

**Oxidative Schritte in der Phenylphenalenonbiosynthese in
Anigozanthos preissii und *Wachendorfia thyrsiflora*
(Haemodoraceae)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich Schiller Universität Jena

von *Dipl. Chemiker Tobias Munde*

geboren am 01.02.1979 in Erfurt

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ondruschka
PD Dr. Bernd Schneider

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.05.2009

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Anigozanthos</i>
AcCl	Acetylchlorid
Aceton- <i>d</i> ₆	deuteriertes Aceton
Acetonitril- <i>d</i> ₃	deuteriertes Acetonitril
AcOH	Eisessig
AD	asymmetrische Dihydroxylierung
$[\alpha]_D^{20}$	Spezifischer Drehwert bei 20°C
BuLi	Butyllithium
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
CD ₃ OD	deuteriertes Methanol
Cl-CH ⁺ NMe ₂ Cl ⁻	Dimethylchlormethyleniminiumchlorid
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CH ₃ CN	Acetonitril
CO ₂	Kohlendioxid
CuI	Kupfer-(I)-iodid
d	Dublett
dd	Dublett von Dubletts
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
(DHQ) ₂ -PHAL	Hydrochinon-1,4-phthalazindiyl-diether
diglyme	2,2'- Dimethoxydiethylether
DIP-Cl	Chlordiisopinocampheylboran
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
EE	Ethoxyethoxy
ESI	Elektrosprayionisation
Et ₃ N	Triethylamin
EtOCH=CH ₂	Ethylvinylether
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
Et ₂ O	Diethylether
Glc	Glucose
HCl	Salzsäure
HCO ₂ NH ₄	Ammoniumformat
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Abkürzungsverzeichnis

IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante
kat.	katalytisch
KBr	Kaliumbromid
K_2CO_3	Kaliumcarbonat
K_3FeCN_6	Kaliumhexacyanoferrat
KOH	Kaliumhydroxid
<i>L.</i>	<i>Lachnanthes</i>
$LiAlH(OBu^t)_3$	Lithium-tri- <i>tert</i> -butyloxy-aluminiumhydrid
OsO_4	Osmiumtetroxid
m	Multipllett
M	Molmasse
MeLi	Methylithium
MeOH	Methanol
$MeP(O)(OMe)_2$	Dimethyl-methylphosphonat
MS	Massenspektrometrie, Murashige/Skoog bei Medien
m/z	Quotient aus Masse und Ladung
NaOH	Natriumhydroxid
NMR	Nuclear magnetic resonance
$NOBF_4$	Nitrosyltetrafluoroborat
<i>p-</i>	<i>para</i>
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PhOH	Phenol
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
PPh_3	Triphenylphosphin
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
$SOCl_2$	Thionylchlorid
t	Triplett
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -Butanol
TFA	Trifluoressigsäure
TFEA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
TsOH	Toluolsulfonsäure
<i>W.</i> , WDF	<i>Wachendorfia thyrsiflora</i>
UV	Ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1 Allgemeine Einführung.....	6
1.2 Anigozanthos preissii und Wachendorfia thyrsiflora – zwei Vertreter der Haemodoraceae	7
1.2.1 Die Familie der Haemodoraceae	7
1.2.2 Anigozanthos preissii.....	8
1.2.3 Wachendorfia thyrsiflora.....	10
1.3 Phenylphenalenone	12
1.3.1 Struktur, Vorkommen und Bedeutung	12
1.3.2 Biosynthese	13
1.4 Zielstellung	15
2. Ergebnisse	18
2.1 Synthesen	18
2.1.1 Hintergrund.....	18
2.1.2 Synthese ¹³ C-markierter ringhydroxylierter α-Keto-β-phenylcarbonsäuren und β-Phenylmilchsäuren	18
2.1.3 Synthese ¹³ C-markierter Vorstufen für Fütterungsversuche unter ¹⁸ O ₂ -Atmosphäre	21
2.1.4 Synthese von [¹³ C]Diazomethan	23
2.2 Fütterungsexperimente	24
2.2.1 Hintergrund.....	24
2.2.2 Fütterungsexperimente mit ¹³ C-, ¹⁴ C- und ³ H-markierten Phenylpropanoiden .25	
2.2.2.1 Fütterungen von ¹³ C-markierten ringhydroxylierten α-Keto-β-phenylcarbonsäuren und β-Phenylmilchsäuren	25
2.2.2.2 Fütterungsexperimente mit [2,3,4,5,6- ³ H]L-Phenylalanin und [U- ¹⁴ C]p-Cumarsäure	29
2.2.3 Fütterungsexperimente unter ¹⁸ O ₂ -Atmosphäre	31
2.2.3.1 Hintergrund, Durchführung und Funktionsweise der Fütterungsexperimente unter ¹⁸ O ₂ -Atmosphäre.....	31
2.2.3.2 ¹³ C- und ¹⁸ O-Markierungsexperimente zur Biosynthese von Anigorufon (1) und Hydroxyanigorufon (2) in Anigozanthos preissii	33
2.2.3.2.1 Einführung	33
2.2.3.2.2 NMR-Messungen von Anigorufon (1) und Hydroxyanigorufon (2) aus ¹³ C- und ¹⁸ O-Markierungsexperimenten zur Biosynthese	34
2.2.3.2.3 Ergebnisse aus den HR-MS-Messungen der ¹³ C- und ¹⁸ O-Markierungsexperimente zur Biosynthese von Anigorufon (1) und Hydroxyanigorufon (2)	40

2.2.3.2.4	<i>Isotopologmuster aus den NMR- und HR-MS-Messungen der ¹³C- und ¹⁸O-Markierungsexperimente zur Biosynthese von Anigorufon (1) und Hydroxyanigorufon (2)</i>	46
2.2.3.3	¹³ C- und ¹⁸ O-Markierungsexperimente zur Biosynthese von tetraoxygenierten Phenylphenalenonen in <i>Wachendorfia thyrsoflora</i>	49
2.2.3.3.1	<i>Einführung</i>	49
2.2.3.3.2	<i>NMR-Messungen der ¹³C- und ¹⁸O-Markierungsexperimente zur Biosynthese von tetraoxygenierten Phenylphenalenonen in <i>Wachendorfia thyrsoflora</i></i>	52
2.2.3.3.3	<i>HR-MS-Messungen der ¹³C- und ¹⁸O-Markierungsexperimente zur Biosynthese von tetraoxygenierten Phenylphenalenonen in <i>Wachendorfia thyrsoflora</i></i>	66
2.2.3.3.4	<i>Isotopologmuster aus den NMR- und HR-MS-Messungen der ¹³C- und ¹⁸O-Markierungsexperimente zur Biosynthese tetraoxygenerter Phenylphenalenonen in <i>Wachendorfia thyrsoflora</i></i>	73
2.2.4	Fütterungsexperiment mit ¹⁸ O-Wasser	78
3.	Diskussion	80
3.1	<i>Vorbemerkungen zur Phenylphenalenon-Biosynthese</i>	80
3.2	<i>Zur Herkunft der Sauerstoffatome an C-1 und C-4' von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-6 und C-4' von 7-Phenylphenalenonen</i>	83
3.3	<i>Zur Herkunft der Sauerstoffatome an C-2 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-5 von 7-Phenylphenalenonen</i>	85
3.4	<i>Zur Herkunft des Sauerstoffatoms an C-4 von 9-Phenylphenalenonen</i>	88
3.5	<i>Zur Herkunft der Sauerstoffatome an C-5 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-2 von 7-Phenylphenalenonen</i>	90
3.6	<i>Zur Herkunft der Sauerstoffatome an C-1 von 7-Phenylphenalenonen und C-6 von 9-Phenylphenalenonen</i>	95
3.6	<i>Schlussfolgerung für die oxidativen Schritte in der Biosynthese von Phenylphenalenonen</i>	98
3.7	<i>Nutzen und Grenzen der verwendeten Methoden</i>	101
4.	Zusammenfassung	102
5.	Material und Methoden	105
5.1	<i>Material und Geräte</i>	105
5.2	<i>Synthesen</i>	106
5.2.1	Synthese von L-DOPA ^[70-82]	106
5.2.1.1	<i>3-(3,4-Methylenedioxyphenyl)acrylsäure (30)</i>	106
5.2.1.2	<i>[2-¹³C]3-(3,4-Methylenedioxyphenyl)acrylsäure (31)</i>	107
5.2.1.3	<i>3-(3,4-Methylenedioxyphenyl)acrylsäureethylester (32)</i>	107
5.2.1.4	<i>[2-¹³C]3-(3,4-Methylenedioxyphenyl)acrylsäureethylester (33)</i>	107

5.2.1.5	<i>2,3-Dihydroxy-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionsäureethylester (34)</i>	108
5.2.1.6	<i>[2-¹³C]2,3-Dihydroxy-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionsäureethylester (35)</i>	108
5.2.1.7	<i>Ethyl-4-carbethoxy-5-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1,3,2-dioxathiolan-2-oxid (36)</i>	109
5.2.1.8	<i>[2-¹³C]Ethyl-4-carbethoxy-5-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1,3,2-dioxathiolan-2-oxid (37)</i>	109
5.2.1.9	<i>3-Azido-2-hydroxy-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionsäureethylester (38)</i>	110
5.2.1.10	<i>[2-¹³C]3-Azido-2-hydroxy-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionsäureethylester (39)</i>	110
5.2.1.11	<i>Ethyl-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)aziridin-2-carboxylat (40)</i>	110
5.2.1.12	<i>[2-¹³C]Ethyl-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)aziridin-2-carboxylat (41)</i>	111
5.2.1.13	<i>2-Amino-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionsäureethylester (42)</i>	111
5.2.1.14	<i>[2-¹³C]2-Amino-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionsäureethylester (43)</i>	112
5.2.1.15	<i>Dihydroxyphenylalanin (44)</i>	112
5.2.1.16	<i>[2-¹³C]Dihydroxyphenylalanin (45)</i>	112
5.2.2	Herstellung von ringhydroxylierten α -Keto- β -phenylcarbonsäuren ^[83-86]	113
5.2.2.1	<i>3-(4-Hydroxyphenyl)brenztraubensäure (46)</i>	113
5.2.2.2	<i>[2-¹³C]3-(4-Hydroxyphenyl)brenztraubensäure (47)</i>	113
5.2.2.3	<i>3-(3,4-Dihydroxyphenyl)brenztraubensäure (48)</i>	113
5.2.3	Herstellung von ringhydroxylierten β -Phenylmilchsäuren ^[87-89]	114
5.2.3.1	<i>(R)-3-(4-Hydroxyphenyl)milchsäure (49)</i>	114
5.2.3.2	<i>[2-¹³C](R)-3-(4-Hydroxyphenyl)milchsäure (50)</i>	114
5.2.3.3	<i>(S)-3-(4-Hydroxyphenyl)milchsäure (51)</i>	115
5.2.3.4	<i>[2-¹³C](S)-3-(4-Hydroxyphenyl)milchsäure (52)</i>	115
5.2.3.5	<i>(R)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)milchsäure (53)</i>	115
5.2.3.6	<i>(S)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)milchsäure (54)</i>	116
5.2.4	Herstellung von <i>p</i> -Cumarsäure und [2- ¹³ C] <i>p</i> -Cumarsäure ^[71]	116
5.2.4.1	<i>p</i> -Cumarsäure (55)	116
5.2.4.2	<i>[2-¹³C]p</i> -Cumarsäure (56)	116
5.2.5	Herstellung von Diarylheptanoiden ^[71, 92, 93-96]	117
5.2.5.1	<i>[2-¹³C]Zimtsäure (57)</i>	117
5.2.5.2	<i>[2-¹³C]Zimtaldehyd (58)</i>	117
5.2.5.3	<i>3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäuremethylester (59)</i>	118
5.2.5.4	<i>3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäuremethylester (60)</i>	118
5.2.5.5	<i>3-[4-(1-Ethoxyethoxy)-phenyl]propionsäuremethylester (61)</i>	118
5.2.5.6	<i>3-[3,4-bis-(1-Ethoxyethoxy)-phenyl]propionsäuremethylester (62)</i>	119

5.2.5.7	4-[4-(1-Ethoxyethoxy)-phenyl]-2-oxobutylphosphonsäuredimethylester (63).....	119
5.2.5.8	4-[3,4-bis-(1-Ethoxyethoxy)-phenyl]-2-oxobutylphosphonsäuredimethylester (64)	120
5.2.5.9	(4E,6E)-1-[3,4-bis-(1-Ethoxyethoxy)-phenyl]-7-phenylhepta-4,6-dien-3-on (65).....	120
5.2.5.10	[6- ¹³ C]- (4E,6E)-1-[4-(1-Ethoxyethoxy)-phenyl]-7-phenylhepta-4,6-dien-3-on (66).....	121
5.2.5.11	[6- ¹³ C]- (4E,6E)-1-[3,4-bis-(1-Ethoxyethoxy)-Phenyl]-7-Phenylhepta-4,6-dien-3-on (67).....	121
5.2.5.12	[6- ¹³ C]- (4E,6E)-1-(4-Hydroxyphenyl)-7-phenylhepta-4,6-dien-3-on (68)	122
5.2.5.13	[6- ¹³ C]- (4E,6E)-1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-7-phenylhepta-4,6-dien-3-on (69).....	122
5.2.6	Synthese von Diazomethan ^[97-99]	123
5.2.6.1	N-Methyl-p-toluolsulfonamid (70)	123
5.2.6.2	N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid (71)	123
5.2.6.3	N-Methyl- ¹³ C-p-Toluolsulfonamid (72)	124
5.2.6.4	N-Methyl- ¹³ C-N-nitroso-p-toluolsulfonamid (73)	124
5.2.6.5	[¹³ C]Diazomethan (74)	124
5.3	Trennmethoden.....	125
5.3.1	Chromatographische Trennungen.....	125
5.3.1.1	Dünnschichtchromatographie (DC).....	125
5.3.1.2	Säulenchromatographie (SC).....	125
5.3.1.3	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	125
5.4	Pflanzenmaterial	126
5.4.1	Kultivierung.....	126
5.4.2	M3-und M3·5.3-Medium für <i>A. preissii</i> und <i>W. thyriflora</i>	126
5.5	Fütterungsexperimente	127
5.5.1	Fütterungsexperimente mit ¹³ C-, ¹⁴ C- und ³ H-markierten Phenylpropanoiden.....	127
5.5.1.1	Fütterungen von ¹³ C-markierten ringhydroxylierter α -Keto- β -phenylcarbonsäuren und β -Phenylmilchsäuren	127
5.5.1.2	Fütterungsexperimente mit [2,3,4,5,6- ³ H]L-Phenylalanin und [U- ¹⁴ C]p-Cumarsäure	127
5.5.2	Fütterungsexperimente unter ¹⁸ O ₂ -Atmosphäre und unter Verwendung von ¹⁸ O-Wasser	128
5.5.2.1	Fütterungsversuche unter ¹⁸ O ₂ -Atmosphäre	128
5.5.2.2	Fütterungsversuche mit ¹⁸ O-Wasser.....	129
5.5.3	Extraktion und Isolierung.....	129
5.5.4	Isolierte Reinverbindungen aus <i>A. preissii</i>	129

5.5.4.1	<i>Anigorufon (1)</i>	129
5.5.4.2	<i>Hydroxyanigorufon (2)</i>	130
5.5.5	Derivate der Reinverbindungen aus <i>A. preissii</i>	130
5.5.5.1	<i>[2-O¹³CH₃]Methoxyanigorufon (75)</i>	130
5.5.5.2	<i>[2,4'-di-O¹³CH₃]2,4'-Dimethoxyanigorufon (76)</i>	130
5.5.6	Isolierte Reinverbindungen aus <i>W. thyrsoflora</i>	131
5.5.6.1	<i>6-O-[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (25)</i>	131
5.5.6.2	<i>2,5,6-Trihydroxy-9-phenylphenalen-1-on (17)</i>	131
5.5.7	Derivate der Reinverbindungen aus <i>W. thyrsoflora</i>	131
5.5.7.1	<i>[2,5-di-O¹³CH₃]6-O-[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-methoxy-7-phenylphenalen-1-on (77)</i>	131
5.5.7.2	<i>[2,5,6-tri-O¹³CH₃]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (78)</i>	132
5.5.7.3	<i>[2,5,6-tri-O¹³CH₃]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (79)</i>	132
5.6	<i>Nachweismethoden</i>	133
5.6.1	Kernmagnetische Resonanz (NMR)-Spektroskopie	133
5.6.1.1	<i>Spektrometer und Probenköpfe</i>	133
5.6.1.2	<i>Lösungsmittel und Referenzierung</i>	133
5.6.1.3	<i>NMR-Methoden</i>	133
5.6.2	Massenspektrometrie	133
5.6.2.1	<i>Massenspektren von Syntheseprodukten</i>	133
5.6.2.2	<i>Massenspektren von Phenylphenalenonen und deren Derivaten</i>	134
6.	Literaturverzeichnis	135
7.	Anhang.....	141

1. Einleitung

1.1 *Allgemeine Einführung*

Sekundäre Pflanzenstoffe stellen eine große Gruppe von chemisch sehr unterschiedlichen Naturstoffen dar^[1-4]. Ihre Anzahl wird auf mehr als 200000 geschätzt. Sie entstehen im Stoffwechsel, haben aber gewöhnlich keine Funktion im Wachstum und in der Entwicklung neuer Zellen. Eine unmittelbare Bedeutung für den Primärmetabolismus von Pflanzen ist nicht bekannt (Sachs, 1873). Mit der Vielzahl an Sekundärstoffen beschäftigten sich zunächst ausschließlich Chemiker. So fand mit der Isolierung des ersten Naturstoffs, des Morphins, die Naturstoffchemie ihren Anfang und lieferte einen großen Beitrag zur Entwicklung der organischen und analytischen Chemie^[9]. Der erste synthetisch hergestellte Naturstoff stellte einen Meilenstein der Synthesechemie dar – 1886 gelang es Baeyer Indigo, den ersten pflanzlichen Naturstoff, synthetisch darzustellen^[5, 9]. In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde versucht die Biosynthese von Sekundärmetaboliten, z.B. durch Vergleich mit Reaktionen aus der organischen Chemie, zu erklären (Robinson, 1981). Die Forschung im Bereich des Sekundärstoffwechsels erhielt mit der Einführung der Radiotracer-technik in der Mitte des 20. Jahrhunderts einen wichtigen Impuls. Künstlich hergestellte radioaktive Nuklide wurden zur Markierung von biosynthetischen Vorstufen verwendet^[6, 9]. Durch die Einführung neuer MS- und NMR-Techniken in den 70er Jahren wurden Vorstufen und Intermediate, welche mit stabilen Nukliden (z.B. ²H, ¹³C, ¹⁸O und ¹⁵N) markiert waren, in der Biosyntheseforschung etabliert^[7-9].

Obwohl weitgehend ohne Bedeutung für Wachstum und Entwicklung, haben sekundäre Pflanzenstoffe wichtige Funktionen für die produzierenden Pflanzen, wie z.B. die Abwehr von Fraßfeinden. Des Weiteren dienen sie Pflanzen zum Schutz vor UV-Strahlung, gegen Befall durch Krankheitserreger, zur Kommunikation zwischen verschiedenen Organismen sowie gegen Schädigung durch pflanzenpathogene Pilze. Erst Anfang der 90er Jahre bestätigten amerikanische Wissenschaftler in einer Studie, dass Menschen, die viel Obst und Gemüse essen, viel seltener z.B. an Krebs erkrankten, als Menschen die wenig davon verzehrten^[10]. Mittlerweile ist bekannt, dass viele dieser Sekundärstoffe antikanzerogene, antimikrobielle, antioxidative, immunmodulierende und andere Wirkungen haben können.

In der klassischen Naturstoffforschung beschäftigt man sich unter anderem mit der Aufklärung der Struktur dieser Verbindungen, um neue Leitstrukturen für die Arzneimittelentwicklung zu finden. Dagegen ist die Bedeutung für die produzierenden Organismen, d.h. die Erforschung ihrer ökologischen Funktionen, ein wichtiger Untersuchungsgegenstand der chemischen Ökologie. Hinzu kommt die Forschung an der Biosynthese dieser Substanzen, welche dem Verständnis des Stoffwechselweges dient und

bei der Erklärung helfen soll, weshalb manche Pflanzen dazu in der Lage sind Verbindungen herzustellen, die sie z.B. in der Abwehr gegen Schädlinge resistenter machen.

Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich mit der Aufklärung der oxidativen Schritte in der Biosynthese von Phenylphenalenonen. Diese Verbindungen kommen in Arten der Familien Haemodoraceae, zu denen z.B. *Wachendorfia thyrsiflora*, *Anigozanthos preissii* und *Xiphidium caeruleum* zählen, vor. Weitere Vorkommen sind die Familien Pontederiaceae^[11, 12] (z.B. *Eichhornia crassipes*), Strelitziaceae^[13] wie auch Musaceae^[14, 15], zu denen wirtschaftlich bedeutende Bananenpflanzen (*Musa acuminata*) gehören, deren Früchte ein wichtiges Grundnahrungsmittel in vielen Ländern in Südostasien, Afrika sowie Latein- und Südamerika darstellen. Der Befall mit den pflanzenpathogenen Pilzen *Fusarium oxysporum*^[15-18] und *Mycosphaerella fijiensis*^[19, 20], die bei Bananen zu großen Ernteverlusten führen, erfordert den extensiven Einsatz von Pflanzenschutzmitteln. Phenylphenalene stellen einen Teil des natürlichen Abwehrsystems der sie produzierenden Arten dar, das in kommerziell angebauten Bananenpflanzen weniger ausgeprägt zu sein scheint als im Wildtyp von *Musa* und in den Haemodoraceae.

Darüber hinaus besitzen Phenylphenalene und verwandte Verbindungen UV-protective, antibakterielle, nematizide und fungizide Eigenschaften^[15, 20-25]. Die Aufklärung der Biosynthese ist somit ein wichtiger Schritt, um die Grundlagen für eine genetische Modifikation zu schaffen und perspektivisch die Resistenz dieser Pflanzen gegenüber Krankheitserregern und anderen Einflüssen zu erhöhen. In Musaceae werden Phenylphenalene allerdings erst nach Infektion als Phytoalexine in größeren Mengen gebildet^[17, 25-27]. Phytoalexine sind niedermolekulare Verbindungen, die direkt nach einer Infektion durch Mikroorganismen (wie z.B. Bakterien oder Pilze), von der betroffenen Pflanze produziert werden, um Ausbreitung, Wachstum oder Vermehrung der Pathogene in der Pflanze zu hemmen^[28, 29]. Einer der Gründe für die Verwendung der Haemodoraceae für die durchzuführenden Versuche war das konstitutive Vorkommen relativ hoher Konzentrationen von Phenylphenalenonen, die damit in dieser Familie als Phytoanticipine^[30] angesehen werden können. Phytoanticipine sind niedermolekulare, antimikrobielle Verbindungen, die bereits vor Befall durch Mikroorganismen (wie z.B. Bakterien oder Pilze) in der Pflanze enthalten sind oder direkt nach Infektion aus bereits vorhandenen Vorstufen gebildet werden.

1.2 *Anigozanthos preissii* und *Wachendorfia thyrsiflora* – zwei Vertreter der Haemodoraceae

1.2.1 Die Familie der Haemodoraceae

Die Haemodoraceae zählen zu den monokotyledonen Pflanzenfamilien und sind in zwei Unterfamilien und 14 Gattungen mit 116 Arten gegliedert. Es besteht eine enge

taxonomische Verwandtschaft zu den Familien der Pontederiaceae, Phyllidraceae, Commelinaceae und Hanguanaceae^[31]. Die zwei Unterfamilien der Haemodoraceae sind Haemodoroideae mit den Gattungen *Barbaretta*, *Dilatris*, *Haemodorum*, *Lachnanthes*, *Pyrrohiza*, *Schiekia*, *Wachendorfia* und *Xiphidium*, sowie Conostylidoideae mit *Anigozanthos*, *Blancoa*, *Conostylis*, *Phlebocarya* und *Tribonanthes*^[32, 33]. Ihre Verbreitung ist auf die tropischen und subtropischen Regionen Australiens, Südafrikas und Lateinamerikas beschränkt. Während alle Conostylidoideae in Südwest-Australien zu finden sind Haemodoroideae auf dem gesamten australischen Kontinent, Südafrika und Lateinamerika anzutreffen. *Xiphidium*, *Schiekia* und *Pyrrohiza* stammen aus Mittel- und Südamerika, *Barbaretta*, *Dilatris* und *Wachendorfia* hingegen aus Südafrika. *Lachnanthes* ist der einzige Vertreter der in gemäßigten Regionen entlang der Ostküste Nordamerikas beheimatet ist^[34]. Der Name Haemodoraceae leitet sich von den stark rot bis violett gefärbten Wurzeln von Arten wie *L. tinctoria* und *W. thyrsoiflora* ab und ist ebenso verantwortlich für den deutschen Namen „Blutwurzler“^[35, 36]. Die Gründe für die Färbung sind Phenylphenalenone und ähnliche Verbindungen, welche als chemotaxonomische Marker der Haemodoraceae genutzt wurden^[34].

1.2.2 *Anigozanthos preissii*

Die Gattung *Anigozanthos*, auch Känguruh-Blumen oder Känguruh-Pfötchen genannt, besteht aus etwa 11 Arten, die nur in Südwest-Australien beheimatet sind^[37]. Sie sind auf mineralarmen, ausgelaugten, tiefsandigen und gut durchlässigen Böden zu finden und sind meist starker Sonneneinstrahlung ausgesetzt^[38–40]. Alle *Anigozanthos*-Arten gehören zu den mehrjährigen krautigen Pflanzen. Die Blütenstände werden bis zu 150 cm hoch.

A. preissii ist eine bis zu 70 cm groß werdende Pflanze mit gelb-orange-roten Blüten^[41, 42]. In ihr sind zahlreiche Phenylphenalenone^[43] und andere phenolische Verbindungen enthalten. In Abb. 1.2 sind die bisher in dieser Pflanze nachgewiesenen Naturstoffe dargestellt. Es handelt sich um Phenylphenalenone, Stilbendimere^[44] und deren Glycoside^[45].

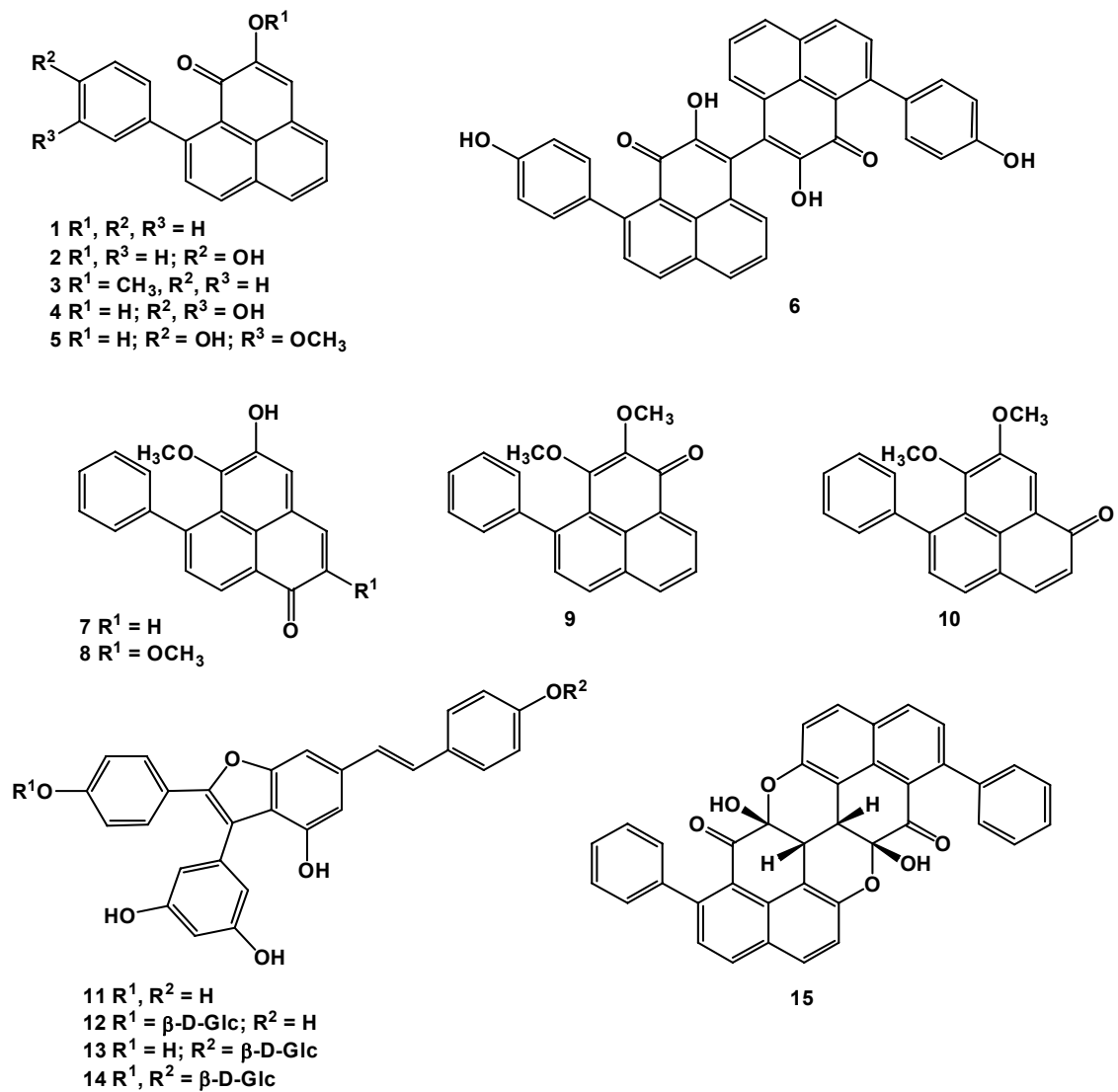


Abb. 1.2: Phenylphenalenone und verwandte Verbindungen aus *A. preissii*^[43–45].

1 Anigorufon, **2** Hydroxyanigorufon, **3** Methoxyanigorufon, **4** Dihydroxyanigorufon, **5** Musalonon F^[47],
6 3,3'-Bis[2-hydroxy-9-(4-hydroxyphenyl)-phenalen-1-on] (3,3'-bis-hydroxyanigorufon), **7** 5-Hydroxy-6-methoxy-7-phenylphenalen-1-on, **8** 5-Hydroxy-2,6-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on, **9** 2,3-Dimethoxy-4-phenylphenalen-1-on, **10** 7,8-Dimethoxy-6-phenylphenalen-1-on, **11** Anigopreissin A, **12** Anigopreissin A-4a-O- β -D-glucopyranosid, **13** Anigopreissin A-4b-O- β -D-glucopyranosid, **14** Anigopreissin A-4a, 4b-di-O- β -D-glucopyranosid, **15** Anigorotin^[46]

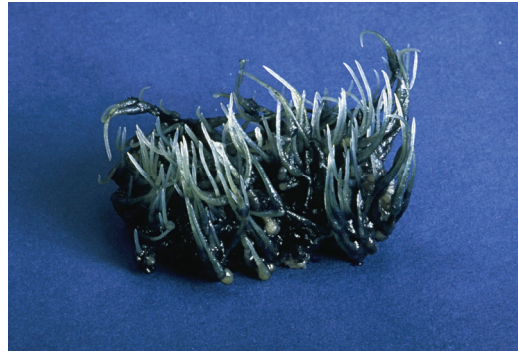
**A****B**

Abb. 1.1: *Anigozanthos preissii*: **A** : Ganzpflanze (Foto: R. Davis^[120]), **B** : Wurzelkultur

1.2.3 *Wachendorfia thyrsiflora*

Die vier bekannten Arten von *Wachendorfia* (Burm.) sind alle in der Kapregion Südafrikas heimisch^[48]. Die Gattung wurde benannt nach E.J. von Wachendorff, einem Professor für Botanik und Chemie. Die drei Arten *W. paniculata*, *W. brachyandra* und *W. parviflora* bevorzugen saisonal trockene Habitate, *W. thyrsiflora* hingegen Habitate in immerfeuchten Marschen und an Flüssen. Alle Arten, außer *W. thyrsiflora*, welche immergrün ist, gedeihen von Frühjahr bis Sommer. Sie können bis zu 2.5 m hoch werden^[34]. Der Name *thyrsiflora* leitet von thyrsus (thyse) ab, womit ein ähriger oder traubiger Blütenstand gemeint ist.

**A****B**

Abb. 1.3: *Wachendorfia thyrsiflora*: **A** Ganzpflanze im Gewächshaus, **B** Wurzelkultur

W. thyrsiflora weist eine große Vielfalt an Phenylphenalenonen und verwandten Verbindungen auf. In Abb. 1.4 werden die bisher bekannten Verbindungen vorgestellt.

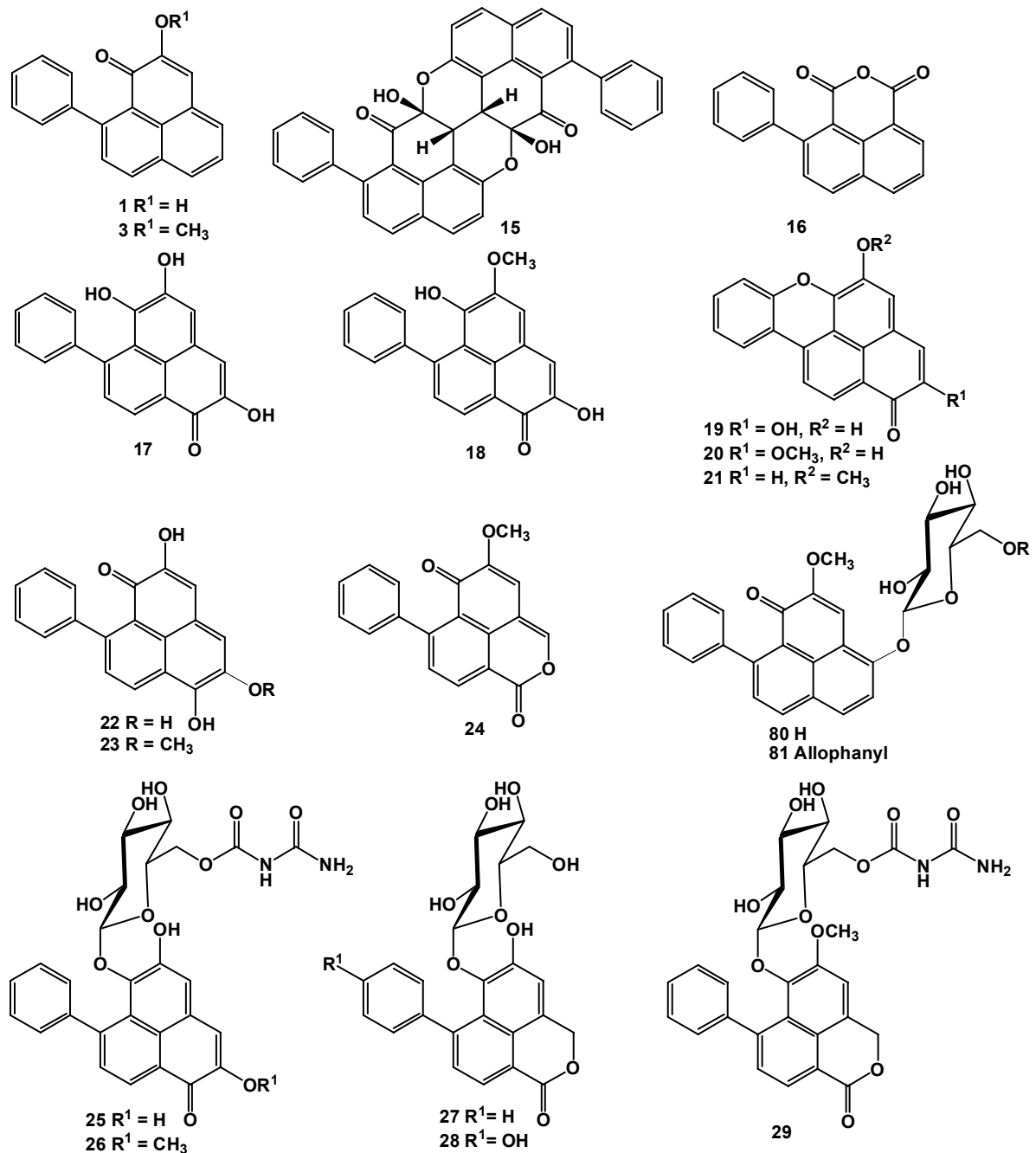


Abb. 1.4: Phenylphenalenone und verwandte Verbindungen aus *W. thyriflora*:

1 Anigorufon^[49]; **3** Methoxyanigorufon; **15** Anigorootin^[46]; **16** 4-Phenyl-benzo[*de*]isochromen-1,3-dion^[50]; **17** Lachnanthosid-Aglycon, **18** Haemodrin^[51]; **19** 2,5-Dihydroxy-6-oxa-benzo[*def*]chrysen-1-on^[52]; **20** 5-Hydroxy-2-methoxy-6-oxa-benzo[*def*]chrysen-1-on^[52]; **21** 5-Methoxy-6-oxa-benzo[*def*]chrysen-1-on^[53]; **22** 2,5,6-Trihydroxy-9-phenylphenalen-1-on^[54]; **23** 2,6-Dihydroxy-5-methoxy-9-phenylphenalen-1-on^[54]; **24** 5-Methoxy-7-phenyl-benzo[*de*]isochromen-1-on^[52]; **24**, **25** 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on^[49]; **26** 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-5-dihydroxy-2-methoxy-7-phenylphenalen-1-on^[49]; **27** 6-O-(β -D-glucopyranosyl)-5-hydroxy-7-phenyl-3*H*-benzo[*de*]isochromen-1-on; **28** 6-O-(β -D-glucopyranosyl)-5-hydroxy-7-(*p*-hydroxyphenyl)-3*H*-benzo[*de*]isochromen-1-on; **29** 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-5-methoxy-7-phenyl-3*H*-benzo[*de*]isochromen-1-on^[49]; **80** 4-O-(β -D-glucopyranosyl)-2-methoxy-9-phenylphenalen-1-on ; **81** 4-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2-methoxy-9-phenylphenalen-1-on.

1.3 Phenylphenalene

1.3.1 Struktur, Vorkommen und Bedeutung

Phenylphenalene sind phenolische Farbstoffe die im sichtbaren Bereich absorbieren. Der Name leitet sich aus ihren strukturellen Merkmalen ab. Dabei handelt es sich um ein Phenalengerüst, welches mit einer Ketofunktion und einem Phenylring versehen ist (Abb.1.5). Nach den Nomenklaturregeln für die Priorität von funktionellen Gruppen hat die

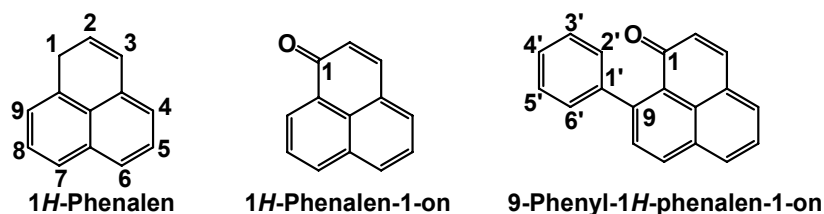


Abb. 1.5: Grundstruktur von Phenalen, Phenalenon und Phenylphenalenon

Ketofunktion die Positionsnummer 1. Der Phenylring kann unterschiedliche Positionen im Bezug zur Ketofunktion einnehmen. Hinzu kommen weitere Modifikationen der Grundstruktur durch zusätzliche Sauerstofffunktionen, welche außerdem noch teilweise glycosyliert sein können, z.B. mit Glucose (Verbindungen **25** – **29** sowie **80** und **81** in Abb. 1.4). Des Weiteren kann der Phenyl- und Phenalenonring durch eine Etherbrücke verknüpft sein, wie es in den Verbindungen des Oxabenzochrysenon-Typs der Fall ist (z.B. Verbindungen **19** – **21** in Abb. 1.4). Eine weitere Möglichkeit wird beim Phenylbenzochromenon-Typ deutlich. Hier ist ein Kohlenstoff im Phenalenongerüst durch Sauerstoff ersetzt (z.B. Verbindungen **24** und **27–29** in Abb. 1.4). Alle Kohlenstoffatome des Phenylphenalenon-Grundgerüsts sind sp^2 -hybridisiert. Phenylphenalene haben eine gelbe bis violette Farbe. Dies ergibt sich durch die Absorption im nahen ultravioletten und sichtbaren Licht. Dies ist typisch für Verbindungen mit konjugierten Mehrfachbindungen im Molekülgerüst.

Sekundäre Pflanzenstoffe, die ein Phenalenongerüst besitzen, wurden erstmals vor 50 Jahren aus Pflanzen der Haemodoraceae isoliert^[55–57]. Haemocorin war das erste aus einer Pflanze isolierte Phenylphenalenon. Es wurde aus *Haemodorum corymbosum* isoliert^[55]. Verbindungen des Phenylphenalenon-Typs wurden bisher sowohl aus den Wurzeln, wie auch aus den Blüten, Früchten oder der kompletten Pflanze der vier monokotyledonen Pflanzenfamilien Haemodoraceae^[57], Musaceae^[14, 15], Pontederiaceae^[11, 12] und Strelitziaceae^[13] isoliert. Eine große Anzahl an weiteren Phenylphenalenonen wurde in den darauf folgenden Jahrzehnten für diese Pflanzenfamilien beschrieben^[43, 54, 58]. Bei Musaceae ist die Konzentration an Phenylphenalenonen bei gesunden Pflanzen allerdings sehr gering. Diese wird durch Infektion jedoch deutlich erhöht^[25, 26], wodurch man hier den Begriff

Phytoalexine verwenden kann. Für einige Verbindungen wurden außerdem anti-tumorale, anti-bakterielle, anti-mikrobielle und fungitoxische Wirkungen nachgewiesen^[23, 55].

1.3.2 Biosynthese

Zur Aufklärung der Biosynthese von Phenylphenalenonen bieten sich zunächst Fütterungsexperimente mit ¹³C-markierten Vorstufen gefolgt von NMR- und MS-Analysen an. Grundlage für alle bisher durchgeführten Untersuchungen zur Biosynthese von Phenylphenalenonen bildete eine von R. Thomas 1961 veröffentlichte Hypothese, wonach die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin gemeinsam mit einem von Acetat stammenden C1-Baustein ein Diarylheptanoid-Intermediat ausbilden^[60]. Weiterführende Studien an *Haemodorum corymbosum*, *Lachnanthes caroliniana* und *Anigozanthos preissii* unter Verwendung [¹⁴C]- und [¹³C]markierter Vorstufen bestätigten diese Hypothese^[61–64]. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin werden durch PAL (Phenylalanin-Ammonium-Lyase) in Zimtsäure bzw. mittels Tyrosin-Ammonium-Lyase in *p*-Cumarsäure umgewandelt und durch CoA-Ligasen weiter in ihre aktivierten CoA-Ester umgesetzt (Abb. 1.6). Die in Pflanzen verbreitete Möglichkeit zur Synthese von *p*-Cumarsäure besteht jedoch nicht in der Umwandlung aus Tyrosin, sondern in der P-450-abhängigen Oxidation der aus Phenylalanin synthetisierten Zimtsäure.

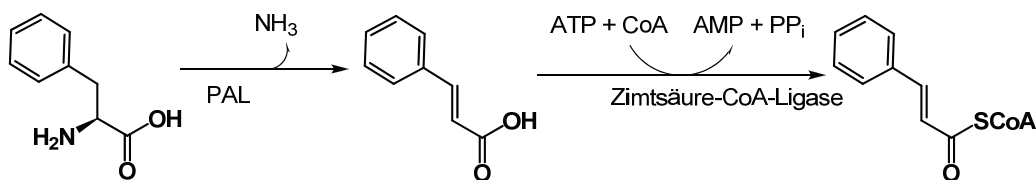


Abb. 1.6: Biosynthese von Zimtsäure-CoA-ester

Mittels ¹³C-markierter Vorstufen konnte der Einbau von Phenylalanin und Tyrosin^[62], sowie verschiedener Phenylpropanensäuren wie Zimtsäure^[65], *p*-Cumarsäure^[64] und Kaffeesäure^[63] nachgewiesen werden. Durch NMR konnte eindeutig der Einbau von [¹³C]Zimtsäure (Abb. 1.7 1) und [¹³C]Dihydrozimtsäure in *Anigozanthos preissii* konnte die Nutzung von zwei Phenylpropanoidmolekülen zur Synthese von Anigorufon gezeigt werden^[65, 66]. Es kann auch ein Mol *p*-Cumarsäure oder Dihydro-*p*-cumarsäure in Anigorufon eingebaut werden. Zum Aufbau von Hydroxyanigorufon hingegen werden zwei Mol *p*-Cumarsäure (Abb. 1.7 2) bzw. Dihydro-*p*-cumarsäure verwendet^[67]. Des Weiteren konnte durch Fütterung von [2-¹³C]Acetat der Ursprung des Kohlenstoffs in Position 6a in Phenylphenalenonen nachgewiesen werden (Abb. 1.7)^[64].

Durch den Einbau eines [6-¹³C]Diarylheptanoids in Anigorufon wurde der Nachweis erbracht, dass Phenylphenalenone aus linearen Diarylheptanoiden gebildet werden und daher eine

Untergruppe der Diarylheptanoide sind^[65]. Wahrscheinlich werden diese intermediären linearen Diarylheptanoide in der Zelle sofort im nächsten Schritt der Biosynthese weiter umgesetzt. Dieser Schritt besteht in der Zyklisierung und Ausbildung des Phenylphenalenon-Grundgerüsts. Die Zyklisierung verläuft vermutlich nach einer Diels-Alder-Zykloaddition^[67]. Für diesen 4+2-Zykloadditionsmechanismus benötigt das Diarylheptanoid-Intermediat einige strukturelle Merkmale. Ein 1,3-Dienstrukturelement und ein durch elektrophile Gruppen aktiviertes Dienophil sind die Voraussetzung für die Zyklisierungsreaktion (Abb. 1.7)^[63].

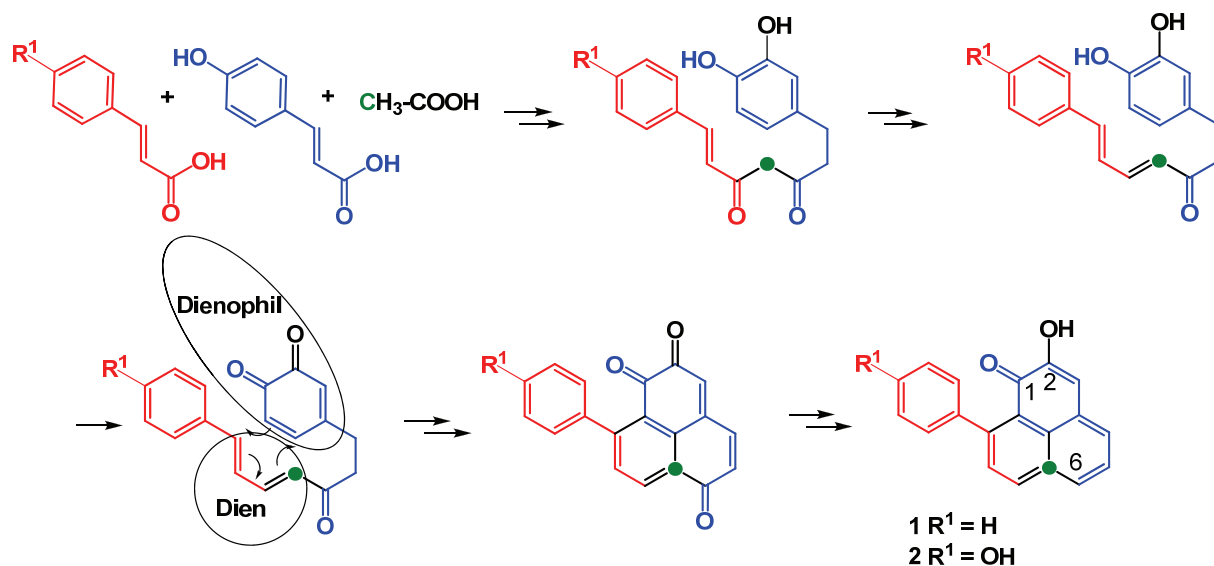


Abb. 1.7: Schema für die Biosynthese von Anigorufon (1) und Hydroxyanigorufon (2), ausgehend von Zimtsäure (rot, $R^1 = H$) bzw. *p*-Cumarsäure (rot, $R^1 = OH$), *p*-Cumarsäure (blau) und C-2 von Acetat (grün).

Anschließend folgen noch weitere vermutlich enzymatische Reaktionen, wie z. B. Dehydrogenierungen, Oxygenierungen und Methylierungen. Diese führen zur strukturellen Diversifizierung der gebildeten Phenylphenalene. Die Reihenfolge der Oxidationsschritte wurde bislang nicht genauer untersucht. Es kann angenommen werden, dass die Sauerstofffunktionen in Pos. 1 und 6 des Phenylphenalengerüsts (Abb. 1.7) von der *p*-Hydroxyl- und Carboxylgruppe der Phenylpropansäure, *p*-Cumarsäure, stammen. Weitere Oxidationen erfolgen vermutlich später in der Biosynthese der Phenylphenalene. Alternativ könnten Sauerstofffunktionen bereits mit den Phenylpropansäure-Vorstufen in Form von Phenylmilchsäure- oder Phenylbrenztraubensäure-Derivaten eingeführt werden oder Oxidationen auf der Stufe der linearen Diarylheptanoide erfolgen.

1.4 Zielstellung

Auf Grundlage von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde die Zielstellung für die vorliegende Arbeit entwickelt. Phenylphenalenone sind aus verschiedenen Gründen interessant. In den letzten 15 Jahren wurden sie in Bananen (Musaceae)^[15, 19, 20, 25, 27, 30, 68, 69], welche von enormer wirtschaftlicher Bedeutung für Schwellen- und Entwicklungsländer sind, nachgewiesen. Es entstehen zum Teil erhebliche Ernteauffälle aufgrund von Befall durch Schadorganismen, wie z.B. phytopathogene Pilze sowie Wurzelschädlinge, wie im Boden lebende Nematoden. Als Reaktion auf diese Angriffe bilden die Bananenpflanzen verstärkt Phenylphenalenone.

Pflanzen der Familie der Haemodoraceae wurden als Untersuchungsobjekte ausgewählt, da sie vor allem in den Wurzeln eine hohe Konzentration an konstitutiv vorkommenden Phenylphenalenonen aufweisen und sterile Wurzelkulturen als Versuchsmaterial unabhängig von der Vegetationsperiode verfügbar sind. Das macht diese Pflanzen zu idealen Studienobjekten zur Biosynthese der Phenylphenalenone. In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits einige Versuche zur Biosynthese von Phenylphenalenonen durchgeführt. So wurde nachgewiesen, dass Phenylalanin, sowie Phenylpropansäuren, wie *p*-Cumarsäure und Zimtsäure, für den Aufbau der Phenylphenalenon-Grundstruktur genutzt werden. Wie bereits in Kapitel 1.3 erwähnt, stellen lineare Diarylheptanoide ein biosynthetisches Intermediat für Phenylphenalenone dar. Die exakte Sequenz der Phenylphenalenon-Biosynthese ist allerdings nicht bekannt. So ist bisher experimentell nicht nachgewiesen worden, über welchen Mechanismus und zu welchem Zeitpunkt funktionelle Gruppen, wie Hydroxyl- und Ketogruppen, biosynthetisch aufgebaut werden. Es bestehen die Möglichkeiten, dass die Oxidation auf Stufe des Precursors, auf Stufe des Diarylheptanoids oder nach Ringschluss, durch ein Enzym, z.B. Cytochrom P 450, vollzogen wird.

Das Ziel dieser Arbeit besteht somit darin, durch Fütterungsversuche an Haemodoraceae herauszufinden, auf welcher Stufe der Biosynthese von Phenylphenalenonen Sauerstofffunktionen eingeführt werden. Das zu untersuchende Material wird mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie analysiert.

Die Schwerpunkte der Arbeit liegen:

- (1) in der Synthese geeigneter ¹³C-markierter Vorstufen,
- (2) in Fütterungsexperimenten mit den synthetisierten ¹³C-markierten Vorstufen
- (3) in Fütterungsexperimenten unter ¹⁸O₂- Atmosphäre
- (4) in der Isolierung und Reinigung der zu untersuchenden Phenylphenalenone
- (5) in der Methylierung der betreffenden Phenylphenalenone mittels [¹³C]Diazomethan mit anschließender Aufreinigung
- (6) in der Analyse der isolierten Verbindungen mittels NMR und MS

(7) in der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse zur Klärung der Frage, auf welcher Stufe der Biosynthese Sauerstofffunktionen eingeführt werden.

Es bestehen zwei unterschiedliche Hypothesen für den biosynthetischen Einbau von Sauerstofffunktionen in Phenylphenalenone. In Abb. 1.8 sind diese Hypothesen für die Biosynthese eines tetraoxygenierten Phenylphenalenons dargestellt:

- (a) Früher Oxygenierungsweg: Einer der Phenylpropanoid-Vorstufen enthält den Sauerstoff als Hydroxy- bzw. Carbonylfunktion. Beispiel: $[2-^{13}\text{C}](\text{S})$ -3-(4-Hydroxyphenyl)milchsäure (Abb. 1.8 **a**). Der Sauerstoff wird durch Transaminierung eingeführt. Ein Beispiel für eine frühe Einführung des Sauerstoffes an C-2 von tetraoxygenierten 7-Phenylphenalenonen ist in Abb. 1.8 **a** dargestellt. Die Oxygenierung erfolgt vor Ringschluss, auf Stufe der Phenylpropanoid-Vorstufen.
- (b) Später Oxygenierungsweg: Der Sauerstoff wird durch enzymatische Oxidation (z.B. durch Cytochrom P 450) eingebaut. Als Beispiel hierfür ist in Abb. 1.8 **b** der Einbau des Sauerstoffes an Pos. C-2 eines tetraoxygenierten 7-Phenylphenalenons dargestellt. Die Oxygenierung erfolgt nach Ringschluss, nach Ausbildung der Phenylphenalenon-Grundstruktur.

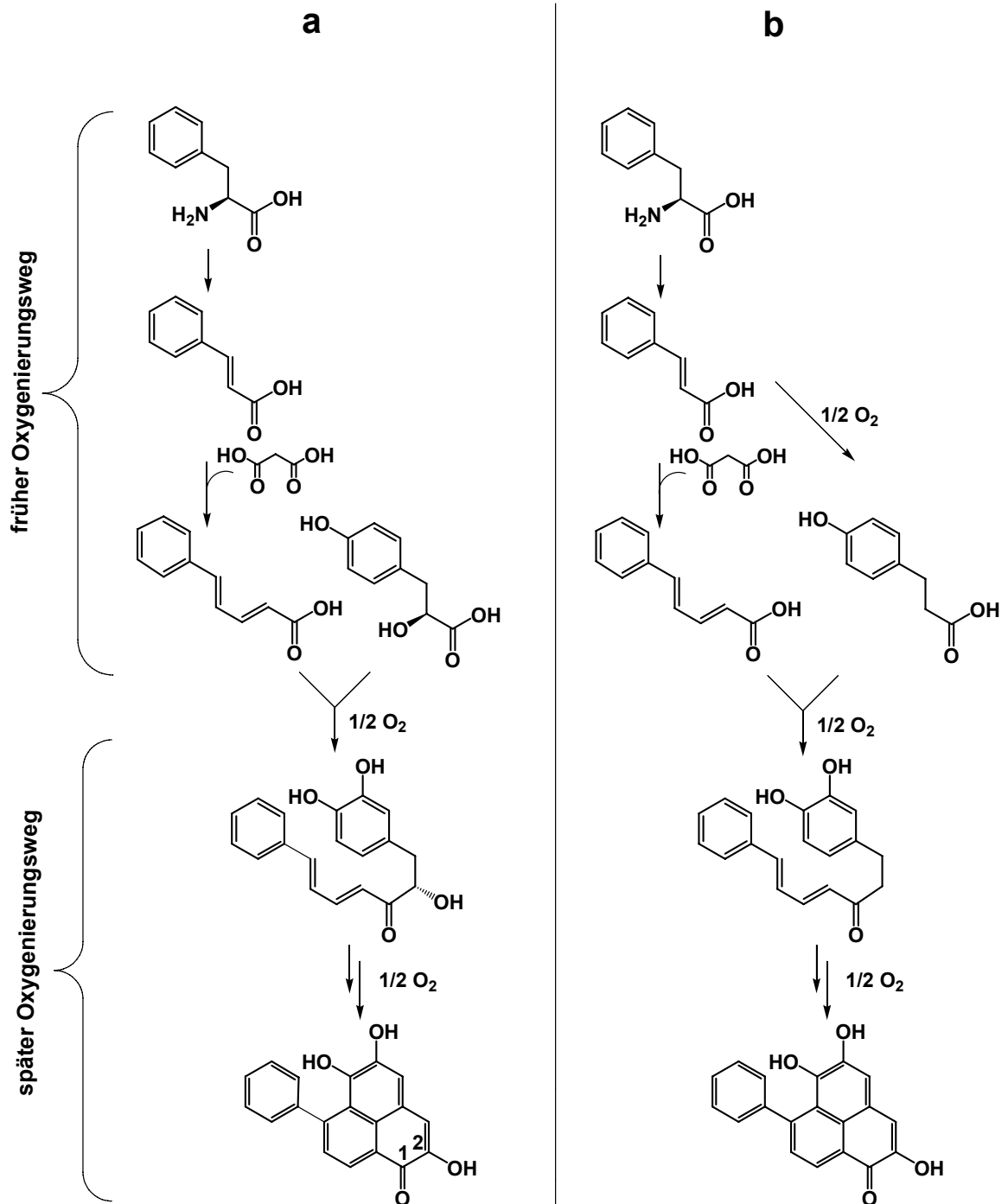


Abb. 1.8: Hypothesevarianten für die Biosynthese eines tetraoxygenierten Phenylphenalenons unter besonderer Berücksichtigung der Oxidationsreaktionen: Einführung der Sauerstofffunktion an C-2 eines tetraoxygenierten 7-Phenylphenalenons durch: (a) Eine der beiden Phenylpropanoid-Vorstufen enthält Sauerstoff als Hydroxyfunktion in der Seitenkette (frühe Oxygenierung) und (b) der Sauerstoff wird durch enzymatische Oxidation nach Ringschluss, auf Stufe des ausgebildeten Phenylphenalenons, eingebaut. Zur Vereinfachung wurden nur die freien Säuren dargestellt und auf die CoA-Ester verzichtet.

2. Ergebnisse

2.1 Synthesen

2.1.1 Hintergrund

Die Überlegung, nachfolgende ^{13}C -markierte Verbindungen zu synthetisieren resultiert aus Ergebnissen von vorangegangenen Biosynthesestudien der Spezies *A. preissii* und *W. thyrsoflora*. Diese ergaben, dass Phenylpropansäuren, wie z.B. Phenylalanin und Zimtsäure, Vorstufen in der Biosynthese von Phenylphenalenonen darstellen^[62–67]. Die Aufgabe bestand nun darin, sauerstofffunktionalisierte ^{13}C -markierte Verbindungen herzustellen, welche für Fütterungsversuche verwendet werden können, um die Herkunft des Sauerstoffs in Phenylphenalenonen aufzuklären (Abb. 2.1).

Die synthetisierten ^{13}C -markierten Vorstufen fanden Anwendungen in zwei unterschiedlichen Gruppen von Fütterungsversuchen:

- (1) Fütterung [2- ^{13}C]-markierter ringhydroxylierter α -Keto- β -phenylcarbonsäuren und β -Phenylmilchsäuren an *W. thyrsoflora*
- (2) Fütterung von [2- ^{13}C]Phenylalanin, [2- ^{13}C]p-Cumarsäure und [6- ^{13}C]Diarylheptanoiden an *A. preissii* und *W. thyrsoflora* unter konstanter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre

Außer den ^{13}C -markierten Vorstufen wurde [^{13}C]Diazomethan z.T. aus selbst synthetisiertem Diazald hergestellt. [^{13}C]Diazomethan fand Anwendung in der Derivatisierung der zu untersuchenden Phenylphenalene, welche nach Fütterungsexperimenten unter konstanter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre extrahiert und aufgereinigt wurden.

Alle Synthesen erfolgten zuerst ohne ^{13}C -Markierung, um die Gewissheit der Funktionalität der einzelnen Synthesestufen und akzeptabler Ausbeuten zu haben. Die Syntheseverläufe wurden mittels DC kontrolliert und die Produkte durch NMR-, MS- und IR-Spektroskopie analysiert. Die Daten hierfür werden im Teil Material und Methoden (Kapitel 5) detailliert aufgeführt.

2.1.2 Synthese ^{13}C -markierter ringhydroxylierter α -Keto- β -phenylcarbonsäuren und β -Phenylmilchsäuren

Als Ausgangsmaterialien dienten [2- ^{13}C]Tyrosin und [2- ^{13}C]L-DOPA (**45**). Im Gegensatz zu [2- ^{13}C]Tyrosin ist [2- ^{13}C]L-DOPA (**45**) nicht kommerziell erhältlich. Aus diesem Grund musste diese Verbindung über eine 8-Stufen Synthese hergestellt werden (Abb. 2.1)^[70]. Im ersten

Schritt (a) wurde in einer KNOEVENAGEL-Kondensation Piperonal und [2-¹³C]Malonsäure zur [2-¹³C]3-(3,4-Methylenedioxyphenyl)acrylsäure (**31**) umgesetzt^[71], gefolgt von einer Veresterung (b)^[72-74] zum Ethylester **33**. Der α,β -ungesättigte Ester wurde im nächsten Schritt einer asymmetrischen Dihydroxylierung (AD)^[70, 75] (c) in Gegenwart von katalytischen Mengen OsO₄ und Hydrochinon-1,4-phthalazindiyl-diether [(DHQ)₂-PHAL] als chiraalem Reagens unterworfen. Das dabei erhaltene vicinale Diol **35** lieferte im nächsten Schritt (d) nach Reaktion mit SOCl₂ in Gegenwart von Et₃N und CH₂Cl₂ das cyclische Sulfit **37**^[70, 76, 77], als Diastereomerengemisch im Verhältnis 1:1. Die Umsetzung (e) des cyclischen Sulfits mit Natriumazid resultierte in der Bildung des Azidoalkohols **39**^[70, 78, 79], welcher anschließend nach Behandlung mit Triphenylphosphin in Acetonitril (f) das chirale Aziridin **41**^[70, 80] in guten Ausbeuten lieferte. Mittels Pd-katalysierter reduktiver Ringöffnung, wobei die Öffnung des Rings an der benzylic Position stereospezifisch und regioselektiv erfolgte, wurde in der nächsten Stufe (g) der α -Aminosäureester **43** erhalten^[70, 81, 82]. Im letzten Schritt (h) lieferte die Umsetzung des Aminosäureesters mit 6M HCl, Phenol und Essigsäure das gewünschte [2-¹³C]L-DOPA (**45**)^[70].

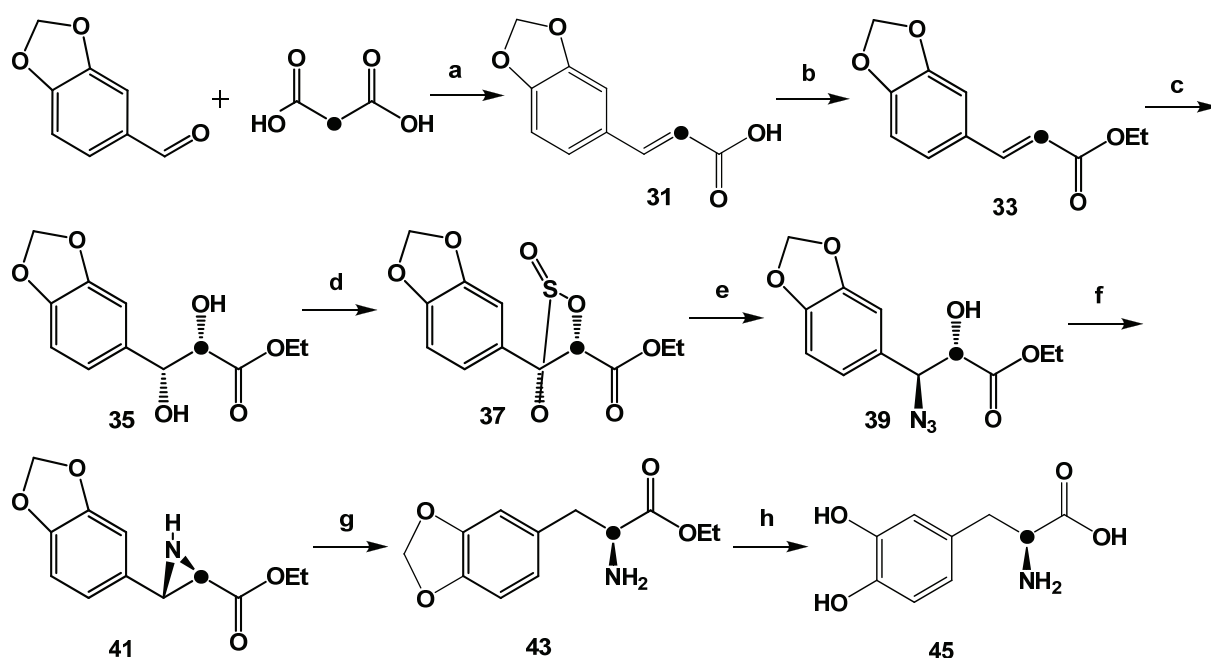


Abb.2.1: Synthese von [2-¹³C]L-DOPA **45**: (a) Pyridin, Piperidin, Rückfluss, 12 h, 90%; (b) EtOH, konz. HCl, Rückfluss, 6 h, 82%; (c) kat. OsO₄, (DHQ)₂-PHAL, K₃FeCN₆, K₂CO₃, *t*-BuOH-H₂O, 0 °C, 84%; (d) SOCl₂, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C, 86%; (e) NaN₃, DMF, 60 °C, 82%; (f) PPh₃, CH₃CN, RT, 84%; (g) 10% Pd/C, HCO₂NH₄, MeOH, Rückfluss, 70%; (h) 6 M HCl, PhOH, AcOH, 130-135 °C, 24 h, 77%, ● = ¹³C.

Im Folgenden wird die Umwandlung phenolischer α -Aminosäuren in die entsprechenden α -Ketosäuren beschrieben, die anschließend einerseits für Fütterungsexperimente genutzt wurden und des Weiteren in die enantiomerenreinen β -Phenylmilchsäuren überführt wurden, welche ebenfalls Anwendung in Fütterungsexperimenten fanden (Abb. 2.2)^[83-85]. Unter Verwendung von TFEA erfolgt eine Zyklisierung der Aminosäure. Die darauffolgende

Hydrolyse des gebildeten 2-Trifluormethyl-3-oxazolin-5-ons^[86] liefert die entsprechende α -Ketosäure. Auf diese Weise wurde [2-¹³C]Tyrosin in die entsprechende ringhydroxylierte 3-Phenylbrenztraubensäure **47** umgewandelt. Bei der Reaktion musste DMAP zugegeben werden, um die Bildung schwerlöslicher Polymere, welche bei der Umsetzung mit TFEA entstehen könnten, zu verhindern. In enantioselektiven Reduktionen wurde die Ketosäure **47** in *R*- und *S*- β -Phenylmilchsäuren umgewandelt^[87–89]. Unter Verwendung der Methode nach Wang wurde die *S*- α -Hydroxysäure **52** durch Behandlung der entsprechenden α -Ketosäure **47** mit (+)-DIP-Cl^[87, 88] hergestellt. Die *R*- α -Hydroxysäure **50** wurde durch Umsetzung mit (–)-DIP-Cl^[89] erhalten.

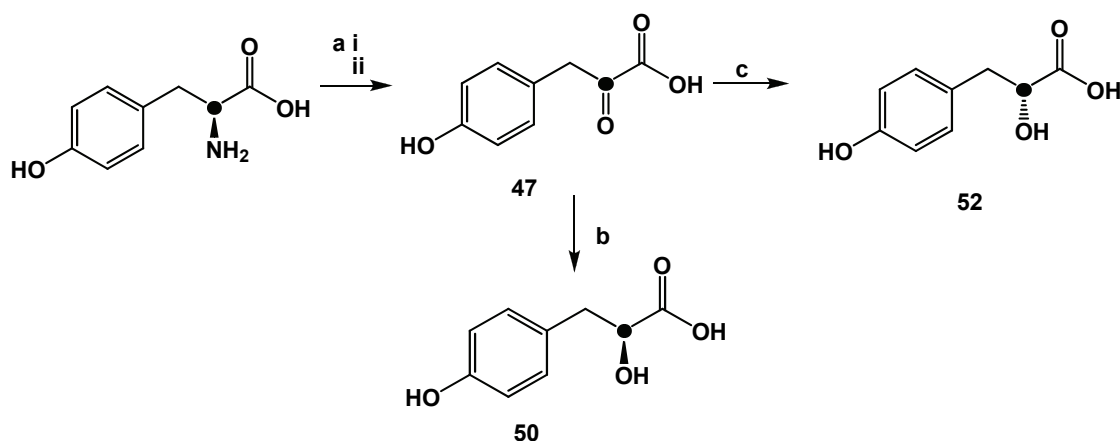


Abb. 2.2: Darstellung von (*S*)- und (*R*)-[2-¹³C]3-(4-Hydroxyphenyl)milchsäure (**52** und **50**) als Beispiel für die Synthese von ringhydroxylierten enantiomerenreinen *R*- und *S*-[2-¹³C]3-Phenylmilchsäuren über die entsprechende [2-¹³C]3-Phenylbrenztraubensäure **47**: (a) i DMAP, TFEA, Rückfluss, 20 h, ii 1% HCl, RT, 12 h, 81%; (b) Et₃N, (+)-DIP-Cl, THF, -20 °C – RT, 8 h, 65%; (c) Et₃N, (–)-DIP-Cl, THF, -20 °C – RT, 8 h, 70%, ● = ¹³C.

Mittels NMR-Spektroskopie, unter Verwendung von Europium-tris-(*d*₃-heptafluorobutyrylcamphorat in Acetonitril-*d*₃, konnte für die jeweiligen Enantiomeren die Enantiomerenreinheit nachgewiesen werden, wie in Abb. 2.3 sichtbar^[90, 91].

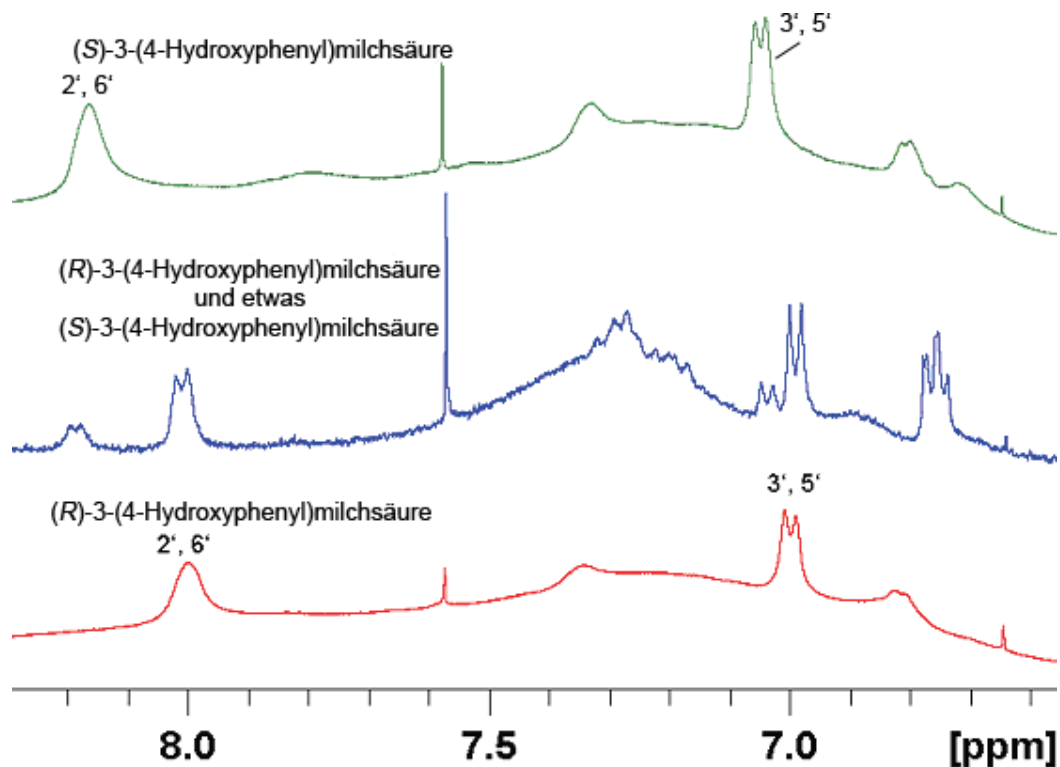


Abb. 2.3: ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, MeCN-d_3) der synthetischen ringhydroxylierten Phenylmilchsäuren **50** und **52** zum Nachweis der Enantiomerenreinheit mittels Europium-tris-(d_3 -heptafluorobutyrylcamphorat)

2.1.3 Synthese ^{13}C -markierter Vorstufen für Fütterungsversuche unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre

Wie bereits beschrieben, stellen Phenylpropansäuren Vorstufen in der Biosynthese von Phenylphenalenonen dar. Für Fütterungsversuche an *W. thyrsoflora* und *A. preissii* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre, wurde $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) synthetisiert (Abb. 2.4). Diese wurde durch eine KNOEVENAGEL-Kondensation von 4-Hydroxybenzaldehyd mit $[2-^{13}\text{C}]$ Malonsäure erhalten^[71].

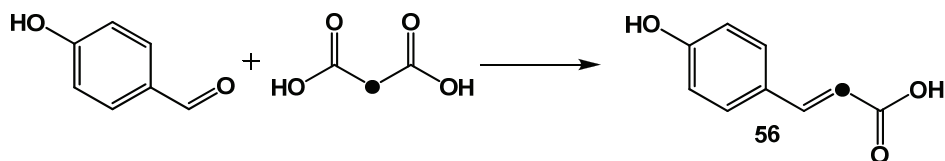


Abb. 2.4: Synthese von $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure **56**: Pyridin, Piperidin, Rückfluss, 12 h, 71%, ● = ^{13}C .

