

**Etablierung von Pflanzenzellkulturen,  
Isolierung und Strukturaufklärung der  
Inhaltsstoffe**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Claus Cordes  
geb. in Harderberg

Mainz 2001

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2001

Für meine Eltern

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1	Bedeutung von Pflanzen für die Medizin im Verlauf der Geschichte .....	1
2	Bedeutung von Pflanzenzellkulturen .....	7
3	Zielsetzung .....	11
<b>II</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>12</b>
1	Geräte.....	12
1.1	Geräte, benutzt am Institut für Pharmazie in Mainz .....	12
1.2	Geräte der Firma AnalytiCon AG/AnalytiCon Discovery.....	13
2	Chemikalien und Materialien .....	14
2.1	Chemikalien und Materialien, verwendet im Institut für Pharmazie in Mainz ...	14
2.2	Chemikalien und Materialien, verwendet bei der Firma AnalytiCon AG/AnalytiCon Discovery.....	15
3	Pflanzen.....	16
<b>III</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>17</b>
1	Anlegen von Pflanzenzellkulturen.....	17
1.1	Anlegen von Kalluskulturen .....	17
1.1.1	Mechanische Vorbereitung des Pflanzenmaterials .....	17
1.1.2	Sterilisation der vorbereiteten Pflanzenteile .....	18
1.1.3	Herstellung der Schälchen und Auflegen des Pflanzenmaterials .....	19
1.2	Erhalt und Vermehrung des Kallusgewebes .....	20
1.3	Erstellung, Erhalt und Vermehrung von Suspensionskulturen .....	21
2	Gewinnung von Pflanzenzellkulturextrakten .....	21
2.1	Erstellung von Rohextrakten.....	22
2.2	Erstellung von zuckerfreien Extrakten.....	23
3	Isolierung von Reinsubstanzen aus Pflanzenzellkulturextrakten .....	23
3.1	Isolierung von Reinsubstanzen in der Pharmazie in Mainz.....	24
3.1.1	Trennung mit Hilfe analytischer HPLC.....	24

---

3.2	Isolierungen von Substanzen bei der Firma AnalytiCon .....	26
3.2.1	Probenvorbereitung für die semipräparative HPLC .....	26
3.2.2	Trennung mit Hilfe semipräparativer HPLC .....	26
3.2.3	Untersuchung der Fraktionen der semipräparativen Trennungen.....	28
<b>4</b>	<b>Strukturaufklärung .....</b>	<b>30</b>
4.1	Molekülmassenbestimmungen mit Hilfe der LC-MS-Technik .....	30
4.1.1	Molekülmassenbestimmungen von Reinsubstanzen.....	30
<b>IV</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>32</b>
<b>1</b>	<b>Erstellung von Zellkulturen.....</b>	<b>32</b>
1.1	Anlegen von Kalluskulturen .....	32
1.2	Anlegen von Suspensionskulturen.....	47
<b>2</b>	<b>Isolierung und Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen der Pflanzenzellkulturen</b>	<b>49</b>
2.1	Herstellung der Extrakte .....	49
2.2	Trennung der Extrakte und Untersuchung der Inhaltsstoffe.....	50
2.2.1	Untersuchung des Extraktes von <i>Polygonum aubertii</i> .....	51
2.2.1.1	Isolierung der Inhaltsstoffe .....	52
2.2.1.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen .....	52
2.2.2	Untersuchung des Extraktes von <i>Epilobium angustifolium</i> .....	53
2.2.2.1	Isolierung der Inhaltsstoffe .....	55
2.2.2.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen .....	55
2.2.3	Untersuchung des Extraktes von <i>Bryonia dioica</i> .....	56
2.2.3.1	Isolierung der Inhaltsstoffe .....	57
2.2.3.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen .....	57
2.2.4	Untersuchung des Extraktes von <i>Hypericum perforatum</i> .....	58
2.2.4.1	Isolierung der Inhaltsstoffe .....	59
2.2.4.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen .....	60
2.2.5	Untersuchung des Extraktes von <i>Euonimus europaeus</i> .....	61
2.2.5.1	Isolierung der Inhaltsstoffe .....	62
2.2.5.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen .....	63
2.2.6	Untersuchung des Extraktes von <i>Galium odoratum</i> .....	64
2.2.6.1	Isolierung der Inhaltsstoffe .....	65
2.2.6.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen .....	65

---

2.2.7	Untersuchung des Extraktes von <i>Forsythia viridissima</i> .....	66
2.2.7.1	Isolierung der Inhaltsstoffe .....	67
2.2.7.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen .....	68
2.2.8	Untersuchung des Extraktes von <i>Syringa vulgaris</i> .....	69
2.2.8.1	Isolierung der Inhaltsstoffe .....	70
2.2.8.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen .....	70
2.2.9	Untersuchung des Extraktes von <i>Ajuga reptans</i> .....	71
2.2.9.1	Isolierung der Inhaltsstoffe .....	73
2.2.9.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen .....	73
2.2.10	Untersuchung des Extraktes von <i>Melissa officinalis</i> .....	74
2.2.10.1	Isolierung der Inhaltsstoffe .....	76
2.2.10.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen .....	76
2.2.11	Untersuchung des Extraktes von <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	77
2.2.11.1	Isolierung der Inhaltsstoffe .....	79
2.2.11.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen .....	79
2.2.12	Untersuchung des Extraktes von <i>Levisticum officinale</i> .....	80
2.2.12.1	Isolierung der Inhaltsstoffe .....	81
2.2.12.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen .....	81
2.2.13	Untersuchung des Extraktes von <i>Bellis perennis</i> .....	82
2.2.13.1	Isolierung der Inhaltsstoffe .....	83
2.2.13.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen .....	84
	Untersuchung des Extraktes von <i>Taraxacum officinale</i> .....	85
2.2.14.1	Isolierung der Inhaltsstoffe .....	86
2.2.14.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen .....	86
<b>V</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>88</b>
<b>1</b>	<b>Etablierung von Pflanzenzellkulturen</b> .....	<b>88</b>
<b>2</b>	<b>Einteilung der isolierten Inhaltsstoffe nach Biosynthesewege</b> .....	<b>89</b>
<b>3</b>	<b>Bewertung der Ergebnisse</b> .....	<b>99</b>
<b>VI</b>	<b>SPEKTROSKOPISCHE DATEN</b> .....	<b>105</b>

---

<b>VII</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>126</b>
1	Etablierung von Pflanzenzellkulturen .....	126
2	Isolierung und Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen der Zellkulturen .....	126
3	Abschließende Bewertung.....	127
<b>VIII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>128</b>
<b>IX</b>	<b>SPEKTROSKOPISCHER ANHANG.....</b>	<b>138</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1.	1: Digoxin, 2: Digitoxin.....	1
Abbildung 2.	3: Morphin; 4: Chinin, 5: Plasmochin .....	2
Abbildung 3.	6: Salicin , 7: Salicylsäure, 8: Acetylsalicylsäure .....	3
Abbildung 4.	9: Reserpin, 10: Atropin, 11: Camptothecin .....	4
Abbildung 5.	12: Vincristin, 13: Penicillin G.....	5
Abbildung 6.	14: Paclitaxel (Taxol®), 15: Galantamin .....	6
Abbildung 7.	14: Paclitaxel (Taxol®), 16: 10-Deacetyl-baccatin III.....	9
Abbildung 8.	Aus der Gattung <i>Polygonum</i> isolierte Verbindungen und Strukturelemente .. .....	51
Abbildung 9.	Semipräparative Trennung des Extraktes von <i>Polygonum aubertii</i> .....	52
Abbildung 10.	Substanzen, die aus der Zellkultur von <i>Polygonum aubertii</i> isoliert wurden .....	53
Abbildung 11.	Aus der Pflanze <i>Epilobium angustifoliums</i> isolierte Substanzen: .....	54
Abbildung 12.	Semipräparative Trennung des Extraktes von <i>Epilobium angustifolium</i> .....	55
Abbildung 13.	Substanz, die aus der Zellkultur von <i>Epilobium angustifolium</i> isoliert wurde .....	55
Abbildung 14.	Aus der Pflanze <i>Bryonia dioica</i> isolierte Substanzen:.....	56
Abbildung 15.	Semipräparative Trennung des Extraktes von <i>Brionia dioica</i> .....	57
Abbildung 16.	Substanzen, die aus der Zellkultur von <i>Bryonia dioica</i> isoliert wurden .....	58
Abbildung 17.	Aus der Pflanze <i>Hypericum perforatum</i> und deren Zelkulturen bereits isolierte Substanzen .....	59
Abbildung 18.	Semipräparative Trennung des Extraktes von <i>Hypericum perforatum</i> .....	60
Abbildung 19.	Substanzen, die aus der Zellkultur von <i>Hypericum perforatum</i> isoliert wurden .....	61
Abbildung 20.	Aus der Pflanze <i>Euonimus europaeus</i> isolierte Substanzen .....	62
Abbildung 21.	Semipräparative Trennung des Extraktes von <i>Euonimus europaeus</i> .....	62
Abbildung 22.	Substanzen, die aus der Zellkultur von <i>Eunimus europaeus</i> isoliert wurden .....	63
Abbildung 23.	Aus der Pflanze <i>Galium odoratum</i> isolierte Substanzen .....	64
Abbildung 24.	Semipräparative Trennung des Extraktes von <i>Galium odoratum</i> .....	65
Abbildung 25.	Substanzen, die aus der Zellkultur von <i>Galium odoratum</i> isoliert wurden .	66



---

Abbildung 26. Aus der Pflanze und aus Zellkulturen von <i>Forsythia viridissima</i> isolierte Substanzen .....	67
Abbildung 27. Semipräparative Trennung des Extraktes von <i>Forsythia viridissima</i> .....	68
Abbildung 28. Substanzen, die aus der Zellkultur von <i>Forsythia viridissima</i> isoliert wurden .....	68
Abbildung 29: Aus der Pflanze <i>Syringa vulgaris</i> isolierte Substanzen .....	69
Abbildung 30. Semipräparative Trennung des Extraktes von <i>Syringa vulgaris</i> .....	70
Abbildung 31. Substanzen, die aus der Zellkultur von <i>Syringa vulgaris</i> isoliert wurden ..	71
Abbildung 32. Aus der Pflanze <i>Ajuga reptans</i> isolierte Substanzen .....	72
Abbildung 33. Semipräparative Trennung des Extraktes von <i>Ajuga reptans</i> .....	73
Abbildung 34. Substanzen, die aus der Zellkultur von <i>Ajuga reptans</i> isoliert wurden .....	73
Abbildung 35. Aus der Pflanze <i>Melissa officinalis</i> isolierte Substanzen .....	75
Abbildung 36. Semipräparative Trennung des Extraktes von <i>Melissa officinalis</i> .....	76
Abbildung 37. Substanzen, die aus der Zellkultur von <i>Melissa officinalis</i> isoliert wurden	77
Abbildung 38. Aus der Pflanze und bereits aus Zellkulturen von <i>Rosmarinus officinalis</i> isolierte Substanzen .....	78
Abbildung 39. Semipräparative Trennung des Extraktes von <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	79
Abbildung 40. Substanzen, die aus der Zellkultur von <i>Rosmarinus officinalis</i> isoliert wurden .....	80
Abbildung 41. Aus der Pflanze <i>Levisticum officinale</i> isolierte Substanzen .....	80
Abbildung 42. Semipräparative Trennung des Extraktes von <i>Levisticum officinale</i> .....	81
Abbildung 43. Substanzen, die aus der Zellkultur von <i>Levisticum officinale</i> isoliert wurden .....	82
Abbildung 44. Aus der Pflanze <i>Bellis perennis</i> isolierte Substanzen .....	83
Abbildung 45. Semipräparative Trennung des Extraktes von <i>Bellis perennis</i> .....	84
Abbildung 46. Substanz, die aus der Zellkultur von <i>Bellis perennis</i> isoliert werden konnte .....	84
Abbildung 47. Aus der Pflanze <i>Taraxacum officinale</i> isolierte Substanzen .....	85
Abbildung 48. Semipräparative Trennung des Extraktes von <i>Taraxacum officinale</i> .....	86
Abbildung 49: Substanzen, die aus der Zellkultur von <i>Taraxacum officinale</i> isoliert wurden .....	87
Abbildung 50. Flavonoide .....	90
Abbildung 51. Derivat eines Produktes des Shikimat-Chorismat-Weges .....	90
Abbildung 52. Caffeoylchinasäuren .....	91

---

Abbildung 53. Phenylpropanoid-Glucoside.....	91
Abbildung 54. Phenylpropan-Dimere .....	92
Abbildung 55. Lignane .....	93
Abbildung 56. Phenole und Gallussäure.....	93
Abbildung 57. Xanthone und Anthrachinone .....	95
Abbildung 58. Triterpen.....	95
Abbildung 59. Isopropylderivate .....	96
Abbildung 60. Postuliertes Stoffpaar in <i>Passiflora moriflora</i> .....	97
Abbildung 61. Biosyntheschema von Chlorogensäure.....	101
Abbildung 62. Entstehung von 3-Deoxy-rosmarinsäure neben der Bildung von Rosmarinsäure.....	102

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1. Beispiele für Zellkulturen, die Sekundärmetabolite in höherer Menge bilden als die differenzierte Pflanze.....	8
Tabelle 2. Liste der für die Kalluserzeugung verwendeten Medien .....	19
Tabelle 3. Liste der Pflanzen, aus denen Kalluskultur angelegt werden sollte.....	34
Tabelle 4. Liste der Pflanzen, bei denen erfolgreich Kallus erhalten wurde. ....	46
Tabelle 5. Liste der Pflanzen, von denen eine Suspensionskultur angelegt wurde. ....	48
Tabelle 6. Überblick über die Extraktgewinnung aus Suspensionbskulturen.....	49

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AFP	Ammoniumformiatpuffer
COSY	Correlated Spectroscopy
FM	Fließmittel
g	Gravitationskonstante: $9.81 \text{ ms}^{-2}$
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Connectivity
HT	High-Throughput
Lux	Lichtstärkeneinheit
MG	Molekulargewicht
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
neg. Ionis.	negative Ionisierung
pos. Ionis.	positive Ionisierung
TG	Trockengewicht

## I EINLEITUNG

### 1 Bedeutung von Pflanzen für die Medizin im Verlauf der Geschichte

Im Verlaufe der Koevolution von Pflanzen und ihren Freßfeinden entwickelten und optimierten die Pflanzen eine Reihe verschiedener Freßabwehrmethoden; eine besonders erfolgreiche ist die Abwehr durch chemische Inhaltsstoffe.

Manche der pflanzlichen Inhaltsstoffe können aber nicht nur schädliche, sondern in manchen Situationen und bestimmten Konzentrationen auch positive Wirkungen entfalten. Dies scheint von Tieren schon lange genutzt zu werden: Es gibt Arten, die bei bestimmten Erkrankungen Pflanzen fressen, die sie sonst meiden<sup>[1]</sup>. Da auch unsere nächsten Verwandten, die Schimpansen, dieses Verhalten zeigen und dies nicht angeboren ist, sondern in einer Art Kultur weitergegeben wird, muß davon ausgegangen werden, daß auch der Mensch von Beginn seiner Entwicklung an Pflanzen zu Heilzwecken genutzt hat.

In diesem Zusammenhang sei an den von Paracelsus geprägten Satz „Die Dosis allein macht das Gift“ erinnert. Zum Beispiel werden aus der Giftpflanze *Digitalis purpurea* die herzwirksamen Glycoside Digoxin (1) und Digitoxin (2) isoliert, die bei geringer Dosierung aufgrund ihres positiv inotropen Effekts bei Herzinsuffizienz verabreicht werden<sup>[2]</sup>.

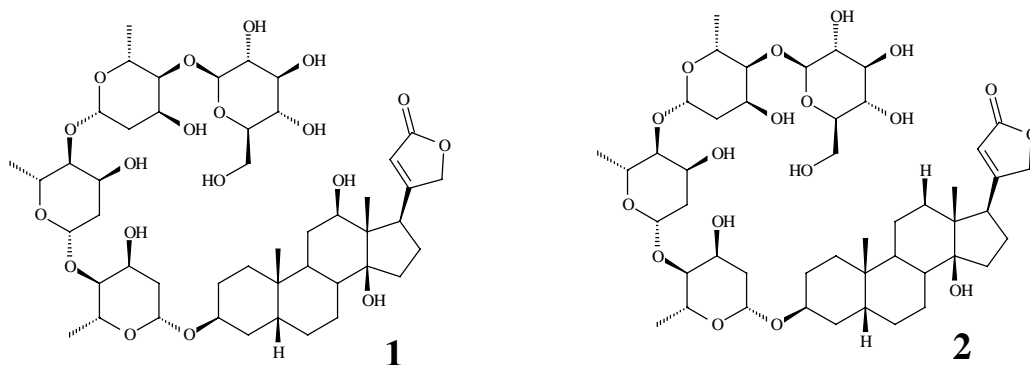


Abbildung 1. 1: Digoxin, 2: Digitoxin

Die erste überlieferte systematische Erforschung und Nutzung von Pflanzen für die Medizin liegt vergleichsweise kurz zurück: Vor ca. 3000 Jahren begann die Präayurvedische Epoche in Indien, der sich die Ayurvedische anschloß. Spätestens um 500

vor Christus begann in China die Erforschung der Heilwirkung von Pflanzen. Einige Arzneimittelformulierungen, die dort zwischen 25 – 250 n. Chr. entstanden sind, werden auch heute noch genutzt.

Auch in Europa begann die systematische Nutzung von Pflanzen als Arzneistoff vor etwa 2500 Jahren. Schon die Griechen und Römer beispielsweise kauten die Rinde der Weide (Cortex salicis) wegen ihrer analgetischen und antipyretischen Wirkung.

Vor allem die Benediktinermönche sammelten viel Wissen über Heilpflanzen. Bereits um das Jahr 800 n. Chr. wendeten sie *Papaver somniferum* nicht nur zur Behandlung von Schmerzen, sondern auch als Anästhetikum an.

Ein Beispiel für die späte Entdeckung einer Arzneipflanze, zumindest für den abendländischen Raum, ist die Nutzung der Chinarinde (Cortex chinae). Mit ihr wurde ein wirksames Mittel für die Bekämpfung der Malaria gefunden.

Im Zuge der beginnenden industriellen Revolution gelang es zunächst, die wirksamen Verbindungen aus den interessierenden Drogen zu isolieren und schließlich auch deren Struktur zu bestimmen. So wurde beispielsweise schon 1803 Morphin (**3**) von F.W. Sertürner aus *Papaver somniferum* isoliert, und 1826 führte E. Merck in Darmstadt diese Substanz als Analgetikum ein.

Für die Chinarinde wurde Chinin (**4**) 1819 als der wirksame Bestandteil identifiziert; dieser Stoff blieb die einzige wirksame Substanz für die Behandlung der Malaria bis zur Einführung von Plasmochin (**5**) im Jahre 1926.

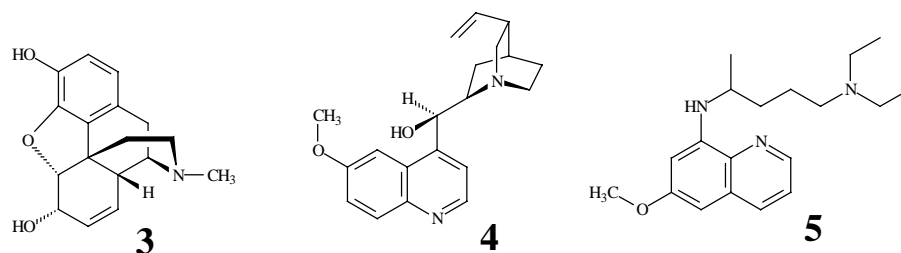


Abbildung 2. 3: Morphin; 4: Chinin, 5: Plasmochin

In der Mitte des 19. Jahrhunderts wurde als Wirksubstanz der Weidenrinde Salicin (**6**), das  $\beta$ -Glucosid des Salicylalkohols, erkannt. Durch anschließende Reaktionen erhielt man schließlich Salicylsäure (**7**)<sup>[3]</sup>. Im Jahre 1859 gelang H. Kolbe die Totalsynthese dieser Substanz, aber erst die Entdeckung F. Hoffmanns, daß die acetylierte Verbindung weitaus

geringere gastrische Nebenwirkungen zeigt, ermöglichte 1899 die Einführung der Acetylsalicylsäure (**8**) unter dem Handelsnamen Aspirin auf dem Arzneimittelmarkt<sup>[4]</sup>.

