

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Isolierung und Strukturaufklärung von
Sekundärmetaboliten aus Pilzen der Gattungen
Scleroderma, Chalciaporus und *Mycena***

von
Monika Winner
aus
Osnabrück

2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Wolfgang Steglich betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 27.01.03

Dissertation eingereicht am 30.01.03

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Steglich
2. Gutachter: Prof. Dr. T. Lindel

Mündliche Prüfung am 14.03.03

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis Mai 2002 am Institut für Organische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Steglich durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Steglich, danke ich sehr herzlich für die Begeisterung und das große Interesse an dieser Arbeit. Er hat mir die Faszination der Naturstoffchemie in zahlreichen Diskussionen und Experimenten nahegebracht. Insbesondere bedanke ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen in den Erfolg von schwierigen Strukturauklärungsarbeiten und für die spannenden Biosynthese-Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. T. Lindel danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin:

Den Damen Andrea Bartsch und Dr. Kirsten Zeitler sowie den Herren Dr. Heiner Ebel, Markus Heinrich, Dr. Martin Lang, Dr. Franz von Nussbaum, Dr. Bernd Sontag und Dr. Peter Spiteller für viele anregende Diskussionen und Hilfestellungen im Verlauf einer langjährigen guten Zusammenarbeit.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft, im besonderen meinen Laborkollegen Frau Andrea Bartsch, Herrn Dr. Heiner Ebel, Frau Kathrin Hohnholt, Herrn Dr. Bernhard Irlinger, Herrn Dr. Christian Miksch und Frau Sabine Voß sowie Frau Nadine Ermel, Frau Claudia Gräf, Frau Dr. Gertraud Gruber, Frau Dr. Lydia Kahner, Herrn Andreas Kreipl, Herrn Dr. Stefan Kroiß, Herrn Dr. Christian Peschko, Herrn Dr. Matthias Rüth und Herrn Dr. Christian Winklhofer.

Frau Claudia Dubler und Frau Dr. Li-Hong Tseng sowie den Herren Dr. Bernhard Irlinger, Dr. Peter Spiteller und Dr. David Stephenson für die Aufnahme von NMR-Spektren. Frau Dr. Li-Hong Tseng vor allem für die Hinführung zu neuen Pulsprogrammen. Den Herren Reinhard Seidl, Dr. Werner Spahl und Dr. Peter Spiteller für die Massenspektren. Herrn Helmut Huber und Herrn Ivo Brück für die Aufnahme der UV- und IR-Spektren. Herrn Helmut Hartl für AAS-Messungen.

Frau Edelgard Lenz, Frau Heidemarie Merten und Frau Irmgard Lüben für ihre wertvolle Hilfe in administrativen Fragen.

Meiner CTA, Frau Kathrin Hohnholt, für ihre große Geduld bei zahlreichen Pilz-Aufarbeitungen und HPLC-Trennungen sowie für ihre Begleitung auf vielen Pilzsammel-fahrten, vor allem bei der mühsamen Beschaffung von *Mycena rosella*.

Herrn Prof. Dr. Michael Spiteller für die wertvollen MS/MS-Messungen.

Herrn Dr. Norbert Arnold für die zahlreichen, äußerst unterhaltsamen Pilzfahrten, vor allem für die Möglichkeit, mit ihm im Harz große Mengen *Chalciporus piperatus* zu sammeln sowie für die Vermittlung von MS-Messungen.

Herrn Dr. Schulz für seinen schönen Kartoffelbovist-Fund im Bayerischen Wald.

Herrn Dr. Peter Spiteller für die Hilfe und Aufmunterung bei schwierigen NMR-Messungen.

Der Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, für die Durchführung von 2D-NMR-Experimenten, vor allem des ADEQUATE-Spektrums von Sclerocitrin.

Herrn Dr. B. Steffan für die Vermittlung dieser wichtigen NMR-Messung.

Frau Dr. P. Martín und Herrn Dr. P. Daniels, Réal Jardino Botanico, Madrid, für die Über-lassung eines Fundes von *Scleroderma meridionale*.

Frau Claudia Gräf für viele schöne Wochenend-Unternehmungen.

Herrn Dr. Heiner Ebel und Herrn Dr. Franz von Nussbaum für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Meiner Familie für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums.

Meiner Familie

I.	ZUSAMMENFASSUNG	5
II.	ALLGEMEINER TEIL.....	9
1.	NMR-TECHNIKEN ZUR STRUKTURAUFKLÄRUNG KOMPLEXER NATURSTOFFE.....	9
1.1	Allgemeine Bemerkungen.....	9
1.2	TOCSY	9
1.3	ACCORD-HMBC	9
1.4	ADEQUATE	10
1.5	¹ H- ¹⁵ N-HMBC	11
1.6	Lösungsmittelunterdrückung.....	11
2.	METHODEN ZUR AUTOMATISCHEN STRUKTURAUFKLÄRUNG	13
2.1	Molgen.....	13
2.2	Genius.....	13
2.3	COCON	13
3.	BIOSYNTHESE AUSGEWÄHLTER AMINOSÄUREN.....	15
3.1	L-Ornithin (10) und L-Lysin (7)	15
3.2	L-Tyrosin (21) und L-Phenylalanin (24).....	16
3.3	L-Tryptophan (34)	17
4.	BIOSYNTHESE VON ISOPRENOIDEN	19
4.1	Acetat-Mevalonat-Weg	19
4.2	Mevanolat-unabhängiger Weg nach Rohmer.....	20
5.	AUSGEWÄHLTE INHALTSSTOFFE VON PILZEN DER ORDNUNG BOLETALES UND IHRE BIOSYNTHESE AUS L-PHENYLALANIN (24) UND L-TYROSIN (21)	22
5.1	Verbindungen aus zwei Arylbrenztraubensäure-Bausteinen	22
5.2	Verbindungen aus drei Arylbrenztraubensäure-Bausteinen.....	28
5.3	Verbindungen aus vier Arylbrenztraubensäure-Bausteinen.....	28
6.	BEKANNTE SEKUNDÄRMETABOLITE AUS PILZEN DER GATTUNG <i>MYCENA</i>.....	30
6.1	Strobilurine.....	30
6.2	Metabolite mit Halogen-Substituenten und mehrfach ungesättigten Strukturelementen	31
6.3	Terpenoide Verbindungen.....	31
6.4	Stickstoff-haltige Metabolite.....	33
7.	PYRROLOCHINOLIN-ALKALOIDE	34
8.	NEUE COENZYME MIT VERWANDTER STRUKTUR.....	35

III. SPEZIELLER TEIL	37
9. PILZE DER ORDNUNG BOLETALES, <i>SCLERODERMA CITRINUM</i> UND <i>CHALCIPORUS PIPERATUS</i>	37
9.1 <i>Scleroderma citrinum</i> : Pilzbeschreibung	37
9.2 <i>Chalciporus piperatus</i> : Pilzbeschreibung	38
9.3 <i>Scleroderma citrinum</i> : bisherige Arbeiten	39
9.4 <i>Chalciporus piperatus</i> : bisherige Arbeiten	44
9.5 Isolierung und Strukturaufklärung der Farbstoffe aus <i>Scleroderma citrinum</i> , eigene Arbeiten	46
9.6 Die relative Stereochemie von Sclerocitrin (125): molecular modeling	58
9.7 Voraussage der absoluten Stereochemie nach Nakanishi	60
9.8 Komplexierung von Alkalimetallen durch Sclerocitrin (125).....	61
9.9 Überlegungen zur Biosynthese von Sclerocitrin (125)	63
9.10 Naturstoffe mit Triquinan-Grundgerüst	70
9.11 Überlegungen zur Strukturaufklärung von Chalcitrin (169), eigene Arbeiten	72
9.12 Überlegungen zur Biosynthese von Chalcitrin (169).....	80
9.13 Vergleichende HPLC-Untersuchungen zur Metabolit-Verteilung in Arten der Gattungen <i>Scleroderma</i> und <i>Chalciporus</i>	85
9.14 Neuere genetische Untersuchungen zur Einordnung von Gastromyceten in der Ordnung Boletales.....	85
10. <i>MYCENA HAEMATOPUS</i>	86
10.1 Pilzbeschreibung	86
10.2 Bisherige Ergebnisse	87
10.3 Isolierung und Strukturaufklärung von Mycenaflavin (175), dem nativen Farbstoff aus <i>Mycena haematopus</i> , eigene Arbeiten.....	89
11. <i>MYCENA PELIANTHINA</i>	96
11.1 Pilzbeschreibung	96
11.2 Isolierung und Strukturaufklärung von Pelianthin (176), dem blauen Farbstoff aus <i>Mycena pelianthina</i> , eigene Arbeiten.....	97
11.3 Massenfragmentierungsmuster des Pelianthins (176).....	109
11.4 Berechnung des UV/Vis-Spektrums von Pelianthin (176).....	110
11.5 Die relative Stereochemie von Pelianthin (176) anhand des NOE-Spektrums.....	112

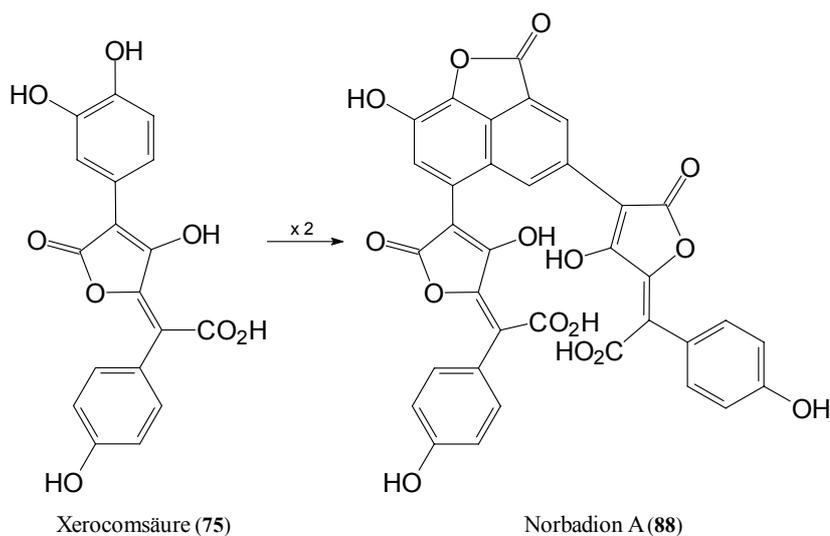
11.6	Vorkommen verwandter chromophorer Systeme.....	113
12.	<i>MYCENA ROSELLA</i>.....	115
12.1	Pilzbeschreibung	115
12.2	Isolierung und Strukturaufklärung der orangeroten Farbstoffe aus <i>Mycena rosella</i> , eigene Arbeiten	116
12.3	Chinolizidin-Alkaloide aus <i>Lupinus argenteus</i> und ein NMR-spektroskopischer Vergleich mit den Rosellinen 185 , 187 und 188	137
12.4	Überlegungen zur Biosynthese der Roselline	138
12.5	Überlegungen zur Stereochemie der exocyclischen Doppelbindung in den Rosellinen 185 , 187 und 188	140
12.6	Andere Diketopiperazinalkaloide mit L-Tryptophan (34) als Biosynthese-Vorläufer und ihre spektroskopischen und biologischen Eigenschaften.....	140
IV.	EXPERIMENTELLER TEIL	143
13.	ANALYTIK	143
14.	FARBSTOFFE AUS <i>SCLERODERMA CITRINUM</i> UND <i>CHALCIPORUS PIPERATUS</i>.....	148
14.1	Aufarbeitung der Fruchtkörper.....	148
14.2	Sclerocitrin (125).....	148
14.3	Chalcitrin (169)	149
15.	FARBSTOFFE AUS <i>MYCENA HAEMATOPUS</i>.....	151
15.1	Aufarbeitung der Fruchtkörper.....	151
15.2	Mycenaflavin (175).....	151
16.	FARBSTOFFE AUS <i>MYCENA PELLANTHINA</i>	152
16.1	Aufarbeitung der Fruchtkörper.....	152
16.2	Pellanthin (176)	152
17.	FARBSTOFFE AUS <i>MYCENA ROSELLA</i>	154
17.1	Aufarbeitung der Fruchtkörper.....	154
17.2	Rosellin A (185)	154
17.3	Rosellin B (187)	155
17.4	Rosellin C (188)	156
V.	ANHANG.....	158
18.	UNTERSUCHTE PILZKOLLEKTIONEN	158
19.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	159
VI.	LITERATUR.....	162

I. ZUSAMMENFASSUNG

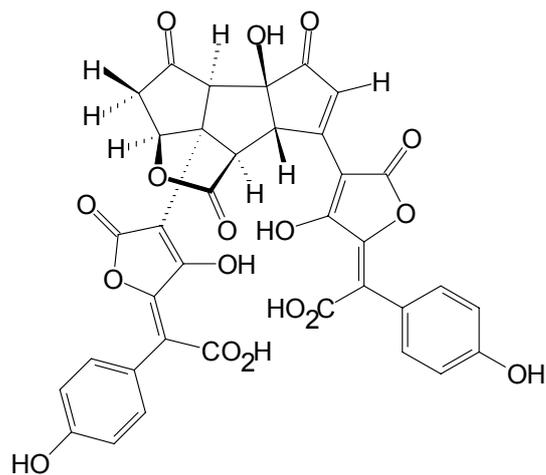
Die vorliegende Arbeit widmet sich der Isolierung und Strukturaufklärung von Farbstoffen aus Pilzen der Ordnungen Boletales und Agaricales. Die Isolierung erfolgte säulenchromatographisch sowie mittels HPLC, die Strukturaufklärung vor allem durch zweidimensionale NMR-Experimente und massenspektrometrische Untersuchungen.

Im ersten Teil werden Arbeiten zu den gelben Farbstoffen aus *Scleroderma citrinum* und *Chalciporus piperatus* vorgestellt.

- Es gelingt, die außergewöhnliche Struktur eines Triquinan-Farbstoffes aus *Scleroderma citrinum*, dem Kartoffelbovist, aufzuklären. Sclerocitrin (**125**) leitet sich wie andere Pilzfarbstoffe von der Xerocomsäure (**75**) ab und entsteht aus ihr durch Dimerisierung. In jungen Fruchtkörpern des Kartoffelbovistes findet man neben Spuren von Xerocomsäure dagegen vorwiegend Norbadion A (**88**), eine aus dem Maronenröhrling (*Xerocomus badius*) bekannte Verbindung, in der die Dimerisierung über eine formale Diels-Alder-Reaktion zur Entstehung eines Naphthalin-Systems führt.

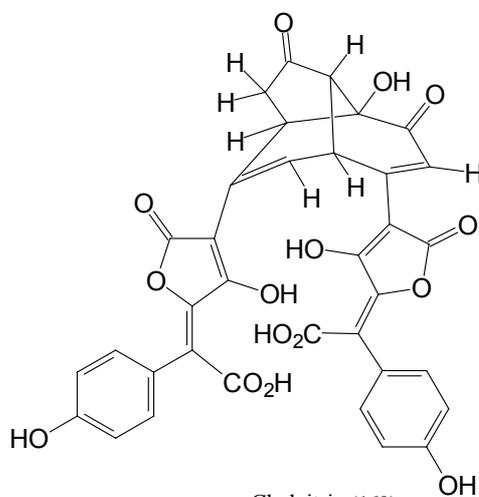


Der intensiv gelbe Hauptinhaltsstoff in älteren Fruchtkörpern des Kartoffelbovistes ist Sclerocitrin (**125**). Sclerocitrin besitzt ein bislang nicht beschriebenes 2-Oxa-dicyclopenta[a,cd]pentalen-Grundgerüst, das biosynthetisch über eine formale [2+2]-Cycloaddition aus Xerocomsäure gebildet wird. Für die absolute Stereochemie des Sclerocitrins wird anhand des CD-Spektrums nach der Nakanishi-Methode eine Voraussage getroffen.



Sclerocitrin (125)

- Aus dem Pfefferröhrling (*Chalciporus piperatus*) kann eine weitere, dem Sclerocitrin verwandte Verbindung isoliert werden. Dem ersten Anschein nach hat in Chalcitrin (**169**) im Vergleich zu **125** nur eine Decarboxylierung stattgefunden. Offenbar bildet sich Chalcitrin aber über einen alternativen Biosyntheseweg aus Xerocomsäure. In einer Kaskade von Michael- und Aldolreaktionen kommt es zur Ausbildung eines überbrückten Tricyclus, für den Strukturvorschlag **169** erarbeitet werden kann.

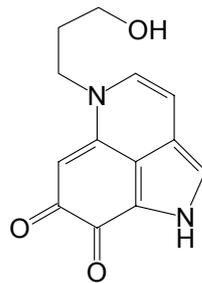


Chalcitrin (169)

Die verschiedenen Ringsysteme in Norbadion A, Sclerocitrin und Chalcitrin lassen sich alle auf Xerocomsäure als aromatische Ausgangsverbindung zurückführen. Die Biosynthese beginnt jeweils mit dem gleichen Michael-Additionsschritt. Durch die Kombination diverser elektrophiler und nucleophiler Reaktivität in dem entstehenden Addukt kommt es aber in den Folgeschritten zur Bildung sehr unterschiedlicher, komplexer Metabolite aus dem einfachen Vorläufer.

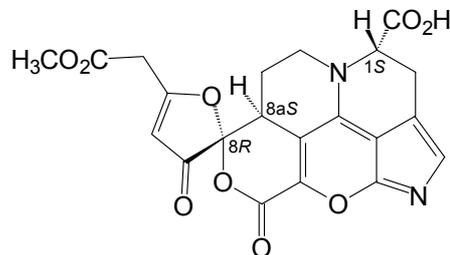
Im zweiten Teil der Arbeit wird die Isolierung und Strukturaufklärung verschiedener Alkaloid-Farbstoffe aus Pilzen der bislang kaum untersuchten Gattung *Mycena* (Helmlinge) beschrieben.

- Aus dem Milchsaft des Bluthelmlings (*Mycena haematopus*) wird ein empfindlicher Farbstoff, das Mycenaflavin (**175**), isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt. In früheren Arbeiten konnte lediglich das optisch aktive Haematopodin (**106**), in dem ein *N,O*-Acetal auftritt, beschrieben werden.



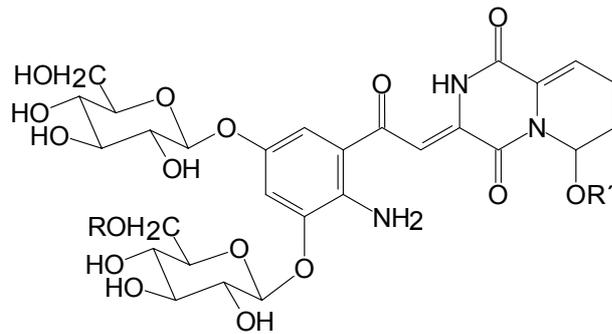
Mycenaflavin (**175**)

- Die Struktur des königsblauen Pelianthins (**176**), des Hauptfarbstoffes aus dem Schwarzgezähnelten Rettichhelmling (*Mycena pelianthina*) kann durch aufwendige NMR-Experimente bestimmt werden. Eine charakteristische Spaltung des Moleküls in zwei Fragmente am instabilen Acetal-Spirozentrum im MS/MS-Spektrum gibt weitere wichtige Anhaltspunkte. Pelianthin besitzt ein ungewöhnliches Pyrano[2,3-*b*]pyrrol-Chromophor, das biosynthetisch durch oxidative Ringspaltung und erneute Cyclisierung aus Tryptophan (**34**) entsteht. Es kann ein biogenetischer Zusammenhang zwischen Haematopodin, Mycenaflavin und Pelianthin vermutet werden. Die relative Stereochemie des Pelianthins wird anhand von NOE-Spektren zu (1*S**, 8*R**, 8*aS**) bestimmt.



Pelianthin (**176**)

- Der Rosa Helmling (*Mycena rosella*) verdankt seine orangerote Farbe den äußerst polaren Glycosidfarbstoffen Rosellin A, B und C (**185**, **187** und **188**), die erstmals isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden konnten. Die Roselline gehören zur Gruppe der Diketopiperazin-Alkaloide, wobei beide Aminosäurebausteine als Dehydroverbindungen vorliegen. Auch in diesem Fall ist ein von Tryptophan durch Ringöffnung und Hydroxylierung abgeleiteter, dem Kynurenin (**186**) verwandter, Biosynthesebaustein zu erkennen.



R = H, R' = Ac: Rosellin A (**185**)
R = Ac, R' = Ac: Rosellin B (**187**)
R = H, R' = H: Rosellin C (**188**)

II. ALLGEMEINER TEIL

1. NMR-TECHNIKEN ZUR STRUKTURAUFKLÄRUNG KOMPLEXER NATURSTOFFE

1.1 Allgemeine Bemerkungen

Viele zweidimensionale NMR-Techniken gehören heute auch für die präparative Organische Chemie zu Routine-Verfahren. Dazu zählen das COSY (*Correlation Spectroscopy*) und das NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) für die ^1H - ^1H -Korrelation, das HMQC- (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) bzw. HSQC- (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) Spektrum für die direkten ^1H - ^{13}C -Kopplungen und das HMBC- (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) Spektrum für die ^1H - ^{13}C -Fernkopplungen. Einige andere, für diese Arbeit wichtige Methoden seien im folgenden besonders erläutert.

1.2 TOCSY

Die Abkürzung TOCSY steht für *Total Correlation Spectroscopy*.^[1] Während ein COSY gekoppelte, homonukleare Spins korreliert, kann man mit Hilfe eines TOCSYs zusammengehörige Strukturelemente identifizieren, deren Protonen sich zwar in einem Spinsystem mit den anderen befinden, in denen aber nicht alle Protonen wechselseitige Kopplungen besitzen müssen. Diese Technik hilft bei Unstimmigkeiten, die in COSYs durch Crosspeaküberlagerungen entstehen können. Dabei überträgt die TOCSY-Sequenz die Magnetisierung eines Spins auf die nächsten entlang der Protonenkette.

1.3 ACCORD-HMBC

Das HMBC-Experiment^[2] unterscheidet sich vom HMQC^[3] lediglich durch eine größere Wartezeit zwischen dem ersten Protonenpuls und dem ersten Kohlenstoffpuls für die Entwicklung der heteronuklearen Kopplung (die Pulssequenz ist aber sonst identisch). Im Falle des HMBC-Experimentes entwickeln sich in dieser Wartezeit die Fernkopplungen. Die Einstellung dieser Wartezeit bedeutet ein großes Problem in der Strukturaufklärung unbekannter Naturstoffe, da die Werte der Kopplungskonstanten nicht bekannt sind. $^1J_{\text{CH}}$ -Kreuzsignale können prinzipiell auch in HMBC-Spektren beobachtet werden. Man versucht aber, das Auftreten solcher Kopplungen durch Verwendung eines sogenannten "low pass filters" zu unterdrücken.^[4] Grundsätzlich können die Konstanten für Fernkopplungen Werte von ungefähr 1–25 Hz annehmen. In HMBC-Spektren wählt man für die Wartezeit oft einen

Kompromißwert von 60 ms. Auf diese Weise wird ein optimaler Transfer für Korrelationssignale erreicht, bei denen die Kopplungskonstante ungefähr 8 Hz beträgt. Unter solchen Bedingungen sind manche Korrelationen nur sehr klein, andere treten gar nicht auf. Theoretisch ist es natürlich möglich, mehrere HMBC-Spektren mit verschiedenen Wartezeiten aufzunehmen. Auch 3D-Ansätze, in denen kontinuierlich die Polarisations-Wartezeit vergrößert und anschließend eine 3D-Fourier-Transformation durchgeführt wird, sind bekannt. Diese Methoden sind jedoch unnötig zeitraubend. Wagner und Berger^[5] entwickelten die sogenannte ACCORD-HMBC-Technik. Sie ist abgeleitet von früheren 2D-ACCORDION Ansätzen für NOESY-Experimente.^[6] Dabei erfolgt die Messung unter zusätzlicher Variation der Mischzeit, also mit drei verschiedenen Zeit-Variablen. Ebenso enthält der HMBC-Ansatz anstelle einer festen Wartezeit für die Entwicklung der Fernkopplungen eine variable Wartezeit. So können Spinkopplungen, die Konstanten im üblichen Bereich zwischen 1 und 25 Hz besitzen, sukzessive aufgenommen werden.

1.4 ADEQUATE

In der Regel lassen sich Strukturprobleme bei Naturstoffen mit COSY-, HSQC- und HMBC-Experimenten lösen. Wenn allerdings die Zahl der Protonen, die solche Korrelationen zeigen können, sehr klein ist, wird es erforderlich, entscheidende Konnektivitäten über mehrere quartäre Kohlenstoffatome hinweg zu ermitteln. Ein ^{13}C - ^{13}C -INADEQUATE hat aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit des ^{13}C -Kernes einen entscheidenden Empfindlichkeitsnachteil. Selbst wenn die erforderliche Substanzmenge vorhanden ist, was bei Naturstoffen nur selten der Fall ist, kommt es häufig zu Löslichkeitsproblemen. Ein Protonen-angeregtes und -detektiertes Experiment wie das ADEQUATE kann die Empfindlichkeit um einen Faktor bis zu 64 erhöhen.^[7] ADEQUATE steht für *Adequate Sensitivity Double-Quantum Spectroscopy*. Nach einem Kohärenz-Transfer von einem Proton zum benachbarten Kohlenstoffatom über eine $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung (HSQC-Typ), wird eine C-C-Doppelquanten-Kohärenz angeregt. Die Korrelation dieses zweiten Schrittes ist abhängig von der gewählten Wartezeit, in der sich die $^nJ_{\text{CC}}$ -Kopplungen entwickeln, wobei n einen Wert bis zu fünf annehmen kann (also vom Proton aus gesehen über sechs Bindungen hinweg).^[8] Das einfachste Experiment dieser Art allerdings ist das 1,1-ADEQUATE, das eine sichere Zuordnung von $^2J_{\text{CH}}$ -Kopplungen ermöglicht und äußerst hilfreich in der Strukturaufklärung von Naturstoffen ist. In aromatischen und olefinischen Systemen sind $^2J_{\text{CH}}$ -Kopplungen im ADEQUATE-Experiment fast immer, bei HMBC-Sequenzen deutlich weniger häufig zu beobachten.

1.5 ^1H - ^{15}N -HMBC

Die äußerst geringe natürliche Häufigkeit des ^{15}N -Kernes (0.37 %) in Kombination mit einem niedrigen gyromagnetischen Verhältnis machen Stickstoff zu einem schwierigen Untersuchungsobjekt in NMR-Experimenten. Auch in diesem Fall können invers detektierte Messungen Abhilfe schaffen.^[9] Der Bereich von gängigen ^{15}N -Verschiebungen ist allerdings im Vergleich zu denen des ^{13}C -Kernes sehr groß (> 300 ppm). Üblicherweise beobachtet man in ^1H - ^{15}N -HMBC-Spektren 2J - und $^3J_{\text{NH}}$ -Kopplungen, je nach relativer Position der Atome zueinander.

1.6 Lösungsmittelunterdrückung

Die meisten für die NMR-Spektroskopie organischer Moleküle gebräuchlichen Lösungsmittel sind in deuterierter Form erhältlich. Bei LC-NMR-Anwendungen und Messungen von biologischen Makromolekülen ist man aus Kosten- und Löslichkeitsgründen dazu übergegangen, Messungen auch in undeuterten Lösungsmitteln, vor allem in H_2O durchzuführen. Im Hinblick auf diese Problematik wurde eine neue Unterdrückungstechnik entwickelt. Auch in deuterierten Lösungsmitteln beobachtet man in vielen NMR-Spektren eine oft störende Rest-HDO-Resonanz. Vor allem in der Naturstoffanalytik verfügt man oft nur über sehr kleine Substanzmengen. Das jeweilige Lösungsmittel ist so in einem großen Überschuß vorhanden. Die HDO-Resonanz läßt sich vor allem in Lösungsmitteln wie $[\text{D}_4]\text{Methanol}$ nicht vollständig vermeiden und kann auf eine mangelhafte Trocknung der Probe zurückzuführen sein, die man aber bei sehr empfindlichen Substanzen bisweilen in Kauf nehmen muß. Durch Lösungsmittelunterdrückung können Signale, die durch den breiten HDO-Peak überlagert sind, sichtbar gemacht werden. Dies ist zum Beispiel für Signale anomerer Protonen in Glykosiden von Bedeutung.

Es gibt verschiedene Techniken, Lösungsmittelresonanzen zu unterdrücken. Eine gebräuchliche besteht darin, noch vor der eigentlichen Anregung und Aufnahme des Spektrums durch gezielte Einstrahlung die Lösungsmittelprotonenspins zu sättigen.^[10] So können die entsprechenden Signale bei der folgenden Messung nicht mehr auftreten. Natürlich erfahren auf diese Weise auch Resonanzen, die der Lösungsmittelfrequenz sehr ähnlich sind, eine Intensitätsabschwächung.

In Gradientenexperimenten verwendet man vor allem die sogenannte WATERGATE-Technik.^[11] Diese Abkürzung steht für *Water Supression By Gradient-Tailored Excitation*. Die Pulssequenz ist so gewählt, daß die Lösungsmittelmagnetisierung in der Summe gleich Null wird. Dies wird dadurch erreicht, daß sich der Spin des Lösungsmittelprotons durch

gezielte Binom-Sequenz auf der z-Achse befindet, während in der xy-Ebene das Gradientenexperiment und die Spektrenaufnahme für die übrigen Protonen erfolgt.

2. METHODEN ZUR AUTOMATISCHEN STRUKTURAUFKLÄRUNG

2.1 Molgen

Eines der ersten Programme zur automatischen Strukturaufklärung ist Molgen.^[12] Es berechnet alle möglichen Konstitutionen aus einer Summenformel, ohne Restriktionen in den Ermittlungsprozeß einzubeziehen (so z. B. nicht sinnvolle Strukturteile auszuschließen). Diese Vorgehensweise führt zu einer sehr großen Anzahl an möglichen Lösungen, so werden bei dem sehr kleinen Tyrosin (**21**) ($C_9H_{11}NO_3$) bereits über 2 Milliarden Strukturen berechnet.

2.2 Genius

Eine Weiterentwicklung stellt Genius (*Genetic Algorithm for Automated Structure Elucidation*) dar.^[13] Die Berechnung stützt sich auf Summenformel und ^{13}C -NMR-Verschiebungen. Entscheidend für die Strukturermittlung ist die Qualität des Optimierungsprozesses, der von der theoretischen Berechnung von ^{13}C -NMR-Verschiebungen ausgeht.^[14] Dabei wird der Wert für jedes einzelne Kohlenstoffatom ermittelt, indem die Umgebung in mehrere Sphären unterteilt wird. Der Inkrementbeitrag eines jeden Substituenten errechnet sich dann nach Ordnungszahl des Elementes, Hybridisierung und Anzahl der gebundenen Wasserstoffatome. Die mittlere Abweichung von dem tatsächlichen, experimentell bestimmten Verschiebungswert beträgt für diese Berechnung ungefähr 1.6 ppm. Der "genetische Code" eines Moleküles zu Beginn des Optimierungsprozesses sind die numerischen Vektoren der bindenden und nicht-bindenden Orbitale zwischen allen möglichen Atom-Atom-Paaren. Die folgende Mutation inseriert eine neue Bindung unter Zerstörung einer anderen. Die Berechnung berücksichtigt auch Stabilitäts-Gesichtspunkte.

Genius ist eine sinnvolle Methode, um die NMR-Spektren einfacher Syntheseprodukte schnell zu überprüfen. Bei komplizierteren Naturstoffen scheitert das Programm aber in den meisten Fällen. Die Rechenzeit ist vergleichsweise kurz, da nur ^{13}C -NMR-Daten berücksichtigt werden müssen. Wertvolle 2D-NMR-Werte jedoch, die bei der Strukturaufklärung von Naturstoffen vorliegen, werden nicht in die Ermittlung einbezogen.

2.3 COCON

COCON (*Constitutions from Connectivities*) ist ein speziell im Hinblick auf die Strukturaufklärung von Naturstoffen entwickeltes Programm.^[15] 1H - 1H -COSY-, 1H - ^{13}C -HSQC-, 1H - ^{13}C - und 1H - ^{15}N -HMBC- sowie 1,1-ADEQUATE-Daten können in Kombination mit ^{13}C -NMR-Verschiebungen berücksichtigt werden. Dazu muß ein "input file", das alle

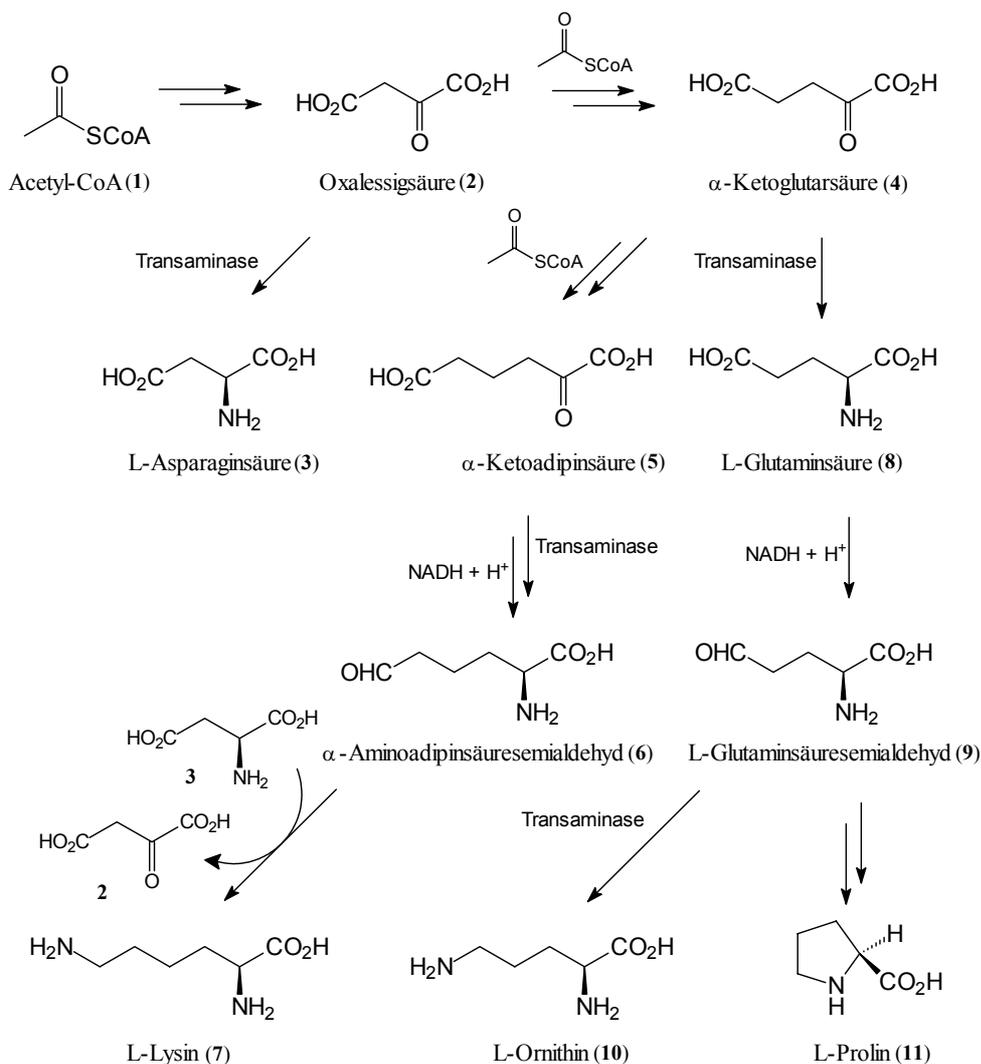
Informationen in Tabellenform enthält, erstellt werden. Eine Voraussage des Hybridisierungszustandes wird anhand bestimmter Regeln erstellt,^[16] das Programm SpecEdit^[17] zur Berechnung von ^{13}C -NMR-Verschiebungen verwendet. Dadurch können ermittelte Strukturvorschläge beurteilt und eine Art Rangfolge erstellt werden. Existieren zuverlässige Informationen über die direkte Verknüpfung zweier Kohlenstoffatome, so wird diese Konnektivität als "fixiert" eingegeben und die Zahl möglicher Lösungen eingeschränkt. COCON berücksichtigt nur 2J - und 3J -, aber keine 4J -Korrelationen. Auch für relativ protonenarme, heterocyclische Systeme ist das Programm erfolgreich eingesetzt worden.^[18]

Die Berücksichtigung von 2D-NMR-Daten ist für den Versuch einer automatischen Strukturaufklärung von Naturstoffen sicher unerlässlich. Dennoch treten bei der Verwendung von COCON einige Probleme auf. Artefakte in HMBC-Spektren müssen sicher erkannt werden. Eine zuverlässige Unterscheidung von 2J -, 3J - und 4J -Korrelationen muß gelingen. Dies ist vor allem in aromatischen Systemen, wo 2J -Kopplungen oft fehlen und 4J -Korrelationen eine relativ große Intensität besitzen, schwierig. Stark unterbestimmte Systeme (also Strukturen mit großen Bereichen, in denen keine Wasserstoff-tragenden Kohlenstoffatome auftreten) führen zu einer nicht mehr zu bewältigenden Zahl von möglichen Konstitutionen (erst im nachfolgenden Schritt erfolgt eine Bewertung und Reduktion der Lösungen). Eine zusammenfassende Betrachtung findet sich in der Literatur.^[19]

3. BIOSYNTHESE AUSGEWÄHLTER AMINOSÄUREN

3.1 L-Ornithin (10) und L-Lysin (7)

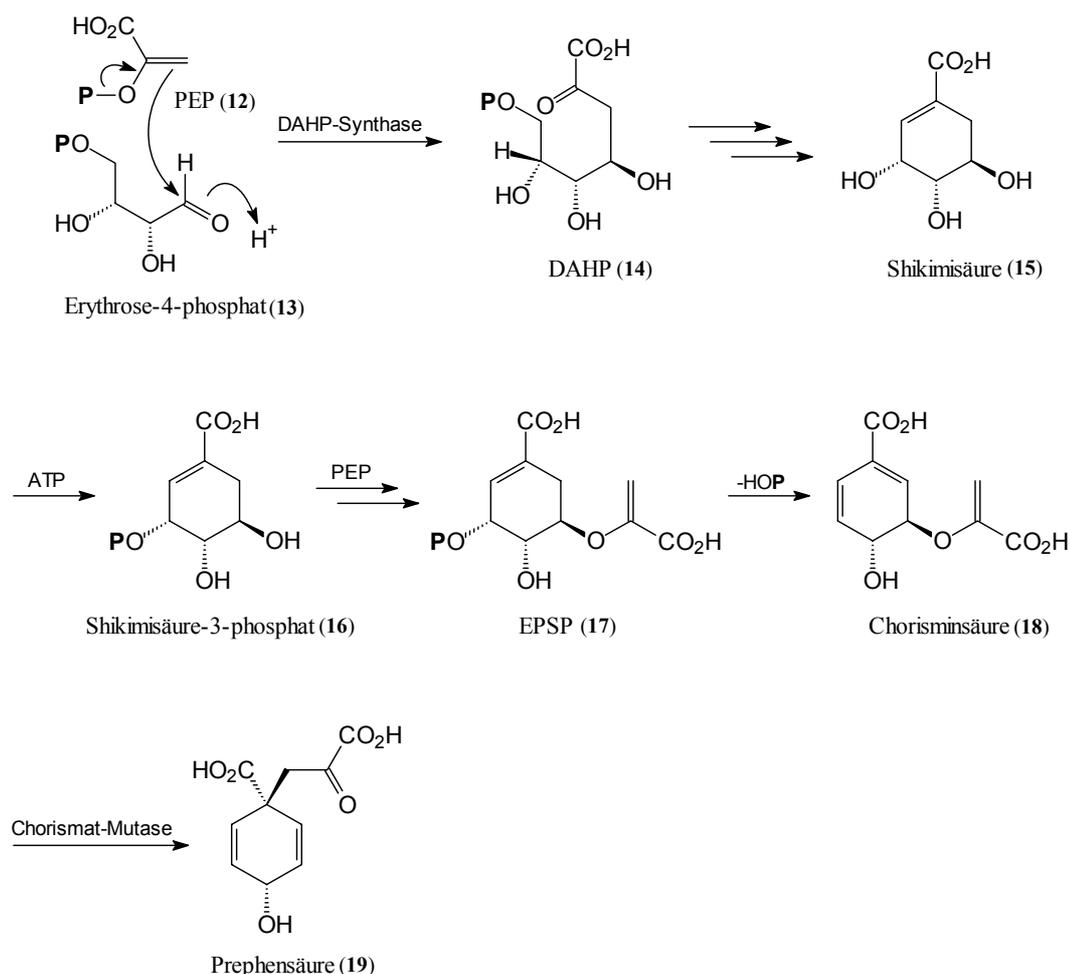
L-Ornithin (10) und L-Lysin (7) sind Produkte des Primärstoffwechsels.^[20] Sie entstehen letztlich aus Oxalessigsäure (2) und damit aus Acetyl-CoA (1). Aus Oxalessigsäure kann durch Transaminierung L-Asparaginsäure (3) gebildet werden, die dann selbst als Transaminierungsmittel in der Biosynthese von L-Lysin (7) zu fungiert. Transaminierungen werden in der Regel durch Pyridoxalphosphat (PLP) katalysiert. Unter Einbau eines weiteren Bausteines Acetyl-CoA gelangt man von der Oxalessigsäure über Citronensäure zur α -Ketoglutarinsäure (4). Durch erneute Kettenverlängerung kann α -Keto adipinsäure (5) gebildet werden, die zu α -Amino adipinsäuresemialdehyd (6) reduziert und schließlich durch L-Asparaginsäure zu L-Lysin transaminiert wird. Ohne den erneuten Kettenverlängerungsschritt kann analog Glutaminsäuresemialdehyd (9) und L-Ornithin gebildet werden. Durch Ringschluß kann auch L-Prolin entstehen.



Schema 1: Biosynthese von L-Lysin (7), L-Ornithin (10) und L- Prolin (11)

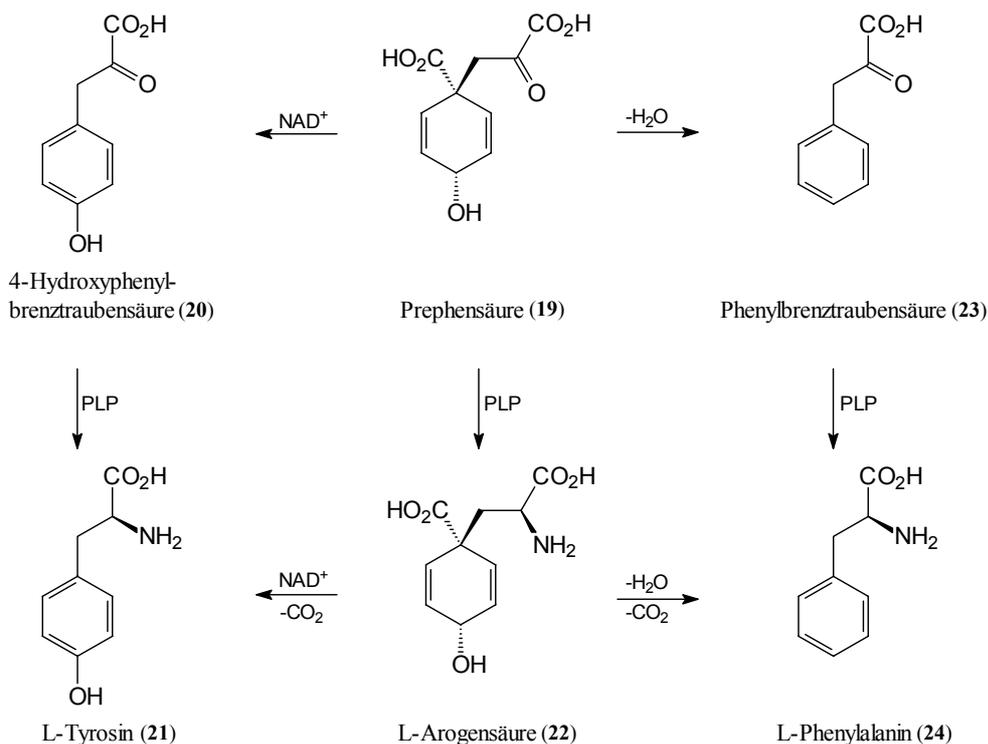
3.2 L-Tyrosin (21) und L-Phenylalanin (24)

L-Tyrosin (**21**) und L-Phenylalanin (**24**) werden über den Shikimatweg^[21, 22] gebildet. Aminosäuren aus diesem Biosyntheseweg sind von besonderer Bedeutung für diese Arbeit. Shikimisäure (**15**) entsteht letztlich aus D-Erythrose-4-phosphat (**13**) und Phosphoenolpyruvat (PEP) (**12**), die über eine aldolartige Reaktion miteinander zu 3-Desoxy-D-arabino-heptulosäure-7-phosphat (DAHP, **14**) verknüpft werden. Es hat sich herausgestellt, daß es sich hierbei um eine Enzym-katalysierte Reaktion handelt, die mechanistisch sehr komplex ist.^[23] Eliminierung von Phosphorsäure, intramolekulare Aldolreaktion, Wasserabspaltung und Reduktion der 3-Dehydroshikimisäure führen zu Shikimisäure. Durch ATP-katalysierte Phosphorylierung der Hydroxyfunktion in 3-Position und Reaktion der 5-Hydroxygruppe mit Phosphoenolpyruvat gelangt man unter Eliminierung von Phosphorsäure zu 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat (EPSP, **17**).^[24] Durch Eliminierung des Phosphatrestes an der 3-Hydroxyfunktion entsteht Chorisminsäure (**18**). Die Chorismat-Mutase katalysiert die Claisen-Umlagerung zu Prephensäure (**19**), der Ausgangsverbindung für die Tyrosin- und Phenylalanin-Biosynthese.



Schema 2: Shikimat- und Prephenat-Biosyntheseweg

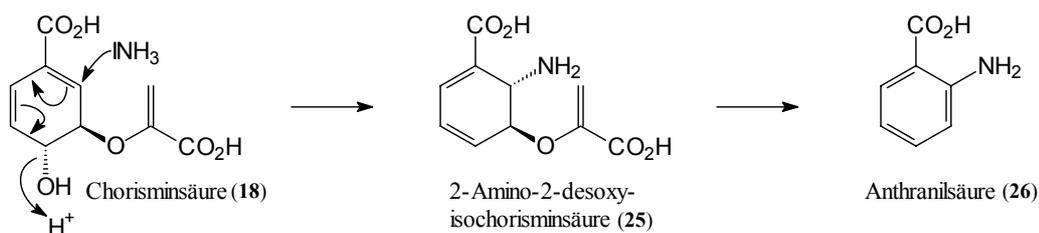
Die nun folgenden Schritte variieren je nach Organismus und verfügbarer Enzymaktivität. Im wesentlichen sind jedoch die Reaktionstypen Aromatisierung (unter Decarboxylierung), Transaminierung (durch Pyridoxalphosphat, PLP) und Oxidation beteiligt. Die Reaktion kann entweder über eine Phenylbrenztraubensäure (**20**, **23**) oder über L-Arogensäure (**22**) erfolgen. Im zweiten Fall findet die Transaminierung vor der Decarboxylierung statt. Abhängig von einer passenden Dehydrogenase-Aktivität kann entweder L-Tyrosin oder L-Phenylalanin gebildet werden.



Schema 3: Biosynthese von L-Tyrosin (**21**) und L-Phenylalanin (**24**)

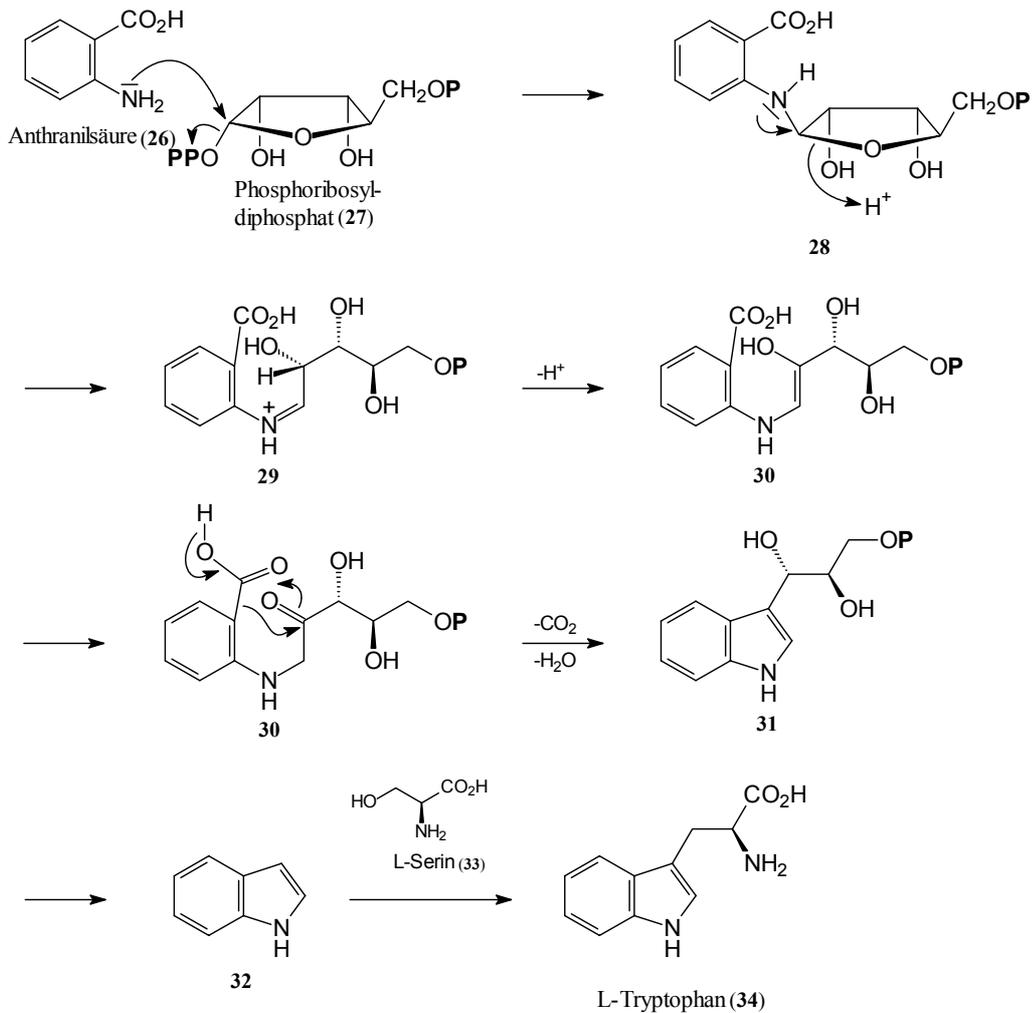
3.3 L-Tryptophan (**34**)

Ausgehend von Chorisminsäure (**18**) kann man auch die Biosynthese von Tryptophan formulieren.^[25] Mit Hilfe der Anthranilat-Synthase wird dann aus L-Glutamin Ammoniak freigesetzt, der als Nucleophil in 2- oder 4-Position angreifen kann. Im ersten Fall bildet sich unter Eliminierung der Enolpyruvat-Seitenkette aus der entstandenen 2-Amino-2-desoxyisochorisminsäure (**25**) Anthranilsäure (**26**).



Schema 4: Biosynthese von Anthranilsäure (**26**)

Anthranilsäure reagiert anschließend in einer S_N2 -Reaktion mit Phosphoribosyldiphosphat (27). Das entstehende *N*-Ribosid 28 unterliegt einer Amadori-Unlagerung unter Katalyse von Phosphoribosylanthranilat-Isomerase. Imin-Enamin- sowie Enol-Keto-Tautomerie liefern die Ausgangsverbindung zum Ringschluß unter CO_2 -Verlust. Unter Wasserabspaltung wird dann das Indol-Ringsystem gebildet. Verlust von Glycerinaldehyd und Umsetzung mit *L*-Serin (33) führen zu *L*-Tryptophan.

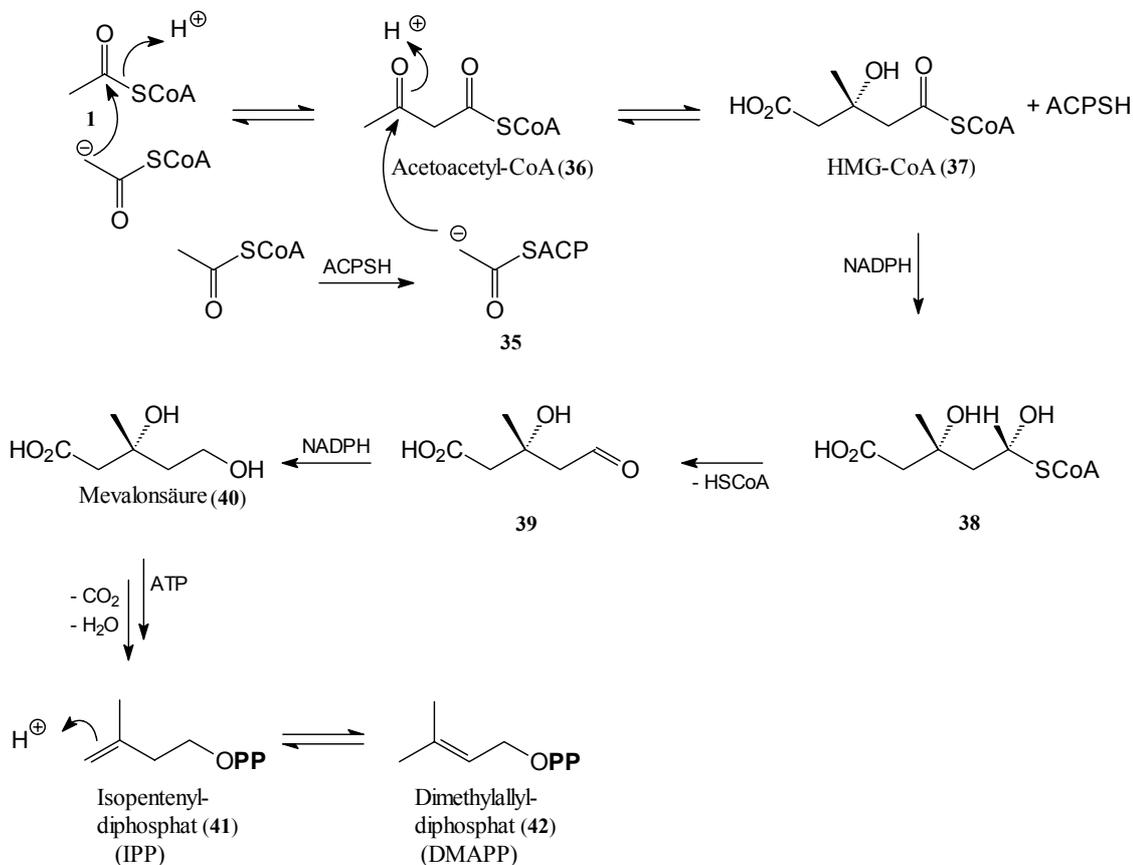


Schema 5: Biosynthese von *L*-Tryptophan (34)

4. BIOSYNTHESE VON ISOPRENOIDEN

4.1 Acetat-Mevalonat-Weg

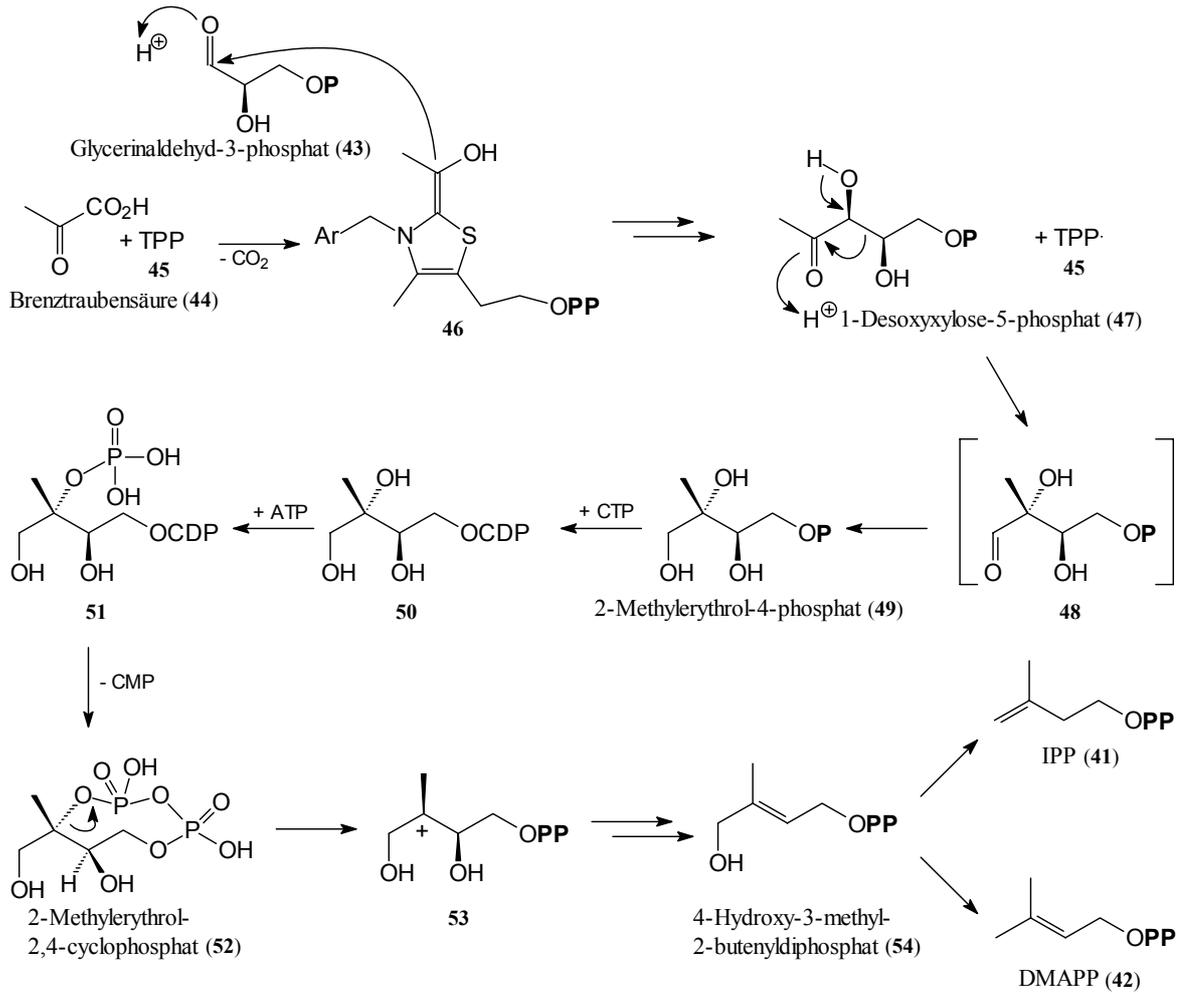
Isoprenoide findet man in allen lebenden Organismen. Sie leiten sich vom C₅-Kohlenstoff-Gerüst des Isoprens ab und unterscheiden sich in der Zahl der Wiederholungen dieses Bausteines sowie dem Oxidationszustand. Biosynthetisch entstehen sie durch unterschiedliche Cyclisierungen und Umlagerungen. Die Isoprenbiosynthese^[26] startet mit zwei Molekülen Acetyl-CoA (**1**), die in einer Claisen-Reaktion zu Acetoacetyl-CoA (**36**) reagieren. Ein dritter Baustein Acetyl-CoA wird in Form einer Acyl-Carrier-Protein gebundenen Acetyl-Gruppe über eine stereospezifische Aldol-Reaktion übertragen. Das entstandene β-Hydroxy-β-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA **37**) wird durch die HMG-CoA-Reductase reduziert, Coenzym A abgespalten und erneut durch NADPH reduziert. Es entsteht die C₆-Einheit Mevalonsäure (**40**), die in einer Serie von Reaktionen zu der C₅-Einheit Isopentenyl-diphosphat (IPP, **41**) decarboxyliert und dann zu Dimethylallyldiphosphat (DMAPP, **42**) isomerisiert wird.