Des Weiteren ist aus vorangegangenen Studien an *A. preissii* bekannt, dass Diarylheptanoide Intermediate in der Biosynthese von Phenylphenalenonen darstellen. Dies lässt die Vermutung zu, dass Diarylheptanoide in *W. thyrsoflora* ebenfalls Zwischenstufen in der Phenylphenalenon-Biosynthese sind. Deren genaue Struktur ist jedoch nicht bekannt. Aus diesem Grund wurden verschiedene $[6-^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoide hergestellt, deren endogene unmarkierte Analoga als potentielle Intermediate der Phenylphenalenon-Biosynthese angesehen werden. Diese markierten Precursoren fanden Anwendungen in

Fütterungsversuchen an *W. thyrsoflora*, welche ebenfalls unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre durchgeführt wurden. Für die Synthese der ^{13}C -markierten Diarylheptanoide war es notwendig $[2-^{13}\text{C}]$ Zimtaldehyd (**58**) herzustellen (Abb. 2.5). Dies erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt (a) wurde Benzaldehyd und $[2-^{13}\text{C}]$ Malonsäure in einer KNOEVENAGEL-Kondensation zur $[2-^{13}\text{C}]$ Zimtsäure (**57**)^[71] umgesetzt. In der folgenden Stufe wurde die Säure **57** direkt zum $[2-^{13}\text{C}]$ Zimtaldehyd (**58**)^[92] reduziert. Hierbei wurden zur Reaktionslösung aus $[2-^{13}\text{C}]$ Zimtsäure (**57**) und zuvor frisch synthetisiertem *N,N*-Dimethylchloromethyleniminiumchlorid in Gegenwart von Pyridin katalytische Mengen Kupfer(I)-iodid und Lithium-tri-*tert*-butyloxyaluminiumhydrid hinzugegeben (b). Diese Reduktion liefert direkt $[2-^{13}\text{C}]$ Zimtaldehyd (**58**) in guten Ausbeuten.

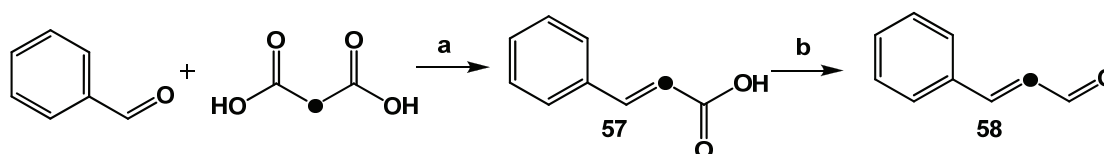


Abb. 2.5: Synthese von $[2-^{13}\text{C}]$ Zimtaldehyd **58**: (a) Pyridin, Piperidin, Rückfluss, 12 h, 77%; (b) i $\text{Cl}-\text{CH}=\text{NMe}_2 \text{Cl}^-$, Pyridin, THF, $-30\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, ii $\text{LiAlH}(\text{O}i\text{Bu})_3$, CuI (kat.), THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min, 73%, ● = ^{13}C .

Die Diarylheptanoide **68** und **69** wurden mittels Wittig-Horner Reaktion hergestellt (Abb. 2.6)^[93–96]. Die Ausgangsmaterialien Hydrokaffesäure und 4-Hydroxyphenylpropionsäure wurden jeweils zunächst im Schritt (a) in die Methylester **59** und **60** überführt. Nach Einführung von EE-Schutzgruppen (b) an den Hydroxy-Funktionen wurden die geschützten Ester **61** und **62** erhalten. Die darauffolgende Umsetzung (c) der Ester **61** und **62** lieferte die entsprechenden Phosphonate **63** und **64**. Nach Aufreinigung wurden die Phosphonate **63** und **64** unter den Bedingungen einer Wittig-Horner Reaktion (d) mit $[2-^{13}\text{C}]$ Zimtaldehyd (**58**) zu den entsprechenden EE-geschützten $[6-^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoiden **66** und **67** umgesetzt. Im letzten Schritt (e) lieferte die Entschützung durch den Einsatz katalytischer Mengen *p*-Toluolsulfonsäure die entsprechenden $[6-^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoide **68** und **69**.

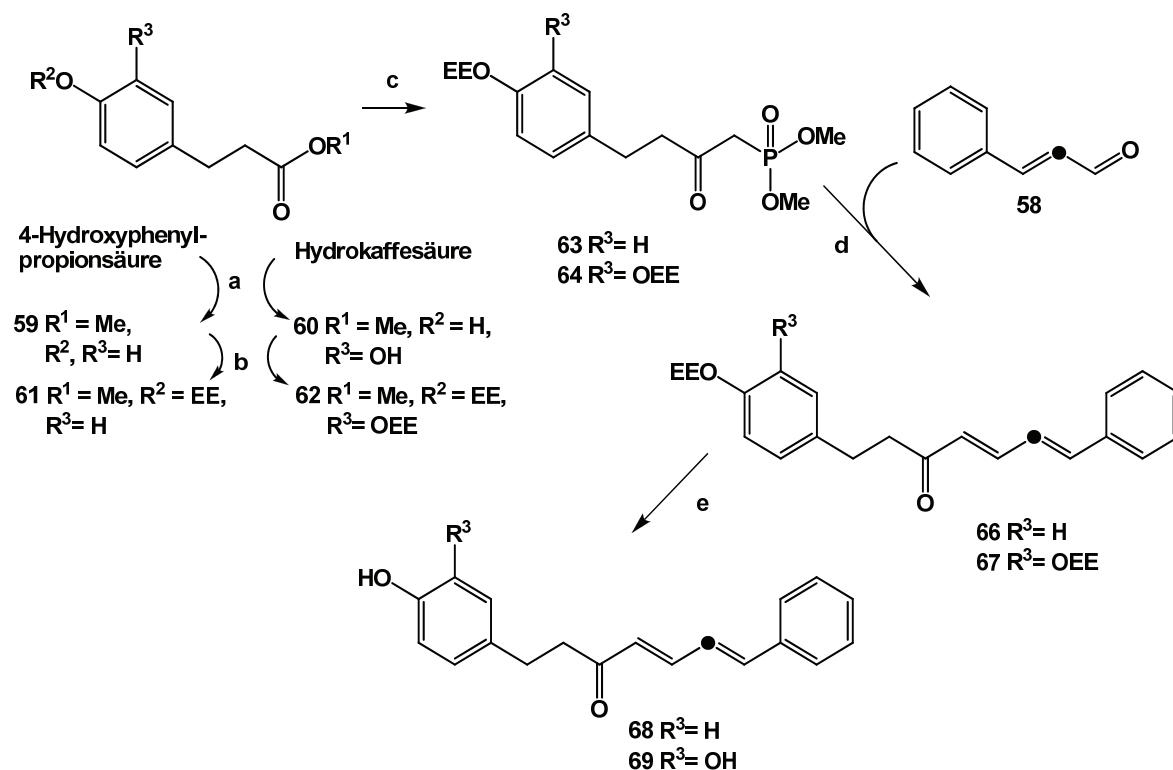


Abb. 2.6: Synthese der $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoide **68** und **69**: (a) AcCl , MeOH , RT , 12 h, 99%; (b) $\text{EtOCH}=\text{CH}_2$, Et_2O , RT , 24 h, 95%; (c) $\text{MeP}(\text{O})(\text{OMe})_2$, THF , MeLi , **61** oder **62**, -78°C , 1 h, 78%; (d) DBU , THF , Rückfluss, 4 h, 70%; (e) TsOH (kat.), MeOH , RT , 5 min, 89%, ● = ^{13}C .

2.1.4 Synthese von $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan

Für die Synthese von $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan war es zunächst notwendig, $N\text{-}[^{13}\text{C}]$ Methyl- N -nitroso- p -toluolsulfonamid in zwei Stufen herzustellen (Abb. 2.7)^[97, 98]. Hierfür wurde p -Toluolsulfonylchlorid in Ether mit $[^{13}\text{C}]$ Methylamin versetzt. Dabei wurde in Schritt (a) $N\text{-}[^{13}\text{C}]$ Methyl- p -toluolsulfonamid (**72**) erhalten. $[^{13}\text{C}]$ Methylamin wurde durch Zugabe von $[^{13}\text{C}]$ Methylaminhydrochlorid zu äquimolaren Mengen Natriumhydroxid gewonnen und direkt eingesetzt. Im 2. Schritt (b) wurde Verbindung **72** mit einem leichten Überschuss an Butyllithium behandelt, gefolgt von der Zugabe von 1,5-fachen Überschuss an Nitrosyltetrafluorborat. Das damit erhaltene $N\text{-}[^{13}\text{C}]$ Methyl- N -nitroso- p -toluolsulfonamid (**73**) wurde für die Synthese von $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan (**74**) eingesetzt^[99].

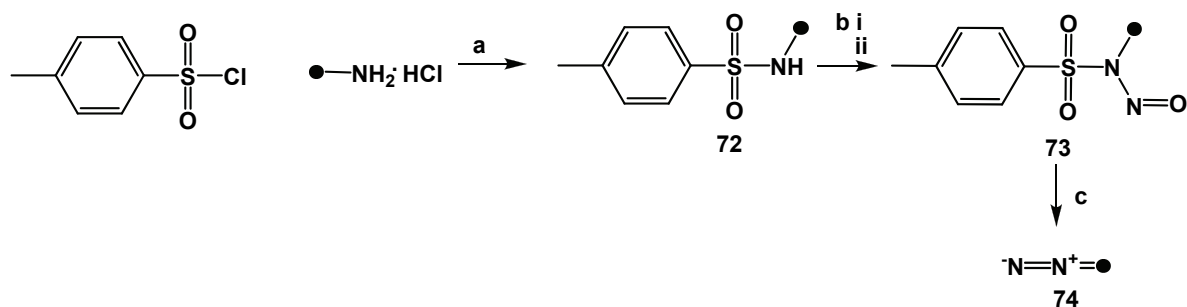


Abb. 2.7: Synthese von [^{13}C]Diazomethan **74**: (a) NaOH, Et₂O, RT, 12 h, 94%; (b) i BuLi, Et₂O, 0 °C, ii NOBF₄, 0 °C – RT, 1 h, 72%; (c) KOH, Diglyme, H₂O, Et₂O, 70 °C, 30 min, ● = ^{13}C .

2.2 Fütterungsexperimente

2.2.1 Hintergrund

Die Durchführung von Fütterungsexperimenten erfolgte an Pflanzen der Gattung Haemodoraceae. In unserer Arbeitsgruppe wurden Wurzelkulturen dieser Gattung, unter anderem von *A. preissii* und *W. thyrsoflora* etabliert. Eine genaue Beschreibung, wie sterile Wurzelkulturen erhalten wurden, folgt im Kapitel Material und Methoden (Kapitel 5). Die kultivierten Wurzeln bilden die zu untersuchenden Sekundärmetaboliten (Phenylphenalenone) in für NMR- und MS-Analysen ausreichenden Mengen. Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, bestehen zwei unterschiedliche Hypothesen für den biosynthetischen Einbau von Sauerstofffunktionen in die interessierenden Positionen des Phenylphenalenon-Moleküls:

- Früher Oxygenierungsweg: Einer der Phenylpropanoid-Vorstufen enthält den Sauerstoff als Hydroxy- bzw. Carbonylfunktion.
- Später Oxygenierungsweg: Der Sauerstoff wird durch enzymatische Oxidation (z.B. durch Cytochrom P450) auf einer späten Stufe der Biosynthese eingebaut.

Hierfür wurden zum einen Fütterungsexperimente mit zuvor synthetisierten [2- ^{13}C]markierten Phenylpropanoiden durchgeführt. Diese erfolgten an Wurzelkulturen von *W. thyrsoflora* und dienten zur Klärung der Herkunft des Sauerstoffs an C-5 (Bezugssystem: 9-Phenylphenalenon **A**, Abb. 2.8) bzw. C-2 (Bezugssystem: 7-Phenylphenalenon **B**, Abb. 2.8). Für die Klärung des Einbaus der Sauerstofffunktionen in Pos. C-2, C-4, C-6 und ebenfalls C-5 (Bezugssystem: 9-Phenylphenalenon **A**, Abb. 2.8) und C-1, C-2, C-3 und C-5 (Bezugssystem: 7-Phenylphenalenon **B**, Abb. 2.8) fanden Fütterungsexperimente mit [2- ^{13}C]Phenylalanin, [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) und [6- ^{13}C]Diarylheptanoiden **68** und **69** unter

einer konstanten $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre Anwendung. Hierfür wurden Wurzelkulturen von *A. preissii* und *W. thyrsoflora* verwendet.

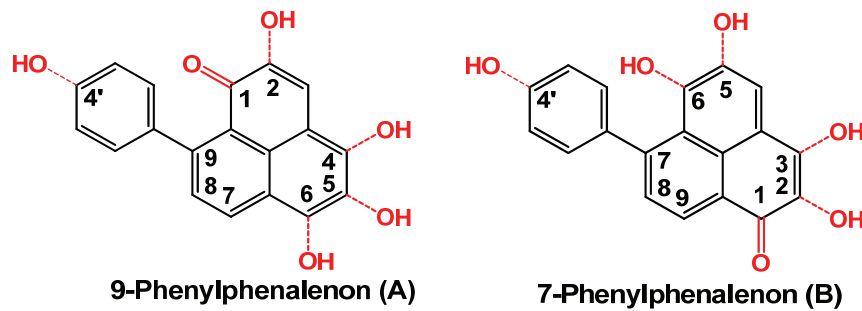


Abb. 2.8: 9-Phenylphenalenon (A)– und 7-Phenylphenalenon (B)–Modellstruktur mit möglichen Positionen für Hydroxyl- und Ketogruppen (rot) im Grundgerüst.

In Abb. 2.8 sind mögliche Positionen für Hydroxyl- und Ketogruppen in Phenylphenalenonen aus *A. preissii* und *W. thyrsoflora* dargestellt. Phenylphenalenone, welche Sauerstofffunktionen an C-1 und in mindestens einer weiteren Position besitzen, sind aus diesen Pflanzen bekannt und sind somit Untersuchungsobjekte der vorliegenden Arbeit.

2.2.2 Fütterungsexperimente mit ^{13}C -, ^{14}C - und ^3H -markierten Phenylpropanoiden

2.2.2.1 Fütterungen von ^{13}C -markierten ringhydroxylierten α -Keto- β -phenylcarbonsäuren und β -Phenylmilchsäuren

Aufgrund der bereits in früheren Studien erlangten Kenntnisse, dass Phenylpropansäuren Vorstufen in der Biosynthese von Phenylphenalenonen darstellen^[62–67], erfolgte die Auswahl von Phenylpropanoiden, welche in der Seitenkette sauerstofffunktionalisiert sind. Hierfür dienten zuvor synthetisierte [$2\text{-}^{13}\text{C}$]markierte ringhydroxylierte α -Keto- β -phenylcarbonsäuren und β -Phenylmilchsäuren. Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 erwähnt, erfolgten die Fütterungsexperimente an *W. thyrsoflora* zur Aufklärung der Herkunft des Sauerstoffs in Pos. C-5 der 9-Phenylphenalenone (s. **A** in Abb. 2.8) bzw. C-2 der 7-Phenylphenalenone (s. **B** in Abb. 2.8). Die Notwendigkeit der ^{13}C -Markierung besteht darin, den Einbau der gefütterten Vorstufe in die entsprechenden Phenylphenalenone mittels ^{13}C -NMR und/oder MS nachweisen zu können. Ein verstärktes Kohlenstoff-Signal im ^{13}C -NMR-Spektrum eines isolierten tetraoxygenierten Phenylphenalenons **17** oder **25** im Vergleich zu einem Referenzspektrum würde den Einbau einer ^{13}C -markierten Vorstufe beweisen. Für die aus den entsprechenden Fütterungsexperimenten isolierten Phenylphenalenone (Abb. 2.9), wären verstärkte ^{13}C -Signale des Kohlenstoffs in Pos. C-5 (s. **A** in Abb. 2.8) bzw. C-2 (s. **B** in Abb. 2.8) im ^{13}C -NMR-Spektrum zu erwarten.

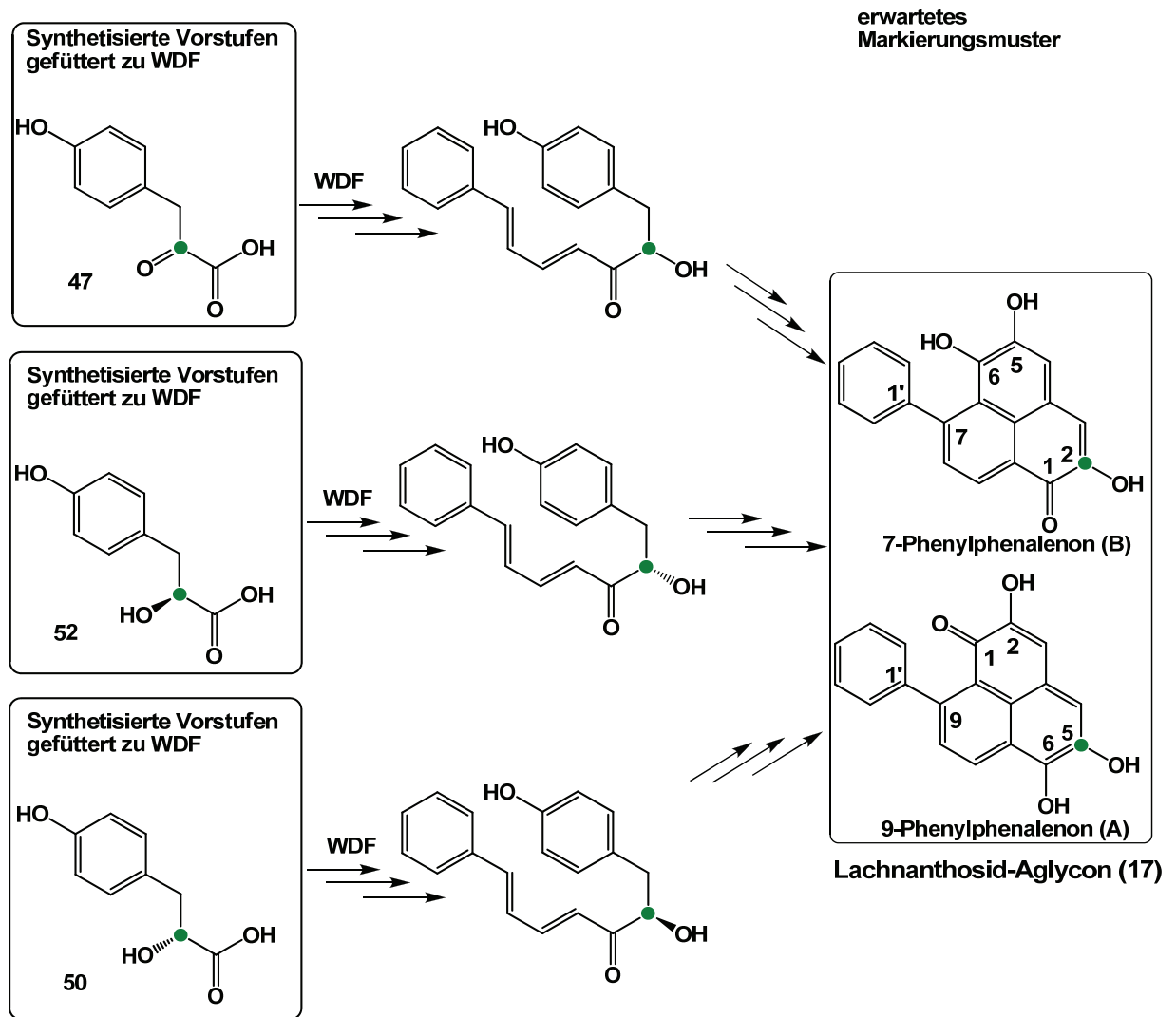


Abb. 2.9: Nach Fütterungsexperimenten mit ^{13}C -markierten ringhydroxylierten α -Keto- β -phenylcarbonsäuren und β -Phenylmilchsäuren an Wurzelkulturen von *W. thyrsoflora* erwartetes Markierungsmuster von 2,5,6-trihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (Lachnanthosid-Aglycon, **17**) als Beispiel für ein tetraoxygeniertes Phenylphenalenon, ● = ^{13}C .

Die Fütterungsexperimente lieferten jedoch weder für die ^{13}C -markierte ringhydroxylierte α -Keto- β -phenylcarbonsäure noch für die ^{13}C -markierten ringhydroxylierten β -Phenylmilchsäuren einen Einbau in die entsprechenden Phenylphenalenone. Es konnten keine verstärkten ^{13}C -Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum nachgewiesen werden. Daraus ergaben sich zwei Vermutungen. Eine Erklärung wäre, dass die Vorstufe zwar von der Wurzelkultur aufgenommen wurde, jedoch nicht in ausreichendem Umfang in die entsprechenden Phenylphenalenone eingebaut, sondern entweder anderweitig verstoffwechselt oder unverändert im Gewebe, z.B. in den Vakuolen, abgelagert wurde. Die zweite Möglichkeit bestand darin, dass die Vorstufe nicht ins Gewebe aufgenommen wurde und somit im Medium verblieb. Dies könnte aufgrund des polaren Charakters der synthetisierten Vorstufen möglich sein. Zur Kontrolle, ob die Vorstufen von den Wurzelkulturen aufgenommen wurden, erfolgten ^{13}C -NMR-Messungen aller Fraktionen von gefütterten Wurzelkulturen, wie auch

einer nicht gefütterten Wurzelkultur (Kontrolle). Am Beispiel der EtOAc-Fractionen (Abb. 2.10) konnten nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}](S)$ -3-(4-Hydroxyphenyl)milchsäure (**52**) im Vergleich zum Referenzspektrum keine verstärkten ^{13}C -NMR-Signale von gefütterten Wurzelkulturen festgestellt werden.

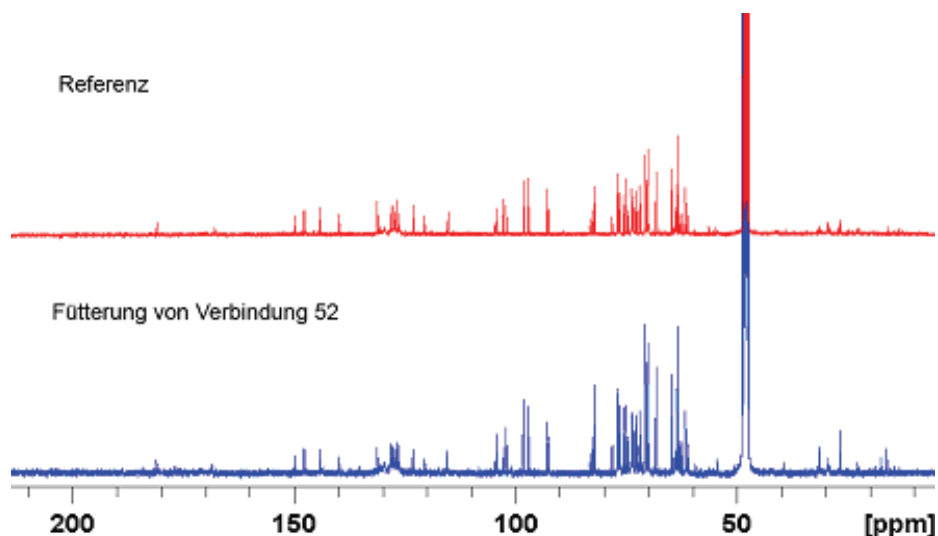


Abb. 2.10: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren (125 MHz, CD_3OD , ns = 5k) von EtOAc-Fractionen nach Fütterung von *W. thyrsoflora* Wurzelkulturen mit $[2-^{13}\text{C}](S)$ -3-(4-Hydroxyphenyl)milchsäure (**52**) mit einem Referenzspektrum eines Extraktes einer ungefütterten Wurzelkultur.

Zur genaueren Kontrolle wurden die ^{13}C -NMR-Spektren des tetraoxygenierten Phenylphenalenons **25** aus einer Fütterung mit Verbindung **52** und einer aus ungefütterter Wurzelkultur von *W. thyrsoflora* isolierten Referenz miteinander verglichen. Auch hier konnte kein verstärktes ^{13}C -Signal nach Fütterung mit **52**, welches in Pos. C-2 von Verbindung **25** zu finden wäre, identifiziert werden (Abb. 2.11). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit $[2-^{13}\text{C}]3$ -Phenylbrenztraubensäure (**47**) sowie der β -Phenylmilchsäure **50** erhalten.

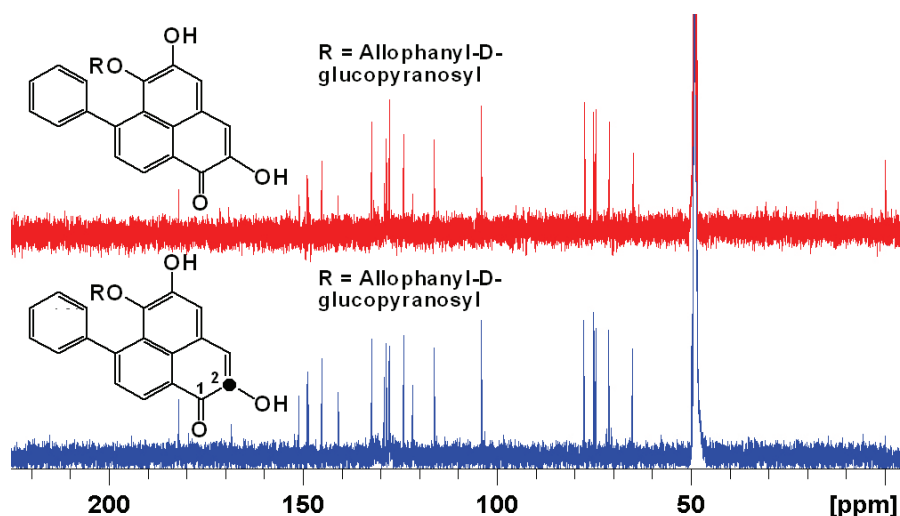
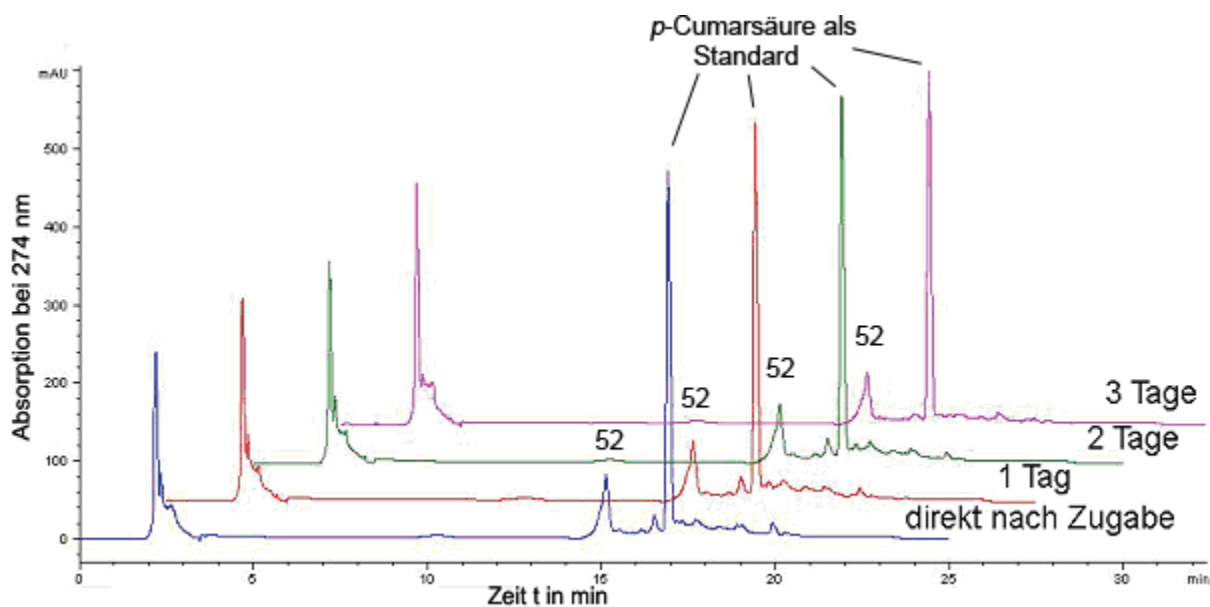


Abb. 2.11: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren (125 MHz, CD_3OD , ns = 15k) von Verbindung **25** isoliert aus einer mit Verbindung **52** gefütterten Wurzelkultur (blaues Spektrum) und einer aus ungefütterter *W. thyrsoflora* Wurzelkultur isolierten Referenz (rotes Spektrum). Im blauen Spektrum ist die hypothetisch zu erwartende ^{13}C -Markierung für Verbindung **25** dargestellt.

Wie oben diskutiert wurde, ist eine mögliche Interpretation dieser negativen Befunde, dass die ^{13}C -markierten ringhydroxylierten β -Phenylmilchsäuren von den Wurzelkulturen nicht in ausreichend großen Mengen aufgenommen wurden, um mittels NMR detektiert zu werden. Es bestand also die Möglichkeit, dass die Vorstufen im Medium verblieben. Um dies zu testen, wurden synthetische Vorstufen den Wurzelkulturen von *W. thyrsoiflora* zugefügt und das Kulturmedium über einen Zeitraum von 3 Tagen (angefangen direkt nach der Zugabe des Precursors) regelmäßig beprobt. Die entnommenen Proben (jeweils 1 ml) wurden mittels analytischer HPLC analysiert. Anhand des Vergleichs der Peakflächen (Integrale) der gefütterten Verbindungen im HPLC-Chromatogramm mit denen von *p*-Cumarsäure (Standard) konnte gezeigt werden, dass sich die Konzentrationen der Precursoren im Kulturmedium über drei Tage nicht signifikant ändern (Bsp. von $[2\text{-}^{13}\text{C}](\text{S})\text{-3-(4-Hydroxyphenyl)milchsäure}$ (**52**), Abb. 2.12). Die Ergebnisse in Tab. 2.1 machen am Beispiel von Verbindung **52** deutlich, dass diese im Medium verbleibt.



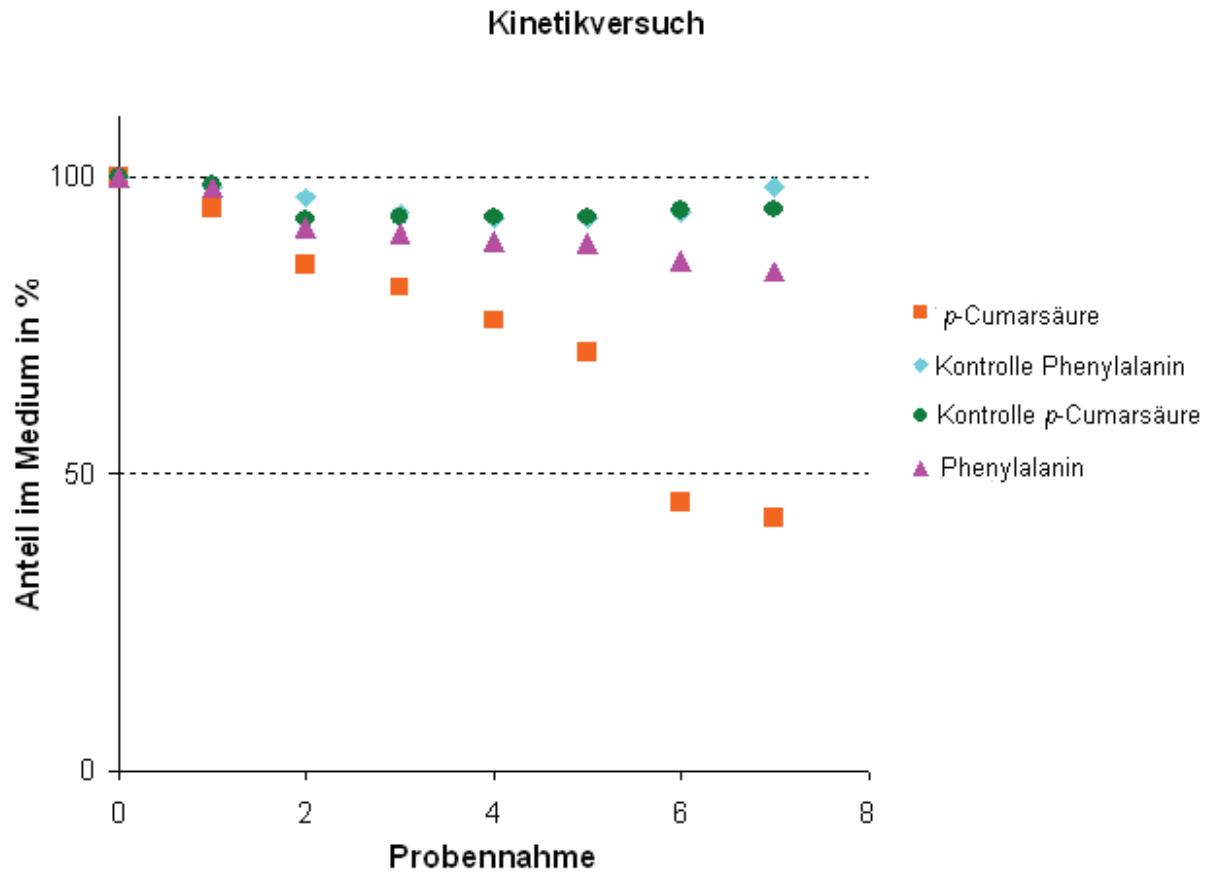
Zeitpunkt der Probenahme	Peakfläche (Integral) des Signals von 52 in mAU • min	Peakfläche (Integral) des Signals des Standards in mAU • min	Anteil an 52 in % (Standard 100%)
direkt nach Zugabe	1340,5	3860,6	34,7
1.Tag	1359,2	3953,4	34,4
2.Tag	1404,2	3842,8	36,5
3.Tag	1320,9	3775,1	35,0

Abb. 2.12: Vergleich der HPLC-Läufe (Methode: Gradient h (Kapitel Material und Methoden)) von je 1 ml Medium einer Wurzelkultur von *W. thyrsoiflora*. Die Probenahme erfolgte über 3 Tage nach Fütterung von $[2\text{-}^{13}\text{C}](\text{S})\text{-3-(4-Hydroxyphenyl)milchsäure}$ (**52**). *p*-Cumarsäure wurde als Standard zugegeben. In der Tabelle sind die Peakflächen von Verbindung **52** und des Standards der HPLC-Läufe aufgelistet und die daraus berechneten Anteile von **52** in % des Standards angegeben.

Um die Aufnahme der ^{13}C -markierten ringhydroxylierten α -Keto- β -phenylcarbonsäuren und β -Phenylmilchsäuren dennoch zu erreichen, wurde dem Medium DMSO zugesetzt. Anhand von DMSO sollte die Permeabilität der Zellwände verbessert und so die Aufnahme der Vorstufen erleichtert werden. Als weitere Möglichkeit wurde versucht, die Vakuuminfiltration, zur Verbesserung der Aufnahme anzuwenden. Durch das temporäre Anlegen von Vakuum (7000 Pa) sollte die aus den Interzellularräumen austretende Luft durch Medium mit den darin enthaltenen ^{13}C -markierten Vorstufen ersetzt werden. Die Versuche führten jedoch ebenso zu keiner nachweisbaren Aufnahme der Precursoren.

2.2.2.2 Fütterungsexperimente mit [2,3,4,5,6- ^3H]L-Phenylalanin und [U- ^{14}C]p-Cumarsäure

In Kinetikversuchen mit [2,3,4,5,6- ^3H]L-Phenylalanin und [U- ^{14}C]p-Cumarsäure wurde die Aufnahme dieser Precursoren durch Wurzelkulturen von *W. thyrsoiflora* untersucht. Dazu wurden mehrere Fütterungsversuche durchgeführt. In jedem Experiment wurden [2,3,4,5,6- ^3H]L-Phenylalanin und [U- ^{14}C]p-Cumarsäure eingesetzt. Durch einen Radioaktivitätsdetektor (Tri-Carb 2300 TR, Perkin Elmer) erfolgte die Messung der Abnahme der Radioaktivität im Medium. In einem Versuch wurden die gleichen Anteile [2,3,4,5,6- ^3H]L-Phenylalanin und [U- ^{14}C]p-Cumarsäure in ein Medium ohne Wurzelkultur gegeben. Dies diente der Kontrolle ob und wie stark sich die gefütterten Phenylpropanoide z.B. an der Glaswand des Erlenmeyerkolbens absetzen und dadurch deren Radioaktivität im Medium nicht mehr nachweisbar ist. Die Versuche erfolgten über 24 Stunden. In den ersten 2 Stunden wurde jede halbe Stunde 1 ml Medium entnommen und hinsichtlich der Abnahme an Radioaktivität analysiert. Anschließend erfolgte stündlich Probenentnahme und deren Untersuchung. In Abb. 2.13 sind die Ergebnisse dieser Versuche graphisch dargestellt. Dabei ergab sich, dass der Großteil von Phenylalanin in den ersten Stunden nach der Zugabe aufgenommen wird. Die Aufnahme von Phenylalanin erfolgt vermutlich aktiv durch spezifische Aminosäuretransporter bei Bedarf. Hingegen wird [U- ^{14}C]p-Cumarsäure gleichmäßig über die Zeit aufgenommen, was für eine passive Aufnahme spricht. Es besteht wahrscheinlich keine direkte Abhängigkeit von Transportmechanismen.



Proben- nahme	Zeit	[2,3,4,5,6- ³ H]L-Phenylalanin im Medium		[U- ¹⁴ C]p-Cumarsäure im Medium	
	t in h	RA [Bq]	nmol / (%)	RA [Bq]	nmol / (%)
0	0	370,0	9,1 (100)	340,0	11,1 (100)
1	nach Zugabe	363,5	8,8 (98,2)	322,1	10,5 (94,7)
2	0,5	338,6	8,1 (91,5)	289,5	9,5 (85,1)
3	1	334,7	7,9 (90,5)	277,1	8,8 (81,5)
4	2,5	329,7	7,6 (89,1)	258,1	8,0 (75,9)
5	5,5	328,5	7,5 (88,8)	239,7	7,4 (70,5)
6	23,5	317,9	7,0 (85,9)	153,7	4,5 (45,2)
7	25,5	311,0	6,7 (84,1)	145,4	4,2 (42,7)

Abb. 2.13: Kinetikversuch zur Abnahme von Phenylalanin und p-Cumarsäure im Kulturmedium von kultivierten Wurzeln und damit verbundener Aufnahme durch die Wurzelkulturen von *W. thyrsoiflora*. Dem Medium wurde [2,3,4,5,6-³H]L-Phenylalanin (0,37 kBq) und [U-¹⁴C]p-Cumarsäure (0,34 kBq) zugefügt. In der Tabelle sind die gemessenen Radioaktivitäten und die daraus errechneten Stoffmengen der Anteile der jeweiligen Precursoren im Medium zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgelistet. RA = Radioaktivität.

2.2.3 Fütterungsexperimente unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre

2.2.3.1 Hintergrund, Durchführung und Funktionsweise der Fütterungsexperimente unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre

Der Nachweis für den Einbau von ^{13}C -markierten Precursoren in ein Zielmolekül erfolgt mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Hingegen ist ^{18}O wegen des fehlenden magnetischen Moments durch NMR nicht direkt nachweisbar, kann aber aufgrund seines Isotopieeffekts zum Nachweis des positionsspezifischen Einbaus und damit unter Umständen der Herkunft des Sauerstoffes dienen. Hierfür macht man sich die isotoopeninduzierte Verschiebung der Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum zunutze, wodurch ein indirekter Nachweis über den Einbau des Sauerstoffs gelingt^[103–105]. Für Studien der oxidativen Schritte in Biosynthesen von Sekundärmetaboliten ist ^{18}O demnach ein nützliches Isotop^[100–102]. Auf diesen Isotopieeffekt (oder die sogenannte isotoopeninduzierte Verschiebung) soll im Folgenden etwas näher eingegangen werden.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Kernmasse besetzen Isotope verschiedene Schwingungsebenen innerhalb des gleichen elektronischen Potentials einer chemischen Bindung. Dies führt zu einer kürzeren Bindungslänge für schwerere Isotope^[106] und bei „magnetischen“ Kernen damit zu leicht veränderten chemischen Verschiebungen im NMR-Spektrum. Diese Isotopenverschiebung wird durch den Term ${}^n\Delta X(Y)$ ausgedrückt, wobei n die Anzahl der chemischen Bindungen zwischen dem betrachteten Kern X und dem Isotop Y darstellt, welches die Änderung der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta$) des Kerns X verursacht. Für die Substitution von ^{16}O durch ^{18}O ergibt sich für die chemische Verschiebung von ^{13}C -Atomen ${}^n\Delta\delta^{13}\text{C}(^{18}\text{O}) = \delta^{13}\text{C}(^{16}\text{O}) - \delta^{13}\text{C}(^{18}\text{O})$. Die Größe von $\Delta\delta$ ist neben anderen Parametern von der Zahl der Bindungen zwischen Kohlenstoff und Sauerstoff abhängig. Die von direkt gebundenem ^{18}O verursachte Isotopenverschiebung ($n = 1$, α -Isotopenverschiebung) von ^{13}C -Atomen liegt im Bereich von $\Delta\delta + 0.016 - 0.050$ ppm^[107].

Die Fütterungsexperimente an *W. thyrsoiflora* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre erfolgten unter Verwendung einer eigens dafür konzipierten Apparatur, welche in Abb. 5.1 (Kapitel Material und Methoden) abgebildet ist. Es war nötig, dass diese Apparatur komplett geschlossen werden konnte, um eine konstante $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre zu erzeugen. Die Kultivierung der Wurzelkulturen erfolgte für sieben Tage unter einer konstanten $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre nach Zugabe eines Precursors ($[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin, $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure bzw. ein $[6-^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoid) ins sterile Medium. Nach anschließender Extraktion der Wurzelkulturen und Fraktionierung wurden die organischen Fraktionen mittels präparativer HPLC getrennt. Danach dienten NMR-Messungen der Identifizierung isotoopenmarkierter Verbindungen.

Um die Funktionsfähigkeit der Apparatur und der Methode zu untersuchen, wurde Ferulasäure nach einem ersten Fütterungsexperiment an einer Wurzelkultur von *W.*

thrysiflora unter Verwendung des Precursors [2- ^{13}C]Phenylalanin und Kultivierung für 7 Tage unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre isoliert und spektroskopisch analysiert. Für die isolierte Ferulasäure (blau in Abb. 2.14) ist im Vergleich zur Referenzsubstanz der Einbau von [2- ^{13}C]Phenylalanin im ^{13}C -NMR-Spektrum aufgrund des verstärkten Signals C-2 nachzuweisen.

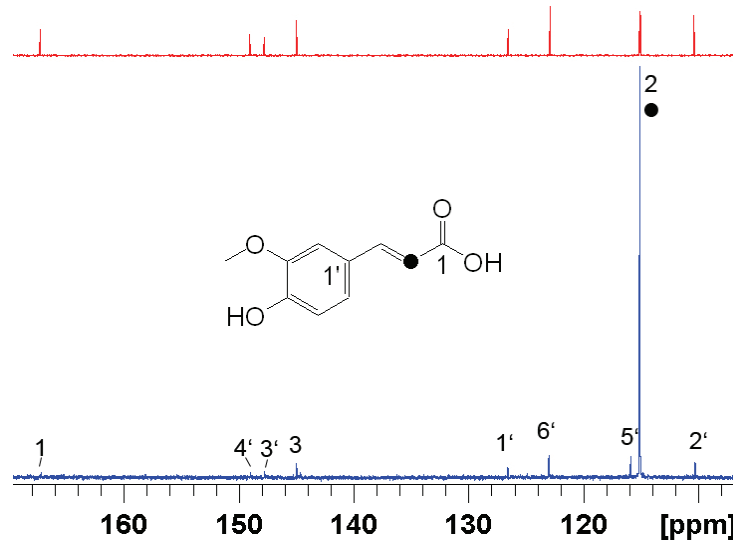


Abb. 2.14: Vergleich von ^{13}C -NMR-Spektren (125 MHz, Aceton- d_6 , ns = 12k) für den Nachweis des Einbaus von [2- ^{13}C]Phenylalanin: Ferulasäure aus einem Fütterungsexperiment mit [2- ^{13}C]Phenylalanin unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre an *W. thrysiflora* (blau), Ferulasäure isoliert aus einer ungefütterter Wurzelkultur von *W. thrysiflora* als Referenz (rot). ● = ^{13}C .

Der Nachweis des Einbaus von ^{18}O -Sauerstoff erfolgt indirekt durch den oben beschriebenen Effekt der Isotopenverschiebung, welcher im ^{13}C -NMR-Spektrum in Abb. 2.15 bei den Signalen von C-3' und C-4' zu sehen ist. Für das ^{13}C -NMR-Signal in Pos. C-3' ist $\Delta\delta = +21$ ppb und für das Signal in Pos. C-4' ist $\Delta\delta = +15$ ppb.

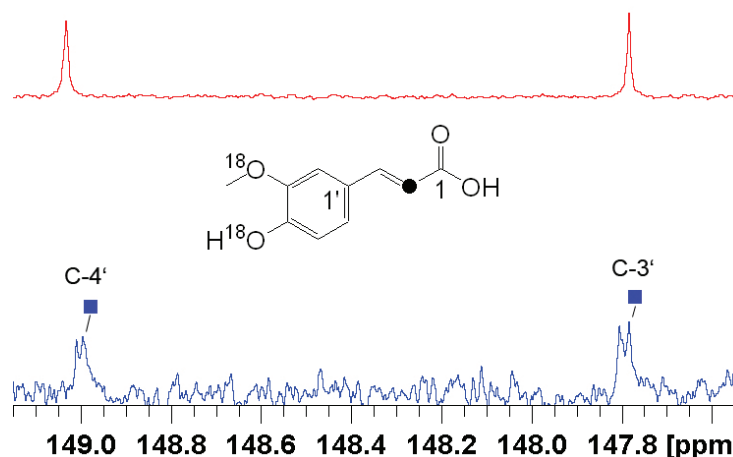


Abb. 2.15: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren (125 MHz, Aceton- d_6 , ns = 12k) für den Nachweis des Einaus von ^{18}O : Ferulasäure aus einem Fütterungsexperiment unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre (blau) und Ferulasäure isoliert aus einer ungefütterter Wurzelkultur von *W. thrysiflora* als Referenz (rot), ● = ^{13}C . ■ = Signal eines ^{13}C -Atoms an welchem ^{18}O gebunden ist.

Die Analyse der aus dem Fütterungsexperiment isolierten Ferulasäure lieferte somit eindeutig den Nachweis für die Funktionsfähigkeit der Fütterungsapparatur und erbrachte als Ergebnis, dass sowohl [2-¹³C]Phenylalanin wie auch ¹⁸O₂ durch die Wurzelkultur von *W. thyrsoiflora* verstoffwechselt und für die Biosynthese von [3',4'-¹⁸O,2-¹³C]Ferulasäure genutzt wurden. Nun galt es zu untersuchen, welche Ergebnisse für die Biosynthese der Phenylphenalene nach Fütterungsexperimenten mit unterschiedlichen Precursoren, wie bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben, unter konstanter ¹⁸O₂-Atmosphäre erhalten werden. In den folgenden Kapiteln sollen nun die Ergebnisse weiterer Fütterungsexperimente an Wurzelkulturen von *A. preissii* und *W. thyrsoiflora* vorgestellt werden.

2.2.3.2 ¹³C- und ¹⁸O-Markierungsexperimente zur Biosynthese von Anigorufon (**1**) und Hydroxyanigorufon (**2**) in *Anigozanthos preissii*

2.2.3.2.1 Einführung

Für Fütterungsexperimente an Wurzelkulturen von *A. preissii* unter ¹⁸O₂-Atmosphäre wurden als ¹³C-markierte Vorstufen [2-¹³C]Phenylalanin und [2-¹³C]*p*-Cumarsäure (**56**) verwendet. Die Wahl fiel auf diese Precursoren, da bekannt ist, dass sie durch Wurzelkulturen der Haemodoraceae zu Phenylphenalenonen verstoffwechselt werden^[62-67]. Diese biosynthetischen Precursor-Produkt-Beziehungen sollten genutzt werden, um die in Vorstufen bereits vorhandenen von später in der Biosynthese eingeführten Sauerstofffunktionen zu unterscheiden. So sollte es möglich sein, die Reihenfolge des biosynthetisch erfolgenden Sauerstoffeinbaus zu verfolgen und damit auf einzelne Schritte der Phenylphenalenon-Biosynthese zu schließen. So ist z. B. im Fall der Verwendung von Phenylalanin als Precursor zu erwarten, dass nach ¹⁸O-Einbau alle Sauerstofffunktionen mit Ausnahme der Carbonylgruppe ¹⁸O enthalten. Hingegen kann bei Verwendung von *p*-Cumarsäure ¹⁸O-Einbau in die *para*-Position am Phenylring ausgeschlossen werden, wodurch eine Unterscheidung zu Fütterungen mit [2-¹³C]Phenylalanin möglich sein sollte. In Abb. 2.16 sind die zu erwartenden Markierungsmuster von Anigorufon (**1**) und Hydroxyanigorufon (**2**) aus den Fütterungsexperimenten unter ¹⁸O₂-Atmosphäre dargestellt. Für Anigorufon (**1**) ist nach Fütterung von [2-¹³C]Phenylalanin ein zweifacher Einbau der ¹³C-markierten Vorstufe zu erwarten, und unter ¹⁸O₂-Atmosphäre zusätzlich ein Einbau von ¹⁸O an C-1 und C-2. Hingegen ist nach Fütterungsexperimenten mit [2-¹³C]*p*-Cumarsäure (**56**) lediglich der Einbau einer ¹³C-markierten Vorstufe ins Phenalen-Grundgerüst und unter ¹⁸O₂-Atmosphäre eines ¹⁸O an C-2 zu erwarten. Für Hydroxyanigorufon (**2**) ist im Fall der Fütterung von [2-¹³C]Phenylalanin ein zweifacher Einbau des ¹³C-markierten Precursors zu erwarten, und unter ¹⁸O₂-Atmosphäre ein Einbau an C-1, C-2 und C-4'. Bei Verwendung von [2-¹³C]*p*-Cumarsäure (**56**) als Vorstufe ist ebenfalls ein zweifacher Einbau in

Hydroxyanigorufon (**2**) zu erwarten, und unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre lediglich ein Einbau von ^{18}O an C-2.

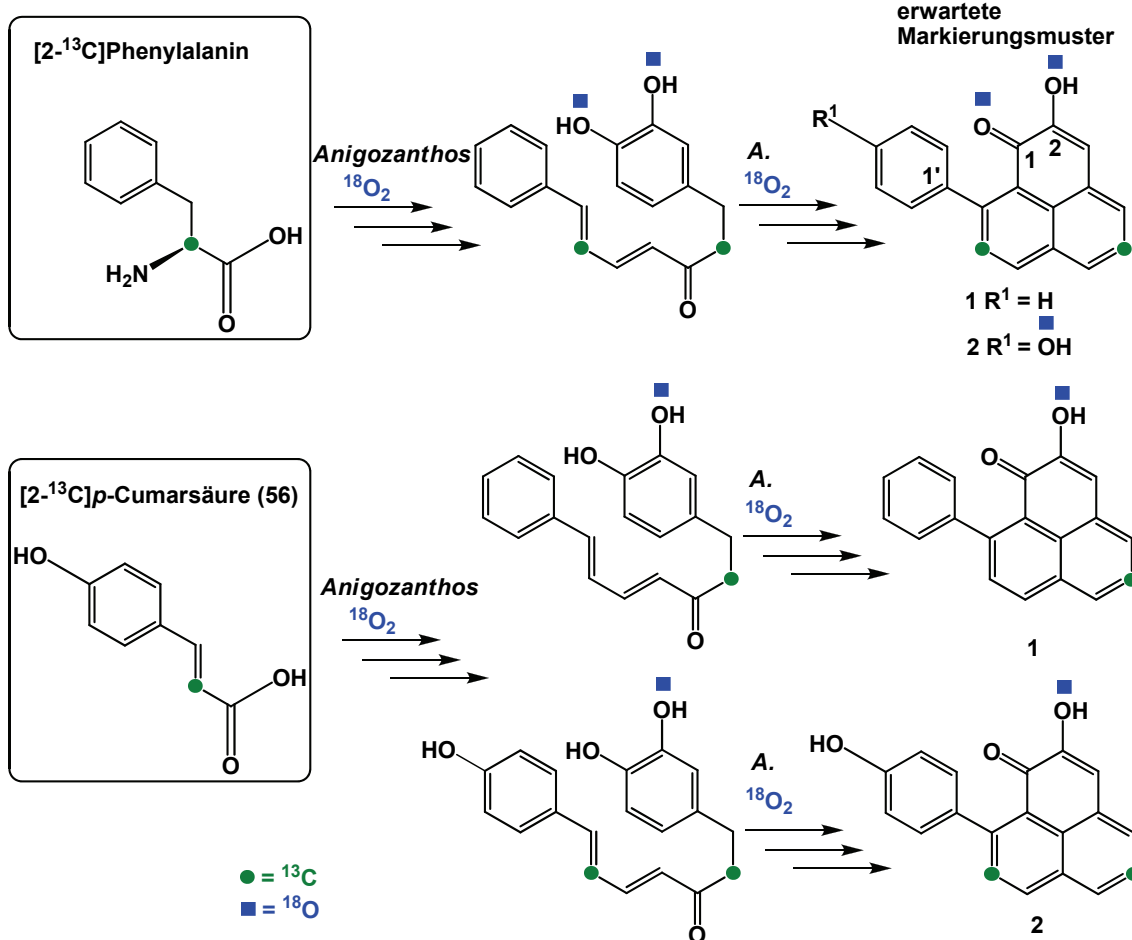


Abb. 2.16: Zu erwartende Markierungsmuster der hypothetischen Diarylheptanoide und der Biosyntheseprodukte Anigorufon (**1**) und Hydroxyanigorufon (**2**) nach Fütterungsexperimenten an Wurzelkulturen von *A. preissii* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre und Einsatz von [2- ^{13}C]Phenylalanin bzw. [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) als Precursoren. Die abgebildeten Markierungsmuster der als Intermediate der Biosynthese auftretenden Diarylheptanoide sowie der Phenylphenalenone **1** und **2** stellen jeweils die Summe von einfach, doppelt und mehrfach markierten Isotopologen dar.

2.2.3.2.2 NMR-Messungen von Anigorufon (**1**) und Hydroxyanigorufon (**2**) aus ^{13}C - und ^{18}O -Markierungsexperimenten zur Biosynthese

Die nach den entsprechenden Fütterungsexperimenten isolierten Phenylphenalenone Anigorufon (**1**) und Hydroxyanigorufon (**2**) wurden mittels NMR untersucht. Durch die ^1H -NMR-Spektren ist kein Einbau der ^{13}C -markierten Precursoren und des ^{18}O -Sauerstoffs nachweisbar, hierfür müssen die ^{13}C -NMR-Spektren herangezogen werden. In den ^{13}C -NMR-Spektren (Abb. 2.17) ist anhand der, im Vergleich zur unmarkierten Referenzsubstanz, verstärkten ^{13}C -Signale (●) von C-5 und C-8 von Anigorufon (**1**) nach Fütterung mit [2- ^{13}C]Phenylalanin ein zweifacher Einbau dieser ^{13}C -markierten aromatischen Aminosäure

nachweisbar. Im Fall des Fütterungsexperimentes mit $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) ist, wie auch erwartet wurde, Einbau nur in die „rechte Hälfte“ von Anigorufon (**1**) erfolgt (Abb. 2.17).

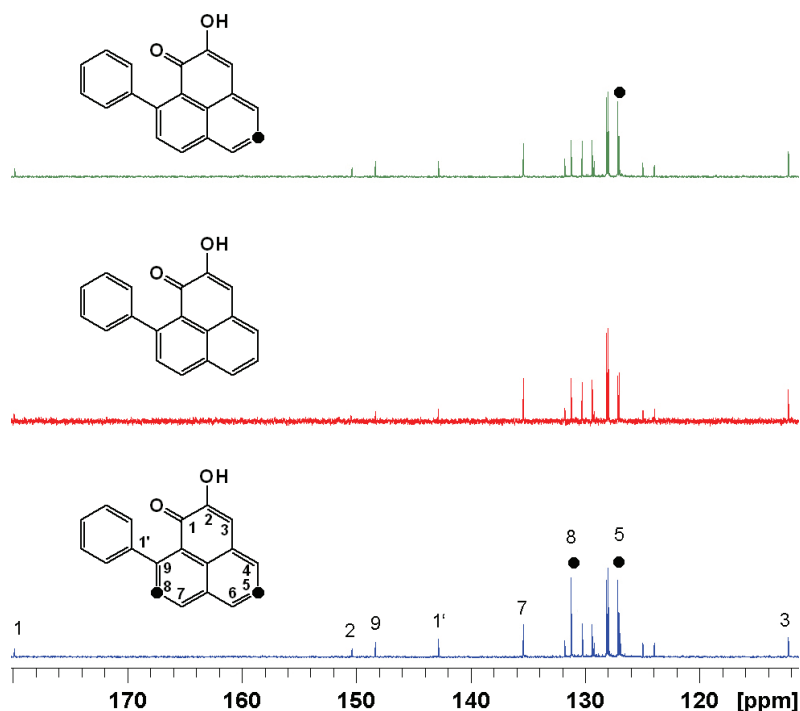


Abb. 2.17: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren (125 MHz, Aceton- d_6 , ns = 70k) von Anigorufon (**1**): Nach Fütterung mit $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin (blau) bzw. $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) (grün) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre und aus ungefütterter Wurzelkultur isoliert (rot). Die gegenüber dem Spektrum der Kontrolle verstärkten Signale von C-5 bzw. C-5 und C-8 sind markiert (●) und weisen auf den Einbau von einem bzw. zwei Molekülen des jeweiligen ^{13}C -markierten Precursors hin.

Aus den ^{13}C -NMR-Spektren von Hydroxyanigorufon (**2**) in Abb. 2.18 ist sowohl für die Fütterung mit $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin wie auch jene mit $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) nach Vergleich mit Hydroxyanigorufon aus einer ungefütterten Wurzelkultur ein doppelter Einbau der ^{13}C -markierten Precursoren durch die signifikant verstärkten ^{13}C -Signale von C-5 und C-8 (●) feststellbar. Bei genauerer Betrachtung der ^{13}C -NMR-Spektren von Anigorufon (**1**) und Hydroxyanigorufon (**2**) fällt auf, dass infolge einer relativ geringen ^{13}C -Anreicherung und einer entsprechend geringen Intensität der NMR-Signale der sp^2 -Kohlenstoff-Atome ^{18}O -induzierte Änderungen der chemischen Verschiebung von C-1 bzw. C-2 nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden können. Daraufhin stellte sich nun die Frage, wie dieses Problem gelöst werden könnte und eine bessere Detektierbarkeit des ^{18}O erreicht wird. Dabei ergab sich die Idee der Einführung von O^{13}CH_3 -Gruppen durch Derivatisierung der Hydroxylgruppen der isolierten Phenylphenalenone mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan (99% ^{13}C). Von diesem Ansatz waren intensive ^{13}C -Signale der vollständig ^{13}C -markierten Methoxy-Gruppen zu erwarten. Außerdem wurde erreicht, dass jedes der aus der $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre eingebauten ^{18}O einer OH-Gruppe an ein ^{13}C gebunden wird. Damit sollte auch das durch isotopeninduzierte Verschiebung erhaltene $^{18}\text{O}^{13}\text{CH}_3$ -Signal verstärkt werden. In Abb. 2.19

sind die nach Derivatisierung für Analysen verwendeten O-methylierten Phenylphenalenone dargestellt.

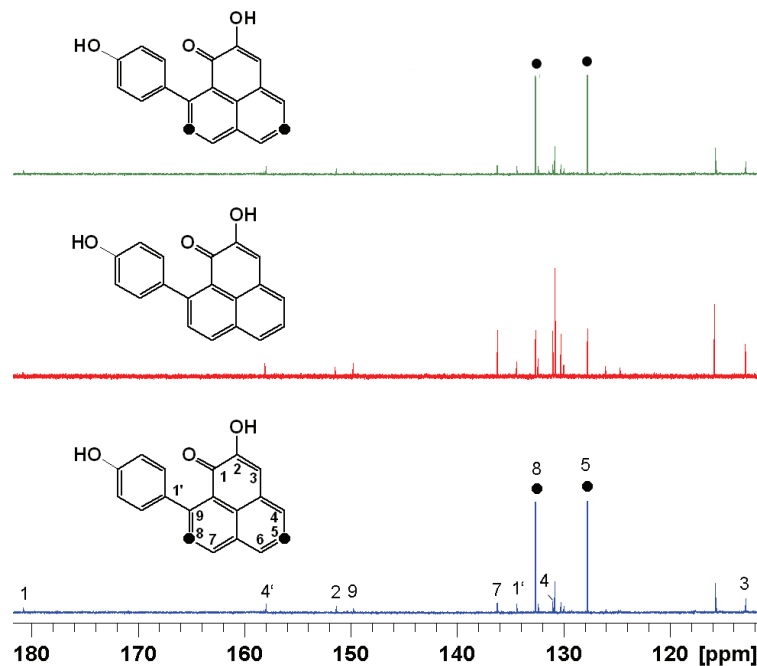


Abb. 2.18: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren (125 MHz, Aceton- d_6 , $n_s = 70\text{k}$) von Hydroxyanigorufon (**2**): Nach Fütterung mit $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin (blau), $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) (grün) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre und aus ungefütterter Wurzelkultur isoliert (rot). Die gegenüber dem Spektrum der Kontrolle deutlich verstärkten Signale von C-5 und C-8 weisen auf den Einbau des jeweiligen ^{13}C -markierten Precursors in beide „Hälften“ von Hydroxyanigorufon (**2**) hin.

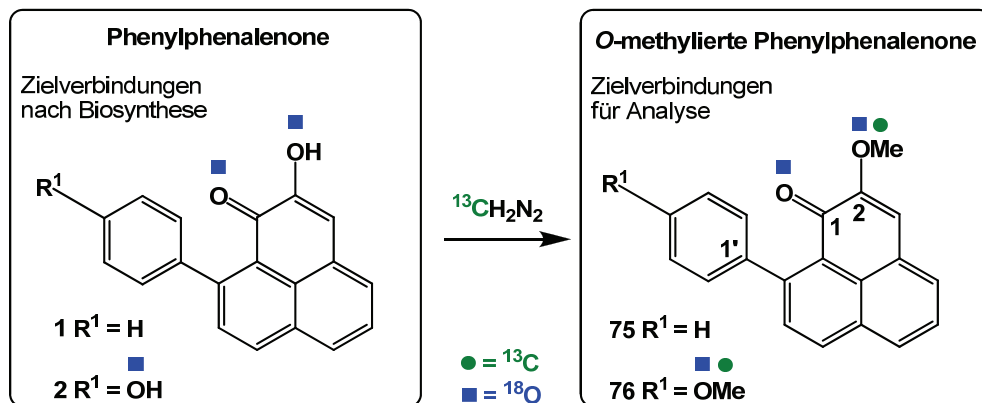


Abb. 2.19: Zielverbindungen nach Fütterungsexperimenten an *A. preissii* (links) und nach Methylierung mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan (rechts) für die Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit von ^{18}O mittels isopeninduziertem Verschiebungseffekt in der ^{13}C -NMR-Analyse. Die Positionen der erwarteten ^{18}O - und ^{13}C -Isotopenanreicherung sind in den Strukturformeln markiert.

Diese Erwartung bestätigte sich schließlich auch, was in den ^{13}C -NMR-Spektren sichtbar wurde. Bevor ich auf diese näher eingehe, vergleichen wir die ^1H -NMR-Spektren (Abb. 2.20) der durch O-Methylierung von Anigorufon (**1**) und Hydroxyanigorufon (**2**) erhaltenen O-Methylderivate $[2\text{-O}^{13}\text{CH}_3]$ Methoxyanigorufon (**75**) und $[2,4'\text{-di-O}^{13}\text{CH}_3]$ 2,4'-Dimethoxyanigorufon (**76**) (Abb. 8.16 im Anhang), nach Aufreinigung mittels

semipräparativer HPLC, mit unmarkiertem Methoxyanigorufon bzw. 2,4'-Dimethoxyanigorufon als Referenzen. Die O-[^{13}C]Methylierung wird durch die Signale der Methyl-Protonen, welche aufgrund des 99%igen Anteils ^{13}C eine Dublettaufspaltung aufweisen, deutlich. Die Kopplungskonstanten betragen für die (2-O $^{13}\text{CH}_3$)-Gruppen in [2-O $^{13}\text{CH}_3$]Methoxyanigorufon (**75**) und [2,4'-di-O $^{13}\text{CH}_3$]2,4'-Dimethoxyanigorufon (**76**) jeweils $^1J_{\text{H-C}} = 144.6$ Hz sowie $^1J_{\text{H-C}} = 143.8$ Hz für die (4'-O $^{13}\text{CH}_3$)-Gruppe in Verbindung **76**. Weitergehende Informationen, vor allem was den Einbau von ^{18}O betrifft, sind den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren nicht zu entnehmen.

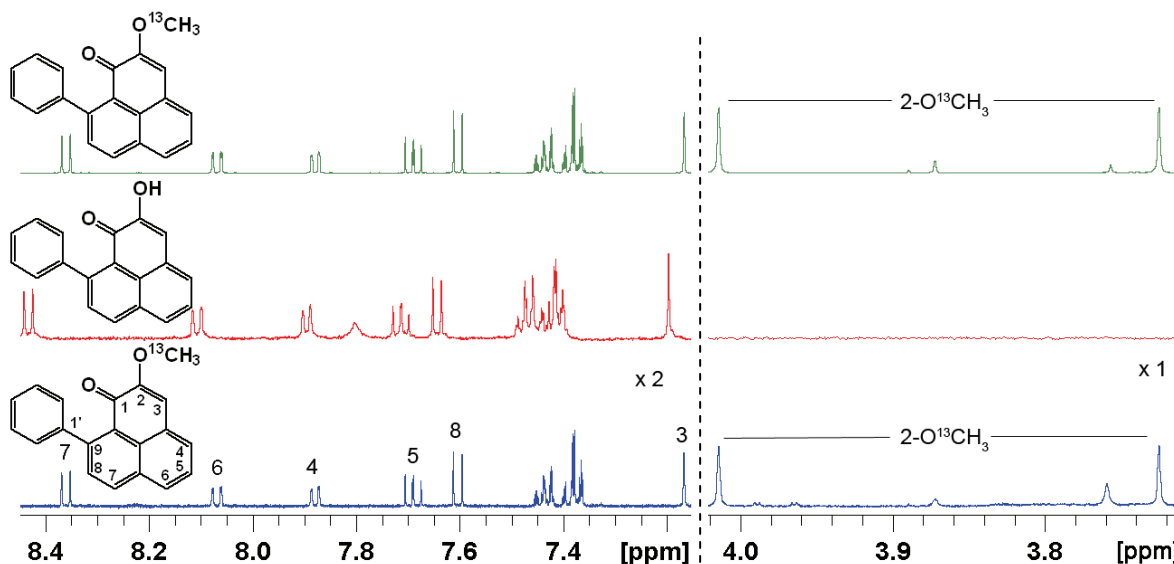


Abb. 2.20: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (500 MHz, Aceton- d_6 , ns = 64) von [2-O $^{13}\text{CH}_3$]Methoxyanigorufon (**75**). Das O- $^{13}\text{CH}_3$ -Derivat wurde nach Fütterung von [2- ^{13}C]Phenylalanin (blau) bzw. [2- ^{13}C] p -Cumarsäure (**56**) (grün) an *A. preissii* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre und Methylierung des daraus isolierten Anigorufon (**1**) erhalten. Rotes Spektrum: unmarkiertes Anigorufon als Referenz.

Somit möchte ich nun zur Betrachtung der $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren kommen. Den Nachweis des Einbaus der ^{13}C -markierten Vorstufen erbrachten bereits die $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren der isolierten Reinverbindungen, wie zuvor bereits beschrieben (Abb. 2.17 und 2.18). Der Einbau wird in den $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren der O-methylierten Verbindungen in Abb. 2.21 und 2.22 erneut deutlich durch die signifikant vergrößerte Intensität der Signale von C-5 und C-8. Wichtiger ist allerdings nun die Betrachtung der Methoxy-Signale, welche dem Nachweis für den Einbau von ^{18}O dienen sollten. Für das Methoxy-Signal von [2-O $^{13}\text{CH}_3$]Methoxyanigorufon (**75**) ist sowohl nach Fütterung mit [2- ^{13}C]Phenylalanin als auch nach Verwendung von [2- ^{13}C] p -Cumarsäure (**56**) als Precursor der erwartete isotopeninduzierte Verschiebungseffekt zu beobachten (Abb. 2.21). Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum erscheint ein zweites, gegenüber dem Signal von $^{16}\text{O}^{13}\text{CH}_3$ um $^1\Delta\delta \text{ }^{18}\text{O}(^{13}\text{C}) = +26$ ppb verschobenes Methoxy-Signal, was durch den Einbau von ^{18}O in Anigorufon (**1**) und den damit verbundenen isotopeninduzierten Verschiebungseffekt zu erklären ist. Die Intensität des quarternären $^{13}\text{C-NMR}$ -Signals von C-1 war zu gering um einen ^{18}O -induzierten Effekt

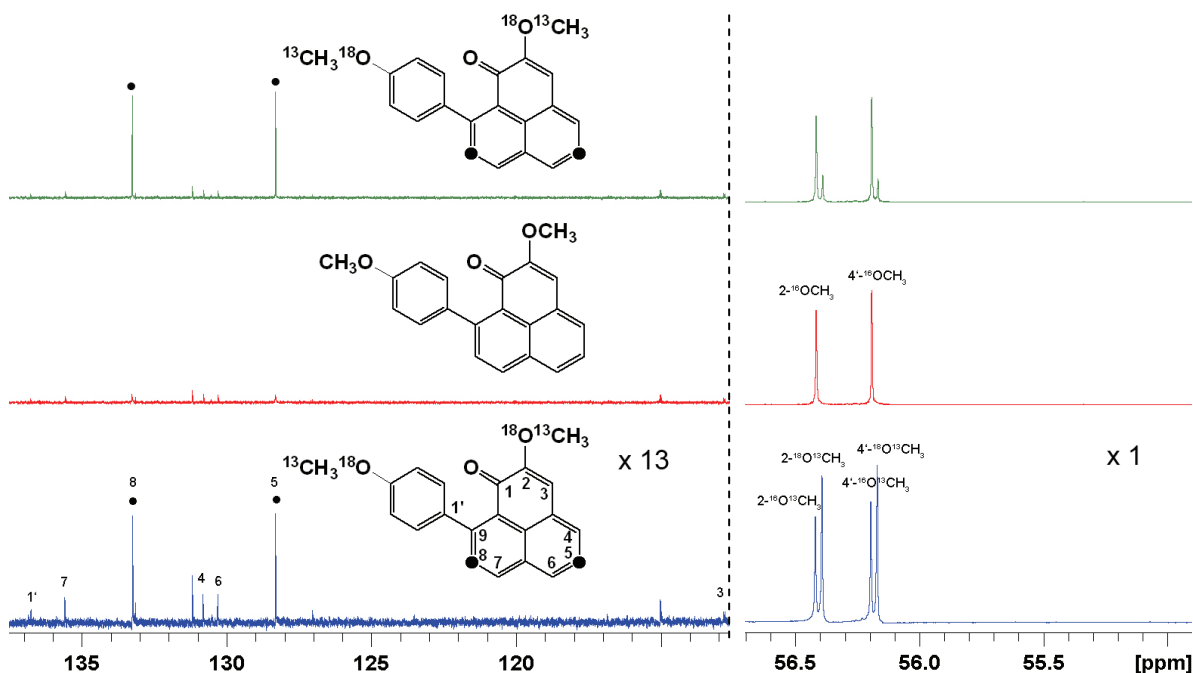


Abb. 2.22: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren (125 MHz, Aceton- d_6 , ns = 74k) von aus Fütterungsexperimenten an *A. preissii* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre isoliertem und mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan methyliertem $[2,4'\text{-di-}^{13}\text{CH}_3]2,4'$ -Dimethoxyanigorufon (**76**) mit unmarkiertem $2,4'$ -Dimethoxyanigorufon als Referenz. Links: Bereich der Aromatensignale von 105 – 140 ppm. Rechts: Bereich der Methoxysignale von 55.0 – 56.5 ppm. Mit ^{13}C angereicherte Positionen sind mit ● markiert.

Nach Fütterung von $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin bzw. $[2\text{-}^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) unter einer konstanten $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre und nach Interpretation der NMR-Spektren erhalten wir für Anigorufon (**1**) bzw. dessen Derivat **75** die erwarteten Markierungsmuster. Für Hydroxyanigorufon (**2**) bzw. dessen Derivat **76** erhalten wir nach Fütterung von $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin unter konstanter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre ebenfalls die erwarteten Markierungsmuster, jedoch nach Fütterung von $[2\text{-}^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) außer dem Einbau von ^{18}O in die OH-Gruppe an C-2 ein zweites ^{18}O in Position C-4'. Das ^{18}O an C-4' kann nicht aus der gefütterten $[2\text{-}^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) stammen. So liegt die Vermutung nahe, dass der Einbau von $^{18}\text{O}_2$ über eine in der Wurzelkultur natürlich vorkommende Vorstufe von p -Cumarsäure, wie z.B. Phenylalanin erfolgte. Die aus $[2\text{-}^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) stammende ^{13}C -Markierung und die ^{18}O -Markierung müssen sich demnach nicht zwangsläufig im selben mehrfach markierten Phenylphenalenon-Molekül befinden, sondern können in verschiedenen Isotopologen enthalten sein.

Die NMR-Spektroskopie ist zur Isotopologanalyse sehr gut geeignet, wenn die entsprechenden Atome miteinander wechselwirken. So lassen sich z.B. ^{13}C , ^{13}C - und ^1H , ^{13}C -Kopplungen in der Regel über bis zu drei Bindungen beobachten und für die Bestimmung der Isotopenverteilung in mehrfach markierten Verbindungen nutzen. Sind die schweren Isotope weiter als drei Bindungen voneinander entfernt oder ist die Häufigkeit der zu

beobachtenden Kerne bei gleichzeitig geringem Signal-Rauschverhältnis unzureichend, werden die Grenzen der NMR-Methoden erreicht. Für das vorliegende Problem des indirekten Nachweises von ^{18}O ergibt sich außerdem die Schwierigkeit, dass ^{18}O -induzierte Änderungen der ^{13}C -chemischen Verschiebung meist nur über eine („ α -Verschiebung“) oder maximal zwei Bindungen („ β -Verschiebung“) beobachtbar sind. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den NMR-Spektren der Phenylphenalenone aus den Fütterungsversuchen auch deren hochauflösende Massenspektren gemessen, welche zur Analyse der Isotopologmuster beitragen sollten. Die hochauflösenden Massenspektren wurden an einem LTQ-Orbitrap aufgenommen. Die erhaltenen Massenspektren sind im Anhang dargestellt. Während mit der NMR-Spektroskopie die Position der einzelnen Isotope im Molekül zugeordnet werden kann, lässt sich die Isotopenzusammensetzung von Isotopolog-Gruppen mit hochauflösender Massenspektrometrie bestimmen. Aus beiden komplementären Methoden lassen sich Informationen über Isotopologmuster erhalten und im Idealfall die Häufigkeit von einzelnen Isotopologen in einem Isotopologgemisch ermitteln.