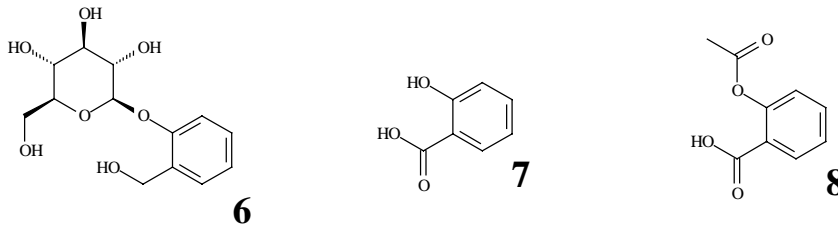


Abbildung 3. **6: Salicin** , **7: Salicylsäure**, **8: Acetylsalicylsäure**

Nach und nach gelang es, viele Verbindungen des Sekundärstoffwechsels von Pflanzen zu isolieren und ihre Struktur aufzuklären. Bis Mitte der 90er Jahre waren über 150.000 Naturstoffe bekannt<sup>[5]</sup>, davon entfallen etwa 80.000 auf das Pflanzenreich<sup>[5]</sup>. Demgegenüber stehen etwa zum gleichen Zeitpunkt über 18 Millionen in den Chemical Abstracts beschriebene chemische Verbindungen<sup>[6]</sup>.

Durch die oben angeführten Ergebnisse in der Erforschung der Wirksubstanzen pflanzlicher Drogen ging man im 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts davon aus, daß die medizinische Wirksamkeit einer pflanzlichen Droge im wesentlichen auf eine einzelne Substanz zurückzuführen sei.

In Anbetracht des enormen Fortschritts im Bereich der Chemie schien es auf lange Sicht möglich, auf Pflanzen als Quelle pharmazeutisch wirksamer Substanzen verzichten zu können und diese statt dessen synthetisch zu erzeugen. Dieser Ansatz setzte sich auch deshalb durch, da in vielen Fällen nur eine technische Produktion von Arzneistoffen den steigenden Bedarf decken konnte.

Der weitere Fortschritt in der chemischen Industrie ließ die Hoffnung entstehen, neue, nicht in der Natur enthaltene Substanzen zu synthetisieren, diese auf ihre biologische Wirksamkeit zu testen und damit eine völlig neue Quelle für die Entdeckung von Arzneistoffen zu erschließen<sup>[7,8]</sup>.

In den letzten Jahrzehnten wurden Testsysteme wie das High-Throughput Screening (HTS) entwickelt, das in-vitro-Testsysteme auf der Basis von molekularen Testmodellen (z.B. Enzym-, Rezeptorbindungstests) benutzt. Mit diesen Systemen lassen sich Tausende Proben pro Woche testen, weshalb es möglich schien, neue Verbindungen schnell und kostengünstig untersuchen zu können. Aus diesem Grund erschien eine bzgl. einer

medizinischen Wirksamkeit niedrigere Trefferquote tolerierbar als bei Substanzen, die der Natur entstammen.

Die optimistische Beurteilung der Möglichkeiten der kombinatorischen Chemie als Quelle für neue Medikamente wurde – zumindest bis jetzt – nicht bestätigt<sup>[9,10]</sup>. Selbst die Hoffnung, alle aus Pflanzen bekannten Substanzen auf chemischem Wege produzieren zu können, erfüllte sich nicht. Deren Strukturen sind teilweise so kompliziert, daß ihre Synthese zu aufwendig ist bzw. zu geringe Ausbeuten liefert. Deshalb ist es bis heute deutlich ökonomischer, sie aus Pflanzen zu isolieren<sup>[11]</sup>, selbst wenn diese - wie im Fall von *Rauwolfia* spez., aus der Reserpin (**9**) gewonnen wird, - nur schwer kultivierbar sind.

Andere Beispiele für pharmazeutisch relevante Substanzen, die immer noch aus Pflanzen gewonnen werden, sind u.a. Atropin (**10**) aus *Atropa belladonna* und Camptothecin (**11**) aus *Camptotheca acuminata*.

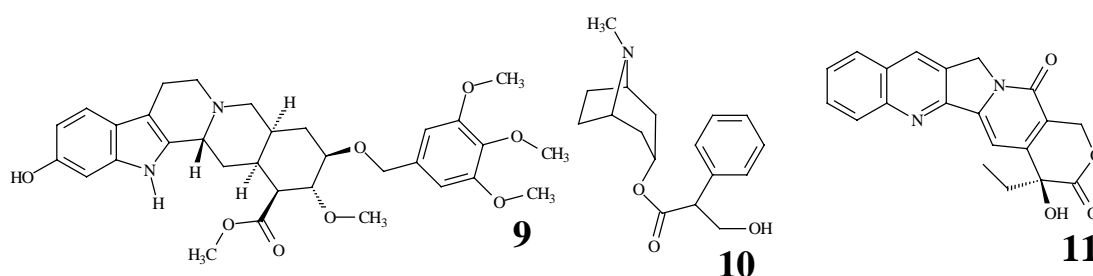


Abbildung 4. **9: Reserpin, 10: Atropin, 11: Camptothecin**

Wie sehr aus der Natur stammende Substanzen sowohl auf dem etablierten Arzneimittelmarkt als auch bei der Neueinführung von Medikamenten eine Rolle spielen, sollen die folgenden Zahlen verdeutlichen:

- 60 % der Antitumormittel und Antiinfektiva, die bereits angewendet werden oder sich in einer späten Phase der klinischen Entwicklung befinden, stammen aus der Natur oder sind von natürlichen Substanzen abgeleitet worden<sup>[12]</sup>.
- 40 % der zwischen 1983 und 1994 neu zugelassenen Medikamente sind Naturstoffe oder wurden auf Naturstoffbasis entwickelt<sup>[12]</sup>. Als Beispiel sei hier das Antimalariamittel Artemether genannt, das auf der Grundlage des aus der Pflanze *Artemisia annua* stammenden Wirkstoffs Artemisinin entwickelt werden konnte<sup>[13,14,15]</sup>.
- Von den 20 Substanzen, mit denen weltweit der größte Umsatz erzielt wird, sind 8 Naturstoffe<sup>[16]</sup>.



Vor allem die Erfolge im Bereich der Krebsbekämpfung wie - zum Beispiel durch den Topoisomerasehemmer Vincristin (**12**) oder durch den auf die Microtubuli einwirkenden Arzneistoff Taxol (**14**) (s.u.), aber auch schon die Entdeckung des Penicillins<sup>[17]</sup> (**13**) durch Fleming im Jahre 1929 - haben zu einer Rückbesinnung auf die Natur als Quelle medizinisch wirksamer Stoffe geführt.

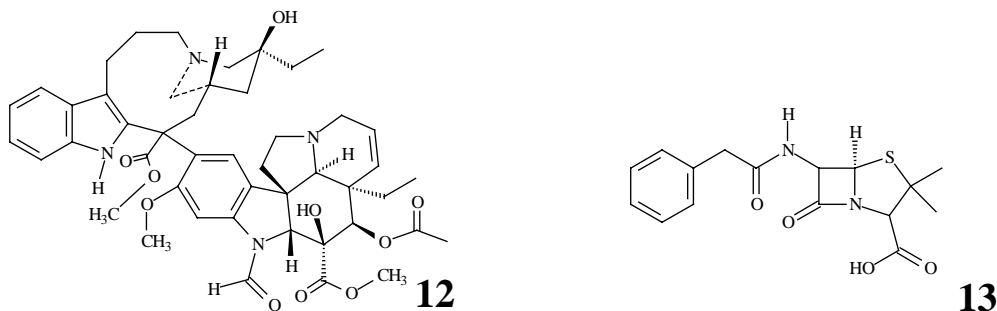


Abbildung 5. 12: Vincristin, 13: Penicillin G

Wie notwendig auch weiterhin die Suche nach neuen Wirksubstanzen ist, zeigt die zunehmende Resistenzentwicklung human-pathogener Keime oder die Verbreitung neuer Krankheiten (z.B. Aids). Aber auch von den bereits beschriebenen Krankheiten ist bisher nur ein kleiner Teil ursächlich therapierbar.

Besonders die Fülle an neuen außergewöhnlichen Strukturprinzipien, die immer wieder in der belebten Welt gefunden wurden, die aber durch einfaches Kombinieren bekannter Strukturmerkmale kaum zu erhalten ist, rechtfertigt deshalb eine verstärkte Suche in allen Bereichen der Natur. Als Beispiel für eine erfolgreiche Suche sei Paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) genannt, ein in den neunziger Jahren in die Krebstherapie eingeführtes Mittel<sup>[18,19]</sup>. Paclitaxel (**14**) besitzt eine so außergewöhnliche Struktur, daß bezweifelt werden kann, daß diese Verbindung jemals zufällig in einem Labor für kombinatorische oder organische Chemie synthetisiert worden wäre<sup>[20]</sup>.

Ein weiteres, sehr aktuelles Beispiel für ein erst kürzlich in die Therapie eingeführtes Medikament ist Galantamin (**15**). Es handelt sich dabei um ein ursprünglich aus *Galanthus nivalis*, dem kaukasischen Schneeglöckchen, isoliertes Alkaloid. Die Substanz wird seit Ende 2000 in der Alzheimer-Therapie eingesetzt. Sie wirkt einerseits als Acetylcholin-Esterasehemmer, andererseits aber auch als allosterischer Modulator am nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor. Durch diese Wirkungsweisen wird die Signalweiterleitung verbessert, was das Absterben der Hirnzellen verzögert<sup>[21,22,23]</sup>.

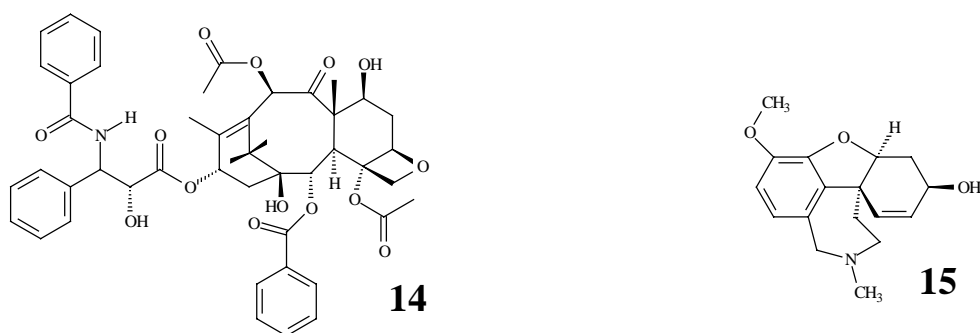


Abbildung 6. 14: Paclitaxel (Taxol®), 15: Galantamin

Von den geschätzten 400.000 Pflanzenarten wurde bis jetzt nur ein sehr kleiner Teil auf ihre Inhaltsstoffe untersucht<sup>[24]</sup>, und selbst in den bereits untersuchten Pflanzen lassen sich, wie die Erfahrung zeigt, viele weitere interessante Verbindungen isolieren. Durch das HT-Screening besteht die Möglichkeit, eine große Anzahl von Substanzen auf ihre Wirksamkeit zu testen. Andererseits hält die Natur eine Fülle von zu testenden Substanzen bereit, die über eine lange Zeitspanne optimiert und in ihrer Wirksamkeit auf tierische Organismen ausgerichtet sind. Deshalb scheint es sehr wahrscheinlich, daß auch in Zukunft viele medizinisch wirksame Substanzen in Pflanzen gefunden werden<sup>[25,26]</sup>.

Da die Suche nach neuen interessanten Verbindungen in den letzten Jahren auf Regionen der Erde ausgedehnt wurde, die nur schwer zugänglich sind, muß immer damit gerechnet werden, daß viele der entdeckten Pflanzen kaum in großen Mengen an diesen Standorten entnommen werden können. Andererseits ist anzunehmen, daß ein Teil der neu entdeckten, pharmazeutisch interessanten Strukturen, in Pflanzen vorkommen, welche nur mit sehr großem Aufwand kultivierbar sind, oder diese Inhaltsstoffe nur schwer synthetisierbar sein werden. Deshalb kann es in diesen Fällen sinnvoll sein, von solchen Pflanzen Zellkulturen anzulegen, um mit ihnen die neu entdeckten Inhaltsstoffe in ausreichenden Mengen und billiger zu produzieren<sup>[27,28,29]</sup>.

## 2 Bedeutung von Pflanzenzellkulturen

Schon zu Beginn dieses Jahrhunderts führte Haberlandt erste Versuche mit isolierten Pflanzenzellen durch, wobei noch keine Zellteilungen beobachtet werden konnten<sup>[30]</sup>. Erst 30 Jahre später gelang es, lebensfähige Kulturen aus Wurzeln von *Lycopersion esculentum* und Knollen von *Daucus corata* anzulegen<sup>[31,32]</sup>.

Von diesen Erfolgen ermutigt wurden vermehrt Anstrengungen unternommen, die Kultivierungsbedingungen zu verbessern<sup>[33,34]</sup>. Da die Kultivierung von Mikroorganismen bereits erfolgreich durchgeführt werden konnte, orientierte man sich zunächst stark an den hier gesammelten Erfahrungen. Pflanzenzellen sind aber durch ihre Größe und die relativ dünnen und unflexiblen Zellwände sehr viel empfindlicher gegen Scherkräfte als Mikroorganismen. Auch in den Wachstumsraten unterscheiden sie sich erheblich von denen der Mikroorganismen. Während sich letztere im Zeitrahmen von Minuten bis Stunden verdoppeln, liegen die Zeitspannen bei Pflanzenzellkulturen im allgemeinen im Bereich von Tagen. Ein weiterer Unterschied ergibt sich durch die Speicherung der gebildeten Substanzen. Während Mikroorganismen diese in die Nährlösung abgeben, werden sie von Pflanzen und den daraus abgeleiteten Zellkulturen meist in ihren Zellvakuolen eingelagert, was eine Isolierung und Reinigung erschwert.

Inzwischen wurde eine Fülle von Vorschriften für die Kultivierung von Pflanzenzellkulturen veröffentlicht und Nährmedien entwickelt, die zum Teil als Fertigmischungen bezogen werden können.

Pflanzenzellkulturen bestehen aus völlig entdifferenzierten Zellen. Diese Entdifferenzierung wird durch Zugabe von Phytohormonen zum Nährmedium erreicht. Verändert man die Gaben dieser Phytohormone, gelingt es in den meisten Fällen, die differenzierte Pflanze aus der Zellkultur wieder zu regenerieren. Wegen dieser Totipotenz der Zellen könnte man theoretisch erwarten, daß jede Zelllinie die gesamte Bandbreite der Inhaltsstoffe der differenzierten Pflanze produziert. In der Realität sieht das anders aus, da nicht alle Gene, die in der Pflanze expremiert werden, auch in den Zelllinien translatiert werden.

Gewöhnlich bilden Zellkulturen, wenn überhaupt (s.o.), geringere Mengen an Sekundärmetaboliten mit anderer Zusammensetzung als die differenzierte Pflanze<sup>[35]</sup>.

Durch Variation der Wachstumsbedingungen können aber auch höhere Ausbeuten erzielt werden.

Tabelle 1 zeigt einige Beispiele für Substanzen, die aus Zellkulturen in höheren Ausbeuten als in den Pflanzen gewonnen werden können.

**Tabelle 1. Beispiele für Zellkulturen, die Sekundärmetabolite in höherer Menge bilden als die differenzierte Pflanze.**

Pflanze	Produkt	Ausbeute (% TG)		Literatur
		Zellkultur	Pflanze	
<i>Coptis japonica</i>	Berberin	10	2 - 4	[36]
<i>Coleus blumeii</i>	Rosmarinsäure	15	3	[37]
<i>Nicotiana tabacum</i>	Ubichinon-10	0.036	0.0003	[38]

Eine Substanz, die nicht in ausreichender Menge aus natürlichen Ressourcen gewonnen werden kann, ist das bereits erwähnte Paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) (**14**). Diese Substanz wurde in der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) entdeckt<sup>[20]</sup> und ist inzwischen in die Tumortherapie eingeführt<sup>[39]</sup>. Die Verbindung kommt vor allem in der Rinde, aber auch dort nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Da bei der Entfernung der Rinde der Baum irreversibel geschädigt wird und die pazifische Eibe sehr langsam wächst, lässt sich die Nachfrage nach Paclitaxel nicht aus den natürlichen Ressourcen decken. Andererseits ist die aufwendige chemische Totalsynthese zwar gelungen, aber mit einer Ausbeute von weniger als einem Prozent keine Alternative zur Gewinnung aus biologischem Material<sup>[40,41]</sup>.

Zur Zeit gewinnt man deshalb aus den Nadeln der europäischen Eibenart *Taxus baccata* eine Vorstufe des Paclitaxel, das 10-Deacetyl-baccatin III, in ausreichender Menge und synthetisiert daraus in zufriedenstellenden Ausbeuten das benötigte Taxol<sup>[42]</sup>.

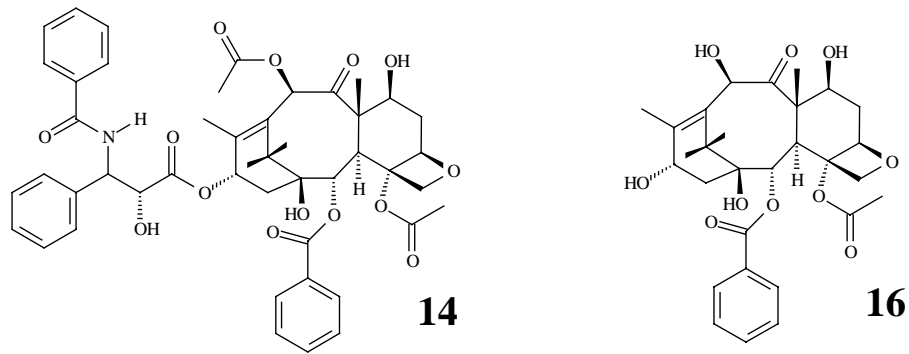


Abbildung 7. 14: Paclitaxel (Taxol®), 16: 10-Deacetyl-baccatin III

Eine Alternative zu dieser partialsynthetischen Gewinnung stellen Zellkulturen dar. Es gelang eine Zellkultur *Taxus media* durch Hybridisierung von *Taxus baccata* und *Taxus cuspidata* zu erzeugen, die die gesuchte Substanz in Ausbeuten von 150 mg/l innerhalb von zwei Wochen produziert.<sup>[43]</sup> Die gesamte benötigte Menge an Taxol für Korea und Australien wird ausschließlich mit Hilfe von diesen Zellkulturen gewonnen.

Wie schon erwähnt, produzieren Zellkulturen unter normalen Bedingungen - das heißt ohne Zusatz von speziellen Substanzen oder ohne besonderen chemischen oder physikalischen Streß - häufig nicht die für die Pflanze typischen Verbindungen. Oft bilden aber nach Variation des Phytohormonverhältnisses von Auxin zu Cytokinin, nach Zugabe von Elizitoren oder unter Einfluß anderer verschiedene Streßfaktoren die Zellkulturen die gesuchten Substanzen. Dabei muß die ideale Medienzusammensetzung für jede Pflanze speziell ermittelt werden, was bei der Fülle von Variationsmöglichkeiten einen enormen Aufwand bedeuten kann. Zellkulturen sind somit zum Teil geeignet, Substanzen zu gewinnen, die aus intakten Pflanzen nicht ausreichend oder nur mit zu großem Aufwand isoliert werden können.

Wie bereits oben erwähnt, gibt es bei Zellkulturen nicht nur das Fehlen, sondern auch das Auftreten anderer, von denen der Pflanze abweichende Biosynthesewege, weshalb bei der Erforschung des Inhaltsstoffspektrums dieser Kulturen auch mit anderen, zum Teil auch bis dahin unbekanntem Substanzen gerechnet werden muß. Bis 1999 wurden 322 Substanzen aus Pflanzenzellkulturen isoliert, die bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt waren. Einige von diesen Stoffen konnten allerdings nach ihrer Entdeckung auch in Pflanzen nachgewiesen werden<sup>[44]</sup>.

Da Zellen aus Pflanzenzellkulturen die gleiche genetische Ausstattung wie die entsprechenden Pflanzen besitzen, wird die Fülle an Verbindungsklassen, die in Zellkulturen isoliert werden kann, ähnlich hoch sein wie im Pflanzenreich.

Die Ursachen für die Unterschiede der Sekundärstoffwechsel zwischen intakten Pflanzen und deren Zellkulturen könnten in folgenden Überlegungen eine Erklärung finden:

Möglicherweise werden in Zellkulturen Substrate von Enzymen umgesetzt, die in den Pflanzen gar nicht aufeinandertreffen. Dies kann zum einen daran liegen, daß da sie in den intakten Pflanzen durch eine Kompartimentierung der Zellen, welche in Zellkulturen nicht entwickelt ist, voneinander getrennt sind. Andererseits kann es sein, daß das Enzym unter natürlichen Bedingungen nur in den Pflanzenteilen expremiert wird, in denen dieses Substrat nicht vorkommt.

Auch der Ausfall eines Gens in einer Zelllinie kann zu neuen oder zumindest erstmals detektierbaren Substanzen führen. Durch die unterbleibende Exprimierung des zugehörigen Enzyms kommt es zu einer Anreicherung eines Zwischenprodukts, das dann über Nebenzweige des Biosyntheseweges in so großem Maße umgesetzt werden kann, daß Verbindungen in ausreichenden Mengen entstehen, daß sie aus der Zellkultur im Gegensatz zur Pflanze in den für die Strukturaufklärung benötigten Mengen isoliert werden können.

