

Isolierung und Strukturaufklärung
neuer Naturstoffe aus
marinen Invertebraten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sven Thorwald Possner

Hamburg 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Francke
2. Gutachter: Prof. Dr. C. Meier

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis Februar 2005 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wittko Francke danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die wertvollen Diskussionen und Anregungen, die freundschaftliche Betreuung während dieser Arbeit und die schöne Zeit in seiner Arbeitsgruppe.

Allen jetzigen und ehemaligen AK-Mitgliedern: Jenny Haftmann, Carolin Kellersmann, Melanie Mosler, Stephanie Nagorny, Claudia Schulz, Dr. Susanne Sölter, Dr. Jan Bergmann, Karsten Fehler, Matthias Fritsche, Nicolas Heinzl, Dr. Mathias Rietdorf, Michael Specht, Armin Tröger, Robert Twele, Gunnar Weibchen, einen ganz herzlichen Dank für die gemeinschaftliche Atmosphäre und den starken Zusammenhalt als „*Gute Gruppe*“!

Herrn Dr. Volker Sinnwell und seinen Mitarbeiterinnen möchte ich herzlich für die zuverlässige Aufnahme der NMR-Spektren danken.

Herrn Dr. Stephan Franke danke ich für die vielen lehrreichen Stunden bei der Unterweisung im Umgang mit den Massenspektrometern und Gaschromatographen.

Für den erfolgreichen und spannenden Aufenthalt auf der Meeresbiologischen Station der Universität Bergen, Norwegen sei Herrn Dr. Hans Tore Rapp und allen Mitgliedern der Station herzlich gedankt.

Herrn Dr. Frank C. Schroeder (Cornell University) danke ich für die Diskussion und den Erfahrungsaustausch hinsichtlich NMR-spektroskopischer Probleme.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. W. Michaelis und seine Arbeitsgruppe für die Organisation und Koordinierung des Projekts.

Mein Dank geht an alle BOSMAN Kooperationspartner, insbesondere Frau Dr. Friederike Hoffmann für Taxonomie und Expertise in Sachen marine Invertebraten.

Frau Prof. Dr. H. Anke und den Mitarbeiter des IBWF, insbesondere Frau A. Meffert, sei für die Durchführung von HPLC-Fraktionierungen und Bio-Assays herzlich gedankt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. A. König († 2004) für seine stete Hilfsbereitschaft und sein anregendes Interesse bei der Strukturaufklärung von Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen.

Meinem Freund Herrn Dr. Fernando Ibarra danke ich herzlich für das Korrekturlesen und die ungebrochene Unterstützung und Ermutigung in guten wie in schlechten Zeiten.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und meinen Bruder, und vor allem an meine Frau Imke und ihre Familie, die mich alle unterstützt haben und die Belastungen während meiner Promotion mitgetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	THEMENSTELLUNG	4
3	PHAKELLIA VENTILABRUM	5
3.1	Inhaltsstoffe von <i>P. ventilabrum</i>	6
3.2	Fraktionierung und Gewinnung von Reinsubstanzen	9
3.2.1	Kohlenwasserstoffe	10
3.2.2	Quartette strukturverwandter Isocyanide, Isocyanate, Isothiocyanate und Dichlorimine	12
3.2.2.1	Axane	15
3.2.2.2	Spiroaxane	26
3.2.2.3	Cubebane	29
3.2.2.4	Isodaucane	36
3.2.2.5	Muurolane	42
3.2.2.6	Eudesmane	46
3.3	Diskussion der Ergebnisse	61
3.3.1	Isocyanide als Naturstoffe	61
3.3.2	Bedeutung der Sekundärmetabolite in <i>P. ventilabrum</i>	63
4	ANTHOTHELA GRANDIFLORA	65
4.1	Naturstoffe in <i>A. grandiflora</i> : Extraktion und GC-MS Analytik	65
4.2	Oxygenierte Sesquiterpene aus <i>Anthothela grandiflora</i>	71
4.2.1	Chromatographie	71
4.2.2	NMR-Spektroskopie	73
4.2.2.1	Strukturaufklärung eines Vinylfurans (70)	74
4.2.2.2	Strukturaufklärung eines Benzofurans (71)	80
4.2.3	Strukturvorschläge für die Spurenkomponenten 72 und 73	82
4.3	Diskussion der Ergebnisse	83
5	ASCIDIA VIRGINEA	85
5.1	Extraktion und Voruntersuchungen	86
5.1.1	HPLC-DAD	86
5.1.2	Massenspektrometrie	87
5.1.3	HPLC-APCI-MS: Detektion positiver Ionen	88
5.1.4	APCI-MS: Detektion negativer Ionen	90
5.2	Isolierung und Identifizierung neuer Chinone mit Isochinolin-Skelett	92
5.2.1	Ascidin A: MS/MS des negativen Moleküliions.	92
5.2.2	Ascidin A: IR-Spektroskopie	95
5.2.3	Ascidin A: NMR-Spektroskopie	95
5.2.3.1	Ermittlung von Teilstrukturen	95
5.2.3.2	Kombination der Teilstrukturen	98
5.2.3.3	Struktur des Naturstoffs Ascidin A (83)	99
5.2.4	Ascidin B: MS/MS des negativen Moleküliions	104
5.2.5	Ascidin B: IR-Spektroskopie	106
5.2.6	Ascidin B: NMR-Spektroskopie	106

5.3	Strukturvorschläge für unvollständig charakterisierte Verbindungen in <i>A. virginea</i>	111
5.3.1	Ascidin C: Strukturbeweis durch Derivatisierung	111
5.3.2	Strukturvorschläge der Spurenkomponenten Ascidin D, E und F	112
5.4	Diskussion der Ergebnisse	114
5.4.1	Iodierte Naturstoffe	114
5.4.2	Isochinolinchinone	115
5.4.3	Iodierte Isochinolinchinone in <i>A. virginea</i>	116
6	ZUSAMMENFASSUNG	117
7	SUMMARY	119
8	EXPERIMENTELLER TEIL	121
8.1	Probenmaterial	121
8.1.1	Probennahme	121
8.1.2	Hälterung von <i>P. ventilabrum</i>	122
8.1.3	Taxonomie	122
8.2	Extraktion	122
8.3	Chromatographische Methoden	124
8.3.1	Niederdruck-Säulenchromatographie	124
8.3.2	HPLC	124
8.3.3	Präparative GC	124
8.4	Analytische Messungen	124
8.4.1	Gaschromatographie und GC-FTIR	124
8.4.2	Massenspektrometrie	125
8.4.3	UV-Vis-Spektroskopie	125
8.4.4	NMR-Spektroskopie	125
8.4.5	IR-Spektroskopie	126
8.5	Derivatisierungsreaktionen	126
8.5.1	Umsetzung eines Sesquiterpen-Isocyanids mit <i>m</i> -CPBA zum Isocyanat	126
8.5.2	Umsetzung eines Sesquiterpen-Isocyanids mit Schwefel zum Isocyanat	126
8.5.3	Umsetzung eines Sesquiterpen-Isocyanids mit Chlor zum Dichlorimin	126
8.5.4	Reduktion von Isocyanaten, Isothiocyanaten oder Dichloriminen zum Isocyanid	126
8.5.5	Umsetzung des Vinylfurans 70 mit DDQ zum Benzofuran 71	127
8.5.6	Iodierung von Ascidin A mit I(Py ₂)BF ₄ zu den Ascidinen B und C	127
9	SICHERHEITSDATEN	128
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	134
11	LITERATURHINWEISE	136

1 Einleitung

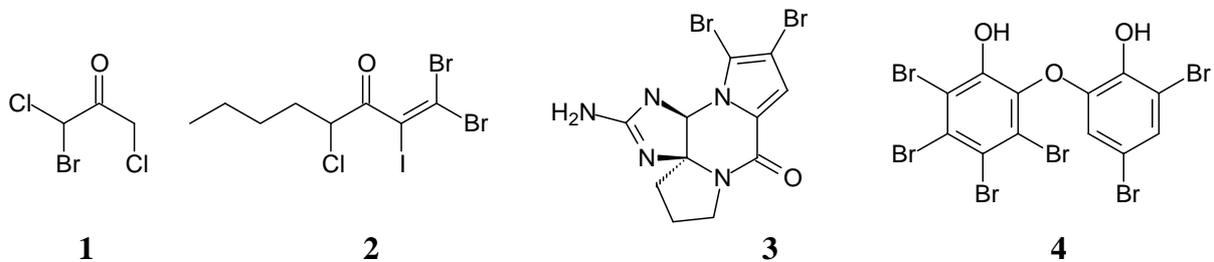
Die marine Naturstoffchemie beschäftigt sich mit der Untersuchung von organischen Verbindungen aus Meeresorganismen. Sie ist untrennbar mit der Erschließung des marinen Lebensraumes durch die Entwicklung des SCUBA*-Tauchens verbunden und hat damit eine wesentlich kürzere Geschichte als die Erforschung terrestrischer Naturstoffe. Über den gegenwärtigen Stand der Forschung der marinen Naturstoffchemie informiert die Reihe „Marine Natural Products“, die in der Zeitschrift *Natural Products Research* erscheint. Sie wurde jahrelang von D. J. Faulkner verfasst und wird nun, nach dessen Tod im Jahre 2002, von dem neuseeländischen Autorenkollektiv um J. Blunt weitergeführt¹. In der Ausgabe zur Jahrtausendwende 2000 heißt es zu Beginn²: „*Marine Natural Products Chemistry is essentially a child of the 1970's that developed rapidly during the 1980's and matured in the last decade. (...)*“ Dieser Satz zeigt wie kurz die Geschichte dieser Teildisziplin ist, stellt jedoch auch heraus, dass die marine Naturstoffchemie zu Beginn des 21. Jahrhunderts nicht mehr als gänzlich „junges“ Fachgebiet angesehen werden kann. Dennoch ist das Interesse an neuen chemischen Strukturen aus marinen Organismen ungebrochen. Insbesondere der Bedarf an neuen Leitstrukturen für die pharmakologische Forschung treibt die marine Naturstoffchemie voran. Hierbei spielt der Aspekt der räumlichen und evolutionsbiologischen Abgrenzung des marinen Lebensraumes zur terrestrischen Welt eine bedeutende Rolle. Das gewissermaßen „unverbrauchte“ Arsenal biologisch-aktiver Substanzen aus marinen Organismen nährt die Hoffnung auf Wirkstoffe gegen resistente Krankheitserreger³ oder Krankheiten, deren Auslöser nicht auf bekannte Substanzen angesprochen haben.

Die Suche nach biologisch-aktiven Sekundärmetaboliten wird durch die Beobachtung biologischer Aktivität in der Natur erleichtert. Es ist zu erwarten, dass alle Naturstoffe aus marinen Organismen ein biologisches Signal oder einen ökologischen Effekt auslösen. Die energieaufwendige Biosynthese von Sekundärmetaboliten dient in vielen Fällen der chemischen Verteidigung ihrer Produzenten. Der Begriff der „Verteidigung“ kann dabei von der Abwehr von Fraßfeinden bis zur Kontrolle symbiontischer Bakterienpopulationen verstanden werden. Das Studium von Ursachen, Einflüssen und Wirkwegen kann in jedem Fall Hinweise auf den Einsatz mariner Naturstoffe in medizinischen Anwendungen geben. Die chemische Ökologie mariner Systeme ist daher kein rein akademisches Forschungsgebiet sondern bezieht zunehmend Interesse aus der Perspektive der Wirkstoffforschung⁴. Chemische Verteidigung ist nahezu überall zu erwarten, wo Organismen die Fähigkeit zu mechanisch-physischem Schutz

* SCUBA = „Self-Contained Underwater Breathing Apparatus“

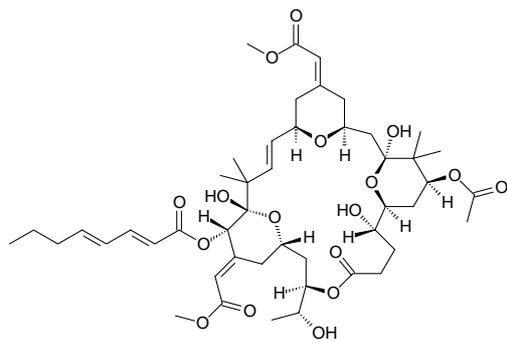
(Panzer, Stacheln, Gehäuse) oder die Möglichkeit zur Flucht durch mangelnde Mobilität fehlt. Während im terrestrischen Bereich hauptsächlich Pflanzen diese Kriterien erfüllen, findet man in der marinen Biosphäre eine Vielzahl sessiler Invertebraten, zu deren Schutzmechanismen das Konzept der chemischen Verteidigung zählt.

Die faszinierende strukturelle Vielfalt mariner Naturstoffe läßt sich auf zwei prinzipielle Unterschiede zur terrestrischen Biosphäre zurückführen. Zum einen stellen viele der rein marin vorkommenden Tier- und Pflanzenarten phylogenetisch vollkommen eigenständige Gruppen dar, deren äußerst geringe Verwandtschaft zu terrestrischen Spezies ein beispielloses Bioynthese-Potential erwarten läßt. Zum anderen bietet das Meer andere physikalisch-chemische Rahmenbedingungen: aphotische Zonen, Bereiche hohen hydrostatischen Drucks und die gute Verfügbarkeit der Elemente Chlor, Brom, Iod, die sich in der großen Häufigkeit halogenierter organischer Verbindungen widerspiegelt. Insbesondere Rotalgen bilden mehrfach halogenierte, flüchtige Verbindungen (**1**⁵, **2**⁶). Da die Konzentrationen im Meerwasser von Chlorid (ca. 0.5 M) über Bromid (ca. 1 mM) nach Iodid (ca. 1 µM) abnehmen, die Oxidationspotentiale ($X^- \rightarrow X^+ + e^-$) aber in umgekehrter Reihenfolge zunehmen, sind insbesondere bromierte Verbindung relativ häufig⁷. Bromierte Alkaloide wie das Dibromophakellin **3** oder der hexabromierte Diphenylether **4** sind eindrucksvolle Beispiele mariner Organohalogenverbindungen^{8,9}.

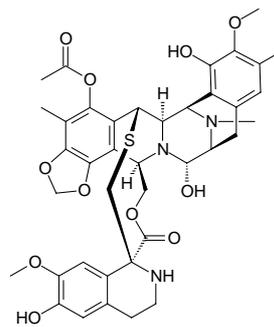


Zu den besonders hervorzuhebenden marinen Naturstoffe, die Einzug in die medizinische Forschung gehalten haben und sich gegenwärtig im Test in der klinischen Phase II befinden, zählen z.B. Bryostatin 1 (**5**) aus dem Moostierchen *Bugula neritina* (Bryozoa)¹⁰ und Ecteinascidin 743* (**6**) aus der Ascidie *Ecteinascidia turbinata*^{11,12}.

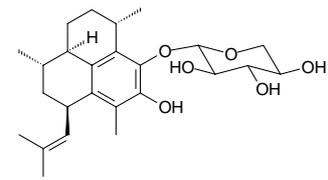
* auch bekannt als Et743, sowie unter der Bezeichnung Yondelis™ (PharmaMar und Johnson & Johnson Pharmaceuticals)



5



6



7

Neben diesen komplexen Strukturen sind es aber auch kleinere Moleküle, die aufgrund ihrer biologischen Aktivität Aufsehen erregt haben. Derivate des Pseudopterosin A (7), eines Diterpen-Glycosids aus der Gorgonie *Pseudopteroergorgia elisabethae*, sind durch ihre entzündungshemmende Wirkung von medizinischem Interesse¹³.

Schwämme stellen eine besonders intensiv untersuchte Organismengruppe dar. Ihre phylogenetische Stellung innerhalb des Tierreichs kennzeichnet sie als älteste und primitivste Eumetazoa¹⁴. Im Hinblick auf die medizinische Anwendung biologisch aktiver Sekundärmetabolite stellt die Verfügbarkeit und damit der biotechnologische Zugang eine entscheidende wirtschaftliche Rolle¹⁵. Dies hat in den letzten Jahren die Frage des Ursprungs von Naturstoffen in marinen Wirbellosen vermehrt aufgeworfen. Der häufig sehr hohe Anteil von Mikroorganismen an der Biomasse von Schwämmen läßt in vielen Fällen die Vermutung zu, dass die schwamm-assoziierten Bakterien die eigentlichen Produzenten von biologisch-aktiven Substanzen im System „Schwamm“ sind. In diesem Fall ließe sich die biotechnologische Produktion von Naturstoffen durch Bakterienkulturen oder die Klonierung bakterieller Biosynthese-Gene anstreben. Ist jedoch der Wirtsorganismus (Schwamm, Koralle, Tunicate, usw.) der tatsächliche Produzent biologisch-aktiver Naturstoffe, so ist die Hälterung der Organismen für die Produktion der benötigten Substanzen erforderlich. Die ökologischen und physiologischen Faktoren, die mit der Aquakultur mariner Invertebraten verbunden sind, müssen dabei erkannt und optimiert werden, so dass auch gehälterte Individuen ihre Sekundärmetabolitproduktion entfalten. Es besteht daher ein großes Interesse, die Hälterung von marinen Invertebraten zu studieren und die eventuellen Auswirkungen auf den Naturstoffgehalt zu kontrollieren.

2 Themenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Identifizierung neuer Naturstoffe aus marinen Invertebraten. Hierbei galt es, durch Einsatz von HPLC-DAD, HPLC-MS, GC-FID und GC-MS-Kopplungen neue Sekundärmetabolite in Extrakten bisher nicht-untersuchter Spezies aufzuspüren. Die Strukturaufklärung neuer Verbindungen sollte anschließend durch deren chromatographische Reingewinnung und Charakterisierung mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Experimente (COSY90, DQF-COSY, HMQC, HMBC, NOESY) erfolgen.

Für Spurenkomponenten, deren geringe Konzentration eine vollständige NMR-spektroskopische Charakterisierung ausschloss, galt es, mit Hilfe massenspektrometrischer Daten und des Einsatzes von Derivatisierungsreaktionen Strukturvorschläge zu entwickeln.

Anhand der untersuchten Spezies ist die vorliegende Arbeit in drei Kapitel gegliedert. Diese behandeln die Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen aus dem Schwamm *Phakellia ventilabrum*, der Gorgonie *Anthothela grandiflora*, sowie der Tunicate *Ascidia virginea*.

Ein weiterer Themenschwerpunkt dieser Arbeit lag in der Suche biologisch aktiver Inhaltsstoffe durch Testung von Extrakten, Fraktionen und Reinsubstanzen. In enger Kooperation mit dem IBWF, Kaiserslautern, wurden HPLC-Fraktionierungen durchgeführt, die anschließend einem breiten Spektrum verschiedener Assay-Systeme zugeführt wurden. Auf diese Weise sollte bereits in einem frühen Stadium der analytischen Arbeit die biologische Aktivität eines unfraktionierten Extrakts einzelnen Inhaltsstoffen zugeordnet werden, um deren Strukturaufklärung vorrangig anzustreben.

3 *Phakellia ventilabrum*

Phakellia ventilabrum PALLAS, 1766 ist ein fächerförmiger Schwamm von blattartigem Wuchs, der eine Größe von bis zu 30cm erreichen kann. Er ist an den Küsten Nordeuropas weit verbreitet.



Abbildung 3-1 Junges Exemplar der Spezies *Phakellia ventilabrum* kurz nach der Beprobung (Sula-Rücken, Norwegen). Foto: Koordination (Prof. Dr. W. Michaelis, Dr. T. Pape) des Verbundprojektes BOSMAN

P. ventilabrum gehört zur Familie der Axinellidae (Ordnung Halichondrida), aus der mehrere Schwammarten bekannt sind, die reich an Sekundärmetaboliten sind. Insbesondere terpenoide Isocyanide wurden in dieser Gruppe nachgewiesen.

Trotz seiner großen Häufigkeit und der Beschreibung seiner antibiotischen Aktivität¹⁶ liegen bisher keine chemischen Arbeiten zu diesem Schwamm vor.

3.1 Inhaltsstoffe von *P. ventilabrum*

Individuen des Schwammes *P. ventilabrum* wurden nach dem im experimentellen Teil beschriebenen Aceton-Verfahren extrahiert und vorfraktioniert. Der so gewonnene Dichlormethanextrakt wurde zunächst gaschromatographisch untersucht.

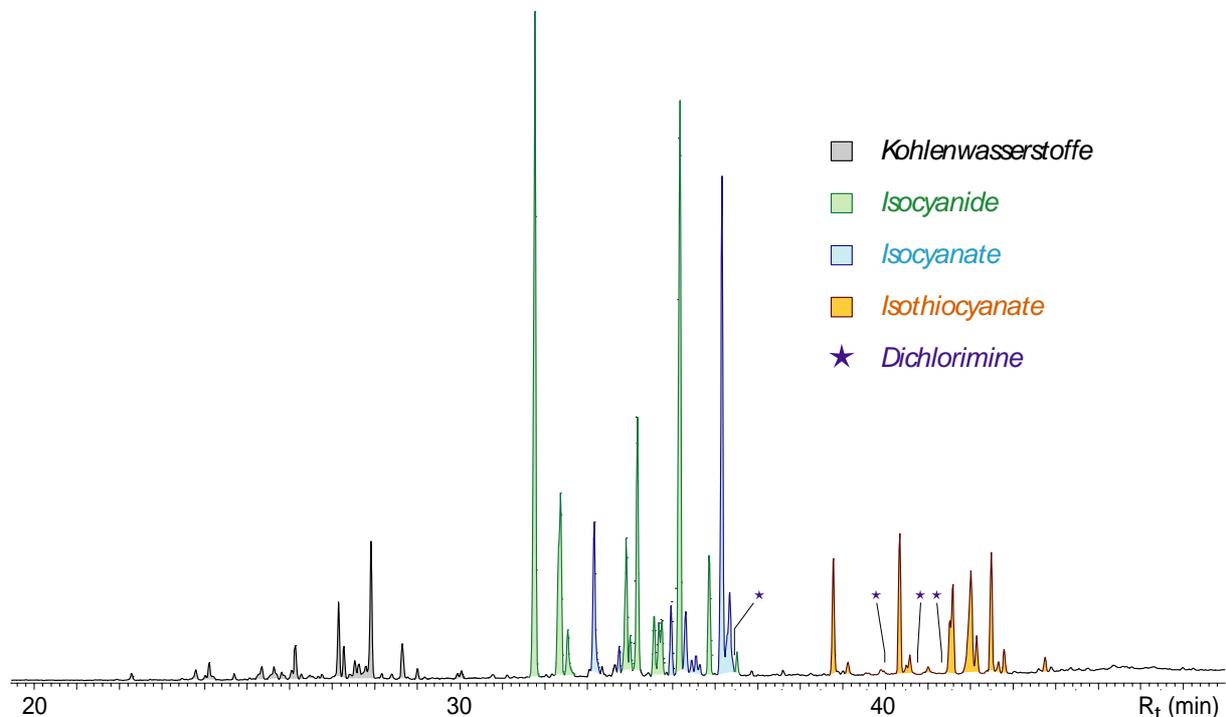


Abbildung 3-2 Gaschromatogramm des Dichlormethanextrakts von *P. ventilabrum*. GC-Säule: DB-5MS, 60m, T-Prog.: 80°C, 3 min isotherm, Aufheizrate 4°/min bis 300°C

Wie das Gaschromatogramm in Abbildung 3-2 zeigt, besteht der Dichlormethanextrakt aus einem komplexen Gemisch flüchtiger Verbindungen. Bei allen Komponenten dieses Gemisches handelt es sich um Sesquiterpene, die – mit Ausnahme der Kohlenwasserstoffe – eine stickstoffhaltige funktionelle Gruppe tragen. Durch hochaufgelöste Massenspektrometrie wurden die elementaren Zusammensetzungen ermittelt, anhand derer die Inhaltsstoffe in *P. ventilabrum* (bis auf wenige Ausnahmen) in Serien aus Isomeren mit den Summenformeln $C_{16}H_{25}N$, $C_{16}H_{25}NO$, $C_{16}H_{25}NS$ und $C_{16}H_{25}NCl_2$ eingeteilt werden konnten. GC-FTIR Untersuchungen zeigten, dass es sich hierbei um Isocyanide, Isocyanate, Isothiocyanate und Dichlorimine handelt.

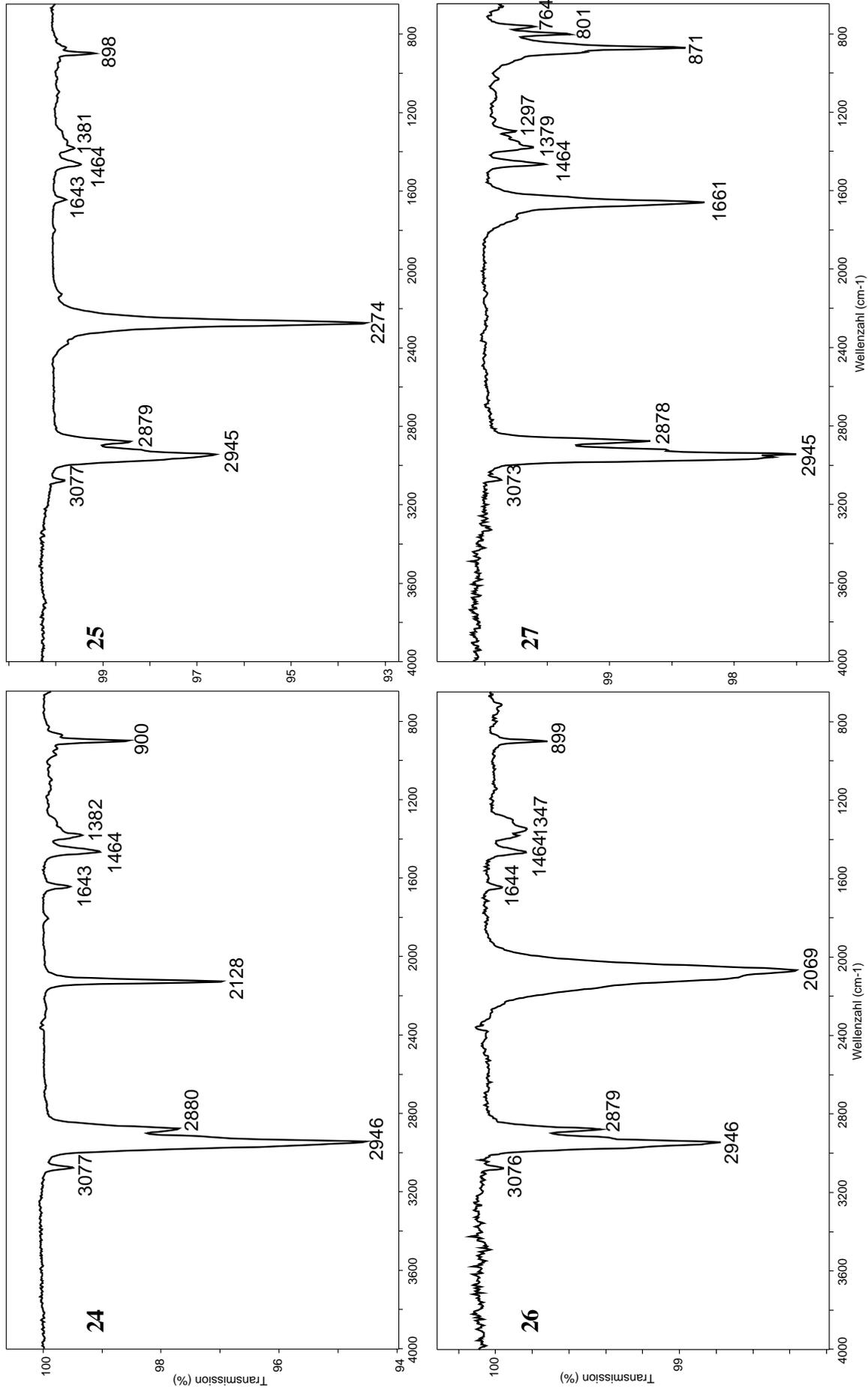


Abbildung 3-3 GC-FTIR-Spektren eines Quartetts aus einem Isocyanid (**24**), Isocyanat (**25**), Isothiocyanat (**26**) und Dichlorimin (**27**) mit gleichem Sesquiterpen-Skelett.

Tabelle 3-1 Liste stickstoffhaltiger Sesquiterpene in *P. ventilabrum*.

Nr.	Summenformel	RI	M_r (HR-EI-MS)		Abweichung [ppm]
			gefunden	berechnet	
28	C ₁₆ H ₂₃ N	1592	229.1827	229.1831	1.5
24	C ₁₆ H ₂₅ N	1611	231.1981	231.1987	2.6
29	C ₁₆ H ₂₃ NO	1626	-	245.1780	
31	C ₁₆ H ₂₅ N	1637	231.1982	231.1987	2.2
25	C ₁₆ H ₂₅ NO	1658	247.1935	247.1936	0.3
32	C ₁₆ H ₂₅ NO	1681	247.1932	247.1936	1.6
34	C ₁₆ H ₂₅ N	1687	231.1983	231.1987	1.7
41	C ₁₆ H ₂₅ N	1696	231.1980	231.1987	2.9
35	C ₁₆ H ₂₅ NO	1718	247.1925	247.1936	4.4
52	C ₁₆ H ₂₅ N	1731	231.1980	231.1987	2.9
45	C ₁₆ H ₂₅ N	1734	231.1980	231.1987	2.9
42	C ₁₆ H ₂₅ NO	1735	247.1933	247.1936	1.2
46	C ₁₆ H ₂₅ NO	1738	247.1934	247.1936	0.8
53	C ₁₆ H ₂₅ NO	1746	247.1931	247.1936	2.0
49	C ₁₆ H ₂₅ N	1748	231.1981	231.1987	2.6
27	C ₁₆ H ₂₅ NCl ₂	1765	266.1684	266.1676 [M-Cl] ⁺	-2.9
50	C ₁₆ H ₂₅ NO	1765	247.1931	247.1936	2.0
30	C ₁₆ H ₂₃ NS	1830	-	261.1551	
26	C ₁₆ H ₂₅ NS	1850	263.1705	263.1708	1.1
33	C ₁₆ H ₂₅ NS	1865	263.1711	263.1708	-1.0
37	C ₁₆ H ₂₅ NCl ₂	1904	-	266.1676 [M-Cl] ⁺	
43	C ₁₆ H ₂₅ NS	1911	263.1712	263.1708	-1.5
36	C ₁₆ H ₂₅ NS	1933	263.1701	263.1708	2.7
54	C ₁₆ H ₂₅ NS	1953	263.1707	263.1708	0.5
48	C ₁₆ H ₂₅ NCl ₂	1958	-	266.1676 [M-Cl] ⁺	
44	C ₁₆ H ₂₅ NCl ₂	1961	-	266.1676 [M-Cl] ⁺	
51	C ₁₆ H ₂₅ NS	1975	263.1714	263.1708	-2.4
47	C ₁₆ H ₂₅ NS	1996	263.1721	263.1708	-4.9

Die Massenspektren dieser Sesquiterpene können nur einen geringen Beitrag zu ihrer Strukturaufklärung liefern. Man findet in fast allen Spektren neben der Eliminierung der

stickstoffhaltigen Säuren (Blausäure, Isocyanursäure, Isothiocyanursäure) immer wieder typische Fragment-Ionen mit m/z 188, 161, 119, 105, u.v.m, die aus dem Zerfall des Isoprenoid-Skeletts hervorgehen. Die Ableitung von Substrukturen ist daher in den meisten Fällen nicht möglich. Die Massenspektren unterscheiden sich jedoch deutlich und reproduzierbar, so dass sie als „Fingerabdruck“ im Vergleich mit Referenspektren eine eindeutige Zuordnung erlauben sollten.

Bedauerlicherweise sind für die zahlreichen bekannten Sesquiterpen-Isocyanide und Isothiocyanate keine Massenspektren dokumentiert. Die überwiegende Mehrheit der Autoren beschränkt sich auf die Erwähnung einiger weniger Massenpeaks mit Intensitätsangaben. Viele der sehr unvollständig wiedergegebenen Spektren aus älteren Publikationen sind darüberhinaus mit einer Ionisierungsenergie von 20eV aufgenommen worden. Dieser Mangel in der Literatur bedeutet für die Strukturaufklärung, dass Reingewinnung und NMR-spektroskopische Charakterisierung unverzichtbar sind, um die Strukturen auch bekannter Verbindungen aufzuklären. Die überragenden Leistungsmerkmale der GC-MS-Analytik, die in dem äußerst geringen Substanzbedarf unfraktionierter Gemische, sowie im hohen Durchsatz liegen, kommen daher in der Analytik mariner Sesquiterpen-Isocyanide bisher leider nicht zur Geltung. Mit der Strukturaufklärung der Sesquiterpene aus *P. ventilabrum* sei hier ein Beitrag geleistet, der die Identifizierung von bekannten Vertretern dieser Substanzklasse in Zukunft erleichtern möge.

3.2 Fraktionierung und Gewinnung von Reinsubstanzen

Der sesquiterpenhaltige Dichlormethanextrakt von *P. ventilabrum* wurde durch Chromatographie an Kieselgel mit einem Lösungsmittelgradienten fraktioniert. Mit reinem Pentan eluieren ausschließlich die Kohlenwasserstoffe. Ein Wechsel zu einem Laufmittelgemisch aus Pentan und Dichlormethan im Verhältnis 20:1 liefert die Isocyanate, Isothiocyanate und Dichlorimine als Gemisch. Schließlich eluieren mit reinem Dichlormethan die Isocyanide als polarste Fraktion. Diese Auftrennung des Extrakts in drei Fraktionen **A**, **B** und **C** ist in Abbildung 3-4 schematisch dargestellt. Die Strukturaufklärung der Komponenten wird in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 besprochen.

Isolierung und Identifizierung von Inhaltsstoffen in *P. ventilabrum*

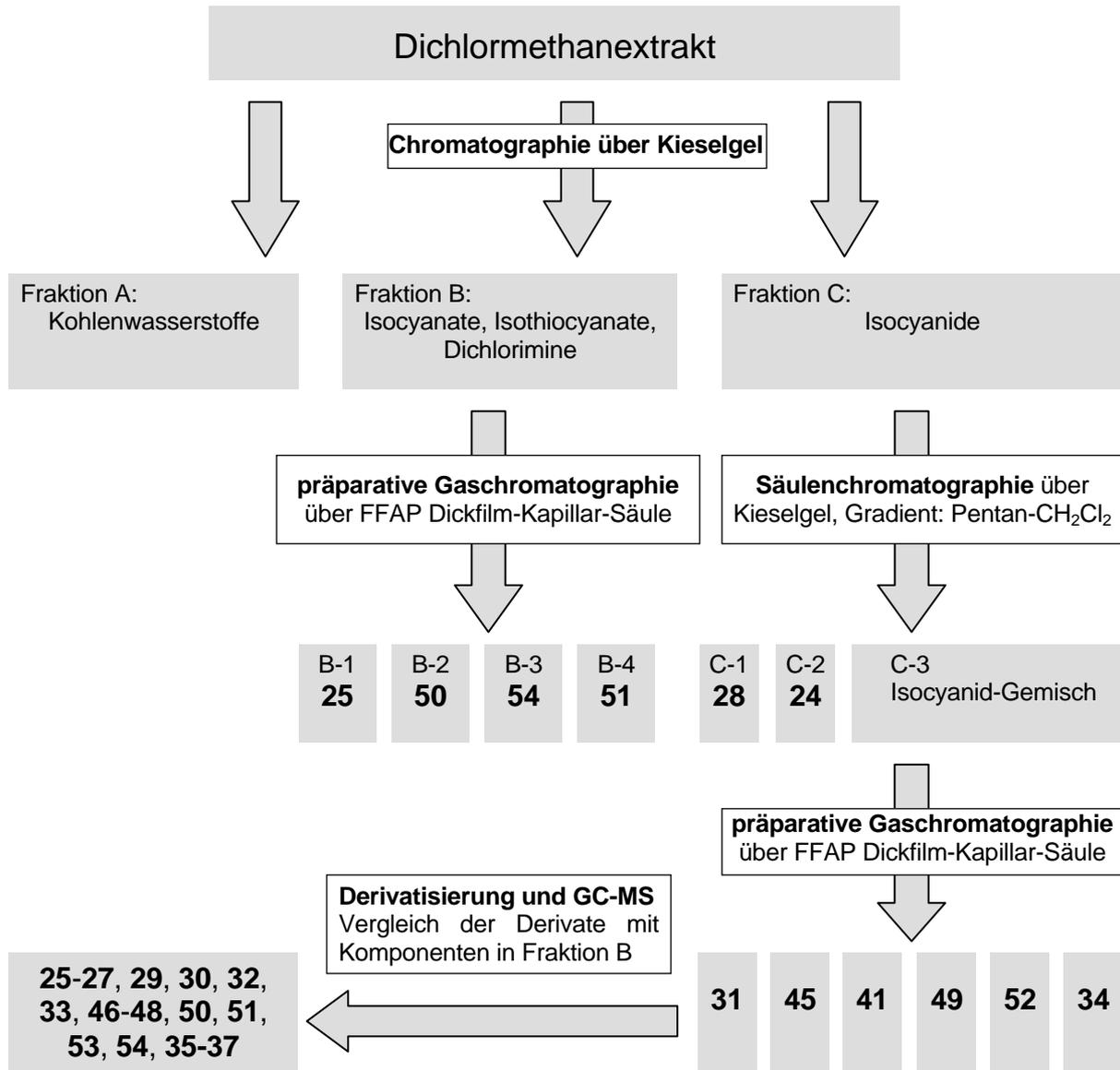


Abbildung 3-4 Analyse des Dichlormethanextrakts von *P. ventilabrum*.

3.2.1 Kohlenwasserstoffe

Die Kohlenwasserstoff-Fraktion (A, Abbildung 3-4) wurde ausschließlich durch GC-MS untersucht. Ein Gaschromatogramm dieser Fraktion ist in Abbildung 3-5 abgebildet. Für die meisten Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe konnten anhand ihrer Massenspektren und Retentionsindices Strukturvorschläge gemacht werden¹⁷. Die absolute Konfiguration der Kohlenwasserstoffe wurde nicht bestimmt.

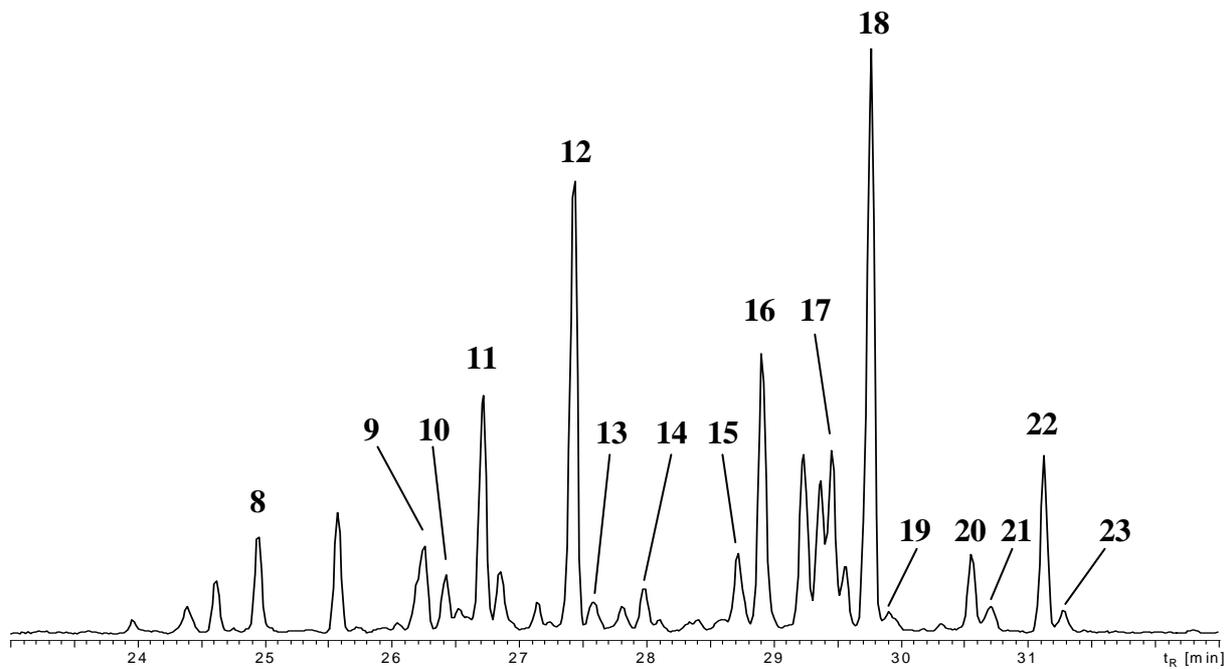
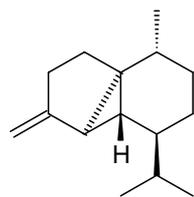
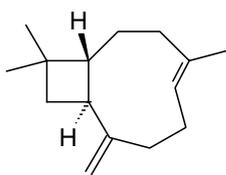


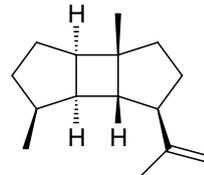
Abbildung 3-5 Gaschromatogramm der Kohlenwasserstoffe aus *P. ventilabrum*. Säule: DB5-MS, 0.32 mm ID, 0.25 μ m FD, Trägergas: Helium, T-Prog.: 50°C, 0min isotherm, Aufheizrate 3°C/min bis 300°C.



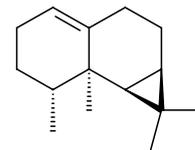
8 β -Cubeben



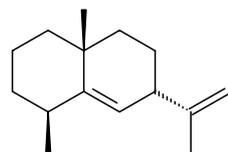
9 (E)- β -Caryophyllen



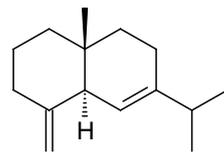
10 Bourbon-11-en



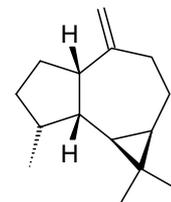
11 Calaren



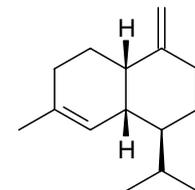
12 Selina-5,11-dien



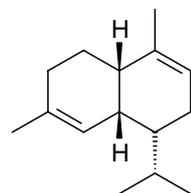
13 Selina-4(15),6-dien



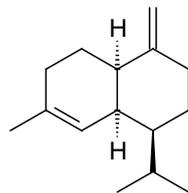
14 *allo*-Aromadendren



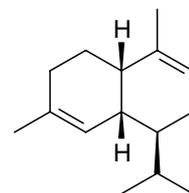
15 γ -Muurolen



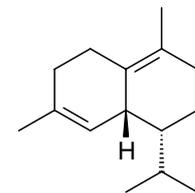
16 α -Amorphen



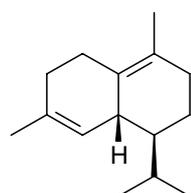
17 γ -Amorphen



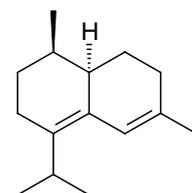
18 α -Muurolen



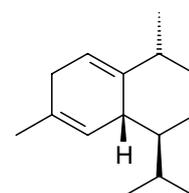
19 δ -Amorphen



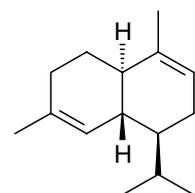
20 δ -Cadinen



21 Zonaren



22 Cadina-1,4-dien



23 α -Cadinen

3.2.2 Quartette strukturverwandter Isocyanide, Isocyanate, Isothiocyanate und Dichlorimine

Dieser Abschnitt ist der Strukturaufklärung der stickstoffhaltigen Sesquiterpene in *P. ventilabrum* gewidmet. Von diesen stellen die Isocyanide den Hauptteil. Einige der Isocyanate werden in vergleichbaren Konzentrationen gefunden, treten jedoch insgesamt mit den Isothiocyanaten als Nebenkomponenten auf, während die Dichlorimine nur in Spuren detektiert werden konnten. Von den Fraktionen **B** und **C**, die aus der säulenchromatographischen Trennung des Dichlormethanextrakts hervorgingen, wurde die Isocyanid-Fraktion (**C**) ein weiteres Mal mittels Säulenchromatographie über Kieselgel und einem Laufmittel-Gradienten aus Pentan und Dichlormethan fraktioniert. Auf diese Weise konnten zwei Isocyanide (Fraktion C-1 = **24** und C-2 = **28**) ausreichend rein gewonnen werden, um NMR-spektroskopisch charakterisiert zu werden. Die restlichen Isocyanide eluierten hierbei als Isomeren-Gemisch (Fraktion C-3, Abbildung 3-4), das schließlich durch präparative Gaschromatographie aufgetrennt wurde (Abbildung 3-7).

Aus der Fraktion der Isocyanate, Isothiocyanate und Dichlorimine (Fraktion **B** in Abbildung 3-4) konnten mittels präparativer Gaschromatographie vier Verbindungen gewonnen werden. Hier erschwerten die geringen Substanzmengen, sowie die unvollständige Trennung des komplexen Gemisches auf verschiedenen GC-Phasen die Isolierung weiterer Komponenten. Auch Trennversuche mittels Normalphasen-HPLC oder Umkehrphasen-HPLC waren nicht erfolgreich. Die Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe dieser Fraktion gelang jedoch auf indirektem Wege. Die identifizierten Isocyanide aus Fraktion **C** wurden durch Mikroreaktionen in Derivate umgewandelt (Abbildung 3-6). Isocyanide lieferten so, unter Erhalt des Kohlenstoffgerüsts, die jeweils strukturanalgen Isocyanate bzw. Isothiocyanate. Auch die Umsetzung zum entsprechenden Dichlorimin gelang in einigen Fällen. Die so erhaltenen Derivate wurden durch GC-MS untersucht und mit den Inhaltsstoffen von Fraktion **B** verglichen. Die Übereinstimmung von Massenspektrum sowie Retentionszeit von synthetischem und authentischem Material wurde als Strukturbeweis gewertet.

Hierzu wurden Mikroreaktionen mit Isocyaniden, die isoliert und deren Strukturen vollständig bestimmt werden konnten, durchgeführt, die die entsprechenden Derivate mit gleichem Sesquiterpen-Skelett ergaben. Die geringen verfügbaren Substanzmengen stellten hierbei besondere Anforderungen an die präparativen Methoden. Der Einsatz nicht-stöchiometrischer Äquivalente, der im Mikrogramm-Maßstab unvermeidbar ist, durfte für die Durchführbarkeit der Reaktionen kein Problem darstellen. Idealerweise sollte der Reaktionsansatz ohne Aufarbeitung in Gegenwart von unumgesetzten Reagenzien gaschromatographisch untersucht

werden können. Hierfür wurden literatur-bekannte Synthesemethoden abgewandelt und optimiert.

Eine schematische Darstellung dieser Reaktionen ist in Abbildung 3-6 wiedergegeben.

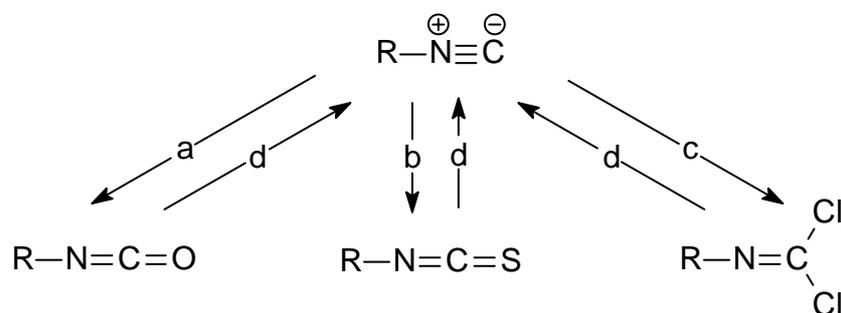


Abbildung 3-6 Umwandlung funktioneller Gruppen durch Mikroreaktionen: [a] *m*-CPBA, CH₂Cl₂, -20°C, 5 min, [b] S₈, kat. Se, THF/Et₃N, Rückfluss, 20 min, [c] Cl₂/CCl₄, -30°C, 5 min, [d] LiAlH₄, Et₂O, -78°C

Vom Isocyanid zum Isocyanat gelangt man durch Oxidation mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA). Evtl. vorhandene C-C-Doppelbindungen können epoxidiert werden. Die Bildung dieser Nebenprodukte lässt sich jedoch unterdrücken, wenn die Reaktion bei -20°C innerhalb weniger Minuten durchgeführt wird und der Reaktionsansatz anschließend durch eine Filtration über Kieselgel und Natriumhydrogencarbonat von überschüssiger *m*-CPBA, sowie entstandener *meta*-Chlorbenzoesäure befreit wird. Diese Aufarbeitung verhindert darüberhinaus die säurekatalysierte Hydrolyse des Isocyanids zum Formamid.

Isothiocyante lassen sich aus Isocyaniden durch einfaches Erhitzen mit elementarem Schwefel gewinnen. Diese Umsetzung ist jedoch häufig sehr verlustreich und birgt die Gefahr thermischer Isomerisierung oder Aromatisierung cyclischer Systeme. Alternativ bietet sich hier die Umsetzung des Isocyanids mit elementarem Selen in THF/Triethylamin zum Isoselenocyanat an. Dieses reagiert mit Schwefel bereits in siedendem THF schnell zum Isothiocyanat^{18,19}. Diese Reaktion konnte auch mit nicht-stöchiometrischen Mengen in befriedigenden Ausbeuten durchgeführt werden.

Die Umwandlung der Isocyanide in die Dichlorimine erfolgte durch Addition von elementarem Chlor an die Isocyanid-Gruppe^{20,21}. Hierzu wurde eine Lösung von Chlor in Tetrachlorkohlenstoff hergestellt und das in Dichlormethan gelöste Isocyanid bei -30°C mit einigen Tropfen dieser Lösung versetzt. Überschüssiges Chlor wurde unmittelbar nach der Zugabe durch einen Stickstoff-Strom ausgetrieben. Auf diese Weise konnte die unerwünschte Addition an evtl. vorhandene C-C-Doppelbindungen vermieden werden. Der Grad der Umsetzung wurde gaschromatographisch verfolgt und die Derivatisierung ggf. durch weitere Zugabe von Chlor in CCl₄ vervollständigt.

In den folgenden Abschnitten wird die Strukturaufklärung von 28 Sesquiterpen-Isocyaniden, Isocyanaten, Isothiocyanaten und Dichloriminen aus *P. ventilabrum* besprochen. Die Bezeichnung der Grundgerüste, sowie die Numerierung der Positionen folgt hierbei dem „Atlas of Sesquiterpene Hydrocarbons“ von Joulain und König¹⁷. Es sei darauf hingewiesen, dass die hier vertretene Systematik in einigen Fällen von den Numerierungen in den Originalpublikationen abweicht. Zum Verständnis der Zuordnung der NMR-Signale von Methylengruppen wurden die Nummern der Wasserstoffatome mit den Indices „ax“ bzw. „eq“ versehen (Abbildung 3-8, Tabelle 3-2), obwohl weder in Fünfringen, noch in den meisten Sechsringen oder Siebenringen klassische „axiale“ und „äquatoriale“ Positionen vorliegen. Eine räumliche Darstellung des Moleküls in den Abbildungen über den NMR-Spektren dient daher der Klärung dieser Problematik. Ergänzend ist für alle Verbindungen der IUPAC-Name angegeben, der sich aus der Systematik für substituierte polycyclische Kohlenwasserstoffe ergibt.

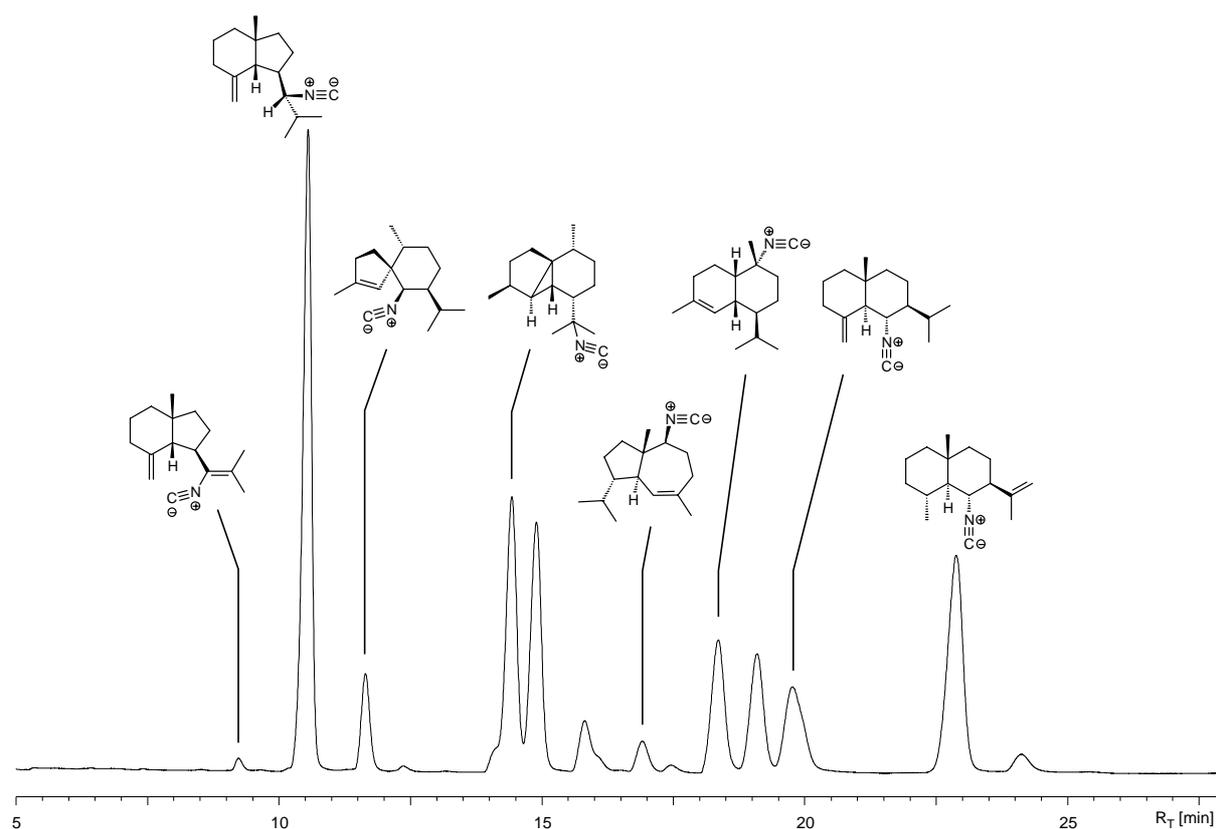


Abbildung 3-7 Trennung der Isocyanid Fraktion (C) mittels präparativer Gaschromatographie an einer polaren GC-Phase (FFAP, 50m, 0.53 mm ID, 1 µm FD; 175°C isotherm, Säulenvordruck (H₂) 28 hPa)

3.2.2.1 Axane

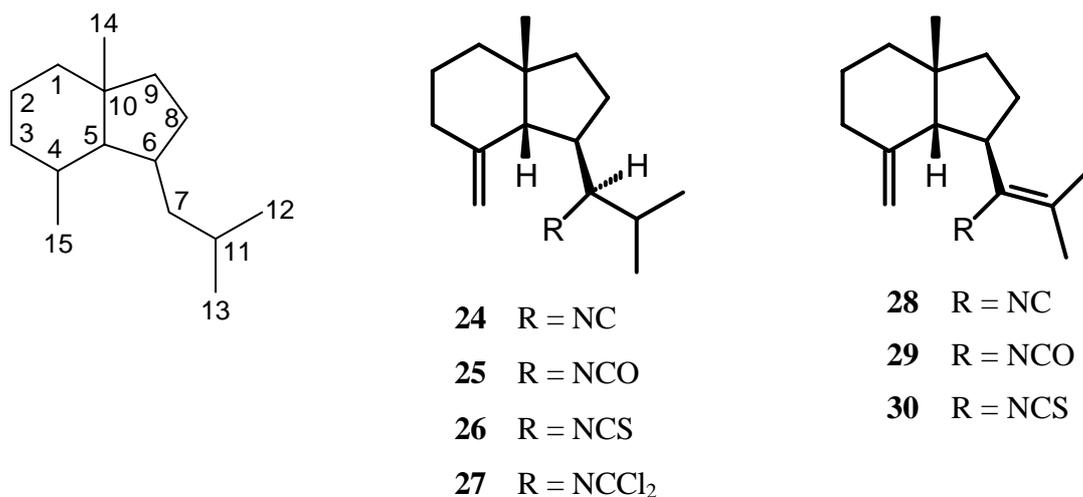


Abbildung 3-8 Axan-Skelett und Strukturen von **24-30**

Die Hauptkomponente (**24**) der Isocyanidfraktion aus *P. ventilabrum* konnte durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Pentan-Dichlormethan-Gradienten von den restlichen Isocyaniden abgetrennt werden. Von **24** konnten ein ¹H-NMR- (Abbildung 3-9) und ein ¹³C-NMR-Spektrum (Abbildung 3-10), sowie die zweidimensionalen Spektren HMQC, HMBC, COSY90, NOESY aufgenommen werden. Die Analyse der NMR-Daten zeigte, dass **24** identisch mit dem ersten Sesquiterpen-Isocyanid ist, das 1973 in *Axinella cannabina* gefunden und Axisonitril-1 genannt wurde²². Dort ist es neben zahlreichen weiteren Isocyaniden mit dem strukturanalogen Axisothiocyanat-1 (**26**) vergesellschaftet²³, das ebenfalls in *P. ventilabrum* vorkommt.

Das ¹H-NMR von Axisonitril-1 (**24**) zeigt zwei olefinische Protonen ($\delta_{\text{H}} = 4.79$ und 4.81 ppm), die anhand von HMQC-Untersuchungen dem Kohlenstoffatom ($\delta_{\text{C}} = 111.92$ ppm) zugeordnet werden konnten und damit eine Methylengruppe einer terminalen Doppelbindung darstellen. Ein weiteres Protonensignal, das Strukturinformationen liefert, ist das unaufgelöste Multiplett bei $\delta_{\text{H}} = 2.77$ ppm. Dieses Signal repräsentiert die Methingruppe mit der NC-Gruppe und zeigt, dass **24** ein sekundäres Isocyanid ist. Fast alle Signale im ¹H-NMR-Spektrum von **24** sind bei 500 MHz aufgelöst. Die chemischen Verschiebungen aller 16 Kohlenstoffatome konnten im ¹³C-NMR-Spektrum abgelesen werden. Die seltene ¹³C-¹⁴N-Kopplung für C-7 ($\delta_{\text{C}} = 67.55$ ppm, Triplet, 5.5 Hz), die nur für Isocyanide und einige Diazoverbindungen beobachtet werden kann, bestätigt nochmals die Natur der funktionellen Gruppe in **24**. Die HMBC, COSY90 und NOESY-Kreuzsignale, die die Struktur von **24** beweisen, sind in Tabelle 3-2 aufgelistet. Die hier angewandte Numerierung entspricht dem am C-5 epimeren Oppositan¹⁷ und weicht von der

bei Adinolfi *et al.* beschrieben ab²³. Der IUPAC-Name von **24** ist 1-(1-Isocyano-2-methylpropyl)-3a-methyl-7-methylenoctahydroinden

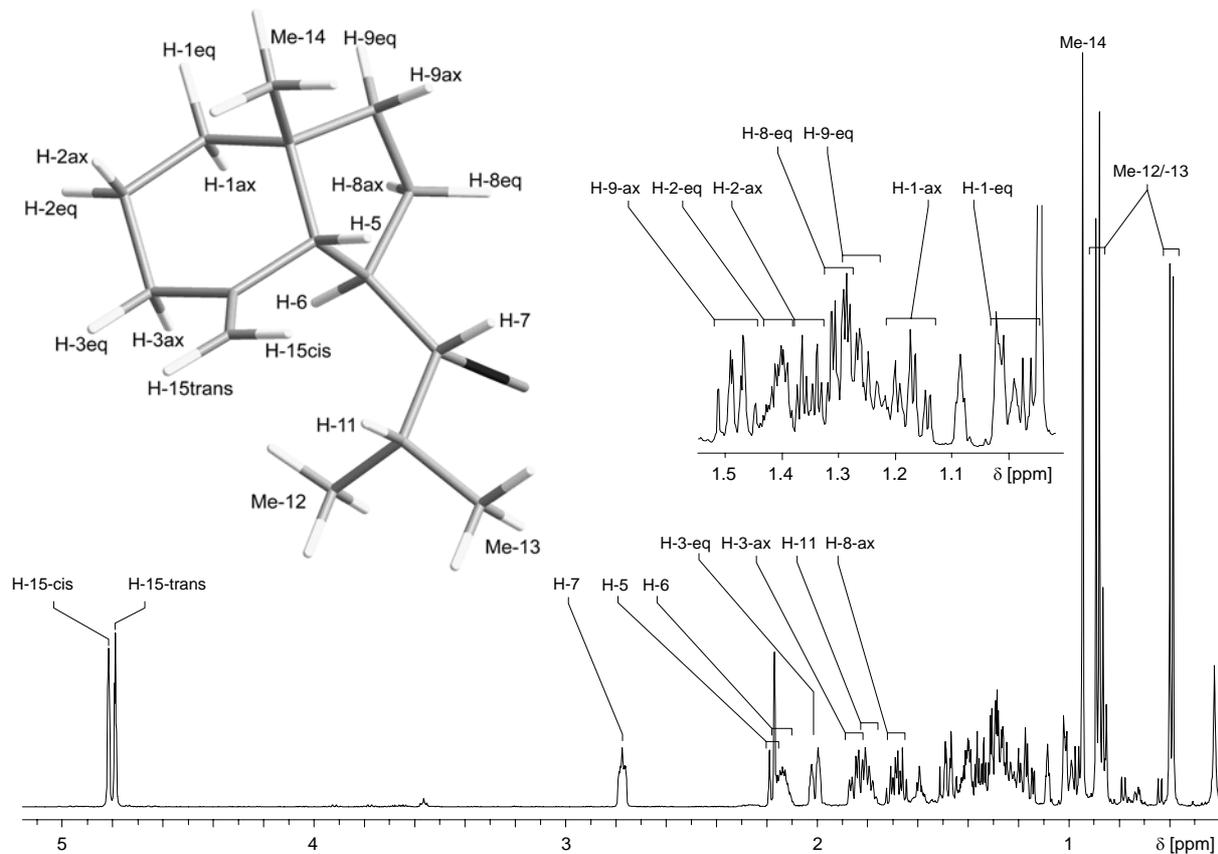


Abbildung 3-9 ¹H-NMR-Spektrum von Axisonitril-1 (**24**), (500 MHz, C₆D₆).

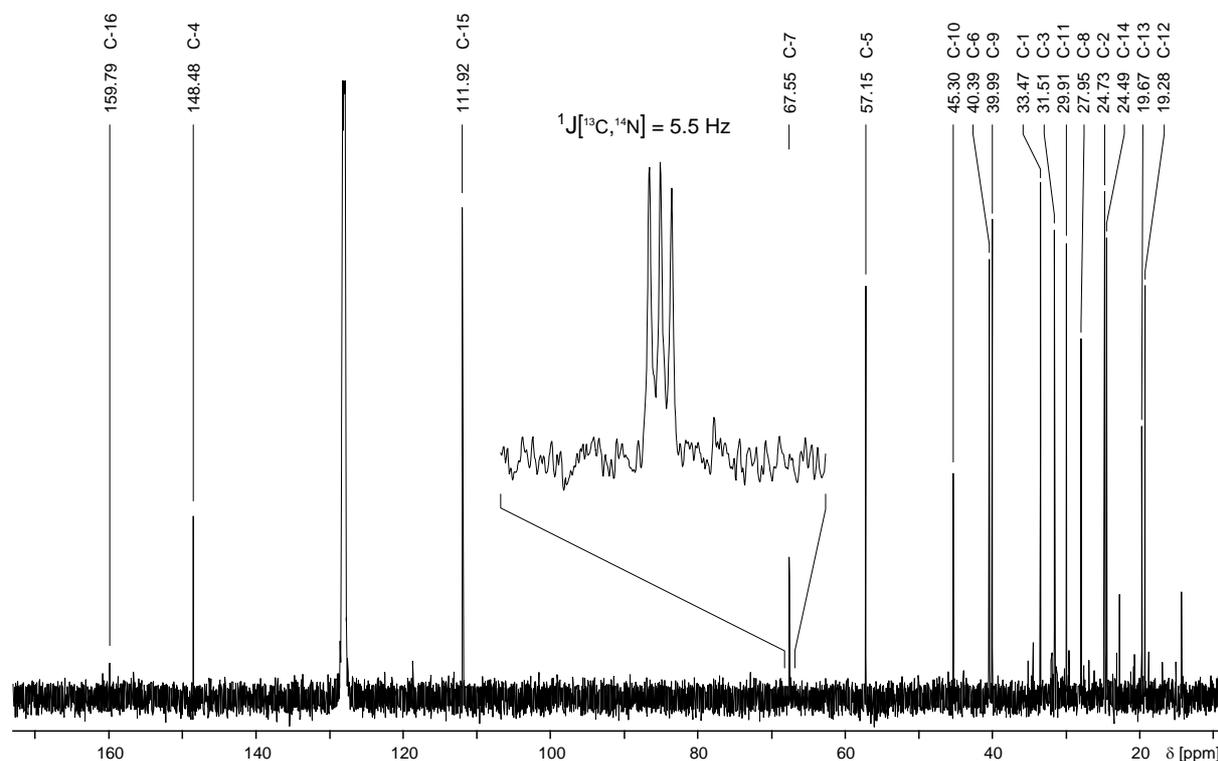


Abbildung 3-10 ¹³C-NMR-Spektrum von (**24**), (100.6 MHz, Benzol-d₆).

