

Isolierung und Strukturaufklärung von
Saponinen des Seesterns *Asterias rubens*
mittels eines LC-NMR-MS-Screenings
sowie weiterer NMR-spektroskopischer
Methoden

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades Doktor der
Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation von

Lebensmittelchemiker Martin Sandvoß
geboren am 9. März 1970 in Wolfenbüttel

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Experimente wurden in der Zeit von Oktober 1997 bis Mai 2000 am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Nikolai-Fuchs-Straße, Hannover, der Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Chemie, Hessische Straße, sowie der Firma Bruker Analytische Meßtechnik GmbH, Silberstreifen, Rheinstetten, durchgeführt.

Tag der Annahme vom Fachbereichsrat Chemie der Universität Hannover: 8. November 2000.

Tag der mündlichen Prüfung: 24. November 2000

Referent: Prof. Dr. Gerold Wünsch

Korreferent: Prof. Dr. Karsten Levsen

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig abgefaßt und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Ich erkläre ferner, daß diejenigen Stellen der Arbeit, die anderen Werken wörtlich oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Fall unter der Angabe der Quelle kenntlich gemacht sind und daß die hier vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, den 23. Oktober 2000

Martin Sandvoß

Kurzzusammenfassung

Wegen seiner negativen Auswirkungen auf die marine Umwelt und der daraufhin in vielen Ländern erlassenen Nutzungsbeschränkungen werden Ersatzstoffe für den Antifoulingwirkstoff Tributylzinn (TBT) benötigt. Das Projekt, in dem diese Arbeit entstand, beschäftigt sich mit der Suche nach antifoulingaktiven Naturstoffen aus Meeresorganismen. Hier wurde erstmals die biologisch aktive Asterosaponinfraktion des Seesterns *Asterias rubens* untersucht.

Um rasch einen Überblick über die in einer Seesternprobe vorliegenden Saponine zu erhalten und um die Reisolierung bereits bekannter Verbindungen zu vermeiden, wurde eine neuartige LC-NMR-MS-Screeningmethode in Verbindung mit einer MSPD-Extraktion entwickelt. Mittels der mikropräparativen Probenaufarbeitung MSPD können ausgehend vom intakten Seesternmaterial innerhalb eines Arbeitstages Asterosaponinextrakte erhalten werden, die rein genug sind, um direkt in das LC-NMR-MS-System injiziert zu werden.

Für das LC-NMR-MS-Screening wurde ein on-flow-Ansatz bei langsamen Flußraten gewählt. Innerhalb eines chromatographischen Laufes können so die umfassenden spektroskopischen Daten von $^1\text{H-NMR}$ und MS erhalten werden. Die Identifizierung neuer Asterosaponine erfolgte durch Zuordnung einzelner Strukturmerkmale, Subspektrenvergleich sowie durch homonukleare 2D-NMR-Experimente im stopped-flow-Modus. Erstmals konnte die Eignung dieser Methode zur Charakterisierung komplexer glycosidischer Moleküle im Molmassenbereich zwischen 1200 und 1400 a.m.u. gezeigt werden. Die zusätzliche Information über die Anzahl austauschender Protonen, die durch D-H-Rücktauschexperimente erhalten werden kann, erwies sich im Fall der Asterosaponine als besonders hilfreich zur Strukturaufklärung. Anhand der Daten, die das LC-NMR-MS-Screening lieferte, erfolgte die zielgerichtete semi-präparative Isolierung von neuen Inhaltsstoffen mittels HPLC.

Die Strukturen von sieben neuen Saponinen aus *Asterias rubens* (Ruberoside A bis G) wurden ausschließlich durch moderne ein- und zweidimensionale NMR-Methoden sowie Massenspektrometrie ohne weitere Derivatisierung oder Abbau der Verbindungen aufgeklärt. Die Strukturvorhersagen des LC-NMR-MS-Screenings wurden durchgehend bestätigt.

Schlagwörter

LC-NMR-MS-Kopplung, Saponine, Seestern *Asterias rubens*

Abstract

Because of its negative effects on the marine environment and the restrictions of use that were subsequently issued in many countries, substitutes for the antifouling agent tri butyl tin (TBT) are required. The project, in the course of which this work was performed, deals with the search for antifouling-active natural products from marine organisms. In this study the biologically active asterosaponin fraction of the starfish *Asterias rubens* was investigated for the first time.

To obtain a rapid overview of the saponins present in a starfish specimen and to avoid the reisolation of already known compounds, a novel LC-NMR-MS screening method in conjunction with an MSPD extraction scheme was developed. By means of the micro-preparative sample preparation MSPD asterosaponin extracts, which are pure enough to be injected directly into the LC-NMR-MS system, can be obtained within one working day.

For the LC-NMR-MS screening an on-flow approach at low flow rates was chosen. The spectroscopic data of ¹H NMR and MS could thus be obtained from one single chromatographic run. The identification of novel asterosaponins was achieved by assignment of individual structural features, by comparison of subspectra as well as by two-dimensional NMR-spectra in stopped-flow mode. The suitability of this method to characterize complex glycosidic molecules in the molecular weight range between 1200 and 1400 a.m.u. could be demonstrated for the first time. The additional information on the number of exchangeable protons, which is available by means of D-H-back-exchange experiments, proved to be particularly useful for structural elucidation in the case of asterosaponins. With the help of the data obtained from the LC-NMR-MS screening the targeted semi-preparative isolation of new constituents by means of HPLC was achieved.

The structures of seven new saponins from *Asterias rubens* (ruberoides A to G) were elucidated exclusively by use of modern one and two-dimensional NMR experiments as well as mass spectrometry without further derivatization or cleavage of the compounds. The structures predicted by the LC-NMR-MS screening were confirmed without exception.

Keywords

LC-NMR-MS Hyphenation, Saponins, Starfish *Asterias rubens*

meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Antifoulingproblematik	1
1.1.1. Biofouling	1
1.1.2. Antifouling	1
1.1.3. Wirtschaftliche Notwendigkeit von Antifoulingmaßnahmen	2
1.1.4. Antifoulingwirkstoff Tributylzinn (TBT)	2
1.1.5. Konventionelle Anstriche und SPCs	5
1.1.6. Alternative Schiffsanstriche	6
1.1.7. Bewuchsverhinderung in der Natur	7
1.1.8. Forschungsprojekt Strukturaufklärung bewuchshemmender Wirkstoffe in Antifoulingmitteln, isoliert aus dem Seestern <i>Asterias rubens</i>	8
1.2. Der Seestern <i>Asterias rubens</i>	9
1.2.1. Systematische Einordnung und Lebensweise	9
1.2.2. Inhaltsstoffe von <i>Asterias rubens</i>	10
1.3. Saponine	11
1.3.1. Asterosaponine	12
1.3.2. Pharmakologische Wirksamkeit von Asterosaponinen	13
1.4. Aufgabenstellung	14
1.5. Literaturübersicht	16
1.5.1. Die Anwendung der LC-NMR-Kopplung in der Naturstoff- analytik	16
1.5.2. Die Anwendung der LC-NMR-MS-Kopplung	22
2. Grundlagen der spektroskopischen Methoden	25
2.1. NMR-Spektroskopie	25
2.1.1. Grundlagen der NMR-Spektroskopie ¹ - Energieniveauschema	25
2.1.2. Pulsfourier-Transform-NMR-Spektroskopie - Vektorbild	27
2.1.3. Zweidimensionale NMR-Spektroskopie ²	30
2.1.4. Inverse Spektroskopie	31
2.1.5. Selektive Spektroskopie ³	32
2.1.6. Cryo-Probenköpfe	33
2.2. Ionenfallen-Massenspektrometrie mit ESI-Ionenquelle	34
2.2.1. Elektronenspray-Interface ESI	34
2.2.2. Ionenfallen-Massenspektrometrie	35
2.3. NMR-Kopplungen	40
2.3.1. Aufbau der LC-NMR-Kopplung	41

2.3.2.	On-flow-Modus	43
2.3.3.	Stopped-flow-Modus	44
2.3.4.	Weitere Betriebsarten	44
2.3.5.	LC-NMR-MS-Kopplung	45
2.3.6.	Lösemittelunterdrückung	46
3.	Isolierung von Asterosaponinen aus <i>Asterias rubens</i>	50
3.1.	<i>Einleitung</i>	50
3.2.	<i>Präparative säulenchromatographische Aufarbeitung von Asterosaponinen</i>	51
3.3.	<i>HPLC-Aufreinigung von Asterosaponinen</i>	53
3.3.1.	Ausgangssystem	54
3.3.2.	Ionenpaarchromatographie	54
3.3.3.	Ammoniumpuffer	55
3.3.4.	Entfernung des Ammoniumpuffers	56
3.4.	<i>Resultate - Notwendigkeit einer zielgerichteten Isolierung von Asterosaponinen</i>	57
4.	Aufbau einer LC-NMR-MS-Methode	59
4.1.	<i>LC</i>	59
4.1.1.	Wahl der Flußrate	59
4.2.	<i>NMR</i>	63
4.2.1.	Wahl der Lösemittelunterdrückung	63
4.2.2.	Relaxationsverhalten – Pulswiederholungszeit – NMR-Quantifizierung	63
4.2.3.	Scanzahl vs. zeitliche Auflösung	65
4.2.4.	Gradientenelution	65
4.3.	<i>MS</i>	66
4.3.1.	Aufbau der MS-Methode	66
4.3.2.	MS-Spektren in deuteriumoxidhaltigen Eluenten	67
4.3.3.	D-H-Rücktauschexperimente	68
4.3.4.	Bestimmung der Transferzeiten im LC-NMR-MS-System	69
4.4.	<i>Zusammenfassung</i>	70
5.	LC-NMR-MS-Untersuchungen von Asterosaponin-Feinfraktionen	71
5.1.	<i>Strukturinformation aus on-flow LC-NMR-Chromatogrammen</i>	71
5.2.	<i>LC-NMR-MS Untersuchung der wirksamen Asterosaponin-Subfraktion 37-39M</i>	72
5.2.1.	On-flow-NMR-Chromatogramm	72
5.2.2.	MS-Daten: D-H-Rücktauschexperimente	77
5.2.3.	2D-stopped-flow-Experimente - Strukturvorschläge	79

5.3.	<i>LC-NMR-MS Untersuchung der wirksamen Asterosaponin-Subfraktion 35-36M</i>	82
5.4.	<i>Zusammenfassung</i>	85
6.	Mikropräparative Methode Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)	86
6.1.	<i>Bedarf einer mikropräparativen Extraktionsmethode</i>	86
6.2.	<i>Matrix Solid Phase Dispersion - MSPD</i>	87
6.3.	<i>MSPD-Extraktion von Asterosaponinen</i>	88
6.4.	<i>Zusammenfassung</i>	91
7.	LC-NMR-MS des MSPD-Extrakts (Asterosaponin-Gesamtfraktion)	92
7.1.	<i>Identifizierung des neuen Asterosaponins Ruberosid G mittels LC-NMR-MS</i>	95
7.2.	<i>Quantitative Aussagen über die Probenzusammensetzung</i>	97
7.3.	<i>Gradientenelution</i>	100
7.4.	<i>Zusammenfassung</i>	102
8.	Strukturaufklärung von Asterosaponinen	103
8.1.	<i>NMR von Asterosaponinen</i>	103
8.1.1.	<i>Eindimensionale ¹H-NMR-Spektren</i>	103
8.1.2.	<i>Eindimensionale ¹³C-NMR-Spektren</i>	105
8.1.3.	<i>Zweidimensionale und selektive NMR-Experimente</i>	107
8.1.4.	<i>Messungen mit dem 5 mm-Cryo-Probenkopf</i>	119
8.2.	<i>MS von Asterosaponinen</i>	122
8.2.1.	<i>Retro-Aldol-Spaltung in der Steroidseitenkette</i>	122
8.2.2.	<i>Abspaltung von Zuckerresten</i>	123
8.2.3.	<i>Bevorzugte Wasserabspaltung (Hydratwasser)</i>	124
8.3.	<i>Ruberoside</i>	125
8.3.1.	<i>Ruberosid A aus <i>Asterias rubens</i></i>	125
8.3.2.	<i>Ruberosid B aus <i>Asterias rubens</i></i>	139
8.3.3.	<i>Ruberosid C aus <i>Asterias rubens</i></i>	142
8.3.4.	<i>Ruberosid D aus <i>Asterias rubens</i></i>	145
8.3.5.	<i>Ruberosid E aus <i>Asterias rubens</i></i>	149
8.3.6.	<i>Ruberosid F aus <i>Asterias rubens</i></i>	152
8.3.7.	<i>Ruberosid G aus <i>Asterias rubens</i></i>	156
8.4.	<i>Weitere aus <i>Asterias rubens</i> identifizierte Asterosaponine</i>	158
8.4.1.	<i>Hauptkomponenten</i>	158
8.4.2.	<i>Nebenkompnenten</i>	162

8.4.3.	Vorbehaltlich zugeordnete Verbindungen	165
8.5.	<i>Diskussion</i>	168
9.	Zusammenfassung und Schlußfolgerung	169
9.1.	<i>Aufarbeitung, Trennung, Isolierung von Asterosaponinen</i>	169
9.2.	<i>MSPD-Extraktion</i>	170
9.3.	<i>On-flow-LC-NMR-MS-Methode</i>	170
9.4.	<i>LC-NMR-MS: Vorteile der „Doppelkopplung“</i>	171
9.5.	<i>LC-NMR-MS als chemisches Screening</i>	172
9.6.	<i>NMR-Strukturaufklärung</i>	172
9.7.	<i>Asterosaponine aus Asterias rubens</i>	173
10.	Experimenteller Teil	174
10.1.	<i>Geräte und Materialien</i>	174
10.1.1.	LC-NMR-MS	174
10.1.2.	NMR	174
10.1.3.	HPLC	175
10.1.4.	Fließmittel und Chemikalien	175
10.2.	<i>Probenmaterial</i>	175
10.3.	<i>Chromatographische und spektroskopische Bedingungen</i>	176
10.3.1.	Rohextrakte von <i>Asterias rubens</i>	176
10.3.2.	Säulenchromatographie	176
10.3.3.	MSPD	177
10.3.4.	HPLC	178
10.3.5.	LC-NMR-MS	179
10.3.6.	NMR	181
11.	Anhang	183
11.1.	<i>Ruberoside</i>	183
11.1.1.	Ruberosid A	183
11.1.2.	Ruberosid B	183
11.1.3.	Ruberosid C	183
11.1.4.	Ruberosid D	183
11.1.5.	Ruberosid E	184
11.1.6.	Ruberoside F	184
11.1.7.	Ruberosid G	184

11.2.	<i>Hauptkomponenten</i>	185
11.2.1.	Asteriidolid C	185
11.2.2.	Glycosid B ₂	185
11.2.3.	ovarian Asterosaponin 1	185
11.3.	<i>Nebekomponenten</i>	185
11.3.1.	Asteriidolid B	185
11.3.2.	Asterosid C.....	186
11.3.3.	Versicosid A.....	186
11.3.4.	Solasterosid A	186
11.4.	<i>Vorbehaltlich zugeordnete Verbindungen</i>	187
11.4.1.	Verbindung A	187
11.4.2.	Verbindung B.....	187
11.4.3.	Verbindung C.....	187
11.4.4.	Verbindung D	188
11.5.	<i>Weitere NMR-Daten aus Asterias rubens isolierter Asterosaponine</i>	189
11.5.1.	Asteriidolid C	189
11.5.2.	Glycosid B2	191
11.5.3.	Ovarian Asterosaponin 1	193
11.5.4.	Asterosid C und Ruberosid F	195
11.5.5.	Versicosid A.....	197
11.5.6.	Solasterosid A	198
12.	Literatur	199

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Belastung des Hamburger Hafensediments mit TBT über einen Zeitraum von fünf Jahren.....	4
Abbildung 2: Gemeiner Seestern <i>Asterias rubens</i> . Die Muschelschale zeigt Bewuchs einer Seepocke.....	10
Abbildung 3: Thornasterosid A, das erste vollständig aufgeklärte Asterosaponin	12
Abbildung 4: Energieniveauschema für ein Zweispinsystem AX.....	27
Abbildung 5: Ein 90°-Puls erzeugt transversale Magnetisierung in der x,y-Ebene	28
Abbildung 6: Signalerzeugung in der Puls-Fourier-Transform-NMR.	29
Abbildung 7: Das Prinzip zweidimensionaler NMR-Spektroskopie am Beispiel eines C,H-COSY-Experiments.....	31
Abbildung 8: Aufbau der ESI-Ionenquelle	35
Abbildung 9: Querschnitt durch eine Ionenfalle und angelegte Spannungen.....	36
Abbildung 10: Das Mathieu-Stabilitätsdiagramm	37
Abbildung 11: Schematische Darstellung des massenselektiven Instabilitätsmodus (oben) und der Resonanzdestabilisierung	38
Abbildung 12: Schematischer Ablauf des MS/MS-Experiments: 1. Entleerung der Ionenfalle, 2. Einlass von Ionen (Akkumulation), 3. Isolierung der Zielmasse, 4. Fragmentierung, 5. Massenanalyse.....	40
Abbildung 13: Schematischer Aufbau der LC-NMR-Kopplung	41
Abbildung 14: Geometrie eines konventionellen und eines LC-Durchflußprobenkopfes nach K. Albert.....	42
Abbildung 15: Schematischer Aufbau der verwendeten LC-NMR-MS-Kopplung.....	46
Abbildung 16: Pulsschema der WET-Sequenz.....	48
Abbildung 17: Schema der präparativen Aufarbeitung der Asterosaponine aus <i>Asterias rubens</i> ...	52
Abbildung 18: HPLC-Lauf von Asteriidosid C im Ausgangs-HPLC-System.....	54
Abbildung 19: Ionenpaarchromatographie einer Saponinmischung.	55
Abbildung 20: Chromatographisches System mit Ammoniumpuffer. HPLC-Chromatogramme von Glycosid B ₂ , ov. Asterosaponin 1, Asteriidosid C.....	56
Abbildung 21: Van-Deemter-Kurve: Abhängigkeit der Trennstufenhöhe vom linearen Fluß.	60
Abbildung 22: Abhängigkeit der Signalintensität (Integral) von Glycosid B ₂ von der Pulswiederholungszeit.....	64
Abbildung 23: Deuteriumaustausch von Asteriidosid C	67
Abbildung 24: Massenspektrum von Glycosid B ₂ in NH ₄ HCO ₃ /D ₂ O/CH ₃ CN, anfänglich und nach drei Tagen	68
Abbildung 25: Massenspektrum von ov. Asterosaponin 1 unter D-H-Rücktauschbedingungen des LC-NMR-MS-Systems.	69
Abbildung 26: On-flow-NMR-Chromatogramm der Asterosaponin-Feinfraktion 37-39M (Konturplot). Ausschnitt des Bereichs der Methylprotonenresonanzen.....	73

Abbildung 27: On-flow-NMR-Chromatogramm der Asterosaponin-Feinfraktion 37-39M (Konturplot). Ausschnitt des Bereichs der anomeren Protonenresonanzen.	75
Abbildung 28: Aus dem on-flow-NMR-Chromatogramm der Asterosaponin-Feinfraktion 37-39M extrahierte ¹ H-NMR-Spektren der Hauptkomponenten.....	76
Abbildung 29: Stopped-flow-2D-WET-TOCSY-Spektrum von Ruberosid A. Magnetisierungstransfer von den Methylgruppen A-H ₃ -21 und A-H ₃ -26/27 zu einer Resonanz bei δ _H 3,67 ppm zeigt eine Hydroxyfunktion in der Seitenkette an.....	79
Abbildung 30: Stopped-flow-2D-WET-TOCSY-Spektrum von Ruberosid B. Magnetisierungstransfer von den Methylgruppen A-H ₃ -21 und A-H ₃ -26/27 zeigt die chemischen Verschiebungen der Seitenkettensignale an.	80
Abbildung 31: On-flow-NMR-Chromatogramm der Asterosaponin-Feinfraktion 35-36M. Ausschnitt des Bereichs der Methylprotonenresonanzen.	82
Abbildung 32: Solasterosid A und Ruberosid E: Beide MS ² -Spektren zeigen identische Massenfragmente, jedoch mit unterschiedlicher Intensität. Im entsprechenden Ausschnitt aus dem LC-NMR-Chromatogramm erkennt man, daß beide Verbindungen die gleiche Aglycon-Seitenkette aber unterschiedliche Oligosaccharidseitenketten besitzen.....	83
Abbildung 33: MSPD-Extraktionsschema	89
Abbildung 34: DC-Kontrolle einer MSPD-Trennung	90
Abbildung 35: On-flow-NMR-Chromatogramm der mittels MSPD-Extraktion erhaltenen Asterosaponinfraktion. Ausschnitt der anomeren und Methylprotonenresonanzen.....	92
Abbildung 36: UV-Chromatogramm des in Abbildung 35 gezeigten LC-NMR-MS-Laufs eines MSPD-Asterosaponinextrakts	93
Abbildung 37: MS-Totalionenstrom des in Abbildung 35 gezeigten LC-NMR-MS-Laufs eines MSPD-Asterosaponinextrakts..	93
Abbildung 38: Aus dem on-flow-NMR-Chromatogramm extrahierte NMR-Spektren von Asterosaponinen mit gleicher Oligosaccharidkette (Ruberosid A und G, ov. Asterosaponin 1) sowie MS-Daten.	95
Abbildung 39: On-flow LC-NMR-Chromatogramm einer MSPD-Asterosaponinfraktion, Gradientenelution. Ausschnitt der Methylprotonenresonanzen.....	100
Abbildung 40: UV-Chromatogramm des in Abbildung 39 gezeigten Laufes mit Gradientenelution	101
Abbildung 41 ¹ H-Übersichtsspektrum von Ruberosid A (D ₂ O/CD ₃ CN, 2:3, v/v)	104
Abbildung 42: ¹³ C-DEPT-Übersichtsspektrum von Asteriidosid C (Pyridin-d ₅ /D ₂ O, 7:3, v/v)	105
Abbildung 43: DQF-COSY-Spektrum von Ruberosid A, Ausschnitt der Kohlenhydratresonanzen (D ₂ O/CD ₃ CN, 2:3, v/v)	108
Abbildung 44: TOCSY-Spektrum von Ruberosid A	109
Abbildung 45: Selektive TOCSY-Subspektren der einzelnen Zuckerbausteine von Ruberosid A	111
Abbildung 46: Mischzeitvariation in 1D TOCSY-Spektren (Quinovose I aus Ruberosid A).....	113
Abbildung 47: β-D-Fucopyranose; die Pfeile zeigen 1,3-diaxiale NOE/ROE-Korrelationen an	115

Abbildung 48: Multiplizitäten-editiertes HSQC von Ruberosid A	116
Abbildung 49: HMBC-Spektrum Ruberosid A	117
Abbildung 50: HSQC-TOCSY-Spektrum von Ruberosid A; t_{mix} 100 ms	118
Abbildung 51: HMBC-Spektren von Ruberosid E (1,9 mM). Links: konventioneller 5 mm-Inverskopf (TXI) bei 500 MHz, 4 Scans; Mitte: 5 mm-Cryo-Inverskopf (Cryo-TXI) bei 500 MHz, 4 Scans; rechts: konventioneller 5 mm-Inverskopf (TXI), 64 Scans.	120
Abbildung 52: Hochaufgelöstes 2D TOCSY einer 0,4 mM Lösung von Ruberosid F, aufgenommen mit einem Scan pro Inkrement. Oben: Die extrahierte Reihe stellt ein TOCSY-Subspektrum der Quinovose-Einheit II von Ruberosid F dar	121
Abbildung 53: Retro-Aldol-Spaltung einer 20-Hydroxy-23-oxoSteroidseitenkette.....	122
Abbildung 54: 1D TOCSY-Subspektrum des anomeren Protons der DXU-Einheit von Ruberosid A und Simulation des Multipletts (Ausschnitt aus dem simulierten Spinsystem DXU-H-1, H-2, H-3).....	127
Abbildung 55: 6-Deoxy- <i>xyl</i> -hex-4-ulose - Hydratationsgleichgewicht der Ketogruppe.....	130
Abbildung 56: 1D TOCSY-Subspektrum der 6-Deoxy- <i>xyl</i> -hex-4-ulose-Einheit von Ruberosid A (Keto-Form).....	131
Abbildung 57: Magnetisierungstransfer ausgehend vom anomeren Signal Qui I-1 über die glycosidische Bindung hinweg.....	133
Abbildung 58: Spuren der anomeren Protonen- und Kohlenstoffresonanzen im mult.-edit. HSQC, HSQC-TOCSY und HMBC.....	134
Abbildung 59: Strukturaufklärung des Aglycons von Ruberosid A. Die aus COSY und TOCSY erhaltenen Spinsysteme werden anhand von HMBC-Daten zusammengefügt. Die Pfeile zeigen diagnostische NOE-Korrelationen an	136
Abbildung 60: Ruberosid A	138
Abbildung 61: Ruberosid B	141
Abbildung 62: Ruberosid C	143
Abbildung 63: Ruberosid D.....	147
Abbildung 64: Ruberosid E	150
Abbildung 65: Ruberosid F	154
Abbildung 66: Ruberosid G	157
Abbildung 67: Asteriidosid C.....	159
Abbildung 68: Variation der Mischzeiten im HMQC-TOCSY von Glycosid B2.	160
Abbildung 69: Glycosid B ₂	161
Abbildung 70: Ovarian Asterosaponin 1	161
Abbildung 71: Asterosid C	162
Abbildung 72: Versicosid A.....	163
Abbildung 73: Solasterosid A.....	163
Abbildung 74: Asteriidosid B	164
Abbildung 75: Strukturvorschläge für die vorbehaltlich zugeordneten Verbindungen A, B, C und D	165

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenstellung der mit LC-NMR untersuchten Naturstoffklassen und ihrer Molmassen.	21
Tabelle 2: Zusammenstellung der mit LC-NMR-MS untersuchten Naturstoffklassen und ihrer Molmassen.	24
Tabelle 3: Gegenüberstellung der Unterdrückungssequenzen NOESY-PRESAT und WET.....	49
Tabelle 4: Peakvolumina [ml] von Asterosaponinen in Abhängigkeit von der Flußrate,.....	62
Tabelle 5: Anzahl austauschender Protonen von drei Asterosaponinen mit gleicher Saccharidkette.....	78
Tabelle 6: Gegenüberstellung von ursprünglicher Aufarbeitung und MSPD-Extraktion	90
Tabelle 7: Übersicht über die im MSPD-Extrakt von <i>Asterias rubens</i> identifizierten Asterosaponine	99
Tabelle 8: Chemische Verschiebungen der Asterosaponin-Signale in D ₂ O/CD ₃ CN.....	106
Tabelle 9: Erwartungswerte für die vicinalen Kopplungskonstanten der Ringprotonen in Hexapyranose-Ringen.	110
Tabelle 10: Massenverluste bei Abspaltung von Zuckereinheiten in Asterosaponinen	124
Tabelle 11: Identifizierung der Monosaccharid-Einheiten von Ruberosid A	128
Tabelle 12: ¹ H und ¹³ C-Daten der Monosaccharideinheiten von Ruberosid A	129
Tabelle 13: ¹ H und ¹³ C-Daten des Aglycons von Ruberosid A.....	138
Tabelle 14: HMBC-Korrelationen des Aglycons von Ruberosid A	139
Tabelle 15: ¹ H und ¹³ C-Daten des Aglycons von Ruberosid B.....	141
Tabelle 16: ¹ H und ¹³ C-Daten des Aglycons von Ruberosid C.....	143
Tabelle 17: ¹ H und ¹³ C-Daten der Monosaccharideinheiten von Ruberosid C	144
Tabelle 18: ¹ H- und ¹³ C-Daten des Aglycons von Ruberosid D	147
Tabelle 19: ¹ H- und ¹³ C-Daten der Monosaccharideinheiten von Ruberosid D	148
Tabelle 20: ¹ H- und ¹³ C-Daten des Aglycons von Ruberosid E	151
Tabelle 21: ¹ H- und ¹³ C-Daten des Aglycons von Ruberosid F.....	154
Tabelle 22: ¹ H- und ¹³ C-Daten der Monosaccharideinheiten von Ruberosid F	155
Tabelle 23: ¹ H- und ¹³ C-Daten des Aglycons von Ruberosid G	157
Tabelle 24: Exp. Bedingungen der Ionenpaarchromatographie (Kapitel 3.3.2)	178
Tabelle 25: Exp. Bedingungen der HPLC-Aufreinigung von Asterosaponinen (Kapitel 3.3).....	178
Tabelle 26: Experimentelle Bedingungen der LC-NMR-MS-Messungen.....	179
Tabelle 27: Experimentelle Bedingungen der NMR-Messungen.	181
Tabelle 28: Verwendete Pulsprogramme	182
Tabelle 29: ¹ H- und ¹³ C-Daten der Monosaccharideinheiten von Asteriidosid C in Pyridin-d ₅ /D ₂ O 7:3 (v/v) 320 K	189
Tabelle 30: ¹ H- und ¹³ C-Daten des Aglycons von Asteriidosid C in Pyridin-d ₅ /D ₂ O 7:3 (v/v) 320 K	190
Tabelle 31: ¹ H- und ¹³ C-Daten der Monosaccharideinheiten von Glycosid B ₂ in Pyridin-d ₅ /D ₂ O 7:3 (v/v) 310 K	191

Tabelle 32: ¹H- und ¹³C-Daten des Aglycons von Glycosid B₂ in Pyridin-d₅/D₂O 7:3 (v/v)	192
Tabelle 33: ¹H- und ¹³C-Daten der Monosaccharideinheiten von ovarian Asterosaponin 1 in D₂O/CD₃CN 2:3 (v/v) 290 K	193
Tabelle 34: ¹H- und ¹³C-Daten des Aglycons von ovarian Asterosaponin 1 in D₂O/CD₃CN 2:3 (v/v); 290 K	194
Tabelle 35: ¹H- und ¹³C-Daten Aglycons von Asterosid C in Pyridin-d₅/D₂O 7:3 (v/v)	195
Tabelle 36: ¹H- und ¹³C-Daten Aglycons von Ruberosid F in Pyridin-d₅/D₂O 7:3 (v/v)	196
Tabelle 37: ¹H- und ¹³C-Daten der Monosaccharideinheiten von Versicosid A in D₂O/CD₃CN 2:3 (v/v)	197
Tabelle 38: ¹H- und ¹³C-Daten der Monosaccharideinheiten von Solasterosid A in D₂O/CD₃CN 2:3 (v/v)	198

Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
a.m.u.	Atomic Mass Unit (Atommasseneinheit)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
API	Atmospheric Pressure Ionization
BPSU	Bruker Peak Sampling Unit
br	breit, broad
CD	Circular Dichroism (Zirkulardichroismus)
COSY	COReLation SpectroscopY (Korrelationsspektroskopie)
d	Dublett
D ₂ O	Deuteriumoxid (deutertes Wasser)
DCCC	Droplet Counter Current Chromatography (Tröpfchen-Gegenstromchromatographie)
DXU	Deoxy-xylo-hexulose
ESI	ElektronenSpray-Interface bzw. -Ionisierung
FID	Free Induction Decay (freier Induktionsabfall)
FT	Fouriertransformation
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMQC-TOCSY	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence - TOtal Correlation SpectroscopY
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HSQC-TOCSY	Heteronuclear Single Quantum Coherence - TOtal Correlation SpectroscopY
Hz	Hertz
i. D.	Inner Diameter (Innendurchmesser)
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie), in Verbindung mit LC-NMR und LC-NMR-MS auch: Hochleistungsflüssigchromatographie
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level
m	Multipllett
MS	Massenspektrometrie
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion (Matrix-Festphasendispersions-Extraktion)
mult. edit. HSQC	multiplicity edited Heteronuclear Single Quantum Coherence (- spectrum)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (kernmagnetische Resonanz)
NOAEL	No Observable Adverse Effect Level

NOEC	No Observed Effect Concentration
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie)
o. D.	Outer Diameter (Außendurchmesser)
ppm	Parts Per Million (chemische Verschiebung des Resonanzsignals)
Qui	Quinose
R _f	Retentionsfaktor
ROESY	Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy (Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie im rotierenden Koordinatensystem)
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
s	Singulett
S/R	Signal/Rausch-(Verhältnis)
SIS	Solvent Induced Shift
SPC	Self Polishing Copolymer
t	Triplet
TBT	Tri Butyl Tin (Tributylzinn)
TBTAc	Tributylzinnacetat
TBTCl	Tributylzinnchlorid
TBTO	<i>bis</i> -Tributylzinnoxid
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy (Totalkorrelationsspektroskopie)
UV	Ultraviolett
WET	Water suppression Enhanced through T1 effects
WHO	World Health Organization
Xyl	Xylose

1. Einleitung

1.1. Antifoulingproblematik

1.1.1. Biofouling

Biofouling ist eines der größten Probleme, denen die marine Technologie heute gegenübersteht. Man versteht darunter den Bewuchs fester Oberflächen, die dem Seewasser ausgesetzt sind, mit einer komplexen Schicht aus verschiedenen marinen Organismen.

Taucht man einen beliebigen Körper (Substrat) mit einer sauberen inerten Oberfläche in Seewasser, so wird dieser bald Bewuchs zeigen. Der Besiedlungsvorgang läßt sich in folgende Phasen unterteilen:^{1,2}

Zuerst lagert sich innerhalb weniger Sekunden bis Minuten ein Film von im Wasser gelösten Makromolekülen - hauptsächlich Glycoproteinen – an die Oberfläche an (biochemische Konditionierung). Nach etwa einer Stunde beginnt sich ein bakterieller Film auszubilden. Wenige Tage später siedeln sich dann eukaryontische Einzeller wie etwa Kieselalgen, Sporen von Makroalgen und Protozoen an (Mikrofoouling). Wie die Bakterien bilden auch die Kieselalgen einen oberflächendeckenden Bewuchs aus und tragen so zur chemisch-biologischen Konditionierung des Substrats bei. Nachdem sich auf der Oberfläche eine Mikrofooulingsschicht ausgebildet hat, etablieren sich in der letzten Phase Gemeinschaften aus Makroalgen und Wirbellosen durch Sporen- und Larvenbesiedlung (Makrofoouling). Typische Makrofooulingorganismen sind - neben Algen - Muscheln, Schnecken und vor allem Seepocken.

1.1.2. Antifouling

Maßnahmen gegen das Biofouling werden als Antifouling bezeichnet. Antifoulingmaßnahmen sind in der Schifffahrt seit dem Altertum in Gebrauch. Über die Jahrhunderte kam eine Vielzahl von Wirkstoffen zum Einsatz: Bitumen, Pech, Blei, Kupferbleche, arsen- und quecksilberhaltige Anstriche sowie auch DDT und Pentachlorphenol. Heute werden in der Großschifffahrt neben organischen und kupferhaltigen Bioziden in erster Linie Organozinnverbindungen (Tributylzinn, TBT, siehe Abschnitt 1.1.4) angewandt.⁴

1.1.3. Wirtschaftliche Notwendigkeit von Antifoulingmaßnahmen

Die bakterielle Schleimschicht und die große Anzahl an Makrofouthern, die sich auf Schiffsrümpfen anhäufen, bewirken einen erhöhten Strömungswiderstand und führen zu einer verstärkten Oberflächenkorrosion. Infolgedessen steigt der Treibstoffverbrauch an und die CO₂-Emission sowie die Betriebskosten nehmen zu. Daher ist die Ansiedlung von Mikro- und Makrofoulingorganismen auf Schiffskörpern sowohl aus ökonomischen, wie ökologischen Gründen zu vermeiden.²

Bereits die Zunahme der Rauigkeit des Schiffsrumpfes um 10 µm bewirkt ein Anwachsen des Brennstoffverbrauches um 0,3 bis 1 %. Nach einer Einsatzdauer von sechs Monaten ohne Antifoulinganstrich ist der Treibstoffverbrauch um 40 % erhöht.³ Da die Brennstoffkosten eines Handelsschiffes einen Anteil von 50 % der Gesamtbetriebskosten darstellen, ist dies ein entscheidender Faktor. Der Verband Deutscher Reeder gibt die Kraftstoffeinsparung durch die Verwendung von Antifoulinganstrichen mit 4 % an.⁴ Dies entspricht, bezogen auf den weltweiten Brennstoffverbrauch der Seeschifffahrt, einer Einsparung von 7,2 Millionen Tonnen Schweröl im Wert von 500 Mio. US-\$ pro Jahr.

Darüber hinaus können durch moderne Antifoulinganstriche die Dockungsintervalle (die Zeitspanne zwischen zwei Neuanstrichen) von Hochseehandelsschiffen auf bis zu fünf Jahre verlängert werden, was zu einer weiteren Erhöhung der Wirtschaftlichkeit führt.

1.1.4. Antifoulingwirkstoff Tributylzinn (TBT)

Die Tributylverbindungen des vierwertigen Zinns besitzen breite biozide Wirkung. Sie sind weitaus giftiger als das anorganische Zinn. Die GefahrstoffVO schreibt für TBT-Verbindungen eine Kennzeichnung mit dem Gefahrensymbol „T“ vor. Als Antifoulingwirkstoff werden vor allem das *bis*-Tributylzinnoxid (TBTO) und das Tributylzinnfluorid (TBTF) angewandt. Technisch bedeutend sind darüber hinaus das Chlorid (TBTCl) sowie das Acetat (TBTAc).

70 % der in Deutschland hergestellten 2000 t an *bis*-Tributylzinnoxid (TBTO) werden in Antifoulingfarben eingesetzt. 20 % finden in Holzschutzmitteln Verwendung und 10 % dienen der antibakteriellen Ausrüstung von Textilien und Lederwaren oder als Desinfektionsmittel.⁷ Weltweit werden 80 % der Produktion von TBT in Schiffsanstrichen eingesetzt.⁵

Durch Kampagnen von Umweltschutzverbänden^{6,8} ist die Bedenklichkeit von TBT-Verbindungen in der marinen Umwelt, in Lebensmitteln (Fischkonserven) und in Bedarfsgegenständen (Sportbekleidung) während der letzten Jahre zunehmend ins Bewußtsein der Öffentlichkeit getreten.

1.1.4.1. Auswirkungen von TBT in der Umwelt⁷

TBT beeinträchtigt neben den eigentlichen Foulingorganismen viele weitere Formen des marinen Lebens, darunter auch ökonomisch bedeutsame, z. B. Austern. So wurden Ende der siebziger Jahre Deformationen der Schale der pazifischen Auster *Crasostrea giga* festgestellt. In der Bucht von Archachon, Frankreich, wurde ein Rückgang und stellenweise ein Ausbleiben der natürlichen Ansiedlung von Austernlarven beobachtet.² Den Austernzüchtern entstand dadurch ein Schaden in Höhe von 300 Mio. DM.⁸

Drastischere Auswirkungen zeigte Mitte der achtziger Jahre die Meeresschneckenart *Nucella lapillus* an der Südwestküste von England. Hier kam es an weiblichen Tieren zur Ausbildung männlicher Geschlechtsorgane (Penis und Samenleiter): sogenannte Imposex-Erscheinungen. Die Anzahl weiblicher Tiere und abgelegter Eier war deutlich reduziert.² Entlang der Schiffrouten der Nordsee starben die Meeresschnecken sogar aus, da nur noch Tiere mit männlichen Geschlechtsmerkmalen vorkamen.⁹ Inzwischen wurden bei über 100 Seeschneckenarten Schädigungen durch TBT festgestellt. Die niedrigste Wirkungsschwelle wurde dabei an Purpurschnecken bei einer Konzentration von 1,2 ng/L TBT gemessen.¹¹

TBT ist der einzige bisher bekannte Stoff mit androgenem Effekt,⁹ ein sogenannter endokriner Disruptor, der in das Hormonsystem eingreift und es durch falsche Signalgebung beeinflusst (vermutlich durch Hemmung der Cytochrom P-450-abhängigen Aromatase, die Testosteron zu Östradiol-17 β umwandelt).⁷ Es bewirkt in den Meeresschnecken eine Verminderung der Östrogen- und eine Erhöhung der Testosteronproduktion. Daraufhin werden männliche Merkmale ausgebildet.

Unabhängig von den endokrinen Effekten bei Schnecken wirken triorganische Zinnverbindungen auf Gewässerorganismen, vor allem auf Fische, schon in geringen Konzentrationen toxisch (90 d-NOEC bei der Süßwasser-Species *Poecilia reticulata*: 10 ng/L TBT).

1.1.4.2. Wirkung auf den Menschen

Der niedrigste dokumentierte toxikologische Endpunkt von TBTO ist eine Depression des Immunsystems der Schilddrüse. Ausgehend von diesen Daten wurde von der WHO ein LOAEL von 0,25 mg/kg Körpergewicht/Tag angegeben. Bei einem Sicherheitsfaktor von 10 leitet sich daraus ein NOAEL- Wert von 0,025 mg/kg Körpergewicht /Tag ab.¹¹ Eine Hormonwirkung beim Menschen kann bislang nicht ausgeschlossen werden.

1.1.4.3. Verbreitung in der Umwelt¹¹

Der Einsatz von TBT-haltigem Antifouling führt zu einer deutlichen Akkumulation im Sediment von Häfen, Dockanlagen und stark frequentierten Schifffahrtslinien, sogenannten „hot spots.“ Ein Belastungsschwerpunkt für TBT ist z. B. die Elbe im Bereich des Hamburger Hafens (Abbildung 1).

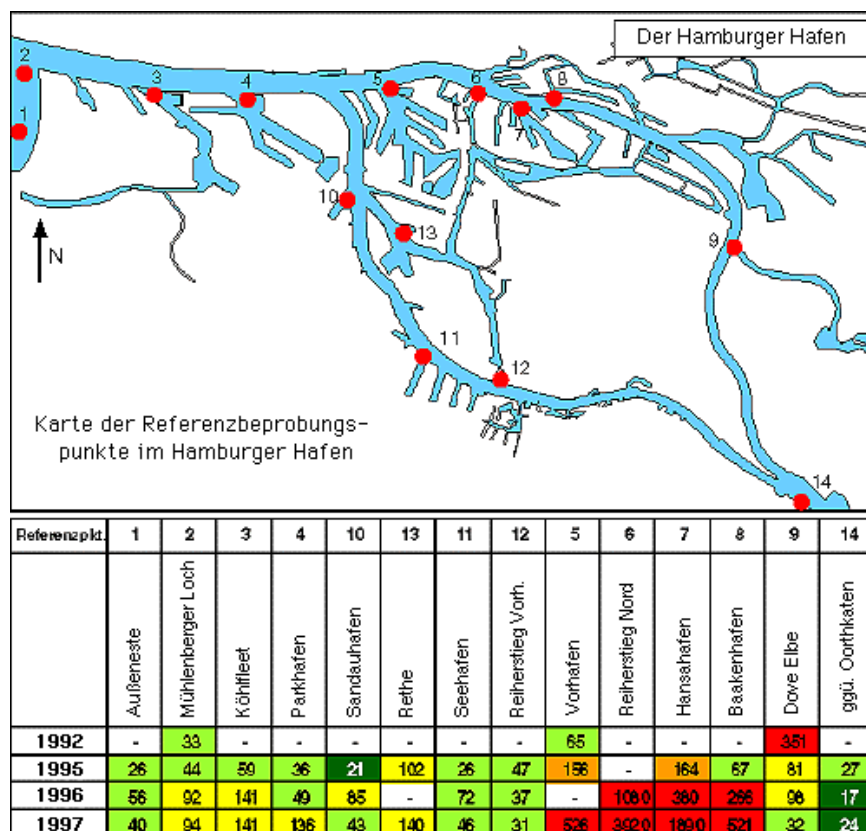


Abbildung 1: Belastung des Hamburger Hafensediments mit TBT über einen Zeitraum von fünf Jahren [$\mu\text{g Sn/kg Trockensubstanz}$].¹⁰

In Nord- und Ostsee werden Medianwerte für TBT zwischen 34 und 1200 ng/kg Sediment (Frischgewicht) gefunden, Spitzenwerte liegen bei 84 $\mu\text{g/kg}$. Mit Konzentra-

tionen zwischen 10 und 30 ng/L liegen die Gehalte im freien Seewasser um zwei- bis drei Größenordnungen unter denen in Sedimenten.

TBT reichert sich in der Nahrungskette an. In Fischen aus Nord- und Ostsee werden zwischen 20 und 200 µg/kg Frischgewicht an Butylzinnverbindungen gefunden. Die höchsten Konzentrationen weist dabei entgegen der Erwartung nicht das Fettgewebe, sondern Muskel, Leber und Niere auf. Extreme Werte finden sich zudem in Organismen aus Brennpunkten, „hot spots,“ wie Dreikantmuscheln aus dem Hamburger Hafen (940 µg TBT/kg) oder Muscheln aus dem Hafenbecken von Genua (2000 bis 4000 µg TBT/kg essbarer Anteil).

1.1.4.4. Rechtliche Lage

Nachdem die gravierenden Umweltschäden durch TBT in Antifoulings erkannt worden waren, hat die EU-Kommission in der Richtlinie 89/677/EWG die Verwendung von TBT-haltigen Antifouling-Farben an Schiffen unter 25 m Gesamtlänge verboten. Die Umsetzung in deutsches Recht erfolgte durch die Gefahrstoffverordnung (§ 51 Ziffer 2 in Verbindung mit Anhang IV Nr. 5 Abs. 1).

Die Hauptversammlung der internationalen Seeschiffsorganisation IMO beschloß Ende November 1999 in London Schiffsanstriche mit Organozinnverbindungen wie TBT ab 2003 bei Schiffen mit Neuanstrichen und ab 2008 bei Altanstrichen endgültig zu verbieten. Das Verbot wird allerdings erst in Kraft treten, wenn die IMO-Mitgliedsländer es bis 2001 ratifizieren.⁶ Zeitgleich hierzu ist in Deutschland eine nationale Verbotsverordnung geplant, die ab 2003 TBT als Antifoulinganstrich verbieten soll.¹¹

1.1.5. Konventionelle Anstriche und SPCs

Antifouling-Farben können in folgende zwei Klassen eingeteilt werden:⁴

1. Konventionelle oder „free associated“ Antifouling-Farben

Bei dieser Klasse von Antifouling-Anstrichen ist der biozide Wirkstoff lose in die Farbmatrix eingemischt, ohne chemisch an sie gebunden zu sein. Die Abgabe des Wirkstoffes an das Seewasser erfolgt diffusionskontrolliert durch Auslaugen, wobei die Freisetzungsrates zunächst sehr hoch ist, dann jedoch relativ schnell abfällt. Mit einem solchen Anstrich bleibt die Schutzwirkung etwa für zwei Jahre erhalten. Die

zurückbleibende ausgelaugte Farbschicht ist aufgrund eigener Rauigkeit wiederum anfällig für neuen Bewuchs.

2. Self-Polishing-Copolymere (SPCs)

Stand der Technik sind momentan die „Self-Polishing-Copolymere“ (SPCs). Bei diesen Antifouling-Farben ist das Biozid (z.B. TBT) chemisch an die Farbmatrix (meist Acryl-, Methacryl-, oder Vinypolymere) gebunden. Im Kontakt mit strömendem Wasser wird der Wirkstoff durch Hydrolyse von dem Polymer abgelöst. Die bei der Freisetzung des Biozids zurückbleibenden Polymere sind wasserlöslich. Eine monomolekulare Schicht nach der anderen wird gewaschen. Auf diese Weise wird eine kontrollierte, mit der Zeit konstante und in der Summe geringere Abgabe des Antifoulingwirkstoffes erreicht. Zudem bleibt die ebene Oberfläche des Anstrichs erhalten. Der Bewuchsschutz durch TBT-SPCs hält bis zu fünf Jahre an.

1.1.6. Alternative Schiffsanstriche

Wegen der negativen Auswirkungen des TBT auf marine Organismen und der daraufhin in vielen Ländern erlassenen Nutzungsbeschränkungen finden TBT-freie Antifouling-Anstriche vermehrt Beachtung.

So kommen beispielsweise Herbizide, wie das Triazin Irgarol® 1051 (2-Methylthio-2-tert.-butylamino-6-cyclopropylamino-S-triazin), zum Einsatz. Die Auswirkungen dieser organischen Biozide auf die Umwelt ist jedoch weithin unerforscht – zukünftige gesetzliche Einschränkungen sind nicht ausgeschlossen.^{12,13}

Nach Auffassung des Umweltbundesamtes kommt nach derzeitigem Stand der Technik als Alternative zu den TBT-haltigen Antifouling-Anstrichen nur die Verwendung von kupferhaltigen SPCs in Frage, da diese eine vergleichbare Wirksamkeit und Wirkungsdauer besitzen.¹¹ Cu-SPCs setzen allerdings ihrerseits das ökotoxische, nicht abbaubare zweiwertige Kupfer Cu^{++} frei und können daher nur als Übergangslösung mit geringerem umweltschädigendem Potential angesehen werden, bis biozidfreie Antifouling-Techniken verfügbar sind.

Eine nichttoxische Alternative ist beispielsweise die Verwendung von sogenannten „foul-release“ oder „easy-release“-Anstrichen. Die glatte Oberfläche dieser silikon- oder teflonbasierten Farben zeigt aufgrund ihrer geringen freien Oberflächenenthalpie Antihafwirkung. Eine feste Adhäsion von Foulingorganismen ist daher nicht möglich und auch die Anheftungsrate ist stark vermindert. Diese Wirkung zeigt sich al-

lerdings nur bei Schiffen mit hoher Fahrtgeschwindigkeit, wie Sport- oder Fährschiffen. Für die Handels- und Fischereischiffahrt sind diese foul-release Anstriche ungeeignet, zumal sie sich auch gegenüber mechanischer Beschädigung (Abkratzen von Teilen der Beschichtung z. B. an Kaimauern) als anfällig erwiesen.

Während die oben genannten Anstriche bereits auf dem Markt etabliert sind, befinden sich weitere Antifoulingtechniken in der Entwicklung. Dazu gehören einerseits physikalische Methoden, wie das Abhalten von Organismen durch Anlegen einer Wechselspannung an den Schiffsrumpf, die elektrolytische Erzeugung von Hypochlorit aus dem Meerwasser oder die Verwendung von Ultraschall. Andererseits werden Anstriche erprobt, die durch eingearbeitete Enzyme oder Oberflächen mit hydrophilen Eigenschaften Bewuchs verhindern sollen.¹²

Ein sehr vielversprechender Ansatz¹² ist die Isolierung von antifoulingaktiven marinen Naturstoffen, wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

1.1.7. Bewuchsverhinderung in der Natur^{1,13}

Um sich gegen den hohen Bewuchsdruck zur Wehr zu setzen, haben viele sessile (seßhafte) marine Organismen Wege zur Bewuchsverhinderung entwickelt. Zur Aufrechterhaltung ihrer bewuchsfreien Oberfläche setzen sie eine Kombination aus mechanisch/physikalischer und chemischer Verteidigung ein.

Mechanische Verteidigungsmechanismen wie Schleimbildung, Häutung oder Reibung der Oberfläche verhindern ein dauerhaftes Festsetzen von Foulingorganismen. Zu den physikalischen Strategien, dem Bewuchsdruck zu begegnen, gehört neben der Ausbildung von Oberflächen mit Antihafwirkung auch eine häufige Milieuänderung des Organismus, z.B. ein Wechsel zwischen Süß- und Salzwasser, denn die seßhaften Foulingorganismen sind in der Regel an ein bestimmtes Elektrolytmilieu gebunden.

Die Verteidigung durch Toxine zählt mit Sicherheit zu den wichtigsten Foulingabwehrmechanismen in der Natur. Neben fungiziden, antibakteriellen, antialgalen und antilarvalen Sekundärmetaboliten sind viele weitere Substanzen beschrieben worden, die behindernd, oder zumindest erschwerend, auf Besiedlung wirken. Starke Bewuchsresistenz ist von Schwämmen (Homarine), Korallen (Saponine, Diterpene, Homarine, Prostaglandine, Stickstoffheterocyclen, Crassin-Acetate), Seescheiden (Didemnine, Alkaloide, Peptide) und Stachelhäutern (Saponine, Homarine) berichtet

worden.^{1,2,13} Auch marine Pflanzen besitzen Abwehrstoffe gegen Bewuchs (Terpene, Phenole, Tannine, Acetylene, Lipidverbindungen und Proteine).¹

Mit den hochwirksamen TBT-SPC-Farben ist das natürliche Prinzip der Bewuchsabwehr durch Häutung im Zusammenspiel mit einem Biozid (hier: TBT) bereits industriell verwirklicht. Es wäre wünschenswert, diese bereits etablierte Technik der „self-polishing-coatings“ mit einem hochwirksamen Naturstoff zu kombinieren, der relativ rasch abgebaut wird und für die Umwelt keine Dauerbelastung darstellt.

Es liegt daher nahe, marine Organismen auf Naturstoffe mit Antifouling-Wirkung zu untersuchen, die in der Lage sind, eine bewuchsfreie Oberfläche aufrecht zu erhalten. In der Literatur sind nur sehr wenige Stachelhäuter (Echinodermata) beschrieben worden, die Bewuchs zeigen. Die Wahrscheinlichkeit ist daher hoch, daß hier effektive Antifouling-Mechanismen entwickelt worden sind.^{138,14}

1.1.8. Forschungsprojekt Strukturaufklärung bewuchshemmender Wirkstoffe in Antifoulingmitteln, isoliert aus dem Seestern *Asterias rubens*

Das Ziel des Forschungsprojekts, in dem diese Arbeit entstanden ist, war die Identifizierung, Isolierung und Strukturaufklärung von bewuchshemmenden Naturstoffen aus dem Ostsee-Seestern *Asterias rubens*. Der Rohextrakt dieses Seesterns hatte sich bereits in vorangegangenen Forschungsarbeiten als antifoulingaktiv erwiesen.^{15,142} Die Tests auf biologische Aktivität wurden bei der Firma Bioplan GmbH, Groß Stove/Rostock durchgeführt.

Die Auftrennung des Rohextraktes in weitere Fraktionen und Einzelverbindungen sowie deren Strukturaufklärung lag beim Fraunhofer Institut ITA. Auf verschiedenen Stufen des Aufreinigungsprozesses (siehe Kapitel 3.2) wurden die erhaltenen Feinfraktionen und Einzelverbindungen auf ihre Antifoulingaktivität getestet. Dabei wurde mit einem Satz aus vier Biotests sowohl auf Mikro- als auch auf Makrofoulingorganismen (siehe Abschnitt 1.1.1) geprüft:

- **Leuchtbakterientest**

Die Verminderung der Leuchtkraft von marinen Leuchtbakterien wird gemessen.

- **Toxizitätstest mit Seepockennauplien**

In diesem Test werden Naupliuslarven von *Balanus improvisus* (Seepockenlarven)

verschiedenen Konzentrationen des Extrakts ausgesetzt. Es wird die Mortalitätsrate nach einer Stunde bestimmt.

- **Ansatzhemmtest mit Miesmuscheln**

Miesmuscheln (*Mytilus*) verändern aktiv ihren Siedlungsplatz, wenn sie ein ungünstiges Umgebungsmilieu auffinden. Es wird geprüft, ob sich mittelgroße Miesmuscheln auf einem mit dem Testextrakt imprägnierten Filterpapier mit ihren Byssusfäden festsetzen oder abwandern

- **Ansatzhemmtest mit Kieselalgen**

In diesem Test wird geprüft, ob sich die Kieselalge *Nitzschia pusilla* auf Glasfaserfiltern, die mit Testlösung getränkt wurden, anheftet.

Durch diese biologischen Tests konnten Steroid-Saponine als antifoulingaktive Substanzen in *Asterias rubens* identifiziert werden. Aus Gründen der Vertraulichkeit können Daten zur Wirksamkeit einzelner Verbindungen an dieser Stelle jedoch nicht präsentiert werden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der gezielten Isolierung und Strukturaufklärung der Steroid-Saponine.

1.2. Der Seestern *Asterias rubens*

1.2.1. Systematische Einordnung und Lebensweise

Der Seestern *Asterias rubens*, Gemeiner Seestern, gehört zum Stamm der Stachelhäuter (Echinodermata); weitere systematische Einordnung: Klasse Asteroidea (Seesterne), Ordnung Forcipulata (Zangenseesterne), Familie Asteroidea. Er ist im östlichen Atlantik, dem Ärmelkanal sowie der Nordsee weit verbreitet. *Asterias rubens* ist einer der wenigen Seesterne, die in das Brackwasser der westlichen Ostsee vordringen.

Einzelne Exemplare können bis zu 50 cm im Durchmesser erreichen, in der Regel messen sie 10 bis 30 cm. Der Seestern besitzt fünf rundliche, kräftige Arme, an dessen Unterseite in Viererreihen Saugfüßchen angeordnet sind. Ebenfalls auf der Unterseite befindet sich, in der Mitte der Zentralscheibe, die Mundöffnung. Die Färbung des Seestern ist für gewöhnlich rötlich oder violett, in größeren Tiefen gelblich oder auch braun-schwarz.

Asterias rubens lebt ausgesprochen räuberisch und ernährt sich neben Schnecken hauptsächlich von Muscheln, indem er sich über sie stülpt, sie mit seinen Saugfüßchen einen Spalt (0,2 mm) weit auseinanderzerrt, seinen Magen in das Muscheltier ausstülpt, es durch Enzyme vorverdaut und schließlich verschlingt. Er hat kaum natürliche Feinde und tritt auf Muschelbänken stellenweise massenhaft auf.^{16,17,18,19}



Abbildung 2: Gemeiner Seestern *Asterias rubens*. Die Muschelschale zeigt Bewuchs einer Seepocke. Foto: Sue Scott.

1.2.2. Inhaltsstoffe von *Asterias rubens*

Aus *Asterias rubens* wurden bisher Sterole, Östrogene, Prostaglandine, Neuropeptide sowie Sphingoglycolipide (Cerebroside und Ganglioside) isoliert.

Die Sterolfraktion von *Asterias rubens* wurde in den siebziger Jahren von L. J. Goad eingehend untersucht.²⁰ 30-50 % der Sterole liegen ionisch als Sulfate vor.²¹ Die Hauptkomponenten der sulfatierten Sterole sind das 5α -Cholestan- 3β -ol und das Cholest-5-en- 3β -ol.²² Die freie Sterolfraktion hingegen, besteht hauptsächlich aus C_{26} , C_{27} , C_{28} und C_{29} -Verbindungen, die eine Δ^7 -Doppelbindung tragen. Später wurde Thornasterol A, das häufige Steroid-Aglycon vieler Asterosaponine (vergl. Abschnitt 1.3.1), als Bestandteil von *Asterias rubens* gefunden.²²

1992 konnte das weibliche Keimdrüsenhormon Östradiol- 17β als endogene Komponente bei der Steuerung der Fortpflanzung von *Asterias rubens* nachgewiesen werden.²³

Von den Sphingoglycolipiden in *Asterias rubens* weisen die Cerebroside unübliche, langkettige Basen (hauptsächlich C₁₈ und C₂₂-Basen mit einer oder zwei Doppelbindungen), gesättigte 2-Hydroxy-Fettsäuren (C₁₆-C₂₆) sowie Glucose auf.²⁴ Die Ganglioside (Sphingoglycolipide mit Sialinsäuren im Glycosidteil) aus *Asterias rubens* besitzen vornehmlich die seltene N-Glycoloyl-8-O-methyl-neuraminsäure, Neu5Gc8Me, als Sialinsäurekomponente.²⁵ Die Biosynthese solcher Sialinsäuren in *Asterias rubens* wird anhand von isolierten Enzymen weiter erforscht.^{26,27}

Aus den Nervensträngen des Gemeinen Seesterns wurden 1991 zwei Vertreter einer neuen Gruppe von Neuropeptiden isoliert: die SALMFamide. Es handelt sich dabei um ein Octapeptid (SALMFamid S1) und ein Dodecapeptid (SALMFamid S2).²⁸ Während die Bedeutung von S1 noch nicht geklärt ist, scheint S2 eine Rolle bei der Signalübertragung im Verdauungssystem des Tieres zu spielen.^{29,30}

Wie aus *Asterias rubens* wurden auch die Inhaltsstoffe aus anderen Seesternarten isoliert und charakterisiert. Dabei fand in den letzten Jahren eine weitere Substanzklasse aufgrund ihrer toxischen Eigenschaften besonderes Interesse:³² die Steroidglycoside, eine Gruppe von Inhaltstoffen, die in *Asterias rubens* bislang noch nicht näher untersucht wurde. Diese teilen sich in drei Gruppen auf: die Glycoside von Polyhydroxysteroiden (mit in der Regel ein bis zwei Zuckereinheiten), die in geringen Mengen in Seesternen verbreitet sind, die cyclischen Glycoside, die bisher nur in der Gattung *Echinaster* gefunden wurden und die Asterosaponine (siehe Abschnitt 1.3.1), die Gegenstand dieser Arbeit sind.

1.3. Saponine

Saponine verdanken ihren Namen der Eigenschaft, in wäßriger Lösung stark schäumende, seifenartige Lösungen zu bilden (lat. Sapo – Seife).³¹ Sie bestehen aus dem Aglycon (Sapogenin) und einem daran gebundenen Oligosaccharidrest. Nach dem Aglycon werden sie in Triterpen- und Steroidsaponine eingeteilt. Man unterscheidet weiterhin zwischen Saponinen mit einer und zwei Oligosaccharidketten (mono- bzw. bisdesmosidische Saponine). Bekannte Vertreter dieser Stoffklasse sind beispielsweise die Hauptwirkstoffe der Ginsengwurzel - Panaxoside oder Ginsenoside - (Triterpensaponine) oder die herzwirksamen Digitalissaponine aus dem Fingerhut *Digitalis purpurea* (Steroidsaponine).

Der einzige Stamm aus dem Tierreich, bei dem bisher Saponine beschrieben wurden, sind die Stachelhäuter (Echinodermata). Die in *Holothuroidea* (Seegurken, Seewalzen) gefundenen Triterpensaponine werden als Holothurine bezeichnet. In Analogie dazu wurde der Begriff Asterosaponine für Saponine aus Seesternen geprägt.³²

1.3.1. Asterosaponine

Die als Asterosaponine bezeichneten Steroidsaponine aus *Asteroidea* (Seesternen) weisen sowohl in ihrem Aglycon, als auch in der Oligosaccharidkette eine Reihe gemeinsamer Merkmale auf.³²

Die Aglyka sind durchgehend $\Delta^{9(11)}$ - $3\beta,6\alpha$ -dihydroxysterioide, die an C-3 eine Sulfatgruppe aufweisen. Häufig tritt eine Oxo-Funktion an Position 23 der Steroidseitenkette auf. Die Oligosaccharidkette besteht in der Regel aus fünf oder sechs Zuckereinheiten (zumeist D-Fucose, D-Quinovose, D-Xylose, D-Galactose oder D-Glucose, seltener D-6-deoxy-xylo-hex-4-ulose und L-Arabinose) und ist mit C-6 des Aglycons glycosidisch verbunden. Es wird ein wiederkehrendes Verknüpfungsmuster beobachtet: An H-2 der zweiten Zuckereinheit (in der Regel eine Xylose oder Quinovose) befindet sich immer eine einzelne verzweigte Quinovose-Einheit. Die Zucker liegen in ihrer Pyranoseform vor und sind am anomeren Proton β -konfiguriert. Eine Ausnahme bildet lediglich die α -Konfiguration bei L-Arabinose.

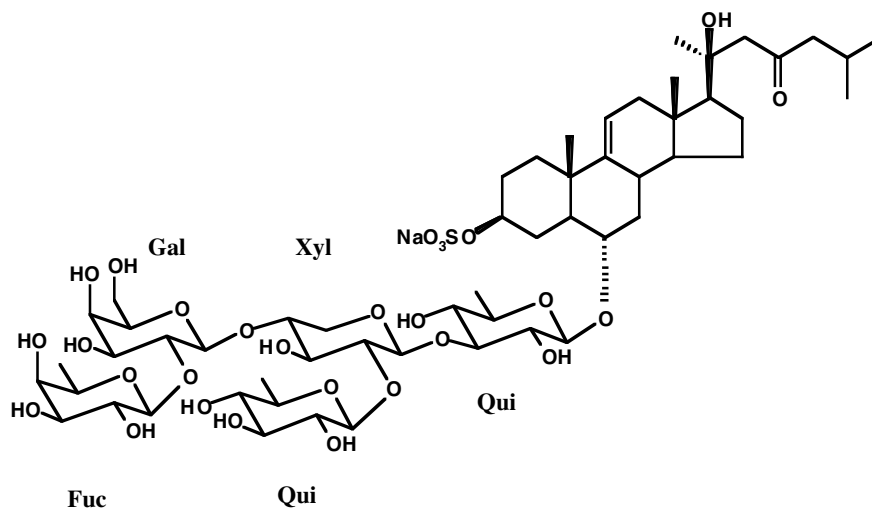


Abbildung 3: Thornasterosid A, das erste vollständig aufgeklärte Asterosaponin¹²⁶

Eine vollständige Übersicht über alle 70 bis 1996 beschriebenen Asterosaponine geben die Übersichtsartikel Ref. 32 und 33. Seither isolierten DeMarino et al. aus einem nicht näher bezeichneten antarktischen Seestern der Familie *Echinasteridae* fünf neue Asterosaponine. Drei davon, Antarcticoside A bis C wiesen eine neuartige Hexasaccharidkette mit zwei Verzweigungsstellen auf. Die beiden anderen Saponine wurden als 24-Methyl-analoge der bekannten Asterosaponine Brasiliosid und Pectinosid A identifiziert.¹³⁶ Im November 1998 erschien ein weiterer Artikel, in dem DeMarino et al. erneut fünf bisher unbekannte Asterosaponine aus einem antarktischen Seestern, diesmal aus der Familie *Asteriidae*, gewinnen konnten (Asteriidoside A bis E).¹³⁴

1.3.2. Pharmakologische Wirksamkeit von Asterosaponinen

Die seit langem bekannten toxischen Eigenschaften von Seesternen konnten 1960 durch Hashimoto und Yasumoto auf Verbindungen zurückgeführt werden, die denen von Pflanzensaponinen ähnlich waren.³⁴ Asterosaponine wirken toxisch auf Fische, Würmer, Mollusken, Gliederfüßer und Vertebraten. Sie inhibieren zudem die Entwicklung befruchteter Seeigeleier. Diese breite Wirksamkeit deutet auf eine Funktion der Asterosaponine als chemischer Abwehrstoff zur Verteidigung gegen Pilze, Protisten, Parasiten oder Räuber hin.³² Auch über eine Funktion bei der Steuerung der Fortpflanzung von Seesternen wurde berichtet.

Seesternextrakte und aufgereinigte Saponine wiesen eine Reihe pharmakologischer Wirkungen auf:³² hämolytische Aktivität, in-vitro-Cytotoxizität gegenüber Tumor- und Lungencarcinomzellen^{134,136} sowie antivirale, entzündungshemmende, schmerzstillende und blutdrucksenkende Eigenschaften. Asterosaponine hemmen gram-positive Bakterien, jedoch keine gram-negativen.³⁵

Von besonderem Interesse im Rahmen dieser Arbeit sind die Untersuchungen von M. Iorizzi et al.¹³⁸ über die Wirkung von Asterosaponinen auf das Ansiedlungsverhalten von Cypruslarven der Seepocke *Balanus amphitrite* und von Larven des Moostierchens *Bugula neritina*. Die vier getesteten Asterosaponine hinderten die Larven daran, sich an Oberflächen anzuheften. Die aktivste Verbindung zeigte ab einer Konzentration von 8 mg/L Seewasser Inhibitorwirkung auf Cypris-Larven.

Auf psychrotrophe marine Bakterien, die aus Meerwasser oder von Oberflächen von Macroinvertebraten isoliert wurden, zeigten Asterosaponine dagegen keine Hemmwirkung.³⁶

1.4. Aufgabenstellung

- Da sich im Laufe der eingangs erwähnten Studie zeigte, daß die aktiven Komponenten aus *Asterias rubens* von komplexer glycosidischer Struktur sind, bestand der erste Teil der Forschungsaufgabe darin, Methoden zu etablieren, mit denen es möglich ist, die Struktur von Saponinen mit mehreren Zuckereinheiten ohne zeit- und arbeitsaufwendigen chemischen Abbau oder Derivatisierung aufzuklären. Zum Einsatz kommen sollten neben der Massenspektrometrie in erster Linie moderne ein- und zweidimensionale NMR-Techniken. NMR-Untersuchungen besitzen den Vorteil, daß sie im Vergleich zu Abbau-/Derivatisierungsmethoden nur wenig Substanz benötigen und die Probe auch nach der zerstörungsfreien Messung erhalten bleibt. Der aufwendig isolierte Naturstoff kann so nach der NMR-Messung noch für toxikologische Tests verwendet oder zu Vergleichszwecken aufbewahrt werden. Zur Minimierung der eingesetzten Substanzmengen sollten im Rahmen dieser Teilaufgabe zudem neue empfindlichere Meßsonden (Cryo-Probenköpfe) erprobt werden.

Wie schon unter 1.2.2 ausgeführt, gab es bislang keine Untersuchungen über Steroid-Saponine in *Asterias rubens*.

- Die zweite Hauptaufgabe bestand darin, Methoden zu finden, mit denen die Strukturaufklärung von Naturstoffgemischen beschleunigt werden kann. Bei der Suche nach biologisch aktiven Naturstoffen wird in der Regel zunächst die Wirksamkeit von Teilfraktionen erprobt. Zeigt sich eine Wirkung, werden aus der relevanten Fraktion Einzelstoffe isoliert und diese wiederum auf ihre biologische Aktivität geprüft. Die Struktur wirksamer Einzelkomponenten wird dann schließlich mittels off-line-spektroskopischer Methoden aufgeklärt. Oft ist jedoch eine Auftrennung der aktiven Fraktion nicht oder nur mit großem Aufwand möglich, so daß keine Strukturaussage erhalten wird. Beispielsweise konnte von den 21 in Ref. 2 zusammengestellten antimakrofoulingaktiven Invertebraten nur in zehn Fällen angegeben werden, woraus der biologisch aktive Extrakt letztlich bestand (in Ref. 13 sogar nur in 25 von 55 Naturstoffextrakten). Ein weiteres Problem ist, daß ein solcher aktivitätsgeleiteter Ansatz häufig zur Reisolierung bereits bekannter Wirkstoffe (Replikation) führt.

Die Verwendung gekoppelter Methoden, wie der LC-NMR-Kopplung, verspricht in solchen Fällen eine Beschleunigung des Analysenfortgangs, da der Trennschritt direkt mit der Aufnahme von Strukturinformationen verbunden ist. Der Anwendungsbereich der LC-NMR-Kopplung für die Strukturaufklärung von Naturstoffgemischen wird von einer wachsenden Anzahl von Arbeitsgruppen stetig erweitert (siehe Literaturübersicht im Abschnitt 1.5), doch gab es bis zu dieser Arbeit noch keine Erfahrungen über ihre Eignung zur Charakterisierung von Verbindungen im mittleren Molmassenbereich von etwa 1200 bis 1400 Masseneinheiten. Ebensovienig lagen Erkenntnisse über die Anwendbarkeit der LC-NMR-Kopplung zur Strukturerkennung und –aufklärung komplexer glycosidischer Substanzgemische vor.

- Als weitere Teilaufgabe galt es, am Fraunhofer Institut eine direkte LC-NMR-MS-Kopplung einzurichten und ihre Eignung für die oben genannten Zwecke zu erproben. Eine derartige Doppelkopplung wurde vor dieser Arbeit lediglich vereinzelt in der pharmazeutischen Analytik eingesetzt.
- Im Zusammenhang mit den vorangenannten Punkten sollten darüber hinaus Möglichkeiten erprobt werden, neben der Strukturaufklärung von Naturstoffgemischen auch die Gewinnung geeigneter Naturstoffextrakte selbst zu beschleunigen. Es galt, den durch das LC-NMR-MS-Screening gewonnenen Geschwindigkeitsvorteil auch auf die Probenaufarbeitung umzusetzen. Zu diesem Zweck sollte ein an die Anforderungen der LC-NMR-MS-Kopplung (Reinheit der Extrakte, Zeitbedarf, Extraktionsmaßstab, breite Anwendbarkeit) angepaßtes Extraktions- und Anreicherungsverfahren entwickelt werden.

1.5. Literaturübersicht

1.5.1. Die Anwendung der LC-NMR-Kopplung in der Naturstoffanalytik

Neben der pharmazeutischen Analytik und Metabolismusforschung ist die Naturstoffanalytik heute der wichtigste Anwendungsbereich für die LC-NMR-Kopplung. Die Gründe dafür sind offensichtlich: Bei der Suche nach neuen Naturstoffen, wo oft komplizierte eng verwandte Strukturen unterschieden werden müssen, ist die Kernresonanzspektroskopie die grundlegende analytische Methode, um die benötigte Strukturinformation zu gewinnen. Gerade solche eng verwandten Naturstoffe liegen zudem oft als schwer aufzutrennendes Gemisch vor, so daß die HPLC mit ihrer hohen Trennleistung in vielen Fällen für nichtflüchtige Verbindungen die Methode der Wahl darstellt. Die Kopplung dieser beiden Analysenverfahren, d. h. eines Trennverfahrens mit einer strukturanalytisch leistungsfähigen spektroskopischen Methode, erscheint daher für die Naturstoffaufklärung besonders vielversprechend.

Die LC-NMR-Kopplung begann ab etwa 1997 in der Naturstoffanalytik Anwendungen zu finden. Im folgenden sollen die bisher auf diesem Gebiet geleisteten Arbeiten, geordnet nach Arbeitsgruppen, zusammengefaßt werden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Breite der untersuchten Stoffklassen und ihrer Molmassen.