Schema 6: Acetat-Mevalonat-Biosyntheseweg

4.2 Mevanolat-unabhängiger Weg nach Rohmer

Rohmer^[27] konnte durch Verfütterungsexperimente an dem Bakterium *Zymomonas mobilis*, das ausschließlich Hexosen als Kohlenstoffquelle benutzt, zeigen, daß es eine Mevalonat-unabhängige Isopren-Biosynthese geben muß. Pilze beschreiten diesen Weg allerdings nicht. Neuere Untersuchungen geben Aufschluß über den genauen Verlauf dieses Desoxyxylulose-Weges.^[28, 29] Danach kondensieren Glycerinaldehyd-3-phosphat (**43**) und Brenztraubensäure (**44**) [nach Decarboxylierung durch Thiamindiphosphat (TPP, **45**)] zu 1-Desoxyxylose-5-phosphat (**47**). Umlagerung führt zu 2-Methylerythrol-4-phosphat (**49**), dessen Reaktion mit Cytidintriphosphat (CTP) und erneute Phosphorylierung schließlich zu einem cyclischen Phosphat, dem 2-Methylerythrol-2,4-cyclophosphat (**52**). Kürzlich konnten von Rohmer et al.^[30] Anhaltspunkte zum Verlauf der Reaktion von **52** zu **54** gewonnen werden. Dabei öffnet sich das Cyclophosphat **52** zunächst zu Kation **53**, um dann durch ein Enzym mit $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster als prosthetische Gruppe in mehreren Schritten zu **54** reduziert zu werden. Zenk et al.^[31] konnten durch Verfütterung von Deuterium- bzw. Tritium-markiertem 4-Hydroxy-3-methyl-2-butenyldiphosphat an *Narcissus pseudonarcissus* und *Capsicum annuum* dessen Rolle als Zwischenstufe auf dem Weg zu Isopentenylidiphosphat (**41**) und Dimethylallyldiphosphat (**42**) zeigen. Dabei wird **42** wahrscheinlich nicht durch Isomerisierung von **41**, sondern unabhängig davon gebildet.



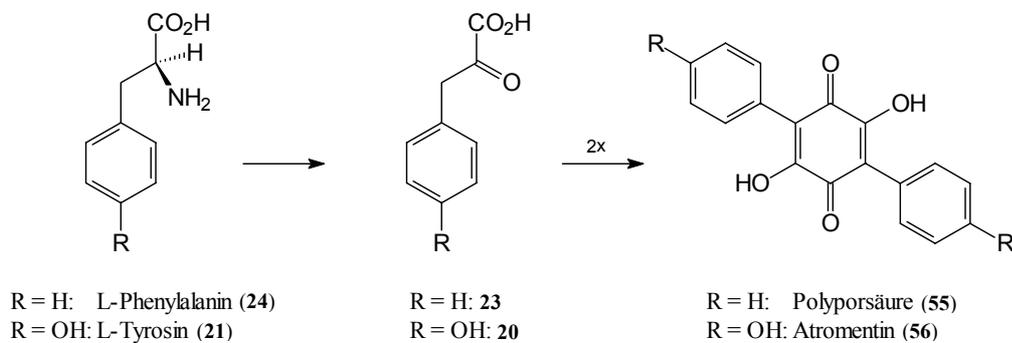
Schema 7: Mevalonat-unabhängiger Weg nach Rohmer

5. AUSGEWÄHLTE INHALTSSTOFFE VON PILZEN DER ORDNUNG BOLETALES UND IHRE BIOSYNTHESE AUS L-PHENYLALANIN (24) UND L-TYROSIN (21)

Viele Inhaltsstoffe aus Pilzen der Ordnung Boletales leiten sich von Arylbrenztraubensäuren ab.^[32] Sie entstehen damit aus L-Phenylalanin und L-Tyrosin, aus denen sie durch Transaminierung gebildet werden. Es sind Verbindungen bekannt, die aus zwei, drei oder vier Arylbrenztraubensäure-Bausteinen aufgebaut sind.

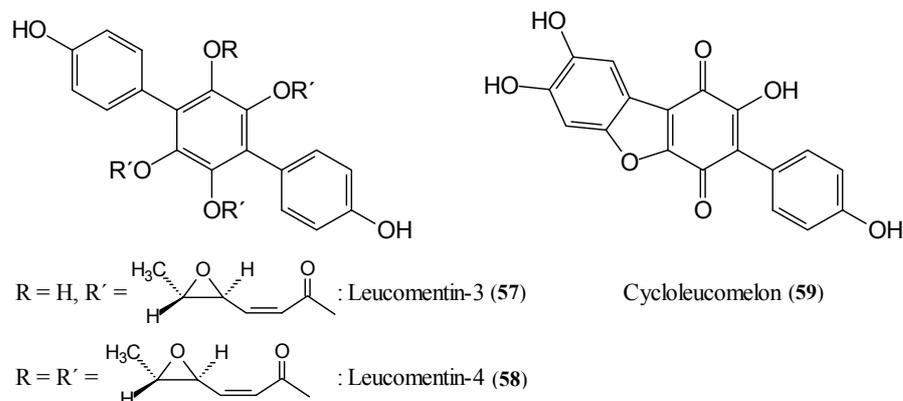
5.1 Verbindungen aus zwei Arylbrenztraubensäure-Bausteinen

Eine Kondensation führt zur Gruppe der Terphenylchinone. Es entstehen Polyporsäure (55) und Atromentin (56).



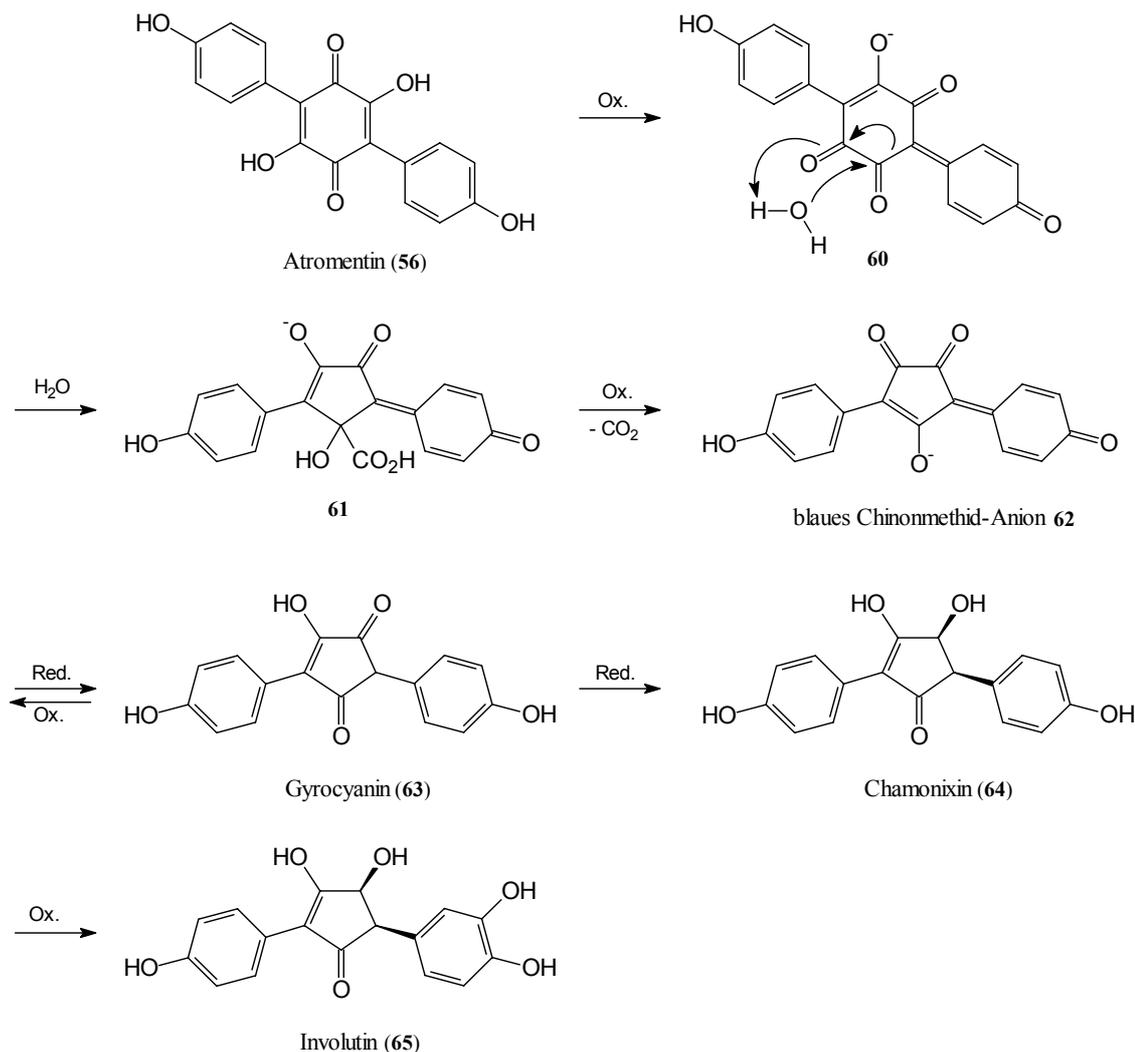
Schema 8: Biosynthese der Terphenylchinone **55** und **56**

Polyporsäure konnte bereits im 19. Jahrhundert im Zimtfarbenen Weichporling, *Hapalopilus nidulans*, gefunden werden.^[33, 34] Atromentin^[35-38] ist nach dem Samtfußkrempling, *Paxillus atrotomentosus*, benannt, liegt aber im Pilz überwiegend in Form von mehrfach veresterten Leucoverbindungen wie **57** und **58** vor.^[39] Auch cyclisierte Formen wie das Cycloleucomelon (**59**) aus *Boletopsis leucomelaena*, dem Grauen Rußporling, sind bekannt.^[40, 41]



Schema 9: Vorkommen von Atromentinderivaten in Höheren Pilzen

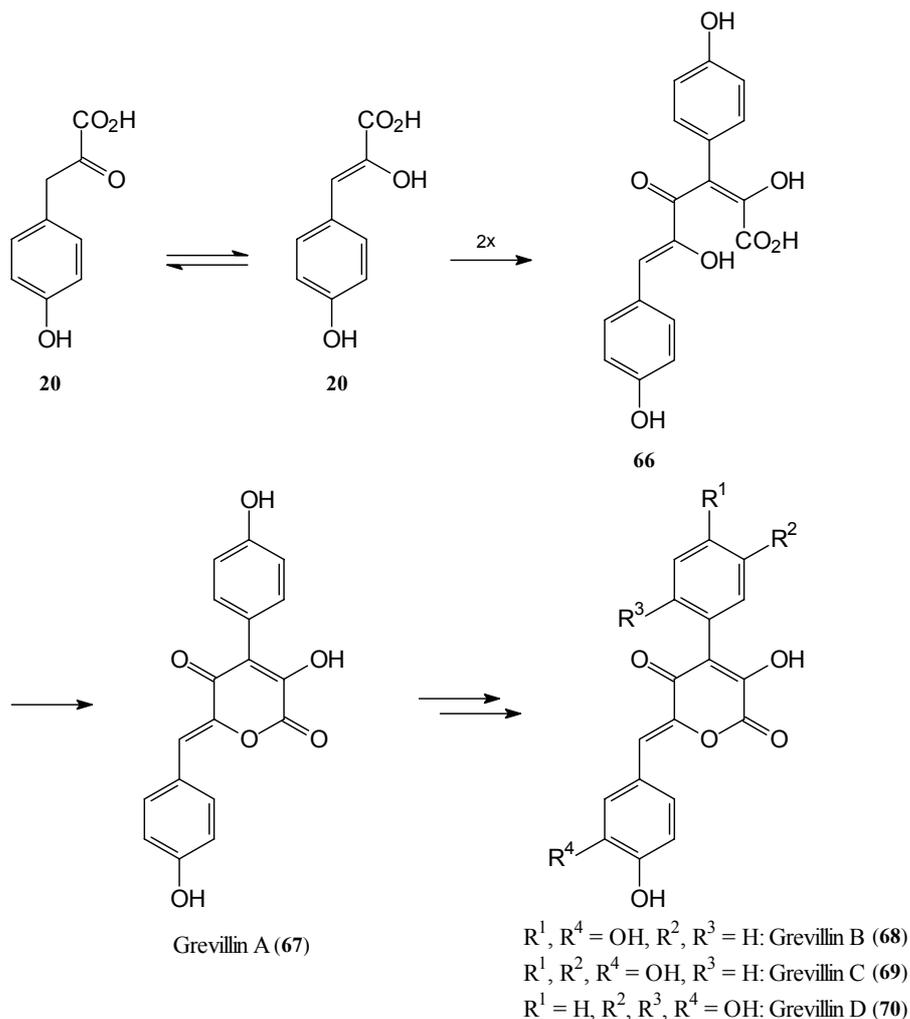
Ebenfalls aus einer *Paxillus*-Art, dem Kahlen Krempling, *P. involutus*, konnte Involutin (**65**) isoliert werden.^[42] Es ist - wie die oben erwähnten Verbindungen - aus zwei Bausteinen Arylbrenztraubensäure aufgebaut und besitzt einen zentralen Cyclopentenonring. Es entsteht biosynthetisch aus Atromentin (**56**) durch Oxidation, Ringverengung, Decarboxylierung, Reduktion und Hydroxylierung. Dabei werden als Biosynthese-Zwischenverbindungen das Gyrocyanin (**63**) (aus *Gyroporus cyanescens*, dem Kornblumen-Röhrling)^[43] und das Chamonixin (**64**) (aus *Gyrodon lividus*, dem Erlengrübling)^[44] durchlaufen.



Schema 10: Biosynthese von Involutin (**65**)

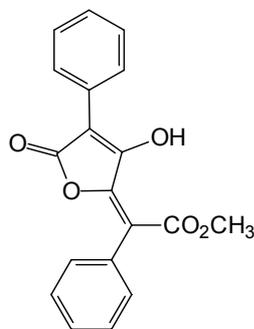
Wie der Name Kornblumen-Röhrling bereits sagt, kommt es bei Verletzung des Pilzes zu einer blauen Farbreaktion, die auf die Entstehung eines Chinonmethid-Anions (**62**) zurückzuführen ist ($\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$). Es entsteht aus Gyrocyanin (**63**) durch enzymatische Oxidation. Auch Chamonixin (**64**) zeigt diese Bläuungsreaktion.

Eine weitere, aus zwei Bausteinen Arylbrenztraubensäure aufgebaute Substanzklasse ist die der Grevilline.^[45, 46] Diese Pyrandione treten in der Gattung *Suillus* auf. Die Grevilline A–C (67–69) konnte man aus *Suillus grevillei*, dem Goldröhrling, und *S. tridentinus*, dem Rostroten Lärchenröhrling, isolieren. Grevillin D (70) läßt sich in *S. granulatus*, dem Körnchenröhrling, nachweisen. Biosynthetisch entstehen die Grevilline durch Dimerisierung von 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure (20), jedoch im Gegensatz zu Atromentin (56) über eine C–O-Bindungsbildung.



Schema 11: Biosynthese der Grevilline 67–70

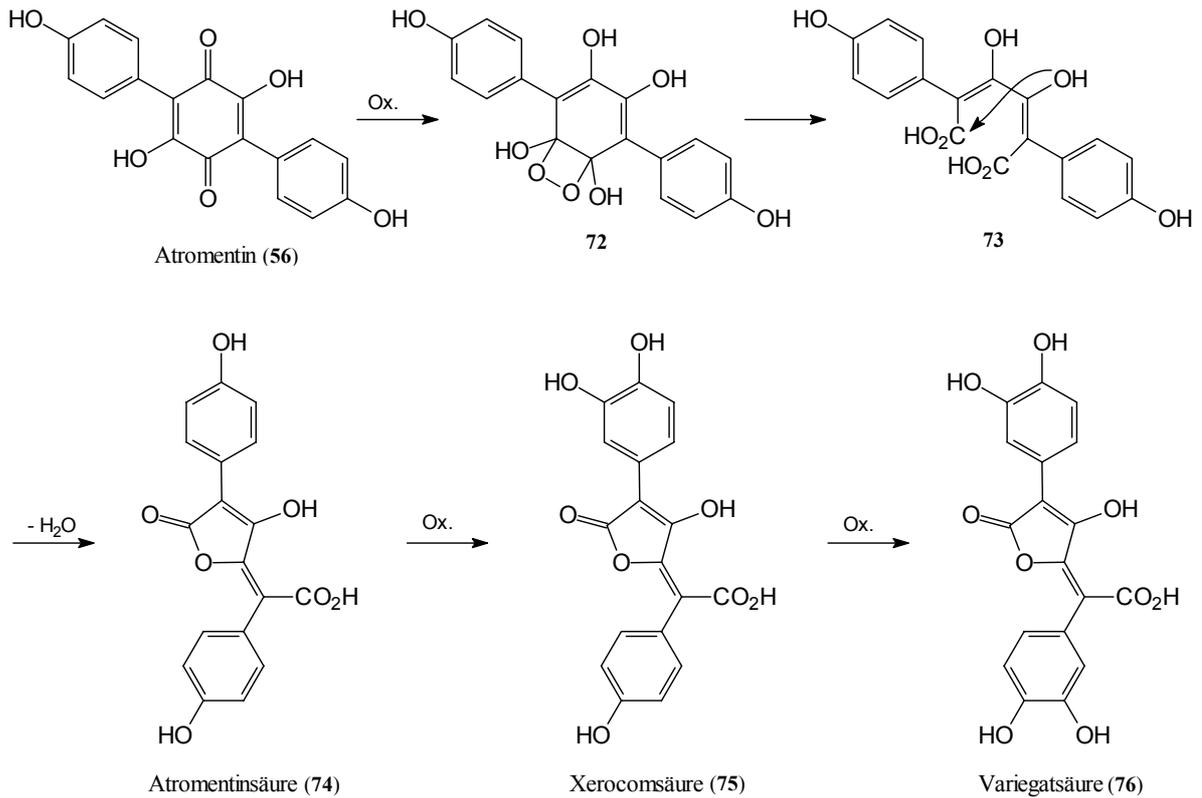
Eine für diese Arbeit besonders bedeutende Substanzgruppe ist die der Pulvinsäuren. Hydroxylierte Pulvinsäuren sind verantwortlich für die gelbe oder rote Farbe der meisten Pilze der Ordnung Boletales. Die erste Pulvinsäure wurde allerdings aus Flechten isoliert und Vulpinsäure (**71**) genannt.^[47, 48]



Vulpinsäure (**71**)

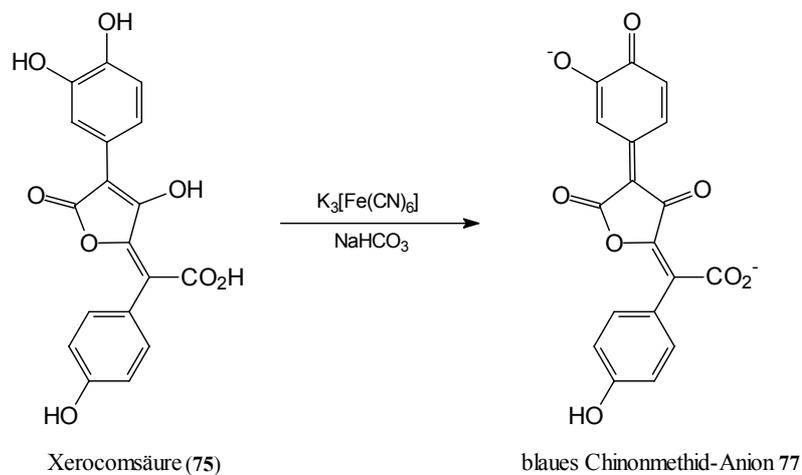
Schema 12: Vulpinsäure (**71**), eine erste Pulvinsäure aus Flechten

Die erste Hydroxypulvinsäure konnte in *Suillus variegatus*, dem Sandröhrling, gefunden werden, es ist die Variegatsäure (**76**).^[49] Sie wurde später auch in zahlreichen anderen verwandten Arten nachgewiesen, so z. B. in *Boletus calopus*, *B. edulis*, *Chalciporus piperatus* und *Xerocomus badius*. Wenig später konnten Steglich et al.^[50] die Xerocomsäure (**75**) aus dem Rotfußröhrling (*X. chrysenteron*) charakterisieren. Diese Verbindung, die der Grundbaustein vieler anderer, komplexer Verbindungen ist, findet man unter anderem auch in *C. piperatus*, *S. citrinum* und *X. badius*. Variegatsäure und Xerocomsäure entstammen dem gleichen Biosyntheseweg. Ausgehend von dem bereits beschriebenen Atromentin (**56**) erfolgt eine oxidative Ringöffnung. Das Produkt **73** lactonisiert sofort wieder unter Wasserabspaltung zur Atromentinsäure (**74**). Einfache Hydroxylierung führt zur Xerocomsäure, zweifache zur Variegatsäure.



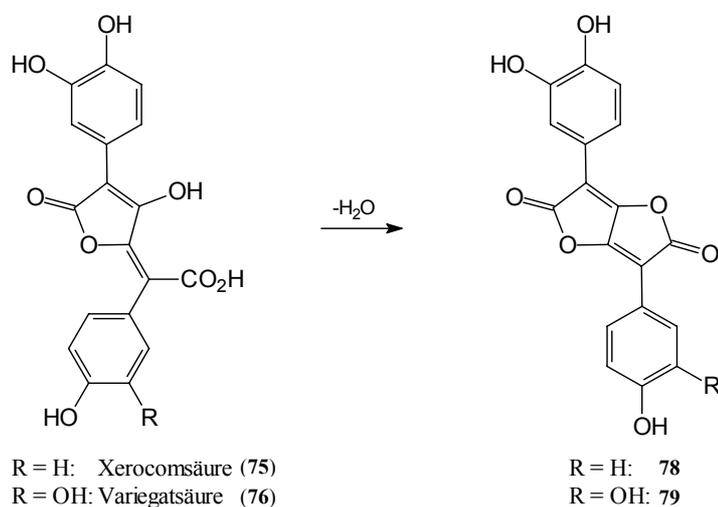
Schema 13: Hydroxylierte Pulvinsäuren in Höheren Pilzen

Zur Entdeckung der Xerocom- und Variegatsäure führte die Beobachtung einer charakteristischen Bläuungsreaktion, die viele der besprochenen Arten zeigen. Vergleichbar mit dem Gyrocyanin (**63**) kommt es hierbei zur Ausbildung eines resonanzstabilisierten Anions, das durch Oxidasen oder durch Kalium-hexacyanoferrat aus den gelben Farbstoffen gebildet werden kann. Die Reaktion sei am Beispiel der Xeroconsäure veranschaulicht.



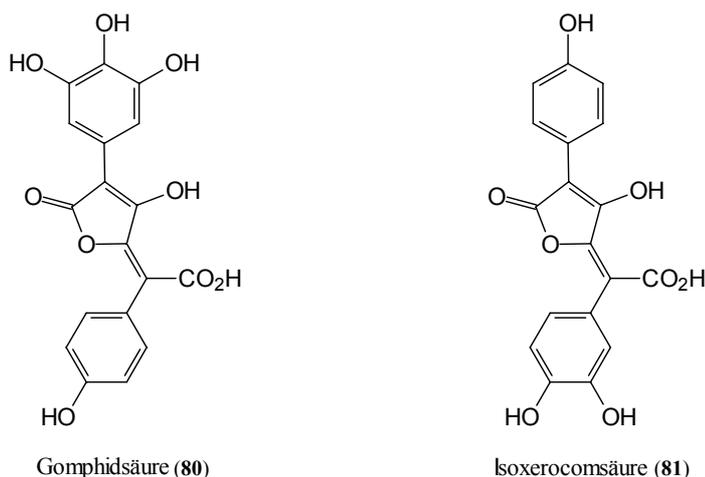
Schema 14: Bläuungsreaktion der Xeroconsäure (75)

Eine massenspektrometrische Besonderheit von Pulvinsäuren ist die Bildung eines weiteren Lactonringes unter Wasserabspaltung. Furtner^[51] konnte dies für die Xeroconsäure (**75**) und die Variegatsäure (**76**) zeigen. In beiden Fällen konnte im EI-Massenspektrum kein Molekülpeak erhalten werden.



Schema 15: Massenspektrometrische Besonderheiten von Pulvinsäuren

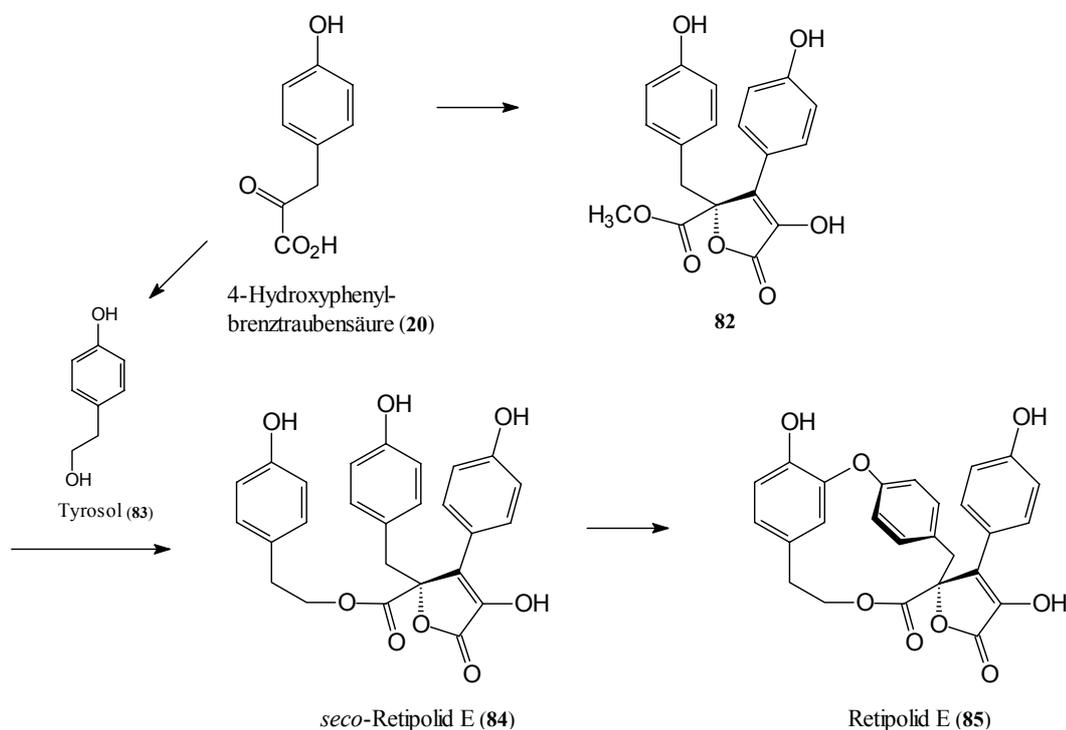
Es gibt noch weitere, sich im Grad der Hydroxylierung der beiden Arylsubstituenten unterscheidende Pulvinsäurederivate aus Pilzen der Ordnung Boletales. Dazu gehört die Gomphidsäure (**80**) aus dem Großen Gelbfuß oder Kuhmaul (*Gomphidius glutinosus*).^[52] Die zuerst in Kulturen von *Serpula lacrimans* (Hausschwamm) gefundene Isoxeroconsäure (**81**) konnte auch in *Paxillus curtisii* nachgewiesen werden.^[53, 54]



Schema 16: Weitere Pulvinsäurederivate in Pilzen der Ordnung Boletales

5.2 Verbindungen aus drei Arylbrenztraubensäure-Bausteinen

Eine interessante, aus drei Arylbrenztraubensäure-Einheiten aufgebaute Verbindung ist das Retipolid E (**85**) aus *Boletus retipes* (*B. ornatipes*). Justus^[55] konnte die faszinierende Struktur, die ein 14-gliedriges Makrolacton enthält, aufklären. Ferner identifizierte er Tyrosol (**83**) im Rohextrakt des Pilzes. Die Biosynthese von Retipolid E geht von einer intermolekularen Aldol-Addition zweier Moleküle 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure (**20**) aus. Umesterung von **82** mit Tyrosol ergibt das *seco*-Retipolid E (**84**). Es folgt eine intramolekulare Kupplung zweier Phenole unter Ausbildung des 14-gliedrigen Makrocyclus in Retipolid E.

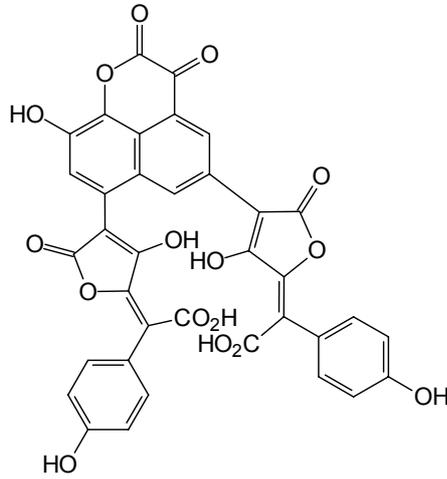


Schema 17: Biosynthese von Pilzinhaltsstoffen aus drei Arylbrenztraubensäure-Einheiten

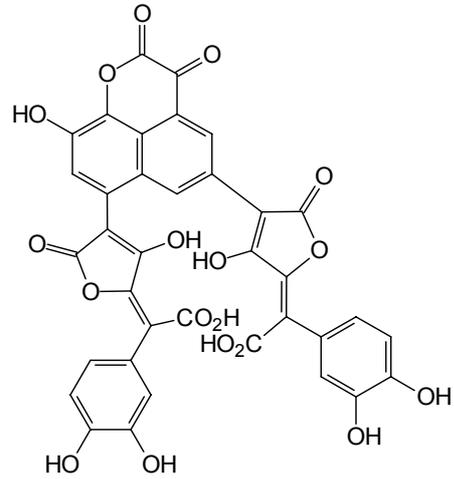
5.3 Verbindungen aus vier Arylbrenztraubensäure-Bausteinen

Unter Einbau eines vierten Bausteines Arylbrenztraubensäure gelangt man zur Gruppe der dimeren Pulvinsäurederivate. In der braunen Huthaut des Maronentröhrlings (*Xerocomus badius*) konnten mehrere Farbstoffe dieses Typs gefunden werden. Dabei handelt es sich um Badion A (**86**), Norbadion A (**88**) und Bisnorbadiochinon A (**89**).^[56] In den Hüten des Flockenstielligen Hexentröhrlings (*Boletus erythropus*) ist anstelle von Badion A das zusätzlich hydroxylierte Badion B (**87**) zu finden. Biosynthetisch sind alle diese Verbindungen durch Dimerisierung der Xerocomsäure (**75**) entstanden. Der genaue Verlauf der Biosynthese wird in Kapitel 9.9 besprochen. Farbstoffe aus der Badion-Gruppe sind in vielen weiteren Pilz-

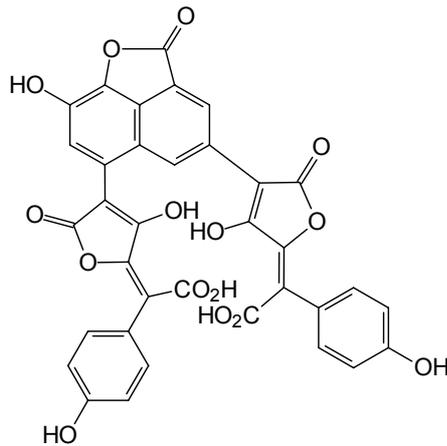
Arten verbreitet. So z. B. findet man Norbadion A in *Boletus mirabilis*, *Chalciporus piperatus*, *Pisolithus tinctorius*, *Scleroderma citrinum*, *S. verrusosum* und *Xerocomus parasiticus*.^[46, 57] Gruber^[58] konnte Bisnorbadiochinon A auch in *Porphyrellus pseudoscaber*, dem Düsteren Röhrling, und *Xanthoconium affine* nachweisen.



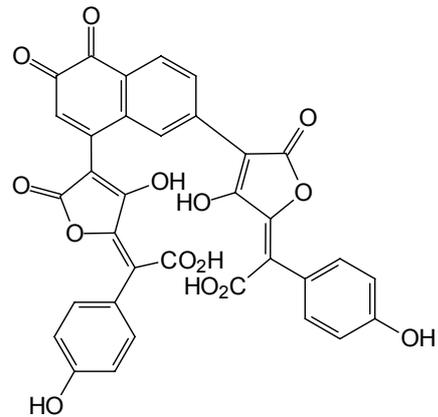
Badion A (86)



Badion B (87)



Norbadion A (88)



Bisnorbadiochinon A (89)

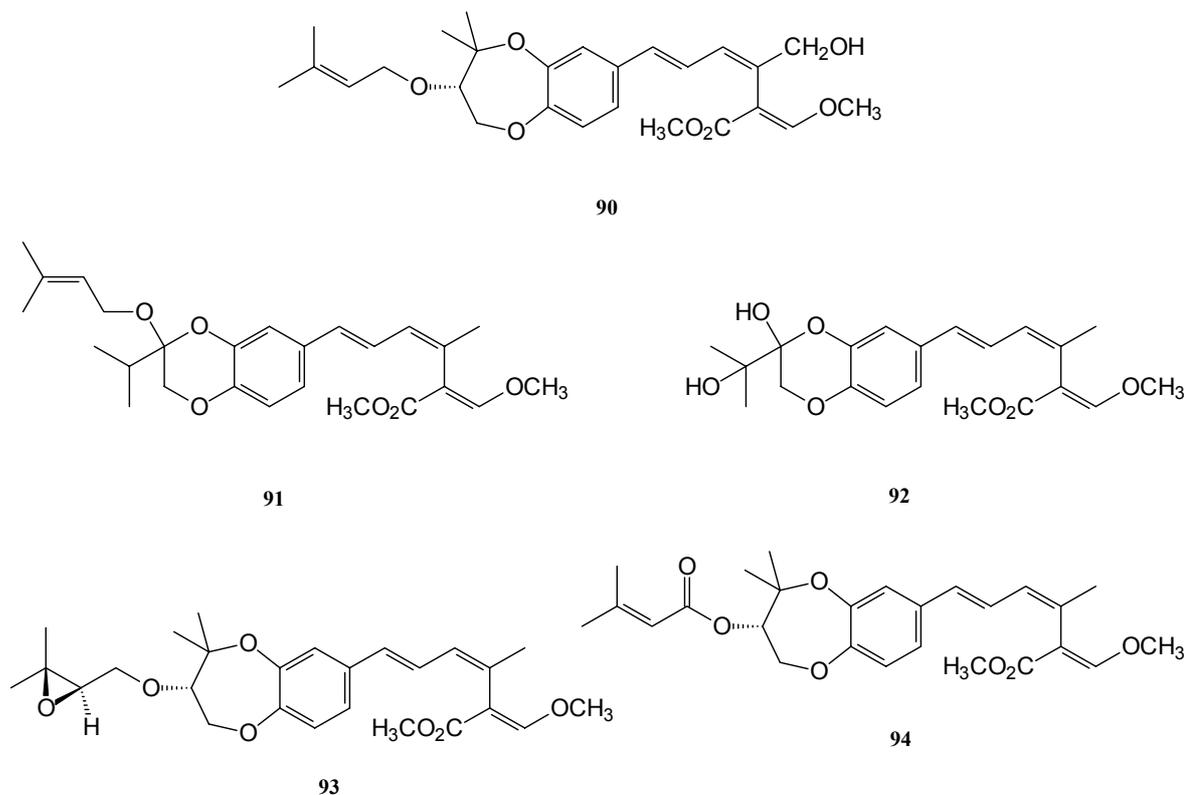
Schema 18: Dimere Pulvinsäurederivate

6. BEKANNTE SEKUNDÄRMETABOLITE AUS PILZEN DER GATTUNG *MYCENA*

Die Gattung *Mycena* umfaßt weltweit etwa 200 Arten.^[59] Zur Chemie ihrer Sekundärmetabolite sind jedoch nur wenige Untersuchungen durchgeführt worden. Chemotaxonomische Ansätze gibt es daher kaum. Auch in biologischer Hinsicht kann man die verschiedenen *Mycena*-Arten als heterogen ansehen. Es handelt sich eher um eine Sammelgattung für sehr unterschiedliche Helmlinge.^[60] Einige Inhaltsstoffe konnten jedoch bereits isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Viele besitzen eine bemerkenswerte physiologische Aktivität.

6.1 Strobilurine

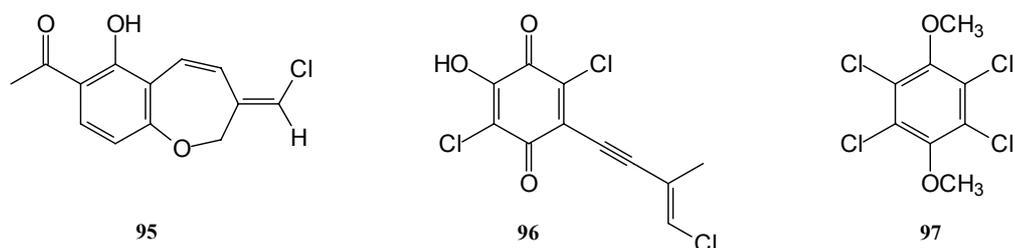
In verschiedenen Arten fand man bisher unbekannte Strobilurine, so das Hydroxystrobilurin G (**90**) in *Mycena sanguinolenta* (Purpurschneidiger Helmling),^[61] die Strobilurine M (**91**) (*M. sp. 96097*),^[62] N (**92**) (*M. crocata*, Gelbmilchender Helmling),^[63] O (**93**) und P (**94**) (*M. galericulata*, Rosablättriger Helmling).^[64] Letztere zeigen cytotoxische Aktivität gegen menschliche Gehirntumorzellen vom Typ HeLa-S3 sowie antifungische Aktivität gegen *Pyricularia oryzae* und *Botrytis cinerea*.



Schema 19: Strobilurine in *Mycena*-Arten

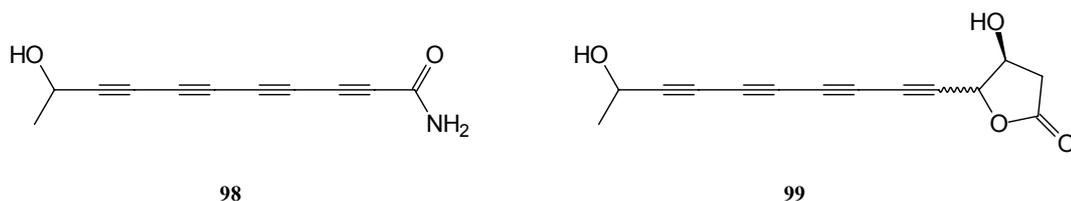
6.2 Metabolite mit Halogen-Substituenten und mehrfach ungesättigten Strukturelementen

Einige *Mycena*-Metabolite enthalten als besonderes Strukturmerkmal Halogen-Substituenten. Aus *Mycena galopus*, dem Weißmilchenden Helmling, konnte der interessante Inhaltsstoff **95** mit 1-Benzoxepin-Grundgerüst isoliert werden,^[65] aus Kulturen einer kanadischen *Mycena*-Art TA 87202 das Benzochinon-Antibiotikum Mycenon (**96**).^[66] Mycenon ist ein selektiver Inhibitor der Isocitrat-Lyase. In *Mycena megaspora*, dem Torfmooshelmling, findet man den antibakteriell wirksamen Drosophilin A-methylether (**97**).^[67]



Schema 20: Halogen-haltige Verbindungen in *Mycena*-Arten

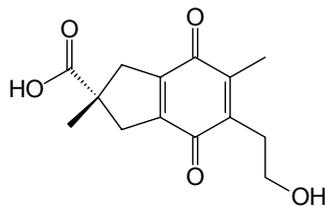
Es gibt viele weitere Arten, die in Kultur Metabolite mit mehrfach ungesättigten Strukturelementen produzieren, wie dies bei Mycenon der Fall ist. Dazu gehören die tetraacetylenischen Verbindungen aus *M. viridimarginata* (Grünschneidiger Helmling).^[68, 69] Als Hauptmetabolit ließ sich das instabile 10-Hydroxy-2,4,6,8-undecatetraensäureamid (**98**) identifizieren, als Nebenmetabolit 3,4,13-Trihydroxy-5,7,9,11-tetradecatetraensäure- γ -lacton (**99**). Das Amid **98** hemmt bereits in sehr geringen Konzentrationen das Wachstum Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien sowie das von Pilzen.



Schema 21: *Mycena*-Metabolite mit mehrfach ungesättigten Strukturelementen

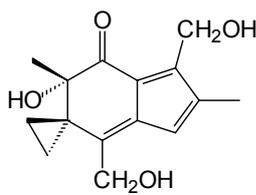
6.3 Terpenoide Verbindungen

Purachinonsäure (**100**), eine neue sesquiterpenoide Verbindung vom Norilludan-Typ, konnte aus Mycelkulturen von *M. pura* (Rettich-Helmling) isoliert werden.^[70] Durch Synthese konnte auch ihre absolute Konfiguration bestimmt werden.^[71] Purachinonsäure zeigt eine hohe Aktivität gegen menschliche HL-60-Leukämie-Zellen.



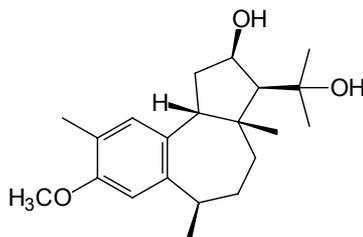
Schema 22: Purachinonsäure (**100**)

Ebenfalls stark cytotoxisch wirkt das durch Fermentationen der amerikanischen Art *M. leaiana* gewonnene Leaianafulven (**101**).^[72] Leaianafulven ist der intensiv orangegelbe Hauptfarbstoff der Kulturen des Pilzes. Er entsteht wie die Purachinonsäure (**100**) aus einem Illudan-Vorläufer. Dabei findet vermutlich eine 1,2-Wanderung einer Methylgruppe statt. Dadurch erklärt sich die ungewöhnliche Stellung des CH₂OH-Substituenten am Fünfring. Die DNS- und RNS-Synthese in menschlichen Ehrlich-Carcinom-Zellen wird gezielt durch Verhinderung des Einbaus bestimmter Nucleoside gehemmt.



Schema 23: Leaianafulven (**101**)

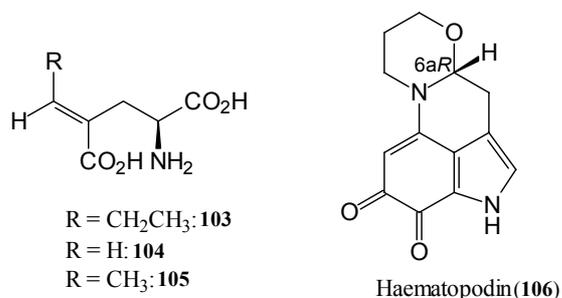
Aus Fruchtkörpern von *M. tintinnabulum* (Winterhelmling) konnte das diterpenoide Tintinnadiol (**102**) isoliert werden.^[73] Auch Tintinnadiol zeigt cytotoxische Effekte gegen HL-60- und L-1210-Tumorzellen.



Schema 24: Tintinnadiol (**102**)

6.4 Stickstoff-haltige Metabolite

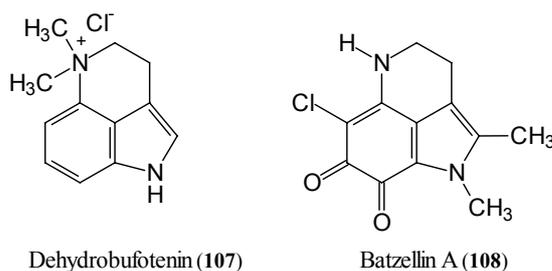
Die einzigen bislang bekannten Stickstoff-haltigen Verbindungen in Arten der Gattung *Mycena* sind das bereits erwähnte Carbonsäureamid **98** aus *M. viridimarginata*, die von Hatanaka et al.^[74] gefundenen Glutaminsäurederivate **103–105** aus *M. pura* und ein von Bröckelmann^[75] aus *M. haematopus* (Bluthelmling) isolierter Farbstoff, das Haematopodin (**106**). Die Verbindungen **103–105** konnten aus dem Ethanol-Extrakt der Fruchtkörper gewonnen werden, als Hauptmetabolit γ -Propylidenglutaminsäure (**103**), als Nebenverbindungen γ -Methylidenglutaminsäure (**104**) und γ -Ethylidenglutaminsäure (**105**). Bei (+)-(6a*R*)-Haematopodin handelt es sich um ein optisch aktives, rosaviolettes Artefakt aus *M. haematopus*, dessen Struktur auch durch Synthese bewiesen werden konnte.^[76] Die *R*-Konfiguration an C-6a konnte über eine Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden.



Schema 25: Stickstoff-haltige *Mycena*-Metabolite

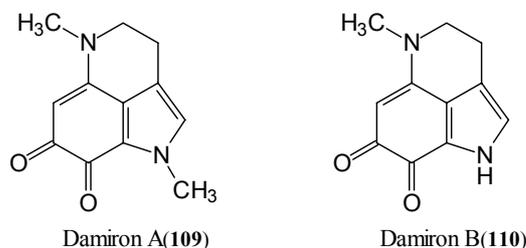
7. PYRROLOCHINOLIN-ALKALOIDE

Haematopodin (**106**) gehört zur ungewöhnlichen Klasse der Pyrrolo[4,3,2-*de*]chinolin-Alkaloide, die cytotoxische, antimikrobielle und fungizide Eigenschaften zeigen. Bislang sind nur wenige Vertreter dieser Gruppe gefunden worden, zuerst das Dehydrobufotenin (**107**) aus dem toxischen Hautsekret der japanischen Kröte *Bufo gama*,^[77, 78] später aus marinen Organismen wie dem karibischen Tiefseeschwamm *Batzella* sp. verschiedene Batzelline und Isobatzelline, so z. B. Batzellin A (**108**).^[79, 80]



Schema 26: Pyrrolochinolin-Alkaloide aus *Bufo gama* und *Batzella* sp.

Ferner konnten Faulkner et al.^[81] aus dem Schwamm *Damiria* sp., den man im Pazifischen Ozean vor den Palau-Inseln findet, die rotviolettten Pyrrolochinolin-Alkaloide Damiron A (**109**) und B (**110**) isolieren.

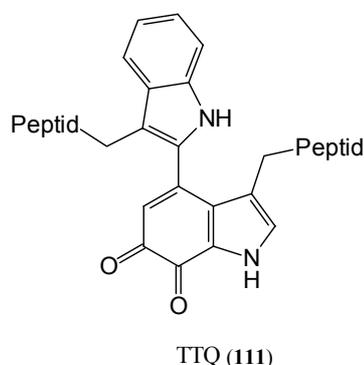


Schema 27: Pyrrolochinolin-Alkaloide aus *Damiria* sp.

Die Biosynthese der 1,3,4,5-Tetrahydropyrrolo[4,3,2-*de*]chinolin-Alkaloide verläuft vermutlich über eine intramolekulare Cyclisierung eines Tryptamin-6,7-chinons.^[75]

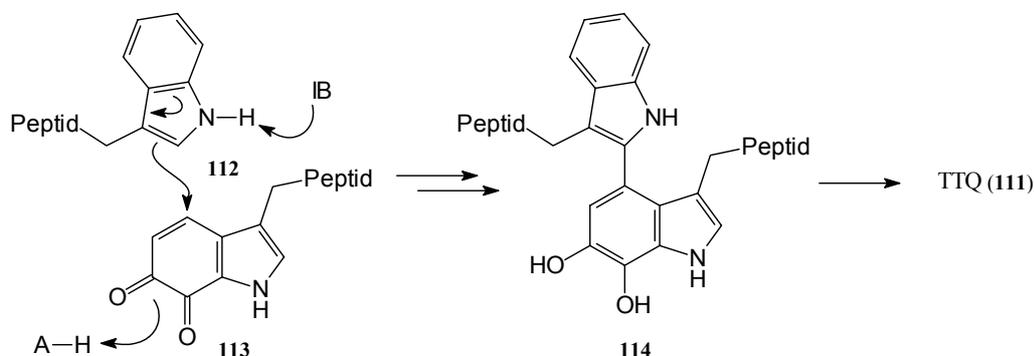
8. NEUE COENZYME MIT VERWANDTER STRUKTUR

Besonders interessant ist die Entdeckung von Indolochinolin-Derivaten als neue Coenzyme in Dehydrogenasen. Lange glaubte man, daß enzymatische Oxidations- und Reduktionsvorgänge entweder von Nicotinamid-adeninucleotid (NADP⁺) oder Flavin-adeninucleotid (FAD) abhängig sein müßten. In den letzten 20 Jahren konnten allerdings viele neue Cofaktoren gefunden werden. Die in Bakterien wie *Paracoccus denitrificans* vorkommenden Methylamindehydrogenase (MADH) und die aromatische Amindehydrogenase (AADH) sind neue Chinonproteine, die den heterocyclischen *ortho*-Chinon-Cofaktor TTQ (Tryptophan TryptophylQuinone **111**) enthalten.^[82] In den meisten Bakterien, wie auch in *P. denitrificans* ist der Elektronenakzeptor für MADH dabei ein blaues Kupfer-Protein, das Amicyanin.^[83]



Schema 28: Indolochinolin-Cofaktoren in Dehydrogenasen

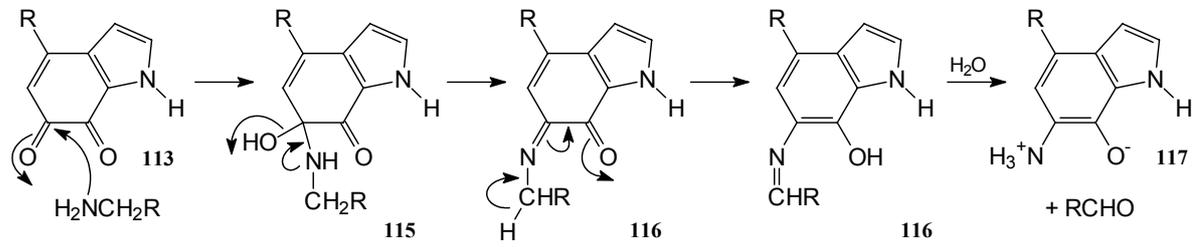
TTQ wird durch posttranslationale Modifikation zweier Tryptophanreste in der Polypeptidkette gebildet. Dabei nimmt man an, daß sich eine Tryptophaneinheit an das 6,7-Indolochinonderivat der Aminosäure in einer anderen Peptidkette durch nucleophile Substitution in 4-Position addiert.^[84]



Schema 29: Biogenese von TTQ (**111**)

Der häufigste Transaminierungsfaktor ist das bereits in Kapitel 3.1 erwähnte Pyridoxal-phosphat (PLP). Es können aber auch mit Hilfe von TTQ oxidative Desaminierungen von

primären Aminen über eine reaktive Carbonylgruppe an der aktiven Seite des Enzyms erfolgen. Davidson et al.^[85] zeigten, daß diese Reaktion über einen Transaminierungsmechanismus verläuft. Später konnte auch das Tryptophan-tryptophylechinon-aminochinol-Intermediat **115** ¹⁵N-NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.^[86, 87]



Schema 30: Mechanismus einer Desaminierung mit Hilfe von TTQ (**111**)

III. SPEZIELLER TEIL

9. PILZE DER ORDNUNG BOLETALES, *SCLERODERMA CITRINUM* UND *CHALCIPORUS PIPERATUS*

9.1 *Scleroderma citrinum*: Pilzbeschreibung

Scleroderma citrinum (Pers.), auch *S. vulgare* oder *S. aurantium* genannt, der Dickschalige Kartoffelbovist, zählt zu den Bauchpilzen (Gastromycetes), in älterer Literatur zu den "Aphylophorales" (Nichtblätterpilzen).^[88, 89] Er gehört zur Familie der Sclerodermataceae, Ordnung Boletales.^[90] Der Kartoffelbovist hat einen derbschaligen, fast stiellosen Fruchtkörper, der einen Durchmesser von bis zu 10 cm erreichen kann. Die Außenhaut (Peridie) ist hellbraun bis gelblich und mit groben Schuppen besetzt. Die darin enthaltene Fruchtschicht (Gleba) ist in jungem Zustand weiß und fest, zerfällt später und wird schwarzviolett. Reife Fruchtkörper platzen und verteilen auf diese Weise ihren Sporenstaub. Den Pilz findet man von Sommer bis Mitte des Herbstes auf sandigen, nährstoffarmen Böden in Laub- und Nadelwäldern.



Abbildung 1: *Scleroderma citrinum* (Pers.)

9.2 *Chalciporus piperatus*: Pilzbeschreibung

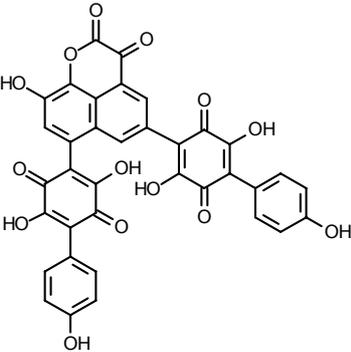
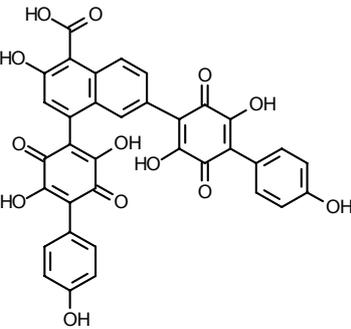
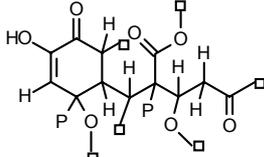
Chalciporus piperatus (Bull.: Fr.) Bat., der Pfefferröhrling, gehört zur Familie der Boletaceae, Ordnung Boletales.^[91] In älteren Büchern findet man ihn noch der Gattung *Boletus* oder *Suillus* zugeordnet.^[90] Der 2 bis 6 cm breite, gelb bis orangebräunliche Hut ist halbkugelig bis polsterförmig, die Röhren sind zimt- bis dunkelbraun. Die Huthaut ist bei feuchtem Wetter oft schmierig. Der Stiel ist sehr schlank, außen dem Hut ähnlich gefärbt, innen und vor allem an der Basis leuchtend gelb. Der Hut wird bald weichlich und hat einen scharfen, an Pfeffer erinnernden Geschmack. Der Pfefferröhrling wird daher oft als Würzpilz verwendet. Man findet ihn in moosigen Jungfichtenschonungen vor allem in der Nähe von Fliegenpilz-Hexenringen und neben Steinpilzen.



Abbildung 2: *Chalciporus piperatus* (Bull.:Fr.) Bat.

9.3 *Scleroderma citrinum*: bisherige Arbeiten

In den Kapiteln 9.3 und 9.4 wird über verschiedene ältere Arbeiten zu den verwandten Verbindungen aus *Scleroderma citrinum* und *Chalciporus piperatus* berichtet. Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten, werden in der folgenden Tabelle die unterschiedlichen Bezeichnungen und Strukturvorschläge gegenübergestellt. Dabei werden nur die Verbindungen berücksichtigt, die nicht schon aus anderen Pilzen bekannt sind. Der mit den Namen SC Gelb I und CP-3 bezeichnete Farbstoff wird in dieser Arbeit Sclerocitrin (**125**), der von Sontag und Gimenez als CP-2 beschriebene hier Chalcitrin (**169**) genannt.

Autor	Bezeichnung der Verbindung	Strukturvorschlag	Analytische Methoden
Fugmann	Sclerocitrin D		MS, ¹ H-NMR
Fugmann	Sclerocitrin E		MS, ¹ H-NMR
Schmidt	SC Gelb I	—	UV/Vis, MS, ¹ H-, ¹³ C-NMR, COSY, HETCOR
Sontag	SC Gelb I bzw. CP-3		MS, ¹ H-, ¹³ C-NMR, COSY, HMQC, HMBC

P = Pulvinsäurerest

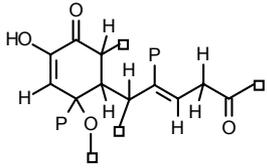
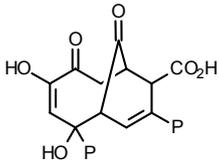
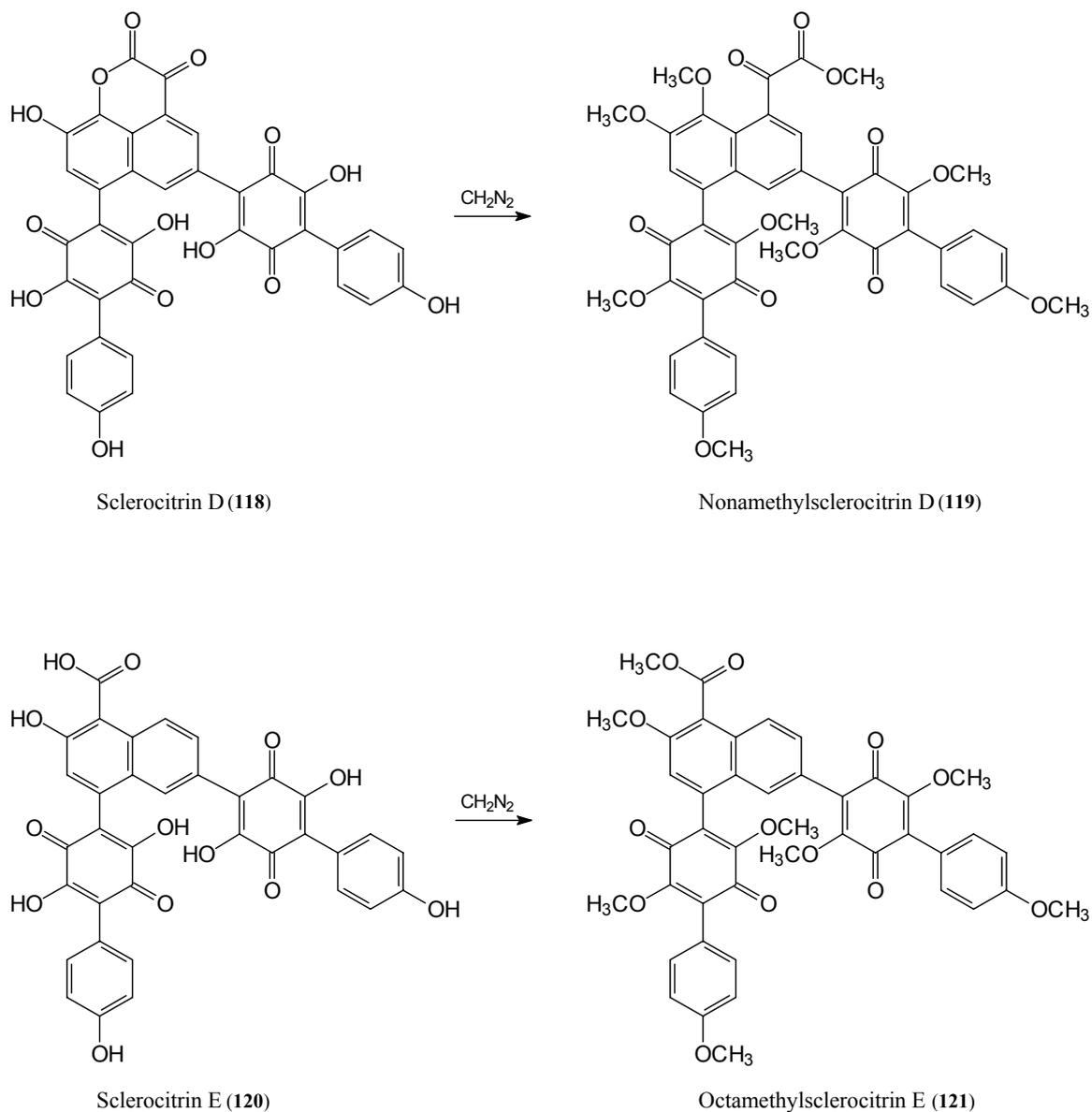
Sontag	CP-2		MS, ^1H -, ^{13}C -NMR
Gimenez	CP-3	—	^1H -, ^{13}C -NMR, COSY, HETCOR, COLOC
Gimenez	CP-2		^1H -, ^{13}C -NMR, COSY, HETCOR, COLOC

Tabelle 1: Gegenüberstellung der verschiedenen Arbeiten zu den Inhaltsstoffen aus *Scleroderma citrinum* und *Chalciporus piperatus*

Fugmann^[92] untersuchte die Farbstoffe des Methanolextraktes der kleingeschnittenen Schalen (Peridien) des Kartoffelbovistes. Die Reinigung der underivatisierten Pigmente an verschiedenen Säulenmaterialien gelang jedoch nicht. Erst nach Überführung der Farbstoffe in ihre Permethylverbindungen mit Diazomethan ließen sich die beiden Hauptpigmentderivate aufreinigen. Fugmann bezeichnete sie als Nonamethylsclerocitrin D (**119**) und Octamethylsclerocitrin E (**121**) und unterbreitete folgende vorläufige Strukturvorschläge für die nativen Farbstoffe Sclerocitrin D (**118**) und Sclerocitrin E (**120**).



