 2933, 2870, 1653, 1600, 1547, 1506, 1453, 1408, 1374, 1267, 1199, 1056 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ (Hauptkonformer) = 0.65 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, 27- H_3), 0.67 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, 16- H_3), 0.94 (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 3H, 17- H_3), 1.04 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, 28- H_3), 1.33 (s, 3H, 29- H_3), 1.44 (m, 1H, 24- H_A), 1.46 (m, 1H, 23- H_A), 1.49 (s, 3H, 20- H_3), 1.93 (m, 2H, 23- H_B , 24- H_B), 2.29 (m, 1H, 26-H), 2.62 (m, 1H, 15-H), 2.92 (s, 3H, 18- H_3), 3.03 (br dd, $J = 17.5, 3.5 \text{ Hz}$, 1H, 8- H_A), 3.14 (br d, $J = 17.5 \text{ Hz}$, 1H, 8- H_B), 3.62 (dd, $J = 11.5, 8.5 \text{ Hz}$, 1H, 14- H_A), 3.79 (dd, $J = 11.5, 3.5 \text{ Hz}$, 1H, 14- H_B), 4.33 (d, $J = 10.5 \text{ Hz}$, 1H, 12-H), 4.38 (m, 1H, 9-H), 5.27 (dd, $J = 11.0, 1.0 \text{ Hz}$, 1H, 22- H_A), 5.40 (dd, $J = 17.5, 1.0 \text{ Hz}$, 1H, 22- H_B), 6.24 (dd, $J = 17.5, 11.5 \text{ Hz}$, 1H, 21-H), 6.49 (br s, 1H, 6-H), 6.79 (br s, 1H, 2-H), 7.72 (br s, 1H, 10-NH), 8.49 (br s, 1H, 1-NH) ppm; 14-OH nicht eindeutig zuzuordnen.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CDCl_3): δ (Hauptkonformer) = 17.0 (q, C-27), 18.3 (q, C-28), 19.3 (q, C-16), 21.5 (q, C-17), 21.7 (q, C-20), 24.9 (t, C-24), 28.5 (d, C-15), 29.8 (q, C-29), 33.2 (q, C-18), 33.6 (t, C-8), 34.7 (t, C-23), 37.0 (d, C-26), 39.4 (s, C-25), 39.6 (s, C-19), 55.9 (d, C-9), 65.1 (t, C-14), 70.7 (d, C-12), 106.4 (d, C-5), 111.1 (t, C-22), 113.5 (s, C-3), 116.5 (s, C-3a), 118.1 (s, C-7), 120.0 (d, C-2), 137.2 (s, C-6), 138.3 (s, C-7a), 145.8 (s, C-4), 151.6 (d, C-21), 174.9 (s, C-11) ppm.

14-O-Acetylteleocidin B-3 (40)

Aus den Myzelextrakten der Variationen B – D (siehe B.II.7.2.) konnte **40** durch weitere Säulenchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2), Sephadex[®] LH-20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1) und semipräparativer HPLC (Programm 2) in Ausbeuten von 8.0 – 12.0 mg/L erhalten werden.

$\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_3$ (493.69)

hellgelbes Öl

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rot-violett (Anis).

R_f = 0.69 (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 19:1);

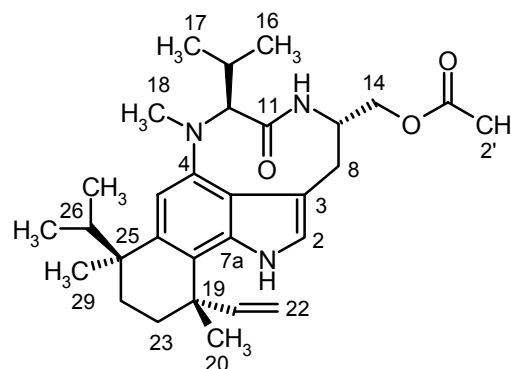
0.34 (RP-18, Aceton/ H_2O 4:1).

R_t = 21.4 min (LC-MS).

DCI-MS: $m/z = 494 [\text{M}+\text{H}]^+$.

HRESI-MS: 516.31978 gefunden wie berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$.

$[\alpha]_D^{20}$ = -76° ($c = 0.1$, MeOH).



UV (MeOH): λ_{\max} ($\lg \epsilon$) = 230 (4.53), 286 (3.97), 297 (sh) nm.

CD (MeOH): λ_{\max} ($[\theta]^{20}$) = 303 (+13172), 256 (-30007), 224 (-19251) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3449, 2959, 1742, 1669, 1637 (sh), 1600, 1559, 1543, 1507, 1457, 1407, 1373, 1236, 1044 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (Hauptkonformer) = 0.64 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 16- H_3), 0.66 (d, J = 6.0 Hz, 3H, 27- H_3), 0.93 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 17- H_3), 1.02 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 28- H_3), 1.30 (s, 3H, 29- H_3), 1.40 (m, 1H, 24- H_A), 1.46 (m, 1H, 23- H_A), 1.50 (s, 3H, 20- H_3), 1.92 (m, 2H, 23- H_B , 24- H_B), 2.10 (s, 3H, 2'- H_3), 2.26 (m, 1H, 26-H), 2.59 (m, 1H, 15-H), 2.91 (s, 3H, 18- H_3), 3.05 (br dd, J = 14.5, 5.0 Hz, 1H, 8- H_A), 3.18 (br d, J = 17.5 Hz, 8- H_B), 4.02 (dd, J = 11.5, 8.0 Hz, 1H, 14- H_A), 4.19 (dd, J = 11.5, 3.5 Hz, 1H, 14- H_B), 4.29 (d, J = 10.0 Hz, 1H, 12-H), 4.58 (m, 1H, 9-H), 5.25 (br d, J = 11.0 Hz, 1H, 22- H_A), 5.38 (dd, J = 17.5, 1.0 Hz, 1H, 22- H_B), 6.22 (dd, J = 17.5, 11.0 Hz, 1H, 21-H), 6.50 (br s, 1H, 5-H), 6.79 (br s, 1H, 2-H), 8.50 (br s, 1H, 1-NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ (Hauptkonformer) = 17.0 (q, C-27), 18.3 (q, C-28), 19.3 (q, C-16), 20.8 (q, C-2'), 21.5 (q, C-17), 21.6 (q, C-20), 24.8 (t, C-24), 28.5 (d, C-15), 29.8 (q, C-29), 33.2 (q, C-18), 34.0 (t, C-8), 34.6 (t, C-23), 36.9 (d, C-26), 39.5 (s, C-19, C-25), 53.1 (d, C-9), 65.9 (t, C-14), 70.9 (d, C-12), 106.6 (d, C-5), 111.2 (t, C-22), 112.6 (s, C-3), 116.5 (s, C-3a), 118.3 (s, C-7), 120.2 (d, C-2), 137.2 (s, C-6), 138.4 (s, C-7a), 145.5 (s, C-4), 151.4 (d, C-21), 171.1 (s, C-1'), 172.4 (s, C-11) ppm.

8. *Actinomyces* sp. Stamm K 17/9

8.1. Vorkulturen

Die Kultivierung von Vorkulturen erfolgte analog zu dem in B.II.2. beschriebenen Verfahren in Ha-Nährmedium. Sie wurden 48 h bei 28 °C und 180 U/min inkubiert.

8.2. Variation der Hauptkultur

Variation A (VA): Kultivierung in Schüttelkolben

Die Kultivierung in Schüttelkolben (1 L, 20 x 50 mL) erfolgte mit Ha-Nährmedium analog zu dem in B.II.2. beschriebenen Verfahren.

Variation B (VB): Kultivierung im Biostat B-Fermenter

Die Fermentation im Biostat B-Fermenter, befüllt mit 3.6 L Ha-Nährmedium und 400 mL Vorkultur, erfolgte bei 28 °C, 300 U/min und einer Belüftung von 1 vvm.

Variation C (VC): Kultivierung im Airlift-Fermenter bei Normaldruck

Die Fermentation im 10 L-Airlift-Fermenter, befüllt mit 9.2 L Ha-Nährmedium und 800 mL Vorkultur, wurde unter Normaldruck bei 28 °C und einer Belüftung von 4 vvm durchgeführt.

Variation D (VD): Kultivierung im Airlift-Fermenter bei 5 bar Überdruck

Die Fermentation im 10 L-Airlift-Fermenter (befüllt mit 9.2 L Ha-Nährmedium und 800 mL Vorkultur) erfolgte bei 28 °C, 5 bar Überdruck und einer Belüftung von 4 vvm.

Variation E (VE): Kultivierung in P-Kolben

Die Ruhekultivierung in P-Kolben (10 L, 10 x 1 L) erfolgte bei 28 °C. Die P-Kolben wurden jeweils mit 900 mL Ha-Nährmedium gefüllt und mit 100 mL Vorkultur angeimpft.

8.3. Standardaufarbeitung von Fermentationsansätzen

Die in B.II.8.2. genannten Variationen A – D wurden jeweils nach 72 h und die Variation E nach 28 d nach dem in B.II.3.1. beschriebenen Verfahren aufgearbeitet. Für die Extraktion des Myzels bei den Variationen B – E wurde anstelle des Ultraschallbades der Ultraturax verwendet. Die erste Aufreinigung der Rohextrakte erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Kulturfiltratextrakt: CH₂Cl₂/MeOH 9:1→3:1, Myzelextrakt: CH₂Cl₂/MeOH 50:1→3:1).

8.4. Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Reticulol (52)

52 wurde aus den Kulturfiltratextrakten der Variationen A – E (siehe B.II.8.2.) durch weitere Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1) isoliert. Ausbeuten: VA = 7.0 mg/L, VB = 23.0 mg/L, VC = 21.0 mg/L, VD = 17.5 mg/L, VE = 14.0 mg/L.

C₁₁H₁₀O₅ (222.20)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: violett (Anis).

R_f = 0.66 (KG, CHCl₃/MeOH 50:1);

0.55 (RP-18, MeOH/H₂O 4:1).

R_t = 10.4 min (LC-MS).

EI-MS: m/z (%) = 222 (100) [M]⁺, 207 (84) [M-CH₃]⁺, 179 (72) [M-CH₃-CO]⁺.

HREI-MS: 222.0528 gefunden wie berechnet für C₁₁H₁₀O₅.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 239 (sh), 245 (4.61), 278 (sh), 289 (sh), 329 (3.71) nm;

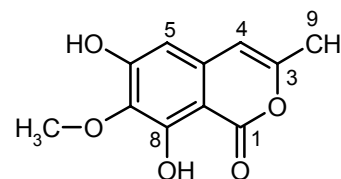
(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 240 (sh), 245 (4.62), 278 (sh), 286 (sh), 332 (3.66) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 247 (sh), 256 (4.61), 313 (4.19) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3425, 1693, 1650, 1624 (sh), 1574, 1516, 1444, 1395, 1355, 1333, 1297, 1281, 1232, 1192, 1151, 1080 cm⁻¹.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.25 (d, J = 1.0 Hz, 3H, 9-H₃), 3.85 (s, 3H, 7-OCH₃), 6.18 (d, J = 1.0 Hz, 1H, 4-H), 6.40 (s, 1H, 5-H), 6.51 (s, 1H, 6-OH), 11.30 (s, 1H, 8-OH) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 19.3 (q, C-9), 60.9 (q, 7-OCH₃), 100.3 (s, C-8a), 101.2 (d, C-5), 104.3 (d, C-4), 132.7 (s, C-7), 134.5 (s, C-4a), 153.3 (s, C-3), 153.8 (s, C-8), 156.3 (s, C-6), 166.4 (s, C-1) ppm.



6-O-Methylreticulol (53)

Bei den Variationen C – E (siehe B.II.8.2.) konnte aus den Kulturfiltratextrakten **53** durch weitere Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1) isoliert werden. Ausbeuten: VC = 1.0 mg/L, VD = 1.5 mg/L, VE = 3.5 mg/L.

C₁₂H₁₂O₅ (236.22)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: violett (Anis).

R_f = 0.83 (KG, CHCl₃/MeOH 50:1);

0.44 (RP-18, MeOH/H₂O 4:1).

R_t = 11.3 min (LC-MS).

EI-MS: m/z (%) = 236 (100) [M]⁺, 221 (96) [M-CH₃]⁺, 193 (65) [M-CH₃-CO]⁺.

HREI-MS: 236.0685 gefunden wie berechnet für C₁₂H₁₂O₅.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 241 (4.59), 255 (sh), 278 (sh), 290 (sh), 334 (3.74) nm;

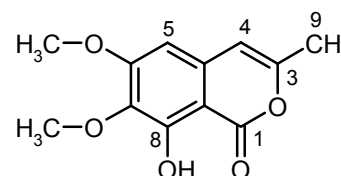
(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 242 (4.59), 255 (sh), 278 (sh), 291 (sh), 333 (3.71) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 234 (4.54), 246 (sh), 289 (sh), 360 (3.77) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3425, 1681, 1639, 1561, 1522, 1459, 1443, 1423, 1378, 1356, 1290, 1265, 1212, 1168, 1105, 1025, 1004 cm⁻¹.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.24 (s, 3H, 9-H₃), 3.89 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.92 (s, 3H, 7-OCH₃), 6.16 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, 4-H), 6.31 (s, 1H, 5-H), 11.04 (br s, 1H, 8-OH) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 19.3 (q, C-9), 56.1 (q, 6-OCH₃), 60.7 (q, 7-OCH₃), 98.0 (d, C-5) 100.7 (s, C-8a), 104.3 (d, C-4), 134.4 (s, C-4a), 135.0 (s, C-7), 153.5 (s, C-3), 154.6 (s, C-8), 159.9 (s, C-6), 166.3 (s, C-1) ppm.



8-O-Methylreticulol (54)

54 konnte aus den Kulturfiltratextrakten der Variationen D und E (siehe B.II.8.2.) durch weitere Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20 (CH₂Cl₂) und Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 50:1) erhalten werden. Ausbeuten: VD = 0.1 mg/L, VE = 0.3 mg/L.

C₁₂H₁₂O₅ (236.22)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: violett (Anis).

R_f = 0.47 (KG, CHCl₃/MeOH 50:1)

0.64 (RP-18, MeOH/H₂O 4:1).

R_t = 8.8 min (LC-MS).

EI-MS: m/z (%) = 236 (62) [M]⁺, 221 (100) [M-CH₃]⁺, 193 (43) [M-CH₃-CO]⁺.

DCI-MS: m/z = 237 [M + H]⁺, 254 [M + NH₄]⁺.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 239 (sh), 245 (4.36), 272 (sh), 321 (3.42) nm;

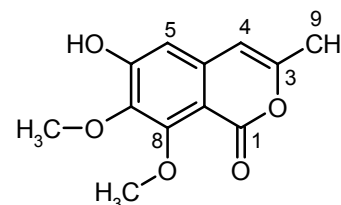
(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 239 (sh), 245 (4.36), 275 (sh), 326 (3.30) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 237 (sh), 245 (4.24), 254 (4.32), 313 (3.88) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3426, 1773, 1710, 1666, 1654 (sh), 1636, 1610, 1559, 1489, 1456, 1424, 1370, 1260, 1194, 1099, 1068, 1015 cm⁻¹.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 2.19 (s, 3H, 9-H₃), 3.95 (s, 3H, 8-OCH₃), 4.00 (s, 3H, 7-OCH₃), 6.05 (d, J = 1.0 Hz, 1H, 4-H), 6.39 (s, 1H, 8-OH), 6.59 (s, 1H, 5-H) ppm.

¹³C-NMR (150.8 MHz, CDCl₃): δ = 19.3 (q, C-9), 61.6* (q, 8-OCH₃), 61.8* (q, 7-OCH₃), 103.1 (d, C-4) 105.5 (d, C-5), 107.1 (s, C-8a), 136.7 (s, C-4a), 139.8 (s, C-7), 154.2 (s, C-3), 154.5 (s, C-8), 155.4 (s, C-6), 159.4 (s, C-1) ppm; * Signale sind untereinander austauschbar.



9-Hydroxyreticulol (55)

55 konnte aus den Kulturfiltratextrakten der Variationen B und C (siehe B.II.8.2.) erhalten werden. Die Aufreinigung erfolgte durch weitere Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20 (MeOH) und Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1). Ausbeuten: VB = 0.5 mg/L, VC = 0.2 mg/L.

C₁₁H₁₀O₆ (238.20)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: braun (Anis).

R_f = 0.53 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

R_t = 6.8 min (LC-MS).

EI-MS: m/z (%) = 238 (100) [M]⁺, 223 (30) [M-CH₃]⁺, 164 (44) [M-CH₃-CH₂OH-CO]⁺,
148 (58) [M-CH₃-CH₂OH-CO₂]⁺.

DCI-MS: m/z = 239 [M+H]⁺, 256 [M+NH₄]⁺.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 240 (sh), 245 (4.47), 278 (sh), 328 (3.62) nm;

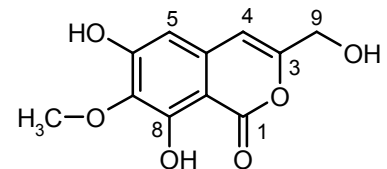
(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 241 (sh), 245 (4.48), 279 (sh), 330 (3.58) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 217 (sh), 249 (sh), 258 (4.45), 315 (4.02) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3425, 1682, 1650, 1636, 1622, 1515, 1457, 1402, 1361, 1287, 1270, 1188,
1154, 1084 cm⁻¹.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 3.87 (s, 3H, 7-OCH₃), 4.34 (d, *J* = 0.5 Hz, 2H, 9-H₂), 6.46 (s, 1H, 5-H), 6.52 (s, 1H, 4-H) ppm.

¹³C-NMR (150.8 MHz, CD₃OD): δ = 60.9 (q, 7-OCH₃), 61.4 (t, C-9), 100.7 (s, C-8a), 104.6* (d, C-4), 104.7* (d, C-5), 135.4 (s, C-4a), 135.7 (s, C-7), 156.3 (s, C-8), 156.6 (s, C-3), 160.2 (s, C-6), 167.6 (s, C-1); * Signale sind untereinander austauschbar.



Diketopiperazin XR330 (56)

Aus den Myzelextrakten der Variationen A – E (siehe B.II.8.2.) konnte **56** durch weitere Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 100:1) und Sephadex[®] LH-20 (CH₂Cl₂) erhalten werden. Ausbeuten: VA = 2.0 mg/L, VB = 4.0 mg/L, VC = 2.0 mg/L, VD = 2.5 mg/L, VE = 1.5 mg/L.

C₂₀H₁₈N₂O₃ (334.37)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

gelb fluoreszierend (366 nm)

Anfärbeverhalten: gelb (Anis).

R_f = 0.84 (KG, CHCl₃/MeOH 50:1);

0.30 (RP-18, MeOH/H₂O 4:1).

R_t = 16.3 min (LC-MS).

EI-MS: m/z (%) = 334 (100) [M]⁺, 147 (5) [M-C₁₁H₉NO₂]⁺, 132 (25) [M-C₁₁H₁₀N₂O₂]⁺, 116 (18) [M-C₁₂H₁₂NO₃]⁺, 91 (10) [M-C₁₃H₁₁N₂O₃]⁺, 77 (5) [M-C₁₄H₁₃N₂O₃]⁺.

HREI-MS: 334.1317 gefunden wie berechnet für C₂₀H₁₈N₂O₃.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 228 (sh), 261 (sh), 342 (4.44) nm;

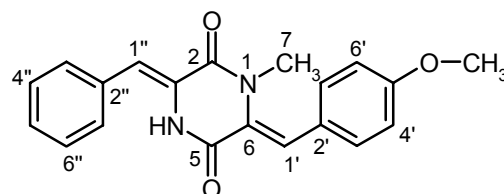
(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 226 (sh), 261 (sh), 340 (4.44) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 216 (sh), 248 (sh), 322 (sh), 368 (4.35) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1682, 1635 (sh), 1619, 1606, 1512, 1465, 1442, 1400, 1381, 1357, 1301, 1250, 1176, 1110, 1033 cm⁻¹.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 2.98 (s, 3H, 7-H₃), 3.83 (s, 3H, 5'-OCH₃), 6.95 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 4'-H, 6'-H), 7.01 (s, 1H, 1''-H), 7.27 (m, 2H, 3'-H, 7'-H), 7.28 (s, 1H, 1'-H), 7.32 (m, 1H, 5''-H), 7.36 (m, 4H, 3''-H, 4''-H, 6''-H, 7''-H), 8.05 (br s, 1H, 4-NH) ppm.

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 36.7 (q, C-7), 55.4 (q, 5'-OCH₃), 114.9 (d, C-4', C-6'), 117.4 (d, C-1''), 120.7 (d, C-1'), 124.5 (s, C-2'), 125.3 (s, C-3), 128.3 (d, C-3'', C-7''), 128.5 (d, C-5''), 129.5 (d, C-4'', C-6''), 130.1 (d, C-3', C-7'), 130.5 (s, C-6), 134.0 (s, C-2''), 159.4 (s, C-2), 159.7 (s, C-5'), 160.0 (s, C-5) ppm.



Diketopiperazin XR334 (57)

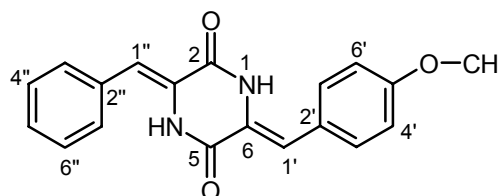
Durch weitere Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 100:1) und Sephadex[®] LH-20 (CH₂Cl₂) konnte **57** aus den Myzelextrakten der Variationen B – E (siehe B.II.8.2.) erhalten werden. Ausbeuten: VB = 5.5 mg/L, VC = 0.5 mg/L, VD = 1.0 mg/L, VE = 1.5 mg/L.

C₁₉H₁₆N₂O₃ (320.35)

hellgelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

gelb fluoreszierend (366 nm)



Anfärbeverhalten: gelb (Anis).

R_f = 0.84 (KG, CHCl₃/MeOH 50:1);

0.39 (RP-18, MeOH/H₂O 4:1).

R_t = 15.2 min (LC-MS).

EI-MS: m/z (%) = 320 (100) [M]⁺, 148 (8) [M-C₁₀H₆NO₂]⁺, 132 (8) [M-C₁₀H₈N₂O₂]⁺, 118 (15) [M-C₁₁H₈NO₃]⁺.

HREI-MS: 320.1161 gefunden wie berechnet für C₁₉H₁₆N₂O₃.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 233 (sh), 263 (sh), 348 (4.10) nm;

(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 236 (sh), 261 (sh), 348 (4.05) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 247 (sh), 385 (4.23) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3199, 1698 (sh), 1681, 1629, 1604, 1511, 1406, 1356, 1302, 1250, 1179, 1155, 1030 cm⁻¹.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 3.84 (s, 3H, 5'-OCH₃), 6.97 (s, 1H, 1'-H), 6.97 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 4'-H, 6'-H), 7.00 (s, 1H, 1''-H), 7.36 (m, 5H, 3''-H, 4''-H, 5''-H, 6''-H, 7''-H), 7.45 (m, 2H, 3'-H, 7'-H), 8.12 (br s, 2H, 1-NH, 4-NH) ppm.

¹³C-NMR (150.8 MHz, CDCl₃): δ = 55.5 (q, 5'-OCH₃), 115.1 (d, C-4', C-6'), 116.3 (d, C-1''), 116.9 (d, C-1'), 124.2 (s, C-2'), 125.0 (s, C-3), 125.7 (s, C-6), 128.4 (d, C-3'', C-7''), 129.0 (d, C-5''), 129.6 (d, C-4'', C-6''), 130.0 (d, C-3', C-7'), 132.7 (s, C-2''), 157.0* (s, C-2), 157.2* (s, C-5'), 160.1 (s, C-5) ppm; * Signale sind untereinander austauschbar.