Tabelle 3-2 NMR-Daten von Axisonitril-1 (**24**). (Benzol-d₆, ¹H: 500MHz, ¹³C: 100.6 MHz, δ in ppm relativ zu δ_H(Benzol) = 7.16 ppm, δ_C(Benzol) = 128.06 ppm, ax = axial, eq = äquatorial)

Pos	δ 13C	δ 1H	COSY90	HMBC	NOESY
1	33.47	1.17 (ax)	H-1-eq, H-2-ax, H-2-eq	C-2, C-3, C-9, C-10, Me-14	H-1-eq, H-3-ax, H-6, H-8-ax
		1.01 (eq)	H-1-ax, H-2-ax, H-2-eq	-	-
2	24.73	1.35 (ax)	H-1-ax, H-1-eq, H-3-ax, H-3-eq	C-1, C-3, C-4, C-10	H-1-eq, H-3-eq, Me-14
		1.40 (eq)	H-1-ax, H-1-eq, H-3-ax, H-3-eq	-	H-3-ax, H-3-eq
3	31.51	1.84 (ax)	H-2-ax, H-2-eq, H-3-eq, H-4-trans	C-2, C-4, C-15	H-2-eq, H-2-ax, H-3-eq, H-6
		2.01 (eq)	H-3-ax, H-2-ax	C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-15	H-2-eq, H-2-ax, H-3-ax, H-15-trans
4	148.48	-	-	-	-
5	57.15	2.18	H-6	C-1, C-3, C-4, C-6, C-7, C-10, Me-14, C-15	H-7, H-9-ax, Me-12, Me-13, Me-14, H-15-cis
6	40.39	2.14	H-5, H-7, H-8-ax, H-8-eq	C-4, C-5, C-8	H-1-ax, H-3-ax, H-7, H-9-eq, Me-13,
7	67.55	2.77	H-6, H-11	C-5, C-6, C-8, C-11, C-12, C-13	H-6, H-9-eq, H-11, Me-12, Me-13
8	27.95	1.68 (ax)	H-6, H-9-ax, H-9-eq	C-5, C-6, C-7, C-9	H-1-ax, H-6, H- 8-eq
		1.29 (eq)	H-6, H-8-ax, H-9-ax	C-5, C-6, C-7, C-9, C-10	b
9	39.99	1.48 (ax)	H-8-ax, H-8-eq, H-9-eq	C-1, C-8, C-10, Me-14	H-5, H-8-eq, H-9-eq, Me-14
		1.25 (eq)	a	A	A
10	45.30	-	-	-	-
11	29.91	1.79	H-7, Me-12, Me-13	C-7, C-12, C-13	H-7, Me-12, Me-13, H-15-cis
12	19.28	0.89	H-11	C-7, C-11, C-13	H-6, H-7, H-11, Me-13
13	19.67	0.59	H-11	C-7, C-11, C-12	H-6, H-7, H-11, Me-12
14	24.49	0.95	-	C-1, C-5, C-9, C-10	H-2-ax, H-5, H-9-ax
15	111.92	4.81 (cis)	H-3-ax	C-3, C-4, C-5	H-5, H-11, Me-14
		4.79 (trans)	H-3-ax		H-3-eq
16	159.79				

a überlagert mit H-9-eq

b überlagert mit H-10-eq

Eine genaue Drehwertbestimmung von **24** war aufgrund der geringen isolierten Menge nicht möglich, jedoch stimmte das Vorzeichen des Drehwerts ($[\alpha]_D = +22.6^\circ$, $c = 1$, CHCl_3) mit dem in der Literatur beschriebenen überein²². Damit ist die in Abbildung 3-8 dargestellte absolute Konfiguration von **24** wahrscheinlich und kann auch für die Derivate **25-27** angenommen werden.

Das zu **24** strukturanaloge Isocyanat **25** ist ein neuer Naturstoff. Es konnte durch präparative Gaschromatographie aus Fraktion B (Abbildung 3-4) isoliert werden. Darüberhinaus ließ sich **25** auch aus **24** durch Reaktion mit *m*-CPBA gewinnen. Die Struktur von **25**, das hier in Analogie zu **24** als „Axisocyanat-1“ bezeichnet wird, konnte wiederum durch die ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren bewiesen werden. (Tabelle 3-3).

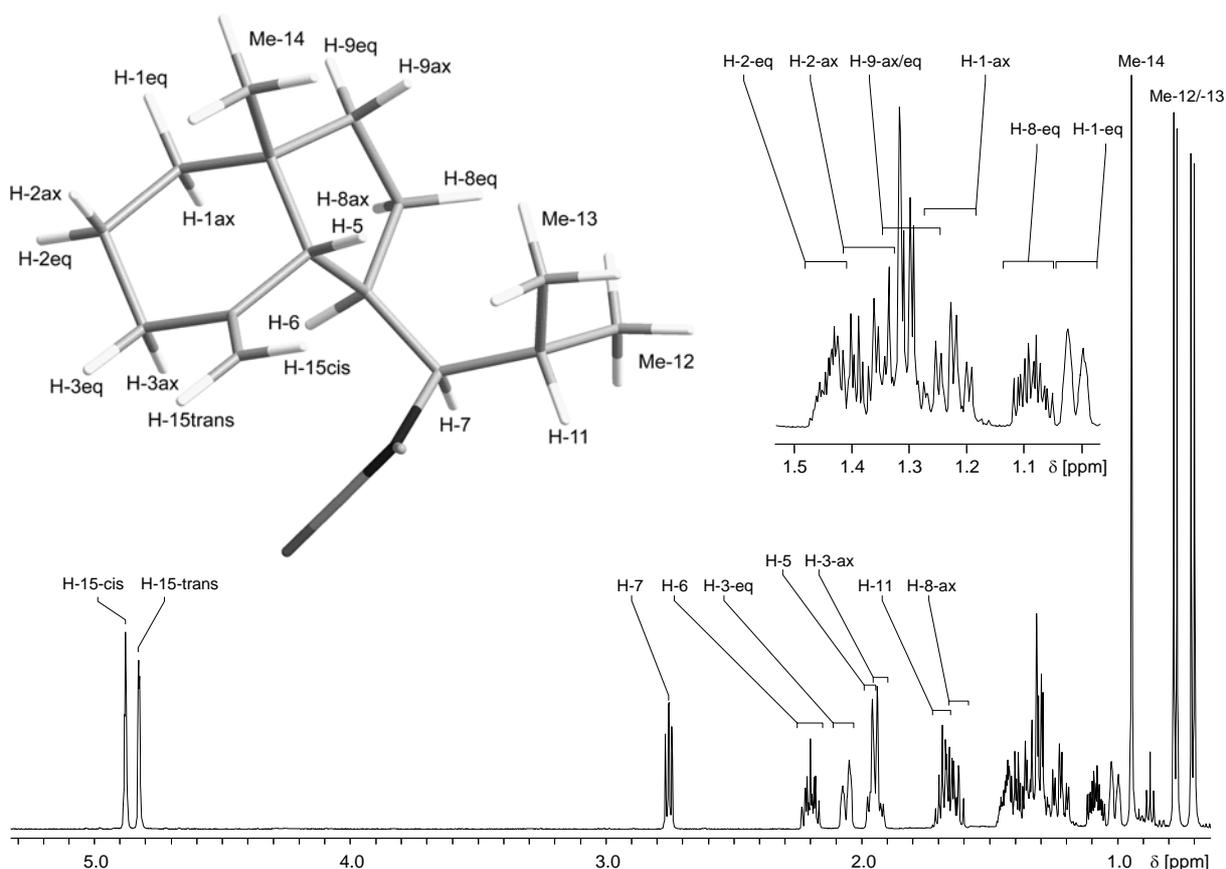


Abbildung 3-11 ^1H -NMR-Spektrum von **25** (500 MHz, C_6D_6)

Das ^1H -NMR-Spektrum von Axisocyanat-1 (**25**) läßt sich gut mit dem Spektrum von **24** vergleichen. Die exakte Lage der Protonensignale ist leicht verändert, die Spinsysteme sind jedoch identisch. Im ^{13}C -NMR tritt für C-16 anstelle des Signals bei $\delta_{\text{C}} = 159.79$ ppm der Isocyanid-Gruppe in **24** ein Signal mit $\delta_{\text{C}} = 122.73$ ppm (nur indirekt detektierbar, siehe HMBC, Tabelle 3-3), welches typisch für *sp*-hybridisierte Kohlenstoffatome in Heterokumulenen ist.

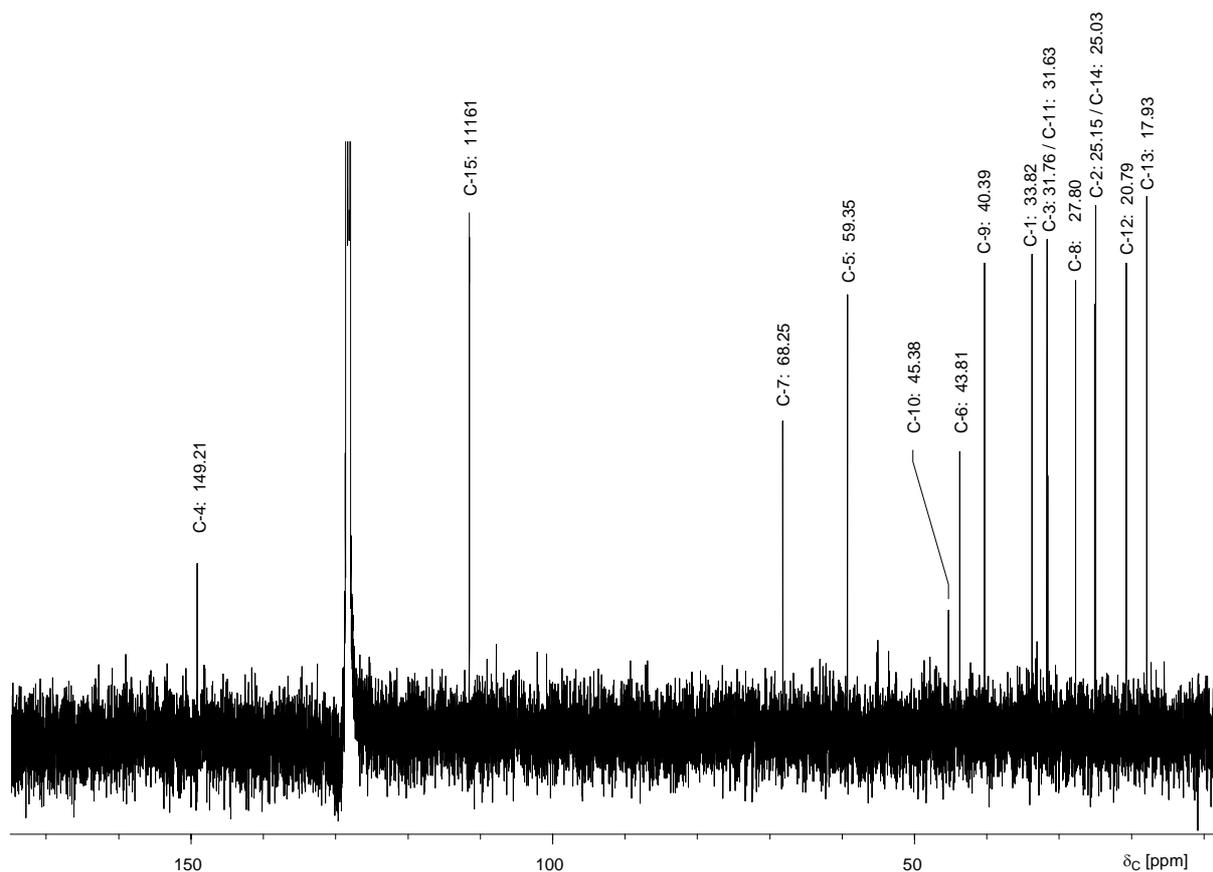


Abbildung 3-12 ^{13}C -NMR-Spektrum des Isocyanats **25** (100.6 MHz, C_6D_6).

Die HMBC-Kopplungen bestätigen die Verknüpfungsreihenfolge der Methin-, Methylen- und Methylgruppen. In Tabelle 3-3 sind alle COSY90, HMBC und NOESY-Kopplungen aufgeführt, die die Struktur des neuen Isocyanats **25** belegen.

Der IUPAC-Name von Axisocyanat-1 (**25**) lautet 1-(1-Isocyanato-2-methylpropyl)-3a-methyl-7-methylen-octahydroinden. Die absolute Konfiguration wurde nicht bestimmt, jedoch ist die in Abbildung 3-8 dargestellte Konfiguration aufgrund der Analogie zu **24** wahrscheinlich.

Das bereits erwähnte Axisothiocyanat-1 **26** (1-(1-Isothiocyanato-2-methylpropyl)-3a-methyl-7-methylen-octahydroinden) ließ sich nicht in ausreichender Menge isolieren, um NMR-spektroskopisch charakterisiert zu werden. Seine Präsenz in *P. ventilabrum* wurde jedoch durch Derivatisierung von **24** (Schema Abbildung 3-6) bewiesen.

Gleiches gilt für das nur in Spuren vorkommende Dichlorimin **27** (1-(1-*N,N*-Dichlorimino-2-methylpropyl)-3a-methyl-7-methylen-octahydroinden). Wie die Übereinstimmung von Massenspektrum und Retentionszeit zeigte, ist dieses Dichlorimin identisch mit dem Reaktionsprodukt aus Axisonitril-1 (**24**) und elementarem Chlor in Tetrachlorkohlenstoff. **27** ist wie **25** eine neuer Naturstoff, der erstmals in einem marinen Schwamm gefunden wurde.

Tabelle 3-3 NMR-Daten von Axisocyanat-1 (**25**) (C₆D₆, ¹H: 500 MHz, bzw. ¹³C: 100.6 MHz)

Pos.	δ ¹³ C	δ ¹ H	COSY90	HMBC	NOESY
1	33.82	1.01 (eq)	H-1-ax, H-2-eq	C-2/C-14	Me-14, H-1-ax, H-2-ax, H-2-eq
		1.22 (ax)	H-1-eq, H-2-ax	C-2/C-14, C-3, C-9, C-10,	H-2-eq, H-3-ax, H-6, H-8-ax
2	25.15	1.38 (ax)	H-1-eq, H-1-ax, H-3-ax, H-3-eq	-	H-3-eq, H-1-eq, Me-14
		1.43 (eq)	H-1-eq, H-1-ax, H-3-ax, H-3-eq	C-3, C-4	H-1-eq, H-1-ax, H-3-ax, H-3-eq
3	31.76	1.93 (ax)	H-1-eq, H-2-ax,	-	H-1-ax, H-3-eq, H-6
		2.06 (eq)	H-1-eq, H-2-eq, H-3-ax	-	H-2-ax, H-2-eq, H-15-trans
4	149.21	-	-	-	-
5	59.35	1.94	H-6, H-15-cis/trans	C-1, C-2, C-3, C-4, C-6, C-7, C-10, C-14, C-15	H-7, H-11, Me-14, H-15-cis
6	43.81	2.20	H-5, H-7, H-8-eq, H-8-ax,	C-3, C-4, C-5, C-7, C-8	H-1-ax, H-3-ax, H-7, H-8-ax, Me-12, Me-13
7	68.25	2.75	H-6, H-11	C-3, C-5, C-6, C-8, C-12, C-13, C-16	H-5, H-6, H-8-eq, H-11, Me-12, Me-13, H-15-cis
8	27.80	1.08 (eq)	H-6, H-8-ax, H-9	C-6, C-7, C-9, C-10	H-8-ax, H-9-„ax/eq“, H-11
		1.64 (ax)	H-6, H-8-eq, H-9-ax	C-5, C-6, C-7, C-9	H-1-ax, H-6, H-8-eq
9	40.39	1.18-1.35	H-8-ax	C-1, C-5, C-6, C-8, C-10, C-14	H-8-eq, Me-14
10	45.38	-	-	-	-
11	31.63	1.68	H-7, Me-12, Me-13	C-7, C-12, C-13	H-7, H-8-eq, Me-12, Me-13, H-15-cis
12	20.79	0.77	H-11	C-7, C-11, C-13	H-6, H-7, H-8-ax, H-11
13	17.93	0.70	H-11	C-7, C-11, C-12	H-5, H-6, H-7, H-8-ax, H-11
14	25.03	0.94	-	C-1, C-5, C-9, C-10	H-2-ax, H-5, H-9-ax, H-9-eq
15	111.61	4.82(cis)	H-3eq, H-15-trans	C-3, C-4, C-5	H-5, H-11, Me-14, H-15-trans
		4.87(trans)	H-3eq, H-15-cis	C-3, C-4, C-5	H-3-ax, H-3-eq, Me-14, H-15-cis
16	122.73	-	-	-	-

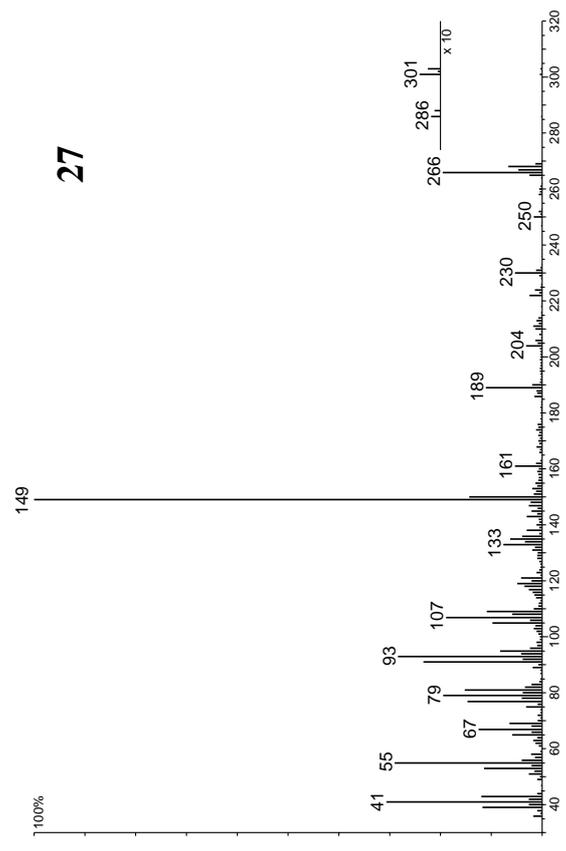
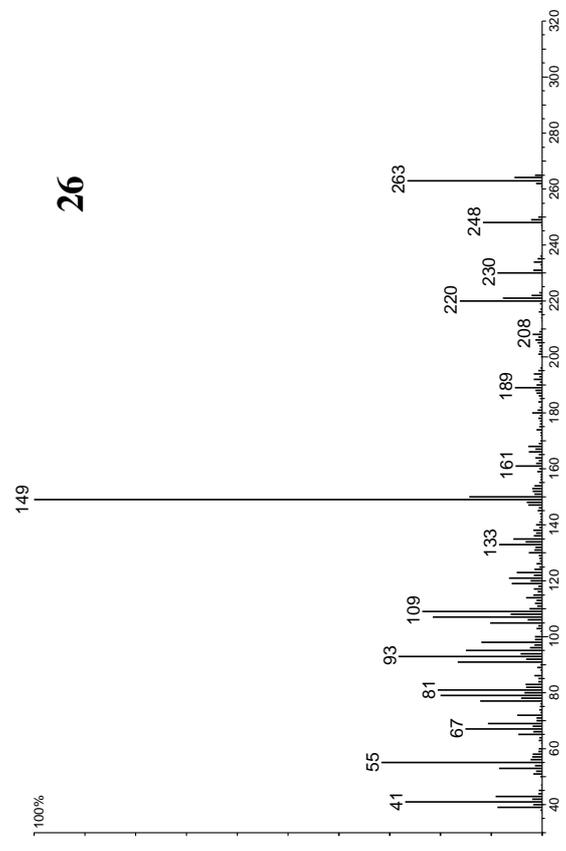
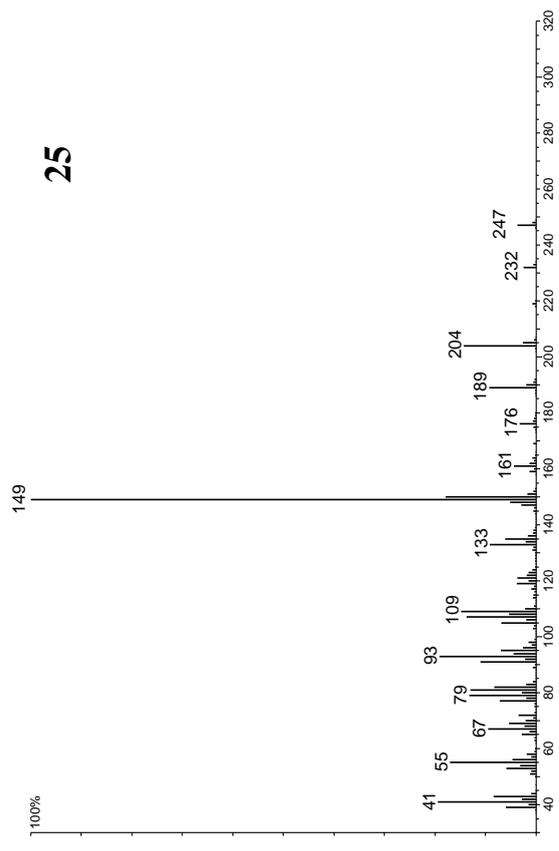
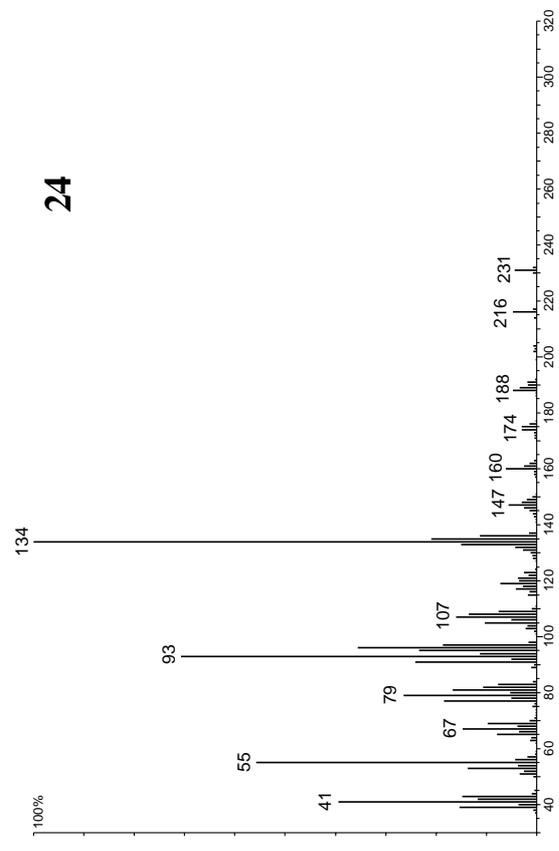


Abbildung 3-13 Massenspektren (EI, 70 eV) von Axisonitrit-1 (**24**), Axisocyanat-1 (**25**), Axisothiocyanat-1 (**26**) und des Dichlorimins **27**.

Aus *P. ventilabrum* konnte ein weiteres Isocyanid mit Axan-Gerüst isoliert werden, das im Gegensatz zu allen anderen eine zusätzliche Unsatigung besitzt. **28** (C₁₆H₂₃N) wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel von den restlichen Isocyaniden abgetrennt, wobei es vor diesen eluierte. Anhand der ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren wurde es als das bereits bekannte Axisonitril-4 identifiziert^{23,24}. **28** ist das einzige α,β -ungesättigte Isocyanid in *P. ventilabrum*.

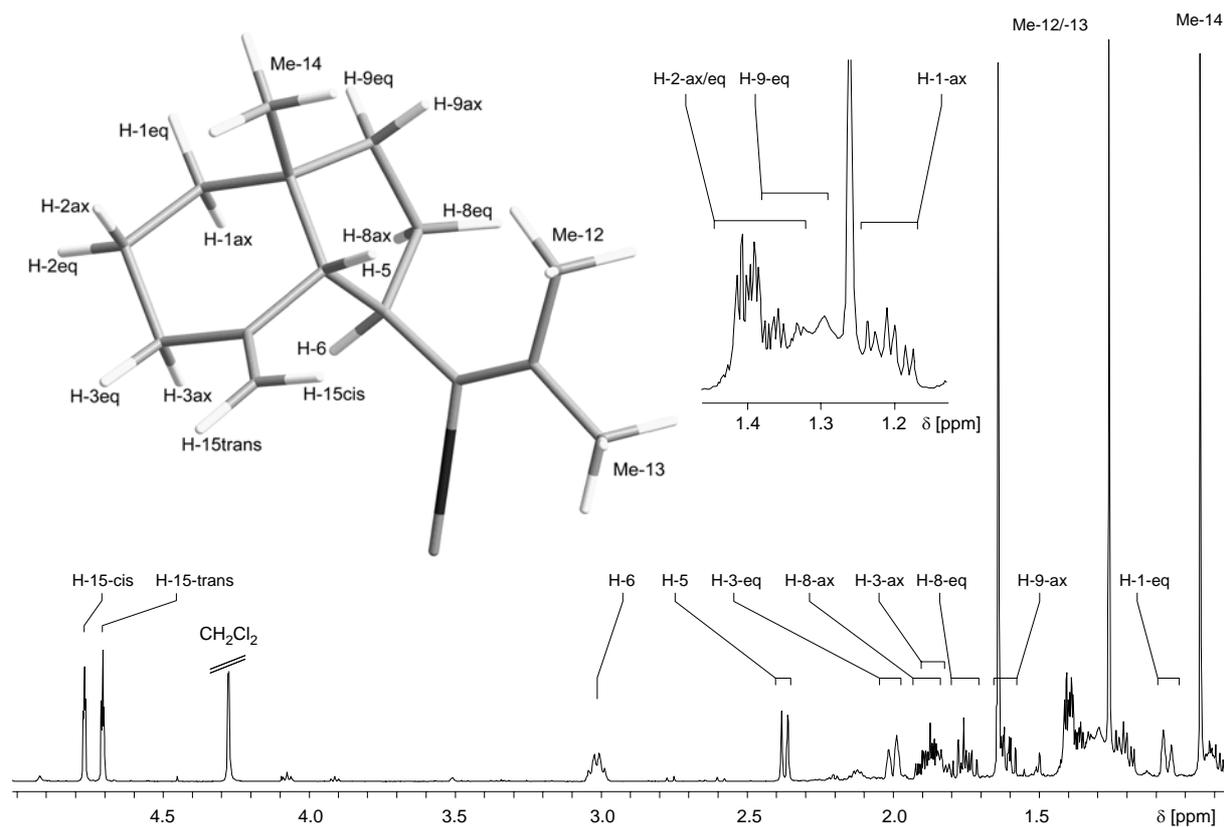


Abbildung 3-14 ¹H-NMR-Spektrum von **28** (500 MHz, C₆D₆)

Das ¹H-NMR-Spektrum unterscheidet sich von den zuvor besprochenen Spektren durch zwei weitere Singulets anstelle der Dubletts für die Methylgruppen Me-12 und Me-13 ($\delta_{\text{H}} = 1.27$ und 1.64 ppm). Das Signal für H-6 liegt aufgrund der allylischen Position bei $\delta_{\text{H}} = 3.02$ ppm. Alle Signale konnten anhand der zweidimensionalen Spektren COSY90, HMQC und HMBC identifiziert werden. Ihre Zuordnung, sowie die Korrelationen, die die Struktur beweisen sind in Tabelle 3-4 wiedergegeben.

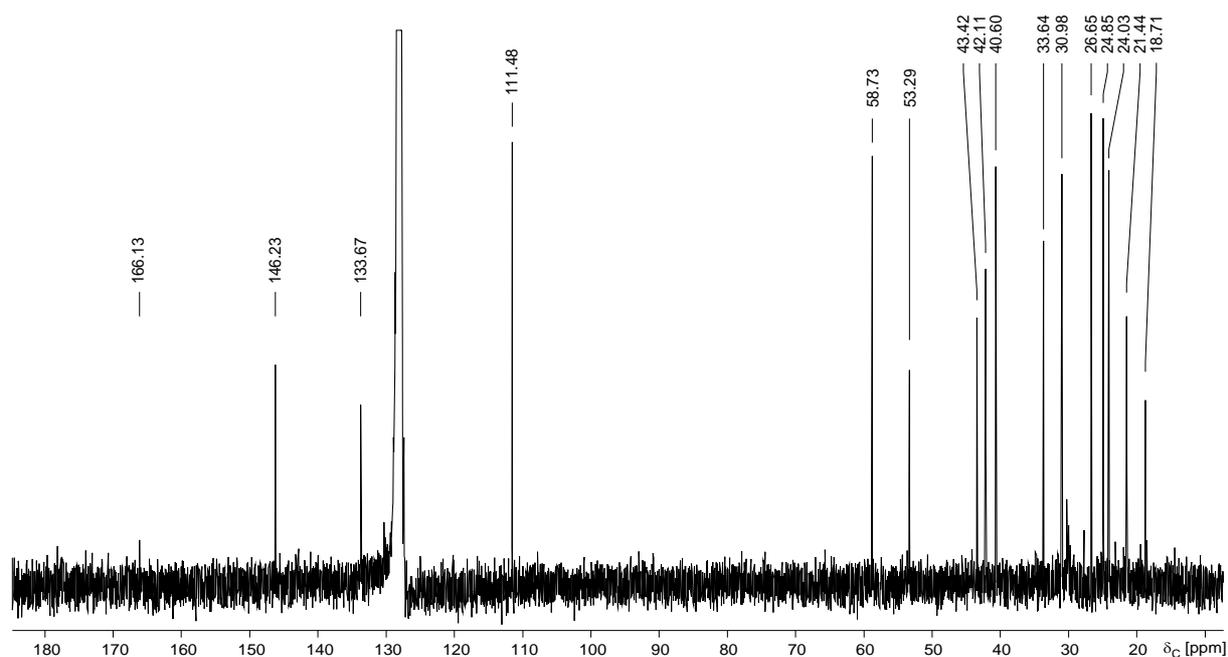


Abbildung 3-15 ^{13}C -NMR-Spektrum von Axisonitril-4 (**28**, Benzol- d_6 , 100.6 MHz).

Tabelle 3-4 NMR-Daten von Axisonitril-4 (**28**). (Benzol- d_6 , ^1H : 500 MHz, ^{13}C : 100.6 MHz, δ in ppm relativ zu $\delta_{\text{H}}(\text{Benzol}) = 7.16$ ppm, $\delta_{\text{C}}(\text{Benzol}) = 128.06$ ppm, ax = axial, eq = äquatorial)

Pos.	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Int/Mult	COSY90	HMBC
1	33.64	1.21 (ax)	1H, m	H-1-eq, H-2-ax, H-2-eq	C-2, C-3, C-9, C-10, C-14
		1.06 (eq)	1H, m	H-1-ax, H-2-ax, H-2-eq	C-3, C-5, C-10
2	24.03	1.40	2H, m	überlagert mit H-9eq	C-1, C-3, C-4, C-10
3	30.98	2.01 (eq)	1H, m	H-2-ax, H-2-eq, H-3-ax	C-1, C-2, C-4, C-5, C-15
		1.85 (ax)	1H, m	H-2-ax, H-2-eq, H-3-eq	C-2, C-4, C-15
4	146.23	-	-	-	-
5	58.73	2.37	1H, d, J = 10.7 Hz	H-6	C-1, C-3, C-4, C-6, C-7, C-10, C-14, C-15
6	42.11	3.02	1H, m	H-5, H-7, H-8-ax, H-8-eq	C-11, C-4, C-8, C-5
7	124.94	-	-	-	-
8	26.65	1.89 (ax)	1H, m	H-6, H-9-ax, H-9-eq	C-5, C-6, C-7, C-9, C-10
		1.77 (eq)	1H, m	H-6, H-8-ax, H-9-ax	C-5, C-6, C-7, C-9
9	40.60	1.62 (ax)	1H, m	H-8-ax, H-8-eq, H-9-eq	C-1, C-8, C-10, C-14
		1.39 (eq)	1H, m	überlagert mit H-2	C-5, C-8, C-10
10	43.42	-	-	-	-
11	133.67	-	-	-	-
12	18.71 ^a	1.27	3H, s	-	C-7, C-11, C-13
13	21.44 ^a	1.64	3H, s	-	C-7, C-11, C-12
14	24.85	0.95	3H, s	-	C-1, C-5, C-9, C-10
15	111.48	4.71	1H, m	H-3eq	C-3, C-4, C-5, C-6
		4.74	1H, m	H-3ax	C-3, C-4, C-5, C-6
16	166.13	-	-	-	-

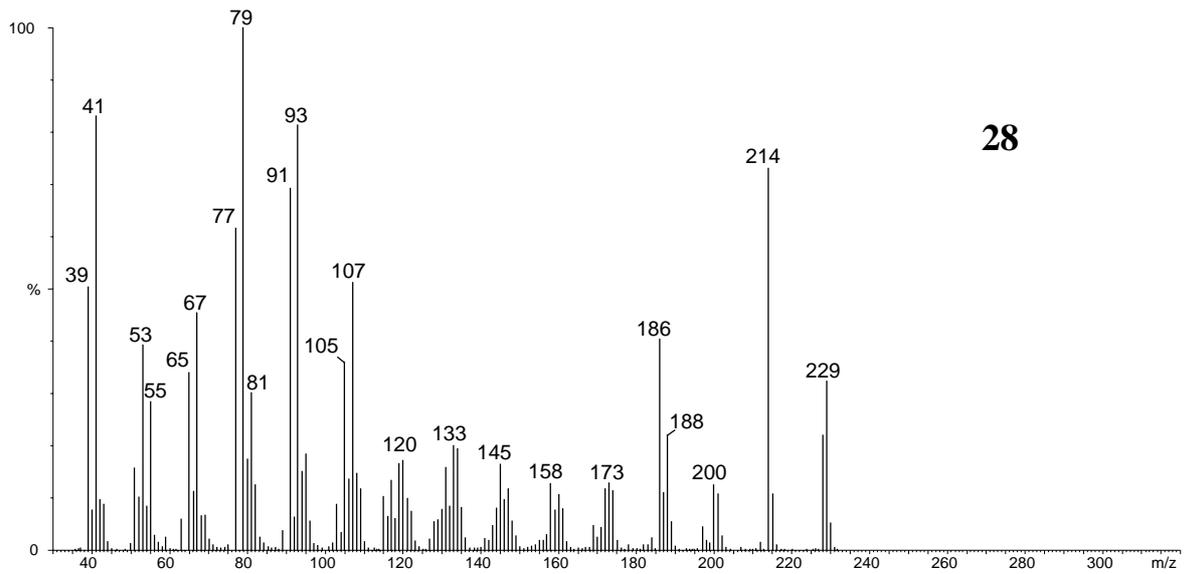
a) Zuordnung nicht eindeutig

28 konnte in das Isocyanat **29** und Isothiocyanat **30** umgewandelt werden, von diesen ist **30** als „Axisothiocyanat-4“ bereits bekannt, das Isocyanat **29** ist dagegen ein neuer Naturstoff. **29** und **30** konnten aufgrund ihrer geringen Konzentration in *P. ventilabrum* nur massenspektrometrisch nachgewiesen und nicht vollständig charakterisiert werden (Abbildung 3-16).

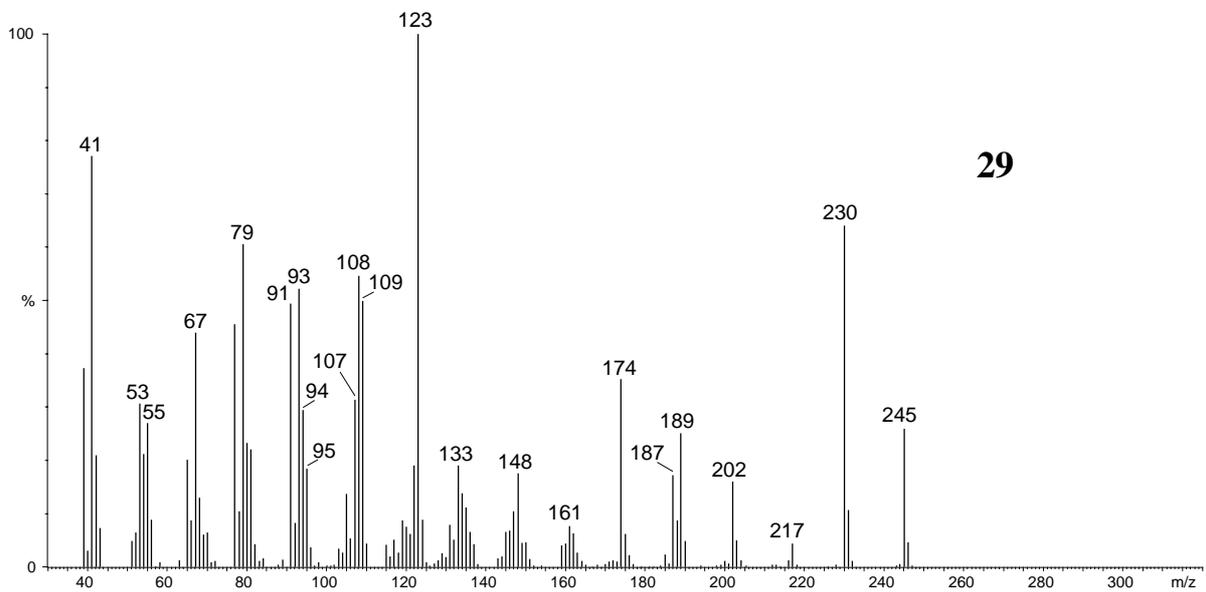
Die Darstellung eines entsprechenden Dichlorimins gelang nicht. Die Umsetzung des Isocyanids **28** mit Chlor bei -70°C ergab ein uneinheitliches Produktgemisch, das gaschromatographisch untersucht wurde. Ein für das Zielmolekül zu erwartendes Fragmention $[M-Cl]^+$ ($C_{16}H_{23}NCl$) mit m/z 264/266 konnte bei den durchgeführten GC-MS-Untersuchungen nicht detektiert werden. Möglicherweise stört hier die zusätzliche Doppelbindung, die zur Isocyanid-Gruppe konjugiert ist.

Die IUPAC-Namen der Sesquiterpene dieser Serie lauten:

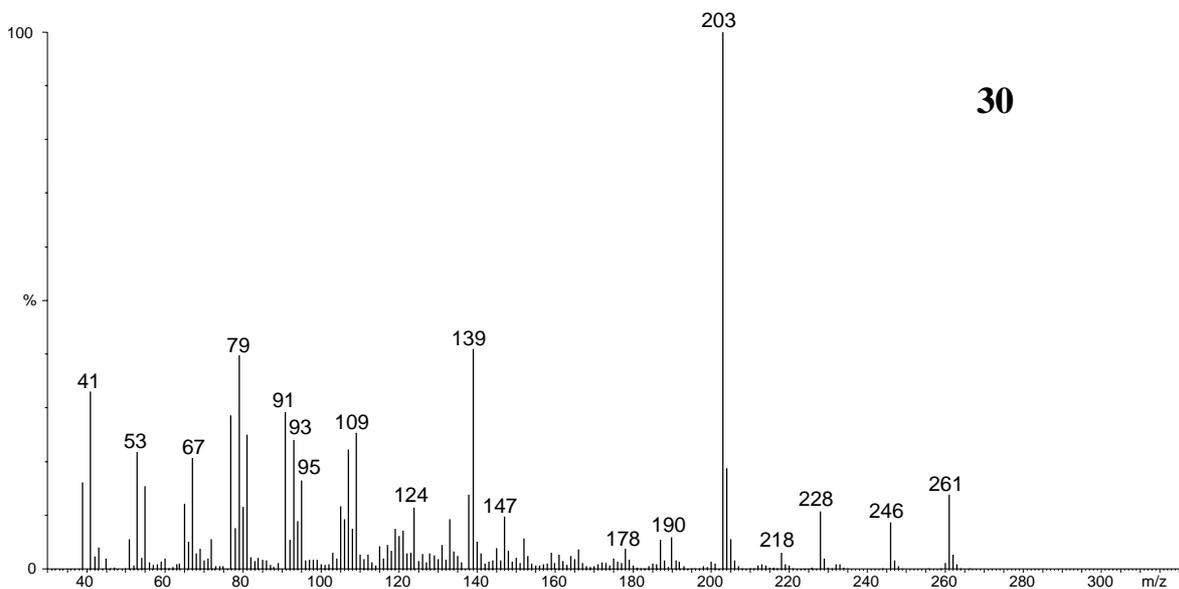
(1R,3aR,7aR)-1-(1-Isocyano-2-methylprop-1-enyl)-3a-methyl-7-methylenoctahydro-1*H*-inden (**28**), (1R,3aR,7aR)-1-(1-Isocyanato-2-methylprop-1-enyl)-3a-methyl-7-methylenoctahydro-1*H*-inden (**29**), sowie (1R,3aR,7aR)-1-(1-Isothiocyanato-2-methylprop-1-enyl)-3a-methyl-7-methylenoctahydro-1*H*-inden (**30**).



28



29



30

Abbildung 3-16 Massenspektren (EI, 70 eV) der Axanderivate **28-30**.

3.2.2.2 Spiroaxane

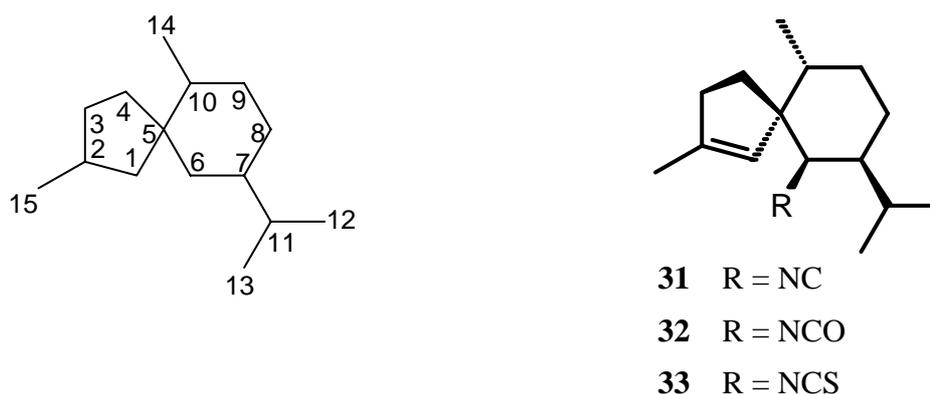


Abbildung 3-17 Spiroaxan-Skelett mit Numerierung nach Di Blasio *et al.*²⁵ und Strukturen von **31-33**

Neben den zuvor besprochenen Indanen Axisonitril-1 und -4, sowie ihrer Derivate, wurden in *P. ventilabrum* eine Serie spirocyclischer Sesquiterpene (**31-33**) gefunden.

Das Isocyanid (**31**) wurde durch präparative Gaschromatographie aus Fraktion B (Schema Abbildung 3-4) gewonnen. Die isolierte Substanzmenge reichte jedoch nicht für eine vollständige NMR-spektroskopische Charakterisierung aus. **31** ließ sich durch Vergleich des ¹H-NMR-Spektrums^{25,26} und des Massenspektrums²⁶ mit Literatur-Daten als „Axisonitril-3“ identifizieren. Dieses wurde zusammen mit dem Isothiocyanat **33** („Axisothiocyanat-3“) erstmals im Schwamm *Axinella cannabina* gefunden und wurde mittlerweile in weiteren axinelliden Schwämmen gefunden²⁷⁻²⁹. Ein Diastereomer von **31** mit invertierter Konfiguration an C-10 (10-*epi*-Axisonitril-3) ist ebenfalls bekannt³⁰, läßt sich jedoch anhand des ¹H-NMR-Spektrums eindeutig von **31** unterscheiden und war nicht in *P. ventilabrum* präsent.

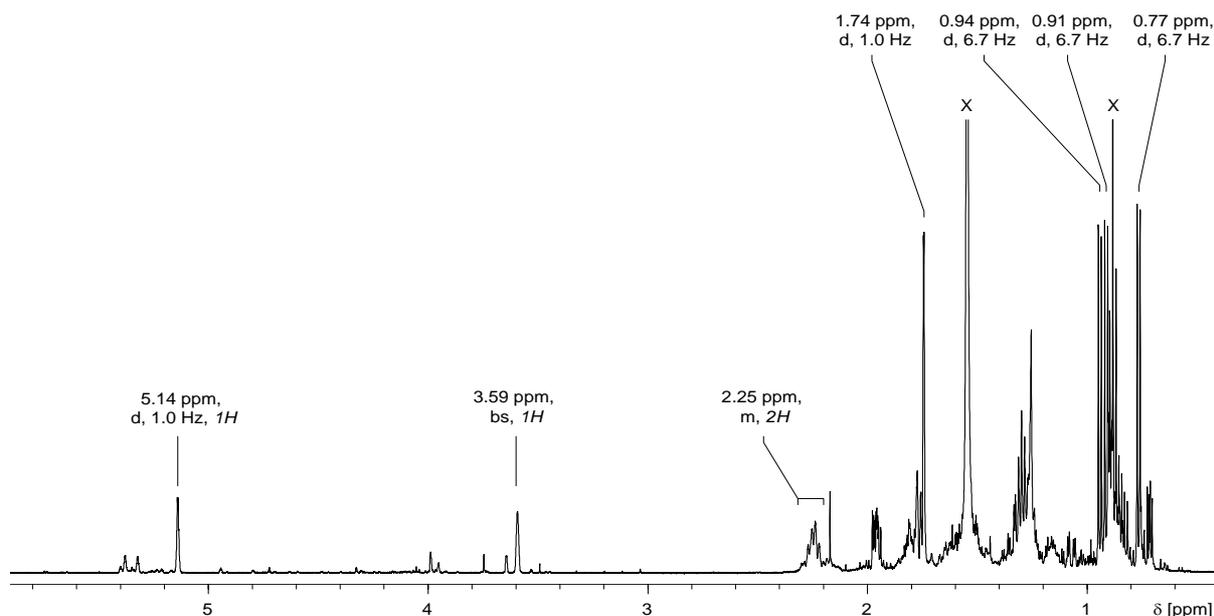
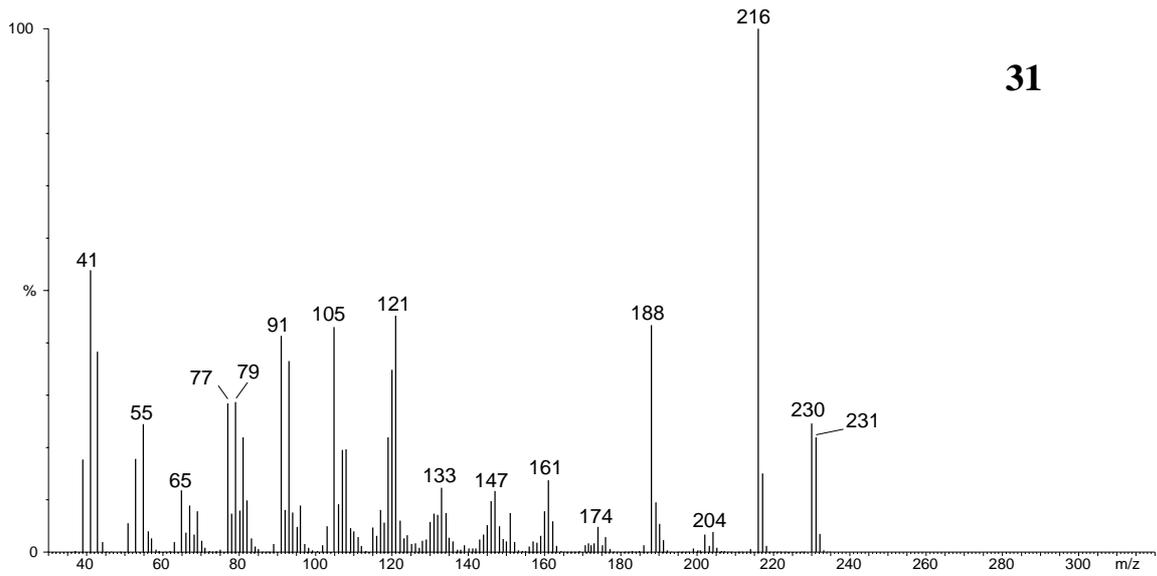


Abbildung 3-18 ¹H-NMR von **31** mit Kennzeichnung der Signale, die dem Literaturspektrum²⁵ entsprechen. Die mit X markierten Signale sind auf Verunreinigungen zurückzuführen. (CDCl₃, 500 MHz)

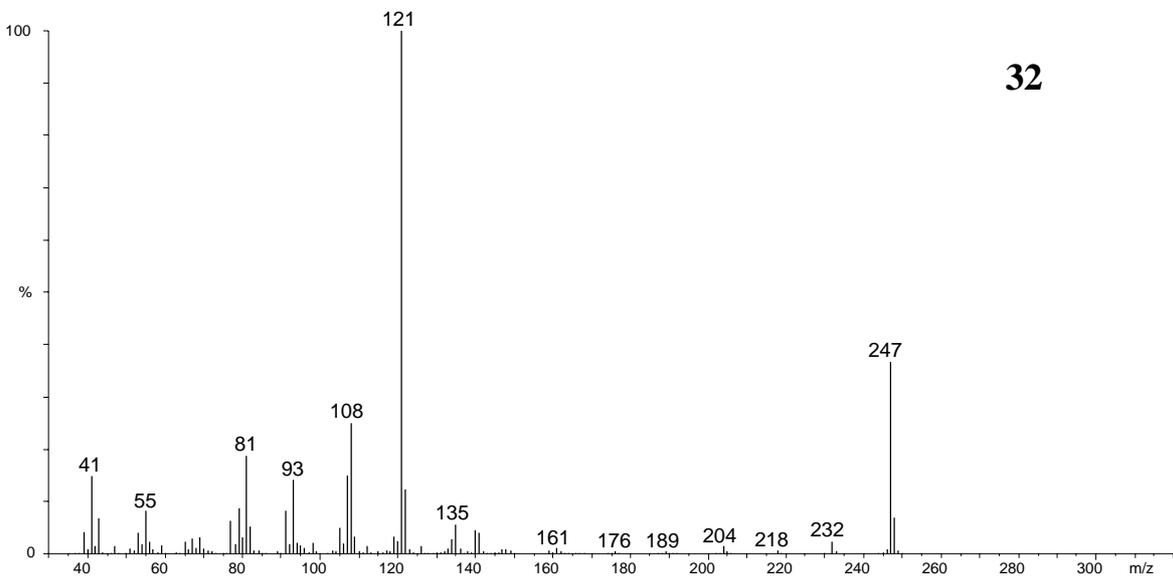
Tabelle 3-5 NMR-Daten für Axisonitril-3 bei Di Blasio *et al.*²⁵, Braekman *et al.*²⁶, sowie eigene Daten für **31**.

	¹ H-NMR: „Axisonitril-3“		31
	90 MHz, CCl ₄ [25]	250 MHz, CDCl ₃ [26]	500 MHz, CDCl ₃
Me-12/13/14	0.76 ppm, 3H, d, J = 7 Hz	0.76 ppm, 3H, d, 6.7 Hz	0.76 ppm, 3H, d, 6.7 Hz
	0.92 ppm, 3H, d, J = 7 Hz	0.91 ppm, 3H, d, 6.7 Hz	0.91 ppm, 3H, d, 6.7 Hz
	0.95 ppm, 3H, d, J = 7 Hz	0.94 ppm, 3H, d, 6.7 Hz	0.94 ppm, 3H, d, 6.7 Hz
Me-15	1.73 ppm, 3H, bs	1.74, d, 1.0 Hz	1.74, d, 1.0 Hz
?	2.25 ppm, 2H, m	2.24 ppm, 2H, m	2.24 ppm, 2H, m
H-6	3.51 ppm, 1H, s	3.59, 1H, bs	3.59, 1H, bs
H-1	5.1 ppm, 1H, bs	5.14 ppm, q, 1.0 Hz	5.14 ppm, q, 1.0 Hz

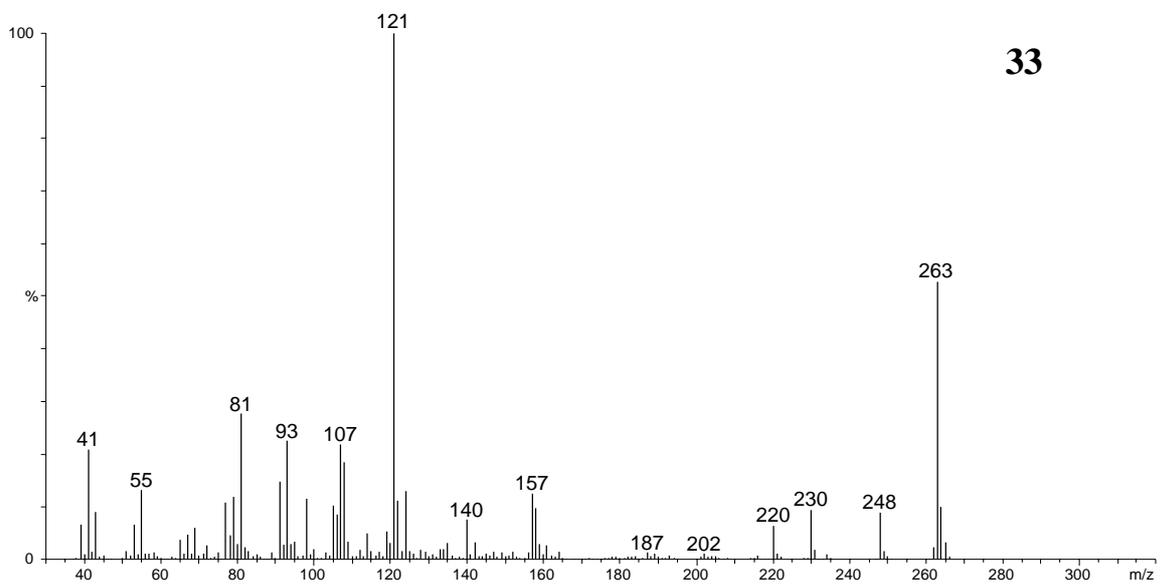
Das Isocyanat **32** („Axisocyanat-3“) ist ein neuer Naturstoff, der wie auch Axisothiocyanat-3 (**33**) durch Derivatisierung aus **31** dargestellt und anhand des Massenspektrums und der Retentionszeit in *P. ventilabrum* nachgewiesen wurde. Ein strukturanaloges spirocyclisches Dichlorimin ließ sich aus **31** durch Derivatisierung mit Chlor nicht gewinnen. Die Analyse der Reaktionsprodukte lieferte keine Hinweise auf die Bildung eines Chloraddukts an der Isocyanidgruppe. Die Massenspektren dieser Serie (**31-33**) sind in Abbildung 3-19 wiedergegeben. Die IUPAC-Namen der spirocyclischen Sesquiterpene in *P. ventilabrum* lauten: 6-Isocyano-7-(1-methylethyl)-2,10-dimethyl-spiro[4.5]dec-1-en (**31**), 6-Isocyanato-7-(1-methylethyl)-2,10-dimethyl-spiro[4.5]dec-1-en (**32**), 6-Isothiocyanato-7-(1-methylethyl)-2,10-dimethyl-spiro[4.5]dec-1-en (**33**). Die absolute Konfiguration wurde nicht bestimmt.



31



32



33

Abbildung 3-19 Massenspektren (EI, 70 eV) der spirocyclischen Sesquiterpene **31-33**.

3.2.2.3 Cubebane

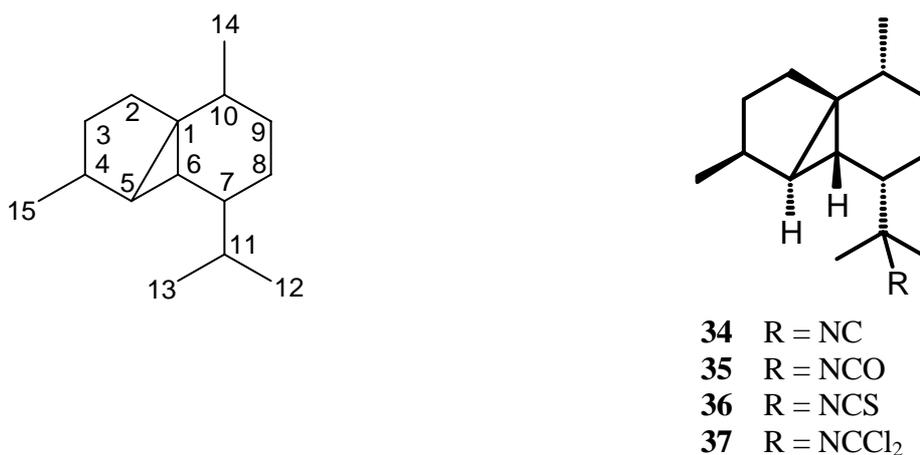


Abbildung 3-20 Cubeban-Skelett und Strukturen von **34-37**

Wie fast alle Isocyanide in *P. ventilabrum* (bis auf **28**), hat auch **34** die elementare Zusammensetzung C₁₆H₂₅N (M_r = 231 g/mol). Zusätzlich zur Isocyanid-Gruppe liegen drei Doppelbindungsäquivalente vor. Das ¹H-NMR-Spektrum des Isocyanids **34** (Abbildung 3-21) zeigt keine olefinischen Protonen. Auch im ¹³C-NMR-Spektrum (Abbildung 3-22) findet man keine Signale die einer C-C-Doppelbindung zuzuordnen wären. Damit ist **34** das einzige tricyclische Sesquiterpen-Isocyanid, das aus *P. ventilabrum* isoliert werden konnte.

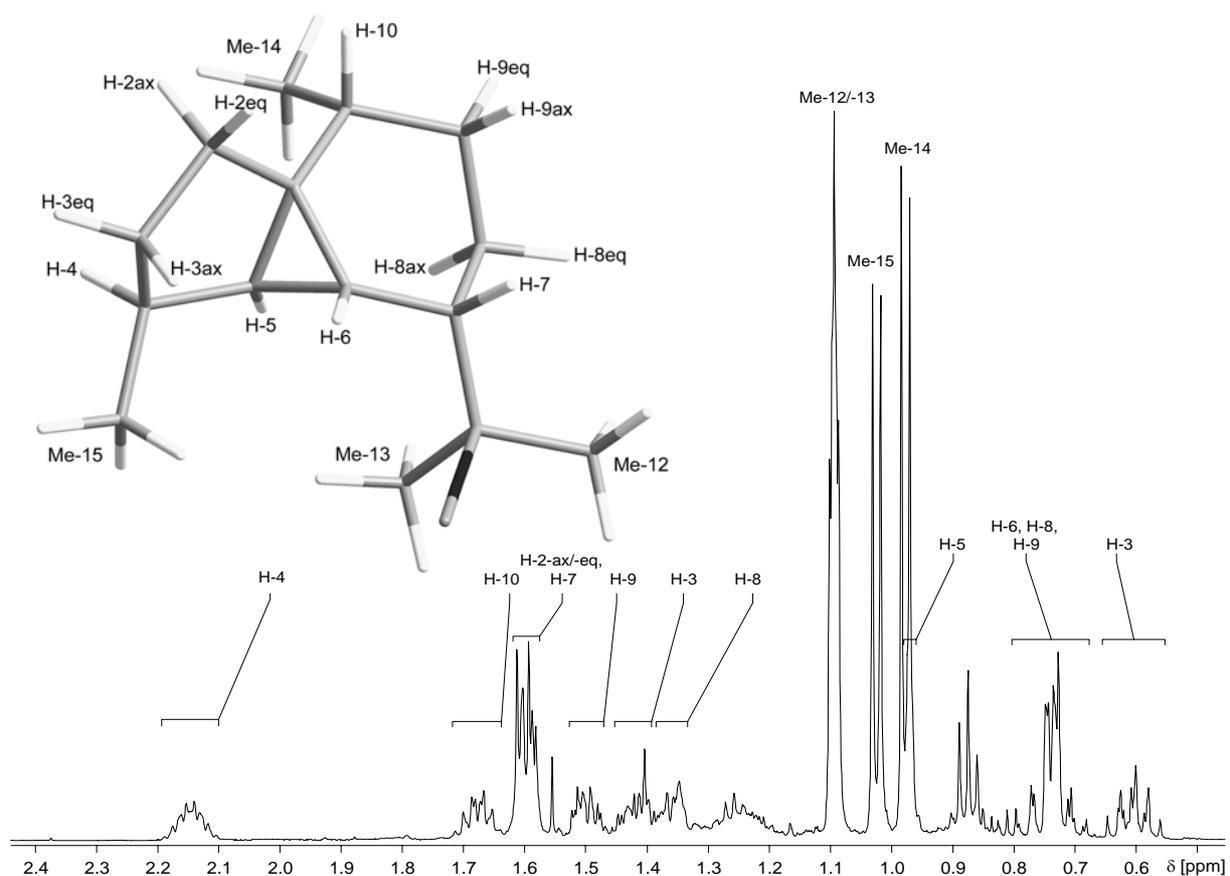


Abbildung 3-21 ¹H-NMR-Spektrum von **34** (500 MHz, Benzol-d₆)

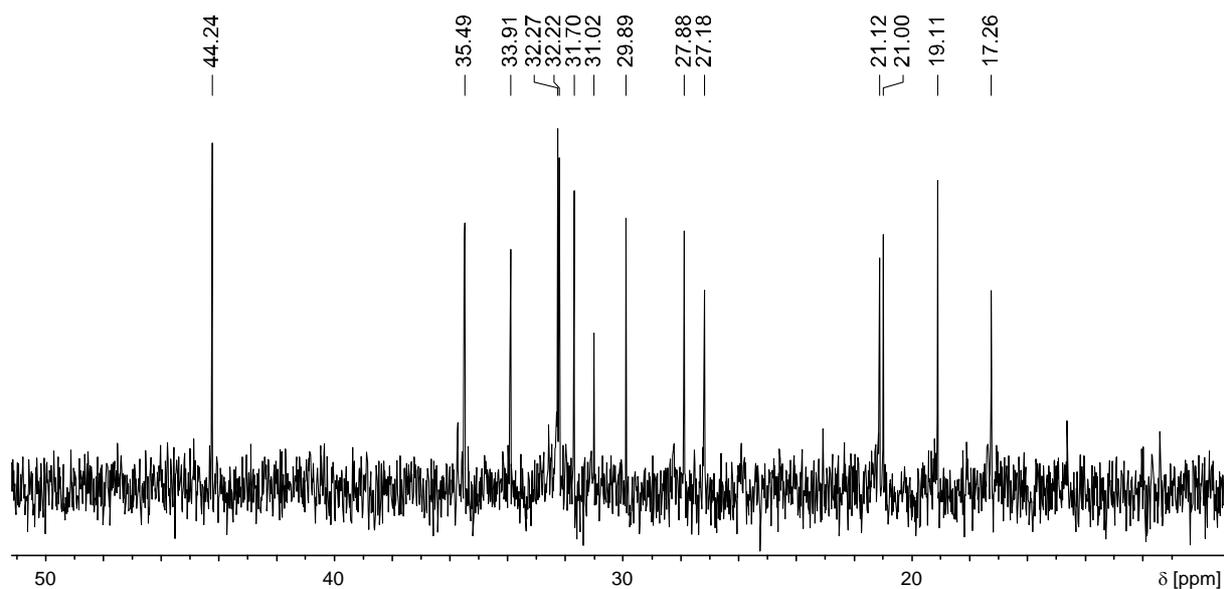


Abbildung 3-22 ^{13}C -NMR-Spektrum von **34** (100.6 MHz, Benzol- d_6)

Da vinyliche und allyliche Protonen fehlen, liegen alle 25 ^1H -Signale im Bereich zwischen 0.5 und 2.2 ppm. Dies führt zu zahlreichen Überlagerungen, die insbesondere die Auswertung des NOE-Spektrums und damit die Bestimmung der relativen Konfiguration erschweren.

Die Konstitution konnte anhand der HMBC- und COSY90-Daten dennoch zweifelsfrei ermittelt werden. **34** ist ein Cubebanderivat, das eine tertiäre Isocyanidgruppe in der Isopropylseitenkette trägt (Abbildung 3-20).

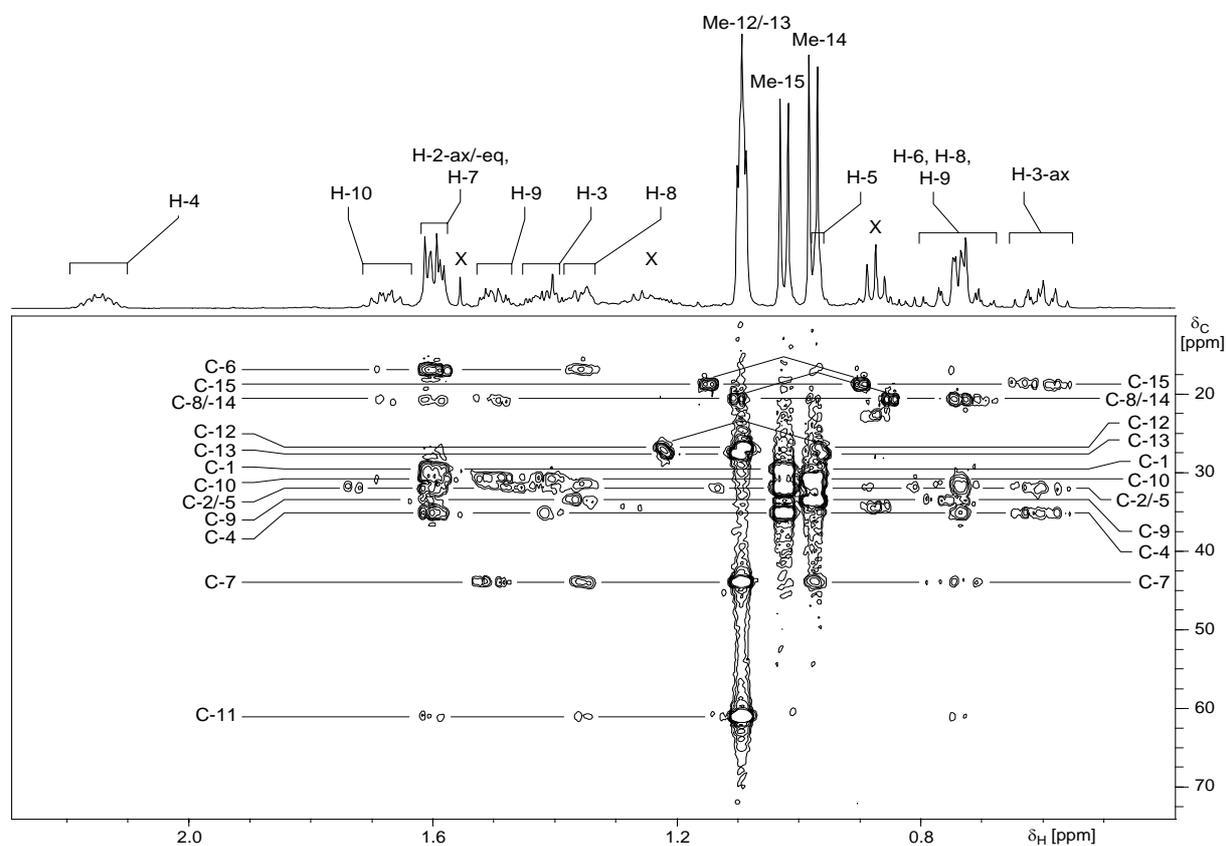


Abbildung 3-23 HMBC-Spektrum des Isocyanids **34** (500 MHz, C_6D_6).

Die Methylgruppen dieser Seitenkette (Me-12 und Me-13, beide bei $\delta_{\text{H}} = 1.09$ ppm überlagert) geben im HMBC gut erkennbare Kreuzsignale zum tertiären Kohlenstoffatom C-12 ($\underline{\text{C}}\text{-NC}$, $\delta_{\text{C}} = 61.3$ ppm) und zur Methingruppe C-7 ($\delta_{\text{C}} = 44.24$ ppm), woraus die Position am Tricyclus hervorgeht.

