



UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES

Untersuchungen zur stereochemischen Zusammensetzung von Myrtucommulonen mittels chiraler HPLC und CD-Spektroskopie

Dissertation

zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen-Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von

Marcus Hans

Saarbrücken 2016

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2012 bis Februar 2016, in der Fachrichtung 8.1 Chemie der Universität des Saarlandes unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Johann Jauch (Organische Chemie II).

Tag des Kolloquiums: Freitag, den 27.05.2016

Dekan: Prof. Dr. –Ing. Dirk Bähre

Berichtersteller: Prof. Dr. Johann Jauch

PD. Dr. Ralf Kautenburger

Vorsitz: Prof. Dr. Andreas Speicher

Akad. Mitarbeiter: Dr. Bernd Morgenstern

Nichts existiert, als die Atome und der leere Raum, alles andere ist Meinung.

(Demokrit ca. 460 v. Chr.)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	- 1 -
1.1. Naturstoffe: Moderne oder altertümliche Medizin ?	- 1 -
1.2. Geschichte der Myrte	- 2 -
1.3. Ethnobotanik der Myrte	- 3 -
1.4. Pharmazeutisch wichtige Inhaltstoffe der Myrte	- 5 -
1.5. Myrtus communis - Stand der Forschung.....	- 6 -
1.5.1. Chronologie über die Isolierung der Myrtucommulone	- 6 -
1.5.2. Weitere wichtige Pflanzeninhaltsstoffe	- 12 -
1.5.3. Zusammenfassung der pharmazeutischen Eigenschaften	- 13 -
1.5.3.1. Antibakterielle Aktivität	- 13 -
1.5.3.2. Entzündungshemmende Wirkung	- 13 -
1.5.3.3. Schmerzlindernde Wirkung	- 14 -
1.5.3.4. Antioxidative Wirkung.....	- 14 -
1.5.3.5. Antidiabetische Wirkung.....	- 14 -
1.5.3.6. Zytotoxische Wirkung	- 14 -
1.5.4. Synthese von Myrtucommulon A (1).....	- 15 -
1.6. Warum Enantiomeranalytik ?	- 16 -
1.6.1. Lineare Polysaccharide	- 18 -
1.6.2. Zyklische Polysaccharide	- 19 -
1.6.3. Aminosäurephasen.....	- 20 -
1.6.4. Pirkle-Phasen	- 21 -
1.6.5. TAPA-Phase	- 23 -
1.6.5.1. Synthese von enantiomerenreinem TAPA (28, 29)	- 24 -
1.6.5.2. Herstellung des Säulenmaterials.....	- 24 -
1.6.5.3. Trennungen mit TAPA-Säulen	- 24 -
1.6.6. Reprosil Chiral NR	- 26 -
1.7. Ziele dieser Arbeit	- 27 -

2. Ergebnisse und Diskussion	- 29 -
2.1. Stand der Forschung aus der Master-Arbeit	- 29 -
2.1.1. Unzyklisierte Myrtucommulone	- 29 -
2.1.2. Zyklisierte Myrtucommulone.....	- 32 -
2.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Masterarbeit.....	- 34 -
2.2. Herstellung eines Myrte-Rohextrakts und Auftrennung in verschiedene Fraktionen.....	- 35 -
2.2.1. Massenspektroskopische Untersuchungen der Fraktionen	- 37 -
2.3. Myrtucommulon A (1).....	- 44 -
2.3.1. Isolierung von MC A (1).....	- 44 -
2.3.2. Analytik von MC A (1).....	- 47 -
2.3.2.1. Massenspektrum (EI) von (1).....	- 47 -
2.3.2.2. Massenspektrum ESI (-) von 1	- 49 -
2.3.2.3. NMR-Spektroskopie, CD-Spektroskopie, Polarimetrie.....	- 50 -
2.4. Pentazyklisches Myrtucommulon A (2).....	- 51 -
2.4.1. Synthese und Charakterisierung von 2a und 2b	- 51 -
2.4.2. Analytik von PMCA (2) Razemat (2b) und Meso-Form (2a).....	- 52 -
2.5. Trennung von unzyklisiertem Myrtucommulon A (1).....	- 58 -
2.5.1. Arbeiten zur Trennung von unzyklisiertem MC A (1).....	- 58 -
2.5.2. Charakterisierung der drei isolierten Peaks.....	- 61 -
2.6. Untersuchungen zum Epimerisierungsverhalten von MC A (1)	- 63 -
2.7. Strukturaufklärung von MC A (1) aus Neofusicoccum Australe	- 71 -
2.8. Norsemimyrtucommulon (30).....	- 74 -
2.8.1. Isolierung von NSMC (30)	- 74 -
2.8.2. Analytik von NSMC (30).....	- 75 -
2.8.2.1. Massenspektrum (EI) von (30).....	- 75 -
2.8.2.2. Massenspektrum ESI(-) von (30).....	- 77 -
2.8.2.3. NMR-Spektroskopie, CD-Spektroskopie, Polarimetrie.....	- 78 -
2.9. Zyklisiertes NSMC (30) = MC B (3).....	- 79 -
2.9.1. Synthese und Charakterisierung von MC B (3)	- 79 -

2.9.2. Analytik von MC B (3).....	- 80 -
2.10. Trennung von unzyklisiertem NSMC (30).....	- 83 -
2.10.1. Arbeiten zur Trennung von unzyklisiertem NSMC (30).....	- 83 -
2.10.2. Charakterisierung der Enantiomere des NSMC (30)	- 87 -
2.11 Untersuchung zum Razemisierungsverhalten von NSMC (30)	- 88 -
2.12 TAPA-Säule	- 90 -
2.12.1. Synthese von TAPA (28, 29)	- 90 -
2.12.2. Charge-Transfer-Komplexe	- 93 -
2.12.2. Derivatisierung von Kieselgel.....	- 96 -
2.12.3. Anbindung des chiralen Selektors an Kieselgel	- 98 -
2.12.3.1. Einschub: Synthese einer Pirkle-Phase	- 102 -
2.12.3.2. Packen der HPLC-Säule	- 102 -
2.12.4. Chirale Trennungen von Myrtucommulonen mittels TAPA-Säule und 3,5-Dnbp-Säule.....	- 104 -
2.13. Semimyrtucommulon (4)	- 110 -
2.13.1. Isolierung von Semimyrtucommulon (4)	- 110 -
2.13.2. Analytik von SMC (4).....	- 111 -
2.13.2.1 Massenspektrum (EI) von SMC (4)	- 111 -
2.13.2.2 ESI(-)-Massenspektrum ESI von SMC (4).....	- 112 -
2.13.2.3. NMR-Spektroskopie, CD-Spektroskopie, Polarimetrie	- 113 -
2.13.3. Enantiomeranalytik von SMC (4)	- 114 -
2.13.4. NMR-Spektroskopie von zyklisiertem SMC (68).....	- 115 -
2.14. Homologe des MC A (1).....	- 116 -
2.14.1. Strukturaufklärung von Fraktion 4.9.....	- 118 -
2.14.1.1 Massenspektrometrie von Fraktion 4.9	- 118 -
2.14.1.2. CD-Spektroskopie von Fraktion 4.9	- 122 -
2.14.2. Strukturaufklärung von Fraktion 4.10.....	- 123 -
2.14.2.1. Massenspektrometrie von Fraktion 4.10	- 123 -
2.14.2.2. CD-Spektroskopie von Fraktion 4.10	- 128 -
2.14.2.3 Zusammenfassung.....	- 129 -

2.14.3. Strukturaufklärung von Fraktion 4.11	- 130 -
2.14.3.1. Massenspektrometrie von Fraktion 4.11	- 130 -
2.14.3.2. CD-Spektroskopie von Fraktion 4.11	- 135 -
2.14.3.3. Zusammenfassung zu Fraktion 4.11 = MC F (9)	- 135 -
2.14.4. Zusammenfassung der Isolierung von Fraktion 4.9 bis Fraktion 4.11	- 136 -
2.15. Homologe des NSMC (30).....	- 137 -
2.15.1. Strukturaufklärung von Fraktion 5.2.1	- 139 -
2.15.1.1. Massenspektrometrie von Fraktion 5.2.1	- 139 -
2.15.1.2. CD-Spektroskopie von Fraktion 5.2.1	- 143 -
2.15.2. Strukturaufklärung von Fraktion 5.2.2	- 144 -
2.15.2.1. Massenspektrometrie von Fraktion 5.2.2	- 144 -
2.15.2.2. CD-Spektroskopie von Fraktion 5.2.2	- 148 -
2.15.3. Strukturaufklärung von Fraktion 5.3.1	- 149 -
2.15.3.1. Massenspektrometrie von Fraktion 5.3.1	- 149 -
2.15.3.2. CD-Spektroskopie von Fraktion 5.3.1	- 152 -
2.15.4. Strukturaufklärung von Fraktion 5.3.2	- 153 -
2.15.4.1. CD-Spektroskopie von Fraktion. 5.3.2	- 153 -
2.15.5. Zusammenfassung der Strukturaufklärung von Fraktion 5.2.1 bis Fraktion 5.3.2	- 157 -
2.16. Myrtucommulon C (6)	- 158 -
2.16.1. Isolierung von Fraktion 4.3 6a und 4.6 6b	- 158 -
2.16.2. Analytik von MC C (6)	- 159 -
2.16.2.1 NMR-Spektroskopie von MC C (6)	- 159 -
2.16.2.2 Massenspektrum (EI) von MC C (6)	- 162 -
2.16.2.3. Massenspektrum ESI(-) von MC C (6).....	- 164 -
2.16.2.4 CD-Spektroskopie, Polarimetrie.....	- 165 -
2.16.3. Enantiomeranalytik von Fraktion 4.3 6a und 4.6 6b	- 166 -
2.16.4 NMR-Spektroskopie von zyklisiertem MC C = PMCA (2)	- 168 -
2.16.5. Zusammenfassung zu Fraktion 4.3 6a und 4.6 6b	- 168 -

2.17. Zusammenfassung der Strukturaufklärung der Myrtucommulone und mögliche Biosynthese	169 -
2.18 Enantiomeranalytik von Myrtucommulon-Analoga	171 -
2.19. Eucalyptus Acmenoides	175 -
2.19.1. Herstellung des Rohextraktes und Einteilung in Fraktionen.....	175 -
2.19.2. Strukturaufklärung von Fraktion 2	178 -
2.19.3. Strukturaufklärung von Fraktion 4	179 -
2.19.4. Zusammenfassung	181 -
2.20. Corymbia peltata	181 -
2.21. Zitronenmyrte – backhousia citridora – leptospermum petersonnii	183 -
3. Experimenteller Teil	186 -
3.1 Allgemeine Angaben	186 -
3.2. Myrte	190 -
3.2.1. Soxhlet-Extraktion.....	190 -
3.2.2. Flash-Chromatographie	190 -
3.2.3. Isolierung der reinen Myrtucommulone.....	190 -
3.2.4. Isolierung der reinen Norsemimyrtucommulone (30), (4), (56), (57), (58), (59)	193 -
3.2.5. Zyklisierungsreaktion	193 -
3.2.6. Reinigung der Zyklisierten Verbindungen	194 -
3.2.7. NMR der Myrtucommulone	196 -
3.2.7.1. NMR von razemischen PMCA (2b)	196 -
3.2.7.2. NMR von PMCA Meso-Form (2a)	197 -
3.2.7.3. NMR von MC B (3).....	197 -
3.2.7.4. NMR von zyklisiertem SMC.....	198 -
3.2.7.5. NMR von Fraktion 4.3 (6a) = syn - MC C (6).....	198 -
3.2.7.6. NMR von Fraktion 4.6 (6b) = anti - MC C (6)	199 -
3.2.7.7. NMR von zyklisierter Fraktion 4.3 = meso-Form PMCA (2b)	199 -
3.2.7.8. NMR von zyklisierter Fraktion 4.6 = razemisches PMCA (2a)....	199 -
3.2.7.9. NMR von zyklisierter Fraktion 4.3 ohne Isobutylgruppe (69).....	199 -
3.2.7.10. NMR von zyklisierter Fraktion 4.3 ohne Isobutylgruppe (70)....	200 -

3.2.8. Präparative chirale HPLC der zyklisierten Verbindungen.....	- 200 -
3.2.9. Präparative chirale HPLC der unzyklisierten Myrtucommulone.....	- 202 -
3.2.10. Präparative Trennung der Myrtucommulon-Analoga.....	- 207 -
3.3. TAPA (29).....	- 209 -
3.3.1. Synthese des TAPA-stationärphasen Materials.....	- 209 -
3.3.2. Synthesen der TAPA-Butanamid-Stationärphasen.....	- 215 -
3.3.3. Synthese der Pirklephasen.....	- 216 -
3.3.4. Packen einer HPLC-Säule.....	- 217 -
3.4. Eucalyptus Acmenoides.....	- 218 -
3.4.1. Soxhlet-Extraktion.....	- 218 -
3.4.2. Flash-Chromatographie.....	- 218 -
3.4.2. Isolierung der einzelnen Verbindungen.....	- 219 -
3.5. Corymbia Peltata.....	- 221 -
3.5.1. Soxhlet-Extraktion.....	- 221 -
3.5.2. Flash-Chromatographie.....	- 221 -
3.6. Zitronenmyrte.....	- 221 -
3.6.1. Soxhlet-Extraktion.....	- 221 -
3.6.2. Flash-Chromatographie.....	- 221 -
4. Zusammenfassung.....	- 223 -
5. Ausblick in die Zukunft.....	- 225 -
6. Literaturverzeichnis.....	I
7. Anhang.....	IV

Abkürzungsverzeichnis

3,5Dnbp	D-3,5-Dinitrobenzoylphenylglycin
α	spezifische optische Rotation
α	Trennfaktor
Abb.	Abbildung
abs.	absolutiert
Ac	Acetat
Aptes	Aminopropyltriethoxysilan
Äq.	Äquivalent
Bt	Benzotriazol
c, konz.	Konzentration
CD	Zirkulardichroismus
CD	Cyclodextrin
CDI	1,1-Carbonyldiimidazol
Cl-Ptms	Chlor-propyltrimethoxysilan
Cpx.	Komplex
CSP	Chirale Stationärphase
CT	Charge-Transfer
DC / (TLC)	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEA	Diethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
EE	Ethylacetat
ee / de	Enantiomeric excess / Diastereomeric excess
EEDQ	1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl
et al.	Und andere
F:	Fließgeschwindigkeit
FA	Ameisensäure

Abkürzungsverzeichnis

GC	Gaschromatographie
Gptms	Glycidoxypropyltrimethoxysilan
H	Bodenhöhe
H,H-COSY	HH correlation spectroscopy
HMBC	heteronuclear multiple bond coherence
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	high resolution = hochaufgelöst
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
I .D.	Innendurchmesser
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration
Inj.	Injektionsvolumen
IR	Infrarot
KPG	Kerngezogenes präzisions Glasgerät
LC	liquid chromatography
k	Retentionsfaktor
M&N	Machery und Nagel
m/z	Masse zu Ladung
MC A – MC M	Myrtucommulon A – Myrtucommulon M
MCs	Myrtucommulone
Me	Methyl
MS	Massenspektrometrie/ Massenspektrum
N	Bodenzahl
NMR	nuclear magnetic resonance
NP	Normalphase
Nr.	Nummer
NSMC	Norsemimyrtucommulon
PE	Petrolether
Ph	Phenyl
PMCA	pentazyklisches Myrtucommulon A
ppm	parts per million
pTsOH	Para-Toluolsulfonsäure
R	Auflösung
Rf.	Rückfluss
R _f	Retentionsfaktor (DC)

Abkürzungsverzeichnis

R _t	Retentionszeit
ROESY	rotational overhauser effect spectroscopy
RP, RP18	Umkehrphase
Rt.	Raumtemperatur
R _t	Retentionszeit
SMC	Semimyrtucommulon
Smp.	Schmelzpunkt
(±)-TAPA	(±)-α-(2,4,5,7-Tetranitro-9-fluorenylidenaminoxy)-propionsäure
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
UI.	Umlagerung
UV/Vis	Ultraviolett/Sichtbar
ZChl	Zentrales Chemikalienlager

Abstract

Myrtus communis L. (myrtle) is an evergreen shrub growing in the Mediterranean area from family of myrtaceae. In summer, the plant wears yellow white flowers which grow to blue, eatable berries. The most important pharmaceutical contents are called myrtucommulones and show analgesic, anti-inflammatory, anti-bacterial, anti-oxidative, hypoglycemic and cytotoxic activity. Since first discovery of MC A in 1974 by Kashman, further myrtucommulones were discovered, the latest one MC M in 2013 by Shaheen and coworkers. The absolute configuration was only known for few compounds.

The present work describes the structure determination of known and new myrtucommulones especially considering the absolute configuration and the existence of stereoisomers. For determination of the absolute configuration a new chiral HPLC column was developed. First the chiral reagent (TAPA) was synthesized, then linked with silica gel and this material was packed in a HPLC column. The finally separated stereoisomers (enantiomers) were analyzed by CD-Spectroscopy. Continuing in this way the structures and configurations of a multitude of homologues could be elucidated. Furthermore other plants of the Myrtaceae and myrtle itself were analyzed for additional constituents with structures similar to MC A and their structures were elucidated.

Zusammenfassung

Die Myrte (*Myrtus communis*) ist ein kleiner immergrüner Strauch aus der Familie der Myrtaceae. Sie besitzt reich verzweigte Äste und trägt im Spätsommer weiß-gelbe Blüten, aus denen blauschwarze Beeren entstehen. Die pharmazeutisch wichtigsten Inhaltsstoffe heißen Myrtucommulone. Sie zeigen antibakterielle, entzündungshemmende, schmerzlindernde, antioxidative, hypoglykämische und zytotoxische Wirkung. Seit der Entdeckung von Myrtucommulon A, 1973 durch Kashman, wurden viele weitere Myrtucommulone entdeckt bis hin zum Myrtucommulon M durch Shaheen 2013. Nur bei wenigen Myrtucommulonen war die Absolutkonfiguration bekannt.

Diese Arbeit beschreibt die Strukturaufklärung der Myrtucommulone, unter spezieller Berücksichtigung der Absolutkonfiguration und der stereochemischen Zusammensetzung, im Besonderen der von MC A und Norsemyrtucommulon. Zur Aufklärung der Konfiguration wurde eine chirale HPLC-Säule entwickelt. Dazu wurde ein chirales Reagenz (TAPA) synthetisiert, dieses mit Kieselgel verlinkt und das erhaltene Material anschließend in eine HPLC-Säule gepackt. Die getrennten Stereoisomere bzw. Enantiomere wurden im Folgenden mittels CD-Spektroskopie untersucht.

Des Weiteren wurde in Pflanzen der Familie der Myrtaceae und in der Myrte selbst nach weiteren Inhaltsstoffen mit Myrtucommulon-analoger oder –homolger Struktur gesucht und deren Struktur und Konfiguration aufgeklärt.

1. Einleitung

1.1. Naturstoffe: Moderne oder altertümliche Medizin ?

Die moderne Medizin des 20. und 21. Jahrhundert hat eine Vielzahl von Wirkstoffen und Behandlungsmöglichkeiten hervorgebracht, wie sonst kaum ein Zeitalter. Auf der Suche nach immer neuen Wirkstoffen, spielt die Naturstoffchemie eine herausragende Rolle. Besonders Pflanzen, Mikroben und marine Organismen sind reichhaltige Quellen neuer Natur- und Wirkstoffe. In den Jahren 2005 bis 2010 wurden insgesamt 19 neue Medikamente zugelassen, welche von Naturstoffen abstammen. Diese zeigen ein Wirkungsspektrum im Bereich von immunologischen-, kardiovaskulären-, neurologischen Krankheiten und bei der Behandlung von Krebs, Depressionen und Entzündungen.

Vor allem durch fortschreitende Aufklärung der Wirkstoff -Target-Beziehung, müssen neue Arzneimittel oft eine sehr komplexe Struktur aufweisen. Die Natur zeigt dabei hervorragende Leistungen auf dem Gebiet der chemischen Synthese, im Besonderen durch den Aufbau von Stereozentren in komplexen Molekülen.[1] In klinischen Tests konnte gezeigt werden, dass die meisten Patienten gegenüber natürlichen Wirkstoffen eine größere Toleranz und Akzeptanz zeigen.[2] Aus diesen Gründen liegt der Anteil der an naturstoffbasierten Pharmaka bei mittlerweile 52% des Marktanteils. Im Bereich der Krebsforschung liegt der Anteil deutlich höher und die Forschung erhofft sich in diesem Bereich die größten Fortschritte.[3] Somit liegt großes Potential und Zukunft im Bereich der Phytochemie.

Mit dem Blick nicht nur in die Zukunft, sondern auch in die Vergangenheit gerichtet, wird klar, dass der Menschheit schon seit mehreren tausend Jahren die Heilkraft der Naturstoffe bekannt gewesen sein muss. Die frühesten Aufzeichnungen stammen von 2600 v.Chr. aus Mesopotamien. Schon damals waren über 1000 Heilpflanzen bekannt. Sehr beliebt war das Öl von Zedern, Zypressen, Lakritz und Myrrhe zur Behandlung von Wunden und Entzündungen. Auch von den alten Ägyptern existieren Aufzeichnungen aus dem Jahr 1500 v. Chr., die die Verwendung von Heilkräutern bestätigen. Wichtige Dokumente, welche die Verwendung von Pflanzen in der Medizin beschreiben, stammen aus dem Jahr 1100 v. Chr. aus China. Besonders in heutiger Zeit findet die traditionelle chinesische Medizin großen Anklang in der Bevölkerung. In der europäischen Gegend, wurde die pflanzliche

Medizin vor allem durch die alten Griechen und Römer verbreitet.[4] Eine wichtige Heilpflanze in deren Kultur stellte unter anderem die Myrte dar, deren chemische und pharmazeutische Eigenschaften die Hauptrolle in dieser Dissertation spielen.[5] Im Mittelalter erforschten die Araber, Inder und Chinesen weitergehend die Wirkung von Naturmedizin. Laut WHO (1985) greifen näherungsweise 65 % der Menschen bei ihrer Gesundheitsvorsorge auf pflanzliche Medizin zurück, da deren Wirkung schon seit tausenden Jahren genutzt wird.[4] Naturstoffe spielen somit in der Geschichte der Menschheit schon immer eine wesentliche Rolle und auf Grundlage der Wissenschaft in unserer Zeit, wird man das Potential der Phytochemie weitergehend erforschen.

1.2. Geschichte der Myrte

So wie die frühesten Aufzeichnungen über Naturstoffe in der Medizin auf das Jahr 2600 v. Chr. zurück zu datieren sind, so findet man ähnliche alte Aufzeichnungen über die Myrte: *"Ich will für dich bewachen Myrte, Zeder und Zypresse, die hohen, hochgewachsenen Bäume, den Stolz deines Palastes! ... und stellte sieben und sieben Opfertrankflaschen auf. Ihnen zu Füßen schüttete ich Rohr, Zeder und Myrte hin."*[6] (Gilgamesch-Epos, Babylon, 2100 v. Chr.). Ebenso findet die Myrte im Alten Testament Würdigung: *"Es sollen Zypressen statt Dornen wachsen und Myrten statt Nesseln. ..."* Jesaja (55, 13). *"Ich will in der Wüste wachsen lassen Zedern, Akazien, Myrten und Ölbäume; ..."* Jesaja (41,19). *"Ich sah in dieser Nacht, und siehe, ein Mann saß auf einem roten Pferde und er hielt zwischen den Myrten im Talgrund, ..."* Sacharja (1, 8). *"Da ließen sie es kundtun und ausrufen in allen ihren Städten und in Jerusalem und sagen: Geht hinaus auf die Berge und holt Ölzweige, Balsamzweige, Myrtenzweige, ..."* Nehemia (8,15).[7] In diesen Bibelversen wird der Myrte generell ein sehr edler Charakter zugesprochen. Nicht nur in der jüdischen Geschichte ist die Myrte weit verbreitet, sondern auch in der ägyptischen, griechischen, und römischen Tradition wurde die Myrte schon seit tausenden von Jahren als religiöse Pflanze verehrt. In der römischen Mythologie war die Myrte sogar der Göttin Aphrodite geweiht. Daraus entstand der Brauch, Brautkränze aus Myrtenzweige zu tragen. Davon abgeleitet ist auch der Name Brautmyrte, welchen die Myrte unter anderem trägt.[8] Neben der sakralen Anwendung wurde auch schon früh das medizinische und kosmetische Potential erkannt. Das Myrtenöl wurde zur

Behandlung vieler Krankheitsbilder eingesetzt. Dazu gehörten die Behandlung von bronchialen Infektionen, Harnwegsleiden und die Verwendung als Salbe bei Wunden und Zahnfleischentzündungen. Weitere Anwendungen fand die Myrte im kosmetischen und im Nahrungsmittelbereich. Es sind Rezepte überliefert, bei dem Myrte, zubereitet als Soße, zu Wildschweinbraten serviert wurde. Auch zur Erzeugung von Schnäpsen und Likören (Abb. 1) wurde die Myrte schon früh verwendet. Des Weiteren wurde das Öl der Myrte bereits früh in der Antike zur Herstellung von Crèmes und Parfums genutzt.[5]



Abb. 1.
Myrtenlikör

Auch die Myrte wurde im Zuge der Erforschung neuer Pflanzeninhaltsstoffe für neue Pharmazeutika wieder entdeckt, weshalb vor rund fünfzig Jahren erste chemische Untersuchungen von Myrteinhaltstoffen angestellt worden sind.

1.3. Ethnobotanik der Myrte

Die Myrte ist ein immergrüner Strauch (Abb. 2) mit reich verzweigten Ästen (Abb. 3). An diesen sitzen kleine gegenständig angeordnete, dunkelgrüne, lanzettartige Blätter. Diese sind durchscheinend drüsig punktiert. In den Monaten Mai bis August tragen die Äste weiße Blüten.



Abb. 2. Myrtenstrauch



Abb. 3. Myrtenzweig

Die Kelchblätter sind dreieckig und die Kronblätter kreisförmig. In den Blüten befinden sich gelbe Staubbeutel aus denen sich im Herbst kugelförmige, blauschwarze Beeren entwickeln (Abb. 4). Die Blätter werden in den Monaten Mai bis Juni gesammelt, da dann der Ölgehalt am höchsten ist. Beheimatet ist die

Brautmyrte im gesamten Mittelmeergebiet und im vorderen Orient, sogar in Teilen Afrikas. Je nach klimatischen Bedingungen wächst sie als kleinerer oder größerer Strauch von bis zu einer maximalen Größe von fünf Metern. Bevorzugt wächst sie auf steinigem, kalkfreien Böden.[9]



Abb. 4. a) blühender Zweig, b) Blatt, c) Blüte, d) Blüte ohne Blätter, e) Frucht, f) Samen [9] die Abbildung entstammt Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis.

Die Myrte gehört zur Ordnung der Myrtales. In dieser gehört sie der Familie der Myrtaceae an. Die Unterfamilie trägt die Bezeichnung Myrtoideae. Weitergehend in dieser Unterteilung gelangt man zur Gattung, welche den Namen *Myrtus* trägt. Verwandte Gattungen in dieser Unterfamilie sind die Eukalypten, die Guaven, der Granatapfel, die Nachtkerzen, die Nelken und 126 weitere Vertreter. Folgt man der botanischen Unterteilung weiter, so gelangt man zur Art, welche mit dem lateinischen Namen *Myrtus communis* bezeichnet wird. Es sind ca. 4620 Myrtenarten bekannt, wobei die Brautmyrte am bekanntesten und gängigsten ist.[10] Vier weitere Arten, welche in dieser Arbeit eine wichtige Rolle spielen, sind *Eucalyptus acmenoides*, *Corymbia peltata*, *Corymbia scabrada* und *Leptospermum petersonii* (Zitronenmyrte). Schematisch kann der Stammbaum der Myrtales (Abb. 5) wie folgt dargestellt werden:

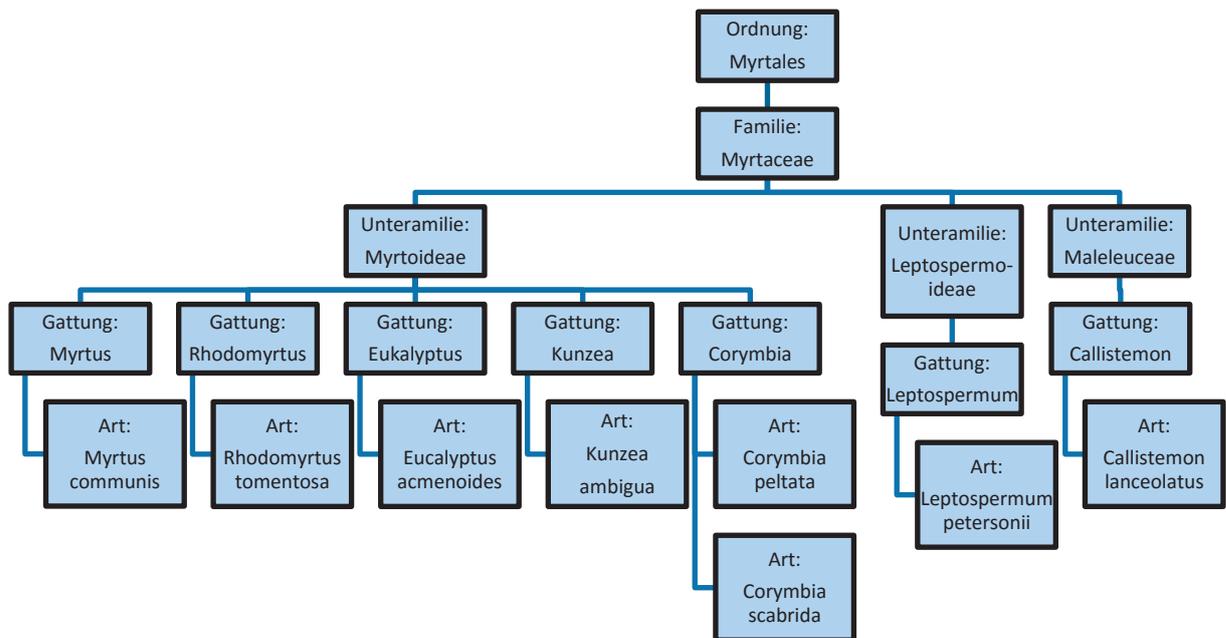


Abb. 5. Stammbaum der Myrtales. [9], [10], [11], [12], [13], [14], [15]

1.4. Pharmazeutisch wichtige Inhaltsstoffe der Myrte

Den alten Römern und Griechen war die heilende Wirkung von Myrtenöl schon sehr lange bekannt gewesen. In der heutigen Zeit gehört das Myrtenöl zu den wichtigsten Produkten, welches aus den Myrtenblättern gewonnen wird. Dies geschieht durch Wasserdampfdestillation. Chromatographische Analysen ergeben folgende Zusammensetzung (Tabelle 1). Je nach Herkunftsland bzw. Destillationsmethode kann der Gehalt variieren.

Tabelle 1. Inhaltsstoffe Myrtenöl.[9]

Inhaltsstoff	Zusammensetzung	Inhaltsstoff	Zusammensetzung
1,8 Cineol	12 – 45 %	α-Terpineol	2 – 12 %
α-Pinen	15 – 38 %	Nerol	0,2 – 2 %
Myrtenol	0,8 – 5 %	Geraniol	0,5 – 1,5 %
Myrtenylacetat	4 – 20 %	Linalylacetat	0,2 – 5 %
Linalool	2 – 19 %	α-Terpinylacetat	0,2 – 0,3 %
Limonen	4 – 10 %	Nerylacetat	0,1 – 3 %
Camphen	0,4 – 1 %	Geranylacetat	1 – 5 %
β-Pinen	0,2 – 0,8 %	Methyleugenol	0,2 – 6 %

Myrtenöl ist käuflich als ethanolische Lösung zu erwerben. Es besitzt eine antifungizide-, desinfizierende-, und antibakterielle Wirkung. Volkstümlich wurde es bei Erkrankungen der Atemorgane wie bspw. Bronchitis oder bei Erkrankung der Harnblase, Durchfall und Wurmbefall angewendet.

Neben dem Myrtenöl werden vor allem alkoholische Blattextrakte für medizinische Zwecke verwendet. Diese setzen sich wie folgt zusammen (Tabelle 2).

Tabelle 2. Zusammensetzung alkoholischer Myrtenextrakt.[9]

Inhaltstoff	Zusammensetzung
Ätherische Öle	0,1 – 0,5 %
Gerbstoffe	20 %
Tannine	14 %
Gallensäuren	Ohne Gehaltsangabe
Flavone	Ohne Gehaltsangabe
Myrtucommulone	Ohne Gehaltsangabe

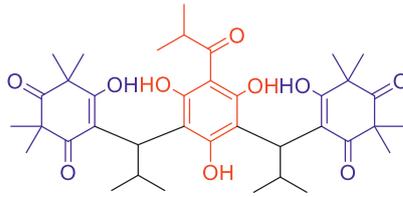
Der alkoholische Extrakt zeigt antimikrobielle, antiödematöse, antientzündliche und Blutzucker senkende Wirkung. Volkstümlich wurde der Extrakt zur Behandlung von Tuberkulose, Diarrhöe, Hämorrhoiden und Prostatitis eingesetzt.[9] Vor allem die antientzündliche Wirkung, welche auf die Myrtucommulone zurückzuführen ist, sorgte im Bereich der Chemie und Medizin für großes Interesse.

1.5. Myrtus communis - Stand der Forschung

1.5.1. Chronologie über die Isolierung der Myrtucommulone

Angesichts der antientzündlichen und antibakteriellen Wirkung des ethanolischen Pflanzenextraktes aus Myrte (*Myrtus communis*), weckten diese in den 1970 er Jahren verstärkt das Interesse der Forschung.

Der Arbeitsgruppe von Kashman gelang 1974 erstmals die Isolierung und Strukturaufklärung von Myrtucommulon A (1) (Abb. 6).

**1****Abb. 6.** Struktur von Myrtucommulon A.

Dazu extrahierten sie getrocknetes Myrtenpulver aus Blättern mit CHCl_3 . Der erhaltene Rohextrakt wurde durch Flash-Chromatographie aufgetrennt und reines Myrtucommulon A (**1**) konnte erhalten werden. Analog dazu konnte MC A (**1**) auch durch flüssig-flüssig Extraktion mit diversen Ansäuerungsschritten erhalten werden.[11] MC A (**1**) besteht strukturell gesehen aus einer Isobutyrylphloroglucin-Einheit (rot), und zwei Syncarpinsäure-Einheiten (blau), welche über zwei Isobutylgruppen (schwarz) miteinander verknüpft sind. Bestimmt wurde die Struktur mittels NMR-, IR-, und Massenspektrometrie. Im Bereich des IR-Spektrums konnten charakteristische Banden gefunden werden, die bei typischen Wellenzahlen für Enole und Ketogruppen lagen. Im Massenspektrum (EI) (Abb. 49) konnten der Molekülpeak mit 668 m/z entdeckt werden und ein Fragmentierungsmuster, das den einzelnen Fragmenten des MC A (**1**) zugeordnet werden konnte. Die NMR-Spektren lieferten kaum einen Hinweis zur Struktur, da dieses aus schlecht aufgespaltenen und schlecht aufgelösten Signalen bestand. Lediglich typische Signalfelder für aromatische und vinyliche Hydroxylgruppen im Tieffeld und mehrere Multipletts von Methylgruppen im Hochfeld konnten erkannt werden (Abb. 28). Erklärt wird dies durch die hohe Anzahl an freien OH-Gruppen und Ketogruppen, die in der Lage sind Wasserstoffbrücken-Bindungen untereinander und Keto-Enol-Tautomere auszubilden. Dadurch stellt das NMR-Spektrum eine Überlagerung von mehreren tautomeren und rotameren Formen dar. Daher spalteten Kashman et al. formal Wasser aus MC A (**1**), mit pTsoH unter Rückfluss in Benzol ab, womit man einen linearen Pentazyklus erhält, genannt PMCA (**2**) (Abb. 7, Abb. 212). Das starre Gerüst lieferte nun Signale, die eindeutig zugeordnet werden konnten. Ein IR- und MS-Spektrum wurde von PMCA (**2**) ebenso analysiert.[16] So gelang es Kashman und Mitarbeitern, die Struktur von MC A (**1**) aufzuklären. Neben MC A (**1**) wurde noch eine weitere Substanz isoliert. Diese wurde MC B (**3**) genannt. Es

handelt sich formal um ein Molekül PMCA (2), bei dem eine Syncarpinsäureeinheit fehlt.[16]

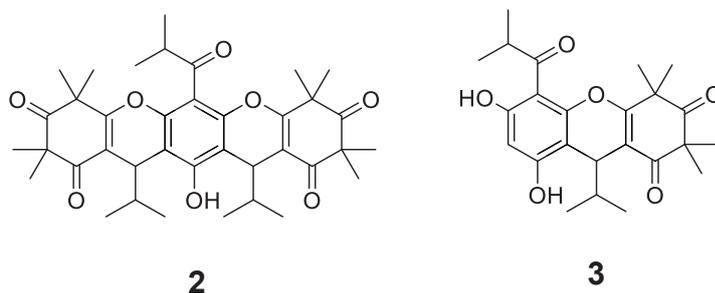


Abb. 7. Struktur von pentazyklischem Myrtucommulon A (PMCA) (2) und Myrtucommulon B (3).

Ferner wurde MC A (1) auf seine antibakterielle Wirkung hin an verschiedenen gram-positiven Bakterienstämmen untersucht. Es wurden vergleichbare Werte wie bei Penicillinen erhalten.[11]

1977 konnten Lounasmaa et al. MC A (1) aus der Pflanze *Callistemon lanceolatus* isolieren, die zur Familie der Myrtaceae gehört.[17]

Erst 30 Jahre nach der Veröffentlichung von Kashman et al., wurde die Forschung im Bereich der Myrte fortgeführt. Im Jahr 2002 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Appendino die Struktur von Semimyrtucommulon (4) und einer abgewandelten Form von 3, das iso-MC B (5) (Abb. 8). Die Existenz und Struktur von MC A (1) in *Myrtus communis* konnte durch diese Forschung, in Einklang mit Kashman et al. bestätigt werden.[18]

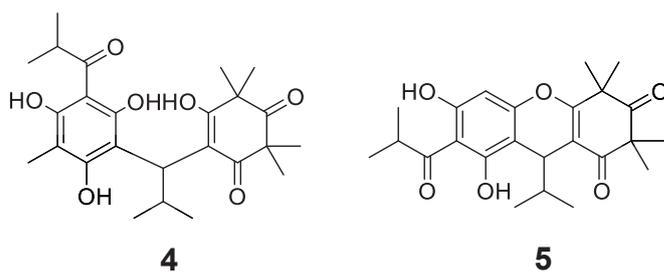


Abb. 8. Struktur von Semimyrtucommulon (4) und Struktur von iso-MC B (5).

Da es sich bei 4 und 5 um Verbindungen handelt, bei denen in Bezug auf 1 Struktureinheiten fehlen, stellte Appendino die Vermutung an, dass es sich um Fragmente handeln könnte, welche durch zu hohe Temperatureinwirkung entstanden sein könnten.[19] Im Jahr 2005 konnten Appendino und Werz die

entzündungshemmende Wirkung von MC A (1) und SMC (4) bestätigen. Diese unterdrücken die Biosynthese von Eicosanoiden, indem sie direkt die Cyclooxygenase-1 und die 5-Lipoxygenase hemmen.[18]

Der Forschungsgruppe von Shaheen et al. gelang 2006 die Isolierung und Strukturaufklärung der Myrtucommulone C (6), D (7), E (8) (Abb. 9). Die Strukturen konnten mittels NMR-, IR-, Massenspektrometrie und Röntgenstrukturanalyse ermittelt werden.

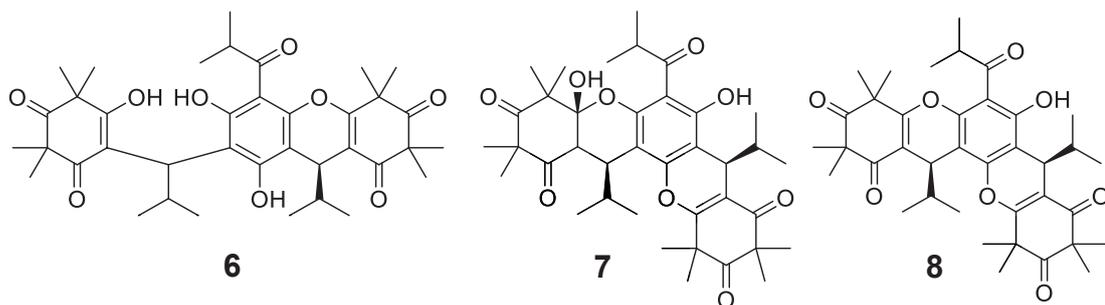


Abb. 9. Struktur von Myrtucommulon C (6), D (7), E (8).

Aus der Röntgenstrukturanalyse konnte nicht nur die Konstitution, sondern auch die relative Konfiguration an den beiden Stereozentren bestimmt werden. Beide Isobutylgruppen haben syn-Konfiguration. Die Struktur des iso-MC B (5) konnte nochmals bestätigt werden. Die Verbindungen 6 und 8 zeigen eine antidiabetische Wirkung, durch Hemmung der α -Glucosidase. Ebenso konnte eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden.[20]

Im Jahr 2008 folgten die Myrtucommulone F (9), G (10), H (11) und I (12) (Abb. 10) durch die Arbeitsgruppe von Quinn und Mitarbeitern, die auf der Suche nach Naturstoffen waren mit Bindungsaffinität an den TRH-Rezeptor 2. Dieser reguliert unter anderem das Schmerzempfinden. Im Gegensatz zu den vorherigen Substanzen wurden diese nicht aus *Myrtus communis*, sondern aus *Corymbia scabrida* isoliert (Abb. 5).[21]

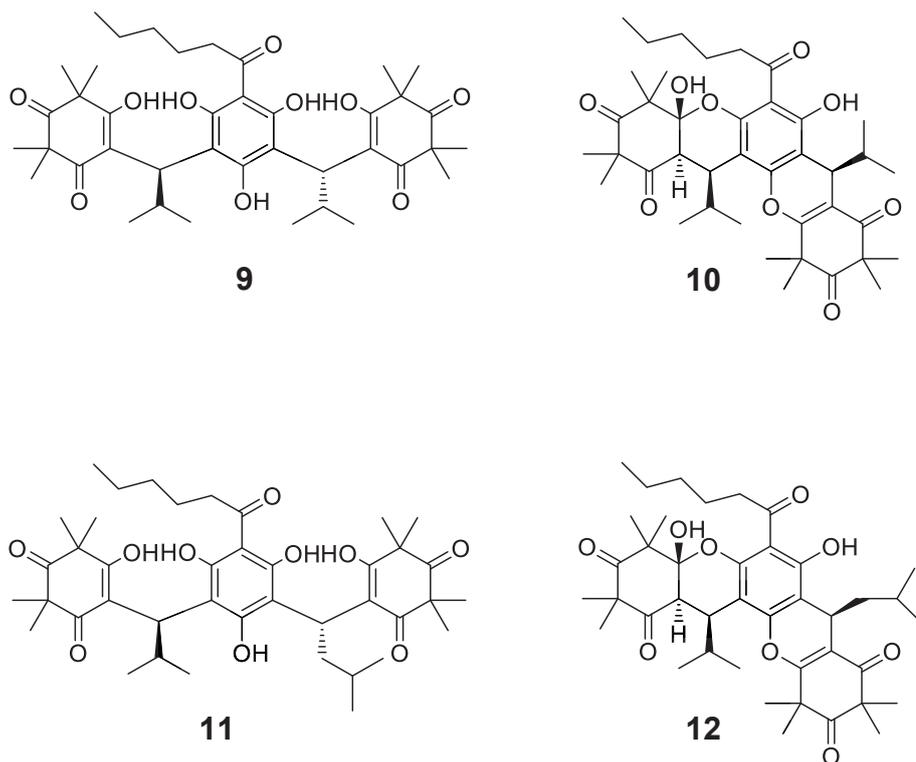


Abb. 10. Struktur von Myrtucommulon F (9), Myrtucommulon G (10), Myrtucommulon H (11) und Myrtucommulon I (12).

Die Struktur der hier aufgeführten Myrtucommulone wurde durch NMR-, IR-, Röntgenstrukturanalyse und Massenspektrometrie aufgeklärt. Neben den von Shaheen isolierten MCs [20], wurden auch zu den hier in 2008 entdeckten Myrtucommulonen, eine Angabe zur spezifischen Optischen Rotation gemacht.[21] Quinn und Mitarbeiter machten in ihrer Veröffentlichung widersprüchliche Angaben zur Relativkonfiguration. Quinn schrieb diesbezüglich (Zitat):

„It therefore followed that the configurations at C-3' and C-3'' in myrtucommulone A (1) were both R*.”

Einige Absätze später schrieb Quinn (Zitat):

„The observation that 1 show optical activity is somewhat surprising since symmetry about the phloroglucinol core suggests that the three compounds should be meso. Their chirality could result from atropisomerism about either C-2-C-1' or C-6-C-1'' bonds, and this would result in axial chirality.”

Damit widerspricht sich der Autor in seinem Artikel selbst.[21] Es wird nicht klar, ob es sich bei MC A (1) um eine meso-Verbindung handelt oder an beiden Stereozentren R*-Konfiguration vorliegt. Es ist auch nicht möglich, dass eine meso-Verbindung optische Aktivität zeigt, selbst wenn es sich um Atropisomerie handeln sollte. Quinn et al. gaben auch eine spezifische Optische Rotation von $[\alpha]_D^{17,6} = 42,1$ ($c=0.066$, MeOH) an. Allerdings beschrieben die Autoren ihr erhaltenes MC A (1)

nicht als gelbes Pulver sondern, als „yellow gum“ und gaben keinen Schmelzpunkt an.[21] Tendenziell würde dies für eine ungenügende Reinheit des Probenmaterials sprechen. Diese Problematik lässt sich auf die anderen Myrtucommulone ebenso anwenden. Auf diesen Widerspruch soll in dieser Arbeit unter anderem eingegangen werden.

Weitere Myrtucommulone wurden 2012 von Sanna et al. wieder in *Myrtus communis* entdeckt. Dabei handelt es sich um die Myrtucommulone J (**13**), K (**14**) und L (**15**) (Abb. 11).

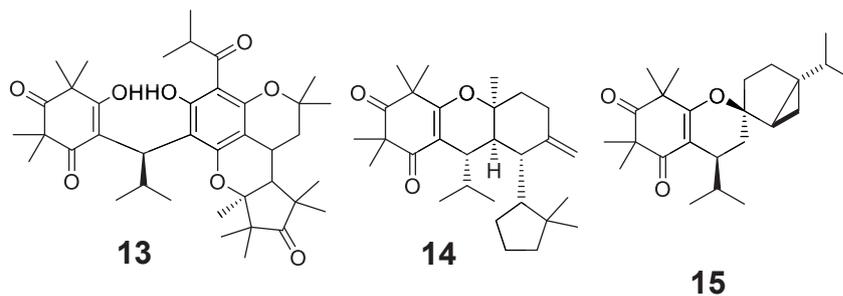


Abb. 11. Struktur von Myrtucommulon J (**13**), Myrtucommulon K (**14**) und Myrtucommulon L (**15**).

Pharmazeutisch untersuchten Sanna et al. diese Myrtucommulone hinsichtlich ihrer antibakteriellen und zytotoxischen Wirkung. Sie konnten zeigen, dass MCs Apoptose in verschiedenen Tumorzelllinien auslösen und somit als Antikanzerogene eingesetzt werden können. Die antibakteriellen Befunde bestätigten im Großen und Ganzen vorherige Tests.[22]

Die neuesten MCs wurden 2013 von Shaheen und Mitarbeitern isoliert. Es handelte sich um das Myrtucommulon M (**16**) und Myrtucommunoacetalon (**17**) (Abb. 12).[23]

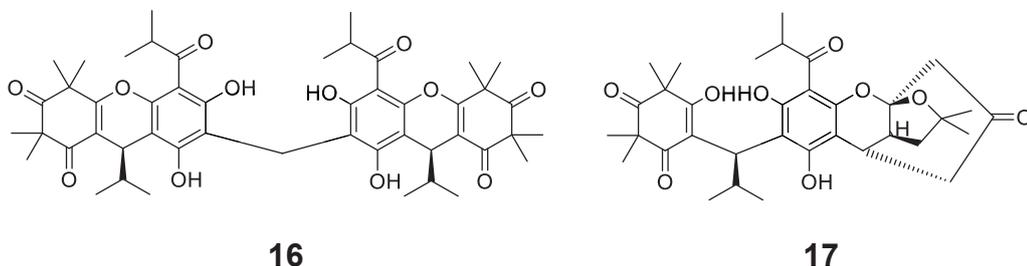


Abb. 12. Struktur von Myrtucommulon M (**16**) und Myrtucommunoacetalon (**17**).

Die MCs **16** und **17** zeigten einen Inhibitionseffekt gegen NO-Radikale und sind signifikante Wachstumshemmer gegen T-Zellen-Wachstum.[23]

Im Jahr 2014 veröffentlichten Nicoletti et al., dass Myrtucommulon A (**1**) und D (**7**) aus einem Pilzstamm isoliert worden sind. Dazu wurde der endophytische Pilz (*Neofusicocum australe*) in Myrtenzweigen entdeckt und isoliert. Der Pilz wurde auf Nährböden kultiviert und anschließend auf die Produktion von MCs untersucht. Mittels HR-LC-MS konnte das Vorhandensein von **1** und **7** bestätigt werden.[24] Damit stellt sich die Frage, ob die Myrtucommulone in der Myrte selbst oder im Pilz biosynthetisiert werden? Ebenso kommt die Frage nach der stereochemischen Zusammensetzung auf. Synthetisiert der Pilz racemisch oder enantioselektiv? Gleichermaßen stellt sich die Frage nach dem symbiotischen Zusammenspiel. Diese Thematik soll im Hauptteil dieser Arbeit ausführlich diskutiert werden.

1.5.2. Weitere wichtige Pflanzeninhaltsstoffe

Pflanzeninhaltsstoffe bestehend aus Phloroglucin und Syncarpinsäure (**21**) kommen nicht nur in Pflanzen der Gattung myrtus vor, sondern sind auch in vielen anderen verwandten Pflanzen der Familie Myrtaceae anzutreffen. Diese Substanzen zeigen ebenso pharmazeutisch relevante Eigenschaften (Tabelle 3, Abb. 13).

Tabelle 3. Auflistung von Naturstoffen mit Phloroglucin bzw. Syncarpinsäure.

Jahr	Arbeitsgruppe	Inhaltstoff	Wirkung
1999	Khambay et al.[25]	Ericifolion 1	Insektizid
2004	Yoshida et al.[26]	Kunzeanon A,B	Insektizid
2006	Appendino et al.[27]	Gallomyrtucommulone	Antibakterium
2008	Mahabusarakam et al. [28]	Rhodomyrtone	Antibakterium
2008	Quinn et al.[29]	Corymbone	Schmerzmittel

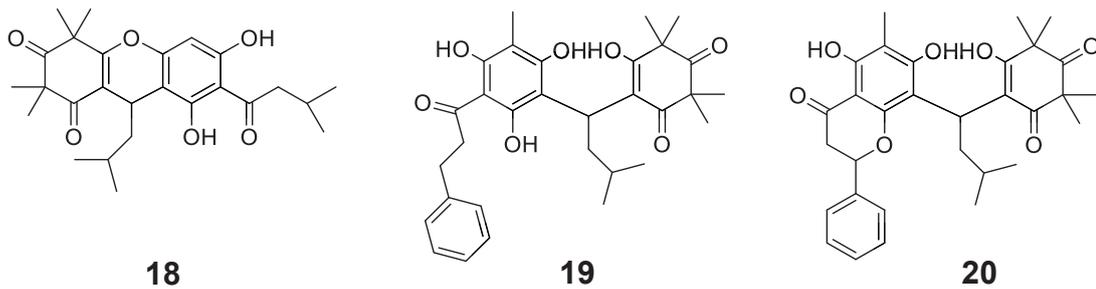


Abb. 13. Struktur von Corymbon B (18), Struktur von Rhodomyrton B (19) und Struktur von Kunzeanon (20).

1.5.3. Zusammenfassung der pharmazeutischen Eigenschaften

Die pharmazeutisch interessante Wirkung der Myrtucommulone wurde bereits in Kapitel 1.5.1 kurz zu der jeweiligen Isolierung beschrieben. Im Folgenden werden die einzelnen Wirkungen detailliert aufgelistet.

1.5.3.1. Antibakterielle Aktivität

Bereits 1974 konnten Kashman et al. bei der ersten Isolierung von MC A (1) eine antibakterielle Wirkung feststellen. Als Bakterienstämme wurden *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* ausgewählt. MC A (1) war in der Lage das Wachstum der grampositiven Bakterien deutlich zu verlangsamen. Gramnegative Bakterien blieben unbeeinflusst.[11] Appendino stellte fest, dass 1 sogar Wirkung gegen klinische, multiresistente Keime besitzt.[19] Neben 1 konnte die antibakterielle Wirkung auch für die MCs D(7), E(8) und J(13) festgestellt werden.[20], [22]

1.5.3.2. Entzündungshemmende Wirkung

In weitergehenden pharmazeutischen Tests, entdeckte die Arbeitsgruppe Werz, dass MC A (1) und SMC (4) in der Lage sind die Biosynthese von Eicosanoiden durch direkte Inhibition der Cyclooxygenase-1 und der 5-Lipoxygenase mit IC_{50} -Werten von bis zu 1,8 bis 28 $\mu\text{mol/L}$ zu hemmen.[18] Es konnte weiter gezeigt werden, dass MCs die mikrosomale Prostaglandin E_2 -Synthase-1 inhibieren, die für die Entstehung von Entzündungen mitverantwortlich ist.[30] In in-vivo Versuchen konnte die entzündungshemmende Wirkung, welche über die Hemmung der Eicosanoide läuft bestätigt werden.[31]

1.5.3.3. Schmerzlindernde Wirkung

Die schmerzlindernde Wirkung von MCs wird über den TRH Rezeptor-2 beeinflusst. Verbindungen mit Acylphloroglucin als Strukturelement sind oftmals in der Lage diesen zu hemmen. Besonders müssen hier MC A (1), MC D (7), MC F (9), MC G (10) MC H (11) und MC I (12) (ebenso die Corymbone (18)) angeführt werden.[21], [29]

1.5.3.4. Antioxidative Wirkung

Die antioxidative Wirkung von Rotwein auf Grund der enthaltenen Phenole ist allgemein bekannt. Eine vergleichbare Wirkung konnte durch Shaheen bei MC M (16) und 17 festgestellt werden. Diese sind in der Lage reaktive Spezies wie NO- und Sauerstoff-Radikale abzufangen. Diese reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen zu Zell- und Gewebeschäden und führen zu einer Reihe neurodegenerativer Krankheiten.[23] Die gleiche Wirkung konnte auch für MC A (1) und SMC (4) festgestellt werden.[32]

1.5.3.5. Antidiabetische Wirkung

α -Glucosidasehemmer regeln den nicht Insulin-abhängigen Diabetes mellitus, durch reversible Hemmung der gastrointestinalen Invertase. Die Myrtucommulone B (3), C (6), D (7), und E (8) zeigten eine deutlich bessere Hemmung als das Standardmedikament Acarbose.[33]

1.5.3.6. Zytotoxische Wirkung

Krebs stellt eine Krankheit dar, von der eine Vielzahl an Menschen betroffen ist. Daher gehört die Krebsforschung mit zu den wichtigsten medizinischen Forschungsbereichen. Somit kommt der zytotoxischen Wirkung der MCs eine wichtige Eigenschaft zu. Diese lösen in Krebszellen den selbstinduzierten Zelltod aus, genannt Apoptose.[34]

Cottiglia et al. isolierten MC J (13), MC K (14) und MC L (15) und testeten diese Verbindungen erfolgreich auf Zytotoxizität gegen MT4-Zellen.[22]

In einer neueren Veröffentlichung wurde gezeigt, dass MC A (1) die Apoptose sowohl auf dem extrinsischen wie als auch auf dem intrinsischen Weg in 4T1-Krebszellen auslöst.[35].

1.5.4. Synthese von Myrtucommulon A (1)

Unter Anbetracht des steigenden Interesses an Myrtucommulonen aufgrund ihres interessanten pharmakologischen Wirkungsspektrums, war eine Bereitstellung von größeren Mengen an MCs notwendig geworden. Die Isolierung lieferte lediglich eine geringe Ausbeute an MC A (1), im Bereich von wenigen Milligramm. Die Ausbeute der anderen MCs ist sogar noch geringer. 2010 gelang der Arbeitsgruppe Jauch die erste Synthese von MC A (1). Retrosynthetisch betrachtet, besteht MC A (1) aus Isobutyrylphloroglucin (23), Isobutyraldehyd (22) und Syncarpinsäure (21) (Abb. 14). [36] Das synthetische MC A (1) zeigte die gleichen pharmazeutischen Wirkungen und auch dieselben Schwierigkeiten bei der Interpretation der NMR-Spektren, wie das natürliche MC A (1). Daher wurde auch das synthetische MC A (1), analog zu der Vorschrift von Kashman in die pentazyklische Form (PMCA (2)) (Abb. 15) überführt.[16] Vom synthetischen PMCA (2) konnte ein NMR-Spektrum und eine Kristallstruktur erhalten werden, anhand derer die Struktur aufgeklärt werden konnte.

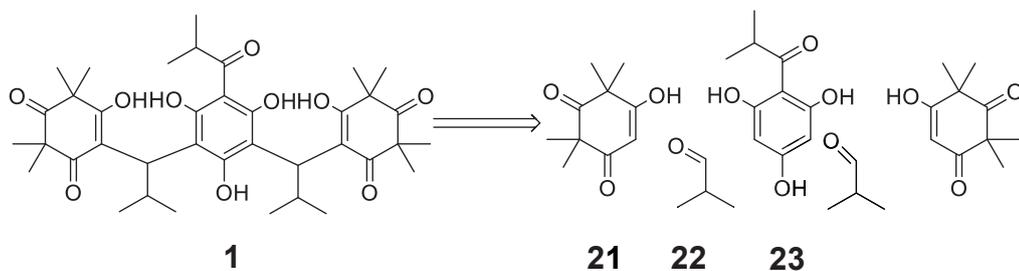


Abb. 14. Retrosynthese von MC A (1)

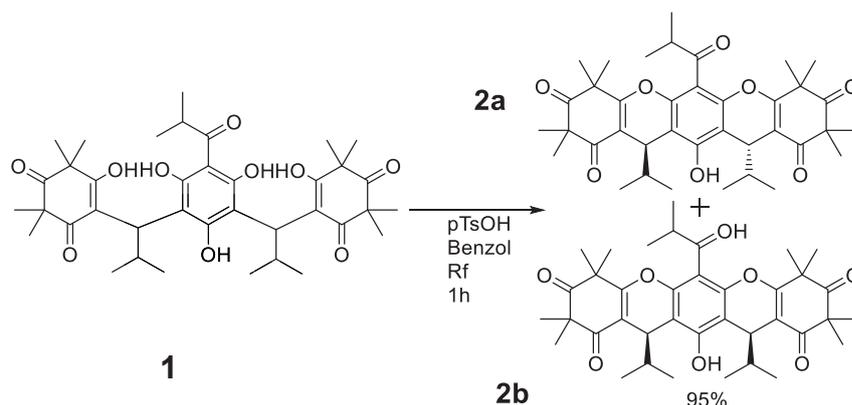


Abb. 15. Synthese von PMCA (2)

Die Synthese wurde mit achiralen Edukten sowie ohne chiralen Katalysator durchgeführt und liefert somit synthetisches MC A (1) als Mischung von drei Stereoisomeren (2 Enantiomeren und 1 meso-Form). Das synthetische MC A (1)

konnte mittels HPLC nicht in Razemat und meso-Form aufgetrennt werden, weshalb die Trennung mit PMCA (**2**) versucht worden war. Dieses konnte aufgetrennt werden, und somit den erwarteten stereochemischen Verlauf der Synthese bestätigen. Synthetisches PMCA (**2**) liegt als eine Mischung (1 : 1) aus meso-Form (**2b**) und Razemat (**2a**) vor.[36]

1.6. Warum Enantiomeranalytik ?

Die in Punkt 1.1 beschriebene Entwicklung in der Forschung nach immer neuen Naturstoffen als Pharmazeutika, stellt sowohl die enantioselektive Synthese wie auch die Enantiomeranalytik vor neue Herausforderungen. Diese Tatsache liegt darin begründet, dass die meisten in der Natur vorkommenden Verbindungen chiral sind.

Dazu zählen einfache Verbindungen wie Aminosäuren, Kohlenhydrate, Terpene etc. besonders auch deren höhere Reaktionsprodukte wie Eiweiße, DNA, Steroide und andere Stoffwechselprodukte. Dies gilt ebenso für moderne Naturstoff-pharmazeutika.[37] Die in dieser Arbeit beschriebenen Myrtucommulone und strukturverwandten Verbindungen besitzen mindestens ein Stereozentrum.

Die Contergan-Katastrophe aus den 1960er Jahren ist vielen Menschen ein Begriff. Bei Contergan handelte es sich um ein Medikament, das zur Behandlung von Schlafstörungen eingesetzt wurde. Der Hauptbestandteil des Medikamentes ist die razemische Verbindung Thalidomid (S-Enantiomer (**24**), R-Enantiomer (**25**) siehe (Abb. 16). Verbindung **25** zeigt sedierende Wirkung, **24** hingegen zeigt fruchtschädigende Wirkung.[38] Eine nicht ausreichende Enantiomeranalytik, bei der unter anderem das Problem der Razemisierung unbeachtet blieb, führte zu den bekannten Folgen.

Oft zeigt auch nur ein Enantiomer die gewünschte Wirksamkeit und das andere im schlechtesten Fall sogar toxische Wirkung. Aus diesen Gründen ist eine genaue Strukturaufklärung und Enantiomeranalytik unerlässlich.

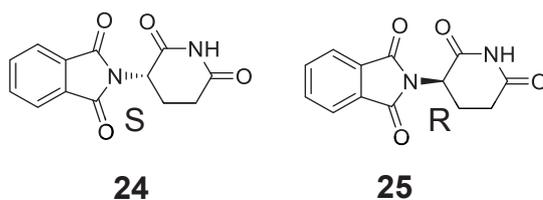


Abb. 16 Struktur von Thalidomid, S-Enantiomer (**24**) und R-Enantiomer (**25**).

Die Strukturaufklärung komplexer Naturstoffe gestaltet sich oft schwierig und verlangt die Kombination mehrerer Arbeitstechniken nebeneinander. Zur Strukturaufklärung gehört auch die Trennung der einzelnen Stereoisomere, um anschließend die absolute Konfiguration an den einzelnen Stereozentren zu bestimmen. Eine besonders geeignete und gängige Trennmethode, stellt der Einsatz einer chiralen stationären Phase in der HPLC dar. Es handelt sich um ein sehr oft angewandtes Verfahren (Abb. 17), da eine sehr große Auswahl an chiralen HPLC-Säulen existiert und das Upscaling auf präparative Säulen gut zu realisieren ist. Die erste kommerzielle chirale Phase wurde von Pirkle 1981 entwickelt.[39] Es ist kaum möglich, anhand der Eigenschaften des Analyten und des chiralen Selektors auf eine geeignete Phase zu schließen. Oftmals hilft dem Analytiker bei der Vielzahl an erhältlichen Phasen nur seine Erfahrung und Intuition. Im Folgenden werden wichtige Vertreter von Typen von chiralen Stationärphasen vorgestellt.

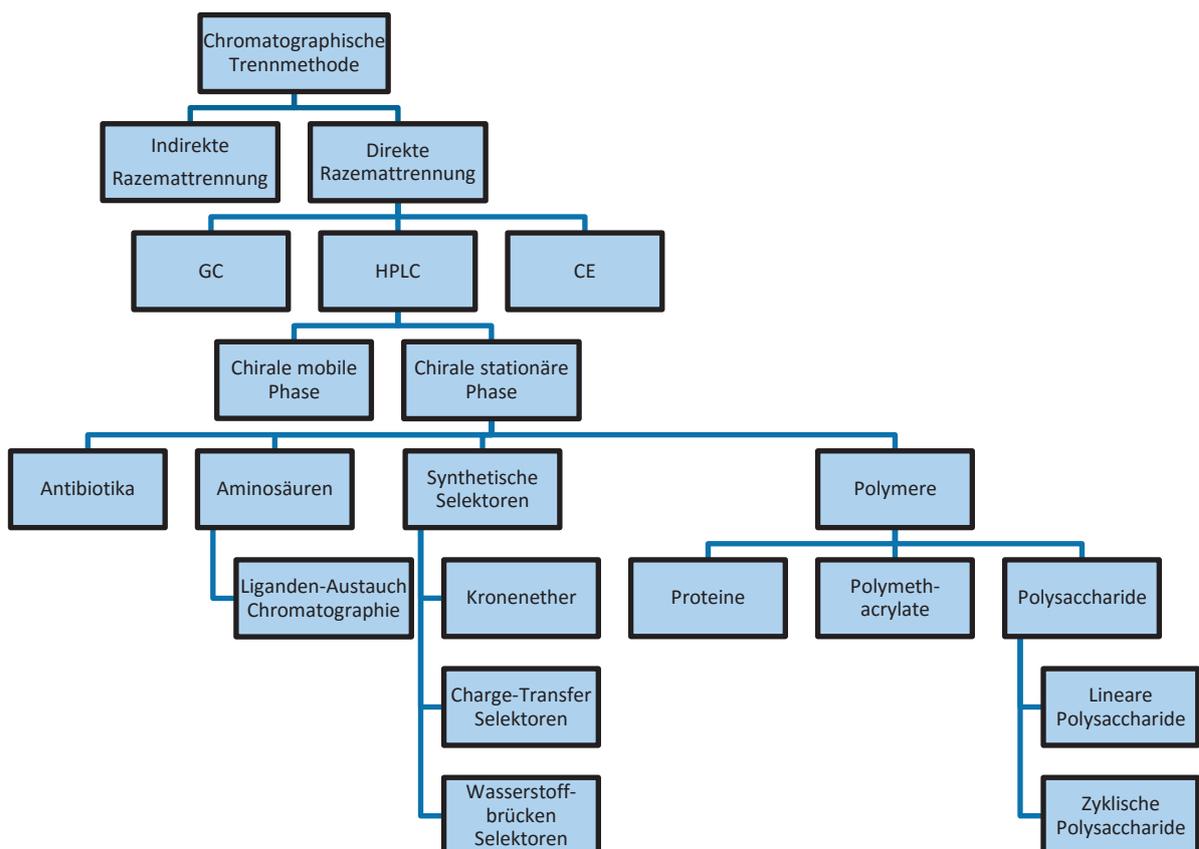


Abb. 17. Überblick über chromatographische Trennmethoden für chirale Verbindungen [40] (andere Einteilungen der chromatographischen Methoden sind prinzipiell möglich).

1.6.1. Lineare Polysaccharide

Die beiden wichtigsten Vertreter der linearen Polysaccharide sind die Cellulose (**26**) und die Amylose (**27**) (Abb. 18). Die Cellulose (**26**) besteht aus linearen β -1,4-glycosidisch verknüpften Glucose-Einheiten. Hingegen besteht die Amylose (**27**) aus α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucose-Einheiten. Aufgrund der mikrokristallinen Struktur und der Dichte an Interaktionsstellen besitzen **26** und **27** eine ausgeprägte Fähigkeit zwischen Enantiomeren zu unterscheiden.[40] Problematischer Weise sind beide Materialien wenig chemisch stabil, weisen eine geringe Trenneffizienz auf und sie sind nur schwer in Säulen zu packen. Der Firma Daicel gelang es dieses Problem zu lösen, indem sie Cellulose- bzw. Amylosederivate an sphärisches Kieselgel binden (coating) konnten. Meistens handelt es sich nicht um das reine Polysaccharid, sondern um Ester oder Carbamatderivate als Säulenmaterial. Die Säulen werden überwiegend als Normalphase betrieben. Lösemittel sind Kohlenwasserstoffe mit Alkoholen. Chlorierte Lösungsmittel können nicht verwendet werden.[40]

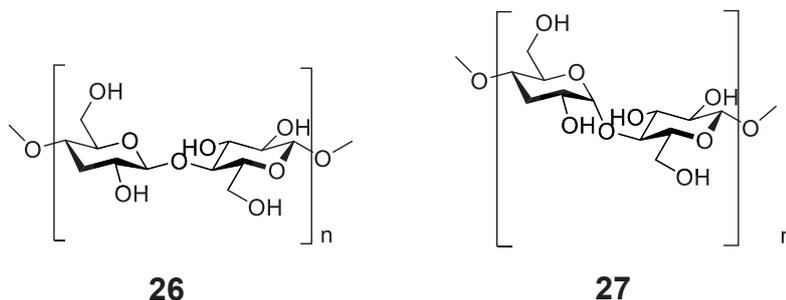


Abb. 18. Struktur von Cellulose (**26**) und Amylose (**27**).

Das Problem der Halogenunverträglichkeit wurde von Daicel durch Immobilisierung gelöst. Diese Säulen tragen die Bezeichnung Chiralpak IA oder IB vor dem Handelsnamen. In Tabelle 4 wird eine kleine Auswahl an linearen Polysaccharid-Säulen gezeigt.

Tabelle 4. Auswahl an linearen Polysaccharid Säulen.

Chiraler Selektor	Handelsname
Cellulose tris(3,5-dimethyl-phenylcarbamat)	Chiralcel OD, Chiralpak IB, Lux Cellulose1, Reprisil Chiral AM
Cellulose tris(3,5-dichlor-phenylcarbamat)	Chiralpak IC
Amylose tris(3,5-dimethyl-phenylcarbamat)	Chiralpak AD
Amylose tris(3-Chlor-4-methyl-phenylcarbamat)	Chiralpak AZ
Amylose tris(3,5-dichlor -phenylcarbamat)	Chiralpak IE-3
Cellulose tris(3,5-dichlor -phenylcarbamat)	Chiralpak IC-3

1.6.2. Zyklische Polysaccharide

Werden Glucose-Moleküle nicht linear α -1,4-glycosidisch verknüpft, sondern im 6-Ring (α -CD), 7-Ring (β -CD) oder 8-Ring (γ -CD) zyklisch miteinander verknüpft, so spricht man von Cyclodextrinen (CD). Die räumliche Struktur ist konusförmig. Die primäre (6)-Hydroxygruppe am schmalen Ende und die (2)- und (3)- Hydroxygruppe zeigen nach außen und bilden den polaren Teil. Der innere Teil, Cavität genannt, ist unpolar (vgl. Abb. 19).[37] Die exakten Maße der CDs sind in Tabelle 5 aufgelistet.

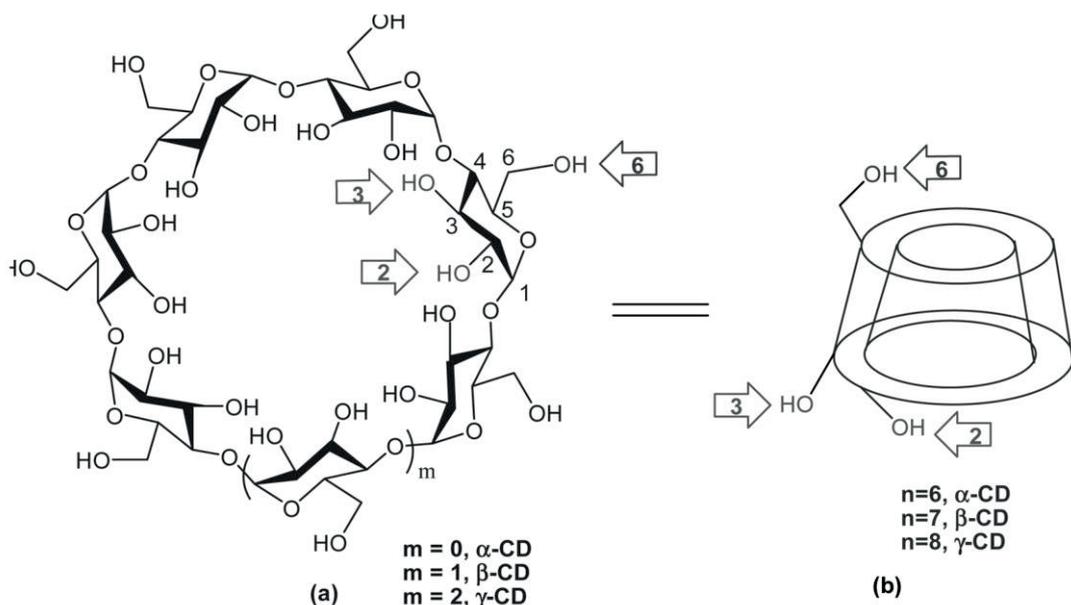


Abb. 19. schematische Darstellung von Cyclodextrinen.
 die Abbildung wurde aus W. Tang, S. I. Ng, *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 3246 - 3256 entnommen.[41]

Tabelle 5. Angaben über Cyclodextrine.[42]

	α -CD	β -CD	γ -CD
Molmasse g/mol	972	1135	1297
Anzahl an Einheiten	6	7	8
Cavitätsvolumen [nm ³]	1,74	2,62	4,27
Außendurchmesser [nm]	1,37	1,53	1,69
Cavitätsdurchmesser [nm]	0,57	0,78	0,95
Tiefe [nm]	14,5	18,5	23,2

Auch die CDs müssen an Kieselgel gebunden werden um sie für die HPLC nutzbar zu machen. Sie können im NP- oder RP-Modus verwendet werden, jedoch sind wässrige Eluenten besser geeignet als nichtwässrige Eluenten. Vor allem Trennungen mit hohem Wasser-/Pufferanteil wirken sich günstig auf die Trennung aus. Eine wichtige Rolle bei der Trennung spielt der pH-Wert und die Ionenstärke. Die chirale Erkennung hängt von den Wechselwirkungen der äußeren OH-Gruppen über Wasserstoffbrückenbindung und inneren Dipol-Dipol- und π - π -Wechselwirkungen mit dem Analyten ab.[40] Die Trennleistung der CDs kann durch Modifikation der OH-Gruppen wesentlich verbessert werden. Hierzu zählen das Anbringen von Methylgruppen und Carbamaten zu den gängigsten Derivatisierungen. Daher gibt es auch hier eine Vielzahl von Cyclodextrinderivaten. Die CD-Säulen werden unter Markenbezeichnungen wie Chirose, Chiradex, Cyclobond und Nucleodex im Handel geführt.

1.6.3. Aminosäurephasen

Aminosäuren sind von Natur aus chirale Verbindungen. Es lag daher nahe diese an Kieselgel zu binden und so chirales Säulenmaterial zu erhalten. Diese Säulen gehören mit zu den ältesten chiralen Phasen.[43] Die ersten Aminosäurephasen wurden von Gil-Av für die GC entwickelt und enthielten L-Valin als chiralen Selektor. Es konnten darauf eine Vielzahl von N-Trifluoracetyl-Aminosäurederivaten getrennt werden.[44] Dieses Trennprinzip sollte nun auf die HPLC übertragen werden. Als erstes Exemplar einer aminosäurenbasierenden Stationärphase, entwickelte Foucault [33] eine Prolinamidphase zur Trennung von Aminosäuren. Als Spacer wurden 3-Aminopropyltriethoxysilan Aptes (**40**) und Glycidoxypropyltrimethoxysilan

Gptms (**43**) verwendet. Jedoch zeigten diese Aminosäurephasen ein relativ eingeschränktes Anwendungsgebiet. Dieses konnte aber durch Zugabe von Cu^{2+} in Lösung deutlich vergrößert werden. Verbindungen, die in der Lage sind mit Kupfer stabile Chelatkomplexe zu bilden, können dadurch getrennt werden. Dieses Trennverfahren wird chirale Ligandenaustausch-Chromatographie genannt.[33] Das System wurde auf weitere Aminosäuren und Derivate ausgeweitet. Auch das Metallatom kann variiert werden.[45], [46] Mit der Idee eine von Natur aus chirale Verbindung an Kieselgel zu binden, wurde die Grundlage für weitere Säulenmaterialien geschaffen, die auf diesem Prinzip basieren. Dazu gehören unter anderem die Pirkle-Phasen.

1.6.4. Pirkle-Phasen

Bei NMR-Untersuchungen stellte Pirkle fest, dass chirale Fluoralkohole mit zahlreichen Enantiomeren Assoziate bildeten. Diese Feststellung übertrug er auf die HPLC.[47] Er entwickelte als erste Phase ein an Kieselgel gebundenes 2,2,2-Trifluor-1-(9-Anthryl)-ethanol (Abb. 20) mit dem er viele Analyten bspw. Amine, Schwefelverbindungen, Phosphine, Lactone und Aminosäuren auftrennen konnte. Diese Art von Stationärphasen nennt man Brush-Type-Phasen.

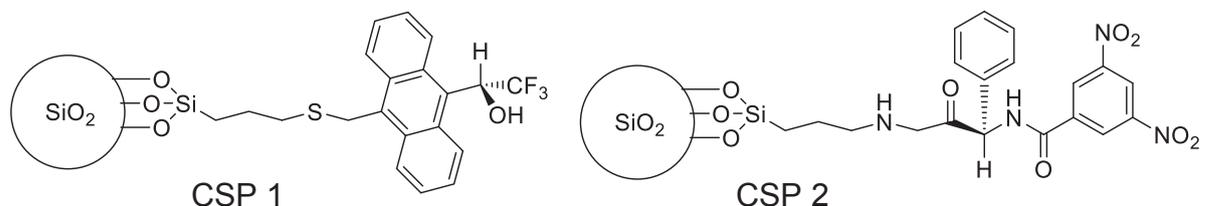


Abb. 20. Struktur der chiralen Stationärphase 1 (CSP 1) und CSP 2.

Der elektronenreiche Aromat (CSP 1) zeigte vor allem mit elektronenarmen Verbindungen starke Wechselwirkungen. Bei Versuchen mit 3,5-Dinitrobenzoylderivaten von Aminoverbindungen stellte er eine hervorragende Trennleistung fest, wodurch Pirkle zum Umkehrschluss kam und eine stationäre Phase mit 3,5-Dinitrobenzoyleinheit (CSP 2) (Abb. 20) entwickelte.

CSP 2 zeigte eine deutlich bessere Trennleistung als CSP 1 und die Bandbreite an trennbaren Molekülen war viel größer.[47] CSP 2 kann neben Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auch π - π -Wechselwirkungen ausbilden. Vor allem Moleküle mit π -System in Nachbarschaft

zum Assymetriezentrum konnten gut getrennt werden.[48] Mit der Drei-Punkt-Wechselwirkungstheorie (Abb. 21) zwischen Selektor und Analyten kann bestimmt werden, ob eine Trennung überhaupt möglich ist. Um gute π - π -Wechselwirkungen zu erhalten sind unpolare Lösemittel von Vorteil, weshalb diese Säulen überwiegend als Normalphase betrieben werden.[40], [49]

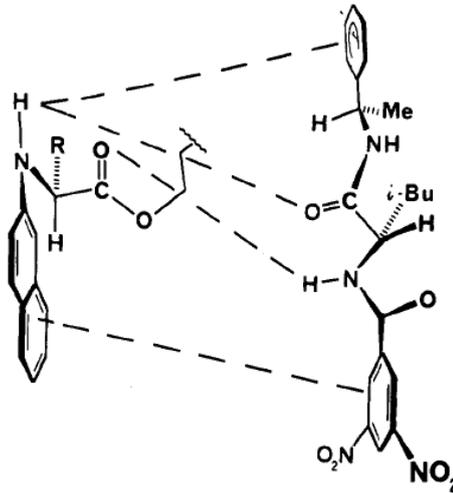


Abb. 21. Drei-Punkts-Wechselwirkung. die Abbildung wurde aus W. H. Pirkle, T. C. Pochapsky, G. S. Mahler, D. E. Corey, D.S. Reno, D. M. Alessi, *J. Org. Chem*, **1986**, 51, 4991 – 5000.[142]

Bei den Pirkle-Phasen wurden in den letzten Jahren immer weitere neue Selektoren entwickelt. Eine sehr gängige Phase ist die Whelk-O 1-Phase (Abb. 22) oder die ULMO. Alle Phasen bestehen in ihrem grundlegenden Aufbau aus einem H-Brücken-Donor, dem Dinitrobenzamid π -System und einem Anthracen/Naphthalin- π -System.[40] Ein Überblick über 65 unterschiedliche Pirkle-Phasen wird in dem Review von Welch gegeben.[47]

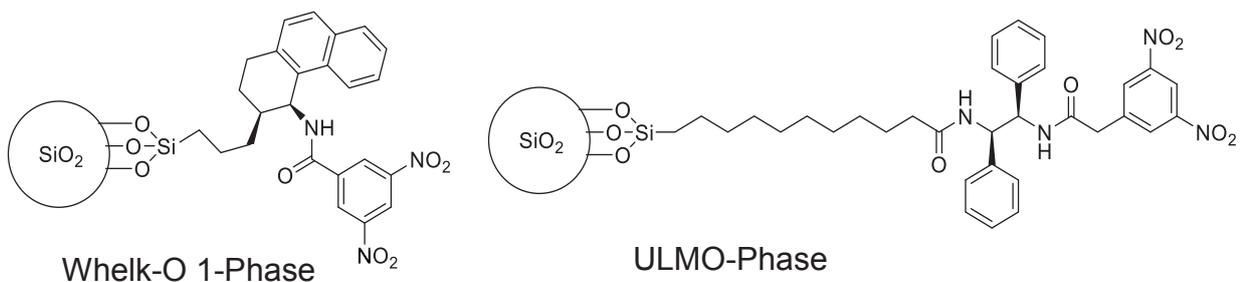


Abb. 22. Struktur der Whelk-O 1-Phase und der ULMO-Phase

Eine Weiterentwicklung im Bereich der Pirkle-Phasen war das Hinzufügen einer weiteren Wechselwirkung, der Charge-Transfer-Wechselwirkung. Unter anderem gehören dazu die Säulen von Gil-Av mit dem chiralen Selektor TAPA (**28**).[50]

1.6.5. TAPA-Phase

(±)-α-(2,4,5,7-Tetranitro-9-Fluorenylidenoxy)-Propionsäure (**28**, **29**) (±)-TAPA (Abb. 23) wurde 1968 von M. Newman und P. Block erstmals synthetisiert.[51] Enantiomerenreines TAPA (**28**) kann an Kieselgel gebunden werden und als Säulenmaterial in der HPLC für Enantiomerentrennungen verwendet werden. Die ersten getrennten Enantiomere waren Helicene. Es war möglich, racemische Lewis-Basen in Enantiomere zu trennen, auch solche, die keine funktionellen Gruppen aufweisen. Dies war mit herkömmlichen Mitteln bisher nicht möglich gewesen.[50] Die Trennung erfolgt, indem ein Enantiomer einen stärkeren Charge-Transfer-Komplex mit TAPA (**28**) bildet als das Andere und dadurch im Vergleich zum anderen Enantiomer zurückgehalten wird. Ein Charge-Transfer-Komplex kann deshalb ausgebildet werden, da TAPA (**28**) ein elektronenarmes Molekül, ein Elektronenakzeptor, ist. Es kann mit elektronenreichen Molekülen, sogenannten Elektronendonoren, einen Elektronen-Donor-Akzeptor-Komplex bilden (Abb. 94). Hierbei werden negative elektrische Ladungen reversibel vom elektronenreichen zum elektronenarmen Molekül übertragen. Dies geschieht unter Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes mit charakteristischer Färbung.[52]

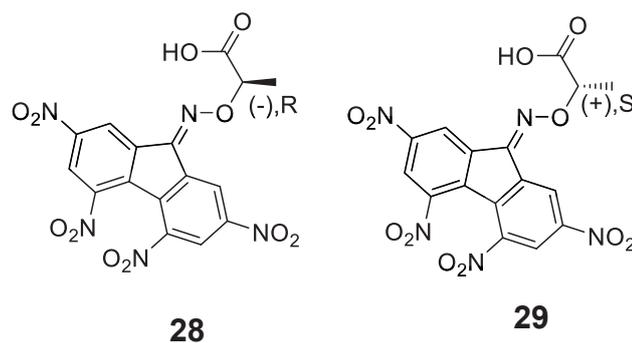


Abb. 23. Struktur von (-)-R-TAPA (**28**) und (+)-S-TAPA (**29**).

1.6.5.1. Synthese von enantiomerenreinem TAPA (28, 29)

Die Synthese geht aus von 9-Fluorenon (**31**), welches mit Nitriersäure zu 2,4,5,7-Tetranitro-9-fluorenon (**32**) umgesetzt wird (Abb. 88).[53] In einem parallelen Ansatz wird Ethyl- α -brompropionat (**34**) zu Acetonoxim (**33**) hinzuge tropft. Der entstandene α -(Isopropylaminooxy)-propionsäureethylester (**35**) wird zur Säure **36** verseift.[50] Im nächsten Schritt wird die racemische Säure **36** mit (-)-Ephedrin (**37**) in Essigsäureethylester gelöst. Durch Abkühlen wird das (-)-Ephedrin-(+)- α -(isopropylaminooxy)-propionsäure-Salz als watteartige Kristalle erhalten. Die Mutterlauge wird mit PE versetzt, um das (-)-Ephedrin-(-)- α -(isopropylaminooxy)-propionsäure-Salz als harte Kristalle zu erhalten. Das enthaltene (-)-Ephedrin (**37**) jeden Salzes wird mit Salzsäure abgespalten und man erhält (-)- α -(Isopropylaminooxy)propionsäure (**38**) bzw. (+)- α -(Isopropylaminooxy)propionsäure (**39**).[50] Verbindung **38** bzw. **39** wird mit 2,4,5,7-Tetranitro-9-fluorenon (**32**) durch Umoximierung zu (+)-TAPA (**29**) bzw. (-)-TAPA (**28**) umgesetzt.[50]

1.6.5.2. Herstellung des Säulenmaterials

Kieselgel (Lichrosorb SI 100 (5 μ m), Partisil 7) wird mit einer 30 %igen Lösung aus 3-Aminopropyltriethoxysilan (Aptes) (**40**) in Toluol unter Rückfluss gerührt. Das Lösemittel wird anschließend abgesaugt und das derivatisierte Kieselgel **41** getrocknet. Das getrocknete Kieselgel **41** wird in CHCl_3 abs. suspendiert und TAPA (**28**) zusammen mit DCC hinzugefügt und 4 h gerührt. Das mit chiralem Selektor belegte Kieselgel **50** wird abgesaugt und mehrfach gewaschen. Das fertig derivatisierte Kieselgel wird anschließend in eine HPLC-Säule gepackt.[54]

1.6.5.3. Trennungen mit TAPA-Säulen

1975 gelang Amoss et al. die Trennung von verschiedenen Helicenen mittels einer HPLC Säule, die als Stationärphase 2,4,5,7-Tetranitro-9-fluorenon (**32**) (Abb. 24) enthielt. Sie nutzten die Wechselwirkungen des elektronenarmen (**32**) mit den elektronenreichen Helicenen aus. Es gelang ihnen unter anderem mit der Säule Benzol, Naphthalin und Anthracen voneinander zu trennen.[55]

Die erste Trennung mit einer TAPA-Säule wurde 1976 von Gil-Av veröffentlicht.[54] Neben der α -Hydroxy-propionsäure als chiralem Selektor in TAPA (**28**), wurden auch α -substituierte Butansäure, α -substituierte Isovaleriansäure und α -substituierte

Hexansäure getestet (Abb. 24). Ab dem 7-Helicen ist deutlich die Aufspaltung des Peaks in seine Enantiomeren zu erkennen. Ebenso konnten Doppelhelicene aufgetrennt werden.[54] In darauffolgenden Untersuchungen konnten auch Helicene mit Schwefel-, Ester und Bromsubstituenten aufgetrennt werden.[56], [57] Neben den Helicenen gelang 1993 die Auftrennung von Buckminsterfullerenen.[58] und Derivaten davon.[59] Weitere Moleküle, die separiert werden konnten, waren verschiedenste Dihydrodirole polyaromatischer Verbindungen.[60]

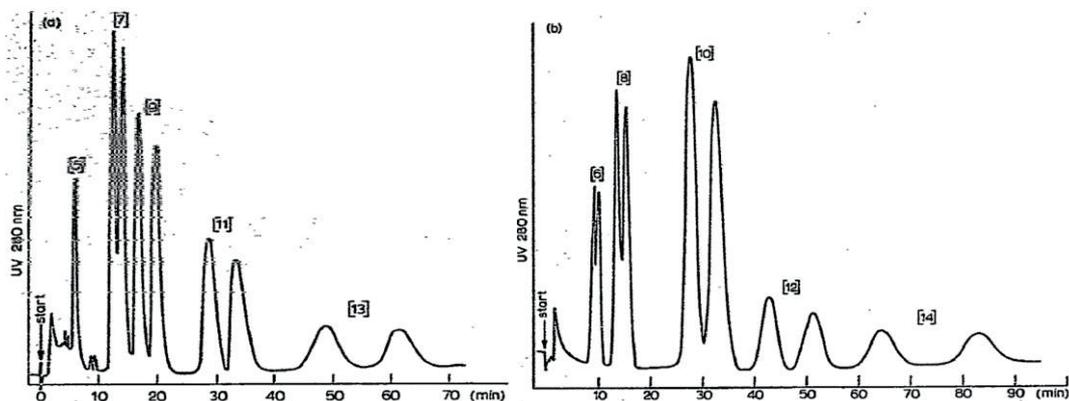


Abb. 24. Chromatogramm (-)TAPA-Säule **50**.
die Abbildung wurde entnommen aus F. Mikes, G. Boshart, E. Gil-Av, *Journal of Chromatography*, **1976**, 122, 205 - 221. [54]

c-Hexan - DCM 75:25 v/v, F: 0,26 cm/s,

a) Trennung von 5-, 7-, 9-, 11- und 13-Helicen

b) Trennung von 6-, 8-, 10-, 12-Helicen

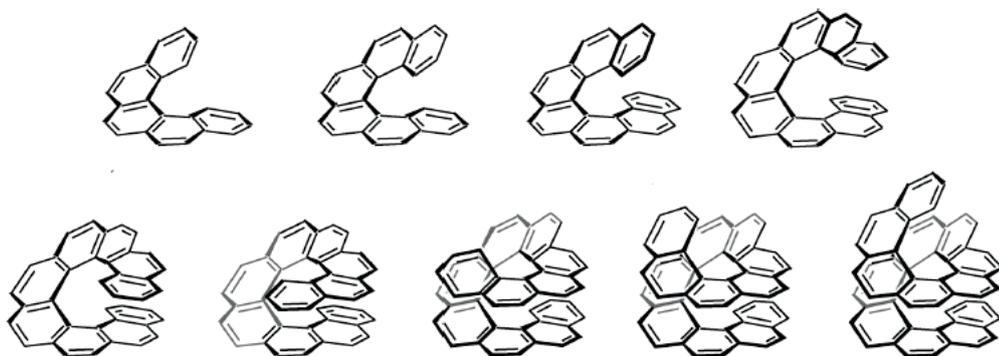


Abb. 25. Struktur von [5]Helicen bis [13]Helicen
die Abbildung wurde entnommen aus M. Gingras, G. Felix, R. Peresutti, *Chem. Soc. Rev*, **2013**, 42, 1007 – 1050.[61]

Betrachtet man die in der Literatur mittels TAPA (28, 29) aufgetrennten Verbindungen, so besitzen die niedrigen Helicene eine planare Struktur. Die höheren weisen eine helicale Struktur auf (Abb. 25). Es handelt sich um elektronenreiche Verbindungen. Elektronenschiebende Substituenten an den Helicenen, wie beispielweise Hydroxylgruppen, verbessern das Trennergebnis.[57] Betrachtet man diese Strukturmerkmale mit denen von MC A (1) bzw. PMCA (2), so stellt man doch eine gewisse Gemeinsamkeit fest. Dazu gehören die teilweise planare Struktur und die elektronenschiebenden Hydroxylgruppen mit ihrem elektronenreichen Aromaten. Somit könnte es möglich sein, dass TAPA-Säulen in der Lage sind auch die Myrtucommulone in Enantiomere aufzutrennen.

1.6.6. Reprosil Chiral NR

Bei der Reprosil Chiral NR handelt es sich um eine chirale HPLC-Säule des Säulenherstellers Dr. A. Maisch GmbH. Die Firma Maisch GmbH stellt verschiedenste Sorten von HPLC-Säulen her. Typische Markennamen sind Reprosil, Reprosphere, Reprobond, Reproshell, Repro-Gel, Repropak und viele mehr. Von besonderem Interesse für uns ist die 2009 eingeführte Gruppe der chiralen Säulen, welche die Bezeichnung Reprosil-Chiral trägt. Ergänzt wird diese Bezeichnung durch Kürzel wie AA, OH, NR, JM und weitere. Hinter diesen Produktbezeichnungen befindet sich eine große Auswahl an chiralen HPLC-Säulen wie beispielweise lineare-, cyclische Polysaccharid-Phasen, Aminosäure-Phasen und Pirkle-Phasen, wie sie auch bei andren Herstellern größtenteils gefunden werden können. Von besonderem Interesse ist die Reprosil-Chiral NR. Sie basiert auf dem ultrapure Reprosil-Kieselgel 100. Der chirale Selektor, eine aromatische Verbindung, ist kovalent gebunden und zeigt Trenneigenschaften vergleichbar mit einer Mischung aus Polysaccharidphase und Pirkle-Phase. Sie besitzt π -Akzeptor- und π -Donorgruppen. Die genaue Struktur des chiralen Selektors ist Firmengeheimnis. Die Säule kann im NP- oder RP-Modus genutzt werden und ist in fast allen gängigen Lösemitteln stabil. Der optimale pH-Bereich liegt zwischen 2 und 7 und sie ist bis 300 bar druckstabil. Die Zugabe von Laufmittelzusätzen ist ebenso möglich. Geeignet ist die Säule für chirale Trennungen, bei der der Analyt einen Aromaten und eine Sauerstoff- bzw. Stickstoff-Gruppe in direkter Nähe zum Assymetriezentrum besitzt. Dazu gehören: Amide, Alkohole, Aldehyde, Carbonsäuren, Ester, Ketone

Phosphonate und weitere ähnliche Verbindungen.[62] Auf dem Internetauftritt der Maisch GmbH kann eine große Zahl an Referenztrennungen gefunden werden.

1.7. Ziele dieser Arbeit

Die Myrtucommulone zeigen viele interessante pharmazeutische Eigenschaften (Punkt 1.4). Aus diesem Grund ist es von großem Interesse diese Substanzklasse tiefergehend zu erforschen.