Antibiotikum UK-1 (58)

58 wurde aus den Myzelextrakten der Variationen A – E (siehe B.II.8.2.) isoliert. Die Aufreinigung erfolgte durch weitere Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 100:1) und Sephadex[®] LH-20 (CH₂Cl₂). Ausbeuten: VA = 10.0 mg/L, VB = 21.5 mg/L, VC = 5.5 mg/L, VD = 5.5 mg/L, VE = 4.5 mg/L.

C₂₂H₁₄N₂O₅ (386.36)

hellgelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

gelb fluoreszierend (366 nm)

Anfärbeverhalten: gelb (Anis).

R_f = 0.80 (KG, CHCl₃/MeOH 50:1);

0.04 (RP-18, MeOH/H₂O 4:1).

R_t = 21.1 min (LC-MS).

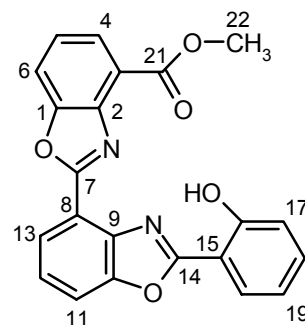
DCI-MS: m/z = 387 [M+H]⁺, 404 [M+NH₄]⁺.

UV (CHCl₃): λ_{max} (lg ε) = 250 (4.27), 265 (sh), 275 (sh), 317 (4.42), 328 (4.48), 351 (4.39), 367 (sh) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3426, 1656 (sh), 1631 (sh), 1621, 1586, 1543, 1478, 1424, 1282, 1259, 1241, 1191, 1157, 1142, 1109, 1058, 1029 cm⁻¹.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.17 (s, 3H, 22-H₃), 7.02 (td, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 19-H), 7.18 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 17-H), 7.46 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, 5-H), 7.48 (td, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, 18-H), 7.5 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, 12-H), 7.76 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 11-H), 7.84 (dd, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H, 6-H), 8.04 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, 20-H), 8.09 (dd, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H, 4-H), 8.34 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 13-H), 11.96 (br s, 1H, 16-OH) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 52.6 (q, C-22), 110.0 (s, C-15), 113.8 (d, C-11), 115.1 (d, C-6), 117.6 (s, C-8), 117.8 (d, C-17), 119.6 (d, C-19), 122.4 (s, C-3), 124.9 (d, C-5), 125.2* (d, C-12), 125.3* (d, C-13), 127.2 (d, C-20), 127.4 (d, C-4), 134.3 (d, C-18), 138.7 (s, C-9), 141.5 (s, C-2), 149.9 (s, C-10), 151.3 (s, C-1), 159.6 (s, C-16), 161.9 (s, C-7), 164.6 (s, C-14), 166.1 (s, C-21) ppm; * Signale sind untereinander austauschbar.



Demethyl-UK-1 (59)

59 wurde in einer Ausbeute von 14.0 mg/L aus dem Myzelextrakt der Variation A (siehe B.II.8.2.) isoliert, jedoch aus einer Kultivierung im Nährmedium SM. Die Aufreinigung erfolgte durch eine weitere Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20 (MeOH).

C₂₁H₁₂N₂O₅ (372.34)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

gelb fluoreszierend (366 nm)

Anfärbeverhalten: keine Anfärbung (Anis).

R_f = 0.19 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

R_t = 19.7 min (LC-MS).

ESI-MS: m/z = 789 [2M-H+2Na]⁺, 811 [2M-2H+3Na]⁺.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 233 (4.09), 264 (sh), 270 (4.00), 308 (sh), 324 (4.15), 340 (4.19), 415 (3.92) nm;

(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 249 (3.98), 261 (sh), 271 (sh), 316 (sh), 326 (4.17), 347 (4.09), 362 (sh) nm;

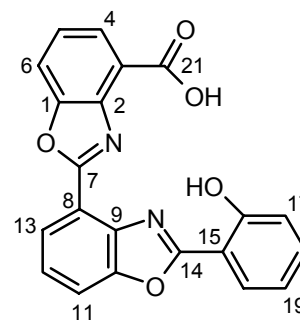
(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 233 (4.24), 263 (sh), 270 (4.13), 309 (sh), 323 (4.27), 340 (4.27), 414 (3.99) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3424, 1650 (sh), 1633, 1615, 1587, 1558, 1529, 1472, 1430, 1403, 1388, 1358, 1253, 1158, 1046 cm⁻¹.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 6.59 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, 19-H), 6.89 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, 17-H), 7.31 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, 18-H), 7.60 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 7.63 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, 12-H), 7.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 6-H), 7.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 11-H), 8.00 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, 20-H), 8.16 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, 4-H), 8.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 13-H) ppm.

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD): δ = 111.1 (s, C-15), 114.7* (d, C-6), 114.8 (d, C-19), 114.9* (s, C-8), 115.9 (d, C-11), 124.2 (d, C-13), 124.5 (d, C-17), 126.3 (d, C-12), 127.3 (d, C-5), 128.4 (s, C-3), 129.1 (d, C-4), 129.9 (d, C-20), 136.5 (d, C-18), 140.0 (s, C-9), 140.7 (s, C-2), 150.9 (s, C-10), 151.8 (s, C-1), 162.7 (s, C-7, C-14), 169.5 (s, C-21), 172.0 (s, C-16) ppm;

* Signale sind untereinander austauschbar.



Piericidin A₁ (63)

63 konnte aus dem Myzelextrakt der Variation C (siehe B.II.8.2.) durch weitere Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 50:1), Sephadex[®] LH-20 (CH₂Cl₂) und wiederum an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 50:1) in einer Ausbeute von 0.8 mg/L erhalten werden.

C₂₅H₃₇NO₄ (415.57)

braunes Öl

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: violett (Anis).

R_f = 0.70 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

R_t = 20.5 min (LC-MS).

DCI-MS: m/z = 416 [M+H]⁺, 831 [2M+H]⁺.

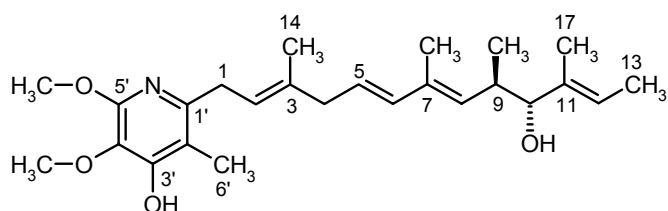
[α]_D²⁰ = -2° (c = 0.1, MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 222 (sh), 269 (3.59), 293 (sh) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3424, 2927, 2855, 1773 (sh), 1738, 1721, 1707 (sh), 1691, 1677 (sh), 1633 (sh), 1607, 1589, 1472, 1412, 1382, 1258, 1192, 1127, 1048 cm⁻¹.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.78 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 16-H₃), 1.60 (br s, 3H, 13-H₃), 1.62 (br s, 3H, 17-H₃), 1.73 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, 14-H₃), 1.78 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, 15-H₃), 2.07 (s, 3H, 6'-H₃), 2.66 (m, 1H, 9-H), 2.77 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, 4-H₂), 3.37 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, 1-H₂), 3.60 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 10-H), 3.84 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.93 (s, 3H, 5'-OCH₃), 5.19 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, 8-H), 5.39 (td, *J* = 7.0, 1.5 Hz, 1H, 2-H), 5.46 (m, 1H, 12-H), 5.59 (dt, *J* = 14.5, 7.0 Hz, 1H, 5-H), 6.07 (dd, *J* = 14.5, 1.0 Hz, 1H, 6-H), 6.16 (br s, 1H, 3'-OH) ppm; 10-OH nicht eindeutig zuzuordnen.

¹³C-NMR (150.8 MHz, CDCl₃): δ = 10.5 (q, C-17, C-6'), 13.1* (q, C-13), 13.2* (q, C-14), 16.6 (q, C-15), 17.4 (q, C-16), 34.4 (t, C-1), 36.8 (d, C-9), 43.1 (t, C-4), 53.0 (q, 5'-OCH₃), 60.6 (q, 4'-OCH₃), 82.8 (d, C-10), 112.0 (s, C-2'), 122.2 (d, C-2), 123.6 (d, C-12), 126.8 (d, C-5), 127.8 (s, C-4'), 133.1 (d, C-8), 134.8 (s, C-3), 135.5 (s, C-7), 135.7 (d, C-6), 136.0 (s, C-11), 150.8 (s, C-1'), 153.5 (s, C-5'), 154.0 (s, C-3') ppm; * Signale sind untereinander austauschbar.



IT-143-B (64)

64 wurde aus den Myzelextrakten der Variationen C und D (siehe B.II.8.2.) erhalten. Die Aufreinigung erfolgte durch weitere Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20 (CH₂Cl₂) und Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 50:1). Ausbeuten: VC = 0.3 mg/L, VD = 0.1 mg/L.

C₂₈H₄₄NO₄ (455.64)

braunes Öl

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: violett (Anis).

R_f = 0.73 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

R_t = 21.6 min (LC-MS).

ESI-MS: m/z = 454 [M-H]⁻, 931 [2M-2H+Na]⁻.

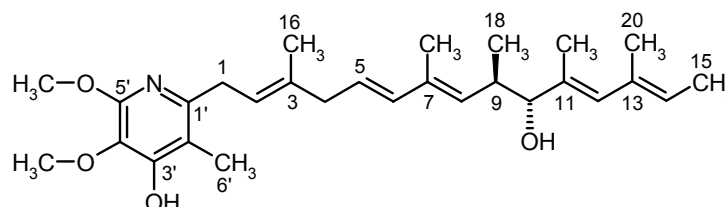
[α]_D²⁰ = +1° (c = 0.1, MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 220 (sh), 269 (3.57), 293 (sh) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3447, 2927, 1795, 1774, 1751, 1737, 1719, 1702, 1682 (sh), 1651, 1635, 1619, 1605, 1589, 1558, 1543, 1526, 1512, 1474, 1459, 1440, 1412, 1382, 1260, 1192, 1127, 1045 cm⁻¹.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.82 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 18-H₃), 1.66 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 15-H₃), 1.72 (s, 3H, 16-H₃), 1.73 (s, 3H, 20-H₃), 1.76 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, 19-H₃), 1.78 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, 17-H₃), 2.07 (s, 3H, 6'-H₃), 2.69 (m, 1H, 9-H), 2.77 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, 4-H₂), 3.37 (br d, *J* = 7.0 Hz, 2H, 1-H₂), 3.61 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 10-H), 3.84 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.95 (s, 3H, 5'-OCH₃), 5.20 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 8-H), 5.39 (m, 2H, 2-H, 14-H), 5.59 (dt, *J* = 15.5, 7.0 Hz, 1H, 5-H), 5.82 (br s, 1H, 12-H), 6.08 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, 6-H), 6.16 (br s, 1H, 3'-OH) ppm; 10-OH nicht eindeutig zuzuordnen.

¹³C-NMR (150.8 MHz, CDCl₃): δ = 10.4 (q, C-6'), 12.5 (q, C-19), 13.2 (q, C-17), 13.7 (q, C-15), 16.6 (q, C-16, C-20), 17.5 (q, C-18), 34.3 (t, C-1), 37.1 (d, C-9), 43.1 (t, C-4), 53.3 (q, 5'-OCH₃), 60.6 (q, 4'-OCH₃), 83.3 (d, C-10), 112.1 (s, C-2'), 122.1 (d, C-2), 124.7 (d, C-14), 126.8 (d, C-5), 127.8 (s, C-4'), 132.7 (d, C-12), 133.0 (d, C-8), 133.0 (s, C-13), 134.0 (s, C-11), 134.9 (s, C-3), 135.7 (d, C-6), 136.0 (s, C-7), 150.8 (s, C-1'), 153.5 (s, C-3', C-5') ppm.



4'-Demethoxy-IT-143-B (65)

65 wurde aus den Myzelextrakten der Variationen A – E (siehe B.II.8.2.) durch weitere Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) und Sephadex[®] LH-20 (CH₂Cl₂/MeOH 1:1) isoliert. Ausbeuten: VA = 1.5 mg/L, VB = 7.0 mg/L, VC = 5.5 mg/L, VD = 2.0 mg/L, VE = 1.0 mg/L.

C₂₇H₃₉NO₃ (425.61)

braunes Öl

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau-violett (Anis).

R_f = 0.49 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

R_t = 22.2 min (LC-MS).

ESI-MS: m/z = 426 [M+H]⁺, 448 [M+Na]⁺.

[α]_D²⁰ = -17° (c = 0.1, MeOH).

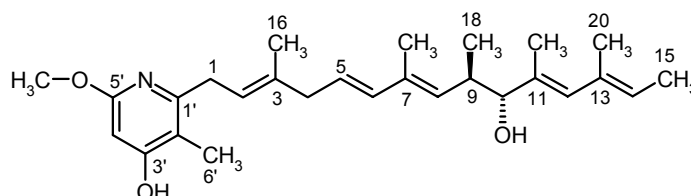
UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 223 (4.40), 240 (4.45), 265 (sh), 294 (sh) nm.

CD (MeOH): λ_{max} ([θ]²⁰) = 244 (-16294), 220 (+6680), 214 (+5833), 207 (+4338) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3424, 2925, 2864, 1634, 1619, 1604, 1493, 1453, 1400, 1386, 1233, 1192, 1150, 1058, 1008 cm⁻¹.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 0.84 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 18-H₃), 1.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H, 15-H₃), 1.70 (s, 3H, 19-H₃), 1.72 (s, 9H, 16-H₃, 17-H₃, 20-H₃), 1.95 (s, 3H, 6'-H₃), 2.69 (m, 1H, 9-H), 2.77 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, 4-H₂), 3.34 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, 1-H₂), 3.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 10-H), 3.83 (s, 3H, 5'-OCH₃), 5.18 (br t, *J* = 6.5 Hz, 1H, 2-H), 5.29 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, 8-H), 5.35 (m, 1H, 14-H), 5.49 (dt, *J* = 15.5, 7.0 Hz, 1H, 5-H), 5.79 (br s, 1H, 12-H), 5.86 (s, 1H, 4'-H), 6.07 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, 6-H) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 10.4 (q, C-6'), 13.2^{*1} (q, C-17), 13.4^{*1} (q, C-19), 13.7 (q, C-15), 16.7^{*2} (q, C-16), 16.8^{*2} (q, C-20), 18.3 (q, C-18), 32.4 (t, C-1), 37.7 (d, C-9), 43.9 (t, C-4), 56.0 (q, 5'-OCH₃), 83.9 (d, C-10), 92.8 (d, C-4'), 117.5 (s, C-2'), 121.0 (d, C-2), 124.9 (d, C-14), 125.7 (d, C-5), 132.3 (d, C-12), 134.3 (s, C-13), 134.8 (s, C-11), 135.6 (d, C-8), 136.6 (s, C-7), 138.0 (d, C-6), 138.2 (s, C-3), 149.8 (s, C-1'), 161.8 (s, C-5'), 178.7 (s, C-3') ppm; ^{*1,*2} Signale sind jeweils untereinander austauschbar.



Echinosporin (75)

Bei den Variationen A – D (siehe B.II.8.2.) konnte aus den Kulturfiltratextrakten **75** durch weitere Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20 (MeOH) erhalten werden. Ausbeuten: VA = 1.5 mg/L, VB = 15.0 mg/L, VC = 10.0 mg/L, VD = 13.0 mg/L.

C₁₀H₉NO₅ (223.20)

weißer Feststoff

UV-löschend

Anfärbeverhalten: rot-violett (Anis).

R_f = 0.33 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

R_t = 1.4 min (LC-MS).

ESI-MS: m/z = 246 [M+Na]⁺, 469 [2M+Na]⁺.

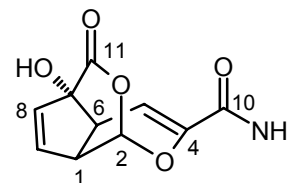
[α]_D²⁰ = -325° (c = 0.1, MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 215 (3.89) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3437, 3313, 3182, 1741, 1688, 1651, 1603, 1406, 1365, 1325, 1291, 1272, 1181, 1135, 1115, 1096, 1072, 1022, 1003 cm⁻¹.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 3.04 (ddd, *J* = 5.5, 3.5, 1.5 Hz, 1H, 1-H), 3.17 (td, *J* = 5.5, 1.5 Hz, 1H, 6-H), 6.02 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H, 2-H), 6.25 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, 8-H), 6.29 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, 5-H), 6.47 (dd, *J* = 6.0, 3.5 Hz, 1H, 9-H) ppm.

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD): δ = 42.1 (d, C-1), 49.5 (d, C-6), 85.3 (s, C-7), 98.3 (d, C-2), 107.6 (d, C-5), 134.4 (d, C-9), 143.3 (d, C-8), 144.2 (s, C-4), 165.1 (s, C-10), 173.6 (s, C-11) ppm.

**7-Desoxyechinosporin (76)**

76 wurde in einer Ausbeute von 0.2 mg/L aus dem Kulturfiltratextrakt der Variation D (siehe B.II.8.2.) isoliert. Die Aufreinigung erfolgte durch weitere Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1→9:1) und Sephadex[®] LH-20 (CH₂Cl₂).

C₁₀H₉NO₄ (207.19)

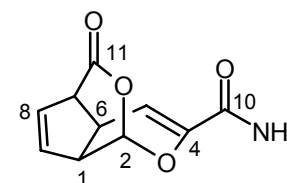
weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rot-violett (Anis).

R_f = 0.53 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

R_t = 1.9 min (LC-MS).



DCI-MS: $m/z = 225 [M+NH_4]^+$.

$[\alpha]_D^{20} = -343^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH).

UV (MeOH): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 211 (3.90)$ nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3443, 1752, 1694, 1651, 1600, 1404, 1320, 1200, 1123, 1097, 1067 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.77$ (m, 1H, 6-H), 3.14 (br q, $J = 5.0$ Hz, 1H, 1-H), 3.41 (dd, $J = 5.0, 3.0$ Hz, 1H, 7-H), 5.17 (br s, 2H, NH_2), 5.86 (s, 1H, 2-H), 6.35 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 5-H), 6.40 (m, 2H, 8-H, 9-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CDCl_3): $\delta = 38.7$ (d, C-6), 41.9 (d, C-1), 51.7 (d, C-7), 95.7 (d, C-2), 107.8 (d, C-5), 134.2 (d, C-9), 137.1 (d, C-8), 142.6 (s, C-4), 162.2 (s, C-10), 167.8 (s, C-11) ppm.

Benzisoxamid (78)

78 konnte aus dem Kulturfiltratextrakt der Variation D (siehe B.II.8.2.) durch weitere Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20 (MeOH) und Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) in einer Ausbeute von 1.0 mg/L erhalten werden.

$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6$ (418.45)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

hellblau fluoreszierend (366 nm)

Anfärbeverhalten: schwach violett (Anis).

$R_f = 0.16$ (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1).

$R_t = 10.1$ min (LC-MS).

ESI-MS: $m/z = 441 [M+\text{Na}]^+$, $859 [2M+\text{Na}]^+$.

HRESI-MS: 419.19249 gefunden wie berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_6$.

$[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH).

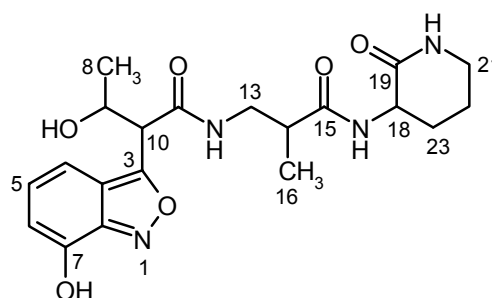
UV (MeOH): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 250$ (sh), 255 (4.05), 264 (sh), 316 (3.44) nm;

(MeOH, HCl): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 220$ (sh), 270 (4.20), 345 (3.48) nm;

(MeOH, NaOH): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 236$ (4.27), 260 (sh), 273 (sh), 342 (3.49) nm.

CD (MeOH): $\lambda_{\max} ([\theta]^{20}) = 318$ (br, -5841), 253 (+19843), 220 (-19463), 208 (+8790) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3290, 2935, 1680, 1666, 1650, 1636, 1542, 1492, 1474, 1380, 1260, 1148, 1038 \text{ cm}^{-1}$.



¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 1.11 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 16-H₃), 1.52 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 8-H₃), 1.77 (m, 1H, 23-H_A), 1.84 (m, 1H, 22-H_A), 1.90 (m, 1H, 22-H_B), 2.05 (m, 1H, 23-H_B), 2.60 (m, 1H, 14-H), 3.28 (m, 3H, 13-H_A, 21-H₂), 3.49 (dd, J = 13.5, 5.0 Hz, 1H, 13-H_B), 4.34 (dd, J = 10.5, 6.5 Hz, 1H, 18-H), 4.47 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 10-H), 4.90* (1H, 9-H), 6.73 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 3-H), 6.94 (dd, J = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 2-H), 7.16 (dd, J = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 4-H) ppm; * δ -Wert wurde aus einem HSQC-Spektrum ermittelt.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 15.4 (q, C-16), 21.3 (q, C-8), 22.4 (t, C-22), 28.4 (t, C-23), 41.8 (d, C-14), 42.7 (t, C-21), 43.9 (t, C-13), 50.8 (d, C-18), 75.8 (d, C-10), 80.5 (d, C-9), 111.9 (s, C-3a), 119.8*¹ (d, C-4), 119.9*¹ (d, C-5), 120.2*¹ (d, C-6), 146.8 (s, C-7), 149.5 (s, C-7a), 168.2 (s, C-3), 172.9*² (s, C-11), 173.0*² (s, C-19), 177.4 (s, C-15) ppm; *^{1,2} Signale sind jeweils untereinander austauschbar.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.97 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 16-H₃), 1.43 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 8-H₃), 1.61 (qd, J = 11.5, 4.0 Hz, 1H, 23-H_A), 1.72 (m, 1H, 22-H_A), 1.77 (m, 1H, 22-H_B), 1.93 (m, 1H, 23-H_B), 2.52 (m, 1H, 14-H), 3.09 (m, 1H, 13-H_A), 3.13 (m, 2H, 21-H₂), 3.27 (m, 1H, 13-H_B), 4.19 (m, 1H, 18-H), 4.45 (d, J = 7.0 Hz, 1H, 10-H), 4.89 (quint, J = 6.5 Hz, 1H, 9-H), 6.72 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 6.95 (br d, J = 7.5 Hz, 1H, 6-H), 7.05 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 4-H), 7.57 (br s, 1H, 20-NH), 8.00 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 17-NH), 8.27 (br t, J = 5.0 Hz, 1H, 12-NH), 9.35 (br s, 1H, 9-OH), 11.72 (br s, 1H, 7-OH) ppm.

¹³C-NMR (150.8 MHz, DMSO-d₆): δ = 15.0 (q, C-16), 20.4 (q, C-8), 21.0 (t, C-22), 27.2 (t, C-23), 39.3* (d, C-14), 40.9 (t, C-21), 42.2 (t, C-13), 48.8 (d, C-18), 73.5 (d, C-10), 78.6 (d, C-9), 110.2 (s, C-3a), 117.8 (d, C-4), 118.5 (d, C-5), 119.2 (d, C-6), 145.7 (s, C-7), 148.3 (s, C-7a), 165.6 (s, C-3), 169.5 (s, C-11), 170.2 (s, C-19), 173.4 (s, C-15) ppm; * δ -Wert wurde aus einem HSQC-Spektrum ermittelt.