### 3 Zielsetzung

Pflanzenzellkulturen stehen bereits seit einigen Jahrzehnten im Blickpunkt des Forschungsinteresses. Einerseits lassen sich mit ihnen die Biosynthesewege der zugehörigen Pflanze leichter untersuchen, andererseits können Metabolisierungsreaktionen, die diese Kulturen durchführen können, genutzt werden.

Bei der Untersuchung der Zellkulturen wurde festgestellt, daß sich viele Kulturen bzgl. ihres Inhaltsstoffspektrums von den differenzierten Pflanzen unterscheiden.

Diese Erfahrungen legen die Vermutung nahe, daß auch Pflanzenzellkulturen pharmakologisch wirksame Substanzen enthalten, die über das High-Throughput-Screening identifiziert werden könnten. Somit würden diese Kulturen eine weitere Quelle bei der Suche nach neuen Arzneistoffen darstellen.

Um für das HT-Screening eine große Zahl solcher potentiellen Verbindungen zu erhalten, muß eine große Zahl von Zellkulturen untersucht werden. Während bei der Etablierung einer einzigen Zellkultur die Reduzierung des Arbeitsaufwandes keine entscheidende Rolle spielt, ist dies bei der Erzeugung einer Vielzahl von Kulturen von entscheidender Bedeutung; vor allem unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten muß das Identifizieren neuer pharmakologisch wirksamer Substanzen in Zellkulturen konkurrenzfähig zu dem in differenzierten Pflanzen sein.

Im ersten Teil der Arbeit verfolgte aus diesem Grund das Ziel, aus zufällig ausgewählten Pflanzen möglichst viele Zellkulturen anzulegen und Variationen von bereits etablierten Verfahren zu entwickeln, mit denen sich der dafür notwendige Arbeitsaufwand reduzieren läßt.

In einem zweiten Teil sollten dann die Inhaltsstoffe einer Reihe ausgewählter etablierter Kulturen isoliert werden. Nach Aufklärung der Struktur dieser Substanzen sollten sich durch den Vergleich dieser Inhaltsstoffe mit denen der differenzierten Pflanzen Aussagen machen lassen, ob ein intensiviertes Naturstoffscreening auf der Basis von Pflanzenzellkulturen eine Alternative bzw. Ergänzung zur Untersuchung natürlicher Organismen sein kann.

## II MATERIAL

### 1 Geräte

#### 1.1 Geräte, benutzt am Institut für Pharmazie in Mainz

Methode	Gerät
Autoklaven	Autoklav TEC 120, <i>Federagi Autoklavi SPA</i> (Albuzzano Italien)
Gefriertrocknung	Gefriertrocknungsanlage Alpha I-6, <i>Christ</i> (Osterode)
HPLC	Merck Hitachi-System (Darmstadt) Pumpe L 6200 Autosampler AS 2000 UV/VIS-Detektor L4250 Integrator D 2500
Steril-Arbeitsplätze	Laminar-Flow-Box, <i>Fröbel</i> NU 440-400 E, <i>Zapf</i> (Sarstedt)
Massenspektrometer	El-Bedingungen (70 eV) MAT 44S Gerät, <i>Finnigan</i> (Bremen)
NMR	AM 400, AC 300, <i>Bruker</i> (Karlsruhe)
pH-Messung	pH-Meter 761Calmatic, <i>Bacherhofer</i> (Reutlingen)
Schüttler (für Suspensionskulturen)	Pilot Shake RC SR, <i>Braun</i> (Melsungen)
Seralwasser	Seralpur PRO 90 CN, <i>Seral</i> (Ransbach-Baumbach)
Zentrifugen	Avanti J-25 mit Rotor JA 10, <i>Beckman</i> (München)  Biofuge 15 mit Rotor für 2 ml Reaktionsgefäße, <i>Heraeus</i> (Osterode)



## 1.2 Geräte der Firma AnalytiCon AG/AnalytiCon Discovery

Methode	Gerät
HPLC (analytisch)	Untersuchung der Rohextrakte: Merck Hitachi-System (Darmstadt) Pumpe: L 6250 Intelligent Pump Autosampler: L 4000 A Dioden-Array-Detektor: L4500 DAD Interface: D 6000 Lichtstreuendetektor: Sedex 75 , <i>Sedere France</i> (Alforteville)
HPLC (semipräparativ)	Trennung der Extrakte: Pumpe: L 6250 Intelligent Pump, <i>Merck Hitachi</i> (Darmstadt) Lichtstreuendetektor: Sedex 75 , <i>Sedere France</i> (Alforteville) Interface: D 6000 Fraktionskollektor: L 7650, <i>Merck</i> (Darmstadt) Auftragssäule: $\varnothing$ 1,6 cm $\times$ 1 cm, <i>Hartmann</i> (Berlin)
HPLC (Kurzgradient)	Überprüfung der Reinheit der Fraktionen Merck Hitachi-System (Darmstadt): Pumpe: L 6250 Intelligent Pump Autosampler: L 7500 Programable AS Lichtstreuendetektor: Sedex 75 , <i>Sedere France</i> (Alforteville) Interface: D 6000
NMR	<i>Bruker</i> (Karlsruhe): NMR-Meßgerät: DPX 400 Probensammler: B-ACS 120
Evaporator	TurboVap LV Evaporator, <i>Zymark</i> (München)
Bi-Dest-Wasser	Super-Q <sup>TM</sup> -Anlage, <i>Millipore</i> (Eschborn)

LC-MS	<p>LC-Teil:  Perkin-Elmer-System (Langen):  Pumpe: series 200 micro Hochdruck-gradientenpumpe (2×)  Autosampler: series 200 Autosampler  Detektoren:  Lichtstreuendetektor: Sedex 55, <i>Sedere France</i> (Alforteville)  UV-Detektor (254 nm): L 4000 <i>Merck-Hitachi</i> (Darmstadt)</p> <p>MS-Teil:  PE SCIEX API 165, <i>Perkin-Elmer</i> (Langen)  Quelle: Turbo IONSPRAY</p> <p>Interface: PE Nelson 900 series, <i>Perkin-Elmer</i> (Langen)  Software: MassChrom 1.1.1, <i>Perkin-Elmer</i> (Langen)</p>
-------	--

## 2 Chemikalien und Materialien

Alle verwendeten Chemikalien und Materialien, die nicht im folgenden gesondert aufgeführt werden, stammen aus den gängigen Bezugsquellen.

### 2.1 Chemikalien und Materialien, verwendet im Institut für Pharmazie in Mainz

Lieferant/Hersteller	Produkt
Aldrich (Steinheim)	CD <sub>3</sub> OD
Colgate-Palmolive GmbH (Hamburg)	Dan Klorix <sup>®</sup> Hygienereiniger
Deutero (Kastellaun)	NMR-Röhrchen (5 mm)
Fluka (CH/Buchs)	1-Naphthylelessigsäure N <sup>6</sup> -Benzyladenin L(+)-Natriumascorbat Calcium-D-panthotenat Titriplex (EDTA)

Merck (Darmstadt)	Acetonitril gradient grade Trennsäule: LiChrosper® 60 RP select B (5 µm), 250 × 4 mm und Vorsäule (gleiches Material) 4 × 4 mm Agar 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure D(+)-Biotin Indol-3-essigsäure Pyridoxolhydrochlorid Thiaminchlorid-hydrochlorid Folsäure
Nerbe plus (Winsen/Luhe)	Petrischalen ohne Entlüftungsnocken PS, 55 × 16 mm
Serva (Heidelberg)	Albumin
Sigma	Tryptamin Kinetin p-Chlorphenoxyessigsäure Myo-Inositol

## 2.2 Chemikalien und Materialien, verwendet bei der Firma AnalytiCon AG/AnalytiCon Discovery

Lieferant/Hersteller	Produkt
Merck (Darmstadt)	Methanol gradient grade  HPLC-Säule (analytisch, Langgradient): LiChrosper® 60 RP select B (5 µm), 250 × 4 mm und Vorsäule (gleiches Material) 4 × 4 mm  HPLC-Säule (semipräparativ): LiChrosper® 60 RP select B (5 µm), 250 × 16 mm und Vorsäule (gleiches Material) 30 × 16 mm  Trifluoressigsäure
Macherey-Nagel (Düren)	RP-Material: Polygoprep 300 - 50 C4
Phenomenex (Aschaffenburg)	HPLC-Säule (analytisch, Kurzgradient): Luna C8 (5 µm), 50 × 4.6 mm

### **3 Pflanzen**

Das für das Anlegen der Pflanzenzellkulturen verwendeten Pflanzenmaterial stammte aus Gärtnereien, aus dem Botanischen Garten der Universität Mainz, aus Gärten und aus der Natur (Wegränder, Wiesen etc.).

### **III   METHODEN**

#### **1     Anlegen von Pflanzenzellkulturen**

Sämtliche Arbeitsschritte der Herstellung von Pflanzenzellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Box durchgeführt. Die eingesetzten Materialien wurden, sofern notwendig, vor ihrer Verwendung autoklaviert.

##### **1.1   Anlegen von Kalluskulturen**

Der erste Schritt der Zellkulturerstellung stellte in jedem Fall das Anlegen von Kalluskulturen dar.

###### **1.1.1   Mechanische Vorbereitung des Pflanzenmaterials**

Für das Generieren von Kalluskulturen wurde Material von verschiedenen Teilen der Pflanzen verwendet. Je nach Art des eingesetzten Materials variierte die weitere Vorgehensweise. Zunächst wurde das Material gründlich unter fließendem Wasser gewaschen und anschließend durch Aufbringen auf Küchentücher abgetrocknet.

Dienten Blätter oder Blütenblätter als Ausgangsmaterial, wurden diese, falls sie größer als 2 cm<sup>2</sup> waren, in 1 – 2 cm<sup>2</sup> große Teile zerschnitten und - wie auch die kleineren Blätter ( $\leq 2$  cm<sup>2</sup>) - mit einem Skalpell im Abstand von 1 – 3 mm eingeritzt.

Handelte es sich bei dem Pflanzenmaterial um Wurzeln oder Stengel, so wurden diese in 2 – 3 cm lange Stücke zerteilt und alle 3 – 5 mm quer zur Stengel bzw. Wurzelrichtung bis zur Achsenmitte eingeschnitten.

Bei der Verwendung von Nadeln wurden diese erst nach der Sterilisierung (siehe 1.1.2) vorsichtig mit einem keimfreien Skalpell angeritzt.

Zwiebeln und Knollen wurden in flache 1 – 2 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und auf die gleiche Art wie die Blätter eingeritzt.

Beim Einsatz von Samen als Material gab es zwei verschiedene Möglichkeiten der Bearbeitung. Entweder wurden sie bis zur Mitte angeschnitten, oder die sterilisierten

intakten Samen (siehe 1.1.2) keimten unter sterilen Bedingungen. Das durch den Keimungsprozeß erhaltene Pflanzenmaterial wurde entsprechend seiner Morphologie bearbeitet (zerteilen und einschneiden) und ohne Sterilisierung auf mit Medium gefüllte Petrischalen gelegt.

Sämtliches mechanisch vorbereitetes Pflanzenmaterial wurde anschließend in autoklaviertes Wasser gegeben, um es bis zur weiteren Bearbeitung vor Austrocknung zu schützen.

### **1.1.2 Sterilisation der vorbereiteten Pflanzenteile**

Das Pflanzenmaterial für die Erzeugung von Kalluskulturen stammte fast ausnahmslos von Pflanzen, die nicht unter keimfreien Bedingungen gewachsen waren. Um Infektionen der sich entwickelnden Kalluskulturen zu vermeiden, mußten deshalb die anhaftenden Bakterien und/oder Pilze mit geeigneten Verfahren abgetötet werden.

Dazu wurden die Pflanzenteile 5 – 60 s in 70 %ige Ethanollösung gegeben und mit einer keimfreien Pinzette in ein Gefäß mit autoklaviertem Wasser überführt. Nach ca. 2 Minuten wurden die Stücke erneut mit der Pinzette für 5 – 60 s in 20 %ige Dan-Klorix-Lösung und danach wieder in steriles Wasser gegeben. Dort verblieb das Pflanzenmaterial bis zur Weiterverarbeitung mindestens 2 Minuten.

Da das Pflanzenmaterial durch die Sterilisationsmittel geschädigt und bei zu langer Einwirkungszeit das gesamte teilungsfähige Gewebe irreversibel zerstört wird, ist es wichtig, die Sterilisationslösungen nicht zu lange einwirken zu lassen. Eine Kalluskultur kann aber nur dann erfolgreich angelegt werden, wenn keine Infektion vorliegt. Deshalb war es entscheidend, das *Zeitfenster* für die Dauer der Sterilisierung zu finden, in dem alle Keime abgetötet wurden, aber ausreichend teilungsfähige Pflanzenzellen verblieben. Diese *Zeitfenster* waren von Pflanzenart zu Pflanzenart sehr verschieden, da sie von der Beschaffenheit des Pflanzenmaterials abhingen. Prognosen über die benötigte Sterilisationsdauer waren nur eingeschränkt möglich, so daß für jedes Material die Sterilisationszeiten zwischen 5 - 60 s variiert wurden. Um dies auf einfachem Wege zu erreichen, wurde das gesamte Versuchsmaterial auf einmal in die Sterilisationlösung gegeben und aus dieser im Verlauf von 60 s sukzessive entnommen. Bei dieser Methode mußte immer damit gerechnet werden, daß ein Teil des Materials nicht vollständig sterilisiert und ein anderer irreversibel zerstört wurde. Sofern genügend Pflanzenmaterial

zur Verfügung stand, wurden 100 – 150 Schalen pro Pflanze angelegt. Damit sollte gewährleistet werden, daß nach Aussortierung der Petrischalen, die infiziertes oder zerstörtes Pflanzenmaterial enthielten, eine ausreichende Anzahl für die Kallusentwicklung übrig geblieben waren.

### 1.1.3 Herstellung der Schälchen und Auflegen des Pflanzenmaterials

Um von möglichst vielen Pflanzen Kallus zu erhalten, wurde von jeder Pflanze Material auf eine Reihe verschiedener Nährmedien aufgelegt.

Tabelle 2 zeigt eine Liste der verwendeten Medien.

**Tabelle 2. Liste der für die Kalluserzeugung verwendeten Medien**

Die Medien 4X<sub>1</sub> - 4X<sub>4</sub> sind Abwandlungen des Mediums 4X durch veränderte Phytohormonzusammensetzung.

<b>Medium</b>	<b>Entwickler</b>	<b>Literatur</b>
<b>LS</b>	E.M. LINSMAIER, F. SKOOG	[34]
<b>MS</b>	T. MURASHIGE, F. SKOOG	[45]
<b>X</b>	O.L. GAMBORG, R.A. MILLER, K. OJIMA	[46]
<b>P</b>	O.L. GAMBORG, R.A. MILLER, K. OJIMA	[46]
<b>B5</b>	O.L. GAMBORG, R.A. MILLER, K. OJIMA	[46]
<b>O</b>	O.L. GAMBORG, R.A. MILLER, K. OJIMA	[46]
<b>MSH</b>	T. MURASHIGE, F. SKOOG	[45]
<b>4X</b>	O.L. GAMBORG, R.A. MILLER, K. OJIMA	[46]
<b>4X<sub>1</sub></b>	Variation von 4X	
<b>4X<sub>2</sub></b>	Variation von 4X	
<b>4X<sub>3</sub></b>	Variation von 4X	
<b>4X<sub>4</sub></b>	Variation von 4X	

Zur Herstellung der Kallusmedien wurden die entsprechenden Flüssigmedien mit Agar (8 g/l) versetzt und in einem mit einem Schaumstoffstopfen verschlossenen Erlenmeyerkolben autoklaviert. War das Medium auf 60 °C abgekühlt, wurde es unter sterilen Bedingungen (Lamina-Flow-Box) in sterile Petrischalen (50 × 16 mm) ca. 5 – 10 mm hoch eingefüllt.

Die nach 1.1.1 und 1.1.2 vorbereiteten Pflanzenstücke wurden mit der Pinzette aus der Aufbewahrungslösung entnommen und zur Entfernung überschüssigen Wassers auf steriles Filterpapier gelegt. Anschließend wurden die Pflanzenteile auf das erkaltete Agar-Medium gebracht und leicht angedrückt.

Für die Entwicklung des Kallus wurden die Schalen unter Lichtausschluß bei 23 – 26 °C gelagert. Alle zwei bis drei Tage wurden diejenigen Schalen aussortiert, deren Versuchsmaterial infiziert oder durch die Sterilisation zerstört war. Nach 10 bis 14 Tagen wurden alle verbliebenen Schalen mit einem Parafilm-Streifen verschlossen, um das Austrocknen des Mediums zu verhindern.

## 1.2 Erhalt und Vermehrung des Kallusgewebes

Die Pflanzenteile, an denen sich Kallus gebildet hatte, wurden nach ca. acht Wochen auf neue Petrischalen übertragen, um die neuen Kalli mit frischem Nährmedium zu versorgen. Normalerweise entwickelten sich mehrere Kalli an einem "Muttergewebe". Sobald sie eine Größe von mehr als 1 cm<sup>3</sup> erreicht hatten, wurden diese vom Pflanzengewebe abgetrennt und erneut in eine frische Petrischale überführt.

Der begrenzte Nährstoffvorrat erfordert nach einiger Zeit die Erneuerung des Nährmediums. Normalerweise ist dies nach etwa vier Wochen erforderlich. Diese Zeitspanne kann sich, je nach Wachstumsgeschwindigkeit des Kallus, verkürzen oder deutlich verlängern. Daß der Nährstoffvorrat des Mediums verbraucht ist, zeigt sich daran, daß der Kallus nur noch langsam oder nicht weiterwächst bzw. sich leicht verfärbt. Spätestens zu diesem Zeitpunkt muß das Medium erneuert werden.

Bei diesem sogenannten Überimpfen wird ein ca. 1 cm<sup>3</sup> großes Stück vom Mutterkallus abgetrennt und in eine neue Petrischale überführt. Hatten sich Kalli zunächst nur auf speziellen Medien entwickelt, konnte im Zuge des Überimpfens der Wechsel auf Standardmedien (LS, MS) versucht werden, was in den meisten Fällen auch gelang.



Innerhalb von 4 Wochen (s.o.) verdoppelte bis verdreifachte sich das Kallusvolumen, und es mußte erneut überimpft werden.

### **1.3 Erstellung, Erhalt und Vermehrung von Suspensionskulturen**

War durch die aufeinanderfolgenden Vermehrungszyklen der Kalluskultur ausreichend Zellmaterial vorhanden (mindestens 30 Schälchen), konnte eine Suspensionskultur angelegt werden. Zu diesem Zweck wurde jeweils der Kallus von 3 bis 5 Petrischalen in kleine Stücke zerschnitten und in 30 ml autoklaviertes Flüssigmedium gegeben (100 ml Erlenmeyerkolben). Der Ansatz wurde mit einem Schaumstoff-Stopfen steril, aber luftdurchlässig verschlossen und bei  $25 \pm 2$  °C, 600 Lux und 100 U/min geschüttelt. Etablierte sich ein stabiles Wachstum, konnte nach ca. 7 - 14 Tagen unter Verdoppelung des Volumens in einen größeren Kolben überimpft werden. Um den Arbeitsaufwand möglichst gering zu halten, wurde als Medium für Suspensionskulturen ausschließlich LS-Medium verwendet.

Für den Erhalt und die Gewinnung von Pflanzenzellkulturmaterial wurden 300 und 1000 ml-Erlenmeyerkolben verwendet. Diese wurden mit 80 bzw. 250 ml Medium befüllt, mit Schaumstoffstopfen verschlossen und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden sowohl die frischen als auch die Suspensionskultur enthaltenen Kolben zur Vermeidung von Infektionen mit 70 %-iger Isopropanollösung eingesprüht und die frischen Kolben auf 150 ml bzw 400 ml mit der 7 Tage alten Pflanzenzellkultursuspension aufgefüllt. Die Kultivierungsbedingungen blieben gleich, und das Material konnte durch das Überimpfen verdoppelt werden.

## **2 Gewinnung von Pflanzenzellkulturextrakten**

Im Verlauf dieser Arbeit wurden vor allem Suspensionskulturen auf ihr Inhaltsstoffspektrum untersucht, weil diese ca. viermal schneller wachsen als Kalluskulturen und sich zusätzlich durch geringeren Arbeitsaufwands pro erhaltene Zellmenge auszeichnen. Aber auch von Kallusgewebe wurden Extrakte erstellt, aus denen aber keine Inhaltsstoffe isoliert wurden. Statt dessen wurden von diesen Extrakten

---

Chromatogramme am LC-MS und an der HPLC aufgezeichnet und mit denen der Suspensionskulturen verglichen.

## **2.1 Erstellung von Rohextrakten**

Die Herstellung der Extrakte aus Suspensionskulturen und aus Kallus ist bis auf den ersten Schritt identisch. Deshalb wird im folgenden das Verfahren für beide Kulturarten gemeinsam dargestellt.

Vor der Extrakterstellung wurden die benötigten Zellmengen durch Vermehrung der Kulturen, wie unter 1.1.3 beschrieben, hergestellt.