Diese Arbeit soll folgende Fragen aufklären:

- 1.) Bisher ist es noch nicht gelungen die unzyklisierten Myrtucommulone aufzutrennen. Somit konnten die pharmazeutischen und chemischen Eigenschaften jedes einzelnen Enantiomeres noch nicht getrennt voneinander untersucht werden. Um diese Trennung zu realisieren, soll in dieser Arbeit eine Vielzahl an Methoden und HPLC-Techniken untersucht werden. Vor allem soll die nicht kommerziell erhältliche TAPA-Säule **50** synthetisiert und deren Trenneigenschaften in Bezug auf die MCs getestet werden.
- 2.) Die Ergebnisse im Bereich der zyklisierten Myrtucommulone, welche in der Master-Arbeit gemacht worden sind, sollen noch einmal überprüft und weitergeführt werden (Seite- 34 -). Sollte es möglich sein (unzyklisiertes) MC A (**1**) auftrennen zu können, so sollten diese Ergebnisse mit den bisher gemachten Ergebnissen der zyklisierten Verbindungen verglichen werden. Besondere Aufmerksamkeit soll hier auf die Gefahr der Razemisierung während der Zyklisierungsreaktion gelegt werden.
- 3.) Ebenso sollen die bisher gefundenen Myrtucommulone auf ihre Absolutkonfiguration hin untersucht werden, da die Literatur hier widersprüchliche Angaben macht.[21] Es ist bisher unklar, ob alle oder nur einzelne MCs enantiomerenrein bzw. angereichert biosynthetisiert werden. Eine Untersuchung in diesem Bereich kann wertvolle Erkenntnisse bezüglich der Biosynthese liefern. Ebenso muss überprüft werden, ob manche der bisher bekannten MCs nur Isolierungsartefakte der unzyklisierten MCs sind. Erklärbar wäre dies durch die Einwirkung großer Hitze oder von zu saurem Milieu bei der Isolierung der Myrtucommulone aus der Pflanze. Selbst Appendino zweifelt die Existenz der zyklischen MCs stark an.[19]

- 4.) Die Veröffentlichung von Nicoletti und Mitarbeitern [24] führt zu der Frage ob die im Pilz hergestellten MCs razemisch oder enantiomerenrein vorliegen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob der Pilz die Myrte oder die Myrte den Pilz für die Synthese der MCs braucht oder ob beide (zufällig) unabhängig voneinander Myrtucommulone synthetisieren.
- 5.) Da in den letzten Jahren immer wieder neue Myrtucommulone entdeckt worden sind, soll die Myrte auf weitere neue MCs hin untersucht werden. Ebenso sollen Vertreter aus dieser Familie (*Eucalyptus acmenoides*, *Corymbia peltata* und *Leptospermum petersonii*) untersucht werden, ob diese MC A (1) oder neue chemisch und pharmazeutisch interessante Substanzen enthalten.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1. Stand der Forschung aus der Master-Arbeit

2.1.1. Unzyklisierte Myrtucommulone

Um Untersuchungen an MCs durchzuführen war es nötig, diese absolut rein aus dem Pflanzenmaterial zu isolieren. Dazu wurden getrocknete und pulverisierte Myrtenblätter in einer Soxhlet-Apparatur mit Diethylether erschöpfend extrahiert. Der nach dem Entfernen des Lösemittels erhaltene Rohextrakt wurde durch Flash-Chromatographie (PE : Aceton 3 : 2 v/v) in mehrere Fraktionen aufgetrennt. Mittels HPLC konnten die Fraktionen auf ihre Hauptbestandteile hin analysiert werden. Es konnte eine Myrtucommulon-Fraktion (Fraktion 3) und eine Norsemyrtucommulon-Fraktion (Fraktion 4) erhalten werden. Fraktion 4 wurde zweimal hintereinander mit dem Laufmittel MeOH (0,1 % TFA) und MeCN (0,1 % TFA) (80 : 20 v/v) über eine präparative HPLC-Säule (MN C18 ec) gereinigt. Um das Lösemittel möglichst schonend zu entfernen, wurde eine Ölpumpe verwendet. Am Ende konnte MC A (1) mit 99,9 %iger Reinheit isoliert werden.[63] In Abb. 26 werden die Aufreinigungsschritte im Chromatogramm gezeigt.

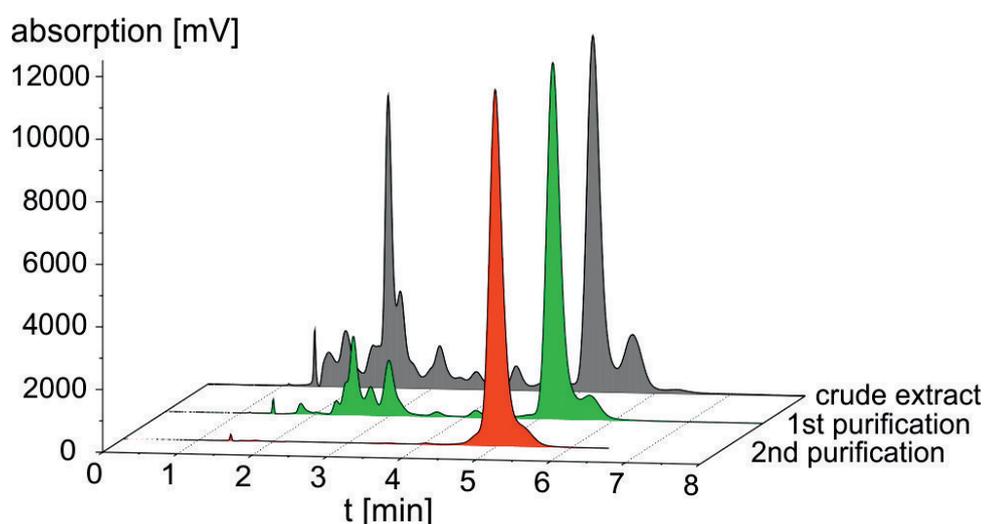


Abb. 26. Aufreinigungsschritte von MC A (1).
die Abbildung entstammt aus M. Hans, M. Charpentier, V. Huch,
J. Jauch, T. Bruhn, G. Bringmann, D. Quandt,
J. Nat. Prod. **2015**, *78*, 2381 – 2389.[64]

Nach einem weitestgehend vergleichbaren Verfahren (einmal präparative HPLC im Laufmittel MeOH (0,1 % TFA) und MeCN (0,1 % TFA) (80 : 20 v/v) und zweites Mal MeOH (0,1 % TFA) und Wasser (0,1 % TFA) (90 : 10 v/v) auf RP18) wurde auch NSMC (**30**) (Abb. 27) mit einer Reinheit von 99,9 % isoliert.

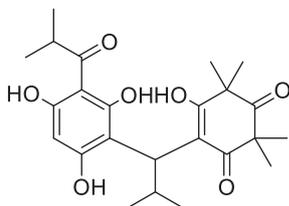
**30**

Abb. 27. Struktur von Norsesmyrtucommulon (**30**).

Tabelle 6: Charakterisierung von MC A (**1**) und NSMC (**30**).

Charakterisierung	MC A (1)	NSMC (30)
Massenspektrum (ESI (-))	667,3	431,2
Spezifische optische Rotation	0	0
Schmelzpunkt	175° C	170° C
R _f -Wert (PE:Aceton 1:1 v/v)	0,57	0,22
CD-Spektrum	Nulllinie	Nulllinie
NMR	Abb. 28	Abb. 29

In Tabelle 6 werden die beiden isolierten Substanzen charakterisiert. Wie bereits von Kashman et al. beschrieben, [16] zeigten sowohl das natürliche MC A (**1**), als auch das im Ak Jauch synthetisierte MC A (**1**) und NSMC (**30**) [36] die gleichen komplexen Spektren. Es war zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich, die unzyklisierten Stereoisomere des MC A (**1**) aufzutrennen. Anhand von Vergleichen mit der Literatur [16], [36] und synthetischem MC A (**1**) [65] konnte an dieser Stelle gezeigt werden, dass reines natürliches MC A (**1**) hier isoliert worden war.[65] Ebensoleses galt für NSMC (**30**).[63]

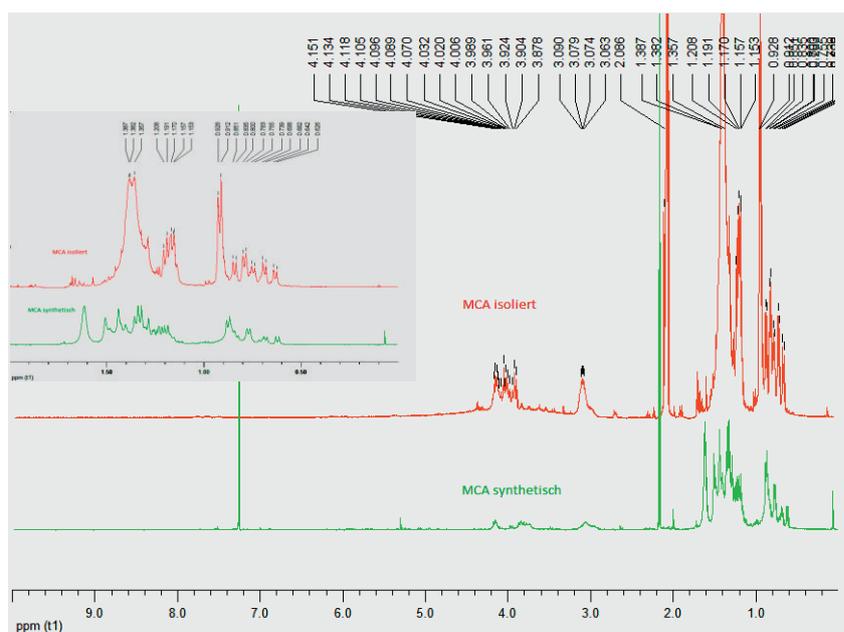


Abb. 28. ¹H-NMR-Spektrum von MC A (**1**) im Vergleich mit synthetischem MC A (**1**) die Abbildung entstammt der Master-Arbeit M. Hans Seite 19 Abb. 19.[63]

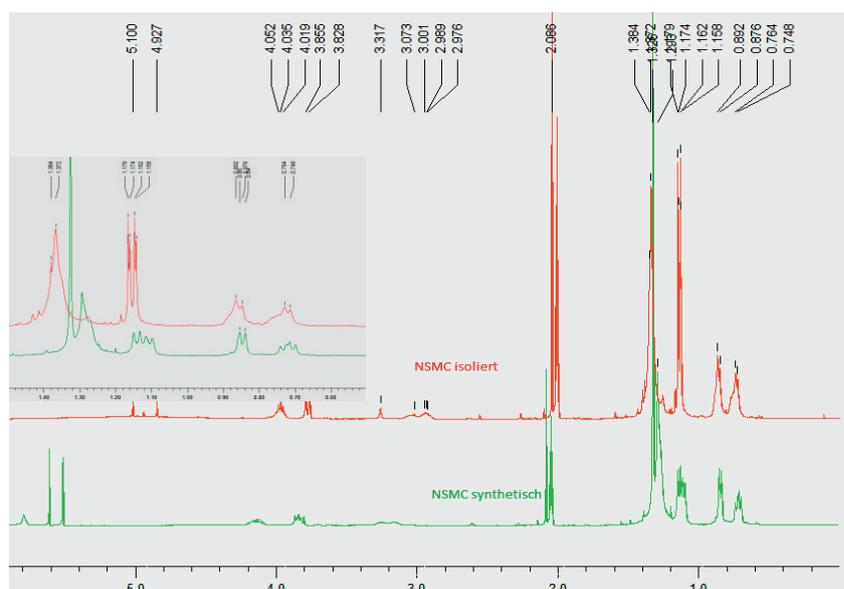


Abb. 29. ¹H-NMR von NSMC (**30**) im Vergleich mit synthetischem NSMC (**30**) die Abbildung entstammt der Master-Arbeit M. Hans Seite 27 Abb. 29.[63]

2.1.2. Zyklisierte Myrtucommulone

Da die stereochemische Zusammensetzung nicht aus den unzyklisierten MCs bestimmt werden konnte, wurde **1** und **30** nach Abb. 212 zu ihren zyklischen Verbindungen PMCA (**2**) und MC B (**3**) umgesetzt. Von beiden konnte ein $^1\text{H-NMR}$ erhalten werden, wodurch die Struktur eindeutig belegt werden konnte. Weitere Substanzcharakterisierung wie Massen-, CD-Spektroskopie und Schmelzpunkt stimmten mit den synthetischen Proben [65] und Literaturdaten überein.[36] Verbindung **2** konnte auf RP18-HPLC mit MeOH / Wasser in Meso-Form **2a** und Razemat **2b** getrennt werden (Abb. 30). Das Razemat **2b** von **2** und MC B (**3**) konnten anschließend auf einer chiralen Säule in ihre Enantiomeren getrennt werden (Abb. 31).[63]

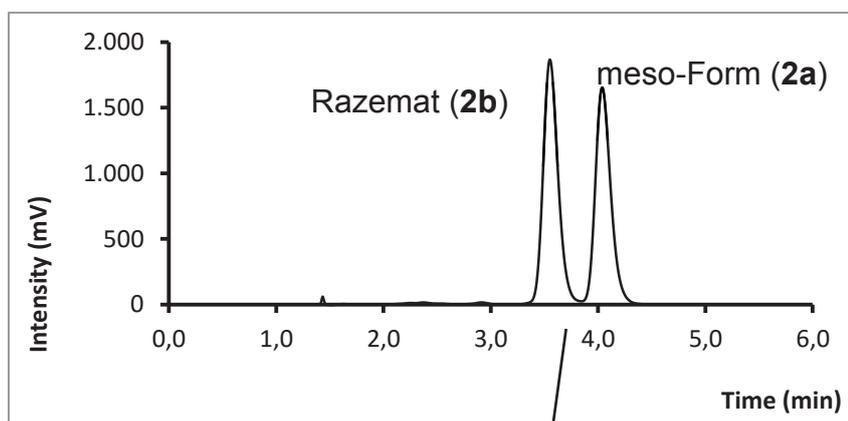


Abb. 30. Chromatogramm von PMCA (**2**)
MN C18ec, MeOH : MeCN 20 : 80 v/v, F: 1 mL/min, rt
die Abbildung entstammt der Master-Arbeit M. Hans Seite 23 Abb. 24.[63]

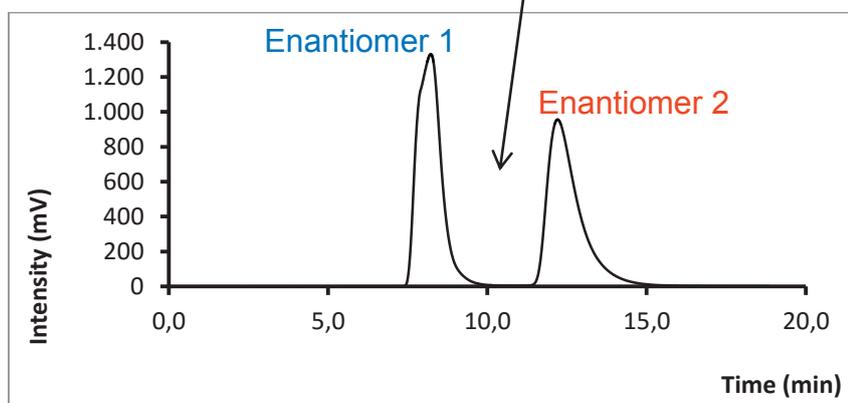


Abb. 31. Chromatogramm von racemischen PMCA (**2**).
Chiralcel OD-H, iso-PrOH : n-Hexan 30 : 70 v/v, F: 0,5 mL/min, 15°C
die Abbildung entstammt der Master-Arbeit M. Hans Seite 24 Abb. 26.[63]

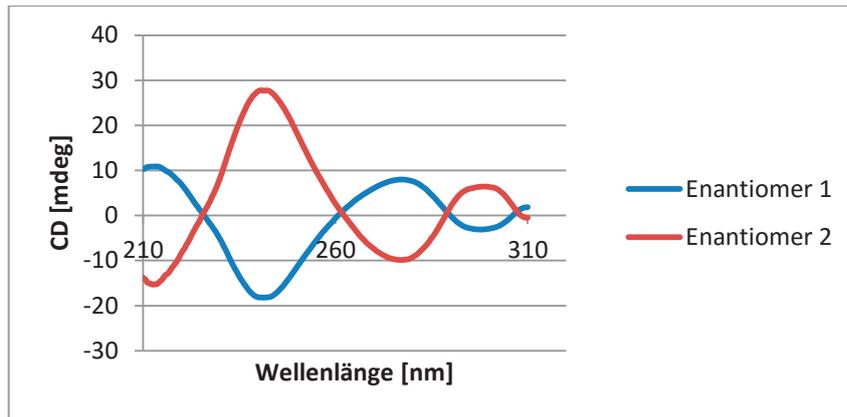


Abb. 32. CD-Spektren der einzelnen Enantiomere von PMCA (2).
(getrennt gemessen aber im selben Diagramm Dargestellt),
die Abbildung entstammt der Master-Arbeit M. Hans Seite 25 Abb. 27.[63]

Die getrennten Enantiomere wurden CD-spektroskopisch untersucht. Es konnte ein entgegengesetzter Cotton-Effekt erhalten werden (Abb. 32). Ebenso wurde MC B (3) analysiert (Abb. 33 und Abb. 34):

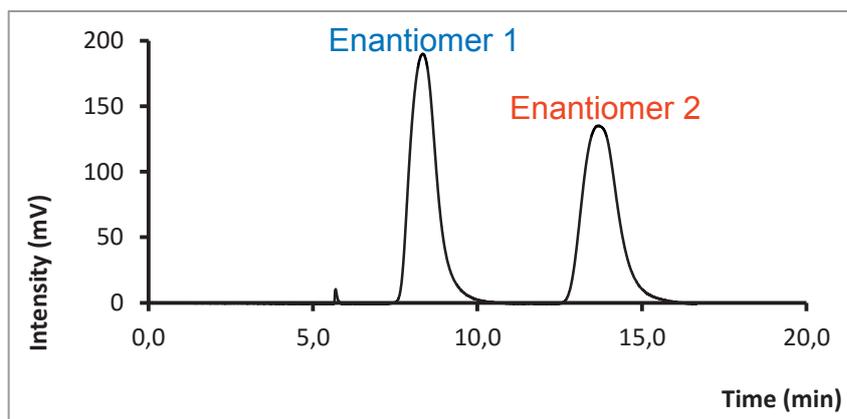


Abb. 33. Chromatogramm MC B (3).
Chiralcel OD-H, iso-PrOH : n-Hexan 30 : 70 v/v, F: 0,5 mL/min, 15° C
die Abbildung entstammt der Master-Arbeit M. Hans Seite 29 Abb. 33.[63]

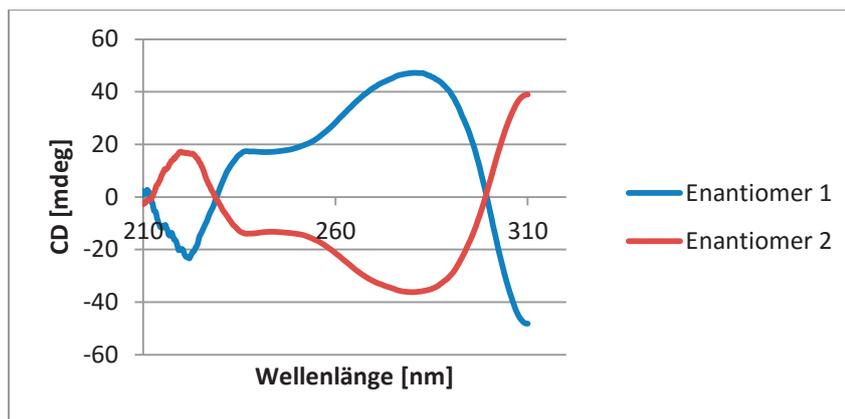


Abb. 34. CD-Spektren der einzelnen Enantiomere von MC B (**3**) (getrennt gemessen, aber im selben Diagramm Dargestellt) die Abbildung entstammt der Master-Arbeit M. Hans Seite 30 Abb. 34.[63]

2.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Masterarbeit

In der Masterarbeit konnten reines MC A (**1**) und NSMC (**30**) isoliert werden. Es wurde festgestellt, dass PMCA (**2**) aus der Meso-Form **2a** und dem Razemat **2b** im Verhältnis 1 : 1 besteht. Aus der Konfiguration des PMCA (**2**) konnte auf die Konfiguration des MC A (**1**) geschlossen werden. Ein Vergleich mit dem synthetischen MC A (**1**) bestätigte die Ergebnisse der Master-Arbeit.[36] Daher stellt sich hier die Frage, ob die anderen MCs auch razemisch vorliegen oder so, wie Quinn es berichtet.[29]

Analog zur Strukturaufklärung des MC A (**1**) verlief die Strukturaufklärung des NSMC (**30**) und lieferte das Ergebnis, dass sowohl natürliches NSMC (**30**) als auch MC B (**3**) im Enantiomerenverhältnis 1 : 1 vorliegen.

Als weitere Substanzen konnten noch SMC (**4**), MC C (**6**) und ein Homologes des MC A (**1**) isoliert werden. Jedoch konnten diese Substanzen nie in genügender Menge und reiner Form erhalten werden, weshalb keine Informationen zur Konfiguration und der genauen Struktur vorliegen.[63]

Die Ergebnisse der Masterarbeit lassen noch einige Fragen ungeklärt oder bedürfen der Überprüfung. Einige Fragen, die daraus resultieren, sind in Punkt 1.7. in dieser Dissertation aufgelistet.

2.2. Herstellung eines Myrte-Rohextrakts und Auftrennung in verschiedene Fraktionen

Die Herstellung des Pflanzenrohextraktes orientierte sich an der Vorhergehensweise der Masterarbeit.[63] Zur Extraktion wurden getrocknete und pulverisierte Myrtenblätter (*Myrtus communis*) verwendet.

Die Blätter wurden bei der Firma Galke GmbH in Gittelde erworben. Die Identität der Myrte wurde durch die Kreuz-Apotheke in Seelze, im Auftrag der Firma Galke an Hand von makro- und mikroskopischen Merkmalen mittels Datenabgleich unverwechselbar bestätigt. Ebenso wurden die hier verwendeten Myrtenblätter durch D.Quandt mithilfe einer ITS-Sequenzierung identifiziert.[64]

Pulverisierte Myrtenblätter wurden in einer Soxhlet-Apparatur mit Diethylether erschöpfend extrahiert. Nachdem das Lösungsmittel entfernt worden war, wurde die grüne, gummiartige Masse mittels DC (Abb. 35), HPLC (Abb. 36) und (Abb. 37) GC-MS analysiert.

Im Rohextrakt konnten sowohl eindeutig per DC, unter Nutzung von UV-Detektion und Anfärben, ebenso eindeutig per HPLC MC A (1) und NSMC (30) gefunden werden. Diese Verbindungen können als Leitsubstanzen angesehen werden, nach denen sich die Einteilung in Fraktionen durch Flash-Chromatographie richtete. Die Hälfte des Extraktes wurde auf Aufziehkieselgel geladen und anschließend im Laufmittel PE : Aceton 3 : 2 v/v mittels Kieselgel in 7 Fraktionen aufgetrennt. Fraktion 6 war das Spülen der Säule mit Aceton, Fraktion 7 mit MeOH.

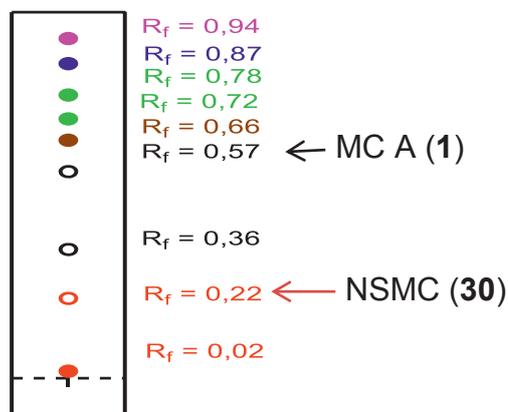


Abb. 35. Dünnschichtchromatogramm des Myrte Rohextraktes in PE : Aceton 1 :1 v/v.

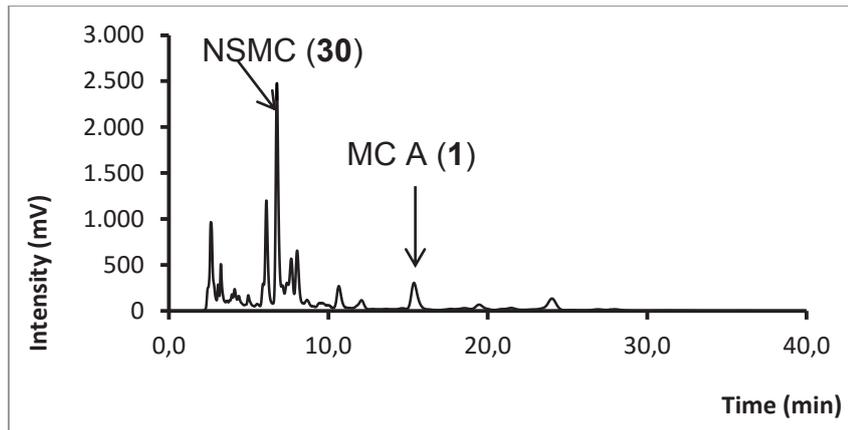


Abb. 36. HPLC-Chromatogramm des Myrte-Rohextrakts aus pulverisierter Myrte.

M&N C18ec, MeOH (0,1 % TFA) : H₂O (0,1 % TFA) 95 : 5 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

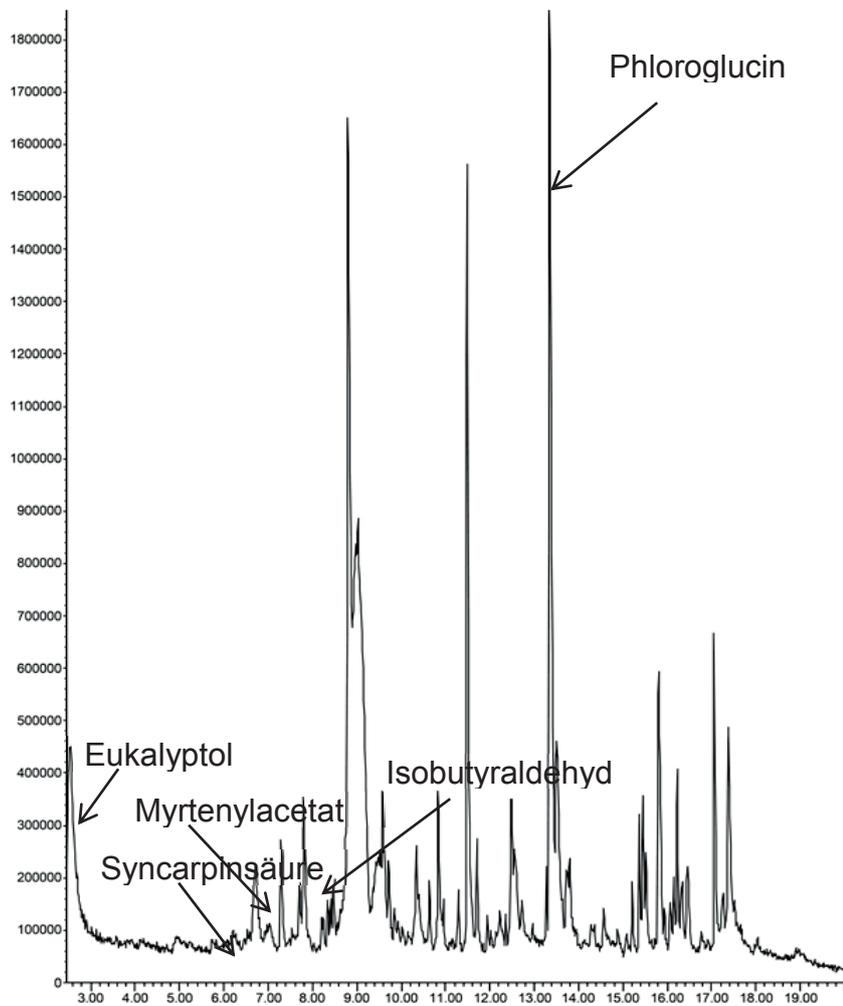


Abb. 37. Chromatogramm des Myrte-Rohextraktes aufgenommen mittels GC-MS HP5890 II, M&N OPTIMA 1 0,35 µm Film, 30 m x 0,32 mm ID, Helium, F: 0,68 mL/min, linearer Temperaturgradient von 60° C auf 300° C in 20 Minuten.

Die chemisch wichtigsten Komponenten, die im Rohextrakt mittels GC-MS gefunden wurden und durch Datenbankabgleich (NIST) identifiziert worden sind, werden in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7. wichtige Inhaltsstoffe im Rohextrakt.

Zeit	Verbindung
2,54	Eukalyptol
6,71	Syncarpinsäure (21)
7,30	Myrtenylacetat
7,83	Isobutyraldehyd (22)
13,36	Phloroglucin

Das Vorliegen der Verbindungen Syncarpinsäure (**21**), Isobutyraldehyd (**22**) und Phloroglucin ist wesentlich für die Bildung von Myrtucommulonen. Retrosynthetische Betrachtungen in der Einleitung zeigten dies bereits (Abb. 14). Auch für spätere Überlegungen bezüglich der Biosynthese von MCs ist das Auffinden dieser Verbindungen wichtig.

2.2.1. Massenspektroskopische Untersuchungen der Fraktionen

Die 7 Fraktionen wurden mittels GC-MS bzw. LC-MS (ESI(-)) auf relevante m/z-Werte hin untersucht. Die Fraktionen 1 und 2 wurden auf der GC-MS und Fraktion 3 bis 6 mittels LC-MS untersucht. Die Untersuchungsmethode resultierte aus der Polarität und der Flüchtigkeit der Fraktionen. Fraktion 6 und 7, als sehr polare Fraktionen, die durch Spülen der Flash-Säule erhalten wurden, werden hier nicht abgebildet und berücksichtigt. Das Spülen der Säule diente lediglich der Bestimmung der Gesamtausbeute von aufgegebenem Rohextrakt, in Bezug auf die Masse der erhaltenen Fraktionen.

Im Chromatogramm (Abb. 38) von Fraktion 1 konnten keine für diese Arbeit relevanten Verbindungen gefunden werden. Es handelte sich um eine Fraktion in der vor allem Verbindungen auf Terpenbasis, wie beispielsweise Derivate von Linalool, Pinen und Geraniol enthalten sind. Diese waren nicht von Interesse und eine weitere Substanzidentifizierung wurde nicht durchgeführt.

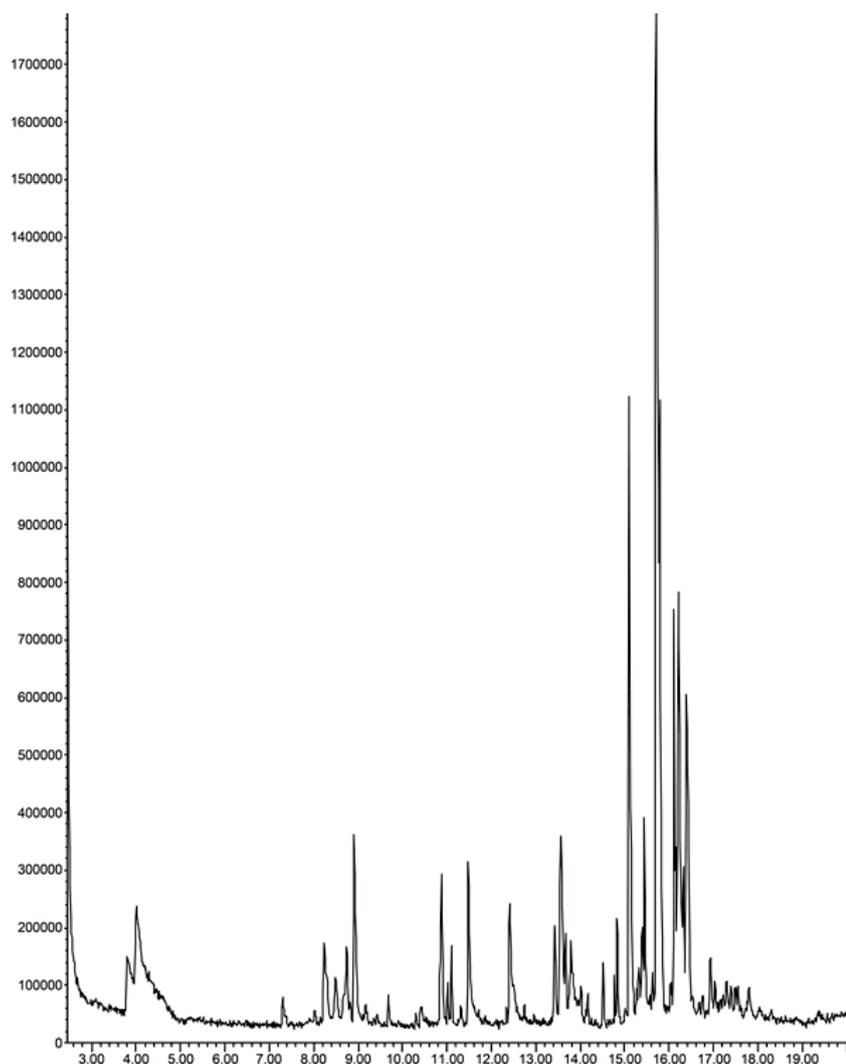


Abb. 38. Chromatogramm der Fraktion 1 aufgenommen mittels GC-MS
HP5890 II, M&N OPTIMA 1 0,35 μm Film,
30 m x 0,32 mm ID, Helium, F: 0,68 mL/min,
linearer Temperaturgradient von 60° C auf 300° C in 20 Minuten.

Die schon im Rohextrakt gefundenen Bestandteile der Myrtucommulone konnten in Fraktion 2 wiedergefunden werden (Abb. 39). Außer der Syncarpinsäure (**21**), dem Isobutyraldehyd (**22**) und dem Phloroglucin wurden keine weiteren, in dieser Arbeit relevanten Verbindungen in Fraktion 1 bzw. 2 mehr gefunden (Tabelle 8). Ein Überblick über die Bestandteile der leicht flüchtigen Fraktionen in *Myrtus communis* wird in Literatur [66] und [67] gegeben. Fraktion 3 war für eine Messung mittels GC-MS auf Grund ihrer Polarität nicht mehr geeignet.

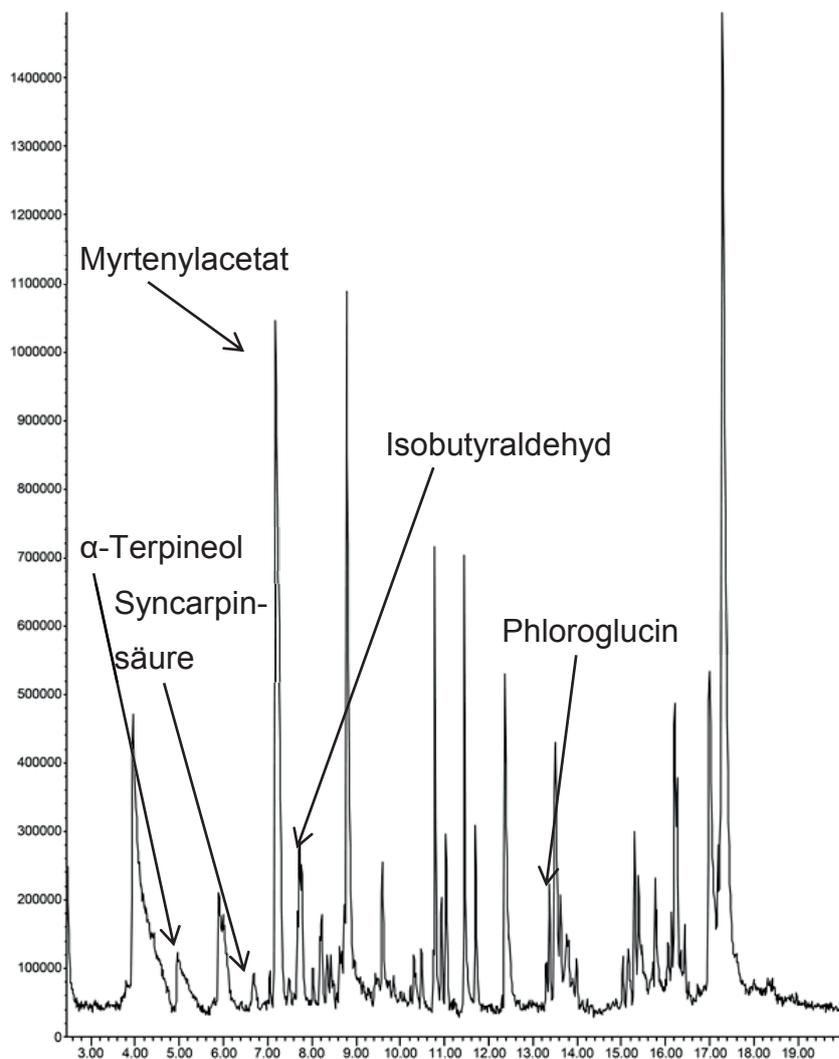


Abb. 39. Chromatogramm der Fraktion 2 aufgenommen mittels GC-MS HP5890 II, M&N OPTIMA 1 0,35 μ m Film, 30 m x 0,32 mm ID, Helium, F: 0,68 mL/min, linearer Temperaturgradient von 60° C auf 300° C in 30 Minuten.

Tabelle 8. wichtigste Inhaltsstoffe von Fraktion 2.

Zeit	Verbindung
5,90	α -Terpineol
6,71	Syncarpinsäure (21)
7,19	Myrtenylacetat
7,72	Isobutyraldehyd (22)
13,38	Phloroglucin

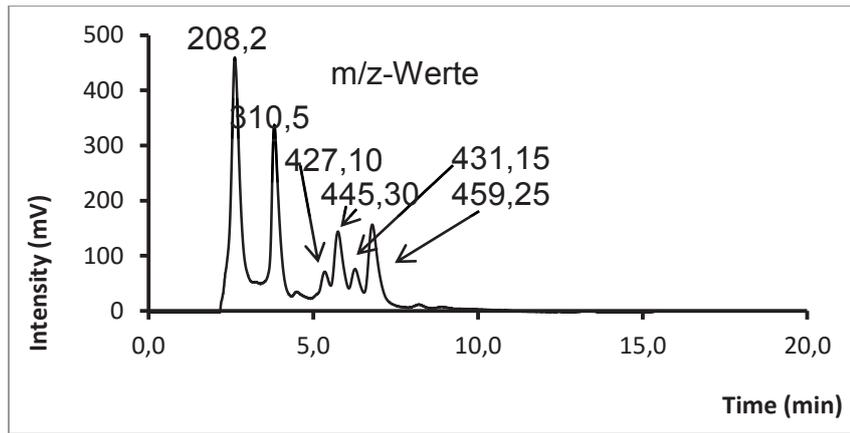


Abb. 40. Chromatogramm von Fraktion 3 aufgenommen mittels LC-MS. ESI(-)-Modus, Merck Chromolith, MeOH : H₂O (1 % FA) 85 : 15 v/v, F: 0,6 mL/min, T: 24° C, Inj: 10 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

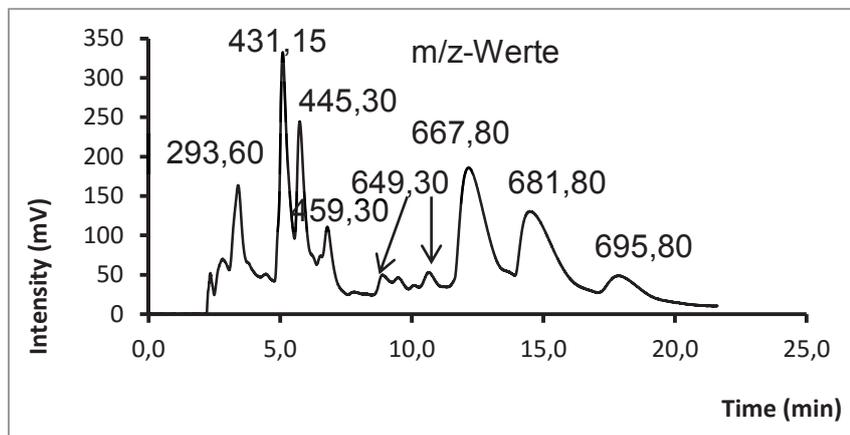


Abb. 41. Chromatogramm von Fraktion 4 aufgenommen mittels LC-MS. ESI(-)-Modus, Merck Chromolith, MeOH : H₂O (1 % FA) 85 : 15 v/v, F: 0,6 mL/min, T: 24° C, Inj: 10 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

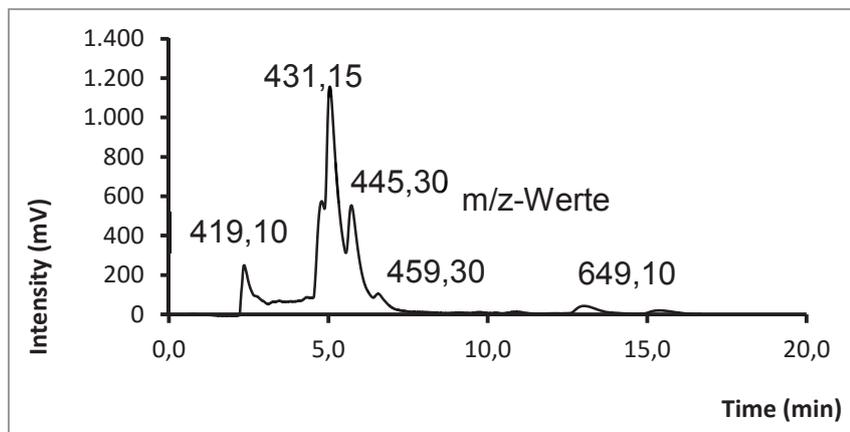


Abb. 42: Chromatogramm von Fraktion 5 aufgenommen mittels LC-MS. ESI(-)-Modus, Merck Chromolith, MeOH : H₂O (1%FA) 85 : 15 v/v, F: 0,6 mL/min, T: 24° C, Inj: 10µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

In Fraktion 1 und 2 konnten lediglich Terpene und die einzelnen Bestandteile der Myrtucommulone identifiziert werden. In Fraktion 3 wurden Massen im Bereich von 445 g/mol erhalten. Prinzipiell würde, das auf Verbindungen mit Semimyrtucommulonstruktur (SMC = m/z 445)

hinweisen. In späteren Analysen konnten für die Inhaltstoffe der Fraktion 3 (Abb. 40) Strukturen von Chromon-Verbindungen (Abb. 43) erhalten



werden.[68], [69] Aus Interesse an den MCs wurde die Arbeit an diesen Verbindungen zurückgestellt.

Abb. 43. Struktur von Chromon-Verbindungen.

In Fraktion 4 konnten die m/z-Werte erhalten werden, die typisch für Myrtucommulone sind (Abb. 41). In Fraktion 5 wurden die m/z-Verhältnisse der Semimyrtucommulone gefunden (Abb. 42). Somit handelte es sich bei diesen beiden Fraktionen um wichtige Fraktionen, welche näher untersucht worden sind.

Die Auftrennung der einzelnen Fraktionen, sowie die zugehörigen Strukturaufklärungen der Verbindungen werden in den folgenden Kapiteln weitergehend beschrieben.

Abb. 44 gibt einen Überblick über die einzelnen Isolierungsschritte und zeigt den Zusammenhang der einzelnen Fraktionen untereinander.

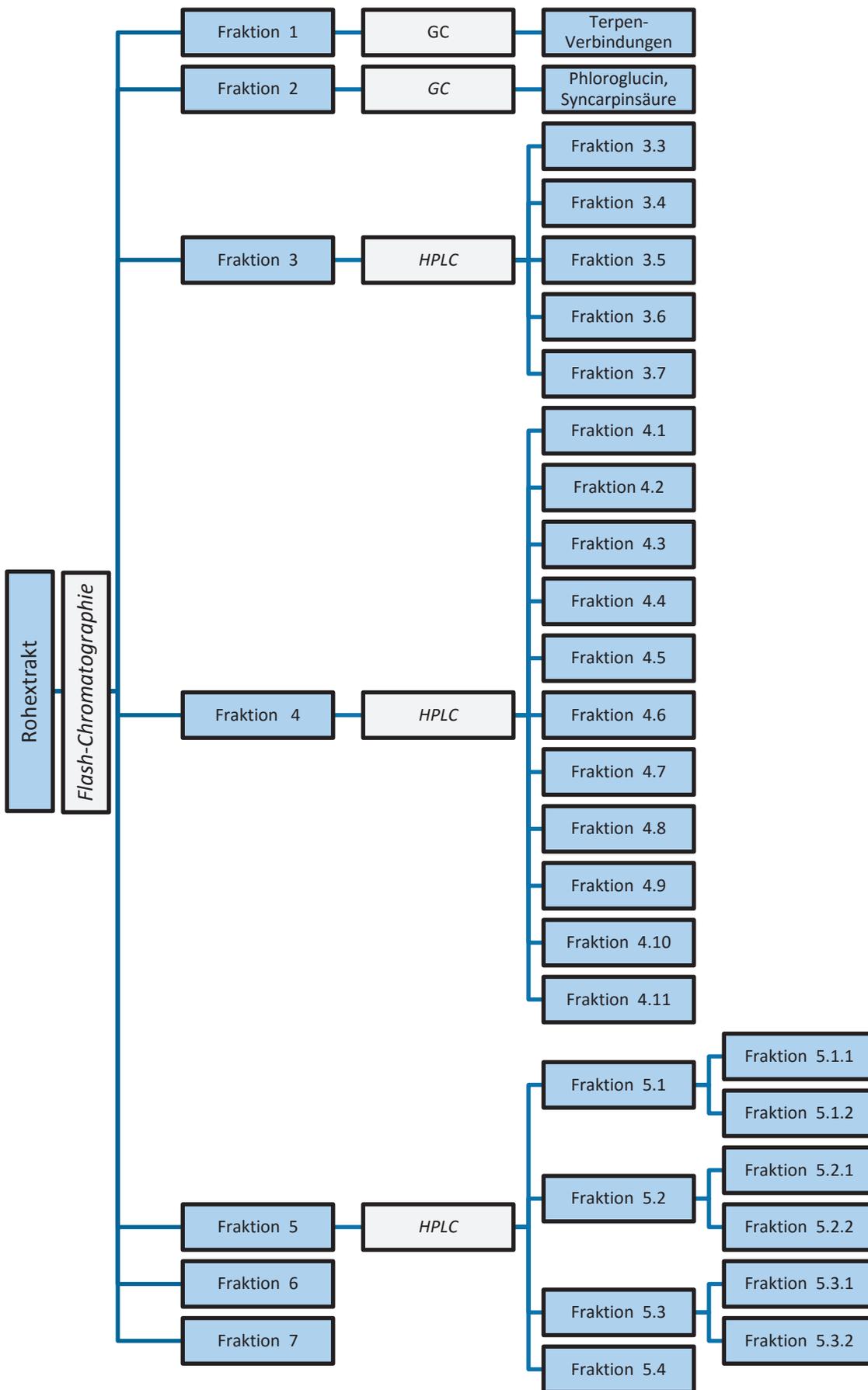


Abb. 44: Überblick: Einzelschritte der Isolierung.

Tabelle 9: Erklärung von Abb. 44.

Fraktion 1	Terpenverbindungen
Fraktion 2	Chlorophyll-Fraktion und Bestandteile MCs
Fraktion 3	Chromon-Fraktion
Fraktion 4	Myrtucommulon-Fraktion
Fraktion 5	Semimyrtucommulon-Fraktion
Fraktion 6	Spülen Flash-Säule mit Aceton
Fraktion 7	Spülen Flash-Säule mit MeOH
Fraktion 4.3	MC C (7)
Fraktion 4.6	MC C (7)
Fraktion 4.8	MC A (1)
Fraktion 4.9	MC A+CH ₂ (54)
Fraktion 4.10	MC A+CH ₂ (55)
Fraktion 4.11	MC F (9)
Fraktion 5.1	NSMC-Fraktion
Fraktion 5.2	SMC-Fraktion
Fraktion 5.3	SMC+CH ₂ -Fraktion
Fraktion 5.4	SMC+2CH ₂ -Fraktion
Fraktion 5.1.1	NSMC (30)
Fraktion 5.1.2	SMC (4)
Fraktion 5.2.1	SMC (56)
Fraktion 5.2.2	SMC (57)
Fraktion 5.3.1	SMC+CH ₂ (58)
Fraktion 5.3.2	SMC+2CH ₂ (59)

2.3. Myrtucommulon A (1)

2.3.1. Isolierung von MC A (1)

Um reines Myrtucommulon A (1) zu erhalten, wurde mit Fraktion 4 der Flash-Chromatographie weitergearbeitet. Diese wurde auf einer C18-Säule injiziert und weitergehend aufgetrennt.

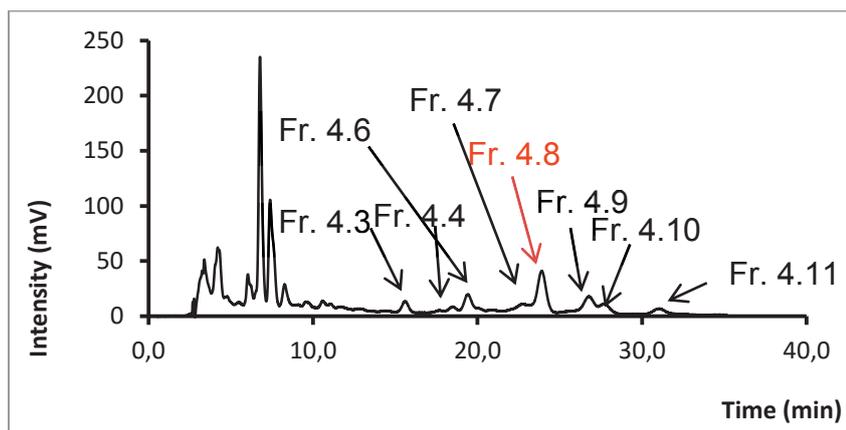


Abb. 45. Chromatogramm von Fraktion 4.
M&N C18ec, MeOH (0,1 % TFA) : H₂O (0,1 % TFA) 95 : 5 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Abb. 45. zeigt die Auftrennung von Fraktion 4 auf einer analytischen HPLC-Säule. Es konnten mehrere Peaks erhalten werden. Fraktion 4.8 wurde als MC A (1) identifiziert. Dies geschah durch Vergleich der Retentionszeit von synthetischem MC A (1) [36] und dem MC A (1) aus der Masterarbeit [63] mit der jetzigen Probe. Zur weiteren Charakterisierung wurde mittels Massenspektrometrie (ESI(-)) die Masse von Peak 4.8 mit 667,3 m/z ermittelt. Um weitere analytische Messungen durchführen zu können, musste Fraktion 4.8 im größeren Maßstab isoliert werden. Das Laufmittel MeOH (0,1 % TFA) : H₂O (0,1 % TFA) 95 : 5 v/v zeigte zum Laufmittel MeOH (0,1 % TFA) : MeCN (0,1 % TFA) 80 : 20 v/v aus der Master-Arbeit, eine deutlich bessere Auflösung beim Upscaling auf die präparative HPLC. In einem Lauf konnte Fraktion 4.8 mit 85 % - 95 % Reinheit und deutlich besserer Ausbeute isoliert werden. Ebenso konnten Fraktion 4.3 bis Fraktion 4.11 in einem Schritt mitisoliert werden um in späteren Analysen verwendet zu werden (Abb. 45). Um 99,9 %ig reines MC A (1) zu erhalten, wurde die Fraktion noch ein zweites Mal im gleichen chromatographischen System gereinigt. Das Laufmittel wurde nach jedem

präparativen Schritt mittels Ölpumpe bei einer Wasserbadtemperatur von 30° C entfernt.

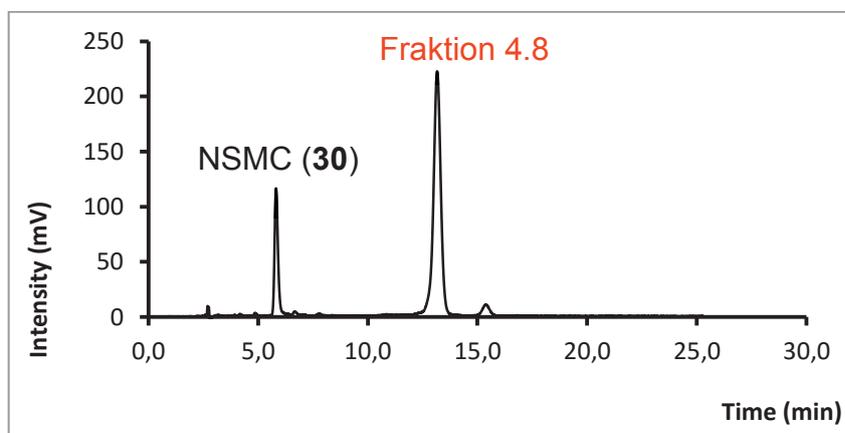


Abb. 46. Chromatogramm Fraktion 4.8 nach erster präparativer Reinigung, M&N C18ec, MeOH (0,1 % TFA) : H₂O (0,1 % TFA) 97 : 3 v/v, F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Nach der ersten Isolierung war im Chromatogramm ein Peak entstanden, der laut Massenspektrum und Retentionszeit dem NSMC (**30**) entsprach. Wie in (Abb. 46) zu sehen kann aber NSMC (**30**) auf Grund der verschiedenen Retentionszeiten nicht mitisoliert worden sein. Es ist stark anzunehmen, dass es sich um ein Fragment handelt, das aus MC A (**1**) entstanden war. Bei der Isolierung von Peak 4.8 wurden 6 bis 7 HPLC-Läufe hintereinander durchgeführt, was bei einem Lauf von ca. 50 Minuten, einer Gesamtzeit von fast 6 Stunden entsprach. Nur so konnte genügend Substanz erhalten werden. Somit befand sich MC A (**1**) längere Zeit im Laufmittel, welches 0,1 % TFA enthielt. Nach dieser Zeit wurde das Lösemittel so schonend wie möglich entfernt. Es ist davon auszugehen, dass die Verweilzeit ausreichend war, so dass die TFA das MC A (**1**) teilweise zersetzen konnte. Theoretisch wäre auch zu erwarten gewesen, dass die TFA Verbindung **1** zum PMCA (**2**) hätte zyklisieren können, ähnlich Abb. 212, jedoch konnte **2** nicht nachgewiesen werden. Für eine Zyklisierung, hätten vor allem die Einwirkung von höheren Temperaturen ($T > 80^\circ \text{C}$) und einem wasserfreien Lösemittel begünstigend gewirkt. Somit ist die Zyklisierung thermodynamisch und kinetisch ungünstiger, als die Zersetzung des MC A (**1**). Vor allem im zweiten Aufreinigungsschritt wurde Peak 4.8 vollständig in die präparative HPLC aufgegeben und direkt nach dem Eluieren von der Säule schonend einrotiert (Abb. 47). Diesmal wurden keine Fragmente erhalten, sondern nur das reine MC A (**1**), was die Hypothese der säurekatalysierten Zersetzung beim ersten

Reinigungsschritt stützt. Bei der später durchgeführten Isolierung von NSMC (30) hingegen konnte dies direkt nach dem ersten präparativen Lauf sauber erhalten werden. Es traten keine Fragmentpeaks auf. Somit scheint die TFA Myrtucommulon A (1) teilweise zu zersetzen. Dies bestätigt die Vermutungen von Appendino.[19]

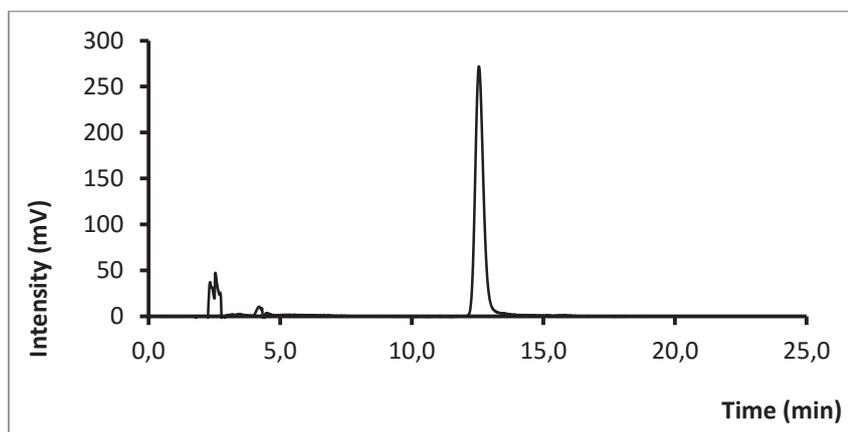


Abb. 47. Chromatogramm von Fraktion 4.8 = MC A (1).
M&N C18ec, MeOH (0,1 % TFA) : H₂O (0,1 % TFA) 97 : 3 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Das erhaltene MC A (1) wurde standardmäßig auf seine Reinheit und Identität überprüft.[63] Die folgenden Analysen konnten mit reinem 1 durchgeführt werden.

2.3.2. Analytik von MC A (1)

2.3.2.1. Massenspektrum (EI) von (1)

Bereits Kashman et al. haben Massenspektren von MC A (1) veröffentlicht,[16] die sie durch Elektronenstoßionisation (EI) erhalten haben. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden in dieser Arbeit Massenspektren von **1** unter denselben Bedingungen aufgenommen (Abb. 48).

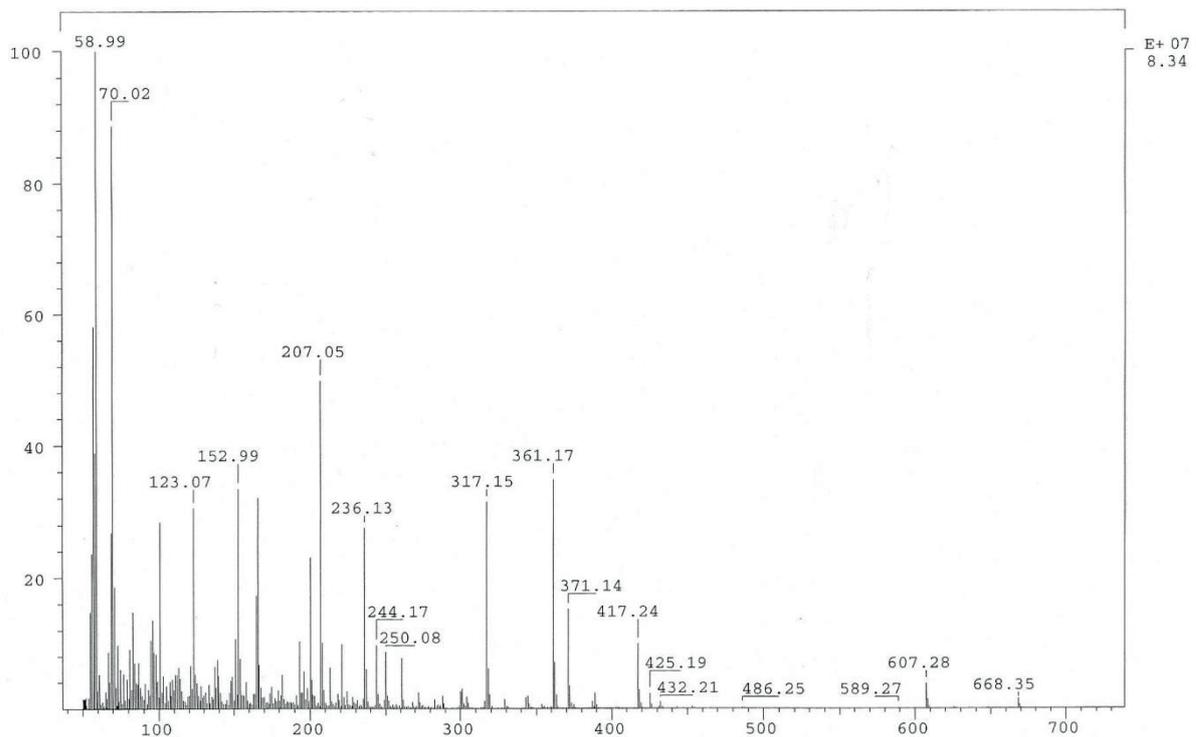


Abb. 48. Massenspektrum mit Fragmentierung (EI, 70 eV) von MC A (1).

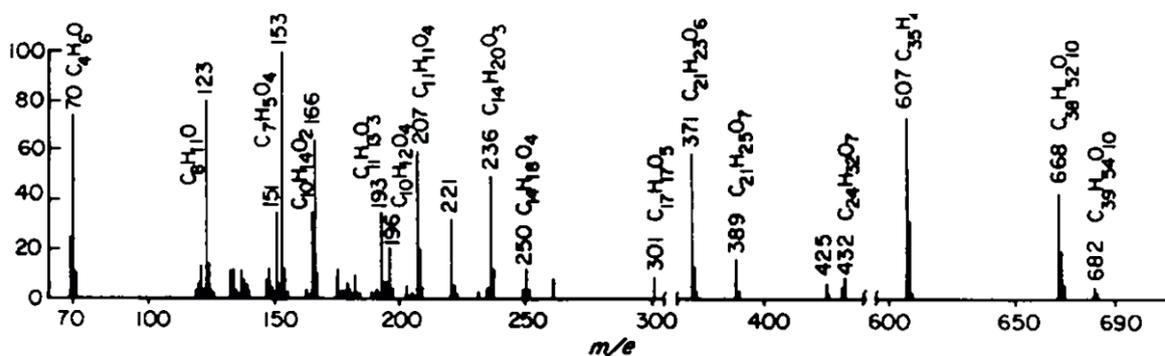


Abb. 49. Massenspektrum von MC A (1) entnommen aus der Veröffentlichung von Y. Kashman, A. Rotstein und A. Lifshitz, *Tetrahedron*, 1974, 991 – 997.[16]

Bis auf wenige kleine Peaks war das hier gemessene Spektrum (Abb. 48) identisch mit dem Spektrum aus der Veröffentlichung von Kashman (Abb. 49).

Für die erhaltenen Peaks im Spektrum wurde der folgende mögliche Fragmentierungsmechanismus vorgeschlagen (Abb. 50).

(Die vollständige Aufklärung des Fragmentierungsmechanismus wird in Kapitel 2.15, der Strukturaufklärung der Homologen von großer Wichtigkeit sein.)

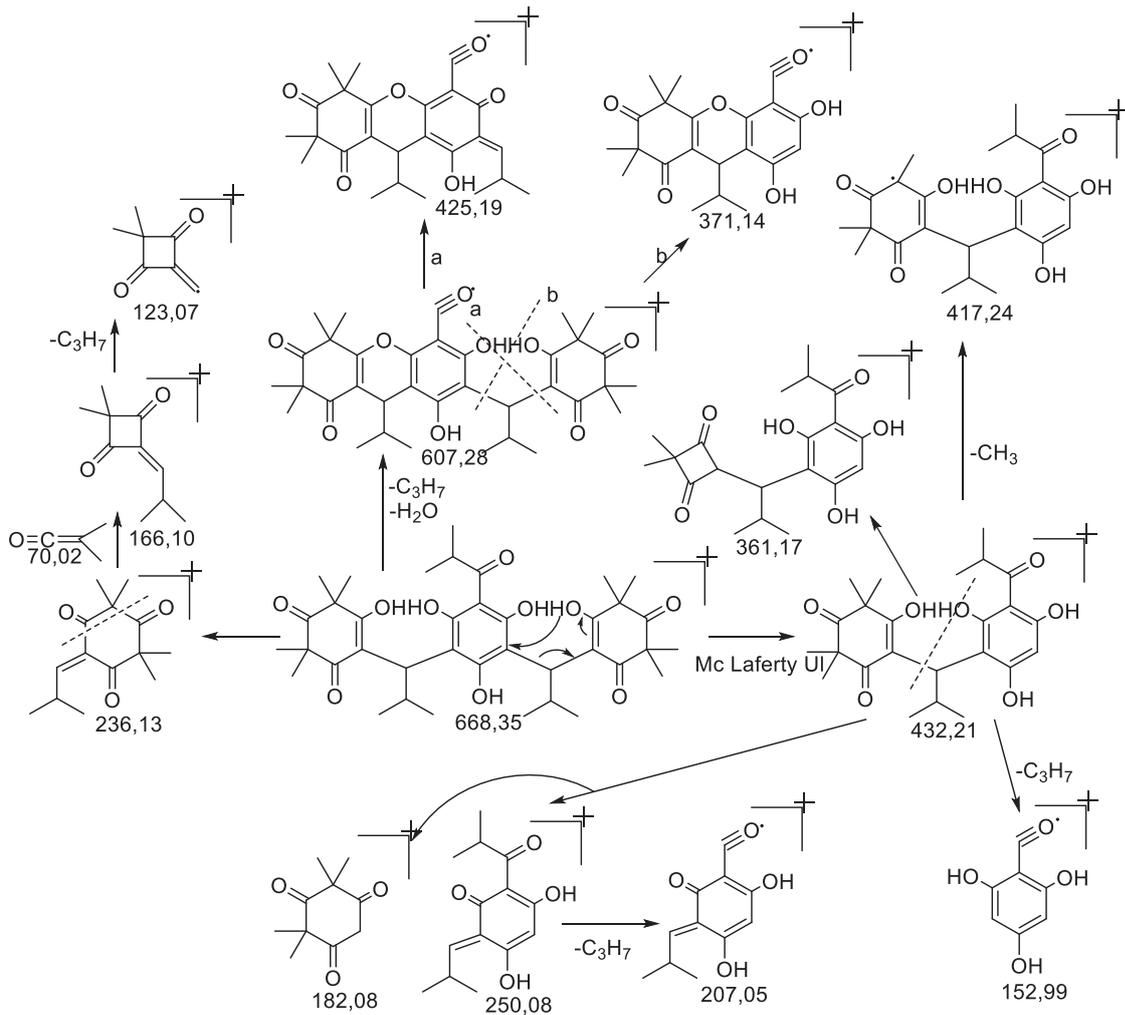


Abb. 50. möglicher Fragmentierungsmechanismus (EI) von MC A (1).

Sowohl das Massenspektrum in Abb. 48 als auch das Massenspektrum von Kashman (Abb. 49) zeigen deutlich den Molekülpeak des MCA (1) bei 668 m/z. Der nächste größere Peak liegt bei einem m/z von 607. Dabei handelt es sich um das Produkt der α -Spaltung an der Isobutyrylgruppe der Phloroglucin-Einheit. Es entsteht ein Acylradikal in diesem Molekül. Im weiteren Verlauf wird an diesem Molekül durch Mc-Lafferty-Umlagerung eine Syncarpinsäure-Einheit abgespalten,

woraus ein m/z von 371 resultiert. Ein anderes markantes Fragment liegt bei einem m/z von 236. Es handelt sich hier um das Isobutylsyncarpinsäure-Fragment, welches aus einer Mc-Lafferty-Umlagerung hervorgegangen sein muss.[70] Ebenso auffällig ist der Wert von 207 m/z , bei dem es sich um die Phloroglucin-Einheit des MCA (**1**) handelt, an der durch α -Spaltung die Isopropylgruppe abgespalten worden sein muss. Die meisten Fragmente in Abb. 50 können durch wiederholte α -Spaltung und Mc-Lafferty-Umlagerung bis hin zu den Bestandteilen (Syncarpinsäure (**21**), Isobutyraldehyd (**22**) und Phloroglucin) des MCA (**1**) erklärt werden. Bei einigen Fragmenten kann zusätzlich noch die Abspaltung von $C_nH_nO_n$ -Einheiten ($n = 2, 3$ und 4) gefunden werden.

2.3.2.2. Massenspektrum ESI (-) von 1

Von Myrtucommulon A (**1**) wurde neben dem Massenspektrum mittels Elektronenstoßionisation auch ein Massenspektrum aufgenommen, bei dem ESI(-) (Abb. 51) als Ionisierungsmethode genutzt wurde.

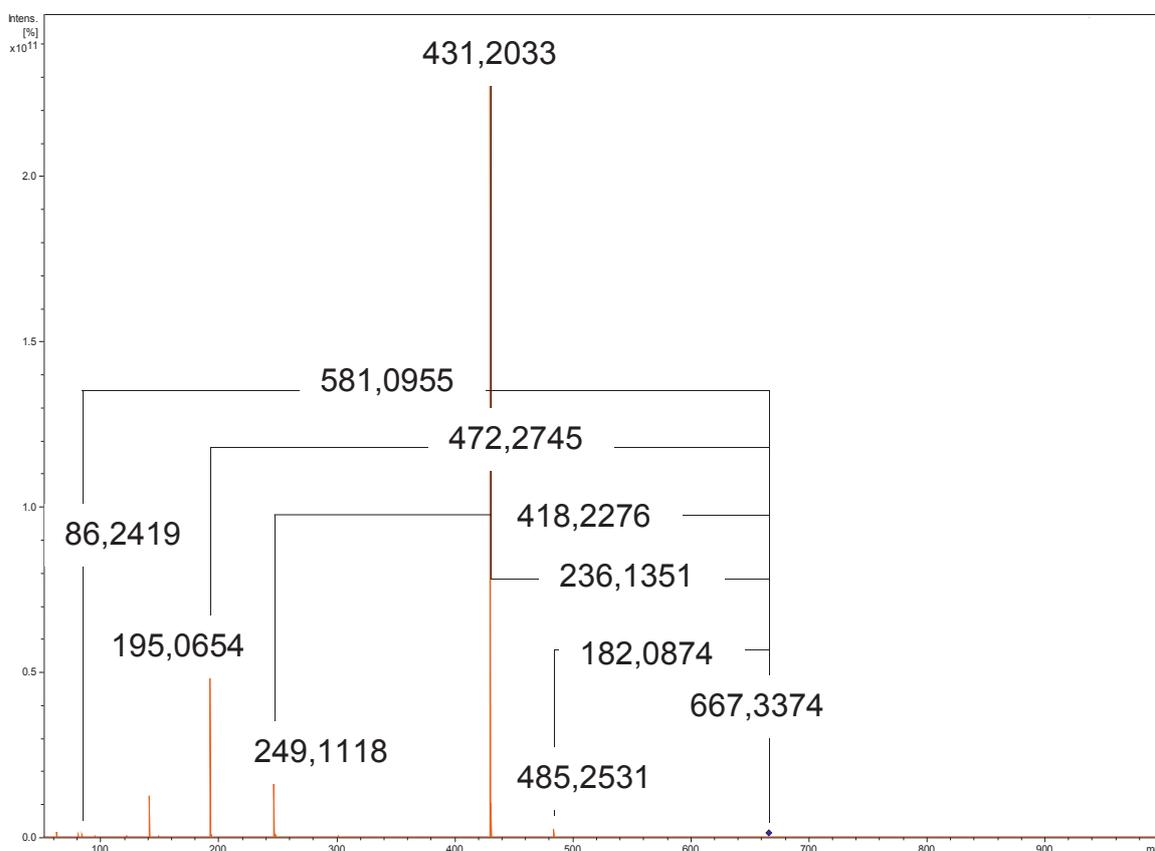


Abb. 51. Massenspektrum ESI(-) (25 eV) MC A (**1**).

Zusätzlich zu dem Fragmentierungsmuster, wurde die Molare Masse von MC A (**1**) hochaufgelöst vermessen. Es wurde eine Masse von 667,3498 g/mol ermittelt. Rechnerisch erhielt man eine Masse von 667,3482 g/mol. Daraus resultierte eine Abweichung von 2,36 ppm. Abweichungen kleiner 5 ppm gelten als akzeptable Messwerte.

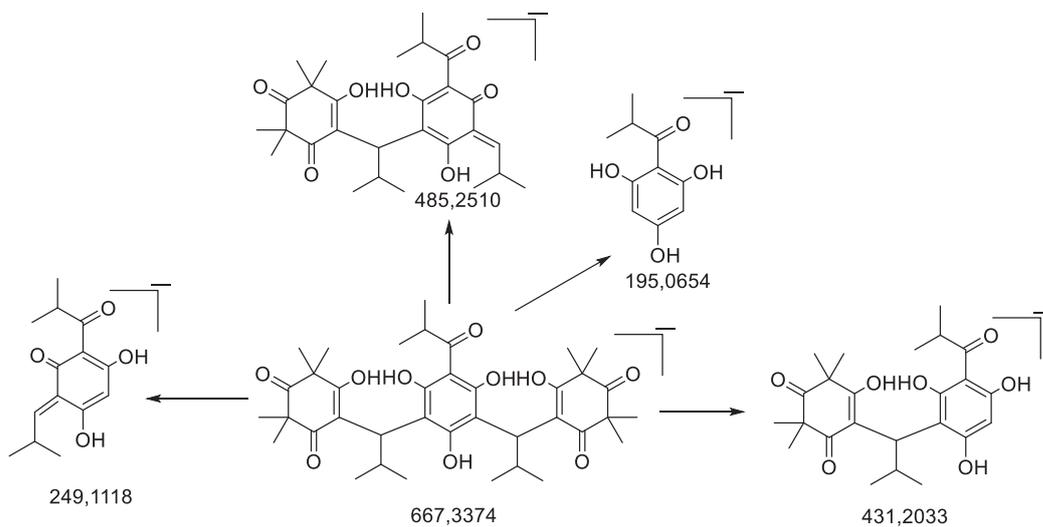


Abb. 52. möglicher Fragmentierungsmechanismus (ESI(-)) MC A (**1**).

Die in Abb. 52 erhaltenen Fragmente entstehen in einer Art Mc-Lafferty-Umlagerung, bei der das Molekül im Bereich der verknüpfenden Isobutylgruppe in seine Bestandteile Isobutyrylphloroglucin (**23**) und Syncarpinsäure (**22**) gespalten wird.

2.3.2.3. NMR-Spektroskopie, CD-Spektroskopie, Polarimetrie

Das NMR-Spektrum des hier isolierten natürlichen MC A (**1**) war identisch mit den Spektren des MC A (**1**) (Abb. 28) aus der Masterarbeit [63] und mit denen von synthetischem MC A (**1**).[36] Es war wiederum nicht möglich, die Spektren sinnvoll auszuwerten aufgrund der bereits diskutierten Problematik.

In der Dissertation von M. Charpentier [71], als auch in der Literatur [20], [21], [22] wird von einigen unzyklisierten MCs das ^1H -Spektrum interpretiert. Wie aber in den Abb. 28 und Abb. 29 zu sehen, kann man keine scharfen Signale erkennen, die man eindeutig irgendwelchen Protonen zuordnen könnte. Die Beschreibung der Peaks als Multiplett entspricht nicht der korrekten Signalaufspaltung. Daher macht es kaum Sinn, die hier erhaltenen Spektren der unzyklisierten MCs mit anderer Literatur zu

vergleichen. Es macht daher nur Sinn die zyklisierten Verbindungen mit der Literatur zu vergleichen. Die beste Möglichkeit des Vergleiches der unzyklisierten MCs stellt die Abbildung mehrere Spektren in einer Abbildung (Abb. 61) dar.

Die Messung des CD-Spektrums ergab eine Nulllinie. Es war kein Cotton-Effekt zu sehen. Somit liegt reines natürliches MC A (1) nicht enantiomerenrein oder angereichert vor. Dafür spricht ebenso die spezifische optische Rotation, die sich nicht signifikant von Null unterschied. Da zu diesem Zeitpunkt keine Möglichkeit bekannt war, MC A (1) irgendwie in seine enantiomeren Bestandteile aufzutrennen, wurde mit der Zyklisierungsreaktion fortgefahren.

2.4. Pentazyklisches Myrtucommulon A (2)

2.4.1. Synthese und Charakterisierung von 2a und 2b

Um PMCA (2) zu erhalten, wurde analog zu Abb. 212 verfahren. Es wurden MC A (1) 1 Äq. und pTsOH 6 Äq. unter Rückfluss in Benzol 4 h lang erhitzt.[36] Das Reaktionsgemisch wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und anschließend über MgSO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer RP18 HPLC gereinigt (MeOH : H₂O 90 : 10 v/v). Dabei konnte gleichzeitig eine Auftrennung in meso-Form **2a** und Razemat **2b** erhalten werden (Abb. 30).

Tabelle 10. Charakterisierung von PMCA (2) meso-Form und Razemat.

Charakterisierung	PMCA meso-Form (2a)	PMCA Razemat (2b)
HR-MS(ESI (+))	633,3403	655,3240 [PMCA-Na]
Abweichung	3,2 ppm	1,06 ppm
Spezifische optische Rotation	0	0
Schmelzpunkt	142°C	133°C
CD-Spektrum	Nulllinie	Nulllinie
NMR	Kapitel 3.2.8.2	Kapitel 3.2.8.1

Das Lösemittel wurde mit Hilfe einer Membranpumpe entfernt (Siehe Kapitel 3.2.5.). Eine Charakterisierung der beiden Diastereoisomere wird in Tabelle 10 angegeben.

Die NMR-Spektren zeigten interpretierbare Signale, die den Molekülen zweifelsfrei zugeordnet werden konnten. Im ^1H -NMR-Spektrum konnte eindeutig zwischen der meso-Form **2a** (rot) und dem Razemat **2b** (grün) (Abb. 53) unterschieden werden. Die Verschiebung der Methylgruppen an den Isobutylgruppen beider Stereoisomere befindet sich bei verschiedenen Werten. Bei der meso-Form **2a** und Razemat **2b** handelt es sich um Diastereoisomere. Diese besitzen unterschiedliche chemische Eigenschaften und deren Verschiebung unterscheidet sich daher auch. Aus diesem Grund konnte PMCA (**2**) auch in meso-Form (**2a**) und Razemat **2b** durch RP 18-HPLC aufgetrennt werden (Abb. 30). Die hier erhaltenen NMR-Spektren für **2a** und **2b** waren identisch mit den Spektren der Master-Arbeit.[63] Vergleicht man die Spektren von **2a** und **2b** (siehe 3.2.8), mit den Spektren von PMCA (**2**), aus synthetischem MC A (**1**), so stimmen diese ebenso gut überein.[36], [71] Durch die Vergleiche der Spektren, konnte sicher bestimmt werden, dass MC A (**1**) bzw. PMCA (**2**) isoliert wurde.

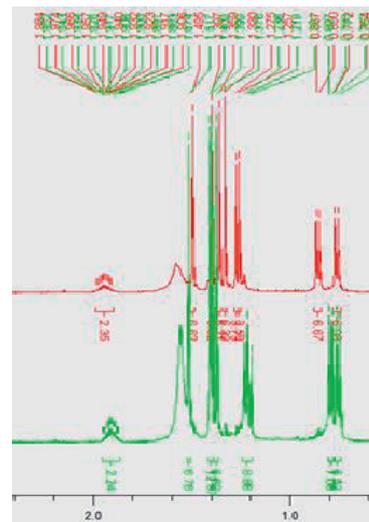


Abb. 53. Ausschnitt NMR-Spektrum PMCA (**2**) meso-Form und Razemat

2.4.2. Analytik von PMCA (**2**) Razemat (**2b**) und meso-Form (**2a**)

In der Master-Arbeit wurde Razemat (**2b**) auf der Chiralcel OD-H in die Enantiomere aufgetrennt. Da diese Säule aber nur als analytische Säule im Arbeitskreis vorhanden war, konnten nie größere Mengen der Enantiomere gesammelt werden. Messungen, wie Polarimetrie, NMR-Spektroskopie oder das Züchten von Kristallen war daher nicht möglich. Aus diesem Grund wurde nach einer anderen Trennmethode gesucht.

Als sinnvolle Idee erwies sich das Austesten einer neuen stationären Phase. Dabei handelte es sich um die Reprosil Chiral NR, die auch im semipräparativen Maßstab vorhanden war. Auf dieser Säule konnte das Razemat **2b** getrennt werden. Eine deutliche Verbesserung war die Basislinientrennung aller 3 Formen des PMCA (**2**). Somit war es nicht mehr nötig, PMCA (**2**) auf der RP18-Säule in meso-Form **2a** und Razemat **2b** zu trennen. **2** konnte direkt auf der Reprosil Chiral NR in einem Durchgang in alle drei Stereoisomere getrennt werden (Abb. 54).

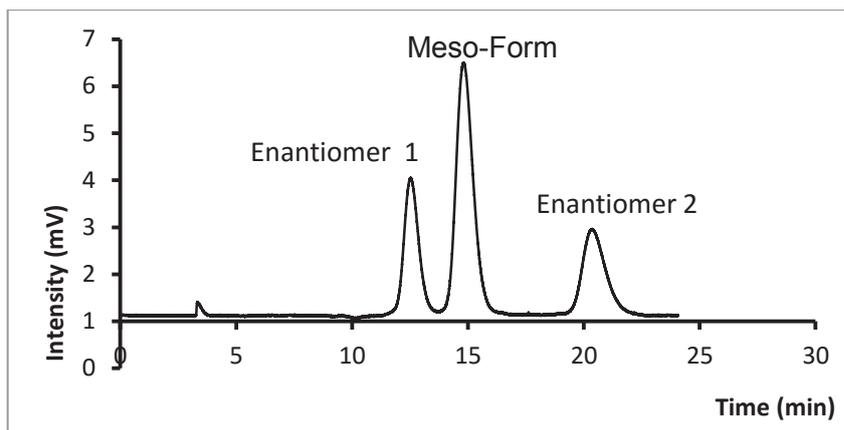


Abb. 54. Chromatogramm von PMCA (**2**).
 Reprosil Chiral NR, iso-PrOH : n-Hexan 5 : 95 v/v,
 F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Abb. 54 zeigt deutlich das Verhältnis der einzelnen Stereoisomeren zueinander. Die meso-Form **2a** und das Razemat **2b** liegen im Verhältnis 1 : 1 vor. Die Tatsache, dass es sich um ein Razemat handelte, wurde bestätigt. Um die spezifische optische Rotation jedes Enantiomeren des Razemates zu erhalten, mussten diese präparativ getrennt und am Polarimeter vermessen werden.

Die präparative HPLC-Trennung wurde mit dem PMCA (**2**), welches aus dem synthetischen MCA (**1**) [65] hergestellt worden war, durchgeführt. Grund dafür war, dass natürliches MCA (**1**) in nur sehr geringen Mengen aus dem Pflanzenmaterial zu isolieren war. (Die Übereinstimmung von dem synthetischen MCA (**1**) [65] und natürlichen MCA (**1**) konnte bisher in dieser Arbeit, aber auch in der Master-Arbeit [63], bewiesen werden.)

Die erste Messung, die mit den einzelnen Enantiomeren des PMCA (**2**) erfolgte, war die spezifische optische Rotation. Dazu wurde je ein Enantiomer mit einer Konzentration von 10 mg/mL in CHCl_3 vermessen. Für das Enantiomer 1 wurde ein Wert von $[\alpha]_D^{25} = +22$ erhalten. Für das Enantiomer 2 wurde eine spezifische optische Rotation von $[\alpha]_D^{25} = -24$ ermittelt. Ebenso wurde die meso-Form vermessen und ergab wie zu erwarten eine spezifische optische Rotation von Null.

Alle drei Stereoisomere wurden mittels CD-Spektroskopie nacheinander vermessen. Das Ergebnis war identisch mit Abb. 32. Die Meso-Form ergab eine Nulllinie, die Enantiomere zeigten einen entgegengesetzten Cotton-Effekt.

Von weiterem Interesse war an dieser Stelle nun die Bestimmung der Absolutkonfiguration. Daher wurden insgesamt 300 mg PMCA (**2**) (hergestellt aus synthetischem MCA (**1**) [65]) präparativ in die 3 Stereoisomere aufgetrennt. Die

getrennten Enantiomere wurden durch M. Charpentier mit (S)-Mosher-Säure verestert und anschließend wurde versucht, Kristalle daraus zu erhalten. Vom (+)-Enantiomer (Abb. 55) wurden Kristalle erhalten, die durch anormale Röntgenbeugung vermessen worden sind.[71] Aus dieser Struktur konnte bestimmt werden, dass es sich beim (+)-Enantiomer um R,R-Konfiguration handeln muss. Folglich muss das (-)-Enantiomer S,S-Konfiguration besitzen.

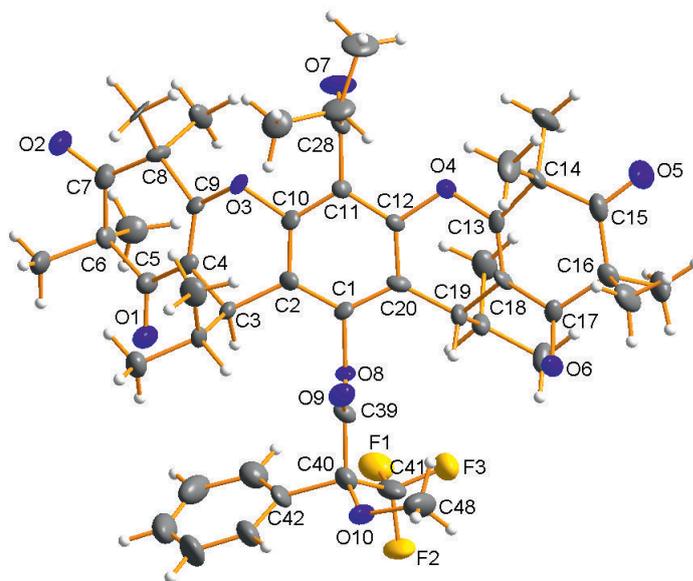


Abb. 55: Röntgenstruktur von (+)-(R,R)-PMCA-(S)-Mosher-Ester die Abbildung entstammt aus M. Hans, M. Charpentier, V. Huch, J. Jauch, T. Bruhn, G. Bringmann, D. Quandt, *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2381 – 2389. [71], [64]

Ab diesem Zeitpunkt war eine Zuordnung der absoluten Konfiguration zu den einzelnen Enantiomeren möglich.

In weiteren Analysen wurde von den getrennten Diastereoisomeren ein $^1\text{H-NMR}$ gemessen. Dieses unterschied sich nicht von den NMR des PMCA (**2**), das zuvor noch mittels RP18-Säule getrennt worden war. Ebenso war das Spektrum vom (+)-(R,R)-Enantiomer identisch mit dem Spektrum des (-)-(S,S)-Enantiomer. Von den mittels Reprosil Chiral getrennten Enantiomeren wurde ein CD-Spektrum aufgenommen. Dieses war identisch mit dem CD-Spektrum, der auf der Chiralcel getrennten Enantiomere (Abb. 32).

Ein Vergleich der Chiralcel OD-H mit der Reprosil Chiral NR zeigt, dass nur die Reprosil Chiral meso-Form **2a** und die Enantiomere des Razemat **2b** gleichzeitig

auftrennen konnte. Bei der Chiralcel besaß ein Peak der Enantiomere die gleiche Retentionszeit, wie die meso-Form **2a**. Wurde die meso-Form zuvor abgetrennt, so sind Peak 1 der Chiralcel und Peak 1 der Reprosil Chiral identisch. Beide sind das (+)-(R,R)-Enantiomer. Für Peak 2 gilt das in umgekehrter Analogie.

Um die Absolutkonfiguration mittels anormaler Röntgenbeugung zu bestimmen, war es nötig, Kristalle zu erhalten. Das Züchten von Kristallen kann sehr lange Zeit dauern oder im schlechtesten Fall nicht funktionieren. Daher wurde eine alternative Methode zur Bestimmung der Absolutkonfiguration gesucht. Weitere Methoden zur Bestimmung der Absolutkonfiguration sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11. Methoden zur Bestimmung der Absolutkonfiguration.

Methode	Literatur
Anormale Röntgenbeugung	[72], [73], [74]
Veresterung mit Mosher-Säure	[75], [76],
Veresterung mit Mandel-Säure	[77], [78], [79]
NMR-Spektroskopie in chiralen Lösemitteln	[80], [81], [82], [83], [84]
Zirkulardichroismus	[85], [86], [87], [88], [89], [90] [91], [92] [93]
Optische Rotationsdispersion	[94], [95], [96],
Optische Raman-Aktivitätsspektroskopie	[97]

Beim sorgfältigen Lesen der in Tabelle 11 aufgeführten Methoden, weckte besonders die Methode der CD-Spektroskopie zur Bestimmung der Absolutkonfiguration Interesse. Häufig in Veröffentlichungen zitiert findet man den Arbeitskreis G. Bringmann an der Universität Würzburg. Zu deren Spezialgebiet gehört die Absolutkonfigurationsbestimmung mittels quantenmechanischer Berechnungen. Diese sind in der Lage, das CD-Spektrum eines Enantiomeren durch quantenmechanische Berechnungen zu simulieren. Durch Vergleichen der experimentell erhaltenen CD-Kurven und den Berechneten, sind sie in der Lage, den Enantiomeren die entsprechende Absolutkonfiguration zuzuordnen. [98] , [99], [100] Zu diesem Zweck wurde mit dem Ak Bringmann kooperiert. Deren Verfahren [101],

[102] wurde nun auf die Enantiomeren des MCA (1) angewendet. Die Ergebnisse wurden in einer gemeinsamen Publikation veröffentlicht. [64]

Um die experimentellen Messdaten der CD-Spektroskopie zu erhalten, wurde von den Enantiomeren des PMCA (2) aus isoliertem MCA (1) ausgegangen. Durch den Vergleich (Abb. 56) der experimentell erhaltenen CD-Messdaten mit den quantenmechanisch simulierten Spektren, konnten Bringmann und Mitarbeiter die Absolutkonfiguration bestimmen. Das Ergebnis stimmte mit der Kristallstrukturanalyse überein. Bei Enantiomer 1 handelte es sich definitiv um (+)-(R,R)-PMCA, bei Enantiomer 2 um (-)-(S,S)-PMCA.

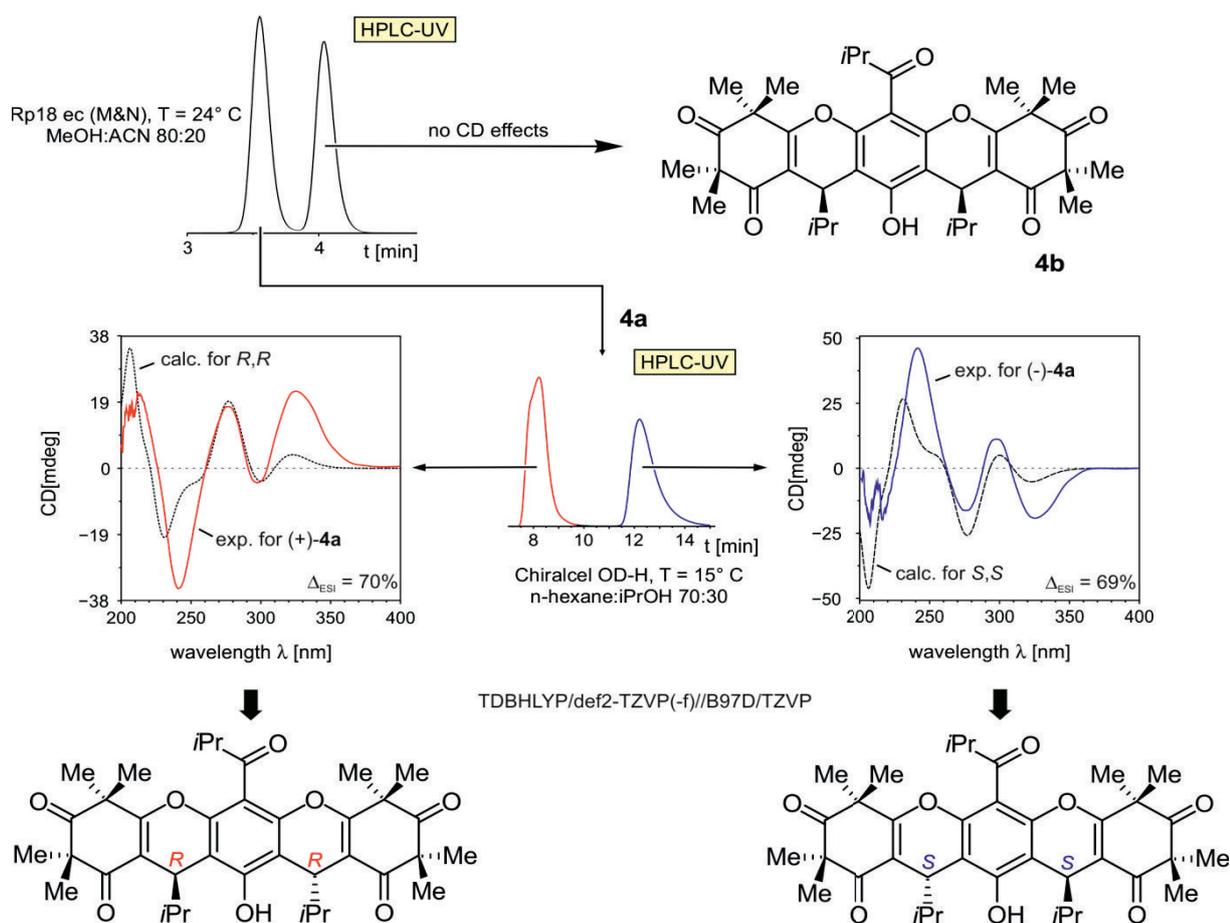


Abb. 56. Quantenmechanische Berechnung der Absolutkonfiguration von PMCA (2). die Abbildung entstammt aus M. Hans, M. Charpentier, V. Huch, J. Jauch, T. Bruhn, G. Bringmann, D. Quandt, *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2381 – 2389 [64]

Abschließend wird festgestellt: Durch die Trennung des PMCA (2) auf der Reprisil Chiral NR, konnten alle drei Stereoisomere, sowohl in einem HPLC-Lauf getrennt, als auch im präparativen Maßstab isoliert werden. Dadurch war es möglich, beide Enantiomere des PMCA (2) vollständig zu charakterisieren und sogar eine

Kristallstruktur zu erhalten. Durch Messung des Zirkulardichroismus und den daraus resultierenden Messdaten, konnte ebenfalls die Absolutkonfiguration bestimmt werden. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass MC A (1) 1 : 1 aus meso-Form **2a** und dem Razemat **2b** besteht. Von den Enantiomeren konnte mit zwei unabhängigen Methoden die Absolutkonfiguration aufgeklärt werden. Somit konnten die Ergebnisse der Masterarbeit bestätigt werden und die Strukturaufklärung des MC A (1) bzw. PMCA (2) vollendet werden.