8.5. Zugabe von Glyphosat

Das Glyphosat wurde in Konzentrationen von 0.01 mM, 0.06 mM, 0.6 mM und 3 mM zur 30. Stunde in die Kultur gegeben. Für jede Glyphosat-Konzentration wurde der Stamm K 17/9 wie unter B.II.2. beschrieben in Haferkleie kultiviert und aufgearbeitet.

III. Charakterisierung der Metaboliten aus *Micromonospora* sp. Tü 6368

1-Methyllumichrom (87)

$C_{13}H_{12}N_4O_2$ (256.26)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

hellblau fluoreszierend (366 nm)

Anfärbeverhalten: gelb (Anis).

$R_f = 0.77$ (KG, $CHCl_3/MeOH$ 9:1).

$R_t = 12.7$ min (LC-MS).

EI-MS: m/z (%) = 256 (100) $[M]^+$, 185 (22) $[M-C_2H_3N_2O]^+$, 158 (60) $[M-C_3H_2N_2O_2]^+$.

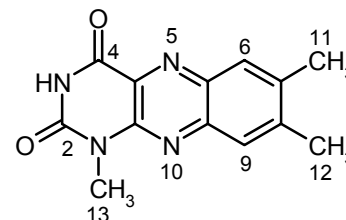
HREI-MS: 256.0952 gefunden wie berechnet für $C_{13}H_{12}N_4O_2$.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 219 (4.43), 250 (4.44), 259 (sh), 338 (3.78), 386 (3.76) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3422, 3197, 3078, 1719, 1700, 1655$ (sh), 1636 (sh), 1623 (sh), 1558, 1484, 1359, 1295, 1217, 1154, 1073 cm^{-1} .

1H -NMR (600 MHz, Pyridin- d_5): $\delta = 2.28$ (s, 3H, 11- H_3), 2.35 (s, 3H, 12- H_3), 3.79 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H, 13- H_3), 7.81 (s, 1H, 9-H), 8.04 (s, 1H, 6-H), 14.05 (br s, 1H, 3-NH) ppm.

^{13}C -NMR (150.8 MHz, Pyridin- d_5): $\delta = 19.5$ (q, C-11), 20.1 (q, C-12), 28.2 (q, C-13), 126.9 (d, C-9), 129.2 (d, C-6), 130.9 (s, C-4a), 138.5 (s, C-5a), 139.2 (s, C-7), 141.8 (s, C-9a), 144.7 (s, C-8), 146.8 (s, C-10a), 150.9 (s, C-2), 160.5 (s, C-4) ppm.



Lumichrom (88)

$C_{12}H_{10}N_4O_2$ (242.24)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

hellblau fluoreszierend (366 nm)

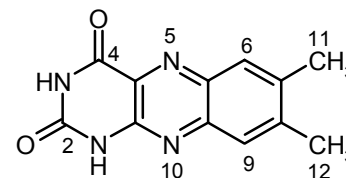
Anfärbeverhalten: gelb (Anis).

$R_f = 0.35$ (KG, $CHCl_3/MeOH$ 9:1).

$R_t = 9.4$ min (LC-MS).

EI-MS: m/z (%) = 242 (100) $[M]^+$, 199 (7) $[M-CHNO]^+$, 171 (57) $[M-C_2HNO_2]^+$, 156 (36) $[M-C_2H_2N_2O_2]^+$.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 219 (4.29), 248 (4.20), 257 (4.19), 338 (3.59), 384 (3.55) nm.



IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3446, 2925, 1734, 1700, 1654$ (sh), 1636, 1577, 1560, 1543, 1488, 1458, 1384, 1362, 1287, 1216, 1105, 1022 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Pyridin- d_5): $\delta = 2.28$ (s, 3H, 11- H_3), 2.34 (s, 3H, 12- H_3), 7.87 (s, 1H, 9-H), 8.05 (s, 1H, 6-H), 13.95 (br s, 2H, 1-NH, 3-NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, Pyridin- d_5): $\delta = 19.8$ (q, C-11), 20.4 (q, C-12), 127.2 (d, C-9), 129.7 (d, C-6), 131.0 (s, C-4a), 139.1 (s, C-5a), 139.9 (s, C-7), 143.1 (s, C-9a), 144.8 (s, C-8), 147.7 (s, C-10a), 151.8 (s, C-2), 162.0 (s, C-4) ppm.

1-(α -Ribofuranosyl)-lumichrom (89)

$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6$ (374.35)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

blau fluoreszierend (366 nm)

Anfärbeverhalten: gelb-grün (Anis).

$R_f = 0.22$ (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1).

$R_t = 8.3$ min (LC-MS).

ESI-MS: $m/z = 375$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 397 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRESI-MS: 375.12972 gefunden wie berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_6$.

$[\alpha]_D^{20} = +319^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 214 (4.45), 254 (4.55), 340 (3.85) nm;

(MeOH, HCl): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 214 (4.44), 254 (4.55), 340 (3.86) nm;

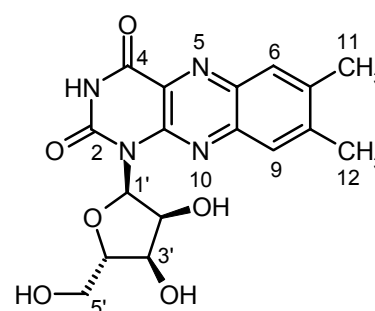
(MeOH, NaOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 219 (4.52), 253 (4.54), 331 (3.95), 383 (3.92) nm.

CD (MeOH): λ_{max} ($[\theta]^{20}$) = 259 (+43864), 240 (-5393), 226 (+7147) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3425, 2923, 1767, 1755, 1693, 1682, 1637, 1623, 1558, 1488, 1461, 1430, 1401, 1355, 1275, 1228, 1192, 1150, 1129, 1039$ cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): $\delta = 2.54$ (s, 6H, 11- H_3 , 12- H_3), 3.69 (dd, $J = 12.5, 4.0$ Hz, 1H, 5'- H_A), 3.91 (dd, $J = 12.5, 2.0$ Hz, 1H, 5'- H_B), 4.18 (dd, $J = 9.0, 5.5$ Hz, 1H, 3'-H), 4.22 (ddd, $J = 9.0, 4.0, 2.0$ Hz, 1H, 4'-H), 5.13 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, 2'-H), 6.61 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, 1'-H), 7.81 (s, 1H, 9-H), 7.93 (s, 1H, 6-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): $\delta = 20.4^{*1}$ (q, C-11), 20.6 *1 (q, C-12), 60.9 (t, C-5'), 71.6 (d, C-3'), 79.4 (d, C-2'), 80.9 (d, C-4'), 89.8 (d, C-1'), 128.1 (d, C-9), 129.2 (d, C-6), 139.7 (s, C-5a), 141.6 (s, C-9a), 142.7 *2 (s, C-4a), 142.8 *2 (s, C-10a), 143.2 (s, C-7), 145.1 (s, C-8), 157.0 (s, C-2), 169.2 (s, C-4) ppm; $^{*1, *2}$ Signale sind jeweils untereinander austauschbar.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.48 (s, 6H, 11- H_3 , 12- H_3), 3.47 (dd, J = 12.5, 4.0 Hz, 1H, 5'- H_A), 3.67 (dd, J = 12.5, 2.0 Hz, 1H, 5'- H_B), 4.01 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 4.68 (br s, 1H, 5'-OH), 5.04 (t, J = 5.5 Hz, 1H, 2'-H), 5.54 (br s, 1H, 3'-OH), 6.41 (d, J = 5.5 Hz, 1H, 1'-H), 7.56 (br s, 1H, 2'-OH), 7.82 (s, 1H, 9-H), 7.90 (s, 1H, 6-H), 8.09 (br s, 1H, 3-NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, DMSO- d_6): δ = 19.8^{*1} (q, C-11), 19.9^{*1} (q, C-12), 59.3 (t, C-5'), 69.6 (d, C-3'), 77.5 (d, C-2'), 79.6 (d, C-4'), 87.8 (d, C-1'), 126.7 (d, C-9), 127.6 (d, C-6), 137.6 (s, C-5a), 139.3 (s, C-9a), 141.2^{*2} (s, C-4a), 141.5^{*2} (s, C-10a), 142.7 (s, C-7), 143.0 (s, C-8), 154.5 (s, C-2), 166.1 (s, C-4) ppm; ^{*1,*2} Signale sind jeweils untereinander austauschbar.

Dehydrorabelomycin (90)

$\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{O}_5$ (320.30)

grau-grüner Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: braun (Anis).

R_f = 0.75 (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 50:1).

R_t = 21.1 min (LC-MS).

EI-MS: m/z (%) = 320 (100) $[\text{M}]^+$.

HREI-MS: 320.0685 gefunden wie berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{O}_5$.

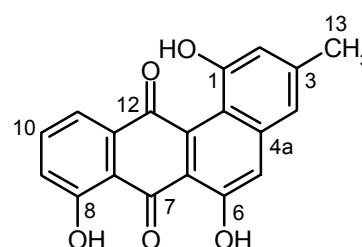
UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 233 (4.54), 267 (sh), 323 (4.12), 453 (3.83) nm;

(MeOH, HCl): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 233 (4.50), 268 (sh), 324 (4.06), 452 (3.78) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 235 (4.49), 309 (4.08), 554 (3.83) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3430, 2921, 1650 (sh), 1636, 1608, 1542, 1481, 1457, 1413, 1380, 1359, 1308, 1269, 1215, 1166, 1099, 1079 cm^{-1} .

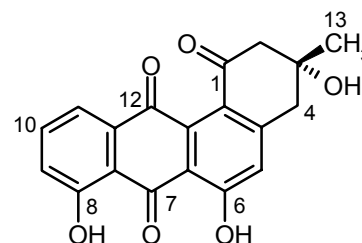
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 2.40 (s, 3H, 13- H_3), 6.88 (d, J = 1.0 Hz, 1H, 2-H), 7.02 (br s, 1H, 4-H), 7.30 (dd, J = 8.5, 1.0 Hz, 1H, 9-H), 7.58 (s, 1H, 5-H), 7.68 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 10-H), 7.80 (dd, J = 7.5, 1.0 Hz, 1H, 11-H), 10.28 (s, 1H, OH, 1-OH), 11.72^{*} (s, 1H, 6-OH), 12.06^{*} (s, 1H, 8-OH) ppm; ^{*} Signale sind untereinander austauschbar.



Rabelomycin (91)**C₁₉H₁₄O₆** (338.32)

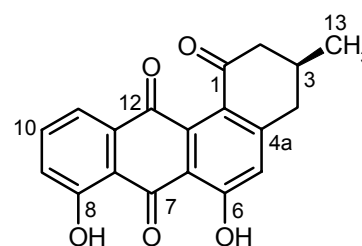
gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: braun (Anis).**R_f** = 0.75 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).**R_t** = 13.5 min (LC-MS).**EI-MS:** m/z (%) = 338 (12) [M]⁺, 320 (20) [M-H₂O]⁺, 310 (58) [M-CO]⁺, 295 (18) [M-C₂H₃O]⁺, 292 (12) [M-CO-H₂O]⁺, 280 (100) [M-C₃H₆O]⁺.**HREI-MS:** 338.0786 gefunden wie berechnet für C₁₉H₁₄O₆.**[α]_D²⁰** = -71° (c = 0.1, CHCl₃).**UV** (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 228 (4.41), 266 (4.43), 429 (3.88) nm;(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 228 (4.39), 266 (4.41), 429 (3.87) nm;(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 217 (4.24), 257 (4.39), 323 (3.91), 498 (3.77) nm.**CD** (MeOH): λ_{max} ([θ]²⁰) = 380 (br, -2308), 294 (-10367), 262 (-9457), 240 (-7434), 216 (+8903) nm.**IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3428, 2924, 1696, 1685 (sh), 1674, 1631, 1600, 1560, 1458, 1374, 1287, 1257, 1207, 1166, 1127, 1097, 1074, 1054 cm⁻¹.**¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ = 1.46 (s, 3H, 13-H₃), 2.05 (s, 1H, 3-OH), 2.93 (d, J = 15.0 Hz, 1H, 4-H_A), 3.00 (d, J = 15.0 Hz, 1H, 4-H_B), 3.05 (s, 2H, 2-H₂), 6.96 (s, 1H, 5-H), 7.22 (dd, J = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 9-H), 7.62 (dd, J = 7.5, 1.0 Hz, 1H, 11-H), 7.65 (dd, J = 8.0, 7.5 Hz, 1H, 10-H), 11.62* (s, 1H, 6-OH), 12.26* (s, 1H, 8-OH) ppm; * Signale sind untereinander austauschbar.**3-Desoxyrabelomycin (92)****C₁₉H₁₄O₅** (322.32)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: violett (Anis).**R_f** = 0.70 (KG, CHCl₃/MeOH 50:1).**R_t** = 17.1 min (LC-MS).**EI-MS:** m/z (%) = 322 (44) [M]⁺, 307 (6) [M-CH₃]⁺, 294 (56) [M-CO]⁺, 280 (100) [M-C₃H₆]⁺.

HREI-MS: 322.0849 gefunden wie berechnet für C₁₉H₁₄O₅.

$[\alpha]_D^{20} = +101^\circ$ (c = 0.1, CHCl₃).

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 227 (4.18), 265 (4.20), 429 (3.65) nm;

(MeOH, HCl): λ_{\max} (lg ϵ) = 227 (4.24), 266 (4.28), 430 (3.74) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 257 (4.21), 321 (3.76), 496 (3.62) nm.

CD (MeOH): λ_{\max} ($[\theta]^{20}$) = 439 (br, -3003), 366 (br, +5907), 298 (+12158), 266 (-7613), 244 (+5698), 215 (-11529) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3442, 2920, 1733, 1716$ (sh), 1701, 1684, 1670, 1653, 1635, 1599, 1576, 1559, 1542, 1523, 1506, 1458, 1419, 1373, 1350, 1291, 1270, 1209 cm⁻¹.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.16$ (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 13-H₃), 2.39 (m, 1H, 3-H), 2.47 (dd, $J = 16.0, 11.0$ Hz, 1H, 2-H_A), 2.59 (ddd, $J = 16.5, 11.0, 1.0$ Hz, 1H, 4-H_A), 2.89 (ddd, $J = 16.5, 4.0, 1.5$ Hz, 1H, 4-H_B), 2.95 (ddd, $J = 16.0, 5.0, 2.0$ Hz, 1H, 2-H_B), 6.97 (s, 1H, 5-H), 7.24 (dd, $J = 6.0, 3.5$ Hz, 1H, 9-H), 7.65 (m, 2H, 10-H, 11-H), 11.68* (s, 1H, 6-OH), 12.28* (s, 1H, 8-OH) ppm; * Signale sind untereinander austauschbar.

Galtamycinon (93)

C₂₅H₂₂O₈ (450.44)

roter Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rot-violett (Anis).

R_f = 0.37 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

R_t = 20.9 min (LC-MS).

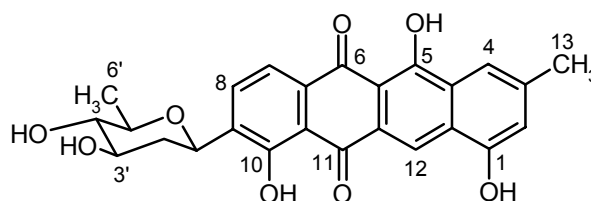
ESI-MS: m/z = 449 [M-H]⁻.

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 251 (sh), 265 (4.69), 290 (sh), 303 (sh), 494 (4.14) nm;

(MeOH, HCl): λ_{\max} (lg ϵ) = 252 (sh), 264 (4.67), 293 (4.09), 302 (sh), 492 (4.14) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 274 (4.71), 384 (3.79), 588 (4.11) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3422, 2922, 2856, 1651, 1635, 1617, 1577, 1561, 1541, 1526, 1471, 1456, 1434, 1388, 1320, 1285, 1257, 1180, 1145, 1084, 1059, 1028, 1004$ cm⁻¹.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Pyridin- d_5): δ = 1.74 (d, J = 6.0 Hz, 3H, 6'-H₃), 1.96 (q, J = 12.0 Hz, 1H, 2'-H_A), 2.36 (s, 3H, 13-H₃), 2.97 (ddd, J = 12.0, 5.0, 1.5 Hz, 1H, 2'-H_B), 3.71 (t, J = 8.5 Hz, 1H, 4'-H), 3.88 (m, 1H, 5'-H), 4.32 (m, 1H, 3'-H), 5.24 (br d, J = 11.0 Hz, 1H, 1'-H), 7.18 (br d, J = 1.0 Hz, 1H, 2-H), 7.93 (br s, 1H, 4-H), 8.05 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 7-H), 8.12 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 8-H), 9.20 (s, 1H, 12-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, Pyridin- d_5): δ = 19.0 (q, C-6'), 22.2 (q, C-13), 41.1 (t, C-2'), 72.2 (d, C-1'), 73.5 (d, C-3'), 77.5 (d, C-5'), 78.7 (d, C-4'), 109.9 (s, C-5a), 115.5 (d, C-4), 116.9 (s, C-10a), 117.1 (d, C-2), 118.0 (d, C-12), 118.9 (d, C-7), 125.9 (s, C-12a), 126.4 (s, C-11a), 129.9 (s, C-4a), 133.3 (s, C-6a), 133.4 (d, C-8), 138.6 (s, C-9), 142.1 (s, C-3), 157.7 (s, C-1), 159.6 (s, C-10), 164.0 (s, C-5), 187.0 (s, C-6), 188.4 (s, C-11) ppm.

Metabolit 6368J (97)

$\text{C}_{44}\text{H}_{52}\text{O}_{16}$ (836.57)

roter Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: violett (Anis).

R_f = 0.68 (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1).

R_t = 22.6 min (LC-MS).

ESI-MS: m/z = 835 $[\text{M-H}]^-$.

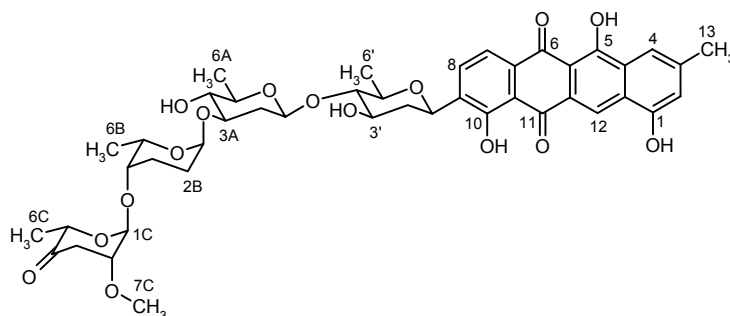
HRESI-MS: 835.31881 gefunden wie berechnet für $\text{C}_{44}\text{H}_{51}\text{O}_{16}$.

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 251 (sh), 264 (4.31), 296 (sh), 303 (sh), 490 (3.70) nm;

(MeOH, HCl): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 250 (sh), 264 (4.22), 290 (sh), 303 (sh), 484 (3.61) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 274 (4.42), 384 (3.43), 584 (3.81) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3428, 2926, 1724, 1708, 1687, 1662 (sh), 1655, 1637, 1616, 1610, 1561 (sh), 1458, 1384, 1283, 1261, 1207, 1114, 1086, 1040, 1015 cm^{-1} .



$^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.9$ (C-6C), 16.1 (C-6B), 17.2 (C-6A), 18.6 (C-6'), 22.2 (C-13), 24.5^{*1} (C-3B), 24.6^{*1} (C-2B), 32.2 (C-3C), 38.4 (C-2A), 39.8 (C-2'), 57.1 (C-7C), 64.5^{*2} (C-2C), 66.8^{*2} (C-5C), 67.2 (C-5B), 71.2^{*3} (C-1'), 71.4^{*3} (C-3'), 72.0^{*3} (C-5A), 74.3 (C-5'), 75.6 (C-4B), 78.9^{*4} (C-3A), 79.1^{*4} (C-4A), 89.5 (C-4'), 99.6^{*5} (C-1B), 100.0^{*5} (C-1C), 100.6^{*5} (C-1A), 109.3 (C-5a), 116.6 (C-4, C-10a), 116.8 (C-2), 118.8 (C-12), 124.6 (C-7), 126.2 (C-12a), 127.4 (C-11a), 129.1 (C-4a), 132.9 (C-6a), 137.0 (C-8), 141.3 (C-9), 142.9 (C-3), 154.1 (C-1), 159.4 (C-10), 163.2 (C-5), 186.9 (C-6), 187.9 (C-11), 207.6 (C-4C) ppm; *1,*2,*3,*4,*5 Signale sind jeweils untereinander austauschbar; Zuordnung der Zuckersignale über Vergleich mit Literaturdaten (siehe Kapitel A.III.3.4., Tabellen 8 und 9); Zuordnung der Signale des Grundgerüsts über Vergleich mit **93**.

Metabolit 6368C2 (100)

$\text{C}_{74}\text{H}_{106}\text{O}_{30}$ (1475.63)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: violett (Anis).

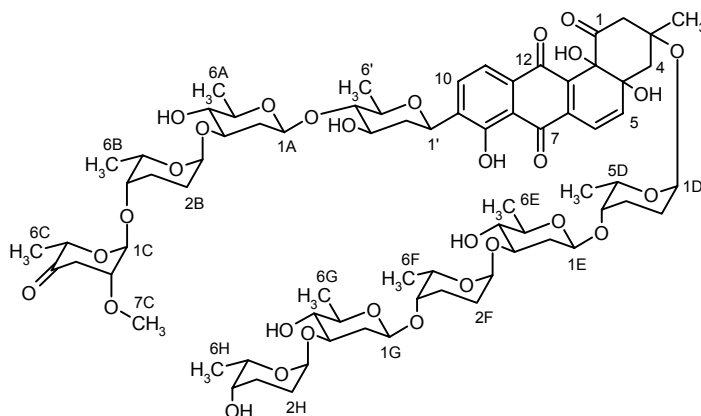
$R_f = 0.59$ (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1).

$R_t = 18.1$ min (LC-MS).

ESI-MS: $m/z = 1497$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CDCl_3): **Aglykon:** $\delta = 25.5$ (C-13), 44.7 (C-4), 50.1 (C-2), 77.4 (C-12b), 79.9 (C-4a), 82.3 (C-3), 113.9 (C-7a), 117.4 (C-6), 119.6 (C-11), 130.4 (C-11a), 133.3 (C-10), 138.1 (C-9), 138.7^{*} (C-6a), 138.8^{*} (C-12a), 145.5 (C-5), 157.9 (C-8), 182.1 (C-12), 188.1 (C-7), 204.8 (C-1) ppm; * Signale sind untereinander austauschbar; Zuordnung der Signale durch Vergleich mit Saquayamycin B (**101**);

Tetrasaccharidkette: $\delta = 16.0$ (C-6B), 16.9 (C-6C), 17.5 (C-6A), 18.4 (C-6'), 24.5^{*1} (C-3B), 24.6^{*1} (C-2B), 32.1 (C-3C), 38.6 (C-2A), 39.7 (C-2'), 57.0 (C-7C), 64.5^{*2} (C-2C), 66.7^{*2} (C-5C), 67.1 (C-5B), 70.9^{*3} (C-1'), 71.1^{*3} (C-3'), 71.9 (C-5A), 74.2 (C-5'), 75.5 (C-4B), 78.8^{*4} (C-3A), 79.0^{*4} (C-4A), 89.5 (C-4'), 99.5^{*5} (C-1B), 100.0^{*5} (C-1C), 100.5^{*5} (C-1A), 207.5 (C-4C) ppm; *1,*2,*3,*4,*5 Signale sind jeweils untereinander austauschbar; Zuordnung der Signale in Anlehnung an **97**;



Pentasaccharidkette: $\delta = 16.9$ (C-6D, C-6F), 17.1 (C-6H), 18.0 (C-6E, C-6G), 24.0 (C-3H), 24.4 (C-2H), 24.6 (C-3D), 25.0 (C-2D), 25.2 (C-3F), 25.5 (C-2F), 36.9 (C-2E), 37.1 (C-2G), 67.0 (C-5H), 67.1 (C-4H), 67.4 (C-5D, C-5F), 71.7 (C-5E, C-5G), 75.5 (C-4D), 75.6 (C-3E, C-4F), 75.8 (C-3G), 80.5 (C-4E), 80.8 (C-4G), 92.6 (C-1H), 97.2 (C-1D), 97.5 (C-1F), 101.2 (C-1E), 101.4 (C-1G) ppm; Zuordnung der Zuckersignale über Vergleich mit Literaturdaten (siehe Kapitel A.III.3.4., Tabellen 8 und 9); Signale mit ähnlicher Verschiebung sind jeweils untereinander austauschbar.