2.2.3.2.3 Ergebnisse aus den HR-MS-Messungen der ^{13}C - und ^{18}O -Markierungs- experimente zur Biosynthese von Anigorufon (1) und Hydroxyanigorufon (2)

Als Referenzsubstanzen für die massenspektrometrische Analyse dienten [2- O^{13}CH_3]Methoxyanigorufon (**75**) und [2,4'-di- O^{13}CH_3]2,4'-Dimethoxyanigorufon (**76**), deren unmethylierte Analoga aus einer ungefütterten Wurzelkultur von *A. preissii* isoliert und anschließend mit [^{13}C]Diazomethan derivatisiert wurden. In Abb. 2.23 ist ein Ausschnitt des Massenspektrums von [2- O^{13}CH_3]Methoxyanigorufon (**75**) dargestellt. Auf die Auswertung der mittels Massenspektrometrie für die Verbindungen **75** und **76** erhaltenen Ergebnisse möchte ich im Folgenden näher eingehen. Die Massenpeaks der Isotopologe bzw. Isotopologgruppen mit den verschiedenen Isotopenzusammensetzungen ergeben sich nach Messungen im positiven ESI-Ionisationsmodus und sind als m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ anzusehen. In den Abbildungen sind diese auch dementsprechend aufgelistet. Im fortlaufenden Text werden die Molekülmassen anstelle der bzw. zusätzlich zu den im positiven Ionisationsmodus erhaltenen Massen der Molekülkationen verwendet. Die aus den Massenspektren für [2- O^{13}CH_3]Methoxyanigorufon (**75**), des synthetischen O-Methylderivats von Anigorufon (**1**), erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 2.24 dargestellt. Es sind deutliche Unterschiede in den Anteilen der verschiedenen Isotopologe bzw. Isotopologgruppen der gleichen Isotopenzusammensetzungen nach Fütterungsexperimenten mit [2- ^{13}C]Phenylalanin bzw. [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre im Vergleich zur Referenzsubstanz ([2- O^{13}CH_3]Methoxyanigorufon (**75**)) zu erkennen. Die Säulen **1** – **7** entsprechen unterschiedlichen Isotopologen bzw. Isotopologgruppen von [2- O^{13}CH_3]Methoxyanigorufon (**75**) im jeweiligen Isotopologgemisch. In Abb. 2.24 sind tabellarisch die prozentualen Anteile

der Isotopologe bzw. Isotopologgruppen nach Subtraktion von 1.12% ^{13}C natürlicher Häufigkeit pro C-Atom aufgelistet. Das $[2\text{-O}^{13}\text{CH}_3]\text{Methoxyanigorufon}$ -Isotopolog der Isotopenzusammensetzung $\text{C}_{19}^{13}\text{CH}_{14}\text{O}_2$ (Molekülkation $[\text{C}_{19}^{13}\text{CH}_{15}\text{O}_2]^+$) wird sowohl nach Fütterung mit $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{Phenylalanin}$ (ca. 50%) wie auch $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{p-Cumarsäure}$ (**56**) (ca. 70%) am häufigsten beobachtet. Dieses Isotopolog entspricht $[2\text{-O}^{13}\text{CH}_3]\text{Methoxyanigorufon}$ (**75**), erhalten nach O-Methylierung von Anigorufon (**1**) mit $[^{13}\text{C}]\text{Diazomethan}$. Es enthält weder aus ^{13}C -markierten Vorstufen eingebautes ^{13}C noch aus $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre inkorporiertes ^{18}O , obwohl beide Precursoren zur Verfügung standen. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass dieses Isotopolog aus den in der Wurzelkultur vorhandenen Precursoren mit natürlicher Isotopenzusammensetzung gebildet wurde bzw. bereits vor Beginn des Fütterungsexperiments in der Kultur vorhanden war.

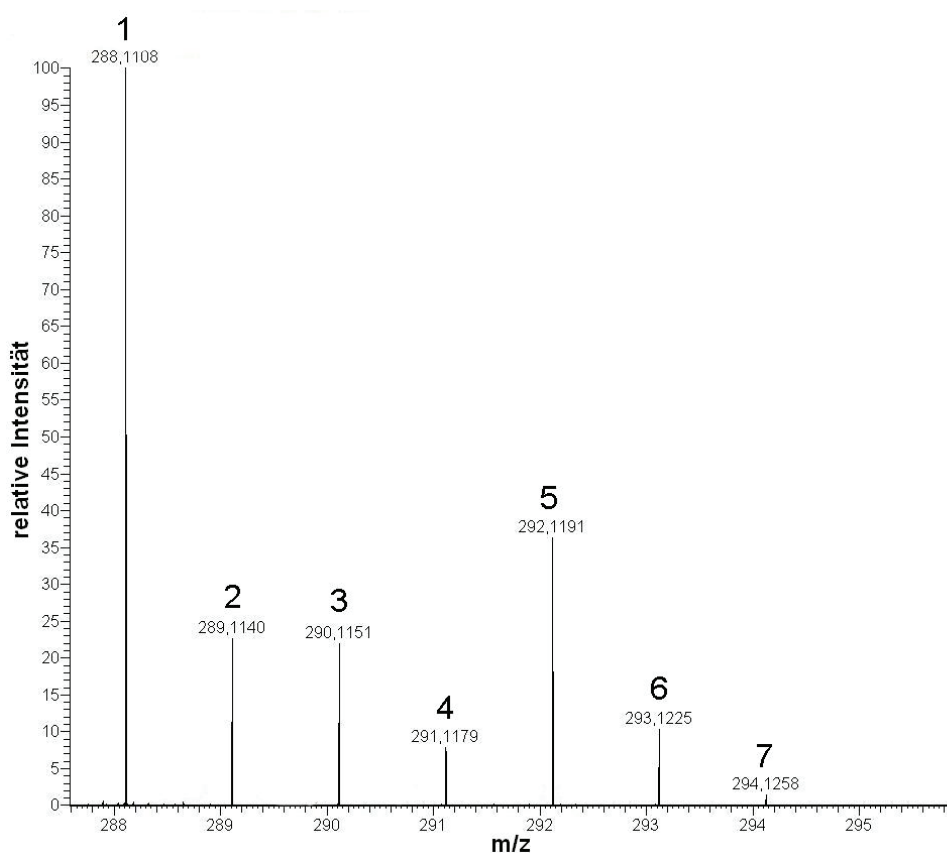


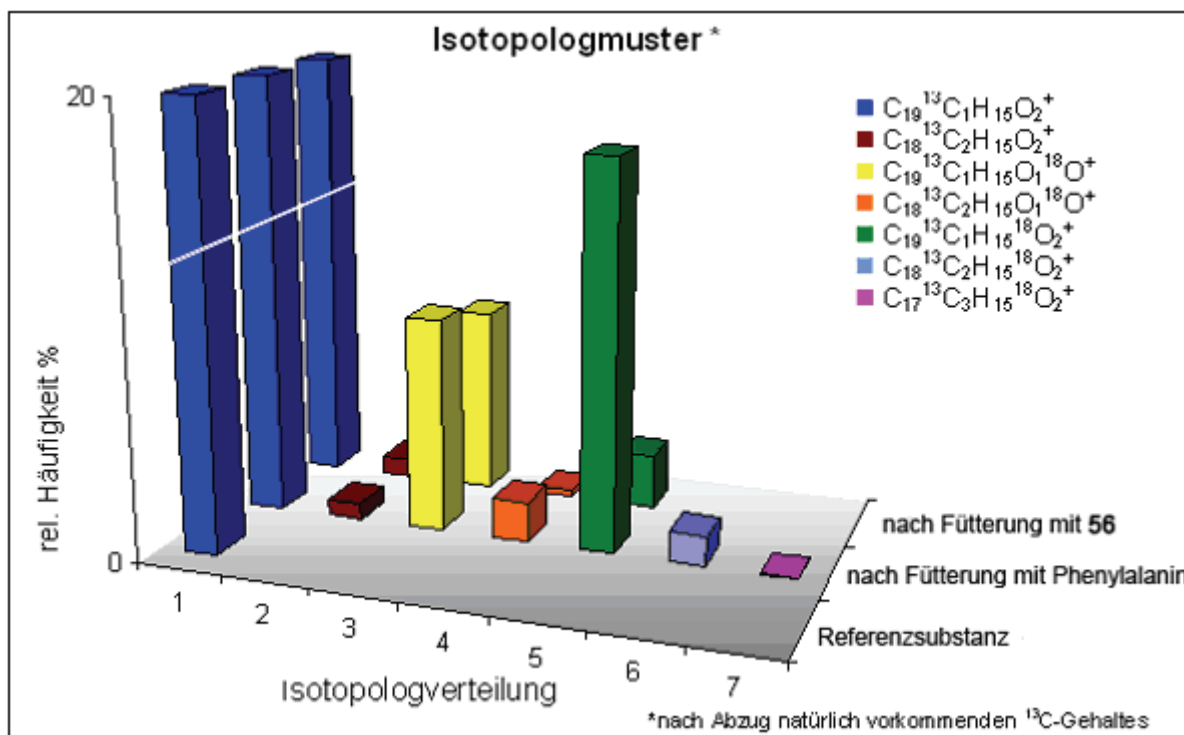
Abb. 2.23: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von $[2\text{-O}^{13}\text{CH}_3]\text{Methoxyanigorufon}$ (**75**) aus Fütterung mit $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{Phenylalanin}$ unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Verbindung **75** wurde durch Methylierung von Anigorufon (**1**) mit $[^{13}\text{C}]\text{Diazomethan}$ erhalten. **1** - **7** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar. Die Isotopenzusammensetzungen der Massenpeaks **1** - **7** wird in Abb. 2.24 ersichtlich.

Den Nachweis des Einbaus von ^{18}O aus einer $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre erbringen die in Abb. 2.24 als Säulen **3** - **7** dargestellten Isotopologe mit den dort angegebenen Isotopenzusammensetzungen. Die durch Säule **3** repräsentierte Isotopologgruppe mit der experimentell erhaltenen Molmasse von m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 290,1151 entspricht einer Isotopenzusammensetzung von $\text{C}_{19}^{13}\text{CH}_{14}\text{O}_1^{18}\text{O}$ (Molekülkation $[\text{C}_{19}^{13}\text{CH}_{15}\text{O}^{18}\text{O}]^+$). Dies stellt

einen Einbau von einem ^{18}O unter Verwendung natürlich vorkommender Vorstufen, wie z.B. Phenylalanin, dar.

Von großer Bedeutung sind jedoch Isotopologe mit Isotopenzusammensetzungen, die den Nachweis des Einbaus von ^{18}O unter kombinierter Inkorporation eines ^{13}C -markierten Precursors erbringen. Diese Isotopologe sind in der Tabelle in Abb. 2.24 farbig hervorgehoben. Für $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{Methoxyanigorufon}$ (**75**), das nach Fütterung von $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{Phenylalanin}$ und Derivatisierung mit $[^{13}\text{C}]\text{Diazomethan}$ erhalten wurde, werden Isotopologe der Isotopenzusammensetzung $\text{C}_{18}^{13}\text{C}_2\text{H}_{14}\text{O}^{18}\text{O}$ (Molekülkation $[\text{C}_{18}^{13}\text{C}_2\text{H}_{15}\text{O}^{18}\text{O}]^+$) mit der Häufigkeit ca. 1,8% bzw. $\text{C}_{18}^{13}\text{C}_2\text{H}_{14}^{18}\text{O}_2$ (Molekülkation $[\text{C}_{18}^{13}\text{C}_2\text{H}_{15}^{18}\text{O}_2]^+$) mit ca. 1,4% Häufigkeit nachgewiesen (Säule **4** bzw. **6** in Abb. 2.24). Unter gleichen Bedingungen wird ein Isotopolog der Isotopenzusammensetzung von $\text{C}_{17}^{13}\text{C}_3\text{H}_{14}^{18}\text{O}_2$ (Molekülkation $[\text{C}_{17}^{13}\text{C}_3\text{H}_{15}^{18}\text{O}_2]^+$, Säule **7**) mit einem geringen Anteil von 0,06% am Isotopologgemisch erhalten, was den Nachweis des Einbaus der Vorstufe in die linke und rechte Seite und eine zweifache Inkorporation von ^{18}O erbringt. Nach Fütterung von $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{p-Cumarsäure}$ (**56**) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre wird der kombinierte Einbau des Phenylpropans und von ^{18}O anhand des Auftretens eines Isotopologs der Isotopenzusammensetzung $\text{C}_{18}^{13}\text{C}_2\text{H}_{14}\text{O}_1^{18}\text{O}$ (Säule **4** in Abb. 2.24) mit der Häufigkeit von ca. 0,3% deutlich.

Die aus den Massenspektren von $[2,4'\text{-di-}^{13}\text{C}]\text{2,4'-Dimethoxyanigorufon}$ (**76**) erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 2.25 veranschaulicht. Hydroxyanigorufon, das unmethylierte Analogon von Verbindung **76** wurde aus unterschiedlich gefütterten Wurzelkulturen von *A. preissii* isoliert und anschließend mit $[^{13}\text{C}]\text{Diazomethan}$ derivatisiert. Dabei wurde eine ungefütterte Wurzelkultur verwendet um $[2,4'\text{-di-}^{13}\text{C}]\text{2,4'-Dimethoxyanigorufon}$ (**76**) als Referenzsubstanz zu erhalten und mit $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{Phenylalanin}$ bzw. $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{p-Cumarsäure}$ (**56**) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre gefütterte Kulturen dienten der Gewinnung der $^{13}\text{C}/^{18}\text{O}$ -markierten Isotopologen und Isotopologgruppen.



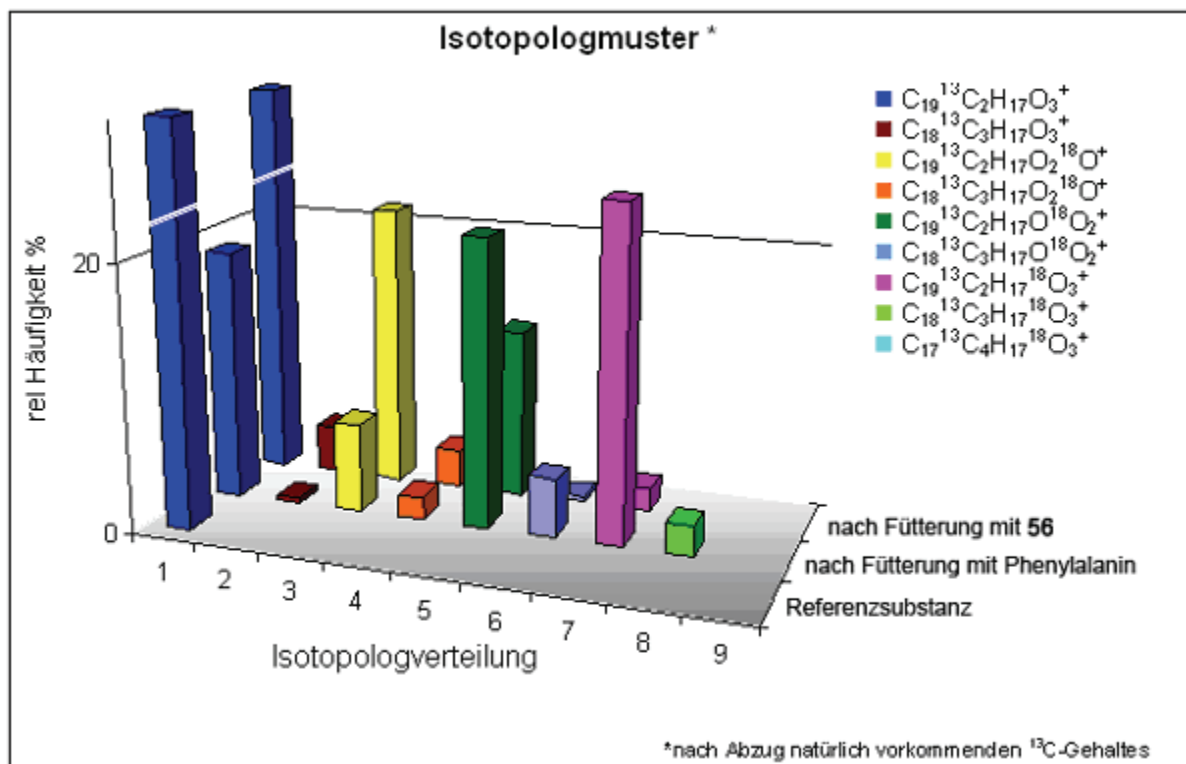
Isotopen- zusammensetzung	Molmasse m/z $[M+H]^+$	Rel. Häufigkeit (%)			
		simuliert	exp.	nach Fütterung mit Phenylalanin	nach Fütterung mit 56
1	$C_{19}^{13}C_1H_{15}O_2^+$	288,1106	288,1108	49,63	68,67
2	$C_{18}^{13}C_2H_{15}O_2^+$	289,1139	289,1140	0,75	0,85
3	$C_{19}^{13}C_1H_{15}O_1^{18}O^+$	290,1148	290,1151	9,75	8,49
4	$C_{18}^{13}C_2H_{15}O_1^{18}O^+$	291,1182	291,1179	1,83	0,33
5	$C_{19}^{13}C_1H_{15}^{18}O_2^+$	292,1190	292,1191	17,45	2,48
6	$C_{18}^{13}C_2H_{15}^{18}O_2^+$	293,1224	293,1225	1,36	0
7	$C_{17}^{13}C_3H_{15}^{18}O_2^+$	294,1258	294,1258	0,06	0

Abb. 2.24: Nach Fütterung von $[2-^{13}C]$ Phenylalanin bzw. $[2-^{13}C]$ *p*-Cumarsäure (**56**) an *A. preissii* unter $^{18}O_2$ -Atmosphäre mittels HR-MS erhaltene Isotopenzusammensetzungen von Isotopologen und Isotopologgruppen von $[2-O^{13}CH_3]$ Methoxyanigorufon (**75**). Verbindung **75** wurde nach Isolierung von Anigorufon (**1**) durch Methylierung mit $[^{13}C]$ Diazomethan erhalten. In der Tabelle sind die experimentell erhaltenen und berechneten Molmassen sowie die rel. Häufigkeit der Isotopologe bzw. Isotopologgruppen aufgelistet. Farblich gekennzeichnete Werte in der Tabelle: Durch kombinierten Einbau von ^{18}O und eines ^{13}C -markierten Precursors gebildete Isotopologe.

In diesem Versuch sind die Unterschiede in den Isotopologmustern nach Fütterungsexperimenten mit $[2-^{13}C]$ Phenylalanin bzw. $[2-^{13}C]$ *p*-Cumarsäure (**56**) unter $^{18}O_2$ -Atmosphäre im Vergleich zur Referenzsubstanz noch sehr viel deutlicher zu erkennen als für $[2-O^{13}CH_3]$ Methoxyanigorufon (**75**) (Abb. 2.25). Die Säulen 1 – 9 entsprechen hier ebenfalls unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen von $[2,4'-di-O^{13}CH_3]$ 2,4'-Dimethoxyanigorufon (**76**) in den erhaltenen Isotopologen bzw. Isotopologgruppen und die Säulenhöhe gibt deren relative Häufigkeit wieder. Die relativen Häufigkeiten von Isotopologen und Isotopologgruppen nach Subtraktion von 1.12% ^{13}C natürlicher Häufigkeit

pro C-Atom sowie deren experimentell erhaltenen und berechneten Molmassen sind in einer Tabelle in Abb. 2.25 aufgelistet. Für 2,4'-Dimethoxyanigorufon (**76**) werden nach Fütterung mit [2-¹³C]Phenylalanin unter ¹⁸O₂-Atmosphäre Isotopologe nachgewiesen, die durch den Einbau von einem ¹⁸O-Atom (rel. Häufigkeit ca. 6,7%; Isotopenzusammensetzung C₁₉¹³C₂H₁₆O₂¹⁸O; Molekülkation [C₁₉¹³C₂H₁₇O₂¹⁸O]⁺; Säule **3**), zwei ¹⁸O-Atomen (ca. 21,6%; C₁₉¹³C₂H₁₆O¹⁸O₂; Molekülkation [C₁₉¹³C₂H₁₇O¹⁸O₂]⁺; Säule **5**) bzw. drei ¹⁸O-Atomen (24,8%; C₁₉¹³C₂H₁₆¹⁸O₃; Molekülkation [C₁₉¹³C₂H₁₇¹⁸O₃]⁺; Säule **7**) entstehen, aber außer in den mittels [¹³C]Diazomethan eingeführten O¹³CH₃-Gruppen keine ¹³C-Anreicherung enthalten. Daraus lässt sich schließen, dass diese Isotopologe nicht aus dem gefütterten [2-¹³C]Phenylalanin sondern aus den in der Wurzelkultur vorhandenen Precursoren mit natürlicher Isotopenzusammensetzung gebildet wurden. Die gleichen Isotopologe bzw. Isotopologgruppen sind auch nach Fütterung mit [2-¹³C]*p*-Cumarsäure (**56**) wieder zu finden, jedoch hier mit einem prozentualen Anteil von ca. 21,4% (Säule **3**), ca. 12,9% (Säule **5**) und ca. 1,7% (Säule **7**).

Den Nachweis des kombinierten Einbaus von ¹⁸O und des jeweiligen ¹³C-markierten Precursors erbringen die durch die Säulen **4**, **6**, und **8** repräsentierten Isotopologgruppen von 2,4'-Dimethoxyanigorufon (**76**), welche in der Tabelle in Abb. 2.25 farbig gekennzeichnet sind. Für die Fütterung von [2-¹³C]Phenylalanin wird die Isotopologgruppe der Isotopenzusammensetzung C₁₈¹³C₃H₁₆O₂¹⁸O (Molekülkation [C₁₈¹³C₃H₁₇O₂¹⁸O]⁺; Säule **4**) mit einer relativen Häufigkeit von ca. 1,8 %, die Isotopologgruppe C₁₈¹³C₃H₁₆O¹⁸O₂ (Molekülkation [C₁₈¹³C₃H₁₇O¹⁸O₂]⁺; Säule **6**) mit ca. 4,5% und C₁₈¹³C₃H₁₆¹⁸O₃ (Molekülkation [C₁₈¹³C₃H₁₇¹⁸O₃]⁺; Säule **8**) mit ca. 2,3% erhalten. Die relative Häufigkeit eines hypothetischen Isotopologs der Isotopenzusammensetzung C₁₇¹³C₄H₁₆¹⁸O₂ (Säule **9**), welches sich durch den Einbau von zwei Molekülen [2-¹³C]Phenylalanin und einem dreifachen Einbau von ¹⁸O ergeben würde, lag unter der Nachweisgrenze. Nach Fütterung von [2-¹³C]*p*-Cumarsäure (**56**) werden die Isotopologgruppen C₁₈¹³C₃H₁₆O₂¹⁸O (Molekülkation [C₁₈¹³C₃H₁₇O₂¹⁸O]⁺; Säule **4**) mit einem prozentualen Anteil von ca. 2,9% und C₁₈¹³C₃H₁₆O¹⁸O₂ (Molekülkation [C₁₈¹³C₃H₁₇O¹⁸O₂]⁺; Säule **6**) mit ca. 0,4% nachgewiesen.



Isotopen- zusammensetzung	Molmasse m/z $[M+H]^+$		Rel. Häufigkeit (%)	
	simuliert	exp.	nach Fütterung mit Phenylalanin	nach Fütterung mit 56
1 $C_{19}^{13}C_2H_{17}O_3^+$	319,1245	319,1249	18,93	37,95
2 $C_{18}^{13}C_3H_{17}O_3^+$	320,1278	320,1281	0,39	3,51
3 $C_{19}^{13}C_2H_{17}O_2^{18}O^+$	321,1287	321,1297	6,69	21,37
4 $C_{18}^{13}C_3H_{17}O_2^{18}O^+$	322,1321	322,1326	1,81	2,94
5 $C_{19}^{13}C_2H_{17}O^{18}O_2^+$	323,133	323,1338	21,61	12,86
6 $C_{18}^{13}C_3H_{17}O^{18}O_2^+$	324,1363	324,1368	4,51	0,44
7 $C_{19}^{13}C_2H_{17}^{18}O_3^+$	325,1372	325,1374	24,80	1,68
8 $C_{18}^{13}C_3H_{17}^{18}O_3^+$	326,1406	326,1407	2,26	0
9 $C_{17}^{13}C_4H_{17}^{18}O_3^+$	327,1439	327,1443	0	0

Abb. 2.25: Nach Fütterung von $[2-^{13}C]$ Phenylalanin bzw. $[2-^{13}C]$ *p*-Cumarsäure (**56**) an *A. preissii* unter $^{18}O_2$ -Atmosphäre mittels HR-MS erhaltene Isotopenzusammensetzungen von Isotopologen und Isotopologgruppen von $[2,4'-di-O^{13}CH_3]2,4'$ -Dimethoxyanigorufon (**76**). Verbindung **76** wurde nach Isolierung von Hydroxyanigorufon (**2**) durch Methylierung mit $[^{13}C]$ Diazomethan erhalten. In der Tabelle sind die experimentell erhaltenen und berechneten Molmassen sowie die rel. Häufigkeit der Isotopologe bzw. Isotopologgruppen aufgelistet. Farblich gekennzeichnete Werte in der Tabelle: Durch kombinierten Einbau von ^{18}O und eines ^{13}C -markierten Precursors gebildete Isotopologe.

2.2.3.2.4 Isotopologmuster aus den NMR- und HR-MS-Messungen der ^{13}C - und ^{18}O -Markierungsexperimente zur Biosynthese von Anigorufon (1) und Hydroxyanigorufon (2)

Die Abb. 2.26 - 2.28 zeigen die nach Fütterungen von $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin bzw. $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) an *A. preissii* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre mittels NMR und MS erhaltenen Markierungsmuster. Die durch kombinierten Einbau von ^{18}O und der jeweiligen ^{13}C -markierten Vorstufe gebildeten Phenylphenalenone Anigorufon (**1**) und Hydroxyanigorufon (**2**) wurden isoliert und mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan zu deren O^{13}CH_3 -Analoga, Methoxyanigorufon (**75**) bzw. 2,4'-Dimethoxyanigorufon (**76**), umgesetzt. Für $[2\text{-O}^{13}\text{CH}_3]$ Methoxyanigorufon (**75**) nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin bzw. $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) sind die Isotopologgruppen mit den unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen in Abb. 2.26 abgebildet. Nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin werden sieben Isotopologe erhalten (Abb. 2.26A). Dabei handelt es sich um sechs Isotopologe, welche einem Einbau der ^{13}C -markierten Vorstufe in die linke bzw. rechte Seite des Phenylphenalenon-Skeletts entsprechen und zugleich einer Inkorporation von ^{18}O an Position C-1 oder C-2 bzw. einen Einbau an beiden Positionen aufweisen. Des Weiteren wurde zu einem geringen Anteil ein Isotopolog erhalten, welches durch den Einbau der ^{13}C -markierten Vorstufe in die rechte und linke Seite und Inkorporation von ^{18}O an C-1 und C-2 aufgebaut wurde. Hingegen wird nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) (Abb. 2.26B) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre lediglich ein Isotopolog erhalten, welches einem Einbau des Phenylpropans in die rechte Seite und ^{18}O -Sauerstoffes an C-2 entspricht. Ein Einbau von $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) in die linke Seite ist aufgrund der Existenz der *para*-Hydroxylgruppe in *p*-Cumarsäure und dem Fehlen einer OH-Funktion an C-4' von Anigorufon (**1**) nicht möglich.

Für $[2,4'\text{-di-O}^{13}\text{CH}_3]$ 2,4'-Dimethoxyanigorufon (**76**) nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin bzw. $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) sind die identifizierten Isotopologe mit den verschiedenen Isotopenzusammensetzungen in den Abb. 2.27 bzw. 2.28 dargestellt. Aus der Fütterung mit $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin ergeben sich 14 Isotopologe (Abb. 2.27), wobei sechs einem Einbau der ^{13}C -markierten Vorstufe in die linke bzw. rechte Seite und einer Inkorporation von einem ^{18}O an C-1, C-2 oder C-4' entsprechen. Weitere sechs Isotopologe werden ebenfalls durch den Einbau der ^{13}C -markierten Vorstufe in die linke bzw. rechte Seite erhalten, jedoch mit einem zweifachen Einbau von ^{18}O -Sauerstoff an C-1 und C-2, C-1 und C-4' oder C-2 und C-4'. Für zwei weitere Isotopologe ergibt sich eine Isotopenzusammensetzung, welche einen dreifachen Einbau an ^{18}O verdeutlicht. Nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) werden für $[2,4'\text{-di-O}^{13}\text{CH}_3]$ 2,4'-Dimethoxyanigorufon (**76**) sechs Isotopologe erhalten (Abb. 2.28), welche in allen sechs Fällen einem Einbau des Precursors in die linke bzw. rechte Seite entsprechen. Für vier Isotopologe ergibt sich eine Isotopenzusammensetzung, welche einen

einfachen Einbau von ^{18}O an C-1, C-2 oder C-4' darstellt und zwei Isotopologe mit einer zweifachen Inkorporation von ^{18}O an C-1 und C-2 bzw. C-2 und C-4'.

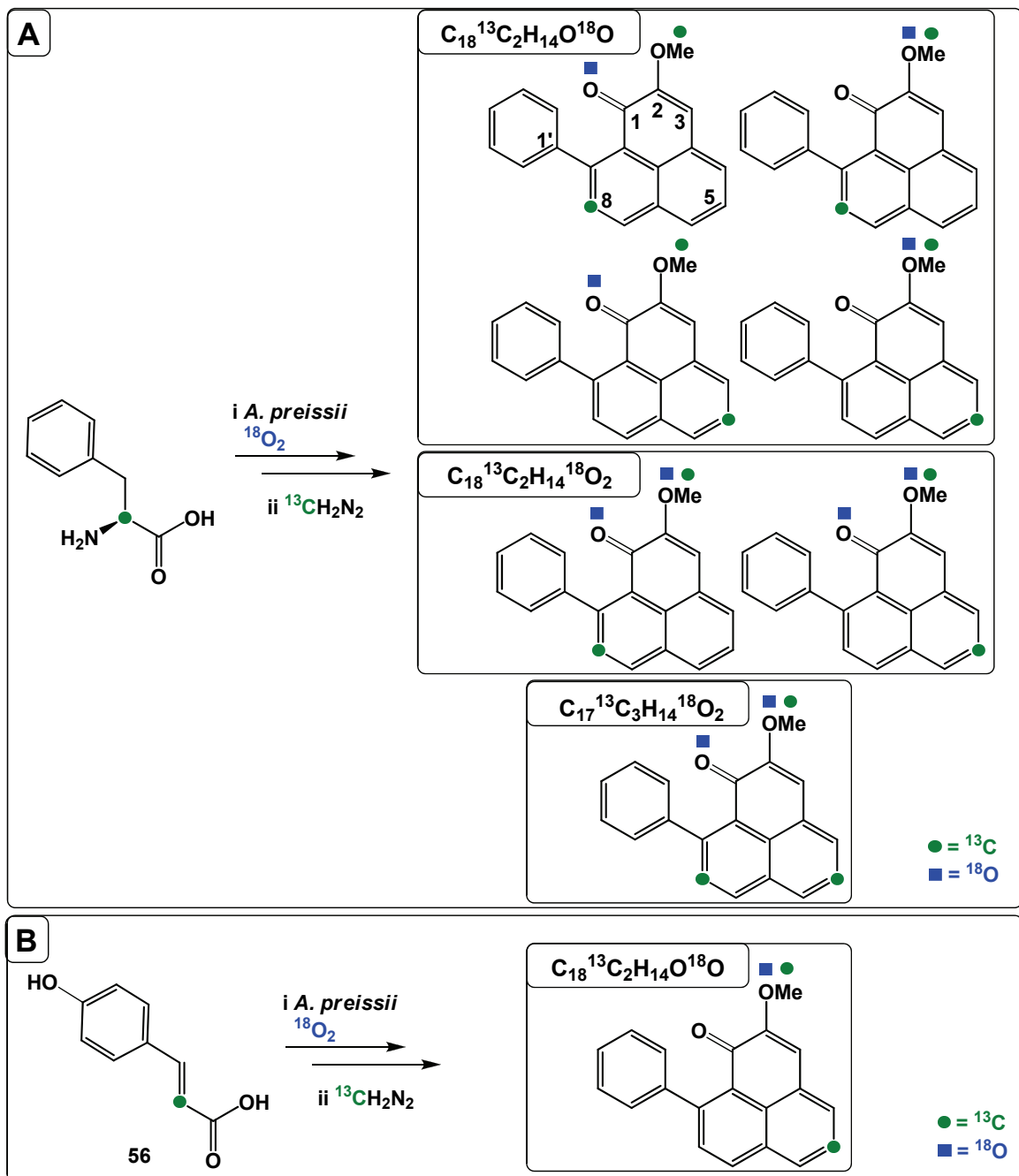


Abb. 2.26: Aus NMR- und HR-MS-Messungen abgeleitete Isotopologe, erhalten nach kombiniertem Einbau von $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin und ^{18}O (A) bzw. $[2\text{-}^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) und ^{18}O (B) in Anigorufon (**1**) und Methylierung mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan zu $[2\text{-O}^{13}\text{CH}_3]$ Methoxyanigorufon (**75**). Die Fütterung erfolgte an *A. preissii* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Aus selektiver Inkorporation eines ^{13}C -markierten Precursors oder ^{18}O hervorgegangene Isotopologe sind nicht abgebildet.

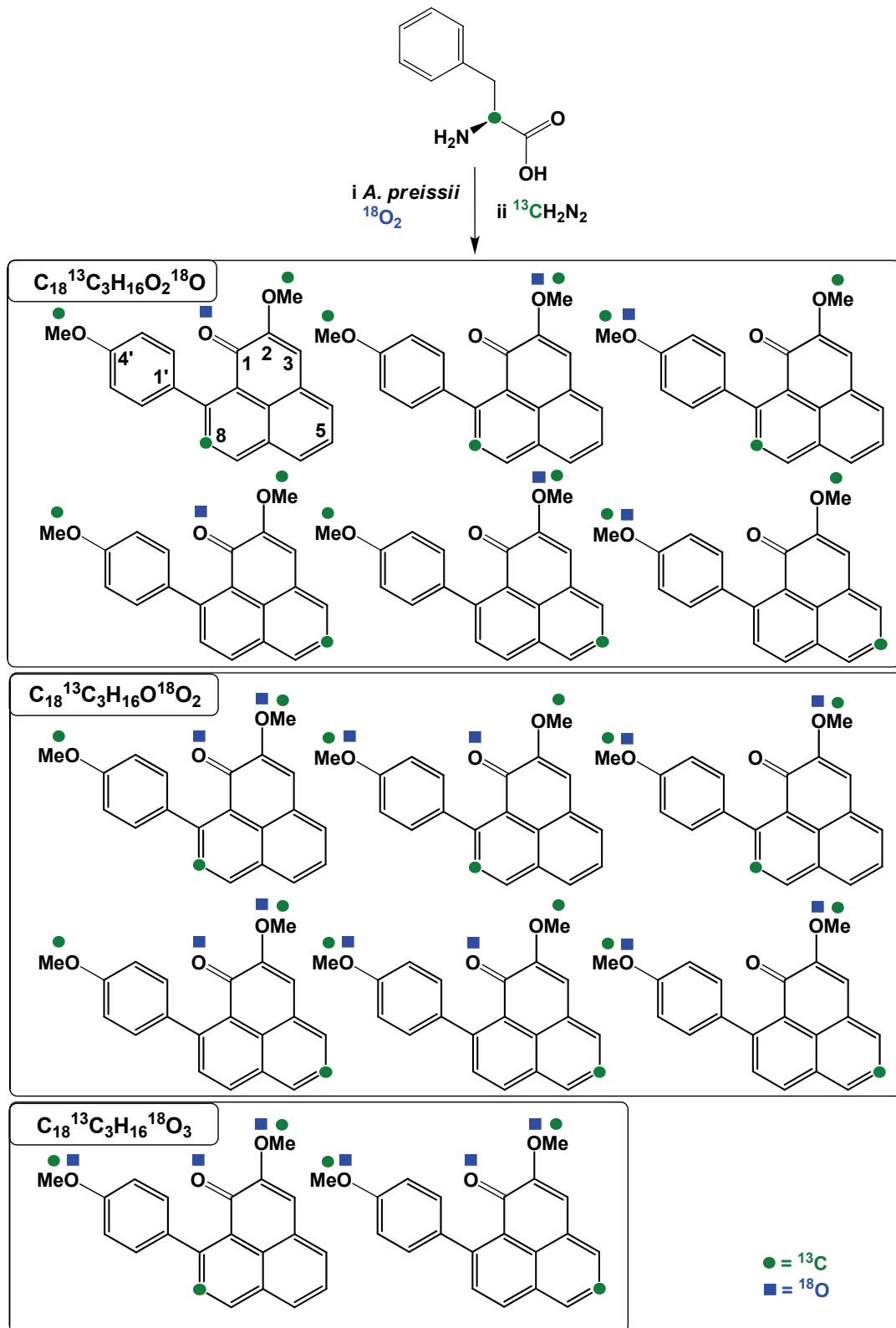


Abb. 2.27: Aus NMR- und HR-MS-Messungen abgeleitete Isotopologe, erhalten nach kombiniertem Einbau von $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin und $^{18}\text{O}_2$ in Hydroxyanigorufon (**2**) und Methylierung mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan zu $[2,4'\text{-di-}^{13}\text{CH}_3]2,4'\text{-Dimethoxyanigorufon}$ (**76**). Die Fütterung erfolgte an *A. preissii* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Aus selektiver Inkorporation eines ^{13}C -markierten Precursors oder ^{18}O hervorgegangene Isotopologe sind nicht abgebildet.

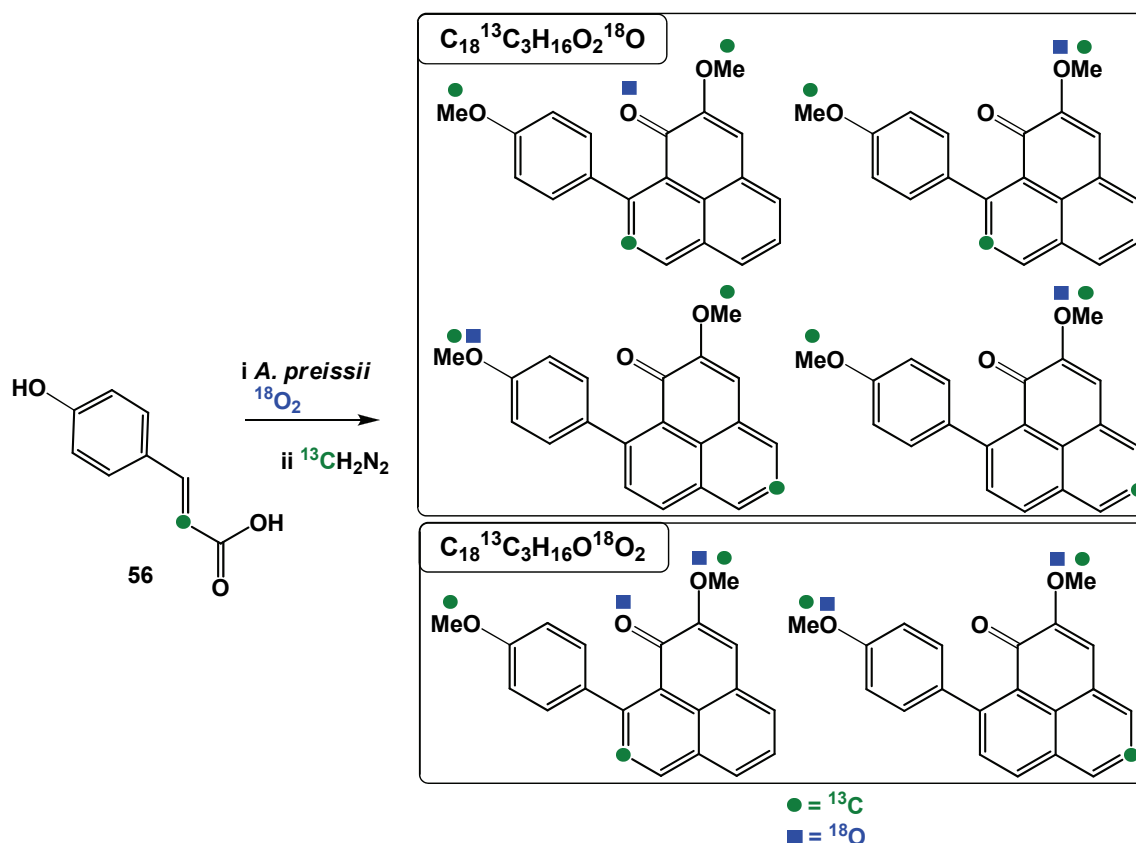


Abb. 2.28: Aus NMR- und HR-MS-Messungen abgeleitete Isotopologe, erhalten nach kombiniertem Einbau von $[2\text{-}^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) und $^{18}\text{O}_2$ in Hydroxyanigorufon (**2**) und Methylierung mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan zu $[2,4\text{'-di-O}^{13}\text{CH}_3]2,4\text{'-Dimethoxyanigorufon}$ (**76**). Die Fütterung erfolgte an *A. preissii* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Aus selektiver Inkorporation eines ^{13}C -markierten Precursors oder ^{18}O hervorgegangene Isotopologe sind nicht abgebildet.

2.2.3.3 ^{13}C - und ^{18}O -Markierungsexperimente zur Biosynthese von tetraoxygenierten Phenylphenalenonen in *Wachendorfia thyrsiflora*

2.2.3.3.1 Einführung

Wurzelkulturen von *W. thyrsiflora* unterscheiden sich von *A. preissii*-Kulturen durch das Profil darin vorkommender Phenylphenalenone. Während in *A. preissii* 1,2-dioxygenierte 9-Phenylphenalenone dominieren, überwiegt in *W. thyrsiflora* das Vorkommen von tetraoxygenierten Phenylphenalenonen. Wurzelkulturen von *W. thyrsiflora* bieten deshalb zusätzlich zu der bereits in Abschnitt 2.2.3.2 dokumentierten Aufklärung der Herkunft des Sauerstoffes in Position C-1 und C-2 die Möglichkeit, auch den Sauerstoffeinbau an C-5 und C-6 zu untersuchen (Bezugssystem: 9-Phenylphenalenon, s. **A** in Abb. 2.8). Für Fütterungsexperimente an Wurzelkulturen von *W. thyrsiflora* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre wurden neben den ^{13}C -markierten Vorstufen $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin und $[2\text{-}^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) die synthetisch hergestellten $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoide **68** und **69** verwendet. Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben besteht die Möglichkeit, dass der Einbau des Sauerstoffes bereits auf Stufe

der Phenylpropansäuren vollzogen wird oder erst zu einem späteren Zeitpunkt der Biosynthese der Phenylphenalenone, z.B. auf Stufe der Diarylheptanoid-Intermediate oder nach Ringschluss auf Stufe des ausgebildeten Phenylphenalenon-Grundgerüsts eingeführt wird. Wegen ihres Vorkommens in Wurzelkulturen von *W. thyrsoiflora* wurden die tetraoxygenierten Verbindungen Lachnanthosid-Aglycon (**17**) und dessen Glycosid, 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) für die Analyse des Einbaus markierter Vorstufen ausgewählt. Für Verbindungen **17** und **25** ist nach Fütterung mit [2- 13 C]Phenylalanin unter 18 O₂-Atmosphäre ein Einbau von 18 O in allen Sauerstofffunktionen mit Ausnahme der vermutlich aus der Carboxylgruppe von Phenylalanin stammenden Ketogruppe in Position 1 zu erwarten (Abb. 2.29). Nach Fütterungsexperimenten mit [2- 13 C]*p*-Cumarsäure (**56**) hingegen kann 18 O-Einbau an C-6 der Phenylphenalenone ausgeschlossen werden. Hingegen ist ein Einbau dieses 13 C-markierten Precursors nur in die rechte Seite des Phenylphenalenon-Grundgerüsts und ein zweifacher 18 O-Einbau in Position C-2 und C-5 (Bezugssystem: 7-Phenylphenalenon, s. **B** in Abb. 2.8) zu erwarten. Damit ist eine Unterscheidung zu Fütterungen mit [2- 13 C]Phenylalanin zu erwarten. Durch Verwendung der [6- 13 C]Diarylheptanoide **68** und **69** (Abb. 2.30) sollte es möglich sein, herauszufinden ob die Sauerstofffunktion an C-5 vor oder nach Ringschluss eingeführt wird. Der Einbau des [6- 13 C]Diarylheptanoids **69** lässt auf eine Inkorporation von 18 O vor Ringschluss schließen.

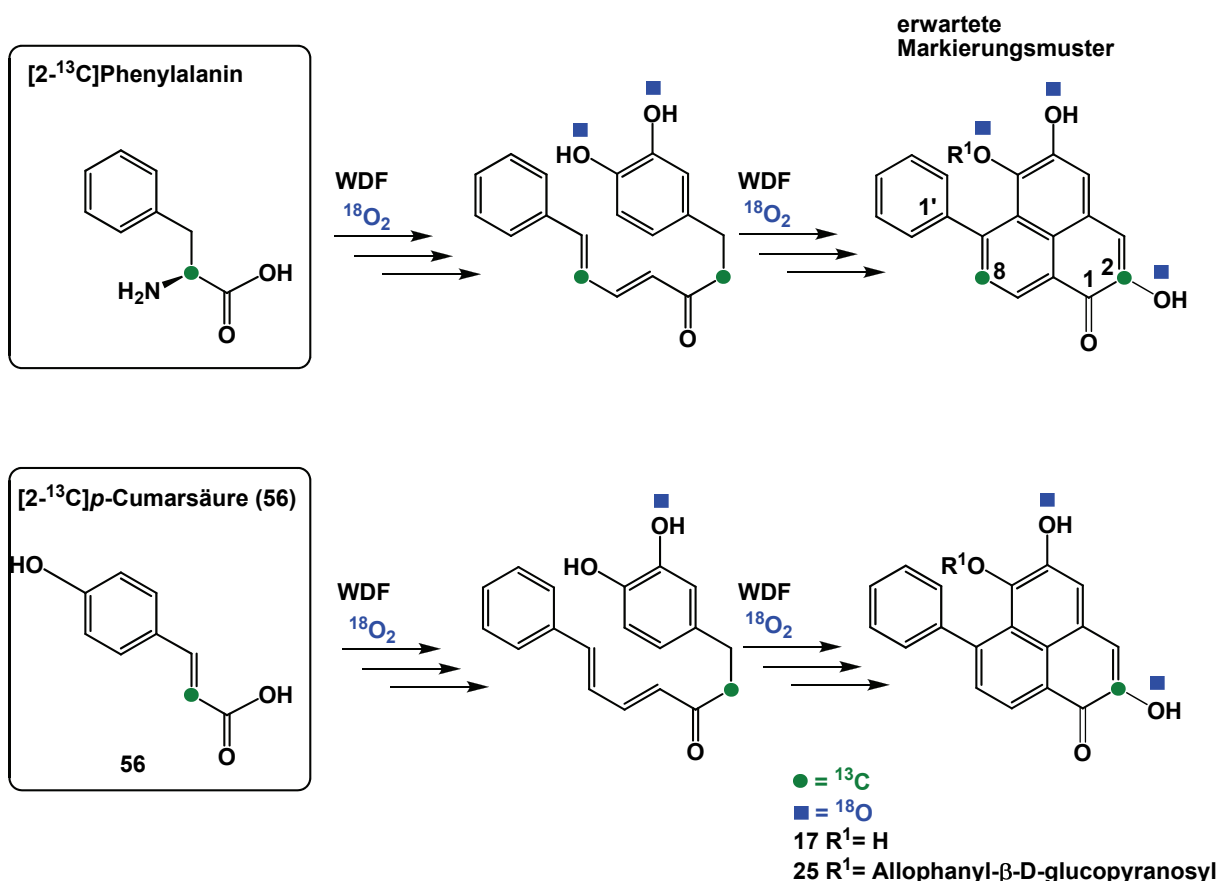


Abb. 2.29: Zu erwartende Markierungsmuster der hypothetischen Diarylheptanoide und der Biosyntheseprodukte Lachnanthosid-Aglycon (**17**) und 6-O-[(6''-O-Allophanlyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) nach Fütterung von $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin bzw. $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ *p*-Cumarsäure (**56**) an Wurzelkulturen von *W. thyrsiflora* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Die abgebildeten Markierungsmuster der als Intermediate der Biosynthese auftretenden Diarylheptanoide sowie der Phenylphenalenone **17** und **25** stellen jeweils die Summe von einfach, doppelt und mehrfach markierten Isotopologen dar.

Die erwarteten Markierungsmuster für Fütterungsexperimente unter Verwendung der synthetisierten $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoide **68** und **69** sind in Abb. 2.30 aufgeführt. Der Einbau der Diarylheptanoide sollte ebenfalls anhand der ^{13}C -Markierung nachweisbar sein, welche nach Ringschluss im Phenylphenalenon-Gerüst der 7-Phenylphenalenone **17** und **25** an Position C-8 identifizierbar wäre. Nach Inkorporation von $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ -(4E,6E)-1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-7-phenylhepta-4,6-dien-3-on (**69**) ist lediglich die Einführung eines ^{18}O -Sauerstoffes an C-2 zu erwarten (Bezugssystem: 7-Phenylphenalenon, s. **B** in Abb. 2.8). Hingegen ist nach Fütterung von $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ -(4E,6E)-1-(4-Hydroxyphenyl)-7-phenylhepta-4,6-dien-3-on (**68**) Einbau von ^{18}O an C-2 und C-5 am Grundgerüst der tetraoxygenierten 7-Phenylphenalenone **17** und **25** zu vermuten (Bezugssystem: 7-Phenylphenalenon, s. **B** in Abb. 2.8). Die biosynthetische Herkunft der Sauerstoffatome im Allophanlylglucosyl-Rest, z. B. von Verbindung **25**, war nicht Gegenstand dieser Arbeit.

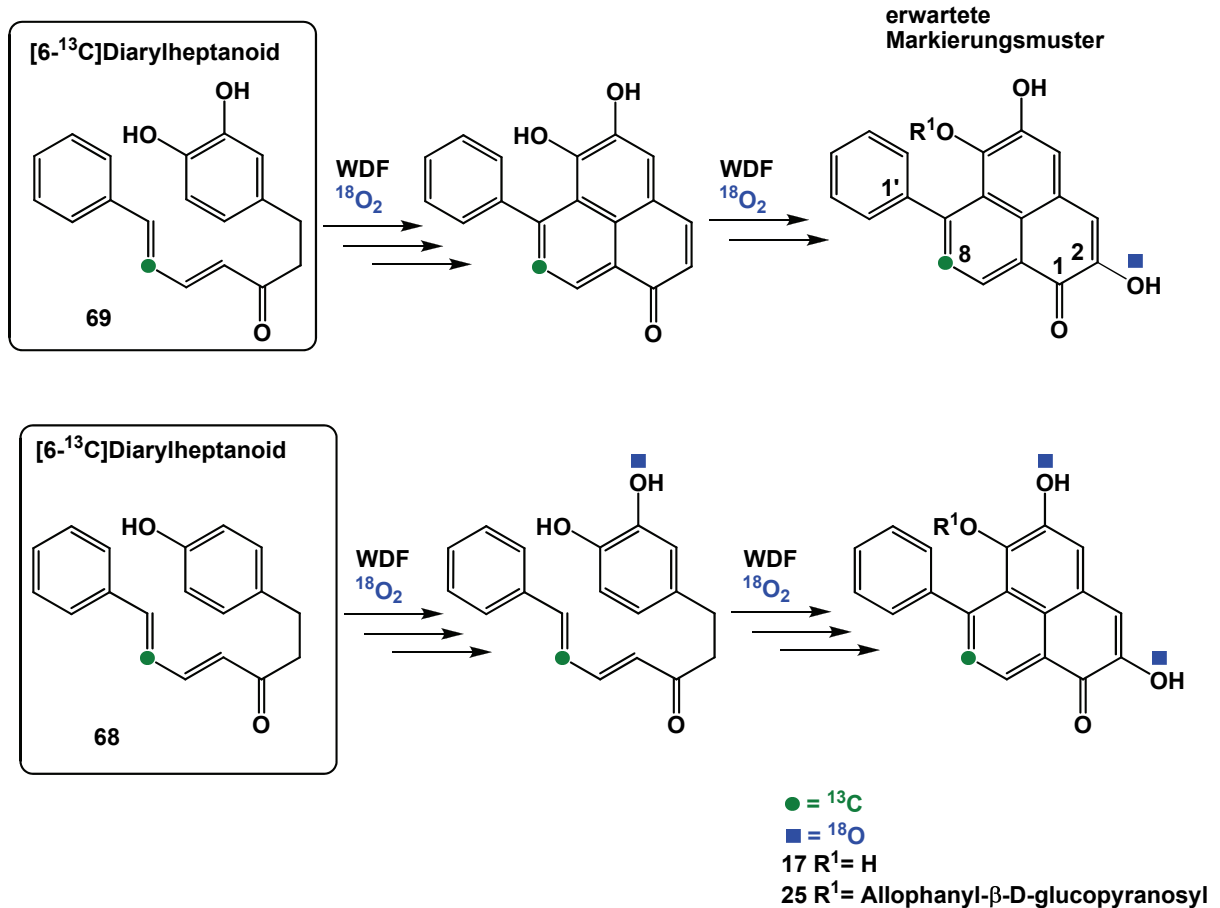


Abb. 2.30: Zu erwartende Markierungsmuster der hypothetischen Intermediate der Biosynthese und der Biosyntheseprodukte Lachnanthosid-Aglycon (**17**) und 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) nach Fütterung von $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoiden **68** und **69** an Wurzelkulturen von *W. thyrsoiflora* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Die abgebildeten Markierungsmuster der als Intermediate der Biosynthese auftretenden Diarylheptanoide sowie der Phenylphenalene **17** und **25** stellen jeweils die Summe von einfach, doppelt und mehrfach markierten Isotopologen dar.

2.2.3.3.2 NMR-Messungen der ^{13}C - und ^{18}O -Markierungsexperimente zur Biosynthese von tetraoxygenierten Phenylphenalenonen in *Wachendorfia thyrsoiflora*

Das aus einem Fütterungsexperiment mit $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre isolierte Phenylphenalenon **25** wurde auf den Einbau des Precursors sowie von ^{18}O -Sauerstoff mittels NMR untersucht. Wie bereits für Phenylphenalene aus Fütterungsexperimenten an *A. preissii* hervorging, sind auch im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **25** nach Fütterung im Vergleich zu einer Referenzsubstanz, welche aus einer ungefütterten Wurzelkultur von *W. thyrsoiflora* isoliert wurde, keine CH-Kopplungen nachweisbar, die auf extensive Anreicherung von ^{13}C schließen lassen. Es ist somit durch die ^1H -NMR-Spektren weder ein Einbau des Precursors noch des ^{18}O -Sauerstoffes nachweisbar. Das ^{13}C -NMR-Spektrum der aus zuvor beschriebenem Fütterungsexperiment

isolierten Verbindung **25** weist dagegen im Vergleich zur Kontrolle signifikant verstärkte ^{13}C -NMR-Signale von C-2 und C-8 auf. Als Kontrolle wurde die aus einer ungefütterten Wurzelkultur von *W. thyrsoflora* isolierte Verbindung **25** verwendet. Dieses Ergebnis weist den Einbau von zwei Molekülen $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin nach (Abb. 2.31). Analog zu dem bereits in Kapitel 2.2.3.2.2 beschriebenen zu geringen Signal-Rausch-Verhältnis der entsprechenden ^{13}C -NMR-Signale konnte auch hier kein Signal für eine ^{18}O -Induzierte Verschiebung und damit den Nachweis für den Einbau von ^{18}O erbracht werden.

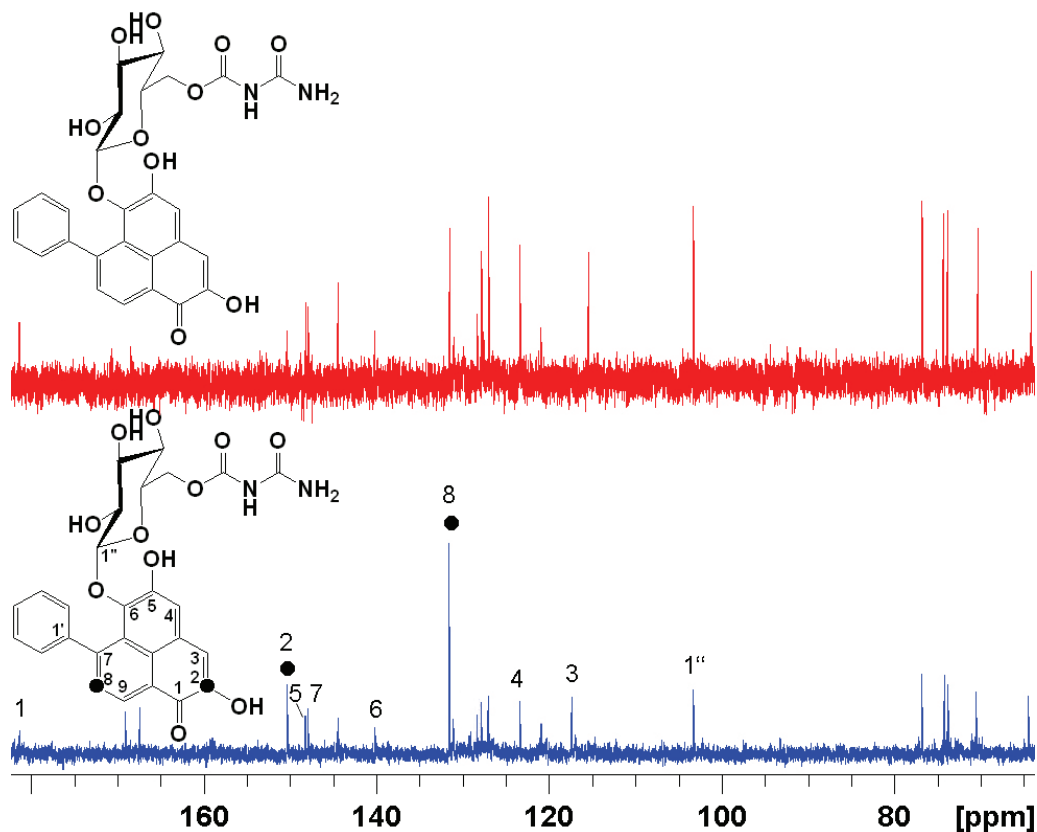


Abb. 2.31: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren (125 MHz, CD_3OD , ns = 70k) von 6-O-[[6''-O-Allophanyl]- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**), isoliert aus Wurzelkulturen von *W. thyrsoflora* nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin (blau) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre, und unmarkierter Verbindung **25** als Referenz (rot). Mit ^{13}C angereicherte Positionen sind mit ● markiert.

Aus diesem Grund erfolgte, wie schon anhand der Verbindungen **1** und **2** aus *A. preissii* praktiziert wurde, erneut die Methylierung der Hydroxylgruppen der isolierten tetraoxygenierten Phenylphenalenone **17** und **25** mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan (99% ^{13}C).

Durch diese Derivatisierung waren intensive Signale für die ^{13}C -Signale der Methoxygruppen einschließlich der leicht verschobenen Signale der $^{18}\text{O}^{13}\text{CH}_3$ -Gruppen zu erwarten. Nach der Einführung der $[^{13}\text{C}]$ Methoxygruppen wurden die in Abb. 2.32 dargestellten Phenylphenalenon-Derivate **77-79** erhalten und mit NMR und MS-Methoden hinsichtlich der in den Strukturformeln angegebenen hypothetischen ^{18}O -Anreicherungen analysiert.

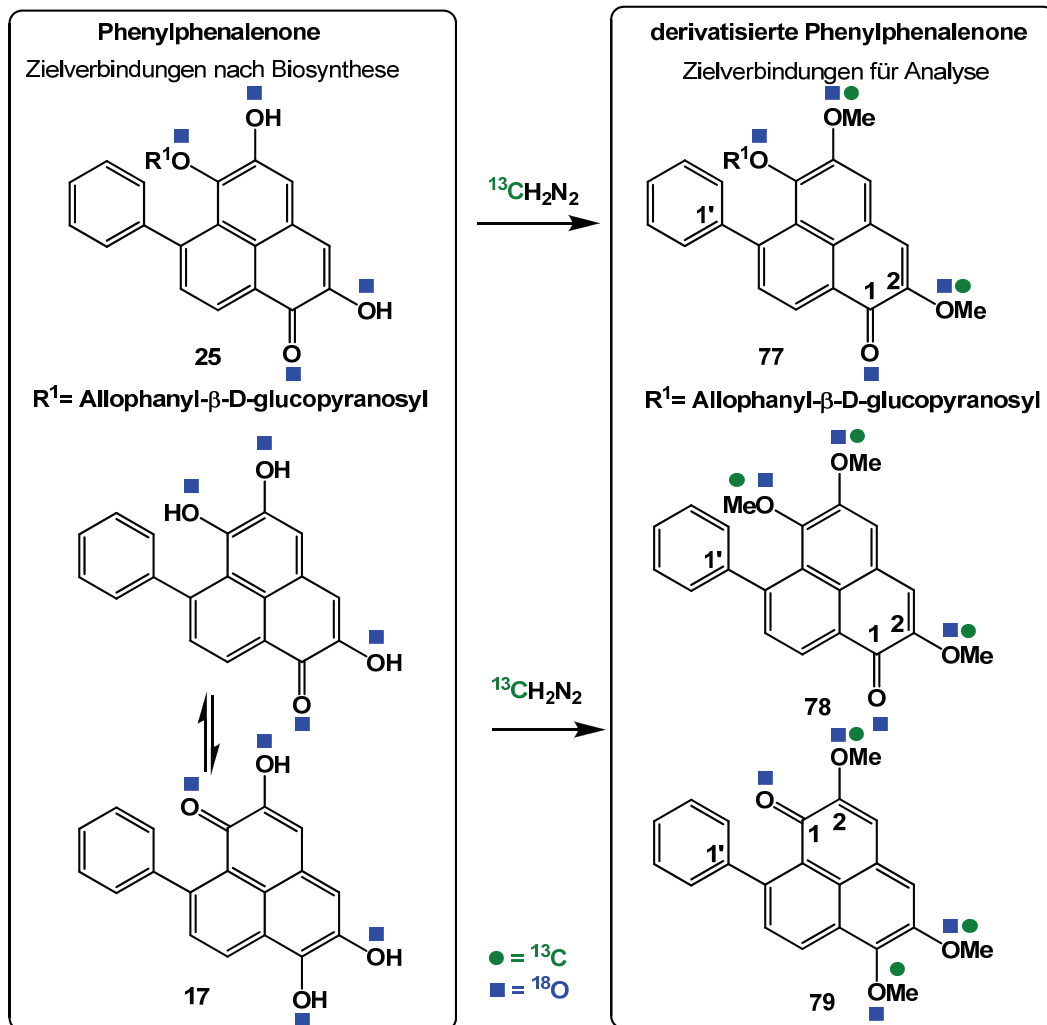


Abb. 2.32: Zielverbindungen nach Fütterungsexperimenten an *W. thyrsoflora* (links) und nach Methylierung mit [^{13}C]Diazomethan (rechts) für die Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit von ^{18}O mittels isopeninduziertem Verschiebungseffekt in der ^{13}C -NMR-Analyse. Die Positionen der erwarteten ^{18}O - und ^{13}C -Isotopenanreicherung sind in den Strukturformeln markiert.

Im nachfolgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse für [2,5-di- O^{13}CH_3]-6-O-[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**77**) nach Fütterungsexperimenten unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre unter Verwendung von [2- ^{13}C]Phenylalanin, [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) bzw. [6- ^{13}C]Diarylheptanoiden **68** und **69** vorgestellt werden. In den ^1H -NMR-Spektren der Derivate **77**, erhalten nach Fütterung mit [2- ^{13}C]Phenylalanin bzw. [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**), sind die nachträglich mit [^{13}C]Diazomethan eingeführten [O^{13}C]Methylgruppen durch die Dublett-Aufspaltung der O-Methylsignale nachweisbar. Die Kopplungskonstanten der (2- O^{13}CH_3)-Gruppe und der (5- O^{13}CH_3)-Gruppe betragen jeweils $^1J_{\text{H-C}} = 145.0$ Hz (Abb. 2.33). Im ^1H -NMR-Spektrum der underivatisierten Referenzprobe 6-O-[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) fehlen die O-Methylsignale und die übrigen Signale sind z.T. deutlich verschoben. Die Signale der beiden O^{13}CH_3 -Gruppen sind ebenso in den ^1H -NMR-Spektren der Derivate **77** nach

Fütterung mit [6- ^{13}C]Diarylheptanoiden **68** und **69** zu finden. Die Spektren entsprechen jenen in Abb. 2.33. Eine zusätzliche Abbildung erübrigt sich deshalb. Informationen über den Einbau der ^{13}C -markierten Vorstufen und von ^{18}O -Sauerstoff ist auch hier den ^1H -NMR-Spektren nicht zu entnehmen.

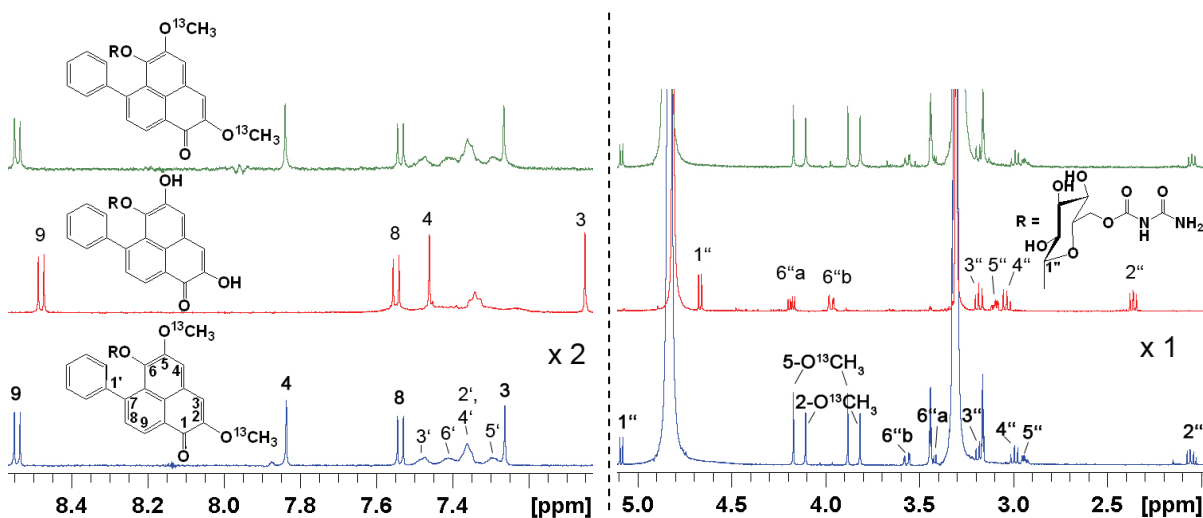


Abb. 2.33: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (500 MHz, CD_3OD , ns = 64) von [2,5-di- O^{13}CH_3]6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**77**) nach Fütterung von [2- ^{13}C]Phenylalanin (blau) bzw. [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) (grün) an *W. thyrsoflora* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre mit unmarkiertem 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) als Referenz (rot).

Der Nachweis des Einbaus der ^{13}C -markierten Vorstufen, welcher bereits durch die ^{13}C -NMR-Spektren der isolierten Reinverbindungen **25** erhalten wurde, wird durch die signifikant vergrößerte Intensität für das Signal von C-8 in den ^{13}C -NMR-Spektren der Derivate **77** bestätigt (Abb. 2.34). Der Einbau einer zweiten [2- ^{13}C]Phenylalanin- bzw. von [2- ^{13}C]p-Cumarsäureeinheit (**56**) war aufgrund der für die Messung von ^{13}C -NMR-Spektren zu geringen Substanzmenge der Derivate **77** und den damit verbundenen zu geringen Intensitäten der entsprechenden Signale der sp^2 -Kohlenstoffatome (C-2) nicht nachweisbar. Für diesen Nachweis wurden HMBC-Messungen durchgeführt (Abb. 8.17 im Anhang). In Abb. 2.35 sind die aus den HMBC-Spektren extrahierten ^{13}C -NMR-Spuren für H-3 (δ_{H} 7.29) abgebildet. Im Vergleich zum Spektrum der unmarkierten Referenz zeigen sich im HMBC-Spektrum verstärkte H-3/C-2-Kreuzsignale bzw. Signale in den extrahierten Spuren, welche die Inkorporation von [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) bzw. [2- ^{13}C]Phenylalanin in die rechte Hälfte des Phenylphenalens nachweisen.

Anhand der Methoxy-Signale an C-2 und C-5 war nach Fütterung mit [2- ^{13}C]Phenylalanin bzw. [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre der Einbau von ^{18}O nachweisbar (Abb. 2.34). Aufgrund des bereits in Kapitel 2.2.3.1 beschriebenen isotoneninduzierten Verschiebungseffektes erscheinen kleine aber signifikante zusätzliche ($^{18}\text{O}^{13}\text{CH}_3$)-Signale die

gegenüber den ($^{16}\text{O}^{13}\text{CH}_3$)-Signalen um $^1\Delta\delta \text{ } ^{18}\text{O}(^{13}\text{C}) = +25 \text{ ppb}$ für $2\text{-}^{18}\text{O}^{13}\text{CH}_3$ bzw. $^1\Delta\delta \text{ } ^{18}\text{O}(^{13}\text{C}) = +29 \text{ ppb}$ für $5\text{-}^{18}\text{O}^{13}\text{CH}_3$ zu hohem Feld verschoben sind.

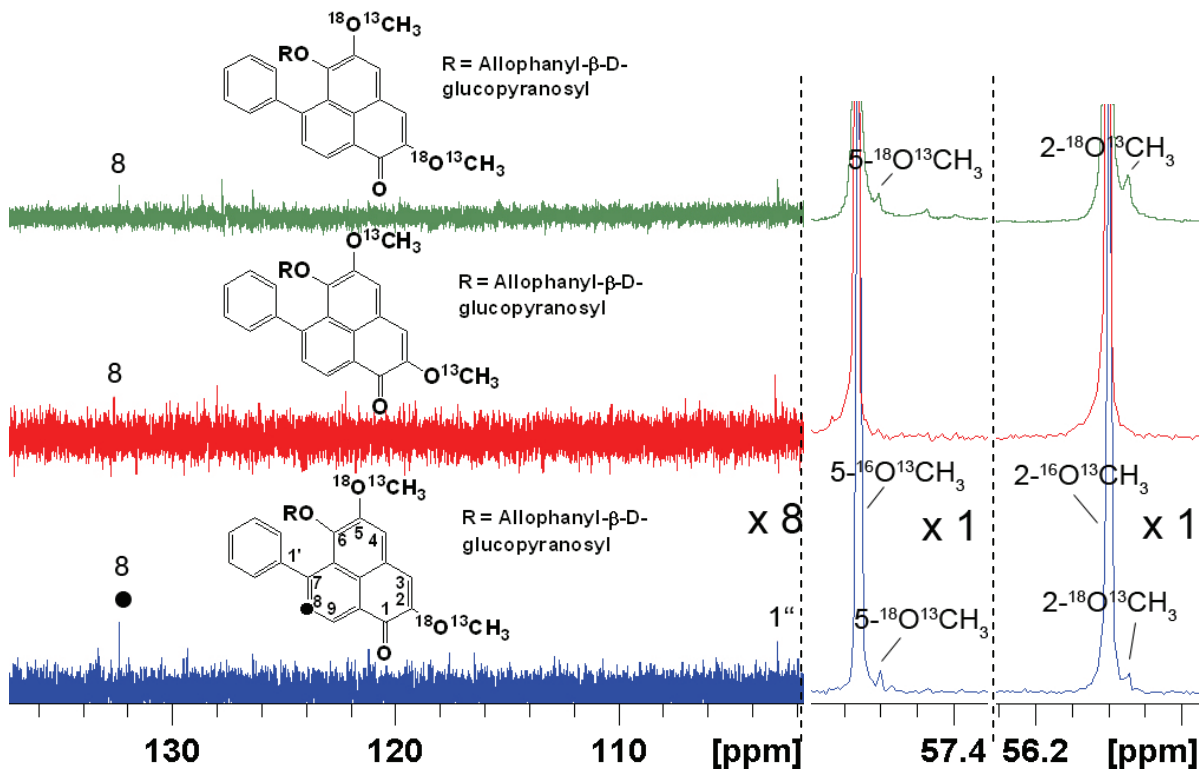


Abb. 2.34: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren von $[2,5\text{-di-}^{13}\text{CH}_3]6\text{-O-}[(6''\text{-O-Allophanyl})\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyl}]-2,5\text{-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on}$ (**77**) nach Fütterung von $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin (blau) bzw. $[2\text{-}^{13}\text{C}]p\text{-Cumarsäure}$ (**56**) (grün) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre mit unmarkiertem $6\text{-O-}[(6''\text{-O-Allophanyl})\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyl}]-2,5\text{-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on}$ als Referenz (rot). Mit ^{13}C angereicherte Positionen sind mit ● markiert.

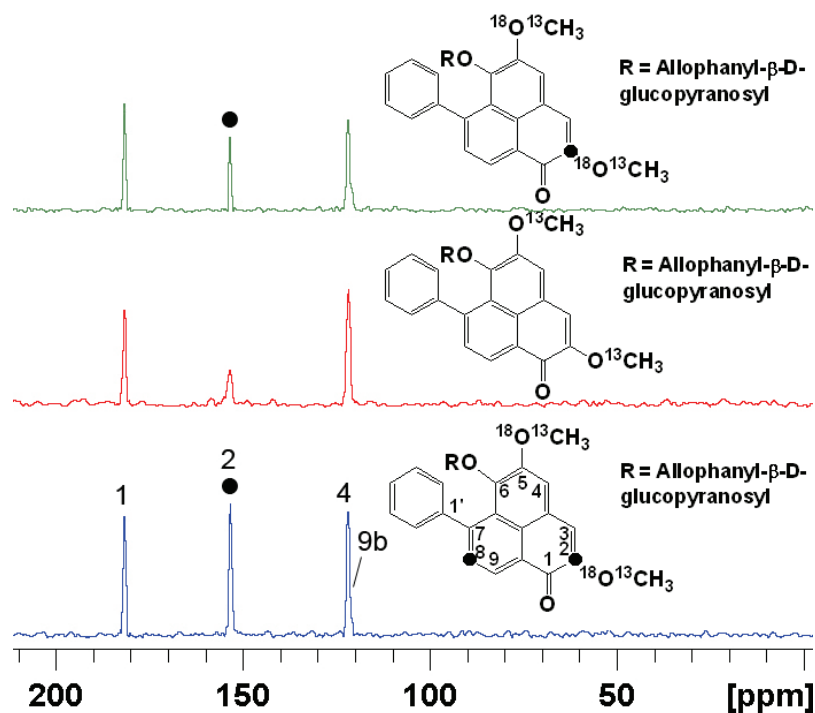


Abb. 2.35: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spuren von $[2,5\text{-di-}^{18}\text{O-}^{13}\text{CH}_3]6\text{-O-}[(6''\text{-O-Allophanyl})\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyl}]\text{-}2,5\text{-dimethoxy-}7\text{-phenylphenalen-}1\text{-on}$ (**77**) nach Fütterung von $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin (blau), $[2\text{-}^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) (grün) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre mit unmarkiertem $6\text{-O-}[(6''\text{-O-Allophanyl})\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyl}]\text{-}2,5\text{-dimethoxy-}7\text{-phenylphenalen-}1\text{-on}$ als Referenz (rot). Die ^{13}C -NMR-Spuren der mit H-3 (δ 7.29) korrelierenden ^{13}C -Atome wurden aus den entsprechenden HMBC-Spektren (500 MHz, Aceton- d_6 , ns = 240) extrahiert. Verstärkte Signale weisen ^{13}C -Anreicherung in Position C-2 und damit den Einbau der ^{13}C -markierten Vorstufen in die rechte Hälfte des Phenylphenalenons nach. ● = ^{13}C .