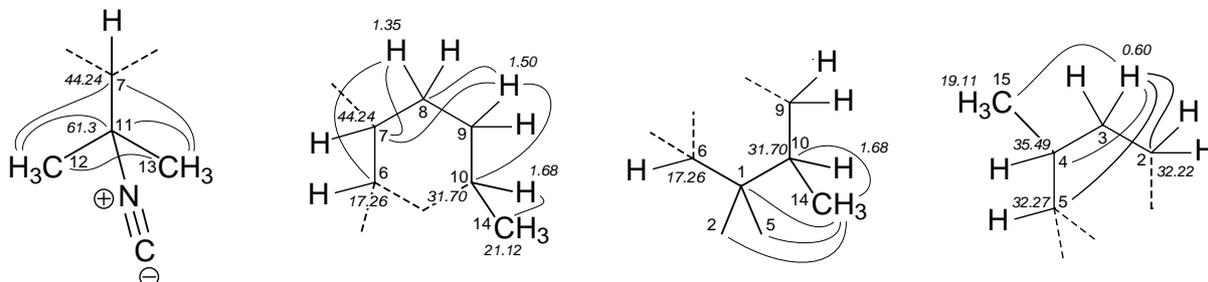


Abbildung 3-24 Einige Teilstrukturen von **34**, die sich aus der Analyse der HMBC-Signale ergeben.

Die Umgebung des Kohlenstoffatoms C-7 ($\delta_{\text{C}} = 44.24$ ppm) lässt sich aus HMBC-Signalen der Protonen H-8 ($\delta_{\text{H}} = 1.35$ ppm) und H-9 ($\delta_{\text{H}} = 1.50$ ppm) herleiten. Die Cubeban-Struktur von **34** ergibt sich aus der Kombination weiterer Teilstrukturen (Abbildung 3-24).

Die sechs stereogenen Zentren ergeben formal $2^6 = 64$ mögliche Stereoisomere. Die Ringspannung des Systems schränkt jedoch die Zahl der tatsächlich möglichen Isomere ein. Hierzu betrachte man zunächst den tricyclischen Kern des Cubeban-Systems, das Tricyclo[4.4.0^{1,5}]decan (Abbildung 3-25). Bereits einfache MM2-Berechnungen* zeigen, dass Dreiring und Fünfring nicht *trans*-verknüpft sein können (III und IV in Abbildung 3-25). Die Substrukturen III und IV sind nicht von realer Bedeutung, da sie bereits bei Raumtemperatur zu I bzw. II isomerisieren würden. Von diesen beiden ist II wesentlich energiereicher als I.

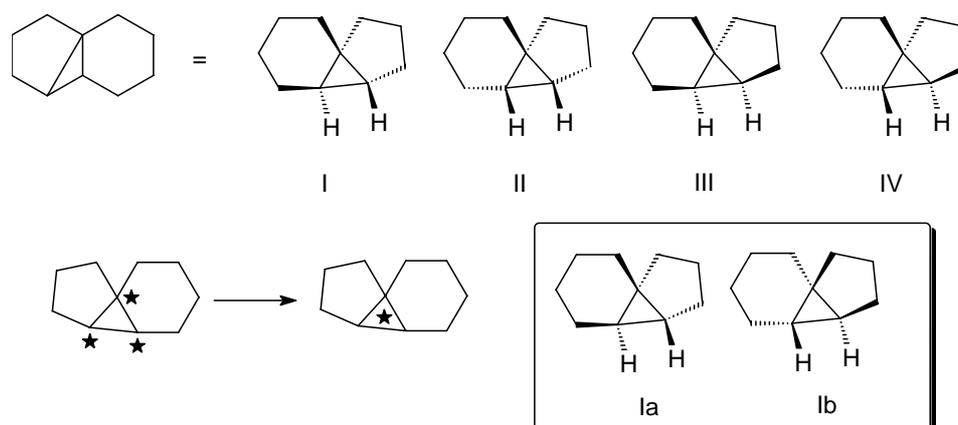
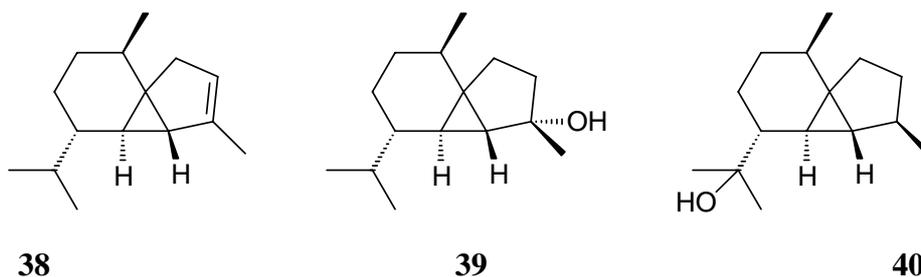


Abbildung 3-25 Betrachtungen zur Stereochemie des Tricyclo[4.4.0^{1,5}]decan-Systems. Die Strukturen III und IV sind nicht stabil, II ist aufgrund sehr hoher Ringspannung zu vernachlässigen, so dass nur das Enantiomerenpaar Ia und Ib von Bedeutung sind.

* Durchgeführt mit dem Programm Chem3D[®] Ultra, Molecular Modeling and Analysis, CambridgeSoft Corp., USA

Alle bisher bekannten Cubeban-Derivate besitzen die relative Konfiguration I (Beispiele: β -Cubeben **8**^{17,31}, α -Cubeben **38**^{17,31}, Cubebol **39**^{31,32}, Epicubebol **40**³¹).



Fasst man die drei Stereozentren des Tricyclo[4.4.0^{1,5}]decan-Systems zu einem Stereozentrum zusammen (Abbildung 3-25) so reduziert sich unter Berücksichtigung der drei weiteren Chiralitätszentren der Substituenten die Zahl der möglichen Diastereomere für **34** auf acht. Mit dieser Vorgabe konnte die relative Konfiguration anhand der COSY90 und NOESY-Daten (Abbildung 3-26) bestimmt werden.

Ebenso in *P. ventilabrum* vorhanden sind die Derivate **35-37**. Aus dieser Serie wurde bisher nur das Isothiocyanat **36** beschrieben, das He und Faulkner aus dem Schwamm *Axinyssa aplysinoides* isolierten²⁸. Die von ihnen ermittelte relative Konfiguration stimmt mit der von **34** überein und stützt die hier beschriebenen Ergebnisse. Im Schwamm *Axinyssa aplysinoides*, der ebenso wie *P. ventilabrum* zur Familie der Axinellidae gehört, wurde neben anderen Sesquiterpenen auch das spirocyclische Axisonitril-3 (**31**) gefunden^{28,33}. Die Strukturverwandschaft zwischen letzterem und **34** wird deutlich, wenn man in Axisonitril-3 eine zusätzliche Bindung zwischen C-1 und C-6 hinzufügt, bzw. im Cubeban **34** die Bindung zwischen C-5 und C-6 aufhebt.

Die absolute Konfiguration der Verbindungen **34-37** wurde nicht bestimmt. Der IUPAC-Name der in Abbildung 3-20 dargestellten Struktur des Isocyanids **34** lautet: (1R,4R,5S,6R,7R,10R)-4,10-dimethyl-7-(1-isocyano-1-methylethyl)-tricyclo[4.4.0^{1,5}]decan.

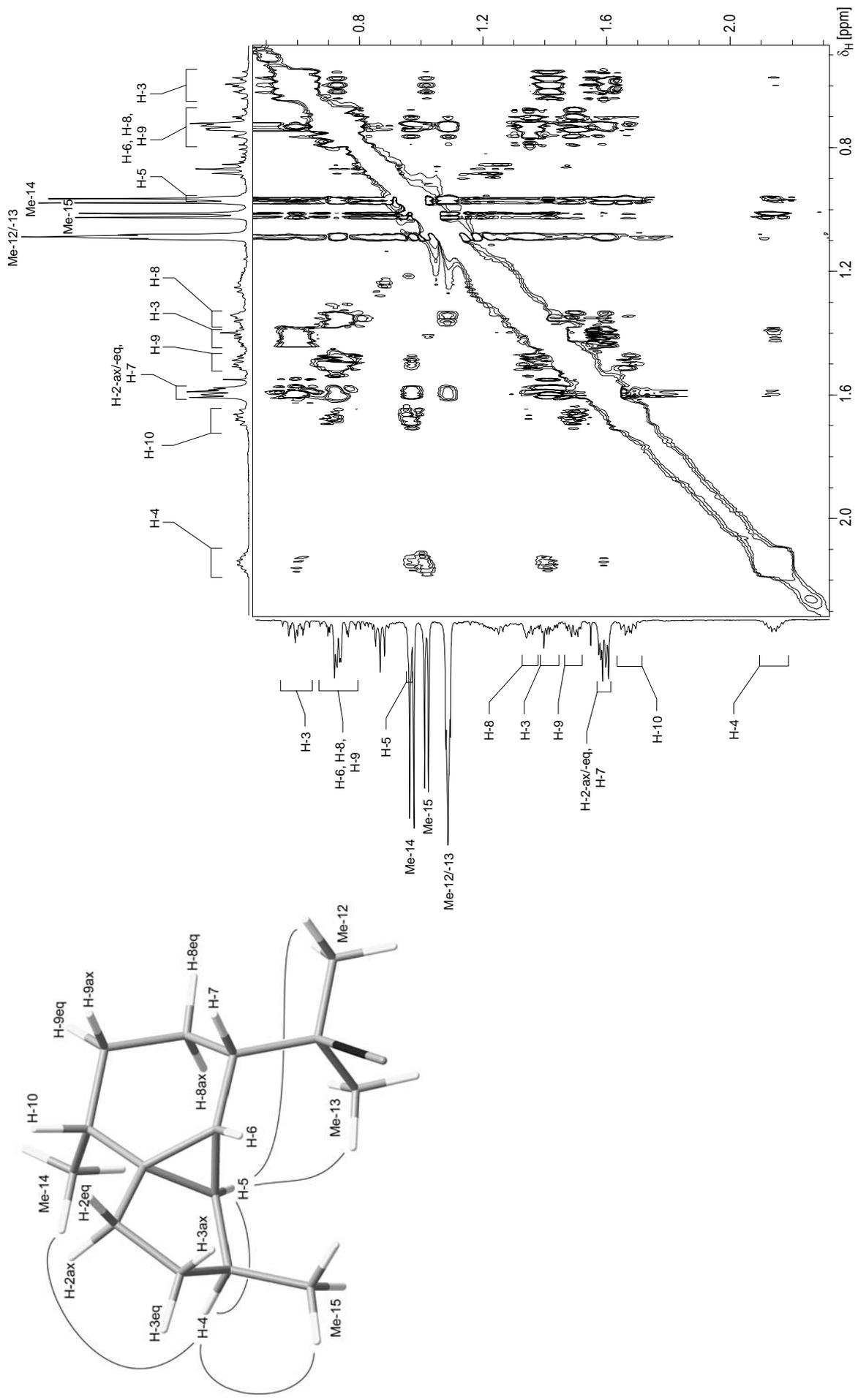


Abbildung 3-26 NOESY (500 MHz, C₆D₆) des Isocyanids **34** mit Hervorhebung einiger NOEs, die zur Klärung der relativen Konfiguration beitragen.

Tabelle 3-6 NMR-Daten von **34**

Pos.	¹³ C δ[ppm]	¹ H δ[ppm]	Int.	Mult.	COSY90	HMBC	NOESY
1	31.02	-	-	-	-	-	-
2	32.22 ^a	1.58- 1.62	2H	m	überlagert mit H-7	überlagert mit H-7	überlagert mit H-7
3-ax	29.89	0.60	1H	m	H-2-ax/-eq, H-3- eq, H-4,	C-4, C-5, C-15	H-2, H-3- eq, H-6, Me-15
3-eq		1.42	1H	m	H-2, H-3-ax	C-1, C-2, C-4	H-3-ax
4	35.49	2.14	1H	m	H-3, Me-15	-	H-3, Me-15
5	32.27 ^a	0.97	1H		überlagert mit Me- 14	überlagert mit Me- 14	H-4, Me-12, Me-13
6	17.26	0.73	1H		überlagert mit H-8 und H-9	überlagert mit C-8, C-9	überlagert mit H-8, H-9
7	44.24	1.60	1H		überlagert mit H-2	überlagert mit H-2	überlagert mit H-2
8	21.00 ^b	0.73	1H		überlagert mit H-6 und H-9	überlagert mit C-6, C-9	überlagert mit H-6, H-9
		1.35	1H		H-8	C-6, C-7, C-9, C-10, C-11	H-9, Me-12, Me-13
9	33.91	0.73	1H		überlagert mit H-6 und H-8	überlagert mit C-6, C-8	überlagert mit H-6, H-8
		1.50	1H		H-8, H-10	C-1, C-7, C-8, C-10	H-8, Me-14
10	31.70	1.68	1H	m	H-9, Me-14	C-14	H-9, Me-14
11	61.3 ^c	-	-	-	-	-	-
12	27.18 ^d	1.09	3H	s	-	C-7, C-11, C-13	H-6, H-7, H-8
13	27.88 ^d	1.09	3H	s	-	C-7, C-11, C-12	H-6, H-7, H-8
14	21.12 ^b	0.98	3H	d, J = 7 Hz	H-10	C-1, C-2, C-5, C-7, C-9, C-10	H-4
15	19.11	1.03	3H	d, J = 7 Hz	H-4	C-3, C-4, C-5	H-4
16	? ^e	-	-	-	-	-	-

a, b und d: Signalzuordnung unklar, können evtl. vertauscht werden.

c: nur indirekt im HMBC detektierbar.

e: nicht detektierbar

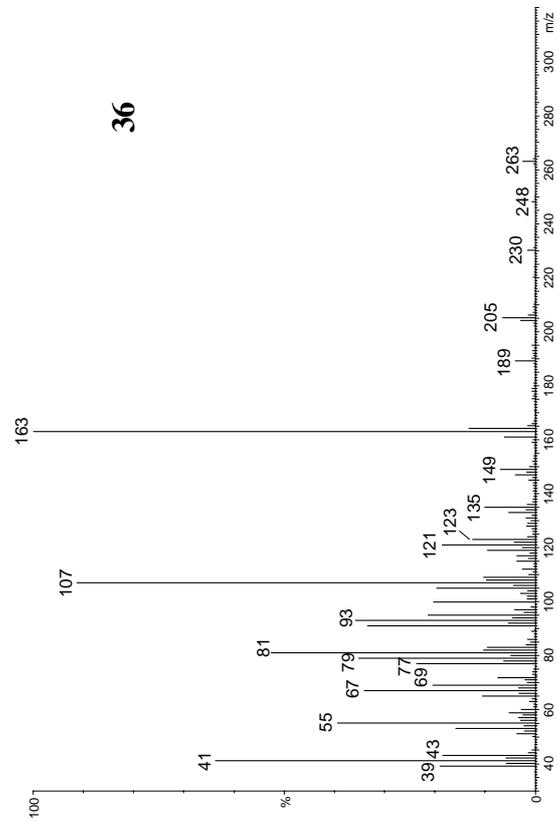
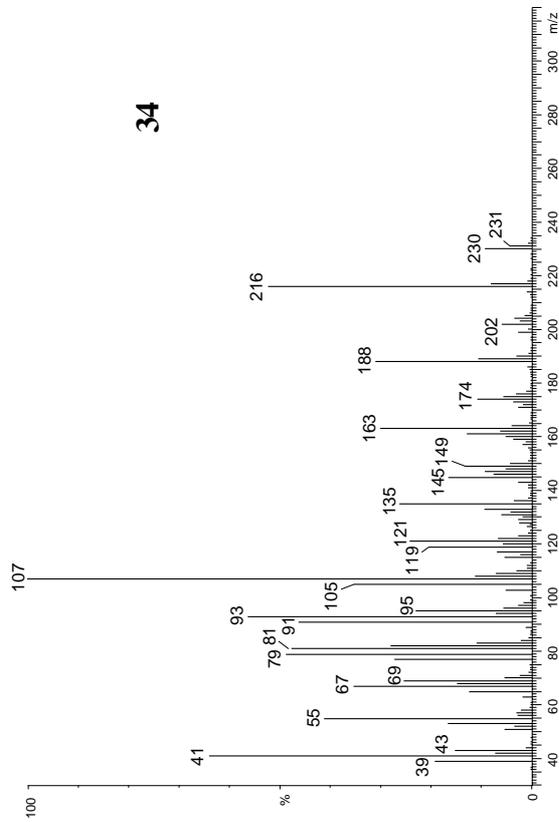
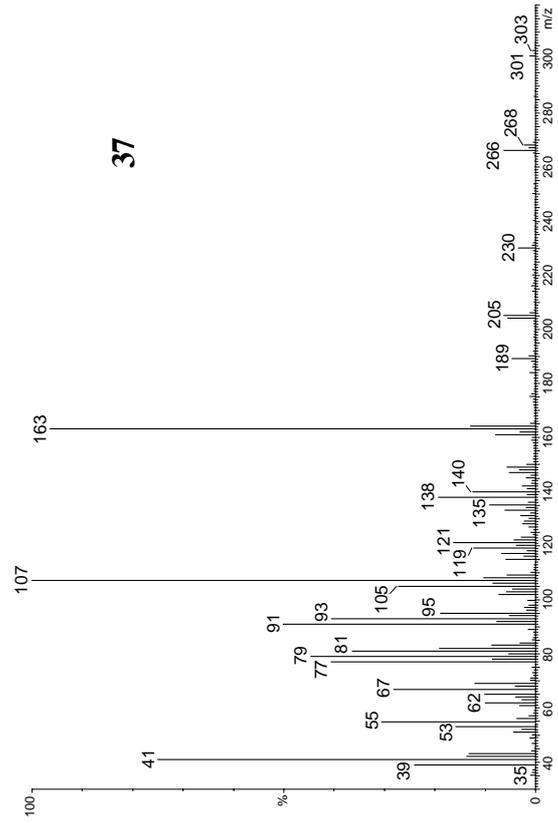
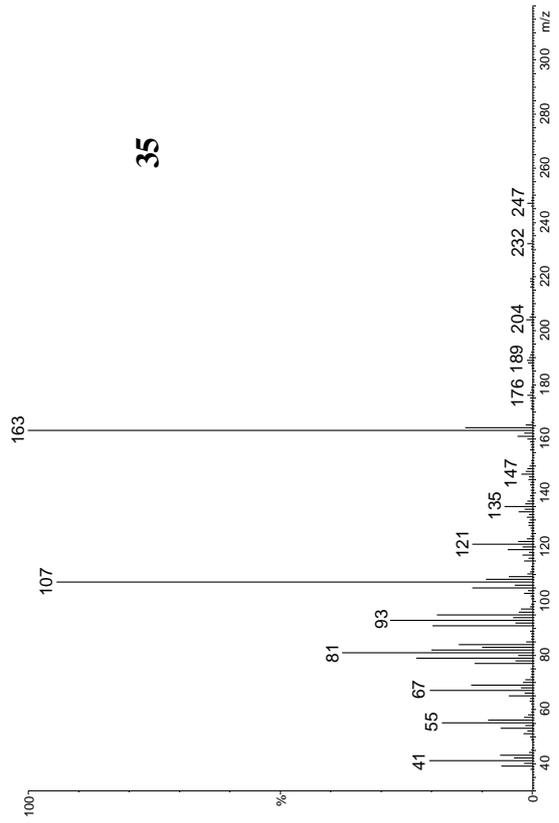


Abbildung 3-27 Massenspektren (EI, 70 eV) der Cubebane 34-37.

3.2.2.4 Isodaucane

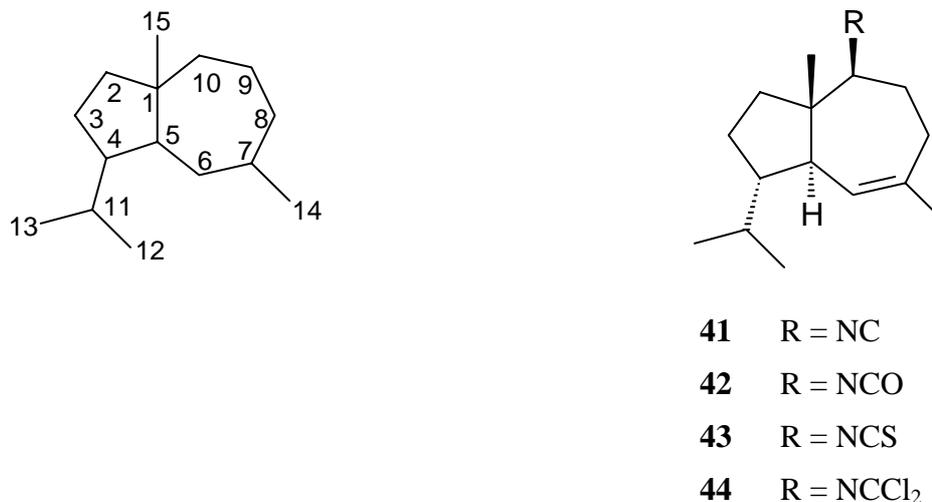


Abbildung 3-28 Isodaucan-Gerüst und Strukturen von **41-44**.

Unter den bicyclischen Sesquiterpenen in *P. ventilabrum* findet man eine Serie von Octahydroazulenen, die aufgrund der Positionen der Isopropyl- und Methylgruppen als Isodaucane bezeichnet werden. Alle vier Vertreter des Quartetts **41-44** sind neue Naturstoffe. Die Strukturaufklärung dieser Serie gelang auch hier über die Isolierung des Isocyanids **41** durch präparative Gaschromatographie und dessen NMR-spektroskopische Charakterisierung. Der Strukturbeweis der Derivate **42-44** erfolgte anschließend durch Transformation des Isocyanids **41** mit Hilfe der in Abbildung 3-6 dargestellten Mikroreaktionen und des gaschromatographischen sowie massenspektrometrischen Vergleichs der Reaktionsprodukte mit den Inhaltsstoffen in Fraktion B (Schema in Abbildung 3-4).

Trotz zahlreicher Signalüberlagerungen im ¹H-NMR-Spektrum von **41** (siehe Abbildung 3-29 und Tabelle 3-7) gelang die Aufklärung der Konstitution und relativen Konfiguration anhand der Korrelationsspektren HMQC, HMBC, COSY90 und NOESY.

Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt die Signale der vier Methylgruppen, von denen zwei (Me-12 und Me-13, 0.75 und 0.81 ppm) durch ihre Dublett-Struktur die Nähe zu einem Methin-Proton anzeigen, während die anderen beiden Methylgruppen aufgrund ihrer Stellung an quartären Kohlenstoffatomen Singulets ergeben.

Im ¹³C-NMR-Spektrum zeigen die Signale für C-6 (CH, $\delta_C = 129.00$ ppm) und C-7 (quartär, $\delta_C = 137.57$ ppm) eine trisubstituierte Doppelbindung an. Das entsprechende Protonensignal für H-6 erscheint im ¹H-NMR-Spektrum bei $\delta_H = 5.01$ ppm. Ein weiterer Substituent der Doppelbindung ist die Methylgruppe Me-14, die ein Singulett bei $\delta_H = 1.49$ ppm erzeugt. **41** ist

ein sekundäres Isocyanid, wie man anhand des $^1\text{H-NMR}$ -Signals des Protons H-10 ($\delta_{\text{H}} = 2.71$ ppm) erkennen kann.

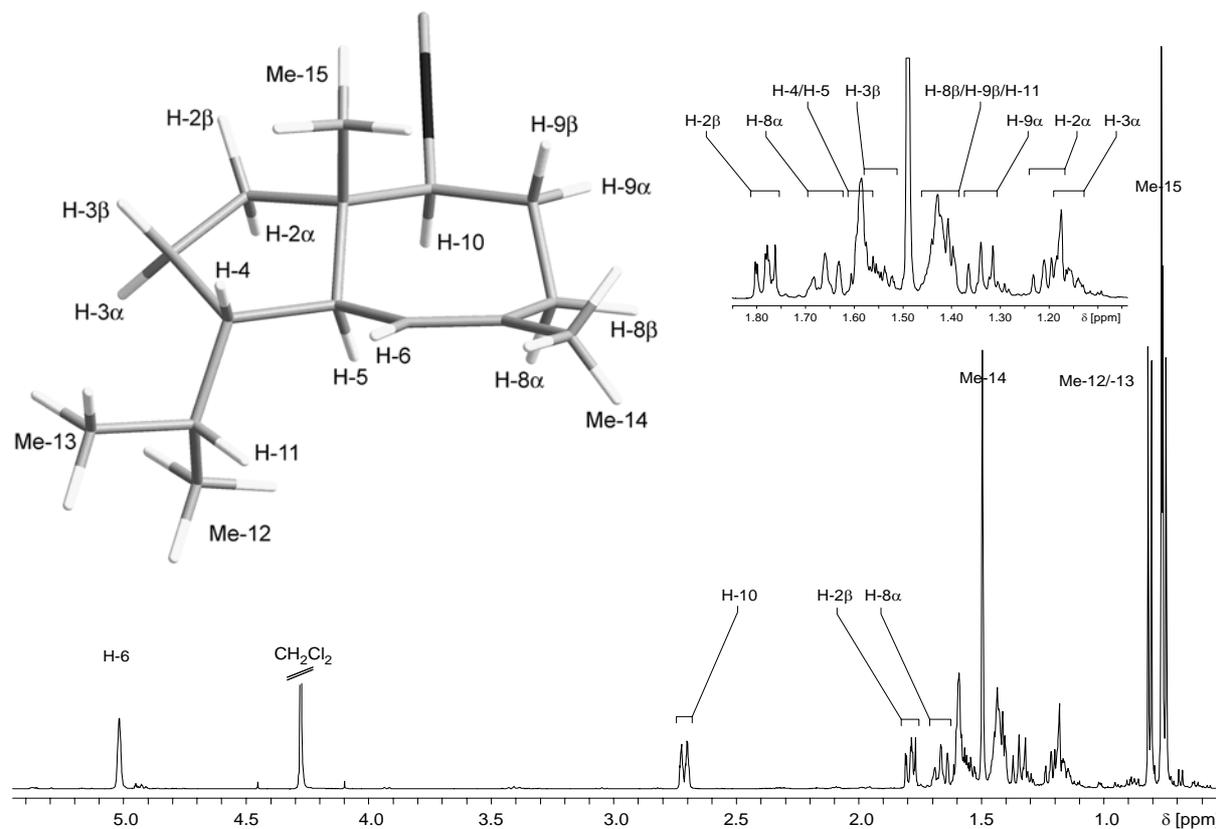


Abbildung 3-29 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **41** (500 MHz, Benzol- d_6).

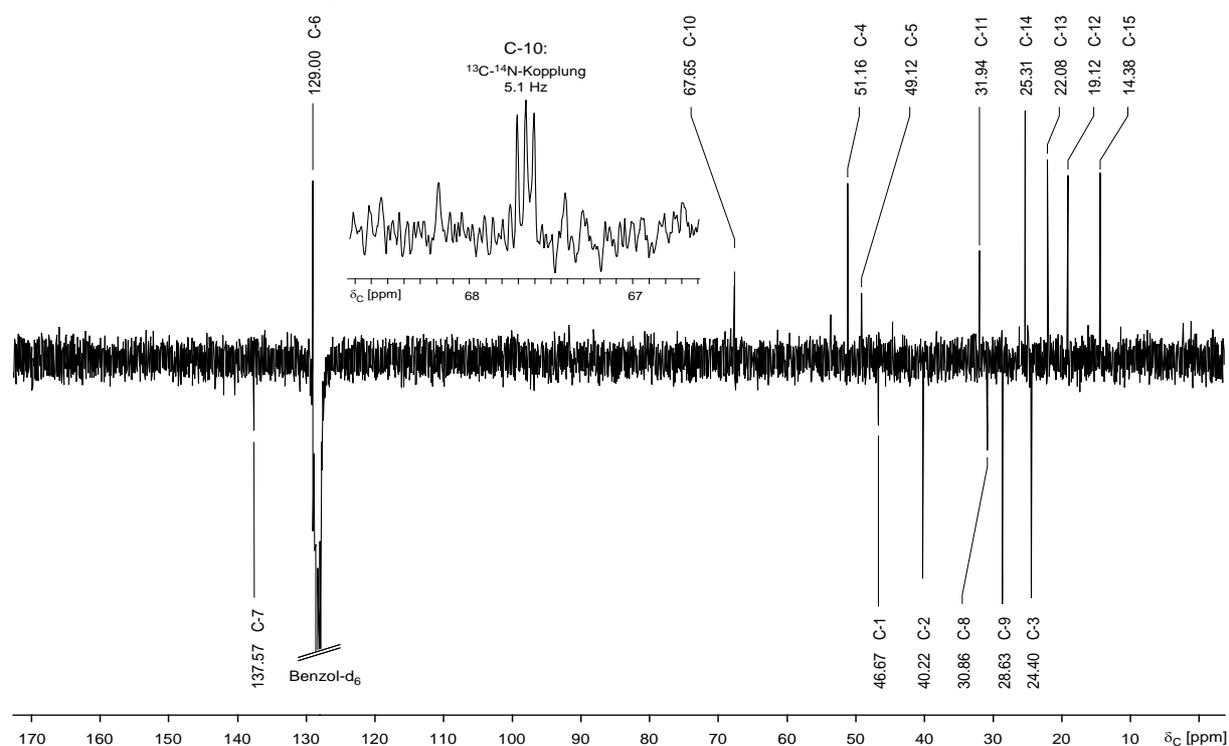


Abbildung 3-30 $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (PENDANT) des Isocyanids **41** (100.6 MHz, Benzol- d_6) mit vergrößerter Ansicht des Signals bei 67.75 ppm, das die für Isocyanide typische $^{13}\text{C-}^{14}\text{N}$ -Kopplung zeigt. CH₃- und CH-Gruppen geben positive Signale, CH₂-Gruppen und quartäre C-Atome negative Signale.

Die Analyse der HMBC-Kopplungen (Tabelle 3-7) liefert die Konstitution von **41**, das vier Stereozentren hat. Die relative Konfiguration von **41** kann man an ausgewählten NOE-Signalen in wenigen Schritten herleiten (Abbildung 3-31). Die diastereotopen Wasserstoffatome H-2 α und H-2 β haben die chemischen Verschiebungen $\delta_{\text{H}} = 1.19$ und 1.78 ppm. Die Zuordnung der Signale erfolgt anhand des starken NOE-Kreuzsignals zwischen Me-15 ($\delta_{\text{H}} = 0.76$ ppm) und dem ^1H -Signal bei $\delta_{\text{H}} = 1.78$ ppm, das damit als H-2 β identifiziert ist. Das Proton H-10, das zur Methingruppe mit der Isocyanidgruppe gehört, zeigt ein NOE-Kreuzsignal zu H-2 α , nicht jedoch zu H-2 β oder zur Methylgruppe Me-15. Daraus folgt, dass die Isocyanid-Gruppe und die anguläre Methylgruppe Me-15 *cis*-ständig sind.

Die *trans*-Verknüpfung von Fünf- und Siebenring wird durch die NOEs zwischen Me-15 und dem vinylicischen Proton H-6, sowie durch die NOESY-Kreuzsignale zwischen H-2 α , H-5 und H-10 belegt. Die Stellung der Isopropylgruppe schließlich ergibt sich aus den NOEs zwischen den Methylgruppen Me-12 / 13 und dem Proton H-6.

Die absolute Konfiguration dieser Isodaucan-Derivate (**41-44**) konnte nicht bestimmt werden, ihre IUPAC-Namen lauten: (1R*,3aR*,4R*,8aS*,Z)-4-isocyano-1-(1-methylethyl)-3a,7-dimethyl-1,2,3,3a,4,5,6,8a-octahydroazulen (**41**), (1R*,3aR*,4R*,8aS*,Z)-4-isocyanato-1-(1-methylethyl)-3a,7-dimethyl-1,2,3,3a,4,5,6,8a-octahydroazulen (**42**), (1R*,3aR*,4R*,8aS*,Z)-4-isothiocyano-1-(1-methylethyl)-3a,7-dimethyl-1,2,3,3a,4,5,6,8a-octahydroazulen (**43**) und (1R*,3aR*,4R*,8aS*,Z)-4-(*N,N*-Dichlorimino)-1-(1-methylethyl)-3a,7-dimethyl-1,2,3,3a,4,5,6,8a-octahydroazulen (**44**)

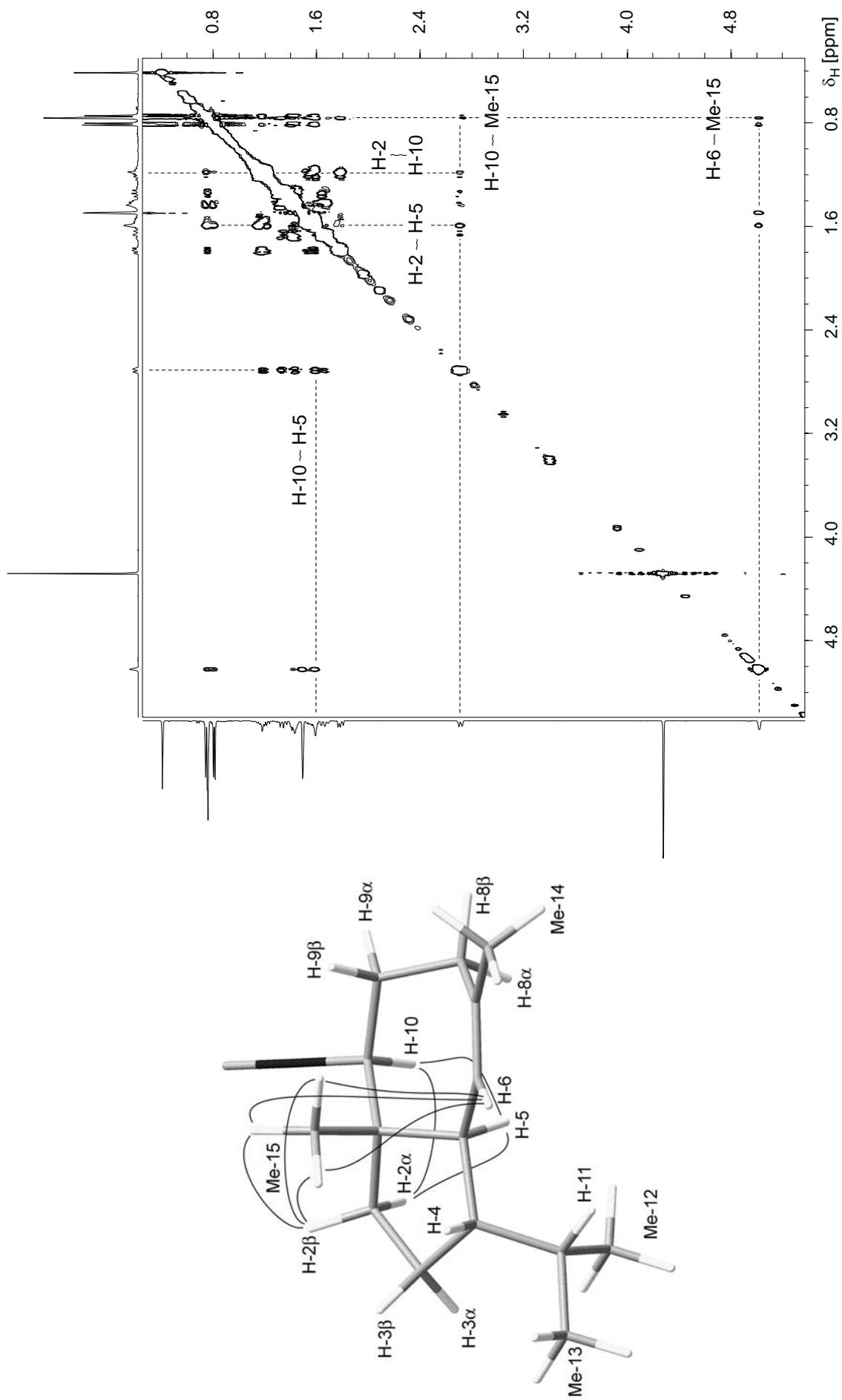


Abbildung 3-31 NOESY des Isocyanids **41** mit Hervorhebung einiger Kreuzsignale, die zur Klärung der relativen Konfiguration beitragen. (500 MHz, C_6D_6)

Tabelle 3-7 NMR-Daten des Isocyanids **41**

Pos.	¹³ C	¹ H		COSY90	HMBC	NOESY
1	46.76	-	-	-	-	-
2	40.32	1.19 (α)	1H	H-3β, H-2β	C-1, C-3, C-10, C-15	H-2β, H-10
		1.78 (β)	1H	H-2α, H-3α, H-3β	C-1, C-3, C-4, C-5, C-15	H-2α, Me-15
3	24.49	1.16 (α)	1H	H-3β, H-2β	C-1, C-2, C-4, C-5, C-11	H-3β, H-5
		1.54 (β)	1H	H-2α, H-3α	C-4	H-3α, Me-15
4	51.26	1.59	1H	a	überlagert mit H-5	überlagert mit H-5
5	49.22	1.59	1H	b	überlagert mit H-4	überlagert mit H-4
6	129.10	5.01	1H	H-5, H-8α, Me- 14	C-8	H-5, Me-12, Me- 13, Me-14
7	137.67	-	-	-	-	-
8	30.96	1.40 (β)	1H	überlagert mit H-9β und H-11	überlagert mit H-9β und H-11	überlagert mit H-9β und H-11
		1.64 (α)	1H	H-8β, H-9α	C-7, C-9, C-10	H-8β, H-10
9	28.73	1.33 (α)	1H		C-1, C-7, C-8, C-10	
		1.43 (β)	1H	C	überlagert mit H-8β und H-11	überlagert mit H-8β und H-11
10	67.75	2.71	1H	H-8β, H-9α, H-9β	C-1, C-2, C-5, C-8, C-9, C-15, C-16	H-2α, H-8α, H-9α
11	32.04	1.42	1H, d	Me-12, Me-13	überlagert mit H-8β und H-9β	überlagert mit H-8β und H-9β
12	19.22	0.75	3H, d	H-11	C-4, C-11, C-13	H-4, H-11
13	22.17	0.81	3H, d	H-11	C-4, C-11, C-12	H-4, H-11
14	25.40	1.49	3H	-	C-6, C-7, C-8	H-6
15	14.48	0.76	3H	-	C-1, C-2, C-5, C-10	H-2β, H-6
16	158.5	-	-	-	-	-

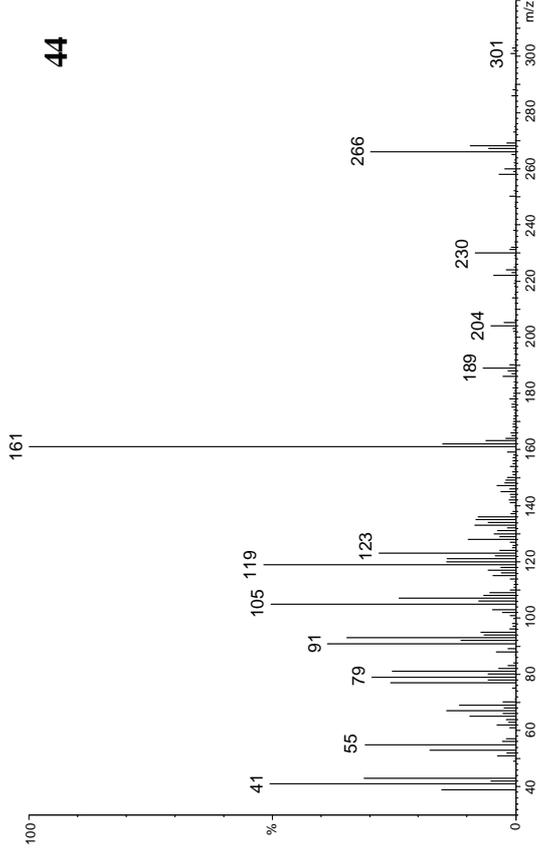
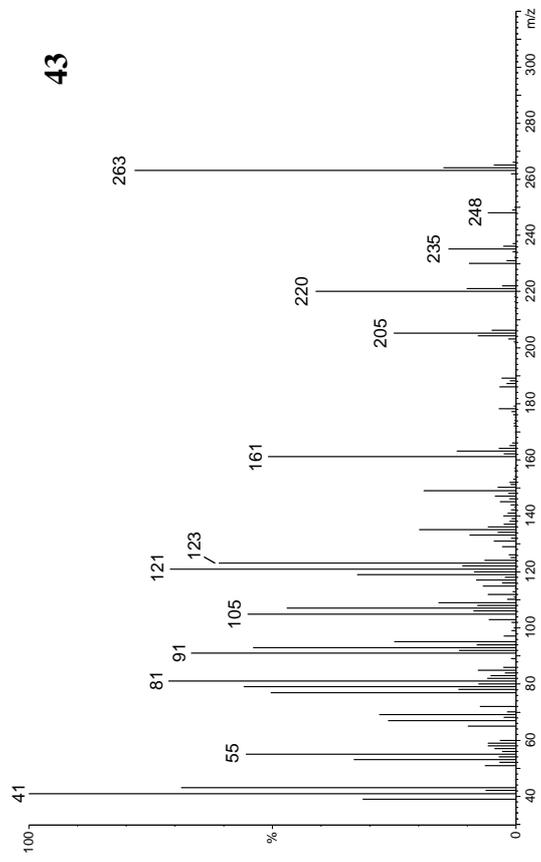
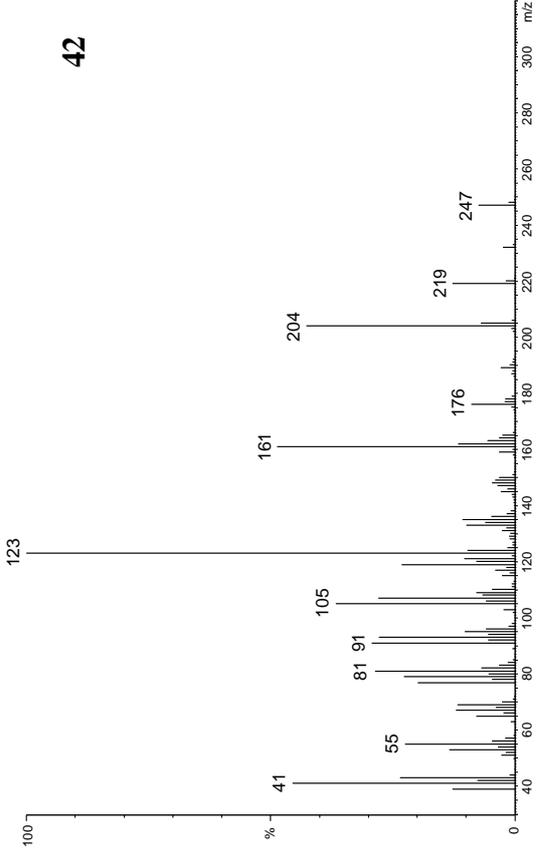
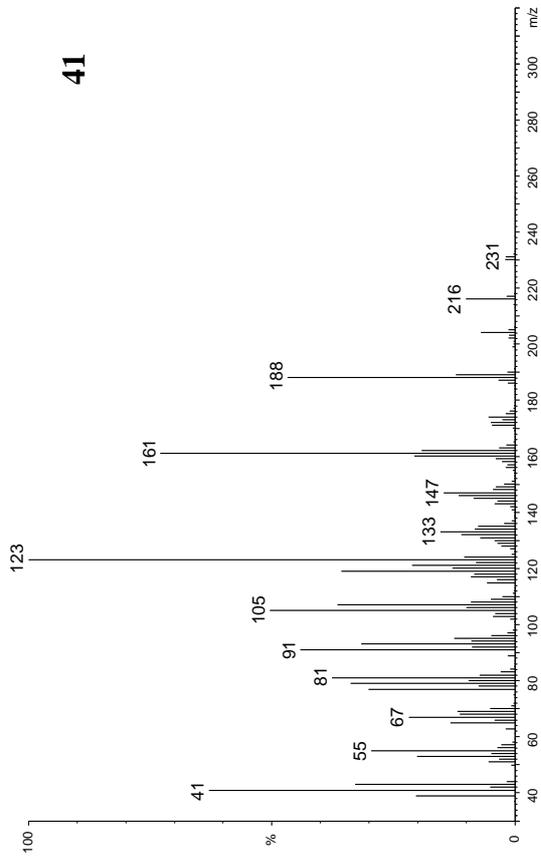


Abbildung 3-32 Massenspektren (EI, 70 eV) der Isodaucane **41-44**.

3.2.2.5 Muurolane

Das Kohlenstoff-Skelett der Verbindungen **45-48** ist ein Octahydronaphthalinsystem mit *cis*-verknüpften Ringen. Das Substitutionsmuster aus zwei Methylgruppen und einer Isopropylgruppe, sowie deren relative Konfiguration entspricht dem γ -Muurolen **18**. Das Isocyanid **45** wurde bereits 1992 von Fusetani *et al.* aus dem Schwamm *Acanthella cavernosa* isoliert²⁹.

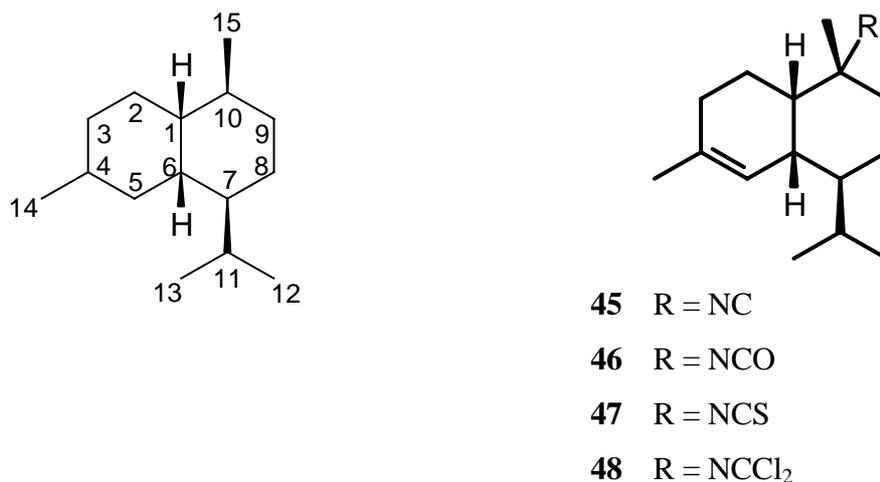


Abbildung 3-33 Muurolan-Skelett und Strukturen der Verbindungen **45-48**. Die Numerierung der Kohlenstoffatome richtet sich auch hier nach Joulain und König [17] und weicht von der Originalpublikation von Fusetani [29] ab. Dort sind die Methylgruppen C-14 und C-15 vertauscht.

Im ¹H-NMR-Spektrum sind leicht die Signale der vier Methylgruppen zu erkennen, von denen zwei als Singulett erscheinen, da sie an quartären Kohlenstoffe gebunden sind (Me-14 und Me-15), und zwei jeweils aufgrund ihrer Zugehörigkeit zur Isopropyl-Seitenkette ein Dublett erzeugen (Me-12 und Me-13). Ein einzelnes Signal bei $\delta_{\text{H}} = 5.37$ ppm (H-5) belegt die trisubstituierte Doppelbindung. Die Signale der restlichen Protonen sind teilweise überlagert, erlauben aber über die zweidimensionalen Spektren DQFCOSY, HMQC und HMBC die eindeutige Zuordnung und damit den Strukturbeweis für **45**. Alle Kopplungen in **45** sind in Tabelle 3-8 aufgeführt. Die Numerierung der Kohlenstoffatome weicht von der bei Fusetani *et al.*²⁹ ab, dort sind die Methyl-Gruppen 14 und 15 vertauscht.

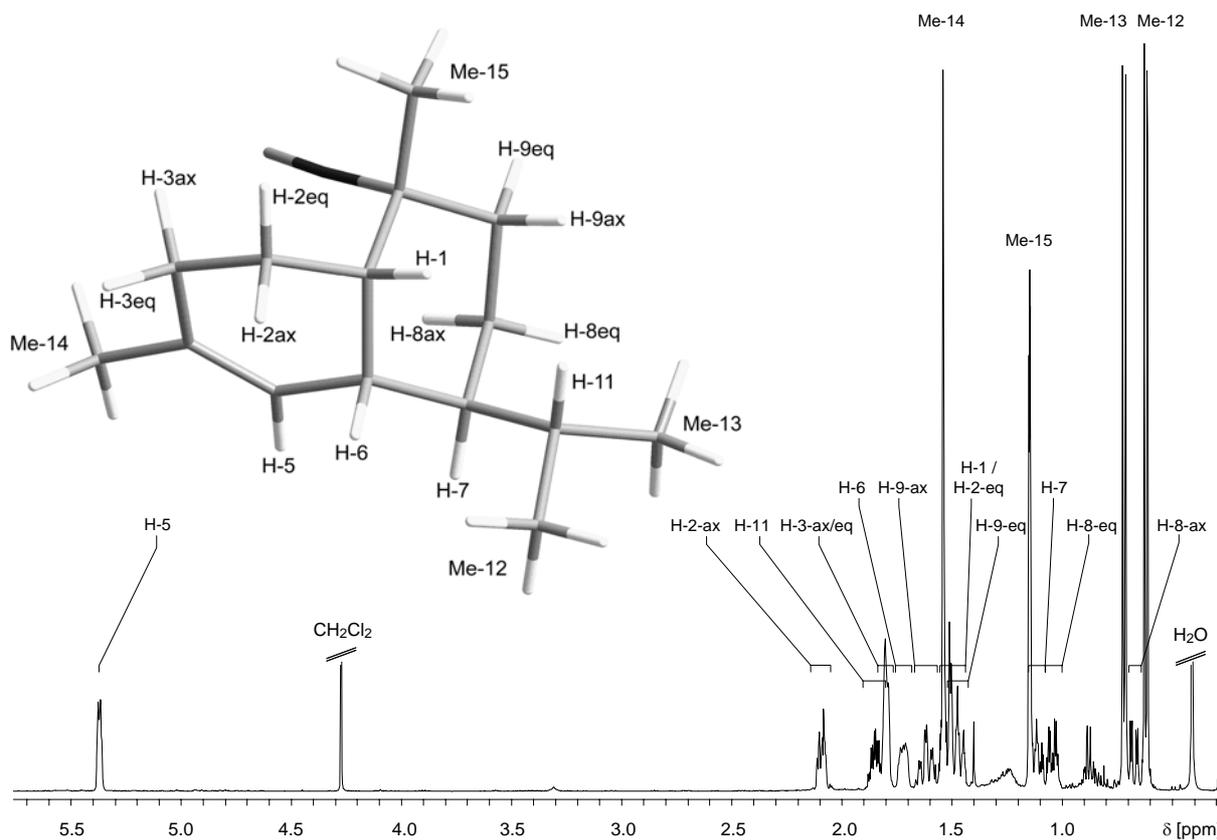


Abbildung 3-34 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **45** (500 MHz, C_6D_6)

Das strukturverwandte Isocyanat **46**, das Isothiocyanat **47** und das Dichlorimin **48** ließen sich nur über die Derivatisierung von **45** nachweisen. Alle drei Verbindungen sind neue Naturstoffe.

Die isolierte Substanzmenge von **45** reichte zur Messung des Vorzeichens des Drehwerts, das mit dem des Literaturwertes bei Fusetani *et al.* übereinstimmt ($[\alpha]_{\text{D}} = +101^\circ$, c 0.52, MeOH)²⁹. Die absolute Konfiguration dieses Isocyanids ist jedoch nicht bekannt.

Die IUPAC-Namen der Vertreter dieses Quartetts lauten:

4-Isocyano-1-(1-methylethyl)-4,7-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydronaphthalin (**45**)

4-Isocyanato-1-(1-methylethyl)-4,7-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydronaphthalin (**46**)

4-Isothiocyanato-1-(1-methylethyl)-4,7-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydronaphthalin (**47**)

4-(*N,N*-Dichlorimino)-1-(1-methylethyl)-4,7-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydronaphthalin (**48**)

Tabelle 3-8 NMR-Daten von **45**

Pos.	¹³ C δ[ppm]	¹ H δ[ppm]	Int.	Mult.	COSY90	HMBC
1	43.96	1.51	1H	m	*	
2	21.06	2.09 (ax)	1H	m	1.80, 1.51	C-1, C-3, C-4, C-6, C-10
		1.51 (eq)	1H	m	*	C-1
3	31.47	1.80	2H	m	2.09, 1.51	C-1, C-2, C-4, C-5
4	134.99	-	-	-	-	-
5	124.20	5.37	1H	m	1.80, 1.72,	C-1/-7*, C-3, C-6, C-14
6	35.39	1.72	1H	m	2.09(s), 1.51, 1.10	C-2, C-1/-7*
7	43.96	1.10	1H	m	1.85(s), 1.72, 1.05, 0.67	C-1, C-5, C-6, C-8, C-11, C-13
8	20.32*	1.05 (eq)	1H	ddd	1.62, 1.48, 1.10, 0.67	C-5, C-6/-9*, C-7, C-10,
		0.67 (ax)	1H	dd	1.62, 1.48(s), 1.10, 1.05	C-7, C-9, C-10, C-11
9	34.80	1.62 (ax)	1H	ddd	1.48, 1.05(s), 0.67	C-1/-7*, C-8, C-10, C-15
		1.48 (eq)	1H	m	1.62, 1.05, 0.67	C-1/-7*, C-8, C-10, C-15
10	61.18	-	-	-	-	-
11	26.94	1.85	1H	qq	0.72, 0.62, 1.10(s)	C-6, C-7, C-8, C-12, C-13
12	15.55	0.62	3H	d	1.85	C-7, C-11/-15*, C-13
13	21.84	0.72	3H	d	1.85	C-7, C-11/-15*, C-12
14	23.88	1.54	3H	s(b)	-	C-1/-7*, C-3, C-4, C-5
15	27.17	1.15	3H	dd	1.62	C-1, C-9, C-10
16	≈157.5	-	-	-	-	-

* Zuordnung aufgrund von Überlagerungen nicht eindeutig.

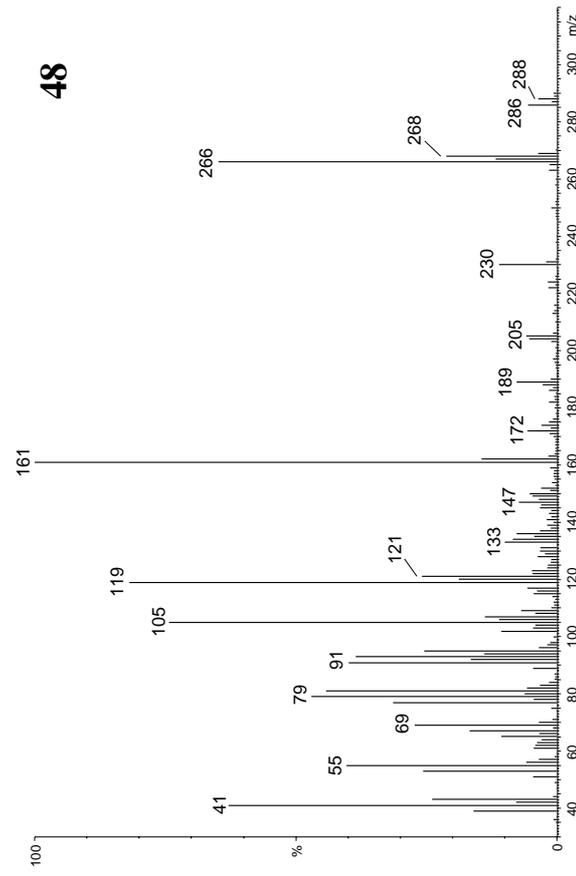
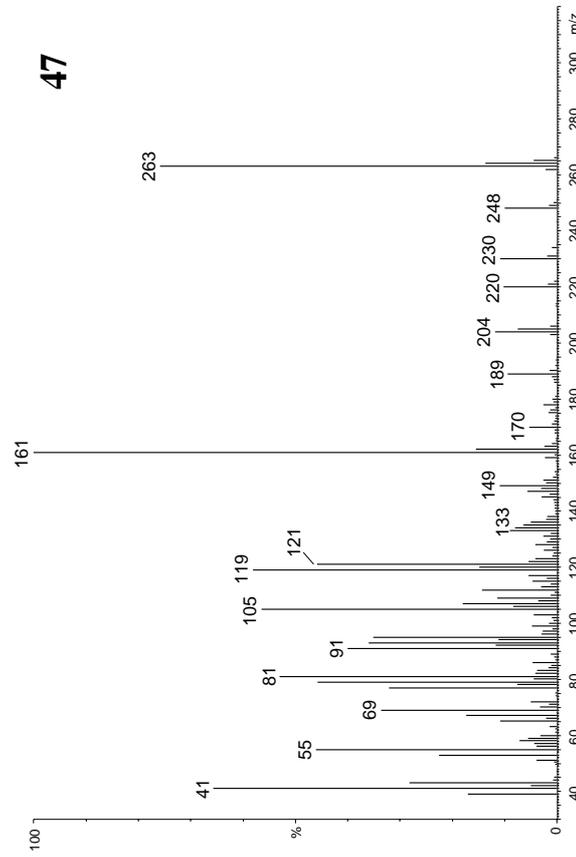
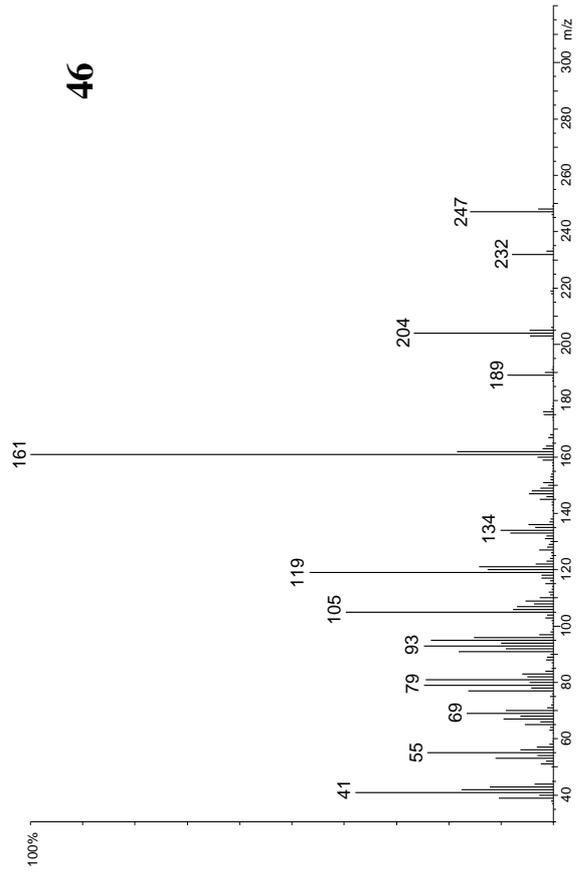
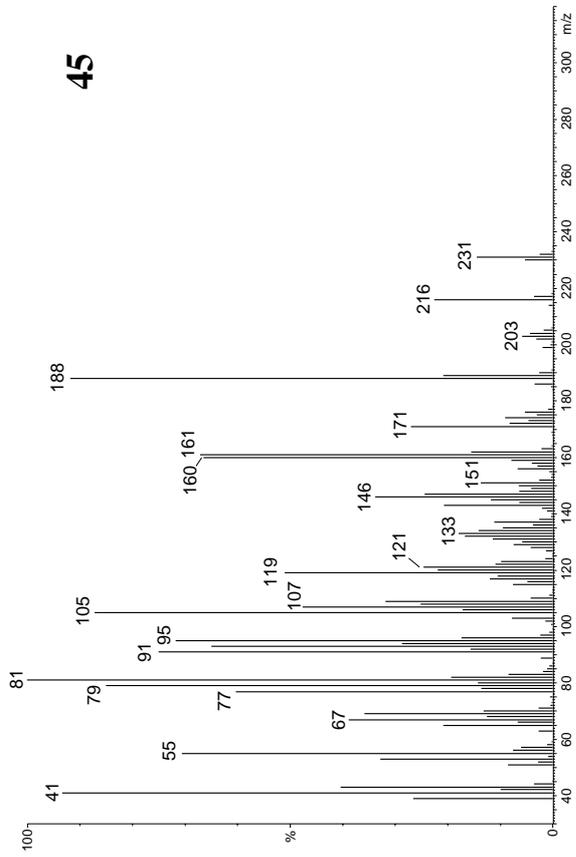


Abbildung 3-35 Massenspektren (EI, 70 eV) der Sesquiterpene 45-48.

3.2.2.6 Eudesmane

In *P. ventilabrum* konnten zwei Serien aus je einem Isocyanid, Isocyanat und einem Isothiocyanat mit Eudesman-Skelett gefunden werden (Abbildung 3-36). **49-51** sowie **52-54** sind *trans*-verknüpfte Decahydronaphthaline, alle tragen die stickstoffhaltige funktionelle Gruppe an C-7. Die beiden Gruppen unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Lage der C-C-Doppelbindung. Während man in **52-54** eine Isopropenylgruppe findet, ist in **49-51** die Methylgruppe C-15 zur Methylengruppe verändert.

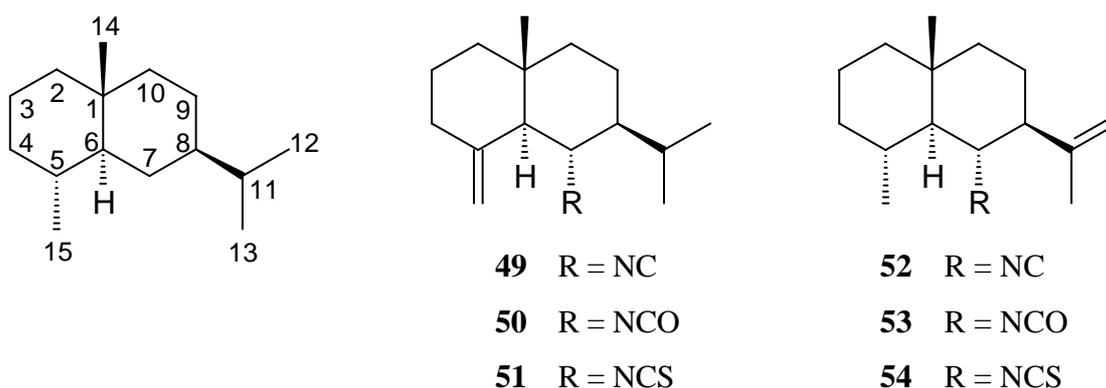


Abbildung 3-36 Eudesman-Skelett und Strukturen der Verbindungen **49-54**

Aus der Serie der 5(15)-Eudesmene konnten das Isocyanid **49** und das Isothiocyanat **51** reingewonnen und vollständig charakterisiert werden. **51** wurde bereits 1993 aus dem Schwamm *Acanthella* sp. isoliert und identifiziert³⁴. Dieses Isothiocyanat, als „Acanthen B“ bezeichnet, kommt dort zusammen mit dem strukturanalogen Chlorid („Acanthen A“) vor. Darüberhinaus wurde in der Hinterkiemerschnecke *Cadlina luteomarginata*, zu deren Nahrung der Schwamm *Acanthella* sp. gehört, das Formamid („Acanthen C“), das aus der Hydrolyse des Isocyanids **49** hervorgeht, gefunden. Das Isocyanid **49** selbst wurde jedoch nicht nachgewiesen und ist ein neuer Naturstoff.

Die NMR-spektroskopische Strukturaufklärung von **49** gelang durch die Zuordnung der COSY90 und HMBC-Kreuzsignale. Im ¹H-NMR-Spektrum fallen die zwei breiten Singulets der Methylengruppe auf, die einen großen Unterschied in ihrer chemischen Verschiebung zeigen. Dies ist auf ihre starre Position und die Entschirmung von H-15-*cis* durch den Anisotropiekegel der Isocyanid-Gruppe zu erklären. Die relative Konfiguration von **49** ließ sich ohne NOESY ermitteln. Das Proton H-6 ist im ¹H-NMR-Spektrum deutlich als Dublett mit ³J = 11 Hz erkennbar, welches auf die Kopplung mit H-7 zurückzuführen ist. Dieses bildet ein Pseudo-Triplett, das aus der Superposition zweier Dubletts mit gleich großen Kopplungskonstanten (³J = 11 Hz) entsteht (Abbildung 3-38). H-6 koppelt sowohl mit H-7, als auch mit

H-8 mit einer großen Kopplungskonstante, die typisch für Protonen in axialer Stellung von Sechsringen in der Sesselkonformation ist. Daraus folgt die *trans*-Verknüpfung der beiden Sechsringe und die äquatoriale Anordnung der Substituenten an C-7 und C-8. Die Methylgruppe Me-14 an C-1 muss schließlich in axialer Position angeordnet sein (Abbildung 3-37).

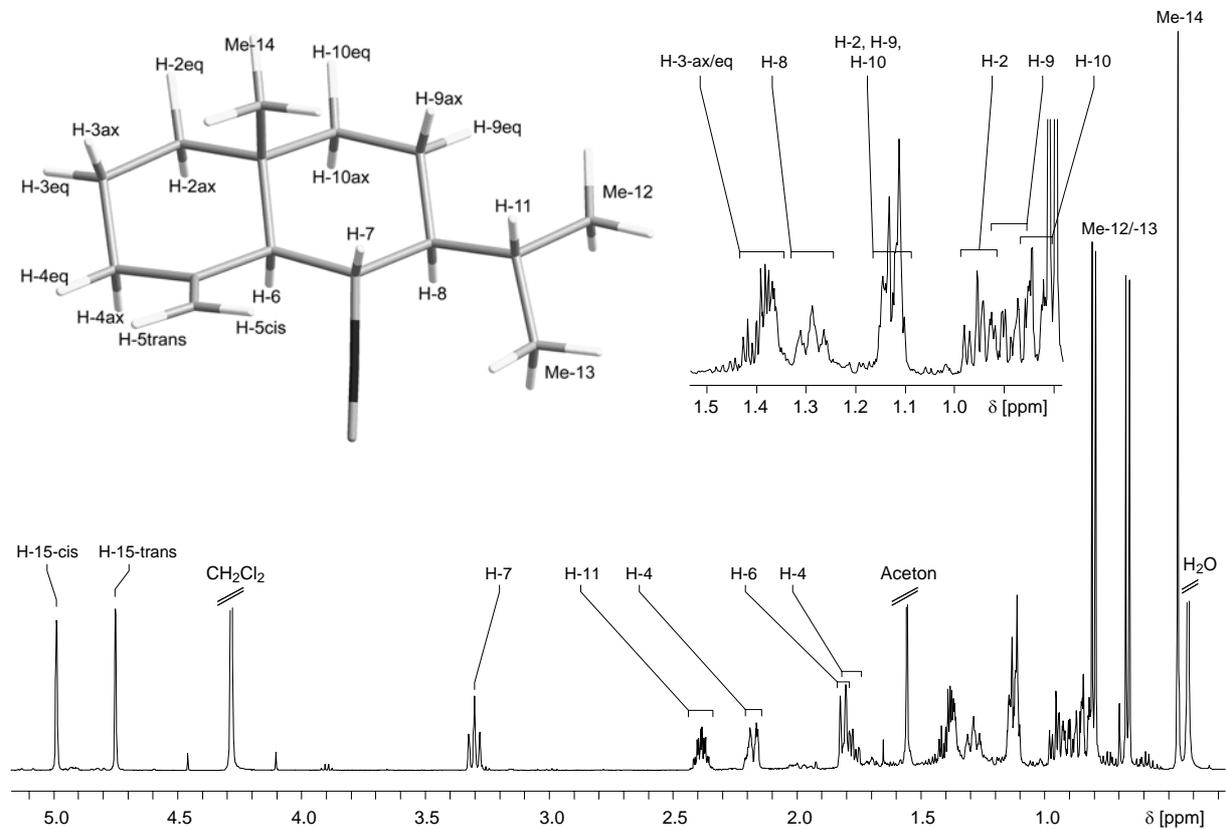


Abbildung 3-37 ^1H -NMR-Spektrum des Isocyanids **49** (500 MHz, C_6D_6).