Metabolit 6368A2 (103)

C₁₈H₁₆O₆ (328.32)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: orange-gelb (Anis).

R_f = 0.54 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

R_t = 10.0 min (LC-MS).

ESI-MS: $m/z = 329$ [M+H]⁺, 351 [M+Na]⁺.

HRESI-MS: 329.10259 gefunden wie berechnet für C₁₈H₁₇O₆.

[α]_D²⁰ = +54° (c = 0.1, MeOH).

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 215 (4.18), 268 (4.29), 303 (sh), 328 (sh) nm;

(MeOH, HCl): λ_{\max} (lg ϵ) = 215 (4.13), 267 (4.28), 307 (sh), 337 (sh) nm;

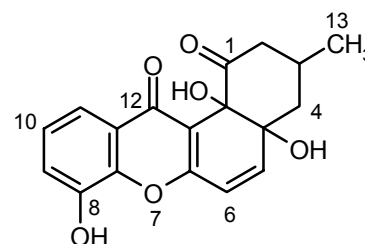
(MeOH, NaOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 224 (4.20), 242 (sh), 283 (4.26), 377 (3.20) nm.

CD (MeOH): λ_{\max} ($[\theta]^{20}$) = 348 (+7656), 309 (-11146), 268 (-35325), 219 (+59865) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3408, 2959, 1717, 1640, 1616, 1593, 1561, 1494, 1430, 1360, 1294, 1273, 1223, 1180, 1122, 1056, 1044$ cm⁻¹.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.97$ (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 13-H₃), 1.57 (dd, $J = 14.0, 11.5$ Hz, 1H, 4-H_A), 1.97 (dt, $J = 14.0, 3.0$ Hz, 1H, 4-H_B), 2.20 (m, 1H, 3-H), 2.29 (dd, $J = 12.5, 11.0$ Hz, 1H, 2-H_A), 2.54 (dt, $J = 11.0, 2.5$ Hz, 1H, 2-H_B), 6.47 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, 6-H), 6.52 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, 5-H), 7.20 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H, 9-H), 7.24 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, 10-H), 7.47 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H, 11-H) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 21.8$ (q, C-13), 31.4 (d, C-3), 43.6 (t, C-4), 47.4 (t, C-2), 78.4 (s, C-12b), 80.4 (s, C-4a), 116.0 (d, C-11), 117.8 (s, C-12a), 120.4 (d, C-6), 120.7 (d, C-9), 126.0 (s, C-11a), 126.9 (d, C-10), 146.3 (s, C-7a), 148.2 (s, C-8), 150.7 (d, C-5), 162.1 (s, C-6a), 176.8 (s, C-12), 209.3 (s, C-1) ppm.



¹H-NMR (600 MHz, Pyridin-d₅): δ = 0.95 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 13-H₃), 1.77 (dd, J = 14.0, 12.0 Hz, 1H, 4-H_A), 2.15 (dt, J = 14.0, 3.0 Hz, 1H, 4-H_B), 2.61 (m, 1H, 3-H), 2.69 (dd, J = 13.0, 12.0 Hz, 1H, 2-H_A), 2.92 (dt, J = 12.0, 3.0 Hz, 1H, 2-H_B), 6.29 (d, J = 10.0 Hz, 1H, 6-H), 6.69 (d, J = 10.0 Hz, 1H, 5-H), 7.29 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 10-H), 7.45 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H, 9-H), 7.90 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H, 11-H) ppm.

¹³C-NMR (150.8 MHz, Pyridin-d₅): δ = 21.5 (q, C-13), 30.5 (d, C-3), 43.2 (t, C-4), 47.0 (t, C-2), 78.1 (s, C-12b), 79.6 (s, C-4a), 115.2 (d, C-11), 118.0 (s, C-12a), 119.3 (d, C-6), 120.1 (d, C-9), 125.8 (d, C-10), 125.9 (s, C-11a), 145.8 (s, C-7a), 148.4 (s, C-8), 150.4 (d, C-5), 160.2 (s, C-6a), 175.2 (s, C-12), 208.0 (s, C-1) ppm.

Metabolit 6368A2Br (105)

Zu einer Lösung von **103** (32.0 mg, 0.097 mmol, 1.0 Äq.) in 4.0 mL Dichlormethan (p.A.) und 0.5 mL THF (p.A.) wurden *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidhydrochlorid (20.0 mg, 0.1067 mmol, 1.1 Äq.), 4-(Dimethylamino)pyridin (1.8 mg, 0.015 mmol, 0.15 Äq.) und 2-Brombenzoesäure (21.4 mg, 0.1067 mmol, 1.1 Äq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde drei Stunden gerührt und die Reaktion durch Zugabe von 0.5 mL Wasser beendet. Anschließend wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und es konnte **105** nach Chromatographie an Sephadex[®] LH-20 (CH₂Cl₂) und Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) in einer Ausbeute von 38.5 mg (0.075 mmol, 78 %) erhalten werden.

C₂₅H₁₉O₇Br (511.32)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

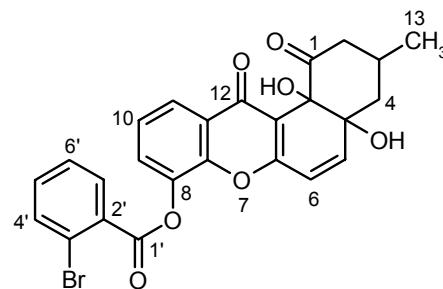
Anfärbeverhalten: rot-violett (Anis).

R_f = 0.65 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

DCI-MS: m/z = 528 [C₂₅H₁₉O₇⁷⁹Br+NH₄]⁺, 530 [C₂₅H₁₉O₇⁸¹Br+NH₄]⁺.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.03 (d, J = 6.0 Hz, 3H, 13-H₃), 1.56 (m, 1H, 4-H_A), 2.08 (m, 1H, 4-H_B), 2.30 (m, 2H, 2-H_A, 3-H), 2.76 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 2-H_B), 3.15 (d, J = 2.5 Hz, 1H, 4a-OH), 5.07 (s, 1H, 12b-OH), 6.28 (d, J = 10.0 Hz, 1H, 6-H), 6.45 (d, J = 10.0 Hz, 1H, 5-H), 7.47 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 10-H), 7.51 (m, 2H, 5'-H, 6'-H), 7.61 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H, 9-H), 7.81* (m, 1H, 4'-H), 8.07 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H, 11-H), 8.13* (m, 1H, 7'-H) ppm;

* Signale sind untereinander austauschbar; Spektrum wurde in Analogie zu **103** ausgewertet.



IV. Charakterisierung der Pflanzenmetaboliten

1. *Centranthus longiflorus* ssp. *longiflorus* (Valerianaceae)

Coniferin (117)

$C_{16}H_{22}O_8$ (342.35)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: violett (Vanillin).

$R_f = 0.30$ (KG, $CHCl_3/MeOH/H_2O$ 80:20:2).

ESI-MS: $m/z = 365 [M+Na]^+$, $707 [2M+Na]^+$.

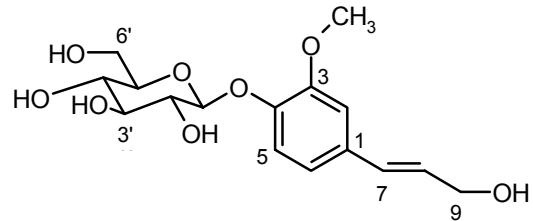
$[\alpha]_D^{20} = -55^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 257 (4.13), 292 (sh) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3422, 2924, 1735, 1719, 1650, 1635, 1622$ (sh), 1561, 1543, 1513, 1458, 1420, 1404, 1383, 1263, 1228, 1077 cm^{-1} .

1H -NMR (300 MHz, CD_3OD): $\delta = 3.40$ (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 3.48 (m, 2H, 2'-H, 5'-H), 3.67 (m, 1H, 6'-H_A), 3.86 (m, 1H, 6'-H_B), 3.87 (s, 3H, 3-OCH₃), 4.20 (dd, $J = 6.0, 1.0$ Hz, 2H, 9-H₂), 4.88* (1H, 1'-H), 6.27 (dt, $J = 16.0, 6.0$ Hz, 1H, 8-H), 6.54 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, 7-H), 6.94 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H, 6-H), 7.07 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 2-H), 7.10 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 5-H) ppm; * δ -Wert wurde aus einem HSQC-Spektrum ermittelt.

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CD_3OD): $\delta = 56.7$ (q, 3-OCH₃), 62.5 (t, C-6'), 63.7 (t, C-9), 71.3 (d, C-4'), 74.9 (d, C-2'), 77.8 (d, C-5'), 78.2 (d, C-3'), 102.7 (d, C-1'), 111.3 (d, C-2), 117.9 (d, C-5), 120.7 (d, C-6), 128.9 (d, C-8), 131.3 (d, C-7), 133.7 (s, C-1), 147.6 (s, C-4), 150.9 (C-3) ppm.



Isoconiferinosid (118)

$C_{22}H_{32}O_{13}$ (504.49)

weißer Feststoff

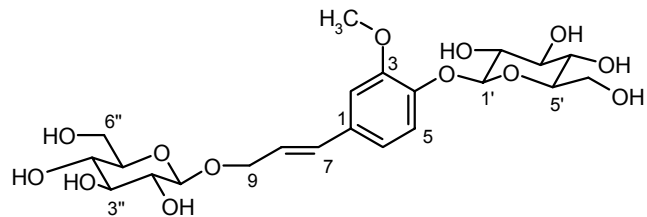
UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Vanillin).

$R_f = 0.08$ (KG, $CHCl_3/MeOH/H_2O$ 80:20:2).

ESI-MS: $m/z = 527 [M+Na]^+$, $1031 [2M+Na]^+$.

$[\alpha]_D^{20} = -61^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH).



UV (MeOH): λ_{\max} ($\lg \epsilon$) = 258 (4.19), 291 (sh) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3417, 2923, 1650, 1636, 1512, 1455, 1420, 1382, 1265, 1226, 1076, 1027 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 3.07 (m, 5H, 4'-H, 5'-H, 2''-H, 4''-H, 5''-H), 3.27 (m, 3H, 2'-H, 3'-H, 3''-H), 3.44 (m, 2H, 6'-H₂), 3.66 (m, 2H, 6''-H₂), 3.77 (s, 3H, 3-OCH₃), 4.17 (dd, J = 13.0, 6.5 Hz, 1H, 9-H_A), 4.19 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1''-H), 4.40 (dd, J = 13.0, 5.5 Hz, 1H, 9-H_B), 4.88 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 1'-H), 6.26 (dt, J = 16.0, 6.0 Hz, 1H, 8-H), 6.57 (d, J = 16.0 Hz, 1H, 7-H), 6.90 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H, 6-H), 7.02 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 5-H), 7.06 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 2-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ = 55.7 (q, 3-OCH₃), 60.7 (t, C-6'), 61.2 (t, C-6''), 68.8 (t, C-9), 69.7 (d, C-4'), 70.2 (d, C-4''), 73.2 (d, C-2'), 73.6 (d, C-2''), 77.0 (d, C-3', C-5', C-3'', C-5''), 100.0 (d, C-1'), 102.2 (d, C-1''), 109.9 (d, C-2), 115.2 (d, C-5), 119.4 (d, C-6), 124.6 (d, C-8), 130.7 (s, C-1), 131.4 (d, C-7), 146.3 (s, C-4), 149.1 (s, C-3) ppm.

Kanokosid A (120)

C₂₁H₃₂O₁₂ (476.48)

weißer Feststoff

Anfärbeverhalten: braun (Vanillin).

R_f = 0.25 (KG, CHCl₃/MeOH/H₂O 80:20:2).

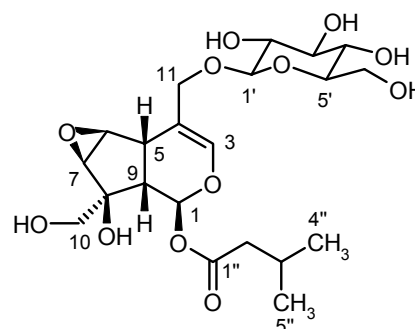
ESI-MS: m/z = 499 [M+Na]⁺, 975 [2M+Na]⁺.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -137° (c = 0.1, MeOH).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3408, 2958, 2873, 1738, 1673, 1635, 1462, 1370, 1256, 1199, 1152, 1078, 1041 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD₃OD): δ = 0.94 (d, J = 7.0 Hz, 6H, 4''-H₃, 5''-H₃), 2.01 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 2.03 (m, 1H, 3''-H), 2.17 (m, 2H, 2''-H₂), 3.07 (dd, J = 8.5, 1.5 Hz, 1H, 5-H), 3.20 (dd, J = 9.0, 8.0 Hz, 1H, 2''-H), 3.27 (m, 2H, 4''-H, 5''-H), 3.35 (d, J = 2.5 Hz, 1H, 7-H), 3.36 (m, 1H, 3''-H), 3.65 (m, 1H, 6''-H_A), 3.68 (d, J = 4.0 Hz, 2H, 10-H₂), 3.88 (dd, J = 11.5, 1.5 Hz, 1H, 6''-H_B), 4.03 (d, J = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 4.24 (d, J = 11.5 Hz, 1H, 11-H_A), 4.34 (d, J = 11.5 Hz, 1H, 11-H_B), 4.39 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1''-H), 6.39 (s, 1H, 1-H), 6.41 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 3-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 22.6 (q, C-4'', C-5''), 26.8 (d, C-3''), 35.4 (d, C-5), 43.4 (d, C-9), 44.1 (t, C-2''), 59.7 (d, C-6), 60.2 (d, C-7), 62.9 (t, C-6'), 67.0 (t, C-10), 69.5 (t, C-11), 71.8 (d, C-4'), 75.1 (d, C-2'), 78.0 (d, C-5'), 78.2 (d, C-3'), 80.1 (s, C-8), 90.6 (d, C-1), 102.1 (d, C-1'), 109.2 (s, C-4), 142.6 (d, C-3), 173.0 (s, C-1'') ppm.



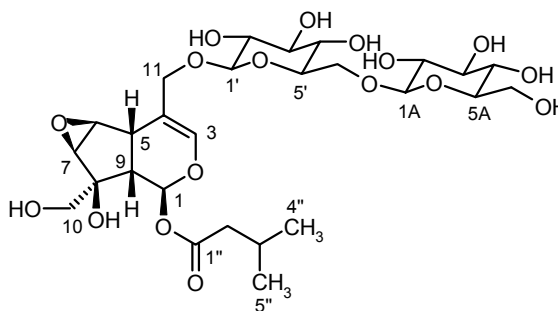
Kanokosid C (121)**C₂₇H₄₂O₁₇** (638.62)

weißer Feststoff

Anfärbeverhalten: braun (Vanillin).**R_f** = 0.07 (KG, CHCl₃/MeOH/H₂O 80:20:2).**ESI-MS:** m/z = 661 [M+Na]⁺, 1299 [2M+Na]⁺.**[α]_D²⁰** = -123° (c = 0.1, MeOH).**IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3421, 2929, 1738, 1675, 1635, 1461, 1415, 1372, 1258, 1075, 1040 cm⁻¹.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.94 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, 4''-H₃, 5''-H₃), 2.01 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 2.03 (m, 1H, 3''-H), 2.17 (m, 2H, 2''-H₂), 3.07 (dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, 1H, 5-H), 3.21 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 2H, 2'-H, 2A-H), 3.28 (m, 3H, 4'-H, 4A-H, 5A-H), 3.35 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 7-H), 3.35 (m, 2H, 3'-H, 3A-H), 3.47 (ddd, *J* = 9.5, 6.0, 2.5 Hz, 1H, 5'-H), 3.66 (m, 1H, 6A-H_A), 3.68 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H, 10-H₂), 3.77 (dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H, 6'-H_A), 3.86 (dd, *J* = 12.0, 2.0 Hz, 1H, 6A-H_B), 4.05 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 4.15 (dd, *J* = 12.0, 2.0 Hz, 1H, 6'-H_B), 4.24 (dd, *J* = 11.5, 6.0 Hz, 1H, 11-H_A), 4.33 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, 11-H_B), 4.39 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, 1A-H), 4.40 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, 1'-H), 6.39 (s, 1H, 1-H), 6.44 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 3-H) ppm.

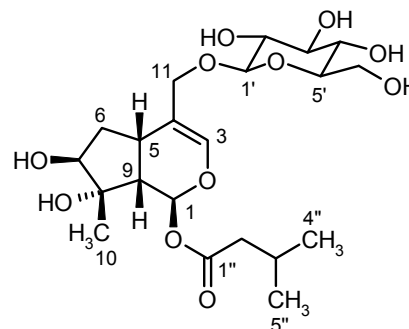
¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD): δ = 22.6 (q, C-4'', C-5''), 26.8 (d, C-3''), 35.4 (d, C-5), 43.3 (d, C-9), 44.1 (t, C-2''), 59.7 (d, C-6), 60.2 (d, C-7), 62.7 (t, C-6A), 67.0 (t, C-10), 69.6 (t, C-11), 70.1 (t, C-6'), 71.6^{*1} (d, C-4'), 71.7^{*1} (d, C-4A), 75.0^{*2} (d, C-2'), 75.1^{*2} (d, C-2A), 77.0 (d, C-5'), 78.0 (d, C-3', C-3A, C-5A), 80.1 (s, C-8), 90.5 (d, C-1), 102.0 (d, C-1'), 105.0 (d, C-1A), 109.1 (s, C-4), 142.8 (d, C-3), 173.0 (s, C-1'') ppm; ^{*1,*2} Signale sind jeweils untereinander austauschbar.

**Valerosidatum (122)****C₂₁H₃₄O₁₁** (462.49)

weißer Feststoff

Anfärbeverhalten: braun (Vanillin).**R_f** = 0.23 (KG, CHCl₃/MeOH/H₂O 80:20:2).**ESI-MS:** m/z = 485 [M+Na]⁺, 947 [2M+Na]⁺.**[α]_D²⁰** = -60° (c = 0.1, MeOH).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3402, 2929, 1737, 1667, 1635, 1606 (sh), 1559, 1458, 1382, 1292, 1259, 1196, 1148, 1077, 1043 cm⁻¹.



¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 0.96 (d, J = 7.0 Hz, 6H, 4''-H₃, 5''-H₃), 1.36 (s, 3H, 10-H₃), 1.98 (m, 2H, 6-H₂), 2.08 (m, 1H, 3''-H), 2.21 (d, J = 6.0 Hz, 2H, 2''-H₂), 2.24 (dd, J = 10.5, 4.0 Hz, 1H, 9-H), 3.01 (m, 1H, 5-H), 3.18 (dd, J = 9.0, 8.0 Hz, 1H, 2'-H), 3.26 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 3.34 (m, 1H, 3'-H), 3.65 (m, 1H, 6'-H_A), 3.75 (t, J = 3.5 Hz, 1H, 7-H), 3.86 (dd, J = 11.0, 1.5 Hz, 1H, 6'-H_B), 4.08 (d, J = 11.5 Hz, 1H, 11-H_A), 4.25 (d, J = 11.5 Hz, 1H, 11-H_B), 4.28 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 6.16 (d, J = 4.0 Hz, 1H, 1-H), 6.32 (br s, 1H, 3-H) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 22.7 (q, C-4'', C-5''), 22.9 (q, C-10), 26.8 (d, C-3''), 32.1 (d, C-5), 38.1 (t, C-6), 44.3 (t, C-2''), 48.3 (d, C-9), 62.8 (t, C-6'), 70.0 (t, C-11), 71.7 (d, C-4'), 75.2 (d, C-2'), 77.9 (d, C-5'), 78.1 (d, C-3'), 81.0 (d, C-7), 82.3 (s, C-8), 91.9 (d, C-1), 103.6 (d, C-1'), 117.0 (s, C-4), 139.6 (d, C-3), 173.3 (s, C-1'') ppm.

4'-Desoxykanokosid A (123)

C₂₁H₃₂O₁₁ (460.48)

weißer Feststoff

Anfärbeverhalten: braun (Vanillin).

R_f = 0.36 (KG, CHCl₃/MeOH/H₂O 80:20:2).

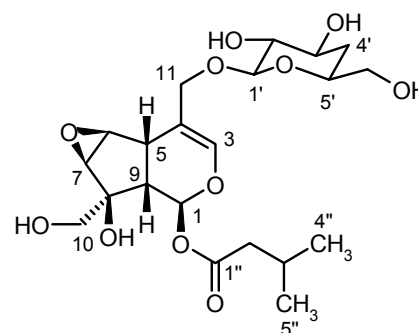
ESI-MS: m/z = 483 [M+Na]⁺, 943 [2M+Na]⁺.

[α]_D²⁰ = -122° (c = 0.1, MeOH).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3409, 2958, 2929, 1734, 1675, 1631, 1461, 1374, 1259, 1065 cm⁻¹.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.93 (d, J = 7.0 Hz, 6H, 4''-H₃, 5''-H₃), 1.35 (dt, J = 12.5, 11.0 Hz, 1H, 4'-H_A), 1.91 (ddd, J = 12.5, 5.5, 2.0 Hz, 1H, 4'-H_B), 2.01 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 9-H), 2.03 (m, 1H, 3''-H), 2.17 (m, 2H, 2''-H₂), 3.07 (dd, J = 8.5, 1.5 Hz, 1H, 5-H), 3.10 (dd, J = 9.0, 8.0 Hz, 1H, 2'-H), 3.35 (d, J = 2.5 Hz, 1H, 7-H), 3.53 (m, 1H, 5'-H), 3.56 (br s, 2H, 6'-H₂), 3.60 (m, 1H, 3'-H), 3.68 (d, J = 4.0 Hz, 2H, 10-H₂), 4.03 (d, J = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 4.22 (d, J = 11.5 Hz, 1H, 11-H_A), 4.32 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.33 (d, J = 11.5 Hz, 1H, 11-H_B), 6.39 (br s, 1H, 1-H), 6.40 (br s, 1H, 3-H) ppm.

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD): δ = 22.6 (q, C-4'', C-5''), 26.8 (d, C-3''), 35.4 (d, C-5), 36.5 (t, C-4'), 43.4 (d, C-9), 44.1 (t, C-2''), 59.7 (d, C-6), 60.1 (d, C-7), 65.6 (t, C-6'), 67.0 (t, C-10), 69.5 (t, C-11), 72.3 (d, C-3'), 73.9 (d, C-5'), 76.9 (d, C-2'), 80.1 (s, C-8), 90.5 (d, C-1), 102.5 (d, C-1'), 109.3 (s, C-4), 142.5 (d, C-3), 173.0 (s, C-1'') ppm.