Das gleiche qualitative Ergebnis für den Einbau von ^{18}O -Sauerstoff wird nach Fütterungen mit $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoiden **68** und **69** erhalten (Abb. 2.36). Die durch den isopeninduzierten Verschiebungseffekt hervorgerufenen Signalverschiebungen betragen für $2\text{-}^{18}\text{O-}^{13}\text{CH}_3$ ebenfalls $^1\Delta\delta\ ^{18}\text{O}(^{13}\text{C}) = +25$ ppb bzw. $^1\Delta\delta\ ^{18}\text{O}(^{13}\text{C}) = +29$ ppb für $5\text{-}^{18}\text{O-}^{13}\text{CH}_3$. Während sich das Ergebnis für Verbindung **68** in Einklang mit der Hypothese (Abb. 2.32) befindet, besteht für das auf den ersten Blick überraschende Ergebnis des ^{18}O -Einbaus in Position C-5 für Verbindung **69** Interpretationsbedarf (s. Abschnitt 2.2.3.3.3). Da für die Ketofunktion in Position C-1 ebenso wie für die glucosidierte Sauerstofffunktion an C-6 keine Möglichkeit der Veretherung mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan und eine damit verbundene Sensitivitätssteigerung besteht, konnte der ^{18}O -induzierte Verschiebungseffekt in diesen Fällen nicht beobachtet werden. Die Frage, ob ^{18}O -Einbau in diese beiden Positionen erfolgte, konnte deshalb mit der verwendeten NMR-Methode nicht beantwortet werden.

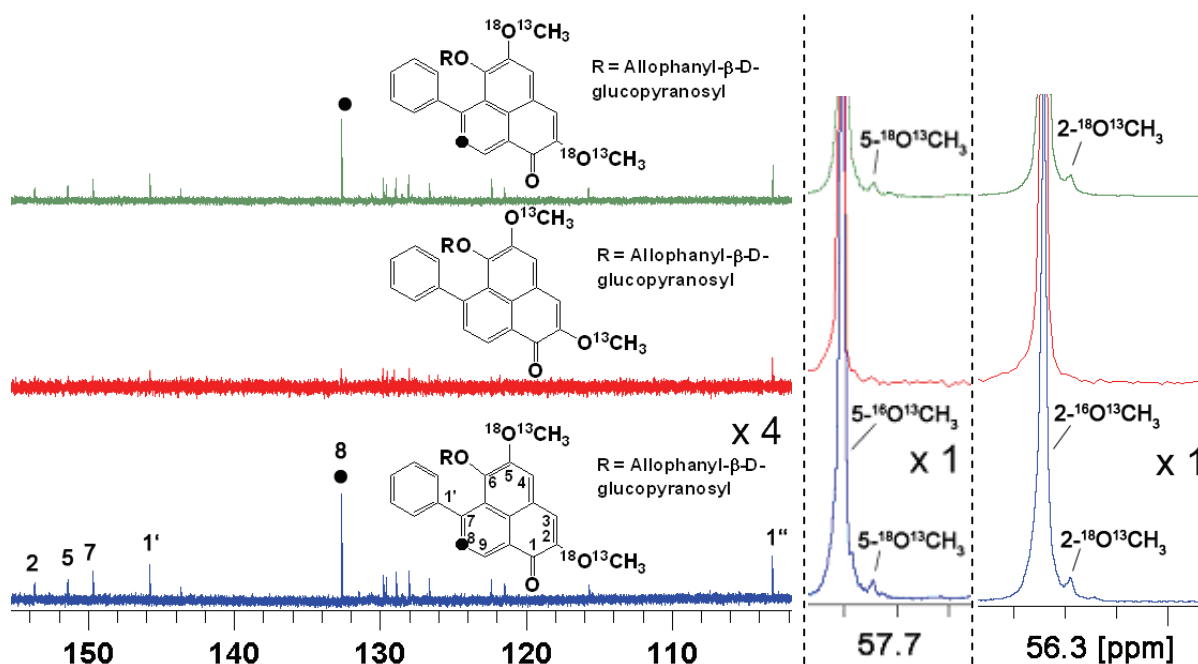


Abb. 2.36: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren von $[2,5\text{-di-}^{13}\text{C}_3]6\text{-O-}[(6''\text{-O-Allophanyl})\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyl}]-2,5\text{-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on}$ (**77**) nach Fütterung von $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoiden **68** (blau) bzw. **69** (grün) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre mit unmarkiertem $6\text{-O-}[(6''\text{-O-Allophanyl})\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyl}]-2,5\text{-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on}$ als Referenz (rot). ● = ^{13}C .

Wie bereits beschrieben, ist eine weitere Untersuchungssubstanz ein aus *W. thyrsoflora* isoliertes tetraoxygeniertes Phenylphenalenon, welches in einem tautomeren Gleichgewicht vorliegen kann. Mittels NMR wurde die Reinverbindung als Lachnanthosid-Aglycon (2,5,6-Trihydroxy-9-phenylphenalen-1-on) (**17**) identifiziert. Die Daten dazu sind im Kapitel Material und Methoden (s. 5.5.6.2) aufgeführt. Nach O-Methylierung von **17** mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan und anschließender Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC wurden wegen der Tautomerie des Edukts die beiden Trimethylether $[2,5,6\text{-tri-}^{13}\text{C}_3]2,5,6\text{-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on}$ (**78**) und $[2,5,6\text{-tri-}^{13}\text{C}_3]2,5,6\text{-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on}$ (**79**) erhalten. In Abb. 2.37 sind die ^1H -NMR-Spektren von Verbindung **78** nach Fütterungsexperimenten mit $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin (blau) und $[2\text{-}^{13}\text{C}]p\text{-Cumarsäure}$ (**56**) (grün) im Vergleich zu Lachnanthosid-Aglycon (**17**) als Referenz (rot) dargestellt. Es wird ebenso wie für alle bisher vorgestellten O^{13}CH_3 -Phenylphenalenon-Derivate eine Aufspaltung der Methoxy-Signale aufgrund der ^{13}C -Anreicherung von 99% deutlich. Die Kopplungskonstanten betragen für die $(2\text{-O}^{13}\text{CH}_3)$ -Gruppe $^1J_{\text{H-C}} = 144.7$ Hz, die $(5\text{-O}^{13}\text{CH}_3)$ -Gruppe $^1J_{\text{H-C}} = 144.5$ Hz und die $(6\text{-O}^{13}\text{CH}_3)$ -Gruppe $^1J_{\text{H-C}} = 144.6$ Hz. Informationen über den Einbau der ^{13}C -markierten Vorstufen und von ^{18}O -Sauerstoff ist auch hier den ^1H -NMR-Spektren nicht zu entnehmen. In Abb. 2.38 ist der Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von Verbindung **79** nach Fütterungsexperimenten mit $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin und $[2\text{-}^{13}\text{C}]p\text{-Cumarsäure}$ (**56**) mit Lachnanthosid-Aglycon (**17**) als Referenz zu sehen. Die Kopplungskonstanten der Methoxy-

Signale betragen in diesem Fall $^1J_{\text{H-C}} = 144.5$ Hz für die (2-O ^{13}C H $_3$)-Gruppe, $^1J_{\text{H-C}} = 144.8$ Hz für die (5-O ^{13}C H $_3$)-Gruppe und $^1J_{\text{H-C}} = 144.7$ Hz für die (6-O ^{13}C H $_3$)-Gruppe.

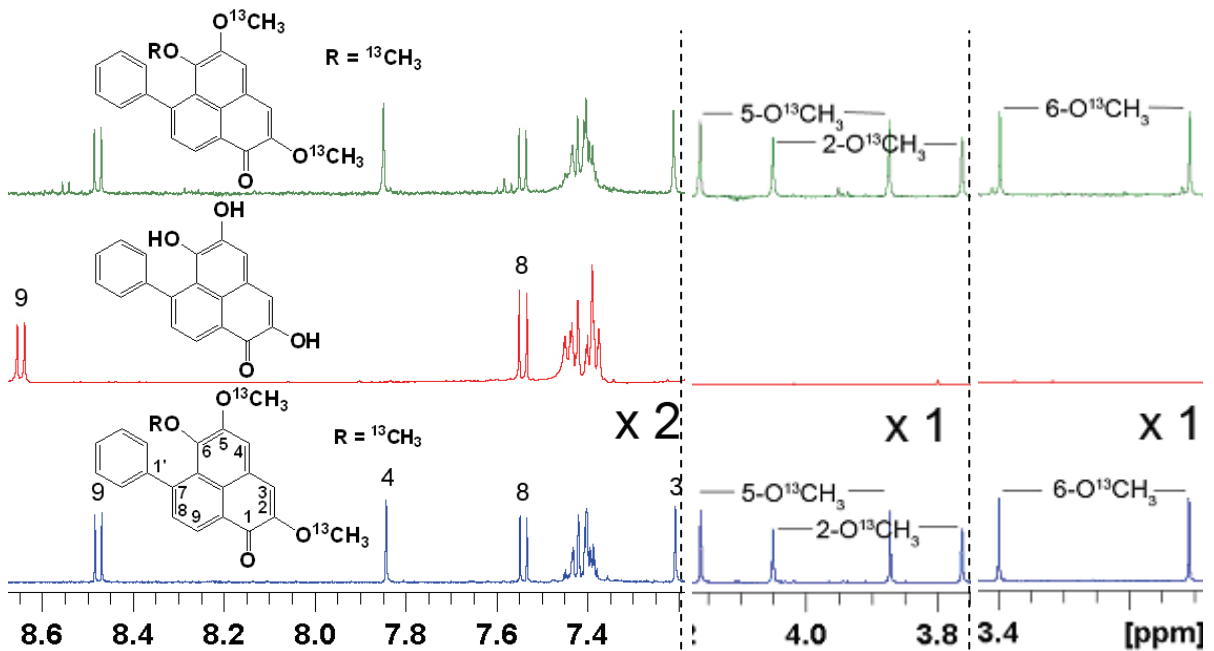


Abb. 2.37: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (500 MHz, Aceton- d_6 , ns = 64) von [2,5,6-tri-O ^{13}C H $_3$]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) nach Fütterung von [2- ^{13}C]Phenylalanin (blau) bzw. [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) (grün) an *W. thyrsoflora* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre mit unmarkiertem Lachnanthosid-Aglycon (**17**) als Referenz (rot).

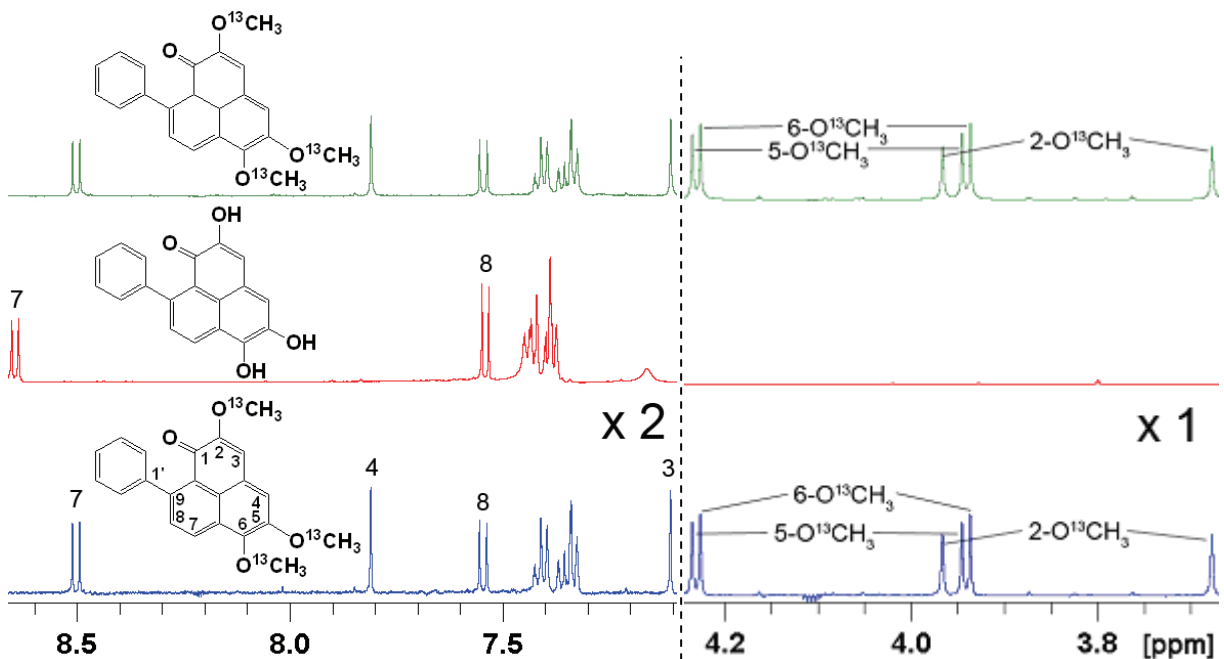


Abb. 2.38: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (500 MHz, Aceton- d_6 , ns = 64) von [2,5,6-tri-O ^{13}C H $_3$]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (**79**) nach Fütterung von [2- ^{13}C]Phenylalanin (blau) bzw. [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) (grün) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre an *W. thyrsoflora* mit unmarkiertem Lachnanthosid-Aglycon (**17**) als Referenz (rot). ● = ^{13}C .

Für den Nachweis des Einbaus der ^{13}C -markierten Vorstufen sowie des ^{18}O -Sauerstoffes sind für die Verbindungen **78** und **79** ebenfalls die ^{13}C -NMR-Spektren notwendig, welche im Folgenden näher betrachtet werden. In Abb. 2.39 sind die ^{13}C -NMR-Spektren von Verbindung **78**, nach Fütterungen mit $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin bzw. $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre, im Vergleich zu $[2,5,6\text{-tri-}^{13}\text{O}^{13}\text{CH}_3]$ 2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on als Referenz, welches nach Derivatisierung mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan von Lachnanthosid-Aglycon (**17**) aus einer ungefütterten Wurzelkultur erhalten wurde, dargestellt. Aus den Ausschnitten der ^{13}C -NMR-Spektren (Bereich 120-150 ppm) lässt sich lediglich der Nachweis für den Einbau von einem Molekül $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin in Verbindung **78** erbringen, was anhand des signifikant vergrößerten Signals von C-8 (blaues Spektrum in Abb. 2.39) zu sehen ist. Der Einbau von $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin in die rechte Molekülhälfte bzw. von $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) ist aufgrund der für die Messung von ^{13}C -NMR-Spektren zu geringen Substanzmengen und der daraus resultierenden geringen Signalintensitäten der entsprechenden sp^2 -Kohlenstoffatome (C-2) (Bezugssystem: 7-Phenylphenalenon, s. **B** in Abb. 2.8) nicht nachweisbar. Für diesen Nachweis dienten deshalb erneut HMBC-Messungen (Abb. 8.18 im Anhang). In Abb. 2.40 sind die aus den HMBC-Spektren extrahierten Spuren der mit H-3 korrelierenden ^{13}C -Atome abgebildet. Im Vergleich zum Spektrum der unmarkierten Referenz zeigt sich ein verstärktes H-3/C-2-Kreuzsignal, das die Inkorporation von $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) in die rechte Hälfte des Phenylphenalens nachweist. Ein Einbau von $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin in die rechte Hälfte wurde nicht sicher nachgewiesen, da das Signal-Rauschverhältnis der extrahierten Spur zu gering war. Nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin bzw. $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre ist aufgrund des isopeninduzierten Verschiebungseffektes der Methoxy-Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum ein Einbau von ^{18}O an C-2 nachweisbar (Abb. 2.39). Im ^{13}C -NMR-Spektrum erscheint ein zweites, gegenüber dem Signal von $^{16}\text{O}^{13}\text{CH}_3$ um $^1\Delta\delta\ ^{18}\text{O}(^{13}\text{C}) = +28$ ppb verschobenes Signal (Abb. 2.39). Die $^{18}\text{O}^{13}\text{CH}_3$ -Signale weisen jedoch nur sehr geringe Intensitäten auf, die auf unten zu diskutierende (Abschnitt 2.2.3.3.3) sehr geringe ^{18}O -Einbauraten hindeuten

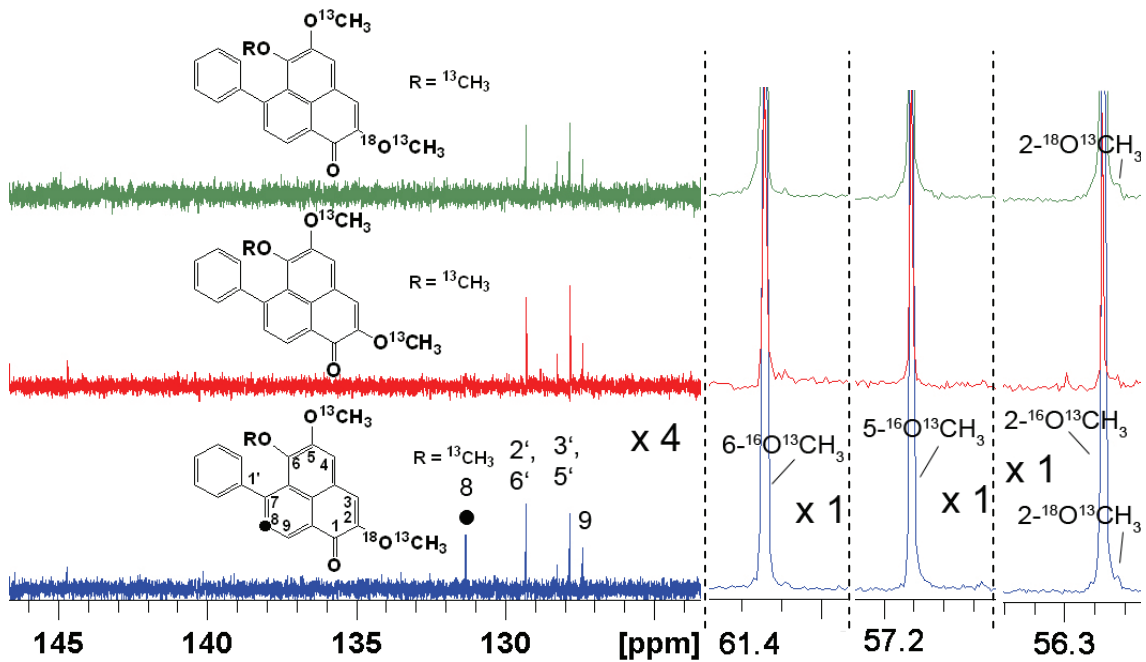


Abb. 2.39: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren (125 MHz, Aceton- d_6 , ns = 74k) von [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) nach Fütterung von [2- ^{13}C]Phenylalanin (blau) bzw. [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) (grün) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre an *W. thyrsoflora* mit unmarkiertem 2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on als Referenz (rot). ● = ^{13}C .

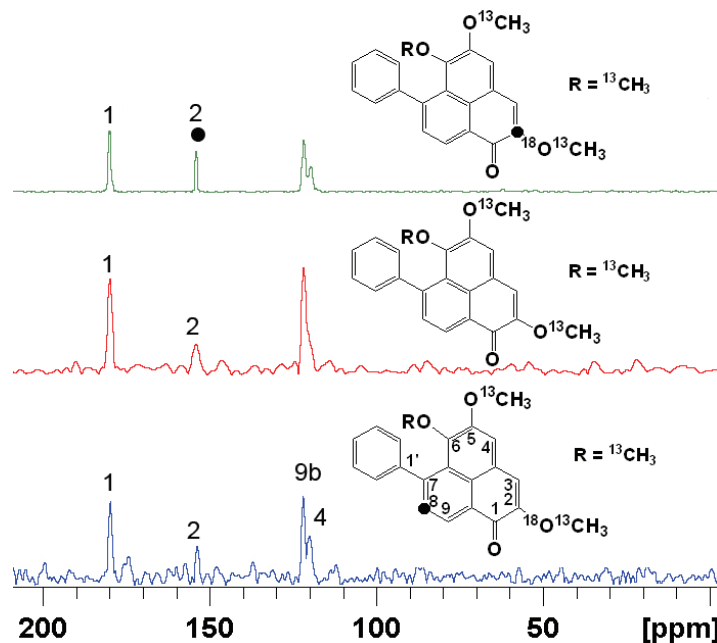


Abb. 2.40: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren von [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) nach Fütterung von [2- ^{13}C]Phenylalanin (blau) bzw. [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) (grün) an *W. thyrsoflora* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre mit unmarkiertem 2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on als Referenz (rot). Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden aus den entsprechenden HMBC-Spektren (500 MHz, Aceton- d_6 , ns = 240) extrahiert. Die Signale stellen H3/C-Kreuzsignale dar und dienen dem Nachweis des Einbaus der ^{13}C -markierten Vorstufen in die rechte Hälfte des Phenylphenalenons. ● = ^{13}C .

Für [2,5,6-tri- ^{13}C] O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**), nach Fütterung der [6- ^{13}C]Diarylheptanoide **68** (blau) und **69** (grün) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre, wird der Nachweis für den Einbau der Diarylheptanoide durch die signifikant vergrößerte Intensität der Signale von C-8 erbracht (Abb. 2.41). Bei Betrachtung der Methoxy-Signale ist lediglich für das (2- O^{13}CH_3)-Signal, nach Fütterung mit **69**, der erwartete isotopeninduzierte Verschiebungseffekt zu beobachten (Abb. 2.41). Das zusätzlich im ^{13}C -NMR-Spektrum erschienene ($^{18}\text{O}^{13}\text{CH}_3$)-Signal hat eine Verschiebung gegenüber dem ($^{16}\text{O}^{13}\text{CH}_3$)-Signal von $^1\Delta\delta \text{ } ^{18}\text{O}(^{13}\text{C}) = +28 \text{ ppb}$.

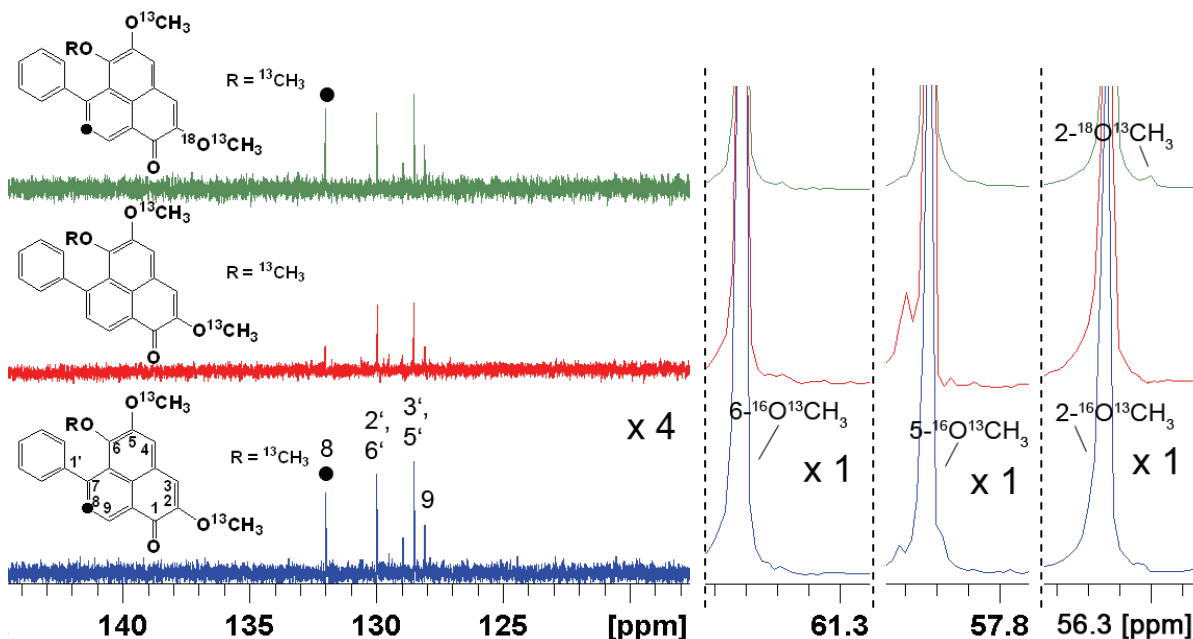


Abb. 2.41: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren (125 MHz, Aceton- d_6 , ns = 74k) von [2,5,6-tri- ^{13}C] O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) nach Fütterung von [6- ^{13}C]Diarylheptanoiden **68** (blau) bzw. **69** (grün) an *W. thyrsoflora* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre mit unmarkiertem 2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on als Referenz (rot). ● = ^{13}C .

Für das aus den Tautomeren nach Methylierung mit [^{13}C]Diazomethan erhaltene [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (**79**) kann nach Fütterung mit [2- ^{13}C]Phenylalanin unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre beim Vergleich mit 2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on als Referenz, welches nach Derivatisierung mit [^{13}C]Diazomethan von Lachnanthosid-Aglycon (**17**) aus ungefütterter Wurzelkultur erhalten wurde, der Einbau von [2- ^{13}C]Phenylalanin in die linke Hälfte des Phenylphenalenons nachgewiesen werden (Abb. 2.42). Entscheidendes Indiz dafür ist das signifikant vergrößerte Signal von C-8 im ^{13}C -NMR-Spektrum (blaues Spektrum in Abb. 2.42). Dagegen ist das Signal von C-5 (Bezugssystem: 9-Phenylphenalenon, s. **A** in Abb. 2.8) gegenüber dem Spektrum der unmarkierten Verbindung **79** nicht verstärkt und auch im HMBC-Spektrum konnte keine Intensivierung des Kreuzsignals von H-4/C-5 und damit kein Einbau von [2- ^{13}C]Phenylalanin in die rechte Hälfte des Phenylphenalenons gezeigt werden (Abb. 8.19 im Anhang). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Befund am Tautomer **78** (s. Abb. 2.40).

Das verstärkte Signal von C-5 im HMBC-Spektrum von [2,5,6-tri- $^{18}\text{O}^{13}\text{CH}_3$]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (**79**) aus dem Fütterungsversuch mit [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre weist auf den Einbau in die rechte Hälfte des Phenylphenalenon-Moleküls hin. Anhand der erwarteten isotopeninduzierten Verschiebungseffekte der Methoxy-Signale (Abb. 2.42) wird der Einbau von ^{18}O an C-2 und C-5 nach Fütterung mit [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) erbracht (grünes Spektrum in Abb. 2.42). Die Verschiebungen der Signale gegenüber den Signalen von $^{16}\text{O}^{13}\text{CH}_3$ betragen $^1\Delta\delta \text{ } ^{18}\text{O}(^{13}\text{C}) = +28 \text{ ppb}$ für 2- $^{18}\text{O}^{13}\text{CH}_3$ und $^1\Delta\delta \text{ } ^{18}\text{O}(^{13}\text{C}) = +25 \text{ ppb}$ für 5- $^{18}\text{O}^{13}\text{CH}_3$. Nach Fütterung von [2- ^{13}C]Phenylalanin unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre ist im ^{13}C -NMR-Spektrum kein Einbau von ^{18}O in Verbindung **17** bzw. seinen Trimethylether **79** nachweisbar.

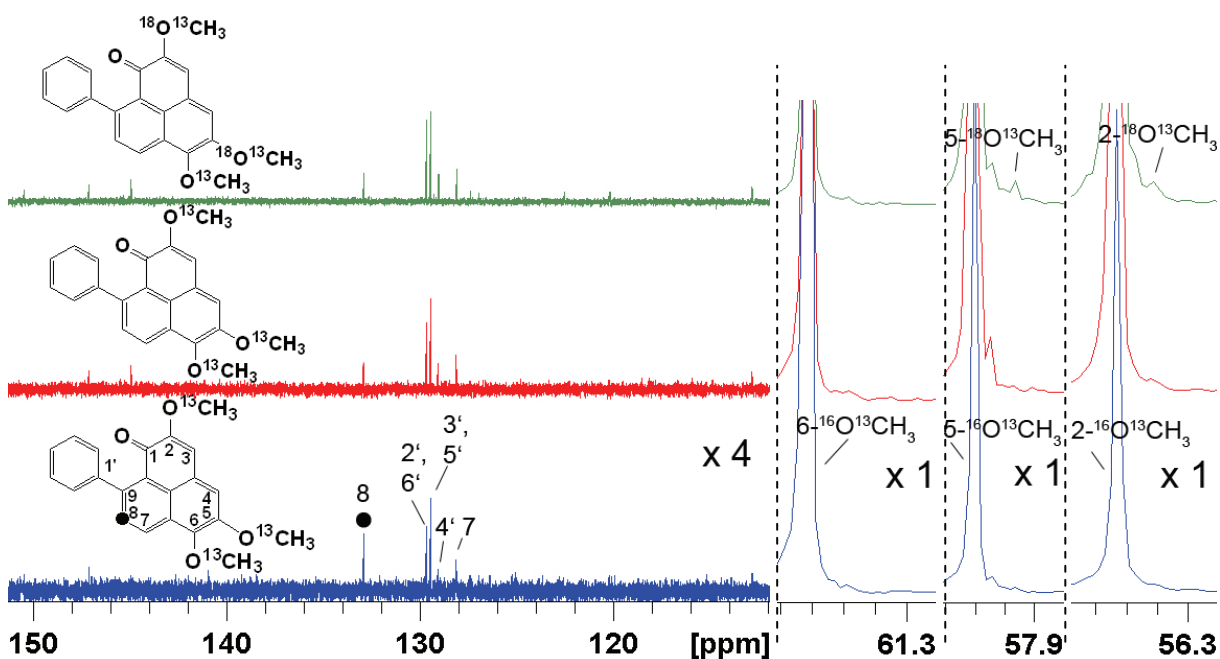


Abb. 2.42: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren (125 MHz, Aceton- d_6 , ns = 74k) von [2,5,6-tri- $^{18}\text{O}^{13}\text{CH}_3$]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (**79**) nach Fütterung von [2- ^{13}C]Phenylalanin (blau) bzw. [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) (grün) an *W. thyrsiflora* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre mit unmarkiertem 2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on als Referenz (rot). ● = ^{13}C .

Durch die ^{13}C -NMR-Spektren von Verbindung **79** aus Fütterungsexperimenten mit den [6- ^{13}C]Diarylheptanoiden **68** (blau) und **69** (grün) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre wurde der Einbau dieser markierten Vorstufen durch die im Vergleich mit [2,5,6-tri- $^{18}\text{O}^{13}\text{CH}_3$]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on signifikant vergrößerte Intensität der Signale von C-8 nachgewiesen (Abb. 2.43). Nach Fütterung mit [6- ^{13}C]Diarylheptanoid **69** konnte durch die isotopeninduzierte Verschiebung des (5- $^{18}\text{O}^{13}\text{CH}_3$)-Signals gegenüber dem ($^{16}\text{O}^{13}\text{CH}_3$)-Signal um $^1\Delta\delta \text{ } ^{18}\text{O}(^{13}\text{C}) = +25 \text{ ppb}$ auch der Einbau von ^{18}O in die 5-OH-Gruppe nachgewiesen werden.

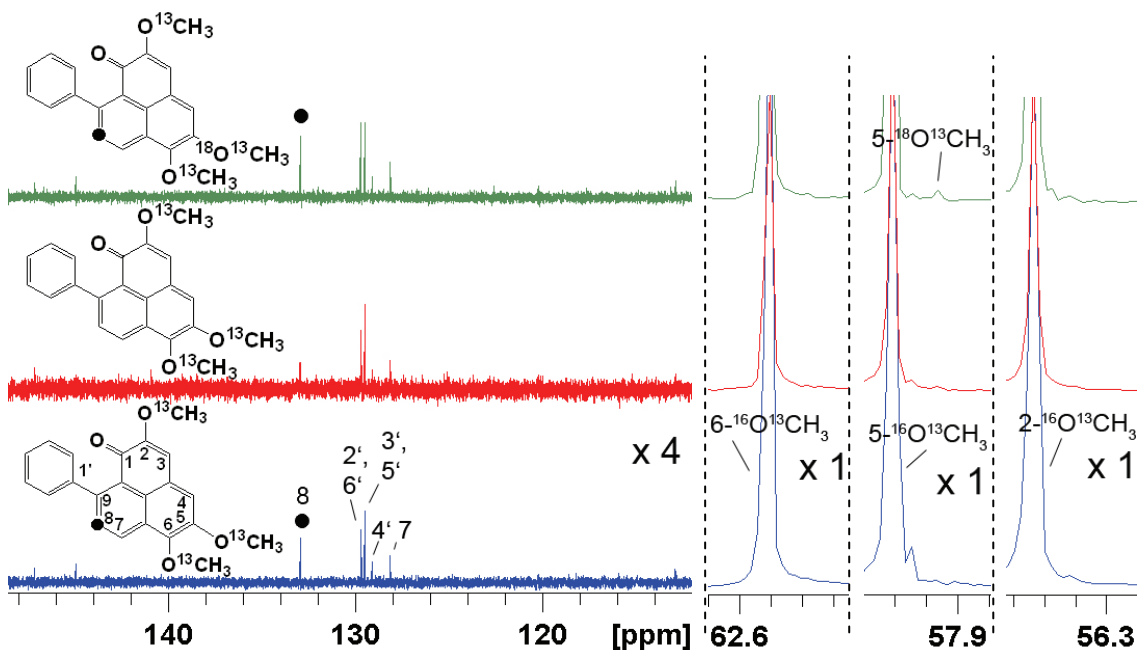


Abb. 2.43: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren (125 MHz, Aceton- d_6 , ns = 74k) von [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (**79**) nach Fütterung von [6- ^{13}C]Diarylheptanoiden **68** (blau) bzw. **69** (grün) an *W. thyrsiflora* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre mit unmarkiertem 2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on als Referenz (rot). ● = ^{13}C .

Nach Fütterung von [2- ^{13}C]Phenylalanin unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre erhalten wir für [2,5-di- O^{13}CH_3]6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**77**), [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) und [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (**79**) folgende Ergebnisse:

- Nachweis für den Einbau des ^{13}C -markierten Precursors in die linke sowie rechte Hälfte des Allophanyl-Dimethylethers **77** und in die linke Hälfte der tautomeren Trimethylether **78** und **79**.
- Nachweis für den Einbau von ^{18}O an C-2 und C-5 des Phenylphenalenons **77** und C-2 von **78**.

Dies entspricht nur teilweise den erwarteten Markierungsmustern nach Fütterungsexperimenten mit [2- ^{13}C]Phenylalanin unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre (s. Abb. 2.29).

Für die ($\text{O}-^{13}\text{CH}_3$)-Phenylphenalenon-Derivate **77**, **78** und **79** erhalten wir nach Fütterung von [2- ^{13}C]*p*-Cumarsäure (**56**) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre folgende Ergebnisse:

- Nachweis für den Einbau des ^{13}C -markierten Precursors in die rechte Hälfte der ($\text{O}-^{13}\text{CH}_3$)-Phenylphenalenon-Derivate **77**, **78** und **79**.
- Nachweis für den Einbau von ^{18}O an C-2 und C-5 der ($\text{O}-^{13}\text{CH}_3$)-Phenylphenalenon-Derivate **77** und **79** sowie an C-2 von Verbindung **78**.

Nach Fütterung von [2-¹³C]p-Cumarsäure (**56**) unter ¹⁸O₂-Atmosphäre werden somit die erwarteten Markierungsmuster für die (O-¹³CH₃)-Phenylphenalenon-Derivate **77** und **79**, jedoch nur teilweise für Verbindung **78** erhalten (s. Abb. 2.29).

Folgende Ergebnisse werden nach Fütterung des [6-¹³C]Diarylheptanoid **68** unter ¹⁸O₂-Atmosphäre für die Verbindungen **77**, **78** und **79** erhalten:

- Nachweis für den Einbau des ¹³C-markierten Precursors in die (O-¹³CH₃)-Phenylphenalenon-Derivate **77**, **78** und **79**.
- Nachweis für den Einbau von ¹⁸O an C-2 und C-5 des (O-¹³CH₃)-Phenylphenalenon-Derivats **77**, jedoch kein Nachweis für den Einbau von ¹⁸O in die Verbindungen **78** und **79**.

Bei diesen Versuchen wurde das erwartete Markierungsmuster des (O-¹³CH₃)-Phenylphenalenon-Derivats **77** komplett erhalten (s. Abb. 2.30).

Nach Fütterung des [6-¹³C]Diarylheptanoids **69** unter ¹⁸O₂-Atmosphäre erhalten wir für [2,5-di-O¹³CH₃]6-O-[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**77**), [2,5,6-tri-O¹³CH₃]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) und [2,5,6-tri-O¹³CH₃]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (**79**) folgende Ergebnisse:

- Nachweis für den Einbau des ¹³C-markierten Precursors in die (O-¹³CH₃)-Phenylphenalenon-Derivate **77**, **78** und **79**.
- Nachweis für den Einbau von ¹⁸O an C-2 und C-5 des (O-¹³CH₃)-Phenylphenalenon-Derivats **77** sowie an C-2 von Verbindung **78** und C-5 von **79**.

Nach Fütterungen von [6-¹³C]Diarylheptanoid **69** unter ¹⁸O₂-Atmosphäre werden ebenso wie für [2-¹³C]Phenylalanin nur teilweise die erwarteten Markierungsmuster von Verbindung **77** erhalten (s. Abb. 2.30). Für die (O-¹³CH₃)-Phenylphenalenon-Derivate **78** und **79** werden diese hingegen vollständig nachgewiesen.

Die Intensität des quarternären ¹³C-NMR-Signals von C-1 der Verbindungen **77**, **78** und **79** war zu gering um einen ¹⁸O-induzierten Effekt auf die chemische Verschiebung zu beobachten. Aufgrund des Glycosid-Restes an C-6 von Verbindung **77** war zudem keine O-Methylierung durch [¹³C]Diazomethan möglich. Damit war auch für den sp²-Kohlenstoff von C-6 keine isotopeninduzierte Verschiebung durch einen Einbau von ¹⁸O an Pos. C-6 von Verbindung **77** nachweisbar. Damit war in diesem Versuch keine Aussage zur Herkunft dieser Sauerstoffe möglich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mittels NMR-Spektroskopie wichtige Informationen über den Einbau der gefütterten ¹³C-markierten Vorstufen und von ¹⁸O erhalten werden konnten. Neben dem Nachweis der spezifischen ¹³C- und ¹⁸O-Anreicherung

bestimmter Positionen und dem daraus abzuleitenden Einbau der verschiedenen markierten Vorstufen wurde gezeigt, dass sich die aus den durchgeführten Fütterungsexperimenten stammenden ^{13}C - und ^{18}O -Markierungen nicht alle im selben mehrfach markierten Phenylphenalenon-Molekül befinden. Stattdessen entsteht ein komplexes Isotopologgemisch. Wie bereits in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben, ist die NMR-Spektroskopie zur Isotopologanalyse sehr gut geeignet, hat jedoch Grenzen, wenn die entsprechenden Atome durch zu viele Bindungen voneinander getrennt sind, um miteinander in Wechselwirkung zu treten und z. B. ^{13}C - ^{13}C -Kopplungsaufspaltungen aufzuweisen. Als ergänzende Methode bietet sich hier die hochauflösende Massenspektrometrie zur Analyse von Isotopologgemischen an, indem sie die Isotopenzusammensetzung einzelner Isotopologe oder Isotopologgruppen liefert. Deshalb wurden zusätzlich zu den NMR-Spektren der Phenylphenalene aus den Fütterungsversuchen auch deren hochauflösenden Massenspektren gemessen, welche zur Analyse des Isotopologmusters beitragen sollten. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt beschrieben und die erhaltenen Massenspektren sind im Anhang dargestellt.

2.2.3.3.3 HR-MS-Messungen der ^{13}C - und ^{18}O -Markierungsexperimente zur Biosynthese von tetraoxygenierten Phenylphenalenonen in *Wachendorfia thyrsiflora*

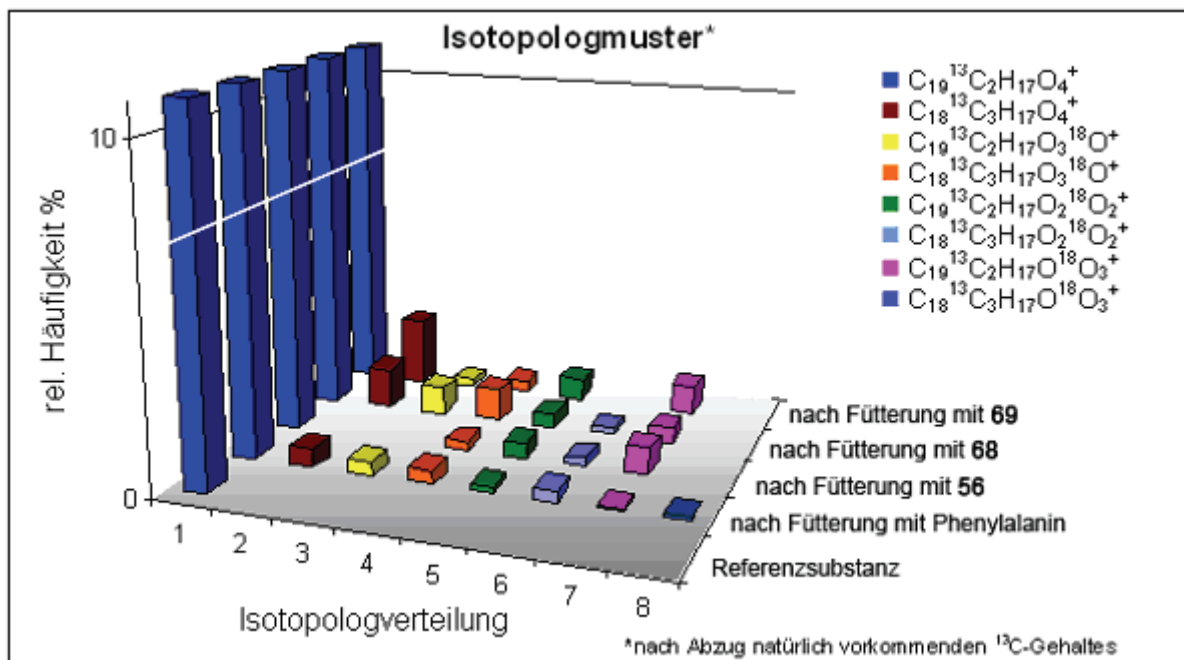
Als Referenzsubstanzen für die massenspektrometrischen Analysen dienten [2,5-di- O^{13}CH_3]6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**77**), [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) und [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (**79**). Deren unmethylierte Analoga wurden aus einer ungefütterten Wurzelkultur von *W. thyrsiflora* isoliert und anschließend mit [^{13}C]Diazomethan derivatisiert. In Abb. 2.44 sind die erhaltenen Ergebnisse aus den Massenspektren des Aglycons von [2,5-di- O^{13}CH_3]6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**77**), des synthetischen O-Methylderivats von 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**), dargestellt. Es sind deutliche Unterschiede in den Anteilen der verschiedenen Isotopologe bzw. Isotopologgruppen der gleichen Isotopenzusammensetzungen nach Fütterungsexperimenten mit [2- ^{13}C]Phenylalanin, [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) bzw. [6- ^{13}C]Diarylheptanoiden **68** und **69** unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre im Vergleich zur Referenzsubstanz zu erkennen. Die Massenpeaks der Isotopologe bzw. Isotopologgruppen mit den verschiedenen Isotopenzusammensetzungen wurden nach Messungen im positiven ESI-Ionisierungsmodus erhalten und geben die Masse/Ladungsverhältnisse (m/z) der Molekülkationen ($[\text{M}+\text{H}]^+$) bzw. Natrium-Addukte ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) wider. In den Abbildungen sind diese auch dementsprechend aufgelistet. Im

fortlaufenden Text werden die Molekülmassen jedoch anstelle der bzw. zusätzlich zu den Massen der Molekülkationen oder Na⁺-Addukte angegeben.

Die Säulen **1** – **8** in Abb. 2.44 entsprechen unterschiedlichen Isotopologen bzw. Isotopologgruppen des Aglycons von Verbindung **77** im jeweiligen Isotopologgemisch. Die prozentualen Anteile der Isotopologe bzw. Isotopologgruppen nach Subtraktion von 1.12% ¹³C natürlicher Häufigkeit pro C-Atom sind in Abb. 2.44 tabellarisch aufgelistet. Die Isotopenzusammensetzung C₁₉¹³C₂H₁₆O₄ (Molekülkation [C₁₉¹³C₂H₁₇O₄]⁺) des Aglycon-Isotopologs von Verbindung **77** wird nach den Fütterungen mit [2-¹³C]Phenylalanin, [2-¹³C]*p*-Cumarsäure (**56**) sowie den [6-¹³C]Diarylheptanoiden **68** und **69** mit einer jeweils zwischen 76 und 78% liegenden Häufigkeit beobachtet (Abb. 2.44). Diese Isotopenzusammensetzung entspricht dem Aglycon von Verbindung **77**, markiert nur in den beiden bei der Derivatisierung eingeführten O-¹³CH₃-Gruppen. Weder die eingesetzten ¹³C-markierten Vorstufen noch ¹⁸O wurden in dieses Isotopolog eingebaut. Wie schon bei Versuchen mit *A. preissii* (Abschnitt 2.2.3.2.3) ist davon auszugehen, dass Isotopologe aus in den Wurzelkulturen vorhandenen Vorstufen natürlicher Isotopenhäufigkeit gebildet wurden und/oder unmarkierte Phenylphenalenone bereits vor Beginn der Fütterungsexperimente vorhanden waren. Den Nachweis des Einbaus von ¹⁸O aus der ¹⁸O₂-Atmosphäre erbrachten die in Abb. 2.44 als Säulen **3** – **8** dargestellten Isotopologe mit den dort angegebenen Isotopenzusammensetzungen. Säule **3** repräsentiert die Isotopologgruppe mit der experimentell erhaltenen Molmasse von *m/z* 337,1256, welche einer Isotopenzusammensetzung von C₁₉¹³C₂H₁₆O₃¹⁸O (Molekülkation [C₁₉¹³C₂H₁₇O₃¹⁸O]⁺) und somit dem Einbau eines einzelnen ¹⁸O unter Verwendung natürlich vorkommender Vorstufen, wie z.B. Phenylalanin, entspricht.

Von großer Bedeutung sind Isotopologe mit Isotopenzusammensetzungen, welche den Nachweis des kombinierten Einbaus von ¹⁸O und einer ¹³C-markierten Vorstufen erbrachten. In der Tabelle in Abb. 2.44 sind diese Isotopologe farbig hervorgehoben. Nach Fütterung von [2-¹³C]Phenylalanin und Methylierung mit [¹³C]Diazomethan werden für das Aglycon von Verbindung **77** Isotopologe der Isotopenzusammensetzung C₁₈¹³C₃H₁₆O₃¹⁸O (ca. 0,4%; Molekülkation [C₁₈¹³C₃H₁₇O₃¹⁸O]⁺), C₁₈¹³C₃H₁₆O₂¹⁸O₂ (ca. 0,3%; Molekülkation [C₁₈¹³C₃H₁₇O₂¹⁸O₂]⁺) bzw. C₁₈¹³C₃H₁₆O¹⁸O₃ (ca. 0,1%; Molekülkation [C₁₈¹³C₃H₁₇O¹⁸O₃]⁺) nachgewiesen (Säulen **4**, **6** bzw. **8** in Abb. 2.44). Nach Fütterung von [2-¹³C]*p*-Cumarsäure (**56**) unter ¹⁸O₂-Atmosphäre wurde der kombinierte Einbau des Phenylpropans und von ¹⁸O anhand der Isotopologe der Isotopenzusammensetzung C₁₈¹³C₃H₁₆O₃¹⁸O (Molekülkation [C₁₈¹³C₃H₁₇O₃¹⁸O]⁺) bzw. C₁₈¹³C₃H₁₆O₂¹⁸O₂ (Molekülkation [C₁₈¹³C₃H₁₇O₂¹⁸O₂]⁺) (jeweils ca. 0,3%) deutlich (Säulen **4** bzw. **6** in Abb. 2.44). Im Fall der Fütterung des [6-¹³C]Diarylheptanoids **68** unter ¹⁸O₂-Atmosphäre kann der Einbau von ¹⁸O und gleichzeitiger Nutzung des Diarylheptanoids durch Isotopologe der Isotopenzusammensetzung C₁₈¹³C₃H₁₆O₃¹⁸O (ca. 1,0%; Molekülkation [C₁₈¹³C₃H₁₇O₃¹⁸O]⁺) bzw. C₁₈¹³C₃H₁₆O₂¹⁸O₂ (ca.

0,2%; Molekülkation $[C_{18}^{13}C_3H_{17}O_2^{18}O_2]^+$) nachgewiesen werden (Säulen **4** bzw. **6** in Abb. 2.44). Nach Fütterung des $[6-^{13}C]$ Diarylheptanoids **69** wird der Nachweis des kombinierten Einbaus der ^{13}C -markierten Vorstufe und ^{18}O durch das Isotopolog der Isotopenzusammensetzung $C_{18}^{13}C_3H_{16}O_3^{18}O$ (ca. 0,4%) erhalten (Säule **4** in Abb. 2.44; Molekülkation $[C_{18}^{13}C_3H_{17}O_3^{18}O]^+$)).

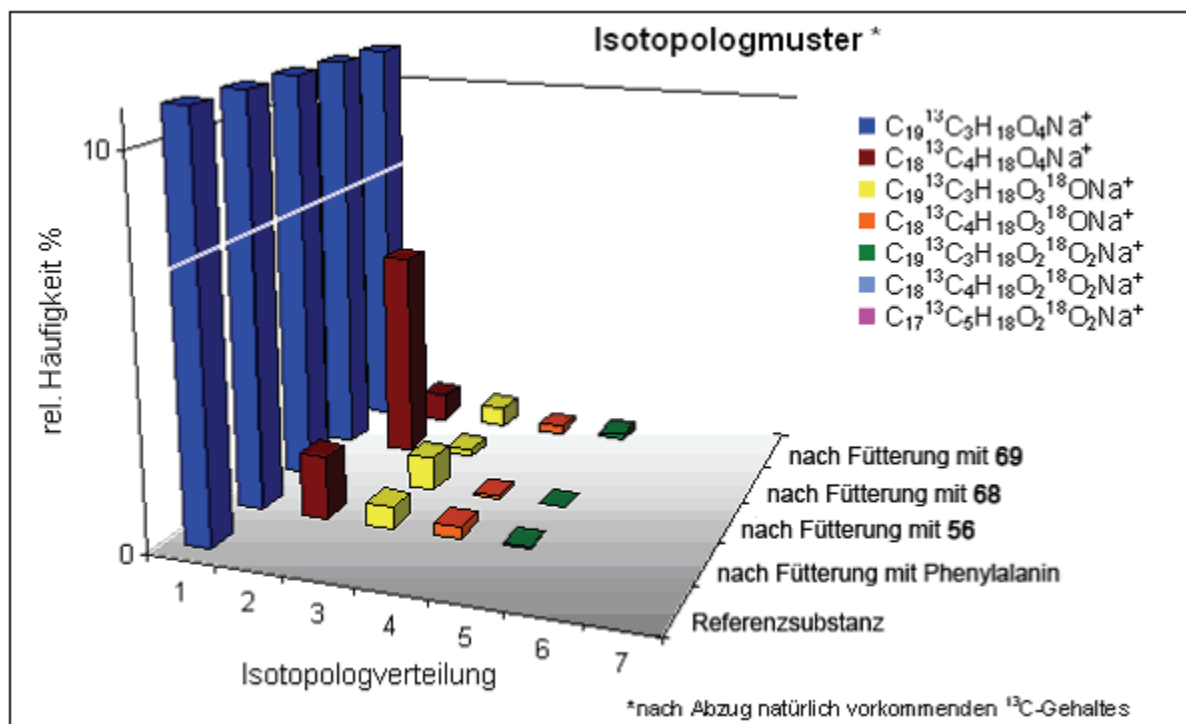


Isotopen- zusammensetzung	Molmasse $m/z [M+H]^+$	Rel. Häufigkeit (%)				
				nach Fütterung mit Phenylalanin	nach Fütterung mit 69	
		simuliert	exp.	nach Fütterung mit 56	nach Fütterung mit 68	
1 $C_{19}^{13}C_2H_{17}O_4^+$	335,1188	335,1201	78,22	78,46	76,20	76,27
2 $C_{18}^{13}C_3H_{17}O_4^+$	336,1222	336,1233	0,55	0	1,22	2,06
3 $C_{19}^{13}C_2H_{17}O_3^{18}O^+$	337,1231	337,1256	0,42	0	0,83	0,26
4 $C_{18}^{13}C_3H_{17}O_3^{18}O^+$	338,1264	338,1275	0,41	0,29	0,98	0,42
5 $C_{19}^{13}C_2H_{17}O_2^{18}O_2^+$	339,1273	339,1283	0,19	0,51	0,46	0,66
6 $C_{18}^{13}C_3H_{17}O_2^{18}O_2^+$	340,1307	340,1314	0,33	0,28	0,21	0
7 $C_{19}^{13}C_2H_{17}O^{18}O_3^+$	341,1316	341,1325	0,10	0,81	0,44	0,82
8 $C_{18}^{13}C_3H_{17}O^{18}O_3^+$	342,1349	342,1358	0,11	0	0	0

Abb. 2.44: Nach Fütterung von $[2-^{13}C]$ Phenylalanin, $[2-^{13}C]$ *p*-Cumarsäure (**56**) bzw. $[6-^{13}C]$ Diarylheptanoiden **68** und **69** an *W. thyrsoflora* unter $^{18}O_2$ -Atmosphäre mittels HR-MS erhaltene Isotopenzusammensetzungen von Isotopologen und Isotopologgruppen von $[2,5\text{-di-}^{13}CH_3]6\text{-O-}[(6''\text{-O-Allophanyl})\beta\text{-D-glucopyranosyl}]-2,5\text{-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on}$ (**77**). Verbindung **77** wurde nach Isolierung von $6\text{-O-}[(6''\text{-O-Allophanyl})\beta\text{-D-glucopyranosyl}]-2,5\text{-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on}$ (**25**) durch Methylierung mit $[^{13}C]$ Diazomethan erhalten. In der Tabelle sind die experimentell erhaltenen und berechneten Molmassen sowie die rel. Häufigkeit der Isotopologe bzw. Isotopologgruppen aufgelistet. Farblich gekennzeichnete Werte in der Tabelle: Durch kombinierten Einbau von ^{18}O und eines ^{13}C -markierten Precursors gebildete Isotopologe.

In Abb. 2.45 sind die Ergebnisse für [2,5,6-tri-O¹³CH₃]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) graphisch dargestellt. Die Säulen **1** – **5** im Diagramm entsprechen unterschiedlichen Isotopologen bzw. Isotopologgruppen im entsprechenden Isotopologgemisch. In der Tabelle in Abb. 2.45 sind die exakten relativen Häufigkeiten der jeweiligen Isotopologe bzw. Isotopologgruppen sowie deren berechneten und experimentell erhaltenen Molmassen aufgelistet. Nach Fütterungen mit [2-¹³C]Phenylalanin, [2-¹³C]*p*-Cumarsäure (**56**) sowie den [6-¹³C]Diarylheptanoiden **68** und **69** erhalten wir Isotopologe des [2,5,6-tri-O¹³CH₃]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) mit einer Isotopenzusammensetzung von C₁₉¹³C₃H₁₈O₄ (Na⁺-Addukt [C₁₉¹³C₃H₁₈O₄Na]⁺) mit einer relativen Häufigkeit von mindestens 75% (Abb. 2.45), wobei 1.12% ¹³C natürlicher Häufigkeit pro C-Atom bereits subtrahiert wurde. Diese Isotopenzusammensetzung entspricht dem [2,5,6-tri-O¹³CH₃]-Trimethylether (**78**), markiert nur in den drei bei der Derivatisierung eingeführten O-¹³CH₃-Gruppen. Einbau der eingesetzten ¹³C-markierten Vorstufen oder ¹⁸O in dieses Isotopolog erfolgte demnach nicht.

Für den Nachweis des Einbaus von ¹⁸O dienen die in Abb. 2.45 als Säulen **3** – **5** dargestellten Isotopologe mit den dort angegebenen Isotopenzusammensetzungen. Die Isotopologgruppe mit der experimentell erhaltenen Molmasse von *m/z* 374,1255 (Säule **3** in Abb. 2.45), welche einer Isotopenzusammensetzung von C₁₉¹³C₃H₁₈O₃¹⁸O (Na⁺-Addukt [C₁₉¹³C₃H₁₈O₃¹⁸ONa]⁺) entspricht, weist den Einbau von einem ¹⁸O unter Verwendung natürlich vorkommender Vorstufen, wie z.B. Phenylalanin, nach. Isotopologe mit Isotopenzusammensetzungen, welche den kombinierten Nachweis des Einbaus von ¹⁸O und einer ¹³C-markierten Vorstufen erbringen, sind in der Tabelle in Abb. 2.45 farbig hervorgehoben. Für [2,5,6-tri-O¹³CH₃]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) werden Isotopologe der Isotopenzusammensetzung C₁₈¹³C₄H₁₈O₃¹⁸O (Na⁺-Addukt [C₁₈¹³C₄H₁₈O₃¹⁸ONa]⁺) nach Fütterung von [2-¹³C]Phenylalanin (ca. 0,3%), [2-¹³C]*p*-Cumarsäure (**56**) (0,15%) und [6-¹³C]Diarylheptanoid **69** (0,2%) nachgewiesen (Säule **4** in Abb. 2.45), welche einem einfachen Einbau des jeweiligen ¹³C-markierten Precursors und der Inkorporation eines ¹⁸O entsprechen.

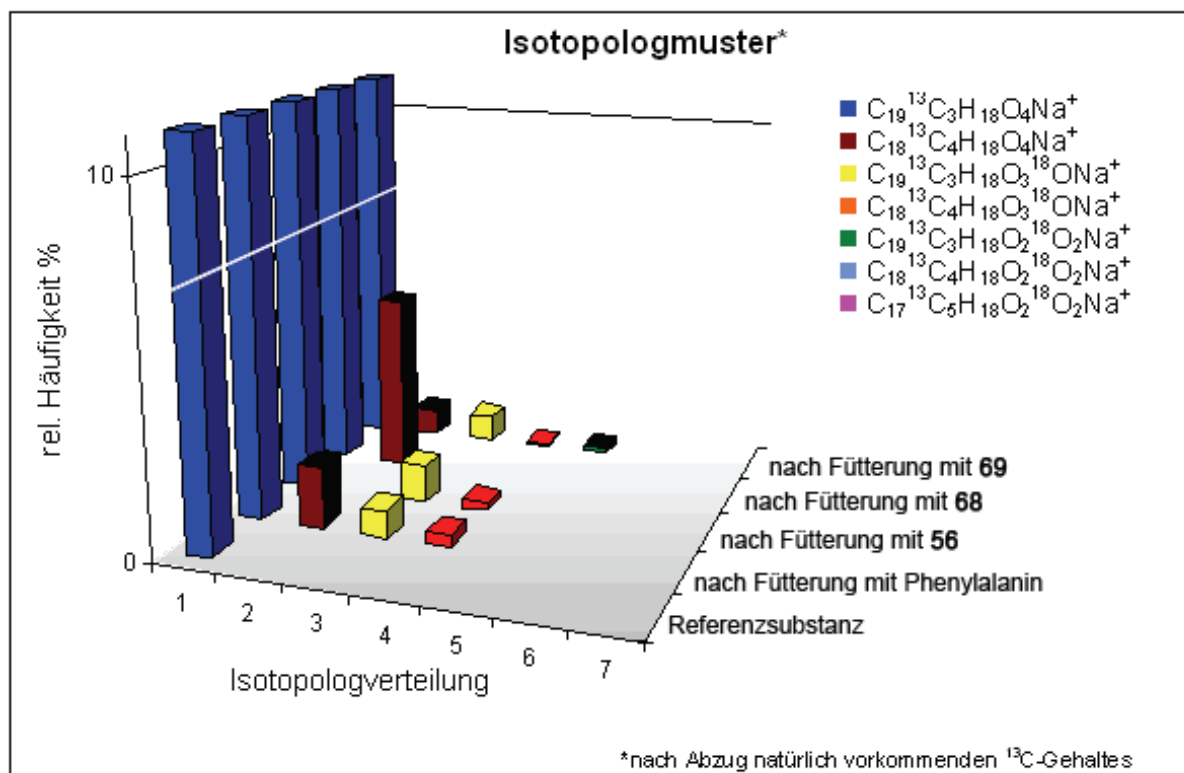


Isotopen- zusammensetzung	Molmasse m/z $[M+H]^+$	Rel. Häufigkeit (%)					
				nach Fütterung mit Phenylalanin	nach Fütterung mit 56	nach Fütterung mit 68	nach Fütterung mit 69
		simuliert	exp.				
1 $C_{19}^{13}C_3H_{18}O_4Na^+$	372,1204	372,1205	77,75	79,21	74,73	78,67	
2 $C_{18}^{13}C_4H_{18}O_4Na^+$	373,1237	373,1235	1,65	0,02	5,59	0,76	
3 $C_{19}^{13}C_3H_{18}O_3^{18}ONa^+$	374,1247	374,1255	0,58	0,91	0,19	0,53	
4 $C_{18}^{13}C_4H_{18}O_3^{18}ONa^+$	375,1279	375,1276	0,29	0,15	0	0,20	
5 $C_{19}^{13}C_3H_{18}O_2^{18}O_2Na^+$	376,1288	376,1282	0,03	0,03	0	0,15	
6 $C_{18}^{13}C_4H_{18}O_2^{18}O_2Na^+$	377,1323	—	0	0	0	0	
7 $C_{17}^{13}C_5H_{18}O_2^{18}O_2Na^+$	378,1357	—	0	0	0	0	

Abb. 2.45: Nach Fütterung von $[2-^{13}C]$ Phenylalanin, $[2-^{13}C]$ *p*-Cumarsäure (**56**) bzw. eines der $[6-^{13}C]$ Diarylheptanoide **68** und **69** an *W. thyrsoflora* unter $^{18}O_2$ -Atmosphäre mittels HR-MS erhaltene Isotopenzusammensetzungen von Isotopologen und Isotopologgruppen von $[2,5,6\text{-tri-}O^{13}CH_3]2,5,6\text{-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on}$ (**78**). Verbindung **78** wurde nach Isolierung von Lachnanthosid-Aglycon (**17**) durch Methylierung mit $[^{13}C]$ Diazomethan erhalten. In der Tabelle sind die experimentell erhaltenen und berechneten Molmassen sowie die rel. Häufigkeit der Isotopologe bzw. Isotopologgruppen aufgelistet. Farblich gekennzeichnete Werte in der Tabelle: Durch kombinierten Einbau von ^{18}O und eines ^{13}C -markierten Precursors gebildete Isotopologe.

Für das zweite „Tautomerenderivat“, $[2,5,6\text{-tri-}O^{13}CH_3]2,5,6\text{-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on}$ (**79**) sind die Ergebnisse der Massenspektrometrie in Abb. 2.46 graphisch dargestellt. Ebenso wie für $[2,5,6\text{-tri-}O^{13}CH_3]2,5,6\text{-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on}$ (**78**) entsprechen die Säulen **1** – **5** im Diagramm unterschiedlichen Isotopologen bzw. Isotopologgruppen im Isotopologgemisch. In der Tabelle in Abb. 2.46 sind die prozentualen Anteile der Isotopologe bzw. Isotopologgruppen nach Subtraktion von 1.12% ^{13}C natürlicher Häufigkeit pro C-Atom

aufgelistet. Isotopologe der Verbindung **79** mit einer Isotopenzusammensetzung von $C_{19}^{13}C_3H_{18}O_4$ (Na^+ -Addukt $[C_{19}^{13}C_3H_{18}O_4Na]^+$) werden nach Fütterungen mit $[2-^{13}C]$ Phenylalanin, $[2-^{13}C]$ *p*-Cumarsäure (**56**) sowie den $[6-^{13}C]$ Diarylheptanoiden **68** oder **69** mit einer relativen Häufigkeit von 76-79% beobachtet (Abb. 2.46). Diese Isotopenzusammensetzung entspricht dem $[2,5,6\text{-tri-}O^{13}CH_3]$ -Trimethylether (**79**), markiert nur in den drei bei der Derivatisierung eingeführten $O-^{13}CH_3$ -Gruppen. Einbau der eingesetzten ^{13}C -markierten Vorstufen oder ^{18}O in dieses Isotopolog erfolgte demnach nicht. Den Einbau einer Vorstufe erbringen die Isotopologe bzw. Isotopologgruppen mit einer Isotopenzusammensetzung von $C_{18}^{13}C_4H_{18}O_4$ (Säulen **2** in Abb. 2.46; Na^+ -Addukt $[C_{18}^{13}C_4H_{18}O_4Na]^+$). Den Nachweis des Einbaus von ^{18}O aus der $^{18}O_2$ -Atmosphäre erbringen die in Abb. 2.46 als Säulen **3** – **5** dargestellten Isotopologe mit den dort angegebenen Isotopenzusammensetzungen. Säule **3** entspricht der Isotopologgruppe und der Isotopenzusammensetzung von $C_{19}^{13}C_3H_{18}O_3^{18}O$ (Na^+ -Addukt $[C_{19}^{13}C_3H_{18}O_3^{18}ONa]^+$) mit der experimentell erhaltenen Molmasse von m/z 374,1255. Dies entspricht einem einfachen Einbau von ^{18}O unter Verwendung natürlich vorkommender Vorstufen, wie z.B. Phenylalanin. Die Isotopologe mit Isotopenzusammensetzungen, welche den kombinierten Nachweis des Einbaus von ^{18}O und einer ^{13}C -markierten Vorstufen erbringen, sind in der Tabelle in Abb. 2.46 farbig dargestellt. Derartige Isotopologe werden mit einer Isotopenzusammensetzung von $C_{18}^{13}C_4H_{18}O_3^{18}O$ (Na^+ -Addukt $[C_{18}^{13}C_4H_{18}O_3^{18}ONa]^+$) nach Fütterung von $[2-^{13}C]$ Phenylalanin (ca. 0,3%), $[2-^{13}C]$ *p*-Cumarsäure (**56**) (ca. 0,2%) und dem $[6-^{13}C]$ Diarylheptanoid **69** (0,1%) unter $^{18}O_2$ -Atmosphäre nachgewiesen (Säule **4** in Abb. 2.46).



Isotopen- zusammensetzung	Molmasse		Rel. Häufigkeit (%)			
	$m/z [M+H]^+$		nach	nach	nach	nach
	simuliert	exp.	Fütterung mit Phenylalanin	Fütterung mit 56	Fütterung mit 68	Fütterung mit 69
1 $C_{19}^{13}C_3H_{18}O_4Na^+$	372,1204	372,1205	77,55	79,01	75,66	78,49
2 $C_{18}^{13}C_4H_{18}O_4Na^+$	373,1237	373,1235	1,72	0,00	4,93	0,77
3 $C_{19}^{13}C_3H_{18}O_3^{18}ONa^+$	374,1247	374,1255	0,78	1,03	0	0,77
4 $C_{18}^{13}C_4H_{18}O_3^{18}ONa^+$	375,1279	375,1276	0,34	0,23	0	0,10
5 $C_{19}^{13}C_3H_{18}O_2^{18}O_2Na^+$	376,1288	376,1282	0	0	0	0,18
6 $C_{18}^{13}C_4H_{18}O_2^{18}O_2Na^+$	377,1323	—	0	0	0	0
7 $C_{17}^{13}C_5H_{18}O_2^{18}O_2Na^+$	378,1357	—	0	0	0	0

Abb. 2.46: Nach Fütterung von $[2-^{13}C]$ Phenylalanin, $[2-^{13}C]$ *p*-Cumarsäure (**56**) bzw. einem der $[6-^{13}C]$ Diarylheptanoiden **68** und **69** an *W. thyrsoiflora* unter $^{18}O_2$ -Atmosphäre mittels HR-MS erhaltene Isotopenzusammensetzungen von Isotopologen und Isotopologgruppen von $[2,5,6\text{-tri-}^{13}CH_3]2,5,6\text{-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on}$ (**79**). Verbindung **79** wurde nach Isolierung von Lachnanthosid-Aglycon (**17**) durch Methylierung mit $[^{13}C]$ Diazomethan erhalten. In der Tabelle sind die experimentell erhaltenen und berechneten Molmassen sowie die rel. Häufigkeit der Isotopologe bzw. Isotopologgruppen aufgelistet. Farblich gekennzeichnete Werte in der Tabelle: Durch kombinierten Einbau von ^{18}O und eines ^{13}C -markierten Precursors gebildete Isotopologe.

2.2.3.3.4 Isotopologmuster aus den NMR- und HR-MS-Messungen der ^{13}C - und ^{18}O -Markierungsexperimente zur Biosynthese tetraoxygenerter Phenylphenalenonen in *Wachendorfia thyrsoflora*

Um Schlußfolgerung hinsichtlich der Herkunft der Sauerstofffunktionen von tetraoxygenierten Phenylphenalenonen ziehen zu können, musste die Verteilung der verschiedenen Markierungen in den Zielmolekülen ermittelt werden. Abb. 2.47 - 2.50 zeigen die Strukturen der in Fütterungsversuchen mit ^{13}C -markierten Precursoren unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre an Wurzelkulturen von *W. thyrsoflora* erhaltenen Isotopologe. Wie weiter oben beschrieben, wurden in den Experimenten $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin, $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) bzw. eines der $[6-^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoide **68** und **69** als einfach ^{13}C -markierte Vorstufen eingesetzt. Nach Isolierung der Zielverbindungen 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) und Lachnanthosid-Aglycon (**17**) wurden diese mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan derivatisiert. Detaillierte ^{13}C -NMR- und HRMS-Analysen der O- $^{13}\text{CH}_3$ -Derivate $[2,5\text{-di-O}^{13}\text{CH}_3]6\text{-O-}[(6''\text{-O-Allophanyl)-}\beta\text{-D-glucopyranosyl]-2,5\text{-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on}$ (**77**), $[2,5,6\text{-tri-O}^{13}\text{CH}_3]2,5,6\text{-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on}$ (**78**) und $[2,5,6\text{-tri-O}^{13}\text{CH}_3]2,5,6\text{-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on}$ (**79**) ergaben dann die in Abb. 2.47 - 2.50 wiedergegebenen Isotopologmuster.

Die für $[2,5\text{-di-O}^{13}\text{CH}_3]6\text{-O-}[(6''\text{-O-Allophanyl)-}\beta\text{-D-glucopyranosyl]-2,5\text{-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on}$ (**77**) nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin gefundenen Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen sind in Abb. 2.47 abgebildet. Zusätzlich zu in Abb. 2.47 nicht gezeigten Isotopologen, die aus selektiver Inkorporation eines ^{13}C -markierten Precursors oder ^{18}O hervorgegangen sind, werden 14 Isotopologe erhalten. Dabei handelt es sich um jeweils sieben Isotopologe, welche einem Einbau der ^{13}C -markierten Vorstufe in die linke und sieben Isotopologe mit Einbau in die rechte Hälfte des Phenylphenalenon-Skeletts entsprechen und zugleich Anreicherung von ^{18}O an C-2, C-5 oder C-6, Anreicherung von zwei ^{18}O an C-2 und C-5, C-2 und C-6 bzw. C-5 und C-6 oder von drei ^{18}O -Atomen an C-2, C-5 und C-6 aufweisen. Diese Befunde entsprechen den erwarteten Markierungsmustern für den Einbau von ^{18}O -Sauerstoff (s. Abb. 2.29). Ebenso entspricht der Einbau der ^{13}C -markierten Vorstufe in die linke bzw. rechte Hälfte des Phenylphenalenons der Erwartung (s. Abb. 2.29). Jedoch konnte kein Isotopolog mit einem kombinierten Einbau des Precursors in beide Seiten und von ^{18}O nachgewiesen werden.

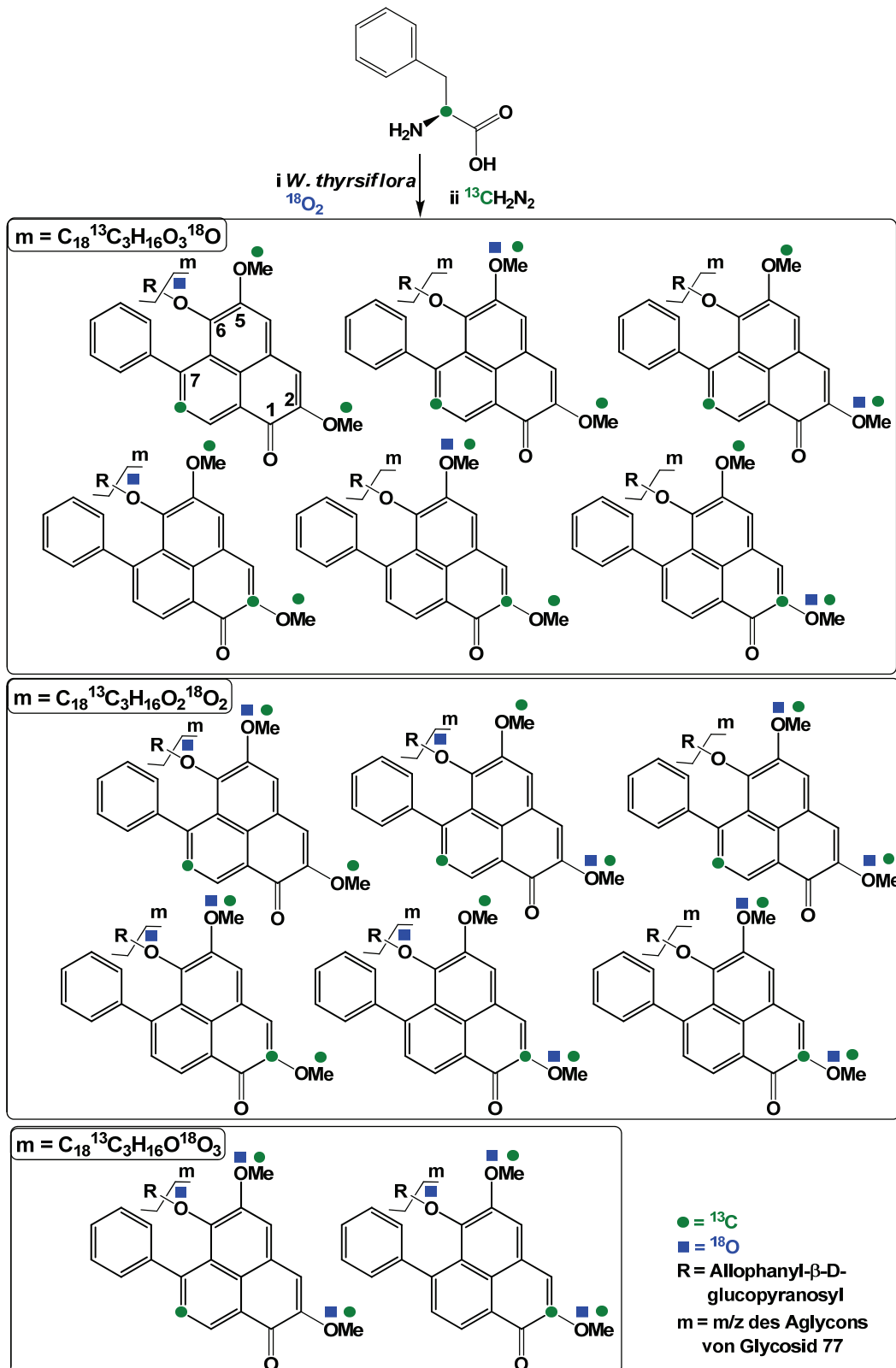


Abb. 2.47: Aus NMR- und HRMS-Messungen abgeleitete Isotopologe, erhalten nach kombiniertem Einbau von $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin und ^{18}O in 6-O-[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) und Methylierung mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan zu [2,5-di-O $^{13}\text{C}\text{H}_3$]-6-O-[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**77**). Die Fütterung erfolgte an Wurzelkulturen von *W. thyrsoflora* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Aus selektiver Inkorporation eines ^{13}C -markierten Precursors oder ^{18}O hervorgegangene Isotopologe sind nicht abgebildet. Die Isotopenzusammensetzung bezieht sich auf das Aglycon.

Nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre werden drei Isotopologe erhalten (Abb. 2.48). Diese entsprechen einem Einbau des ^{13}C -markierten Phenylpropans in die rechte Seite des Phenylphenalenons. Einbau in die linke Seite wurde mit ^{13}C -NMR-Spektroskopie ausgeschlossen und ist auch wegen des Fehlens der Hydroxylgruppe in p -Position des Phenylringes von Verbindung **77** nicht denkbar. Zwei der Isotopologe repräsentieren einen Einbau von einem ^{18}O entweder an C-2 oder C-5 und ein weiteres einer Inkorporation von zwei ^{18}O an C-2 und C-5. Isotopologe mit ^{18}O an C-6 wurden, wegen des durch ^{13}C -NMR bestätigten Einbaus von $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) in die rechte „Hälfte“ des Phenylphenalenon-Skeletts, nicht in Betracht gezogen (Abb. 2.35). Eine solche ^{18}O -Anreicherung ist durch C4H-katalysierte Hydroxylierung von Zimtsäure und nachfolgenden Einbau der entstandenen p -Cumarsäure erklärbar.

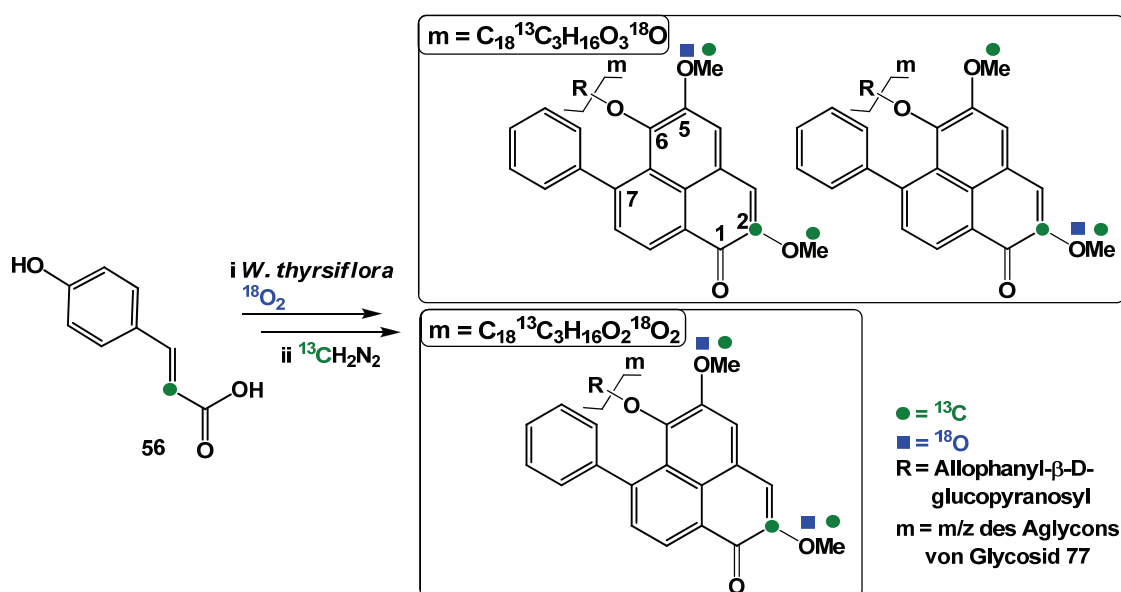


Abb. 2.48: Aus NMR- und HRMS-Messungen abgeleitete Isotopologe, erhalten nach kombiniertem Einbau von $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) und ^{18}O in 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) und Methylierung mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan zu [2,5-di- ^{13}C]6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**77**). Die Fütterung erfolgte an Wurzelkulturen von *W. thyrsoflora* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Aus selektiver Inkorporation von ^{18}O -Atomen hervorgegangene Isotopologe sind nicht abgebildet. Die Isotopenzusammensetzung bezieht sich auf das Aglycon.

Nach Fütterung von $[6-^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoid **68** unter ^{18}O -Atmosphäre wurden drei Isotopologe erhalten (Abb. 2.49A). Zwei davon entsprechen einem Einbau des gefütterten Precursors in Kombination mit einem ^{18}O -Atom an Position C-2 oder C-5. Das dritte Isotopolog dem kombinierten Einbau des $[6-^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoid **68** und zwei ^{18}O -Atomen an C-2 und C-5. Im Fall der Fütterung des $[6-^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoids **69** unter ^{18}O -Atmosphäre wurde nur eine Molekülspezies (Isotopolog) von **77** identifiziert (Abb. 2.49B). Sie ist nur durch kombinierte Inkorporation des Diarylheptanoids **68** und eines ^{18}O -Atoms an C-2 erklärbar. Diese Ergebnisse decken sich mit den erwarteten Markierungsmustern (s. Abb.

2.30). Die Analyse des aus den Fütterungsexperimenten isolierten Phenylphenalenons **25** bzw. dessen Derivat **77** lieferten somit eindeutig den Nachweis für den Einbau der beiden Diarylheptanoide **68** und **69** und des ^{18}O -Sauerstoffes.

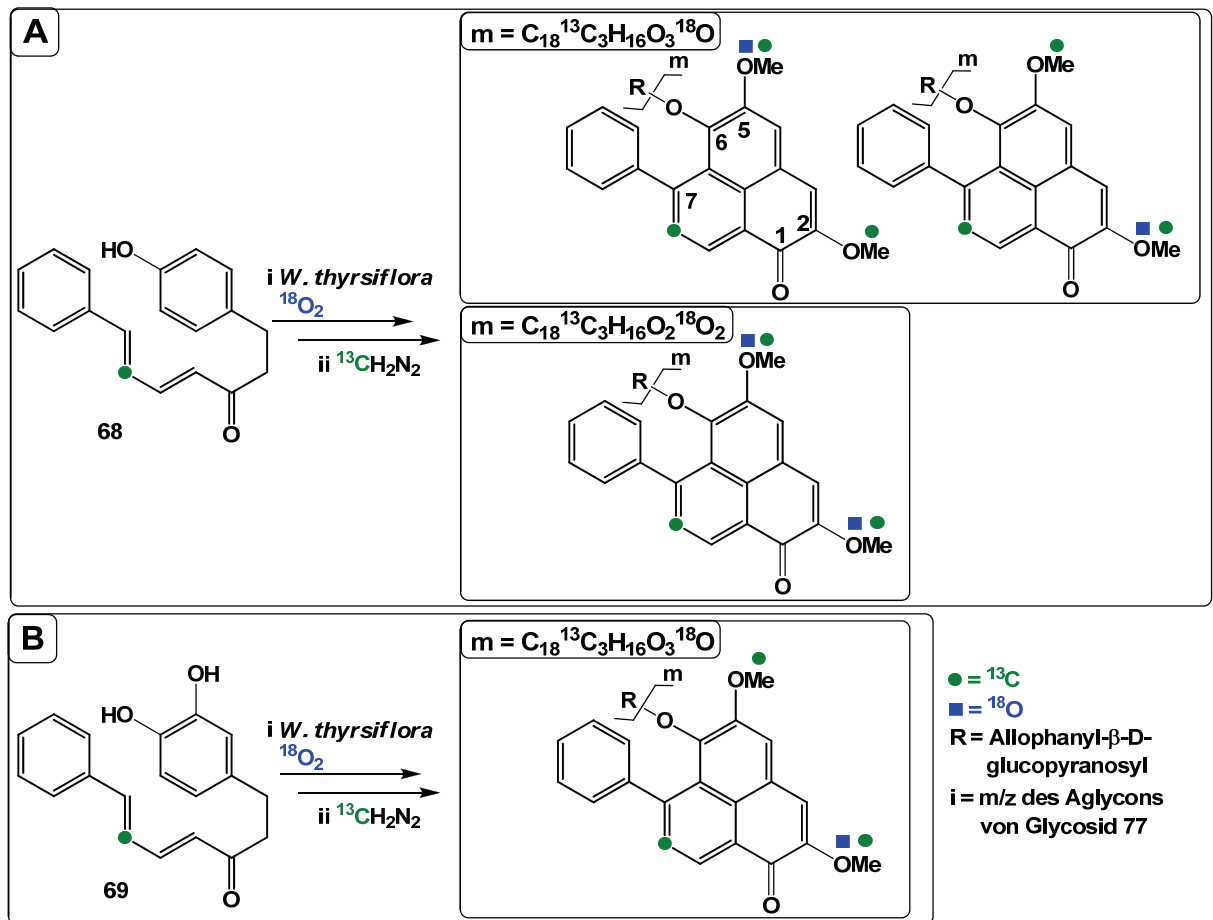


Abb. 2.49: Aus NMR- und HRMS-Messungen abgeleitete Isotopologe, erhalten nach kombiniertem Einbau der $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoiden **68** und ^{18}O (A) bzw. **69** und ^{18}O (B) in das 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) und Methylierung mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan zu $[2,5\text{-di-O}^{13}\text{CH}_3]6\text{-O-}[(6''\text{-O-Allophanyl)-}\beta\text{-D-glucopyranosyl]-2,5\text{-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on}$ (**77**). Die Fütterung erfolgte an Wurzelkulturen von *W. thyrsiflora* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Aus selektiver Inkorporation eines ^{13}C -markierten Precursors oder ^{18}O hervorgegangene Isotopologe sind nicht abgebildet. Die Isotopenzusammensetzung bezieht sich auf das Aglycon.

Für $[2,5,6\text{-tri-O}^{13}\text{CH}_3]2,5,6\text{-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on}$ (**78**) und $[2,5,6\text{-tri-O}^{13}\text{CH}_3]2,5,6\text{-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on}$ (**79**), welche durch O-Methylierung von Lachnanthosid-Aglycon (**17**) mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan erhalten wurden, das wiederum nach Fütterungen von $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin, $[2\text{-}^{13}\text{C}]p\text{-Cumarsäure}$ (**56**) bzw. dem $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoid **69** gebildet wurde, sind die identifizierten Isotopologgruppen mit den unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen in Abb. 2.50 dargestellt. Nach Fütterung mit dem $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoid **68** wurde kein kombinierter Einbau dieser ^{13}C -markierten Vorstufe mit ^{18}O gefunden.

Im Fall der Fütterung von [2-¹³C]Phenylalanin erfolgte ein Einbau der ¹³C-markierten Vorstufe in die linke Seite des Phenylphenalenon-Skeletts und Inkorporation von einem ¹⁸O-Atom an Position C-2 bei Verbindung **78** bzw. C-5 für Verbindung **79**. Nach Fütterung von [2-¹³C]*p*-Cumarsäure (**56**) unter ¹⁸O₂-Atmosphäre entsprechen die Isotopologe einem Einbau des Phenylpropans in die rechte Seite und von ¹⁸O an C-2 von Verbindung **78** bzw. C-5 für Verbindung **79**. Während sich die Isotopenzusammensetzung der nach Einbau von [2-¹³C]*p*-Cumarsäure erhaltenen Isotopologen in Einklang mit der Hypothese (s. Abschnitt 2.2.3.3.1) befindet, bedarf das Ausbleiben der ¹⁸O-Anreicherung an C5-von **78** bzw. an C-2 von **79** weiterer Diskussion (s. Abschnitt 3). Ebenso bleibt im Fütterungsversuch mit [2-¹³C]Phenylalanin die Ursache für das Fehlen der ¹³C-Markierung in der rechten Hälfte des Phenylphenalenon-Gerüsts zunächst unerklärt. Da die Ergebnisse mit den beiden aus einem tautomeren Edukt erhaltenen Trimethylether **78** und **79** komplett übereinstimmen, sind methodische Fehler als Ursache der unerwarteten Ergebnisse nahezu auszuschließen.

Sowohl mittels NMR als auch HRMS-Analysen der nach Fütterung von [6-¹³C]Diarylheptanoid **68** unter ¹⁸O₂-Atmosphäre gebildeten Produkte liessen sich keine ¹³C/¹⁸O-markierten Isotopologe nachweisen. Die Isotopologe der nach Fütterung von [6-¹³C]Diarylheptanoid **69** unter ¹⁸O₂-Atmosphäre und Einführung der *O*-¹³CH₃-Gruppen erhaltenen Derivate **78** und **79** ergeben sich durch kombinierten Einbau des ¹³C-markierten Precursors und einem ¹⁸O-Atom an C-2 von Verbindung **78** bzw. C-5 von Verbindung **79**. Abgesehen von den aus NMR-technischen Gründen eingeführten „Hilfsmarkierungen“ der *O*-Methylgruppen entsteht demnach nach Fütterung des [6-¹³C]Diarylheptanoid **69** unter ¹⁸O₂-Atmosphäre ein [8-¹³C,2-¹⁸OH]-Isotopolog von Lachnanthosid-Aglycon (**17**), wenn auch nur in geringen Mengen. Die Konsequenzen dieses Befundes und der anderen mit NMR und HRMS erhaltenen Ergebnisse der Fütterungsversuche werden in der Diskussion (Abschnitt 3) behandelt.

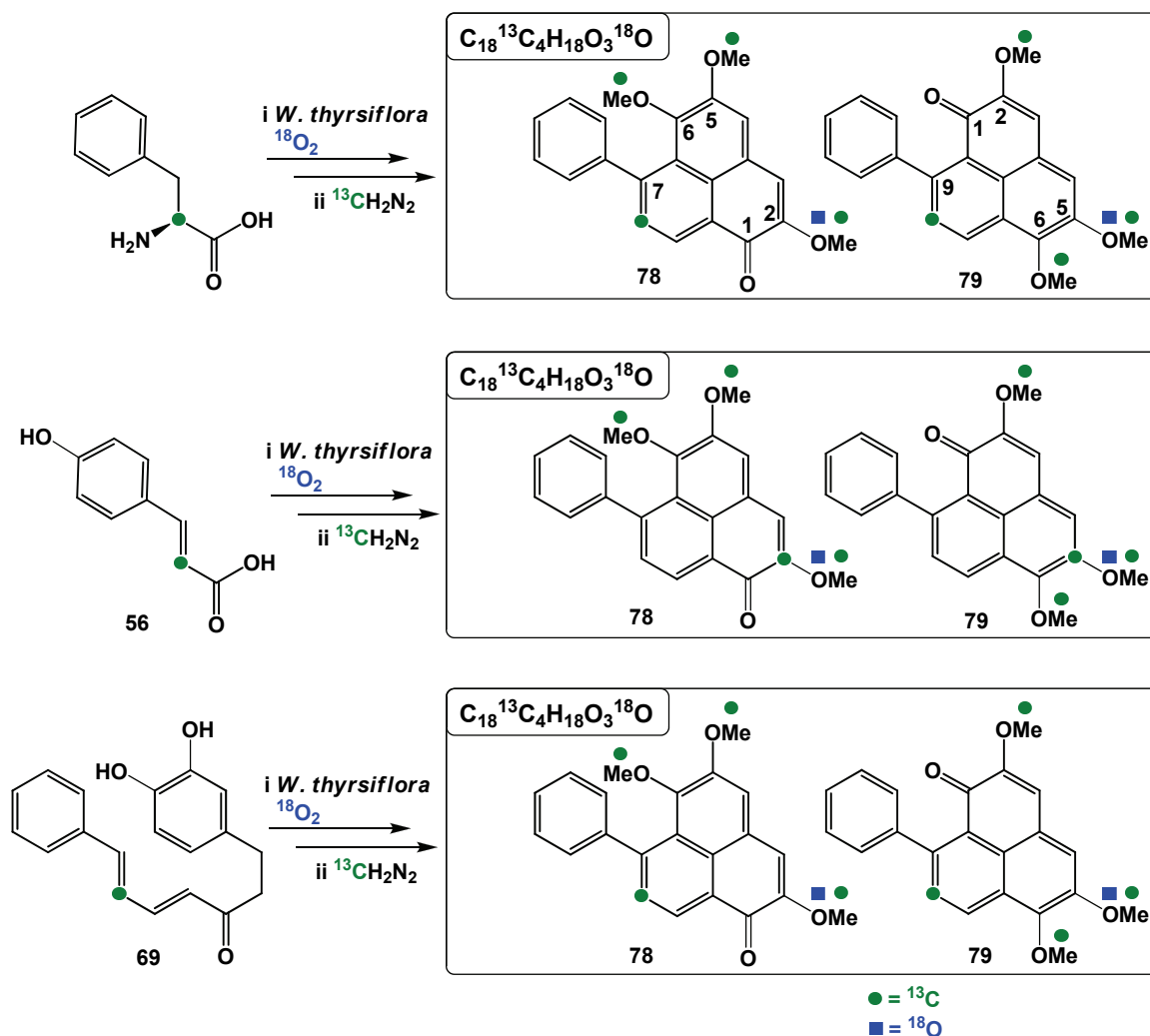


Abb. 2.50: Aus NMR- und HRMS-Messungen abgeleitete Isotopologe, erhalten nach kombiniertem Einbau von [2-¹³C]Phenylalanin und ¹⁸O (A), [2-¹³C]*p*-Cumarsäure (56) und ¹⁸O (B), bzw. des [6-¹³C]Diarylheptanoids 69 (C) und ¹⁸O in Lachnanthosid-Aglycon (17) und Methylierung mit [¹³C]Diazomethan zu [2,5,6-tri-O¹³CH₃]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (78) und [2,5,6-tri-O¹³CH₃]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (79). Die Fütterung erfolgte an Wurzelkulturen von *W. thyrsoflora* unter ¹⁸O₂-Atmosphäre. Aus selektiver Inkorporation eines ¹³C-markierten Precursors oder ¹⁸O hervorgegangene Isotopologe sind nicht abgebildet.

2.2.4 Fütterungsexperiment mit ¹⁸O-Wasser

Nach Fütterungsexperimenten an Wurzelkulturen von *W. thyrsoflora* unter ¹⁸O₂-Atmosphäre wurden zwar für die isolierten tetraoxygenierten Phenylphenalenone 17 und 25 Einbauten von ¹⁸O nachgewiesen (s. Abschnitt 2.2.3.3), jedoch in verhältnismäßig geringen Einbauraten im Vergleich zu den Phenylphenalenonen 1 und 2, welche nach Fütterungen unter ¹⁸O₂-Atmosphäre aus *A. preissii* isoliert wurden (s. Abschnitt 2.2.3.2). Daraufhin ergab sich der Gedanke, dass die Inkorporation der Sauerstofffunktionen, wie der Phenylpropanoid-Stoffwechsel vermuten lässt, nicht oder nicht nur durch Cytochrom P450 Enzyme, wie z.B. Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) erfolgt. Dabei wird Zimtsäure, welche zuvor aus

Phenylalanin durch PAL gebildet wird, durch C4H-katalysierte Hydroxylierung an C-4' unter Nutzung des Sauerstoffes aus der Atmosphäre in *p*-Cumarsäure überführt. Eine andere Möglichkeit ist darin zu sehen, dass der Einbau der Sauerstofffunktionen durch eine Oxidoreduktase erfolgt, welche Wasser als Sauerstofflieferant nutzt. Um dies aufzuklären wurde ein Fütterungsexperiment an einer Wurzelkultur von *W. thyrsoiflora* unter Verwendung von ^{18}O -Wasser (10% ^{18}O) durchgeführt. Für den Fall, dass Wasser als Sauerstofflieferant für den Einbau der Sauerstofffunktionen in Phenylphenalenone dient, wäre eine signifikant vergrößerte Anreicherung von ^{18}O aus dem Medium zu erwarten, dem H_2^{18}O bei der Herstellung zugesetzt worden war. $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin wurde auch in diesem Fütterungsexperiment als ^{13}C -markierter Precursor verwendet. Die Dauer der Fütterung betrug ebenso 7 Tage, wie für die Fütterungsversuche unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Nach der Isolierung der Reinverbindungen 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) und Lachnanthosid-Aglycon (**17**) aus *W. thyrsoiflora* wurden diese ebenfalls durch Methylierung mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan in ihre Derivate [2,5-di- O^{13}CH_3]6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**77**), [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) und [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (**79**) überführt. Bei Betrachtung der Methoxy-Signale in den ^{13}C -NMR-Spektren konnten keine weiteren Methoxy-Signale, welche eine isotopeinduzierte Verschiebung gegenüber den ($^{16}\text{O}^{13}\text{CH}_3$)-Signalen im Bereich von $\Delta\delta + 0.016 - 0.050$ ppm aufweisen, nachgewiesen werden. Es erfolgte vermutlich kein Einbau von ^{18}O aus dem Medium, oder der Anteil von 10% ^{18}O im Medium war zu gering, um einen Einbau von ^{18}O in die Verbindungen **17** und **25** nachweisen zu können.

3. Diskussion

3.1 Vorbemerkungen zur Phenylphenalenon-Biosynthese

Phenylphenalenone sind charakteristische sekundäre Pflanzenstoffe der monokotylen Pflanzenfamilien Haemodoraceae^[57], Musaceae^[14, 15], Pontederiaceae^[11, 12] und Strelitziaceae^[13]. Ihre Beteiligung an der pflanzlichen Pathogenabwehr wurde bisher vorwiegend an den ökonomisch überaus wichtigen Bananengewächsen (Musaceae) untersucht in denen Phenylphenalenone als Phytoalexine wirken^[15-19, 25]. Für die als Vorarbeiten zu der vorliegenden Arbeit wichtigen Untersuchungen zur Biosynthese der Phenylphenalenone haben sich neben *Musa* vor allem Pflanzen und *in vitro*-Kulturen aus verschiedenen Gattungen der Haemodoraceae als gute Untersuchungsobjekte erwiesen, obwohl die Funktion der Phenylphenalenone in diesen Pflanzen bisher kaum untersucht wurde. Ein Grund für die Verwendung von Pflanzen der Haemodoraceae in dieser Arbeit war das Vorkommen unterschiedlicher substituierter Phenylphenalenone in relativ hohen Konzentrationen, die damit in dieser Familie als Phytoanticipine^[30] angesehen werden können. Bislang in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchungen zur Biosynthese von Phenylphenalenonen wurden vor allem an Arten der Gattungen *Anigozanthos*, *Wachendorfia* und *Xiphidium* durchgeführt^[47, 49, 64-66]. In Abb. 3.1 ist der Kenntnisstand zur Biosynthese der Phenylphenalenone am Beispiel der tetraoxygenierten Verbindung **17** (Lachnanthosid-Aglycon), wie sie bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit bestand, dargestellt. Einige Schritte sind hypothetisch und wurden bislang noch nicht aufgeklärt.

Im ersten Schritt wird Phenylalanin durch Phenyl-Ammonium-Lyase in Zimtsäure umgewandelt (**a** in Abb. 3.1). Anschließend wird ein Teil der Zimtsäure zum Aufbau eines C₁₁-Körpers verwendet. Dabei wird sie durch C₄H zuerst in *p*-Cumarsäure überführt (**b** in Abb. 3.1), gefolgt von der Bildung von *p*-Cumaroyl-CoA durch *p*-Cumarsäure: CoA-Ligase (**c** in Abb. 3.1). Daraufhin erfolgt vermutlich ein nucleophiler Angriff von Malonyl-CoA an der Carbonsäurethioesterfunktion des *p*-Cumaroyl-CoA (**d** in Abb. 3.1). Die darauf folgende Verknüpfung mit dem ausgebildeten Cinnamoyl-CoA (**b1** in Abb. 3.1) und anschließender Thioester-Hydrolyse sowie Decarboxylierung führt zur Ausbildung eines Diketids (**e** in Abb. 3.1). Für die bereits in früheren Arbeiten postulierte Diels-Alder Reaktion^[63, 67], welche vermutlich zum Ringschluss führt (**h** in Abb. 3.1) sind einige strukturelle Voraussetzungen nötig (s. Abschnitt 1.3.2). Nach Eliminierung der Hydroxylgruppe an der schon existierenden Dien-Struktur (**f** in Abb. 3.1), Einführung einer weiteren Hydroxylgruppe an C-3' des Phenylrings (**f** in Abb. 3.1) und Ausbildung der *ortho*-Chinon-Struktur (**g** in Abb. 3.1) kommt es vermutlich spontan zum Ringschluss (**h** in Abb. 3.1). Durch Dehydrogenierungen, wodurch die noch bestehenden sp³-hybridisierten Kohlenstoffe zu sp²-hybridisierten umgewandelt werden, Reduktionen der Carbonylfunktionen an Pos. C-5 und C-6 zum

entsprechenden Alkohol (i in Abb. 3.1) und Einführung einer weiteren Hydroxyfunktion an C-2 (j in Abb. 3.1) kommt es zur Ausbildung des tetraoxygenierten Phenylphenalenons Lachnanthosid-Aglycon (17).

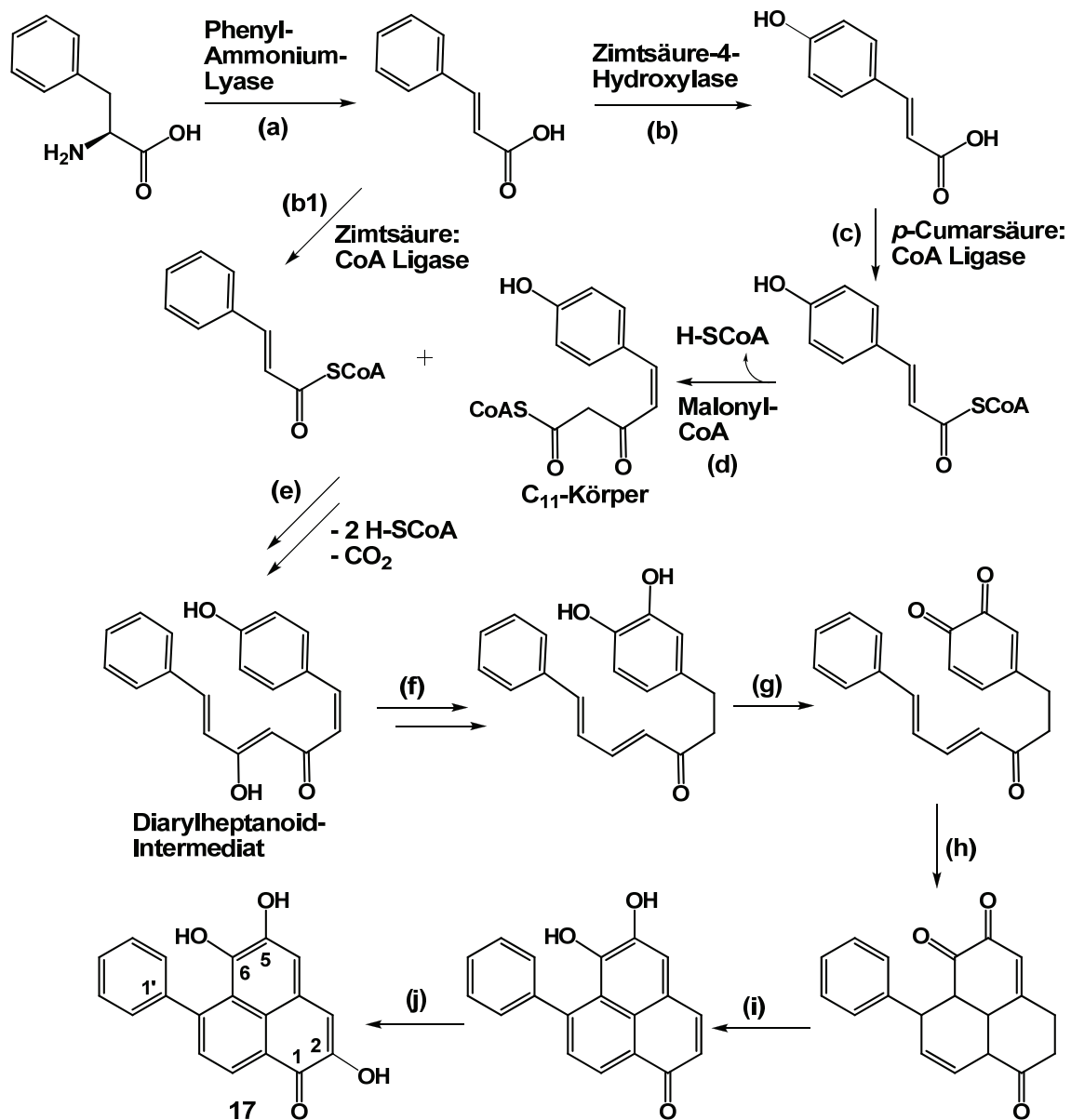


Abb. 3.1: Stand der Kenntnisse zur Biosynthese von Phenylphenalenonen, mit z. T. hypothetischen Schritten, am Beispiel von Lachnanthosid-Aglycon (17). Umsetzung von Phenylalanin zu Zimtsäure durch Phenyl-Ammonium-Lyase (PAL) (a) und anschließend Umwandlung eines Teils der Zimtsäure in Cinnamoyl CoA (b1) und des anderen Teils in *p*-Cumarsäure durch Zimtsäure-4-Hydroxylase (b). Ausbildung des C₁₁-Körpers aus *p*-Cumarsäure und Malonyl CoA (c und d). Verknüpfung von Cinnamoyl CoA und C₁₁-Körper zum Diarylheptanoid-Intermediat (e). Ausbildung der Dien- und Dienophil-Strukturmerkmale unter anderem durch Einführung einer weiteren Hydroxyfunktion an C-3' des Diarylheptanoids (f) und Bildung der *ortho*-Chinonstruktur (g). Ringschluss und damit Ausbildung des Phenylphenalenon-Grundgerüsts (h). Anschließende Dehydrogenierungen, Reduktionen der Carbonylfunktionen an C-5 und C-6 (i) und Einführung einer weiteren Hydroxyfunktion an C-2 führen zur Ausbildung des Aglycons 17 (j).

Enzymatische Reaktionen, wie z. B. Dehydrogenierungen, Oxidationen und Methylierungen führen zur strukturellen Diversifizierung der gebildeten Phenylphenalenone. Bislang ist die Reihenfolge der Oxidationsschritte nicht bekannt. Es wurde zwar vermutet, dass die Sauerstofffunktionen in Pos. C-1 und C-6 des Phenylphenalenongerüsts (s. Abb. 3.1) von der Carboxyl- und *p*-Hydroxylgruppe der Phenylpropansäure, *p*-Cumarsäure, stammen, dies konnte bisher aber noch nicht experimentell nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde vermutet, dass weitere Oxidationen später in der Biosynthese der Phenylphenalenone erfolgen. Weitere Möglichkeiten bestehen darin, dass bestimmte Sauerstofffunktionen der Phenylphenalenone von Seitenketten-oxidierten Phenylpropansäure-Vorstufen wie Phenylmilchsäure- oder Phenylbrenztraubensäure-Derivaten stammen oder Oxidationen auf der Stufe der linearen Diarylheptanoide erfolgen.

Das Oxidationsmuster der in *Anigozanthos preissii* und *Wachendorfia thyrsiflora* enthaltenen Phenylphenalenone erschien geeignet, um die Herkunft der einzelnen Sauerstofffunktionen und die Reihenfolge ihrer Einführung in der Biosynthese aufzuklären. In *A. preissii* vorkommende Phenylphenalenone enthalten typischerweise eine Ketogruppe in Position C-1 und eine Hydroxylgruppe an C-2 (Beispiel: Anigorufon (**1**)) sowie in einigen Fällen eine weitere Hydroxyl- oder Etherfunktion an C-4 (Beispiel Anigorootin (**15**)) oder im seitlichen Phenylring an C-4' (Beispiel: Hydroxyanigorufon (**2**)) bzw. C-3' und C-4'. Dagegen überwiegen in *W. thyrsiflora* die so genannten tetraoxygenierten Phenylphenalenone, die in zwei tautomeren Formen **A** und **B**, z. B. von Verbindung **17** und als Glycoside der tautomeren Form **B** (Beispiel: **25**) vorkommen können. Entsprechend befindet sich die Ketofunktion an zwei unterschiedlichen Positionen, jedoch jeweils benachbart zu einer Hydroxylgruppe (Abb. 3.2). 4-Hydroxylierte Phenylphenalenone kommen in beiden Arten vor, die isolierbaren Mengen sind jedoch relativ gering. 4-Oxygenierte Phenylphenalenone wie z. B. Glycoside von 4-Hydroxyanigorufon kommen auch in *W. thyrsiflora* vor.

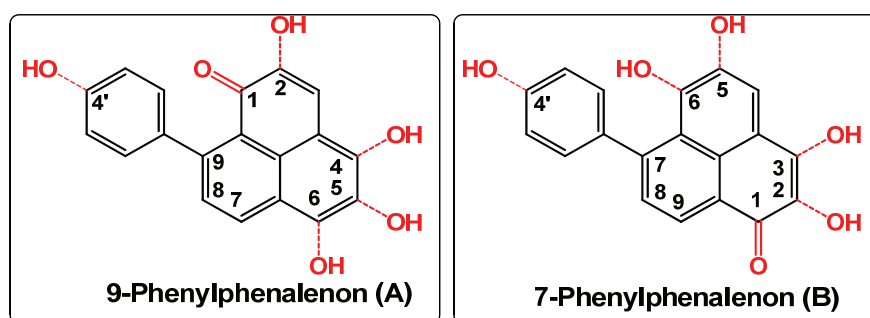


Abb. 3.2: 9-Phenylphenalenon- und 7-Phenylphenalenon-Modellstruktur mit möglichen Positionen für Hydroxyl- und Ketogruppen (rot) im Grundgerüst.

Im Folgenden sollen die oxidativen Schritte der Phenylphenalenon-Biosynthese als Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit diskutiert und einzelne Abläufe detailliert dargestellt werden. Zum Nachweis der Einführung von Sauerstofffunktionen wurde das aus der Atmosphäre der geschlossenen Fütterungsapparatur stammende Sauerstoffisotop $^{18}\text{O}_2$

genutzt und anhand der isopeninduzierten Verschiebung im ^{13}C -NMR-Spektrum und / oder massenspektrometrisch nachgewiesen. Aufgestellte Schemata sollen klar herausarbeiten, wie die Einführung von Sauerstofffunktionen in Phenylphenalenone erfolgt.

3.2 Zur Herkunft der Sauerstoffatome an C-1 und C-4' von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-6 und C-4' von 7-Phenylphenalenonen

Zunächst soll darauf eingegangen werden, auf welcher Stufe Sauerstofffunktionen an Pos. C-1 und C-4' von 9-Phenylphenalenonen (**A** in Abb. 3.3) bzw. an C-6 und C-4' von 7-Phenylphenalenonen (**B** in Abb. 3.3) eingeführt werden. Bekannte 9-Phenylphenalenone mit Sauerstofffunktionen an C-1 (**A** in Abb. 3.3) sind z.B. Anigorufon (**1**) und Hydroxyanigorufon (**2**). Beispiele für 7-Phenylphenalenone mit Hydroxyfunktion an Pos. C-6 sind Lachnanthosid-Aglycon (**17**), Haemodorin (**18**) und 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**).

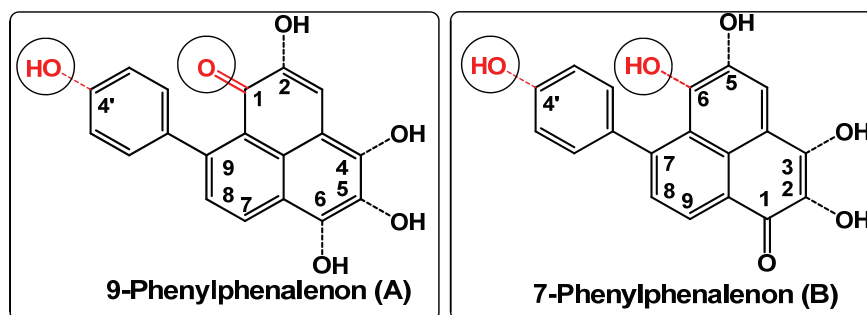


Abb. 3.3: 9-Phenylphenalenon- und 7-Phenylphenalenon-Modellstruktur mit möglichen Positionen für Hydroxyl- und Ketogruppen im Grundgerüst. Rot: In Abschnitt 3.2 zu diskutierende Herkunft dieser Sauerstoffatome.

Wie aus Biosynthesearbeiten an verschiedenen Arten der Haemodoraceae^[62–67] und von *Musa*^[14, 16, 26] bekannt ist, werden Phenylphenalenone durch Kondensation von zwei Phenylpropaneinheiten mit Malonyl-CoA gebildet. Durch Fütterungsexperimente wurde nachgewiesen, dass ^{13}C -markierte *p*-Cumarsäure z.B. die rechte Hälfte von Anigorufon (**1**) bildet und „symmetrisch“ in Hydroxyanigorufon (**2**) eingebaut wird^[47, 67]. Diese Befunde wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Abschnitt 2.2.3.2), wenn auch die früher gefundenen hohen Einbauraten von 31,7% für einfach ^{13}C -markierte Isotopologe bzw. 3,6% für doppelt markierte Isotopologe von Hydroxyanigorufon (**2**) vermutlich wegen der veränderten experimentellen Bedingungen nicht erreicht wurden und der Anteil der doppelt markierten Isotopologen unter der Nachweisgrenze lag.

Die in Abschnitt 2.2.3.2 vorgestellten Fütterungsexperimente mit $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre an Wurzelkulturen von *A. preissii* erbrachten den Nachweis des Einbaus von ^{18}O an C-1 von Anigorufon (**1**) und C-1 und C-4' von Hydroxyanigorufon (**2**). Entsprechende Versuche mit $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) führten trotz $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre

erwartungsgemäß zu ^{13}C -Einbau, nicht aber zur ^{18}O -Anreicherung an C-1 bzw. C-4' der Phenylphenalenone **1** und **2** (s. Abb. 2.26 und 2.28), da der Precursor **56** das natürlich vorkommende ^{16}O in *p*-Position enthielt. Entsprechend interpretierbare Ergebnisse bei jedoch relativ geringen Einbauraten wurden nach Fütterungen von $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin bzw. $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) an Wurzelkulturen von *W. thyrsoflora* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre erhalten. Für das in *W. thyrsoflora* vorkommende Glycosid **25** des tetraoxygenierten Lachnanthosid-Aglycons **17** wurde nach Gabe von $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin mittels HRMS ein dreifach ^{18}O -markiertes Isotopolog mit einem ^{13}C -Atom detektiert welches nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) nicht beobachtet wurde (s. Abb. 2.44). Gemeinsam mit dem Fehlschlagen des Einbaus von ^{13}C -markiertem Tyrosin (Ergebnisse nicht gezeigt) widerlegen diese Befunde für *A. preissii* und *W. thyrsoflora* die früher an *Haemodorum corymbosum*^[61] und *Lachnanthes tinctoria*^[62] demonstrierte Möglichkeit der Beteiligung von Tyrosin an der Phenylphenalenon-Biosynthese und damit der Herkunft der betreffenden Sauerstofffunktionen aus Schikimisäure.

Somit ist es als erwiesen anzusehen, dass ausgehend von Phenylalanin, die Einführung des Sauerstoffes an C-1 der 9-Phenylphenalenone bzw. C-6 der 7-Phenylphenalenone und an C-4' beider Phenylphenalenongruppen im Zuge der C4H-katalysierten Hydroxylierung von Zimtsäure zu *p*-Cumarsäure erfolgt (**b** in Abb. 3.4). Wie weiter oben diskutiert, kondensiert *p*-Cumarsäure dann als SCoA-Ester mit Malonyl-CoA und einer weiteren Einheit *p*-Cumaroyl-CoA oder einem anderen Phenylpropanoyl-CoA, z.B. Zimtsäure-CoA, zu einem „linearen“ Diarylheptanoid. Dieses wird durch Zyklisierung und weitere Biosyntheseschritte in verschiedene Phenylphenalenone umgeformt.

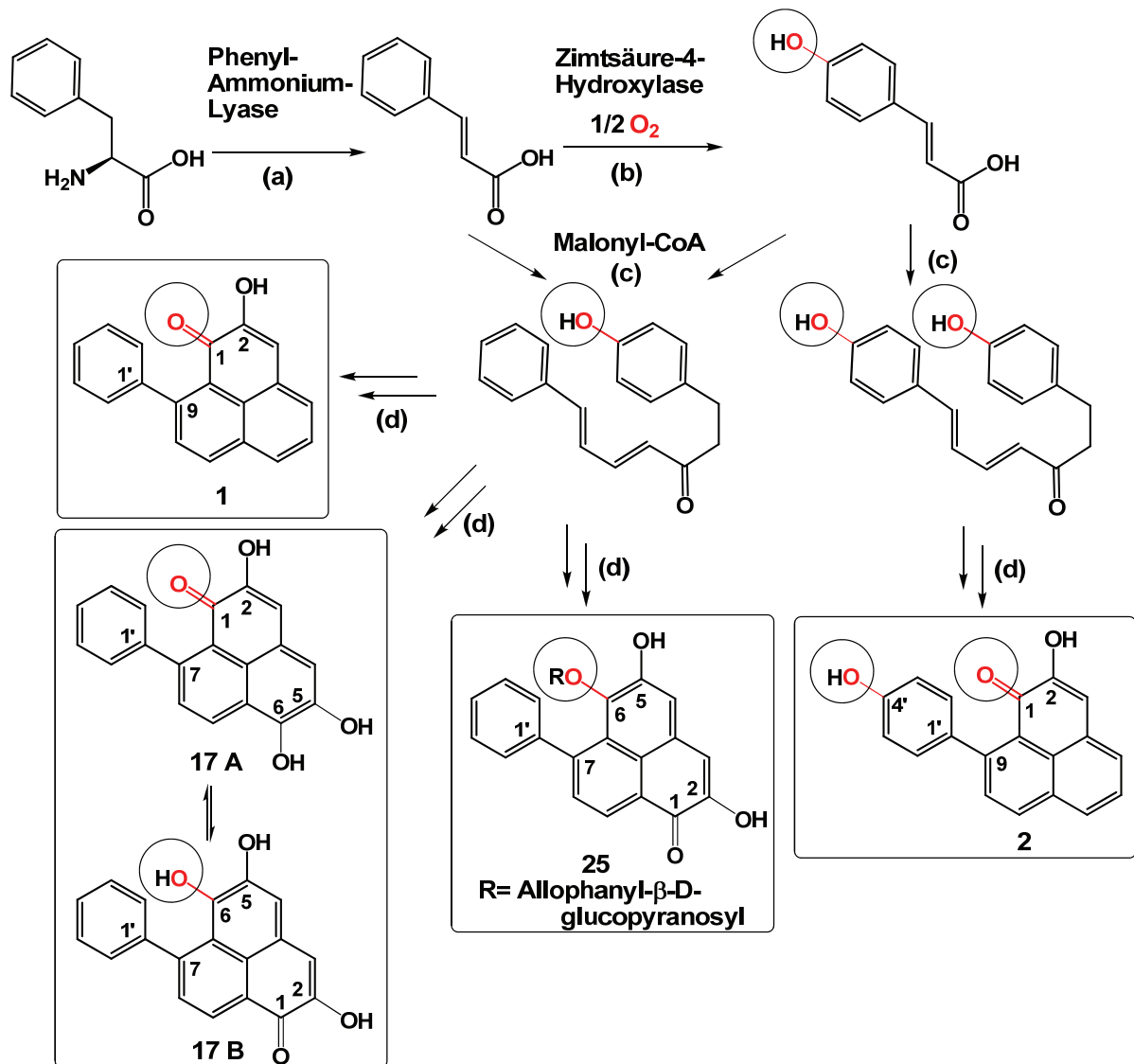


Abb. 3.4: Oxidative Schritte in der Biosynthese von Phenylphenalenonen zum Einbau der Sauerstofffunktion an C-1 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-6 von 7-Phenylphenalenonen und an C-4': Umsetzung von Phenylalanin zu Zimtsäure durch Phenyl-Ammonium-Lyase (PAL) (a) und anschließend Umwandlung eines Teils der Zimtsäure in *p*-Cumarsäure durch Zimtsäure-4-Hydroxylase (b). Ausbildung des Diarylheptanoid-Intermediates (c). Anschließend nach Ringschluss erfolgt in weiteren Schritten die Bildung der jeweiligen Phenylphenalenone Anigorufon (1), Lachnanthosid-Aglycon (17), 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (25) und Hydroxyanigorufon (2) (d).

3.3 Zur Herkunft der Sauerstoffatome an C-2 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-5 von 7-Phenylphenalenonen

Zur Aufklärung der Herkunft des Sauerstoffes an C-2 von 9-Phenylphenalenonen (A in Abb. 3.5) und von C-5 in 7-Phenylphenalenonen (B in Abb. 3.5) dienen z.B. Anigorufon (1) und Hydroxyanigorufon (2) aus *A. preissii* bzw. Lachnanthosid-Aglycon (17), Haemodorin (18) und 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (25) aus *W. thyrsoflora*.

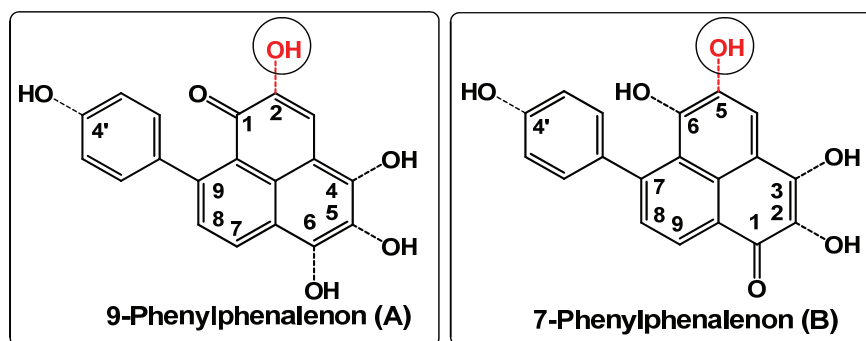


Abb. 3.5: 9-Phenylphenalenon- und 7-Phenylphenalenon-Modellstruktur mit möglichen Positionen für Hydroxyl- und Ketogruppen im Grundgerüst. Rot: In diesem Abschnitt zu diskutierende Herkunft dieses Sauerstoffatoms.

Die früheste Möglichkeit der Einführung der Hydroxylgruppe an C-2 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-5 von 7-Phenylphenalenonen besteht in der Kondensation von Kaffeeoyl-CoA mit Malonyl-CoA und einem zweiten Phenylpropanoyl-CoA. Dabei würde zunächst ein intermediäres Diarylheptanoid mit 3',4'-Catecholstruktur entstehen, das dann zum Phenylphenalenon zyklisieren könnte. Fütterungen von [2-¹³C]Kaffeensäure an *A. preissii*^[47] führte zum Einbau in die linke Hälfte von Dihydroxyanigorufon jedoch nur zu einem sehr begrenzten Einbau in die rechte Hälfte dieses Phenylphenalenons. Anigorufon und Hydroxyanigorufon wurden von [2-¹³C]Kaffeensäure nicht markiert. Nach diesen Ergebnissen kommt der frühen Hydroxylierungsvariante nur untergeordnete Bedeutung zu.

In einer zweiten Möglichkeit würde die Biosynthese von *p*-Cumaroyl-CoA ausgehen und die *p*-Hydroxysubstitution im zunächst gebildeten Diarylheptanoid erscheinen. Hier bietet sich nun die Hydroxylierung in 3'-Position benachbart zur vorhandenen *p*-Hydroxylgruppe an einem der beiden Phenylringe eines Diarylheptanoids an. Zur Prüfung dieser Möglichkeit dienten Fütterungsexperimente an Wurzelkulturen von *W. thyrsoiflora* mit zuvor synthetisierten [6-¹³C]Diarylheptanoiden **68** und **69**. Diese unterscheiden sich darin, dass Verbindung **68** eine *para*-Hydroxylgruppe am Phenylring besitzt, wohingegen das [6-¹³C]Diarylheptanoid **69** Hydroxyfunktionen an C-3' und C-4' des Phenylrings aufweist. In vorangegangenen Studien an *A. preissii* wurde der Einbau des [6-¹³C]Diarylheptanoid **69** bereits nachgewiesen^[64]. Dies deutete auf einen Einbau des Sauerstoffes an C-2 der 9-Phenylphenalenone bzw. C-5 der 7-Phenylphenalenone auf Stufe des Diarylheptanoid-Intermediates hin.

In der vorliegenden Arbeit werden diese Ergebnisse durch den Einbau des [6-¹³C]Diarylheptanoids **69** in Phenylphenalenone aus *W. thyrsoiflora* bestätigt. Somit liegt vor Ringschluss ein lineares Diarylheptanoid mit einem 4,6-Dienstrukturmerkmal und der für die Ausbildung einer *ortho*-Chinonstruktur notwendigen Catecholfunktion an C-3' und C-4' vor (Abb. 3.6). Oxidation zum *o*-Chinon erzeugt ein geeignetes Dienophil, das gemeinsam mit dem Dien und den beiden flexiblen Methylengruppen in der C-7-Kette dem Diarylheptanoid

optimale strukturelle Voraussetzungen zur enzymatischen oder spontanen Diels-Alder-Zykloaddition verleiht. Weitere Schritte führen dann zur Ausbildung der Phenylphenalenone **1**, **17** und **25**. Durch den in dieser Arbeit nachgewiesenen kombinierten Einbau des [6-¹³C]Diarylheptanoids **68** und ¹⁸O (Abb. 2.49) an C-2 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-5 von 7-Phenylphenalenonen lässt sich folgende Reaktionsfolge bezüglich der Einführung dieses Sauerstoffes aufstellen (Abb. 3.6). Unter Verwendung von Luftsauerstoff erfolgt, wahrscheinlich katalysiert durch eine Tyrosinase, Polyphenol-Oxidase oder Cytochrom P450-Monooxygenase, der Einbau einer Hydroxyfunktion an C-3' des Diarylheptanoid-Intermediates.

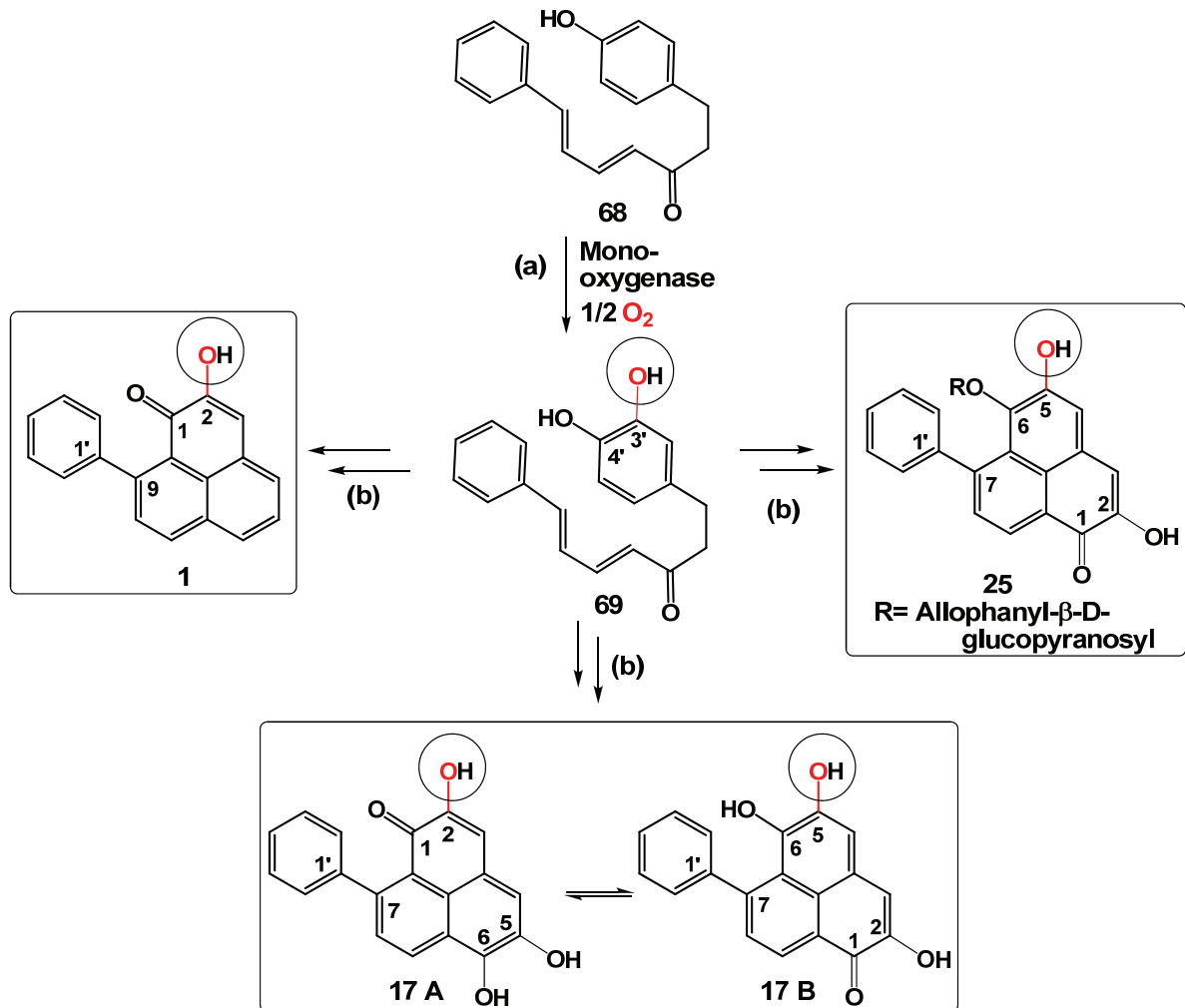


Abb. 3.6: Oxidative Schritte in der Biosynthese von Phenylphenalenonen zum Einbau der Sauerstofffunktion an C-2 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-5 von 7-Phenylphenalenonen: Einführung einer weiteren Hydroxylgruppe an C-3' des Diarylheptanoid-Intermediates (a). Nach Ausbildung des Dienophil-Strukturmerkmals (s. Abb. 3.1) erfolgt der Ringschluss und nach weiteren Schritten kommt es zur Ausbildung der jeweiligen Phenylphenalenone Anigorufon (**1**), Lachnanthosid-Aglycon (**17**), 6-O-[(6''-O-Allophanoyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) (b).

Wie bereits oben beschrieben kommt es nach Ausbildung der Dien-Dienophil-Strukturmerkmale zum Ringschluss und schließlich in darauf folgenden Schritten zur Bildung

der entsprechenden Phenylphenalenone mit Sauerstofffunktionen an C-2 (Bezugssystem: 9-Phenylphenalenon) bzw. C-5 (Bezugssystem: 7-Phenylphenalenon). Da bislang aber noch kein Enzym, wie z.B. eine Diels-Alderase, isoliert wurde, bleibt der Mechanismus des Ringschlusses noch zu klären, was aber nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

Die dritte Möglichkeit der Einführung der hier diskutierten Sauerstofffunktion an C-2 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-5 von 7-Phenylphenalenonen ist in der „späten“ Oxidation des fertigen Phenylphenalenons zu sehen. Voraussetzung für diese Variante ist die Möglichkeit, dass der Ringschluss auch über ein Diarylheptanoid-Intermediat vollzogen werden kann, welches eine Sauerstofffunktion nur an C-4', nicht aber an C-3' besitzt (Abb. 3.7). Jedoch sind 9-Phenylphenalenone, denen die sonst übliche Hydroxylgruppe an C-2 fehlt, in Pflanzen nicht verbreitet. Bisher wurde lediglich ein solches Phenylphenalenon, 9-Phenylphenalenon-1-on in *Anigozanthos rufus* (unveröffentlicht) gefunden. Einer späten Oxidation der hier betrachteten Positionen wird deshalb keine größere Bedeutung beigemessen. Ein völlig unsubstituierter Phenylring reicht offensichtlich nicht aus um ein Dienophil zu generieren, welches das Diarylheptanoid zur 4+2-Zykloaddition befähigt. Dieser Schluss wurde aus dem bisher einzigen Vorkommen eines linearen Diarylheptanoids in den Haemodoraceae, dem in Nektar von *Anigozanthos*-Blüten gefundenen 1,7-Diphenylheptan-1,3-dien-5-ol, gezogen^[119].

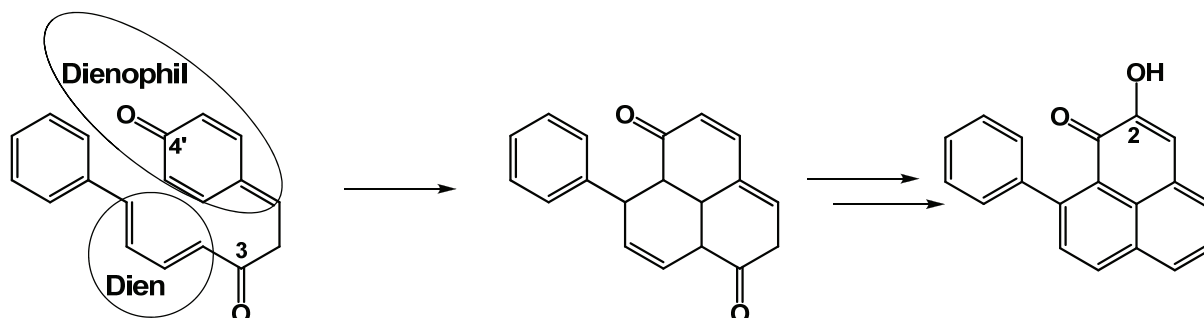


Abb. 3.7: Hypothese für Ringschluss durch Strukturmerkmale eines Diens und Dienophils und damit verbundene Einführung des Sauerstoffes in Position C-2 nach Ringschluss.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Einbau des ¹³C-markierten Diarylheptanoids [6-¹³C]1-(3',4'-Dihydroxyphenyl)-7-phenylhepta-4,6-dien-1-on (**69**) in Anigorufon^[64] sowie, in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, in Phenylphenalenone (**17** und **25**) aus *W. thyrsoflora*, dafür spricht, dass Diarylheptanoide mit *o*-Chinon-Strukturelement besser zum Ringschluss geeignet sind als solche mit Sauerstoff lediglich an C-4'.

3.4 Zur Herkunft des Sauerstoffatoms an C-4 von 9-Phenylphenalenonen

Für die Aufklärung der Herkunft des Sauerstoffes an C-4 von 9-Phenylphenalenonen (**A** in Abb. 3.8) können z.B. 4-Hydroxyanigorufon, 4-O-(β-D-glucopyranosyl]-2-methoxy-9-

phenylphenalen-1-on (**80**) und Anigorootin (**15**) genutzt werden. Wie bei den anderen Sauerstofffunktionen stellt sich auch bei der Hydroxylgruppe an C-4 die Frage nach der Herkunft und dem an der Einführung beteiligten Biosyntheseschritt. Grundsätzlich kommen folgende Möglichkeiten in Betracht. Variante 1 (frühe Hydroxylierung): Beteiligung von β -Keto- oder β -Hydroxy- β -phenylcarbonsäuren bzw. deren SCoA-Estern an der Kondensation mit Malonyl-CoA zur Bildung von „linearen“ Diarylheptanoiden als Intermediate der Phenylphenalenon-Biosynthese. Variante 2 (späte Hydroxylierung): Nachträgliche Hydroxylierung am „fertigen“ Phenylphenalenon-Gerüst oder auf der Stufe eines Diarylheptanoid-Intermediates.

Um die Einführung des Sauerstoffes mit einem Seitenketten-oxidierten Phenylpropan (Variante 1) zu prüfen, sollten ^{13}C -markierte ringhydroxylierte β -Keto- β -phenylcarbonsäuren und ringhydroxylierte β -Hydroxy- β -phenylpropansäuren in Fütterungsexperimenten verwendet werden.

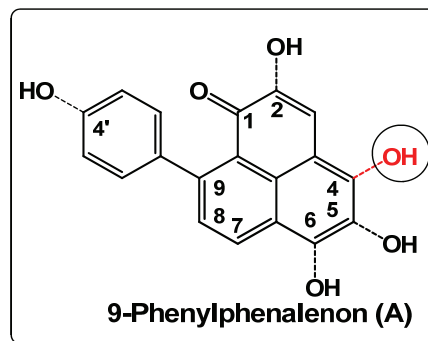


Abb. 3.8: 9-Phenylphenalenon-Modellstruktur mit möglichen Positionen für Hydroxyl- und Ketogruppen im Grundgerüst. Rot: In Abschnitt 3.4 zu diskutierende Herkunft dieses Sauerstoffatoms.

Es wurde versucht diese über unterschiedlichste Synthesewege, wie z.B. die Reformatsky-Reaktion herzustellen^[115–117]. Zuerst wurden Synthesen mit unmarkierten Ausgangsstoffen durchgeführt, welche anschließend auf die Herstellung der ^{13}C -markierten Verbindungen übertragen werden sollten. Die Versuche zur Synthese der unmarkierten Verbindungen führten jedoch entweder zu keinem Produkt oder lieferten nur sehr geringe Ausbeuten. Für die Herstellung teurer ^{13}C -markierter Verbindungen sind gute Ausbeuten aber aus wirtschaftlichen Gründen Voraussetzung. Deshalb wurde auf die Synthese ^{13}C -markierter Verbindungen diese Typs verzichtet. Außerdem sind Phenylpropansäuren mit Sauerstofffunktion in β -Stellung in der pflanzlichen Biosynthese weniger weit verbreitet als deren isomere β -Phenylmilchsäuren und Phenylpyruvate (vgl. Abschnitt 3.5). Obwohl deshalb oben genannte Variante 1 nicht auszuschließen war, wurde sie dennoch als wenig wahrscheinlich angesehen und nicht weiter verfolgt.

Eine andere Möglichkeit der Untersuchung der Herkunft der 4-Hydroxyfunktion bestand in Fütterungsexperimenten unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre mit anschließender NMR-spektroskopischer Analyse der isotopeninduzierten Verschiebung bzw. massenspektrometrischer Messung. Die

9-Phenylphenalenone **15**, **80** und **81** sollten dabei auf einen Einbau von ^{18}O speziell an C-4 untersucht werden. Der Versuch des Nachweises der isotopeninduzierten Verschiebung des ^{13}C -Signals des quartären C-4 scheiterte an den dafür zu geringen isolierbaren Substanzmengen von Anigorootin (**15**) und den anderen 4-oxygenierten Phenylphenalenonen, z. B. **80** und **81**. Eine weitere Überlegung bestand in der Öffnung der Pyranringe des Anigorootin (**15**) und anschließende O-Methylierung der OH-Gruppe mit ^{13}C -Diazomethan, um den isotopeninduzierten Verschiebungseffekt auf die so eingeführte 99% ^{13}C enthaltende O-Methylgruppe empfindlich messen zu können. Versuche in diese Richtung führten aber nicht zum erwünschten Ergebnis. Schließlich lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die Herkunft des Sauerstoffes an C-4 von 9-Phenylphenalenonen nicht abschließend nachweisen.

3.5 Zur Herkunft der Sauerstoffatome an C-5 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-2 von 7-Phenylphenalenonen

Zielverbindungen zur Untersuchung der Herkunft der Sauerstoffatome an C-5 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-2 von 7-Phenylphenalenonen waren Lachnanthosid-Aglycon (**17**) und 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) aus *W. thyrsoiflora*. Verbindung **17** liegt in einem Tautomerengleichgewicht vor, das weit auf der Seite des Tautomeren **A**, einem 9-Phenylphenalenon liegt während Tautomer **B** ein 7-Phenylphenalenon darstellt und nur als Glycosid **25** bzw. nach O-Methylierung als 2,5,6-Trimethylether **78** beobachtbar ist (Abb. 2.32).

Wie bereits oben erwähnt ist eine mögliche Herkunft der Sauerstofffunktion an C-5 von 9-Phenylphenalenonen (**A** in Abb. 3.9) bzw. C-2 von 7-Phenylphenalenonen (**B** in Abb. 3.9) in α -Keto- β -phenylcarbonsäure oder β -Phenylmilchsäuren zu suchen. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde ringhydroxylierte $[2-^{13}\text{C}]\alpha$ -Keto- β -phenylcarbonsäure ($[2-^{13}\text{C}]$ Phenylpyruvat, **47**) sowie die entsprechenden enantiomeren ringhydroxylierten β -Phenylmilchsäuren **50** und **52** synthetisiert (Abschnitt 2.1.2) und an *W. thyrsoiflora* verabreicht (2.2.2.1). Aufnahme-probleme verhinderten jedoch eine Aussage über den Einbau in die Zielverbindungen und die Beteiligung von ringsubstituierten Phenylpyruvaten und ringsubstituierten Phenylmilchsäuren an der Phenylphenalenon-Biosynthese.

Eine Betrachtung zum Phenylpropanstoffwechsel könnte dennoch Informationen zur Herkunft des hier betrachteten Sauerstoffatoms liefern: Die Biosynthese von 4-Hydroxyphenylpyruvat erfolgt in Pflanzen durch Transaminierung aus Tyrosin. Fütterungsversuche mit $[2-^{13}\text{C}]$ Tyrosin an *W. thyrsoiflora* lieferten jedoch keinen Hinweis auf den Einbau in die Verbindungen **17** bzw. **25** (s. Abschnitt 3.2). Damit erscheint auch die frühe Einführung der Sauerstofffunktion an C-5 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-2 von 7-Phenylphenalenonen in *W. thyrsoiflora* wenig wahrscheinlich. Es ist jedoch anzumerken,

dass, anders als bei *W. thyrsoiflora*, Einbau von [^{14}C]Tyrosin in die 5-Hydroxy-9-phenylphenalenonene Haemocorin aus *Haemodorum corymbosum*^[61] bzw. Lachnanthosid Aglycon aus *Lachnanthes tinctoria*^[62] berichtet wurde. Auch ist die bisher nicht bekannte, jedoch durchaus denkbare *p*-Hydroxylierung von Phenylpyruvat zu *p*-Hydroxyphenylpyruvat eine Variante zur Erklärung der frühen Einführung von Sauerstoff in die fraglichen Positionen.

Der α -Sauerstoff von biosynthetisch gebildeten Phenylpyruvaten stammt wegen des im Verlauf der Transaminierung erfolgenden Hydrolyseschrittes aus dem Wasser. Deshalb sollte der Weg der frühen Oxidation über *p*-Hydroxyphenylpyruvat (**47**) oder eine der enantiomeren *p*-Hydroxyphenylmilchsäuren **50** oder **52** zum Einbau von ^{18}O an C-5 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-2 von 7-Phenylphenalenonen aus ^{18}O -markiertem Wasser führen. Entsprechende Experimente lieferten jedoch keinen Einbau von ^{18}O -Sauerstoff, was gegen die Hypothese der frühen Oxidation spricht. Andererseits könnte der Anteil an ^{18}O im Wasser mit 10% zu gering gewesen sein, um einen Einbau nachweisen zu können. Ein schlüssiger Beweis für eine frühe Einführung des fraglichen Sauerstoffs konnte damit nicht erbracht werden. Die weiteren Arbeiten konzentrierten sich deshalb darauf, die Einführung der Sauerstofffunktion an C-5 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-2 von 7-Phenylphenalenonen in einem späteren Schritt der Biosynthese zu erkunden.

Für biosynthetische Oxidationsreaktionen besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit der Beteiligung von Cytochrom P450-Monooxygenase, welche Luftsauerstoff als O_2 -Lieferanten nutzt. Dazu wurden Fütterungsexperimente mit [2- ^{13}C]Phenylalanin, [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) bzw. [6- ^{13}C]Diarylheptanoiden **68** und **69** unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre durchgeführt. Die ^{13}C -Markierungen sollten dem Nachweis der Precursor-Produkt-Beziehung dienen und die $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre den entscheidenden Hinweis auf die Monooxygenase-katalysierte Oxidation durch molekularen Sauerstoff liefern. Der kombinierte Einbau beider Markierungen würde zur Ermittlung des Substrates der Oxidation beitragen. Aus den genannten Fütterungsexperimenten an *W. thyrsoiflora* wurden die tetraoxygenierten Phenylphenalene **17** und **25**, isoliert.

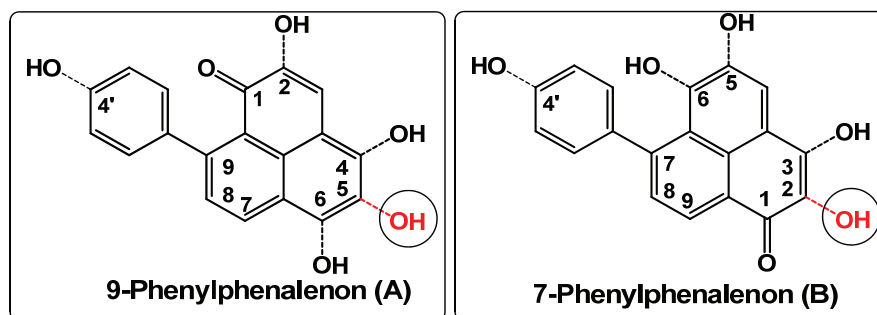


Abb. 3.9: 9-Phenylphenalenon- und 7-Phenylphenalenon-Modellstruktur mit möglichen Positionen für Hydroxyl- und Ketogruppen im Grundgerüst. Rot: In diesem Abschnitt zu diskutierende Herkunft dieses Sauerstoffatoms.

Die NMR und HRMS-Ergebnisse (Abschnitt 2.2.3.3) lieferten den Beweis für den kombinierten Einbau von ^{18}O und den jeweils verwendeten ^{13}C -markierten Precursoren an Position C-5 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-2 von 7-Phenylphenalenonen. Das bedeutet, dass zur Einführung dieser Sauerstofffunktion der aus der Atmosphäre stammende Sauerstoff verwendet wird. Isotopeninduzierte Änderungen der chemischen Verschiebungen in den nach Fütterung von $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin in Abb. 2.39 erhaltenen ^{13}C -NMR-Spektren und HRMS-Analysen des Trimethylethers **78** von Verbindung **17** weisen z. B. auf $[2\text{-}^{13}\text{C},^{18}\text{O}]$ -Isotopologe hin (Abb. 2.50). Die Oxidation erfolgt demzufolge nach der Biosynthese von Phenylalanin und auch nach der Biosynthese von *p*-Cumarsäure. Entsprechende Ergebnisse wurden bei Fütterung des $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoids **69** unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre erhalten. Damit wurde nachgewiesen, dass auch die Biosynthese der linearen Diarylheptanoide sowie die Hydroxylierung an deren C-3' vor der Hydroxylierung an den hier diskutierten Positionen C-2 (7-Phenylphenalenone) bzw. C-5 (9-Phenylphenalenone) stattfindet.

Wie die Isotopologanalysen (Abb. 2.47-2.50) nach Fütterung von ^{13}C -markierten Precursoren unter ^{18}O -Atmosphäre zeigten, wurden für die Tautomeren des Lachnanthosid-Aglycon (**17**) und des Glycosids **25** abweichende Ergebnisse bezüglich des Einbaus von ^{18}O festgestellt. Nach Fütterungen von $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin, $[2\text{-}^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) bzw. des $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoids **69** konnte Einbau dieser ^{13}C -markierten Vorstufen nur in Kombination mit ^{18}O an C-5 des Tautomers **A** (9-Phenylphenalenon) bzw. C-2 des Tautomers **B** (7-Phenylphenalenon) nachgewiesen werden (Abb. 2.50). ^{18}O -Anreicherung in anderen Positionen von Verbindung **17** wurde nicht verzeichnet. Dieses Ergebnis war überraschend, denn das unter gleichen Bedingungen isolierte Glycosid **25** weist ^{18}O auch an C-5 bzw. nach Phenylalaninfütterung zusätzlich auch an C-6 der jeweiligen ^{13}C -markierten Isotopologe auf (Abb. 2.47-2.49).

Gedankenexperimente zur Erklärung dieser Diskrepanz durch den während des zeitlichen Verlaufs der Biosynthese Phenylalanin \rightarrow Zimtsäure \rightarrow *p*-Cumarsäure \rightarrow 4'-Hydroxydiarylheptanoid (**68**) \rightarrow 3',4'-Dihydroxydiarylheptanoid (**69**) \rightarrow Aglycon **17** \rightarrow Glycosid **25** graduell zunehmende Verfügbarkeit von ^{18}O und entsprechende Unterschiede des ^{18}O -Gehaltes in den nacheinander eingeführten Sauerstofffunktionen sind problematisch und sollen hier nicht weiter im Detail diskutiert werden. Eine sich über die Fütterungsperiode ändernde Verfügbarkeit von Precursoren könnte sich im Isotopologmuster der Biosyntheseprodukte widerspiegeln, wenn die Existenz zweier getrennter Pools von Phenylphenalenonen angenommen wird. Phenylphenalenonaglyca (z.B. Verbindung **17**) könnten sich im Cytosol bzw. lipophilen Kompartimenten befinden und Glycoside (z.B. Verbindung **25**) könnten in den Vakuolen akkumuliert werden. Bei langsamem Austausch zwischen den beiden Pools könnten in der ersten Phase der Fütterungsexperimente gebildete Isotopenmuster eine zeitlang erhalten bleiben. Im vorliegenden Fall könnte eine solche „Konservierung“ für das Aglycon **17** zutreffen, das in den meisten

Sauerstofffunktionen den geringeren ^{18}O -Anteil der noch nicht in allen Positionen markierten Vorstufen aufweist. Bei der vermutlich späteren Bildung des glycosidierten Phenylphenalenon-Pools (z.B. **25**) wird das aus inzwischen in weiteren Positionen ^{18}O -angereicherten Vorstufen notwendigerweise ebenfalls gebildete Aglycon nicht in den „konservierten Pool“ eingelagert sondern rasch weiter zum Glycosid umgesetzt und wahrscheinlich in die Vakuolen eingelagert.