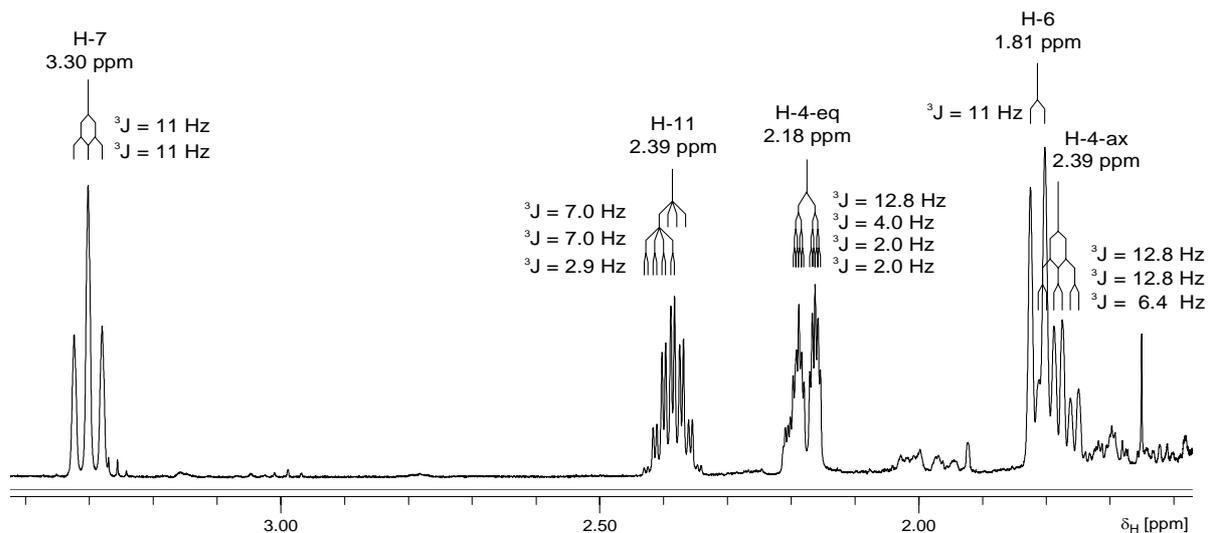


Abbildung 3-38 Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum mit Analyse der Kopplungskonstanten, die die relative Konfiguration in **49** eindeutig beweisen.

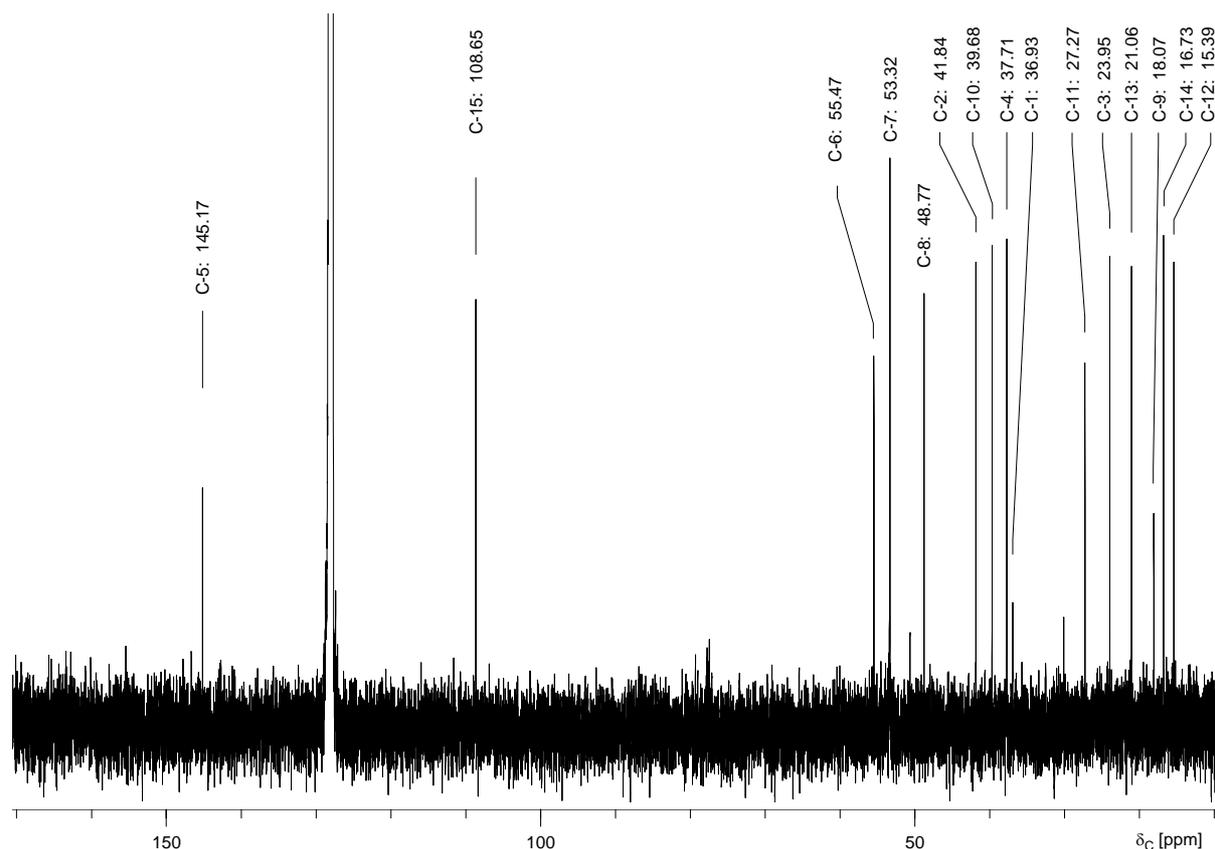


Abbildung 3-39 ^{13}C -NMR-Spektrum des Isocyanids **49** (100.6 MHz, C_6D_6).

Im ^{13}C -NMR Spektrum sieht man die Signale von 15 Kohlenstoffatomen. Das terminale C-Atom der Isocyanid-Gruppe (C-16, $\delta_{\text{C}} = 159.7$) konnte nur protonensensitiv detektiert werden (HMBC, siehe Tabelle 3-9).

Das oben erwähnte Isothiocyanat „Acanthen B“ (**51**) konnte aus Fraktion B (Isocyanate und Isothiocyanate) durch präparative Gaschromatographie isoliert werden. Das ^1H -NMR-Spektrum (Abbildung 3-40) ähnelt aufgrund der Identität der Spinsysteme, gleicher Konnektivitäten und weitestgehender Übereinstimmung der Bindungswinkel dem Spektrum des Isocyanids **49**. Im ^{13}C -Spektrum verschwindet das Signal der Isocyanid-Gruppe (C-16, $\delta_{\text{C}} = 159.7$ ppm), an dessen Stelle das zentrale C-Atom der Isothiocyanat-Gruppe ($\delta_{\text{C}} = 131.4$ ppm) tritt. Dieses konnte aufgrund der geringen Substanzmenge jedoch nur indirekt im HMBC nachgewiesen werden.

Die Struktur von **51** wurden ergänzend durch Umwandlung des Isocyanids **49** in das Isothiocyanat bestätigt. Die Derivatisierung von **49** zum entsprechenden Isocyanat **50** durch Umsetzung mit *m*-CPBA gelang jedoch nicht. Bei allen Versuchen, die Isocyanid-Gruppe zur Isocyanato-Gruppe zu oxidieren, entstanden ausschließlich die Epoxide der Methylengruppe an C-5. Dies kann nicht allein mit der höheren Reaktivität im Vergleich zu den Isocyaniden mit trisubstituierten C-C-Doppelbindungen begründet werden, wie die erfolgreiche Bildung von

Axisocyanat-1 (**25**) aus Axisonitril-1 (**24**) belegt. Wahrscheinlich verhindert die sterische Abschirmung durch die Isopropyl-Gruppe in **49** die Reaktion an der Isocyanid-Gruppe. Das Isocyanat **50** konnte dennoch durch die Analogie des Massenspektrums mit dem Isothiocyanat **51** und durch die zu erwartende Retentionsreihenfolge der Isocyanate **46**, **50** und **53** in *P. ventilabrum* identifiziert werden.

Das strukturanaloge Dichlorimin konnte in *P. ventilabrum* nicht identifiziert werden. Die Derivatisierung des Isocyanids **49** durch Umsetzung mit elementarem Chlor gelang nicht. Das Massenspektrum des Reaktionsprodukts von **49** zeigte die Abspaltung einer Chloromethyl-Gruppe (m/z 252/254, $[M-CH_2Cl]^+$), die nur durch die Bildung des Additionsprodukts an die terminale C-C-Doppelbindung erklärt werden kann.

Tabelle 3-9 NMR-Daten des Isocyanids **49** (Benzol- d_6 , 1H : 500 MHz, ^{13}C : 100.6 MHz).

Pos.	^{13}C	1H	Int	Mult	COSY90	HMBC
1	36.93	-	-	-	-	-
2	41.84	1.13	1H		überlagert mit H-9/H-10	überlagert mit H-9/ H-10
		0.95	1H		H-2, H-3-ax/-eq	C-1, C-3, C-10, C-14
3	23.95	1.35- 1.45	2H	m	H-2-ax/-eq, H-4-ax/eq	C-1, C-2, C-4, C-5
4	37.71	1.78	1H	ddd	H-3-ax/-eq, H-4	C-3, C-5, C-15
		2.18	1H	dddd	H-3-ax/-eq, H-4	C-2, C-3, C-6
5	145.17	-	-	-	-	-
6	55.47	1.81	1H	d, 11 Hz	H-7	C-1, C-5, C-7, C-14, C-15
7	53.32	3.30	1H	dd, 11 Hz	H-6, H-8	C-5, C-6, C-8, C-11, C-16
8	48.77	1.29	1H	m	H-7, H-11, H-9-ax/eq	-
9	18.07	1.12	1H		überlagert mit H-2/H-10	überlagert mit H-2/ H-10
		0.88	1H		H-8	C-1, C-10
10	39.68	1.12	1H		überlagert mit H-2 / H-9	überlagert mit H-2 / H-9
		0.82	1H		überlagert mit Me-13	überlagert mit Me-13
11	27.27	2.39	1H	ddd	H-8, Me-12, Me-13	C-7, C-8, C-9, C-12, C-13
12	15.39	0.67	3H	d	H-11	C-8, C-11, C-13
13	21.06	0.80	3H	d	H-11	C-8, C-11, C-12
14	16.73	0.46	3H	s	-	C-1, C-2, C-6, C-10
15	108.65	4.75	1H		H-4	C-4, C-5, C-6
		4.99	1H		H-4	C-4, C-5, C-6
16	159.7	-	-	-	-	-

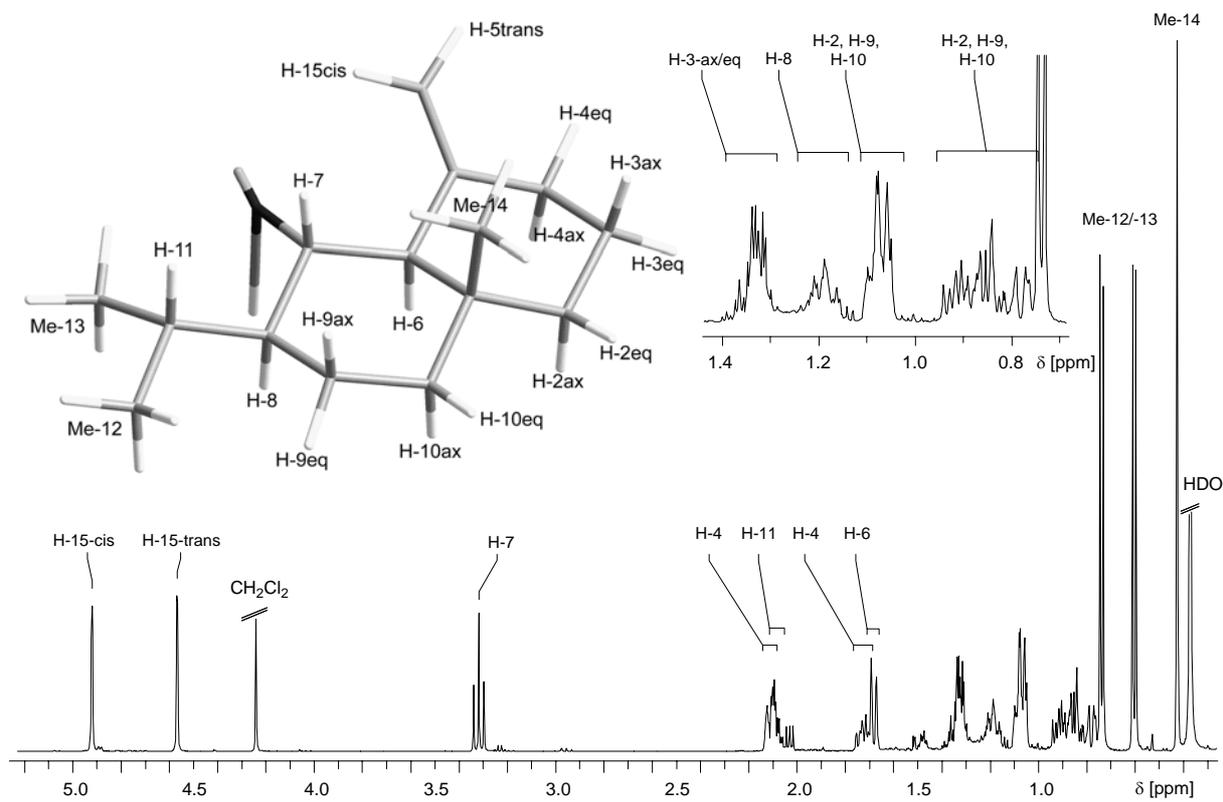


Abbildung 3-40 ¹H-NMR-Spektrum des Isothiocyanats Acanthen B (51). (500 MHz, C₆D₆).

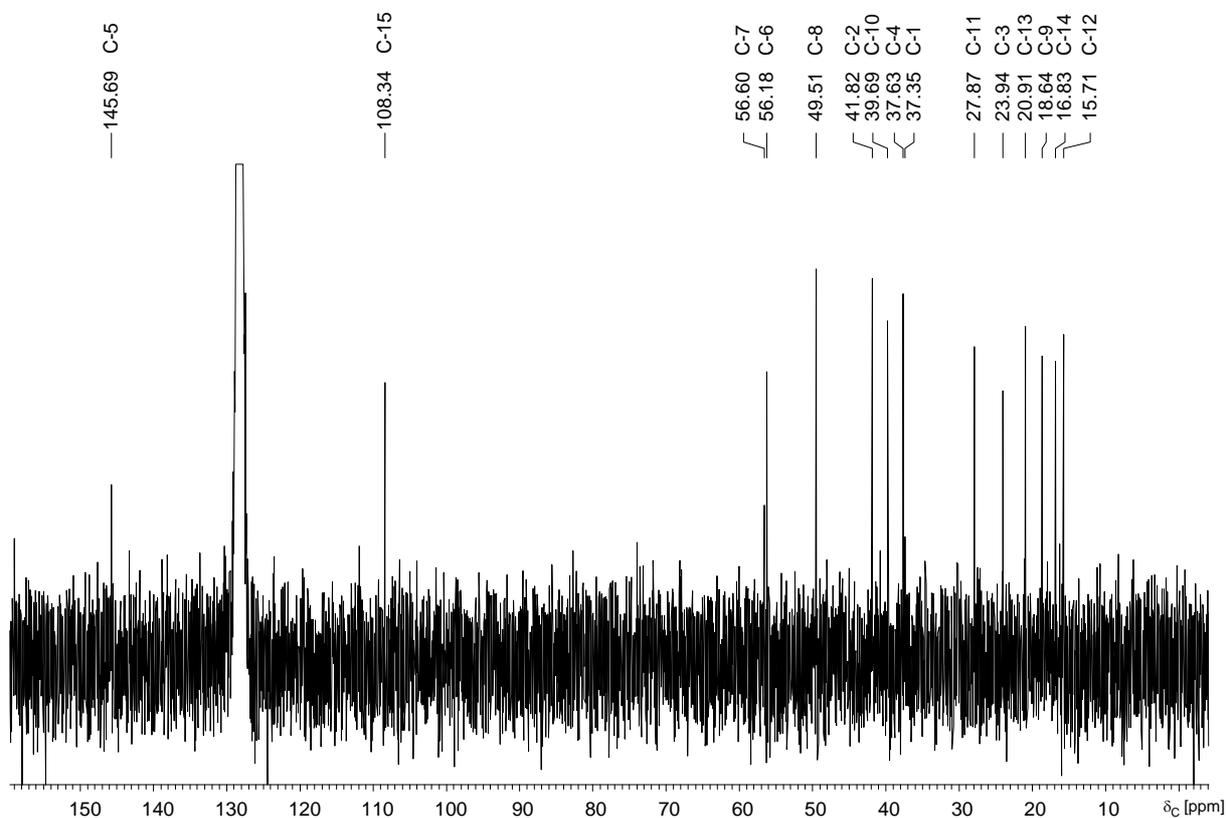


Abbildung 3-41 ¹³C-NMR-Spektrum von Acanthen B (51, 100.6 MHz, C₆D₆)

Tabelle 3-10 NMR-Daten von Acanthen B (**51**, Benzol-d₆, ¹H: 500 MHz, ¹³C: 100.6 MHz)

	¹³ C	¹ H	Int/Mult	COSY90	HMBC
1	37.35	-	-	-	-
2	41.82	0.91	1H, m	überlagert mit H-9 / H-10	C-1, C-3, C-10, C-14
		1.08	1H, m	H-2, H-3-ax/-eq	überlagert mit H-10 und H-9
3	23.94	1.33- 1.41	2H, m	H-2-ax/-eq, H-4-ax/-eq	C-2, C-4, C-5
4	37.63	1.76	1H, m	H-3-ax/-eq, H-4	C-3, C-5, C-15
		2.14	1H, m	H-3-ax/-eq, H-4	überlagert mit H-11
5	145.69	-	-	-	-
6	56.18	1.72	1H, m	H-7	C-1, C-5, C-7, C-14, C-15
7	56.60	3.35	1H, m	H-6, H-8	C-5, C-6, C-8, C-9, C-11, C-16
8	49.51	1.22	1H, m	H-7, H-11, H-9-ax/eq	C-7, C-9, C-10,
9	18.64	0.85	1H, m	H-8	C-1, C-10
9		1.10	1H, m	überlagert mit H-2 / H-10	überlagert mit H-2 und H-10
10	39.69	0.77	1H, m	überlagert mit Me-13	überlagert mit Me-13
10		1.07	1H, m	überlagert mit H-2 und H-9	überlagert mit H-2 und H-9
11	27.87	2.13	1H, dq	überlagert mit H-4	überlagert mit H-4
12	15.71	0.64	3H, d	H-11	C-8, C-11, C-13
13	20.91	0.77	3H, d	H-11	C-8, C-11, C-12
14	16.83	0.46	3H, s	-	C-1, C-2, C-6, C-10
15	108.34	4.60	1H, s	H-4	C-4, C-5, C-6
		4.95	1H, s	H-4	C-4, C-5, C-6
16	131.1	-	-	-	-

Die absolute Konfiguration der Serie **49-51** wurde nicht bestimmt, die IUPAC-Namen der in Abbildung 3-36 dargestellten Enantiomere lauten:

(1*S*,2*S*,4*aR*,8*aS*)-1-Isocyano-2-(1-methylethyl)-4*a*-methyl-8-methylendecahydronaphthalin (**49**), (1*S*,2*S*,4*aR*,8*aS*)-1-Isocyanato-2-(1-methylethyl)-4*a*-methyl-8-methylendecahydronaphthalin (**50**) und (1*S*,2*S*,4*aR*,8*aS*)-1-Isothiocyano-2-(1-methylethyl)-4*a*-methyl-8-methylendecahydronaphthalin (**51**).

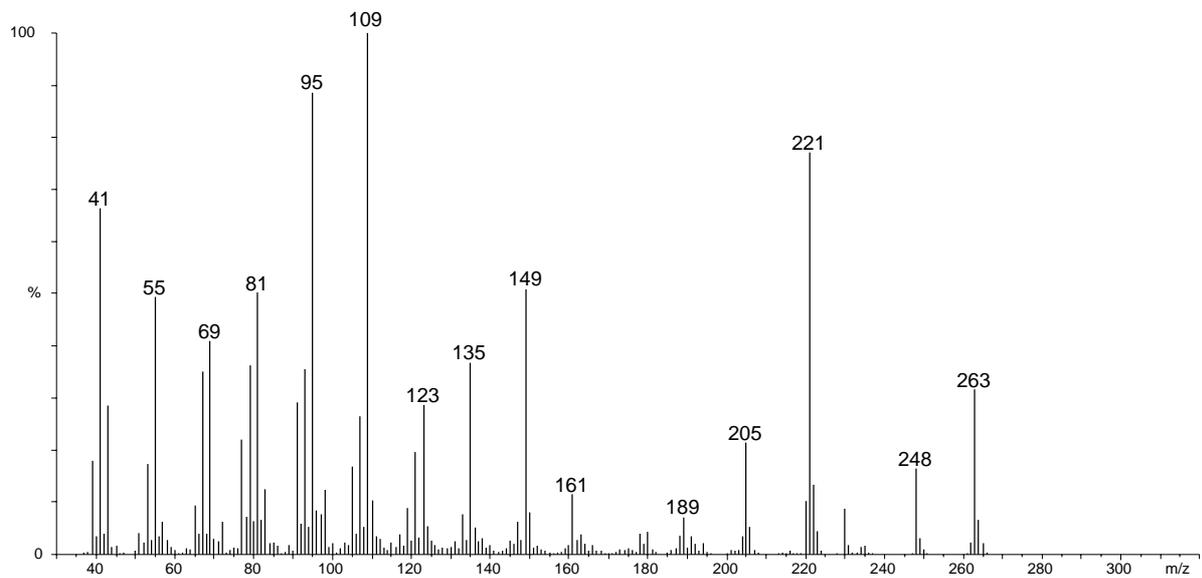
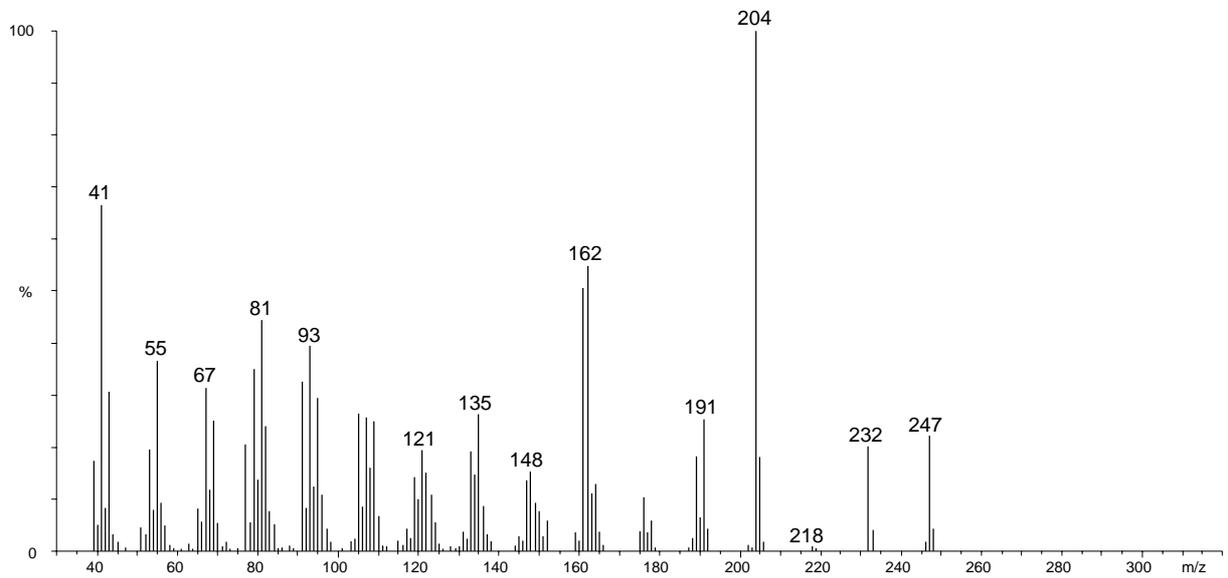
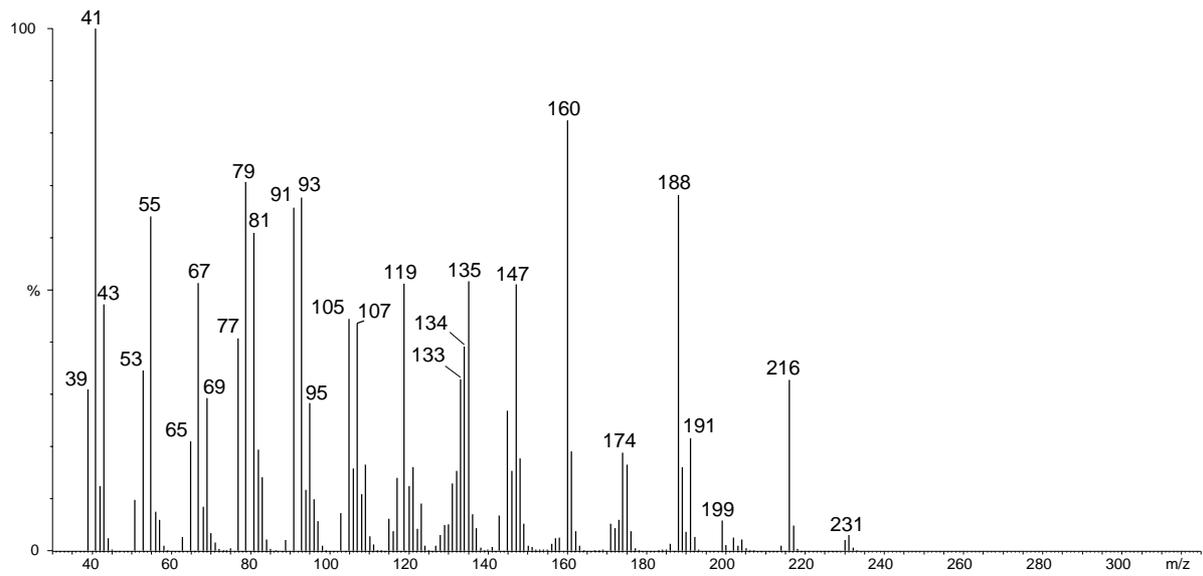


Abbildung 3-42 Massenspektren (EI, 70eV) der Eudesmanderivate **49-51**.

Von den 11-Eudesmenen konnten sowohl das Isocyanid **52**, als auch das Isocyanat **53** durch präparative Gaschromatographie isoliert und NMR-spektroskopisch charakterisiert werden. Das Isocyanid **52** ist identisch mit „Acanthellin-1“, das zusammen mit dem Isothiocyanat **54** im Schwamm *Acanthella acuta* vorkommt³⁵. Diese Verbindungen konnten auch aus dem bereits erwähnten Schwamm *Axinella cannabina* (Axisonitril-1 und -3, S.15) isoliert werden³⁶. Bisher unbekannt ist dagegen das Isocyanat **53**. Dieses Isocyanat ist die Hauptkomponente der Fraktion B (Abbildung 3-4).

Die Strukturaufklärung von Acanthellin-1 (**52**) gelang durch dessen Isolierung mittels präparativer Gaschromatographie und der Charakterisierung anhand ein- und zwei-dimensionaler NMR-Experimente. Die ¹H-NMR-Signale der Methylengruppe der C-C-Doppelbindung, die in **52** in der Isopropenyl-Seitenkette liegt, erscheinen im ¹H-NMR-Spektrum (Abbildung 3-43) bei fast gleicher chemischer Verschiebung. Dies ist auf die freie Drehbarkeit der Isopropenyl-Gruppe zurückzuführen, während die konformativ starre Methylengruppe in **49** zwei weit auseinander liegende ¹H-NMR-Signale erzeugt.

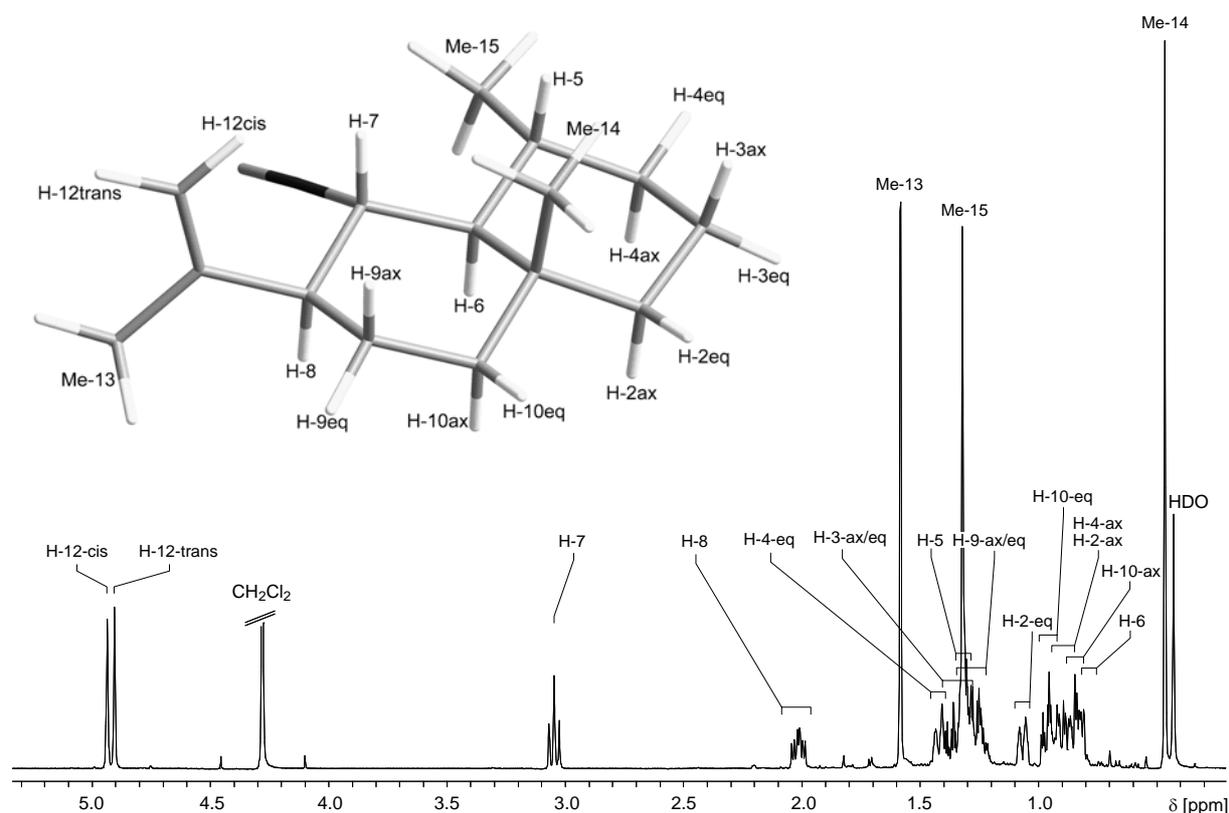


Abbildung 3-43 ¹H-NMR-Spektrum von Acanthellin-1 (**52**, 500 MHz, C₆D₆).

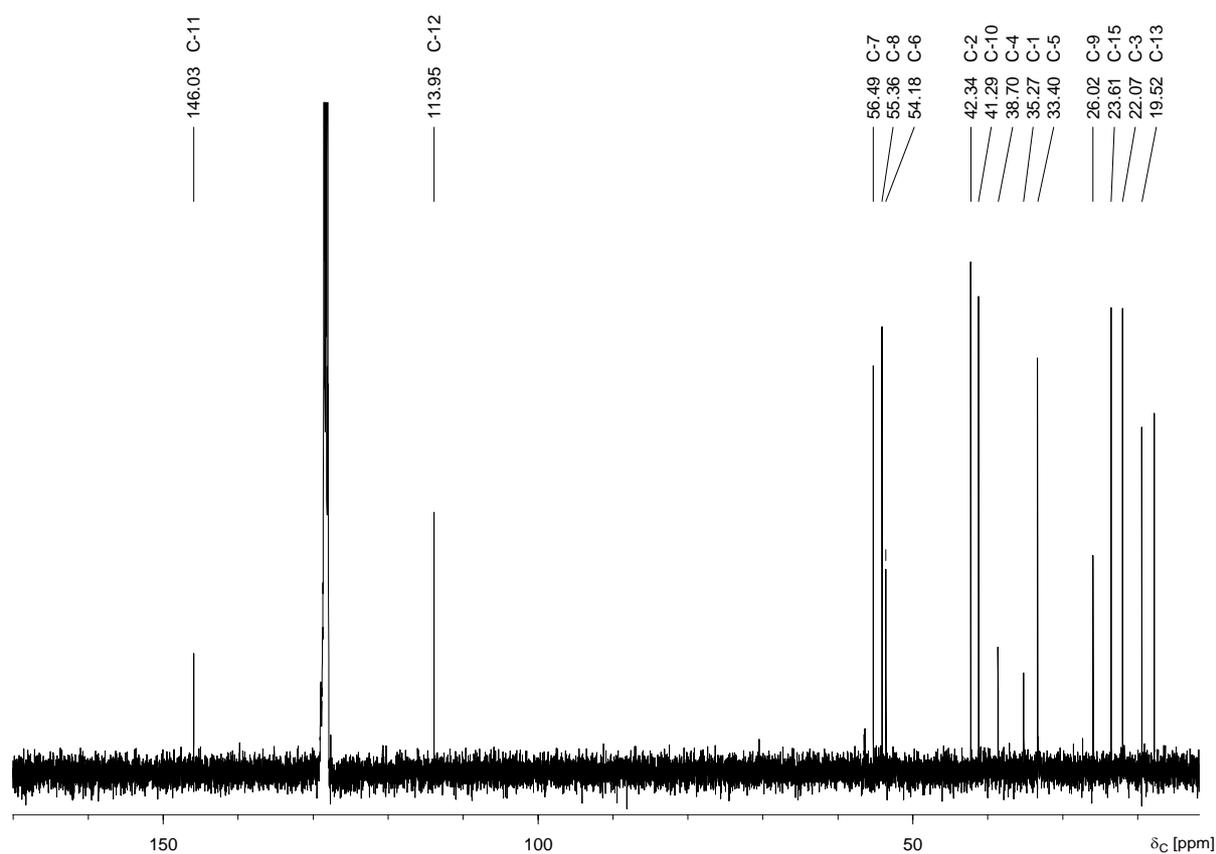


Abbildung 3-44 ^{13}C -NMR von Acanthellin-1 (**52**, 100.6 MHz, C_6D_6).

Die ^{13}C -NMR-Signale von Acanthellin-1 (**52**) sind gut genug separiert, um im HMQC und HMBC eine zweifelsfreie Zuordnung zu erlauben. Die Struktur von **52** konnte so bestätigt werden.

Tabelle 3-11 NMR-Daten des Isocyanids **52** (Acanthellin-1, C_6D_6 , ^1H : 500 MHz, bzw. ^{13}C : 100.6 MHz)

	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	Int., Mult	COSY90	HMBC
1	35.27	-	-	-	-
2	42.34	0.88 (ax)	1H, m	H-2-eq, H-3-ax	C1-, C-3, C-4, C-6, C-10, C-14
		1.07 (eq)	1H, m	H-2-ax, H-3-ax, H-3-eq	C-1, C-3, C-4, C-10, C-14
3	22.07	1.27-1.40	2H, m	H-2-ax, H-3-ax/eq, H-4-ax	C-1, C-2, C-4, C-5
4	38.70	0.92 (ax)	1H, m	H-3-ax, H-4-eq, H-5	C-2, C-3, C-5, C-6
		1.43 (eq)	1H, m	H-4-ax	
5	33.40	1.32	1H, m	H-4-ax, H-6, Me-15	C-6
6	54.18	0.83	1H, m	H-5, H-7	C-1, C-2, C-4, C-5, C-7, C-8, C-14, C-15
7	56.49	3.05	1H, dd, $J = 10.7 \text{ Hz}$	H-6, H-8	C-5, C-6, C-8, C-11, C-16

8	55.36	2.02	1H, ddd, J=10.7 Hz, J=10.7 Hz, J=4.4 Hz	H-7, H-9-ax, H-9-eq	C-8, C-9, C-11, C-12, C-13
9	26.02	1.20-1.27	2H, m	H-8, H-9-ax, H-10-ax/eq	C-1, C-7, C-8, C-10, C-11
10	41.29	0.85 (ax) 0.97 (eq)	1H, m 1H, ddd	H-9-ax, H-10-eq H-9-eq, H-9-ax, H- 10-ax,	C-1, C-8, C-9, C-14 C-1, C-2, C-5, C-6, C- 7, C-8, C-9, C-11, C- 14
11	146.03	-	-	-	-
12	113.95	4.91 <i>trans</i> 4.94 <i>cis</i>	1H, s 1H, s	Me-13 Me-13	C-8, C-11, C-13 C-8, C-11, C-13
13	19.52	1.58	3H, s	H-12-cis/trans	C-8, C-11, C-12
14	17.83	0.47	3H, s	H-2-ax, H-10-ax	C-1, C-2, C-6, C-10
15	23.61	1.32	3H, d	H-5	C-5, C-4, C-6
16	162.83	-	-	-	-

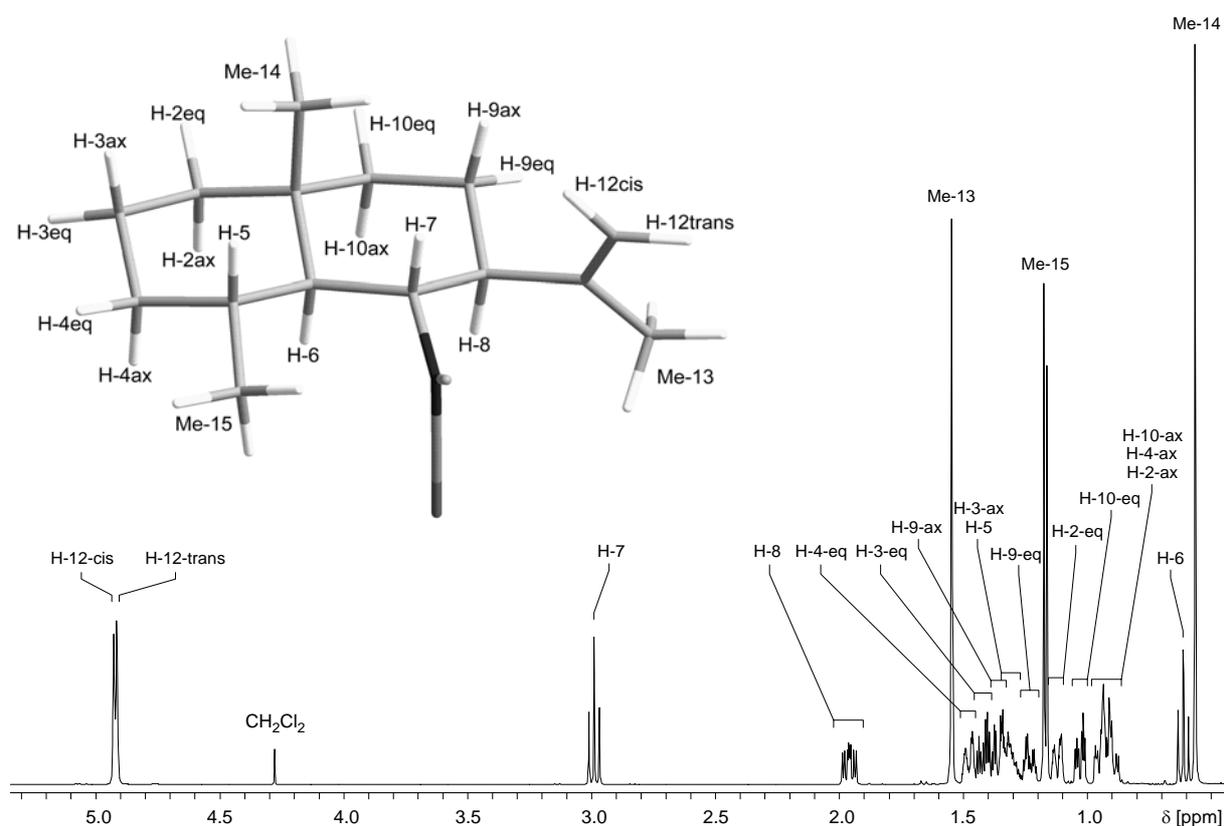


Abbildung 3-45 $^1\text{H-NMR}$ des neuen Isocyanats **53** (500 MHz, C_6D_6)

Im $^1\text{H-NMR}$ des Isocyanats **53** ist aufgrund des Anisotropiekegels der linearen Isocyanat-Gruppe eine bemerkenswerte Hochfeldverschiebung für H-6 ($\delta_{\text{H}} = 0.61$ ppm) zu beobachten. Dieses Proton erscheint im Spektrum des strukturanalogen Isocyanids **52** bei $\delta_{\text{H}} = 0.83$ ppm, wo

es mit anderen Protonen überlagert und die Multiplettstruktur überdeckt wird. Das Signal dieses Protons ist essentiell für die Ermittlung der relativen Konfiguration beider Verbindungen (**52** und **53**). H-6 koppelt sowohl mit H-5 als auch mit H-7 jeweils mit einer Kopplungskonstanten von 11 Hz. Dies gilt auch für H-7 mit H-6 und H-8, so dass auch hier die *trans*-Anordnung der Wasserstoffe H-5, H-6, H-7 und H-8, und damit die in Abbildung 3-45 dargestellte relative Konfiguration von **53** bewiesen ist. Aufgrund der hohen Konzentration in *P. ventilabrum* konnte von **53** ein NOE-Spektrum aufgenommen werden. Dieses bestätigte nochmals die relative Konfiguration, die anhand der zuvor erwähnten Betrachtungen der Kopplungskonstanten ermittelt wurde.

Die absolute Konfiguration von **52** (Acanthellin-1) und **53** wurde nicht bestimmt, jedoch konnte von **52** das Vorzeichen des Drehwerts gemessen werden. Dieses stimmte mit dem Literaturwert für Acanthellin-1 ($[\alpha]_D = -41.2^\circ$, $c = 5$) überein. Die in Abbildung 3-36 dargestellte absolute Konfiguration der Verbindungen **52-54** kann daher angenommen werden.

Die IUPAC-Namen lauten: (1*S*,2*S*,4*aR*,8*R*,8*aS*)-1-Isocyano-4*a*,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-decahydronaphthalin (**52**), (1*S*,2*S*,4*aR*,8*R*,8*aS*)-1-Isocyanato-4*a*,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-decahydronaphthalin (**53**) und (1*S*,2*S*,4*aR*,8*R*,8*aS*)-1-Isothiocyanato-4*a*,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-decahydronaphthalin (**54**).

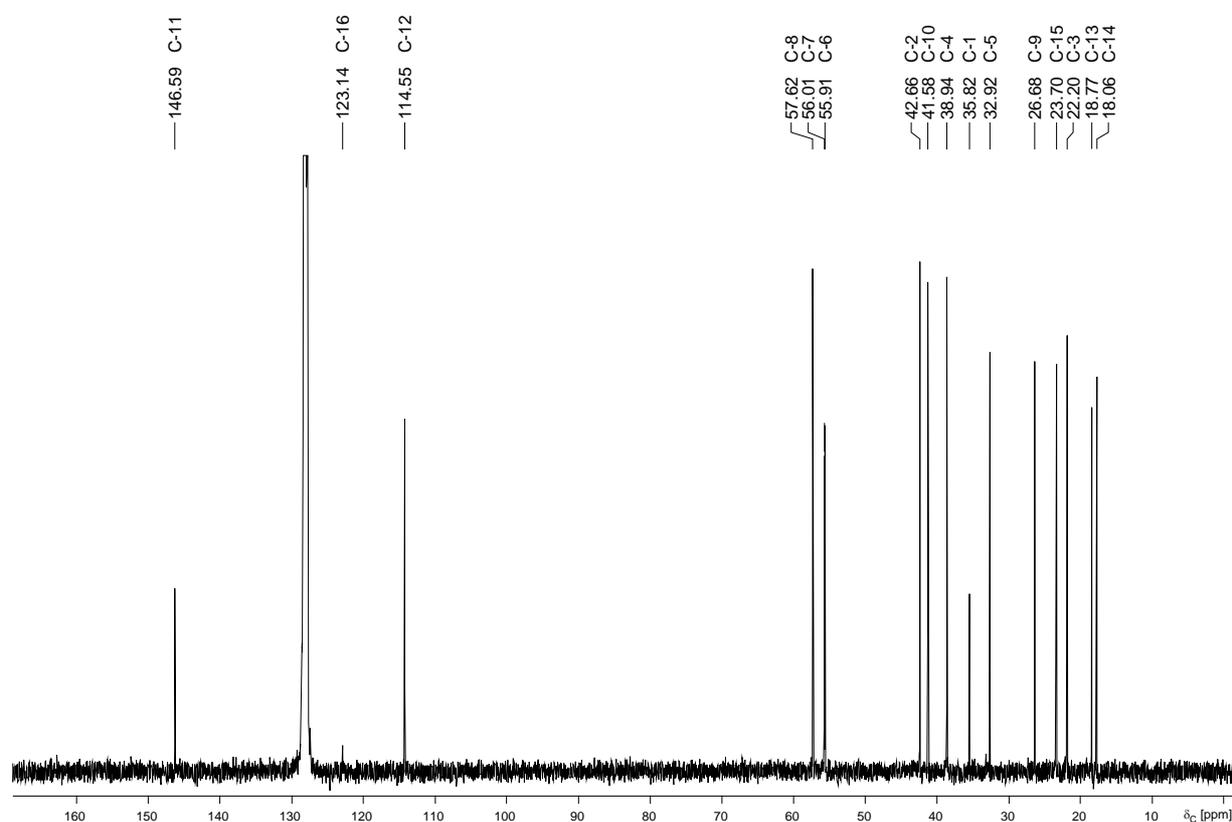


Abbildung 3-46 ^{13}C -NMR des Isocyanats **53** (100.6 MHz, C_6D_6)

Tabelle 3-12 NMR-Daten des Isocyanats (**50**) (C₆D₆, ¹H: 500 MHz, bzw. ¹³C: 100.6 MHz)

	δC [ppm]	δH [ppm]	Int/Mult	COSY90	HMBC	NOESY
1	35.82	-	-	-	-	-
2	42.66	0.94 (ax)	1H, m	H-2-eq, H-3-ax	C-1-, C-3, C-4, C-6, C-10, C-14	H-2-eq, H-3-eq, H-6
		1.12 (eq)	1H, m	H-2-ax, H-3-ax, H-3-eq	C-1, C-3, C-4, C-10, C-14	H-2-ax, H-3-eq, H-10-eq, Me-14
3	22.20	1.34 (ax)	1H, m	H-2-ax, H-3-eq	C-1, C-2, C-4, C-5	H-2-eq, Me-14
		1.42 (eq)	1H, m	H-2-ax, H-3-ax, H-4-ax	C-1, C-2, C-4, C-5	H-4-eq
4	38.94	0.93 (ax)	1H, m	H-3-ax, H-4-eq, H-5	C-2, C-3, C-5, C-6,	H-4-eq, H-6, Me-15
		1.48 (eq)	1H, m	H-4-ax	C-2, C-3, C-5, C-6	H-4-ax, H-5, Me-15
5	32.92	1.30	1H, m	H-4-ax, H-6, Me-15	C-6	H-2-eq, H-4-eq, Me-14
6	55.91	0.61	1H, dd	H-5, H-7	C-1, C-2, C-4, C-5, C-7, C-8, C-14, C-15	H-2-ax, H-4-ax, H-8, H-10-ax
7	56.01	2.99	1H, dd, J = 10.7 Hz	H-6, H-8	C-5, C-6, C-8, C-9, C-11, C-12	H-3-ax., H-5, H-12-trans, Me-13, Me-14, Me-15
8	57.62	1.96	1H, ddd, J ₁ = J ₂ = 10.5 Hz, J = 4.4 Hz	H-7, H-9-ax, H-9-eq	C-6, C-7, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13	H-6, H-10-ax, H-9-eq, H-12-trans
9	26.68	1.23 (eq)	1H, m	H-9-ax, H-10-eq, H-10-ax	C-1, C-7, C-8, C-10, C-11	H-9-ax, H-10-eq
		1.38 (ax)	1H, m	H-8, H-10-ax, H-10-eq	C-1, C-7, C-8, C-10, C-11	H-9-eq, Me-14, Me-13
10	41.58	0.92 (ax)	1H, m	H-9-ax, H-10-eq	C-1, C-8, C-9, C-14	H-10-eq
		1.02 (eq)	1H, m	H-9-eq, H-9-ax, H-10-ax,	C-1, C-2, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-11, C-14	H-2-eq, H-9-ax, H-9-eq, H-10-ax, Me-14
11	146.59	-	-	-	-	-
12	114.55	4.92 trans	3H, s (b)	Me-13	C-8, C-11, C-13	H-7, H-8, H-9-eq, H-9-ax
		4.93 cis	1H, dd, beide J < 1 Hz	Me-13	C-8, C-11, C-13	Me-13
13	18.77	1.54	3H, s	H-12-cis/trans	C-8, C-11, C-12	H-7, H-12-cis
14	18.06	0.56	3H, s	H-2-ax, H-10-ax	C-1, C-2, C-6, C-10	H-3-ax, H-5, H-7, H-9-ax
15	23.70	1.16	3H, d	H-5	C-5, C-4, C-6	H-4-ax, H-4-eq, H-5, H-6
16	123.14	-	-	-	-	-

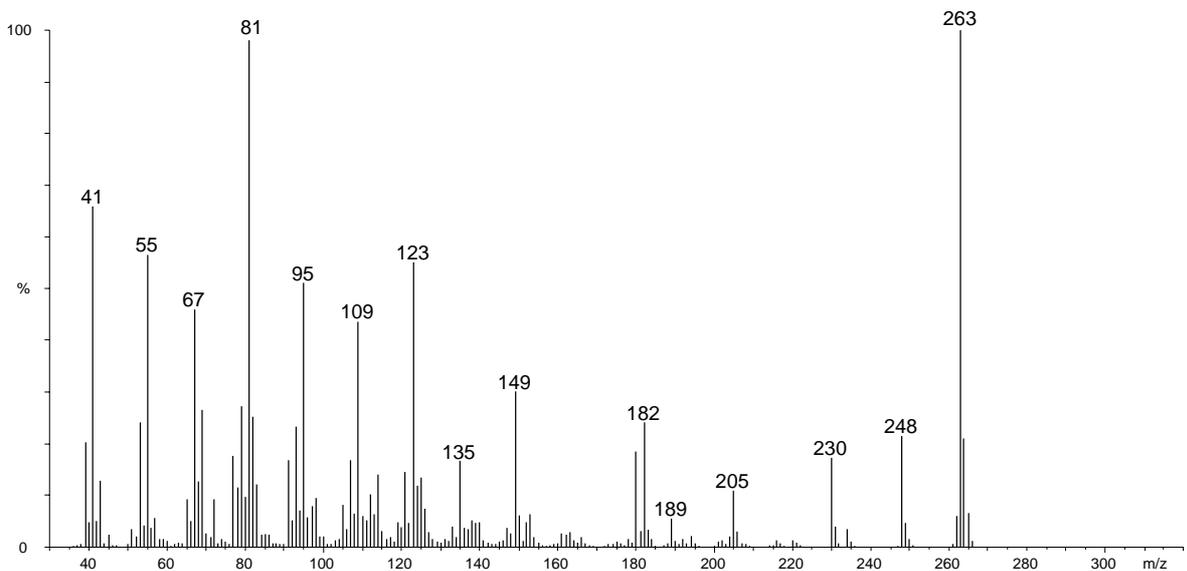
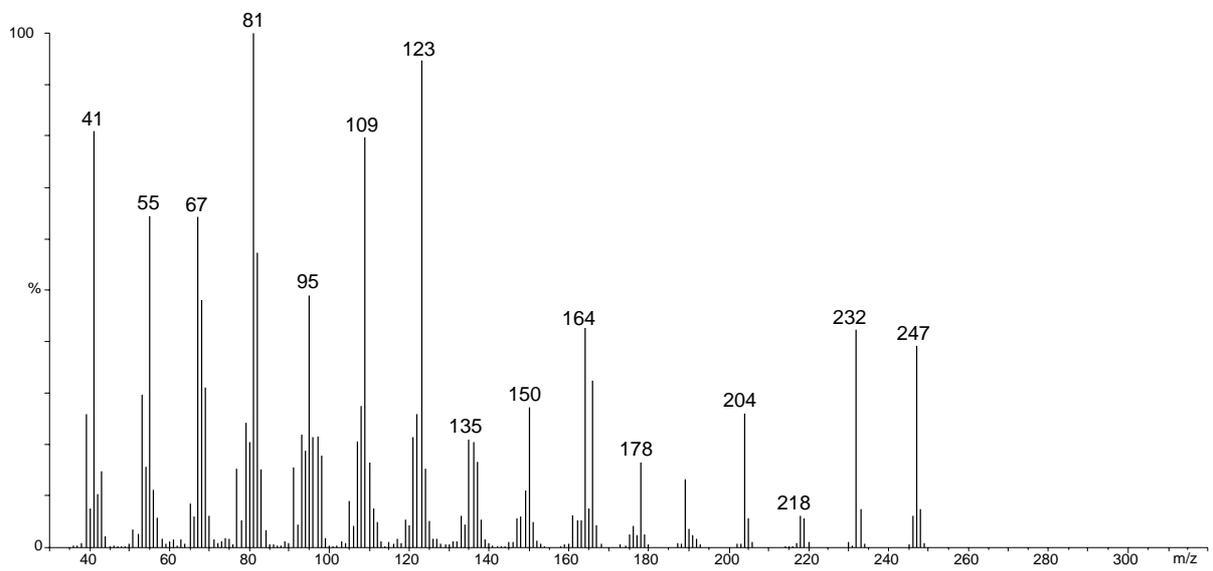
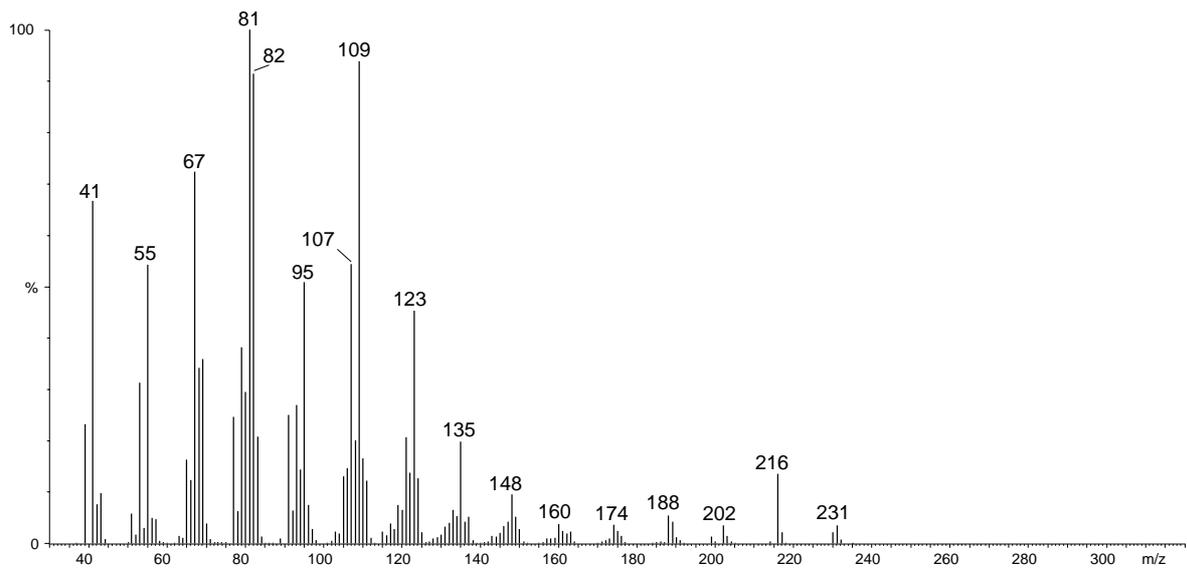


Abbildung 3-47 Massenspektren (EI, 70 eV) der 11-Eudesmene **52-54**.

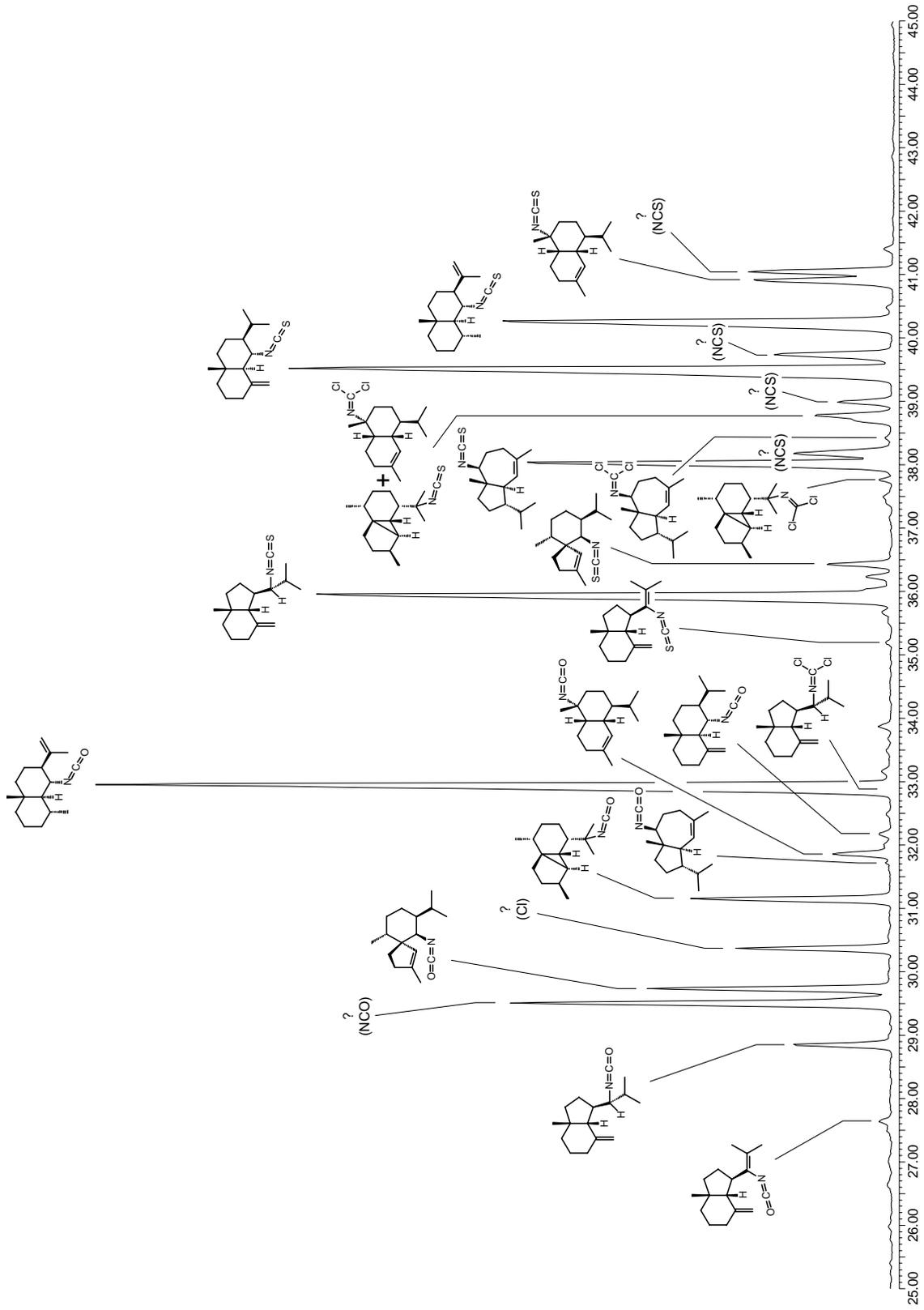


Abbildung 3-48 Gaschromatogramm der Fraktion B (Abbildung 3-4), in der die Isocyanate, Isothiocyanate und Dichlorimine enthalten sind.

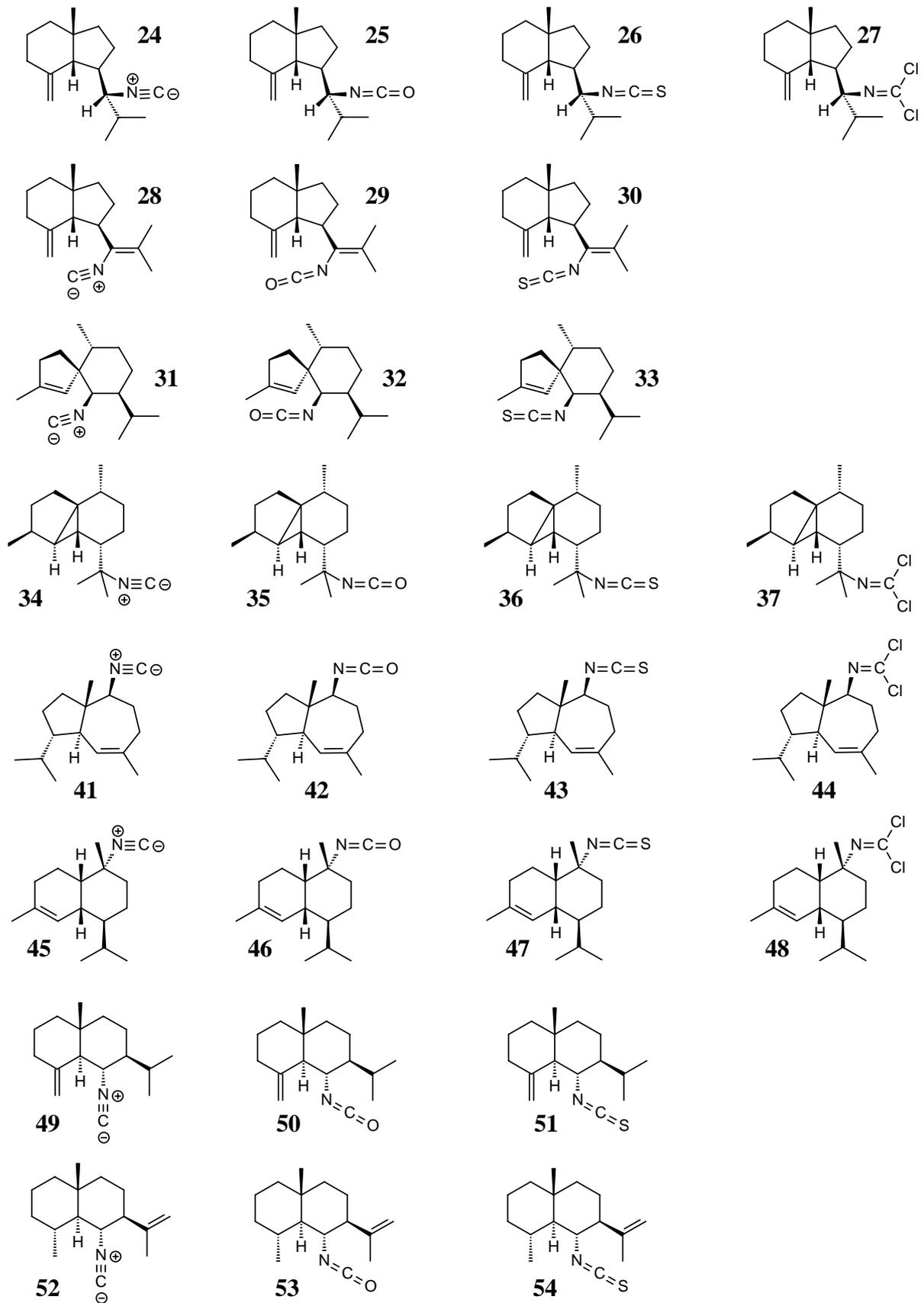
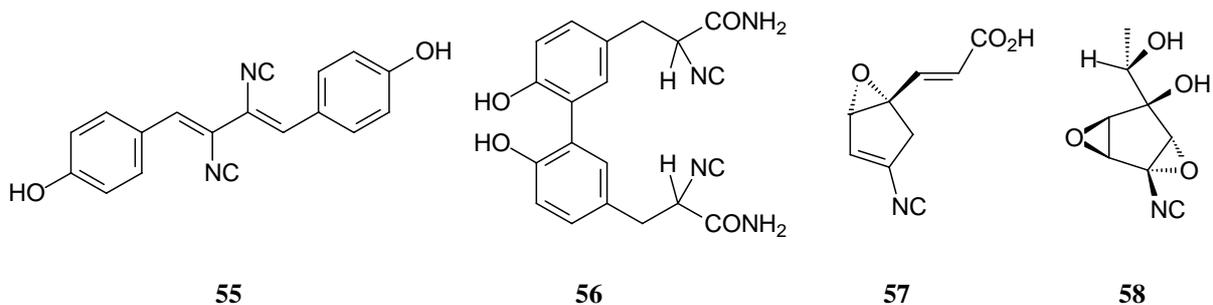


Abbildung 3-49 Übersicht aller Sesquiterpen-Isocyanide, -Isocyanate, -Isothiocyanate und -Dichlorimine, die in *P. ventilabrum* identifiziert werden konnten.

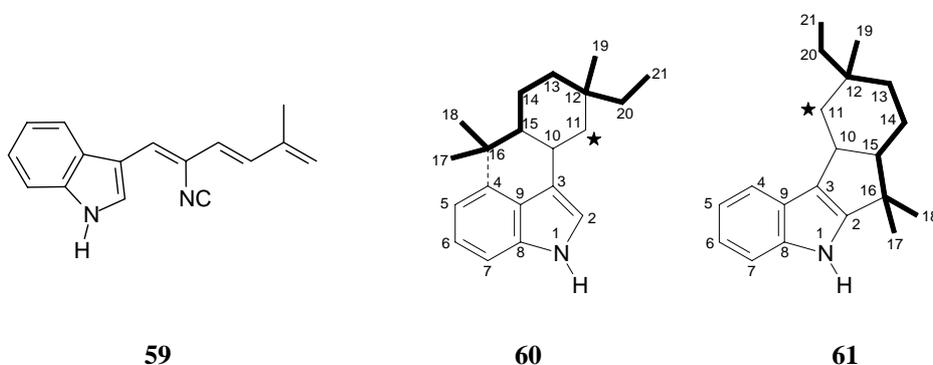
3.3 Diskussion der Ergebnisse

3.3.1 Isocyanide als Naturstoffe

Isocyanide oder „Isonitrile“ wurden sowohl in terrestrischen, als auch in marinen Organismen gefunden. Eine hervorragende und die wohl umfassendste Übersicht bis zum Jahr 2000 hat Chang zusammengestellt³⁷. Daher sei hier nur eine Auswahl bekannter Strukturen angeführt, um einen Einblick in die Diversität dieser Substanzklasse zu geben.