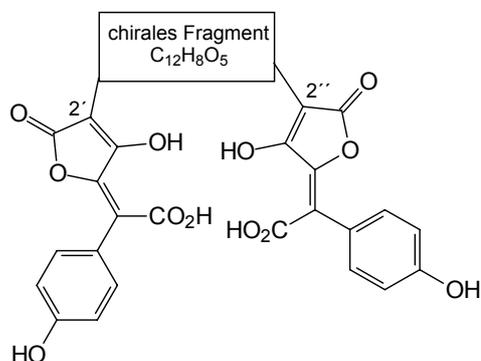
Schema 31: Vorläufige Strukturvorschläge für die Sclerocitrine D (**118**) und E (**120**) nach Fugmann

Fugmann konnte diese Vorschläge lediglich anhand der Massenspektren und der $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Daten erarbeiten. Durch Auswertung der IR-Spektren und einem Vergleich mit dem permethylierten Derivat von Badion A (**86**) wurden weitere Anhaltspunkte gewonnen. $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten lagen jedoch nicht vor, ebensowenig gekoppelte Spektren. Aufgrund

der Komplexität der Kernresonanz-Aufspaltungsmuster können mit diesen analytischen Ergebnissen keine zuverlässigen Strukturvorschläge erhalten werden. Fugmann zog für Verbindung E in Erwägung, daß es sich um einen Aufarbeitungsartefakt handeln könne. Spätere Arbeiten konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen.

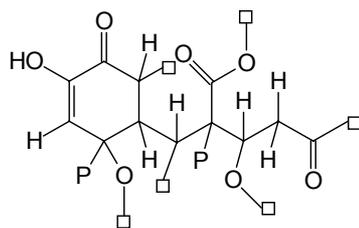
Schmidt^[46] führte umfangreiche vergleichende HPL-chromatographische Untersuchungen durch. Im Rohextrakt fand sie Xerocomsäure (**75**) und Norbadion A (**88**) durch Vergleich der UV/Vis-Spektren mit denen dieser Verbindungen aus *Xerocomus badius*. Weiter beschrieb Schmidt eine intensiv gelbe Verbindung mit charakteristischen UV/Vis-Maxima, die sie SC Gelb I nannte. Nach chromatographischer Aufreinigung des Rohextraktes an Sephadex LH-20 konnte sie auch Badion A (**86**) nachweisen.

Sontag^[93] erkannte, daß die schwarzviolette Sporenmasse des Kartoffelbovistes große Mengen eines gelben Farbstoffes enthält und extrahierte daher nicht nur die Huthaut des Pilzes sondern den gesamten Fruchtkörper. Als Hauptinhaltsstoff ließ sich in außergewöhnlich großen Mengen eine Verbindung isolieren, der aufgrund der massenspektrometrischen Untersuchungen eine Summenformel von $C_{36}H_{22}O_{17}$ zugeordnet werden konnte. Bei diesem Farbstoff handelt es sich um den von Schmidt SC Gelb I genannten. Die Untersuchungen zeigten weiter, daß die optisch aktive Verbindung aus zwei Pulvinsäureseitenketten und einem zentralen chiralen Fragment aufgebaut sein muß.



Schema 32: Strukturüberlegungen zu SC Gelb I durch Sontag

Aus den HMBC-Spektren leitete Sontag für das zentrale Fragment eine Partialstruktur ab.



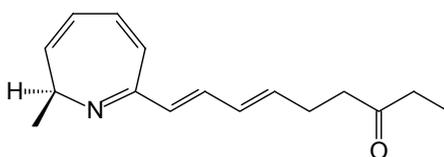
P = Pulvinsäurerest

Schema 33: Strukturüberlegungen zu dem zentralen Fragment von SC Gelb I durch Sontag

Van den Heuvel^[94] versuchte, aus den von Sontag erarbeiteten Partialstrukturen eine Gesamtstruktur zu entwickeln. Er erarbeitete zwei Vorschläge, die jedoch viele Fragen zu den beobachteten Kopplungen und Verschiebungen offen lassen und in Widerspruch zu den mehrfach untermauerten massenspektrometrischen Untersuchungen stehen.

9.4 *Chalciporus piperatus*: bisherige Arbeiten

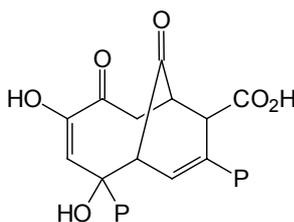
In den Pilzhüten von *Chalciporus piperatus* fanden Steglich et al.^[95] bereits 1987 das für den pfefferartigen Geschmack der Fruchtkörper verantwortliche Chalciporon (**122**) und verwandte Verbindungen. Chalciporon ist ein ungewöhnliches 2*H*-Azepin. Die Struktur konnte durch Synthese bestätigt werden.^[96, 97]



Schema 34: Chalciporon (**122**)

Schmidt untersuchte auch den Rohextrakt der Pfefferröhrlingsstiele HPL-chromatographisch und fand Xerocomsäure (**75**), Atromentinsäure (**74**) und Norbadion A (**88**). In den Stielenden ließ sich ein gelber Farbstoff nachweisen, der ein identisches UV/Vis-Spektrum besaß wie SC Gelb I. Nachdem sie sowohl in *Scleroderma citrinum* als auch in *Chalciporus piperatus* Norbadion A und SC Gelb I finden konnte, vermutete sie einen biogenetischen Zusammenhang zwischen diesen beiden Verbindungen.

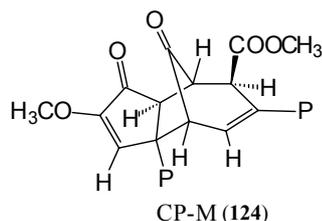
Weitere Untersuchungen zu den Farbstoffen des Pfefferröhrlings führte Gimenez^[98] durch. Er fand zwei gelbe Verbindungen, die er CP-2 (**123**) und CP-3 nannte, wobei erstere ein Nebenpigment sei. Gimenez konnte weder unter EI- noch unter FAB-Bedingungen massenspektrometrische Daten über das Molekül erhalten, verfügte aber über umfangreiches NMR-Datenmaterial. Durch Vergleich der Spektren mit denen des Norbadions A (**88**) und des Badions A (**86**) konnte er zweifelsfrei nachweisen, daß in beiden Verbindungen jeweils zwei Pulvinsäure-Seitenketten vorliegen müssen. CP-2 und CP-3 müßten sich also in dem chiralen Kernstück unterscheiden. Obwohl Gimenez CP-3 als Hauptinhaltsstoff der Pfefferröhrlings beschrieb und zahlreiche NMR-spektroskopische Untersuchungen durchführte, konnte er keinen Strukturvorschlag unterbreiten. Für CP-2 leitete er aus ¹H-, ¹³C- und gekoppelten Spektren folgende vorläufige Struktur ab:



Schema 35: Vorläufiger Strukturvorschlag für CP-2 (**123**) nach Gimenez

Gimenez nimmt eine exocyclische Carbonsäurefunktion an, obwohl dieses Carbonyl-NMR-Signal eindeutig der entsprechenden Pulvinsäureseitenkette zugeordnet werden muß. Spätere Untersuchungen sollten zeigen, daß in CP-2 eine Decarboxylierung stattgefunden hat. Diese Ergebnisse aus ESI-MS-Spektren lagen Gimenez jedoch nicht vor.

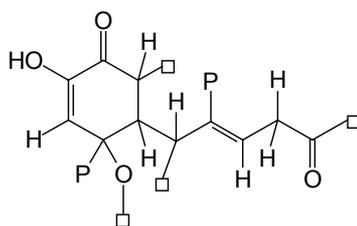
Durch Methylierung von CP-2 (**123**) mit Dimethylsulfat versuchte er, seinen Strukturvorschlag zu bestätigen. Offensichtlich findet dabei jedoch eine Umlagerung statt. Für die methylierte Verbindung CP-M (**124**) leitete er aus COSY, NOESY und ^1H - ^{13}C -Fernkopplungsspektren folgenden Vorschlag ab:



Schema 36: Strukturvorschlag für das Methylierungsprodukt CP-M (**124**) nach Gimenez

Auch bei Methylierung des Hauptfarbstoffes CP-3 soll CP-M (**124**) gebildet werden.

Sontag konnte das Vorliegen zweier Farbstoffe in *Chalciporus piperatus* bestätigen. Er wies nach, daß es sich bei CP-3 und SC Gelb I um identische Verbindungen handelt. Sontag gelang es, ein Massenspektrum von CP-2 zu erhalten. Danach entspricht das Molekülion von CP-2 dem von CP-3 nach Abspaltung von CO₂ [$\Delta(m/z) = 44$]. Während die UV/Vis-Spektren der beiden Verbindungen sehr ähnlich sind, zeigen die CD-Spektren deutliche Unterschiede. Dies könne als weiteres Indiz für eine strukturelle Veränderung gesehen werden. Sontag konnte durch Kombination seiner Ergebnisse mit denen von Gimenez auch für CP-2 einen Partialstrukturvorschlag entwickeln.



Schema 37: Partialstrukturvorschlag für CP-2 nach Sontag

9.5 Isolierung und Strukturaufklärung der Farbstoffe aus *Scleroderma citrinum*, eigene Arbeiten

SC Gelb I wird im folgenden Sclerocitrin (**125**) genannt.

Eine eingehende HPL-chromatographische Untersuchung von Fruchtkörpern des Kartoffelbovistes in verschiedenen Entwicklungsstadien zeigt, daß junge Exemplare (in denen die Gleba noch weißlich ist) vor allem Norbadion A (**88**) enthalten, während in älteren Sclerocitrin die Hauptverbindung ist (vgl. Abb. 3).

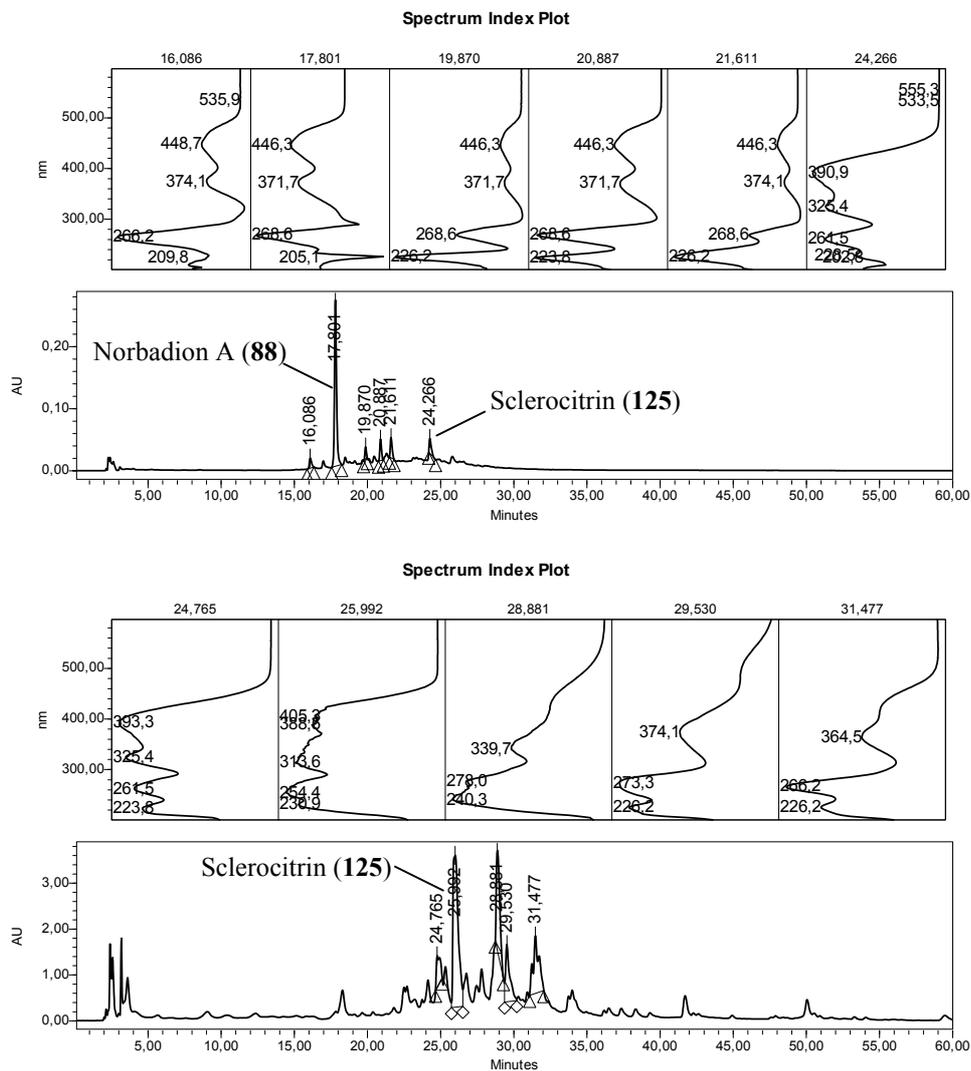


Abbildung 3: HPL-Chromatogramme junger und alter Fruchtkörper von *Scleroderma citrinum* (Trennsystem 1)

Die Aufarbeitung erfolgt analog zu Fugmann^[92] und Sontag.^[93] Frische, reife Fruchtkörper des Kartoffelbovistes werden kleingeschnitten und erschöpfend mit Methanol extrahiert. Der intensiv gelbe Rohextrakt wird eingengt und anschließend zur Abtrennung von Fettsäuren und Sterolen mehrfach mit Wasser gegen Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Die organische

Phase ist nahezu farblos und kann verworfen werden. Die vereinigten Wasserphasen werden vorsichtig mit 2N HCl angesäuert und erneut gegen Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Dabei gehen alle farbigen Verbindungen in die organische Phase über und können problemlos von polaren Substanzen wie Zuckern getrennt werden. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man eine vorgereinigte gelbe, honigartige Substanz, die direkt HPL-chromatographisch feingereinigt werden kann. Dazu wird eine präparative RP-18-Säule mit Wasser-Acetonitril-Laufmittel unter Zusatz von Trifluoressigsäure verwendet.

Sclerocitrin löst sich in Methanol, Acetonitril, DMSO und Aceton. Das UV/Vis-Spektrum in Acetonitril zeigt vier Maxima bei 223, 255, 322 und 388 nm. Der Farbstoff ist optisch aktiv, sein Drehwert beträgt $[\alpha]_D^{22} = -172.5$ ($c = 0.88$, CH_3CN). Das CD-Spektrum weist Cotton-Effekte bei 226, 255, 302, 348 und 410 nm auf.

Die in früheren Untersuchungen abgeleitete Summenformel $\text{C}_{36}\text{H}_{22}\text{O}_{17}$ für Sclerocitrin kann bestätigt werden. Im neg. ESI-MS erhält man für den $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Peak einen Molekülpeak bei $m/z = 725$. Aus der Summenformel errechnet sich die Zahl der Doppelbindungsäquivalente zu 26. Davon entfallen 18 Äquivalente auf die beiden Pulvinsäureseitenketten und acht auf das zentrale chirale Fragment.

Das IR-Spektrum zeigt eine starke Bande bei 3415 cm^{-1} für Valenzschwingungen assoziierter OH-Gruppen, bei 1765 cm^{-1} für ungesättigte Fünfringlactone, bei 1721 cm^{-1} eine Absorption, die bei gesättigten Ketonen auftritt, und bei 1217 cm^{-1} eine für Phenole typische Bande.

Für die NMR-spektroskopische Untersuchung der Verbindung empfiehlt sich $[\text{D}_6]$ Aceton als Lösungsmittel. Auf diese Weise läßt sich eine deutlich bessere Spektrenqualität erzielen als in dem von Sontag und Gimenez verwendeten $[\text{D}_3]$ Acetonitril bzw. $[\text{D}_6]$ DMSO. Wie bereits Sontag beobachtete, sind Verschiebungen und Kopplungskonstanten stark von der Polarität des verwendeten NMR-Lösungsmittels abhängig. In $[\text{D}_3]$ Acetonitril sind alle Signale im ^1H -NMR-Spektrum aufgespalten, in $[\text{D}_6]$ Aceton zeigen einige Signale zwar im COSY eine Korrelation, aber eine zu geringe Aufspaltung im Protonenspektrum, als daß sie nach Multiplikation mit einer Gaußkurve (bei der Auswertung von NMR-Spektren üblich) noch sichtbar wäre. Dennoch ist $[\text{D}_6]$ Aceton als Lösungsmittel zu bevorzugen, vor allem im Hinblick auf die Interpretierbarkeit der HMBC-Spektren.

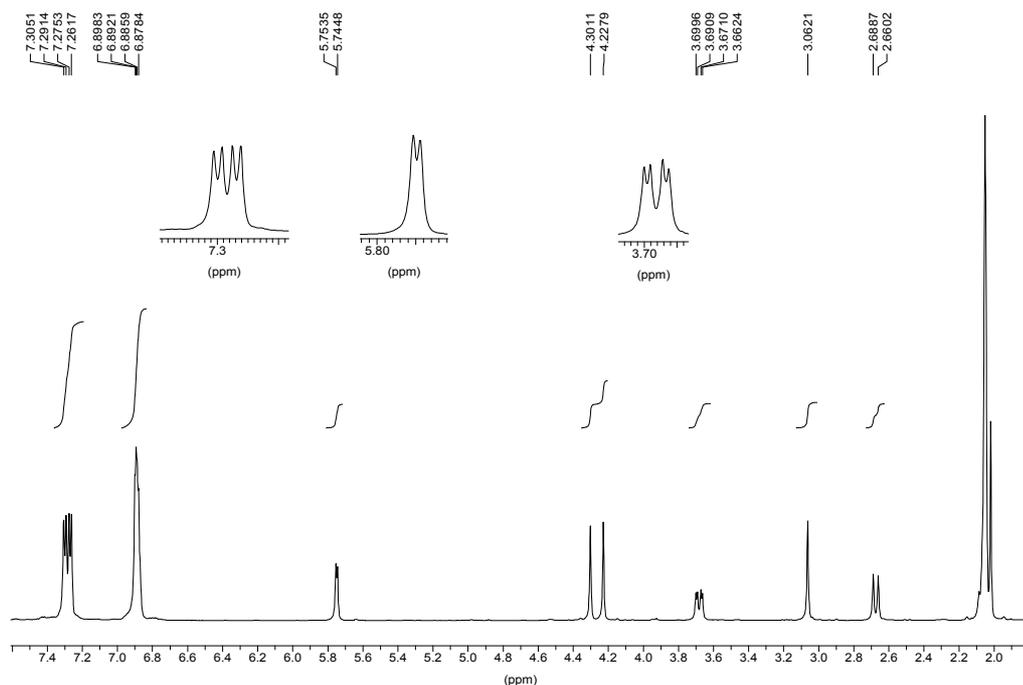


Abbildung 4: ¹H-NMR-Spektrum von Sclerocitrin (**125**), [D₆]Aceton, 600 MHz

Im ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 4) erkennt man - abgesehen von den Signalen der Protonen der *para*-substituierten Aromaten der beiden Pulvinsäurereste - drei Singulets, ein Dublett und ein Dublett von Dubletts im aliphatischen Bereich, ein Dublett bei $\delta_{\text{H}} = 5.75$ und ein Signal, das von denen des Pulvinsäure-Restes überlagert ist (es kann in [D₃]Acetonitril aufgelöst werden und hat dann eine Verschiebung von $\delta_{\text{H}} = 6.78$). Die Signale bei $\delta_{\text{H}} = 2.67/3.68$ gehören zu einer CH₂-Gruppe. Dies zeigt auch das HMQC-Spektrum. Die Konstante der direkten Kopplung beträgt 17.1 Hz. Alle anderen Signale des zentralen Ringsystems sind CH-Gruppen.

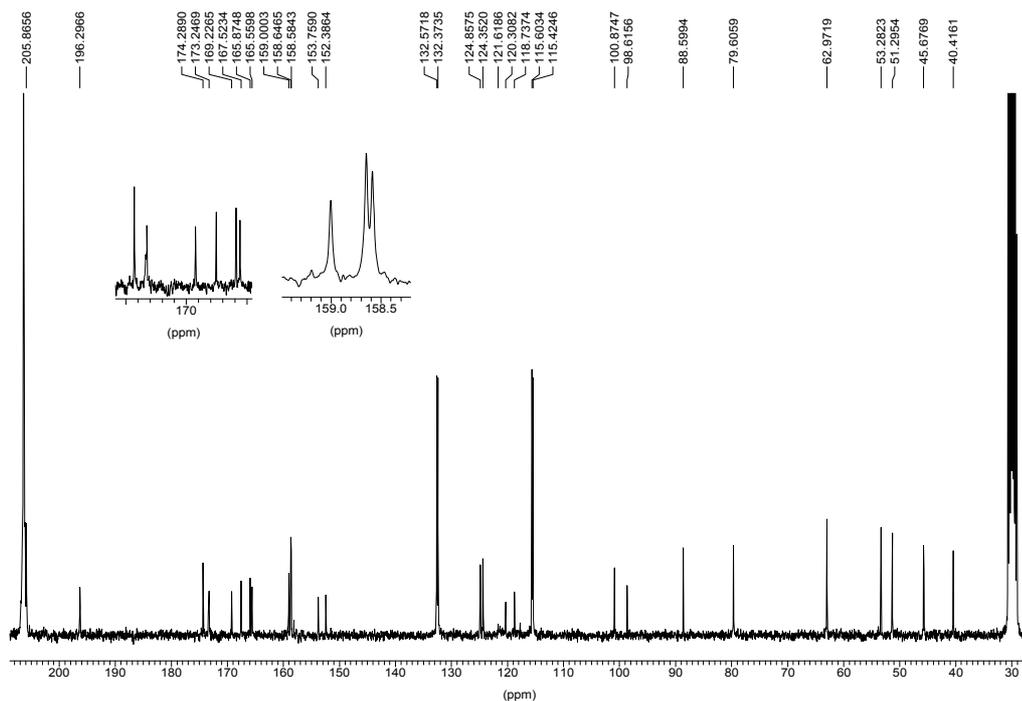


Abbildung 5: ^{13}C -NMR-Spektrum von Sclerocitrin (**125**), $[\text{D}_6]\text{Aceton}$, 151 MHz

Das ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 5) lässt sich ohne Kenntnis der Fernkopplungsdaten nicht auswerten, da einige Kohlenstoffatome der beiden Seitenketten identische Verschiebungen zeigen. Die Aufnahme eines quantitativen ^{13}C -NMR-Spektrums könnte Abhilfe schaffen, ist aber wegen der gut beschriebenen Analytik zahlreicher verwandter Verbindungen nicht erforderlich.^[99] Das HMQC-Spektrum (Abb. 6) erlaubt die Zuordnung der Signale des ^1H - und des ^{13}C -NMR-Spektrums.

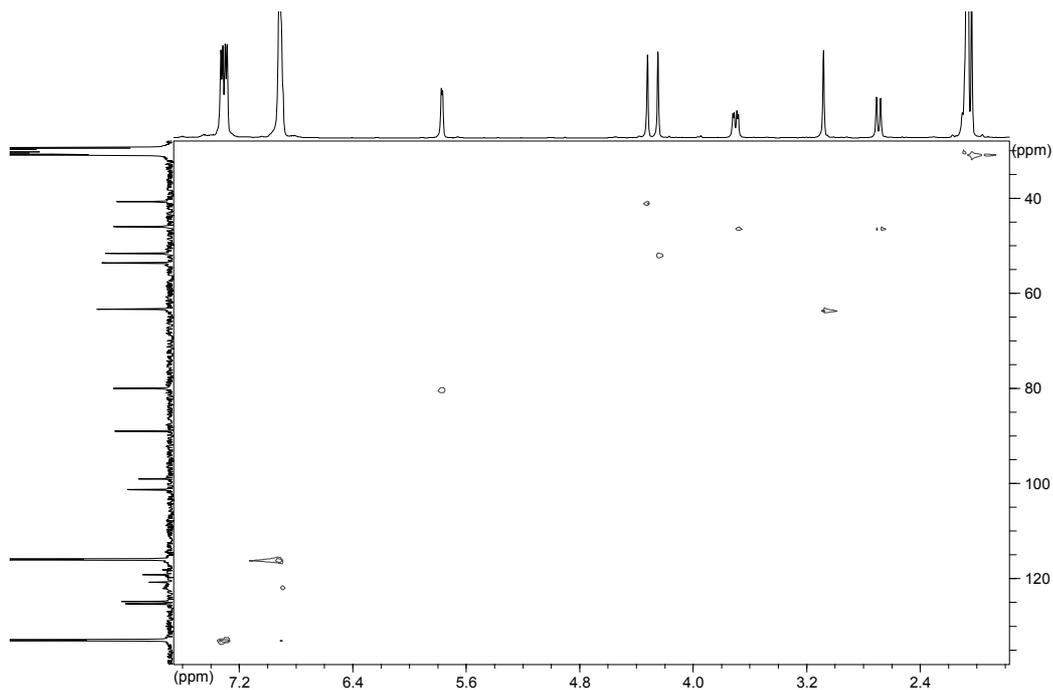


Abbildung 6: HMQC-Spektrum von Sclerocitrin (**125**), [D₆]Aceton, 600/151 MHz

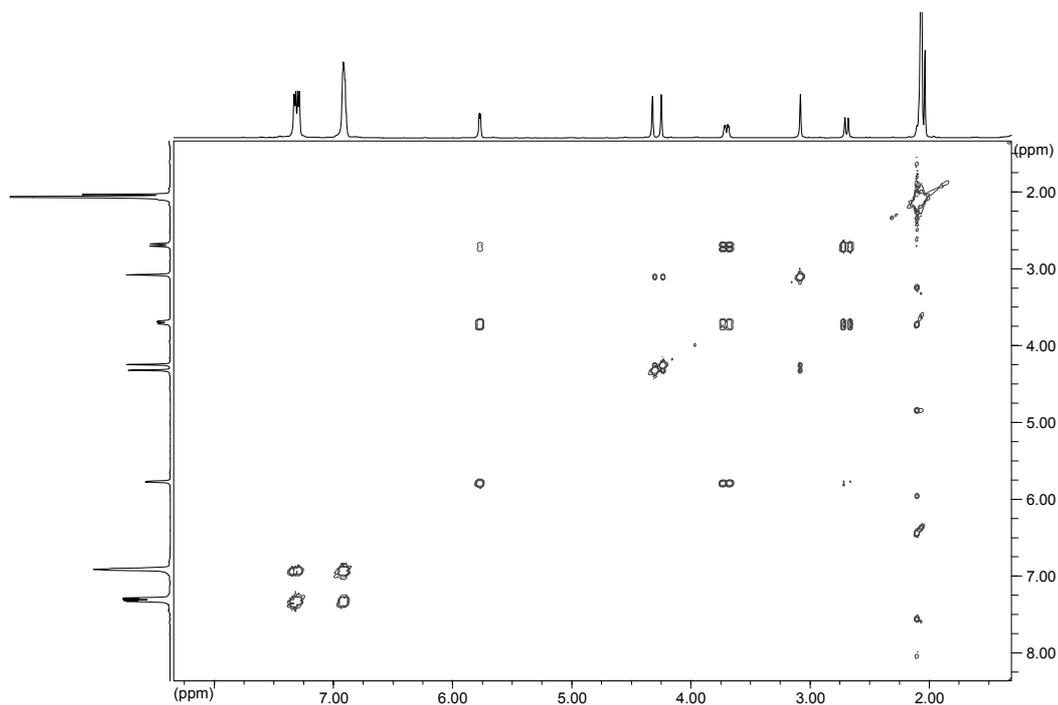


Abbildung 7: COSY von Sclerocitrin (**125**), [D₆]Aceton, 600 MHz

Die CH₂-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 2.67/3.68$ ist direkt benachbart zu einer CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 5.75$. Die Kopplungskonstante beträgt 5.2 Hz. Ferner zeigt das COSY (Abb. 7) Crosspeaks für Protonen, die im ¹H-NMR-Spektrum als Singulets auftreten. Für dieses Phänomen gibt es

zwei mögliche Erklärungen. Erstens kann es sich um sogenannte W-Kopplungen handeln (also Kopplungen über vier Bindungen). Außerdem besteht die Möglichkeit, daß zwei Protonen sich in einem solchen Winkel zueinander befinden, daß die resultierende Kopplungskonstante sehr klein ist (vgl. Karplus-Kurve).^[100] Dies ist für Winkel nahe 90° der Fall. Sontag konnte zeigen, daß in $[D_3]$ Acetonitril eine kleine Aufspaltung zu sehen ist ($J = 0.9$ Hz). Diese Tatsache bestätigt auch die oben formulierte Behauptung, daß das Aufspaltungsmuster von der Polarität des Lösungsmittels abhängig sei. Das Proton bei $\delta_H = 6.88$ zeigt keinen COSY-Crosspeak.

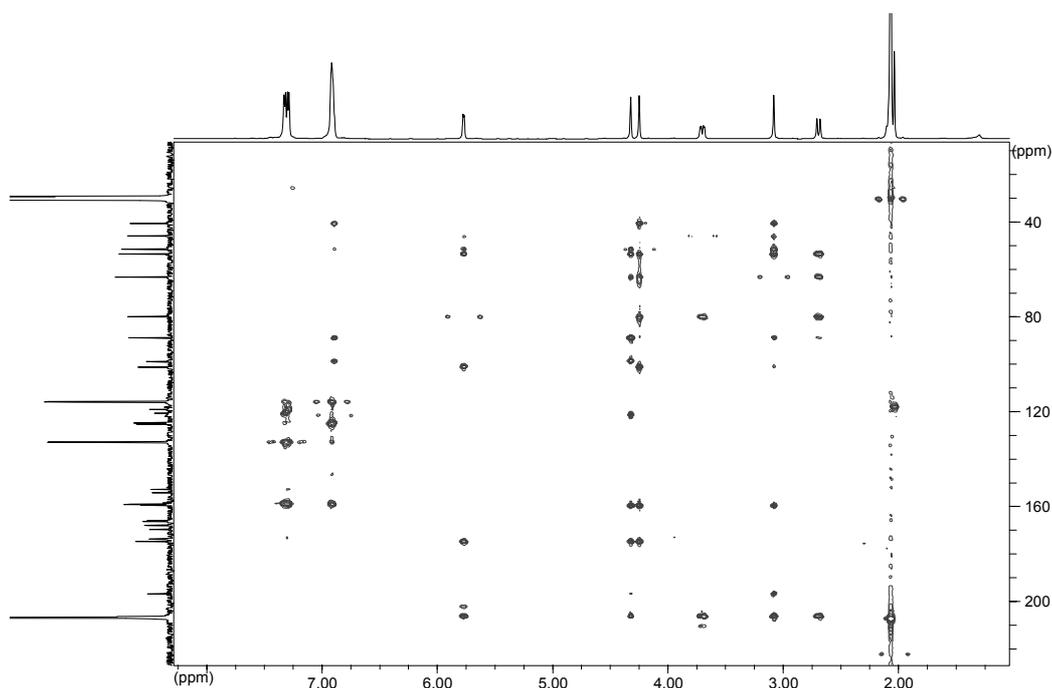


Abbildung 8: HMBC-Spektrum von Sclerocitrin (125), $[D_6]$ Aceton, 600/151 MHz

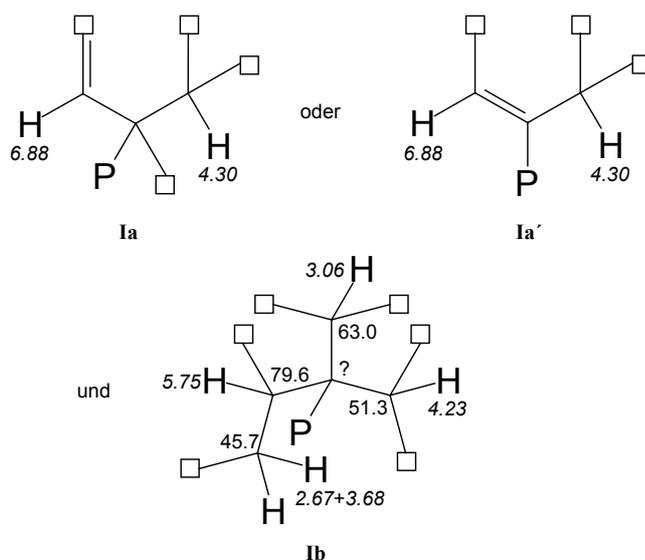
Das HMBC-Spektrum von Sclerocitrin (Abb. 8) zeigt ungewöhnlich viele Korrelationen für das zentrale Ringsystem. Man kann daher annehmen, daß es sich um eine käfigartige Struktur handelt.

C-Atom	δ_C [ppm]	Art	δ_H [ppm]	Multiplizität	J_{HH} [Hz]	$^nJ_{HH}$ -Koppl. δ_H [ppm] COSY	$^nJ_{CH}$ -Koppl. δ_C [ppm] HMBC
7a	40.4	CH	4.30	s		3.06, 4.23	51.3, 53.3, 63.0, 88.6, 98.6, 121.6, 159.0, 173.2, 205.9
3	45.7	CH ₂	2.67 3.68	d dd	17.1 17.1, 5.2	5.75	53.3, 63.0, 79.6, 205.9
7b	51.3	CH	4.23	s		3.06, 4.30	40.4, 53.3, 63.0, 79.6, 100.9, 159.0, 173.2
7c	53.3	C _q					
4a	63.0	CH	3.06	s		4.23, 4.30	40.4, 45.7, 51.3, 53.3, 88.6, 100.9, 159.0, 196.3, 205.9
2a	79.6	CH	5.75	d	5.2	(2.67)/3.68	51.3, 53.3, 100.9, 173.2, 205.9
4b	88.6	C _q					
2''	98.6	C _q					
2'	100.9	C _q					
9''	115.4	CH	6.89	br		7.27	124.9, 132.6, 158.6
9'	115.6	CH	6.90	br		7.30	124.4, 132.4, 158.6
5'	118.7	C _q					
5''	120.3	C _q					
6	121.6	CH	6.88	s			40.4, 88.6, 98.6, 159.0
7'	124.4	C _q					
7''	124.9	C _q					
8'	132.4	CH	7.30	"d"	8.2	6.90	115.6, 118.7, 158.6
8''	132.6	CH	7.27	"d"	8.2	6.89	115.4, 120.3, 158.6
4'	152.4	C _q					
4''	153.8	C _q					
10'	158.6	C _q					
10''	158.6	C _q					
7	159.0	C _q					
3'	165.6	C _q					
3''	165.9	C _q					
1'	167.5	C _q					
1''	169.2	C _q					
1	173.2	C=O					
6'	174.3	C=O					
6''	174.3	C=O					
5	196.3	C=O					
4	205.9	C=O					

Tabelle 2: NMR-Daten von Sclerocitrin (125)

Aus der für das zentrale Fragment berechneten Summenformel $C_{12}H_8O_5$ lassen sich in Kombination mit den 2D-NMR-Daten folgende Aussagen treffen.

- Es existieren mindestens vier Doppelbindungen: eine olefinische CH-Gruppe bei $\delta_H = 6.88$ und $\delta_C = 121.6$ und ein quartäres Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 159.0$, eine Esterfunktion bei $\delta_C = 173.2$ sowie zwei Ketogruppen bei $\delta_C = 196.3$ und $\delta_C = 205.9$.
- Aus der Differenz der Doppelbindungsäquivalente und der Doppelbindungen errechnet sich eine Zahl von vier Ringen. Ein stark verzweigtes System erscheint plausibel bei den vielen beobachteten Fernkopplungen im HMBC-Spektrum. Als Verknüpfungspunkte zweier Ringe eignen sich die CH-Gruppen bei $\delta_C = 40.4$, 51.3 , 63.3 und 79.6 sowie die quartären Kohlenstoffatome bei $\delta_C = 53.3$ und 88.6 . An diesen Stellen sollte eine besonders große Zahl von Fernkopplungen auftreten. Diese Überlegung bestätigt sich bei der Auswertung des HMBC-Spektrums.
- Die Lage der beiden Pulvinsäureseitenketten (P) im Molekül läßt sich gut anhand der Fernkopplungen der Protonen des zentralen Ringsystems zu den Kohlenstoffatomen C-2 des Lactonringes der Seitenketten (vgl. Schema 32) bestimmen. In einem Fall beobachtet man eine Kopplung des Protons bei $\delta_H = 4.30$ und desjenigen bei $\delta_H = 6.88$ zu dem Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 98.6$. Im anderen Fall lassen sich drei Protonen erkennen, die einen Crosspeak zu dem C-Atom bei $\delta_C = 100.9$ erzeugen: $\delta_H = 3.06$, 4.23 und 5.75 . Aus diesen Erkenntnissen lassen sich die ersten Strukturfragmente ableiten.

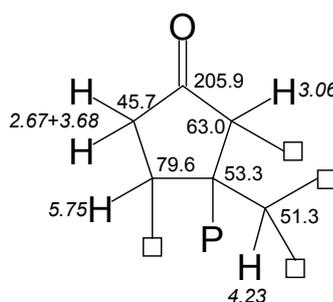


Schema 38: Strukturfragmente I für Sclerocitrin

Alle in Strukturfragment Ib (Schema 38) vorhandenen CH-Gruppen und die CH₂-Gruppe zeigen eine Kopplung zu dem ^{13}C -Signal bei $\delta_C = 53.3$. Daher ist es sehr wahrscheinlich, daß

dies eine dem C-2'-Atom des Pulvinsäurerestes benachbarte Position im zentralen Ring hat (in Schema 38 mit einem Fragezeichen gekennzeichnet).

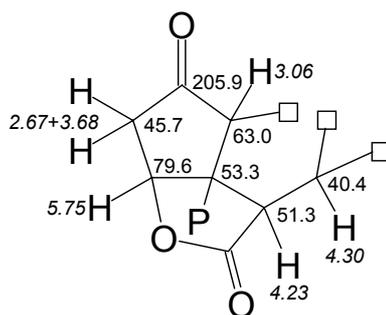
Die in Strukturfragment Ib abgebildete CH₂-Gruppe koppelt nur zu der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 5.75$ (ein direkter Nachbar, vgl. Schema 38). Der andere direkte Nachbar kann keine CH-Gruppe sein, sondern ist wahrscheinlich die Ketofunktion bei $\delta_{\text{C}} = 205.9$. Dies ist die einzige Fernkopplung der Protonen der CH₂-Gruppe zu einem quartären Kohlenstoffatom (abgesehen von der Kopplung zu dem C-Atom, das durch den Pulvinsäurerest substituiert ist). Auch die benachbarte CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 5.75$ koppelt zu dieser Ketofunktion bei $\delta_{\text{C}} = 205.9$. Ferner zeigt die CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.06$ eine Korrelation zu einem C-Atom bei $\delta_{\text{C}} = 205.9$. Aus Fragment Ib ergibt sich folgender Strukturvorschlag (Schema 39) für einen der vier Ringe im zentralen System des gelben Farbstoffes:



Schema 39: Strukturfragment II für Sclerocitrin

Aus der Lage des ¹³C-Signals der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 79.6$ läßt sich schließen, daß ein Sauerstoff-Atom direkt benachbart ist. Dieses Sauerstoffatom könnte Teil einer Estergruppe sein, da das Proton der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 79.6$ eine Kopplung zu dem C-Atom bei $\delta_{\text{C}} = 173.2$ aufweist. Zu letzterem Kohlenstoffatom koppeln auch die beiden Protonen der CH-Gruppen bei $\delta_{\text{C}} = 51.3$ und 40.4 . Diese beiden CH-Gruppen scheinen direkt benachbart zu sein. Dafür sprechen mehrere Argumente: sie zeigen eine Korrelation im COSY und sie koppeln beide zu den C-Atomen bei $\delta_{\text{C}} = 53.3$, 63.0 und 159.0 . Der Winkel zwischen den beiden Wasserstoffatomen muß folglich nahe 90° sein (vgl. Beschreibung der Spektren). Um alle Kopplungen zu der Esterfunktion bei $\delta_{\text{C}} = 173.2$ erklären zu können, kann man annehmen, daß sich ein Lactonring zwischen der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 79.6$ und der bei $\delta_{\text{C}} = 51.3$ gebildet hat. Generell erwartet man in IR-Spektren Banden für gesättigte Fünfringlactone bei 1775 cm^{-1} . Durch die stark ausgeprägten Banden der Schwingungen der beiden ungesättigten Fünfringlactone (Pulvinsäureseitenketten) kann jedoch aus dem IR-Spektrum des Sclerocitrins keine eindeutige Aussage getroffen werden.

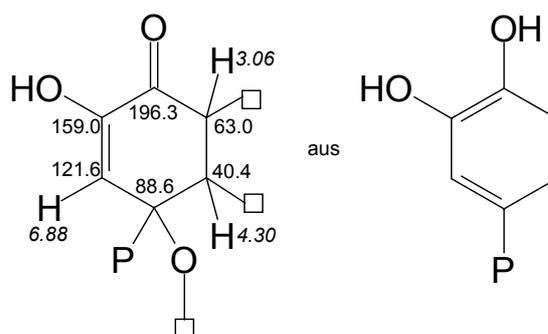
Schema 40 zeigt die so ermittelte Teilstruktur:



Schema 40: Strukturfragment III für Sclerocitrin

In obiger Teilstruktur sind bereits acht der zwölf Kohlenstoffatome des zentralen Ringsystems berücksichtigt.

Schwieriger gestaltet sich die Aufklärung des zweiten Teiles dieses zentralen Fragmentes. Sontag nahm dafür einen substituerten Cyclohexanonring an (Schema 41):



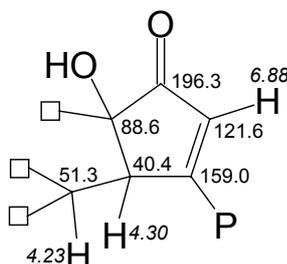
Schema 41: Vorschlag zur zweiten Strukturhälfte von Sclerocitrin nach Sontag

Dieser Vorschlag erscheint zunächst sehr plausibel. Die Teilstruktur kann man sich direkt von der Xerocomsäure (**75**) abgeleitet denken, ist also biosynthetisch sinnvoll, da man davon ausgehen kann, daß in dem Farbstoff zwei Bausteine Xerocomsäure verknüpft sind. Das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 6.88$ koppelt zu den Kohlenstoffatomen bei $\delta_{\text{C}} = 40.4$, 88.6 und 159.0 , das bedeutete zwei 3J - und eine 2J -Korrelation. Auch die Fernkopplungen der beiden Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 3.06$ und 4.30 widersprechen nicht diesem Teilstrukturvorschlag. Dennoch stimmt diese Annahme nicht, denn es ergeben sich folgende Unstimmigkeiten:

- Die Teilstruktur enthält zu viele Sauerstoffatome, die sich nicht sinnvoll in das Ringsystem einfügen lassen.
- Trotz Variation des NMR-Lösungsmittels läßt sich keine Keto-Enol-Tautomerie bei den Positionen $\delta_{\text{C}} = 121.6$ und $\delta_{\text{C}} = 159.0$ erkennen. Eine weitere CH_2 -Gruppe tritt in keinem der Spektren auf.

- Aus verschiedenen Gründen ist es möglich, daß 2J -Kopplungen in HMBC-Spektren nicht sichtbar sind.^[101] Daß man - wie im Falle des Protons bei $\delta_H = 6.88$ - eine 2J - und nicht die entsprechende 3J -Kopplungen beobachtet, ist sehr unwahrscheinlich. Also sollte das C-Atom bei $\delta_C = 88.6$ nicht der direkte Nachbar der CH-Gruppe bei $\delta_C = 121.6$ sein.
- Das Proton bei $\delta_H = 4.30$, das dem bei $\delta_H = 4.23$ benachbart sein sollte, weist eine HMBC-Kopplung zu dem C-Atom bei $\delta_C = 159.0$ auf (s. o.). Das bedeutete hier eine 5J -Korrelation und wäre auch sehr ungewöhnlich.

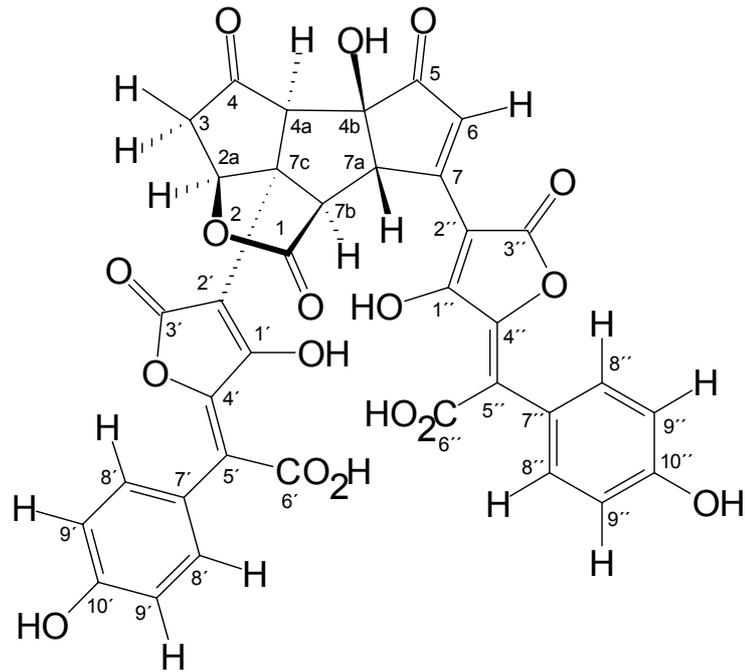
Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß nicht das Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 88.6$ durch den Pulvinsäurerest substituiert ist, sondern vielmehr das bei $\delta_C = 159.0$. Der Tieffeldshift dieses Signales erklärt sich also nicht durch einen Sauerstoffsubstituenten, sondern durch die benachbarte Enolfunktion. Nun läßt sich das Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 88.6$ so anordnen, daß eine plausible 3J -Kopplung des Protons bei $\delta_H = 6.88$ möglich ist. Dies geschieht, indem die Ketofunktion bei $\delta_C = 196.3$ die direkt benachbarte Position zur olefinischen CH-Gruppe einnimmt. Durch diese Umordnung entfällt auch das Problem der fehlenden Keto-Enol-Tautomerie. Die zweite Teilstruktur lautet nun:



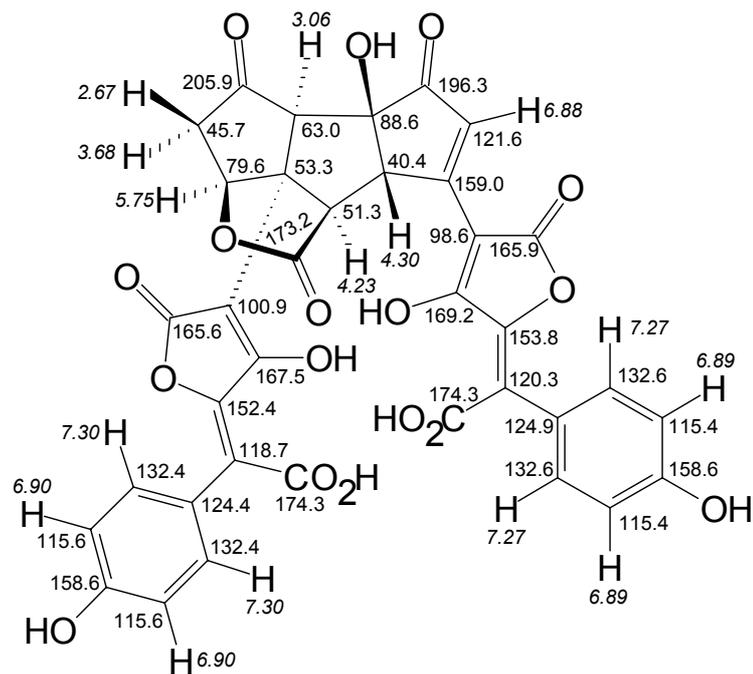
Schema 42: Strukturfragment IV für Sclerocitrin

Diese Anordnung konnte durch die Ergebnisse eines ACCORD-Spektrums untermauert werden, das es erlaubt, zwischen 2J - und 3J -Korrelationen zu unterscheiden. Dieses Spektrum wurde durch die Firma Bruker AG, Karlsruhe aufgenommen.^a Die direkten Verknüpfungen C-1/C-7b, C-2a/C-3, C-3/C-4, C-4/C-4a, C-4a/C-4b, C-4b/C-7a, C-7/C-7a, C-7a/C-7b, C-7b/C-7c (Numerierung der C-Atome s. Schema 43) konnten so bestätigt werden. Die beiden Teilstrukturen lassen sich zu einer Gesamtstruktur zusammenfügen, in der alle NMR-Verschiebungen sinnvoll erscheinen, keine widersprüchliche Fernkopplung auftritt und die in Übereinstimmung mit den massenspektrometrischen Untersuchungen steht.

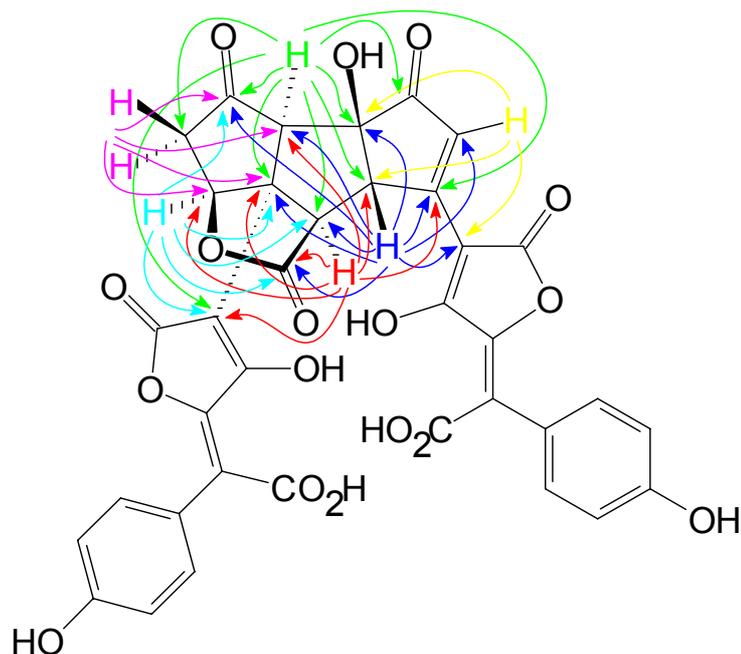
^a Ich danke Herrn Dr. B. Steffan herzlich für die Vermittlung dieser wichtigen Messung.



Schema 43: Struktur von Sclerocitrin (**125**) mit Numerierung



Schema 44: Struktur von Sclerocitrin (**125**) mit NMR-Verschiebungen



Schema 45: Struktur von Sclerocitrin (125) mit HMBC-Korrelationen

9.6 Die relative Stereochemie von Sclerocitrin (125): molecular modeling

Mit MacroModel[®] wurde unter Verwendung eines Amber-Kraftfeldes eine Optimierung von Sclerocitrin durchgeführt.^[102] Die Berechnung lieferte ein eindeutiges Ergebnis, was die räumliche Anordnung des zentralen Ringsystemes (Triquinan und ungesättigtes Lacton) anbelangt (Abb. 9). Die etwa zweihundert energieärmsten Strukturen unterscheiden sich dabei nur in der Stellung der beiden Pulvinsäureseitenketten zueinander bzw. zum zentralen Fragment.

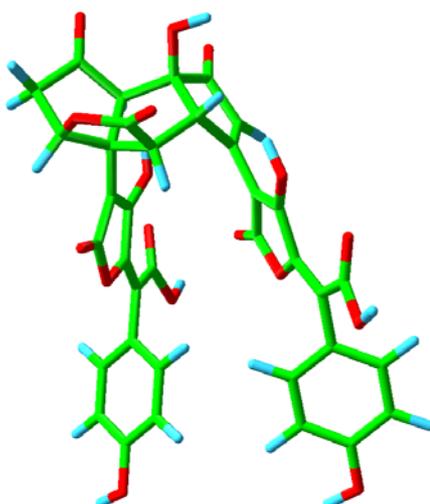


Abbildung 9: MacroModel[®]-Optimierung von Sclerocitrin

Das Ergebnis der MacroModel-Rechnung steht im Einklang mit den beobachteten ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten und NMR-Verschiebungen:

- Das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 5.75$ und ein Proton der CH_2 -Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.68$ zeigen eine gemeinsame Kopplungskonstante von 5.2 Hz, weil der Diederwinkel nahe 0° liegt, während zwischen dem Proton bei $\delta_{\text{H}} = 5.75$ und dem anderen Proton der CH_2 -Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 2.67$ keine bzw. nur eine sehr kleine Kopplung (Diederwinkel $\sim 90^\circ$) zu sehen ist.
- Das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 3.06$ und das bei $\delta_{\text{H}} = 4.23$ zeigen im COSY eine Korrelation, weil aufgrund der Anordnung eine W-Kopplung möglich ist. Ferner ist ein Kern-Overhauser-Effekt zu sehen, die Protonen müssen *cis*-angeordnet sein.
- Die Signale der Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 4.23$ und $\delta_{\text{H}} = 4.30$ sind im ^1H -NMR-Spektrum nicht aufgespalten, obwohl sie vicinal angeordnet sind. Dies läßt sich nur durch eine *trans*-Stellung erklären, der Diederwinkel ist so nahe 90° . Auch das NOE-Spektrum bestätigt diese Aussage, das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 4.30$ zeigt keinen Kern-Overhauser-Effekt zu dem bei $\delta_{\text{H}} = 3.06$.
- Die angulären Wasserstoffatome zeigen sehr unterschiedliche Verschiebungen. Der Tieffeldshift des Protons bei $\delta_{\text{H}} = 4.30$ ist durch die Nachbarschaft zweier Sauerstoffatome an der β -Seite des Moleküls (CO-Gruppe des Lactons und C-OH-Gruppe) zu erklären. Auch das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 4.23$ befindet sich im Anisotropiekegel mehrerer Sauerstoffatome der Lactonringe der Pulvinsäure-Seitenketten. Dagegen wird das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 3.06$ an der α -Seite nicht so stark entschirmt, weil sich keine Sauerstofffunktion in größerer Nähe befindet. Auch der Vergleich mit ähnlichen Ringsystemen bestätigt die Anordnung des Triquinans in Sclerocitrin.^[103]

Im Fall von Bicyclo[3.3.0]octan ist das *cis*-Isomer 25 kJ/mol energieärmer als die *trans*-Verbindung.

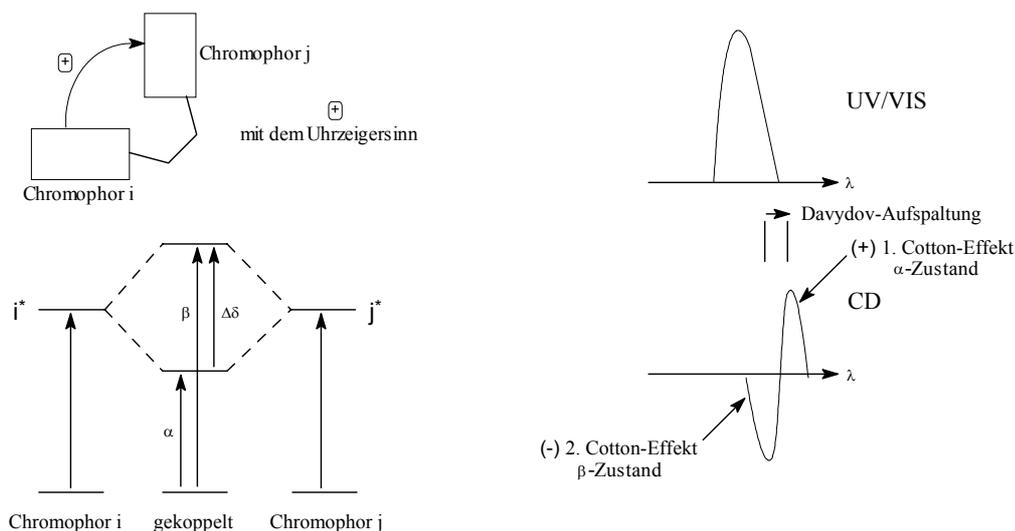
Lactonring, linker und mittlerer Fünfring können nur die dargestellte konkave Anordnung einnehmen. Sind die drei angulären Protonen sowie der Pulvinsäurerest nicht *cis*-ständig, kann sich der Lactonring nicht ausbilden.

So nimmt das Triquinan-System in Sclerocitrin eine *cis-anti-cis*-Anordnung ein.

Ferner können nur für die dargestellte Anordnung beide "Pulvinsäurearme" zur Komplexbildung dienen (vgl. hierzu auch Kapitel 9.8).

9.7 Voraussage der absoluten Stereochemie nach Nakanishi

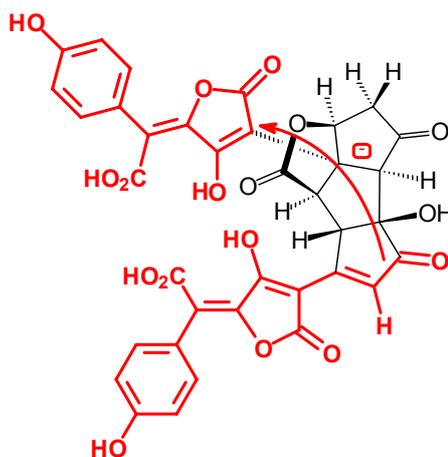
Nakanishi und Harada^[104, 105] entwickelten die "Exciton Chirality Method" auf Grundlage der nicht empirischen Oszillator-Theorie, um die absolute Stereochemie organischer Verbindungen anhand der UV/Vis- und CD-Spektren zu bestimmen. Sie fanden, daß die elektrischen Übergangsmomente zweier benachbarter Chromophore in einem chiralen System räumlich wechselwirken, so daß sich das Energieniveau des angeregten Zustandes aufspaltet. Dabei müssen die beiden Chromophore nicht gleich sein. Die Dipol-Dipol-Wechselwirkung im sogenannten α -Zustand ist stabilisierend, im β -Zustand destabilisierend. Das Ergebnis dieser physikalischen Erscheinung spiegelt sich in den UV/Vis- und CD-Spektren wieder. Der Energieunterschied zwischen α - und β -Zustand, die sogenannte Davydov-Aufspaltung, läßt sich aus dem Wellenlängenunterschied zwischen dem positiven (α -Zustand) und dem negativen (β -Zustand) Cotton-Effekt bestimmen. Legt man in Gedanken eine Verbindungslinie zwischen den am nächsten benachbarten Atomen der beiden chromophoren Systeme, so kann man von dem in der Beobachtungsebene "vorderen" Chromophor je nach absoluter Stereochemie entweder mit oder gegen den Uhrzeigersinn zu dem "hinteren" Chromophor gelangen (dabei wird der Weg des kleineren Winkels beschriftet). Im ersten Fall wird man im CD-Spektrum einen positiven ersten Cotton-Effekt (der erste Cotton-Effekt ist der mit der größten Wellenlänge), im zweiten einen negativen ersten Cotton-Effekt beobachten.