K. Albert war maßgeblich an der Entwicklung des LC-NMR-Durchflußprobenkopfes beteiligt (siehe Abschnitt 2.3). Eine Reihe der Arbeiten seiner Gruppe beschäftigen sich mit der Analytik von fettlöslichen Vitaminen und verwandten Stoffen.

Die ^1H -NMR-Detektion erwies sich für die Untersuchung solcher lipophiler Verbindungen, wie Isomeren von Vitamin A-acetat³⁷, Retinsäure³⁸, β -Carotin^{39,41} oder Lutein und Zeaxanthin⁴⁰, bei denen zahlreiche cis/trans-Isomere auftreten, als besonders geeignet. Eine massenspektrometrische Detektion kommt wegen der identischen Fragmentationsmuster der auftretenden Isomere nicht in Frage. Einen weiteren Vorteil bietet das geschlossene System aus HPLC- und NMR-Gerät für diese unbeständigen, leicht isomerisierenden Verbindungen dadurch, daß die Analyten ohne Licht- und Sauerstoffexposition direkt in die NMR-Meßzelle gelangen. Gearbeitet wurde sowohl im on-flow- als auch im stopped-flow-Modus.

Es konnte gezeigt werden, daß RP-30-Umkehrphasen für die Auftrennung von cis/trans-Isomeren eine hohe Selektivität besitzen.^{38,39,40,42} Nach Ansicht der Autoren ist RP-30-Material wegen seiner hohen Probenbeladbarkeit besonders für die LC-NMR geeignet. Insbesondere das 3µm-Material erwies sich als sehr leistungsfähig.⁴¹ Analog wurden auch Isomergemische des Tocopherols/Tocotrienols untersucht.⁴² Eine weitere Anwendung der LC-NMR ist die Untersuchung von Hopfenextrakten für das Brauereiwesen. Die licht-, sauerstoff- und wärmeempfindlichen Humulone und Lupulone weisen eine Reihe eng verwandter Isomere auf, die mittels der LC-NMR-Kopplung im stopped-flow-⁴³ und on-flow-Modus⁴⁴ vollständig identifiziert werden konnten.

Bringmann und Mitarbeiter setzen die LC-NMR für eine klassische Anwendung der Naturstoffchemie - die Suche nach neuen Pflanzeninhaltsstoffen - ein. Ihr Arbeitsgebiet umfaßt Naphthylisochinolin-Alkaloide. Durchgeführt wurde ein Screening von tropischen Pflanzenextrakten nach neuen Naphthylisochinolin-Alkaloiden, wobei zunächst im on-flow-Modus auf das Vorhandensein von Naphthylisochinolin geprüft, und anschließend in einem zweiten Schritt die interessierenden Komponenten mittels ein- und zweidimensionaler stopped-flow-Spektren weiter charakterisiert wurden.⁴⁵ Zwei neue Verbindungen konnten durch zweidimensionale stopped-flow-NMR-Experimente, erstmals auch ROESY,⁴⁶ identifiziert werden. Die erhaltenen LC-NMR Daten wurden genutzt, um die neu identifizierten Strukturen selektiv zu isolieren. Gegenstand einer weiteren Publikation ist die kombinierte Verwendung von LC-NMR, LC-MS und LC-CD (Zirkulardichroismus) zur Identifizierung von Naphthylisochinolin in Pflanzenextrakten, wobei die Struktur von zwei neuen Verbindungen einschließlich ihrer absoluten Konfiguration aufgeklärt werden konnte.⁴⁷ Die etablierte LC-NMR Methode wurde auch zur Charakterisierung des Überstandes von Kalluskulturen bei der Untersuchung der Funktion von Naphthylchinolin in Parasit/Wirtsbeziehungen tropischer Lianen verwendet.⁴⁸ Ebenso kam sie bei Studien zur enzymatischen Dimerisierung von Naphthylisochinolin zur Anwendung.⁴⁹

Die Gruppe um B. Schneider wendet die LC-NMR zur phytochemischen Untersuchung von Pflanzenextrakten an. Im stopped-flow-Modus wurden eindimensionale Protonenspektren aufgenommen, wobei bekannte Komponenten durch Spektrenver-

gleich identifiziert und unbekanntes aufgrund der Hinweise der LC-NMR isoliert und mit off-line-NMR-Methoden weiter aufgeklärt wurden. Auf diese Weise wurden aus den Rhizomen von *Anigozanthos flavidus* drei neue Phenylphenalenone isoliert.⁵⁰ Beim Screening verschiedener *Taxus*-Species konnten sechs Taxane erkannt⁵¹ – aus der Taxaceenspecies *Torreya jackii* sieben Lignane identifiziert werden.⁵² Eine interessante Anwendung für die LC-NMR Kopplung wurde bei Untersuchungen zur Biosynthese von Phenylphenalenonen gefunden. Bei Fütterungsversuchen mit ¹³C- sowie deuteriummarkierter Dihydrozimtsäure konnte mittels LC-NMR das Isotopomenverhältnis der in die Metaboliten eingebauten Markierung bestimmt werden.⁵³

I. D. Wilson und Mitarbeiter untersuchten im stopped-flow-Modus einen Pflanzenextrakt von *Silene otites* auf Polyhydroxysteroiden (Ecdysteroiden). Drei weithin bekannte Ecdysteroiden wurden in der Probe erkannt. Zur Identifizierung von Steroiden dieser Art reichten 12-13 µg an Substanz aus. Die benötigte NMR-Meßzeit betrug 50 min pro Spektrum.⁵⁴

Die Arbeitsgruppe von W. Kraus und B. Vogler wandte die LC-NMR-Kopplung erfolgreich zur Identifizierung von neun antibakteriell wirksamen Sesquiterpenlactonen aus *Vernonia fastigiata* (Asteraceae) an. Dabei wurden Sesquiterpenfeinfraktionen zunächst im on-flow-Modus untersucht. Zusätzliche Informationen, insbesondere über die Stereochemie der Epoxygruppen, ergaben stopped-flow COSY- sowie NOE-SY-Spektren. Um eine vollständige Signalzuordnung des Spektrums zu erhalten, wurde als Eluent sowohl D₂O/Methanol als auch D₂O/Acetonitril verwendet.⁵⁵

Eine sehr interessante Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse von Triterpensaponinen der Heilpflanze *Bacopa monniera*. Für die beschleunigte Suche nach biologisch aktiven Naturstoffen wird eine Kombination von bioaktivitätsgeleitetem und strukturgeleitetem Screening vorgeschlagen. Das biologische Screening auf wurmabtötende Wirkung erfolgte mittels eines an die HPLC-Feinauftrennung angeschlossenen Schnelltests. Eine aktive Feinfraktion konnte mit on-flow-LC-NMR sowie stopped-flow-COSY- und TOCSY-Experimenten charakterisiert werden. Sie bestand aus vier einander eng verwandten Verbindungen, von denen jeweils zwei Stoffe identische Glycosidreste aus drei Zuckereinheiten besaßen. Drei bereits bekannte Saponine

konnten so zugeordnet werden, das vierte soll in späteren off-line-NMR-Experimenten näher untersucht werden.⁵⁶

O. Spring und B. Vogler verwendeten die LC-NMR-Kopplung bei der chemotaxonomischen Einordnung von Species der Gattung *Scalesia*, einer Pflanze von den Galapagos-Inseln. Wegen der begrenzten Menge an Probenmaterial wurde die on-flow-LC-NMR als micropräparative Methode eingesetzt. Es konnten zwei Flavanone identifiziert werden. Weitere Stoffe, darunter Sesquiterpenlactone, wurden off-line charakterisiert.⁵⁷ Bei der chemotaxonomischen Untersuchung der mexikanischen Pflanze *Zaluzania Grayana* konnte ein neues Sesquiterpenlacton bereits im on-flow-Modus erkannt werden.⁵⁸

Das Konzept eines chemischen Screenings auf biologisch aktive Naturstoffe mit Hilfe der LC-NMR wurde von K. Hostettmann und J.-L. Wolfender maßgeblich mitentwickelt und in mehreren Übersichtsartikeln dargelegt.^{59,60,61,62,63} Sie nutzten eine Kombination der sich in ihrer Strukturaussage ergänzenden Methoden LC-UV-MS und LC-NMR. Es wurden eine Reihe verschiedener Naturstoffextrakte untersucht: So wurde aus einem Gentianaceen-Extrakt (*Swertia calycina*) mittels on-flow-LC-NMR ein Naphtochinon identifiziert und aus einer weiteren Probe (*Gentiana ottonis*) konnten im stopped flow-Modus zwei Flavon-C-glycoside, ein Secoiridoid sowie fünf Xanthone zugeordnet werden.⁶⁴ Im Rohextrakt von *Senecio vulgaris* (Asteraceae) wurden im on-flow-Chromatogramm drei bereits bekannte toxische Pyrrolizidin-Alkaloide als Hauptbestandteile erkannt.⁶⁵ In einer angereicherten Fraktion aus *Oropheia enneandra* (Annonaceae) wurden drei antioxidativ wirksame Lignane und ein Tocopherolderivat mit LC-NMR näher charakterisiert.⁶⁶

Aus dem Dichlormethanextrakt der afrikanischen Heilpflanze *Monotes engleri* konnten in einem on-flow-Lauf zwei prenylierte Flavanone erkannt werden. Da eine der Substanzen Hinweise auf eine neue Verbindung zeigte, wurde der Extrakt fraktioniert, die interessierende Fraktion aufkonzentriert und erneut in das LC-NMR-System injiziert. Aufgrund der sehr hohen Konzentration des Analyten konnten auch heteronuklear korrelierte NMR-Experimente, wie HSQC und HMBC, durchgeführt werden. Auf diese Weise wurde eine vollständige Signalzuordnung eines neuen prenylierten Flavanons erhalten.⁶⁷

Im Dichlormethanextrakt des mittelamerikanischen Busches *Cordia linnaei* konnten zwei Naphtochinone durch präparative Chromatographie nicht zufriedenstellend getrennt werden. Mittels LC-NMR-Messungen wurden jedoch die Protonensignale beider Substanzen eindeutig zugeordnet und dienten als Grundlage zur Auswertung zweidimensionaler off-line-Spektren des Gemisches.⁶⁸

Ein anschauliches Beispiel für die einzigartigen Möglichkeiten der LC-NMR-Kopplung wird in Ref. 69 gegeben: hier konnte ein sich durch cis/trans-Isomerie ineinander umlagerndes Isomerenpaar von dimeren Secoiridoidglycosiden nur mit stopped-flow LC-NMR eindeutig identifiziert werden.

Die Gruppe um A. E. Bäcker beschäftigt sich mit der Analyse von Glycosphingolipiden. In ⁷⁰ wurde on-flow-LC-NMR an Normalphasenmaterial neben immunologischen Assays, ¹H-NMR, GC-MS und MALDI-TOF-MS zur Charakterisierung der Kohlenhydrat-Antigene von Glycosphingolipiden aus der Lunge von Schweinen eingesetzt. Aus dem erhaltenen NMR-Chromatogramm wurden nur die Signale der anomeren Protonen ausgewertet. Die weitere Stukturaufklärung erfolgte durch Erkennung von Merkmalen mittels monoklonaler Antikörper, ergänzt durch MS- und NMR-Daten. Eine solche Charakterisierung mit immunologischen Methoden unterscheidet sich beträchtlich von der in der Naturstoffanalytik verbreiteten spektroskopischen Stukturaufklärung. Dennoch ist von großem Interesse, daß die Eignung der Methode zur Untersuchung von komplexen glycosidischen Verbindungen mit bis zu fünf Zuckereinheiten gezeigt werden konnte.

Kleinwächter et al. entdeckten mit der Hilfe der LC-NMR drei neue Fasciculol-Triterpene in Extrakten des Pilzes *Hypholoma fasciculare*. Die Stukturaufklärung erfolgte off-line nach präparativer Isolierung.⁷¹

Tabelle 1: Zusammenstellung der mit LC-NMR untersuchten Naturstoffklassen und ihrer Molmassen.

Arbeitsgruppe	Stoffklasse	Molekülmasse	Jahr der Veröffentlichung	Literaturstelle
K. Albert	Vitamin A-acetate	<i>m/z</i> 328	1995	37
	Retinsäure-Isomere	<i>m/z</i> 300	1997	38
	β-Carotin-Isomere	<i>m/z</i> 536	1997/99	39,41
	Lutein/Zeaxanthin-Isomere	<i>m/z</i> 540-570	1999	40
	Tocopherole/Tocotrienole	<i>m/z</i> 400-430	1999	42
K. Albert/ E. Bayer	Humulone, Lupulone		1996/99	43,44
G. Bringmann	Naphthylisochinolin-Alkaloide	<i>m/z</i> 180-400	1998/99	45,46,47,48,49
B. Schneider	Phenylphenalenone	<i>m/z</i> 290-580	1999	50,53
	Lignane	<i>m/z</i> 370-400	1999	52
	Taxane	<i>m/z</i> 600	1998	51
I. D. Wilson	Ecdysteroide	<i>m/z</i> 470-510	1998	54
O. Spring/ B. Vogler	Flavanone	<i>m/z</i> 330	1997	57
	Sesquiterpenlactone	<i>m/z</i> 250-260	1995	58
W. Kraus/ B. Vogler	Sesquiterpenlactone	<i>m/z</i> 380-440	1998	55
	Triterpensaponine	<i>m/z</i> 890-930	1999	56
J.-L. Wolfender/ K. Hostettmann	Naphtochinone	<i>m/z</i> 190; 400	1997/99	64,68
	Flavon-C-glycoside	<i>m/z</i> 440-450	1997	64
	Secoiridoide,-Dimere, -Glycoside	<i>m/z</i> 360-380, 860	1997/98	64,69
	Xanthone		1997	64
	Prenylierte Flavanone	<i>m/z</i> 340-430	1998	67
	Pyrrrolizidin Alkaloide	<i>m/z</i> 330-350	1999	65
	Lignane	<i>m/z</i> 370-390	1998	66
	Tocopherolderivat			
P. Kleinwächter et al.	Fasciculol-Triterpene	<i>m/z</i> 650-740	1999	71
A. E. Bäcker	Glycosphingolipide	Glycosphingolipide mit bis zu fünf Zuckereinheiten	1999	70

1.5.2. Die Anwendung der LC-NMR-MS-Kopplung

Die direkte on-line-Kopplung eines LC-NMR-Aufbaus mit einem Massenspektrometer wurde 1995 zuerst von Pullen et al. anhand der Analyse eines Gemisches aus drei Triazolen beschrieben.⁷² Kurze Zeit später nutzten Shockor et al. on-flow-LC-NMR zusammen mit Ionenfallen-MS zur Identifizierung von Metaboliten des Arzneistoffs Acetaminophen neben endogenen Metaboliten in humanem Urin.⁷³ Bereits in diesen ersten Anwendungen kommt eine parallele Anordnung von NMR- und Massenspektrometer mittels eines Fluß-Splitters zum Einsatz.

In den folgenden Jahren erschienen mehrere Artikel zur LC-NMR-MS-Kopplung, die sich mit Anwendungen in der pharmazeutischen Analytik und Metabolismusforschung beschäftigen. Holt et al. untersuchten die Eignung der Methode zur Charakterisierung von Stoffgemischen aus der kombinatorischen Chemie anhand einer Mischung kommerziell erhältlicher Peptide.⁷⁴ Unter den Bedingungen der LC-NMR-Kopplung wurde mit D₂O als Lösemittelkomponente ein vollständiger Deuteriumaustausch, sowohl der NH- als auch der OH-Protonen der Peptide beobachtet. Ein weiterer Artikel dieser Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Eignung der Methode zur Analyse von Metaboliten des Paracetamols in humanem Urin.⁷⁵ Zum ersten Mal wurde ein D-H-Rücktausch durch Zugabe von protonenhaltigen Lösemitteln zum MS-Eluentenstrom durchgeführt, um auf die Anzahl der austauschenden Protonen der Analyten zu schließen.

G. B. Scarfe et al. untersuchten die Verstoffwechslung von 2-Brom-4-trifluormethylanilin im Urin der Ratte mittels LC-NMR-MS. Viele der identifizierten Metaboliten hätten mit LC-NMR bzw. LC-MS allein nicht identifiziert werden können. Das Ausgangsmolekül erwies sich einerseits durch das Brom mit seiner charakteristischen Isotopenverteilung als besonders gut geeignet, um Abbauprodukte identifizieren zu können, andererseits stellt die Trifluormethylgruppe eine Sonde zur spezifischen Detektion exogener Verstoffwechslungsprodukte mittels ¹⁹F-NMR dar.^{76,77} Eine analoge Arbeit beschäftigt sich mit dem Metabolismus von 2-Chlor-4-trifluormethylanilin.⁷⁸

Am Beispiel der Charakterisierung von Ibuprofen-Stoffwechselprodukten aus menschlichem Urin wurde die spezielle Eignung der MS zur Identifizierung von Me-

taboliten des zugeführten Ausgangsmoleküls gezeigt.⁷⁹ Anhand der für Glucuronide typischen MS-Fragmente konnten Konjugate des Ibuprofens identifiziert werden, die dann mit Hilfe von stopped-flow-NMR-Spektren aufgeklärt werden konnten.

Eine Diskussion praktischer Aspekte der direkten LC-NMR-MS-Kopplung wird in Ref. 80 gegeben. Die Autoren erläutern hier die Vorteile der parallelen Anordnung von MS- und NMR-Spektrometer, besprechen den optimalen Abstand und Winkel des MS vom Magneten und gehen auf die verschiedenen Anforderungen beider Methoden in Bezug auf Pufferkomponenten im Eluenten ein. Übersichtsartikel zur LC-NMR-MS finden sich bei I. D. Wilson et al.^{81,82,83}

Eine „Dreifachkopplung“ stellt der LC-NMR-MS-IR-Aufbau von I. D. Wilson et al. dar. Als Anwendungsbeispiel werden eine ausschlußchromatographische Trennung von Polymeradditiven⁸⁴ sowie eine Umkehrphasenchromatographie von entzündungshemmenden Wirkstoffen⁸⁵ gegeben. Aufgrund verschiedener Anforderungen der einzelnen spektroskopischen Methoden gestaltete sich diese Kopplung jedoch problematisch.

R. M. Smith et al. verwendeten überhitztes Deuteriumoxid als Eluent in einem LC-NMR-MS-System.⁸⁶ Die Eignung der Methode wurde an Modellsubstanzen (Schmerzmittel und Coffein) demonstriert.

Bailey et al. nutzten die LC-NMR-MS-Kopplung zur Untersuchung der Umsetzung von 5-Trifluormethylpyridon⁸⁷ und 5-Nitropyridon⁸⁸ (Modellsubstanzen für Herbizide) in Maispflanzen. Sie verwendeten die MS-Daten als Auslösekriterium für stopped-flow NMR-Experimente.

Die erste LC-NMR-MS-Arbeit, die sich mit der Analyse von Naturstoffen beschäftigte, wurde 1999 von I. D. Wilson et al. vorgestellt.⁸⁹ Durch die zusätzliche massenspektrometrische Information konnte aus einem Extrakt von *Silene otites*, neben den bereits in der vorangegangenen Arbeit⁵⁴ mit LC-NMR identifizierten Ecdysteroiden, eine weitere Substanz dieser Stoffklasse aufgeklärt werden. Die Probe wurde im on-

flow-Modus untersucht; zur detaillierteren Strukturaufklärung wurden stopped-flow-2D TOCSY-Spektren aufgenommen.

In einer weiteren Arbeit zur Naturstoffanalytik untersuchten Hansen et al. einen Extrakt von *Hypericum perforatum* mit LC-NMR-MS.⁹⁰ Neben den bekannten Hauptbestandteilen (Naphthodianthrone, Flavonoide) konnten zwei neue Inhaltsstoffe identifiziert werden. Die NMR-Experimente wurden im MS-ausgelösten stopped-flow Modus aufgenommen. Einige bereits bekannte Inhaltsstoffe konnten nur im MS-Chromatogramm detektiert werden. D-H-Rücktauschexperimente gaben zusätzliche Sicherheit bei der Zuordnung der Daten.

Ebenfalls zur Analyse von Flavonoiden (Quercetin-O-Glycoside und Phloretin-O-Glycoside in Apfelschalen) setzten Lommen et al. die LC-NMR-MS ein.⁹¹ Auch hier wurden die LC-NMR-Spektren im MS-ausgelösten stopped-flow Modus aufgenommen. Die Glycosidreste der Flavonoide wurden mit selektiven TOCSY-Spektren charakterisiert.

Tabelle 2: Zusammenstellung der mit LC-NMR-MS untersuchten Naturstoffklassen und ihrer Molmassen.

Arbeitsgruppe	Stoffklasse	Molekülmasse	Jahr der Veröffentlichung	Literaturstelle
I. Wilson	Ecdysteroide	470-510	1999	⁸⁹
S. H. Hansen	Naphthodianthrone, Flavonoide	440-550	1999	⁹⁰
A. Lommen	Flavonoide	430-610	2000	⁹¹

2. Grundlagen der spektroskopischen Methoden

2.1. NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance) hat nach den grundlegenden Arbeiten von Bloch und Purcell (gemeinsamer Nobelpreis für Physik 1946) und der Einführung der Puls-Fourier-Technik, welche die zweidimensionale NMR-Spektroskopie ermöglichte, durch R. R. Ernst (Chemie-Nobelpreis 1991) und Anderson, in vielen Bereichen der Chemie, Biologie, Physik und Medizin entscheidende Bedeutung erlangt. Sie ist die wichtigste Methode zur Strukturaufklärung organischer Moleküle in Lösung. Die NMR arbeitet zerstörungsfrei und durch die Fülle unterschiedlicher Experimente lassen sich verschiedenste Fragen zur Struktur beantworten. Die NMR-Spektroskopie befindet sich in stetiger Entwicklung. Auf der einen Seite werden durch apparative Verbesserungen noch immer Empfindlichkeit und Auflösungsvermögen der Methode erhöht (siehe Abschnitt 2.1.6), auf der anderen Seite wird durch die Entwicklung einer inzwischen kaum noch zu überschauenden Anzahl neuer Pulssequenzen ihr Anwendungsbereich ständig erweitert.

2.1.1. Grundlagen der NMR-Spektroskopie^{92,93,94} - Energieniveauschema

Durch die NMR-Spektroskopie lassen sich Atomkerne vermessen, die einen Eigendrehimpuls \vec{P} (Kernspin) und damit ein magnetisches Moment

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{P}$$

Gleichung 1

besitzen. Die Proportionalitätskonstante, das magnetogyrische Verhältnis γ , ist eine für die jeweilige Kernart charakteristische Größe. ^1H - und ^{13}C -Kerne haben in organischen Molekülen die größte Bedeutung. In einem starken Magnetfeld B_0 gibt es für derartige Kerne vom Spin $I = 1/2$ zwei Möglichkeiten, sich auszurichten: parallel oder antiparallel zum äußeren Feld (Richtungsquantelung). Die parallele Einstellung α ist energieärmer als die antiparallele Ausrichtung β und wird folglich bevorzugt eingenommen.

Die Besetzung dieser beiden Energieniveaus folgt einer Boltzmann Verteilung.

$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} \quad \text{Gleichung 2}$$

N_{β}/N_{α} : Besetzungsverhältnis der antiparallelen und parallelen Energieniveaus

T: Temperatur in K

ΔE : Energiedifferenz dieser Energieniveaus

k: Boltzmann Konstante

Eingestrahlte Energiequanten vom Betrag ΔE bewirken eine Spininversion. Infolge des Besetzungsunterschiedes der Boltzmann-Niveaus erhält man ein Absorptionssignal. Als Resonanzbedingung gilt:

$$\Delta E = h\nu = \gamma \frac{h}{2\pi} \cdot B_0 \quad \text{Gleichung 3}$$

Die Resonanzfrequenz (= Larmorfrequenz, siehe unten) ist von der für die chemische Umgebung typischen Abschirmungskonstante σ abhängig (chemische Verschiebung) und erlaubt es daher Rückschlüsse auf die Struktur zu ziehen:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} (1 - \sigma) B_0 \quad \text{Gleichung 4}$$

Die Energieniveaus benachbarter Kerne können über die Bindungselektronen wechselwirken (skalare Kopplung). Je nach Einstellung des benachbarten Kerns (α oder β) wird das Magnetfeld am Ort des betrachteten Kerns beeinflusst. Es kommt zur Verschiebung der Energieniveaus und somit wegen der zusätzlichen Energieübergänge zu den bekannten Multiplettaufspaltungen. Die Übergänge unterscheiden sich um den Betrag der Kopplungskonstante J. Abbildung 4 zeigt die Energieniveaus für ein Zweispinsystem.

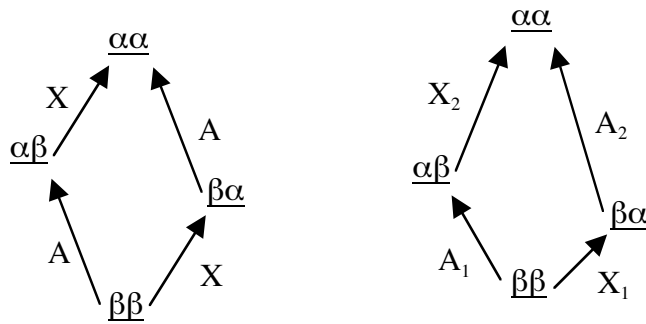


Abbildung 4: Energieniveauschema für ein Zweispinsystem AX. Links: ohne J -Kopplung. Rechts: J -Kopplung führt zur Stabilisierung der Energieniveaus $\alpha\beta$ und $\beta\alpha$ und zur Destabilisierung der Niveaus $\alpha\alpha$ und $\beta\beta$ (Kopplungskonstante J positiv). Für die Kerne A und X ergeben sich so jeweils zwei Energieübergänge (Resonanzfrequenzen).

2.1.2. Pulsfourier-Transform-NMR-Spektroskopie - Vektorbild

Alle modernen NMR-Spektrometer arbeiten nach dem Prinzip der Puls-Fourier-Transform-NMR (PFT-NMR). Das PFT-NMR-Experiment läßt sich am anschaulichsten in der Vektordarstellung erklären.

Die magnetischen Momente $\vec{\mu}$ richten sich nicht streng nach den Feldlinien des Feldes B_0 aus, sondern präzedieren aufgrund des Kernspins mit ihrer Larmorfrequenz (= Resonanzfrequenz, siehe oben) $\omega_0 = \gamma \cdot B_0$ (Gleichung 4) um die Ausrichtung des magnetischen Feldes B_0 . Im Ausgangszustand präzedieren sämtliche magnetischen Momente $\vec{\mu}$ auf einem Doppelpräzessionskegel. Wegen der geringfügig höheren Besetzung des α -Energieniveaus resultiert eine makroskopische Magnetisierung \vec{M} in z-Richtung des B_0 -Feldes (longitudinale Magnetisierung).

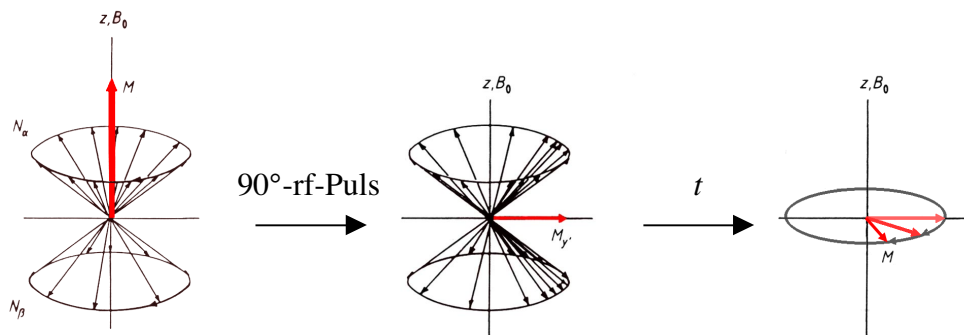


Abbildung 5: Ein 90°-Puls erzeugt transversale Magnetisierung in der x,y-Ebene⁹³

Bei der Puls-Fourier-Transform-NMR wird durch einen kurzen Hochfrequenz-Puls (rf-Puls) von hoher Leistung ein kontinuierliches Frequenzband angeregt. Die makroskopische Magnetisierung kann so beispielsweise um 90° in die x,y-Ebene ausgelenkt werden, was im Energieniveauschema einer Gleichverteilung (Sättigung) beider Niveaus gleichkommt. Vom Sättigungszustand unterscheidet sich diese Situation jedoch dadurch, daß ein Teil der einzelnen Kerndipole nun in Phase um die z-Achse präzedieren (Phasenkohärenz, siehe Abbildung 5). Es resultiert sogenannte transversale Magnetisierung in der x,y-Ebene. Dieser Magnetisierungsvektor präzediert nun (wie auch die Einzelspins) mit der Larmorfrequenz um die z-Achse und induziert in der Empfängerspule ein zeitabhängiges Signal, den sog. FID (Free Induction Decay), der durch Relaxationseffekte (Spin-Gitter- und Spin-Spin-Relaxation) exponentiell abklingt. Der FID stellt ein Interferogramm aller Larmorfrequenzen dar und wird durch eine Fouriertransformation von der Zeitdomäne $f(t)$ in die Frequenzdomäne $f(\nu)$ transferiert.

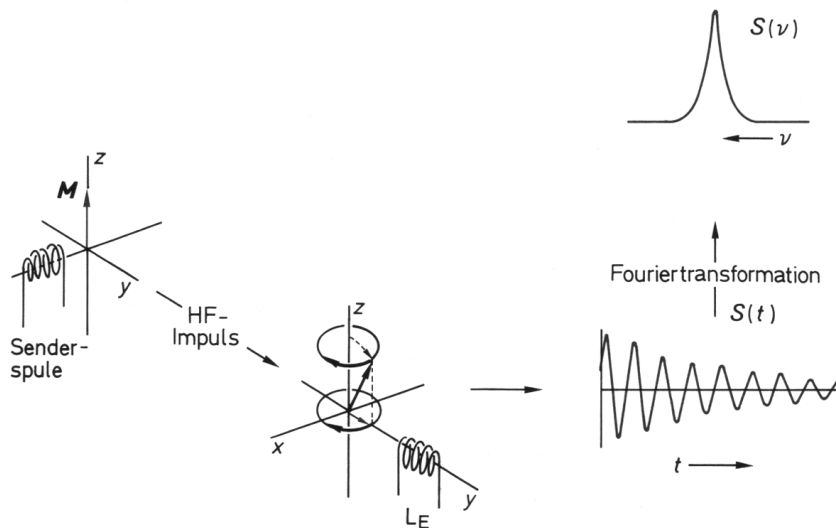


Abbildung 6: Signalerzeugung in der Puls-Fourier-Transform-NMR.⁹²

Die PFT-NMR ermöglicht es, durch Spektrenakkumulation, das Signal/Rauschverhältnis schwacher Signale zu erhöhen. Die Verbesserung ist dabei proportional zur Wurzel der akkumulierten Spektren.

$$S/R \approx \sqrt{ns}$$

Gleichung 5

Das Signal/Rausch-Verhältnis wird daneben noch von zahlreichen weiteren Faktoren beeinflusst:

$$S/R \approx N\gamma I(I+1)B_0^{3/2}\phi(QV_S)^{1/2}b^{-1/2}T^{-3/2}f^{-1}$$

Gleichung 6

mit

N: Anzahl der Kerne im Detektionsvolumen

γ : magnetogyrisches Verhältnis

I: Spinquantenzahl

B_0 : Magnetische Feldstärke

ϕ : Füllfaktor = V_S/V_C ; V_S : Probenvolumen, V_C : Volumen der Meßspule

Q: Qualitätsfaktor der Spule

b: Bandbreite des Empfängers

T: Meßtemperatur

f: Rausch-Zahl des Vorverstärkers

2.1.3. Zweidimensionale NMR-Spektroskopie^{95,96}

Die Puls-Fourier-Transform-NMR-Technik ermöglichte eine neue Klasse von NMR-Experimenten: die zwei- oder mehrdimensionale NMR-Spektroskopie.

Die Energieniveaus zweier Kerne können sich über die Bindungen (skalare Kopplung) oder über den Raum (dipolare Kopplung) beeinflussen. Mit geeigneten Pulssequenzen ist es dadurch möglich, Magnetisierung von einem Kern auf den nächsten zu übertragen (Kohärenztransfer). Man erhält Datenpaare zweier Frequenzen, die in einem Spektrum mit zwei Frequenzachsen aufgetragen werden.

Zweidimensionale Spektren werden durch Aufnahme einer Reihe von eindimensionalen NMR-Experimenten erhalten. Die einzelnen 1-D-Spektren unterscheiden sich dadurch, daß eine zweite Zeitvariable, die inkrementierte Wartezeit t_1 , eingeführt wird.

Zweidimensionale Experimente lassen sich grundsätzlich in vier Perioden unterteilen: Präparation, Evolution, Mischung und Detektion.

Das Spinsystem wird zunächst in der Präparationsphase durch mindestens einen rf-Puls angeregt. In der Evolutionsperiode wird von Spektrum zu Spektrum t_1 inkrementiert. Es entwickeln sich die chemischen Verschiebungen und Kopplungen. Danach erfolgt, je nach Art des durchgeführten Experiments, in der Mischphase der Magnetisierungstransfer von einem Kern auf den nächsten. Schließlich wird dabei transversale Magnetisierung erzeugt, die in der Detektionsperiode als Funktion der Zeit t_2 als FID aufgezeichnet wird. Das Ergebnis ist eine Reihe von FIDs, die zunächst nach t_2 fouriertransformiert werden. Die erhaltenen Spektren zeigen eine Amplituden- bzw. Phasenmodulation. Eine zweite Fouriertransformation bezüglich t_1 liefert schließlich das zweidimensionale NMR-Spektrum mit den Frequenzachsen F_1 und F_2 . Die miteinander wechselwirkenden Kerne sind durch ein Kreuzsignal korreliert.

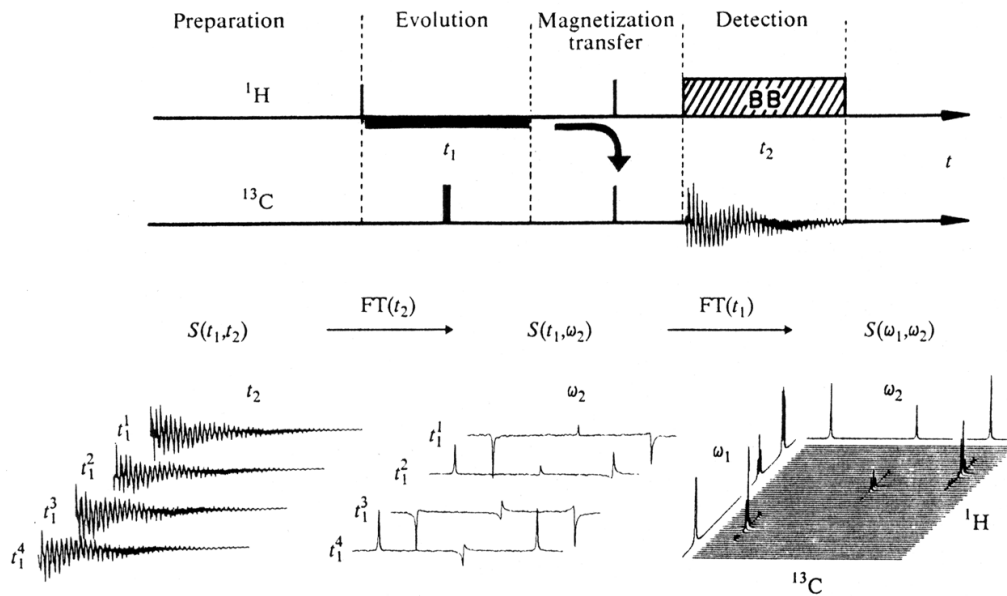


Abbildung 7: Das Prinzip zweidimensionaler NMR-Spektroskopie am Beispiel eines C,H-COSY-Experiments. Es erfolgt Magnetisierungstransfer von Protonen auf Kohlenstoffkerne.⁹⁵

2.1.4. Inverse Spektroskopie

^{13}C -detektierte zweidimensionale NMR-Experimente, wie z. B. C,H-COSY, sind wegen des ungünstigen gyromagnetischen Verhältnisses und der geringen natürlichen Häufigkeit der ^{13}C -Kerne wesentlich unempfindlicher als solche, bei denen Protonensignale aufgezeichnet werden.

Mit der Entwicklung protonendetektierter heteronuklearer (sogenannter inverser) NMR-Experimente, wie z. B. HMQC oder HSQC (Kapitel 8.1.3.5), konnte in den späten achtziger Jahren ein bedeutender Empfindlichkeitsgewinn erzielt werden. Bei diesen Experimenten wird Protonenmagnetisierung angeregt, auf die Kohlenstoffkerne transferiert und am Ende der Pulssequenz wieder auf die Protonen zurück übertragen. Da für die Abhängigkeit des Signal/Rauschverhältnisses von den gyromagnetischen Verhältnissen der angeregten bzw. detektierten Kerne folgende Beziehung gilt:⁹⁷

$$S/N \approx \gamma_{exc} \cdot \gamma_{det}^{3/2}$$

Gleichung 7

ergibt sich daraus eine achtfache $((\gamma_H/\gamma_C)^{3/2})$ Sensitivitätssteigerung.

Moderne NMR-Probenköpfe sind im Hinblick auf derartige Experimente optimiert („Inversköpfe“): Bei ihnen sind die Protonenspulen innenliegend angeordnet, so daß sie zu einem weiteren Empfindlichkeitsgewinn beitragen.

2.1.5. Selektive Spektroskopie^{98,99}

Experimente mit selektiver Anregung stellen Varianten mehrdimensionaler NMR-Experimente mit verringerter Dimensionalität dar. Die häufigste Variante ist eine eindimensionale, selektive Version eines 2D-Experiments. Dabei wird ein Hard-Puls der zweidimensionalen Ausgangs-Pulssequenz durch einen selektiven Puls ersetzt. Die Magnetisierung wird nun entsprechend der Art des zugrundeliegenden Experiments von den angeregten Protonen auf weitere Kerne übertragen. Das Resultat ist ein eindimensionales NMR-Spektrum, das derjenigen Reihe aus der zweidimensionalen Datenmatrix entspricht, die den Cross-Peak zur angeregten Resonanz enthält.

Die Vorteile selektiver Experimente gegenüber ihren mehrdimensionalen Varianten sind:

Geringer Zeitbedarf. Bei eingegrenzten Fragestellungen kann es von Vorteil sein, nicht die ganze zweidimensionale Datenmatrix mit mehreren hundert Inkrementen aufzunehmen, sondern nur den Ausschnitt, der die interessierenden Signale enthält. Darüber hinaus werden manche drei- und mehrdimensionale Experimente durch die Beschränkung in einer Dimension überhaupt erst möglich.

Höhere digitale Auflösung. Da es sich um eindimensionale Spektren handelt, können diese mit voller digitaler Auflösung aufgenommen werden, ohne daß die Datenmatrix zu groß oder die Experimentdauer unverträglich lang wird. Kopplungskonstanten können so exakter bestimmt werden als in zweidimensionalen Spektren.

Ein Nachteil besteht in dem im Vergleich zu zweidimensionalen Experimenten verminderten Signal/Rausch-Verhältnis (S/R). 2D-Experimente gewinnen, bei gegebener Anzahl an Scans (ns), gegenüber den entsprechenden 1D-Varianten an S/R, da bei ihnen noch über die große Anzahl an t1-Inkrementen gemittelt wird (Multiplexeffekt).

2.1.6. Cryo-Probenköpfe

Wegen des geringen Besetzungsunterschieds der Energieniveaus beim NMR-Experiment sind die detektierten Signale oft so schwach, daß das thermische Rauschen in den Signalwegen des Spektrometers selbst für das Signal/Rausch-Verhältnis bestimmend wird. Eine erhebliche Verbesserung der Empfindlichkeit bringt ein neuer apparativer Ansatz, der am Vorverstärker- und Empfängersystem ansetzt.

Werden sowohl die rf-Spulen des Probenkopfes als auch der gesamte Vorverstärker auf etwa 20 K abgekühlt, so ist das thermische Rauschen in diesen Schaltkreisen deutlich vermindert (Gleichung 6: Rauschzahl des Vorverstärkers). Der Hersteller verspricht eine Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses um den Faktor 4,¹⁰⁰ d. h., daß mit einem 500 MHz-Spektrometer ein doppelt so hohes Signal/Rausch-Verhältnis erreicht werden kann, wie mit einem 800 MHz-Gerät. Dies entspräche der zu erwartenden Empfindlichkeit eines 1,2 GHz-Spektrometers.

2.2. Ionenfallen-Massenspektrometrie mit ESI-Ionenquelle

Die Ionenfalle, mit deren Hilfe sich Ionen durch elektrische Felder in einem kleinen Volumen einschließen lassen, wurde 1956 von W. Paul entwickelt. In den folgenden Jahren wurde sie zur Spektroskopie gespeicherter Ionen und in Anfängen auch zur Massenspektroskopie genutzt. Als Massenspektrometer konnte sie sich jedoch zunächst nicht gegen die Quadrupol-Massenfilter durchsetzen, die ebenfalls von W. Paul entwickelt wurden. 1989 erhielt W. Paul zusammen mit H. Dehmelt den Physik-Nobelpreis für die grundlegenden Arbeiten über die Ionenfalle.¹⁰¹

Ab Mitte der achtziger Jahre erlebte die Ionenfallen-Massenspektrometrie mit dem Erscheinen eines preiswerten und empfindlichen Massendetektors für die GC eine Renaissance. Mit der Entwicklung neuer Ionisierungsmethoden für nichtflüchtige Verbindungen und kompakter Ionenfallen-Massenspektrometer mit zuverlässigen Ionenquellen in den frühen neunziger Jahren kann auch LC-(MS)ⁿ mittlerweile als Routinetechnik in der chemischen Analytik bezeichnet werden.

2.2.1. Elektronenspray-Interface ESI

Das Elektronenspray-Interface (kurz: Elektrospray-Interface) zählt wie das APCI-Interface (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) zu den Ionisierungsmethoden, die bei Atmosphärendruck arbeiten (API, Atmospheric Pressure Ionization).

Der HPLC-Eluent gelangt durch eine geerdete Stahlnadel in das Interface. Die Nadel wird mit Zerstäubergas umspült. Zwischen der Nadel und dem Kapillareinlaß (Abbildung 8) liegt ein Potential von etwa 2000 bis 6000 V an. Diese Spannung und die Scherkräfte des Zerstäubergases bewirken, daß die Flüssigkeit in kleine, geladene Tröpfchen versprüht wird. Durch das elektrische Feld kommt es an ihrer Oberfläche zu einer bevorzugten Ausrichtung einer Ladungsart. Die Tröpfchen werden dann in Richtung Kapillare beschleunigt, wobei das Lösemittel durch einen Gegenstrom aus geheiztem Stickstoffgas verdampft wird. Ihr Durchmesser verringert sich und die überwiegend gleichartigen Oberflächenladungen rücken näher aneinander. Wenn die Coulomb-Abstoßung der Ladungen die Oberflächenspannung des Tröpfchens überschreitet (Rayleigh-Limit), zerplatzt es in viele kleinere (Coulomb-Explosion). Aus den so entstandenen Mikro-Tröpfchen verdampft weiter Lösemittel, es kommt zu weiteren Coulomb-Explosionen, die zu immer kleineren Tröpfchen mit immer höhe-

ren Oberflächen-Ladungsdichten führen. Schließlich tritt die Verdampfung von Analytationen in die Gasphase ein.

Die desolvatisierten Ionen gelangen durch die Kapillare in die Niederdruckzone der Ionenquelle. Ein System aus Skimmern, Oktopolen und elektrostatischen Linsen bündelt die Ionen zu einem Strahl. Gleichzeitig werden Zerstäuber-, Trockengas und das Verdampfte Lösemittel durch ein mehrstufiges Pumpensystem abgesaugt und die Ionen treten schließlich in den Massenanalysator ein.

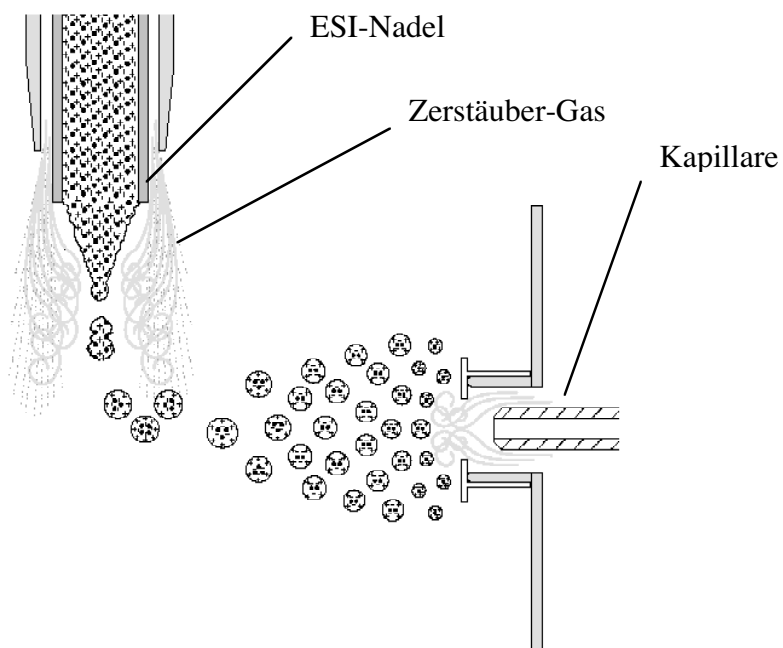


Abbildung 8: Aufbau der ESI-Ionenquelle¹⁰⁴

2.2.2. Ionenfallen-Massenspektrometrie

2.2.2.1. Grundlagen^{102,103,104}

Eine Ionenfalle besteht aus drei Elektroden mit jeweils hyperbolischem Querschnitt: zwei Endkappen und einer Ringelektrode. Die beiden Endkappen besitzen in ihrer Mitte eine Öffnung, durch die die Ionen hinein und wieder herausgelangen. (Abbildung 9). Die Achse zwischen den Endkappen wird als z-Achse bezeichnet, r ist die lotrechte Auslenkung aus dieser Achse in Richtung der Ringelektrode.

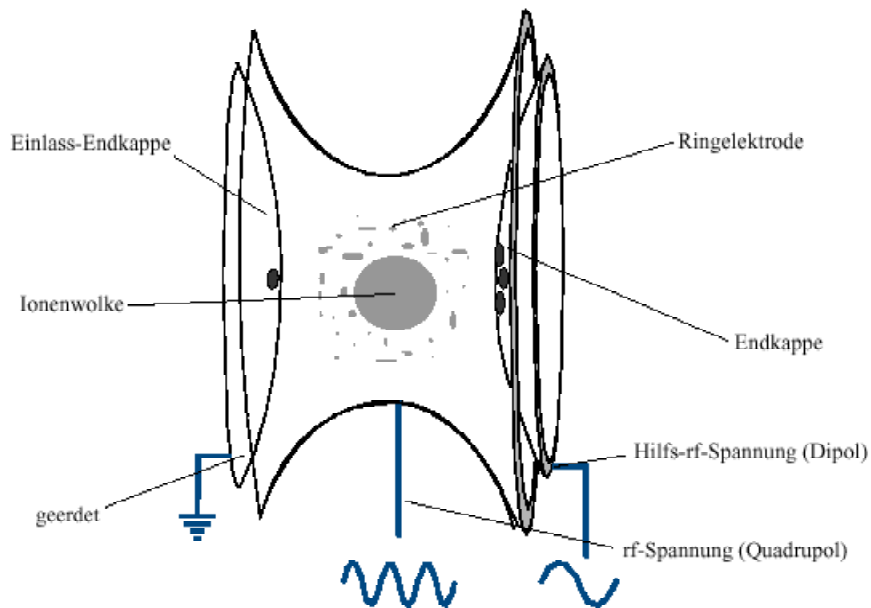


Abbildung 9: Querschnitt durch eine Ionenfalle und angelegte Spannungen¹⁰⁴

Durch ein Quadrupol-Feld, das durch eine Gleich- und Wechselspannung an der Ringelektrode erzeugt wird, werden die Ionen auf eine komplizierte, vorwiegend sinusoidale Bahn gezwungen. Beträgt diese zwischen Ringelektrode und den Endkappen angelegte Spannung $U + V \cos \omega t$, wobei U die zugrundeliegende Gleichspannung und $V \cos \omega t$ die aufmodulierte Wechselspannung (rf-Spannung) ist, so wird die resultierende Ionenbewegung durch die Mathieu-Differentialgleichung beschrieben:

$$\frac{d^2 x}{d\gamma^2} + (a_x + q_x \cos 2\gamma)_x = 0$$

Gleichung 8

mit $x = r$ oder z und

$$a_z = -2a_r = 4eU/mz_0^2 \omega^2$$

Gleichung 9

$$q_z = -2q_r = 2eV/mz_0^2 \omega^2$$

Gleichung 10

$$\gamma = 1/2 \omega t$$

Gleichung 11

Die Parameter a und q bestimmen, ob die Bahn eines Ions in der Falle stabil ist oder instabil. Der Stabilitätsbereich ist durch die Umhüllende im Mathieu-Stabilitätsdiagramm wiedergegeben.

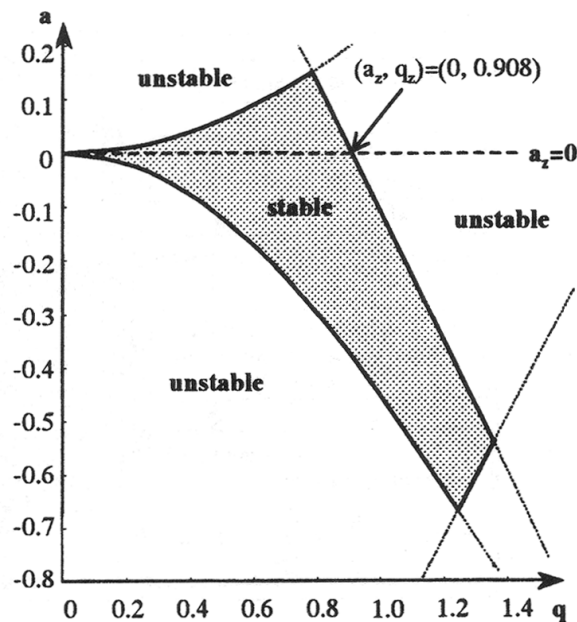


Abbildung 10: Das Mathieu-Stabilitätsdiagramm¹⁰⁵

Ein weiterer Parameter β wurde eingeführt, um die Frequenz der vorherrschenden sinusoidalen Bewegung eines Ions in der Falle anzugeben (Säkularfrequenz f):

$$f = (\omega/2)\beta$$

Gleichung 12

wobei β nur von a und q abhängt und zwischen 0 und 1 variiert.

Diese Säkularfrequenz, mit der die Ionen in der Falle oszillieren, hängt über a und q von dem m/z -Verhältnis des Ions und der Stärke der rf-Spannung ab. Die Gegenwart von Heliumgas (etwa 10^{-3} Torr) stabilisiert die Ionen auf ihrer Bahn, indem diese durch Stöße etwas abgebremst werden.

Die meisten Ionenfallenspektrometer arbeiten im „rf-only“-Modus, d.h. es wird kein Gleichspannungspotential zwischen Ringelektrode und Endkappen gelegt ($U=0$). Damit fällt der Parameter a weg, man bewegt sich im Mathieu-Diagramm nur auf der Geraden mit $a_z=0$ (gestrichelte Linie in Abbildung 1, Abbildung 11 oben).

2.2.2.2. Massenscan – Massenselektiver Instabilitätsmodus

Die untere Massengrenze (m/z) der stabilisierten Ionen hängt von der Höhe der rf-Spannung ab. Es gilt:

$$(m/z) = \frac{4V}{q_{\text{eject}} \omega^2 r_0^2} \quad \text{Gleichung 13}$$

Wird für eine Masse bei steigender rf-Spannung ein q -Wert von 0,908 (q_{eject}) erreicht, so wird die Bahn des betrachteten Ions instabil.

Zur Aufnahme eines Massenspektrums wird deshalb die rf-Spannung linear hochgefahren. Nacheinander werden Ionen mit zunehmendem m/z destabilisiert und axial durch die Öffnung in der Endkappe aus der Falle geworfen (massenselektiver Instabilitätsmodus, Abbildung 11 oben).

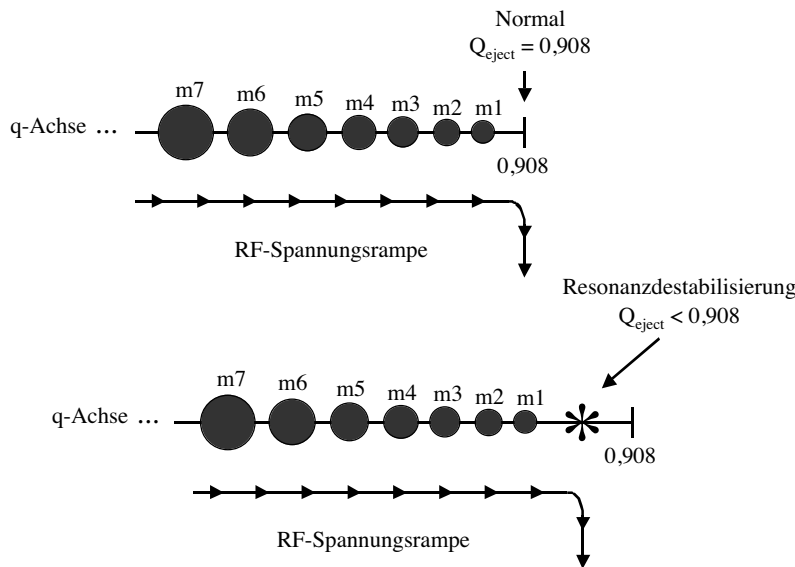


Abbildung 11: Schematische Darstellung des massenselektiven Instabilitätsmodus (oben) und der Resonanzdestabilisierung. Die Darstellung entspricht der Geraden mit $a_z=0$ im Mathieu-Diagramm¹⁰³

2.2.2.3. Resonanzdestabilisierung

Durch Anlegen einer schwachen rf-Spannung ($< 50 \text{ V}_p$) zwischen den beiden Endkappen wird ein weiteres, sogenanntes Hilfs-Dipolfeld erzeugt. Entspricht die Frequenz dieses Hilfsfeldes gerade der Säkularfrequenz eines Ions, kommt es zur Resonanz. Der Bewegung des Ions wird so zusätzliche Energie eingekoppelt, seine Bahn wird destabilisiert (Resonanzdestabilisierung).

Wird nun bei konstanter Frequenz des Hilfs-Dipolfeldes die rf-Spannung des Haupt-Quadrupolfeldes hochgefahren, so treten nacheinander alle m/z -Verhältnisse in Resonanz mit dem Hilfs-rf-Feld. Sie werden destabilisiert noch bevor der q_{eject} -Wert von 0,908 erreicht ist. Dieser massenselektive Instabilitätsmodus mit Resonanzdestabilisierung führt zu einem erweiterten Massenbereich des Ionenfallenspektrometers sowie zu verbesserter Auflösung und Empfindlichkeit.

2.2.2.4. MSⁿ-Experimente

Ein Ionenfallen-Massenspektrometer erlaubt es, in zeitlicher Abfolge MS/MS- und MSⁿ-Experimente durchzuführen. Dabei werden zuerst die zu untersuchenden Ionen isoliert, dann fragmentiert und schließlich erfolgt eine Massenanalyse.

2.2.2.4.1. Isolierung

Die untere Grenze des Massenbereichs ist durch die rf-Spannung des Quadrupolfeldes festgelegt (Gleichung 12). Darunter sind alle Ionen destabilisiert. Um nun auch die Ionen des oberen Massenbereichs zu destabilisieren, wird ein breites Frequenzband eingestrahlt, das die Resonanzen für alle m/z -Verhältnisse ausser dem zu isolierenden enthält. Diese Ionen werden resonanzdestabilisiert.

2.2.2.4.2. Fragmentierung

Zur Fragmentierung wird die Energie des isolierten Ions durch Resonanzanregung mittels des Dipolfeldes erhöht. Die Amplitude der Anregung ist geringer, als die zur Destabilisierung benötigte (typischerweise 1 V). Die Ionen nehmen die eingestrahlte Energie auf und beginnen mit dem Helium-Hintergrundgas zusammenzustoßen, was zur Fragmentierung führt (collision induced dissociation).

In der Ionenfalle befinden sich nun Fragmentionen, die in einem herkömmlichen Massenanalyseschritt nacheinander aus der Falle geworfen werden können. Es besteht die Möglichkeit, noch weitere MS/MS Isolations- und Fragmentationsschritte anzuhängen. Abbildung 12 faßt noch einmal die einzelnen Schritte des MS/MS-Experiments zusammen.

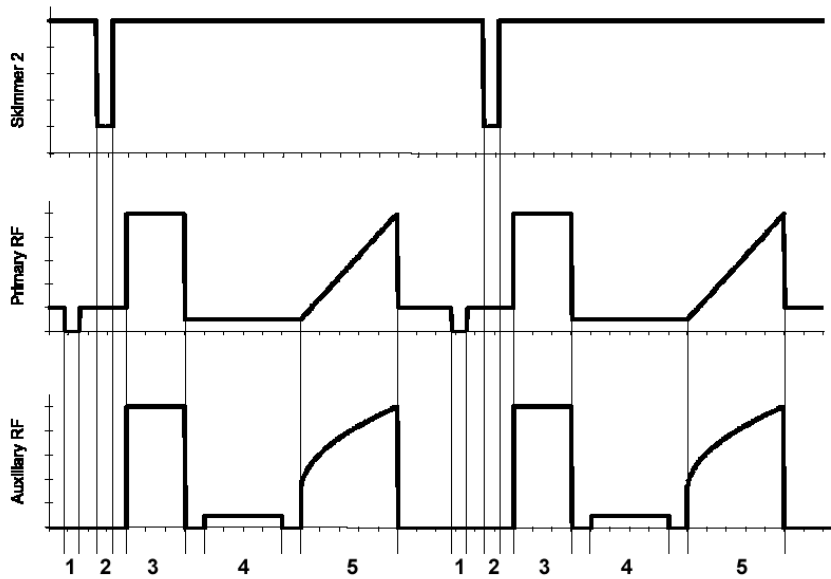


Abbildung 12: Schematischer Ablauf des MS/MS-Experiments: 1. Entleerung der Ionenfalle, 2. Einlass von Ionen (Akkumulation), 3. Isolierung der Zielmasse, 4. Fragmentierung, 5. Massenanalyse

2.3. NMR-Kopplungen

Die ersten Kopplungen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit der Kernresonanzspektroskopie wurden bereits in den späten siebziger Jahren, damals noch mit Eisenmagnet-Spektrometern, entwickelt.^{106,107} Nachdem mit diesen Aufbauten Detektionsempfindlichkeiten in der Größenordnung von Brechungsindex-Detektoren erzielt worden waren, brachte Anfang der achtziger Jahre die Verwendung von supraleitenden Cryomagneten einen Empfindlichkeitsgewinn von etwa einer Größenordnung.^{108,109} In dieser Zeit wurden mehrere Entwürfe für Durchflußprobenköpfe diskutiert, von denen sich der an der Universität Tübingen entwickelte¹⁰⁷ und zunächst von Bruker, Karlsruhe, vermarktete Entwurf heute durchgesetzt hat.¹¹⁰

Aufgrund weiterer Fortschritte, wie Verbesserungen im Bereich der digitalen Signalverarbeitung, Optimierung der Probenköpfe und Entwicklung leistungsfähiger Lösemittelunterdrückungen, werden mit der LC-NMR-Kopplung mittlerweile Nachweisgrenzen um $1\mu\text{g}$ (Molmasse 250)⁵⁹ erreicht.

Wegen der anfänglich limitierten Empfindlichkeit (und unter Umständen auch aufgrund des mangelnden Austauschs zwischen NMR-Spektroskopikern und Chromatographie-Anwendern)¹²⁰ benötigte die LC-NMR-Kopplung annähernd zwanzig Jahre,

um eine breitere Anwendung zu finden. Mittlerweile wurde über Applikationen in vielen Bereichen berichtet, von denen die pharmazeutische Analytik und Metabolismusforschung,^{111,112} sowie die Naturstoffanalytik (siehe Abschnitt 1.5) am bedeutendsten sind. Weitere relevante Bereiche sind die Umweltanalytik^{113,114,115} sowie die Petro- und Polymerchemie.^{116,117} Über die LC-NMR Kopplung sind von J. C. Lindon et al^{118,119} sowie von K. Albert^{110,120} Übersichtsartikel erschienen.

2.3.1. Aufbau der LC-NMR-Kopplung

Verglichen mit anderen Kopplungsmethoden, wie beispielsweise der LC-MS, ist die LC-NMR-Kopplung verhältnismäßig unkompliziert.

Das Chromatographiesystem besteht aus einer konventionellen HPLC-Anlage mit UV-Detektor. Daran ist eine Schaltventileinheit angeschlossen, die die Möglichkeit zum Peakeinfang in Kapillaren bietet (Bruker Peak Sampling Unit, BPSU). Das NMR-Spektrometer ist über eine drei Meter lange PEEK-Kapillare mit dem Auslass der BPSU verbunden (Abbildung 13).

Für die LC-NMR wird ein spezieller Durchflußprobenkopf (Abbildung 14) verwendet. Im Gegensatz zu konventionellen off-line-NMR-Probenköpfen, in denen die NMR-Röhrchen in einem Glaseinsatz rotieren, auf dem die rf-Spulen aufgebracht sind, besteht der Durchflußprobenkopf aus einem gebogenen Glasrohr, auf das die Spulen direkt aufgebracht sind. Zu beiden Enden hin verjüngt sich das Glasrohr, um über Schrumpfverbindungen mit den Kapillaren des LC-Systems verbunden werden zu können.

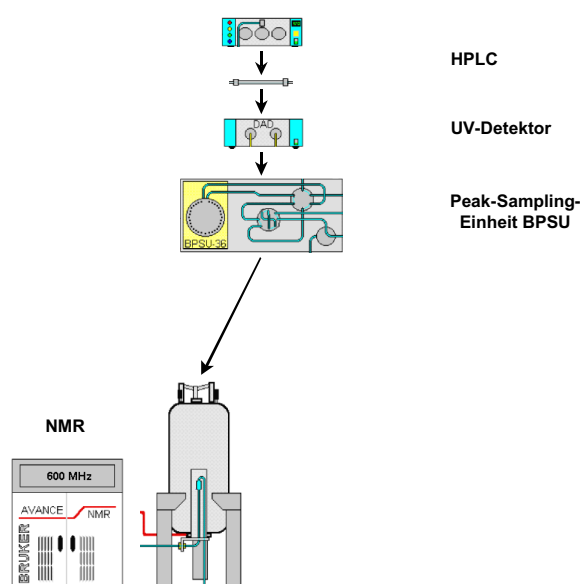


Abbildung 13: Schematischer Aufbau der LC-NMR-Kopplung

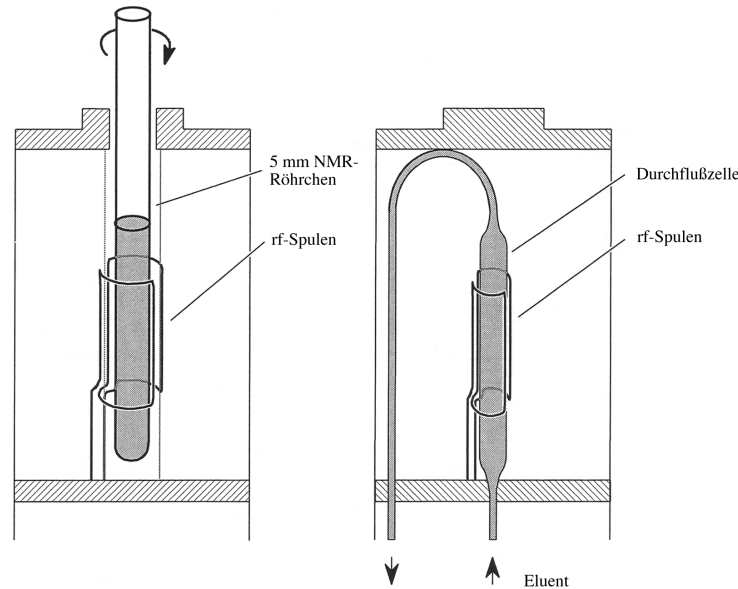


Abbildung 14: Geometrie eines konventionellen und eines LC-Durchflußprobenkopfes nach K. Albert

Dadurch, daß sich die Spulen direkt auf der Glasröhre befinden, besitzt der Probenkopf einen annähernd optimalen Füllfaktor (Verhältnis von Probenvolumen zu Spulenvolumen, Gleichung 6). Damit ist er prinzipbedingt empfindlicher als konventionelle Köpfe. Mittlerweile werden Durchflußprobenköpfe von den Herstellern auch für die off-line-NMR angeboten: sie kommen in Fließinjektionssystemen zum Einsatz, die für einen hohen Probendurchsatz bestimmt sind (bei Bruker: BEST-NMR, Bruker Efficient Sample Transfer. Diese Fließinjektionsköpfe unterscheiden sich lediglich durch größere Wandstärken von den LC-NMR-Versionen).

Der Nachteil des Durchflußprobenkopfes, keine Probenrotation zu ermöglichen, ist mittlerweile durch die hohe Homogenität moderner Cryomagneteten unbedeutend geworden.¹²⁰ Zweidimensionale NMR-Spektren werden ohnehin bei abgeschalteter Rotation gemessen, um Modulationsstörungen zu vermeiden.

Die aktiven Detektionsvolumina von LC-NMR-Köpfen liegen mit 30 bis 120 μl deutlich über denen von UV-Detektoren. Diese Dimensionen stellen einen Kompromiß zwischen den Anforderungen der NMR (möglichst viele NMR-aktive Kerne im Detektionsvolumen, Gleichung 6) und der Chromatographie (möglichst geringe Totvolumina) dar.

In der LC-NMR gibt es folgende grundlegende Betriebsarten:

2.3.2. On-flow-Modus

Im on-flow Betrieb werden ohne Unterbrechung des chromatographischen Laufs kontinuierlich NMR-Spektren aufgenommen. Das Ergebnis ist eine Reihe von eindimensionalen NMR-Spektren, die ein sogenanntes NMR-Chromatogramm darstellen. Der erhaltene Datensatz wird mit der NMR-Software wie ein zweidimensionales Spektrum verarbeitet. Es erfolgt jedoch keine Fouriertransformation nach beiden Dimensionen, sondern nur nach der Zeitdomäne der FIDs (hier: F2).

Ein on-flow-Chromatogramm wird dann sinnvoll eingesetzt, wenn zunächst ein Überblick über eine Probe unbekannter Zusammensetzung gewonnen werden soll. Zum einen kann auf diese Weise ein repräsentativer Eindruck von den wahren Mengenverhältnissen in der Probe gewonnen werden. (So können zum Beispiel Komponenten aufgrund großer molarer Absorptionskoeffizienten im UV-Chromatogramm zu dominanten Peaks führen, im der NMR hingegen wegen ihrer niedrigen Konzentration nur schwache oder gar keine Signale liefern, während sich andere, wenig UV-aktive Verbindungen wie Kohlenhydrate, als Hauptbestandteile erweisen.) Zum anderen kann abgeschätzt werden, ob genug Substanzmenge für ein stopped-flow-Spektrum (siehe unten) vorliegt.

Bei on-flow-Experimenten muss ein Kompromiß zwischen Empfindlichkeit und Auflösung in der chromatographischen Zeitachse getroffen werden. Bei hoher Auflösung können nur wenige Scans pro Reihe akkumuliert werden. Bei hoher Anzahl an Scans wird die Akkumulationszeit unter Umständen so lang, daß zwei chromatographisch getrennte Peaks nicht mehr aufgelöst werden und in eine Reihe fallen. Ein ähnlicher Kompromiß muß auch getroffen werden, wenn für quantitative Untersuchungen längere Relaxationsdelays eingehalten werden müssen. Aus diesem Grund wird zumeist mit verringerter Flußrate gearbeitet, um bei gleicher Auflösung mehr Scans aufnehmen zu können. In der Praxis werden für on-flow-Spektren bei Flußraten zwischen 0,2 und 1 ml/min typischerweise 16 bis 48 Scans akkumuliert. M. Godejohann hat gezeigt, daß bei Nitroaromaten auch mit deutlich niedrigeren Flüssen gearbeitet werden kann.¹²¹ Das zeitliche Auflösungsvermögen anderer HPLC-Detektoren, wie beispielsweise eines UV-Detektors mit einem Datenpunkt pro Sekunde, wird jedoch in keinem Fall erreicht. Die Bedingungen sollten so gewählt sein, daß pro Peak etwa drei Reihen erhalten werden, wobei die Peakverbreiterung durch

die NMR-Durchflußzelle berücksichtigt werden sollte (Abschnitt 4.2.3). Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses können Reihen eines Peaks mit der Spektrometersoftware aufaddiert werden.

2.3.3. Stopped-flow-Modus

Wird ein Peak vom UV-Detektor (bei LC-NMR-MS auch MS-Detektor) erkannt, so wird die HPLC-Pumpe angehalten, sobald sich der Substanzpeak im Probenkopf befindet. Gleichzeitig wird in der BPSU ein Schaltventil geschlossen, um den Druck auf der Trennsäule aufrecht zu erhalten und um ein genaues Positionieren des Peaks im NMR zu ermöglichen. Die erforderliche Zeit zwischen Peakerkennung und Ausschalten der Pumpe ist die sogenannte Transferzeit. Sie hängt vom Volumen der Kapillaren zwischen UV-Detektor und NMR-Meßzelle ab und wird experimentell bestimmt.

Im stopped-flow-Modus steht nun ausreichend Zeit zur Verfügung, um auch von Nebenkomponenten Spektren zu akkumulieren. Typische Werte liegen etwa bei 128 bis 1000 Scans, für die zwischen fünf Minuten und einer Stunde benötigt werden. Darüber hinaus können auch zweidimensionale NMR-Spektren aufgenommen werden. Die Peakerkennung durch den UV-Detektor und der Transfer der Peaks findet in Automation durch die HPLC-Software statt. Eine Automation der MS-detektierten Betriebsart wird von der Fa. Bruker, Rheinstetten, seit Sommer 2000 angeboten.

2.3.4. Weitere Betriebsarten

Zwei weitere Betriebsarten sind das Loop-Sampling und das Time-Slicing.

Beim **Loop-Sampling-Betrieb** werden die vom UV-Detektor erkannten Peaks nacheinander in PEEK-Kapillaren („Loops“) in der BPSU überführt. In dieser Betriebsart ist die BPSU mit einem automatischen Fraktionensammler vergleichbar. Die eluierten Peaks werden in den PEEK-Kapillaren (180 µl Volumen) zwischengeparkt und von dort aus nacheinander zur Vermessung in den NMR-Probenkopf transferiert. Das Verfahren bietet gegenüber dem stopped-flow-Modus den Vorteil, daß die HPLC-Trennung nicht durch Unterbrechungen der Chromatographie beeinträchtigt wird. Darüber hinaus ist es möglich, die Trennung an einer unabhängigen HPLC-Anlage durchzuführen und die gefüllten Probenschleifen anschließend im LC-NMR-System zu vermessen. Das Verfahren ähnelt der unter 2.3.1 erwähnten Fließinjektion. Ein Nachteil dieser Betriebsart ist ihre vergleichsweise hohe Störanfälligkeit.

Der **Time-Slicing-Modus** stellt eine Mischung aus on-flow- und stopped-flow Betrieb dar. Hier wird die Chromatographie nach festen Zeitintervallen, beispielsweise alle 30 Sekunden, unterbrochen, um stopped-flow-Spektren aufzunehmen. Time-Slicing kommt dann in Frage, wenn kein geeignetes Kriterium zur Auslösung des stopped-flow-Experiments gefunden wird. Dies kann bei teilweise koeludierenden Substanzen oder solchen mit sehr geringer UV-Absorption der Fall sein.

2.3.5. LC-NMR-MS-Kopplung

Abbildung 15 zeigt den für die LC-NMR-MS-Kopplung verwendeten Aufbau. Dabei wird am Auslass der BPSU ein Flußsplitter angebracht, der den Eluentenstrom im Verhältnis 1:20 teilt. 95 % des Eluenten werden zum NMR geleitet, während 5 % zum Massenspektrometer gelangen. Dieser parallele Aufbau von NMR und MS hat gegenüber einer möglichen Reihenschaltung (MS am Auslass des NMR-Probenkopfes) zwei Vorteile: zum einen ist so der Rückdruck am Durchflußprobenkopf des NMR vermindert und zum anderen ermöglicht diese Anordnung die Durchführung von MS-ausgelösten stopped-flow-Experimenten. Dazu muß die Länge der HPLC-Kapillaren so abgestimmt werden, daß ein Peak das MS noch vor dem NMR-Spektrometer erreicht. Die entsprechenden Transferzeiten müssen experimentell bestimmt werden.

Über ein T-Stück kann mittels einer Spritzenpumpe noch zusätzliche Pufferlösung zum MS-Eluentenstrom zudosiert werden. Dies kann aus folgenden Gründen geschehen: zum einen kann so gegebenenfalls für die Ionisierung in der MS-Ionenquelle benötigter Puffer zugegeben werden, zum anderen können durch Zugabe von Wasser D-H-Rücktauschexperimente (siehe Abschnitt 4.3.3) durchgeführt werden, um die Anzahl an austauschenden Protonen zu bestimmen. Darüber hinaus beschleunigt die Zudosierung den Peaktransfer zum Massenspektrometer, was für MS-ausgelöste stopped-flow-Experimente günstig ist.