Im Falle von Kalluskulturen wurden zunächst die Kalli sorgfältig von den Agar-Medien getrennt. Handelte es sich um Suspensionskulturen, ließ sich mit Hilfe eines Büchnertrichters das Medium über Papierfilter abtrennen und die Zellen mit etwas Wasser nachwaschen.

Im zweiten Schritt wurde das Zellmaterial mit flüssigem Stickstoff eingefroren, gefriergetrocknet, das Gewicht bestimmt und die Zellen falls nötig gemörsert. Die getrockneten Zellkulturen wurden in drei Schritten mit Lösungsmitteln steigender Polarität extrahiert. Das erste Solvens, Petrolether, löst vor allem Lipide. Darauf folgte eine Extraktion mit einem Ether-Methanol-Gemisch im Verhältnis 1:1 und dann eine mit reinem Methanol. Diese beiden Extrakte wurden vereinigt.

Um die Extraktion möglichst vollständig und mit geringem Arbeitsaufwand zu erreichen, wurden alle Extraktionsschritte in Erlenmeyerkolben durchgeführt und die Zellkultur-Solvens-Mischung mindestens 6 Stunden auf Schüttlern suspendiert. Anschließend wurde über Faltenfilter abfiltriert und mit dem jeweilige Lösungsmittel nachgewaschen.

Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt. Um eine gute Resolvatisierbarkeit zu erzielen, wurde im Falle des methanolischen Extrakts bis kurz vor dem Ausfallen der gelösten Substanzen das zehnfache Volumen Wasser zugegeben, die erhaltene Lösung eingefroren, gefriergetrocknet und das Extraktgewicht bestimmt.

## 2.2 Erstellung von zuckerfreien Extrakten

Die nach 2.1 erhaltenen methanolischen Rohextrakte bestehen zu einem Großteil aus der im Medium gelösten und von den Zellen aufgenommenen Saccharose sowie ihren Bausteinen Fructose und Glucose. Da dieser Anteil die Isolierung von Inhaltsstoffen erschwert, mußte der Zucker unter Verwendung eines XAD-Materials abgetrennt werden. Bei dem XAD-Material handelt es sich um ein hydrophobes Harz, an dem sich Stoffe, die eine geringere Polarität als Zucker besitzen, aus wäßrigen Phasen adsorbieren und mit Methanol wieder eluieren lassen.

Für die Aufarbeitung von Extraktmengen unter 1.0 g wurden Säulen mit einem Durchmesser von 1 cm und einer Packungshöhe von 5 cm (entspricht einem Säulenvolumen von 4 ml) verwendet.

Mußten Rohextrakte von bis zu 20 g von Zucker befreit werden, fand eine Säule mit einem Säulendurchmesser von 5 cm und einer Packungshöhe von 50 cm (entspricht einem Säulenvolumen von 980 ml) Verwendung.

Zunächst wurden die Rohextrakte in Wasser (100 – 1000 ml) unter einstündigem Rühren suspendiert, der unlösliche Rückstand eine halbe Stunde bei  $10000 \times g$  sedimentiert, erneut in Wasser (20 - 200 ml) eine Stunde suspendiert und anschließend abermals zentrifugiert. Die wäßrigen Phasen wurden vereinigt und die ungelösten Rückstände gefriergetrocknet.

Die wäßrige Phase wurde über die XAD-Säule gegeben, mit Wasser nachgewaschen und die gebundenen Substanzen mit Methanol eluiert. Es wurde mit einer Flußrate von ca. 2 ml/min bei Verwendung einer kleinen Säule und von ca. 20 ml/min bei Verwendung einer großen Säule gearbeitet (s.o.).

Das Methanol wurde am Rotationsverdampfer abgedampft, Wasser zugegeben, die Lösung eingefroren und gefriergetrocknet.

Sowohl von den ungelösten Rückständen als auch von den von XAD eluierten Extrakten wurde das Gewicht bestimmt.

## 3 Isolierung von Reinsubstanzen aus Pflanzenzellkulturextrakten

Bei den unter 2.2 beschriebenen Extrakten handelt es sich um eine Mischung vieler verschiedener Substanzen. Deshalb mußten diese Gemische getrennt werden, bevor die einzelnen Bestandteile identifiziert werden konnten.

### 3.1 Isolierung von Reinsubstanzen in der Pharmazie in Mainz

Der Großteil der Arbeiten zur Isolierung von Reinsubstanzen wurde bei der Firma AnalytiCon durchgeführt. Im Institut für Pharmazie in Mainz wurden Substanzen aus den Zellkulturextrakten von *Melissa officinalis* (Zitronenmelisse) und *Taraxacum officinale* (Löwenzahn) isoliert.

#### 3.1.1 Trennung mit Hilfe analytischer HPLC

Für die Trennung mit Hilfe der analytischen HPLC wurde eine Säule genutzt, mit der sich in einer Chromatographie maximal 10 mg Substanzgemisch trennen ließ. Da aber für die anschließende Strukturaufklärung Reinsubstanzmengen von mindestens 4 mg günstig sind, war es nötig 10 - 20 Trennungen durchzuführen und die entsprechenden Fraktionen der einzelnen chromatographischen Läufe zu vereinigen.

Dazu wurden 500 mg des zuckerfreien Extrakts in 1.0 ml Methanol gelöst, zur Sedimentierung ungelöster Bestandteile 15 min bei  $18000 \times g$  in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert und die Lösung in ein HPLC-Probengefäß überführt.

Die Trennungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säule:	LiChrospher® 60 RP select B, 250 × 4 mm, Vorsäule 4 × 4 mm
Detektion:	UV-Absorption bei 225 nm
Flußrate:	1.2 ml/min
Eluenten:	A: Wasser pH 2.3 (Orthophosphorsäure), B: Acetonitril
Injektionsvolumen:	30 µl

Gradient:

<b>Zeit</b> <b>[min]</b>	<b>Eluenten [%]</b>	
	<b>A</b>	<b>B</b>
0	90	10
30	60	40
45	10	90
55	10	90
56	90	10
65	90	10

Die Fraktionierung der chromatographischen Trennungen erfolgte manuell. Hierfür wurde die Absorption am UV-Detektor verfolgt und jeweils das Eluat aufgefangen, wenn der Schreiber einen Peak aufzeichnete. Hierbei konnte genutzt werden, daß die „Totzeit“ zwischen Detektor und Flüssigkeitsaustritt bei der verwendeten Flußrate von 1 ml/min ca. 1 Sekunde beträgt. Diese Verzögerung ergibt sich durch den Schlauchinnendurchmesser von ca 1 mm und einer Schlauchlänge von ca. 100 cm.

Die Fraktionen der einzelnen Trennungen, die identischen Peaks entsprachen, wurden vereinigt. Ein direktes, sofortiges Abdampfen des Lösungsmittels war nicht möglich, da die Orthophosphorsäure dabei aufkonzentriert wurde, was die isolierten Substanzen zerstörte. Deshalb wurde der organische Anteil des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer abgereichert, die nahezu wäßrige Lösung über Festphasenextraktionskartuschen (RP 18, 1 ml) gegeben, mit Wasser nachgespült und die Substanzen mit Methanol eluiert. Schließlich wurde das Lösungsmittel fast bis zur Trockene abgedampft, die zehnfache Menge Wasser zugegeben und die Proben gefriergetrocknet. Die erhaltenen Substanzen wurden direkt für die Strukturaufklärung verwendet.

## **3.2 Isolierungen von Substanzen bei der Firma AnalytiCon**

Die Firma AnalytiCon besitzt hervorragende technische Möglichkeiten für die Trennung von Extrakten. Aus diesem Grund wurden die meisten Arbeiten zur Isolierung von Substanzen aus Pflanzenzellkulturen dort durchgeführt.

### **3.2.1 Probenvorbereitung für die semipräparative HPLC**

Alle Zellkulturextrakte wiesen trotz ihrer guten Löslichkeit in Methanol eine schlechte in Wasser auf. Deshalb war ein Probenauftrag in Form einer konzentrierten methanolischen Lösung nicht möglich, da dies zu einem Ausfällen eines Teils der Substanzen auf der zuvor mit stark wässrig Phase equilibrierten Säule führte.

Um das Ausfallen zu vermeiden, wurden die Extrakte auf RP-Material „aufgezogen“. Bei diesem Verfahren wurde dem Extrakt, der in einer möglichst geringen Menge Methanol vollständig gelöst war, die doppelte Menge RP-Material, bezogen auf die Extraktmenge, zugegeben und das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt.

Im nächsten Schritt wurde eine Auftragssäule ( $\varnothing$  1,6 cm  $\times$  1 cm) mit „beladenem“ RP-Material gefüllt, das einer Menge von 200 mg Extrakt entsprach. Das restliche Volumen wurde mit „unbeladenem“ RP-Material gefüllt und die Auftragssäule verschlossen.

### **3.2.2 Trennung mit Hilfe semipräparativer HPLC**

Bevor die Extrakte an der semipräparativen Anlage getrennt werden konnten, wurden mit Hilfe der analytischen HPLC die optimalen Bedingungen für die Trennungen ermittelt. Mit der Trennsäule der semipräparativen HPLC ließen sich unter diesen Bedingungen pro Chromatographie maximal 200 mg Substanzgemisch trennen. Zum Teil waren die zur Verfügung stehenden Extraktmengen deutlich höher, so daß entsprechend mehr Trennungen durchgeführt wurden. Die Fraktionen mit gleicher Elutionszeit der einzelnen Trennungen wurden vereinigt. Dadurch konnten auch Substanzen in ausreichender Menge isoliert werden, die nur in geringer Konzentration in den Extrakten vorkamen.

Vor dem Start der Chromatographie wurde die Auftragssäule hinter der Pumpe eingebaut und solange mit geringem Fluß (5 ml/min) des Startelutionsmittels die Luft aus der

Auftragssäule entfernt. Dies war erreicht, wenn am hinteren Ende der Auftragssäule Flüssigkeit austrat. Anschließend wurden Auftrags- und Trennsäule miteinander verbunden und das Pumpenprogramm sowie der Fraktionskollektor gestartet. Da bei der semipräparativen Methode - im Gegensatz zur analytischen HPLC - vor allem bei der Mischung reiner Lösungsmittel Mischungseffekte negative Auswirkungen auf das Trennergebnis haben können, wurden für die Trennungen möglichst keine ungemischten Lösungsmittel verwendet. Für die insgesamt 14 verschiedenen Extrakte wurden nur zwei verschiedene Lösungsmittelsysteme genutzt; das Pumpenprogramm (Gradient) war in beiden Fällen gleich. Im Ergebnisteil wird jeweils angegeben, welches System zum Einsatz kam.

Die Trennungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säule:	LiChrospher 60 RP select B, 250 × 16 mm, Vorsäule 30 × 16 mm
Detektion:	Lichtstredetektion
Flußrate:	12 ml/min
Fraktionskollektor:	minutenweise Fraktionierung, Start der Fraktionierung 2 min nach Pumpenstart, 54 Fraktionen

#### **Lösungsmittelsystem 1:**

Eluenten:	A: Wasser (0,05 % Trifluoressigsäure) B: Methanol/Wasser 50:50 (0,05 % Trifluoressigsäure) C: Methanol
-----------	--

#### **Lösungsmittelsystem 2:**

Eluenten:	A: Wasser/Methanol 95:5 (0,05 % Trifluoressigsäure) B: Methanol/Wasser 75:25 (0,05 % Trifluoressigsäure) C: Methanol
-----------	--

Gradient:

Zeit [min]	Eluenten [%]		
	A	B	C
0	100	0	0
50	0	100	0
55	0	0	100
65	0	0	100
66	100	0	0
76	100	0	0

Je nach Gesamtmenge wurden zwischen einer und fünf Trennungen pro Extrakt durchgeführt, wobei die zeitlich entsprechenden Fraktionen direkt vereinigt wurden.

### 3.2.3 Untersuchung der Fraktionen der semipräparativen Trennungen

Bei der semipräparativen Trennung werden die Fraktionen nicht „peakweise“ sondern zeitlich fraktioniert aufgefangen. Deshalb mußte davon ausgegangen werden, daß manche benachbarte Fraktionen die gleiche Substanz enthielten, andere Fraktionen dagegen nur Mischungen. Zur Überprüfung dessen wurden die Fraktionen, für die sich im Chromatogramm des semipräparativen Laufs eine deutliche Absorption zeigte, analytisch mit einer Kurzgradienten-Chromatographie untersucht. Hierfür wurden von jeder Fraktion ca. 300 µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert, aus der der Autosampler die Proben entnehmen konnte.

Je nachdem welches Fließmittelsystem für die semipräparative Trennung verwendet worden war, kamen auch hier entsprechend zwei verschiedene Gradienten zum Einsatz (Gradient 1 und 2 entsprechen den Fließmittelsystemen 1 und 2).



Die Trennungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säule:	Luna C8 (5 µm), 50 × 4.6 mm
Detektion:	Lichtstreuendetektion
Flußrate:	1.0 ml/min
Injektionsvolumen:	10 µl
Elutionsmittel:	A: Wasser (0,05 % Trifluoressigsäure) B: Methanol (0,05 % Trifluoressigsäure)

**Gradient 1:**

Zeit [min]	Eluenten [%]	
	A	B
0	100	0
8	0	60
8.1	100	0
10	100	0

**Gradient 2:**

Zeit [min]	Eluenten [%]	
	A	B
0	100	0
8	0	90
8.1	100	0
10	100	0

Nach Auswertung der Chromatogramme der Untersuchung mit Hilfe des Kurzgradienten wurden die Fraktionen der semipräparativen Trennung entsprechend vereinigt und das Lösungsmittel mit dem TurboVap LV Evaporator entfernt. Das war in diesem Fall direkt möglich, da Trifluoressigsäure im Gegensatz zu Phosphorsäure flüchtig ist.

## 4 Strukturaufklärung

Um Aussagen über die Struktur der aus den Pflanzenzellkulturen gewonnenen Substanzen machen zu können, wurden MS- und NMR-Messungen sowohl im Institut für Pharmazie in Mainz als auch bei der Firma AnalytiCon durchgeführt. Da die MS-Messungen in Mainz wie auch die NMR-Untersuchungen an beiden Orten mit Standardmethoden durchgeführt wurden, wird auf eine Beschreibung verzichtet, und nur das Verfahren der Massenbestimmung mit Hilfe eines LC-MS-Gerätes im folgenden dargestellt.

### 4.1 Molekülmassenbestimmungen mit Hilfe der LC-MS-Technik

Ein LC-MS-Gerät besteht aus zwei Teilen, dem LC-Teil, der einer kompletten HPLC-Anlage entspricht und dem MS-Teil, das aus einem Massenspektrometer besteht.

Die im LC-Teil getrennten Substanzen erreichen nach Abdampfen des Lösungsmittels nacheinander den MS-Teil der Anlage. Die dort verwendete atmosphärische Druckionisation (API = atmospheric pressure ionisation) ist besonders gut zur Ermittlung von Molekülmassen geeignet, da es dabei kaum zu Fragmentierungen kommt. Die Ionisierung wird im allgemeinen durch Anlagerung eines Protons ( $M+1$ ), eines Natriumions ( $M+23$ ), eines Ammoniumions ( $M+18$ ) eines Formations ( $M+45$ ) oder durch Abspaltung eines Protons ( $M-1$ ) erzeugt. Durch permanentes Umschalten der Polarisation lassen sich Anionen und Kationen nebeneinander detektieren. Für jeden Zeitpunkt erhält man deshalb zwei Massenspektren, eines der negativen und eines der positiven Ionisation, mit einem Massenbereich von 150 bis 1500 u. Durch Auswertung des im LC-Teil erhaltenen Chromatogramms läßt sich der Zeitpunkt bestimmen, an dem die Hauptkomponente das MS-Gerät erreicht hat.

#### 4.1.1 Molekülmassenbestimmungen von Reinsubstanzen

Die in 3.2.3 erhaltenen Fraktionen können noch geringe Verunreinigungen enthalten, die bei der MS-Messung zu störenden Fremdsignalen führen. Deshalb ist es sinnvoll für die Molekülmassenbestimmung ein LC-MS-Gerät zu verwenden, das diese Verunreinigungen abzutrennen vermag.

Die Trennungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säule: Luna C8 (5  $\mu$ m), 50  $\times$  4.6 mm  
Detektion: Lichtstreuendetektion, MS  
Flußrate: 2.0 ml/min  
Injektionsvolumen: 20  $\mu$ l  
Elutionsmittel: A: Wasser (5 mM AFP + 0.1 % Ameisensäure)  
B: Acetonitril/Methanol 50:50 (5 mM AFP + 0.1 % HCOOH)

Gradient:

Zeit [min]	Eluenten [%]	
	A	B
0	100	0
7	0	100
9	0	100
9.1	100	0
11	100	0

## **IV ERGEBNISSE**

### **1 Erstellung von Zellkulturen**

Im Zuge dieser Arbeit wurde versucht, Kalluskulturen aus 140 verschiedenen Samenpflanzen anzulegen. Diesen Arten lassen sich 2 Unterabteilungen, 4 Klassen, 9 Unterklassen, 43 Ordnungen und 62 Familien zuordnen.

#### **1.1 Anlegen von Kalluskulturen**

Für das Anlegen der Kalluskulturen wurden - wie im Methodenteil (II.1.1.1) erläutert - verschiedene Pflanzenteile verwendet. In den meisten Fällen wurden Blätter genutzt; Wurzeln, Blüten und Stengel wurden zumeist zusätzlich zu Blättern verwendet. Nur wenn Samen direkt für die Kallusbildung angeschnitten wurden, kamen keine Blätter zum Einsatz.

Am erfolgreichsten war die Kallusbildung an den eingeschnittenen Blättern. Nur selten entwickelte sich Kallus an anderen Pflanzenteile; und wenn, dann war die Zellbildung auch an den ebenfalls verwendeten Blättern zu erkennen. Auf Grund dieser ersten Erfahrungen wurden nur noch Blätter und Samen als Ausgangsmaterial eingesetzt.

Der Kallusbildung am Blatt ging im allgemeinen eine Kräuselung an den Schnittstellen voraus. Meist waren nach spätestens 14 Tagen erste Mikrocalli zu erkennen. Hatte sich auch vier Wochen nach Aufbringen des Pflanzenmaterials auf die Agarschicht keine Zellkultur gebildet, wurde der Versuch abgebrochen, da auch zu einem späteren Zeitpunkt in keinem Fall beginnendes Kalluswachstum beobachtet werden konnte. Bei Verwendung von Pflanzenmaterial mit hoher Zellteilungsrate konnte häufiger Kallusbildung erreicht werden als mit Pflanzenteilen, die nur wenig sich teilende Zellen enthielten.

Das größte Problem bei der Etablierung der Zellkulturen war die Infektion mit Bakterien und Pilzen. Deshalb wurden die Pflanzenteile in zwei Sterilisationsschritten desinfiziert (siehe III.1.1.2). Vorab war das Ausmaß der Verkeimung und die somit benötigte

Sterilisationszeit kaum oder gar nicht abzuschätzen, weshalb die Verweilzeit der Pflanzenteile in den Sterilisationslösungen variiert wurden. Diese Vorgehensweise hatte zur Folge, daß einige Pflanzenteile zu sehr geschädigt wurden und bei anderen die Sterilisation nicht vollständig erreicht wurde. Diese Ausfälle bedeuteten, daß höchstens 10 bis 30 der ursprünglich 50 – 150 Petrischalen übrigblieben. Diese Anzahl reichte im allgemeinen aus, um Kalli zu erhalten. Im Falle einer Kallusentwicklung zeigte sich diese meist bei ca. 20 % der verbliebenen Petrischalen.

Viele der verwendeten Pflanzen waren einerseits so stark infiziert und andererseits so empfindlich gegen die Sterilisationslösungen, daß keine keimfreien Blatteile erhalten wurden, die noch teilungsfähiges Gewebe enthielten. Bei den meisten Pflanzen, bei denen in Tabelle 3 „Abgst./Inf.“ angegeben ist, war das der Grund für fehlende Kallusbildung.

Das Problem des fehlenden „Zeitfensters“ zwischen Infektion und irreversibler Schädigung konnte auf verschiedene Weise umgangen werden. Entweder wurden geringer infizierte oder gegen die Sterilisationsmittel unempfindlichere Pflanzen bzw. Pflanzenteile verwendet. Eine besonders hohe Infektionsrate zeigten Wurzeln, behaarte Blätter und die Pflanzen der sogenannten Krautschicht von natürlichen Standorten. Dagegen wiesen Pflanzen aus Gärtnereien mit neuen Trieben und besonders mit aufbrechenden Knospen häufig einen geringen Keimbefall auf. Beim Anlegen der Kalluskulturen zeigte sich ferner, daß Samen, die unter geeigneten Bedingungen (trockenen und kühl) gelagert worden waren, einerseits kaum infiziert waren und andererseits nur wenig empfindlich auf die Sterilisation reagierten. Bei der Verwendung von frischen Trieben, sich öffnenden Knospen oder Samen trafen geringe Keimzahlen und hohe Zellteilungsraten zusammen, was eine bessere Ausbeute ergab.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden für jede Art bis zu 12 verschiedene Medien verwendet. Der hohe Aufwand für die Erstellung der verschiedenen Agarmedien stellte sich als unnötig heraus, da der Kallus sich niemals nur auf einem Spezialmedium, sondern immer auch auf einem der Standardmedien, wie LS, MS und 4X entwickelte. Deshalb wurden schließlich nur noch diese drei Medien eingesetzt.