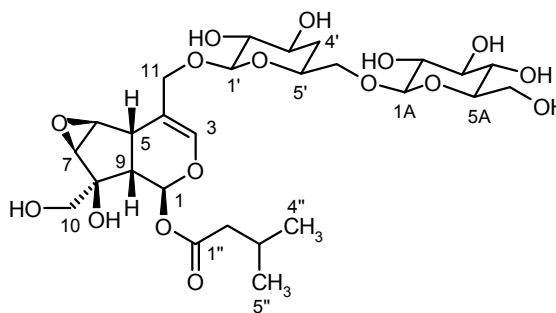
4'-Desoxykanokosid C (124)**C₂₇H₄₂O₁₆** (622.62)

weißer Feststoff

Anfärbeverhalten: braun (Vanillin).**R_f** = 0.06 (KG, CHCl₃/MeOH/H₂O 80:20:2).**ESI-MS:** m/z = 645 [M+Na]⁺, 1267 [2M+Na]⁺.**[α]_D²⁰** = -107° (c = 0.1, MeOH).**IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3405, 2927, 1735, 1671, 1650, 1635, 1459, 1382, 1260, 1072 cm⁻¹.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.94 (d, *J* = 7.5 Hz, 6H, 4''-H₃, 5''-H₃), 1.38 (dt, *J* = 12.5, 11.5 Hz, 1H, 4'-H_A), 1.94 (ddd, *J* = 12.5, 5.5, 1.5 Hz, 1H, 4'-H_B), 2.01 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 2.03 (m, 1H, 3''-H), 2.17 (m, 2H, 2''-H₂), 3.07 (dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, 1H, 5-H), 3.11 (dd, *J* = 9.0, 7.5 Hz, 1H, 2'-H), 3.19 (dd, *J* = 9.0, 7.5 Hz, 1H, 2A-H), 3.27 (m, 2H, 4A-H, 5A-H), 3.34 (m, 1H, 3A-H), 3.35 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 7-H), 3.59 (m, 1H, 3'-H), 3.66 (dd, *J* = 12.0, 5.5 Hz, 1H, 6A-H_A), 3.68 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H, 10-H₂), 3.68 (m, 1H, 6'-H_A), 3.75 (m, 1H, 5'-H), 3.82 (m, 1H, 6'-H_B), 3.86 (dd, *J* = 12.0, 1.5 Hz, 1H, 6A-H_B), 4.05 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 4.22 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, 11-H_A), 4.33 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, 11-H_B), 4.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 1A-H), 6.39 (s, 1H, 1-H), 6.43 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 3-H) ppm.

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD): δ = 22.6 (q, C-4'', C-5''), 26.8 (d, C-3''), 35.5 (d, C-5), 36.7 (t, C-4'), 43.4 (d, C-9), 44.1 (t, C-2''), 59.7 (d, C-6), 60.2 (d, C-7), 62.8 (t, C-6A), 67.0 (t, C-10), 69.6 (t, C-11), 71.6 (d, C-4A), 72.2 (d, C-3'), 72.6 (t, C-6'), 72.8 (d, C-5'), 75.1 (d, C-2A), 76.9 (d, C-2'), 78.0* (d, C-5A), 78.1* (d, C-3A), 80.1 (s, C-8), 90.6 (d, C-1), 102.5 (d, C-1'), 104.9 (d, C-1A), 109.2 (s, C-4), 142.7 (d, C-3), 173.0 (s, C-1'') ppm; * Signale sind untereinander austauschbar.



2. *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae)

Isoorientin (125)

$C_{21}H_{20}O_{11}$ (448.38)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: gelb (Vanillin).

$R_f = 0.51$ (KG, EtOAc/MeOH/H₂O 100:17:13).

ESI-MS: $m/z = 449 [M+H]^+$, $471 [M+Na]^+$.

$[\alpha]_D^{20} = +26^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 213 (4.47), 257 (sh), 270 (4.15), 348 (4.30) nm;

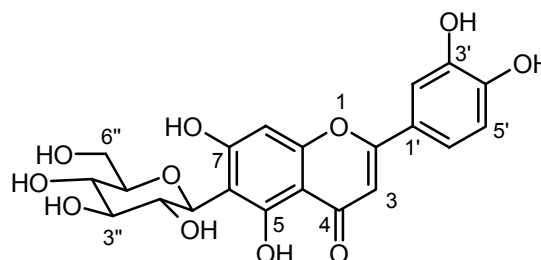
(MeOH, HCl): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 211 (4.52), 257 (4.20), 270 (4.21), 348 (4.31) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 218 (4.42), 235 (sh), 267 (4.29), 275 (sh), 406 (4.43) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3424, 1651, 1620, 1572, 1490, 1457, 1360, 1302, 1265, 1226, 1193, 1117, 1080, 1022 \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): $\delta = 3.46$ (m, 3H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 3.74 (dd, $J = 12.0, 5.0$ Hz, 1H, 6''-H_A), 3.88 (dd, $J = 12.0, 8.0$ Hz, 1H, 6''-H_B), 4.17 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, 2''-H), 4.90* (1H, 1''-H), 6.45 (s, 1H, 8-H), 6.50 (s, 1H, 3-H), 6.92 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 5'-H), 7.32 (s, 1H, 2'-H), 7.35 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 6'-H) ppm; * δ -Wert wurde aus einem HSQC-Spektrum ermittelt.

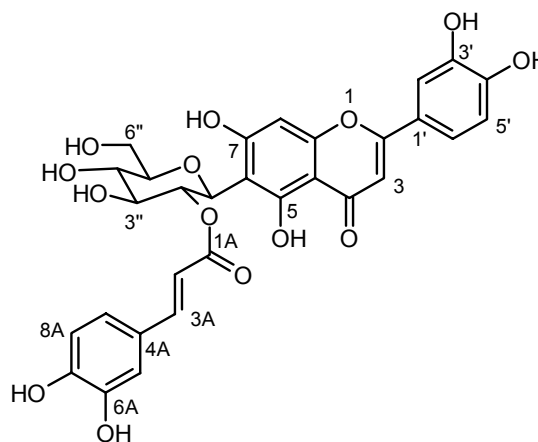
¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 62.9$ (t, C-6''), 71.8 (d, C-4''), 72.6 (d, C-2''), 75.3 (d, C-1''), 80.1 (d, C-3''), 82.6 (d, C-5''), 95.2 (d, C-8), 103.9 (d, C-3), 105.1 (s, C-4a), 109.1 (s, C-6), 114.1 (d, C-2'), 116.8 (d, C-5'), 120.3 (d, C-6'), 123.5 (s, C-1'), 147.0 (s, C-3'), 151.0 (s, C-4'), 158.7 (s, C-8a), 162.0 (s, C-5), 164.9 (s, C-7), 166.2 (s, C-2), 184.0 (s, C-4) ppm.



2''-O-(E)-Caffeoylisoorientin (126)C₃₀H₂₆O₁₄ (610.53)

gelber Feststoff

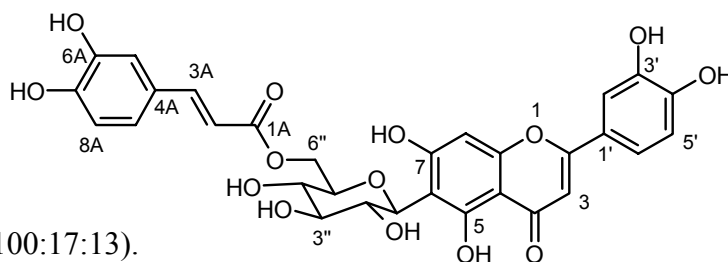
UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: gelb (Vanillin).**R_f** = 0.67 (KG, EtOAc/MeOH/H₂O 100:17:13).**ESI-MS:** m/z = 611 [M+H]⁺, 633 [M+Na]⁺.**[α]_D²⁰** = -227° (c = 0.1, MeOH).**UV** (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 212 (4.62), 248 (4.35), 271 (4.32), 300 (sh), 337 (4.47) nm;(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 208 (4.67), 250 (4.35), 271 (4.31), 300 (sh), 334 (4.48) nm;(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 205 (4.77), 220 (sh), 235 (sh), 265 (4.44), 279 (sh),
309 (sh), 385 (4.55) nm.**IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3426, 1682 (sh), 1651, 1636, 1620, 1601, 1572, 1560, 1543, 1526, 1513,
1490, 1443, 1404, 1264, 1179, 1159, 1114, 1075, 1024 cm⁻¹.**¹H-NMR** (300 MHz, CD₃OD): δ = 3.50 (m, 1H, 5''-H), 3.60 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H, 4''-H), 3.72 (t, *J* = 9.0 Hz, 3''-H), 3.79 (dd, *J* = 12.5, 5.5 Hz, 1H, 6''-H_A), 3.92 (dd, *J* = 12.5, 2.0 Hz, 1H, 6''-H_B), 5.10 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 1''-H), 5.66 (br s, 1H, 2''-H), 6.05 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, 2A-H), 6.39 (br s, 1H, 8-H), 6.44 (s, 1H, 3-H), 6.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 8A-H), 6.80 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H, 9A-H), 6.84 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 5'-H), 6.90 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 5A-H), 7.28 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 6'-H), 7.29 (s, 1H, 2'-H), 7.36 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, 3A-H) ppm.**¹³C-NMR** (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 62.8 (t, C-6''), 71.7 (d, C-4''), 73.2 (d, C-1''), 73.8 (d, C-2''), 77.9 (d, C-3''), 82.8 (d, C-5''), 95.2 (d, C-8), 103.8 (d, C-3), 104.9 (s, C-4a), 107.9 (s, C-6), 114.1 (d, C-2'), 114.8 (d, C-2A), 115.0 (d, C-5A), 116.4 (d, C-8A), 116.7 (d, C-5'), 120.3 (d, C-6'), 122.9 (d, C-9A), 123.4 (s, C-1'), 127.6 (s, C-4A), 146.6 (s, C-6A), 146.9 (s, C-3'), 146.9 (d, C-3A), 149.4 (s, C-7A), 150.9 (s, C-4'), 158.7 (s, C-8a), 161.7 (s, C-5), 164.8 (s, C-7), 166.1 (s, C-2), 168.3 (s, C-1A), 183.8 (s, C-4) ppm.

6''-O-(E)-Caffeoylisoorientin (127)**C₃₀H₂₆O₁₄** (610.53)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: gelb (Vanillin).**R_f** = 0.69 (KG, EtOAc/MeOH/H₂O 100:17:13).**ESI-MS:** m/z = 611 [M+Na]⁺, 633 [M+Na]⁺.**[α]_D²⁰** = -48° (c = 0.1, MeOH).**UV** (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 214 (4.58), 244 (4.25), 272 (4.23), 300 (sh), 338 (4.47) nm;(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 210 (4.63), 247 (4.32), 272 (4.27), 295 (sh), 334 (4.48) nm;(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 221 (4.48), 235 (sh), 266 (4.38), 310 (sh), 388 (4.56) nm.**IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3424, 1683, 1651, 1631 (sh), 1620, 1605, 1574, 1559, 1526, 1513, 1490, 1457, 1443, 1357, 1265, 1181, 1115, 1081, 1021 cm⁻¹.**¹H-NMR** (300 MHz, CD₃OD): δ = 3.51 (m, 2H, 3''-H, 4''-H), 3.65 (m, 1H, 5''-H), 4.23 (t, J = 9.0 Hz, 1H, 2''-H), 4.34 (dd, J = 12.0, 5.5 Hz, 1H, 6''-H_A), 4.52 (dd, J = 12.0, 2.0 Hz, 1H, 6''-H_B), 4.90* (1H, 1''-H), 6.28 (d, J = 16.0 Hz, 1H, 2A-H), 6.48 (s, 1H, 8-H), 6.53 (s, 1H, 3-H), 6.75 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 8A-H), 6.88 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 5'-H), 6.92 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H, 9A-H), 7.02 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 5A-H), 7.34 (s, 1H, 2'-H), 7.36 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 6'-H), 7.55 (d, J = 16.0 Hz, 1H, 3A-H) ppm; * δ-Wert wurde aus einem HSQC-Spektrum ermittelt.**¹³C-NMR** (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 65.0 (t, C-6''), 71.8 (d, C-4''), 72.4 (d, C-2''), 75.4 (d, C-1''), 79.9 (d, C-3'', C-5''), 95.2 (d, C-8), 103.8 (d, C-3), 105.0 (s, C-4a), 108.8 (s, C-6), 114.1 (d, C-2'), 114.9 (d, C-2A), 115.1 (d, C-5A), 116.4 (d, C-8A), 116.8 (d, C-5'), 120.3 (d, C-6'), 123.1 (d, C-9A), 123.4 (s, C-1'), 127.7 (s, C-4A), 146.7 (s, C-6A), 147.0 (s, C-3'), 147.1 (d, C-3A), 149.6 (s, C-7A), 151.1 (s, C-4'), 158.7 (s, C-8a), 162.1 (s, C-5), 165.2 (s, C-7), 166.1 (s, C-2), 169.2 (s, C-1A), 183.9 (s, C-4) ppm.

Luteolin-7-O- β -D-glucosid (128)**C₂₁H₂₀O₁₁** (448.38)

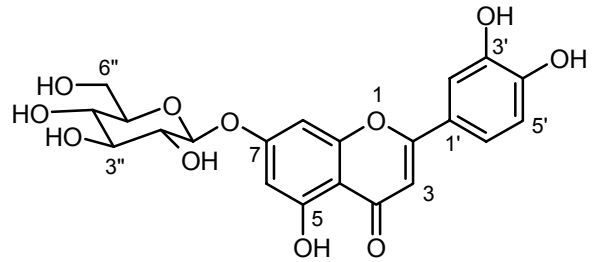
gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: gelb (Vanillin).**R_f** = 0.47 (KG, EtOAc/MeOH/H₂O 100:17:13).**DCI-MS:** m/z = 449 [M+H]⁺.**IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3424, 1652, 1602, 1495, 1444, 1374, 1262, 1178, 1073, 1035 cm⁻¹.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.19 (m, 1H, 4''-H), 3.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, 2''-H), 3.30 (m, 1H, 3''-H), 3.46 (m, 1H, 5''-H), 3.48 (br d, *J* = 10.0 Hz, 1H, 6''-H_A), 3.71 (br d, *J* = 10.0 Hz, 1H, 6''-H_B), 5.06 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, 1''-H), 6.43 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 6.71 (s, 1H, 3-H), 6.77 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 8-H), 6.88 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 5'-H), 7.40 (br s, 1H, 2'-H), 7.43 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H, 6'-H) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ = 60.6 (t, C-6''), 69.6 (d, C-4''), 73.1 (d, C-2''), 76.4 (d, C-3''), 77.1 (d, C-5''), 94.7 (d, C-8), 99.5 (d, C-6), 99.9 (d, C-1''), 103.0 (d, C-3), 105.3 (s, C-4a), 113.4 (d, C-2'), 115.9 (d, C-5'), 119.1 (d, C-6'), 121.1 (s, C-1'), 145.8 (s, C-3'), 150.2 (s, C-4'), 156.9 (s, C-8a), 161.1 (s, C-5), 162.9 (s, C-7), 164.5 (s, C-2), 181.9 (s, C-4) ppm.

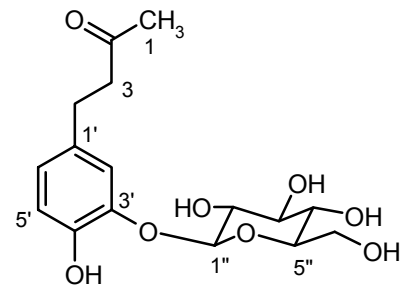
**Myzodendron (129)****C₁₆H₂₂O₈** (342.35)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau-violett (Vanillin).**R_f** = 0.41 (KG, EtOAc/MeOH/H₂O 100:17:13).**ESI-MS:** m/z = 365 [M+Na]⁺, 707 [2M+Na]⁺.**[α]_D²⁰** = -57° (c = 0.1, MeOH).**UV** (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 219 (sh), 276 (3.40) nm;(MeOH, HCl): λ_{\max} (lg ϵ) = 216 (sh), 276 (3.18) nm;(MeOH, NaOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 238 (sh, 3.66), 293 (3.45) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3421, 2924, 1701, 1666 (sh), 1651, 1634, 1622, 1599, 1510, 1457, 1437, 1421, 1402, 1366, 1277, 1236, 1075, 1044 cm⁻¹.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ = 2.11 (s, 3H, 1- H_3), 2.74 (s, 4H, 3- H_2 , 4- H_2), 3.40 (m, 2H, 3''-H, 4''-H), 3.46 (m, 2H, 2''-H, 5''-H), 3.70 (m, 1H, 6''- H_A), 3.80 (br d, J = 11.0 Hz, 1H, 6''- H_B), 4.68 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 1''-H), 6.60 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H, 6'-H), 6.69 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 5'-H), 7.09 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 2'-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): δ = 30.0 (q, C-1), 30.2 (t, C-4), 45.9 (t, C-3), 62.4 (t, C-6''), 71.3 (d, C-4''), 74.9 (d, C-2''), 77.6 (d, C-5''), 78.3 (d, C-3''), 104.7 (d, C-1''), 117.1 (d, C-5'), 119.1 (d, C-2'), 120.6 (d, C-6'), 138.3 (s, C-1'), 145.1 (s, C-4'), 148.4 (s, C-3'), 211.1 (s, C-2) ppm.

Aucubin (130)

$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_9$ (346.33)

weißer Feststoff

Anfärbeverhalten: braun (Vanillin).

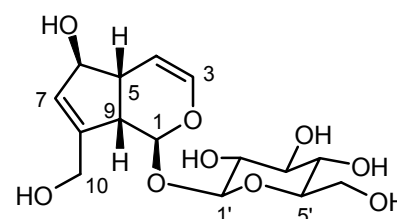
R_f = 0.21 (KG, EtOAc/MeOH/ H_2O 100:17:13).

ESI-MS: m/z = 369 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 715 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

$[\alpha]_D^{20}$ = -98° (c = 0.092, MeOH).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3418, 2923, 1654, 1460, 1402, 1230, 1078, 1045, 1006 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ = 2.64 (m, 1H, 5-H), 2.88 (br t, J = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 3.21 (dd, J = 8.0, 9.0 Hz, 1H, 2'-H), 3.27 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 3.35 (m, 1H, 3'-H), 3.63 (dd, J = 12.0, 5.5 Hz, 1H, 6'- H_A), 3.85 (dd, J = 12.0, 2.0 Hz, 1H, 6'- H_B), 4.15 (br d, J = 15.0 Hz, 1H, 10- H_A), 4.34 (br d, J = 15.0 Hz, 1H, 10- H_B), 4.43 (m, 1H, 6-H), 4.67 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.94 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 1-H), 5.08 (dd, J = 6.0, 4.0 Hz, 1H, 4-H), 5.75 (br s, 1H, 7-H), 6.30 (dd, J = 6.0, 2.0 Hz, 1H, 3-H) ppm.



Agnusid (131)

$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$ (466.44)

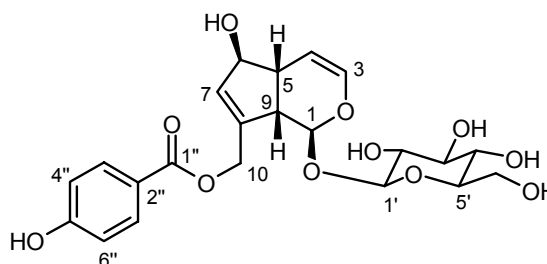
weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: braun (Vanillin).

R_f = 0.49 (KG, EtOAc/MeOH/ H_2O 100:17:13).

ESI-MS: m/z = 489 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 955 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): $\delta = 2.69$ (m, 1H, 5-H), 2.98 (br t, $J = 7.5$ Hz, 1H, 9-H), 3.23 (dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, 1H, 2'-H), 3.28 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 3.36 (m, 1H, 3'-H), 3.64 (dd, $J = 12.0, 5.5$ Hz, 1H, 6'-H_A), 3.85 (dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, 1H, 6'-H_B), 4.46 (dt, $J = 5.5, 2.0$ Hz, 1H, 6-H), 4.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 1'-H), 4.86 (br d, $J = 15.0$ Hz, 1H, 10-H_A), 4.99 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, 1-H), 5.08 (br d, $J = 15.0$ Hz, 1H, 10-H_B), 5.11 (dd, $J = 6.0, 4.0$ Hz, 1H, 4-H), 5.80 (br s, 1H, 7-H), 6.33 (dd, $J = 6.0, 2.0$ Hz, 1H, 3-H), 6.83 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, 4''-H, 6''-H), 7.92 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, 3''-H, 7''-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): $\delta = 46.3$ (d, C-5), 48.5 (d, C-9), 62.7 (t, C-6'), 63.6 (t, C-10), 71.4 (d, C-4'), 74.9 (d, C-2'), 77.9 (d, C-3'), 78.2 (d, C-5'), 82.8 (d, C-6), 97.9 (d, C-1), 100.2 (d, C-1'), 105.5 (d, C-4), 116.2 (d, C-4'', C-6''), 122.0 (s, C-2''), 132.4 (d, C-7), 132.9 (d, C-3'', C-7''), 141.7 (d, C-3), 142.9 (s, C-8), 163.7 (s, C-5''), 167.8 (s, C-1'') ppm.

Mussaenosinsäure (132)

$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$ (376.36)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rosa (Vanillin).

$R_f = 0.19$ (KG, EtOAc/MeOH/ H_2O 100:17:13).

ESI-MS: $m/z = 399$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 775 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

$[\alpha]_D^{20} = -73^\circ$ ($c = 0.084$, MeOH).

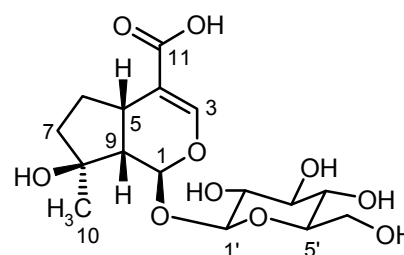
UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 229 (3.82) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3416, 2927, 1736$ (sh), 1718 (sh), 1701 (sh), 1683, 1651, 1637 (sh), 1560, 1542, 1458, 1403, 1303, 1271, 1185, 1075 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.31$ (s, 3H, 10-H₃), 1.47 (m, 1H, 6-H_A), 1.69 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, 7-H₂), 2.21 (dd, $J = 9.0, 4.0$ Hz, 1H, 9-H), 2.28 (m, 1H, 6-H_B), 3.17 (m, 1H, 5-H), 3.18 (dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, 1H, 2'-H), 3.26 (m, 1H, 4'-H), 3.28 (m, 1H, 5'-H), 3.35 (m, 1H, 3'-H), 3.63 (dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 1H, 6'-H_A), 3.89 (dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, 1H, 6'-H_B), 4.65 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 1'-H), 5.43 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 1-H), 7.26 (s, 1H, 3-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): $\delta = 24.7$ (q, C-10), 30.7 (t, C-6), 32.4 (d, C-5), 41.0 (t, C-7), 52.5 (d, C-9), 62.9 (t, C-6'), 71.7 (d, C-4'), 74.7 (d, C-2'), 77.9 (d, C-3'), 78.3 (d, C-5'), 80.5 (s, C-8), 95.0 (d, C-1), 99.7 (d, C-1'), 116.2* (s, C-4), 149.8 (d, C-3), 173.0* (s, C-11) ppm;

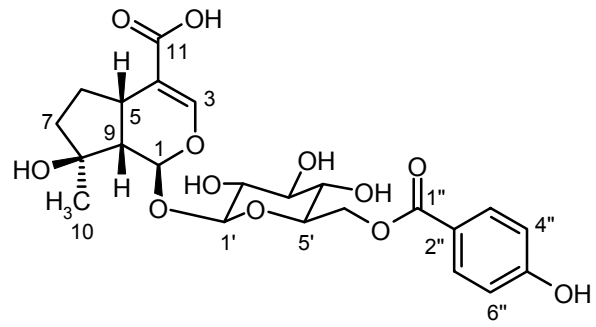
* δ -Wert wurde aus einem HMBC-Experiment ermittelt.