Das erste beschriebene natürlich vorkommende Isocyanid ist das Xanthocillin (**55**). Es wurde 1950 aus dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* von Rothe isoliert³⁸, der auch die antibiotische Aktivität der Verbindung erkannte. Die Strukturaufklärung erfolgte 1957 durch Hagedorn und Tönjes^{39,40}. Das Xanthocillin ist Stammverbindung und Namensgeber der sog. „Xanthocilline“, die ebenfalls aus Pilzen isoliert werden konnten. Sie unterscheiden sich von **55** unter anderem durch höhere Hydroxylierung der aromatischen Systeme, sowie teilweise Methylierung der phenolischen OH-Gruppen. Ebenso wie **55** sind die Hazimycine (**56**) dimere Tyrosinderivate. Alle Stereoisomere dieser Biphenyle wurde im Mikroorganismus *Micromonospora echinospora* var. *challisensis* gefunden⁴¹. Einen gänzlich anderen Strukturtyp repräsentieren das flüchtige Dermadin (**57**) und das höher oxygenierte Trichoviridin (**58**). Dennoch leiten sie sich biosynthetisch ebenfalls vom Tyrosin ab, aus dem sie durch Oxidation und Umlagerung des aromatischen Systems gebildet werden⁴².

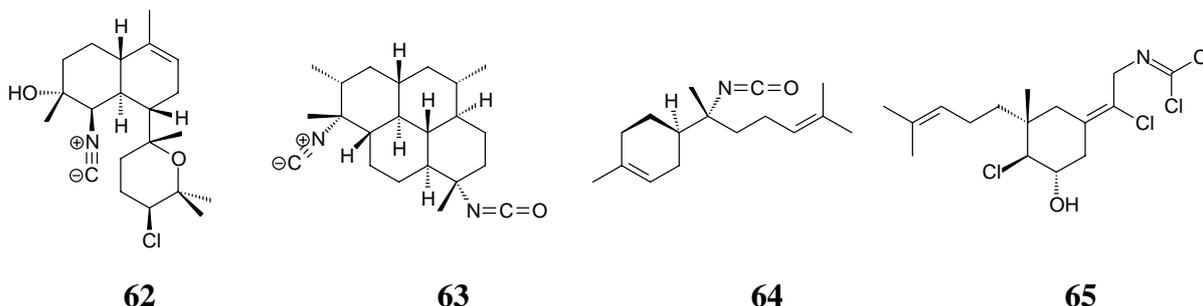


Brassilidin A (**59**) aus einem Actinomyceten⁴³ lässt sich aus der Kondensation von Tryptophan und einer Isopreneinheit herleiten. Die Hapalindole (**60**) und Fischerindole (**61**), die an Position

11 (★) eine Isocyanidgruppe tragen, sind Monoterpen-Alkaloide, ebenfalls mit einer tryptophanbasierten Untereinheit. Zahlreiche Vertreter mit Variationen in der Stereochemie, weiteren Unsatigungen, Oxygenierung und Chlorierung des Systems sind aus terrestrischen Blaualgen beschrieben⁴⁴⁻⁴⁶.

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten terrestrischen Isocyaniden, die fast alle aus dem Aminosäurestoffwechsel hervorgehen, sind alle Isocyanide aus marinen Invertebraten terpenoiden Ursprungs. Das erste Sesquiterpen-Isocyanid, das in einem Schwamm gefunden wurde, ist das Axisonitril-1 (**24**), das in *Axinella cannabina* zusammen mit dem strukturanalogen Axisothiocyanat-1 (**26**) und dem Formamid vorkommt^{22,23}. Bis heute sind zahlreiche weitere Sesquiterpen-Isocyanide mit teilweise neuen Skeletten beschrieben. Häufig findet man sie wie **24** mit den Isothiocyanaten und Formamiden vergesellschaftet. Auch Diterpen-Isocyanide sind bekannt. Diese haben oft zusätzlich funktionelle Gruppen, wie das Pyran **62**⁴⁷ aus dem Schwamm *Phakellia pulcherrima*.

Selten sind dagegen Isocyanate und Dichlorimine. Neben einigen Diterpen-Isocyanaten wie **63**⁴⁸ ist **64** das einzige bisher bekannte Sesquiterpen-Isocyanat⁴⁹. Das zuerst beschriebene der wenigen bekannten Dichlorimine^{50,51} ist das Sesquiterpen **65**.



Die Herkunft der Isocyanidgruppe hat eine vieldiskutierte Frage aufgeworfen⁵². Inkorporation von Cyanid konnte nachgewiesen werden⁵³. Auch die gegenseitige Überführung von Isocyaniden und Isothiocyanaten wird angenommen. Auffallend ist das sehr häufige gemeinsame Vorkommen von strukturanalogen Isothiocyanaten und Isocyaniden in marinen Schwämmen. Ob die stets begleitenden Formamide Naturstoffe oder Artefakte durch extraktionsbedingte Hydrolyse der Isocyanide sind, konnte bisher nicht geklärt werden⁵⁴.

3.3.2 Bedeutung der Sekundärmetabolite in *P. ventilabrum*

Neben den bekannten Triaden aus Isocyaniden, Isothiocyanaten und Formamiden sind die Quartette aus Isocyaniden, Isocyanaten, Isothiocyanaten und Dichloriminen ein neues Motiv im Sesquiterpen-Inventar axinellider Schwämme. Die wenigen bekannten Dichlorimine sind bisher nur als vereinzelte Inhaltsstoffe einiger Schwammarten beschrieben worden. Ein gemeinsamer biosynthetischer Hintergrund mit den Sesquiterpen-Isocyaniden wird zwar allgemein angenommen^{51,55}, jedoch zeigt erst das komplexe Sesquiterpen-Gemisch in *P. ventilabrum* eine mögliche Verwandtschaftsbeziehung erstmals so deutlich an.

Über die Bedeutung der Inhaltsstoffe im Sinne einer biologischen Funktion für *P. ventilabrum* können leider nur Vermutungen geäußert werden. Es ist anzunehmen, dass der Schwamm dieses Arsenal von Sekundärmetaboliten nicht ohne ökologischen Vorteil produziert. Da diese Schwammart nur sehr wenig untersucht wurde, ist über Fraßfeinde nichts bekannt. Denkbar ist, dass die Sesquiterpene in *P. ventilabrum* im weitesten Sinne in das Konzept der chemischen Verteidigung passen.

Die Hälterung von Individuen des Schwammes im Meerwasser-Aquarium, die im Rahmen der Beprobungen in der meeresbiologischen Station der Universität Bergen durchgeführt wurde, lieferte Proben, die ein quantitativ verändertes Sesquiterpen-Inventar aufzeigten. Schwämme an denen durch mechanische Verletzung eine Fraß-Simulation vorgenommen wurde, zeigten nach 3 Stunden ein verändertes Profil in der Zusammensetzung ihrer Sesquiterpene. Während in ruhenden Individuen das Axisonitril-1 (**24**) als dominante Hauptkomponente vorliegt, tritt bei auf diese Weise gestressten Individuen das spirocyclische Axisonitril-3 (**31**) in Konzentrationen gleicher Größenordnung hinzu.

Inwiefern die Hälterung im Aquarium selbst für den Schwamm als Stressfaktor zu werten ist, bleibt unklar. Individuen, die acht Monate im Aquarium gehalten wurden, enthielten nahezu gleiche Konzentration von Axisonitril-1 (**24**) und Axisonitril-4 (**28**), während in frisch beprobten Tieren **28** nur als gering konzentrierte Nebenkomponente auftrat. Auch die Konzentration der Isocyanate erwies sich als variable Größe, die möglicherweise mit den äußeren Einflüssen der Lebensbedingungen gekoppelt sind.

Diesen einfachen Hälterungs- und Fraßsimulationsversuchen ermangelt es sicherlich an einer qualitativ und quantitativ reproduzierbaren Kontrolle vieler einflussreicher Faktoren. Parameter, wie z. B. das Alter der untersuchten Schwämme, saisonale Einflüsse, ortsaufgelöste Untersuchung von inneren und äußeren Bereichen des Schwammes zur Erfassung von Konzentrationsgradienten innerhalb des Individuums wurden nicht berücksichtigt. Dennoch kann man aus diesen Versuchen entnehmen, dass die Biosynthese der Sekundärmetaboliten in

P. ventilabrum möglicherweise nicht konstitutiv, sondern induzierbar ist und der Schwamm auf Stressfaktoren mit der Produktion seiner Inhaltsstoffe reagiert. Dies stützt die Einstufung des Sesquiterpen-Inventars als Mittel zur chemischen Verteidigung.

4 *Anthothela grandiflora*

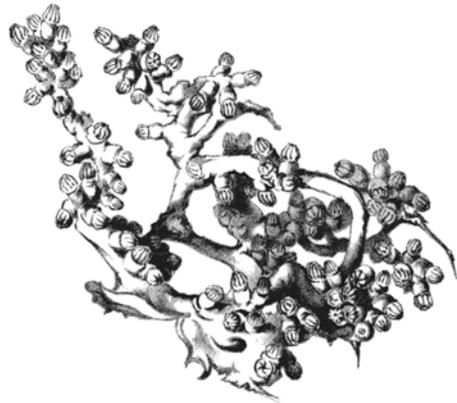


Abbildung 4-1 Kolonie der Lederkoralle *Anthothela grandiflora*, die in den Fjorden Norwegens auf abgestorbenen Stöcken der Steinkoralle *Lophelia* sp. wächst (Foto: H. T. Rapp). Rechts: Historische Darstellung von *A. grandiflora* aus der Beschreibung der Spezies durch M. Sars.

Anthothela grandiflora M. Sars, 1856 ist eine Lederkoralle (Alcyonaria)¹⁴. Diese Spezies bildet kleine Kolonien, die auf ca. 10 cm langen Stöcken wachsen. Die frisch beprobten Tiere haben eine hell-rosa Farbe, während tote Individuen farblos-grau erscheinen. Taxonomisch gehört *A. grandiflora* in die Gruppe der Octocorallia, die ihrerseits in die große, rein marine Klasse der Anthozoa („Blumentiere“) eingeordnet werden, womit sie zu den Cnidaria (Nesseltiere) zählt. Zahlreiche Vertreter der Octocorallia, zu denen neben den Lederkorallen auch die Gorgonien gehören, haben sich als reichhaltige Naturstoffproduzenten erwiesen. Insbesondere terpenoide Verbindungen sind aus diesen Tieren bekannt⁵⁶. Zur Gattung *Anthothela* liegen bisher keine chemischen Untersuchungen vor.

4.1 Naturstoffe in *A. grandiflora*: Extraktion und GC-MS Analytik

Tiefgefrorene Individuen von *A. grandiflora* wurden mit Aceton extrahiert. Der so gewonnene Gesamtextrakt wurde im Vakuum eingedunstet und der wässrige, inhomogene Rückstand mit Dichlormethan extrahiert. Dieser Dichlormethanextrakt wurde gaschromatographisch untersucht.

Wie das Gaschromatogramm eines frisch hergestellten Dichlormethanextrakts (Abbildung 4-2) zeigt, ist das Inventar flüchtiger Komponenten in *A. grandiflora* überschaubar: der Extrakt besteht aus einer Hauptkomponente (70) und einigen geringer konzentrierten Neben- bzw. Spurenkomponenten (66-69, 71-73). Ihre relative Zusammensetzung variiert jedoch beträchtlich in Abhängigkeit vom Alter des Extrakts. Das Gaschromatogramm eines Dichlormethanextrakts, der wenige Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde, zeigt Abbildung 4-3.

Neben der veränderten Elutionsreihenfolge aufgrund der unterschiedlichen Polaritäten der verwendeten GC-Phasen, ist die verminderte Konzentration von **70** deutlich erkennbar. Die Hauptkomponente **70** in *A. grandiflora* ist offenbar instabil und bildet Zersetzungsprodukte, die nicht GC-gängig sind.

Vier Spurenkomponenten (**66-69**), die in Abbildung 4-3 deutlicher hervortreten, sind Sesquiterpenkohlenwasserstoffe. Ihnen konnten anhand ihrer Massenspektren und ihrer Retentionsindices im Vergleich mit Literaturdaten¹⁷ Strukturen zugeordnet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-1 wiedergegeben. Aristolen, Calaren, *allo*-Aromadendren und δ -Cadinen sind häufig vorkommende Sesquiterpenkohlenwasserstoffe. Die absolute Konfiguration der Verbindungen in *A. grandiflora* wurde nicht bestimmt.

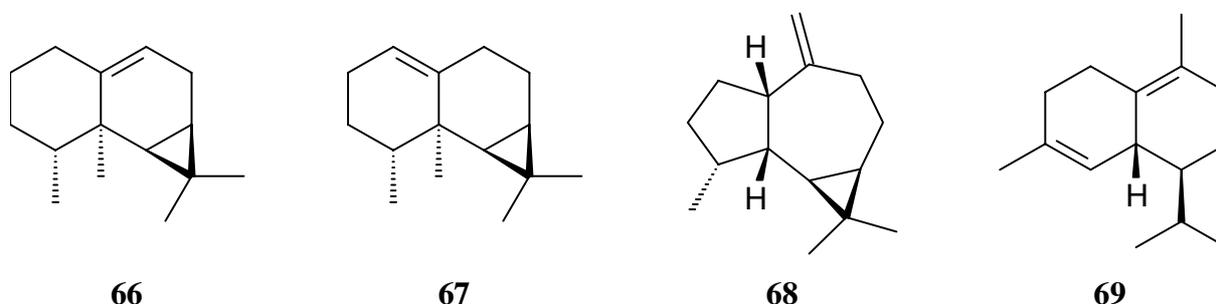


Tabelle 4-1 Sesquiterpenkohlenwasserstoffe in *A. grandiflora*.

Nr.	Substanzname	RI (gemessen*)	RI (Literatur: [17])
66	Aristolen	1421	1423
67	Calaren	1434	1437
68	<i>allo</i> -Aromadendren	1463	1462
69	δ -Cadinen	1521	1520

* Zur Ermittlung der Retentionsindices siehe Experimenteller Teil

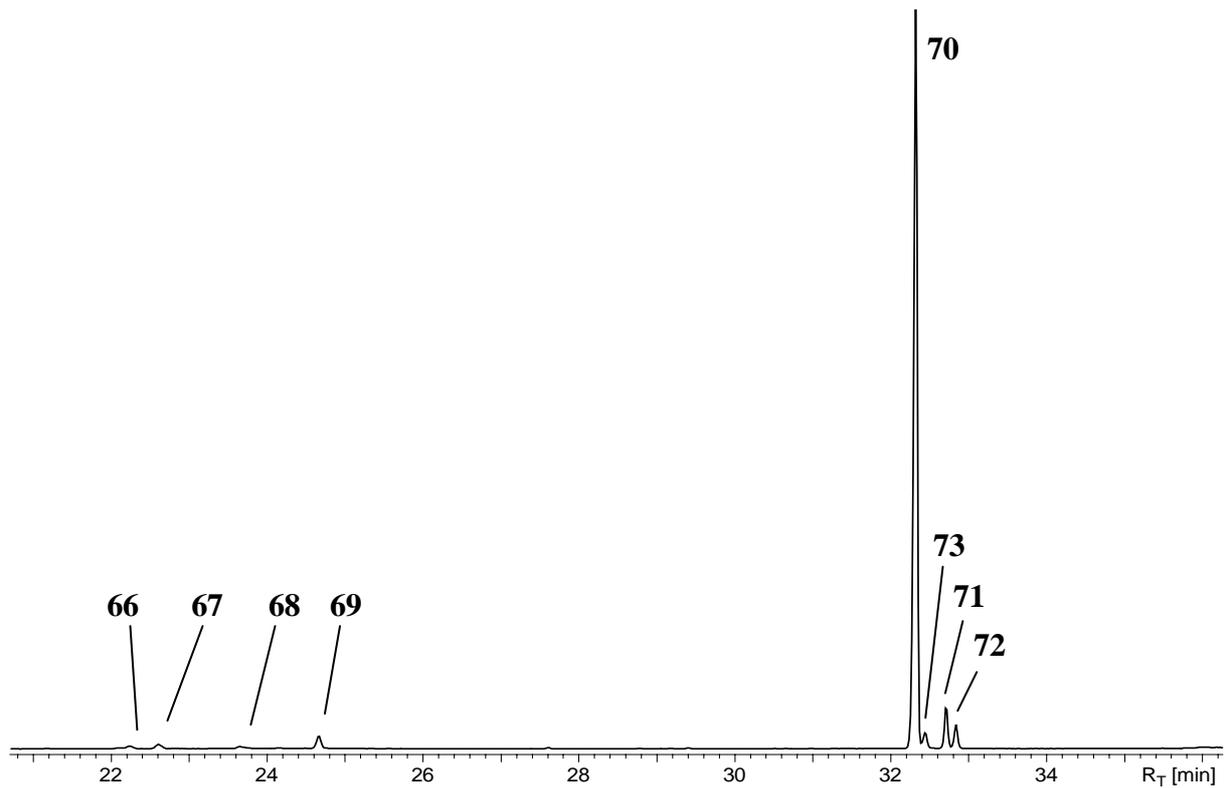


Abbildung 4-2 Gaschromatogramm des frischen Dichlormethanextrakts von *Anthothela grandiflora* gemessen mit Hilfe einer mittelpolaren GC-Säule. (OV-1701, 60m, 0.25 mm ID, 0.25 μ m FD, Trägergas: Helium, Temperatur-Programm: 140°C, 5 min isotherm; Aufheizrate 5°C/min bis 280°C)

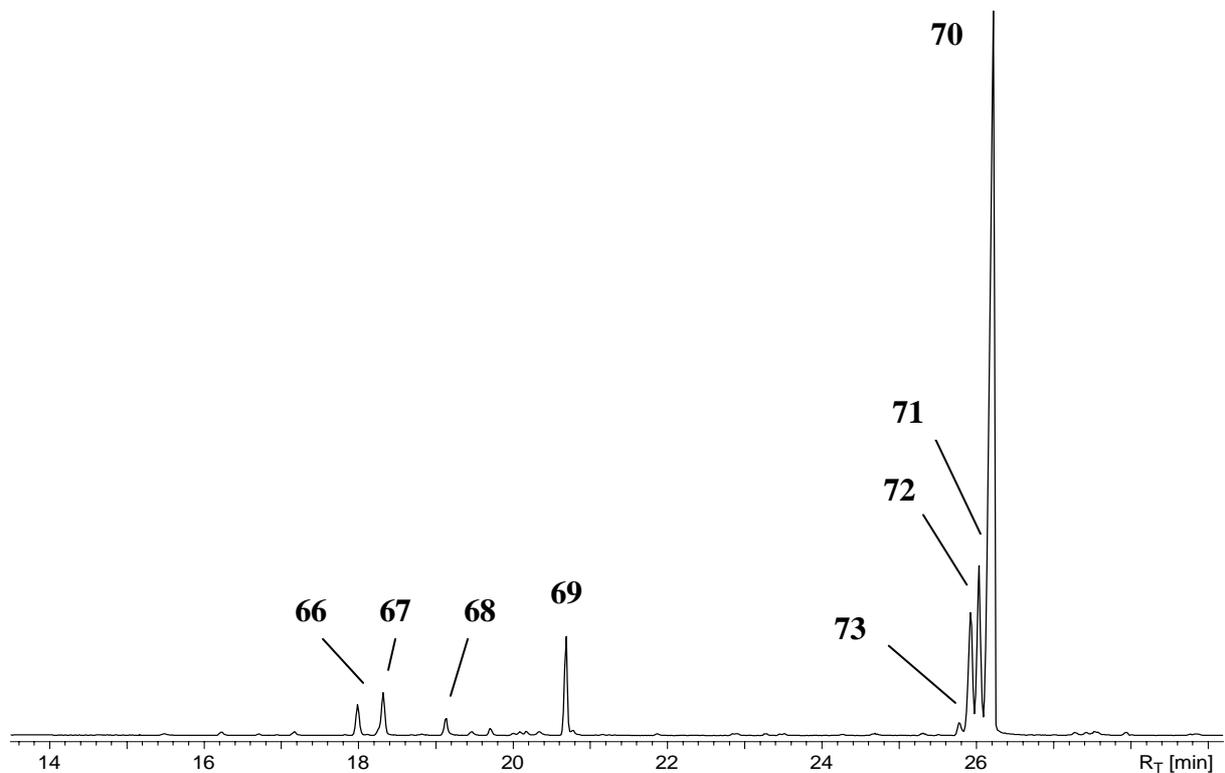


Abbildung 4-3 Gaschromatogramm eines gealterten Dichlormethanextrakts von *A. grandiflora* gemessen mit Hilfe einer unpolaren Trennsäule. (Säule: DB5-MS, 30m, 0.25 mm ID, 0.25 μ m FD, Trägergas: Helium, Temperatur-Programm: 80°C 5 min isotherm; Aufheizrate: 5°C/min bis 300°C; 20 min isotherm).

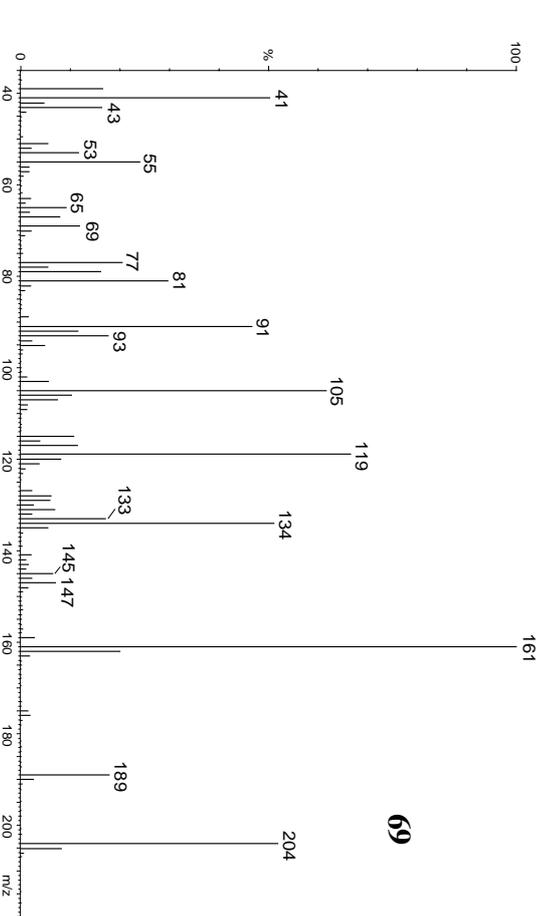
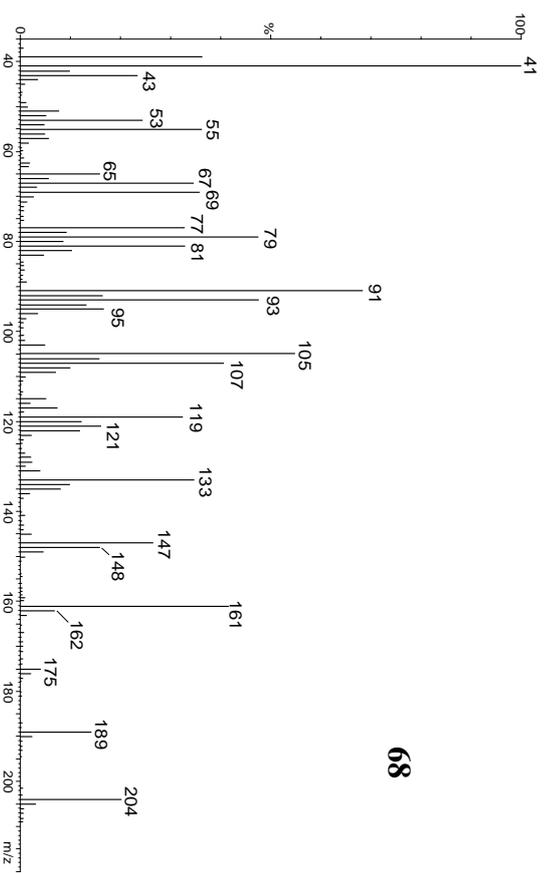
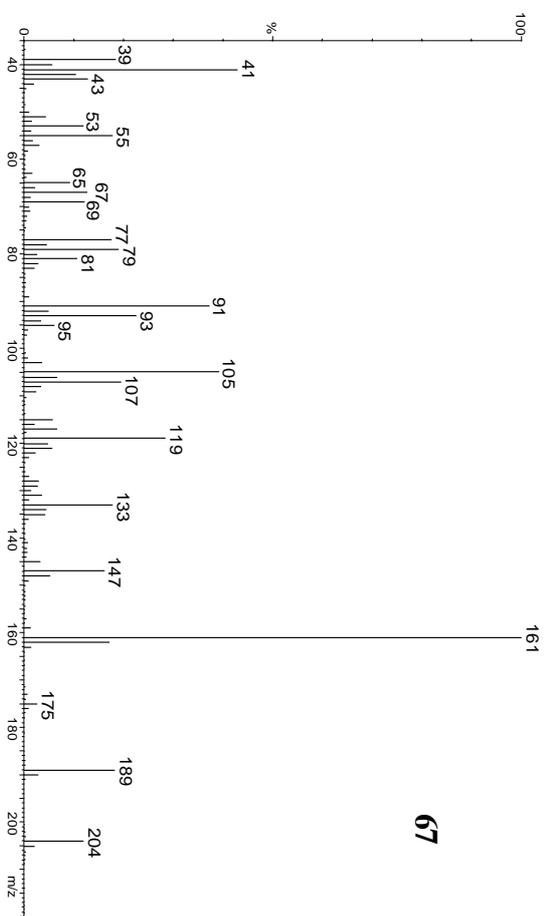
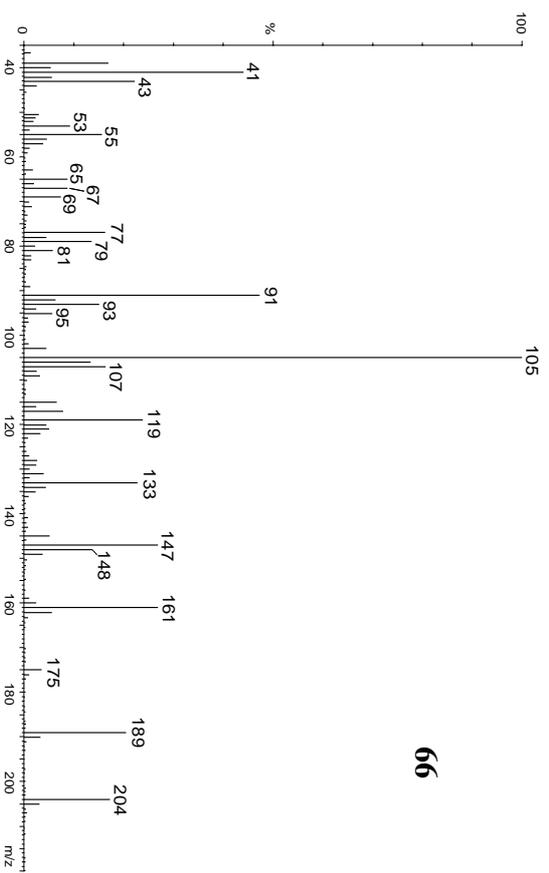


Abbildung 4-4 Massenspektren (EI, 70eV) der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe (66-69).

Die molekularen Zusammensetzungen von **70-73** wurden mittels hochaufgelöster Massenspektrometrie bestimmt. **70** und **73** sind Isomere mit der Summenformel C₁₅H₂₀O (M_r = 216 g/mol), **72** enthält zwei Wasserstoffatome mehr (C₁₅H₂₂O, M_r = 218 g/mol), **71** dagegen zwei Wasserstoffatome weniger (C₁₅H₁₈O, M_r = 214 g/mol) als **70**. Die Massenspektren von **70-73** sind in Abbildung 4-5 dargestellt. Die Elementarzusammensetzung der Substanzen und typische Fragmente in den Massenspektren (m/z 91, 105, 119, u.v.m.) weisen darauf hin, dass es sich hierbei um monooxygenierte Sesquiterpene handelt.

Tabelle 4-2 Oxygenierte Sesquiterpene in *A. grandiflora*.

Nr.	Summenformel	RI	M _r (HR-EI-MS)		
			m/z gefunden	berechnet	Δ [ppm]
70	C ₁₅ H ₂₀ O	1747	216.1511	216.1514	1.4
71	C ₁₅ H ₁₈ O	1742	214.1356	214.1358	0.9
72	C ₁₅ H ₂₂ O	1737	218.1669	218.1671	0.9
73	C ₁₅ H ₂₀ O	1733	216.1527	216.1514	- 6.0

Über die Art der funktionellen Gruppen dieser Verbindungen gibt bereits ihr chromatographisches Verhalten Aufschluss: Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit *n*-Hexan ergab R_f-Werte von 0.7-0.8, d.h. **70-73** eluieren ähnlich wie Kohlenwasserstoffe. Damit sind sie trotz ihrer Oxygenierung deutlich unpolarer als Aldehyde, Ketone oder Alkohole und lassen eher Ether oder Epoxide vermuten. Einen weiteren Hinweis liefert der Einsatz eines Anisaldehyd-Tauchbades zur Detektion der Substanzen auf der DC-Folie. Bereits ohne Erhitzen entstehen hierbei rote Derivatisierungsprodukte. Diese wurden zwar nicht näher charakterisiert, jedoch ist eine solche bei Raumtemperatur unmittelbar auftretende Farbreaktion mit aromatischen Aldehyden für Furane bekannt („Fichtenspan-Reaktion“)⁵⁷.

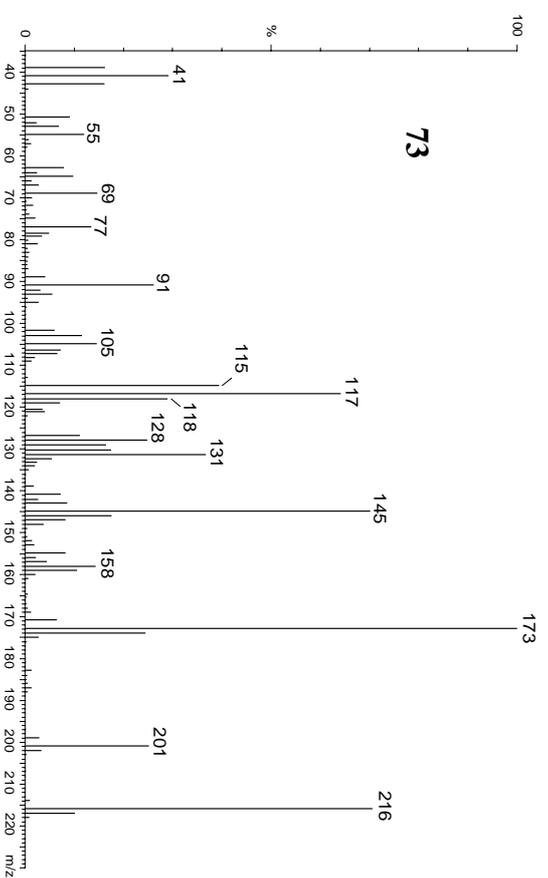
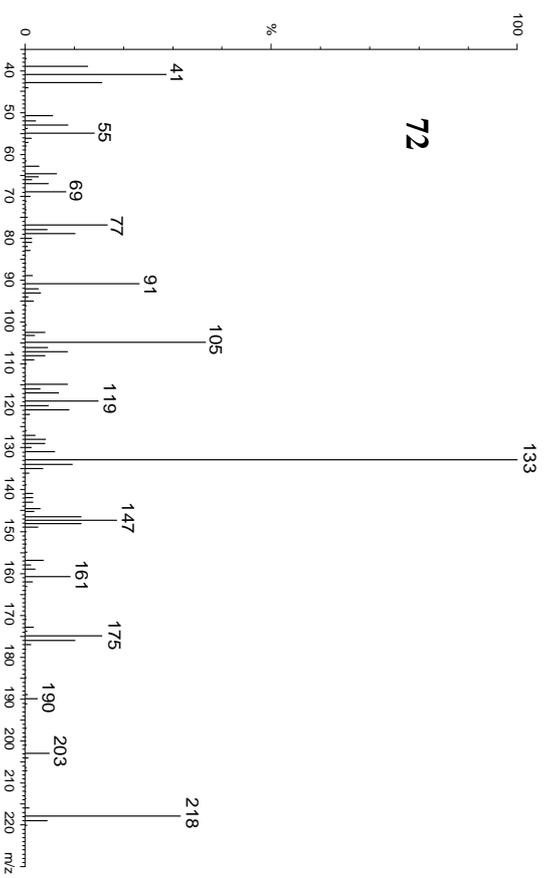
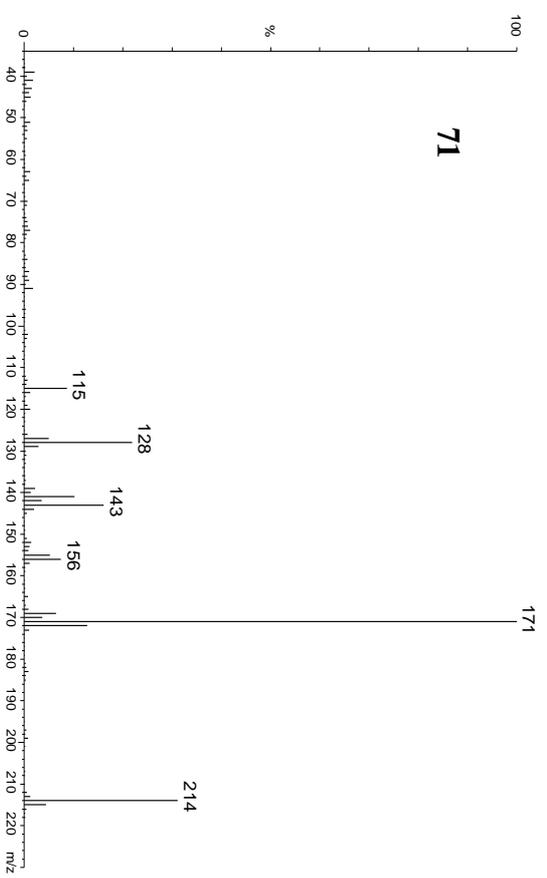
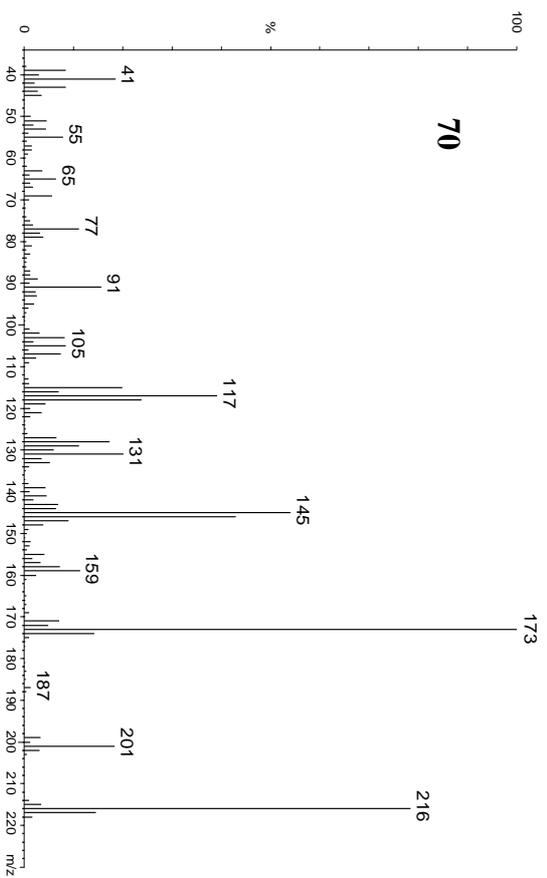


Abbildung 4-5 Massenspektren (EI, 70eV) der oxygenierten Sesquiterpene **70-73**.

4.2 Oxygenierte Sesquiterpene aus *Anthothela grandiflora*

4.2.1 Chromatographie

Zur Strukturaufklärung der oxygenierten Sesquiterpene in *A. grandiflora* wurde zunächst die Reingewinnung dieser Verbindungen angestrebt. Die Trennung durch Säulenchromatographie an Kieselgel gelang nicht. **70** und **71** ließen sich nur in geringen Ausbeuten und unvollständig getrennt aus den Fraktionen re-isolieren. **72** und **73** konnten in keiner Fraktion wiedergefunden werden. Die Trennung an Kieselgel erwies sich somit als ungeeignet und wurde verworfen. Alternativ wurde die Chromatographie über Sephadex LH-20 mit Dichlormethan durchgeführt. Hiermit gelang die Abtrennung von unpolaren, höhermolekularen Substanzen, die nicht GC-gängig waren und möglicherweise zu Lipid-Bestandteilen gehören. Die vier oxygenierten Terpene **70-73** konnten jedoch auf dieser Phase nicht getrennt werden.

Die sehr gute gaschromatographische Trennung von **70-73** an einer mittelpolaren Phase (OV-1701, Abbildung 4-2) legte nahe, die Verbindungen mittels präparativer Gaschromatographie reinzugewinnen. Der konzentrierte Extrakt wurde in Portionen von wenigen Mikrolitern sukzessive im Gaschromatographen getrennt. Hierfür wurde die zuvor erwähnte Gerätekonfiguration (Abschnitt 0) eingesetzt. Reproduzierbares Retentionsverhalten und gute Peaksymmetrie trotz hoher Beladung ließen zwar auf eine erfolgreiche Trennung schließen, als problematisch stellte sich jedoch die Rückgewinnung der Komponenten heraus. Die Kondensationszone in den Glas-Kühlfallen, auf denen sich das Eluat nach dem Verlassen der Trennsäule abscheidet, hat bei dem hier verwendeten Gerätetyp trotz äußerer Kühlung eine hohe Temperatur. Diese Zone befindet sich im Übergang der heißen Transferkapillare (wo die Substanzen in der Gasphase sind) zum kalten Ende der Kühlfalle (das die Verflüchtigung der Substanzen verhindert). Die eluierenden Substanzen sind damit nach der Kondensation auf der heißen Glasoberfläche weiterhin einer starken thermischen Belastung ausgesetzt. Keines der oxygenierten Sesquiterpene aus *A. grandiflora* konnte mittels präparativer Gaschromatographie reingewonnen werden. Neben der Labilität gegenüber sauren Medien (Kieselgel, s.o.) stellt damit die thermische Instabilität ein Problem für die Isolierung dar.

Schließlich gelang die Trennung mittels *Reversed-Phase*-HPLC. Fraktionen, die zuvor durch Größenausschluss-Chromatographie über Sephadex LH-20[®] erhaltenen wurden und die Komponenten **70-73** enthielten, wurden vollständig eingeeengt, in Acetonitril aufgenommen und anschließend über eine präparative Umkehrphasen-Säule (Kromasil 5 RP-18, 21.6mm × 250mm) mit Acetonitril/Wasser 95:5 getrennt. **70** und **71** konnten in ausreichender Menge isoliert werden, um NMR-spektroskopisch vollständig charakterisiert zu werden.

Abbildung 4-6 zeigt das Chromatogramm (HPLC, UV bei 235 nm) des Dichlormethanextrakts. Die Detektion erfolgte mittels Dioden-Array-Detektor, wodurch auch die UV-Spektren der Komponenten erhalten wurden (Abbildung 4-7). Die Intensität der Peaks im Chromatogramm ist aufgrund der unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten der Verbindungen nicht proportional zu deren Konzentration (Vergl. GC, Abbildung 4-2). Die starke UV-Absorption von **71** und das Absorptionsmaximum bei 253nm ist ein Hinweis auf das Vorliegen eines aromatischen Systems, was im Rahmen der Analyse der NMR-Daten bestätigt werden konnte (s.u.).

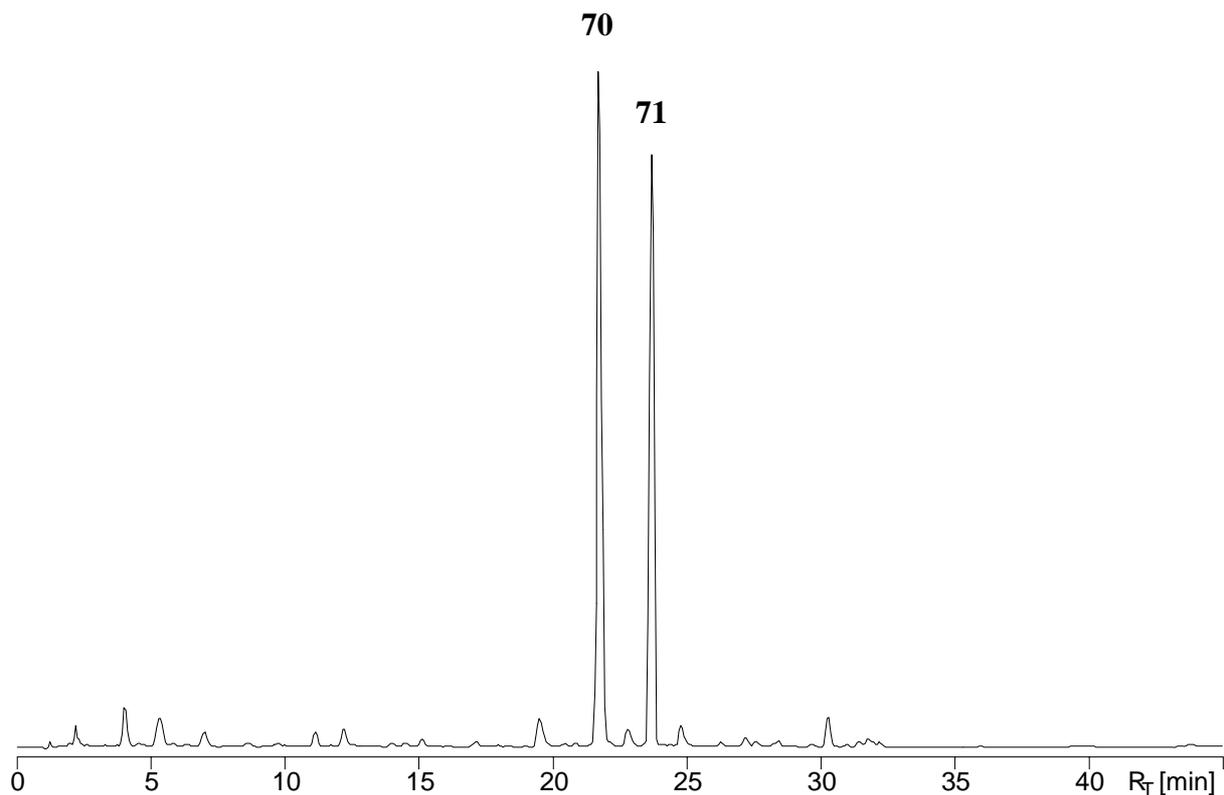


Abbildung 4-6 HPLC-Trennung des Dichlormethanextrakts von *A. grandiflora*. (0-2 min CH₃CN/H₂O 60:40, 2-25 min Gradient, 25-45 min 100% CH₃CN, flow = 1 ml/min, UV bei 235 nm).

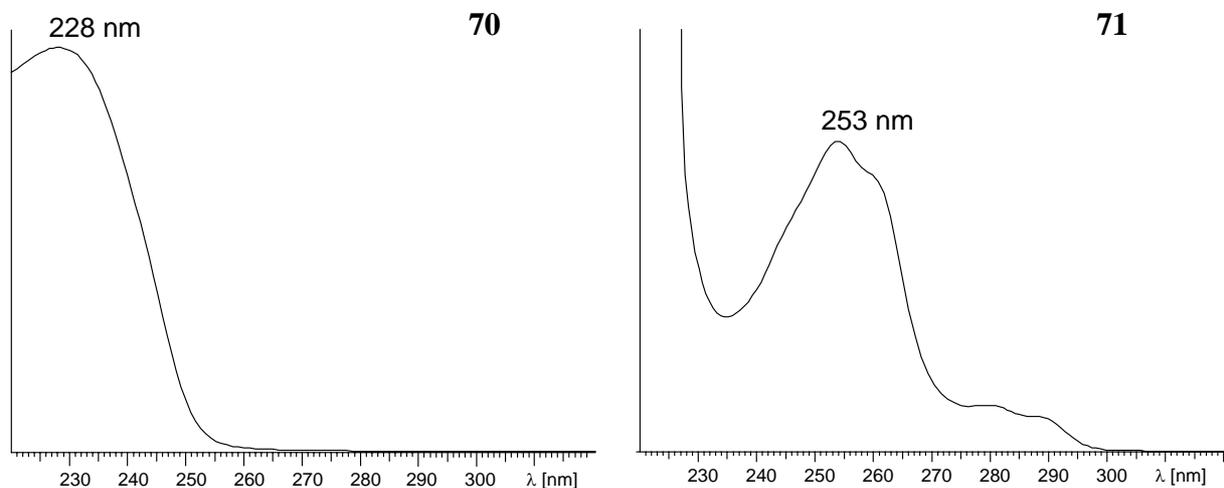


Abbildung 4-7 UV-Spektren der Verbindungen **70** und **71**.

4.2.2 NMR-Spektroskopie

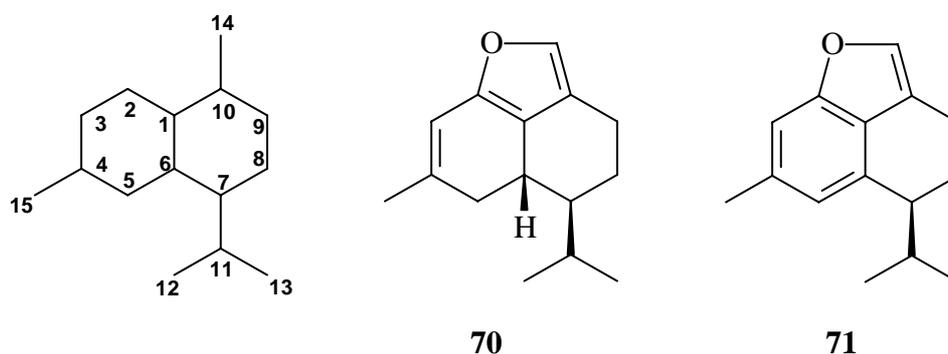


Abbildung 4-8 Cadinan-Skelett und Strukturen der Verbindungen **70** und **71**.

Die Strukturaufklärung der Verbindungen **70** und **71** gelang schließlich durch ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Es handelt sich bei diesen neuen Naturstoffen um teilhydrierte Naphthofurane, deren Grundkörper das Cadinan-Skelett ist. Die IUPAC-Namen lauten: 6-(1-Methylethyl)-4-methyl-5a,6,7,8-tetrahydro-5*H*-naphtho[1,8-bc]furan (**70**) sowie 6-(1-Methylethyl)-4-methyl-7,8-dihydro-6*H*-naphtho[1,8-bc]furan (**71**).

Von beiden Verbindungen konnten ^1H -NMR-Spektren, sowie die zwei-dimensionalen Spektren COSY90, HMQC und HMBC aufgenommen werden. Aufgrund der geringen isolierten Menge und insbesondere aufgrund der Instabilität von **70** konnten weder ein NOE- noch ein ^{13}C -NMR-Spektrum erhalten werden. Die zur Verfügung stehenden NMR-Daten reichten jedoch zur eindeutigen Strukturaufklärung aus.

4.2.2.1 Strukturaufklärung eines Vinylfurans (**70**)

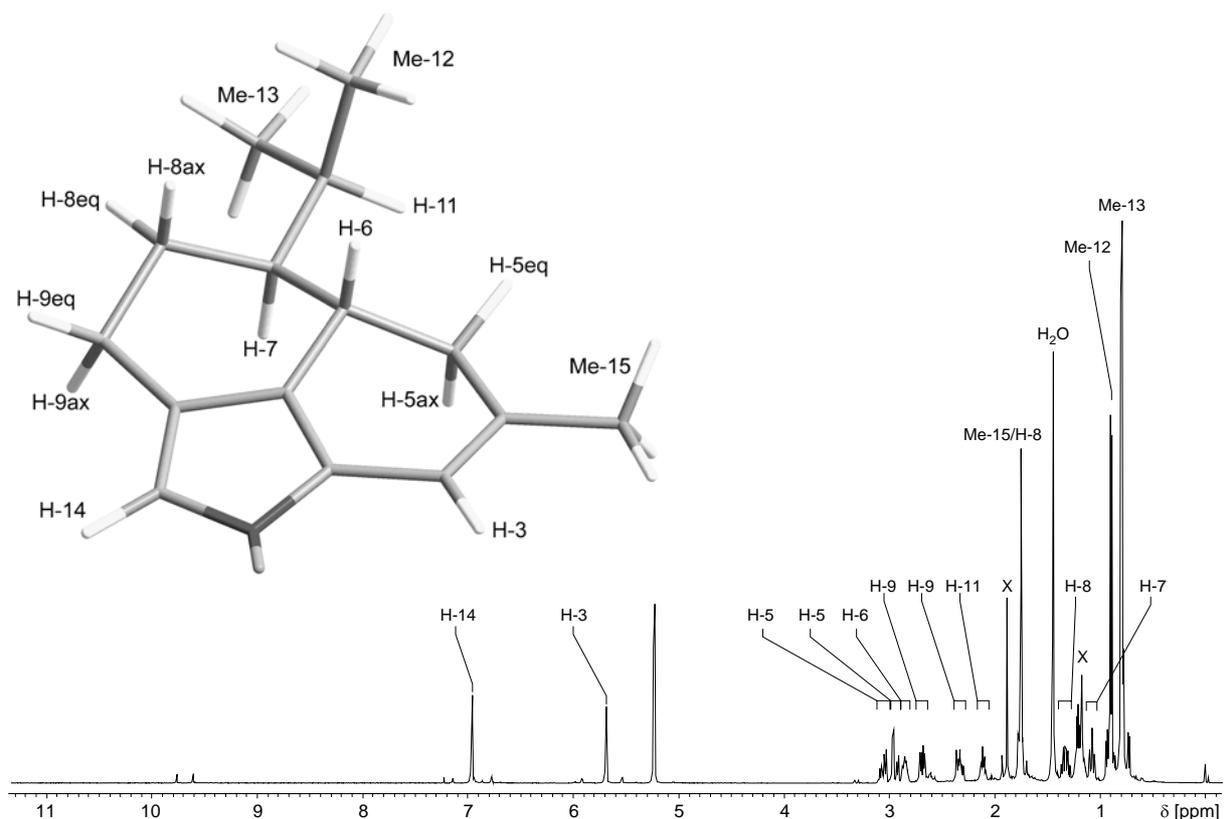


Abbildung 4-9 ¹H-NMR-Spektrum (500MHz, CD₂Cl₂) von **70**.

Im ¹H-NMR-Spektrum von **70** konnten alle 20 Protonen identifiziert werden. Anstelle eines ¹³C-NMR-Spektrums dienen die protonensensitiven Korrelationsspektren HMQC und HMBC zur Identifizierung der Kohlenstoffatome. Sie lieferten die chemischen Verschiebungen aller 15 Kohlenstoffatome, von denen sechs sp²-Hybride sind. Damit liegen drei C-C-Doppelbindungen vor. Aus den sechs Doppelbindungsäquivalenten der Summenformel ergeben sich damit drei Ringe für die Struktur von **70**. Eine Carbonyl- oder Hydroxygruppe kann aufgrund der Abwesenheit entsprechender NMR-Signale ausgeschlossen werden.

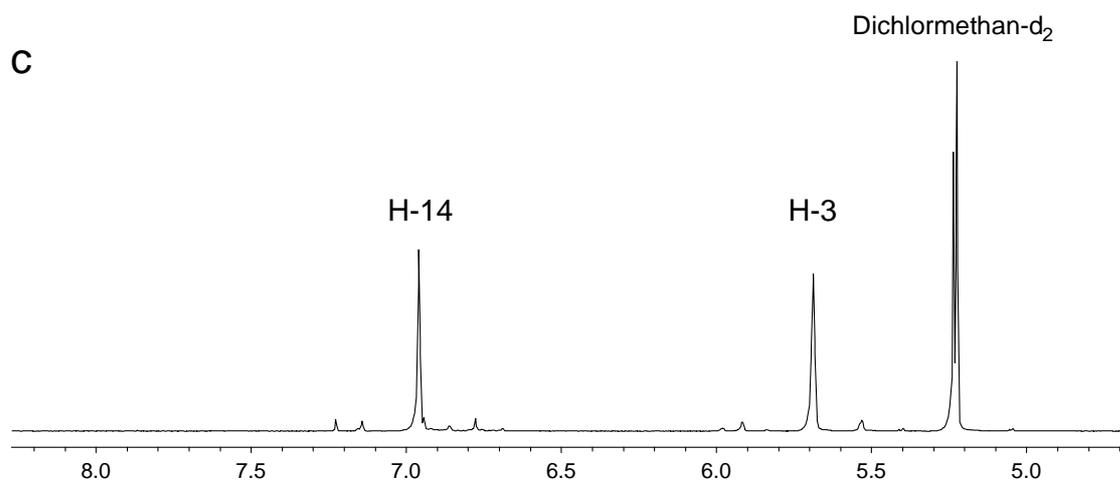
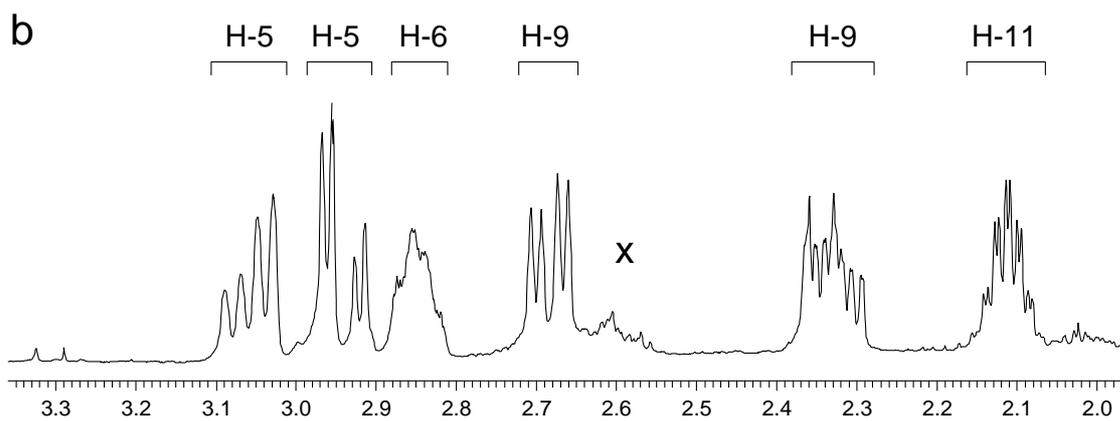
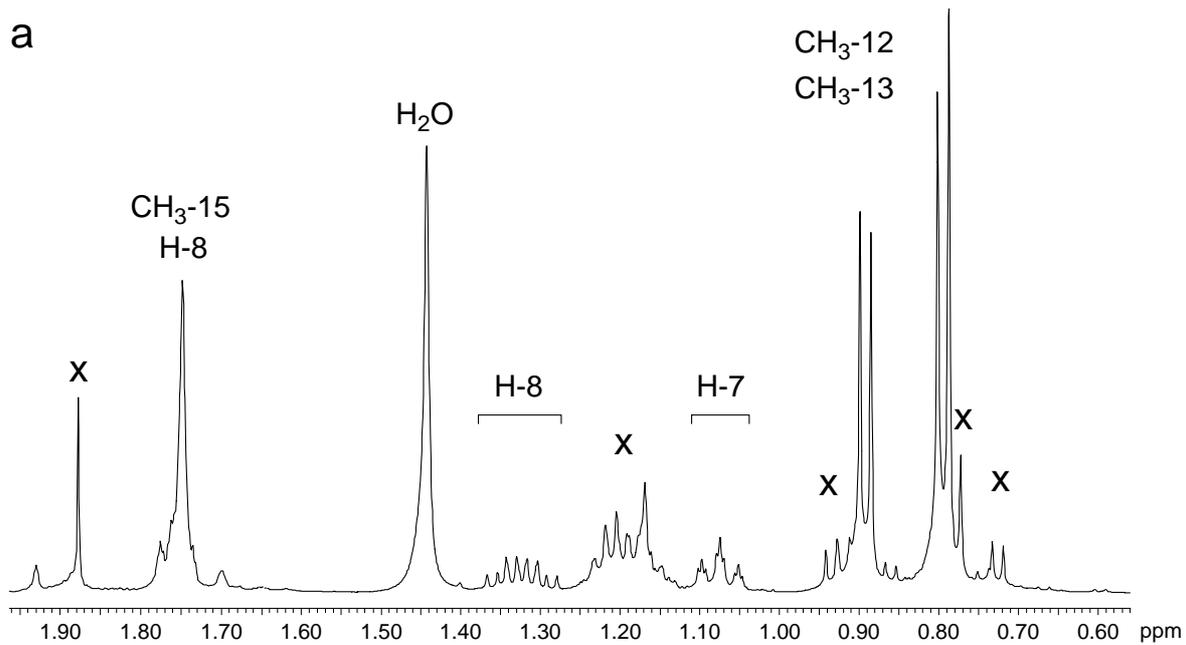


Abbildung 4-10 Detailansichten des ¹H-NMR-Spektrums von **70**. Die mit X markierten Signale sind auf Verunreinigungen zurückzuführen.

Einen Einstieg in die Aufklärung der Konstitution bieten gut separierte Signale, wie das Singulett von H-14 bei 6.96 ppm. Dieses Proton zeigt Fernkopplungen zu den Kohlenstoffatomen C-1 und C-2 (121.09; 146.57 ppm, Abbildung 4-11), die zu einer Doppelbindung gehören. Die chemische Verschiebung von C-2 (146.57 ppm) zeigt die Bindung zu einem Sauerstoffatom an. C-2 ist damit Teil eines Enolethers. Für H-14 wird im HMBC aus dem aufgespaltenen Kreuzsignal die $^1J_{CH}$ -Kopplungskonstante der H,C-Kopplung zu C-14 beobachtet, dem Kohlenstoffatom, an das es kovalent gebunden ist. Diese beträgt 200 Hz und ist damit charakteristisch für sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome mit einer Sauerstoffbindung. Hieraus folgt, dass das Sauerstoffatom C-2 und C-14 verbrückt. Diese Teilstruktur passt zu der zuvor erwähnten Vermutung eines Furansystems in **70**. Das fehlende HMBC-Signal zwischen H-14 und C-10 ist typisch für die sehr kleinen $^2J_{CH}$ -Kopplungen in aromatischen Systemen.

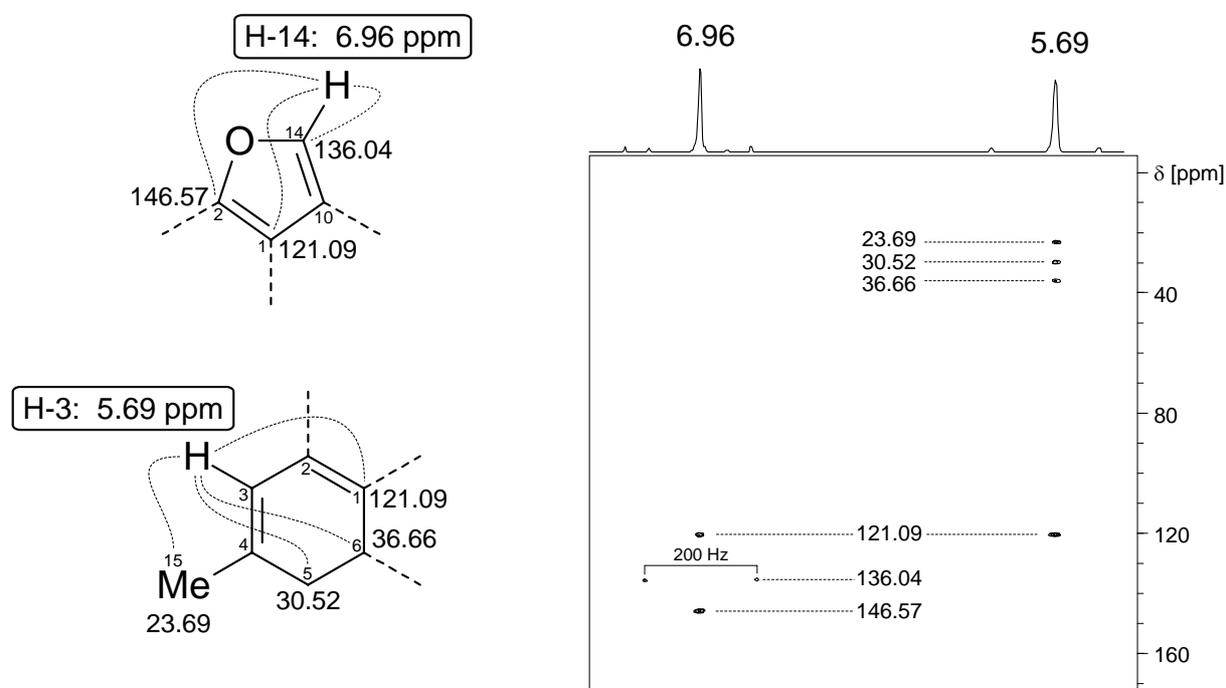


Abbildung 4-11 Teilstrukturen von **70** und H,C-Fernkopplungen von H-14 (6.96 ppm) und H-3 (5.69 ppm) und Ausschnitt aus dem HMBC (500 MHz, CD₂Cl₂).

Ein weiteres Singulett bei 5.69 ppm wird durch H-3 erzeugt. Dieses Proton ist Teil einer trisubstituierten Doppelbindung. H-3 zeigt C,H-Fernkopplungen zu einem der quartären Kohlenstoffe des Furansystems, sowie zu drei sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatomen. Dies sind eine vinyliche Methylgruppe, die benachbarte allylische Methylenruppe und die sich anschließende Methingruppe.

Im 1H -NMR-Spektrum von **70** gibt es fünf Signale, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung allylischen Protonen zuzuordnen sind. Vier dieser fünf Signale gehören zu zwei Methylenruppen, eines gehört zu einer Methingruppe. Die HMBC-Signale dieser Protonen

ermöglichen die Identifizierung der benachbarten Kohlenstoffatome und zeigen die Verknüpfung des gesättigten Teils des Moleküls mit dem ungesättigten an. Die Fernkopplungen der allylischen Methylengruppen (C-5 und C-9) und die sich daraus ergebenden Teilstrukturen sind in Abbildung 4-12 dargestellt.

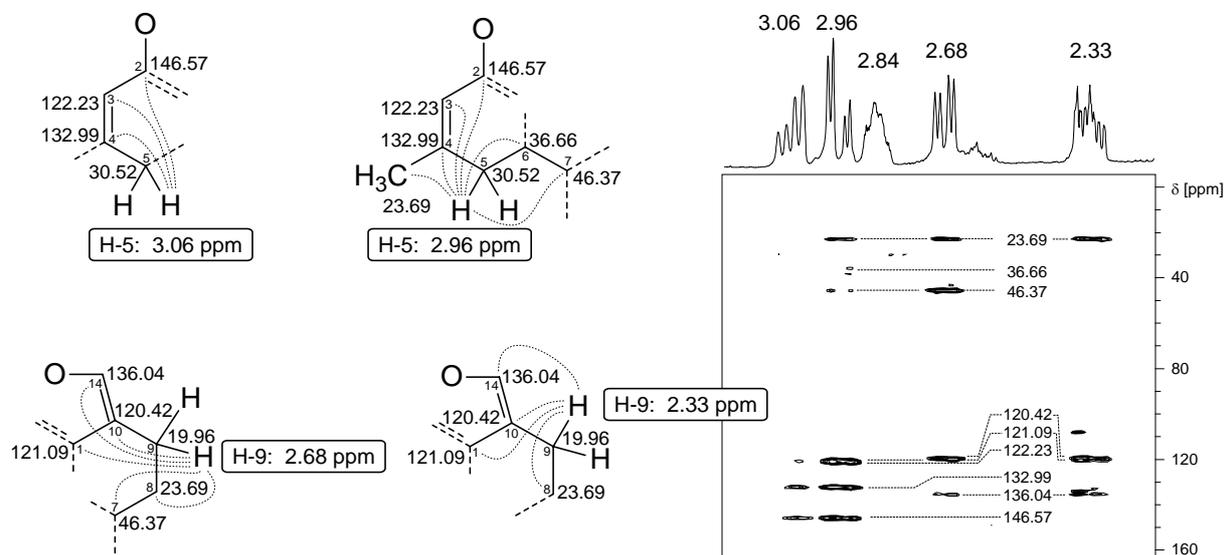


Abbildung 4-12 H,C-Fernkopplung der allylischen Methylengruppen in **70**.

Ein ebenfalls gut separiertes Signal mit einer gut aufgelösten Multipllettstruktur ist H-11 (2.12 ppm), das Teil einer Isopropylgruppe ist. Die Überlagerung zweier Quartett-Aufspaltungen aufgrund der benachbarten Methylgruppen mit gleicher Kopplungskonstante (6.9 Hz) führt zur Bildung eines Pseudo-Septetts, dessen Signale nochmals zu Dubletts mit 2.7 Hz aufgespalten sind. Über die *long-range*-Korrelationen der Methylgruppen C-12 und -13, sowie des verbindenden Methinprotons H-11 kann die Position der Isopropyl-Gruppe am Tricyclus ermittelt werden.

Zwei Dubletts mit einem Integral von jeweils drei Wasserstoffen und ihre COSY90-Kreuzsignale zum Methin-Proton bei 2.12 ppm zeigen die Anwesenheit einer *iso*-Propylgruppe an. Ihre Verknüpfung mit dem Tricyclus läßt sich anhand der HMBC-Signale zur Methingruppe bei 46.37 ppm lokalisieren.

Die Position der Methylgruppe Me-15 bei 1.75 ppm läßt sich trotz Signalüberlagerungen mit dem Proton H-8 (ebenfalls 1.75 ppm) ermitteln. Die Signalstruktur und die chemische Verschiebung belegen den Sitz an einem quartären Kohlenstoffatom einer Doppelbindung. Die benachbarten C-Atome sind das quartäre C-4 ($\delta_C = 132.99$ ppm), die vinyliche Methingruppe des zuvor besprochenen Protons H-3 bei 5.69 ppm ($\delta_C = 122.23$ ppm), sowie eine allylische Methylengruppe (C-5, $\delta_C = 30.52$ ppm) mit den diastereotopen Protonen bei 3.06 und 2.96 ppm.