In Tabelle 3 werden die Pflanzen aufgeführt, aus denen Kalluskulturen anzulegen versucht wurde. Da die meisten Arten aus der heimischen Flora stammen, werden neben den lateinischen auch die deutschen Namen angegeben, unter denen sie zum Teil allgemein bekannt sind. Zu beachten ist aber, daß es sich zum Teil bei diesen Namen häufig nicht um Art- sondern Gattungsbezeichnungen handelt.

Die Einteilung der Pflanzen nach Abteilungen, Klassen, Ordnungen und Familien wurde gemäß der neuesten Erkenntnisse der Systematik durchgeführt<sup>[47]</sup>. In dieser „neuen“ Systematik spielen chemische und genetische Übereinstimmungen und Unterschiede eine wesentliche Rolle für die Einteilung der Pflanzen in das Ordnungssystem. Die Anwendung dieses neuen Ordnungssystems erscheint im Zusammenhang mit den hier durchgeführten Untersuchungen besonders sinnvoll, da eine Korrelation zwischen den Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten Pflanzenarten und ihrer Fähigkeit, Kallus zu bilden, eher von chemischen und genetischen als von morphologischen Eigenschaften abhängig ist.

**Tabelle 3. Liste der Pflanzen, aus denen Kalluskultur angelegt werden sollte.**

Für alle Pflanzen ist in der Auflistung das Verhalten des aufgelegten Materials angegeben. Die Arten, bei denen ein stabiler Kallus erhalten werden konnte, erscheinen fettgedruckt. Für die jeweiligen Beobachtungen werden folgende Abkürzungen verwendet:

- K.-Bldg.** Kallusbildung
- Inf.** Alle Schälchen infiziert.
- Abgst./Inf.** In allen Schälchen Pflanzenmaterial abgestorben oder infiziert.
- keine K.-Bldg.** Keine Kallusbildung, obwohl Pflanzenmaterial nicht abstirbt.
- K.-Bldg./Inf.** Erst Kallusbildung dann Infektion.
- K.-Bldg./Abgst.** Zunächst Kallusbildung, dann wächst Kallus nicht weiter.
- K.-/W.-Bldg.** Zunächst Kallusbildung, dann setzt Wurzelbildung ein.
- Z.-Tng.** Es kommt zu Zellteilung, aber nicht zur Bildung eines echten Kallus (keine entdifferenzierten Zellen).

## Angiospermae, Unterabteilung: Magnoliophytina

### **Klasse: Rosopsida**

#### **Unterklasse: Caryophyllidae**

Ordnungsgruppe: Centrospermen

#### **Ordnung: Caryophyllales**

Familie: Caryophyllaceae

Nr.	Name (lateinisch)	Name (deutsch)	Bemerkung
1	<i>Dianthus carthusianorum</i>	Karthäusernelke	Inf.

Familie: Chenopodiaceae

2	<i>Spinacia oleracea</i>	Spinat	<b>K.-Bldg.</b>
---	--------------------------	--------	-----------------

Familie: Amaranthaceae

3	<i>Alteranthera reineckii</i>	-	K.-Bldg.
---	-------------------------------	---	----------

Ordnungsgruppe: Knöterichartige

**Ordnung: Polygonales**

Familie: Polygonaceae

4	<i>Polygonum aubertii</i>	Schlingknöterich	K.-Bldg.
---	---------------------------	------------------	----------

**Unterklasse: Rosidae**

Ordnungsgruppe: Kätzchenblütige

**Ordnung: Betulales**

Familie: Betulaceae

5	<i>Betula pendula</i>	Hänge-Birke	K.-Bldg./Abgst.
---	-----------------------	-------------	-----------------

Familie: Corylaceae

6	<i>Corylus avellana</i>	Gemeiner Hasel	K.-Bldg.
---	-------------------------	----------------	----------

Ordnungsgruppe: Brennesselartige

**Ordnung: Urticales**

Familie: Cannabaceae

7	<i>Humulus lupulus</i>	Gemeiner Hopfen	Abgst./Inf.
---	------------------------	-----------------	-------------

Ordnungsgruppe: Rosenartige

**Ordnung: Saxifragales**

Familie: Crassulaceae

8	<i>Crassula spec.</i>	-	Abgst./Inf.
---	-----------------------	---	-------------

Familie: Grossulariaceae

9	<i>Ribes rubrum</i>	Rote Johannisbeere	K.-Bldg./Inf.
---	---------------------	--------------------	---------------

**Ordnung: Rosales**

Familie: Rosaceae

10	<i>Alchemilla vulgaris</i>	Gem. Frauenmantel	Abgst./Inf.
----	----------------------------	-------------------	-------------

11	<i>Cotoneaster horizontales</i>	Fächer-Kotoneaster	K.-Bldg./Abgst.
----	---------------------------------	--------------------	-----------------

12	<i>Crataegus monogyna</i>	<b>Weißdorn</b>	<b>K.-Bldg.</b>
13	<i>Cerria japonica</i>	-	<b>K.-Bldg.</b>
14	<i>Filipendula vulgaris</i>	Kleines Mädesüß	Abgst./Inf.
15	<i>Potentilla reptans</i>	<b>Kriech. Fingerkraut</b>	<b>K.-Bldg.</b>
16	<i>Prunus avium</i>	<b>Wildkirsche</b>	<b>K.-Bldg.</b>
17	<i>Prunus spinosa</i>	Schlehe	Abgst./Inf.
18	<i>Prunus spec.</i>	Pflaume	K.-Bldg./Abgst.
19	<i>Rosa canina</i>	Hunds-Rose	Abgst./Inf.

**Ordnung: Rhamnales**

Familie: Rhamnaceae

20	<i>Frangula alnus</i>	Faulbaum	K.-Bldg/Abgst.
----	-----------------------	----------	----------------

Ordnungsgruppe: Schmetterlingsblütige

**Ordnung: Fabales**

Familie: Fabaceae

21	<i>Laburnum anagyroides</i>	<b>Goldregen</b>	<b>K.-Bldg.</b>
----	-----------------------------	------------------	-----------------

Ordnungsgruppe: Rautenartige

**Ordnung: Sapindales**

Familie: Hippocastanaceae

22	<i>Aesculus hippocastanum</i>	<b>Roßkastanie</b>	<b>K.-Bldg.</b>
----	-------------------------------	--------------------	-----------------

Ordnungsgruppe: Myrtenartige

**Ordnung: Myrtales**

Familie: Lythraceae

23	<i>Ammania gracilis</i>	-	Abgst./Inf.
24	<i>Rotala valichii</i>	-	Abgst./Inf.

Familie: Onagraceae

25	<i>Epilobium angustifolium.</i>	<b>Wald-Weidenröschen</b>	<b>K.-Bldg.</b>
26	<i>Ludwigia perennis</i>	Heuerkraut	Inf.



Ordnungsgruppe: Senfartige

**Ordnung: Capparales**

Familie: Brassicaceae

27	<i>Alliaria petiolata</i>	Knoblauchsrauke	K.-Bldg./Abgst.
28	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Gemeines Hirtentäschelkraut	Inf.
29	<i>Cardaria draba</i>	Gemeine Pfeilkresse	Inf.
30	<i>Rorippa aquatica</i>	Sumpfkresse	Inf./Abgst.

**Ordnung: Cucurbitales**

Familie: Cucurbitaceae

31	<i>Bryonia dioica</i>	<b>Rote Zaunrübe</b>	<b>K.-Bldg.</b>
----	-----------------------	----------------------	-----------------

Ordnungsgruppe: Veilchenartige

**Ordnung: Violales**

Familie: Violaceae

32	<i>Viola hirta</i>	Rauhes Veilchen	Inf.
----	--------------------	-----------------	------

Familie: Passifloraceae

33	<i>Passiflora coerulea</i>	<b>Passionsblume</b>	<b>K.-Bldg.</b>
----	----------------------------	----------------------	-----------------

**Ordnung: Salicales**

Familie: Salicaceae

34	<i>Salix erythroflexuora</i>	Korkenzieherweide	K-Bldg/Abgst
----	------------------------------	-------------------	--------------

**Ordnung: Guttiferales**

Familie: Hypericaceae

35	<i>Hypericum perforatum</i>	<b>Johanniskraut</b>	<b>K.-Bldg.</b>
----	-----------------------------	----------------------	-----------------

**Ordnung: Linales**

Familie: Geraniaceae

36	<i>Geranium robertianum</i>	Ruprechts-Storchschnabel	K.-/W.-Bldg.
37	<i>Geranium sanguineum</i>	Blutroter Storchschnabel	K.-/W.-Bldg.

**Ordnung: Euphorbiales**

Familie: Euphorbiaceae

38	<i>Euphorbia cyparissias</i>	Zypressen-Wolfsmilch	K.-Bldg.
39	<i>Euphorbia mysinites</i>	-	Abgst./Inf.
40	<i>Mercurialis perennis</i>	Waldbingelkraut	Inf.

**Ordnung: Thymelaeales**

Familie: Thymelaeaceae

41	<i>Daphne cneorum</i>	Rosmarin Seidelbast	Abgst./Inf.
----	-----------------------	---------------------	-------------

Ordnungsgruppe: Spindelbaumartige

**Ordnung: Celastrales**

Familie: Celastraceae

42	<i>Euonimus europaeus</i>	Pfaffenhütchen	K.-Bldg.
----	---------------------------	----------------	----------

Ordnungsgruppe: Altrososida

**Ordnung: Buxales**

Familie: : Buxaceae

43	<i>Buxus sempervirens</i>	Buxbaum	K.-Bldg./Abgst.
----	---------------------------	---------	-----------------

**Unterklasse: Asteridae**

Ordnungsgruppe: Primel- und Heidekrautartige

**Ordnung: Primulales**

Familie: Primulaceae

44	<i>Cyclamen purpurascens</i>	Alpenveilchen	K.-Bldg./Abgst.
45	<i>Hottonia spez.</i>	Wasserfeder	Abgst./Inf.
46	<i>Lysimachia nummularia</i>	Pfennigkraut	K.-Bldg./Abgst.
47	<i>Primula obconica</i>	Giftprimel	Inf.
48	<i>Primula veris</i>	Schlüsselblume	Abgst./Inf.
49	<i>Primula vulgaris</i>	Gartenprimel	keine K.-Bldg.

**Ordnung: Ericales**

Familie: Ericaceae

50	<i>Rhododendron ponticum</i>	Rhododendron	Abgst./Inf.
51	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Blaubeere	K.-Bldg.

Ordnungsgruppe: Hartriegelartige

**Ordnung: Cornales**

Familie: Cornaceae

52	<i>Cornus sanguinea</i>	Roter Hartriegel	K.-Bldg./Abgst.
----	-------------------------	------------------	-----------------

**Ordnung: Scrophulariales**

Familie: Acanthaceae

53	<i>Hygrophila salicifolia</i>	-	K.-Bldg./Abgst.
----	-------------------------------	---	-----------------

Ordnungsgruppe: Kronröhrenblütige

**Ordnung: Solanales**

Familie: Solanaceae

54	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabak	K.-Bldg. <sup>1</sup>
55-58	<i>Nicotiana tabacum</i> x <i>Atropa belladonna</i>	(somatische Hybride)	K.-Bldg. <sup>1</sup>
59	<i>Nicotiana tabacum</i> x <i>Hyoscyamus aureus</i>	(somatischer Hybrid)	K.-Bldg. <sup>1</sup>
60	<i>Nicotiana tabacum</i> x <i>Hyoscyamus niger</i>	(somatischer Hybrid)	K.-Bldg. <sup>1</sup>

**Ordnung: Gentianales**

Familie: Apocynaceae

61	<i>Nerium oleander</i>	Oleander	K.-Bldg./Abgst.
62	<i>Vinca minor</i>	Immergrün	K.-Bldg./Abgst.

---

<sup>1</sup> Die verwendeten Pflanzen aus der Familie der Solanaceen stammten aus der Sammlung der Pharmazeutischen Biologie. Es handelte sich dabei um auf Nährmedien keimfrei kultivierte, aber differenzierte Pflanzen.

Familie: Asclepiadaceae

63	<i>Vincetoxicum hirundinaria</i>	Weißer Schwalbenwurz	K.-Bldg./Abgst.
----	----------------------------------	----------------------	-----------------

Familie: Rubiaceae

64	<i>Galium odoratum</i>	Waldmeister	K.-Bldg.
----	------------------------	-------------	----------

Ordnung: Scrophulariales

Familie: Scrophulariaceae

65	<i>Baccopa spec.</i>	-	K.-Bldg./Abgst.
66	<i>Digitalis grandiflora</i>	Großblütiger Fingerhut	K.-Bldg.
67	<i>Limnophila aquatica</i>	-	K.-Bldg./Abgst.
68	<i>Micranthemum umbrosum</i>	-	K.-Bldg./Abgst.
69	<i>Microsorium pterosus</i>	-	Abgst./Inf.
70	<i>Verbascum phlomoides</i>	Windblumen-Königskerze	K.-Bldg.

Familie: Plantaginaceae

71	<i>Plantago major</i>	Breitwegerich	K.-Bldg.
72	<i>Plantago lanceolata</i>	Spitzwegerich	Abgst./Inf.

Ordnung: Oleales

Familie: Oleaceae

73	<i>Ligustrum vulgare</i>	Gemeiner Liguster	K.-Bldg.
74	<i>Forsythia viridissima</i>	Forsythie	K.-Bldg.
75	<i>Syringa vulgaris</i>	Gemeiner Flieder	K.-Bldg.

Ordnung: Lamiales

Familie: Lamiaceae

76	<i>Ajuga reptans</i>	Kriechender Günsel	K.-Bldg.
77	<i>Eusteralis stellata</i>	-	K.-Bldg.
78	<i>Glechoma hederacea</i>	Gundermann	Inf.
79	<i>Lamium album</i>	Weißer Taubnessel	K.-/W.-Bldg.
80	<i>Melissa officinalis</i>	Zitronenmelisse	K.-Bldg.
81	<i>Mentha piperita</i>	Pfefferminze	K.-Bldg.
82	<i>Ocimum basilicum</i>	Basilikum	K.-Bldg.

83	<i>Origanum vulgare</i>	<b>Wilder Majoran</b>	<b>K.-Bldg.</b>
84	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<b>Rosmarin</b>	<b>K.-Bldg.</b>
85	<i>Salvia pratensis</i>	<b>Wiesen-Salbei</b>	<b>K.-Bldg.</b>
86	<i>Stachys recta</i>	Berg-Ziest	K-Bldg./Abgst.

Ordnungsgruppe: Dolden- und Korbblütler

**Ordnung: Dipsacales**

Familie: Caprifoliaceae

87	<i>Sambucus niger</i>	<b>Schwarzer Holunder</b>	<b>K.-Bldg.</b>
88	<i>Viburnum oppulus</i>	Gemeiner Schneeball	Abgst./Inf.

Familie: Valerianaceae

89	<i>Valeriana officinalis</i>	Baldrian	Inf.
----	------------------------------	----------	------

Familie: Dipsacaceae

90	<i>Knautia arvensis</i>	Acker-Witwenblume	Abgst./Inf.
----	-------------------------	-------------------	-------------

**Ordnung: Araliales**

Familie: Apiaceae

91	<i>Aegopodium podagraria</i>	Zaun-Giersch	Abgst./Inf.
92	<i>Chaerophyllum bulbosum</i>	Knollen-Kälberkopf	Inf.
93	<i>Heracleum sphondylium</i>	Wiesen-Bärenklau	Abgst./Inf.
94	<i>Hydrocotyle verticillata</i>	Wassernabel	K.-Bldg./Inf.
95	<i>Levisticum officinale</i>	<b>Liebstöckl</b>	<b>K.-Bldg.</b>
96	<i>Pimpinella saxifraga</i>	Kleine Bibernelle	Abgst./Inf.

Familie: Araliaceae

97	<i>Hedera helix</i>	<b>Efeu</b>	<b>K.-Bldg.</b>
----	---------------------	-------------	-----------------

**Ordnung: Campanulales**

Familie: Campanulaceae

98	<i>Lobelia cardinalis</i>	-	Abgst./Inf.
----	---------------------------	---	-------------

Familie: Asteraceae

Unterfamilie: Asteroidea

99	<i>Artemisia vulgaris</i>	Gemeiner Beifuß	K./W.-Bldg.
<b>100</b>	<b><i>Bellis perennis</i></b>	<b>Gänseblümchen</b>	<b>K.-Bldg.</b>
101	<i>Cynara scolymus</i>	Artischocke	Abgst./Inf.

Unterfamilie: Cichoriaceae

<b>102</b>	<b><i>Sonchus arvensis</i></b>	<b>Acker-Gänsedistel</b>	<b>K.-Bldg.</b>
<b>103</b>	<b><i>Taraxacum officinale</i></b>	<b>Löwenzahn</b>	<b>K.-Bldg.</b>

**Klasse: Magnoliopsida**

**Unterklasse: Magnoliidae**

**Ordnung: Magnoliales**

Familie: Magnoliaceae

104	<i>Magnolia grandifolia</i>	Magnolie	K.-Bldg./Abgst.
-----	-----------------------------	----------	-----------------

**Ordnung: Ceratophyllales**

Familie: Ceratophyllaceae

105	<i>Ceratophyllum spec.</i>	Hornblatt	Abgst./Inf.
-----	----------------------------	-----------	-------------

**Unterklasse: Ranunculidae**

**Ordnung: Ranunculales**

Familie: Ranunculaceae

106	<i>Aconitum napellus</i>	Blauer Eisenhut	Abgst./Inf.
107	<i>Anemone nemorosa</i>	Busch-Windröschen	Inf.
108	<i>Aquilegia vulgaris</i>	Akelei	Abgst./Inf.
109	<i>Caltha palustris</i>	Sumpf-Dotterblume	Abgst./Inf.
110	<i>Consolida regalis</i>	Rittersporn	Abgst./Inf.
111	<i>Helleborus niger</i>	Christrose	Abgst./Inf.
112	<i>Pulsatilla vulgaris</i>	Echte Küchenschelle	Abgst./Inf.
113	<i>Ranunculus bulbosus</i>	Knolliger Hahnenfuß	Abgst./Inf.
114	<i>Ranunculus ficaria</i>	Scharbockskraut	Inf.

Familie: Berberidaceae

115	<i>Berberis vulgaris</i>	Gemeine Berberitze	Abgst./Inf.
116	<i>Mahonia aquifolium</i>	Mahonie	Abgst./Inf.

**Ordnung: Papaverales**

Familie: Papaveraceae

117	<i>Chelidonium majus</i>	Großes Schöllkraut	K.-Bldg./Abgst.
-----	--------------------------	--------------------	-----------------

Familie: Fumariaceae

118	<i>Corydalis bulbosa</i>	Hohler Lerchensporn	Abgst./Inf..
-----	--------------------------	---------------------	--------------

**Klasse: Liliopsida**

**Unterklasse: Alismatidae**

**Ordnung: Alismatales**

Familie: Alismataceae

119	<i>Echinodorus spez.</i>	-	Abgst./Inf.
120	<i>Sagittaria platiphylla</i>	Pfeilkraut	Abgst./Inf.

**Unterklasse: Aridae**

**Ordnung: Arales**

Familie: Araceae

121	<i>Anthurium spec.</i>	Flamingoblume	Abgst./Inf.
122	<i>Anubias cult. „Nana“</i>	-	Abgst./Inf.
123	<i>Arum maculatum</i>	Gefleckter Aronstab	Abgst./Inf.
124	<i>Cryptocoryne wendtii</i>		Abgst./Inf.

**Unterklasse: Liliidae**

**Ordnung: Liliales**

Familie: Colchicaceae

125	<i>Colchicum autumnale</i>	Herbstzeitlose	Abgst./Inf.
-----	----------------------------	----------------	-------------

Familie: Liliacea

126	<i>Fritillaria meleagris</i>	Schachblume	Abgst./Inf.
127	<i>Hyacinthus orientalis</i>	Hyazinthe	Z.-Tlng.
128	<i>Tulpia gesneriana</i>	Tulpe	Abgst./Inf.

Familie: Iridaceae

129	<i>Crocus vernus</i>	Krokus	Abgst./Inf.
130	<i>Iris pseudacorus</i>	Schwertlilie	Abgst./Inf.

**Ordnung: Asparagales**

Familie: Convallariaceae

131	<i>Convallaria majalis</i>	Maiglöckchen	Abgst./Inf.
132	<i>Polygonatum multiflorum</i>	Vielblütige Weißwurz	Abgst./Inf.

Familie: Alliaceae

133	<i>Allium schoenoprasum</i>	Schnittlauch	Abgst./Inf.
134	<i>Allium ursinum</i>	Bären-Lauch	Abgst./Inf.

Familie: Amaryllidaceae

135	<i>Galanthus nivalis</i>	Schneeglöckchen	Abgst./Inf.
136	<i>Narzissus pseudonarzissus</i>	Osterglocke	Abgst./Inf.