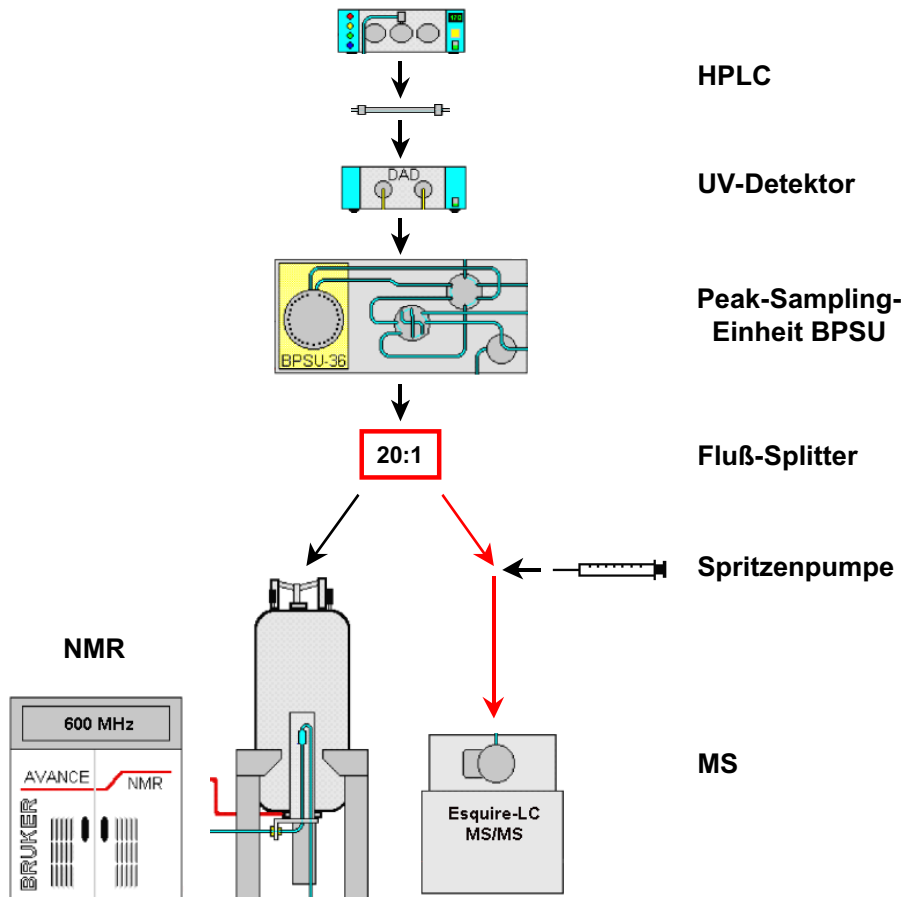


Abbildung 15: Schematischer Aufbau der verwendeten LC-NMR-MS-Kopplung

2.3.6. Lösemittelunterdrückung

In der PFT-NMR müssen große Lösemittelsignale unterdrückt werden. Der Grund ist darin zu sehen, daß das primäre Meßsignal, der FID, ein Interferogramm aller im Spektrum auftretenden Signale ist. Große Signale, wie Lösemittelsignale, treten im FID mit großer Amplitude, kleine Signale mit kleiner Amplitude auf. Anders als in der cw-Spektroskopie, ist es nicht möglich, Signale mit großer Amplitude einfach abzuschneiden, indem man die Empfängerempfindlichkeit an den Probensignalen ausrichtet. Ein derart abgeschnittenes Lösemittelsignal führt nach der Fouriertransformation zu stark verzerrten Spektren. Die Fähigkeit des Spektrometers, kleine Signale neben großen darzustellen, der sogenannte dynamische Bereich, hängt von der Wortbreite des Analog-Digital-Wandlers (ADC) ab. Ein ADC mit 16 Bit Wortbreite kann gerade noch Signale korrekt digitalisieren, die 65536 (2^{16}) mal kleiner sind als das größte.

In der Umkehrphasen-HPLC, der wichtigsten und leistungsfähigsten flüssigchromatographischen Trennmethode, werden als Eluenten in der Regel Acetonitril/Wasser oder Methanol/Wasser-Gemische eingesetzt. Für die LC-NMR ist der Einsatz volldeuterierter Lösemittel, anders als in der konventionellen NMR-Spektroskopie, wegen der hohen Kosten im allgemeinen nicht praktikabel. Es wird daher in der Regel mit Gemischen aus Deuteriumoxid und nichtdeutertem Acetonitril bzw. Methanol gearbeitet. Deuteriumoxid ist mit rund 600 DM pro Liter im Vergleich zu anderen deuterierten Lösemitteln relativ preiswert. Die Signale der nichtdeuterten Fließmittelkomponenten müssen, zusammen mit dem Restwassersignal, unterdrückt werden. Dadurch gehen an den entsprechenden Stellen des Spektrums Signale verloren.

Von der Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Pulssequenzen zur Lösemittelunterdrückung^{122,123} kommen in der LC-NMR hauptsächlich zwei zum Einsatz: NOESY-PRESAT und WET:

2.3.6.1. NOESY-PRESAT-Lösemittelunterdrückung

Die Lösemittelunterdrückung durch Vorsättigung (Presaturation) ist die mit Abstand am meisten genutzte Unterdrückungssequenz. Dabei wird während des Relaxationsdelays bei geringer rf-Leistung selektiv die Resonanzfrequenz des Lösemittels eingestrahlt. Es stellt sich eine Gleichbesetzung (Sättigung) der Energieniveaus ein, so daß das Lösemittelsignal im NMR-Spektrum unterdrückt ist. Für die LC-NMR wird heute fast ausschließlich eine Dreipulssequenz verwendet, die den breiten Fuß des Lösemittelrestsignals schmälert, indem sie Signale ausblendet, die aus Bereichen des Probenkopfes mit inhomogenem B_1 -Feld stammen. Diese Sequenz wird wegen ihrer Ähnlichkeit zum ersten Inkrement eines NOESY-Experiments als NOESY-PRESAT bezeichnet.¹²⁴

2.3.6.2. WET-Lösemittelunterdrückung

Die leistungsfähige WET-Sequenz (Water suppression Enhanced through T1-effects)¹²⁵ macht von mehreren modernen Konzepten der NMR-Spektroskopie gebrauch: gepulste Feldgradienten (PFGs), selektive Anregung, shifted laminar pulses (SLP) und ^{13}C -Entkopplung.

Sie hat folgendes Pulsschema (Abbildung 16):

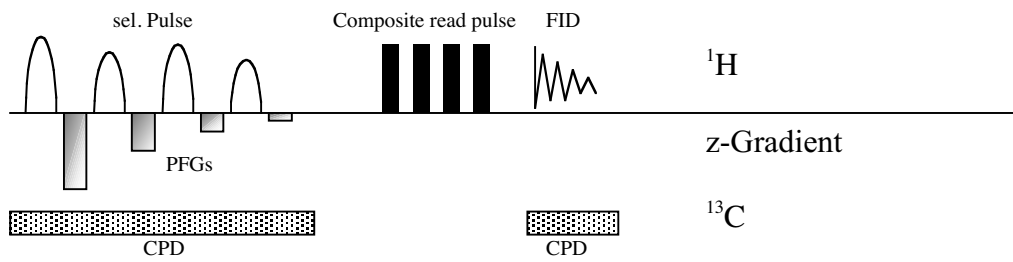


Abbildung 16: Pulsschema der WET-Sequenz

Das Prinzip ist grundsätzlich folgendes: Mit einem Selektivpuls wird zunächst nur das Lösemittelsignal angeregt d. h. die Magnetisierung wird um 90° aus der z- in die xy-Ebene ausgelenkt. Nun wird ein z-Gradient geschaltet, um alle Magnetisierung, die sich in der xy-Ebene befindet zu dephasieren. Diese Kombination von Selektivpuls und z-Gradienten wird noch drei weitere Male wiederholt. Schließlich wird die in der z-Achse verbliebene Magnetisierung (eigentliches Spektrum) mit einem 90° -Leseimpuls in die xy-Ebene ausgelenkt und ein FID aufgezeichnet.

Aufbauend auf diesem Grundschema sind in die WET-Sequenz noch verschiedene Verbesserungen integriert worden:

- Es hat sich gezeigt, daß eine Variation der einzelnen Selektivpulse um 90° günstig ist. Daher werden vier verschiedene Pulse mit variierendem Pulswinkeln geschaltet.
- *Shifted laminar pulses (SLP)*: Es ist möglich, mit einem Selektivpuls mehr als eine Frequenz anzuregen. Dazu werden beim Erzeugen der Pulsform eine oder mehrere Frequenzen auf den Selektivpuls aufmoduliert. Dies geschieht durch Phasenmodulation des Pulses.
- Die Gradientenstärken werden im Verhältnis 1 : 0,5 : 0,25 : 0,125 variiert, um Gradientenechos zu vermindern.
- Ein *composite read pulse*, der sich aus vier 90° -Pulsen zusammensetzt, unterdrückt, wie die NOESY-PRESAT-Sequenz, Signale, die aus Bereichen des Probenkopfes mit inhomogenem B_1 -Feld stammen.
- Da bei Lösemittelunterdrückung die ^{13}C -Satelliten des Lösemittels die größten Restsignale darstellen, kann zusätzlich noch auf dem ^{13}C -Kanal entkoppelt werden

Tabelle 3: Gegenüberstellung der Unterdrückungssequenzen NOESY-PRESAT und WET

	NOESY-PRESAT	WET
Vorteile	hohe Unterdrückungsrate	hohe Unterdrückungsrate
	schmaler Unterdrückungsbereich	Unterdrückung dauert nur 60-100 ms
	hervorragende Basislinie	unempfindlich gegen schlecht kalibrierte Lösemittelfrequenzen
		für on-flow-Messungen geeignet
	Spektren sehr gut integrierbar	Spektren gut integrierbar
	unbegrenzte Anzahl an Resonanzen unterdrückbar (bestimmte Pulssequenz)	Durch SLPs, unbegrenzte Anzahl an Resonanzen unterdrückbar
	einfach in Pulssequenzen einfügbar	einfach in Pulssequenzen einfügbar
Nachteile	Vorsättigung dauert etwa 2 sec	breiterer Unterdrückungsbereich
	für on-flow-Messungen weniger geeignet	

3. Isolierung von Asterosaponinen aus *Asterias rubens*

3.1. Einleitung

Noch Anfang der siebziger Jahre galten Asterosaponinfraktionen als untrennbare Gemische.^{127,32,126} Mit Thornasterosid A aus *Acanthaster planci* (*Crown of Thorns*) gelang Kitagawa und Kobayashi 1978 schließlich die erste Isolierung einer Reinsubstanz und deren vollständige Strukturaufklärung.¹²⁶ Seit 1973 arbeiten Komori und Mitarbeiter an der Isolierung von Seesterntoxinen. Sie begannen zunächst mit einfachen Verteilungstrennungsgängen mit verschiedenen Lösemitteln (Wasser, Butanol, Ether, Ethylacetat) gefolgt von Chromatographie an Kieselgel.¹²⁷ Später entwickelten sie leistungsfähigere, aufwendige Aufarbeitungen, bei denen auf eine Extraktion des Tiermaterials mit Wasser meist eine Filtration über Celite und eine Vortrennung mittels einer Säule aus XAD-2-Adsorberharz folgte. Nach Waschen mit Aceton und Chromatographie über eine Kieselgelsäule schlossen sich noch verschiedene Feinaufreinigungsschritte an Gelpermeations- und Umkehrphasenmaterial,^{127,128,129,130} in einigen Fällen auch DCCC,^{131,132} an. So wurden etwa aus 195 kg rohem Seesternmaterial (1300 Seesterne) 100 g einer Oligoglycosidfraktion und rund 1 g des Asterosaponins Acanthaglycosid A erhalten.¹³³

Die bedeutende Gruppe um Minale verwendet heute eine vergleichbar aufwendige Aufarbeitung als Standardmethode.^{134,135,136,137,138,139,140,36} Dabei werden die zerkleinerten Seesterne zunächst mit Wasser extrahiert und die so erhaltenen Extrakte an XAD-2-Harz aufgereinigt, während das zurückgebliebene Seesternmaterial ggf. noch nacheinander mit verschiedenen Lösemitteln ausgeschüttelt wird. Nach Vereinigung aller Extrakte erfolgt Gelpermeationschromatographie an Sephadex-Material. Die erhaltenen Saponine werden zunächst mittels DCCC und im Anschluß daran mit semipräparativer HPLC weiter aufgereinigt.

Aber auch einfachere Aufarbeitungen erwiesen sich durchaus zur Isolierung von Asterosaponinen geeignet: Bei Findlay et al.¹⁴¹ folgt auf eine Methanolextraktion eine Aufreinigung an XAD-2-Material. Die in Chloroform/Methanol aufgenommenen Saponine werden schließlich mittels präparativer Dünnschichtchromatographie an Kieselgel- und Umkehrphasenmaterial aufgetrennt.

3.2. Präparative säulenchromatographische Aufarbeitung von Asterosaponinen

Die zunächst im Rahmen dieses Forschungsprojekts verwendete Isolierungsmethode ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt. Optimierungsversuche bei der Firma Bioplan GmbH, Rostock, ergaben, daß eine zweimalige Extraktion der zerkleinerten Seesterne mit Acetonitril zu Extrakten mit der höchsten Wirksamkeit führt.¹⁴² Die so gewonnenen Rohextrakte wurden am Fraunhofer Institut säulenchromatographisch an RP-18-Material mit Wasser/Methanol- oder Wasser/Acetonitril-Gradienten aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden durch Dünnschichtchromatographie mit verschiedenen Sprühreagenzien sowie durch Massenspektrometrie charakterisiert.

Die in biologischen Tests besonders wirksamen Fraktionen wurden zur weiteren Aufreinigung mit dem Ziel, Einzelkomponenten zu isolieren, einer zusätzlichen Säulenchromatographie unterzogen. Im Ergebnis wurden neben wenigen Einzelkomponenten, deren Struktur mit NMR-spektroskopischen Methoden aufgeklärt werden konnte, in den meisten Fällen eine Reihe von Asterosaponin-Mischfraktionen (Feinfraktionen) erhalten, die der Strukturaufklärung nicht zugänglich waren.

Abbildung 17 zeigt die präparative Aufarbeitung im Überblick. Später wurde ein zusätzlicher Entfettungsschritt mit Chloroform und Toluol zur Abtrennung lipophiler Störstoffe in den Aufarbeitungsgang eingefügt.

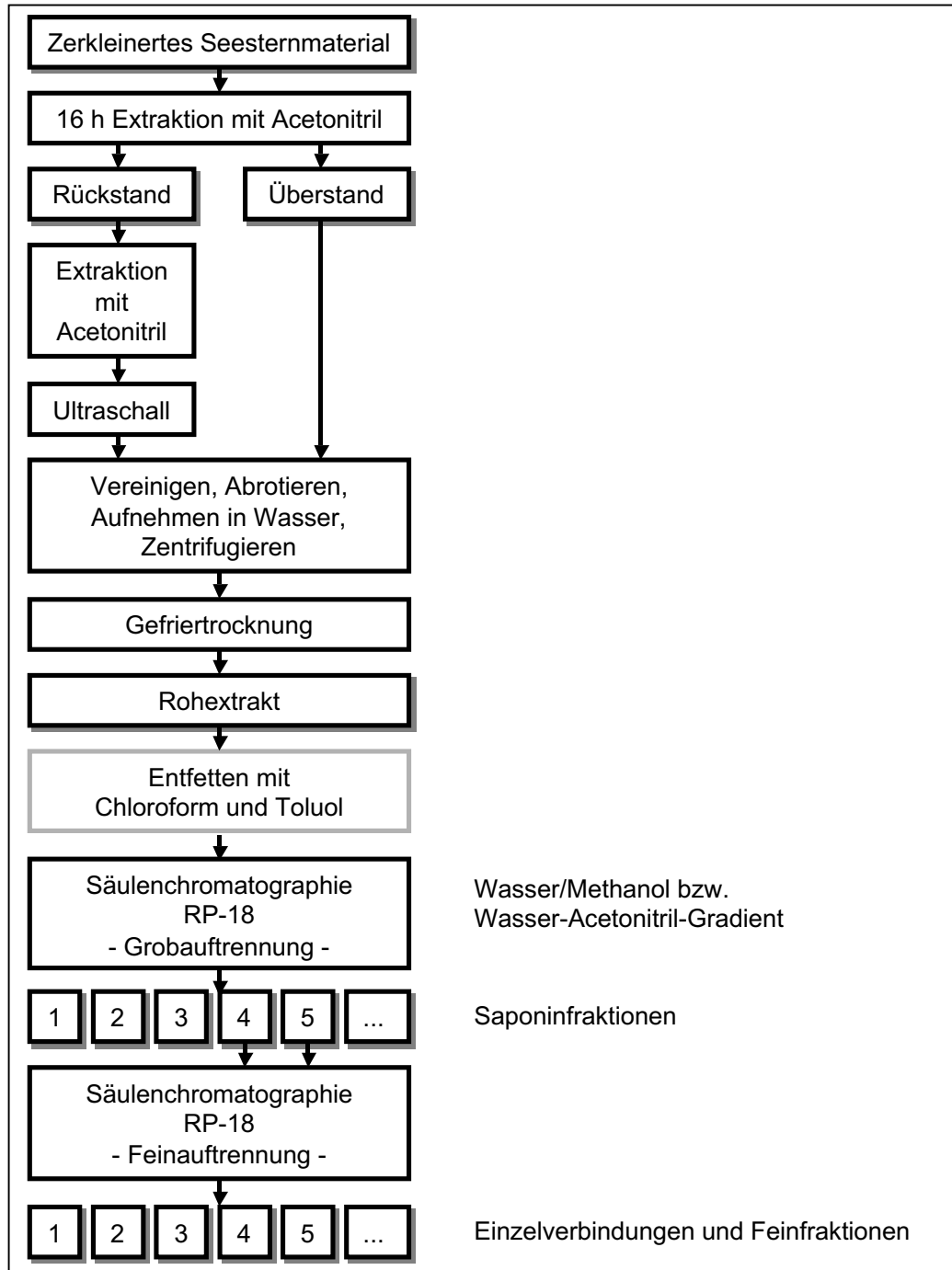


Abbildung 17: Schema der präparativen Aufarbeitung der Asterosaponine aus *Asterias rubens*

3.3. HPLC-Aufreinigung von Asterosaponinen

Die ursprünglichen präparativen Arbeiten mittels säulenchromatographischer Aufreinigung (Abschnitt 3.2) führten zu zahlreichen Feinfraktionen von Asterosaponinen, für deren weitere Auftrennung in Reinsubstanzen zur NMR-Untersuchung eine chromatographische Methode mit höherer Trennleistung benötigt wurde. Aus diesem Grund wurde eine HPLC-Methode zur semi-präparativen Aufreinigung von Asterosaponinen entwickelt.

Die Methode wurde auch im Hinblick auf eine Charakterisierung der Mischfraktionen aufgebaut: in dem ursprünglichen Trennungsgang wurden Saponinfraktionen vor allem durch Dünnschichtchromatographie und off-line Massenspektrometrie charakterisiert. Die Anwendung von HPLC mit UV-Detektion bzw. LC-MS würde hier schnellere und genauere Aussagen über Reinheit und Zusammensetzung einer Fraktion liefern. Darüber hinaus wurde eine HPLC-Methode auch im Hinblick auf die spätere Verwendung von LC-NMR und LC-NMR-MS benötigt (Abschnitt 4.1).

Zunächst mußte ein geeignetes chromatographisches System gefunden werden. Dies wurde dadurch erschwert, daß anfänglich nicht sicher war, ob sich Asterosaponine wegen fehlender chromophorer Gruppen überhaupt mittels UV-Detektion verlässlich nachweisen lassen.

Um diese Frage zu klären, wurden orientierende Versuche mit bereits isolierten Einzelverbindungen vorgenommen, die aufgrund ihrer NMR-Spektren einen hohen Reinheitsgrad zeigten.

Die Anforderungen an eine geeignete HPLC-Methode waren:

- hohe Trennleistung,
- reproduzierbare Peakform,
- schonende pH-Bedingungen, um Hydrolyse der Oligoglycosidkette zu vermeiden,
- die Eignung für LC-MS- und LC-NMR-Messungen sowie
- rückstandslose Verdampfbarkeit des Eluenten für semipräparative Anwendungen,

3.3.1. Ausgangssystem

Die zunächst naheliegende Verwendung von Umkehrphasenmaterial (YMC J'Sphere ODS 1 80, Merck RP-select B) mit Acetonitril / Wasser als Eluent, wie von Sakuma und Motomura¹⁴³ für die Trennung von Saikosaponinen beschrieben, lieferte jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Es wurden verzerrte Peakformen beobachtet. Darüber hinaus waren die Retentionszeiten nicht reproduzierbar (Abbildung 18).

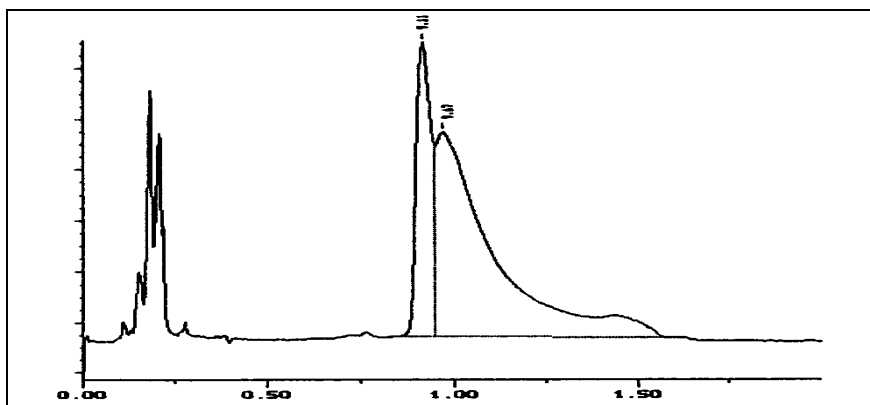


Abbildung 18: HPLC-Lauf von Asteriidosid C im Ausgangs-HPLC-System. Sowohl der erste (RT 9,11 min) als auch der zweite Peak (RT 9,67 min) zeigen die Molekülmasse m/z 1373 und identische NMR-Spektren.

3.3.2. Ionenpaarchromatographie

Neben der Zurückdrängung der Ionisierung durch pH-Wert-Anpassung ist die Zugabe von Ionenpaarreagenz zum Eluenten eine weitere Möglichkeit, die Chromatographie von stark sauren (bzw. basischen) Verbindungen zu stabilisieren.¹⁴⁴

Daher wurde dem Fließmittel des Ausgangssystems Tetrabutylammoniumchlorid zugesetzt und der pH-Wert mit Hydrogenphosphat/Dihydrogenphosphatpuffer auf 6,85 eingestellt. Mit diesem chromatographischen System konnten schließlich reproduzierbare Retentionszeiten und symmetrische Peakformen erhalten werden (Abbildung 19).

Im Hinblick auf eine spätere Anwendung dieser Methode zur präparativen Aufreinigung von Saponinen hat das Ionenpaarreagenz jedoch den Nachteil, daß es nur schwer wieder von der Zielverbindung abzutrennen ist. Zudem ist dieses Reagenz wegen der Butylresonanzen nicht für die Verwendung in LC-NMR-Systemen geeignet. Ebenso

verbieht sich der Einsatz für die LC-MS-Kopplung, da hier ausschließlich flüchtige Puffer verwendet werden können.

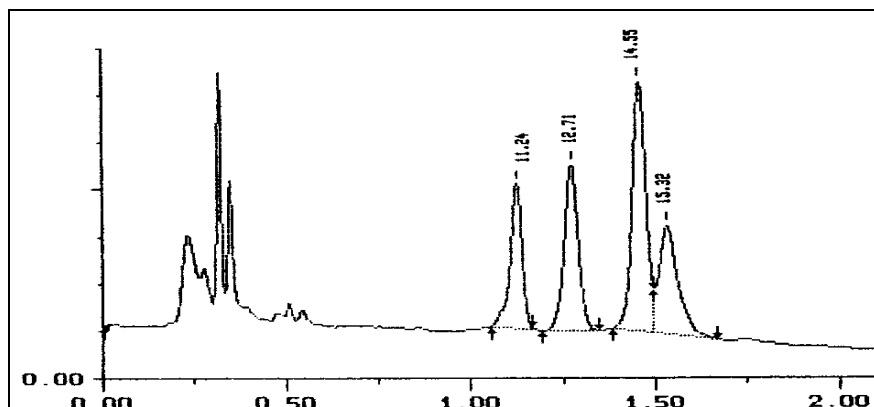


Abbildung 19: Ionenpaarchromatographie einer Saponinmischung: Glycosid B₂ (RT 11,24 min), ovarian Asterosaponin 1 (RT 12,71 min), Isomerengemisch Asterosid C/Ruberosid F (RT 14,55 min), Asteriidosid C (RT 15,32 min). Man beachte die hohe Peaksymmetrie.

3.3.3. Ammoniumpuffer

Der deutliche Einfluß des Ionenpaarreagens auf die Chromatographie der Asterosaponine läßt darauf schließen, daß die ionische Sulfatgruppe an Position 3 des Steroidgerüsts für die im Ausgangssystem beobachteten Störungen verantwortlich ist.

Nach Krebs et al.¹⁴⁵ hat der Zusatz von Ammoniumionen zum Eluenten auf die Trennung von Asterosaponinen einen günstigen Einfluß. Ammoniumpuffer sind zudem in der LC-MS-Kopplung häufig verwendete Fließmittelbestandteile. Daher wurde der Einsatz von Ammoniumformiat (20 mM) als Fließmittelkomponente erprobt. Dieses chromatographische System lieferte schließlich eine Trennung von Saponintestgemischen bei guter Peakform und reproduzierbaren Retentionszeiten. Auch die Eignung zur Verwendung in LC-NMR-Systemen ist gegeben, so daß Ammoniumformiat als Standardpuffer für HPLC-Untersuchungen eingesetzt wurde.

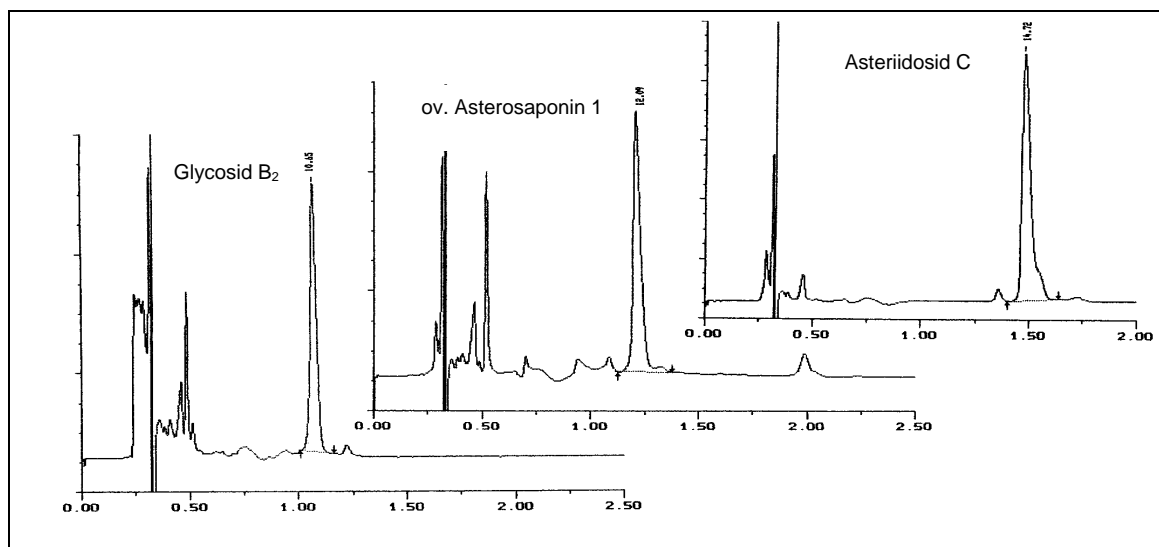


Abbildung 20: Chromatographisches System mit Ammoniumpuffer. HPLC-Chromatogramme von Glycosid B₂, ov. Asterosaponin 1, Asteriidosid C.

3.3.4. Entfernung des Ammoniumpuffers

Wie oben ausgeführt, erwies sich bei der HPLC ein Zusatz von Ammoniumionen zum Eluenten als notwendig. Für semi-präparative Anwendungen mußte jedoch eine Möglichkeit gefunden werden, die Ammoniumsalze nach der chromatographischen Trennung wieder von der isolierten Zielverbindung entfernen zu können. Dies sollte zum einen auf möglichst einfache Weise geschehen, um Substanzverluste durch aufwendige Arbeitsschritte zu verhindern, zum anderen sollten die Bedingungen möglichst schonend sein, um chemische Zersetzung der Substanz auszuschließen.

Die flüchtigen Ammoniumcarbonate erschienen in diesem Zusammenhang als gut geeignet.¹⁴⁶ Diese Salze lassen sich beim Abrotieren des Lösemittels rückstandslos von der Probe entfernen. Wegen seines günstigeren pH-Wertes in wässriger Lösung (pH 7,9 der 20 mM Lösung) wurde das Hydrogencarbonat eingesetzt.

Die gewählte Prozedur zur thermischen Entfernung des Puffers unter Vakuum ist sehr schonend, da die Substanz maximal bis auf 38 °C erwärmt wird und einem nur leicht alkalischen pH-Wert ausgesetzt ist (siehe Abschnitt 10.3.4.2). Anhand von NMR-Untersuchungen wurde gezeigt, daß sich Glycosid B₂ während einer solchen Aufreinigung nicht verändert.

3.4. Resultate - Notwendigkeit einer zielgerichteten Isolierung von Asterosaponinen

Die Aufarbeitung der Seesternextrakte mit Hilfe der präparativen Säulenchromatographie lieferte nur in den wenigen Fällen der Hauptkomponenten von *Asterias rubens* (Asteriidosid C, Glycosid B₂ und ovarian Asterosaponin 1) Reinsubstanzen, die geeignet waren, direkt NMR-spektroskopisch vermessen zu werden. Die detaillierte Strukturaufklärung dieser Verbindungen mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Methoden wird in Abschnitt 8.4.1 beschrieben.

Während Glycosid B₂ und ovarian Asterosaponin 1 bereits in anderen Seesternen gefunden worden waren,^{32,33} war die Struktur der dritten aufgeklärten Hauptverbindung zunächst noch nicht beschrieben. Ende 1998 wurde sie jedoch von De Marino et al. als Asteriidosid C publiziert.¹³⁴

Neben den drei Hauptverbindungen konnten zwar noch in einem Fall die beiden Komponenten eines nicht getrennten Isomerengemisches mittels NMR aufgeklärt werden (Asterosid C/ Ruberosid F, siehe Abschnitt 8.3.6), für die weiteren Mischfraktionen war jedoch eine zusätzliche Feinauftrennung mittels der in Abschnitt 3.3 beschriebenen HPLC-Methode nötig. So wurde beispielsweise im Fall der Strukturaufklärung von Versicosid A folgendermaßen vorgegangen: Die LC-MS-Untersuchung einer Feinfraktion der Säulenchromatographie zeigte ein Saponin mit sechs Zuckereinheiten und der Molekülmasse m/z 1405 als Hauptkomponente an. Anschließende Aufreinigung der Probe mittels HPLC und eine umfassende ein- und zweidimensionale NMR-Untersuchung (Abschnitt 8.4.2) ergaben schließlich die bereits beschriebene Struktur von Versicosid A. Der Arbeitsaufwand dieser Aufarbeitung und Strukturaufklärung betrug etwa eine Woche, davon zwei Tage reine Spektrometermesszeit. Hinzu kam ferner der zeitliche Aufwand für die Interpretation der NMR-Spektren.

Angesichts weiterer noch zur Untersuchung anstehender Feinfraktionen, welche zum Teil mehr als sechs Komponenten enthielten, erschien diese nicht zielgerichtete Vorgehensweise als zu langsam und zu uneffektiv für die Suche nach bislang noch unbekanntem Asterosaponinen.

Es wurde daher eine Lösung angestrebt, mittels einer Screeningmethode rasch abschätzen zu können, ob die in Frage kommenden Feinfraktionen neue Verbindungen enthalten und somit den Aufwand einer weiteren Aufarbeitung rechtfertigen.

Da die Strukturaussagen der LC-MS-Kopplung im Fall von Asterosaponinen mit einer Vielzahl von Isomeren begrenzt war, fiel die Wahl auf die LC-NMR und später auf die LC-NMR-MS-Kopplung. Die LC-NMR-Kopplung gewann seit etwa 1997 auf dem Gebiet der Naturstoffaufklärung zunehmend an Bedeutung (siehe Literaturübersicht Kap. 1.5) . Ihre Eignung zur Charakterisierung von Gemischen komplexer Glycoside im Molmassenbereich zwischen 1200 und 1400 Masseneinheiten war jedoch bislang noch nicht erprobt.

Die Anforderungen an eine geeignete LC-NMR-Screening-Methode waren:

- Das sichere Erkennen von neuen Bestandteilen neben bereits bekannten Verbindungen zur selektiven Auswahl von Verbindungen für eine semi-präparative Isolierung. Dabei ist eine vollständige Strukturaufklärung zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht notwendig.
- Hohe Trennleistung des chromatographischen Systems, wobei in Abhängigkeit von der Komplexität der NMR-Spektren auch teilweise Koelution toleriert werden kann.
- Geringer Arbeitsaufwand beim Aufsetzen und Durchführen der LC-NMR-Messung, da weitere NMR-Messungen im off-line Modus folgen.
- Kompatibilität des Eluentensystems mit den Anforderungen der LC-MS, um vergleichbare Massenchromatogramme bzw. eine direkte LC-NMR-MS-Kopplung zu ermöglichen.

4. Aufbau einer LC-NMR-MS-Methode

4.1. LC

Zur Entwicklung der LC-NMR-Methode wurde von der in Abschnitt 3.3 vorgestellten HPLC-Methode ausgegangen.

Wegen der Komplexizität der zu untersuchenden Asterosaponingemische wurde ein on-flow-Ansatz gewählt, um auch teilweise koeluiierende Verbindungen unterscheiden zu können, was bei einem stopped-flow-Ansatz nur bedingt möglich ist. Zudem ermöglicht ein on-flow-Chromatogramm einen raschen Überblick bezüglich der Zusammensetzung einer zunächst unbekannt Probe, aufgrund dessen dann über weitere Untersuchungen entschieden werden kann.

4.1.1. Wahl der Flußrate

In der Regel werden für on-flow-Experimente im Vergleich zu konventioneller HPLC verringerte Flußraten eingesetzt (siehe Abschnitt 2.3.2), um längere Aufnahmezeiten für die NMR zu ermöglichen. Durch Spektrenakkumulation wird das Signal/Rausch-Verhältnis zwar erhöht, doch ist die Verbesserung nur proportional zur Wurzel der Scanzahl (Gleichung 5). Um optimale Bedingungen zu erreichen, muß sichergestellt sein, daß die Analyten mit der höchstmöglichen Konzentration von der Säule eluieren, d. h. es sollte bedingt durch die langsamen Flußraten zu keiner Peakverbreiterung und damit zu einer Verdünnung des Analyten kommen. Da das S/R-Verhältnis einer NMR-Messung direkt proportional zur Anzahl der Kerne in der Meßzelle ist (Gleichung 6), könnte eine Peakverdünnung auch durch die längere Spektrenakkumulation nicht mehr kompensiert werden.

Die Trennstufenhöhe und damit auch das Peakelutionsvolumen hängt nach der Van-Deemter-Gleichung von drei Faktoren ab:

- der Eddy-Diffusion und Strömungsverteilung,
- der Längsdiffusion und
- dem Stoffaustausch.

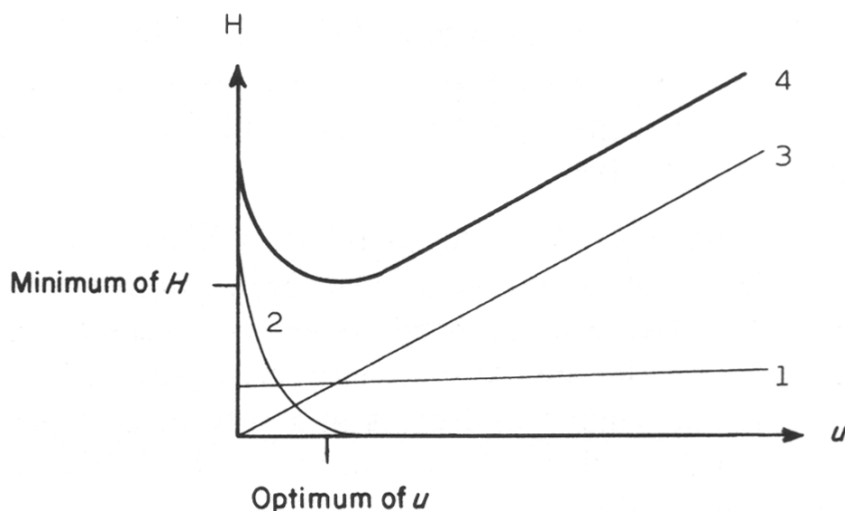


Abbildung 21: Van-Deemter-Kurve: Abhängigkeit der Trennstufenhöhe vom linearen Fluß. 1 Beitrag von Eddy-Diffusion und Strömungsverteilung, 2 Komponente der Längsdiffusion, 3 Stoffaustauschterm, 4 Resultierende.

Während sich geringe Flußraten günstig auf die Strömungsverteilung und den Stoffaustausch auswirken, nimmt die Längsdiffusion mit langsamen Flüssen zu (Abbildung 21).

Unterschreitet die lineare Fließgeschwindigkeit u das nachstehende Minimum, wird die Längsdiffusion bestimmend und es kommt zur Peakverbreiterung:¹⁴⁴

$$u < 2D_m/d_p$$

Gleichung 14

D_m : Diffusionskoeffizient

d_p : Partikeldurchmesser

Der Diffusionskoeffizient großer Moleküle ist geringer als der kleiner Moleküle.

Nach Wilke und Chang^{a,144} errechnet er sich für ein Molekül mit der Molmasse eines

$$^a D_m [m^2 s^{-1}] = \frac{7,4 \cdot 10^{12} \sqrt{\Psi M T [K]}}{\eta [mPa \cdot s] \cdot (V_s [cm^3 mol^{-1}])^{0,6}} \cdot k$$

mit:

Ψ : Lösemittelkonstante (Methanol: 1,9)

M: Molare Masse des Lösemittels

T: absolute Temperatur

η : Viskosität des Lösemittels

V_s : Molares Volumen des Analyten (Molmasse d. Analyten geteilt durch seine Dichte)

k: Korrekturfaktor für große Moleküle (Molmassenbereich 10^3 : 1,3)

Asterosaponins von 1400 Einheiten in einem Methanol/Wasser-Gemisch 50:50 (v/v) unter Vernachlässigung von Dichteunterschieden in erster Näherung zu $0,15 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. Aus Gleichung 14 ergibt sich demnach bei einem Packungsmaterial von $4 \mu\text{m}$ Partikeldurchmesser eine minimale Flußgeschwindigkeit von $0,75 \cdot 10^{-4} \text{ m/s}$, dies entspricht nach Gleichung 15 einer Flußrate F von $0,06 \text{ ml/min}$.

$$F = \frac{ud_c^2 \pi \epsilon_{tot}}{4}$$

Gleichung 15

d_c^2 : Innendurchmesser der Chromatographiesäule

ϵ_{tot} : Gesamtporosität des Füllmaterials (für poröse HPLC-Füllmaterialien: 0,8)

Wie aus dieser Betrachtung ersichtlich, liegt die optimale Flußrate in diesem Fall deutlich unter den normalerweise in der HPLC verwendeten Werten von etwa 0,8 bis 1,0 ml/min.

M. Godejohann¹²¹ konnte in systematischen Untersuchungen zeigen, daß das Van-Deemter-Optimum für Nitroaromaten ($M \approx 200 \text{ g/mol}$) in dem von ihm verwendeten System bei Flußraten zwischen 0,05 und 0,2 ml/min lag. Für spät eluierende Verbindungen wurde mit Reduzierung der Flußrate eine stärkere Abnahme der Peakschärfe festgestellt, als für solche, die früh eluieren.

Um für die Analytik von Asterosaponinen eine geeignete Flußrate zu ermitteln, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Saponingemisch bei verschiedenen Flußraten mittels LC-MS untersucht. Als Entscheidungskriterium wurde das Peakelutionsvolumen V_p (berechnet als Produkt aus Peakhalbwertsbreite $w_{1/2}$ und Flußrate F) herangezogen:

$$V_p = w_{1/2} \cdot F$$

Gleichung 16

In Tabelle 4 ist das eluierte Peakvolumen einzelner Asterosaponine in Abhängigkeit von der Flußrate dargestellt:

Tabelle 4: Peakvolumina [ml] von Asterosaponinen in Abhängigkeit von der Flußrate,

Flußrate [ml/min]	Glycosid B ₂	Ruberosid D	Ruberosid B
0,8	0,26	0,43	0,60*
0,4	0,21	0,37	0,46*
0,1	0,18	0,26	0,39*
0,05	0,17	0,25	0,64*

* Peak zeigt Tailing (siehe Text)

Die Werte zeigen, daß sowohl für ein früh eluierendes (Glycosid B₂) als auch ein spät eluierendes Asterosaponin (Ruberosid D) bei langsamen Flußraten bis hinunter zu 0,05 ml/min noch keine Peakverbreiterung auftritt. Die Peakvolumina sind geringer, als bei der konventionellen Flußrate von 0,8 ml/min. Dieses Ergebnis stimmt auch mit dem oben für Asterosaponine berechneten theoretischen Wert überein. Offensichtlich befindet man sich in diesem Flußratenbereich in einem relativ breiten Van-Deemter-Minimum.

Eine Besonderheit tritt jedoch bei Asterosaponinen mit einer Deoxy-xylo-hexulose-Einheit in der Glycosidkette (Ruberosid B) auf: hier zeigt sich bei niedrigeren Fließgeschwindigkeiten ausgeprägtes Tailing. Es wird vermutet, daß das Gleichgewicht zwischen der hydratisierten und der nichthydratisierten Ketofunktion im Zuckerring für dieses Verhalten verantwortlich ist (siehe Abschnitt 8.3.1.3). Da die LC-NMR-MS als allgemeine Screeningmethode für zunächst unbekannte Substanzen eingesetzt werden sollte, wurde die Flußrate nach dem Verhalten von Asterosaponinen ausgerichtet, die keine Deoxy-xylo-hexulose-Zucker enthalten. Im folgenden wurde eine Flußrate von 0,05 ml/min für on-flow-Experimente verwendet.

4.2. NMR

4.2.1. Wahl der Lösemittelunterdrückung

Zur Lösemittelunterdrückung wurde die leistungsfähige, variable und besonders für on-flow-Chromatogramme geeignete WET-Sequenz eingesetzt (siehe Kap. 2.3.6). Um die ^{13}C -Satelliten des Acetonitrils zu unterdrücken, wurde zeitgleich mit den vier WET-Selektivpulsen auf dem ^{13}C -Kanal entkoppelt. Auf eine Entkopplung während der Aufnahme des FIDs wurde wegen der zusätzlichen Probenerwärmung verzichtet. Bei Acetonitril-Anteilen im Eluenten zwischen 34 und 38 % (v) konnten auf diese Weise Empfängerempfindlichkeiten (*receiver gain*, bestimmt mit rga-Automationsroutine) zwischen 4096 und 8192 erzielt werden.

4.2.2. Relaxationsverhalten – Pulswiederholungszeit – NMR-Quantifizierung

Die Pulswiederholungszeit (Pulse Repetition Time) ist die Zeitspanne, die zwischen zwei NMR-Lesepulsen liegt, d. h. es ist diejenige Zeit, die für einen gesamten Scan benötigt wird. Sie setzt sich in diesem Fall aus der Acquisitionszeit aq , dem Relaxationsdelay $d1$ sowie den für die WET-Unterdrückung und feste Schalt delays benötigten Zeit zusammen. Wird sie kurz gewählt, kann eine höhere Anzahl an Scans akkumuliert und somit das S/R-Verhältnis verbessert werden. Allerdings sind die Protonen dann u. U. nicht voll ausrelaxiert, so daß Signalverminderung auftreten kann.

Die NMR stellt einen universellen Detektor dar, der alle NMR-aktiven Kerne unabhängig von ihrer chemischen Umgebung mit der gleichen Empfindlichkeit („Response“) aufzeichnet. Um die NMR für quantitative bzw. semiquantitative Messungen einzusetzen, muß jedoch sichergestellt sein, daß die betrachteten Kerne zwischen den einzelnen Scans ausreichend Zeit zum relaxieren haben. M. Godejohann konnte zeigen, daß mittels on-flow-LC-NMR quantifiziert werden kann, sofern das Relaxationsverhalten der betrachteten Kerne berücksichtigt wird.¹²¹

Um die Eignung der LC-NMR zur Quantifizierung von Asterosaponinen zu erproben, wurde von Glycosid B₂ eine Kurve der Signalintensität (Integral) in Abhängigkeit von der Pulswiederholungszeit aufgenommen (Abbildung 22).

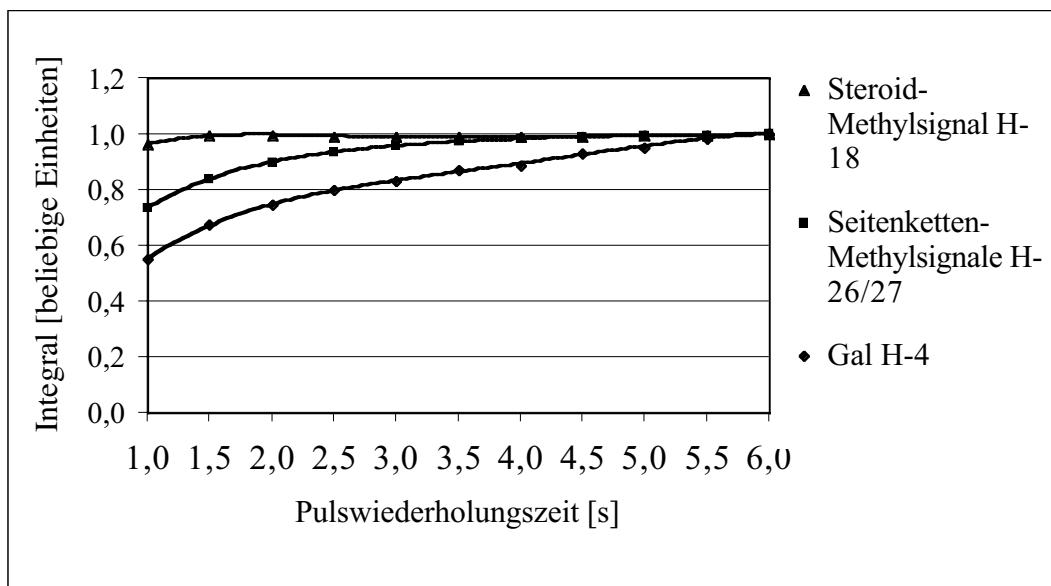


Abbildung 22: Abhängigkeit der Signalintensität (Integral) von Glycosid B₂ von der Pulswiederholungszeit

Aus den Daten ist ersichtlich, daß die Steroid-Methylsignale A-H₃-18 und H₃-19 (nicht gezeigt) ab einer Wiederholungszeit von 1,5 s vollständig ausrelaxiert sind. Die Seitenketten-Methylgruppen A-H₃-26/27 erreichen ihr Signalmaximum dagegen erst bei 4 s, während das Zuckersignal Gal-H-4 selbst nach 6 s noch nicht sein volles Integral aufweist. Die Pulswiederholungszeit wurde daher für die on-flow-LC-NMR Experimente auf 2 s gesetzt, um ausreichend schnelle Spektrenakkumulation bei Wahrung der quantitativen Auswertung über die Steroidgerüst-Methylgruppen zu ermöglichen. Diese aufgrund des starren Steroidgerüsts schnell relaxierenden Signale stellen eine für die LC-NMR-Quantifizierung gut geeignete Sonde dar, da die meisten anderen Protonenresonanzen längere Relaxationszeiten aufweisen. Die T₁-Zeiten dieser Methylgruppen wurden bei ov. Asterosaponin zu 0,4 s bestimmt, während diejenigen der Kohlenhydratresonanzen bis zu 2 s betragen.

Grundsätzlich gibt es zwei Arten, quantitative LC-NMR-Messungen durchzuführen: durch Zumischen eines Standards zum Eluenten oder durch Injektion einer Standardsubstanz zusammen mit der Probe auf die Säule. Kleine, dem Eluenten zugemischte Verbindungen relaxieren jedoch in der Regel langsamer als die Steroid-Methylgruppen und sind daher nicht als Quantifizierungsstandard geeignet. Deshalb kommt in diesem Fall nur die Zugabe eines internen Standards in Frage. Da jedoch keine Asterosaponinstandards kommerziell erhältlich sind, werden in Abschnitt 7 re-

lative quantitative Daten angegeben. LC-NMR bietet die einzigartige Möglichkeit, quantitative Aussagen über Verbindungen zu treffen, für die keine Standardverbindungen zur Verfügung stehen.¹²¹ Die Methode bietet sich daher besonders für die Naturstoffanalytik an, wo Gemische unbekannter Verbindungen charakterisiert werden müssen.

4.2.3. Scanzahl vs. zeitliche Auflösung

Bei der Wahl der Anzahl an Scans, die pro Reihe (Spektrum) aufgenommen werden, muß zwischen günstigem S/R-Verhältnis und ausreichender zeitlicher Auflösung des Chromatogramms abgewogen werden. Die Scanzahl wurde so gewählt, daß früh eluierende Verbindungen, wie z. B. Glycosid B₂ durch 2 bis 3 Reihen (Spektren) charakterisiert sind. Um die aufgrund des großen Volumens der NMR-Durchflußzelle (120 µl) bedingte Peakverbreiterung zu berücksichtigen, wurde sich dabei an der Peakbreite im NMR-Chromatogramm (nicht im UV-Chromatogramm) orientiert. Bei 108 Scans pro Reihe wurde so alle 3,6 min ein Spektrum aufgezeichnet.

4.2.4. Gradientenelution

Um die HPLC-Trennung der Asterosaponine zu optimieren, wurde eine HPLC-Methode mit Gradientenelution entwickelt. Ziel war es, die früh eluierenden Komponenten möglichst weit zu trennen, ohne daß die Elutionszeiten für spät eluierende Verbindungen übermäßig lang würden bzw. diese Komponenten überhaupt nicht mehr von der Säule eluierten. Das Chromatogramm sollte sozusagen im vorderen Bereich gespreizt und im hinteren Bereich gestaucht werden. Durch Anlegen eines Fließmittelgradienten würde zudem der Neigung spät eluierender Peaks zum Tailing entgegengewirkt werden.

Wegen des engen Polaritätsbereichs, in dem die Asterosaponine eluieren, wurde ein flacher Gradient gewählt, der lediglich 7,2% Prozentpunkte in 570 min überstreicht (0-130 min: 34 % Acetonitril, linearer Gradient, 700 min: 41,2 % Acetonitril).

Versuche im LC-NMR-MS-System lieferten jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Bei der verwendeten geringen Flußrate (0,05 ml/min) zeigte sich im NMR-Chromatogramm eine deutliche Peakverbreiterung. Dieser Effekt wurde allerdings nur dann beobachtet, wenn ein Fließmittelgradient durch den Probenkopf eluierte. An Stellen des Chromatogramms, an denen isokratisch eluiert wurde (isokratische Haltephase am Ende des Chromatogramms), trat das Problem nicht auf.

Die Tatsache, daß im MS-Chromatogramm desselben Laufes keine Peakverbreiterung beobachtet wurde, deutete darauf hin, daß das Problem mit dem großen Detektionsvolumen des 4 mm-LC-Probenkopfes (120 µl) zusammenhängt. Mit einem 3 mm-Durchflußprobenkopf konnten daraufhin auch zufriedenstellende Resultate erzielt werden. Es wird vermutet, daß sich bei der relativ langen Verweilzeit in der großen Probenzelle durch die Gradientenelution bedingte Dichteunterschiede (der nachströmende Eluent hat eine geringere Dichte) peakverbreiternd auswirken.

Die entsprechenden Chromatogramme finden sich in Abschnitt 7.3. Durch den Fließmittelgradienten eluieren die Asterosaponinpeaks schärfer. Die Trennung - insbesondere der früh eluierenden Verbindungen voneinander - ist gegenüber der isokratischen Methode mit dem 4 mm-Durchflußprobenkopf verbessert (Abbildung 39 f).

Ein Nachteil des 3 mm-Durchflußprobenkopfes ist jedoch seine - verglichen mit dem 4 mm-Kopf - geringere Empfindlichkeit, die durch das kleinere Detektionsvolumen bedingt ist (siehe Gleichung 6). Dieser Nachteil wird allerdings durch die höhere Peakschärfe zumindest teilweise wieder kompensiert. Im vorliegenden Fall konnte das S/R-Verhältnis des isokratischen Laufes im 4 mm-Kopf dennoch nicht erreicht werden. Die Werte sind jedoch nicht direkt miteinander vergleichbar, da mit dem 3 mm-Kopf keine Unterdrückung der ¹³C-Satelliten des Acetonitrils durch Kohlenstoffentkopplung durchgeführt werden konnte (es handelte sich um einen 3 mm-Durchflußprobenkopf für Protonen und ¹⁹F-Kerne). Außerdem wurde ein MSPD-Extrakt einer anderen Aufarbeitung vermessen. Es bleibt daher im Einzelfall zwischen chromatographischer Trennschärfe und Detektionsempfindlichkeit abzuwägen.

4.3. MS

4.3.1. Aufbau der MS-Methode

Für die Etablierung einer ESI-MS-Methode zur Untersuchung von Asterosaponinen wurde mittels einer Spritzenpumpe eine Lösung von 50 µg/ml Asteriidosid C im HPLC-Eluenten in die Ionenquelle injiziert (Flußrate 4 µl/min). Ausgehend von der ESI-Standardmethode wurden zuerst die Potentiale von Kapillare und Endplatte, anschließend diejenigen vom ersten Skimmer sowie des Kapillarenausgangs derart optimiert, daß die Standardsubstanz a.) mit möglichst hoher Intensität und b.) möglichst

unfragmentiert detektiert wird. Als weniger kritisch erwiesen sich die Werte für die Oktopole und elektrostatischen Linsen und bedurften weniger Anpassung. Die verwendeten MS-Parameter finden sich im experimentellen Teil (Kap. 10.3.5).

4.3.2. MS-Spektren in deuteriumoxidhaltigen Eluenten

Acide Protonen, wie z. B. von Hydroxy- oder Amino-Gruppen, tauschen in deuteriumoxidhaltigen HPLC-Eluenten gegen Deuterium aus. Im Massenspektrum erscheint das Molekülion daraufhin nach höheren Massen verschoben. Um zu erproben, ob sich dieser Austausch quantitativ vollzieht oder ob es zu Massenverteilungen kommt, die auf einen teilweisen Austausch hindeuten, wurde eine Meßreihe mit Asteriidosid C in verschiedenen HPLC-Eluenten aufgenommen. Abbildung 23 zeigt die erhaltenen Spektren. Der Austausch erfolgt offensichtlich schnell und quantitativ. Aus der Differenz der Molekülionenmassen kann auf die Anzahl der austauschenden Protonen geschlossen werden. Bei Asteriidosid C sind es 15 (m/z 1388 – m/z 1373) acide Protonen.

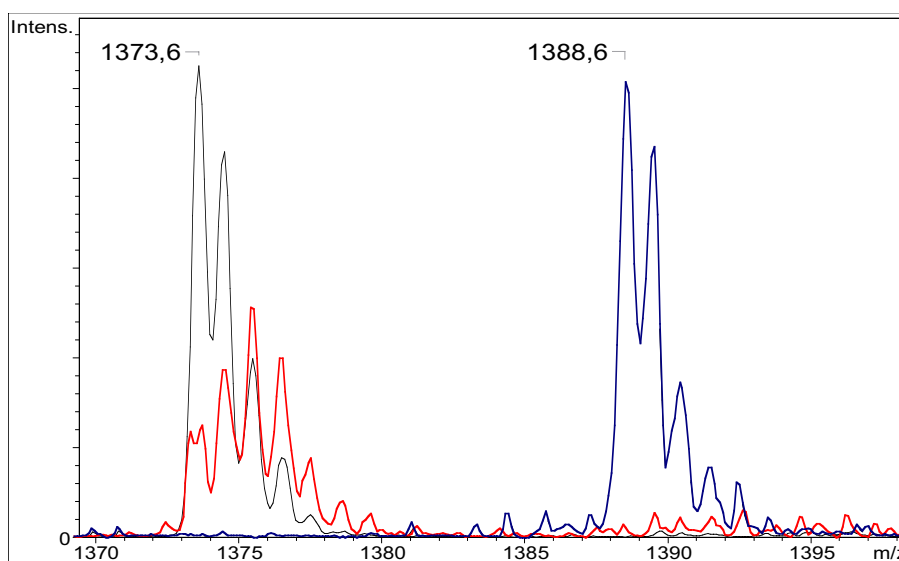


Abbildung 23: Deuteriumaustausch von Asteriidosid C; schwarz: in $\text{NH}_4\text{Formiat}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, blau: in $\text{ND}_4\text{Formiat}/\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, rot: D-H-Rücktausch durch Zugabe von Wasser

Weiterhin wurde erprobt, ob Protonen, die sich in α -Stellung zu einer Carbonylfunktion befinden, unter den gegebenen Bedingungen C-H-Acidität zeigen und gegen Deuterium austauschen. Dazu wurde Glycosid B₂ über drei Tage in deuteriumoxid-

haltigen Eluenten ($\text{NH}_4\text{Formiat}/\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ bei pH 6,3 und $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ bei pH 7,9) stengelassen und anschließend im Massenspektrometer vermessen. Nach drei Tagen zeigte sich in beiden Fällen keine Veränderung des Massenspektrums und somit kein detektierbarer Austausch an potentiell C-H-aciden Positionen (Abbildung 24).

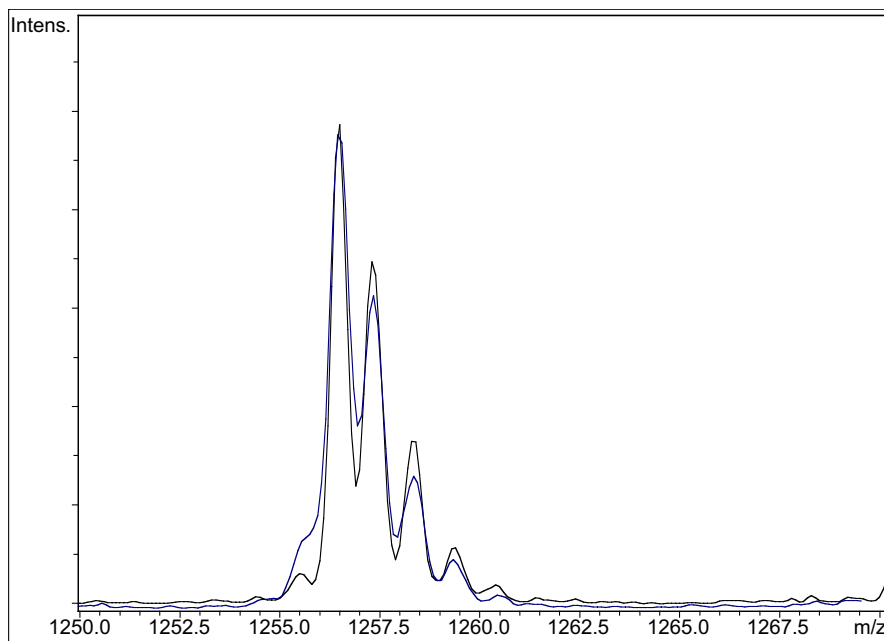


Abbildung 24: Massenspektrum von Glycosid B₂ in $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, anfänglich (blau) und nach drei Tagen (schwarz)

4.3.3. D-H-Rücktauschexperimente

Um beim HPLC-NMR-MS-Experiment Rückschlüsse auf die Molmasse der undeuterten Verbindung und damit auf die Zahl der austauschenden Protonen ziehen zu können, wurden D-H-Rücktauschexperimente durchgeführt. In Abbildung 23 ist der Molekülionenpeak von Asteriidosid C nach Zugabe von Wasser dargestellt (rotes Spektrum). Der Rücktausch erfolgt schnell.

Im verwendeten LC-NMR-MS-Aufbau (Abbildung 15) wurde mittels einer Spritzenpumpe über ein T-Stück Wasser bzw. Ammoniumformiatpuffer zum deuteriumoxidhaltigen Eluentenstrom gegeben. Die Zugabe erfolgte im Verhältnis 1:4. Abbildung 25 zeigt ein Massenspektrum von ov. Asterosaponin 1 eines solchen LC-MS-Laufes. Aufgrund der Anwesenheit von restlichem Deuteriumoxid im Eluenten liegt die am

häufigsten auftretende Masse bei $[M+2]^-$, während das eigentliche Molekölion dennoch deutlich bei m/z 1257 zu erkennen ist.

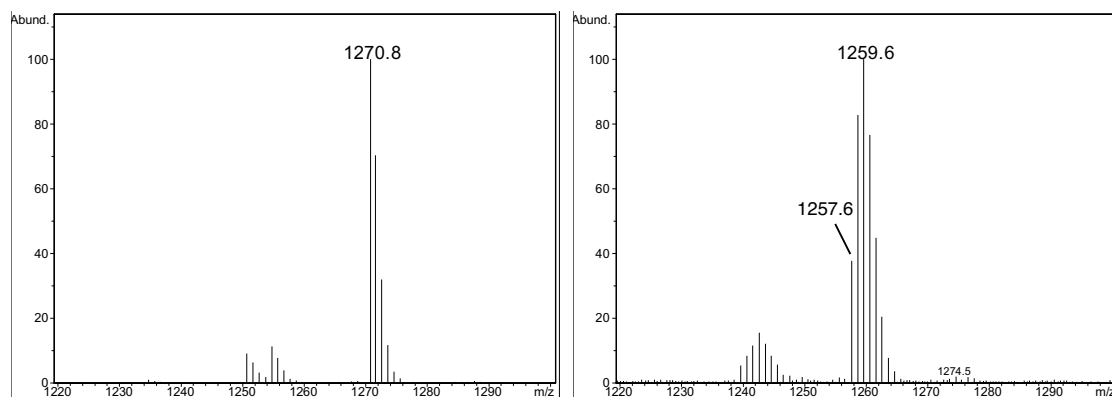


Abbildung 25: Massenspektrum von ov. Asterosaponin 1 unter D-H-Rücktauschbedingungen des LC-NMR-MS-Systems: links in deuteriertem Eluenten, rechts Rücktausch durch Zugabe von Wasser im Verhältnis 4:1.

4.3.4. Bestimmung der Transferzeiten im LC-NMR-MS-System

Um MS-ausgelöste stopped-flow-Experimente durchzuführen, ist die Kenntnis der Transferzeiten des Systems nötig. Zur Bestimmung der Zeit, die zwischen der Ankunft eines gesplitteten Peaks am MS und am NMR-Spektrometer liegt, wurde folgendermaßen vorgegangen:

Nach Injektion einer Standardsubstanz (p-Hydroxybenzoesäure-Methylester) wird am NMR-Spektrometer ein on-flow-Experiment gestartet, bei dem genau ein Spektrum pro Sekunde aufgenommen wird. Darauf notiert man diejenige Reihe, die gerade vom NMR aufgezeichnet wird, wenn der Peak das Massenspektrometer erreicht. Aus dem erhaltenen NMR-Chromatogramm kann dann diejenige Reihe abgelesen werden, bei der die Testsubstanz den NMR-Probenkopf durchfließt.

Die „Transferzeit“ MS-NMR, also die Differenz der beiden abgelesenen Zeiten/Reihen, wurde so für den gegebenen Aufbau des LC-NMR-MS-Systems bei einer Flußrate von 0,5 ml/min, einem Splitverhältnis von 1:20 sowie einer Zugabe von Wasser über die Spritzenpumpe im Verhältnis 4:1, zu 17 Sekunden bestimmt.

4.4. Zusammenfassung

Gegenstand dieses Kapitels war die Entwicklung einer LC-NMR-MS-Methode zur Untersuchung von Asterosaponingemischen.

Für die Screeninguntersuchungen wurde ein on-flow-Ansatz bei niedrigen Flußraten gewählt. Es zeigte sich, daß die Flußrate bis auf 0,05 ml/min reduziert werden kann, ohne daß Peakverbreiterung durch Längsdiffusion auftritt. Eine Ausnahme hiervon bilden Asterosaponine mit einer Deoxy-*xylo*-hex-ulose-einheit, die eine Tendenz zum Tailing aufweisen.

Bei einer Pulswiederholungszeit von 2 s erwiesen sich die Steroid-Methylgruppen A-H₃-18 und -19 als ausrelaxiert. Diese Signale können daher für quantitative Aussagen herangezogen werden.

Für die Gradientenelution bei niedrigen Flußraten zeigte sich ein 3 mm-Durchflußprobenkopf im Vergleich zu einem 4 mm-Standardkopf als besser geeignet.

Die MS-Spektren der Asterosaponine wurden im negativen ESI-Modus aufgenommen. Bei Verwendung von deuteriumoxidhaltigen Eluenten kommt es zum vollständigen H-D-Austausch der aciden Protonen, während an potentiell CH-aciden Positionen in α -Stellung zu einer Carbonylfunktion dagegen kein H-D-Austausch beobachtet wird. Durch D-H-Rücktauschexperimente eröffnet sich zudem die Möglichkeit, auch bei LC-NMR-MS-Experimenten auf das eigentliche Massen-/Ladungsverhältnis m/z der Analyten schließen zu können.

5 LC-NMR-MS-Untersuchungen von Asterosaponin-Feinfraktionen

5.1. Strukturinformation aus on-flow LC-NMR-Chromatogrammen

Wie in Abschnitt 3.4 ausgeführt, sollte die zu entwickelnde LC-NMR-MS-Screeningmethode eine rasche Identifizierung neuer Verbindungen in Gemischproben ermöglichen, um diese gezielt (semi-)präparativ isolieren zu können.

Eine eindeutige und vollständige Strukturaufklärung von unbekannt komplexen Verbindungen - wie Asterosaponinen - ist jedoch nur mit der Kenntnis der ^{13}C -spektroskopischen Daten möglich. Zudem sind noch eine Reihe verschiedener NMR-Experimente notwendig (siehe Kapitel 8.1), um

- das Kohlenstoffgerüst einer Verbindung aufzuklären (HMBC),
- einzelne Spinsysteme und Kopplungsnetzwerke zuzuordnen (TOCSY, COSY, selektive Experimente),
- die ^{13}C - mit den Protonendaten zu korrelieren (HMQC, HSQC) und
- die räumliche Anordnung der Protonen zueinander zu klären (NOESY, ROESY).

Die LC-NMR-Kopplung liefert wegen der begrenzten Stoffmenge jedoch ausschließlich Protonenspektren. Zwar steht im stopped-flow-Modus genügend Messzeit zur Verfügung, um zumindest zweidimensionale Protonenspektren aufzunehmen, jedoch konnten $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -korrelierte Spektren bisher nur in Ausnahmefällen von Hauptkomponenten in großem Überschuß erhalten werden.^{67,147}

Die ^1H -Übersichtsspektren, die mit einem on-flow-NMR-Chromatogramm erhalten werden, können wie in Kapitel 8.1 erläutert wird, wegen der starken Signalüberlappung, insbesondere im Bereich der Kohlenhydrat-Ringprotonen, nicht vollständig ausgewertet werden.

Um unbekannte Asterosaponine dennoch anhand von on-flow-Chromatogrammen näher zu charakterisieren, ergeben sich zwei Möglichkeiten:

- zum einen die Auswertung freistehender, leicht zuordenbarer Signale, wie z. B. olefinische Protonen, anomere Protonen sowie Kohlenhydrat- und Aglycon-

Methylgruppen. Diese Signale liegen entweder deutlich entschirmt in freien Bereichen des Spektrums oder sie geben scharfe, wenig aufgespaltene Signale.

- zum anderen der Vergleich von Subspektren unbekannter Verbindungen mit denen bekannter oder anderer unbekannter Substanzen, um strukturelle Ähnlichkeiten zu erkennen.

Da alle Asterosaponine das gleiche $3\beta, 6\alpha$ -Dihydroxy- 5α -cholest-9(11)en-Grundgerüst besitzen und sich lediglich in ihren Oligosaccharid- bzw. Steroidseitenketten unterscheiden (siehe Kap. 1.3.1), erwies sich vor allem der zweite Ansatz als besonders effektiv, da gleiche Aglyca oder Glycosidreste im on-flow-NMR-Chromatogramm übereinstimmende Subspektren ergaben. Im folgenden sollen Beispiele für beide Ansätze angeführt werden.

5.2. LC-NMR-MS Untersuchung der wirksamen Asterosaponin-Subfraktion 37-39M

5.2.1. On-flow-NMR-Chromatogramm

LC-MS-Voruntersuchungen der Fraktion mit der internen Bezeichnung 37-39M (siehe exp. Teil, Kap. 10.3.2) hatten gezeigt, daß sich diese Fraktion aus mehreren Asterosaponinen in vergleichbaren Mengenanteilen zusammensetzt. Um abschätzen zu können, ob neue bislang noch unbekannte Asterosaponine vorliegen, die eine semi-präparative Aufarbeitung (Abschnitt 3.3.4) und eine umfassende NMR-Strukturaufklärung (Abschnitt 8) rechtfertigen, wurde die Fraktion dem on-flow-LC-NMR-MS-Screening unterworfen.

Für dieses on-flow-Experiment wurde eine absolute Menge von 500 μg der Feinfraktion auf die HPLC-Säule injiziert. Zu Vergleichszwecken waren der Probe noch 40 μg des verbreiteten ovarian Asterosaponin 1 und 80 μg des neu aufgeklärten Asteriidosid C zugemischt. Das NMR-Chromatogramm zeigte fünf Hauptkomponenten in der Feinfraktion an (Abbildung 26 bis 28, Strukturformeln siehe Kapitel 8.3 und 8.4).

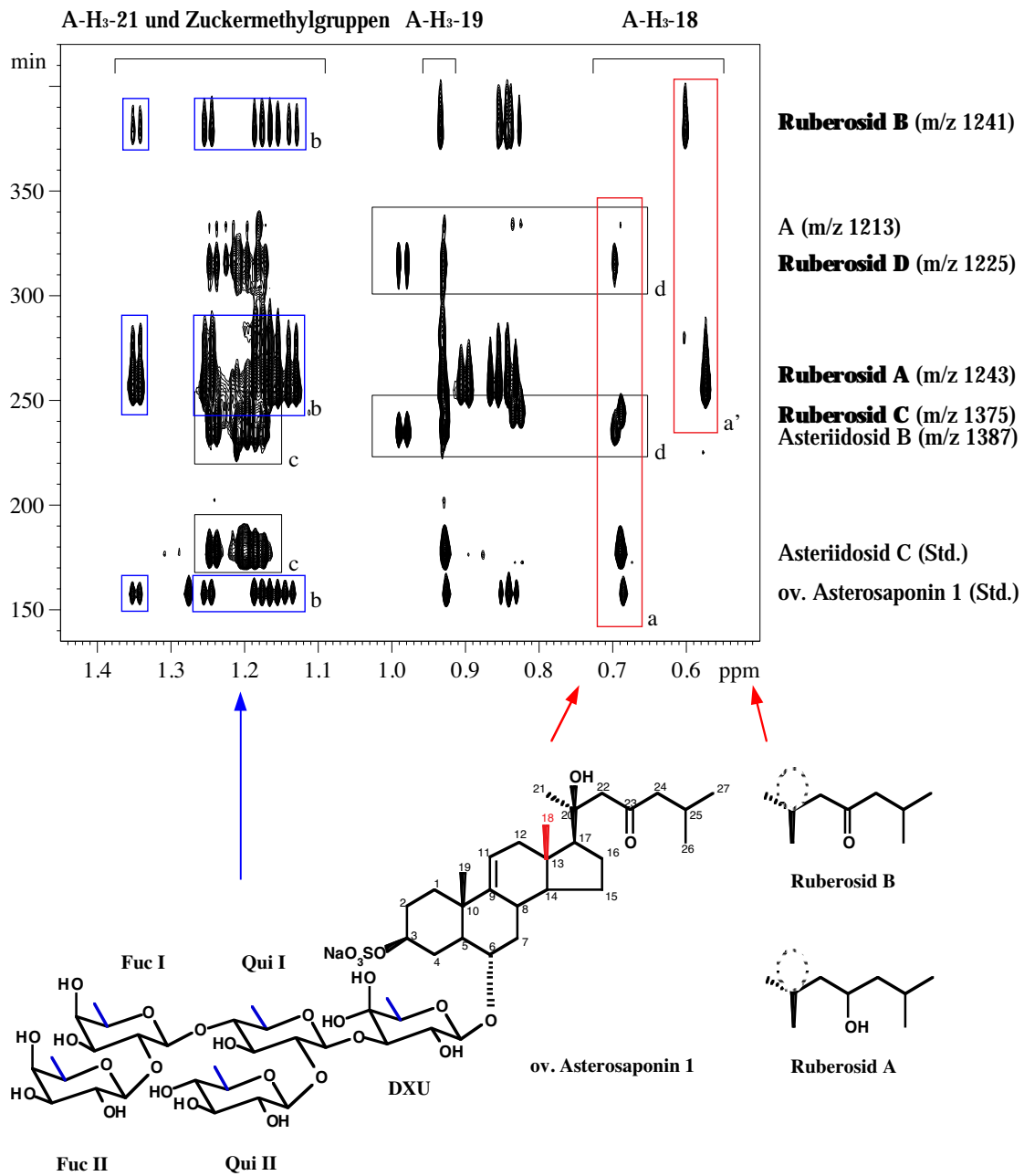


Abbildung 26: On-flow-NMR-Chromatogramm der Asterosaponin-Feinfraktion 37-39M (Konturplot). Ausschnitt des Bereichs der Methylprotonenresonanzen. Ov. Asterosid 1 und Asteriidosid C wurden der Probe zu Vergleichszwecken zugesetzt (Standardverbindung Std.). Die Rahmen zeigen strukturelle Analogien zwischen den Verbindungen an. Es sind die m/z der Molekülanionen $[M]^-$ angegeben

In Abbildung 26 ist der Methylprotonenbereich des Chromatogramms im Konturplot gezeigt. Die chemischen Verschiebungen der Methylgruppen sind für die Art des Aglycons hochcharakteristisch.¹⁴⁸ So besitzen die meisten Asterosaponine, wie z. B. die abgebildete Vergleichssubstanz ov Asterosaponin 1, an C-20 des Aglycons eine Hydroxyfunktion, was dazu führt, daß die H₃-18-Resonanzen dieser Verbindungen bei etwa δ_{H} 0,7 ppm erscheinen (Abbildung 26 rote Rahmen a). Die deutliche Hochfeldverschiebung dieser H₃-18-Signale bei Ruberosid A und B (Abbildung 26 roter Rahmen a') läßt hingegen darauf schließen, daß diese Verbindungen keine Hydroxygruppe an C-20 tragen. (Auf die gleiche Weise zeigt auch die Hochfeldverschiebung der H₃-21-Methylresonanzen das Fehlen einer 20-Hydroxygruppe an. Diese Dublettsignale sind jedoch im NMR-Chromatogramm schwer zuzuordnen, da sie mit den H₃-26/27-Dubletts zusammenfallen (Abbildung 26, Bereich zwischen δ_{H} 0,8 und 0,9 ppm)).