Die bisherige Bestimmung der Absolutkonfiguration wurde ausgehend von PMCA (2) durchgeführt. Von diesem wurde auf die Absolutkonfiguration des MC A (1) geschlossen. Theoretisch wäre es möglich, anzunehmen, dass MC A (1) enantiomerenangereichert vorliegt und erst durch die Zyklisierungsreaktion eine Razemisierung eintritt. Durch parallele Arbeiten von M. Charpentier an der Synthese von enantiomerenangereichertem MC A (1) konnte diese Annahme größtenteils widerlegt werden. Er konnte zeigen, dass die ee-Werte von MC A (1)-Proben vor und nach der Zyklisierung miteinander korrelieren. [71] Um die letzten Zweifel zu beseitigen, wäre die Trennung von unzyklisiertem MC A (1) ein letztes wichtiges Glied in einer Kette von Beweisführungen. Aus diesem Grund wurde in paralleler Arbeitsweise eine Anzahl von 10 HPLC-Säulen mit diversen Laufmittelgemischen und Modifiern ausprobiert und an der Herstellung einer TAPA-Säule gearbeitet.

2.5. Trennung von unzyklisiertem Myrtucommulon A (1)

2.5.1. Arbeiten zur Trennung von unzyklisiertem MC A (1)

Um die Trennung von MC A (1) zu erreichen, wurde eine große Anzahl an verfügbaren chiralen Säulen getestet. 1.) Chiralcel OD-H, 2.) Chiraspher, 3.) Chiralcell OB-H, 4.) Lux Cellulose 2, 5.) Lux Amylose 2, 6.) Nucleodex β -pm und 7.) Reprosil Chiral NR (NP). Die Säulen wurden, wenn möglich als Normalphase und als Umkehrphase betrieben. Als Laufmittel wurden alle gängigen Lösemittel verwendet, sofern sie für die Säule zugelassen waren. Im NP-Modus wurden verwendet: lineare und zyklische Kohlenwasserstoffe, chlorierte Lösemittel, Aceton, EE, Dioxan, THF und viele mehr. Im RP-Modus wurden vor allem MeOH, MeCN, EtOH und Puffer eingesetzt. Ebenso wurde eine Vielzahl an Modifiern getestet, wie bspw. TFA, DEA, NH_3 , TEAA, und AcOH. Das zu erwartende Verhältnis von 2 : 1 : 1 konnte nicht erhalten werden. In manchen Fällen wurde eine schlechte Antrennung erhalten. Optimierungsversuche der Antrennungen führten jedoch ins Ergebnislose. Aus diesem Grunde wurde die Firma Daicel mit einem Säulen-Screening beauftragt. Ihnen wurde synthetisches MC A (1) [65] zur Verfügung gestellt. In ersten Reporten berichtete Daicel, dass ihnen keine Trennung gelungen wäre. In späteren Reporten konnten sie dann eine Antrennung in besagtem Verhältnis erreichen oder eine Trennung im Verhältnis 3 : 1, was dafür spricht, dass meso-Form **1a** und ein Enantiomer des Razemates **1b** koeluieren. Sie berichteten von dem Laufmittel MeCN : Puffer (10 mM NH_4OAc , pH 9 DEA) 70 : 30 v/v) mit dem die besten Ergebnisse erzielt werden konnten. Mit diesem Laufmittel wurden die vorhandenen RP-Säulen erneut getestet. Keine Säule zeigte eine Trennung. Daher wurde dieses Laufmittel mit einer RP18-Säule verwendet, da diese zumindest die meso-Form **1a** vom Razemat **1b** trennen müsste. Das Ergebnis zeigt Abb. 57.

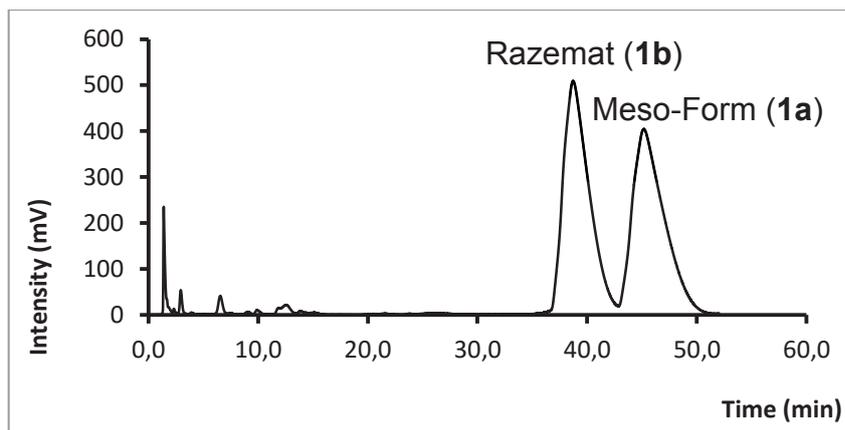


Abb. 57: Chromatogramm von MC A (1)
meso-Form (1a) und Razemat (1b).
MN C18ec, MeCN : Puffer (30 mM NH₄OAc, pH 9 DEA) 45 : 55 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 2 mg/mL

Die Trennung lieferte eine Integration von Peak 1 mit 50,89 % und Peak 2 mit 49,11 %. Somit wurde hier gezeigt, dass MC A (1) im Verhältnis 1 : 1 aus meso-Form 1a und Razemat 1b besteht. Die Zyklisierungsreaktion lieferte dasselbe Ergebnis. Zur Bestimmung bei welchem Peak es sich um die meso-Verbindung bzw. Razemat handelt, wurde die Trennung in Abb. 57 auf die präparative HPLC übertragen und beide Peaks voneinander getrennt. Beide erhaltenen Fraktionen wurden getrennt zyklisiert. Die zyklischen Proben konnten einmal durch ihre Retentionszeit und zweitens durch die Möglichkeit das Razemat auf der Reprosil Chiral in die Enantiomere zu trennen identifiziert werden. Bei Peak 1 handelte es sich um das Razemat und bei Peak 2 um die meso-Form.

In weiteren Berichten der Firma Daicel wurde mitgeteilt, dass es Ihnen gelungen sei Myrtucommulon A (1) im gewünschten Verhältnis aufzutrennen. Die Bedingungen wurden nicht bekannt gegeben, außer dass es sich um die Chiralpak IE handeln würde. Diese Säule besteht aus Amylose mit tris(3,5-dichlor -phenylcarbamat)-Selektor. Diese Säule war nicht verfügbar, lediglich die Lux Amylose 2 war vorhanden. Diese enthielt Amylose tris(5-Chlor -2-methyl-phenylcarbamate), die somit der Chiralpak IE sehr ähnlich war. Jedoch konnte keine Bedingungen für eine Trennung mit dieser Säule gefunden werden. Durch die erfolgreiche Trennung des PMCA (2) auf der Reprosil Chiral NR, war diese mittlerweile sowohl als NP- wie als RP-Säule verfügbar. Die Reprosil Chiral wurde als Umkehrphase getestet und die Trennung des unzyklisierten MC A (1) im Verhältnis 2 : 1 : 1 war möglich.

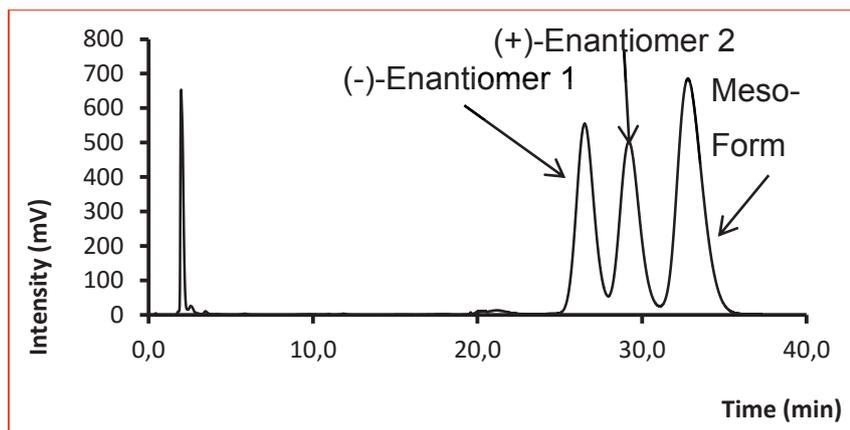


Abb. 58. Chromatogramm Trennung von unzyklisiertem natürlichem MC A (1), Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (30m M NH₄OAc, pH 9 DEA) 40 : 60 v/v, F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 2 mg/mL
(Bemerkung: Ein Austausch von MeCN gegen MeOH würde nur zur Trennung in meso-Form und Razemat führen!)

Abb. 58 zeigt die wohl bedeutendste Erkenntnis der ganzen Dissertation. Es war nun möglich, „unzyklisiertes“ MC A (1) in einer Trennung in alle 3 Stereoisomere aufzutrennen. Die Integration der Fläche unter den Peaks ergab ein Verhältnis von 26,80 zu 27,08 zu 46,10. Somit liegt natürliches 1 näherungsweise im Verhältnis 2 : 1 : 1 vor. Die geringe Abweichung liegt wohl an der nicht kompletten Basislinientrennung. Auf Grundlage dieses Ergebnisses können nun viele offene Fragen beantwortet werden. Dafür musste die Methode auf die präparative HPLC transferiert werden.

Die präparative Trennung zeigte eine schlechtere Basislinientrennung, besonders bei den Razematen (Abb. 222). Durch Variation im Bereich der Ionenstärke (Abb. 59) und Reduzierung des organischen Anteils in der mobilen Phase konnte eine relativ gute Trennung erreicht werden. Abb. 58 zeigt die beste analytische Trennung.

Ionenstärke	
Tief	Hoch →
<ul style="list-style-type: none"> - Auflösung zw. den Enantiomeren steigt - Auflösung zw. Razemat und meso-Form fällt 	<ul style="list-style-type: none"> - t_R steigt - Auflösung zw. Razemat und meso-Form steigt

Abb. 59. Einfluss der Ionenstärke auf die Stereoisomerentrennung.

Um die Peaks möglichst rein zu erhalten, wurde die Zwischenfraktion der beiden Enantiomere verworfen. Um die Pufferlösung zu entfernen wurde das Lösemittel mit der Ölpumpe bei 30° C eingeeengt und anschließend mit OEt₂ extrahiert. Die Peaks konnten ohne eine weitere Reinigung mit mehr als 95 % Reinheit isoliert werden. (Kapitel 3.2.9 beschreibt die genaue Aufarbeitung)

2.5.2. Charakterisierung der drei isolierten Peaks

Tabelle 12: Charakterisierung der Stereoisomere von MC A (1).

Charakterisierung	MC A (1) Meso	MC A (1) Enantiomer 1	MC A (1) Enantiomer 2
HR-MS(ESI (-))	667,3498	667,3505	667,3450
Abweichung	2,36 ppm	3,42 ppm	0,39 ppm
exakte Masse	667,3488	667,3488	667,3488
Spezifische optische Rotation $[\alpha]_D^{25}$ 7 mg/mL in MeOH	-0,71	-8,14	+10,86
CD-Spektrum	Abb. 60	Abb. 60	Abb. 60
NMR	Abb. 61	Abb. 61	Abb. 61

Bei der hochaufgelösten Masse lag die Abweichung deutlich kleiner 5 ppm. Somit konnten diese Werte als akzeptabel eingestuft werden. Die spezifische optische Rotation wurde mit 7 mg Probe in 1 mL MeOH gemessen. Es war nun möglich den Peaks eine spezifische optische Rotation zuzuordnen (Tabelle 12). Die Messung des CD-Spektrums erfolgte in einer Lösung von 1 mg/mL in MeOH. Das Ergebnis zeigte für die Meso-Form **1a** eine (Abb. 60) deutliche Nulllinie. Das (-)-Enantiomer und das (+)-Enantiomer zeigten einen entgegengesetzten Cotton-Effekt. Das CD-Spektrum zeigte unmissverständlich, dass es sich bei den drei isolierten Peaks um die meso-Form und das Razemat handeln musste.

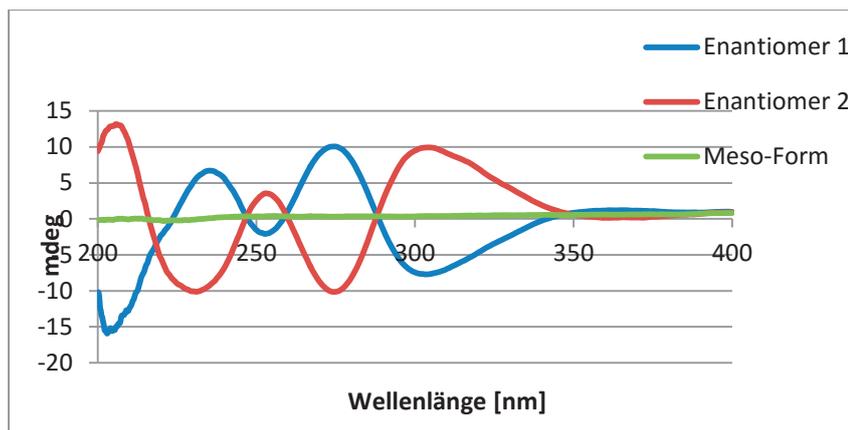


Abb. 60. CD-Spektren der beiden Enantiomeren (Violett und blau) sowie der meso-Form von MC A (**1**) (grün). Die CD-Spektren wurden getrennt aufgenommen und in dasselbe Diagramm abgebildet.

Von allen 3 Formen wurde ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen. Vor allem die Trennung der diastereoisomeren Formen sollte eine geringe Vereinfachung des NMR ergeben.

Im Bereich (Abb. 61) von 0,5 bis 2 ppm kann deutlich erkannt werden, wie sich MC A (**1**) aus meso-Form **1a** und Razemat **1b** zusammensetzt. Das rote NMR scheint eine Überlagerung des grünen und blauen NMR zu sein. Ebenso wurde ein Unterschied zwischen **1a** und **1b** deutlich. Wie zu erwarten unterschieden sich die Diastereomeren im $^1\text{H-NMR}$. Jedoch konnte nicht von einer großen Vereinfachung des NMR gesprochen werden. Eine leichte Entzerrung im niedrigem ppm Bereich war möglicherweise erkennbar. Der Einfluss der Wasserstoffbrückenbindungen, der Rotamere und der Keto-Enol-Tautomerien ließ eine gewohnte Interpretation weiterhin nicht zu. Wie schon vorher diskutiert, macht daher eine übliche Interpretation der NMR-Spektren keinen Sinn.

Die Entwicklung der neuen Trennmethode für MC A (**1**) führte dazu, dass das Stereoisomerenverhältnis von 2 : 1 : 1 absolut festgestellt und bestätigt werden konnte. Es war nun möglich von den unzyklisiertem getrennten Stereoisomeren von **1** die hochaufgelöste Masse, die spezifische optische Rotation, das CD-Spektrum und ein NMR-Spektrum zu erhalten.

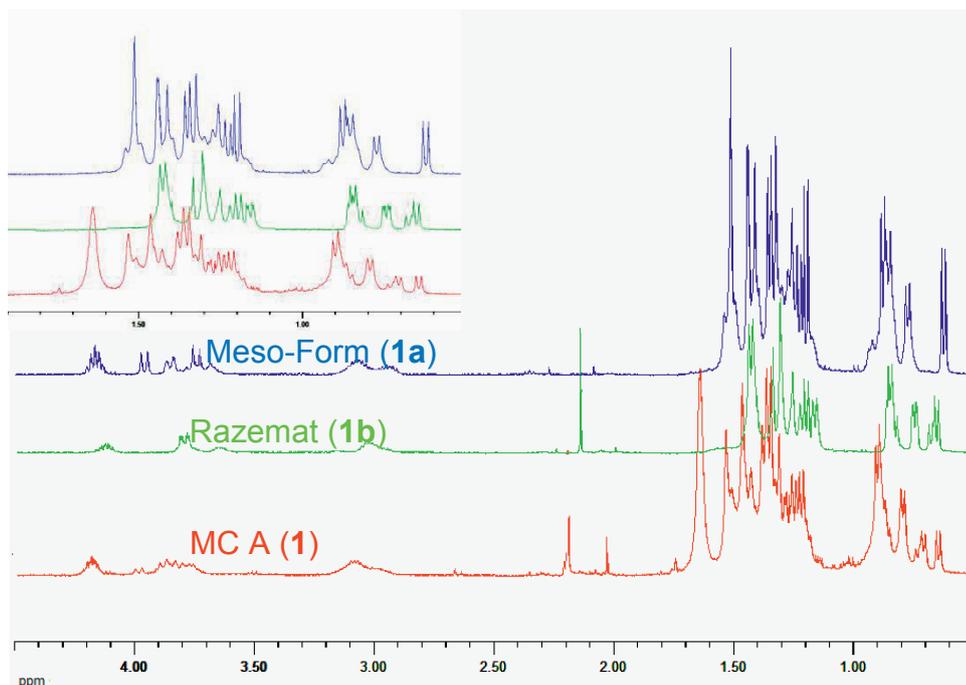


Abb. 61. ¹H-NMR-Spektren von isoliertem MC A (1), meso-Form 1a und Razemat 1b.

2.6. Untersuchungen zum Epimerisierungsverhalten von MC A (1)

Wie bereits an einigen Stellen dieser Arbeit angesprochen, würde eine Razemisierung/Epimerisierung von MC A (1) während der Isolierung oder während der Zyklisierungsreaktion zu PMCA (2) ein Problem darstellen, welches zu verfälschten Ergebnissen im Bereich der *de/ee*-Werte führen könnte. Eine Razemisierung/Epimerisierung bei MC A (1) könnte entweder durch langsames Zersetzen der Probe oder bei der Zyklisierungsreaktion stattfinden. Beide Fälle müssen daher untersucht werden. Mechanistisch könnte eine Razemisierung/Epimerisierung auf drei verschiedenen Wegen ablaufen. 1.) Eine Möglichkeit wäre die Wanderung des Protons der CH-Gruppe der chiralen Isobutylgruppe, in die α -Stellung der enolischen Doppelbindung. Dabei handelt es sich um eine [1,3]-sigmatrope Umlagerung (Abb. 62.), welche nach einem konzertierten Mechanismus abläuft. Rein theoretisch wäre sowohl eine photochemische suprafaciale [1,3]-H Wanderung, als auch eine thermische antarafaciale [1,3]-H Wanderung möglich. Jedoch muss bei der thermischen

Wanderung des Protons die Bindungsebene durchqueren, was unmöglich ist. Betrachtet man daher nur die photochemische Wanderung, so muss das Proton von einem bindenden Orbital in ein anderes bindendes Orbital auf derselben Seite des Molekülgerüsts wechseln. Da es sich um eine konzertierte Reaktion handelt, würde die Rückreaktion ebenso konzertiert ablaufen, demnach unter Beibehalten der Konfiguration. Lediglich eine Mischung aus photochemischer Hinreaktion und thermischer Rückreaktion (oder umgekehrt), würde die Konfiguration ändern und somit zu einer Epimerisierung führen. Da aber die thermische antarafaciale [1,3]-H-Wanderung unmöglich ist, kann durch eine [1,3]-H-Wanderung die Konfiguration im MC A (1) nicht geändert werden. [103], [104], [105]

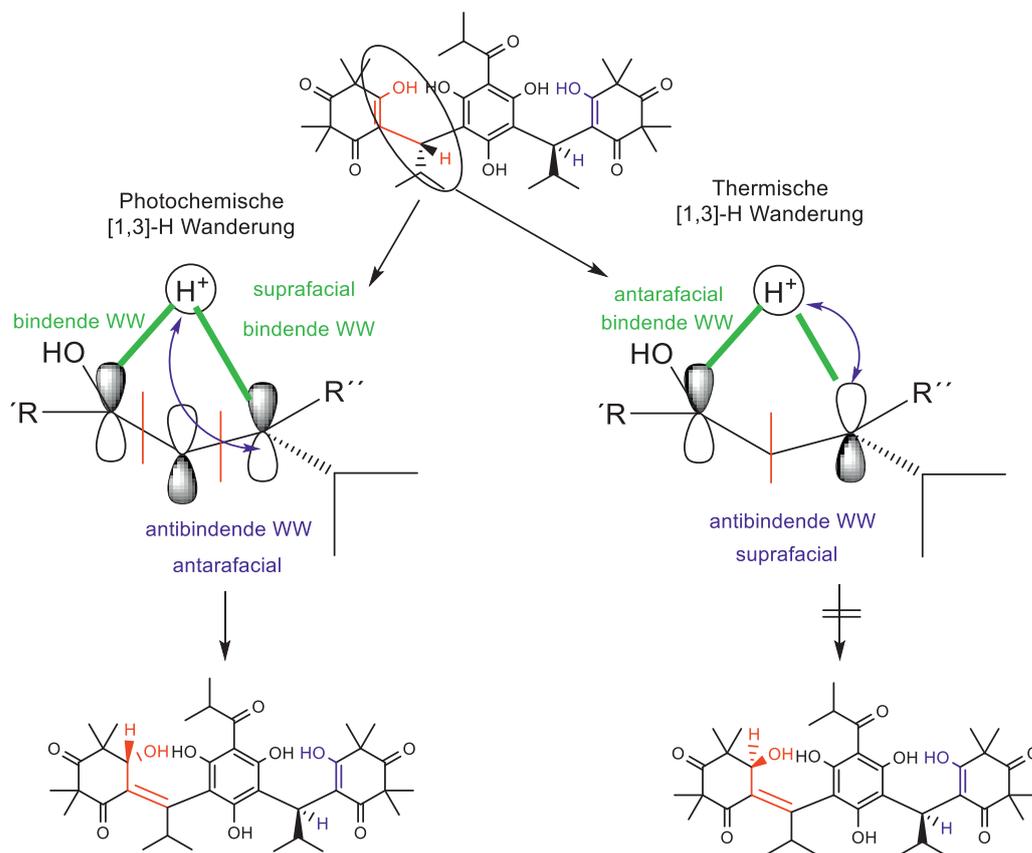


Abb. 62. Mechanismus der [1,3]-sigmatropen Umlagerung, dargestellt an MC A (1).

2.) Eine zweite Möglichkeit der Epimerisierung wäre die Oxidation der Bindung zwischen Syncarpinsäure-Einheit und der verknüpfenden Isobutylgruppe mit anschließender Reduktion (Abb. 63). Eine Oxidation wäre theoretisch mit Luft-Sauerstoff denkbar. Die anschließende Reduktion in oxidierender Atmosphäre kann

chemisch nicht plausibel begründet werden. Daher kann auf diesem Weg MC A (1) nicht razemisieren.

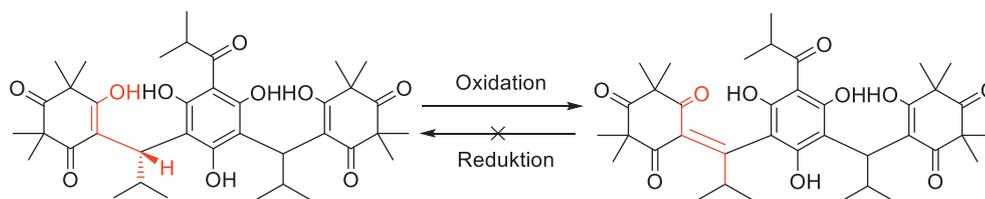


Abb. 63. Oxidation und Reduktion von MC A (1) an Luftsauerstoff.

3.) Eine dritte Möglichkeit zur Razemisierung/Epimerisierung wäre die (saure) Abspaltung beider Isobutylysyncarpinsäure-Einheiten und eine erneute willkürliche Wiederangliederung an die Phloroglucin-Einheit. Eine Abspaltung der Isobutylysyncarpinsäure wurde bereits bei der Isolierung beschrieben, jedoch konnte bisher keine erneute Bindungsausbildung beobachtet werden. Außerdem wäre dies chemisch nur wenig sinnvoll. Die drei hier beschriebenen Möglichkeiten zur Razemisierung /Epimerisierung sind somit chemisch sehr unwahrscheinlich. Daher wurde versucht in zwei Testverfahren eine Razemisierung/Epimerisierung unter für MC A (1) ungünstigen Bedingungen zu erreichen.

Wie schon zuvor erwähnt, kann eine Zersetzung der Probe durch Licht- oder Lufteinwirkung begünstigt werden. Eventuell sind die getrennten Enantiomere thermodynamisch so instabil, dass sie ohne Fremdeinwirkung langsam oder schnell razemisieren. Aus diesem Grund wurden je eine Probe des angereicherten (-)-Enantiomers (enthält noch wenig (+)-Enantiomer und wenig meso-Form), des angereicherten (+)-Enantiomers (enthält noch wenig (-)-Enantiomer und wenig meso-Form) und der angereicherten meso-Form (enthält noch wenig der beiden Enantiomere) auf der HPLC aufgegeben und deren Verhältnisse zum Startzeitpunkt ermittelt. Die Probe wurde unverschlossen an der Luft, bei indirekter Sonneneinstrahlung über 2 Monate aufbewahrt und in regelmäßigen Intervallen vermessen. Exemplarisch werden Abb. 64, Abb. 65 und Abb. 66 abgebildet.

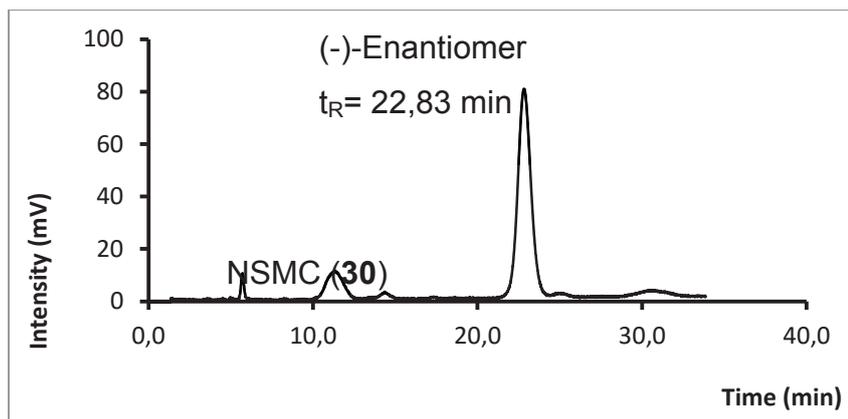


Abb. 64. Chromatogramm (-)-Enantiomer des MC A (1) vom 08.06.2015. Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (30 mM NH_4OAc , pH 9 DEA) 45 : 55 v/v, F: 1,0 mL/min, T: 24 °C, Inj: 20 μL , Konz: \approx 1 mg/mL

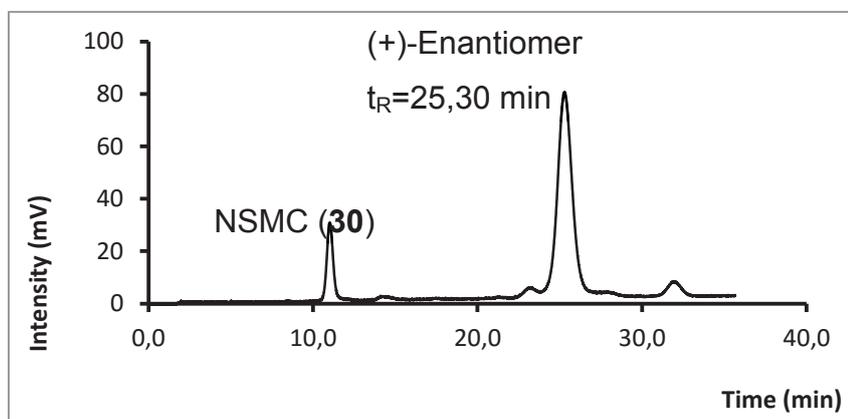


Abb. 65. Chromatogramm (+)-Enantiomer des MC A (1) vom 08.06.2015. Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (30mM NH_4OAc , pH 9 DEA) 45 : 55 v/v, F: 1,0 mL/min, T: 24 °C, Inj: 20 μL , Konz: \approx 1 mg/mL

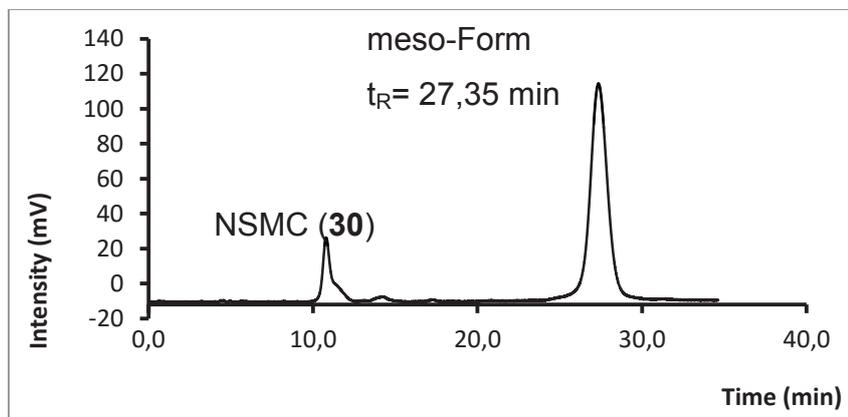


Abb. 66. Chromatogramm der meso-Form des MC A (1) vom 08.06.2015. Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (30 mM NH_4OAc , pH 9 DEA) 45 : 55 v/v, F: 1,0 mL/min, T: 24 °C, Inj: 20 μL , Konz: \approx 1 mg/mL

Tabelle 13. Ergebnisse der Razemisierungs-/Epimerisierungsuntersuchung.

(-)-Enantiomer	08.06.2015	15.06.2015	22.06.2015	22.07.2015
(-)-Enantiomer	92,59%	91,01%	89,10%	89,65%
(+)-Enantiomer	1,05%	0,98%	1,11%	0,54%
meso-Form	6,35%	8,01%	9,78%	9,81%
ee-Wert	97,76	97,87	97,54	98,80
de-Wert	87,30	83,98	80,44	80,38
(+)-Enantiomer	08.06.2015	15.06.2015	22.06.2015	22.07.2015
(-)-Enantiomer	3,36%	3,66%	3,68%	7,13%
(+)-Enantiomer	91,22%	89,16%	90,12%	85,41%
meso-Form	5,42%	7,17%	6,20%	4,45%
ee-Wert	92,89	92,11	92,15	84,59
de-Wert	89,16	85,66	87,60	90,82

Vergleicht man die in Tabelle 13 angegebenen de/ee-Werte der einzelnen Diastereoisomere/Enantiomeren untereinander, so stellt man nur geringe Abweichungen fest. Eine Razemisierung kann definitiv nicht erkannt werden. Beim (-)-Enantiomeren könnte man eventuell von einer geringen Epimerisierung sprechen, da aber beim (+)-Enantiomeren keine Epimerisierung zu erkennen ist, so kann man sagen, dass im Gesamten keine signifikante Epimerisierung festzustellen ist. Es ist unwahrscheinlich, dass nur ein Enantiomer epimerisieren würde. Die kleinen Abweichungen in den Messwerten entstanden durch die teilweise geringfügigen Unterschiede in der Integration. Die Methode war sehr empfindlich auf schwankende Lösemittelkonzentration und Ionenstärke. Eine Razemisierung würde bedeuten, dass der Anteil jedes einzelnen Enantiomeres so lange weniger/mehr werden würde, bis das Verhältnis 1 : 1 beträgt. Eine Epimerisierung würde bedeuten, dass das Verhältnis von meso-Form und Razemat gegen 1 : 1 strebt. Zu beobachten ist die Zunahme des NSMC (**30**) Peaks. Es findet demnach keine Razemisierung bzw. Epimerisierung statt, sondern eine Zersetzung zum NSMC (**30**). Die Feststellung, dass MC A (**1**) zu seinem Prekursor NSMC (**30**) zerfällt wurde in Punkt 2.3.1 bereits erwähnt. Aus diesem Grund sollten Myrtucommulon Proben sehr schonend isoliert und aufbereitet werden und sinnvollerweise im Gefrierschrank aufbewahrt werden. Ein weiterer kritischer Schritt bei der Strukturaufklärung war die Zyklisierungsreaktion, da nicht bekannt war, ob MC A (**1**) dabei razemisierte und

PMCA (**2**) nur deshalb racemisch vorlag. Der Beweis, dass natürliches MC A (**1**) racemisch vorliegt konnte durch die Trennung (Abb. 58) auf der Reprisil bewiesen werden. Trotzdem wurde die Zyklisierungsreaktion untersucht. Dazu wurde enantiomeren angereichertes synthetisches MC A (**1**) [65] untersucht und dessen *de/ee*-Wert bestimmt (siehe Abb. 67 und Abb. 68). Dieses wurde analog zu Abb. 212 zyklisiert. Es wurden 5 Ansätze gemacht, bei der die Reaktionszeiten von einer bis 5 h variierten. Die zyklisierten Proben wurden mittels RP 18 HPLC gereinigt und anschließend ein Chromatogramm aufgenommen um den *de/ee*-Wert der zyklisierten Proben zu bestimmen.

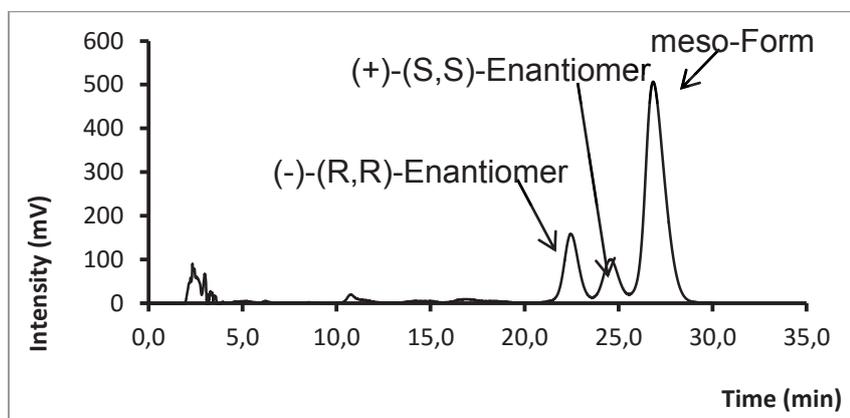


Abb. 67. Chromatogramm von synthetischem MC A (**1**) mit *ee*-Wert 16,5 und *de*-Wert 45,1
Reprisil Chiral NR, MeCN :Puffer (30 mM NH₄OAc, pH 9 DEA) 45 : 55 v/v.,
F: 1,0 mL/min, T: 24 °C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

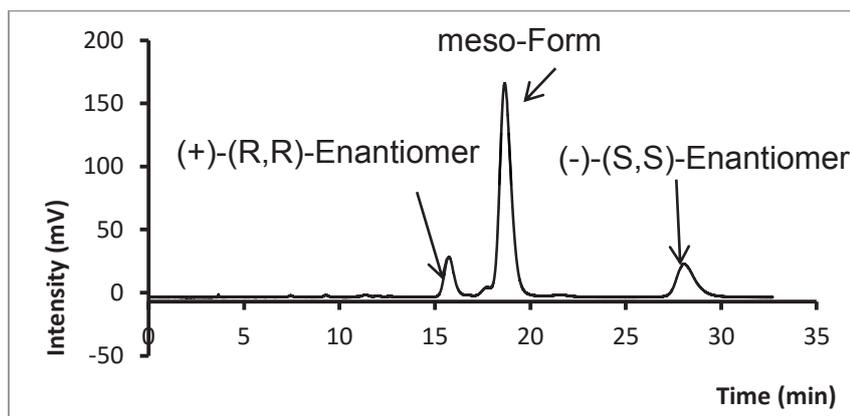


Abb. 68. Chromatogramm von synthetischem PMCA (**2**) mit *ee*-Wert 18,5 und *de*-Wert 45,9 nach 3 h Reaktionszeit
Reprisil Chiral NR, n-Hexan : iso-PrOH 95 : 5 v/v.,
F: 1,0 mL/min, T: 24 °C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Tabelle 14. Übersicht der de/ee-Werte nach den Zyklisierungsreaktionen

	MC A (1)	PMCA (2)	PMCA (2)	PMCA (2)	PMCA (2)	PMCA (2)
Reaktionszeit	Start	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
(S,S)- Enantiomer	16,11	16,20	15,90	16,00	17,10	16,10
(R,R)- Enantiomer	11,35	12,10	12,70	11,00	11,50	11,70
meso-Form	72,54	71,70	73,40	72,90	71,30	72,20
ee-Wert	17,33	14,49	11,10	18,52	19,58	15,80
de-Wert	45,08	43,40	43,92	45,95	42,74	44,40

In Tabelle 14 wurden die Ergebnisse der 5 Zyklisierungen zusammengefasst. (Nomenklatur beachten: (-)-Enantiomer MC A (1) \neq (-)-Enantiomer PMCA (2), (R,R)-Enantiomer MC A (1) = (R,R)-Enantiomer PMCA (2)) Betrachtet man die de-Werte, so stellt man nur geringe Abweichungen fest. Demnach ist eine Epimerisierung durch die Zyklisierungsreaktion vernachlässigbar gering. Bei den ee-Werten ist ein Mittelwert von 16,1 zu erkennen. Die ee-Werte nach einer und zwei Stunden Reaktionszeit weichen davon am stärksten ab. Ein Grund dafür kann sein, dass die Zyklisierungsreaktion nach dieser Zeit noch nicht beendet war und somit diese Werte keine große Aussagekraft in Bezug auf den ee-Wert besitzen. Für einen genügend hohen Umsatz der Zyklisierungsreaktion ist eine Zeit von wenigstens 3h sinnvoll. Die ee-Werte nach drei bis fünf Stunden besitzen eine Abweichung von maximal $\pm 2\%$. Dies kann wahrscheinlich auf Integrationsfehler durch fehlende Basislinientrennung zurückgeführt werden. Auch der Wechsel von RP auf NP kann solch eine Abweichung verursachen. Die geringen Schwankungen, bei den niedrigen Flächenprozentanteilen der einzelnen Enantiomeren, wirken sich mathematisch ungünstig auf die Berechnung des ee-Wertes aus. Größere Zahlenwerte reagieren weniger empfindlich auf Schwankungen im Bereich von $\pm 2\%$. Ebenso konnte bei der Aufarbeitung auf der RP18-HPLC-Säule ein kleiner Teil an meso-Form **1a** bzw. Enantiomer **1b** verloren gegangen sein. Wie schon an vorheriger Stelle, spielt die Zersetzung des MC A (1) zu NSMC (**30**) hier eine

gewisse Rolle. Es kann festgestellt werden, dass die Zyklisierungsreaktion keinen signifikanten Einfluss auf den de/ee-Wert hat.

In diesem Abschnitt wurde bewiesen, dass Myrtucommulon A (**1**) nicht zur Razemisierung oder Epimerisierung neigt. Weder durch Lagerung an Luft und Sonnenlicht, noch durch die Zyklisierungsreaktion konnte der de/ee-Wert verändert werden. Der einzige störende Faktor war die Zersetzung von **1** zu NSMC (**30**). Aus diesem Grunde war eine schonende Aufarbeitung und Behandlung der MC-Proben unumgänglich. Ein Aufbewahren der Proben im Gefrierschrank erweist sich als günstig. Die letzten Zweifel der Master-Arbeit konnten somit widerlegt werden. Somit war der Rückschluss der absolut Konfiguration von PMCA (**2**) auf MC A (**1**) korrekt und führte damals schon zur richtigen Konfiguration.

2.7 Strukturaufklärung von MC A (1) aus *Neofusicoccum Australe*

In Punkt 1.5.1 der Einleitung wurde von der Entdeckung des Pilzstammes *Neofusicoccum australe* in Myrtenzweigen durch Nicoletti et al. [24] berichtet. Eine Probe eines Extraktes von *Neofusicoccum australe*, die von R. Nicoletti zur Verfügung gestellt wurde, konnte hier mittels HPLC untersucht werden, jedoch konnte das Vorhandensein von MC A (1) zunächst nicht bestätigt werden. Aus der Publikation von Nicoletti et al. ging jedoch hervor, dass MC A (1) nur zu einem sehr geringen Teil im Extrakt zu finden ist. Aus diesem Grund wurde der gesamte Pilzextrakt auf der präparativen HPLC injiziert. Die Retentionszeit von MC A (1) war von bisherigen HPLC-Läufen bekannt. Somit wurde beim Pilzextrakt eine Fraktion von ungefähr 9 bis 12 min gesammelt.

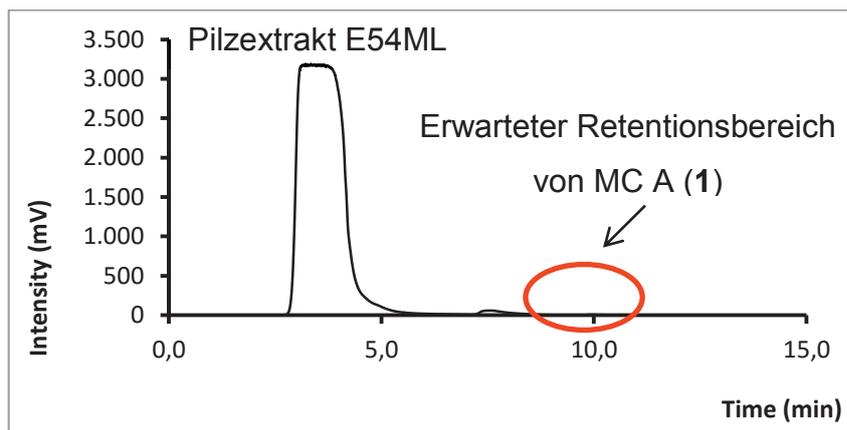


Abb. 69. Chromatogramm der Anreicherung von MC A (1) mittels präparativer HPLC im Pilzextrakt.
MNC18ec, MeCN (0,1 % TFA):MeOH (0,1 % TFA) 20 : 80 v/v.,
F: 19,0 mL/min, T: rt, Inj: 3mL, Konz: \approx 45 mg/mL

Im präparativen Chromatogramm (Abb. 69) konnte auch kein MC A (1) detektiert werden. Trotzdem wurde in dem für MC A (1) zu erwartenden Zeitintervall eine Fraktion gesammelt und das Lösemittel standardmäßig entfernt. Prinzipiell sollte die Fraktion nun mit 1 angereichert sein und wurde nochmals mittels analytischer HPLC untersucht. In Abb. 70 kann deutlich der Peak des MC A (1) bei 4,72 Minuten erkannt werden. Der Peak zeigte lediglich eine Höhe von 10 mV, der trotz Anreicherung noch sehr gering war. Auf jeden Fall konnte die Existenz von 1 im Pilzextrakt nachgewiesen werden. Daher wurde nun die Enantiomeren-Zusammensetzung bestimmt.

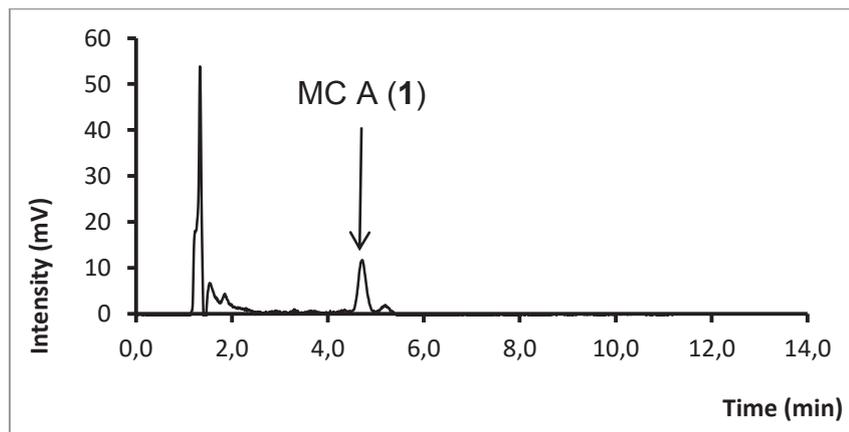


Abb. 70. Chromatogramm von E54ML (*Neofusicocum australe*) nach Anreicherung mittels präparativer HPLC von (1).
MNC18ec, MeCN (0,1 % TFA) : MeOH (0,1 % TFA): 20 : 80 v/v.;
F: 1,5 mL/min, T: 24 °C, Inj: 100 µL,

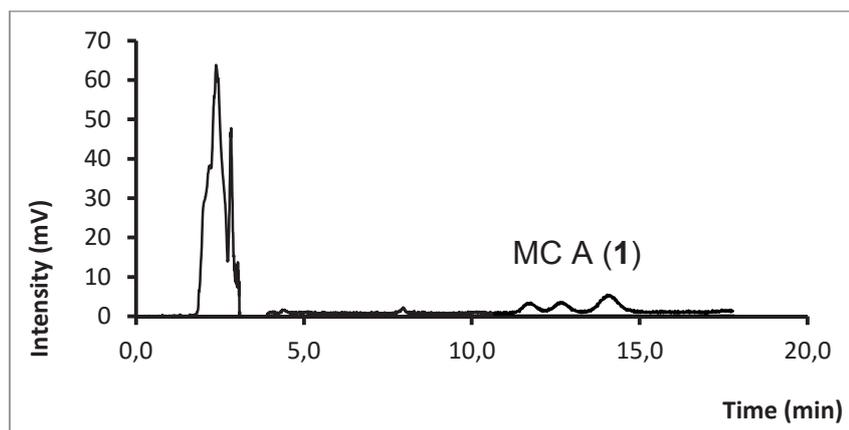


Abb. 71. Chromatographische Trennung der Stereoisomeren von MC A (1) aus *Neofusicocum australe*.
Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (30 mM NH₄OAc, pH 9 DEA) 45 : 55 v/v.;
F: 1,0 mL/min, T: 24 °C, Inj: 100 µL

Die Integration (Abb. 71) ergab ein Peakverhältnis von 22,13 : 23,98 : 53,89, was in guter Näherung 1 : 1 : 2 entspricht. Somit produzierte der Pilz MC A (1) racemisch.

Zusammenfassung:

Im Fermenterextrakt konnte zu Beginn kein MC A (1) gefunden werden, weshalb die Anreicherung mittels präparativer HPLC notwendig war. Selbst nach der Anreicherung konnte dann nur eine sehr geringe Menge MC A (1) nachgewiesen werden. Ebenso zeigten die MS-Spektren aus der Publikation [24] nur sehr kleine Peaks. Jedoch war genügend Probe isoliert worden um das Enantiomerenverhältnis bestimmen zu können. Die Chromatographische Analyse, sowohl des isoliertem MC A (1), als auch des MC A (1) aus *Neofusicocum australe*, lieferte die gleiche Stereoisomerenzusammensetzung. Die im Arbeitskreis Jauch verwendete Myrte wurde durch D. Quandt nicht nur ITS-Sequenziert [64], sondern auch auf das Vorhandensein von DNA eines endophytischen Pilzes untersucht. Es konnte aber keine Pilz-DNA gefunden werden. Laut Quandt hätte diese auf jeden Fall entdeckt worden sein müssen, falls diese vorhanden gewesen wäre. Als mögliche Erklärung dafür kann man folgende Überlegungen in Betracht ziehen. Es ist möglich, dass nicht jeder Myrte Strauch von diesem Pilz befallen ist (entgegen der Meinung von R.Nicoletti). Eines zeigte sich aber deutlich, dass sowohl die Pflanze (allein oder in Symbiose mit dem Pilz) als auch der Pilz MC A (1) im Verhältnis 2 : 1 : 1 biosynthetisiert. In Bezug auf die Biosynthese kann vermutet werden, dass MC A (1) in der Pflanze durch Zufall entsteht, da diese die Bestandteile wie Isobutyraldehyd (22), Isobutyrylphloroglucin (23) und Syncarpinsäure (21) liefert. Eventuell kann der Pilz eine der drei Bestandteile in erhöhtem Maße beisteuern oder der Pilz verstärkt die Menge aller 3 Bestandteile. Der von der Myrte abgetrennte Pilz jedoch, liefert alleine zu geringe Mengen an MC A (1). Daher wird vermutet, dass der Pilz und die Myrte in einer symbiotischen Beziehung MC A (1) produzieren.

2.8. Norsemyrtucommulon (30)

2.8.1. Isolierung von NSMC (30)

Um reines Norsemyrtucommulon (30) zu erhalten, wurde mit Fraktion 5 der Flash-Chromatographie weitergearbeitet. Diese wurde auf einer C18-Säule weitergehend aufgetrennt.

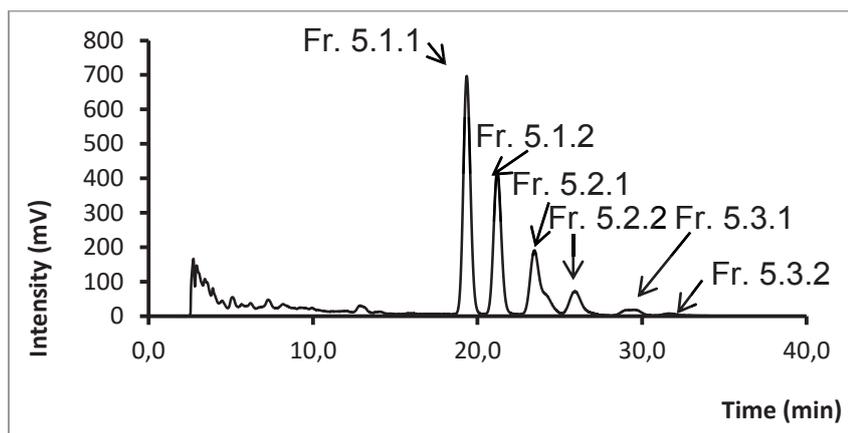


Abb. 72. Chromatogramm von Fraktion 5.
M&N C18ec, MeOH (0,1 % TFA) : H₂O (0,1 % TFA) 85 : 15 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Abb. 72 zeigt die Auftrennung von Fraktion 5 auf einer analytischen HPLC-Säule in mehrere Peaks. Durch Vergleichen der Retentionszeiten von synthetischem NSMC (30) [65] und dem NSMC (30) aus der Masterarbeit [63] mit der von Fraktion 5.1.1, konnte diese als NSMC (30) identifiziert werden. Zur weiteren Charakterisierung wurde mittels Massenspektrometrie (ESI(-)) die Masse von Fraktion 5.1.1 mit 431,25 m/z ermittelt. Um weitere analytische Messungen durchführen zu können, musste Fraktion 5.1.1 in größerem Maßstab isoliert werden. Das Laufmittel MeOH (0,1 % TFA) : H₂O (0,1 % TFA) 85 : 15 v/v zeigte zum Laufmittel MeOH (0,1 % TFA) : MeCN (0,1 % TFA) 80 : 20 v/v aus der Master-Arbeit, eine deutlich bessere Auflösung beim Upscaling auf die präparative HPLC. Vor allem konnten NSMC (30) und SMC (4) in einem Lauf mit > 95 % Reinheit getrennt werden und deutlich besserer Ausbeute (Abb. 211).

Ebenso konnten die Fraktionen 5.1.2 bis 5.3.2 in einem Schritt mitisoliert werden, um in späteren Analysen verwendet zu werden (Abb. 72). Das Laufmittel wurde nach jedem Schritt mittels Ölpumpe bei einer Wasserbadtemperatur von 30° C entfernt.

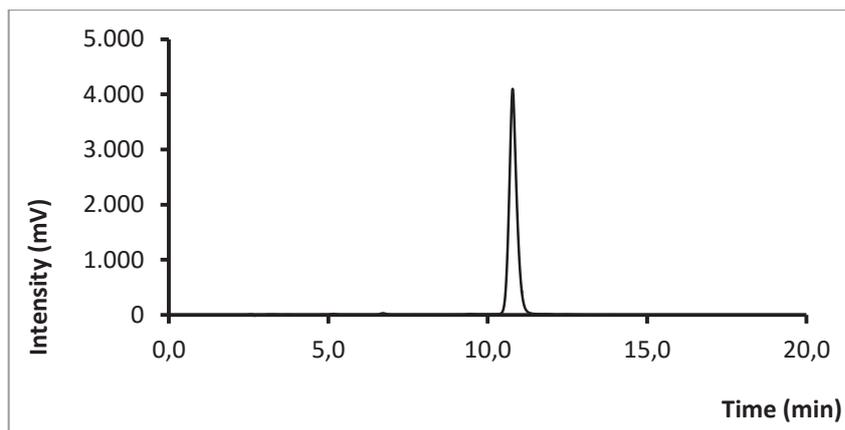


Abb. 73. Chromatogramm von NSMC (**30**).
M&N C18ec, MeOH (0,1 % TFA) : H₂O (0,1 % TFA) 90 : 10 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Wie in Abb. 73 gezeigt, wurde NSMC (**30**) nach einer präparativen Trennung absolut rein erhalten. Weder Verunreinigungen von SMC (**4**) noch irgendwelche Abbaufragmente waren nach der Isolierung aus Fraktion 5 erhalten worden. Somit konnte **30** im Laufmittel MeOH (0,1 % TFA) : H₂O (0,1 % TFA) 85 : 15 v/v sehr effizient isoliert werden.

2.8.2. Analytik von NSMC (**30**)

2.8.2.1. Massenspektrum (EI) von (**30**)

Das Massenspektrum des MC A (**1**) war bereits bekannt (Abb. 48). In diesem konnte NSMC (**30**) als Fragment-Ion entdeckt werden. Es wurde ebenso von **30** ein Massenspektrum aufgenommen. Prinzipiell sollte dieses Spektrum große Ähnlichkeit mit dem Spektrum des MC A (**1**) haben.

Abb. 74 zeigt das Massenspektrum von NSMC (**30**). Dieses kann als Teilspektrum im Massenspektrum des MC A (**1**) (Abb. 48) wiedergefunden werden, weshalb viele m/z-Werte gemeinsam in beiden Spektren erhalten werden können. Ein wichtiger Zerfallsmechanismus stellt hier die Mc-Lafferty-Umlagerung dar. Dadurch wird NSMC (**30**) in seine Bestandteile, in Phloroglucin und Syncarpinsäure (**21**), zerlegt. Je nach Ausgangspunkt der Mc-Lafferty-Umlagerung (Abb. 75) ist die Isobutylgruppe an einer von beiden Bestandteilen zu finden. Somit können die m/z-Werte von 250 und 236 gut erklärt werden. Oftmals lässt sich auch eine α -Spaltung an der Isobutrylgruppierung zum Acylradikal beobachten.

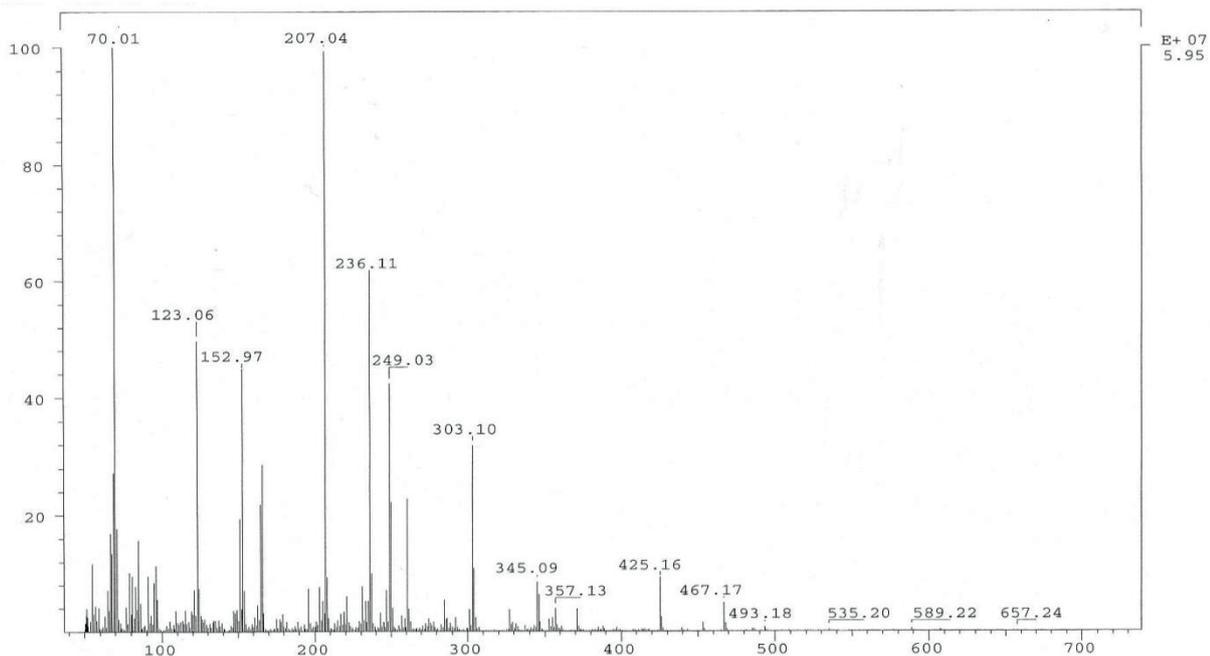


Abb. 74. Massenspektrum (EI, 70 eV) von NSMC (30).

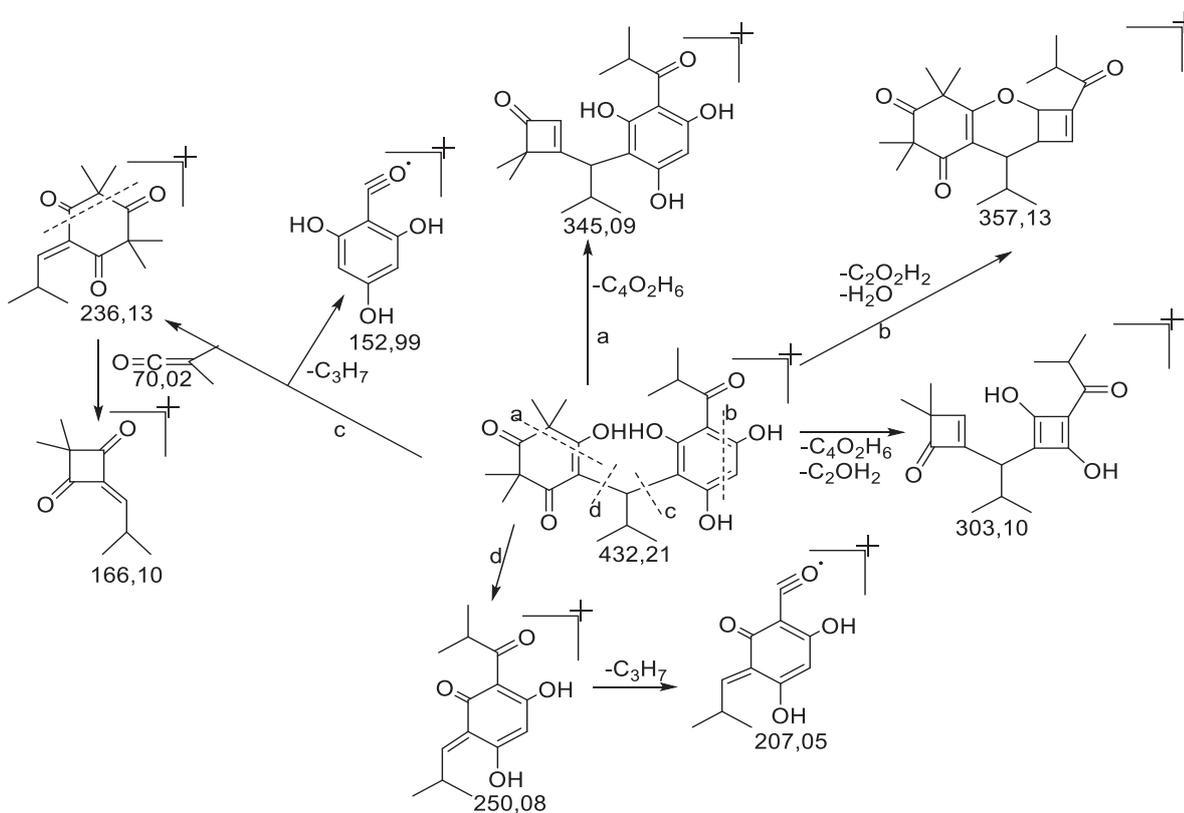


Abb. 75. möglicher Fragmentierungsmechanismus (EI) von NSMC (30).

Daraus resultieren die Werte von 207 und 152. Eine typische Abspaltung für Moleküle mit Flavon-Struktur ist die Abspaltung von $C_4O_2H_6$ -Einheiten, $C_2O_2H_2$ -Einheiten, CO und CO_2 . [106], [107], [108], [109] Daraus resultieren die m/z-Werte von 357, 345 und 303. Die drei hier genannten Zerfallsmechanismen und deren Kombination miteinander ermöglicht das Erklären der meisten Fragmentationen.

2.8.2.2. Massenspektrum ESI(-) von (30)

Neben dem Massenspektrum im EI-Modus wurde noch ein weiteres Spektrum im ESI(-)-Modus (Abb. 76) aufgenommen. Zusätzlich wurde noch die hochaufgelöste Masse bestimmt. Es wurde ein Wert von 431,2026 erhalten. Mit dem errechneten Wert von 431,2075 ergab sich eine Abweichung von -0,95 ppm

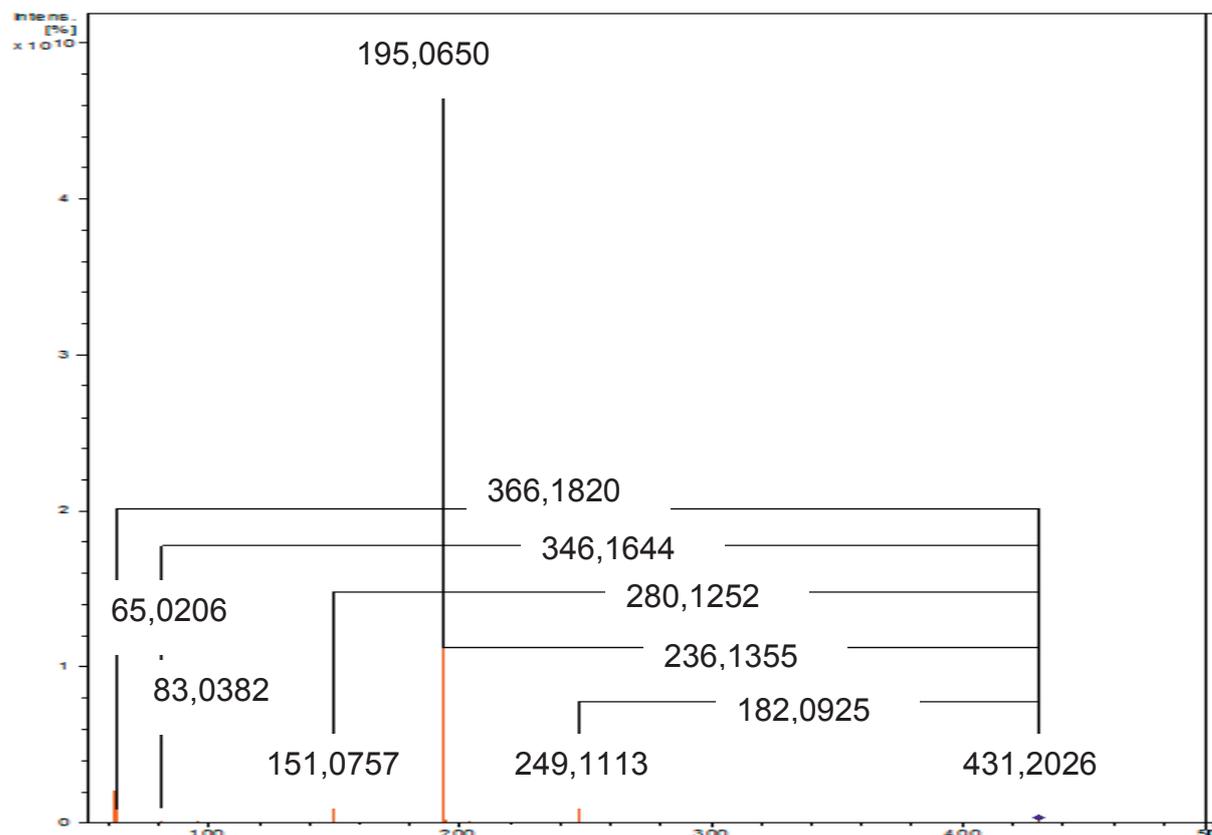


Abb. 76. Massenspektrum ESI(-) (25 eV) von NSMC (30).

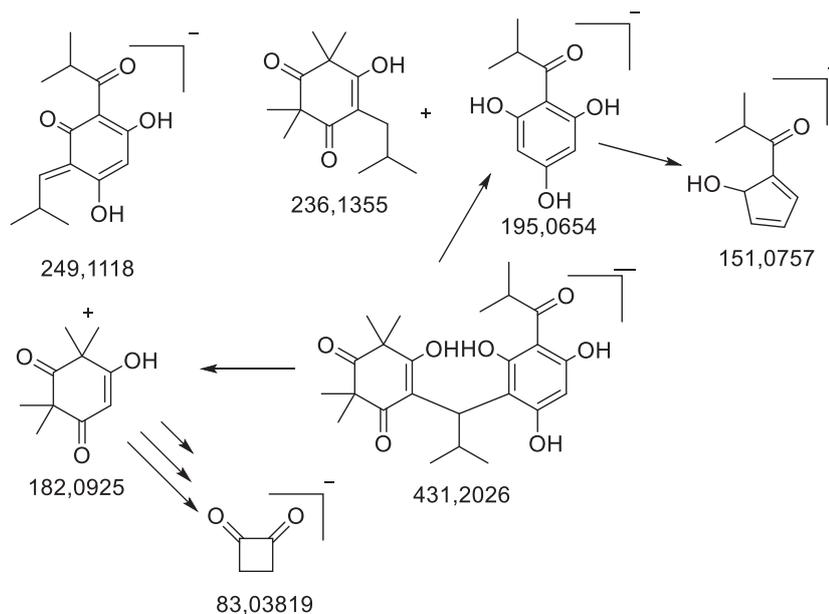


Abb. 77. möglicher Fragmentierungsmechanismus (ESI(-)) NSMC (**30**).

Das Fragmentierungsmuster (Abb. 77) des NSMC (**30**) entsteht vor allem durch Spaltung der verknüpfenden Isobutylgruppe. Die wichtigsten Fragmente setzen sich daher aus den Bestandteilen des NSMC (**30**), Phloroglucin und Syncarpinsäure (**20**) (mit/ohne Isobutylgruppe) zusammen. Durch Abspaltung von CO und C₂O₂H₄-Einheiten aus Syncarpinsäure und Phloroglucin entstehen weitere kleinere Fragmente.

2.8.2.3. NMR-Spektroskopie, CD-Spektroskopie, Polarimetrie

Das ¹H-NMR-Spektrum des hier isolierten natürlichen NSMC (**30**) war identisch mit den Spektren (Abb. 29) des isolierten NSMC (**30**) der Masterarbeit [63] und denen von synthetischem NSMC (**30**).[65], [71] Wie schon beim MC A (**1**) so konnte auch an dieser Stelle keine sinnvolle Interpretation des Spektrums stattfinden.[63] Die Anzahl an freien OH-Gruppen und Ketogruppen im NSMC (**30**), sind in der Lage Wasserstoffbrücken-Bindungen untereinander und Keto-Enol-Tautomere auszubilden. Dadurch stellt das NMR-Spektrum eine Überlagerung von mehreren tautomeren und rotameren Formen dar.

Das CD-Spektrum zeigte keinen Cotton-Effekt, eine Nulllinie. Daher kann reines natürliches NSMC (**30**) nicht enantiomerenrein oder angereichert vorliegen.

Ebenso unterschied sich die spezifische optische Rotation nicht signifikant von Null. Zu diesem Zeitpunkt war keine Möglichkeit bekannt, NSMC (**30**) irgendwie in seine

enantiomeren Bestandteile aufzutrennen. Folglich wurde NSMC (**30**) zyklisiert und zu MC B (**3**) umgesetzt.

2.9. Zyklisiertes NSMC (**30**) = MC B (**3**)

2.9.1. Synthese und Charakterisierung von MC B (**3**)

Um MC B (**3**) zu synthetisieren wurde analog zu Abb. 212 verfahren. Ein Äquivalent von **3** und 3 Äquivalente pTsOH wurden unter Rückfluss in Benzol 4h lang erhitzt. [36] Das Reaktionsgemisch wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und anschließend über MgSO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer RP 18-HPLC gereinigt (MeOH : H₂O 90 : 10 v/v). Das Lösemittel wurde mittels einer Membranpumpe entfernt. In Tabelle 15 werden die Ergebnisse der Charakterisierung mittels HR-MS, Polarimetrie, CD-Spektroskopie und NMR-Spektroskopie gezeigt.

Tabelle 15: Charakterisierung von MC B (**3**).

Charakterisierung	MC B (3)
HR-MS(ESI (+))	437,1935 (Na-Addukt)
Abweichung berechneter Wert	-1,2 ppm 437,1940
Spezifische optische Rotation	0
CD-Spektrum	Nulllinie
NMR	Kapitel 3.2.8.3

Das ¹H-NMR-Spektrum von MC B (**3**) zeigte eindeutig interpretierbare Signale. Es war mit dem Spektrum aus der Master-Arbeit [63] und dem von MC B (**3**) (synthetisiert aus NSMC (**30**)) identisch.[65] Da **3** nur ein Stereozentrum aufweist, im Gegensatz zu MC A (**1**) mit 2 Stereozentren, so kann es sich nicht um Diastereoisomere handeln, sondern nur um Enantiomere. Somit konnte unter RP18-Bedingungen auch keine Trennung erfolgen. Die weitere Auftrennung musste auf einer chiralen Säule erfolgen.

2.9.2. Analytik von MC B (3)

In der Master-Arbeit wurde MC B (3) auf der Chiralcel OD-H in die Enantiomeren aufgetrennt. Da diese Säule nicht im präparativen Maßstab vorlag, wurde wieder die Reprosil Chiral NR verwendet. Mit der präparativen Reprosil Chiral NR konnte genügend Probenmaterial erhalten werden, um weitere Charakterisierungen durchzuführen. Analog zu den Trennbedingungen des PMCA (2), konnte mit dieser Säule MC B (3) ebenso in seine Enantiomeren Bestandteile getrennt werden.

Abb. 78 zeigt deutlich, dass MC B (3) im Enantiomerenverhältnis von 1 : 1 vorlag, somit racemisch.

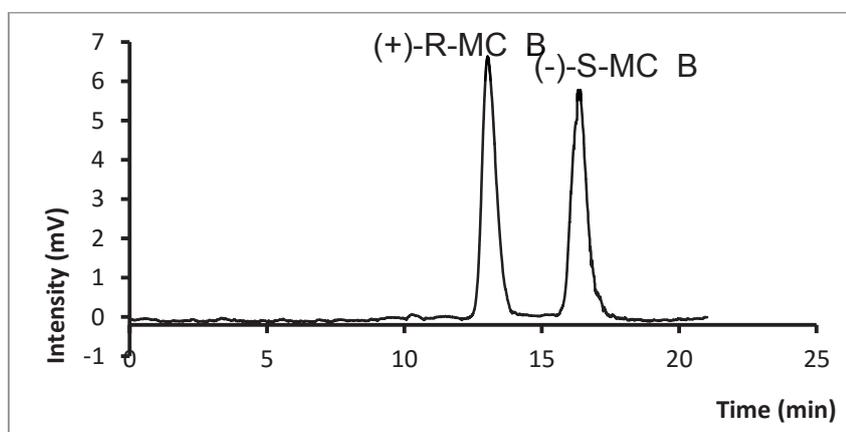


Abb. 78. Chromatogramm von MC B (3).
Reprosil Chiral NR, iso-PrOH : n-Hexan 5 : 95 v/v.,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Um die Enantiomere genauer unterscheiden zu können, musste **3** in größerer Menge isoliert werden. Somit wurde ein Upscaling auf die präparative HPLC entwickelt (Abb. 219). Diese Trennung wurde mit MC B (3), hergestellt aus isoliertem NSMC (30) durchgeführt. Als erstes wurde die spezifische optische Rotation gemessen. Dazu wurde je ein Enantiomer mit einer Konzentration von 10 mg/mL in CHCl₃ vermessen. Für das zuerst eluierende Enantiomer wurde ein Wert von $[\alpha]_D^{25} = +213$. Für das zweite Enantiomer wurde eine spezifische optische Rotation von $[\alpha]_D^{25} = -209$ erhalten.

Ebenso wurden die beiden Enantiomere mittels CD-Spektroskopie vermessen. Das Ergebnis war identisch mit Abb. 34. Die Spektren zeigten einen entgegengesetzten Cotton-Effekt.

Analog wie beim MC A (**1**), so sollte auch hier die absolute Konfiguration ermittelt werden. Daher wurden insgesamt 300 mg des MC B (**3**), hergestellt aus synthetischem NSMC (**30**), [65] präparativ aufgetrennt. Die getrennten Enantiomere wurden durch M. Charpentier mit Brom sowohl an der Isobutyrylgruppe als auch noch an der freien m-Position des Phloroglucins zweifach substituiert. Von diesem zweifach bromierten (+)-MC B (Abb. 79) wurde eine Kristallstruktur erhalten.[71] Aus dieser Struktur konnte bestimmt werden, dass es sich beim (+)-Enantiomer um die R-Konfiguration handeln muss. Folglich muss das (-)-Enantiomer die S-Konfiguration besitzen. Vergleicht man die Elutionsreihenfolge der Enantiomere auf der Reprisil Chiral mit der Reihenfolge auf der Chiralcel OD-H, so stellte man fest, dass diese umgekehrt ist.

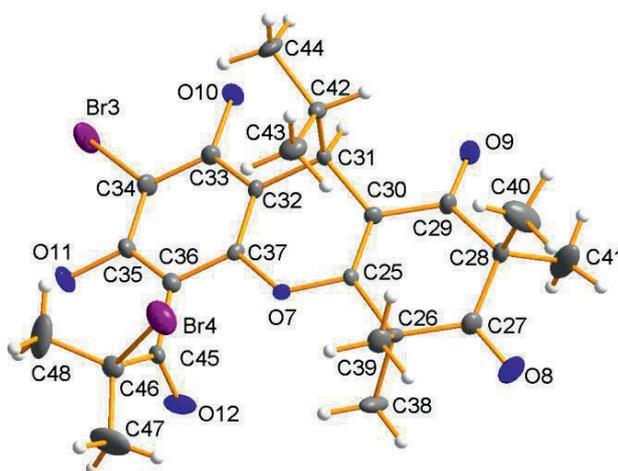


Abb. 79. Röntgenstruktur von zweifach bromiertem (+)-R-MC B. die Abbildung entstammt aus M. Hans, M. Charpentier, V. Huch, J. Jauch, T. Bruhn, G. Bringmann, D. Quandt, *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2381 – 2389. [64] [71]

Des Weiteren wurde je ein $^1\text{H-NMR}$ der getrennten Enantiomere gemessen. Wie zu erwarten unterschieden sich diese nicht voneinander und von dem racemischen MC B (**3**).

Von den mittels Reprisil Chiral getrennten Enantiomeren, wurde je ein CD-Spektrum aufgenommen. Dieses war identisch mit dem CD-Spektrum, der auf der Chiralcel getrennten Enantiomere (Abb. 34) aus der Master-Arbeit.

Wie schon beim PMCA (**2**), so konnte auch hier nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die bromierten Enantiomere des MC B (**3**) kristallisieren. Aus diesem Grunde wurde die Zusammenarbeit mit dem AK Bringmann aus Würzburg weitergeführt. In

einer analogen Methode zum PMCA (**2**), berechneten diese die CD-Spektren für die einzelnen Enantiomere von **3**. Die quantenmechanisch berechneten Spektren wurden mit den Spektren der experimentell gemessenen CD-Spektren der Enantiomeren verglichen. Das Resultat zeigt Abb. 80.

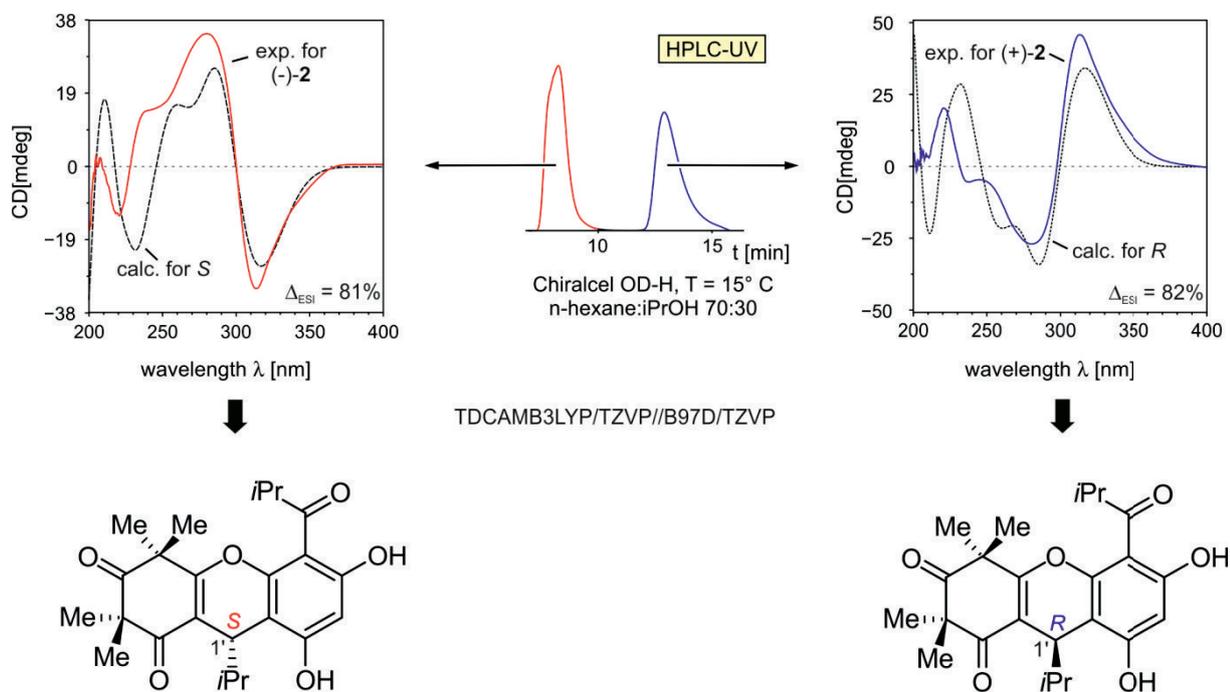


Abb. 80. Quantenmechanische Berechnung der Absolutkonfiguration von MC B (**3**). die Abbildung entstammt aus M. Hans, M. Charpentier, V. Huch, J. Jauch, T. Bruhn, G. Bringmann, D. Quandt, *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2381 – 2389.[64]

Die berechneten Absolutkonfigurationen des AK Bringmann stimmten mit der Kristallstrukturanalyse überein.

Zusammenfassung:

Durch den Wechsel der Trennsäule, von der Chiralcel OD-H auf die Reprosil Chiral NR war es möglich die beiden Enantiomere des MC B (**3**) im präparativen Maßstab zu erhalten, weil von der Reprosil Chiral NR eine semipräparative Säule zur Verfügung stand. Es war sogar möglich die Kristallstrukturen der zweifach bromierten Enantiomere des MC B (**3**) [65] zu erhalten. Die hierbei gefundenen Absolutkonfigurationen stehen in Einklang mit den Ergebnissen der quantenmechanischen Berechnung des AK Bringmann. Es konnte gezeigt werden, dass MC B (**3**) (synthetisiert aus natürlichem NSMC (**30**)) als Razemat vorliegt.

Ähnlich wie beim MC A (**1**), so kann auch hier behauptet werden, dass die unzyklisierten MCs nicht razemisch vorliegen, sondern die Razemisierung erst bei der Zyklisierungsreaktion geschieht. Dies konnte ebenso widerlegt werden durch parallele Arbeiten M. Charpentiers. [71] Um die letzten Zweifel zu beseitigen, so muss die Trennung von unzyklisiertem NSMC (**30**) realisiert werden. Da diese Trennung bereits für MC A (**1**) existierte, musste diese Trennung nun noch für NSMC (**30**) modifiziert werden.

2.10. Trennung von unzyklisiertem NSMC (**30**)

2.10.1. Arbeiten zur Trennung von unzyklisiertem NSMC (**30**)

Die Trennung des unzyklisierten NSMC (**30**) baut auf den Erkenntnissen der Trennung des unzyklisierten MC A (**1**) auf. Aus diesem Grund wurde **30** wie **1** im Laufmittel MeCN : Puffer (30 mM NH₄OAc, pH 9 DEA) 35 : 65 injiziert (Abb. 81).

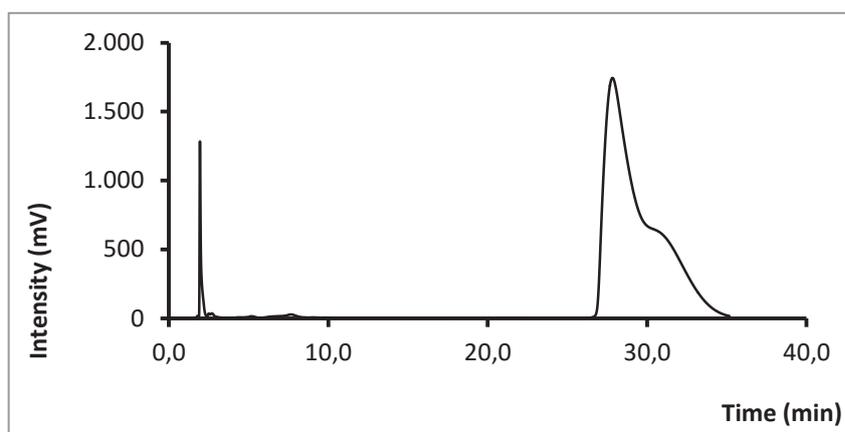


Abb. 81. Chromatogramm von NSMC (**30**).
Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (30 mM NH₄OAc, pH 9 DEA) 35 : 65 v/v.,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 2 mg/mL

Es konnten keine zwei Peaks erhalten werden. Nur ein Peak der auf halber Höhe eine Schulter zeigt. Es war also nicht möglich NSMC (**30**) im gleichen Laufmittel zu trennen wie MC A (**1**). Es wurde zunächst das Lösungsmittel variiert (MeOH oder EtOH statt MeCN), jedoch ohne Erfolg. Ebenso brachte eine Variation der Ionenstärke und des Puffersystems keinen Erfolg. Puffer wie Oxalat, Citrat, Formiat, Phosphat, etc. zeigten keine Verbesserung. Erst durch einen Wechsel des pH-Wertes vom basischen ins Saure konnte eine Trennung erreicht werden. Jedoch zeigten die beiden Peaks keine Basislinientrennung. Erst der Wechsel von MeOH

(Abb. 82) auf EtOH führte zu einer guten Trennung der beiden Enantiomere voneinander (Abb. 83).

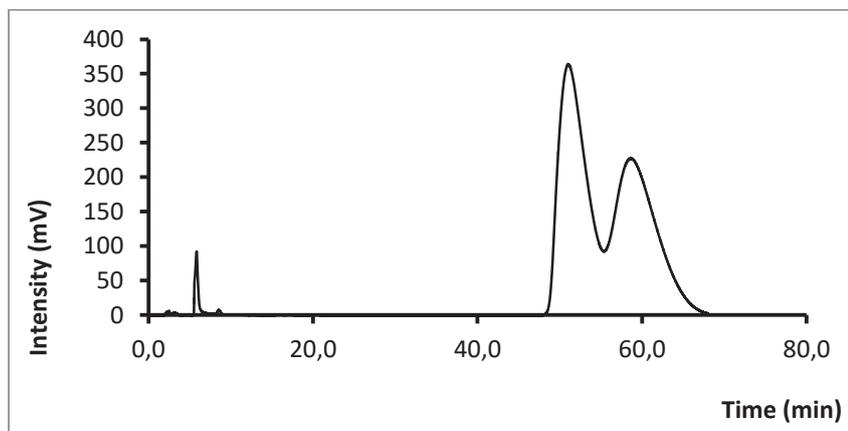


Abb. 82. Chromatogramm von NSMC (**30**).
Reprosil Chiral NR, MeOH : Puffer (30 mM NH₄OAc, pH 4 AcOH) 55 : 45 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 2 mg/mL

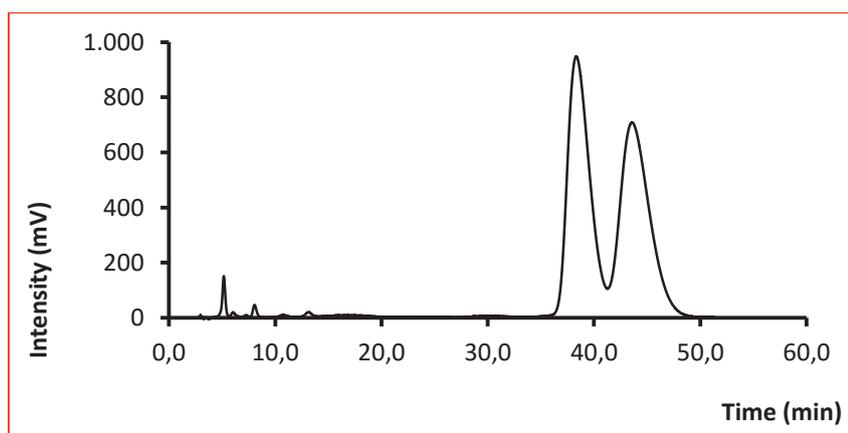


Abb. 83. Chromatogramm von NSMC (**30**).
Reprosil Chiral NR, EtOH : Puffer (150 mM NH₄OAc, pH 4 AcOH) 48 : 52 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 2 mg/mL

Im Laufmittelsystem EtOH : Puffer (150 mM NH₄OAc, pH 4 AcOH) 48 : 52 v/v konnte die Trennung von NSMC (**30**) realisiert werden. Die Integration ergab ein Peakverhältnis von 51 % zu 49 %. Somit lag auch NSMC (**30**) racemisch vor.

Um die einzelnen Enantiomere zu charakterisieren, wurde die Trennung auf die präparative HPLC übertragen. Hier war auf Grund der Viskosität des EtOH-Puffer-Gemisches der Druck in der Säule zu groß für die präparative HPLC-Pumpe, weshalb für die präparative Trennung wieder MeOH als organische

Fließmittelkomponente verwendet wurde. Die Trennung verschlechterte sich dabei. In Abb. 84 wird die präparative Trennung gezeigt. Die Peaks zeigen ein starkes Tailing und konnten nicht basisliniengetrennt fraktioniert werden.

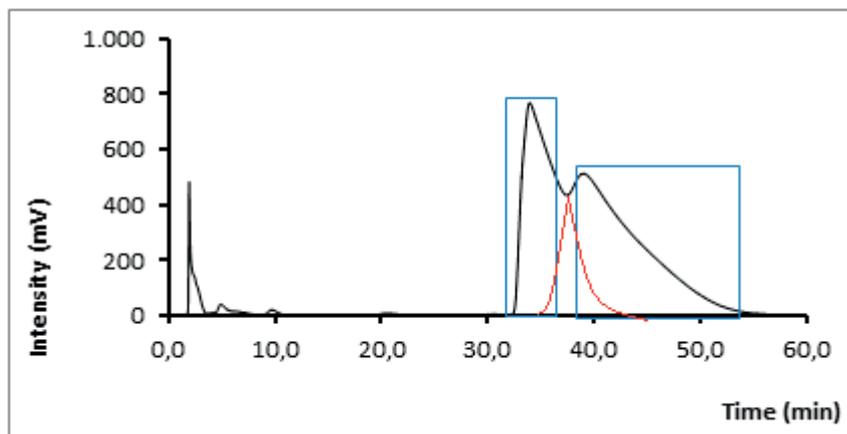


Abb. 84: Chromatogramm der präparativen Trennung in Enantiomere von NSMC (**30**)
Reprosil Chiral NR, MeOH: Puffer (150 mM NH₄OAc, pH 4 AcOH) 55 : 45 v/v,
F: 12,0 mL/min, T: rt, Inj: 3 mL, Konz: ≈ 3 mg/mL

In rot wird der theoretisch wahrscheinlichste Verlauf der beiden Peaks angedeutet. Der blau umrahmte Kasten in Abb. 84 markiert den Bereich der Peaks/Enantiomere, welcher gesammelt worden war. Die jeweils angereicherten Enantiomere mussten aus dem Puffer-Gemisch durch mehrfache Extraktion mit Diethylether vom Laufmittel abgetrennt werden. Bei dieser Aufarbeitung ging ein Teil der Ausbeute an Enantiomer in der wässrigen Phase verloren und geringe Mengen Puffer gingen in die organische Phase über. Auf Grund des Produktverlustes und der aufwendigen Abtrennung der Enantiomere aus dem Puffergemisch, wurde keine zweite präparative Trennung durchgeführt, um die Enantiomere reiner zu erhalten. Somit konnte kein 100% reines Enantiomer isoliert werden. Es konnte eine Anreicherung der Enantiomere erreicht werden. Die Anreicherung war so gut, dass aber eine CD-Kurve gemessen werden konnte. Diese Problematik tritt im weiteren Verlauf der Arbeit wieder auf und betrifft nur (unzyklisierte) Semimyrtucommulone und deren Homologe.

Da die Trennung von unzyklisierten Semimyrtucommulonen in ihre enantiomeren Bestandteile für dieses Arbeit wichtig ist, wurde nach einer besseren Methode für die präparative Trennung gesucht. Es wurden mehrere Puffersysteme ausprobiert (Tabelle 16), keines zeigte aber eine ausreichende Basislinientrennung. Es wurde

nicht nur das Puffersystem variiert, sondern auch die Ionenstärke, der pH-Wert, und MeCN wurde durch EtOH und MeOH ersetzt. Trotzdem konnte keine bessere Trennung als die in Abb. 84 gezeigte erreicht werden.

Tabelle 16. Laufmitteloptimierungen auf der Reprosil Chiral NR für die Trennung der Semimyrtucommulone in ihre Enantiomere.

Laufmittel	Trennung
MeCN 35 : Puffer 65 (30 oder 60 mM NH ₄ OAc, pH 9 DEA)	keine Trennung
MeCN 35 : Puffer 65 (30 oder 60 mM (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ , pH 9 DEA)	keine Trennung
MeCN 35 : Puffer 65 (Phosphat-Puffer pH 10)	keine Trennung
MeCN 35 : Puffer 65 (30 oder 60 mM H ₃ BO ₃ , 30 mM KCl, pH 9 0,1 M NaOH)	keine Trennung
MeCN 35 : Puffer 65 (30 oder 60 mM NH ₄ Cl, pH 9 DEA)	keine Trennung
MeCN 35 : Puffer 65 (30 oder 60 mM (NH ₄) ₂ HC ₆ H ₅ O ₇ , pH 9 NH ₃)	keine Trennung
MeCN 35 : Puffer 65 (30 oder 60 mM NH ₄ OAc, pH 4 HOAc)	Antrennung
MeCN 35 : Puffer 65 (30 oder 60 mM (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ , pH 4 HOAc)	Antrennung
MeCN 35 : Puffer 65 (Phosphat-Puffer pH 4)	keine Trennung
MeCN 35 : Puffer 65 (30 oder 60 mM NH ₄ Cl, pH 9 DEA)	schlechte Trennung
MeCN 35 : Puffer 65 (30 oder 60 mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , pH 4,5 C ₆ H ₈ O ₇)	Antrennung

Die beste Trennung der Semimyrtucommulone konnte mit dem Acetat- bzw. Zitratpuffer erreicht werden.

(Mit den vorhandenen Pufferlösungen wurde zusätzlich noch die Trennung von MC A (1) untersucht, um dort eine Optimierung zu erreichen. Diese Ergebnisse sind für die chiralen Trennungen in Kapitel 2.14 und 2.16 relevant.)

2.10.2. Charakterisierung der Enantiomere des NSMC (30)

Die Abweichung der hochaufgelösten Masse (Tabelle 17) lag deutlich kleiner 5 ppm. Somit handelt es sich um akzeptable Werte. Die spezifische optische Rotation wurde mit 7 mg jeden Enantiomeres in 1 mL MeOH gemessen. Es war nun möglich den Peaks eine spezifische optische Rotation zuzuordnen. Die Messung der CD-Spektren erfolgte mit einer Lösung von je 1 mg/mL in MeOH. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Charakterisierung der Enantiomere von NSMC (30).

Charakterisierung	NSMC Enantiomer 1	NSMC Enantiomer 2
HR-MS(ESI (-))	431,2079	431,2080
Abweichung	2,22 ppm	2,48 ppm
berechneter Wert	431,2075	431,2075
Spezifische optische Rotation $[\alpha]_D^{25}$ 7 mg/mL in MeOH	-18,6	+19,23
CD-Spektren	Abb. 85	Abb. 85

Als Resultat erhielt man für das (-)-R--Enantiomer und das (+)-S-Enantiomer einen entgegengesetzten Cotton-Effekt (Abb. 85). Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der getrennten Enantiomere zeigte wie zu erwarten keine Unterschiede im Vergleich mit dem Spektrum von **30**.

Mit der Entwicklung der Trennmethode für NSMC (**30**) und mit der Methode für MC A (**1**) konnten nun Myrtucommulone und Semimyrtucommulone aufgetrennt werden. Es war nun möglich ohne Zyklisierungsschritt das Enantiomerenverhältnis zu bestimmen. Somit konnte mit viel weniger Probenmaterial gearbeitet werden und eine schnellere Analytik durchgeführt werden.

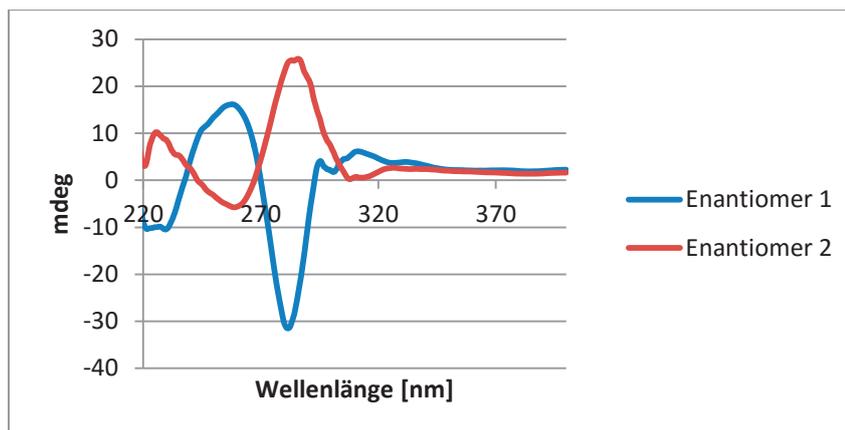


Abb. 85. CD-Spektren der einzelnen Enantiomere von NSMC (**30**).
(zur besseren Vergleichbarkeit in einem Diagramm Dargestellt)

2.11 Untersuchung zum Razemisierungsverhalten von NSMC (**30**)

Die Problematik der Razemisierung/Epimerisierung wurde bereits beim MC A (**1**) ausführlich diskutiert. Da NSMC (**30**) aus zwei Enantiomere besteht, kann es keine Epimerisierung geben, sondern nur eine Razemisierung. Die Razemisierung würde analog zu den drei Mechanismen in Punkt 2.6 beschriebenen ablaufen. Daher wurde von Verbindung **30**, ein kurzer Test auf ihr Razemierungsverhalten durchgeführt. Bei Abb. 86 handelt es sich um enantiomeren angereichertes NSMC (**30**) (MAC471) [65]. Chromatographisch wurde ein Peak-Flächenverhältnis der Enantiomere zu einander von 12,2 % zu 87,8 % (ee=75,6) ermittelt. Dieses wurde nach der Vorschrift in Abb. 212 zyklisiert. Danach konnte ein Peak-Flächenverhältnis von 13,1 % zu 86,9 % (ee=73,8) (Abb. 87) wiedergefunden werden. Dieses Ergebnis bestätigt nochmal die in Punkt 2.6 festgestellten Ergebnisse. Die Zyklisierungsreaktion hat keinen Einfluss auf das Verhältnis der Enantiomere und führt folglich nicht zu Razemierungen. Dies trifft sowohl auf MC A (**1**) als wie auch auf NSMC (**30**) zu.