Schema 46: Schematische Darstellung zur "Exciton Chirality Method"

Die Zuverlässigkeit dieser Voraussagen belegen unzählige Beispiele in der Literatur.^[106-108] Die Vorhersagen sind dann besonders sicher, wenn der Aufspaltung im CD-Spektrum nur ein und nicht mehrere UV/Vis-Übergänge zugrunde liegen, die Davydov-Aufspaltung also nicht

besonders groß ist.^[109] Für Sclerocitrin beobachtet man das langwelligste UV/Vis-Maximum bei 388 nm. Im CD-Spektrum erkennt man den ersten Cotton-Effekt bei 411 nm, den zweiten bei 350 nm. In diesem Wellenlängenbereich ist keine Überlagerung zu erwarten. Nachdem der erste Cotton-Effekt negativ ist, müßte man nach Nakanishi eine "negative Chiralität" erwarten, also einen Übergang gegen den Uhrzeigersinn vom einen zum anderen Chromophor. Auf diese Weise läßt sich zeigen, daß das oben gezeigte Spiegelbildisomere die richtige absolute Stereochemie darstellt. Diese Betrachtung läßt sich am besten an einem Molekülmodell nachvollziehen.

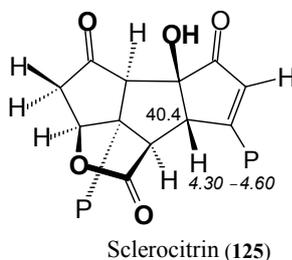


Schema 47: Anwendung der "Exciton Chirality Method" auf Sclerocitrin

9.8 Komplexierung von Alkalimetallen durch Sclerocitrin (125)

Nach dem Tschernobyl-Unfall konnten Steglich et al.^[110] anhand von radioaktivem Cäsium zeigen, daß Badion A (**86**) und Norbadion A (**88**) Komplexbildungsaffinität für Alkalimetall-Kationen besitzen. In der braunen Huthaut von *Xerocomus badius*, die Badion A und Norbadion A enthält, fanden sie eine im Vergleich zum Rest des Fruchtkörpers 3.4-fache Anreicherung von ¹³⁷Cs. In der eng verwandten Art *Boletus edulis* (Steinpilz), wo sich keine der beiden Verbindungen nachweisen läßt, konnten sie nur eine Anreicherung von 0.6 feststellen. Atromentinsäure (**74**) und Xerocomsäure (**75**) zeigten ebenfalls eine deutlich niedrigere Affinität zu ¹³⁷Cs. Dies läßt folgenden Schluß zu: die dimeren Xerocomsäurederivate sind offenbar in der Lage, über ihre beiden "Pulvinsäurearme" Alkalimetallionen zu komplexieren, während dies bei monomeren Verbindungen wie Atromentinsäure nicht oder nur schlecht möglich ist. Neuere Untersuchungen bestimmen die Komplexbildungskonstanten von dimeren Pulvinsäurederivaten für Cäsiumkationen.^[111, 112] LeGall et al.^[113] fanden bei Zugabe von Cäsiumchlorid zu einer methanolischen Lösung des

Dikaliumsalzes von Norbadion A, daß sich zunächst ein mononuclearer, dann ein binuclearer Cäsiumkomplex bildet. So traten im ESI-Massenspektrum der $[M+2 K+Cs]^+$ - und der $[M+K+2 Cs]^+$ -Peak auf. Sie untersuchten auch die Bindungsselektivität von Norbadion A für Na^+ -, K^+ - und Cs^+ -Ionen und stellten fest, daß in Anwesenheit äquimolarer Mengen der drei Kationen sich 60% Cäsium-, 24% Kalium- und 16% Natriumkomplex bildet. Dieses Erkenntnis könnte große praktische Bedeutung erlangen. So versuchten Macias et al.^[114], ^{137}Cs aus radioaktivem Abfall abzutrennen, auch die Entfernung des Cäsium-Kations aus kontaminierten Personen wäre von großem Interesse.^[115] Es ist auffällig, daß der Kartoffelbovist vor allem auf sehr nährstoffarmen Böden wächst. Was den Pfefferröhrling betrifft, so findet man Sclerocitrin (**125**) und Chalcitrin (**169**) nur in den Stielen und nicht im Hut des Pilzes. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß Verbindungen wie Sclerocitrin, Chalcitrin und Norbadion A über ihre Pulvinsäureseitenketten der Mineralstoffspeicherung dienen. Diese Tatsache erschwerte lange Zeit die Strukturaufklärung des Sclerocitrins. Obwohl ausreichend Substanz für ein INADEQUATE-Experiment vorhanden war, konnte kein gutes Signal/Rausch-Verhältnis in konzentrierten Proben erreicht werden. Vermutlich durch Clusterbildung war eine starke Linienverbreiterung zu beobachten. Eine NMR-spektroskopische Besonderheit des Sclerocitrins ist die Verschiebung des Protons der CH-Gruppe bei $\delta_C = 40.4$. Sie ist in Kapitel 9.5 mit $\delta_H = 4.30$ angegeben, kann aber um bis zu 0.3 ppm zu tiefem Feld differieren. Auch hier ist eine Abhängigkeit von der Alkalimetallionen-Komplexierung zu vermuten. Möglicherweise ist auch das zentrale Ringsystem dazu in der Lage, Metallionen zu komplexieren. Die konkave, mit zahlreichen Sauerstoff-Atomen substituierte Struktur des Sclerocitrins läßt - im Vergleich zum flachen Naphthalin-System in Norbadion A - auf eine erhöhte Affinität zu Alkalimetallionen schließen. Folgende Abbildung verdeutlicht diese Situation, die nach oben gerichteten Sauerstoff-Funktionen sind hervorgehoben.



Schema 48: Mögliche Metallionen-Komplexierung durch auf der β -Seite liegende Sauerstoff-Funktionen (fett) in Sclerocitrin (**125**) und deren Einfluß auf die NMR-Verschiebung einzelner Protonen

Vermutlich ist von der β -Seite des Moleküls eine Metallionen-Komplexierung denkbar, die sich auf die Verschiebung des Protons auswirkt.

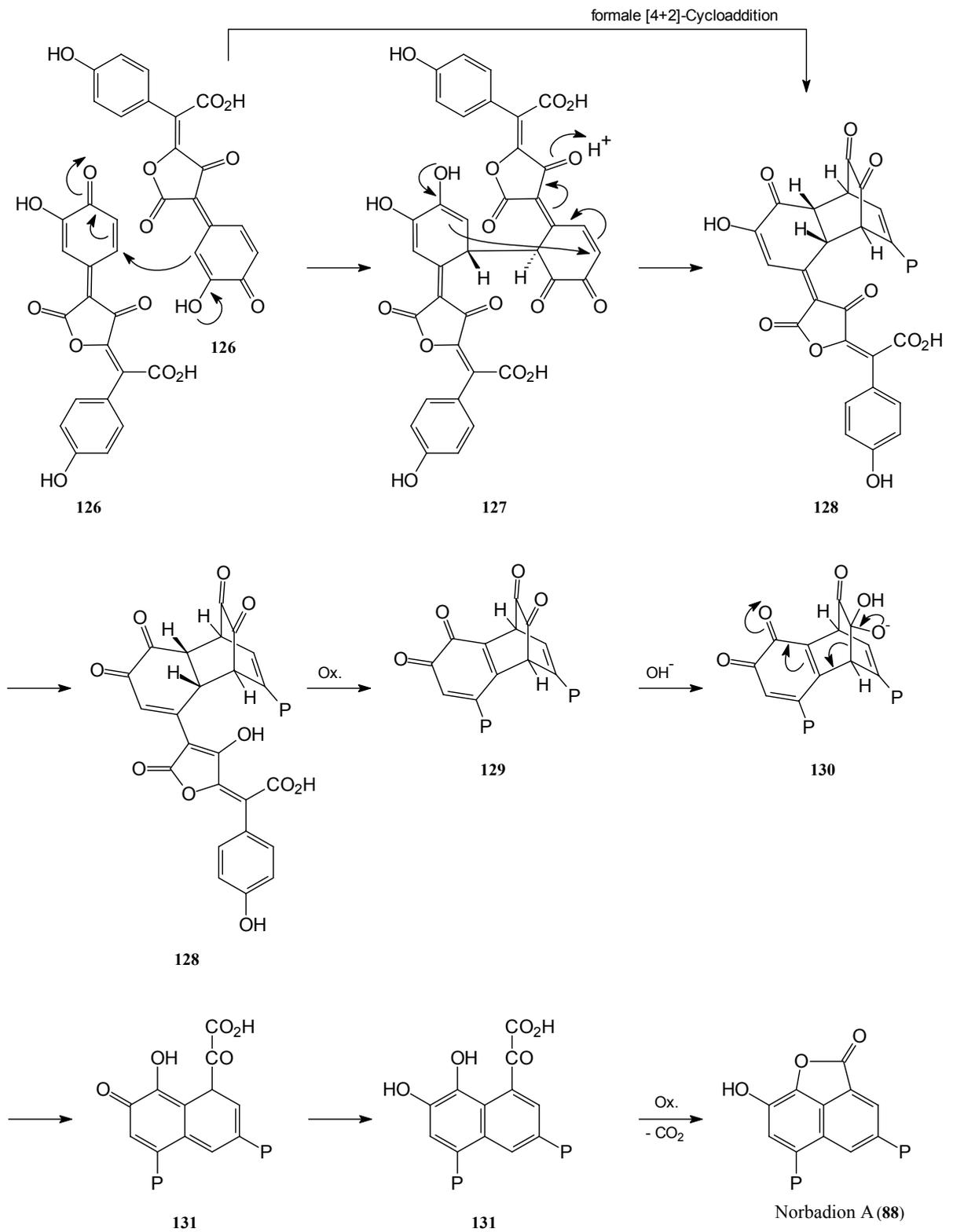
9.9 Überlegungen zur Biosynthese von Sclerocitrin (125)

In jungen Fruchtkörpern von *Scleroderma citrinum* findet man vor allem Norbadion A (88) und kaum Sclerocitrin (125); aus reifen Exemplaren, in denen die Sporenmasse schwarzviolett scheint, lassen sich erhebliche Mengen Sclerocitrin isolieren. Man kann daher annehmen, daß die beiden Farbstoffe ausgehend von gleichen Vorläufern wenig unterschiedlichen Biosynthesewegen entstammen. Fruchtkörper von *Chalciporus piperatus* enthalten in sämtlichen Entwicklungsstadien deutlich geringere Mengen Norbadion A.

9.9.1 [4+2]-Route

Steglich und Huppertz^[116] konnten durch eine Modellsynthese den Verlauf der Biosynthese des Norbadions A stützen. Hierbei dimerisieren zwei oxidierte Xerocomsäure-Moleküle 126 unter zweimaligem Angriff einer enolischen Doppelbindung an einen Michael-Akzeptor (126 zu 127 zu 128) im Sinne einer [4+2]-Cycloaddition. Das oxidierte Diels-Alder-Produkt 129 unterliegt dann im basischen Milieu einer Grob-Fragmentierung und cyclisiert anschließend oxidativ unter CO₂-Abspaltung zu Norbadion A.

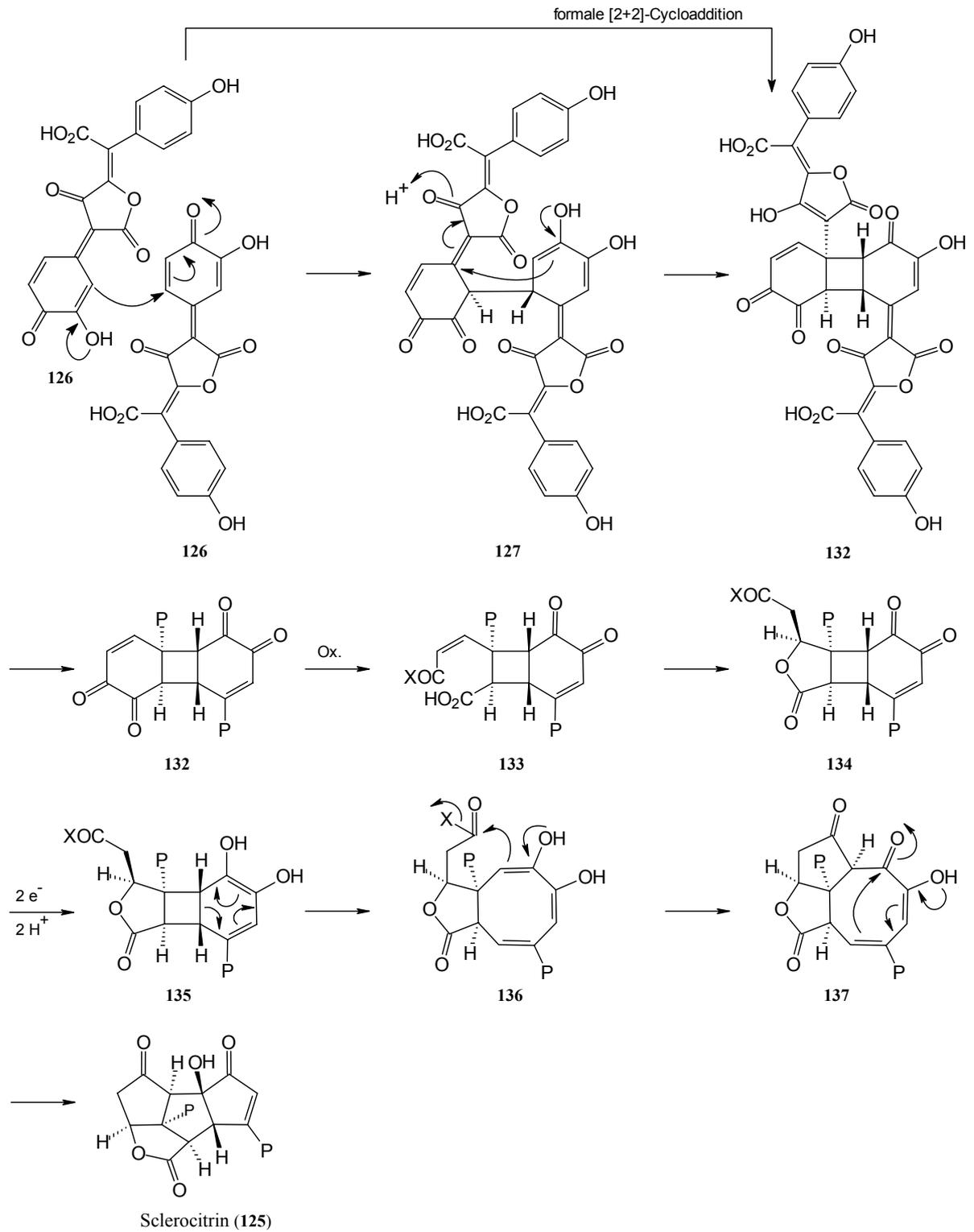
Auch *in vivo* kann die Biosynthese solcher Verbindungen demonstriert werden. Entfernt man ein Stück Huthaut des Maronenröhrlings und bringt eine wäßrige Xerocomsäurelösung auf, so sieht man nach einigen Stunden anstelle der gelben Farbe der Xerocomsäure einen braunen Fleck. Dabei handelt es sich um Badion A (86).^[32]



Schema 49: Vermutlicher Verlauf der Biosynthese von Norbadion A (**88**); P = Pulvinsäurerest

9.9.2 [2+2]-Route

Das zentrale Ringsystem von Sclerocitrin (**125**) deutet auf einen anderen Biosyntheseweg hin, der ebenfalls von oxidiertem Xerocomsäure (**126**) ausgeht. Hierfür kann eine kompliziertere, verschiedene Cycloadditionen und Cycloreversionen umfassende Route formuliert werden (Schema 50). Schlüsselschritt bei diesem Vorschlag ist eine formale [2+2]-Cycloaddition, die als Folge zweier Michael-Additionen (**126** zu **127** zu **132**) formuliert werden kann. Durch oxidative Spaltung eines der beiden Endione und intramolekulare Addition des Carboxylats an die aktivierte Doppelbindung der linken Molekülhälfte in **133** entsteht der Lactonfünfring des Sclerocitrins. Nach Reduktion des zweiten 1,2-Diketons **134** zum Endiol **135** (oder einem entsprechenden Dienolat) erfolgt unter Verlust der Vierringspannung eine elektrocyclische 6π -Ringöffnung zum Cyclooctatrien **136**. Kaskadenartig folgt eine Enol-Acylierung unter Ausbildung des Cyclopentanonringes. Im so entstehenden Enol **137** sind die funktionellen Gruppen ideal angeordnet für die abschließende transannulare vinyloge Aldoladdition, wobei das thermodynamisch günstigere tetracyclische System des Sclerocitrins entsteht.



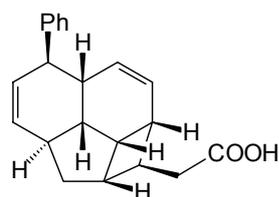
Schema 50: Mögliche Biosynthese von Sclerocitrin (125)

So entsteht in wenigen Schritten ein völlig andersartiges Ringsystem als Dimerisierungsprodukt der Xerocomsäure (**75**), als dies von den Verbindungen der Badion-Gruppe bekannt ist.

Dabei ist der erste Biosyntheseschritt, also die Michael-Addition zweier Moleküle **126** zu **127** in beiden Vorschlägen gleich und bestimmt bereits die Stereochemie. Sämtliche Folgeschritte führen stereoselektiv zum Sclerocitrin.

Die Einzelschritte dieses Biosynthese-Vorschlages können durch Vergleich mit Literaturbekannten Synthesen belegt werden.

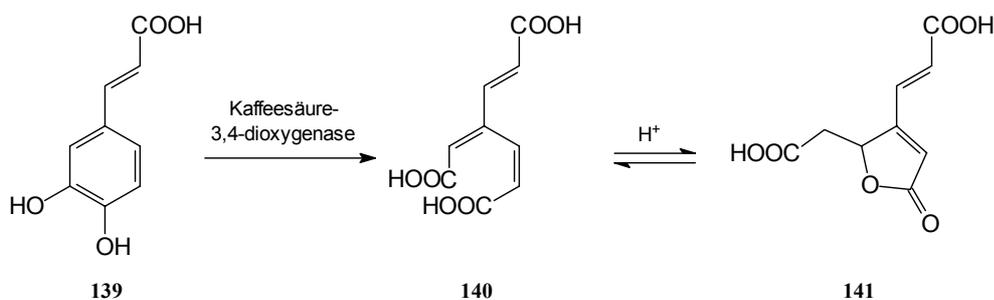
Aus der Synthese verschiedener Naturstoffe wie z. B. der Endiandrinsäure A (**138**), in der polcyclische Systeme an Cyclobutan gebunden sind, kennt man Methoden zum Gerüst-Aufbau durch Tandem-Michael-Aldolreaktionen.^[117] Endiandrinsäure A wurde neben verwandten Metaboliten aus den Blättern des australischen Baumes *Endiandra introrsa* isoliert.^[118]



Schema 51: Endiandrinsäure A (**138**)

Naturstoffe wie **138** werden ähnlich wie Sclerocitrin (**125**) über Kaskaden von pericyclischen Reaktionen gebildet.

Catechole und Endione wie **132** können leicht einer oxidativen Ringöffnung, deren Produkt dann lactonisiert, unterliegen (vgl. Biosynthese der Atromentinsäure (**74**) aus Atromentin (**56**), Kapitel 5.1). In dem aeroben Bakterium *Pseudomonas fluorescens* konnten Wood et al.^[119] den oxidativen Abbau von Kaffeesäure (**139**) durch Kaffeesäure-3,4-dioxygenase beobachten. Nach Stehenlassen der Reaktionsmischung in 5N HCl bildete sich durch Cyclisierung von **140** eine Verbindung, für die die Autoren die Struktur **141** vorschlugen.



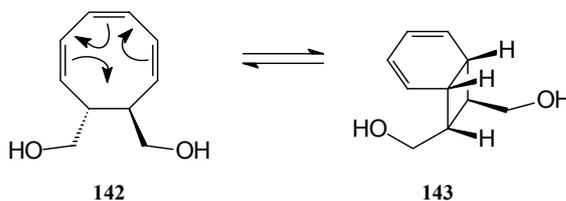
Schema 52: Oxidative Spaltung und Lactonisierung von Kaffeesäure (**139**)

Die Lactonisierung von *cis,cis*-Muconsäuren wie **140** untersuchten Kallen et al.^[120] in *Pseudomonas putida*. Sie wird durch die *cis,cis*-Muconat-Cycloisomerase katalysiert und verläuft schrittweise über eine Carbanion-Zwischenstufe nach Angriff des Carboxylats an der entsprechenden Doppelbindung.

Bei dem Muconolacton **141** handelt es sich um die von Fugmann^[92] aus *Hygrophorus lucorum* (Lärchenschneckling) isolierte Hygrophorsäure, die (*S*)-Konfiguration besitzt. Ebert^[121] gelang die biomimetische Synthese racemischer Hygrophorsäure (**141**) durch Umsetzung von Kaffeesäure (**139**) mit Peressigsäure analog Schema 52. Dabei erfolgten oxidative Spaltung und Cyclisierung in einer Einstufenreaktion nach mehrwöchigem Stehenlassen der Reaktionsmischung.

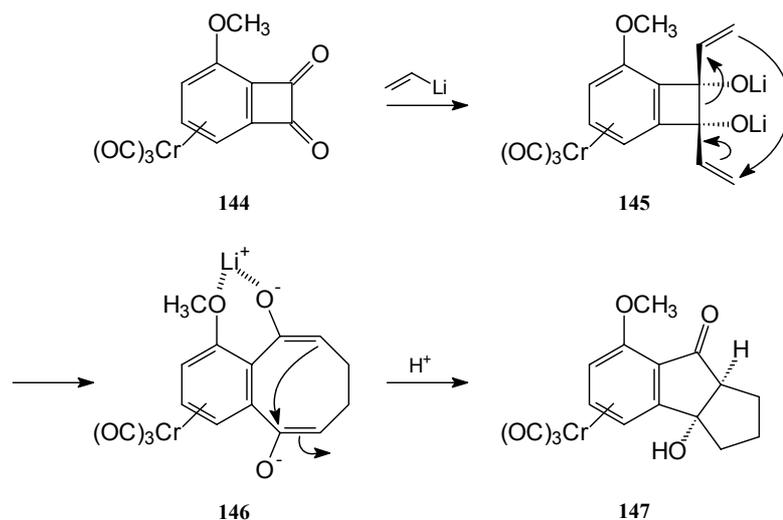
Diese Beispiele unterstützen die vorgeschlagene oxidative Spaltung des Endions **132** zum Lacton **134** in der Biosynthese von Sclerocitrin.

Eine Umkehrreaktion der (reversiblen) electrocyclischen Ringöffnung, wie sie in der Biosynthese von Sclerocitrin (**125**) von **135** zu **136** formuliert ist, kennt man aus der biomimetischen Synthese der Endriandrinssäure A (**138**).^[122] Dabei entsteht aus dem substituierten Cyclooctatrien **142** das Bicyclo[4.2.0]octadien-Derivat **143**.



Schema 53: Ausschnitt aus der Synthese von Endiandrinssäure A (**138**)

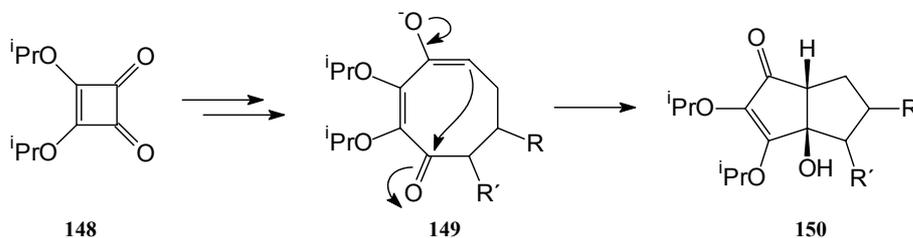
Auch in der Komplexchemie findet man der Reaktionsfolge **135** zu **137** vergleichbare Synthesen. Butenschön et al.^[123, 124] berichteten kürzlich über eine Folge von dianionischer Oxy-Cope-Umlagerung von Verbindung **145** und intramolekularer Aldol-Addition unter Ring-Verengung zu **147**. **145** wird durch *syn*-Addition von Vinylolithium an Benzocyclobutendion-tricarbonylchrom-Komplex **144** gebildet.



Schema 54: Bildung von Polycyclen in der Komplexchemie

Eine Übersicht zur transannularen Bindungsbildung in Achtringen, die zu Bicyclo[3.3.0]octan-Systemen führen, findet sich in der Literatur.^[103]

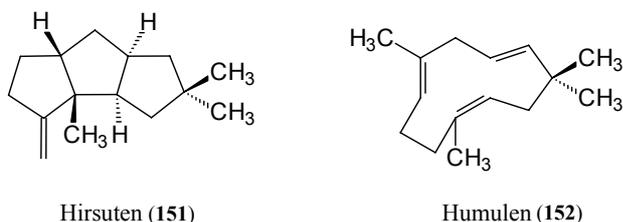
In der Synthese von Hypnophilin (**159**) aus Quadratsäurediisopropylester (**148**) beschreiben Paquette et al.^[125] eine dem Schlußschritt der Sclerocitrin-Biosynthese vergleichbare transannulare Aldoladdition. Auch bei dieser Reaktion (**149** zu **150**) entsteht aus einem Achtring ein Fünf-Fünfringsystem.



Schema 55: Ausschnitt aus der Synthese von Hypnophilin (**159**)

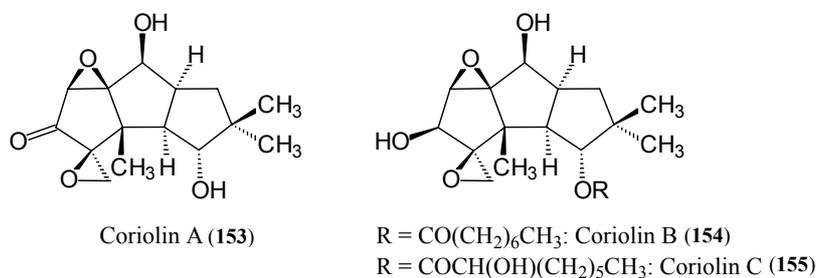
9.10 Naturstoffe mit Triquinan-Grundgerüst

Das 2-Oxa-dicyclopenta[a,cd]pentalen-Grundgerüst des Sclerocitrins (**125**) konnte bislang nicht in Naturstoffen gefunden werden. Sieht man von dem Lactonring ab, so handelt es sich bei Sclerocitrin um ein lineares Triquinan. Bekannte lineare Triquinane aus Pilzen sind alle terpenoiden Ursprungs und leiten sich biosynthetisch vom Hirsuten (**151**) ab, das erstmals aus dem Basidiomyceten *Coriolus consors* isoliert werden konnte.^[126] Hirsuten entsteht durch Cyclisierung des Humulens (**152**).^[127] Sämtliche funktionalisierten Hirsutane aus Basidiomyceten-Kulturen besitzen die absolute Konfiguration des Hirsutens.



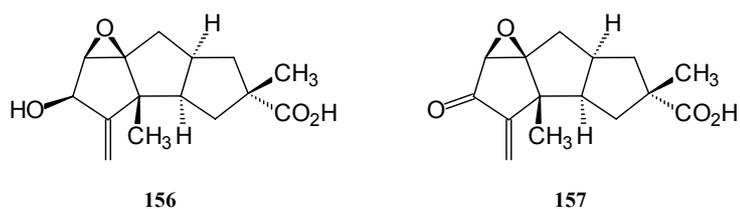
Schema 56: Hirsuten (**151**) und sein Biosynthesevorläufer Humulen (**152**)

Die Corioline **153–155** sind weitere aus *C. consors* isolierte Triquinan-Metabolite, die durch ihre antibiotische Wirkung aufgefallen sind.^[128]



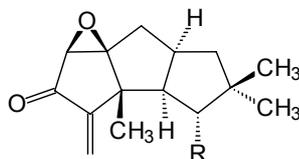
Schema 57: Corioline **153–155** aus *Coriolus consors*

In Basidiomyceten der Gattung *Stereum* konnten ebenfalls Triquinane vom Hirsutan-Typ gefunden werden. Es sind die Hirsutsäure (**156**) aus *Stereum hirsutum* und die Complicatsäure (**157**) aus *Stereum complicatum*.^[129]



Schema 58: Hirsutsäure (**156**) und Complicatsäure (**157**) aus Pilzen der Gattung *Stereum*

Weiterhin wurde aus Kulturen von *Lentinus crinitus* das antimikrobiell wirksame 1-Desoxyhypnophilin (**158**) neben Hypnophilin (**159**) erhalten.^[130]

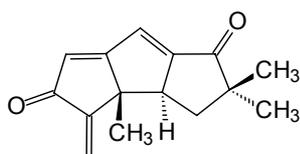


R = H: 1-Desoxyhypnophilin (**158**)

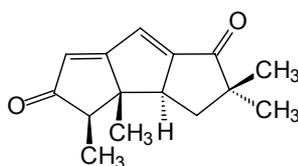
R = OH: Hypnophilin (**159**)

Schema 59: 1-Desoxyhypnophilin (**158**) und Hypnophilin (**159**) aus *Lentinus crinitus*

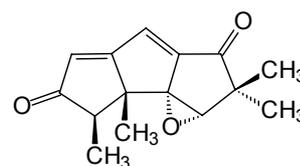
Aus Kulturen des Gurkenschnitzlings, *Macrocyttidia cucumis*, konnten Dasenbrock^[131] und Hellwig^[132] in Zusammenarbeit mit Anke und Mitarbeitern die biologisch wirksamen Cucumine A–H (**160–167**) isolieren und in ihrer Struktur aufklären.^[133] Cucumin A (**160**) war durch seine cytotoxische Aktivität aufgefallen. *Macrocyttidia cucumis* enthält zudem den Hirsutan-Abkömmling Arthrosporin (**168**).^[134] Bei den Cucuminen E–H (**164–167**) hat eine Umlagerung des Hirsutan-Grundgerüsts stattgefunden.



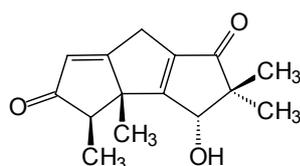
Cucumin A (**160**)



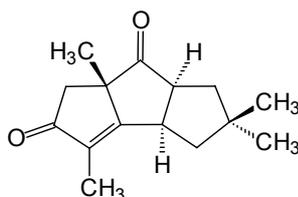
Cucumin B (**161**)



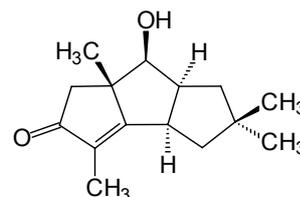
Cucumin C (**162**)



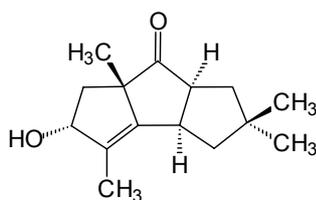
Cucumin D (**163**)



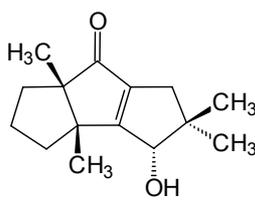
Cucumin E (**164**)



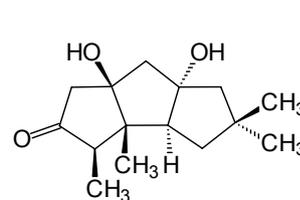
Cucumin F (**165**)



Cucumin G (**166**)



Cucumin H (**167**)



Arthrosporin (**168**)

Schema 60: Cucumine **160–167** und Arthrosporin (**168**) aus *Macrocyttidia cucumis*

9.11 Überlegungen zur Strukturaufklärung von Chalcitrin (169), eigene Arbeiten

Der von Gimenez und Sontag als CP-2 bezeichnete Farbstoff wird im folgenden Chalcitrin (169) genannt.

Im Rahmen dieser Arbeit Jahr 2001 konnten Fruchtkörper von *Chalciporus piperatus* bei Harzgerode (Sachsen-Anhalt) und im Teufelswinkel bei Regensburg in größeren Mengen gefunden werden. Die Trennung und Isolierung der Farbstoffe erfolgt wie die des Sclerocitrins (125) aus *S. citrinum*. Die HPL-chromatographische Analyse des Rohextraktes ergibt, daß die Pilzstiele erhebliche Mengen des von Gimenez als CP-3 bezeichneten Farbstoffes enthalten. Er ist mit Sclerocitrin identisch (dies bestätigen auch die Arbeiten von Schmidt und Sontag). Leider enthalten die anhaltinischen Pfefferröhrlingsstiele nur sehr kleine Mengen des Nebenpigmentes Chalcitrin. Dies zeigt folgendes HPL-Chromatogramm:

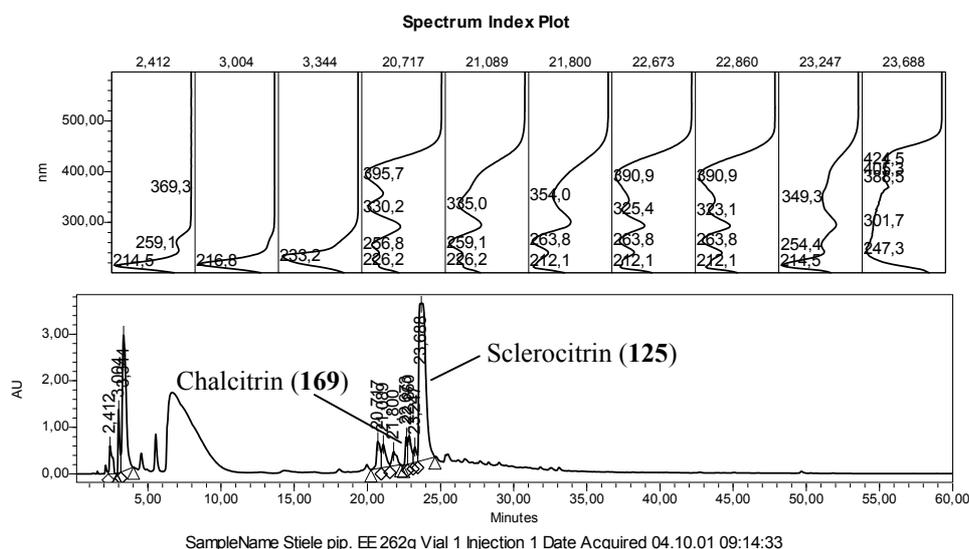


Abbildung 10: HPL-Chromatogramm eines Rohextraktes von *Chalciporus piperatus* (Trennsystem 1)

Sontag konnte nach vollständiger Aufreinigung keine für HMBC-Spektren ausreichenden Mengen des fraglichen CP-2 erhalten, obwohl die Extrakte seiner Kollektionen von *Chalciporus piperatus* fast ebenso viel CP-2 wie Sclerocitrin enthielten. Gimenez verfügte über eindimensionale NMR-Spektren und über ein HMQC-Spektrum, nicht aber über Fernkopplungsdaten der Verbindung.

Um die für die Strukturaufklärung entscheidenden Daten zu erhalten und um große Substanzverluste durch aufwendige HPL-chromatographische Reinigung zu vermeiden, wird in dieser Arbeit eine vorgereinigte Mischfraktion, die neben anderen Verbindungen Sclerocitrin und Chalcitrin als Hauptkomponenten enthält, vermessen. In den NMR-Spektren kommt es dabei

erfreulicherweise zu keinen Signalüberlagerungen, die zu dem zentralen Ringsystem von Chalcitrin gehörenden Signale können zweifelsfrei ermittelt werden, und es gelingt somit, ein HMBC-Spektrum zu erhalten. Die angegebenen ^{13}C -Verschiebungen sind aus der HMBC-Projektion entnommen und auf ganze Zahlen gerundet, da keine für ein ^{13}C -NMR-Spektrum ausreichende Substanzmenge zur Verfügung steht. Die zu den Pulvinsäureseitenketten gehörenden Fernkopplungssignale für C-2' und C-2'' sind mit P gekennzeichnet.

Folgende Tabelle gibt die Daten der zum zentralen Ringsystem von Chalcitrin gehörenden NMR-Signale wieder.

C-Atom	δ_C [ppm]	Art	δ_H [ppm]	Multiplizität	J_{HH} [Hz]	$^nJ_{HH}$ -Koppl. δ_H [ppm] COSY	$^nJ_{CH}$ -Koppl. δ_C [ppm] HMBC
4	39	CH	4.75	dd	4.5, 3.5	2.83, 6.81	58, 78, 95 (P), 130, 132, 159
1	44	CH	3.90	d	6.0	2.46+3.09, (2.83)	78, 102 (P), 130, 132, 210
2	48	CH ₂	2.46 3.09	d dd	17.0 17.0, 6.0	3.09 2.46, 3.90	44, 58, 78, 132, 210
3a	58	CH	2.83	br		(3.90), 4.75, (6.81)	
7a	78	C _q					
6	121	CH	6.96	s			39, 78, 95 (P)
8	130	CH	6.81	d	4.5	4.75	39, 44, 58, 102 (P), 159
9	132	C _q					
5	159	C _q					
7	203	C=O					
3	210	C=O					

Tabelle 3: NMR-Daten des zentralen Fragmentes aus Chalcitrin (**169**)

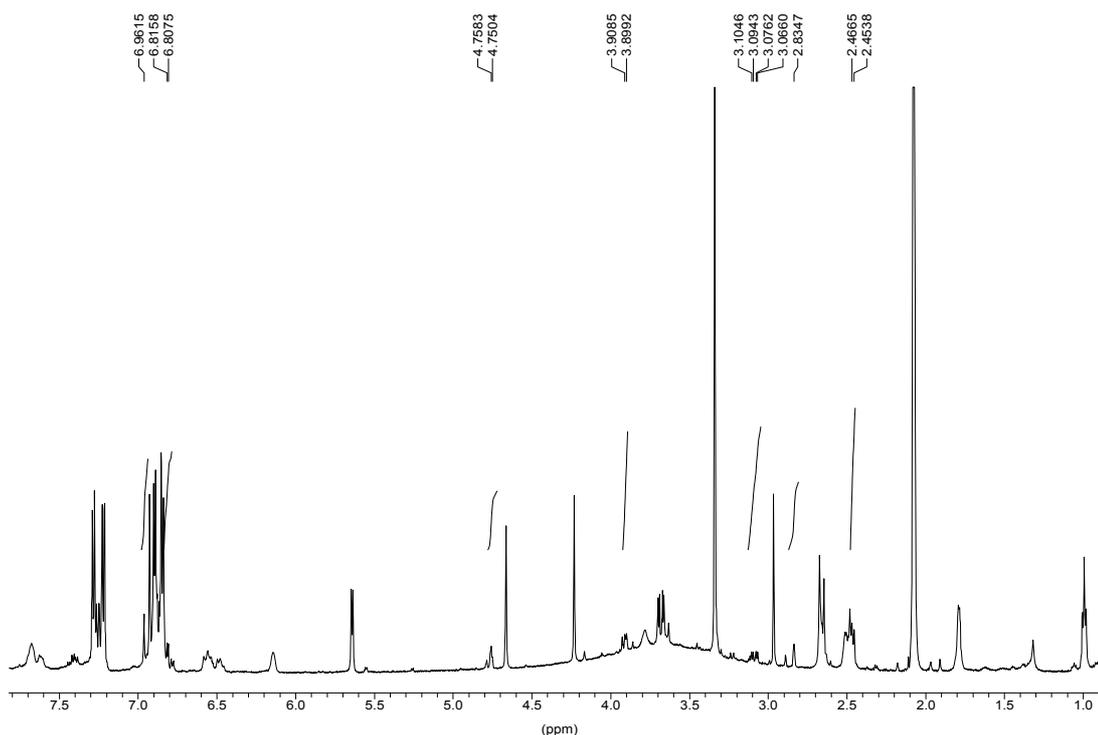


Abbildung 11: ^1H -NMR-Spektrum einer Mischfraktion aus Chalcitrin (**169**) und Sclerocitrin (**125**), $[\text{D}_6]$ Aceton, 600 MHz; die zu Chalcitrin gehörenden Signale sind integriert

Der Vergleich von Chalcitrin (**169**) mit Sclerocitrin (**125**) ergibt, daß das ^1H -NMR-Spektrum von Chalcitrin ein olefinisches Proton ($\delta_{\text{H}} = 6.81$) mehr zeigt (vgl. Kapitel 9.5). Dafür fehlt eine CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 5.75$. Eine CH_2 -Gruppe ($\delta_{\text{H}} = 2.46/3.09$), drei CH-Gruppen bei $\delta_{\text{H}} = 2.83$, 3.90 und 4.75 sowie eine CH-Gruppe an ungesättigter Position ($\delta_{\text{H}} = 6.96$) sind, allerdings mit im Vergleich zum Sclerocitrin geringfügig veränderten Verschiebungen, erhalten.

Das Massenspektrum von **169** zeigt einen um die Masse von CO_2 kleineren Molekülpeak als bei Sclerocitrin. Diese Decarboxylierung (**125** zu **169**) scheint mit der Ausbildung einer weiteren Doppelbindung einherzugehen.

Analysiert man die ^{13}C -NMR-Daten von **169** nach Gimenez, so fehlt im Vergleich zu Sclerocitrin ein quartäres Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 53.3$, eine CH-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 79.6$ und eine Carbonylfunktion bei $\delta_{\text{C}} = 173.2$. Die Verschiebungen der zusätzlichen, bereits durch das Massenspektrum naheliegenden Doppelbindung, gibt Gimenez mit $\delta_{\text{C}} = 121.7$ (CH) und 134.4 (C_q) an.

Aus der Mischfraktion kann ein COSY (Abb. 12) für **169** erhalten werden, welches in Analogie zu Sclerocitrin eine zu einer CH_2 -Gruppe ($\delta_{\text{H}} = 2.46/3.09$) benachbarte CH-Funktion

($\delta_{\text{H}} = 3.90$) zeigt. Ferner kann eine Korrelation der beiden Signale bei $\delta_{\text{H}} = 2.83$ und 6.81 zu $\delta_{\text{H}} = 4.75$ festgestellt werden.

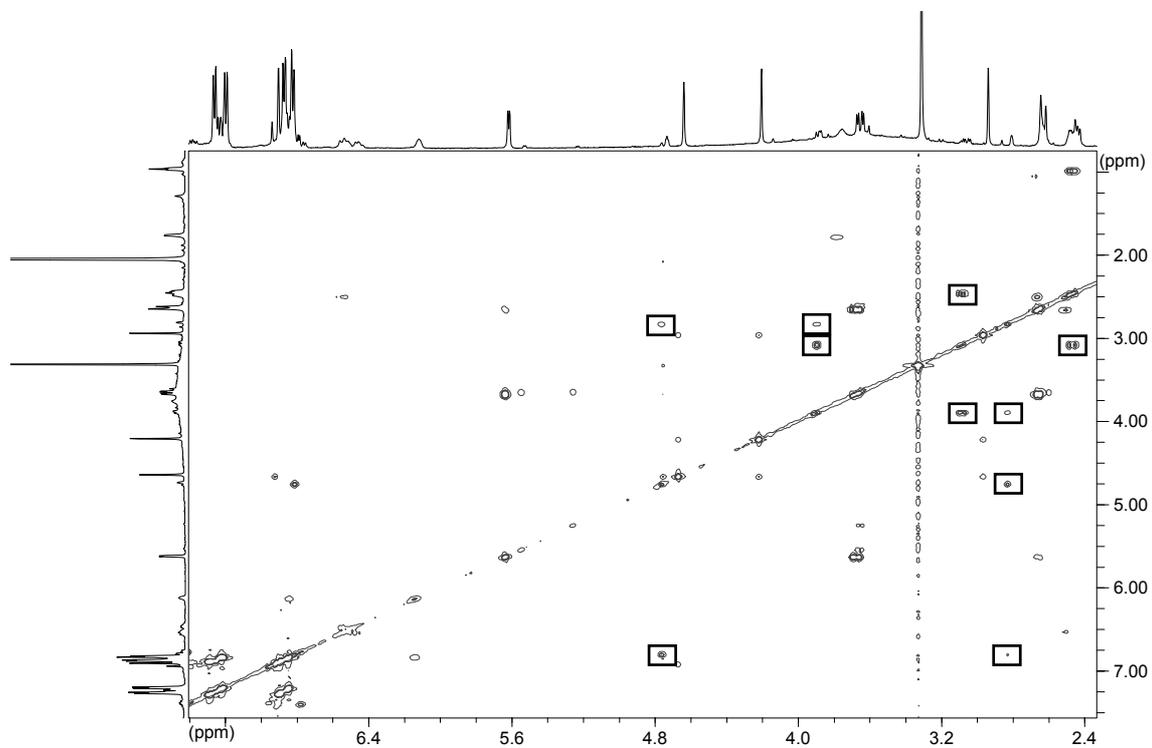


Abbildung 12: COSY einer Mischfraktion aus Chalcitrin (**169**) und Sclerocitrin (**125**), $[\text{D}_6]\text{Aceton}$, 600 MHz; die 2D-Peaks von Chalcitrin sind schwarz umrandet

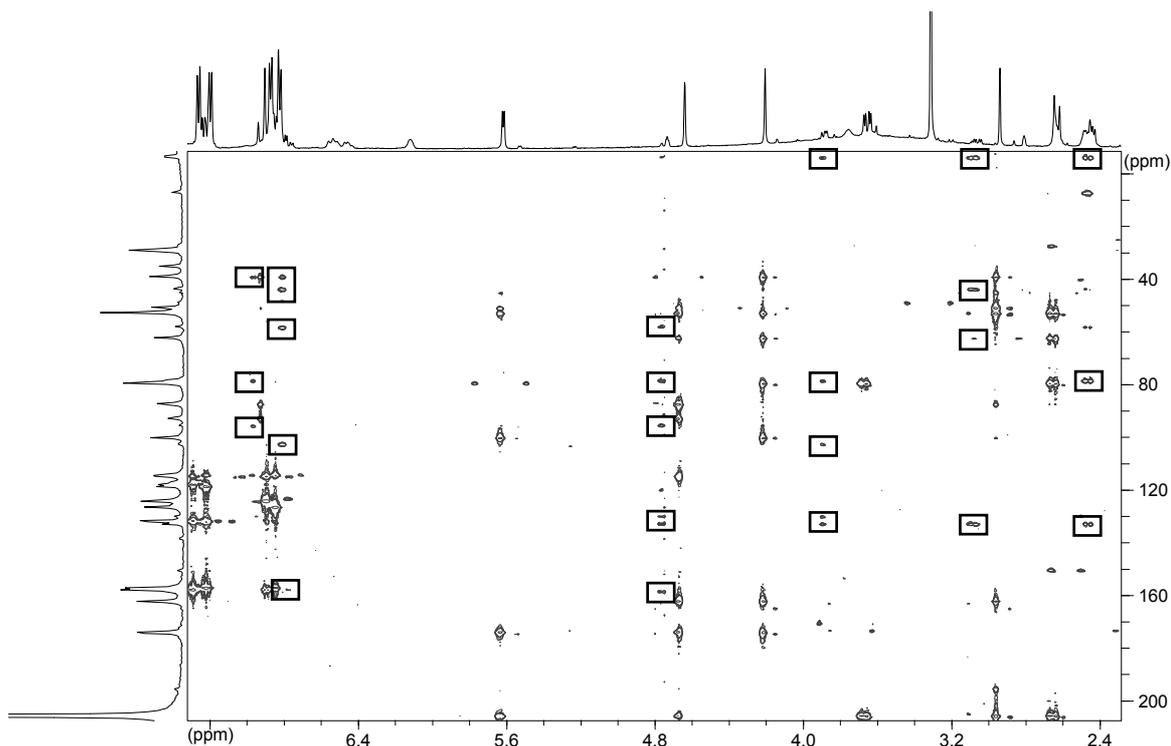
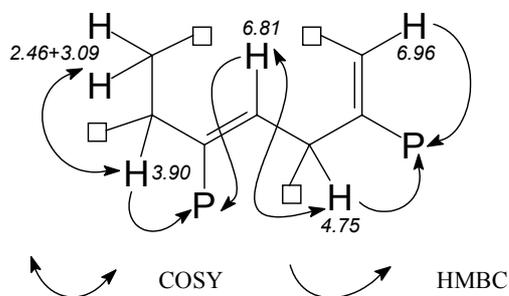


Abbildung 13: HMBC-Spektrum einer Mischfraktion aus Chalcitrin (**169**) und Sclerocitrin (**125**), $[D_6]$ Aceton, 600/151 MHz; die HMBC-Crosspeaks von Chalcitrin sind schwarz umrandet; das Signal bei $\delta_H = 2.83$ ist verbreitert und zeigt daher keine Korrelationen

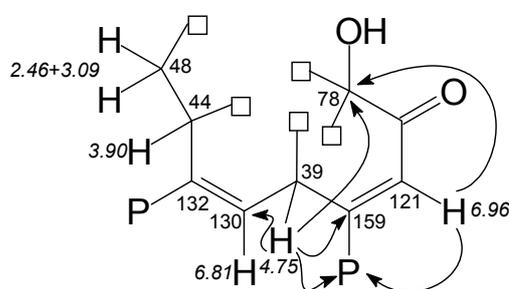
Aufschlußreich zur Bestimmung der Verknüpfung der Pulvinsäurereste sind die Fernkopplungen von Protonen des zentralen Ringsystems zu den Kohlenstoffatomen C-2' und C-2'' der Seitenketten (vgl. Abb. 13). Man erkennt zu einem dieser Seitenketten-C-Atome bei $\delta_C = 95$ eine Fernkopplung der Protonen bei $\delta_H = 4.75$ sowie 6.96, zu dem anderen bei $\delta_C = 102$ eine Korrelation der Protonen bei $\delta_H = 3.90$ sowie 6.81. In Kombination mit den COSY-Daten (Abb. 12) läßt sich ein erstes Strukturfragment formulieren.



Schema 61: Strukturfragment I für Chalcitrin

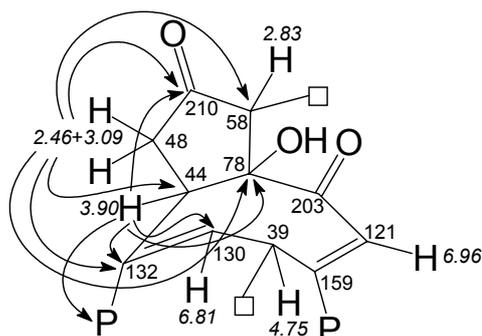
Für die noch ausstehenden Verknüpfungen sind folgende allgemeine Überlegungen anzustellen: aus der Summenformel $C_{35}H_{22}O_{15}$ erhält man für das zentrale Ringsystem der

Verbindung sieben Doppelbindungsäquivalente. Chalcitrin (**169**) enthält zwei Carbonylfunktionen und zwei weitere Doppelbindungen. Daraus ergibt sich eine Zahl von drei Ringen. Zwischen diesen drei Ringen muß es vier Verknüpfungsstellen geben, da sich nur vier Gruppen der Verbindung für Ringanellierungen eignen. Es sind die drei CH-Gruppen bei $\delta_{\text{H}} = 2.83, 3.90$ und 4.75 sowie ein quartäres C-Atom bei $\delta_{\text{C}} = 78$, wie man aus der HMBC-Projektion entnimmt. Zu letzterem quartären C-Atom zeigt das olefinische Proton bei $\delta_{\text{H}} = 6.96$ eine (vermutlich 3J -) Kopplung. Bei dem Protonensignal ($\delta_{\text{H}} = 6.96$) handelt es sich um ein Singulett, der andere direkte Nachbar wird also wahrscheinlich eine Carbonylgruppe sein. In Analogie zu der Struktur von Sclerocitrin (**125**) kann man die obige Teilstruktur ergänzen (Schema 62).



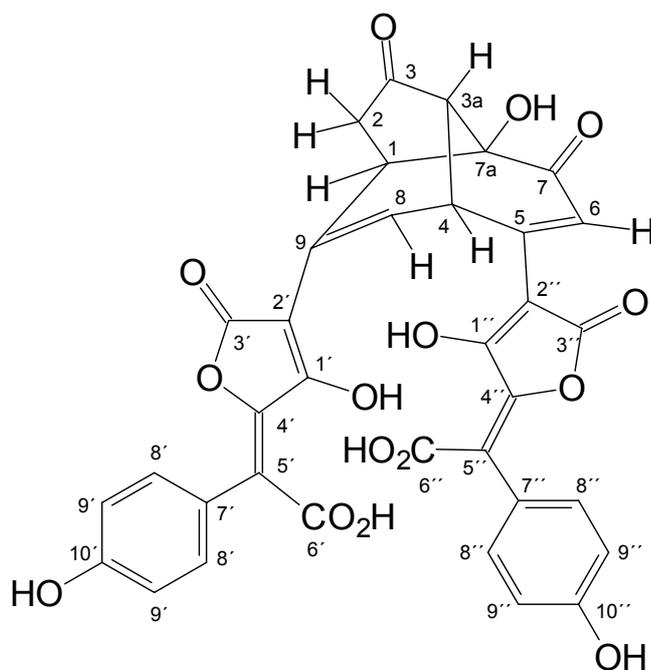
Schema 62: Strukturfragment II für Chalcitrin

Auch die CH_2 -Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 2.46/3.09$ hat - abgesehen von der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.90$ - keine weiteren COSY-Kopplungspartner. In der benachbarten Position ist also ebenfalls eine Carbonylfunktion zu erwarten. So sind alle Fernkopplungen der CH_2 -Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 2.46/3.09$ berücksichtigt, abgesehen von derjenigen zu einer CH-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 58$ und derjenigen zu dem quartären Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 78$. Es gibt noch zwei Positionen in einer Entfernung über drei Bindungen zu den Protonen der CH_2 -Gruppe, zum einen die auf die Carbonylgruppe folgende, zum anderen die zur CH-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 44$ benachbarte. Da auch die CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.90$ keine weiteren COSY-Kopplungspartner hat, ist im Anschluß das quartäre Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 78$ zu erwarten. Folglich wird die CH-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 58$ in α -Position zu einer Carbonylfunktion liegen. Dabei muß es sich aufgrund der HMBC-Kopplungen der CH_2 -Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 2.46/3.09$ um die Carbonylgruppe bei $\delta_{\text{C}} = 210$ handeln.

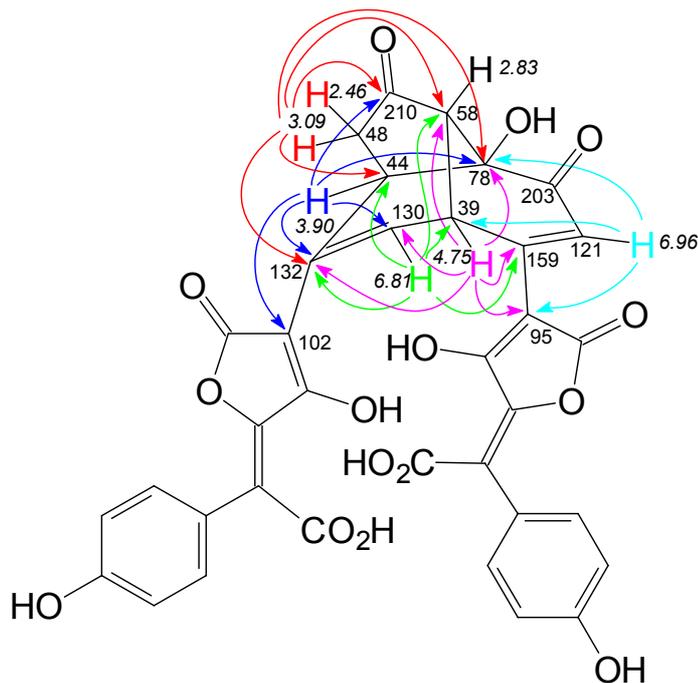


Schema 63: Strukturfragment III für Chalcitrin

Die Struktur des Chalcitrins kann nun durch den einzig möglichen Ringschluß zwischen der CH-Gruppe bei $\delta_C = 58$ und derjenigen bei $\delta_C = 39$ vervollständigt werden. Nachfolgende Abbildung zeigt Chalcitrin mit allen detektierbaren Fernkopplungen:



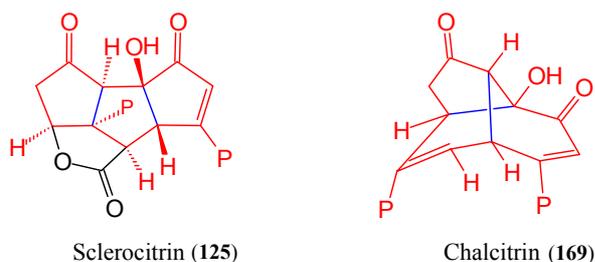
Schema 64: Strukturvorschlag für Chalcitrin (169) mit Numerierung



Schema 65: Strukturvorschlag für Chalcitrin (**169**) mit NMR-Verschiebungen und HMBC-Korrelationen

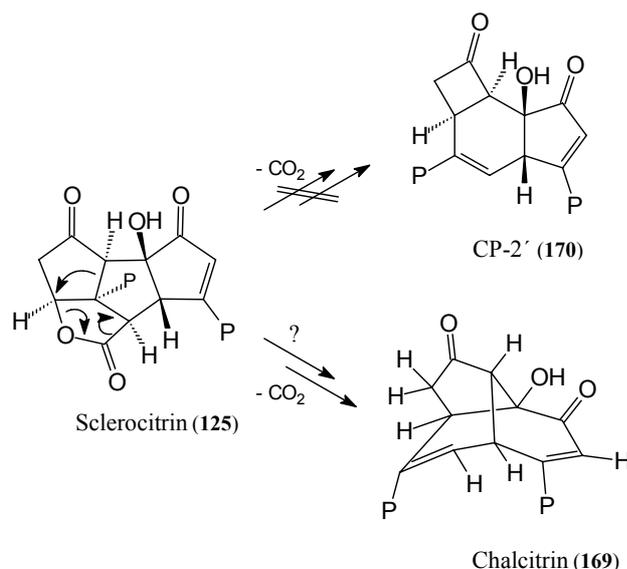
9.12 Überlegungen zur Biosynthese von Chalcitrin (**169**)

Sclerocitrin und Chalcitrin besitzen die gleiche "Gerüst-Peripherie". Lediglich zwei Bindungen haben sich geändert. Dies soll folgende Abbildung verdeutlichen:



Schema 66: "Peripherie" (rot) von Sclerocitrin (**125**) und Chalcitrin (**169**) mit veränderten Bindungen (blau)

Es existieren noch weitere mögliche Strukturvorschläge für Chalcitrin mit gleicher "Peripherie". Fraglich ist der Verlauf der Decarboxylierung von Sclerocitrin zu Chalcitrin. Es ist nicht vorstellbar, daß das stabile Fünf-Fünf-Fünfringsystem in Sclerocitrin biosynthetisch direkt zu dem deutlich gespannten überbrückten System in **169** umlagert. Eine direkte Decarboxylierung von **125** könnte nach Phosphorylierung des Ring-Sauerstoff-Atoms im Lacton eher zu einem Fünf-Sechs-Vierringsystem, wie in **170** angedeutet, führen.