Weiterhin weist die Übereinstimmung der Kohlenhydrat-Methylresonanzen von Ruberosid A und Ruberosid B mit denen der Vergleichssubstanz ovarian Asterosaponin 1 darauf hin, daß diese drei Verbindungen die gleiche Oligosaccharidkette mit einer 6-Deoxy-xylo-hex-4-ulose-Einheit an das Aglycon geknüpft tragen (Abbildung 26 blaue Rahmen b). Diese Zuordnung wird auch durch die Übereinstimmung sowohl der anomeren Resonanzen als auch der Kohlenhydrat-Ringsignale zwischen δ_{H} 3,0 und 3,9 ppm unterstützt. (Abbildung 27, Rahmen b und Abbildung 28).

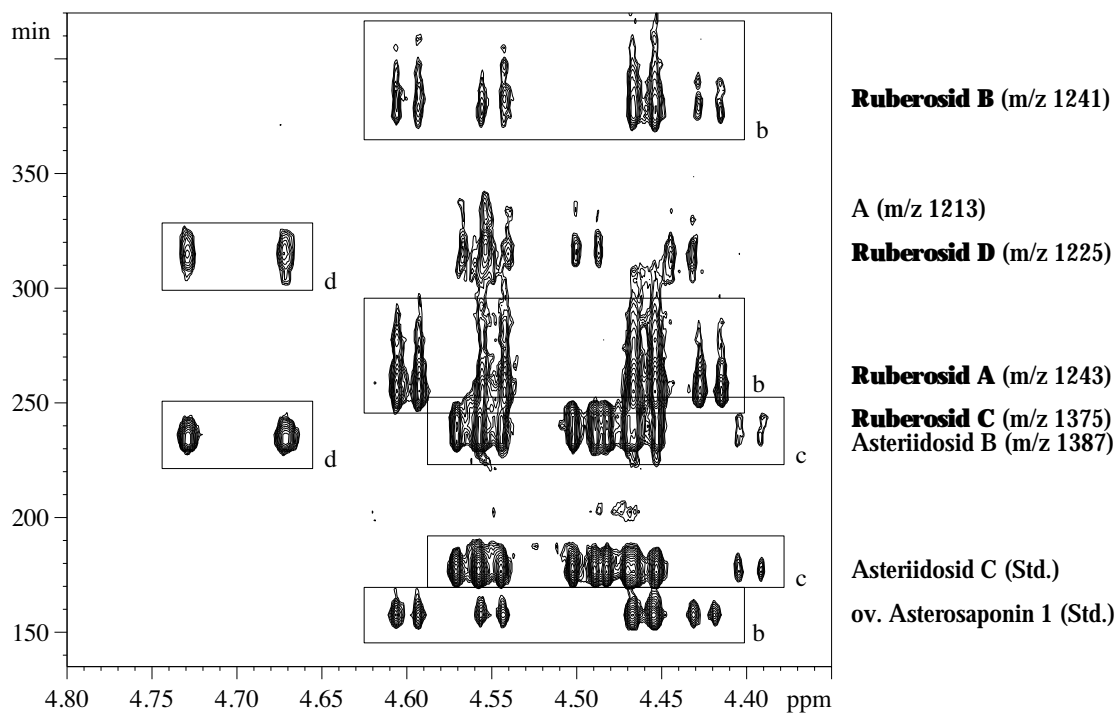


Abbildung 27: On-flow-NMR-Chromatogramm der Asterosaponin-Feinfraktion 37-39M (Konturplot). Ausschnitt des Bereichs der anomeren Protonenresonanzen.

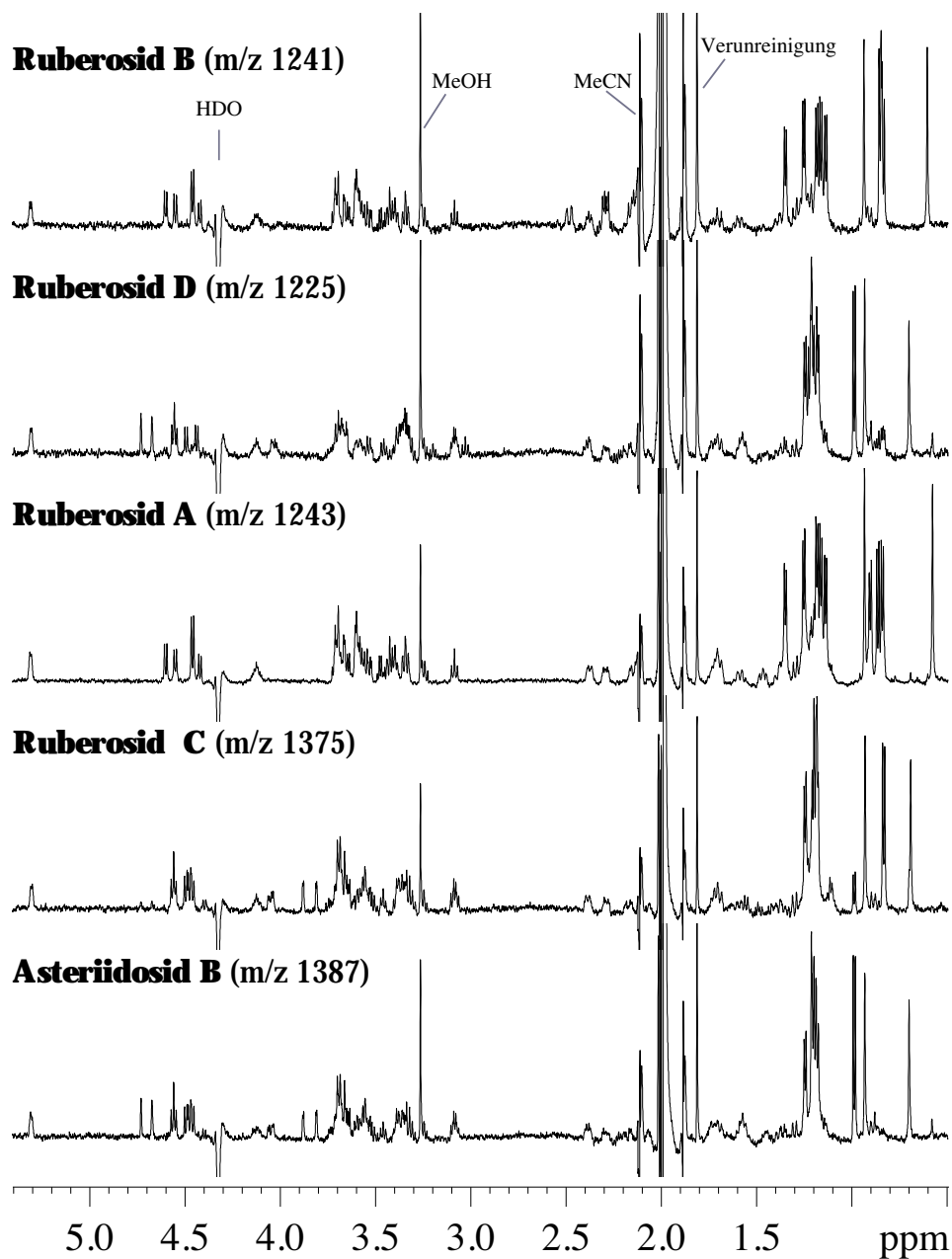


Abbildung 28: Aus dem on-flow-NMR-Chromatogramm der Asterosaponin-Feinfraktion 37-39M extrahierte ^1H -NMR-Spektren der Hauptkomponenten. Man beachte die Übereinstimmung der Zuckerring-Protonen von Ruberosid A und B sowie von Asteriidosid B und Ruberosid C (δ_{H} 3,00 – 3,90 ppm).

Analog ergab auch der Vergleich der Kohlenhydratresonanzen von Ruberosid C mit denen von Asteriidosid C, daß beide Verbindungen den gleichen Oligosaccharidteil besitzen (Rahmen c in Abbildung 26 sowie in Abbildung 27)

Ebenso führte auch die vergleichende Betrachtung der Aglycon-Resonanzen zur Identifizierung sich entsprechender Aglyconseitenketten. Die Verbindungen Asteriidosid B und Ruberosid D besitzen offensichtlich die gleiche Steroidseitenkette, da ihre Methyl- und olefinischen Signale übereinstimmen (Abbildung 26 und Abbildung 27 Rahmen d, unterer Teil). Darüber hinaus zeigt die nach Ruberosid D eluierende Minorkomponente A die gleichen Seitenketten-Methylsignale wie Ruberosid C. Man beachte hier die Ähnlichkeit der Signalmuster jeweils nacheinander eluierender Verbindungen (Abbildung 26, Rahmen d): Während bei Asteriidosid B ein Methyldoublett tieffeldseitig der H₃-19-Resonanz auftritt (δ_{H} 0,98 ppm), erscheint bei dem unmittelbar darauf eluierenden Ruberosid C ein Doublett auf der Hochfeldseite bei δ_{H} 0,83 ppm. Genau dieses Signalmuster wiederholt sich bei Ruberosid D (Methyldoublett bei δ_{H} 0,98 ppm) und der darauf folgenden Minorkomponente A (bei 0,83 ppm).

Von A wurden im on-flow-NMR-Chromatogramm nur die Methylresonanzen detektiert. Aufgrund der Übereinstimmungen der Kohlenhydrat-Methylresonanzen mit denen von Ruberosid D konnte jedoch ein Strukturvorschlag gemacht werden. Dieser wurde durch weitere ¹H-NMR-Daten, die nach Isolierung der Verbindung erhalten wurden, weiter unterstützt. Da jedoch nicht genug Substanz für ¹³C-Experimente vorlag, wurde die Struktur zunächst vorbehaltlich zugeordnet (siehe Kap. 8.4.3.1).

5.2.2. MS-Daten: D-H-Rücktauschexperimente

Die MS-Daten des on-flow-LC-NMR-MS-Laufes wurden bei negativer ESI-Ionisierung im Auto-MS/MS-Modus aufgenommen. Damit ist einerseits die Information über das Molgewicht der Analyten (die schonende Elektronenspray-Ionisierung liefert Molekülionenspektren) unmittelbar zugänglich und andererseits werden anhand der MS²-Fragmentationsmuster bereits Strukturinformationen erhalten (Abschnitt 8.2). Darüber hinaus erwies sich die zusätzliche Information über die Anzahl an austauschbaren Protonen im Molekül, die durch D-H-Rücktauschexperimente (siehe Abschnitt 4.3) erhalten wird, bei der Charakterisierung der Asterosaponine mit der LC-NMR-MS als besonders hilfreich:

Aus dem on-flow-NMR-Chromatogramm ließ sich bereits schließen, daß Ruberosid A und B den gleichen Saccharidrest wie ovarian Asterosaponin 1 besitzen und im Gegensatz zu diesem beide an C-20 keine Hydroxygruppe tragen. Das D-H-Rücktauschexperiment ergab nun folgende zusätzliche Daten:

Tabelle 5: Anzahl austauschender Protonen von drei Asterosaponinen mit gleicher Saccharidkette

	m/z^* (D_2O -haltiger Eluent)	m/z^* (D-H-Rücktausch)	austauschende Protonen
Ruberosid B	1253	1241	12
Ruberosid A	1256	1243	13
ovarian	1270	1257	13
Asterosaponin 1			

* des Molekülanions $[M]^-$

Die Tatsache, daß Ruberosid A ein austauschendes Proton mehr besitzt als Ruberosid B und ebenso viele wie ov. Asterosaponin 1, deutet zusammen mit der Molekülmasse darauf hin, daß Ruberosid A eine Hydroxygruppe in der Seitenkette des Aglycons trägt.

5.2.3. 2D-stopped-flow-Experimente - Strukturvorschläge

Die Anwesenheit dieser zusätzlichen Hydroxygruppe bei Ruberosid A wurde durch ein 2D-WET-TOCSY-Experiment im MS-ausgelösten stopped-flow-Modus an Position C-23 bestätigt. In Abbildung 29 ist die Korrelation zwischen einer Methinresonanz bei tiefem Feld (δ_{H} 3,67 ppm) und den Aglycon-Methylgruppen A-H₃-26/27 (δ_{H} 0,84/0,86 ppm) sowie A-H₃-21 (0,90 ppm) zu erkennen.

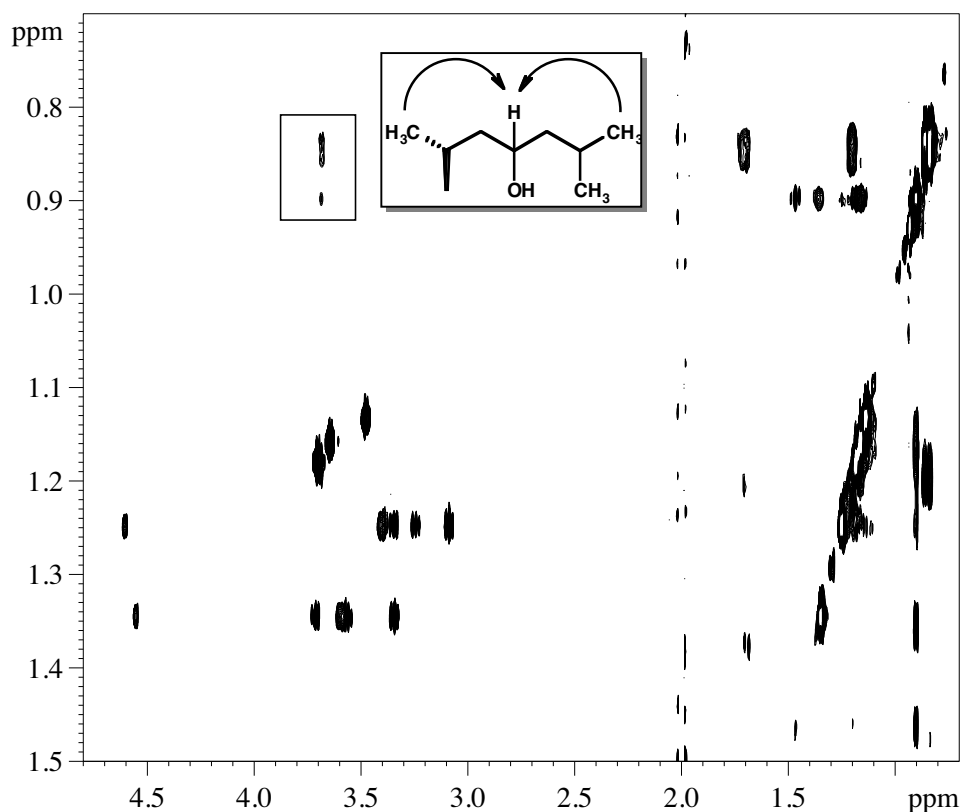


Abbildung 29: Stopped-flow-2D-WET-TOCSY-Spektrum von Ruberosid A. Magnetisierungstransfer von den Methylgruppen A-H₃-21 und A-H₃-26/27 zu einer Resonanz bei δ_{H} 3,67 ppm zeigt eine Hydroxyfunktion in der Seitenkette an.

Mittels der geschilderten LC-NMR-MS-Experimente wurde somit rasch ein Vorschlag für die Struktur von Ruberosid A erhalten. Diese Verbindung war bis dahin in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

Der Strukturvorschlag für Ruberosid B wurde aufgrund der MS- und 2D-NMR-Daten gegeben: Die Molekülmasse liegt unter Bedingungen des D-H-Rücktauschs zwei

Masseneinheiten unter der von Ruberosid A. In deuteriumoxidhaltigem Eluent beträgt der Unterschied hingegen 3 Einheiten. Dies deutet darauf hin, daß sich anstelle einer Hydroxygruppe eine Carbonyl- oder Epoxyfunktion in der Seitenkette befindet. Die Epoxyfunktion konnte jedoch anhand eines stopped-flow 2D-WET-TOCSY-Experiments aufgrund folgender Hinweise ausgeschlossen werden: Das Spinsystem der Seitenkette ist offensichtlich unterbrochen, da der Magnetisierungstransfer ausgehend von den Seitenketten-Methylgruppen A-H₃-26/27 bei H₂-24 abbricht und nicht zu den Resonanzen vordringt, die zu dem Spinsystem von A-H₃-21 gehören (Abbildung 30). Dies wäre jedoch bei Vorliegen einer Epoxygruppe (durchgehendes Spinsystem) zu erwarten. Die beobachteten chemischen Verschiebungen von δ_{H} 2,48/2,13 (A-H₂-22a/b) und 2,28 ppm (A-H₂-24) stimmen zudem mit den Protonen in direkter Nachbarschaft einer 23-Oxo-Gruppe überein (vergl. Daten von ov. Asterosaponin 1, Anhang 11.5.3).

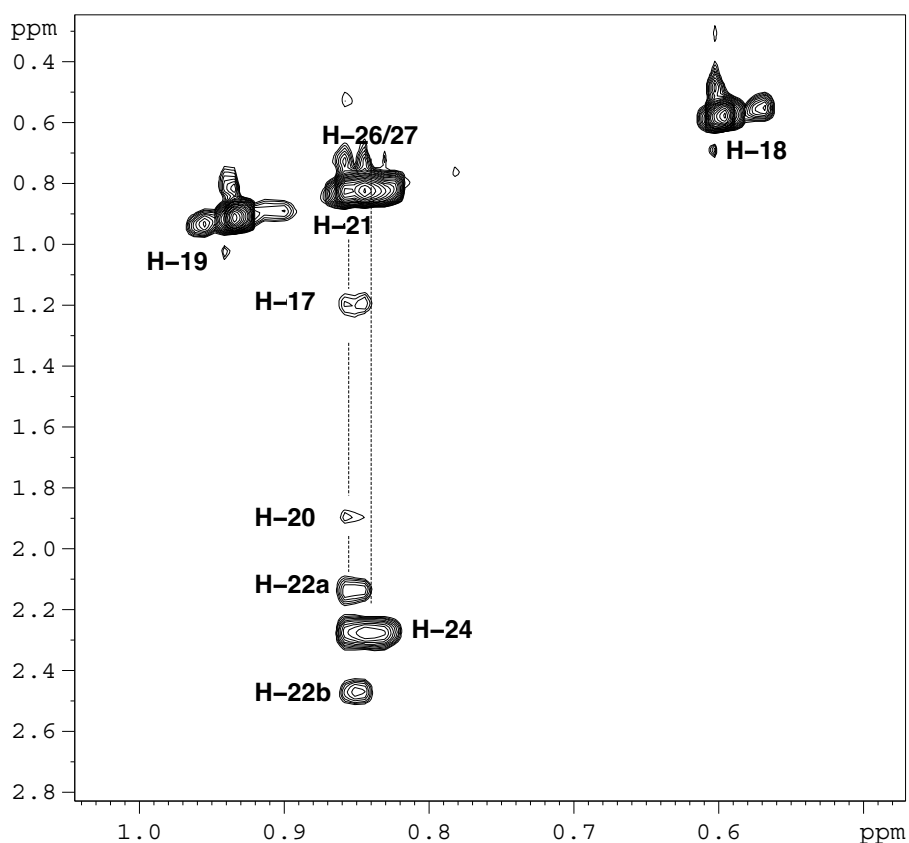


Abbildung 30: Stopped-flow-2D-WET-TOCSY-Spektrum von Ruberosid B. Magnetisierungstransfer von den Methylgruppen A-H₃-21 und A-H₃-26/27 zeigt die chemischen Verschiebungen der Seitenkettensignale an (A-H-25 zusammen mit Acetonitril unterdrückt).

Die 24(28)en-Funktion in der Steroidseitenkette von Ruberosid D und Asteriidolid B wurde anhand der Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen der olefinischen Signale bei δ_{H} 4,72 und 4,66 ppm mit Literaturwerten¹³⁴ vorgeschlagen. Ein 2D-WET-TOCSY-Experiment bestätigte dieses A-H₂-28-Zweispinsystem. Auf die Oligosaccharidkette von Ruberosid D konnte dagegen anhand der vorhandenen Daten noch nicht geschlossen werden.

Umgekehrt war es im Fall von Ruberosid C möglich, die Saccharidkette durch Subspektrenvergleich mit Asteriidolid C zu identifizieren, während für die Steroidseitenkette wegen der wenig charakteristischen Signale zunächst bis auf die 20-Hydroxyfunktion kein Strukturvorschlag gemacht wurde.

Nachdem in der Feinfraktion 37-39M neue Asterosaponine nachgewiesen worden waren, wurden die Bestandteile dieser Probe mittels RP-HPLC (Abschnitt 3.3.4) getrennt und der in Kapitel 8 beschriebenen Strukturaufklärung mittels ein- und zweidimensionalen NMR-Methoden unterworfen, um die vollständige Zuordnung sowohl der ¹H- als auch der ¹³C-Resonanzen zu erhalten. Die Aussagen der LC-NMR-Experimente wurden dabei durchgehend bestätigt.

Durch die Absicherung der LC-NMR-Prognosen und die Aufklärung von zunächst noch nicht identifizierten Verbindungen wurde der Grundstock der sicher identifizierten Verbindungen erweitert. Auf diese Weise konnte wiederum die Anwendbarkeit des Subspektrenvergleichs beim LC-NMR-Screening zur Charakterisierung unbekannter Verbindungen erweitert werden.

5.3. LC-NMR-MS Untersuchung der wirksamen Asterosaponin-Subfraktion 35-36M

Die Asterosaponin-Feinfraktion 35-36M wurde analog untersucht.

Abbildung 31 zeigt eine Übersicht über den Methylresonanzenbereich des Chromatogramms.

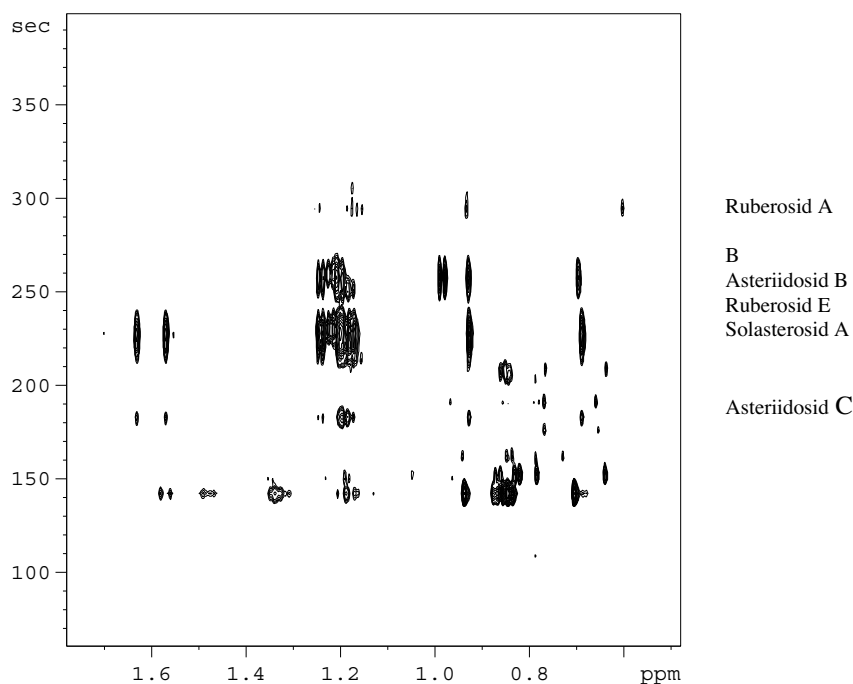


Abbildung 31: On-flow-NMR-Chromatogramm der Asterosaponin-Feinfraktion 35-36M. Ausschnitt des Bereichs der Methylprotonenresonanzen.

An dieser Probe erwies sich die direkte Kombination der sich in ihrer Strukturaussage gegenseitig ergänzenden Methoden MS und NMR als besonders hilfreich.

Im MS-Chromatogramm wurden zwei Hauptkomponenten identifiziert, die mit m/z 1223 (H-D-Austausch) das gleiche Molekulgewicht besitzen. Ferner zeigen die MS^2 -Spektren beider Substanzen identische Fragmente bei m/z 1075, 927, 779 und 645, was dem Verlust von nacheinander drei Methylpentosen und einer Pentose entspricht. Die Massenspektroskopie liefert in diesem Fall nur die Information, daß sich beide Substanzen voneinander unterscheiden, denn die MS^2 -Fragmente (aufgenommen unter identischen Bedingungen in einem LC-MS-Lauf) zeigen unterschiedliche Intensität. Zur weiteren Unterscheidung und Charakterisierung wurde daher die ergänzende NMR-Strukturinformation benötigt.

Die Auswertung der Seitenketten-Methylresonanzen im NMR-Chromatogramm ergab, daß beide Verbindungen die gleiche Steroidseitenkette besitzen wie Asteriidosid C. Der Vergleich der Kohlenhydratsubspektren ergab, daß der Oligosaccharidteil der später eluierenden Verbindung, Ruberosid E, mit dem von Ruberosid D übereinstimmt. Die entsprechende Struktur war noch nicht in der Literatur bekannt, weshalb entschieden wurde, die Probe mittels RP-HPLC semipräparativ aufzuarbeiten. Die zweidimensionale NMR-Strukturaufklärung bestätigte die anhand der LC-NMR-Daten prognostizierte Struktur von Ruberosid E. Darüber hinaus wurde auch die Oligosaccharidkette der zuvor eluierenden Substanz (Solasterosid A) zugeordnet. Es stellte sich heraus, daß sich beide Substanzen lediglich in der Konfiguration der Hydroxygruppe an C-4 der endständigen Zuckereinheit unterscheiden: bei Ruberosid E ist sie äquatorial angeordnet, bei Solasterosid A steht sie axial (siehe Abbildung 32).

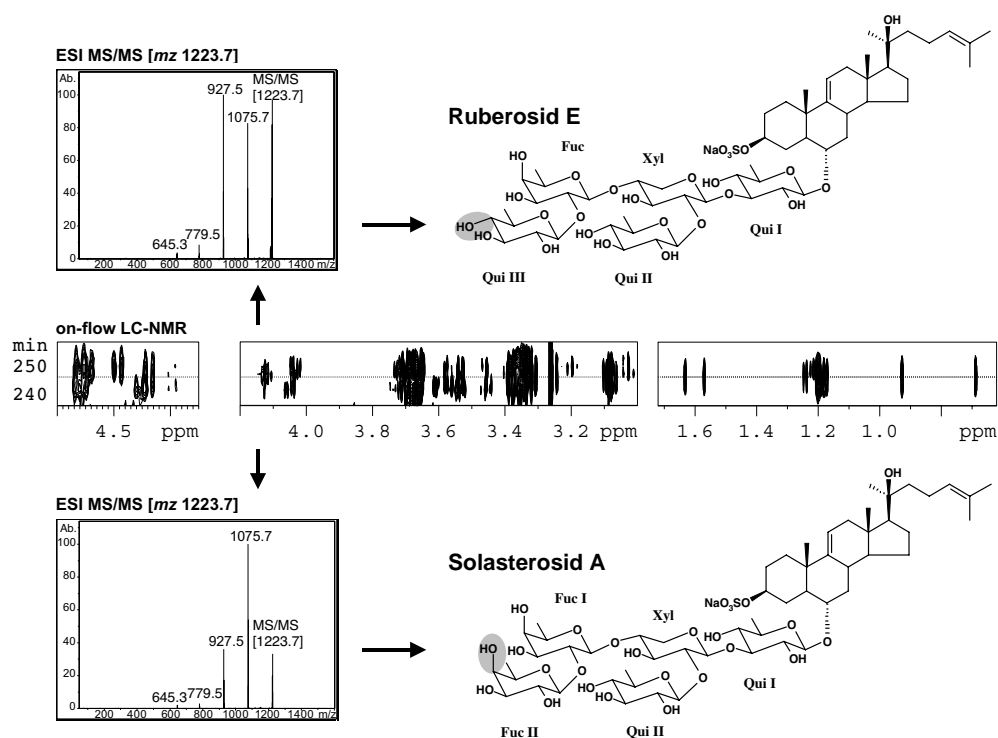


Abbildung 32: Solasterosid A und Ruberosid E: Beide MS²-Spektren zeigen identische Massenfragmente, jedoch mit unterschiedlicher Intensität. Im entsprechenden Ausschnitt aus dem LC-NMR-Chromatogramm erkennt man, daß beide Verbindungen die gleiche Aglycon-Seitenkette aber unterschiedliche Oligosaccharidseitenketten besitzen. Sie unterscheiden sich lediglich in der Anordnung der Hydroxygruppe an C-4 der endständigen Zuckereinheit.

Weiterhin konnten in der Feinfraktion Asteriidosid B und C identifiziert werden. Direkt nach Asteriidosid B eluiert eine Verbindung (**B**) mit m/z 1254 die das gleiche Aglycon aufweist. Die Kohlenhydratresonanzen deuten auf einen Oligosaccharidrest hin, der mit dem von Asterosid C und Ruberosid F identisch ist. Auch die MS²-Daten unterstützen diese Zuordnung (Abspaltung nacheinander einer Methylpentose, einer Hexose, einer Methylpentose und einer Pentose). Jedoch ist im LC-NMR-Chromatogramm zu erkennen, daß noch eine weitere Verbindung (wiederum mit identischem Aglycon) teilweise koeluiert. Die semipräparative HPLC-Aufreinigung dieser Verbindungen gelang nicht, weshalb Verbindung **B** nur vorbehaltlich aufgrund seiner Protonenresonanzen zugeordnet wird (Abschnitt 8.4.3.2).

Darüber hinaus traten in dieser Probe bei frühen Retentionszeiten eine Reihe von Methylsignalen auf, die nicht von Asterosaponinen stammen, sondern vermutlich von Polyhydroxysteroiden oder Steroidsulfaten in der Probe herrühren.

5.4. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die on-flow-LC-NMR-MS-Screeninguntersuchung von Asterosaponinfeinfraktionen geschildert.

Anhand der ^1H -NMR-Daten, die mit dem NMR-Chromatogramm erhalten werden, ist keine vollständige Strukturaufklärung von Asterosaponinen möglich.

Die Identifizierung einzelner Asterosaponine erfolgte daher durch

- a.) die Auswertung einzelner leicht zuordenbarer Signale,
- b.) durch den Vergleich von Subspektren und
- c.) durch die Aufnahme von zweidimensionalen NMR-Spektren im stopped-flow-Modus.

Insbesondere der Vergleich von Subspektren erwies sich im Fall der Asterosaponine als besonders effektiv, da in den untersuchten Proben mehrfach wiederkehrende Strukturmerkmale auftraten.

Erstmals konnte die Eignung des on-flow-LC-NMR-MS-Screeningansatzes zur Charakterisierung von Verbindungen im Molmassenbereich zwischen 1200 und 1400 a.m.u. gezeigt werden. Die zusätzliche Information über die Anzahl der austauschenden Protonen, die das D-H-Rücktauschexperiment liefert, erwies sich bei der Strukturaufklärung von Asterosaponinen als besonders hilfreich.

Das LC-NMR-MS-Screening zeigte die Anwesenheit von bislang noch nicht beschriebenen Asterosaponinen an. Aufgrund dieser Informationen konnten fünf neue Saponine (Ruberoside A bis E) zielgerichtet isoliert und der in Kapitel 8 beschriebenen Strukturaufklärung mit ein- und zweidimensionalen NMR-Methoden unterworfen werden. Dabei wurden die Strukturaussagen der LC-NMR-MS durchgehend bestätigt.

Die Charakterisierung der sich lediglich in der Anordnung einer Hydroxygruppe unterscheidenden Saponine Ruberosid E und Solasterosid A demonstriert das besondere Leistungsvermögen der LC-NMR-MS-Kopplung.

6. Mikropräparative Methode Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)

6.1. Bedarf einer mikropräparativen Extraktionsmethode

Mit der LC-NMR-MS-Kopplung war nun eine leistungsfähige Methode verfügbar, die die zielgerichtete Isolierung von Asterosaponinen ermöglichte und somit die strukturelle Aufklärung neuer Saponine erheblich beschleunigte.

Dieser LC-NMR-MS-Screeningansatz stand jedoch in einem gewissen Gegensatz zur bis dahin verwendeten zeitlich sehr aufwendigen Probenaufarbeitung (Abschnitt 3.2): Die ursprüngliche Methode war auf die Isolierung einzelner Asterosaponine für die off-line-Strukturaufklärung ausgerichtet und diente darüber hinaus zur Bereitstellung von Material für biologische Tests. Zu diesem Zweck wurde eine große Menge (zwischen 1,5 und 3 kg) Seesternmaterial aufgearbeitet und an präparativen Trennsäulen (24 x 4 cm i. D.) fraktioniert. Da jedoch nur die Hauptkomponenten in Reinsubstanz erhalten worden waren, wurden Asterosaponinfraktionen im LC-NMR-MS-System untersucht, um über eine weitere Aufreinigung dieser Fraktionen zu entscheiden.

Der Chromatographieteil der LC-NMR-MS besteht aus einem HPLC-System im analytischen Maßstab. Für Screeninguntersuchungen an Feinfraktionen werden daher lediglich Probenmengen im Bereich zwischen 0,5 und 1 mg benötigt. Es ist deshalb allein für Screening-Zwecke nicht erforderlich, die Aufarbeitung im präparativen Maßstab vorzunehmen.

Da die endgültige Feinauftrennung der Saponine auf der analytischen Säule des LC-NMR-MS-Systems erfolgt, muß die Probenaufarbeitung auch nicht mehr auf die Isolierung von Einzelverbindungen ausgerichtet sein. So kann beispielsweise der zweite chromatographische Trennschritt im Trennungsgang (Abbildung 17) weggelassen werden.

Gesucht wurde also nach einer schnellen Aufarbeitung im kleineren Maßstab, die auf das rasche Erhalten einer Saponin-Gesamtfraktion abzielt. Auf diese Weise sollte es möglich sein, den Screeningschritt noch vor die eigentliche präparative Aufarbeitung zu setzen, um noch frühzeitiger erkennen zu können, ob eine Seesternprobe bisher

unbekannte Asterosaponine enthält, die u. U. für Wirksamkeitsunterschiede verantwortlich sind.

Eine einfache Herunterskalierung der ursprünglichen Aufarbeitung (Verkleinerung der Säulengröße, nur eine chromatographische Trennung) kam nicht in Frage. Die lange Extraktionsdauer von 16 h, die Ultraschallbehandlung und das Gefriertrocknen hätten dem Charakter einer schnellen Voruntersuchung entgegengestanden.

Folgende Anforderungen wurden somit an die zu entwickelnde Aufarbeitung gestellt:

Sie sollte ausgehend von

- a.) einer kleinen Menge Seestermaterial,
- b.) in kurzer Zeit Extrakte liefern, die
- c.) rein genug sind, um direkt mit der LC-NMR-MS-Kopplung untersucht werden zu können.

Weiterhin sollte die Methode aus möglichst wenigen einfachen Schritten bestehen, um die Probe wenig zu beanspruchen.

6.2. Matrix Solid Phase Dispersion - MSPD

Die Matrix-Festphasendispersions-Extraktion (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD)¹⁴⁹ ist eine vereinfachte Methode zur Probenaufarbeitung. Sie wurde 1988/89 von A. R. Long und S. A. Barker, zunächst zur Rückstandsanalytik in biologischen Matrices entwickelt. Die ersten Veröffentlichungen behandeln die Extraktion von Organophosphaten, Benzimidazolen und β -Lactamen aus Fleisch- und Milchproben.^{150,151}

Bei der MSPD wird das grob zerkleinerte, ansonsten intakte Probenmaterial durch Verreiben mit chromatographischem Säulenmaterial (typischerweise RP-Material) aufgeschlossen. Die Verreibung aus Probe und RP-Material wird in eine Glassäule gefüllt; nach Waschschrinen erfolgt die Elution direkt von der erhaltenen Packung.

Die MSPD verspricht Homogenisierung und Aufschluß der Probe sowie Extraktion, Fraktionierung und Aufreinigung der Analyten in einem einzigen Aufarbeitungsschritt.

Beim Verreiben im Mörser wird das Probengewebe zunächst durch die mechanischen Scherkräfte zerrissen. Ferner weist das lipophile RP-18-Material zusätzliche dispergierende Eigenschaften, ähnlich eines zum Zellaufschluß dienenden Tensids, auf. In dem so entstandenen homogenen Brei ist die Probe durch hydrophobe/hydrophile Wechselwirkungen über die sehr große Oberfläche (ca. $500\text{m}^2/\text{g}$ Sorbens)¹⁵² des Trä-

germaterials dispergiert. Dadurch kommt es zu einem innigen Kontakt zwischen Elutionsmittel und der zu extrahierenden Matrix, was eine hohe Extraktionsausbeute ermöglicht.^{152,153}

Das Gemisch aus Probe und RP-18-Material bildet ein einheitliches und für jede Matrix einzigartiges Säulenmaterial zur anschließenden Isolierung der Analyten. Die Retentions- und Elutionseigenschaften der Phase stellen eine Kombination aus Verteilungs-, Adsorptions- und Ionenchromatographie dar. Dies hängt von der jeweiligen Festphase, der Probenmatrix, dem Verhältnis der Probe zur Festphase und der Art des Elutionsmittels ab. Der genaue Mechanismus des Zellaufschlusses und der Extraktion ist noch nicht vollständig aufgeklärt.¹⁵⁴

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, unterhalb der eigentlichen Matrix/Sorbens-Dispersion mit einem Bett aus reinem Festphasenmaterial zu arbeiten, was zu einer weiteren Aufreinigung und Fraktionierung der Analyten führt.

Die Vorteile dieser Methode sind die Schnelligkeit und Einfachheit der Extraktion, ihre Miniaturisierbarkeit und damit verbunden ein geringer Verbrauch an Lösemitteln sowie die geringe Probenbeeinträchtigung durch wenige Aufarbeitungsschritte.

Zwar liegt der Hauptanwendungsbereich der MSPD in der Rückstandsanalytik, doch wurde auch die Anwendbarkeit der Methode zur Fraktionierung von biologischem Material nach Stoffklassen gezeigt.¹⁵³ Glaser et al. diskutierten die MSPD bereits im Zusammenhang mit der LC-NMR.⁴⁰

6.3. MSPD-Extraktion von Asterosaponinen

Die unter 6.1 genannten Anforderungen konnten mit einer MSPD- (Matrix Solid Phase Dispersion)-Methode erfüllt werden.

Dabei wird eine kleine Menge des tiefgefrorenen Seesternmaterials zunächst mit einem Messer zerkleinert und dann im Mörser zusammen mit RP-18 Material und Wasser zu einem homogenen Brei verrieben. Diese Masse wird nun direkt in eine Glas-säule gefüllt, in die zuvor – abgetrennt mit einem Stück Filterpapier – ein Bett von noch einmal der gleichen Menge an RP-18-Material gegeben wurde. Nach Waschen mit Wasser wird mit zunehmenden Anteilen an Acetonitril (Abbildung 33) eluiert.

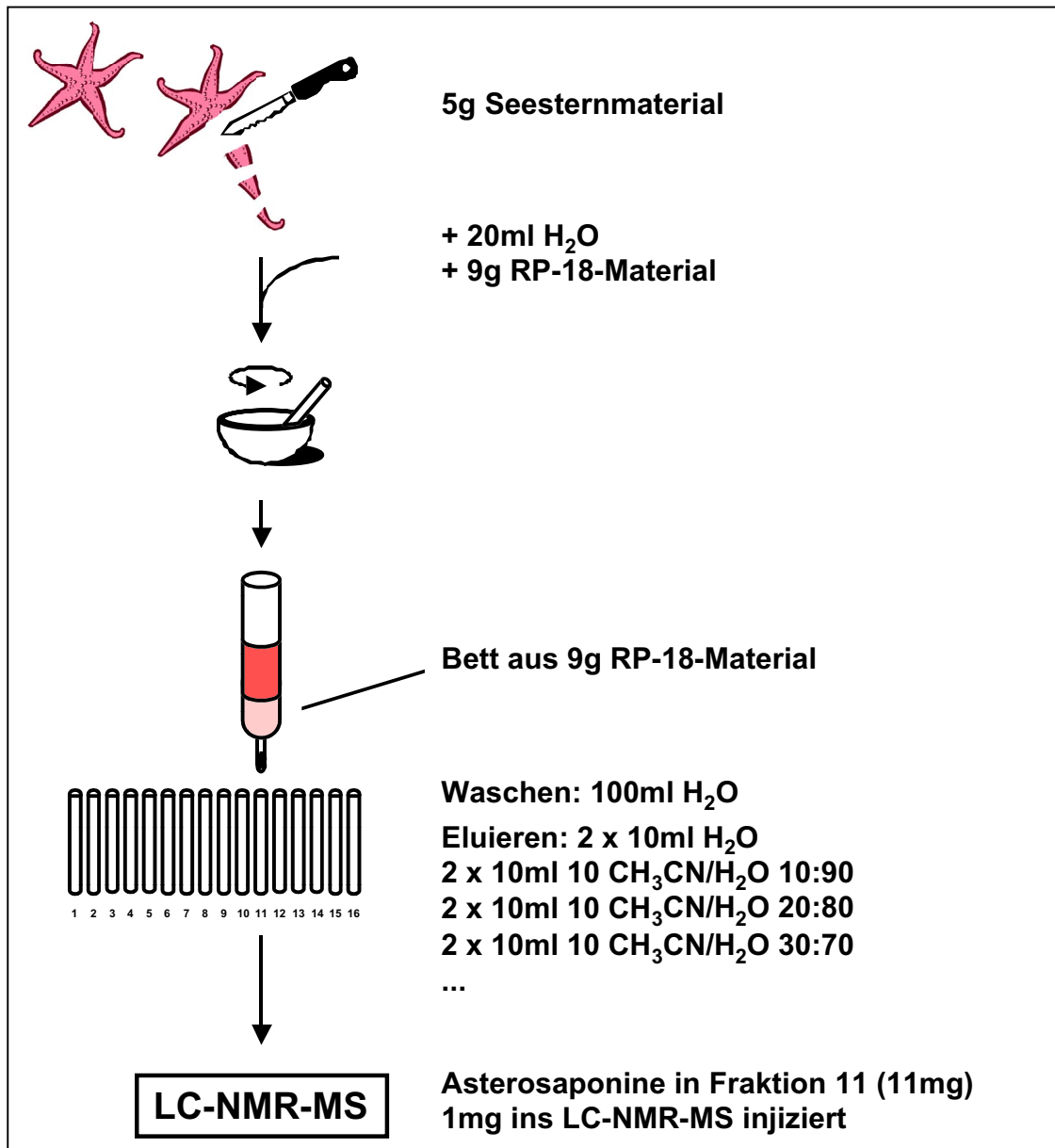


Abbildung 33: MSPD-Extraktionsschema

Abbildung 34 zeigt die dünnschichtchromatographische Kontrolle einer MSPD-Trennung. Die Saponine eluieren scharf und reproduzierbar (drei Wiederholungen, siehe exp. Teil) in der Fraktion 11. Aus 5 g rohem Seesternmaterial wurden 11 mg der Asterosaponinfraktion erhalten, so daß die Ausbeute an Saponinen mit 0,2 % über der ursprünglichen Aufarbeitung liegt (0,1 %). Die so erhaltene Asterosaponinfraktion war rein genug, um direkt in das LC-NMR-MS-System injiziert werden zu können.



Abbildung 34: DC-Kontrolle einer MSPD-Trennung

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die durch die MSPD-Extraktion gewonnene Zeitersparnis. Ausgehend vom intakten Seesternmaterial kann so die umfassende Strukturinformation eines LC-NMR-MS-Laufs innerhalb von zwei Arbeitstagen erhalten werden.

Tabelle 6: Gegenüberstellung von ursprünglicher Aufarbeitung und MSPD-Extraktion

Ursprüngliche Aufarbeitung (3-4 Arbeitstage)	MSPD-Methode (1 Arbeitstag)
1. Zerkleinern der Probe	1. Zerkleinern der Probe
2. 16 h Extraktion mit Acetonitril	2. Verreiben mit dem RP-Material
3. Extraktion des Rückstands / Ultraschall	
4. Einrotieren zur Trockne	
5. Aufnahme in Wasser / Zentrifugation	
6. Gefriertrocknung	
7. Entfetten des Rohextrakts	
8. Säulenchromatographie	3. Säulenchromatographie
Packen der Säule	Einfüllen in Säule
Waschen	Waschen
Eluieren	Eluieren
Einrotieren	Einrotieren

6.4. Zusammenfassung

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, daß sich die Matrix-Festphasendispersions-Extraktion (Matrix Solid Phase Dispersion Extraktion, MSPD) als mikropräparative Methode hervorragend zur raschen Extraktion von Astersaponinen aus Seesternproben eignet.

Die Kombination mit der LC-NMR-MS-Kopplung stellt einen neuen analytischen Ansatz dar. Beide Methoden ergänzen sich gegenseitig in der Beschleunigung des analytischen Prozesses: Während die MSPD in einem Aufarbeitungsschritt für die LC-NMR-MS geeignete Extrakte liefert, bietet die LC-NMR-MS-Kopplung in einem einzigen Chromatographielauf eine umfassende Menge spektroskopischer Daten.

Aus 5 g rohem Seesternmaterial konnten 11 mg der Asterosaponinfraktion erhalten werden. Diese Menge reicht für zehn LC-NMR-MS-Läufe aus.

7 LC-NMR-MS des MSPD-Extrakts (*Asterosaponin-Gesamtfraktion*)

Die Saponing Gesamtfraktion des MSPD-Extrakts wurde nun in das LC-NMR-MS injiziert, um a.) einen Überblick über die Asterosaponinverteilung von *Asterias rubens* zu gewinnen und um b.) weitere Asterosaponine mit noch nicht bekannter Struktur zu erkennen.

Abbildung 35 zeigt eine Übersicht der anomeren und Methylprotonenresonanzen des erhaltenen NMR-Chromatogramms (1 mg Extrakt injiziert). Es wird deutlich, daß der MSPD-Extrakt für die unmittelbare Verwendung zur LC-NMR-geeignet ist. Die drei Hauptasterosaponine von *Asterias rubens*, Glycosid B₂ (**2**), ovarian Asterosaponin 1 (**3**) und Asteriidosid C (**5**) sind klar zu erkennen: Zur besseren Anschaulichkeit sind die Bereiche des NMR-Chromatogramms, in denen Nebenkomponenten eluieren, vergrößert skaliert.

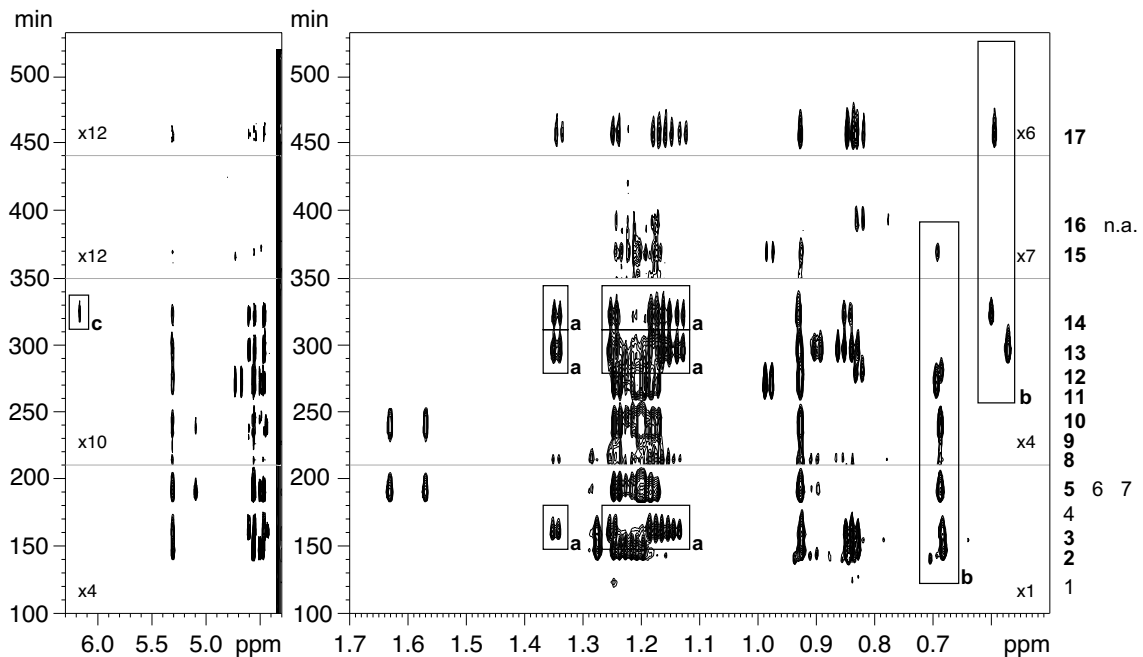


Abbildung 35: On-flow-NMR-Chromatogramm der mittels MSPD-Extraktion erhaltenen Asterosaponinfraktion. Ausschnitt der anomeren und Methylprotonenresonanzen. Einzelne Segmente wurden zur besseren Anschaulichkeit vergrößert skaliert. Verbindungen 1, 4, 6 und 7 erst bei höherer Vergrößerung sichtbar. n.a.: Peak nicht zugeordnet.

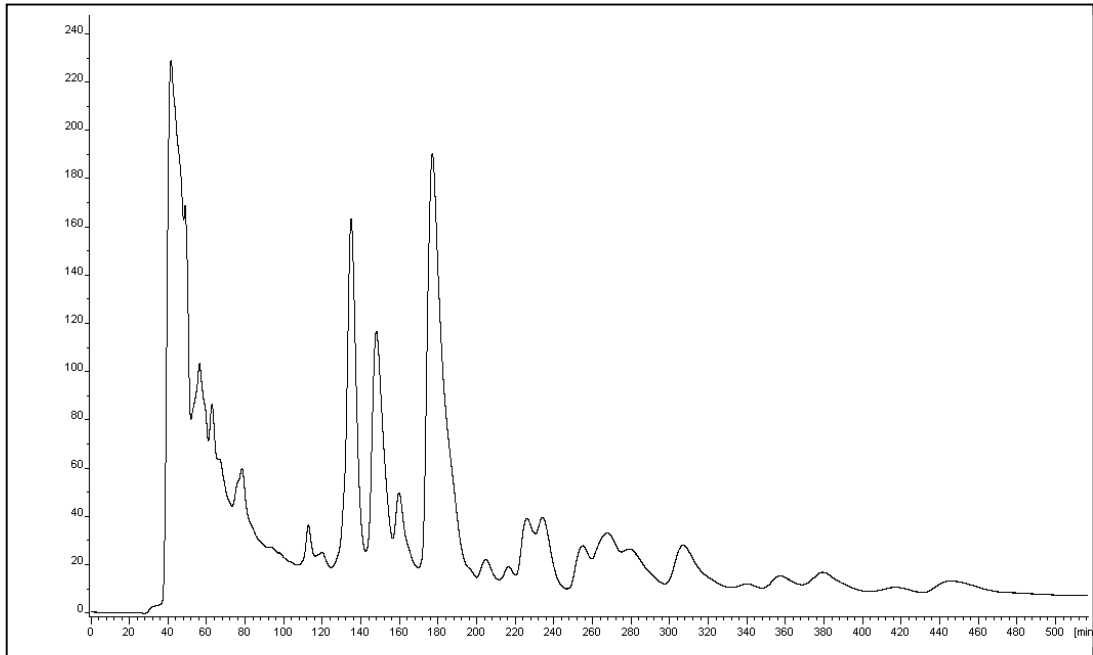


Abbildung 36: UV-Chromatogramm des in Abbildung 35 gezeigten LC-NMR-MS-Laufs eines MSPD-Asterosaponinextrakts

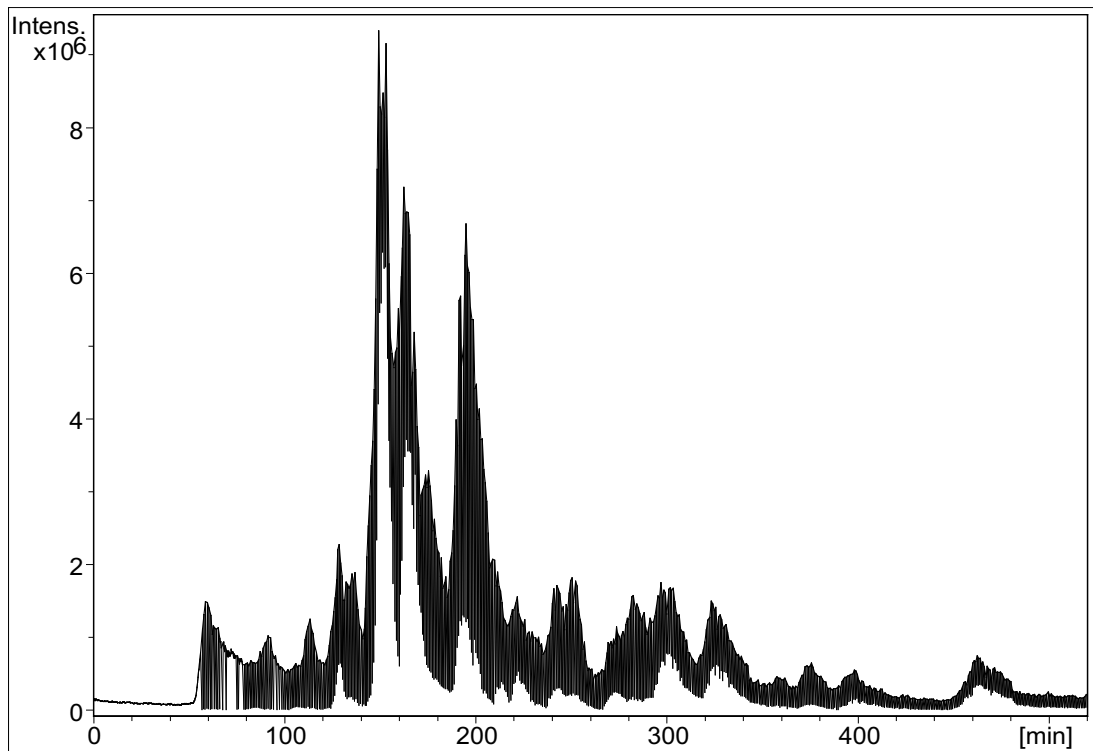


Abbildung 37: MS-Totalionenstrom des in Abbildung 35 gezeigten LC-NMR-MS-Laufs eines MSPD-Asterosaponinextrakts. Die starken Signalausschläge rühren von den alternierend aufgenommenen MS²-Spektren her.

Im MSPD-Extrakt von *Asterias rubens* konnten 17 Asterosaponine (darunter alle nach dem herkömmlichen Verfahren aufgeklärten) identifiziert werden. Bekannte Asterosaponine wurden anhand ihrer NMR-Spektren und MS-Daten zugeordnet. Die Identifizierung neuer Komponenten erfolgte, wie in Kap. 5.1 beschrieben durch Subspektrenvergleich und Analyse leicht zuordenbarer freistehender Resonanzen. Die im gleichen Lauf erhaltenen MS- und MS²-Daten sowie die Information über die Anzahl austauschender Protonen wurde mit zur Charakterisierung herangezogen. Die Daten sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

In der Probe konnte unmittelbar ein neues Asterosaponin, Ruberosid G, erkannt werden: siehe nächste Seite.

7.1. Identifizierung des neuen Asterosaponins Ruberosid G mittels LC-NMR-MS

Die Übereinstimmung der Zucker-Methylresonanzen (δ_{H} 1,1 –1,4 ppm, Abbildung 35, Rahmen a), wie auch des Musters der anomeren Signale, im LC-NMR-Chromatogramm deuten darauf hin, daß Ruberosid G (**14**) den gleichen Oligosaccharidrest besitzt, wie das bereits aufgeklärte Ruberosid A oder das verbreitete ovarian Asterosaponin 1.

Deckungsgleiche Zuckerringresonanzen bestätigen diese Zuordnung (Abbildung 38).

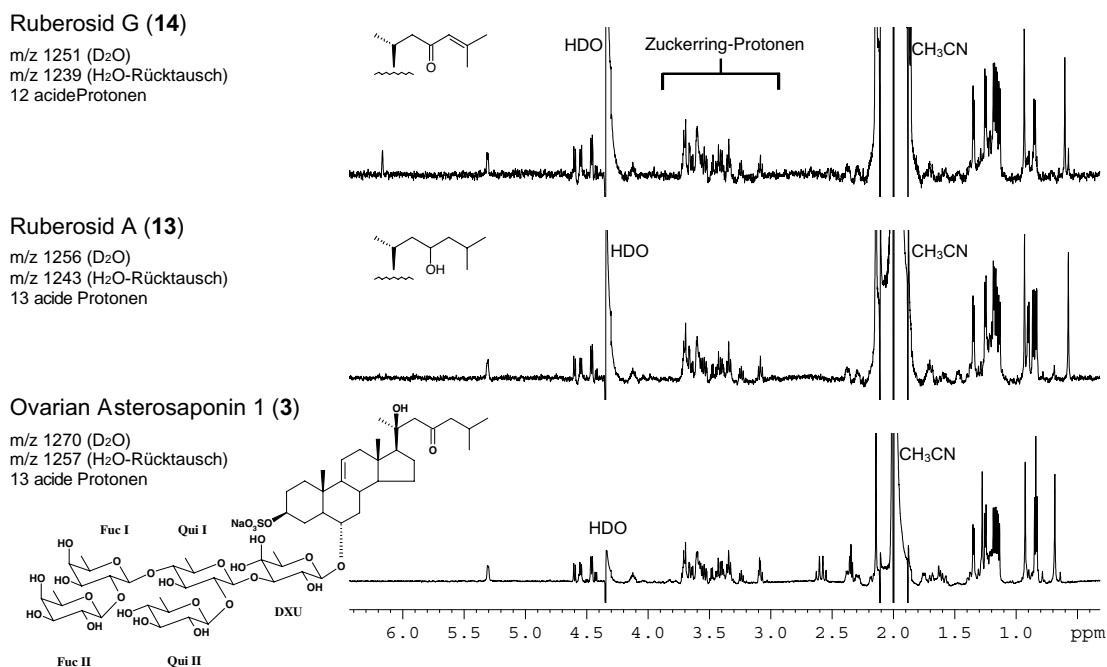


Abbildung 38: Aus dem on-flow-NMR-Chromatogramm extrahierte NMR-Spektren von Asterosaponinen mit gleicher Oligosaccharidkette (Ruberosid A und G, ov. Asterosaponin 1) sowie MS-Daten. Die zusätzliche olefinische Resonanz von Ruberosid G bei δ_{H} 6,16 ppm zeigt eine Doppelbindung in Nachbarschaft einer Carbonylgruppe an.

Wie Ruberosid A und B weist auch Ruberosid G eine, verglichen mit den meisten anderen Asterosaponinen, deutlich nach hohem Feld verschobene H₃-18-Methylgruppe auf. Dies zeigt das Fehlen einer Hydroxygruppe an Position C-20 der Steroidseitenkette an. (Abbildung 35, Rahmen b). Eine zusätzliche olefinische Resonanz bei tie-

fem Feld (δ_{H} 6,16 ppm, Abbildung 35, Rahmen c und Abbildung 38) deutet auf eine Doppelbindung in der Steroidseitenkette in Nachbarschaft einer entschirmenden funktionellen Gruppe, wie beispielsweise einer Carbonylgruppe hin. Ein Methyl-Singulett nahe am Acetonitril-Satellitensignal bei 1,85 ppm zeigt eine mit einer Doppelbindung verbundene Methylgruppe (H_3 -26) an (nicht in Abbildung 38 dargestellt). Das erwartete dazugehörige H_3 -27-Signal ist jedoch vom Acetonitril-Restsignal überlagert. Die chemischen Verschiebungen sind in excellenter Übereinstimmung mit ^1H -NMR-Daten, die für Nipoglycosid B publiziert wurden¹³⁹ und deuten auf eine Δ^{24} ,23-keto-Seitenkette hin.

Die MS-Daten, die der LC-NMR-MS-Lauf lieferte, unterstützen diese Zuordnung:

Das Molekulanion von Ruberosid G (**14**) nach H-D-Austausch (D_2O /Ammoniumformiat/Acetonitril) erscheint bei m/z 1251, d. h. fünf Masseneinheiten unter dem des strukturell ähnlichen Ruberosid A (m/z 1256), welches unmittelbar vor Ruberosid G eluiert. Ein Verlust von zwei Masseneinheiten entspricht der zusätzlichen Doppelbindung in der Seitenkette von Ruberosid G, die verbleibende Differenz von drei Masseneinheiten steht im Einklang mit dem Ersatz der Hydroxyfunktion durch eine Carbonylfunktion in der Seitenkette von Ruberosid G.

Diese Information zeigt einen besonderen Vorteil des LC-NMR-MS-Experiments, bei dem in deuteriumoxidhaltigen Eluenten gearbeitet wird: sie erlaubt die weitere Differenzierung von Wasserstoffequivalenten durch die Analyse der austauschenden Protonen (Doppelbindung bzw. gesättigte Bindung vs. Carbonyl- bzw. Hydroxygruppe). Die Gesamtzahl an aciden Protonen ist in Übereinstimmung mit der oben getroffenen Zuordnung (Ruberosid G: 12 acide Protonen; Ruberosid A: 13; vergl. Abbildung 38 und Tabelle 7).

Nachdem Ruberosid G als neues Asterosaponin identifiziert worden war, wurde es für die off-line NMR-Strukturaufklärung mittels RP-HPLC semi-präparativ isoliert. Der Strukturvorschlag konnte bestätigt werden; die weitere Diskussion und Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Resonanzen findet sich in Kapitel 8.3.7.

Zudem konnten in der Probe zwei weitere neue Asterosaponine vorbehaltlich zugeordnet werden: **C** und **D** (in Abbildung 35: **4** und **8**). Beide weisen Kohlenhydratresonanzen auf, die mit denen von Ruberosid A oder G übereinstimmen.

Die MS-Daten von **C** (Molekülanion $[\text{MD}_{13}]^-$ m/z 1254, 13 austauschende Protonen) weisen auf eine Hydroxyfunktion und eine Doppelbindung in der Steroidseitenkette hin. Auch die LC-NMR-Daten bestätigen dies: ein zusätzliches olefinisches Signal der Seitenkette findet sich bei δ_{H} 5,00 ppm; zwei Methylsignale bei δ_{H} 1,68 und 1,64 ppm weisen auf CH_3 -Gruppen hin, die sich direkt an einer Doppelbindung befinden. Stopped-flow-2D-WET-TOCSY-Experimente zeigen zudem Magnetisierungstransfer vom olefinischen Proton zu einer Resonanz bei δ_{H} 4,37 ppm an, was in Übereinstimmung mit einer Hydroxygruppe in Nachbarschaft einer Doppelbindung ist.

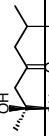
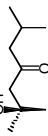
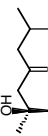
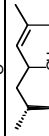



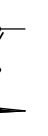

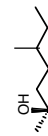
Kurz nach den Verbindungen **5-7** eluiert eine Verbindung (**D**) deren Steroidseitenketten-Signale identisch mit denen von Asterosid C sind (Anhang, Kap. 11.5.4).

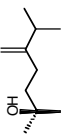
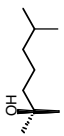
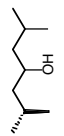
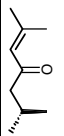
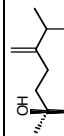
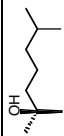
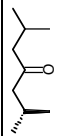
Die Verbindungen **C** und **D** konnten nicht in ausreichender Menge rein erhalten werden. Die Strukturzuordnung erfolgt daher vorbehaltlich aufgrund der ^1H -NMR-Daten aus den LC-NMR-Experimenten. Siehe Abschnitt 8.4.3.

7.2. Quantitative Aussagen über die Probenzusammensetzung

Da die Signalintensität der NMR-Detektion im Gegensatz zur UV- oder MS-Detektion nicht von der chemischen Natur der Analyten, sondern nur von der Anzahl äquivalenter Protonen in der Probenzelle abhängt, liefert das NMR-Chromatogramm einen repräsentativen Eindruck von der mengenmäßigen Zusammensetzung der Probe. In Kapitel 4.2 konnte gezeigt werden, daß eine quantitative Auswertung über die H_3 -18 bzw. H_3 -19-Methylgruppen möglich ist. Da die spektrale Dispersion dieser Signale jedoch aufgrund der Ähnlichkeit der Asterosaponine klein sein kann, können koeluiierende Verbindungen u. U. nicht unterschieden werden. Sind die H_3 -18-Resonanzen jedoch spektral getrennt, so können auch koeluiierende Substanzen quantifiziert werden (z.B. Ruberosid G (**14**), Abbildung 35). Es sind auch quantitative Aussagen über Verbindungen möglich, für die keine Standardverbindungen zur Verfügung stehen. In Tabelle 7 werden relative quantitative Gehalte, bezogen auf Ruberosid A angegeben. Daraus geht u. a. hervor, daß es sich bei den neu gefundenen Asterosaponinen durchgehend um Nebenkomponenten handelt.

7 LC-NMR-MS des MSPD-Extrakts (Asterosaponin-Gesamtfraktion)

Nr.	Retentionszeit [min]	m/z ^a (D ₂ O)	m/z ^b (D-H-Rück- tausch)	MS/MS Massenverlust ^a	Relativer Gehalt ^c	Saccharidkette ^d	Steroidseiten- kette	Verbindung
1	128.5	1421	1405	-101	0.38	G- ₃ F- ₂ G- ₄ X ₂ - ₃ Q- Q		Versicosid A, Forbesid A ^{141,128,155,156}
2	150.7	1256	1243	-101	3.65	Q- ₂ G- ₄ X ₂ - ₃ Q- Q		Glycosid B ₂ , Forbesid B ^{140,141}
3	164.0	1270	1257	-20 -101	4.64	F- ₂ F- ₄ Q ₂ - ₃ D- Q		ov. Asterosaponin 1, Forbesid C ^{140,166,157,158}
4*	176.8	1254	1241	-20 -148 -148 -20 -2x148 -2x148 -20 -757	0.25	F- ₂ F- ₄ Q ₂ - ₃ D- Q		C ^{diese Arbeit}
5	192.7	1388	1373	-165 -148 -148 -148 -134	5.36 Summe 5 und 6	G- ₃ F- ₂ F- ₄ X ₂ - ₃ Q- Q		Asteriidosid C ¹³⁴
6	1270	1270	1257	-148 -134		Q- ₂ G- ₄ X ₂ - ₃ Q- Q		Asterosid C ¹⁴⁰
7								Ruberosid F ^{diese Arbeit}
8*	220.9	1284	1271	-20 -115		F- ₂ F- ₄ Q ₂ - ₃ D- Q		D ^{diese Arbeit}
9	240.9	1223	1211	-148 -148 -148 -134	0.95 Summe 9 und 10	F- ₂ F- ₄ X ₂ - ₃ Q- Q		Solasterosid A ¹⁵⁹
10	251.3	1223	1211	-148 -148 -148 -134		Q- ₂ F- ₄ X ₂ - ₃ Q- Q		Ruberosid E ^{diese Arbeit}

11	272.8	1402	1387	-165 -148 -148 -148 -134	0.51	$G-3F-2F-4X_2-3Q-$ Q		Asterifidosid B ¹³⁴
12	283.3	1390	1375	-165 -148 -148 -148 -134	0.85 ^e	$G-3F-2F-4X_2-3Q-$ Q		Ruberosid C ^{diese Arbeit}
13	300.1	1256	1243	-20 -148 -148-20 -2x148 -2x148-20 -757	1	$F-2F-4Q_2-3D-$ Q		Ruberosid A ^{diese Arbeit}
14	326.3	1251	1239	-20 -148 -148-20 -2x148 -2x148-20 -757	0.56	$F-2F-4Q_2-3D-$ Q		Ruberosid G ^{diese Arbeit}
15	374.9	1237	1225	-148 -148 -148 -134	0.15	$Q-2F-4X_2-3Q-$ Q		Ruberosid D ^{diese Arbeit}
16	399.6	1225	1213	-148 -148	≈ 0.05	$Q-2F-4X_2-3Q-$ Q		A ^{diese Arbeit}
17	463.9	1253	1241	-20 -148 -148-20 -2x148 -2x148-20 -757	0.55	$F-2F-4Q_2-3D-$ Q		Ruberosid B ^{diese Arbeit}

* Verbindung vorbehaltlich zugeordnet; *a* Molekulanion nach H-D-Austausch; *b* Molekulanion nach D-H-Rücktausch; *c* relativ zu **13**; *d* verkürzte Darstellung; alle glycosidischen Bindungen sind (1→X)-verknüpft; *e* beinhaltet nicht getrennte Nebenkomponente B; Q Quinovose; X Xylose; F Fucose; D Deoxy-xylo-hex-ulose; G Galactose

Tabelle 7: Übersicht über die im MSPD-Extrakt von *Asterias rubens* identifizierten Asterosaponine

7.3. Gradientenelution

Wie bereits in Abschnitt 4.2.4 ausgeführt, konnten mit dem 3 mm-Durchflußprobenkopf on-flow-Chromatogramme mit Gradientenelution erhalten werden. Abbildung 39 zeigt den Ausschnitt der Methylprotonen einer Asterosaponin-Gesamtfraktion (MSPD-Extrakt). Durch den Fließmittelgradienten eluieren die Asterosaponinpeaks schärfer (siehe UV-Chromatogramm Abbildung 40). Die früh eluierenden Komponenten sind besser aufgetrennt. Man beachte beispielsweise im Chromatogramm die hervorragende Trennung von Solasterosid A und Ruberosid E (Abbildung 39).

Mit der Gradientenelution ist die Anpassungsfähigkeit des LC-NMR-MS-Screenings für weitere Applikationen grundsätzlich entscheidend erweitert. Im Fall der Asterosaponintrennung stellt sie jedoch eher eine Optimierung des chromatographischen Systems dar. Wegen des engen Polaritätsbereichs der Asterosaponine entspricht die Aussage derjenigen der isokratischen Methode.

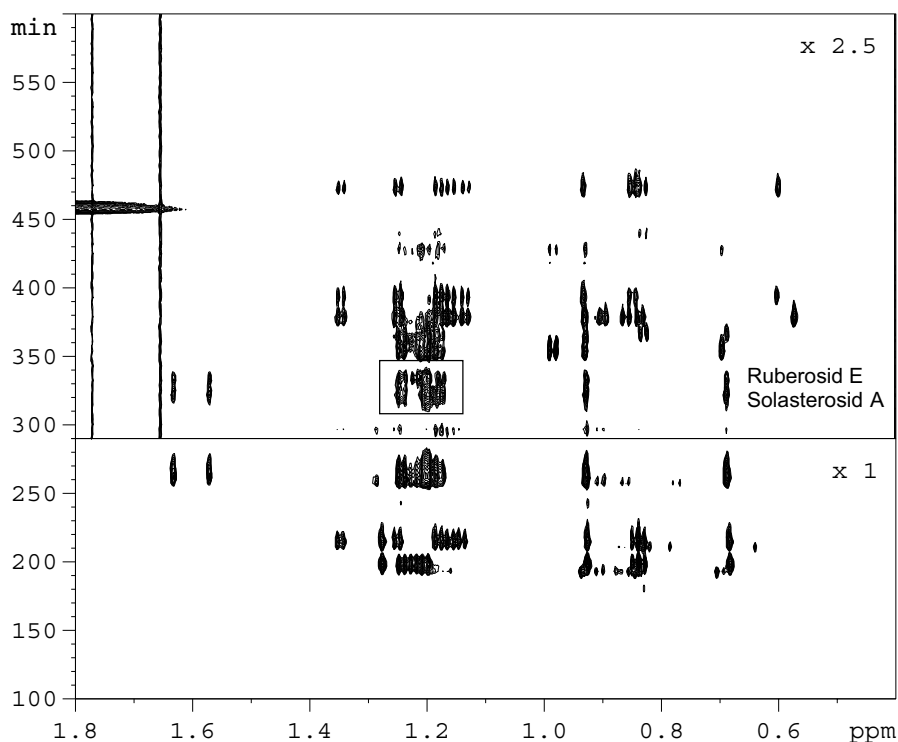


Abbildung 39: On-flow LC-NMR-Chromatogramm einer MSPD-Asterosaponinfraktion, Gradientenelution. Ausschnitt der Methylprotonenresonanzen. Der hintere Teil des Chromatogramms wurde zur Anschaulichkeit vergrößert.