Die in *W. thyrsoflora* generell beobachtete geringe Isotopenanreicherung erschwert wünschenswerte weitergehende Interpretationen. Hier erwies sich die Verwendung einer Kultur bzw. Pflanze mit hohem konstitutivem Gehalt an Phenylphenalenonen als nicht optimal. Ein induzierbares pflanzliches System hätte vermutlich höhere Einbauraten der markierten Precursoren und ^{18}O erbracht. Ein Weg, um mit den vorhandenen Wurzelkulturen von *W. thyrsoflora* höhere ^{18}O -Anreicherung zu erzielen, wird in der Vorinkubation unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre und verzögerter Fütterung der ^{13}C -markierten Phenylpropanoide bzw. Diarylheptanoide oder in einer insgesamt verlängerten Fütterungszeit gesehen.

Dennoch lässt sich nun aus den erhaltenen Ergebnissen das in Abb. 3.10 abgebildete Biosyntheschema ableiten. Der Einbau der Hydroxylgruppe an Pos. C-5 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-2 von 7-Phenylphenalenonen erfolgt demnach nach Ringschluss, d.h. nach Ausbildung der Phenylphenalenon-Grundstruktur. Die Sauerstoffinkorporation wird wahrscheinlich durch eine Cytochrom P450-Monooxygenase katalysiert (f in Abb. 3.10).

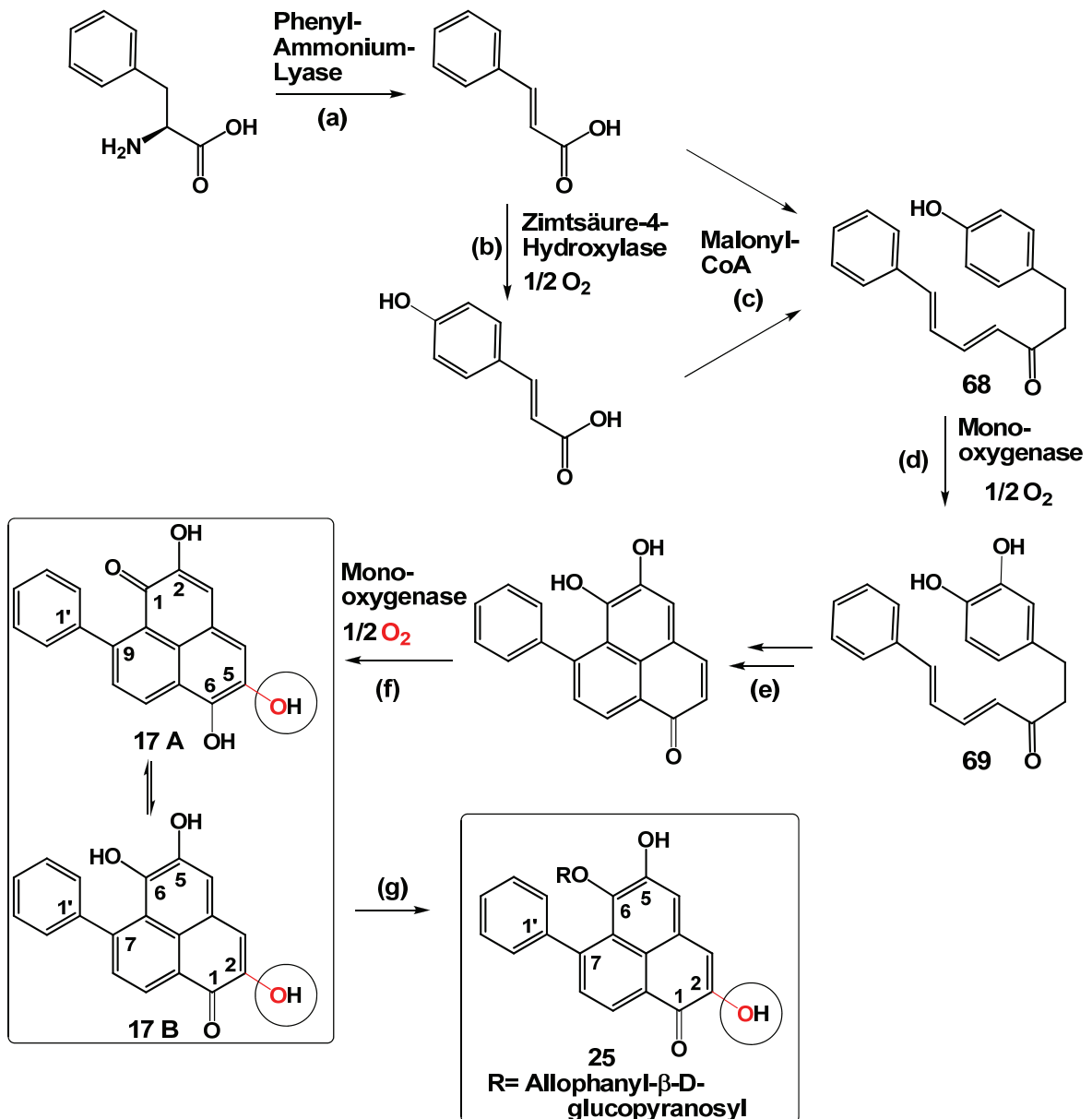


Abb. 3.10: Oxidative Schritte in der Biosynthese von Phenylphenalenonen zum Einbau der Sauerstofffunktion an C-5 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-2 von 7-Phenylphenalenonen: Umsetzung von Phenylalanin zu Zimtsäure durch Phenyl-Ammonium-Lyase (PAL) (a) und anschließend Umwandlung eines Teils der Zimtsäure in *p*-Cumarsäure durch Zimtsäure-4-Hydroxylase (b). Ausbildung des Diarylheptanoid-Intermediates (c). Nach Einführung einer weiteren Hydroxylgruppe an C-3' des Diarylheptanoid-Intermediates (s. Abb. 3.1) (d) und nach Ausbildung des Dienophil-Strukturmerkmals (s. Abb. 3.1) erfolgt der Ringschluss und nach weiteren Schritten die Ausbildung der Phenylphenalenon-Grundstruktur (e). Die zusätzliche Hydroxylgruppe (rot markiert) wird nach Ringschluss (f) durch eine Monooxygenase eingeführt. Das tetraoxygenierte Phenylphenalenon (Lachnanthosid-Aglycon, 17) wird zum 6-O-[(6''-O-Allophanlyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (25) glycosidiert (g).

3.6 Zur Herkunft der Sauerstoffatome an C-1 von 7-Phenylphenalenonen und C-6 von 9-Phenylphenalenonen

In diesem Fall dienen erneut die in der vorliegenden Arbeit untersuchten tetraoxygenierten Phenylphenalenone **17** und **25** zur Aufklärung der Herkunft der Sauerstofffunktion an C-6 von 9-Phenylphenalenonen (Tautomer **A** in Abb. 3.11) bzw. C-1 von 7-Phenylphenalenonen (Tautomer **B** in Abb. 3.11).

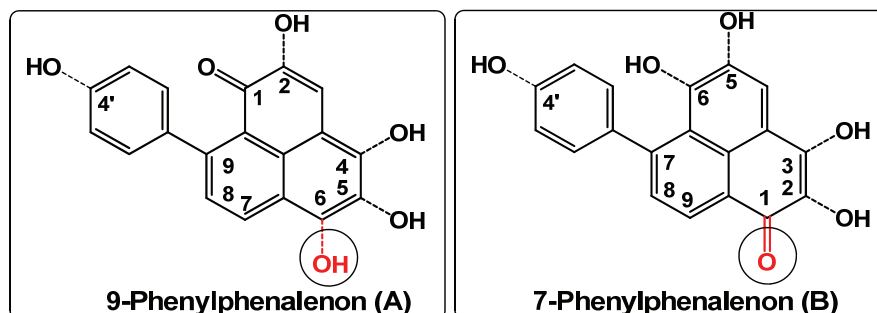


Abb. 3.11: 9-Phenylphenalenon- und 7-Phenylphenalenon-Modellstruktur mit möglichen Positionen für Hydroxyl- und Ketogruppen im Grundgerüst. Rot: In diesem Abschnitt zu diskutierende Herkunft dieses Sauerstoffatoms.

In früheren Arbeiten wurde die Vermutung aufgestellt, dass diese Sauerstofffunktion ihren Ursprung in der Carboxylgruppe einer der Phenylpropanoid-Vorstufen hat^[67]. In diesem Fall wäre eine Keto- oder Hydroxylgruppe bereits im linearen Diarylheptanoid enthalten und würde nicht erst nach Zyklisierung zum Phenylphenalenon eingeführt. Für diese Möglichkeit sprechen die Strukturen der aus Zingiberaceae bekannten Curcuminoide^[126] und anderer linearer oder alizyklischer Diarylheptanoide, z.B. aus den Betulaceae^[127, 128]. Wie die Phenylphenalene werden diese Verbindungen ebenfalls aus zwei Phenylpropanoideinheiten durch Kondensation mit Malonyl-CoA gebildet^[129, 130]. Zur Diskussion steht deshalb, ob die Carbonylfunktion an C-3 im Diarylheptanoid-Intermediat (s. Abb. 3.12) bei der postulierten Diels-Alder-Zykloaddition den Elektronenreichtum des Diens einschränkt und damit die Zyklisierung behindert. Es wäre möglich, dass die Carbonylfunktion für den Ablauf einer Diels-Alder-Reaktion entfernt werden muss und nachträglich wieder eingeführt wird. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Fütterungsexperimente mit [2-¹³C]Phenylalanin, [2-¹³C]*p*-Cumarsäure (**56**) bzw. [6-¹³C]Diarylheptanoiden **68** und **69** unter ¹⁸O₂-Atmosphäre sollten zur Klärung dieser Möglichkeit dienen. Für das tetraoxygenierte Phenylphenalenon-Glycosid **25** wurden nach Fütterungen mit [2-¹³C]Phenylalanin unter ¹⁸O₂-Atmosphäre Isotopologe nachgewiesen, welche einem kombinierten Einbau der ¹³C-markierten Vorstufe und von drei ¹⁸O an C-2, C-5 und C-6, nicht aber in der Ketogruppe (C-1) im Phenylphenalenteil entsprechen (s. Abb. 2.47). Nach Fütterung von [2-¹³C]*p*-Cumarsäure (**56**) bzw. [6-¹³C]Diarylheptanoid **68** entstehen durch kombinierten Einbau des ¹³C-markierten Precursors und zwei ¹⁸O-

Sauerstoffatomen Isotopologe mit ^{18}O an C-2 und C-5, während C-6 und die Ketogruppe (C-1) keine ^{18}O -Anreicherungen aufweisen (Abb. 2.48 und 2.49). Für das $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoid **69** wird ein kombinierter Einbau mit ^{18}O lediglich an C-2 registriert. Alle diese Ergebnisse befinden sich im Einklang mit bereits in den vorangegangenen Abschnitten diskutierten, in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Ursprüngen der Sauerstofffunktionen an C-2, C-5 und C-6 von 7-Phenylphenalenonen (bzw. C-1, C-2 und C-5 von 9-Phenylphenalenonen). In keinem dieser Experimente wurde ^{18}O -Einbau in der Carbonylfunktion von Verbindung **25** gefunden, wie es bei einer späten Oxidation nach Ringschluss zu erwarten gewesen wäre.

Zusätzlich zu dem als 7-Phenylphenalenon vorliegenden Glycosid **25** wurde das im tautomeren Gleichgewicht vorliegende Lachnanthosid-Aglycon (**17**) auf ^{18}O -Anreicherung an C-6 (Tautomer **A**) bzw. C-1 (Tautomer **B**) untersucht. Wäre die Carbonylfunktion an C-3 des Diarylheptanoids für den reibungslosen Ablauf einer Diels-Alder-Reaktion eliminiert und nachträglich nach Ringschluss wieder eingeführt worden, hätte auch hier ein Einbau von ^{18}O in den betreffenden Positionen nachgewiesen werden müssen. Dies erfolgte jedoch nicht (Abb. 2.50) sondern alle Befunde sind in Übereinstimmung mit den für das Glycosid **25** erhaltenen Ergebnissen. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde damit der Nachweis erbracht, dass der Ursprung der Sauerstofffunktion an C-6 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-1 von 7-Phenylphenalenonen in der Carboxylgruppe der Phenylpropanoid-Vorstufen liegt (Abb. 3.12).

Dieses Ergebnis könnte Spekulationen hinsichtlich des Zyklisierungsmechanismus bzw. der Struktur des unmittelbar an der Zyklisierung beteiligten Diarylheptanoids erlauben, was aber nicht Gegenstand dieser Arbeit war. Ein asynchroner Ablauf der Zyklisierung über aus Banane bekannte Verbindungstypen^[16, 131] scheint damit nicht ausgeschlossen und könnte Thema weiterführender Arbeiten sein.

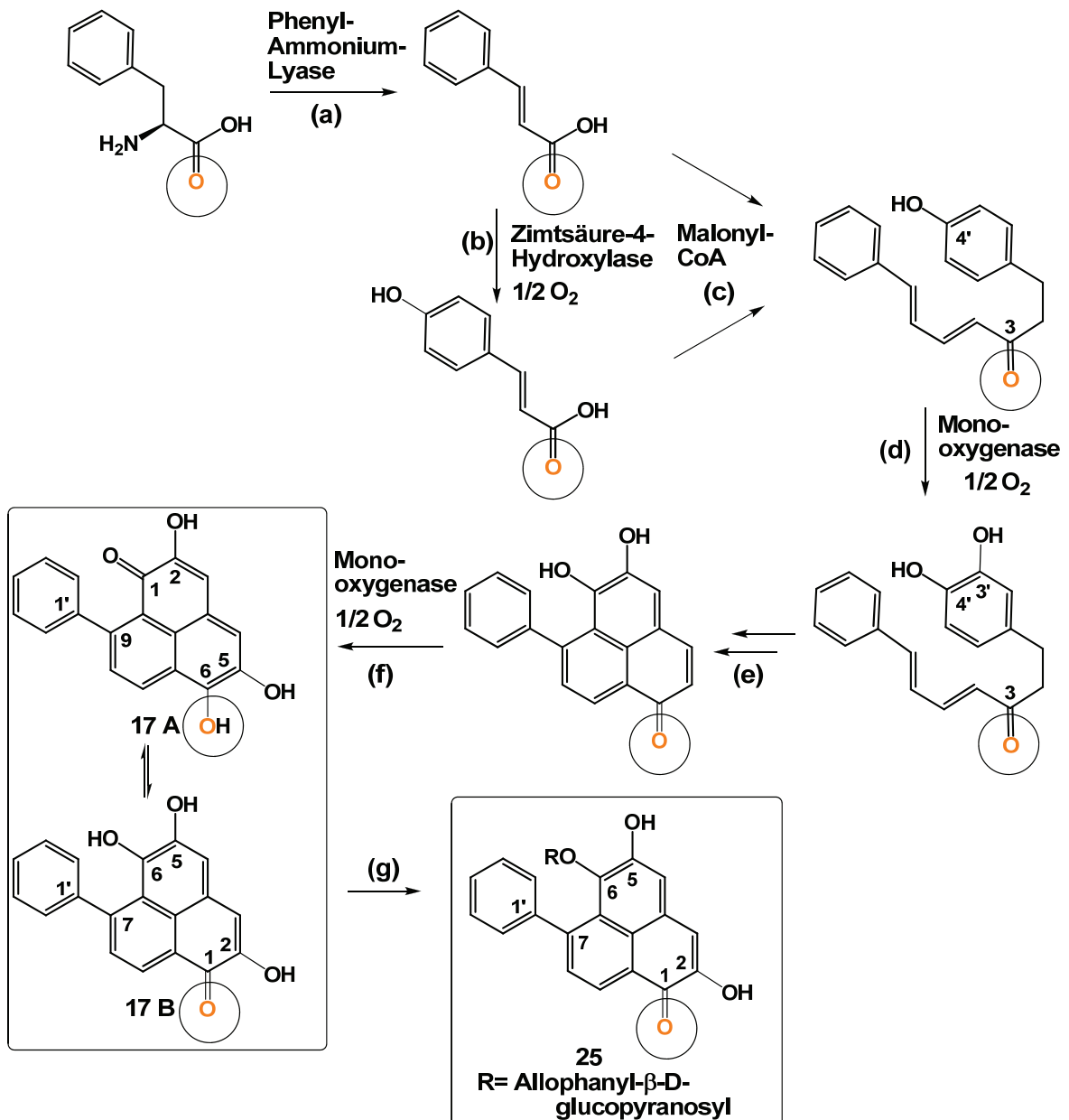


Abb. 3.12: Oxidative Schritte in der Biosynthese von Phenylphenalenonen zum Einbau der Sauerstofffunktion an C-6 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-1 von 7-Phenylphenalenonen: Umsetzung von Phenylalanin zu Zimtsäure durch Phenyl-Ammonium-Lyase (PAL) (a) und anschließend Umwandlung eines Teils der Zimtsäure in *p*-Cumarsäure durch Zimtsäure-4-Hydroxylase (b). Ausbildung des Diarylheptanoid-Intermediates (c). Nach Einführung einer weiteren Hydroxylgruppe an C-3' des Diarylheptanoid-Intermediates (d) und Ausbildung des Dienophil-Strukturmerkmals (s. Abb. 3.1) erfolgt der Ringschluss und nach weiteren Schritten die Ausbildung der Phenylphenalenon-Grundstruktur (e). Im Anschluss daran wird eine weitere Hydroxylgruppe durch eine Monooxygenase eingeführt zur Bildung des tetraoxygenierten Phenylphenalenons Lachnanthosid-Aglycon (17) (f). Durch Glucosylierung wird 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (25) erhalten (g).

3.6 Schlussfolgerung für die oxidativen Schritte in der Biosynthese von Phenylphenalenonen

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lassen sich Herkunft und Reihenfolge der Einführung der Sauerstoffatome der 1,2,4'-trioxygenierten 9-Phenylphenalenone aus *A. preissii* und der 1,2,5,6-tetraoxygenierten 7- bzw. 9-Phenylphenalenone aus *W. thyrsoflora* ableiten. Das Sauerstoffatom an C-6 der 9-Phenylphenalenone (an C-1 der 7-Phenylphenalenone) stammt aus der Carboxylgruppe der *p*-Cumarsäure bzw. ursprünglich aus Phenylalanin. Es wird gemeinsam mit dem Sauerstoffatom an C-1 der 9-Phenylphenalenone (an C-6 der 7-Phenylphenalenone) und, falls vorhanden, an C-4' bei der Kondensation von *p*-Cumaroyl-CoA mit Malonyl-CoA zum Diarylheptanoid eingeführt. Als nächstes folgt Oxygenierung an C-2 der 9-Phenylphenalenone (bzw. C-5 der 7-Phenylphenalenone) und zuletzt an C-5 der 9-Phenylphenalenone (bzw. C-2 der 7-Phenylphenalenone). Alle Sauerstofffunktionen mit Ausnahme des aus der Carboxylgruppe stammenden Sauerstoffatoms an C-6 der 9-Phenylphenalenone bzw. an C-1 der 7-Phenylphenalenone werden vermutlich durch Monooxygenasen eingeführt. Für C-2 (9-Phenylphenalenone) bzw. C-5 (7-Phenylphenalenone) ist eine Tyrosinase oder Polyphenol-Oxidase wahrscheinlich.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich das in Abb. 3.13 dargestellte Schema der Biosynthese, am Beispiel von tetraoxygenierten 7-Phenylphenalenonen aufstellen. Im ersten Schritt wird Phenylalanin durch Phenyl-Ammonium-Lyase in Zimtsäure umgewandelt (**a** in Abb. 3.13). Ein Teil der Zimtsäure wird durch C4H zu *p*-Cumarsäure hydroxyliert (**b** in Abb. 3.13), gefolgt von der Bildung von *p*-Cumaroyl-CoA durch *p*-Cumarsäure: CoA-Ligase (**c** in Abb. 3.13). Daraufhin erfolgt vermutlich ein nucleophiler Angriff von Malonyl-CoA an der Carbonsäurethioesterfunktion des *p*-Cumaroyl-CoA (**d** in Abb. 3.13). Anschließende Verknüpfung mit dem ausgebildeten Cinnamoyl-CoA (**b1** in Abb. 3.13), Thioester-Hydrolyse sowie Decarboxylierung führt zur Ausbildung eines Diketids (**e** in Abb. 3.13). Anschließend kommt es nach einigen z. T. noch hypothetischen Schritten (s. Abb. 3.1) zur Ausbildung des Diarylheptanoid-Intermediates (**f** in Abb. 3.13). Nach Einführung einer weiteren Hydroxylgruppe an C-3' eines der Phenylringe (**f** in Abb. 3.13) erfolgt die Ausbildung der *ortho*-Chinon-Struktur (**g** in Abb. 3.13), welche wahrscheinlich die Voraussetzung für die möglicherweise spontan oder enzymkatalysiert (Diels-Alderase?) verlaufende Reaktion mit dem Dien darstellt, die zum Ringschluss führt (**h** in Abb. 3.13). Nach Dehydrogenierungen, wodurch die noch bestehenden sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffe zu sp^2 -hybridisierten umgewandelt werden und Reduktionen der Carbonylfunktionen an Pos. C-5 und C-6 zum entsprechenden Alkohol (**i** in Abb. 3.13) erfolgt die Einführung einer Hydroxyfunktion an C-2 (**j** in Abb. 3.13). Damit ist die Ausbildung der tetraoxygenierten 9-Phenylphenalenon-Struktur wie z.B. Lachnanthosid-Aglycon (**17**) beendet. Durch Glucosylierung des Aglycons wird 6-O-

[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) erhalten (**k** in Abb. 3.13).

Phenylphenalenone als eine Unterklasse der Diarylheptanoide besitzen 19 Kohlenstoffatome im Grundgerüst. Mit Ausnahme einiger oxidativ entstandener Abkömmlinge, die durch Verlust eines C-Atoms gekennzeichnet sind (z.B. Phenylbenzoesochromenone^[121]), ist dieses Kohlenstoffgerüst nur wenig variabel. Von der Verschiebung des Phenylrings als einer Möglichkeit der strukturellen Diversifizierung macht die Natur scheinbar nur wenig Gebrauch^[12]. Dagegen sind Hydrogenierungen^[122], Oxidationen, Methylierungen und Konjugatbildung häufig beobachtete enzymatische Reaktionen der Sekundärstoffbiosynthese die auch zur strukturellen Diversifizierung der Phenylphenalenone den Hauptbeitrag leisten. Wegen der weitgehend festgelegten Struktur des Kohlenstoffgerüsts der Phenylphenalenone sind die in dieser Arbeit untersuchten Oxygenierungen für die Generierung struktureller Vielfalt in dieser Verbindungsklasse von besonderer Bedeutung. Strukturelle Diversität entsteht jedoch nicht nur durch eine variable Zahl von Sauerstofffunktionen in verschiedenen Positionen des Moleküls sondern diese erlauben wiederum zusätzliche Modifikationen, z.B. durch Tautomerie, O-Methylierung^[132], Bildung von Etherbrücken^[53] und Glycosidierungen^[121].

Wie lässt sich die Entstehung struktureller Diversität der in der Natur vorkommenden Phenylphenalenone erklären? Phenylphenalenone kommen in verschiedenen Pflanzenfamilien (Haemodoraceae, Musaceae, Pontederiaceae, Strelitziaceae) vor, die sich wiederum in eine Vielzahl von Gattungen und Arten unterteilen. Obwohl nicht Gegenstand dieser Arbeit, lässt sich vermuten, dass die Phenylphenalenone monophyletischen Ursprungs sind, da sie bisher nur in den genannten, miteinander verwandten monokotylen Pflanzenfamilien gefunden worden. Diese sind auf unterschiedlichen Kontinenten heimisch und haben eine jeweils lange stammesgeschichtlich getrennte Entwicklung durchlaufen. So sind z.B. die Arten der Gattung *Anigozanthos* in Australien beheimatet, wohingegen *W. thyrsoiflora* in Südafrika heimisch ist. Damit mussten sich die verschiedenen Arten während ihrer Evolution an unterschiedliche klimatische und andere Umweltbedingungen anpassen. Auch waren sie als sesshafte Organismen unterschiedlichen Pathogenen und Herbivoren ausgesetzt, mit denen sie sich auseinandersetzen mussten und gegen die sie sich zu verteidigen hatten. Unter dem Einfluss dieser Koevolution entstand die Diversität der Struktur von Phenylphenalenonen. Die Bedeutung der einzelnen Verbindungen für die produzierenden Pflanzen, speziell Bananenpflanzen, und ihre ökologische Funktionen sind Gegenstand intensiver Forschung^[123, 124].

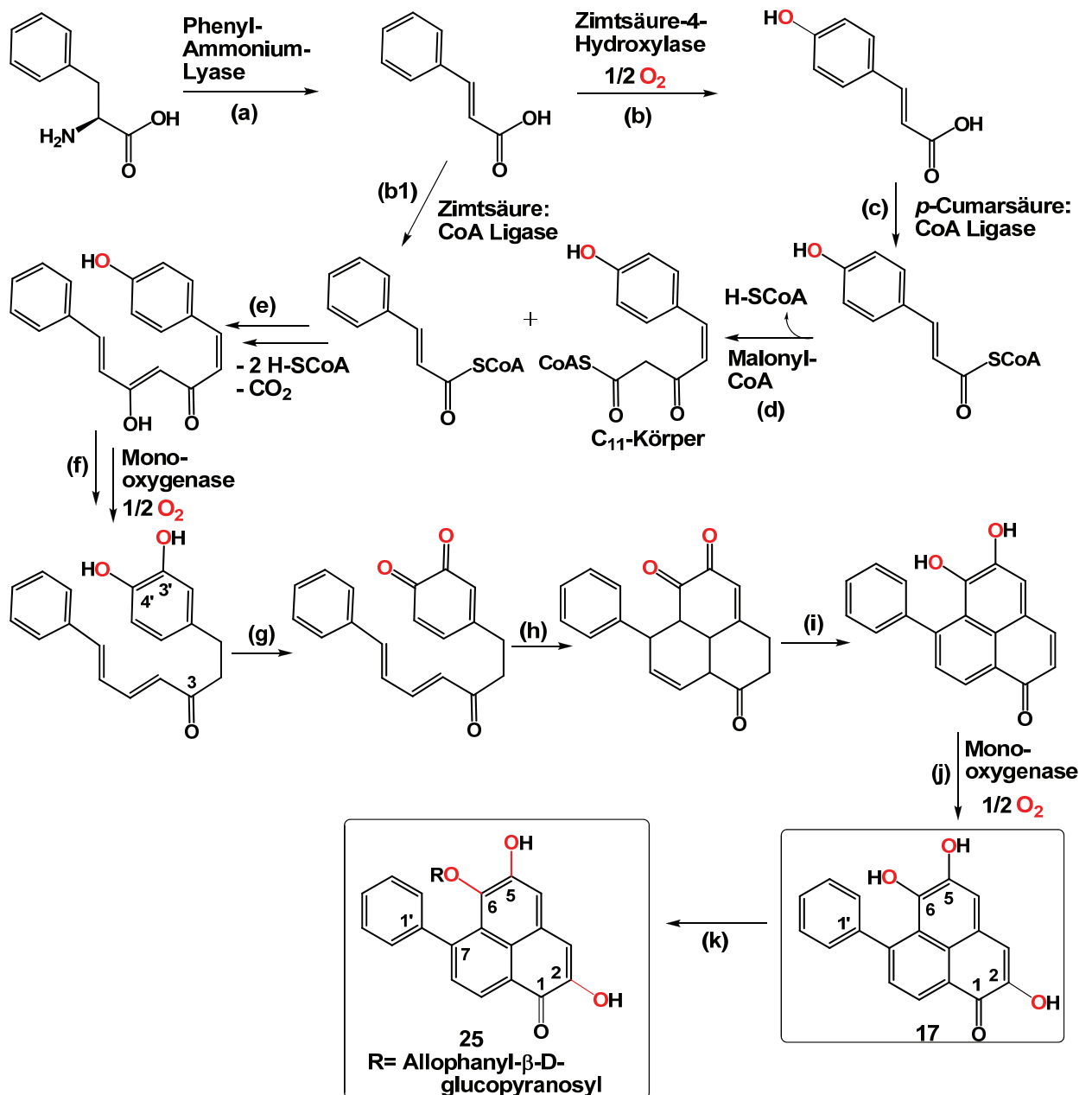


Abb. 3.13: Biosynthese von Lachnanthosid-Aglycon (17) und 6-O-[(6''-O-Allophanlyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (25). Umsetzung von Phenylalanin zu Zimtsäure durch Phenyl-Ammonium-Lyase (PAL) (a) und anschließend Umwandlung eines Teils der Zimtsäure in *p*-Cumarsäure durch Zimtsäure-4-Hydroxylase (b) und in Cinnamoyl CoA (b1). Ausbildung des C₁₁-Körpers aus *p*-Cumarsäure und Malonyl CoA (c und d). Verknüpfung von Cinnamoyl CoA und C₁₁-Körper zum Diarylheptanoid-Intermediat (e). Ausbildung der Dien- und Dienophil-Strukturmerkmale unter anderem durch Einführung einer weiteren Hydroxyfunktion an C-3' des Diarylheptanoids (f) und Bildung der *ortho*-Chinonstruktur (g). Ringschluss und damit Ausbildung des Phenylphenalenon-Grundgerüsts (h). Anschließende Dehydrogenierungen, Reduktionen der Carbonylfunktionen an C-5 und C-6 (i) und Einführung einer weiteren Hydroxyfunktion an C-2 führen zur Ausbildung des Aglycons 17 (j). Abschließende Glucosylierung des Aglycons führt zum Allophanlylglucosid 25 (g).

3.7 Nutzen und Grenzen der verwendeten Methoden

Die Notwendigkeit der Verwendung von ^{13}C -markierten Vorstufen bestand darin, den Einbau der gefütterten Precursoren in die entsprechenden Phenylphenalenone mittels ^{13}C -NMR und/oder MS nachweisen zu können. Wie im Kapitel Ergebnisse (Abschnitt 2) beschrieben dienen verstärkte Kohlenstoff-Signale in ^{13}C -NMR-Spektren von isolierten Phenylphenalenonen, wie z.B. Verbindung **1**, **2** und **25** (s. Abb. 2.17, 2.18 und 2.31) im Vergleich zu Referenzspektren dem Nachweis für den Einbau von ^{13}C -markierten Vorstufen. Weiterhin erbrachten die ^{13}C -NMR-Spektren, durch isotopeinduzierte Verschiebungen, den Nachweis der Inkorporation von ^{18}O -Sauerstoff aus der $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Aufgrund der zu geringen Intensität der sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffe in den ^{13}C -NMR-Spektren der isolierten Reinverbindungen mussten diese allerdings mittels [^{13}C]Diazomethan derivatisiert werden, wodurch alle ^{18}O einer OH-Gruppe an ein ^{13}C gebunden wurden. Durch Verwendung von Diazomethan mit 99% ^{13}C wurden intensive ^{13}C -Signale der $^{13}\text{CH}_3$ -Gruppen erhalten. Damit wurden die durch isotopeinduzierte Verschiebungen erhaltenen $^{18}\text{O}^{13}\text{CH}_3$ -Signale in den ^{13}C -NMR-Spektren, z.B. der Derivate **75** und **76** (s. Abb. 2.21 und 2.22), sichtbar. Wie die Ergebnisse der NMR-Spektroskopie zeigen, ist diese zur Isotopologanalyse sehr gut geeignet und dient der Positionsanalyse der einzelnen Isotope im Molekül. Für den indirekten Nachweis von ^{18}O ergab sich allerdings die Schwierigkeit, dass ^{18}O -induzierte Änderungen der ^{13}C -chemischen Verschiebung meist nur über eine („ α -Verschiebung“) oder maximal zwei Bindungen („ β -Verschiebung“) beobachtbar sind, wodurch keine Aussage über Isotopologmuster getroffen werden konnten. Deshalb wurden zusätzlich hochauflösende Massenspektren der Phenylphenalenone aus den Fütterungsversuchen gemessen, welche zur Analyse der Isotopologmuster dienen. Damit konnten die Isotopenzusammensetzungen von Isotopolog-Gruppen bestimmt werden. Somit wurden aus beiden komplementären Methoden die Isotopologmuster erhalten und die Häufigkeit von einzelnen Isotopologen in den Isotopologgemischen nachgewiesen.

Kinetikversuche mit [2,3,4,5,6- ^3H]L-Phenylalanin und [U- ^{14}C]*p*-Cumarsäure dienten dem Nachweis für eine aktive oder passive Aufnahme der Precursoren Phenylalanin und *p*-Cumarsäure. Dies erfolgte durch Messung der verbliebenen Radioaktivität in den Medien. Die in Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Ergebnisse lassen auf eine aktive Aufnahme von Phenylalanin schließen. Dies erfolgt vermutlich durch spezifische Aminosäuretransporter. Im Jahre 1993 wurde der erste Aminosäuretransporter aus *Arabidopsis* kloniert, durch funktionelle Komplementation einer Hefemutante^[110, 111]. Daraufhin erfolgte bis heute die Isolierung verschiedener pflanzlicher Aminosäuretransporter-cDNAs^[112–114]. Im Gegensatz dazu wird *p*-Cumarsäure gleichmäßig über die Zeit aufgenommen, was für eine passive Aufnahme durch die Wurzelkulturen spricht. Es besteht keine direkte Abhängigkeit von Transportmechanismen.

4. Zusammenfassung

Phenylphenalenone sind sekundäre Pflanzenstoffe, die in wirtschaftlich bedeutenden Bananenpflanzen (*Musa acuminata*) bei Befall durch Schadorganismen auftreten. Die Früchte der Pflanzen sind in vielen Ländern in Südostasien, Afrika sowie Latein- und Südamerika Grundnahrungsmittel. Durch Befall mit Schadorganismen, wie z.B. pflanzenpathogene Pilze (*Fusarium oxysporum*) kommt es zu großen Ernteverlusten. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Phenylphenalenone stellen einen Teil des natürlichen Abwehrsystems dar. Des Weiteren besitzen Phenylphenalenone und ihnen verwandte Verbindungen UV-protective, antibakterielle, nematizide und fungizide Eigenschaften.

Um die Resistenz der sie produzierenden Pflanzen gegen Krankheitserreger und andere Einflüsse zu erhöhen, ist ein wichtiger Schritt die Biosynthese der Phenylphenalenone aufzuklären. Damit soll die Möglichkeit geschaffen werden resistente genetisch modifizierte Pflanzen zu erzeugen. genetische Modifikationen zu schaffen ermöglicht werden. Da Phenylphenalenone in Musaceae jedoch erst nach Infektion in größeren Mengen produziert werden, bot sich die ihr verwandte Familie Haemodoraceae als Untersuchungsobjekt an, da Phenylphenalenone hier konstitutiv in relativ hohen Konzentrationen vorkommen. Als Untersuchungsobjekte wurden deshalb *Anigozanthos preissii* und *Wachendorfia thyrsiflora* aus der Familie der Haemodoraceae ausgewählt.

In der Arbeitsgruppe wurden schon vielfältige phytochemische und biosynthetische Studien an Haemodoraceae vorgenommen. Dabei wurde auch nachgewiesen, dass Phenylpropanoide in der Biosynthese der Phenylphenalenone als Vorstufen fungieren. Des Weiteren wurde der Nachweis erbracht, dass lineare Diarylheptanoide als Intermediate auftreten.

Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich mit der Aufklärung der oxidativen Schritte in der Biosynthese von Phenylphenalenonen. Das Auftreten von Phenylphenalenonen aus *Anigozanthos preissii* und *Wachendorfia thyrsiflora* mit verschiedenen Oxidationsmustern ist Voraussetzung die Herkunft einzelner Sauerstofffunktionen und die Reihenfolge ihrer Einführung in der Biosynthese aufzuklären. Phenylphenalenone aus *A. preissii* enthalten z.B. eine Ketogruppe an C-1 sowie eine Hydroxyfunktion an C-2 (Beispiel: Anigorufon (**1**)). Des Weiteren besitzen sie teilweise Hydroxyl- oder Etherfunktionen an C-4 (Beispiel Anigorootin) bzw. im seitlichen Phenylring an C-4' (Beispiel: Hydroxyanigorufon (**2**)) bzw. C-3' und C-4'. Hingegen existieren in *W. thyrsiflora* die so genannten tetraoxygenierten Phenylphenalenone, die in zwei tautomeren Formen als 7- bzw. 9-Phenylphenalenone, z. B. von Verbindung **17** und als Glycoside der 7-Phenylphenalenon-Form (Beispiel: **25**) vorkommen können. Entsprechend befindet sich die Ketofunktion an zwei unterschiedlichen Positionen, jedoch jeweils benachbart zu einer Hydroxylgruppe (s. Abb. 3.2). Zum Nachweis der Einführung von Sauerstofffunktionen wurde das aus der Atmosphäre der geschlossenen

Fütterungsapparatur stammende Sauerstoffisotop $^{18}\text{O}_2$ genutzt. Durch isopeninduzierte Verschiebungen im ^{13}C -NMR-Spektrum und / oder durch HRMS wurden sowohl Einbau von ^{13}C -markierten Vorstufen wie auch Inkorporation von ^{18}O nachgewiesen. Die Fütterungsexperimente unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre erfolgten unter Verwendung von ^{13}C -markierten Vorstufen, wie $[2-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin, $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) sowie $[6-^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoiden **68** und **69**. Ebenso wie $[2-^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) wurden auch die $[6-^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoide **68** und **69** zuvor selbstständig synthetisch hergestellt.

Aus den Ergebnissen der Fütterungen ist es als erwiesen anzusehen, dass ausgehend von Phenylalanin, die Einführung des Sauerstoffes an C-1 der 9-Phenylphenalenone bzw. C-6 von 7-Phenylphenalenone und an C-4' beider Phenylphenalenongruppen durch C4H-katalysierte Hydroxylierung von Zimtsäure zu *p*-Cumarsäure erfolgt. Damit wurde der Nachweis erbracht, dass die Einführung dieses Sauerstoffes auf Stufe der Phenylpropanoid-Vorstufen, unter Verwendung von Luftsauerstoff als O_2 -Lieferanten, erfolgt.

Zur Aufklärung der Herkunft des Sauerstoffes an C-2 von 9-Phenylphenalenonen (s. **A** in Abb. 3.5) und von C-5 in 7-Phenylphenalenonen (s. **B** in Abb. 3.5) dienen Fütterungsexperimente an Wurzelkulturen von *W. thyrsoflora* mit $[6-^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoiden **68** und **69**. Diese erbrachten einen Einbau beider ^{13}C -markierter Diarylheptanoide in tetraoxygenierte Phenylphenalenone (z.B. Verbindungen **17** und **25**) aus *W. thyrsoflora*. Im Fall des Diarylheptanoids **68** unter Inkorporation von ^{18}O an C-3' dieses Intermediates. Bereits in früheren Studien wurde ein Einbau des $[6-^{13}\text{C}]1-(3',4'\text{-Dihydroxyphenyl})$ -7-phenylhepta-4,6-dien-1-on (**69**) in Anigorufon aus *A. preissii* nachgewiesen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Diarylheptanoide über ein *ortho*-Chinon-Strukturelement den Ringschluss vollziehen und somit die Einführung des Sauerstoffes an C-2 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-5 von 7-Phenylphenalenonen auf Stufe des Diarylheptanoid-Intermediates, vermutlich durch eine Tyrosinase, Polyphenol-Oxidase unter Verwendung von Luftsauerstoff, erfolgt.

Zur Aufklärung der Herkunft der Sauerstofffunktionen an C-5 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-2 von 7-Phenylphenalenonen dienen einerseits Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markierten ringhydroxylierten α -Keto- β -phenylcarbonsäuren und β -Phenylmilchsäuren und weiterhin Fütterungen mit ^{13}C -markierten Phenylpropanoiden, wie z.B. Phenylalanin, sowie $[6-^{13}\text{C}]$ Diarylheptanoiden unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Die ^{13}C -markierte ringhydroxylierte α -Keto- β -phenylcarbonsäure **47** und β -Phenylmilchsäuren **50** und **52** wurden hierfür über bekannte Synthesewege selbstständig hergestellt. Aufnahme-probleme dieser ^{13}C -markierten Precursoren verhinderten jedoch eine Aussage über den Einbau in die entsprechenden Phenylphenalenone und die Beteiligung von ringsubstituierten Phenylpyruvaten und ringsubstituierten Phenylmilchsäuren an der Phenylphenalenon-Biosynthese.

Phenylpyruvate werden biosynthetisch durch Transaminierung der entsprechenden Aminosäuren erhalten. Hierbei wird für den Hydrolyseschritt während der Transaminierung

Wasser als Sauerstofflieferant genutzt. Entsprechende Experimente mit ^{18}O -markiertem Wasser lieferten jedoch keinen Einbau von ^{18}O -Sauerstoff, was gegen die Hypothese der frühen Oxidation spricht. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der Fokus darauf gelegt, die Einführung der Sauerstofffunktion an C-5 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-2 von 7-Phenylphenalenonen in einem späteren Schritt der Biosynthese zu erkunden.

Hierbei lieferten Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markierten Phenylpropanoiden bzw. [6- ^{13}C]Diarylheptanoiden unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre einen kombinierten Einbau beider Markierungen. Ein kombinierter Einbau der gefütterten ^{13}C -markierten Vorstufen und von ^{18}O an Pos. C-5 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-2 von 7-Phenylphenalenonen konnte nachgewiesen werden. Dies spricht für einen Einbau der Hydroxylgruppe nach Ringschluss, d.h. nach Ausbildung der Phenylphenalenon-Grundstruktur (s. Abb. 3.5). Der Einbau des Sauerstoffes wird wahrscheinlich durch eine Cytochrom P450-Monooxygenase, welche Luftsauerstoff als O_2 -Lieferanten nutzt, katalysiert.

Ebenfalls dienten Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markierten Phenylpropanoid-Vorstufen, wie z.B. Phenylalanin, und [6- ^{13}C]Diarylheptanoiden unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre der Aufklärung der Herkunft der Sauerstofffunktion an C-6 von 9-Phenylphenalenonen (s. Tautomer **A** in Abb. 3.11) bzw. C-1 von 7-Phenylphenalenonen (s. Tautomer **B** in Abb. 3.11). In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits die Vermutung aufgestellt, dass die Herkunft dieses Sauerstoffes in der Carboxylgruppe einer der Phenylpropanoid-Vorstufen zu sehen ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erbrachten keinen Nachweis für den Einbau von ^{18}O an C-6 von 9-Phenylphenalenonen bzw. C-1 von 7-Phenylphenalenonen. Damit wurde die Vermutung aus früheren Arbeiten bestätigt, dass der Ursprung dieser Sauerstofffunktion in der Carboxylgruppe der Phenylpropanoid-Vorstufen liegt (s. Abb. 3.12).

Alle in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ermöglichten die Aufklärung der Herkunft der Sauerstofffunktionen an C-1, C-2, C-5, C-6 und C-4' von 9-Phenylphenalenonen bzw. 7-Phenylphenalenonen (Abb.4.1). Einzig der Ursprung des Sauerstoffs an C-4 von 9-Phenylphenalenonen konnte nicht aufgeklärt werden (Abb. 4.1).

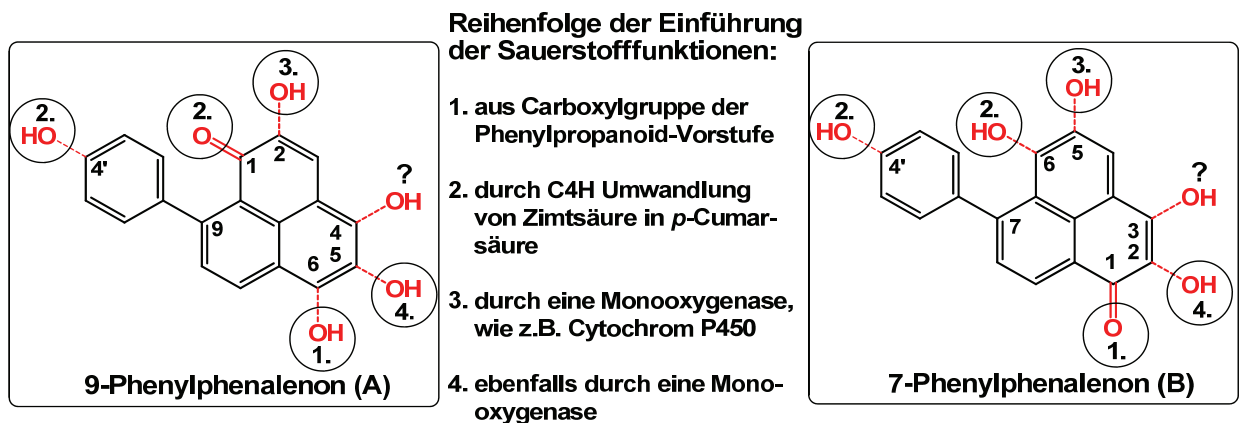


Abb. 4.1: 9-Phenylphenalenon- und 7-Phenylphenalenon-Modellstruktur mit möglichen Positionen für Hydroxyl- und Ketogruppen (rot) im Grundgerüst. Reihenfolge des Einbaus der möglichen Sauerstofffunktionen.

5. Material und Methoden

5.1 **Material und Geräte**

Mit Ausnahme der in Tabelle 5.1 bezeichneten Materialien wurden alle chemischen Substanzen bei Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D), Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (D), Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe (D), VWR International, Darmstadt (D) bezogen. Es wurden die in Tab. 5.2 bezeichneten Geräte verwendet. Auf die Geräte der Massenspektrometrie und Kernmagnetischen Resonanzspektroskopie wird in Abschnitt 2.3 näher eingegangen. Der Enantiomerenüberschuß wurde mit Hilfe des chiralen Reagens, Europium-tris-(d-3-heptafluorobutyrylcamphorat), bestimmt.

Tab. 2.1: Herkunft der verwendeten Spezialchemikalien

Firma	Material
Euriso-top, Saarbrücken, D Deutero GmbH, Kastellaun, D	Sauerstoff $^{18}\text{O}_2$ (95% ^{18}O) ^{18}O -Wasser (10% ^{18}O), [2- ^{13}C]L-Phenylalanin (99% ^{13}C), [2- ^{13}C]L-Tyrosin (99% ^{13}C), [^{13}C]Methylamin Hydrochlorid (99% ^{13}C)
Isotec (Sigma-Aldrich Gruppe), Taufkirchen, D	N-Methyl- ^{13}C -N-nitroso-p-toluolsulfonamid (99% ^{13}C) [2,3,4,5,6- ^3H]L-Phenylalanin (100-
American Radiolabeled Chemicals, Inc. (ARC), St. Louis, USA	140Ci/mmol in Ethanol:Wasser (2:98)

Tab. 2.2: Laborgeräte

Gerät	Modell	Herstellerfirma
Zentrifugen	Avanti J-17 5415 R	Beckman-Coulter, Palo-Alto, USA Eppendorf AG, Hamburg, D
Rotationsverdampfer	Rotavapor R114, B-480	Büchi Labortechnik, Flawil, CH
HPLC-System	HP 1100 mit VWD oder DAD	Agilent Technologies, Palo-Alto, USA
	L-4250 UV-Vis Detector, L-6200A Intelligent Pump, D-2500 Chromato-Integrator	Merck Hitachi, Darmstadt, D
Radioaktivitätsdetektor	Tri-Carb 2300 TR Liquid Scintillation Analyzer	Perkin Elmer, Waltham, USA
pH-Meter	pH330	WTW, Weilheim, D
Waagen	SBC22, SPB52	Scaltec Instr., Göttingen, D

Wasseraufbereitung	RIOs 16, Milli-Q-synthesis	Millipore, Billerica, USA
Autoklav	Varioklav®	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, D
Sterilbank	HeraSafe	Kendro GmbH, Langenselbold, D
Inkubations- schüttelschrank	Certomat® BS-1	Braun Biotech GmbH, Melsungen, D
Schüttler	TR-250 KM-2	Infors AG, Bottmingen, D Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
Vakuumkonzentrator	Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, D
Vakuumcentrifuge	HT-4X	GeneVac Ltd, Ipswich, UK
Infrarotspektroskop	Bruker Irscope II, EQUINOX 55 und GC 86.10	Bruker Optik GmbH, Ettlingen, D
Spektropolarimeter	J-810	Jasco, Gross-Umstadt, D
Polarimeter	Jaso-P1030	Jasco, Gross-Umstadt, D

5.2 Synthesen

5.2.1 Synthese von L-DOPA ^[70-82]

5.2.1.1 3-(3,4-Methylenedioxyphenyl)acrylsäure (30)

Malonsäure (0.831 g; 8 mmol) wird in 20 ml Pyridin gelöst und nach Abklingen der schwach exothermen Reaktion (Knoevenagel) mit Piperonal (0.8 g; 5.3 mmol) und Piperidin (0.1 ml; 1 mmol) versetzt. Dann wird ca. 8 h unter Rückfluss erhitzt bis keine CO₂-Entwicklung mehr zu sehen ist. Anschließend wird auf Eis/konz. Salzsäure gegossen und die abgeschiedene Säure durch Zentrifugieren und mehrmaliges Waschen mit kaltem Wasser erhalten. Getrocknet wird im Vakuum. M = 192; Ausbeute 1.0 g (98%). IR (KBr-Pressling, cm⁻¹): 2920, 2716, 2606, 1695, 1626, 1604, 1494, 1449, 1320, 1250, 1218, 1102, 1038, 982, 927, 750; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 5.99 (s, 2H; H-7'), 6.31 (d, J = 15.9 Hz, 1H; H-2), 6.84 (d, J = 8 Hz, 1H; H-3'), 7.06 (dd, J = 8.0, 1.8 Hz, 1H; H-2'), 7.14 (d, J = 1.8 Hz, 1H; H-6'), 7.58 (d, J = 15.9 Hz, 1H; H-3); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 103.2 (C-7'), 107.5 (C-6'), 109.5 (C-3'), 116.9 (C-2), 125.8 (C-2'), 130.3 (C-1'), 145.9 (C-3); 150.0 (C-4'), 151.3 (C-5'), 169.0 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 192 [M⁺] (100), 175 (78), 145 (18), 117 (7), 89 (12), 77 (5).

5.2.1.2 $[2-^{13}\text{C}]3-(3,4\text{-Methylendioxyphenyl})\text{acrylsäure (31)}$

Ansatz: Aus $[2-^{13}\text{C}]$ Malonsäure (0.831 g; 7.9 mmol), Piperonal (0.82 g; 5.5 mmol) und Piperidin (0.1 ml) in Pyridin (20 ml). Durchführung: Wie **30**. M = 193.04; Ausbeute 0.9 g (90 %). IR (KBr-Pressling, cm^{-1}): 2914, 2712, 2604, 1692, 1597, 1494, 1449, 1318, 1251, 1218, 1102, 1039, 982, 928, 736; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 6.00 (s, 2H; H-7'), 6.31 (d, $^3J_{\text{H-2-H-3}} = 15.9$ Hz, $^1J_{\text{H-2-C-2}} = 160.9$ Hz, 1H; H-2), 6.84 (d, $J = 8$ Hz, 1H; H-3'), 7.07 (dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, 1H; H-2'), 7.15 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H; H-6'), 7.58 (dd, $^2J_{\text{H-3-C-2}} = 3.0$ Hz, $^3J_{\text{H-2-H-3}} = 15.9$ Hz, 1H; H-3); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 103.2 (C-7'), 107.5 (C-6'), 109.5 (C-3'), 117.3 (^{13}C -2), 125.8 (C-2'), 130.5 (C-1'), 146.0 (C-3); 146.6 (C-4'), 151.3 (C-5'), 169.0 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 193 [M^+] (100), 176 (60), 146 (15), 135 (3), 118 (8), 90 (12), 77 (3).

5.2.1.3 $3-(3,4\text{-Methylendioxyphenyl})\text{acrylsäureethylester (32)}$

$3-(3,4\text{-Methylendioxyphenyl})\text{acrylsäure } \mathbf{30}$ (0.92 g; 4.8 mmol) wird in 25 ml Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 2.5 ml konz. HCl wird 6 h unter Rückfluss erhitzt. Danach wird auf Eis/Ammoniak gegossen. Der ausgefallene weiße Niederschlag wird zentrifugiert und mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen. Getrocknet wird im Vakuum. M = 220.04; Ausbeute 0.9 g (86%). IR (KBr-Pressling, cm^{-1}): 3054, 3034, 2989, 2904, 2787, 1703, 1641, 1611, 1491, 1440, 1392, 1357, 1282, 1244, 1193, 1119, 1098, 929, 713; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-5), 4.22 (dd, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-4), 5.99 (s, 2H; H-7'), 6.31 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H; H-2), 6.84 (d, $J = 8$ Hz, 1H; H-3'), 7.06 (dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, 1H; H-2'), 7.14 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H; H-6'), 7.58 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H; H-3); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 14.8 (C-5), 61.5 (C-4), 103.2 (C-7'), 107.5 (C-6'), 109.5 (C-3'), 116.9 (C-2), 125.8 (C-2'), 130.3 (C-1'), 145.9 (C-3); 150.0, 151.3, 169.0 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 220 [M^+] (100), 192 (15), 175 (78), 148 (32), 117 (15), 89 (22).

5.2.1.4 $[2-^{13}\text{C}]3-(3,4\text{-Methylendioxyphenyl})\text{acrylsäureethylester (33)}$

Ansatz: Aus **31** (0.85 g; 4.4 mmol), HCl (2.0 ml) in Ethanol (15 ml). Durchführung: Wie **32**. M = 221; Ausbeute 0.8 g (82%). IR (KBr-Pressling, cm^{-1}): 3072, 2836, 2675, 2558, 1789, 1688, 1602, 1582, 1496, 1454, 1327, 1293, 1179, 1128, 1100, 935, 707; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-5), 4.22 (dd, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-4), 5.99 (s, 2H; H-7'), 6.31 (d, $^3J_{\text{H-2-H-3}} = 15.9$ Hz, $^1J_{\text{H-2-C-2}} = 161.8$ Hz, 1H; H-2), 6.84 (d, $J = 8$ Hz, 1H; H-3'), 7.07 (dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, 1H; H-2'), 7.14 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H; H-6'), 7.58 (dd, $^2J_{\text{H-3-C-2}} = 3.0$ Hz, $^3J_{\text{H-2-H-3}} = 15.9$ Hz, 1H; H-3); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 14.7 (C-5), 61.5 (C-4), 103.1 (C-7'), 107.5 (C-6'), 109.5 (C-3'), 116.9 (^{13}C -2), 125.8 (C-2'), 130.2 (C-1'), 145.7 (C-3); 150.0, 151.3,

169.0 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 221 [M^+] (4), 193 (4), 176 (3), 149 (6), 122 (83), 105 (100), 77 (70).

5.2.1.5 2,3-Dihydroxy-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionsäureethylester (**34**)

K_3FeCN_6 (3.58 g; 10.9 mmol), K_2CO_3 (1.5 g; 10.9 mmol), $(DHQ)_2$ -PHAL (56 mg, 0.072 mmol), $MeSO_2NH_2$ (342 mg, 3.6 mmol) und t -BuOH– H_2O (1:1, 40 ml) werden 5 min bei 25 °C gerührt. Anschließend wird auf 0 °C gekühlt und eine Lösung von OsO_4 (74 μ l, 0.036 mmol) hinzugegeben, gefolgt von **32** (0.8 g; 3.6 mmol). Dann wird 24 h bei 25 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Natriumsulfit (4 g) beendet und mit Ethylacetat (3 x 30 ml) extrahiert. Die organische Phase wird mit sat.NaCl (25 ml) gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (*Kieselgel* 60 F254) unter Verwendung von EtOAc– n -Hexan (1:1) gereinigt. $M = 254$; Ausbeute 0.75 g (81%). $[\alpha]_D^{20} = + 0,8$; IR (CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 3454, 2991, 2901, 2780, 1702, 1613, 1494, 1448, 1243, 1156, 1131, 1056, 930, 764; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 1.28 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-5), 4.26 (dd, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-4), 4.17 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-2), 4.82 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 5.96 (s, 2H; H-7'), 6.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H; H-3'), 6.85 (dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 1H; H-2'), 6.94 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H; H-6'); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 14.8 (C-5), 62.3 (C-4), 76.1 (C-2), 77.2 (C-3), 102.3 (C-7'), 108.4 (C-6'), 108.7 (C-3'), 121.3 (C-2'), 136.4 (C-1'), 148.6, 149.1, 173.9 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 254 [M^+] (30), 220 (3), 164 (13), 163 (18), 152 (33), 151 (100), 135 (22), 123 (17), 121 (12), 104 (16), 93 (80), 76 (29), 65 (57).

5.2.1.6 [$2-^{13}C$]2,3-Dihydroxy-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionsäureethylester (**35**)

Ansatz: Aus **33** (0.7 g; 3.2 mmol), K_3FeCN_6 (3.13 g; 9.5 mmol), K_2CO_3 (1.3 g; 9.5 mmol), $(DHQ)_2$ -PHAL (49 mg, 0.063 mmol), $MeSO_2NH_2$ (299 mg, 3.1 mmol) und OsO_4 (64.4 μ l, 0.031 mmol) in t -BuOH– H_2O (1:1, 32 ml). Durchführung: Wie **34**. $M = 255$; Ausbeute 0.68 g (84%). $[\alpha]_D^{20} = + 1,0$; IR (CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 3521, 3382, 2997, 2959, 2903, 2780, 1715, 1603, 1487, 1447, 1247, 1088, 1042, 925, 765; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 1.18 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, H-5), 4.27 (dd, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-4), 4.29 (d, $^3J_{H-2-H-3} = 3.0$ Hz, $^1J_{H-2-C-2} = 149.5$ Hz, 1H, H-2), 4.90 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, H-3), 5.91 (s, 2H; H-7'), 6.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H; H-3'), 6.85 (dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, 1H; H-2'), 6.95 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H; H-6'); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 14.4 (C-5), 62.3 (C-4), 74.7 (^{13}C -2), 77.2 (C-3), 101.3 (C-7'), 107.2 (C-6'), 108.2 (C-3'), 119.8 (C-2'), 134.0 (C-1'), 147.4, 147.8, 172.9 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 255 [M^+] (20), 165 (11), 163 (18), 152 (37), 151 (100), 123 (20), 105 (18), 93 (82), 77 (33), 65 (47).

5.2.1.7 *Ethyl-4-carbethoxy-5-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1,3,2-dioxathiolan-2-oxid (36)*

Verbindung **34** (0.7 g; 2.8 mmol) wird in CH₂Cl₂ (25 ml) gelöst und bei 0 °C mit Triethylamin (1.2 ml; 8.7 mmol) versetzt. Anschließend wird frisch destilliertes SOCl₂ (298.7 µl; 4.1 mmol) langsam zugetropft und 45 min bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wird (nach Kontrolle durch DC) durch Zugabe von ca. 15 ml kaltem Wasser abgebrochen und mit Ether extrahiert. Die Etherphase wird mit 10% HCl, gesättigter Natriumbicarbonatlösung und sat.NaCl ausgeschüttelt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und anschließend bis zur Trockne eingengt. Reinigung des Rohproduktes erfolgt mittels Säulenchromatographie (*Kieselgel* 60 F254), mit EtOAc-*n*-Hexan (1:9). M = 300; Ausbeute 0.65 g (78%). IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 2981, 1738, 1489, 1444, 1250, 1100, 1037, 931 625; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 1.24-1.27 (m, *J* = 7.2 Hz, 3H, H-5), 4.22-4.31 (m, 2H, H-4), 4.99 und 6.01 (d, *J* = 7.7 Hz jedes, 1H, H-3), 5.23 und 5.60 (d, *J* = 8.1 Hz jedes, 1H, H-2), 5.98-6.00 (2s, 2H; H-7'), 6.84 (d, *J* = 8 Hz, 1H; H-3'), 6.99 (dd, *J* = 8.0, 1.9 Hz, 1H; H-2'), 7.05 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H; H-6'); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 14.3 (C-5), 63.5 und 63.7 (C-4), 76.1 (C-2), 77.2 (C-3), 102.3 (C-7'), 108.4 (C-6'), 108.7 (C-3'), 121.3 (C-2'), 136.4 (C-1'), 148.6, 149.1, 173.9 (C-1); EIMS *m/z* (rel. Int.): 295 (15), 236 (35), 220 (20), 179 (12), 164 (25), 163 (60), 149 (35), 135 (100), 134 (25), 125 (27), 123 (17), 89 (16) 77 (18), 64 (62).

5.2.1.8 *[2-¹³C]Ethyl-4-carbethoxy-5-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1,3,2-dioxa-thiolan-2-oxid (37)*

Ansatz: Aus **35** (0.6 g; 2.4 mmol), Triethylamin (1 ml; 7.3 mmol) und frisch destilliertem SOCl₂ (256.1 µl; 3.5 mmol) in CH₂Cl₂ (25 ml). Durchführung: Wie **36**. M = 301; Ausbeute 610 mg (86%). IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 2985, 1760, 1503, 1450, 1254, 1104, 1038, 935, 666; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 1.28-1.34 (m, *J* = 7.2 Hz, 3H, H-5), 4.25- 4.35 (m, 2H, H-4), 4.75 (d, ³*J*_{H-2-H-3} = 7.6 Hz, ¹*J*_{H-2-C-2} = 158.2 Hz, 1H, H-2), 5.14 (d, ³*J*_{H-2-H-3} = 8.5 Hz, ¹*J*_{H-2-C-2} = 158.2 Hz, 1H, H-2), 5.48 (d, ³*J*_{H-3-H-2} = 8.5 Hz, ²*J*_{H-3-C-2} = 2.7 Hz, 1H, H-3), 6.00-6.01 (2s, 2H; H-7'), 6.05 (d, ³*J*_{H-3-H-2} = 7.6 Hz, ²*J*_{H-3-C-2} = 1.4 Hz, 1H, H-3), 6.83 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H; H-3'), 6.91 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H; H-2'), 7.04 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H; H-6'); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 14.3 (C-5), 63.5 und 63.7 (C-4), 76.1 (¹³C-2), 77.2 (C-3), 102.3 (C-7'), 108.4 (C-6'), 108.7 (C-3'), 121.3 (C-2'), 136.4 (C-1'), 148.6, 149.1, 173.9 (C-1); EIMS *m/z* (rel. Int.): 301 [M⁺] (10), 255 (5), 253 (25), 179 (100), 165 (20), 164 (19), 163 (33), 151 (15), 150 (41), 149 (53), 135 (55), 134 (25), 123 (12), 122 (11), 121 (22), 77 (16), 64 (43).

5.2.1.9 *3-Azido-2-hydroxy-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionsäureethylester (38)*

Zu einer Lösung von **36** (0.6 g; 2 mmol) in DMF (5 ml) wird unter Rühren NaN_3 (52 mg; 8 mmol) hinzugegeben. Dann wird 6 h bei 60 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion, kontrolliert durch DC, wird das Reaktionsgemisch in Wasser (20 ml) gegossen und mit Ether (3 x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit sat. NaCl gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und eingeengt bis zur Trockne. Der reine Azidoalkohol wird dann durch Säulenchromatographie (*Kieselgel* 60 F254) mit *n*-Hexan–EtOAc (7:3) erhalten. $M = 279$; Ausbeute 450 mg (78%). $[\alpha]_D^{20} = -64,23$; IR (CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 3480, 2985, 2906, 2108, 1738, 1610, 1490, 1446, 1251, 1099, 1039, 934, 625; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.24 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-5), 4.15–4.22 (m, $J = 1.9, 7.0$ Hz, 2H, H-4), 4.47 (dd, $J = 4.0, 6.4$ Hz, 1H, H-2), 4.78 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-3), 5.97 (1s, 2H; H-7'), 6.78 (s, 2H; H-3'), 6.90 (s, 1H; H-2'); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 14.5 (C-5), 62.7 (C-4), 67.3, 74.0 (C-2), 101.7 (C-7'), 108.6 (C-6'), 108.7 (C-3'), 122.2 (C-2'), 128.3 (C-1'), 148.4, 148.5, 171.7 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 279 [M^+] (10), 278 (58), 250 (15), 176 (20), 163 (22), 149 (100), 148 (88), 136 (25), 121 (28), 105 (8), 93 (11), 77 (9), 65 (19), 63 (13).

5.2.1.10 *[2- ^{13}C]3-Azido-2-hydroxy-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionsäure-ethylester (39)*

Ansatz: Aus **37** (0.6 g; 1.99 mmol), NaN_3 (52 mg; 8 mmol) in DMF (5 ml). Durchführung: Wie **38**. $M = 280$; Ausbeute 460 mg (82%). $[\alpha]_D^{20} = -64,4$; IR (CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 3480, 2985, 2905, 2108, 1738, 1610, 1490, 1446, 1251, 1095, 1039, 934, 625; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.24 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-5), 4.15–4.22 (m, $J = 1.9, 7.0$ Hz, 2H, H-4), 4.47 (br, $^1J_{\text{H-2-C-2}} = 151.1$ Hz 1H, H-2), 4.78 (d, $^2J_{\text{H-3-C-2}} = 3.0$ Hz, $^3J_{\text{H-3-H-2}} = 3.7$ Hz, 1H, H-3), 5.97 (1s, 2H; H-7'), 6.78 (s, 2H), 6.90 (s 1H; H-2'); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 14.4 (C-5), 62.3 (C-4), 66.9 (C-3), 73.6 (^{13}C -2), 101.4 (C-7'), 108.2 (C-6'), 108.3 (C-3'), 121.8 (C-2'), 128.1 (C-1'), 148.0, 148.1, 171.6 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 280 [M^+] (19), 267 (22), 237 (44), 221 (16), 207 (14), 149 (64), 135 (100), 121 (10), 105 (7), 77 (15).

5.2.1.11 *Ethyl-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)aziridin-2-carboxylat (40)*

Zu einer Lösung von **38** (0.4 g; 1.4 mmol) in Acetonitril (12 ml) wird PPh_3 (377 mg; 1.4 mmol) zugegeben. Anschließend wird 1 h bei 25 °C gerührt und dann 6 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion, kontrolliert durch DC, wird das Lösungsmittel bis zur Trockne eingeengt. Das reine Produkt wird mittels Säulenchromatografie (*Kieselgel* 60 F254) unter Verwendung von *n*-Hexan–EtOAc (8:2) erhalten. $M = 235$; Ausbeute 270 mg (79%).

$[\alpha]_D^{20} = + 123.8$; IR (CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 3285, 2983, 2904, 2781, 1723, 1609, 1501, 1448, 1372, 1244, 1208, 1038, 925, 805; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-5), 2.50 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-2), 3.18 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-3), 4.18- 4.30 (m, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-4), 5.93 (1s, 2H; H-7'), 6.72- 6.80 (m, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 14.7 (C-5), 39.7, 40.7, 62.2 (C-4), 101.5 (C-7'), 106.5 (C-6'), 108.6 (C-3'), 120.4 (C-2'), 132.3 (C-1'), 147.7, 148.3, 172.1 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 235 [M^+] (28), 206 (10), 163 (8), 149 (15), 148 (20), 135 (100), 105 (25), 77 (18).

5.2.1.12 $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Ethyl-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)aziridin-2-carboxylat (**41**)

Ansatz: Aus **39** (0.45 g; 1.6 mmol), PPh_3 (665 mg; 2.47 mmol) in Acetonitril (20 ml). Durchführung: Wie **40**. $M = 236$; Ausbeute 320 mg (84%). $[\alpha]_D^{20} = + 124.5$; IR (CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 3285, 2983, 2904, 2781, 1724, 1609, 1501, 1449, 1372, 1248, 1208, 1040, 925, 805; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-5), 2.50 (br, $^1J_{\text{H-2-C-2}} = 147.2$ Hz, 1H, H-2), 3.18 (br, 1H, H-3), 4.18- 4.30 (m, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-4), 5.93 (1s, 2H; H-7'), 6.72- 6.80 (m, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 14.7 (C-5), 39.7, 40.7, 62.2 (C-4), 101.5 (C-7'), 106.5 (C-6'), 108.6 (C-3'), 120.4 (C-2'), 132.3 (C-1'), 147.7, 148.3, 172.1 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 236 [M^+] (63), 221 (53), 207 (20), 190 (14), 163 (49), 162 (100), 149 (56), 135 (51), 105 (27), 77 (19).

5.2.1.13 2-Amino-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionsäureethylester (**42**)

Zu einer Lösung von **40** (200 mg, 0.85 mmol) in Methanol (10 ml) werden 10 % Pd/C (5 gew.%) und Ammoniumformiat (89 mg, 1.4 mmol) gegeben. Dann wird 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat eingengt. Der Rückstand wird gereinigt mittels Säulenchromatographie (*Kieselgel* 60 F254) mit EtOAc. Man erhält das Amin. $M = 237$; Ausbeute 136 mg (68%). $[\alpha]_D^{20} = + 4.5$, IR (CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 3369, 2981, 2905, 1731, 1606, 1491, 1445, 1247, 1039, 934, 747; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.26 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-5), 2.81 (dd, $J = 17.1, 9.6$ Hz, 1H, H-3), 3.00 (dd, $J = 17.1, 6.3$ Hz, 1H, H-3), 3.60 – 3.70 (br s, 1H, H-2), 4.12- 4.22 (m, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-4), 5.93 (1s, 2H; H-7'), 6.60- 6.86 (m, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 14.2 (C-5), 40.5 (C-3), 55.9 (C-2), 60.0 (C-4), 100.9 (C-7'), 108.2, 109.6, 122.3 (C-2'), 130.9 (C-1'), 146.5, 147.8, 175.0 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 237 [M^+] (17), 220 (12), 206 (5), 165 (40), 164 (30), 149 (12), 136 (38), 135 (100), 121 (5), 106 (15), 102 (14), 91 (4), 77 (24), 69 (12).

5.2.1.14 [2-¹³C]2-Amino-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionsäureethylester (**43**)

Ansatz: Aus **41** (310 mg, 1.5 mmol), 10 % Pd/C (5 gew.%) und Ammoniumformat (155 mg, 2.5 mmol) in Methanol (10 ml). Durchführung: Wie **42**. M = 238; Ausbeute 220 mg (70%). $[\alpha]_D^{20} = + 4.0$, IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3370, 2981, 2906, 1733, 1606, 1491, 1446, 1247, 1039, 934, 747; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 1.26 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-5), 2.81 (m, 1H, H-3), 3.00 (m, 1H, H-3), 3.60 – 3.70 (br s, ¹*J*_{H-2-C-2} = 140.9 Hz, 1H, H-2), 4.12- 4.22 (m, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-4), 5.93 (1s, 2H; H-7'), 6.60- 6.86 (m, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 14.2 (C-5), 40.5 (C-3), 55.9 (¹³C-2) 60.0 (C-4), 100.9 (C-7'), 108.2, 109.6, 122.3 (C-2'), 130.9 (C-1'), 146.5, 147.8, 175.0 (C-1); EIMS *m/z* (rel. Int.): 238 [M⁺] (6), 224 (4), 195 (3), 166 (18), 165 (100), 150 (18), 136 (38), 135 (86), 121 (3), 77 (13).

5.2.1.15 Dihydroxyphenylalanin (**44**)

Zum Amin **42** (0.13 g; 0.55 mmol) werden Phenol (153.4 mg; 1.6 mmol), Eisessig (93.6 ml; 1.6 mmol) und 6M HCl (5 ml) gegeben. Dann wird 35 h unter Rückfluss erwärmt und anschließend bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in EtOAc gelöst und mit Wasser extrahiert. Die vereinten wäßrigen Phasen werden mit 28 % Ammoniaklösung und ein wenig Natriumbisulfat auf pH 5 eingestellt und in Eis gekühlt, wobei DOPA als weiße Kristalle ausfällt. M = 197; Ausbeute 75 mg (70%). $[\alpha]_D^{20} = - 5.2$; IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3500, 3203, 2925, 2854, 2599, 1696, 1654, 1610, 1591, 1514, 1454, 1245, 985, 840; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 2.92 (dd, *J* = 9.8 Hz, 1H, H-3), 3.09 (dd, *J* = 6.4 Hz, 1H, H-3), 3.86 (dd, *J* = 6.4, 8.8 Hz, 1H, H-2), 6.66 (dd, *J* = 2.6, 10.0 Hz, 1H, H-2'), 6.75 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-6'), 6.83 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-3'); ¹³C NMR (125MHz, CD₃OD): δ 14.2 (C-5), 40.5 (C-3), 55.9 (C-2) 60.0 (C-4), 100.9 (C-7'), 108.2, 109.6, 122.3 (C-2'), 130.9 (C-1'), 146.5, 147.8, 175.0 (C-1); EIMS *m/z* (rel. Int.): 197 [M⁺] (5), 124 (15), 123 (100), 77 (9), 74 (5).

5.2.1.16 [2-¹³C]Dihydroxyphenylalanin (**45**)

Ansatz: Aus Amin **43** (0.21 g; 0.92 mmol), Phenol (259.6; 2.7 mmol), Eisessig (158.4 ml; 2.7 mmol) und 6M HCl (10 ml). Durchführung: Wie **44**. M = 198; Ausbeute 135 mg (77%). $[\alpha]_D^{20} = - 4.2$; IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3500, 3203, 2925, 2854, 2599, 1696, 1654, 1610, 1591, 1514, 1454, 1245, 985, 840; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 2.92 (ddd, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-3), 3.05 – 3.13 (m, 1H, H-3), 3.86 (dd, ³*J*_{H-2-H-3} = 7.8 Hz, ¹*J*_{H-2-C-2} = 146.0 Hz, 1H, H-2), 6.66 (dd, *J* = 2.2, 8.2 Hz, 1H, H-2'), 6.75 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-6'), 6.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-3'); ¹³C NMR (125MHz, CD₃OD): δ 14.2 (C-5), 40.5 (C-3), 55.9 (C-2) 60.0 (C-4), 100.9 (C-7'), 108.2, 109.6,

122.3 (C-2'), 130.9 (C-1'), 146.5, 147.8, 175.0 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 198 [M⁺] (5), 124 (15), 123 (100), 77 (9), 74 (5).

5.2.2 Herstellung von ringhydroxylierten α -Keto- β -phenylcarbonsäuren^[83–86]

5.2.2.1 *3-(4-Hydroxyphenyl)brenztraubensäure (46)*

Tyrosin (0.5 g; 2.8 mmol) und DMAP (16.7 mg) werden mit Trifluoressigsäureanhydrid (8.5 ml; 61.1 mmol) unter Argon 20 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abdestillieren des überschüssigen Trifluoressigsäureanhydrids wird der Rückstand mit 10 ml 1%iger HCl versetzt und 12 h bei 25 °C unter Argon gerührt. Anschließend wird über Nacht im Kühlschrank stengelassen und danach der weiße Niederschlag filtriert, zweimal mit wenig kaltem Wasser gewaschen und getrocknet über P₄O₁₀ im Vakuum. M = 180; Ausbeute 407 mg (82%). Im NMR-Spektrum ist nur die Enol-Form zu sehen. IR (Mikroskop, cm⁻¹): 3448, 3398, 1682, 1638, 1606, 1594, 1510, 1459, 1440, 1363, 1318, 1247, 1219, 872, 828, 670; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 6.52 (s, 1 H; H-3), 6.86 (d, J = 8.8 Hz, 2H; H-3', H-5'), 7.72 (d, J = 8.6 Hz, 2H; H-2', H-6'); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 111.7 (C-3), 116.2 (C-3', C-5'), 127.4 (C-1'), 132.3 (C-2', C-6'), 139.2 (C-2), 158.1 (C-4'), 167.4 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 180 [M⁺] (62), 134 (60), 107 (100), 77 (45).