6'-O-p-Hydroxybenzovlmussaenosinsäure (133)**C₂₃H₂₈O₁₂** (496.47)

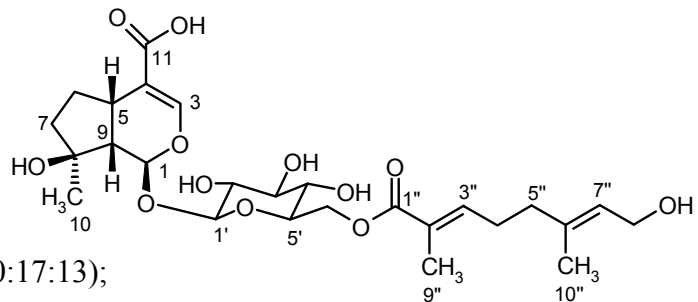
weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rosa (Vanillin).**R_f** = 0.50 (KG, EtOAc/MeOH/H₂O 100:17:13).**ESI-MS:** m/z = 519 [M+Na]⁺, 1015 [2M+Na]⁺.**[α]_D²⁰** = -37° (c = 0.086, MeOH).**UV** (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 255 (4.27) nm;(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 252 (4.22) nm;(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 222 (4.20), 298 (4.38), 362 (sh) nm.**IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3426, 1702, 1652, 1609, 1593 (sh), 1543, 1513, 1457, 1445, 1403, 1280, 1167, 1069, 1014 cm⁻¹.**¹H-NMR** (300 MHz, CD₃OD): δ = 1.25 (s, 3H, 10-H₃), 1.31 (m, 1H, 6-H_A), 1.58 (t, J = 8.0 Hz, 2H, 7-H₂), 2.08 (dd, J = 8.5, 5.5 Hz, 1H, 9-H), 2.23 (m, 1H, 6-H_B), 3.18 (m, 1H, 5-H), 3.24 (dd, J = 9.5, 8.0 Hz, 1H, 2'-H), 3.41 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 3.60 (m, 1H, 5'-H), 4.41 (dd, J = 12.0, 6.0 Hz, 1H, 6'-H_A), 4.62 (dd, J = 12.0, 2.5 Hz, 1H, 6'-H_B), 4.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 5.17 (d, J = 5.5 Hz, 1H, 1-H), 6.80 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 4''-H, 6''-H), 7.22 (s, 1H, 3-H), 7.87 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 3''-H, 7''-H) ppm.**¹³C-NMR** (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 25.1 (q, C-10), 30.9 (t, C-6), 33.9 (d, C-5), 40.1 (t, C-7), 52.3 (d, C-9), 64.4 (t, C-6'), 71.8 (d, C-4'), 74.8 (d, C-2'), 75.6 (d, C-5'), 77.8 (d, C-3'), 81.1 (s, C-8), 95.2 (d, C-1), 99.7 (d, C-1'), 116.2 (d, C-4'', C-6''), 116.6 (s, C-4), 122.1 (s, C-2''), 132.9 (d, C-3'', C-7''), 149.3 (d, C-3), 163.6 (s, C-5''), 167.9 (s, C-1''), 173.9 (s, C-11) ppm.**Agnucastosid A (134)****C₂₆H₃₈O₁₂** (542.58)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: violett (Vanillin).**R_f** = 0.47 (KG, EtOAc/MeOH/H₂O 100:17:13);0.57 (RP-18, MeOH/H₂O 65:35).**ESI-MS:** m/z = 565 [M+Na]⁺, 1107 [2M+Na]⁺.

$[\alpha]_D^{20} = -52^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH).

UV (MeOH): λ_{\max} ($\lg \epsilon$) = 221 (4.25) nm;

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3425, 2927, 1718$ (sh), 1703, 1650, 1637 (sh), 1561, 1542, 1404, 1275, 1072, 1017 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.30$ (s, 3H, 10- H_3), 1.40 (m, 1H, 6- H_A), 1.67 (m, 2H, 7- H_2), 1.68 (s, 3H, 10''- H_3), 1.83 (s, 3H, 9''- H_3), 2.10 (m, 1H, 9-H), 2.15 (m, 2H, 5''- H_2), 2.30 (m, 1H, 6- H_B), 2.34 (m, 2H, 4''- H_2), 3.20 (br t, $J = 8.0$ Hz, 1H, 2'-H), 3.20 (m, 1H, 5-H), 3.35 (m, 1H, 4'-H), 3.39 (m, 1H, 3'-H), 3.50 (m, 1H, 5'-H), 4.09 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H, 8''- H_2), 4.27 (dd, $J = 12.0, 5.5$ Hz, 1H, 6'- H_A), 4.49 (dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, 1H, 6'- H_B), 4.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 1'-H), 5.19 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 1-H), 5.38 (br t, $J = 6.5$ Hz, 1H, 7''-H), 6.78 (td, $J = 8.5, 1.5$ Hz, 1H, 3''-H), 7.30 (s, 1H, 3-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CD_3OD): $\delta = 12.6$ (q, C-9''), 16.2 (q, C-10''), 25.2 (q, C-10), 28.0 (t, C-4''), 31.1 (t, C-6), 33.7 (d, C-5), 39.2 (t, C-5''), 40.1 (t, C-7), 52.3 (d, C-9), 59.4 (t, C-8''), 64.3 (t, C-6'), 71.7 (d, C-4'), 74.8 (d, C-2'), 75.7 (C-5'), 77.8 (C-3'), 81.1 (s, C-8), 95.4 (d, C-1), 99.7 (d, C-1'), 116.4 (s, C-4), 125.8 (d, C-7''), 128.8 (s, C-2''), 138.3 (s, C-6''), 143.6 (d, C-3''), 150.0 (d, C-3), 169.3 (s, C-1''), 171.3 (s, C-11) ppm.

Agnucastosid B (135)

$\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_{12}$ (544.59)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rosa (Vanillin).

$R_f = 0.48$ (KG, EtOAc/MeOH/ H_2O 100:17:13);

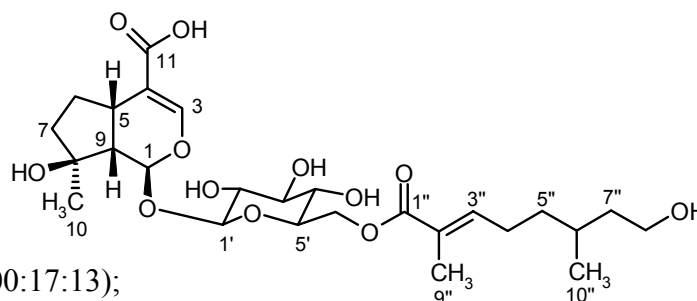
0.51 (RP-18, MeOH/ H_2O 65:35).

ESI-MS: $m/z = 567$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1111 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

$[\alpha]_D^{20} = -64^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH).

UV (MeOH): λ_{\max} ($\lg \epsilon$) = 220 (4.27) nm;

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3425, 2929, 1700, 1649, 1637$ (sh), 1559, 1541, 1527, 1459, 1403, 1277, 1154, 1070, 1022 cm^{-1} .



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.93$ (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, $10''\text{-H}_3$), 1.28 (m, 1H, $5''\text{-H}_A$), 1.31 (s, 3H, 10-H_3), 1.36 (m, 1H, $7''\text{-H}_A$), 1.38 (m, 1H, 6-H_A), 1.46 (m, 1H, $5''\text{-H}_B$), 1.60 (m, 1H, $7''\text{-H}_B$), 1.62 (m, 1H, $6''\text{-H}$), 1.67 (br t, $J = 7.5$ Hz, 2H, 7-H_2), 1.83 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H, $9''\text{-H}_3$), 2.10 (dd, $J = 8.5, 6.0$ Hz, 1H, 9-H), 2.22 (m, 2H, $4''\text{-H}_2$), 2.30 (m, 1H, 6-H_B), 3.20 (m, 1H, 5-H), 3.21 (m, 1H, $2'\text{-H}$), 3.34 (dd, $J = 10.0, 8.5$ Hz, 1H, $4'\text{-H}$), 3.39 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, $3'\text{-H}$), 3.55 (m, 1H, $5'\text{-H}$), 3.60 (m, 2H, $8''\text{-H}_2$), 4.28 (dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 1H, $6'\text{-H}_A$), 4.49 (dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, 1H, $6'\text{-H}_B$), 4.70 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $1'\text{-H}$), 5.18 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 1-H), 6.78 (td, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1H, $3''\text{-H}$), 7.38 (s, 1H, 3-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CD_3OD): $\delta = 12.5$ (q, C- $9''$), 19.8 (q, C- $10''$), 25.2 (q, C-10), 27.2 (t, C- $4''$), 30.6 (d, C- $6''$), 31.1 (t, C-6), 33.6 (d, C-5), 37.0 (t, C- $5''$), 40.0 (d, C-7), 40.6 (t, C- $7''$), 52.2 (d, C-9), 61.0 (t, C- $8''$), 64.4 (t, C- $6'$), 71.7 (d, C- $4'$), 74.8 (d, C- $2'$), 75.7 (d, C- $5'$), 77.9 (d, C- $3'$), 81.1 (s, C-8), 95.5 (d, C-1), 99.7 (d, C- $1'$), 114.5 (s, C-4), 128.5 (s, C- $2''$), 144.4 (d, C- $3''$), 151.1 (d, C-3), 169.4 (s, C- $1''$), 171.3 (s, C-11) ppm.

Agnucastosid C (136)

$\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$ (684.65)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rosa (Vanillin).

R_f = 0.53 (KG, EtOAc/MeOH/ H_2O 100:17:13).

ESI-MS: $m/z = 707$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1391 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

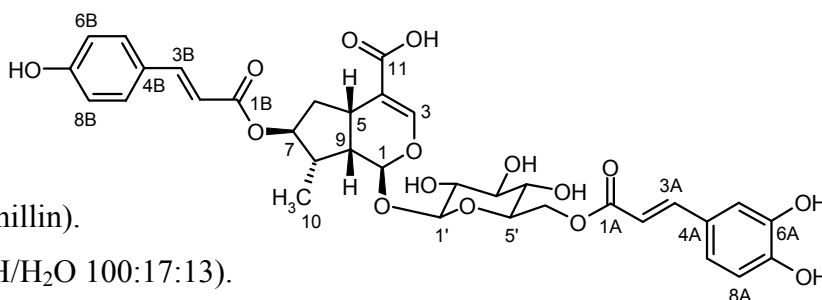
$[\alpha]_D^{20}$ = -28° ($c = 0.2$, MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 301 (sh), 313 (4.24) nm;

(MeOH, HCl): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 222 (sh, 4.16), 302 (sh), 315 (4.22) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 224 (sh), 311 (sh), 363 (4.35) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3423, 1694, 1686$ (sh), 1634, 1605, 1515, 1443, 1382, 1273, 1170, 1115, 1075, 1019 cm^{-1} .



¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 1.08 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 10-H₃), 1.92 (m, 1H, 6-H_A), 2.17 (m, 1H, 6-H_B), 2.42 (m, 1H, 8-H), 2.48 (m, 1H, 9-H), 3.06 (q, J = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 3.30 (m, 1H, 2'-H), 3.39 (t, J = 6.5 Hz, 1H, 4'-H), 3.40 (t, J = 6.5 Hz, 1H, 3'-H), 3.55 (m, 1H, 5'-H), 4.40 (dd, J = 12.0, 6.0 Hz, 1H, 6'-H_A), 4.53 (dd, J = 12.0, 2.0 Hz, 1H, 6'-H_B), 4.73 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.90* (1H, 7-H), 5.33 (d, J = 5.5 Hz, 1H, 1-H), 6.29 (d, J = 16.0 Hz, 2H, 2A-H, 2B-H), 6.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 8A-H), 6.78 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 6B-H, 8B-H), 6.91 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H, 9A-H), 7.04 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 5A-H), 7.41 (s, 1H, 3-H), 7.43 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 5B-H, 9B-H), 7.56 (d, J = 16.0 Hz, 1H, 3B-H), 7.57 (d, J = 16.0 Hz, 1H, 3A-H) ppm; * δ -Wert wurde aus einem HSQC-Spektrum ermittelt.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 14.4 (q, C-10), 32.6 (d, C-5), 39.5 (t, C-6), 43.1*¹ (d, C-8), 43.4*¹ (d, C-9), 64.0 (t, C-6'), 71.7 (d, C-4'), 74.8 (d, C-2'), 75.7 (d, C-5'), 77.8 (d, C-3'), 82.3 (d, C-7), 96.0 (d, C-1), 99.9 (d, C-1'), 114.8 (d, C-5A), 115.1*² (d, C-2B), 115.4*² (d, C-2A), 115.9 (s, C-4), 116.4 (d, C-8A), 116.8 (d, C-6B, C-8B), 123.2 (d, C-9A), 127.2*³ (s, C-4B), 127.7*³ (s, C-4A), 131.2 (d, C-5B, C-9B), 146.4*⁴ (d, C-3B), 146.7*⁴ (d, C-3A), 147.3 (s, C-7A), 149.6 (s, C-6A), 152.4 (d, C-3), 161.2 (s, C-7B), 169.0 (s, C-1A, C-1B), 170.6 (s, C-11) ppm; *^{1,2,3,4} Signale sind jeweils untereinander austauschbar.

3. *Galium verum ssp. verum* (Rubiaceae)

Astragalin (137)

C₂₁H₂₀O₁₁ (448.38)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: gelb (Vanillin).

R_f = 0.37 (KG, CHCl₃/MeOH/H₂O 80:20:2);

0.60 (KG, CHCl₃/MeOH/H₂O 61:32:7).

ESI-MS: m/z = 471 [M+Na]⁺, 919 [2M+Na]⁺.

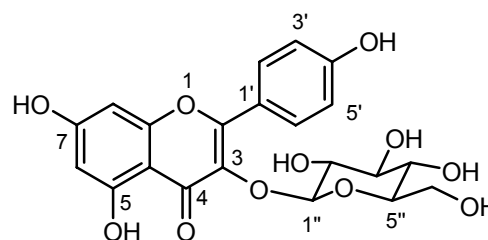
[α]_D²⁰ = -15° (c = 0.1, MeOH).

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 220 (sh), 257 (sh), 267 (3.92), 345 (3.84) nm;

(MeOH, HCl): λ_{\max} (lg ϵ) = 220 (sh), 257 (sh), 267 (3.91), 346 (2.63) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 218 (sh), 273 (3.92), 330 (3.63), 401 (3.96) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3425, 2958, 2928, 1733, 1724 (sh), 1705, 1689, 1654, 1619, 1604, 1579, 1560, 1542, 1460, 1381, 1287, 1124, 1073 cm⁻¹.



¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 3.19 (m, 1H, 2''-H), 3.42 (m, 3H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 3.52 (dd, J = 12.0, 4.5 Hz, 1H, 6''-H_A), 3.68 (dd, J = 12.0, 2.0 Hz, 1H, 6''-H_B), 5.22 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 1''-H), 6.18 (br d, J = 1.0 Hz, 1H, 6-H), 6.37 (br s, 1H, 8-H), 6.87 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 8.04 (d, J = 9.0 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H) ppm.

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD): δ = 62.6 (t, C-6''), 71.3 (d, C-4''), 75.7 (d, C-2''), 78.1^{*1} (d, C-3''), 78.4^{*1} (d, C-5''), 95.1 (d, C-8), 100.3 (d, C-6), 104.2 (d, C-1''), 105.4 (s, C-4a), 116.1 (d, C-3', C-5'), 122.8 (s, C-1'), 132.3 (d, C-2', C-6'), 135.4 (s, C-3), 158.6^{*2} (s, C-2), 158.9^{*2} (s, C-8a), 161.6 (s, C-4'), 163.0 (s, C-5), 167.3 (s, C-7), 179.4 (s, C-4) ppm;

^{*1,*2} Signale sind jeweils untereinander austauschbar.

Rutin (138)

C₂₇H₃₀O₁₆ (610.52)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: gelb (Vanillin).

R_f = 0.04 (KG, CHCl₃/MeOH/H₂O 80:20:2);

0.30 (KG, CHCl₃/MeOH/H₂O 61:32:7).

ESI-MS: m/z = 609 [M-H]⁻, 1219 [2M-H]⁻.

[α]_D²⁰ = +3° (c = 0.1, MeOH).

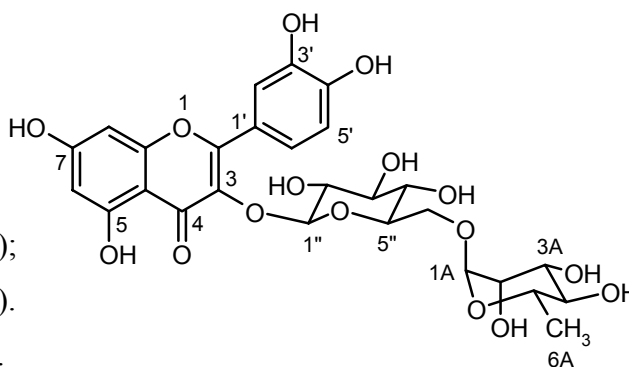
UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 256 (4.09), 265 (sh), 358 (3.99) nm;

(MeOH, HCl): λ_{\max} (lg ϵ) = 256 (4.03), 265 (sh), 356 (3.97) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 271 (4.06), 407 (4.08) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3384, 1652, 1604, 1560, 1494, 1444, 1361, 1304, 1271, 1202, 1171, 1066, 1050, 1026 cm⁻¹.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 1.12 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 6A-H₃), 3.27 (m, 2H, 4''-H, 4A-H), 3.32 (m, 1H, 3''-H), 3.38 (m, 1H, 6''-H_A), 3.42 (m, 1H, 5''-H), 3.44 (m, 1H, 5A-H), 3.47 (m, 1H, 2''-H), 3.53 (dd, J = 9.5, 3.5 Hz, 1H, 3A-H), 3.63 (dd, J = 3.5, 1.5 Hz, 1H, 2A-H), 3.80 (d, J = 10.5 Hz, 1H, 6''-H_B), 4.51 (d, J = 1.5 Hz, 1H, 1A-H), 5.07 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 1''-H), 6.16 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 6.34 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 8-H), 6.86 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 5'-H), 7.62 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H, 6'-H), 7.68 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 2'-H) ppm.



^{13}C -NMR (150.8 MHz, CD_3OD): $\delta = 17.9$ (q, C-6A), 68.6 (t, C-6''), 69.7 (d, C-5A), 71.3 (d, C-4''), 72.1* (d, C-2A), 72.2* (d, C-3A), 73.9 (d, C-4A), 75.7 (d, C-2''), 77.2 (d, C-3''), 78.2 (d, C-5''), 95.2 (d, C-8), 100.4 (d, C-6), 102.4 (d, C-1A), 104.9 (d, C-1''), 105.2 (s, C-4a), 116.0 (d, C-5'), 117.6 (d, C-2'), 123.0 (s, C-1'), 123.6 (d, C-6'), 135.6 (s, C-3), 145.8 (s, C-3'), 149.9 (s, C-4'), 158.5 (s, C-2), 159.1 (s, C-8a), 162.8 (s, C-5), 167.4 (s, C-7), 179.2 (s, C-4) ppm; * Signale sind untereinander austauschbar.

Asperulosinsäure (139)

$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$ (432.38)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Vanillin).

$R_f = 0.13$ (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 80:20:2);

0.39 (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 61:32:7).

ESI-MS: $m/z = 455$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 887 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD): $\delta = 2.09$ (s, 3H, 2''-H₃), 2.62 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, 9-H), 3.02 (br t, $J = 7.0$ Hz, 1H, 5-H), 3.25 (m, 3H, 2'-H, 4'-H, 5'-H), 3.35 (m, 1H, 3'-H), 3.61 (dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 1H, 6'-H_A), 3.85 (dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, 1H, 6'-H_B), 4.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 1'-H), 4.85 (br d, $J = 15.0$ Hz, 1H, 10-H_A), 4.90* (1H, 6-H), 4.94 (br d, $J = 15.0$ Hz, 1H, 10-H_B), 5.05 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 1-H), 6.01 (br d, $J = 1.0$ Hz, 1H, 7-H), 7.62 (br d, $J = 1.0$ Hz, 1H, 3-H) ppm; * δ -Wert wurde aus einem HSQC-Spektrum ermittelt.

^{13}C -NMR (75.5 MHz, CD_3OD): $\delta = 20.8$ (q, C-2''), 42.6 (d, C-5), 46.3 (d, C-9), 63.0 (t, C-6'), 63.8 (t, C-10), 71.5 (d, C-4'), 74.9 (d, C-2'), 75.4 (d, C-6), 77.8 (d, C-5'), 78.5 (d, C-3'), 100.5 (d, C-1'), 101.1 (d, C-1), 109.0 (s, C-4), 131.8 (d, C-7), 145.9 (s, C-8), 154.9 (d, C-3), 172.5 (s, C-11, C-1'') ppm.

6-O-epi-Acetylscandosid (140)

$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$ (432.38)

weißer Feststoff

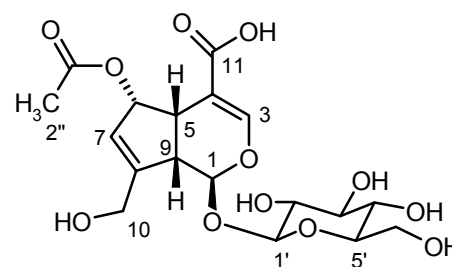
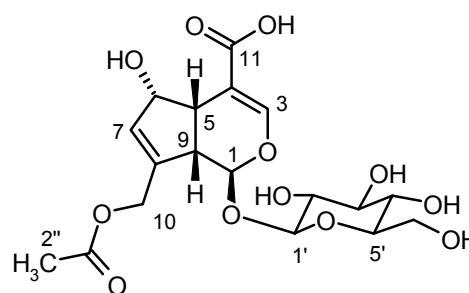
UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Vanillin).

$R_f = 0.13$ (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 80:20:2);

0.28 (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 61:32:7).

ESI-MS: $m/z = 455$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 887 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.



$[\alpha]_D^{20} = -73^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH).

UV (MeOH): λ_{\max} ($\lg \epsilon$) = 228 (3.82), 282 (3.10) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3426, 1720, 1700, 1687, 1653, 1636, 1559, 1543, 1528, 1457, 1402, 1380, 1266, 1159, 1075 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 2.01$ (s, 3H, 2''-H₃), 3.05 (br t, $J = 6.5$ Hz, 1H, 9-H), 3.20 (dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, 1H, 2'-H), 3.27 (m, 3H, 5-H, 4'-H, 5'-H), 3.36 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, 3'-H), 3.64 (dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 1H, 6'-H_A), 3.87 (dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, 1H, 6'-H_B), 4.19 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H, 10-H_A), 4.35 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H, 10-H_B), 4.66 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 1'-H), 5.29 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 1-H), 5.58 (m, 1H, 6-H), 5.78 (m, 1H, 7-H), 7.42 (s, 1H, 3-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): $\delta = 21.2$ (q, C-2''), 42.1 (d, C-5), 46.9 (d, C-9), 60.9 (t, C-10), 62.7 (t, C-6'), 71.5 (d, C-4'), 74.8 (d, C-2'), 77.9 (d, C-3'), 78.4 (d, C-5'), 83.7 (d, C-6), 97.4 (d, C-1), 100.1 (d, C-1'), 110.9 (s, C-4), 126.9 (d, C-7), 150.5 (s, C-8), 153.3 (d, C-3), 172.7 (s, C-11, C-1'') ppm.