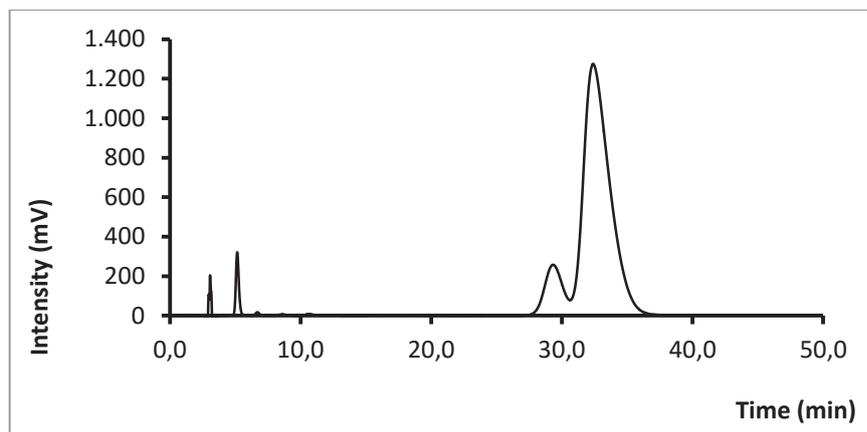


Abb. 86. Chromatogramm von NSMC (30). [65]
Reprosil Chiral NR, EtOH : Puffer (150 mM NH₄OAc, pH 4 AcOH) 48 : 52 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 2 mg/mL

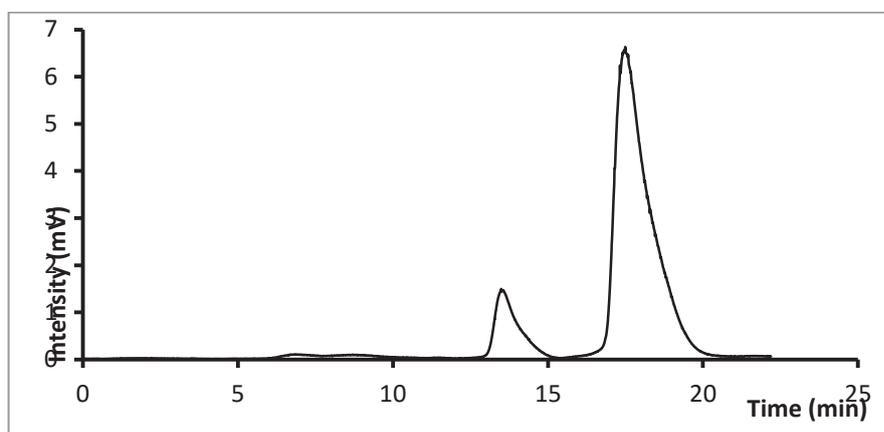


Abb. 87. Chromatogramm MC B (3).
Reprosil Chiral NR, n-Hexan : iso-PrOH 95 : 5 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 2 mg/mL

2.12 TAPA-Säule

Parallel zu den Trennungen mit kommerziellen Säulen, wurde an der Herstellung einer TAPA-Säule gearbeitet um das Trennproblem der unzyklisierten MCs zu lösen. Es war zu Beginn der Arbeiten nicht abzusehen, welcher Weg schneller zum Ziel führen würde. Aus diesem Grund wurde an 2 Trennmethode(n) geforscht.

2.12.1. Synthese von TAPA (28, 29)

Die Synthese von TAPA (**28**, **29**) erfolgte in abgewandelter Form zur Literatur von N. Newman, H. Boden und P. Block.[50], [52], [110] Die Synthese (Abb. 88) startete mit 9-Fluorenon (**31**), welches mit einem Gemisch aus konzentrierter Schwefelsäure und rotrauchender Salpetersäure, unter Rückfluss 8,5 h lang zu 2,4,5,7-Tetranitro-9-fluorenon (**32**) umgesetzt wurde. Die Ausbeute betrug 68%. Das entstandene Produkt wurde mittels NMR-Spektroskopie identifiziert (die NMR-Daten werden in Kapitel 3.3. aufgelistet und können mit der jeweils angegebenen Literatur verglichen werden). Die Reaktion verlief wie in der Literatur beschrieben sehr gut. Jedoch stellten der Umgang mit heißer Nitriersäure und das spätere Quenchen auf Eis höchste Ansprüche an die Sicherheitsvorkehrungen und eine permanente Gefahr dar.[53]

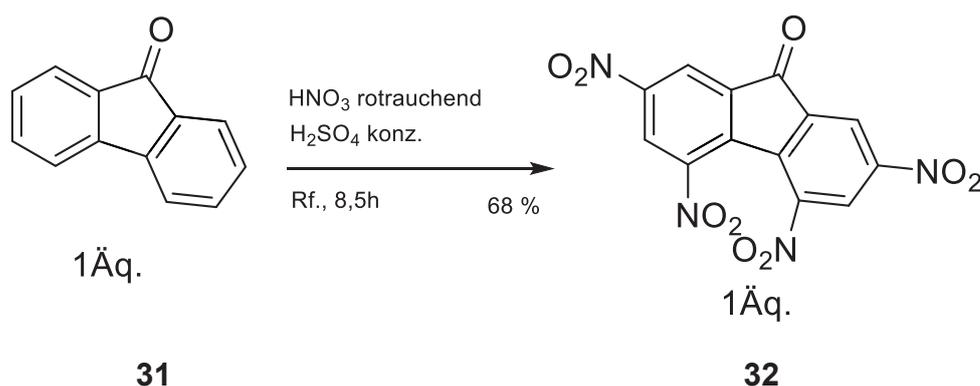


Abb. 88. Synthese von 2,4,5,7-Tetranitro-9-fluorenon (**32**)

Die Synthese (Abb. 89) der (\pm)- α -(Isopropylidenaminoxy)propionsäure (**36**) erfolgte in 4 Stufen. In einem parallelen Ansatz wurde Acetonoxim (**33**) und Ethyl- α -brompropionat (**34**) in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit Natriummethanolat bei 0°C mit einer Ausbeute von 81% umgesetzt. Das destillativ gereinigte Produkt **35** wurde NMR-

Spektroskopisch nachgewiesen. Der entstandene α -(Isopropylaminooxy)-propionsäureethylester (**35**) wurde mit Natronlauge zur α -(Isopropylaminooxy)-propionsäure (**36**) verseift (Ausbeute 87%) und konnte im NMR identifiziert werden.

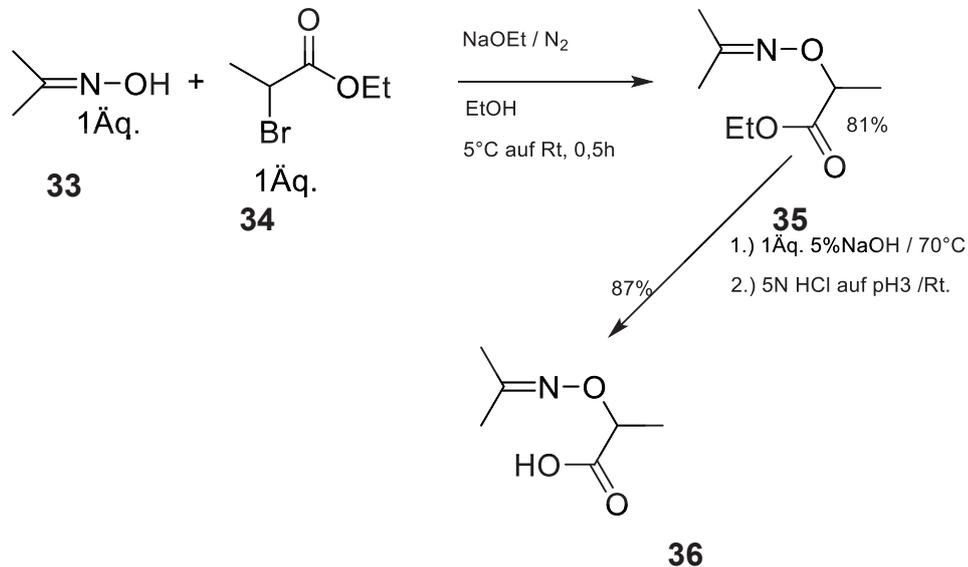


Abb. 89. Synthese von (\pm)- α -(Isopropylidenaminooxy)propionsäure (**36**)

Zur Trennung (Abb. 90) der Enantiomere wurde **36** mit (-)-Ephedrin-monohydrat (**37**) in die diastereoisomeren Salze überführt, die durch Kristallisation auf Grund unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften getrennt werden konnten. Dazu wurde das in Ethylacetat gelöste Salz im Kühlschrank für 7 h aufbewahrt. Das (-)-Salz kristallisierte mit watteartiger Konsistenz aus und wurde über einer Fritte abgesaugt. Dieser Schritt stellte sich jedoch als nicht effizient genug in Bezug auf den d_e -Wert heraus und die Kristallisation musste mehrfach durchgeführt werden, um eine Diastereomerenreinheit von $> 95\%$ für die Ephedrinsalze zu erhalten.[52] Das (+)-Salz wurde durch Zugabe von Petrolether (1:1 v/v) zur Mutterlauge und anschließend weiteren 7h im Kühlschrank, als kleine harten Nadeln erhalten. Dieses musste ebenso mehrfach umkristallisiert werden, um einen d_e -Wert von mindestens 95 % zu erreichen. Durch das mehrfache Auskristallisieren wurde eine Zeit von fast einer Woche benötigt, um einen genügend hohen d_e -Wert zu bekommen. Anstelle der Messung der optischen Aktivität wurde der d_e -Wert mittels ¹H-NMR Spektroskopie bestimmt. Dieses Verfahren ist zeitgemäßer und benötigt weniger Probensubstanz und Zeit. Im NMR konnte dieser Wert sehr genau bestimmt werden.

Nach Abspaltung des (-)-Ephedrins (**37**) wurde eine Ausbeute von 42 % für die (-)-Säure **38** und 41% für die (+)-Säure **39** über beide Stufen erzielt. Das $^1\text{H-NMR}$ und das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum waren wieder identisch mit den NMR-Spektren von (**36**).[52]

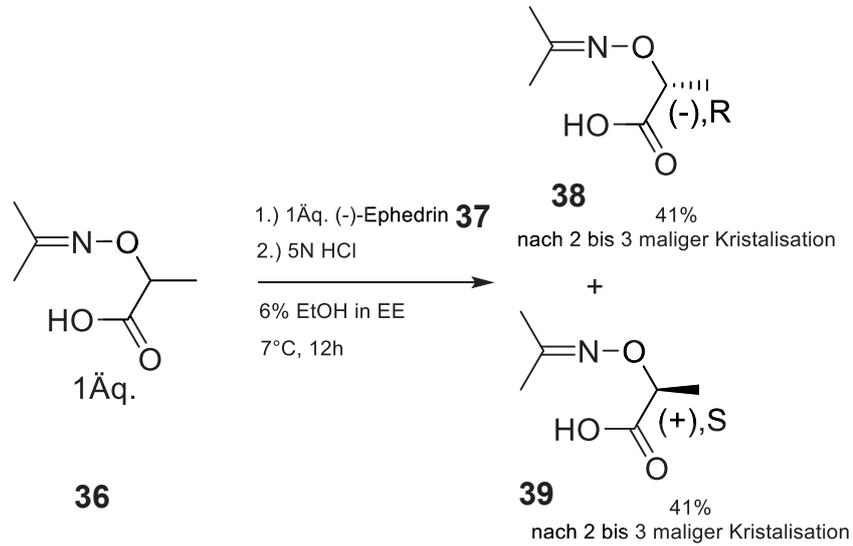


Abb. 90. Enantiomerentrennung von (\pm)- α -(Isopropylidenaminoxy)propionsäure (**36**)

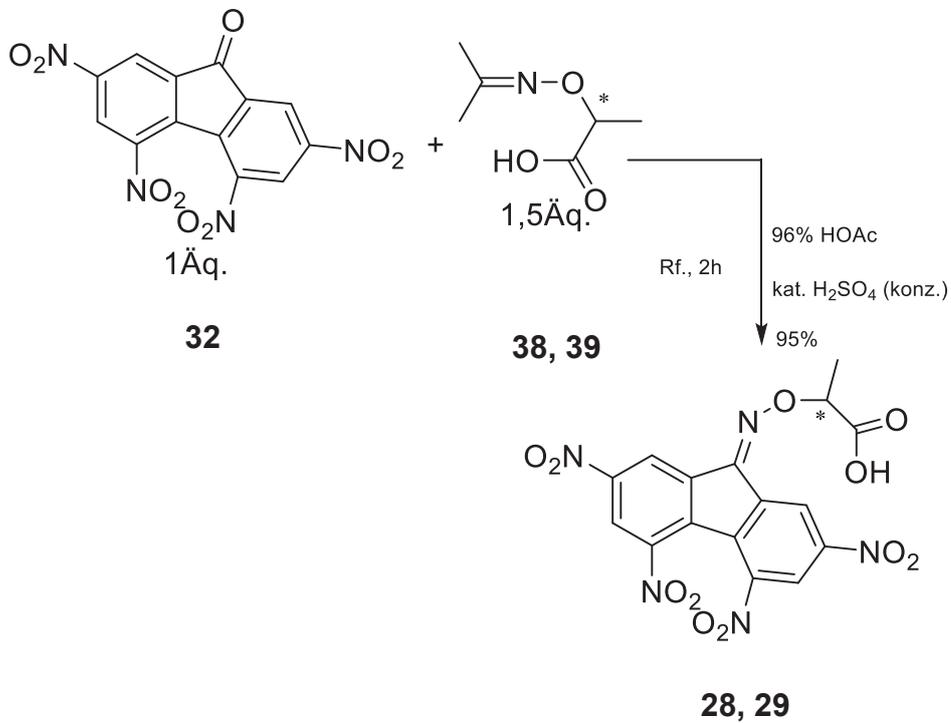


Abb. 91: Synthese von TAPA (**28, 29**)

2,4,5,7-Tetranitro-9-fluorenol (**32**) wurde zusammen mit **38** bzw. **39** in Essigsäure in Gegenwart katalytischer Mengen Schwefelsäure 2 h lang unter Rückfluss (Abb. 91) erhitzt. Durch Umoximierung entstand (+)-TAPA (**29**) bzw. (-)-TAPA (**28**) als gelber Feststoff mit 95 % Ausbeute.

2.12.2. Charge-Transfer-Komplexe

Nach der erfolgreichen Synthese von enantiomerenreinem TAPA (**28**) wurde die Ausbildung von Charge-Transfer-Komplexen mit anderen elektronenreichen Substanzen getestet (siehe Punkt 1.6.5.3). Die dabei auftretende farbliche Veränderung beim Komplexieren konnten sowohl mit bloßem Auge wahrgenommen, als auch durch Aufnahme von UV-Vis-Spektren detektiert werden. Für die optische Wahrnehmung der Farbänderung zeigte Aceton als Lösungsmittel die besten Eigenschaften.



Abb. 92. CT-Komplex von (-)-TAPA (**28**) und Anthracen

In Abb. 92 wird eine Lösung von einem Äquivalent (-)-TAPA (**28**) in Aceton und ein Äquivalent Anthracen in Aceton gezeigt. Das mittlere Glas zeigt die Mischfarbe aus gelbem (-)-TAPA (**28**) und klarem Anthracen. Das resultierende rot-braun zeigt die Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes.

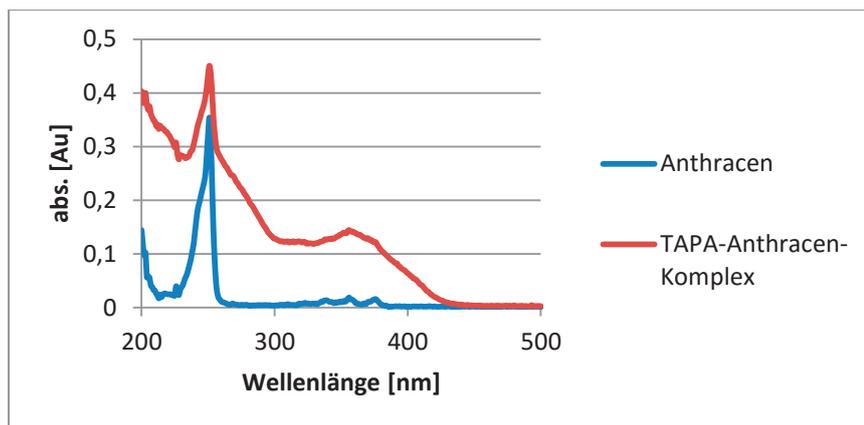


Abb. 93. UV/Vis-Spektrum des TAPA-Anthracen-Komplex

Das UV/Vis-Spektrum von Anthracen und TAPA (**28**) (Abb. 93) zeigt eine deutliche bathochrome Verschiebung. Es entsteht ein π -Donor-Akzeptor-Komplex (Abb. 94).

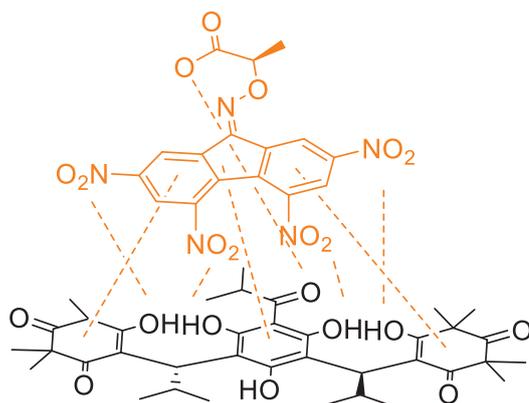


Abb. 94. Mögliche Darstellung des Charge-Transfer-Komplexes von (-)-TAPA (**28**) und MC A (**1**)

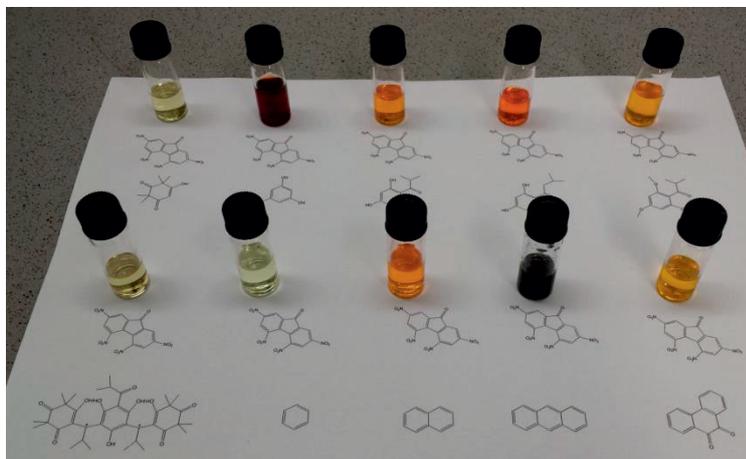


Abb. 95: Charge-Transfer-Komplexe von TAPA (**28**) mit verschiedenen Verbindungen

In Abb. 95 werden die Charge-Transfer-Komplexe von elektronenreichen Verbindungen mit 2,4,5,7-Tetranitro-9-fluorenon (**32**) in Aceton abgebildet. Bei den meisten Testverbindungen handelte es sich um in Lösung farblose Flüssigkeiten. (Beispiele für Verbindungen: Benzol, PMCA (**2**), Syncarpinsäure, MC B (**3**), Phenol, Phloroglucin, Phenanthren, Isobutyrylphloroglucin (**23**), Naphthalin, Naphthalinsulfonsäure, Resorcin, NSMC (**30**), 1,3,5-Trihydroxybenzol, Pyrokatechol, Anilin, Anthracen, Hydrochinon, Pyrogallol, MC A (**1**)...). Die Substanzen waren in der Regel elektronenreiche Aromaten. Isobutyrylphloroglucin (**23**) ein wichtiger Bestandteil des MC A (**1**) zeigte eine Verschiebung ins Rote hinein, MC B (**3**) ins Tiefgelbe, NSMC (**30**) ins Rote und MC A (**1**) ins Tiefgelbe. Anhand dieser Farbumschläge ist klar, dass die Substanzklasse der MCs eine Wechselwirkung mit TAPA (**28**) zeigen. Ob die Stärke der Wechselwirkungen für eine Trennung der Enantiomere genügt, musste in Versuchen getestet werden.

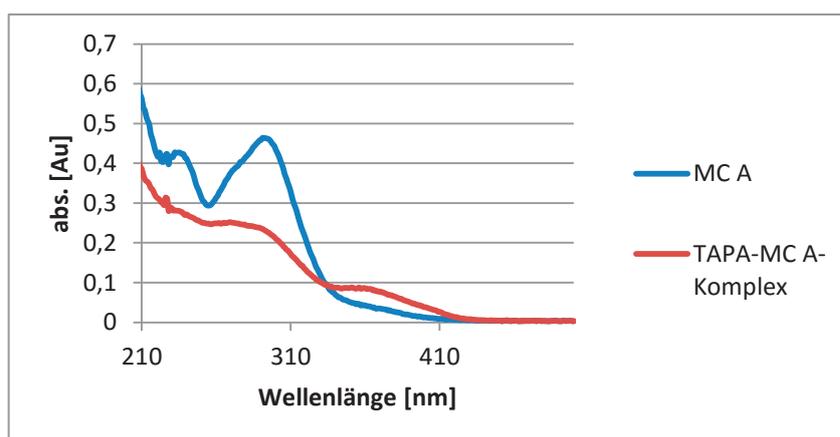


Abb. 96. UV/Vis-Spektrum von MC A-TAPA-Komplex.

In Abb. 96 wird das UV/Vis-Spektrum von TAPA und MC A (**1**) im Komplex gezeigt. Wie beim Anthracen kommt es auch bei MC A (**1**) zu einer bathochromen Verschiebung. Die Intensität des ursprünglichen MC A-Peaks ist allerdings nicht vollständig verschwunden. Grund dafür könnte sein, dass nur ein Enantiomer des Myrtucommulon A (**1**) mit einem Enantiomeren des TAPA (**28**, **29**) wechselwirken kann und das andere Enantiomer isoliert vorliegt. Dies wäre der Idealfall für eine chromatographische Enantiomerentrennung. Oder die Wechselwirkung mit MC A (**1**) ist nur sehr schwach, so dass im Idealfall eine Antrennung der Enantiomere beobachtet werden könnte.

2.12.3. Derivatisierung von Kieselgel

Als Trägermaterial für den chiralen Selektor (-)-TAPA (**28**) wurde Kieselgel verwendet, das mit dem Linker Aptes (**40**) verknüpft worden war.

Sphärisches Kieselgel (60 Å, 10 µm) wurde mit 20 %iger Salzsäure 2 h unter Rückfluss erhitzt (Abb. 97) und anschließend mit H₂O und MeOH neutral gewaschen und im Trockenschrank unter reduziertem Druck getrocknet. Diese Behandlung war notwendig um mehr freie Hydroxylgruppen im Kieselgel zu erhalten. Man spricht von Aktivierung. Das aktivierte Kieselgel wurde in einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer und Toluol aufgeschlämmt. Wenige Tropfen Wasser und pTsOH wurden hinzugefügt und anschließend Aptes (**40**) schnell hinzugegeben. Die Mischung wurde für 16h unter Rückfluss gerührt.[54], [43], [111], [46]

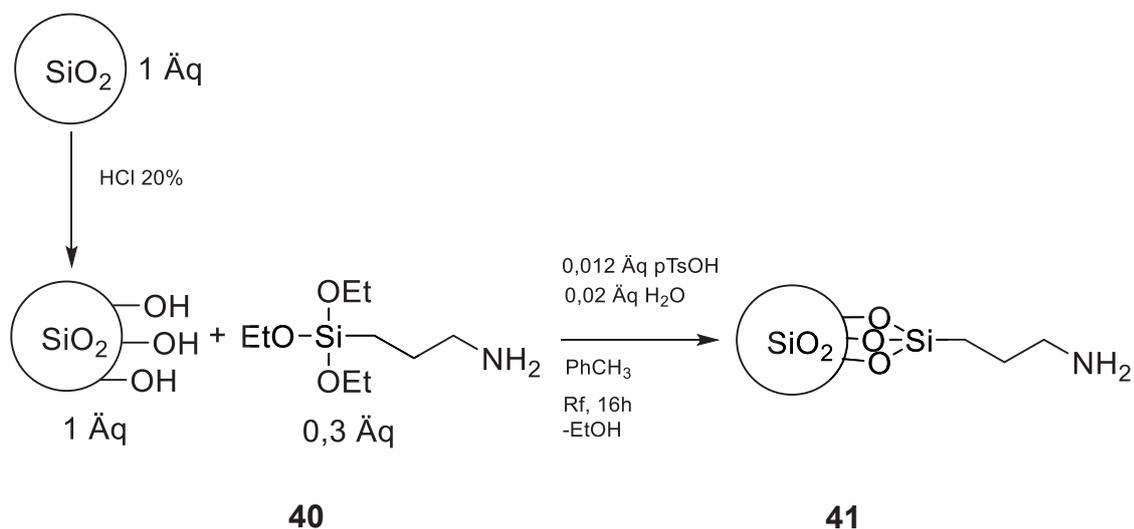


Abb. 97. Anbindung von Aptes (**40**) an Kieselgel

Das Lösemittel wurde vom Kieselgel abgesaugt und mit H₂O, MeOH (0,1 % TFA), MeOH : H₂O (1 : 1, v/v), MeOH und DCM nachgewaschen.[46], [37] Das derivatisierte Kieselgel **41** wurde über Nacht bei 70° C getrocknet. Vom fertigen Produkt wurde eine Elementaranalyse erstellt: C: 8,28 H: 2,21 N: 2,57. Zum Abgleich wurde Literatur verwendet.[54], [56], [78] [39], [45] Vor allem hing die abreagierte Menge an Linker stark von der Güte der Aktivierung und der Beschaffenheit des Kieselgels ab. Die hier angegebenen Werte der Elementaranalyse lagen in einem leicht erhöhten Bereich, jedoch in gutem Einklang mit üblichen Werten. Im Weiteren wurde das derivatisierte Kieselgel **41** durch IR-Spektroskopie (Abb. 98) untersucht.

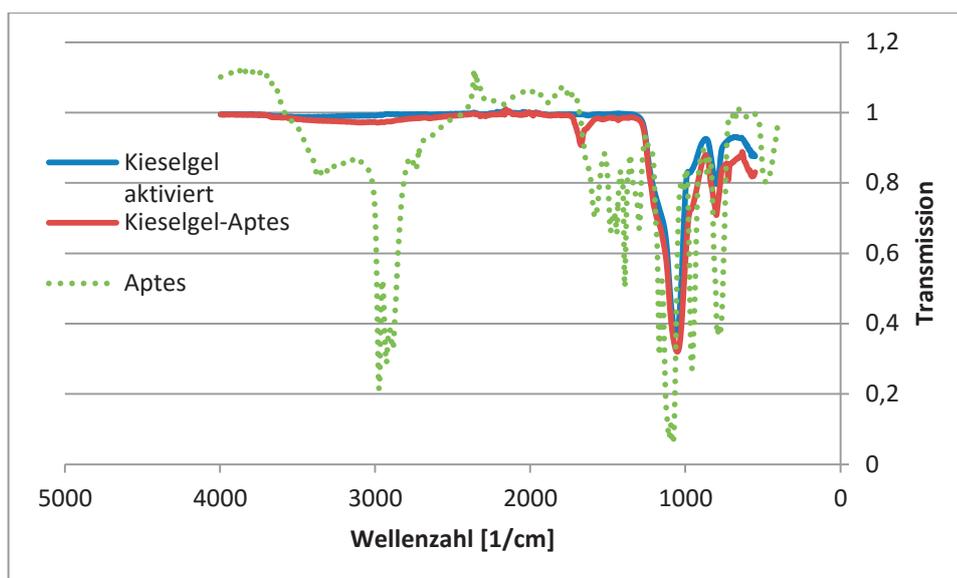


Abb. 98: IR-Spektrum von Kieselgel-Aptes (41).

Tabelle 18: Schwingungen des IR-Spektrum von Kieselgel-Aptes (41).

Substanz	Wellenzahl [1/cm]	Funktionelle Gruppe
Kieselgel	1051	-Si-O
	3450	-Si-OH
Aptes	1390	-CH ₂ (δ)
	2900	-CH ₂ (ν)
	2980	-NH ₂

Aktiviertes Kieselgel zeigte keine charakteristischen Peaks (Tabelle 18). Nur im Fingerprint-Bereich erkennt man die typischen Signale. Aptes (40) zeigt als charakteristische Schwingung sehr deutlich die NH₂-Gruppe und die Methylenschwingungen. Da derivatisiertes Kieselgel 41 aus maximal 0,3 Äquivalenten Linker synthetisiert worden war und ein Großteil der Linkermoleküle sich im Poreninneren befinden, kann man im IR keine deutlichen Banden finden, außer die der Methylengruppe bei 1390 1/cm. Zwischen 2700 und 3400 1/cm war eine leichte Wölbung wahrnehmbar, welche aus den Aminogruppen resultieren kann. Im ¹³C-Festkörper-NMR konnten die Signale der Alkylkette des Aptes (40) gefunden werden. Bei der Reaktion handelte es sich um eine Kondensationsreaktion. Die Silanolgruppe von 40 bildete unter Abspaltung von EtOH eine Siloxanbrücke mit dem Kieselgel aus. Aus dem ²⁹Si-NMR (siehe experimentellen Teil) konnte

festgestellt werden, dass überwiegend 2 bis 3 Silanolgruppen eine Brücke zum Kieselgel ausgebildet haben. Anhand der durchgeführten Analysemethoden konnte die erfolgreiche Anbindung des Linkers an das Kieselgel festgestellt werden. Nur so können die nächsten Schritte zur TAPA-Säule erfolgreich sein.

2.12.4. Anbindung des chiralen Selektors an Kieselgel

Folgt man der Literatur [58], so müsste das derivatisierte Kieselgel in CHCl_3 mit DCC an TAPA (**28**, **29**) gekuppelt werden können.[54] Beim nachsynthetisieren dieser Vorschrift erhielt man schwarzes Kieselgel als Ergebnis. Analysen dieses Materials zeigten, dass der chirale Selektor (**28**, **29**) bei der Reaktion zerstört worden war. Die Eigenschaft CT-Komplexe zu bilden war nicht mehr vorhanden. Bei der Suche nach einer Lösung dieses Problems, konnte festgestellt werden, dass TAPA (**28**, **29**) absolut instabil in Gegenwart von Basen reagierte. Die Basizität von DCC bzw. Aptes (**40**) reichte aus um (**28**, **29**) zu zerstören. Eine mögliche Nebenreaktion könnte die nucleophile Substitution der Nitrogruppe gewesen sein. Nur Chelysheva et al.[112] berichteten über die Reaktion von 2,4,5,7-Tetranitro-9-fluorenol (**32**) mit Aminen und beschreiben die Reaktionsprodukte als dunkelbraunen Niederschlag. [113] Daher wurde an Stelle von Aptes (**40**), Gptms (**42**) und Cl-Ptms (**43**) (Abb. 99) eingesetzt.[114], [115] [116], [117], [118], [119] Jedoch gestaltete sich die Kupplung des TAPA (**28**, **29**) an einen der beiden Linker als sehr schwierig, weshalb Aptes (**40**) sich als der geeignetere Linker erwies (Abb. 99). Die Öffnung des Epoxides an **42** würde zu einem neuen Chiralitätszentrum führen, was zu Schwierigkeiten bei der späteren Trennung führen könnte. Bei Verbindung **43** war es sehr schwer TAPA (**28**, **29**) auf geeignete Weise an das freie Chloratom zu binden. Eine erste wichtige Änderung war das digerieren des Kieselgels mit saurem MeOH (0,1 % TFA).[46] Dadurch konnte ein deutlich größerer Teil des physisorbiertem Aptes (**40**) vom Kieselgel gelöst werden und die Anzahl der basischen Aminogruppen sank.

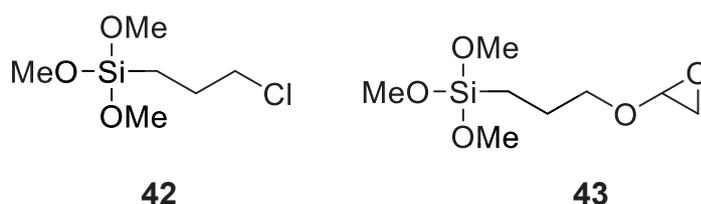


Abb. 99. Gptms (**43**) und Cl-Ptms (**42**)

Um TAPA (**28**, **29**) vor der Basizität der Aminogruppe des Aptes (**40**) noch besser zu schützen, wurde diese mit δ -Valerolacton (**44**) bzw. γ -Butyrolacton (**45**) umgesetzt (Abb. 100). Die neu entstandene freie OH-Gruppe konnte dann mittels DCC an TAPA (**28**, **29**) gekuppelt werden (Abb. 100).[120], [121]

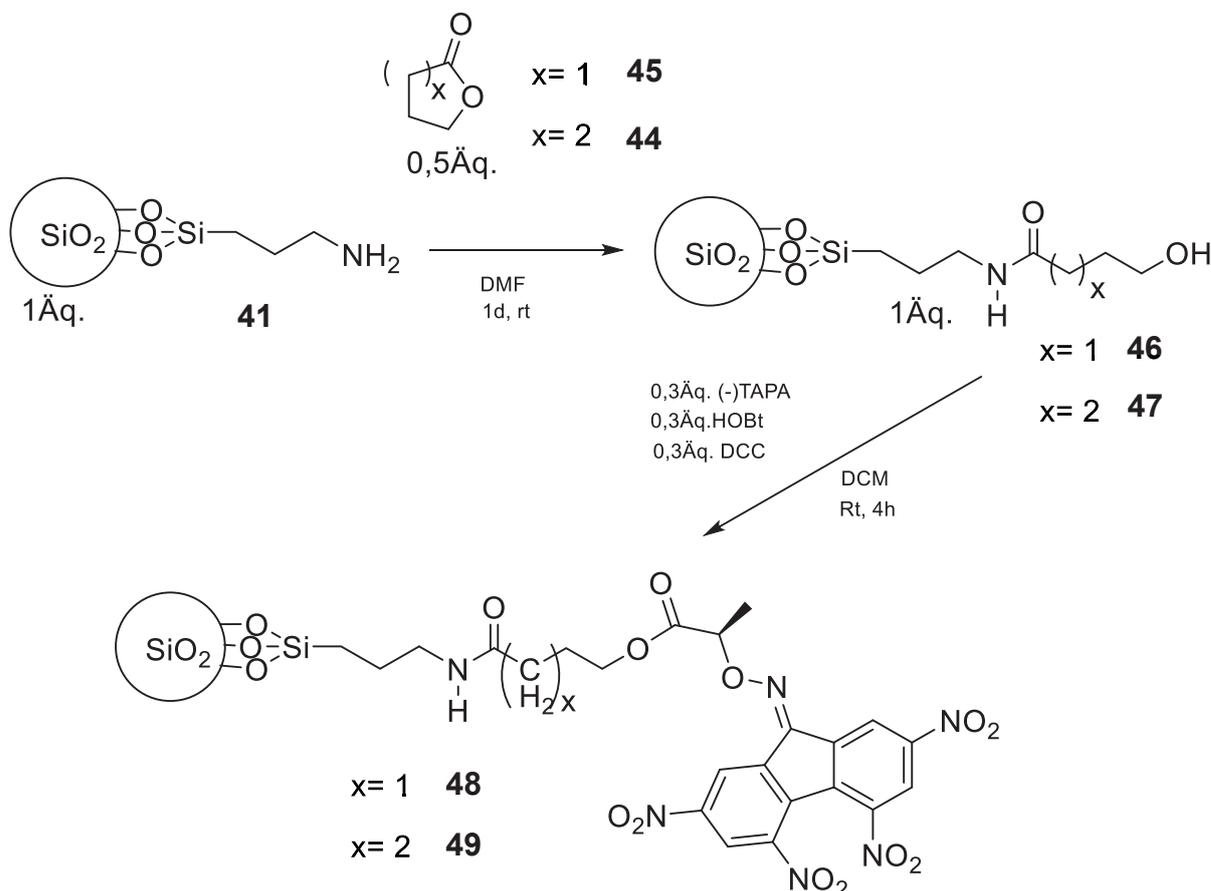


Abb. 100: Reaktion von SiO₂-Aptes mit δ -Valerolacton (**44**) und γ -Butyrolacton (**45**) und Synthese von SiO₂-Aptes-Butanamid-TAPA (**48**) / SiO₂-Aptes-Pentanamid-TAPA (**49**)

Die Kupplung von TAPA (**28**, **29**) an **46** / **47** mittels DCC und HOBt verlief ohne Schwierigkeiten.[122], [123] Jedoch handelte es sich dabei nicht mehr um eine klassische TAPA-Säule wie in der Einleitung beschrieben. Es war fraglich ob diese Säule auch in der Lage wäre eine chirale Trennung durchzuführen. Aus diesem Grund wurde weitergeforscht, TAPA (**28**, **29**) direkt an den Aptes-Linker (**41**) zu binden. Es wurde daher ein Ersatz für das Kupplungsreagenz DCC gesucht. Alternativ wurden, N-Hydroxysuccinimid, HOBt, CDI, DMAP und EDC untersucht.[124], [125], [126] [127], [128] Mit allen gelang die Kupplung in mehr oder weniger guten Ausbeuten. Jedoch neigten manche Kupplungsreagenzien mehr zur Razemisierung als andere. Eine Razemisierung würde die chirale Trennung gänzlich

unmöglich machen. Um dies auszuschließen wurde nach Literaturrecherche EEDQ als Kupplungsreagenz eingesetzt.[48] [129], [130], [131], [132], [133]

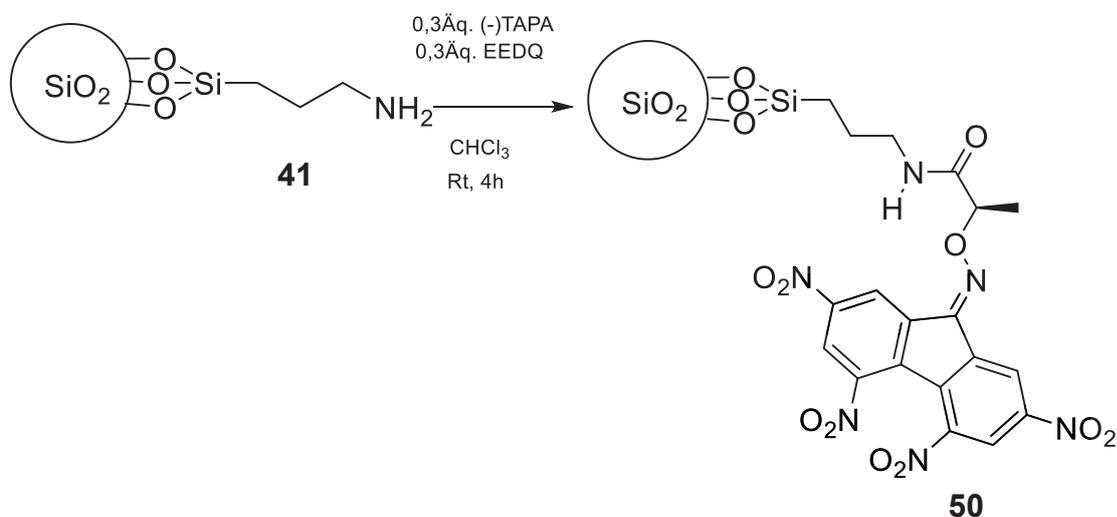


Abb. 101. Synthese von S-TAPA (**50**) an Kieselgel

Durch die Erkenntnisse aus den verschiedenen Variationen in der Synthese gelang es nun die TAPA-Säule so zu synthetisieren, dass bei der Kupplungsreaktion keine Zerstörung des TAPAs (**28**, **29**) mehr auftritt.

Dazu wurde SiO₂-Aptes (**41**), welches zu vor mit saurem MeOH digeriert wurde, in absolutiertem Chloroform mit (-)-TAPA (**28**) und EEDQ bei Raumtemperatur umgesetzt.[134], [46] Die Reaktion (Abb. 101) rührte 4h lang am KPG-Rührer. Anschließend wurde das Lösemittel vom Kieselgel entfernt und mehrfach gewaschen. Zurück blieb ein helles weiß-gelbes Pulver **50**. Die Elementaranalyse ergab C: 12,96%, H: 2,46%, N: 3,84%. Dies passte gut zu den Werten von Diack.[58] Des Weiteren wurde ein IR-Spektrum von **50** aufgenommen. (Abb. 102) Zur besseren Verständlichkeit wurden die IR-Spektren (Abb. 102) von (-)-TAPA (**28**) und SiO₂-Aptes (**41**) mit abgebildet. Die Veränderung durch die Kupplung des chiralen Selektors ist gut zu erkennen. Die Banden werden in Tabelle 19 aufgelistet.

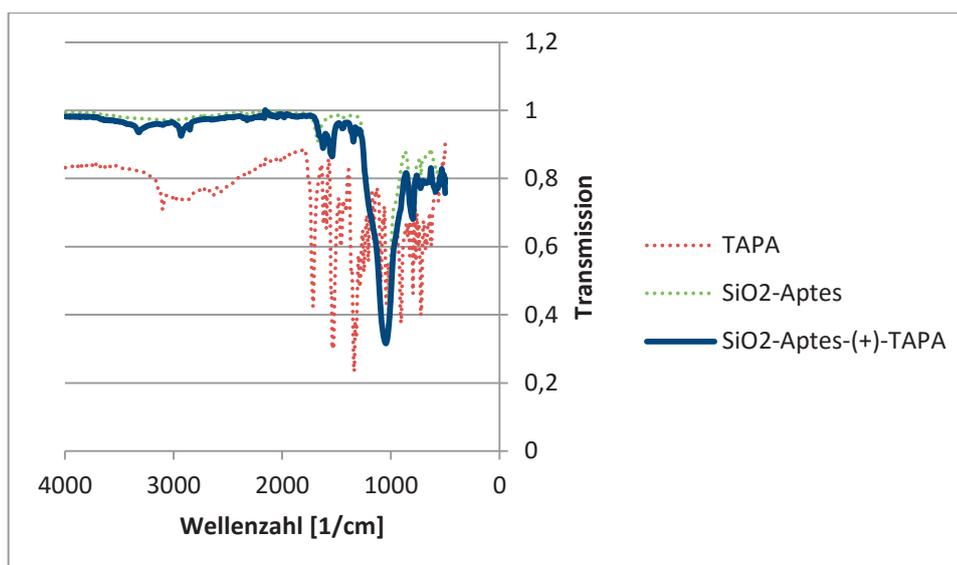


Abb. 102. IR-Spektrum von (**50**). Zum Vergleich wurde das IR-Spektrum von TAPA (**28**) und dem SiO₂-Aptes (**41**) mitabgebildet.

Tabelle 19: Schwingungen des IR-Spektrum von (**50**).

Wellenzahl [1/nm]	funktionelle Gruppe
1089	-C-N
1450	-NO ₂ (v sym.)
1547	-NO ₂ (v asym.)
1620	-C=C-
1717	-C=O

Von Substanz **50** wurde ein ¹³C-Festkörper- und ein ²⁹Si-Festkörper-NMR gemessen (siehe experimenteller Teil). Die NMR-Spektren zeigen, dass die Immobilisierung des chiralen Selektors an Kieselgel erfolgreich war.



Abb. 103. Charge-Transfer-Versuche mit **50**.

In Abb. 103 wurde Verbindung **50** in Aceton aufgeschlämmt und in einem Gefäß Anthracen und in dem anderen Phloroglucin hinzugegeben. An der Farbänderung konnte die Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes festgestellt werden. In Anbetracht der durchgeführten Analysen von **50**, kann die hier hergestellte Stationärphase als ordentlich und korrekt synthetisiert betrachtet werden.

2.12.4.1. Einschub: Synthese einer Pirkle-Phase

Durch die Synthese des TAPA-Kieselgels und der damit verbundenen Literaturrecherche, war die Idee aufgekommen, eine Pirkle-Phase herzustellen. Mit den bisher gemachten Kenntnissen sollte dies nicht allzu schwierig sein. Analog wurde CSP2 (Abb. 20) hergestellt.[48] Sowohl SiO₂-Aptes (**41**) war verfügbar, als auch **53** konnte sehr leicht durch Reaktion von **52** mit **51** (Abb. 104) synthetisiert werden. Die Kupplung des chiralen Selektors an Kieselgels erfolgte analog zu Abb. 101 mit EEDQ.[47] [131], [132], [133] Die Analyse des Produktes erfolgte mittels Elementaranalyse, IR-Spektroskopie und ¹³C-Festkörper-NMR und zeigte das CSP2 erfolgreich hergestellt worden war. Somit konnte schnell und günstig eine weitere HPLC-Säule gewonnen werden, mit der die Trennung des MC A (**1**) untersucht werden konnte.

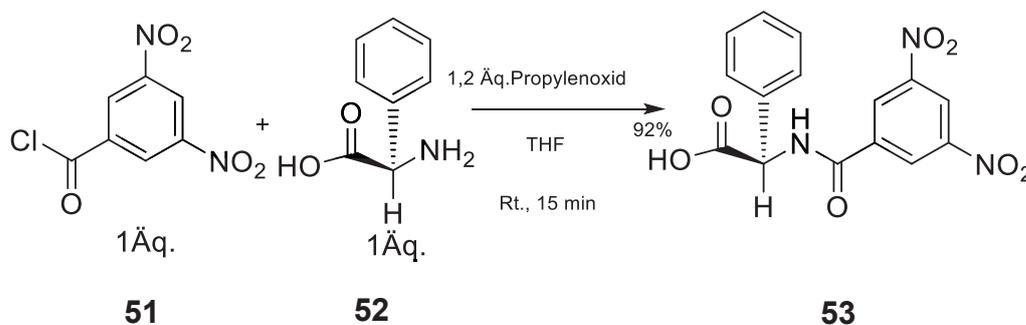


Abb. 104. Synthese von D-N-(3,5-Dinitrobenzoyl)phenylglycin (**53**).

2.12.4.2. Packen der HPLC-Säule

Um das fertig derivatisierte Kieselgel (**50**) mittels eines Packungstopfes (Abb. 238) in eine 210 mm x 4,4 mm ID. Stahlsäule zu packen, musste ein geeignetes Laufmittel zum Packen gefunden werden. Hilfreich dabei war Literatur [111] und [46]. Es wurden Lösemittelkombinationen aus CCl₄, iso-PrOH, Dioxan, Tetrachlorethan,

Tetrabromethan und MeOH untersucht. Als bestes Gemisch stellte sich Tetrachlorethan : iso-PrOH 25 : 10 (v/v) heraus. Dieses Gemisch war sowohl sehr viskos als auch besaß es eine hohe Dichte. Das Kieselgel wurde in diesem Gemische aufgeschlämmt und 2 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert. Das aufgeschlämmte Kieselgel wurde bei 220 bar Druck in die Säule gepackt. Dieser hohe Druck war sehr wichtig, da nur so die fertige Säule bei ebenso hohem Druck benutzt werden konnte und damit eine feste und homogene Packungsdichte daraus resultieren konnte. Die Säule wurde beidseitig verschlossen und konnte nun verwendet werden.

Um die Funktionsfähigkeit der Säule zu überprüfen, wurde die Testsubstanz 1,1-Binaphthyl-2,2-diol verwendet.[135]

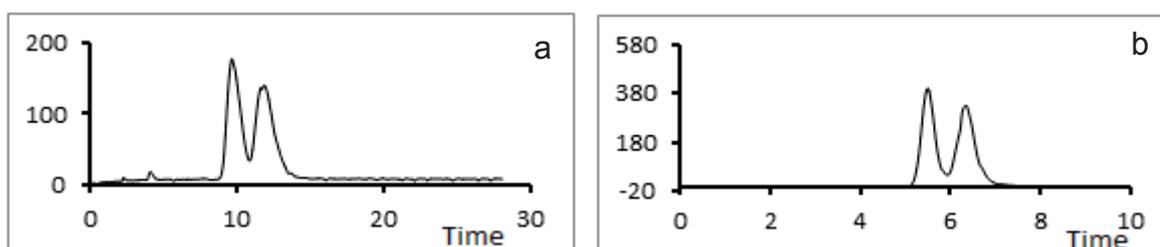


Abb. 105. a) Chromatogramm von 1,1-Binaphthyl-2,2-diol auf einer (-)-TAPA-Säule
 b) Chromatogramm von 1,1-Binaphthyl-2,2-diol auf einer
 D-(3,5-Dinitrobenzoyl)-phenylglycin-Säule
 nHexan : iso-PrOH (0,1 % TFA) 90 : 10 v/v.,
 F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Koz: ≈1 mg/mL

Tabelle 20: Chromatographische Parameter der synthetisierten Trennsäulen.

Parameter	(-)-TAPA-Säule	3,5-Dnbp-Säule
Retentionsfaktor Peak 1	21	37
Retentionsfaktor Peak 2	26	42
Trennfaktor	1,23	1,15
Auflösung	1,07	1,23
Bodenzahl Peak 1	429	1539
Bodenzahl Peak 2	448	1138
Bodenhöhe Peak 1	1,71 mm	6,15 mm
Bodenhöhe Peak 2	1,79 mm	4,50 mm

Die in Abb. 105 dargestellten Testtrennungen zeigen, dass die hergestellten Säulen in der Lage sind Enantiomere aufzutrennen. Somit ist sicher bewiesen, dass die chiralen Selektoren (**53**, **28**, **29**) richtig synthetisiert worden sind und die Anbindung dieser an das Kieselgel (**41**) funktioniert hat (die chromatographischen Parameter der Säulen werden in Tabelle 20 wiedergegeben). Dies wurde zwar schon durch spektroskopische Methoden nachgewiesen, jedoch beseitigt der Funktionstest allerletzte Zweifel. Daher kann im Nachfolgenden die Trennung der MCs untersucht werden.

2.12.5. Chirale Trennungen von Myrtucommulonen mittels TAPA-Säule und 3,5-Dnbp-Säule

Untersucht wurde hier die Trennung der MCs in ihre Stereoisomeren. Vor allem das Myrtucommulon A (**1**), PMCA (**2**), NSMC (**30**) und MC B (**3**) waren von besonderem Interesse. Die Säulen wurden sowohl im NP- als auch im RP-Modus verwendet. Da die Säulen aber bevorzugt im NP-Modus arbeiten wurde dieser zuerst untersucht. Vor allem im RP-Modus sollte die Verwendung des basischen Puffers (pH 9 DEA) zur Zerstörung der TAPA-Säule führen. Testversuche mit dem TAPA-Kieselgel (**50**) und dem 3,5Dnbp-Kieselgel, welche in organischer Lösung mit DEA versetzt worden waren zeigten, dass die TAPA-Säule wie zu erwarten mit Basen zerstört werden wird.[112], [113] Hingegen blieb die 3,5Dnbp-Säule beständig.

Im NP-Modus wurde mit beiden Säulen ein Screening durchgeführt in dem Lösemittelvariationen ausgetestet worden sind (Abb. 106).

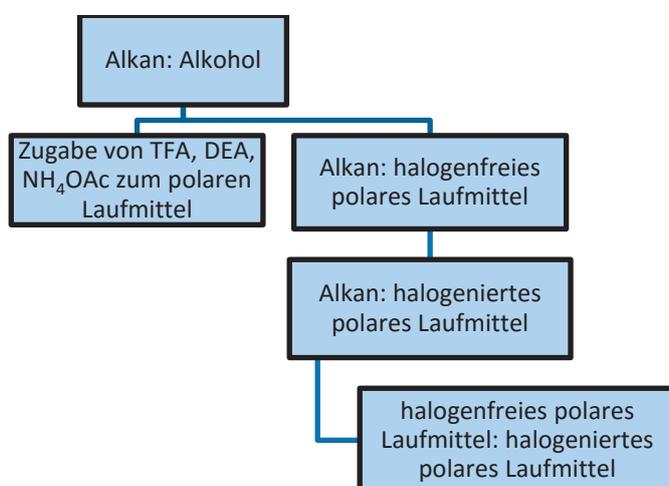


Abb. 106: Work-Flow des Screening auf NP.

Das Ergebnis des Screenings wird in Tabelle 21 gezeigt.

Tabelle 21. Ergebnis Säulenscreening NP-Modus.

	TAPA-Säule	3,5Dnbp-Säule
MC A (1)	keine Trennung	keine Trennung
PMCA (2)	keine Trennung	Meso-Form, Razemat
NSMC (30)	keine Trennung	Antrennung
MC B (3)	Enantiomere	keine Trennung

Auf der TAPA-Säule konnte nur die Trennung von MC B (3) realisiert werden. Da die Trennung eines zyklisierten MCs auch auf anderen Säulen möglich war, war diese Tatsache von untergeordneter Bedeutung. Auf der 3,5Dnbp-Säule konnte PMCA (2) in meso-Form und Razemat aufgetrennt werden. Diese Trennung kann aber ebenso gut auf einer RP18-Säule durchgeführt werden. Mit der Antrennung von NSMC (30) konnte hingegen eine interessante Möglichkeit gefunden werden, um dessen Konfiguration zu bestimmen. Die Spektren (Abb. 107, Abb. 108, Abb. 109) mit zugehörigem Laufmittel sind unten abgebildet.

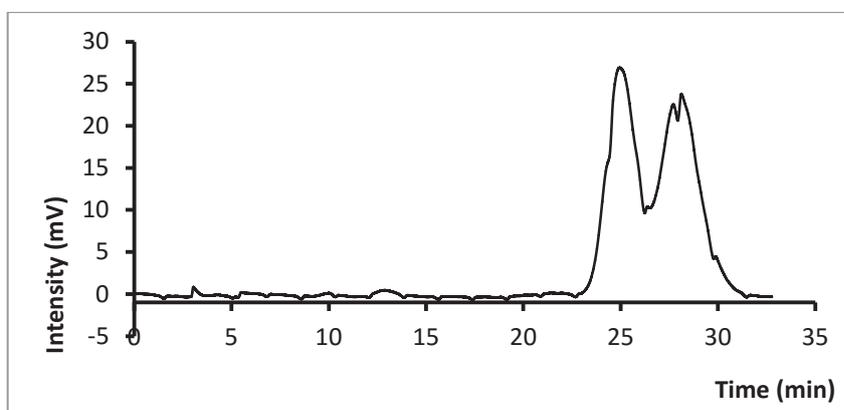


Abb. 107. Chromatogramm Trennung von MC B (3) auf TAPA-Säule.
n-Hexan : iso-PrOH (0,1 % TFA) 80 : 20 v/v.;
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

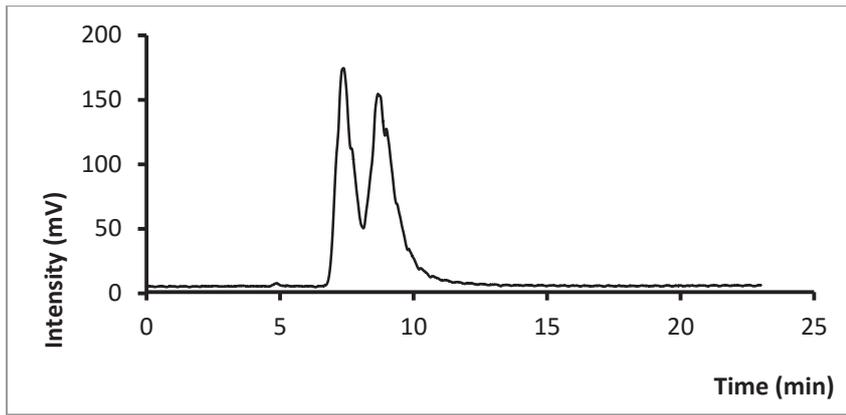


Abb. 108. Chromatogramm Trennung PMCA (**2**) auf 3,5Dnbp-Säule.
n-Hexan : iso-PrOH (0,1 % TFA) 80 : 20 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

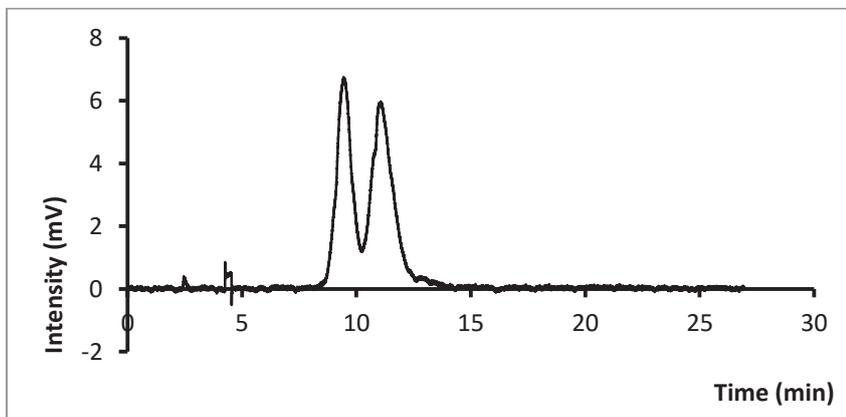


Abb. 109. Chromatogramm Trennung NSMC (**30**) auf 3,5Dnbp-Säule.
n-Hexan : iso-PrOH (0,1 % TFA) 80 : 20 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Ebenso wurde im RP-Modus ein Screening mit den Säulen in verschiedenen Lösemitteln ausgetestet (Abb. 110).

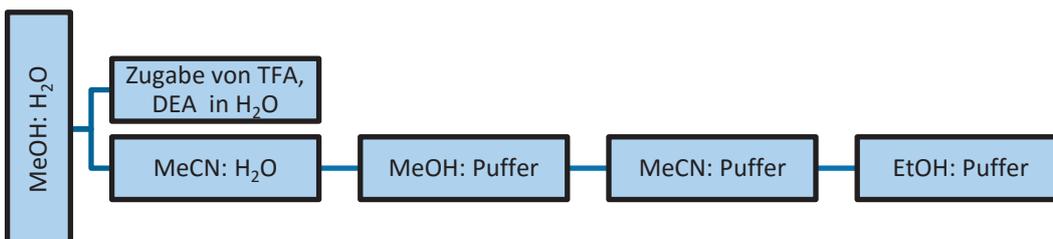


Abb. 110: Work-Flow des Screening im RP-Modus.

Tabelle 22 fasst die Ergebnisse im RP-Modus zusammen.

Tabelle 22. Ergebnisse Säulenscreening im RP-Modus.

	TAPA-Säule	3,5Dnbp-Säule
MC A (1)	keine Trennung	Meso-Form, Razemat
PMCA (2)	Meso-Form, Razemat	Meso-Form, Razemat
NSMC (30)	Antrennung	keine Trennung
MC B (3)	Enantiomere	keine Trennung

Mit der TAPA-Säule konnten im RP-Modus die zyklisierten Myrtucommulone gut getrennt werden. MC A (1) konnte nicht aufgetrennt werden, aber dafür das NSMC (30). Die 3,5Dnbp-Säule konnte ebenso PMCA (2) trennen, allerdings nicht die unzyklisierten Formen. Lediglich eine Trennung des MC A (1) in meso-Form **1a** und Razemat **1b** war möglich. Die Trennungen werden unten (Abb. 111, Abb. 112, Abb. 113, Abb. 114, Abb. 115) abgebildet.

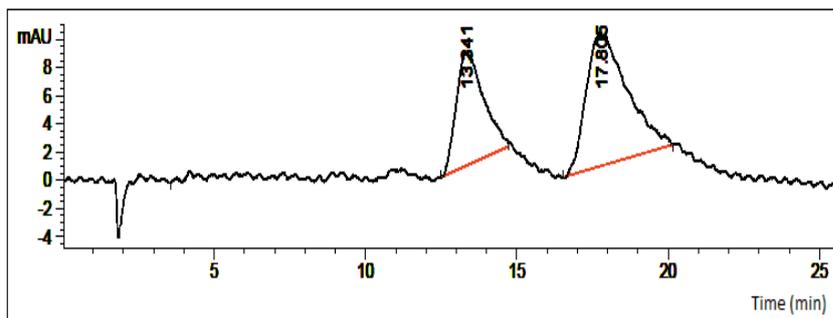


Abb. 111. Chromatogramm Trennung PMCA (2) auf der TAPA-Säule
MeCN : Puffer (150 mM NH₄OAc, pH 4 AcOH) 50 : 50 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: rt, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

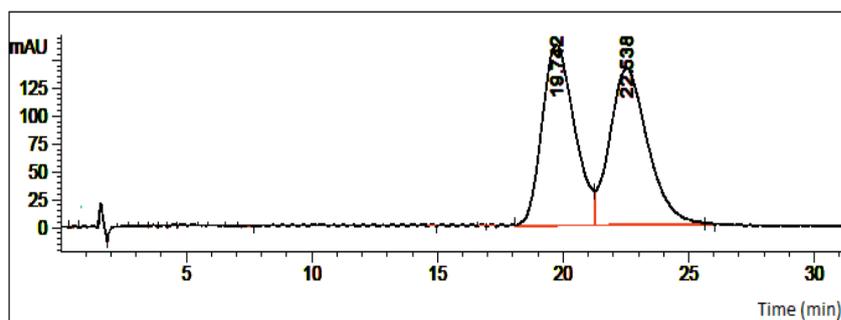


Abb. 112. Chromatogramm Trennung MC B (3) auf der TAPA-Säule
EtOH : Puffer (150 mM NH₄OAc, pH 4 AcOH) 50 : 50 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: rt, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

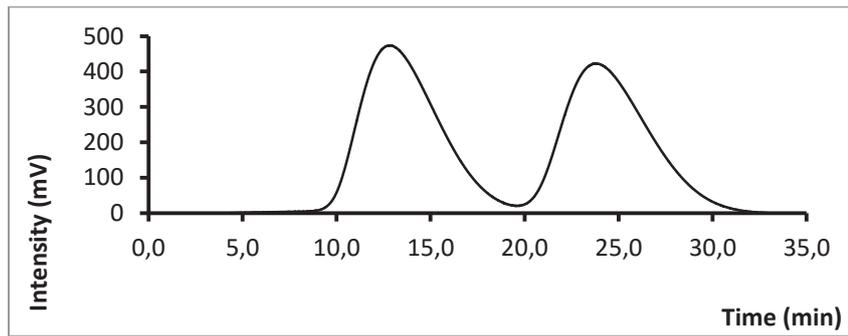


Abb. 113. Chromatogramm Trennung NSMC (**30**) auf der TAPA-Säule
EtOH: Puffer (150 mM NH₄OAc, pH 4 AcOH) 50 : 50 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: rt, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

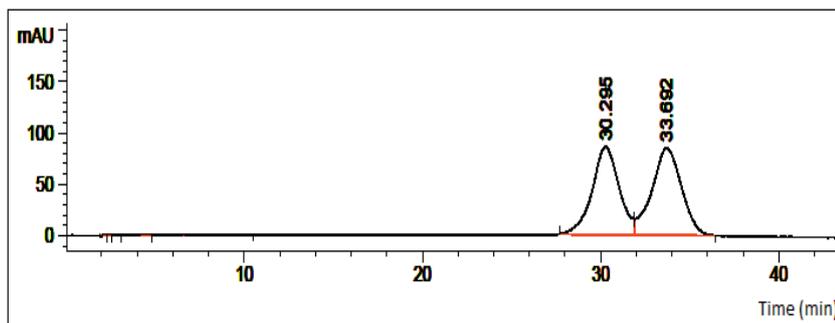


Abb. 114. Chromatogramm Trennung MC A (**1**) in meso-Form und
Razemat auf 3,5Dnbp-Säule
MeCN : Puffer (30 mM NH₄OAc, pH 9 DEA) 75 : 25 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: rt, Inj: 10 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

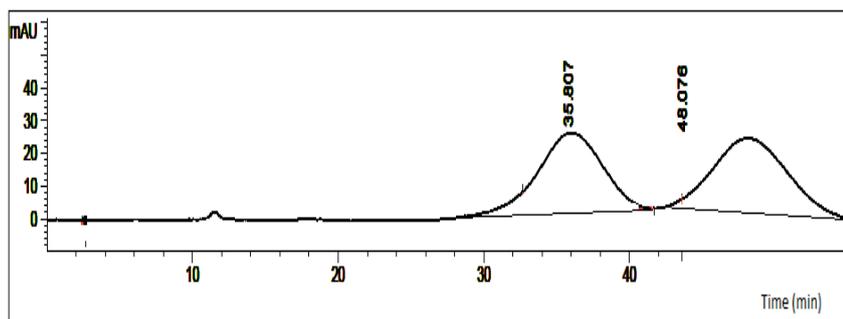


Abb. 115. Chromatogramm Trennung MC A (**1**) in meso-Form und
Razemat auf 3,5Dnbp-Säule
MeOH : Puffer (30 mM NH₄OAc, pH 9 DEA) 75 : 25 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: rt, Inj: 10 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Abschlussbetrachtung

Die selbst synthetisierten und gepackten Säulen zeigten nicht ganz den erhofften Trennerfolg. Eine Trennung des unzyklisierten MC A (**1**) in die Enantiomere gelang nicht, lediglich die Trennung in meso-Form **1a** und Razemat **2b** war möglich. Jedoch kann dies auch auf einer RP 18-Säule erfolgen. In Bezug auf NSMC (**30**) waren die Säulen sehr gut zur Trennung geeignet. Es war möglich gewesen **30** in die Enantiomere aufzutrennen. Es konnte gezeigt werden, dass NSMC (**30**) als Razemat vorliegt. Beide Säulen waren in der Lage die zyklisierten MCs weitestgehend zu trennen.

2.13. Semimyrtucommulon (4)

2.13.1. Isolierung von Semimyrtucommulon (4)

Bereits in der Master-Arbeit wurde versucht Semimyrtucommulon (4) zu isolieren und dessen Struktur aufzuklären. Jedoch gelang dies nicht, da SMC (4) nicht mit genügend Reinheit isoliert werden konnte. Für SMC (4) und NSMC (30) musste ein hinreichend großer Retentionsfaktor gewählt werden, damit diese getrennt voneinander eluieren. Wie in Abb. 72 gezeigt, war dies der Fall im System MeOH(0,1 % TFA) : H₂O (0,1 % TFA) 85 : 15 v/v. Im Laufmittelgemisch 90 : 10 v/v war die Trennung beider Verbindung schon nicht mehr möglich. Bei der Isolierung wurde analog zur Isolierung von NSMC (30) verfahren. Peak 5.1.2 (Abb. 72) von Fraktion 5 wurde isoliert und als SMC (4) identifiziert. Dies geschah durch LC-MS (ESI(-)) mit einem Masse zu Ladungsverhältnis des Hauptpeaks von 445,25 g/mol. Ebenso konnte in einem Vergleich mit dem SMC (4) aus der Master-Arbeit [63] die Identität bestätigt werden. Durch präparative HPLC analog zum Isolierverfahren des NSMC (30) konnte SMC (4) mit 98 %iger Reinheit in einem Lauf erhalten werden (Abb. 116).

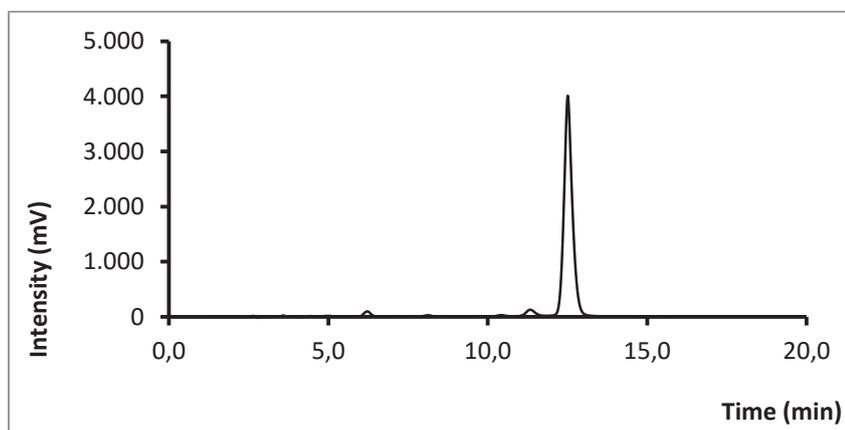


Abb. 116. Chromatogramm von SMC (4).
M&N C18ec, MeOH (0,1 % TFA) : H₂O (0,1 % TFA) 90 : 10 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

2.13.2. Analytik von SMC (4)

2.13.2.1 Massenspektrum (EI) von SMC (4)

Um die Identität des SMC (4) genauer zu untersuchen und da die Massenspektren des MC A (1) und des NSMC (30) bereits bekannt waren, wurde ebenso ein Massenspektrum von 4 aufgenommen (Abb. 117).

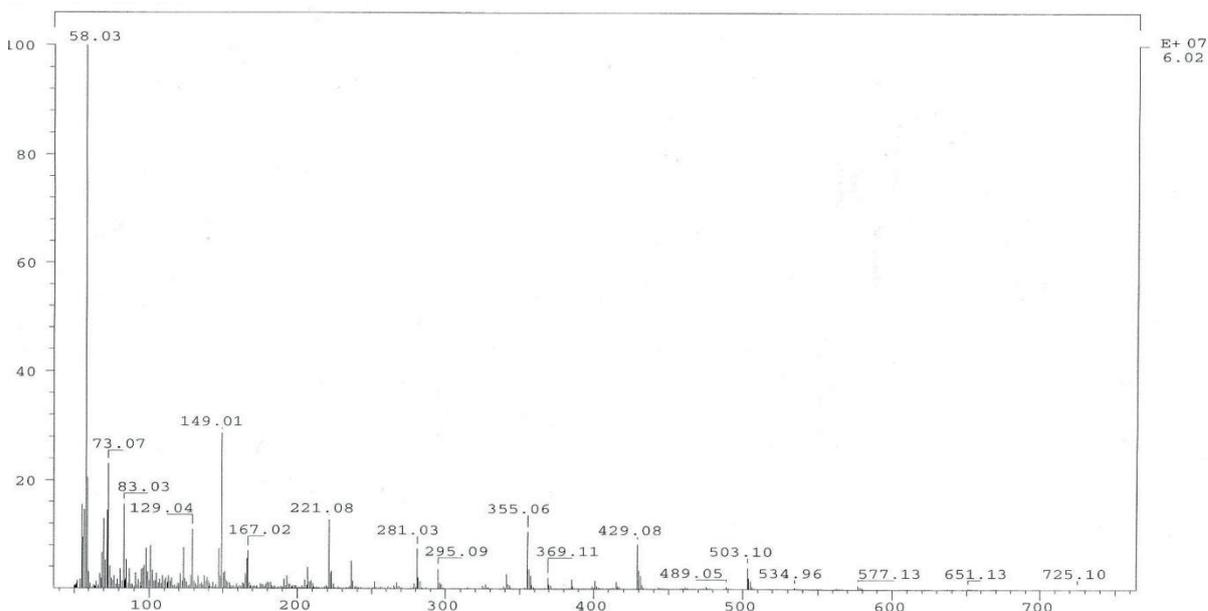


Abb. 117. Massenspektrum (EI, 70 eV) von SMC (4).

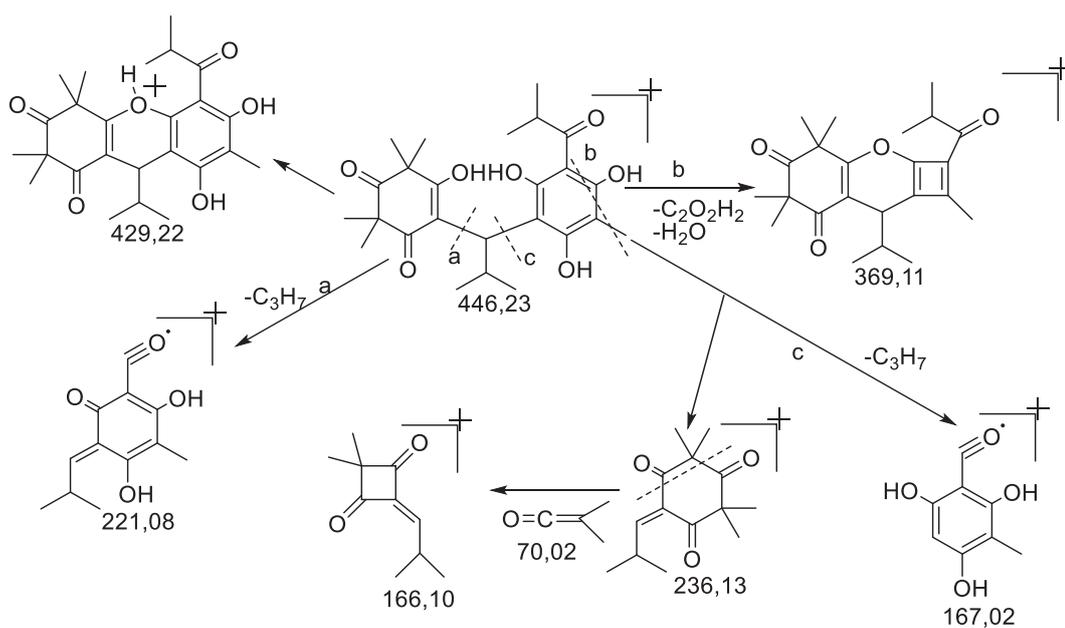


Abb. 118. Fragmentierungsmechanismus (EI) von SMC (4).

Vergleicht man in Abb. 74 das Massenspektrum des NSMC (**30**) mit diesem Spektrum (Abb. 117), so erkennt man, dass in der Tat die meisten Peaks des NSMC-Spektrums mit dem Wert von 14 m/z addiert vorliegen, also um eine Methylengruppe erhöht. Das Spektrum zeigt wie die vorherigen Spektren Mc-Lafferty-Umlagerungen in die Bestandteile Syncarpinsäure (**21**) und 3-Methyl-Phloroglucin und die α -Spaltung der Isobutyrylgruppe zum Acylradikalion auf. Die Fragmente (Abb. 118) wiesen darauf hin, dass die zusätzliche Methylgruppe Gruppe am Aromaten des Phloroglucins (**23**) zu finden war.

2.13.2.2 ESI(-)-Massenspektrum ESI von SMC (**4**)

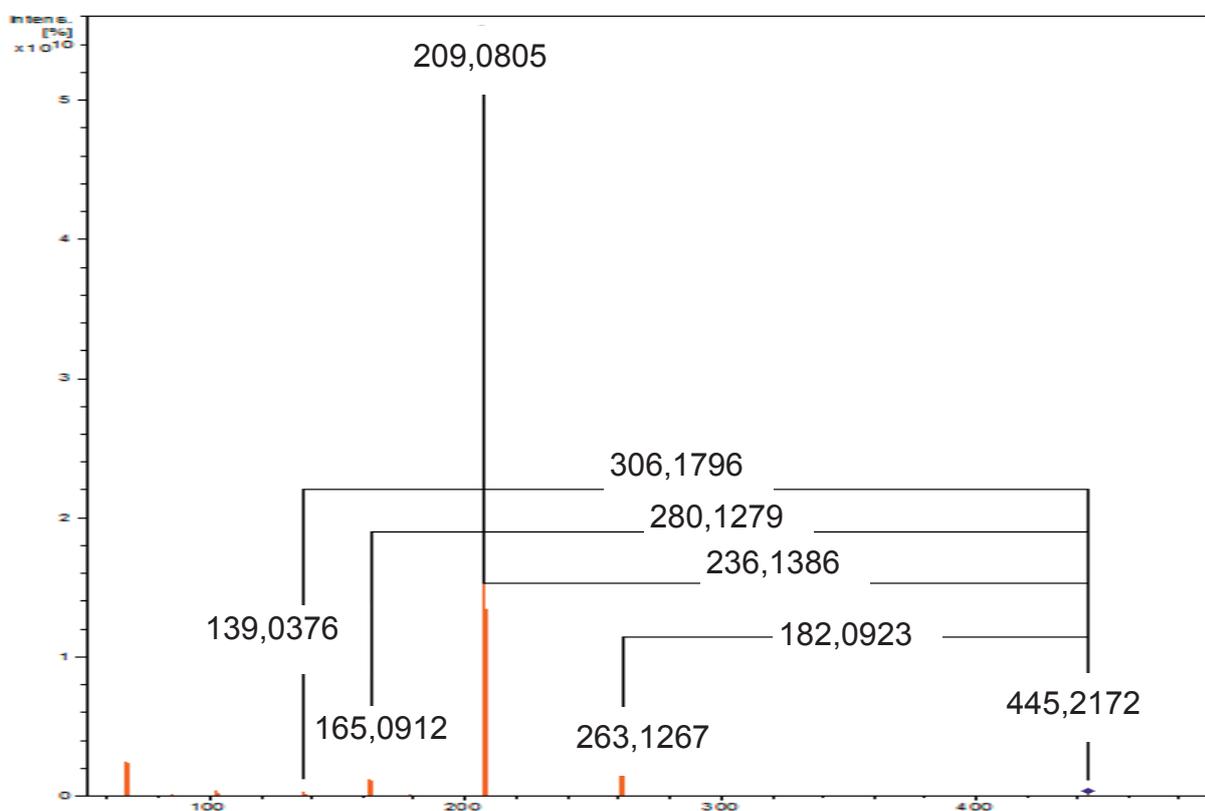


Abb. 119. Massenspektrum (ESI(-), 25 eV) von SMC (**4**).

Zusätzlich wurde noch ein ESI(-)- Massenspektrum (Abb. 119) aufgenommen und die hochaufgelöste Masse bestimmt. Dadurch konnte ein Vergleich mit dem ESI-Spektrum des NSMC (**30**) durchgeführt werden. Es wären Fragmente zu erwarten, die dem des NSMC (**30**) entsprechen, jedoch um eine Methylengruppe höher. Es wurde ein Wert von 445,2221 für die hochaufgelöste Masse erhalten. Daraus

resultierte eine Abweichung von -1,08 ppm im Vergleich zum berechneten Wert von 445,2232 g/mol.

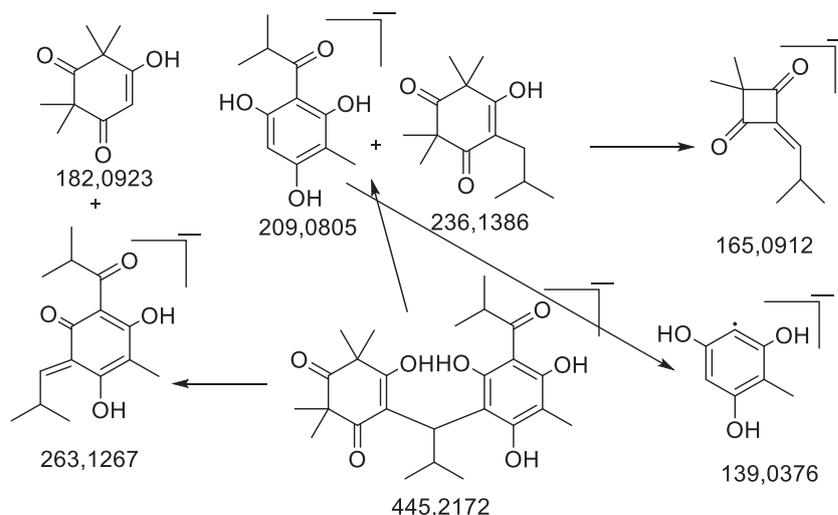


Abb. 120. möglicher Fragmentierungsmechanismus (ESI(-)) SMC (**4**).

Bei der Interpretation des Fragmentierungsmechanismus in Abb. 120, werden Fragmente erhalten, bei denen sich die zusätzliche CH₂-Gruppe in Bezug auf **30**, am Aromaten der Isobutyrylphloroglucin-Einheit (**23**) zu finden war. Mögliche m/z-Werte, wo die Methylengruppe an der Syncarpinsäure (**21**) zu lokalisieren wäre, konnten nicht erhalten werden und lassen sich nicht durch Interpretation erhalten.

2.13.2.3. NMR-Spektroskopie, CD-Spektroskopie, Polarimetrie

Das ¹H-NMR-Spektrum des hier isolierten SMC (**4**) zeigte deutlich das Vorliegen von zwei rotameren Formen und war in vielen Bereichen vergleichbar mit den NMR-Spektren von Appendino et al.[19] Dieser beschreibt in seiner Publikation ebenso das Auftreten von zwei Rotameren von **4** und versucht das ¹H-Spektrum des Hauptrotameren zu interpretieren. Wie aber bereits erwähnt, ist ein Vergleich bzw. Interpretation der Spektren der unzyklisierten MCs nur wenig sinnvoll. Es ist kaum möglich den einzelnen Protonen, eine exakt entsprechende chemische Verschiebung zuzuordnen.

Das CD-Spektrum ergab eine Nulllinie. Somit war kein Cotton-Effekt zu sehen. Daher liegt reines natürliches SMC (**4**) nicht enantiomerenrein oder angereichert vor.

Um normalerweise die Enantiomernanalytik hier fortzuführen, musste an dieser Stelle die Zyklisierung durchgeführt werden. Da aber auf der Reprisil Chiral NR eine

Trennmethode entwickelt worden war, konnte die weitere Trennung/Analytik mit dem unzyklisierten Material durchgeführt werden. Dadurch konnte ein Ersparnis an Zeit und Probenmaterial gewonnen werden.

2.13.3. Enantiomeranalytik von SMC (4)

SMC (4) konnte im gleichen chromatographischen System wie NSMC (30) in seine Enantiomeren aufgetrennt werden.

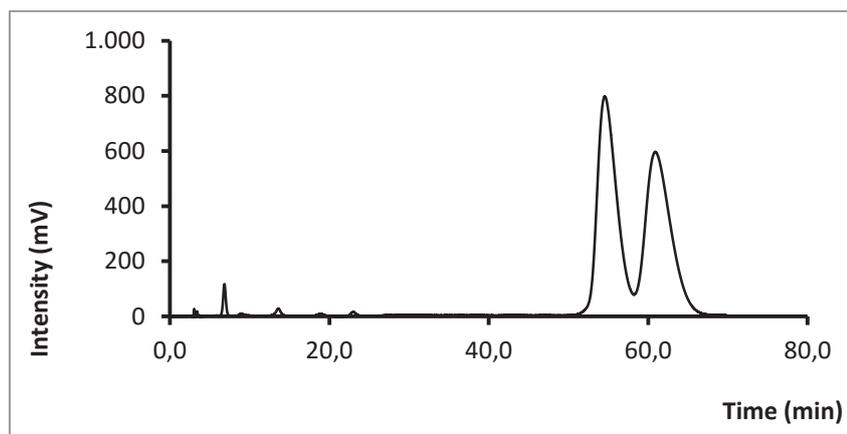


Abb. 121. Chromatogramm von SMC (4).
Reprosil Chiral NR, EtOH : Puffer (150 mM NH₄OAc, pH 4 AcOH) 50 : 50 v/v.,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Das Chromatogramm (Abb. 121) zeigt ein Verhältnis von 1 : 1. Somit lag **4** genauso wie **30** als Razemat vor. Es ist stark anzunehmen, dass die Biosynthese von SMC (4) und NSMC (30) sich bis auf die Methylengruppe nicht stark unterscheiden.

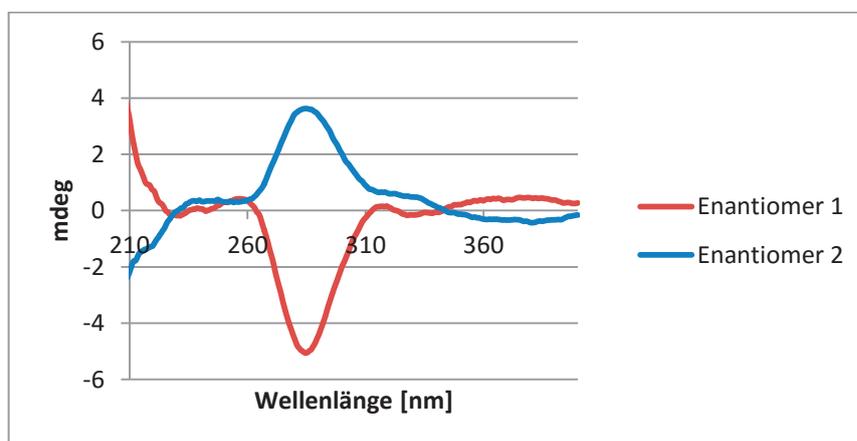
Für die präparative Trennung wurde hier an Stelle von EtOH wieder MeOH verwendet, da dieses Laufmittel einen geringeren Rückdruck verursachte. Von den getrennten Enantiomeren konnten nun die hochaufgelöste Masse und die spezifische optische Rotation bestimmt werden. Die Abweichung der hochaufgelösten Massen vom berechneten Wert lag deutlich unter 5 ppm. Ebenso wurde ein CD-Spektrum jedes Enantiomeres aufgenommen.

Das Ergebnis (Abb. 122) zeigte für das (-)-R--Enantiomer und das (+)-S-Enantiomer einen entgegengesetzten Cotton-Effekt. Somit handelt es sich um Enantiomere.

Die Tatsache, dass die Enantiomere von Verbindung **4** im Verhältnis 1 : 1 vorliegen, passt sehr gut mit den vorherigen Verhältnissen von NSMC (30) und dem Razemat des MC A (1) überein.

Tabelle 23: Charakterisierung der Enantiomere von SMC (**4**).

Charakterisierung	SMC	SMC
	Enantiomer 1	Enantiomer 2
HR-MS(ESI (-))	445,22318	445,22321
Abweichung berechneter Wert	-1,84 ppm 445,2232	-1,91 ppm 445,2232
CD-Spektrum	Abb. 122	Abb. 122
Spezifische optische Rotation 4 mg/mL MeOH	-9,26	+10,82

**Abb. 122.** CD-Spektren der getrennten Enantiomere von SMC (**4**) getrennt gemessen, aber in einer Abbildung zusammengefasst.

2.13.4. NMR-Spektroskopie von zyklisiertem SMC (**68**)

Eine Zyklisierung des SMC (**4**) zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses war nicht mehr nötig, da unzyklisiertes **4** mit der in dieser Arbeit neu entwickelten Methode, getrennt werden konnte. Um die Struktur von Verbindung **4** mittels NMR-Spektroskopie nochmals bestätigen zu können, wurde dieses zu zyklisiertem SMC (**68**) nach der Vorschrift in Abb. 212 umgesetzt. Durch Vergleich der Spektren von **67** (siehe 3.2.8.4) mit den Spektren von NSMC (**30**) und Literaturvergleichen [19] konnte die Struktur des hier isolierten SMC (**4**) durch dessen Überführung in das Zyklisierungsprodukt **67** bestätigt werden.

2.14. Homologe des MC A (1)

Abb. 41 und Abb. 45 zeigen die Auftrennung von Fraktion 4 auf HPLC und LC-MS. Es konnten nach dem Peak des MC A (1) (Fraktion 4.8 $m/z = 667,40$) noch weitere Peaks im Chromatogramm erhalten werden. Im Massenspektrum (ESI(-)) konnte für Fraktion 4.9 ein m/z -Wert von $681,40$ g/mol, für Fraktion 4.10 ebenso $681,40$ g/mol und für Fraktion 4.11 ein Wert von $695,40$ g/mol gefunden werden (Abb. 123, Abb. 124, Abb. 125). Die gefundenen Massen zeigen zur Masse von MC A (1) eine Differenz von 14 bzw. 28, was auf eine oder zwei zusätzliche CH_2 -Gruppen hinweist. Vor allem durch die ähnliche Retentionszeit würde man ein Molekül erwarten, dass dem MC A (1) sehr ähnlich wäre. Bereits in der Master-Arbeit wurde ein Homologes des MC A (1) gefunden.[63]

Um diese Vermutung genauer zu untersuchen und vor allem um die Verknüpfung der CH_2 -Gruppe im Molekül zu bestimmen, wurden die Fraktion 4.9 bis 4.11 mittels präparativer HPLC isoliert. Es konnte analog zur Isolierung von Fraktion 4.8 gearbeitet werden. Nach zweimaliger Reinigung mittels HPLC wurden die Fraktionen rein erhalten.

Vor allem die Verknüpfung der Methylengruppe im Molekül war interessant, da diese mit großer Wahrscheinlichkeit an den Isobutylgruppen zu finden sein müsste. Sollte die CH_2 -Gruppen nicht an der Isobutyrylphloroglucin-Einheit zu finden sein, so würde keine meso-Form mehr existieren. Sollten die zwei CH_2 -Gruppen nicht symmetrisch im Molekül sein, so würde ebenso die meso-Form nicht mehr existieren.

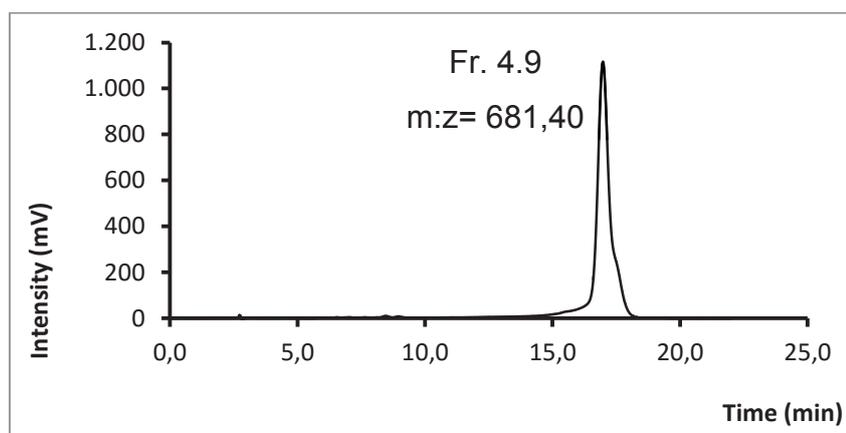


Abb. 123. Chromatogramm von reiner Fraktion 4.9.
M&N C18ec, MeOH(0,1 % TFA) : H₂O(0,1 % TFA) 97 : 3 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 μL , Konz: ≈ 1 mg/mL

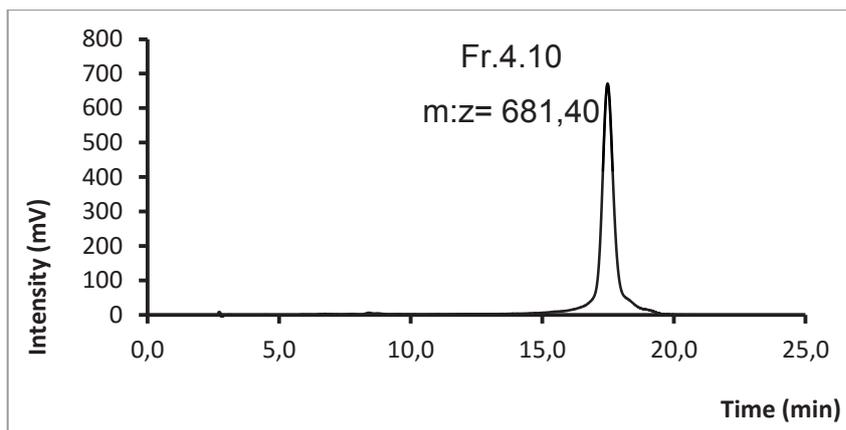


Abb. 124. Chromatogramm von reiner Fraktion 4.10.
M&N C18ec, MeOH(0,1 % TFA) : H₂O(0,1 % TFA) 97 : 3 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20µL, Konz: ≈ 1mg/mL

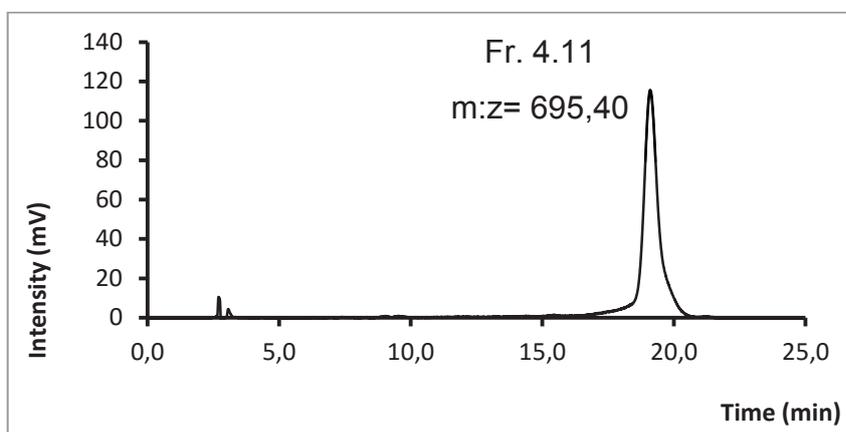


Abb. 125. Chromatogramm von reiner Fraktion 4.11.
M&N C18ec, MeOH(0,1 % TFA) : H₂O(0,1 % TFA): 97 : 3 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Wie beim MCA (1), so wurde auch hier ein Peak erhalten der von der Masse her dem NSMC (30) entsprechen würde. Somit zeigen Fraktion 4.9 bis 4.11 die gleiche Instabilität im Laufmittel wie 1 (Die genaue Diskussion zum Zerfall des MCA (1) wurde in Kapitel 2.3.1 bereits erläutert). Dies war ein erster Hinweis auf die vermutete Struktur.

2.14.1. Strukturaufklärung von Fraktion 4.9

2.14.1.1 Massenspektrometrie von Fraktion 4.9

Um die Struktur von Fraktion 4.9 näher zu bestimmen, wurde ein $^1\text{H-NMR}$ aufgenommen. Es war nicht möglich die Signale sinnvoll zu interpretieren, da die Spektren die gleiche Problematik zeigten, wie sie bereits vom MC A (1) bekannt war. Aus diesem Grund wurde ein hochaufgelöstes ESI(-)-Massenspektrum gemessen. Die Bestimmung der Summenformel erfolgte aus der Messung der hochaufgelösten Masse.

Tabelle 24. hochaufgelöste Massen (ESI(-)) von Fraktion 4.9.

Probe	Summenformel	[M-H] berechnet	[M-H] gemessen	Abweichung [ppm]	Kommentar
Fraktion 4.9	$\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{O}_{10}$	681,36442	681,36205	-3,48	
		682,36777	682,36672	-1,55	$1 \times ^{13}\text{C}$
		683,37113	683,37020	-1,37	$2 \times ^{13}\text{C}$

Die in Tabelle 24 aufgeführten Massen lagen mit einer Abweichung von kleiner 5 ppm in einem wissenschaftlich akzeptierten Bereich. Aus den gemessenen Massen konnte die Summenformel ermittelt werden. Zusätzlich wurde die Masse noch im ESI(+) ermittelt.