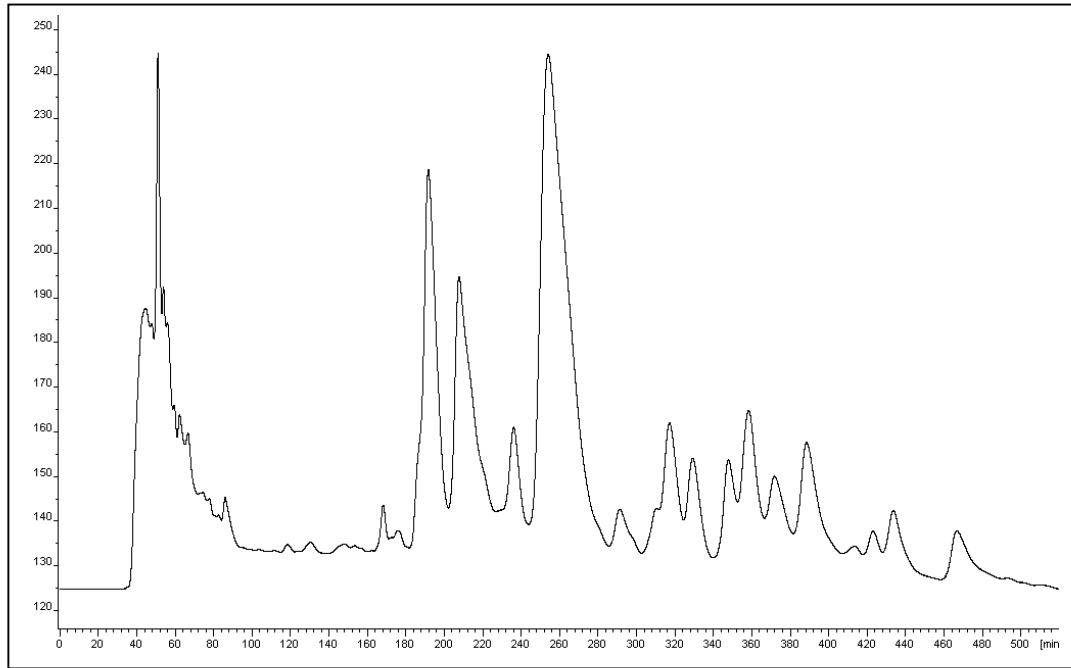


Abbildung 40: UV-Chromatogramm des in Abbildung 39 gezeigten Laufes mit Gradientenelution

7.4. Zusammenfassung

Mit der Kombination von MSPD-Extraktion und chemischem Screening mittels LC-NMR-MS steht nun eine Methode zur Verfügung, die es erlaubt rasch sowohl einen qualitativen als auch einen (relativen) quantitativen Einblick in eine Seesternsaponinprobe zu erhalten. Das Verfahren benötigt nur wenig Probenmaterial (ca. 5 g rohes Seesternmaterial) und führt innerhalb von zwei Arbeitstagen zu umfassenden spektroskopischen und chromatographischen Daten, die eine Aussage über die Struktur der enthaltenen Asterosaponine ermöglichen.

Eine solche Methode kann für zwei Hauptfragestellungen eingesetzt werden:

- 1.) wie in diesem Fall, um auf neue bislang unbekannte Substanzen in einer Seesternspecies zu prüfen. Hier braucht nur eine geringe Probenmenge extrahiert zu werden, um zu erfahren, ob sich eine Aufarbeitung im größeren präparativen Maßstab lohnt und welche Strukturen dabei zu erwarten sind. Die Reisolation bekannter Verbindungen (Replikation) kann somit vermieden werden.
- 2.) Für vergleichende chemotaxonomische Untersuchungen an verschiedenen Seesternspecies. In diesem Fall läßt sich rasch das Asterosaponinspektrum einzelner Seesterne erhalten. Artsspezifische oder durch Umweltfaktoren bedingte Besonderheiten der Saponinverteilung können anhand des on-flow-Chromatogramms leicht erkannt werden (vergleiche Abschnitt 8.5).

8. Strukturaufklärung von Asterosaponinen

8.1. NMR von Asterosaponinen

Die Strukturaufklärung von komplexen glycosidischen Naturstoffen wie Asterosaponinen stellt hohe Anforderungen an die verwendeten spektroskopischen Methoden. Sie müssen über folgende Punkte Informationen liefern:

- die Art und Anzahl der Monosaccharideinheiten einschließlich deren Ringgröße und anomerer Konfiguration,
- die Sequenz der Oligosaccharidkette sowie deren Verknüpfungspositionen, und
- die Struktur des Aglycons.

Aus diesem Grund wurde und wird noch heute mit zusätzlichen chemischen Abbau- und Derivatisierungsmethoden gearbeitet, um insbesondere die Struktur der Oligosaccharidkette aufzuklären (z.B. Ref. 134: Permethylierung und Methanolyse der Zuckerkette in Verbindung mit GC-MS-Analyse bzw. enzymatischer Abbau mit Glucosidase von *Charonia Lampas*. Einen Überblick gibt Ref. ¹⁶⁰).

Mittlerweile stehen jedoch eine Reihe moderner NMR-Methoden zur Verfügung, die die vollständige Strukturaufklärung von Saponinen auch ohne Abbau ermöglichen.^{141,161,162,163,164}

Wegen der Überlagerung der Subspektren einzelner Zuckerbausteine und ihrer großen Ähnlichkeit sind dafür eine Reihe verschiedener NMR-Experimente erforderlich, die in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

8.1.1. Eindimensionale ¹H-NMR-Spektren

Eindimensionale ¹H-NMR-Übersichtsspektren liefern neben einer Aussage über die Reinheit einer Probe bereits wertvolle Informationen über funktionelle Gruppen der zu charakterisierenden Substanz. Die betreffenden Signale müssen jedoch freistehen, d. h. spektral aufgelöst sein, um unmittelbar ausgewertet werden zu können.

Tabelle 8 auf Seite 106 gibt Auskunft über die Bereiche der chemischen Verschiebung von Asterosaponin-Signalen.

Im ^1H -Spektrum lassen die anomeren Signale zwischen δ_{H} 4,0 und 4,6 ppm unmittelbar auf die Anzahl der Monosaccharideinheiten schließen. Über die Größe ihrer Kopplungskonstante $J_{1,2}$ liefern sie zudem Aussagen über die Konfiguration am anomeren C-Atom der Zuckerbausteine. Analog geben die olefinischen Signale (δ_{H} 4,6 bis 6,0 ppm) Auskunft über die Anzahl der Doppelbindungen im Molekül. Die Methylsignale sowohl der Zuckereinheiten (bei Methylpentosen) als auch der Steroidseitenketten sind in der Regel aufgrund ihrer scharfen Signale im Bereich zwischen δ_{H} 0,5 und 1,4 ppm ebenfalls klar erkennbar.

In Bereichen des Spektrums, in denen starke Signalüberlappung auftritt - wie insbesondere im Bereich der Kohlenhydrat-Ringprotonen, wo sich die Subspektren der einzelnen Zuckerbausteine überlagern - ist ein Übersichtsspektrum nicht mehr ohne weiteres auswertbar. Eine vollständige Strukturaufklärung anhand von eindimensionalen Protonenspektren ist daher nicht möglich (vergleiche Kapitel 5.1). Abbildung 41 zeigt ein ^1H -Übersichtsspektrum von Ruberosid A

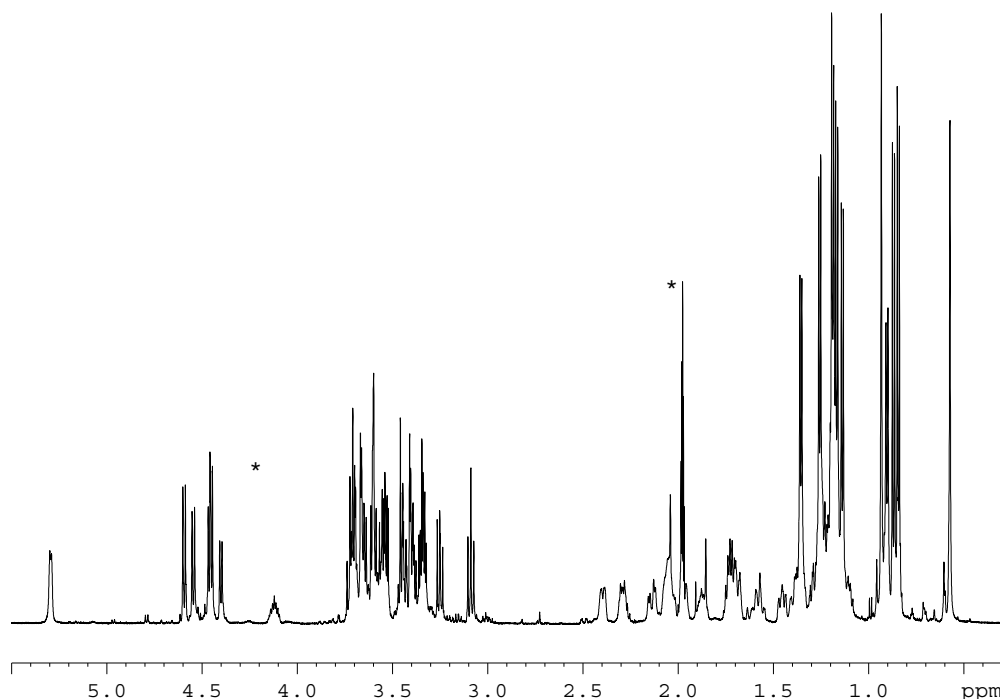


Abbildung 41 ^1H -Übersichtsspektrum von Ruberosid A ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$, 2:3, v/v);

* Lösemittel (HDO bei δ_{H} 4,25 ppm unterdrückt)

8.1.2. Eindimensionale ^{13}C -NMR-Spektren

Eindimensionale breitbandenkoppelte ^{13}C -NMR-Spektren zeigen dagegen nur wenig Signalüberlappung. Durch die hohe spektrale Dispersion der ^{13}C -chemischen Verschiebungen gibt in der Regel jeder Kohlenstoff-13-Kern ein eigenes Signal – die Anzahl der Kohlenstoffatome des Moleküls ist so unmittelbar zugänglich. Wie die Protonenspektren zerfallen auch die ^{13}C -Spektren von Asterosaponinen in vier Verschiebungsbereiche: den der aliphatischen, der anomeren, der olefinischen und der Kohlenhydratresonanzen. Im Bereich der Zuckerringresonanzen können zudem noch C-Atome, die an einer glycosidischen Verknüpfungsposition sitzen, von den übrigen unterschieden werden (Tabelle 8, siehe auch Kapitel 8.3.1.3, „Glycosidierungsshift“). Über multiplizitäten-editierte ^{13}C -NMR-Experimente, wie z.B. DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), kann zwischen CH-, CH_2 - und CH_3 -Gruppen unterschieden werden.

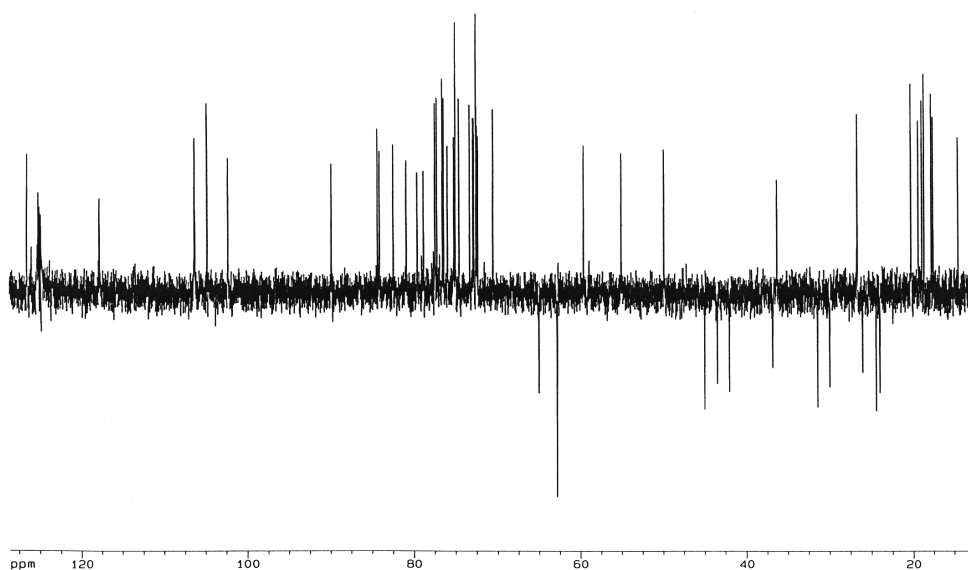



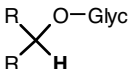
Abbildung 42: ^{13}C -DEPT-Übersichtsspektrum von Asteriidosid C (Pyridin- $d_5/\text{D}_2\text{O}$, 7:3, v/v); CH_3 - und CH-Gruppen mit positiver Phase, CH_2 -Fragmente negativ

Tabelle 8: Chemische Verschiebungen der Asterosaponin-Signale in D₂O/CD₃CN**Bereich aliphatischer Protonen und Kohlenstoffatome**

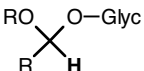
δ_{H} 0,5-2,5 ppm	δ_{C} 10-60 ppm	Aliphatische Signale
δ_{H} 0,5-1,2 ppm	δ_{C} 10-25 ppm	Aglycon-Methylsignale
δ_{H} 1,1-1,4 ppm	δ_{C} 15-20 ppm	Kohlenhydrat-Methylsignale

Bereich der Zuckerring-Protonen und -Kohlenstoffatome

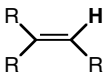
δ_{H} 3,0-4,0 ppm	δ_{C} 60-80 ppm	
---------------------------------	-------------------------------	---

δ_{H} 3,0-4,0 ppm	δ_{C} 80-90 ppm	
---------------------------------	-------------------------------	--

Bereich anomerer Protonen und Kohlenstoffatome

δ_{H} 4,0-4,6 ppm	δ_{C} 100-105 ppm	
---------------------------------	---------------------------------	--

Bereich olefinischer Protonen und Kohlenstoffatome

δ_{H} 4,6-6,0 ppm	δ_{C} 115-160 ppm	
---------------------------------	---------------------------------	--

8.1.3. Zweidimensionale und selektive NMR-Experimente

In Fällen, in denen Übersichtsspektren wegen Signalüberlappung oder aus anderen Gründen keine eindeutige Signalzuordnung ermöglichen, kommen zweidimensionale NMR-Experimente zum Einsatz, die durch Aufspreizung der Signale entlang einer zweiten Frequenzachse Signalüberlagerungen beheben und zudem miteinander wechselwirkende Kerne identifizieren. Im folgenden werden die wichtigsten der verwendeten Experimente anhand von Spektrenbeispielen von Ruberosid A vorgestellt. Die Strukturaufklärung der Ruberoside wird in Kapitel 8.3 im einzelnen erläutert.

8.1.3.1. COSY

Das COSY-Experiment ist die wichtigste und am häufigsten verwendete 2D-NMR-Methode. Sie liefert ein zweidimensionales Spektrum in dem die Kreuzsignale über die durch Bindungselektronen vermittelte skalare Kopplung miteinander korreliert sind. Die Magnetisierung wird durch eine Zweipulssequenz von einem koppelnden Kern auf den nächsten übertragen. Dabei werden hauptsächlich geminale ($^2J_{\text{H,H}}$) und vicinale Kopplungen ($^3J_{\text{H,H}}$) angezeigt, so daß über das COSY-Spektrum die Konnektivitäten in einem Spinsystem verfolgt werden können. Weiterhin ergeben auch Fernkopplungen in Abhängigkeit von der Größe der Kopplungskonstante $^3J_{\text{H,H}}$ Crosspeaks; spezielle COSY-Varianten sind deshalb auf die Detektion solcher Fernkopplungen optimiert (im sog. long-range-COSY werden sogar Kopplungen detektiert, die im normalen ^1H -Übersichtsspektrum nicht aufgelöst werden). Die COSY-Crosspeaks beinhalten die Information über die Größe sowohl der aktiven als auch der passiven Kopplungskonstante.

Von der Vielzahl der möglichen COSY-Sequenzen wurde die Version mit einem Doppelquantenfilter (DQF-COSY) verwendet, da bei dieser Variante im Gegensatz zum konventionellen phasensensitiven COSY die Diagonalpeaks in Absorption erscheinen und deshalb Crosspeaks die nahe an der Diagonalen liegen besser erkannt werden können. Zudem ist hier das Wasser-Restsignal vermindert.

COSY-Spektren wurden in dieser Arbeit grundsätzlich zur Signalzuordnung von Aglycon und Saccharidteil angewandt. Als Beispiel ist in Abbildung 43 der Koppelpfad der Zuckereinheit Quinovose I von Ruberosid A, ausgehend vom anomeren Proton gezeigt: nacheinander werden so die Resonanzen H-2 bis H-6 zugeordnet. Das

long-range-COSY kann auch zur Kohlenhydrat-Sequenzbestimmung eingesetzt werden, wobei man interglycosidische H,H-Fernkopplungen auswertet (Abschnitt 8.3.1.3).

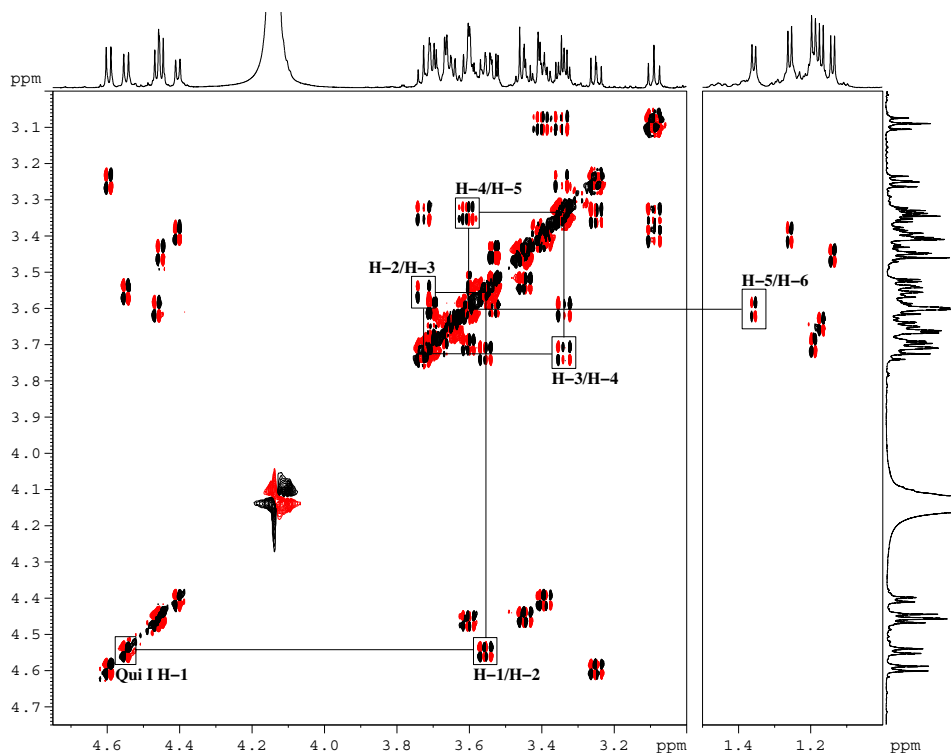


Abbildung 43: DQF-COSY-Spektrum von Ruberosid A, Ausschnitt der Kohlenhydratresonanzen (D_2O/CD_3CN , 2:3, v/v)

8.1.3.2. TOCSY

Beim TOCSY-Experiment (TOtal Correlation SpectroscopY) werden im Gegensatz zum COSY nicht nur Korrelationen zwischen unmittelbar koppelnden Partnern angezeigt, sondern zwischen allen Kernen eines Spinsystems. Dies geschieht durch Anlegen eines Spinlockfeldes (B_1) im Anschluß an den 90° -Puls der Präparationsphase, wodurch die Magnetisierung in der xy -Ebene gehalten wird. In diesem B_1 -Feld ist der Einfluss des äußeren magnetischen Feldes B_0 und damit die Wirkung der chemischen Verschiebung praktisch ausgeschaltet. Es dominiert die skalare Kopplung zwischen den Kernen. In Abhängigkeit von der Dauer des angelegten Spinlocks, der sog. Mischzeit, kann so Magnetisierungstransfer über das gesamte Spinsystem erreicht werden: man spricht von Totalkorrelation.

Die TOCSY-Sequenz dient zur Erkennung von Spinsystemen. So lässt sich beispielsweise in Abbildung 44 das zu A-H-3 (δ_{H} 4,13 ppm) gehörende Spinsystem erkennen. Darüber hinaus können zahlreiche weitere Spinsysteme des Aglycons identifiziert werden (hochsymmetrischer Bereich zwischen δ_{H} 2,5 und 1,0 ppm). Von besonderer Bedeutung ist das Experiment jedoch für die Identifizierung von Zuckereinheiten. Aus dem TOCSY kann abgelesen werden, welche Resonanzen zu einem Zuckerbaustein gehören. Zweckmäßigerweise geht man dabei von den in der Regel freistehenden Signalen der anomeren Protonen aus.

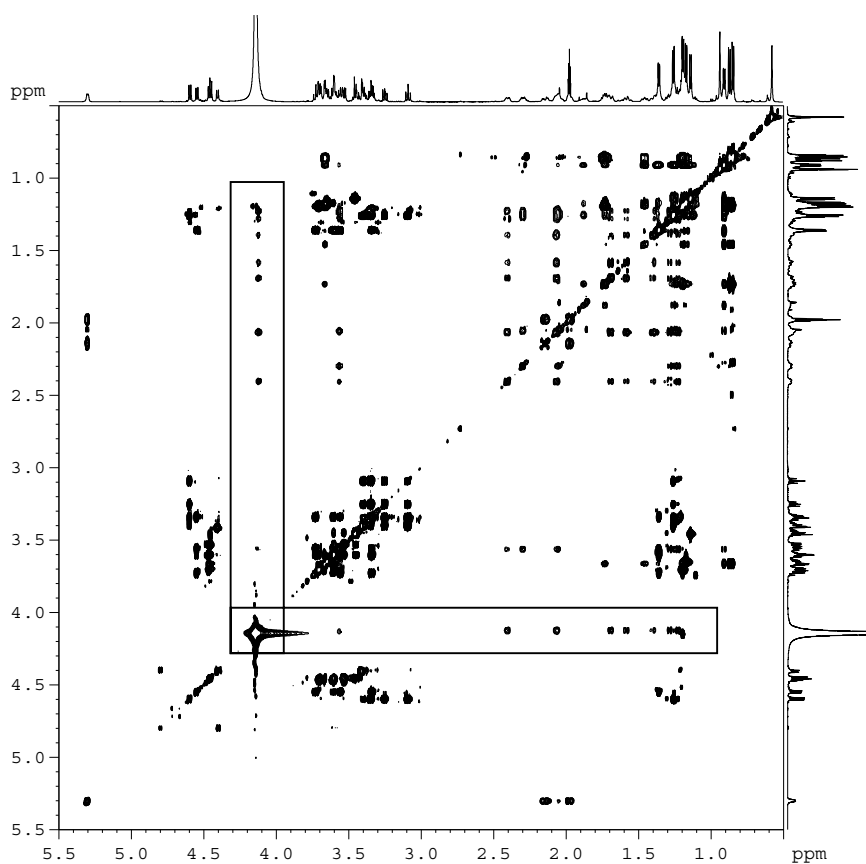


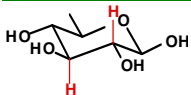
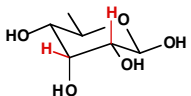
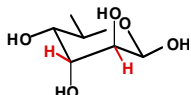
Abbildung 44: TOCSY-Spektrum von Ruberosid A, der Kasten zeigt das zu A-H-3 gehörende Spinsystem (Totalkorrelation von A-H-1 bis H-8)

8.1.3.3. 1D TOCSY

Mit der eindimensionalen Variante des Experiments (siehe Einführung) können durch selektive Anregung der anomeren Protonen hochaufgelöste Subspektren einzelner Zuckereinheiten aufgenommen werden. Die Magnetisierung wird dabei ausgehend vom angeregten Signal durch den TOCSY-Transfer auf das gesamte Spinsystem übertragen.

Mit diesem Experiment ist es somit möglich, auch in den stark überlagerten Bereichen der Kohlenhydratresonanzen die einzelnen Zuckerbausteine zu identifizieren. Abbildung 45 zeigt die erhaltenen Subspektren der Zuckerbausteine von Ruberosid A nach selektiver Anregung der Protonen. Die Kopplungskonstanten geben gemäß einer Karplus-Beziehung Aufschluß über die Konfiguration der Protonen im Zuckerring (Tabelle 9).

Tabelle 9: Erwartungswerte für die vicinalen Kopplungskonstanten der Ringprotonen in Hexapyranose-Ringen.¹⁶⁷

	Anordnung	Diederwinkel	Kopplungskonstante $^3J_{H,H}$
	axial, axial <i>antiperiplanar</i>	180°	8-10 Hz
	axial, äquatorial <i>gauche</i>	60°	3-4 Hz
	äquatorial, äquatorial <i>gauche</i>	60°	3-4 Hz

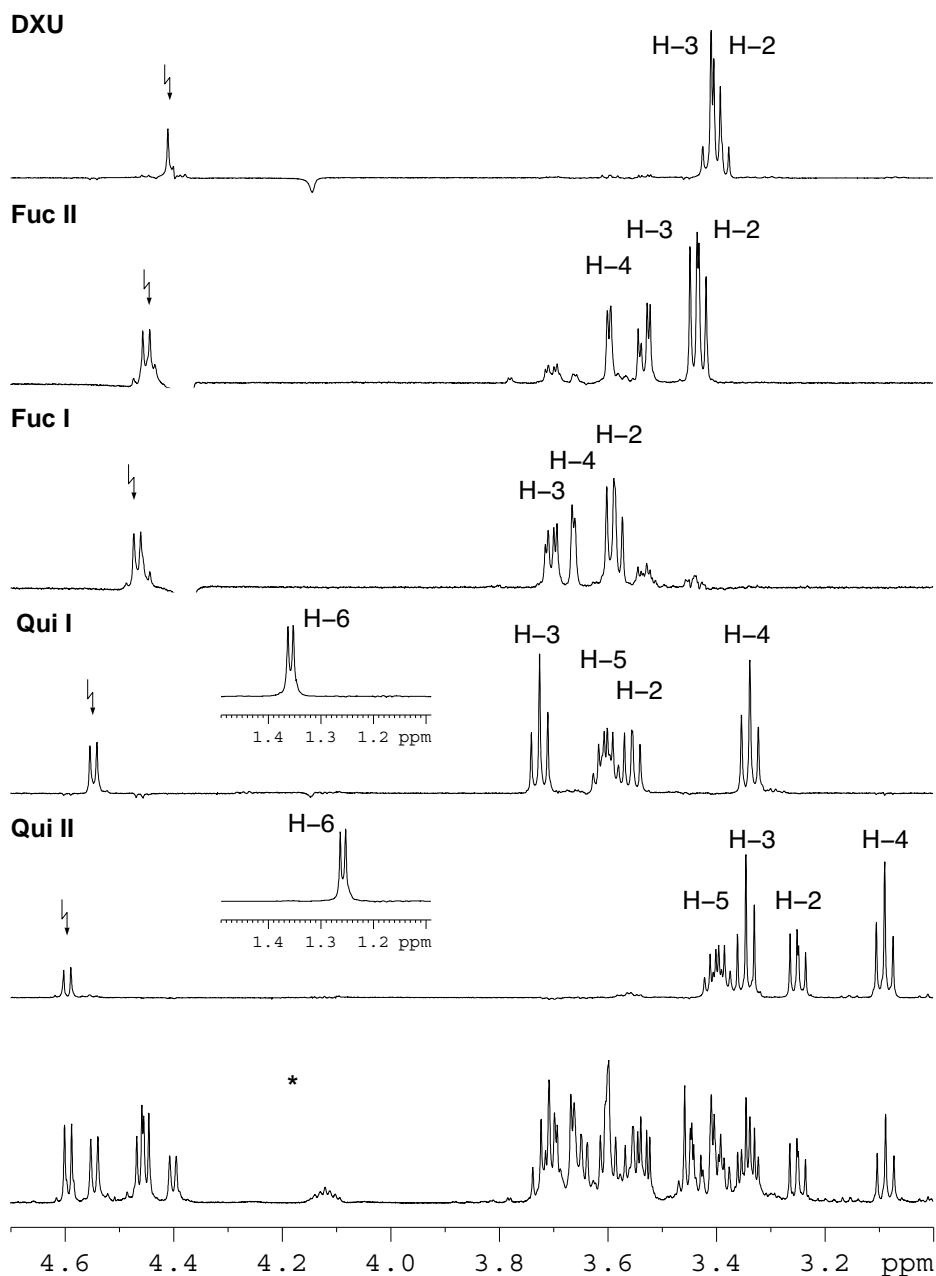


Abbildung 45: Selektive TOCSY-Subspektren der einzelnen Zuckerbausteine von Ruberosid A; Aufnahmetemperatur 300 K, Fucose-Subspektren zur Freistellung der anomeren Signale bei 285 K, * HDO-Restsignal unterdrückt

Der Magnetisierungstransfer ist von der Größe der J -Kopplungen und der Mischzeit t_{mix} abhängig. Dies führt dazu, daß in β -galacto-konfigurierten Spinsystemen, wie Galactose oder Fucose, der Transfer bedingt durch die kleine Kopplungskonstante $J_{4/5}$ ($< 1\text{ Hz}$) an H-4 abbricht (Abbildung 45). Auch lange Mischzeiten von 200 ms bewirken keinen Magnetisierungstransfer über einen solchen „Flaschenhals“¹⁶⁴ hinweg.

Bei ausreichend großen Kopplungskonstanten ($>1\text{ Hz}$) können durch Aufnahme einer Reihe von TOCSY-Subspektren einer Zuckereinheit mit zunehmenden Mischzeiten nach und nach die einzelnen Signale im Spinsystem zugeordnet werden. Abbildung 46 zeigt eine Mischzeitvariation einer Quinovoseeinheit aus Ruberosid A. Die Aussage ist grundsätzlich gleichwertig mit der des COSY-Experiments. Eng beieinanderliegende Signale können jedoch im 1D TOCSY-Subspektrum wegen der höheren Auflösung besser erkannt und zugeordnet werden. (Beim COSY liegen Korrelationsspeaks benachbarter Signale nahe an der Diagonale; durch die Antiphasenstruktur kann es zudem bei aufeinanderfallenden Crosspeaks zu partieller Signalauslöschung kommen).

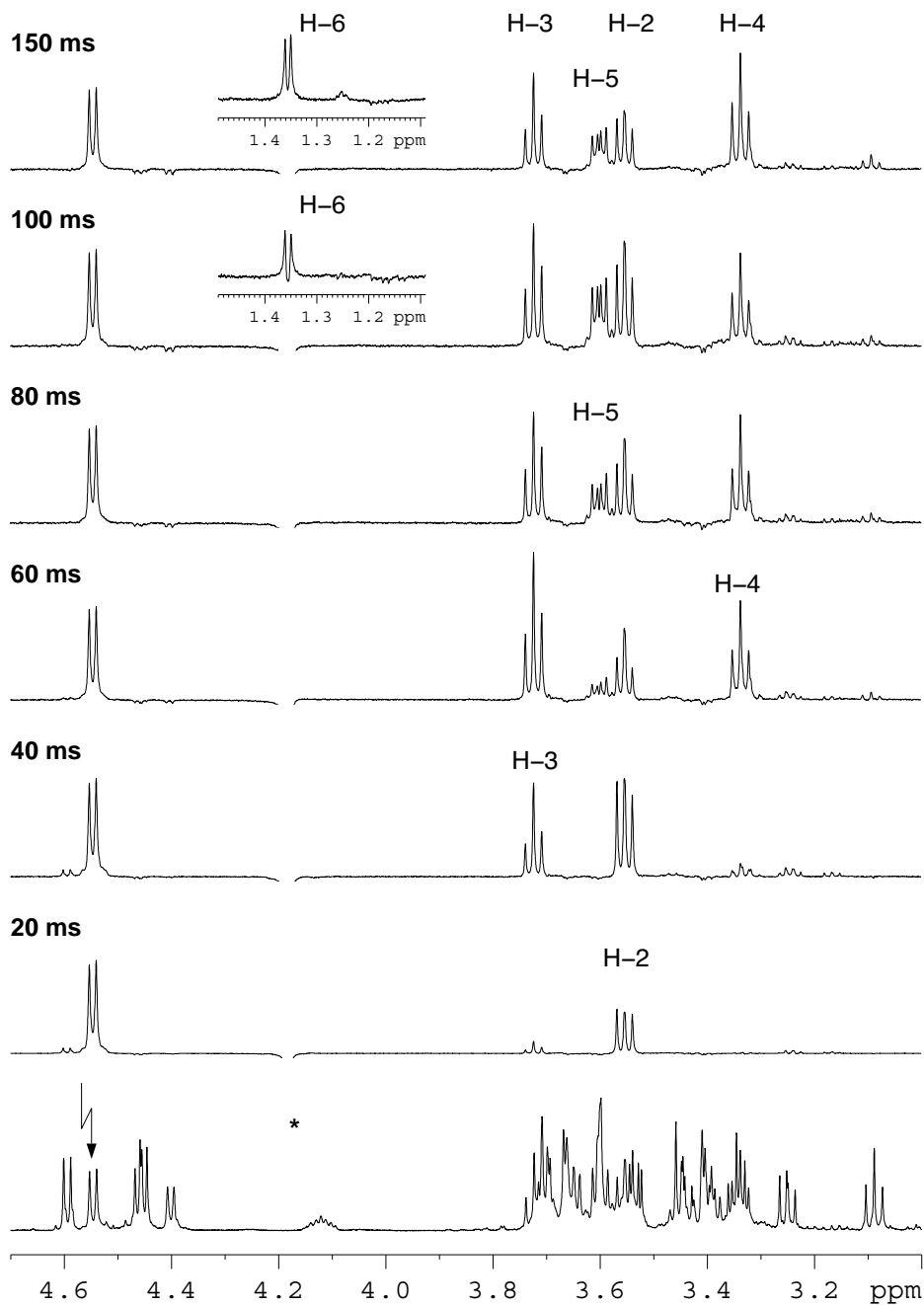


Abbildung 46: Mischzeitvariation in 1D TOCSY-Spektren (Quinovose I aus Ruberosid A). Mit zunehmender Mischzeit erfolgt Magnetisierungstransfer von H-1 auf nacheinander H-2 bis H-6.

8.1.3.4. NOESY/ROESY

Das NOESY-Experiment (Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY) ist das zweidimensionale Equivalent des klassischen NOE-Differenz-Spektrums. Es liefert Korrelationssignale, die von dipolarer Kreuz-Relaxation zwischen räumlich benachbarten Kernen herrühren und gibt somit Auskunft über die stereochemische Anordnung von Protonen im Molekül (z.B. Unterscheidung zwischen exo/endo-, cis/trans- oder axial/äquatorial-Konfigurationen). Neben dem Abstand der wechselwirkenden Kerne voneinander hängt der Betrag des NOE-Effekts von der Molekülbeweglichkeit (Korrelationszeit τ_c) ab. Er kann sowohl positive als auch negative Werte annehmen und für Moleküle im mittleren Molmassenbereich auch Null betragen.

Das ROESY-Experiment (Rotating frame Overhauser Enhancement SpectroscopY) ist eine Variation des NOESY, die dieses Problem behebt. Hier führt im Gegensatz zum NOESY nicht die Kreuzrelaxation longitudinaler, sondern transversaler Magnetisierung - bewirkt durch einen Spinlock im rotierenden Koordinatensystem - zu Korrelationen. ROESY-Signale sind stets positiv.

Sowohl im NOESY, als auch im ROESY treten zuweilen Signale auf, die von COSY-Magnetisierungstransfer herrühren. Diese lassen sich an ihrer Antiphasenstruktur erkennen. Im NOESY werden weiterhin Crosspeaks detektiert, die durch chemischen Austausch bedingt sind. Im ROESY können zudem aufgrund von TOCSY-Transfer Signale mit entgegengesetzter Phase auftreten. Durch geeignete Wahl der Spinlocksequenz lassen sich solche TOCSY-Artefakte jedoch unterdrücken (siehe exp. Teil).

Im Falle der Asterosaponine wurden die Experimente beim Aglycon zur Zuordnung der α - und β -Positionen und bei der Saccharidkette zur Erkennung 1,3-diaxialständiger Protonen eingesetzt. Dies ist besonders im Fall von β -galactokonfigurierten Zuckerbausteinen, wie Fucose oder Galactose, von Bedeutung: Hier ist wegen der äquatorialen Konfiguration von H-4 und der daraus resultierenden kleinen Kopplungskonstanten $J_{4/5}$ keine Aussage über die Anordnung von H-5 (axial oder äquatorial) möglich. Diese Unterscheidung kann anhand von diaxialen NOE/ROE-Korrelationen, z. B. zwischen H-1 (axial) und H-5, getroffen werden (Abbildung 47).

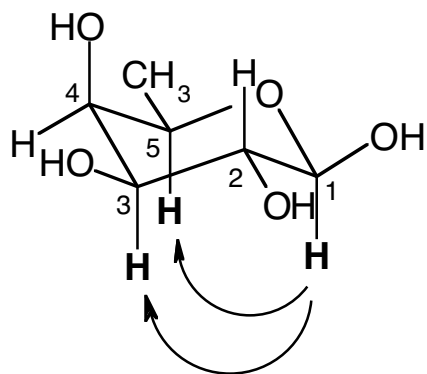


Abbildung 47: β -D-Fucopyranose; die Pfeile zeigen 1,3-diaxiale NOE/ROE-Korrelationen an

Darüber hinaus kann das NOESY/ROESY-Experiment auch zur Identifizierung der glycosidischen Verknüpfungspositionen eingesetzt werden. Dies erfolgt durch Auswertung interglycosidischer Korrelationen zwischen den anomeren Protonen und Wasserstoffatomen an der Verknüpfungsstelle des benachbarten Zuckers. Zur Bestimmung der Zuckersequenz siehe Abschnitt 8.3.1.3.

8.1.3.5. HSQC/HMQC

Bei diesem Experiment handelt es sich um eine inverse H,C-Korrelation. Angezeigt werden Kreuzsignale zwischen Protonen und ^{13}C -Kernen, die über eine Bindung miteinander verbunden sind. Auf diese Weise wird durch die Zuordnung einer Protonenresonanz unmittelbar das zugehörige Kohlenstoffsignal erhalten und umgekehrt. Multiplizitäten-editierte Versionen ermöglichen, wie in einem DEPT-Spektrum, eine Unterscheidung von CH-, CH₂- und CH₃-Gruppen (Abbildung 48). Da es sich um ein protonendetektiertes (inverses) Experiment handelt, ist die Empfindlichkeit gegenüber klassischen C,H-Korrelationen um den Faktor 8 gesteigert (siehe Kapitel 2.1.4). Eine weitere Sensitivitätsverbesserung wird durch den Einsatz von (Mikro-)Inversprobenköpfen erreicht. Durch Verwendung von Pulssequenzen mit Gradientenselektion kann zudem die Empfängerempfindlichkeit voll ausgenutzt werden.

Das HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) unterscheidet sich vom HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) neben dem anderen Weg der Signalerzeugung in der Praxis vor allem dadurch, daß die Signale in der F1-Domäne nicht durch homonukleare H,H-Kopplungen verbreitert sind. Daher ist dieses Experiment (HSQC) für die Aufnahme von signalreichen Saponinspektren besonders geeignet. Abbildung 48 zeigt ein Multiplizitäten-editiertes HSQC (mult. edit. HSQC)

von Ruberosid A. Man erkennt deutlich die Bereiche der olefinischen, anomeren, aliphatischen und Kohlenhydratresonanzen der Asterosaponine in beiden Dimensionen.

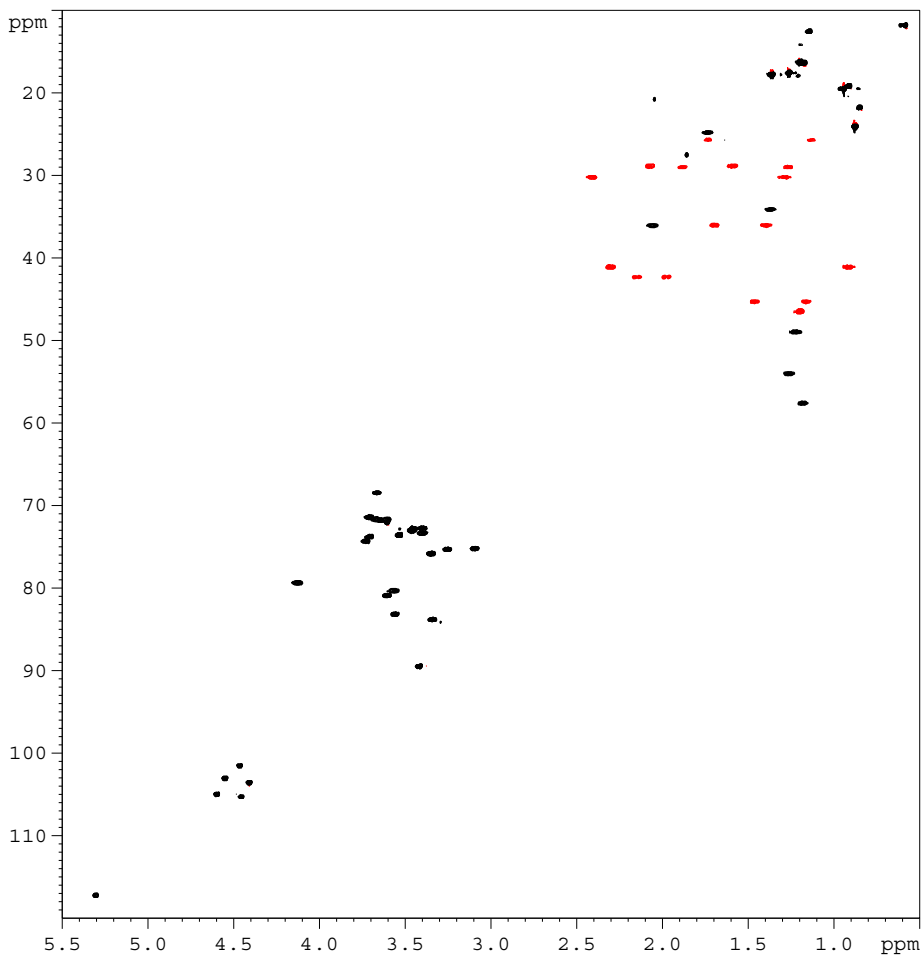


Abbildung 48: Multiplizitäten-editiertes HSQC von Ruberosid A, CH- und CH₃-Gruppen mit positiver Phase (schwarz), CH₂-Fragmente mit negativer Phase (rot)

8.1.3.6. HMBC

Beim HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) werden heteronukleare H,C-Fernkopplungen detektiert. In der Regel handelt es sich dabei um $^2J(\text{C,H})$ und $^3J(\text{C,H})$ -Kopplungen, so daß dieses Experiment zur Aufklärung des Kohlenstoffgerüsts eines Moleküls, beispielsweise des Asterosaponin-Aglycons, eingesetzt wird. Signale, die von $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungen stammen, werden durch die Pulssequenz unterdrückt. Von besonderer Bedeutung für die Bestimmung der Zuckersequenz erweist sich die Möglichkeit des Experiments, auch $^3J(\text{COCH})$ -Fernkopplungen über eine glycosidische Bindung hinweg anzeigen zu können.

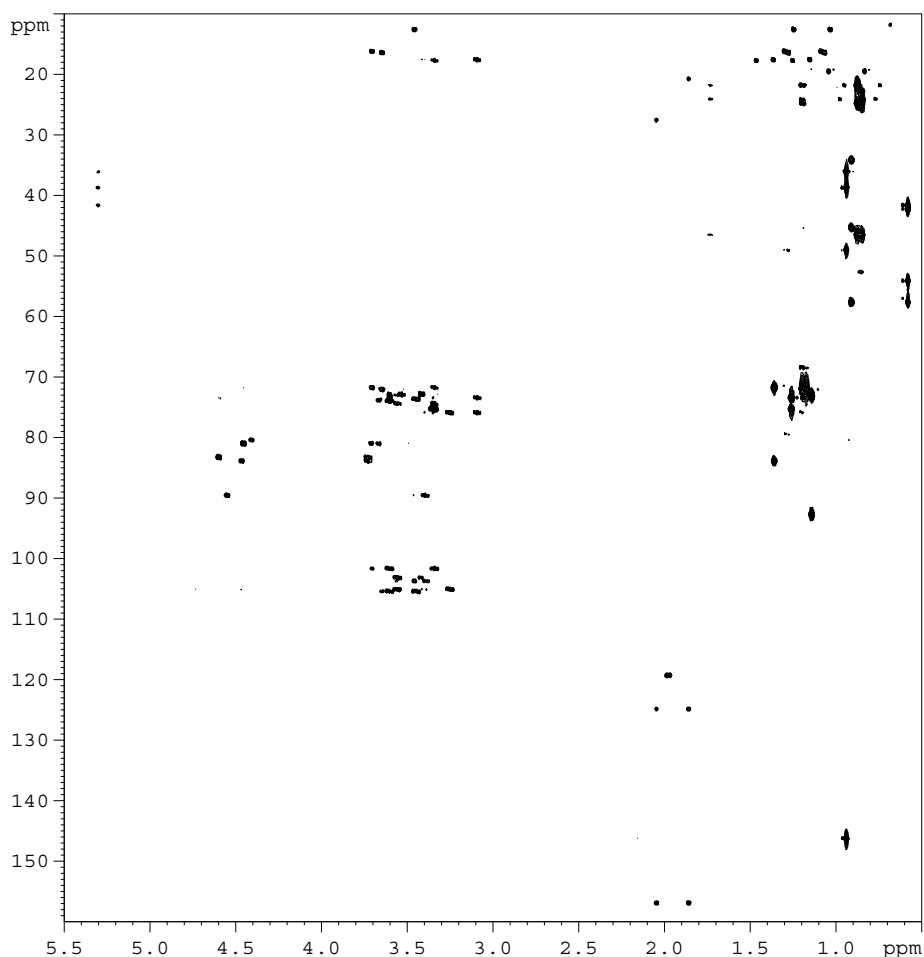


Abbildung 49: HMBC-Spektrum Ruberosid A

8.1.3.7. HSQC-TOCSY/HMQC-TOCSY

Die Kombination der HSQC-Methode mit einer TOCSY-Sequenz führt eigentlich zu einem dreidimensionalen Experiment. Wird jedoch die Evolutionsphase des TOCSY-Teils weggelassen, erhält man ein ^{13}C -editiertes TOCSY-Spektrum. Eine Reihe aus einem solchen Spektrum zeigt den TOCSY-Transfer zu weiteren Protonen im Spinsystem an. Die Kohlenstoffresonanzen eines Spinsystems können dagegen aus einer Spalte des Spektrums erhalten werden. (Dies entspricht jedoch nicht dem eigentlichen Weg des Magnetisierungstransfers). In dem in Abbildung 50 gezeigten Spektrum von Ruberosid A können aus der Reihe bei δ_{C} 105,0 ppm sämtliche Protonenresonanzen des Zuckerspinsystems Quinovose II (blaue Linie) und in der Spalte bei δ_{H} 4,59 ppm die zugehörigen Kohlenstoffsignale (rote Linie) abgelesen werden.

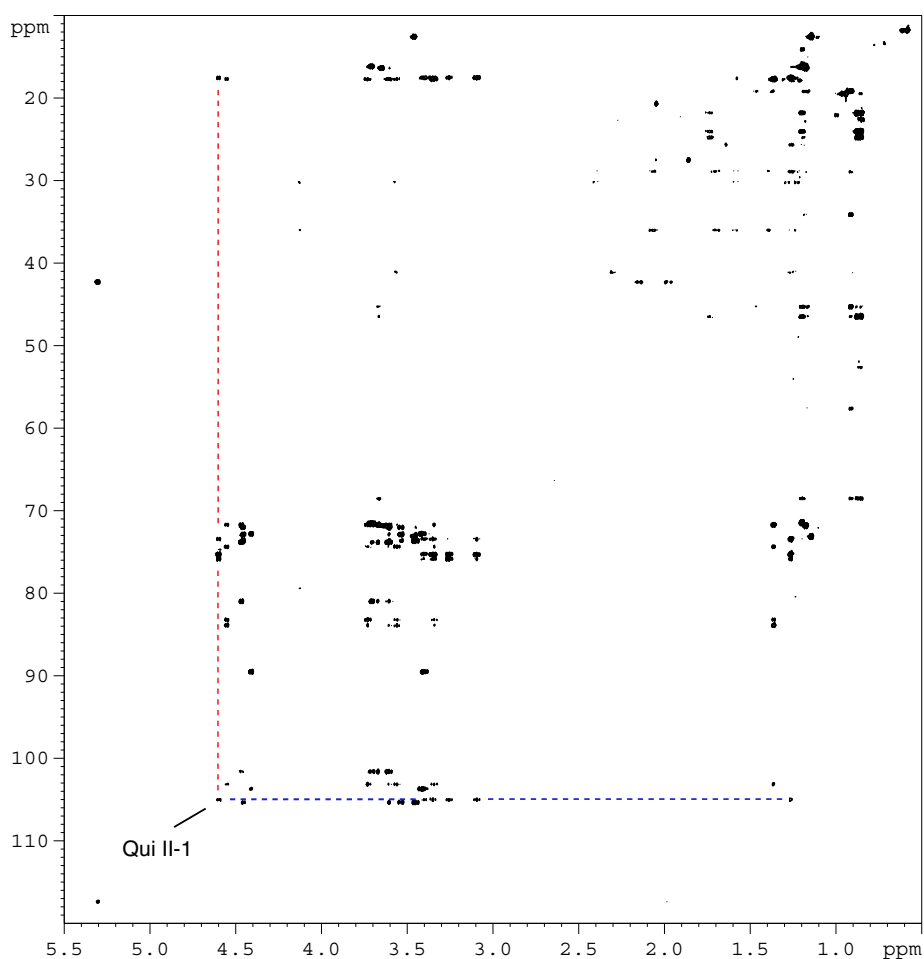


Abbildung 50: HSQC-TOCSY-Spektrum von Ruberosid A; t_{mix} 100 ms

8.1.4. Messungen mit dem 5 mm-Cryo-Probenkopf

Die in dieser Arbeit entwickelte Vorgehensweise von LC-NMR-MS-Screening und zielgerichteter Isolierung neuer Verbindungen erwies sich als sehr effektiv zur Identifizierung neuer Asterosaponine.

Die Menge der auf diesem Wege erhaltenen unbekannt Substanzen kann unter Umständen jedoch sehr gering sein, da die abschließende semi-präparative Auftrennung an einer Säule im analytischen Maßstab erfolgt und es sich bei den interessierenden Verbindungen zumeist um Nebenkomponten der Probe handelt. Darüber hinaus ist die Menge an verfügbarem Naturstoffextrakt in der Regel beschränkt.

Aus diesen Gründen wurde der neuartige supraleitende Cryoprobenkopf der Fa. Bruker auf seine Eignung zur Untersuchung sehr kleiner Substanzmengen erprobt. Der Hersteller gibt gegenüber konventionellen Probenköpfen eine vierfache Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses an (siehe Kap. 2.1.6).

Als Proben wurden Lösungen von 1,4 mg Ruberosid E (Kap. 8.3.5) und 0,3 mg Ruberosid F (Kap. 8.3.6) in 600 μ l D₂O/CD₃CN (2:3, v/v) verwendet. Dies entspricht Konzentrationen von 1,9 mM bzw. 0,4 mM. Die in Kapitel 8.3.5 und 8.3.6 geschilderten NMR-Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Saponine wurden mit diesem supraleitenden Probenkopf durchgeführt.

Die HSQC-Spektren der Ruberosid E-Probe wurden mit dem Cryo-Probenkopf mit zwei Scans pro Inkrement aufgenommen. Bei einer typischen Spektrengöße von 512 Reihen entspricht dies lediglich einer Aufnahmedauer von 45 min. Für die Ruberosid F-Probe wurden 4 Scans benötigt. In beiden Fällen konnte jedoch der komplette Satz zweidimensionaler Experimente innerhalb einer Nacht aufgenommen werden.

Die vierfache Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses konnte bestätigt werden: Abbildung 51 zeigt den Vergleich eines konventionellen 5 mm-Inverskopfes (TXI) bei 500 MHz mit dem entsprechenden Cryo-Inverskopf (Cryo-TXI). Bereits bei 4 Scans pro Inkrement wurden mit dem Cryokopf Spektren hoher Qualität erreicht. Im konventionellen Probenkopf wurden für ein vergleichbares Signal/Rausch-Verhältnis 64 Scans – d. h. die 16fache Aufnahmedauer - benötigt.

Ein weiteres Beispiel der Leistungsfähigkeit des Probenkopfes ist in Abbildung 52 gezeigt. Da der Probenkopf die Acquisition von TOCSY-Spektren der Ruberosid F-Probe mit nur einem Scan pro Inkrement innerhalb von ca. 15 min zulässt, wurde ein

zusätzliches hochaufgelöstes TOCSY-Spektrum vom Kohlenhydrat-Bereich der Probe mit Faltung in der F1-Domäne aufgenommen. Das in einer Aufnahmezeit von 12 min erhaltene Spektrum erlaubt die Analyse der Kopplungsmuster der Zuckerring-Protonen. Es liefert die gleiche Aussage wie ein Satz selektiver eindimensionaler TOCSY-Spektren, ohne daß jedoch fünf verschiedene selektive Experimente aufgesetzt werden müssen.

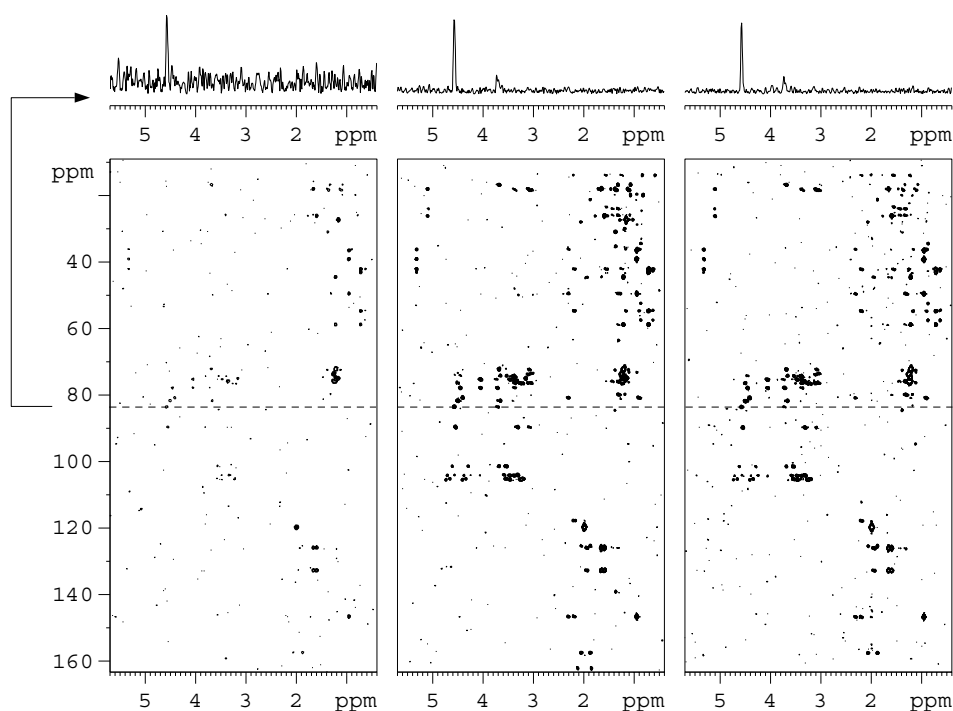


Abbildung 51: HMBC-Spektren von Ruberosid E (1,9 mM). Links: konventioneller 5 mm-Inverskopf (TXI) bei 500 MHz, 4 Scans; Mitte: 5 mm-Cryo-Inverskopf (Cryo-TXI) bei 500 MHz, 4 Scans; rechts: konventioneller 5 mm-Inverskopf (TXI), 64 Scans. Die Spektren sind so dargestellt, daß im Konturplot das Rauschen gerade noch erkennbar ist. Oben sind Reihen bei δ_C 83,0 ppm extrahiert.

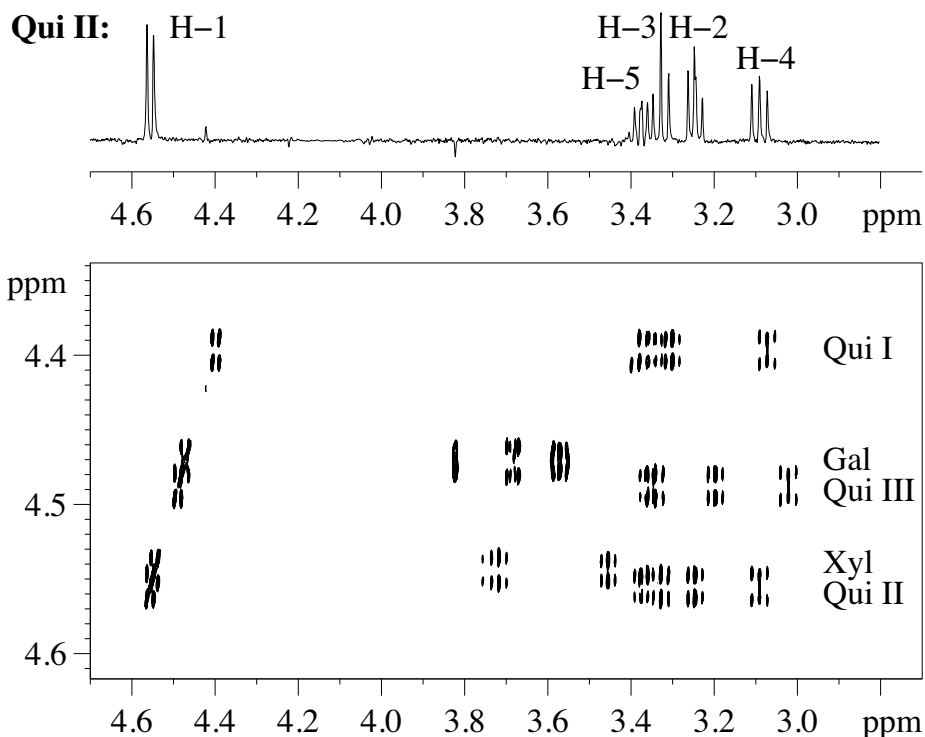


Abbildung 52: Hochaufgelöstes 2D TOCSY einer 0,4 mM Lösung von Ruberosid F, aufgenommen mit einem Scan pro Inkrement. Oben: Die extrahierte Reihe stellt ein TOCSY-Subspektrum der Quinovose-Einheit II von Ruberosid F dar.

Der Cryo-Probenkopf erwies sich als außerordentlich geeignet für die Strukturaufklärung von Asterosaponinen im sub-Milligramm-Bereich. Hier zeigt sich eine Perspektive für die Zukunft der LC-NMR: Sollte es gelingen, die Cryo-Technologie auch auf Durchflußprobenköpfe zu übertragen, wären auch heteronuklear korrelierte LC-NMR-Experimente im Bereich des Möglichen. Bislang jedoch scheint die technische Umsetzung noch Probleme zu bereiten.

8.2. MS von Asterosaponinen

Bei der Elektronenspray-Ionisierung handelt es sich um eine schonende Ionisierungsmethode: das ESI-Spektrum einer Verbindung zeigt in der Regel nur das (Quasi)-Molekölion bzw. Addukte mit Pufferbestandteilen an. Damit wird das Massen-/Ladungsverhältnis des Analytmoleküls erhalten. Um jedoch Fragmentspektren zu erhalten, die eine weitergehende Aussage über die Struktur ermöglichen, müssen MS²- bzw. MSⁿ-Experimente durchgeführt werden. In der in dieser Arbeit entwickelten LC-NMR-MS-Screeningmethode wurden standardmäßig MS²-Spektren im Auto-MS/MS-Modus des Spektrometers durchgeführt. MSⁿ-Experimente wurden bei Bedarf im off-line-Modus aufgenommen.

Dabei wurden folgende drei Fragmentationsmuster beobachtet:

8.2.1. Retro-Aldol-Spaltung in der Steroidseitenkette

Die Retro-Aldol-Spaltung wird beobachtet, wenn sich eine Carbonylfunktion β -ständig zu einer Hydroxyfunktion befindet. Dieses Strukturmerkmal tritt bei Asterosaponinen häufig in der Seitenkette auf: die meisten sind an C-20 hydroxyliert und tragen eine Carbonylfunktion an C-23. Bereits das erste isolierte Asterosaponin, Thornasterosid A, besitzt dieses Strukturelement. Das entsprechende Aglycon wird auch als Thornasterol A bezeichnet. Die Retro-Aldol-Reaktion ist auch für die Bildung von Aglyca vom Pregnantyp verantwortlich, welche in frühen Arbeiten für Bestandteile von Seesternen gehalten worden waren, sich später jedoch als Artefakte von Abbau- und Derivatisierungsreaktionen erwiesen.³²

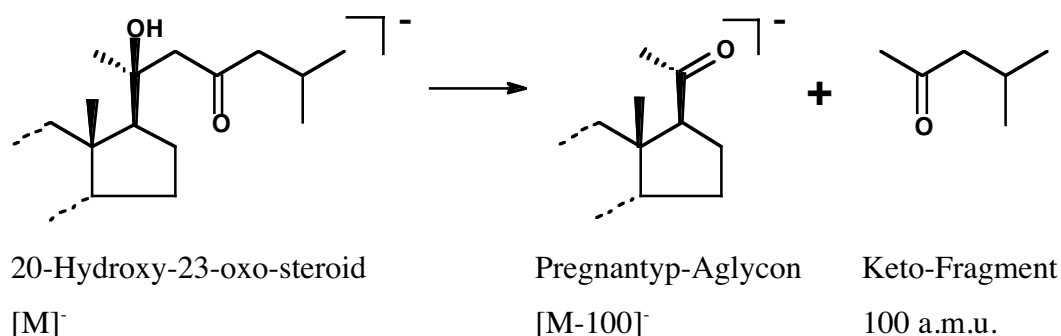


Abbildung 53: Retro-Aldol-Spaltung einer 20-Hydroxy-23-oxo-Steroidseitenkette

Eine Spaltung entsprechend dieser Reaktion findet auch bei MS/MS-Fragmentierungen in der Ionenfalle statt. Die Retro-Aldol-Reaktion ist bevorzugt und führt in der Regel zu den intensivsten Massenpeaks im negativen ESI-Spektrum (Basispeak). Typisch für die Steroidseitenketten von Asterosaponinen sind beispielsweise Massenverluste von 100 (siehe Abbildung 53) oder 114 (weitere Methylgruppe in der Seitenkette) Masseneinheiten.

8.2.2. Abspaltung von Zuckerresten

Die Abspaltung einer oder mehrerer Zuckereinheiten im MS/MS-Spektrum ist von hohem diagnostischen Wert für die Strukturaufklärung der Oligosaccharidseitenkette. In der Regel sind unter den in den LC-NMR-MS-Experimenten im Auto-MS/MS-Modus verwendeten Bedingungen Abspaltungen von zwei Zuckern am häufigsten. Peaks, die vom Verlust von drei, vier oder sämtlichen Zuckern herrühren, sind weniger intensiv aber deutlich erkennbar. Um weiteren Aufschluß über das Verknüpfungsmuster der Kohlenhydratkette zu erhalten, können MSⁿ-Experimente von solchen Fragmenten durchgeführt werden (siehe Kap. 2.2.2.4). Im Fall von Fragmentierungen nach 8.2.1 und besonders nach 8.2.3 sind Zuckerabspaltungen wegen der Intensität der anderen Abspaltungen häufig nur in geringerem Ausmaß im MS/MS-Spektrum zu beobachten. Hier werden Kohlenhydratabspaltungen erst im MS³-Spektrum beobachtet. Tabelle 10 stellt die in wasser- bzw. deuteriumoxidhaltigen Eluenten beobachteten Massenverluste zusammen.

Diese Daten deuten darauf hin, daß während der Fragmentierung offensichtlich ein Hydroxyproton bzw. -Deuteriumatom von der abgespaltenen Zuckereinheit auf das zurückbleibende Molekül übertragen wird: So beträgt die Differenz zwischen der Abspaltung beispielsweise einer Methylpentoseeinheit in Wasser und in Deuteriumoxid zwei Masseneinheiten, obwohl dieser Zucker drei austauschende Hydroxygruppen besitzt. Dies ist im Einklang damit, daß kein Massenunterschied zwischen der Abspaltung endständiger Zuckerbausteine und solcher, die sich in der Saccharidkette befinden, beobachtet wird.

Tabelle 10: Massenverluste bei Abspaltung von Zuckereinheiten in Asterosaponinen

Zuckereinheit	Massenverlust [m/z]	Massenverlust [m/z], H-D-Austausch
Hexose	162	165
Pentose	132	134
6-Deoxy-hexose (Methylpentose)	146	148
6-Deoxy- <i>xyl</i> o-hex-4-ulose	162	165

8.2.3. Bevorzugte Wasserabspaltung (Hydratwasser)

In der Massenspektrometrie sind Wasserabspaltungen von 18 Masseneinheiten (bzw. 20 Einheiten unter H-D-Austauschbedingungen) insbesondere bei positiver Ionisierung häufig und wenig charakteristisch. Asterosaponine, die eine Hydroxygruppe in der Seitenkette besitzen, zeigen jedoch unter den verwendeten ESI-Bedingungen keine solchen Fragmente, andere Abspaltungen sind bevorzugt (z. B. Massenspektrum Asteriidosid C). Bei Asterosaponinen jedoch, die eine 6-Deoxy-*xyl*o-hex-4-ulose-Einheit in der Oligosaccharidkette aufweisen, zeigt das MS/MS-Spektrum fast ausschließlich eine Wasserabspaltung: Die Keto-Funktion der 6-Deoxy-*xyl*o-hex-4-ulose liegt hydratisiert vor und die Abspaltung dieses Hydratwassers findet sehr leicht statt (Kap. 8.3.1.3). Auch hier müssen deshalb zur weiteren Untersuchung des Zuckerrestes ggf. MSⁿ-Experimente durchgeführt werden.

8.3. Ruberoside

8.3.1. Ruberosid A aus *Asterias rubens*

Ruberosid A war das erste Steroidsaponin, das mit der in dieser Arbeit entwickelten Vorgehensweise eines LC-NMR-MS-Screenings als neues Asterosaponin charakterisiert, isoliert und vollständig aufgeklärt wurde. Nachstehend wird die Strukturaufklärung an diesem Beispiel näher erläutert.

8.3.1.1. MS-Daten

Aus den MS-Spektren lassen sich bereits erste Informationen über den Aufbau der Oligosaccharidkette gewinnen. Das ESI-MS zeigt einen Molekülanionen-Peak $[\text{MD}_{13}]^-$ bei m/z 1256 ($\text{D}_2\text{O}/\text{ND}_4^+$ -Formiat/ CH_3CN). Ein MS^2 -Experiment läßt ein Hauptfragment bei m/z 1236 erkennen, welches einer Wasserabspaltung (D_2O) an C-4 der hydratisierten 6-Deoxy-xylo-hex-4-ulose-Einheit entspricht (siehe Abschnitt 8.2). Weitere Fragmente bei m/z 1108 $[\text{1256-148}]^-$, m/z 1088 $[\text{1236-148}]^-$, 960 $[\text{1108-148}]^-$ und 940 $[\text{1088-148}]^-$ entsprechen dem Verlust von zwei Deoxyhexose-Einheiten nacheinander. Ein Nebenfragment bei m/z 499 $[\text{1256-757}]^-$ rührt vom völligen Verlust des Glycosidrestes her. Das D-H-Rücktauschexperiment zeigt an, daß das Molekulargewicht der undeuterten Verbindung $[\text{M}]^-$ m/z 1243 beträgt, was 13 austauschenden Protonen entspricht.

8.3.1.2. Identifizierung der Monosaccharideinheiten von Ruberosid A

Die Identifizierung der einzelnen Zuckerbausteine der Oligosaccharidkette von Ruberosid A basierte auf eindimensionalen TOCSY-Subspektren, die mit selektiver Anregung, ausgehend von den anomeren Protonen, aufgenommen wurden. Zur genauen Extraktion der Kopplungskonstanten wurde eine Pulssequenz mit z-Filter verwendet. Durch Variation der Mischzeiten ergab sich die Zuordnung der Signalsequenz innerhalb des Zuckerspinsystems. Diese wurde anhand der entsprechenden Korrelationen im 2D COSY-Spektrum bestätigt. Die Auswertung der Kopplungsmuster läßt auf die relative Konfiguration der Kohlenhydratprotonen und somit auf die Identität der Zuckereinheiten schließen.¹⁶⁵ Da die Zuordnung der Konfiguration an C-5 von β -glactokonfigurierten Spinsystemen aus den Kopplungskonstanten nicht eindeutig abgeleitet

werden kann (siehe Abschnitt 8.1.3.4), wurden in diesen Fällen zusätzliche NOE-Experimente (NOESY/ROESY) herangezogen. Darüber hinaus ergänzte die Multiplizitäteninformation aus den mult. edit. HSQC-Spektren die Signalzuordnung.

Das ^1H -Übersichtsspektrum von Ruberosid A zeigt fünf β -konfigurierte anomere Protonen bei δ_{H} 4,55, 4,59, 4,46, 4,45 sowie 4,40 ppm an. Neben dem Bereich der überlagerten Kohlenhydratring-Protonen sind noch fünf Methyldoublets im Spektrum zu erkennen (bei δ_{H} 1,36, 1,26, 1,19, 1,17 und 1,14 ppm), die auf Methylpentosen (6-Deoxyhexosen) hindeuten.

8.3.1.2.1.1. *Quinovose I und II*

1D TOCSY-Subspektren, die durch selektive Anregung der anomeren Protonen bei 4,55 und 4,59 ppm erhalten wurden, ergaben zwei Sechs-Spin-Subspektren, welche durchgehend große Kopplungskonstanten ($^3J = 7.9 - 9.4$ Hz) für die ersten fünf Protonen sowie J -Kopplungen von jeweils etwa 6 Hz ($^3J_{\text{H-5, Me-6}}$) zu Hochfeld-Methylresonanzen bei 1,36 bzw. 1,26 ppm aufweisen. Dies zeigt das Vorhandensein von zwei 6-Deoxyhexosen an, bei denen sich die Protonen H-1 bis H-5 alle in axialer Anordnung befinden. Die beiden Zuckereinheiten waren somit als β -Quinovose-Einheiten identifiziert.

8.3.1.2.1.2. *Fucose I und II*

Selektive TOCSY-Experimente, die von der Anregung der anomeren Protonenresonanzen bei 4,46 und 4,45 ppm ausgingen, ergaben zwei Vier-Spin-Systeme; jedes mit zwei großen ($^3J_{\text{H-1, H-2}}$, $^3J_{\text{H-2, H-3}} > 5$ Hz) und zwei kleinen ($^3J_{\text{H-3, H-4}}$, $^3J_{\text{H-4, H-5}} < 5$ Hz) Kopplungskonstanten. Diese Kopplungsmuster zeigen eine β -galacto-Konfiguration der Zuckereinheiten an. Da der Magnetisierungstransfer des TOCSY-Experiments aufgrund der sehr kleinen J -Kopplung ($^3J_{\text{H-4, H-5}} < 1$ Hz) bei H-4 endet („Flaschenhals“), mußten noch weitere NMR-Experimente herangezogen werden, um diese Zuckereinheiten identifizieren zu können. Die Anwesenheit von fünf Kohlenhydrat-Methylgruppen deutet (zusammen mit den MS-Daten) darauf hin, daß es sich bei diesen β -galacto-konfigurierten Zuckern um β -Fucose- und nicht um Galactose-Einheiten handelt. Dies wurde durch HMBC-Korrelationen sowohl zwischen Fuc-C-6 und Fuc-H-4 ($\delta_{\text{C}} 16.4 \rightarrow \delta_{\text{H}} 3.60$ und $16.2 \rightarrow 3.66$ ppm) als auch zwischen Fuc-H-6 und Fuc-C-4 ($\delta_{\text{H}} 1.17 \rightarrow \delta_{\text{C}} 72.0$ und $1.19 \rightarrow 71.7$ ppm) bestätigt. Schließlich erhär-

teten starke NOESY/ROESY-Korrelationen zwischen den anomeren Protonen und H-5 die axiale Anordnung von H-5.