**Unterklasse: Commelinidae**

Ordnungsgruppe: Ingwerartige

**Ordnung: Pontederiales**

Familie: : Pontederiaceae

137	<i>Heteranthera zosterifolia</i>	-	Abgst./Inf.
-----	----------------------------------	---	-------------

Ordnungsgruppe: Grasartige

**Ordnung: Cyperales**

Familie: Cyperaceae

138	<i>Eleocharis spec.</i>	-	Abgst./Inf.
-----	-------------------------	---	-------------



**Gymnospermae, Unterabteilung: Coniferophytina**

**Klasse: Pinopsida**

**Ordnung: Coniferales**

Familie: Pinaceae

139	<i>Larix decidua</i>	Europäische Lärche	K.-Bldg./Abgst.
140	<i>Picea abies</i>	Fichte	Abgst.

Die Auflistung in Tabelle 3 macht deutlich, daß die Pflanzen aus fast allen Klassen und vielen Ordnungen und Familien des Pflanzenreichs stammen. Dies liegt daran, daß sie meist willkürlich der Natur entnommen wurden. Das erklärt auch den großen Anteil artenreicher Ordnungen und Familien in dieser Auswahl. So wurden zum Beispiel aus der sehr artenreichen Familie der Rosaceae 10 Pflanzen für die Kallusentwicklung verwendet.

Von den 140 verschiedenen Pflanzenarten bildeten 45 Kallus, was einer Quote von 32 % entspricht. Diese 45 Pflanzen entstammen 22 Familien, 20 Ordnungen und 2 Unterklassen.

Versucht man eine Beziehung zwischen der erfolgreichen Kallusbildung und der systematischen Zuordnung der einzelnen Pflanzen abzulesen, so fällt auf, daß ausschließlich in der Klasse der Rosopsida Kallusbildungen auftraten, was für die 103 Arten dieser Klasse eine Quote von 44 % für die Kallusbildung ergibt.

Ein Zusammenhang zwischen Zugehörigkeit zu kleineren systematischen Einheiten und Kallusbildung innerhalb der Klasse der Rosopsida ist kaum abzulesen, da für eine statistische Bewertung die Artenzahl bei weitem nicht ausreicht. Allerdings fällt die Häufung an erfolgreicher Kallusbildung in der Familie der Lamiaceae mit einer Erfolgsquote von 72 % besonders auf, und auch in der nah verwandten Familie der Oleaceae entwickelte sich bei allen drei Arten Kallus.

In Tabelle 4 sind alle Arten, aus denen sich Kallus entwickelte, noch einmal nach Pflanzenfamilien geordnet aufgelistet.

Mit Erhöhung des Arbeitsaufwandes bei der Erstellung der Kalluskulturen sowie einer Erhöhung der Petrischalenzahl und Verwendung von Material mit niedrigerer Keimbelastung (Samen etc.) hätten sich vermutlich für deutlich mehr Pflanzenarten Kalluskulturen erzeugen lassen, als das im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist. Bei vielen Pflanzen, bei denen auf Grund von Infektionen die Kallusbildung ausblieb, hätten sich wahrscheinlich unter Verwendung von geringer infiziertem Material Kalluskulturen entwickeln lassen. Dieser Zusammenhang wird besonders bei den Vertretern der Familie

der Solanaceae deutlich, bei der alle untersuchten Arten Kallus bildeten. Das verwendete Pflanzenmaterial stammte in diesem Fall von unter sterilen Bedingungen auf Nährmedien wachsenden Pflanzen, so daß auf Sterilisation verzichtet werden konnte.

**Tabelle 4. Liste der Pflanzen, bei denen erfolgreich Kallus erhalten wurde.**

Nr.	Name (lateinisch)	Name (deutsch)	Familie
1	<i>Spinacia oleracea</i>	Spinat	Chenopodiaceae
2	<i>Alteranthera reineckii</i>	-	Amaranthaceae
3	<i>Polygonum aubertii</i>	Schlingknöterich	Polygonaceae
4	<i>Corylus avellana</i>	Gemeiner Hasel	Coryllaceae
5	<i>Crataegus monogyna</i>	Weißdorn	Rosaceae
6	<i>Cerria japonica</i>	-	Rosaceae
7	<i>Potentilla reptans</i>	Kriech. Fingerkraut	Rosaceae
8	<i>Prunus avium</i>	Wildkirsche	Rosaceae
9	<i>Laburnum anagyroides</i>	Goldregen	Fabaceae
10	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Roßkastanie	Hippocastanaceae
11	<i>Epilobium angustifolium.</i>	Wald-Weidenröschen	Onagraceae
12	<i>Bryonia dioica</i>	Rote Zaurübe	Cucurbiataceae
13	<i>Passiflora coerulea</i>	Passionsblume	Passifloraceae
14	<i>Hypericum perforatum</i>	Johanniskraut	Hyperiaceae
15	<i>Euphorbia cyparissias</i>	Zypressen-Wolfsmilch	Euphorbiaceae
16	<i>Euonimus europaeus</i>	Pfaffenhütchen	Celastraceae
17	<i>Vaccinum myrtillus</i>	Blaubeere	Ericaceae
18	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabak	Solanaceae
19-22	<i>Nicotiana tabacum x Atropa belladona</i>	(somatische Hybride)	Solanaceae
23	<i>Nicotiana tabacum x Hyoscyamus aureus</i>	(somatischer Hybrid)	Solanaceae
24	<i>Nicotiana tabacum x Hyoscyamus niger</i>	(somatischer Hybrid)	Solanaceae
25	<i>Galium odoratum</i>	Waldmeister	Rubiaceae
26	<i>Digitalis grandiflora</i>	Großblütiger Fingerhut	Scrophulariaceae
27	<i>Verbascum phlomoides</i>	Windblumen-Königskerze	Scrophulariaceae
28	<i>Plantago major</i>	Breitwegerich	Plantaginaceae

29	<i>Ligustrum vulgare</i>	Gemeiner Liguster	Oleaceae
30	<i>Forsythia viridissima</i>	Forsythie	Oleaceae
31	<i>Syringa vulgaris</i>	Gemeiner Flieder	Oleaceae
32	<i>Ajuga reptans</i>	Kriechender Günsel	Lamiaceae
33	<i>Eusteralis stellata</i>		Lamiaceae
34	<i>Melissa officinalis</i>	Zitronenmelisse	Lamiaceae
35	<i>Mentha piperita</i>	Pfefferminze	Lamiaceae
36	<i>Ocimum basilicum</i>	Basilikum	Lamiaceae
37	<i>Origanum vulgare</i>	Wilder Majoran	Lamiaceae
38	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rosmarin	Lamiaceae
39	<i>Salvia pratensis</i>	Wiesen-Salbei	Lamiaceae
40	<i>Sambucus niger</i>	Schwarzer Holunder	Caprifoliaceae
41	<i>Levisticum officinale</i>	Liebstöckl	Apiaceae
42	<i>Hedera helix</i>	Efeu	Araliaceae
43	<i>Bellis perennis</i>	Gänseblümchen	Asteraceae
44	<i>Sonchus arvensis</i>	Acker-Gänsedistel	Asteraceae
45	<i>Taraxacum officinale</i>	Löwenzahn	Asteraceae

## 1.2 Anlegen von Suspensionskulturen

Alle Suspensionskulturen wurden aus Kalli angelegt. Hierbei spielten Infektionen des Zellmaterials kaum eine Rolle, weil die eingesetzten Kalli bereits keimfrei waren. Im wesentlichen bedeutet der Schritt von der Kallus- zur Zellkultur nur die Veränderung der Konsistenz des Nährmediums; die Zusammensetzung des Mediums blieb abgesehen vom Verzicht auf Agar identisch. Alle Versuche, aus Kalluskulturen Suspensionskulturen anzulegen, waren erfolgreich. Probleme bereitete allein die Bereitstellung der benötigten Menge an Kallusgewebe. Besonders bei langsam wachsenden Kalli, deren Verdoppelungsrate bei etwa 8 Wochen lag, dauerte es sehr lange, bis neben dem Erhaltungsbestand die erforderliche Anzahl von 20 - 30 Petrischalen für das Anlegen der Suspensionskultur zur Verfügung stand. Dies war umso eher dann ein Problem, wenn die Kallusbildung nur in wenigen Kulturgefäßen erfolgreich war.

Nur ein Teil der Kalli wurde zur Erstellung von Suspensionskulturen in Flüssigkulturen überführt; einerseits weil bis zum Ende der praktischen Arbeiten nicht bei allen Kulturen

genügend Material zur Verfügung stand, andererseits weil der Arbeitsaufwand zu groß gewesen wäre, um aus allen Kalluskulturen auch Suspensionskulturen anzulegen und zu untersuchen. Dennoch kann davon ausgegangen werden, daß dies bei nahezu allen erhaltenen Kalli möglich ist. In Tabelle 5 sind die 21 Pflanzen aufgeführt, aus denen Suspensionskulturen angelegt wurden.

**Tabelle 5. Liste der Pflanzen, von denen eine Suspensionskultur angelegt wurde.**

<b>Nr.</b>	<b>Name (lateinisch)</b>	<b>Name (deutsch)</b>	<b>Familie</b>
1	<i>Polygonum aubertii</i>	Schlingknöterich	Polygonaceae
2	<i>Epilobium angustifolium.</i>	Wald-Weidenröschen	Onagraceae
3	<i>Bryonia dioica</i>	Rote Zaurrübe	Cucurbiataceae
4	<i>Hypericum perforatum</i>	Johanniskraut	Hyperiaceae
5	<i>Euphorbia cyparassias</i>	Zypressen-Wolfsmilch	Euphorbiaceae
6	<i>Euonimus europaeus.</i>	Pfaffenhütchen	Celastraceae
7	<i>Atropa belladona x Hyoscyamus niger</i>	(somatischer Hybrid)	Solanaceae
8	<i>Atropa belladona x Nicotiana tabacum</i>	(somatischer Hybrid)	Solanaceae
9	<i>Galium odoratum</i>	Waldmeister	Rubiaceae
10	<i>Digitalis grandiflora</i>	Großblütiger Fingerhut	Scrophulariaceae
11	<i>Verbascum phlomoides</i>	Windblumen-Königskerze	Scrophulariaceae
12	<i>Forsythia viridissima</i>	Forsythie	Oleaceae
13	<i>Syringa vulgaris</i>	Gemeiner Flieder	Oleaceae
14	<i>Ajuga reptans</i>	Kriechender Günsel	Lamiaceae
15	<i>Lipia citriodora</i>	Zitronenmelisse	Lamiaceae
16	<i>Ocimum basilicum</i>	Basilikum	Lamiaceae
17	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rosmarin	Lamiaceae
18	<i>Levisticum officinale</i>	Liebstöckl	Apiaceae
19	<i>Hedera helix</i>	Efeu	Araliaceae
20	<i>Bellis perennis</i>	Gänseblümchen	Asteraceae
21	<i>Taraxacum officinale</i>	Löwenzahn	Asteraceae

## 2 Isolierung und Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen der Pflanzenzellkulturen

Für die Isolierung und Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe der Pflanzenzellkulturen wurden Suspensionskulturen verwendet, da diese sich mit relativ geringem Aufwand vermehren lassen.

### 2.1 Herstellung der Extrakte

Aus 14 Suspensionskulturen wurden Extrakte erstellt, aus denen Inhaltsstoffe isoliert und deren Struktur aufgeklärt wurden.

**Tabelle 6. Überblick über die Extraktgewinnung aus Suspensionbskulturen.**

In der Tabelle verwendete Abkürzungen:

**WD** Wachstumsdauer der Kulturen

**EZ** Zahl der verwendeten Erlenmeyerkolben (1 Liter)

**FG** Feuchtwicht der abfiltrierten Zellen

**TG** Trockengewicht der abfiltrierten Zellen

**TGL** Trockengewicht der abfiltrierten Zellen pro Liter Suspensionskultur

**RE** Gewicht des methanolischen Rohextrakt

**XE** Gewicht des von der XAD-Säule eluierten Extraktes

**ungel.** Gewicht des Rückstandes des Rohextraktes, der in Wasser ungelöst blieb

Nr.	Pflanze	WD [d]	EZ	FG [g]	TG [g]	TGL [g/l]	RE [g]	XE [g]	ungel. [g]
1	<i>Polygonum aubertii</i>	9	15	503	39.5	6.58	9.51	0.42	0.39
2	<i>Epilobium angustifolium</i>	10	14	320	24.8	4.43	8.72	0.19	0.05
3	<i>Bryonia dioica</i>	7	12	780	59.2	12.31	16.51	0.60	0.70
4	<i>Hypericum perforatum</i>	8	7	220	14.5	5.18	4.76	0.65	-
5	<i>Euonimus europaeus</i>	8	16	950	76.7	11.93	17.41	0.35	0.85
6	<i>Galium odoratum</i>	8	12	544	39.9	8.25	8.42	0.61	-
7	<i>Forsythia viridissima</i>	7	12	653	46.0	9.56	7.16	0.86	0.09
8	<i>Syringa vulgaris</i>	9	14	299	31.8	5.69	8.55	1.07	0.68
9	<i>Ajuga reptans</i>	8	8	536	37.7	11.75	12.51	1.16	0.01
10	<i>Melissa officinalis</i>	8	12	586	40.1	8.31	14.26	1.81	0.09
11	<i>Rosmarinus officinalis</i>	8	12	723	45.9	9.56	13.57	1.20	0.32
12	<i>Levisticum officinale</i>	9	16	721	54.0	8.44	14.56	0.49	-

13	<i>Bellis perennis</i>	6	7	290	16.0	5.71	5.66	0.25	0.05
14	<i>Taraxacum officinale</i>	9	13	641	54.6	10.5	15.43	1.72	0.95

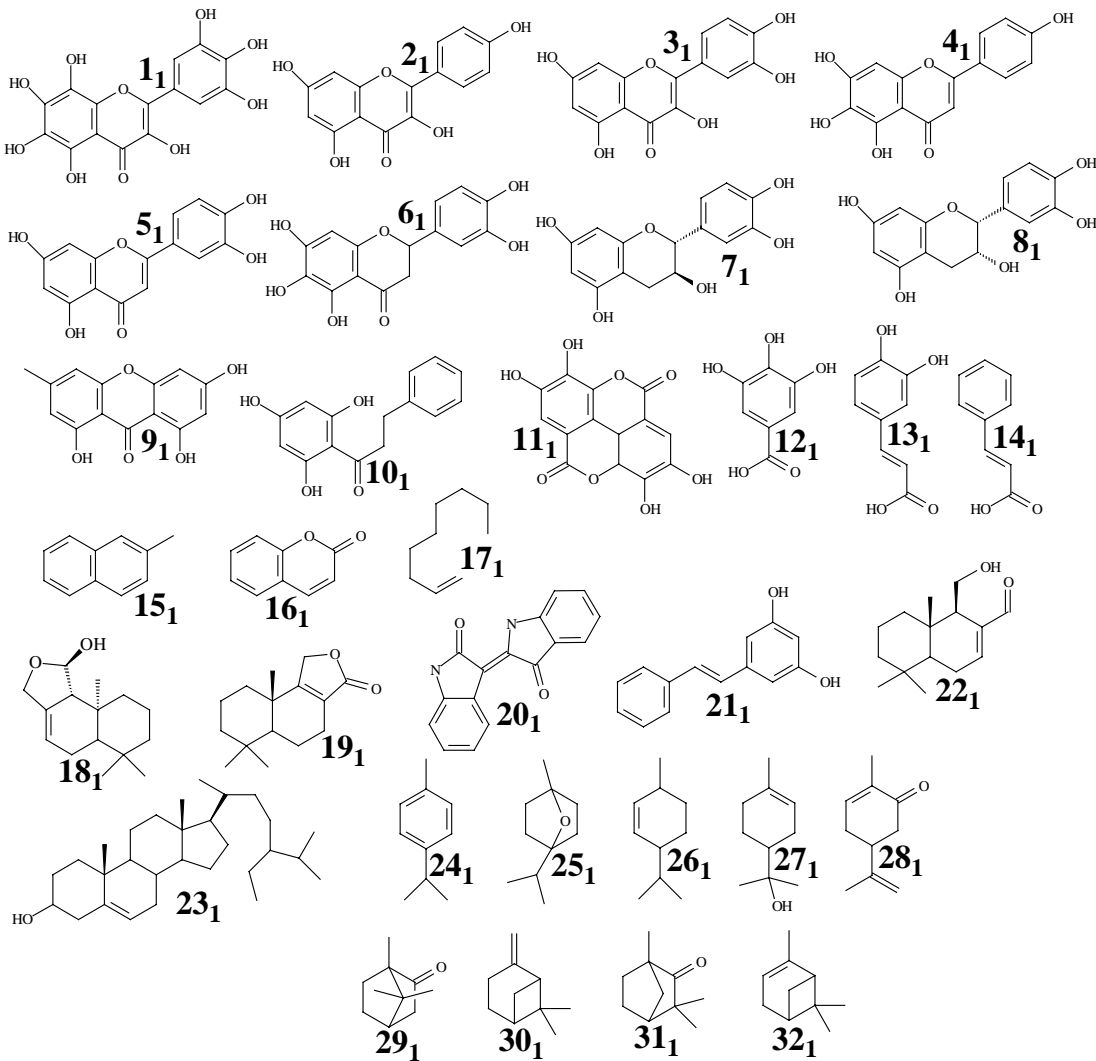
Für die Gewinnung des Extraktes wurden die Kulturen in 1 l-Erlenmeyerkolben nach 7 - 10 Tagen Wachstumsdauer abfiltriert. Nach der Bestimmung des Feuchtgewichts wurde das Zellmaterial gefriergetrocknet. Anschließend wurden die getrockneten Zellen extrahiert und mit Hilfe von XAD-Material die Zucker aus dem methanolischen Extrakt abgetrennt. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Extraktgewinnung.

## 2.2 Trennung der Extrakte und Untersuchung der Inhaltsstoffe

Im folgenden soll die Isolierung und Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen für jeden Zellkulturextrakt getrennt beschrieben werden. Für jede Pflanze werden zu Beginn die Verbindungen angegeben, die bereits bekannt sind, um sie mit denen des Zellkulturextraktes vergleichen zu können. Anschließend wird die Trennung der Extrakte und die Strukturaufklärung beschrieben. In den Chromatogrammen werden die isolierten Substanzen den entsprechenden Peaks zugeordnet.

### 2.2.1 Untersuchung des Extraktes von *Polygonum auberti*

Aus der Pflanze *Polygonum auberti* wurden bis heute keine Substanzen isoliert und deren Strukturen aufgeklärt. Dagegen gibt es in der Gattung *Polygonum* viele gut untersuchte Arten. In Abbildung 8 sind Verbindungen und Verbindungstypen zu sehen, die am häufigsten in dieser Gattung zu finden sind. Besonders stark vertreten sind Flavonoide und Terpene.



**Abbildung 8.** Aus der Gattung *Polygonum* isolierte Verbindungen und Strukturelemente:

- 1<sub>1</sub>**: 3,5,6,7,8-Pentahydroxy-2-(3,4,5-trihydroxy-phenyl)-chromen-4-on<sup>[48]</sup>, **2<sub>1</sub>**: Kaempferol<sup>[49]</sup>,  
**3<sub>1</sub>**: Quercetin<sup>[49]</sup>, **4<sub>1</sub>**: 6-Hydroxy-kaempferol<sup>[50]</sup>, **5<sub>1</sub>**: Luteolin<sup>[50]</sup>, **6<sub>1</sub>**: 2-(4-Hydroxy-phenyl)-chroman-4-on<sup>[51]</sup>, **7<sub>1</sub>**: Catechin<sup>[52]</sup>, **8<sub>1</sub>**: Epicatechin<sup>[52]</sup>, **9<sub>1</sub>**: 1,6,8-Trihydroxy-3-methyl-xanthen-9-on<sup>[53]</sup>,  
**10<sub>1</sub>**: (2,4,6-Trihydroxy-phenyl)-3-phenyl-propan-1-on<sup>[54]</sup>, **11<sub>1</sub>**: 2,3,7,8-Tetrahydroxy-chromeno[5,4,3-cde]chromen-5,10-dion<sup>[55]</sup>, **12<sub>1</sub>**: Gallsäure<sup>[56]</sup>, **13<sub>1</sub>**: Kaffeesäure<sup>[57]</sup>, **14<sub>1</sub>**: Zimtsäure<sup>[58]</sup>,  
**15<sub>1</sub>**: 2-Methylnaphthalen<sup>[54]</sup>, **16<sub>1</sub>**: Cumarin<sup>[59]</sup>, **17<sub>1</sub>**: Non-1-en<sup>[60]</sup>, **18<sub>1</sub>**: Isodrimeninol<sup>[61]</sup>,  
**19<sub>1</sub>**: Confertifolin<sup>[61]</sup>, **20<sub>1</sub>**: Indirubin, **21<sub>1</sub>**: Pinosylvin<sup>[62]</sup>, **22<sub>1</sub>**: 11-Dihydro-9-epipolygodial<sup>[63]</sup>,  
**23<sub>1</sub>**: Sitosterol<sup>[64]</sup>, **24<sub>1</sub>**: p-Cymol<sup>[58]</sup>, **25<sub>1</sub>**: 1,4-Epoxy-p-menthan<sup>[58]</sup>, **26<sub>1</sub>**: β-Phellandren<sup>[58]</sup>,  
**27<sub>1</sub>**: α-Terpineol<sup>[58]</sup>, **28<sub>1</sub>**: (-)-Carvon<sup>[58]</sup>, **29<sub>1</sub>**: Bornan-2-on<sup>[58]</sup>, **30<sub>1</sub>**: β-Pinen<sup>[58]</sup>, **31<sub>1</sub>**: Pinen-4-on<sup>[58]</sup>,  
**32<sub>1</sub>**: α-Pinen.