Tabelle 25. hochaufgelöste Masse (ESI(+)) von Fraktion 4.9.

Probe	Summenformel	[M+H] berechnet	[M+H] gemessen	Abweichung [ppm]	Kommentar
Fraktion 4.9	$\text{C}_{39}\text{H}_{55}\text{O}_{10}$	683,37897	683,37909	0,17	
		684,38233	684,38239	0,09	$1 \times ^{13}\text{C}$
		685,38668	685,38538	-1,89	$2 \times ^{13}\text{C}$

Ebenso konnte im ESI(+) (Tabelle 25) eine sehr geringe Abweichung gefunden werden. Die gefundene Summenformel stimmt bei beiden Messungen genau überein. Aus der Summenformel kann die Lage der CH_2 -Gruppe nicht abgeleitet werden. Um die Interpretation der Spektren zu erleichtern, wurde Fraktion 4.9 auf der Reprosil Chiral NR injiziert um das Verhältnis der Stereoisomere zueinander zu

erhalten. Eine meso-Form kann nur existieren, wenn das Molekül eine Spiegelebene enthält. In Abb. 126 ist ein Verhältnis von etwa 1 : 1 : 2 (genau: 28 : 28 : 44) zu erkennen. Eine meso-Form existiert demnach. Somit müsste die zusätzliche Methylengruppe im Bereich der Isobutyrylgruppe des Phloroglucins zu finden sein.

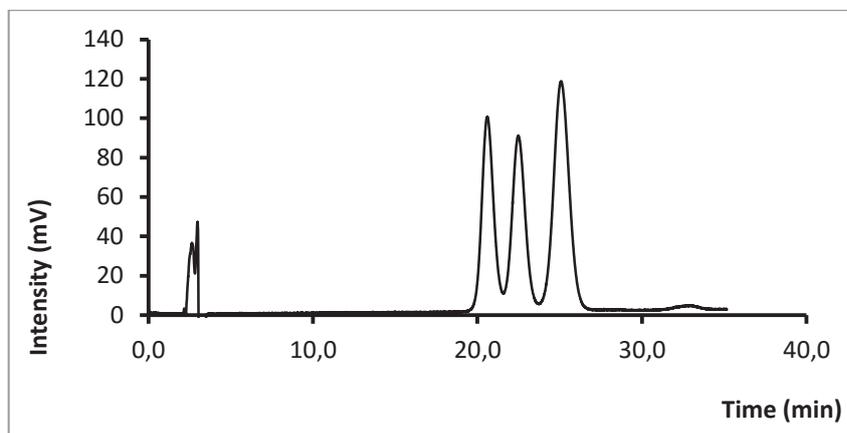


Abb. 126. Chromatogramm von Fraktion 4.9 auf der Reprisil Chiral NR. Reprisil Chiral NR, MeCN : Puffer (30 mM NH₄OAc, pH 9 DEA) 45 : 55 v/v, F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

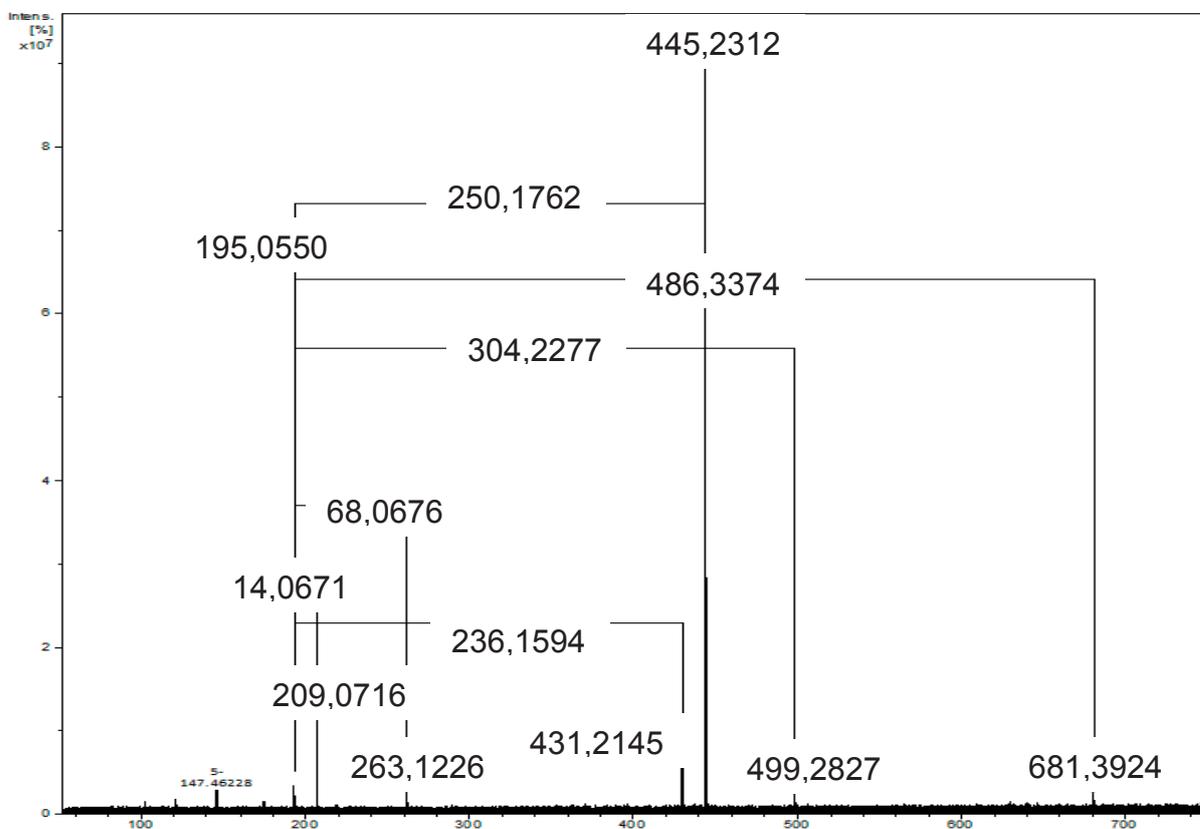
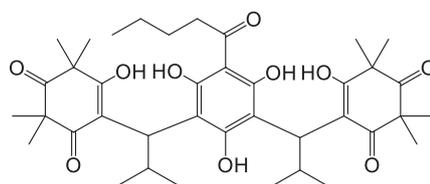
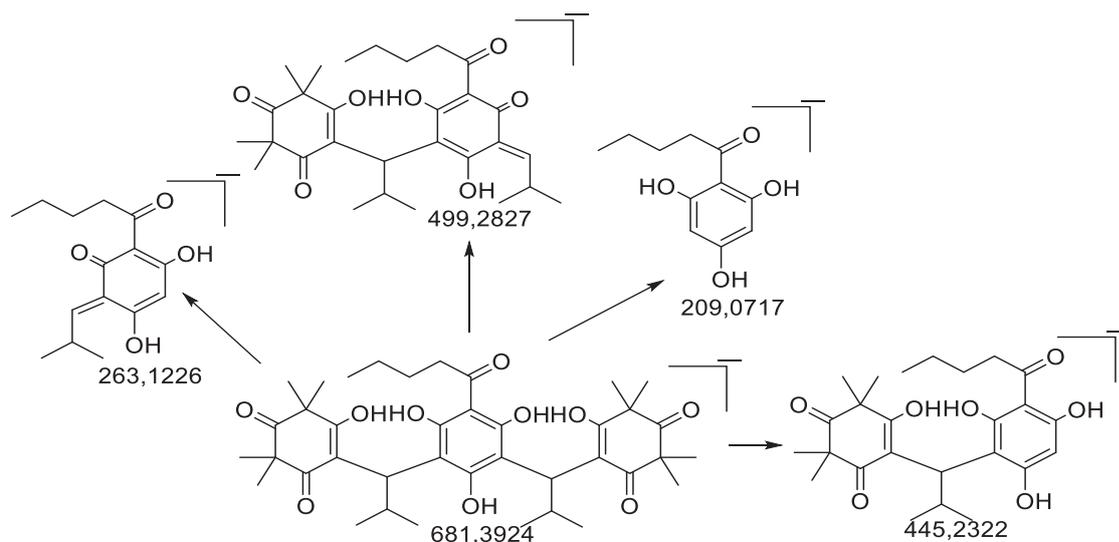


Abb. 127. Massenspektrum (ESI(-) 25 eV) von Fraktion 4.9.

Ein Vorschlag für die Struktur von Fraktion 4.9 wurde unter Berücksichtigung der folgenden Faktoren gemacht. Fraktion 4.9 verhielt sich auf RP 18-HPLC ähnlich wie MC A (**1**). Die hochaufgelöste Masse ergab, dass eine CH_2 -Gruppe mehr im Molekül vorhanden war in Bezug auf **1**. Die chirale HPLC bestätigte die Existenz einer meso-Form. Ein Vergleich der Massenspektren von MC A (**1**), NSMC (**30**), SMC (**4**) und deren dazugehörigen Fragmentierungsmechanismen mit den Massenspektrum (Abb. 127) von Fraktion 4.9 zeigte, dass eine Vielzahl von Fragmenten identisch war oder um den Faktor 14 erhöht. Ebenso konnte bei den Fragmentierungsmechanismen, analoge Zerfallsmuster (Abb. 130) vorgefunden werden. Dies führt zu Verbindung **54** (Abb. 128) als Vorschlag für Fraktion 4.9. Die Überprüfung erfolgte mittels der Fragmentierungsmechanismen der Massenspektren.

**54****Abb. 128.** Strukturvorschlag für Fraktion 4.9 (**54**).**Abb. 129.** möglicher Fragmentierungsmechanismus (ESI(-) 25 eV) von Fraktion 4.9 (**54**).

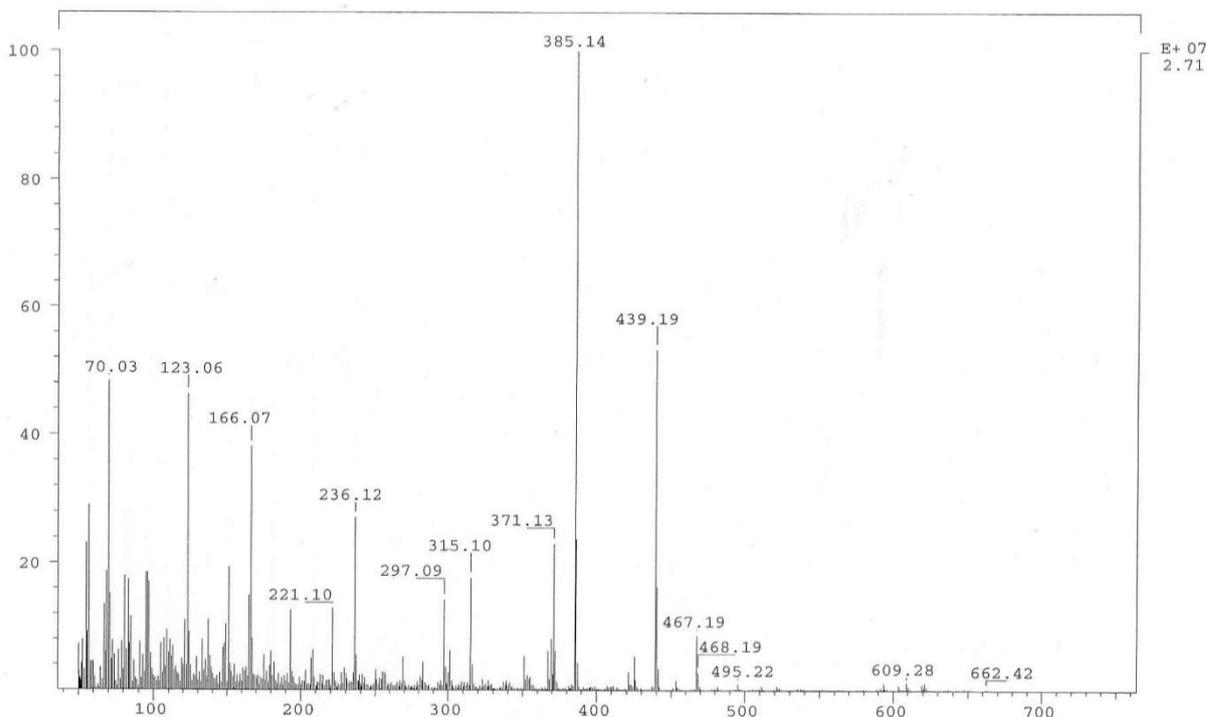


Abb. 130. Massenspektrum (EI, 70 eV) von Fraktion 4.9 (54).

Der aus dem Massenspektrum (Abb. 130) resultierende Fragmentierungsmechanismus (Abb. 131) zeigte starke Ähnlichkeit mit Abb. 50, dem Fragmentierungsmechanismus von MC A (1), lediglich um die Masse einer Methylengruppe erhöht. Die zusätzliche CH_2 -Gruppe konnte eindeutig der Phloroglucin-Einheit zugeordnet werden. Fragmenten der Syncarpinsäure bzw. den verbrückenden Isobutylgruppen konnte die erhöhte Masse nicht zugeordnet werden. Aus Abb. 131 ging hervor, dass es sich um eine n-Valeroylgruppe handeln musste. Im m/z-Bereich von 50 bis 200 konnte die Massendifferenz von 14 in regelmäßigen Abständen entdeckt werden, was ein charakteristisches Zerfallsmuster für lineare Alkylgruppen ist. Als typische Zerfallsmechanismen tritt hier vor allem die Mc-Lafferty-Umlagerung auf, die das Molekül in seine Bausteine zerlegt. Ebenso kann der Zerfall der einzelnen Bausteile durch Abspaltung von CHO-Einheiten beobachtet werden. Somit ähnelt Fraktion 4.9 54 stark dem MC F (9), das eine n-Hexanoylgruppe anstelle der Isobutyrylgruppe trägt. (Die Struktur von MC F (9) wurde von Quinn et al. 2008 veröffentlicht.[21] Diese klärten die Struktur von 9 mittels NMR-Spektroskopie auf. Wie bereits öfters erwähnt, ist die Interpretation der NMR-Spektren von unzyklisierten MCs nur wenig sinnvoll. Daher ist es nicht möglich die hier gefundene Struktur von Verbindung 54 mit Literaturangaben [21] zu

vergleichen.) Unter Berücksichtigung der bisher gemachten Ergebnisse scheint die Struktur in Abb. 128 sinnvoll zu sein.

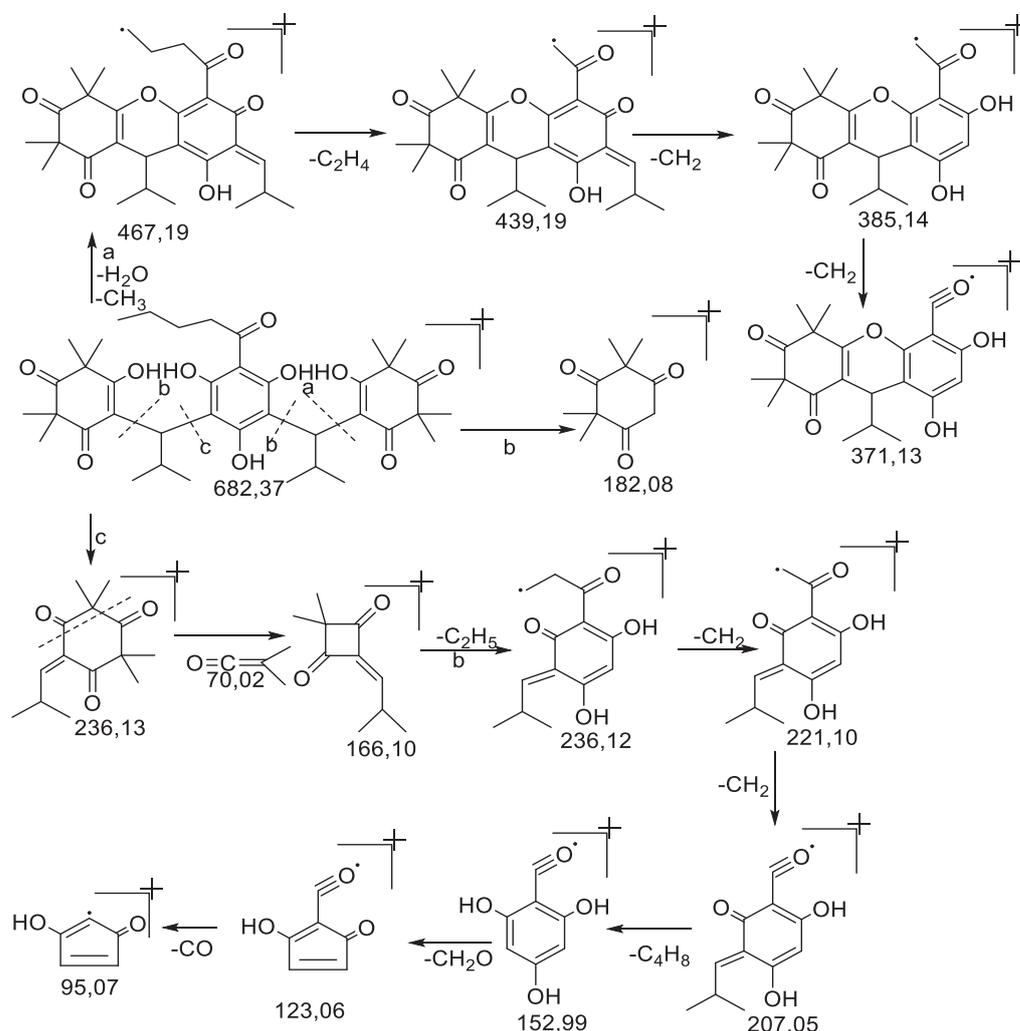


Abb. 131. möglicher Fragmentierungsmechanismus (EI) von Fraktion 4.9.

2.14.1.2. CD-Spektroskopie von Fraktion 4.9

In Abb. 126 wurde die analytische Trennung von Fraktion 4.9 auf der Reprisil Chiral NR bereits dargestellt. Die Trennung konnte ohne Probleme auf die präparative HPLC übertragen werden. Die getrennten Stereoisomere wurden standardmäßig aufgearbeitet und von jedem Isomeren wurde ein CD-Spektrum vermessen.

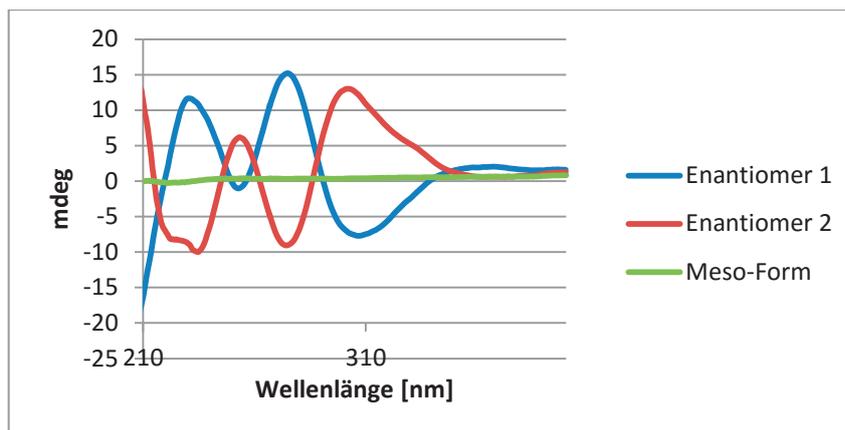


Abb. 132. CD-Spektren der getrennten Enantiomere von Fraktion 4.9 (**54**) getrennt gemessen, aber in einem Diagramm abgebildet.

Das CD-Spektrum Abb. 132 lieferte den zu erwartenden Kurvenverlauf. Die meso-Form ergab in guter Näherung eine Nulllinie und die Enantiomeren zeigten fast perfekt einen entgegengesetzten Kurvenverlauf. Es konnte bewiesen werden, dass Verbindung **54** sich 1 : 1 : 2 aus meso-Form und den Enantiomeren zusammensetzt. Demnach stimmt das hier gefundene Enantiomerenverhältnis mit den bisher beobachteten Verhältnissen, der anderen MCs überein.

2.14.2. Strukturaufklärung von Fraktion 4.10

Fraktion 4.9 und Fraktion 4.10 liefen auf RP18-PLC sehr nahe beieinander. Bei der präparativen Trennung musste daher eine Mischfraktion aus beiden gesammelt werden, die anschließend verworfen wurde. Daher war es sehr aufwendig, Fraktion 4.10 in größerem Maßstab rein zu erhalten. In Abb. 45 kann erkannt werden, dass Fraktion 4.10 nur sehr gering in Fraktion 4 enthalten war. Daher konnten mit dem reinen isolierten Material nur wesentliche Messungen zur Strukturaufklärung gemacht werden.

2.14.2.1. Massenspektrometrie von Fraktion 4.10

Die Messung eines NMR-Spektrums zur Strukturaufklärung erwies sich als nicht sinnvoll, da nicht genügend Probenmaterial zur Verfügung stand und die Spektren der MCs wegen bekannter Problematik nicht interpretierbar waren. Aus diesem Grund wurden wieder mehrere Massenspektren aufgenommen. Die Tatsache, dass bereits viele Massenspektren von MCs in dieser Arbeit interpretiert worden sind,

machte die Auswertung der hier folgenden Analysen einfacher. Im ersten Schritt sollte die Summenformel von Fraktion 4.10 bestimmt werden.

Tabelle 26. hochaufgelöste Masse (ESI(-)) von Fraktion 4.10

Probe	Summenformel	[M-H] berechnet	[M-H] gemessen	Abweichung [ppm]	Kommentar
Fraktion 4.10	C ₃₉ H ₅₄ O ₁₀	681,364424	681,36535	1,36	
		682,367779	682,37014	3,46	1x ¹³ C
		683,371134	683,37445	4,85	2x ¹³ C

Tabelle 27. hochaufgelöste Masse (ESI(+)) von Fraktion 4.10

Probe	Summenformel	[M+H] berechnet	[M+H] gemessen	Abweichung [ppm]	Kommentar
Fraktion 4.10	C ₃₉ H ₅₄ O ₁₀	683,37897	683,37927	0,44	
		684,38233	684,38263	0,44	1x ¹³ C
		685,38668	685,38556	-1,56	2x ¹³ C

Sowohl im ESI(-) (Tabelle 26) als auch im ESI(+) (Tabelle 27) konnte die gleiche Summenformel für Fraktion 4.10 gefunden werden. Die Abweichung der Massen lag durchweg unter 5 ppm. Folglich besaßen Fraktion 4.9 und Fraktion 4.10 die gleiche Masse und Summenformel. Jedoch eluierten beide Peaks getrennt voneinander auf der RP-HPLC. Aus diesem Grund muss es sich um Konstitutionsisomere handeln. An welcher Stelle im Molekül die zusätzliche Methylengruppe zu finden war, musste erneut bestimmt werden. Um die Interpretation der Spektren zu erleichtern, wurde Fraktion 4.10 auf der Reprosil Chiral NR injiziert um das Verhältnis der Stereoisomeren zueinander zu erhalten. In diesem Fall war eine Trennung nicht möglich gewesen. Es wurden 3 bis 4 schlecht angetrennte und breite Peaks erhalten. Diese Tatsache ließ erste Vermutungen bezüglich der Struktur zu. Die CH₂-gruppe könnte im Bereich der verknüpfenden Isobutylgruppe, nahe bei einem Assymetriezentrum eingebaut sein. Sollte die Spiegelebene im Molekül nicht Vorhandensein, so müsste die chirale HPLC (sofern die Säule in der Lage dazu ist) vier Enantiomere voneinander trennen. Eine meso-Form würde nicht mehr existieren.

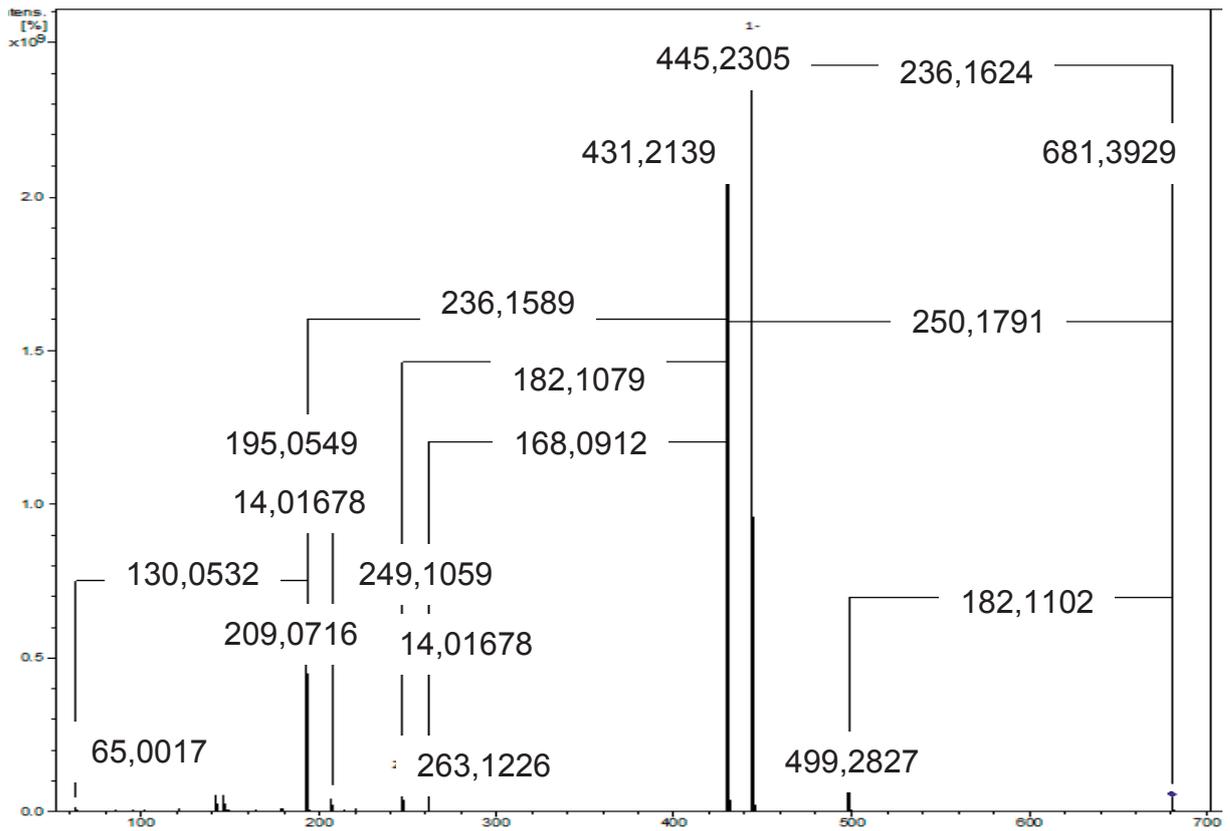


Abb. 133. Massenspektrum (ESI(-), 25 eV) von Fraktion 4.10

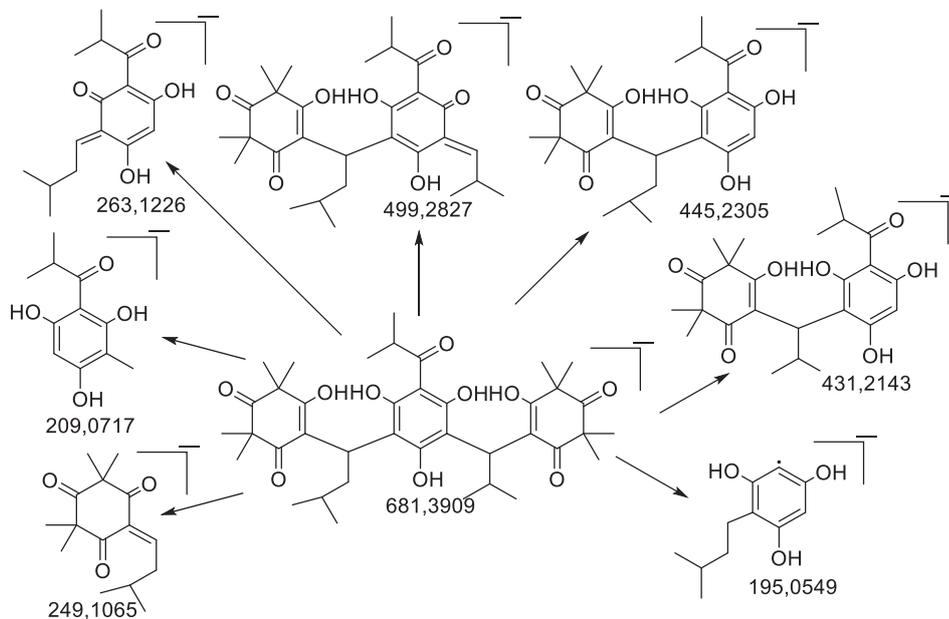


Abb. 134. möglicher Fragmentierungsmechanismus (ESI(-)) von Fraktion 4.10

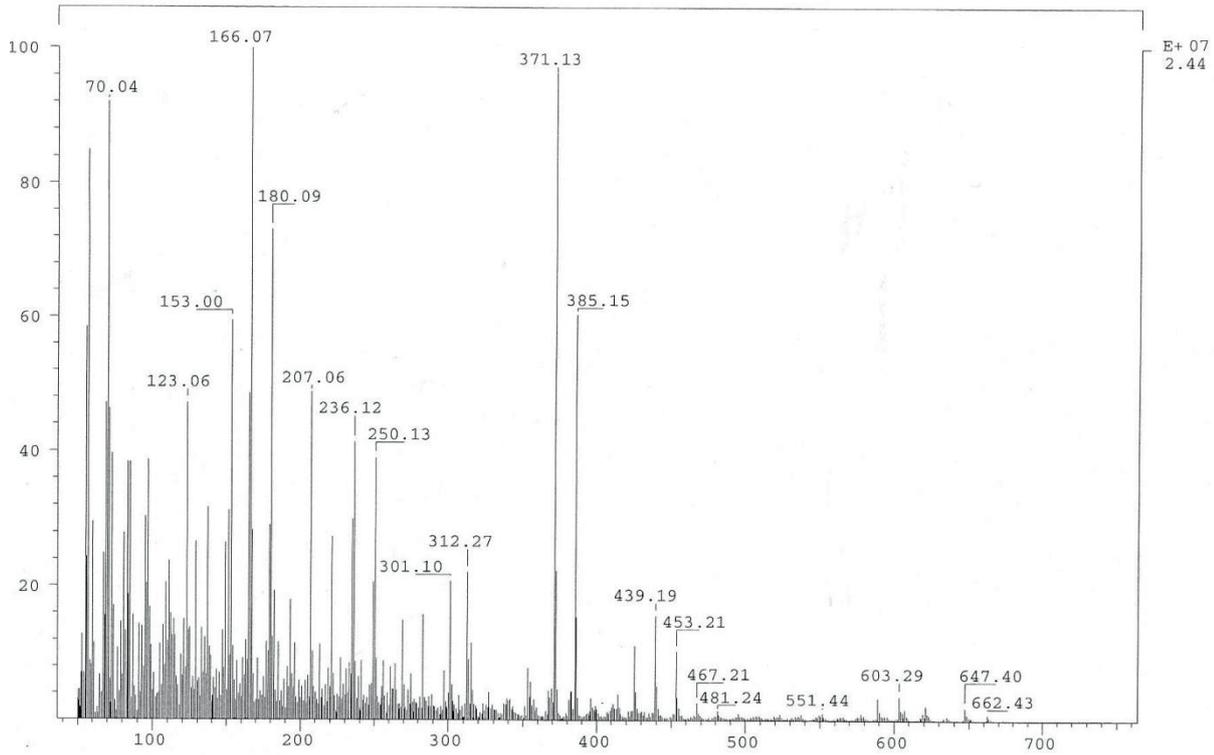
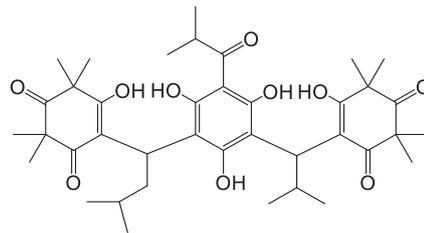


Abb. 135: Massenspektrum (EI, 70 eV) von Fraktion 4.10

Durch Interpretation der Massenspektren (Abb. 133, Abb. 135) und den daraus resultierenden Fragmentierungsmechanismen in Abb. 134 und Abb. 137 konnte folgende mögliche Struktur (Abb. 136) formuliert werden:



55

Abb. 136. mögliche Struktur von Fraktion 4.10 (**55**).

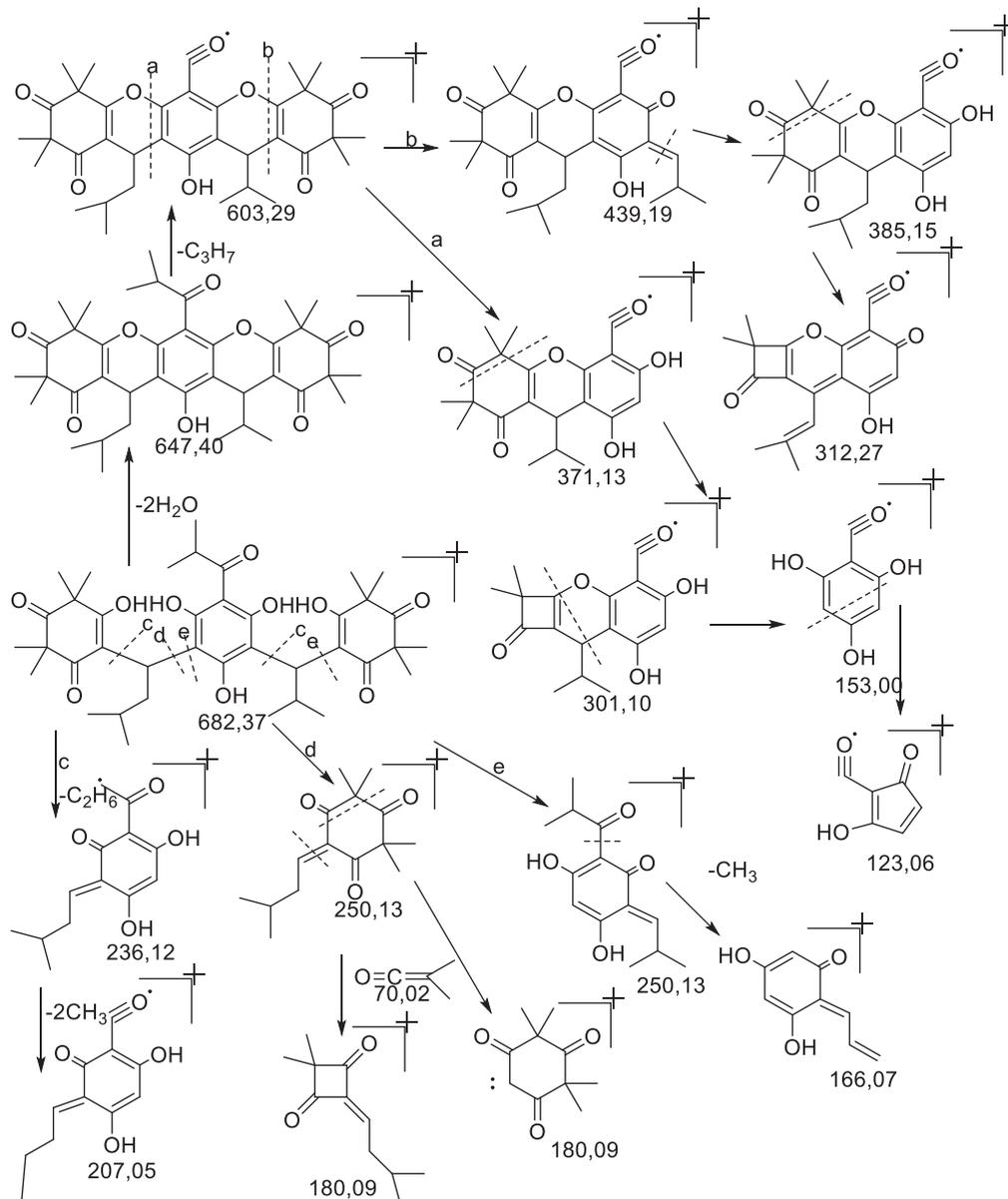


Abb. 137: möglicher Fragmentierungsmechanismus (EI) von Fraktion 4.10

Zur Aufklärung der Struktur von Verbindung **55** trug vor allem das Auffinden zweier Fragmente bei. Ein Fragment besaß die analoge Struktur wie das NSMC (**30**) (siehe Abb. 134, m/z: 431,2143, Abb. 137 m/z: 371,13) das andere entsprach dem NSMC (**30**) mit einer CH_2 -Gruppe mehr (siehe Abb. 134, m/z: 445,2305, Abb. 137: m/z: 385,15) an der verknüpfenden Isobutylgruppe. Die Existenz dieser Fragmente konnte nur erklärt werden, wenn beide Strukturelemente in Verbindung **55** vorkamen. Bei MC A (**1**) und Fraktion 4.9 konnte nur das erstgenannte Fragment entdeckt werden, da diese Moleküle spiegelsymmetrisch waren. Verfolgte man den Fragmentierungsmechanismus weiter, so kann durchgängig ein Fragment mit der

CH₂-Gruppe und ein entsprechendes Fragment ohne CH₂-Gruppe gefunden werden. Diese Fragmente entstanden auf Grund der zwei verschiedenen Hälften von Verbindung **55**. Eine einzige Unsicherheit blieb bei der vorgeschlagenen Struktur **55** noch übrig. Die Aussage, ob es sich um eine Isobutyrylgruppe oder eine n-Butanoylgruppe an der Phloroglucin-Einheit handelte konnte nicht sicher bestimmt werden. Dazu müsste man die Spektren im Bereich von MS³ bis MS⁵ vermessen, was nicht möglich war.

2.14.2.2. CD-Spektroskopie von Fraktion 4.10

Die assymetrische Struktur von **55** wäre ein Grund, weshalb eine Trennung mit der Reprosil Chiral NR nicht funktioniert hat. Die zusätzlich Methylengruppe in der Nähe zum Assymetriezentrum und die Aufhebung der Spiegelebene haben einen Einfluss auf das Enantiomeren/Diastereoisomerenverhältnis und beeinflussen somit die Trenneffizienz der chiralen Säule. Die meso-Form fiel weg und man würde ein Verhältnis von 1 : 1 : 1 : 1 erwarten. Um dies zu überprüfen, wurde die Trennmethode optimiert. Durch das Ersetzen von NH₄OAc durch (NH₄)₂C₂O₄ konnte eine Trennung erreicht werden.

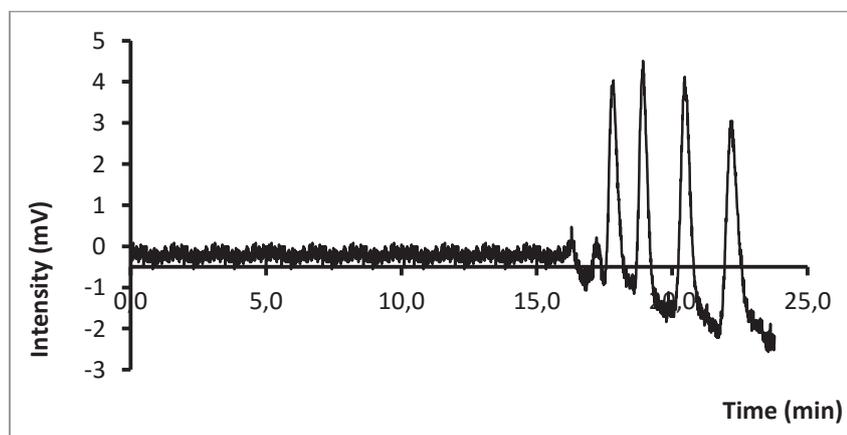


Abb. 138. Chromatogramm von Fraktion 4.10 (**55**).
Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (30 mM (NH₄)₂C₂O₄, pH 9 DEA) 40 : 60 v/v,
F: 1,5 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

In Abb. 138 wird die Trennung von Fraktion 4.10 im Verhältnis 24,2 : 25,9 : 24,5 : 24,4 abgebildet. Die Trennung verlief im vorausgesagten Verhältnis. Es gab demnach keine meso-Form. Fraktion 4.10 setzte sich demzufolge aus zwei Diastereoisomeren und deren Enantiomeren zusammen. Die Trennung der Peaks

konnte auf der präparativen HPLC mit schlechterer Auflösung reproduziert werden. Da Fraktion 4.10 sehr gering nur in der Myrte enthalten war, blieb nach der präparativen Trennung nur sehr wenig Substanz von jedem Enantiomeren übrig, die nur für die Aufnahme von CD-Spektren ausreichte. Um beim Umfüllen möglichst wenig Substanz zu verlieren, wurde das CD-Spektrum mit dem Material gemessen, welches nach dem Entfernen des Lösemittels, nach der präparativen Trennung, im Kolben übrig war. Daher gab es kleine Konzentrationsschwankungen.

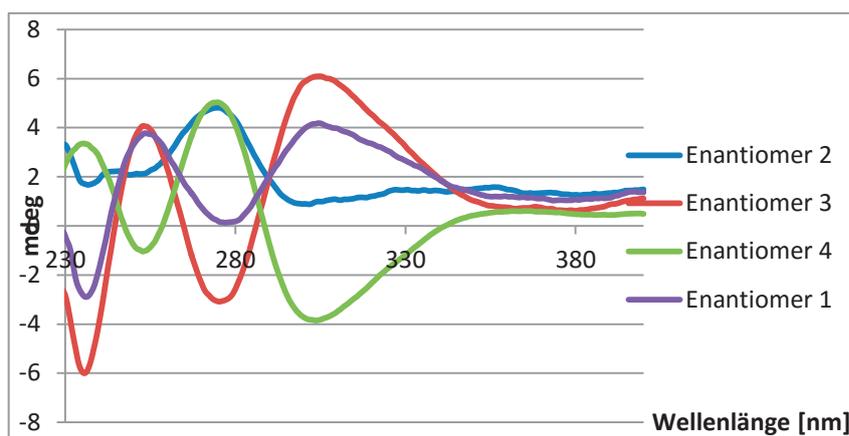


Abb. 139. CD-Spektren der einzelnen Enantiomere von Fraktion 4.10 getrennt gemessen, aber in einer Abbildung zusammengefasst

Die Aufnahme des CD-Spektrums (Abb. 139) zeigte jeweils 2 entgegengesetzt verlaufende Kurven. Es handelte sich definitiv um jeweils 2 Enantiomere. Tendenziell gehören Enantiomer 1 und 4 zusammen und Enantiomer 2 und 3.

2.14.2.3 Zusammenfassung

Die Strukturaufklärung von Fraktion 4.10 gestaltete sich sehr schwierig, da diese nur sehr gering in der Myrte enthalten war. Da die NMR-Spektroskopie zu viel Probenmaterial benötigte um einen vollständigen Satz an 1D und 2D-Spektren zu erhalten, schied diese als Mittel zur Strukturaufklärung aus. Ebenso ist es kaum möglich die NMR-Spektren von unzyklisierten MCs sinnvoll auszuwerten. (Ähnliche Strukturen (MC H (11)) wurden von Quinn et al. [21] bereits gefunden und deren Struktur spektroskopisch aufgeklärt) Jedoch mit den einzelnen Massenspektren, vor allem aber mit der Kenntnis der anderen, bereits aufgeklärten Massenspektren, war es gut möglich die Struktur von Verbindung **55** aufzuklären. Messungen im ESI(+) und ESI(-) führten zum gleichen Ergebnis. Durch Weiterentwicklung der bisherigen

Trennmethode konnte eine Möglichkeit gefunden werden, Fraktion 4.10 in ihre enantiomeren Bestandteile aufzutrennen. $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ führte zu einer sehr guten analytischen Trennung. Die Aufarbeitung nach der präparativen HPLC gestaltete sich etwas mühsamer. Trotzdem konnte Fraktion 4.10 aufgetrennt werden und das Enantiomerenverhältnis bestimmt werden. Wie bei bisher jeder anderen Substanz auch, so besteht Verbindung **55** aus einem Razemat. Anstelle der einen meso-Form, wurden hier zwei diastereoisomere Formen isoliert. Demnach passt auch Fraktion 4.10 in die Vorstellung einer nicht enzymatischen Biosynthese.

2.14.3. Strukturaufklärung von Fraktion 4.11

2.14.3.1. Massenspektrometrie von Fraktion 4.11

Wie aus Abb. 45 ersichtlich, kam Fraktion 4.11 am wenigsten in Fraktion 4 vor. In Anbetracht der geringen Menge und der bekannten NMR-Problematik war die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie so nicht möglich. Daher wurde wieder ein Satz von Massenspektren aufgenommen und zuerst die Summenformel ermittelt.

Tabelle 28. hochaufgelöste Masse (ESI(-)) von Fraktion 4.11.

Probe	Summenformel	[M-H] berechnet	[M-H] gemessen	Abweichung [ppm]	Kommentar
Fraktion 4.11	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_{10}$	695,380074	695,38049	0,60	
		696,383429	696,38432	1,28	1x ¹³ C
		697,386784	697,38911	3,34	2x ¹³ C

Tabelle 29. hochaufgelöste Masse (ESI(+)) von Fraktion 4.11.

Probe	Summenformel	[M+H] berechnet	[M+H] gemessen	Abweichung [ppm]	Kommentar
Fraktion 4.11	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_{10}$	697,39462	697,39490	0,40	
		698,39798	698,39832	0,49	1x ¹³ C
		699,40133	685,40106	-0,39	2x ¹³ C

Sowohl aus ESI(-) (Tabelle 28) als auch ESI(+) (Tabelle 29) konnte die gleiche Summenformel für Fraktion 4.11 abgeleitet werden. Die Abweichung der Massen lag durchweg unter 5 ppm. Aus HRMS-Messungen wurde $C_{40}H_{56}O_{10}$ als Summenformel erhalten. Aus dieser erhielt man die Erkenntnis, dass Fraktion 4.11 im Vergleich zu MC A (1) zwei CH_2 -Gruppen mehr besaß und im Vergleich mit Fraktion 4.09 und Fraktion 4.10 eine Methylengruppe mehr besaß. Mit großer Wahrscheinlichkeit müssten die zwei Methylengruppen an einer Isobutylgruppe oder getrennt an verschiedenen Isobutylgruppen aufzufinden sein. Je nach Konstitution kann eine Spiegelebene vorhanden sein oder nicht. Aus diesem Grund wurde Fraktion 4.11 direkt auf der Reprosil Chiral analysiert. Im Acetat-Puffer konnte nur eine sehr schlechte Trennung erreicht werden. Der Oxalat-Puffer zeigte auch hier sehr gute Trenneigenschaften.

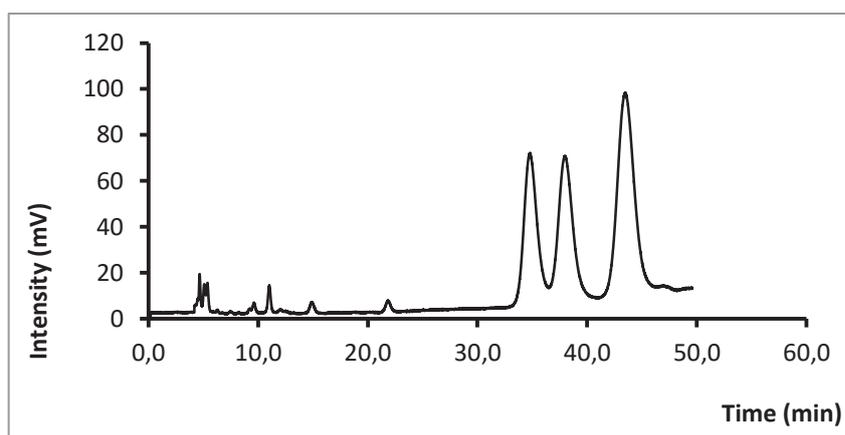


Abb. 140. Chromatogramm von Fraktion 4.11 auf Reprosil Chiral.
Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (30 mM $(NH_4)_2C_2O_4$, pH 9 DEA) 40 : 60 v/v,
F: 1,5 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 μ L, Konz: \approx 1 mg/mL

Mit der Reprosil Chiral wurde eine Trennung im Verhältnis 1 : 1 : 2 erzielt (Abb. 140). Somit müssen die zusätzlichen CH_2 -Gruppen symmetrisch in Bezug zu einer Spiegelebene im Molekül angeordnet sein.

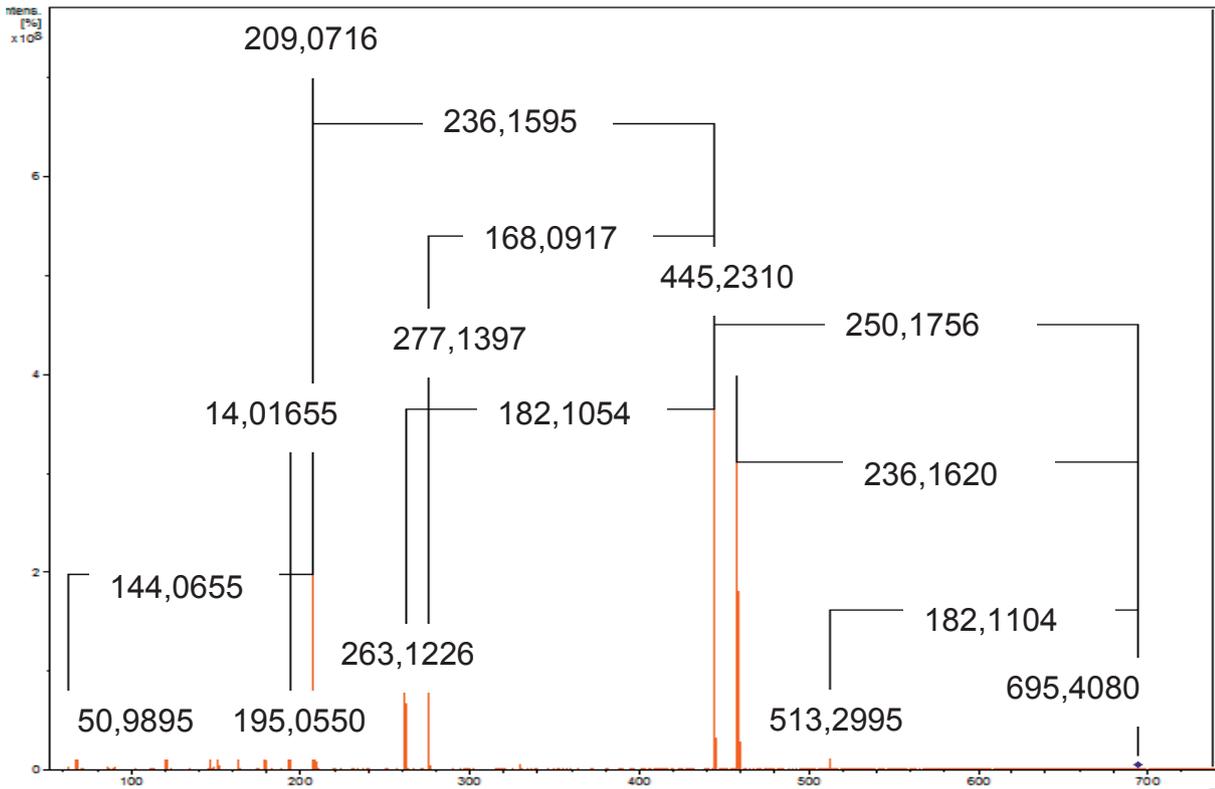


Abb. 141. Massenspektrum (ESI(-), 25 eV) von Fraktion 4.11.

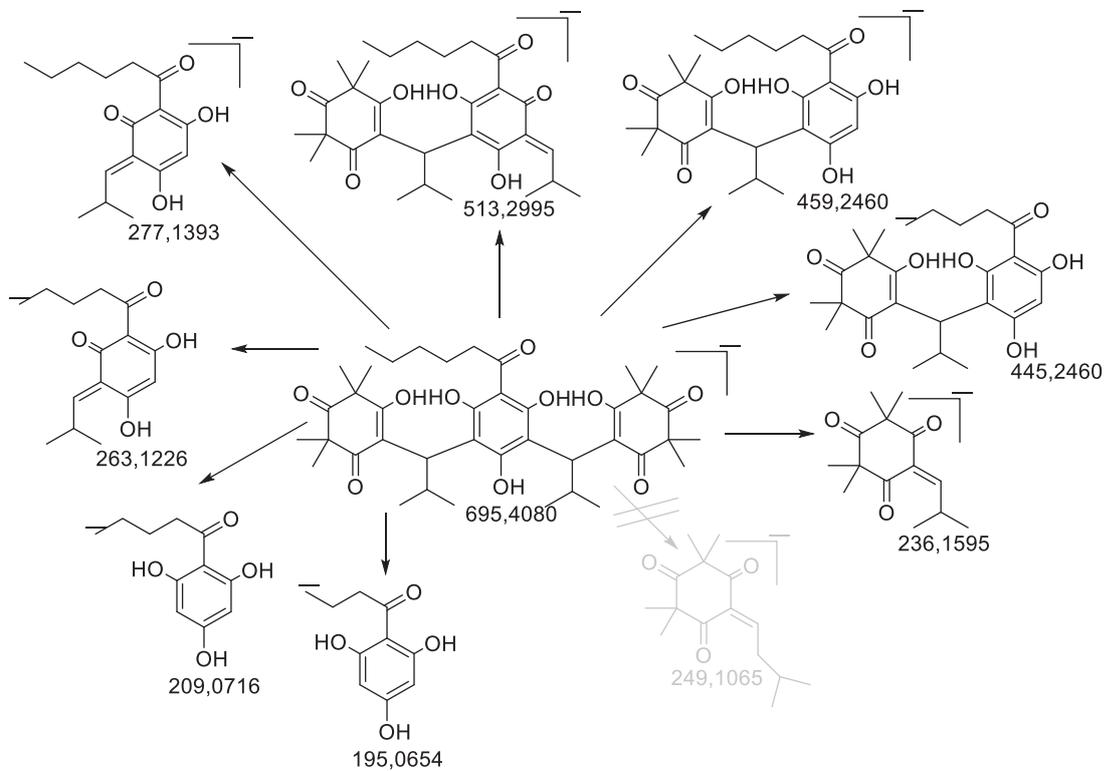


Abb. 142. möglicher Fragmentierungsmechanismus (ESI(-)) von Fraktion 4.11.

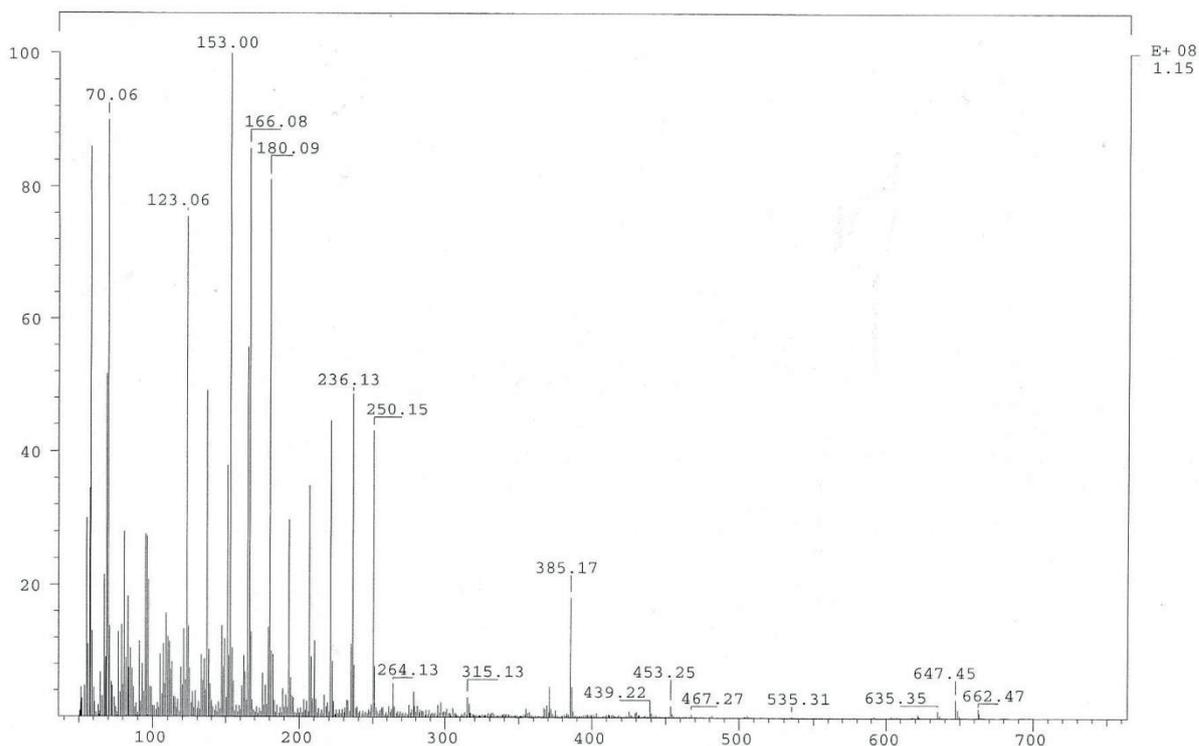


Abb. 143: Massenspektrum (EI, 70 eV) von Fraktion 4.11

Das Ergebnis der chiralen HPLC (Abb. 140) bestätigte die Existenz einer Meso-Form. Das Molekül musste demnach eine Spiegelebene besitzen. Durch Interpretation der Massenspektren (Abb. 141, Abb. 143) und Formulierung der Fragmentierungsmechanismen (Abb. 142, Abb. 145) konnte kein Fragment gefunden werden, bei dem die zusätzlichen Methylengruppen an einer oder beiden verbindenden Isobutyl-Einheiten sein könnten. Abb. 143 zeigte den Zerfall einer langen Alkylkette. Aus diesem Grund wurde von der in Abb. 144 vorgeschlagenen Struktur bei der vollständigen Interpretation der Massenspektren ausgegangen.

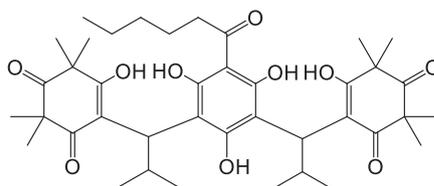


Abb. 144. Strukturvorschlag von Fraktion 4.11 = MC F (9).

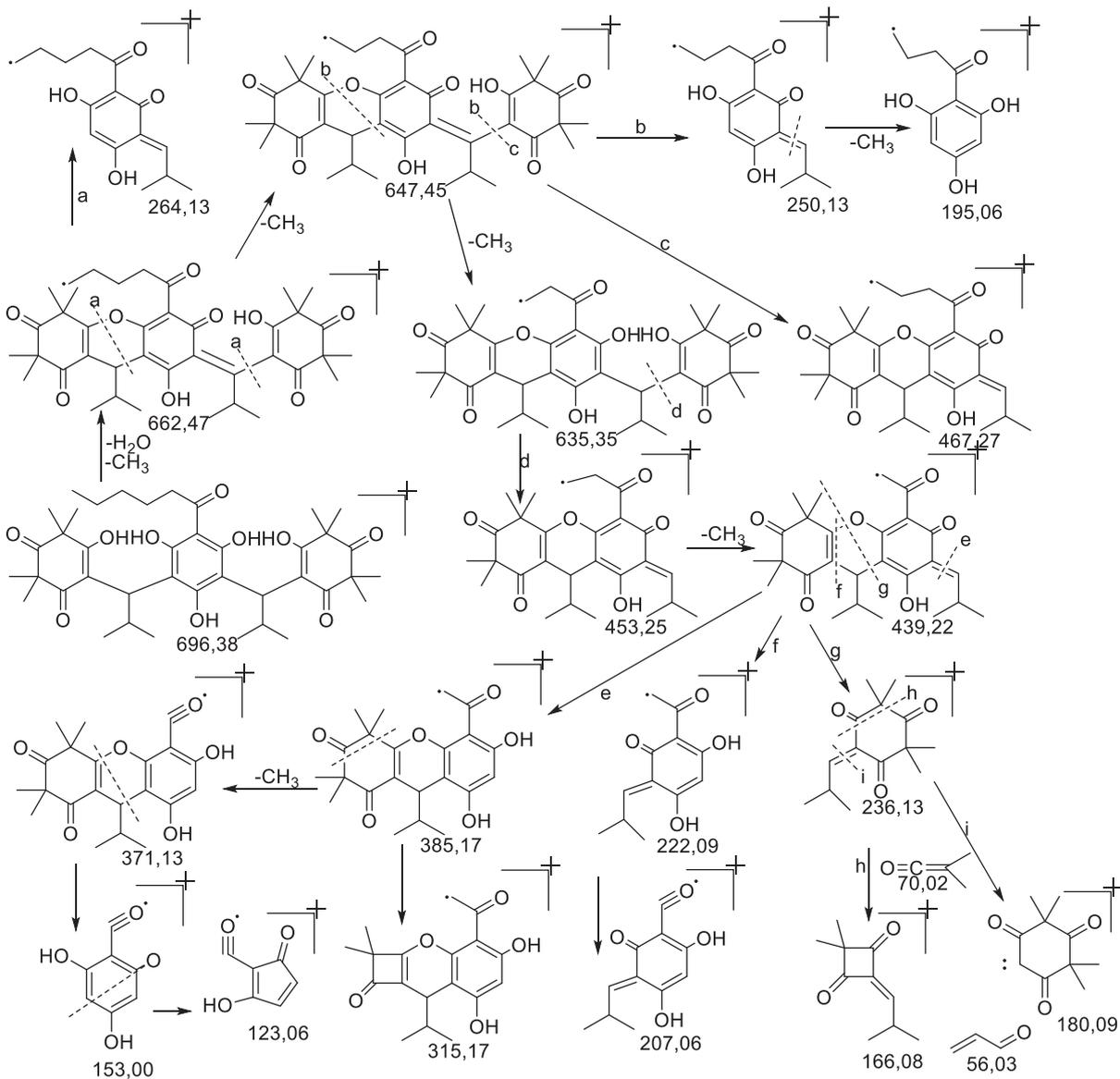


Abb. 145. möglicher Fragmentierungsmechanismus (EI) von Fraktion 4.11.

Unter Berücksichtigung von Abb. 144 und der Interpretation der Zerfallsprodukte in Abb. 141 und Abb. 143, ließ sich für Fraktion 4.11 die hypothetisch gefundene Struktur bestätigen. Die gefundenen m/z -Werte waren logisch und ließen sinnvolle Fragmente zu. Vor allem aus dem Spektrum in Abb. 141 konnte die Struktur sehr gut ermittelt werden, besonders durch Vergleich mit bereits interpretierten Spektren. Das Massenspektrum (EI) in Abb. 143 gab sehr detaillierte Informationen über den Aufbau der *n*-Hexanoylgruppe am Phloroglucin. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse scheint die Struktur in Abb. 144 für Fraktion 4.11 plausibel zu sein.

2.14.3.2. CD-Spektroskopie von Fraktion 4.11

Die Trennung wurde bereits in Abb. 140 gezeigt, da das Aufspaltungsmuster wichtige Hinweise auf die Struktur lieferte. Die präparative Trennung gestaltete sich relativ schwierig, da die Peaks schlechter getrennt waren. Es musste relativ viel verworfen werden um reine Fraktionen zu erhalten.

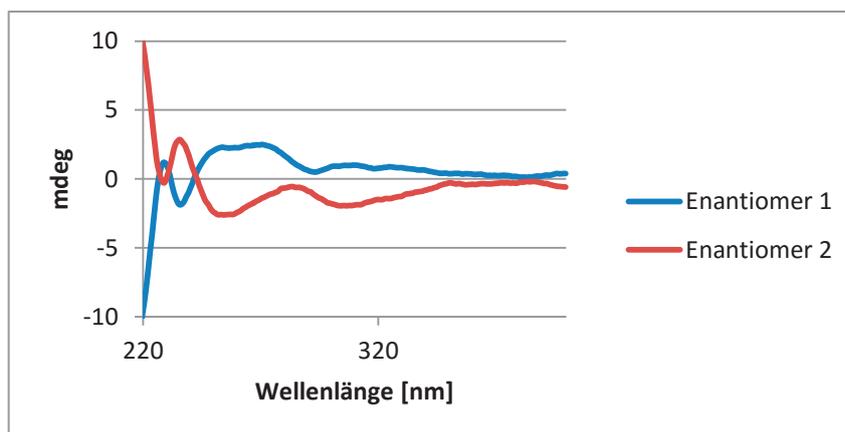


Abb. 146: CD-Spektren der getrennten Enantiomere von Fraktion 4.11 getrennt gemessen, aber in einer Abbildung zusammengefasst.

Die Enantiomere zeigen einen schwachen, entgegengesetzten Cotton-Effekt. Fraktion 4.11 konnte nur in sehr geringer Menge aus Fraktion 4 werden (Abb. 146) isoliert. Die ganze Probe wurde auf chiraler HPLC im Verhältnis 1 : 1 : 2 aufgetrennt. Somit blieb für jedes Enantiomer nur noch sehr wenig Material übrig. Trotzdem kann die Bestimmung der racemischen Struktur als erfolgreich angesehen werden.

2.14.3.3. Zusammenfassung zu Fraktion 4.11 = MC F (9)

Die Summenformel lieferte den Hinweis auf die Präsenz zweier CH_2 -Gruppen mehr in Bezug auf MC A (1) bzw. eine CH_2 -Gruppe mehr bezüglich Fraktion 4.9 und 4.10. Anlässlich der Retentionszeit auf RP18 und der Trennung der Isomere im Verhältnis 1 : 1 : 2 war die Grundstruktur von Verbindung **9** sehr naheliegend. Durch Vergleich der Massenspektren und Interpretation der Fragmentierungsmechanismen konnte schließlich Verbindung **9** als MC F identifiziert werden. Die ausführliche Interpretation der Massenspektren, der anderen hier isolierten Moleküle, vereinfachte die Strukturaufklärung sehr. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Quinn et al. [21]

wurde das hier isolierte MC F (**9**) razemisch vorgefunden. Möglicherweise kommt MC F (**9**) in *Corymbia scabrida* wirklich enantiomerenrein vor oder die von Quinn et al. isolierte Substanz war verunreinigt.

2.14.4. Zusammenfassung der Isolierung von Fraktion 4.9 bis Fraktion 4.11

Fraktion 4.9 bis 4.11 konnten alle aus Fraktion 4 in einem Schritt isoliert werden. Die Strukturaufklärung geschah analog bei allen Fraktionen mittels Massenspektrometrie und chiraler HPLC. Strukturell konnten Verbindungen gefunden werden, wie sie schon teilweise von Quinn [21] beschrieben worden sind. Anstelle der Isobutyrylgruppe am Phloroglucin konnte bei Verbindung Fraktion 4.9 eine n-Valeroylgruppe und bei Fraktion 4.11 eine n-Hexanoylgruppe gefunden werden. Bei Fraktion 4.10 wurde die Methylengruppe an einer verknüpfenden Isobutylgruppe gefunden.

Alle hier isolierten Verbindungen von MC A (**1**), MC F (**9**), NSMC (**30**), SMC (**4**), **54** und **55** zeigten eine razemische Enantiomerenzusammensetzung. Selbst das MC A (**1**) aus dem Pilzstamm Nicolleti's war razemisch.[24] Die Ergebnisse von Quinn [21] konnten bei keinem MCs bestätigt werden.

2.15. Homologe des NSMC (30)

In Abb. 72 wird das Chromatogramm von Fraktion 5 dargestellt. Aus dieser wurden bereits das NSMC (**30**) = Fraktion 5.1.1 und das SMC (**4**) = Fraktion 5.1.2 isoliert. Zusätzlich wurden noch die Fraktionen 5.2.1 bis 5.3.2 entdeckt. Mit Hilfe von LC-MS konnten in einem ersten Screening die Massen 445,25 für Fraktion 5.2.1 und 5.2.2, die Masse von 459,30 für Fraktion 5.3.1 und für Fraktion 5.3.2 die Masse 473,30 bestimmt werden (vgl. Abb. 42). Da alle sechs Fraktionen nacheinander eluierten und sich die Masse um eine CH₂-Gruppe unterscheiden, lag die Vermutung nahe, es könnte sich um Homologe mit NSMC-Struktur handeln. Theoretische Überlegungen lassen für die Lage der CH₂-Gruppe 3 Positionen im Molekül möglich erscheinen (Abb. 147): 1. An der Isobutyrylgruppe des Phloroglucin, 2. an der Isobutylgruppe zwischen Phloroglucin und Syncarpinsäure (**21**), 3. anstelle des aromatischen Protons am Phloroglucin.

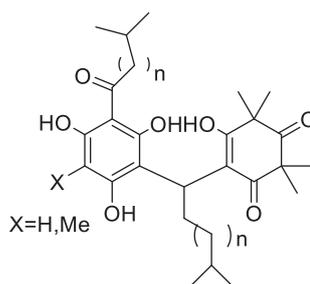


Abb. 147. mögliche
Strukturen für Fraktion 5.2.1
bis 5.3.2
n= 1 bis 3

Um die Lage der zusätzlichen Methylengruppe im Molekül zu bestimmen, wurden Fraktion 5.2.1 bis 5.3.2 präparativ isoliert. Dies geschah analog zu der Isolierung von **30** und **4**. Nach einmaliger präparativer Auftrennung, konnten alle Fraktionen mit mehr als 95% Reinheit isoliert werden. Der einzige Unterschied gab es bezüglich der Menge, da der Gehalt kontinuierlich von Fraktion 5.1.1 bis 5.3.2 abnahm (siehe Abb. 148, Abb. 149, Abb. 150, Abb. 151).

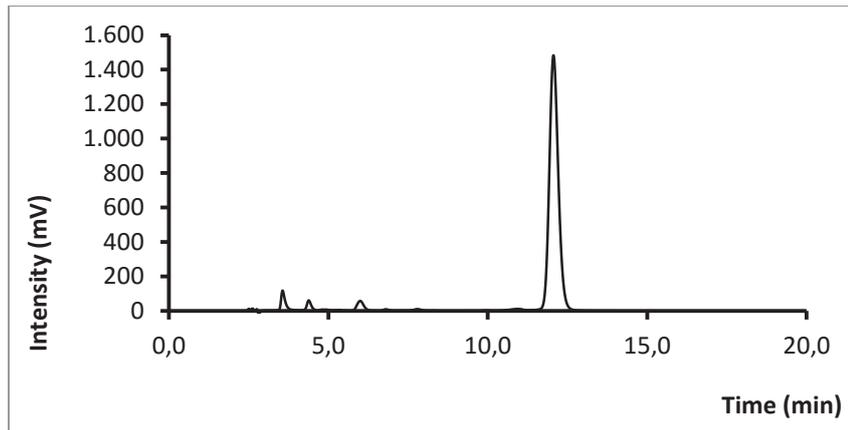


Abb. 148. Chromatogramm von Fraktion 5.2.1.
M&N C18ec, MeOH(0,1 % TFA) : H₂O(0,1 % TFA) 90 : 10 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

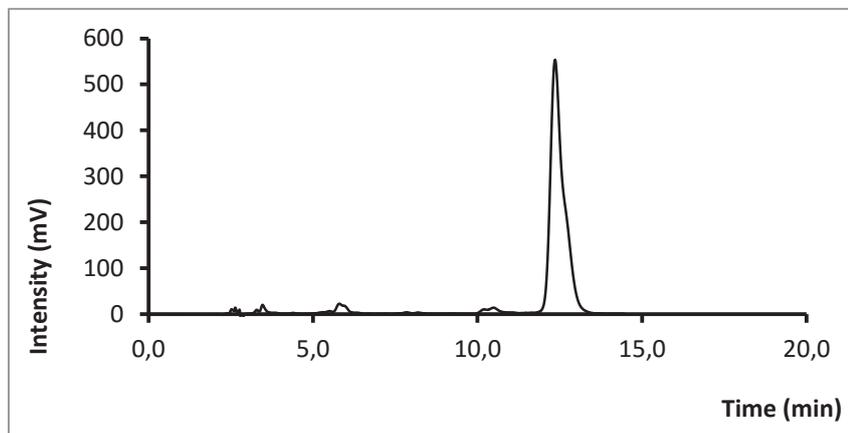


Abb. 149. Chromatogramm von Fraktion 5.2.2.
M&N C18ec, MeOH(0,1 % TFA) : H₂O(0,1 % TFA): 90 : 10 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

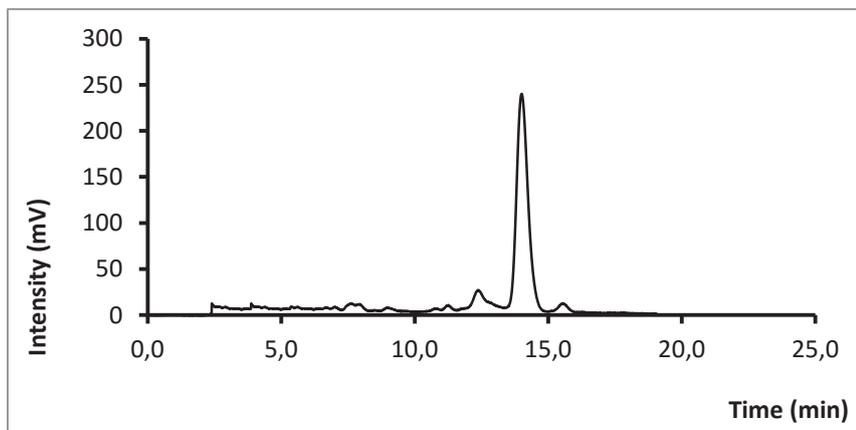


Abb. 150. Chromatogramm von Fraktion 5.3.1.
M&N C18ec, MeOH(0,1 % TFA) : H₂O(0,1 % TFA): 90 : 10 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

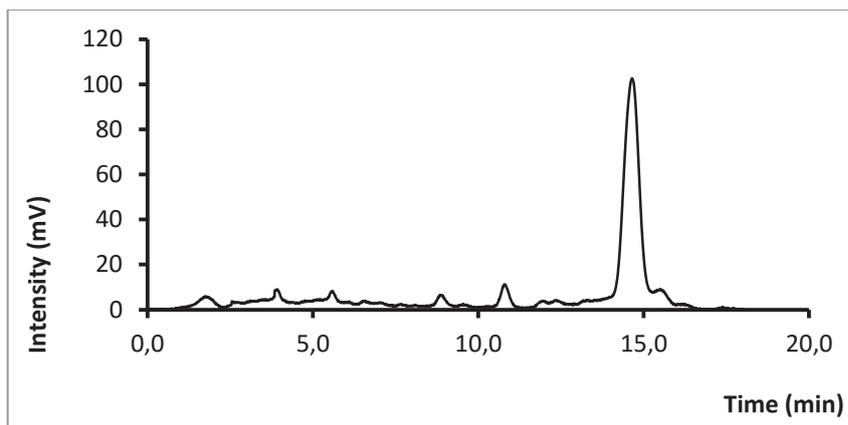


Abb. 151. Chromatogramm von Fraktion 5.3.2.
M&N C18ec, MeOH(0,1 % TFA) : H₂O(0,1%TFA) 90 : 10 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Auf Grund des geringen Vorkommens von Fraktion 5.3.2 konnte dieses mit einer Reinheit von nur 85% isoliert werden. Weitere Reinigungsschritte hätten zu einem größeren Produktverlust geführt.

2.15.1. Strukturaufklärung von Fraktion 5.2.1

2.15.1.1. Massenspektrometrie von Fraktion 5.2.1

Um die Struktur von Fraktion 5.2.1 näher zu bestimmen, wurde ein ¹H-NMR aufgenommen. Wie bei bisher allen unzyklisierten MCs war es nicht möglich die Signale sinnvoll zu interpretieren, da die Spektren die bekannte Problematik zeigten. Eine Zyklisierung hätte zu viel Probe benötigt, da die Fraktion 5.2.1 nur sehr gering in der Myrte vorhanden war. Aus diesem Grund wurde eine Reihe von Massenspektren gemessen (Tabelle 30).

Tabelle 30. hochaufgelöste Masse (ESI(-)) von Fraktion 5.2.1.

Probe	Summenformel	[M-H] berechnet	[M-H] gemessen	Abweichung [ppm]	Kommentar
Fraktion 5.2.1	C ₂₅ H ₃₄ O ₇	445,223179	445,22236	-1,84	
		446,226534	446,22550	-2,32	1x ¹³ C

Aus HR-MS-Messungen wurde C₂₅H₃₄O₇ als Summenformel erhalten. Die Abweichung der Massen war kleiner 5 ppm. Fraktion 5.2.1 zeigte somit die gleiche Summenformel wie SMC (4). Da Fraktion 5.2.1 als getrennte Peaks von der RP18-

Säule eluierten, musste es sich um verschiedene Verbindungen handeln. Im Vergleich zum NSMC (**30**) war die Masse um eine CH_2 -Gruppe erhöht, da es sich nicht um SMC (**4**) handelte, musste die zusätzliche Methylengruppe an einer der Isobutylgruppen zu finden sein. Da Semimyrtucommulone keine meso-Form besitzen, konnte durch deren Trennung in Stereoisomere keine strukturelle Information über Symmetrieelemente gewonnen werden.

Aus den bisher gemachten Erfahrungen zur Elution auf RP18-HPLC, der hochaufgelösten Massen und der Kenntnisse aus der Strukturaufklärung von Fraktion 4.9 bis Fraktion 4.11 wurde Abb. 156 als möglicher Strukturvorschlag gemacht. Anhand des Massenspektrums (Abb. 152) wurde die Interpretation vorgenommen.

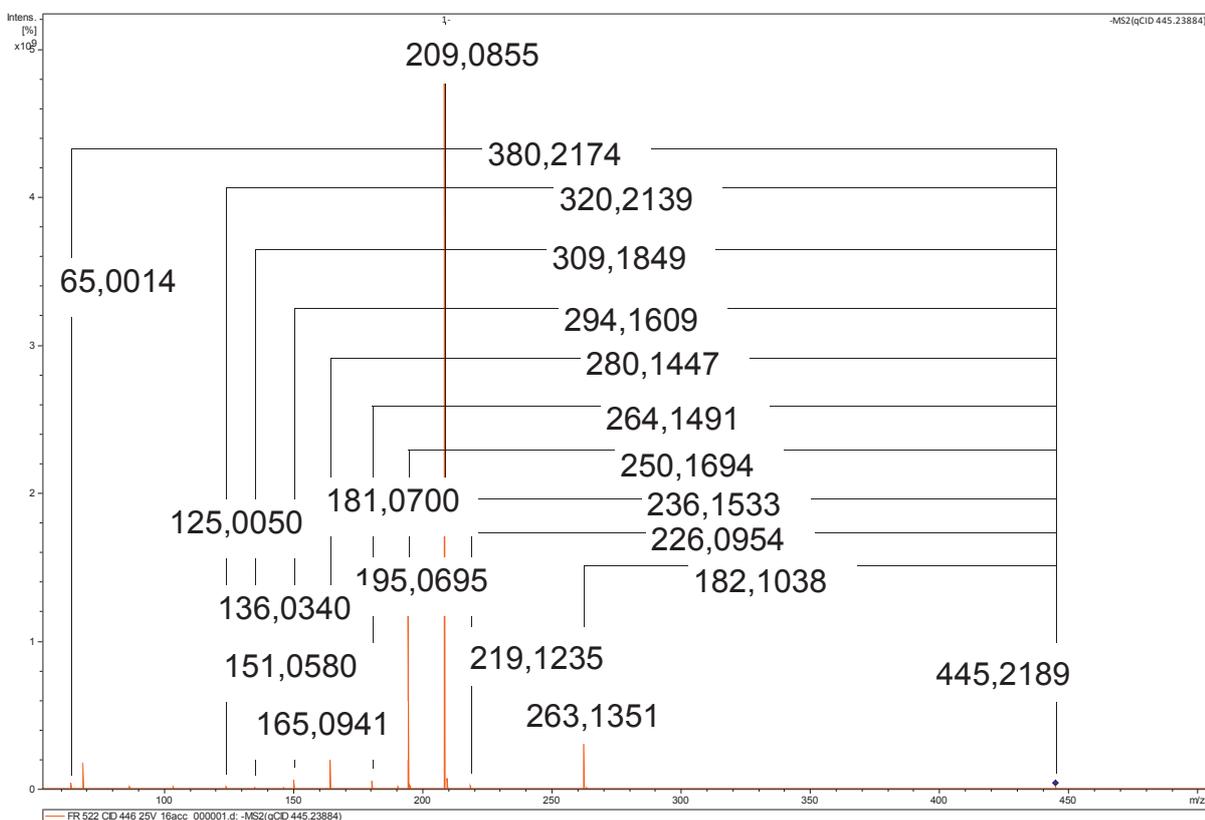


Abb. 152. Massenspektrum (ESI(-), 25 eV) von Fraktion 5.2.1.

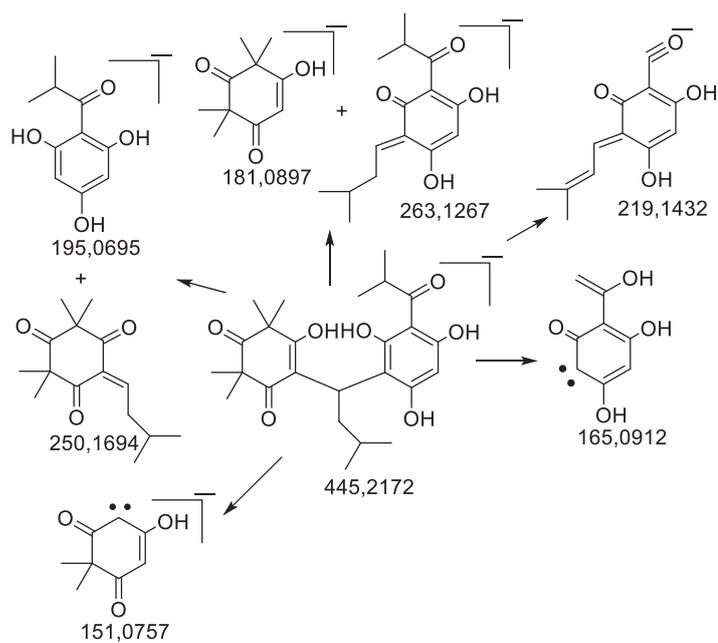


Abb. 153. möglicher Fragmentierungsmechanismus von Fraktion 5.2.1.

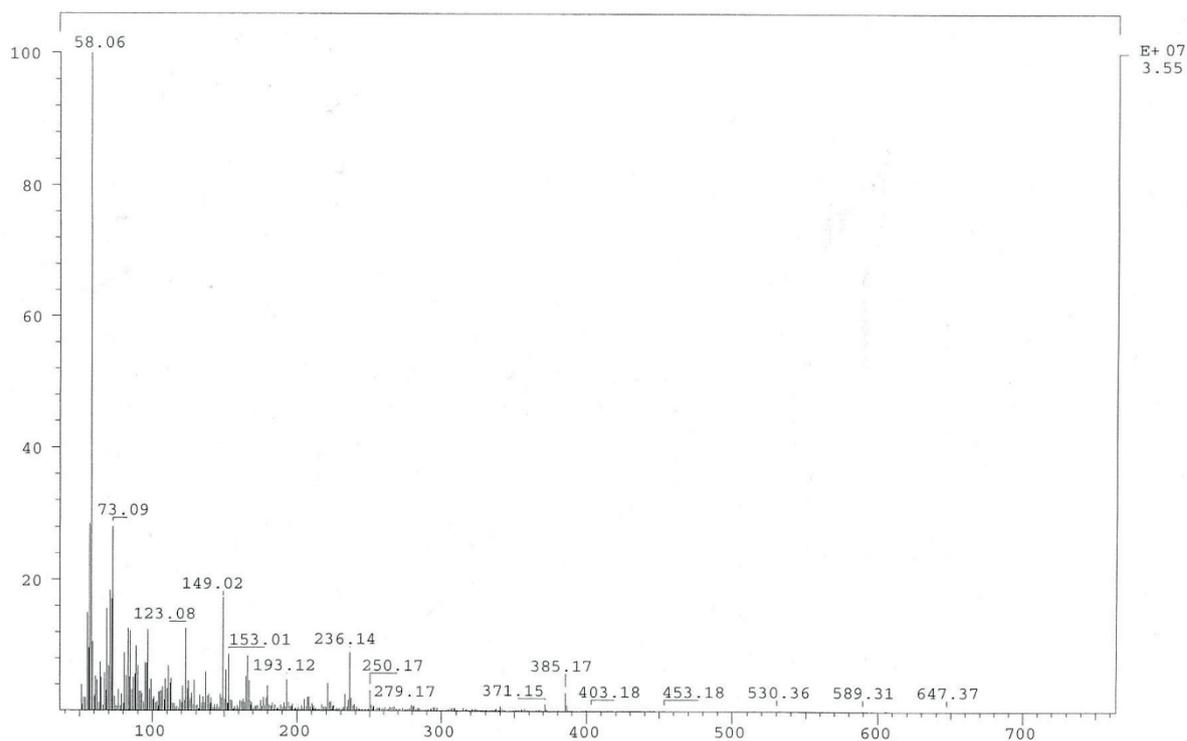


Abb. 154. Massenspektrum (EI, 70 eV) von Fraktion 5.2.1.

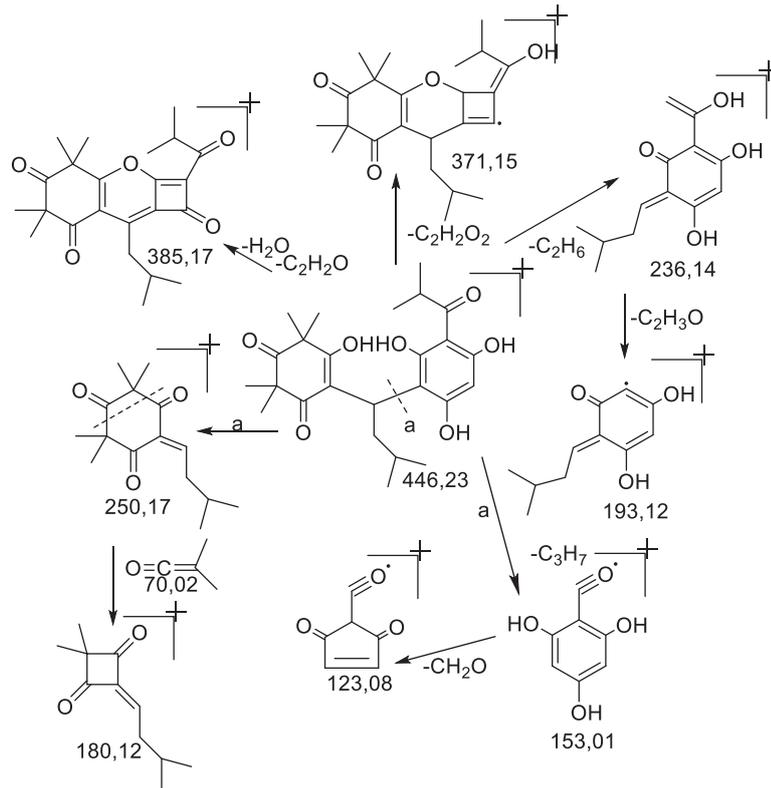
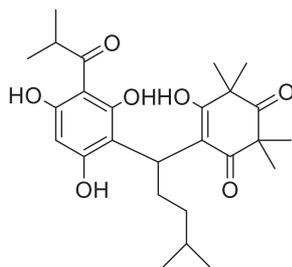


Abb. 155. möglicher Fragmentierungsmechanismus von Fraktion 5.2.1.

Die Auswertung der Fragmentierungsmechanismen (Abb. 153, Abb. 155) ergab als sinnvollste Struktur die in Abb. 156 abgebildete Verbindung.



56

Abb. 156. Struktur von Fraktion 5.2.1 (**56**).

Sowohl in Abb. 152 und Abb. 154 konnten Fragmente identifiziert werden, bei denen die zusätzliche CH_2 -Gruppe einmal an der Sincarpinsäure und einmal am Phloroglucin zu finden war. Somit mussten sich beide Bestandteile die Gruppe teilen. Anders gesagt, die zusätzliche CH_2 -Gruppe musste an der verknüpfenden

Isobutylgruppe zu finden sein. Wäre die Methylengruppe allein am Phloroglucin zu finden gewesen, so hätten keine Fragmente der Syncarpinsäure mit der Methylengruppe auftreten können. Unter Berücksichtigung der Verbindung **55**, bei der dieses Strukturmerkmal ebenso aufgetreten war, macht Abb. 156 umso mehr Sinn, da **56** als Prekursor für **55** angesehen werden kann. Es handelte sich hier um das gleiche Aufbauprinzip wie NSMC (**30**) für MC A (**1**) darstellt. Die Existenz von MCs mit einer Methylengruppe mehr an dieser Isobutyrylgruppe wurde schon von Quinn beschrieben.[21]

2.15.1.2. CD-Spektroskopie von Fraktion 5.2.1

Um von den Enantiomeren aus Verbindung **56** ein CD-Spektrum zu erhalten, mussten diese zuerst getrennt werden. Die klassischen HPLC Bedingungen für die Trennung auf der Reprosil Chiral NR im Laufmittel EtOH: Puffer(NH₄OAc pH4 AcOH) führten hier zu keiner Trennung. Es war anzunehmen, dass die zusätzliche CH₂-Gruppe am Stereozentrum die Trennung beeinflusst. Es wurde daher nach einem neuen Trennsystem gesucht. Ein Säulenwechsel brachte keine Trennmöglichkeit. Erst der Wechsel des Puffers erlaubte eine akzeptable Trennung von Fraktion 5.2.1.

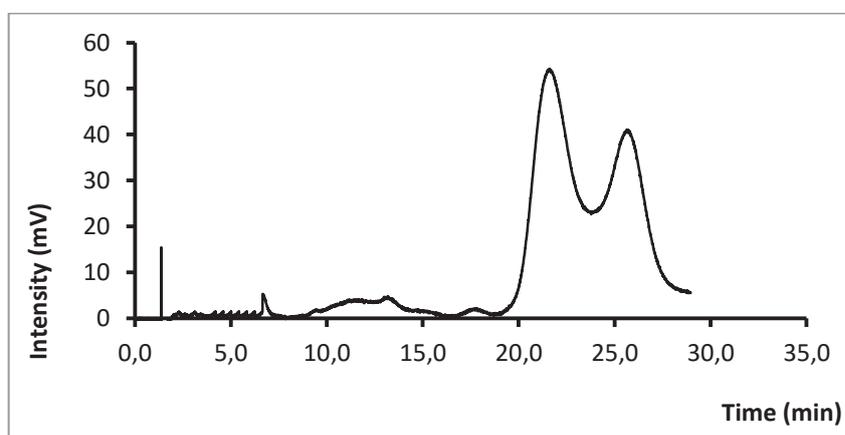


Abb. 157. Chromatogramm der Trennung von Fraktion 5.2.1
Reprosil Chiral NR, EtOH : Puffer (40 mM Na₃C₆H₅O₇, pH 4,5 C₆H₈O₇) 55 : 45 v/v,
F: 1,5 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Erst nach längeren Optimierungsversuchen konnte Zitrat als geeignetes Pufferreagenz entdeckt werden. Es konnte keine Basislinientrennung erreicht werden. Trotzdem konnte mit dieser Trennmethode ein Enantiomerenverhältnis von 1 : 1 ermittelt werden (Abb. 157). Dieses Ergebnis passte mit den vorherigen Erkenntnissen, die im Bereich von NSMC (**30**) und SMC (**4**) gemacht worden sind

überein. Die präparative Trennung konnte vergleichbar mit der analytischen Trennung durchgeführt werden, aber schlechter basisliniengetrennt (siehe Kapitel 2.10.1). Nach Entfernen des Lösemittels konnten die beiden getrennten Enantiomere mittels CD-Spektroskopie untersucht werden. In Abb. 158 wird der entgegengesetzte Cotton-Effekt der Enantiomere abgebildet. Somit handelt es sich bei den in Abb. 157 gezeigten Peaks um die Enantiomere von Fraktion 5.2.1. Demnach liegt Verbindung **56** ebenso racemisch vor, wie die bisher beschriebenen Verbindungen.

Die von Quinn [21] beschriebenen MCs mit einer zusätzlichen Methylengruppe konnten hier ebenso gefundenen werden. Jedoch wurden in dieser Arbeit racemische Verbindungen anstelle von enantiomerenreinen Verbindungen gefunden.

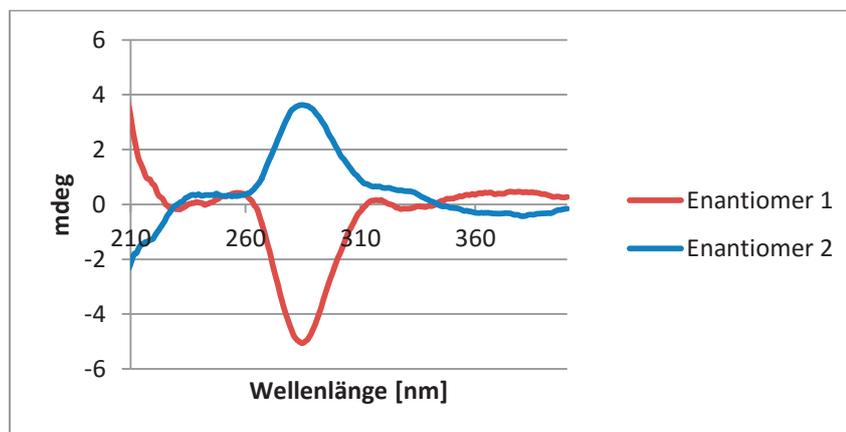


Abb. 158. CD-Spektrum der Enantiomere von Fraktion 5.2.1

2.15.2. Strukturaufklärung von Fraktion 5.2.2

2.15.2.1. Massenspektrometrie von Fraktion 5.2.2

Um die Struktur von Fraktion 5.2.2 aufzuklären wurde eine Reihe massenspektroskopischer Messungen durchgeführt. Die Aufnahme eines NMR-Spektrums war auf Grund der geringen Probenmenge und der NMR-Problematik der Myrtucommulone nicht sinnvoll. Mittels hochaufgelöster Masse (ESI(-)) konnte die Summenformel bestimmt werden (Tabelle 31).

Tabelle 31. hochaufgelöste Masse (ESI(-)) von Fraktion 5.2.2.