8.3.1.2.1.3. 6-Deoxy-xylo-hex-4-ulose

Selektive Anregung des Protons bei δ_{H} 4,40 ppm offenbarte ein Dreispinsystem mit zwei stark gekoppelten Signalen bei 3,39 und 3,42 ppm. Die vicinalen Kopplungskonstanten $^3J_{\text{H-1,H-2}}$ und $^3J_{\text{H-2,H-3}}$ wurden durch Simulation der Subspektren zu 7,9 und 9,2 Hz bestimmt (Abbildung 54). Das Vorliegen einer 6-Deoxy-xylo-hex-4-ulose-Einheit (DXU) wurde durch eine HMBC-Korrelation von δ_{H} 1,14 ppm (DXU-H₃-6, der fünften noch zuzuordnenden Kohlenhydrat-Methylresonanz) zu einem quart. Kohlenstoff bei δ_{C} 92,6 ppm (DXU-C-4) angezeigt.

Die HMBC-Korrelation von DXU-C-4 nach δ_{H} 3,42 (DXU-H-3) und 3,46 ppm (DXU-H-5) bewies auf der anderen Seite die Verbindung zu dem Drei-Spin-System DXU-H-1, H-2, H-3. Eine starke NOESY-Korrelation zwischen DXU-H-1 und H-5 zeigte die axiale Anordnung von DXU-H-5 an.

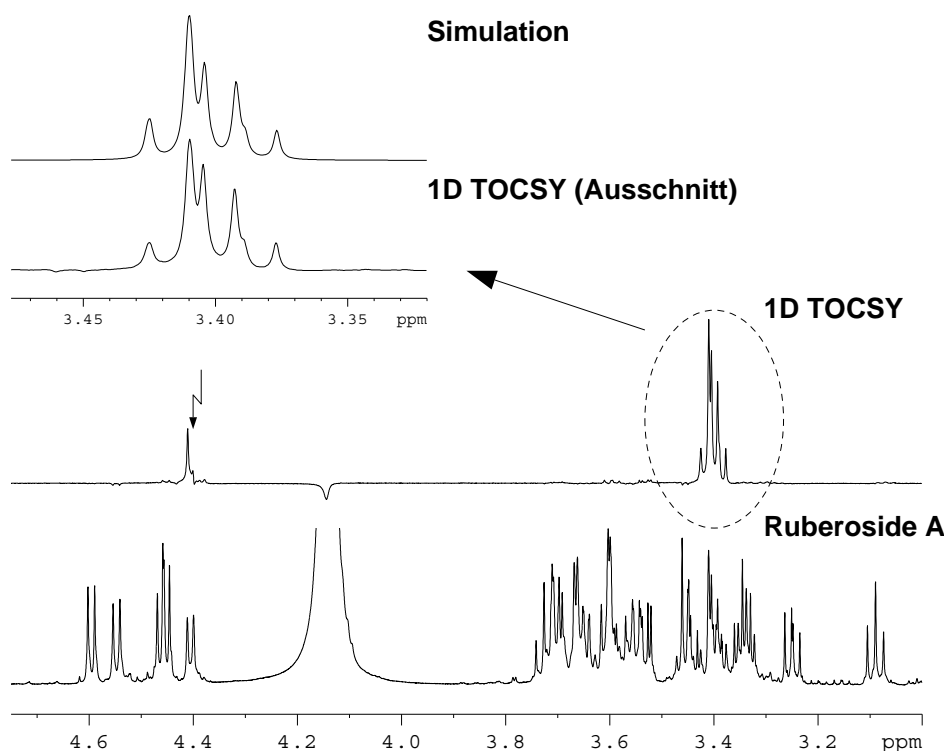


Abbildung 54: 1D TOCSY-Subspektrum des anomeren Protons der DXU-Einheit von Ruberosid A und Simulation des Multipletts (Ausschnitt aus dem simulierten Spinsystem DXU-H-1, H-2, H-3).

Die Zuordnung der verbreiteten D-Konfiguration für die Zuckereinheiten wurde in Analogie zu den Zuckerkonfigurationen der vorher isolierten Asterosaponine getroffen.³²

Tabelle 11: Identifizierung der Monosaccharid-Einheiten von Ruberosid A

Spinsystem	δ anom. Proton [ppm]	Kopplungskonstanten J der Ringprotonen ^{a, 165}				Position H-5	Position 6	Relative Konfiguration	Monosaccharid-Einheit
		1,2	2,3	3,4	4,5				
1	4,59	L	L	L	L	axial	CH ₃	<i>β-gluco</i>	β -Quinovose II
2	4,55	L	L	L	L	axial	CH ₃	<i>β-gluco</i>	β -Quinovose I
3	4,46	L	L	S	S	axial ^b	CH ₃	<i>β-galacto</i>	β -Fucose I
4	4,45	L	L	S	S	axial ^b	CH ₃	<i>β-galacto</i>	β -Fucose II
5	4,40	L	L	-	-	axial ^b	CH ₃		β -6-deoxy-xylohex-4-ulose

^a L (large): $J > 5$ Hz; S (small): $J < 5$ Hz; ^b axiale Stellung aus zusätzlichem NOE-Experiment erhalten

Die ¹³C-chemischen Verschiebungen der Kohlenhydratresonanzen wurden schließlich aus den mult. edit. HSQC, HMBC und HSQC-TOCSY-Experimenten erhalten. Tabelle 12 zeigt sowohl die ¹H- als auch die ¹³C-Daten der Monosaccharideinheiten von Ruberosid A.

Tabelle 12: ^1H und ^{13}C -Daten der Monosaccharideinheiten von Ruberosid A

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}	J
Qui I				
1	103.0	CH	4.55	$J_{1,2}$ 7.9
2	83.2	CH	3.56	$J_{2,3}$ 9.2
3	74.3	CH	3.73	$J_{3,4}$ 9.2
4	83.9	CH	3.34	$J_{4,5}$ 9.4
5	71.7	CH	3.60	$J_{5,6}$ 6.1
6	17.7	CH ₃	1.36	
Qui II				
1	105.0	CH	4.59	$J_{1,2}$ 7.9
2	75.3	CH	3.25	$J_{2,3}$ 9.2
3	75.9	CH	3.35	$J_{3,4}$ 9.4
4	75.2	CH	3.09	$J_{4,5}$ 9.4
5	73.4	CH	3.40	$J_{5,6}$ 6.3
6	17.6	CH ₃	1.26	
Fuc I				
1	101.5	CH	4.46	$J_{1,2}$ 7.6
2	80.9	CH	3.60	$J_{2,3}$ 9.6
3	73.8	CH	3.70	$J_{3,4}$ 3.4
4	71.7	CH	3.66	$J_{4,5}$ < 1
5	71.4	CH	3.71	$J_{5,6}$ 6.5
6	16.2	CH ₃	1.19	
Fuc II				
1	105.3	CH	4.45	$J_{1,2}$ 7.8
2	72.8	CH	3.45	$J_{2,3}$ 9.9
3	73.6	CH	3.53	$J_{3,4}$ 3.5
4	72.0	CH	3.60	$J_{4,5}$ < 1
5	71.8	CH	3.64	$J_{5,6}$ 6.5
6	16.4	CH ₃	1.17	
DXU (Hydratform)				
1	103.6	CH	4.40	$J_{1,2}$ 7.9 [#]
2	72.8	CH	3.39	$J_{2,3}$ 9.2 [#]
3	89.5	CH	3.42	
4	92.6	C		
5	73.0	CH	3.46	$J_{5,6}$ 6.4
6	12.5	CH ₃	1.14	

[#] durch Spektrensimulation, Mult.: Multiplizität

8.3.1.3. Deoxy-xylo-hex-4-ulose: Hydratationsgleichgewicht der Ketogruppe

Bei 6-Deoxy-xylo-hex-4-ulose handelt es sich um einen Ketozucker (Ulose). Die Ketogruppe ist leicht hydratisierbar. Y. Itakura und T. Komori¹⁶⁶ fanden, daß ov. Asterosaponin 1 (gleiche Oligosaccharidkette wie Ruberosid A) in Pyridin in der Ketoform vorliegt und bei Zugabe von Wasser in die hydratisierte Form übergeht (geminales Diol). Unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen (D_2O/CD_3CN , 2:3, v/v) liegen offensichtlich 5 % der 6-Deoxy-xylo-hex-4-ulose in der Keto-Form vor (ermittelt durch Flächenvergleich des Signals bei δ_H 4,79 ppm mit dem anomeren Signal bei 4,59 ppm). Dies verdeutlichen folgende NMR-Daten: Bei δ_H 4,79 ppm ist ein schwaches Dublettsignal zu erkennen. Selektive Anregung dieser Resonanz lieferte ein 1D TOCSY-Spektrum eines Dreispinsystems, das in Einklang mit der dehydratisierten Form steht (H-2: δ_H 3,60 ppm, H-3: 4,40 ppm; $^3J_{1,2} = 7,9$ Hz, $^3J_{2,3} = 9,4$ Hz). Im HMBC von Ruberosid A ist ein schwaches Korrelationssignal zwischen einer H₃-6-Methylgruppe (δ_H 1,19 ppm) zur Carbonylgruppe C-4 (δ_C 201,0 ppm) zu erkennen.

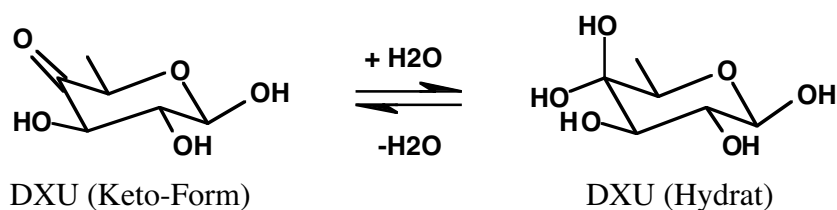


Abbildung 55: 6-Deoxy-xylo-hex-4-ulose - Hydratationsgleichgewicht der Ketogruppe

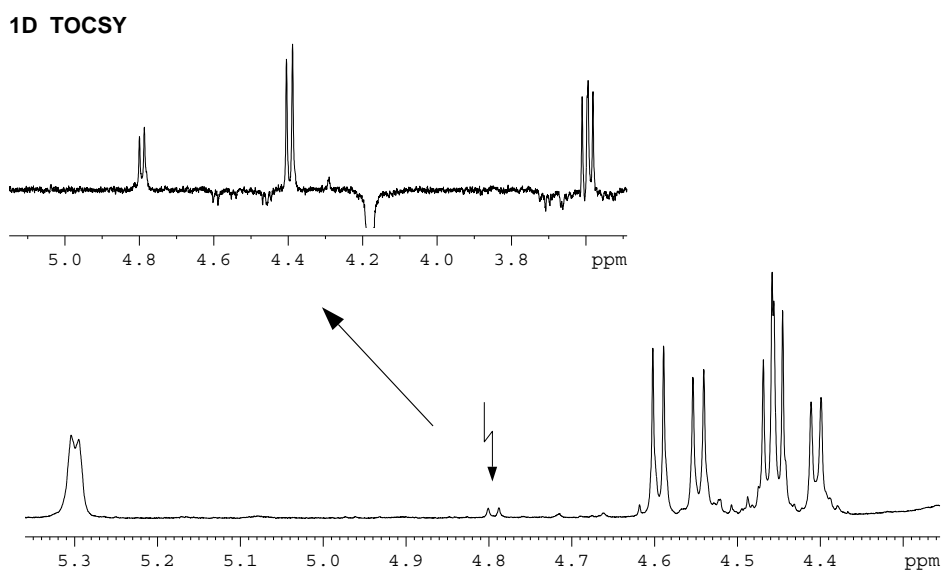


Abbildung 56: 1D TOCSY-Subspektrum der 6-Deoxy-xylo-hex-4-ulose-Einheit von Ruberosid A (Keto-Form). Das Integral des Signals bei δ_{H} 4,79 ppm beträgt 5 % des anomeren Signals bei 4,59 ppm.

8.3.1.4. Identifizierung der Zucker-Verknüpfungspositionen von Ruberosid A

Die Identifizierung der Verknüpfungspositionen der Saccharidkette durch NMR-spektroskopische Methoden kann grundsätzlich anhand von dipolaren Kopplungen über den Raum (NOESY, ROESY) oder aufgrund skalarer - über die glycosidische Bindung vermittelter - Kopplungen erfolgen. Dies können homonukleare (long-range-COSY) oder heteronukleare Kopplungen sein (HMBC).

In Abbildung 57 sind als Beispiel diejenigen Reihen der zweidimensionalen Spektren herausgeschrieben, die Magnetisierungstransfer ausgehend vom anomeren Signal Qui I-1 (δ_{C} 103,0 ppm / δ_{H} 4,55 ppm) zeigen.

So bewirkt beispielsweise die räumliche Nähe zwischen dem anomeren Proton Qui I-H-1 und dem Proton DXU-H-3 bei 3,42 ppm einen deutlichen Cross-Peak im NOESY- und ROESY-Spektrum von Ruberosid A. Dieser interglycosidische NOE deutet auf eine Verknüpfung der Qui I-Einheit an C-3 der DXU-Einheit hin. Doch daneben ergibt auch das DXU-H-3 benachbarte Proton DXU-H-2 ein NOE-Kreuzsignal, wenn auch von geringerer Intensität. Es bleibt zu beachten, daß das NOE-Experiment lediglich Aussagen über die räumliche Nähe und Anordnung liefert. Gewisse Konfor-

mationen der Zuckerkette können so u. U. zu Mehrdeutigkeiten der Zuordnung führen, was eine vorsichtige Auswertung der Ergebnisse erfordert.

Ein weiteres Problem ist die geringe spektrale Dispersion der Protonensignale von Kohlenhydraten: So kann beispielsweise der starke NOE von Fuc II-H-1 zu einer Resonanz bei δ_{H} 3,60 ppm sowohl Fuc I-H-2 (tatsächliche Verknüfungsposition) als auch Qui I-H-5 zugeordnet werden (siehe Tabelle 12). Zwar unterscheiden sich in diesem Fall die Signalformen von Fuc I-H-2 (Triplett) und Qui I-H-5 (dd), doch sind diese im zweidimensionalen Spektrum oft nicht sicher zu erkennen. In solchen Fällen sind hochaufgelöste eindimensionale Experimente, wie ein 1D NOESY oder das klassische NOE-Differenzspektrum, erforderlich. Dennoch ist bei Asterosaponinen mit vielen β -*gluco* konfigurierten Spinsystemen (Glucose, Quinovose) häufig mit dem Auftreten von Signalen mit identischer Triplett-Form zu rechnen. Allgemein ist die Wahrscheinlichkeit von Signalüberlappungen wegen der geringen spektralen Dispersion und der hohen Anzahl an NOE-Cross-Peaks (es treten daneben noch die diaxial-Korrelationen und bei kurzen Mischzeiten COSY-artige Transfers auf) größer als beispielsweise beim HMBC-Experiment (siehe unten).

Das long-range COSY-Experiment besitzt ebenfalls den Nachteil der geringen spektralen Dispersion der Protonenresonanzen. Ferner weisen die 4J -Fernkopplungen deutlich geringere Intensität als die auch im Spektrum auftretenden vicinalen 3J -Kopplungen auf. Dies führt in der Praxis dazu, daß die vicinalen Crosspeaks von geringen Verunreinigungen in der Probe (z.B. dem Ketoisomer der DXU-Einheit, siehe Kap. 8.3.1.3) in etwa die selbe Größenordnung wie die Fernkorrelationen der Hauptkomponente besitzen und somit das Spektrum verkomplizieren. Dafür zeigt das long-range-COSY wegen des skalaren Magnetisierungstransfers die Verknüfungsposition sicher an (Abbildung 57: Magnetisierungstransfer zur DXU-H-3, nicht zu DXU-H-2).

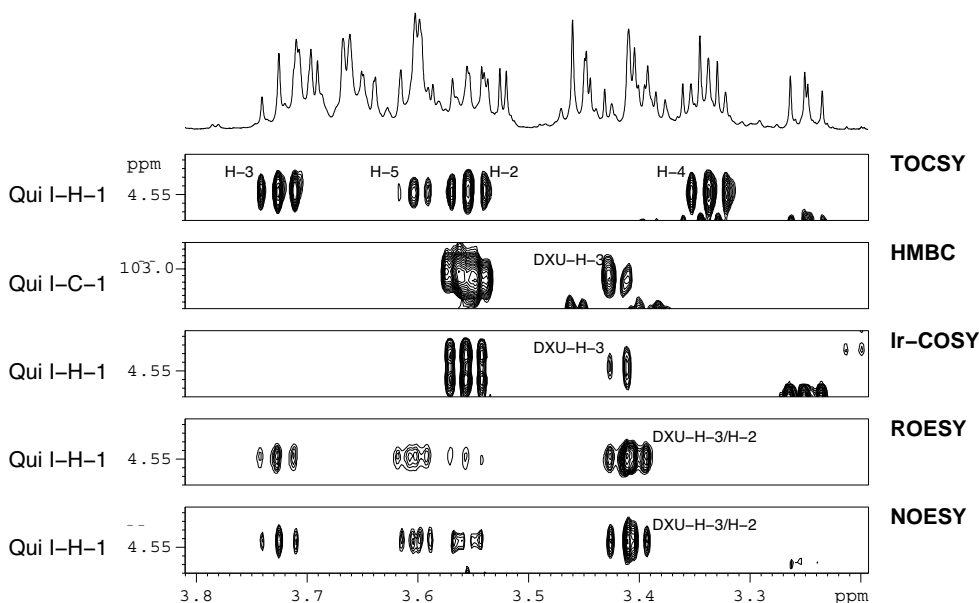


Abbildung 57: Magnetisierungstransfer ausgehend vom anomeren Signal Qui I-1 über die glycosidische Bindung hinweg

Die spektrale Dispersion der ^{13}C -Resonanzen ist wesentlich größer als die der Protonenresonanzen – damit verbunden kommt es seltener zu Signalkoinzidenzen (Tabelle 12). Bereits im einfachen ^{13}C -Übersichtsspektrum kann in der Regel jedem Kohlenstoff ein Signal zugeordnet werden, während es im Protonenübersichtsspektrum zu deutlichen Überlagerungen kommt (vergl. Abschnitt 8.1.1).

Eine Glycosidierung führt zudem selektiv zu einer Tieffeldverschiebung des betreffenden Kohlenstoffatoms, dem sogenannten Glycosidierungsshift.^{167,161} Diese Resonanzen sind im Vergleich zu denen des entsprechenden Monosaccharids um bis zu 10 ppm entschirmt. In Acetonitril- d_3/D_2O lässt sich etwa bei 80 ppm eine Grenze ziehen, unterhalb der die Kohlenstoffkerne erscheinen, die an einer glycosidischen Verknüpfungsposition sitzen (siehe mult. edit. HSQC, Abbildung 48).

Mit dem HMBC Experiment werden heteronukleare long-range Korrelationen zwischen Protonen und Kohlenstoffkernen über zwei oder drei Bindungen hinweg detektiert. So auch 3J (COCH) Korrelationen über die glycosidische Bindung. Die Kopplungskonstante beträgt je nach Diederwinkel bis zu 5 Hz.^{167,168} Auf diese Weise wird die größere spektrale Dispersion der ^{13}C -Verschiebungsachse genutzt, um die Verknüpfungspositionen sicher zu bestimmen und gerade die Kohlenstoffresonanzen der

glycosidischen Verknüpfungspositionen sind durch den Glycosidierungsshift noch zusätzlich gespreizt.

Abbildung 58 erläutert diese Vorgehensweise am Beispiel von Ruberosid A.

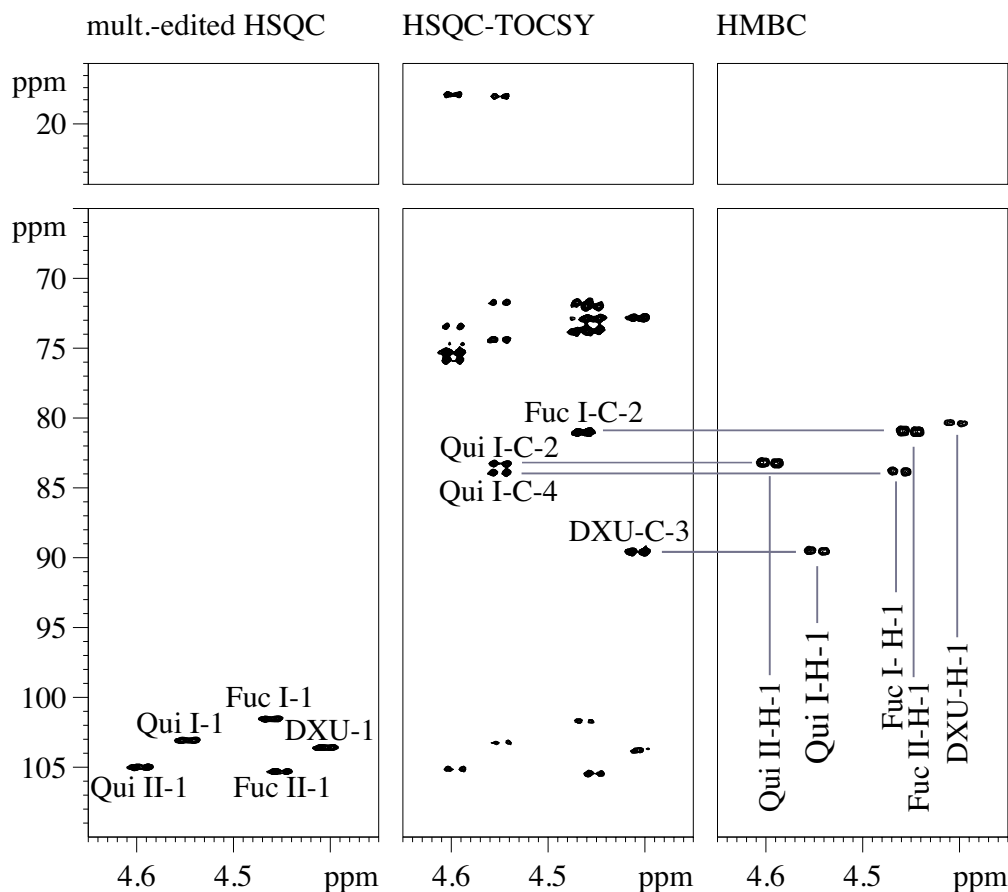


Abbildung 58: Spuren der anomeren Protonen- und Kohlenstoffresonanzen im mult.-edit. HSQC, HSQC-TOCSY und HMBC. Die interglycosidischen Korrelationen der anomeren Protonen mit Kohlenstoffkernen einer benachbarten Zuckereinheit zeigen die Verknüpfungspositionen der Glycosidkette an.

Gezeigt sind die sich entsprechenden Spuren anomerer Protonensignale der HSQC, HSQC-TOCSY und HMBC-Spektren. Im HSQC (ganz links) können die ^{13}C -chemischen Verschiebungen der anomeren Signale abgelesen werden. Aus den daneben abgebildeten anomeren Spuren des HSQC-TOCSY (Mitte) können die ^{13}C -chemischen Verschiebungen der Zuckerring-Kerne abgelesen werden. Man erkennt, daß die Resonanzen zwischen δ_{C} 80 und 90 ppm wegen der Glycosidierung zu tieferem Feld hin verschoben sind. Es ist daher z. B. offensichtlich, daß Qui I zwei glyco-

sidische Verknüpfungen tragen muß. Die anomeren Spuren des HMBC-Spektrums zeigen auf der anderen Seite interglycosidische *long-range*-Korrelationen von den anomeren Protonen zu Ring-Kohlenstoffkernen der benachbarten Zuckereinheit. Da diese Korrelationen nicht im HSQC-TOCSY-Experiment auftreten, rühren sie zweifelsfrei von interglycosidischen 3J (COCH)-Kopplungen her. Hier wird gerade derjenige Weg des Magnetisierungstransfers genutzt, der zu den durch den Glycosidierungsshift weiter gespreizten Kohlenstoffresonanzen führt. Im Fall der Asterosaponine treten keine Signalüberlagerungen auf. Die Zuordnung ist eindeutig.

In Abbildung 57 ist der interglycosidische HMBC-Transfer vom anomeren Kohlenstoff Qui I-C-1 zum Protonensignal DXU-H-3 dargestellt. Auch auf diesem Signalweg ist die Zuordnung der Glycosidierungsposition eindeutig (kein Transfer zu DXU-H-2).

Die HMBC-Korrelationen Fuc II-H-1 \rightarrow Fuc I-C-2, Fuc I-H-1 \rightarrow Qui I-C-4, Qui II-H-1 \rightarrow Qui I-C-2, Qui I-H-1 \rightarrow DXU-C-3 und DXU-H-1 \rightarrow A-C-6 führen zu der in Abbildung 60 gezeigten Pentasaccharid-Kette von Ruberosid A.

Wegen der geschilderten Vorteile wurde für sämtliche Asterosaponine die Verknüpfungposition standardmäßig anhand der HMBC Fernkorrelation bestimmt. Die erhaltenen Zuordnungen wurden dann durch interglycosidische NOEs zwischen den anomeren Protonen und Zuckerring-Protonen auf der anderen Seite der glycosidischen Bindung unterstützt.

8.3.1.5. Strukturaufklärung des Asterosaponinaglycons

Die Strukturaufklärung der Asterosaponin Aglyca durch NMR-spektroskopische Methoden soll am Beispiel von Ruberosid A gezeigt werden.

Die Identifizierung einzelner Spinsysteme und die Zuordnung der ^1H -Signale erfolgte anhand der COSY und TOCSY-Spektren. Auf diese Weise wurden ausgehend von freistehenden Resonanzen, wie A-H-3 (δ_{H} 4,13 ppm) oder A-H-11 (δ_{H} 5,30 ppm) zunächst drei Fragmente zugeordnet: A-H-1 bis 8 (im TOCSY-Spektrum wird über dieses Spinsystem Totalkorrelation beobachtet), A-H-11 bis 12 sowie A-14 bis 17 (Abbildung 59 oben).

Die Zuordnung der axialen bzw. äquatorialen Protonen ergab sich aus den NOE bzw. ROE-Kreuzsignalen sowie der relativen Größe der Kopplungskonstanten (Größe der COSY-Cross-Peaks). Die entsprechenden an diese Protonen gebundenen Kohlen-

stoffkerne wurden anhand des multiplizitäten-editierten HSQC-Spektrums (mult. edit. HSQC) zugeordnet.

Die Verknüpfungen der so erhaltenen Spinsysteme miteinander wurden schließlich anhand der $^2J_{C,H}$ und $^3J_{C,H}$ -Korrelationen des HMBC-Spektrums erhalten. Als diagnostisch besonders wertvoll erwiesen sich dabei die HMBC Korrelationen der Methylgruppen. Diese ermöglichen die Zuordnung der quartären C-Atome A-C-9, C-10 und C-13 – zudem geben sie besonders intensive Signale. Abbildung 59 (Mitte) zeigt die HMBC-Konnektivitäten der Signale A-H₃-18, 19 und 21 sowie A-H-11/12 anhand derer die Verknüpfungen der Spinsysteme des Aglycons belegt werden konnten.

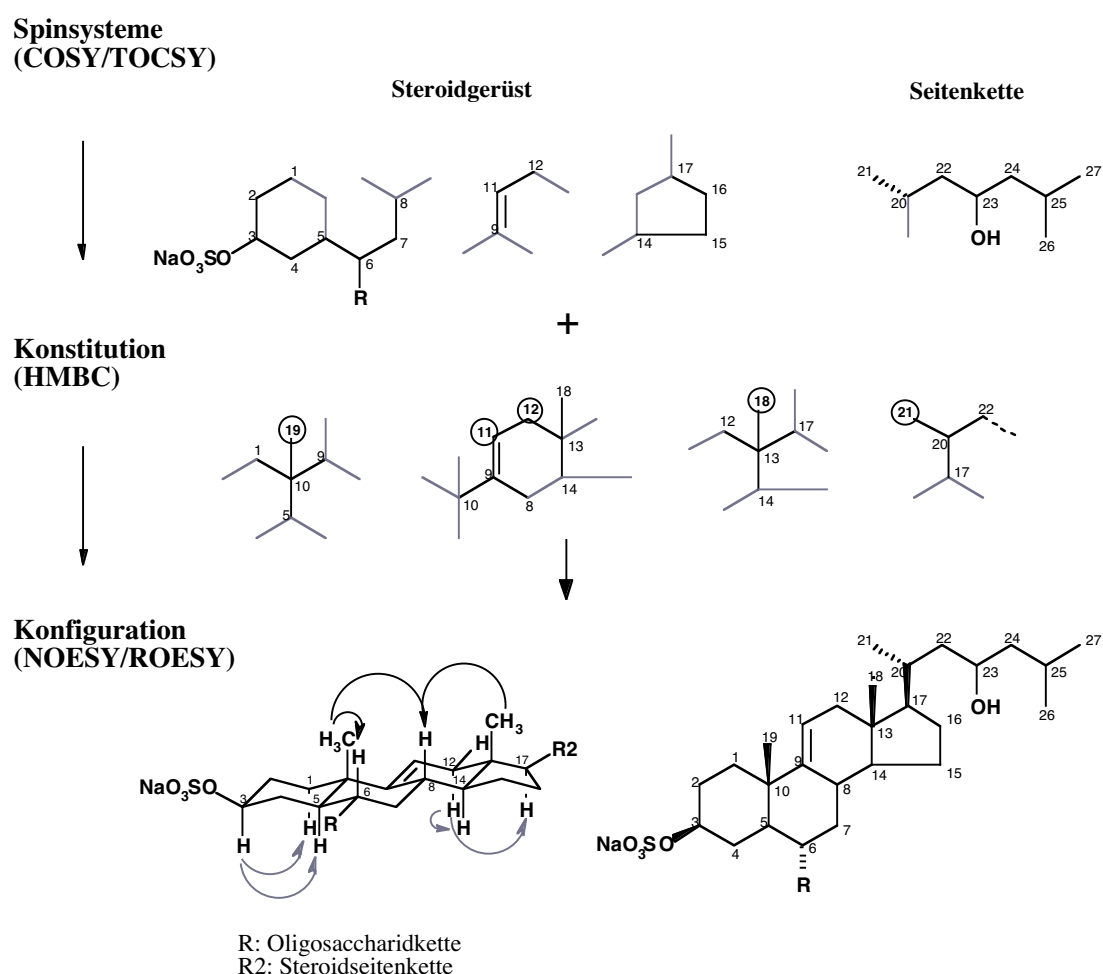


Abbildung 59: Strukturaufklärung des Aglycons von Ruberosid A. Die aus COSY und TOCSY erhaltenen Spinsysteme werden anhand von HMBC-Daten zusammengefügt. Die Pfeile zeigen diagnostische NOE-Korrelationen an. (schwarz: Korrelationen β -ständiger Protonen, grau: solche α -ständiger Protonen)

Die Stereochemie des Aglycons ergab sich schließlich aus den Korrelationen der NOESY- und ROESY-Experimente. Die β -ständige Konfiguration der Protonen A-H-6 β und A-H-8 β wurde durch einen NOE zu A-H₃-19 bzw. A-H₃-18 bewiesen. Die α -ständige Anordnung von A-H-14 α und A-H-17 α wurde durch Korrelationen zu A-H-12 α , die von A-H-3 α durch Crosspeaks zu A-H-1 α und A-H-5 α belegt (Abbildung 59 unten).

Auf diese Weise wurde das allen Asterosaponinen gemeinsame 5 α -Cholest-9(11)en-Grundgerüst (siehe Kap. 1.3.1) nachgewiesen. Auf die Stereochemie an A-C-20 wurde in Analogie zu den bisher isolierten Asterosaponinen geschlossen.^{32,33}

Während die Steroidkerne der Asterosaponine sich nicht unterscheiden, kommt der Steroidseitenkette besondere Bedeutung zu:

Auch hier wurde zunächst ausgehend von den Methylgruppen A-H-21 und A-H-26/27 das Spinsystem, welches sich über die gesamte Seitenkette erstreckt, verfolgt. Im Anschluß wurden die ¹³C-Zuordnungen mit Hilfe des mult. edit. HSQC getroffen. Die chemische Verschiebung des A-23-Signals (δ_{H} 3,66 ppm / δ_{C} 68,4 ppm) bestätigte die im LC-NMR-MS-Experiment vorhergesagte 23-Hydroxyfunktion. Ebenso konnte das Fehlen einer Hydroxygruppe an A-C-20 bestätigt werden. Die Verbindung zum Steroidkern wurde schließlich durch die HMBC-Korrelation von A-H₃-21 zu A-C-17 belegt. Tabelle 13 zeigt die ¹H- und ¹³C-Daten des Aglycons von Ruberosid A.

Die ¹³C-chemischen Verschiebungen sowohl des Steroidgerüsts als auch der Seitenkette sind in sehr guter Übereinstimmung mit den für Nipoglycosid D angegebenen Literaturwerten.¹³⁹

Die Struktur von Ruberosid A kann somit als 6 α -O- $\{\beta$ -D-Fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- $[\beta$ -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-6-deoxy-xylo-hex-4-ulosyl}-5 α -cholest-9(11)-en-23-ol-3 β -yl-sulfat beschrieben werden. Diese Verbindung wurde zuvor noch nicht aus der Natur isoliert. Der Name wurde in Anlehnung an *Asterias rubens* gewählt.

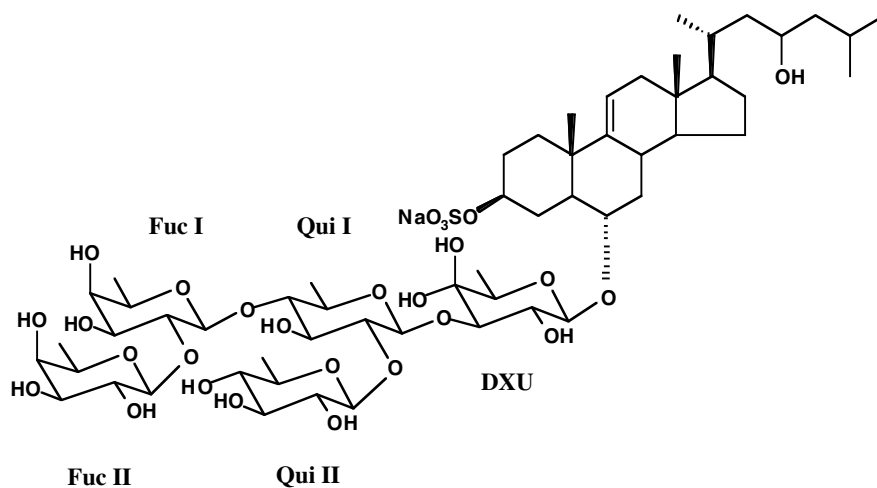


Abbildung 60: Ruberosid A

Tabelle 13: ^1H und ^{13}C -Daten des Aglycons von Ruberosid A

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}	rel. Konfiguration
1	36.0	CH_2	1.39/ 1.69	α β
2	28.9	CH_2	2.07/ 1.59	α β
3	79.3	CH	4.13	α
4	30.2	CH_2	2.40/ 1.28	α β
5	49.0	CH	1.21	α
6	80.3	CH	3.56	β
7	41.1	CH_2	0.91/ 2.30	α β
8	36.0	CH	2.05	β
9	146.2	C		
10	38.7	C		
11	117.2	CH	5.30	
12	42.4	CH_2	1.97/ 2.15	α β
13	41.7	C		
14	54.0	CH	1.26	α
15	25.6	CH_2	1.73/1.13	
16	29.0	CH_2	1.88/1.26	
17	57.6	CH	1.18	α
18	11.8	CH_3	0.58	
19	19.5	CH_3	0.94	
Seitenkette				Signalaufspaltung [#]
20	34.2	CH	1.37	
21	19.2	CH_3	0.91	d (6.6)
22	45.3	CH_2	1.46/1.16	
23	68.4	CH	3.66	
24	46.5	CH_2	1.19	
25	24.8	CH	1.73	
26	21.8	CH_3	0.85	d (6.6)
27	24.1	CH_3	0.87	d (6.6)

[#] Kopplungskonstanten [Hz] in Klammern, Mult.: Multiplizität

Tabelle 14: HMBC-Korrelationen des Aglycons von Ruberosid A

¹ H-Signal	Korrelation zu ¹³ C-Signal
H-1β	C-2 (w), 10, 3 (w), 19 (w)
H-7β	C-5, 6, 8, 9
H-11	C-8, 10, 13
H-12β	C-9, 11, 13, 14, 18
H-18	C-12, 13, 14, 17
H-19	C-1, 5, 9, 10
H-21	C-17, 20, 22
H-22	C-20, 23
H-24	C-22, 23, 25, 26, 27
H-25	C-23, 24, 26, 27
H-26	C-24, 25, 27
H-27	C-24, 25, 26

w: schwach („weak“)

8.3.2. Ruberosid B aus *Asterias rubens*

Ruberosid B wurde wie Ruberosid A bereits im LC-NMR-MS-Screening als neues Asterosaponin identifiziert. Die in diesem Abschnitt angegebenen ¹H- und ¹³C-NMR-Daten bestätigen die getroffene Zuordnung.

8.3.2.1. MS-Daten

Das ESI-MS zeigt einen Molekulanionenpeak [MD₁₂]⁻ bei *m/z* 1253 (D₂O/ND₄⁺-Formiat/CH₃CN). Das MS²-Experiment zeigt ein Fragmentierungsmuster, das dem vom Ruberosid A gleicht: Ein Hauptfragment bei *m/z* 1233 entspricht einer Wasserabspaltung (D₂O) an C-4 der hydratisierten 6-Deoxy-xylo-hex-4-ulose-Einheit.

Weitere Fragmente bei *m/z* 1105 [1253-148]⁻, *m/z* 1085 [1233-148]⁻, 957 [1105-148]⁻ and 937 [1085-148]⁻ zeigen den Verlust von nacheinander zwei Deoxyhexoseeinheiten an. Ein Nebenfragment bei *m/z* 496 [1253-757]⁻ stimmt mit dem völligen Verlust der Pentasaccharidkette überein. Das D-H-Rücktauschexperiment ergab ein Molekulanion [M]⁻ von *m/z* 1241, was im Gegensatz zu Ruberosid A 12 austauschenden Protonen entspricht.

8.3.2.2. NMR-Strukturaufklärung

Wie bereits von den on-flow-LC-NMR-Spektren angezeigt, stimmen die Signale der Oligosaccharidkette von Ruberosid B sowohl in ihren ¹H- als auch ihren ¹³C-Verschiebungen mit denen von Ruberosid A überein. Dies konnte durch 1D TOCSY-Spektren der einzelnen Zuckerbausteine sowie durch HMBC-Analyse der glycosidischen Verknüpfungsstellen weiter bestätigt werden.

Ebenso sind die Resonanzen des Steroidgerüsts identisch mit denen anderer Asterosaponine.

Die Signale der Steroidseitenkette wurden zugeordnet, indem die COSY-Konnektivitäten ausgehend von den Methylgruppen verfolgt wurden. Während der bei A-H₃-21 beginnende Kopplungspfad über A-H-20 bis zu A-H-22 reicht, erstreckt sich das von A-H₃-26 bzw. H₃-27 ausgehende Spinsystem über A-H-25 bis zu A-H₂-24. Die Carbonylfunktion bei A-C-23 konnte durch HMBC-Korrelationen zwischen A-C-23 ($\delta_C = 214.7$ ppm) und A-H₂-22 ($\delta_H = 2.46/2.13$ ppm), H₂-24 ($\delta_H = 2.27$ ppm) sowie H-25 ($\delta_H = 2.02$ ppm) nachgewiesen werden.

Die ¹³C-Daten sind in sehr guter Übereinstimmung mit Literaturwerten, die für Saponine mit einem 24, 25 Dihydromarthasteron-Aglycon angegeben werden.^{169,139}

Ruberosid B konnte somit als $6\alpha\text{-O-}\{\beta\text{-D-Fucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)}\text{-}\beta\text{-D-fucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)}\text{-}[\beta\text{-D-quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)}\text{-}\beta\text{-D-quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)}\text{-}\beta\text{-D-6-deoxy-xylo-hex-4-ulosyl}\}\text{-}5\alpha\text{-cholest-9(11)\text{-en-23-on-}3\beta\text{-yl-sulfat}$, ein neues Asterosaponin, identifiziert werden.

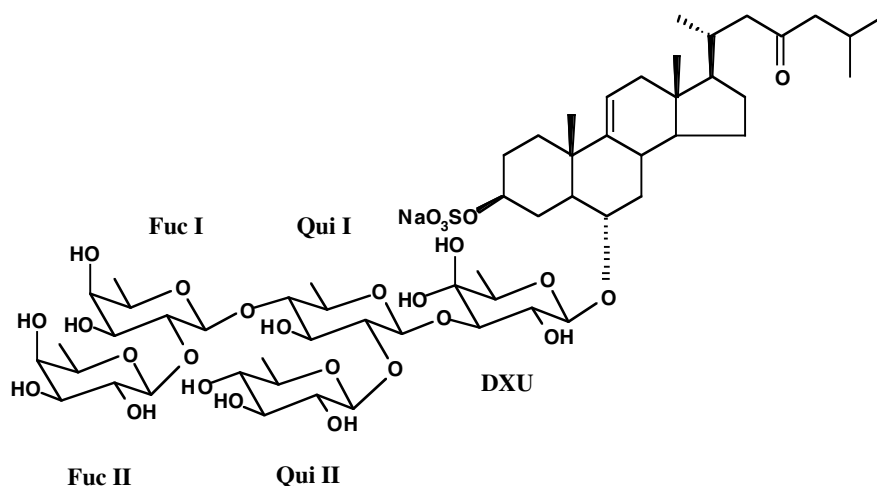


Abbildung 61: Ruberosid B

Tabelle 15: ¹H und ¹³C-Daten des Aglycons von Ruberosid B

Pos.	δ_C	Mult.	δ_H	rel. Konfiguration
1	36.1	CH ₂	1.38/ 1.69	α β
2	28.9	CH ₂	2.07/ 1.59	α β
3	79.3	CH	4.12	α
4	30.3	CH ₂	2.40/ 1.29	α β
5	49.0	CH	1.22	α
6	80.3	CH	3.56	β
7	41.1	CH ₂	0.91/ 2.30	α β
8	36.1	CH	2.06	β
9	146.2	C		
10	38.7	C		
11	117.2	CH	5.30	
12	42.2	CH ₂	1.96/ 2.13	α β
13	41.7	C		
14	54.1	CH	1.27	α
15	25.7	CH ₂	1.74/1.14	
16	28.9	CH ₂	1.80/1.25	
17	56.7	CH	1.20	α
18	11.7	CH ₃	0.61	
19	19.5	CH ₃	0.94	
Seitenkette				Signalaufspaltung [#]
20	33.1	CH	1.91	
21	19.6	CH ₃	0.85	d (6.5)
22	50.7	CH ₂	2.46/2.13	
23	214.7	C		
24	52.6	CH ₂	2.27	ABX (15/6.5)
25	25.1	CH	2.02	
26	22.5*	CH ₃	0.84	d (6.6)
27	22.7*	CH ₃	0.86	d (6.6)

[#] Kopplungskonstanten [Hz] in Klammern, Mult.: Multiplizität, * Zuordnung austauschbar

8.3.3. Ruberosid C aus *Asterias rubens*

Ruberosid C wurde aus der Feinfraktion 37-39M isoliert (Abschnitt 5.2.3).

8.3.3.1. MS-Daten

Das ESI-MS von Ruberosid C zeigt einen Molekülanionen-Peak $[\text{MD}_{15}]^-$ bei m/z 1390 ($\text{D}_2\text{O}/\text{ND}_4^+$ -Formiat/ CH_3CN). Das MS^2 -Experiment liefert Fragmente bei m/z 1225 $[\text{1390-165}]^-$, 1077 $[\text{1225-148}]^-$ und 929 $[\text{1077-148}]^-$. Dies entspricht dem Verlust von nacheinander einer Hexose- und zwei Deoxyhexoseeinheiten. Das D-H-Rücktauschexperiment ergibt ein Molekulargewicht der undeutierten Komponente $[\text{M}]^-$ von m/z 1375, was einer Anzahl von 15 austauschenden Protonen entspricht.

8.3.3.2. NMR-Strukturaufklärung

Das LC-NMR-Chromatogramm wies bereits darauf hin, daß Ruberosid C die gleiche Hexasaccharidkette (mit jeweils zwei Quinovose- und Fucose- sowie einer Xylose- und einer Galactose-Einheit) besitzt, wie Asteriidid B und die Vergleichssubstanz Asteriidid C (Abbildung 26 bis 28). Dies konnte durch das mult. edit. HSQC bestätigt werden: sämtliche ^1H - und ^{13}C -Kohlenhydratresonanzen sind annähernd deckungsgleich mit denen von Asteriidid B (siehe Kap. 8.4.2.4). Die NMR-Daten des Saccharidteils sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Die Analyse des COSY-Kopplungsmusters ausgehend von den endständigen Methylgruppen A- H_3 -26/27 ergab eine 20-Hydroxycholestan-Seitenkette ohne weitere funktionelle Gruppen.

Die ^{13}C -chemischen Verschiebungen der Seitenkette sind in sehr guter Übereinstimmung mit den für Latespinosid B angegebenen Literaturwerten.¹⁷⁰

Die Struktur des neuen Asterosaponins Ruberosid C war somit als $6\alpha\text{-O-}\{\beta\text{-D-Galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-fucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-fucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}[\beta\text{-D-quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)]-}\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-quinovopyranosyl}\}$ -20-hydroxy- 5α -cholest-9(11)-en- 3β -yl-sulfat identifiziert.

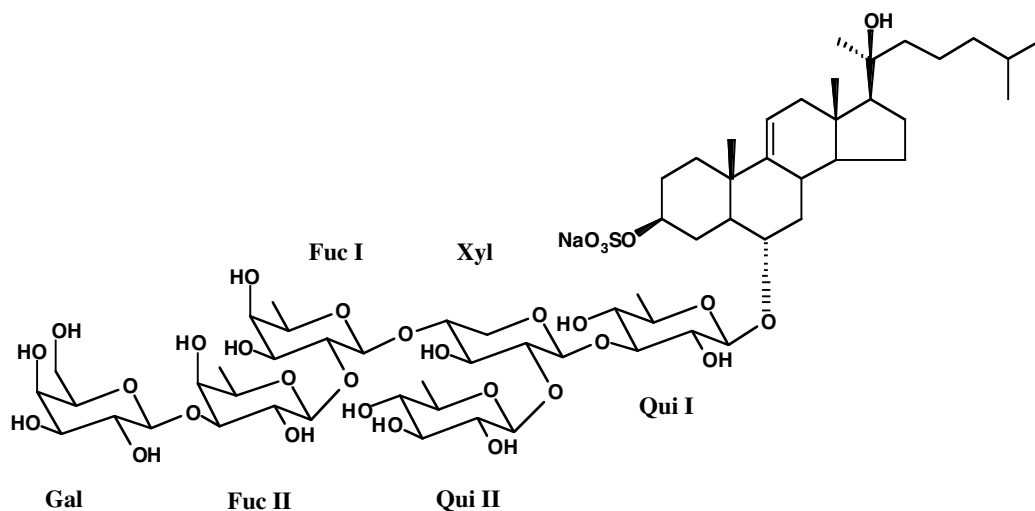


Abbildung 62: Ruberosid C

Tabelle 16: ^1H und ^{13}C -Daten des Aglycons von Ruberosid C

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}	rel Konfiguration
1	36.0	CH ₂	1.38/ 1.69	α β
2	28.9	CH ₂	2.07/ 1.59	α β
3	79.5	CH	4.12	α
4	30.2	CH ₂	2.42/ 1.28	α β
5	49.1	CH	1.21	α
6	80.4	CH	3.56	β
7	41.3	CH ₂	0.89/ 2.29	α β
8	35.8	CH	2.04	β
9	146.1	C		
10	38.6	C		
11	117.3	CH	5.30	
12	42.7	CH ₂	1.99/ 2.18	α β
13	41.7	C		
14	54.3	CH	1.29	α
15	23.0 [†]	CH ₂	1.73/1.63	
16	25.3 [†]	CH ₂	1.74/1.15	
17	58.4	CH	1.53	α
18	13.5	CH ₃	0.70	
19	19.5	CH ₃	0.94	
Seitenkette				Signalaufspaltung [#]
20	75.6	C		
21	25.7	CH ₃	1.18	s
22	44.5	CH ₂	1.40/1.25	
23	22.6	CH ₂	1.24	
24	40.1	CH ₂	1.11	
25	28.4	CH	1.50	
26	22.8	CH ₃	0.84	d (6.7)
27	22.8	CH ₃	0.84	d (6.7)

[#] Kopplungskonstanten [Hz] in Klammern, Mult.: Multiplizität

Tabelle 17: ^1H und ^{13}C -Daten der Monosaccharideinheiten von Ruberosid C

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}	J
Qui I				
1	103.7	CH	4.39	$J_{1,2}$ 7.8
2	73.9	CH	3.30	$J_{2,3}$ 9.0
3	89.3	CH	3.37	$J_{3,4}$ 9.2
4	74.2	CH	3.07	$J_{4,5}$ 9.4
5	71.8	CH	3.34	$J_{5,6}$ 6.1
6	18.0	CH ₃	1.21	
Qui II				
1	105.0	CH	4.57	$J_{1,2}$ 7.8
2	75.3	CH	3.25	$J_{2,3}$ 9.4
3	76.1	CH	3.33	$J_{3,4}$ 9.4
4	75.3	CH	3.10	$J_{4,5}$ 9.4
5	73.4	CH	3.38	$J_{5,6}$ 6.1
6	17.6	CH ₃	1.25	
Fuc I				
1	100.8	CH	4.47	$J_{1,2}$ 7.9
2	81.3	CH	3.57	$J_{2,3}$ 9.9
3	73.7	CH	3.70	$J_{3,4}$ 3.3
4	71.7	CH	3.66	$J_{4,5}$ < 1
5	71.5	CH	3.68	$J_{5,6}$ 6.5
6	16.3	CH ₃	1.19	
Fuc II				
1	105.0	CH	4.50	$J_{1,2}$ 7.8
2	71.8	CH	3.61	$J_{2,3}$ 9.9
3	83.3	CH	3.69	$J_{3,4}$ 3.3
4	71.7	CH	3.88	$J_{4,5}$ < 1
5	71.5	CH	3.70	$J_{5,6}$ ~ 6
6	16.7	CH ₃	1.21	
Xyl				
1	103.8	CH	4.54	$J_{1,2}$ 7.7
2	83.1	CH	3.46	$J_{2,3}$ 9.0
3	74.8	CH	3.71	$J_{3,4}$ 9.4
4	77.4	CH	3.74	$J_{4,5\text{ax}}$ 9.5
5	63.9	CH ₂	4.06/ 3.37	$J_{4,5\text{eq}}$ 4.4 $J_{5\text{ax},5\text{eq}}$ 11.7
Gal				
1	105.1	CH	4.48	$J_{1,2}$ 7.6 [#]
2	72.0	CH	3.52	$J_{2,3}$ 9.4 [#]
3	73.6	CH	3.53	$J_{3,4}$ 2.9 [#]
4	69.3	CH	3.81	$J_{4,5}$ < 1
5	75.9	CH	3.56	
6	61.7	CH ₂	3.67-3.64	br m

[#] durch Spektrensimulation, Mult.: Multiplizität, br m breites Multiplett

8.3.4. Ruberosid D aus *Asterias rubens*

Ruberosid D wurde aus der Feinfraktion 37-39M durch RP-HPLC semi-präparativ isoliert (Abschnitt 5.2.3).

8.3.4.1. MS-Daten

Das ESI-MS zeigt einen Molekülanionen-Peak $[\text{MD}_{12}]^-$ bei m/z 1237 ($\text{D}_2\text{O}/\text{ND}_4^+$ -Formiat/ CH_3CN). Das MS^2 -Experiment liefert Fragmente bei m/z 1089 $[\text{1237-148}]^-$ und 941 $[\text{1089-148}]^-$, was einer Abspaltung von nacheinander zwei Deoxyhexose-Einheiten entspricht. Das D-H-Rücktauschexperiment ergibt ein Molekulargewicht der undeuterten Komponente $[\text{M}]^-$ von m/z 1225 an, was einer Anzahl von 12 austauschenden Protonen entspricht.

8.3.4.2. NMR-Strukturaufklärung

8.3.4.2.1.1. Oligosaccharidkette

Selektive Anregung der anomeren Dubletts bei δ_{H} 4,39, 4,48 und 4,56 ppm ergaben 1D TOCSY-Subspektren von β -gluco-konfigurierten Sechs-Spin-Systemen (ausnahmslos große axial/axial Kopplungskonstanten) mit Magnetisierungstransfer zu jeweils einer H_3 -6-Resonanz bei hohem Feld (δ_{H} 1,21, 1,22 und 1,25 ppm). Diese Zuckereinheiten waren somit rasch als β -Quinovose-Einheiten identifiziert.

Durch selektive Anregung des anomeren Protons bei δ_{H} 4,53 ppm wurde ein 1D TOCSY-Subspektrum erhalten, das ein Sechs-Spin-System mit vier axial/axial Kopplungen ($^3J = 7,9\text{--}8,9$ Hz) und einer 11,7 Hz geminalen Kopplungskonstante anzeigte. Diese Zuckereinheit war somit als Xylose in ihrer Pyranoseform identifiziert. Die Methylenresonanz bei δ_{C} 63,9 ppm im mult. edit. HSQC wurde ihrer Xyl-C-5-Position zugeordnet.

Der fünfte Zuckerbaustein (anomeres Proton bei δ_{H} 4,44 ppm) wies einen β -galactokonfigurierten Pyranosering auf ($^3J_{3,4} = 3,5$ Hz, $^3J_{4,5} < 1$ Hz). Die Anwesenheit von vier Kohlenhydrat-Methylgruppen im ^1H -Übersichtsspektrum ließ auf eine β -Fucose-Einheit schließen, was durch die HMBC-Korrelation zwischen Fuc- H_3 -6 und Fuc-C-4 (δ_{H} 1,18 \rightarrow δ_{C} 71,7 ppm) bestätigt werden konnte. Eine NOESY-Korrelation zu Fuc-H-1 beweist schließlich die axiale Position von Fuc-H-5.

8.3.4.2.1.2. Aglycon

Bereits die offensichtliche Übereinstimmung sowohl der Methylprotonen-Resonanzen als auch der beiden breiten olefinischen Singulets tieffeldseitig der anomeren Protonen im LC-NMR-Chromatogramm deuteten auf die gleiche Aglycon-Seitenkette mit einer 24(28)-en-Funktion hin, wie bereits von in Asteriidolid B bekannt war (Abbildung 27). Diese Zuordnung wird durch die Anwesenheit eines olefinischen Methylsignals im mult. edit. HSQC (A-28: δ_C 106,7; δ_H 4,72/4,66 ppm) in Verbindung mit HMBC-Korrelationen zwischen A-H₃-26/27 und A-C-24 (δ_C 157,7 ppm) sowie zwischen A-H₂-28, A-C-23 (δ_C 29,5 ppm) und C-25 (δ_C 34,4 ppm) bestätigt.

Die ¹³C-chemischen Verschiebungen befinden sich in sehr guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten für Asteriidolid B¹³⁴ und Asterolid D.¹⁴⁰

Die Struktur von Ruberosid D kann daher als 6 α -O- $\{\beta$ -D-Quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- $[\beta$ -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-quinovopyranosyl}-20-hydroxy-5 α -cholest-9(11),24(28)-dien-3 β -ylsulfat angegeben werden (Abbildung 63).

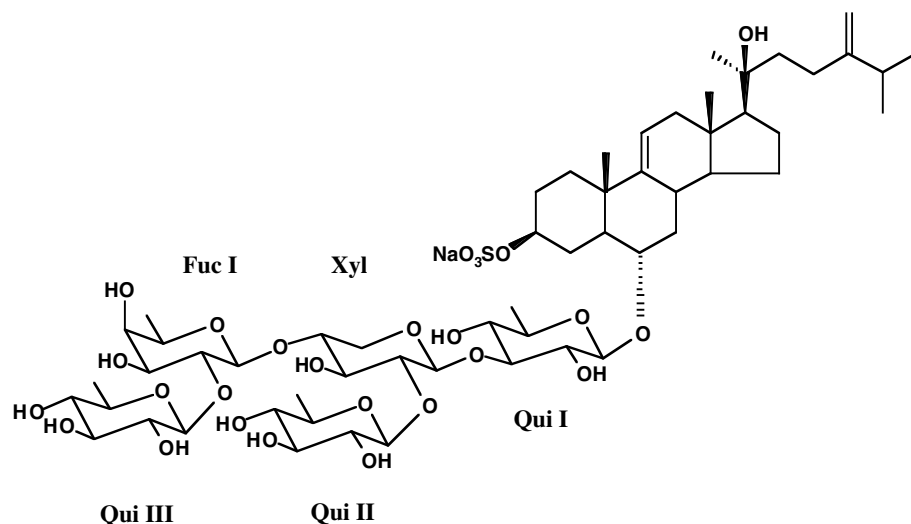


Abbildung 63: Ruberosid D

Tabelle 18: ^1H - und ^{13}C -Daten des Aglycons von Ruberosid D

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}	rel. Konfiguration
1	36,0	CH_2	1,38/ 1,70	α β
2	28,9	CH_2	2,07/ 1,59	α β
3	79,5	CH	4,13	α
4	30,2	CH_2	2,41/ 1,29	α β
5	49,0	CH	1,20	α
6	80,3	CH	3,56	β
7	41,1	CH_2	0,89/ 2,30	α β
8	35,8	CH	2,05	β
9	146,1	C		
10	38,6	C		
11	117,3	CH	5,30	
12	42,6	CH_2	2,01/ 2,18	α β
13	41,6	C		
14	54,3	CH	1,24	α
15	22,9	CH_2	1,74/1,65	
16	25,2	CH_2	1,74/1,16	
17	58,5	CH	1,56	α
18	13,4	CH_3	0,71	
19	19,4	CH_3	0,93	
Seitenkette				Signalaufspaltung [#]
20	75,5	CH		
21	25,3	CH_3	1,21	s
22	43,0	CH_2	1,54/1,45	
23	29,5	CH_2	1,99	
24	157,7	C		
25	34,4	CH	2,22	
26	22,1	CH_3	0,99	d (6,6)
27	22,1	CH_3	0,99	d (6,6)
28	106,7	CH_2	4,72/ 4,66	br s br s

[#] Kopplungskonstanten [Hz] in Klammern, Mult.: Multiplizität, br s: breites Singulett

Tabelle 19: ^1H - und ^{13}C -Daten der Monosaccharideinheiten von Ruberosid D

	δ_{C}	Mult.	δ_{H}	J
Qui I				
1	103,6	CH	4,39	$J_{1,2}$ 7,9
2	73,8	CH	3,30	$J_{2,3}$ 8,3
3	89,2	CH	3,37	$J_{3,4}$ 9,0
4	74,2	CH	3,07	$J_{4,5}$ 9,2
5	71,8	CH	3,34	$J_{5,6}$ 6,1
6	17,9	CH_3	1,21	
Qui II				
1	105,0	CH	4,56	$J_{1,2}$ 7,9
2	75,3	CH	3,25	$J_{2,3}$ 9,4
3	76,0	CH	3,33	$J_{3,4}$ 9,2
4	75,3	CH	3,09	$J_{4,5}$ 9,3
5	73,3	CH	3,38	$J_{5,6}$ 6,1
6	17,6	CH_3	1,25	
Qui III				
1	104,7	CH	4,48	$J_{1,2}$ 7,9
2	75,6	CH	3,20	$J_{2,3}$ 9,4
3	76,0	CH	3,34	$J_{3,4}$ 9,2
4	75,7	CH	3,02	$J_{4,5}$ 9,2
5	73,0	CH	3,36	$J_{5,6}$ 6,0
6	17,8	CH_3	1,22	
Fuc				
1	101,0	CH	4,44	$J_{1,2}$ 7,9
2	81,2	CH	3,53	$J_{2,3}$ 9,4
3	73,7	CH	3,68	$J_{3,4}$ 3,5
4	71,7	CH	3,65	$J_{4,5}$ <1
5	71,5	CH	3,67	$J_{5,6}$ 6,5
6	16,2	CH_3	1,19	
Xyl				
1	103,7	CH	4,53	$J_{1,2}$ 7,9
2	83,1	CH	3,46	$J_{2,3}$ 8,3
3	74,8	CH	3,71	$J_{3,4}$ 8,9
4	77,4	CH	3,73	$J_{4,5\text{ax}}$ 9,9
5	63,9	CH_2	4,04/ 3,36	$J_{4,5\text{eq}}$ 4,4 $J_{5\text{ax},5\text{eq}}$ 11,7

Mult.: Multiplizitäten

8.3.5. Ruberosid E aus *Asterias rubens*

Die LC-NMR-MS-Daten zeigten Ruberosid E bereits als neues Asterosaponin mit einer Oligosaccharidkette wie in Ruberosid D und dem Aglycon von Asteriidosid C an. Die in diesem Abschnitt angegebenen ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten bestätigen diese Zuordnung.

8.3.5.1. MS-Daten

Das ESI-MS-Spektrum von Ruberosid E weist ein Molekulanion $[\text{MD}_{12}]^-$ bei m/z 1223 ($\text{D}_2\text{O}/\text{ND}_4^+$ -Formiat/ CH_3CN) auf. Das MS^2 -Experiment zeigt mit Hauptfragmenten bei m/z 1075 $[\text{1223-148}]^-$ und 927 $[\text{1075-148}]^-$ sowie Nebenfragmenten bei m/z 779 $[\text{927-148}]^-$ und 645 $[\text{779-134}]^-$ die Abspaltung von nacheinander drei Deoxyhexosen und einer Pentose an. Das D-H-Rücktauschexperiment führt zu einem Molekulanion $[\text{M}]^-$ bei m/z 1211. Dies entspricht 12 austauschenden Protonen.

8.3.5.2. NMR-Strukturaufklärung

Nach ihrer Isolierung wurden von dieser Verbindung im 5 mm-Cryo-Probenkopf ein- und zweidimensionale NMR Spektren aufgenommen (Kap. 8.1.4). Auch hier erfolgte die Signalzuordnung nach der in Kap. 8.3.1 beschriebenen Vorgehensweise anhand der Experimente COSY, TOCSY, mult. edited HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY, ROESY sowie 1D selektiver Experimente.

Sämtliche NMR-Daten des Oligosaccharidrestes (^1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen, Kopplungskonstanten, HMBC-Konnektivitäten, NOE-Korrelationen) stimmen mit den Daten von Ruberosid D überein.

Ebenso sind auch die ^1H - und ^{13}C -Resonanzen des Steroidkerns in sehr guter Übereinstimmung mit den Daten der vorangegangenen Asterosaponine, was ein an C-3 sulfatiertes $3\beta,6\alpha$ -Dihydroxy- 5α -cholest-9(11)en-Aglycon mit einem Zuckerrest an C-6 anzeigt.

Die Signalzuordnung der Steroidseitenketten-Resonanzen wurde durch Analyse der COSY-Konnektivitäten ausgehend von den Methylgruppen H_3 -26 und H_3 -27 und durch Analyse der HMBC long-range-Korrelationen getroffen.

Die chemischen Verschiebungen der olefinischen A-24 und A-25 Protonen- und Kohlenstoffresonanzen zeigen eine 24(25)-Doppelbindung an. Die NMR-Daten der Aglycon-Seitenkette sind in sehr guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten für Asteriidosid C.

Die Struktur des neuen Asterosaponins kann daher als 6 α -O-{\mathit{\beta}}-D-Quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-quinovopyranosyl}-20-hydroxy-5 α -cholest-9(11)-24-dien-3 β -yl-sulfat festgelegt werden.

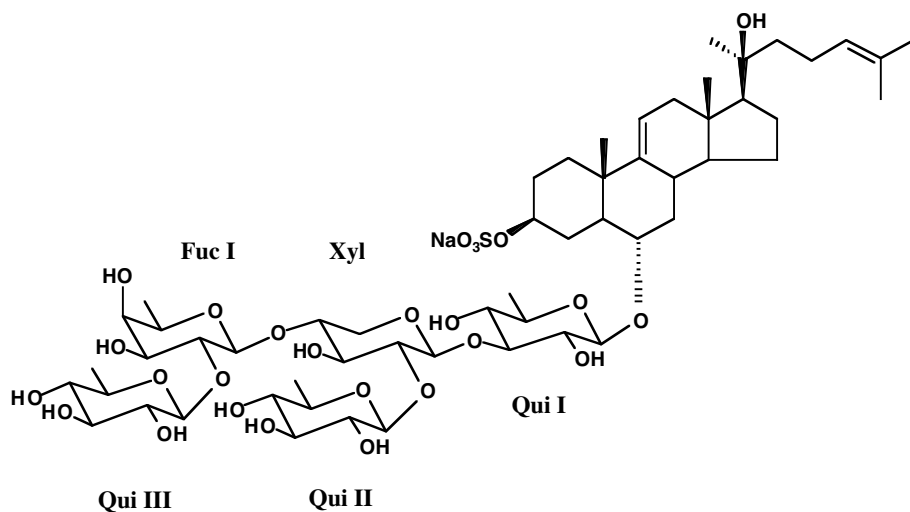


Abbildung 64: Ruberosid E

Tabelle 20: ^1H - und ^{13}C -Daten des Aglycons von Ruberosid E

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}	rel. Konfiguration
1	36,0	CH_2	1,39/ 1,70	α β
2	28,9	CH_2	2,06/ 1,59	α β
3	79,4	CH	4,12	α
4	30,2	CH_2	2,41/ 1,29	α β
5	49,1	CH	1,21	α
6	80,3	CH	3,57	β
7	41,2	CH_2	0,89/ 2,30	α β
8	35,7	CH	2,05	β
9	146,0	C		
10	38,7	C		
11	117,2	CH	5,31	
12	42,6	CH_2	2,00/ 2,18	α β
13	41,7	C		
14	54,2	CH	1,24	α
15	23,2	CH_2	1,73/ 1,65	
16	25,3	CH_2	1,73/ 1,17	
17	58,3	CH	1,55	α
18	13,6	CH_3	0,71	
19	19,4	CH_3	0,94	
Seitenkette				Signalaufspaltung [#]
20	75,3	C		
21	25,4	CH_3	1,20	s
22	44,0	CH_2	1,43/ 1,32	
23	23,6	CH_2	1,93	
24	125,4	CH	5,09	t (7,0)
25	132,2	C		
26	17,5	CH_3	1,58	s
27	25,6	CH_3	1,64	s

[#] Kopplungskonstante [Hz] in Klammern, Mult.: Multiplizität

8.3.6. Ruberosid F aus *Asterias rubens*

Im Zuge der ursprünglichen Aufarbeitung (Kap. 3.3.4) wurde eine Mischfraktion erhalten, die aus Ruberosid F und Asterosid C bestand. Mit selektiven und zweidimensionalen NMR-Methoden gelang die Zuordnung beider Verbindungen im Gemisch nebeneinander (Kap. 8.4.2.1). Auf diese Weise wurden ^1H - und ^{13}C -Verschiebungsdaten in Pyridin- d_5 / D_2O , (7:3, v/v) erhalten. Zur Absicherung wurde Ruberosid F jedoch noch mit der HPLC-Methode semi-präparativ aufgetrennt und als Reinsubstanz mit dem 5 mm-Cryo-Probenkopf (Kap. 8.1.4) in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ (2:3, v/v) vermessen.

8.3.6.1. MS-Daten

ESI-MS liefert ein Molekülanion von Ruberosid F [MD_{13}] bei m/z 1270 ($\text{D}_2\text{O}/\text{ND}_4$ -Formiat/ CH_3CN). Im MS^2 -Spektrum zeigt ein Fragment bei m/z 1155 [1270-115] den Verlust der Steroidseitenkette durch Retro-Aldol-Spaltung der C-20-(22)-Bindung an. Die Fragmente bei m/z 1122 [1270-148] and 957 [1122-165] rühren von der Abspaltung einer Deoxyhexose und einer Hexose her. Das D-H-Rücktauschexperiment führt zu einem Molekülanion [M] bei m/z 1257. Dies entspricht 13 austauschenden Protonen.

8.3.6.2. NMR-Strukturaufklärung

Die 1D-TOCSY-Subspektren der einzelnen Zuckereinheiten zeigen, wie schon bei Ruberosid F, die Anwesenheit von drei Quinovose-Einheiten, einer Xylose und eines β -galacto-konfigurierten Spinsystems an.

Im Gegensatz zu Ruberosid E zeigt das mult. edit HSQC von Ruberosid F jedoch eine Methylen-Resonanz bei δ_{C} 61,8 / δ_{H} 3,63/3,69 ppm, welche als H₂-6 einer β -Galactose-Einheit zugeordnet wird. Ein starker syndiaxialer NOE zwischen Gal-H-1 und Gal-H-5 beweist schließlich die axiale Anordnung von Gal-H-5.

Die Signale des Steroidkerns von Ruberosid F sind in Übereinstimmung ($\Delta\delta_{\text{C}} \leq 0,1$ ppm) mit denen von Ruberosid E. Die Steroidseitenketten-Signale wurden wieder durch Analyse der COSY-Konnektivitäten ausgehend von den Seitenketten-Methylsignalen zugeordnet. Sowohl die Protonen- als auch die Kohlenstoff-

Verschiebungen der Methingruppen A-22 und A-23 deuten auf die Gegenwart einer Epoxy-Gruppe hin. Dies wird durch die Tieffeldverschiebung des quart. Kohlenstoffs A-C-20 um ca. 3 ppm (verglichen mit anderen 20-hydroxylierten Asterosaponinen) weiter bestätigt. Anhand der Kopplungskonstante $^3J_{\text{H-22,H-23}}$ (in Pyridin-d₅/D₂O, 7:3, v/v) kann auf die relative Konfiguration der 22,23-Epoxygruppe geschlossen werden. Der Betrag von ≈ 2 Hz läßt auf einen Diederwinkel zwischen den beiden Protonen H-22 und H-23 von etwa 120° und somit auf eine *transoide* Anordnung schließen. Die absolute Konfiguration wird in Abbildung 65 in Analogie zu den bisher isolierten Asterosaponinen mit dieser Steroidseitenkette als 22R, 23S formuliert.^{32,33,129} Ruberosid F besitzt das gleiche Aglycon wie Pectinosid B; die ¹³C-chemischen Verschiebungen sind in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten.¹²⁹

Ruberosid F wurde somit als 6α -O- $\{\beta$ -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- $[\beta$ -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-quinovopyranosyl}-20-hydroxy-22,23-epoxy-24-methyl-5 α -cholest-9(11)-en-3 β -yl-sulfat identifiziert.