Schema 67: Überlegungen zur Biosynthese: CP-2' (**170**) vs. Chalcitrin (**169**)

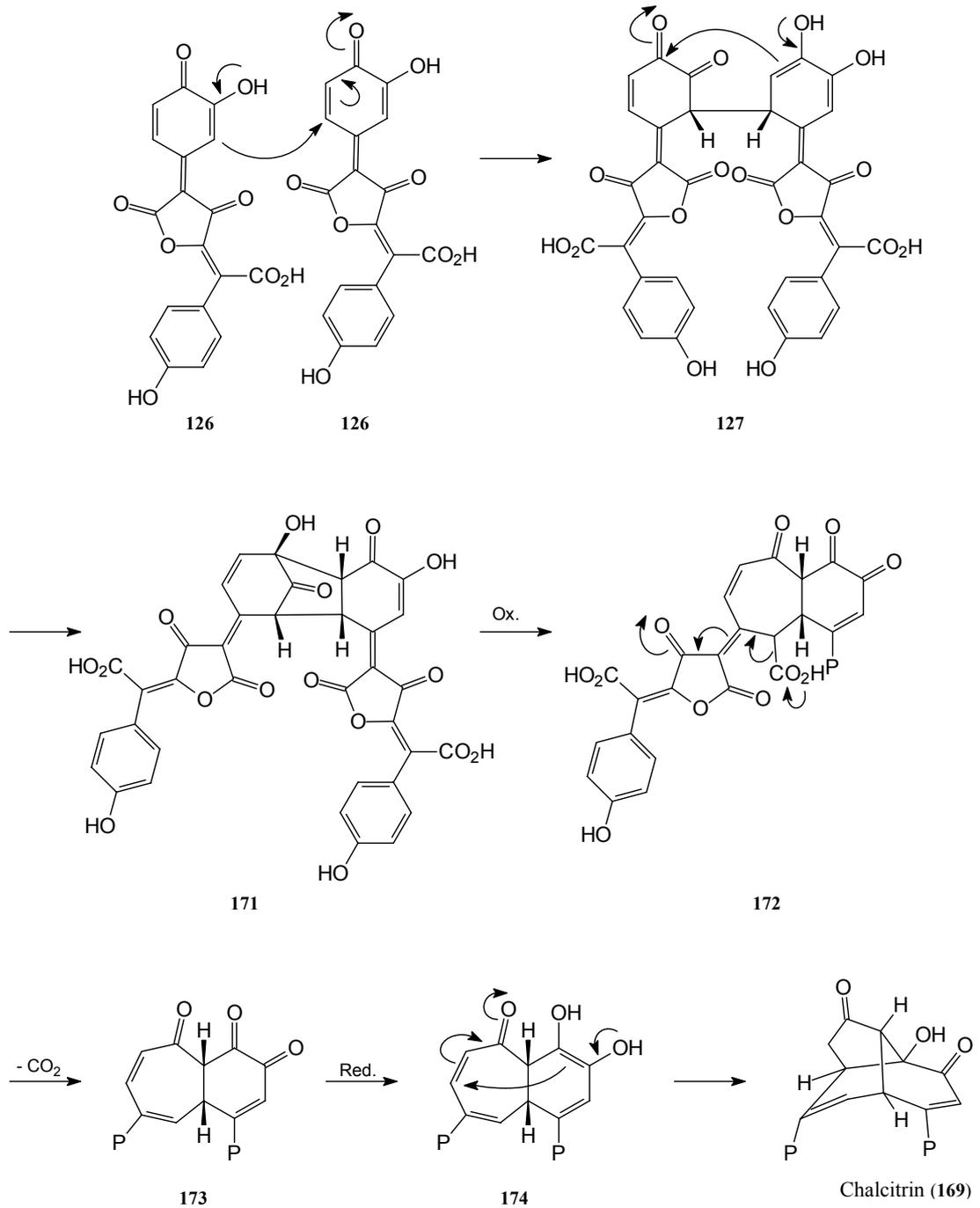
Einige NMR-Messungen sprechen aber gegen diese in Formel **170** vorgeschlagene Verknüpfung.

- Im COSY ist keine Kopplung zwischen den beiden Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 2.83$ und 3.90 zu erkennen.
- Ferner sieht man im HMBC-Spektrum eine Korrelation des Protons bei $\delta_{\text{H}} = 6.81$ zu der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 58$ und nicht zu dem quartären Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 78$. Der hier vorgestellte Strukturvorschlag **157** zeigt, daß die $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplung zu erkennen ist, während die $^4J_{\text{CH}}$ -Kopplung nicht auftritt. Im Falle der 5-6-4-Ringverknüpfung müßte die $^4J_{\text{CH}}$ -Kopplung sichtbar sein, die $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplung dagegen nicht.
- Auch Gimenez spricht von einer starken Fernkopplung des Protons bei $\delta_{\text{H}} = 2.83$ zu dem olefinischen Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 130$. Dies unterstützt die oben formulierten Überlegungen.
- Er beobachtet weiter eine $^4J_{\text{HH}}$ -Kopplung zwischen den beiden Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 2.83$ und 6.81 . Mit einer kleinen Konstante von 2 Hz belegt er eine (vermutlich W-) Korrelation zwischen den Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 2.83$ und $\delta_{\text{H}} = 3.90$, während die direkte Kopplung ($\delta_{\text{H}} = 2.83$ mit $\delta_{\text{H}} = 4.75$) aufgrund des eingenommenen Winkels einen Wert von 3.5 Hz zeigt. Sie kann in den eigenen Messungen durch einen COSY-Crosspeak belegt werden.
- Die Konstante der geminalen Kopplung der Protonen der CH_2 -Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 2.46/3.09$ beträgt 17 Hz. Sie besitzt ähnliche Werte in vergleichbaren Triquinan-Systemen, so etwa in Cucumin F (**165**).^[132] Von entscheidender Bedeutung für die Größe dieser Kopplungskonstante ist der Torsions-Winkel zwischen dem C-Atom der CH_2 -Gruppe und der

benachbarten Carbonyl-Gruppe, also die Orientierung des π -Elektronenorbitales der CO-Gruppe.^[135] Für den in **169** eingenommenen Winkel von ca. 30° ergeben sich Werte von etwa 17 Hz, während im Falle des Vierringes in **170** der Winkel 45° betrüge und daher die Kopplungskonstante deutlich kleiner wäre (ca. 15 Hz).

Diese Überlegungen sprechen für die in **169** vorgeschlagene Struktur und legen damit die Vermutung nahe, daß Chalcitrin nicht direkt aus Sclerocitrin entsteht, sondern die Biosynthese von Anfang an einen anderen Verlauf nimmt. In der Tat gibt es eine weitere denkbare Reaktionsfolge, in der zwei Moleküle oxidierte Xerocomsäure (**126**) miteinander reagieren können (abgesehen von den in Schema 49 und 50 vorgestellten).

Wie in Schema 68 dargestellt, erfolgt im ersten Schritt wie bei den Biosynthesen von Norbadion A (**88**) und Sclerocitrin die Addition einer enolischen Doppelbindung an einen Michael-Akzeptor. Im zweiten Schritt kann man sich eine direkte Aldoladdition des Enols an die aktivierte Carbonylgruppe unter Bildung des C=O-überbrückten Systems **171** vorstellen. Oxidative Spaltung des α -Hydroxyketons (bzw. des tautomeren Endiols) der linken Molekülhälfte in **171** und anschließende Decarboxylierung der vinylogenen β -Ketosäure führen zu **173**. Nach Reduktion des Endions der rechten Molekülhälfte kann das Endiol erneut im Sinne einer Michael-Addition mit der elektrophilen Doppelbindung im linken Teil reagieren. Anhand eines Molekül-Modells sieht man, daß sich Enol und β -Position des Michael-Akzeptors räumlich sehr nahe kommen können. Theoretisch denkbar wäre im letzten Biosyntheseschritt auch eine andere Michaeladdition, bei der die zweite Hydroxygruppe in **174** zum Keton würde und ein Sechs-Sechs-Siebenringsystem entstünde. Diese Alternative ist aber mit Hilfe der Ergebnisse des HMBC-Spektrums auszuschließen.

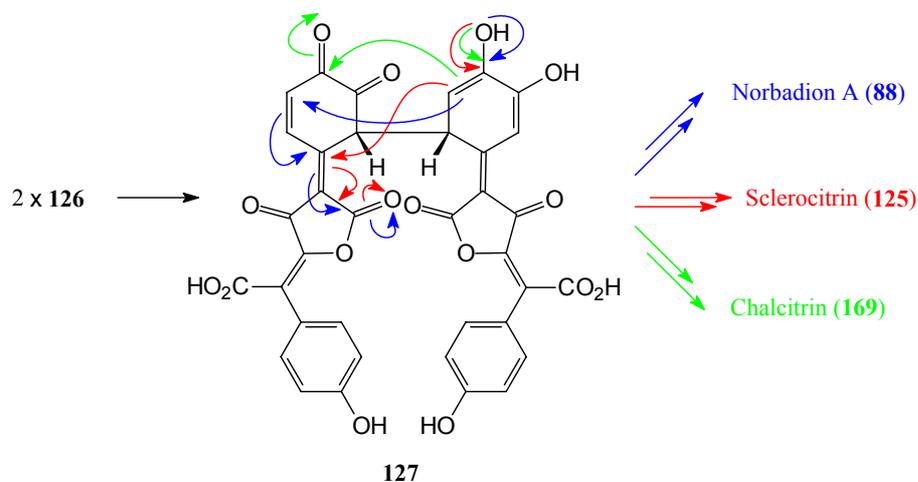


Schema 68: Vorschlag zur Biosynthese von Chalcitrin (**169**)

Dieser Biosynthesevorschlag umfaßt ausschließlich Aldol- und Michael-Additionsschritte sowie oxidative Spaltungen und Reduktionen wie bereits in Kapitel 9.9.2 durch Literatursynthesen belegt.

Eine Komplexierung von Alkalimetallionen ist in Chalcitrin aufgrund der entgegengesetzten Stellung der beiden Pulvinsäureseitenketten nicht so gut wie in Sclerocitrin möglich.

Die unterschiedlichen Strukturen der drei in *Chalciporus piperatus* vorkommenden Farbstoffe Norbadion A, Sclerocitrin und Chalcitrin lassen sich auf Xerocomsäure als einfache aromatische Ausgangsverbindung zurückführen. In einer chemisch plausiblen Reaktionsfolge lassen sich Biosynthesewege formulieren, die die Bildung dieser Metabolite zwingend erklärt. Eine Bestätigung sollte durch Verfütterungsexperimente und Isolierung der Enzyme möglich sein. Schema 69 faßt die drei Biosynthesewege zu Norbadion A, Sclerocitrin und Chalcitrin zusammen. Aus dem Michael-Additionsprodukt **127** der oxidierten Xerocomsäure **126** können im zweiten Schritt drei verschiedene Michael- bzw. Aldoladditionsprodukte entstehen, da im Endion der linken Molekülhälfte verschiedene nucleophile Positionen existieren.



Schema 69: Bildung von Norbadion A (**88**), Sclerocitrin (**125**) und Chalcitrin (**169**) aus der gemeinsamen Biosynthese-Zwischenstufe **127**

9.13 Vergleichende HPLC-Untersuchungen zur Metabolit-Verteilung in Arten der Gattungen *Scleroderma* und *Chalciporus*

Mittels analytischer HPLC-Messungen (Trennsystem 1) werden die *Scleroderma*-Arten *S. citrinum* (USA), *S. meridionale* Demoulin & Malencon (Mittelmeer-Kartoffelbovist), *S. verrucosum* (Bull.) Pers. (Braunwarziger Kartoffelbovist) und die *Chalciporus*-Art *C. rubinellus* (Peck) Singer (USA) auf ihre Metabolit-Verteilung untersucht. Das Ergebnis gibt folgende Tabelle wieder:

	Sclerocitrin (125)	Chalcitrin (169)	Norbadiion A (88)	Badiion A (86)	Xerocomsäure (75)
<i>S. citrinum</i> (USA)	++	–	+	+	(+)
<i>S. meridionale</i>	++	–	++	(+)	(+)
<i>S. verrucosum</i>	(+)	–	++	+	(+)
<i>C. rubinellus</i> (USA)	++	+	+	–	+

Tabelle 4: Metabolit-Verteilung in *Scleroderma*- und *Chalciporus*-Arten;
++: Hauptmetabolit, +: Nebenmetabolit, (+): Spuren

Es ist auffällig, daß in keiner *Scleroderma*-Art Chalcitrin (169) nachgewiesen werden kann.

9.14 Neuere genetische Untersuchungen zur Einordnung von Gastromyceten in der Ordnung Boletales

Die geringe morphologische Ähnlichkeit der Sclerodermataceae und der Boletaceae führt zu Unsicherheiten in der Taxonomie von Gastromyceten. Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen sowie die Entdeckung von Pulvinsäurederivaten in verschiedenen Pilzen der Familie der Sclerodermataceae, so unter anderem in *Pisolithus arhizus* (Erbsenstreuling)^[136] und *Scleroderma sinnamariense*^[137] lassen eine engere genetische Verwandtschaft zu Pilzen der Unterordnungen Boletineae (z. B. *Boletus erythropus*), Paxillineae (z. B. *Paxillus atrotomentosus*) und Suillineae (z. B. *Suillus grevillei*) vermuten. Neuere genetische Untersuchungen bestätigen diese chemotaxonomischen Erkenntnisse.^[138] In verschiedenen Kern- und Mitochondrien-DNA-Bereichen konnte durch Sequenzanalyse die phylogenetische Verwandtschaft von Gastromyceten und Röhrlingen untermauert werden. Dies gilt auch für *Chalciporus piperatus*, der ebenfalls zur Unterordnung der Boletineae gehört.

10. *MYCENA HAEMATOPUS*

10.1 Pilzbeschreibung

Mycena haematopus (Pers.: Fr.) Kumm., der Bluthelmling, wächst von Frühling bis Herbst meist gesellig an totem Laubholz. Er gehört zur Familie der Tricholomataceae (Roze ex Overeem), Ordnung Agaricales.^[139] Der Hut ist jung halbkugelig, dann glockig, glänzend braunrosa, durchscheinend gerieft und hat einen Durchmesser von 1 bis 3 cm. Die Lamellen sind rosa und bei Verletzung dunkelfleckig. Das Fleisch ist rötlichbraun, der Stiel 3 bis 7 cm lang, bis zu 4 mm breit, zylindrisch, glatt, rosabräunlich, hohl und brüchig. Der Bluthelmling riecht moderig. Das Fleisch von Hut und Stiel sondert bei frischen Fruchtkörpern einen dunkel braunroten Milchsaft ab, wenn es verletzt wird. *Mycena haematopus* kann leicht mit der Art *M. sanguinolenta* verwechselt werden, welche ebenfalls einen rötlichen Saft ausscheidet, jedoch meist am Boden wächst.

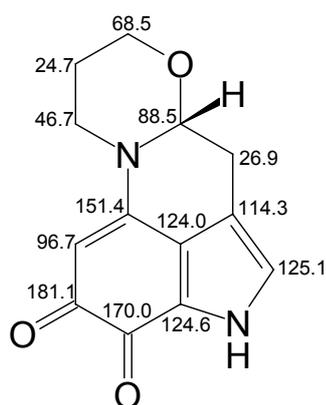


Abbildung 14: *Mycena haematopus* (Pers.: Fr.) Kumm.

10.2 Bisherige Ergebnisse

Fugmann^[92] unternahm erste Untersuchungen des blutroten Milchsafte aus *Mycena haematopus*. Durch mehrfache Reinigung an Sephadex LH-20 und Mitteldruckflüssigchromatographie erhielt er eine orangerote und eine violette Verbindung, die er Mycenaflavin (**175**) und MH-Violett nannte. Fugmann erkannte, daß sich die Farbstoffe schnell zersetzen und führte daher alle Trennungen bei tiefer Temperatur und unter Schutzgas durch. Übereinanderlegen der UV/Vis-Spektren der beiden Verbindungen ergab das des Blutsafte. MH-Violett beschrieb er als polare Verunreinigung. So konzentrierte er seine Untersuchungen auf Mycenaflavin und erhielt ¹H-, ¹³C- und gekoppelte ¹³C-NMR-Spektren. Aus den Ergebnissen der Kernresonanz-Spektroskopie konnte er eine Zusammensetzung C₁₂H₁₀₋₁₄N_xO_y und die Teilstruktur –O–CH₂–CH₂–CH₂–R ableiten.

Bröckelmann^[140] führte diese Untersuchungen fort. Er gab die Fruchtkörper direkt an der Fundstelle in Methanol und bewahrte den Extrakt bis zur Aufarbeitung bei –15°C auf. Um Temperatur- und Lichteinflüsse auszuschließen, führte er die Aufreinigung bei 4°C unter Lichtausschluß durch. Dennoch konnte er aufgrund der Instabilität von Mycenaflavin und MH-Violett nur ein Artefakt isolieren. Durch wiederholte Chromatographie an Sephadex LH-20 reicherte er einen rosavioletten Farbstoff an, den er Haematopodin (**106**) nannte. Dieser bildete sich auch bei längerem Stehenlassen des Rohextraktes. Bröckelmann führte umfangreiche spektroskopische Untersuchungen durch und konnte schließlich die Struktur des Haematopodins durch eine Röntgenstrukturanalyse belegen. Hierüber wurde auch die absolute Konfiguration aufgeklärt.^[75]



Schema 70: Struktur von Haematopodin (**106**) mit ¹³C-NMR-Verschiebungen

Unklar blieb die Struktur des Mycenaflavins. Bröckelmann stellte einige Vermutungen zu möglichen optisch aktiven Vorläufern des Haematopodins an. Er verglich UV/Vis-Spektrum von Rohextrakt und Artefakt **106** und erkannte aufgrund der großen Ähnlichkeit, daß das

chromophore System im Artefakt im wesentlichen erhalten bleibt. Für den Rohextrakt war eine bathochrome Verschiebung der langwelligen Maxima festzustellen. Bröckelmann postulierte, daß es sich bei dem Vorläufer um eine labile Schiff'sche Base von Aminosäuren und Haematopodin (**106**) handeln könne, die sich bei der Aufarbeitung zersetzen. Ferner zog er ein labiles, über den Indol-Stickstoff gebundenes Glycosid in Erwägung.

Biosynthese-Untersuchungen konnten aufgrund der mangelnden Größe, der Seltenheit und der sehr kurzen Lebensdauer der Fruchtkörper von *M. haematopus* nicht durchgeführt werden. Man kann vermuten, daß der Pyrrolochinolin-Teil des Haematopodins von Tryptophan (**34**) abgeleitet ist. Auch Tyrosin (**21**) könnte ein möglicher Biosynthese-Vorläufer sein. Wie es allerdings zu der Ausbildung des seltenen *N,O*-Acetals kommt, blieb unklar.

10.3 Isolierung und Strukturaufklärung von Mycenaflavin (175), dem nativen Farbstoff aus *Mycena haematopus*, eigene Arbeiten

Mycenaflavin (175) läßt sich aus dem Methanolextrakt von *M. haematopus* durch vorsichtige Chromatographie an Sephadex LH-20 bei tiefer Temperatur und unter Lichtausschluß gewinnen. Es muß sofort NMR-spektroskopisch vermessen werden, da andernfalls eine schnelle Zersetzung erfolgt. Mißt man den Drehwert von Mycenaflavin, so stellt man mit Erstaunen fest, daß es sich hierbei im Gegensatz zu Haematopodin offenbar um eine achirale Verbindung handelt.

Das Massenspektrum zeigt den $[M+H]^+$ -Peak bei $m/z = 245$ und den $[M]^+$ -Peak bei $m/z = 244$ Masseneinheiten, es unterscheidet sich also nicht von dem des Haematopodins.

Im ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung (Abb. 15) erkennt man im aliphatischen Bereich drei aufgespaltene Signale mit einem Integral von jeweils zwei Protonen, im aromatischen Bereich vier CH-Gruppen-Signale, zwei Singulets und zwei Dubletts.

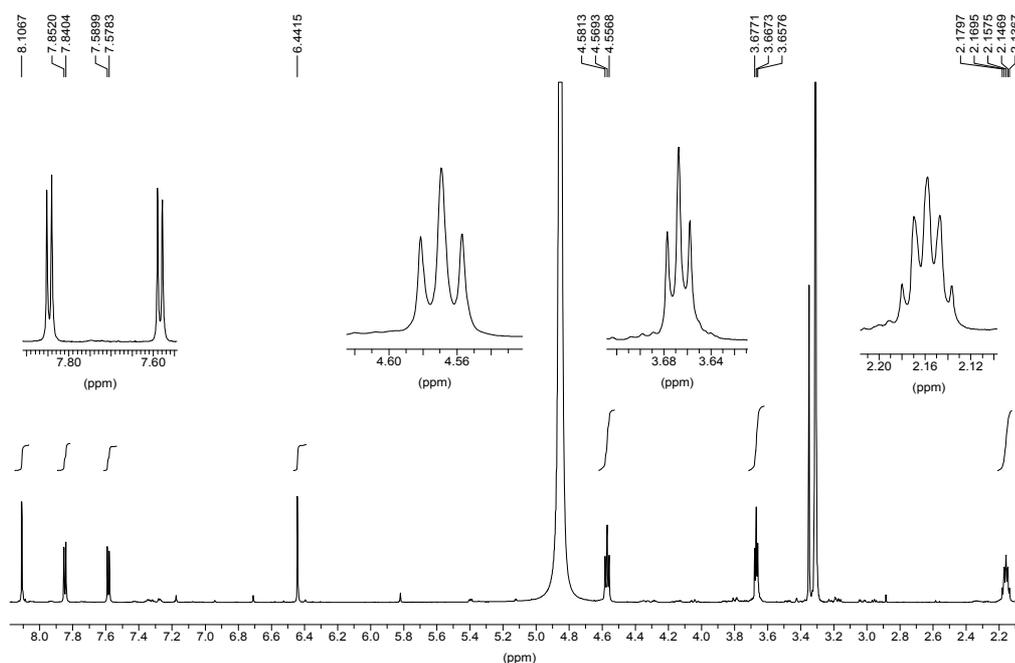


Abbildung 15: ^1H -NMR-Spektrum von Mycenaflavin (175), $[\text{D}_4]\text{Methanol}$, 600 MHz

Das ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 16) zeigt 13 Signale, drei CH_2 - und vier CH -Gruppen sowie fünf quartäre Kohlenstoffatome.

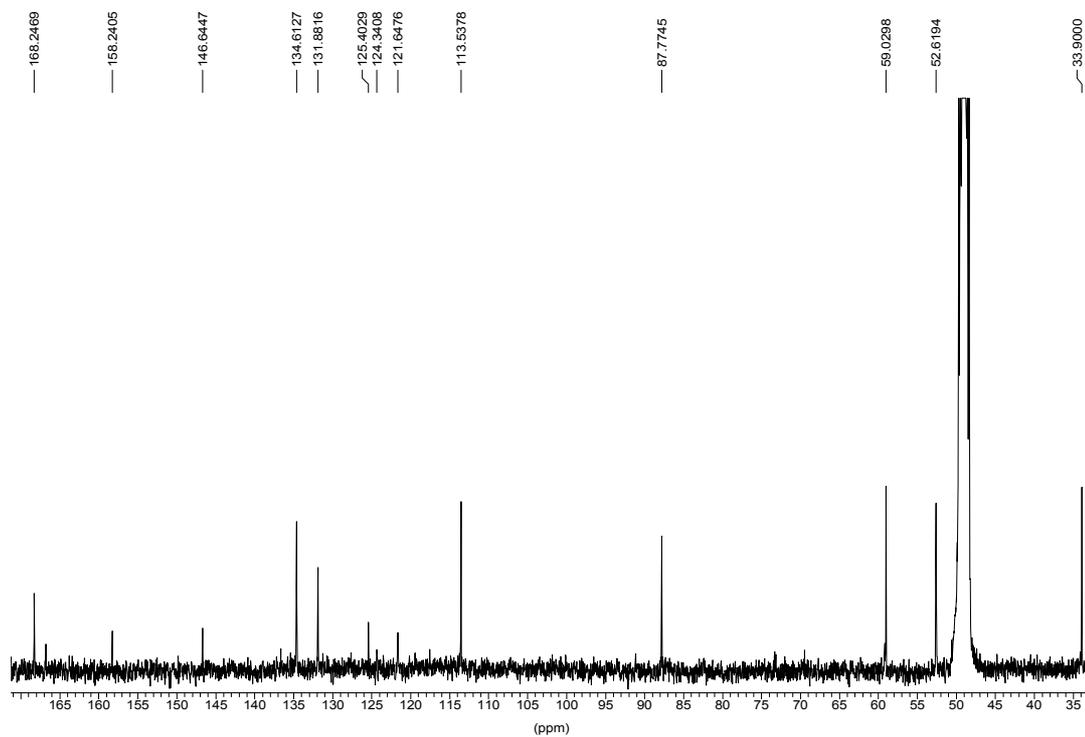


Abbildung 16: ^{13}C -NMR-Spektrum von Mycenaflavin (175), $[\text{D}_4]$ Methanol, 101 MHz

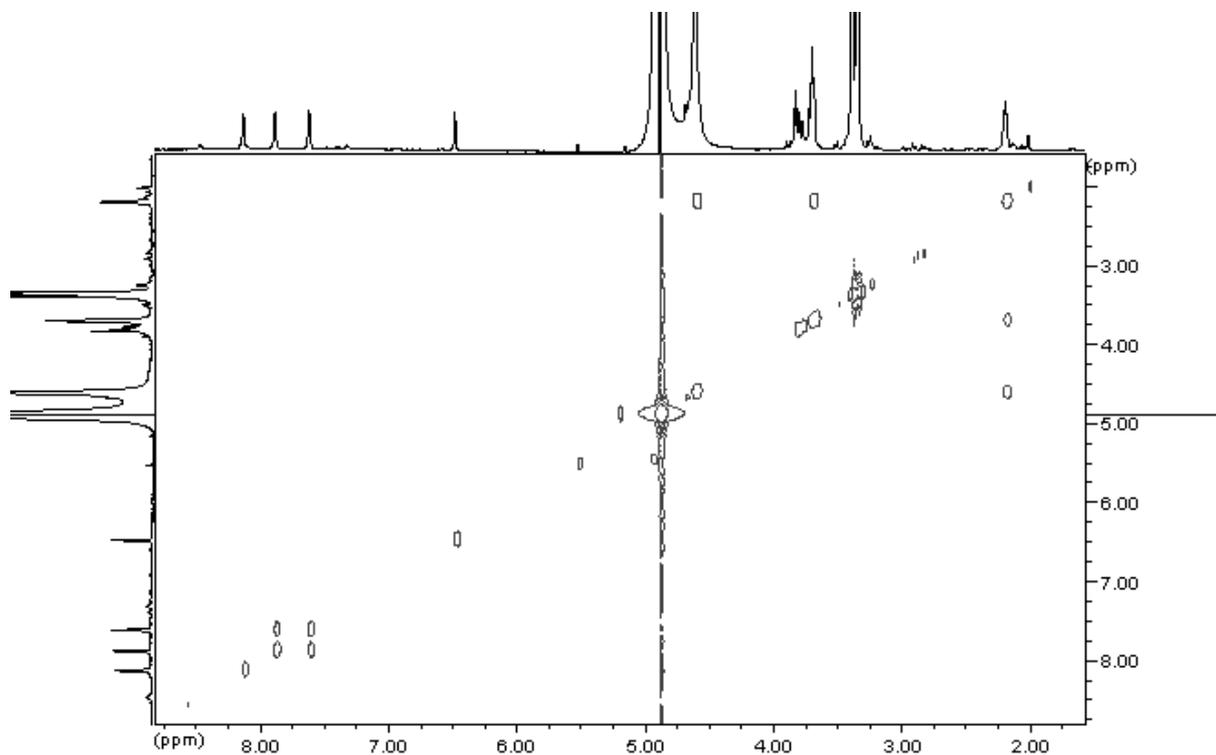


Abbildung 17: COSY-Spektrum von Mycenaflavin (175), $[\text{D}_4]$ Methanol, 600 MHz

Aufspaltungsmuster der ^1H -NMR-Signale und das COSY (Abb. 17) lassen folgende Schlußfolgerungen zu: es liegt eine Kette aus drei aufeinanderfolgenden CH_2 -Gruppen vor, ausgehend von der bei $\delta_{\text{H}} = 4.57$, gefolgt von einer bei $\delta_{\text{H}} = 2.16$ und schließlich derjenigen bei $\delta_{\text{H}} = 3.67$. Die Signale der beiden aromatischen Protonen sind zu Dubletts aufgespalten und zeigen eine Kopplungskonstante $J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz. Dies deutet darauf hin, daß diese Wasserstoffatome direkt benachbart sind.

Weitere Informationen lassen sich aus der Verschiebung des ^{13}C -NMR-Signales bei $\delta_{\text{C}} = 59.0$ und $\delta_{\text{H}} = 3.67$ in der Kette aus CH_2 -Gruppen gewinnen. Dieses Kohlenstoffatom ist wahrscheinlich an ein Sauerstoffatom gebunden. Die Verknüpfung der aliphatischen Kette mit dem aromatischen Teil des Moleküls läßt sich aus den Fernkopplungen des HMBC-Spektrums (Abb. 18) ermitteln.

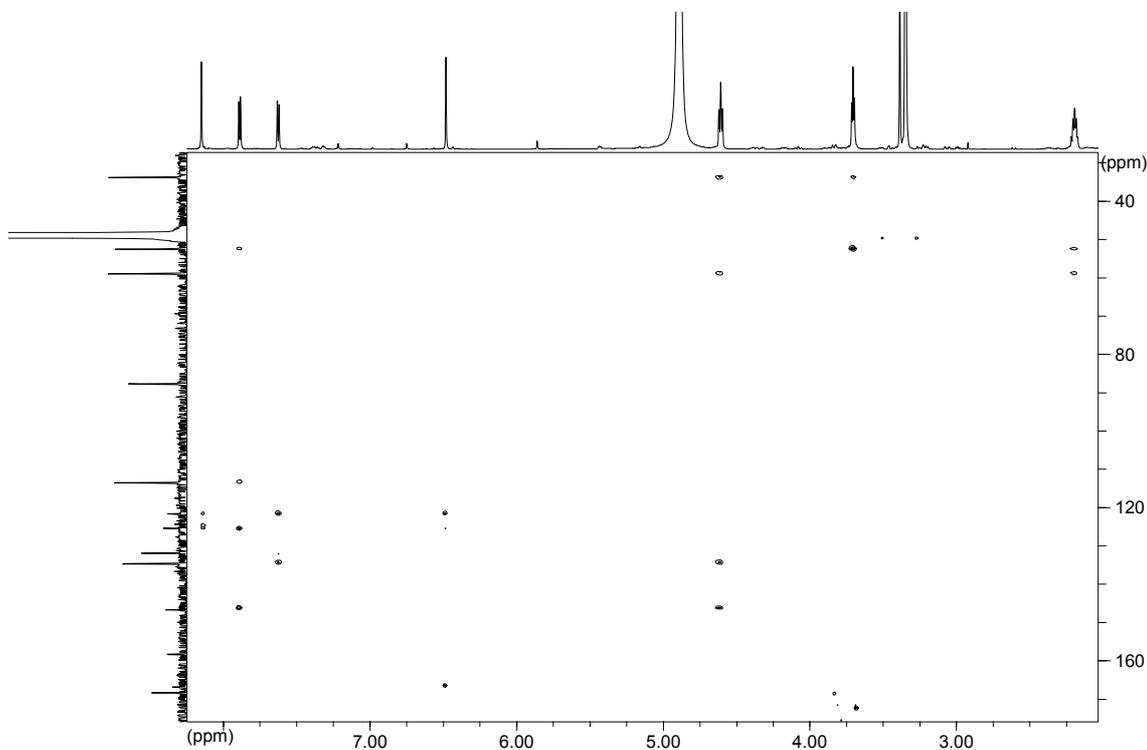


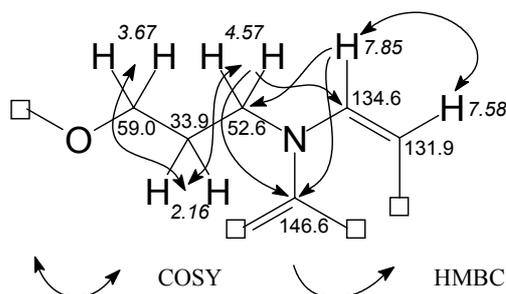
Abbildung 18: HMBC-Spektrum von Mycenaflavin (**175**), $[\text{D}_4]$ Methanol, 600/151 MHz

Folgende Tabelle faßt die NMR-spektroskopischen Daten zusammen:

C-Atom	δ_C [ppm]	Art	δ_H [ppm]	Multiplizität	J_{HH} [Hz]	$^nJ_{HH}$ -Koppl. δ_H [ppm] COSY	$^nJ_{CH}$ -Koppl. δ_C [ppm] HMBC
2'	33.9	CH ₂	2.16	dt	13.6, 7.3, 5.8	3.67, 4.57	52.6, 59.0
1'	52.6	CH ₂	4.57	t	7.3	2.16	33.9, 59.0, 134.6, 146.6
3'	59.0	CH ₂	3.67	t	5.8	2.16	33.9, 52.6
6	87.8	CH	6.44	s			121.6, 124.3, 168.2
2	113.5	CH	8.11	s			121.6, 124.3
5b	121.6	C _q					
8a	124.3	C _q					
2a	125.4	C _q					
3	131.9	CH	7.58	d	7.0	7.85	121.6, 134.6
4	134.6	CH	7.85	d	7.0	7.58	52.6, 113.5, 125.4, 146.6
5a	146.6	C _q					
7	158.2	C _q					
8	168.2	C _q					

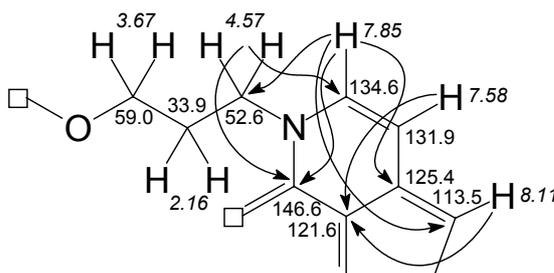
Tabelle 5: NMR-Daten von Mycenaflavin (175)

Die CH₂-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 4.57$ und die CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 7.85$ zeigen wechselseitige Fernkopplungsbeziehungen (vgl. Abb. 18) sowie eine gemeinsame Kopplung zu dem C-Atom bei $\delta_{\text{C}} = 146.6$, sind aber nicht direkt benachbart (vgl. COSY, Abb. 17). Auch die Verschiebungen der zugehörigen Kohlenstoffatome ($\delta_{\text{C}} = 52.6$ und 134.6) deuten darauf hin, daß sie über ein Stickstoffatom verbunden sind, an welchem sich als dritter Substituent das quartäre C-Atom bei $\delta_{\text{C}} = 146.6$ befindet. Berücksichtigt man ferner, daß sich zu der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 134.6$ in *ortho*-Stellung eine weitere CH-Gruppe befindet, so läßt sich eine erste Teilstruktur ableiten.



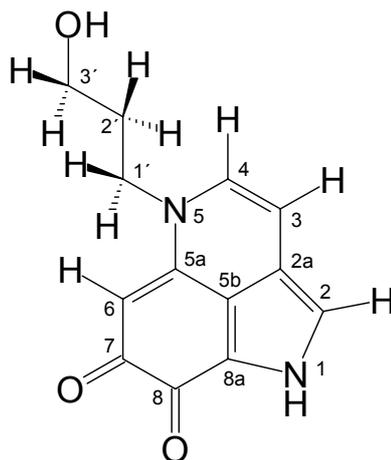
Schema 71: Strukturfragment I für Mycenaflavin

Das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 7.85$ zeigt weitere Fernkopplungen zu $\delta_{\text{C}} = 113.5$ und 125.4 . Die CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 8.11$ und $\delta_{\text{C}} = 113.5$ koppelt wie das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 7.58$ zu dem C-Atom bei $\delta_{\text{C}} = 121.6$. Nimmt man an, daß es sich bei diesen beiden Kopplungen um $^3J_{\text{CH}}$ -Korrelationen handelt und berücksichtigt man die Verwandtschaft zu Haematopodin (**106**), so läßt sich die erste Teilstruktur erweitern:

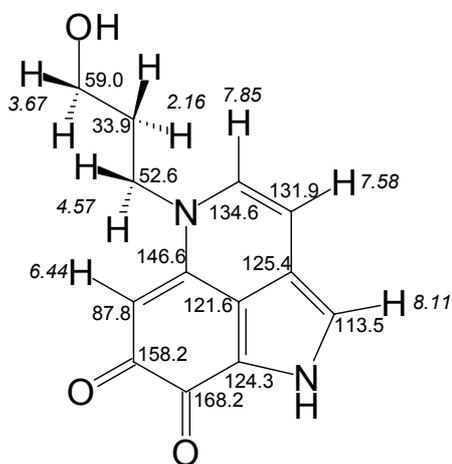


Schema 72: Strukturfragment II für Mycenaflavin

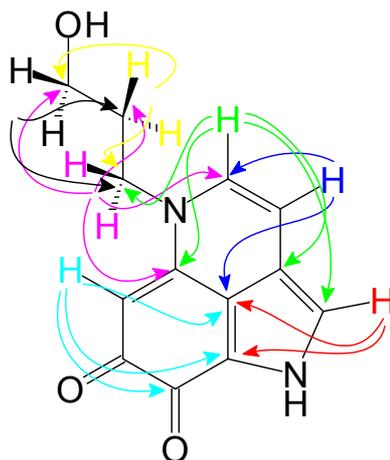
Auch das Proton der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 6.44$ zeigt eine starke und damit vermutlich $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplung zu dem C-Atom bei $\delta_{\text{C}} = 121.6$. Sowohl für das H-Atom bei $\delta_{\text{H}} = 8.11$ als auch für das bei $\delta_{\text{H}} = 6.44$ läßt sich eine Fernkopplung zu dem quartären Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 124.3$ erkennen. Im ersten Fall ist dies eine stark ausgeprägte, im zweiten Fall eine schwache Korrelation (also $^3J_{\text{CH}}$ und $^4J_{\text{CH}}$). In Kombination mit den übrigen Daten des HMBC-Spektrums kann die Struktur des Mycenaflavins aufgelöst werden:



Schema 73: Struktur von Mycenaflavin (175) mit Numerierung



Schema 74: Struktur von Mycenaflavin (175) mit NMR-Verschiebungen



Schema 75: Struktur von Mycenaflavin (175) HMBC-Korrelationen

Man kann annehmen, daß aus Mycenaflavin unter Ausbildung des *N,O*-Acetals biosynthetisch racemisches Haematopodin entstehen kann. Läßt man den Rohextrakt des Pilzes längere Zeit stehen, so kann man HPL-chromatographisch kein Mycenaflavin, aber große Mengen Haematopodin nachweisen.

Aus dem Rohextrakt von *M. haematopus* läßt sich weiterhin in größeren Mengen Phenylalanin (24) gewinnen.

11. *MYCENA PELIANTHINA*

11.1 Pilzbeschreibung

Mycena pelianthina (Fr.) Quél., der Schwarzgezähnelte Rettichhelmling, gehört zur Familie der Tricholomataceae (Roze ex Overeem), Ordnung Agaricales.^[59, 139] Man findet den Pilz von Juli bis zum Auftreten des ersten starken Nachtfrostes im Spätherbst vor allem in Buchenwäldern, aber auch in Mischwäldern. Der Rettichhelmling wächst oft in kleinen Gruppen von bis zu drei Exemplaren, selten in größerer Anzahl oder gar in Hexenringen. Der Hut ist jung konvex, später abgeflacht mit nur angedeutetem Buckel, die Oberfläche glatt, hygrophan, weißlich bis beigefarben mit graubraunem Rand und hat einen Durchmesser von 3–5 cm. Der Geruch ist rettichartig, der Stiel ist 4–8 cm lang, bis zu 5 mm breit, zylindrisch, glatt, beigefarben, feucht graubraun. Der auf den ersten Blick unscheinbar wirkende Rettichhelmling zeigt bei genauerem Betrachten mit der Lupe an den gezähnelten Lamellenschneiden kleine Kristalle eines violetten Farbstoffes, welcher für die intensive Farbe des Methanol-Extraktes verantwortlich ist.



Abbildung 19: *Mycena pelianthina* (Fr.) Quél.

11.2 Isolierung und Strukturaufklärung von Pelianthin (176), dem blauen Farbstoff aus *Mycena pelianthina*, eigene Arbeiten

Mycena pelianthina tritt viel seltener als die verwandten Arten *M. rosea* und *M. pura* auf. Der Schwarzgezähnelte Rettichhelmling wurde daher bislang nicht auf seine Inhaltsstoffe untersucht. Arnold^[60] entdeckte, daß der methanolische Rohextrakt des unscheinbaren Pilzes intensiv violett gefärbt ist und regte eine eingehendere Untersuchung an.

Die Aufreinigung der bei Breitbrunn, in der Pupplinger Au und im Mühlthal gesammelten Fruchtkörper muß mit großer Vorsicht durchgeführt werden. *M. pelianthina* kann nicht lyophilisiert werden, bei der Extraktion wird auf Zusatz verdünnter Mineralsäuren verzichtet. Der Extrakt kann nicht längere Zeit bei Raumtemperatur an der Luft gelagert werden. Nur so ist die irreversible Bildung brauner Zersetzungsprodukte zu vermeiden. Der so erhaltene blauviolette methanolische Rohextrakt wird bei 4 °C unter Argon als Schutzgas mit entgasten Lösungsmitteln gelochromatographisch aufgereinigt. Eine HPL-chromatographische Trennung ist nicht empfehlenswert. Hier werden fast alle Inhaltsstoffe aus *M. pelianthina* bei Verwendung einer RP-18-Säule bereits mit reinem Wasser eluiert. Aufgrund der hohen Polarität lassen sich die Farbstoffe nicht durch Verteilen zwischen Essigsäureethylester und Wasser in die organische Phase überführen. Der Rohextrakt enthält erhebliche Mengen Mannit. An Sephadex LH-20 mit Methanol als Laufmittel wird zuerst eine rotviolette Verbindung (MP-1) eluiert, die sich sehr leicht zersetzt und im Rahmen dieser Arbeit nicht näher charakterisiert wird. Vermutlich handelt es sich dabei um ein Farbstoffglycosid. Als zweite Fraktion erhält man den intensiv königsblauen Hauptinhaltsstoff aus *M. pelianthina*. Er soll Pelianthin (176) genannt werden. Der Farbstoff löst sich in Methanol und Wasser, nur schlecht in DMSO.

Das IR-Spektrum zeigt bei 3431 cm⁻¹ überlagerte NH- oder OH-Valenzschwingungen, eine Carbonylbande bei 1662 cm⁻¹, die auf ein Carbonsäureamid zurückzuführen sein könnte und bei 1594 cm⁻¹ eine Bande, die darauf hindeuten könnte, daß eine Carbonsäure zumindest partiell als Salz vorliegt. Bei 1373 cm⁻¹ liegt eine CH₃-Deformationsschwingung vor, bei 1297 und 1194 cm⁻¹ C–O–C-Valenzschwingungen. Dünnschichtchromatogramme des Farbstoffes zeigen eine Farbreaktion mit Ninhydrin.

Im UV/Vis-Spektrum in Methanol treten fünf Absorptionsmaxima bei 210, 255, 295, 353 und 565 nm auf. Der Farbstoff ist optisch aktiv $\{[\alpha]_{436}^{22} = -18.5 (c = 0.77, \text{CH}_3\text{OH})\}$. Das CD-Spektrum weist Cotton-Effekte bei 213, 254, 317, 369 und 556 nm auf.

Im (+)-ESI-MS sieht man einen $[M+K]^+$ -Peak bei einer Masse von 479 und einen $[M+H]^+$ -Peak bei 441. Daraus folgt eine gerade Anzahl von Stickstoffatomen. Von dieser Verbindung liegt ein $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum vor, in dem man die Korrelationen zweier N-Atome erkennt. Die Hochauflösung des Massenspektrums bestätigt das Vorliegen zweier Stickstoff-Atome mit einer Summenformel von $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_9$. Von besonderer Bedeutung für die Strukturaufklärung ist das LC-ESI-MS/MS-Spektrum. Es zeigt nur eine Spaltung, sie tritt unabhängig von dem gewählten Ionisationspotential (20 bis 50 Elektronenvolt) auf. Offenbar fragmentiert das Molekül an einer labilen Bindung in zwei Schlüsselbruchstücke der Massen 270 und 170. Auch der $[270+K]^+$ -Peak tritt im gekoppelten Spektrum auf. Bei 50 Elektronenvolt erleidet das Fragment der Masse 270 einen CO-Verlust. Dieses ESI-MS/MS-Spektrum ist von entscheidender Bedeutung für die Strukturaufklärung des Pelianthins.

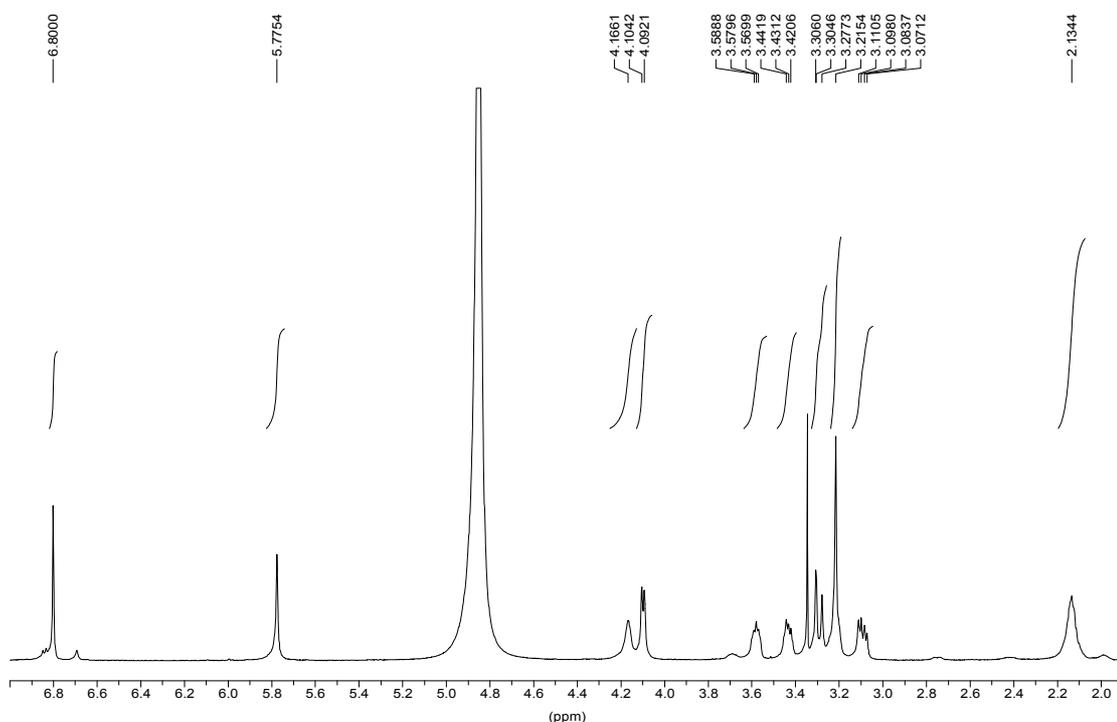


Abbildung 20: ^1H -NMR-Spektrum von Pelianthin (**176**), $[\text{D}_4]$ Methanol, 600 MHz

Im ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 20) erkennt man vier CH_2 - ($\delta_{\text{H}} = 2.13, 3.09/3.3^{\text{b}}, 3.22$ und $3.43/3.58$), zwei CH -Gruppen ($\delta_{\text{H}} = 4.10$ und 4.17) und ein vom Lösungsmittel überlagertes Signal bei ungefähr $\delta_{\text{H}} = 3.31$ sowie zwei olefinische CH -Funktionen bei $\delta_{\text{H}} = 5.78$ und 6.80 .

^b Eine genauere Angabe dieser NMR-Verschiebung ist aufgrund von Signalüberlagerungen nicht möglich.

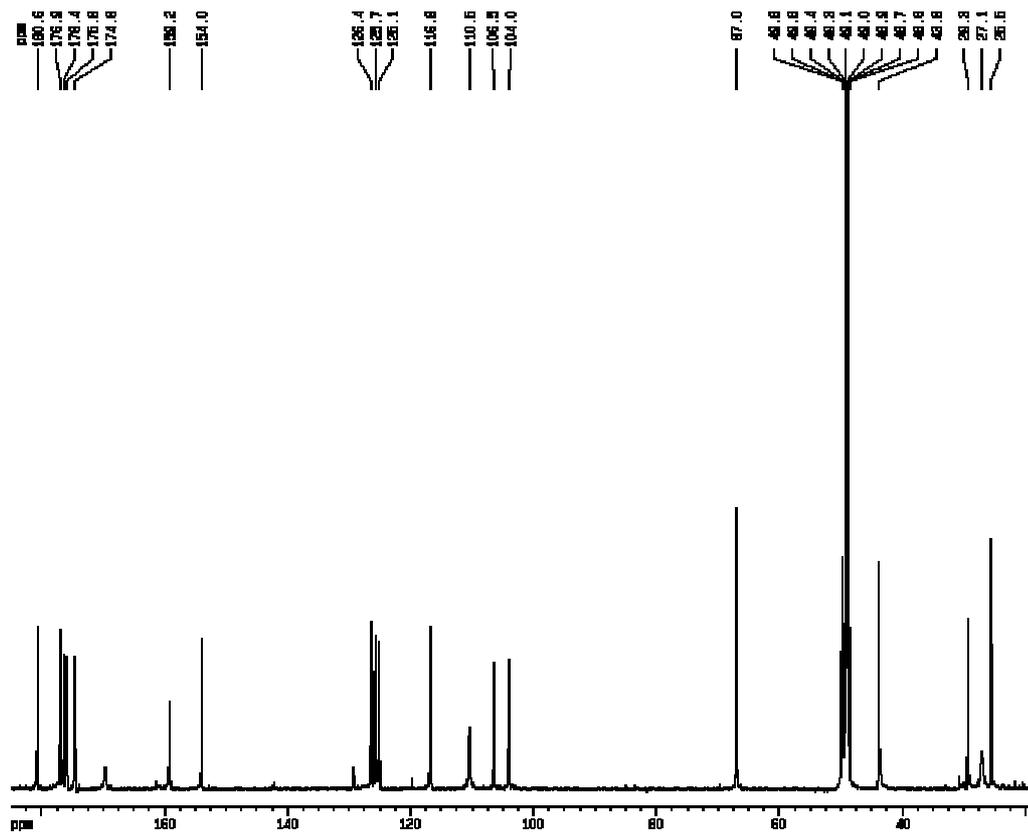


Abbildung 21: ^{13}C -NMR-Spektrum von Pelianthin (176), $[\text{D}_4]$ Methanol, 151 MHz

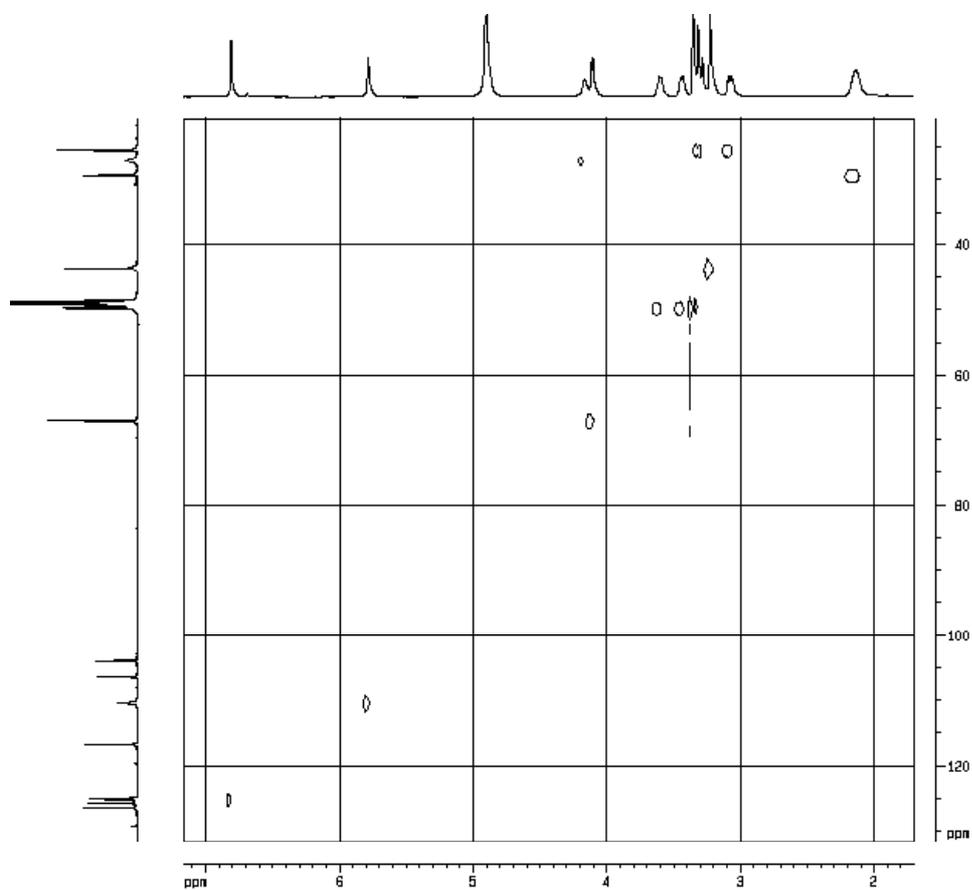


Abbildung 22: HMQC-Spektrum von Pelianthin (176), $[\text{D}_4]$ Methanol, 600/151 MHz

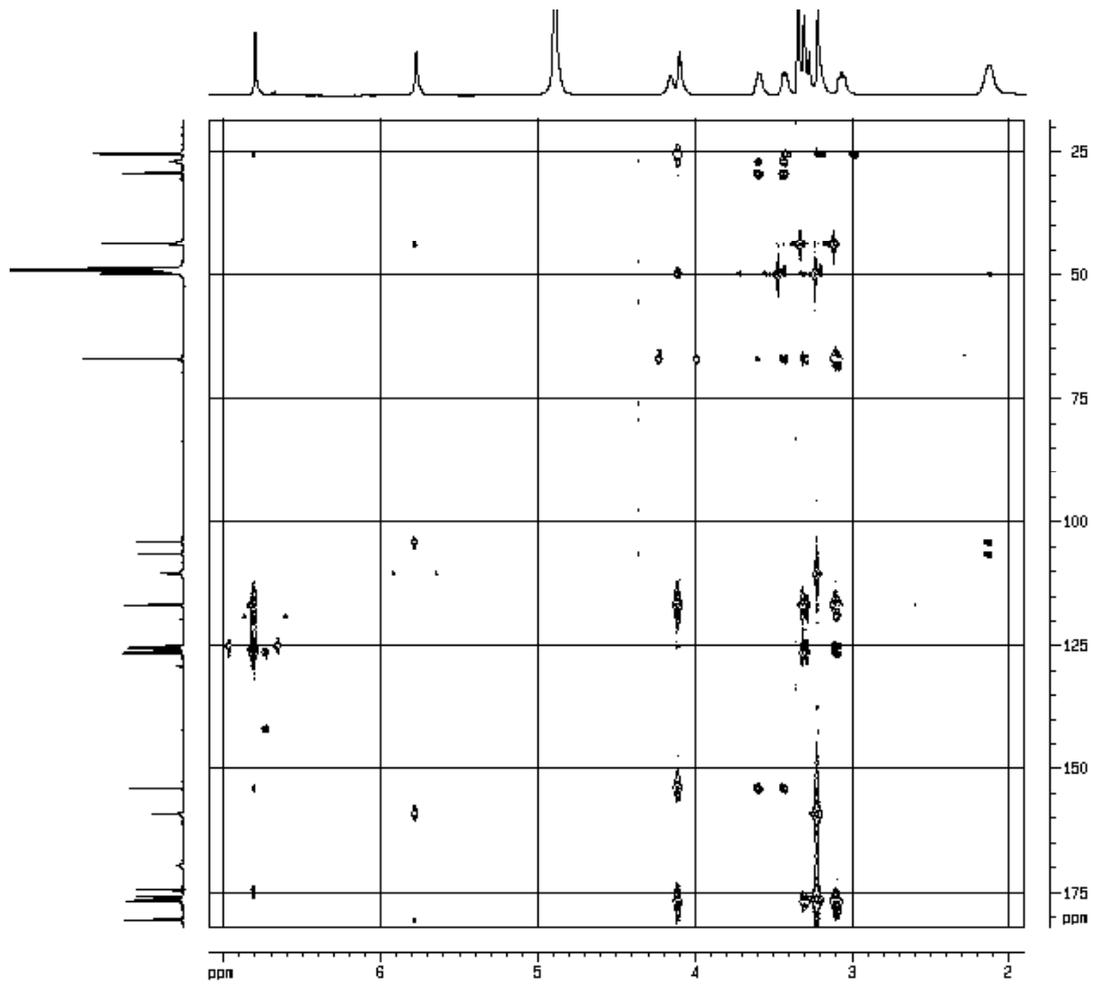


Abbildung 23: HMBC-Spektrum von Pelianthin (176), [D₄]Methanol, 600/151 MHz

C-Atom	δ_C [ppm]	Art	δ_H [ppm]	Multiplizität	J_{HH} [Hz]	$^nJ_{HH}$ -Koppl. δ_H [ppm] COSY	$^nJ_{CH}$ -Koppl. δ_C [ppm] HMBC
2	25.5	CH ₂	3.09 3.3	dd br	15.9, 7.1	3.3,4.10 3.09, 4.10	67.0, 116.8, 125.2, 125.7, 176.9
8a	27.1	CH	4.17	br		2.13 ⁱ	29.3 ⁱ , 49.8 ⁱ , 104.0 ⁱ , 106.5 ⁱ , 154.0 ⁱ , 180.6 ⁱ
9	29.3	CH ₂	2.13	m		3.43/3.58, 4.17 ⁱ	27.1 ⁱ , 49.8, 104.0, 106.5
16	43.8	CH ₂	3.22	s			110.5, 159.2, 175.8
10	49.8	CH ₂	3.43 3.58	dd dd	12.4, 6.4 12.4, 5.8	2.13, 3.58 2.13, 3.43	27.1, 29.3, 67.0, 154.0
18	49.9	CH ₃	3.31	s			
1	67.0	CH	4.10	d	7.1	3.09/3.3	25.5, 49.8, 116.8, (125.2), 154.0, 176.9
8	104.0	C _q					
8b	106.5	C _q					
13	110.5	CH	5.78	s			43.8, 104.0, 159.2, 180.6
2a	116.8	C _q					
3	125.2	CH	6.80	s			25.5, 116.8, 125.7, 154.0, 174.6
10c	125.7	C _q					
5a	126.4	C _q					
10b	154.0	C _q					
12	159.2	C _q					
4a	174.6	C _q					
17	175.8	C _q					
6	176.4	C _q					
15	176.9	C _q					
14	180.6	C _q					

Tabelle 6: NMR-Daten von Pelianthin (176), (ⁱ: nicht bei Raumtemperatur sichtbar)

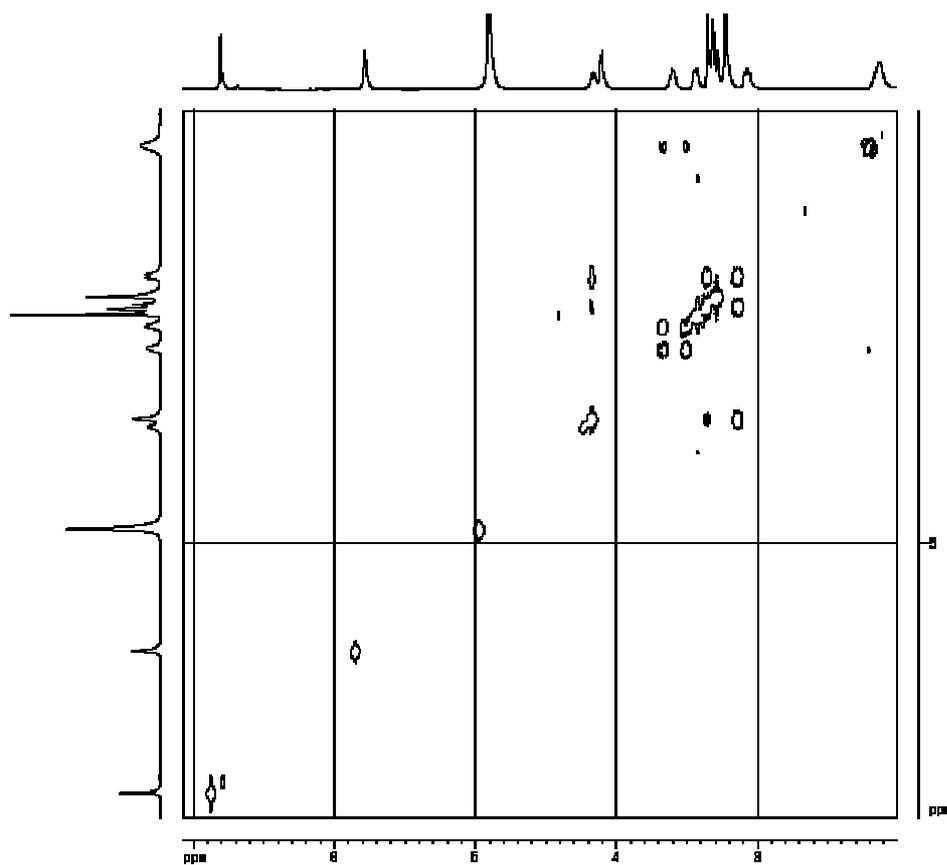


Abbildung 24: COSY von Pelianthin (176), [D₄]Methanol, 600 MHz

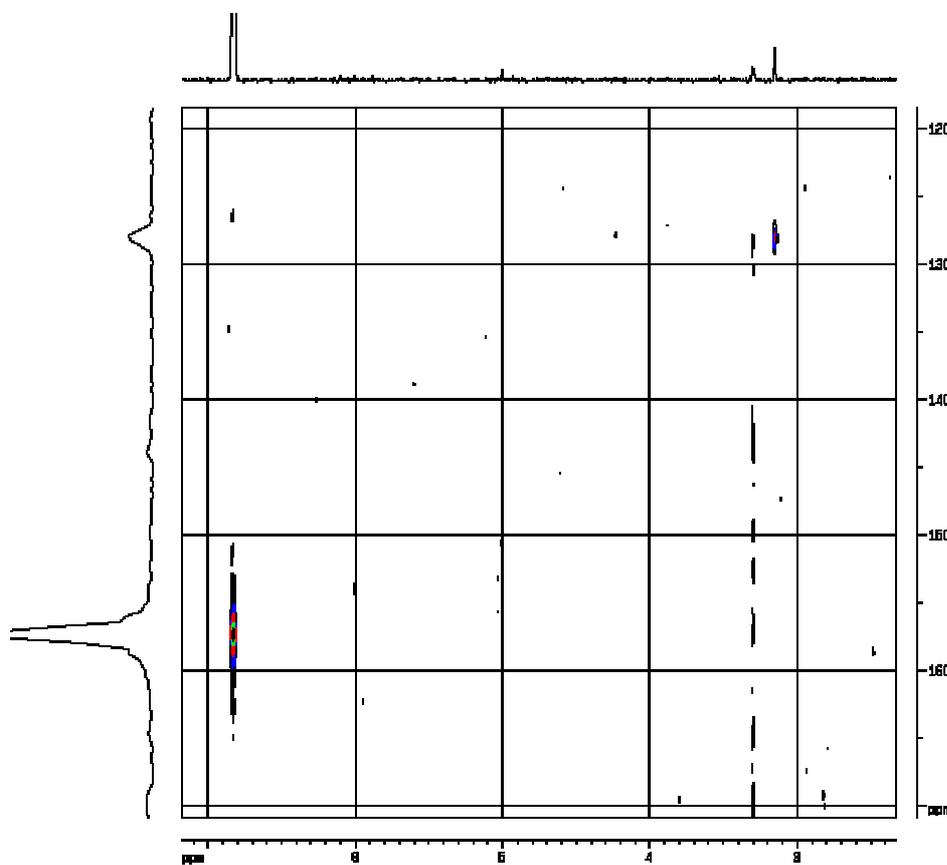
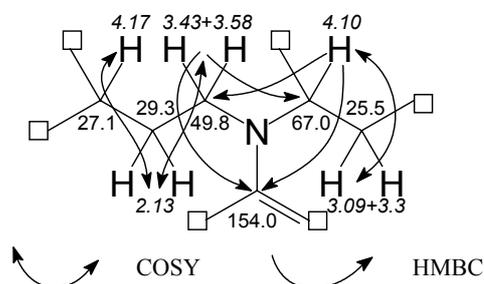


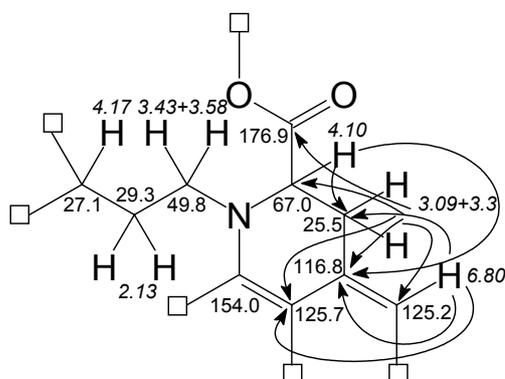
Abbildung 25: ¹H-¹⁵N-HMBC-Spektrum von Pelianthin (176), [D₄]Methanol, 600/61 MHz

Das COSY (Abb. 24) zeigt eine CH₂–CH-Gruppierung ($\delta_{\text{H}} = 3.09/3.3$ und 4.10) und eine CH₂–CH₂–CH-Sequenz ($\delta_{\text{H}} = 3.43/3.58$, 2.13 und 4.17). Diese beiden Fragmente scheinen über ein Stickstoff-Atom miteinander verbunden zu sein, da die Gruppen bei $\delta_{\text{H}} = 4.10$ und die bei $\delta_{\text{H}} = 3.43/3.58$ dafür charakteristische Verschiebungen und im HMBC (Abb. 23) wechselseitige Fernkopplungen zeigen, sowie eine gemeinsame Korrelation zu einem quartären Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 154.0$ besitzen. Die Vermutung, daß es um ein zentrales Stickstoff-Atom handelt, kann man durch eine ¹H–¹⁵N-HMBC-Korrelation (Abb. 25) der Protonen der CH₂-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.09$ und 3.3 (also eine ³J_{NH}-Kopplung) stützen. Es läßt sich so eine erste Teilstruktur formulieren (Strukturfragment I).