Probe	Summenformel	[M-H] berechnet	[M-H] gemessen	Abweichung [ppm]	Kommentar
Fraktion 5.2.2	C ₂₅ H ₃₄ O ₇	445,223179	445,22132	-4,18	
		446,226534	446,22441	-5,30	1x ¹³ C

Die Abweichung der Massen war ohne ¹³C-Messung kleiner 5 ppm. Für das ¹³C ergab sich eine Abweichung von -5,30 ppm. Da dieser Wert nur sehr wenig von 5 ppm abwich und die Messung ohne ¹³C akzeptabel war, kann die hier bestimmte Summenformel als richtig angesehen werden. Aus HR-MS-Messungen wurde C₂₅H₃₄O₇ als Summenformel erhalten. Fraktion 5.2.2 zeigte somit die gleiche Summenformel wie SMC (**4**) und Fraktion 5.2.1. Da diese aber als getrennte Peaks von der RP18-Säule eluierten, musste es sich um verschiedene Verbindungen handeln. Da die Struktur von SMC (**4**) und Verbindung **56** bekannt waren, wurde die Vermutung angestellt, die zusätzliche CH₂-Gruppe könnte im Bereich der Isobutyrylgruppe der Phloroglucineinheit zu finden sein.

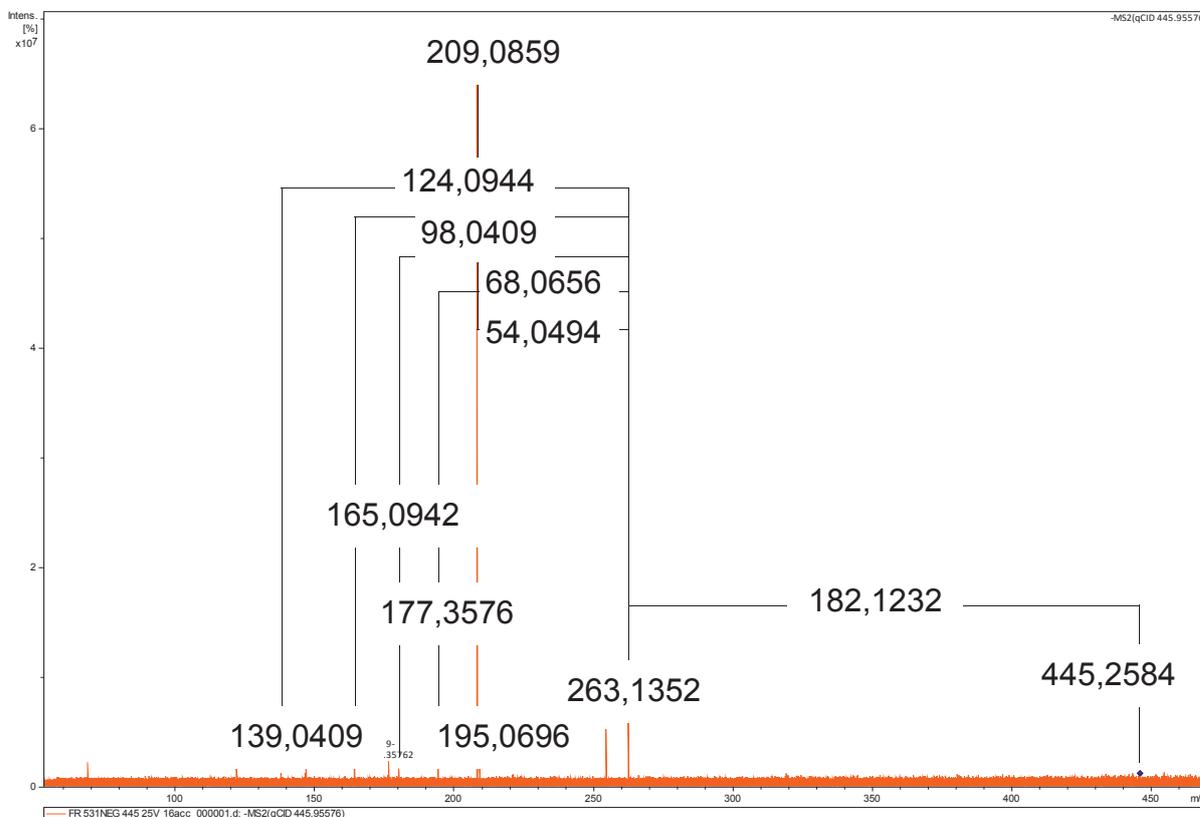


Abb. 159. Massenspektrum (ESI(-), 25 eV) von Fraktion 5.2.2.

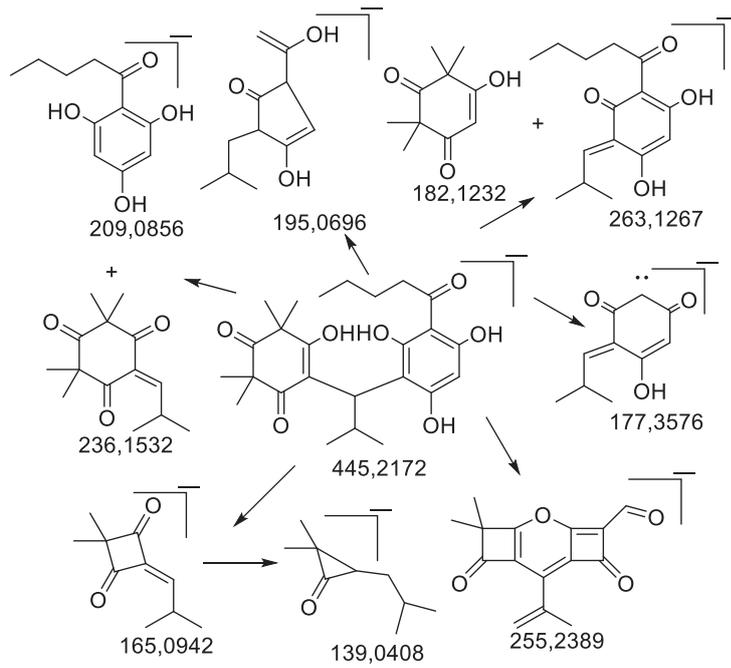


Abb. 160. möglicher Fragmentierungsmechanismus (ESI(-)) von Fraktion 5.2.2.

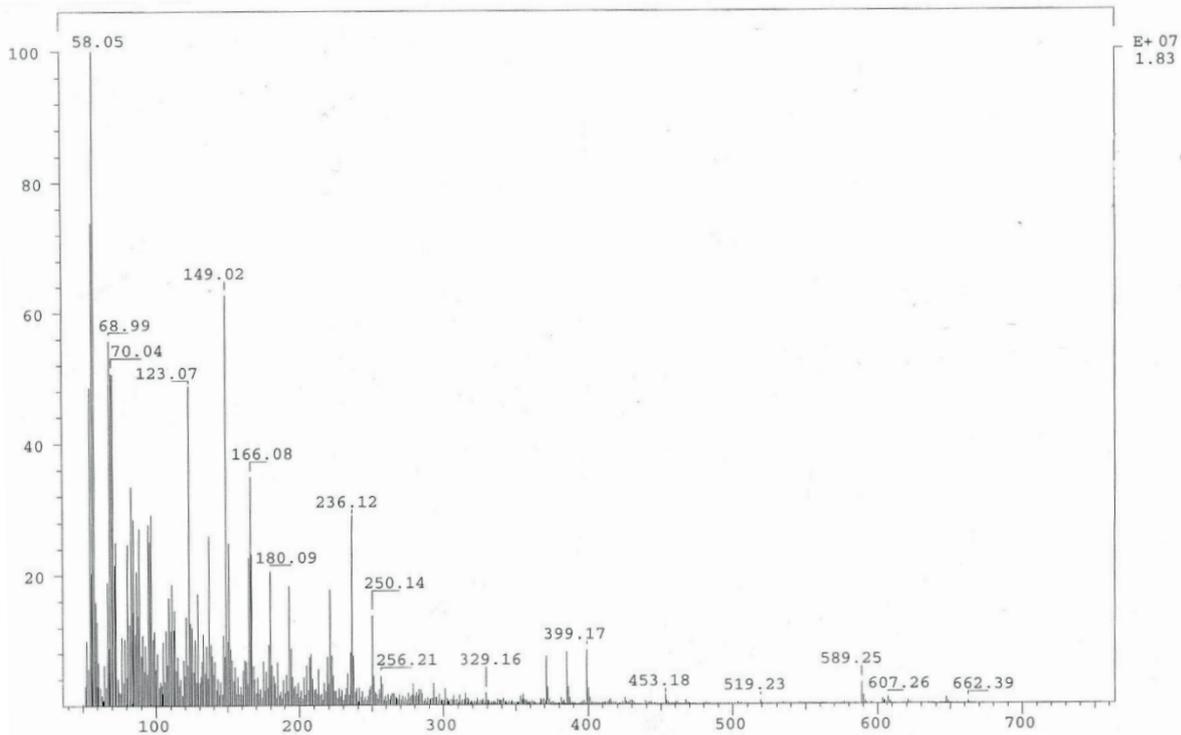


Abb. 161. Massenspektrum von (EI, 70 eV) Fraktion 5.2.2.

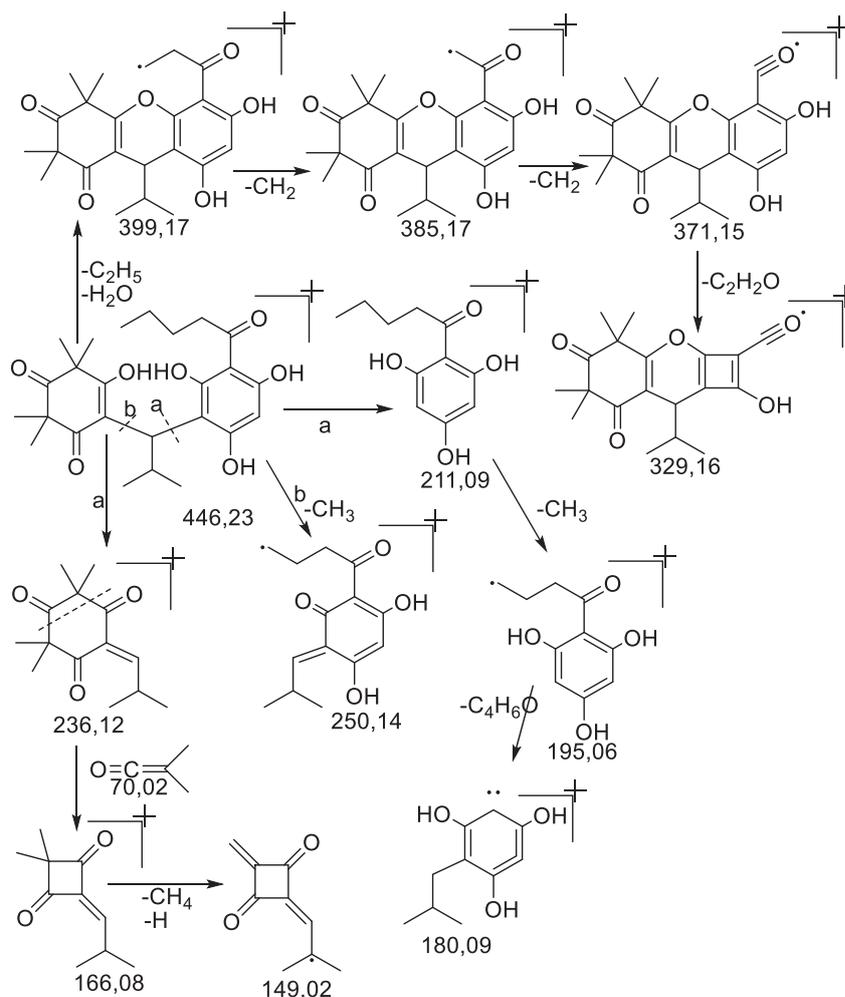
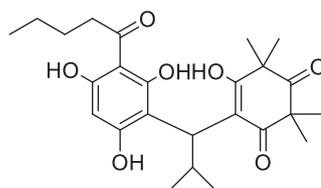


Abb. 162. möglicher Fragmentierungsmechanismus von Fraktion 5.2.2.



57

Abb. 163. möglicher Strukturvorschlag von Fraktion 5.2.2 (**57**).

Aus den Spektren in Abb. 159 und Abb. 161 und den Fragmentierungsmechanismen (Abb. 160, Abb. 162) konnte der Strukturvorschlag in Abb. 163 bestätigt werden. Umgekehrt wie bei Verbindung **56** konnte die zusätzliche Methylengruppe nicht an der Syncarpinsäure gefunden werden, sondern ausschließlich am Phloroglucin. Man konnte im EI-Spektrum das Zerfallsmuster einer Alkylkette erkennen. Sowohl die

Ausgangsverbindung, wie alle anderen Fragmente wiesen diesen Zerfall im Alkylbereich auf. Die Schlussfolgerung war sinnvoll, da Fraktion 4.9 **54** ebenso diese Gruppe besitzt. Vor allem unter der Annahme, dass **57** Prekursor zu Verbindung **54** ist, ist die Struktur sinnvoll.

2.15.2.2. CD-Spektroskopie von Fraktion 5.2.2

Für die Aufnahme des CD-Spektrums wurde Fraktion 5.2.2 auf der Reprosil Chiral im Zitratpuffer getrennt. Wegen der nur geringen Probemenge fand die Trennung auf der analytischen HPLC statt (Abb. 164). In 5 Läufen konnte genügend Material für die CD-Spektroskopie gewonnen werden.

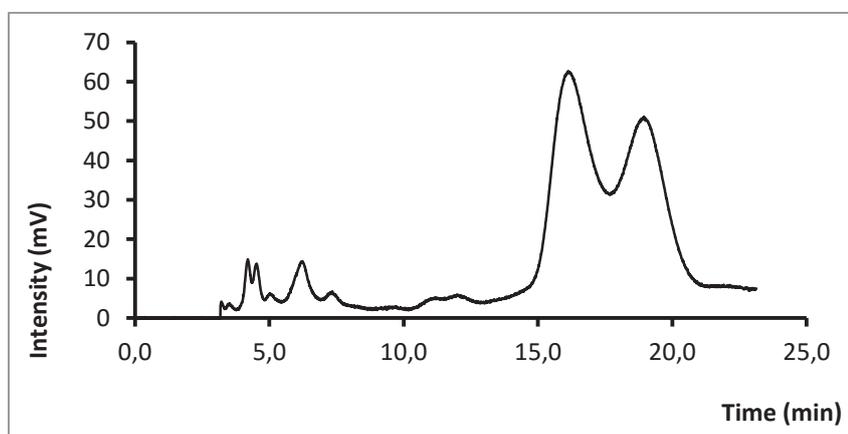


Abb. 164. Chromatogramm der Trennung von Fraktion 5.2.2. Reprosil Chiral NR, EtOH : Puffer (40 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, pH 4,5 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 55 : 45 v/v, F: 1,5 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 μL , Konz: \approx 1 mg/mL

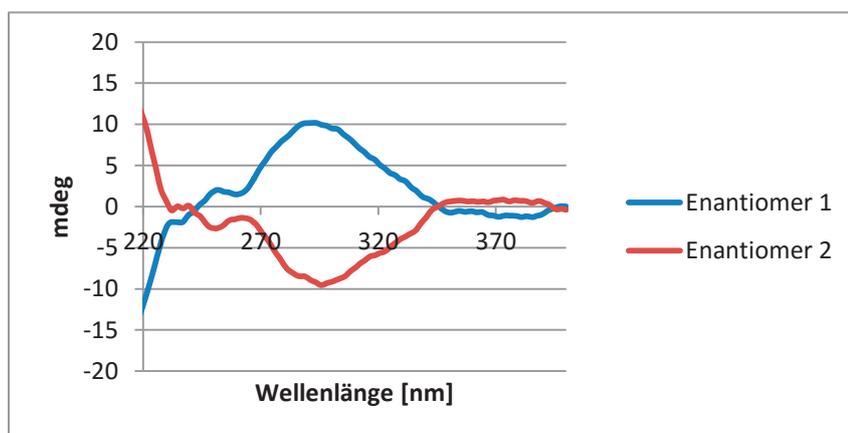


Abb. 165. CD-Spektren der Enantiomere von Fraktion 5.2.2 getrennt vermessen, aber in der gleichen Abbildung zusammengefasst.

Durch die präparative Trennung mittels analytischer HPLC konnten genügend reines Material erhalten werden. Das CD-Spektrum (Abb. 165) zeigte zwei entgegengesetzt verlaufende Kurven. Somit zeigte Verbindung **57** die gleiche razemische Zusammensetzung wie bereits alle anderen isolierten und untersuchten Verbindungen in dieser Arbeit.

2.15.3. Strukturaufklärung von Fraktion 5.3.1

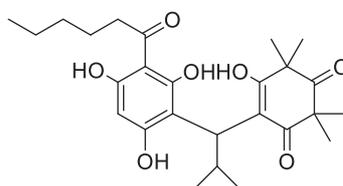
2.15.3.1. Massenspektrometrie von Fraktion 5.3.1

Die NMR-Spektroskopie bot sich hier als Analyseverfahren ebenso wenig an wie zuvor, weshalb die Struktur mittels ESI(-) -HRMS bestimmt worden war (Tabelle 32).

Tabelle 32. hochaufgelöste Masse (ESI(-)) von Fraktion 5.3.1.

Probe	Summenformel	[M-H] berechnet	[M-H] gemessen	Abweichung [ppm]	Kommentar
Fraktion 5.3.1	C ₂₆ H ₃₆ O ₇	459,238829	459,23738	-3,16	
		460,242184	460,24103	-2,51	1x ¹³ C

Die Abweichung der Massen war kleiner 5 ppm. Aus der HR-MS-Messung wurde C₂₆H₃₆O₇ als Summenformel erhalten. Fraktion 5.3.1 zeigte somit im Vergleich zur vorherigen Fraktion eine Methylengruppe mehr. Schon wie zuvor würde diese Gruppe im Bereich der Isobutyrylgruppen/n-Valeroylgruppen am sinnvollsten sein. Daraus resultiert der Strukturvorschlag in Abb. 166.



58

Abb. 166: möglicher Strukturvorschlag von Fraktion 5.3.1 (**58**).

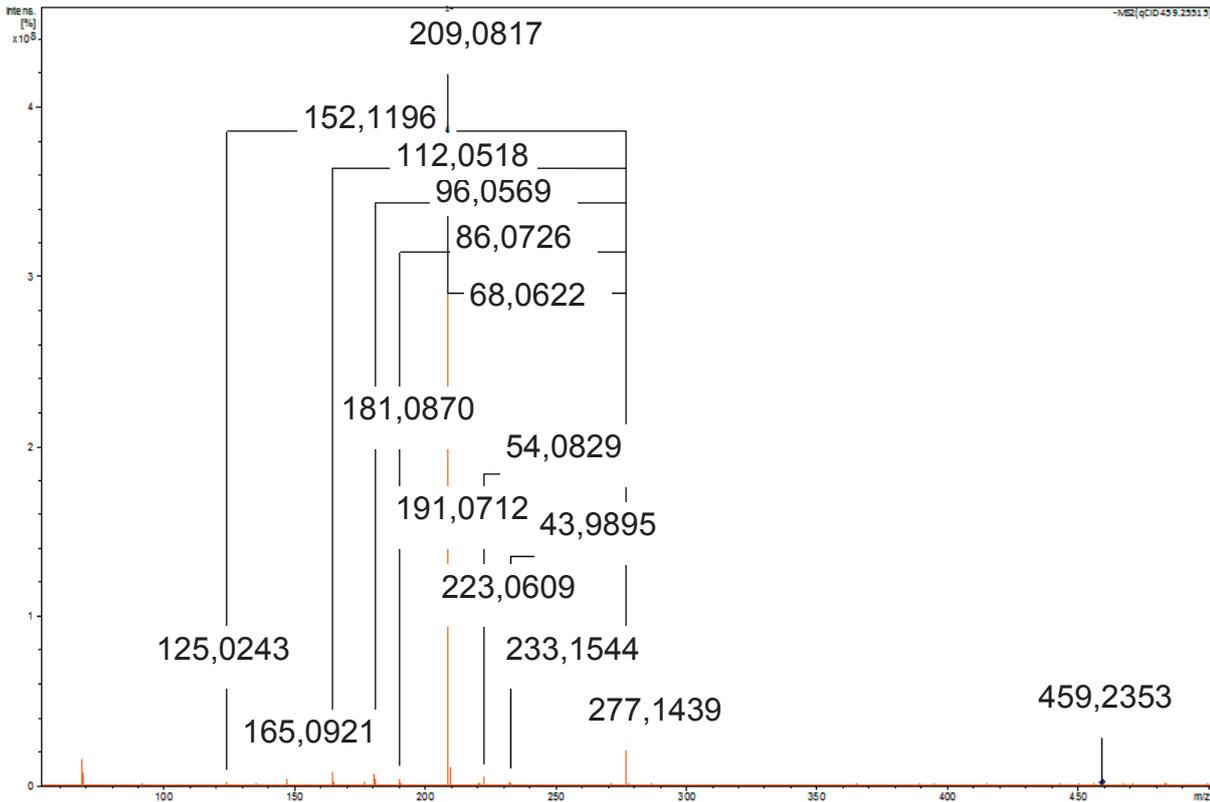


Abb. 167. Massenspektrum (ESI(-), 25 eV) von Fraktion 5.3.1.

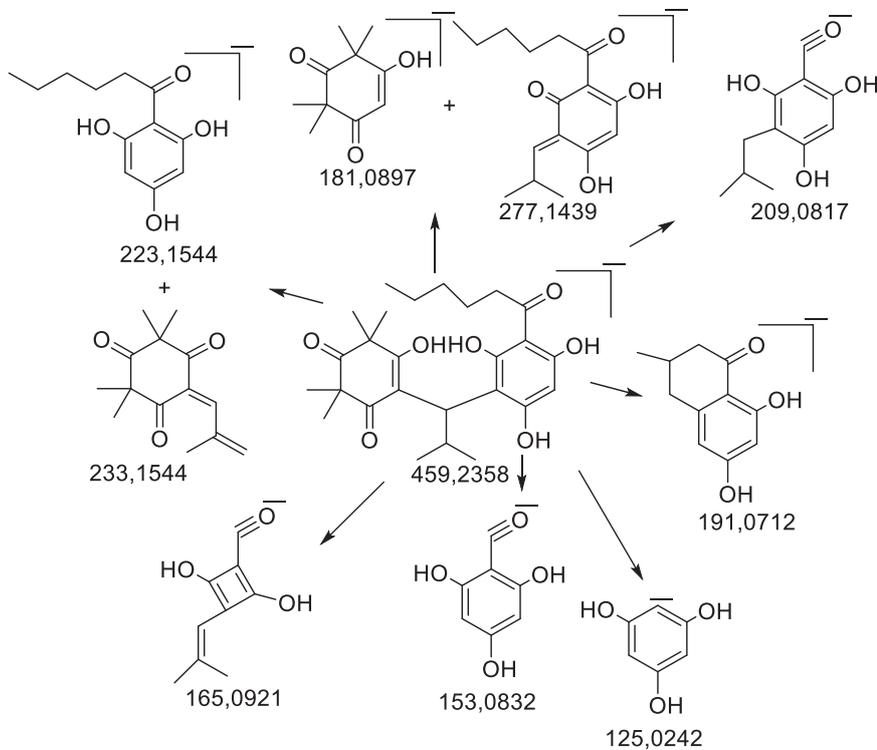


Abb. 168. möglicher Fragmentierungsmechanismus (ESI(-)) von Fraktion 5.3.1.

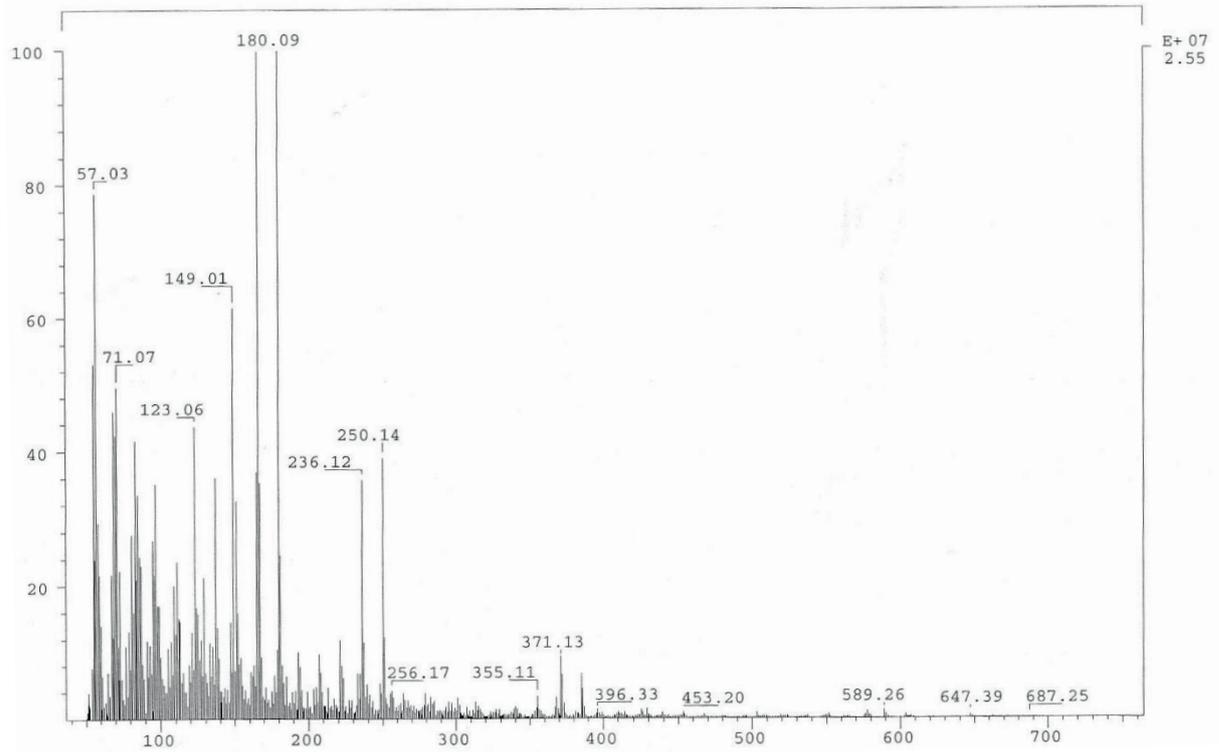


Abb. 169. Massenspektrum (EI, 70 eV) von Fraktion 5.3.1

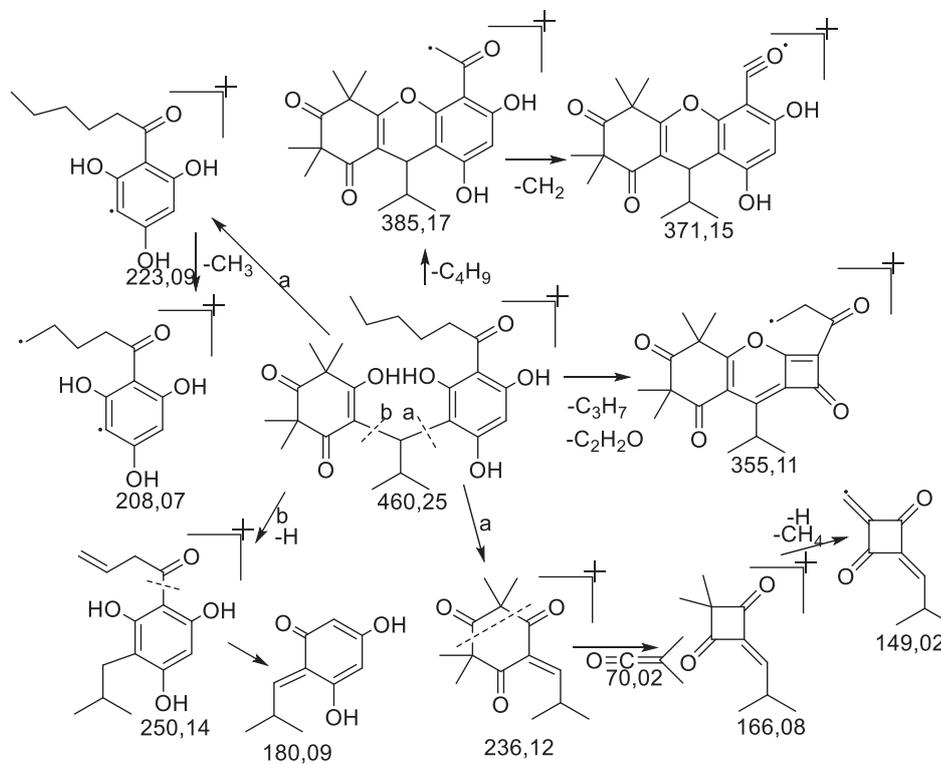


Abb. 170. möglicher Fragmentierungsmechanismus (EI) von Fraktion 5.3.1

Betrachtet man die Fragmente des Phloroglucins und der Syncarpinsäure in der Abb. 168 und Abb. 170 bezüglich ihrer Struktur an der verknüpfenden Isobutylgruppe, so stellte man fest, dass die zusätzliche Methylengruppe nur am Phloroglucin sein kann. Daher musste die CH_2 -Gruppe im Bereich der Isobutyrylgruppe des Phloroglucins zu finden sein. Abb. 170 zeigte ein typisches Zerfallsmuster einer Alkylkette. Aus diesem Grund ist es sinnvoll nicht von einer Isobutyrylgruppe auszugehen, sondern von einer n-Hexanoylkette. Prinzipiell lassen sich die erhaltenen Spektren mit diesen Annahmen gut interpretieren und die in Abb. 166 vorgeschlagene Struktur bestätigen.

Die Tatsache, dass die n-Hexanoylkette bereits in Fraktion 4.11 (MC F (9)) vorgefunden werden konnte führt zu der Feststellung, dass Verbindung **58** wohl als Prekursor beim Aufbau von (9) dienen könnte.

2.15.3.2. CD-Spektroskopie von Fraktion 5.3.1

Um die Enantiomere von Fraktion 5.3.1 im CD-Spektrometer untersuchen zu können, mussten diese getrennt werden. Dies geschah wieder auf der Reprisil Chiral im Zitratpuffer.

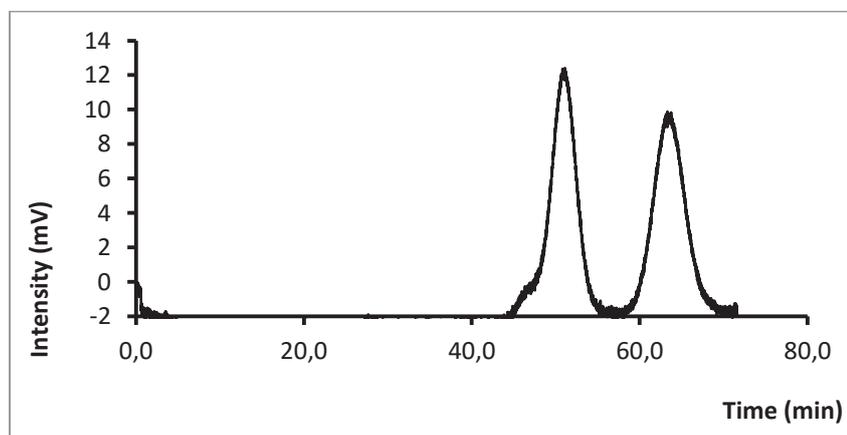


Abb. 171. Chromatogramm der Trennung von Fraktion 5.3.1.
Sykam, Reprisil Chiral NR, EtOH : Puffer (60 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, pH 4,5 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 55 : 45 v/v,
F: 1,5 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 μL , Konz: \approx 1 mg/mL

In Abb. 171 ist deutlich die Trennung in die beiden Enantiomere zu erkennen. Das Verhältnis lag bei 1 : 1. Von Fraktion 5.3.1 konnte nicht sehr viel Material isoliert werden, weshalb diese in mehreren analytischen HPLC-Läufen getrennt worden war.

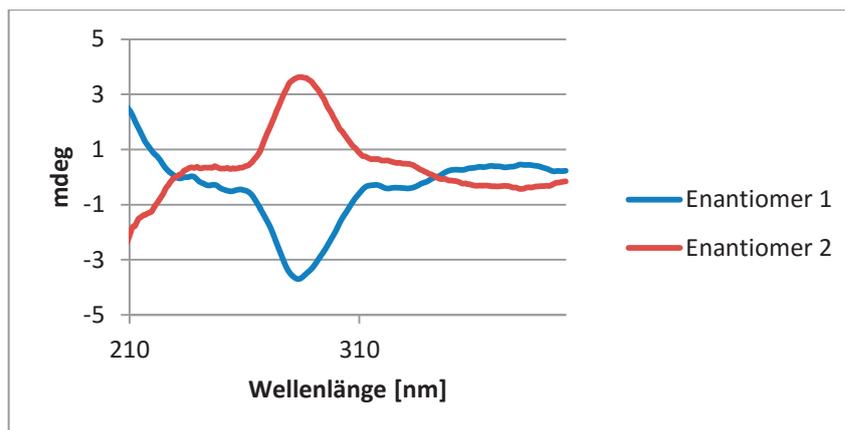


Abb. 172. CD-Spektren der Enantiomere von Fraktion 5.3.2. getrennt vermessen, aber in der gleichen Abbildung zusammengefasst.

Im CD-Spektrum (Abb. 172) wurden zwei entgegengesetzt verlaufende Kurven erhalten. Somit konnte die Trennung in die Enantiomere von Fraktion 5.3.1 bestätigt werden. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den bisher gemachten Erkenntnissen. Es handelte sich wieder um eine racemische Verbindung.

2.15.4. Strukturaufklärung von Fraktion 5.3.2

2.15.4.1. CD-Spektroskopie von Fraktion. 5.3.2

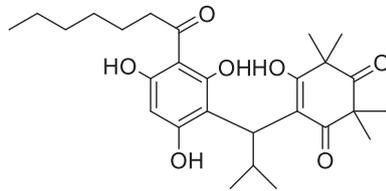
Die NMR-Spektroskopie bot sich hier wiederum als Analyseverfahren wenig an, weshalb die Struktur mittels Massenspektrometrie aufgeklärt wurde. Durch die hochaufgelöste Masse (ESI(-)) konnte die Summenformel (Tabelle 33) bestimmt werden.

Tabelle 33. hochaufgelöste Masse (ESI(-)) von Fraktion 5.3.2.

Probe	Summenformel	[M-H] berechnet	[M-H] gemessen	Abweichung [ppm]	Kommentar
Fraktion 5.3.2	$C_{27}H_{38}O_7$	473,254479	473,25324	-2,62	
		474,257834	474,25739	-0,94	$1 \times ^{13}C$

Die Abweichung der Massen war kleiner 5 ppm und somit in einem guten Bereich. Aus HRMS-Messungen wurde $C_{27}H_{38}O_7$ als Summenformel erhalten. Fraktion 5.3.2 zeigte somit im Vergleich zur vorherigen Fraktion eine Methylengruppe mehr. Im Vergleich zu SMC (**4**) zeigte diese Fraktion sogar 2 CH_2 -Gruppen mehr. Die

zusätzliche Methylengruppe könnte im Bereich der verknüpfenden Isobutylgruppe oder an der n-Hexanoylkette zu finden sein. Unter Berücksichtigung der bisher bekannten Strukturen, wurde folgender Strukturvorschlag (Abb. 173) entwickelt und anhand der Spektren überprüft.



59

Abb. 173. möglicher Strukturvorschlag von Fraktion 5.3.2 (**59**).

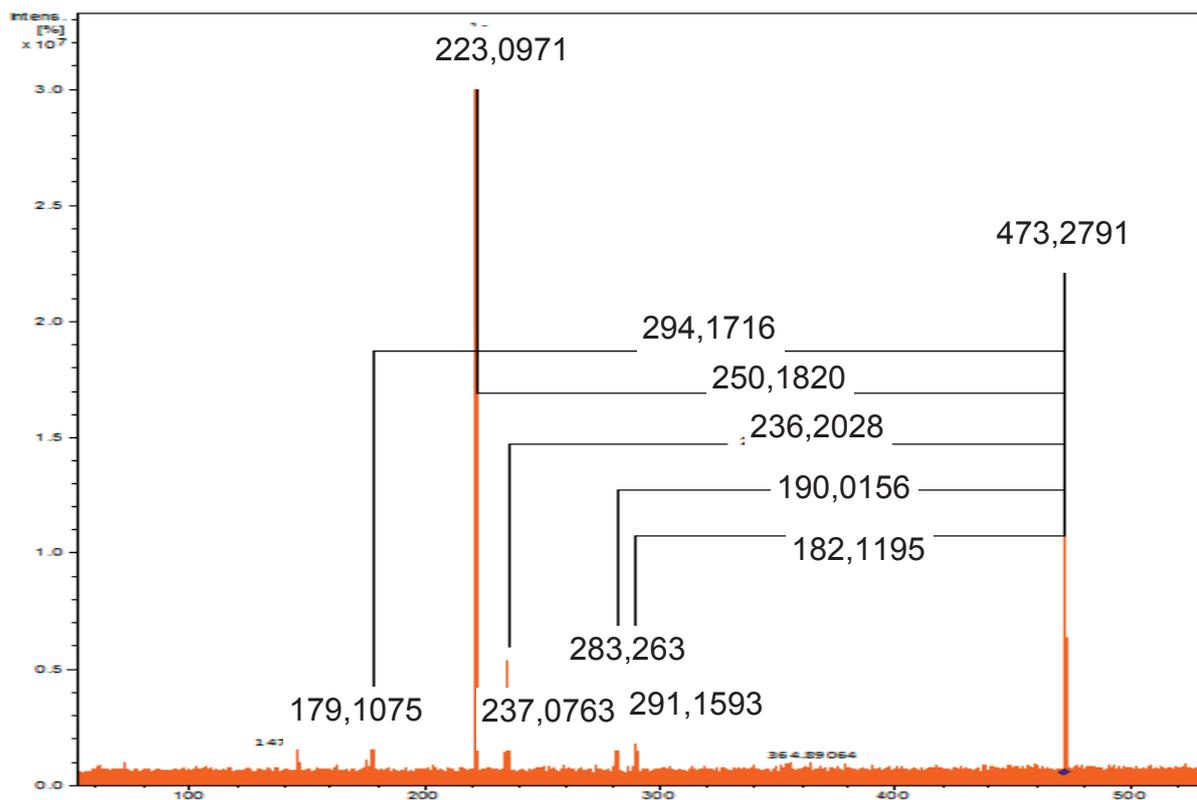


Abb. 174. Massenspektrum (ESI(-), 25 eV) von Fraktion 5.3.2.

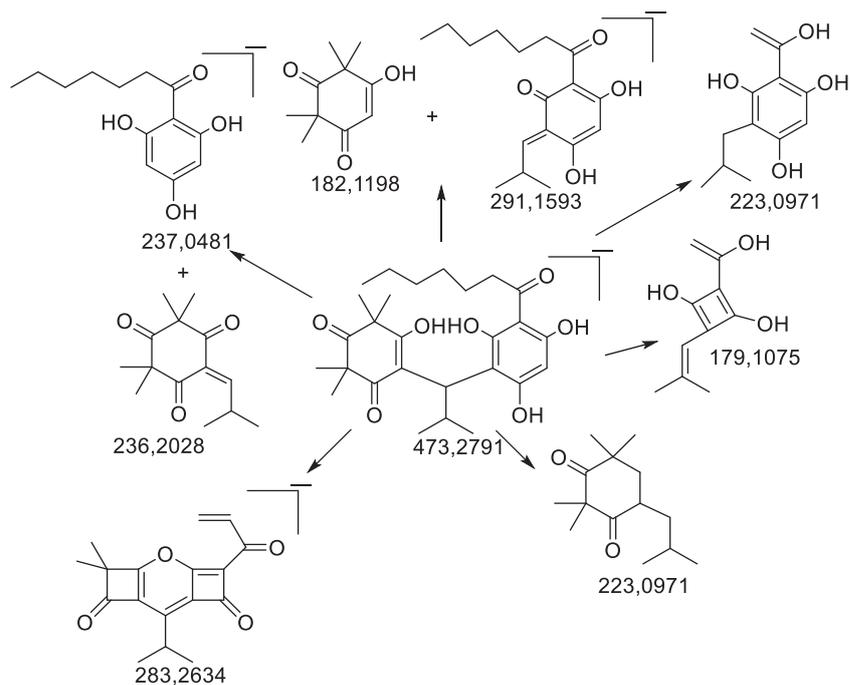


Abb. 175. möglicher Fragmentierungsmechanismus (ESI(-)) von Fraktion 5.3.2.

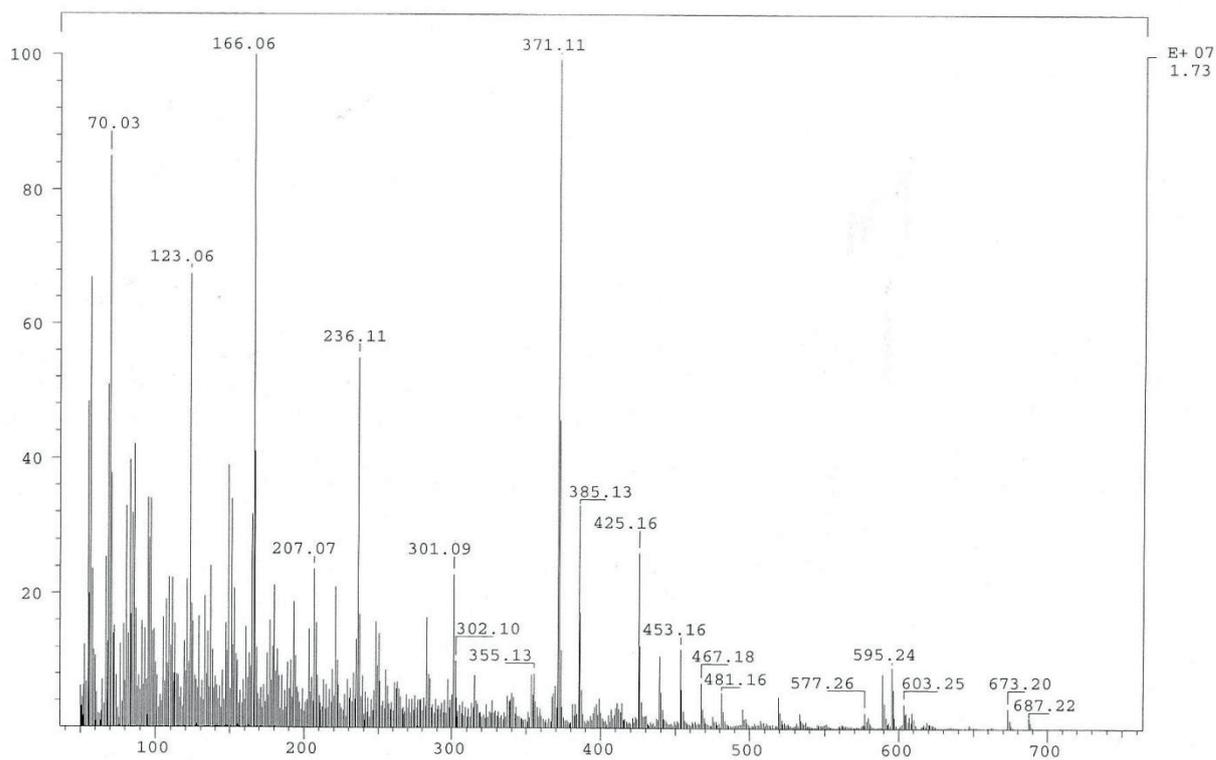


Abb. 176. Massenspektrum (EI, 70 eV) von Fraktion 5.3.2.

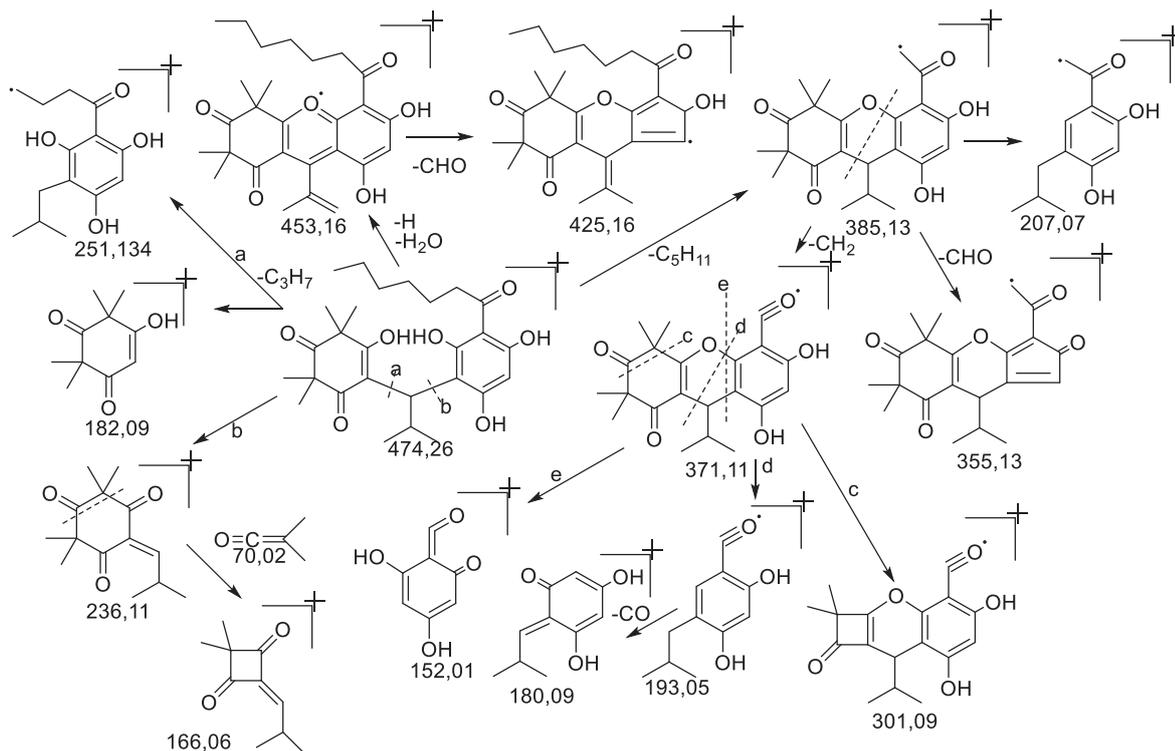


Abb. 177. möglicher Fragmentierungsmechanismus (EI) von Fraktion 5.3.2.

Die Analyse der Fragmentierungsmechanismen in Abb. 175 und Abb. 177 erfolgte besonders anhand der Fragmente des Phloroglucins und der Syncarpinsäure. Die zusätzliche Methylengruppe konnte wieder in der Acylgruppe am Phloroglucin lokalisiert werden. In Abb. 176 konnte das Zerfallsmuster einer Alkylkette beobachtet werden. Auf diese analoge Art und Weise der Spektreninterpretation konnte die in Abb. 173 vorgeschlagene Struktur bestätigt werden.

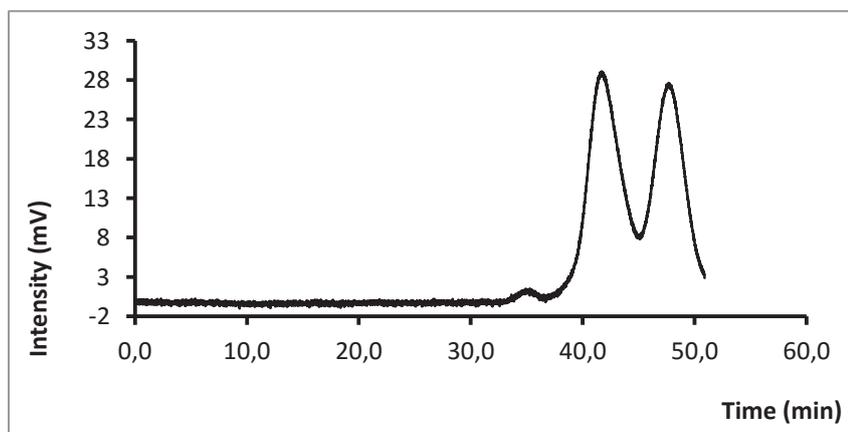


Abb. 178. Chromatogramm der Trennung von Fraktion 5.3.2.
 Reprosil Chiral NR, EtOH : Puffer (60 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, pH 4,5 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 55 : 45 v/v,
 F: 1,5 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 μL , Konz: ≈ 1 mg/mL

Verbindung **59** wurde auf der Reprosil Chiral NR im Zitratpuffer in seine Enantiomere aufgetrennt (Abb. 148). Es wurde ein Verhältnis von 48 : 52 erhalten, was in guter Näherung 1 : 1 entspricht. Somit setzte sich auch Fraktion 5.3.2 racemisch zusammen. Ein CD-Spektrum konnte nicht gemessen werden, da nicht genügend Material isoliert werden konnte.

2.15.5. Zusammenfassung der Strukturaufklärung von Fraktion 5.2.1 bis Fraktion 5.3.2

Die Strukturaufklärung erfolgte bei allen Verbindungen durch Massenspektrometrie. Zu Beginn wurde die Summenformel aus der hochaufgelösten Masse bestimmt. Es wurde ein Spektrum in ESI(-) und im EI-Modus gemessen. Da die Strukturen, die Spektren und die Fragmentierungsmechanismen von NSMC (**30**) und SMC (**4**) bekannt waren, konnten diese als Ausgangsbasis zum Vergleich für Fraktion 5.2.1 – 5.3.2 verwendet werden. Vor allem die Fragmente des Phloroglucin bzw. der Syncarpinsäure mit oder ohne Isobutylgruppe gaben einen wichtigen Hinweis auf die Struktur. Aus deren Fragmenten konnten wiederum wichtige Strukturmerkmale erkannt werden. Ebenso konnte im Spektrum, welches durch EI aufgenommen wurde, die Struktur der Seitenkette näher bestimmt werden.

Die hier gefundenen Strukturen passten gut mit den Strukturen, die bei den Homologen des MC A (**1**) gefunden worden waren, überein. Als mögliche Erklärung können die Strukturen der Homologe des NSMC (**30**) als Prekursor für die Homologen des MC A (**1**) betrachtet werden. Die n-Valeroyl-, die n-Hexanoylgruppe und die zusätzliche CH₂-Gruppe an der verknüpfenden Isobutylgruppe konnten bei den Myrtucommulonen, wie als auch bei den Semimyrtucommulonen gefunden werden.

Lediglich ein Homologes des MC A (**1**) mit n-Heptanoylgruppe, analog zu dem Homologen des NSMC mit n-Heptanoylgruppe konnte nicht entdeckt werden.

Von allen Verbindungen wurde eine chirale Trennung durchgeführt mit anschließender Untersuchung der Enantiomere durch CD-Spektroskopie. Bei jedem Homologen konnte eine racemische Zusammensetzung gefunden werden, genauso wie bei Fraktion 4.9 bis Fraktion 4.11. Wieso Quinn et al. [21] optische Aktivität für die von ihnen gefundenen MCs angeben konnten, kann aus Sicht dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden (Fehlende Reinheit?, Isolierung aus *Corymbia scabrida*?).

2.16. Myrtucommulon C (6)

2.16.1. Isolierung von Fraktion 4.3 6a und 4.6 6b

Bei der Isolierung des MC A (1) aus von Fraktion 4 konnten mittels LC-MS (ESI(-)) zwei Peaks (Fraktion 4.3 und Fraktion 4.6) in Abb. 45 mit einem m/z-Verhältnis von 649,10 gefunden werden. Prinzipiell würde diese Masse dem MC C (6) und dem MC D (7) entsprechen. Aus diesem Grund, wurden beide Peaks isoliert. Dies geschah in dem chromatographischen System wie in Abb. 209 dargestellt, analog zur Isolierung des MC A (1). Fraktion 4.3 **6a** musste zweimal auf der präparativen HPLC (Abb. 209) und Fraktion 4.6 **6b** dreimal (Abb. 210) gereinigt werden, um diese mit einer Reinheit von > 98 % zu erhalten (Abb. 179, Abb. 180).

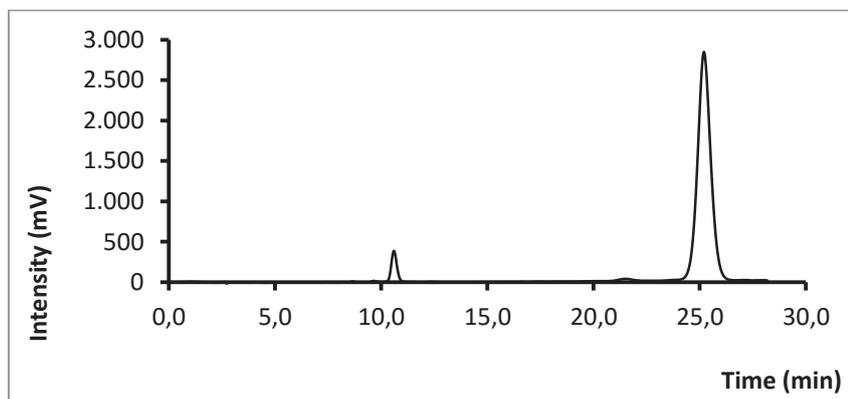


Abb. 179. Chromatogramm von Fraktion 4.3 (**6a**) nach 2x präparativer HPLC.
M&N C18ec, MeOH(0,1 % TFA) : H₂O(0,1 % TFA): 92 : 8 v/v.;
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

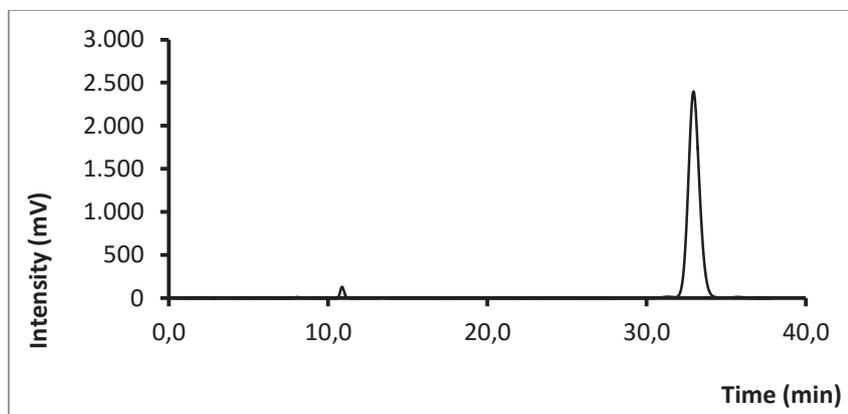


Abb. 180. Chromatogramm von Fraktion 4.6 (**6b**) nach 3x präparativer HPLC
M&N C18ec, MeOH(0,1 % TFA) : H₂O(0,1 % TFA): 92 : 8 v/v.;
F: 1,0 mL/min, T: 24°C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

2.16.2. Analytik von MC C (6)

2.16.2.1 NMR-Spektroskopie von MC C (6)

Um die Struktur von Fraktion 4.3 **6a** und 4.6 **6b** genauer identifizieren zu können, wurde von diesen ein vollständiger Satz an NMR-Spektren aufgenommen. Für die Interpretation der Spektren sind die im Folgenden gemachten Überlegungen wichtig. Betrachtet man die Struktur von MC D (**7**) (Abb. 9) so stellt man fest, dass dieses Molekül komplett zyklisiert vorliegt, allerdings nicht linear wie das PMCA (**2**), sondern gewinkelt. Betrachtet man hingegen die Struktur von MC C (**6**) (Abb. 9) so stellt man fest, dass diese Verbindung an einer Syncarpinsäureeinheit zyklisiert und an der anderen Syncarpinsäureeinheit unzyklisiert vorliegt. Verbindung **6** ähnelt somit einer Mischung aus (**1**) und (**2**). Sowohl das MC C (**6**) als auch das MC D (**7**) enthalten keine Spiegelebene und besitzen daher auch keine meso-Form. An dieser Stelle wäre es daher plausibel anzunehmen, dass es sich bei Fraktion 4.3 und 4.6 entweder um MC C (**6**) oder MC D (**7**) oder um die jeweiligen Diastereoisomeren beider Verbindungen handeln könnte.

Abb. 181 zeigt die ¹H-NMR-Spektren von Fraktion 4.3 **6a** und 4.6 **6b**. Die Signale im Tieffeld bestehen aus Singulettpaaren aufgespalten im Verhältnis von näherungsweise 3 : 1. Ebenso liegt dieses Verhältnis auch bei den teilweise komplexer aufgespaltenen Signalen im Hochfeld vor. Ähnlich wie beim MC A (**1**), können diese Signale nicht eindeutig interpretiert werden. Dieses Aufspaltungsmuster kann auf drei Arten gedeutet werden. 1.) Es handelt sich sowohl bei Fraktion 4.3 **6a** als auch Fraktion 4.6 **6b** um diastereomere Verunreinigungen, die chromatographisch nicht abgetrennt worden sind. 2.) Das Aufspaltungsmuster resultiert aus dem Auftreten von Keto-Enol-Tautomeren. 3.) Das Spektrum zeigt eine komplexe Mischung aus diastereomeren Verunreinigungen und von Keto-Enol-Tautomeren.

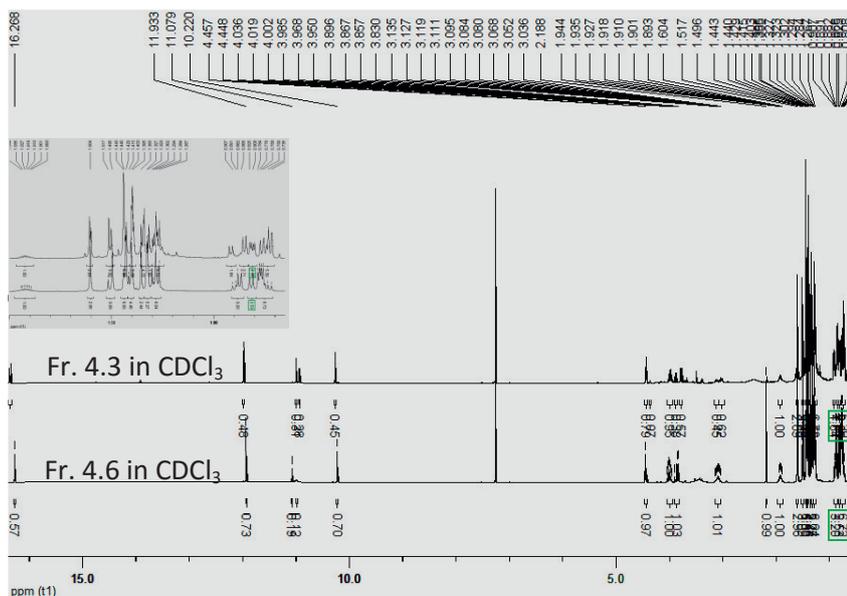


Abb. 181. ¹H-NMR-Spektren von Fraktion 4.3 und 4.6 in CDCl₃ zum besseren Vergleich in derselben Abbildung.

Um Signalaufspaltungen, verursacht durch Keto-Enol-Tautomere zu unterdrücken, wurde ein ¹H-Spektrum in Aceton-d₆ mit einem Tropfen D₂O aufgenommen. Dadurch werden enolische OH-Gruppen durch Deuterium ausgetauscht und die Signale werden in den NMR-Spektren verschwinden.

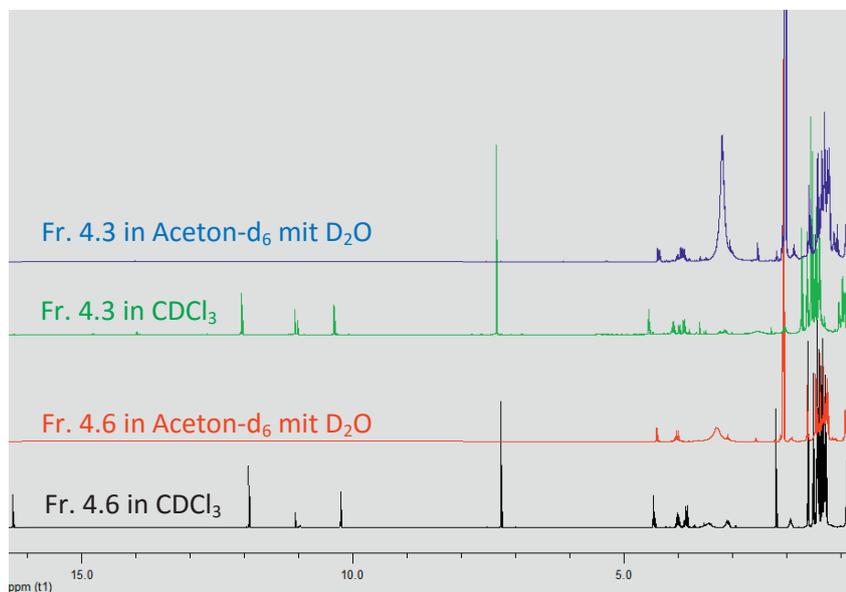


Abb. 182. ¹H-NMR-Spektren von Fraktion von 4.3 und 4.6 in CDCl₃ und in Aceton-d₆ mit D₂O im Vergleich.

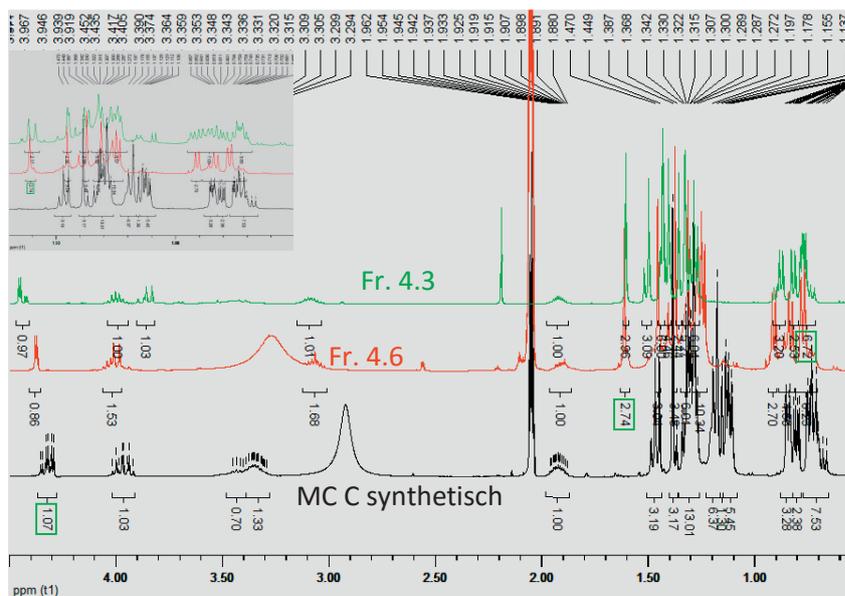


Abb. 183. Ausschnitt der ^1H -NMR-Spektren von Fraktion von 4.3 und 4.6 in Aceton- d_6 mit D_2O , zum Vergleich wird das ^1H -Spektrum von synthetischem MC C (**6**) mitabgebildet.

Abb. 181 zeigt, dass die Spektren mit D_2O -Zugabe keine aufgespaltenen Signale mehr im Verhältnis von näherungsweise 3 : 1 enthalten, wodurch die Interpretation im Hochfeld (Abb. 183) deutlich einfacher wird. Die Signale der enolischen Protonen im Tieffeld verschwinden ganz. Es handelte sich somit nicht um irgendwelche diastereomere Verunreinigungen im Spektrum (was prinzipiell schon durch Chromatographie versucht wurde auszuschließen), die zu der Aufspaltung geführt haben. Ein weiterer Vorteil bei der Strukturaufklärung, war die Tatsache, dass im Ak Jauch die NMR-Spektren von synthetischem MC C (**6**) [136] und von synthetischem MC E (**8**) [65], [71], welches dem MC D (**7**) stark ähnelt vorlagen. Ebenso war es möglich gewesen, die erhaltenen NMR-Spektren mit den NMR-Angaben von Quinn et al. [21] zu vergleichen. Es zeigt sich im Hochfeld eine gute Übereinstimmung. Jedoch wird diese im Tieffeld ab ca. 4 ppm schlechter. Vorallem gibt Quinn nicht an, dass im ^1H -Spektrum Keto-Enol-Tautomere vorliegen. Die Tatsache, dass die Spektren von Fraktion 4.3 **6a** und 4.6 **6b** enolische Signale zeigen und das ^1H -Spektrum von MC E (**8**) [71] in keiner Weise vergleichbare Signale und Aufspaltungsmuster zeigte, führte dazu, dass MC D (**7**) als Verbindung ausgeschlossen wurde. Da Verbindung (**7**) sogar drei Stereozentren enthält, hätte man für (**7**) mehr als zwei Diastereoisomere finden müssen.

Besonders der in Abb. 183 abgebildete Vergleich zwischen Fraktion 4.3 **6a**, 4.6 **6b** und MC C (**6**) [136] und das Vorhandensein der enolischen Signale (Abb. 181),

wiesen stark darauf hin, dass es sich bei Fraktion 4.3 **6a** und 4.6 **6b** um die Diastereoisomeren von MC C (**6**) handeln muss. Das ^1H -Spektrum von MC C (**6**) konnte gut interpretiert werden, da dieses einer Mischung der Spektren von MC A (**1**) und PMCA (**2**) entsprach, welche beide genau bekannt sind (die Spektreninterpretation kann im experimentellen Teil nachgelesen werden). Bei Fraktion 4.3 **6a** handelt es sich um das Diastereoisomer, bei dem die Isobutylgruppen in syn-Stellung zueinander stehen, bei Fraktion 4.6 **6b** stehen die Isobutylgruppen anti zueinander.

2.16.2.2 Massenspektrum (EI) von MC C (**6**)

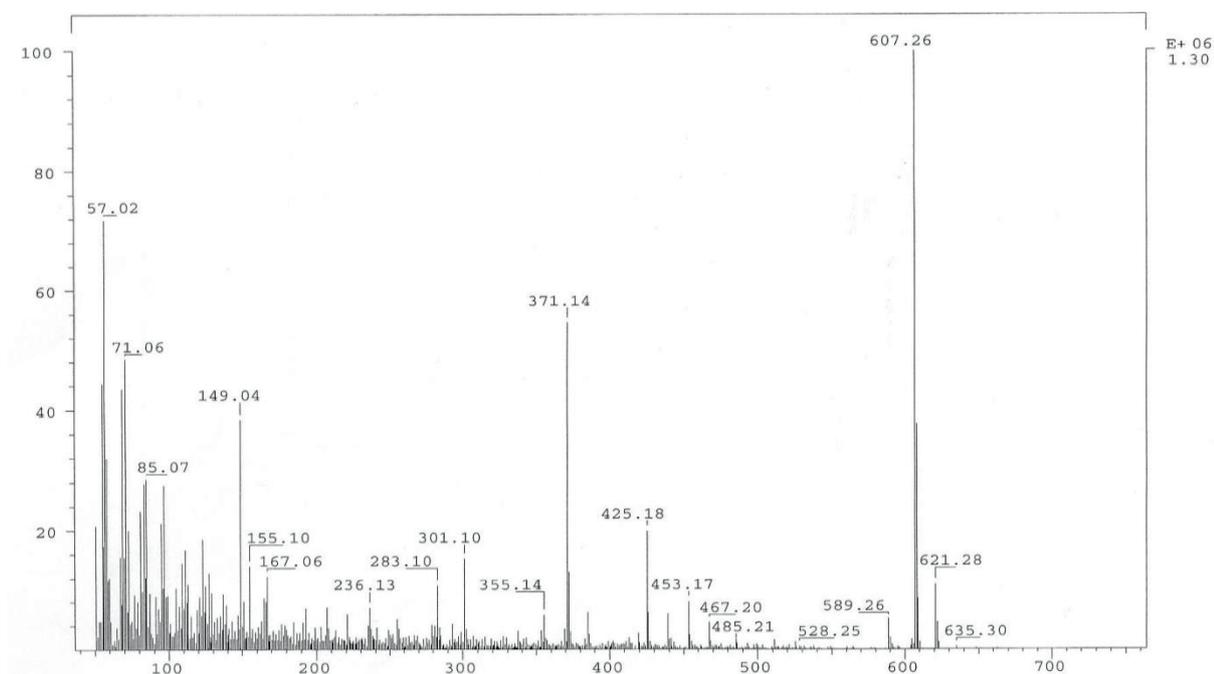


Abb. 184. Massenspektrum (EI, 70eV) von MC C (**6**).

Die Messung des Massenspektrums (EI) von Fraktion 4.3 **6a** und Fraktion 4.6 **6b** ergab jeweils ein absolut identisches Spektrum (Abb. 184). Dies würde dafür sprechen, dass es sich bei den Fraktionen um Diastereoisomere handelt. Aus diesem Grund wird nur ein Spektrum abgebildet. Anhand des Fragmentierungsmechanismus soll die Struktur bestätigt werden.

Vergleicht man den Fragmentierungsmechanismus in Abb. 185 mit dem Fragmentierungsmechanismus des MC A (**1**) in Abb. 48, so stellt man eine hohe Gemeinsamkeit fest, einmal im Bereich der Auftretenden m/z-Werte aber auch im

Bereich der Fragmentierungsmechanismen (Abb. 185). Die drei häufigsten Zerfallsmechanismen des MC C (**6**) sind wie schon zuvor ausführlich erläutert, die McLafferty-Umlagerung, die α -Spaltung und der Verlust von C_2H_4O -Einheiten.

Im Bereich von 195 - 236 m/z kann man die intakten Bestandteile (Syncarpinsäure (**21**) und Phloroglucin) des MC C (**6**) finden. Diese spalten weiterhin CO , CO_2 und CHO ab und man landet bei Molekülen im Bereich von 149 m/z.

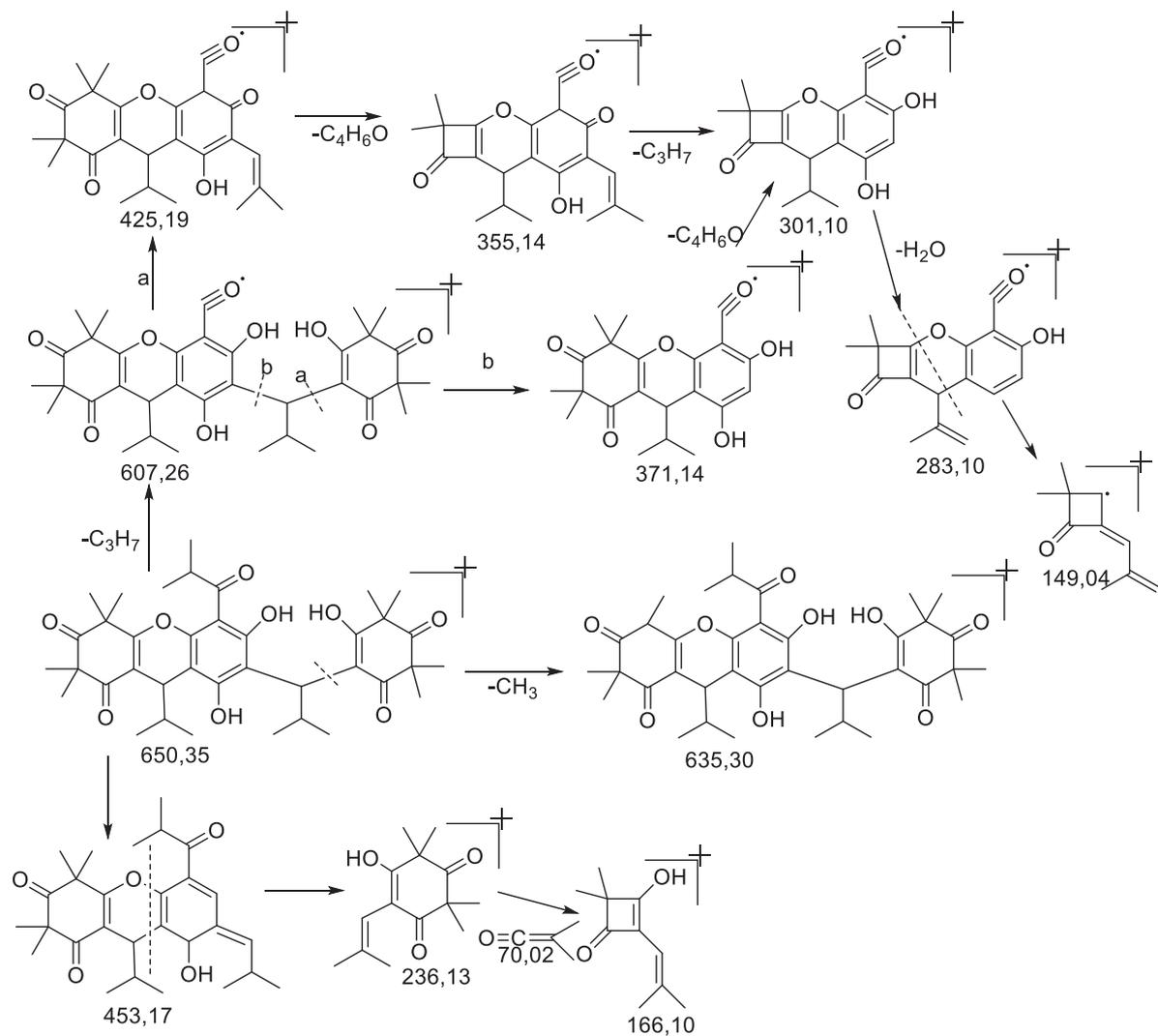


Abb. 185. Fragmentierungsmechanismus (EI) von MC C (**6**).

2.16.2.3. Massenspektrum ESI(-) von MC C (6)

Von MC C (6) wurde neben dem Massenspektrum mittels Elektronenstoßionisation auch ein Massenspektrum im ESI(-)-Modus (Abb. 186) aufgenommen. Zusätzlich zu dem Fragmentierungsmuster, wurde die hochaufgelöste Masse gemessen. Es wurde ein Wert von 649,33945 g/mol gemessen. Daraus resultierte eine Abweichung von 1,91 ppm vom berechneten Wert 649,3382. Sowohl die hochaufgelöste Masse als auch das Fragmentierungsmuster von Fraktion 4.3 **6a** und Fraktion 4.6 **6b** waren identisch.

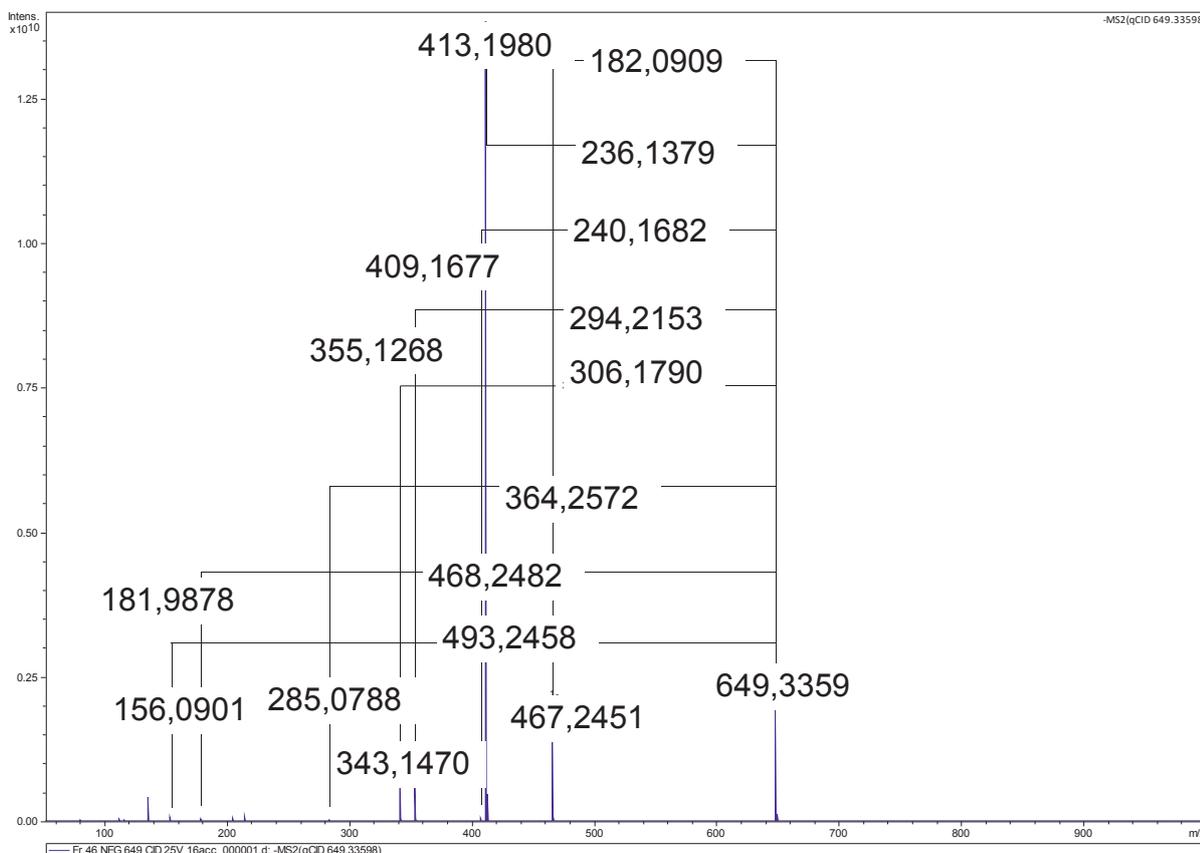


Abb. 186: Massenspektrum (ESI(-)) von MC C (6)

Der in Abb. 187 vorgeschlagene Fragmentierungsmechanismus kann die einzelnen Fragmente des MC C (6) gut erklären. Es können hier die gleichen Fragmentierungsmechanismen, wie in den vorherigen Spektren und deren Interpretation gefunden werden. Zuerst zerfällt der Prekursor in seine Bestandteile, welche dann durch α -Spaltung und Abspaltung von CHO-Einheiten in noch kleinere Fragmente zerfallen.

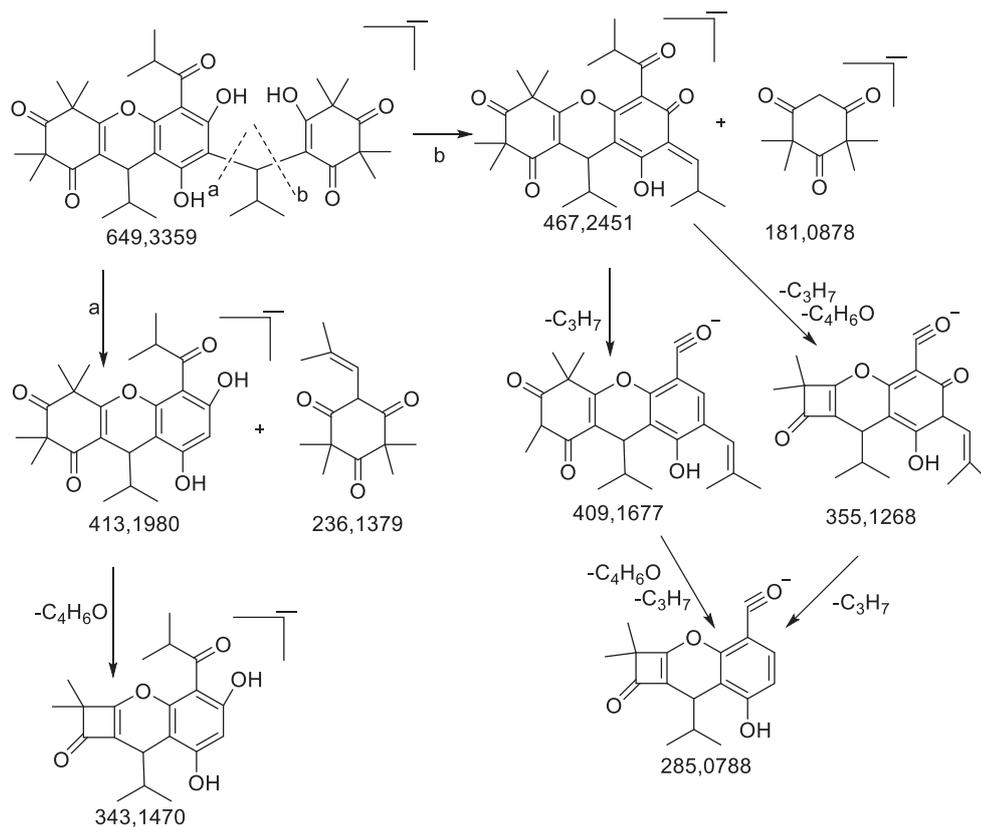


Abb. 187. Fragmentierungsmechanismus ESI(-) von MC C (6)

2.16.2.4 CD-Spektroskopie, Polarimetrie

Die Messung des CD-Spektrums von Fraktion 4.3 **6a** und Fraktion 4.6 **6b** ergab eine Nulllinie. Ebenso lag die spezifische optische Rotation bei einem nicht signifikant von Null unterscheidbaren Wert. Somit lagen beide Fraktionen nicht enantiomerenrein bzw. angereichert vor. Shaheen gibt für sein gefundenes MC C (**6**) eine spezifische Optische Rotation von $[\alpha]_D^{30} = +13$ an ($c=1.5$, $CHCl_3$).^[20] Somit handelt es sich bei ihm um eine enantiomerenreine oder angereicherte Verbindung. Um mehr über den stereochemischen Aufbau beider Fraktionen zu erfahren, wurden diese auf einer chiralen HPLC-Säule untersucht.

2.16.3. Enantiomeranalytik von Fraktion 4.3 **6a** und 4.6 **6b**

Die Diastereoisomere des MC C (**6**) wurden beide auf der Reprosil Chiral NR injiziert. Fraktion 4.6 konnte im gewohnten Laufmittelsystem MeCN : Puffer (30 mM NH₄OAc, pH 9 DEA) 35 : 65 v/v getrennt werden. Die Integration ergab ein Verhältnis von 51 zu 49. Somit lag auch diese Verbindung razemisch vor (Abb. 189).

Fraktion 4.3 konnte in diesem Laufmittelsystem nur sehr schlecht getrennt werden. Daher wurde nach einigen Optimierungsversuchen (NH₄)₂HC₆H₅O₇ anstelle von NH₄OAc verwendet, womit die beste Trennung erreicht werden konnte. Trotz der schlechteren Trennung in Bezug auf Fraktion 4.6 kann in Abb. 188 ein Peakverhältnis von 52 : 48 vorgefunden werden. Somit liegt auch diese Fraktion razemisch vor (Abb. 188).

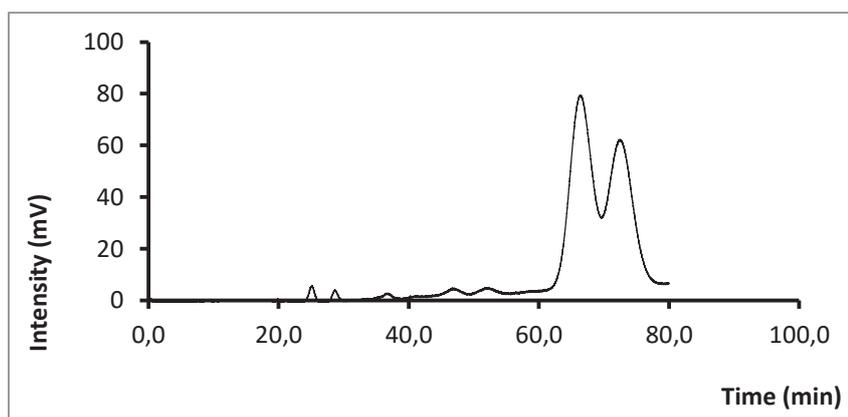


Abb. 188. Chromatogramm von Fraktion 4.3 (**6a**).
Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (30 mM (NH₄)₂HC₆H₅O₇, pH 9 DEA) 35 : 65 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

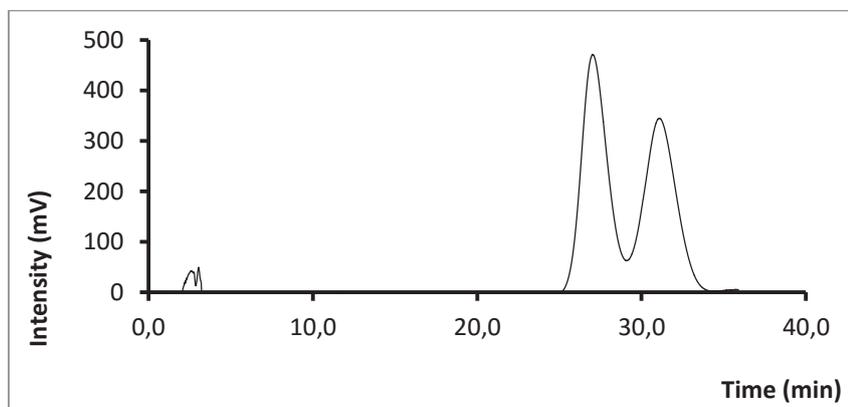


Abb. 189. Chromatogramm von Fraktion 4.6 (**6b**).
Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (30 mM NH₄OAc, pH 9 DEA) 35 : 65 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Für die weitere Analytik der Enantiomere des MC C (6) wurden die Diastereoisomere auf der präparativen HPLC im RP-Modus getrennt und weitergehend analysiert.

Von den getrennten Enantiomeren wurden CD-Spektren (Abb. 190 und Abb. 191) gemessen. Für beide Proben wurde ein entgegengesetzter Cotton-Effekt gefunden. Damit war abgesichert, dass es sich bei den auf chiraler HPLC getrennten Peaks um Enantiomere handeln muss. Wie schon an anderen Stellen in dieser Arbeit erwähnt, gelang es nicht die Enantiomere von Fraktion 4.3 vollständig zu trennen. Auch die Entfernung des Puffers gestaltete sich sehr schwierig, weshalb die CD-Spektren keinen perfekt spiegelbildlichen Verlauf darstellen.

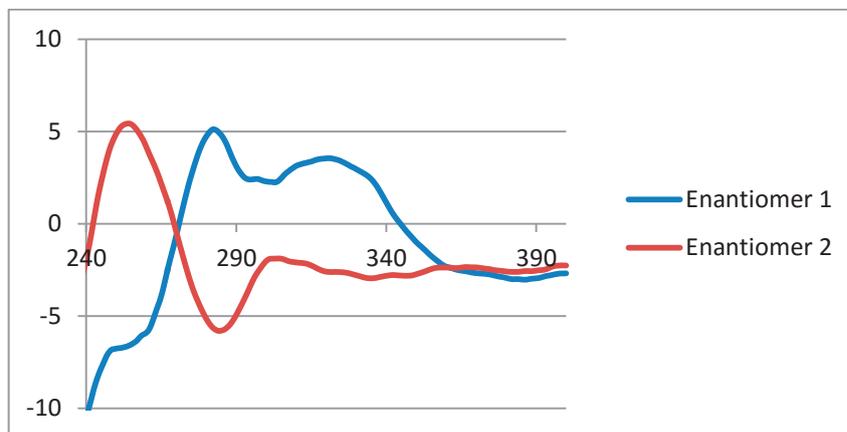


Abb. 190: CD-Spektren der Enantiomere von Fraktion 4.3 (6a) getrennt gemessen, aber in einer Abbildung zusammengefasst

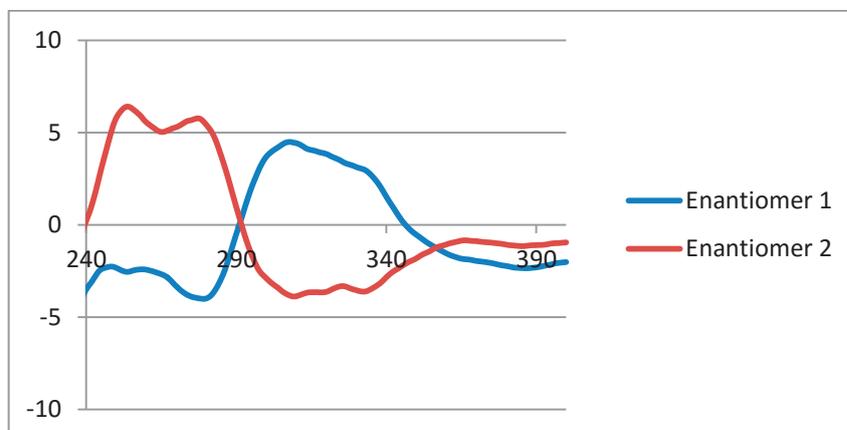


Abb. 191. CD-Spektren der Enantiomere von Fraktion 4.6 (6b) getrennt gemessen, aber in einer Abbildung zusammengefasst

2.16.4 NMR-Spektroskopie von zyklisiertem MC C = PMCA (2)

Die NMR Spektren des MC C (**6**) (Abb. 181, Abb. 183) zeigten vor allem im Bereich des Hochfeldes, bei der Verschiebung der CH₃-Gruppen eine schlechte Aufspaltung und machten die Interpretation schwierig. Diese Problematik kann wieder auf die rotameren und tautomeren Formen zurückgeführt werden. Um die Ergebnisse der bisherigen Strukturaufklärung von (**6**) zu validieren, wurde Fraktion 4.3 **6a** und Fraktion 4.6 **6b** gemäß Abb. 212 zyklisiert. Das Rohprodukt wurde chromatographisch (MeOH : H₂O 90 : 10) gereinigt und anschließend getrennt ein NMR-Spektrum beider Fraktionen aufgenommen. Da MC C (**6**) halbzyklisiert vorliegt (im Vergleich zu MC A (**1**)) (Abb. 9), führt die Zyklisierung formal zu einer Verbindung mit der gleichen Struktur, wie PMCA (**2**). Daher sollten die NMR-Spektren von PMCA (**2**) und zyklisiertem MC C (**2**) identisch sein. Fraktion 4.6 **6b**, bei der die Isobutylgruppen in anti-Position stehen, führt zu racemischem PMCA (**2a**). Analog dazu wird aus Fraktion 4.3 **6a** (syn-Position) die meso-Form des PMCA (**2b**). Die NMR-Spektroskopie bestätigte dies (siehe experimenteller Teil).

Bei Fraktion 4.6 (**6b**) konnte die Isobutylgruppe im ¹H-NMR nicht gefunden werden. Auf Grund zu saurer Reaktionsbedingungen wurde diese Gruppe abgespalten. Diese Tatsache wurde auch von Maier et al. bei der Synthese von Rhodomyrtonen beobachtet.[137] Bei der Zyklisierung von Fraktion 4.3 **6a** konnte sowohl **2b** als auch **2b** ohne Isobutyrylgruppe **70** gefunden werden.

2.16.5. Zusammenfassung zu Fraktion 4.3 **6a** und 4.6 **6b**

In Abb. 41 und Abb. 45 von Fraktion 4 war deutlich zu sehen, dass MC C (**6**) nur in sehr geringen Mengen in der Myrte vorlag. Eine Isolierung im größeren Maßstab stellte sich als sehr schwierig heraus. Nach mehreren Tagen der Isolierung mit Reinigung, konnten nur wenige Milligramm des MC C (**6**) rein isoliert werden. Um genügend reines Material für die NMR-Spektren zu erhalten, war viel Aufwand nötig.

Schon bei der Isolierung aus Fraktion 4 mittels RP18-HPLC, konnte MC C (**6**) in Diastereoisomere (Fraktion 4.3 **6a** und Fraktion 4.6 **6b**) getrennt isoliert werden. Die getrennten Diastereoisomere wurden mittels chiraler HPLC in ihre Enantiomere aufgetrennt. Es konnte hier ein racemischer Aufbau für MC C (**6**) gefunden werden. Somit standen diese Ergebnisse nicht im Einklang mit Shaheen et al. [20], die für ihr

gefundenes MC C (**6**) eine spezifische optische Rotation angeben konnten. Auch die hier erhaltenen NMR-Spektren passen nicht ganz mit den Spektren von Quinn überein. Bisher konnten für MC A (**1**), D (**7**), NSMC (**30**), SMC (**4**) und die Homologen eine racemische Struktur bewiesen werden. Somit stellt sich die Frage ob die von Quinn et al. [21] gefundenen MCs wirklich enantiomerenrein vorliegen.

2.17. Zusammenfassung der Strukturaufklärung der Myrtucommulone und mögliche Biosynthese

Eine sehr wichtiges Ergebniss dieser Arbeit war die Erforschung der chiralen Trennung der unzyklisierten Myrtucommulone. Es war nun möglich ohne Zyklisierungsreaktion, direkt die stereochemische Zusammensetzung zu erhalten. Dadurch konnte Zeit gespart werden und es wurden nur geringe Substanzmengen benötigt.

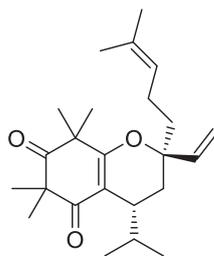
In den ersten Kapiteln der Arbeit wurde die Strukturaufklärung von MC A (**1**), NSMC (**30**) und SMC (**4**) neu bearbeitet. Anschließend wurde die Strukturaufklärung von den Verbindungen **54**, **55**, **56**, **57**, **58**, **59** und **9** durchgeführt. Das MC C (**6**) wurde ebenso isoliert und dessen stereochemische Zusammenstezung bestimmt. Gleichermaßen wurde die Stereoisomerenzusammensetzung des MC A (**1**) aus dem Pilzstamm *Neofusicoccum australe* untersucht. Von allen Verbindungen konnte die Struktur durch Massenspektrometrie und/oder NMR-Spektroskopie verifiziert oder neu aufgeklärt werden. Die stereochemische Zusammensetzung wurde durch die neu entwickelte chirale Trennung bestimmt. Alle gefundenen MCs besaßen eine racemische Struktur. Es konnte nicht festgestellt werden, dass ein Myrtucommulon enantiomerenrein oder enantiomerenangereichert vorliegt.

Mit diesen Ergebnissen kann man Rückschluss auf die Biosynthese ziehen. Es ist stark anzunehmen, dass bei der Entstehung der MCs keine Enzyme anwesend sind. In der Pflanze werden Phloroglucin, Syncarpinsäure (**21**) und Isobutyraldehyd (**22**) erzeugt und können sich im Plasma der Pflanze frei bewegen. Vermutlich entstehen die Myrtucommulone als zufälliges Reaktionsprodukt der drei Edukte.

In der Dissertation von M. Charpentier [71] wurde die enantioselektive Synthese von Myrtucommulonen mittels Organokatalyse untersucht. Dazu wurden die Edukte (Syncarpinsäure (**21**), Isobutyrylphloroglucin (**23**), Isobutyraldehyd (**22**)) zusammen mit (S)-Prolin wenige Minuten bei 60° C oder über Nacht bei Raumtemperatur

umgesetzt. Es konnte MC A (**1**) mit 99 % Ausbeute erhalten werden, allerdings ebenfalls als Mischung von Stereoisomeren. Daraus konnte eine Eintopfreaktion entwickelt werden, bei der die Edukte in einem Schritt miteinander umgesetzt werden konnten. Anstelle von (S)-Prolin konnten auch andere Aminosäuren verwendet werden, aber mit meist schlechterer Ausbeute.[71] Da Aminosäuren auch im Zytoplasma von Pflanzenzellen vorkommen, könnte man auf diese Weise die Entstehung von Myrtucommulonen erklären. Es müssen also keine Enzyme an der Bildung von MCs beteiligt sein. Durch Verknüpfung der Erkenntnisse beider Arbeiten, so scheint die razemische, zufällige Entstehung der Myrtucommulone sehr plausibel.