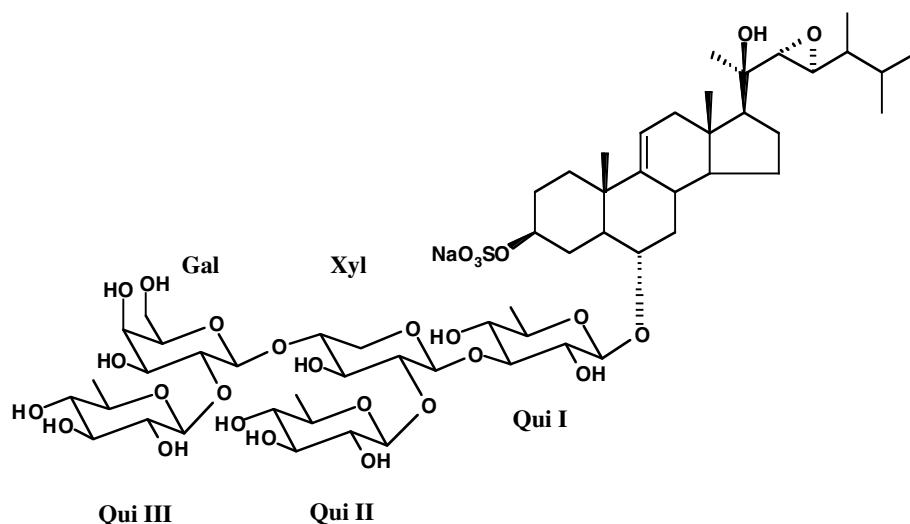


Abbildung 65: Ruberosid F

Tabelle 21: ^1H - und ^{13}C -Daten des Aglycons von Ruberosid F

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}	rel. Konfiguration
1	36,0	CH ₂	1,40/ 1,70	α β
2	28,9	CH ₂	2,07/ 1,60	α β
3	79,4	CH	4,12	α
4	30,2	CH ₂	2,42/ 1,29	α β
5	49,0	CH	1,22	α
6	80,3	CH	3,57	β
7	41,1	CH ₂	0,90/ 2,30	α β
8	35,7	CH	2,06	β
9	146,2	C		
10	38,7	C		
11	117,2	CH	5,32	
12	42,4	CH ₂	2,05/ 2,19	α β
13	42,0	C		
14	53,8	CH	1,24	α
15	23,0	CH ₂	1,73br	
16	25,4	CH ₂	1,77/1,19	
17	59,3	CH	1,63	α
18	13,3	CH ₃	0,72	
19	19,5	CH ₃	0,94	
Seitenkette				Signalaufspaltung [#]
20	72,2	C		
21	22,8	CH ₃	1,18	s
22	64,5	CH	2,74	
23	58,7	CH	2,74	
24	42,1	CH	1,10	
25	31,9	CH	1,67	
26	20,4	CH ₃	0,93	d (7,0)
27	19,1	CH ₃	0,88	d (6,8)
28	12,8	CH ₃	0,85	d (6,8)

[#] Kopplungskonstanten [Hz] in Klammern, Mult.: Multiplizität

Tabelle 22: ^1H - und ^{13}C -Daten der Monosaccharideinheiten von Ruberosid F

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}	J
Qui I				
1	103,6	CH	4,40	$J_{1,2}$ 7,9
2	73,7	CH	3,30	$J_{2,3}$ 9,2
3	89,1	CH	3,38	$J_{3,4}$ 9,2
4	74,1	CH	3,08	$J_{4,5}$ 9,2
5	71,8	CH	3,35	$J_{5,6}$ 6,2
6	17,9	CH ₃	1,21	
Qui II				
1	104,9	CH	4,56	$J_{1,2}$ 7,7
2	75,2	CH	3,24	$J_{2,3}$ 9,5
3	76,0	CH	3,33	$J_{3,4}$ 9,4
4	75,2	CH	3,09	$J_{4,5}$ 9,2
5	73,3	CH	3,38	$J_{5,6}$ 6,2
6	17,6	CH ₃	1,25	
Qui III				
1	104,7	CH	4,49	$J_{1,2}$ 7,9
2	75,6	CH	3,20	$J_{2,3}$ 9,5
3	76,0	CH	3,34	$J_{3,4}$ 9,4
4	75,7	CH	3,03	$J_{4,5}$ 9,2
5	73,0	CH	3,37	$J_{5,6}$ 6,2
6	17,9	CH ₃	1,23	
Gal				
1	101,4	CH	4,47	$J_{1,2}$ 7,9
2	81,4	CH	3,57	$J_{2,3}$ 9,3
3	73,5	CH	3,69	$J_{3,4}$ ca 4
4	69,1	CH	3,83	$J_{4,5}$ < 1
5	75,9	CH	3,57 [#]	$J_{5,6a}$ 8,2
6	61,8	CH ₂	3,69a	$J_{5,6b}$ 4,1
			3,63b	$J_{6a,6b}$ 11,7
Xyl				
1	103,7	CH	4,55	$J_{1,2}$ 7,7
2	83,0	CH	3,46	$J_{2,3}$ 8,1
3	74,9	CH	3,72	$J_{3,4}$ 9,2
4	77,6	CH	3,77	$J_{4,5ax}$
5	63,9	CH ₂	4,05eq	$J_{4,5eq}$ 4,9
			3,36ax	$J_{5ax,5eq}$ 11,9

Mult.: Multiplizität

8.3.7. Ruberosid G aus *Asterias rubens*

Wie bereits in Kapitel 7.1 ausgeführt, zeigten die Daten des LC-NMR-MS-Laufs ein Asterosaponin mit einer Δ^{24} ,23-Keto-Seitenkette und einer Oligosaccharidkette wie bei Ruberosid A an.

8.3.7.1. MS-Daten

ESI-MS von Ruberosid G liefert ein Molekulanion $[\text{MD}_{12}]^-$ bei m/z 1251 an ($\text{D}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{-Formiat}/\text{CH}_3\text{CN}$). Das MS^2 -Experiment zeigt ein Hauptfragment bei m/z 1231, was einer für die 6-Deoxy-*xyl*o-hex-4-ulose-Einheit typischen Wasserabspaltung entspricht. Weitere Fragmente bei m/z 1103 [1251-148], m/z 1083 [1231-148], 955 [1103-148] und 935 [1083-148] entsprechen dem Verlust von zwei Deoxyhexose-Einheiten nacheinander. Ein Nebenfragment bei m/z 494 [1251-757] ist in Übereinstimmung mit dem völligen Verlust des Glycosidrestes. Das D-H-Rücktauschexperiment zeigt an, daß das Molekulargewicht der undeutierten Verbindung $[\text{M}]$ m/z 1239 beträgt. Die Verbindung besitzt also 12 acide Protonen.

8.3.7.2. NMR-Strukturaufklärung

Sowohl die ^1H - als auch die ^{13}C -chemischen Verschiebungsdaten des Oligosaccharidrestes von Ruberosid G sind identisch mit den Daten, die für Ruberosid A erhalten wurden. Ebenso stimmen die Verschiebungsdaten für das Steroidgerüst mit denen der bislang isolierten Asterosaponine überein.

Die im LC-NMR-Spektrum durch das Acetonitrilsignal verdeckte A- H_3 -27-Methylresonanz der Steroidseitenkette findet sich bei δ_{H} 2,05 ppm. Das von A- H_3 -21 ausgehende COSY-Kopplungsnetzwerk endet bei A- H_2 -22. Die quartären Kohlenstoffsignale A-C-23 und A-C-25 wurden durch HMBC-Korrelationen zum olefinischen Proton A- H -24 bzw. zu den Methylgruppen A- H_3 -26/27 nachgewiesen. Die chemische Verschiebung von δ_{C} 204,6 ppm bestätigt eine Carbonylfunktion an C-23. Die NMR-Daten für die Steroidseitenkette stimmen sehr gut mit den für Nipoglycosid B publizierten Daten überein.¹³⁹

Die Struktur dieses neu isolierten Asterosaponins konnte somit als $6\alpha\text{-O}\{-\beta\text{-D-Fucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)}-\beta\text{-D-fucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)}-[\beta\text{-D-quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)}]-\beta\text{-D-quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)}-\beta\text{-D-6-deoxy-xyl}o\text{-hex-4-ulosyl}\}-5\alpha\text{-cholest-9(11),24\text{-dien-23-on-3}\beta\text{-yl-sulfat}$ identifiziert werden.

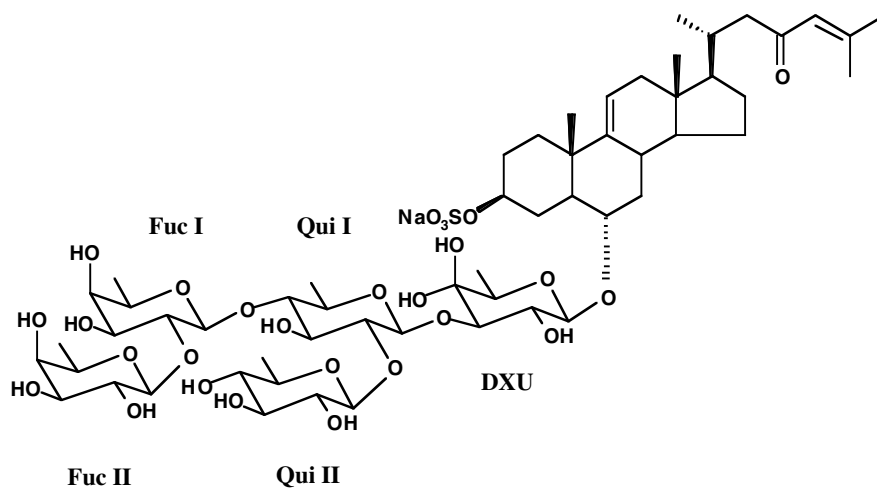


Abbildung 66: Ruberosid G

Tabelle 23: ^1H - und ^{13}C -Daten des Aglycons von Ruberosid G

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}	rel. Konfiguration
1	36,2	CH_2	1,38/ 1,69	α β
2	28,8	CH_2	2,06/ 1,57	α β
3	79,2	CH	4,12	α
4	30,2	CH_2	2,40/ 1,26	α β
5	49,2	CH	1,22	α
6	80,3	CH	3,57	β
7	41,1	CH_2	0,91/ 2,30	α β
8	36,2	CH	2,07	β
9	146,3	C		
10	38,8	C		
11	117,0	CH	5,31	
12	42,3	CH_2	1,96/ 2,13	α β
13	41,5	C		
14	54,1	CH	1,27	α
15	25,6	CH_2	1,74/1,16	
16	28,9	CH_2	1,80/1,29	
17	57,0	CH	1,21	β
18	11,8	CH_3	0,61	
19	19,5	CH_3	0,94	
Seitenkette				Signalaufspaltung [#]
20	34,0	CH	1,90	
21	19,5	CH_3	0,86	d (6,5)
22	52,0	CH_2	2,51/2,05	
23	204,6	C		
24	124,7	CH_2	6,16	
25	157,0	C		
26	27,5	CH_3	1,86	s
27	20,8	CH_3	2,05	s

[#] Kopplungskonstanten [Hz] in Klammern, Mult.: Multiplizität

8.4. Weitere aus *Asterias rubens* identifizierte Asterosaponine

8.4.1. Hauptkomponenten

Die drei Verbindungen Asteriidosid C, Glycosid B₂ und ov. Asterosaponin sind die einzigen Asterosaponine, die mit der Säulenchromatographie nach Kap. 3.2 für NMR-Messungen ausreichend rein gewonnen werden konnten. Alle anderen Saponine mußten mittels RP-HPLC semipräparativ weiter aufgetrennt werden (Kap. 3.3.4).

Aus dem LC-NMR-MS-Chromatogramm der MSPD-Gesamtfraction (Kap. 7) geht deutlich hervor, daß es sich bei diesen drei Verbindungen um die Hauptasterosaponine von *Asterias rubens* handelt. Die Struktur dieser Verbindungen mußte vollständig aus den MS- und NMR-Daten abgeleitet werden, da zunächst noch keine Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen. Die Aufklärung dieser Asterosaponine legte jedoch die Grundlage für einen Satz von Vergleichstandards, die in den HPLC-NMR-Messungen zum Subspektrenvergleich genutzt wurden.

Asteriidosid C und Glycosid B₂ wurden zu Beginn der Arbeit in Pyridin-d₅/D₂O (7:3, v/v) vermessen. Später kam D₂O/CD₃CN (2:3, v/v) zum Einsatz, siehe exp. Teil – Wahl des Lösemittels.

8.4.1.1. Asteriidosid C

Die Struktur von Asteriidosid C war zunächst noch nicht bekannt, wurde jedoch im Verlauf dieser Arbeit von deMarino et al. publiziert.¹³⁴ Sowohl die NMR- als auch die MS-Daten sind in guter Übereinstimmung mit diesen Literaturwerten.

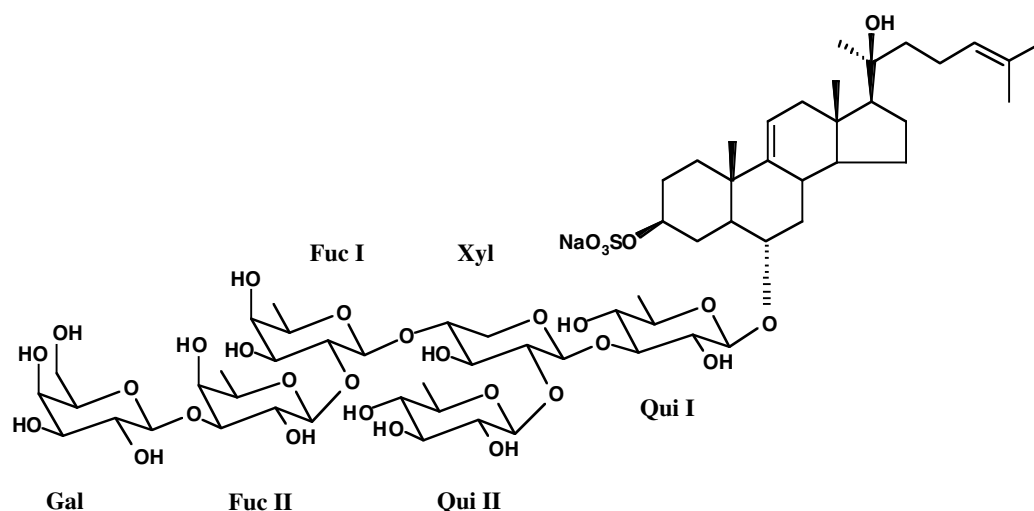


Abbildung 67: Asteriidosid C

8.4.1.2. Glycosid B₂

Glycosid B₂ (auch: Forbesid B), ein Asterosaponin mit dem verbreiteten Thornasterol A-Aglycon, wurde bislang aus den Seesternarten *A. forbesi* und *A. amurensis* isoliert.^{140,141} Die dort angegebenen Daten stimmen mit den beobachteten Werten sehr gut überein.

Im Fall von Glycosid B₂ ergab sich bei der Signalzuordnung eine Mehrdeutigkeit, die die Zuordnung einer Verknüpfungsposition der Oligosaccharidkette betraf:

Das HMBC-Spektrum zeigt eine interglycosidische Korrelation vom anomeren Proton Gal-H-1 zu einer Kohlenstoffresonanz bei δ_c 79,0 ppm an. Dieses Kohlenstoffsignal gehört laut HMQC-TOCSY zum Xylose-Spinsystem. Aufgrund der Koinzidenz der ¹H-Signale von Xyl-H-3 und Xyl-H-4 (bei δ_H 4,26 ppm) konnte allein mit Hilfe des HMQC keine Zuordnung des ¹³C-Signals zu einer dieser beiden Positionen getroffen werden. Die fehlende Information wurde dann durch eine Serie von HMQC-TOCSY-Experimenten mit verschiedenen Mischzeiten und geringer digitaler Auflösung erhalten. In Abbildung 68 erkennt man, daß mit zunehmender Mischzeit (18 bis 93 ms) in der Spur über dem anomeren Proton der Xylose-Einheit zuerst das Signal bei δ_c 84,2 ppm, dann das bei 76,1 ppm und schließlich dasjenige bei 79,0 ppm erscheint. Damit wird als Ort der glycosidischen Verknüpfung – in Übereinstimmung mit den anderen bisher isolierten Asterosaponinen^{32,33} – die Position 4 der Xylose ermittelt.

Es sei darauf hingewiesen, daß der Magnetisierungstransfer beim HMQC-TOCSY-Experiment nicht, wie die Abbildung evtl. vermuten läßt, von Kohlenstoffkernen auf Kohlenstoffkerne stattfindet (in der Abbildung in vertikaler Richtung), sondern mittels der HMQC-Sequenz von ^{13}C -Kernen auf Protonen wo dann der TOCSY-Transfer auf weitere Protonen erfolgt (in der Abbildung also in horizontaler Richtung). Siehe auch Kapitel 8.1.3.7.

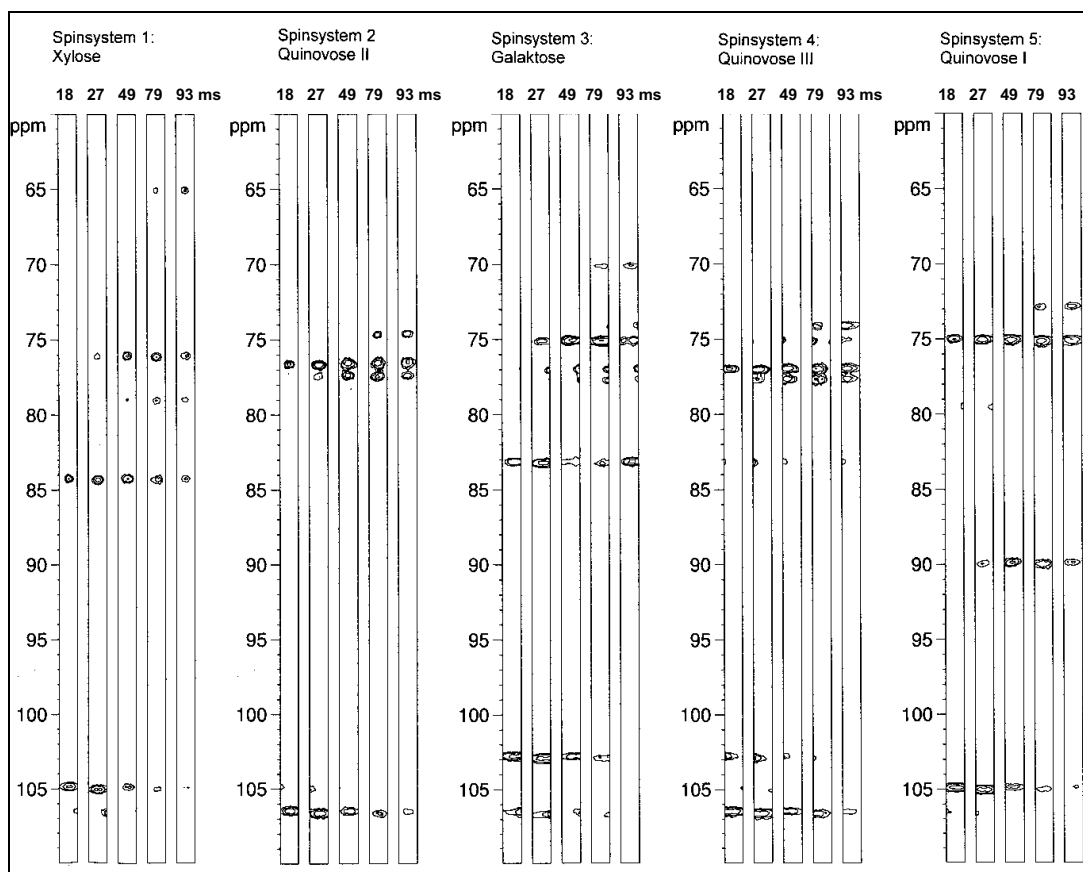
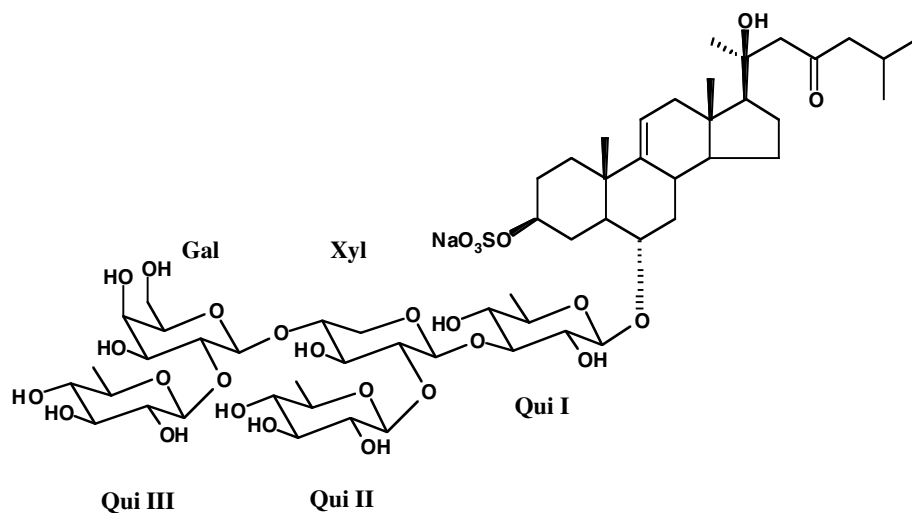


Abbildung 68: Variation der Mischzeiten im HMQC-TOCSY von Glycosid B2.

Abbildung 69: Glycosid B₂

8.4.1.3. Ovarian Asterosaponin 1

Ovarian Asterosaponin 1 (auch: Co-Aris I, Forbesid C) wurde bereits aus *Asterias amurensis*, *Asterias vulgaris* und *Asterias forbesi* isoliert.^{140,157,158,166} Es besteht aus dem verbreiteten Thornasterol A-Aglycon und einer Oligosaccharidkette mit einer in der Natur ungewöhnlichen 6-Deoxy-xylo-hex-4-ulose-Einheit.

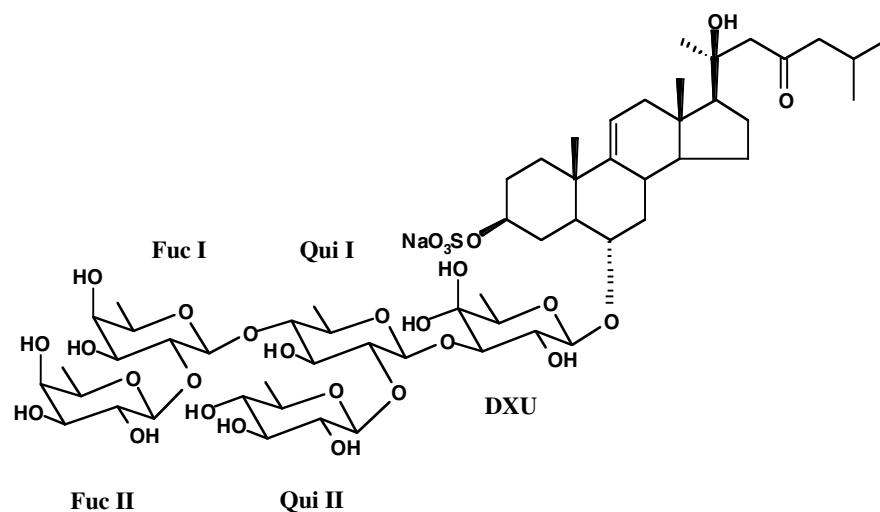


Abbildung 70: Ovarian Asterosaponin 1

8.4.2. Nebenkomponenten

Die in diesem Kapitel aufgeführten Nebenkomponenten aus *Asterias rubens* konnten mit der Säulenchromatographie nicht rein gewonnen werden. In einem Fall konnte ein Gemisch aus zwei Substanzen (Asterosid C zusammen mit Ruberosid F) aufgeklärt werden, in den anderen Fällen wurde die betreffende Feinfraktion mittels RP-HPLC semi-präparativ aufgereinigt.

8.4.2.1. Asterosid C

Das Gemisch aus Asterosid C und Ruberosid F wurde in Pyridin-d₅/D₂O (7:3, v/v) untersucht. Beide Verbindungen besitzen übereinstimmende Oligosaccharidsignale. Die Spinsysteme der Aglyconseitenketten konnten durch Analyse des Kopplungsnetzwerks ausgehend von den freistehenden Dubletts der Methylsignale zugeordnet werden.

Asterosid C wurde bislang bereits in *Asterias amurensis* gefunden.¹⁴⁰

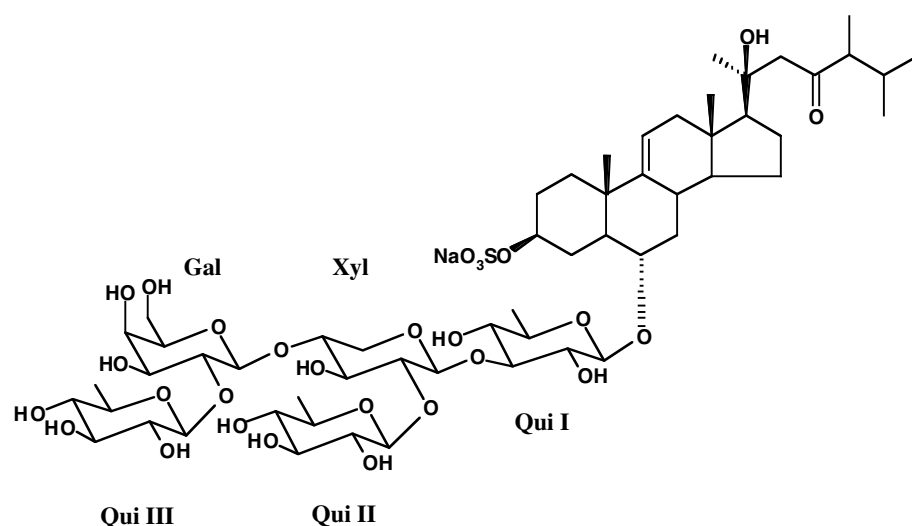


Abbildung 71: Asterosid C

8.4.2.2. Versicosid A

Versicosid A wurde als Hauptkomponente einer Feinfraktion mittels RP-HPLC aufgereinigt. Die Verbindung (auch: Forbesid A) ist in einer Reihe von Seesternen verbreitet und wurde bislang aus *Asterias amurensis versicolor*, *A. forbesi*, *Pisaster ochraceus*, *P. brevispinus* und *P. giganteus* isoliert.^{128,141,155,156}

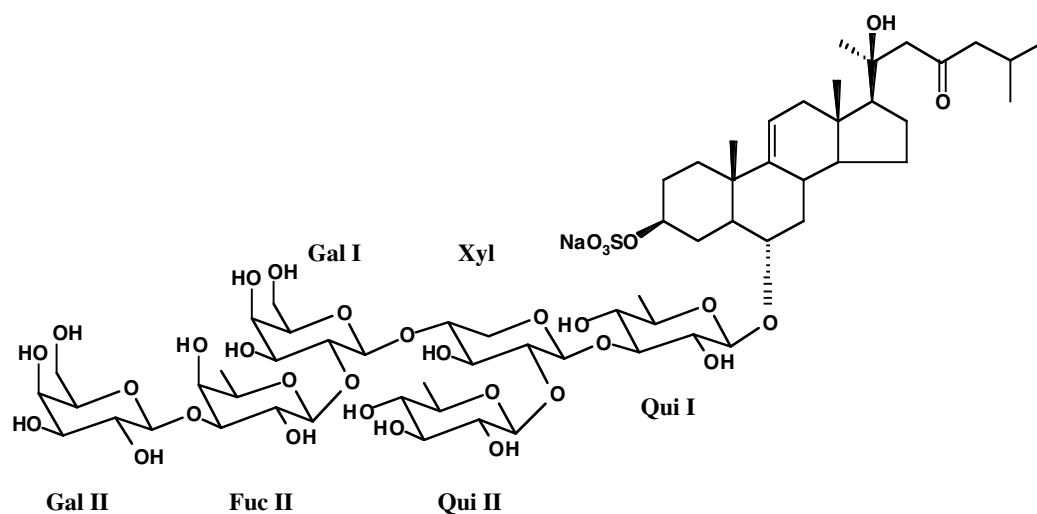


Abbildung 72: Versicosid A

8.4.2.3. Solasterosid A

Solasterosid A wurde zusammen mit Ruberosid E aus der Feinfraktion mit der internen Bezeichnung 35-36M durch die RP-HPLC-Aufarbeitung gewonnen. Es besitzt das gleiche Aglycon wie Ruberosid E und unterscheidet sich von diesem nur durch die Konfiguration an Position 4 der endständigen Zuckereinheit (Kapitel 5.3). Solasterosid A wurde bislang in *Solaster borealis* beschrieben.¹⁵⁹

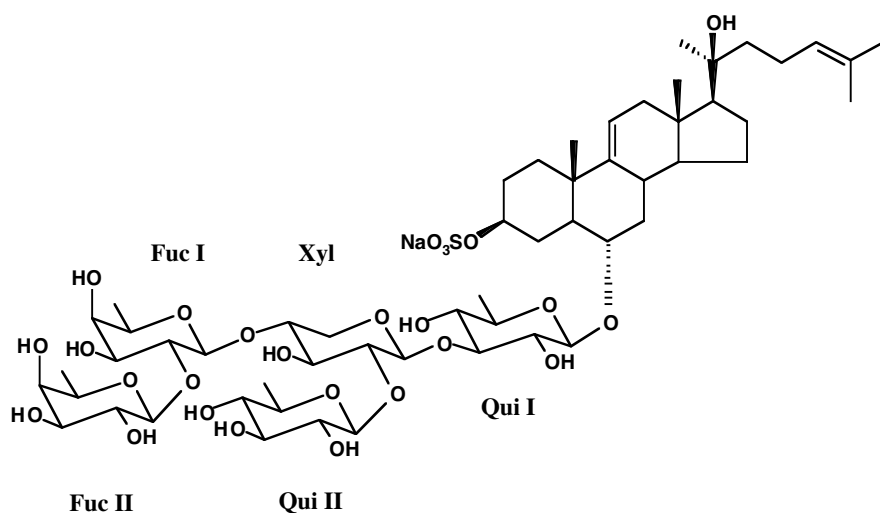


Abbildung 73: Solasterosid A

8.4.2.4. Asteriidosid B

Asteriidosid B wurde zusammen mit den Ruberosiden A bis D aus der Feinfraktion 37-39M erhalten. Die Verbindung wurde kürzlich von de Marino et al. aus einem antarktischen Seestern der Familie *Asteriidae* isoliert (siehe Asteriidosid C, Kap. 8.4.1.1).¹³⁴

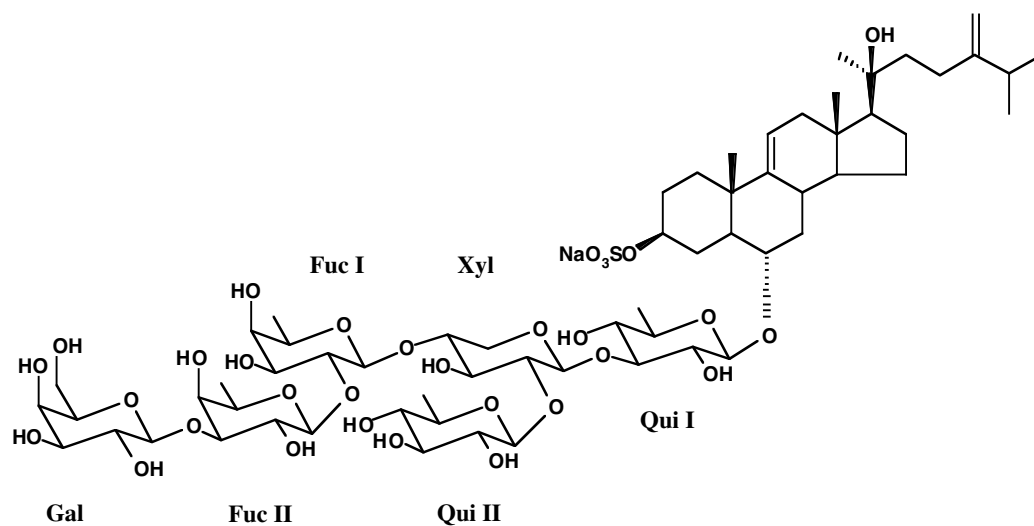


Abbildung 74: Asteriidosid B

8.4.3. Vorbehaltlich zugeordnete Verbindungen

Die hier aufgeführten Verbindungen konnten durch semi-präparative HPLC-Auftrennung nicht in ausreichender Menge rein erhalten werden, um ^{13}C -NMR-Daten zu erhalten. Da jedoch die Kenntnis der Kohlenstoffverschiebungen zur völligen Absicherung einer Struktur notwendig ist (Abschnitt 5.1), erfolgt die Strukturzuordnung daher vorbehaltlich aufgrund der ^1H -NMR-Daten aus den LC-NMR-Experimenten bzw. aus off-line-NMR-Spektren. Diese Komponenten wurden bislang noch nicht in Seesternen gefunden. Die MS- und NMR-Daten finden sich im Anhang.

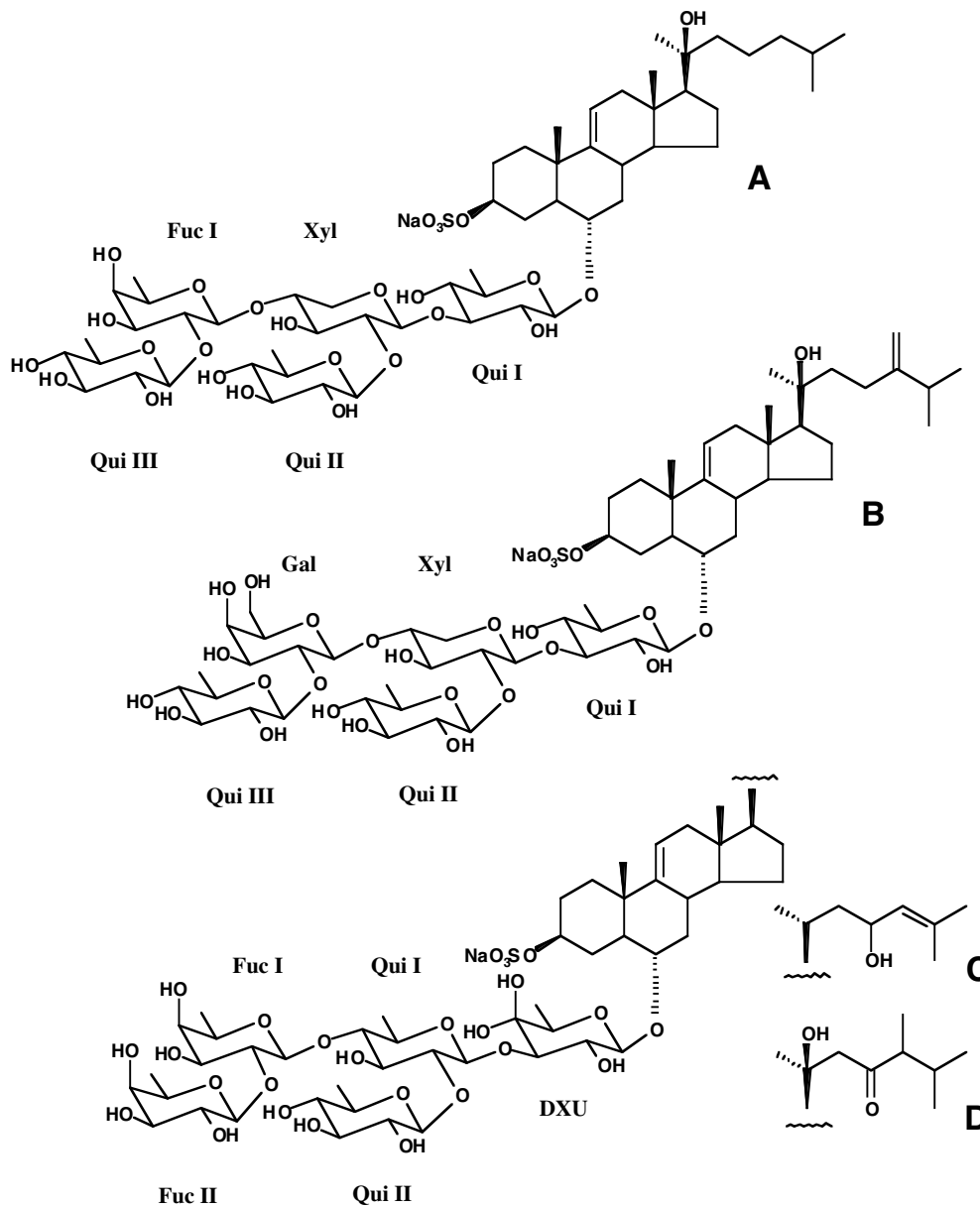


Abbildung 75: Strukturvorschläge für die vorbehaltlich zugeordneten Verbindungen A, B, C und D

8.4.3.1. Verbindung A

Im LC-NMR-Chromatogramm der Feinfraktion 37-39M eluiert unmittelbar hinter Ruberosid D die Nebenkomponente A. Das ESI-Spektrum ergibt einen Molekülanionenpeak $[\text{MD}_{12}]^-$ bei m/z 1225 ($\text{D}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{-Formiat}/\text{CH}_3\text{CN}$). MS^2 -Fragmente zeigen einen Verlust von nacheinander zwei Methylpentosen an: m/z 1077 $[\text{1225-148}]^-$ und 929 $[\text{1077-148}]^-$. Der D-H-Rücktausch lieferte 12 austauschende Protonen. Die NMR-Signale des Oligosaccharidteiles sind identisch mit denen von Ruberosid D, die des Aglyconteiles mit denen der nichtsubstituierten Seitenkette von Ruberosid C.

Auch $^1\text{H-NMR}$ - und 1D TOCSY-Spektren der isolierten Verbindung unterstützen die Zuordnung der Struktur von Verbindung A als $6\alpha\text{-O-}\{\beta\text{-D-Quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-fucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}[\beta\text{-D-quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)]-}\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-quinovopyranosyl}\}$ -20-hydroxy-5 α -cholest-9(11)-en-3 β -yl-sulfat.

8.4.3.2. Verbindung B

Das ESI-MS von Verbindung B aus der Feinfraktion 35-36M zeigt einen Molekülanionenpeak $[\text{MD}_{13}]^-$ bei m/z 1254 an. MS^2 -Hauptfragmente bei 1106 $[\text{1254-148}]^-$ und 941 $[\text{1106-165}]^-$ sowie Nebenfragmente bei 793 $[\text{941-148}]^-$ und 659 $[\text{793-134}]^-$ entsprechen der Abspaltung von nacheinander einer Methylpentose, einer Hexose, einer weiteren Methylpentose und schließlich einer Pentose. Die Anzahl der austauschenden Protonen beträgt 13.

Die NMR-Signale der Oligosaccharidkette stimmen mit denen von Asterosid C und Ruberosid F überein, die der Steroidseitenkette mit denen von Asteriidosid B und Ruberosid D. Daher wird der Verbindung B vorbehaltlich die in Abbildung 75 gezeigte Struktur ($6\alpha\text{-O-}\{\beta\text{-D-quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}[\beta\text{-D-quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)]-}\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-quinovopyranosyl}\}$ -20-hydroxy-5 α -cholest-9(11),24(28)-dien-3 β -yl-sulfat) zugeordnet.

8.4.3.3. Verbindung C

Der Molekülanionenpeak $[\text{MD}_{13}]^-$ von Verbindung C erscheint im ESI-MS bei m/z 1254 ($\text{D}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{-Formiat}/\text{CH}_3\text{CN}$). Das MS^2 -Experiment zeigt Fragmente bei m/z 1234 $[\text{1254-20}]^-$, 1106 $[\text{1254-148}]^-$, 1086 $[\text{1234-148}]^-$, 958 $[\text{1106-148}]^-$ und 938 $[\text{1086-148}]^-$ an, was dem Verlust von Wasser (D_2O) und Deoxyhexoseeinheiten ent-

spricht. Das D-H-Rücktauschexperiment liefert einen Molekülionenpeak bei m/z 1241. Dies stimmt mit 13 austauschende Protonen überein.

Das on-flow-LC-NMR-Spektrum zeigt an, daß diese Verbindung die gleiche Oligosaccharidkette, wie ov. Asterosaponin 1 und Ruberosid A, B und G besitzt. Weiterhin zeigt es neben der typischen A-H-11-Resonanz bei δ_{H} 5,31 ppm ein zweites olefinisches Signal bei 5,00 ppm, zwei Methylsingulets bei 1,68 und 1,64 ppm sowie ein Methyldublett bei 0,89 ppm. Anhand von zwei 2D-TOCSY-Experimente im stopped-flow-Modus - eines mit einer kurzen Mischzeit von 20 ms und eines mit 100 ms - konnte gezeigt werden, daß das olefinische Proton mit einer Resonanz bei 4,37 ppm und den beiden Methylsignalen bei hohem Feld koppelt. Das Spinsystem erstreckt sich weiter über Signale bei δ_{H} 1,49 und 1,24 ppm zum Methyldublett bei 0,89 ppm. Dies weist auf eine $\Delta^{24,23}$ -Hydroxy-Seitenkette hin, die bislang noch nicht in Asterosaponinen gefunden wurde. (Die ^1H -Daten sind in guter Übereinstimmung mit denen eines kürzlich isolierten Cycloartans mit der gleichen Seitenkette)³⁴ Verbindung C wird daher vorbehaltlich die Struktur $6\alpha\text{-O-}\{\beta\text{-D-Fucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-fucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}[\beta\text{-D-quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)]-}\beta\text{-D-quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-6-deoxy-xylo-hex-4-ulosyl}\}\text{-5}\alpha\text{-cholest-9(11),24-dien-23-ol-3}\beta\text{-yl-sulfat}$ zugeordnet.

8.4.3.4. Verbindung D

Das ESI-MS-Spektrum von Verbindung D weist einen Molekülionenpeak $[\text{MD}_{13}]^+$ bei m/z 1284 auf. MS^2 -Fragmente bei 1264 $[\text{1284-20}]^+$ und 1169 $[\text{1284-115}]^+$ zeigen die Abspaltung von Wasser und den Verlust der Steroidseitenkette durch Retro-Aldol-Spaltung an. Die Anzahl der austauschenden Protonen beträgt 13.

Die NMR-Signale der Oligosaccharidkette stimmen mit denen von ov. Asterosaponin 1 überein, die der Steroidseitenkette mit denen von Asterosid C. Daher wird der Verbindung D vorbehaltlich die in Abbildung 75 gezeigte Struktur $(6\alpha\text{-O-}\{\beta\text{-D-Fucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-fucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}[\beta\text{-D-quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)]-}\beta\text{-D-quinovopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-6-deoxy-xylo-hex-4-ulosyl}\}\text{-24-methyl-20-hydroxy-5}\alpha\text{-cholest-9(11)-en-23-on-3}\beta\text{-yl-sulfat})$ zugeordnet.

8.5. Diskussion

Im Überblick über die in *Asterias rubens* identifizierten Asterosaponine lassen sich folgende Merkmale erkennen:

- allen isolierten Asterosaponinen ist das charakteristische 3 β ,6 α -Dihydroxy-5 α -cholest-9(11)-en-Gerüst gemein.
- die Saponine folgen dem verbreiteten Verknüpfungsmuster mit einer verzweigten Quinovose an Position 2 des zweiten Zuckers der Kette. Handelt es sich bei diesem Zucker um eine Xylose, so ist der erste Zucker des Glycosidrests immer eine Quinovose; ist es eine Quinovose, so tritt eine 6-Deoxy-xylo-hex-4-ulose an erster Stelle auf.
- als Zuckerbausteine werden Fucose, Quinovose, 6-Deoxy-xylo-hex-4-ulose und Galactose jedoch keine Glucose und Arabinose gefunden.
- der β -D-Fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-6-deoxy-xylo-hex-4-ulosyl-Oligosaccharidrest tritt bei *Asterias rubens* ausgesprochen häufig auf. Er wurde in sechs Verbindungen gefunden (ov. Asterosaponin 1, Ruberosid A, B und G sowie in den vorbehaltlich zugeordneten Verbindungen C und D). Bislang ist dieser Kohlenhydratrest erst in zwei Asterosaponinen nachgewiesen worden (ov. Asterosaponin 1 und CO-ARIS II).^{32,33}
- Das Auftreten von Aglyca ohne Hydroxyfunktion an Position 20 der Seitenkette (Ruberoside A, B und G) wurde bislang nur für die Arten *Distolasterias nipon*, *Luidia maculata* bzw. *clathrata*, *Coscinasterias tenuispina* sowie *Neomilaster georgianus* berichtet. Auffällig ist die Übereinstimmung dieser vergleichsweise selten auftretenden Aglyca von Ruberosid A, B und G mit denen von Nipoglycosid B, C und D aus *Distolasterias nipon*.¹³⁹

9. Zusammenfassung und Schlußfolgerung

- Dies ist die erste Arbeit über die biologisch wirksame Asterosaponinfraktion von *Asterias rubens*. Zu ihrer Untersuchung wurde eine neue LC-NMR-MS-Screeningmethode (in Kombination mit einer MSPD-Extraktion) entwickelt und in dieser Arbeit erstmals eingesetzt. Anhand der durch das LC-NMR-MS-Screening erhaltenen Daten erfolgte die zielgerichtete Isolierung von neuen Inhaltsstoffen. Die Struktur von sieben neuen Saponinen (Ruberoside A bis G) wurde ausschließlich durch massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Methoden ohne weitere Derivatisierung oder Abbau der Verbindungen aufgeklärt.

9.1. Aufarbeitung, Trennung, Isolierung von Asterosaponinen

- Eine konventionelle säulenchromatographische Aufarbeitung zeigte sich zur Auftrennung der Asterosaponinfraktion in Einzelkomponenten nur bedingt geeignet. Es konnten lediglich die drei Hauptsaponine aus *Asterias rubens* in reiner Form isoliert werden. Alle anderen Asterosaponine wurden als Gemische (Feinfraktionen) erhalten.
- Die weitere Auftrennung der Asterosaponinfeinfraktionen gelang mit der Hochleistungsflüssigchromatographie. Dabei erwies sich der Zusatz von Ammoniumsalzen zum Eluenten für eine reproduzierbare Chromatographie als notwendig. Zur semi-präparativen Aufarbeitung der Asterosaponine wurde das leicht entfernbare Ammoniumhydrogencarbonat eingesetzt.
- Die Ionenpaarchromatographie zeigte sich für die Trennung von Asterosaponinen geeignet.
- Der ursprüngliche nicht-zielgerichtete Ansatz einer Auftrennung in Einzelverbindungen mit anschließender off-line-NMR-Strukturaufklärung erwies sich für die Suche nach neuen Asterosaponinen als nicht effektiv genug. Er führte lediglich zur Reisolierung der bereits bekannten Verbindungen Asteriidosid C, Glycosid B₂, ovarian Asterosaponin 1, Asterosid C und Versicosid A. (Im Fall von Ruberosid F ergaben sich aus einem Gemischspektrum Hinweise auf eine neue Verbindung, die zur zielgerichteten Isolierung der Komponente führten).

9.2. MSPD-Extraktion

- Mit der MSPD steht nun eine mikropräparative Extraktionsmethode zur Verfügung, die den Erfordernissen für ein LC-NMR-Screening (siehe unten) sehr gut gerecht wird. Diese schnelle, nur aus wenigen Arbeitsschritten bestehende, Aufarbeitung ergänzt den beschleunigten Screeningansatz der hochintegrierten Kopplungstechnik LC-NMR-MS. Die aufzuarbeitende geringe Probenmenge entspricht im Maßstab der für die LC-NMR benötigten Menge.

9.3. On-flow-LC-NMR-MS-Methode

- Die Eignung der LC-NMR-MS zur Charakterisierung von komplexen glycosidischen Verbindungen im Molmassenbereich von 1200 bis 1400 Einheiten konnte erstmals gezeigt werden. Es wurde ein on-flow-Ansatz bei niedrigen Flußraten gewählt.
- Bis zu einer Flußrate von 0,05 ml/min konnte keine Peakverbreiterung durch Längsdiffusion festgestellt werden. Das Peakelutionsvolumen von Asterosaponinen ist im Gegenteil geringer als bei konventionellen Flußraten (etwa 0,8 ml/min). Eine Ausnahme bilden Asterosaponine, die eine 6-Deoxy-xylo-hex-4-ulose-Einheit aufweisen: hier kommt es bei niedrigen Flußraten – vermutlich aufgrund des Gleichgewichts zwischen hydratisierter und nicht hydratisierter Form – zu verstärktem Tailing.
- In deuteriumoxidhaltigen Eluenten tauschen alle aciden Protonen der Asterosaponine schnell und vollständig gegen Deuteriumkerne aus. Anhand von D-H-Rücktauschexperimenten kann auf die Anzahl der austauschenden Protonen geschlossen werden. Diese zusätzliche Strukturinformation erwies sich im Fall der Seesternsaponine als sehr hilfreich zur Strukturaufklärung. Weiterhin können in deuterierten Eluenten unterschiedliche Wasserstoffäquivalente voneinander unterschieden werden (Hydroxy- bzw. Oxo-Funktion vs. gesättigtes bzw. olefinisches System).
- Über die schnell relaxierenden Aglycon-Methylgruppen A-H₃-18 bzw. H₃-19 ermöglicht die on-flow-LC-NMR quantitative Aussagen. Diese ergänzen andere Quantifizierungsmethoden in Fällen, wo keine Standardverbindungen zur Verfügung stehen. Die Methode bietet sich daher besonders für die Quantifizierung neuer Verbindungen in Naturstoffextrakten an.

- Mit einem 3 mm-Durchflußprobenkopf (60 µl aktives Zellvolumen) konnte bei einer geringen Flußrate von 0,05 ml/min mit Gradientenelution gearbeitet werden. Im 4mm-Probenkopf (120 µl) kam es dagegen bei Gradientenelution zu Peakverbreiterung im NMR-Detektionsvolumen.

9.4. LC-NMR-MS: Vorteile der „Doppelkopplung“

- Neben dem Gewinn an Zeit- und Probeneffizienz besteht der bedeutendste Vorteil der direkten LC-NMR-MS-Kopplung gegenüber zwei separaten LC-NMR und LC-MS-Aufbauten mit Sicherheit in der eindeutigen Zuordnung der MS-Daten zu den LC-NMR-Peaks, da alle spektroskopischen Daten in demselben chromatographischen Lauf aufgenommen werden. Getrennte LC-MS- und LC-NMR-Läufe einer Probe sind in manchen Fällen schlecht miteinander zu korrelieren, da voneinander verschiedene Chromatogramme erhalten werden. Mögliche Gründe hierfür können z. B. die größere injizierte Probenmenge bei der LC-NMR, die Unterschiede im Elutionsverhalten von Deuteriumoxid und Wasser¹⁷¹ oder unterschiedliche Gradientenformeinheiten der verwendeten chromatographischen Systeme sein.
- Die Möglichkeit, MS-ausgelöste stopped-flow-Experimente durchzuführen, erlaubt eine zuverlässige und spezifische Selektion interessierender Peaks. Insbesondere bei Verbindungen mit geringer UV-Absorption, die bei kürzeren Wellenlängen vermessen werden (Asterosaponine: 210 nm), werden so Störungen ausgeschlossen. Darüber hinaus ergibt sich im MS-ausgelösten stopped-flow-Modus ein weiteres Auslösekriterium: die Peakreinheit. Bei teilweise koelueierenden Verbindungen kann das Anhalten der LC-Pumpe in bestimmten Fällen noch so lange herausgezögert werden, bis der Molekülionenpeak der zu untersuchenden Verbindung möglichst ohne weitere Verunreinigungen im MS-Spektrum erscheint.
- H-D-Austausch- und Rücktauschexperimente sind zwar prinzipiell in jedem LC-MS-System möglich, liegen bei der LC-NMR-MS jedoch auf der Hand.
- Das Massenspektrometer kann mit wenigen Handgriffen in das LC-NMR-MS-System eingebunden werden. Unter der Voraussetzung, daß eine weitere HPLC-Anlage vorhanden ist, läßt sich rasch zum konventionellen LC-MS-Betrieb wechseln. Das für diese Arbeit verwendete Ionenfallen-Spektrometer wurde tagsüber

in der Regel für andere Anwendungen genutzt, abends wurde dann für über-nacht-on-flow-Messungen das LC-NMR-System angeschlossen.

9.5. LC-NMR-MS als chemisches Screening

- Das LC-NMR-MS-Screening wurde zur Suche nach neuen Asterosaponinen eingesetzt. Es wurden sowohl Feinfraktionen der präparativen säulenchromatographischen Trennung als auch Asterosaponin-Gesamtfractionen der MSPD-Aufarbeitung untersucht. Die Identifizierung der Saponine erfolgte dabei
 - durch Zuordnung einzelner Strukturmerkmale,
 - durch Subspektrenvergleich oder
 - durch homonukleare 2D-NMR-Experimente im stopped-flow-Modus.
- Die LC-NMR-MS-Strukturinformation wurde zur Orientierung für weitere präparative Arbeiten verwendet. Unbekannte Verbindungen, die u. U. für Wirksamkeitsunterschiede verantwortlich sind, können so frühzeitig von bereits bekannten Verbindungen unterschieden werden: eine unnötige Reisolierung bekannter Substanzen (Replikation), wie sie z.B. bei einem reinen aktivitätsgeleiteten Screening häufig auftritt, kann so vermieden werden. Dieser LC-NMR-MS-Ansatz stellt ein sogenanntes chemisches Screening dar.
- Mit der Kombination von mikropräparativer MSPD-Extraktion und LC-NMR-MS-Kopplung steht nun eine neue Methode zur Verfügung, die es erlaubt, innerhalb von 2 Arbeitstagen vom intakten Seesternmaterial zu den umfassenden NMR- und MS-Daten des on-flow-Laufs zu gelangen. Darüber hinaus ermöglicht der kleine Maßstab der Methode Untersuchungen der Asterosaponinverteilung in einzelnen Individuen.

9.6. NMR-Strukturaufklärung

- Die weitere vollständige NMR-Strukturaufklärung der Asterosaponine erfolgte off-line anhand von ein- und zweidimensionalen Methoden. Die einzelnen Zuckerbausteine der Oligosaccharidketten wurden hauptsächlich anhand ihrer 1D TOCSY-Subspektren identifiziert. Die Aufklärung der glycosidischen Verknüpfungspositionen basierte auf interglycosidischen 3J (COCH)-Kopplungen zwischen anomeren Protonen und Ring-Kohlenstoffkernen des benachbarten Zuckers. Diese Zuordnungen wurden durch NOE/ROE-Korrelationen unterstützt.
- Die Technologie supraleitender Probenköpfe bewirkt eine Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses um den Faktor vier. Die NMR-Daten zur Strukturauf-

klärung eines Asterosaponins im sub-Milligramm-Bereich können so innerhalb einer Nacht erhalten werden.

9.7. Asterosaponine aus *Asterias rubens*

- Aus *Asterias rubens* konnten sieben neue Asterosaponine isoliert werden (Ruberosid A bis G). Die Strukturen wurden anhand von umfassenden NMR-Untersuchungen aufgeklärt. Es konnten sowohl die Protonensignale als auch die ¹³C-Resonanzen zugeordnet werden.
- Anhand der Protonendaten, die aus den LC-NMR-Experimenten erhalten worden waren, wurden vier neue Asterosaponine (Verbindungen **A** bis **D**) vorbehaltlich zugeordnet.
- Als Hauptasterosaponine wurden in *Asterias rubens* die Verbindungen Glycosid B₂, ovarian Asterosaponin 1 und Asteriidolid C identifiziert. Weiterhin wurden die bereits aus anderen Species isolierten Verbindungen Versicosid A, Asterosid C, Solasterosid A und Asteriidolid B identifiziert.

10. Experimenteller Teil

10.1. Geräte und Materialien

10.1.1. LC-NMR-MS

Das verwendete chromatographische System besteht aus einer Bruker LC-22 HPLC-Pumpe (Rheinstetten), einem Rheodyne 7725i Injektionsventil mit 20 μl Injektionschleife (Cotati, CA, USA), einem Bischoff Lambda 1010 UV-Detektor (Leonberg) und einer Bruker BPSU 36 Peaksammeleinheit, an deren Auslaß ein LC-Packings ICP-20 Fluß-Splitter (Amsterdam, Niederlande) mit einem Splitverhältnis von 1:20 angebracht ist. Über ein PEEK-T-Stück (Upchurch, Oak Harbor, WA, USA) kann dem MS-Eluentenstrom mittels einer Cole Parmer 74900 Spritzenpumpe (Vernon Hills, IL, USA) zusätzliche Pufferlösung zugegeben werden (siehe Abbildung 15). Die Chromatographiesoftware HystarNT stammt von Bruker (Rheinstetten).

Im Bruker DRX 600 NMR-Spektrometer kamen für isokratische Messungen ein 4 mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Durchflußprobenkopf mit einem aktiven Detektionsvolumen von 120 μl , für Gradientenelution ein 3 mm $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Durchflußprobenkopf mit einem Detektionsvolumen von 60 μl zum Einsatz. Beide Probenköpfe sind für gepulste z-Feldgradienten ausgestattet. Als Software zur Datenaufnahme und -verarbeitung diente Bruker XWinNMR 2.5 auf einer Silicon Graphics O2-Workstation.

Das Esquire-LC-Ionenfallen-Massenspektrometer stammt von Bruker Daltonik (Bremen). Es ist mit einer ESI-Ionenquelle ausgestattet. Als Steuersoftware diente EsquireControl von Bruker Daltonik.

10.1.2. NMR

Für die off-line-NMR-Messungen kamen ein Bruker DRX 600 (Rheinstetten) mit einem 2,5 mm Micro- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Inverskopf, ein Bruker AMX 600 mit einem 5 mm dreifach-Inverskopf sowie ein Bruker DRX 500 mit einem 5 mm Cryo-dreifach-Inverskopf zum Einsatz. Sämtliche Geräte erlauben gepulste z-Feldgradienten. Die Datenaufnahme und -verarbeitung erfolgte mit dem Softwarepaket Bruker XWinNMR 2.5 auf Silicon Graphics O2-Workstations.

Die Probenröhrchen (2 mm o. D. NMR-Kapillaren bzw. 5 mm o. D. NMR-Röhrchen) wurden von Wilmad (Buena, NJ, USA) bezogen.

10.1.3. HPLC

Zur Optimierung der HPLC-Bedingungen und zur Isolierung von Einzelverbindungen im semipräparativen Maßstab wurde eine HPLC-Anlage der Fa. Waters (Milford, MA, USA) verwendet. Sie besteht aus zwei Pumpen Modell 510 mit Hochdruckgradientenformeinheit, einem WISP 712 Autosampler sowie einem UV-Detektor Modell 486. Die Datenaufnahme wurde mit dem Softwarepaket Waters Millennium32 gesteuert.

10.1.4. Fließmittel und Chemikalien

LC-NMR-MS

Acetonitril (Chromasolv, für die LC-NMR) wurde von Riedel-de-Haen (Seelze) bezogen. Das Deuteriumoxid (99,9 Atom-%) stammte von Deutero GmbH (Kastellaun). Deuteriertes Ammoniumformiat (ND_4^+ Formiat) wurde durch H-D-Austausch in einem Überschuß an Deuteriumoxid dargestellt.

NMR

Die deuterierten NMR-Lösemittel Acetonitril- d_3 (99,8 Atom-%) und Deuteriumoxid (100 Atom-%) stammten von Euriso-top (Gif-sur-Yvette, Frankreich). Deuteriumoxid (99,9 Atom-%)/Pyridin- d_5 (99,5 Atom-%) wurde - vorgemischt im Verhältnis 3:7 (v/v) - von Deutero GmbH (Kastellaun) bezogen.

HPLC, Säulenchromatographie, MSPD, Dünnschichtchromatographie

Wasser für chromatographische Zwecke wurde mit einer Milli-Q Aufreinigungsanlage von Millipore (Badford, MA, USA) aus deionisiertem Leitungswasser gewonnen. Acetonitril (HPLC ultra gradient grade) wurde von Baker (Deventer, Niederlande) erworben. Sämtliche Puffersubstanzen waren von p.a- oder vergleichbarer Qualität.

10.2. Probenmaterial

Rohextrakte von *Asterias Rubens* sowie intaktes Seesternmaterial wurden vom Institut für Angewandte Biologie und Landschaftsplanung - Bioplan GmbH, Rostock, Groß Stove, zur Verfügung gestellt.

Die zur Herstellung dieser Rohextrakte verwendeten Proben wurden zwischen Juli und September 1997 in Fredericia, Dänemark, gesammelt und bis zur Aufarbeitung

tiefgefroren aufbewahrt. Zur MSPD-Extraktion eingesetzte intakte Seesterne stammen vom Sommer 1998, ebenfalls aus Fredericia, Dänemark.

10.3. Chromatographische und spektroskopische Bedingungen

10.3.1. Rohextrakte von *Asterias rubens*

Die Seesterne wurden nach dem Auftauen mechanisch zerkleinert und mit Acetonitril versetzt. Nach 16 h wurde der Überstand dekantiert. Der feste Rückstand wurde noch einmal mit Acetonitril aufgeschlämmt und für 60 min mit Ultraschall behandelt. Nach Filtration wurden die vereinigten Acetonitrilextrakte am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Dieser konzentrierte Extrakt wurde dann in Wasser aufgenommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend gefriergetrocknet (Dauer: 52 h).

10.3.2. Säulenchromatographie

20 g des Rohextraktes von *Asterias rubens* wurden auf eine präparative Trennsäule (4 x 24 cm i. D.), bestehend aus 100 g RP-18-Material (40 µm Partikeldurchmesser, zur Flash-Chromatographie, Baker, Deventer, Niederlande), gegeben. Die Fraktionen wurden mit einem Gradienten von 100 % Wasser zu 100 % MeOH eluiert. Bei einer Eluentenzusammensetzung von H₂O/MeOH 30:70 (v/v) wurden 1688 mg einer Asterosaponinfraktion erhalten.

Davon wurden 600 mg zur weiteren Feinauftrennung an einer Trennsäule aus 32 g RP-18-Material mit H₂O/MeOH (Gradient von 50:50 auf 10:90, v/v) weiter fraktioniert. Bei einer Eluentenzusammensetzung von H₂O/MeOH 40:60 (v/v) wurden dabei die Fraktionen 33-34M (16 mg, Asteriidosid C in Reinsubstanz), 35-36M (124 mg) und 37-39M (179 mg) erhalten. Von diesen wurde der Hauptteil für biologische Tests eingesetzt. Ein kleinerer Teil stand für die NMR-Strukturaufklärung zur Verfügung.

Im Rahmen weiterer Aufarbeitungen wurden bei variierten Bedingungen die Verbindungen Glycosid B₂, ovarian Asterosaponin 1 und Versicosid A in Reinsubstanz sowie ein Gemisch von Ruberosid F und Asterosid C erhalten. Für die genauen Säulenprotokolle sei auf 142 und ¹⁷² verwiesen.

Glycosid B₂

Probe: 40 g Rohextrakt,

Säule: 40 x 6 cm, 500 g RP-18-Material,

Eluent: Acetonitril/Wasser-Gradient von 100 % Wasser bis 50:50 (v/v),

54 mg Glycosid B₂ eluierten bei einer Eluentenzusammensetzung von 25:75 (v/v).

ov. Asterosaponin 1, Ruberosid F/Asterosid C

Probe: 400 mg einer ebenfalls bei 25:75 (v/v) Acetonitril/Wasser erhaltenen

Asterosaponinfraktion der vorangenannten Trennung (Glycosid B₂),

Säule: 18 x 2,1 cm, 32 g RP-18-Material,

Eluent: Acetonitril/Wasser 80:20 (v/v)

43 mg ov. Asterosaponin 1

39 mg Gemisch Ruberosid F/Asterosid C

Versicosid A

Säule: 23 x 6 cm, 400 g RP-18-Material,

Probe: 20 g Rohextrakt, nacheinander mit Chloroform und Toluol entfettet,

Eluent: Acetonitril/Wasser-Gradient von 100 % Wasser bis 50:50 (v/v),

56 mg einer Fraktion mit Versicosid A als Hauptkomponente eluieren bei einer Eluentenzusammensetzung von 20:80 (v/v); 3,8 mg davon wurden mit der HPLC weiter aufgereinigt

10.3.3. MSPD

5 g einer tiefgefrorenen intakten Seesternprobe wurden mit einem Messer in kleine Stücke von ca. 3 mm Größe geschnitten und mit 20 ml Wasser sowie 9 g RP-18-Material (LiChroprep RP-18, 25-40 µm Partikeldurchmesser, Merck, Darmstadt) vermenget. Die Mischung wurde dann in einem Mörser fünf Minuten lang zermahlen, bis ein homogener Brei entstanden war. Diese Paste wurde anschließend in eine Glassäule gefüllt (2 cm i. D.), in die zuvor ein Bett aus weiteren 9 g RP-18-Material, abgedeckt mit einem Stück Filterpapier, gegeben worden war. Nach dem Spülen des Säuleninhalts (100 ml Wasser) wurden die Bestandteile mit zunehmenden Anteilen an Acetonitril eluiert (siehe Abbildung 33). Die Elution wurde durch Anlegen eines leichten Überdrucks unterstützt. Schließlich wurden die erhaltenen Fraktionen unter einem Stickstoffstrom zur Trockne abgeblasen. Die Fraktion, die die Asterosaponine enthielt, eluierte bei einer Zusammensetzung von H₂O/CH₃CN 50:50 (v/v). Aus 5 g rohen Seesternmaterial wurden 11 mg der Asterosaponinfraktion erhalten.

Die Trennung wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Alugram RP-18 W, Macherey u. Nagel, Dueren; H₂O/CH₃CN 50:50 (v/v); Detektion: 5 % H₂SO₄ in Me-OH; R_f-Werte der Asterosaponine: 0,78, 0,69-0,63).

10.3.4. HPLC

10.3.4.1. Ionenpaarchromatographie

Tabelle 24: Exp. Bedingungen der Ionenpaarchromatographie (Kapitel 3.3.2)

Säule:	Merck RP-select B (Darmstadt), 250 x 4,6 mm i. D., 5 µm Partikeldurchmesser
Eluent:	0,01 M Tetrabutylammoniumchlorid, 0,025 M Na ₂ HPO ₄ , 0,025 M KH ₂ PO ₄ /Acetonitril 60:40 (v/v)
Flußrate:	0,8 ml/min
Detektion:	UV 210 nm

10.3.4.2. HPLC-Fraktionierung und -Aufreinigung von Asterosaponinen

Tabelle 25: Exp. Bedingungen der HPLC-Aufreinigung von Asterosaponinen (Kapitel 3.3)

Säule:	YMC J'sphere ODS L80, 4,6 x 250 mm i. D., 4 µm Partikeldurchmesser, mit Vorsäule (YMC Schermbbeck)	
Eluent	20 mmol NH ₄ ⁺ HCO ₃ in D ₂ O/Acetonitril 65:35 (v/v)* bzw. 68:32 (v/v)**,**	
Flußrate:	1 ml/min** bzw. 0,8 ml/min***	
Injektionsschleife	20 µl	
UV-Detektion:	210 nm	
Probenaufgabe:	Eine Lösung von 25 mg/ml der Asterosaponin-Feinfraktionen bzw. der Asterosaponin-Gesamtfraktion im Eluenten wurde wiederholt chromatographiert. Die Einzelverbindungen wurden gesammelt und durch mehrmaliges Einrotieren am Vakuumrotationsverdampfer bei maximal 38 °C vom NH ₄ ⁺ HCO ₃ befreit.	
Aufgegebene Menge:	37-39M*	20 mg
	35-36M**	15 mg
	Asterosaponin-Gesamtfraktion***	30 mg

10.3.5. LC-NMR-MS

Tabelle 26: Experimentelle Bedingungen der LC-NMR-MS-Messungen.**LC-NMR-MS: LC**

Säule:	YMC J'sphere ODS L80, 4,6 x 250 mm i. D., 4 µm Partikeldurchmesser, mit Vorsäule (YMC Schermbeck)	
Eluent:	isokratisch:	20 mmol NH ₄ ⁺ Formiat in D ₂ O/ Acetonitril 64:36 (v/v) (Asterosaponin-Feinfraktionen) 65,5:34,5 (v/v) (Asterosaponin-Gesamtfraktion)
	Gradientenelution:	A: 20 mmol NH ₄ ⁺ Formiat in D ₂ O/Acetonitril 90:10 (v/v) B: 20 mmol NH ₄ ⁺ Formiat in D ₂ O/Acetonitril 10:90 (v/v)
	0 min:	70 % A, 30 % B (entspricht 34 % Acetonitril)
	130 min:	70 % A, 30 % B (entspricht 34 % Acetonitril)
	700 min:	61 % A, 39 % B (entspricht 41,2 % Acetonitril)
Flußrate:	on-flow-Modus:	0,05 ml/min
	stopped-flow-Modus:	0,5 ml/min
UV-Detektion:	210 nm	
Probenmenge:	Feinfraktionen: Eine 25 mg/ml-Lösung der Probe im Eluenten wurde durch eine mit Baumwollwatte gestopfte Eppendorf-Pipettenspitze filtriert. Mittels einer 20 µl Injektionsschleife wurden 500 µg der Probe auf die Säule gegeben. Asterosaponin-Gesamtfraktion: Mit 20 µl einer filtrierten 50 mg/ml-Lösung wurde 1 mg der Probe auf die Säule injiziert.	

LC-NMR-MS: NMR

Meßfrequenz:	600,13 MHz (¹ H)
Temperatur:	300 K
Referenzierung:	CH ₃ CN = δ _H 2,0 ppm

on-flow-¹H-Spektren

Datenaufnahme:	Pulssequenz:	1c2wetdc (isokratisch), 1c2wetdcus (Gradientenelution) , WET-Lösemittelunterdrückung, ¹³ C-Entkopplung nur während des WET-Pulszugs
	Spektrenbreite (sw):	8400 Hz

LC-NMR-MS: NMR

Spektrengröße (td): 16k bzw. 24k Datenpunkte
 Scanzahl pro Reihe (ns): 108
 Pulswiederholungszeit: 2 s

Datenverarbeitung: Spektrengröße (si): 32k Datenpunkte
 Fensterfunktion: exponentielle Multiplikation, lb 1 Hz

Zur Extraktion von 1D-Protonenspektren aus den on-flow-NMR-Chromatogrammen wurden bis zu 4 Reihen aufaddiert.

Die Integration der Methylsignale wurde mit der 2D-Integrationsroutine des XWinNMR-Softwarepakets durchgeführt.

stopped-flow-¹H-Spektren

Datenaufnahme: Pulssequenz: 1cmlvtpwetdc, MLEV-Pulszug, WET-Lösemittelunterdrückung, ¹³C-Entkopplung
 Spektrengröße (td): 4k x 512 Datenpunkte
 TOCSY-Mischzeit: zwischen 20 und 100 ms

Datenverarbeitung: Spektrengröße (si): 4k x 2k Datenpunkte
 Fensterfunktion: verschobene Sinus-Quadrat Filter

LC-NMR-MS: Splitter

Splitverhältnis: 1:20 (95 % zum NMR, 5 % zum MS)
 Pufferzugabe: Über Spritzenpumpe im Verhältnis 4:1 zum MS-Eluentenstrom (4 Volumenteile Puffer zu 1 Volumenteil Eluent). Verwendet wurden 20 mmol NH₄⁺ Formiat bzw. ND₄⁺ Formiat in Wasser bzw. D₂O

LC-NMR-MS: MS

Ionisierung: ESI, negativer Modus
 Kapillarspannung: 3150 V
 Endplattenspannung: 2350 V
 Trockengas: Stickstoff bei 300°C (5 - 11 l/min)
 Zerstäubergas: Stickstoff (10 - 30 psi)
 Scanbereich: m/z 50 bis 1600
 Accumulation cut-off: m/z 85
 Averages: 125 bis 150 Averages pro Spektrum im on-flow-Modus, 20 im stopped-flow-Modus

10.3.6. NMR

Tabelle 27: Experimentelle Bedingungen der NMR-Messungen.

Messfrequenzen:	DRX 600, AMX 600: ^1H 600,13 MHz, ^{13}C 150,90 MHz	
	DRX 500: ^1H 500,13 MHz, ^{13}C 125,76 MHz	
Temperatur:	300 K, soweit nicht anders angegeben	
Verwendetes Spektrometer und Lösemittel:	DRX 600 mit 2,5 mm $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ 2:3 (v/v); Micro-Inverskopf	Ruberoside A-D und G, ov. Asterosaponin 1, Asteriidosid B, Versicosid A, Verbindung A
	DRX 500 mit 5 mm $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ 2:3 (v/v); Cryo-Inverskopf	Ruberosid E und F, Solasterosid A
	AMX 600 mit 5 mm $\text{Pyridin-d}_5/\text{D}_2\text{O}$ 7:3 (v/v) Inverskopf	Asteriidosid C, Glykosid B ₂ , Asterosid C/Ruberosid F
Referenzierung:	CD_3CN : δ_{H} 1,975 ppm, δ_{C} 1,3 ppm Pyridin-d_5 : δ_{C} 149,9 ppm, TMS: δ_{H} 0 ppm	

Die typische zur Strukturaufklärung eingesetzte Substanzmenge betrug im DRX 600 mit 2,5 mm Micro-Inverskopf 3 mg; im AMX 600 mit 5 mm Inverskopf 10 mg Saponin. Zum DRX 500 mit 5 mm Cryo-Inverskopf siehe Abschnitt 8.1.4.

Wahl des Lösemittels

Als Lösemittel wurde zunächst $\text{Pyridin-d}_5/\text{D}_2\text{O}$ 70:30 (v/v) eingesetzt, da Pyridin als Verschiebungsreagenz wirkt und so zu einer Verteilung der NMR-Signale in einen größeren chemischen Verschiebungsbereich führen kann (Solvent Induced Shift - SIS).¹⁷³ Für die Entwicklung der LC-NMR-Methode wurden später Acetonitril/ D_2O -Gemische verwendet, wobei die erhaltenen Spektren gegenüber $\text{Pyridin-d}_5/\text{D}_2\text{O}$ eine verbesserte Signalform bei etwa gleicher spektraler Dispersion der Zuckerringssignale aufwiesen. Deshalb und wegen der besseren Vergleichbarkeit mit den LC-NMR-Daten wurde daraufhin auf Acetonitril/ D_2O 3:2 (v/v) als Lösemittel für die NMR-Strukturaufklärung umgestellt.

Eindimensionale Spektren

Typische Aufnahmeparameter für eindimensionale ^1H -NMR-Spektren waren: Spektrenbreite (sw) 5400 Hz, Spektrengröße (td) 16k Datenpunkte, Acquisitionszeit (aq) 1,5 s, Relaxationsdelay (d1) 2 s. Die Daten wurden in eine Spektrengröße von 32k Datenpunkten prozessiert (Zero-Filling). Auf den FID wurde eine exponentielle Multiplikation von lb = 0,3 Hz angewendet.

Zweidimensionale Spektren

Mit Ausnahme von TOCSY und NOESY wurden für die zweidimensionalen Experimente Pulsprogramme mit Gradientenunterstützung angewendet.^b Die typische Spektrengröße betrug 4k x 512 Datenpunkte, die zu 4k x 2k Datenpunkten prozessiert wurden. Dabei wurde in homonuklearen Experimenten Zero-Filling und in heteronuklearen Experimenten Linear Prediction angewendet. Als Fensterfunktionen wurden verschobene bzw. unverschobene Sinus-Quadrat Filter eingesetzt. Die folgende Aufstellung gibt Auskunft die verwendeten Pulsprogramme sowie weitere Parameter.