5.2.2.2 *[2-¹³C]3-(4-Hydroxyphenyl)brenztraubensäure (47)*

Ansatz: Aus [2-¹³C]Tyrosin (0.3 g; 1.6 mmol), DMAP (9.9 mg) und Trifluoressigsäureanhydrid (4 ml; 28.8 mmol). Durchführung: Wie **46**. M = 181; Ausbeute 240 mg (81%). IR (Mikroskop, cm⁻¹): 3448, 3398, 1682, 1638, 1606, 1594, 1510, 1459, 1440, 1363, 1318, 1247, 1219, 872, 828, 670; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6.44 (d, ² J_{H-C} = 2.5 Hz, 1H; H-3), 6.75 (d, J = 8.8 Hz, 2H; H-3', H-5'), 7.63 (d, J = 8.8 Hz, 2H; H-2', H-6'); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 112.6 (C-3), 116.2 (C-3', C-5'), 128.0 (C-1'), 132.4 (C-2', C-6'), 140.1 (¹³C-2), 158.3 (C-4'), 169.1 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 181 [M⁺] (16), 135 (20), 107 (100), 77 (17).

5.2.2.3 *3-(3,4-Dihydroxyphenyl)brenztraubensäure (48)*

L-DOPA (0.5 g; 2.5 mmol) wird mit Trifluoressigsäureanhydrid (8.5 ml; 61.1 mmol) unter Argon 40 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abdestillieren des überschüssigen Trifluoressigsäureanhydrids wird der Rückstand mit 10 ml 1%iger HCl versetzt und 12 h bei 25 °C unter Argon gerührt. Anschließend wird über Nacht im Kühlschrank stengelassen und danach der weiße Niederschlag filtriert, zweimal mit wenig kaltem Wasser gewaschen

und getrocknet über P_4O_{10} im Vakuum. $M = 196$; Ausbeute 250 mg (51%). IR (Mikroskop, cm^{-1}): 3444, 3317, 1738, 1703, 1612, 1559, 1523, 1449, 1351, 1287, 1207, 1183, 1167, 1116, 885, 815, 674; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 6.39 (s, 1H; H-3), 6.73 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H; H-5'), 7.05 (dd, $J = 2.1, 8.3$ Hz, 1H; H-6'), 7.40 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H; H-2'); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 112.7 (C-3), 116.1 (C-2'), 117.9 (C-5'), 123.7 (C-6'), 128.5 (C-1'), 140.0 (C-2), 145.9 (C-4'), 146.5 (C-3'), 168.8 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 196 [M^+] (44), 150 (30), 123 (100), 77 (18).

5.2.3 Herstellung von ringhydroxylierten β -Phenylmilchsäuren^[87-89]

5.2.3.1 (*R*)-3-(4-Hydroxyphenyl)milchsäure (**49**)

Eine Lösung von **46** (0.2 g; 1.1 mmol) in THF (10 ml) wird mit Triethylamin (0.15 ml; 1.1 mmol) bei $-20^\circ C$ versetzt. Nach 5 min bei dieser Temperatur wird eine Lösung von (–)-DIP-Cl (0.415 g; 1.3 mmol) in THF hinzugegeben. Die Lösung wird bei Raumtemperatur für 8 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend mit 2 N Natronlauge (1.2 ml) und Wasser (0.6 ml) abgeschreckt. Die wässrige Phase wird mit tert-Butylmethylether (2 x) und die organische Phase mit Wasser (2 x) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit 2 N HCl auf pH 1 eingestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Einengen der organischen Phasen bis zur Trockne liefert das Produkt. $M = 182$; Ausbeute 148 mg (75%). $[\alpha]_D^{20} + 9,9^\circ$; IR (Mikroskop, cm^{-1}): 3470, 3238, 1738, 1599, 1509, 1449, 1366, 1238, 1185, 1107, 1082, 828, 779, 710; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 2.81 (dd, $J = 14.0, 7.7$ Hz, 1H; H-3), 2.99 (dd, $J = 14.0, 4.3$ Hz, 1H; H-3), 4.26 (dd, $J = 7.8, 4.3$ Hz, 1H; H-2), 6.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H; H-3', H-5'), 7.07 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H; H-2', H-6'); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 40.8 (C-3), 73.1 (C-2), 116.0 (C-3', C-5'), 129.6 (C-1'), 131.6 (C-2', C-6'), 157.1 (C-4'), 177.3 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 182 [M^+] (60), 137 (25), 107 (100), 77 (58)

5.2.3.2 [$2-^{13}C$](*R*)-3-(4-Hydroxyphenyl)milchsäure (**50**)

Ansatz: Aus **47** (0.1 g; 0.55 mmol) in THF (10 ml) mit Triethylamin (77 μ l; 0.55 mmol) und (–)-DIP-Cl (0.300 g; 0.94 mmol). Durchführung: Wie **49**. $M = 183$; Ausbeute 65 mg (65%). IR (Mikroskop, cm^{-1}): 3319, 1679, 1613, 1518, 1445, 1372, 1205, 1144, 1106, 1065, 825, 801, 724; 1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 2.80 (dd, $^3J_{H-2-H-3} = 7.8$ Hz, $^2J_{H-3-C-2} = 14.0$ Hz, 1H; H-3), 3.01 (dd, $^3J_{H-2-H-3} = 4.0$ Hz, $^2J_{H-3-C-2} = 14.0$ Hz, 1H; H-3), 4.26 (dd, $^3J_{H-2-H-3} = 7.8, 4.0$ Hz, $^1J_{H-2-C-2} = 145.5$ Hz, 1H; H-2) 6.70 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H; H-3', H-5'), 7.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H; H-2', H-6'); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 40.9 (C-3), 74.1 (^{13}C -2), 116.1 (C-3', C-5'), 129.9 (C-1'),

131.7 (C-2', C-6'), 157.1 (C-4'), 174.1 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 183 [M^+] (9), 107 (100), 77 (10).

5.2.3.3 (S)-3-(4-Hydroxyphenyl)milchsäure (51)

Ansatz: Aus **46** (0.125 g; 0.7 mmol) in THF (10 ml) mit Triethylamin (95 μ l; 0.7 mmol) und (+)-DIP-Cl (0.340 g; 1.1 mmol). Durchführung: Wie **49**. $M = 182$; Ausbeute 148 mg (70%). $[\alpha]_D^{20} - 9,3^\circ$; IR (Mikroskop, cm^{-1}): 3470, 3242, 3025, 2954, 2928, 1737, 1613, 1599, 1510 1448, 1354, 1237, 1184, 1105, 1066, 1015, 828, 779, 729; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 2.81 (dd, $J = 14.0, 7.7$ Hz, 1H; H-3), 2.99 (dd, $J = 14.0, 4.3$ Hz, 1H; H-3), 4.26 (dd, $J = 7.8, 4.3$ Hz, 1H; H-2), 6.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H; H-3', H-5'), 7.07 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H; H-2', H-6'); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 40.8 (C-3), 73.1 (C-2), 116.0 (C-3', C-5'), 129.6 (C-1'), 131.6 (C-2', C-6'), 157.1 (C-4'), 177.3 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 182 [M^+] (60), 137 (25), 107 (100), 77 (58).

5.2.3.4 [$2\text{-}^{13}\text{C}$](S)-3-(4-Hydroxyphenyl)milchsäure (52)

Ansatz: Aus **47** (70 mg; 0.39 mmol) in THF (10 ml) mit Triethylamin (41.6 μ l; 0.39 mmol) und (+)-DIP-Cl (0.170 g; 0.53 mmol). Durchführung: Wie **49**. $M = 183$; Ausbeute 45 mg (65%). IR (Mikroskop, cm^{-1}): 3470, 3242, 3025, 2954, 2928, 1737, 1613, 1599, 1510 1448, 1354, 1237, 1184, 1105, 1066, 1015, 828, 779, 729; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 2.80 (dd, $^3J_{\text{H-2-H-3}} = 7.8$ Hz, $^2J_{\text{H-3-C-2}} = 14.0$ Hz, 1H; H-3), 3.01 (dd, $^3J_{\text{H-2-H-3}} = 4.0$ Hz, $^2J_{\text{H-3-C-2}} = 14.0$ Hz, 1H; H-3), 4.26 (dd, $^3J_{\text{H-2-H-3}} = 7.8, 4.0$ Hz, $^1J_{\text{H-2-C-2}} = 145.5$ Hz, 1H; H-2) 6.70 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H; H-3', H-5'), 7.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H; H-2', H-6'); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 39.7 (C-3), 71.8 (^{13}C -2), 114.7 (C-3', C-5'), 128.3 (C-1'), 130.3 (C-2', C-6'), 155.8 (C-4'), 174.9 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 183 [M^+] (13), 107 (100), 77 (5).

5.2.3.5 (R)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)milchsäure (53)

Ansatz: Aus **48** (0.120 g; 0.6 mmol) in THF (10 ml) mit Triethylamin (91 μ l; 0.6 mmol) und (-)-DIP-Cl (0.330 g; 1.0 mmol). Durchführung: Wie **49**. $M = 198$; Ausbeute 78 mg (65%). IR (Mikroskop, cm^{-1}): 3380 (OH), 1735 (C=O); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 2.7 (dd, $J = 14.1, 8.1$ Hz, 1H; H-3), 3.0 (dd, $J = 13.9, 3.5$ Hz, 1H; H-3), 4.12 (dd, $J = 14.3, 7.2$ Hz, 1H; H-2), 6.62 (d, $J = 1.9, 8.0$ Hz, 1H; H-6'), 6.70 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1H; H-5'), 6.75 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H; H-2'); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 42.2 (C-3), 74.9 (C-2), 116.7 (C-2'), 118.2 (C-5'), 122.8 (C-6'), 132.2 (C-1'), 144.9 (C-4'), 146.0 (C-3'), 173.8 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 198 [M^+] (14), 123 (100), 77 (12)

5.2.3.6 (S)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)milchsäure (54)

Ansatz: Aus **48** (0.120 g; 0.6 mmol), Triethylamin (91 μ l; 0.6 mmol) und (+)-DIP-Cl (0.330 g; 1.0 mmol) in THF (10 ml). Durchführung: Wie **49**. M = 198; Ausbeute 90 mg (75%). IR (Mikroskop, cm^{-1}): 3380 (OH), 1735 (C=O); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 2.7 (dd, $J = 14.1, 8.1$ Hz, 1H; H-3), 3.0 (dd, $J = 13.9, 3.5$ Hz, 1H; H-3), 4.12 (dd, $J = 14.3, 7.2$ Hz, 1H; H-2), 6.62 (dd, $J = 1.9, 8.0$ Hz, 1H; H-6'), 6.70 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H; H-5'), 6.75 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H; H-2'); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 42.2 (C-3), 74.9 (C-2), 116.7 (C-2'), 118.2 (C-5'), 122.8 (C-6'), 132.2 (C-1'), 144.9 (C-4'), 146.0 (C-3'), 173.8 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 198 [M^+] (14), 123 (100), 77 (12).

5.2.4 Herstellung von *p*-Cumarsäure und [$2\text{-}^{13}\text{C}$]*p*-Cumarsäure^[71]

5.2.4.1 *p*-Cumarsäure (55)

Malonsäure (5.0 g; 48 mmol) wird in Pyridin (7.2 ml) gelöst und nach Abklingen der schwach exothermen Reaktion (Knoevenagel) mit 4-Hydroxybenzaldehyd (4.89 g; 40 mmol) und Piperidin (0.4 ml) versetzt. Dann wird unter Rückfluss bis zum Aufhören der Kohlendioxidentwicklung erwärmt. Nach dem Abkühlen wird auf Eis/ konz. Salzsäure gegossen. Die abgeschiedene Cumarsäure wird durch zentrifugieren und waschen mit wenig kaltem Wasser erhalten. M = 164; Ausbeute 4.92 g (75%). IR (KBr, cm^{-1}): 3377, 3025, 2826, 2578, 1672, 1628, 1602, 1511, 1449, 1378, 1244, 1215, 979, 939, 834; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 6.35 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H-2), 6.90 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.55 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-3', H-5') 7.62 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H-3); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 115.8 (C-2), 116.7 (C-3', C-5'), 127.2 (C-1'), 130.9 (C-2', C-6'), 145.6 (C-3), 160.6 (C-4'), 168.3 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 165 (40), 164 (100), 163 (70), 147 (82), 119 (59), 118 (51), 107 (17), 91(42), 65 (33).

5.2.4.2 [$2\text{-}^{13}\text{C}$]*p*-Cumarsäure (56)

Ansatz: Aus [$2\text{-}^{13}\text{C}$]Malonsäure (115 mg, 1.1 mmol), 4-Hydroxybenzaldehyd (126.7 mg; 1.0 mmol) und Piperidin (20 μ l) in Pyridin (2 ml). Durchführung: Wie **55**. M = 165; Ausbeute 117 mg (71%). IR (KBr, cm^{-1}): 3384, 2958, 2936, 2599, 1670, 1598, 1512, 1448, 1325, 1245, 1215, 979, 934, 831; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 6.33 (d, $^3J_{\text{H-2-H-3}} = 15.9$ Hz, $^1J_{\text{H-2-C-2}} = 160.8$ Hz, 1H, H-2), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H; H-2', H-6'), 7.55 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H; H-3', H-5'), 7.61 (d, $^2J_{\text{H-3-C-2}} = 3.0$, $^3J_{\text{H-2-H-3}} = 15.9$ Hz, 1H; H-3); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 115.8 ($^{13}\text{C-2}$), 116.7 (C-3', C-5'), 127.2 (C-1'), 130.9 (C-2', C-6'), 145.6 (C-3), 160.6 (C-4'), 168.3 (C-

1); EIMS m/z (rel. Int.): 165 (100), 164 (31), 148 (41), 120 (23), 119 (17), 107 (6), 92 (15), 65 (8).

5.2.5 Herstellung von Diarylheptanoiden^[71, 92, 93–96]

5.2.5.1 [2-¹³C]Zimtsäure (57)

[2-¹³C]Malonsäure (0.5 g; 4.8 mmol) wird in Pyridin (4 ml) gelöst und nach Abklingen der schwach exothermen Reaktion (Knoevenagel) mit Benzaldehyd (0.45 g; 4.5 mmol) und Piperidin (0.09 ml) versetzt. Dann wird unter Rückfluss bis zum Aufhören der Kohlendioxidentwicklung erwärmt. Nach dem Abkühlen wird auf Eis/ konz. Salzsäure gegossen. Die abgeschiedene Zimtsäure wird durch zentrifugieren und waschen mit wenig kaltem Wasser erhalten. $M = 149.05$; Ausbeute 0.55 g (77%). IR (KBr, cm^{-1}): 3066, 3028, 1674, 1610, 1575, 1449, 1285, 1025, 934, 769; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 6.35 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H-2), 6.90 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.55 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-3', H-5') 7.62 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H-3); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 115.8 (C-2), 116.7 (C-3', C-5'), 127.2 (C-1'), 130.9 (C-2', C-6'), 145.6 (C-3), 160.6 (C-4'), 168.3 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 149 (90), 132 (25), 104 (45), 77 (22).

5.2.5.2 [2-¹³C]Zimtaldehyd (58)

Zu einer Lösung von DMF (0.15 ml, 2 mmol) in Dichlormethan (3 ml) wird Oxalylchlorid gegeben bei 0 °C. Nachdem die Lösung für 1 h gerührt wurde, wird bis zur Trockne eingengt. Das verbliebene weiße Pulver wird in Acetonitril (3ml) und THF (5ml) gelöst und mit **57** (0.29 g, 2mmol), sowie Pyridin (0.16 ml, 2mmol) in THF (3ml) bei -30 °C versetzt. Dann wird 1 h bei -30 °C gerührt. Anschließend wird eine Suspension von 10 mol% Kupfer(I)iodid (38 mg) in THF und eine Lösung von LiAlH(OBu^t)₃ (2.6 ml einer 1.54 M THF-Lösung, 4 mmol) bei -78 °C hinzugegeben. Nach Rühren für 10 min wird die Reaktion durch Zugabe wässrigen 2N HCl-Lösung abgebrochen. Die organische Phase wird mit Ether extrahiert, mit einer wässrigen NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Gereinigt wird mittels Säulenchromatographie (*Kieselgel* 60 F254, *n*-Hexan–EtOAc = 1:1). $M = 133.05$, Ausbeute 0.19 g (73%). IR (KBr, cm^{-1}): 3062, 3029, 2992, 2814, 1727, 1605, 1450, 1328, 1178, 1029, 606, 583; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 6.35 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H-2), 6.90 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.55 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-3', H-5') 7.62 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H-3); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 115.8 (C-2), 116.7 (C-3', C-5'), 127.2 (C-1'), 130.9 (C-2', C-6'), 145.6 (C-3), 160.6 (C-4'), 168.3 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 133 (90), 104 (50), 77 (30).

5.2.5.3 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäuremethylester (**59**)

Zu einer Lösung von 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure (0.350 g, 2.10 mmol) in Methanol (10 ml) werden Acetylchlorid (0.014 ml, 0.19 mmol) hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 12 h gerührt. Anschließend wird bis zur Trockne eingeeengt und man erhält **59**. M = 180.18; Ausbeute 378 mg (99%). IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3403, 2953, 1713, 830; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 2.55 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H-2), 2.80 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H-3), 3.60 (s, 3H), 6.74 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 8.6 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 30.1 (C-3), 36.0 (C-2), 51.7 (OCH₃), 115.3 (C-3' und C-5'), 129.4 (C-2' und C-6'), 130.2 (C-1'), 154.4 (C-4'), 174.1 (C-1), EIMS *m/z* (rel. Int.): 180 (25), 149 (5), 120 (32), 107 (100).

5.2.5.4 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäuremethylester (**60**)

Zu einer Lösung von Hydrokaffesäure (1.8 g, 10.0 mmol) in Methanol (30 ml) werden Acetylchlorid (0.070 ml, 1.0 mmol) hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 12 h gerührt. Anschließend wird bis zur Trockne eingeeengt und man erhält **60**. M = 196.18; Ausbeute 1.92 g (99%). IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3403, 2953, 1713, 830; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 2.54 (t, J = 7.7 Hz, 2H, H-2), 2.75 (t, J = 7.7 Hz, 2H, H-3), 3.62 (s, 3H), 6.50 (dd, J = 2.2, 8.0 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 8.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100MHz, CD₃OD): δ 30.4 (C-3), 36.0 (C-2), 51.0 (OCH₃), 115.4 (C-2'), 115.4 (C-5'), 119.5 (C-6'), 132.6 (C-1'), 143.7 (C-4'), 145.3 (C-3'), 174.4 (COOCH₃), EIMS *m/z* (rel. Int.): 196 (20), 165 (6), 137 (15), 123 (100).

5.2.5.5 3-[4-(1-Ethoxyethoxy)-phenyl]propionsäuremethylester (**61**)

Der Ester **59** (0.370 g, 2.1 mmol) wird in einer Mischung aus Diethylether (5 ml) und Ethylvinylether (4.4 ml) gelöst, mit Pyridinium-4-toluolsulfonat (0.0625 g, 0.25 mmol) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird dann mit *n*-Hexan verdünnt, vom Katalysator abgetrennt, mit Wasser und sat.NaCl gewaschen und nach dem Trocknen über Na₂SO₄ bis zur Trockne eingeeengt. Gereinigt wird mittels Säulenchromatographie (*Kieselgel* 60 F254) mit CH₂Cl₂ und man erhält ein leicht gelbes Öl. M = 252.14, Ausbeute 470 mg (90%). IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 2925, 2854, 1732, 1604, 1460, 1377, 1271, 810; ¹H NMR (400 MHz, Aceton-*d*₆): δ 1.13 (t, J = 7.0 Hz, m, CH₃CH₂, 3H), 1.40 (d, J = 5.3 Hz, m, CH₃CH, 3H), 2.58 (t, J = 7.7 Hz, 2H, H-2), 2.84 (t, J = 7.7 Hz, 2H, H-3), 3.51 (m, CH₃CH₂, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.72 (m, CH₃CH₂, 1H), 5.38 (q, J = 5.3 Hz, CH₃CH, 1H), 6.92 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.14 (d, J = 8.7 Hz, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, Aceton-*d*₆): δ 15.3 (CH₃CH₂), 20.7 (CH₃-CH), 30.9 (C-3), 36.0 (C-2), 51.6 (OCH₃), 62.5 (CH₃CH₂), 101.7 (CH₃-CH), 120.7 (C-3' und C-5'), 128.7 (C-2' und C-6'), 136.2 (C-1'), 147.1 (C-4'), 172.8 (C-1), EIMS *m/z* (rel. Int.): 340 (10), 268 (30), 196 (95), 123 (45)., EIMS *m/z* (rel. Int.): 252 (4), 196 (25), 136 (40), 123 (100).

5.2.5.6 3-[3,4-bis-(1-Ethoxyethoxy)-phenyl]propionsäuremethylester (**62**)

Der Ester **60** (1.8 g, 9.2 mmol) wird in einer Mischung aus Diethylether (15 ml) und Ethylvinylether (14.4 ml) gelöst, mit Pyridinium-4-toluolsulfonat (0.25 g, 1.0 mmol) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird dann mit *n*-Hexan verdünnt, vom Katalysator abgetrennt, mit Wasser und sat.NaCl gewaschen und nach dem Trocknen über Na₂SO₄ bis zur Trockne eingengt. Gereinigt wird mittels Säulenchromatographie (*Kieselgel* 60 F254) mit CH₂Cl₂ und man erhält ein leicht gelbes Öl. M = 340.19, Ausbeute 2.5 g (80%). IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 2925, 2854, 1732, 1604, 1460, 1377, 1271, 810; ¹H NMR (500 MHz, Aceton-*d*₆): δ 1.15 (m, CH₃CH₂, 6H), 1.42 (m, CH₃CH, 6H), 2.59 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-2), 2.84 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-3), 3.55 (m, CH₃CH₂, 2H), 3.62 (s, 3H), 3.79 (m, CH₃CH₂, 2H), 5.33 (dq, *J* = 5.3 Hz, CH₃CH, 1H), 6.81 (dd, *J* = 1.9, 8.2 Hz, 1H, H-6'), 6.87- 6.97 (m, *J* = 1.9, 8.2 Hz, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, Aceton-*d*₆): δ 15.5/15.6 (CH₃CH₂), 20.90/20.94/20.95/20.98 (CH₃-CH), 31.0 (C-3), 36.2 (C-2), 51.6 (OCH₃), 62.43/62.46/62.54/62.58 (CH₃CH₂), 101.67/101.75/101.82 (CH₃-CH), 120.47/120.49 und 120.57/120.62 (C-2' und C-5'), 123.16/123.20 (C-6'), 136.35/136.40 (C-1'), 147.21/147.28 (C-4'), 148.89/148.95 (C-3'), 173.43 (C-1), EIMS *m/z* (rel. Int.): 340 (10), 268 (30), 196 (95), 123 (45).

5.2.5.7 4-[4-(1-Ethoxyethoxy)-phenyl]-2-oxobutylphosphonsäuredimethylester (**63**)

Zu einer Lösung von Dimethylmethylphosponat (0.43 ml, 0.40 mmol) in THF (15ml) wird bei -78 °C eine 1.6 N MeLi-Lösung in Ether (2.46 ml, 3.4 mmol) zugetropft und anschließend für 1 h bei -78 °C gerührt. Dann wird der Ester **61** (0.5 g, 2 mmol) in THF (10 ml) bei -78 °C hinzugetropft. Nach dieser Zugabe wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 3 h gerührt. Danach wird die Reaktion mit gesättigter NH₄Cl gestoppt und mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird mit sat.NaCl gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Gereinigt wird mittels Säulenchromatographie (*Kieselgel* 60 F254) unter Verwendung von CHCl₃ als Eluent und man erhält **63**. M = 344.14, Ausbeute 510 mg (75%). IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3241, 2956, 2854, 1715, 1614, 1517, 1447, 1366, 1222, 1032, 822; ¹H NMR (400 MHz, Aceton-*d*₆): δ 1.13 (t, *J* = 7.0 Hz, m, CH₃CH₂, 3H), 1.40 (d, *J* = 5.3 Hz, m, CH₃CH, 3H), 2.76 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-4), 2.96 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-3), 3.18 (d, ²*J*_{H-P} = 22.5 Hz, 2H, H-1), 3.51 (m, CH₃CH₂, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.74 (m, CH₃CH₂, 1H), 5.38 (q, *J* = 5.3 Hz, CH₃CH, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H); ¹³C NMR (100MHz, Aceton-*d*₆): δ 15.6 (CH₃CH₂), 20.7 (CH₃CH), 29.2 (C-4), 41.7 (d, ¹*J*_{C-P} = 126.4 Hz, C-1), 46.0 (C-3), 53.0 (OCH₃), 53.1 (OCH₃), 61.8 (CH₃CH₂), 100.3 (CH₃CH), 118.3 (C-3' und C-5'), 130.1 (C-2' und C-6'), 135.2 (C-1'), 156.5 (C-4'), 201.66 (d, ²*J*_{C-P} = 6.0 Hz, C-2); EIMS *m/z* (rel. Int.): 271 (100), 162 (86), 107 (52).

5.2.5.8 4-[3,4-bis-(1-Ethoxyethoxy)-phenyl]-2-oxobutylphosphonsäure-dimethylester (64)

Zu einer Lösung von Dimethylmethylphosponat (0.43 ml, 0.40 mmol) in THF (15ml) wird bei -78 °C eine 1.6 N MeLi-Lösung in Ether (2.46 ml, 3.4 mmol) zugetropft und anschließend für 1 h bei -78 °C gerührt. Dann wird der Ester **62** (0.5 g, 1.5 mmol) in THF (10 ml) bei -78 °C hinzugetropft. Nach dieser Zugabe wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 3 h gerührt. Danach wird die Reaktion mit gesättigter NH₄Cl gestoppt und mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird mit sat.NaCl gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Gereinigt wird mittels Säulenchromatographie (*Kieselgel* 60 F254) unter Verwendung von CHCl₃ als Eluent und man erhält **64**. M = 432.19, Ausbeute 500 mg (78%). IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3355, 2920, 2851, 1711, 1606, 1520, 1444, 1363, 1282, 998, 813; ¹H NMR (500 MHz, Aceton-d₆): δ 1.14 (m, CH₃CH₂, 6H), 1.42 (m, CH₃CH, 6H), 2.79 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H-4), 2.97 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H-3), 3.18 (d, ²J_{H-P} = 22.5 Hz, 2H, H-1), 3.55 (m, CH₃CH₂, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.79 (m, CH₃CH₂, 2H), 5.33 (q, J = 5.3 Hz, CH₃CH, 1H), 5.39 (dq, J = 1.4, 5.3 Hz, CH₃CH, 1H), 6.81 (dd, J = 1.8, 8.2 Hz, 1H, H-6'), 6.98- 6.99 (m, J = 1.8, 8.2 Hz, 2H); ¹³C NMR (125MHz, Aceton-d₆): δ 15.5/15.6 (CH₃CH₂), 20.90/20.94/20.95/20.98 (CH₃-CH), 31.0 (C-3), 36.2 (C-2), 51.6 (OCH₃), 62.43/62.46/62.54/62.58 (CH₃CH₂), 101.67/101.75/101.82 (CH₃-CH), 120.47/120.49 und 120.57/120.62 (C-2' und C-5'), 123.16/123.20 (C-6'), 136.35/136.40 (C-1'), 147.21/147.28 (C-4'), 148.89/148.95 (C-3'), 173.43 (C-1); EIMS m/z (rel. Int.): 432 (10), 360 (5), 315 (20), 288 (100), 178 (65).

5.2.5.9 (4E,6E)-1-[3,4-bis-(1-Ethoxyethoxy)-phenyl]-7-phenylhepta-4,6-dien-3-on (65)

Zu einer Lösung von **64** (0.270 g, 0.62 mmol) in THF (6 ml) werden DBU (0.094 ml, 0.63 mmol) und Zimtaldehyd (0.082 g, 0.62 mmol) hinzugegeben. Die Mischung wird für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung in Wasser gegossen und mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser und sat.NaCl gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Anschließend wird über Säulenchromatographie (*Kieselgel* 60 F254) unter Verwendung von EtOAc-*n*-hexan (1:9) als Eluent gereinigt und man erhält **65**. M = 438.24, Ausbeute 186 mg (68%); IR: (ν_{max} cm⁻¹) 2977, 2932, 1683, 1660, 1619, 1265, 942; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.14 (m, CH₃CH₂, 6H), 1.40 (m, CH₃CH, 6H), 2.89 (m, 4H, H-1 und H-2), 3.55 (m, CH₃CH₂, 2H), 3.80 (m, CH₃CH₂, 2H), 5.33 (q, J = 5.1 Hz, CH₃CH, 1H), 5.39 (dq, J = 1.6, 5.1 Hz, CH₃CH, 1H) 6.27 (d, J = 15.4 Hz, 1H, H-4), 6.84 (dd, J = 2.2, 8.2 Hz, 1H, H-6'), 6.99 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-5'), 7.10 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-2'), 6.92 (1H, d, J = 8.59 Hz, H-7), 7.09 (1H, dd, J = 15.41, 3.01 Hz, H-5); ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 15.23, 15.27 (CH₃CH₂), 20.45/20.49/20.50/20.56 (CH₃-CH), 29.7 (C-1), 42.3 (C-2), 61.96/62.01/62.19/62.24 (CH₃CH₂), 101.06/101.13/101.13/101.20 (CH₃-CH), 119.84/119.90

und 119.98/120.05 (C-3' und C-5'), 122.56/122.63 (C-6'), 126.7 (C-6), 127.2 (C-2'' und C-6''), 128.5 (C-3'' und C-5''), 129.2 (C-4''), 129.6 (C-4), 135.99/136.03 (C-1'), 136.1 (C-1''), 141.4 (C-7), 142.7 (C-5), 146.03/146.06 (C-4'), 147.78/147.82 (C-3'), 199.3 (C-3); EIMS m/z (rel. Int.): 438 (10), 366 (25), 321 (20), 294 (100), 157 (50).

5.2.5.10 [6-¹³C]-(4E,6E)-1-[4-(1-Ethoxyethoxy)-phenyl]-7-phenylhepta-4,6-dien-3-on (66)

Zu einer Lösung von **63** (0.165 g, 0.38 mmol) in THF (6 ml) werden DBU (0.057 ml, 0.39 mmol) und [2-¹³C]Zimtaldehyd **58** (0.05 g, 0.38 mmol) hinzugegeben. Die Mischung wird für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung in Wasser gegossen und mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser und sat.NaCl gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und bis zur Trockne eingeeengt. Anschließend wird über Säulenchromatographie (*Kieselgel* 60 F254) unter Verwendung von EtOAc-*n*-hexan (1:9) als Eluent gereinigt und man erhält **66**. M = 350.19, Ausbeute 120 mg (71%); IR: (ν_{\max} cm⁻¹) 2978, 2934, 1685, 1660, 1620, 1265, 943; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.14 (m, CH₃CH₂, 6H), 1.40 (m, CH₃CH, 6H), 2.89 (m, 4H, H-1 und H-2), 3.55 (m, CH₃CH₂, 2H), 3.80 (m, CH₃CH₂, 2H), 5.33 (q, J = 5.1 Hz, CH₃CH, 1H), 5.39 (dq, J = 1.6, 5.1 Hz, CH₃CH, 1H) 6.27 (d, J = 15.4 Hz, 1H, H-4), 6.84 (dd, J = 2.2, 8.2 Hz, 1H, H-6'), 6.99 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-5'), 7.10 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-2'), 6.92 (1H, d, J = 8.59 Hz, H-7), 7.09 (1H, dd, J = 15.41, 3.01 Hz, H-5), ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 15.5 (CH₃CH₂), 20.67/20.69 (CH₃-CH), 30.7 (C-1), 42.7 (C-2), 61.80/61.81 (CH₃CH₂), 100.29/100.33 (CH₃-CH), 119.84/119.90 und 119.98/120.05 (C-2' und C-5'), 122.56/122.63 (C-6'), 126.7 (¹³C-6), 127.2 (C-2'' und C-6''), 128.5 (C-3'' und C-5''), 129.2 (C-4''), 129.6 (C-4), 135.99/136.03 (C-1'), 136.1 (C-1''), 141.4 (C-7), 142.7 (C-5), 146.03/146.06 (C-4'), 147.78/147.82 (C-3'), 199.3 (C-3); EIMS m/z (rel. Int.): 351 (M⁺, 15), 278 (100), 77 (35).

5.2.5.11 [6-¹³C]-(4E,6E)-1-[3,4-bis-(1-Ethoxyethoxy)-Phenyl]-7-Phenylhepta-4,6-dien-3-on (67)

Zu einer Lösung von **64** (0.270 g, 0.78 mmol) in THF (6 ml) werden DBU (0.12 ml, 0.79 mmol) und [2-¹³C]Zimtaldehyd **58** (0.10 g, 0.78 mmol) hinzugegeben. Die Mischung wird für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung in Wasser gegossen und mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser und sat.NaCl gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und bis zur Trockne eingeeengt. Anschließend wird über Säulenchromatographie (*Kieselgel* 60 F254) unter Verwendung von EtOAc-*n*-hexan (1:9) als Eluent gereinigt und man erhält **67**. M = 439.24, Ausbeute 167 mg (61%); IR: (ν_{\max} cm⁻¹) 2977, 2932, 1683, 1660, 1619, 1265, 942; ¹H NMR (400 MHz, Aceton-*d*₆): δ 1.13 (t, J = 7.0

Hz, m, CH_3CH_2 , 3H), 1.40 (d, $J = 5.3$ Hz, m, CH_3CH , 3H), 2.86 (m, 2H, H-2), 2.94 (m, 2H, H-1), 3.51 (m, CH_3CH_2 , 1H), 3.60 (s, 3H), 3.73 (m, CH_3CH_2 , 1H), 5.38 (m, CH_3CH , 1H), 6.34 (dd, $J = 7.6, 15.5$ Hz, 1H, H-4), 6.91 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.08 (dd, $^2J_{\text{H-7-C-6}} = 3.0, ^3J_{\text{H-6-H-7}} = 15.6$ Hz, 1H, H-7), 7.10 (dd, $^3J_{\text{H-2-H-3}} = 15.6$ Hz, $^1J_{\text{H-2-C-2}} = 155.6$ Hz, 1H, H-6), 7.17 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.31-7.44 (m, 4H, H-3'', H-4'', H-5'' und H-5), 7.57 (d, $J = 7.2, 2\text{H}$, H-2'' und H-6''); ^{13}C NMR (100MHz, Aceton- d_6): δ 15.2/15.7 (CH_3CH_2), 20.45/20.49/20.50/20.56 ($\text{CH}_3\text{-CH}$), 29.7 (C-1), 42.3 (C-2), 61.96/62.01/62.19/62.24 (CH_3CH_2), 101.07/101.13/101.13/101.20 ($\text{CH}_3\text{-CH}$), 119.84/119.90 und 119.98/120.05 (C-2' und C-5'), 122.56/122.63 (C-6'), 126.7 ($^{13}\text{C-6}$), 127.2 (C-2'' und C-6''), 128.5 (C-3'' und C-5''), 129.2 (C-4''), 129.6 (C-4), 135.99/136.03 (C-1'), 136.1 (C-1''), 141.4 (C-7), 142.7 (C-5), 146.03/146.06 (C-4'), 147.78/147.82 (C-3'), 199.3 (C-3); EIMS m/z (rel. Int.): 439 (M^+ , 12), 367 (27), 322 (17), 293 (100), 157 (45).

5.2.5.12 $[6-^{13}\text{C}]$ -(4E,6E)-1-(4-Hydroxyphenyl)-7-phenylhepta-4,6-dien-3-on (68)

Zu einer Lösung von **66** (0.1 g, 0.23 mmol) in Methanol (2.5 ml) wird *p*-Toluolsulfonsäure (0.003 g, 0.015 mmol) zugegeben. Nach 5 min wird das Lösungsmittel bis zur Trockne ohne Erhitzen verdampft. Das entstehende orange farbene Öl wird mittels Säulenchromatographie (*Kieselgel* 60 F254) unter Verwendung von EtOAc-*n*-hexan (3:7) gereinigt. $M = 278.13$, Ausbeute 60 mg (89%); IR: (ν_{max} cm^{-1}) 3364, 3024, 2925, 1694, 1613, 1514, 1446, 1361, 1219, 965, 827, 748; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 2.59 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-1), 2.87 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-2), 6.28 (dd, $J = 7.6, 15.6$ Hz, 1H, H-4), 6.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-3'), 6.76 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5'), 6.85 (dd, $^3J_{\text{H-6-H-5}} = 10.6$ Hz, $^3J_{\text{H-6-H-7}} = 15.6$ Hz, $^1J_{\text{H-6-C-6}} = 156.5$ Hz, 1H, H-6), 6.92 (dd, $^3J_{\text{H-7-H-6}} = 15.5$ Hz, $^2J_{\text{H-7-C-6}} = 3.4$ Hz, 1H, H-7), 7.04 (d, $J = 8.4$ Hz, H-2'), 7.07 (d, $J = 8.4$ Hz, H-6''), 7.29 – 7.38 (m, 4H, H-3'', H-4'', H-5'' und H-5), 7.45 (d, $J = 7.2, 2\text{H}$, H-2'' und H-6''), ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3): δ 30.1 (C-1), 36.1 (C-2), 115.4 (C-3' und C-5'), 126.6 (C-6), 127.2 (C-2'' und C-6''), 128.1 (C-3'' und C-5''), 129.3 (C-4''), 129.4 (C-2' und C-6'), 129.5 (C-4), 132.4 (C-1'), 135.9 (C-1''), 141.4 (C-7), 143.0 (C-5), 154.1 (C-4'), 200.4 (C-3); EIMS m/z (rel. Int.): 279 (72), 185 (16), 158 (56), 130(35) 107 (100).

5.2.5.13 $[6-^{13}\text{C}]$ -(4E,6E)-1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-7-phenylhepta-4,6-dien-3-on (69)

Zu einer Lösung von **67** (0.1 g, 0.29 mmol) in Methanol (2.5 ml) wird *p*-Toluolsulfonsäure (0.003 g, 0.015 mmol) hinzugegeben. Nach 5 min wird das Lösungsmittel bis zur Trockne ohne Erhitzen verdampft. Das entstehende orange farbene Öl wird mittels Säulenchromatographie (*Kieselgel* 60 F254) unter Verwendung von EtOAc-*n*-hexan (3:7) gereinigt. $M = 294.13$, Ausbeute 68 mg (85%); IR: (ν_{max} cm^{-1}) 3368, 2922, 2852, 1710, 1606, 1519, 1444, 1360, 1282, 997, 813; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 2.88 – 2.89 (m, 4H, H-1 und

H-2), 6.28 (dd, $J = 7.6, 15.5$ Hz, 1H, H-4), 6.61 (dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, 1H, H-6'), 6.72 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-2'), 6.77 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5'), 6.85 (dd, $^3J_{\text{H-6-H-5}} = 10.6$ Hz, $^3J_{\text{H-6-H-7}} = 15.6$ Hz, $^1J_{\text{H-6-C-6}} = 156.5$ Hz, 1H, H-6), 6.94 (dd, $^3J_{\text{H-7-H-6}} = 15.6$ Hz, $^2J_{\text{H-7-C-6}} = 3.4$ Hz, 1H, H-7), 7.31-7.44 (m, 4H, H-3'', H-4'', H-5'' und H-5), 7.46 (d, $J = 7.1$, 2H, H-2'' und H-6''), ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3): δ 29.7 (C-1), 42.3 (C-2), 115.4/115.5 (C-2' und C-5'), 120.5 (C-6'), 126.5 (C-6), 127.3 (C-2'' und C-6''), 128.9 (C-3'' und C-5''), 129.2 (C-4''), 129.5 (C-4), 133.3 (C-1'), 135.9 (C-1''), 141.8 (C-7), 142.1 (C-4'), 143.5 (C-5), 143.7 (C-3'), 201.0 (C-3); EIMS m/z (rel. Int.): 295 (70), 185 (14), 172 (40), 158 (30), 130 (20), 107 (100).

5.2.6 Synthese von Diazomethan^[97-99]

5.2.6.1 *N*-Methyl-*p*-toluolsulfonamid (**70**)

p-Toluolsulfonylchlorid (1.33 g, 6.9 mmol) wird in trockenem Ether (30 ml) gelöst. Anschließend wird Methylamin • HCl (1 g, 14.9 mmol) in NaOH (0.6 g) gelöst und zur Reaktionslösung gegeben. Dann wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wird mit Ethylacetat (ca. 200 ml) verdünnt und mit 10% wässriger Zitronensäure gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockne eingeeengt. $M = 185.05$, Ausbeute 1.2 g (94%); IR: (ν_{max} cm^{-1}) 3273, 3065, 3047, 2979, 2955, 1597, 1495, 1380, 1291, 1043, 838, 707, 629, 566, 497; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 2.43 (s, 3H, H-1'), 2.64 (s, 3H, H-2''), 7.37 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-3' und H-5'), 7.75 (d, $J = 8.3$, 2H, H-2'' und H-6''), ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3): δ 21.5 (C-1''), 29.3 (C-2''), 127.3 (C-2' und C-6'), 129.7 (C-3' und C-5'), 135.8 (C-4'), 143.5 (C-1'); EIMS m/z (rel. Int.): 185 (37), 155 (24), 91 (100), 65 (20).

5.2.6.2 *N*-Methyl-*N*-nitroso-*p*-toluolsulfonamid (**71**)

Verbindung **70** wird in trockenem Ether (100 ml) unter Argon-Atmosphäre gelöst. Die Mischung wird auf 0 °C gekühlt und eine 1.6 M BuLi Lösung (7 ml) hinzugegeben. Anschließend wird Nitrosoniumtetrafluorborat zugegeben und für 1 h bei 0 °C gerührt. Dann wird bei Raumtemperatur mit Wasser (3 x 30 ml), 5 % wässriges Natriumhydroxid Lösung (3 x 30 ml) und nochmals Wasser (3 x 30 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, bis zur Trockne eingeeengt und man erhält **71**. $M = 214.04$, Ausbeute 0.98 g (71%); IR: (ν_{max} cm^{-1}) 2946, 2929, 1597, 1515, 1451, 1387, 1308, 1293, 1221, 1188, 1175, 1137, 1119, 1090, 1019, 849, 546; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 2.45 (s, 3H, H-1'), 3.12 (s, 3H, H-2''), 7.37 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-3' und H-5'), 7.87 (d, $J = 8.3$, 2H, H-2'' und H-6''), ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3): δ 21.7 (C-1''), 28.9 (C-2''), 128.0 (C-2' und C-6'),

130.4 (C-3' und C-5'), 134.2 (C-4'), 146.0 (C-1'); EIMS m/z (rel. Int.): 186 (31), 155 (35), 91 (100), 65 (21).

5.2.6.3 *N*-Methyl-¹³C-*p*-Toluolsulfonamid (**72**)

p-Toluolsulfonylchlorid (1.33 g, 6.9 mmol) wird in trockenem Ether (30 ml) gelöst. Anschließend wird [¹³C]Methylamin • HCl (1 g, 14.9 mmol) in NaOH (0.6 g) gelöst und zur Reaktionslösung gegeben. Dann wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wird mit Ethylacetat (ca. 200 ml) verdünnt und mit 10% wässriger Zitronensäure gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockne eingeengt. $M = 186.05$, Ausbeute 1.2 g (94%); IR: (ν_{\max} cm^{-1}): 3375, 2977, 1673, 1596, 1399, 1305, 1153, 1087, 818; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.43 (s, 3H, H-1'), 2.64 (d, ³ $J_{\text{H-2-H-3}} = 5.6$ Hz, ¹ $J_{\text{H-2-C-2}} = 139.7$ Hz, 3H, H-2''), 7.37 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-3' und H-5'), 7.75 (d, $J = 8.3$, 2H, H-2'' und H-6''), ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 21.5 (C-1''), 29.3 (C-2''), 127.3 (C-2' und C-6'), 129.7 (C-3' und C-5'), 135.8 (C-4'), 143.5 (C-1'); EIMS m/z (rel. Int.): 186 (67), 155 (43), 91 (100).

5.2.6.4 *N*-Methyl-¹³C-*N*-nitroso-*p*-toluolsulfonamid (**73**)

Verbindung **72** wird in trockenem Ether (100 ml) unter Argon-Atmosphäre gelöst. Die Mischung wird auf 0 °C gekühlt und eine 1.6 M BuLi Lösung (7 ml) hinzugegeben. Anschließend wird Nitrosoniumtetrafluorborat zugegeben und für 1 h bei 0 °C gerührt. Dann wird bei Raumtemperatur mit Wasser (3 x 30 ml), 5 % wässriges Natriumhydroxid Lösung (3 x 30 ml) und nochmals Wasser (3 x 30 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, bis zur Trockne eingeengt und man erhält **73**. $M = 215.04$, Ausbeute 1 g (72%); IR: (ν_{\max} cm^{-1}): 3275, 2928, 1732, 1597, 1454, 1318, 1157, 1090, 817; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.45 (s, 3H, H-1'), 3.12 (s, ¹ $J_{\text{H-C}} = 144.5$ Hz 3H, H-2''), 7.37 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-3' und H-5'), 7.87 (d, $J = 8.3$, 2H, H-2'' und H-6''), ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 21.7 (C-1''), 28.9 (C-2''), 128.0 (C-2' und C-6'), 130.4 (C-3' und C-5'), 134.2 (C-4'), 146.0 (C-1'); EIMS m/z (rel. Int.): 200 (95), 186 (28), 155 (80), 91 (100).

5.2.6.5 [¹³C]Diazomethan (**74**)

In einem 2-Halskolben wird Kaliumhydroxid (0.3 g, 5.3 mmol) in Wasser (0.5 ml) und Diglyme (1.7 ml) gelöst. Es wird für auf 70 °C erhitzt und die Lösung wird orange/braun. Es wird ca. 10 min gerührt bis eine konstante Temperatur von 70 °C eingestellt ist. Anschließend wird Verbindung **73** (1 g, 4.7 mmol) in Diethylether (10 ml) gelöst und langsam zugetropft. Diazomethan wird unter Atmosphärendruck in eine durch Aceton/Trockeneis gekühlte Vorlage destilliert.

5.3 Trennmethoden

5.3.1 Chromatographische Trennungen

5.3.1.1 *Dünnschichtchromatographie (DC)*

Diese Methode diente der Kontrolle der Abläufe von Synthesen und der Reinigung der Reaktionsprodukte. Dafür wurden Aluminiumfolien, welche mit Kieselgel 60 und Fluoreszenzindikator (F₂₅₄) beschichtet sind, verwendet.

5.3.1.2 *Säulenchromatographie (SC)*

Diese Methode wurde zur Reinigung von Synthesegemischen angewandt. Hierfür wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0.063 - 0.2 mm) benutzt. Die entsprechenden Lösungsmittelgemische wurden in Abschnitt 5.2 für die jeweiligen Substanzen beschrieben.

5.3.1.3 *Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)*

Diese Methode wurde zur Trennung von sekundären Pflanzenstoffen verwendet. Anwendungen fanden eine präparative HPLC (Merck Hitachi LiChrograph Chromatographie-System) und analytische HPLC (HP 1100 mit Diodenarraydetektor [DAD] oder variablen Wellenlängendetektor [VWD], Agilent Technologies). Die Trennungen erfolgten mit Säulen des Typs LiChrosphere 100 RP-18 (10 µm) 250x10 und LiChrosphere 100 RP-18 (5 µm) 250x4 mm. Als flüssige Phase wurden Gemische aus MeCN-H₂O (0.1% TFA) und MeCN-H₂O gewählt. Die Flussrate betrug für die präparative HPLC 3.5 ml·min⁻¹ und für die analytische HPLC 0.8 ml·min⁻¹.

Verwendete lineare Gradienten:

- (a) MeCN-H₂O (0.1% TFA in H₂O), 30:70%→75:35% in 35 min und 90:10% in weiteren 5 min
- (b) MeCN-H₂O (0.1% TFA in H₂O), 10:90%→90:10% in 30 min
- (c) MeCN-H₂O (0.1% TFA in H₂O), 40:60%→75:35% in 30 min
- (d) MeCN-H₂O (0.1% TFA in H₂O), 40:60%→60:40% in 20 min
- (e) MeCN-H₂O, 10:90%→50:50% in 40 min
- (f) MeCN-H₂O, 55:45% für 20 min und anschließend auf 70:30% in weiteren 5 min
- (g) MeCN-H₂O, 10:90%→50:50% in 20 min
- (h) MeCN-H₂O (0.1% TFA in H₂O), 3:97% für 10 min und in weiteren 10 min auf 95:5% und in 5 min auf 3:97%

5.4 Pflanzenmaterial

5.4.1 Kultivierung

Die sterilen Wurzelkulturen wurden in 300 ml Weithals-Erlenmeyerkolben mit sterilem Medium (100 ml) kultiviert. Dies erfolgte auf Schüttlern (85 rpm) bei 23 °C unter permanentem Licht ($4.4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Drei Tage vor der Zugabe der [^{13}C]markierten Vorstufen wurden die Wurzelkulturen in neue Erlenmeyerkolben mit frischem sterilem Medium umgesetzt. Im Fall der Fütterungsexperimente unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre wurden die Wurzelkulturen in einen Erlenmeyerkolben mit Schliff (250 ml, 29/32) und frischem sterilem Medium (100 ml) überführt.

5.4.2 M3- und M3-5.3-Medium für *A. preissii* und *W. thyrsoiflora*

Zusammensetzung des Mediums M3:

Stammlösung 1 (1 Liter):

82.5 g NH_4NO_3

95.0 g KNO_3

18.5 g $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$

8.5 g KH_2PO_4

845 mg $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$

430 mg $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$

310 mg H_3BO_3

41.5 mg KJ

12.5 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1.25 mg $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$

1.25 mg $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Stammlösung 2 (1 Liter):

22.0 g $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Stammlösung 3 (1 Liter):

1.866 g $\text{Na}_2\text{-EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

(Chelaplex III)

1.39 g $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$

M3-Medium (1 Liter):

Salze:

20 ml Stammlösung 1

20 ml Stammlösung 2

20 ml Stammlösung 3

Vitamine:

80 mg *myo*-Inosit

0.4 mg Vitamin B1

2.0 mg NAA

0.2 mg Kinetin

Für *A. preissii* wurde M3-Medium verwendet. Für *W. thyrsoiflora* wurde das M3-Medium mit 1M HCl auf pH 5.3 eingestellt. Es wurde jeweils 100 ml Medium in 300 ml Erlenmeyerkolben abgefüllt und 20 min bei 121 °C autoklaviert.

5.5 Fütterungsexperimente

5.5.1 Fütterungsexperimente mit ^{13}C -, ^{14}C - und ^3H -markierten Phenylpropanoiden

5.5.1.1 Fütterungen von ^{13}C -markierten ringhydroxylierter α -Keto- β -phenylcarbonsäuren und β -Phenylmilchsäuren

Drei Tage vor Zugabe der Precursoren wurden die Wurzelkulturen in frisches steriles Medium (100 ml) übertragen. Die Vorstufen wurden zuvor, wie in Abschnitt 5.2 beschrieben, synthetisiert. Alle Vorstufen wurden in EtOH (1 ml) gelöst und hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug für alle Experimente drei Tage. Die Tests auf Verbleib der Vorstufen im Medium erfolgten mittels analytischer HPLC durchgeführt. Es wurde über einen Zeitraum von drei Tagen der Fütterungen pro Tag 1 ml des Mediums abgenommen. Diese wurden anschließend nach Zugabe von 8 μg eines Standards (*p*-Cumarsäure) durch HPLC unter Verwendung des Gradienten (h) analysiert.

5.5.1.2 Fütterungsexperimente mit [2,3,4,5,6- ^3H]L-Phenylalanin und [U- ^{14}C]p-Cumarsäure

Die Aufnahme der Precursoren L-Phenylalanin und *p*-Cumarsäure wurde durch Kinetikversuche mit [2,3,4,5,6- ^3H]L-Phenylalanin und [U- ^{14}C]p-Cumarsäure nachgewiesen.

Durch Verdünnung von [2,3,4,5,6- ^3H]L-Phenylalanin und [U- ^{14}C]p-Cumarsäure werden folgende Konzentrationen erhalten:

9.097 nmol: 1.49 mg L-Phenylalanin (9.087 nmol), 1 μl [2,3,4,5,6- ^3H]L-Phenylalanin (0.01 nmol)

11.087 nmol: 1.49 mg *p*-Cumarsäure (9.087 nmol), 10 μl [U- ^{14}C]p-Cumarsäure (2.0 nmol)

[2,3,4,5,6- ^3H]L-Phenylalanin wurde mit einer spezifischen Aktivität von 3700 kBq·nmol $^{-1}$ und einer Konzentration von 37 MBq·ml $^{-1}$ geliefert. Die spezifische Aktivität von [U- ^{14}C]p-Cumarsäure beträgt 17 kBq·nmol $^{-1}$ bei einer Konzentration von 3.4 MBq·ml $^{-1}$. Die radioaktive Strahlung wird mit Hilfe spezieller organischer Verbindungen (Szintillatoren) in Licht umgesetzt, wobei die Lichtenergie und Menge sich proportional zur radioaktiven Strahlung des zu messenden Stoffes verhalten. Jede, aus dem Medium abgenommene Probe wurde mit einer Scintillationsflüssigkeit (Lumasafe) versetzt und an einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Tri-Carb 2300 TR; Perkin Elmer) vermessen.

Zur Durchführung der Experimente wurden drei Wurzelkulturen in je 100 ml frisches M3-5.3-Medium, drei Tage vor Beginn der Experimente, überführt. Anschließend wurden 4

Lösungen mit jeweils den oben angegebenen Konzentrationen für Phenylalanin und *p*-Cumarsäure in EtOH:H₂O (1:1, 1 ml) hergestellt. Diese wurden den Medien der 3 Wurzelkulturen und einem Medium ohne Wurzelkultur zugegeben. Das Medium ohne Wurzelkultur diente zur Kontrolle ob und wie stark sich die gefütterten Phenylpropanoide z.B an der Glaswand des Erlenmeyerkolbens absetzen und dadurch deren Radioaktivität im Medium nicht mehr nachweisbar ist. Direkt nach der Zugabe wurde von jedem Medium eine Probe (1 ml) entnommen und vermessen. Anschließend erfolgte in den ersten 2,5 h jede halbe Stunde und danach stündlich die Abnahme einer Probe (1 ml). Die Experimente erfolgten über 24 h.

5.5.2 Fütterungsexperimente unter ¹⁸O₂-Atmosphäre und unter Verwendung von ¹⁸O-Wasser

5.5.2.1 Fütterungsversuche unter ¹⁸O₂-Atmosphäre

Die Fütterungsapparatur (Abb. 5.1) wurde für Fütterungsexperimente unter ¹⁸O₂-Atmosphäre verwendet. Vor jeder Fütterung wurde die komplette Apparatur autoklaviert. Anschließend wurde, wie in Abschnitt 5.4.1 beschrieben, jede Wurzelkultur drei Tage vor Beginn des Fütterungsexperimentes in frisches steriles Medium überführt. Dann wurde die Apparatur unter sterilen Bedingungen zusammgebaut und nach Zugabe der ¹³C-markierten Vorstufe [2-¹³C]Phenylalanin, [2-¹³C]*p*-Cumarsäure bzw. [6-¹³C]Diarylheptanoide und des Natriumhydroxids (auf Trägermaterial), welches zum Abfangen des im Stoffwechsel entstehenden Kohlendioxids diente, komplett verschlossen. Die Apparatur wurde anschließend unter dem Abzug platziert, komplett evakuiert (72 mbar), verschlossen und mit ¹⁸O₂-Gas befüllt. Dann wurde für sieben Tage auf dem Schüttler (85 rpm) kultiviert.

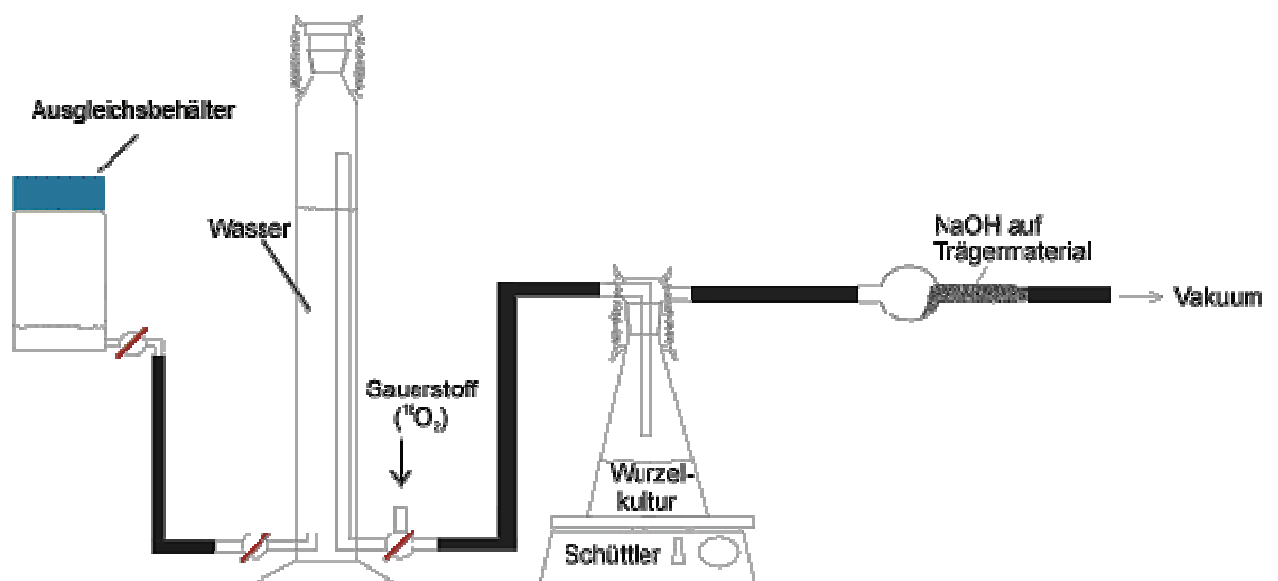


Abb. 5.1: Graphik der für Fütterungsexperimente unter ¹⁸O₂-Atmosphäre verwendeten Fütterungsapparatur

5.5.2.2 Fütterungsversuche mit ^{18}O -Wasser

Für den Fütterungsversuch mit ^{18}O -Wasser wurde das in Abschnitt 5.4.2 beschriebene M3-Medium mit ^{18}O -Wasser (10% ^{18}O) und Murashige Skoog Salzmischung mit Mikronährstoffen (Sigma-Aldrich) hergestellt und für die Fütterung der Wurzelkultur von *W. thyrsoflora* auf pH 5.3 eingestellt. Anschließend wurde die Wurzelkultur unter sterilen Bedingungen in das Medium überführt und für sieben Tage auf einem Schüttler kultiviert. Im Anschluß daran erfolgte die Zugabe von $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{L}$ -Phenylalanin und Kultivierung für weitere sieben Tage. Nach Abbruch der Inkubationszeit wurde wie in Abschnitt 5.5.3 beschrieben extrahiert und die Reinverbindungen isoliert.

5.5.3 Extraktion und Isolierung

Die Wurzeln von *A. preissii* (~20 g) und *W. thyrsoflora* (~40 g) wurden durch flüssigen Stickstoff eingefroren, gemahlen und mit Methanol bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bis zur Trockne wurde der Rückstand mit Wasser gelöst und fraktioniert zwischen *n*-Hexan– H_2O , CH_2Cl_2 – H_2O und EtOAc– H_2O . Anschließend erfolgt eine Trennung mittels präparativer HPLC, an einer LiChrosphere 100 RP-18 (10 μm) 250x10 mm-Säule. Für die *n*-Hexan- und CH_2Cl_2 -Fraktionen wurde der Gradient (a) (siehe Abschnitt 5.3.1.3) verwendet. Für die EtOAc-Fraktion wurde Gradient (b) angewendet. Nach Derivatisierung der isolierten reinen Verbindungen durch $[^{13}\text{C}]\text{Diazomethan}$ erfolgte eine Reinigung dieser mit analytischer HPLC, unter Verwendung der LiChrosphere 100 RP-18 (5 μm) 250x4 mm-Säule. Die hierfür verwendeten Gradienten werden für die jeweiligen Substanzen in Abschnitt 5.3.1.3 im Einzelnen benannt. Methylierungen erfolgten durch den Einsatz von $[^{13}\text{C}]\text{Diazomethan}$ in Ether.

5.5.4 Isolierte Reinverbindungen aus *A. preissii*

5.5.4.1 Anigorufon (1)

HPLC (Gradient b): t_{R} 27.5 min, Isolierte Menge: 1.0 mg; UV (MeCN– H_2O) λ_{max} 203, 241, 260, 367 nm; ^1H NMR (500 MHz, Aceton- d_6): δ 7.18 (s, 1H, H-3), 7.38–7.47 (m, 5H, H-1'–H-5'), 7.63 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-8), 7.70 (dd, $^3J_{\text{H-5-H-4}} = 7.1$ Hz, $^3J_{\text{H-5-H-6}} = 8.0$ Hz, 1H, H-5), 7.88 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-4), 8.09 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-6), 8.41 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-7); ^{13}C NMR (125MHz, Aceton- d_6): δ 113.1 (C-3), 124.7 (C-9a), 125.7 (C-9b), 127.8 (C-4'), 127.9 (C-5), 128.8 (C-3' und C-5'), 128.9 (C-2' und C-6'), 130.0 (C-3a), 130.2 (C-6), 131.0 (C-4), 132.0 (C-8), 132.5 (C-6a) 136.2 (C-7), 143.6 (C-1'), 149.1 (C-9), 151.3 (C-2), 180.7 (C-1).

5.5.4.2 *Hydroxyanigorufon (2)*

HPLC (Gradient b): t_R 22.8 min, Isolierte Menge: 0.9 mg; UV (MeCN—H₂O) λ_{max} 202, 240, 267, 370, 420 nm; ¹H NMR (500 MHz, Aceton- *d*₆): δ 6.92 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-3' und H-5'), 7.15 (s, 1H, H-3), 7.27 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-2' und H-6'), 7.64 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-8), 7.68 (dd, $^3J_{H-5-H-4}$ = 7.2 Hz, $^3J_{H-5-H-6}$ = 8.2 Hz, 1H, H-5), 7.86 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H-4), 8.07 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-6), 8.38 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-7); ¹³C NMR (125MHz, Aceton- *d*₆): δ 112.8 (C-3), 115.7 (C-3' und C-5'), 124.6 (C-9a), 126.0 (C-9b), 127.7 (C-5) 129.9 (C-3a), 130.1 (C-6), 130.7 (C-2' und C-6'), 130.9 (C-4), 132.3 (C-6a), 132.5 (C-8) 134.5 (C-1'), 136.1 (C-7), 149.7 (C-9), 151.4 (C-2), 157.9 (C-4'), 180.7 (C-1).

5.5.5 Derivate der Reinverbindungen aus *A. preissii*

5.5.5.1 *[2-O¹³CH₃]Methoxyanigorufon (75)*

HPLC (Gradient c): t_R 21.1 min, Ausbeute: 1.0 mg, UV (MeCN—H₂O) λ_{max} 203, 240, 260, 287, 366 nm; IR: (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3055, 2921, 2851, 1726, 1597, 1454, 1383, 1272, 1146, 1079, 858; ¹H NMR (500 MHz, Aceton- *d*₆): δ 3.85 (s, $^1J_{H-C}$ = 144.6 Hz, 3H, 2-O¹³CH₃), 7.15 (s, 1H, H-3), 7.34–7.45 (m, 5H, H-1'–H-5'), 7.59 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-8), 7.68 (dd, $^3J_{H-5-H-4}$ = 7.1 Hz, $^3J_{H-5-H-6}$ = 8.2 Hz, 1H, H-5), 7.87 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H-4), 8.06 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-6), 8.35 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-7); ¹³C NMR (125MHz, Aceton- *d*₆): δ 55.67 (2-¹⁸O¹³CH₃, $^1\Delta\delta$ ¹⁸O(¹³C) = -26 ppb), 55.70 (2-¹⁶O¹³CH₃), 112.2 (C-3), 126.2 (C-9a), 126.8 (C-9b), 127.6 (C-4'), 127.8 (C-5), 128.8 (C-3' und C-5'), 128.9 (C-2' und C-6'), 129.6 (C-6), 129.9 (C-3a), 130.2 (C-4), 132.2 (C-8), 132.6 (C-6a) 134.9 (C-7), 144.2 (C-1'), 148.1 (C-9), 154.6 (C-2), 179.7 (C-1).

5.5.5.2 *[2,4'-di-O¹³CH₃]2,4'-Dimethoxyanigorufon (76)*

HPLC (Gradient d): t_R 17.5 min, Ausbeute: 0.7–0.8 mg, UV (MeCN—H₂O) λ_{max} 202, 238, 270, 368 nm; IR: (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3058, 2927, 2853, 1723, 1609, 1516, 1454, 1246, 1178, 1079, 1016, 836, 734; ¹H NMR (500 MHz, Aceton- *d*₆): δ 3.85 (s, $^1J_{H-C}$ = 144.6 Hz, 3H, 2-O¹³CH₃), 3.90 (s, $^1J_{H-C}$ = 143.8 Hz, 3H, 4'-O¹³CH₃), 7.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-3' und H-5'), 7.16 (s, 1H, H-3), 7.35 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-2' und H-6'), 7.62 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-8), 7.68 (dd, $^3J_{H-5-H-4}$ = 7.2 Hz, $^3J_{H-5-H-6}$ = 8.2 Hz, 1H, H-5), 7.87 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H-4), 8.05 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-6), 8.34 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-7); ¹³C NMR (125MHz, Aceton- *d*₆): δ 55.48 (4'-¹⁸O¹³CH₃, $^1\Delta\delta$ ¹⁸O(¹³C) = -25 ppb), 55.50 (4'-¹⁶O¹³CH₃), 55.70 (2-¹⁸O¹³CH₃, $^1\Delta\delta$ ¹⁸O(¹³C) = -26 ppb), 55.73 (2-¹⁶O¹³CH₃), 112.2 (C-3), 114.3 (C-3' und C-5'), 126.3 (C-9a), 126.9 (C-9b), 127.6 (C-5)

129.8 (C-3a), 129.6 (C-6), 130.1 (C-4), 130.5 (C-2' und C-6'), 132.5 (C-6a), 132.6 (C-8), 134.9 (C-7), 134.9 (C-1'), 149.7 (C-9), 151.4 (C-2), 157.9 (C-4'), 180.7 (C-1).

5.5.6 Isolierte Reinverbindungen aus *W. thyrsoflora*

5.5.6.1 *6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (25)*

HPLC (Gradient e): t_R 13.0 min, Isolierte Menge: 0.6 mg, UV (MeCN—H₂O) λ_{max} 211, 279, 378, 477 nm; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 2.36 (dd, $J = 7.9, 9.0$ Hz, 1H, H-2''), 3.04 (dd, $J = 9.0, 9.3$ Hz, 1H, H-4''), 3.09 (ddd, $J = 2.2, 6.5, 9.0$ Hz, 1H, H-5''), 3.19 (dd, $J = 9.0, 9.3$ Hz, 1H, H-3''), 3.96 (dd, $J = 2.2, 11.8$ Hz, 1H, H-6''b), 4.18 (dd, $J = 6.5, 11.8$ Hz, 1H, H-6''a), 4.67 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-1''), 7.04 (s, 1H, H-3), 7.22 (br, 1H, H-5'), 7.33 (br, 2H, H-2' und H-4'), 7.39 (br, 1H, H-6'), 7.43 (br, 1H, H-3'), 7.46 (s, 1H, H-4), 7.54 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-8), 8.47 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-9); ¹³C NMR (125MHz, CD₃OD): δ 64.9 (C-6''), 71.1 (C-4''), 74.6 (C-2''), 75.2 (C-5''), 77.6 (C-3''), 104.1 (C-1'') 116.3 (C-3), 121.7 (C-9b), 124.2 (C-4), 127.3 (C-2'), 127.8 (C-6a und C-4') 128.3 (C-6'), 128.5 (C-3a), 128.6 (C-9), 130.0 (C-9a), 130.7 (C-3'), 131.8 (C-5'), 132.3 (C-8), 141.0 (C-6), 145.3 (C-1'), 148.8 (C-7), 149.0 (C-5), 151.2 (C-2), 169.3 (C-1'''), 171.5 (C2'''), 182.2 (C-1).

5.5.6.2 *2,5,6-Trihydroxy-9-phenylphenalen-1-on (17)*

HPLC (Gradient a): t_R 16.0 min, Isolierte Menge: 0.5 mg, UV (MeCN—H₂O) λ_{max} 208, 278, 374 nm; ¹H NMR (500 MHz, Aceton- *d*₆): δ 7.36 (s, 1H, H-3), 7.38-7.44 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5' und H-6'), 7.54 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-8), 7.84 (s, 1H, H-4), 8.66 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-9); ¹³C NMR (125MHz, Aceton- *d*₆): δ 112.9 (C-3), 118.4 (C-3a), 120.7 (C-9b), 122.7 (C-4), 125.4 (C-9a), 126.9 (C-4'), 128.2 (C-3' und C-5'), 129.1 (C-2' und C-6'), 129.2 (C-9), 129.9 (C-6a), 130.6 (C-8), 139.0 (C-6), 144.2 (C-1'), 147.3 (C-7), 149.0 (C-5), 150.7 (C-2), 178.4 (C-1).

5.5.7 Derivate der Reinverbindungen aus *W. thyrsoflora*

5.5.7.1 *[2,5-di-O¹³CH₃]₆-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-methoxy-7-phenylphenalen-1-on (77)*

HPLC (Gradient g): t_R 15.7 min, Ausbeute 400 μ g, UV (MeCN—H₂O) λ_{max} 201, 279, 374 nm; IR: (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3325, 2922, 1681, 1566, 1426, 1208, 1129, 880, 723; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 2.05 (dd, $J = 7.7, 9.3$ Hz, 1H, H-2''), 2.97 (ddd, $J = 2.3, 5.6, 9.7$ Hz, 1H, H-5''),

3.03 (dd, $J = 8.7, 9.7$ Hz, 1H, H-4''), 3.21 (dd, $J = 8.7, 9.3$ Hz, 1H, H-3''), 3.45 (dd, $J = 5.6, 11.9$ Hz, 1H, H-6''a) 3.60 (dd, $J = 2.3, 11.9$ Hz, 1H, H-6''b), 3.99 (s, $^1J_{\text{H-C}} = 145.0$ Hz, 3H, 2-O¹³CH₃), 4.05 (s, $^1J_{\text{H-C}} = 145.0$ Hz, 3H, 5-O¹³CH₃), 5.11 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-1''), 7.29 (s, 1H, H-3), 7.32 (br, 1H, H-5'), 7.38 (br, 2H, H-2' und H-4'), 7.44 (br, 1H, H-6'), 7.50 (br, 1H, H-3'), 7.55 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-8), 7.86 (s, 1H, H-4), 8.56 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-9); ¹³C NMR (125MHz, CD₃OD): δ 56.31 (2-¹⁸O¹³CH₃, $^1\Delta\delta$ ¹⁸O(¹³C) = -25 ppb), 56.34 (2-¹⁶O¹³CH₃), 57.73 (5-¹⁸O¹³CH₃, $^1\Delta\delta$ ¹⁸O(¹³C) = -29 ppb), 57.76 (5-¹⁶O¹³CH₃), 62.8 (C-6''), 71.5 (C-4''), 74.6 (C-2''), 77.8 (C-5''), 78.2 (C-3''), 103.0 (C-1''), 115.6 (C-3), 121.4 (C-9b), 122.3 (C-4), 126.6 (C-3a), 128.0 (C-6a, C-2' und C-4'), 128.6 (C-9), 128.9 (C-6'), 129.5 (C-9a), 129.7 (C-3'), 130.3 (C-5'), 132.6 (C-8), 143.6 (C-6), 145.8 (C-1'), 149.7 (C-7), 151.4 (C-5), 153.7 (C-2), 169.3 (C-1''), 171.5 (C-2'''), 179.2 (C-1).

5.5.7.2 [2,5,6-tri-O¹³CH₃]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (78)

HPLC (Gradient a): t_{R} 13.8 min, Ausbeute 220 μg , UV (MeCN—H₂O) λ_{max} 208, 279, 373 nm; IR: (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 2927, 2854, 1623, 1567, 1461, 1353, 1288, 1167, 865; ¹H NMR (500 MHz, Aceton-*d*₆): δ 3.27 (s, $^1J_{\text{H-C}} = 144.7$ Hz, 3H, 6-O¹³CH₃), 3.93 (s, $^1J_{\text{H-C}} = 144.5$ Hz, 3H, 2-O¹³CH₃), 4.03 (s, $^1J_{\text{H-C}} = 144.6$ Hz, 3H, 5-O¹³CH₃), 7.22 (s, 1H, H-3), 7.39 - 7.47 (br, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5' und H-6'), 7.56 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-8), 7.86 (s, 1H, H-4), 8.49 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-9); ¹³C NMR (125MHz, Aceton-*d*₆): δ 55.7 (2-¹⁶O¹³CH₃), 57.2 (5-¹⁶O¹³CH₃), 60.64 (6-¹⁸O¹³CH₃, $^1\Delta\delta$ ¹⁸O(¹³C) = -28 ppb), 60.67 (6-¹⁶O¹³CH₃), 114.1 (C-3), 119.9 (C-4), 121.9 (C-9b), 125.9 (C-3a), 127.2 (C-9a), 127.4 (C-4'), 127.8 (C-3' und C-5'), 128.2 (C-9), 129.3 (C-2' und C-6'), 129.9 (C-6a), 131.3 (C-8), 144.7 (C-1'), 146.9 (C-7), 146.6 (C-6), 151.5 (C-5), 153.4 (C-2), 179.6 (C-1).

5.5.7.3 [2,5,6-tri-O¹³CH₃]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (79)

HPLC (Gradient a): t_{R} 13.4 min, Ausbeute 180 μg , UV (MeCN—H₂O) λ_{max} 209, 277, 374 nm; IR: (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 2927, 2854, 1623, 1567, 1461, 1353, 1288, 1167, 865; ¹H NMR (500 MHz, Aceton-*d*₆): δ 3.84 (s, $^1J_{\text{H-C}} = 144.5$ Hz, 3H, 2-O¹³CH₃), 4.10 (s, $^1J_{\text{H-C}} = 144.8$ Hz, 3H, 6-O¹³CH₃), 4.11 (s, $^1J_{\text{H-C}} = 144.7$ Hz, 3H, 5-O¹³CH₃), 7.12 (s, 1H, H-3), 7.34 - 7.45 (br, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5' und H-6'), 7.56 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-8), 7.82 (s, 1H, H-4), 8.52 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-7); ¹³C NMR (125MHz, Aceton-*d*₆): δ 55.8 (2-¹⁶O¹³CH₃), 57.24 (5-¹⁸O¹³CH₃, $^1\Delta\delta$ ¹⁸O(¹³C) = -28 ppb), 57.27 (5-¹⁶O¹³CH₃), 61.9 (6-¹⁶O¹³CH₃), 112.2 (C-3), 119.6 (C-4), 121.9 (C-6b), 126.3 (C-3a), 127.5 (C-4'), 128.4 (C-7), 128.6 (C-6a), 128.8 (C-3' und C-5'), 129.0 (C-2' und C-6'), 129.9 (C-9a), 132.2 (C-8), 144.3 (C-1'), 144.8 (C-6), 145.8 (C-5), 146.5 (C-9), 153.9 (C-2), 179.8 (C-1).