Asperulosid (141)

C₁₈H₂₂O₁₁ (414.37)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Vanillin).

R_f = 0.44 (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 80:20:2);

0.64 (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 61:32:7).

ESI-MS: $m/z = 437$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 851 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

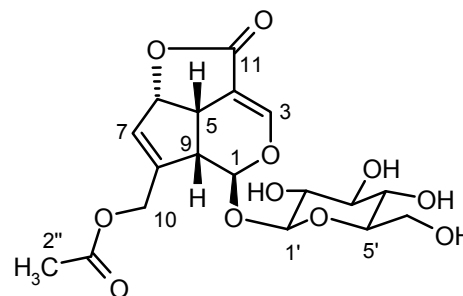
$[\alpha]_D^{20} = -115^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH).

UV (MeOH): λ_{\max} ($\lg \epsilon$) = 232 (3.84), 312 (3.21) nm;

(MeOH, HCl): λ_{\max} ($\lg \epsilon$) = 232 (3.73), 314 (2.97) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{\max} ($\lg \epsilon$) = 235 (3.82), 363 (3.06) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3426, 1750$ (sh), 1737, 1722, 1706, 1687 (sh), 1653, 1638, 1622 (sh), 1256, 1229, 1180, 1075, 1021 cm^{-1} .



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 2.07$ (s, 3H, $2''\text{-H}_3$), 3.17 (dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, 1H, $2'\text{-H}$), 3.24 (m, 1H, $4'\text{-H}$), 3.26 (m, 1H, $3'\text{-H}$), 3.29 (m, 1H, 9-H), 3.36 (m, 1H, $5'\text{-H}$), 3.64 (m, 1H, 5-H), 3.66 (dd, $J = 12.0, 6.5$ Hz, 1H, $6'\text{-H}_\text{A}$), 3.91 (dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, 1H, $6'\text{-H}_\text{B}$), 4.66 (dd, $J = 14.0, 1.0$ Hz, 1H, 10-H_A), 4.67 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $1'\text{-H}$), 4.77 (dd, $J = 14.0, 1.5$ Hz, 1H, 10-H_B), 5.56 (dt, $J = 6.5, 1.5$ Hz, 1H, 6-H), 5.72 (m, 1H, 7-H), 5.95 (dd, $J = 1.5, 0.5$ Hz, 1H, 1-H), 7.29 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 3-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CD_3OD): $\delta = 20.6$ (q, C- $2''$), 37.5 (d, C-5), 45.3 (d, C-9), 61.9 (t, C-10), 62.8 (t, C- $6'$), 71.6 (d, C- $4'$), 74.7 (d, C- $2'$), 77.9 (d, C- $5'$), 78.4 (d, C- $3'$), 86.3 (d, C-6), 93.3 (d, C-1), 100.0 (d, C- $1'$), 106.2 (s, C-4), 128.9 (d, C-7), 144.3 (s, C-8), 150.3 (d, C-3), 172.2 (s, C-11), 172.6 (s, C- $1''$) ppm.

Daphyllosid (142)

$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$ (446.41)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Vanillin).

$R_f = 0.49$ (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 80:20:2);

0.68 (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 61:32:7).

ESI-MS: $m/z = 469$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 915 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

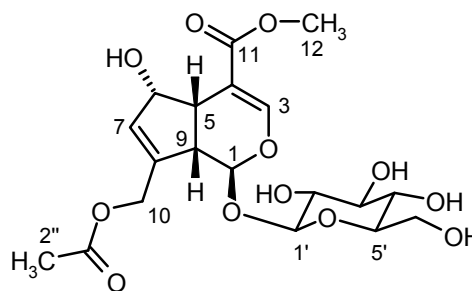
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +19^\circ$ (c = 0.1, MeOH).

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 236 (3.96) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3425, 1733$ (sh), 1704, 1689 (sh), 1635, 1440, 1382, 1269, 1194, 1158, 1100, 1078, 1049 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): $\delta = 2.08$ (s, 3H, $2''\text{-H}_3$), 2.63 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H, 9-H), 3.03 (br t, $J = 6.5$ Hz, 1H, 5-H), 3.23 (dd, $J = 8.5, 8.0$ Hz, 1H, $2'\text{-H}$), 3.26 (m, 2H, $4'\text{-H}, 5'\text{-H}$), 3.37 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H, $3'\text{-H}$), 3.61 (dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 1H, $6'\text{-H}_\text{A}$), 3.74 (s, 3H, 12-H_3), 3.85 (dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, 1H, $6'\text{-H}_\text{B}$), 4.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $1'\text{-H}$), 4.80 (m, 2H, 6-H, 10-H_A), 4.94 (br d, $J = 15.0$ Hz, 1H, 10-H_B), 5.06 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, 1-H), 6.00 (br d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 7-H), 7.65 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, 3-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): $\delta = 20.8$ (q, C- $2''$), 42.4 (d, C-5), 46.2 (d, C-9), 51.8 (q, C-12), 63.0 (t, C- $6'$), 63.8 (t, C-10), 71.6 (d, C- $4'$), 74.9 (d, C- $2'$), 75.4 (d, C-6), 77.9 (d, C- $5'$), 78.6 (d, C- $3'$), 100.6 (d, C- $1'$), 101.2 (d, C-1), 108.1 (s, C-4), 131.8 (d, C-7), 146.0 (s, C-8), 155.4 (d, C-3), 169.3 (s, C-11), 172.5 (s, C- $1''$) ppm.



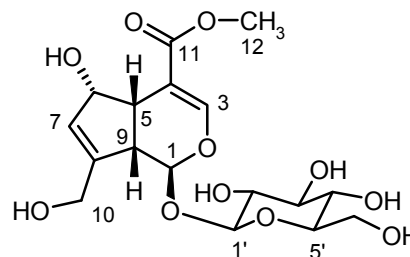
Desacetyldaphyllosid (143)**C₁₇H₂₄O₁₁** (404.37)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Vanillin).**R_f** = 0.24 (KG, CHCl₃/MeOH/H₂O 80:20:2);0.50 (KG, CHCl₃/MeOH/H₂O 61:32:7).**ESI-MS:** m/z = 427 [M+Na]⁺, 831 [2M+Na]⁺.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 2.65 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, 9-H), 3.03 (td, *J* = 6.5, 1.5 Hz, 1H, 5-H), 3.24 (dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 1H, 2'-H), 3.27 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 3.38 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H, 3'-H), 3.61 (dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H, 6'-H_A), 3.74 (s, 3H, 12-H₃), 3.85 (dd, *J* = 12.0, 2.0 Hz, 1H, 6'-H_B), 4.20 (br d, *J* = 15.5 Hz, 1H, 10-H_A), 4.45 (dd, *J* = 15.5, 1.5 Hz, 1H, 10-H_B), 4.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.80 (m, 1H, 6-H), 5.05 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 1-H), 6.01 (br d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 7-H), 7.62 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 3-H) ppm.

**Desacetylasperulosinsäure (144)****C₁₆H₂₂O₁₁** (390.34)

weißer Feststoff

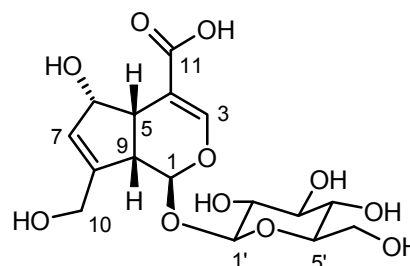
UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Vanillin).**R_f** = 0.39 (KG, CHCl₃/MeOH 1:1).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 2.54 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, 9-H), 3.01 (br t, *J* = 6.5 Hz, 1H, 5-H), 3.21 (m, 1H, 2'-H), 3.26 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 3.37 (m, 1H, 5'-H), 3.61 (dd, *J* = 12.0, 5.5 Hz, 1H, 6'-H_A), 3.84 (dd, *J* = 12.0, 1.5 Hz, 1H, 6'-H_B), 4.21 (br d, *J* = 15.5 Hz, 1H, 10-H_A), 4.45 (dd, *J* = 15.5, 1.0 Hz, 1H, 10-H_B), 4.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.82* (1H, 6-H), 5.03 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 1-H), 6.00 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 7-H), 7.58 (s, 1H, 3-H) ppm;

* δ-Wert wurde aus einem HSQC-Spektrum ermittelt.

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD): δ = 43.2 (d, C-5), 46.1 (d, C-9), 61.8 (t, C-10), 62.8 (t, C-6), 71.7 (d, C-4'), 75.0 (d, C-2'), 75.6 (d, C-6), 77.8 (d, C-5'), 78.5 (d, C-3'), 100.4 (d, C-1'), 101.3 (d, C-1), 110.3 (s, C-4), 129.8 (d, C-7), 151.5 (s, C-8), 154.2 (d, C-3), 172.5 (s, C-11) ppm.



Monotropein (145)**C₁₆H₂₂O₁₁** (390.34)

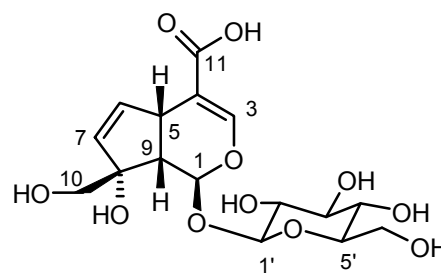
weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Vanillin).**R_f** = 0.39 (KG, CHCl₃/MeOH 1:1).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 2.67 (dd, *J* = 8.5, 3.0 Hz, 1H, 9-H), 3.21 (m, 1H, 2'-H), 3.26 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 3.37 (m, 1H, 5'-H), 3.56 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 5-H), 3.56 (m, 2H, 10-H₂), 3.61 (dd, *J* = 12.0, 5.5 Hz, 1H, 6'-H_A), 3.84 (dd, *J* = 12.0, 1.5 Hz, 1H, 6'-H_B), 4.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 1'-H), 5.54 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, 1-H), 5.60 (dd, *J* = 5.5, 2.0 Hz, 1H, 7-H), 6.21 (dd, *J* = 5.5, 2.5 Hz, 1H, 6-H), 7.31 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, 3-H) ppm.

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD): δ = 40.0 (d, C-5), 45.8 (d, C-9), 62.6 (t, C-6'), 68.5 (t, C-10), 71.4 (d, C-4'), 74.7 (d, C-2'), 77.9 (d, C-5'), 78.5 (d, C-3'), 86.4 (s, C-8), 95.2 (d, C-1), 100.1 (d, C-1'), 113.4 (s, C-4), 133.2 (d, C-7), 138.5 (d, C-6), 150.7 (d, C-3), 172.5 (s, C-11) ppm.



C. LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ W. Tang, G. Eisenbrand, *Chinese Drugs of Plant Origin, Chemistry, Pharmacology and Use in Traditional and Modern Medicine*, Springer, Berlin, Heidelberg, **1992**.
- ² D. Guo, Y.-F. Su, J.-G. Dai, H.-Z. Guo, in *Abstract Book*, International Symposium on the Chemistry of Natural Products (23rd IUPAC), Florenz, Italien, **2002**, 102.
- ³ D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 215-234.
- ⁴ P. A. Cox, in *Ethnobotany and the Search for new Drugs*, Ciba Foundation Symposium 185, Wiley, Chichester, **1994**, 25-41.
- ⁵ N. R. Farnsworth, in *Ethnobotany and the Search for new Drugs*, Ciba Foundation Symposium 185, Wiley, Chichester, **1994**, 42-59.
- ⁶ G. M. Cragg, D. J. Newman, in *Ethnomedicine and Drug Discovery*, Hrsg.: M. M. Iwu, J. C. Wootton, Elsevier, Amsterdam, **2002**, 23-37.
- ⁷ G. M. Cragg, M. R. Boyd, J. H. Cardellina, D. J. Newman, K. M. Snader, T. G. McCloud, in *Ethnobotany and the Search for new Drugs*, Ciba Foundation Symposium 185, Wiley, Chichester, **1994**, 178-196.
- ⁸ D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037.
- ⁹ T. J. S. Carlson, in *Ethnomedicine and Drug Discovery*, Hrsg.: M. M. Iwu, J. C. Wootton, Elsevier, Amsterdam, **2002**, 45-53.
- ¹⁰ H. Yu, S. Zhong, in *Artemisia*, Hrsg.: C. W. Wright, Taylor & Francis, London, **2002**, 149-157.
- ¹¹ G. T. Prance, in *Ethnobotany and the Search for new Drugs*, Ciba Foundation Symposium 185, Wiley, Chichester, **1994**, 1-3.
- ¹² M. J. Balick, in *Ethnobotany and the Search for new Drugs*, Ciba Foundation Symposium 185, Wiley, Chichester, **1994**, 4-24.
- ¹³ A. Stierle, D. Stierle, G. Strobel, G. Bignami, P. Grothaus, in *Taxane Anticancer Agents*, Hrsg.: G. I. Georg, T. T. Chen, I. Ojima, D. M. Vyas, ACS Symposium Series 583, American Chemical Society, Washington DC, **1995**, 81-97.
- ¹⁴ G. Walsh, *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*, Wiley, Chichester, **1999**, 1-36.
- ¹⁵ H. I. Miller, Book Review: *The Story of Taxol* by J. Goodman and V. Walsh, *Nature Medicine* **2001**, *7*, 148.
- ¹⁶ J.-J. Zhong, *J. Biosci. Bioeng.* **2002**, *94*, 591-599.
- ¹⁷ S. Grabley, R. Thiericke, in *Drug Discovery from Nature*, Hrsg.: S. Grabley, R. Thiericke, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, **1999**, 3-37.
- ¹⁸ S. A. Waksman, H. A. Lechevalier, *Science* **1949**, *109*, 305-307.
- ¹⁹ The International Human Genome Mapping Consortium, *Nature* **2001**, *409*, 934-941.
- ²⁰ The Celera Genomics Sequencing Team, *Science* **2001**, *291*, 1304-1351.
- ²¹ S. Grabley, R. Thiericke, in *Drug Discovery from Nature*, Hrsg.: S. Grabley, R. Thiericke, Springer, Heidelberg, **1999**, 38-48.
- ²² S. Grabley, R. Thiericke, A. Zeeck, in *Drug Discovery from Nature*, Hrsg.: S. Grabley, R. Thiericke, Springer, Heidelberg, **1999**, 124-148.
- ²³ H. P. Fiedler, *Nat. Prod. Lett.* **1993**, *2*, 119-128.
- ²⁴ J.-L. Wolfender, K. Ndjoko, K. Hostettmann, *J. Chromatog. A* **2003**, *1000*, 437-455.

- ²⁵ M. Arnold, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2002**.
- ²⁶ K. F. Chater, M. J. Bibb, in *Biotechnology: Products of Secondary Metabolism, Volume 7, Regulation of Bacterial Antibiotic Production*, 2. Auflage, Hrsg.: H. Kleinkauf, H. von Döhren, VCH, Weinheim, **1997**.
- ²⁷ H. B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 619-627.
- ²⁸ J. Fuchser, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1996**.
- ²⁹ R. Thiericke, J. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 265-289.
- ³⁰ M. S. Osbourne, T. H. Grossman, P. R. August, I. A. MacNeil, *ASM News* **2000**, *66*, 411-417.
- ³¹ H. Umezawa, I. R. Hooper, *Aminoglycoside Antibiotics*, Springer, New York, Heidelberg, Berlin, Tokyo, **1982**.
- ³² J. J. Hlava, J. H. Boothe, *The Tetracyclines*, Springer, New York, Heidelberg, Berlin, Tokyo, **1985**.
- ³³ W. Schönfeldt, H. A. Kirst, *Macrolide Antibiotics*, Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin, **2002**.
- ³⁴ T. Henkel, R. M. Brunne, H. Müller, F. Reichel, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 688-691.
- ³⁵ L. F. Tietze, H. P. Bell, S. Chandrasekhar, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4128-4160.
- ³⁶ S. Umezawa, T. Tsuchiya, K. Tatsuna, Y. Horiyuchi, T. Usi, H. Umezawa, M. Hamada, A. Yagi, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 20-27.
- ³⁷ H. Zähler, H. Drautz, W. Weber, in *Bioactive Microbial Product-Search and Discovery*, Hrsg.: J. D. Bullock, L. J. Nisbet, D. J. Winstley, Academic Press, London, New York, **1982**, 51-70.
- ³⁸ S. Breiding-Mack, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 953-960.
- ³⁹ H. Laatsch, *Naturstoffdatenbank AntiBase*, Version 2002, Chemical Concepts, Weinheim, **2000**.
- ⁴⁰ H. Tomoda, N. Tabata, M. Shinose, Y. Takahashi, H. B. Woodruff, S. Omura, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 1101-1107.
- ⁴¹ N. Tabata, H. Tomoda, S. Omura, *J. Antibiot.*, **1999**, *52*, 1108-1113.
- ⁴² G. Bach, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen, **1989**.
- ⁴³ R. Höfs, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1999**.
- ⁴⁴ I. Bergère, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2000**.
- ⁴⁵ O. Wagner, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2000**.
- ⁴⁶ J. Bitzer, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen, **2001**.
- ⁴⁷ G. Bach, S. Breiding-Mack, S. Grabley, P. Hammann, K. Hütter, R. Thiericke, H. Uhr, J. Wink, A. Zeeck, *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 241-250.
- ⁴⁸ G. E. McCasland, S. Furuta, L. J. Durham, *J. Org. Chem.* **1996**, *31*, 1516-1521.
- ⁴⁹ T. Suami, S. Ogawa, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, *48*, 22-90.
- ⁵⁰ Y.-Q. Tang, C. Maul, R. Höfs, I. Sattler, S. Grabley, Y.-Z. Feng, A. Zeeck, R. Thiericke, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 149-153.
- ⁵¹ W. Son, J. S. Choi, J. C. Kim, K. W. Nam, D.-S. Kim, H. Y. Chung, J. S. Kang, H. D. Choi, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 794-795.
- ⁵² K. Nabeta, S. Yamada, A. Ichihara, *Agric. Biol. Chem.* **1971**, *35*, 1639-1641.
- ⁵³ N. Kinoshita, H. Naganawa, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 435-437.
- ⁵⁴ P. Wipf, Y. Kim, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3518-3519.
- ⁵⁵ L. Vértesy, H.-W. Fehlhaber, A. Schulz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1936-1937.
- ⁵⁶ Y. Kameda, N. Asano, T. Yamaguchi, K. Matsuti, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 563-565.
- ⁵⁷ A. Isogai, S. Sakuda, J. Nakayama, S. Watanabe, A. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 2277-2279.

- ⁵⁸ Y. Kameda, N. Asano, M. Yoshikawa, M. Takeuchi, T. Yamaguchi, K. Matsuti, S. Horii, H. Fukase, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1301-1307.
- ⁵⁹ S. Omura, H. Tanaka, H. Kuga, N. Imamura, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 309-313.
- ⁶⁰ D. Schmidt, W. Frommer, B. Junge, W. Müller, W. Wingender, E. Truscheit, D. Schafter, *Naturwissenschaften* **1977**, *64*, 535-537.
- ⁶¹ T. D. Heightman, A. T. Vasella, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 794-815.
- ⁶² T. Takeuchi, H. Chimura, M. Hamada, H. Umezawa, O. Yoshioka, N. Oguchi, Y. Takahashi, A. Matsuda, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 737-742.
- ⁶³ R. Höfs, S. Schoppe, R. Thiericke, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1883-1887.
- ⁶⁴ O. Schlörke, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen, **2001**.
- ⁶⁵ H. Drautz, H. Zähler, E. Kupfer, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 1752-1765.
- ⁶⁶ M. Mayer, R. Thiericke, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3486-3489.
- ⁶⁷ S. Grabley, H. Kluge, H. U. Hoppe, *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 692-693.
- ⁶⁸ H. Hoff, H. Drautz, H.-P. Fiedler, H. Zähler, J. E. Schultz, W. Keller-Schierlein, S. Phillips, M. Ritzau, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1096-1107.
- ⁶⁹ C. Puder, P. Krastel, A. Zeeck, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1258-1260.
- ⁷⁰ B. E. Leach, K. M. Calhoun, L. R. Johnson, C. M. Teeters, W. G. Jackson, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 4011-4012.
- ⁷¹ L. H. Sternbach, S. Kaiser, M. W. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1639-1647.
- ⁷² E. Simonitsch, W. Eisenhut, O. A. Stamm, H. Schmid, *Helv. Chim. Acta* **1960**, *43*, 58-63.
- ⁷³ E. Simonitsch, W. Eisenhut, O. A. Stamm, H. Schmid, *Helv. Chim. Acta* **1964**, *47*, 1459-1475.
- ⁷⁴ W. Eisenhut, O. A. Stamm, H. Schmid, *Helv. Chim. Acta* **1964**, *47*, 1475-1484.
- ⁷⁵ J. P. McGovren, G. L. Neil, S. L. Crampton, M. I. Robinson, J. D. Douros, *Cancer Res.* **1977**, *37*, 1666-1672.
- ⁷⁶ L. H. Li, T. D. Clark, L. L. Murch, J. M. Wooden, L. M. Psigoda, W. C. Krüger, *Cancer Res.* **1978**, *38*, 3012-3018.
- ⁷⁷ M. Yagi, T. Nishimura, H. Suziki, H. Tannaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *98*, 3012-3018.
- ⁷⁸ P. Canham, L. C. Vining, A. McInnes, W. J. A. Gavin, J. L. C. Wright, *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 2450-2457.
- ⁷⁹ S. Grond, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1997**.
- ⁸⁰ S. Grond, H.-J. Langer, P. Henne, I. Sattler, R. Thiericke, S. Grabley, H. Zähler, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 929-937.
- ⁸¹ S.-I. Sakai, Y. Hitotsuyanagi, N. Aimi, H. Fujiki, M. Suganuma, T. Sugimura, Y. Endo, K. Shudo, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5219-5220.
- ⁸² Y. Endo, M. Hasegawa, A. Itai, K. Shudo, M. Tori, Y. Asakawa, S.-I. Sakai, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1069-1072.
- ⁸³ Y. Endo, K. Shudo, A. Itai, M. Hasegawa, S.-I. Sakai, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 5905-5924.
- ⁸⁴ K. Irie, T. Isaka, Y. Yanai, Y. Nakamura, F. Koizumi, H. Ohigaschi, P. A. Wender, Y. Satomi, H. Nishino, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10733-10743.
- ⁸⁵ H. Muratake, K. Okabe, M. Natsume, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 8545-8558.
- ⁸⁶ W. A. Gallimore, D. L. Galario, C. Lacy, Y. Thu, P. J. Scheuer, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1022-1026.