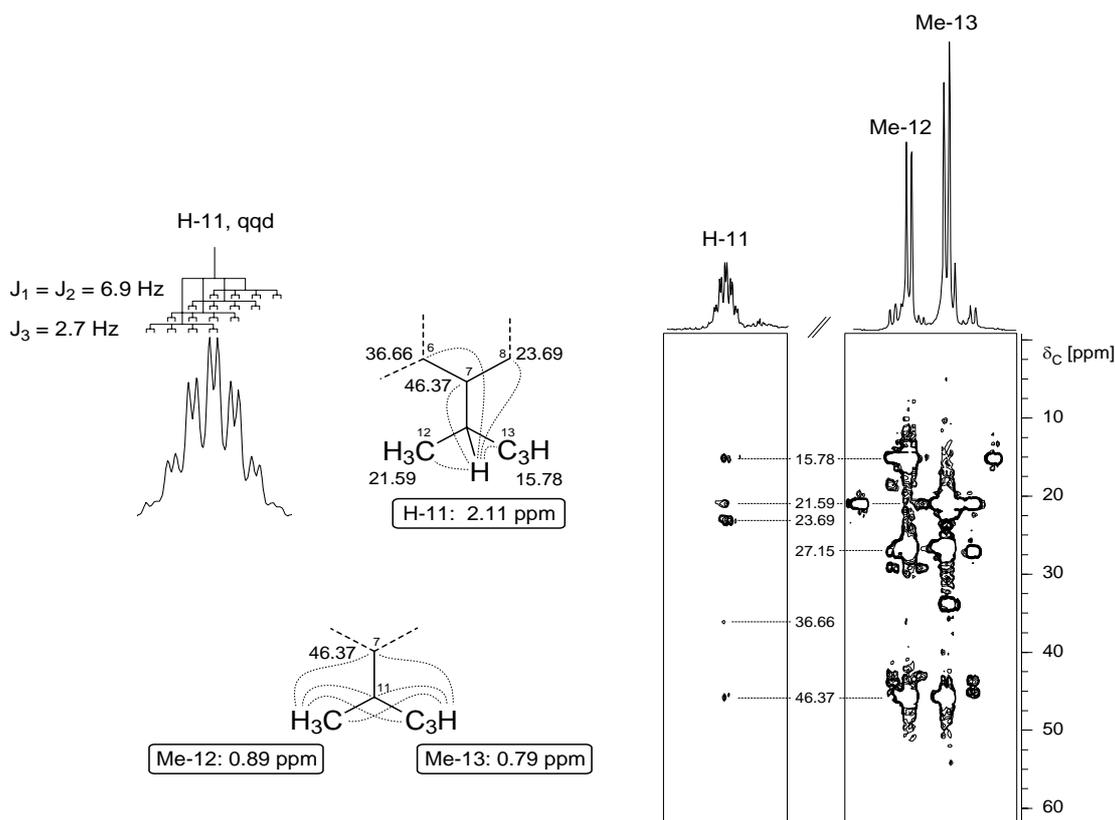


Abbildung 4-13 Ausschnitte aus dem HMBC mit den Signalen der Isopropyl-Gruppe in **70**.

Die H,C-Fernkopplungen der übrigen Protonen bestätigen die hier dargestellte Ableitung der Konnektivitäten aus den HMBC und H,H-COSY-Signalen. Damit ergibt sich für **70** die Struktur des 6-Isopropyl-4-methyl-5a,6,7,8-tetrahydro-5*H*-naphtho[1,8-bc]furans, dessen Grundkörper ein Cadinan ist.

Die relative Konfiguration an C-6 und C-7 konnte auch ohne NOE-Spektrum geklärt werden.

Aus der Signalstruktur von H-6 lassen sich keine Kopplungskonstanten ablesen. Das Signal des Protons H-7 ist ein vierfaches Dublett, in dem je zwei Kopplungskonstanten gleich groß sind (2.7 und 11.4 Hz). Da H-7 nur mit einem der Protonen H-8-ax/eq eine große Kopplung haben kann und mit H-11 eine Kopplung von 2.7 Hz vorliegt, muss die Kopplung zwischen H-7 und H-6 11.4 Hz betragen. Dies ist eine axiale Kopplung, was die in Abbildung 4-8 dargestellte relative Konfiguration beweist.

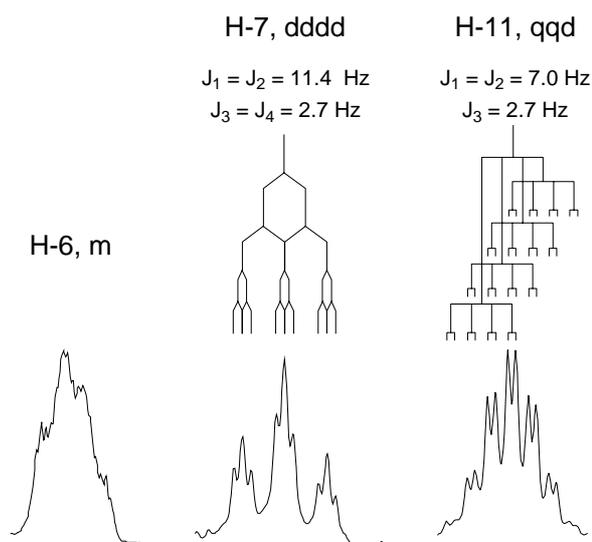


Abbildung 4-14 Analyse der Kopplungskonstanten der Protonen H-7 und H-11.

Tabelle 4-3 ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale von **70** sowie Kreuzsignale der zweidimensionalen Spektren. (500 MHz, CD_2Cl_2 , chemische Verschiebungen relativ zu $\delta_{\text{H}} = 5.32$ ppm bzw. $\delta_{\text{C}} = 53.8$ ppm)

Position	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	COSY90	HMBC
1	121.09 (C)	-	-	-
2	146.57 (C)	-	-	-
3	122.23 (CH)	5.69, bs, 1H	H-5ax/eq, Me-15	C-1, C-5, C-6, C-15
4	132.99 (C)	-	-	-
5	30.52 (CH_2)	3.06, dd, 1H 2.96, dd, 1H	H-5, H-6, Me-15 H-5, H-6, Me-15	C-2, C-3, C-4, C-2, C-3, C-4, C-6, C-7, C-15
6	36.66 (CH)	2.84, m, 1H	H-5, H-7	-
7	46.37 (CH)	1.07, td, 1H	H-6, H-8, H-11	-
8	23.69 (CH_2)	1.32, ddd, 1H 1.75, m, 1H	H-7, H-8, H-9 H-7, H-8, H-9	C-6, C-7, C-9 C-6, C-7, C-9, C-10, C-11,
9	19.96 (CH_2)	2.68, dd, 1H 2.33, m, 1H	H-8, H-9, H-14 H-8, H-9, H-14	C-7, C-8, C-14, C-10 C-1, C-8, C-10, C-14
10	120.42 (C)	-	-	-
11	27.15 (CH)	2.12, sext-d, 1H	H-7, Me-12, Me-13	C-7, C-8, C-12, C-13
12	21.59 (CH_3)	0.89, d, 3H	H-11	C-7, C-11, C-13
13	15.78 (CH_3)	0.79, d, 3H	H-11	C-7, C-11, C-12
14	136.04 (CH)	6.96, bs, 1H	H-9ax/eq	C-1, C-2
15	23.69 (CH_3)	1.75, bs, 3H	H-3, H-5ax/eq	C-3, C-4, C-5

4.2.2.2 Strukturaufklärung eines Benzofurans (**71**)

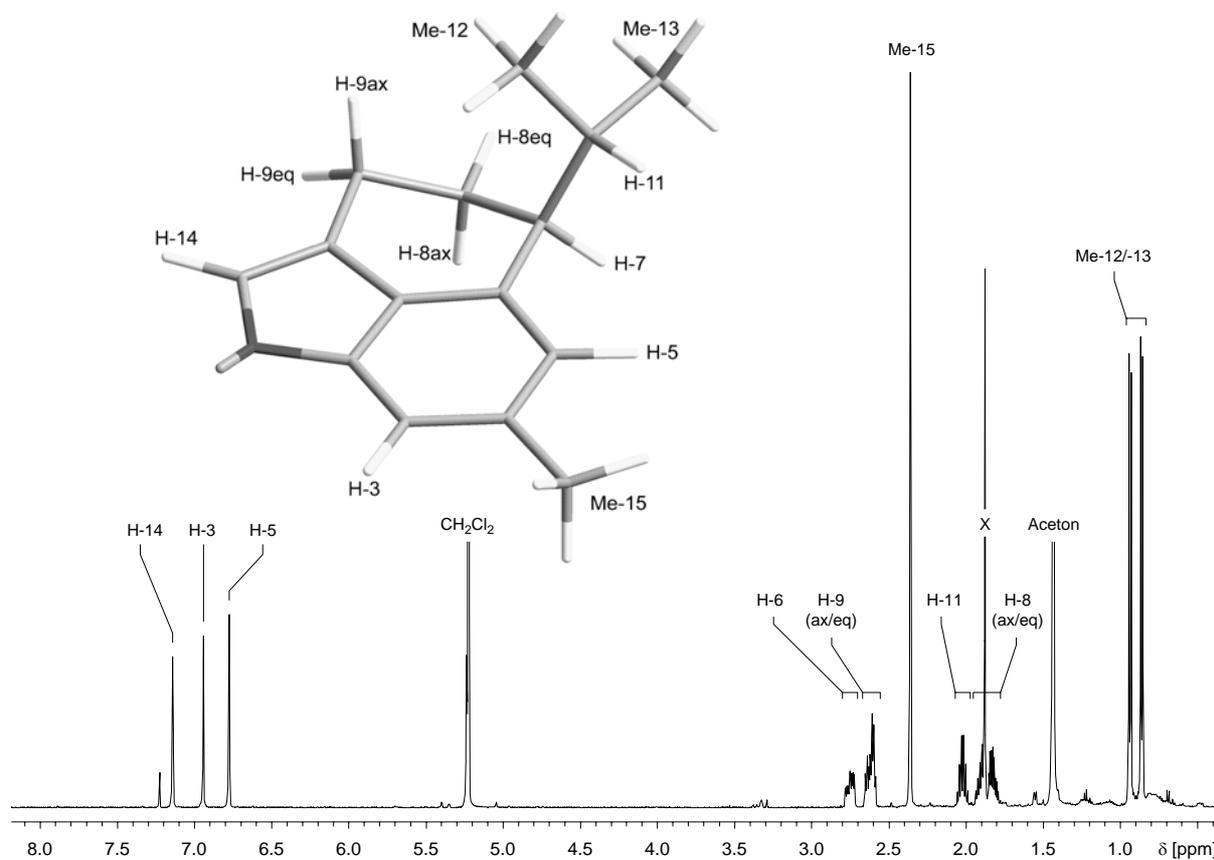


Abbildung 4-15 ^1H -NMR-Spektrum von **71** (500 MHz, CD_2Cl_2).

Das Sesquiterpen **71** ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}$), dessen Summenformel gegenüber **70** zwei Wasserstoffe weniger enthält, konnte ebenfalls mittels HPLC isoliert und durch Aufnahme eines COSY90, HMQC und HMBC Spektrums charakterisiert werden.

Der Vergleich der ^1H -NMR-Spektren zeigt die Strukturverwandtschaft der beiden Verbindungen an, läßt jedoch auch sofort den strukturellen Unterschied erkennen. Neben leicht veränderten chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen verschwinden in **71** eine allylische Methylengruppe sowie eine Methingruppe, hinzu kommt dagegen ein zusätzliches Proton im aromatischen Bereich. Die Methylgruppe C-15, die in **70** ein Singulett bei 1.75 ppm erzeugt, erscheint in **71** bei 2.36 ppm. Diese chemische Verschiebung ist charakteristisch für Methylgruppen an substituierten Aromaten, woraus klar wird, dass der in **70** teilweise ungesättigte Sechsring in **71** zum Benzen-System aromatisiert ist. Die Struktur dieses Benzofurans wird durch die in Tabelle 4-4 zusammengefassten HMBC- und COSY90-Signale bestätigt. Die Präsenz eines aromatischen Systems wird auch durch das UV-Spektrum (Abbildung 4-7) belegt und spiegelt sich nicht zuletzt in der chemischen Stabilität wider, die **71** im Gegensatz zum reaktiven Vinylfuran **70** kennzeichnen.

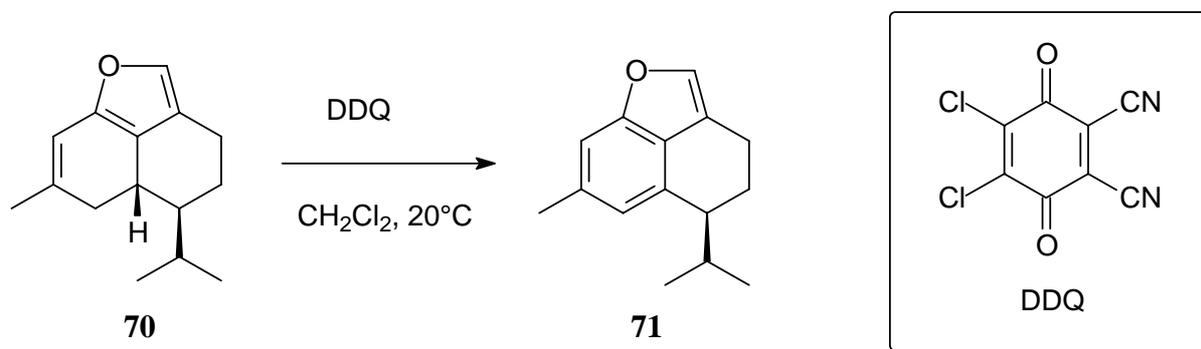
Tabelle 4-4 ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale von **71** sowie Kreuzsignale der zweidimensionalen Spektren. (500 MHz, CD_2Cl_2 , chemische Verschiebungen relativ zu $\delta_{\text{H}} = 5.32$ ppm bzw. $\delta_{\text{C}} = 53.8$ ppm, ^{13}C -Daten aus HMBC Spektren)

Position	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	COSY90	HMBC
1	125.5	-	-	-
2	*	-	-	-
3	108.4	6.94, s	H-5, Me-15	C-1, C-5
4	134.7	-	-	-
5	121.1	6.77, s	H-3, H-7, Me-15	C-1, C-3, C-7, C-15
6	135.9	-	-	-
7	43.5	2.61	H-8ax/eqm H-11	C-1, C-5, C-6, C-8, C-11
8	25.7	1.83	H-7, H-9ax/eq	C-6, C-7, C-9, C-10, C-11
		1.89	H-7, H-9ax/eq	C-6, C-7, C-9, C-10, C-11
9	18.6	2.64	H-8ax/eq, H-9,	C-7, C-8, C-10, C-14
		2.75	H-8ax/eq, H-9	C-7, C-8, C-10, C-14
10	117.6	-	-	-
11	29.7	2.02	H-7, Me-12, Me-13	C-6, C-7, C-8, C-12, C-13,
12	21.6	0.93	H-11	C-7, C-11, C-13
13	19.2	0.86	H-11	C-7, C-11, C-12
14	137.1	7.14	H-9ax/eq	C-1
15	22.3	2.36	-	C-3, C-4, C-5

* konnte auch im HMBC nicht detektiert werden

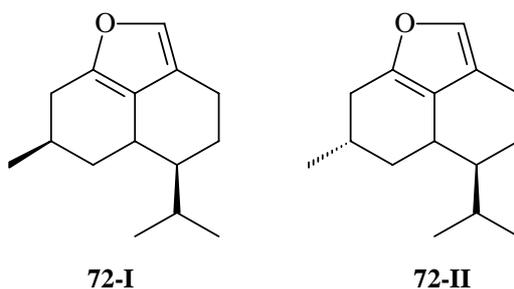
Die Strukturverwandschaft der Sesquiterpene **70** und **71** läßt sich durch eine einfache Derivatisierungsreaktion belegen. Die Einführung einer zusätzlichen Doppelbindung an C-6

und C-7 durch Umsetzung des Vinylfurans **70** mit DDQ (= 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-*p*-benzoquinon)^{58,59} führt zur Bildung des Benzofurans **71**.

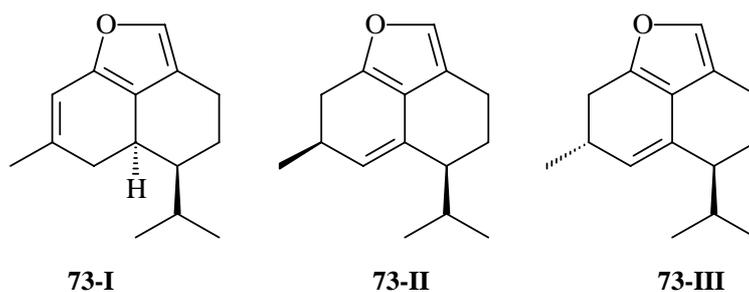


4.2.3 Strukturvorschläge für die Spurenkomponenten **72** und **73**

Die Strukturen der Verbindungen **72** und **73** konnten nicht aufgeklärt werden. Die elementare Zusammensetzung $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$ legt die Vermutung nahe, dass **72** eine Doppelbindung weniger als die Hauptkomponente besitzt. Möglicherweise fehlt in **72** die Doppelbindung an C-3 und C-4, wodurch in C-4 ein weiteres Stereozentrum vorliegen würde (Strukturvorschläge **72-I** und **72-II**). Daher wurde versucht, **72-I** oder **72-II** aus **70** durch katalytische Hydrierung zu gewinnen. In der Reaktionslösung konnte jedoch kein Reaktionsprodukt gaschromatographisch detektiert werden. Möglicherweise stellt die hohe Reaktivität von **70** bei Anwesenheit von Palladium auf Aktivkohle ein Problem dar. Dennoch ist denkbar, dass im Rahmen der Biosynthese des Vinylfurans **70** das Dihydro-Derivat **72-I** oder **72-II** die Vorstufe bildet.

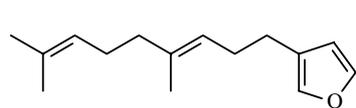


Die Struktur der Verbindung **73** bleibt ebenfalls ungeklärt. Das Massenspektrum stimmt fast vollständig mit dem seines Isomers **70** überein. Möglicherweise handelt es sich bei **73** um ein Stereoisomer im Hinblick auf die relative Konfiguration an C-6 und C-7 (**73-I**). Alternativ ist denkbar, dass in **73** eine Doppelbindung an C-5 und C-6, statt an C-3 und C-4 vorliegt. (**73-II** und **73-III**).

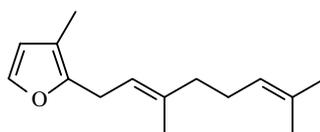


4.3 Diskussion der Ergebnisse

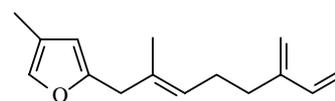
Monooxygenierte Sesquiterpene mit einem Furansystem finden sich sowohl im terrestrischen, als auch im marinen Bereich. Das strukturell einfachste, auf dem Farnesan-Gerüst basierende Dendrolasin (**74**) wurde 1957 von Pavan und Quilico aus der Holzameise *Lasius fuliginosus*^{*} isoliert und identifiziert⁶⁰. Mittlerweile wurde **74** sowohl in terrestrischen Pflanzen, als auch in marinen Wirbellosen⁶¹ wiederholt gefunden. Ebenso kennt man Dendrolasinderivate, die sich hinsichtlich der Lage und der Anzahl ihrer Doppelbindungen von **74** unterscheiden⁶². Eine abweichende Position des Furansystems innerhalb des Farnesan-Skeletts findet man im Sesquirosefuran **75** aus der japanischen Pflanze *Actinodaphne longifolia*⁶³ und in der Verbindung **76** aus der Koralle *Alcyonium palmatum*⁶⁴.



74



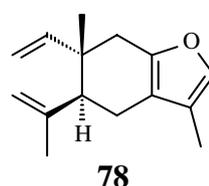
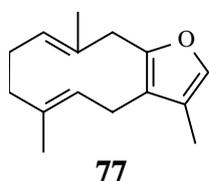
75



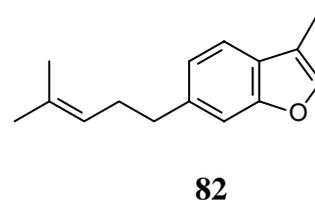
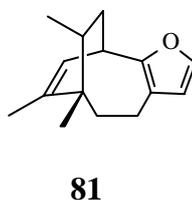
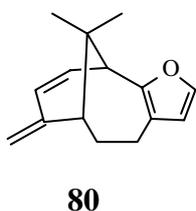
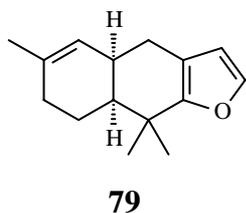
76

^{*} *Lasius* = *Dendrolasius* (synonym)

Das Furanodien **77**, sowie sein *Cope*-Umlagerungsprodukt, das Furanoelemen* **78**, sind weitverbreitete Sekundärmetabolite terrestrischer Heilpflanzen⁶⁵⁻⁶⁷, wurden jedoch auch in Octokorallen⁶⁸ gefunden. Ihre antibiotische und frasshemmende Wirkung wurde nachgewiesen⁶⁹.



Von den zahlreichen Furanosesquiterpenen aus marinen Wirbellosen seien hier das Furodysin **79**⁷⁰ und ein Vertreter der Pallescensine (**80**)⁷¹⁻⁷³ aus Schwämmen der Gattung *Dysidea* genannt. Nakafuran-8 (**81**)⁷⁴ ist eines von mehreren Furanosesquiterpenen, die in Hinterkiemerschnecken gefunden wurden, denen *Dysidea fragilis* als Nahrungsquelle dient. Die aufgrund ihres Körperbaues schutzlosen Tiere sequestrieren diese Terpene und speichern sie in den äußeren Hautpartien. Die biologische Aktivität der Furanosesquiterpene wird zur chemischen Verteidigung ausgenutzt^{74,69}.



In Gorgonien wurden ebenfalls wiederholt Terpene nachgewiesen. Ein sehr frühes Beispiel wurde bereits 1969 beschrieben: das Furoventalen **82** aus der Octokoralle *Gorgonia ventalina*⁷⁵, dessen Struktur durch Synthese bestätigt wurde, läßt sich nicht unmittelbar biosynthetisch aus einem Farnesen-Vorläufer ableiten.

Welche Funktion die Furanosesquiterpene in *A. grandiflora* haben, bleibt ungewiss. Es ist nicht bekannt, inwiefern *A. grandiflora* von Fraßfeinden befallen wird und sich die Notwendigkeit zur chemischen Verteidigung ergibt. Auffallend ist jedoch die Instabilität des Dihydroaromaten **70**, die wahrscheinlich auf der Konjugation des Furansystems mit der zusätzlichen Doppelbindung beruht. Die hohe Reaktivität von **70** könnte mit einer biologischen Abwehrfunktion verbunden sein. Dies bleibt jedoch vor dem Hintergrund mangelnder Information über die Ökologie dieser Gorgonie unklar.

* synonym findet man die Bezeichnungen „Curzeren“, „Isogermafuren“ und „Isofuranogermacren“

5 *Ascidia virginea*

Ascidien, die auch als „Seescheiden“ bezeichnet werden, gehören zu den Chordata und stellen damit eine der höchstentwickelten Tiergruppen innerhalb der marinen Wirbellosen dar. Diese Tiere setzen sich im Hinblick auf ihren komplexen Bauplan (Abbildung 5-1 rechts) deutlich von den zuvor erwähnten Schwämmen ab. Ökologisch sind sie jedoch als aktive Suspensionsfresser mit diesen in die Gruppe der hartsubstratbewohnenden Filtrierer einzuordnen. Sie unterliegen damit ähnlichen ökologischen Faktoren, und es ist nicht verwunderlich, dass sich viele dieser sessilen Invertebraten, dem Konzept der chemischen Verteidigung folgend, als potente Naturstoffproduzenten herausgestellt haben.^{1,76}

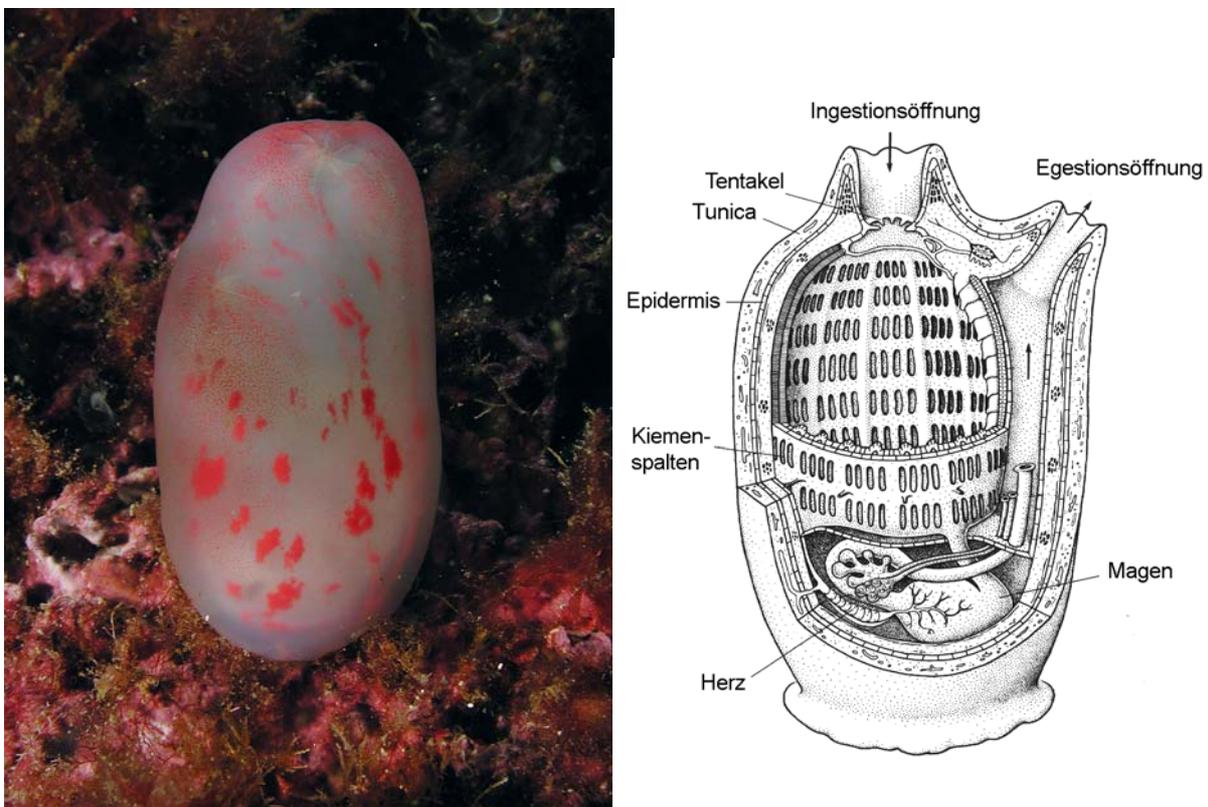


Abbildung 5-1 links: Einzelnes Individuum der Spezies *Ascidia virginea*. Die Ein- und Ausstromöffnung sind im Moment der Aufnahme verschlossen. (mit freundlicher Genehmigung Gerrit van Wijk), rechts: Bauplan der Tunicaten (nach Westheide¹⁴).

Abbildung 5-1 zeigt ein Individuum der Spezies *Ascidia virginea* (Ascidiidae). Von nahezu vollständiger Farblosigkeit bis zu einer durchgehend intensiv roten Pigmentierung findet man diese wenige Zentimeter großen Tiere im gesamten Nord-Atlantik. Über die Funktion der Farbstoffe ist nichts bekannt. Sie werden ausschließlich in der sehr stark ausgeprägten Außenhaut präsentiert, die die Tiere wie ein Mantel (lat. “*túnica*” = Hemd, Untergewand) schützt und ihnen auch den Namen “Tunicaten” gibt.

5.1 Extraktion und Voruntersuchungen

Tiefgefrorene Individuen wurden mehrfach mit Aceton extrahiert. Der intensiv rote Gesamtextrakt wurde eingeeengt und der Rückstand zunächst mit Pentan, dann mit Dichlormethan extrahiert. Hierbei gingen die roten Bestandteile in die Dichlormethanphase über, die nun eingehend untersucht wurde. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dieses Extrakts (Abbildung 5-2) zeigt neben unaufgelösten Signalen im aliphatischen Bereich (0.5 bis ca. 2.5 ppm), die möglicherweise von Lipid-Bestandteilen stammen, die Anwesenheit aromatischer Verbindungen an (Signale zwischen 6 und 11 ppm).

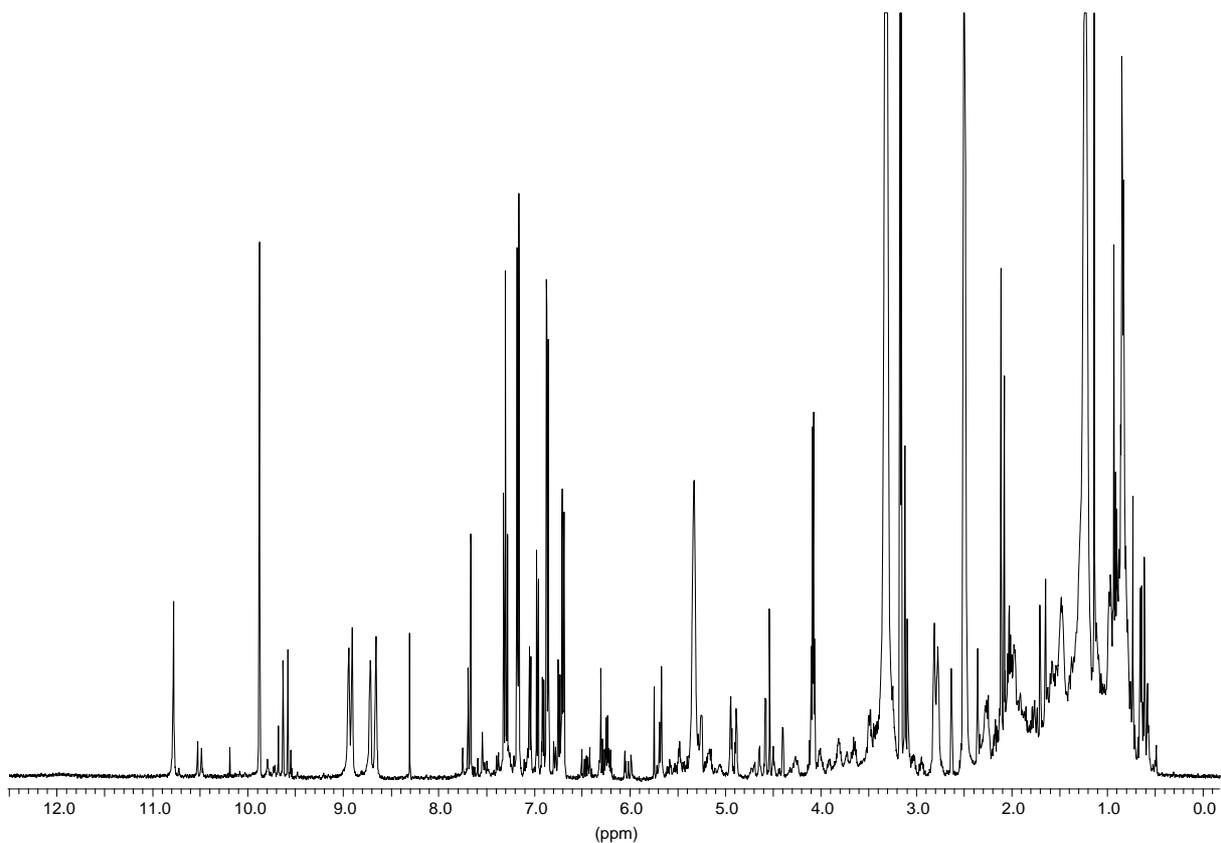


Abbildung 5-2 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Dichlormethanextrakts von *A. virginea* (500 MHz, DMSO-d_6)

5.1.1 HPLC-DAD

Der intensiv rot gefärbte Aceton-Gesamtextrakt wurde mit einer HPLC-DAD-Kopplung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die rote Farbe des Extrakts im Wesentlichen durch zwei Verbindungen (**83** und **84**) mit UV-Vis-Absorptionsmaxima bei 485 nm und 321 bzw. 323 nm hervorgerufen wird. Das Chromatogramm des Extrakts (HPLC) ist in Abbildung 5-3 wiedergegeben, die UV-Vis-Spektren der Hauptkomponenten **83** und **84** zeigt Abbildung 5-4.

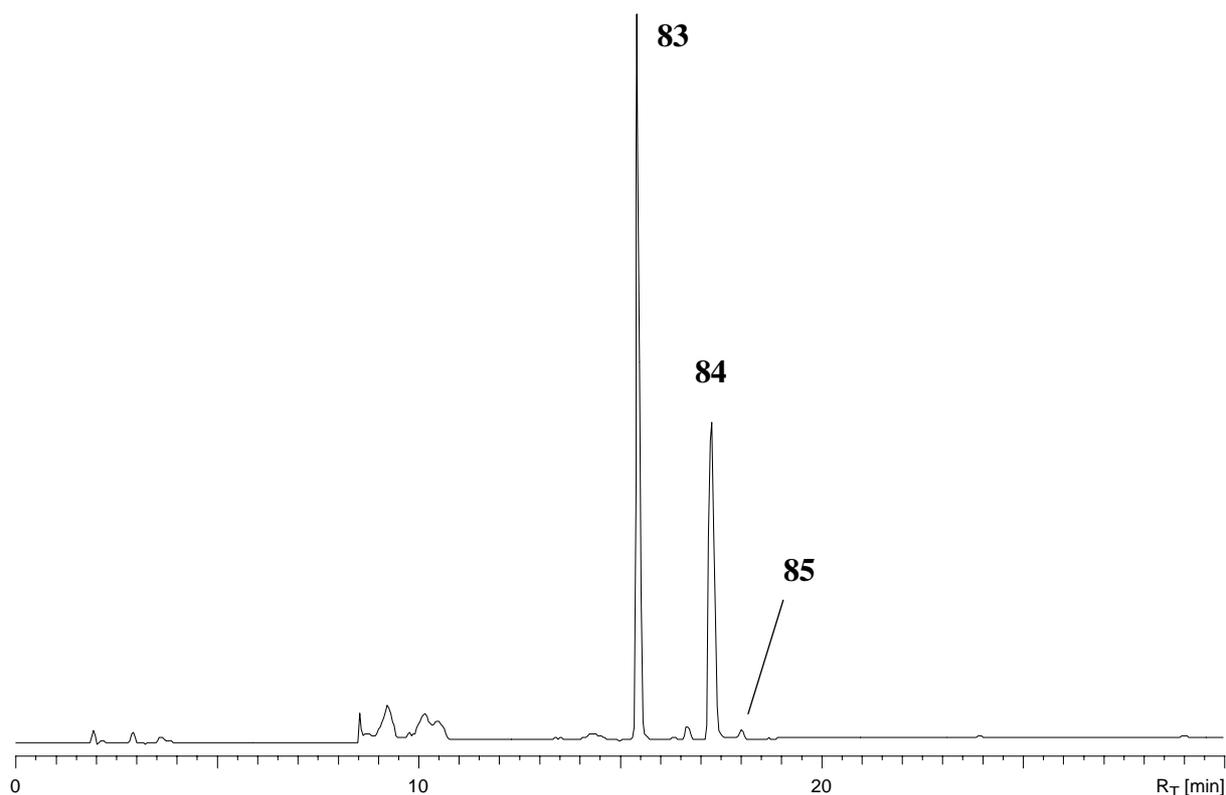


Abbildung 5-3 HPLC des Acetongesamtexttrakts von *A. virginea*, Detektion: UV-Vis bei 485 nm, Säule: Merck® RP-18e (5µm), 250×4mm, 0-5 min Acetonitril/Wasser 20:80, 5-20 min Gradient, 20-30 min Acetonitril, Flussrate = 1.5 ml/min

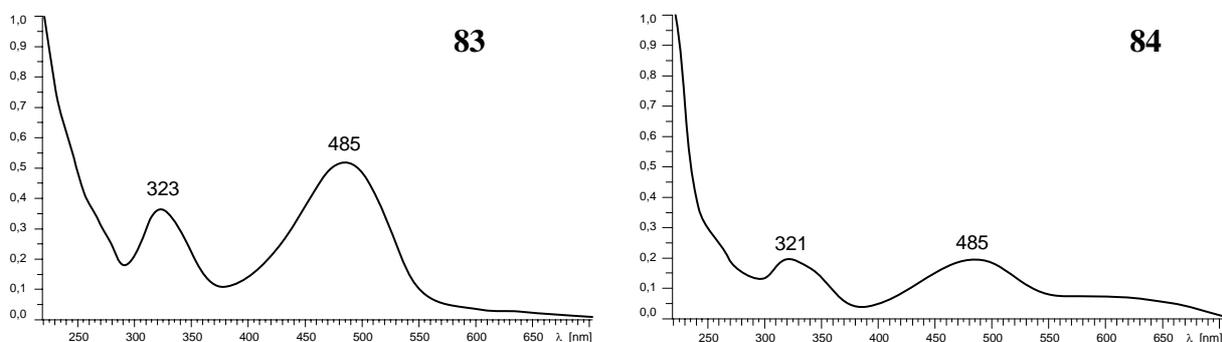


Abbildung 5-4 UV-Vis-Spektren der Verbindungen **83** (links) und **84** (rechts)

5.1.2 Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der elementaren Zusammensetzung der Inhaltsstoffe in *A. virginea* wurden verschiedene massenspektrometrische Verfahren angewendet. Der Extrakt enthielt keine GC-gängigen Komponenten, was die Untersuchung durch GC-MS-Kopplung ausschloss. Versuche, mittels FAB-MS oder MALDI Sekundärmetabolite zu detektieren, blieben ebenso erfolglos. In beiden Fällen konnten nur Matrix-Bestandteile nachgewiesen werden.

Die mangelnde Verdampfbarkeit und die gute Löslichkeit in Lösungsmittelgemischen mit hohem Wasseranteil ließen auf hohe Polarität der Verbindungen schließen. Da jedoch mittels

ESI-MS keine Ionen nachgewiesen werden konnten, dürften **83-85** in Lösung nicht ionisch vorliegen.

Als erfolgreiche Methode erwies sich schließlich die APCI-MS, bei der durch Corona-Entladung unter Normaldruck sowohl positive als auch negative Ionen gebildet werden. Diese Ionisierungsmethode ermöglicht die massenspektrometrische Untersuchung mittelpolarer Verbindung durch chemische Ionisation in Lösung.

5.1.3 HPLC-APCI-MS: Detektion positiver Ionen

Die durchgeführten HPLC-MS-Analysen bei Detektion positiver Ionen (Abbildung 5-5) ergaben zunächst keine Klarheit über die molekularen Zusammensetzungen der Inhaltsstoffe in *A. virginea*. Die Komponenten **83** und **84** konnten nur mit sehr geringer Ionenausbeute im Extrakt nachgewiesen werden. Positiv geladene Pseudomolekülonen $[M+H]^+$ waren hierbei zunächst jedoch nicht eindeutig zu identifizieren. Diese treten zwar bei beiden Komponenten auf, werden aber sowohl von Fragment-Ionen, als auch von Lösungsmittel-Addukten dominiert. Die relative Intensität dieser Ionen variiert sehr stark je nach Mischungsverhältnis der Eluenten (Acetonitril-Wasser), was eine Interpretation zusätzlich erschwert. Dass die in Abbildung 5-5 gezeigten Ionen aus den Verbindungen **83** und **84** hervorgehen, konnte eindeutig durch synchrone, gesplittete MS- und UV-Detektion des HPLC-Eluats belegt werden. Darüberhinaus erkennt man anhand der Ionen m/z 110, 141, 169, 197, 230, 256, 271 und 299, die sowohl bei **83**, als auch bei **84** auftreten, die Strukturverwandschaft beider Verbindungen. Bei diesen Ionen handelt es sich wahrscheinlich um Reaktionsprodukte energiereicher, positiv ionisierter Lösungsmittel-Moleküle mit **83** bzw. **84**. Das Massenspektrum von **84** unterscheidet sich von dem von **83** durch eine Serie zusätzlicher Ionen, die eine Massendifferenz von $\Delta m/z$ 126 zu einigen der gemeinsamen Ionen beider Verbindungen zeigen. Obwohl die Bedeutung dieser Ionen bis hier noch unklar ist, deutet diese Massendifferenz bereits den strukturellen Unterschied zwischen **83** und **84** an.

Die Masse des Ions mit m/z 256 (Abbildung 5-5) ließ sich mittels hochauflösender Massenspektrometrie exakt bestimmen und ergab eine elementare Zusammensetzung von $C_{14}H_{10}NO_4$. Vom Ion mit m/z 284 konnte aufgrund starker Überlagerung mit dem Pseudomolekülion $[M+H]^+$ von Octadecansäureamid $C_{18}H_{38}NO$ keine Elementarzusammensetzung ermittelt werden.

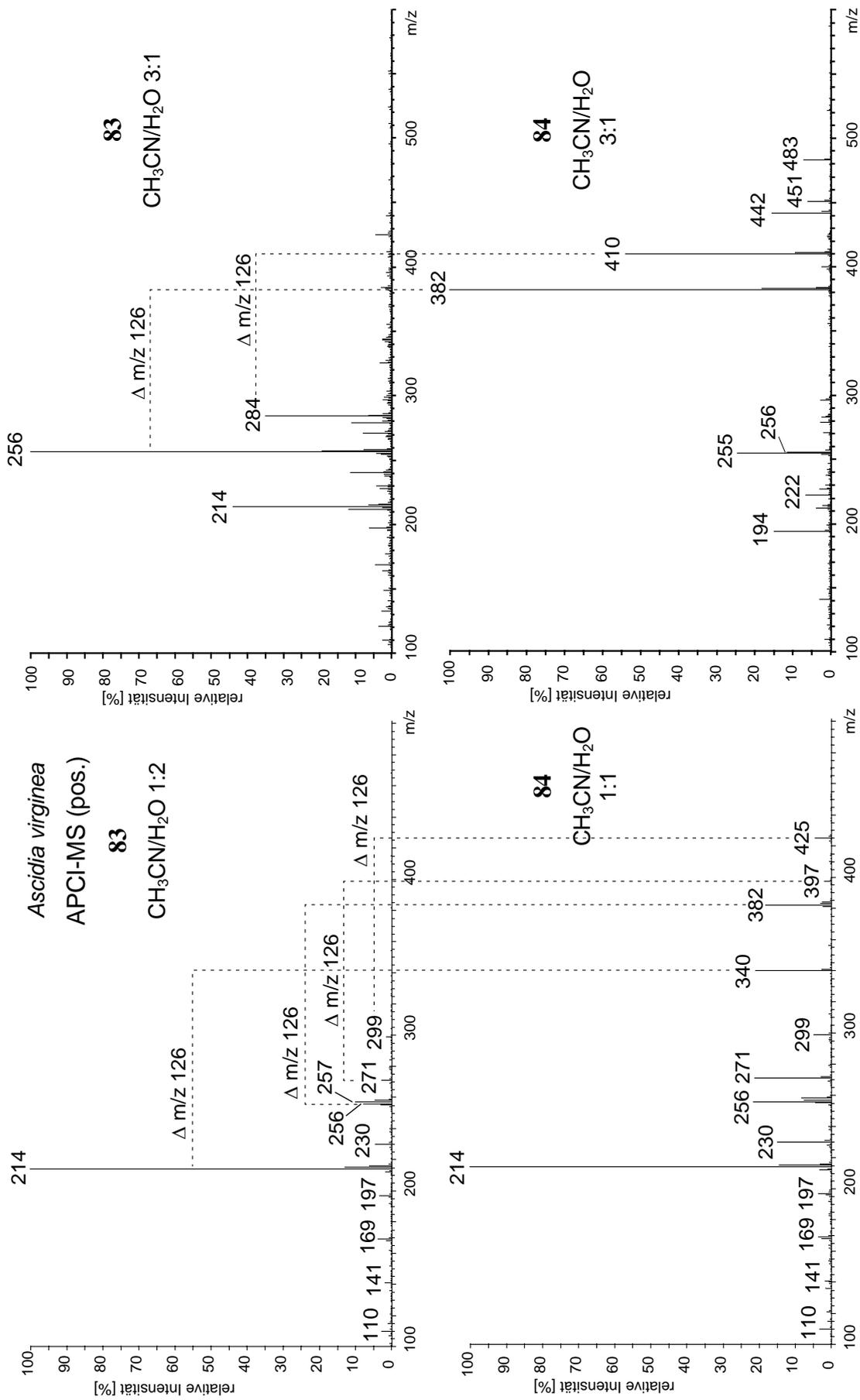


Abbildung 5-5 APCI-MS (positive Ionen) der Komponenten **83** und **84** bei unterschiedlicher Zusammensetzung des HPLC-Eluats.

Auf weitere Untersuchungen wie z.B. Hochauflösung der positiven Ionen aus **84** wurde verzichtet, da mit der äußerst geringen Ausbeute positiver Ionen für diesen Detektionsmodus hohe Flussraten der Analyt-Lösungen und damit ein problematischer Substanzverbrauch verbunden war. Die Bedeutung der positiven Ionen aus den Verbindungen **83** und **84** wird erst vor dem Hintergrund der Ergebnisse des nächsten Abschnitts klar.

5.1.4 APCI-MS: Detektion negativer Ionen

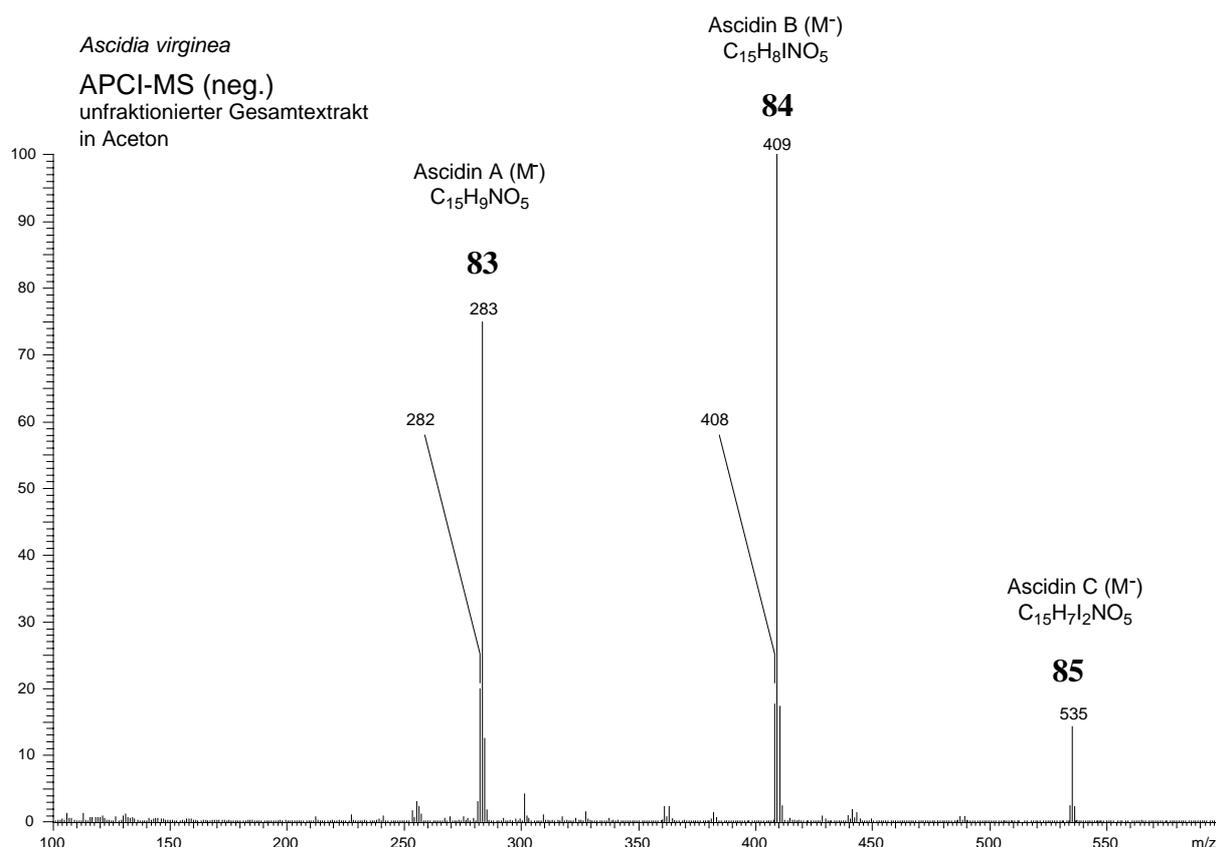


Abbildung 5-6 APCI-MS im Negativ-Ionen-Modus des Gesamtextrakts von *A. virginea*. Die Intensitäten der Molekülionen spiegeln aufgrund der unterschiedlichen Elektronenaffinitäten nicht deren relative Häufigkeitsverteilung wieder. (Vergl. Intensitäten bei HPLC-UV-Detektion, Abbildung 5-3)

Bei der Detektion negativer Ionen wurde eine sehr gute Ionenausbeute beobachtet. Das Spektrum des Rohextrakts (Abbildung 5-6) wird durch die Gegenwart dreier Ionen mit m/z 283, 409 und 535 bestimmt. Mit Hilfe der HPLC-MS-Kopplung wurden diese Ionen den intensiv roten Verbindungen **83**, **84** und **85** zugeordnet. Ihre elementaren Zusammensetzungen konnten durch hochaufgelöste Massenspektrometrie ermittelt werden, die Ergebnisse sind in Tabelle 5-1 wiedergegeben.

Das Ion m/z 283 hat die Summenformel $[C_{15}H_9NO_5]^-$, in den beiden anderen Ionen findet man ein bzw. zwei Wasserstoffatome gegen Iod ausgetauscht (**84**, m/z 409, $[C_{15}H_8INO_5]^-$ und **85**, m/z 535, $[C_{15}H_7I_2NO_5]^-$). Die Verbindungen wurden Ascidin A, B und C genannt.

Tabelle 5-1 Ergebnisse der hochaufgelösten Massenspektrometrie für die in Abbildung 5-6 dargestellten Ionen.

	Bezeichnung	Summenformel	m/z		Δ (ppm)	Doppelbindungs- äquivalente
			gemessen	berechnet		
83	Ascidin A	$C_{15}H_9NO_5$	283.0474	283.0481	+ 1.4	12
84	Ascidin B	$C_{15}H_8INO_5$	408.9441	408.9447	+ 1.5	12
85	Ascidin C	$C_{15}H_7I_2NO_5$	534.8416	534.8414	- 0.4	12

Wie man anhand der ganzzahligen Werte für die Doppelbindungsäquivalente (Tabelle 5-1) sehen kann, handelt es sich hierbei um negativ geladene Molekülionen $[M]^-$, und nicht um die aus der Deprotonierung hervorgegangenen Pseudomolekülionen $[M-H]^-$. Diese um eine Masseneinheit leichteren Ionen treten zwar im APCI-Spektrum ebenso auf, werden jedoch um ein Vielfaches durch die jeweiligen $[M]^-$ -Spezies dominiert. Offensichtlich werden die Ascidine A, B und C eher durch Elektroneneinfang (*Electron Capture*, EC) ionisiert, als durch Deprotonierung. Dieser Ionisierungsprozess tritt besonders bei Molekülen mit hoher Elektronenaffinität auf⁷⁸. Typische funktionelle Gruppen, die diese Fähigkeit zur Bildung negativer Ionen erhöhen, sind die Halogene, Nitrogruppen, sowie konjugierte Carbonylsysteme, wie sie in Chinonen vorkommen. In diesem Zusammenhang ist die Bildung von $[M]^-$ -Ionen für die iodierten Ascidine B und C (**84**, $C_{15}H_8INO_5$ bzw. **85**, $C_{15}H_7I_2NO_5$) nicht verwunderlich, für das nicht-halogenierte Ascidin A (**83**, $C_{15}H_9NO_5$) jedoch bemerkenswert. Da hier die Bildung des negativen Molekülions nicht durch die Anwesenheit von Halogenen erklärt werden kann, muss ein anderes Strukturmerkmal für die Stabilisierung der negativen Ladung verantwortlich sein. Der hohe Grad der Unsättigung und die große Zahl von Sauerstoffatomen macht die Gegenwart eines chinoiden Systems wahrscheinlich. Chinone mit ausgedehnten konjugierten π -Systemen sind häufig farbige Verbindungen. Auch bei den intensiv roten Ascidinen **83**, **84** und **85** korreliert die leichte $\pi \rightarrow \pi^*$ -Anregung durch energiegunstige antibindende Orbitale mit hoher Elektronenaffinität, die zum Elektroneneinfang im CI-Plasma der Corona-Entladung führt. Dies erklärt auch die äußerst geringe Tendenz zur Bildung positiver Ionen. Das zuvor besprochene positive Ion $[C_{14}H_{10}NO_4]^+$ m/z 256 (S.88) ist demzufolge das protonierte Fragment, das aus **83** ($C_{15}H_9NO_5$) durch CO-Abspaltung hervorgeht. Decarbonylierung ist typisch für Polycarbonylverbindungen, was die Annahme eines chinoiden-Systems zusätzlich

stützt. Das positive Ion m/z 284 ist wahrscheinlich das Pseudomolekülion $[M+H]^+$, was jedoch aufgrund der mangelnden Ionenintensität und Überlagerung mit Kontaminanten nicht durch hochaufgelöste Massenspektrometrie bewiesen werden konnte. Unter Berücksichtigung der in Tabelle 5-1 aufgeführten Ergebnisse sind in Analogie dazu die positiven Ionen m/z 382 und m/z 410 (Abbildung 5-5) wahrscheinlich das protonierte Decarboxylierungsprodukt $[M-CO+H]^+$ bzw. das Pseudomolekülion $[M+H]^+$ von Ascidin B (**84**).

5.2 Isolierung und Identifizierung neuer Chinone mit Isochinolin-Skelett

Zur Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe **83**, **84** und **85** aus *A. virginea* wurde deren Reingewinnung angestrebt. Chromatographie des Extrakts über Kieselgel erwies sich als ungeeignet. Trotz rascher Elution konnte ein partieller Verlust der rot gefärbten Anteile nicht vermieden werden. Methanol stellte sich ebenfalls als ungeeignetes Lösungsmittel heraus, da in methanolischer Lösung bereit nach wenigen Minuten eine Entfärbung des Extrakts auftrat. Aufgrund dieser Einschränkungen der flüssig-chromatographischen Möglichkeiten wurde die Chromatographie an Sephadex LH-20[®] angewendet. Hier zeigte sich das Gemisch aus Aceton und Dichlormethan im Verhältnis 1:1 als geeignetes Laufmittel. Der Dichlormethanextrakt wurde auf diese Weise fraktioniert, so dass die rotgefärbte Fraktion eingehender untersucht werden konnte. Das ¹H-NMR-Spektrum dieser Fraktion zeigte, dass die bereits im Rohextrakt beobachteten aromatischen Signale offenbar den roten Verbindungen zuzuordnen war. Schließlich wurden die Verbindungen **83** und **84** mittels präparativer *Reversed-Phase*-HPLC reingewonnen. Die Trennung wurde an einer Kromasil[®] RP-18 Säule mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch im Verhältnis 40:60 durchgeführt. **83** und **84** wurden massenspektrometrisch durch MS/MS-Experimente untersucht, sowie NMR-spektroskopisch vollständig charakterisiert. Von beiden Komponenten konnten darüberhinaus IR-Spektren aufgenommen werden. Diese analytischen Daten werden in den folgenden Abschnitten für **83** und **84** separat diskutiert.

5.2.1 Ascidin A: MS/MS des negativen Molekülions.

Mit Ascidin A (**83**) wurden mit Hilfe einer Ionenfalle MS/MS-Experimente durchgeführt, um anhand von charakteristischen Fragmentierungen Rückschlüsse auf Teilstrukturen ziehen zu können. Da **83** fast ausschließlich negative Ionen in der APCI-Quelle bildet, wurden die MS/MS-Untersuchung im Negativ-Ionen-Modus durchgeführt.

Die Massenspektrometrie negativer Ionen ist wenig untersucht und in der Naturstoff-Analytik leider wenig etabliert. Typische Fragmentierungen und Zerfallsreaktionen, wie man sie für positive Ionen kennt, sind für negative Ionen kaum bekannt⁷⁷. Die NI-MS (*Negative Ion Mass Spectrometry*) gilt nach wie vor als spezielle Methode zur Untersuchung einzelner Substanzklassen (Polyhalogenierte Verbindungen, aromatische Nitroverbindungen, u.a.)^{78,79}.

In Abbildung 5-7 ist die Fragmentierung des Molekülions und des intensivsten Tochterions für Ascidin A (**83**) wiedergegeben. Da die exakte Masse der Fragment-Ionen nicht bestimmt werden konnte, bleibt deren Zusammensetzung ungewiss. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen Fragmentierungen hauptsächlich um die Abspaltung von CO₂ (44), CO₂H (45), CO (28), sowie CHO (29). Diese unspezifischen Prozesse liefern leider keine detaillierten Hinweise auf Substrukturen, die zur Strukturaufklärung von **83** beitragen könnten, lassen jedoch auf die Präsenz von Carbonylgruppen schließen, die bereits aufgrund der hohen Zahl an Sauerstoffatomen und Doppelbindungsäquivalenten vermutet wurden.

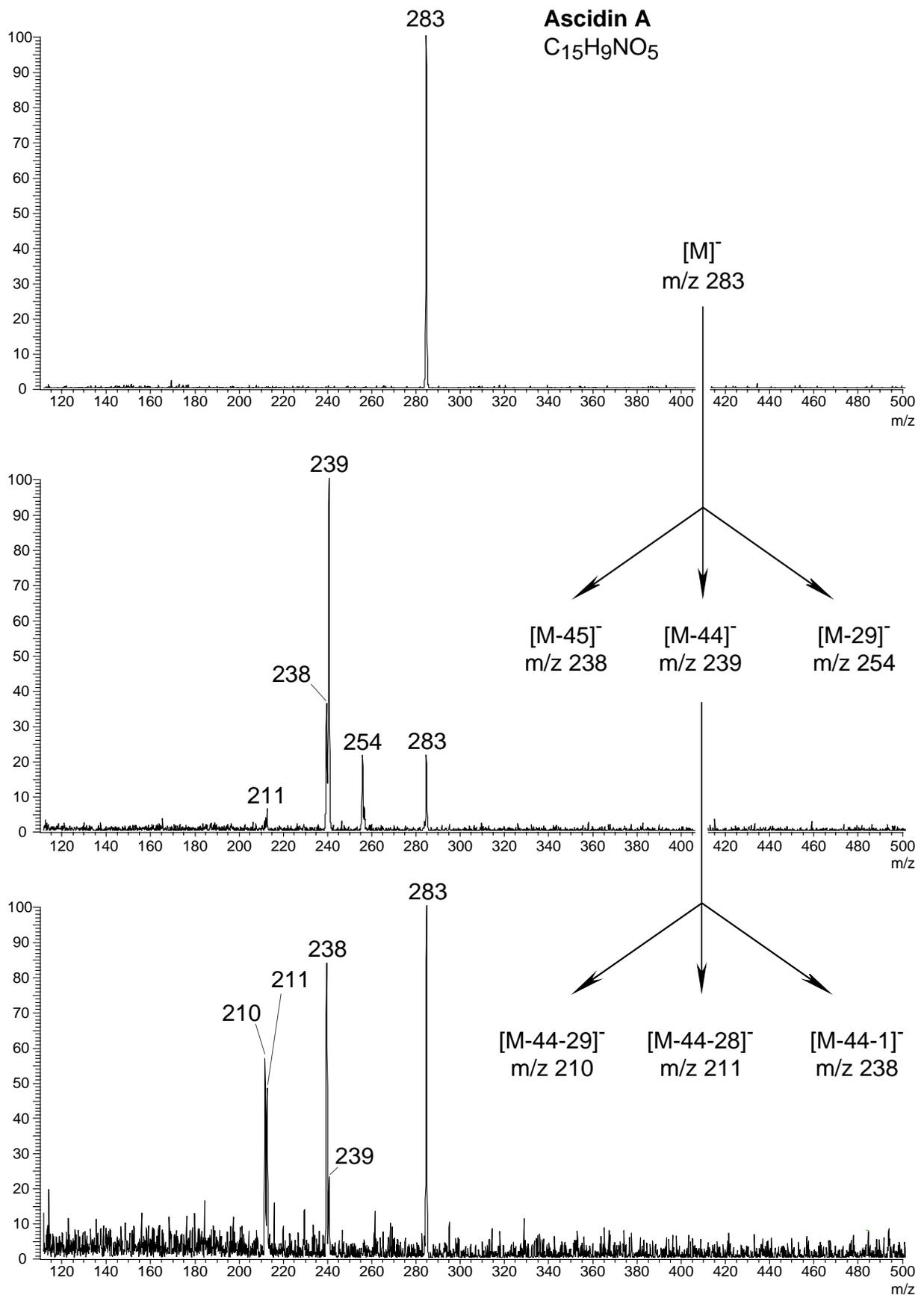


Abbildung 5-7 MS/MS-Untersuchung von Ascidin A (**83**). a) $[M]^-$ m/z 283 b) Tochterionen von $[M]^-$ bei relativer Kollisionsenergie von 18%. c) Tochterion aus m/z 239, relative Kollisionsenergie 17%

5.2.2 Ascidin A: IR-Spektroskopie

Von **83** konnte ein IR-Spektrum aufgenommen werden. Dieses bestätigt die Anwesenheit mehrerer Carbonylgruppen in **83** (Absorptionsbanden bei 1734 cm^{-1} , 1707 cm^{-1}). Darüberhinaus ist das Stickstoffatom in **83** möglicherweise Teil eines Amids. (Banden bei 1617 cm^{-1} , 1598 cm^{-1} , 1587 cm^{-1}). Weiterhin fallen breite OH-Banden auf (3530 , 3365 und 3276 cm^{-1}).

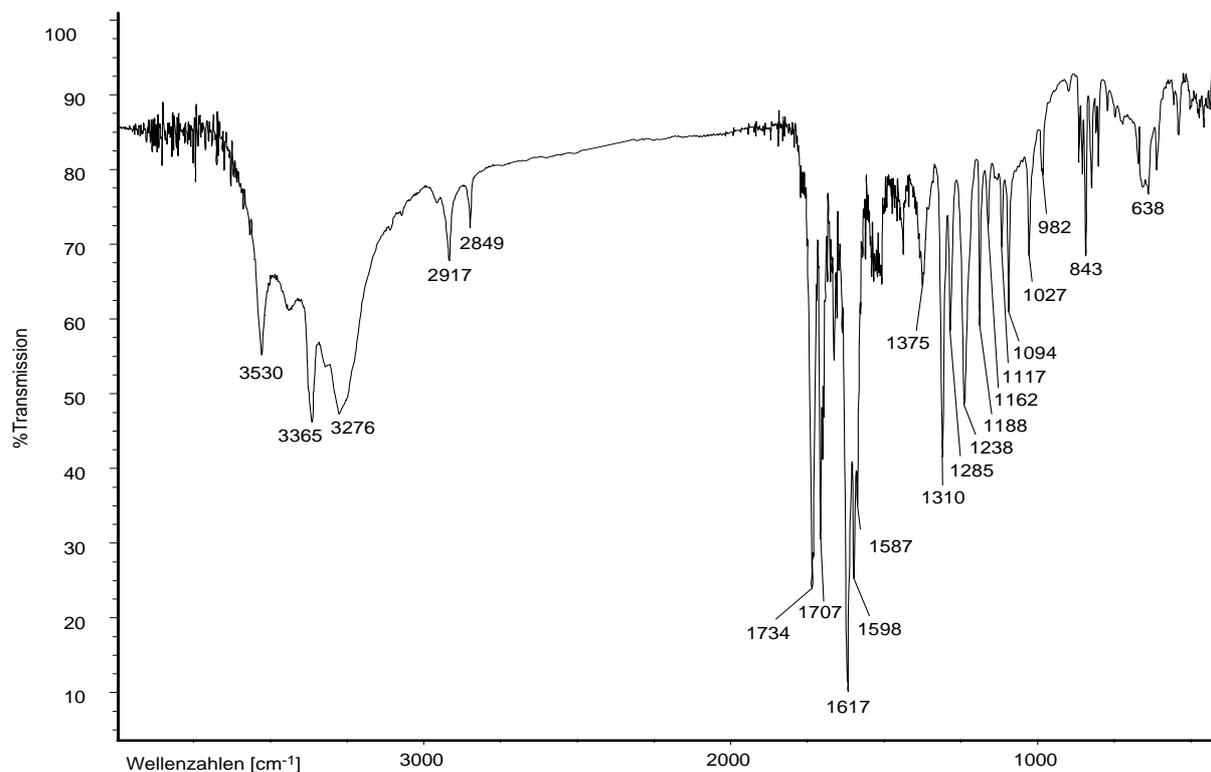


Abbildung 5-8 IR-Spektrum von **83** (KBr-Pressling)

5.2.3 Ascidin A: NMR-Spektroskopie

5.2.3.1 Ermittlung von Teilstrukturen

Das ^1H -NMR-Spektrum von **83** (DMSO-d_6) zeigt drei Singuletts bei $\delta_{\text{H}} = 8.69$, 8.93 und 9.90 ppm, sowie vier Dubletts bei $\delta_{\text{H}} = 6.72$, 6.89 , 7.20 und 7.34 ppm. Wie durch Aufnahme des ^1H -NMR-Spektrums in Aceton- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$ gezeigt werden konnte, unterliegen die Singuletts dem chemischen Austausch. Es handelt sich demnach um heteroatom-gebundene Protonen (OH oder NH) aromatischer oder vinyllischer Systeme. Die vier Dubletts lassen sich in zwei Paare aufteilen. Die Signale bei $\delta_{\text{H}} = 6.72$ und 7.34 ppm repräsentieren jeweils ein Wasserstoffatom und zeigen eine Kopplung von 10 Hz . Die beiden inneren Dubletts bei $\delta_{\text{H}} = 6.89$ und 7.20 ppm werden ebenfalls durch koppelnde Protonen erzeugt, beide Signale haben ein Integral von je zwei Wasserstoffatomen.