Schema 76: Strukturfragment I für Pelianthin

Die Protonen der CH₂-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.09/3.3$ und das der olefinischen CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 6.80$ zeigen sowohl wechselseitige HMBC-Kopplungen als auch gemeinsame Korrelationen zu den quartären Kohlenstoffatomen bei $\delta_{\text{C}} = 116.8$ und 125.7. Das Wasserstoffatom bei $\delta_{\text{H}} = 4.10$ hingegen koppelt nur zu dem C-Atom bei $\delta_{\text{C}} = 116.8$. Ferner zeigt nur die CH₂-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.09/3.3$ Fernkopplungen zu einer Carbonylfunktion bei $\delta_{\text{C}} = 176.9$. Anhand dieser Informationen kann Strukturfragment I weiter vervollständigt werden:



Schema 77: Strukturfragment II für Pelianthin

Die bislang beschriebene Strukturaufklärung bezieht sich auf NMR-Spektren bei Raumtemperatur. Dabei tritt ein Problem auf: das Signal des Protons bei $\delta_{\text{H}} = 4.17$ ist stark verbreitert und zeigt daher keine Kopplungen im HMBC-Spektrum. Diese Korrelationen sind aber insofern entscheidend, als sie Aufschluß über die weitere Verknüpfung von Strukturfragment II liefern sollten. Es werden daher Versuche zur Temperaturabhängigkeit der Signalschärfe unternommen. Bei tiefer Temperatur können keine Erfolge erzielt werden, erst bei 325 K in $[\text{D}_4]$ -Methanol kann ein ausreichend aufgelöstes Signal erhalten werden, das auch Fernkopplungen zeigt (Abb. 26).

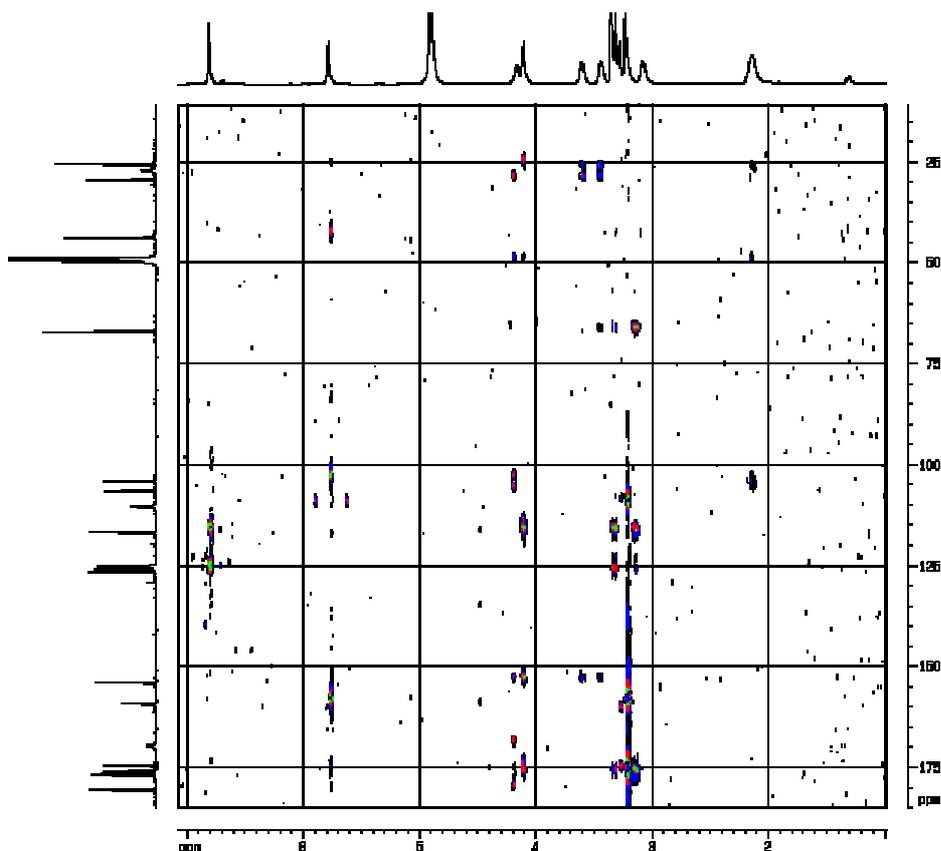
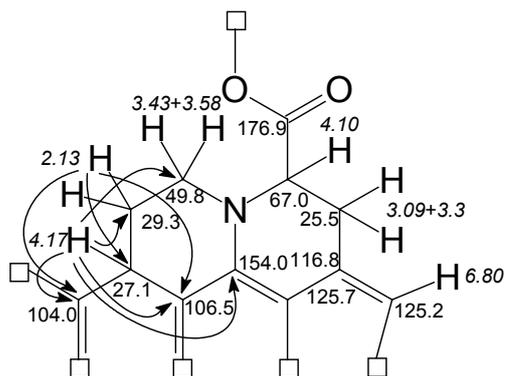


Abbildung 26: HMBC-Spektrum von Pelianthin (176), $[\text{D}_4]$ Methanol, 600/151 MHz, 325K

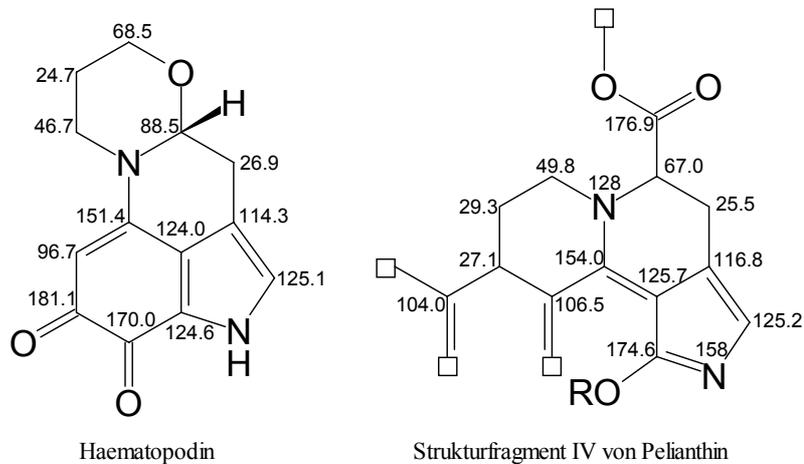
Man erkennt - abgesehen von den Korrelationen zu den beiden CH₂-Gruppen bei $\delta_C = 29.3$ und 49.8 - zwei Kopplungen zu quartären C-Atomen bei $\delta_C = 104.0$ und 106.5. Diese sind auch ausgehend von den Protonen der CH₂-Gruppe bei $\delta_C = 29.3$ zu sehen. Es ist daher anzunehmen, daß sie direkt benachbart zu der CH-Funktion bei $\delta_H = 4.17$ und $\delta_C = 27.1$ liegen. Ferner zeigt das Proton bei $\delta_H = 4.17$ noch eine Kopplung zu den Kohlenstoffatomen bei $\delta_C = 154.0$ und 180.6. Daraus läßt sich schließen, daß ein Ringschluß zu der Position bei $\delta_C = 154.0$ erfolgt sein muß.



Schema 78: Strukturfragment III für Pelianthin

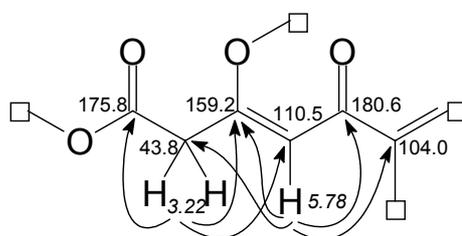
Ausgehend von der olefinischen CH-Gruppe bei $\delta_H = 6.80$ und $\delta_C = 125.2$ läßt sich Strukturfragment III und damit der erste Strukturteil von Pelianthin weiter vervollständigen. Diese CH-Gruppe zeigt eine Kopplung zu einem Stickstoffatom bei $\delta_N = 158$. Diese N-Verschiebung deutet auf eine Amidfunktion hin. So erklärt sich auch die Fernkopplung der CH-Gruppe bei $\delta_H = 6.80$ zu einem quartären Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 174.6$. Aufgrund der Ähnlichkeit des bislang abgeleiteten Strukturfragmentes III mit Haematopodin ist anzunehmen, daß ein biosynthetischer Zusammenhang mit Tryptophan (**34**) besteht. Dabei scheint im *ortho*-Chinonteil von Haematopodin eine Veränderung stattgefunden zu haben. Außerdem ist der *N,O*-Acetalring des Haematopodins in Pelianthin auf andere Weise geschlossen. Man kann also davon ausgehen, daß auch in dem blauen Farbstoff aus *M. pelianthina* der Pyrrolring des Tryptophan-Biosynthesevorläufers zu finden ist. Aufgrund der intensiven Farbe von Pelianthin ist aber auszuschließen, daß das Chromophor ein Amid (also –NH–CO–R) enthält. Es muß sich vielmehr um einen Imidoester (–N=C(OR')–R) handeln, so daß eine weitere Verknüpfung des π -Elektronensystems über eine Etherbrücke möglich wird.

Schema 79 stellt Haematopodin und den weiter ergänzten ersten Strukturteil (Strukturfragment IV) gegenüber:



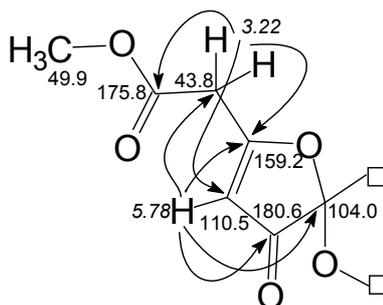
Schema 79: Strukturfragment IV für Pelianthin im Vergleich mit Haematopodin (106)

Ein zweiter Strukturteil von Pelianthin zeigt nur wenige gemeinsame Fernkopplungen mit dem ersten. Sowohl die CH₂-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 2.13$ als auch das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 5.78$ koppeln zu dem quartären Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 104.0$. Dabei handelt es sich in beiden Fällen um eine stark ausgeprägte Kopplung, also vermutlich eine $^3J_{\text{CH}}$ -Korrelation. Das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 5.78$ und die der CH₂-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.22$ zeigen wechselseitige Fernkopplungen und eine gemeinsame Korrelation zu einem quartären, wahrscheinlich Heteroatom-substituierten C-Atom bei $\delta_{\text{C}} = 159.2$. Da keine ^1H - ^{15}N -Korrelationssignale festzustellen sind, ist davon auszugehen, daß es sich dabei um ein Sauerstoffatom handelt. Unter Berücksichtigung einer Kopplung der CH₂-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.22$ zu einer Carbonylfunktion bei $\delta_{\text{C}} = 175.8$ und der des Protons bei $\delta_{\text{H}} = 5.78$ zu einer weiteren Carbonylgruppe bei $\delta_{\text{C}} = 180.6$ läßt sich eine Teilstruktur für das zweite Bruchstück formulieren (Schema 80).



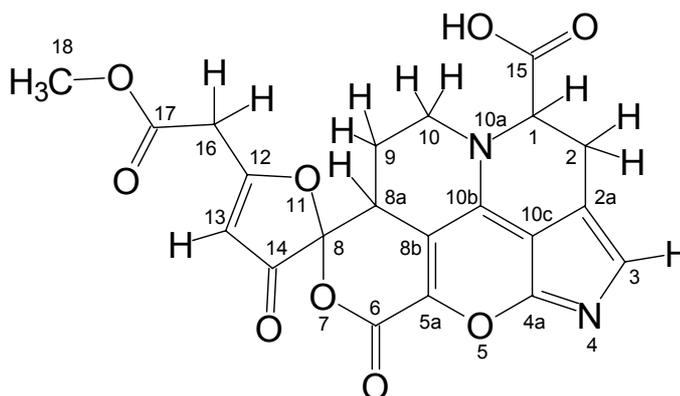
Schema 80: Strukturfragment V für Pelianthin

Abgesehen von einer CH₃-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 49.9$, die entweder mit der Carboxylfunktion des ersten oder der des zweiten Strukturteiles von Pelianthin verestert sein muß, bleiben noch ein quartäres Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 126.4$ und eine Carbonylfunktion bei $\delta_{\text{C}} = 176.4$, zu denen kein Proton eine Fernkopplung zeigt. Diese Gruppen müssen unter Berücksichtigung des biosynthetischen Ursprunges in Tryptophan (**34**) in die Struktur eingefügt werden. Berechnet man die Zahl der verbleibenden Doppelbindungsäquivalente, so stellt man fest, daß eines der quartären Kohlenstoffatome mit einer Verschiebung größer 100 sp³-hybridisiert sein muß. Es wird vermutlich dasjenige sein, das den ersten mit dem zweiten Strukturteil verknüpft. Um den Tieffeldshift dieses sp³-hybridisierten C-Atoms zu erklären, muß man annehmen, daß es doppelt Heteroatom-substituiert ist. Auf diese Weise versteht sich auch die leichte MS/MS-Fragmentierung. Das Bruchstück mit einem Massenanteil von $m/z = 170$ entsteht also aus dem zweiten Strukturteil durch die massenspektrometrische Instabilität des Spiro-C(O,O)-Zentrums. Aus der Größe dieses Schlüsselfragmentes ergibt sich ferner, daß die Carbonylfunktion dieses Teiles als Methylester vorliegen muß.

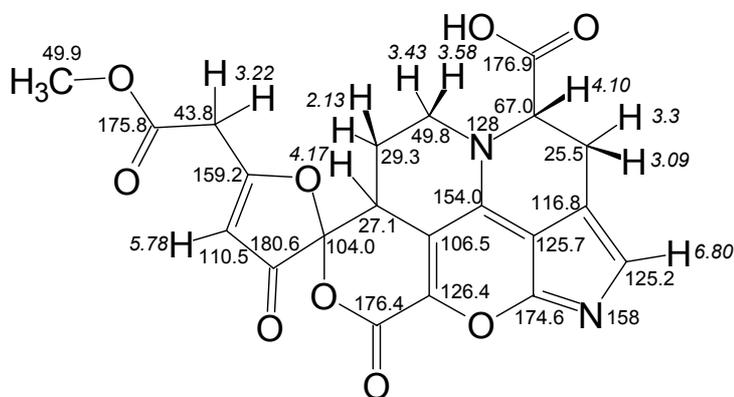


Schema 81: Strukturfragment VI für Pelianthin

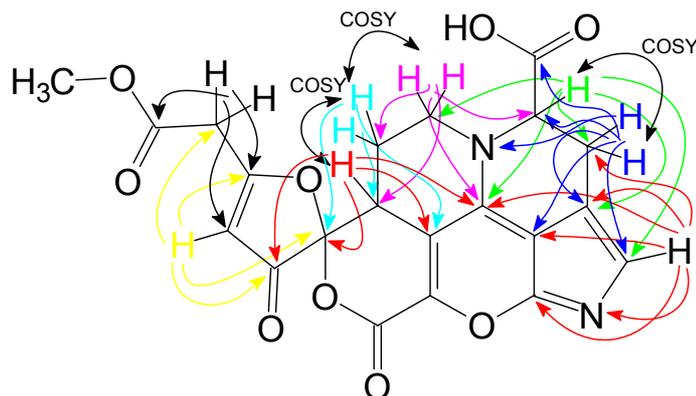
Die noch verbleibenden Gruppen können unter der Annahme, daß der *ortho*-Chinonring, wie er in Haematopodin vorliegt, durch eine Baeyer-Villiger-Oxidation aufgespalten wird, in den ersten Strukturteil eingefügt werden. Die Verschiebung des quartären Kohlenstoffatoms bei $\delta_C = 126.4$ ist durch die push-pull-Substitution zu erklären. Die Struktur des Pelianthins kann somit gelöst werden.



Schema 82: Struktur von Pelianthin (176) mit Numerierung



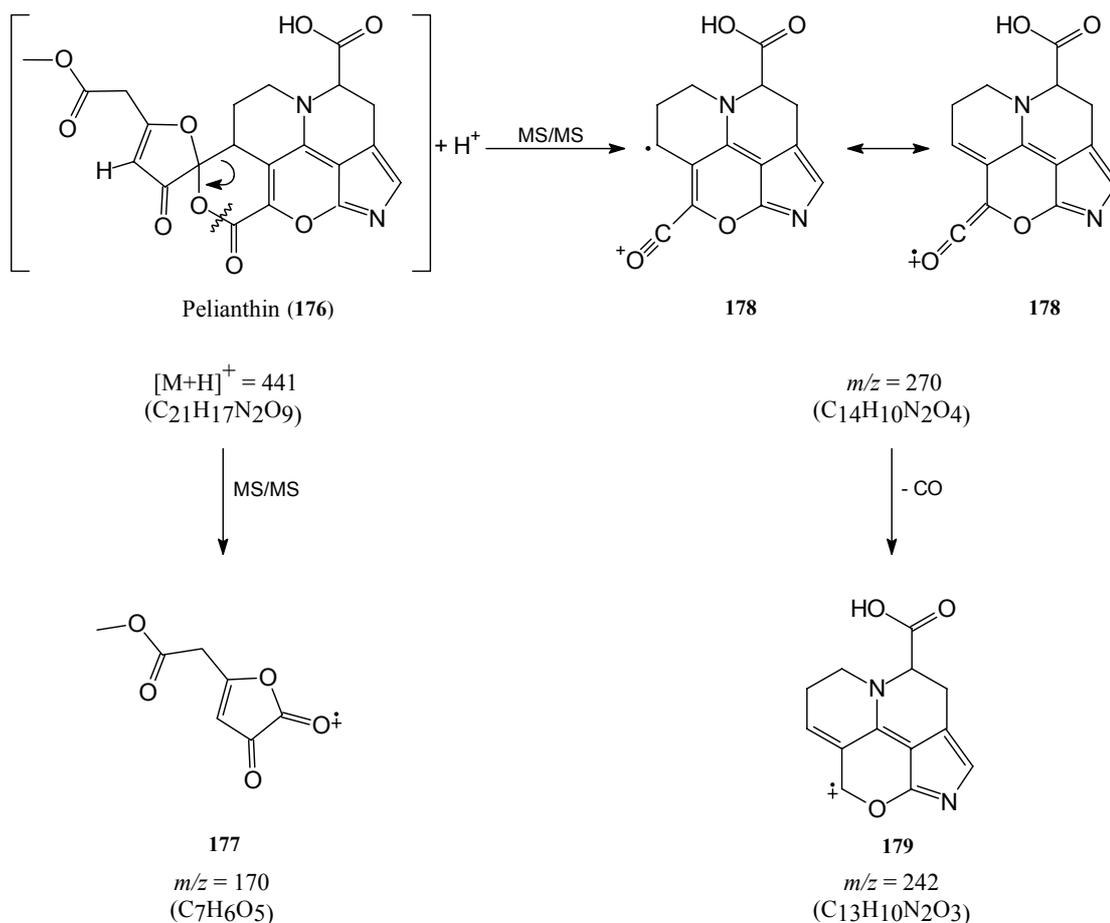
Schema 83: Struktur von Pelianthin (176) mit NMR-Verschiebungen



Schema 84: Struktur von Pelianthin (**176**) mit HMBC-Korrelationen

11.3 Massenfragmentierungsmuster des Pelianthins (**176**)

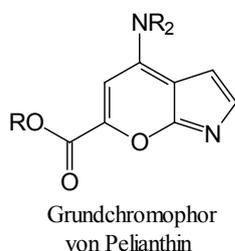
Die ESI-MS/MS-Fragmentierung (Schema 85) des $[M+H]^+$ -Ions in Pelianthin beginnt vermutlich mit einer Spaltung des Lactons im Sechsring mit nachfolgendem C–C-Bindungsbruch. Man detektiert abhängig von der gewählten Spannung überwiegend das Radikalkation **178** der Masse $m/z = 270$, das weiter unter CO-Abspaltung zu **179** ($m/z = 242$) zerfällt. In diesem Fall wird ein ungeladenes Radikal der Masse $m/z = 171$ abgespalten. Es tritt aber auch das Bruchstück **177** ($m/z = 170$) auf. Folgendes Schema veranschaulicht diese beiden Fragmentierungsreaktionen:



Schema 85: ESI-MS/MS-Fragmentierung von Pelianthin (176)

11.4 Berechnung des UV/Vis-Spektrums von Pelianthin (176)

Um die Farbigkeit der Verbindung **176** und das UV/Vis-Spektrum des Strukturvorschlages zu überprüfen, wird mit dem Programm WPSIN 4^[141, 142] eine semiempirische Berechnung durchgeführt.^c Dabei wird zunächst eine Moleküloptimierung mit dem Hartree-Fock-Verfahren vorgenommen. Die Berechnung wird auf folgendes Grundchromophor beschränkt:



Schema 86: Grundchromophor von Pelianthin (176)

^c Ich danke Herrn Dr. H.-U. Wagner herzlich für die Durchführung dieser Berechnung.

Das mit WPSIN 4 berechnete UV/Vis-Spektrum zeigt große Ähnlichkeit mit dem experimentell bestimmten des Naturstoffes. Die errechneten Absorptionsmaxima liegen bei 262, 307, 359 und 491 nm, die gemessenen bei 255, 295, 353 und 565 nm. Nur das langwelligste Maximum ist im Vergleich zum Naturstoff hypsochrom verschoben. Diese Tatsache ist vermutlich auf die Solvatochromie des als Lösungsmittel verwendeten Methanols zurückzuführen. WPSIN 4 berechnet UV/Vis-Spektren für deutlich unpolare Lösungsmittel. Ferner ist es möglich, daß die Carboxylfunktion des Pelianthins partiell als Salz und das Stickstoff-Atom im Pyrrolring protoniert vorliegen (also als Betain: $-\text{N}^+\text{H}(\text{R})-\text{CH}-\text{CR}'-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{R}'')\text{COO}^-$). Dies würde ebenfalls für eine Farbvertiefung sprechen. Eine AAS-Analyse der Verbindung zeigt deutlich erhöhte Kaliumwerte. Also könnte auch zum Teil ein Carbonsäure-Kaliumsalz vorliegen. Allerdings ist die Entfernung dieser Gruppe zum chromophoren System relativ groß und es liegt keine Konjugation vor. Entscheidend jedoch für die Aussagekraft der Berechnung ist die Intensität des Maximums. Es entsteht zu ca. 80% durch einen HOMO-LUMO-Übergang. Ein Blick auf die Elektronendichteverteilung in den beiden Orbitalen (Abb. 27) erklärt die geringe Intensität der Bande. Im HOMO ist die Elektronendichte im Fünfring besonders hoch, im LUMO dagegen in Sechsring und Esterfunktion.

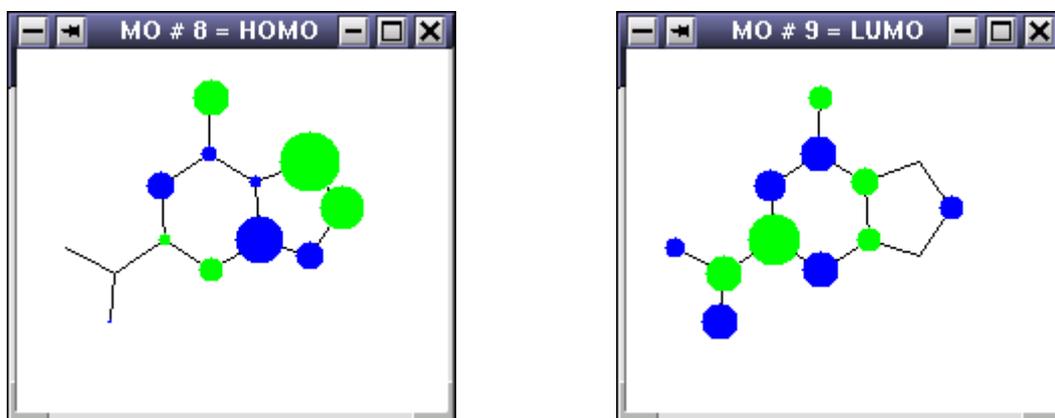
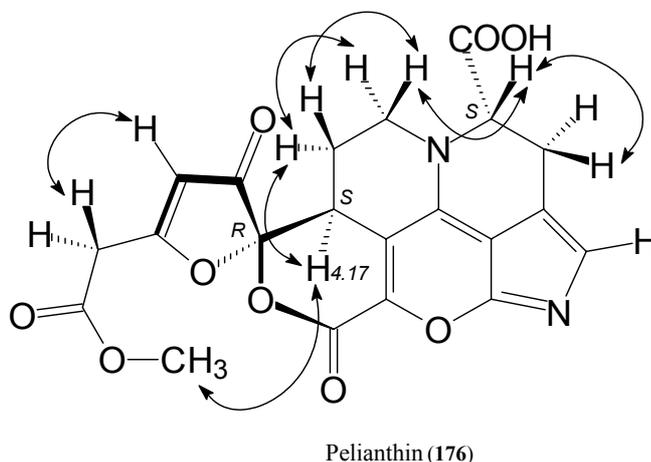


Abbildung 27: berechnete Elektronendichteverteilung in HOMO und LUMO von Pelianthin (176)

Mißt man das UV/Vis-Spektrum von Pelianthin unter Zusatz von Trifluoressigsäure, so findet man eine Verschiebung des langwelligsten Maximums auf 486 nm. Vermutlich verschiebt sich dann das Protonierungsgleichgewicht des Pelianthins. Die WPSIN 4-Berechnung kann als Bestätigung für den vorgestellten Strukturvorschlag gesehen werden.

11.5 Die relative Stereochemie von Pelianthin (176) anhand des NOE-Spektrums

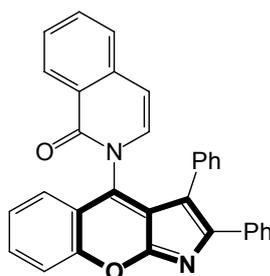
Die relative Stereochemie ($1S^*$, $8R^*$, $8aS^*$) von Pelianthin (176) kann anhand eines NOE-Spektrums ermittelt werden. Unter der Annahme, daß die L-Konfiguration des vermutlichen Biosynthesevorläufers Tryptophan (34) erhalten bleibt, ergibt sich die absolute Stereochemie ($1S$, $8R$, $8aS$). Die relative Konfiguration an der CH-Gruppe bei $\delta_H = 4.17$ kann aufgrund der starren Anordnung des Ringsystems ausgehend vom α -Wasserstoffatom des Tryptophanbausteines bestimmt werden. Wegen des Kern-Overhauser-Effektes zwischen den Protonen der Carbonsäureesterfunktion und dem Wasserstoffatom bei $\delta_H = 4.17$ ist ferner anzunehmen, daß das Spirozentrum (R)-konfiguriert ist. Der biosynthetische Ursprung der linken Molekülhälfte bleibt rätselhaft. Folgendes Schema faßt die ermittelten NOE-Korrelationen zusammen:



Schema 87: NOE-Korrelationen in Pelianthin (176) und Ableitung der relativen Stereochemie

11.6 Vorkommen verwandter chromophorer Systeme

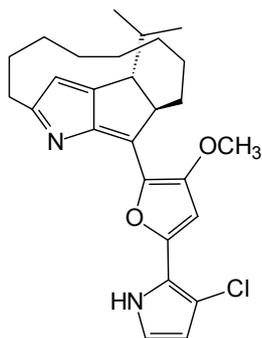
Das ungewöhnliche Pyrano[2,3-b]pyrrol-Chromophor der Verbindung konnte bislang nicht in Naturstoffen gefunden werden. Vebrel et al.^[143] beschreiben ein rotes 2,3-Diphenylchromeno[2,3-b]pyrrol-derivat **180** als Nebenprodukt einer Diels-Alder Reaktion von Isochinolincarbo-nitrilen mit Arylidenbenzofuranonen.



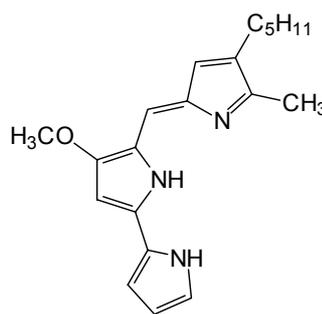
4-[2-(1,2-Dihydro-1-oxoisochinoliny)]-
2,3-diphenylchromeno[2,3-b]pyrrol (**180**)

Schema 88: Verbindungen mit Pyrano[2,3-b]pyrrol-Chromophor (fett markiert) in der Synthesechemie

Farbige Verbindungen, die ein Azafulven-Chromophor enthalten, findet man in der Natur. So konnten Seto et al.^[144] aus der Fermentationsbrühe des Actinomyceten *Streptomyces griseoviridis* das rote Roseophilin (**181**) isolieren. Roseophilin zeigt *in vitro*-Aktivität gegen menschliche K562-Leukämiezellen und beachtliche Wirksamkeit gegen Hautkrebszelllinien.^[145] Ein weiterer Farbstoff mit gleichem Strukturfragment ist das Prodigiosin (**182**), das man ebenfalls in verschiedenen Actinomycetenstämmen findet.^[146, 147]



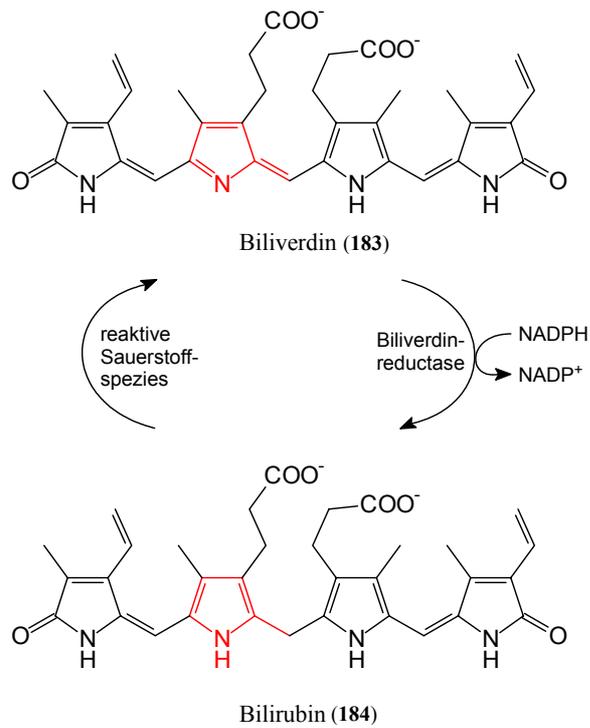
Roseophilin (**181**)



Prodigiosin (**182**)

Schema 89: Roseophilin (**181**) und Prodigiosin (**182**), Naturstoffe mit Azafulvenchromophor

Auch Biliverdin (**183**), das als Zwischenprodukt beim Abbau des roten Blutfarbstoffes Häm zum Gallenfarbstoff Bilirubin (**184**) gebildet wird, besitzt einen Azafulven-Baustein. Dieses Azafulven wird im grünen Biliverdin durch die NADPH-abhängige Biliverdinreductase zu Pyrrol reduziert.^[148] Die entstehende CH₂-Brücke unterbricht die Konjugation, Bilirubin ist orange-rot.



Schema 90: Stoffwechselweg von Biliverdin (**183**) zu Bilirubin (**184**)

12. *MYCENA ROSELLA*

12.1 Pilzbeschreibung

Mycena rosella (Fr.) Kumm., der Rosa Helmling, gehört zur Familie der Tricholomataceae (Roze ex Overeem), Ordnung Agaricales.^[139] Man findet den Pilz von Sommer bis Spätherbst vor allem in Jungfichten-Schonungen. Der Hut erreicht einen Durchmesser von 0.5–1 cm, ist kegelförmig, bis fast zur Mitte gefurcht, in frischem Zustand rosafarben mit dunkler Mitte, später orangerosa mit bräunlicher Mitte. Das Fleisch ist weißlich. Der Stiel ist 2–5 cm lang, 0.5–2 mm breit, zylindrisch, glatt, blaß bräunlich, oft mit Rosaton. Die Lamellenschneiden sind besonders farbintensiv orangerosa. Ist der Pilz lang anhaltenden Regenfällen ausgesetzt, wird er langsam braun und enthält nicht mehr die im Rahmen dieser Arbeit isolierten orangeroten Farbstoffe.

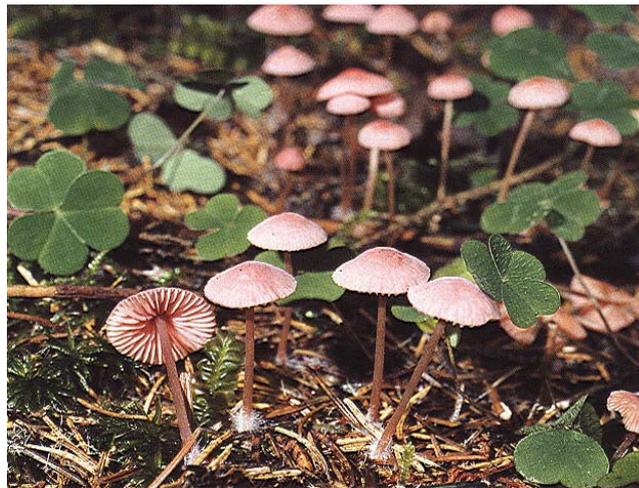


Abbildung 28: *Mycena rosella* (Fr.) Kumm.

12.2 Isolierung und Strukturaufklärung der orangeroten Farbstoffe aus *Mycena rosella*, eigene Arbeiten

Da *M. rosella* ein schwierig zu beschaffender Pilz ist, werden bisher keine Voruntersuchungen zur Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe beschrieben.

Die am Reisberg, bei Penzberg und Geibenstetten gesammelten Fruchtkörper werden direkt an der Fundstelle in Methanol gegeben. Auf diese Weise ist eine optimale Ausbeute an farbigen Verbindungen des mühsam in ausreichender Menge zu findenden Pilzes gewährleistet. Eine Überführung der Farbstoffe in die organische Phase nach Ausschütteln gegen Essigsäureethylester ist nicht möglich. Zur Abtrennung von Zucker-Verunreinigungen wird der Rohextrakt aus *M. rosella* daher an Sephadex LH-20 mit Methanol und Sephadex G-10 mit Wasser vorgereinigt. Die Feinreinigung erfolgt HPL-chromatographisch mit einer präparativen RP-18-Säule. Der analytische HPLC-Lauf (Trennsystem 3) der Kollektionen aus dem Jahr 2001 (Abb. 29) zeigt zwei orangerote Hauptverbindungen mit den Retentionszeiten 30.57 und 33.77 min. Sie sollen Rosellin A (**185**) und B (**187**) genannt werden. Ein Vergleich mit HPL-Chromatogrammen aus den Jahren 1998 und 2000 zeigt, daß *M. rosella* drei Orange-Farbstoffe in unterschiedlichen Mengenverhältnissen enthält. Eine dritte, geringfügig polarere Verbindung mit ähnlichem UV/Vis-Spektrum tritt auf, die im folgenden Rosellin C (**188**) genannt wird ($R_t = 26.25$ min) (Abb. 30).

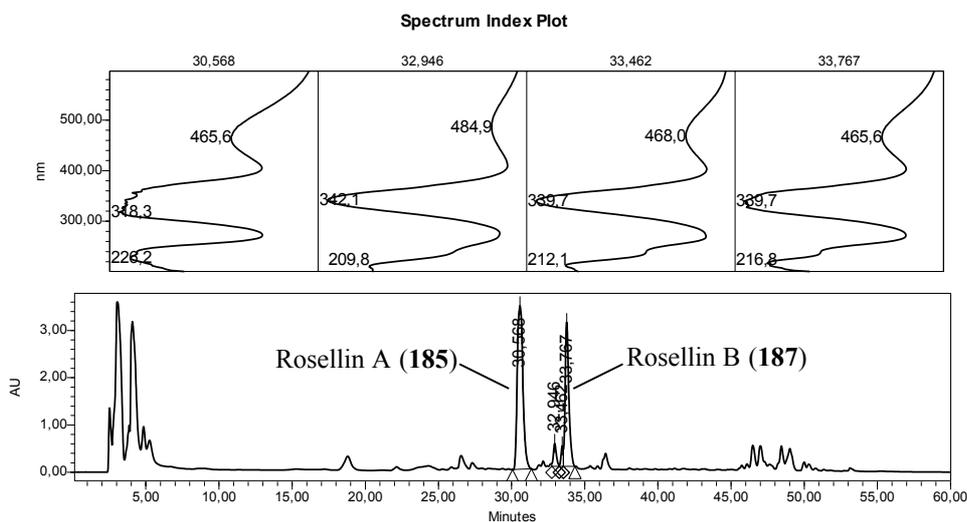


Abbildung 29: HPL-Chromatogramm einer Kollektion 2001 von *Mycena rosella* (Trennsystem 3)

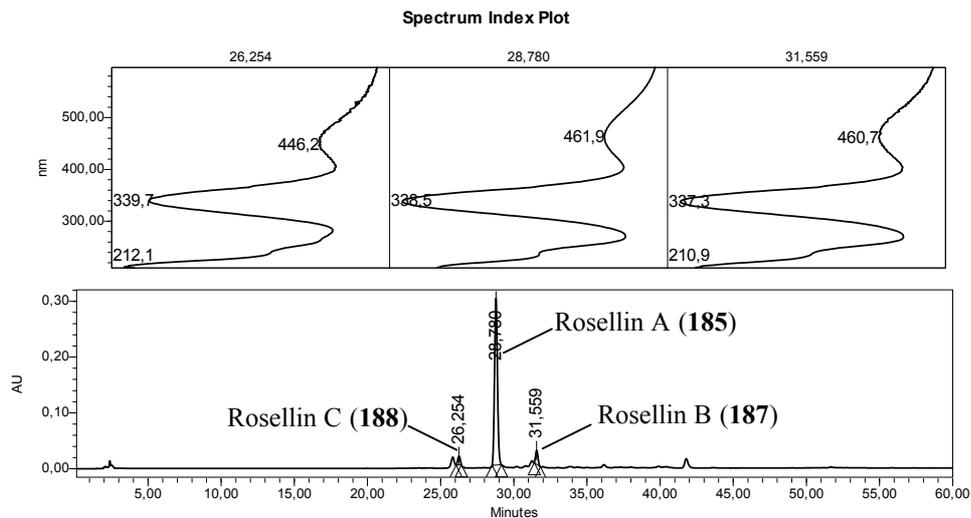
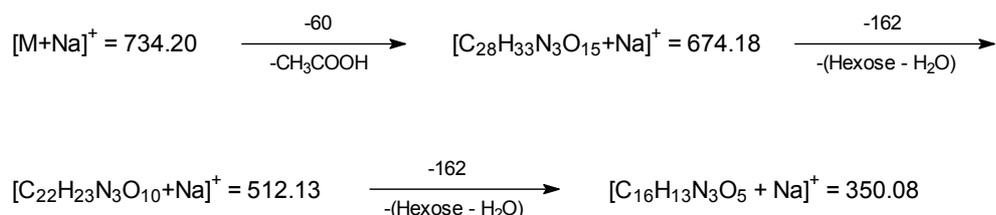


Abbildung 30: HPL-Chromatogramm einer Kollektion 1998 von *Mycena rosella* (Trennsystem 3)

Im neg. ESI-MS der beiden Hauptverbindungen (Kollektionen 2001) sieht man den $[M-H]^-$ -Peak von Rosellin A (**186**) bei $m/z = 710$, den von Rosellin B (**187**) bei $m/z = 752$. Eine Massendifferenz von 42 deutet auf eine zusätzliche Acetylgruppe (C_2H_2O) in Verbindung B hin. Rosellin C (**188**) aus den Jahren 1998 und 2000 unterscheidet sich von Rosellin A wiederum um 42 Masseneinheiten, eine fehlende Acetylgruppe führt zu einem $[M-H]^-$ -Peak bei $m/z = 668$.

12.2.1 Rosellin A (185)

Für Rosellin A (185) ergibt sich aus der Stickstoffregel^[100] eine ungerade Anzahl von N-Atomen. Da für diese Verbindung ein $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -HMBC vorliegt, in dem man Fernkopplungen zu zwei Stickstoffatomen erkennen kann, muß man davon ausgehen, daß mindestens drei N-Atome im Gesamtmolekül vorhanden sind. So ergibt die Hochauflösung auch eine Summenformel $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_{17}$. Im Laser-ESI-MS/MS-Spektrum erhält man wertvolle Fragmentierungsinformationen. Die Verbindung spaltet zunächst eine Masseneinheit von $m/z = 60$ ab. Das entspricht einem Molekül Essigsäure. Anschließend erfolgt zweimal die Abspaltung eines Schlüsselbruchstückes der Masse 162. Der Massenverlust von $m/z = 162$ ist typisch für die Abspaltung von Hexoseeinheiten.^[149] Auch bei Orellanin-4,4'-di- β -D-glucopyranosid aus *Cortinarius speciosissimus* konnte eine solche Fragmentierung beobachtet werden.^[150] Folgende Abbildung faßt die massenspektrometrischen Daten zusammen.



Schema 91: Fragmentierung von Rosellin A (185) im Laser-ESI-MS/MS-Spektrum

In diesen Ergebnissen zeigt sich auch, daß sich die drei Stickstoffatome im Aglykon der Verbindung befinden müssen.

Rosellin A löst sich in Methanol, Wasser und Pyridin. Das UV/Vis-Spektrum in Methanol zeigt drei Absorptionsmaxima bei 236, 336 und 476 nm. Der Farbstoff ist optisch aktiv $\{[\alpha]_D^{22} = -101 (c = 0.004, \text{CH}_3\text{OH})\}$, das CD-Spektrum weist mehrere ausgeprägte Cotton-Effekte auf.

Im IR-Spektrum sieht man einige sehr charakteristische Banden: bei 3340 cm^{-1} eine starke NH- oder OH-Valenzschwingung, bei 1692 und 1546 cm^{-1} die Amid I- bzw. Amid II-Banden von *N*-monosubstituierten Amiden, bei 1638 cm^{-1} eine Bande, die für *N,N*-disubstituierte Amide charakteristisch ist und bei 1358 cm^{-1} eine C–N-Valenzschwingung.

Das ^1H -NMR-Spektrum von Rosellin A (Abb. 31) zeigt, daß es sich bei dieser Verbindung um ein Diglykosid handelt. Unterdrückt man das Lösungsmittelsignal von HOD, so sieht man die Signale zweier anomerer Protonen. Die Kopplungskonstante von jeweils 7.1 Hz deutet auf eine β -Verknüpfung der beiden Zuckerbausteine hin. Bei α -Glycosiden liegt die Kopplungskonstante bei ungefähr 3.5 Hz.^[100] Im Bereich zwischen 3.38 und 3.52 befinden sich weitere,

beiden Zuckerresten zugehörige Signale. Für den Aglykon-Teil der Verbindung lassen sich im aliphatischen Bereich drei aufgespaltene Signale bei $\delta_{\text{H}} = 1.88$, 2.27 und 2.43, sowie ein Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 2.08$ erkennen. Bei tieferem Feld sieht man ein Triplet bei $\delta_{\text{H}} = 6.62$, ein Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 7.14$, ein Dublett bei $\delta_{\text{H}} = 7.17$, ein schlecht aufgelöstes Signal bei $\delta_{\text{H}} = 7.18$ und ein weiteres Dublett bei $\delta_{\text{H}} = 7.29$.

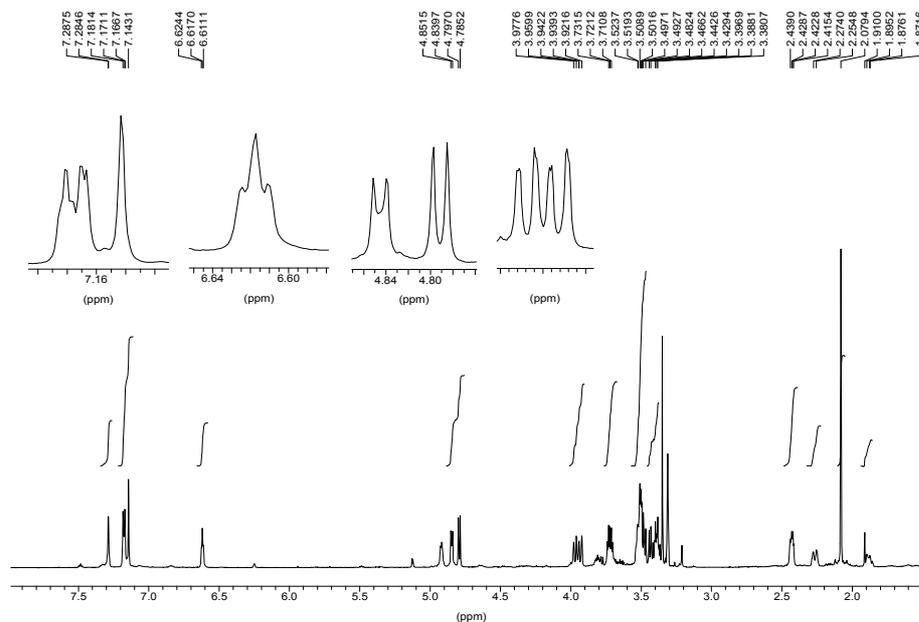


Abbildung 31: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Rosellin A (185), $[\text{D}_4]\text{Methanol}$, 600 MHz

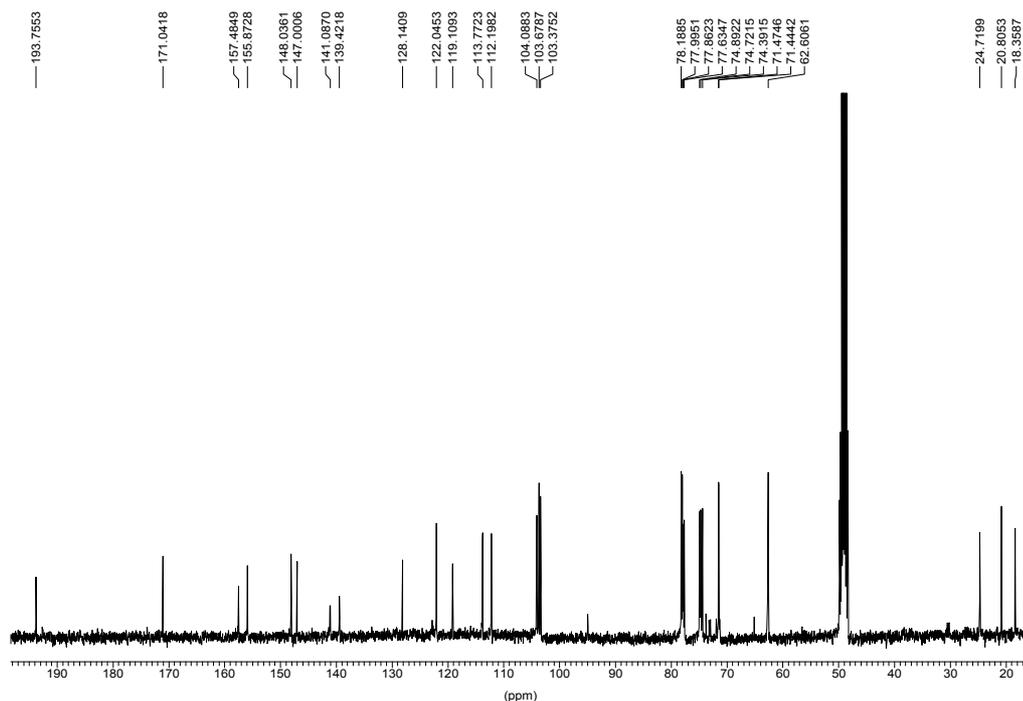


Abbildung 32: ^{13}C -NMR-Spektrum von Rosellin A (**185**), $[\text{D}_4]$ Methanol, 101 MHz

Vergleicht man die ^{13}C -NMR-Verschiebungen der Kohlenstoffatome der Zuckerreste in Rosellin A mit denen verschiedener Pyranoside, so erhält man eine sehr gute Übereinstimmung für Methyl- β -D-glucopyranosid in D_2O .

Auf das Aglykon entfallen zwei CH_2 -Gruppen bei $\delta_{\text{C}} = 18.4$ und 24.7 , eine CH_3 -Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 20.8$, eine CH -Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 74.4$, vier weitere bei $\delta_{\text{C}} = 104.1$, 112.2 , 113.8 und 122.0 und insgesamt zehn quartäre Kohlenstoffatome.

C-Atom	δ_C [ppm]	Art	δ_H [ppm]	Multiplizität	J_{HH} [Hz]	$^nJ_{HH}$ -Koppl. δ_H [ppm] COSY	$^nJ_{CH}$ -Koppl. δ_C [ppm] HMBC
8	18.4	CH ₂	2.43	ddd	14.0, 4.4, 3.5	1.88/2.27, 6.62	24.7, 74.4, 122.0, 128.1
19	20.8	CH ₃	2.08	s			74.4, 171.0
7	24.7	CH ₂	1.88 2.27	m dd	11.5, 3.5	2.43, 7.18	
6''	62.6	CH ₂	3.72	dd	16.4, 3.4	3.38–3.52	71.4, 74.9
6'	62.6	CH ₂	3.95	dd	16.0, 2.4	3.38–3.52	71.5
4''	71.4	CH	3.43				
4'	71.5	CH	3.44				
6	74.4	CH	7.18	br		(1.88)/2.27	18.4, 128.1, 171.0
5'	74.7	CH	3.38–3.52				
5''	74.9	CH	3.38–3.52				
2''	77.6	CH	3.38–3.52				
2'	77.9	CH	3.38–3.52				
3'	78.0	CH	3.38–3.52				103.4
3''	78.2	CH	3.38–3.52				103.7
1'	103.4	CH	4.85	d	7.1	3.50	147.0, 74.7
1''	103.7	CH	4.79	d	7.1	3.52	148.0, 74.9
10	104.1	CH	7.14	s			155.9, (157.5), 193.8
17	112.2	CH	7.29	d	3.2	7.17	113.8, 141.1, 148.0, 193.8
15	113.8	CH	7.17	d	3.2	7.29	112.2, 141.1, 147.0, 148.0
12	119.1	C _q					
9	122.0	CH	6.62	t	4.4	2.43	18.4, 24.7, 128.1, (155.9) 157.5
9a	128.1	C _q					
3	139.4	C _q					
13	141.1	C _q					
14	147.0	C _q					
16	148.0	C _q					
4	155.9	C _q					
1	157.5	C _q					
18	171.0	C=O					
11	193.8	C=O					

Tabelle 7: NMR-Daten von Rosellin A (185)

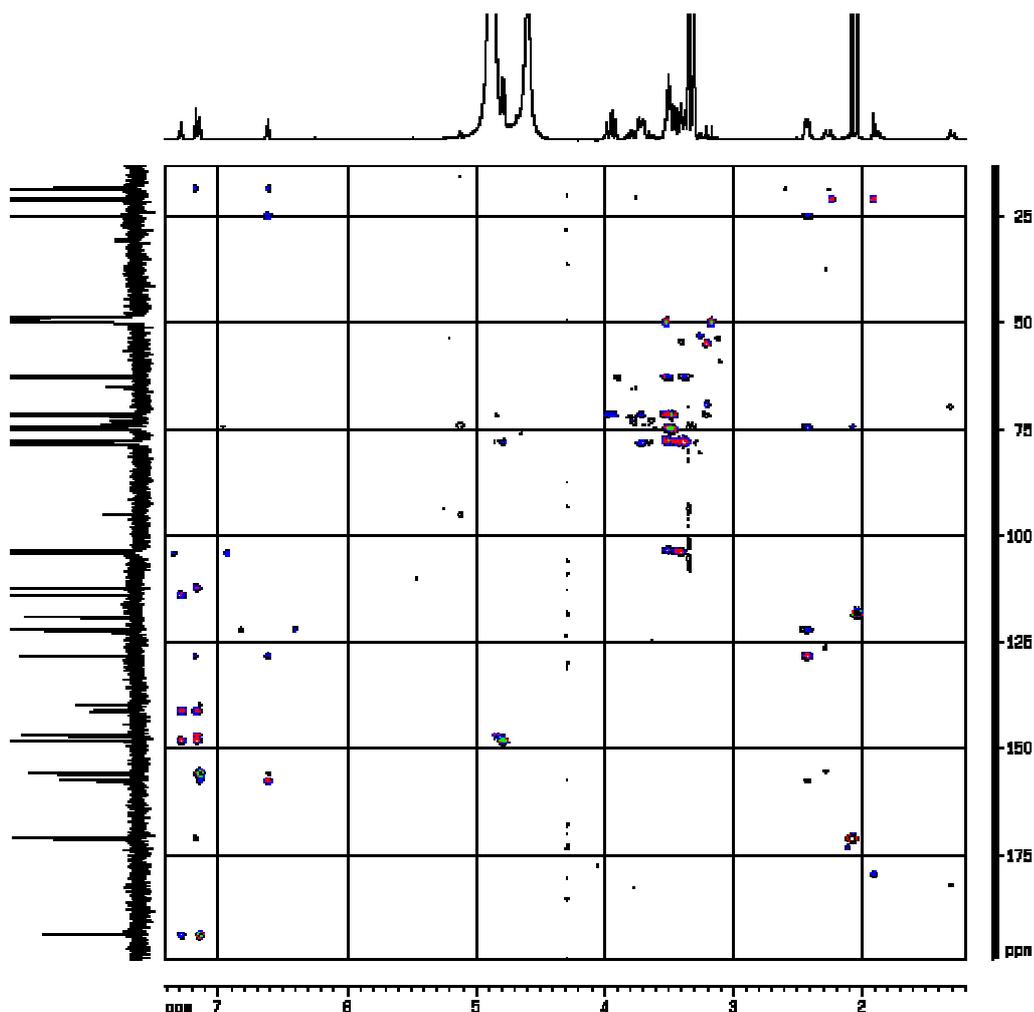
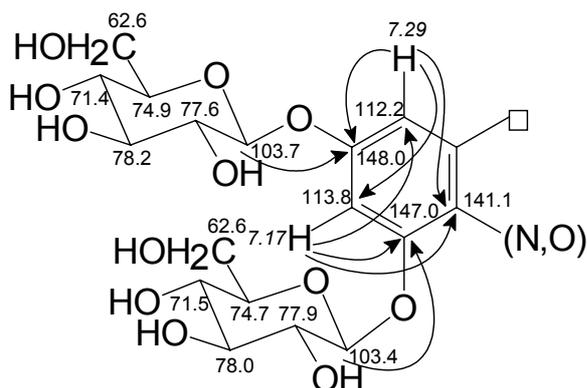


Abbildung 33: HMBC-Spektrum von Rosellin A (185), $[D_4]$ Methanol, 400/101 MHz

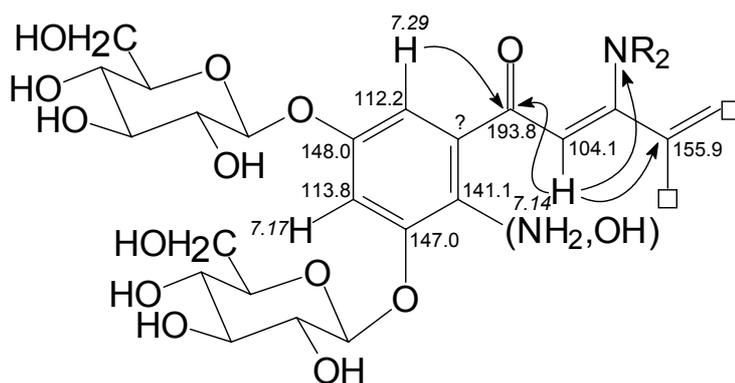
Weiteren Aufschluß erhält man aus den Fernkopplungsdaten der Verbindung (Abb. 33). Die beiden Glucosereste substituieren offensichtlich einen aromatischen Ring des Aglykons. Das anomere Proton bei $\delta_H = 4.79$ zeigt eine Fernkopplung zu einem C-Atom bei $\delta_C = 148.0$, das bei $\delta_H = 4.85$ zu einem C-Atom bei $\delta_C = 147.0$. Der aromatische Ring enthält zwei *meta*-ständige H-Atome bei $\delta_H = 7.17$ und 7.29 . Dies läßt sich aus der gemeinsamen Kopplungskonstante ${}^4J_{HH} = 3.2$ Hz ablesen. Das Proton bei $\delta_H = 7.17$ zeigt Fernkopplungen sowohl zu dem Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 147.0$ als auch zu dem bei $\delta_C = 148.0$, das Proton bei $\delta_H = 7.29$ zu einem C-Atom bei $\delta_C = 148.0$. Abgesehen von den wechselseitigen HMBC-Korrelationen der beiden CH-Gruppen des aromatischen Ringes zeigen beide Protonen auch eine Fernkopplung zu einem quartären C-Atom bei $\delta_C = 141.1$.