- ⁸⁷ Y. Hitotsuyanagi, H. Fujiki, M. Suganama, N. Aimi, S.-I. Sakai, Y. Emdo, K. Shudo, T. Sugimura, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 4233-4236.
- ⁸⁸ K. Okabe, H. Muratake, M. Natsume, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 8559-8572.
- ⁸⁹ M. Takashima, H. Sakai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1960**, *24*, 647-651.
- ⁹⁰ M. Takashima, H. Sakai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1960**, *24*, 652-655.
- ⁹¹ M. Takashima, H. Sakai, K. Arima, *Agric. Biol. Chem.* **1962**, *26*, 660-668.
- ⁹² J. H. Cardellina, F. J. Marner, R. E. Moore, *Science* **1979**, *204*, 193-195.
- ⁹³ Y. Endo, K. Shudo, K. Furuhashi, H. Ogura, S.-I. Sakai, N. Aimi, Y. Hitotsuyanagi, Y. Koyama, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 358-361.
- ⁹⁴ N. Aimi, H. Odaka, S.-I. Sakai, H. Fujiki, M. Suganuma, R. E. Moore, G. M. L. Patterson, *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1593-1596.
- ⁹⁵ S.-I. Sakai, N. Aimi, K. Yamaguchi, Y. Hitotsuyanagi, C. Watanabe, K. Yokose, Y. Koyama, K. Shudo, A. Itai, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 354-357.
- ⁹⁶ Y. Hitotsuyanagi, K. Yamaguchi, K. Ogata, N. Aimi, S.-I. Sakai, Y. Koyama, Y. Endo, K. Shudo, A. Itai, Y. Iitaka, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3774-3778.
- ⁹⁷ N. Hagiwara, K. Irie, K. Koshimizu, H. Hayashi, S. Murao, H. Tokuda, Y. Ito, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 2529-2530.
- ⁹⁸ K. Irie, N. Hagiwara, T. Kurome, H. Hayashi, M. Arai, K. Koshimizu, *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 285-287.
- ⁹⁹ K. Irie, N. Hagiwara, A. Funaki, H. Hayashi, M. Arai, K. Koshimizu, *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 1733-1735.
- ¹⁰⁰ N. Hagiwara, K. Irie, A. Funaki, H. Hayashi, M. Arai, K. Koshimizu, *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 641-648.
- ¹⁰¹ K. Irie, N. Hagiwara, A. Funaki, H. Hayashi, M. Arai, H. Tokuda, K. Koshimizu, *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 3193-3195.
- ¹⁰² K. Irie, A. Funaki, K. Koshimizu, H. Hayashi, M. Arai, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2113-2116.
- ¹⁰³ K. Irie, S.-I. Kajiyama, S. Okuno, M. Kondo, K. Koshimizu, H. Hayashi, M. Arai, H. Nishino, A. Iwashima, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 363-368.
- ¹⁰⁴ K. Irie, S. Tomimatsu, Y. Nakagawa, H. Ohigashi, H. Hayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 1669-1670.
- ¹⁰⁵ H. Fujiki, M. Mori, M. Nakayasu, M. Terada, T. Sugimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *90*, 976-983.
- ¹⁰⁶ Y. Imai, Y. Kaneko, F. Matsuzaki, Y. Endo, T. Oda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *97*, 926-931.
- ¹⁰⁷ Y. Kaneko, M. Yatsuzuka, Y. Endo, T. Oda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *100*, 888-893.
- ¹⁰⁸ S. Kume, M. Yamanaka, Y. Kaneko, T. Kariya, Y. Hashimoto, A. Tanabe, T. Ohashi, T. Oda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *102*, 659-666.
- ¹⁰⁹ Y. Endo, M. Ohno, M. Hirano, A. Itai, K. Shudo, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1841-1855.
- ¹¹⁰ K. Irie, T. Isaka, Y. Iwata, Y. Yanai, Y. Nakamura, F. Koizumi, H. Ohigashi, P. A. Wender, Y. Satomi, H. Nishino, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10733-10743.
- ¹¹¹ K. Irie, S.-I. Kajiyama, A. Funaki, K. Koshimizu, H. Hayashi, M. Arai, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 101-104.
- ¹¹² K. Irie, S.-I. Kajiyama, A. Funaki, K. Koshimizu, H. Hayashi, M. Arai, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 2773-2788.
- ¹¹³ M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565-574.

- ¹¹⁴ K. Irie, Y. Nakagawa, S. Tomimatsu, H. Ohigaschi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7929-7930.
- ¹¹⁵ M. A. W. Eaton, D. W. Hutchinson, *Tetrahedron Lett.* **1971**, *18*, 1337-1340.
- ¹¹⁶ Y. Furutani, I. Tsuchiya, H. Naganawa, T. Takeuchi, H. Umezawa, *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 1581-1585.
- ¹¹⁷ Y. Furutani, T. Takeuchi, H. Umezawa, *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 1587-1592.
- ¹¹⁸ Y. Furutani, H. Naganawa, T. Takeuchi, H. Umezawa, *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 1179-1183.
- ¹¹⁹ J. Bryans, P. Charlton, I. Chicarelli-Robinson, M. Collins, R. Faint, C. Latham, I. Shaw, S. Trew, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 1014-1021.
- ¹²⁰ M. Ueki, K. Ueno, S. Miyadoh, K. Abe, K. Shibata, M. Taniguchi, S. Oi, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1089-1094.
- ¹²¹ K. Shibata, M. Kashiwada, M. Ueki, M. Taniguchi, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1095-1100.
- ¹²² M. B. Reynolds, M. R. DeLuca, S. M. Kerwin, *Bioorg. Chem.* **1999**, *27*, 326-337.
- ¹²³ M. Ueki, M. Taniguchi, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 788-790.
- ¹²⁴ M. Ueki, K. Shibata, M. Taniguchi, *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 883-885.
- ¹²⁵ S. Yoshida, K. Yoneyama, S. Shiraishi, A. Watanabe, N. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 855-862.
- ¹²⁶ S. Tamura, N. Takahashi, S. Miyamoto, R. Mori, S. Suzuki, J. Nagatsu, *Agric. Biol. Chem.* **1963**, *27*, 576-582.
- ¹²⁷ N. Takahashi, A. Suzuki, S. Tamura, *Agric. Biol. Chem.* **1963**, *27*, 798-805.
- ¹²⁸ N. Takahashi, A. Suzuki, S. Tamura, *Agric. Biol. Chem.* **1966**, *30*, 1-12.
- ¹²⁹ N. Takahashi, A. Suzuki, S. Tamura, *Agric. Biol. Chem.* **1966**, *30*, 13-17.
- ¹³⁰ S. Yoshida, S. Shiraishi, N. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 587-591.
- ¹³¹ R. Jansen, G. Höfle, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5485-5486.
- ¹³² C. Hall, M. Wu, F. L. Crane, H. Takahashi, S. Tamura, K. Folkers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, *25*, 373-377.
- ¹³³ E. Darrouzet, J.-P. Issartel, J. Lunardi, A. Dupuis, *FEBS Letters* **1998**, *431*, 34-38.
- ¹³⁴ A. Urakawa, T. Sasaki, K.-I. Yoshida, T. Otani, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 1052-1055.
- ¹³⁵ K. Kominato, Y. Watanabe, S.-I. Hirano, T. Kioka, T. Terasawa, T. Yoshioka, K. Okamura, H. Tone, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 103-105.
- ¹³⁶ S. Yoshida, K. Yoneyama, S. Shiraishi, A. Watanabe, N. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 849-853.
- ¹³⁷ M. Matsumoto, K.-I. Mogi, K. Nagaoka, S. Ishiezeki, R. Kawahara, T. Nakashima, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 149-156.
- ¹³⁸ S. Funayama, M. Ishibashi, Y. Anraku, M. Miyauchi, M. Hiroharu, K. Komiyama, S. Omura, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1734-1740.
- ¹³⁹ H. Mori, S. Funayama, Y. Sudo, K. Komiyama, S. Omura, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1329-1331.
- ¹⁴⁰ K.-I. Kimura, S. Nakayama, N. Nakajima, M. Yoshihama, N. Miyata, G. Kawanishi, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1341-1343.
- ¹⁴¹ K.-I. Kimura, H. Takahashi, N. Miyata, M. Yoshihama, M. Uramoto, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 697-699.
- ¹⁴² H. Iwasaki, K.-I. Kamisango, H. Kuboniwa, H. Sasaki, S. Matsubara, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 451-452.
- ¹⁴³ H. Nishioka, T. Sawa, K. Isshiki, Y. Takahashi, H. Naganawa, N. Matsuda, S. Hattori, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 1283-1285.
- ¹⁴⁴ H. Nishioka, T. Sawa, Y. Takahashi, H. Naganawa, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 564-568.

- ¹⁴⁵ K. Kominato, Y. Watanabe, S.-I. Hirano, T. Kioka, T. Terasawa, T. Yoshioka, K. Okamura, H. Tone, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 99-102.
- ¹⁴⁶ Y. Kimura, N. Takahashi, S. Tamura, *Agric. Biol. Chem.* **1969**, *33*, 1507-1516.
- ¹⁴⁷ M. Tanabe, H. Seto, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 2087-2088.
- ¹⁴⁸ S. Yoshida, S. Shiraishi, K. Fujita, N. Takahashi, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *22*, 1863-1866.
- ¹⁴⁹ A. Dübeler, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1997**.
- ¹⁵⁰ T. Sato, I. Kawamoto, T. Oka, R. Okachi, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 266-271.
- ¹⁵¹ N. Hirayama, T. Iida, K. Shirahata, Y. Ohashi, Y. Sasada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 287-289.
- ¹⁵² A. B. Smith, G. A. Sulikowsky, K. Fujimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8039-8041.
- ¹⁵³ M. Morimoto, R. Imai, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 490-495.
- ¹⁵⁴ P. Krastel, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2000**.
- ¹⁵⁵ A. Dübeler, P. Krastel, H. G. Floss, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 983-987.
- ¹⁵⁶ K. B. Killday, R. Longley, P. J. McCarthy, S. A. Pomponi, A. E. Wright, R. F. Neale, M. A. Sills, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 500-507.
- ¹⁵⁷ G. Tsoungas, B. F. De Costa, *Magn. Reson. Chem.* **1988**, *26*, 8-13.
- ¹⁵⁸ O. Prakash, R. K. Saini, S. P. Singh, R. S. Varma, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3147-3150.
- ¹⁵⁹ M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, New York, **2002**, 170.
- ¹⁶⁰ *SciFinder Scholar 2001*, American Chemical Society.
- ¹⁶¹ *Chapman & Hall/CRC Dictionary of Natural Products on CD-ROM*, Version 12:1, Chapman & Hall, CRC, **2003**.
- ¹⁶² W. Trowitzsch-Kienast, V. Wray, K. Gerth, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 93-98.
- ¹⁶³ M. Otsuka, T. Eguchi, K. Shindo, K. Kakinuma, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3185-3188.
- ¹⁶⁴ C. Abell, *Enzymology and Molecular Biology of the Shikimat Pathway*, in: *Comprehensive Natural Product Chemistry Volume 1*, Hrsg.: D. Barton, K. Nakanishi, Elsevier, Amsterdam, **1999**, 573-607.
- ¹⁶⁵ Produktinformation MONSANTO, <http://www.roundupultra.de>.
- ¹⁶⁶ J. Rohr, A. Zeeck, *Biogenetisch-chemische Klassifizierung fermentativ hergestellter Sekundärstoffe*, in *Jahrbuch der Biotechnologie Band 2*, Hrsg.: P. Präve, Hanser, München, Wien, **1988**, 263-295.
- ¹⁶⁷ B. Bethe, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1994**.
- ¹⁶⁸ W. A. Ayer, R. H. Caskill, *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 2150-2158.
- ¹⁶⁹ J. Koziol, B. Tyrakowska, *Helv. Chim. Acta*, **1981** *64*, 1812-1817.
- ¹⁷⁰ F. Müller, K. H. Dudley, *Helv. Chim. Acta* **1971**, *54*, 1487-1497.
- ¹⁷¹ K. Ienaga, W. Pfeleiderer, *Chem. Ber.* **1977**, *110*, 3449-3455.
- ¹⁷² N. Yamashita, T. Harada, K. Shin-Ya, H. Seto, *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 79-81.
- ¹⁷³ N. Imamura, K. Kakinuma, N. Ikekawa, H. Tanaka, S. Omura, *J. Antibiot.* **1982**, *41*, 1260-1264.
- ¹⁷⁴ K. A. Parker, Q.-J. Ding, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 10249-10254.
- ¹⁷⁵ T. Okazaki, T. Kitahara, Y. Okami, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 176-184.
- ¹⁷⁶ T. Kitahara, H. Naganawa, T. Okazaki, Y. Okami, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 280-285.
- ¹⁷⁷ Y. Hayakawa, K. Furihata, H. Seto, N. Otake, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 3471-3474.
- ¹⁷⁸ M. Sezaki, S. Kondo, K. Maeda, H. Umezawa, *Tetrahedron* **1970**, *26*, 5171-5190.

- 179 T. P. Korobkova, E. M. Singal, L. P. Ivanitskaya, M. K. Kudinova, V. D. Karbyshev, N. V. Murenets, N. A. Klyuev, T. G. Terentyeva, N. A. Rudneva, A. N. Dimitriev, L. V. Egorov, *Antibiotiki* **1986**, *31*, 428-430.
- 180 N. V. Murenets, M. K. Kudinova, N. A. Klyuev, A. I. Chernyshev, S. V. Shorshnev, *Antibiotiki* **1986**, *31*, 431-434.
- 181 K. Ohta, E. Mizuta, H. Okazaki, T. Kishi, *Chem. Pharm Bull.* **1984**, *32*, 4350-4359.
- 182 T. Henkel, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 830-837.
- 183 T. Henkel, J. Rohr, J. M. Beale, L. Schwenen, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 492-503.
- 184 T. Uchida, M. Imoto, Y. Watanabe, K. Miura, T. Dobashi, N. Matsuda, T. Sawa, H. Naganawa, M. Hamada, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1171-1181.
- 185 JP 02072884, **1990**, 10 ff.
- 186 H. Drautz, H. Zähler, J. Rohr, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1986**, *34*, 1657-1669.
- 187 J. Rohr, R. Thiericke, *Nat. Prod. Rep.* **1992**, 103-137.
- 188 A. Kawashima, Y. Kishimura, M. Tamai, K. Hanada, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 3429-3431.
- 189 M. Igarashi, C. Sasao, A. Yoshida, H. Naganawa, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 335-337.
- 190 K. Krohn, J. Rohr, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *188*, 127-195.
- 191 J. Schimana, H.-P. Fiedler, I. Groth, R. Süßmuth, W. Beil, M. Walker, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 779-787.
- 192 M. Holzenkämpfer, M. Walker, A. Zeeck, J. Schimana, H.-P. Fiedler, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 301-307.
- 193 M. Holzenkämpfer, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2001**.
- 194 M. Gerlitz, G. Udvarnoki, J. Rohr, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1757-1761.
- 195 J. G. Hill, T. T. Nakashima, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1745-1748.
- 196 K. Kulowski, E. Wendt-Pienkowski, L. Han, K. Yang, L. C. Vining, C. R. Hutchinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1786-1794.
- 197 U. Rix, L. L. Remsing, D. Hoffmeister, A. Bechthold, J. Rohr, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 109-111.
- 198 E. Künzel, B. Faust, C. Oelkers, U. Weißbach, D. W. Bearden, G. Weitnauer, L. Westrich, A. Bechthold, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11058-11062.
- 199 N. Tóth, mündliche Mitteilung, **2003**.
- 200 A. Kuruüzüm-Uz, Z. Güvenalp, L. Ö. Demirezer, I. Bergère, K. Ströch, A. Zeeck, *Phytochemistry* **2002**, *61*, 937-941.
- 201 L. Ö. Demirezer, Z. Güvenalp, H.-J. Schiewe, I. Strietzel, M. Harmandar, A. Zeeck, *Phytochemistry* **1999**, *51*, 909-912.
- 202 M. E. Büyükkuroglu, L. Ö. Demirezer, Z. Güvenalp, *Pharmazie* **2002**, *8*, 559-561.
- 203 Department of Biology, Faculty of Science and Literature, Atatürk Universität, Erzurum, Türkei.
- 204 Faculty of Pharmacy, Ankara, Türkei.
- 205 *Chapman & Hall/CRC Dictionary of Natural Products on CD-ROM*, Version 11:2, Chapman & Hall, CRC, **2003**.
- 206 M. Sugiyama, E. Nagayama, M. Kikuchi, *Phytochemistry* **1993**, *33*, 1215-1219.
- 207 T. Endo, H. Taguchi, *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 2140-2142.
- 208 K. Nishiya, T. Kimura, K. Takeya, H. Itokawa, *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3511-3514.
- 209 P. W. Thies, *Tetrahedron Lett.* **1970**, *28*, 2471-2474.
- 210 H. Inouye, S. Ueda, S. Uesato, T. Shingu, *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2317-2325.

- ²¹¹ C. A. Boros, F. R. Stermitz, *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1173-1246.
- ²¹² L. Tomassini, M. F. Cometa, S. Foddai, M. Nicoletti, *Phytochemistry* **1995**, *38*, 423-425.
- ²¹³ L. Tomassini, S. Foddai, M. Nicoletti, M. F. Cometa, G. Palazzino, C. Galeffi, *Phytochemistry* **1997**, *46*, 901-905.
- ²¹⁴ P. Junior, *Planta Medica* **1983**, *47*, 161-163.
- ²¹⁵ K. Bock, C. Pedersen, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1983**, *41*, 27-65.
- ²¹⁶ P. Junior, *Planta Medica* **1984**, *50*, 417-420.
- ²¹⁷ A. Kuruüzüm-Uz, K. Ströch, L. Ö. Demirezer, A. Zeeck, *Phytochemistry* **2003**, *63*, 959-964.
- ²¹⁸ S.-H. Kuo, M.-H. Yen, M.-I. Chung, C.-N. Lin, *Phytochemistry* **1996**, *41*, 309-312.
- ²¹⁹ C. Hirobe, Z.-S. Qiao, K. Takeya, H. Itokawa, *Phytochemistry* **1997**, *46*, 521-524.
- ²²⁰ K. R. Markham, B. Ternai, R. Stanley, H. Geiger, T. J. Mabry, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1389-1397.
- ²²¹ I. Kuono, M. Inoue, Y. Onizuka, T. Fujisaki, N. Kawano, *Phytochemistry* **1988**, *27*, 611-612.
- ²²² A. Pabst, D. Barron, R. Adda, P. Schreier, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3853-3858.
- ²²³ K. Görler, B. Oehlke, H. Soicke, *Planta Medica* **1985**, *51*, 530-531.
- ²²⁴ M. Nicoletti, *Org. Magn. Reson.* **1983**, *21*, 460-461.
- ²²⁵ P. K. Dutta, U. S. Chowdhury, A. K. Chakravarty, B. Achari, S. C. Pakrashi, *Tetrahedron* **1983**, *39*, 3067-3072.
- ²²⁶ S. Damtoft, S. B. Hansen, B. Jacobsen, S. R. Jensen, B. J. Nielsen, *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2387-2389.
- ²²⁷ C. K. Sehgal, S. C. Taneja, K. L. Dhar, C. K. Atal, *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1036-1038.
- ²²⁸ S. Damtoft, H. Franzyk, S. R. Jensen, *Phytochemistry* **1997**, *45*, 743-750.
- ²²⁹ K. Nakamoto, H. Otsuka, K. Yamasaki, *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1856-1858.
- ²³⁰ H. Nishimura, H. Sasaki, T. Morota, H. Mitsushashi, *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2705-2709.
- ²³¹ H. Otsuka, N. Kubo, K. Yamasaki, W. Padolina, *Phytochemistry* **1989**, *28*, 513-515.
- ²³² J. Garcia, A. J. Chulia, *Planta Medica* **1986**, *52*, 327-329.
- ²³³ J. Garcia, A. J. Chulia, *Planta Medica* **1987**, *53*, 101-103.
- ²³⁴ P. H. Davies, *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Vol. 7, University Press, Edinburgh, **1966**.
- ²³⁵ K. Bøjthe-Horvath, A. Kocsis, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 965-966.
- ²³⁶ D. V. Banthorpe, J. J. White, *Phytochemistry* **1995**, *38*, 107-111.
- ²³⁷ E. Wenkert, H. E. Gottlieb, *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1811-1816.
- ²³⁸ K. Kamiya, Y. Fujita, Y. Saiki, E. Hanani, U. Mansur, T. Satake, *Heterocycles* **2002**, *56*, 537-544.
- ²³⁹ S.-K. Ling, A. Komorita, T. Tanaka, T. Fujioka, K. Mihashi, I. Kouno, *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 1035-1040.
- ²⁴⁰ H. Otsuka, K. Yoshimura, K. Yamasaki, M. C. Cantoria, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2049-2052.
- ²⁴¹ R. K. Chaudhuri, F. Ü. Afifi-Yazar, O. Sticher, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2317-2326.
- ²⁴² Merck, *Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie*, Darmstadt, **1980**.

DANKSAGUNG

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei Prof. Dr. H.-P. Fiedler und seinen Mitarbeitern in Tübingen bedanken, insbesondere bei Noemi Tóth. Das gleiche gilt für Prof. Dr. L. Ö. Demirezer und Dr. Ayşe Kuruüzüm-Uz (Ankara/Türkei).

Für die Aufnahme von NMR-Spektren danke ich Carola Zolke, Christiane Siebert und Martin Weitemeyer. Aus unserer Abteilung sei Diana Wolff, Stephanie Grond, Sven Meyer, Oliver Schlörke, Jens Bitzer und Tim Schuhmann gedankt, die manchmal die liebe Not mit mir hatten.

Györgyi Udvarnoki und Dr. Holm Frauendorf danke ich für die Aufnahme von Massenspektren und der Bereitstellung von Messzeit an der LC-MS.

Herrn Dr. Claus danke ich für die Bereitstellung der Kilimanjaro-Stämmen.

Michaela Klingebiel und Hans-Peter Kroll danke ich für die Unterstützung beim Screening und bei der Aufreinigung von Substanzen sowie für die Aufnahme der Drehwerte, IR-, UV- und CD-Spektren.

Für die Unterstützung bei Fermentationen im Fermenter möchte ich mich bei Hans-Jörg Langer bedanken und bei Jutta Gerber-Nolte für die Erstellung zahlreicher Testplatten.

Für die Unterstützung bei Computerproblemen sei Meike Holzenkämpfer, Philipp Krastel, Jens Bitzer und Gerald Thormann gedankt.

Ein ganz herzliches Dankeschön an Beatrix Girmann, Oliver Schlörke und Jens Bitzer für das sorgfältige und konstruktive Korrekturlesen dieser Arbeit.

Den Mitgliedern der Abteilung möchte ich für die gute Zusammenarbeit, den Spaß, vielen netten nicht chemischen Abenden, den hilfreichen Ratschlägen und Diskussionen sowie für die vielen verschiedenen Kuchen und Frühstücke danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Reinhild, die mich auch in schwierigen Zeiten uneingeschränkt unterstützt hat und für mich da war.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

LEBENS LAUF

Am 12.01.1975 wurde ich als zweites Kind von Gisela Ströch, geb. Struve, und Hans-Ulrich Ströch in Leverkusen geboren.

Von August 1981 bis Juli 1985 besuchte ich die Grundschule in Marne und von August 1985 bis Juni 1994 das Gymnasium in Marne, welches ich mit der Allgemeinen Hochschulreife verließ.

Von Juli 1994 bis Juni 1995 leistete ich meinen Grundwehrdienst im Transportbataillon 4/610 in Seeth.

Im Wintersemester 1995/96 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Georg-August-Universität zu Göttingen und legte im Oktober 1997 die Diplom-Chemiker-Vorprüfung ab.

In der Zeit von Juli 1999 bis März 2000 fertigte ich im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Zeeck meine Diplomarbeit mit dem Titel „Seitenkettenvariationen am Manumycingrundgerüst bei der Fermentation von *Streptomyces parvulus* (Tü 64) unter erhöhtem Sauerstoffpartialdruck“ an und absolvierte im Mai 2000 die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung.

Seit August 2000 arbeite ich unter Anleitung von Prof. Dr. A. Zeeck an der vorliegenden Dissertation.