Vergleicht man die bisherige Erkenntnis dieser Arbeit, dass MCs razemisch vorliegen, mit der Literatur, so muss man feststellen, dass die razemische Biosynthese weit aus seltener vorkommt als die Synthese eines enantiomerenreinen (angereicherten) Naturstoffes.[138] Jedoch lassen sich in der Literatur aber auch einige Beispiele für razemische Naturstoffe finden.[139], [140] Besonders die Entdeckung der Calliviminone C–H aus *Callistemon viminalis* durch Kong et al. [141] stärkt die hier gefundenen Ergebnisse. Diese fanden ebenso eine razemische Struktur für ihre isolierten Verbindungen. Vor allem das Calliviminon C (**60**) zeigt strukturell starke Ähnlichkeit mit den MCs. Die Biosynthese wird daher sehr ähnlich der Biosynthese der MCs sein.

**60****Abb. 192.** Struktur von Calliviminon C (**60**)

2.18 Enantiomeranalytik von Myrtucommulon-Analoga

Die hier entwickelte chirale HPLC-Methode war essentiell für die Strukturaufklärung der MCs. Von Interesse war es nun zu untersuchen, ob nur Myrtucommulone oder auch ähnliche Verbindungen damit getrennt werden können.

In der Dissertation von M. Charpentier wurde nicht nur eine universelle Eintopfsynthese für Myrtucommulone entwickelt, sondern auch die Synthese von Myrtucommulon-Analoga.[71] Für die HPLC-Untersuchungen wurde ein synthetisches Analogon zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um die Probe MAC 445 (Abb. 193) mit folgender Struktur.

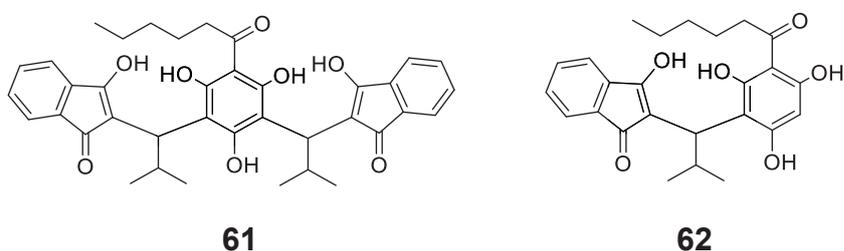


Abb. 193. Struktur von MAC 445 (**61**) und Struktur von Semi-Mac 445 (**62**)

Bei der Aufarbeitung von MAC 445 (**61**) mittels Flashchromatographie wurden zwei Spots erhalten. Somit existierten die Proben MAC 445 Spot 1 und MAC 445 Spot 2 für die Analysen. Beide wurden zur Kontrolle der Reinheit auf RP18-HPLC injiziert.

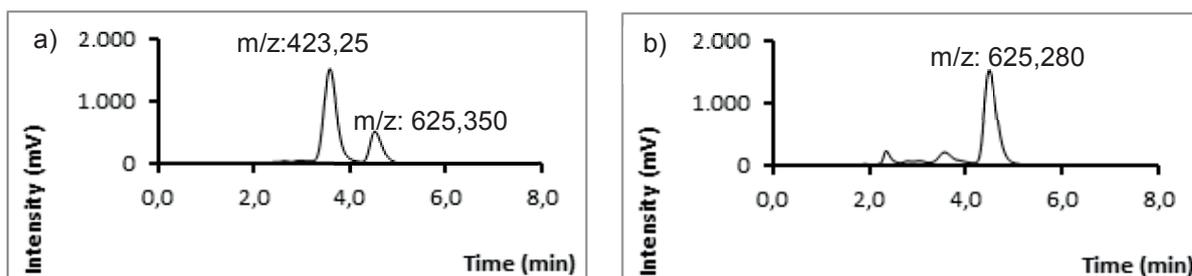


Abb. 194. a) Chromatogramm von MAC 445 Spot 1
b) Chromatogramm von MAC 445 Spot 2
M&N C18ec, MeOH : H₂O 90 : 10 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Abb. 194 zeigt die Auftrennung von MAC 445 Spot 1 in 2 Peaks. Mittels LC-MS (ESI(-)) konnte der m/z -Wert der Peaks bestimmt werden. MAC 445 Spot 2 wurde als annähernd reiner Peak auf der HPLC erhalten. Angesichts der Massen konnte festgestellt werden, dass es sich bei Peak 1 von MAC 445 Spot 1 um die Semi-Verbindung (**62**) handeln musste. Bei Peak 2 von MAC 445 Spot 1 und MAC 445 Spot 2 wurde die gleiche Masse erhalten. Spot 1 wurde durch präparative HPLC getrennt. Die einzelnen Peaks wurden auf der Reprosil Chiral injiziert. Bemerkenswert an der Trennung auf RP18 war die Tatsache, dass die Trennung ohne TFA möglich war. Dies war normalerweise nur bei zyklisierten MCs möglich gewesen.

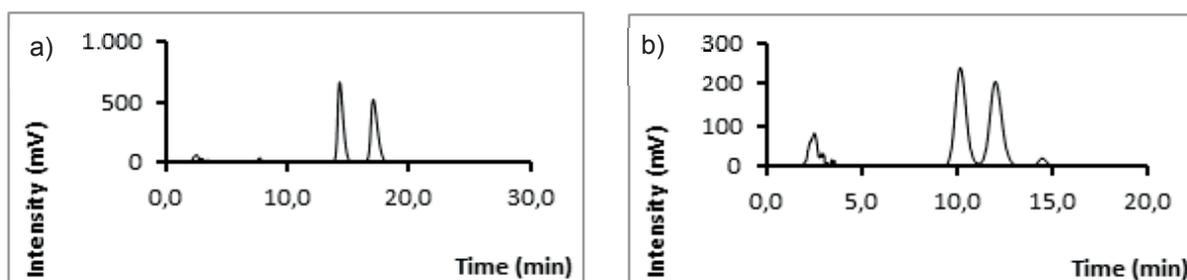


Abb. 195. a) Chromatogramm von MAC 445 Spot1 Peak 1
 b) Chromatogramm der Trennung von MAC 445 Spot 1 Peak 2
 Sykam, Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (30 mM NH₄OAc, pH 9 DEA) 45 : 55 v/v,
 F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Die Peaks von MAC 445 Spot 1 konnten auf der chiralen Säule in ihre Enantiomere getrennt werden (Abb. 195). Folglich konnte die Semi-Verbindung **62** in ihre Enantiomere im Verhältnis 1 : 1 getrennt werden. Gleichmaßen wurde das Razemat von **61** 1 : 1 in seine Enantiomere getrennt (Abb. 195). Die meso-Form wurde nicht erhalten, da es sich bei dieser um MAC 445 Spot 2 handelte. Es war daher nicht möglich, diese auf der chiralen HPLC aufzutrennen. Besonders interessant ist die Tatsache, dass die meso-Form von **61** und das Razemat von **61** auf Normalphasen Flash-Chromatographie getrennt werden konnten. Vergleicht man dies mit der Trennung von Myrtucommulon A (**1**), so ist festzustellen, dass unzyklisiertes MC A (**1**) nicht auf NP oder RP in meso-Form und Razemat getrennt werden kann.

Die chirale Trennung wurde präparativ durchgeführt um die einzelnen Enantiomeren mittels CD-Spektroskopie zu analysieren.

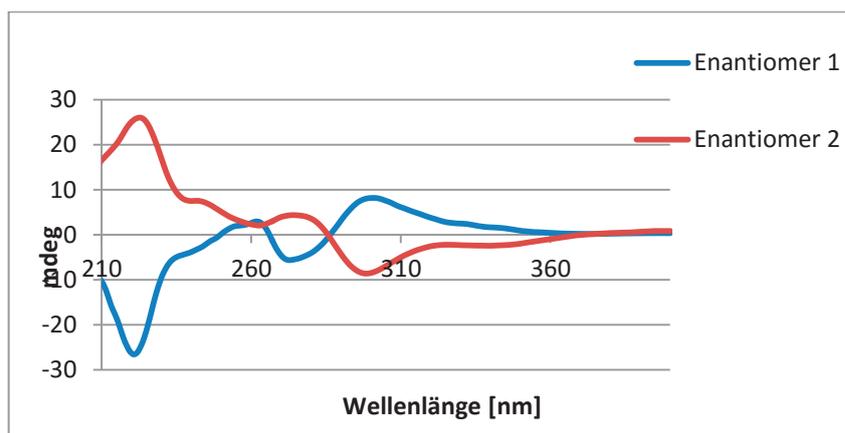


Abb. 196. CD-Spektren von MAC 445 Spot 1 Peak 1 und Peak 2, getrennt vermessen, aber im selben Diagramm abgebildet.

Die getrennten Enantiomere der Semi-Verbindung **62** in Abb. 196 zeigen einen entgegengesetzten Cotton-Effekt. Es handelte sich somit um die Enantiomere. Das gleiche Ergebnis konnte für das Razemat von Verbindung **61** (Abb. 197) erhalten werden. Die meso-Form ergab eine Nulllinie.

In demselben Maße wie sich MC A (**1**) im Verhältnis 1 : 1 : 2 aus Isomeren zusammensetzt genauso verhält sich sein Indandion-Analoga. Ebenso kann diese Tatsache auf die Semi-Verbindung **62** übertragen werden. Sowohl die Semimyrtucommulone als auch die Semi-Analoga bestehen 1 : 1 aus Enantiomeren.

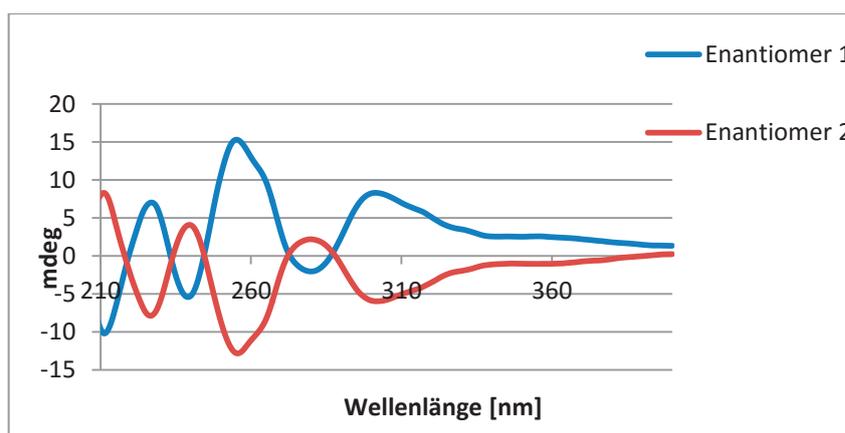


Abb. 197. CD-Spektren von MAC 445 Spot 2 Peak 1 und Peak 2, getrennt vermessen, aber im selben Diagramm abgebildet.

Es war also möglich mit der Reprisil Chiral NR nicht nur reine MCs in ihre Enantiomere zu trennen, sondern auch deren Analoga. Diese Erkenntnisse waren

für M. Charpentier sehr wichtig, da es ihm so möglich war eine schnelle Analytik seiner synthetisierten Verbindungen zu erhalten. Eine Zyklisierung der Proben war nicht mehr nötig gewesen.

2.19. Eucalyptus Acmenoides

In der Einleitung wurde die Chronologie der Isolierung von Myrtucommulonen berichtet. Wie bereits dort erwähnt wurden nicht alle MCs aus *Myrtus communis* isoliert. Quinn et al. [21] isolierten ihre Myrtucommulone aus *Corymbia scabrida*. Ebenso findet sich in Abb. 5 eine Angabe von weiteren Naturstoffen, die sich aus Phloroglucin und Syncarpinsäure (**21**) zusammensetzen und in verschiedenen Pflanzen der Familie der Myrtaceae zu finden waren. Daher wurde eine mit der Myrte nahe Verwandte Eukalyptusgattung auf das Vorhandensein von MCs hin untersucht. Nach langer Recherche konnte *Eucalyptus acmenoides* aus Australien gefunden werden und bei der Firma Seedworld Australia bestellt werden. Die Identifizierung erfolgte durch deren Direktor Gary Bridge (siehe Anhang).

2.19.1. Herstellung des Rohextraktes und Einteilung in Fraktionen

Die Herstellung des Pflanzenrohextraktes erfolgte in analoger Weise zur Herstellung des Myrte Rohextraktes. Zur Extraktion wurden pulverisierte und getrocknete Samen (*Eucalyptus acmenoides*) verwendet. In Lösemitteluntersuchungen wurde Diethylether als geeignetes Lösemittel bestimmt (vgl. [142]).

Die Samen wurden mit Petrolether gewaschen und anschließend gemahlen. Die pulverisierten Eukalyptussamen wurden in einer Soxhlet-Apparatur erschöpfend mit Diethylether extrahiert. Das Lösemittel wurde entfernt und eine grüne, ätherisch-riechende, gummi-artige Masse erhalten. Dieser wurde per DC (Abb. 198), HPLC und GC-MS analysiert.

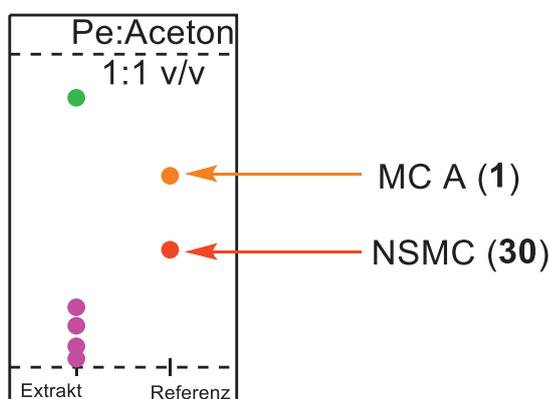


Abb. 198. Dünnschichtchromatogramm des Rohextraktes

Im DC (Abb. 198) wurde der Rohextrakt aus dem Soxhlet mit Referenzproben von MC A (**1**) und NSMC (**30**) analysiert. Es konnte kein Spot für die Referenzsubstanzen im Extrakt erhalten werden.

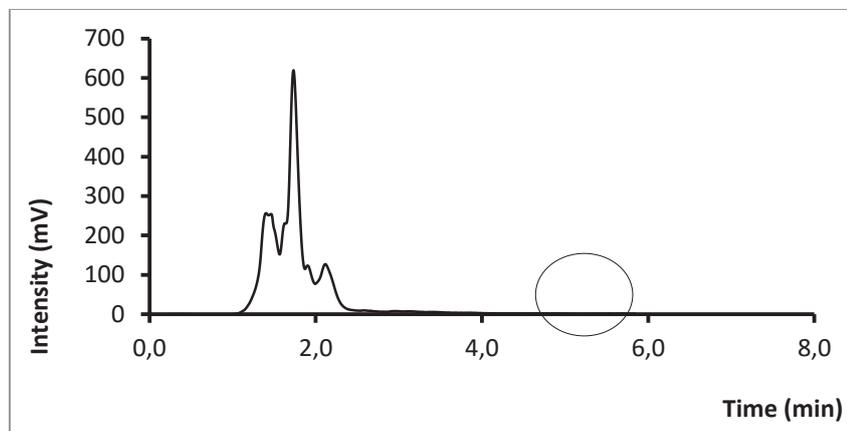


Abb. 199. Chromatogramm Rohextrakt *Eucalyptus acmenoides*.
M&N C18ec, MeOH (0,1 % TFA) : MeCN (0,1 % TFA) 80 : 20 v/v,
F: 1,5 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Im Rohextrakt konnte auf der HPLC kein MC A (**1**) gefunden (Abb. 199). Bei einer Retentionszeit von etwa 5 Minuten wäre ein Peak zu erwarten gewesen. In *Myrtus communis* liegt MC A (**1**) in sehr großen Mengen vor und kann dort kaum übersehen werden. Zur Anreicherung von eventuell vorhandenem MC A (**1**), wurde der Rohextrakt auf einer NP Flashsäule im Laufmittel PE: OEt₂ 5:1 v/v aufgetrennt. Die Flashchromatographie ergab 6 Fraktionen. Die erste Fraktion war sehr unpolar und wurde auf der GC-MS injiziert. In dieser konnten Terpenverbindungen gefunden werden. Fraktion 2 war etwas polarer. Im LC-MS (ESI(+)) konnten Massen im Bereich von 800 bis 1000 m/z gefunden werden. Fraktion 3 bis 5 zeigte bei 292 nm im UV/Vis-Detektor eine sehr starke Absorption. Bei diesem Wert liegt das Absorptionsmaximum der MCs. Das LC-MS (ESI(-)) zeigte m/z-Werte im Bereich von 240 bis 300. Dieser Bereich schloss eigentlich myrtucommulonartige Strukturen aus. Ebenso die Tatsache, dass die Trennung auf HPLC ohne TFA möglich war, sprach gegen die Anwesenheit von MCs. Abb. 200 und Tabelle 34 geben einen Überblick über die einzelnen Fraktionen.

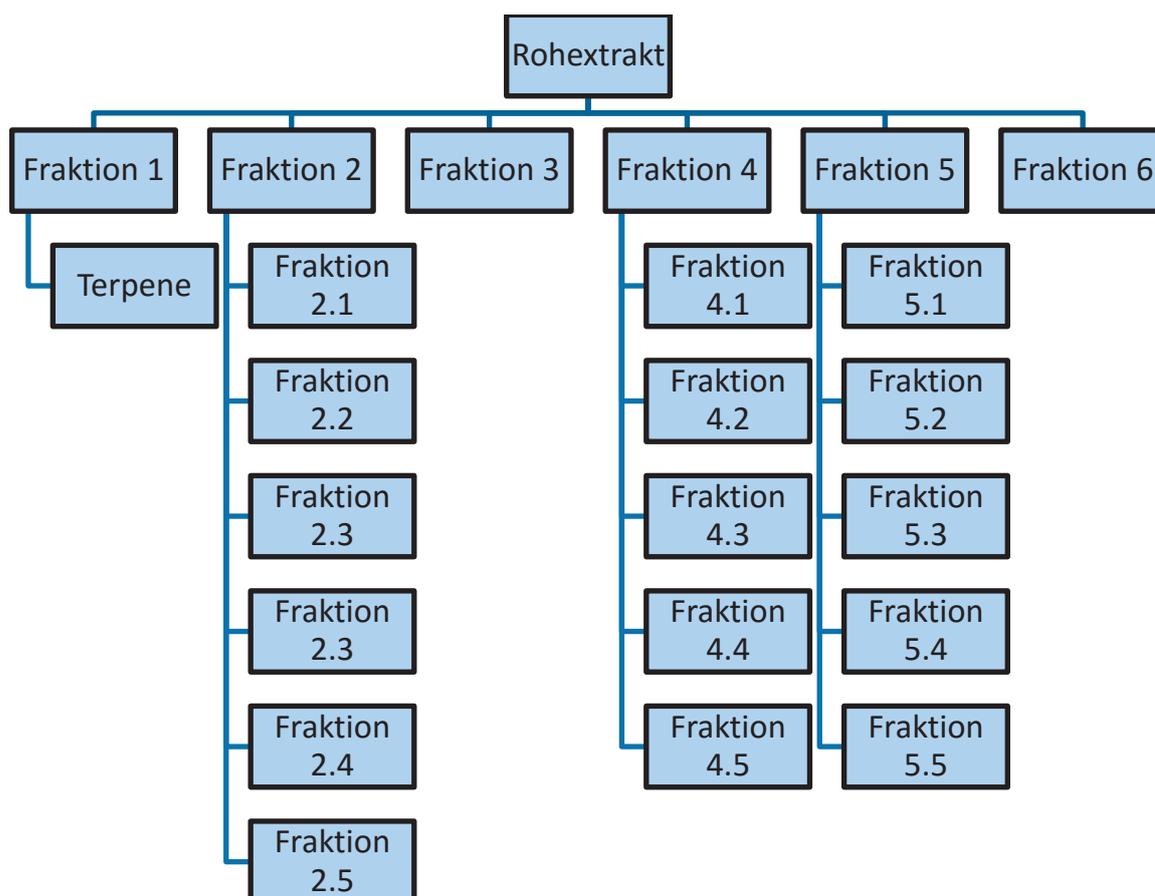


Abb. 200. Übersicht über die Fraktionen des *Eucalyptus acmenoides*.

Tabelle 34. Fraktionen des *Eucalyptus acmenoides*.

Fraktion 1	Terpene
Fraktion 2	Fettsäuren
Fraktion 3	Chromone
Fraktion 4	Chromone
Fraktion 5	Chromone
Fraktion 6	Spülen der Säule mit Aceton

Trotz den ausführlichen Untersuchungen der einzelnen Fraktionen mittels DC, GC-MS, HPLC und LC-MS konnten keine Myrtucommulone gefunden werden. Trotzdem wurde von einigen Verbindungen die Struktur aufgeklärt um die Abwesenheit von MCs mit Sicherheit bestimmen zu können.

2.19.2. Strukturaufklärung von Fraktion 2

Um weitere Informationen zu den Inhaltsstoffen von Fraktion 2 zu erhalten, musste diese mittels HPLC aufgetrennt werden. Die enorme Apolarität von Fraktion 2 machte den Einsatz von Wasser unmöglich. Es wurde ein geeignetes Laufmittel gesucht, welches mit dem System MeOH: iso-PrOH gefunden wurde. Fraktion 2 wurde auf der HPLC in ihre einzelnen Bestandteile zerlegt (Abb. 201).

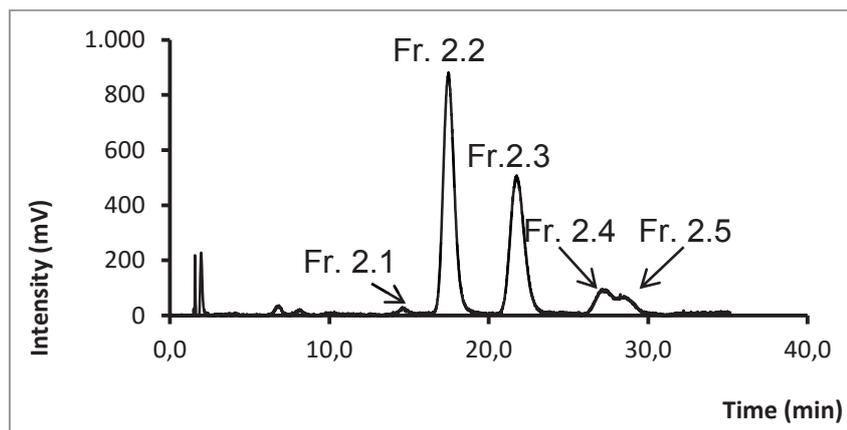


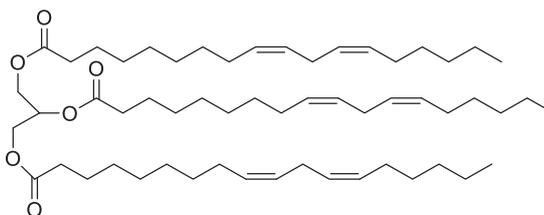
Abb. 201. Chromatogramm der Trennung von Fraktion 2 .
M&N C18ec, MeOH : iso-PrOH 60 :40 v/v,
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Fraktion 2 wurde in 5 Fraktionen unterteilt. Das Upscaling auf präparative HPLC gelang gut und Fraktion 2.2 bis Fraktion 2.5 konnten isoliert werden.

Tabelle 35. hochaufgelöste Masse der Fraktionen 2.2 - 2.5.

	Masse	Summenformel
Fraktion 2.2	957,7390	$C_{63}H_{106}O_6$
Fraktion 2.3	879,3836	$C_{57}H_{98}O_6$
Fraktion 2.4	939,7287	$C_{62}H_{98}O_6$
Fraktion 2.5	926,7339	$C_{61}H_{98}O_6$

Von allen Fraktionen wurde die hochaufgelöste Masse gemessen und die Summenformel bestimmt (Tabelle 35). Da es sich nicht um MCs handeln konnte wurde nur die Struktur von Fraktion 2.3 aufgeklärt. Es wurde ein vollständiger Satz 1D- und 2D-NMR-Spektren aufgenommen.

**63****Abb. 202.** Struktur von Fraktion 2.3 = Trilinolein (**63**)

Aus dem NMR-Spektrum konnte die Struktur in Abb. 202 bestimmt werden. Besonders die ^1H -Signale des Glycerinelements in **63** waren charakteristisch. Ebenso die Signale der Doppelbindungen und die Multipletts der Alkylketten ließen schnell auf die Struktur in Abb. 202 schließen.

Da diese Fettsäuren für die Myrtucommulonforschung nicht von Interesse und schon bekannt waren, wurden keine weiteren Peaks der Fraktion 2 untersucht.[143]

2.19.3. Strukturaufklärung von Fraktion 4

Fraktion 4 wurde auf der HPLC weitergehend aufgetrennt und es konnte eine Fraktion mit 5 basisliniengetrennten Peaks erhalten werden (Abb. 203). Auf der präparativen HPLC konnten die 5 Peaks gut voneinander getrennt und Material für weitere Analysen erhalten werden.

Tabelle 36. hochaufgelöste Massen von Fraktion 4

	Masse	Summenformel
Fraktion 4.1	223,0714	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_2$
Fraktion 4.2	257,0806	$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_4$
Fraktion 4.3	285,1117	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_4$
Fraktion 4.4	271,0962	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$
Fraktion 4.5	299,1275	$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4$

Chromatographische und massenspektroskopische Analysen (Tabelle 36) der Fraktion 3 und 5 zeigten, dass deren Hauptkomponenten mit denen von Fraktion 4 identisch waren. Da Fraktion 4 diese Substanzen in größerer Menge enthielt, wurden die Peaks aus dieser isoliert.

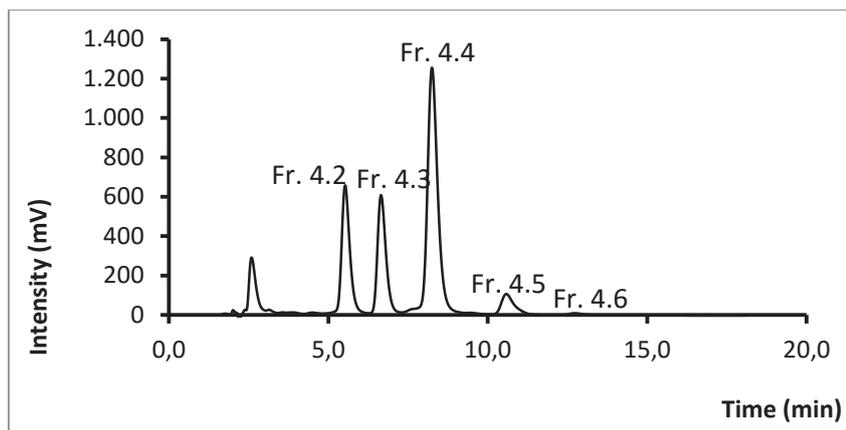


Abb. 203. Chromatogramm der Trennung von Fraktion 4.
M&N C18ec, MeOH : Wasser (75 : 25 v/v),
F: 1,0 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Von den einzelnen Peaks wurde eine hochaufgelöste Masse (ESI(+)) zur Ermittlung der Summenformel aufgenommen. Die Summenformeln und Massen wiesen nicht auf MCs hin. Von allen Verbindungen wurde ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen. Die Spektren zeigten untereinander große Ähnlichkeit. Stellvertretend wurde die Struktur von Fraktion 4.3 detailliert aufgeklärt. Die Strukturen (Abb. 204) von Fraktion 4.2, 4.4 und 4.5 konnten durch Vergleich mit dem Spektrum von Fraktion 4.3 und Literatur ermittelt werden.

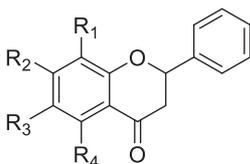


Abb. 204. Allgemeine Struktur von Fraktion 4.2 bis 4.5

Tabelle 37. Struktur der Verbindungen 4.2 bis 4.5

	R1	R2	R3	R4	
Fraktion 4.2	H	OH	H	OH	64
Fraktion 4.3	OMe	H	H	OMe	65
Fraktion 4.4	Me	OH	H	OH	66
Fraktion 4.5	OMe	Me	H	OMe	67

Die Spektren zeigten einen gut zu interpretierbaren aromatischen Bereich. Durch die vielen Methoxy- bzw. Methylgruppen (Tabelle 37) am Aromaten wurden charakteristische Singulets mit definierter Integration erhalten. Bei Verbindung **64** bis **67** handelte es sich um Literaturbekannte Substanzen.[68] Ein Abgleich mit dieser, bestätigte die gefundenen Strukturen.

2.19.4. Zusammenfassung

Im *Eucalyptus acmenoides* konnte trotz seiner engen Verwandtschaft zur gemeinen Myrte keine MCs isoliert und gefunden werden. Nur das Vorhandensein und die Struktur von einigen Fettsäuren und Chromon-Verbindungen konnten nachgewiesen werden. Die Arbeiten am *Eucalyptus acmenoides* fanden zu Beginn der Promotion statt. Da an dieser Stelle keine wesentlichen Verbindungen gefunden werden konnten, wurde mit dem der Schwerpunkt dieser Arbeit fortgefahren, der Strukturaufklärung der MCs.

2.20. *Corymbia peltata*

Neben dem *Eucalyptus acmenoides* konnte noch der Samen der *Corymbia peltata* erhalten werden. Diese gehört ebenso zu den nahen Verwandten des *Myrtus communis* (Abb. 5). Noch näher ist diese Gattung aber mit der *Corymbia scabrida* verwandt, aus der Quinn et al MC F (**9**) bis I (**12**) isolieren konnten.[21] Aus Pflanzen dieser Gattung wurden die Corymbone (Abb. 13) isoliert.[29]

Nach längerer Recherche konnte der Samen der *Corymbia peltata* durch die Firma Nindethana Seed Supply in Australien bezogen werden. Dieser wurde auf das Vorhandensein von MCs hin untersucht.

Die Herstellung eines Rohextraktes erfolgte in analoger Weise zu den vorherigen Extraktionen. Die Samen wurden in n-Hexan gewaschen und nach der Trocknung gemahlen und in einer Soxhlet-Apparatur erschöpfend mit OEt₂ extrahiert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und 6 g einer braunen, modrig- riechenden, öligen Flüssigkeit erhalten. Diese wurde per DC, HPLC und GC-MS analysiert.

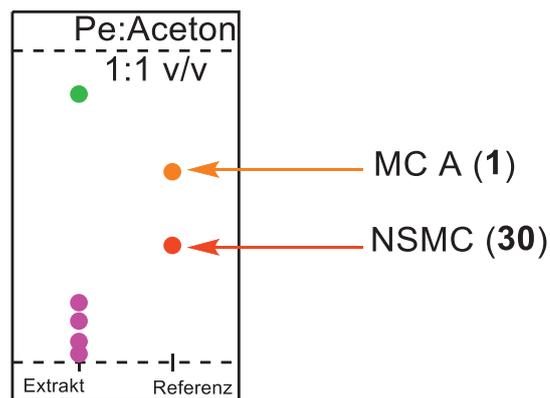


Abb. 205. DC des Rohextraktes von *Corymbia peltata*.

Anhand des DCs (Abb. 205) konnte kein MC A (1) nachgewiesen werden. Es wäre möglich gewesen NSMC (30) im Extrakt zu vermuten, jedoch färbten beide Spots verschieden farbigen. Die Analyse des GC-MS ergab lediglich eine Auswahl an diversen Terpenen. Um eine genauere Aussage zu bekommen wurde der Rohextrakt auf die HPLC aufgegeben. Im Rohextrakt konnte kein MC A (1) gefunden werden (Abb. 206). Bei einer Retentionszeit von etwa 5 Minuten wäre ein Peak zu erwarten gewesen, da MC A (1) in der Myrte im Allgemeinen in sehr großen Mengen anzufinden ist.

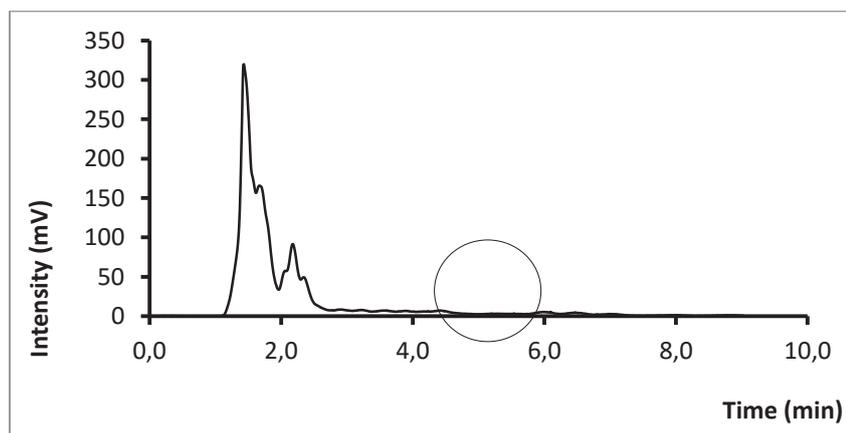


Abb. 206. Chromatogramm Rohextrakt *Corymbia peltata*.
M&N C18ec, MeOH (0,1 % TFA) : MeCN (0,1 % TFA) 80 : 20 v/v,
F: 1,5 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Um eine Aufkonzentrierung zu erreichen wurden 2 g des Rohextrakt auf einer NP Flashsäule im Laufmittel PE: OEt₂ 5:1 v/v aufgetrennt. Die Flashchromatographie ergab 6 Fraktionen. Die Fraktionseinteilung geschah analog zum *Eucalyptus*

acmenoides. An erster Stelle die apolare Fraktion, welche laut GC-MS Terpene enthielt. In Fraktion 2 waren wieder Fettsäuren zu finden. Fraktion 3 bis 4 zeigten wieder Chromon-Verbindungen. Trotz intensiver Untersuchung der Fraktionen mittels HPLC und LC-MS konnten keine MCs gefunden werden. Selbst vom gut aufzufindenden MC A (1), konnten keine Spuren gefunden werden.

Weder im *Eucalyptus acmenoides* noch in der *Corymbia peltata* konnten irgendwelche MCs gefunden werden. Dies kann daran liegen, dass keine Blätter sondern der Samen analysiert wurden. Prinzipiell sollte der Samen als Erbgutträger der Pflanze Spuren von MCs enthalten, falls diese in den Blättern anzutreffen gewesen wären. Wie bei allen Pflanzen kann die Entwicklung von Pflanzeninhaltsstoffen auf Grund verschiedener äußerer Faktoren variieren. Sicher ist, dass in den hier analysierten Samenproben keine MCs enthalten waren. Demnach enthält nicht jeder Vertreter der Gattung *corymbia* MCs, sowie die *Corymbia scabrida* von Quinn.[21]

2.21. Zitronenmyrte – backhousia citridora – leptospermum petersonnii

In dem Samen des *Eucalyptus acmenoides* und in den Samen der *Corymbia scabrida* konnten keine MCs gefunden werden. Daher wurde eine weitere Pflanze untersucht von der getrocknete Blätter erhältlich waren. Dabei handelte es sich um die Zitronenmyrte. Trotz des Namens Myrte gehört diese nicht zur gleichen Unterfamilie, sondern zur Unterfamilie Leptospermum (Abb. 5).[10] Die Pflanze wurde bezogen durch die Firma Galke GmbH in Gittelde.

Am Anfang der Analyse stand die Herstellung eines Rohextraktes. Dazu wurden pulverisierte, getrocknete Blätter in einer Soxhlet-Apparatur erschöpfend mit OEt₂ extrahiert. Das Lösemittel wurde entfernt und 37 g einer grünen, zitronig-riechenden, gummi-artigen Masse erhalten. Diese wurde per DC, HPLC und GC-MS analysiert.

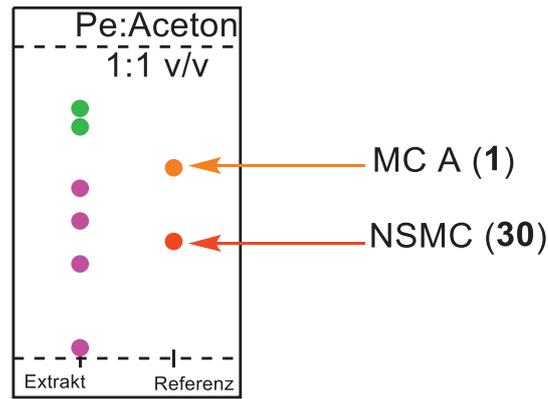


Abb. 207. DC des Zitronenmyrtrohextraktes

Im DC (Abb. 207) konnte kein Spot gefunden werden, der MC A (1) bzw. NSMC (30) von der Retentionszeit hätte entsprechen können. Im GC-MS konnten überwiegend die Terpene wie Geranial, Neral und Zitronellal entdeckt werden, welche für den charakteristischen Geruch verantwortlich sind.

Für genauere Ergebnisse wurde der Rohextrakt auf der HPLC injiziert. Im Chromatogramm (Abb. 208) konnte bei einer Retentionszeit von etwa 5 Minuten kein MC A (1) oder weitere MCs gefunden werden. Um den Myrtucommulonanteil aufzukonzentrieren wurde der Rohextrakt durch Flashchromatographie in Fraktionen eingeteilt. Analog wie bei den beiden Eukalypten wurden 6 Fraktionen enthalten. In diesen konnten mittels HPLC und LC-MS keine Peaks gefunden werden, welche Myrtucommulonen zugeordnet werden könnten.

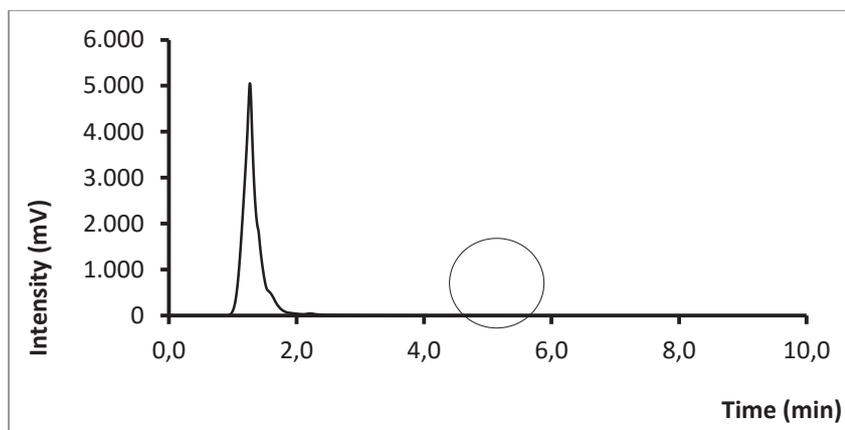


Abb. 208. Chromatogramm des Rohextraktes von Zitronenmyrte.
M&N C18ec, MeOH (0,1 % TFA) : MeCN (0,1 % TFA) 80 : 20 v/v,
F: 1,5 mL/min, T: 24° C, Inj: 20 µL, Konz: ≈ 1 mg/mL

Gleichermaßen wie beim *Eucalyptus acmenoides* und in der *Corymbia peltata* konnten in der Zitronenmyrte keine Spuren von MCs entdeckt werden. Selbst das in *Myrtus communis* stark vorliegende MC A (1) konnte nicht gefunden werden.

Somit konnte bisher nur in der gemeinen Myrte (*myrtus communis*) selbst und in der *corymbia scabrida* die Existenz von MCs [21] nachgewiesen werden. Jedoch konnten mittlerweile in der Myrte über zehn MCs gefunden werden. Somit ist die Brautmyrte noch immer der wichtigste Lieferant von Myrtucommulonen.

3. Experimenteller Teil

3.1 Allgemeine Angaben

Verwendete Myrte

Myrtenblätter gemahlen, der Firma Alfred Galke GmbH, am Bahnhof 1 in 37534 Gittelde, Abpackdatum 20.02.2010, Losnummer 6652, analysiert durch die Kreuz-Apotheke in Seelze. Die Blätter wurden durch Prof. Dr. D. Quandt vom Nees-Institut für Biodiversität der Pflanzen, Meckenheimer Allee 170, D – 53115 Bonn anhand ihrer DNA identifiziert und als *Myrtus communis* bestätigt.

Verwendeter Eukalyptus

Samen des *Eucalyptus acmenoides* wurden in der Graft-Region in N.S.W. Australien im April 2012 gesammelt. Die Samen wurden durch Gary Bridge, Direktor von Seedworld Australia identifiziert.

Verwendete Corymbia

Samen der *Corymbia peltata* wurden vom Nindethana Seed Service PO Box 2121, Albany, Westaustralien bezogen.

Verwendete Zitronenmyrte

Zitronenmyrtenblätter gemahlen, der Firma Alfred Galke GmbH, am Bahnhof 1 in 37534 Gittelde, Abpackdatum 24.04.2015, Losnummer 20468, analysiert durch die Kreuz-Apotheke in Seelze.

Dünnschicht-Chromatographie

-Zur analytischen NP-DC wurden Kieselgelplatten der Firma Merck auf Glas (Si60, F₂₅₄ 5x10cm) mit Fluoreszenz-Indikator verwendet.

-Zur analytischen RP-DC wurden Kieselgelplatten der Firma Merck auf Glas (RP18, F₂₅₄ 5x10cm) mit Fluoreszenz-Indikator verwendet.

-Zur Detektion wurde eine UV-Lampe ($\lambda = 254 \text{ nm}$), Sprühreagenz II (Anisaldehyd, MeOH, H₂SO₄ konz.) eingesetzt.

Flash-Chromatographie

Die NP-Flash-Chromatographie wurde mit Kieselgel 60 (40-63 μm) der Firma Merck durchgeführt. Als Aufziehkieselgel wurde Kieselgel 80 (60-200 μm) der Firma Merck verwendet.

HPLC

-Analytische RP-HPLC: Fa. Sykam, Fürstenfeldbruck, Deutschland. Typ: S3100 Pumpe, S8111 Niederdruckmischer, S3210 DAD, Rheodyne 7725i, Jet-Stream II Säulenofen. Zur Auswertung und Steuerung wurde Chromstar 6.1 SCPA GmbH verwendet. Die Detektion erfolgte bei 210 nm, 252 nm und bei 292 nm. Alle Lösemittel wurden zuvor mit Helium entgast und sind HPLC grade.

-Präparative HPLC: Fa. Sykam, Fürstenfeldbruck, Deutschland. Typ: S1122 Pumpe, S3210 DAD, Rheodyne 5330, Jet-Stream II Säulenofen. Zur Auswertung und Steuerung wurde Chromstar 6.1 SCPA GmbH verwendet. Die Detektion erfolgte bei 210 nm, 252 nm und bei 292 nm. Alle Lösemittel wurden zuvor mit Helium entgast.

-Analytische NP-HPLC: Beckmann Goldsystem, Pumpe 128 Gold, Detektor 166 Gold, Bischhoff 1100, Detektion bei 292 nm, Jet-Stream II Säulenofen, Rheodyne 5255, Auswertung erfolgte mit Clarity Lite 2.6.4 von Data Apex

-Analytische RP-HPLC mit Autosampler: HP 1090 Series II LC, Software LC506

-Packen der Säule: Pumpe der Firma Shimadzu LC-9AT. Diese wurde bei einem Druck von 210 bar betrieben.

HPLC-Säulen

Hersteller	Bezeichnung	Dimension
Macherey&Nagel	Nucleodur C18ec 100-5	250 x 4,6 mm
Macherey&Nagel	Nucleodur C8ec 100-5	250 x 4,6 mm
Macherey&Nagel	Nucleodur C18ec 100-5	250 x 21 mm
Merck	Chromolith Performance	100 x 4,6 mm
Maisch GmbH	Reprosil Chiral NR 8	250 x 4,6 mm
Maisch GmbH	Reprosil Chiral NR 8	250 x 10 mm
DAICEL	Chiralcel OD-H	250 x 4,6 mm
Merck	Luna	100 x 4,6 mm
Eigene Herstellung Kapitel 2.12	TAPA	250 x 4,6 mm
Eigene Herstellung Kapitel 2.12.3.2	3,5Dnbp	250 x 4,6 mm

Vorsäulen

Hersteller	Bezeichnung	Dimension
Macherey&Nagel	Nucleodur C18ec 100-5	15 x 4,6 mm
Macherey&Nagel	Nucleodur 100-5	15 x 4,6 mm
Macherey&Nagel	Nucleodur C18ec 100-5	0,5 x 4,6 mm
Macherey&Nagel	Nucleodur 100-5	0,5 x 4,6 mm
Grace	Grom Saphir 110 C18	30 x 4,6 mm

GC-MS

-Die Messung der Massenspektren erfolgte an einem Gaschromatographen vom Typ HP 5890 II mit Autosampler 7673 und mit Massendetektor 5971A, (EI). Die Auswertung erfolgte mit Chemstation.

-Die hochaufgelösten Massenspektren wurden an einem Finnigan MAT 95S Spectrometer (CI,EI, HRMS) gemessen durch Rudolf Thomes (Ak. Kazmaier).

Kernresonanzspektroskopie

Die 1D- und 2D-Spektren wurden mit einem NMR-Gerät der Firma Bruker Typ Avance II mit (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz) und einem Avance 500 (die Messungen erfolgten durch J. Zapp, Ak Kiemer) aufgenommen. Die chemische Verschiebung wird in ppm angegeben. Zur Auswertung wurde Mestrec 4.9.9.6 von Mestrelab Research verwendet. Chloroform-d (CDCl_3 , ^1H : $\delta = 7,26\text{ppm}$, ^{13}C : $\delta = 77,00\text{ ppm}$), Aceton- d_6 ($\text{CO}(\text{CD}_3)_2$, ^1H : $\delta = 2,05\text{ ppm}$, ^{13}C : $\delta = 30,83\text{ ppm}$), die Kopplungskonstante wird in Hertz (Hz) angegeben,

Für die Aufspaltung im ^1H -NMR werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dubplett, t = Triplett, q = Quartett, qu = Quintett, spt = Septett, dd = Dubplett von Dubpletts, dt = Dubplett von Triplets (usw.), bs = breites Singulett, m = Multiplett, sh = Signalhaufen.

Massenspektren

Die Massenspektren wurden an einem HPLC-MS der Firma Shimadzu aufgenommen. Typ: LCMS 2020, Autosampler: SIL6B, SCL6B, Detektor: SPD M10AVP, Detektion bei 254nm Wellenlänge, Pumpe: LC-10AT, SCL10AVP, Gradientenmischer: FCV-10AC. Zur Auswertung und Steuerung wurde Shimadzu Labsoft verwendet.

Hochaufgelösten Massen

-Hochaufgelöste Massenspektren wurden von Tobias Dier Ak. D. Volmer, an einem Bruker Solarix 7 Tesla MALDI/ESI/APCI-FTIR imaging MS und von Michael Hoffmann AK. R. Müller an einem Ultimate 3000 RSLC (Fa. Dionex) gekoppelt mit Triversa Nanomate nano-ESI-Gerät (Fa. Advion) und dem Massendetektor Thermo Fisher Orbitrap (Fa. Thermo-Scientific) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Xcalibur 3.0.63.

Polarimeter

Die optische Aktivität wurde an einem Polarimeter Perkin Elmer 241 mit Natrium-Lampe bei $\lambda = 589$ nm bestimmt.

UV/Vis

UV/Vis-Spektren wurden an einem UV-Messgerät UV-Varian Cary 50Scan aufgezeichnet. Alle Proben wurden in Glasküvetten ($d = 1,0$ cm) vermessen und in HPLC-grade Methanol gelöst.

CD-Spektren

Die CD-Spektren wurden an einem JASCO Spectropolarimeter Typ J-715, PS150J, PTC-348W1, MPS-60 gemessen. Zur Auswertung wurde die Software JASCO Spectra Manager verwendet. Alle Proben wurden in Glasküvetten ($d = 0,5$ cm) vermessen und in HPLC-grade Methanol gelöst.

IR-Spektren

IR-Spektren wurden an einem IR-Spektrometer von Bruker Typ Tensor 27 aufgenommen.

Lösemittel und Chemikalien

Alle Lösemittel und Chemikalien wurden vom ZChL (Zentrales Chemiekalienlager der Universität des Saarlandes) bezogen. Absolutierte Lösemittel wurden nach gängigen Methoden getrocknet.

3.2. Myrte

3.2.1. Soxhlet-Extraktion

In einer Soxhlet-Apparatur werden 500 g pulverisierte und getrocknete Myrtenblätter mit 8 Litern Diethylether 12 h lang extrahiert. In 2 h-Intervallen wird je eine Probe aus der Kopf- und der Sumpfphase entnommen und mittels DC auf das Vorhandensein von Myrtucommulonen untersucht. Nach 11 Durchläufen konnte in der Kopfphase keine Myrtucommulone mehr gefunden werden. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer bei 27° C Wasserbadtemperatur im Vakuum entfernt. Zurück bleiben 22 g einer grünen gummiartigen Masse.

3.2.2. Flash-Chromatographie

Eine Flash-Säule (Durchmesser 7,5 cm; Länge 30 cm) wird mit 700 mL Kieselgel Merck 60 (Schüttvolumen) nass gepackt und unter Druck (1bar) verdichtet. 10 g des grünen Rohextrakt werden in 120 mL Aceton gelöst und auf 100 mL Kieselgel (Merck 80, 60-200 µm) aufgezogen. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Das mit Myrtenextrakt beladene Kieselgel wird mittels Flash-Chromatographie weiter aufgetrennt. Als Laufmittel wird ein Gemisch aus PE/Aceton (3 : 2 v/v) verwendet. Gegen Ende wird die Säule mit MeOH gespült, um alle Bestandteile von der Säule zu eluieren. Die Fraktionen werden mit einem Fraktionensammler gesammelt und mittels NP-DC wurden die Fraktionen nach den Hauptbestandteilen aufgeteilt (siehe Abb. 44). Das Lösemittel wird bei 27° C Wasserbadtemperatur im Vakuum entfernt. Fraktion 1 ergibt 700 mg, Fraktion 2 ergibt 3 g, Fraktion 3 ergibt 2,2 g, Fraktion 4 ergibt 0,8 g, Fraktion 5 ergibt 1 g, Fraktion 6 ergibt 0,4 g. Es können 82 % der aufgegebenen Masse wieder gefunden werden.

3.2.3. Isolierung der reinen Myrtucommulone

Die reinen Myrtucommulone werden aus Fraktion 4 erhalten. Es wird eine filtrierte Lösung mit einer Konzentration von 3 mg/mL Fraktion 4 in MeOH hergestellt. Davon werden 3 bis 4 mL in die präparative HPLC injiziert. Es werden 5 bis 6 HPLC-Läufe nacheinander durchgeführt (Abb. 209). Die blau eingerahmten Fraktionen werden getrennt in Kolben aufgefangen.

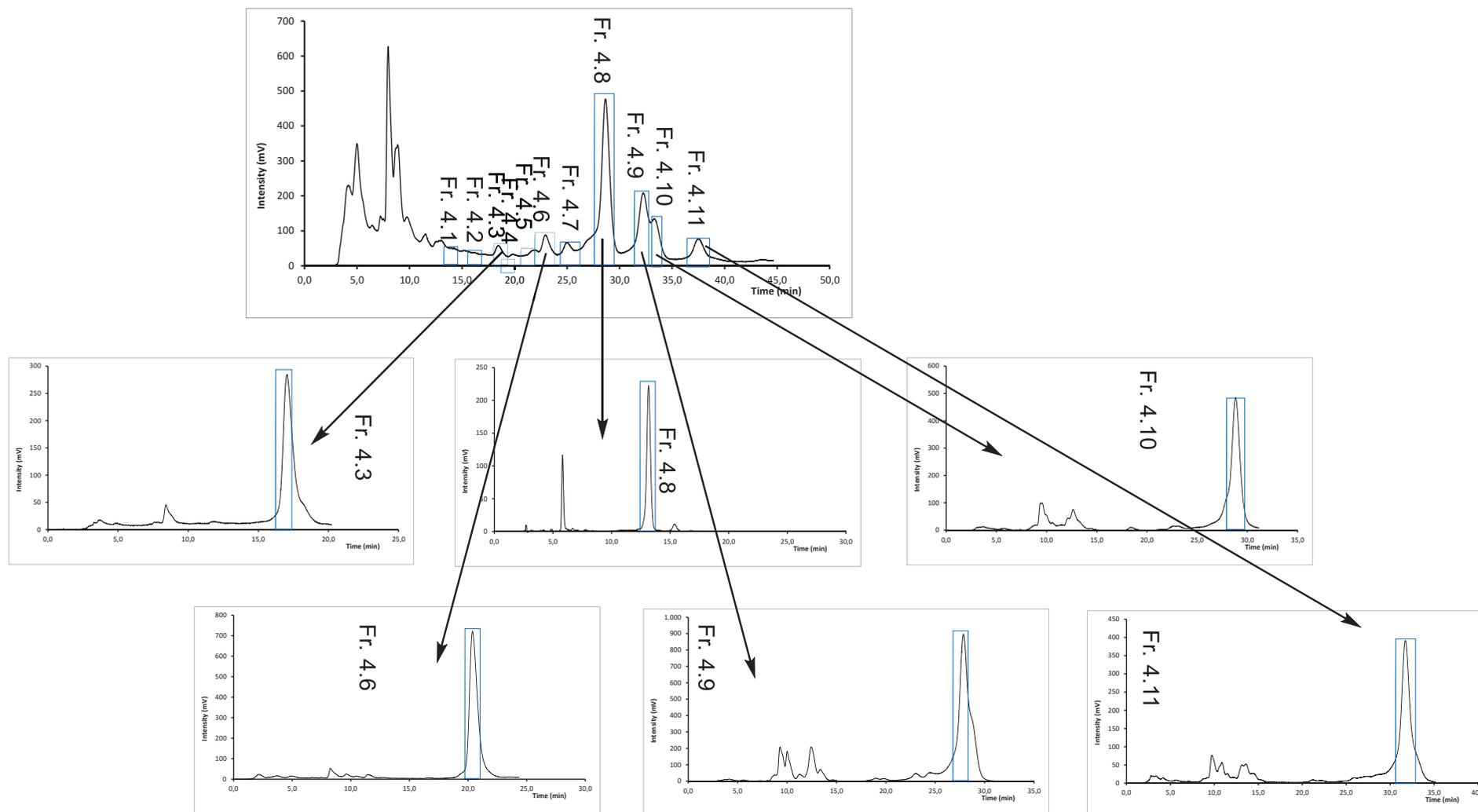


Abb. 209. Chromatogramme zur Trennung und Reinigung der einzelnen Teilfraktionen von Fraktion 4.

M&N C18ec, MeOH (0,1 % TFA) : H₂O (0,1 % TFA) 95:5 v/v,
F: 19,0 mL/min, T: rt, Inj: 1 mL, Konz: ≈ 3 mg/mL

Das Lösemittel wird im Kolben an einer Ölpumpe mit großer Kühlfalle bei 27° C Wasserbadtemperatur entfernt. Aufgrund zu geringer Reinheit (60 % bis 70 %) der einzelnen Fraktionen wird der in Abb. 209 blau umrahmte Teil eines Peaks jeder Fraktion erneut präparativ gereinigt. Das Lösemittel im Kolben wird im Ölpumpenvakuum mit großer Kühlfalle bei 27°C Wasserbadtemperatur entfernt. Fraktion 4.6 wird ein drittes Mal gereinigt (Abb. 210) um diese absolut rein zu erhalten.

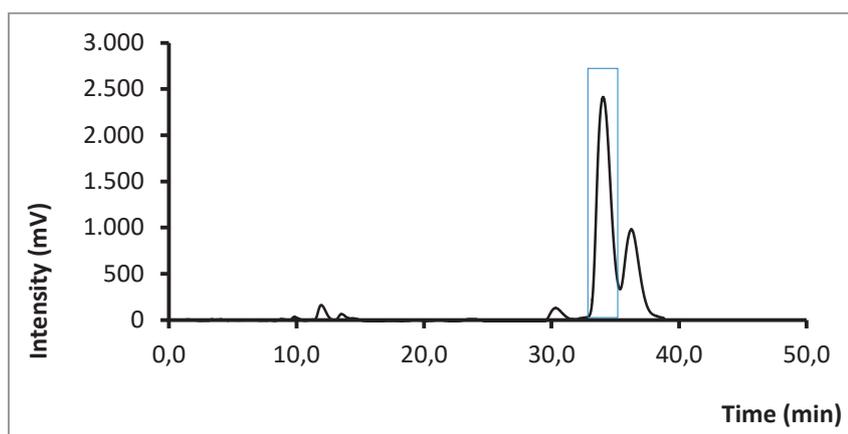


Abb. 210. Chromatogramm zur dritten präparativen Reinigung von Fraktion 4.6.
M&N C18ec, MeOH (0,1 % TFA) : H₂O (0,1 % TFA) 92:8 v/v,
F: 19,0 mL/min, T: rt, Inj:1 mL, Konz: ≈ 10 mg/mL

Die Reinheit und Massen der isolierten Peaks werden in Tabelle 38 angegeben.

Tabelle 38: Reinheit und Massen von Fraktion 4.3 bis 4.11.

Probenname	Reinheit	Masse
Fraktion 4.3 = MC C (6)	> 98 %	12 mg
Fraktion 4.6 = MC C (6)	> 98 %	15 mg
Fraktion 4.8 = MC A (1)	> 98 %	10 – 15 mg
Fraktion 4.9 (54)	> 93 %	5 – 7 mg
Fraktion 4.10 (55)	> 94 %	2 – 3 mg
Fraktion 4.11= MC F (9)	> 98 %	1 mg

3.2.4. Isolierung der reinen Norsemimyrtucommulone (30), (4), (56), (57), (58), (59)

Die reinen Norsemimyrtucommulone werden aus Fraktion 5 erhalten. Es wird eine filtrierte Lösung mit einer Konzentration von 3 mg/mL der Fraktion 5 in MeOH hergestellt. Davon werden 3 bis 4 mL in die präparative HPLC injiziert. Es werden 5 bis 6 HPLC-Läufe nacheinander durchgeführt (Abb. 211). Die blau eingerahmten Fraktionen wurden getrennt in Kolben aufgefangen.

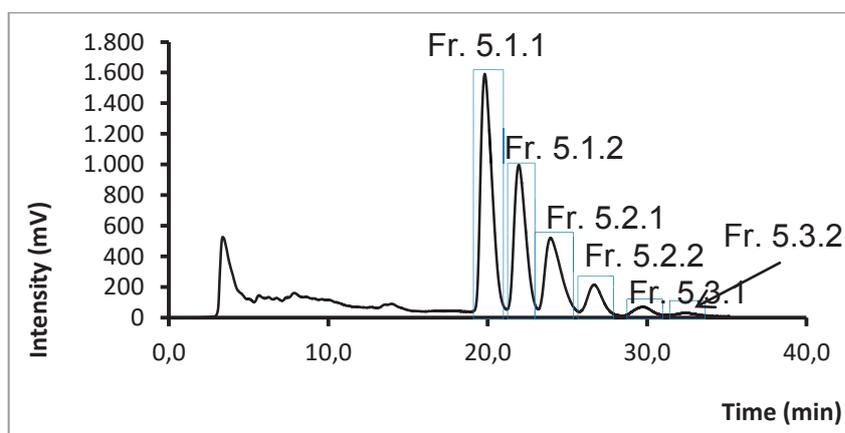


Abb. 211. Chromatogramm der präparativen Trennung von Fraktion 5.
M&N C18ec, MeOH (0,1 % TFA) : H₂O (0,1 % TFA) 85 : 15 v/v,
F: 19,0 mL/min, T: rt, Inj: 3-4 mL, Konz: ≈ 3 mg/mL

Das Lösemittel im Kolben wird an einer Ölpumpe mit großer Kühlfalle bei 27° C Wasserbadtemperatur entfernt. Die in Abb. 211 eingerahmten Peaks können nach einem präparativen HPLC-Lauf mit einer Reinheit > 95 % isoliert werden.

3.2.5. Zyklisierungsreaktion

Zu einem Äquivalent MC A (1)/ MC C (6) bzw. NSMC (30)/ SMC(4) wird so viel Benzol hinzugegeben bis die Konzentration 10 mmol/L (5 mg/mL) beträgt. Anschließend werden 6 Äquivalente für 1/ 6 und 3 Äquivalente für 30/ 4 p-TsOH hinzugefügt. Die Mischung wird langsam bis zum Rückfluss erhitzt und dann ca. 3-4 h unter Rückfluss weitergerührt (Abb. 212). Das Ende der Reaktion wurde mittels DC bestimmt. Die überschüssige p-TsOH wird mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (2 mL pro 0,1 mmol an (1)) neutralisiert. Die Trocknung erfolgt über MgSO₄ und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer

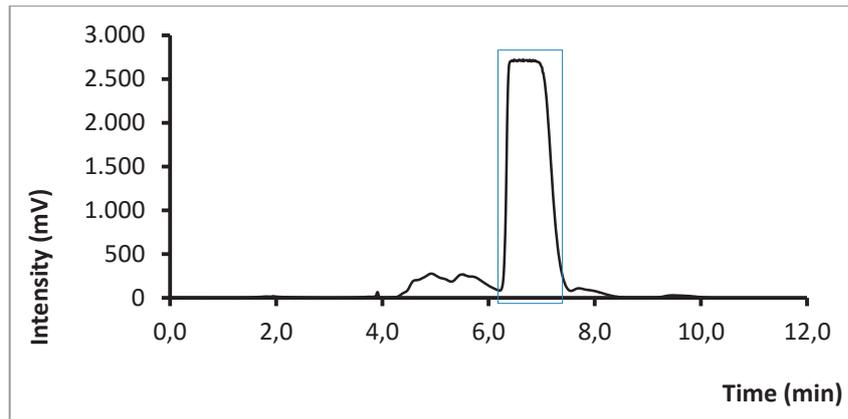


Abb. 214. Chromatogramm der Reinigung von MC B (**3**).
M&N C18ec, MeOH : H₂O 90 : 10 v/v,
F: 16,0 mL/min, T: rt, Inj: 1-2 mL, Konz: ≈ variabel

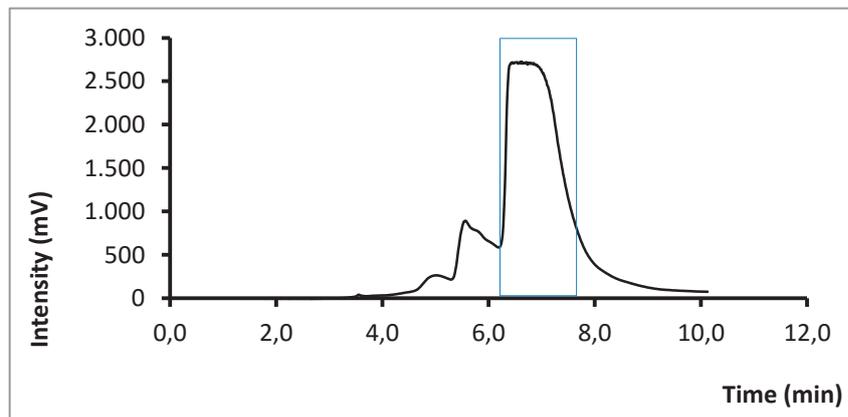


Abb. 215. Chromatogramm der Reinigung von zyklisiertem SMC (**68**).
M&N C18ec, MeOH : H₂O 90 : 10 v/v,
F: 16,0 mL/min, T: rt, Inj: 1-2 mL, Konz: ≈ variabel

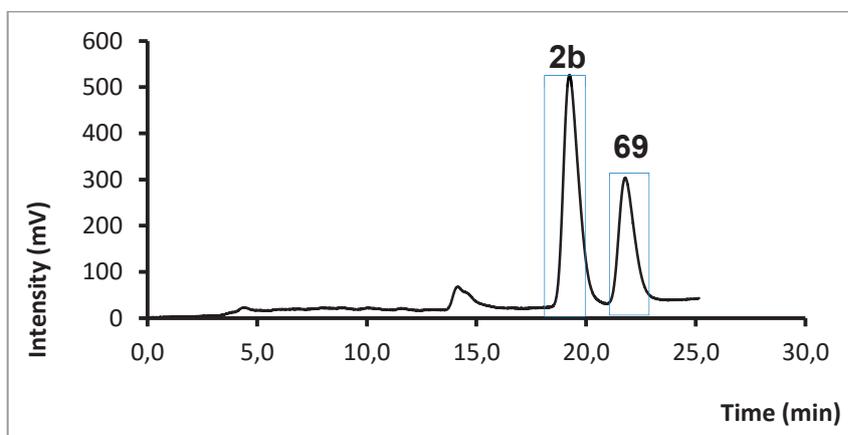


Abb. 216. Chromatogramm der Reinigung von zyklisierter
Fraktion 4.3 (**69**). M&N C18ec, MeOH : H₂O 90 : 10 v/v,
F: 15,0 mL/min, T: rt, Inj: 1-2 mL, Konz: ≈ variabel

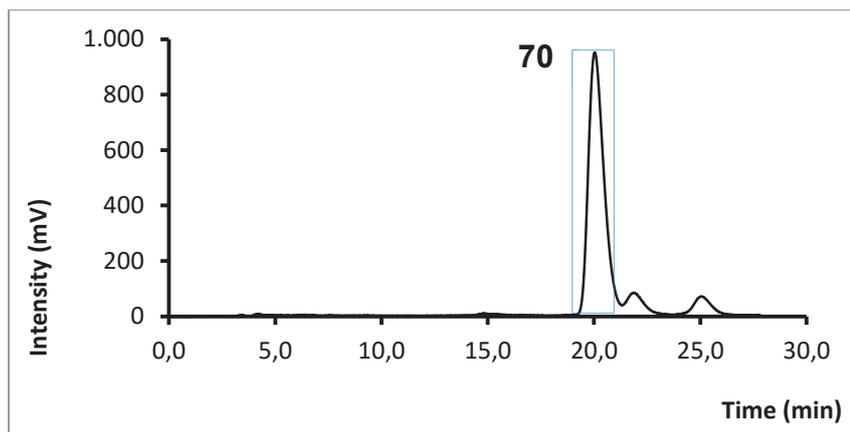


Abb. 217. Chromatogramm der Reinigung von zyklisierter Fraktion 4.6 (**70**).
M&N C18ec, MeOH : H₂O 90 : 10 v/v,
F: 15,0 mL/min, T: rt, Inj: 1-2 mL, Konz: ≈ variabel

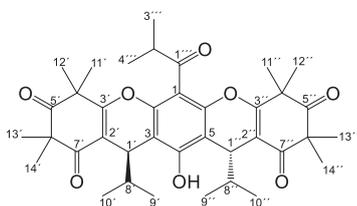
Die blau umrahmten Peaks in Abb. 213, Abb. 214, Abb. 215, Abb. 216 und Abb. 217 werden isoliert und in Kolben aufgefangen. Das Lösemittel wird bei 35° C im Wasserbad an der Membranpumpe entfernt. Es werden Proben mit einer Reinheit > 95 % erhalten.

3.2.7. NMR der Myrtucommulone

3.2.7.1. NMR von razemischen PMCA (2b)

DC: PE/Aceton 5:1, $R_f(\text{PMCA (2)}) = 0.27$, Schmelzpunkt: 142° C, $[\alpha]_D^{25} = 0$

HR-MS (ESI⁺) $[M+H]^+ = 655,3240$, Berechnete Masse für C₃₈H₄₈O₈Na⁺: 655,3247



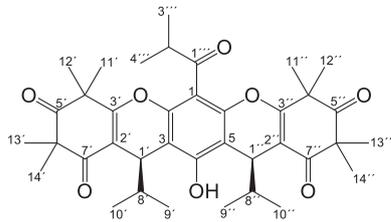
¹H-NMR (400MHz, Aceton-d₆): $\delta = 0.78$ (d, J = 7.2 Hz, 6 H, H10', H10''), 0.80 (d, J = 7.2 Hz 6 H, H9', H9''), 1.24 (d, J = 7.2 Hz, 6 H, H4''', H3'''), 1.42 (s, 6 H, H13', H13''), 1.43 (s, 6 H, H11', H11''), 1.45 (s, 6 H, H14', H14''), 1.55 (s, 6 H, H12', H12''), 1.96 (m, 2 H, H8', H8''), 3.18 (spt, J = 7.0 Hz, J = 6.8Hz, 1 H, H2'''), 4.57 (d, J = 3.6Hz, 2 H, H1', H1'')

¹³C-NMR (100MHz, Aceton-d₆): $\delta = 17.98$ (C3''', C4'''), 18.60 (C9', C9''), 19.24 (C10', C10''), 24.40 (C14', C13''), 24.81 (C11',), 25.19 (C12', C11''), 32.29 (C1', C1''), 35.10 (C8', C8''), 42.67 (C2'''), 47.54 (C4', C4''), 55.84 (C6', C6''), 108.70 (C2', C2''), 110.21 (C1), 110.88 (C3, C5), 147.55 (C2, C6), 152.03 (C4), 168.82 (C3', C3''), 198.72 (C7', C7''), 204.30 (C1'''), 211.78 (C5', C5'')

3.2.7.2. NMR von PMCA Meso-Form (2a)

DC: PE/Aceton 5:1, $R_f(\text{PMCA (2)}) = 0.27$, Schmelzpunkt: 133°C , $[\alpha]_D^{25} = 0$

HR-MS (ESI⁺) $[\text{M}+\text{H}]^+ 633,3403$, Berechnete Masse für $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_8^+$: 633,3383



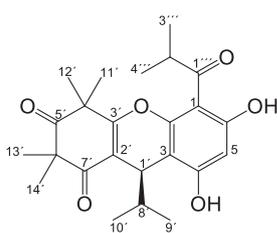
¹H-NMR (400MHz, Aceton-d₆): $\delta = 0.78$ (d, $J = 7.2$ Hz, 6 H, H10', H10''), 0.88 (d, $J = 7.2$ Hz 6 H, H9', H9''), 1.29 (d, $J = 7.2$ Hz, 6 H, H4''', H3'''), 1.36 (s, 6 H, H13', H13''), 1.38 (s, 6 H, H11', H11''), 1.44 (s, 6 H, H14', H14''), 1.52 (s, 6 H, H12', H12''), 1.97 (m, 2 H, H8', H8''), 3.19 (spt, $J = 7.0$ Hz, $J_b = 6.8$ Hz, 1 H, H2'''), 4.55 (d, $J = 3.6$ Hz, 2 H, H1', H1'')

¹³C-NMR (100MHz, Aceton-d₆): $\delta = 17.73$ (C3''', C4'''), 18.77 (C9', C9''), 19.12 (C10', C10''), 24.27 (C14', C13''), 24.76 (C11',), 24.78 (C12', C11''), 32.47 (C1', C1''), 35.11 (C8', C8''), 43.26 (C2'''), 47.52 (C4', C4''), 55.97 (C6', C6''), 108.48 (C2', C2''), 110.50 (C1), 111.27 (C3, C5), 147.49 (C2, C6), 152.31 (C4), 169.08 (C3', C3''), 198.58 (C7', C7''), 205.30 (C1'''), 211.76 (C5', C5'')

3.2.7.3. NMR von MC B (3)

Schmelzpunkt: 90°C , $[\alpha]_D^{25} = 0$

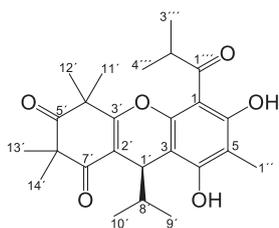
HR-MS (ESI⁺) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 437,1935$, Berechnete Masse für $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{Na}^+$: 437,1940



¹H-NMR (400MHz, Aceton-d₆): $\delta = 0.79$ (d, $J = 7.2$ Hz, 3 H, H10'), 0.83 (d, $J = 7.2$ Hz 3 H, H9'), 1.24 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, H3'''), 1.25 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, H4'''), 1.39 (s, 3 H, H13'), 1.43 (s, 3 H, H11'), 1.45 (s, 3 H, H14'), 1.62 (s, 3 H, H12'), 1.91 (ddq, $J = 3.6$ Hz, 1 H, H8'), 3.90 (m, 1 H, H2'''), 4.32 (d, $J = 3.6$ Hz, 2 H, H1'), 6.29 (s, 1 H, H5), 6.59 (br.s, 1 H, OH4)

¹³C-NMR (100MHz, Aceton-d₆): $\delta = 17.68$ (C3''', C4'''), 18.72 (C9'), 18.84 (C10'), 24.16 (C13'), 24.86 (C11',), 24.96 (C14'), 25.12 (C12') 31.53 (C1'), 34.80 (C8'), 39.68 (C2'''), 47.28 (C4'), 56.41 (C6'), 100.62 (C5), 103.60 (C1), 112.07 (C2'), 153.48 (C2), 159.31 (C6), 164.71 (C4), 167.84 (C3'), 198.20 (C7'), 208.92 (C1'''), 211.79 (C5')

3.2.7.4. NMR von zyklisiertem SMC (68)

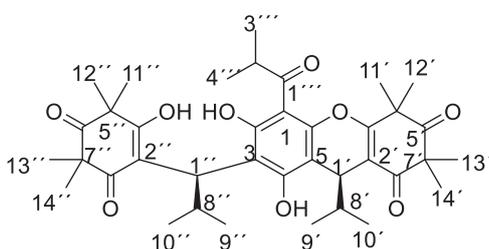


¹H-NMR (400MHz, Aceton-d₆): δ = 0.79 (d, J = 7.2Hz, 3 H, H10'), 0.82 (d, J = 7.2Hz 3 H, H9'), 1.24 (d, J = 7.2Hz, 3H, H3'''), 1.25 (d, J = 7.2Hz, 3H, H4'''), 1.39 (s, 3 H, H13'), 1.42 (s, 3 H, H11'), 1.44 (s, 3 H, H14'), 1.61 (s, 3 H, H12'), 1.91 (ddq, J = 3.6Hz, 1 H, H8'), 2.14 (s, 3 H, H1'') 3.90 (m, 1 H, H2'''), 4.29 (d, J= 3.6Hz, 2 H, H1'), 5.60 (s, 1 H, OH4)

¹³C-NMR (100MHz, Aceton-d₆) : δ = 9.22 (C1''), 17.68 (C3''', C4'''), 18.72 (C9'), 18.84 (C10'), 24.16 (C13'), 24.86 (C11'), 24.96 (C14'), 25.12 (C12') 31.53 (C1'), 34.80 (C8'), 39.68 (C2'''), 47.28 (C4'), 56.41 (C6'), 100.62 (C5), 103.60 (C1), 112.07 (C2'), 153.48 (C2), 159.31 (C6), 164.71 (C4), 167.84 (C3'), 198.20 (C7'), 208.92 (C1'''), 211.79 (C5')

3.2.7.5. NMR von Fraktion 4.3 (6a) = syn - MC C (6)

HR-MS (ESI) [M+H]⁻ = 649,3359 , Berechnete Masse für C₃₈H₄₉O₉⁻: 649,3382



¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ = 0.72 – 0.76 (m, 6 H, H9'', H10''), 0.80 – 0.93 (m, 6 H, H9', H10') 1.25 (tr, 6 H, H3''', H4'''), 1.31 – 1.61 (m, 24 H, H11', H11'', H12', H12'', H13', H13'', H14', H14''), 1.91 (m, 1 H, H8'), 3.04 (m, 0.62 H, H8''), 3.11 (m, 0.45 H, H8''), 3.79

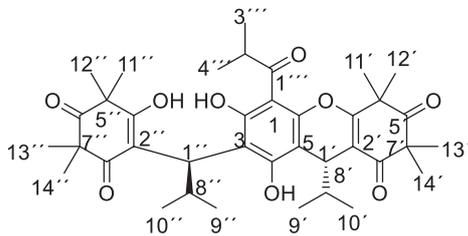
(d, J = 11.2, 0.57 H, H1''), 3.89 (d, J = 11.2, 0.38 H, H1'') 3.98 (m, 1 H, H2'''), 4.43 (tr, J = 4.4, 1 H, H1'), 10.27 (s, 0.45 H, OH), 10.94 (s, 0.28 H, OH), 11.00 (s, 0.31 H, OH), 11.99 (s, 0.48 H, OH), 16.35 (s, 0.28 H, OH), 16.38 (s, 0.19 H, OH)

Die detaillierte Strukturaufklärung erfolgte mit der vollständig zyklisierten Form mittels NMR-Spektroskopie und ergibt die gleichen Daten wie die meso-Form des PMCA (2b)

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃) : δ = 17.95 (C3'''), 18.89 (C9'), 19.57 (C9''), 21.10 (C4'''), 21.90 (C10'), 21.98 (C10''), 23.98 (C8''), 23.81 – 26.82 (C11', C12', C13', C14', C11'', C12'', C13'', C14''), 31.48 (C1'), 34.35 (C8'), 39.22 (C2'''), 39.64 (C1''), 47.12 (C4'), 48.77 (C4''), 54.89 (C6'), 56.15 (C6''), 101.88 (C1), 106.08 (C2''), 112.32 (C5), 112.51 (C3), 113.89 (C2'), 145.43 (C2), 161.28 (C4), 161.57 (C6), 166.83 (C3'), 178.41 (C3''), 197.62 (C7''), 203.02 (C7'), 209.64 (C1'''), 212.31 (C5'), 212.36 (C5'')

3.2.7.6. NMR von Fraktion 4.6 (6b) = anti - MC C (6)

HR-MS (ESI⁻) [M+H]⁻ = 649,3361 , Berechnete Masse für C₃₈H₄₉O₉⁻: 649,3382



¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ = 0.72 – 0.77 (m, 6 H, H9'', H10''), 0.81- 0.91 (m, 6 H, H9', H10') 1.27 (tr, 6 H, H3''', H4'''), 1.32 – 1.60 (m, 24 H, H11', H11'', H12', H12'', H13', H13'', H14', H14''), 1.93 (m, 1 H, H8'), 3.09 (m, 1 H, H8''), 3.86 (d, J = 10.8, J = 0.75 H, H1''), 3.89 (d, J = 10.8, 0.29 H, H1''), 4.00 (m, 1 H, H2''') 4.42 (d, J = 3.6, 0.23 H, H1'), 4.46 (d, J = 3.6, 0.75 H, H1'), 10.22 (s, 0.70 H, OH), 11.08 (s, 0.19 H, OH), 11.93 (s, 0.73 H, OH), 16.27 (s, 0.57 H, OH)

Die detaillierte Strukturaufklärung erfolgte mit der vollständig zyklisierten Form mittels NMR-Spektroskopie und ergibt die gleichen Daten wie das Razemat des PMCA (2a)

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ = 17.86 (C3'''), 18.74 (C9'), 18.95 (C9''), 21.10 (C4'''), 21.70 (C10'), 21.86 (C10''), 23.91 (C8''), 23.11 – 26.76 (C11', C12', C13', C14', C11'', C12'', C13'', C14''), 31.59 (C1'), 34.82 (C8'), 39.24 (C2'''), 39.28 (C1''), 47.14 (C4'), 48.72 (C4''), 55.02 (C6'), 56.09 (C6''), 101.89 (C1), 106.20 (C2''), 112.37 (C5), 112.50 (C3), 113.63 (C2'), 152.15 (C2), 161.31 (C4), 161.57 (C6), 166.78 (C3'), 178.10 (C3''), 197.63 (C7''), 203.05 (C7'), 209.83 (C1'''), 212.04 (C5'), 212.20 (C5'')

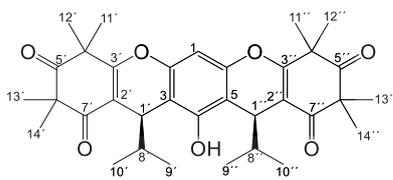
3.2.7.7. NMR von zyklisierter Fraktion 4.3 = meso-Form PMCA (2b)

Siehe Kapitel 3.2.8.2

3.2.7.8. NMR von zyklisierter Fraktion 4.6 = razemisches PMCA (2a)

Siehe Kapitel 3.2.8.1

3.2.7.9. NMR von zyklisierter Fraktion 4.3 ohne Isobutyrylgruppe (69)

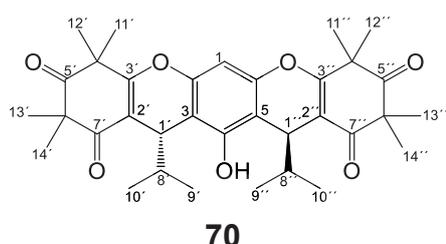


69

¹H-NMR (400MHz, Aceton-d₆): δ = 0.78 (d, J = 7.2 Hz, 6 H, H10', H10''), 0.88 (d, J = 7.2 Hz 6 H, H9', H9''), 1.36 (s, 6 H, H13', H13''), 1.38 (s, 6 H, H11', H11''), 1.44 (s, 6 H, H14', H14''), 1.52 (s, 6 H, H12', H12''), 1.93 (m, 2 H, H8', H8''), 4.29 (d, J = 3.6Hz, 2 H, H1', H1''), 5.41 (OH), 6.55 (H_{ar})

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, Aceton- d_6): $\delta = 18.77$ ($\text{C}9'$, $\text{C}9''$), 19.12 ($\text{C}10'$, $\text{C}10''$), 24.27 ($\text{C}14'$, $\text{C}13''$), 24.76 (p, $\text{C}11'$), 24.78 ($\text{C}12'$, $\text{C}11''$), 32.47 ($\text{C}1'$, $\text{C}1''$), 35.11 ($\text{C}8'$, $\text{C}8''$), 47.52 ($\text{C}4'$, $\text{C}4''$), 55.97 ($\text{C}6'$, $\text{C}6''$), 108.48 ($\text{C}2'$, $\text{C}2''$), 100.50 ($\text{C}1$), 111.27 ($\text{C}3$, $\text{C}5$), 147.49 ($\text{C}2$, $\text{C}6$), 152.31 ($\text{C}4$), 169.08 ($\text{C}3'$, $\text{C}3''$), 198.58 ($\text{C}7'$, $\text{C}7''$), 211.76 ($\text{C}5'$, $\text{C}5''$)

3.2.7.10. NMR von zyklisierter Fraktion 4.3 ohne Isobutyrylgruppe (70)



$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, Aceton- d_6): $\delta = 0.78$ (d, $J = 7.2$ Hz, 6 H, $\text{H}10'$, $\text{H}10''$), 0.80 (d, $J = 7.2$ Hz 6 H, $\text{H}9'$, $\text{H}9''$), 1.42 (s, 6 H, $\text{H}13'$, $\text{H}13''$), 1.43 (s, 6 H, $\text{H}11'$, $\text{H}11''$), 1.45 (s, 6 H, $\text{H}14'$, $\text{H}14''$), 1.55 (s, 6 H, $\text{H}12'$, $\text{H}12''$), 1.94 (m, 2 H, $\text{H}8'$, $\text{H}8''$), 4.31 (d, $J = 3.6$ Hz, 2 H, $\text{H}1'$, $\text{H}1''$), 5.69 (OH), 6.56 (H_{ar})

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, Aceton- d_6): $\delta = 18.60$ ($\text{C}9'$, $\text{C}9''$), 19.24 ($\text{C}10'$, $\text{C}10''$), 24.40 ($\text{C}14'$, $\text{C}13''$), 24.81 ($\text{C}11'$), 25.19 ($\text{C}12'$, $\text{C}11''$), 32.29 ($\text{C}1'$, $\text{C}1''$), 35.10 ($\text{C}8'$, $\text{C}8''$), 47.54 ($\text{C}4'$, $\text{C}4''$), 55.84 (q, $\text{C}6'$, $\text{C}6''$), 108.70 ($\text{C}2'$, $\text{C}2''$), 100.21 ($\text{C}1$), 110.88 ($\text{C}3$, $\text{C}5$), 147.55 ($\text{C}2$, $\text{C}6$), 152.03 ($\text{C}4$), 168.82 ($\text{C}3'$, $\text{C}3''$), 198.72 ($\text{C}7'$, $\text{C}7''$), 211.78 ($\text{C}5'$, $\text{C}5''$)

3.2.8. Präparative chirale HPLC der zyklisierten Verbindungen

Die getrennten Enantiomere wurden durch chirale präparative HPLC erhalten. Eine Verbesserung gegenüber der Chiralcel OD-H war die Trennung mit der Reprisil Chiral. Die blau umrahmten Peaks in Abb. 218, Abb. 219 und Abb. 220 werden in getrennten Kolben gesammelt und das Lösemittel bei reduziertem Druck bei 35°C im Wasserbad entfernt. Pro HPLC-Lauf können von jedem Enantiomer etwa 2,5 mg Material erhalten werden.

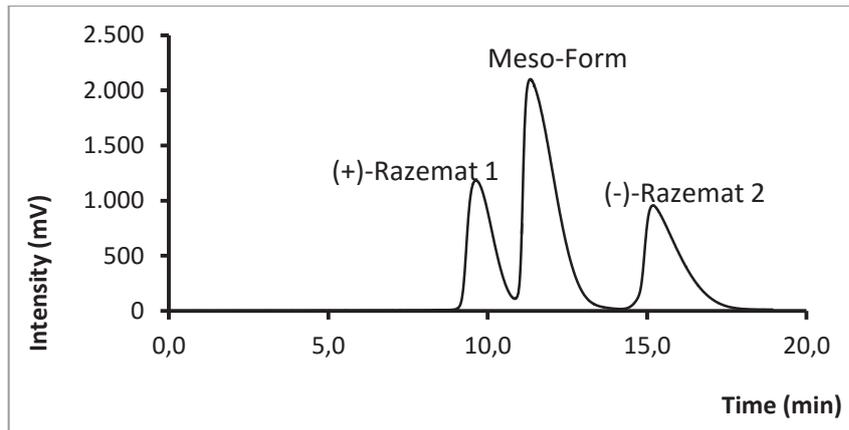


Abb. 218. Chromatogramm der präparativen Trennung von PMCA (2).
Sykam, Reprosil Chiral NR, n-Hexan : iso-PrOH 97 : 3 v/v,
F: 8,0 mL/min, T:rt, Inj: 2 mL, Konz: \approx 5 mg/mL

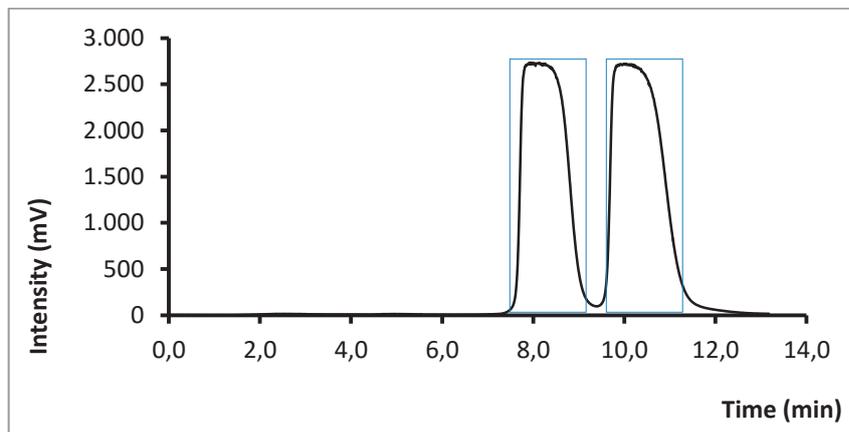


Abb. 219: Chromatogramm der präparativen Trennung von MC B (3).
Sykam, Reprosil Chiral NR, n-Hexan: iso-PrOH 97 : 3 v/v,
F: 8,0 mL/min, T: rt, Inj: 2 mL, Konz: \approx 5 mg/mL

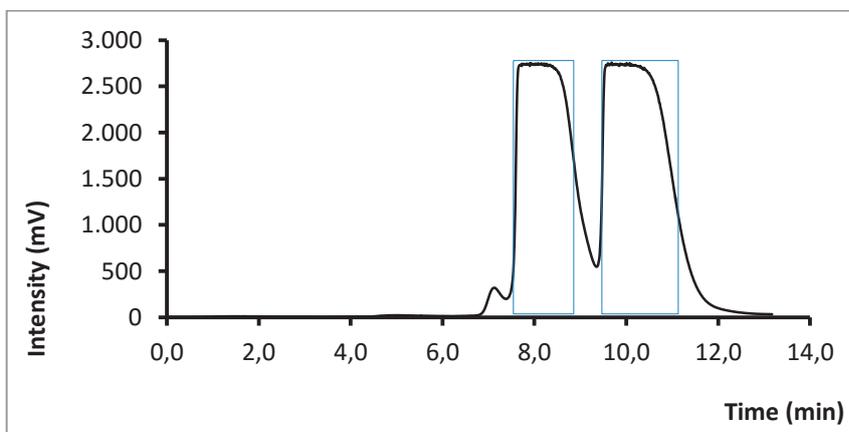


Abb. 220. Chromatogramm der präparativen Trennung von
zyklisiertem SMC (68). Reprosil Chiral NR, n-Hexan: iso-PrOH 97 : 3 v/v,
F: 8,0 mL/min, T: rt, Inj: 2 mL, Konz: \approx 5 mg/mL

3.2.9. Präparative chirale HPLC der unzyklisierten Myrtucommulone

Die Isolierung der zyklisierten Verbindungen auf präparativer Normalphasen-HPLC verursachte keine Probleme bei der Trennung und der Aufarbeitung, da diese Laufmittel ohne Modifier verwendet werden können. Die unzyklisierten Verbindungen wurden mit einem Puffer getrennt. Dieser musste schonend mit dem Lösemittel entfernt werden.

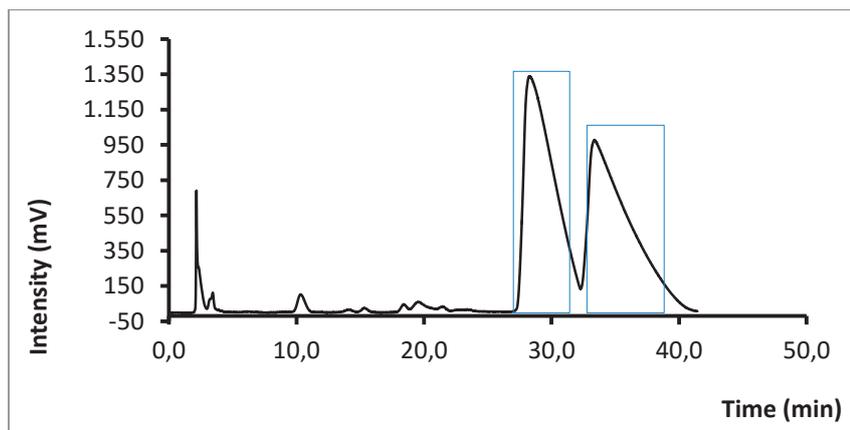


Abb. 221. Chromatogramm der präparativen Trennung von MC A (1).
MN C18 ec, MeCN : Puffer (90m M NH₄OAc, pH 9 DEA) 35 : 65 v/v,
F: 20,0 mL/min, T:rt, Inj: 2mL, Konz: ≈ 3 mg/mL

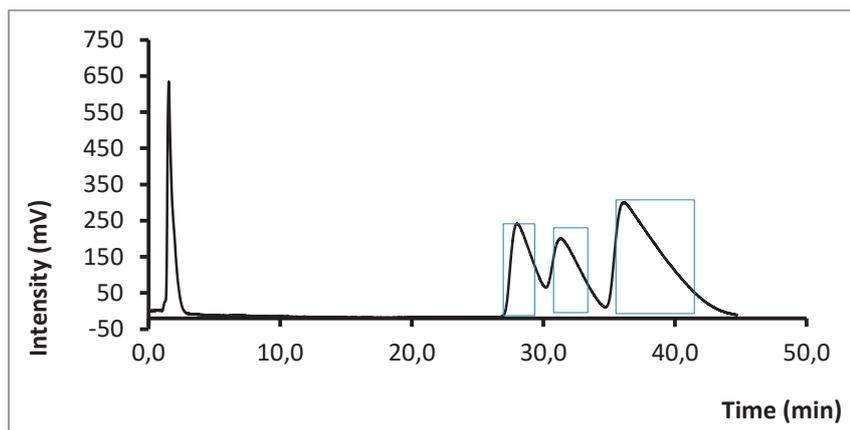


Abb. 222. Chromatogramm der präparativen Trennung
in Enantiomere von MC A (1).
Reprisil Chiral NR, MeCN : Puffer (90m M NH₄OAc, pH 9 DEA) 35 : 65
55 v/v, mF: 8,0 mL/min, T: rt, Inj: 3 mL, Konz: ≈ 3 mg/mL

In Abb. 221 wird die Trennung von MC A (1) in die Meso-Form und das Razemat auf der MN C18 ec gezeigt. Abb. 222 zeigt die Trennung von MC A (1) auf der Reprisil

Chiral. Es können alle drei Isomere in einem Schritt erhalten werden. Bei einer Injektion von 3 mL mit 3 mg/mL Konzentration können 2 mg jedes Enantiomeren und 4 mg von der meso-Form erhalten werden.

Die Probe mit dem Lösemittel wird bei reduziertem Druck und bei einer Wasserbadtemperatur von 30°C eingengt, um den größten Anteil an MeCN zu entfernen. Anschließend wird der Kolben mit gesättigter Kochsalzlösung aufgefüllt und mehrfach (2- bis 3-mal) mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand im Kolben wird in MeOH aufgenommen und über ein mit Kieselgel gefülltes Filterrohr gespült. Das erhaltene methanolische Filtrat ist frei von Pufferanteilen. Mit der MeOH-Lösung können die weiteren Analysen durchgeführt werden.

Das hier beschriebene Verfahren fand bei allen Enantiomerentrennungen mit einem Puffer Anwendung.

Die präparative Trennung von NSMC (**30**) (Abb. 84) und die Problematik der Trennung, der unzyklisierten Semimyrtucommulon-Homologen wird in Kapitel 2.10.1 im theoretischen Teil beschrieben. Die Trennung von SMC (**4**) und der SMC-Homologen wird in Abb. 223, Abb. 224, Abb. 225, Abb. 226, Abb. 227, Abb. 228, Abb. 229 und Abb. 230 dargestellt.