Aus diesen Informationen läßt sich folgende Teilstruktur ableiten:



Schema 92: Strukturfragment I für Rosellin A

Von dem H-Atom bei $\delta_{\text{H}} = 7.29$ sieht man noch eine weitere Fernkopplung zu einer Carbonylfunktion bei $\delta_{\text{C}} = 193.8$. Von dort aus läßt sich die Struktur weiter entwickeln. Auch das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 7.14$ koppelt zu dieser Carbonylgruppe. Die C=O-Verschiebung von $\delta_{\text{C}} = 193.8$ deutet darauf hin, daß sich nicht direkt anellierte ein zweiter Ring an den ersten anschließt. In Verbindungen vom Typ 1,4-Naphthochinon oder Benzo- γ -pyron tritt dieses Signal bei deutlich höherem Feld auf. Von dem H-Atom bei $\delta_{\text{H}} = 7.14$ läßt sich ferner eine Kopplung zu einem C-Atom bei $\delta_{\text{C}} = 155.9$ und zu einem Stickstoffatom erkennen. Bei letzterer Beziehung wird es sich vermutlich um eine $^3J_{\text{CN}}$ -Korrelation handeln. So können erste Überlegungen zu einer größeren Partialstruktur angestellt werden (Schema 93).



Schema 93: Strukturfragment II für Rosellin A

Eine weitere Teilstruktur läßt sich aufgrund der zahlreichen COSY-Signale und HMBC-Korrelationen entwickeln. Die CH-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 122.0$ und $\delta_{\text{H}} = 6.62$ ist direkt benachbart zu einer CH_2 -Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 18.4$ und $\delta_{\text{H}} = 2.43$. Diese wiederum zeigt eine COSY-Beziehung zu einer weiteren CH_2 -Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 24.7$ sowie $\delta_{\text{H}} = 1.88$ und 2.27 , die direkt benachbart ist zu einer CH-Funktion bei $\delta_{\text{C}} = 74.4$ und $\delta_{\text{H}} = 7.18$. Offensichtlich befindet sich

an dieser Position die Acetatfunktion, die schon in der MS/MS-Fragmentierung aufgefallen war. Dies läßt sich durch wechselseitige Fernkopplungen nachvollziehen. Sehr ungewöhnlich ist der erhebliche Tieffeldshift des Protons ($\delta_{\text{H}} = 7.18$) der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 74.4$. Diese auffallende Verschiebung eines Wasserstoffatoms an einem sp^3 -Kohlenstoffatom kann nur dadurch erklärt werden, daß es sich im Anisotropiekegel mehrerer Heteroatome befindet (zur Bestätigung der richtigen Zuordnung dieser ungewöhnlichen Verschiebung vgl. Kapitel 12.3). Die Zugehörigkeit der CH_2 - bzw. CH-Gruppen bei $\delta_{\text{H}} = 1.88$ und 2.27, 2.43, 6.62 und 7.18 zu einem Spinsystem ist durch ein TOCSY-Experiment (Abb. 34) belegt.

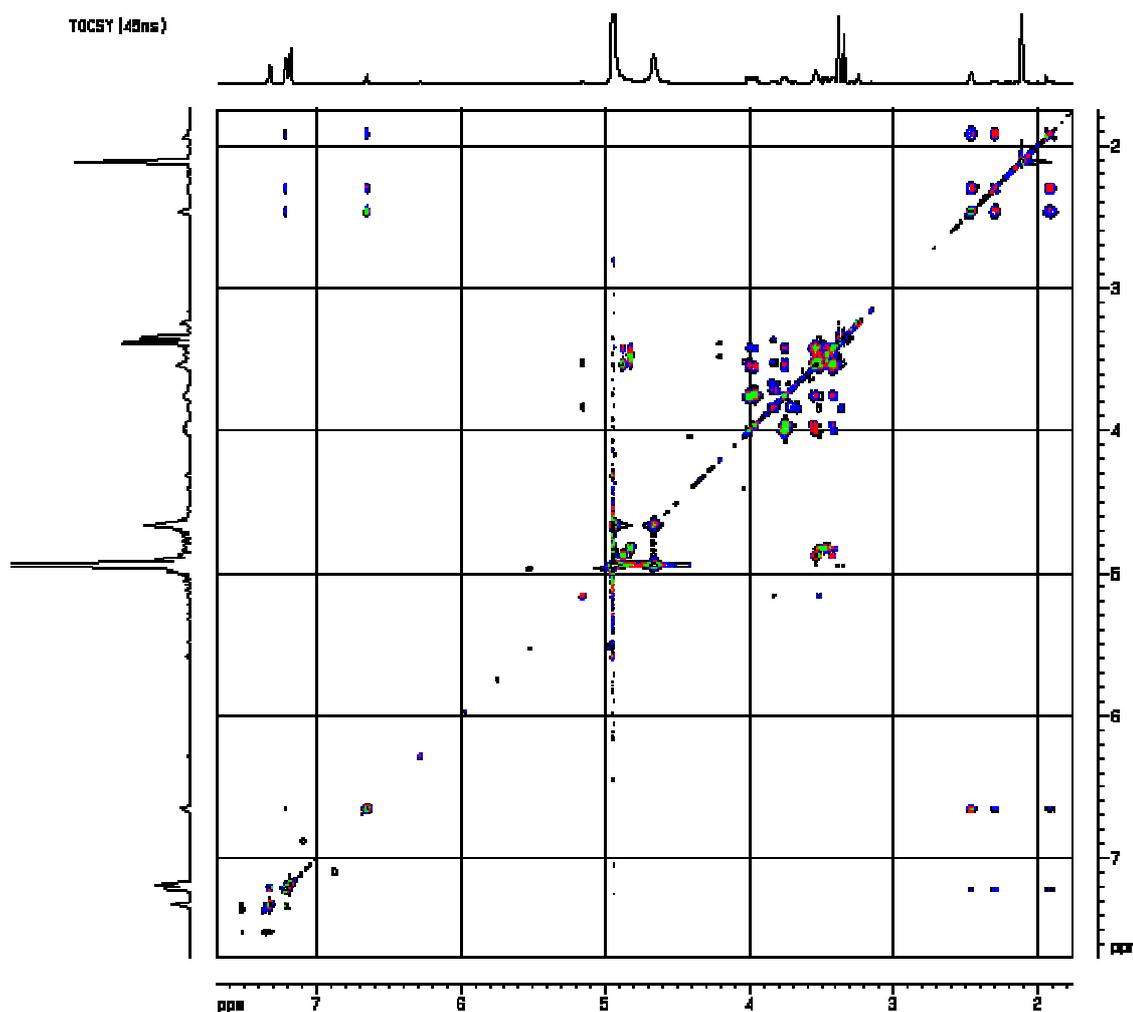
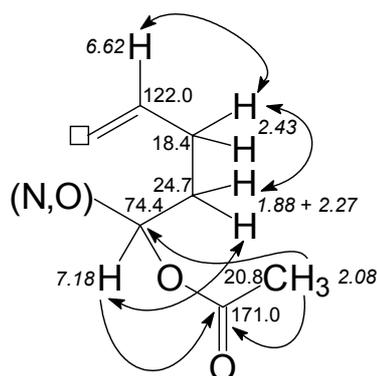


Abbildung 34: TOCSY von Rosellin A (185), $[\text{D}_4]$ Methanol, 600 MHz

Die aus diesen Überlegungen resultierende Partialstruktur formuliert sich wie folgt:



Schema 94: Strukturfragment III für Rosellin A

Sowohl die Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 2.43$ als auch die bei $\delta_{\text{H}} = 6.62$ und $\delta_{\text{H}} = 7.18$ zeigen im HMBC (Abb. 33) eine Fernkopplung zu einem quartären Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 128.1$. Es ist daher zu vermuten, daß ein Ring vorliegt und dieses C-Atom direkt an die ungesättigte CH-Funktion bei $\delta_{\text{H}} = 6.62$ und $\delta_{\text{C}} = 122.0$ gebunden ist. Um den postulierten Ringschluß zu formulieren, muß aber das Heteroatom neben der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 74.4$ ebenfalls direkt benachbart zu dem quartären C-Atom bei $\delta_{\text{C}} = 128.1$ sein. Um dann die Verschiebung von 128.1 zu erklären, muß man den zweiten Substituenten an dieser Doppelbindung als elektronenziehend annehmen. Bei dem Heteroatom handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Stickstoffatom, da im $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -HMBC (Abb. 35) eine Kopplung des Protons bei $\delta_{\text{H}} = 6.62$ zu einem Stickstoffatom zu erkennen ist. Der elektronenziehende Substituent ist vermutlich die Gruppe um das C-Atom bei $\delta_{\text{C}} = 157.5$, da auch zu dieser Funktion das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 6.62$ koppelt.

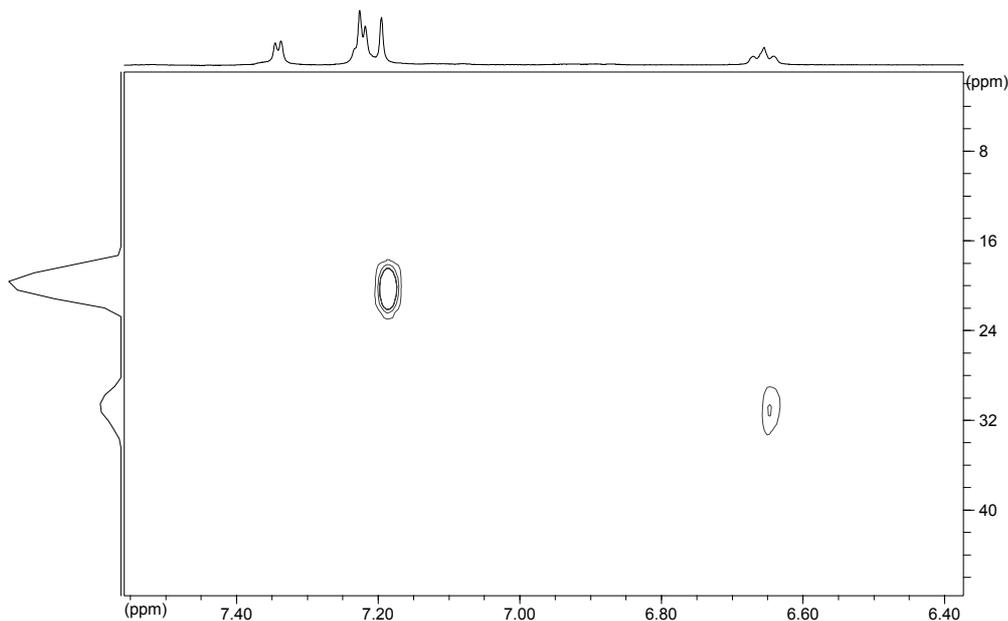
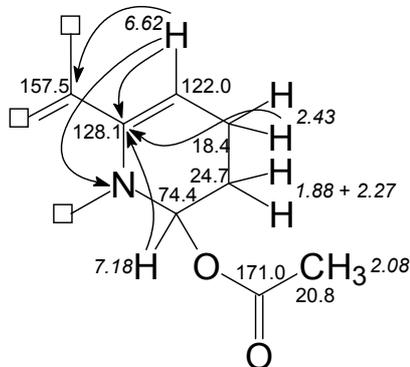


Abbildung 35: ^1H - ^{15}N -HMBC-Spektrum von Rosellin A (**185**), $[\text{D}_4]\text{Methanol}$, 600/61 MHz

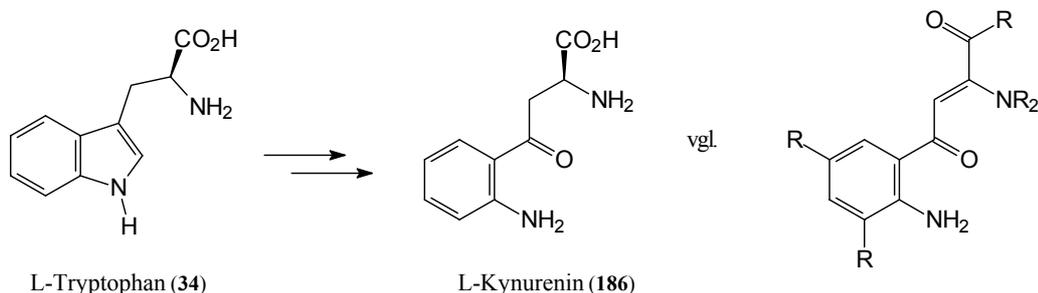
So kann die zweite Teilstruktur vervollständigt werden:



Schema 95: Strukturfragment IV für Rosellin A

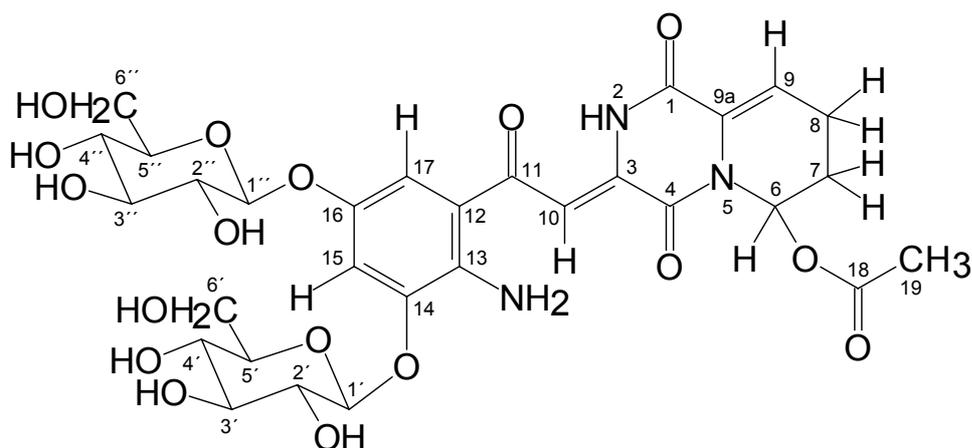
Zur Ermittlung einer Gesamtstruktur helfen biosynthetische Überlegungen. Die Hochauflösung des ESI-MS ergibt, daß das Molekül drei Stickstoffatome enthält. Zwei der drei N-Atome sind durch die Fernkopplungsspektren bereits lokalisiert. Das dritte muß sich in einem Abstand von mindestens vier Bindungen zu allen nicht austauschbaren Wasserstoffatomen der Verbindung befinden, da anderenfalls eine Fernkopplung zu beobachten wäre. $^4J_{\text{NH}}$ -Korrelationen sind in ^1H - ^{15}N -HMBC-Spektren sehr selten zu detektieren.^[151] Eine mögliche Position für eine Stickstofffunktion befindet sich am aromatischen Ring von Strukturfragment I. Diese ist *meta*-ständig zu beiden Wasserstoffsubstituenten und erfüllt damit die oben formulierte Bedingung für eine fehlende Fernkopplung. In diesem Fall wäre eine von

L-Kynurenin (**186**) - und damit letztlich L-Tryptophan (**34**) - abgeleitete Teilstruktur zu erkennen.

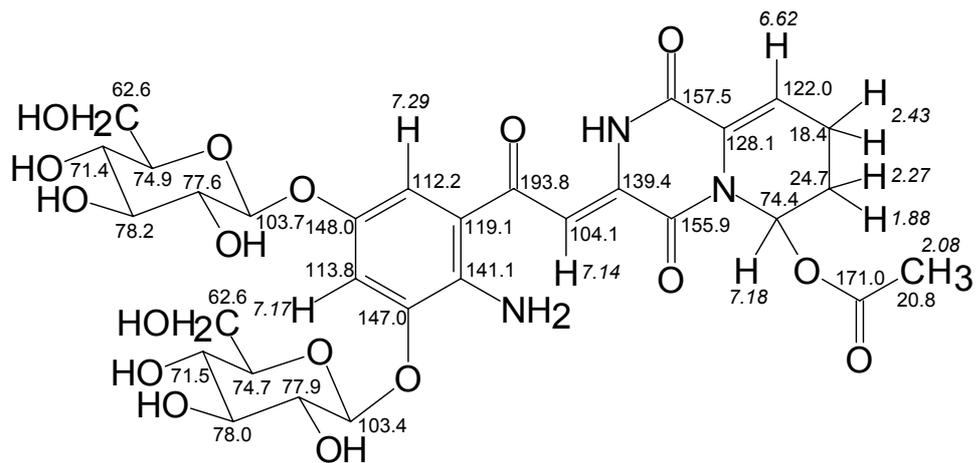


Schema 96: Vergleich einer Teilstruktur aus Rosellin A (**185**) mit Kynurenin (**186**)

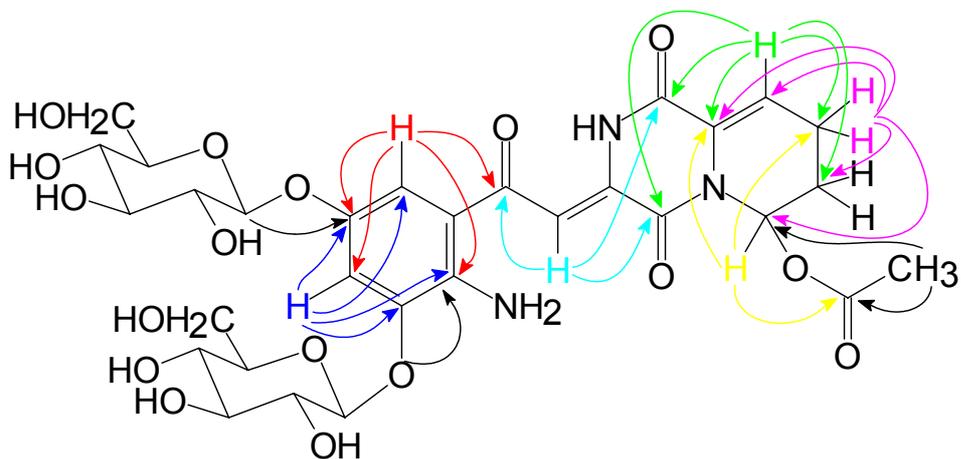
Um die beiden Teilstrukturen zusammenzufügen, muß man zunächst gemeinsame Fernkopplungen beider Teile suchen. Das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 6.62$ zeigt - abgesehen von der stark ausgeprägten Kopplung zu dem C-Atom bei $\delta_{\text{C}} = 157.5$ - eine schwache Korrelation zu dem Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 155.9$. Zu diesem C-Atom koppelt auch das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 7.14$. Somit befinden sich im zentralen System der Verbindung zwei quartäre Kohlenstoffatome, die im Verschiebungsbereich von Carbonylfunktionen in Diketopiperazinen liegen. Diese Annahme steht außerdem im Einklang mit der Summenformel des Moleküls und mit biosynthetischen Überlegungen. Rosellin A ist somit letztlich ein von zwei, über ein Diketopiperazin verknüpften Aminosäuren abgeleitetes Alkaloid. Die folgenden Schemata fassen die NMR-Verschiebungen und die wesentlichen Kopplungen des HMBC-Spektrums in Rosellin A zusammen:



Schema 97: Struktur von Rosellin A (**185**) mit Numerierung



Schema 98: Struktur von Rosellin A (185) mit NMR-Verschiebungen



Schema 99: Struktur von Rosellin A (185) mit HMBC-Korrelationen

12.2.2 Rosellin B (187)

Eine zweite Hauptverbindung der Kollektionen von *M. rosella* aus dem Jahr 2001 ist eine Verbindung mit der Masse $m/z = 753$. Rosellin B (**187**) ist nur wenig unpolarer als Verbindung A **185** und trägt eine zusätzliche Acetylgruppe, wie aus den Massenspektren zu entnehmen ist. Die ähnliche Farbe deutet darauf hin, daß das Chromophor in Rosellin B unverändert bleibt.

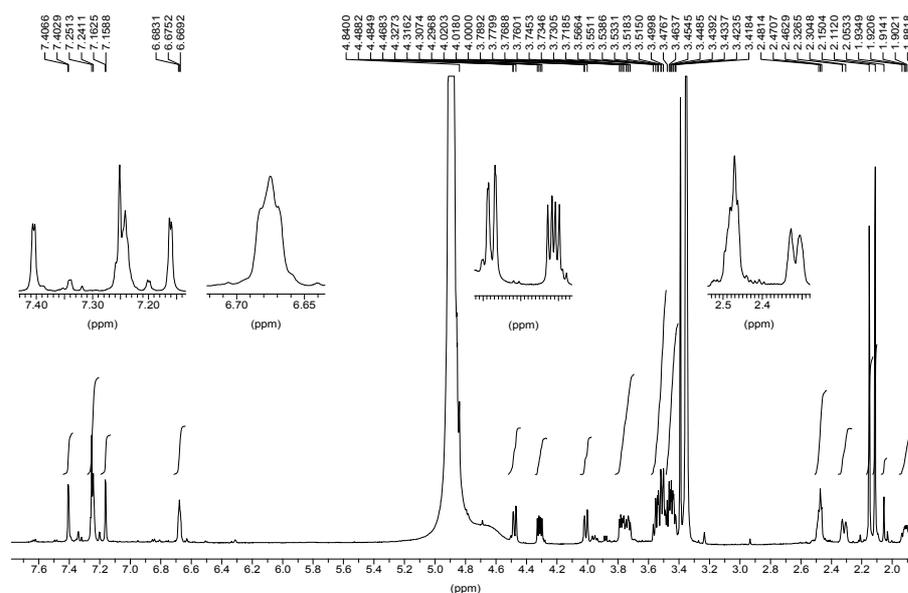


Abbildung 36: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Rosellin B (**187**), $[\text{D}_4]\text{Methanol}$, 600 MHz

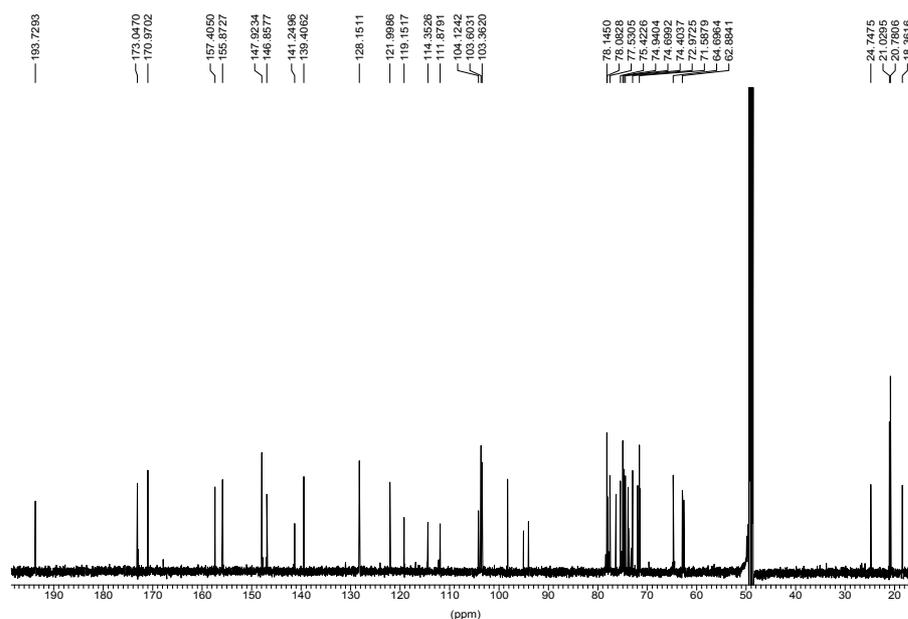


Abbildung 37: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Rosellin B (**187**), $[\text{D}_4]\text{Methanol}$, 151 MHz

C-Atom	δ_C [ppm]	Art	δ_H [ppm]	Multiplizität	J_{HH} [Hz]	$^nJ_{HH}$ -Koppl. δ_H [ppm] COSY	$^nJ_{CH}$ -Koppl. δ_C [ppm] HMBC
8	18.4	CH ₂	2.47	m		1.91/2.32, 6.68	24.7, 74.4, 122.0, 128.2
19	20.8	CH ₃	2.11	s			74.4, 171.0
8'	21.0	CH ₃	2.15	s			64.7, 173.0
7	24.7	CH ₂	1.91 2.32	dbr dd	13.0 13.0, 7.2	2.47, 7.24	128.2, 157.4
6''	62.9	CH ₂	3.78/4.01	dd	12.2, 5.5	3.48–3.55	73.0, 74.9
6'	64.7	CH ₂	4.32/4.48	dd	12.0, 6.7	3.48–3.55	71.6, 173.0
4'	71.6	CH	3.45				
4''	73.0	CH	3.44				
6	74.4	CH	7.24	br		1.91/2.32	18.4, 128.2, 155.9, 171.0
5'	74.7	CH	3.48–3.55				
5''	74.9	CH	3.48–3.55				
2''	75.4	CH	3.48–3.55				
2'	77.5	CH	3.48–3.55				
3''	78.1	CH	3.48–3.55				103.6
3'	78.1	CH	3.48–3.55				103.4
1'	103.4	CH	ca. 5.0 ⁱⁱ			3.45	146.9, 74.7
1''	103.6	CH	ca. 5.0 ⁱⁱ			3.44	147.9, 74.9
10	104.1	CH	7.25	s			155.9, 193.7
17	111.9	CH	7.40	d	2.2	7.16	114.4, 141.2, 147.9, 193.7
15	114.4	CH	7.16	d	2.2	7.40	111.9, 141.2, 146.9, 147.9
12	119.2	C _q					
9	122.0	CH	6.68	t	3.6	2.47	18.4, 24.7, 128.2, (155.9) 157.4
9a	128.2	C _q					
3	139.4	C _q					
13	141.2	C _q					
14	146.9	C _q					
16	147.9	C _q					
4	155.9	C _q					
1	157.4	C _q					
18	171.0	C=O					
7'	173.0	C=O					
11	193.7	C=O					

Tabelle 8: NMR-Daten von Rosellin B (**187**) (ⁱⁱ verdeckt durch HDO-Resonanz)

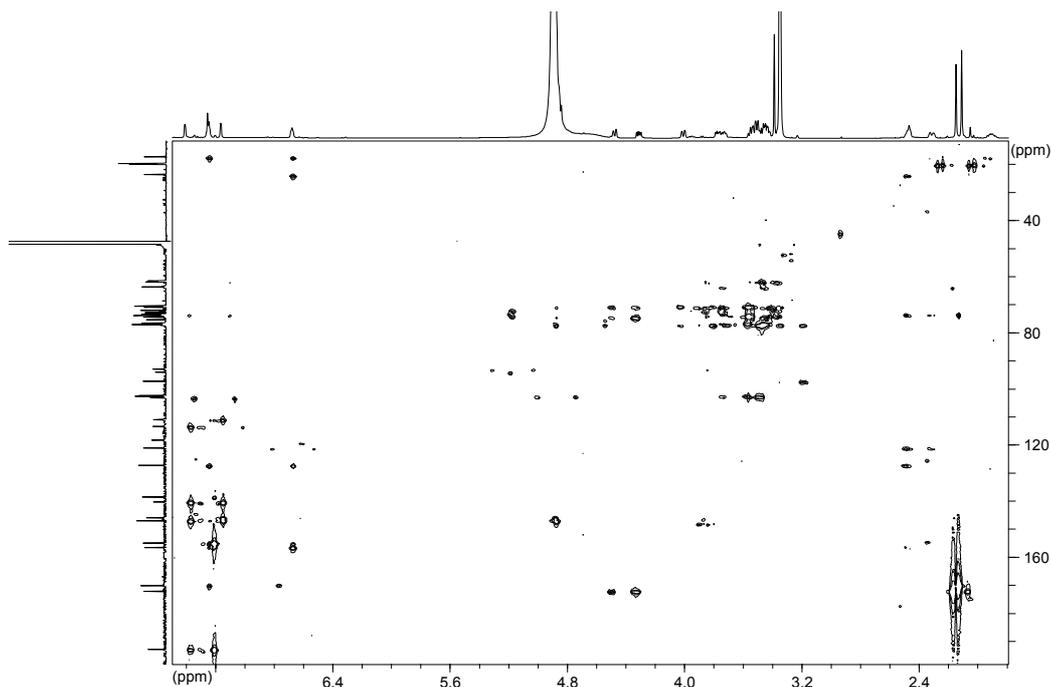
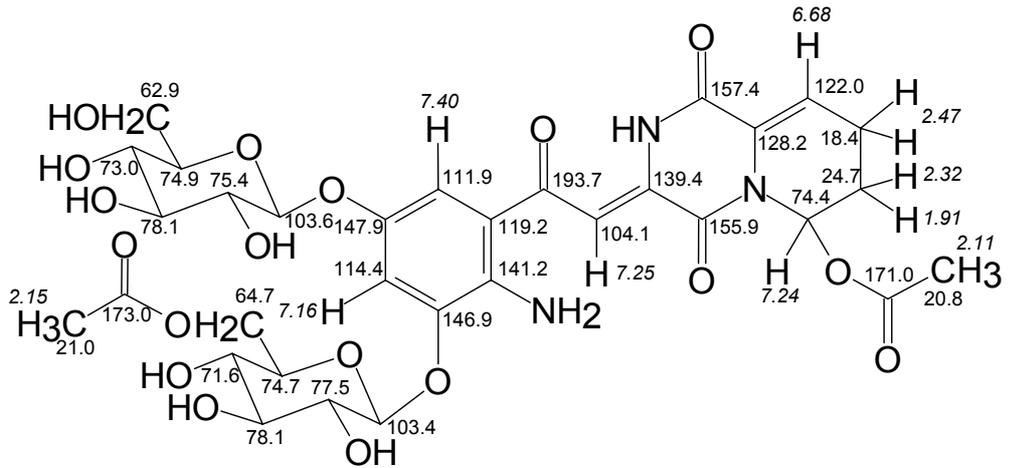


Abbildung 38: HMBC-Spektrum von Rosellin B (**187**), [D₄]Methanol, 600/151 MHz

Der Vergleich der Verschiebungswerte der acylierten Position in Rosellin A (**185**) bei $\delta_C = 74.4$ und $\delta_H = 7.18$ mit denen von Verbindung B ($\delta_C = 74.4$ und $\delta_H = 7.24$) legt die Vermutung nahe, daß dort keine biosynthetische Modifikation stattgefunden hat. Die zweite Acylfunktion mit einer CH₃-Gruppe bei $\delta_C = 21.0$ und $\delta_H = 2.15$ sowie einer Carbonylgruppe bei $\delta_C = 173.0$ tritt nur in Rosellin B auf. Die Protonen ihrer CH₃-Gruppe zeigen im HMBC-Spektrum eine Fernkopplung zu einer CH₂-Funktion bei $\delta_C = 64.7$, der C-6-Position eines der Glucosereste. Eine Acylierung ist also sowohl im Aglykon als auch in einem der Glucosesubstituenten erfolgt. Der Ort der Substitution kann anhand der Fernkopplungen in dem Zuckerrest und von dem anomeren Proton zum aromatischen Ring des Aglycons bestimmt werden (vgl. Abb. 38).

Folgende Abbildung zeigt die Struktur von Rosellin B:



Schema 100: Struktur von Rosellin B (187) mit NMR-Verschiebungen

12.2.3 Rosellin C (188)

Rosellin C (**188**) ist geringfügig polarer als Rosellin A (**185**) und weist eine Masse von $m/z = 668$, also 42 Einheiten weniger als Verbindung A auf. Auch Rosellin C sollte dasselbe Chromophor wie Rosellin A besitzen.

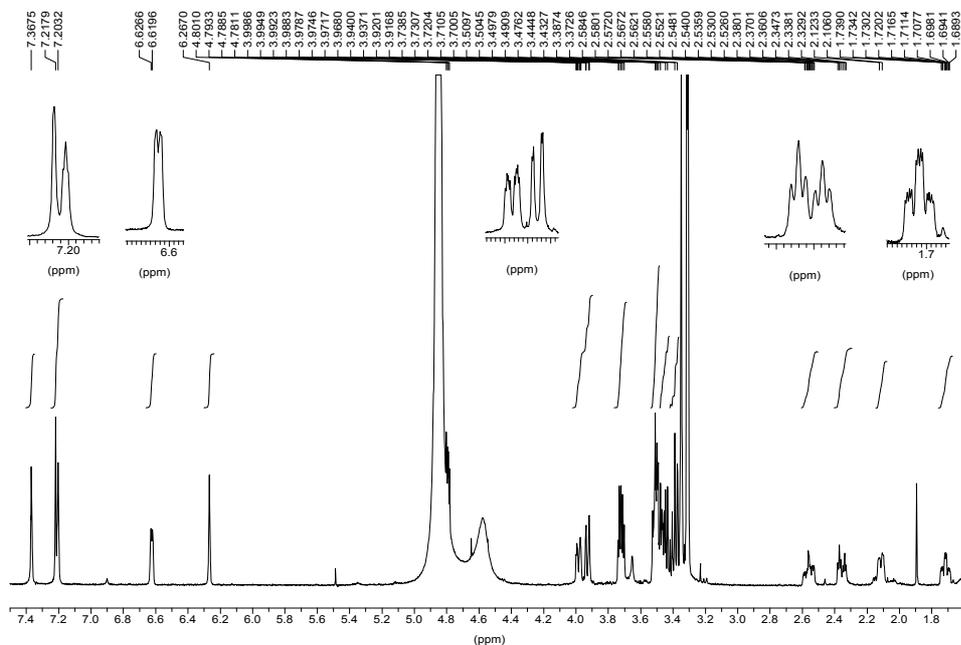


Abbildung 39: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Rosellin C (**188**), $[\text{D}_4]\text{Methanol}$, 600 MHz

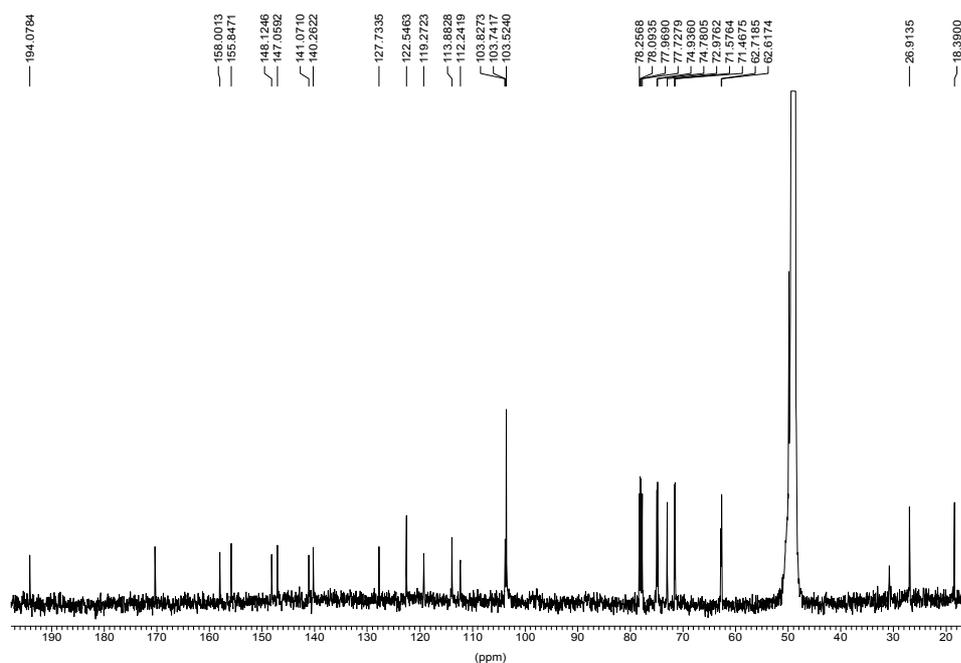


Abbildung 40: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Rosellin C (**188**), $[\text{D}_4]\text{Methanol}$, 151 MHz

Folgende Tabelle zeigt die NMR-Werte der Verbindung.

C-Atom	δ_C [ppm]	Art	δ_H [ppm]	Multiplizität	J_{HH} [Hz]	$^nJ_{HH}$ -Koppl. δ_H [ppm] COSY	$^nJ_{CH}$ -Koppl. δ_C [ppm] HMBC
8	18.4	CH ₂	2.35 2.56	ddd m	19.2, 5.3, 4.2	(1.71)/2.11, 6.62	73.0, 122.5, 127.7
7	26.9	CH ₂	1.71 2.11	ddd dbr	10.4, 5.3, 3.1 10.4	(2.35)/2.56, 6.27	
6''	62.6	CH ₂	3.72	m		3.37–3.51	
6'	62.7	CH ₂	3.96	m		3.37–3.51	
4''	71.5	CH	3.48				
4'	71.6	CH	3.48				
6	73.0	CH	6.27	br		1.71/2.11	18.4, 127.7, 155.8
5'	74.8	CH	3.37–3.51				
5''	74.9	CH	3.37–3.51				
2''	77.7	CH	3.37–3.51				
2'	78.0	CH	3.37–3.51				
3'	78.1	CH	3.37–3.51			4.79	
3''	78.3	CH	3.37–3.51			4.80	
10	103.5	CH	7.22	s			155.8, 158.0 194.1
1''	103.7	CH	4.80	d	7.7		148.1
1'	103.8	CH	4.79	d	7.3		147.1
17	112.2	CH	7.37	br		7.20	113.9, 141.1, 148.1, 194.1
15	113.9	CH	7.20	br		7.37	112.2, 141.1, 147.1, 148.1
12	119.3	C _q					
9	122.5	CH	6.62	dd	4.2, 4.1	2.35/2.56	26.9, 158.0
9a	127.7	C _q					
3	140.3	C _q					
13	141.1	C _q					
14	147.1	C _q					
16	148.1	C _q					
4	155.8	C _q					
1	158.0	C _q					
11	194.1	C=O					

Tabelle 9: NMR-Daten von Rosellin C (188)

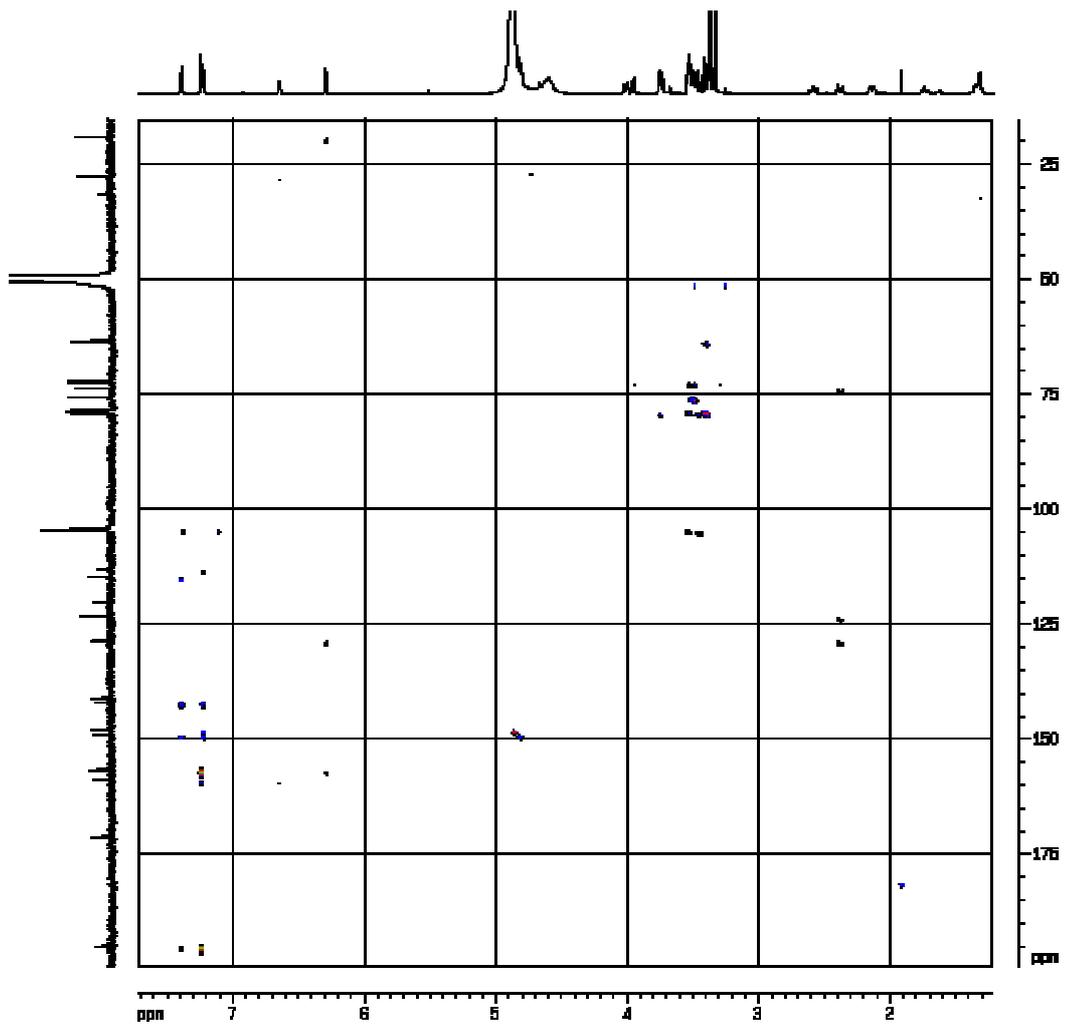
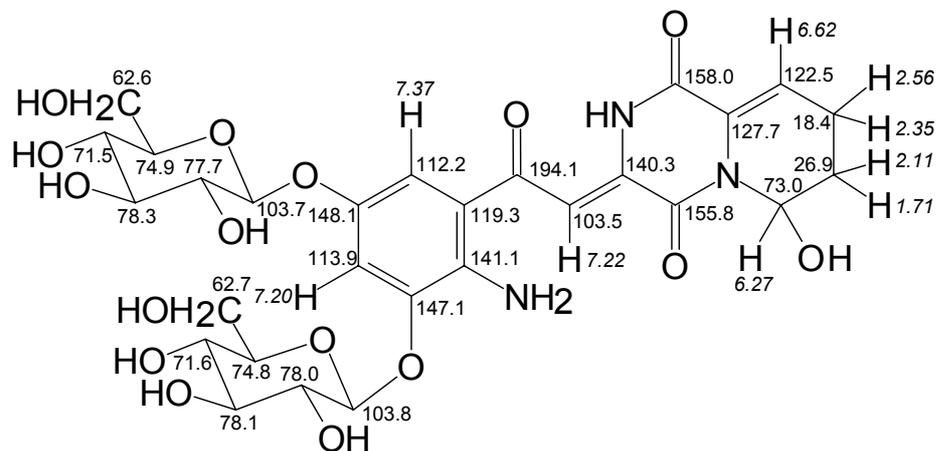


Abbildung 41: HMBC-Spektrum von Rosellin C (**188**), [D₄]Methanol, 600/151 MHz

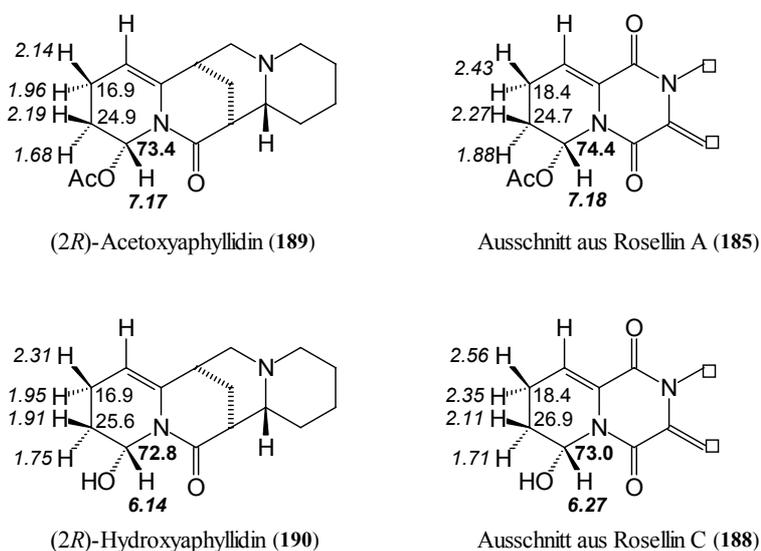
Der Hochfeldshift von Proton und Kohlenstoffatom der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 6.27$ und $\delta_{\text{C}} = 73.0$ im Vergleich zu Verbindung A (**185**) zeigen, daß an dieser Stelle vermutlich keine Acylierung stattgefunden hat. Ein Vergleich mit den Chinolizidin-Alkaloiden aus *Lupinus argenteus* bestätigt diese Annahme (s. Kapitel 12.3). Die Struktur von Rosellin C kann nun abgeleitet werden.



Schema 101: Struktur von Rosellin C (**188**) mit Verschiebungen

12.3 Chinolizidin-Alkaloide aus *Lupinus argenteus* und ein NMR-spektroskopischer Vergleich mit den Rosellinen 185, 187 und 188

Stermitz et al.^[152] konnten Chinolizidin-Alkaloide in *Lupinus argenteus* und durch Wurzelparasitismus auch in *Castilleja sulphurea* nachweisen,^[153] die im 2,3-Dehydropiperidin-Teil sehr ähnliche Verschiebungen wie die Roselline zeigen und so die Zuordnung des Protons an dem durch den Acetylrest substituierten C-Atom bestätigen. Dies gilt sowohl für Rosellin A (**185**) als auch für Rosellin C (**188**). Folgende Abbildung stellt ¹H- und ¹³C-NMR-Daten von (2*R*)-Acetoxyaphyllidin (**189**) und (2*R*)-Hydroxyaphyllidin (**190**) denen der Roselline gegenüber:

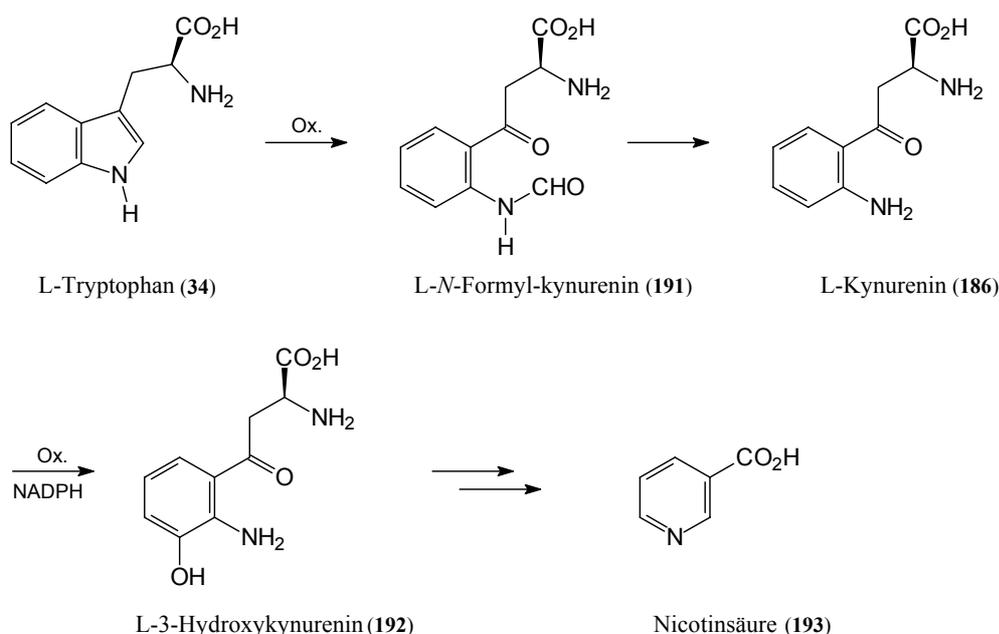


Schema 102: Gegenüberstellung der NMR-Daten der Aphyllidine **189** und **190** und der Roselline A (**185**) und C (**188**)

Die Verschiebungen der sp^2 -Kohlenstoffatome des 2,3-Dehydropiperidin-Teiles sind deswegen nicht vergleichbar, weil das vinylische Proton der Roselline durch die zur Doppelbindung konjugierte Carbonylgruppe stärker entschirmt ist. Die Autoren fanden, daß Hydroxy- und Acetoxyreste unabhängig von der Konfiguration stets axial stehen. Für ein verwandtes Alkaloid aus *L. argenteus* konnten sie eine Röntgenstrukturanalyse erhalten.

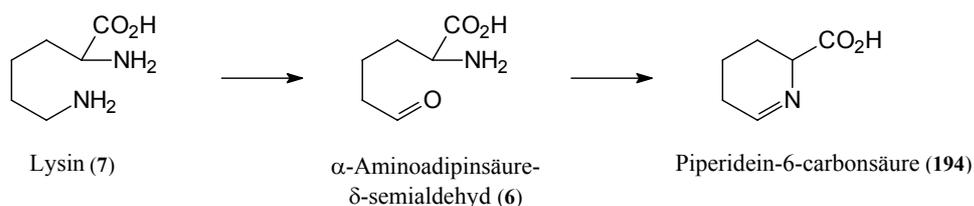
12.4 Überlegungen zur Biosynthese der Roselline

Es ist bekannt, daß Tryptophan (**34**) durch oxidative Öffnung des Indolsystems und anschließende Hydrolyse des entstehenden Formamides zu Kynurenin (**186**) abgebaut werden kann. Kynurenin kann dann in 3-Position hydroxyliert werden. Der Biosyntheseweg führt über 3-Hydroxyanthranilsäure letztlich zu Nicotinsäure (**193**).



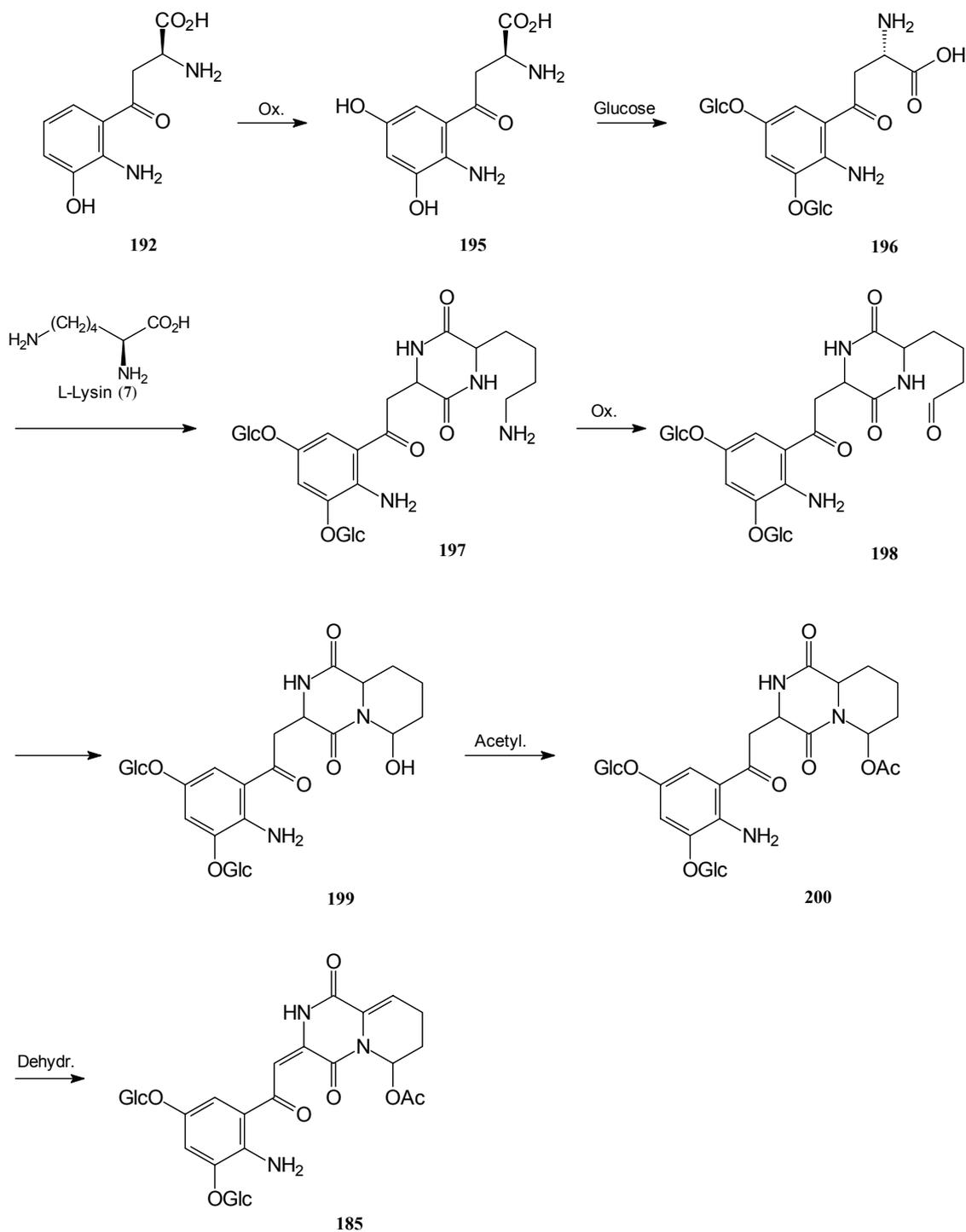
Schema 103: Tryptophan-Abbau zu Kynurenin (**186**) und Biosynthese von Nicotinsäure (**193**)

In Rosellin A (**185**), B (**187**) und C (**188**) wird Kynurenin (**186**) offensichtlich zweimal, und zwar in 3- und 5-Position, hydroxyliert und glucosyliert. Dieses Substitutionsmuster ist ungewöhnlich. Hydroxylierungen in 5-Position kennt man z. B. aus *Amanita citrina*. Wieland et al.^[154] fanden *N,N*-Dimethyl-5-hydroxytryptamin im gelben Knollenblätterpilz. Die Roselline liegen dehydriert vor. Auf welcher Stufe der Biosynthese diese Dehydrierung erfolgt, kann nicht entschieden werden. Der zweite Biosynthesebaustein der Roselline scheint Lysin (**7**) zu sein. Wie von β -Lactam-produzierenden Organismen bekannt, kann aus Lysin α -Amino adipinsäure- δ -semialdehyd (**6**) gebildet werden, der leicht zu Piperidin-6-carbonsäure (**194**) cyclisiert.^[155]



Schema 104: Biosynthese von Piperidin-6-carbonsäure (**194**) aus Lysin (**7**)

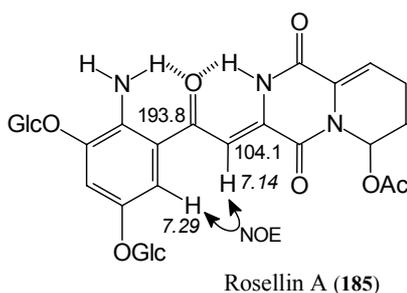
Folgende Abbildung zeigt einen Biosynthesevorschlag für Rosellin A (**185**). Die einzelnen Biosyntheseschritte sind in ihrer Reihenfolge vertauschbar, da nur für Einzelschritte die vorgestellten Literaturbeispiele existieren.



Schema 105: Biosynthesevorschlag für Rosellin A (**185**)

12.5 Überlegungen zur Stereochemie der exocyclischen Doppelbindung in den Rosellinen 185, 187 und 188

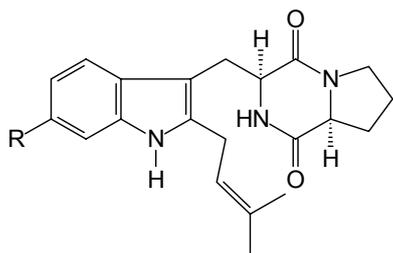
Um zu einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die exocyclische Doppelbindung in den Rosellinen in der (*E*) oder (*Z*)-Anordnung vorliegt, wird mit dem Programm ACD/CNMR von Advanced Chemistry Development^[156] eine Berechnung durchgeführt. Dabei ergibt sich für die olefinische CH-Gruppe bei $\delta_C = 104.1$ (Wert für Rosellin A) eine vorausgesagte Verschiebung von $\delta_C = 111.6$ im Falle der (*E*)-Konfiguration und $\delta_C = 106.8$ im Falle der (*Z*)-Konfiguration. In letzterem Fall wäre auch eine stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Ketofunktion bei $\delta_C = 193.8$ (Rosellin A) und der amidischen Ring-NH-Gruppe denkbar. Durch Drehen des aromatischen Sechsrings kann auch eine zweite Wasserstoffbrückenbindung zwischen NH₂-Gruppe und dieser Ketofunktion ausgebildet werden. Diese Überlegungen sprechen für eine (*Z*)-Konfiguration der exocyclischen Doppelbindung in den Rosellinen. Ferner zeigt das Proton bei $\delta_H = 7.29$ einen Kern-Overhauser-Effekt zu dem Proton bei $\delta_H = 7.14$ (Werte für Rosellin A). Folgendes Schema veranschaulicht die Situation.



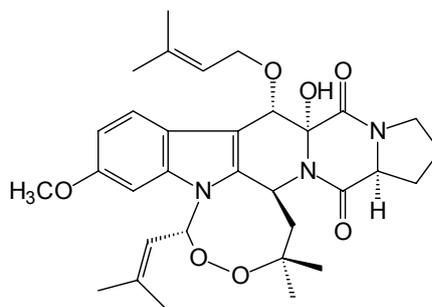
Schema 106: Wahrscheinliche Konfiguration der exocyclischen Doppelbindung und Lage der Wasserstoffbrückenbindungen am Beispiel von Rosellin A (185)

12.6 Andere Diketopiperazinalkaloide mit L-Tryptophan (34) als Biosynthese-Vorläufer und ihre spektroskopischen und biologischen Eigenschaften

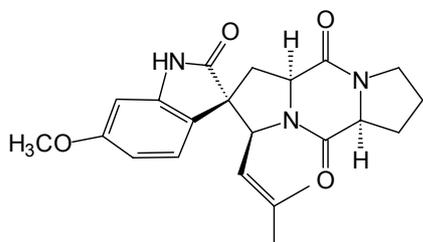
Die Tryprostatine und Fumitremorgine gehören zu den wohl bekanntesten Diketopiperazinen mit einem Biosynthese-Baustein L-Tryptophan (34), die in letzter Zeit durch ihre biologische Wirkung aufgefallen sind.^[157-159] Osada et al.^[160, 161] konnten die ersten Tryprostatine aus der Zellbrühe von *Aspergillus fumigatus* isolieren und stellten fest, daß sie den Zellcyclus in Säugetieren mit IC₅₀-Werten im mikromolaren Bereich inhibieren. Diese Erkenntnis löste eine große Aktivität auf dem synthetischen Gebiet aus, vor allem was die Spirotryprostatine anbelangt.^[162-165] Sowohl Tryprostatine als auch Fumitremorgine, die ebenfalls in *Aspergillus fumigatus* gefunden wurden, leiten sich von Tryptophan und Prolin (11) ab.