Tabelle 28: Verwendete Pulsprogramme

NMR-Experiment	Pulsprogramm	Bemerkung
^1H -Übersicht	zg, zg30	
1D TOCSY	selmlzf	Selektive Anregung mit 100 ms Halbgaußpuls, z-Filter, Mischzeitvariation zwischen 25 und 150 ms
COSY	cosygsmftp	Doppelquantengefiltertes COSY; Gradientenverhältnis 10:20
TOCSY	mlevtp	MLEV-17-Spinlock, typische Mischzeit 100 ms
NOESY	noesytp	typische Mischzeit 200 ms
ROESY	roesyetgppr	Mischzeit 250 ms Spinlock aus 180°_x - und 180°_{-x} -Pulsen
mult. edit. HSQC	inviedetgs	
HMBC	inv4gslplrnd	$^2J_{\text{CH}} = 7$ Hz, Magnitudenkalkulation
HSQC-TOCSY	invietgsm1	TOCSY-Mischzeit 100 ms

Spektrensimulationen wurden mit den Bruker Programmen NMRsim und WinDaisy durchgeführt.

^b Im AMX 600 mit 5 mm Inverskopf wurden anstelle von HSQC-Experimenten die entsprechenden HMQC-Sequenzen ohne Gradientenunterstützung verwendet, zudem wurden ^{13}C -Übersichts- sowie DEPT-Spektren aufgenommen (zgdc und dept135).

11. Anhang

Im Anhang sind die MS- und NMR-Daten der aus *Asterias rubens* isolierten Asterosaponine zusammengefaßt. Darüber hinaus werden für die bereits aus anderen Species isolierten Asterosaponine weitere NMR-Daten gegeben.

11.1. Ruberoside

11.1.1. Ruberosid A

Ruberosid A wurde aus der Feinfraktion mit der internen Bezeichnung 37-39M (Abschnitt 10.3.2) durch HPLC nach 10.3.4.2 semipräparativ als Reinsubstanz erhalten. LC-ESI-MS (D_2O/ND_4^+ Formiat/ CH_3CN , negativer Modus): $m/z = 1256$ [MD_{13}]⁻, MS²: m/z 1236, 1108, 1088, 960, 940, 499. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1243$ [M]⁻. ¹H- und ¹³C-NMR: δ_H , δ_C (D_2O/CD_3CN , 2:3, v/v) in Tabelle 12 und Tabelle 13.

11.1.2. Ruberosid B

Ruberosid B wurde aus der Feinfraktion mit der internen Bezeichnung 37-39M (Abschnitt 10.3.2) durch HPLC nach 10.3.4.2 semipräparativ als Reinsubstanz erhalten. LC-ESI-MS (D_2O/ND_4^+ Formiat/ CH_3CN , negativer Modus): $m/z = 1253$ [MD_{12}]⁻, MS²: m/z 1233, 1105, 1085, 957, 937, 496. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1241$ [M]⁻. ¹H- und ¹³C-NMR δ_H , δ_C (D_2O/CD_3CN , 2:3, v/v) des Aglycons in Tabelle 15. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten des Oligosaccharidrestes in Übereinstimmung mit denen von Ruberosid A.

11.1.3. Ruberosid C

Ruberosid C wurde aus der Feinfraktion mit der internen Bezeichnung 37-39M (Abschnitt 10.3.2) durch HPLC nach 10.3.4.2 semipräparativ als Reinsubstanz erhalten. LC-ESI-MS (D_2O/ND_4^+ Formiat/ CH_3CN , negativer Modus): $m/z = 1390$ [MD_{15}]⁻, MS²: m/z 1225, 1077, 929. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1375$ [M]⁻. ¹H- und ¹³C-NMR: δ_H , δ_C (D_2O/CD_3CN , 2:3, v/v) in Tabelle 16 und Tabelle 17.

11.1.4. Ruberosid D

Ruberosid D wurde aus der Feinfraktion mit der internen Bezeichnung 37-39M (Abschnitt 10.3.2) durch HPLC nach 10.3.4.2 semipräparativ als Reinsubstanz erhalten.

LC-ESI-MS (D_2O/ND_4^+ Formiat/ CH_3CN , negativer Modus): $m/z = 1237$ [MD_{12}] $^-$, MS^2 : m/z 1089, 941. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1225$ [M] $^-$. 1H - und ^{13}C -NMR: δ_H , δ_C (D_2O/CD_3CN , 2:3, v/v) in Tabelle 18 und Tabelle 19.

11.1.5. Ruberosid E

Ruberosid E wurde aus der Feinfraktion mit der internen Bezeichnung 35-36M (Abschnitt 10.3.2) durch HPLC nach 10.3.4.2 semipräparativ als Reinsubstanz erhalten. LC-ESI-MS (D_2O/ND_4^+ Formiat/ CH_3CN , negativer Modus): $m/z = 1223$ [MD_{12}] $^-$, MS^2 : m/z 1075, 927, 779, 645. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1211$ [M] $^-$. 1H - und ^{13}C -NMR δ_H , δ_C (D_2O/CD_3CN , 2:3, v/v) des Aglycons in Tabelle 20. 1H - und ^{13}C -NMR-Daten des Oligosaccharidrestes in Übereinstimmung mit denen von Ruberosid D.

11.1.6. Ruberoside F

Ruberosid F wurde zunächst im Gemisch mit Asterosid C erhalten (siehe 10.3.2) und zusammen mit diesem in Pyridin- d_5/D_2O (7:3, v/v) vermessen. Durch weitere HPLC-Auftrennung konnte es semipräparativ als Reinsubstanz erhalten werden (siehe Abschnitt 8.3.6). LC-ESI-MS (D_2O/ND_4^+ Formiat/ CH_3CN , negativer Modus): $m/z = 1270$ [MD_{13}] $^-$, MS^2 : m/z 1155, 1122, 957. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1257$ [M] $^-$. 1H - und ^{13}C -NMR δ_H , δ_C (D_2O/CD_3CN , 2:3, v/v) in Tabelle 21 und Tabelle 22. 1H - und ^{13}C -NMR-Daten des Aglycons in Pyridin- d_5/D_2O (7:3, v/v) im Anhang Tabelle 36.

11.1.7. Ruberosid G

Ruberosid G wurde aus der Asterosaponin-Gesamtfraction der MSPD-Extraktion (Abschnitt 10.3.3) durch HPLC nach 10.3.4.2 semipräparativ als Reinsubstanz erhalten. LC-ESI-MS (D_2O/ND_4^+ Formiat/ CH_3CN , negativer Modus): $m/z = 1251$ [MD_{12}] $^-$, MS^2 : m/z 1231, 1103, 1083, 955, 935, 494. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1239$ [M] $^-$. 1H - und ^{13}C -NMR δ_H , δ_C (D_2O/CD_3CN , 2:3, v/v) des Aglycons in Tabelle 23. 1H - und ^{13}C -NMR-Daten des Oligosaccharidrestes in Übereinstimmung mit denen von Ruberosid A.

11.2. Hauptkomponenten

11.2.1. Asteriidosid C

Asteriidosid C wurde mit der Fraktion 33-34M (Abschnitt 10.3.2) in ausreichender Reinheit erhalten, um unmittelbar NMR-spektroskopisch vermessen zu werden. LC-ESI-MS (D_2O/ND_4^+ Formiat/ CH_3CN , negativer Modus): $m/z = 1388$ [MD_{15}]⁻, MS^2 : m/z 1223, 1075, 927, 779, 645. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1373$ [M]⁻. 1H - und ^{13}C -NMR δ_H , δ_C (D_2O /Pyridin- d_5 , 3:7, v/v; 320 K) im Anhang Tabelle 29 und Tabelle 30.

11.2.2. Glycosid B₂

Glycosid B₂ wurde mit der säulenchromatographischen Aufarbeitung (siehe 10.3.2) in ausreichender Reinheit erhalten, um unmittelbar NMR-spektroskopisch vermessen zu werden. LC-ESI-MS (D_2O/ND_4^+ Formiat/ CH_3CN , negativer Modus): $m/z = 1256$ [MD_{13}]⁻, MS^2 : m/z 1155. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1243$ [M]⁻. 1H - und ^{13}C -NMR δ_H , δ_C (D_2O /Pyridin- d_5 , 3:7, v/v; 310 K) im Anhang Tabelle 31 und Tabelle 32.

11.2.3. ovarian Asterosaponin 1

Ovarian Asterosaponin 1 wurde mit der säulenchromatographischen Aufarbeitung (siehe 10.3.2) in ausreichender Reinheit erhalten, um unmittelbar NMR-spektroskopisch vermessen zu werden. LC-ESI-MS (D_2O/ND_4^+ Formiat/ CH_3CN , negativer Modus): $m/z = 1270$ [MD_{13}]⁻, MS^2 : m/z 1250, 1169. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1257$ [M]⁻. 1H - und ^{13}C -NMR δ_H , δ_C (D_2O/CD_3CN , 2:3, v/v; 290 K) im Anhang Tabelle 33 und Tabelle 34.

11.3. Nebenkomponenten

11.3.1. Asteriidosid B

Asteriidosid B wurde aus der Feinfraktion mit der internen Bezeichnung 37-39M (Abschnitt 10.3.2) durch HPLC nach 10.3.4.2 semipräparativ als Reinsubstanz erhalten. LC-ESI-MS (D_2O/ND_4^+ Formiat/ CH_3CN , negativer Modus): $m/z = 1402$ [MD_{15}]⁻, MS^2 : m/z 1237, 1089, 941. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1387$ [M]⁻. 1H - und ^{13}C -NMR-Daten des Oligosaccharidrestes in Übereinstimmung

mit denen von Ruberosid C, NMR-Daten des Aglycons in Übereinstimmung mit denen von Ruberosid D.

11.3.2. Asterosid C

Asterosid C wurde im Gemisch mit Ruberosid F (siehe 10.3.2) erhalten zusammen mit diesem in Pyridin-d₅/D₂O (7:3, v/v) vermessen. LC-ESI-MS (D₂O/ND₄⁺Formiat/CH₃CN, negativer Modus): $m/z = 1270$ [MD₁₃]⁻, MS²: m/z 1155, 1122, 957. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1257$ [M]⁻. ¹H- und ¹³C-NMR δ_H , δ_C (D₂O/Pyridin-d₅, 3:7, v/v) des Aglycons im Anhang Tabelle 35. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten des Oligosaccharidrestes in Übereinstimmung mit denen von Glycosid B₂.

11.3.3. Versicosid A

Versicosid A wurde aus der Feinfraktion (Abschnitt 10.3.2) durch HPLC nach 10.3.4.2 semipräparativ als Reinsubstanz erhalten.

LC-ESI-MS (D₂O/ND₄⁺Formiat/CH₃CN, negativer Modus): $m/z = 1421$ [MD₁₆]⁻, MS²: m/z 1320. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1405$ [M]⁻. ¹H- und ¹³C-NMR: δ_H , δ_C (D₂O/CD₃CN, 2:3, v/v) im Anhang Tabelle 37. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten des Aglycons in Übereinstimmung mit denen von ovarian Asterosaponin 1.

11.3.4. Solasterosid A

Solasterosid A wurde aus der Feinfraktion mit der internen Bezeichnung 35-36M (Abschnitt 10.3.2) durch HPLC nach 10.3.4.2 semipräparativ als Reinsubstanz erhalten. LC-ESI-MS (D₂O/ND₄⁺Formiat/CH₃CN, negativer Modus): $m/z = 1223$ [MD₁₂]⁻, MS²: m/z 1075, 927, 779, 645. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1211$ [M]⁻. ¹H- und ¹³C-NMR δ_H , δ_C (D₂O/CD₃CN, 2:3, v/v) des Oligosaccharidrestes in Tabelle 38. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten des Aglycons in Übereinstimmung mit denen von Ruberosid E.

11.4. Vorbehaltlich zugeordnete Verbindungen

11.4.1. Verbindung A

Verbindung A wurde aus der Feinfraktion mit der internen Bezeichnung 37-39M (Abschnitt 10.3.2) durch HPLC nach 10.3.4.2 semipräparativ als Reinsubstanz erhalten. LC-ESI-MS (D_2O/ND_4^+ -Formiat/ CH_3CN , negativer Modus): $m/z = 1225 [MD_{12}]^-$, MS^2 : m/z 1077, 929. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1213 [M]^-$. 1H -NMR-Spektrum des Aglycons in Übereinstimmung mit dem von Ruberosid C; 1H -NMR-Spektrum des Oligosaccharidrestes in Übereinstimmung mit dem von Ruberosid D. 1H -NMR: δ_H (D_2O/CD_3CN , 2:3, v/v) = 5,30 (br d, A-H-11), 4,56 (d, $J = 7,9$ Hz, Qui II-H-1), 4,53 (d, $J = 7,9$ Hz, Xyl-H-1), 4,48 (d, $J = 7,9$ Hz, Qui III-H-1), 4,44 (d, $J = 7,9$ Hz, Fuc-H-1), 4,39 (d, $J = 7,9$ Hz, Qui I-H-1), 2,40 (m, A-H-4), 2,29 (m, A-H-7), 1,25 (d, $J = 6,1$ Hz, Qui II-H₃-6), 1,22 (d, $J = 6,2$ Hz, Qui III-H₃-6), 1,20 (d, $J = 6,2$ Hz, Qui I-H₃-6), 1,19 (d, Fuc-H₃-6), 1,18 (s, A-H₃-21), 0,93 (s, A-H₃-19), 0,84 (d, $J = 6,6$ Hz, A-H₃-26/27), 0,70 (s, A-H₃-18). 1D TOCSY-Subspektren der einzelnen Zuckerbausteine in Übereinstimmung mit denen von Ruberosid D.

11.4.2. Verbindung B

Die Verbindung B wurde mit der LC-NMR-MS in der Feinfraktion 35-36M charakterisiert. LC-ESI-MS (D_2O/ND_4^+ -Formiat/ CH_3CN , negativer Modus): $m/z = 1254 [MD_{13}]^-$, MS^2 : m/z 1106, 941, 793, 659. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1241 [M]^-$. 1H -NMR-Spektrum des Oligosaccharidrestes in Übereinstimmung mit dem von Asterosid C; Steroidseitenketten-Methylsignale deckungsgleich mit denen von Asteriidosid B und Ruberosid D. 1H -NMR (D_2O/NH_4^+ -Formiat/ CH_3CN): 5,31 ppm (br d, A-H-11), 4,73 (br s, A-H-28a), 4,67 (A-H-28b), 4,55 (d, $J = 7,7$ Hz, Qui II-H-1), 4,55 (d, 7,7 Hz, Xyl-H-1), 4,50 (d, 7,9 Hz, Qui III-H-1), 4,47 (d, 7,9 Hz, Gal-H-1), (Qui II-H-1 von HDO-Restsignal verdeckt), 1,24 (d, 6,2 Hz, Qui II-H₃-6), 1,22 (d, 6,2 Hz, Qui III-H₃-6), 1,21 (s, A-H₃-21), 1,20 (d, 6,2 Hz, Qui I-H₃-6), 0,98 (d, 7 Hz, A-H₃-26), 0,98 (d, 7 Hz, A-H₃-27), 0,93 (s, A-H₃-19), 0,70 (s, A-H₃-18).

11.4.3. Verbindung C

Die Verbindung C wurde mit der LC-NMR-MS in der Asterosaponin-Gesamtfraction des MSPD-Extraktes charakterisiert. LC-ESI-MS (D_2O/NH_4^+ -Formiat/ CH_3CN , negativer Modus): $m/z = 1254 [MD_{13}]^-$, MS^2 : m/z 1106, 941, 793, 659. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1241 [M]^-$. 1H -NMR-Spektrum des Oligosaccharidrestes in Übereinstimmung mit dem von Asterosid C; Steroidseitenketten-Methylsignale deckungsgleich mit denen von Asteriidosid B und Ruberosid D. 1H -NMR (D_2O/NH_4^+ -Formiat/ CH_3CN): 5,31 ppm (br d, A-H-11), 4,73 (br s, A-H-28a), 4,67 (A-H-28b), 4,55 (d, $J = 7,7$ Hz, Qui II-H-1), 4,55 (d, 7,7 Hz, Xyl-H-1), 4,50 (d, 7,9 Hz, Qui III-H-1), 4,47 (d, 7,9 Hz, Gal-H-1), (Qui II-H-1 von HDO-Restsignal verdeckt), 1,24 (d, 6,2 Hz, Qui II-H₃-6), 1,22 (d, 6,2 Hz, Qui III-H₃-6), 1,21 (s, A-H₃-21), 1,20 (d, 6,2 Hz, Qui I-H₃-6), 0,98 (d, 7 Hz, A-H₃-26), 0,98 (d, 7 Hz, A-H₃-27), 0,93 (s, A-H₃-19), 0,70 (s, A-H₃-18).

tiver Modus): $m/z = 1254$ [MD_{13}]⁻, MS^2 : m/z 1234, 1106, 1086, 958, 938, 497. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1241$ [M]⁻. ¹H-NMR-Spektrum des Oligosaccharidrestes in Übereinstimmung mit dem von ovarian Asterosaponin 1. ¹H-NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{NH}_4^+\text{Formiat}/\text{CH}_3\text{CN}$): 5,31 ppm (br d, A-H-11), 5,00 (d, $J = 9,1$ Hz, A-H-24), 4,60 (d, 7,7 Hz, Qui II-H-1), 4,56 (d, 7,7 Hz, Qui I-H-1), 4,47 (d, 7,7 Hz, Fuc I-H-1), 4,47 (d, 7,7 Hz, Fuc I-H-1), 4,44 (d, 7,2 Hz, DXU-H-1), 4,37 (m, A-H-23*), 4,13 (m, A-H-3), 1,68 (s, A-H-27), 1,64 (s, A-H-26), 1,49 (A-H-20*), 1,49/1,24 (A-H₂-22*), 1,35 (d, 6,1 Hz, Qui I-H₃-6), 1,25 (d, 6,1 Hz, Qui II-H₃-6), 1,18 (d, 6,7 Hz, Fuc I-H₃-6), 1,16 (d, 6,7 Hz, Fuc II-H₃-6), 1,14 (d, 6,7 Hz, DXU-H₃-6), 0,93 (s, A-H₃-19), 0,89 (d, 5,1 Hz A-H₃-21), 0,54 (s, A-H₃-18). * Signale durch 2D WET-TOCSY-Experimente im stopped-flow-Modus zugeordnet.

11.4.4. Verbindung D

Die Verbindung D wurde mit der LC-NMR-MS in der Asterosaponin-Gesamtfraction des MSPD-Extraktes charakterisiert. LC-ESI-MS ($\text{D}_2\text{O}/\text{NH}_4^+\text{Formiat}/\text{CH}_3\text{CN}$, negativer Modus): $m/z = 1284$ [MD_{13}]⁻, MS^2 : m/z 1264, 1169. LC-ESI-MS (D-H-Rücktausch, negativer Modus): $m/z = 1271$ [M]⁻. ¹H-NMR-Spektrum des Oligosaccharidrestes in Übereinstimmung mit dem von ovarian Asterosaponin 1; Steroidseitenketten-Methylsignale deckungsgleich mit denen von Asterosid C. ¹H-NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{NH}_4^+\text{Formiat}/\text{CH}_3\text{CN}$): 5,31 ppm (br d, A-H-11), 4,60 (d, $J = 7,7$ Hz, Qui II-H-1), 4,56 (d, 7,7 Hz, Qui I-H-1), 4,47 (d, 7,7 Hz, Fuc I-H-1), 4,47 (d, 7,7 Hz, Fuc I-H-1), 4,44 (d, 7,2 Hz, DXU-H-1), 4,12 (m, A-H-3), 1,35 (d, 6,1 Hz, Qui I-H₃-6), 1,25 (d, 6,1 Hz, Qui II-H₃-6), 1,18 (d, 6,7 Hz, Fuc I-H₃-6), 1,16 (d, 6,7 Hz, Fuc II-H₃-6), 1,14 (d, 6,7 Hz, DXU-H₃-6), 1,28 (s, A-H₃-21), 0,92 (s, A-H₃-19), 0,90 (d, 7,3 Hz, A-H₃-28), 0,86 (d, 7,3 Hz, A-H₃-26), 0,77 (d, 7,3 Hz, A-H₃-27), 0,69 (s, A-H₃-18).

11.5. Weitere NMR-Daten aus *Asterias rubens* isolierter *Asterosapnine*

11.5.1. Asteriidosid C

Tabelle 29: ¹H- und ¹³C-Daten der Monosaccharideinheiten von Asteriidosid C in Pyridin-d₅/D₂O 7:3 (v/v) 320 K

Pos.	δ _C	Mult.	δ _H	J
Xyl				
1	104,8	CH	5,12	<i>J</i> _{1,2} 7,5
2	84,2	CH	3,95	<i>J</i> _{2,3} 9,0
3	76,0	CH	4,24	<i>J</i> _{3,4} 9,0
4	78,9	CH	4,17	<i>J</i> _{4,5a} 9,8
5	65,0	CH ₂	4,52/3,87	<i>J</i> _{4,5b} 5,3 <i>J</i> _{5a,5b} 11,9
Gal				
1	106,4	CH	5,09	<i>J</i> _{1,2} 7,8
2	73,4	CH	4,35	<i>J</i> _{2,3} 9,5
3	75,0*	CH	4,10	<i>J</i> _{3,4} 3,3
4	70,6	CH	4,36	<i>J</i> _{4,5} < 1,5
5	77,3	CH	4,03	<i>J</i> _{5,6a} ~ 5
6	62,8	CH ₂	4,28/4,18	<i>J</i> _{5,6b} 7,3 <i>J</i> _{6a,6b} 11,7
Qui I				
1	104,8	CH	4,84	<i>J</i> _{1,2} 7,3
2	75,0	CH	3,94	<i>J</i> _{2,3} ~ 9 [#]
3	90,0	CH	3,94	<i>J</i> _{3,4} ~ 9 [#]
4	75,3	CH	3,56	<i>J</i> _{4,5} 9,3
5	72,8	CH	3,76	<i>J</i> _{5,6} 6,1
6	19,3	CH ₃	1,60	
Fuc I				
1	102,3	CH	4,86	<i>J</i> _{1,2} 7,8
2	82,5	CH	4,26	<i>J</i> _{2,3} 9,7
3	75,1*	CH	4,11	<i>J</i> _{3,4} 3,3
4	72,6	CH	4,03	<i>J</i> _{4,5} < 1,5
5	72,5	CH	3,88	<i>J</i> _{5,6} 6,5
6	17,5	CH ₃	1,50	
Fuc II				
1	106,4	CH	4,95	<i>J</i> _{1,2} 7,8
2	73,0	CH	4,36	<i>J</i> _{2,3} 9,8
3	84,5	CH	4,13	<i>J</i> _{3,4} 3,3
4	72,6	CH	4,30	<i>J</i> _{4,5} < 1,5
5	72,4	CH	3,81	<i>J</i> _{5,6} 6,5
6	17,7	CH ₃	1,53	
Qui II				
1	106,4	CH	5,06	<i>J</i> _{1,2} 7,8
2	76,6	CH	3,94	<i>J</i> _{2,3} 9,3
3	77,5	CH	4,02	<i>J</i> _{3,4} 8,6
4	76,5	CH	3,79	<i>J</i> _{4,5} 9,6
5	74,7	CH	3,74	<i>J</i> _{5,6} 6,0
6	18,9	CH ₃	1,78	

* Zuordnung austauschbar, [#] durch Computersimulation des Subspektrums, Mult.: Multiplizität

Tabelle 30: ^1H - und ^{13}C -Daten des Aglycons von Asteriidosid C in Pyridin- $\text{d}_5/\text{D}_2\text{O}$ 7:3 (v/v) 320 K

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}
1	36,8	CH_2	1,42/1,67
2	29,9	CH_2	2,64/1,90
3	79,7	CH	4,77
4	31,4	CH_2	3,16/1,75
5	50,0	CH	1,50
6	81,0	CH	3,84
7	42,1	CH_2	1,26/2,62
8	36,4	CH	2,07
9	146,5	C	
10	39,2	C	
11	117,8	CH	5,23
12	43,5	CH_2	2,05/2,27
13	42,3	C	
14	55,1	CH	1,27
15	23,9	CH_2	1,27/1,83
16	26,0	CH_2	2,17/1,83
17	59,7	CH	1,67
18	14,4	CH_3	0,96
19	20,2	CH_3	0,97
Seitenkette			
20	75,5	C	
21	26,7	CH_3	1,52
22	45,0	CH_2	1,72
23	24,4	CH_2	2,25/2,18
24	126,6	CH	5,24
25	132,3	C	
26	26,7	CH_3	1,72
27	18,6	CH_3	1,67

Mult.: Multiplizität

11.5.2. Glycosid B2

Tabelle 31: ¹H- und ¹³C-Daten der Monosaccharideinheiten von Glycosid B₂ in Pyridin-d₅/D₂O 7:3 (v/v) 310 K

Pos.	δ_c	Mult.	δ_H	J
Xyl				
1	104,8	CH	5,12	$J_{1,2}$ 7,5
2	84,2	CH	3,97	$J_{2,3}$ ~ 9,0
3	76,1	CH	4,26	$J_{3,4}$ ~ 9,0
4	79,0	CH	4,26	$J_{4,5a}$ ~ 9,8
5	65,1	CH ₂	4,51/3,86	$J_{4,5b}$ ~ 5,3 $J_{5a,5b}$ 11,9
Gal				
1	102,7	CH	4,95	$J_{1,2}$ 7,5
2	83,1	CH	4,34	$J_{2,3}$ 9,4
3	75,1 [§]	CH	4,20	$J_{3,4}$ 3,4
4	70,2	CH	4,39	$J_{4,5}$ ~ 1
5	77,4	CH	4,06	$J_{5,6a}$ 4,5
6	62,8	CH ₂	4,37/4,19	$J_{5,6b}$ 7,7 $J_{6a,6b}$ 11,7
Qui I				
1	104,8	CH	4,86	$J_{1,2}$ 7,1
2	75,0	CH	3,97	$J_{2,3}$ 9,0 [#]
3	89,9	CH	3,98	$J_{3,4}$ 8,9
4	75,2	CH	3,59	$J_{4,5}$ 8,9
5	72,8	CH	3,79	$J_{5,6}$ 6,1
6	19,3	CH ₃	1,63	
Qui II				
1	106,4	CH	5,07	$J_{1,2}$ 7,7
2	76,6	CH	3,99	$J_{2,3}$ 9,1
3	77,4	CH	4,06	$J_{3,4}$ 9,5
4	76,4	CH	3,83	$J_{4,5}$ 9,1
5	74,6	CH	3,74	$J_{5,6}$ 6,1
6	18,9	CH ₃	1,81	
Qui III				
1	106,4	CH	4,94	$J_{1,2}$ 7,7
2	77,0	CH	3,94	$J_{2,3}$ 9,2
3	77,7	CH	4,02	$J_{3,4}$ 9,0
4	76,9	CH	3,63 [*]	$J_{4,5}$ 9,4 [#]
5	74,1	CH	3,64 [*]	$J_{5,6}$ 5,7
6	19,1	CH ₃	1,61	

* Zuordnung austauschbar, [§] ¹³C-Signale liegen vollständig aufeinander, Zuordnung durch Vergleich ¹³C-Übersicht - DEPT (siehe Tabelle 32), [#] durch Computersimulation des Subspektrums, Mult.: Multiplizität

Tabelle 32: ^1H - und ^{13}C -Daten des Aglycons von Glycosid B₂ in Pyridin-d₅/D₂O 7:3 (v/v)

Pos.	δ_{H}	Mult.	δ_{H}
1	36,8	CH ₂	1,41/1,64
2	29,9	CH ₂	2,68/1,90
3	79,4	CH	4,81
4	31,4	CH ₂	3,21/1,77
5	49,9	CH	1,51
6	80,9	CH	3,85
7	41,9	CH ₂	2,62/1,25
8	36,2	CH	2,06
9	146,3	C	
10	39,2	C	
11	117,6	CH	5,21
12	43,2	CH ₂	2,30/2,08
13	42,4	C	
14	54,9	CH	1,27
15	24,1	CH ₂	2,21/1,84
16	25,9	CH ₂	1,82/1,27
17	60,0	CH	1,84
18	14,4	CH ₃	0,97
19	20,2	CH ₃	0,95
Seitenkette			
20	75,1 ^s	C	
21	27,6	CH ₃	1,66
22	56,1	CH ₂	2,93/2,83
23	214,4	C	
24	54,9	CH ₂	2,53
25	25,5	CH	2,22
26	23,5*	CH ₃	0,96
27	23,4*	CH ₃	0,96

* Zuordnung austauschbar, ^s ^{13}C -Signale liegen vollständig aufeinander, Zuordnung durch Vergleich ^{13}C -Übersicht - DEPT (siehe Tabelle 31), Mult.: Multiplizität

11.5.3. Ovarian Asterosaponin 1

Tabelle 33: ^1H - und ^{13}C -Daten der Monosaccharideinheiten von ovarian Asterosaponin 1 in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ 2:3 (v/v) 290 K

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}	J
Qui I				
1	104,9	CH	4,55	$J_{1,2}$ 7,9
2	75,2	CH	3,20	$J_{2,3}$ 9,4
3	75,8	CH	3,29	$J_{3,4}$ 9,4
4	75,1	CH	3,04	$J_{4,5}$ 9,4
5	73,3	CH	3,35	$J_{5,6}$ 6,3
6	17,5	CH_3	1,21	
Qui II				
1	103,0	CH	4,50	$J_{1,2}$ 7,9
2	83,1	CH	3,51	$J_{2,3}$ 9,2
3	74,3	CH	3,68	$J_{3,4}$ 9,2
4	83,7	CH	3,30	$J_{4,5}$ 9,2
5	71,6	CH	3,57	$J_{5,6}$ 6,2
6	17,7	CH_3	1,31	
Fuc I				
1	101,4	CH	4,42	$J_{1,2}$ 7,7
2	81,0	CH	3,55	$J_{2,3}$ 9,6
3	73,7	CH	3,65	$J_{3,4}$ 3,3
4	71,6*	CH	3,62	$J_{4,5}$ <1
5	71,3	CH	3,66	$J_{5,6}$ 6,5
6	16,1	CH_3	1,15	
Fuc II				
1	105,3	CH	4,41	$J_{1,2}$ 7,7
2	72,7	CH	3,40	$J_{2,3}$ 9,9
3	73,5	CH	3,48	$J_{3,4}$ 3,3
4	71,9	CH	3,55	$J_{4,5}$ <1
5	71,7*	CH	3,60	$J_{5,6}$ 6,5
6	16,3	CH_3	1,12	
6-Deoxy-xylo-hex-4-ulose (DXU)				
1	103,5	CH	4,37	$J_{1,2}$ 7,5
2	72,6	CH	3,35	$J_{2,3}$ ~9,0 [#]
3	89,4	CH	3,37	
4	92,7	C		
5	73,0	CH	3,42	$J_{5,6}$ 6,4
6	12,5	CH_3	1,10	

* Zuordnung austauschbar, [#] durch Computersimulation des Subspektrums, Mult.: Multiplizität

Tabelle 34: ^1H - und ^{13}C -Daten des Aglycons von ovarian Asterosaponin 1 in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ 2:3 (v/v); 290 K

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}
1	35,9	CH_2	1,65/1,34
2	28,8	CH_2	2,02/1,55
3	79,2	CH	4,08
4	30,1	CH_2	2,36/1,24
5	48,9	CH	1,17
6	80,2	CH	3,53
7	40,9	CH_2	2,26/0,87
8	35,6	CH	2,00
9	146,1	C	
10	38,7	C	
11	117,1	CH	5,26
12	42,3	CH_2	2,14/1,94
13	41,9	C	
14	54,05	CH	1,19
15	23,2	CH_2	1,74/1,60
16	25,2	CH_2	1,72/1,12
17	59,4	CH	1,54
18	13,4	CH_3	0,65
19	19,4	CH_3	0,89
Seitenkette			
20	75,0	C	
21	26,2	CH_3	1,23
22	54,3	CH_2	2,52
23	215,2	C	
24	54,1	CH_2	2,29
25	24,8	CH	1,98
26	22,5	CH_3	0,81*
27	“	CH_3	0,80*

* Zuordnung austauschbar, Mult.: Multiplizität

11.5.4. Asterosid C und Ruberosid F

Tabelle 35: ^1H - und ^{13}C -Daten Aglycons von Asterosid C in Pyridin- d_5 / D_2O 7:3 (v/v)

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}
1	36,80	CH_2	1,64/1,39
2	29,98	CH_2	2,70/1,91
3	79,52	CH	4,84
4	31,41	CH_2	3,24/1,78
5	49,88	CH	1,52
6	80,98	CH	3,86
7	42,00	CH_2	2,63/1,25
8	36,19	CH	2,05
9	146,29	C	
10	39,21	C	
11	117,75	CH	5,19
12	43,26	CH_2	2,12/2,29
13	42,47	C	
14	54,94	CH	1,28
15	24,17	CH_2	1,82/2,25
16	26,00	CH_2	1,82/1,27
17	59,55	CH	1,92
18	14,60	CH_3	ca. 0,99
19	20,24	CH_3	0,94
Seitenkette			
20	75,18	C	
21	27,74	CH_3	1,69
22	55,36	CH_2	3,03/2,90
23	218,33	C	
24	54,84	CH	2,62
25	31,21	CH	2,03
26	22,36	CH_3	0,98
27	19,60	CH_3	0,87
28	13,26	CH_3	1,07

Mult.: Multiplizität

Tabelle 36: ^1H - und ^{13}C -Daten Aglycons von Ruberosid F in Pyridin- d_5 /D $_2$ O 7:3 (v/v)

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}
1	36,80	CH ₂	1,64/1,39
2	29,98	CH ₂	2,70/1,91
3	79,52	CH	4,84
4	31,41	CH ₂	3,24/1,78
5	49,88	CH	1,52
6	80,98	CH	3,86
7	~ 42,03	CH ₂	2,63/1,25
8	36,22	CH	2,05
9	146,36	C	
10	39,21	C	
11	117,81	CH	5,21
12	43,11	CH ₂	2,35/2,19
13	42,67	C	
14	54,55	CH	1,27
15	24,02	CH ₂	*
16	~ 26,20	CH ₂	1,82/1,27
17	60,30	CH	1,82
18	14,46	CH ₃	ca. 0,99
19	20,24	CH ₃	0,94
Seitenkette			
20	72,70	C	
21	24,28	CH ₃	1,56
22	65,51	CH	3,01
23	59,13	CH	3,12
24	42,80	CH	1,28
25	32,58	CH	1,75
26	21,43	CH ₃	1,02
27	20,18	CH ₃	0,95
28	13,94	CH ₃	0,96

* wegen Signalüberlappung keine eindeutige Zuordnung möglich, Signal liegt im Verschiebungsbereich zwischen 2,25 und 1,82 ppm, Mult.: Multiplizität

11.5.5. Versicosid A

Tabelle 37: ^1H - und ^{13}C -Daten der Monosaccharideinheiten von Versicosid A in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ 2:3 (v/v)

	δ_{C}	Mult.	δ_{H}	J
Xyl				
1	103,8	CH	4,51	$J_{1,2}$ 7,7
2	83,0	CH	3,42	$J_{2,3}$ 8,8
3	74,9	CH	3,69	$J_{3,4}$ 8,9
4	77,7	CH	3,74	$J_{4,5a}$ ~ 10,0
5	64,0	CH_2	4,02/3,33	$J_{4,5b}$ 4,8 $J_{5a,5b}$ 11,8
Fuc				
1	105,0	CH	4,45	$J_{1,2}$ 7,7
2	71,8	CH	3,57	$J_{2,3}$ 9,9
3	83,3	CH	3,65	$J_{3,4}$ 3,3
4	71,7	CH	3,84	$J_{4,5}$ <1
5	71,6	CH	3,66	$J_{5,6}$ 6,4
6	16,6	CH_3	1,17	
Gal I				
1	101,3	CH	4,45	$J_{1,2}$ 7,7
2	81,5	CH	3,56	$J_{2,3}$ 9,9
3	73,6	CH	3,66	$J_{3,4}$ 3,3
4	69,1	CH	3,79	$J_{4,5}$ <1
5	76,0*	CH	3,54	
6	61,8**	CH_2	3,65/3,60	
Gal II				
1	105,1	CH	4,44	$J_{1,2}$ 7,4
2	72,0	CH	3,47	$J_{2,3}$ ~9,5 [#]
3	73,6	CH	3,48	$J_{3,4}$ 2,4
4	69,4	CH	3,77	$J_{4,5}$ <1
5	75,8*	CH	3,51	
6	61,7**	CH_2	3,63/3,60	
Qui I				
1	105,0	CH	4,52	$J_{1,2}$ 7,9
2	75,3	CH	3,21	$J_{2,3}$ 9,2
3	76,1	CH	3,29	$J_{3,4}$ 9,2
4	75,3	CH	3,05	$J_{4,5}$ 9,2
5	73,4	CH	3,34	$J_{5,6}$ 6,4
6	17,6	CH_3	1,21	
Qui II				
1	103,6	CH	4,35	$J_{1,2}$ 7,8
2	73,9	CH	3,26	$J_{2,3}$ 9,2
3	89,2	CH	3,34	$J_{3,4}$ 9,2
4	74,2	CH	3,03	$J_{4,5}$ 9,2
5	71,9	CH	3,30	$J_{5,6}$ 6,4
6	18,0	CH_3	1,17	

*,** Zuordnung austauschbar, [#] durch Computersimulation des Subspektrums, Mult.: Multiplizität

11.5.6. Solasterosid A

Tabelle 38: ^1H - und ^{13}C -Daten der Monosaccharideinheiten von Solasterosid A in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ 2:3 (v/v)

Pos.	δ_{C}	Mult.	δ_{H}	J
Qui I				
1	103,6	CH	4,39	$J_{1,2}$ 7,7
2	73,9	CH	3,30	$J_{2,3}$ 9,2
3	89,2	CH	3,37	$J_{3,4}$ 9,2
4	74,3	CH	3,07	$J_{4,5}$ 9,2
5	71,9	CH	3,34	$J_{5,6}$ $\sim 6^{\S}$
6	18,0	CH_3	1,21	
Qui II				
1	105,0	CH	4,56	$J_{1,2}$ 7,7
2	75,3	CH	3,24	$J_{2,3}$ 9,4
3	76,0	CH	3,33	$J_{3,4}$ 9,2
4	75,3	CH	3,09	$J_{4,5}$ 9,2
5	73,4	CH	3,37	$J_{5,6}$ 6,2
6	17,6	CH_3	1,25	
Fuc I				
1	101,0	CH	4,46	$J_{1,2}$ 7,7
2	81,0	CH	3,55	$J_{2,3}$ 9,2
3	73,7	CH	3,68	$J_{3,4}$ 3,6
4	71,8	CH	3,65	$J_{4,5}$ < 1
5	71,6	CH	3,67	$J_{5,6}$ 6,5
6	16,5	CH_3	1,18	
Fuc II				
1	105,3	CH	4,44	$J_{1,2}$ 7,7
2	72,8	CH	3,43	$J_{2,3}$ 9,5
3	73,6	CH	3,52	$J_{3,4}$ 9,6
4	72,1	CH	3,60	$J_{4,5}$ < 1
5	71,9	CH	3,66	$J_{5,6}$ $\sim 6^{\S}$
6	16,8	CH_3	1,19	
Xyl				
1	103,7	CH	4,54	$J_{1,2}$ 7,7
2	83,0	CH	3,46	$J_{2,3}$ 9,2
3	74,8	CH	3,71	$J_{3,4}$ 9,2
4	77,3	CH	3,74	$J_{4,5\text{ax}}$ $\sim 9,5$
5	63,9	CH_2	4,06eq 3,37ax	$J_{4,5\text{eq}}$ 4,0 $J_{5\text{ax},5\text{eq}}$ 11,0

§ Signalüberlagerung mit A-H₃-21, Mult.: Multiplizität

12. Literatur

- ¹ H. Sönnichsen, *Antifouling in der Natur und Perspektiven nichttoxischer Schiffsanstriche*, in: B. Watermann (Hrsg.), *Antifouling im Meer – Gefahren durch Schiffsanstriche*, SDN Kolloquium, Schriftenreihe der Schutzgemeinschaft deutsche Nordseeküste e. V., Wilhelmshaven, **1993**, 93.
- ² S. Abarzua, S. Jakubowski, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **1995**, 123, 301.
- ³ C. J. Evans, *Industrial Uses of Tin*, in: P. J. Smith (Hrsg.), *Chemistry of Tin*, 2nd edition, Blackie Academic and Professional, London, **1998**.
- ⁴ H.-J. Golchert, *Ökonomische Notwendigkeit für den Einsatz von Antifoulingbeschichtungen auf seegehenden Schiffen*, in: B. Watermann (Hrsg.), *Antifouling im Meer – Gefahren durch Schiffsanstriche*, SDN Kolloquium, Schriftenreihe der Schutzgemeinschaft deutsche Nordseeküste e. V., Wilhelmshaven, **1993**, 14.
- ⁵ Umweltbundesamt, Berlin, Pressemitteilung vom 18. 2. 2000.
- ⁶ Umweltstiftung WWF Deutschland, *Jahresbericht 1999*, Frankfurt am Main, Juni 2000.
- ⁷ K. Fent, *Critical Reviews in Toxicology*, **1996**, 26, 1.
- ⁸ M. Krautter, T. Maack, *Dauergift TBT (Tributylzinn)*, Greenpeace Informationsschrift, März 2000.
- ⁹ Umweltbundesamt, Berlin, Pressemitteilung vom 23. 10. 1997.
- ¹⁰ Quelle: Wassergütestelle Elbe, <http://www.hamburg.de/Umwelt/wge/Belastg/Organozinn/TBTHafen.html>.
- ¹¹ *Produktion und Verwendung Zinnorganischer Verbindungen in Deutschland*, Bericht des Umweltbundesamtes und des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin, Juni 2000.
- ¹² M. Plesman, *North Sea Monitor*, **1998**, 17.
- ¹³ A. S. Clare, *Biofouling*, **1996**, 9, 211.
- ¹⁴ A. R. Davies, N. M. Targett, O. J. McConnell, C. M. Young, *Bioorganic Marine Chemistry*, **1989**, 3, 85.
- ¹⁵ Fraunhofer Institut ITA, 1. *Zwischenbericht zum Forschungsvorhaben Strukturaufklärung bewuchshemmender Wirkstoffe in Antifoulingmitteln*, Hannover, **1997**, vertraulich.
- ¹⁶ P. J. Hayward, J. S. Ryland (Hrsg.), *Handbook of the Marine Fauna of North-West Europe*, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, **1995**.
- ¹⁷ E. Stresemann (Begr.), *Exkursionsfauna in Deutschland, Band 1: Wirbellose ohne Insekten*, Volk und Wissen Verlag, Berlin, **1992**.
- ¹⁸ R. Kiliass, in: *Urania Tierreich, Wirbellose Band 2*, Urania-Verlag Leipzig, Jena, Berlin, **1994**.
- ¹⁹ D. Kühlmann, R. Kiliass, M. Moritz, M. Rauschert, *Wirbellose Tiere Europas außer Insekten*, Neumann Verlag, Radebeul, **1993**.
- ²⁰ A. G. Smith, I. Rubinstein, L. J. Goad, *Biochem. J.*, **1973**, 135, 443.
- ²¹ R. M. Goodfellow, L. J. Goad, *Comp. Biochem Physiol.*, **1983**, 76B, 575.
- ²² M. P. Veares, L. J. Goad, J. W. ApSimon, *Comp. Biochem Physiol.*, **1988**, 90B, 25.

- ²³ P. A. Voogt, J. G. D. Lambert, J. C. M. Grannemann, M. Jansen, *Comp. Biochem. Physiol.*, **1992**, *101B*, 13.
- ²⁴ L. R. Björkmann, K.-A. Karsson, I. Pascher, B. E. Samuelsson, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1972**, *270*, 260.
- ²⁵ G. Muralikrishna, G. Reuter, J. Peter-Katalinic, H. Egge, F.-G. Hanisch, H.-C. Siebert, R. Schauer, *Carbohydrate Research*, **1992**, *236*, 321.
- ²⁶ A. A. Bergwerff, S. H. D. Hullemann, J. P. Kamerling, J. F. G. Viegenthart, L. Shaw, G. Reuter, R. Schauer, *Structural and Biosynthetic Aspects of N-Glycolyl-8-O-Methylneuraminic-Acid-Oligomers, linked through their N-Glycolyl-Groups, isolated from the Starfish Asterias rubens*, in: J. Roth, U. Ruitshauer, F. A. Troy (Hrsg.), *Polisialic Acid*, Birkhäuser Verlag, Basel, **1993**, 201.
- ²⁷ A. Kelm, L. Shaw, R. Schauer, G. Reuter, *European Journal of Biochemistry*, **1998**, *251*, 874.
- ²⁸ M. R. Elphick, D. A. Price, T. D. Lee, M. C. Thorndyke, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **1991**, *243*, 121.
- ²⁹ S. J. Newmann, M. R. Elphick, M. C. Thorndyke, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **1995**, *261*, 187.
- ³⁰ M. R. Elphick, S. J. Newmann, M. C. Thorndyke, *Journal of Experimental Biology*, **1995**, *198*, 2519.
- ³¹ P. Nuhn, *Naturstoffchemie*, 3. neubearbeitete Auflage, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, Leipzig, **1997**.
- ³² M. V. D'Auria, L. Minale, R. Riccio, *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 1839.
- ³³ J. M. Kornprobst, C. Sallenave, G. Barnathan, *Comp. Biochem. Physiol.*, **1998**, *119B*, 1.
- ³⁴ Y. Hashimoto, T. Yasumoto, *Bull. Jpn. Soc. Scient. Fish*, **1960**, *26*, 1132.
- ³⁵ L. Andersson, L. Bohlin, M. Iorizzi, R. Riccio, I. Minale, W. Moreno-Lopez, *Toxicon*, **1989**, *27*, 179.
- ³⁶ S. DeMarino, M. Iorizzi, F. Zollo, L. Minale, C. D. Amsler, B. J. Baker, J. B. McClintock, *J. Nat. Prod.*, **1997**, *60*, 959.
- ³⁷ K. Albert, G. Schlotterbeck, U. Braumann, H. Händel, M. Spraul und G. Krack, *Angew. Chem.*, **1995**, *107*, 1102.
- ³⁸ S. Strohschein, G. Schlotterbeck, J. Richter, M. Pursch, L.-H. Tseng, H. Händel, K. Albert, *J. Chromatogr. A*, **1997**, *765*, 207.
- ³⁹ S. Strohschein, M. Pursch, H. Händel, K. Albert, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1997**, *357*, 498.
- ⁴⁰ T. Glaser, M. Dachtler, K. Albert, *GIT*, **1999**, *43*, 904.
- ⁴¹ S. Strohschein, M. Pursch, K. Albert, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, *21*, 669.
- ⁴² S. Strohschein, C. Rentel, T. Lacker, E. Bayer, K. Albert, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 1780.
- ⁴³ A. Hötzel, G. Schlotterbeck, K. Alber, E. Bayer, *Chromatographia*, **1996**, *42*, 499.
- ⁴⁴ K. Pusecker, K. Albert, E. Bayer, *J. Chromatogr. A*, **1999**, *836*, 245.
- ⁴⁵ G. Bringmann, M. Rückert, K. Messer, O. Schupp, A. M. Louis, *J. Chromatogr. A*, **1999**, *837*, 267.
- ⁴⁶ G. Bringmann, C. Günther, J. Schlauer, M. Rückert, *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 2805.
- ⁴⁷ G. Bringmann, K. Messer, M. Wohlfahrt, J. Kraus, K. Dumbuya, M. Rückert, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 2678.
- ⁴⁸ G. Bringmann, J. Schlauer, M. Rückert, B. Wiesen, K. Ehrenfeld, P. Proksch, F.-C. Czygan, *Plant Biol.*, **1999**, *1*, 581.
- ⁴⁹ J. Schlauer, M. Rückert, B. Wiesen, M. Herderich, L. A. Assi, R. D. Haller, S. Bär, K.-U. Fröhlich, G. Bringmann, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1998**, *350*, 87.

- ⁵⁰ D. Hölscher, B. Schneider, *Phytochemistry*, **1999**, *50*, 155.
- ⁵¹ B. Schneider, Y. Zhao, T. Blitzke, B. Schmitt, A. Nookandeh, X. Sun, J. Stöckigt, *Phytochem. Anal.*, **1998**, *9*, 237.
- ⁵² Y. Zhao, A. Nookandeh, B. Schneider, X. Sun, B. Schmitt, J. Stöckigt, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 837, 83.
- ⁵³ B. Schmitt, B. Schneider, *Phytochemistry*, **1999**, *52*, 45.
- ⁵⁴ I. D. Wilson, E. D. Morgan, R. Lafont, B. Wright, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 799, 333.
- ⁵⁵ B. Vogler, I. Klaiber, G. Roos, C. U. Walter, W. Hiller, P. Sandor, W. Kraus, *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 175.
- ⁵⁶ T. Renupka, G. Roos, I. Klaiber, B. Vogler, W. Kraus, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 847, 109.
- ⁵⁷ O. Spring, N. Heil, B. Vogler, *Phytochemistry*, **1997**, *46*, 1369.
- ⁵⁸ O. Spring, H. Buschmann, B. Vogler, E. E. Schilling, M. Spraul, M. Hofmann, *Phytochemistry*, **1995**, *39*, 609.
- ⁵⁹ J.-L. Wolfender, K. Ndjoko, K. Hostettmann, *Current Organic Chemistry*, **1998**, *2*, 575.
- ⁶⁰ K. Hostettmann, J.-L. Wolfender, S. Rodriguez, *Planta Med.*, **1997**, *63*, 2.
- ⁶¹ K. Hostettmann, J.-L. Wolfender, *Pestic. Sci.*, **1997**, *51*, 471.
- ⁶² K. Hostettmann, O. Potterat, J.-L. Wolfender, *Chimia*, **1998**, *52*, 10.
- ⁶³ J.-L. Wolfender, S. Rodriguez, K. Hostettmann, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 794, 299.
- ⁶⁴ J.-L. Wolfender, S. Rodriguez, K. Hostettmann, W. Hiller, *Phytochem. Anal.*, **1997**, *8*, 97.
- ⁶⁵ K. Ndjoko, J.-L. Wolfender, E. Röder, K. Hostettmann, *Planta Med.*, **1999**, *65*, 562.
- ⁶⁶ A. Cavin, O. Potterat, J.-L. Wolfender, K. Hostettmann, W. Dyatmyko, *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 1497
- ⁶⁷ E. Garo, J.-L. Wolfender, K. Hostettmann, W. Hiller, S. Antus, S. Mavi, *Helvetica Chimica Acta*, **1998**, *81*, 754.
- ⁶⁸ J. R. Ioset, J.-L. Wolfender, A. Marston, M. P. Gupta, K. Hostettmann, *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 137.
- ⁶⁹ S. Rodriguez, J.-L. Wolfender, H. Stoeckli-Evans, M. P. Gupta, K. Hostettmann, *Helvetica Chimica Acta*, **1998**, *81*, 1393.
- ⁷⁰ A. E. Bäcker, S. Thorbert, O. Rakotonirainy, E. C. Hallberg, A. Olling, M. Gustavsson, B. E. Samuelsson, B. Soussi, *Glycoconj. J.*, **1999**, *16*, 45.
- ⁷¹ P. Kleinwächter, U. Luhmann, B. Schlegel, S. Heinze, A. Härtl, T. T. Kiet, U. Gräfe, *J. Basic Microbiol.*, **1999**, *39*, 345.
- ⁷² F. S. Pullen, A. G. Swanson, M. J. Newman, D. S. Richards, *Rapid. Comm. Mass Spectrom.*, **1995**, *9*, 1003.
- ⁷³ J. P. Shockor, S. E. Unger, I. D. Wilson, P. J. D. Foxall, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 4431.
- ⁷⁴ R. M. Holt, M. J. Newman, F. S. Pullen, D. S. Richards, A. G. Swanson, *J. Mass Spectrom.*, **1997**, *32*, 64.
- ⁷⁵ K. I. Burton, J. R. Everett, M. J. Newman, F. S. Pullen, D. S. Richards, A. G. Swanson, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1997**, *15*, 1903.

- ⁷⁶ G. B. Scarfe, I. D. Wilson, M. Spraul, M. Hofmann, U. Braumann, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *Analytical Communications*, **1997**, 34, 37.
- ⁷⁷ G. B. Scarfe, B. Wright, E. Clayton, S. Taylor, I. D. Wilson, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *Xenobiotica*, **1998**, 28, 373.
- ⁷⁸ G. B. Scarfe, B. Wright, E. Clayton, S. Taylor, I. D. Wilson, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *Xenobiotica*, **1999**, 29, 77.
- ⁷⁹ E. Clayton, S. Taylor, B. Wright, I. D. Wilson, *Chromatographia*, **1998**, 47, 264.
- ⁸⁰ S. D. Taylor, B. Wright, E. Clayton, I. D. Wilson, *Rapid. Comm. Mass Spectrom.*, **1999**, 12, 1732.
- ⁸¹ I. D. Wilson, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *LC-GC*, **1998**, 16, 842.
- ⁸² I. D. Wilson, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, A 534
- ⁸³ I. D. Wilson, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 892, 315.
- ⁸⁴ M. Ludlow, D. Louden, A. Handley, S. Taylor, B. Wright, I. D. Wilson, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 857, 89.
- ⁸⁵ D. Louden, A. Handley, S. Taylor, E. Lenz, S. Miller, I. D. Wilson, A. Sage, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 3922
- ⁸⁶ R. M. Smith, O. Chienthavorn, I. D. Wilson, B. Wright, S. D. Taylor, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 4493.
- ⁸⁷ N. J. C. Bailey, P. Cooper, S. T. Hadfield, E. M. Lenz, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, P. D. Stanley, I. D. Wilson, B. Wright, S. D. Taylor, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48 42.
- ⁸⁸ J. C. Bailey, P. D. Stanley, S. T. Hadfield, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *Rapid. Comm. Mass Spectrom.*, **2000**, 14, 679.
- ⁸⁹ I. D. Wilson, E. D. Morgan, R. Lafont, J. P. Shockor, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, B. Wright, *Chromatographia*, **1999**, 49, 374.
- ⁹⁰ S. H. Hansen, A. G. Jensen, C. Cornett, I. Bjornsdottir, S. Taylor, B. Wright, I. D. Wilson, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 5235.
- ⁹¹ A. Lommen, M. Godejohann, D. P. Venema, P. H. C. Hollmann, M. Spraul, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 1793.
- ⁹² H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, 3. neubearbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1992**.
- ⁹³ H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie – Eine Einführung*, zweite Auflage, VCH, Weinheim, **1992**.
- ⁹⁴ A. E. Derome, *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Pergamon Press, Oxford New York, **1987**.
- ⁹⁵ H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 490
- ⁹⁶ S. Braun, H.-O. Kalinowski, S. Berger, *150 and More Basic NMR Experiments – a Practical course*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- ⁹⁷ C. Griesinger, H. Schwalbe, J. Schleucher, M. Sattler, *Proton-Detected Heteronuclear and Multidimensional NMR*, in: W. R. Croasmun, R. M. K. Carlson (Hrsg.), *Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, 2nd Edition, VCH, New York, Weinheim, Cambridge, **1994**, 457.
- ⁹⁸ H. Kessler, S. Mronga, G. Gemmecker, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **1991**, 29, 527.

- ⁹⁹ S. Berger, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 1997, 30, 137.
- ¹⁰⁰ M. Spraul, B. Steffan, *Bruker Report*, **2000**, 148, 22.
- ¹⁰¹ R. G. Cooks, R. E. Kaiser Jr., *Acc. Chem. Res.*, **1990**, 23, 213.
- ¹⁰² I. W. Griffiths, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **1990**, 4, 69.
- ¹⁰³ J. C. Schwartz, I. Jardine, *Methods in Enzymology*, **1996**, 270, 552.
- ¹⁰⁴ Esquire-LC Operations Manual V 3.1, Bruker Daltonik, Bremen, 1999.
- ¹⁰⁵ K. Yoshinari, *Rapid. Comm. Mass. Spectrom.*, **2000**, 14, 215.
- ¹⁰⁶ N. Watanabe, E. Niki, *Proc. Japan Acad. Ser. B*, **1978**, 54, 194.
- ¹⁰⁷ E. Bayer, K. Albert, M. Nieder, E. Grom, T. Keller, *J. Chromatogr.*, **1979**, 186, 497.
- ¹⁰⁸ E. Bayer, K. Albert, M. Nieder, E. Grom, G. Wolff, M. Rindlisbacher, *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 1747.
- ¹⁰⁹ H. C. Dorn, *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 747 A.
- ¹¹⁰ K. Albert, *J. Chromatogr. A*, **1995**, 703, 123.
- ¹¹¹ I. D. Wilson, J. K. Nicholson, M. Hofmann, M. Spraul, J. C. Lindon, *J. Chromatogr.*, **1993**, 617, 324.
- ¹¹² J. C. Lindon, J. K. Nicholson, U. G. Sidelmann, I. D. Wilson, *Drug Metab. Rev.*, **1997**, 29, 705.
- ¹¹³ M. Godejohann, C. Mügge, G. Wünsch, A. Preiss, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 3832.
- ¹¹⁴ M. Godejohann, C. Mügge, A. Preiss, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 590.
- ¹¹⁵ A. Preiss, U. Sängler, N. Karfich, K. Levsen, C. Mügge, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 992.
- ¹¹⁶ J. F. Haw, T. E. Glass, H. C. Dorn, *Anal. Chem.*, **1983**, 55, 22.
- ¹¹⁷ G. Schlotterbeck, H. Pasch, K. Albert, *Polymer Bull.*, **1997**, 38, 673.
- ¹¹⁸ J. C. Lindon, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, *Prog. NMR Spectrosc.*, **1996**, 29, 1.
- ¹¹⁹ J. C. Lindon, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, *Adv. Chromatogr.*, **1995**, 36, 315.
- ¹²⁰ K. Albert, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 856, 199.
- ¹²¹ M. Godejohann, *Der Einsatz der HPLC-¹H-NMR in der Umweltanalytik*, Dissertation, Universität Hannover, **1997**.
- ¹²² M. Gueron, P. Plateau, M. Decorps, *Prog. NMR Spectrosc.*, **1991**, 23, 135.
- ¹²³ P. J. Hore, *Methods Enzym.*, **1989**, 176, 64.
- ¹²⁴ M. Spraul, *Bruker Report*, **1988**, 1, 9.
- ¹²⁵ S. H. Smalcombe, S. L. Patt, P. A. Keifer, *Journal of Magnetic Resonance A*, **1995** 117, 295.
- ¹²⁶ I. Kitagawa, M. Kobayashi, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1978**, 26, 1864.
- ¹²⁷ T. Komori, *Toxicon*, 1997, 35, 1537.
- ¹²⁸ Y. Itakura, T. Komori, T. Kawasaki, *Liebigs Ann. Chem.*, **1983**, 2079.
- ¹²⁹ Y. Noguchi, R. Higuchi, N. Marubayashi T. Komori, *Liebigs Ann. Chem.*, **1987**, 341
- ¹³⁰ M.-A. Dubois, Y. Noguchi, R. Higuchi, T. Komori, *Liebigs Ann. Chem.*, **1988**, 495.
- ¹³¹ Y. Itakura, T. Komori, T. Kawasaki, *Liebigs Ann. Chem.*, **1983**, 56.
- ¹³² T. Komori, H. C. Krebs, Y. Itakura, R. Higuchi, K. Sakamoto, S. Taguchi, T. Kawasaki, *Liebigs Ann. Chem.*, **1983**, 2092.
- ¹³³ T. Komori, H. Nanri, Y. Itakura, K. Sakamoto, S. Taguchi, R. Higuchi, T. Kawasaki, T. Higuchi, *Liebigs Ann, Chem.*, **1983**, 37.
- ¹³⁴ S. De Marino, M. Iorizzi, E. Palagiano, F. Zollo, C. Roussakis, *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 1319.

- ¹³⁵ M. Iorizzi, F. De Riccardis, L. Minale, R. Riccio, *J. Nat. Prod.*, **1993**, 56, 2149-2162.
- ¹³⁶ S. De Marino, L. Minale, F. Zollo, M. Iorizzi, V. Le Bert, C. Roussakis, *Gazzetta Chimica Italiana*, **1996**, 126, 667.
- ¹³⁷ M. Iorizzi, G. Bifulco, F. De Riccardis, L. Minale, R. Riccio, F. Zollo, *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 10.
- ¹³⁸ M. Iorizzi, P. Bryan, J. McClintock, L. Minale, E. Palagiano, S. Maurelli, R. Riccio, F. Zollo, *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 653.
- ¹³⁹ M. Iorizzi, L. Minale, R. Riccio, T. Yasumoto, *J. Nat. Prod.*, **1993**, 56, 1786.
- ¹⁴⁰ R. Riccio, M. Iorizzi, L. Minale, Y. Oshima, T. Yasumoto, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1988**, 1337.
- ¹⁴¹ J. A. Findlay, M. Jaseja, J. D. Burnell, J.-R. Brisson, *Can. J. Chem.*, **1987**, 65, 1384.
- ¹⁴² Fraunhofer Institut ITA, 2. Zwischenbericht zum Forschungsvorhaben *Strukturaufklärung bewuchshemmender Wirkstoffe in Antifoulingmitteln*, Hannover, **1998**, vertraulich.
- ¹⁴³ S. Sakuma, H. Motomura, *J. Chromatogr.*, **1987**, 400, 293.
- ¹⁴⁴ V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Chichester, Frankfurt/Main, Aarau, **1999**.
- ¹⁴⁵ H. C. Krebs, T. Komori, T. Kawasaki, *Liebigs Ann. Chem.*, **1984**, 296.
- ¹⁴⁶ M. DeLuca, W. D. McElroy, *Meth. of Enzymol.*, **1978**, 57, 1.
- ¹⁴⁷ J. P. Shockcor, R. W. Wurm, L. W. Frick, P. N. Sanderson, R. D. Farrant, B. C. Sweatman, J. C. Lindon, *Xenobiotica*, **1996**, 26, 189.
- ¹⁴⁸ N.S. Bhacca, D.H. Williams: *Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry, Illustrations from the Steroid Field*, Holden Day Inc., San Francisco, **1966**.
- ¹⁴⁹ S. A. Barker, *J. J. Chromatogr. A*, **2000**, 885, 115.
- ¹⁵⁰ S. A. Barker, A. R. Long, C. R. Short, *J. Chromatogr.*, **1989**, 475, 353.
- ¹⁵¹ A. R. Long, L. C. Hsieh, M. S. Marlborough, C. S. Short, S. A. Barker, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1989**, 72, 739.
- ¹⁵² L. S. Yago, *Seminars in Food Analysis*, **1996**, 1, 45.
- ¹⁵³ S. A. Barker, A. R. Long, M. E. Hines II, *J. Chromatogr.*, **1993**, 629, 23.
- ¹⁵⁴ S. Barker, R. Hawley, *American Laboratory*, **1992**, 42.
- ¹⁵⁵ F. Zollo, E. Finamore, R. Riccio, L. Minale, *J. Nat. Prod.*, **1989**, 52, 693.
- ¹⁵⁶ F. Zollo, E. Finamore, R. Riccio, L. Minale, *J. Nat. Prod.*, **1990**, 53, 1000.
- ¹⁵⁷ J. A. Findlay, M. Jaseja, J. R. Brisson, *Can. J. Chem.*, **1987**, 65, 2605.
- ¹⁵⁸ K. Okano, T. Nakamura, Y. Kamiya, S. Ikegami, *Agric. Biol. Chem.*, **1981**, 45, 805.
- ¹⁵⁹ M. Iorizzi, L. Minale, R. Riccio, T. Yasumoto, *J. Nat. Prod.*, **1992**, 55, 866.
- ¹⁶⁰ K. Hostettmann, A. Marston: *Saponins*, Cambridge University Press, Cambridge, **1995**.
- ¹⁶¹ P. K. Agrawal, D. C. Jain, A. K. Pathak, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **1995**, 33, 923.
- ¹⁶² a.) H. Duddeck, *Strategies and Tactics in Structure Elucidation of Unknown Natural Products by Modern NMR*, b.) G. Toth: *Modern One- and Two-Dimensional NMR for Structure Elucidation of Natural Products*, in: P. Schreier, M. Herderich, H.-U. Humpf, W. Schwab (Hrsg.), *Natural Product*

Analysis, Chromatography – Spectroscopy – Biological Testing, Vieweg Verlag, Braunschweig, Wiesbaden, **1998**, 105 und 119.

¹⁶³ H. Schröder, E. Haslinger, *Liebigs Ann. Chem.*, **1993**, 413.

¹⁶⁴ J. Dabrowski, *Two-Dimensional and Related NMR Methods in Structural Analyses of Oligosaccharides and Polysaccharides*, in: W. R. Croasmun, R. M. K. Carlson (Hrsg.), *Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, 2nd Edition, VCH, New York, Weinheim, Cambridge, **1994**, 741.

¹⁶⁵ T. A. W. Koerner, J. H. Prestegard, R. K. Yu, *Methods in Enzymology*, **1987**, 138, 38.

¹⁶⁶ Y. Itakura, T. Komori, *Liebigs Ann. Chem.*, **1986**, 359.

¹⁶⁷ E. B. Rathbone, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in the Structural Analysis of Food-Related Compounds*, in: G. G. Birch (Hrsg.), *Analysis of Food Carbohydrate*, Elsevier, Baarking, New York, **1985**, 149.

¹⁶⁸ H.O. Kalinowski, S. Berger, S. Braun: *¹³C-NMR-Spektroskopie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1984**, 475.

¹⁶⁹ M. J. Vazquez, E. Quinoa, R. Riguera, A. San Martin, J. Darias, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 6739.

¹⁷⁰ R. Higuchi, M. Fujita, S. Matsumoto, K. Yamada, T. Miyamoto, T. Sasaki, *Liebigs Ann.*, **1996**, 837.

¹⁷¹ M. Sandvoß, *Die Implementierung der HPLC-NMR-Kopplung*, Wissenschaftliche Abschlußarbeit, Institut für Lebensmittelchemie, Technische Universität Braunschweig, **1995**.

¹⁷² Fraunhofer Institut ITA, *3. Zwischenbericht zum Forschungsvorhaben Strukturaufklärung bewuchshemmender Wirkstoffe in Antifoulingmitteln*, Hannover, **1999**, vertraulich.

¹⁷³ H. J. Harwood, in : P. Diehl, E. Fluck, R. Kosfeld (Hrsg.), *NMR Basic Principles and Progress*, Vol. 4, Springer, Berlin, **1971**, 74.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerold Wunsch, meinem Doktorvater, für die Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung sowie die anregenden Diskussionen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Karsten Levsen danke ich herzlich für das interessante Thema, die stete Diskussionsbereitschaft und die Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Alfred Preiß für die gute Betreuung am Fraunhofer Institut, die hilfreichen Gespräche sowie die vielen wertvollen Anregungen.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Clemens Mügge, bei dem ich das NMR-„Messen“ lernen durfte, wie auch der gesamten NMR-Arbeitsgruppe der Humboldt-Universität: den Mitdoktoranden Babett Schablinski, Hardy Weisshoff und Marcus Butz, die mir rund um die Uhr mit Rat und Tat zur Seite standen und den Mitarbeitern Frau Angela Thiesies und Herrn Wolf-Dieter Bloedorn, deren Erfahrung und Routine auch mir schnell zugute kamen.

Bei den Kollegen in der Abteilung Bio- und Umweltanalytik am Fraunhofer Institut möchte ich mich für die Unterstützung bei allen Problemen sowie für die kollegiale Atmosphäre bedanken. Mein spezieller Dank gilt dabei Frau Dr. Lam Huong Pham für die enge Zusammenarbeit am Seesternprojekt, Frau Ute Sängler, die für dieses Projekt MS-Spektren aufgenommen hat und Herrn Manfred Elend für die gute Kooperation am NMR-Gerät. Meinem Mitdoktoranden Markus Walles möchte ich für die Unterstützung beim gemeinsamen Meistern der Ionenfalle danken.

Weiterhin danke ich Frau Anja Weltring für ihre engagierte Mitarbeit an der Entwicklung der MSPD-Methode.

Bei Frau Dr. E.-M. Scharf und Herrn Dr. S. Sandrock von der Fa. Bioplan, Groß Stove, bedanke ich mich für die Proben von *Asterias rubens* sowie die interessanten und lehrreichen Gespräche über Seesterne.

Den Herren Dr. Manfred Spraul, Dr. Markus Godejohann und Dr. Rüdiger Weisemann von der Firma Bruker, Rheinstetten, gilt mein Dank für den engen Kontakt und die Möglichkeit, an aktuellen Geräteentwicklungen teilhaben zu können. Der Firma Bruker Daltonik, Bremen, danke ich für technische Unterstützung.

Veröffentlichungen

Artikel

M. Sandvoß, L. H. Pham, K. Levsen, A. Preiß, C. Mügge and G. Wünsch: *Isolation and Structural Elucidation of Steroid Oligoglycosides from the Starfish Asterias rubens by Means of Direct On-line LC-NMR-MS Hyphenation and One- and Two-Dimensional NMR Investigations*, Eur. J. Org. Chem, **2000**, 1253.

M. Sandvoß, A. Weltring, A. Preiß, K. Levsen and G. Wünsch: *Combination of Matrix Solid Phase Dispersion Extraction and Direct On-line LC-NMR-MS² Hyphenation as a New Efficient Approach for the Rapid Screening of Natural Products: Application to the Total Asterosaponin Fraction of the Starfish Asterias rubens*, J. Chromatogr. A, **2001**, 917, 75.

M. Sandvoß, A. Preiß, K. Levsen, R. Weisemann and M. Spraul: *Structural Elucidation of Steroid Oligoglycosides from the Starfish Asterias rubens by Means of Direct On-line LC-NMR-MS Hyphenation and One- and Two-Dimensional NMR Investigations - Application of a superconducting NMR probehead*, in Vorbereitung.

Vorträge

M. Sandvoß, A. Preiß, K. Levsen: *The Application of the Direct Online LC-NMR-(MS)ⁿ Hyphenation - an Analytical Method for the Next Century?*
3rd Euroconference on Environmental Analytical Chemistry, Chalkidiki, Griechenland, **1999**.

M. Sandvoß, A. Preiß, K. Levsen: *The Application of Direct Online LC-NMR-(MS)ⁿ Hyphenation - Structural Elucidation of Steroid Oligoglycosides of Marine Origin*.
LifeCom Symposium & Exposition, Düsseldorf, **2000**.

M. Sandvoß, A. Preiß, K. Levsen: *Direkte online LC-NMR-(MS)ⁿ-Kopplung - mehr als die Summe ihrer Teile - ein chemisches Screening von Steroid-Oligoglycosiden des Seesterns Asterias rubens*.
10. Chromatographie-Seminar, Hohenroda, **2000** und Norddeutsches NMR/ESR-Meeting, Hamburg, **2000**.

Poster

M. Sandvoß, A. Preiß, K. Levsen: *Direct Online LC-NMR-(MS)ⁿ Hyphenation - More than the Sum of its Parts. A Chemical Screening of Steroid Oligoglycosides from the Starfish Asterias rubens*.
6th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography, Brügge, Belgien, **2000**.

M. Sandvoss, A. Weltring, A. Preiss, K. Levsen: *A Rapid Screening for Steroid Oligoglycosides from the Starfish Asterias rubens by Means of Matrix Solid Phase Dispersion Extraction and Direct On-line LC-NMR-MS² Hyphenation*.
48th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (GA) and International Congress, Zürich, Schweiz, **2000** und 22^{te} Diskussionstagung der Fachgruppe Magnetische Resonanzspektroskopie in der GDCh, Regensburg, **2000**.

Lebenslauf

Name: Martin Sandvoß
Geburtsdatum: 9. März 1970
Geburtsort: Wolfenbüttel
Familienstand: ledig

Schulbildung

1976 bis 1980 Grundschole Karlstraße, Wolfenbüttel
1980 bis 1982 Orientierungsstufe Wallstraße, Wolfenbüttel
1982 bis 1989 Gymnasium am Rosenwall, Wolfenbüttel
Mai 1989 Allgemeine Hochschulreife

Ersatzdienst

August 1989 bis Oktober 1990 Zivildienst im Krankenhaus Herzogin-Elisabeth-Heim, Braunschweig

Studium

Oktober 1990 bis Oktober 1995 Studium der Lebensmittelchemie an der TU-Braunschweig
April 1993 Vorexamen Lebensmittelchemie
März bis Mai 1995 1. Staatsexamen für Lebensmittelchemiker
Juli 1995 bis September 1995 Wissenschaftliche Abschlußarbeit bei der Firma Kraft Jacobs Suchard, Bremen.
Thema: *Implementierung der HPLC-NMR-Kopplung.*
November 1995 bis November 1996 Praktikum am Staatlichen Lebensmitteluntersuchungsamt Braunschweig
November 1996 2. Staatsexamen für Lebensmittelchemiker am Staatlichen Lebensmitteluntersuchungsamt Braunschweig
Januar bis September 1997 Wiss. Mitarbeiter am Institut für Lebensmittelchemie Frankfurt/Main

Promotion

seit Oktober 1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung ITA, Hannover. Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. Karsten Levsen und Prof. Dr. Gerold Wünsch
Thema: *Isolierung und Strukturaufklärung von Saponinen des Seesterns *Asterias rubens* mittels eines LC-NMR-MS-Screenings sowie weiterer NMR-spektroskopischer Methoden.*
Oktober 1997 bis September 1998 Tätigkeit in der NMR-Arbeitsgruppe der Humboldt Universität Berlin im Rahmen der o. g. Promotion. Kooperation mit dem Fraunhofer Institut ITA.