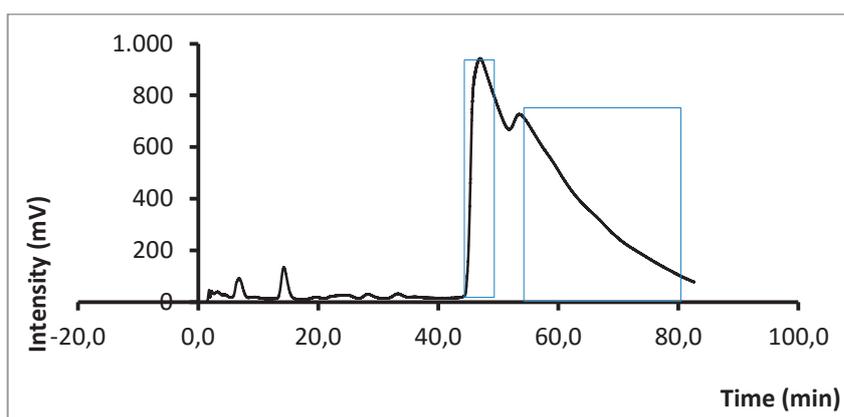


Abb. 223. Chromatogramm der präparativen Trennung in Enantiomere von SMC (**4**).
Reprosil Chiral NR, MeOH : Puffer (150 mM NH₄OAc, pH 4 AcOH)
55 : 45 v/v, F: 12,0 mL/min, T: rt, Inj: 3 mL, Konz: ≈ 3 mg/mL

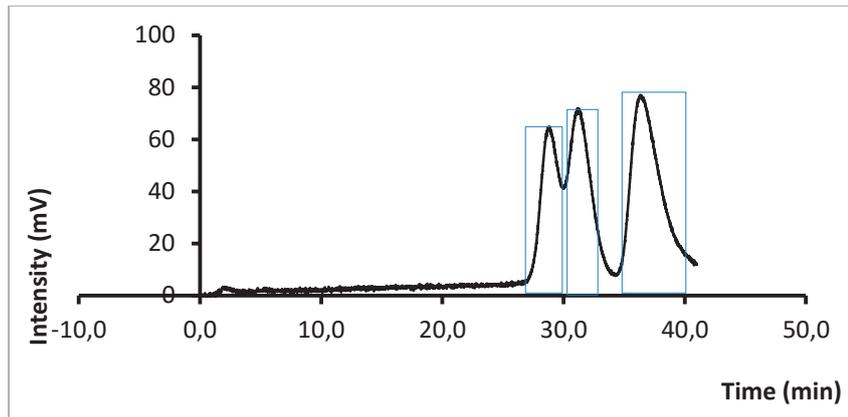


Abb. 224. Chromatogramm der präparativen Trennung in Enantiomere von Fraktion 4.9 (**54**).
 Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (60 mM $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, pH 9 DEA)
 40 : 60 v/v, F: 12,0 mL/min, T:rt, Inj: 2 mL, Konz: \approx 1 mg/mL

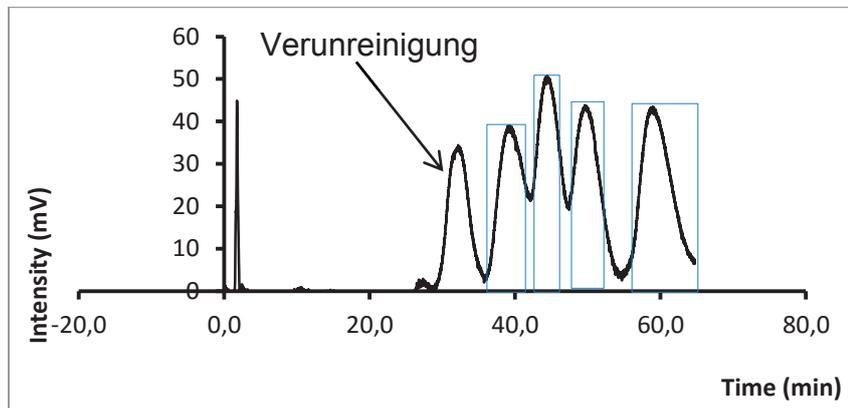


Abb. 225. Chromatogramm der präparativen Trennung in Enantiomere von Fraktion 4.10 (**55**).
 Sykam, Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (60 mM $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, pH 9 DEA)
 40 : 60 v/v, F: 12,0 mL/min, T:rt, Inj: 2 mL, Konz: \approx 1 mg/mL

Bei dem ersten Peak handelt es sich um eine Verunreinigung. Von Peak 2 bis 4 wird nur der blau eingerahmte Teil gesammelt um eine möglichst reine Fraktion zu erhalten.

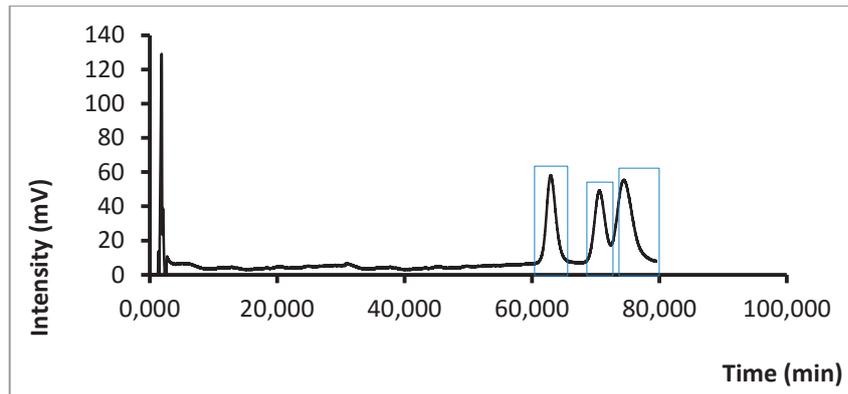


Abb. 226. Chromatogramm der präparativen Trennung in Enantiomere von Fraktion 4.11 (**9**)
 Reprisil Chiral NR, MeCN : Puffer (60 mM $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, pH 9 DEA)
 40 : 60 v/v, F: 12,0 mL/min, T: rt, Inj: 2mL, Konz: \approx 1 mg/mL

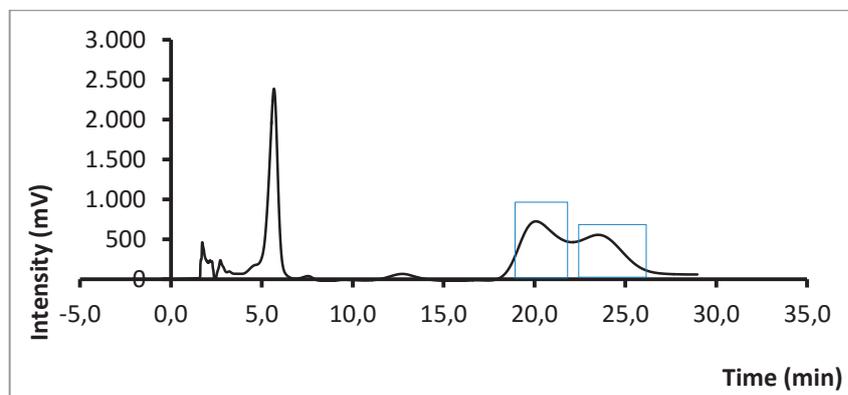


Abb. 227. Chromatogramm der präparativen Trennung in Enantiomere von Fraktion 5.2.1 (**56**)
 Reprisil Chiral NR, MeOH: Puffer (60 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, pH 4 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)
 60 : 40 v/v, F: 12,0 mL/min, T: rt, Inj: 1 mL, Konz: \approx 1 mg/mL

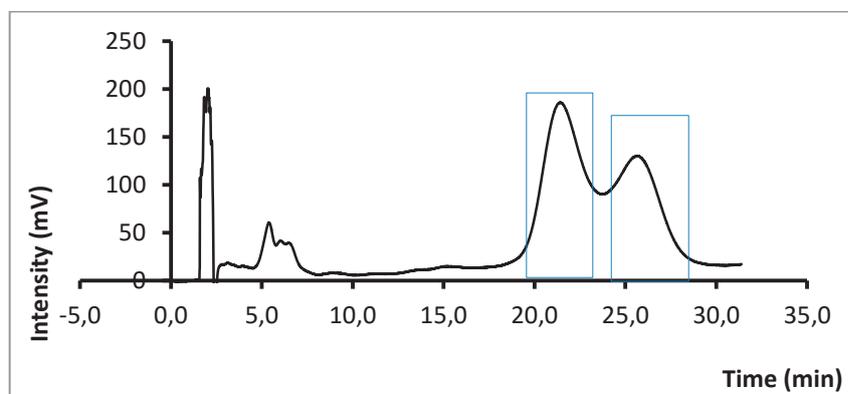


Abb. 228. Chromatogramm der präparativen Trennung in Enantiomere von Fraktion 5.2.2 (**57**)
 Reprisil Chiral NR, MeOH : Puffer (60 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, pH 4 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 60 : 40 v/v,
 F: 12,0 mL/min, T: rt, Inj: 1 mL, Konz: \approx 1 mg/mL

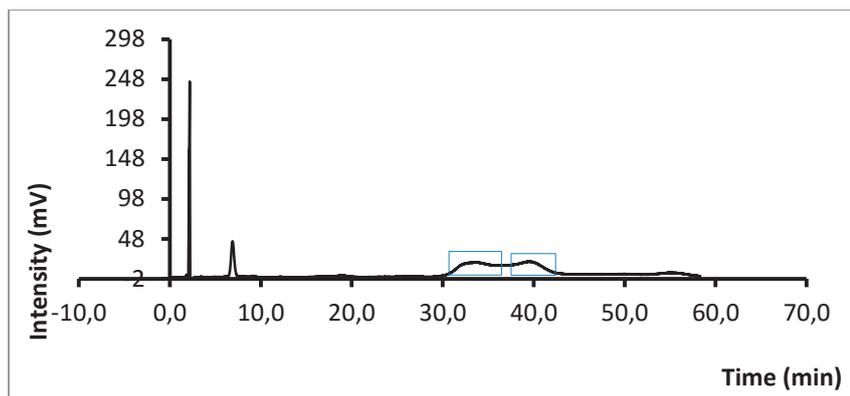


Abb. 229. Chromatogramm der präparativen Trennung in Enantiomere von Fraktion 5.3.1 (**58**), Reprosil Chiral NR, MeOH: Puffer (60mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, pH4 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 60 : 40 v/v, F: 12,0 mL/min, T:rt, Inj:1mL, Konz: ≈ 1 mg/mL

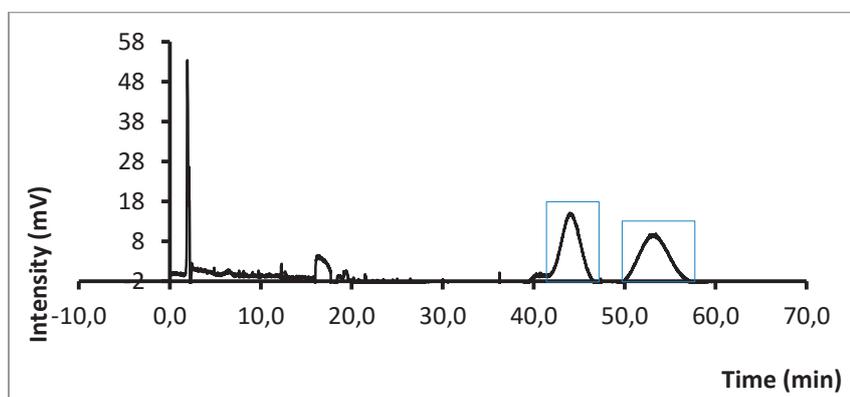


Abb. 230. Chromatogramm der präparativen Trennung in Enantiomere von Fraktion 5.3.2 (**59**), Reprosil Chiral NR, EtOH : Puffer (60 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, pH 4 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 55 : 45 v/v, F: 1,5 mL/min, T: rt, Inj: 100 μL , Konz: ≈ 1 mg/mL

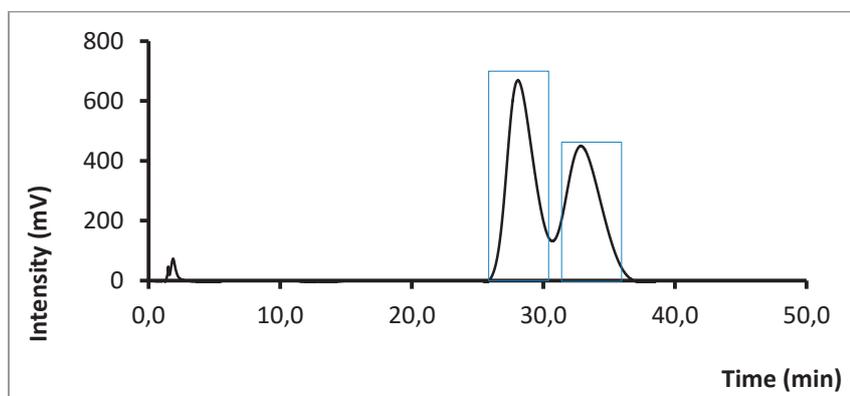


Abb. 231. Chromatogramm der präparativen Trennung Fraktion 4.6 MC C (**6**) Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (90m M NH_4OAc , pH 9 DEA) 35 : 65 55 v/v, F: 12,0 mL/min, T: rt, Inj: 3 mL, Konz: ≈ 3 mg/mL

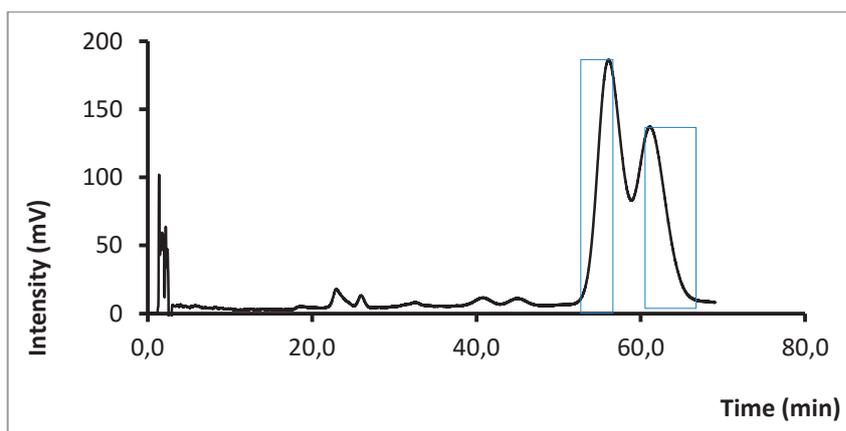


Abb. 232. Chromatogramm der präparativen Trennung Fraktion 4.3 MC C (6), Reprosil Chiral NR, MeCN : Puffer (90m M $(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$, pH 9 DEA) 35 : 65 55 v/v, F: 8,0 mL/min, T: rt, Inj: 3 mL, Konz: \approx 3 mg/mL

Um die Verbindungen in Abb. 231 und Abb. 232 rein zu erhalten, wurde der Peak nur im Bereich des blaumarkierten Rahmens isoliert. Der Puffer wurde standardmäßig entfernt. Es konnte genügend Material für die CD-Spektroskopie erhalten werden.

3.2.10. Präparative Trennung der Myrtucommulon-Analoga

Auf der präparativen HPLC wird MAC 445 Spot 1 in 2 zwei Bestandteile aufgetrennt, in Peak 1 und Peak 2 (Abb. 233, Abb. 234).

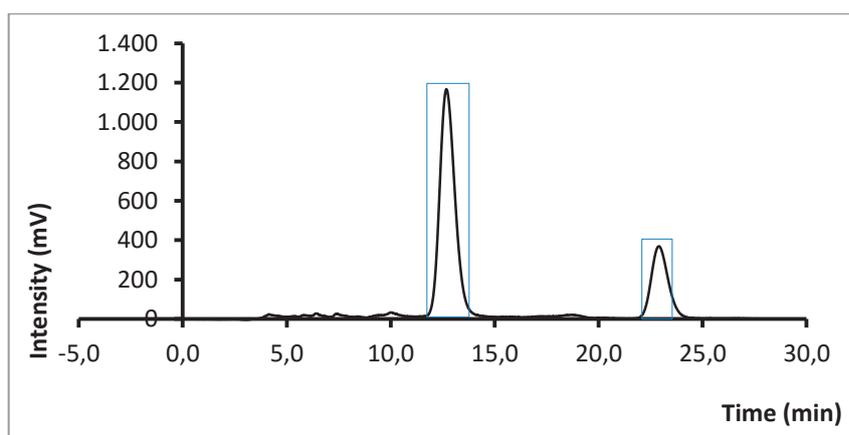


Abb. 233. Chromatogramm der präparativen Trennung von MAC 445 Spot 1, M&N C18ec, MeOH : H_2O 80 : 20 v/v, F: 19,0 mL/min, T: rt, Inj: 3 mL, Konz: \approx 3 mg/mL

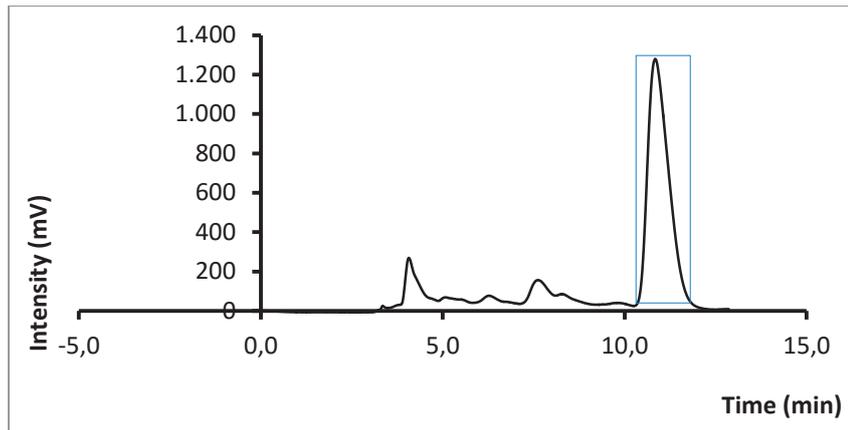


Abb. 234. Chromatogramm der präparativen Trennung von MAC 445 Spot 2, M&N C18ec, MeOH : H₂O 80 : 20 v/v, F: 19,0 mL/min, T: rt, Inj: 3 mL, Konz: ≈ 3 mg/mL

Auf der Reprisil Chiral wird MAC445 Spot 1 Peak 1 in seine Enantiomere aufgetrennt (Abb. 235). Der Puffer wird standardmäßig entfernt. Von jedem Peak werden etwa 1 mg Substanz erhalten.

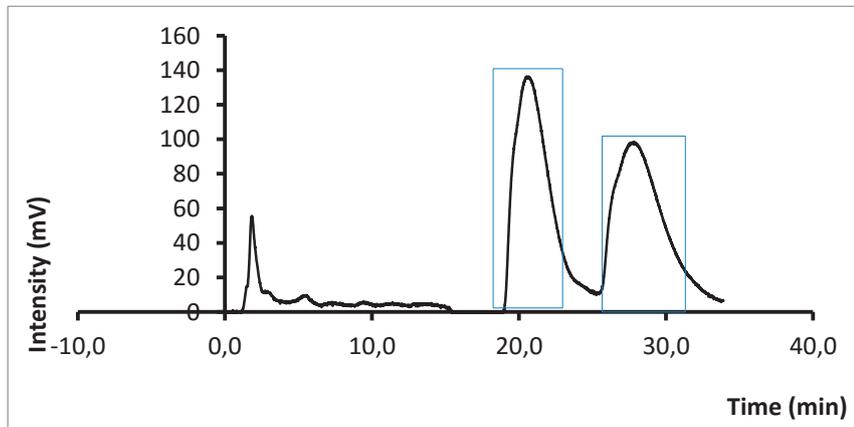


Abb. 235. Chromatogramm der präparativen Trennung in Enantiomere von MAC 445 Spot 1 Peak1, Reprisil Chiral NR, MeCN : Puffer (90 mM NH₄OAc, pH 9 DEA) 35 : 65 v/v, F: 14,0 mL/min, T: rt, Inj: 1 mL, Konz: ≈ 2 mg/mL

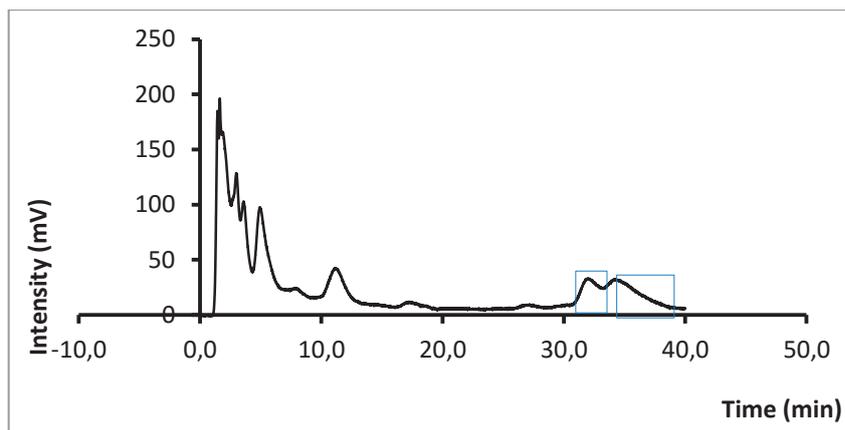


Abb. 236. Chromatogramm der präparativen Trennung in Enantiomere von MAC 445 Spot 1 Peak2
Reprosil Chiral NR, MeCN: Puffer (90 mM NH₄OAc, pH 9 DEA) 35 : 65 v/v,
F: 14,0 mL/min, T: rt, Inj: 1mL, Konz: ≈ 2 mg/mL

Ebenso wird MAC445 Spot 1 Peak 2 aufgetrennt (Abb. 236). Von jedem Peak werden wenige Milligramm Substanz erhalten. Das pufferhaltige Lösemittel wird standradmäßig entfernt. Mit den erhaltenen reinen Enantiomeren werden die Messung des CD-Spektrums und die analytische HPLC durchgeführt.

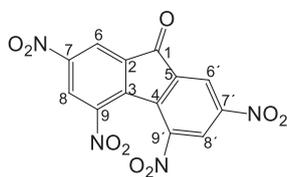
3.3. TAPA (29)

3.3.1. Synthese des TAPA-stationärphasen Materials

2,4,5,7-Tetranitrofluorenon (32)

In einem 1 L Dreihalskolben werden 77 mL H₂SO₄ (konz.) und 130 mL HNO₃(konz.) vorgelegt und unter Rückfluss erhitzt. Anschließend werden 7,30 g 9-Fluorenon (31) (41.0 mmol) in 84 mL H₂SO₄ (konz.) gelöst, innerhalb 1 h zur heißen H₂SO₄ (konz.)/HNO₃ (konz.)- Lösung hinzugegeben. Danach wird eine Lösung aus 95 mL HNO₃ (konz.) und 112 mL H₂SO₄ (konz.) über 4,25 h zu getropft. Die Lösung wird 3 weitere Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf 1,75 L Eiswasser gegeben (Vorsicht, heftige Reaktion). Der ausgefallene gelbe Niederschlag wird abfiltriert und der Filterkuchen mit viel Wasser neutral gewaschen. Das neutrale Rohprodukt wird im Exikator über CaCl₂ bei 70° C getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation in 160 mL Essigsäure mit 10 mL Essigsäureanhydrid gereinigt. Das

reine Produkt **32** wird im Exikator über KOH bei 70° C getrocknet. Das fertige Produkt **32** wird mit 9,42 g, 68% Ausbeute (26,0 mol) als gelber Feststoff erhalten. (Schmelzpunkt: 252° C)

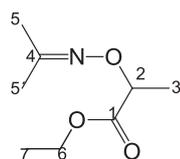


¹H-NMR (400MHz, Aceton-d₆): δ = 8.89 (d, $J_{H6, H8} = 2.0$ Hz, 2 H, H6, H6'), 9.06 (d, $J_{H8, H6} = 2.0$ Hz, 2 H, H8, H8')

¹³C-NMR (100MHz, Aceton-d₆): δ = 123.04 (C8, C8'), 125.73 (C6, C6'), 137.52 (C3, C4), 138.63 (C2, C5), 149.91 (C7, C7'), 150.10 (C9, C9'), 191.18 (C1)

(±)-α-(Isopropylaminoxyl)-propionsäureethylester (**35**)

Zu 500 ml abs. Ethanol wird unter N₂-Atmosphäre 17,54 g Natrium (0,76 mol, 1Äq.) hinzugegeben und bis zur vollständigen Auflösung erhitzt. Die klare Lösung wird auf 5° C abgekühlt und 55,6 g Acetonoxim (**33**) (0,76 mol, 1Äq.) hinzugegeben und die Reaktionsmischung bei 5-10° C gehalten. Anschließend werden 98 ml Ethyl-α-brompropionat (**34**) (136,61 g, 0,75 mol) innerhalb von 30 min zugegeben, sodass die Temperatur nicht 20°C überschreitet. Nach beendeter Zugabe wird die Suspension über Nacht stehen gelassen. Das ausgefallene Natriumbromid wird abfiltriert und mit 50 ml Ethanol nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate werden auf 400 ml eingeeengt und 250 ml Wasser werden zugefügt. Anschließend erfolgt eine Extraktion mit 50 ml und 100 ml einer 1:1-Mischung aus OEt₂/Benzol. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die Trocknung erfolgt über MgSO₄. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand destillativ (p=5 mbar, T=30°C) gereinigt. Als fertiges Produkt **35** werden 105,15 g 81 % (0,315 mol) als farbloses Öl erhalten. (Siedepunkt: 30° C bei 5 mbar Druck)

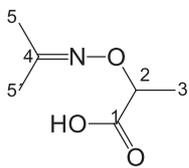


¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ = 1.26 (t, $J_{H7, H6} = 8.0$ Hz, 3 H, H7), 1.44 (d, $J_{H3, H2} = 4.0$ Hz, 3 H, H3), 1.85 (s, 3 H, H5'), 1.91 (s, 3 H, H5), 4.19 (m, 2 H, H6), 4.62 (q, $J_{H2, H3} = 4.0$ Hz, 1 H, H2)

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ = 14.14 (C7), 16.92 (C3), 18.71 (C5'), 21.74 (C5), 60.63 (C6), 74.78 (C2), 156.25 (C4), 173.18 (C1)

(±)-α-(Isopropylaminooxy)-propionsäure (36)

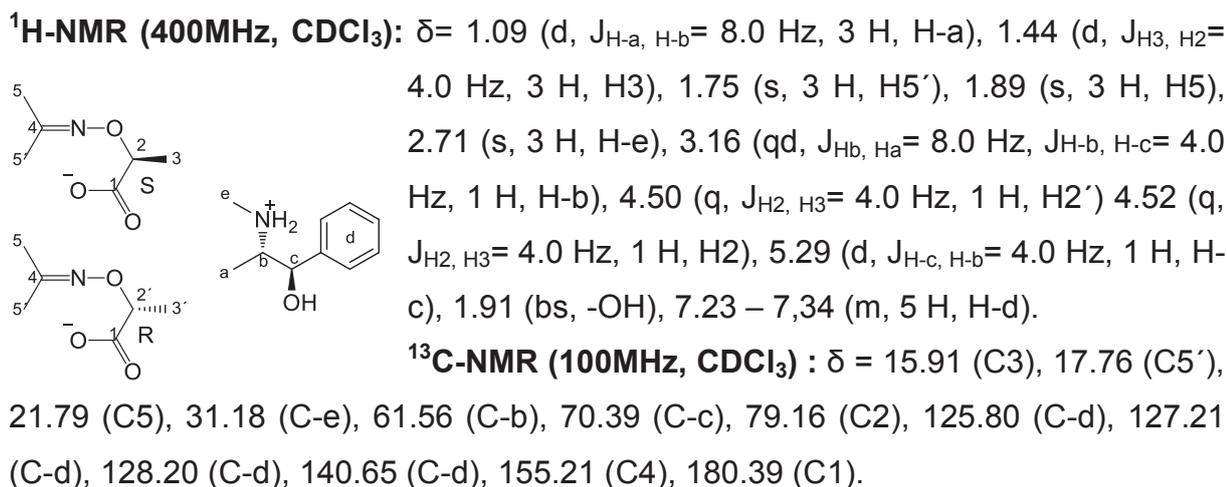
300 ml einer 5%igen NaOH-Lösung werden auf 70°C erhitzt und 51,35 g von **36** (0,30 mol) zugegeben. Nach 12 min rühren wird die Lösung gekühlt und mit 5N HCl-Lösung auf pH 3 eingestellt. Anschließend werden 175 g Ammoniumsulfat hinzugegeben und dreimal mit 100 ml einer 1:1-Mischung aus OEt₂/Benzol extrahiert. Nach Trocknung über MgSO₄, wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es werden 160 ml Petrolether hinzugegeben und auf 7°C im Kühlschrank gekühlt. Die entstandenen Kristalle werden mit Petrolether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es werden 37,80 g 87 % (0,26 mol) von **36** als farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 53-57°C erhalten. (Schmelzpunkt: 60° C)



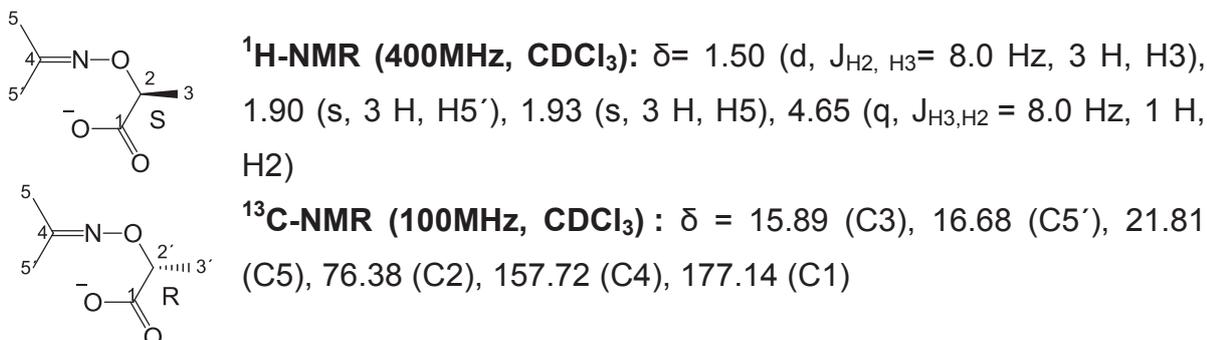
¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ = 1.50 (d, J_{H₃, H₂} = 8.0 Hz, 3 H, H₃), 1.89 (s, 3 H, H₅'), 1.93 (s, 3 H, H₅), 4.65 (q, J_{H₂, H₃} = 8.0 Hz, 1 H, H₂)
¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ = 15.90 (C₃), 16.72 (C₅'), 21.82 (C₅), 76.41 (C₂), 157.63 (C₄), 177.47 (C₁)

(+)-α-(Isopropylaminooxy)-propionsäure (39)**(-)-α-(Isopropylaminooxy)-propionsäure (38)**

In einer Lösung, bestehend aus 800 ml Ethylacetat mit 6% Ethanol und 36,61 g (-)-Ephedrin-monohydrat (**37**) (0,2 mol, 1Äq.), werden 29,00 g (0,2 mol, 1Äq) von **36** gelöst. Die klare Lösung wird kurz in einem Eisbad gekühlt und bis zur Flockenbildung 3-7 h im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wird das Ephedrinsalz von **38** als Feststoff abfiltriert. Zur Gewinnung des Salzes von **39** wird das Filtrat 1:1 mit Petrolether gemischt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Die jeweils erhaltenen Kristalle werden abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Zur Verbesserung des de-Wertes wird dieser Vorgang der Umkristallisation 2- bis 3-mal durchgeführt. Als Produkte werden (10,58 g 0,034 mol) 34 % des Ephedrinsalzes von **39** als farblose Kristalle mit einem de-Wert von 91 % (Schmelzpunkt: 116° C) und (9,02 g, 0,029 mol) 29 % des Ephedrinsalzes von **38** als farblose Kristalle mit einem de-Wert von 95 % (Schmelzpunkt: 116° C) erhalten.

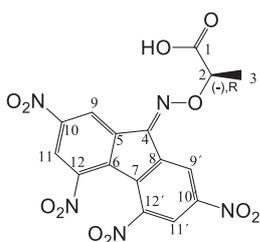


10,58 g (-)-Salz von **38** (0,034 mol) werden in 32 ml Wasser gelöst und 7.5 ml 5N HCl zugegeben. Die wässrige Phase wird zweimal mit 25 ml einer 1:1 Mischung OEt₂:Benzol gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wird zum Rückstand 40 ml Petrolether hinzugegeben und dieser im Kühlschrank auskristallisiert. Nach Trocknung im Vakuum wird das Produkt **38** mit (4,16 g, 0,029 mol) 85 % Ausbeute als farblose Kristalle erhalten. Die Darstellung von **39** erfolgt analog dazu mit (3,32 g, 0,023 mol) 79 % Ausbeute. (Schmelzpunkt: 83° C)



(+) bzw. (-)-α-(2,4,5,7-Tetranitro-9-Fluorenylidenoxy)-Propionsäure (**28**), (**29**) 4,16 g von **38** bzw. **39** (0,029 mol, 1,5 Äq.) werden in 65 ml 96%iger Essigsäure gelöst und 6,86 g von **32** (0,019 mol, 1Äq.) zugegeben. 0,25 ml H₂SO₄(konz.) werden hinzugefügt und die Lösung 2 h unter Rückfluss erhitzt. Danach wird 140 ml Wasser zu der heißen Lösung zugegeben und diese im Kühlschrank bis zur vollständigen Kristallisation aufbewahrt. Zur Reinigung werden die erhaltenen gelben

Kristalle in 53.3 ml heißer Essigsäure gelöst, 46 ml Wasser zu der heißen Lösung hinzugegeben und auf 0°C unter Rühren abgekühlt. Die erhaltenen Kristalle werden abfiltriert und im Exsikkator über KOH bei 70°C getrocknet. Das fertige Produkt **28** (bzw. **29**) wird mit 95% Ausbeute (8,00 g, 0,018 mol) als gelbe Kristalle erhalten. (Schmelzpunkt: 75 - 80° C)



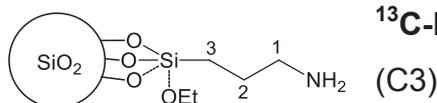
¹H-NMR (400MHz, Aceton-d₆): δ = 1.86 (d, $J_{H_2, H_3} = 8.0$ Hz, 3 H, H₃), 5.40 (q, $J_{H_3, H_2} = 8.0$ Hz, 1 H, H₂), 8.93 (d, $J_{H_{9'}, H_{11'}} = 2.0$ Hz, 1 H, H_{9'}), 8.97 (d, $J_{H_{11'}, H_{9'}} = 2.0$ Hz, 1 H, H_{11'}), 9.02 (d, $J_{H_9, H_{11}} = 2.0$ Hz, 1 H, H₉), 9.64 (d, $J_{H_{11}, H_9} = 2.0$ Hz, 1 H, H₁₁)

¹³C-NMR (100MHz, Aceton-d₆): δ = 17.39 (C₃), 81.87 (C₂), 121.10 (C_{11'}), 122.65 (C_{9'}), 123.63 (C₉), 127.74 (C₁₁), 131.48 (C₈), 132.77 (C₇), 134.06 (C₅), 134.84 (C₆), 141.94 (C₄), 147.35 (C_{10'}), 148.01 (C_{12'}), 150.03 (C₁₀), 150.29 (C₁₂), 171.98 (C₁)

Aptes-Kieselgel (**41**)

20 g Kieselgel (10 μ m, 1Äq.) werden mit 240 mL Salzsäure p.a. (20%ig) in einem 3-Halskolben mit KPG-Rührer und Rückflusskühler unter Rückfluss für 2 h erhitzt. Das Kieselgel wird abgesaugt und mit Wasser und MeOH neutral gewaschen. Anschließend wird das Kieselgel im Exikator über CaCl₂ bei 70°C getrocknet.

Vom aktivierten Kieselgel werden 20 g in einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer und Rückflusskühler zusammen mit 240 mL Toluol vorgelegt. Dazu werden 1,2 g Wasser (0,064 mol, 0,2 Äq.), 0,69 g pTsoH (0,004 mol, 0,012 Äq.) und 24 mL Aptes (**40**) (0,1 mol, 0,03 Äq., 22,14 g) hinzugegeben. Die Mischung wird für 16h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktion, wird das derivatisierte Kieselgel abgesaugt und mit etwa 50 mL 10 %iger TFA, 100 mL MeOH (0,1 % HCl), 100 mL Wasser, 100mL MeOH und 100 mL DCM gewaschen. Das gereinigte Produkt **41** wird im Exikator über CaCl₂ bei 70°C getrocknet. (Die Reaktion verläuft mit Gptms (**43**) und Cl-Ptms (**42**) analog)



¹³C-Festkörper-NMR: δ = 9.63 (C₁), 21.35 (C₂), 42,09 (C₃)

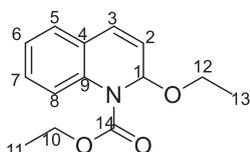
²⁹Si-Festkörper-NMR : δ = -57,82 ppm (Si-OEt), -66,68 (Si-O-Si)

Elementaranalyse: C: 8,28 % H: 2,21 % N: 2,57 %

IR-Spektrum: siehe Abb. 98

EEDQ

10 g frisch destilliertes Chinolin (76 mmol, 1Äq.) werden in einem 200 mL Dreihalskolben mit 8 g Wasser (0,44 mol, 5,8 Äq.), 80 mL EtOH (1,36 mol, 17,7 Äq.) und 80 mL DCM für 10 min. bei Raumtemperatur gerührt. Es werden 9,44 g Natriumbicarbonat (112,8 mmol, 1,4 Äq.) hinzugegeben und die Mischung im Eisbad auf 0° C abgekühlt. Anschließend werden 8,8 mL Ethylchloroformiat (92,4 mmol, 1,2 Äq.) langsam über 10 Minuten hinzuge tropft, so dass die Temperatur nicht über 5°C ansteigt. Die Mischung wird 4h lang weiter gerührt bis sie auf Raumtemperatur gelangt ist. Die Reaktion wird mit 50 mL Wasser gequentscht. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit 2x75 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Salz-Lösung gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wird entfernt und es bleibt eine viskoses Öl übrig. Dieses wird mit Petrolether (20mL) versetzt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die ausgefallenen Kristalle werden abgesaugt und im Vakuum getrocknet. EEDQ wird mit einer Ausbeute von 70 % erhalten (13,5 g). [138]

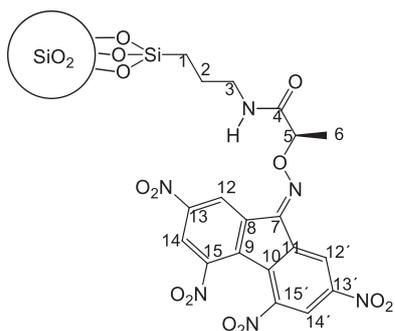


¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ = 1.13 (t, J_{H14, H13} = 7.2 Hz, 3 H, H13), 1,35 (t, J_{H12, H11} = 7.2 Hz, 3 H, H11), 3.63 (q, J_{H13, H14} = 7.2 Hz, 2 H, H12), 4.32 (q, J_{H11, H11} = 7.2 Hz, 2 H, H10), 6.14 (d, 1 H, H1), 6.15 (dd, 1 H, H2), 6.73 (m, 1 H, H3), 7.09 – 7.30 (m, 3 H, H5-7), 7.68 (m, 1 H, H8)

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ = 14.41 (C14), 15.18 (C12), 62.39 (C13), 62.56 (C11), 78.12 (C1), 123.79 (C2), 124.09 (C6), 124.27 (C8), 126.89 (C5), 125.79 (C4), 127.70 (C3), 133.85 (C9), 154.87 (C14)

Kieselgel-TAPA (50)

In einem 100 mL Kolben mit KPG-Rührer werden 5.0 g des derivatisierten Kieselgels (41) (0,04 mol, 1 äq.) mit 60 mL THF (abs.) vorgelegt. Zur Mischung werden 5,3 g (-)-TAPA (28) (0,012 mol, 0,3 Äq.) und 2,97 g EEDQ (0,012 mol 0,3 Äq.) hinzugefügt. Die Mischung wird für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Reaktionsende wird das Kieselgel abgesaugt und mit etwa 100 mL MeOH (0,1% HCl), 100 mL Wasser, 100mL MeOH, 100mL Aceton und 100 mL DCM gewaschen. Das gereinigte Produkt 50 wird im Exikator über CaCl₂ bei 70°C getrocknet. Es wird ein hell-gelbes feines Pulver erhalten.



^{13}C -Festkörper-NMR: $\delta = 10.00$ (C3), 21.40 (C6), 21.48 (C2), 42.75 (C1), 83.55 (C5), 121.66 – 149.30 (C-aromatisch), 158.39 (C7), 172.86 (C4)

^{29}Si -Festkörper-NMR : $\delta = -56,75$ ppm (Si-OEt), -65,18 (Si-O-Si)

Elementaranalyse: C: 12,96 %, H: 2,46 %, N: 3,84 %.

IR-Spektrum: siehe Abb. 102

3.3.2. Synthesen der TAPA-Butanamid-Stationärphasen

Kieselgel-Butanamid/Pentanamid (**46/47**)

In einem 100 mL Kolben mit KPG-Rührer werden 5,0 g des derivatisierten Kieselgels (**41**) (0,04 mol, 1 äq.) mit 60 mL Toluol vorgelegt. Zur Mischung werden 3,79 mL γ -Butyrolacton (**45**) (0,042 mol, 0,5 Äq.) gegeben und die Mischung unter Rückfluss 12 h lang erhitzt. Nach Reaktionsende wird das Kieselgel abgesaugt und mit etwa 100 mL MeOH (0,1 % HCl), 100 mL Wasser, 100mL MeOH, 100mL Aceton und 100 mL DCM gewaschen. Das gereinigte Produkt **46** wird im Exikator über CaCl_2 bei 70° C getrocknet. (Die Reaktion verläuft mit δ -Valerolacton (**44**) analog zu Produkt **47**)

Elementaranalyse: C: 16,15 %, H: 3,10 %, N: 2,82 %.

Kieselgel-Butanamid-TAPA (**48**)

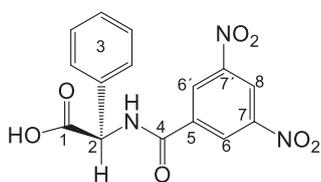
In einem 100 mL Kolben mit KPG-Rührer werden 3,0 g des Butanamid-Kieselgels (**46**) (0,0197 mol, 1 äq.) mit 60 mL DM (abs.) vorgelegt. Zur Mischung werden 1,8 g (+) TAPA (**29**) (3,93 mmol, 0,2 Äq.), 530 mg HOBt (3,92 mmol 0,2 Äq.) und 809 mg DCC (4,33 mmol, 0,2Äq.) hinzugefügt. Die Mischung wird für 1 h bei 0°C gerührt und für weitere 12 h bei Raumtemperatur. Nach Reaktionsende wird das Kieselgel abgesaugt und mit etwa 100 mL MeOH (0,1 % HCl), 100 mL Wasser, 100mL MeOH, 100mL Aceton und 100 mL DCM gewaschen. Das gereinigte Produkt **48** wird im Exikator über CaCl_2 bei 70°C getrocknet. Es wird ein hell-gelbes feines Pulver erhalten.

Elementaranalyse: C: 16,58 %, H: 2,58 %, N: 3,85 %.

3.3.3. Synthese der Pirklephasen

D-3,5-Dinitrobenzoylphenylglycin (**53**)

In einem 100 mL Kolben werden 2,42 g D-2-Phenylglycin (**52**) (0,016 mol, 1,1 Äq.) in 50 mL THF (abs.) vorgelegt. Unter Rühren gibt man 3,46 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid (**51**) (0,015 mol, 1 Äq.) und 1,12 mL Propylenoxid (0,016 mol, 0,93 g, 1,1 Äq.) hinzu und lässt die Reaktion für 3 h bei Raumtemperatur rühren. Das Lösemittel wird mittels Ölmembranpumpe entfernt und man erhält Verbindung **53** als festen Stoff mit 71 % Ausbeute. (Schmelzpunkt: 206° C)



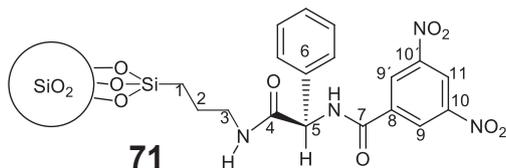
¹H-NMR (400MHz, Aceton-d₆): δ = 5.80 (m, 1 H, H2), 7.39 – 7.58 (m, 5 H, H3), 9.08 (d, 2 H, H6 H6'), 9.14 (d, 1 H, H8)

¹³C-NMR (100MHz, Aceton-d₆): δ = 68.09 (C2), 121.92 (C8), 123.15-130.07 (C3, C6, C6'), 137.19 (C5), 149,56 (C7, C7'), 163.47 (C4), 171.58 (C1)

C7'), 163.47 (C4), 171.58 (C1)

Kieselgel- D-3,5-Dinitrobenzoylphenylglycin (71)

Dies Synthese von (71) erfolgte analog zur Synthese von Kieselgel-TAPA (**50**). Anstelle von TAPA wird D-3,5-Dinitrobenzoylphenylglycin (**53**) verwendet.



71

¹³C-Festkörper-NMR: δ = 9.83 (C3), 21.41 (C6), 42.58 (C1), 59.56 (C5), 120.35 – 136.52 (C3, C8, C9, C9', C11)), 158.31 (C9, C9'), 162.84 (C7), 171.35 (C4)

²⁹Si-Festkörper-NMR : δ = -57,59 ppm (Si-OEt), -66,63 (Si-O-Si)

Elementaranalyse: C: 14,09%, H: 2,48%, N: 3,47%.

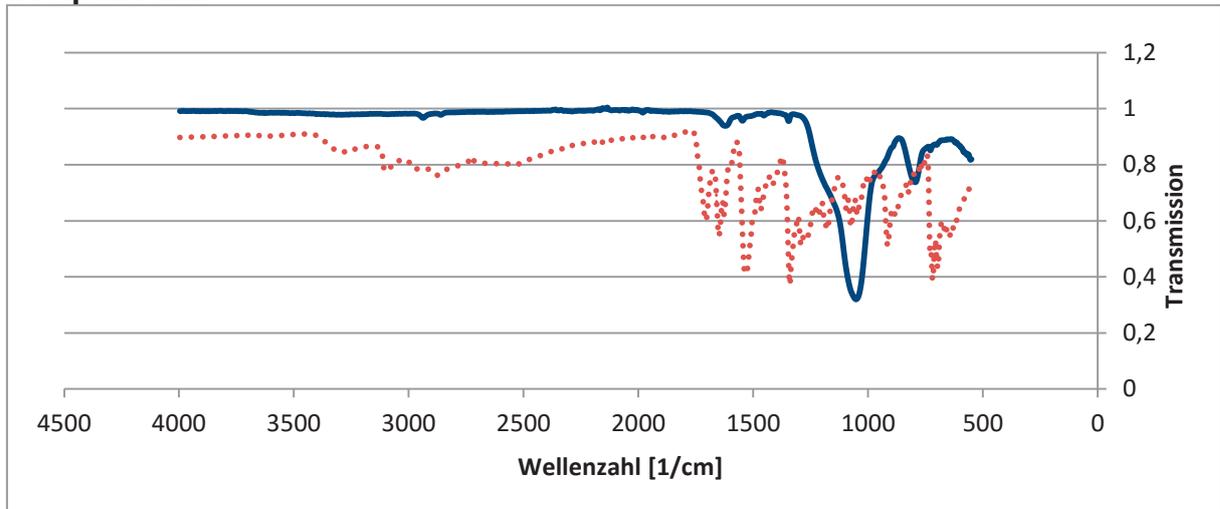
IR-Spektrum:

Abb. 237: IR-Spektrum von (71) in blau mit Vergleichsspektrum von 3,5Dnbpq in rot.

3.3.4. Packen einer HPLC-Säule

Gil-Av [54] packte ihre TAPA-HPLC-Säule (20 cm x 0,23 cm I.D) nach der viscosity slurry Technik. Im Gegensatz dazu gibt es noch die Methode das Kieselgel trocken in eine Säule zu packen.[53] Das Kieselgel wurde in 10 mL Tetrachlorkohlenstoff oder Tetrabromethen-Tetrachlorethen (3:2 v/v) aufgeschlämmt und im Ultraschallbad homogenisiert. Das Kieselgel wurde in ein Reservoir gegeben und bei 6000 PSI (400 bar) mit n-Hexan verdichtet. Der gesamte Prozess dauerte 30 Minuten.

Eine weiterentwickelte Methode zum Packen von HPLC-Säulen beschrieb die Arbeitsgruppe von Engelhardt. Das Lösemittel wurde auf die Dichte des Kieselgels abgestimmt. Dies geschah durch Mischung von einem Lösemittel mit hoher Dichte (bspw. Tetrabromethan) und Zusatz eines polaren Lösemittels (bspw. Tetrachlorkohlenstoff, Dioxan). Ebenso geeignet und deutlich weniger toxisch zeigte sich das Laufmittelgemisch iso-PrOH und MeOH zum Aufschlämmen. Zum Packen wurde ein Packungstopf verwendet. Mit dieser Methode konnten sehr gut HPLC-Säulen von 30 cm Länge und einem Innendurchmesser von 4,2 mm und Kieselgel mit 5 µm bis 10 µm gepackt werden.[111]



Abb. 238. Abbildung eines Packungstopfes

In dieser Arbeit wurde eine HPLC-Säule (250 mm x 4,6 mm I.D.) an einer Seite mit einem Sieb und der zugehörigen Verschraubung verschlossen und mit dem anderen Ende am Packungstopf (Abb. 238) befestigt. 3,00 g des mit chiralem Selektor belegten Kieselgels werden in Tetrachlorethylen : iso-PrOH 25 : 10 v/v aufgeschlämmt und im Ultraschallbad für 5 Minuten homogenisiert. Die Suspension wird in den Packungstopf gefüllt und dieser bis zum oberen Ende mit n-Heptan gefüllt. Die Säule und der Packungstopf werden mittels HPLC bei einem Druck von 210 bar (Flussrate von 7-10 mL/min) mit n-Heptan gespült. Nachdem ein Volumen von 75 mL Heptan das Säulenende durchflossen haben (ca. 20 -30 min), ist die Säule fest gepackt. Die Säule wird vom Packungstopf entfernt und das offene Ende mit der zugehörigen Verschraubung verschlossen.

3.4. Eucalyptus Acmenoides

3.4.1. Soxhlet-Extraktion

Die Soxhlet-Extraktion erfolgt analog zu der Extraktion der Myrtenblätter in Punkt 3.2.1. Es werden 517 g pulverisierte und getrocknete Samen verwendet. Es werden 22 g Rohextrakt erhalten.

3.4.2. Flash-Chromatographie

Eine Flash-Säule (Durchmesser 7,5 cm; Länge 30 cm) wird mit 800 mL Kieselgel Merck 60 (Schüttvolumen) nass gepackt und unter Druck (1bar) verdichtet. 15 g des grünen Rohextrakt werden in 120 mL Aceton gelöst und auf 100 mL Kieselgel (Merck 80, 60-200 μ m) aufgezogen. Das Lösemittel wird unter Vakuum im Wasserbad entfernt. Als Laufmittel wird ein Gradient aus PE/OEt₂ 5 : 1 v/v auf PE/OEt₂ 1 : 1 v/v

verwendet. Gegen Ende wurde die Säule mit Aceton gespült um alle Bestandteile von der Säule zu eluieren. Die Fraktionen wurden mit einem Fraktionensammler gesammelt und mittels NP-DC werden die Fraktionen nach den Hauptbestandteilen aufgeteilt. Das Lösemittel wird bei 27° C Wasserbadtemperatur entfernt.

Fraktion 1 ergab 126 mg, Fraktion 2 ergab 8,57 g, Fraktion 3 ergab 284 mg, Fraktion 4 ergab 665 mg, Fraktion 5 ergab 925 mg, Fraktion 6 ergab 865 mg. Es können 76% der aufgegebenen Masse wieder gefunden werden.

3.4.2. Isolierung der einzelnen Verbindungen

Die einzelnen Verbindungen werden aus Fraktion 2 und 4 erhalten (Abb. 239, Abb. 240).

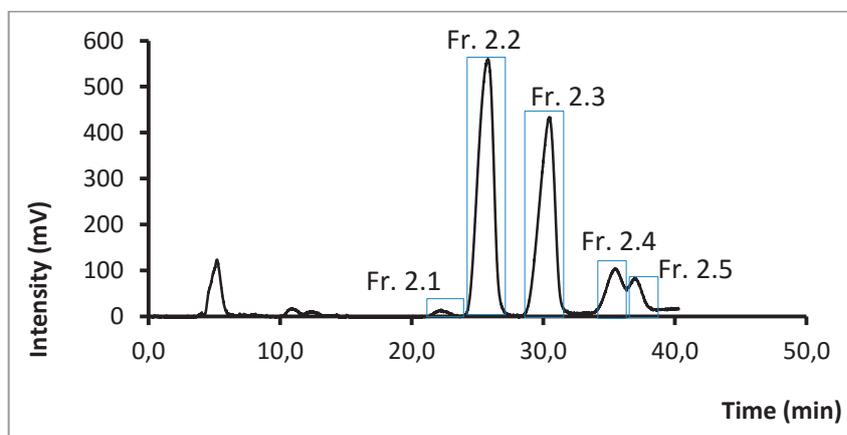


Abb. 239. Chromatogramm der Isolierung der einzelnen Peaks aus Fraktion 2, Sykam, M&N C18ec, MeOH : iso-PrOH 60 : 40 v/v, F: 16,0 mL/min, T: rt, Inj: 2mL, Konz: \approx 2 mg/mL.

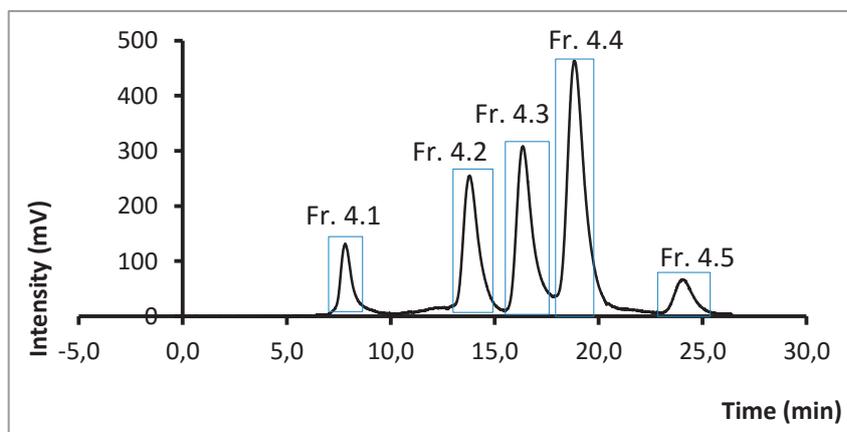
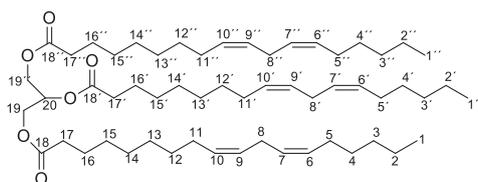


Abb. 240. Chromatogramm der Isolierung der einzelnen Peaks aus Fraktion 4, Sykam, M&N C18ec, MeOH : Wasser 80 : 20 v/v, F: 10,0 mL/min, T: rt, Inj: 1 mL, Konz: \approx 3mg/mL

Es wird eine filtrierte Lösung mit einer Konzentration von 3 mg/mL von Fraktion 2 in MeOH : iso-PrOH 60 : 40 v/v bzw. Fraktion 4 in MeOH hergestellt. Davon werden 3 bis 4 mL in die präparative HPLC injiziert. Es werden 5 bis 6 HPLC-Läufe nacheinander durchgeführt. Die blau eingerahmten Fraktionen wurden getrennt in Kolben aufgefangen. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer im Wasserbad bei 35° C entfernt.

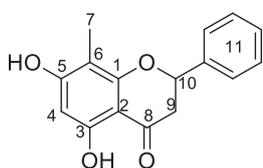
Trilinolein (**63**) = Fraktion 2.3



¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ = 0.90 (tr, $J_{H1, H2}$ = 4 Hz, 9 H, H1, H1', H1''), 1.30 (m, 42 H, H2-4, H12-15, H2'-4', H12'-15', H2''-4'', H12''-15''), 1.59 (m, 6 H, H16, H16', H16'') 2.05 (q, 12 H, H5, H5', H5''), 2.31 (tr, 6 H, H17, H17', H17''), 2.76 (tr, 6 H, H8, H8', H8''), 4.13 (dd, 2 H, H19), 4.30 (dd, 2 H, H19''), 5.27 (dt, 1 H, H20), 5.37 (qu, 12 H, H6-7, H9-10, H6'-7', H9'-10', H6''-7'', H9''-10'')

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ = 14.05 (C1, C1', C1''), 22.55 (C2, C2', C2''), 24.85 (C16, C16', C16''), 25.61 (C8, C8', C8''), 27.18 (C5, C5', C5''), 29.10 (C13, C13', C13''), 29.32 (C4, C4', C4''), 29.59 (C12, C12', C12''), 31.50 (C3, C3', C3''), 34.00 (C17, C17''), 34.17 (C17'). 62.08 (C19, C19''), 68.86 (C20), 127.87 (C9, C9', C9''), 128.05 (C7, C7', C7''), 129.98 (C6, C6', C6''), 130.20 (C10, C10', C10''), 172.81 (C18'), 173.22 (C18, C18'')

Fraktion 4.4 (**66**)



¹H-NMR (400MHz, Aceton-d₆): δ = 1.99 (s, 3 H, H7), 2.81 (dd, 1 H, H9) 2.85 (dd, 1 H, H9'), 5.56 (dd, 1 H, H10), 6.06 (s, 1 H, H4), 7.37 – 7.60 (m, 5 H, H11), 12.09 (br.s, 1 H, OH3)

¹³C-NMR (100MHz, Aceton-d₆): δ = 8.81 (C7), 44.52 (C9), 80.50 (C10), 97.44 (C4), 104.06 (C2), 105.03 (C6), 128.04-141.45 (C11), 161.89 (C3), 163.84 (C5), 166.88 (C1), 197.91 (C8)

3.5. Corymbia Peltata

3.5.1. Soxhlet-Extraktion

Die Soxhlet-Extraktion erfolgt analog zu der Extraktion der Myrtenblätter in Punkt 3.2.1. Es werden 50 g gepulverte und getrocknete Samen verwendet. Es werden 1,9 g Rohextrakt erhalten.

3.5.2. Flash-Chromatographie

Eine Flash-Säule (Durchmesser 2,5 cm; Länge 30 cm) wird mit 140 mL Kieselgel Merck 60 (Schüttvolumen) nass gepackt und unter Druck (1bar) verdichtet. 1,9 g des Rohextrakts werden aufgegeben. Als Laufmittel wird ein Gradient aus PE/OEt₂ 5: 1 v/v auf PE/OEt₂ 1 : 1 v/v verwendet. Gegen Ende wurde die Säule mit Aceton gespült um alle Bestandteile von der Säule zu eluieren. Die Fraktionen werden mit einem Fraktionensammler gesammelt und mittels NP-DC werden die Fraktionen nach den Hauptbestandteilen aufgeteilt. Das Lösemittel wird bei 27°C Wasserbadtemperatur entfernt.

Fraktion 1 ergab 20 mg, Fraktion 2 ergab 1,2 g, Fraktion 3 ergab 15 mg, Fraktion 4 ergab 150 mg, Fraktion 5 ergab 1,5 mg, Fraktion 6 ergab 40 mg. Es können 74 % der aufgegebenen Masse wieder gefunden werden.

3.6. Zitronenmyrte

3.6.1. Soxhlet-Extraktion

Die Soxhlet-Extraktion erfolgt analog zu der Extraktion der Myrtenblätter in Punkt 3.2.1. Es werden 500 g pulverisierte und getrocknete Blätter verwendet. Es werden 37 g Rohextrakt erhalten.

3.6.2. Flash-Chromatographie

Eine Flash-Säule (Durchmesser 10 cm; Länge 30 cm) wird mit 1400 mL Kieselgel Merck 60 (Schüttvolumen) nass gepackt und unter Druck (1bar) verdichtet. 37 g des grünen Rohextrakt werden in 200 mL Aceton gelöst und auf 300 mL Kieselgel (Merck 80, 60-200µm) aufgezogen. Das Lösemittel wird unter Vakuum entfernt. Als

Laufmittel wird ein Gemisch aus PE/Aceton 3 : 2 v/v verwendet. Gegen Ende wurde die Säule mit Aceton und MeOH gespült um alle Bestandteile von der Säule zu eluieren. Die Fraktionen wurden mit einem Fraktionensammler gesammelt und mittels NP-DC werden die Fraktionen nach den Hauptbestandteilen aufgeteilt. Das Lösemittel wird bei 27° C Wasserbadtemperatur entfernt.

4. Zusammenfassung

Im Bereich der Myrtucommulonforschung konnten die durch Zyklisierung von MC A (**1**) und NSMC (**30**) erhaltenen Verbindungen PMCA (**2**) und MC B (**3**) in ihre Enantiomere aufgetrennt und somit präparativ erhalten werden. Dadurch konnte die Absolutkonfiguration von PMCA (**2**) und MC B (**3**) mittels Kristallstrukturanalyse bestimmt werden, wodurch auf die Konfiguration von **1** und **30** geschlossen werden konnte. Analog wurde durch quantenmechanische Berechnungen von Bringmann et al. die gefundene Absolutkonfiguration bestätigt.[64]

Im weiteren Verlauf, gelang es sogar, unzyklisierte MCs in ihre enantiomeren Bestandteile aufzutrennen. Mit der neu entwickelten Methode kann schnell per HPLC, die Verhältnisse der meso-Form und der Enantiomeren bestimmt werden. In ersten Arbeiten konnte von MC A (**1**), NSMC (**30**) und SMC (**4**) das Verhältnis 1 : 1 : 2 (ohne Zyklisierung) bewiesen werden. Ebenso wurde gezeigt, dass die Zyklisierungsreaktion das Enantiomerenverhältnis nicht beeinflusste.

In parallelen Versuchen, wurde selbst eine chirale Säule hergestellt, falls andere Trennmethode nicht zum gewünschten Erfolg geführt hätten. Aus diesem Grund wurde TAPA (**28**) als chirales Reagenz synthetisiert und an Kieselgel geknüpft. Damit wurde eine HPLC-Säule gepackt und deren Trennvermögen untersucht. Es konnten lediglich MC B (**3**) und NSMC (**30**) getrennt werden. Im späteren Verlauf wurden unbekannte Verbindungen in der Myrte weiter erforscht. Es gelang die Strukturaufklärung von mehreren Homologen des MC A (**1**) und des NSMC (**30**). Diese konnten mit der entwickelten Methode (mit kleineren Modifizierungen) auch in ihre Enantiomere aufgetrennt werden. Somit konnte bei diesen Verbindungen ebenso ein Verhältnis von 1 : 1 : 2 gefunden werden. Bei dieser Suche nach unbekanntem Verbindungen wurde die Masse des MC C (**6**) entdeckt und dieses daher isoliert. Die Struktur von Verbindung **6** wurde mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie bestätigt und ein Stereoisomerenverhältnis von 1 : 1 : 2 gefunden. Gleichmaßen wurde eine Probe des Extraktes der Kulturflüssigkeit des endophytischen Pilzes *Neofusicoccum australe* untersucht. Für das MC A (**1**) des Pilzes wurde das selbige Verhältnis wie bereits beschrieben vorgefunden. Demnach konnte für alle hier beschriebenen Verbindungen ein racemischer Aufbau gefunden werden, was den Ergebnissen von Quinn [21] und Shaheen [20] widerspricht. Das racemische Vorliegen der MCs lässt somit Rückschlüsse auf den Biosyntheseweg

zu. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die MCs ohne enzymbeteiligung in der Pflanze gebildet werden.

Neben der Myrte wurden noch drei weitere Pflanzen untersucht. Sowohl im *Eucalyptus acmenoides*, in der *Corymbia peltata* als auch in der *Backhousia citrindoria* (Zitronenmyrte) konnten keine MCs nachgewiesen werden. Es zeigt sich hier, dass nicht jede Pflanze aus der Familie der Myrtaceae dazu in der Lage ist, MCs zu produzieren. Eine wesentliche Voraussetzung für die Synthese ist das Vorliegen von Syncarpinsäure (**21**) und Isobutyrylphloroglucin (**23**) in der Pflanze.

Im *Eucalyptus acmenoides* konnten diverse Fettsäuren und Chromon-Verbindungen gefunden werden.

In dieser Dissertation konnte ein wichtiger Beitrag zur Struktur- und Enantiomeranalytik im Bereich der Myrtucommulone erbracht werden. Das genaue Enantiomerenverhältnis kann ab sofort schnell bestimmt werden, ohne vorherige Zyklisierung. Ebenso sind die hier gefundenen Homologe und deren Untersuchungen eine wichtige Erkenntnis für die Myrtucommulonforschung.

5. Ausblick in die Zukunft

Viele wichtige Fragen in der Myrtucommulonforschung konnten in dieser Arbeit beantwortet werden. Die hier gemachten Ergebnisse werfen aber nun auch neue Fragen auf. Wieso konnte in dieser Arbeit eine racemische Struktur für die MCs gefunden werden, wohingegen dem Anschein nach Quinn et al. [21] und Sahheem [20] enantiomerangereicherte Verbindungen gefunden haben? Es wäre daher sinnvoll andere Pflanzen aus der Familie der Myrtaceae zu untersuchen, ob diese MCs enthalten und wenn ja, welches Stereoisomerenverhältnis in diesen Pflanzen vorgefunden wird. Eng verknüpft mit dieser Thematik ist die Frage nach der Biosynthese. Eine genaue Erforschung dieser wäre sehr sinnvoll. Somit könnte das racemische Vorliegen der MCs erklärt werden. Am ehesten müsste hier die Biosynthese in *Myrtus communis* und *Corymbia scabrida* weiter erforscht werden.

Für die Trennung der unzyklisierten MCs in ihre enantiomeren Bestandteile musste ein Puffer als Laufmittel verwendet werden. Vor allem bei den präparativen Trennungen zeigte sich die Verwendung eines Puffers als Nachteil. Es wäre wünschenswert eine Trennmethode zu entwickeln, bei der kein Puffer verwendet werden müsste.

Eine interessante Struktur zeigen die Rhodomyrtone (Abb. 13). Diese ähneln den zyklisierten Myrtucommulonen, enthalten aber eine oder zwei zusätzliche Methylengruppen. Bisher wurde keine Aussage zur relativen Konfiguration gemacht. Die in dieser Arbeit entwickelten HPLC-Methoden, sollten diese Frage schnell beantworten können.

Aus diesen Gründen, bleibt die Forschung im Bereich der Myrte weiterhin sehr interessant. Mit großer Sicherheit endet die Myrtenforschung nicht bei dem Buchstaben M!

6. Literaturverzeichnis

- [1] J. Chen, W. Li, H. Yao, J. Xu, *Fitoterapia* **2015**, *103*, S. 231 – 241.
- [2] S. K. Kumar, D. Saravanan, B. Kumar, A. Jayakumar, *Asian. Pac. J. Trop. Med.* **2014**, *7*, S. 54 - 59.
- [3] Y. Chin, M. Balunas, H. B. Chai, A. D. Kinghorn, *AAPS Journal.* **2006**, *8*, S. 239 - 253.
- [4] G. M. Cragg, D. J. Newman, *Biochimica et Biophysica Acta* **2013**, *1830*, S. 3670 -3695.
- [5] H. Halina, *Balkon und Kübelpflanzen* **1991**, Gräfe und Unzer GmbH 281/096545.
- [6] S. M. Maul, *Das Gilgamesch-Epos* **2014**, C.H. Beck 3406528708.
- [7] Deutsche Bibelgesellschaft, *Altes Testament*, Luther Bibel **1984**.
- [8] H. Heitz, *Zimmerpflanzen* **1990**, Gräfe und Unzer GmbH, 281/096552.
- [9] R. Hänsel, K. Keller, H. Rimpler, G. Schneider, *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis* **2012**, Springer Verlag, München.
- [10] P. A. Gadek, P. G. Wilson, C. J. Quinn, *bAm. J. Bot.* **2001**, *88*, S. 2013 - 2025.
- [11] A. Rotstein, A. Lifshitz, Y. Kashman, *Antimicrob. AG Chemother* **1974**, *6*, S. 539 - 542.
- [12] D. A. Steane, G. E. McKinnon, R. E. Vaillancourt, B. M. Potts, *Molecular Phylogenesis and Evolution* **1999**, *12*, S. 215 - 223.
- [13] M. Lounasmaa, H-S. Puri, C. J. Widen, *Phytochemistry* **1977**, *16*, S. 1851 - 1852.
- [14] J. J. Brophy, P. I. Forster, R. J. Goldsack, D. B. Hibbert, *Biochemical Systematics and Ecology* **1998**, *26*, S. 239 - 249.
- [15] A. J. Demuner, L. C. A. Barbosa, C. G. Magalhaes, C. J. Silva, C. R. A. Maltha, A. L. Pinheiro, *Molecules* **2011**, *16*, S. 1181 - 1191.
- [16] Y. Kashman, A. Rotstein, A. Lifshitz, *Tetrahedron* **1974**, *30*, S. 991 – 997.
- [17] C. J. Widen, H. S. Puri, M. Lounasmaa, *Phytochemistry* **1977**, *16*, S. 1852 - 1853
- [18] C. Feißt, L. Franke, G. Appendino, O. Werz, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2005**, *315*, S. 389 - 396.

- [19] G. Appendino, F. Bianchi, A. Minassi, O. Sterner, M. Ballero, S. Gibbons. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, S. 334 - 338.
- [20] F. Shaheen, M. Ahmad, S. N. Khan, S. S. Hussain, S. Anjum, B. Tashkhodjaev, K. Turgunov, M. N. Sultankhdzhaev, M. I. Choudhary, A. Rahman, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, S. 2371 - 2377.
- [21] A. R. Carroll, J. Lamb, R. Moni, G. P. Guymer, P. I. Forster, R. J. Quinn, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, S. 1564 - 1568.
- [22] F. Cottiglia, L. Casu, M. Leonti, P. Caboni, C. Floris, B. Busonera, P. Farci, A. Outhit, G. Sanna, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, S. 225 – 229.
- [23] M. I. Choudhary, N. Khan, M. Ahamad, S. Yousuf, H. Fun, S. Soomor, M. Aisf, M. A. Mesaik, F. Shaheen, *Organic Letters*, **2013** *15*, S. 1862 - 1865.
- [24] P. Ferranti, S. Caira, G. Misso, M. Castellano, G. D. Lorenzo, M. Caraglia, R. Nicoletti, *World J. Microbiol Biotechnol* **2014**, *30*, S. 1047 - 1052.
- [25] B. P. S. Khambay, D. G. Beddie, M. S. J. Simmonds, P. W. C. Green, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, S. 1423 - 1424.
- [26] H. Ito, H. Iwamori, N. Kasajima, M. Kaneda, T. Yoshida, *Tetrahedron* **2004**, *60*, S. 9971 - 9976.
- [27] G. Appendino, L. Maxia, P. Bettoni, M. Locvatelli, C. Valdivia, M. Ballero, M. Stavri, S. Gibbons, O. Sterner, *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, S. 251 - 254.
- [28] A. Hiranrat, W. Mahabusarakam, *Tetrahedron* **2008**, *64*, S. 11193 - 11197.
- [29] A. R. Carroll, S. Urban, J. Lamb, R. Moni, G. P. Guymer, P. I. Forst, R. J. Quinn, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, S. 881 - 883.
- [30] A. Koeberle, F. Pollastro, H. Northoff, O. Werz, *British Journal of Pharmacology* **2009**, *156*, S. 952 - 961.
- [31] A. Rossi, R. D. Paola, E. Mazzon, T. Genovese, R. Caminiti, P. Bramanti, C. Pergola, A. Koeberle, O. Werz, L. Sautebin, S. Cuzzocrea, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2009**, *329*, S. 76 -86.
- [32] A. Rosa, M. Deiana, V. Casu, G. Corona, G. Appendino, F. Bianchi, M. Ballero, M. A. Dessi, *Free Radical Research* **2003**, *37*, S. 1013 - 1019.
- [33] A. Foucault, M. Caude, L. Oliveros, *J. Chrom.* **1979**, *185*, S. 345 - 360.
- [34] I. Tretiakova, D. Blaesius, L. Maxia, S. Wesselborg, K. Schulze-Osthoff, J. Cinatl, M. Michaelis, O. Werz, *Apoptosis* **2008**, *13*, S. 119 - 131.
- [35] K. Izgi, B. Iskender, J. Jauch, S. Sezen, M. Cakir, M. Charpentier, H. Canatan, C. Sakalar, *J. Biochem Molecular Toxicology* **2015**, S. 1 - 8.

- [36] H. Müller, M. Paul, D. Hartmann, V. Huch, D. Blaesius, A. Koeberle, O. Werz, J. Jauch, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, S. 2089 - 2093.
- [37] W. Götzinger, Dissertation: *Synthese und Charakterisierung chiraler Polyacrylamid-Phasen für die HPLC* **1993**, Saarbrücken.
- [38] T. Eriksson, S. Björkman, B. Roth, P. Höglund, *Pharmacol. J. Pharm* **2000**, *52*, S. 807 - 817.
- [39] W. H. Pirkle, J. M. Finn, J. L. Schreiner, B. C. Hamper, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, S. 3964 – 3966.
- [40] S. Kromidas, *HPLC richtig optimiert* **2011**, Wiley-VCH, 978-3-527-31470-6.
- [41] W. Tang, S. I. Ng, *J. Sep. Sci* **2008**, *31*, S. 3246 - 3256.
- [42] F. Bresolle, M. Audran, T. Pham, J. Vallon, *Journal of Chromatography B* **1996**, *687*, S. 303 -336.
- [43] H. Engelhardt, T. König, S. Kromidas, *Chromatographia* **1986**, *21*, S. 205 - 213.
- [44] E. Freibush, E. Gil-Av, *Tetrahedron* **1970**, *26*, S. 1361 - 1368.
- [45] S. Kromidas, Diplomarbeit: *Chirale Phasen für die HPLC* **1980**, Saarbrücken.
- [46] S. Kromidas, Dissertation: *Enantiomerentrennung mittels Ligandenaustausch in der HPLC* **1983**, Saarbrücken.
- [47] C. J. Welch, *Journal of Chromatography A* **1994**, *666*, S. 3 - 26.
- [48] W. H. Pirkle, D. W. House, J. M. Finn, *J. Chromatogr* **1980**, *192*, S. 143 - 158.
- [49] W. H. Pirkle, J. M. Finn, *J. Org. Chem.* **1980**, *46*, S. 2935 - 2938.
- [50] P. Block, M. S. Newman, *Organic Syntheses* **1968**, *48*, S. 120 - 124.
- [51] C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, C. J. Urch, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2001**, *2*, S. 651 - 669.
- [52] M. S. Newman, H. Boden, *Organic Syntheses* **1962**, *42*, S. 95 .
- [53] B. C. C. Gonnet, J. Rocca, *Journal of Chromatography* **1975**, *106*, S. 249 - 262.
- [54] F. Mikes, G. Boshart, E. Gil-Av, *Journal of Chromatography* **1976**, *122*, S. 205 - 221.
- [55] C. H. Lochmüller, C. W. Amoss, *Journal of Chromatography* **1975**, *108*, S. 85 - 93.
- [56] F. Mikes, G. Boshart, *Journal of Chromatography* **1978**, *149*, S. 455 - 646.

- [57] J. M. Brown, I. P. Field, P. J. Sidebottom, *Tetrahedron Letters* **1981**, 22, S. 4867 - 4870.
- [58] M. Diack, R. N. Compton, G. Guichon, *Journal of Chromatography* **1993**, 639, S. 129 - 140.
- [59] B. Gross, V. Schurig, I. Lamparth, A. Hirsch, *Journal of Chromatography A* **1997**, 791, S. 65 – 69.
- [60] M. Funk, F. Oesch, K. L. Platt, *Journal of Chromatography* **1994**, 659, S. 57 - 68.
- [61] M. Gingras, G. Felix, R. Peresutti, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, S. 1007 - 1050.
- [62] Dr. A. Maisch GmbH, <http://www.dr-maisch.com/>. 2015.
- [63] M. Hans, Master-Arbeit: *Isolierung und Strukturaufklärung von entzündungshemmenden Inhaltsstoffen aus der geimenen Myrte* **2012**, Saarbrücken.
- [64] M. Hans, M. Charpentier, V. Huch, J. Jauch, T. Bruhn, G. Bringmann, D. Quandt, *J. Nat. Prod.* **2015**, 78, S. 2381 - 2389.
- [65] Synthetische Myrtucommulone wurden durch M. Charpentier bereitgestellt
- [66] V. Aleksic, P. Knezevic, *Microbiological Research* **2014**, 169, S. 240 – 254.
- [67] A. Bouzabataa, V. Castolaa, A. Bighellia, L.i Abedb, J. Casanova, F. Tomi, *Chemistry and Biodiversity* **2013**, 10, S. 129 - 137.
- [68] G. Solladie, N. Gehrold, J. Maignan, *Eur. J. Org. Chem* **1999**, S. 2309 - 2314.
- [69] H. A. Junio, A. A. Sy-Cordero, K. A. Etefagh, J. T. Burns, K. T. Micko, T. N. Graf, S. J. Richter, R. E. Cannon, N. H. Oberlies, N. B. Cech, *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, S. 1621 – 1629.
- [70] J. H. Gross, *Massenspektrometrie* **2012**, Springer Spektrum.
- [71] M. Charpentier, Dissertation: *Asymmetric synthesis of myrtucommulone derivatives and synthesis of a biotin-linked myrtucommulone for affinity based target identification* **2015**, Saarbrücken.
- [72] G. Helliwell, *Journal of Synchrotron Radiation* **2000**, 7, S. 139 -147.
- [73] T. R. Hoye, C. S. Jeffrey, F. Shao, *Nature Protocols* **2007**, 10, S. 2451 - 2458.
- [74] G. Wendin, *Physica Scripta* **1980**, 21, S. 535 - 542.
- [75] W. E. Hell, K. Seeholzer, H. Baumeister, I. Ugi, *Tetrahedron* **1985**, 42, S. 547 - 552

- [76] C. Clerc, I. Matarazzo, P. Ruedi, *Helvetica Chimica Acta* **2009**, *92*, S. 14 - 28.
- [77] H. M. Badawi, W. Förner, S. A. Ali, *Journal of Molecular Structure* **2015**, *1093*, S. 150 -161.
- [78] W. H. Pirkle, D. L. Sikkenga, M. S. Pavlin, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, S. 384 - 387.
- [79] A. O. Patil, W. T. Pennington, C. Paul, D. Y. Curtin, C. E. Dykstra, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, S. 6199 - 6200.
- [80] S. R. Chaudhari, N. Suryaprakash, *Chemical Physics Letters* **2013**, *555*, S. 286 - 299.
- [81] P. Lesot, V. Baillif, I. Billault, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, S. 2963 - 2972.
- [82] P. Lesot, O. Lafon, H. B. Kaganb, C. Fanb, *Chem. Commun.* **2006**, S. 389 – 391.
- [83] P. Lesot, C. Aroulanda, H. Zimmermann, Z. Luz, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, S. 2330 - 2375.
- [84] W. H. Pirkle, D. J. Hoover, *Topics in Stereochemistry* **1982**, Wiley
- [85] J. M. Scher, J. Zapp, H. Becker, Nicole Kather, J. Kolz ,A. Speicher, M. Dreyer, K. Maksimenkac , G. Bringmann, *Tetrahedron* **2004**, *60*, S. 9877 – 9881.
- [86] G. Bringmann, M. Reichert, Y. Hemberger, *Tetrahedron* **2005**, *64*, S. 515 - 521
- [87] G. Bringmann, K. Maksimenka , T. Bruhn , M. Reichert, T. Harada, R. Kuroda, *Tetrahedron*, **2009**, *65*, S. 5720 – 5728.
- [88] G. Bringmann, S. Busemann, K. Krohn, K. Beckmann, *Tetrahedron*, **2010** *53*, S. 1655 - 1644.
- [89] S. R. Domingos, F. Hartl, W. Buma, S. Woutersen, *ChemPhysChem* **2015**, *16*, S. 3363 – 3373.
- [90] M. Groh, D. I. Meidlinger, G. Bringmann, A. Speicher, *Organic letters* **2012**, *14*, S. 4548– 4551.
- [91] A. C. Gehrold, T. Bruhn, H. Schneider, U. Radius, G. Bringmann, *Organic letters* **2015**, *17*, S. 210 - 213.
- [92] A. E. Nugroho, H. Morita, *J. Nat Med.* **2014**, *68*, S. 1 - 10.
- [93] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie* **2005**, *7*, Thieme
- [94] G. Snatzke, *Fresenius zeitschrift für analytische Chemie* **1968**, *1*, S. 1 – 10.

- [95] W. Gaffield, *Tetrahedron* **1970**, 26, S. 4093 – 4108.
- [96] N. Purdie, K. A. Swallows, *Analytical Chemistry* **1989**, 61, S. 77 – 89.
- [97] V. Parchansky, J. Kapitan, P. Bour, *RSC Adv* **2014**, 4, S. 57125 - 57136.
- [98] T. Bruhn, A. Schaumlöffel, G. Bringmann, *Chirality* **2013**, 25, S. 243 - 249.
- [99] G. Bringmann, K. Messer, M.I Wohlfarth, J. Kraus, K. Dumbuya, M. Rückert, *Anal. Chem.* **1999**, 71, S. 2678 -2686.
- [100] G. Bringmann, T. A. M. Guldner, M. Reichert, T. Guldner, *Chirality* **2008**, 20, S. 628 - 642.
- [101] G. Bringmann, T. Bruhn, K. Maksimenka, Y. Hemberger, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, S. 2717 – 2727.
- [102] T. Bruhn, A. Schaumlöffel, Y. Hemberger, G. Bringmann, *Chirality* **2013**, 25, S. 243 - 249.
- [103] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen* **2004**, 3, Elsevier GmbH.
- [104] R. B. Woodward, *Angew. Chem.* **1969**, 11, S. 781 - 932.
- [105] Nubbemeyer, U. Recent, *Synthesis* **2003**, 7, S. 961 - 1008.
- [106] N. Fabre, I. Rustan, E. Hoffmann, J. Quetin-Leclercq, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2001**, 12, S. 707 – 715.
- [107] M. C. Crispina, M. Hura, T. Parkb, Y. Kimb, E. S. Wurtelea, *Physiologia Plantarum* **2013**, 148, S. 354 – 370.
- [108] G. C. Justino, C. M. Borges, M. H. Florencio, *Rapid Commun. Mass Spectrom* **2009**, 23, S. 237 – 248.
- [109] J. G. Kang, L. A. Hick, and W. E. Price, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, 212, S.
- [110] L. Yang, US Patent 7,875,602B2 25 **2011**.
- [111] H. Elgass, H. Engelhardt, I. Halasz, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1979**, 294, S. 97 - 106.
- [112] A. M. Andrievskii, M. K. Grachev, O .V. Chelysheva, *Journal of Organic Chemistry* **2013**, 49, S. 228 - 232.
- [113] P. Buck, *Angew. Chem.* **1969**, 81, S. 136 – 148.
- [114] W. Guo, A. Monge-Marcet , X.r Cattoën, A. Shafira, R. Pleixats, *Reactive & Functional Polymers* **2013**, 73, S. 192 – 199.
- [115] H. Li, L. Wang, M. Yang, Y. Qi, *Catalysis Communications* **2012**, 17, S. 197 -183.

- [116] S. Dastgir, K. S. Colemanb, M. L. H. Green, *Dalton Trans.* **2011**, 40, S. 661 – 672.
- [117] Y. Shen, M. L. Lee, *Microcolumn Separations* **1996**, 8, S. 413 – 420.
- [118] N. Muhammad, Tahir, R.I Qamar, A. Adnan, E. Cho, S.Jung, *Tetrahedron Letters* **2013**, 54, S. 3268– 3273.
- [119] L. Genhu, L. Liting, X. Xiaohu, W. Yinmao, Z. Xiaohui, *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, S. 3002 – 3008.
- [120] J. Schartner, J. Güldenhaupt, B. Mei, M. Rögner, M. Muhler, K. Gerwert, C. Kötting, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, 135, S. 4079 - 4087.
- [121] M. C. Pirrung, F. Zhang, S. Ambadi, T. R. Ibarra-Rivera, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, S. 4283 - 4286.
- [122] L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, S. 3561 – 3564.
- [123] T. Claudio, M. Luis, F.Aurthur G. Murray, *Houben-Weyl-Methods in Organic Chemistry* **2004**, E22, Thieme.
- [124] D. F. Taber, J. F. Berry, T. J. Martin, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, S. 9334 – 9339.
- [125] V. R. Kammili, G. M. Reddy, K. Mukkanti, *Pharma Chemica* **2011**, 3, S. 141 - 145.
- [126] B. Sambarkar, A. C. Patil, *Journal of Current Pharmaceutical Research*, **2012** 10, S. 22 - 24.
- [127] C. Einhorn, J. Einhorn, C. M. Abbadi, *Synthetic Cummunication* **2001**, 3, S. 741 – 748.
- [128] S. Jayanthi, V. Frydman, S. Vega, *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116, S. 10398 – 10405.
- [129] A. Yang, A. P. Gehring, *Journal of Chromatography* **2000**, 878, S. 165 - 170.
- [130] Y. S. Klausner, M. Bodansky, *Synthesis* **1971**, 4, S. 453 – 463.
- [131] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, 90, S. 556 - 557.
- [132] W. König, R. Geiger, *Chrom. Ber* **1970**, 103, S. 788 - 798.
- [133] B. Belleau, G. Malek, *Journal of the American Chemical Society* **1968**, 13, S. 1651 - 1652.
- [134] A. L. Norick, T. Li, *Journal of Chromatographic Science* **2005**, 43,
- [135] A. Berthold, H. L. Jin, A.L M. Stalculp, *Chirality* **1990**, 2, S. 38 – 42.

- [136] Hans Müller, *Dissertation: Synthese und Struktur-Wirkungs-Beziehungen*, **2012**, Saarbrücken.
- [137] M. Morkunas, L. Dube, F. Goetz, M. E. Maier, *Tetrahedron* **2013**, *69*, S. 8559 - 8563.
- [138] J. M. Finefield, D. H. Sherman, M. Kreitman, R. M. Williams, *Angew. Chem. Int.* **2012**, *51*, S. 4802 – 4836.
- [139] Y. Usami, Y. Okada, T. Yamada, *Chirality* **2011**, *28*, S. E7 - E11.
- [140] J. M. Batista, A. N. L. Batista, D. Rinaldo, W. Vilegas, D. L. Ambrosio, *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, S. 1154 – 1160.
- [141] L. Wu, J. Luo, X. Wang, R. Li, Y. Zhang, L. Kong, *RSC Adv* **2015**, *5*, S. 93900 – 93906.
- [142] M. Hans, Bachelor-Arbeit: Isolierung und Charakterisierung von Myrtucommulon-A aus der gemeinen Myrte **2010**, Saarbrücken.
- [143] R. S. Ramsewak, M. G. Nair, S. Murugesan, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, S. 5852 - 5856.
- [144] K. T. Sylvester, K. Wu, A. G. Doyle, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, S. 16967 - 16970.
- [145] W. H. Pirkle, T. C. Pochapsky, G. S. Mahler, D. E. Corey, D. S. Reno, D. M. Alessi, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, S. 4991 - 5000

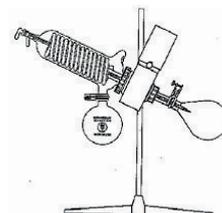
7. Anhang

Analysenzertifikat der Myrte

KREUZ-APOTHEKE · SEELZE

Pharmazierat Constantin Meyer
 Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik,
 Pharmazeutische Technologie und Offizin-Pharmazie

Herstellung von Arzneimitteln, Lohn- und Lizenzherstellung
 Pharmazeut.- chem. und phytochem. Untersuchungen



[KREUZ-APOTHEKE · PHARM.-RAT CONSTANTIN MEYER]

Alfred Galke GmbH

Postfach 11 20

37535 Gittelde / Harz

[HANNOVERSCHE STR. 1 · 30926 SEELZE]

Ihre Zeichen

Ihre Nachricht

Unser Zeichen
Me/De

Datum

11.01.05

Tel.: 05137/82920

Fax: 05137/92619

apotheke@kreuzapotheke-seelze.de

www.kreuzapotheke-seelze.de

Bankverbindung:

Hannoversche Volksbank

Kt.-Nr. 713 292 100 BLZ 251 900 01

Postgiroamt Hannover

Kt.-Nr. 13 562-302 BLZ 250 100 30

ANALYSENZERTIFIKAT

Produkt: Myrti folium Prüfvorschrift: eigene PV

Auftrag: Alfred Galke GmbH, Vegetabilien-Großhandlung
 Postfach 11 20, 37535 Gittelde / Harz

Art.-Nr.: 85302 eigene PV 4L4 Mind. haltbar bis: 01/08
 Ch.-B.: 8530 Menge: 2000 kg

Eingang: 23.12.04 Analysennummer: 307

Prüfungen:

Identität: **entspricht**
 Makroskopie, Mikroskopie: entspricht

Reinheit: **entspricht**
 Fremde Bestandteile:
 - Blüten, Früchte, Zweige: < 2,0 % Soll: max. 2,0 %
 - Stengelanteile: < 5,0 % Soll: max. 5,0 %
 Trocknungsverlust: 8,00 % Soll: max. 10,0 %

Gehalt: **entspricht**
 Ätherisches Öl: 0,80 % Soll: min. 0,5 %

Ergebnisse: entsprechen Prüfvorschrift: **ja**

Bemerkung: Die Droge entspricht den Pflanzenschutzmittel-Grenzwerten
 gemäß Ph. Eur. 4.00 2.8.13 Pestizid-Rückstände.
 Die Werte zur Aflatoxin Verbots VO entsprechen.
 Schwermetalle, mikrobielle Reinheit: nicht geprüft

Datum: 11.01.05
 Unterschrift:

Analytik durchgeführt:
Apotheker Pharm.-Rat C. Meyer
Kontrolleiter § 15 AMG
Kreuz - Apotheke 30926 Seelze

1. Identität – makroskopische Identität

- Leichter aromatischer Geruch
- Bis zu 4 cm lange, sehr steife, längliche Blätter
- Blätter ganzrandig, beiderseits stark drüsig punktiert, Mittelnerv unterseits deutlich hervortretend

Das Ergebnis entspricht den Anforderungen der eigenen PV.

2. Identität – mikroskopische Identität

Chloralhydrat-Präparat des Pulvers:

- Große, kugelige Sekretlücken im Palisadengewebe
- Calciumoxalatdrusen im Mesophyll und frei liegend
- Epidermisfragmente aus kleinen, polygonalen Zellen
- Einzellige, glatte, dickwandige Deckhaare

Das Ergebnis entspricht den Anforderungen der eigenen PV.

3. Reinheit - Fremde Bestandteile

Fremde Bestandteile:

- Blüten, Früchte oder Zweige: < 2,0 %, erlaubt sind höchstens 2,0 %.
- Stengelanteile: < 5,0 %, erlaubt sind höchstens 5,0 %.

Das Ergebnis entspricht den Anforderungen der eigenen PV.

- 3 -

Analysenzertifikat von Myrti folium eigene PV:

11.01.05

Art.-Nr.: 85302 eigene PV 4L4

Ch.-B.: 8530

4. Reinheit - Trocknungsverlust

I. Wert:

II. Wert:

Wägegglas + Substanz	: 16,0252 g	Wägegglas + Substanz	: 17,3585 g
Wägegglas konstant	: 15,0249 g	Wägegglas konstant	: 16,3586 g
	-----		-----
Einwaage	: 1,0003 g	Einwaage	: 0,9999 g
Wägegglas + Substanz	: 16,0252 g	Wägegglas + Substanz	: 17,3585 g
nach Trocknung	: 15,9454 g	nach Trocknung	: 17,2784 g
	-----		-----
Trocknungsverlust	: 0,0798 g	Trocknungsverlust	: 0,0801 g

Berechnung: $1,0003 \text{ g} / 100 = 0,0798 \text{ g} / x$
 $x = 7,98 \%$

$0,9999 \text{ g} / 100 = 0,0801 \text{ g} / x$
 $x = 8,01 \%$

Trocknungsverlust: 8,00 %, erlaubt sind höchstens 10,0 %.

Das Ergebnis entspricht den Anforderungen der eigenen PV.

5. Gehalt - Ätherisches Öl

$$\text{ätherisches Öl} = \frac{(V_2 - V_1) \times 100}{m}$$

Abgelesenes Volumen $V_2 = 0,59 \text{ ml}$, Xylolwert $V_1 = 0,51 \text{ ml}$,
 Einwaage $m = 10,01 \text{ g}$

$$\text{ätherisches Öl} = \frac{(0,59 - 0,51) \times 100}{10,01} = 0,80\%$$

Der ätherische Ölgehalt beträgt 0,80 % Droge, gefordert sind mindestens 0,5 %.

Das Ergebnis entspricht den Anforderungen der eigenen PV.

Myrti folium

Prüfvorschrift: eigene PV

Art.-Nr.: 85302 eigene PV 4L4

Ch.-B.: 8530 Mind. haltbar bis: 01/08

PRÜFZERTIFIKAT

gepr. gem. ApBetrO § 6/3

Eigenschaften:	ENTSPRECHEN	
Identität:	ENTSPRICHT	
Reinheit:	ENTSPRICHT	
Fremde Bestandt.:		
- Blüten, Früchte:	< 2,0 %	Soll: max. 2,0 %
- Stengelanteile:	< 5,0 %	Soll: max. 5,0 %
Trocknungsverlust:	8,00 %	Soll: max. 10,0 %
Gehalt:	ENTSPRICHT	
Ätherisches Öl:	0,80 %	Soll: min. 0,5 %

Die Ergebnisse entsprechen der Prüfvorschrift.

Analytik durchgeführt:
Apotheker Pharm.-Rat C. Meyer
Kontrolleiter § 15 AMG
Kreuz - Apotheke
30926 Seelze, 11.01.05



Telephone: (02) 4423 0894
International: 61-244 23 0894
Email: sales@seedworld.com.au
Mobile: 0419 493 858
Facsimile: (02) 4423 5200
International: 61-244 23 5200
Website: www.seedworld.com.au

Postal Address:
P.O. Box 1408
Nowra NSW 2541 Australia
Factory situated:
164 Cabbage Tree Lane
Nowra Hill, NSW, 2541

Certificate of Indentification

To whom it may concern,

The seeds we supply from collections of *Eucalyptus acmenoides* in the Grafton region of N.S.W Australia are true to name. The parent trees were identified by experienced seed collectors and harvest activities were conducted over 3 days in April 2012.

The common name of this species is "white mahogany". It is a tall forest tree and is used for timber production. Seeds from this same collection have been used for seedling production, mine site rehabilitation and by local landcare groups.

Yours truly,

Mr Gary Bridge Director

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'G. Bridge', written over a faint circular stamp.



International Seed and Plant Merchants