5.6 *Nachweismethoden*

5.6.1 Kernmagnetische Resonanz (NMR)-Spektroskopie

5.6.1.1 *Spektrometer und Probenköpfe*

Bruker Ultrashield 500 NMR Spektrometer ausgerüstet mit einer CryoPlatform™, ¹H-Resonanzfrequenz 500.13 MHz, ¹³C-Resonanzfrequenz 125.75 MHz. Probenköpfe: Cryo-TCI 5 mm für isolierte Reinverbindungen aus Wurzelkulturen und deren Derivate, Bruker Avance 400 NMR Spektrometer: ¹H-Resonanzfrequenz 400.13 MHz, ¹³C-Resonanzfrequenz 100.62 MHz und Bruker Avance DRX-500 NMR Spektrometer: ¹H-Resonanzfrequenz 500.13 MHz, ¹³C-Resonanzfrequenz 125.75 MHz. Probenköpfe: BBO 400 MHz SB-Probenkopf 5 mm und BBO 500 MHz S2-Probenkopf 5mm.

5.6.1.2 *Lösungsmittel und Referenzierung*

Es wurden deuterierte Lösungsmittel mit Deuteriumgehalt > 98% verwendet. Die Referenzierung der Spektren erfolgte auf $\delta^1\text{H} = 0$ bzw. $\delta^{13}\text{C} = 0$ mit TMS als internem Standard.

5.6.1.3 *NMR-Methoden*

Es wurden ¹H-NMR-, ¹³C-NMR-, ¹H-¹H COSY-, gHMBC-, gHMQC- und ROESY-Messungen durchgeführt unter Verwendung von Bruker Standard-Pulssequenzen. Teilweise erfolgte eine Unterdrückung der restlichen ¹H-Lösungsmittel-Signale von H₂O mittels Vorsättigung.

5.6.2 Massenspektrometrie

5.6.2.1 *Massenspektren von Syntheseprodukten*

Zur Messung der Syntheseprodukte wurde ein Micromass MasSpec sector field – Massenspektrometer mit einem direkten Insertionsprobenkopf verwendet. Es wurde die Methode der Elektronenstoß-Massenspektrometrie (EI-MS) im positiven Modus (70 eV) benutzt.

5.6.2.2 *Massenspektren von Phenylphenalenonen und deren Derivaten*

Die Bestimmung der Phenylphenalene und ihrer Derivate erfolgte durch ein LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) mit einer Elektrosprayquelle (ESI). Das LTQ Orbitrap XL ist ein Fourier-Transformationsmassenspektrometer, welches sich durch eine extrem hohe Massengenauigkeit (≤ 1 ppm bei interner Kalibrierung), eine hohe Auflösung (100.000) sowie Sensitivität auszeichnet. Die Spannungen an den Düsen und Kapillaren betrug im positiven ESI-Modus 4.0 kV und 39 V. Der Stickstofffluss zur Zerstäubung betrug $15 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$. Die Quelle und die Elektrospray-Kapillare wurden auf 58.5°C bzw. 270°C geheizt. Zur Separation wurde eine Symmetry[®] C18-Säule (100 mm x 2.1 mm, $3.5 \mu\text{m}$, Waters, Eschborn, D) verwendet (Flussrate $0.3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

HPLC-Methode: MeCN (0.1% FA)-H ₂ O (0.1% FA),	0 min	98:2%
	4 min	96:4%
	11 min	82:18%
	15 min	72:28%
	20 min	47:53%
	22 min	7:93%
	27 min	7:93%
	27.10 min	98:2%
	30 min	98:2%

6. Literaturverzeichnis

- (1) Dewick, P. M., Medicinal natural products. A biosynthetic approach **2002**, Wiley, New York.
- (2) Harborne, J. B., Introduction to ecological biochemistry, 4. ed., Academic press **1993**, London.
- (3) Luckner, M., Secondary metabolism in microorganism, plants and animals, Springer **1990**, Heidelberg.
- (4) Roberts, M. F., Wink, M., Alkaloids-Biochemistry, ecological functions and medical applications, Plenum **1998**, New York.
- (5) von Baeyer, A., *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 51-70 (1900).
- (6) Benson, A. A., Calvin, M., *Annual Reviews in Plant Physiology* **1**, 25-42 (1950).
- (7) Eisenreich, W., Bacher, A., *Phytochemistry* **68**, 2799-2815 (2007).
- (8) Lawson, A. M., *Clinical Chemistry* **21**, 803-824 (1975).
- (9) Hartmann, T., *Phytochemistry* **68**, 2831-2846 (2007).
- (10) Block, G., Patterson, B., Subar, A., *Nutrition and Cancer* **18**, 1-29 (1992).
- (11) Della Greca, M., Lanzetta, R., Molinaro, A., Monaco, P., Previtiera, L., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2**, 311-314 (1992).
- (12) Hölscher, D., Schneider, B., *Phytochemistry* **66**, 59-64 (2005).
- (13) Hölscher, D., Schneider, B.: *Journal of Natural Products* **63**, 1027-1028 (2000).
- (14) Kamo, T., Hirai, N., Iwami, K., Fujioka, D., Ohigashi, H., *Tetrahedron* **57**, 7649-7656 (2001).
- (15) Luis, J. G., Fletcher, W. Q., Echeverri, F., Abad, T., Kishi, M. P., Perales, A., *Natural Product Letters* **6**, 23-30 (1995).
- (16) Luis, J. G., Fletcher, W. Q., Echeverri, F., Grillo, T. A., Perales, A., Gonzales, J. A., *Tetrahedron* **51**, 4117-4130 (1995).
- (17) Luis, J. G., Fletcher, W. Q., Echeverri, F., Grillo, T. A., *Tetrahedron* **50**, 10963-10970 (1994).
- (18) Luis, J. G., Quiñones, W., Echeverri, F., Grillo, T. A., Kishi, M., García-García, F., Torres, F., Cardona, G., *Phytochemistry* **41**, 753-757 (1996).
- (19) Simmonds, N. W. Bananas. Longman **2 nd ed.**, 512 (1982), London.
- (20) Luis, J. G., Echeverri, F., Quinines, W., Brito, I., Lopez, M., Torres, F., Cardona, G., Aguiar, Z., Pelaez, C., Rojas, M., *Journal of Organic Chemistry* **58**, 4306-4308 (1993).
- (21) Kornfeld, J. M., Edwards, J. M., *Biochimica et Biophysica Acta* **286**, 88-90 (1972).
- (22) Millspaugh, C. F., American Medicinal Plants, Caxton Press of Sherman **1887**, Philadelphia.
- (23) Schultes, R. E., *Journal of Ethnopharmacology* **38**, 129-135 (1993).

- (24) Schwenk, E., *Arzneimittel-Forschung* **12**, 1143 (1962).
- (25) Binks, R. H., Greenham, J. R., Luis, J. G., Gowen, S. R., *Phytochemistry* **45**, 47-49 (1997).
- (26) Kamo, T., Hirai, N., Tsuda, M., Fujioka, D., Ohigashi, H., *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **64**, 2089-2098 (2000).
- (27) Hirai, N., Ishida, H., Koshimizu, K., *Phytochemistry* **37**, 383-385 (1994).
- (28) Grisebach, H., Ebel, J., *Angewandte Chemie* **90**, 668-681 (1978).
- (29) Osbourn, A. E., *The Plant Cell* **8**, 1821-1831 (1996).
- (30) Luis, J. G., Lahlou, E. H., Andres, L. S., Echeverri, F., Fletcher, W. Q., *Tetrahedron* **53**, 8249-8256 (1997).
- (31) Hopper, S.D., Kangaroo Paws and Catspaws, Dept. of Conversation and Land Management, Perth (1993).
- (32) Simpson, M. G., *Systematic Botany* **18**, 593-613 (1993).
- (33) Hopper, S. D., Fay, M. F., Rossetto, M., Chase, M. W., *Botanic Journal of the Linnean Society* **131**, 285-299 (1999).
- (34) Simpson, M. G., Haemodoraceae. *The Families and Genera of Vascular Plants, vol. IV: Flowering Plants-Monocotyledons*, Springer, 1998.
- (35) Simpson, M. G.: Phylogeny and classification of the Haemodoraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **77**, 722-784 (1990).
- (36) Ascherson, P., *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1**, 498-502 (1883).
- (37) Grieve, B. J., Marchant, N., *Australia Plants* **2**, 107-115 (1963).
- (38) Schubert, R., *Geogr. Ber.* **116**, 177-185 (1985).
- (39) Baird, A. M., *Journal of the Royal Society of Western Australia* **60**, 1-22 (1977).
- (40) Speck, N., H., Baird, A., M., *Journal of the Royal Society of Western Australia* **66**, 147-162 (1983).
- (41) Dixon, B., *Australia Plants* **16**, 77-87 (1991).
- (42) Hopper, S. D., Campbell, N. A., *Australian Journal of Botany* **25**, 523-544 (1977).
- (43) Hölscher, D., Schneider, B., *Phytochemistry* **45**, 87-91 (1997).
- (44) Hölscher, D., Schneider, B., *Phytochemistry* **43**, 471-473 (1996).
- (45) Schneider, B., *Phytochemistry* **64**, 459-462 (2003).
- (46) Otalvaro, F., Görls, H., Hölscher, D., Schmitt, B., Echeverri, F., Quinones, W., Schneider, B., *Phytochemistry* **60**, 61-66 (2002).
- (47) Schmitt, B., Hölscher, D., Schneider, B., *Phytochemistry* **53**, 331-337 (2000).
- (48) Helme, N. A., Linder, H. P., *Bothalia* **22**, 59-75 (1992).
- (49) Opitz, S., Schneider, B., *Phytochemistry* **62**, 307-312 (2003).
- (50) Cooke, R. G., Thomas, R. L., *Australian Journal of Chemistry* **28**, 1053-1057 (1975).
- (51) Bick, I. R. C., Blackman, A. J., *Australian Journal of Chemistry* **26**, 1377-1380 (1973).

- (52) Opitz, S.: Phenylphenalenones and related phenolic pigments of the Haemodoraceae: structure, biosynthesis and accumulation patterns in *Xiphidium caeruleum* and *Wachendorfia thyrsiflora*. Biologisch-Pharmazeutische Fakultät. Universität Jena. Jena (2002).
- (53) Opitz, S., Ojalvaro, F., Echeverri, F., Quinones, W., Schneider, B.: *Natural Product Letters* **16**, 335-338 (2002).
- (54) Edwards, J. M., Weiss, U., *Phytochemistry* **13**, 1597-1602 (1974).
- (55) Cooke, R. G., Segal, W., *Australian Journal of Chemistry* **8**, 107-113 (1955a).
- (56) Cooke, R. G., Segal, W., *Australian Journal of Chemistry* **8**, 413-421 (1955b).
- (57) Cooke, R. G., Edwards, J. M., *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* **40**, 153-190 (1981).
- (58) Cooke, R. G., Dagley, I. J., *Australian Journal of Chemistry* **32**, 1841-1847 (1979).
- (59) Hammerschmidt, R., *Annual Reviews in Phytopathology* **37**, 285-306 (1999).
- (60) Thomas, R., *Biochemical Journal* **78**, 807-813 (1961).
- (61) Thomas, R., *Journal of the Chemical Society D, Chemical Communication*, 739-740 (1971).
- (62) Edwards, J. M., Schmitt, R. C., Weiss, U., *Phytochemistry* **11**, 1717-1720 (1972).
- (63) Harmon, A. D., Edwards, J. M., Highet, R. J., *Tetrahedron Letters*, 4471-4474 (1977).
- (64) Hölscher, D., Schneider, B., *Natural Product Letters* **7**, 177-182 (1995a).
- (65) Hölscher, D., Schneider, B., *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 525-526 (1995b).
- (66) Schmitt, B., Schneider, B., *Phytochemistry* **52**, 45-53 (1999).
- (67) Hölscher, D. J.: Biosynthese und Strukturermittlung von Phenylphenalenonen aus *Anigozanthos preisii* Endl. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät. Martin-Luther-Universität Halle. Halle-Wittenberg (1996).
- (68) Kamo, T., Kato, N., Hirai, N., Tsuda, M., Fujioka, D., Ohigashi, H., *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **62**, 95-101 (1998).
- (69) del Rio, J. C., Jimenez-Barbero, J., Chavez, M. I., Politi, M., Gutierrez, A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8744-8748 (2006).
- (70) Sayyed, I. A., Sudalai, A., *Tetrahedron Asymmetry* **15**, 3111-3116 (2004).
- (71) Schwetlick, K., *Organikum* **10. Auflage**, 510 (1971).
- (72) Katritzky, A. R., *Journal of the Chemical Society*, 2586-2598 (1955).
- (73) Tanaka, K., Matsuo, K., Nakanishi, A., Hatano, T., Izeki, H., Ishida, Y., Mori, W., *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **31**, 2810-2819 (1983).
- (74) Brown, T. H., Blakemore, R. C., Durant, G. J., Emmett, J. C., Ganellin, C. R., Parsons, M. E., Rawlings, D. A., Walker, T. F., *European Journal of Medicinal Chemistry* **23**, 53-62 (1988).

- (75) Kolb, H. C., VanNieuwenhze, M. S., Sharpless, K. B., *Chemical Reviews* **94**, 2483-2547 (1994).
- (76) Lohray, B. B., *Synthesis*, 1035-1052 (1992).
- (77) Byun, H. S., He, L., Bittman, R., *Tetrahedron* **56**, 7051-7091 (2000).
- (78) Bonini, C., Chiummiento, L., De Bonis, M., Funicello, M., *Tetrahedron Letters* **45**, 2797-2799 (2004).
- (79) Fox, D. J., Parris, S., Pedersen, D. S., Tyzack, C. R., Warren, S., *Organic and Biomolecular Chemistry* **4**, 3108-3112 (2006).
- (80) Gololobov, Y. G., Zhmurova, I. N., Kasukhin, L. F., *Tetrahedron* **37**, 437-472 (1981).
- (81) Davis, F. A., Wu, Y., Yan, H., McCoull, W., Prasad, K. R., *Journal of Organic Chemistry* **68**, 2410-2419 (2003).
- (82) Hu, X. E., *Tetrahedron* **60**, 2701-2743 (2004).
- (83) Klein, C., Schulz, G., Steglich, W., *Liebigs Annalen der Chemie*, 1638-1639 (1983).
- (84) Weygand, F., Steglich, W., Tanner, H., *Liebigs Annalen der Chemie* **658**, 128-150 (1962).
- (85) Wilson, M. L., Coscia, C. J., *Journal of Organic Chemistry* **44**, 301-302 (1979).
- (86) Steglich, W., *Fortschr. Chem. Forsch.* **12**, 77 (1969).
- (87) Valls, N., Lopez-Canet, M., Vallribera, M., Bonjoch, J., *Chemistry-A European Journal* **7**, 3446-3460 (2001).
- (88) Wang, Z., La, B., Fortunak, J. M., Meng, X.-J., Kabalka, G. W., *Tetrahedron Letters* **39**, 5501-5504 (1998).
- (89) Aikins, J. A., Haurez, M., Rizzo, J. R., Van Hoeck, J. P., Brione, W., Kestemont, J. P., Stevens, C., Lemair, X., Stephenson, G. A., Marlot, E., Forst, M., Houpis, I. N., *Journal of Organic Chemistry* **70**, 4695-4705 (2005).
- (90) Rackham, D. M., *Spectroscopy Letters* **13**, 321-327 (1980).
- (91) Coxon, J. M., Cambridge, J. R. A., Nam, S. G. C., *Synlett* **8**, 1422-1424 (2004).
- (92) Fujisawa, T., Mori, T., Tsuge, S., Sato, T., *Tetrahedron Letters* **24**, 1543-1546 (1983).
- (93) Baranovsky, A., Schmitt, B., Fowler, D. J., Schneider, B., *Synthetic Communication* **33**, 1019-1045 (2003).
- (94) Collado, I., Ezquerro, J., Mazon, A., Pedregal, C., Yruretagoyena, B., Kingston, A. E., Tomlinson, R., Wright, R. A., Johnson, B. G., Schoepp, D. D., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **8**, 2849-2854 (1998).
- (95) Konno, M., Nakae, T., Sakuyama, S., Nishizaki, M., Odagaki, Y., Nakai, H., Hamanaka, N., *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **5**, 1621-1647 (1997).
- (96) Vig, O. P., Bari, S. S., Sharma, A., Satter, M. A., *Indian Journal of Chemistry B.* **29**, 284-286 (1990).
- (97) Hinklin, R. J., Kiessling, L. L., *Organic Letters* **4**, 1131-1133 (2002).
- (98) Simpson, J. M., Kapp, D. C., Chapman, T. M., *Synthesis*, 100-102 (1979).

- (99) Hudlicky, M., *Journal of Organic Chemistry* **45**, 5377-5378 (1980).
- (100) Saito, K., Ohmoto, J., Kuriha, N., *Phytochemistry* **44**, 805-809 (1997).
- (101) Eisenreich, W., Menhard, B., Lee, M. S., Zenk, M. H., Bacher, A., *Journal of the American Chemical Society* **120**, 9694-9695 (1998).
- (102) Hecht, St., Kammhuber, K., Reiner, J., Bacher, A., Eisenreich, W., *Phytochemistry* **65**, 1057-1060 (2004).
- (103) Risley, J. M., VanEtten, R. L., *Journal of the American Chemical Society* **101**, 252-253 (1979).
- (104) Risley, J. M., VanEtten, R. L., *Journal of the American Chemical Society* **102**, 4609-4614 (1980).
- (105) Vederas, J. C., *Journal of the American Chemical Society* **102**, 374-376 (1980).
- (106) Braun, S., Kalinowski, H. O., Berger, S., 150 and More Basic NMR Experiments **1998**, Wiley, Weinheim.
- (107) Risley, J. M., VanEtten, R. L., *NMR Principles Progress* **22**, 81 (1990).
- (108) Jang, D. S., Park, E. J., Hawthorne, M. E., Vigo, J. S., Graham, J. G., Cabieses, F., Santarsiero, B. D., Mesecar, A. D., Fong, H. H. S., Mehta, R. G., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 6330-6334 (2002).
- (109) Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Banerjee, R. K., *Current Science* **87**, 44-53 (2004).
- (110) Frommer, W. B., Hummel, S., Riesmeier, J. W., *Plant Biology* **90**, 5944-5948 (1993).
- (111) Hsu, L.-C., Chiou, T.-J., Chen, L., Bush, D. R., *Plant Biology* **90**, 7441-7445 (1993).
- (112) Kwart, M., Hirner, B., Hummel, S., Frommer, W. B., *The Plant Journal* **4**, 993-1002 (1993).
- (113) Fischer, W.-N., Kwart, M., Hummel, S., Frommer, W. B., *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 16315-16320 (1995).
- (114) Okumoto, S., Schmidt, R., Tegeder, M., Fischer, W.-N., Rentsch, D., Frommer, W. B., Koch, W., *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 45338-45346 (2002).
- (115) Hertweck, Ch., Moore, B. S., *Tetrahedron* **56**, 9115-9120 (2000).
- (116) Rathke, M. W., Lindert, A., *Journal of Organic Chemistry* **35**, 3966-3967 (1970).
- (117) Viscontini, M., Adank, K., *Helvetica Chimica Acta* **35**, 1342-1347 (1952).
- (118) Ehltling, J., Hamberger, B., Million-Rousseau, R., Werck-Reichhart, D., *Phytochemistry Review* **5**, 239-270 (2006).
- (119) Hölischer, D., Brand, S., Wenzler, M., Schneider, B., *Journal of Natural Products* **71**, 251-257 (2008).
- (120) Quelle: <http://florabase.calm.wa.gov.au/browse/photo/1413>
- (121) Opitz, S., Hölischer, D., Oldham, N. J., Bartram, S., Schneider, B., *Journal of Natural Products* **65**, 1122-1130 (2002).

- (122) Hölscher, D., Reichert, M., Görls, H., Ohlenschläger, O., Bringmann, G., Schneider, B., *Journal of Natural Products* **69**, 1614-1617 (2006).
- (123) Otálvaro, F., Nanclares, J., Estella, L., Quinones, W., Echeverri, W., Arango, R., Schneider, B., *Journal of Natural Products* **70**, 887-890 (2007).
- (124) Jitsaeng, K.: Phytochemistry and Response of *Musa* sp. and related species to elucidation. Biologisch-Pharmazeutische Fakultät. Friedrich-Schiller-Universität Jena. Jena (2009), in Vorbereitung.
- (125) Quinones, W., Escobar, G., Echeverri, F., Torres, F., Rosero, Y., Arango, V., Cardona, G., Gallego, A., *Molecules* **5**, 974-980 (2000).
- (126) Tønnesen, H. H., Karlsen, J., Adhikary, S. R., Pandey, R., *European Food Research and Technology* **189**, 116-118 (1989).
- (127) Asakawa, Y., Genjida, F., Hayashi, S., Matsuura, T., *Tetrahedron Letters* **38**, 3235-3237 (1969).
- (128) Tori, M., Hashimoto, A., Hirose, K., Asakawa, Y., *Phytochemistry* **40**, 1263-1264 (1995).
- (129) Roughley, P. J., Whiting, D. A., *Tetrahedron Letters* **12**, 3741-3746 (1971).
- (130) Inoue, T., Kenmochi, N., Furukawa, N., Fujita, M., *Phytochemistry* **26**, 1409-1411 (1987).
- (131) Kamo T., Kato N., Hirai N., Tsuda M., Fujioka D., Ohigashi, H., *Phytochemistry* **49**, 1617-1621 (1998).
- (132) Otálvaro, F., Jitsaeng, K., Munde, T., Echeverri, F., Quinones, W., Schneider, B., *Phytochemistry* (submitted).

7. Anhang

7.1 Spektrenanhang

7.1.1 HR-MS-Spektren

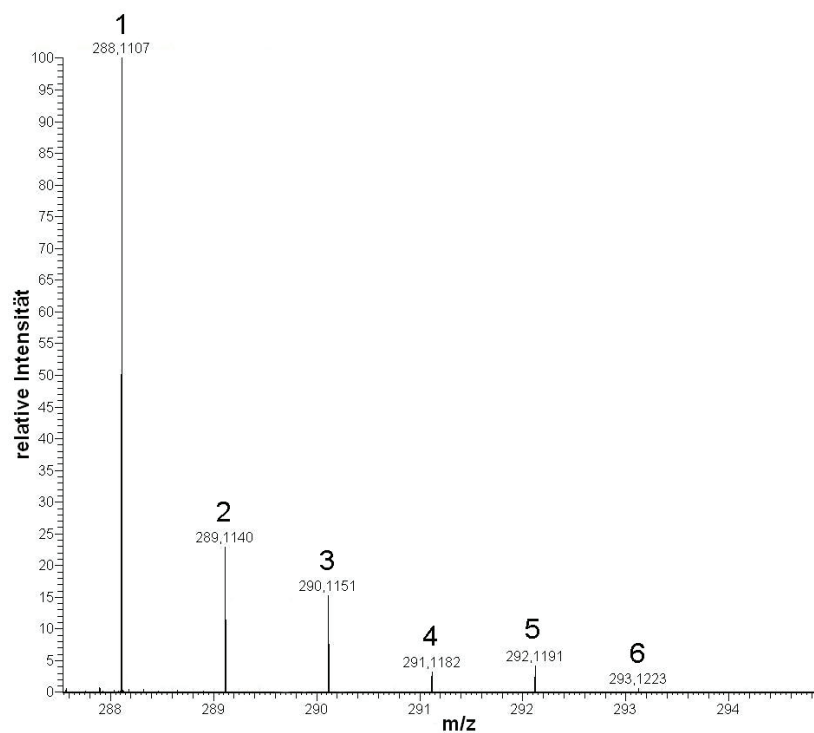


Abb. 8.1: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von $[2\text{-O}^{13}\text{CH}_3]\text{Methoxyanigorufon}$ (**75**) aus Fütterung mit $[2\text{-}^{13}\text{C}]\textit{p}$ -Cumarsäure (**56**) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Verbindung **75** wurde durch Methylierung von Anigorufon (**1**) mit $[^{13}\text{C}]\text{Diazomethan}$ erhalten. **1** - **6** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

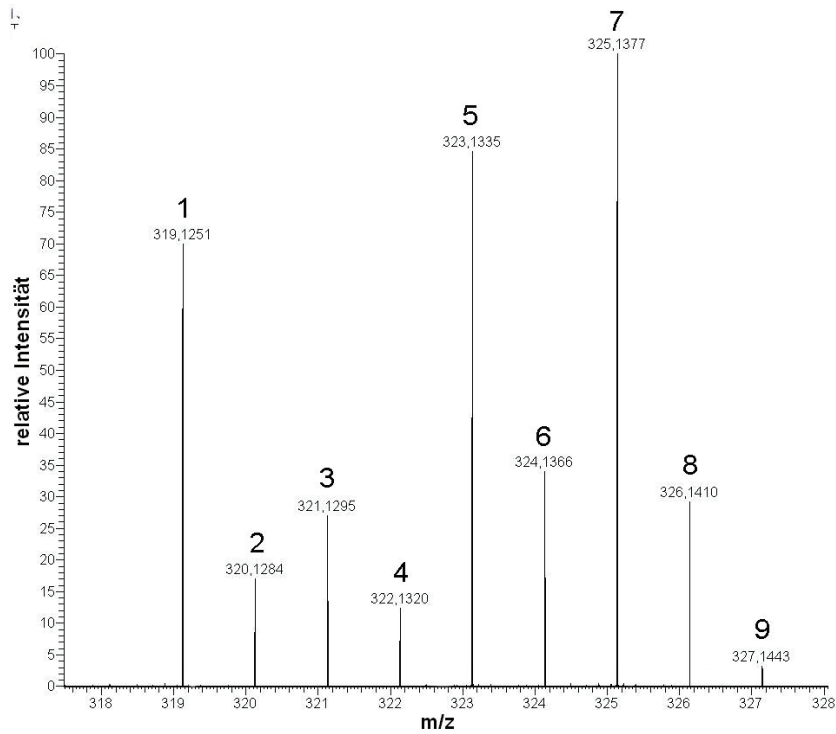


Abb. 8.2: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von $[2,4'\text{-di-O}^{13}\text{CH}_3]2,4'$ -Dimethoxyanigorufon (**76**) aus Fütterung mit $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Phenylalanin unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Verbindung **76** wurde durch Methylierung von Hydroxyanigorufon (**2**) mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan erhalten. **1 - 9** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

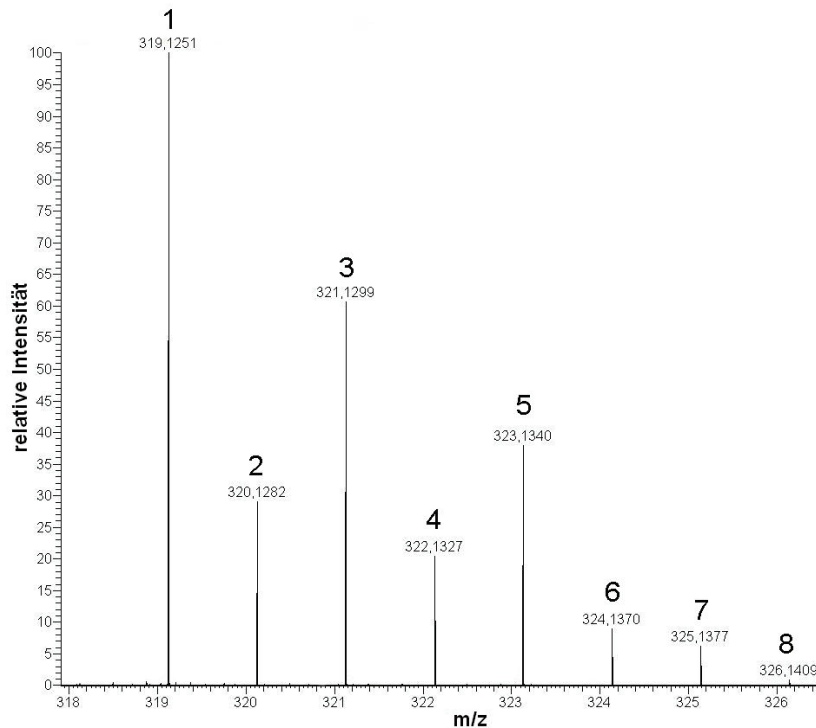


Abb. 8.3: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von $[2,4'\text{-di-O}^{13}\text{CH}_3]2,4'$ -Dimethoxyanigorufon (**76**) aus Fütterung mit $[2\text{-}^{13}\text{C}]p$ -Cumarsäure (**56**) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Verbindung **76** wurde durch Methylierung von Hydroxyanigorufon (**2**) mit $[^{13}\text{C}]$ Diazomethan erhalten. **1 - 8** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

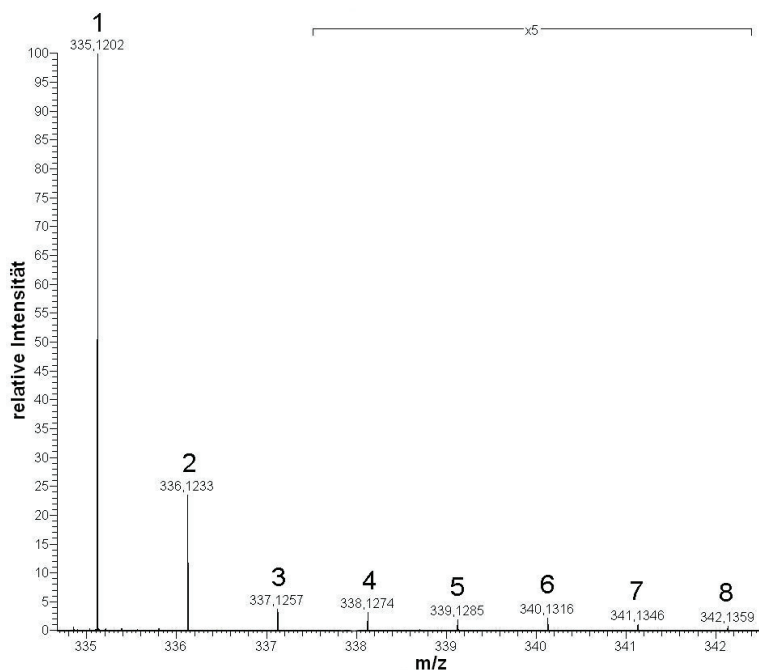


Abb. 8.4: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von [2,5-di- $^{13}\text{C}_3$]6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**77**) aus Fütterung mit [2- ^{13}C]Phenylalanin unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Verbindung **77** wurde durch Methylierung von 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) mit [^{13}C]Diazomethan erhalten. **1 - 8** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

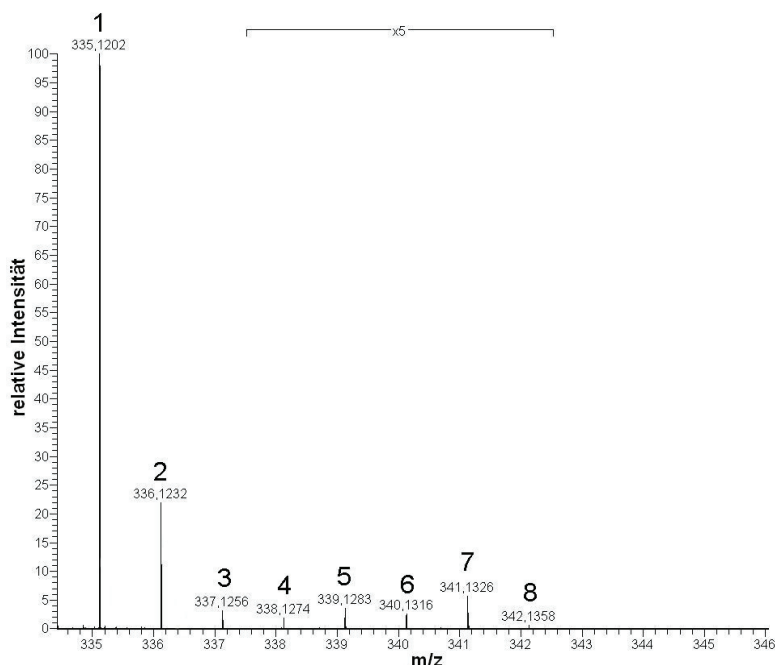


Abb. 8.5: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von [2,5-di- $^{13}\text{C}_3$]6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**77**) aus Fütterung mit [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**69**) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Verbindung **77** wurde durch Methylierung von 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) mit [^{13}C]Diazomethan erhalten. **1 - 8** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

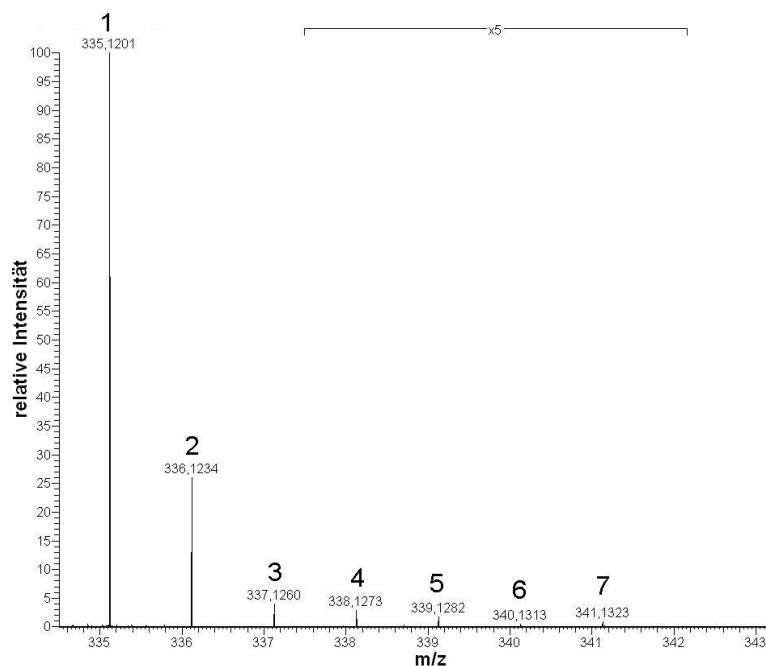


Abb. 8.6: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von [2,5-di-O¹³CH₃]6-O-[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**77**) aus Fütterung mit [6-¹³C]Diarylheptanoid **68** unter ¹⁸O₂-Atmosphäre. Verbindung **77** wurde durch Methylierung von 6-O-[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) mit [¹³C]Diazomethan erhalten. **1 - 7** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

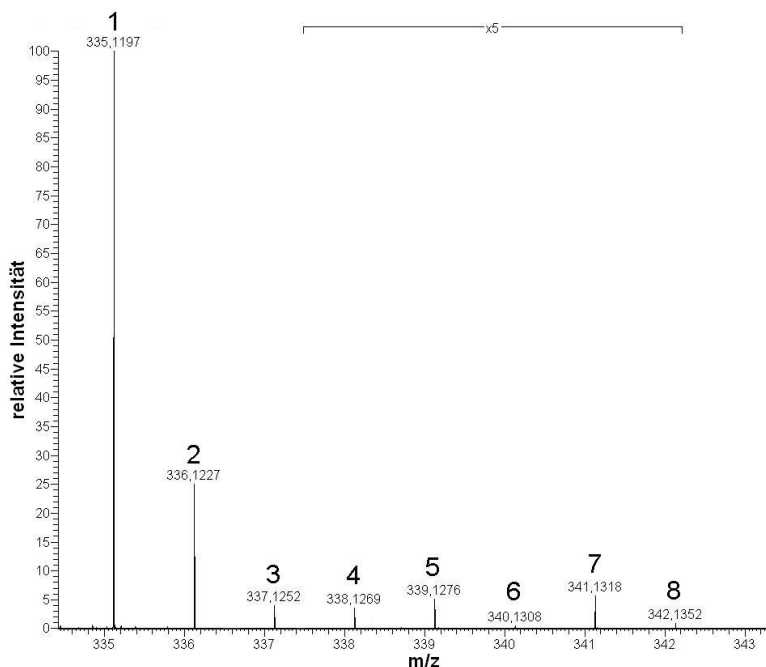


Abb. 8.7: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von [2,5-di-O¹³CH₃]6-O-[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**77**) aus Fütterung mit [6-¹³C]Diarylheptanoid **69** unter ¹⁸O₂-Atmosphäre. Verbindung **77** wurde durch Methylierung von 6-O-[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenylphenalen-1-on (**25**) mit

[^{13}C]Diazomethan erhalten. **1 - 8** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

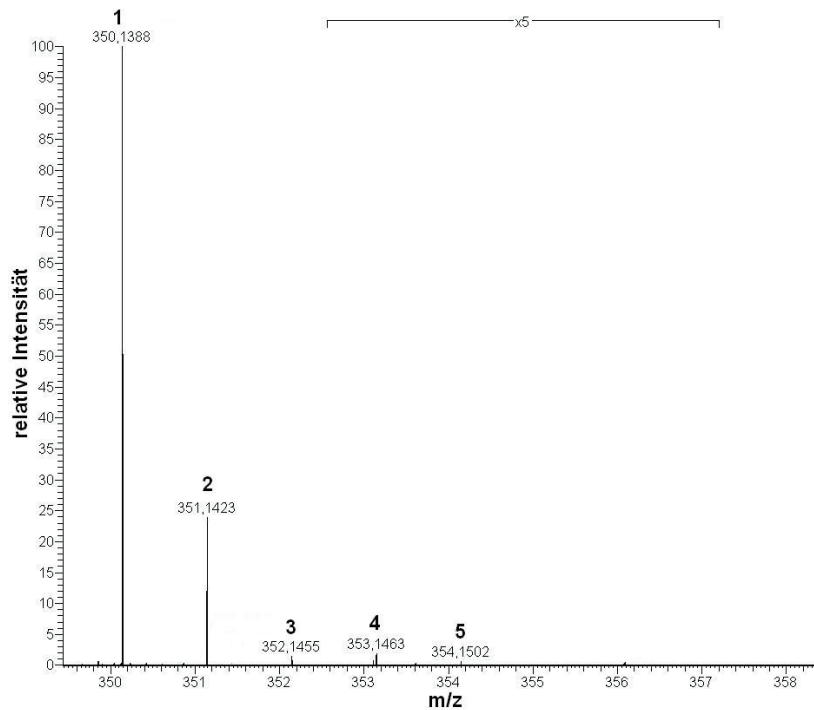


Abb. 8.8: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) aus Fütterung mit [2- ^{13}C]Phenylalanin unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Verbindung **78** wurde durch Methylierung von Lachnanthosid-Aglycon (**17**) mit [^{13}C]Diazomethan erhalten. **1 - 5** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

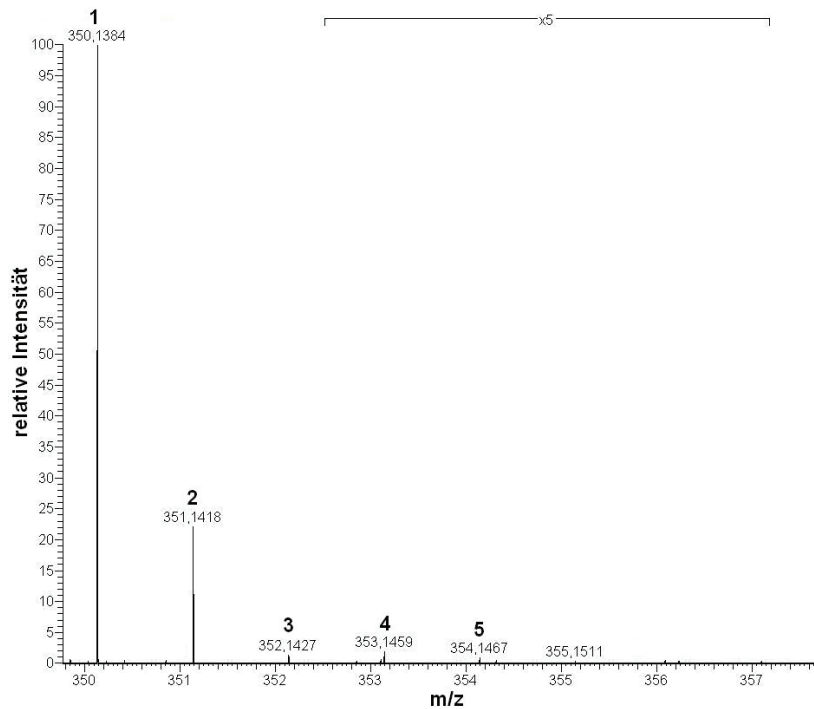


Abb. 8.9: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) aus Fütterung mit [2- ^{13}C]*p*-Cumarsäure (**56**) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Verbindung **78** wurde durch Methylierung von Lachnanthosid-Aglycon (**17**) mit

[^{13}C]Diazomethan erhalten. **1 - 5** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

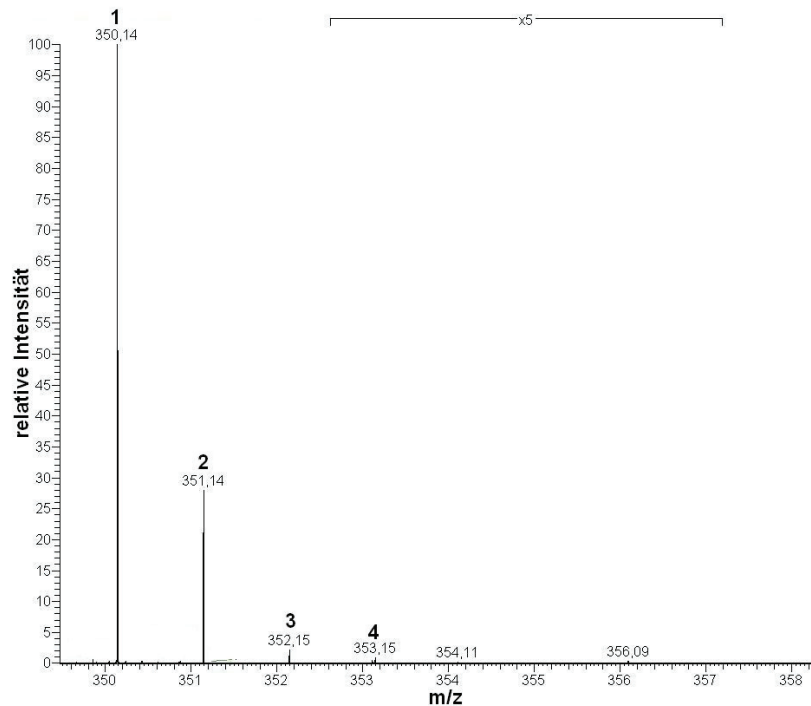


Abb. 8.10: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) aus Fütterung mit [$6\text{-}^{13}\text{C}$]Diarylheptanoid **68** unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Verbindung **78** wurde durch Methylierung von Lachnanthosid-Aglycon (**17**) mit [^{13}C]Diazomethan erhalten. **1 - 4** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

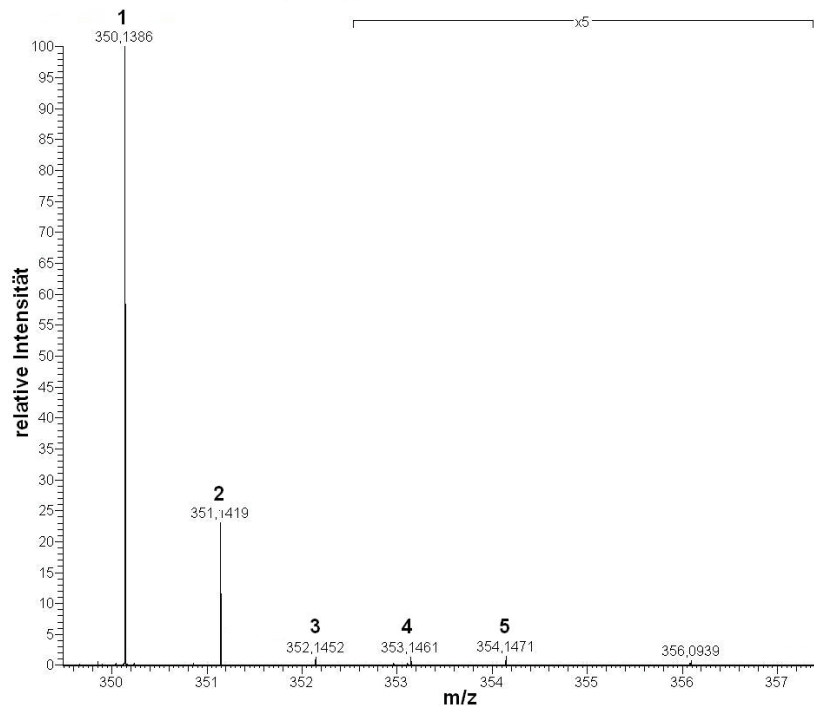


Abb. 8.11: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**) aus Fütterung mit [$6\text{-}^{13}\text{C}$]Diarylheptanoid **69** unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Verbindung **78** wurde durch Methylierung von Lachnanthosid-Aglycon (**17**) mit

[^{13}C]Diazomethan erhalten. **1 - 5** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

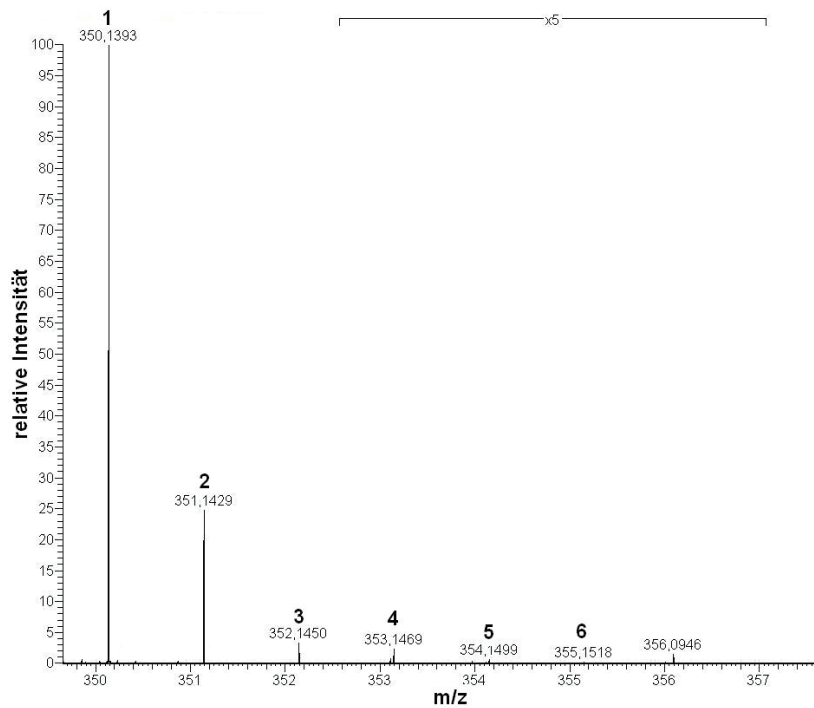


Abb. 8.12: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von [2,5,6-tri- ^{13}C]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (**79**) aus Fütterung mit [2- ^{13}C]Phenylalanin unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Verbindung **79** wurde durch Methylierung von Lachnanthosid-Aglycon (**17**) mit [^{13}C]Diazomethan erhalten. **1 - 6** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

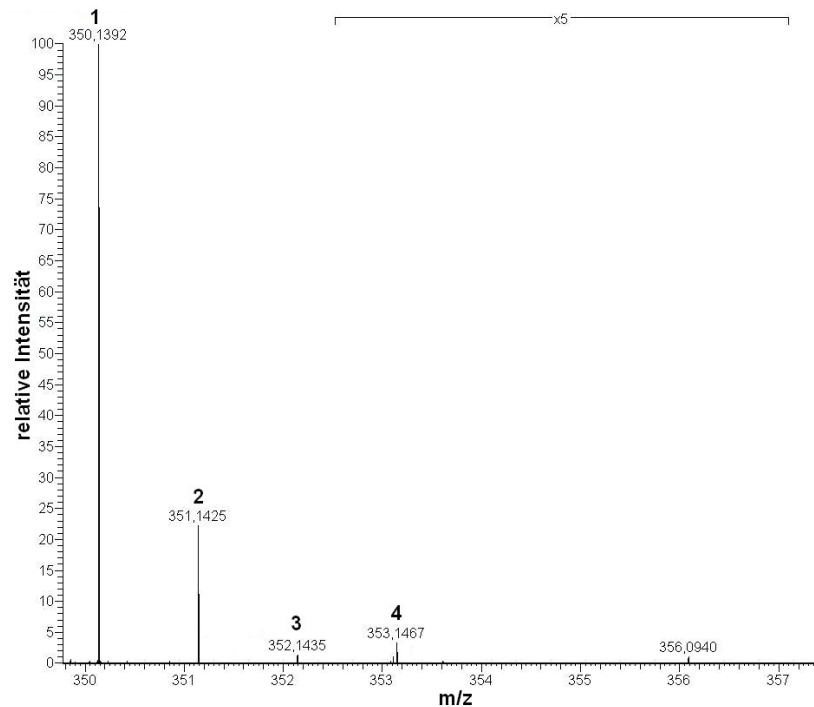


Abb. 8.13: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von [2,5,6-tri- ^{13}C]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (**79**) aus Fütterung mit [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Verbindung **79** wurde durch Methylierung von Lachnanthosid-Aglycon (**17**) mit

[^{13}C]Diazomethan erhalten. **1 - 4** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

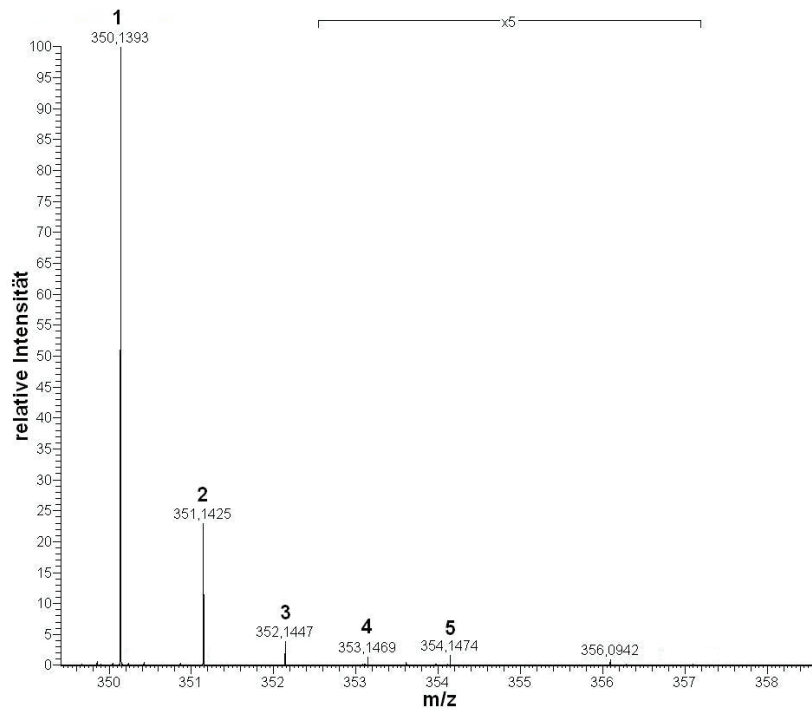


Abb. 8.14: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (**79**) aus Fütterung mit [$6\text{-}^{13}\text{C}$]Diarylheptanoid **68** unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Verbindung **79** wurde durch Methylierung von Lachnanthosid-Aglycon (**17**) mit [^{13}C]Diazomethan erhalten. **1 - 5** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

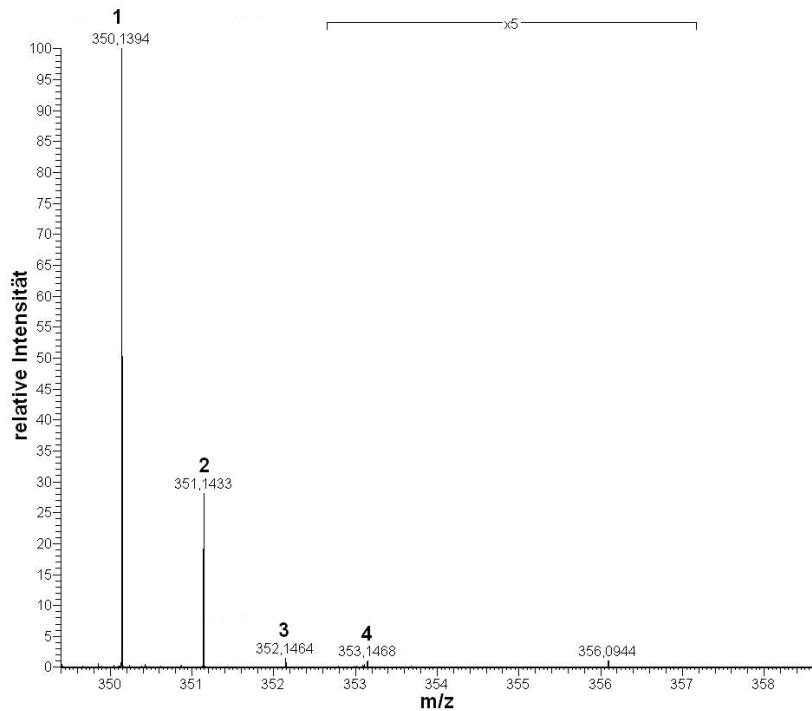


Abb. 8.15: Ausschnitt des HR-MS-Spektrums (positive Ionisierung) von [2,5,6-tri- O^{13}CH_3]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (**79**) aus Fütterung mit [$6\text{-}^{13}\text{C}$]Diarylheptanoid **69** unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. Verbindung **79** wurde durch Methylierung von Lachnanthosid-Aglycon (**17**) mit

[^{13}C]Diazomethan erhalten. **1 - 4** stellen Massenpeaks von Isotopologen und Isotopologgruppen mit unterschiedlichen Isotopenzusammensetzungen dar.

7.1.2 NMR-Spektren

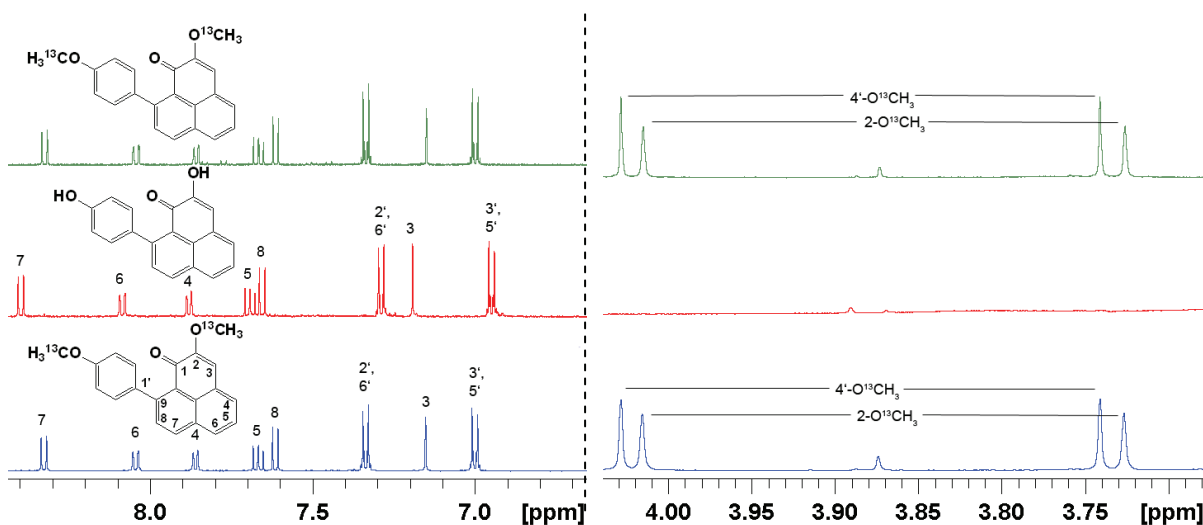


Abb. 8.16: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (500 MHz, Aceton- d_6 , ns = 64) von [2,4'-di- O^{13}CH_3]2,4'-Dimethoxyanigorufon (**76**). Das O^{13}CH_3 -Derivat wurde nach Fütterung von [$2\text{-}^{13}\text{C}$]Phenylalanin (blau) bzw. [$2\text{-}^{13}\text{C}$]p-Cumarsäure (**56**) (grün) an *A. preissii* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre und Methylierung des daraus isolierten Hydroxyanigorufon (**2**) erhalten. Rotes Spektrum: unmarkiertes Hydroxyanigorufon als Referenz.

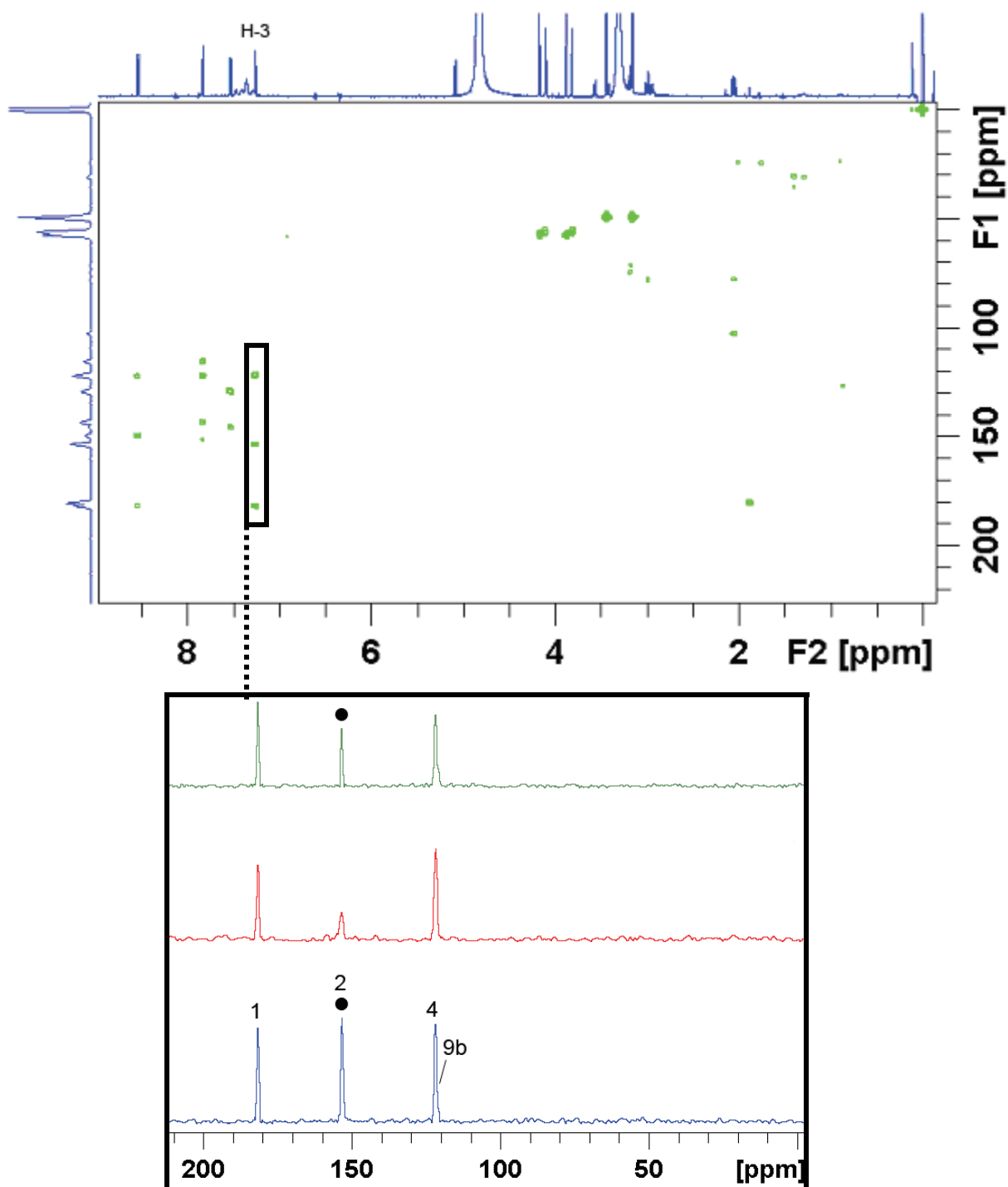


Abb. 8.17: HMBC-Spektrum (500 MHz, Aceton- d_6 , ns = 240) von [2,5-di- $O^{13}CH_3$]6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**77**). Ausschnitt: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spuren von Verbindung **77** nach Fütterung von [2- ^{13}C]Phenylalanin (blau), [2- ^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) (grün) unter $^{18}O_2$ -Atmosphäre mit unmarkiertem 6-O-[(6''-O-Allophanyl)- β -D-glucopyranosyl]-2,5-dimethoxy-7-phenylphenalen-1-on als Referenz (rot). Die ^{13}C -NMR-Spuren der mit H-3 (δ 7.29) korrelierenden ^{13}C -Atome wurden aus den entsprechenden HMBC-Spektren extrahiert. Verstärkte Signale weisen ^{13}C -Anreicherung in Position C-2 und damit den Einbau der markierten Vorstufen in die rechte Hälfte des Phenylphenalenons nach. ● = ^{13}C .

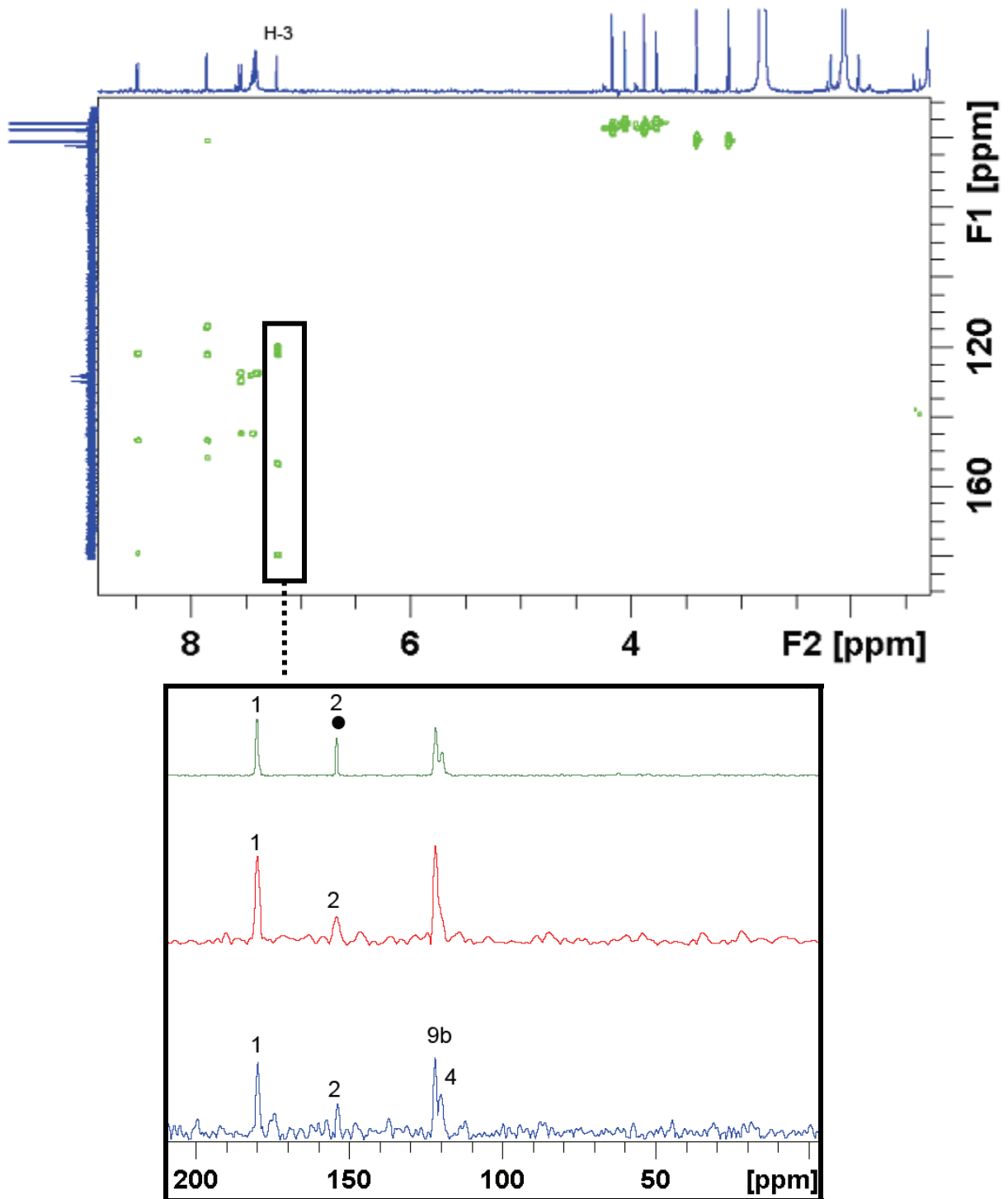


Abb. 8.18: HMBC-Spektrum (500 MHz, Aceton-*d*₆, ns = 240) von [2,5,6-tri-¹³CH₃]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on (**78**). Ausschnitt: Vergleich der ¹³C-NMR-Spuren von Verbindung **78** nach Fütterung von [2-¹³C]Phenylalanin (blau), [2-¹³C]p-Cumarsäure (**56**) unter ¹⁸O₂-Atmosphäre mit unmarkiertem [2,5,6-tri-¹³CH₃]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on als Referenz (rot). Die ¹³C-NMR-Spuren der mit H-3 (δ 7.22) korrelierenden ¹³C-Atome wurden aus den entsprechenden HMBC-Spektren extrahiert. Verstärkte Signale weisen ¹³C-Anreicherung in Position C-2 und damit den Einbau der markierten Vorstufen in die rechte Hälfte des Phenylphenalenons nach. ● = ¹³C.

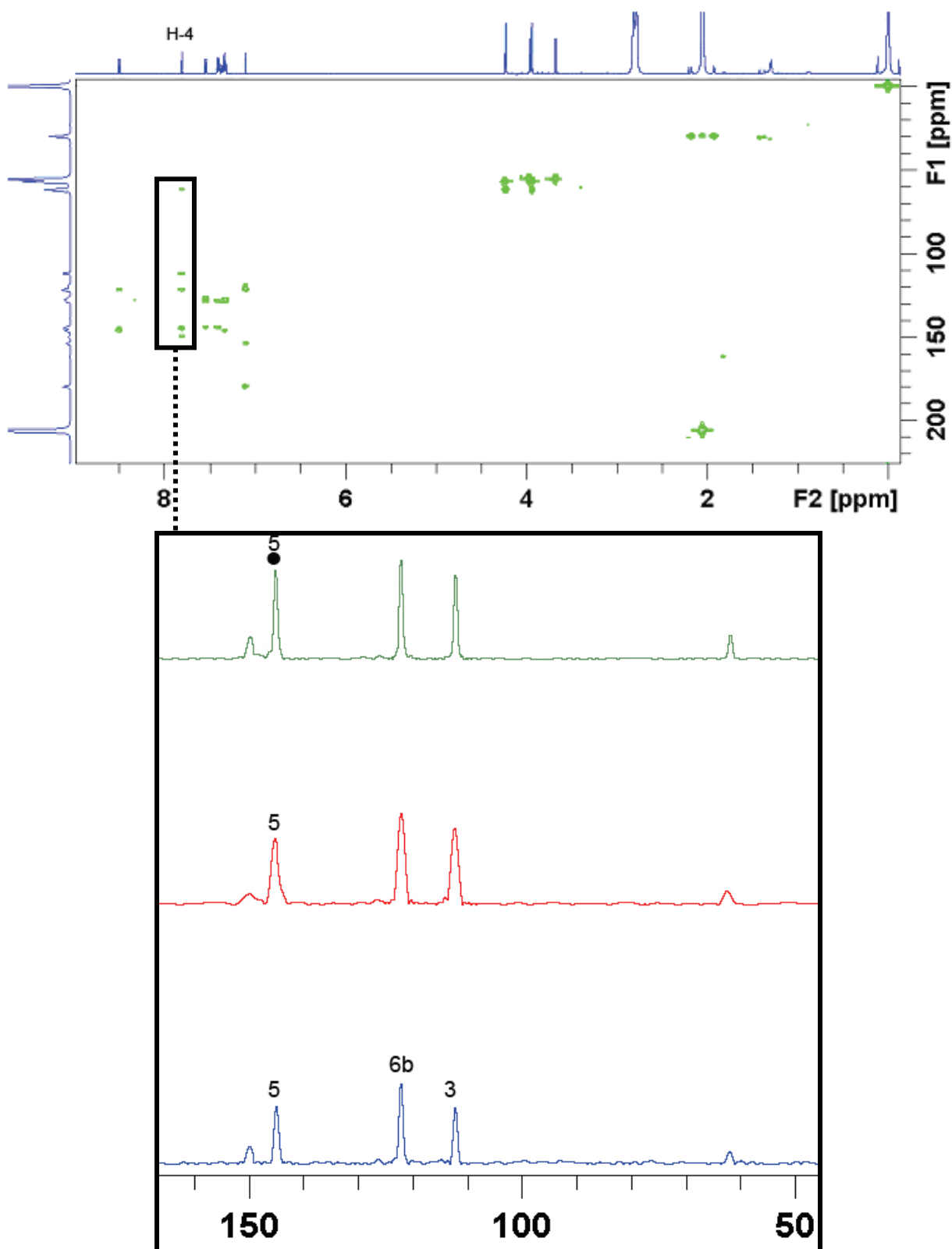


Abb. 8.19: HMBC-Spektrum (500 MHz, Aceton- d_6 , ns = 240) von [2,5,6-tri- ^{13}C] $^{13}\text{CH}_3$]2,5,6-Trimethoxy-9-phenylphenalen-1-on (**79**). Ausschnitt: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spuren von Verbindung **79** nach Fütterung von [^{13}C]Phenylalanin (blau), [^{13}C]p-Cumarsäure (**56**) (grün) unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre mit unmarkiertem [2,5,6-tri- ^{13}C] $^{13}\text{CH}_3$]2,5,6-Trimethoxy-7-phenylphenalen-1-on als Referenz (rot). Die ^{13}C -NMR-Spuren der mit H-4 (δ 7.82) korrelierenden ^{13}C -Atome wurden aus den entsprechenden HMBC-Spektren extrahiert. Verstärkte Signale weisen ^{13}C -Anreicherung in Position C-5 und damit den Einbau der markierten Vorstufen in die rechte Hälfte des Phenylphenalenons nach. ● = ^{13}C .

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. Bernd Schneider möchte ich mich für die interessante Thematik, die gewährte große Freiheit, die Anregungen, die persönlichen Gespräche und das in mich gesetzte Vertrauen bedanken.

Bei Prof. Dr. Bernd Ondruschka möchte ich mich für die Anfertigung des Zweitgutachtens bedanken.

Meinen Arbeitskreiskollegen Kati Gruner, Sonja Rosenlöcher, Dr. Renate Ellinger, Dr. Michael Wenzler, Dr. Christian Pätz, Dr. Silke Brand, Dr. Evangelos Tatsis, Kusuma Jitsaeng, Annika Lenz danke ich für die vielen fachlichen und nicht fachlichen Diskussionen und das angenehme Arbeitsklima.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft, DFG, sowie der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung meines Projektes.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern Institutes für deren Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken:

- Herrn Dr. Ales Svatos und Frau Sibylle Lorenz für die Aufnahme der MS-Spektren
- Prof. Dr. Wilhelm Boland und Prof. Dr. Jonathan Gershenzon für die Erlaubnis die Geräte und Labore ihrer Arbeitsgruppen mitbenutzen zu dürfen.
- Dr. Axel Schmidt und Dr. Silke Brand für ihre Hilfe im Isotopenlabor.
- Kati Gruner für die Aufzucht der Wurzelkulturen von *Anigozanthos preissii* und *Wachendorfia thyrsoiflora*.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und Freunden und Freundinnen die mir immer zur Seite standen und viele schöne Jahre in Jena bescherten.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, den 18.02.2009

Publikationen

- (1) Otalvaro, F., Jitsaeng, K., Munde, T., Echeverri, F., Quinones, W., Schneider, B.: O-Methylation of inducible phenylphenalenones in *Musa acuminata* and *Wachendorfia thyrsiflora*, *Phytochemistry* (submitted).
- (2) Munde, T., Brand, S., Schneider, B.: Further insides in the biosynthesis of phenylphenalenones: early or late oxidation?, in Vorbereitung.
- (3) Munde, T., Schneider, B.: Biosynthetic oxygenation of phenylphenalenones in *Anigozanthos preissii* studied by orthogonal $^{13}\text{C}/^{18}\text{O}$ labelling, in Vorbereitung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tobias Munde
Geburtsdatum: 01.02.1979
Geburtsort: Erfurt
Familienstand: ledig
Schulabschluss: Abitur

Schulbildung

06.1997 Allgemeine Hochschulreife
09.1991 - 06.1997 Besuch des Neideck-Gymnasiums in Arnstadt
09.1990 – 07.1991 Oberschule 9 in Arnstadt
09.1985 – 07.1990 Käthe-Kollwitz-Schule in Arnstadt

Berufsausbildung

10.2004 – 09.2008 Doktorat am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena, Abteilung Biosynthese/NMR unter Leitung von PD Dr. Bernd Schneider
07.2003 – 07.2004 Diplomarbeit in Chemie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena in Kooperation mit DEGUSSA Construction Chemicals
10.1998 – 07.2004 Studium der Chemie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Berufspraxis

07.2002 – 09.2002 Praktikum bei DEGUSSA Construction Chemicals in Freising
Aufgabe: Synthese von Polyethylenglycol gekoppelten Kohlenhydraten als Fließmittel für Beton und Mörtel
05.2002 – 07.2002 studentische Hilfskraft an der Friedrich-Schiller-Universität Jena am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie in der Arbeitsgruppe Naturstoffchemie/ Polysaccharide von Prof. Dr. Dieter Klemm in Kooperation mit Dr. Lars Einfeldt von DEGUSSA Construction Chemicals
07.2001 – 09.2001 Werksstudent bei der BASF AG
Aufgabe: Arbeit in der Sulfonatfabrik, Überwachung der Anlage, Probennahme am Reaktor und Analysen der Proben

Sonstige Tätigkeiten

10.2004 – 10.2008	PR-Beauftragter der Arbeitsgruppe Biosynthesis/NMR am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie
05.2000 – 06.2002	Mitarbeiter der REWE-Zentral AG im Logistikzentrum Neudietendorf
06.1999 – 10.2004	Nebenjob in der Firma RK-Event (Tätigkeiten in der Veranstaltungs- und Messebetreuung)
07.1997 – 07.1998	Zivildienst im Marienstift Arnstadt

Jena, 15.05.2009