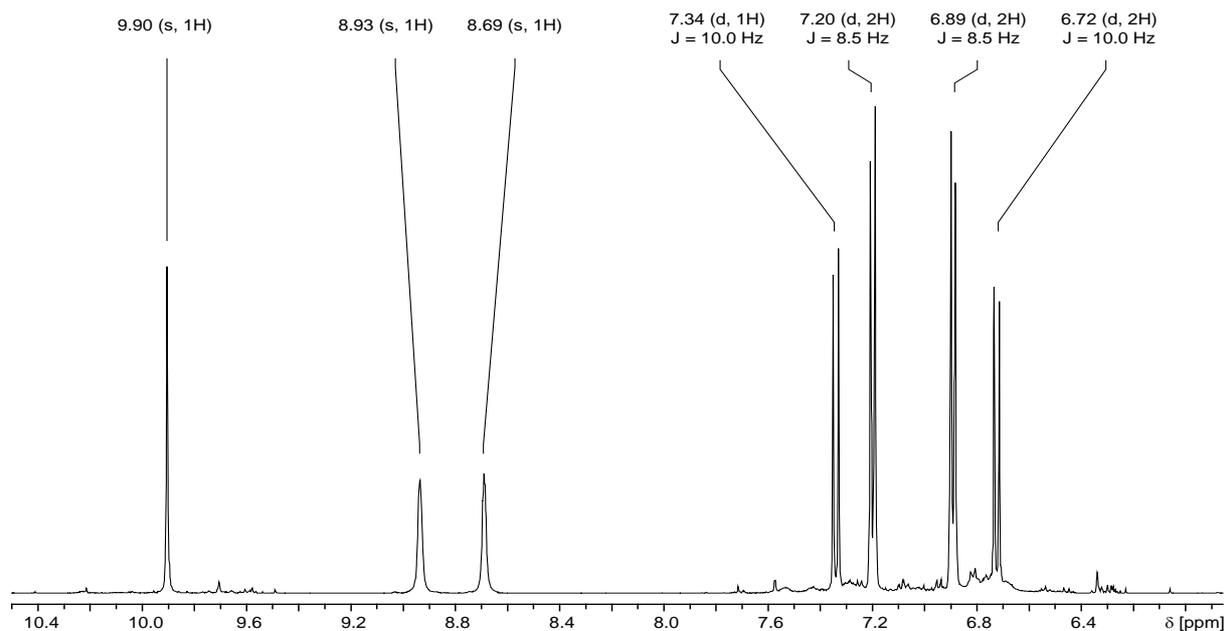


Abbildung 5-9 ^1H -NMR-Spektrum von **83** (DMSO- d_6 , 500 MHz)

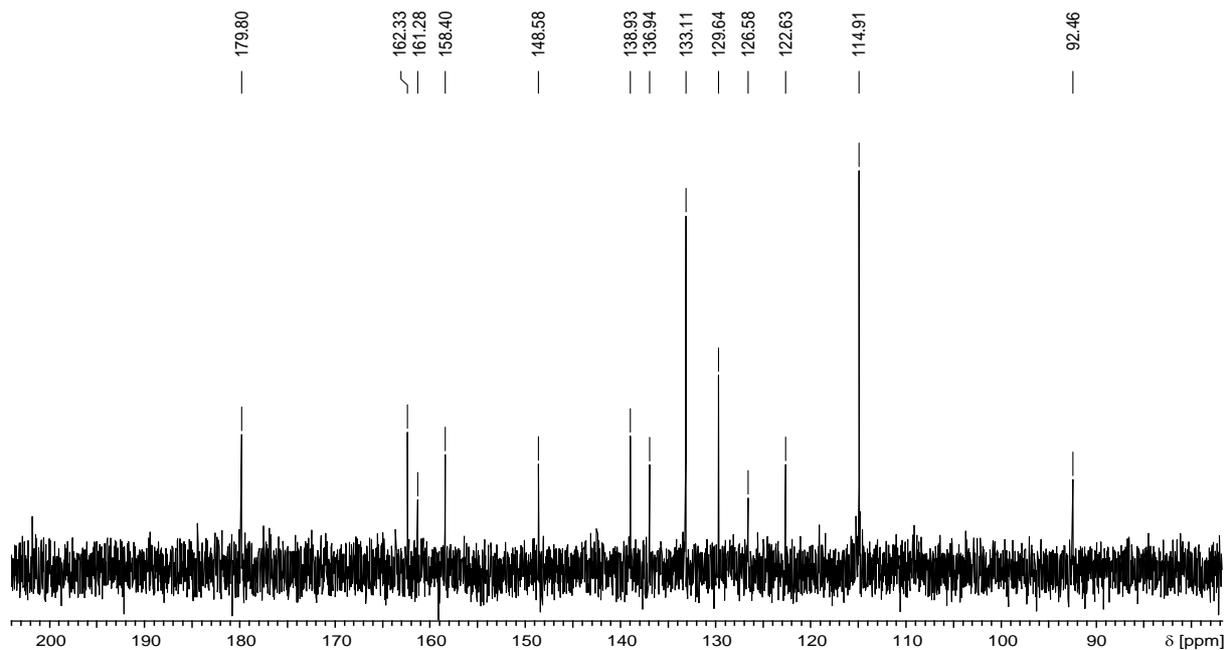


Abbildung 5-10 ^{13}C -NMR-Spektrum von **83** (DMSO- d_6 , 100.6 MHz)

Von **83** konnte ein ^{13}C -NMR-Spektrum aufgenommen werden. Das Relaxationsintervall wurde hierfür auf 3 Sekunden gesetzt, um auch jene quartären Kohlenstoffatome zu detektieren, die in stark substituierten aromatischen Systemen aufgrund ihrer langen Relaxationszeiten häufig eine äußerst geringe Signalintensität aufweisen. Das ^{13}C -Spektrum von Ascidin A ($\text{C}_{15}\text{H}_9\text{NO}_5$) zeigt dennoch insgesamt nur 13 Signale unterschiedlicher chemischer Verschiebungen. Von diesen treten zwei mit hoher Intensität hervor (114.91 und 133.11 ppm). Die C-H-Konnektivitäten, die über das HMQC-Spektrum ermittelt wurden, zeigen, dass es sich hierbei um vier aromatische Methin-Gruppen handelt, die aufgrund der Symmetrie einer Teilstruktur nur zwei Signale im

^{13}C -NMR-Spektrum und nur zwei Dubletts (6.89 und 7.20 ppm) mit einem Integral von je 2H im ^1H -NMR-Spektrum erzeugen. Im HMBC Spektrum bestätigt das überlagerte Auftreten von $^1\text{J}_{\text{C,H}}$ - und $^3\text{J}_{\text{C,H}}$ -Kopplung zu ein- und demselben ^{13}C -Signal das Vorliegen eines symmetrischen Systems (Abbildung 5-11). Weitere HMBC-Signale zu den quartären Kohlenstoffatomen $\delta_{\text{C}} = 158.40$ und 122.63 ppm, sowie die *long-range*-Korrelationen des scharfen Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 9.90$ ppm ergeben ein 1,4-disubstituiertes Phenol als Teilstruktur I von **83**.

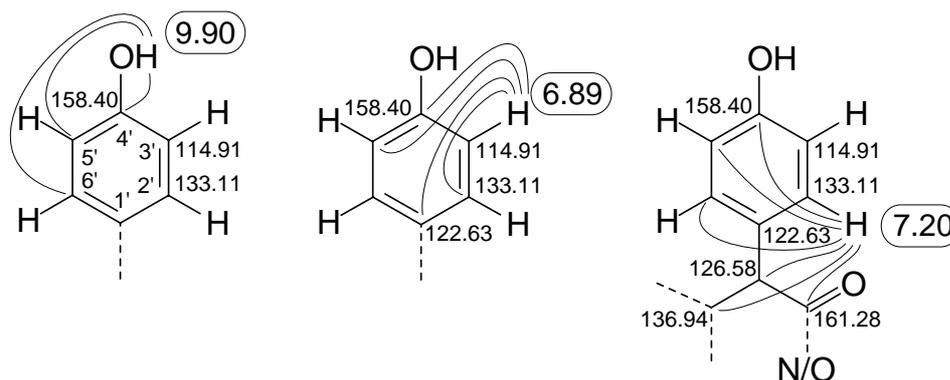


Abbildung 5-11 Teilstruktur I von Ascidin A (**83**), die nach Analyse der *long-range*-Korrelationen (HMBC) des Spinsystems $\delta_{\text{H}} = 6.89/7.20/9.90$ ppm erhalten wurde.

Die Verknüpfung dieser *para*-Phenoleinheit mit dem restlichen Teil des Moleküls wird aus den C,H-Fernkopplungen von H-2'/6' ersichtlich (Abbildung 5-11 rechts). Ein besonders starkes HMBC-Kreuzsignal zu $\delta_{\text{C}} = 126.58$ ppm (Abbildung 5-18) lokalisiert die Verknüpfung des Phenolrestes mit dem $\text{C}_9\text{H}_4\text{NO}_4$ -Rest des Moleküls. Weitere Fernkopplungen zeigen die Umgebung dieses quartären Kohlenstoffatoms an. Dieses trägt nicht nur den *para*-Phenolrest, sondern ist an zwei weitere quartäre C-Atome gebunden ($\delta_{\text{C}} = 136.94$ ppm und 161.28 ppm), von denen eines Teil einer Carbonylgruppe eines Esters oder Amids sein muss. (Abbildung 5-11).

Das zweite Dublett-Paar im ^1H -NMR-Spektrum (6.72 und 7.34 ppm) zeigt eine Kopplungskonstante von 10 Hz. Eine Kopplungskonstante dieser Größe ist untypisch für benzoide Aromaten, vielmehr ist sie charakteristisch für geminale *cis*-Kopplungen. Der große Unterschied in der chemischen Verschiebung beider Signale weist auf eine α,β -ungesättigte Carbonylgruppe hin (Abbildung 5-12). Beide Protonen dieser Teilstruktur zeigen ein HMBC-Signal zum Carbonylkohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 179.80$ ppm. Darüberhinaus sieht man zahlreiche Fernkopplungen zu weiteren quartären Kohlenstoffatomen. Da hier nicht zwischen ^2J -, ^3J -, ^4J -, oder auch ^5J -Kopplungen unterschieden werden kann, läßt sich die Konnektivität dieser C-Atome nicht unmittelbar ablesen.

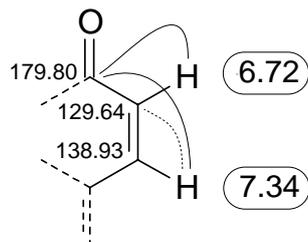


Abbildung 5-12 Teilstruktur II in 83.

Eine dritte Teilstruktur (III, Abbildung 5-13) geht aus den beiden heteroatomgebundenen H-Atomen $\delta_{\text{H}} = 8.69$ und 8.93 ppm hervor. Hierbei handelt es sich um Protonen zweier phenolischer Hydroxylgruppen. Die räumliche Nähe dieser beiden OH-Gruppen wird durch ein starkes NOE-Signal angezeigt. Durch Aufnahme eines phasensensitiven NOESY konnte ausgeschlossen werden, dass dieses NOE-Signal durch chemischen Austausch erzeugt wird.

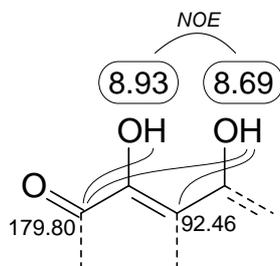


Abbildung 5-13 Teilstruktur III in 83.

Beide OH-Protonen zeigen HMBC-Kreuzsignale zur Carbonylgruppe $\delta_{\text{C}} = 179.80$ ppm. Das Proton mit $\delta_{\text{H}} = 8.69$ ppm koppelt darüberhinaus auch noch mit einem quartären Kohlenstoffatom mit $\delta_{\text{C}} = 92.46$ ppm. Diese außergewöhnliche chemische Verschiebung eines sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatoms lässt sich mit der in Abbildung 5-13 gezeigten 1,3-Diolstruktur erklären. β -Kohlenstoffatome in Enolen und Enolethern haben chemische Verschiebungen im Bereich von ca. 100 bis 115 ppm. Aufgrund der zweifachen Enol-Struktur in III kommt es hier zu einer besonders starken Hochfeldverschiebung von $\delta_{\text{C}} = 92.46$ ppm für das mittlere Kohlenstoffatom des 1,3-Diols. Diese Substruktur erlaubt darüberhinaus die durch Wasserstoffbrückenbindung vermittelte CH-Korrelation beider OH-Gruppen zum Carbonyl-Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 179.80$ ppm.

5.2.3.2 Kombination der Teilstrukturen

Aus den HMBC-Signalen der zuletzt besprochenen OH-Gruppen zum Carbonylkohlenstoffatom $\delta_{\text{C}} = 179.80$ ppm ergibt sich die Verknüpfung der Teilstrukturen II und III. (Abbildung 5-14).

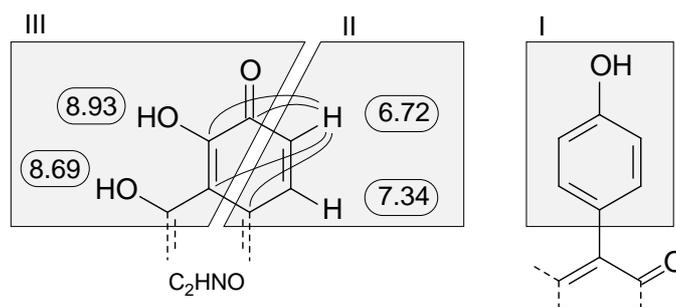


Abbildung 5-14 Kombination der Teilstrukturen II und III

Sie wird zusätzlich durch eine H,H-Fernkopplung zwischen dem Proton $\delta_{\text{H}} = 6.72$ ppm und der OH-Gruppe $\delta_{\text{H}} = 8.93$ ppm gestützt (siehe DQF-COSY, Abbildung 5-16). Aus dieser Kombination der Substrukturen II und III (Abbildung 5-14) lässt sich ein Teil eines ausgedehnten chinoiden Systems erkennen, dass zusätzlich hydroxyliert ist.

Neben der bereits besprochenen Teilstruktur I, dem *para*-Phenolsubstituenten, verbleiben zwei Kohlenstoffatome und jeweils ein Wasserstoff-, Stickstoff- und Sauerstoffatom, deren Verknüpfung zur abschließenden Strukturaufklärung von Ascidin A geklärt werden muss.

5.2.3.3 Struktur des Naturstoffs Ascidin A (**83**)

Wie bereits zuvor erwähnt, befindet sich der *para*-Phenolsubstituent an einem quartären Kohlenstoff, der von einem weiteren quartären C-Atom und einer Carbonylgruppe umgeben ist (Abbildung 5-11, HMBC in Abbildung 5-18). Den entscheidenden Hinweis auf die Verknüpfung mit den Teilstrukturen II und III liefert das phasensensitive NOESY (Abbildung 5-17). Ein NOE-Signal zwischen dem Proton aus Teilstruktur II bei $\delta_{\text{H}} = 7.34$ ppm und den äquivalenten Wasserstoffatomen H-2'/6' der Phenoleinheit ($\delta_{\text{H}} = 7.20$ ppm) zeigt die räumliche Nähe dieser Protonen an. Sie lässt sich nur mit der Struktur des substituierten Isochinolins **83** erklären.

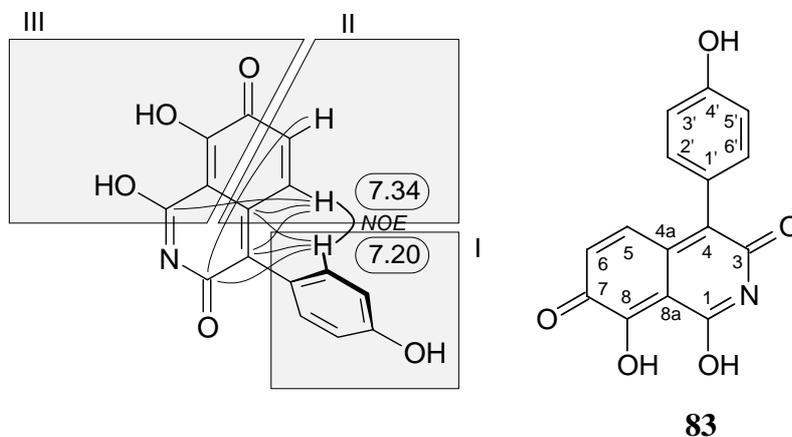


Abbildung 5-15 Zusammensetzung der Teilstrukturen anhand der NOESY und HMBC Daten zur Struktur des Naturstoffs Ascidin A (**83**).

Die Kombination der Teilstrukturen ergibt für **83** die Struktur eines Isochinolin-3,7-dions, das in Position 4 einen 4'-Hydroxyphenylrest trägt und an C-1 und C-8 hydroxyliert ist. Der IUPAC-Name von **83** lautet: 1,8-Dihydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-isochinolin-3,7-dion. In Tabelle 5-2 sind alle NMR-Daten von Ascidin A zusammengefasst.

Tabelle 5-2 NMR-Daten von Ascidin A (**83**) (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 100.6 MHz, DMSO- d_6)

Position	^{13}C δ [ppm]	^1H δ [ppm]	DQFCOSY	HMBC	NOESY
1	162.33				
3	161.28				
4	126.58				
4a	136.94				
5	138.93	7.34 , 1H, d, J=10.0 Hz	H-6, OH-8	C-1, C-4, C-4a, C-7, C-8, C-8a, C-6	H-6, H-2'/6'
6	129.64	6.72 , 1H, d, J=10.0 Hz	H-5	C-3, C-4a, C-7, C-8, C-8a	H-5
7	179.80				
8	148.58				
8a	92.46				
1'	122.63				
2' / 6'	133.11	7.20 , 2H, d, J=8.5 Hz	H-3'/5'	C-3, C-4, C-4a, C-2'/6', C-4', C-3'/5'	H-5, H-3'/5'
3' / 5'	114.91	6.89 , 2H, d, J=8.5 Hz	H-2'/6'	C-4, C-1', C-2'/6', C-3'/5', C-4'	H-2'/6', 4'-OH
4'	158.40				H-3'/5'
1-OH	-	8.69 , 1H, s(b)		C-7, C-8a	8-OH**
8-OH	-	8.93 , 1H, s(b)	H-6	C-7	1-OH**
4'-OH	-	9.90 , 1H, s	-	C-2'/6', C-3'/5', C-4'	H-3'/5'

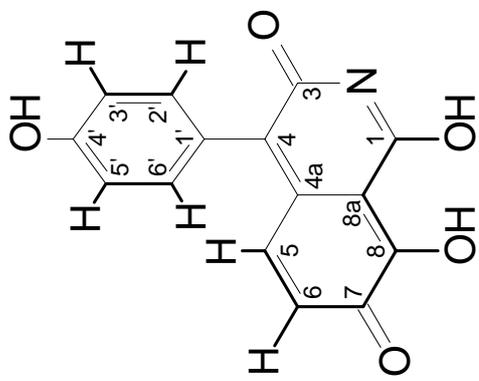
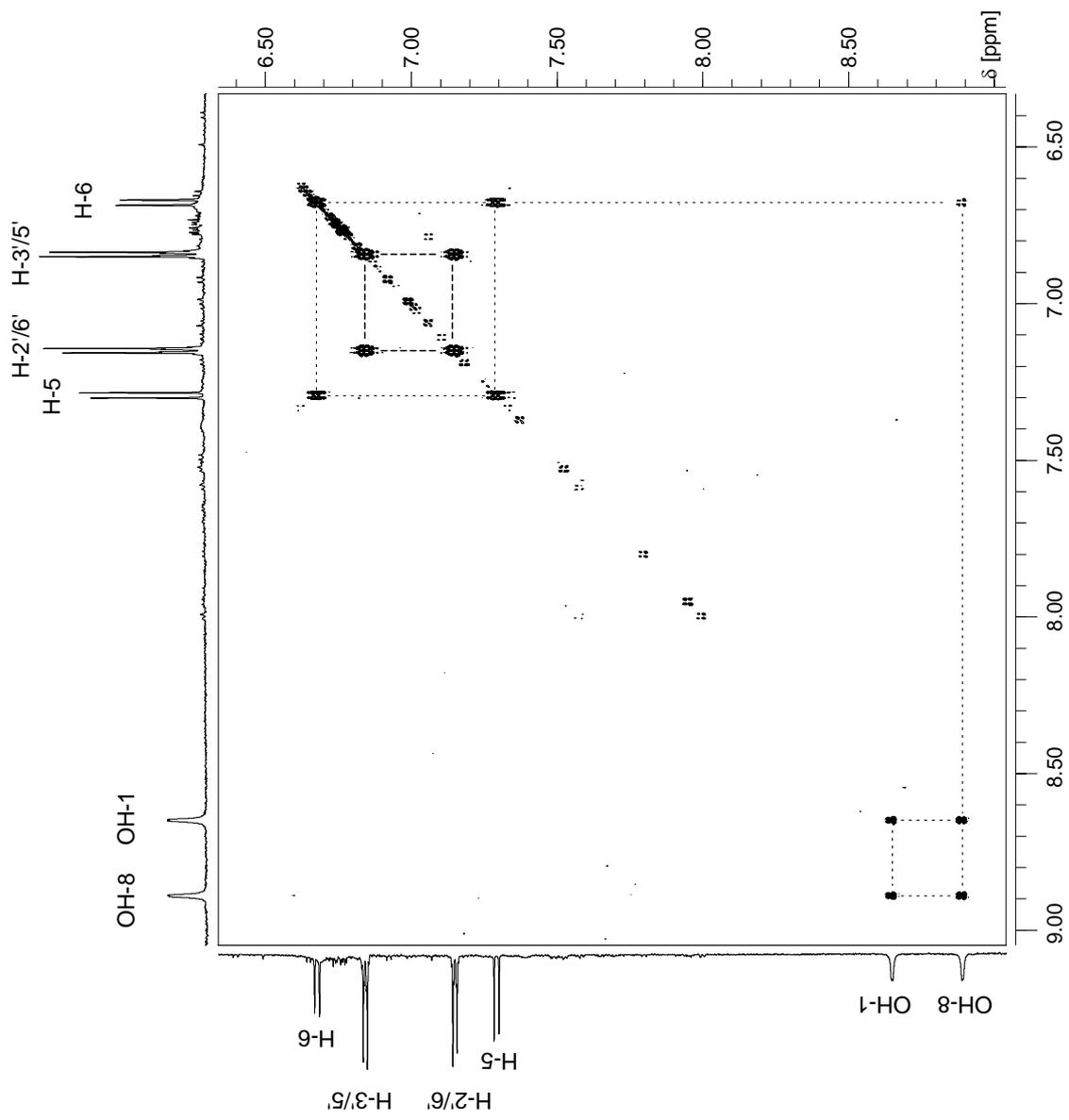


Abbildung 5-16 DQF-COSY von Ascidin A (**83**). Die Kopplungswege der zwei Spinsysteme sind hervorgehoben (DMSO- d_6 , 600 MHz).

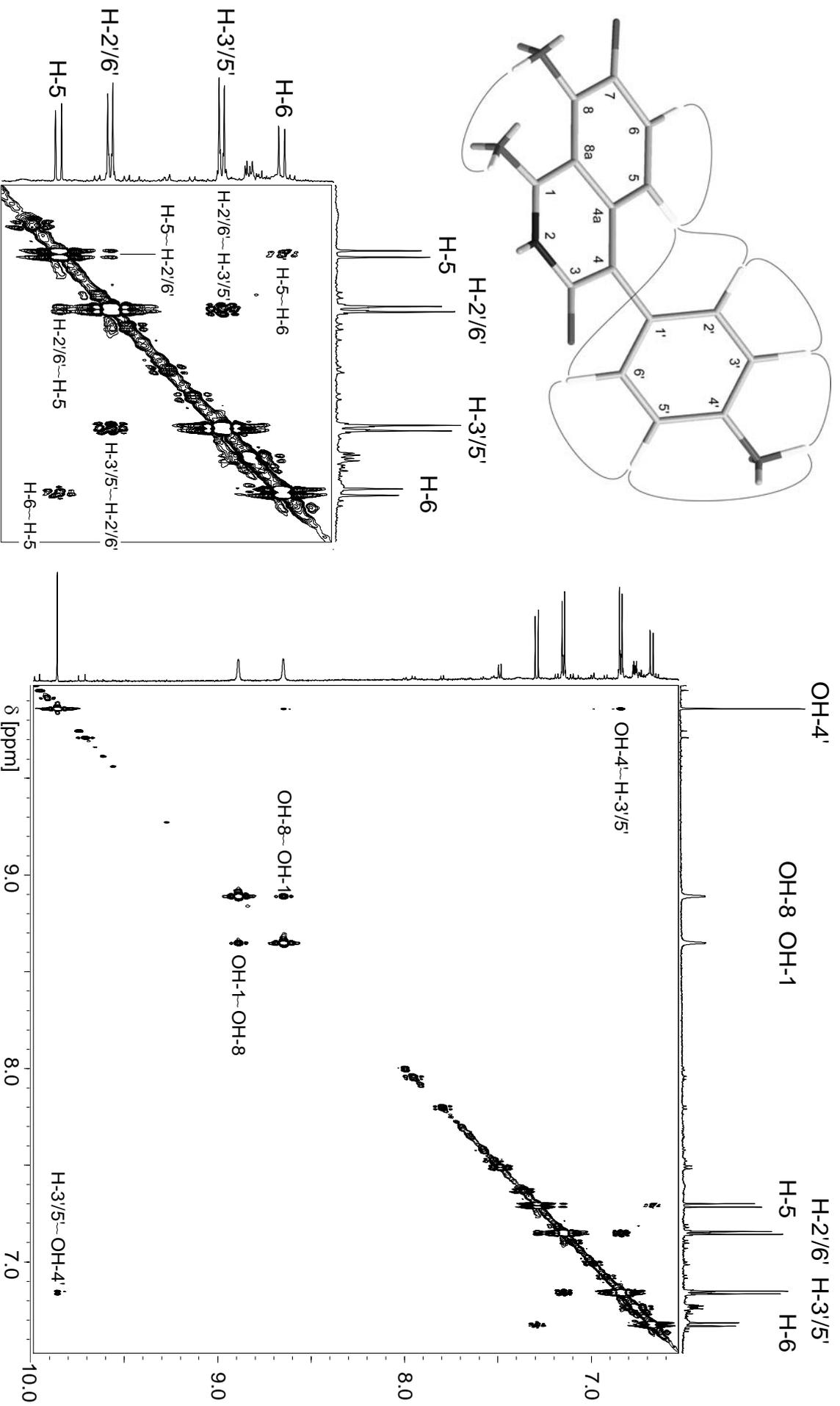


Abbildung 5-17 Phasensensitives NOESY von **83** (DMSO- d_6 , 600 MHz) mit räumlicher Ansicht des Moleküls und Vergrößerung des Bereichs für die Teilstrukturen I und II.

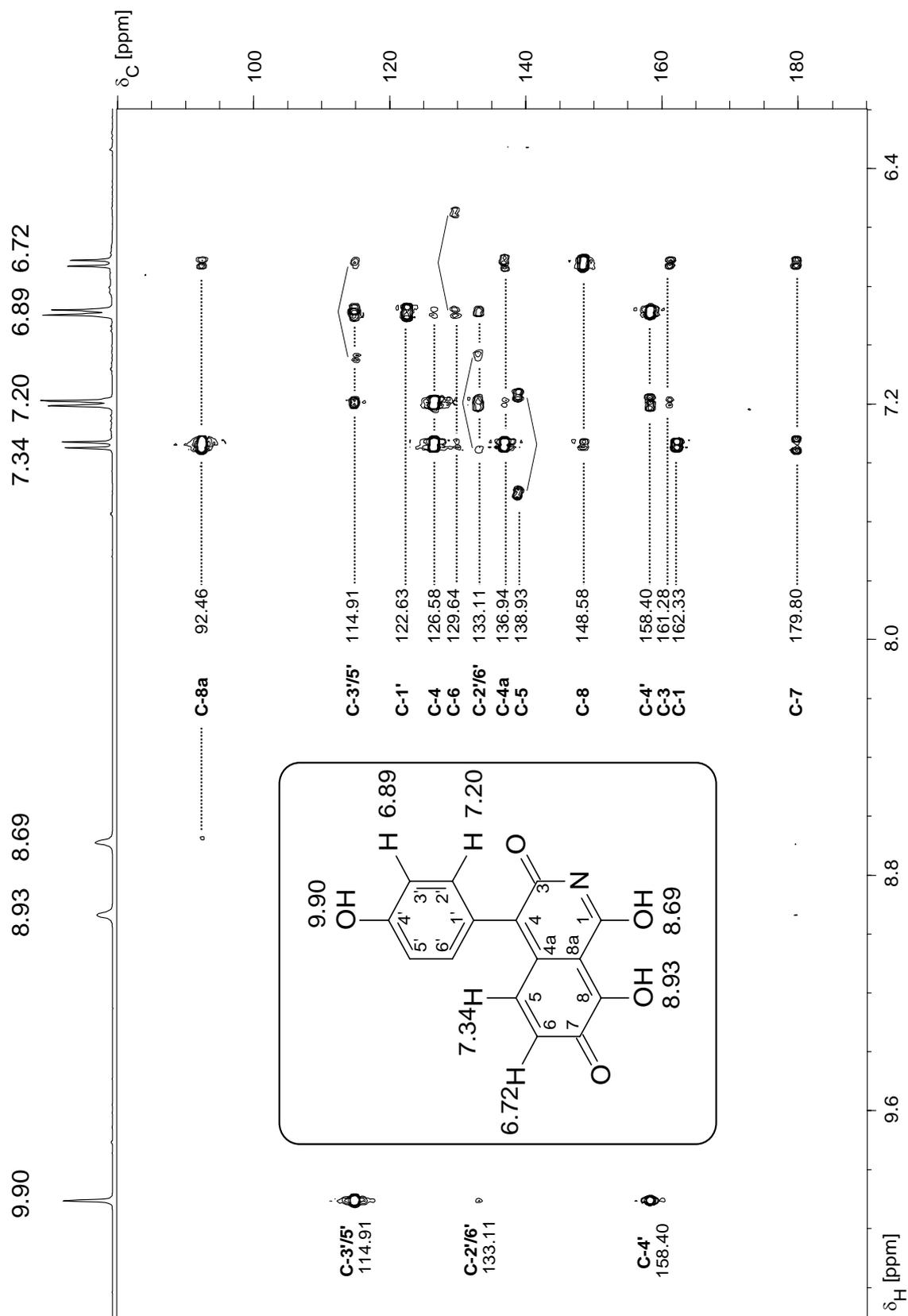


Abbildung 5-18 HMBC von **83** (DMSO- d_6 , 500 MHz)

5.2.4 Ascidin B: MS/MS des negativen Moleküliions

Ascidin B (**84**) unterscheidet sich von **83** durch Substitution eines Wasserstoffatoms durch ein Iodatome. Dass beide Verbindungen strukturverwandt sind, legt ihr gemeinsames Vorkommen in *A. virgnea*, sowie die Ähnlichkeit ihrer spektroskopischen Daten (UV-Vis, APCI-MS, NMR) nahe. Nimmt man daher die gleiche Grundstruktur wie für **83** an, so beschränkt sich die Strukturaufklärung auf die Lokalisation des Iod-Atoms in **84**.

MS/MS-Untersuchungen, die mit **84** ebenso im Negativ-Ionen-Modus durchgeführt wurden, lieferten hierzu jedoch keine Strukturhinweise. Abbildung 5-19 zeigt die Fragmentierung des negativ geladenen Moleküliions $[M]^-$ m/z 409 in Tochterionen bei Zufuhr von Kollisionsenergie. Obwohl auch hier die exakten Massen der Fragment-Ionen nicht bestimmt werden konnten, ist die Abspaltung von Iodid ($[I]^-$, m/z 127) wahrscheinlich. Bemerkenswert ist das mit vergleichbarer Intensität auftretende Ionenpaar m/z 281 und 282. Diese Signale gehen wahrscheinlich aus $[M]^-$ durch den Verlust von HI bzw. eines Iodradikals hervor. Hieraus kann man nochmals erkennen, dass das 10- π -Elektronen-System des Azachinons, das in **84** wahrscheinlich ebenso vorliegt wie in **83**, Ursache für eine besonders hohe Elektronenaffinität ist.

Das Tochterion m/z 365 geht auch hier analog zu **83** vermutlich aus dem Verlust von CO_2 hervor. Weitere Fragmentierung des Tochterions m/z 281 liefert auch in diesem Fall keine Information über Substrukturen in Ascidin B.

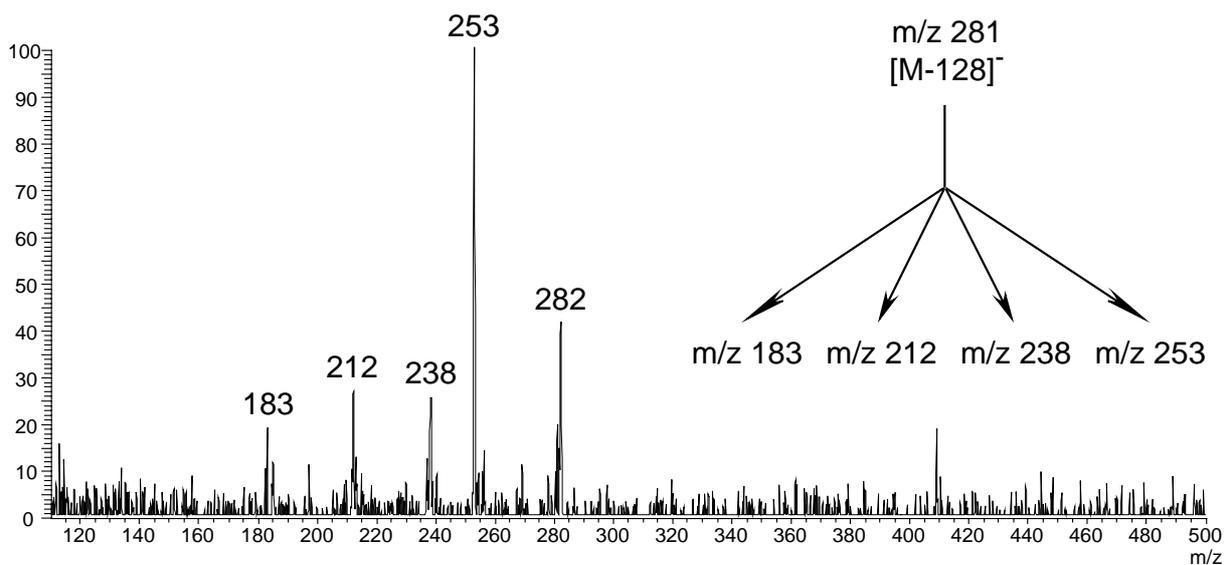
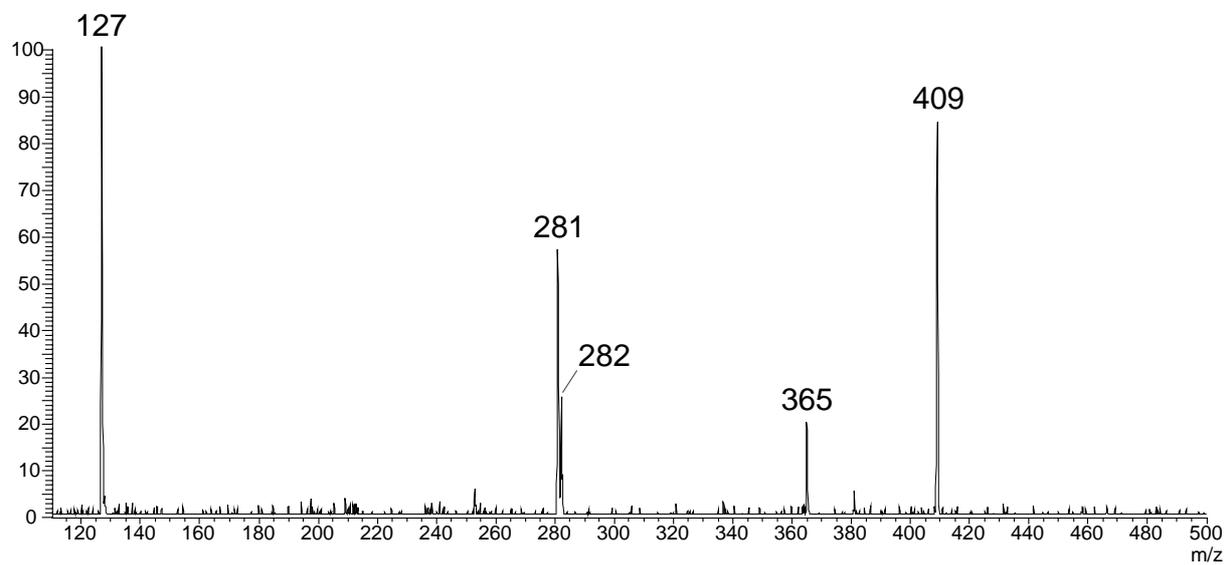
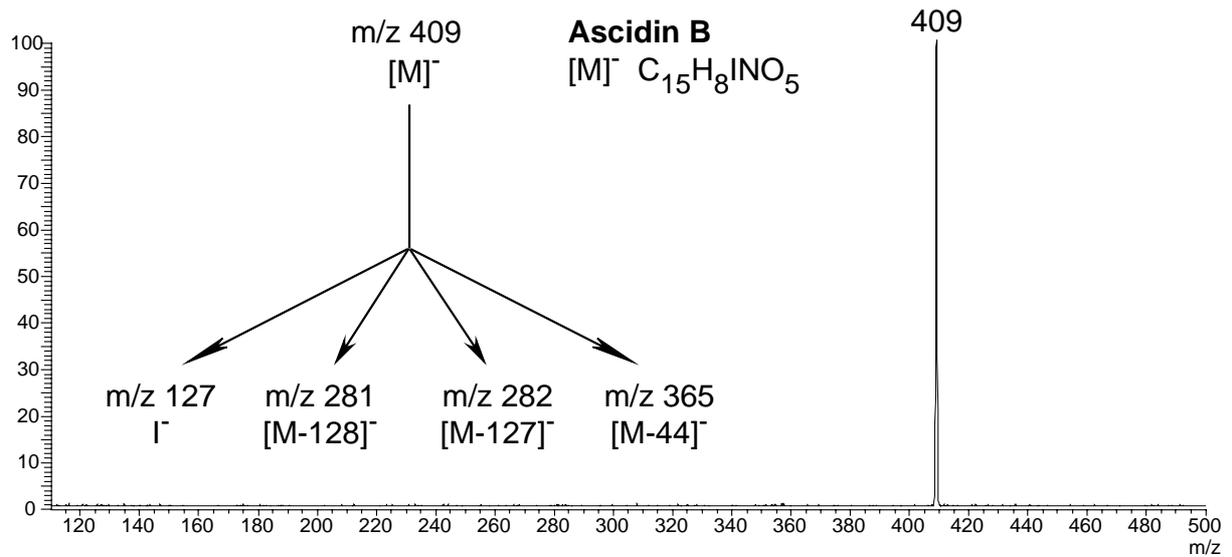


Abbildung 5-19 MS/MS des negativ geladenen Molekülions $[M]^-$ m/z 409 von **84**.

5.2.5 Ascidin B: IR-Spektroskopie

Von **84** wurde ebenfalls ein IR-Spektrum aufgenommen. Auch hier sind Carbonyl-, Amid- und Hydroxylbanden erkennbar.

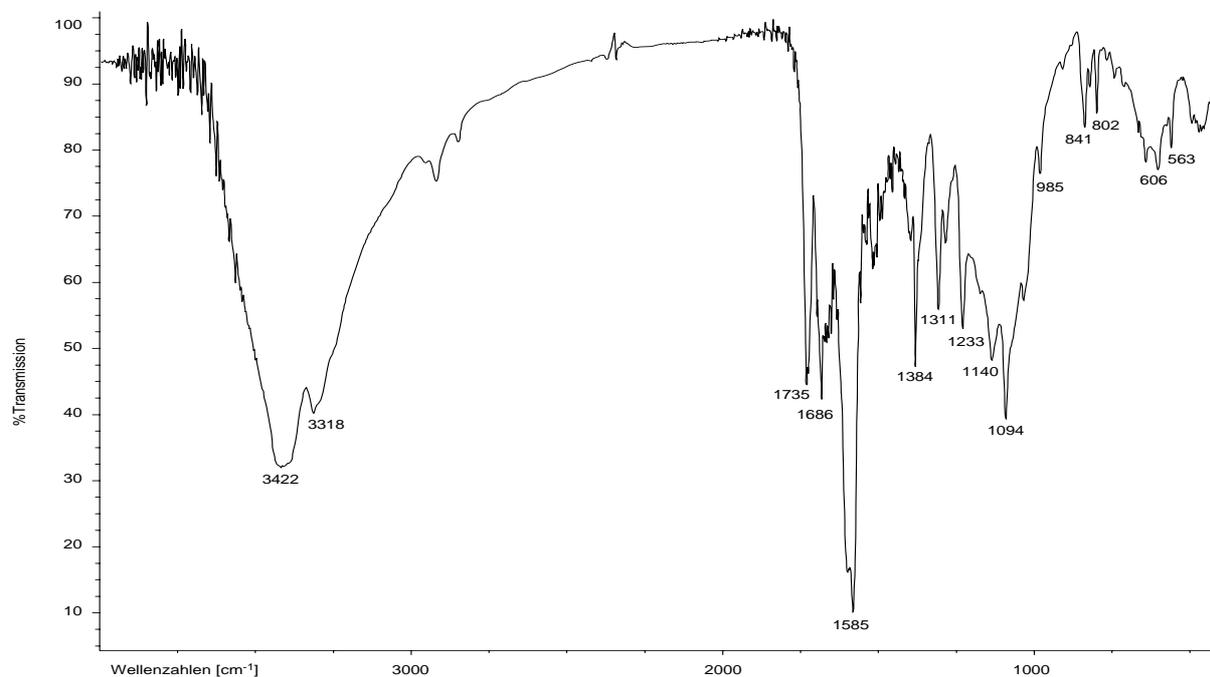


Abbildung 5-20 IR-Spektrum von **84** (KBr-Pressling)

5.2.6 Ascidin B: NMR-Spektroskopie

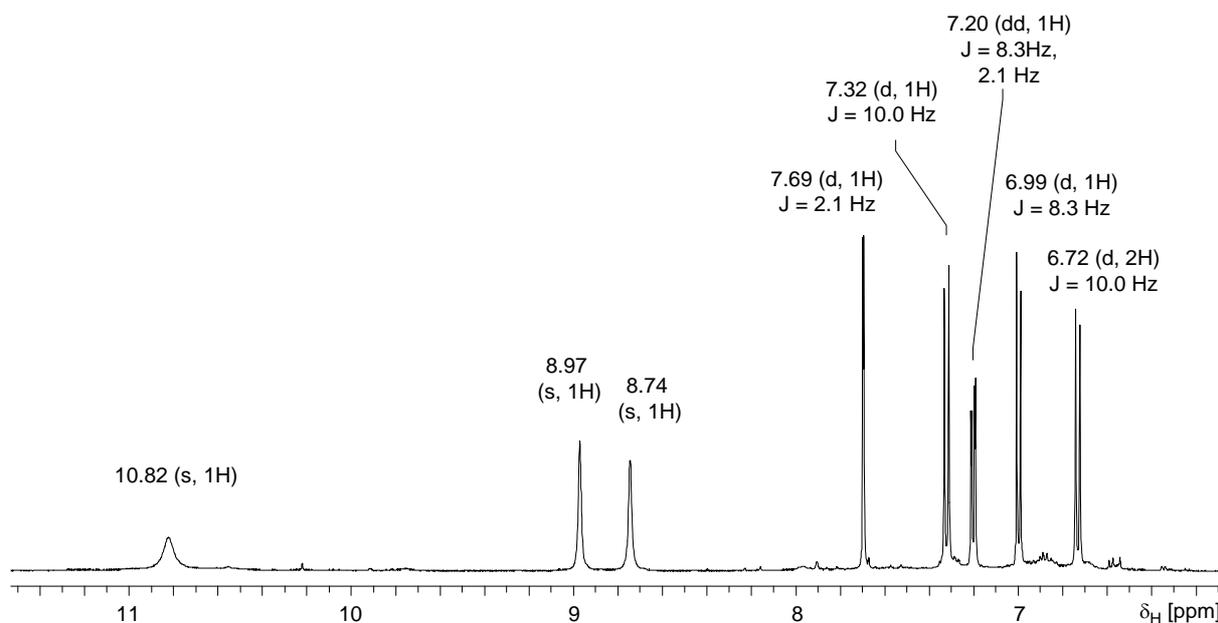


Abbildung 5-21 ¹H-NMR des iodhaltigen Ascidin B (**84**) (500 MHz, DMSO-d₆)

Die Lokalisation des Iodsubstituenten in **84** erfolgt leicht anhand des ¹H-NMR-Spektrums. Das Spektrum von Ascidin B ähnelt durch die Protonenarmut der Verbindung sehr dem Spektrum

von Ascidin A. Dennoch setzt es sich durch einige signifikante Unterschiede von letzterem ab. Das Dublett-paar der Protonen H-5 und H-6 in **83** ist in **84** nahezu unverändert vorhanden. Auch die Protonen der OH-Gruppen an C-1 und C-8 in **83** findet man im Spektrum von Ascidin B wieder. Das OH-Proton an C-4' in Ascidin B erscheint dagegen mit stark veränderter chemischer Verschiebung und als deutlich breiteres Singulett. Insbesondere der Vergleich der C-gebundenen aromatischen Protonen (6.6 – 7.8 ppm, Abbildung 5-22) zeigt, dass das symmetrische Spinsystem der *para*-Phenol-Einheit in **84** nicht mehr vorliegt. Anstelle der beiden Dubletts mit einem Integral von je 2H in **83** treten in **84** drei Signale (je 1H), die anhand ihrer Multiplizitäten einem 1,2,4-trisubstituierten Aromaten zugeordnet werden können.

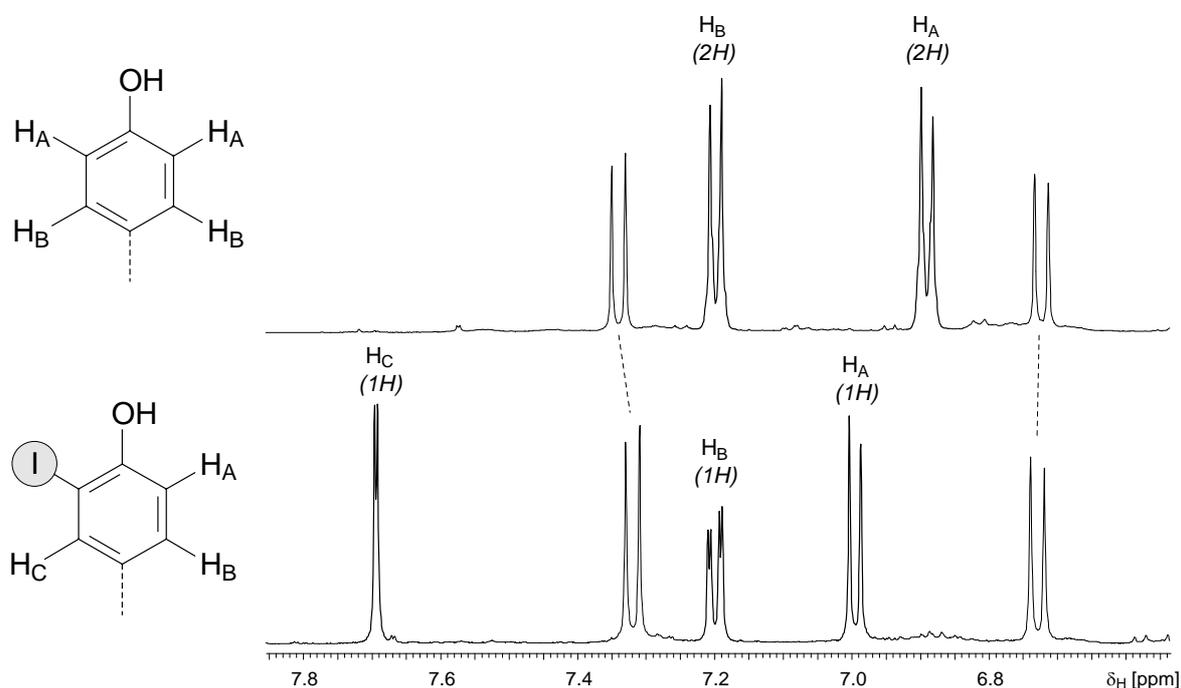
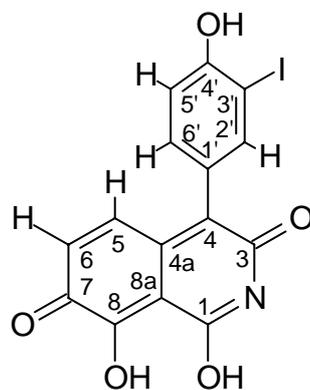


Abbildung 5-22 Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von Ascidin A und Ascidin B im Bereich δ_{H} 6.6 – 7.8 ppm

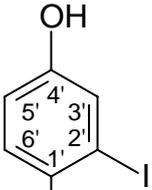
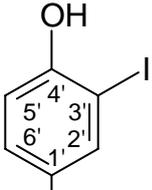
Ascidin B ist das in 3'-Position iodierter Derivat von Ascidin A. Der IUPAC-Name von **84** lautet: 1,8-Dihydroxy-4-(4-hydroxy-3-iodophenyl)-isochinolin-3,7-dion.



84

In allen natürlich vorkommenden iodierten Phenolen befindet sich der Iodsubstituent in *ortho*-Position zur OH-Gruppe. Auch in Ascidin B (**84**) wird dies durch NOE-Signale zwischen H-2' und H-5 sowie H-6' und H-5 bestätigt. Als Substituent erster Ordnung dirigiert die OH-Gruppe das Halogen zwar erwartungsgemäß in *ortho*-Position, doch läßt sich dies auch zusätzlich durch den Vergleich der ¹³C-Daten mit theoretischen Werten aus Inkrement-Berechnungen stützen.

Tabelle 5-3 ¹³C-Inkrementberechnung und Daten von **84**

δ_C [ppm] berechnet:		gefunden*:		
3'-Iodo- 83	2'-Iodo- 83	84		
126.8 (C-1')	136.4 (C-1')	125.6	<chem>C9H4NO4</chem>	<chem>C9H4NO4</chem>
135.3 (C-2')	122.4 (C-3')	142.2		
87.4 (C-3')	92.1 (C-2')	84.9		

*) aus HMBC-Daten

Tabelle 5-4 NMR-Daten von Ascidin B (**84**) (DMSO-d₆, ¹H: 500 MHz, ¹³C: 100.6 MHz)

position	¹³ C δ [ppm]	¹ H δ [ppm]	COSY90	HMBC	NOESY
1	163.0	-	-	-	-
3	162.0	-	-	-	-
4	125.6	-	-	-	-
4a	138.1	-	-	-	-
5	139.5	7.32 , 1H, d, J=10.0 Hz	H-6	C-1, C-4, C-4a, C-7, C-8a	H-6, H-2'
6	130.6	6.72 , 1H, d, J = 10.0 Hz	H-5, OH-8	C-4a, C-8	H-5
7	180.6	-	-	-	-
8	149.3	-	-	-	-
8a	93.2	-	-	-	-
1'	125.6	-	-	-	-
2'	142.2	7.69 , 1H, d, J = 2.1 Hz	H-6'	C-1', C-3', C-4', C-6'	H-5
3'	84.9	-	-	-	-
4'	158.3	-	-	-	H-3'/5'
5'	114.9	6.99 , 1H, d, J = 8.3 Hz	H-6'	C-1', C-3', C-4'	-
6'	133.7	7.20 , 1H, dd, J = 2.1 Hz, 8.3 Hz	H-2', H-5'	C-1', C-2', C-4'	H-5
1-OH	-	8.74 , 1H, s(b)	OH-8		8-OH**
8-OH	-	8.97 , 1H, s(b)	OH-1	C-7	1-OH**
4'-OH	-	10.82 , 1H, s(b)			

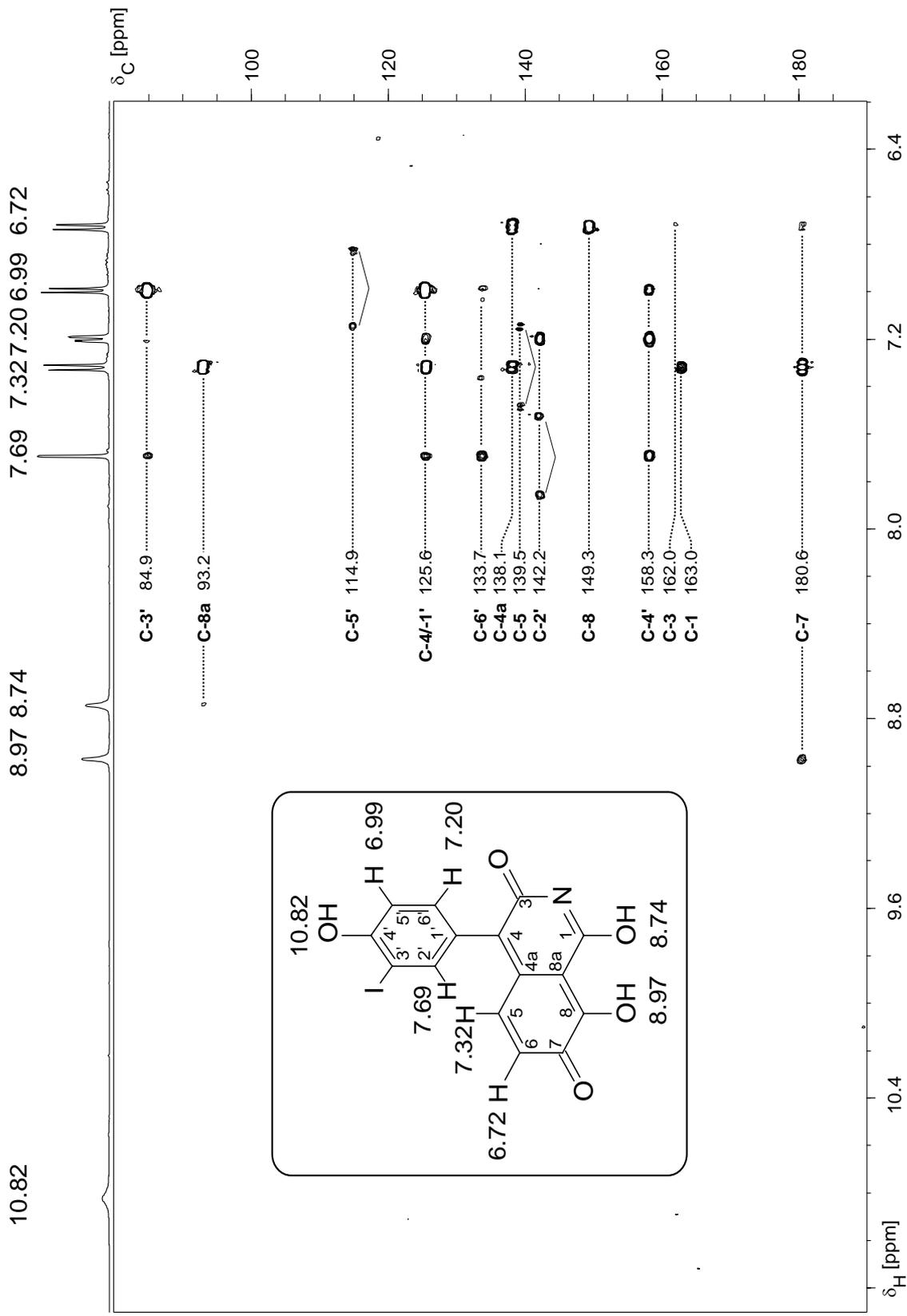


Abbildung 5-23 HMBC von **84** (DMSO- d_6 , 500 MHz). Die eckigen Klammern kennzeichnen aufgesplante Signale direkter ($J_{\text{C-H}}$)-Kopplungen.

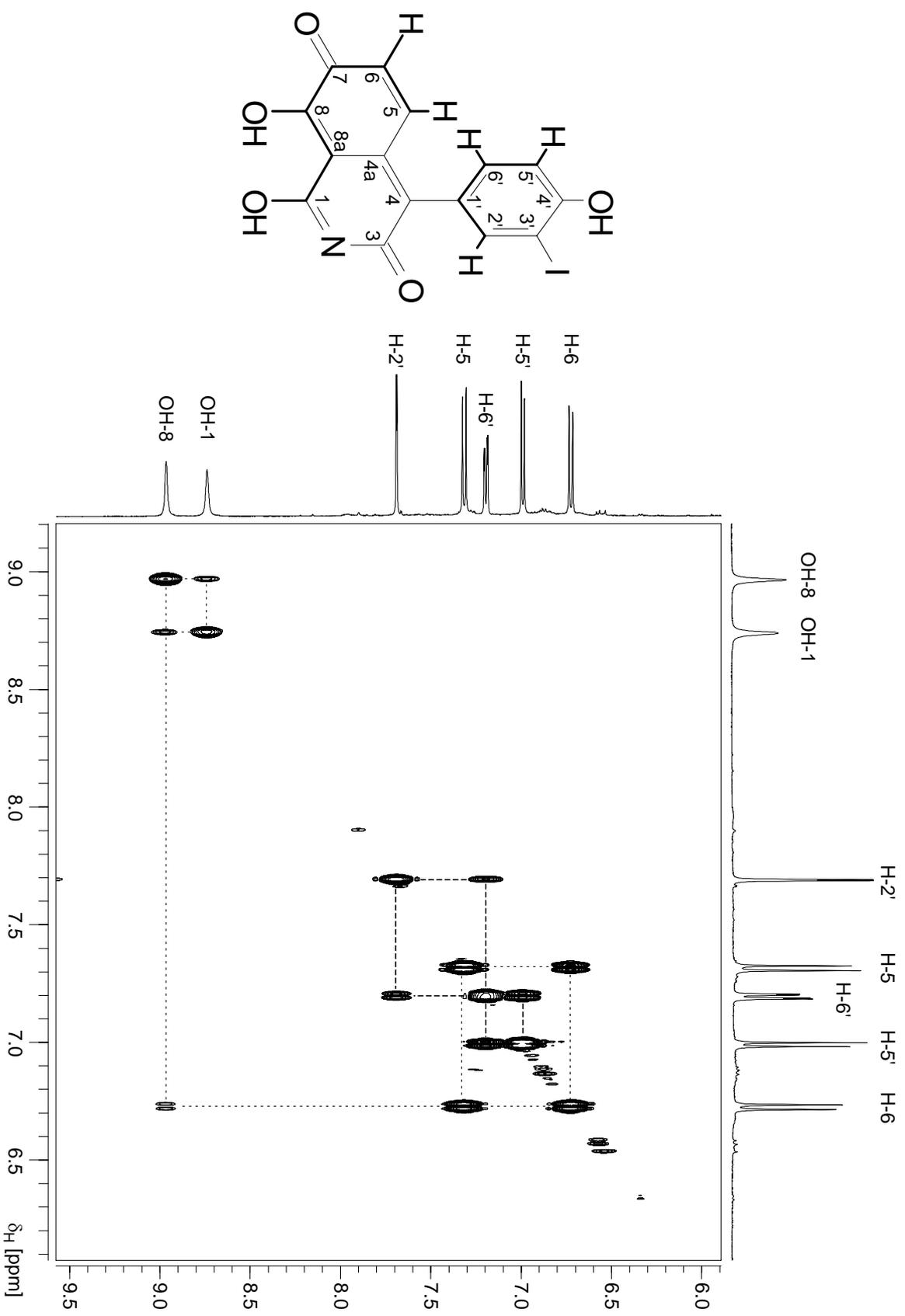


Abbildung 5-24 COSY90 von Ascidin B (84), die Kopplungswege der zwei Spinsysteme sind hervorgehoben (DMSO-d₆, 500 MHz).

5.3 Strukturvorschläge für unvollständig charakterisierte Verbindungen in *A. virginea*

5.3.1 Ascidin C: Strukturbeweis durch Derivatisierung

Das zweifach iodierte Ascidin C (**85**) konnte aufgrund seiner geringen Konzentration in *A. virginea* nicht NMR-spektroskopisch charakterisiert werden. Daher wurde auch hier versucht, wie bei den zuvor erwähnten Neben- und Spurenkomponenten in *P. ventilabrum* und *A. grandiflora*, durch Einsatz einer Derivatisierungsreaktion den indirekten Strukturbeweis zu ermöglichen. Es wurde versucht das nicht-iodierte Ascidin A (**83**) durch Substitution der *ortho*-ständigen Wasserstoffatome im Phenolrest in seine Abkömmlinge Ascidin B (**84**) bzw. C (**85**) umzuwandeln. Zahlreiche Iodierungsreaktionen aromatischer Systeme sind bekannt, in allen Fällen ist die aktive Spezies ein *in situ* gebildetes Iodonium-Ion, welches den Aromaten elektrophil angreift. Dieses kann aus der heterolytischen Spaltung von elementarem Iod hervorgehen, alternativ ist die Oxidation von Natriumiodid durch Natriumhypochlorit zu erwähnen⁸⁰. Unter den Reaktionsbedingungen dieser klassischen Umsetzungen können jedoch unter Umständen beträchtliche Nebenreaktionen auftreten.

Ein besonders mildes Iodierungsreagenz ist dagegen Bis(pyridin)iodonium Tetrafluoroborat (IPy₂BF₄, „Barluengas Reagenz“)⁸¹. Hierbei handelt es sich um ein stabilisiertes Iodonium-Ion, das sich hervorragend für die Iodierung von Phenolen in *ortho*-Position zur OH-Gruppe eignet⁸².

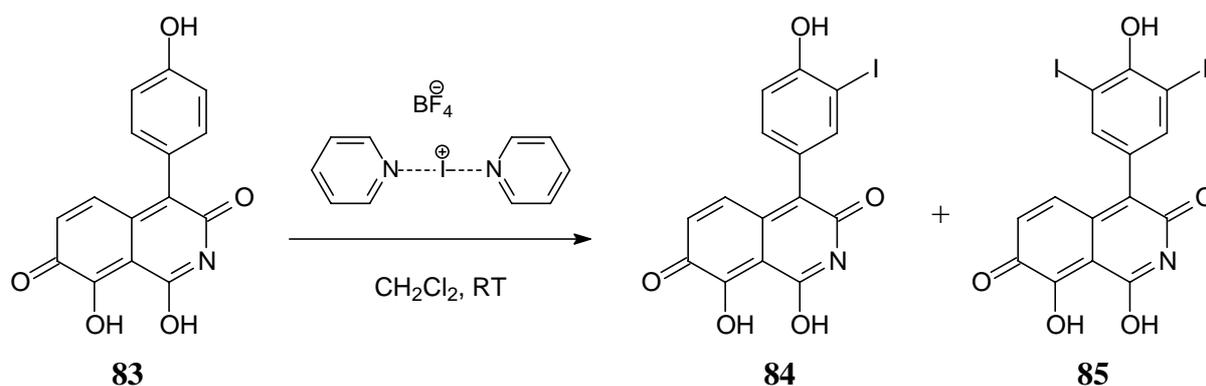


Abbildung 5-25 Derivatisierung von Ascidin A (**83**) mit Barluengas Reagenz.

Die Analyse der Rohprodukte aus der Umsetzung von **83** mit IPy₂BF₄ mittels HPLC-MS-Kopplung zeigte, dass die Reaktionsprodukte die gleichen Retentionszeiten und Massenspektren, wie die im Extrakt enthaltenen Verbindungen **84** und **85** besaßen. Dies wurde als indirekter Strukturbeweis für das unvollständig charakterisierte Ascidin C (**85**) gewertet.

5.3.2 Strukturvorschläge der Spurenkomponenten Ascidin D, E und F

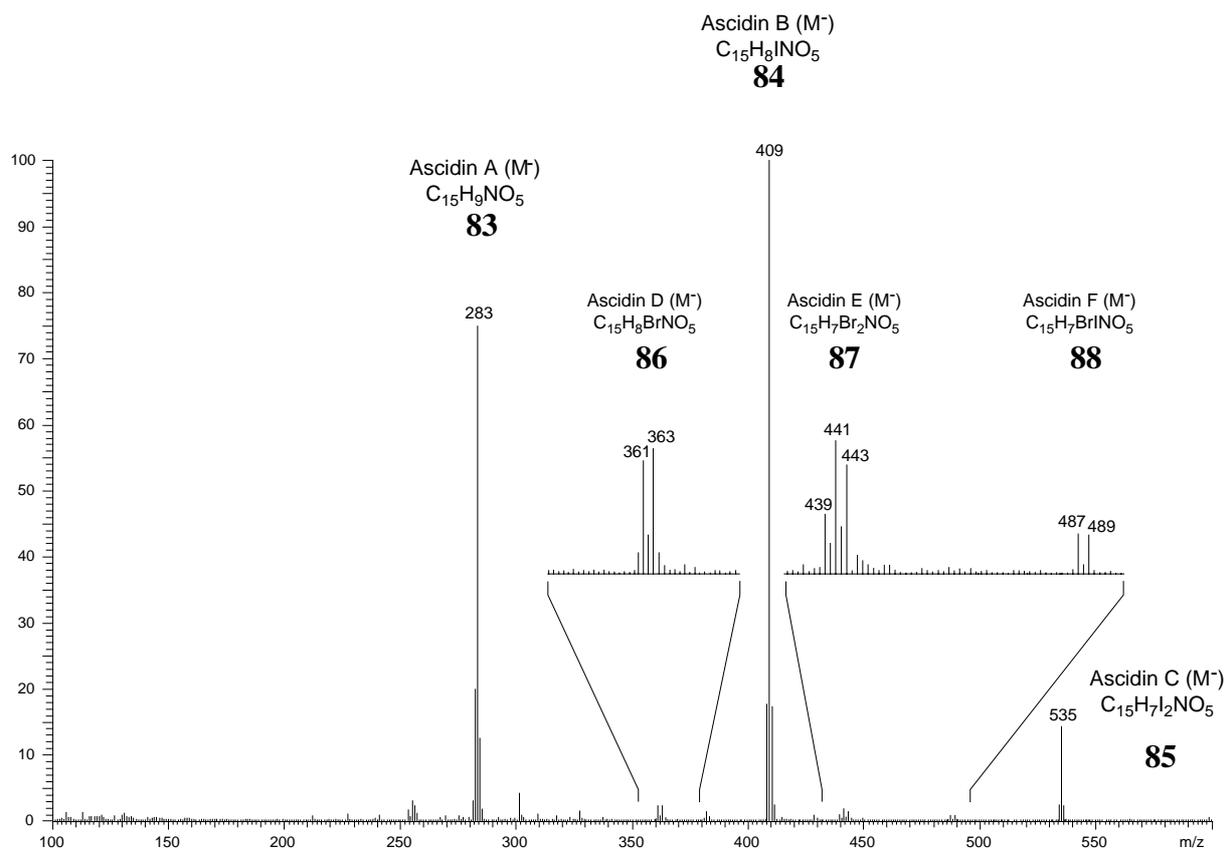


Abbildung 5-26 APCI-MS Negativ-Ionen-Modus des Gesamtextrakts von *A. virginea* mit Hervorhebung einiger Spurenkomponenten.

Mit der Kenntnis der Strukturen der Komponenten **83**, **84** und **85** läßt sich durch Variation einzelner Strukturmodule die Anwesenheit zusätzlicher Sekundärmetabolite erklären. Die wesentlich höhere Konzentration von Bromid gegenüber Iodid im Meerwasser, läßt die Vermutung zu, dass trotz des höheren Oxidationspotentials von Bromid auch bromierte Ascidine gebildet werden. Im Negativ-Ionen-Spektrum des Gesamtextrakts treten in der Tat mit geringer Intensität Ionen auf, deren Masse-/Ladungsverhältnis und deren Isotopenmuster den mono- und dibromierten, sowie gemischt bromiert-iodierten Ascidinen D, E und F (**86-88**) entspricht.