### 2.2.1.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Zunächst wurden mit Hilfe der analytischen HPLC die geeigneten Trennbedingungen ermittelt. Die semipräparative HPLC wurde schließlich mit Hilfe des Fließmittelsystem 1 (siehe III.3.2.2; 0 – 50 % Methanol) durchgeführt. Es wurden 400 mg des zuckerfreien Extraktes in zwei HPLC-Läufen getrennt.

Abbildung 9 zeigt ein Chromatogramm dieser Trennungen.

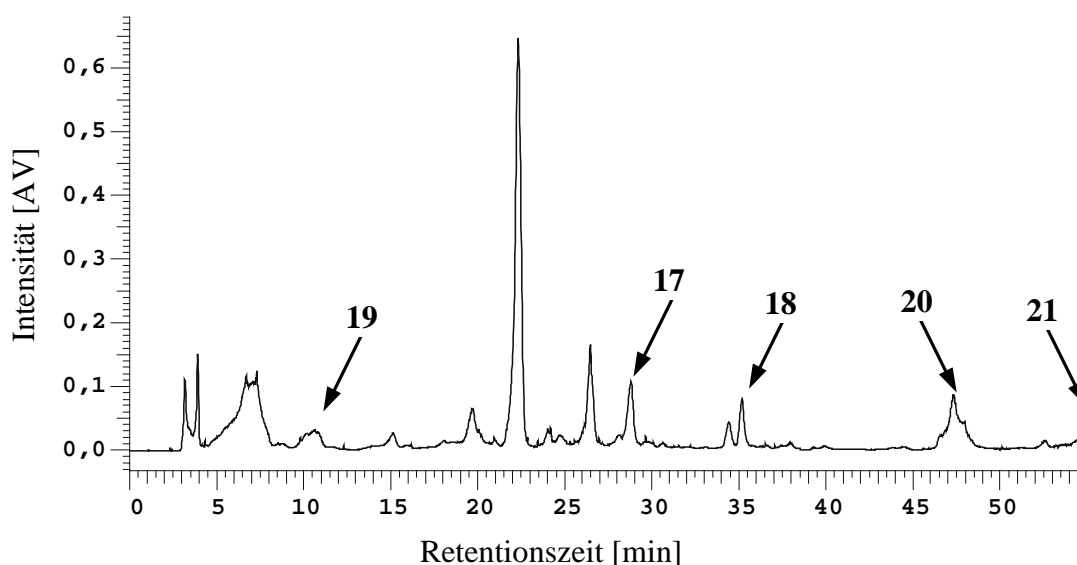


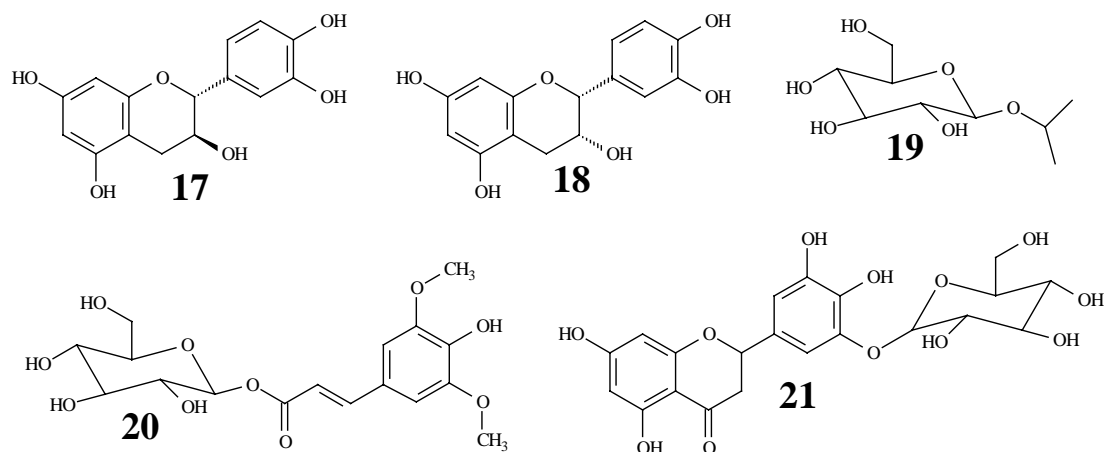
Abbildung 9. Semipräparative Trennung des Extraktes von *Polygonum aubertii*, (Lichtstredetektion).

### 2.2.1.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

Nach Untersuchung der Fraktionen der semipräparativen Trennung mit Hilfe der analytischen Kurzgradienten-HPLC (siehe III.3.2.3) und Vereinigung von Fraktionen mit identischem Chromatogramm blieben 5 Proben, bei denen die Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe durchgeführt werden konnte. Die Strukturen konnten aufgrund ihrer Massen- und  $^1\text{H}$ -Spektren aufgeklärt (siehe V) und durch Vergleich mit Literaturdaten bestätigt werden. Es handelt sich um Catechin<sup>[65]</sup> (**17**), Epicatechin<sup>[65]</sup> (**18**), 1'-Sinapoyl-O- $\beta$ -D-glucopyranosid<sup>[66]</sup> (**20**), Plantagosid<sup>[67,68]</sup> (**21**) und Isopropylglukose<sup>[69]</sup> (**19**). Abbildung 10 zeigt die Strukturformeln dieser Verbindungen.



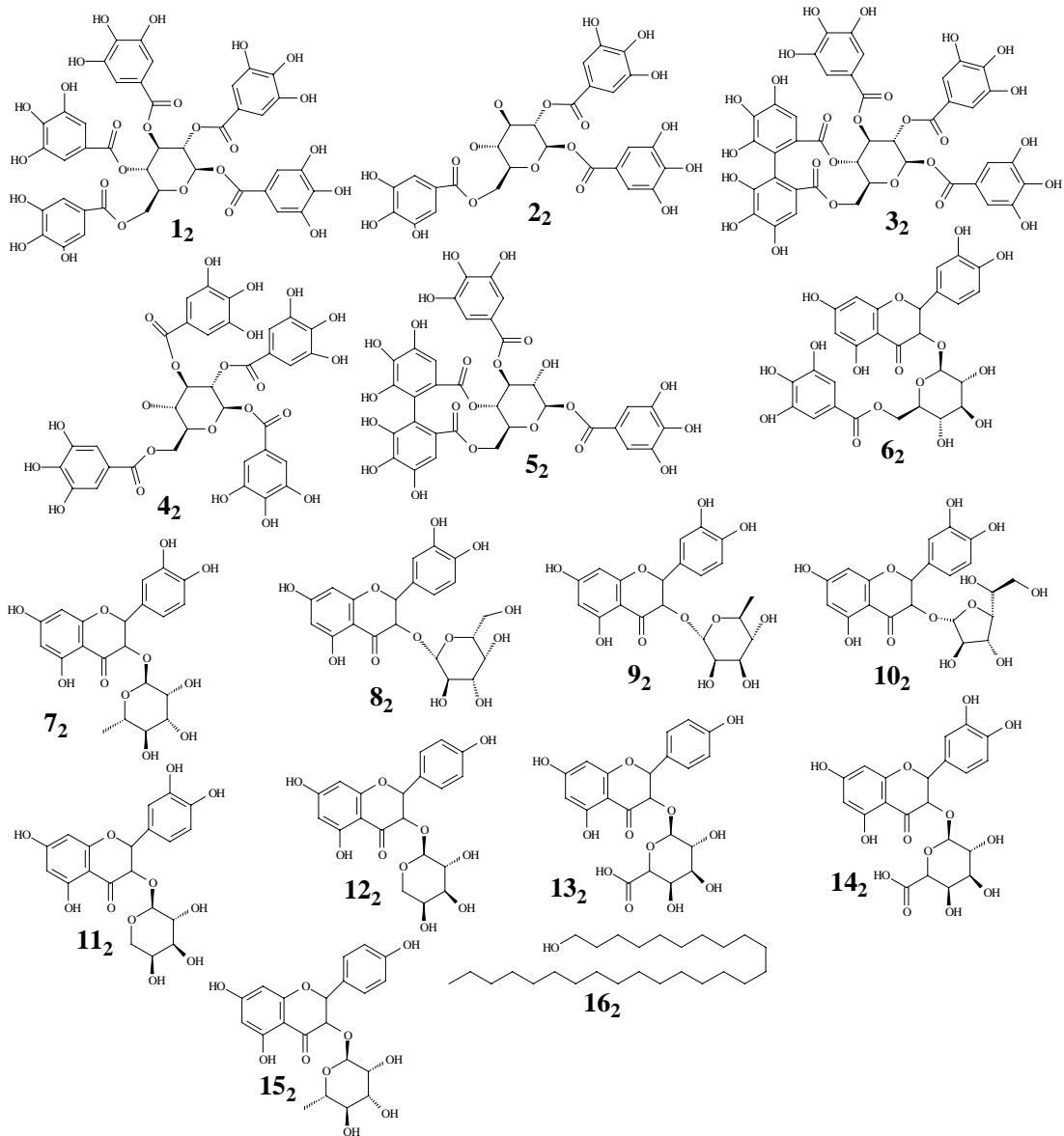
Wie aus Abbildung 8 zu entnehmen ist, konnten Catechin und Epicatechin bereits aus der Gattung *Polygonum* isoliert werden. Plantagosid und Sinapoylglucose dagegen sind Verbindungen, die bis jetzt noch nicht als Inhaltsstoffe der Gattung beschrieben werden konnten. Bei Sinapoylglucose handelt es sich um ein Zimtsäurederivat, während Plantagosid ein Flavonoid ist. Isopropylglucose dagegen läßt sich nicht den aus der Gattung *Polygonum* bekannten charakteristischen Verbindungen zuordnen (siehe V).



**Abbildung 10. Substanzen, die aus der Zellkultur von *Polygonum aubertii* isoliert wurden:**  
17: Catechin, 18: Epicatechin, 19: Isopropylglucose, 20: 1'-Sinapoyl-O-β-D-glucopyranosid,  
21: Plantagosid.

## 2.2.2 Untersuchung des Extraktes von *Epilobium angustifolium*

Aus der Pflanze *Epilobium angustifolium* sind eine Reihe von Verbindungen isoliert worden. Bei den Inhaltsstoffen handelt es sich vor allem um Flavonoide und um Gallussäurederivate, zumeist in Mehrfachestern mit Glukose. Wie Abbildung 11 zeigt, sind bei einigen dieser Verbindungen zwei Gallussäuren zusätzlich untereinander verbunden (Verbindungen **3<sub>2</sub>** und **5<sub>2</sub>**).



**Abbildung 11. Aus der Pflanze *Epilobium angustifolium* isolierte Substanzen:**

**12:** Penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose<sup>[70]</sup>, **22:** 1,2,6-tri-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose<sup>[70]</sup>,  
**32:** Tellimagrandin II<sup>[70]</sup>, **42:** 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose<sup>[70]</sup>, **52:** 2,3-di-O-galloyl-4,6-(S)-  
hexahydroxydiphenoyl- $\beta$ -D-glucopyranose<sup>[70]</sup>, **62:** 1-O-galloyl-6-[5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-  
phenyl)-4-oxo-chroman-O-1- $\beta$ -D-glucopyranose<sup>[71]</sup>, **72:** 6-[5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-4-oxo-  
chroman-3-yloxy]-3-O- $\alpha$ -L-rhamnosid<sup>[71]</sup>, **82:** Hyperperosid<sup>[71]</sup>, **92:** Astilbin<sup>[71]</sup>, **102:** 6-[5,7-dihydroxy-  
2-(4-hydroxy-phenyl)-4-oxo-chroman-3-yloxy]-3-O- $\beta$ -D-furanosid<sup>[71]</sup>, **112:** Guaijaverin<sup>[71]</sup>, **122:** 5,7-  
dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-(3,4,5-trihydroxy-tetrahydro-pyran-2-yloxy)-chroman-4-on<sup>[71]</sup>,  
**132:** 6-[5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-4-oxo-chroman-3-yloxy]-glucuronsäure<sup>[71]</sup>,  
**142:** Dihydrohaemferol-glucuronsäure<sup>[71]</sup>, **152:** Dihydrohaemferol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnosid<sup>[71]</sup>,  
**162:** 1-Hexacosanol<sup>[60]</sup>.

### 2.2.2.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Nach den analytischen Vortests wurde die semipräparative HPLC mit Hilfe des Fließmittelsystems 1 (siehe III.3.2.2; 0 – 50 % Methanol) durchgeführt. Es wurden 180 mg des zuckerfreien Extraktes in einer Chromatographie getrennt.

Abbildung 12 zeigt das Chromatogramm dieser Trennung.

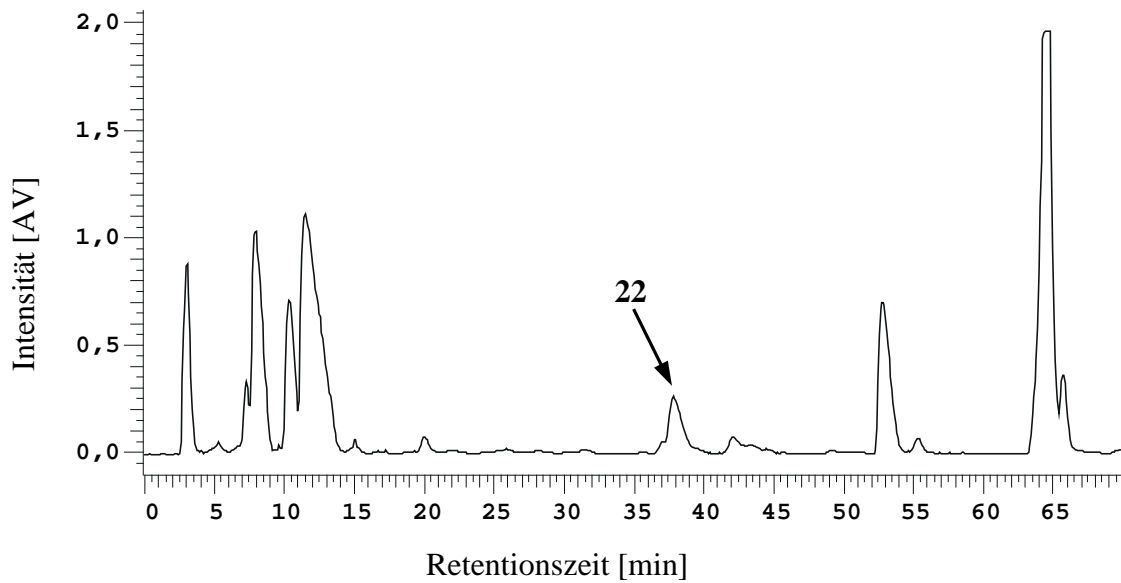


Abbildung 12. Semipräparative Trennung des Extraktes von *Epilobium angustifolium*, (Lichtstreuungsdetektion).

### 2.2.2.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

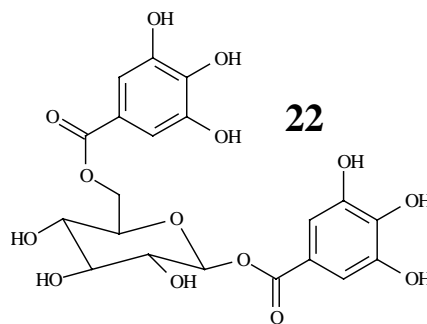
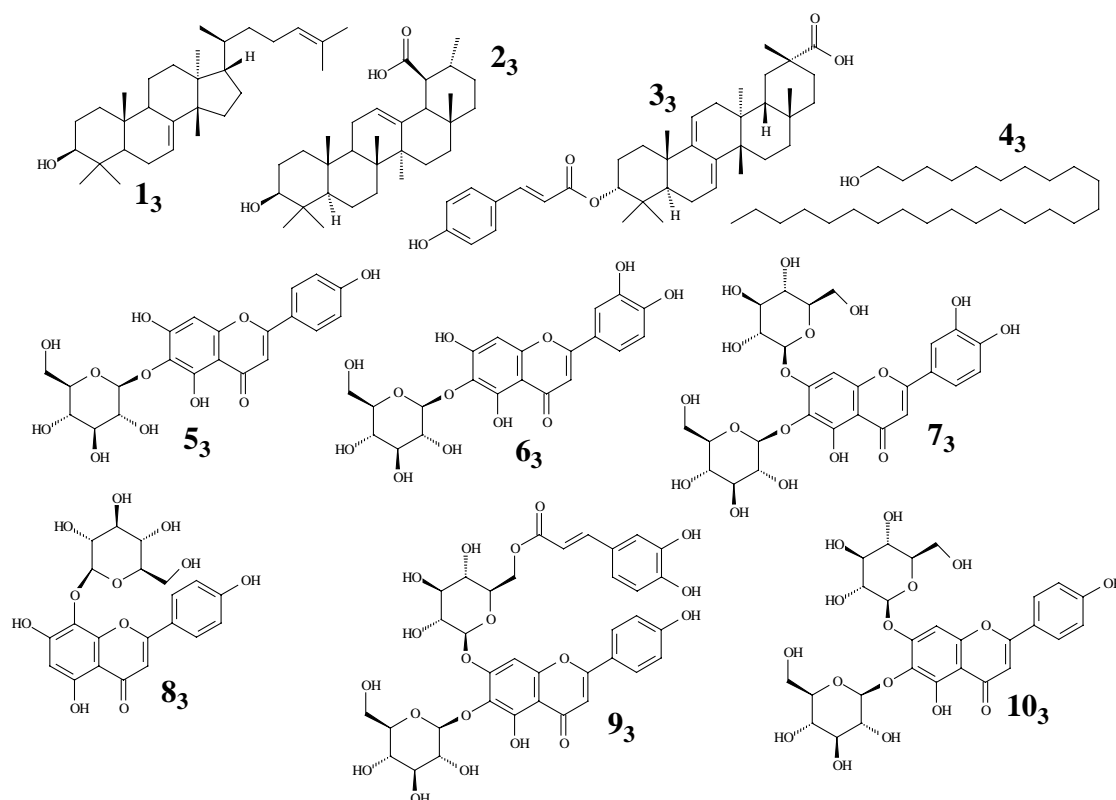


Abbildung 13. Substanz, die aus der Zellkultur von *Epilobium angustifolium* isoliert wurde: 22: 1,6-O-Digalloylglucose.

Nach Untersuchung der Fraktionen der semipräparativen Trennung mit Hilfe der analytischen Kurzgradienten-HPLC (siehe III.3.2.3) und Vereinigung von Fraktionen mit identischem Chromatogramm, konnte nur für eine Probe der Inhaltsstoff eindeutig durch Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie und Vergleich mit Literaturdaten identifiziert werden. Bei dieser Substanz handelt es sich um 1,6-O-Digalloylglucose<sup>[72]</sup> (**22**) (Abbildung 13). Zwar konnte diese Substanz in der Pflanze nicht nachgewiesen werden, aber auch für die intakte Pflanze sind eine ganze Reihe von Gallussäurederivate beschrieben (siehe Abbildung 11).

### 2.2.3 Untersuchung des Extraktes von *Bryonia dioica*



**Abbildung 14. Aus der Pflanze *Bryonia dioica* isolierte Substanzen:**

**1<sub>3</sub>:** (5 $\alpha$ )Tirucalla-7,24-dien-3 $\beta$ -ol<sup>[73]</sup>, **2<sub>3</sub>:** Bryonolsäure<sup>[74]</sup>, **3<sub>3</sub>:** Bryocoumarinsäure<sup>[75]</sup>,  
**4<sub>3</sub>:** 1-Hexacosanol<sup>[76]</sup>, **5<sub>3</sub>:** Iovitexin<sup>[77]</sup>, **6<sub>3</sub>:** Isoorientin<sup>[77]</sup>, **7<sub>3</sub>:** Lutonarin<sup>[77]</sup>, **8<sub>3</sub>:** Vitexin<sup>[77]</sup>,  
**9<sub>3</sub>:** Saponarin-Kaffeensäureester<sup>[77]</sup>, **10<sub>3</sub>:** Saponarin<sup>[77]</sup>.

Die Pflanze *Bryonia dioica* enthält ca. 80 Verbindungen mit Triterpengerüst (siehe Abbildung 14, Verbindungen **1<sub>3</sub>**, **2<sub>3</sub>**, **3<sub>3</sub>**). Die Verbindungen unterscheiden sich in der Anzahl und Position von Doppelbindungen, OH-Gruppen, CH<sub>3</sub>-Gruppen, Zuckern und

weiteren funktionellen Gruppen. Neben diesem Verbindungstypus gibt es vor allem Flavonoide und Kaffeesäurederivate.