Tryprostatin A: R = OCH₃ (201)

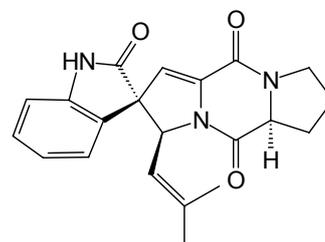
Tryprostatin B: R = H (202)



Fumitremorgin A (203)



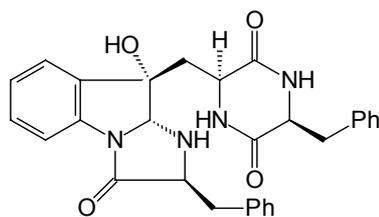
Spirotryprostatin A (204)



Spirotryprostatin B (205)

Schema 107: Andere Diketopiperazinalkaloide aus *Aspergillus*-Arten

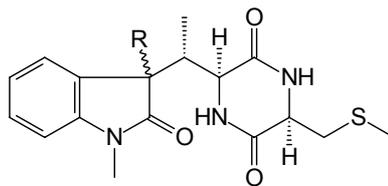
Ein Hybridstamm aus *Penicillium citreo-viride* produziert eine von Tryptophan (34) und Phenylalanin (21) abgeleitete Verbindung, die die Autoren Citreindol (206) nannten.^[166] Citreindol zeigt cytotoxische Aktivität gegen HeLa-Zellen.



Citreindol (206)

Schema 108: Citreindol (206) aus *Penicillium citreo-viride*

Besonders interessant für die Verifizierung der Strukturen der Roselline war auch der Vergleich mit den spektroskopischen Daten der Maremycine (207 und 208).^[167] Die Maremycine wurden sowohl in marinen als auch terrestrischen *Streptomyces*-Stämmen gefunden. Sie sind aus einem von Tryptophan abgeleiteten Oxindolteil und einem von Cystein abgeleiteten C₂-Baustein aufgebaut.

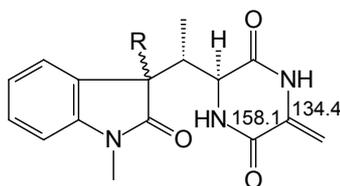


Maremycin A: R = $\cdots\cdots\text{OH}$ (207)

Maremycin B: R = $\blacktriangleright\text{OH}$ (208)

Schema 109: Maremycine A (207) und B (208) aus *Streptomyces*-Stämmen

In Maremycin D₁ (209) und D₂ (210) hat eine formale Thioethanol-Eliminierung im Cysteinteil der Verbindung stattgefunden.^[168] Die so entstandene ungesättigte Position am Diketopiperazinring läßt sich gut mit den Rosellinen in ihren NMR-spektroskopischen Werten vergleichen.



Maremycin D₁: R = $\cdots\cdots\text{OH}$ (NMR) (209)

Maremycin D₂: R = $\blacktriangleright\text{OH}$ (210)

Schema 110: Maremycine D₁ (209) und D₂ (210)

Die Doppelbindung am Diketopiperazinring tritt auch im Spirotryprostatin B (205) auf, ist sonst aber selten. Auch in diesem Fall sind die NMR-spektroskopischen Daten sehr gut zu vergleichen. Der doppelt ungesättigte Fall - wie er in den Rosellinen beobachtet ist - konnte jedoch bisher nicht gefunden werden.

IV. EXPERIMENTELLER TEIL

13. ANALYTIK

Chromatographie:

Analytische Dünnschichtchromatographie wurde auf DC-Alufolien, Kieselgel 60 F₂₅₄ oder RP-18 der Firma Merck durchgeführt. Die Säulenchromatographie wurde in zylindrischen Glassäulen an Kieselgel (SiO₂) bzw. RP 18 (Lichroprep[®]) der Korngröße 40-63 µm der Firma Merck unter Druck (Flash-Chromatographie) durchgeführt. Für die Gelchromatographie wurde Sephadex LH-20 und Sephadex G10 der Firma Pharmacia verwendet.

Optische Drehwerte:

Perkin-Elmer 241 Polarimeter. Es wurde eine Natriumdampflampe als Lichtquelle verwendet. Angegeben werden die Temperatur, das Lösungsmittel sowie die Konzentration c in $\frac{\text{g}}{100 \text{ ml}}$.

UV/Vis-Spektren:

Perkin-Elmer UV/Vis-Spektrometer Lambda 16 oder Photodiodenarray-Spektrometer Hewlett-Packard HP 8452 A. Angegeben werden die Absorptionsmaxima in nm und die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ . Die Spektren werden bei Raumtemperatur in 1 cm Standard-Quarzküvetten aufgenommen. Qualitative Spektren werden mit dem HPLC Photodiode Array Detector 990+ (Fa. Millipore) gemessen.

CD-Spektren:

S. A. Jobin Yvon CD-6-Dichrograph. Angegeben werden die Wellenlängen λ der Maxima, Minima und Nulldurchgänge der CD-Kurven in nm sowie deren differentielle Absorbanz $\Delta\epsilon$ und das verwendete Lösungsmittel.

IR-Spektren:

Perkin-Elmer Spectrum 1000 (FT-IR). Die Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ sind in cm^{-1} angegeben, die Bandenintensitäten wie folgt abgekürzt: s = stark, m = mittel, w = schwach, sh = Schulter. Die Substanzen wurden als KBr-Preßling oder als Film auf KBr gemessen.

¹H-NMR-Spektren:

Bruker ARX 300 (300.13 MHz), Varian VXR 400S (399.92 MHz) und Bruker AMX 600 (600.19 MHz). Das angegebene Lösungsmittel wurde als interner Standard verwendet (Kalibrierungswerte nach Gottlieb et al.^[169]). Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in ppm, die der Kopplungskonstanten J in Hz. Die Signalmultiplizität wird wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett, verbreiterte Signale sind mit br gekennzeichnet.

¹³C-NMR-Spektren:

Bruker ARX 300 (75.47 MHz), Varian VXR 400S (100.57 MHz) und Bruker AMX 600 (150.92 MHz). Das angegebene Lösungsmittel wurde als interner Standard verwendet. Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in ppm.

¹⁵N-NMR-Spektren:

Bruker AMX 600 (60.83 MHz). Die Eichung erfolgt mit DMF ($\delta_N = 77.7$) als externem Standard, so daß Ammoniumchlorid der Nullpunkt der Verschiebungsskala ist.

2D-NMR-Spektren:

Varian VXR 400S und Bruker AMX 600. Es wurde in der Regel ein inverser Meßkopf verwendet, z. T. mit Gradienteneinheit. ¹H-¹H-Konnektivitäten wurden mit COSY90- (Programm "cosygs") und COSY45-Experimenten (Programm "cosypnpszs") bestimmt. NOESY-Experimente wurden mit dem Programm "noesytp" mit Mischzeiten von 450 bis 600 msec durchgeführt. Direkte ¹H-¹³C-Korrelationen wurden mit dem Programm "inv4gstp" (optimiert für $^1J_{CH} = 145$ Hz) bestimmt, Fernkopplungen aus "inv4gslplrnd"-Experimenten (optimiert für $^nJ_{CH} = 7.3$ Hz). Für TOCSY-Versuche wurde das Programm "nlevprtp" verwendet.

Massenspektren:

Finnigan MAT 90 und Finnigan MAT 95 Q. Angegeben werden die Ionisierungsmethode, die Massenzahl m/z und die relativen Intensitäten in %, bei Hochauflösungsmessungen (HR-MS) zudem die berechnete Masse des Molekülions. EI- und CI-Proben wurden auf den Platinfaden einer DCI-Schubstange aufgetragen (Direkteinlaß), die Elektronenenergie betrug 70 eV. Die Auflösung (10% Tal) wurde auf > 1000 und für Hochauflösungsmessungen (HR-MS) auf > 4000 eingestellt. Bei einer Scanrate von 0.8 bzw. 4 s/Dekade umfaßte der Massenbereich

40-3240 u. FAB-Proben wurden auf einem Kupfer-Target in einer *m*-Nitrobenzylalkohol- oder Glycerin-Matrix gelöst und mit einem 20 kV Cs⁺-Ionenstrahl oder einem 4 kV Xe-Atomstrahl ionisiert. ESI-MS wurde an einem API-Interface II mit ESI-Kopf der Firma Finnigan MAT durchgeführt. Die Spraykapillarenspannung betrug 2.5 kV, die Heizkapillarentemperatur 250°C und die Flußrate 100 µl/min bei einem Schießgasdruck von 6 bar Stickstoff. Für LC-ESI-MS-Untersuchungen wurde ein API-150EX-Gerät der Firma Applied Biosystems verwendet. Das Massenspektrometer war mit einer Gynkotec-HPLC gekoppelt. Es wurde eine RP-18-Säule der Firma Macherey und Nagel (250 x 2 mm, 5 µm) verwendet. Die Laser-ESI-MS/MS-Fragmentierung wurde an einem FTMS-7 APEX[®] III 70e-Gerät (IRMPD) der Firma Bruker Daltonik durchgeführt. Als Stoßgas diente Argon (1.5 mTorr), als Schießgas Stickstoff (40 psi). Die Spannung des Sekundärelektronenvervielfachers betrug 1.4 kV, die Stoßenergie -20, -30 und -40 eV.

Festphasenextraktion:

Chromabond[®] Kartuschen der Größen 100 und 500 mg der Firma Macherey und Nagel (Material: RP-18).

Analytische HPLC-Messungen:

Es werden HPLC-grade- Lösungsmittel (Fa. Acros Organics, Geel/ Belgien bzw. Fa. Merck, Darmstadt) verwendet. Reinstwasser wird mit der Anlage der Firma Millipore erhalten.

Es werden die Anlagen Waters 2690 Alliance[®] (separation module) mit Millenium^{3,2}-Software sowie Waters 510 HPLC Pump mit Waters 996 Photodiode Array Detector, Waters 717plus Autosampler (10 °C), Säulenofen K5 (Fa. Techlab, Erkerode; 20 °C) mit NEC-Rechner Image 466 (Millenium-Software) bzw. Waters/Millipore Pumpen- und Gradientensteereinheit 600E, Injektor U6K, Photodiode Array Detector 990+ verwendet. Da Druck- und Temperaturschwankungen sich auf die Trenneigenschaften des HPLC-Systems auswirken, kann der Wert für die Retentionszeit um ca. ± 3 min variieren.

Es werden folgende *Säulen* verwendet:

Säule 98: Nucleosil 100 C18, 5 µm, 250 x 4 mm, LH 177 (Fa. Knauer)

Säule 107: Eurospher C18, 5 µm, 250 x 4 mm, LH 177 (Fa. Knauer)

Es werden folgende *Gradienten* verwendet:

Gradient 1: Start: 100% A, 10 min: 100% A, 50 min: 100% B, 60 min: 100% B
Laufmittel A: Wasser/Acetonitril 9:1 + 0.5% Tfa, Laufmittel B: Acetonitril,
Flußrate: $1 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$.

Gradient 2: Start: 100% A, 10 min: 100% A, 50 min: 100% B, 60 min: 100% B.
Laufmittel A: Wasser/Methanol 9:1, Laufmittel B: Methanol, Flußrate:
 $0.75 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$.

Gradient 3: Start: 100% A, 10 min: 100% A, 50 min: 100% B, 60 min: 100% B.
Laufmittel A: Wasser/Methanol 9:1 + 0.1% Ameisensäure, Laufmittel B:
Methanol, Flußrate: $1 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$.

Diese Bedingungen werden in folgende *Trennsysteme* zusammengefaßt:

Trennsystem 1: Säule 98, Gradient 1

Trennsystem 2: Säule 107, Gradient 2

Trennsystem 3: Säule 107, Gradient 3

Präparative HPLC-Trennungen:

Es werden die Waters/Millipore- Anlagen mit zwei Pumpen 590 EF, Gradientensteereinheit 680, Injektor U6K, Variable Wavelength Monitor mit superpräparativer Flußzelle (Fa. Knauer) und Linienschreiber TY (Fa. Knauer) bzw. eine Anlage der Firma Merck-Hitachi mit L-6200 Intelligent Pump, 655A Variable Wavelength UV-Monitor und D-2000 Chromato-Integrator verwendet.

Es werden folgende *Säulen* verwendet:

Säule 99: Nucleosil-100 C18, 7 μm , 250 x 16.0 mm (Fa. Knauer) mit Vorsäule Nucleosil 100-7 C18, 7 μm .

Säule 100: Nucleosil-100 C18, 7 μm , 250 x 16.0 mm (Fa. Knauer).

Säule 106: Prontosil C18, 5 μm , 250 x 20.0 mm (Fa. Bischoff).

Säule 111: Nucleosil-100 C18, 7 μm , 250 x 21.0 mm (Fa. Macherey & Nagel).

Es werden folgende *Gradienten* verwendet:

- Gradient 1: Start: 100% A, 30 min: 50%A, 50% B, 40 min: 100% B, 50 min: 100% B.
Laufmittel A: Wasser/Acetonitril 9:1 + 0.5% Tfa, Laufmittel B: Acetonitril,
Flußrate: $5 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$.
- Gradient 2: Start: 100% A, 10 min: 100% A, 40 min: 50%A, 50% B, 50 min: 100% B,
60 min: 100% B. Laufmittel A: Wasser/Acetonitril 9:1 + 0.5% Tfa, Lauf-
mittel B: Acetonitril, Flußrate: $5 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$.
- Gradient 3: Start: 100% A, 10 min: 100%A, 50 min: 100% B, 60 min: 100% B.
Laufmittel A: Wasser/Methanol 9:1 + 0.1% Ameisensäure, Laufmittel B:
Methanol, Flußrate: $4 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$.
- Gradient 4: Start: 100% A, 10 min: 100%A, 40 min: 100% B, 50 min: 100% B.
Laufmittel A: Wasser/Methanol 9:1, Laufmittel B: Methanol, Flußrate: $5 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$.
- Gradient 5: Start: 100% A, 15 min: 50%A, 50% B, 40 min: 100% B, 50 min: 100% B.
Laufmittel A: Wasser/Methanol 9:1 + 0.1% Ameisensäure, Laufmittel B:
Methanol, Flußrate: $5 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$.

Diese Bedingungen werden in folgende *Trennsysteme* zusammengefaßt:

- Trennsystem 1: Säule 100, Gradient 1
Trennsystem 2: Säule 99, Gradient 2
Trennsystem 3: Säule 111, Gradient 3
Trennsystem 4: Säule 106, Gradient 4
Trennsystem 5: Säule 106, Gradient 5

14. FARBSTOFFE AUS *SCLERODERMA CITRINUM* UND *CHALCIPORUS PIPERATUS*

14.1 Aufarbeitung der Fruchtkörper

1 kg frische Fruchtkörper von *scleroderma citrinum* der Pilzkollektion aus dem Bayerischen Wald (2001) werden zerkleinert und etwa sechsmal mit ca. 1000 ml Methanol extrahiert. Der Rohextrakt wird im Vakuum eingeeengt. Es bleibt eine zähe, braungelbe Flüssigkeit zurück. Sie wird in einer Mischung aus ca. 300 ml Essigsäureethylester und Wasser aufgenommen. Die gelben Farbstoffe gehen in die Wasserphase über und werden dreimal gegen Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Die organische Phase kann verworfen werden. Die vereinigten Wasserphasen werden vorsichtig mit 2N HCl angesäuert und erneut dreimal gegen 250 ml Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Dabei gehen nun alle farbigen Verbindungen in die organische Phase über. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man eine weitgehend vorgereinigte gelbe, honigartige Substanz. Sie wird HPL-chromatographisch feingereinigt (Trennsystem 1).

Zur Aufarbeitung von 300 g Pilzstielen von *chalciporus piperatus* (Kollektion Harzgerode 2001) verfährt man analog. Die HPL-chromatographische Aufreinigung erfolgt mit Trennsystem 2.

14.2 Sclerocitrin (125)

Ausbeute	400.0 mg (ca. 0.4% des Frischgewichtes), gelber Feststoff.
R_f -Wert	0.52 [RP-18, Wasser/Acetonitril/Tfa (19:14:0.1)].
R_t (HPLC _{präp.})	27.81 min (Trennsystem 1).
$[\alpha]_D^{22}$	-172.5 ($c = 0.88$, CH ₃ CN).
UV/Vis	(CH ₃ CN): λ_{\max} (ϵ) = 223 (sh, 0.21), 255 (0.24), 322 (0.21), 388 nm (0.22).
CD	(CH ₃ CN): λ ($\Delta\epsilon$) = 218 (0.00), 226 (+2.80), 247 (0.00), 255 (-0.47), 266 (-0.27), 302 (-4.54), 337 (0.00), 348 (+0.52), 360 (0.00), 410 nm (-3.54).
IR	(KBr): $\tilde{\nu} = 3415$ (br), 2928 (w), 1765 (s), 1721 (s), 1608 (s), 1572 (s), 1514 (s), 1456 (s), 1394 (m), 1347 (w), 1272 (m), 1217 (m), 1131 (m), 1023 (m), 997 (m), 886 (w), 837 (w), 764 (w), 568 (w), 530 cm ⁻¹ (w).
¹ H-NMR	(600 MHz, CD ₃ COCD ₃): $\delta = 2.67$ (dd, $J = 17.1, 5.2$ Hz, 1 H), 3.06 (s, 1 H), 3.68 (dd, $J = 17.1, 5.2$ Hz, 1 H), 4.23 (s, 1 H), 4.30 (s, 1 H), 5.75 (d,

	$J = 5.2$ Hz, 1 H), 6.88 (s, 1 H), 6.89 (br, 2 H), 6.90 (br, 2 H), 7.27 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H), 7.30 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H).
$^{13}\text{C-NMR}$	(151 MHz, CD_3COCD_3): $\delta = 40.4$ (CH), 45.7 (CH_2), 51.3 (CH), 53.3 (C_q), 63.0 (CH), 79.6 (CH), 88.6 (C_q), 98.6 (C_q), 100.9 (C_q), 115.4 (2 CH), 115.6 (2 CH), 118.7 (C_q), 120.3 (C_q), 121.6 (CH), 124.4 (C_q), 124.9 (C_q), 132.4 (2 CH), 132.6 (2 CH), 152.4 (C_q), 153.8 (C_q), 158.6 (2 C_q), 159.0 (C_q), 165.6 (C_q), 165.9 (C_q), 167.5 (C_q), 169.2 (C_q), 173.2 (C_q), 174.3 (2 C_q), 196.3 (C_q), 205.9 (C_q).
ESI-MS	m/z (%) = 726 (5) $[\text{M}]^-$, 725 (100) $[\text{M-H}]^-$.
HR(-)-ESI-MS	ber.: 725.0779 gef.: 725.0768.
Summenformel	$\text{C}_{36}\text{H}_{22}\text{O}_{17}$ (726.09).

14.3 Chalcitrin (169)

Ausbeute	n. b. (liegt im Gemisch vor), gelber Feststoff.
R_f -Wert	0.65 [RP-18, Wasser/Acetonitril/Tfa (19:14:0.1)].
R_t (HPLC _{präp.})	37.24 min (Trennsystem 2).
$[\alpha]_D^{20}$	-36 ($c = 0.10$, CH_3OH). (Sontag)
UV/Vis	(CH_3OH): λ_{max} (ϵ) = 227 (4.18), 332 (4.16), 397 nm (4.17). (Sontag)
CD	(CH_3OH): λ ($\Delta\epsilon$) = 213 (+0.49), 220 (+1.39), 250 nm (-1.39), 255 nm (-1.33), 286 (-2.94), 343 (-0.62), 356 (-0.76), 426 (+0.39). (Sontag)
IR	(KBr): $\tilde{\nu} = 3436$ (br), 2927 (w), 1731 (m), 1677 (s), 1629 (s), 1577 (s), 1514 (m), 1442 (m), 1400 (m), 1207 (m), 1142 (m), 838 cm^{-1} (w). (Sontag)
$^1\text{H-NMR}$	(600 MHz, CD_3COCD_3): $\delta = 2.46$ (dd, $J = 17.0$, 6.0 Hz, 1 H), 2.83 (br, 1 H), 3.09 (dd, $J = 17.0$, 6.0 Hz, 1 H), 3.90 (d, $J = 6.0$ Hz, 1 H), 4.75 (dd, $J = 4.5$, 3.5 Hz, 1 H), 6.96 (s, 1 H), 6.70 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), 6.75 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), 6.81 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H), 6.97 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), 7.10 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H). (Werte für Pulvinsäureseitenketten: Gimenez)
$^{13}\text{C-NMR}$	(151 MHz, CD_3COCD_3): $\delta = 39$ (CH), 44 (CH), 48 (CH_2), 58 (CH), 78 (C_q), 91 (C_q), 94 (C_q), 113 (2 CH), 114 (2 CH), 117 (C_q), 118 (C_q), 121 (CH), 125 (C_q), 127 (C_q), 130 (CH), 131 (4 CH), 132 (C_q), 149 (C_q), 152 (C_q), 156 (C_q), 157 (C_q), 159 (C_q), 166 (C_q), 167 (C_q), 168 (2 C_q), 171 (C_q), 177 (C_q), 203 (C_q), 210 (C_q). (Werte für Pulvinsäureseitenketten: Gimenez)

ESI-MS m/z (%) = 726 (5) $[M]^-$, 725 (100) $[M-H]^-$. (Sontag)

HR-(–)-ESI-MS ber.: 681.0880 gef.: 681.0911. (Sontag)

Summenformel $C_{35}H_{22}O_{15}$ (682.55).

16. FARBSTOFFE AUS *MYCENA PELIANTHINA*

16.1 Aufarbeitung der Fruchtkörper

870 g frisch gesammelte Fruchtkörper werden mehrfach im Ultraschallbad mit insgesamt ca. 3 l Methanol extrahiert, bis der Extrakt nach Filtration farblos bleibt. Es wird vorsichtig im Vakuum auf ein Zehntel eingengt und mit Argon belüftet. Auf diese Weise erhält man ca. 3 g Rohextrakt als violette, zähflüssige Masse. Der Rohextrakt muß bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden und wird dann bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Argonschutzgasatmosphäre in Portionen von ca. 100 mg an Sephadex LH-20 mit entgastem Methanol als Eluenten chromatographisch vorgereinigt. Der Vorlauf ist farblos bis schwach gelb und enthält vor allem Zuckerverunreinigungen, die erste Farbstofffraktion ist rotviolett gefärbt und auch bei geringer Tropfgeschwindigkeit nur unvollständig vom Vorlauf zu trennen. Als zweite Fraktion wird eine blaue Verbindung eluiert. Der Nachlauf ist braun und enthält NMR-spektroskopisch undefinierbare Zersetzungsprodukte. Die zweite Fraktion der ersten Reinigungssäule wird durch Rechromatographie an Sephadex LH-20 feingereinigt. Mannit kann z. T. auch durch Auskristallisieren entfernt werden.

16.2 Pelianthin (176)

Ausbeute	28.4 mg (ca. 1% des Rohextraktes), königsblauer Feststoff.
R_f -Wert:	0.92 [RP-18, Wasser/Methanol (1:1)].
R_t (HPLC _{präp.}):	2.27 min (Trennsystem 4).
$[\alpha]_{436}^{22}$	-18.5 ($c = 0.77$, CH_3OH).
UV/Vis	(CH_3OH): λ_{max} (ϵ) = 210 (3.10), 255 (3.08), 295 (2.85), 353 (2.90), 565 nm (2.01).
CD	(CH_3OH): λ ($\Delta\epsilon$) = 201 (0.00), 213 (+4.94), 225 (0.00), 254 (-10.58), 303 (0.00), 317 (+0.93), 328 (0.00), 360 (-6.12), 446 (0.00), 556 nm (+1.63).
IR	(KBr): $\tilde{\nu} = 3431$ (br), 2924 (w), 1662 (s), 1594 (br), 1511 (m), 1482 (m), 1438 (w), 1415 (w), 1373 (m), 1297 (w), 1194 (w), 1046 (w), 1008 (w), 936 (w), 900 (w), 776 (w), 726 (w), 524 cm^{-1} (w).
$^1\text{H-NMR}$	(600 MHz, CD_3OD): $\delta = 2.13$ (m, 2 H), 3.09 (dd, $J = 15.9, 7.1$ Hz, 1 H), 3.3 (m, 1 H), 3.22 (s, 2 H), 3.31 (s, 3 H), 3.43 (dd, $J = 12.4, 6.1$ Hz, 1 H), 3.58

(dd, $J = 12.4, 6.1$ Hz, 1 H), 4.10 (d, $J = 7.1$ Hz, 1 H), 4.17 (br, 1 H), 5.78 (s, 1 H), 6.80 (s, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_3OD): $\delta = 25.5$ (CH_2), 27.1 (CH), 29.3 (CH_2), 43.8 (CH_2), 49.8 (CH_2), 49.9 (CH_3), 67.0 (CH), 104.0 (C_q), 106.5 (C_q), 110.5 (CH), 116.8 (C_q), 125.2 (CH), 125.7 (C_q), 126.4 (C_q), 154.0 (C_q), 159.2 (C_q), 174.6 (C_q), 175.8 (C_q), 176.4 (C_q), 176.9 (C_q), 180.6 (C_q).

ESI-MS m/z (%) = 479 (3) $[\text{M}+\text{K}]^+$, 441 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HR-(+)-ESI-MS ber.: 441.0934 gef.: 441.0981.

Summenformel $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_9$ (440.37).

17. FARBSTOFFE AUS *MYCENA ROSELLA*

17.1 Aufarbeitung der Fruchtkörper

240 g bei Penzberg und Mittenwald gesammelte Fruchtkörper werden frisch mehrfach im Ultraschallbad mit insgesamt ca. 1 l Methanol extrahiert, bis der Extrakt nach Filtration farblos bleibt. Daraus erhält man 430 mg Rohextrakt. Durch Chromatographie des Rohextraktes an Sephadex LH-20 mit Methanol und Sephadex G-10 mit Wasser lassen sich die Zuckerverunreinigungen abtrennen. In einer anschließenden HPL-chromatographischen Reinigung (Trennsystem 5) erhält man das orangefarbene Rosellin A (**185**) mit einer Retentionszeit von 27.53 min sowie Rosellin B (**187**, $R_t = 29.83$ min). Zur Gewinnung von Rosellin C (**188**) aus den Kollektionen vom Reisberg bei Ingolstadt verfährt man analog ($R_t = 25.21$ min).

17.2 Rosellin A (**185**)

Ausbeute	8.6 mg (2% des Rohextraktes), orangefarbener Feststoff.
R_f -Wert	0.55 [RP-18, Wasser/Methanol (1:1)].
R_t (HPLC _{präp.})	27.53 min (Trennsystem 5).
$[\alpha]_D^{20}$	-101.2 ($c = 0.004$, CH ₃ OH).
UV/Vis	(CH ₃ OH): λ_{\max} (ϵ) = 236 (sh, 0.46), 336 (0.65), 476 nm (0.18).
CD	(CH ₃ OH): λ ($\Delta\epsilon$) = 221 (-1.06), 243 (-4.45), 279 (0.00), 293 (+0.59), 332 (+1.20), 358 (0.00), 370 (-0.26), 409 (-0.05), 463 (-0.21), 545 (0.00), 573 nm (+0.14).
IR	(KBr): $\tilde{\nu} = 3440$ (br), 2924 (m), 1731 (w), 1692 (w), 1638 (s), 1546 (m), 1358 (br), 1271 (m), 1235 (m), 1182 (w), 1074 (s), 865 (w), 803 (w), 750 (w), 571 cm ⁻¹ (w).
¹ H-NMR	(600 MHz, CD ₃ OD): $\delta = 1.88$ (dd, $J = 14.0, 3.5$ Hz, 1 H), 2.08 (s, 3 H), 2.27 (dd, $J = 14.0, 3.5$ Hz, 1 H), 2.43 (ddd, $J = 14.0, 4.4, 3.5$ Hz, 2 H), 3.38–3.52 (m, 8 H), 3.72 (dd, $J = 16.4, 3.4$ Hz, 2 H), 3.95 (dd, $J = 16.0, 2.4$ Hz, 2 H), 4.79 (d, $J = 7.1$ Hz, 1 H), 4.85 (d, $J = 7.1$ Hz, 1 H), 6.62 (t, $J = 4.4$ Hz, 1 H), 7.14 (s, 1 H), 7.17 (d, $J = 3.2$ Hz, 1 H), 7.18 (br, 1 H), 7.29 (d, $J = 3.2$ Hz, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$	(101 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.4$ (CH_2), 20.8 (CH_3), 24.7 (CH_2), 62.6 (2 CH_2), 71.4 (CH), 71.5 (CH), 74.4 (CH), 74.7 (CH), 74.9 (CH), 77.6 (CH), 77.9 (CH), 78.0 (CH), 78.2 (CH), 103.4 (CH), 103.7 (CH), 104.1 (CH), 112.2 (CH), 113.8 (CH), 119.1 (C_q), 122.0 (CH), 128.1 (C_q), 139.4 (C_q), 141.1 (C_q), 147.0 (C_q), 148.0 (C_q), 155.9 (C_q), 157.5 (C_q), 171.0 (C_q), 193.8 (C_q).	
ESI-MS	m/z (%) = 746 (32) $[\text{M} - \text{H} + 2 \text{H}_2\text{O}]^-$, 710 (13) $[\text{M} - \text{H}]^-$. m/z (%) = 1423 (2) $[2 \text{M} + \text{H}]^+$, 734 (13) $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 712 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$.	
CID (140 eV)	m/z (%) = 710 (100) $[\text{M} - \text{H}]^-$, 668 (21) $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^-$, 488 (46) $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_3\text{O} - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6]^-$, 326 (56) $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_3\text{O} - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$.	
HR-(+)-ESI-MS	ber.: 712.2201	gef.: 712.2250.
	ber.: 734.2020	gef.: 734.2002 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$ -Peak).
Summenformel	$\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_{17}$ (711.63).	

17.3 Rosellin B (187)

Ausbeute	6.3 mg (ca. 1.5% des Rohextraktes), orangefarbener Feststoff.	
R_t (HPLC _{präp.})	29.83 min (Trennsystem 5).	
$[\alpha]_D^{20}$	-100.5 ($c = 0.006$, CH_3OH).	
UV/Vis	(CH_3OH) : λ_{max} (ϵ) = 237 (sh, 0.35), 336 (0.52), 470 nm (0.12).	
CD	(CH_3CN) : λ ($\Delta\epsilon$) = 246 nm (-3.85), 271 (0.00), 325 (+2.63), 383 (+0.03), 460 nm (+0.33).	
IR	(KBr): $\tilde{\nu} = 3436$ (br), 2924 (w), 1736 (m), 1698 (m), 1638 (s), 1546 (m), 1438 (w), 1397 (w), 1344 (m), 1307 (w), 1271 (m), 1232 (m), 1182 (m), 1077 (s), 1041 (s), 902 (w), 866 (w), 842 (w), 804 (w), 752 (w), 499 cm^{-1} (w).	
$^1\text{H-NMR}$	(600 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.91$ (dd, $J = 13.0, 7.2$ Hz, 1 H), 2.11 (s, 3 H), 2.15 (s, 3 H), 2.32 (d, $J = 13.0$ Hz, 1 H), 2.47 (m, 2 H), 3.44–3.55 (m, 8 H), 3.78 (dd, $J = 12.2, 5.5$ Hz, 1 H), 4.01 (dd, $J = 12.2, 5.5$ Hz, 1 H), 4.32 (dd, $J = 12.0, 6.7$ Hz, 1 H), 4.48 (dd, $J = 12.0, 6.7$ Hz, 1 H), ca. 5.0 (verdeckt, 1 H), ca. 5.0 (verdeckt, 1 H), 6.68 (t, $J = 3.6$ Hz, 1 H), 7.16 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H), 7.24 (br, 1 H), 7.25 (s, 1 H), 7.40 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H).	
$^{13}\text{C-NMR}$	(151 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.3$ (CH_2), 20.8 (CH_3), 21.0 (CH_3), 24.7 (CH_2), 62.9 (CH_2), 64.7 (CH_2), 71.6 (CH), 73.0 (CH), 74.4 (CH), 74.7 (CH), 74.9	

(CH), 75.4 (CH), 77.5 (CH), 78.1 (2 CH), 103.4 (CH), 103.6 (CH), 104.1 (CH), 111.9 (CH), 114.4 (CH), 119.2 (C_q), 122.0 (CH), 128.2 (C_q), 139.4 (C_q), 141.2 (C_q), 146.9 (C_q), 147.9 (C_q), 155.9 (C_q), 157.4 (C_q), 171.0 (C_q), 173.0 (C_q), 193.7 (C_q).

ESI-MS m/z (%) = 774 (16) [M-2 H+Na]⁻, 752 (100) [M-H]⁻.

m/z (%) = 776 (100) [M+Na]⁺, 754 (4) [M+H]⁺.

HR(-)-ESI-MS ber.: 752.2150 gef.: 752.2146.

HR(+)-ESI-MS ber.: 776.2126 gef.: 776.2156 ([M+Na]⁺-Peak).

Summenformel C₃₂H₃₉N₃O₁₈ (753.67).

17.4 Rosellin C (188)

Ausbeute 0.8 mg (ca. 0.2% des Rohextraktes), orangefarbener Feststoff.

R_t (HPLC_{präp.}) 25.21 min (Trennsystem 5).

[α]_D²⁰ -92.3 (c = 0.013, CH₃OH).

UV/Vis (CH₃OH): λ_{max} (ε) = 238 (0.10), 338 (0.20), 461 nm (0.05).

CD (CH₃OH): λ (Δε) = 244 nm (-0.20), 269 (0.00), 301 (+0.79), 376 (+0.44), 441 (+0.48).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3436 (br), 2924 (w), 3030 (w), 1632 (s), 1546 (w), 1525 (w), 1441 (w), 1359 (m), 1272 (w), 1238 (w), 1186 (w), 1068 (m), 817 (w), 541 cm⁻¹ (w).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 1.71 (ddd, *J* = 13.4, 5.3, 4.2 Hz, 1 H), 2.11 (dd, *J* = 13.4, 5.3 Hz, 1 H), 2.35 (ddd, *J* = 19.2, 5.3, 3.1 Hz, 1 H), 2.56 (ddd, *J* = 19.2, 5.3, 3.1 Hz, 1 H), 3.37–3.51 (m, 8 H), 3.72 (m, 2 H), 3.96 (m, 2 H), 4.79 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 4.80 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 6.27 (br, 1 H), 6.62 (dd, *J* = 4.2, 4.1 Hz, 1 H), 7.20 (br, 1 H), 7.22 (s, 1 H), 7.37 (br, 1 H).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD): δ = 18.4 (CH₂), 26.9 (CH₂), 62.6 (CH₂), 62.7 (CH₂), 71.5 (CH), 71.6 (CH), 73.0 (CH), 74.8 (CH), 74.9 (CH), 77.7 (CH), 78.0 (CH), 78.1 (CH), 78.3 (CH), 103.5 (CH), 103.7 (CH), 103.8 (CH), 112.2 (CH), 113.9 (CH), 119.3 (C_q), 122.5 (CH), 127.7 (C_q), 140.3 (C_q), 141.1 (C_q), 147.1 (C_q), 148.1 (C_q), 155.8 (C_q), 158.0 (C_q), 194.1 (C_q).

ESI-MS m/z (%) = 704 (98) [M-H+2 H₂O]⁻, 668 (100) [M-H]⁻.

CID (140 eV) m/z (%) = 668 (100) $[M-H]^-$, 506 (66) $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 344 (14) $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_5]^-$.

HR(-)-ESI-MS ber.: 668.1939 gef.: 668.1933.

Summenformel $C_{28}H_{35}N_3O_{16}$ (669.60).

V. ANHANG

18. UNTERSUCHTE PILZKOLLEKTIONEN

- *Chalciporus piperatus* (13/01, 15/01) wurde bei Harzgerode (Sachsen-Anhalt) im September 2001 (leg. et det. Arnold/Winner) und im Teufelswinkel bei Regensburg (leg. et det. Steglich) gesammelt.
- *Chalciporus rubinellus* (USA 51/99) konnte im White Mountains National Parc, Maine (leg. et det. Arnold/Helfer) im August 1999 gefunden werden.
- *Mycena haematopus* (14/01, 46/01) wurde bei Dießen am Ammersee im Oktober 2001 gefunden (leg. et det. Steglich).
- *Mycena pelianthina* (51/98, 316/98, 53/99, 2/00, 13/00, 41/00, 45/00, 55/00, 67/00, 84/00, 86/00, 89/00, 107/00, 130/00, 131/00, 139/00, 140/00, 144/00) wurde im Mühlthal bei Leutstetten, in der Pupplinger Au bei Wolfratshausen und bei Breitbrunn am Ammersee im Juli und Oktober 1998, Oktober 1999 und August bis Oktober 2000 gesammelt (leg. et det. Steglich/Winner).
- *Mycena rosella* (322/98, 344/98, 96/00, 18/01, 23/01, 30/01, 34/01) konnte am Reisberg bei Ingolstadt im Oktober 1998 und 2000 sowie bei Penzberg und Geibenstetten im September und Oktober 2001 gefunden werden (leg. et det. Winner/Hohnholt).
- *Scleroderma citrinum* (37/00, 09/01) wurde bei Abensberg im September 2000 und bei Grattersdorf im Bayerischen Wald im September 2001 (leg. et det. Arnold/Schulz) gefunden.
- *Scleroderma citrinum* (USA 133/97) wurde im Joyce Kilmore Forest bei Graham, NC (leg. et det. Arnold) im August 1997 gesammelt.
- *Scleroderma meridionale* (Spanien 12/91) konnte in Pelagos de la Presa im Dezember 1991 gefunden werden (leg. Santos, det. Calonge).
- *Scleroderma verrucosum* (17/01) wurde im Teufelswinkel bei Regensburg im September 2001 (leg. et det. Steglich) gesammelt.

19. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAS	Atom-Absorptions-Spektroskopie
Abs.	Absorption
Ac	Acetyl
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
Ar	Aryl
<i>B.</i>	<i>Boletus</i>
Bat.	Bataille
ber.	berechnet
br.	verbreitert
Bull.	Bulliard
<i>C.</i>	<i>Chalciporus, Coriolus</i>
CD	Circulardichroismus
CI	Chemical Ionisation
COLOC	Correlation via Long-Range-Coupling
COSY	Correlation Spectroscopy
det.	determinavit
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EE	Essigsäureethylester
EI	Elektronenstoß-Ionisation
eq.	Äquivalent(e)
ESI	Electrospray-Ionisation
et al.	et alii
FAB	Fast-Atom Bombardment
Fr.	Fries
GC	Gaschromatographie
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
Glc	Glucose
HETCOR	Heteronuclear Correlation
HPL(C)	High Performance Liquid (Chromatography)

HR-MS	High Resolution Mass Spectrometry
konz.	konzentriert
Kumm.	Kummer
INADEQUATE	Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment
IR	Infrarot-Spektroskopie
<i>L.</i>	<i>Lupinus</i>
leg.	legit
Lit.	Literaturstelle
Lsg.	Lösung
Lsgm.	Lösungsmittel
<i>M.</i>	<i>Mycena, Macrocyttidia</i>
M	molar
[M] ⁺	Molekülion
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
Me	Methyl
min	Minute(n)
MS	Mass Spectrometry
n. b.	nicht bestimmt
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear-Overhauser-Enhancement
NOESY	Nuclear-Overhauser-Effect Spectroscopy
org.	organisch
P	Pulvinsäurerest
Pers.	Persoon
proz.	prozentig
quart.	quartär
Qué.	Quélet
<i>R_f</i>	relative Wanderungsgeschwindigkeit, Rückhaltefaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RP	reverse Phase
RT	Raumtemperatur
<i>S.</i>	<i>Scleroderma, Stereum, Suillus</i>
Schmp.	Schmelzpunkt
sh	Schulter

TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Tetramethylsilan
UV	Ultraviolett
Vak.	Vakuum
verd.	verdünnt
Vis	visible
vs.	Versus
<i>X.</i>	<i>Xerocomus</i>

VI. LITERATUR

- [1] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521-528.
- [2] A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093-2094.
- [3] L. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4481-4484.
- [4] H. Kogler, O. W. Sørensen, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, *55*, 157-163.
- [5] R. Wagner, S. Berger, *Magn. Res. Chem.* **1998**, *36*, 44-46.
- [6] G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1304-1309.
- [7] B. Reif, M. Köck, R. Kerssebaum, J. Schleucher, C. Griesinger, *J. Magn. Res., Serie B* **1996**, *112*, 295-301.
- [8] B. Reif, M. Köck, R. Kerssebaum, H. Kang, W. Fenical, C. Griesinger, *J. Magn. Res., Serie A* **1996**, *118*, 282-285.
- [9] G. E. Martin, C. E. Hadden, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 543-585.
- [10] D. I. Hoult, *J. Magn. Reson.* **1987**, *72*, 162-167.
- [11] V. Sklenár, M. Piotto, R. Leppik, V. Saudek, *J. Magn. Res., Serie A* **1993**, *102*, 241-245.
- [12] C. Benecke, R. Grund, R. Hohberger, A. Kerber, R. Laue, T. Wieland, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *314*, 141-147.
- [13] J. Meiler, M. Will, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1868-1870.
- [14] J. Meiler, M. Will, R. Meusinger, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2000**, *40*, 1169-1176.
- [15] T. Lindel, J. Junker, M. Köck, *J. Mol. Model.* **1997**, *3*, 364-368.
- [16] T. Lindel, J. Junker, M. Köck, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 573-577.
- [17] W. Maier, *Computer-Enhanced Analytical Spectroscopy, Vol. 4*, Plenum Press, New York, London **1993**.
- [18] M. Köck, J. Junker, W. Maier, M. Will, T. Lindel, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 579-586.
- [19] J. Meiler, E. Sanli, J. Junker, R. Meusinger, T. Lindel, M. Will, W. Maier, M. Köck, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 241-248.
- [20] J. Mann, *Chemical Aspects of Biosynthesis*, Oxford Chemistry Primers, Oxford **1994**.
- [21] A. R. Knaggs, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 169-292.
- [22] D. Barton, K. Nakanishi, *Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 1*, Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York **1999**.
- [23] P. R. Srinivasan, D. B. Sprinson, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 716-722.

-
- [24] Y. Asano, J. J. Lee, T. L. Shieh, F. Spreafico, C. Kowal, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4314-4320.
- [25] I. P. Crawford, *Annu. Rev. Microbiol.* **1965**, *14*, 2860-2865.
- [26] B. J. Rawlings, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 425-484.
- [27] M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565-574.
- [28] S. Hecht, W. Eisenreich, P. Adam, S. Amslinger, K. Kis, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, *PNAS* **2001**, *98*, 14837-14842.
- [29] F. Rohdich, S. Hecht, K. Gärtner, P. Adam, C. Krieger, S. Amslinger, D. Arigoni, A. Bacher, W. Eisenreich, *PNAS* **2002**, *99*, 1158-1163.
- [30] M. Seemann, B. T. S. Bui, M. Wolff, D. Tritsch, N. Campos, A. Boronat, A. Marquet, M. Rohmer, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4513-4515, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4337-4339.
- [31] W. Gao, R. Loeser, M. Raschke, M. A. Dessoy, M. Fulhorst, H. Alperman, L. A. Wessjohann, M. Zenk, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2716-2719, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2604-2607.
- [32] M. Gill, W. Steglich, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer Verlag, Wien, New York **1987**.
- [33] C. Stahlschmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1877**, *187*, 177-197.
- [34] C. Stahlschmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1879**, *195*, 365-372.
- [35] W. Thörner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1878**, *11*, 533-535.
- [36] W. Thörner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1879**, *12*, 1630-1635.
- [37] F. Kögl, H. Becker, *Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *465*, 211-242.
- [38] F. Kögl, *Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *465*, 243-256.
- [39] M. Holzapfel, C. Kilpert, W. Steglich, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 797-801.
- [40] M. Akagi, *J. Pharm. Chem. Soc. Japan* **1942**, *62*, 129.
- [41] E. Jägers, E. Hillen-Maske, W. Steglich, *Z. Naturforsch.* **1987**, *42b*, 1349-1360.
- [42] R. L. Edwards, G. C. Elsworthy, N. Kale, *J. Chem. Soc. C* **1967**, 405-409.
- [43] H. Besl, A. Bresinsky, W. Steglich, K. Zipfel, *Chem. Ber.* **1973**, *106*, 3223-3229.
- [44] H. Besl, A. Bresinsky, R. Herrmann, W. Steglich, *Z. Naturforsch.* **1980**, *35c*, 824-825.
- [45] W. Steglich, B. Oertel, *Sydovia, Ann. Mycol. Ser. II* **1985**, *37*, 284-295.
- [46] H. Schmidt, *Dissertation*, Universität Bonn **1990**.
- [47] A. Spiegel, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1882**, *15*, 1546-1554.
- [48] J. Santesson, *Phytochemistry* **1967**, *6*, 685.
- [49] R. L. Edwards, G. C. Elsworthy, *Chem. Comm.* **1967**, 373-374.

-
- [50] W. Steglich, W. Furtner, A. Prox, *Z. Naturforsch.* **1968**, *23b*, 1044-1050.
- [51] W. Furtner, *Dissertation*, Technische Universität München **1969**.
- [52] W. Steglich, W. Furtner, A. Prox, *Z. Naturforsch.* **1969**, *24b*, 941-942.
- [53] H. Besl, A. Bresinsky, A. Kämmerer, *Z. Mykol.* **1986**, *52*, 277-286.
- [54] T. Hartmann, *Pl. Syst. Evol.* **1985**, *150*, 15-34.
- [55] K. Justus, *Dissertation*, Universität Bonn **1993**.
- [56] B. Steffan, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 435-437, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *23*, 445-447.
- [57] M. Gill, D. A. Lally, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1351.
- [58] G. Gruber, *Dissertation*, Universität München **2002**.
- [59] D. L. Hawksworth, P. M. Kirtz, B. C. Sutton, D. N. Pegler, *Dictionary of the Fungi*, eight ed., CAB International, Oxon **1995**.
- [60] N. Arnold, *Persönliche Mitteilung*.
- [61] V. Hellwig, J. Dasenbrock, D. Klostermeyer, S. Kroiß, T. Sindlinger, P. Spiteller, B. Steffan, W. Steglich, M. Engler-Lohr, S. Semar, T. Anke, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 10101-10118.
- [62] M. Daferner, T. Anke, V. Hellwig, W. Steglich, O. Sterner, *J. Antibiotics* **1998**, *51*, 816-822.
- [63] M. S. Buchanan, W. Steglich, T. Anke, *Z. Naturforsch.* **1999**, *54c*, 463-468.
- [64] N. Hosokawa, I. Momose, R. Sekizawa, H. Naganawa, H. Iinuma, T. Takeuchi, S. Matsui, *J. Antibiotics* **2000**, *53*, 297-300.
- [65] J. B. P. A. Wijnberg, A. v. Veldhuizen, H. J. Swarts, J. C. Frankland, J. A. Field, *Tetrahedron Let.* **1999**, *40*, 5767-5770.
- [66] R. Hautzel, H. Anke, W. S. Sheldrick, *J. Antibiotics* **1990**, *43*, 1240-1244.
- [67] G. W. v. Eijk, *Phytochemistry* **1975**, *14*, 2506.
- [68] J. Bäuerle, *Dissertation*, Universität Tübingen **1981**.
- [69] R. Jente, F. Bosold, J. Bäuerle, T. Anke, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 553-559.
- [70] U. Becker, G. Erkel, T. Anke, O. Sterner, *Nat. Prod. Let.* **1997**, *9*, 229-236.
- [71] D. L. Clive, M. Yu, *Chem. Comm.* **2002**, 2380-2381.
- [72] U. Harttig, T. Anke, A. Scherer, W. Steglich, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3942-3944.
- [73] M. Engler, T. Anke, O. Sterner, *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2591-2593.
- [74] S.-I. Hatanaka, H. Katayama, *Phytochemistry* **1975**, *14*, 1434-1436.
- [75] C. Baumann, M. Bröckelmann, B. Fugmann, B. Steffan, W. Steglich, W. S. Sheldrick, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1120-1121, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1087-1089.

-
- [76] C. Hopmann, *Dissertation*, Universität München **1995**.
- [77] H. Wieland, T. Wieland, *Liebigs Ann. Chem.* **1937**, 528, 234-246.
- [78] B. Robinson, G. F. Smith, A. H. Jackson, D. Shaw, B. Frydman, V. Deulofeu, *Proc. Chem. Soc. London* **1961**, 310-311.
- [79] S. Sakemi, H. H. Sun, *Tetrahedron Let.* **1989**, 30, 2517-2520.
- [80] H. H. Sun, S. Sakemi, N. Burres, P. McCarthy, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4964-4966.
- [81] D. B. Stierle, D. J. Faulkner, *J. Nat. Prod.* **1991**, 54, 1131-1133.
- [82] W. S. McIntire, D. E. Wemmer, A. Chistoserdov, M. E. Lidstrom, *Science* **1991**, 252, 817-824.
- [83] D. Sun, V. L. Davidson, *Biochemistry* **2001**, 40, 12285-12291.
- [84] S. Itoh, M. Ogino, S. Haranou, T. Terasaka, T. Ando, M. Komatsu, Y. Oshiro, S. Fukuzumi, K. Kano, K. Takagi, T. Ikeda, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 1485-1493.
- [85] Y.-L. Hyun, V. L. Davidson, *Biochemistry* **1995**, 34, 816-823.
- [86] G. R. Bishop, E. J. Valente, T. L. Whitehead, K. L. Brown, R. P. Hicks, V. L. Davidson, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 12868-12869.
- [87] G. R. Bishop, Z. Zhu, T. L. Whitehead, R. P. Hicks, V. L. Davidson, *Biochem. J.* **1998**, 330, 1159-1163.
- [88] E. Garnweidner, *GU Naturführer Pilze*, Gräfe und Unzer Verlag GmbH, München **1993**.
- [89] R. Phillips, *Der Kosmos-PilzAtlas*, Franck-Kosmos, Stuttgart **1990**.
- [90] <http://194.131.255.3/cabipages>.
- [91] E. Gerhardt, *Der große BLV Pilzführer*, BLV Verlagsgesellschaft mbH, München **2001**.
- [92] B. Fugmann, *Dissertation*, Universität Bonn **1985**.
- [93] B. Sontag, *Dissertation*, Universität München **1999**.
- [94] M. v. d. Heuvel, *Diplomarbeit*, Universität München **1999**.
- [95] O. Sterner, B. Steffan, W. Steglich, *Tetrahedron* **1987**, 43, 1075-1082.
- [96] D. Hamprecht, J. Josten, W. Steglich, *Tetrahedron* **1996**, 52, 10883-10902.
- [97] D. Hamprecht, *Dissertation*, Universität München **1995**.
- [98] A. Gimenez, *Unveröffentlichte Ergebnisse*.
- [99] W. Steglich, H. Besl, K. Zipfel, *Z. Naturforsch.* **1974**, 29b, 96-98.
- [100] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York **1995**.
- [101] P. E. Hansen, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1981**, 14, 175-295.

- [102] F. Mohamadi, N. Richards, W. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W. Still, *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 440-467.
- [103] L. A. Paquette, *Recent Synthetic Developments in Polyquinane Chemistry*, Springer Verlag, Heidelberg, New York, Tokyo **1984**.
- [104] N. Harada, K. Nakanishi, *Circular Dichroic Spectroscopy - Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*, University Science Books, Mill Valley, California **1983**.
- [105] N. Harada, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3989-3991.
- [106] S. Ito, M. Kasai, H. Ziffer, J. V. Silverton, *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 574-582.
- [107] H.-U. Humpf, N. Zhao, N. Berova, K. Nakanishi, P. Schreier, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1761-1765.
- [108] T. W. Wiesler, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9205-9213.
- [109] M. Müller, *Persönliche Mitteilung*.
- [110] D. C. Aumann, G. Clooth, B. Steffan, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 495-496, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 453-454.
- [111] S. Garaudée, M. Elhabiri, D. Kalny, C. Robiolle, J.-M. Trendel, R. Hueber, A. v. Dorsselaer, P. Albrecht, A.-M. Albrecht-Gary, *Chem. Comm.* **2002**, *9*, 944-945.
- [112] M. Gill, M. J. Kieferl, *Aust. J. Chem.* **1994**, *47*, 1967-1977.
- [113] M. Desage, S. Nowaczyk, T. L. Gall, C. Mioskowski, B. Amekraz, C. Moulin, *Angew. Chem.* **2003**, in Vorbereitung.
- [114] J. F. Dozol, M. Dozol, R. M. Macias, *J. Incl. Phenom.* **2000**, *38*, 1-22.
- [115] M. H. Henge-Napoli, G. N. Stradling, D. M. Taylor, *Radiat. Prot. Spectrom.* **2000**, *87*, 3-57.
- [116] W. Steglich, H.-T. Huppertz, B. Steffan, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 716-717, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, *24*, 711-712.
- [117] M. Ihara, M. Ohnishi, M. Takano, K. Makita, N. Taniguchi, K. Fukumoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4408-4410.
- [118] W. M. Bandaranayake, J. E. Banfield, D. S. C. Black, G. D. Fallon, B. M. Gatehouse, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1980**, 162-163.
- [119] M. M. Seidman, A. Toms, J. M. Wood, *J. of Bacteriology* **1969**, *97*, 1192-1197.
- [120] K.-L. -. Ngai, L. N. Ornston, R. G. Kallen, *Biochemistry* **1983**, *22*, 5223-5230.
- [121] B. Ebert, *Diplomarbeit*, Universität Bonn **1984**.
- [122] K. C. Nicolaou, N. A. Petasis, R. E. Zipkin, J. Uenishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5555-5557.
- [123] B. Voigt, R. Wartchow, H. Butenschön, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2519-2527.

-
- [124] K. G. Dongol, R. Wartchow, H. Butenschön, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1972-1983.
- [125] F. Geng, J. Liu, L. A. Paquette, *Org. Let.* **2002**, 4, 71-73.
- [126] S. Nozoe, J. Furukawa, U. Sankawa, S. Shibata, *Tetrahedron Let.* **1976**, 195-198.
- [127] W. A. Ayer, L. M. Browne, *Tetrahedron* **1981**, 37, 2199-2248.
- [128] S. Takahashi, H. Nagawana, H. Iinuma, T. Takita, K. Maeda, H. Umezawa, *Tetrahedron Let.* **1971**, 1955-1958.
- [129] G. Mellows, P. G. Mantle, T. C. Feline, D. J. Williams, *Phytochemistry* **1973**, 12, 2717-2720.
- [130] D. Abate, W.-R. Abraham, *J. Antibiotics* **1994**, 47, 1348-1350.
- [131] J. Dasenbrock, *Dissertation*, Universität Bonn **1994**.
- [132] V. Hellwig, *Dissertation*, Universität München **1999**.
- [133] V. Hellwig, J. Dasenbrock, S. Schumann, W. Steglich, K. Leonhardt, T. Anke, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 73-79.
- [134] E. Amouzou, W. A. Ayer, L. M. Browne, *J. Nat. Prod.* **1989**, 52, 1042-1054.
- [135] K. Titlestad, P. Groth, J. Dale, M. Y. Ali, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1973**, 346-347.
- [136] M. Gill, R. Watling, *Pl. Syst. Evol.* **1986**, 154, 225-236.
- [137] N. Arnold, W. Steglich, H. Besl, *Z. Mykol.* **1996**, 62, 69-73.
- [138] M. Binder, A. Bresinsky, *Mycologia* **2002**, 94, 85-98.
- [139] J. Breitenbach, F. Kränzlin, *Pilze der Schweiz, Röhrlinge und Blätterpilze, Vol. 3*, Verlag Mycologia, Luzern **1984**.
- [140] M. Bröckelmann, *Dissertation*, Universität Bonn **1991**.
- [141] E. Pfeil, A. Mehdorn, J. Fabian, *PPP-CSVCH-Programm*, Technische Universität Dresden **1998**.
- [142] J. Fabian, H.-U. Wagner, *WPSIN 4-Programm*, Technische Universität Dresden und Universität München **2000**.
- [143] J. Vebrel, M. Msaddek, F. Djapa, K. Ciamala, B. Laude, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2855-2859.
- [144] Y. Hayakawa, K. Kawakami, H. Seto, K. Furihata, *Tetrahedron Let.* **1992**, 33, 2701-2704.
- [145] D. L. Boger, J. Hong, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8515-8519.
- [146] A. Treibs, R. Zimmer-Galler, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **1960**, 318, 12-32.
- [147] J. J. Perry, *Nature* **1961**, 191, 77-78.
- [148] D. E. Baranano, M. Rao, C. D. Ferris, S. H. Snyder, *PNAS* **2002**, 99, 16093-16098.

- [149] W. Chai, G. C. Cashmore, M. S. Stoll, S. J. Gashell, R. S. Orkiszewski, A. M. Lawson, *Biol. Mass Spectrom.* **1991**, *20*, 313-323.
- [150] P. Spiteller, *Dissertation*, Universität München **2001**.
- [151] H. Koshino, J. Uzawa, *Kagaku to Seibutsu* **1995**, *33*, 252-258.
- [152] R. Arslanian, G. H. Harris, F. R. Stermitz, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1204-1210.
- [153] Y. Tsuda, L. Marion, *Can. J. Chem.* **1964**, *42*, 764-769.
- [154] T. Wieland, W. Motzel, *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *581*, 10-16.
- [155] P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester **2002**.
- [156] <http://www.acdlabs.com>.
- [157] M. Yamazaki, H. Fujimoto, T. Kawasaki, *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 245-254.
- [158] S. Kodato, M. Nakagawa, M. Hongu, T. Kawate, T. Hino, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 359-377.
- [159] P. D. Bailey, P. J. Cochrane, K. Lorenz, I. D. Collier, D. P. J. Pearson, G. M. Rosair, *Tetrahedron Let.* **2001**, *42*, 113-115.
- [160] C.-B. Cui, H. Kakeya, H. Osada, *J. Antibiotics* **1994**, *49*, 534-540.
- [161] C.-B. Cui, H. Kakeya, G. Okada, R. Onose, M. Ubukata, I. Takahashi, K. Isono, H. Osada, *J. Antibiotics* **1995**, *48*, 1382-1384.
- [162] S. D. Edmonson, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1190-1193, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1138-1140.
- [163] F. v. Nussbaum, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2259-2262, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2175-2178.
- [164] P. R. Sebahar, R. M. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5666-5667.
- [165] L. E. Overman, M. D. Rosen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4768-4771, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4596-4599.
- [166] K. Matsunaga, Y. Shizuri, S. Yamamura, K. Kawai, H. Furukawa, *Tetrahedron Let.* **1991**, *32*, 6883-6884.
- [167] W. Balk-Bindseil, E. Helmke, H. Weyland, H. Laatsch, *Liebigs Ann.* **1995**, 1291-1294.
- [168] Y.-Q. Tang, I. Sattler, R. Thiericke, S. Grabley, X.-Z. Reng, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 261-267.
- [169] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.

Lebenslauf

Name: Monika Winner
Geburtsdatum, -ort: 20. Dezember 1974, Osnabrück
Eltern: Dr. Carl-Heinrich Winner, Mechthild Winner (geb. Brockes)

Schulausbildung

Sept. 1981 – Juli 1985 Grundschole Horneburg
Aug. 1985 – Juni 1990 Mallinckrodt-Gymnasium Dortmund
Aug. 1990 – Juni 1993 St. Antonius-Gymnasium Lüdinghausen
Juni 1993 Abitur

Studium

Nov. 1993 – Juli 1998 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
April 1996 Vordiplom
Juli 1998 Mündliche Diplomprüfungen
Aug. 1998 – Feb. 1999 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Wolfgang Steglich zum Thema: „Trennung und Isolierung von Farbstoffen aus *Mycena pelianthina* und *Mycena rosella*“.
März 1999 Diplom

Dissertation

April 1999 – Mai 2002 Experimentelle Arbeiten zur Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Wolfgang Steglich am Department Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München zum Thema: „Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus Pilzen der Gattungen *Scleroderma*, *Chalciporus* und *Mycena*“.

Tätigkeiten

seit April 1999 Wissenschaftliche Angestellte am Department Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, als Mitglied eines BMBF-Projektes mit der BASF-AG sowie des Sonderforschungsbereiches 369 der Deutschen Forschungsgemeinschaft: „Molekulare und bioorganische Grundlagen des Sekundärstoffwechsels.“