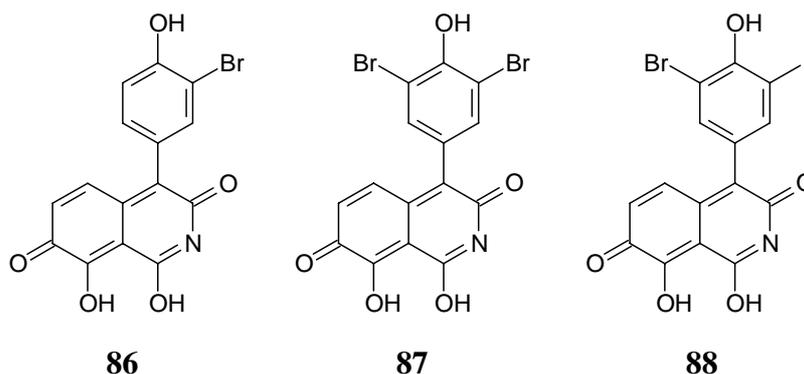


Tabelle 5-5 Postulierte bromierte Spurenkomponenten in *A. virginea*

Nr.	Bezeichnung	[M] ⁻ m/z (Int.)	entspricht Summenformel
86	Ascidin D	361/363 (~ 1:1)	C ₁₅ H ₈ BrNO ₅
87	Ascidin E	439/441/443 (~ 1:2:1)	C ₁₅ H ₇ Br ₂ NO ₅
88	Ascidin F	487/489 (~ 1:1)	C ₁₅ H ₇ BrINO ₅

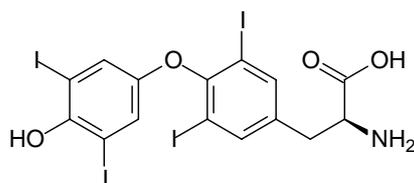
Diese Ionen konnten aufgrund ihrer geringen Intensität nicht hochaufgelöst werden, weshalb die Identität der Verbindungen **86-88** nur postuliert werden kann.

Die Anwesenheit zusätzlicher Metabolite zeigt jedoch, dass mit der Strukturaufklärung der Ascidine A-C der Bioynthese-Pool dieser Spezies keineswegs erschöpft ist, sondern weiterführende Untersuchungen die Existenz neuer Naturstoffe beweisen könnten.

5.4 Diskussion der Ergebnisse

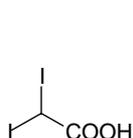
5.4.1 Iodierte Naturstoffe

Iodierte Sekundärmetabolite stellen innerhalb der Naturstoffe eine recht exotische, dennoch gut belegte Gruppe dar, deren bekanntester Vertreter wohl das Thyroxin **89** und dessen minderiodierten Derivate sind⁸³. Diese Hormone spielen bei den höheren Vertebraten, einschließlich des Menschen, eine bedeutende Rolle in der Regulation von Wachstum und Reifung.

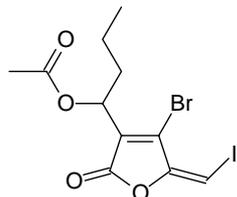


89

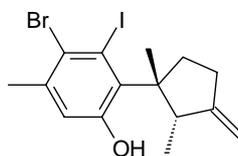
Im Bereich der marinen Naturstoffe sind bisher nur ca. 50 iodierte Substanzen bekannt⁵⁶. Rotalgen (Rhodophyta) produzieren flüchtige Acetogenine und Terpene. Diiodessigsäure (**90**) aus *Asparagopsis taxiformis*⁸⁴ und das mehrfach halogenierte Butenolid **91** aus *Delisea fimbriata*⁸⁵, sowie das Sesquiterpen **92**⁸⁶ aus *Laurencia nana* seien hier stellvertretend genannt.



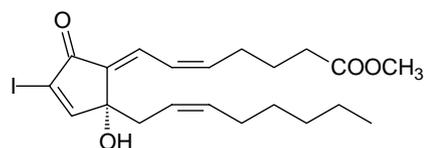
90



91

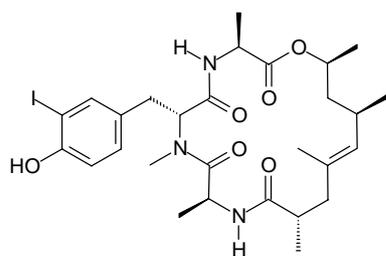


92

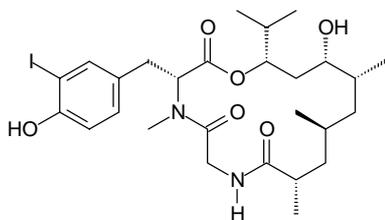


93

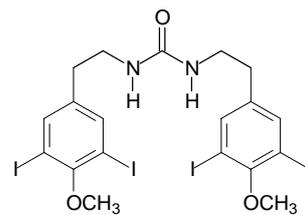
Innerhalb der marinen Fauna finden sich ebenfalls Produzenten iodierter Naturstoffe. Auch hier kennt man lipophile Metabolite wie das prostaglandinähnliche Iodovulone I (**93**) aus der Weichkoralle *Clavularia viridis*⁸⁷. Den Hauptteil stellen jedoch Alkaloide mit *ortho*-Iodphenolresten, die ebenso wie **89** aus dem Tyrosin-Stoffwechsel hervorgehen. Zu erwähnen sind hier die Depsipeptide Dolicolid (**94**)⁸⁸, sowie das Geodiamolid A (**95**)⁸⁹, aus dem sich durch Austausch der Alanin-Einheiten gegen andere aliphatische Aminosäuren, zusätzliche Hydroxylierungen und Einführung weiterer Doppelbindungen andere Geodiamolide ableiten lassen. Ihre strukturanalogen bromierten oder chlorierten Derivate sind ebenso bekannt⁹⁰.



94

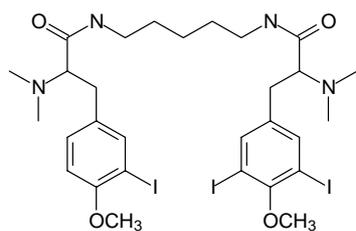


95

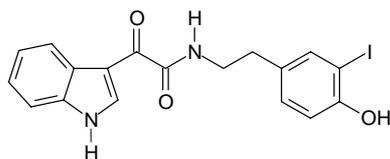


96

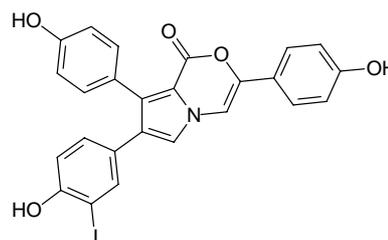
Die zuletzt erwähnten Verbindungen wurden aus einem Gastropoden bzw. einem Schwamm isoliert. Auffallend ist jedoch das relativ häufige Vorkommen iodierter Naturstoffe in Ascidien. Beispiele hierfür sind das Harnstoffderivat **96**, die Amide **97** und **98**, sowie das Alkaloid Lukianol B (**99**)⁹¹. In allen sind die β -Phenylethylamin-Untereinheiten erkennbar, die sich aus dem Tyrosin ableiten. Während in den symmetrischen Verbindungen **96** und **97** jeweils zwei solcher Einheiten verbrückt sind, liegt in **98** eine Verknüpfung mit einem substituierten Indol vor, das aus der Aminosäure Tryptophan hervorgeht. **99** ist ein Trimer, hier sind drei β -Phenylethylamin-Einheiten zu einem substituierten Pyrrolooxazinon kondensiert.



97



98

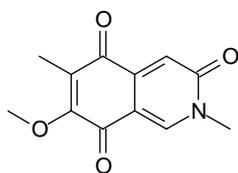


99

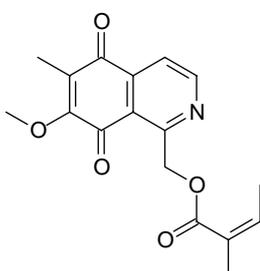
5.4.2 Isochinolinchinone

Als erster Vertreter einer neuen Substanzklasse wurde das Mimosamycin **100** aus dem Bakterienstamm *Streptomyces lavendulae* Nr. 314 isoliert⁹². Alle weiteren Isochinolinchinone haben die Oxo-Gruppen ebenfalls an den Kohlenstoffatomen C-5 und C-8 des Isochinolin-Systems. Das Renieron **101**, das in marinen Schwämmen gefunden wurde ist ein Angelikasäureester eines Mimosamycin Derivats⁹³. Dimere Formen dieser Isochinolin-Chinone, wie das Renieramycin A **102**⁹⁴, sind durch ihre antineoplastische und antibiotische Wirkung aufgefallen. Durch zusätzliche Kondensation eines Isochinolin-Systems gelangt man zu noch komplexeren Strukturen wie dem stark biologisch-aktiven Ecteinascidin 743 (**6**). Mittlerweile sind ca. 30 Isochinolinchinone bekannt. Diese Verbindungen wurden sowohl in Mikroorganismen, als auch in Schwämmen, sowie in der höher entwickelten Tiergruppe der Ascidien gefunden. Ihr Vorkommen in marinen Invertebraten und Bakterien läßt keine

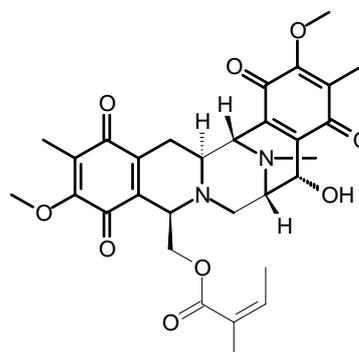
chemotaxonomischen Zusammenhänge erkennen und wirft die Frage des Ursprungs auf. Möglicherweise werden diese Substanzen von assoziierten Mikroorganismen produziert.



100



101



102

5.4.3 Iodierte Isochinolinchinone in *A. virginea*

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Isochinolinchinonen haben die Ascidine an den Positionen 3 und 7 des Isochinolinsystems eine Carbonyl-Gruppe. Bisher sind keine Naturstoffe mit diesem Strukturmotiv bekannt. Die zusätzliche Hydroxylierung der Ascidine läßt mehrere tautomere Formen zu. Die in den Strukturen **83-88** dargestellte 1,8-Dihydroxy-Form hat ein durchgehend konjugiertes π -Elektronen-System, in dem das Stickstoffatom Teil der Chinonstruktur ist. Dies ist ein bedeutender Strukturunterschied zu den bekannten Isochinolin-5,8-dionen. Ein ebenfalls neues Strukturmotiv im Kontext dieser Substanzklasse ist die Iodierung bzw. Bromierung der Ascidine B-F (**84-88**). Bisher sind keine halogenierten Isochinolinchinone bekannt.

Die Ascidine aus *Ascidia virginea* wurde im Institut für Biologische Wirkstoffforschung (IBWF), Kaiserslautern in einem Breitband-Screening getestet. Eine cytostatische Wirkung auf die Zell-Linien **HeLa** (humanes Zervixkarzinom) und **Jurkat** (Zellen der humanen T-Zellen-Leukämie) des Dichlormethanextrakts von *A. virginea* wurde festgestellt. In einer anschließenden HPLC-Trennung (RP-18, H₂O-CH₃CN-Gradient) wurden Fraktionen gewonnen, die nach Entfernung des Lösungsmittels direkt dem Zellkultur-Test zugeführt wurden. Die cytostatische Wirkung des Extrakts konnte so auf jene Fraktionen zurückgeführt werden, die die Ascidine A-C (**83-85**) enthielten. Aufgrund des geringen zur Verfügung stehenden Materials und des für analytische Arbeiten erforderlichen Substanzbedarfs konnten leider keine quantifizierbaren Untersuchungen an den Reinsubstanzen vorgenommen werden. Dennoch lassen diese pharmakologischen Untersuchungen das Wirkstoffpotential dieser neuen Verbindungen erkennen und legen den Grundstein für weitere Arbeiten.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird über neue Naturstoffe aus marinen Invertebraten des Nord-Atlantiks berichtet. Der Schwamm *Phakellia ventilabrum*, die Koralle *Anthothela grandiflora* und die Tunicate *Ascidia virginea* wurden im Hinblick auf ihre Inhaltsstoffe untersucht.

Sesquiterpen-Isocyanide sind aus mehreren Spezies der Familie Axinellidae bekannt, zu der auch der bisher nicht untersuchte Schwamm *P. ventilabrum* gehört. Die Isocyanide sind häufig mit den Isothiocyanaten und Formamiden vergesellschaftet, die das gleiche Sesquiterpen-Skelett aufweisen. Das Naturstoffinventar in *P. ventilabrum* weicht von diesem Muster ab. In diesem Schwamm konnten erstmals Quartette aus strukturanalogen Isocyaniden, Isocyanaten, Isothiocyanaten und Dichloriminen nachgewiesen werden. Aus dem komplexen Gemisch dieser Inhaltsstoffe ließen sich durch präparative Gaschromatographie zehn Substanzen reingewinnen, die durch zweidimensionale NMR-Experimente vollständig charakterisiert wurden. Unter diesen befanden sich die fünf bekannten Verbindungen Axisonitril-1 (**24**), Axisonitril-4 (**28**), Acanthellin-1 (**51**), Acanthen B (**52**), sowie das 10-Isocyano-muuroolan **45**. Fünf weitere Strukturen sind neu: die Isocyanide mit Cubeban- (**31**), Isodaucan- (**41**) und Eudesman-Skelett (**49**), sowie die zwei Isocyanate Axisocyanat-1 (**25**) und das Eudesman-Derivat **53**.

Strukturen von Neben- und Spurenkomponenten, die aufgrund ihrer geringen Konzentration nicht in ausreichender Menge isolierbar waren, um für NMR-Experimente zur Verfügung zu stehen, konnten durch indirekte Strukturbeweise bestimmt werden. Hierzu wurden isolierte Isocyanide, deren Strukturen eindeutig zugeordnet worden waren, anhand von Derivatisierungsreaktionen unter Erhalt des jeweiligen Sesquiterpen-Skeletts in die strukturanalogen Isocyanate, Isothiocyanate und Dichlorimine umgewandelt. Der gaschromatographische und massenspektrometrische Vergleich dieser Reaktionsprodukte mit authentischem Material in den Extrakten bestätigte die Anwesenheit weiterer 18 Sesquiterpene, von denen 10 neue Verbindungen sind.

Aus *A. grandiflora* wurden zwei neue monooxygenierte Sesquiterpene durch *Reversed-Phase*-HPLC isoliert. Anhand ihrer NMR-Spektren wurden diese als 6-(1-Methylethyl)-4-methyl-5a,6,7,8-tetrahydro-5*H*-naphtho[1,8-*bc*]furan (**70**), sowie 6-(1-Methylethyl)-4-methyl-7,8-dihydro-6*H*-naphtho[1,8-*bc*]furan (**71**) identifiziert. Es handelt sich hierbei um ein Vinylfuran und ein Benzofuran mit Cadinan-Skelett. Die Strukturverwandtschaft beider Verbindungen konnte durch Umsetzung von **70** mit DDQ in sein Dehydro-Derivat **71** bestätigt werden.

Aus der Tunicate *Ascidia virginea* wurden die neuen Alkaloide Ascidin A (**83**) und B (**84**) isoliert und identifiziert. Diese intensiv roten Farbstoffe mit neuer Azachinon-Struktur erwiesen sich im Zellkultur-Test mit den Zell-Linien HELA (humanes Zervixkarzinom) und JURKAT (Zellen der humanen T-Zellen-Leukämie) als aktive Cytostatika.

Mit Hilfe der hochaufgelösten APCI-MS im Negativionen-Modus wurden die Elementarzusammensetzungen von **83** und **84** zu $C_{15}H_9NO_5$ und $C_{15}H_8INO_5$ ermittelt. Eine zweifach iodierte Verbindung $C_{15}H_7I_2NO_5$ (Ascidin C, **85**) ließ sich zusätzlich bestimmen.

Die zweidimensionalen NMR-Spektren DQF-COSY, HMQC, HMBC und NOESY ermöglichten die Strukturaufklärung von **83** und **84**. Ascidin A (**83**) ist ein Isochinolin-3,7-dion, das an C-4 einen 4'-Hydroxyphenyl-Rest trägt und an den Positionen 1 und 8 hydroxyliert ist. Ascidin B (**84**) ist das 3'-Iodo-Derivat von **83**.

Das doppelt iodierte Ascidin C (**85**) ist eine Spurenkomponente, die nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand, um NMR-spektroskopisch charakterisiert zu werden. Dass es sich hierbei um 3',5'-Diododerivat von **83** handelt konnte durch Derivatisierung von Ascidin A (**83**) gezeigt werden. Die Umsetzung von **83** mit Bispyridiniodonium Tetrafluoroborat (IPy₂BF₄, Barluengas Reagenz) lieferte die iodierten Ascidine B und C.

Drei weitere Spurenkomponenten Ascidin D, E und F (**86-88**) werden auf der Basis massenspektrometrischer Daten postuliert. Die Massen der Molekülonen und ihre Isotopenmuster ließen vermuten, dass es sich hierbei um 3'-Bromo-, 3',5'-Dibromo- und 3'-Iodo-5'-bromo-**83** handelt.

7 Summary

This thesis presents results on the isolation and structure elucidation of natural products from marine invertebrates of the North Atlantic Ocean. The sponge *Phakellia ventilabrum*, the gorgonian coral *Anthothela grandiflora* and the tunicate *Ascidia virginea* were investigated with respect to their secondary metabolites.

The co-occurrence of isocyanides, isothiocyanates and formamides, bearing the same carbon skeleton is known from sponges of the family Axinellidae. This family includes *P. ventilabrum*, which has not yet been chemically investigated. In *P. ventilabrum* the range of metabolites differs from this well-known pattern, as quartets of structurally related isocyanides, isocyanates, isothiocyanates and dichloroimines could be established.

From the complex mixture of sesquiterpenes, ten compounds could be isolated by preparative gas chromatography. Their structures were elucidated by two-dimensional NMR experiments. Among them were five known compounds: axisonitrile-1 (**24**), axisonitrile-4 (**28**), acanthellin-1 (**51**), acanthene B (**52**), as well as the 10-isocyano-muurolane **45**. Another five of the isolated sesquiterpenes are new: three isocyanides showing a cubebane- (**31**), an isodaucane- (**41**) and a eudesmane-skeleton (**49**) and the two isocyanates axisocyanate-1 (**25**) as well as the eudesmane derivative **53**.

Minor and trace compounds, which could not be isolated because of their low concentration, were not characterised by means of NMR-spectroscopy. The structures of these compounds were elucidated by derivatising the isolated isocyanides into their isocyanate, isothiocyanate and dichloroimine analogues. Comparison of gas chromatographical and mass spectroscopical data of the reaction products with the compounds present in the natural extract revealed the structures of additional 18 isocyanates, isothiocyanates and dichloroimines, of which ten are new natural products.

Two new mono-oxygenated sesquiterpenes, **70** and **71**, could be isolated from the extracts of *A. grandiflora* by reversed phase HPLC. Structure elucidation of the compounds, based on two dimensional NMR experiments, proved **70** to be 6-(1-methylethyl)-4-methyl-5a,6,7,8-tetrahydro-5*H*-naphtho[1,8-*bc*]furan and **71** to be 6-(1-methylethyl)-4-methyl-7,8-dihydro-6*H*-naphtho[1,8-*bc*]furan. Both, the vinyl furan **70** and the benzofuran **71**, show a cadinane skeleton. Their structural relation could be shown by reaction of **70** with DDQ, to yield its dehydro derivative **71**.

Two new alkaloids, named ascidine A (**83**) and B (**84**), were isolated and identified from the tunicate *Ascidia virginea*. These intensively red coloured compounds showing a novel azaquinone structure exhibited potent anticancer activity when tested in HeLa (human cervix carcinoma) and Jurkat (human T-cell leukemia) bio assays.

High resolution APCI-MS of the negative molecular ions revealed **83** to be $C_{15}H_9NO_5$ and **84** $C_{15}H_8INO_5$. Furthermore a doubly iodinated compound, $C_{15}H_7I_2NO_5$ (ascidine C, **85**), was detected.

The two dimensional NMR spectra DQF-COSY, HMQC, HMBC and NOESY allowed the structure elucidation of **83** and **84**. Ascidine A (**83**) is a isoquinoline-3,7-dione, bearing a 4'-hydroxyphenyl moiety at C-4 and is hydroxylated at C-1 and C-8. Ascidine B (**84**) is its 3'-iodo derivative.

The doubly iodinated ascidine C (**85**) occurs as a trace compound, which could not be isolated and characterised by NMR-spectroscopy. Its identity with 3',5'-iodo-**83** could be shown by reaction of **83** with bispyridine iodonium tetrafluoroborate (IPy_2BF_4 , Barluenga's reagent) which yielded the iodinated ascidines B and C.

Three further trace compounds, ascidine D, E and F (**86-88**), could be detected by means of negative ion mass spectrometry. Their molecular ions and their isotopic pattern propose their structures to be 3'-bromo-, as well as 3',5'-dibromo- and 3'-iodo-5'-bromo-**83**.

8 Experimenteller Teil

8.1 Probenmaterial

8.1.1 Probennahme

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben entstammen drei Beprobungsphasen, die im Rahmen des BOSMAN-Projektes zwischen Juli 1999 und August 2002 an verschiedenen Orten des Nord-Atlantiks vorgenommen wurden. Die erste Beprobung fand am Sula-Rücken, einem Tiefwasserkorallenriff vor der Küste Norwegens, statt (Abbildung 8-1, Punkt 1). Hierbei wurde zur Schonung des Riffs, sowie zur Dokumentation der Beprobung mit Video-Aufzeichnungen das Tauchboot JAGO eingesetzt. Aus dieser Beprobungsphase entstammen einige der in dieser Arbeit untersuchten Individuen der Spezies *Phakellia ventilabrum*.



Abbildung 8-1 Beprobungen, die im Rahmen des BOSMAN-Projekts durchgeführt wurden. (1) Sula-Rücken, (2) Korsfjord, (3) Spitzbergen, Vesterisbanken bis Grönländische Küste westlich von Island.

Eine zweite Beprobung wurde im Oktober/November 2001 und Januar 2002 im Korfjord in der Nähe der Stadt Bergen (Norwegen) vorgenommen (Abbildung 8-1, Punkt 2). Hierbei stellte sich mit dem am Sula-Rücken gesammelten Material eine sehr große Übereinstimmung des Arten-Inventars heraus. Hinsichtlich des Naturstoffinventars des Schwammes *P.ventilabrum* konnten keine regionalen Unterschiede festgestellt werden.

Die Probennahmen am Korsfjord wurden durch die Meeresbiologische Station der Universität Bergen ermöglicht und vom Forschungsschiff *Hans-Brattström* aus mit einer Dredsch durchgeföhrt. Hierbei wurde biologisches Material aus Tiefen bis zu 600m an die Oberfläche geföhrt. Im Zusammenhang mit der Beprobung im Korsfjord wurden alle in dieser Arbeit untersuchten Arten gesammelt. Diese stellte daher den Hauptteil des untersuchten Materials.

Eine dritte Beprobungsphase im Rahmen des Projekts erfolgte während einer Ausfahrt des Forschungsschiffs *Polarstern* des Alfred-Wegener-Instituts, Bremerhaven (Abbildung 8-1, Punkt 3). In den Sommermonaten 2002 wurden hierbei mehrere Beprobungspunkte angefahren, die sich von der Vesterisbanken bei Spitzbergen bis zur Südküste Grönlands, westlich von Island erstreckten. Die in dieser Arbeit untersuchten Arten waren in dem dort gesammelten Probeninventar jedoch nur gering vertreten. Individuen der Spezies *Phakellia ventilabrum* wurden ergänzend zu dem untersuchten Material hinzugezogen.

8.1.2 Hälterung von *P. ventilabrum*

Individuen des Schwammes *P. ventilabrum* wurden nach der Beprobung 2-3 Stunden lang in Behältern mit frischem Oberflächenwasser gelagert und anschließend in Aquarien, die kontinuierlich mit frischem Meerwasser (5-8°C) gespeist wurden, befestigt.

Alle Aquarien wurden vor einfallendem Licht geschützt, um den Wuchs von Algen einzudämmen. Nach der Entnahme der gehälterten Schwämme zur Untersuchung der Inhaltsstoffe, wurden diese bis zur analytischen Aufarbeitung bei -30°C tiefgefroren.

Die Hälterung der Schwämme wurde von Dr. H. T. Rapp beaufsichtigt.

8.1.3 Taxonomie

Die Bestimmung der Schwammarten wurde von Frau Dr. Friederike Hoffmann, Universität Göttingen und Herrn Dr. Hans Tore Rapp, Universität Bergen, Norwegen durchgeföhrt. Die Einordnung in Familien und Ordnungen entspricht dem aktuellen Standardwerk zur Schwamm-Taxonomie von John N. A. Hooper und Rob W. M. van Soest⁹⁵.

Die Arten *Anthothela grandiflora* und *Ascidia virginea* wurden von Dr. H. T. Rapp bestimmt.

8.2 Extraktion

Alle in dieser Arbeit untersuchten marinen Invertebraten wurden nach einem einheitlichen Verfahren extrahiert, dessen schematischer Ablauf in Abbildung 8-2 dargestellt ist. Das biologische Material (A) wurde im gefrorenen Zustand mit Aceton versetzt und in einem Labormixer homogenisiert, sowie 15 min im Ultraschallbad behandelt (a). Anschließend wurde der Extrakt (B) von unlöslichen Bestandteilen abgetrennt (c). Hierzu wurde ggf. zentrifugiert,

um die Sedimentation von Feststoffen zu beschleunigen. Die klare Lösung konnte dann abdekantiert werden. Diese Arbeitsschritte wurden mit dem zurückbleibenden Material zweimal wiederholt (b). Nach Abtrennung des ersten Acetonextrakts und Zufuhr frischer Aceton-Portionen ließen sich so in zunehmendem Maße auch gering-polare, lipophile Substanzen lösen. Die Vereinigung der gewonnenen Extrakte (d) und ihre Einengung durch destillative Entfernung des Acetons im Vakuum führte zu einem inhomogenen Gesamtextrakt (D), aus dem aufgrund des veränderten Aceton- und Wassergehalts sowohl lipophile Bestandteile, als auch Salze ausfielen (D). Dieses Gemisch wurde nun mehrfach mit Dichlormethan extrahiert (e). Man erhielt den sog. Dichlormethanextrakt (E), der mit Magnesiumsulfat getrocknet wurde, zurück blieb eine wässrige Phase. Diese wurde anschließend mehrfach mit 1-Butanol extrahiert (f), was den Butanolextrakt (F) lieferte. Nach Beendigung dieser Extraktionsschritte lagen ein Dichlormethanextrakt, ein Butanolextrakt, sowie ein wässriger Rückstand vor (G).

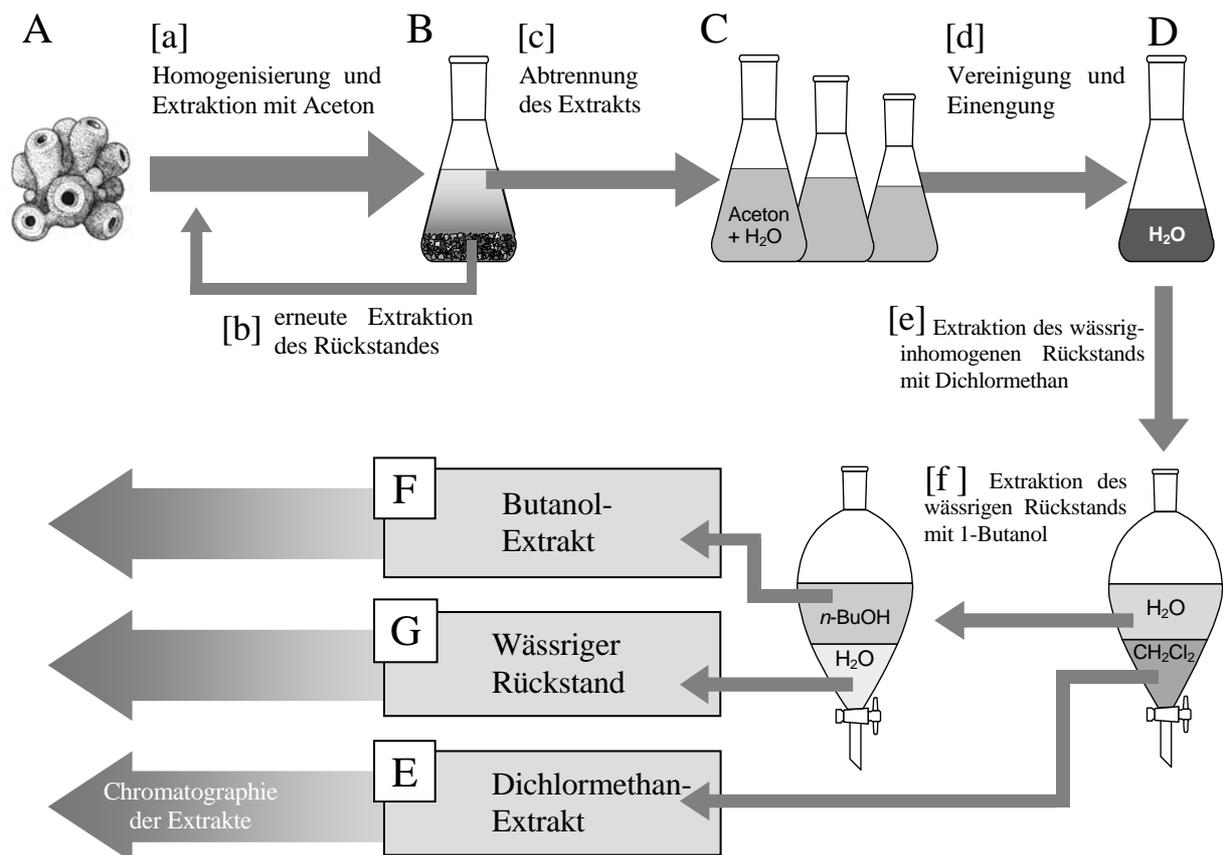


Abbildung 8-2 Extraktions-Schema, nach der alle in dieser Arbeit untersuchten Proben bearbeitet wurden.

8.3 Chromatographische Methoden

8.3.1 Niederdruck-Säulenchromatographie

Flüssigchromatographische Trennungen wurde an Kieselgel 60 (240-400 mesh) der Firma Merck, sowie an Sephadex LH-20[®] der Firma Amersham Bioscience durchgeführt⁹⁶. Letzteres wurde 10 min vorgequollen und anschließend in einer Niederdruck-Säule gepackt.

8.3.2 HPLC

Analytische HPLC Untersuchungen wurden mit einer Merck Hitachi L-6200 Intelligent Pump und einem L-4500 Diode Array Detector durchgeführt. Für präparative Trennungen stand eine L-7150 Intelligent Pump sowie ein L-4000 UV-Detektor zur Verfügung.

Folgende Säulen und Laufmittel wurden eingesetzt:

- Merck Lichrosphere 100 RP-18 endcapped (5 µm Korngröße), Länge 250 mm, 4 mm ID, mobile Phase Acetonitril/Wasser Gemische, Flussraten 1-1.5 ml/min
- Kromasil RP18 (5 µm Korngröße), Länge 250, 21.2 mm ID, mobile Phase Acetonitril/Wasser Gemische, Flussraten 10-15 ml/min

8.3.3 Präparative GC

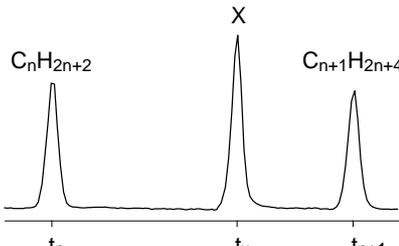
Zur präparativen gaschromatographischen Trennung diente ein HP 5890 Series II GC der Firma Hewlett & Packard (Agilent), der mit einem Fraktionensammler der Firma Gerstel gekoppelt wurde. Folgende GC-Trennsäulen wurden verwendet:

- FFAP-CB, 50m-Säule (0.53 mm ID, 1µm FD) der Firma Macherey&Nagel (Trennung der Sesquiterpen-Isocyanide)
- Optima-1701, 30m-Säule, (0.53 mm ID, 2µm FD) der Firma Macherey&Nagel (Trennung der Isocyanate und Isothiocyanate)

8.4 Analytische Messungen

8.4.1 Gaschromatographie und GC-FTIR

GC-FID Messungen wurden mit Hilfe eines HP6890 Gas-Chromatographen der Firma Agilent durchgeführt. Zur Bestimmung der linearen Retentionsindices (RI) wurde der Extrakt mit einem internen Standard aus *n*-Alkanen koinjiziert und die Indices anschließend nach der rechts abgebildeten Formel berechnet (C_n Anzahl der Kohlenstoffatome des Alkans, das vor der unbekanntem Substanz eluiert, t_n Retentionszeit des Alkans C_nH_{2n+2} , t_{n+1} Retentionszeit des folgenden Alkans, t_x Retentionszeit

$$RI = 100 \cdot C_n + \frac{t_x - t_n}{t_{n+1} - t_n}$$


The chromatogram displays three distinct peaks on a baseline. The first peak on the left is labeled C_nH_{2n+2} and has a retention time t_n marked below it. The second, taller peak in the middle is labeled x and has a retention time t_x marked below it. The third peak on the right is labeled $C_{n+1}H_{2n+4}$ and has a retention time t_{n+1} marked below it.

t_n Retentionszeit des Alkans C_nH_{2n+2} , t_{n+1} Retentionszeit des folgenden Alkans, t_x Retentionszeit

der unbekannt Substanz). Diese Messungen wurden mit folgenden GC-Parametern durchgeführt: GC-Säule VF5-MS (Varian), 30m, ID 0.25mm, FD 0.25 μ m, Temperatur-Programm: 80°C Starttemperatur (keine Isothermzeit), Aufheizrate 3°/min bis 300°C, Trägergas Helium.

Zur Aufnahme von GC-FTIR Spektren wurde ein HP5890 Series II Gaschromatograph in Kopplung mit einem HP 5965A Infrared Detector eingesetzt.

8.4.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektren der flüchtigen Verbindungen (Sesquiterpene in Kapitel 0 und 4) wurden mittels GC-MS-Kopplungen mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV aufgenommen. Folgende Gerätekombinationen kamen hierbei zum Einsatz:

- ein Quadrupol-Massenspektrometer md800 der Firma Fisons in Kopplung mit einem GC8008,
- ein HP5890 Series II Gaschromatograph in Kopplung mit ein Sektorfeld-Massenspektrometer VG 70/70 E der Firma VG Analytical,
- sowie ein HP6890 Gaschromatograph der Firma Hewlett Packard (Agilent) in Kopplung mit einem VG 70-250 SE Sektorfeld-Massenspektrometer der Firma VG Analytical

Hochaufgelöste Massenspektrometrien wurden mit den Sektorfeldgeräten mit Perfluorkerosen (PFK) als Referenzsystem durchgeführt.

Zur Aufnahme der APCI-Massenspektren und MS/MS-Experimente diente die Sektorfeldgeräten-Ionenfallenkopplung MAT 95 XL der Firma ThermoQuest.

8.4.3 UV-Vis-Spektroskopie

Die UV-Vis-Spektren wurden mit einem Merck Hitachi L-4500 Diode Array Detector, in Kopplung mit der analytischen HPLC-Pumpe aufgenommen. Da die Konzentrationen der Analyt-Lösungen unbekannt waren, konnten keine Extinktionskoeffizienten ermittelt werden.

8.4.4 NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden auf einem Bruker AMX 400, Bruker DRX 500, sowie einem Varian INOVA 600 Spektrometer gemessen. Die folgenden Pulsprogramme wurden verwendet:

- zg30 (^1H -NMR)
- zgpg30 (^{13}C -NMR)
- inviedetgs (HMQC)
- cosy90 (COSY90)
- inv4gslplrnd (HMBC)
- cosyftp (DQF-COSY)
- noesygptp (NOESY)

8.4.5 IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren der Ascidine A und B (**83** und **84**) wurden als KBr-Presslinge mit einem Avatar 370 FT-IR Spektrometer der Firma THERMO Nicolet aufgenommen.

8.5 Derivatisierungsreaktionen

Alle Derivatisierungsreaktionen wurden mit sehr geringen, nicht bestimmbar Mengen durchgeführt. Anhand der Signalintensitäten der im Anschluß durchgeführten Analysen (GC-FID, GC-MS, APCI-MS, HPLC-DAD) lassen sich die Ansatzgrößen auf wenige Mikrogramm schätzen. Alle Reagenzien wurden daher in nicht-stöchiometrischen Mengen eingesetzt.

8.5.1 Umsetzung eines Sesquiterpen-Isocyanids mit *m*-CPBA zum Isocyanat

Einige Mikroliter einer GC-Probe des Isocyanids in Dichlormethan wurden bei -20°C mit wenigen Tropfen einer verdünnten Lösung von *m*-Chlorperbenzoesäure in Dichlormethan versetzt und gerührt. Anschließend wurde die Lösung bis auf wenige Mikroliter eingeeengt und mit Pentan versetzt. Diese Reaktionsmischung wurde über eine kurze Säule, befüllt mit Kieselgel und Natriumhydrogencarbonat, filtriert. Anschließend wurde diese Säule mit 2-3 ml Pentan gespült und das Eluat gaschromatographisch untersucht.

8.5.2 Umsetzung eines Sesquiterpen-Isocyanids mit Schwefel zum Isocyanat

Einige Mikroliter einer GC-Probe des Isocyanids wurden zu einigen Tropfen einer verdünnten Lösung Schwefel in THF gegeben und 30 min unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das THF im Stickstoffstrom weitestgehend entfernt und der Rückstand in Pentan aufgenommen. Diese Lösung des Rohprodukts wurde über eine kurze Pasteurpipette, die 2-3 cm hoch mit Kieselgel befüllt wurde, filtriert. Das Eluat wurde durch GC-MS untersucht.

8.5.3 Umsetzung eines Sesquiterpen-Isocyanids mit Chlor zum Dichlorimin

Einige Mikroliter einer verdünnten Lösung von trockenem Chlorgas in Tetrachlorkohlenstoff wurden zu einer GC-Probe des Isocyanids bei -70°C hinzugegeben. Nach 1 min wurde das Kühlbad entfernt und evtl. überschüssiges Chlor durch eingeleiteten Stickstoff ausgetrieben. Die Reaktionslösung wurde anschließend gaschromatographisch untersucht.

8.5.4 Reduktion von Isocyanaten, Isothiocyanaten oder Dichloriminen zum Isocyanid

Eine GC-Probe der zu reduzierenden Isocyanate, Isothiocyanate oder Dichlorimine wurde im Stickstoffstrom bis auf wenige Mikroliter eingeeengt und in absolutem Diethylether aufgenommen. Diese Lösung wurde bei -70°C mit einer kleinen Spatelspitze LiAlH₄ versetzt und durch Schütteln vermischt. Nach max. 1 min wurde überschüssiges LiAlH₄ mit wenigen

Tropfen Wasser hydrolysiert, die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt und die Reaktionsprodukte mit Pentan extrahiert. Die Pentanphase wurde anschließend gaschromatographisch untersucht.

8.5.5 Umsetzung des Vinylfurans 70 mit DDQ zum Benzofuran 71

Eine kleine Menge des Vinylfurans **70** wurde in Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur mit wenigen Tropfen einer verdünnten Lösung von 2,3-Dichlor-5,6-dicyanobenzochinon (DDQ) in Dichlormethan versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unmittelbar danach gaschromatographisch untersucht und das gebildete Benzofuran **71** massenspektrometrisch nachgewiesen.

8.5.6 Iodierung von Ascidin A mit I(Py₂)BF₄ zu den Ascidinen B und C

Eine Lösung von wenigen Mikrogramm Ascidin A (**83**) in Dichlormethan wurde mit einer verdünnten Lösung von Bispyridinium Tetrafluoroborat, I(Py₂)BF₄, bei Raumtemperatur versetzt. Nach 1h wurde die Reaktionsmischung mit einer HPLC-DAD Kopplung untersucht und die iodierten Ascidine B und C (**84** und **85**) anhand ihrer Retentionszeiten und UV-Spektren nachgewiesen.

9 Sicherheitsdaten

Substanzname	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	F, Xn	11-36-66-67	9-16-26
Acetonitril	F, Xn	11-20/21/22-36	16-36/37
Benzol-d ₆	F, T	45-11-48/23/24/25	53.1-45
Bispyridinium Tetrafluoroborat	Xn	36/37/38	26-36
1-Butanol	Xn	10-22-37/38-41-67	13-26-37/39-46-7/9
Chlor	T, N	23-36/37/38-50	1/2-9-45-61
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
<i>m</i> -Chlorperbenzoesäure	O, Xn	5-8-36/37/38	17-26-36
Dichlormethan	Xn	40	23-24/25-36/37
2,3-Dichlor-5,6-dicyan- <i>p</i> -benzochinon	T	25-29	22-24/25-37-45
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Dimethylsulfoxid-d ₆ (DMSO-d ₆)	Xn	20/21/22-38	
n-Hexan	F, Xn, N	11-38-48/20-51/53-62-65-67	9-16-29-33-36/37-61-62
Kaliumbromid	Xn	36/37/38	26-36
Kieselgel 60	Xi	40-37	22-24/25
Lithiumaluminiumhydrid	F	15	24/25-43.12-7/8
Magnesiumsulfat Hydrat			22-24/25
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
n-Pentan	F, Xn, N	12-51/53-65-66-67	9-16-29-33-61-62
Schwefel	F	11	16-26
Selen	T	23/25-33-53	20/21-28-45-61
Sephadex LH-20			
Tetrachlorkohlenstoff	T, N	23/24/25-40-48/23-52/53-59	23-36/37-45-59-61
Tetrahydrofuran	F, Xn	11-19-36/37	16-29-33
Triethylamin	F, Xi	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Wasserstoff	F	12	9-16-33

R-Sätze

- R 1 Im trockenen Zustand explosionsgefährlich
- R 2 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen explosionsgefährlich
- R 3 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen besonders explosionsgefährlich
- R 4 Bildet hochempfindliche explosionsgefährliche Metallverbindungen
- R 5 Beim Erwärmen explosionsfähig
- R 6 Mit und ohne Luft explosionsfähig
- R 7 Kann Brand verursachen
- R 8 Feuergefahr bei Berührung mit brennenden Stoffen
- R 9 Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen
- R 10 Entzündlich
- R 11 Leichtentzündlich
- R 12 Hochentzündlich
- R 13 Hochentzündliches Flüssiggas
- R 14 Reagiert heftig mit Wasser
- R 15 Reagiert mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase
- R 16 Explosionsgefährlich in Mischung mit brandfördernden Stoffen
- R 17 Selbstentzündlich an der Luft
- R 18 Bei Gebrauch Bildung explosionsfähiger / leichtentzündlicher Dampf-Luftgemische möglich
- R 19 Kann explosionsfähige Peroxide bilden
- R 20 Gesundheitsschädlich beim Einatmen
- R 21 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut
- R 22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
- R 23 Giftig beim Einatmen
- R 24 Giftig bei Berührung mit der Haut
- R 25 Giftig beim Verschlucken
- R 26 Sehr giftig beim Einatmen
- R 27 Sehr giftig Berührung mit der Haut
- R 28 Sehr giftig beim Verschlucken
- R 29 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase
- R 30 Kann bei Gebrauch leicht entzündlich werden
- R 31 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase
- R 32 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
- R 33 Gefahr kumulativer Wirkungen
- R 34 Verursacht Verätzungen
- R 35 Verursacht schwere Verätzungen
- R 36 Reizt die Augen
- R 37 Reizt die Atmungsorgane
- R 38 Reizt die Haut
- R 39 Ernste Gefahr irreversiblen Schadens
- R 40 Irreversibler Schaden möglich
- R 41 Gefahr ernster Augenschäden
- R 42 Sensibilisierung durch Einatmung möglich
- R 43 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
- R 44 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss
- R 45 Kann Krebs erzeugen
- R 46 Kann vererbare Schäden verursachen
- R 47 Kann Missbildungen verursachen
- R 48 Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition.
- R 49 Kann Krebs erzeugen beim Einatmen

- R 50 Sehr giftig für Wasserorganismen
- R 51 Giftig für Wasserorganismen
- R 52 Schädlich für Wasserorganismen
- R 53 Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
- R 54 Giftig für Pflanzen
- R 55 Giftig für Tiere
- R 56 Giftig für Bodenorganismen
- R 57 Giftig für Bienen
- R 58 Kann längerfristig schädliche Wirkungen auf die Umwelt haben
- R 59 Gefährlich für die Ozonschicht
- R 60 Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
- R 61 Kann das Kind im Mutterleib schädigen
- R 62 Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
- R 63 Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen
- R 64 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen

Kombinationen der R-Sätze

- R 14/15 Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase
- R 15/29 Reagiert mit Wasser unter Bildung giftiger und hochentzündlicher Gase
- R 20/21 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 21/22 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
- R 20/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken
- R 20/21/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
- R 23/24 Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 24/25 Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
- R 23/25 Giftig beim Einatmen und Verschlucken
- R 23/24/25 Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
- R 26/27 Sehr giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 27/28 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
- R 26/28 Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken
- R 26/27/28 Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
- R 36/37 Reizt die Augen und die Atmungsorgane
- R 37/38 Reizt die Atmungsorgane und die Haut
- R 36/38 Reizt die Augen und die Haut
- R 36/37/38 Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut
- R 39/23 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen
- R 39/23/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 39/23/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 39/23/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken
- R 39/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut
- R 39/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 39/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken
- R 39/26 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen
- R 39/26/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 39/26/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

R 39/26/28	Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und Verschlucken
R 39/27	Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut
R 39/27/28	Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 39/28	Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken
R 40/20	Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen
R 40/20/21	Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut
R 40/20/21/22	Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 40/20/22	Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken
R 40/21	Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut
R 40/21/22	Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 40/22	Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Verschlucken
R 42/43	Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich
R 48/20	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen
R 48/20/21	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Berührung mit der Haut
R 48/20/21/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 48/20/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken
R 48/21	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut
R 48/21/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 48/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken
R 48/23	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen
R 48/23/24	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Berührung mit der Haut
R 48/23/24/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 48/23/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken
R 48/24	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut
R 48/24/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 48/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken
R 50/53	Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
R 51/53	Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
R 52/53	Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

S-Sätze

- S 1 Unter Verschluss aufbewahren
- S 2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen
- S 3 Kühl aufbewahren
- S 4 Von Wohnplätzen fernhalten
- S 5 Unter ... aufbewahren (Geeignete Flüssigkeit vom Hersteller anzugeben)
- S 6 Unter ... aufbewahren (inertes Gas vom Hersteller anzugeben)
- S 7 Behälter dicht geschlossen halten
- S 8 Behälter trocken halten
- S 9 Behälter an einem gut belüfteten Ort aufbewahren
- S 12 Behälter nicht gasdicht verschließen
- S 13 Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten
- S 14 Von ... fernhalten (inkompatible Substanzen vom Hersteller anzugeben)
- S 15 Vor Hitze schützen
- S 16 Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen
- S 17 Von brennbaren Stoffen fernhalten
- S 18 Behälter unter Vorsicht öffnen und handhaben
- S 20 Bei der Arbeit nicht essen und trinken
- S 21 Bei der Arbeit nicht rauchen
- S 22 Staub nicht einatmen
- S 23 Gas / Rauch / Dampf / Aerosol nicht einatmen
- S 24 Berührung mit der Haut vermeiden
- S 25 Berührung mit den Augen vermeiden
- S 26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und den Arzt konsultieren
- S 27 Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen
- S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 29 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen
- S 30 Niemals Wasser hinzugießen
- S 33 Maßnahmen gegen elektromagnetische Aufladungen treffen
- S 34 Schlag und Reibung vermeiden
- S 35 Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden
- S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
- S 37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen
- S 38 Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen
- S 39 Schutzbrille / Gesichtsschutz tragen
- S 40 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit ... reinigen (vom Hersteller anzugeben)
- S 41 Explosions- und Brandgase nicht einatmen
- S 42 Beim Räuchern/Versprühen geeignetes Atemschutzgerät anlegen (geeignete Bezeichnung[en] vom Hersteller anzugeben)
- S 43 Zum Löschen verwenden ... (vom Hersteller anzugeben) (wenn Wasser die Gefahr erhöht, einfügen: Kein Wasser verwenden)
- S 44 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen
- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen)
- S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen
- S 47 Nicht aufbewahren bei Temperaturen über ... °C (vom Hersteller anzugeben)
- S 48 Feucht halten mit ... (geeignetes Mittel vom Hersteller anzugeben)
- S 49 Nur im Originalbehälter aufbewahren
- S 50 Nicht mischen mit ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 51 Nur in gut belüfteten Bereichen verwenden
- S 52 Nicht großflächig für Wohn und Aufenthaltsräume zu verwenden
- S 53 Explosion vermeiden - vor Gebrauch besondere Einweisungen einholen

- S 54** Vor Ableitung in Kläranlagen Einwilligung der zuständigen Behörden einholen
- S 55** Vor Ableitung in die Kanalisation oder in Gewässer nach dem Stand der Technik behandeln
- S 56** Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen
- S 57** Zur Vermeidung einer Kontamination der Umwelt geeigneten Behälter verwenden
- S 58** Als gefährlichen Abfall entsorgen
- S 59** Informationen zur Wiederverwendung/Wiederverwertung beim Hersteller / Lieferanten erfragen
- S 60** Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen
- S 61** Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen
- S 62** Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder dieses Etikett vorzeigen

Kombination der S-Sätze

- S 1/2** Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren
- S 3/7** Behälter dicht geschlossen halten und an einem kühlen Ort aufbewahren
- S 3/7/9** Behälter dicht geschlossen halten und an einem kühlen, gut gelüfteten Ort aufbewahren
- S 3/9** Behälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort aufbewahren
- S 3/14** An einem kühlen Ort, entfernt von ... aufbewahren (die Stoffe, mit denen Kontakt vermieden werden muss, sind vom Hersteller anzugeben)
- S 3/9/14** An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ... aufbewahren (die Stoffe, mit denen Kontakt vermieden werden muss, sind vom Hersteller anzugeben)
- S 3/9/49** Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut belüfteten Ort aufbewahren
- S 3/9/14/49** Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ... aufbewahren (die Stoffe, mit denen Kontakt vermieden werden muss, sind vom Hersteller anzugeben)
- S 7/8** Behälter trocken und dicht geschlossen halten
- S 7/9** Behälter dicht geschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren
- S 7/47** Behälter dicht geschlossen und nicht bei Temperaturen über ... °C aufbewahren
- S 20/21** Bei der Arbeit nicht essen, trinken, rauchen
- S 24/25** Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden
- S 29/56** Nicht in die Kanalisation gelangen lassen
- S 36/37** Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
- S 36/39** Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille / Gesichtsschutz tragen
- S 37/39** Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille / Gesichtsschutz tragen
- S 36/37/39** Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille / Gesichtsschutz tragen
- S 47/49** Nur im Originalbehälter bei einer Temperatur von nicht über ... °C (vom Hersteller anzugeben) aufbewahren

10 Abkürzungsverzeichnis

APCI-MS	Atmospherical Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BOSMAN	<u>B</u> oreale <u>S</u> chwämme als <u>M</u> arine <u>N</u> aturstoffquelle (BMBF-Projekt)
d	Dublett
DB5-MS	unpolare stationäre Phase von Trennsäulen für die Gaschromatographie: 5% Phenyl-, 95% Dimethyl-polysiloxan
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	deutertes Dimethylsulfoxid
EC	Electron Capture
EI	Electron Impact
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
<i>et al.</i>	und weitere
eV	Elektronenvolt
FAB	Fast Atom Bombardment
FD	Filmdicke
FFAP	polare stationäre Phase von Trennsäulen für die Gaschromatographie: Polyethylenglykol-2-nitroterephthalsäureester
FID	Flammenionisationsdetektor
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
GC	Gaschromatographie
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ID	Innendurchmesser
Int.	Intensität
IR	Infrarot
m	Multipllett
m/z	Masse/Ladungsverhältnis (in der Massenspektrometrie)
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
Me	Methylgruppe
MHz	Mega-Hertz
MS	Massenspektrometrie
Mult.	Multiplizität (von NMR-Signalen)
NICI	Negative Ion Chemical Ionization
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Optima-1701	Trennsäule für die Gaschromatographie, Phase: 14% Cyanopropyl- phenyl- / 86% Dimethylpolysiloxan
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglycol
ppm	parts per million
q	Quartett
RI	Retentionsindex
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
R _T	retention time (Retentionszeit)
t	Tripllett

THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan, interner Standard für die NMR-Spektroskopie
UV	Ultraviolett
VF5-MS	siehe DB5-MS
Vis	visuell

11 Literaturhinweise

- [1] [a] Faulkner, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 113-158. [b] Faulkner, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 155-198. [c] Faulkner, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 7-55. [d] Faulkner, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 1-49. [e] Faulkner, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 1-48. [f] Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 1-48.
- [2] Faulkner, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 1-6.
- [3] Nobuhiro Fusetani (Hrsg.), *Drugs from the sea*, Karger, Basel, **2000**.
- [4] [a] Engel, S., Jensen, P. R., Fenical, W., *J. Chem. Ecol.*, **2002**, *28*, 1971-1984. [b] Lindquist, N., *J. Chem. Ecol.*, **2002**, *28*, 1987-2000. [c] Hay, M. E., *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **1996**, *200*, 103-134.
- [5] McConnell, O., Fenical, W., *Phytochemistry*, **1977**, *16*, 367-374.
- [6] Rose, A. F., Pettus, J. A., Sims, J. J., *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 1847-1850.
- [7] Butler, A., Walker, J. V., *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 1937-1944.
- [8] Sharma, G., Magdoff-Fairchild, B., *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, 4118-4124.
- [9] Norton, R. S., Croft, K. D., Wells, R. J., *Tetrahedron*, **1981**, *37*, 2341-2349.
- [10] [a] Pettit, G. R., Herald, C. L., Doubek, D. L., Herald, D. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 6846-6848. [b] Pettit, G. R., Kamano, Y., Herald, C. L., Tozawa, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 6768-6771. [c] Pettit, G. R., Kamano, Y., Herald, C. L., *J. Nat. Prod.*, **1986**, *49*, 661-664.
- [11] [a] Wright, A. E., Forleo, D. A., Gunawardana, G. P., Gunasekera, S. P., Koehn, F. E., McConnell, O. J., *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 4508-4512. [b] Rinehart, K. L., Holt, T. G., Fregeau, N. L., Stroh, J. G., Keifer, P. A., Sun, F., Li, L. H., Martin, D. G., *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 4512-4515. [c] Rinehart, K. L., Holt, T. G., Fregeau, N. L., Stroh, J. G., Keifer, P. A., Sun, F., Li, L. H., Martin, D. G., *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 1676.
- [12] R. Garcia-Carbonero, J.G. Supko, J. Manola, M.V. Seiden, D. Harmon, D.P. Ryan, M.T. Quigley, P. Merriam, J. Canniff, G. Goss, U. Matulonis, R.G. Maki, T. Lopez, T.A. Puchalski, M.A. Sancho, J. Gomez, C. Guzman, J. Jimeno, and G.D. Demetri, *J. Clin. Onc.*, **2004**, *22*, 1480-1490.
- [13] [a] Look, S. A., Fenical, W., Matsumoto, G. K., Clardy, J., *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 5140-5145. [b] Look, S. A., Fenical, W., Jacobs, R. S., Clardy, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 6238-6240. [c] Ettouati, W. S., Jacobs, R. S., *Mol. Pharmacol.* **1987**, *31*, 500-505.
- [14] Westheide, W., Rieger, R., *Spezielle Zoologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1996, pp.157
- [15] Proksch, P., Edrada, R. A., Ebel, R., *Appl Microbiol Biotechnol*, **2002**, *59*, 125-134.
- [16] Amade, P., Pesando, D., Chevolut, L., *Mar. Biol.*, **1982**, *70*, 223-228.
- [17] Joulain, D., König, W.A., *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*, E.B.-Verlag, Hamburg, **1998**
- [18] Sonoda, N., Yamamoto, G., Tsutsumi, S., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1972**, *45*, 2937-2938.
- [19] Fujiwara, S., Shin-Ike, T., Sonoda, N., Aoki, M., Kazuhiro, O., Miyoshi, N., Kambe, N., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 3503-3506.
- [20] Bergemann, M., Neidlein, R., *Synthesis*, **1998**, *10*, 1437-1441.
- [21] Kühle, E.; Andres, B.; Zumach, G. *Angew. Chem.* **1967**, *79*, 663-680.
- [22] Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Santacroce, C.; Sica, D. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 4259-4262.
- [23] Adinolfi, M.; DeNapoli, L.; DiBlasio, B.; Iengo, A.; Pedone, C.; Santacroce, C. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *32*, 2815-2816.
- [24] Iengo, A.; Mayol, L.; Santacroce, C. *Experientia* **1977**, *33*, 11-12.
- [25] DiBlasio, B.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Mayol, L.; Pedone, C.; Santacroce, C.; Sica, S. *Tetrahedron* **1976**, *32*, 473-478.
- [26] Braekman, J. C.; Daloz, D.; Deneubourg, F.; Huysecom, J.; Vandevyver, G. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1987**, *96*, 539-543.
- [27] Alvi, K. A.; Tenenbaum, L.; Crews, P. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 71-78.
- [28] He, H.-Y.; Salvá, J.; Catalos, R. F.; Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3191-3194.
- [29] Fusetani, N., Wolstenholme, H.J., Shinoda, K., Asai, N., Matsunaga, S., Onuki, H., Hirota, H., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 6823-6826
- [30] Okino, T.; Yoshimura, E.; Hirota, H.; Fusetani, N. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 9447-9454.
- [31] Glasby, J. S., *Encyclopedia of the Terpenoids*, JOHN WILEY & SONS, Chichester, **1982**

- [32] Tanaka, A., Tanaka, R., Uda, H., Yoshikoshi, A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1972**, 1721-1727.
- [33] Mitome, H.; Shirato, N.; Miyaoka, H.; Yamada, Y.; Soest, R. W. M. v., *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67*, 833-837.
- [34] Burgyone, D. L.; Dumdei, E. J.; Andersen, R. J. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 4503-4510.
- [35] Minale, L.; Riccio, R.; Sodano, G. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 1341-1343.
- [36] Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Mayol, L. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3949-3951.
- [37] Chang, C. W. J., *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **2000**, *80*, 1-186.
- [38] Rothe, W., *Pharmazie*, 1950, *5*, 190.
- [39] Hagedorn, I., Tönjes, H., *Pharmazie*, **1956**, *11*, 409-410.
- [40] Hagedorn, I., Tönjes, H., *Pharmazie*, **1957**, *12*, 567-580.
- [41] Wright, J. J. K., Cooper, A. B., McPhail, A. T., Merrill, Y., Nagabhushan, T. L., Puar, M. S., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1982**, 1188-1190.
- [42] Baldwin, J. E., Bansal, H. S., Chondrogianni, J., Field, L. D., Taha, A. A., Thaller, V., Brewer, D., Taylor A., *Tetrahedron*, **1985**, *41*, 1931-1938.
- [43] Kobayashi, J., Tsuda, M., Nemoto, A., Tanaka, Y., Yazawa, K., Mikami, Y., *J. Nat. Prod.*, **1997**, *60*, 719-720.
- [44] Moore, R. E., Cheuk, C., Yang, X.-Q. C., Patterson, G. M. L., Bonjouklian, R., Smitka, T. A., Mynderse, J. S., Foster, R. S., Jones, N. D., Swartzendruber, J. K., Deeter, J. B., *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 1036-1043.
- [45] Stratmann, K., Moore, R. E., Bonjouklian, R., Deeter, J. B., Patterson, G. M. L., Shaffer, S., Smith, C. D., Smitka, T. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 9935-9942.
- [46] Smitka, T. A., Bonjouklian, R., Doolin, L., Jones, N. D., Deeter, J. B., Yoshida, W. Y., Prinsep, M. R., Moore, R. E., Patterson, G. M. L., *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 857-861.
- [47] Wolf, D., Schmitz, F. J., *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 1524-1527.
- [48] König, G. M., Wright, A. D., Angerhofer, C. K., *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 3259-3267.
- [49] Gulavita, N. K.; DeSilva, E. D.; Hagadone, M. R.; Karuso, P.; Scheuer, P. J. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 5136-5139.
- [50][a] Wratten, S. J.; Faulkner, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7367-7368. [b] Wratten, S. J.; Faulkner, D. J. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *16*, 1391-1394. [c] Wratten, S. J.; Faulkner, D. J. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *16*, 1395-1398.
- [51] Simpson, J. S.; Raniga, P.; Garson, M. J. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7947-7950.
- [52] Karuso, P.; Scheuer, P. J. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2092-2095.
- [53] [a] Hagadone, M. R.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2447-2448. [b] Simpson, J. S.; Brust, A.; Garson, M. J. *J. Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 949-956. [c] Garson, M. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 35-36.
- [54] Tada, H.; Tozoy, T.; Shiro, M. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3366-3368.
- [55] [a] Simpson, J. S.; Brust, A.; Garson, M., *J. Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 949-956. [b] Garson, M., *Nat. Prod. Rep.*, **1989**, *6*, 143-170.
- [56] *MarinLit*, Marine Literature DataBase, Devised by Murray H. G. Munro, John W. Blunt, University of Canterbury, Christchurch, New Zealand
- [57] Reichstein, H. *Helv. Chim. Acta* **1932**, *15*, 1110-1112.
- [58] Paquette, L. A., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, New York, 1995; Vol. 3, 1699-1703.
- [59] Fu, P. P., Harvey, R. G., *Chem. Rev.*, **1978**, *78*, 317
- [60] Quilico, A.; Piozzi, F.; Pavan, M. *Tetrahedron* **1957**, *1*, 177-185.
- [61] [a] Hochlowski, J. E.; Walker, R. P.; Ireland, C.; Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 88-91. [b] Fontana, A.; Muniaín, C.; Cimino, G. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1027-1029. [c] Kakou, Y.; Crews, P.; Bakus, G. J.; *J. Nat. Prod.*, **1987**, *50*, 482-484.
- [62] [a] Cimino, G.; De Stefano, S.; Minale, L.; Trivellone, E. *Tetrahedron* **1972**, *28*, 4761-4767. [b] Clark, R. J.; Garson, M. J.; Brereton, I. M.; Kennedy, J. A. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 915-916.
- [63] Hayashi, N.; Komae, H.; Eguchi, E.; Nakayama, M.; Hayashi, S.; Sakao, T.; *Chem. Ind.*, **1972**, 572.
- [64] Cimino, G.; De Rosa, S., De Stefano, S.; Sodano, G.; *J. Nat. Prod.*, **1984**, *47*, 877-878.
- [65] [a] Hikino, H.; Agatsuma, K.; Takemoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 931-933. [b] Hikino, H.; Agatsuma, K.; Takemoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 2855-2858.
- [66] Brieskorn, C. H.; Noble, P. *Planta Med.* **1982**, *44*, 87-90.

- [67] [a] Rücker, G.; Assis Brasil E Silva, G. A.; Bauer, L.; Schikarski, M. *Planta Med.* **1977**, *33*, 322-327. [b] Rücker, G.; De Assis Brasil E Silva, G. A.; Bauer, L. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 221-224. [c] Weyerstahl, P.; Marschall-Weyerstahl, H.; Christiansen, C.; Oguntimoin, B. O.; Adeoye, A. O. *Planta Med.* **1988**, 546-549.
- [68] [a] Bowden, B. F.; Braekman, J.-C.; Coll, J. C.; Mitchell, S. J. *Aust. J. Chem.* **1980**, *33*, 927-932. [b] Chan, W. R.; Tinto, W. F.; Moore, R. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 1499-1502.
- [69] Pawlik, J. R., *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 1911-1922.
- [70] [a] Dunlop, R. W.; Kazlauskas, R.; March, G.; Murphy, P. T.; Wells, R. J. *Aust. J. Chem.* **1982**, *35*, 95-103. [b] Kazlauskas, R.; Murphy, P. T.; Wells, R. J. *J. Org. Chem.* **1978**, *49*, 4949-4950.
- [71] Cimino, G.; De Stefano, S.; Guerriero, A.; Minale, L. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1425-1428.
- [72] Matsumoto, T.; Usui, S. *Chem. Lett.* **1978**, 105-108.
- [73] Cimino, G.; De Stefano, S.; Guerriero, A.; Minale, L. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1421-1424.
- [74] Schulte, G.; Scheuer, P. J.; McConnell, O. J. *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 2159-2167.
- [75] Weinheimer, A. J.; Washecheck, P. H. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 3315-3318.
- [76] Davidson, B. S., *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 1771-1791.
- [77] Budzikiewicz, H. *Mass Spectrom. Rev.* **1986**, *5*, 345-380.
- [78] Gross, J. H., *Mass Spectrometry. A Textbook*, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York **2004**, 331-354.
- [79] Budzikiewicz, H. *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 635-649.
- [80] Edgar, K. J.; Falling, S. N. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5287-5291.
- [81] Barluenga, J.; García-Martín, M. A.; González, J. M.; Clapés, P.; Valencia, G. *Chem. Commun.* **1996**, 1505-1506.
- [82] Barluenga, J.; González, J. M.; García-Martín, M. A.; Campos, P. J.; Asensio, G. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2058-2060.
- [83] Stryer, L., *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1996**, 768f.
- [84] Woolard, F. X., Moore, R. E., Roller, P. P., *Phytochemistry*, **1979**, *18*, 617-620.
- [85] Kazlauskas, R., Murphy, P. T., Quinn, R. J., Wells, R. J., Why, D., *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 37-40.
- [86] Izac, R. R.; Sims, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6136-6137.
- [87] [a] Watanabe, K.; Sekine, M.; Takahashi, H.; Iguchi, K. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1421-1425. [b] Iguchi, K., Kaneta, S., Mori, K., Yamada, Y., Honda, A., Mori, Y., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1986**, 981-982
- [88] [a] Ishiwata, H.; Nemoto, T.; Ojika, M.; Yamada, K. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4710-4711. [b] Ishiwata, K.; Sone, H.; Kigoshi, H.; Yamada, K. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4712-4713. [c] Ghosh, A. K.; Liu, C. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 635-638. Bai, R.; Covelli, D. G.; Liu, C.; Ghosh, A. K.; Hamel, E. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32165-32171.
- [89] [a] Chan, W. R.; Tinto, W. F.; Manchand, P. S.; Torado, L. J. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3091-3093. [b] White, J. D.; Amedio Jr., J. C. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 736-738.
- [90] Coleman, J. E.; Van Soest, R.; Andersen, R. J. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1137-1141.
- [91] Yoshida, W. Y.; Lee, K. K.; Carroll, A. R.; Scheuer, P. J. *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 1721-1725.
- [92] [a] Fukumi, H.; Kurihara, H.; Hata, T.; Tamura, C.; Mishima, H. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *43*, 3825-3828. [b] Fukumi, H., Maruyama, F., Yoshida, K., Arai, M., Kubo, A., Arai, T., *J. Antibiotics*, **1978**, *31*, 847-849.
- [93] [a] Frincke, J. M.; Faulkner, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 265-269. [b] McKee, T. C.; Ireland, C. M. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 754-756.
- [94] Davidson, B. S. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3721-3724.
- [95] John N. A. Hooper, Rob W. M. Van Soest: *SYSTEMA PORIFERA – A Guide to the Classification of Sponges*, Kluwer Academic, New York, 2002
- [96] Hencke, H., *Präparative Gelchromatographie an Sephadex LH-20*, Obernburg 1994.