### 2.2.3.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Mit Hilfe der analytischen HPLC wurden als geeignetes Trennverfahren für die semipräparative HPLC das Fließmittelsystem 1 (siehe III.3.2.2; 0 – 50 % Methanol) ermittelt. Es wurden 580 mg des zuckerfreien Extraktes in drei HPLC-Läufen getrennt.

Abbildung 15 zeigt das Chromatogramm dieser Trennung.

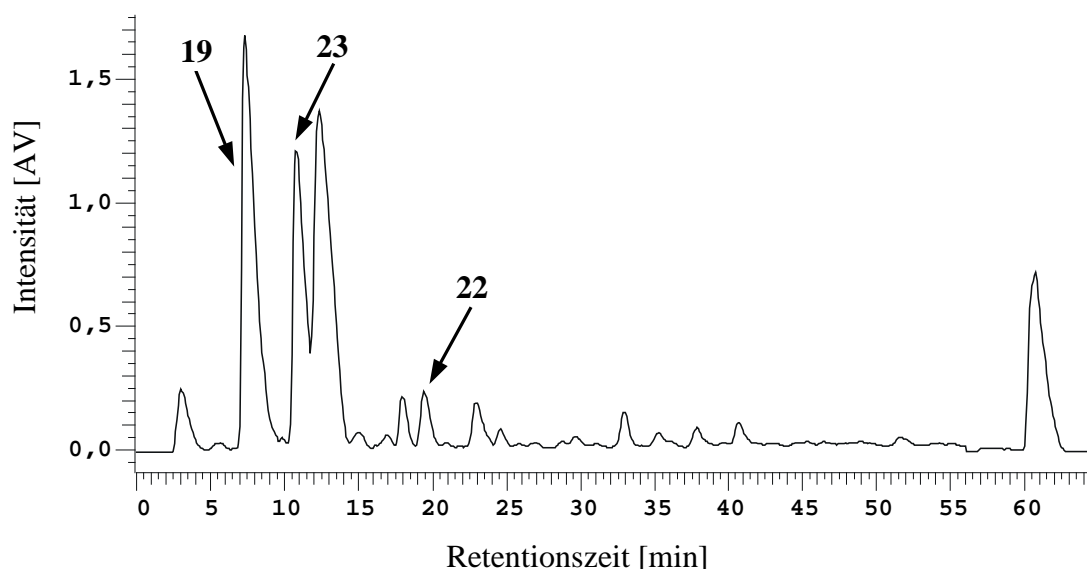
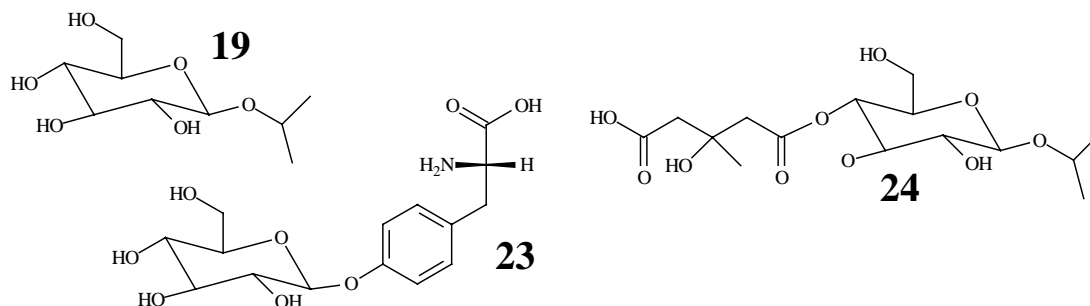


Abbildung 15. Semipräparative Trennung des Extraktes von *Brionia dioica*, (Lichtstredetektion).

### 2.2.3.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

Nach Untersuchung der Fraktionen der semipräparativen Trennung mit Hilfe der analytischen Kurzgradienten-HPLC (siehe III.3.2.3) und Vereinigung von Fraktionen mit identischem Chromatogramm, blieben 3 Proben, bei denen die Struktur der Inhaltsstoffe aufgeklärt werden konnte. Durch Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie und Vergleich mit Literaturdaten konnten Tyrosinyl-O- $\beta$ -D-glucosid<sup>[78]</sup> (**23**), 4-O-(3'-Methylglutaryl)-1-O-isopropyl- $\beta$ -D-glucose<sup>[69,79]</sup> (**24**), Isopropylglucose<sup>[69]</sup> (**19**) eindeutig identifiziert werden. Bei diesen Substanzen handelt es sich nicht um solche, die für *Bryonia dioica* charakteristisch sind. So handelt es sich bei Tyrosinylglucosid um ein

Derivat einer in allen Lebewesen vorkommenden Aminosäure. Auch in dieser Zellsuspension, wie schon in der von *Polygonum aubertii*, wurde Isopropylglucosid isoliert und zusätzlich in veresteter Form mit 3'-Methylglutarylsäure (siehe V).

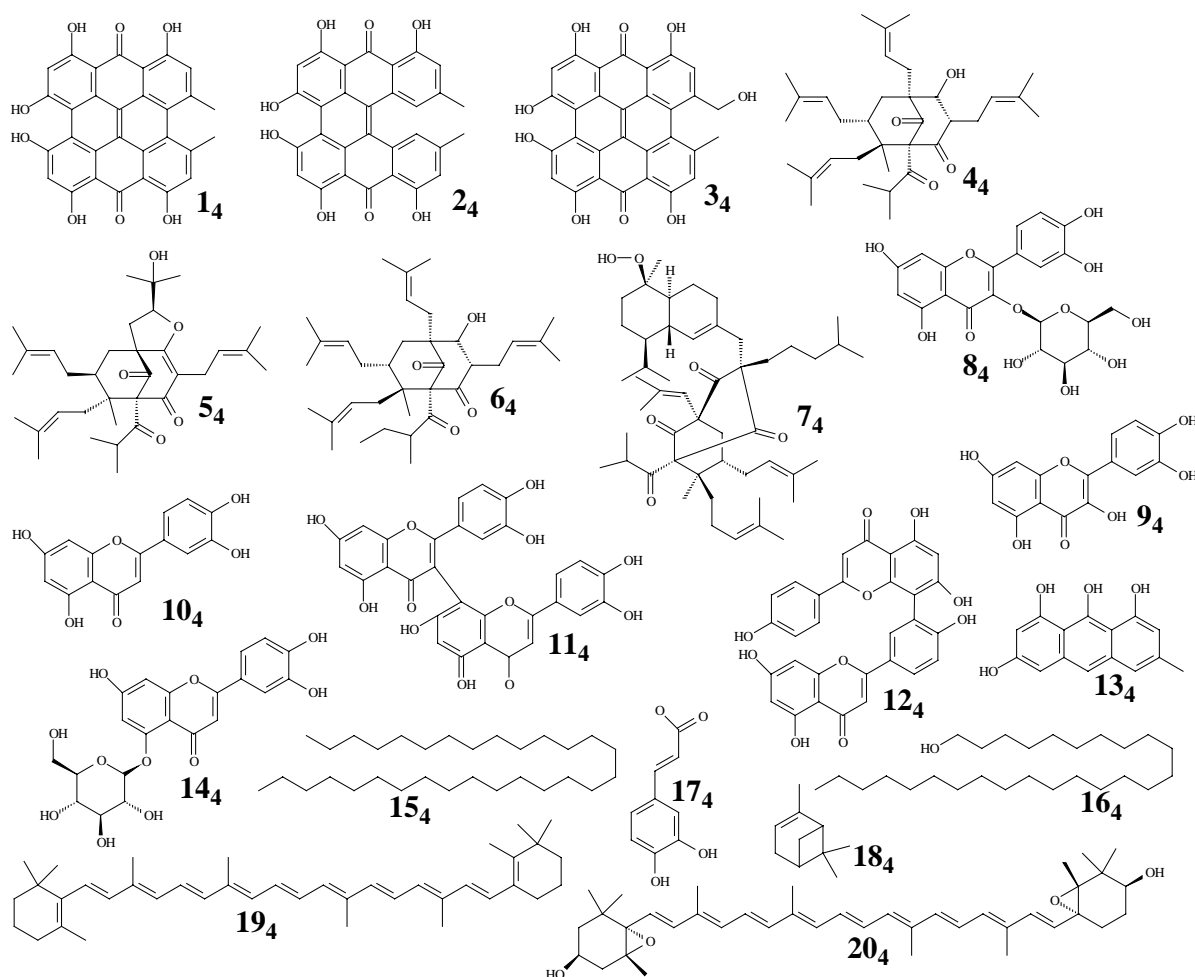


**Abbildung 16. Substanzen, die aus der Zellkultur von *Bryonia dioica* isoliert wurden:**

**23:** Tyrosinyl-O- $\beta$ -D-glucosid, **24:** 4-O-(3'-Methyl-glutaryl)-1-O-isopropyl- $\beta$ -D-glucose,  
**19:** Isopropylglucose.

#### 2.2.4 Untersuchung des Extraktes von *Hypericum perforatum*

Auf die Pflanze *Hypericum perforatum* richtet sich seit einigen Jahren vermehrt das Interesse der Pharmazie, da der Extrakt eine gute Wirksamkeit bei der Behandlung leichter Depressionen zeigt. Als Wirkmechanismus wird eine Hemmung der Monoaminoxidase vermutet, was zu einem erhöhten Neurotransmittergehalt im synaptischen Spalt führen würde. Diesen Wirkmechanismus wurde bereits für synthetischen Psychopharmaka erkannt. Die pharmakologisch wirksame Substanz dieser Arzneipflanze konnte noch nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Einige Untersuchungen weisen inzwischen auf Hyperforin (**4<sub>4</sub>**) (siehe Abbildung 17) hin, während vor ein paar Jahren noch Hypericin (**1<sub>4</sub>**) favorisiert wurde. Neben diesen beiden Verbindungen finden sich leichte abgewandelte Produkte wie Adhyperforin (**6<sub>4</sub>**) und Protohypericin (**2<sub>4</sub>**). Außerdem lassen sich Flavonide, Kaffeesäure (**17<sub>4</sub>**), 1,3,8,9-Tetrahydroxy-6-methyl-anthracen (**13<sub>4</sub>**) und Carotene nachweisen.



**Abbildung 17.** Aus der Pflanze *Hypericum perforatum* und deren Zellkulturen bereits isolierte Substanzen:

**14:** Hypericin<sup>[80]</sup>, **24:** Protohypericin<sup>[80]</sup>, **34:** Pseudohypericin<sup>[80]</sup>, **44:** Hyperforin<sup>[81]</sup>,  
**54:** Furohyperforin<sup>[82]</sup>, **64:** Adhyperforin<sup>[80]</sup>, **74:** Hydroperoxycadiforin<sup>[83]</sup>, **84:** 2-O-β-D-Glucopyranosyl-  
 Quercetin<sup>[84]</sup>, **94:** Quercetin<sup>[84]</sup>, **104:** Luteolin<sup>[85]</sup>, **114:** 5,7,5'-Tetrahydroxy-2,2'-bis-(4-hydroxy-  
 phenyl-[3,8']bichromenyl-4,4'-dion<sup>[80]</sup>, **124:** 5,7,5'-Tetrahydroxy-2'-(4-hydroxy-phenyl-2,8'-(4-  
 hydroxy-m-phenyl)-bis-chromen-4-on<sup>[80]</sup>, **134:** 1,3,8,9-Tetrahydroxy-6-methyl-anthracen<sup>[60]</sup>,  
**144:** 5-O-β-D-Glucopyranosyl-Luteolin<sup>[86]</sup> (isoliert nur aus Kalluskulturen von *Hypericum*  
*perforatum*), **154:** Nonacosan<sup>[87]</sup>, **164:** 1-Hexacosanol<sup>[76]</sup>, **174:** Kaffeesäure<sup>[88]</sup>, **184:** Pin-2-en<sup>[80]</sup>,  
**194:** β-Caroten<sup>[85]</sup>, **204:** Violaxanthin<sup>[85]</sup>.

### 2.2.4.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Das Fließmittelsystem 2 (siehe III.3.2.2; 5 - 75 % Methanol) wurde als das geeignete Trennverfahren ermittelt. 600 mg des zuckerfreien Extraktes wurden in drei chromatographischen Läufen getrennt. In Abbildung 18 ist das Chromatogramm einer dieser Trennungen abgebildet.

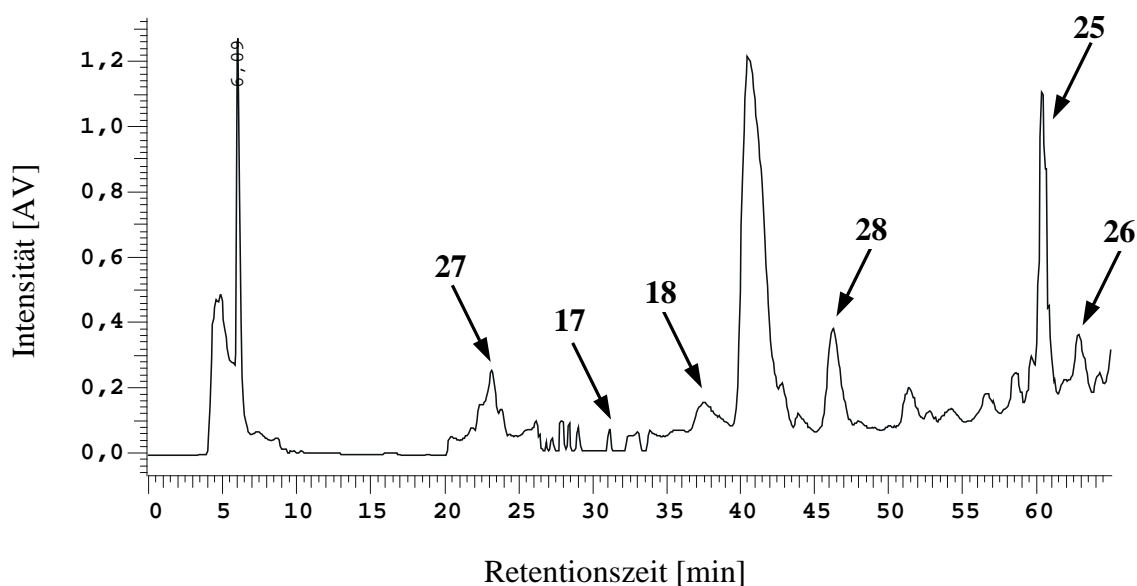


Abbildung 18. Semipräparative Trennung des Extraktes von *Hypericum perforatum*, (Lichtstredetektion).

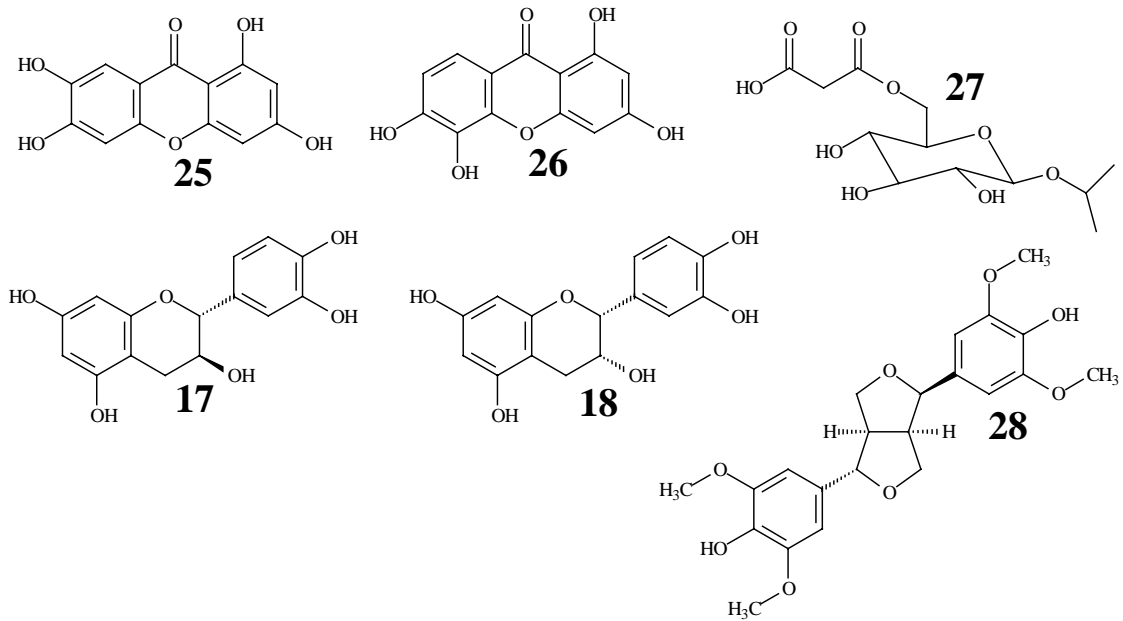
#### 2.2.4.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

Die Fraktionen der semipräparativen Trennung wurden mit Hilfe der analytischen Kurzgradienten-HPLC (siehe III.3.2.3) untersucht und Fraktionen mit identischem Chromatographiemuster vereinigt. Es blieben 6 Proben, für die die Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Neben Catechin<sup>[65]</sup> (**17**), Epicatechin<sup>[65]</sup> (**18**) und zwei Xanthenonderivaten, Magniferitin<sup>[89]</sup> (**25**) und 1,3,5,6-Tetrahydroxy-9*H*-xanthen-9-on<sup>[78,90]</sup> (**26**), konnten Episyningaresinol<sup>[91,92]</sup> (**28**) und 1-*O*-Isopropyl-6-*O*-Malonyl- $\beta$ -D-Glucose<sup>[69,93]</sup> (**27**) eindeutig in ihrer Struktur durch Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie und Literaturdatenvergleich identifiziert werden (siehe Abbildung 19).

Vergleicht man die isolierten Verbindungen mit denen, die aus der Pflanze bekannt sind, so läßt sich das Auftreten von Catechin und Epicatechin, obwohl sie für die Pflanze noch nicht beschrieben wurde, durch die Verwandtschaft zu den Flavonoiden erklären. Eine Abweichung vom erwarteten Inhaltsstoffmuster stellt die Isolierung der Xanthonderivate (**25**, **26**), des Isopropylderivates (**27**) und von Episyningaresinol (**28**) dar. Letzteres gehört zur Stoffklasse der Lignane, die zum Beispiel in den Gattungen Forsythia und Syringa zu finden sind (siehe V).

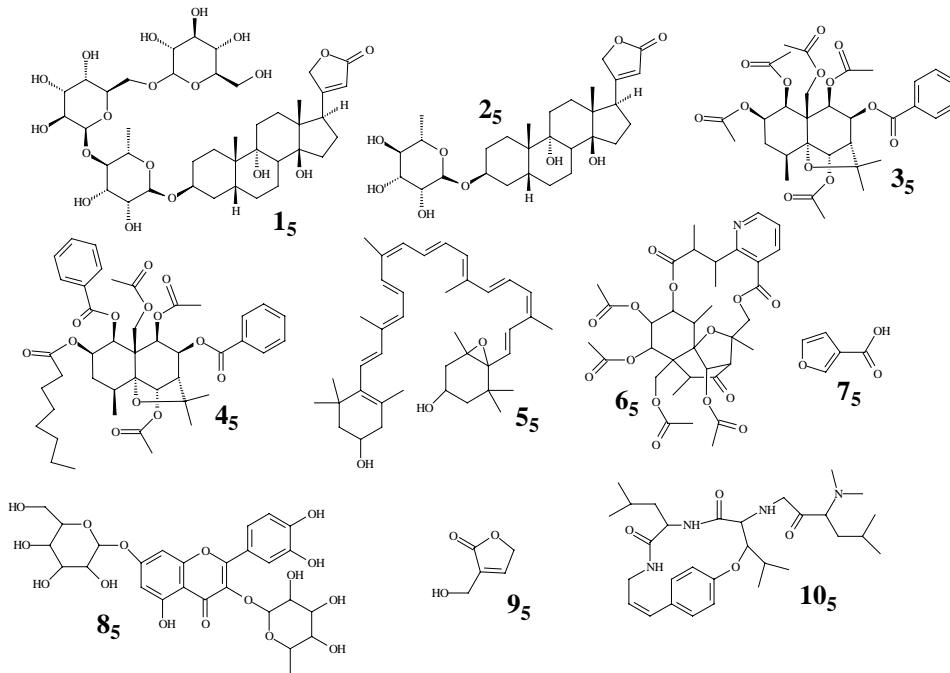




**Abbildung 19. Substanzen, die aus der Zellkultur von *Hypericum perforatum* isoliert wurden:**  
**17:** Catechin, **18:** Epicatechin, **25:** 1,3,6,7-Tetrahydroxy-9*H*-xanthen-9-on (Magniferitin)  
**26:** 1,3,5,6-Tetrahydroxy-9*H*-xanthen-9-on, **27:** 1-O-Isopropyl-6-O-Malonyl- $\beta$ -D-Glucose,  
**28:** Episingaresinol.

### 2.2.5 Untersuchung des Extraktes von *Euonimus europaeus*

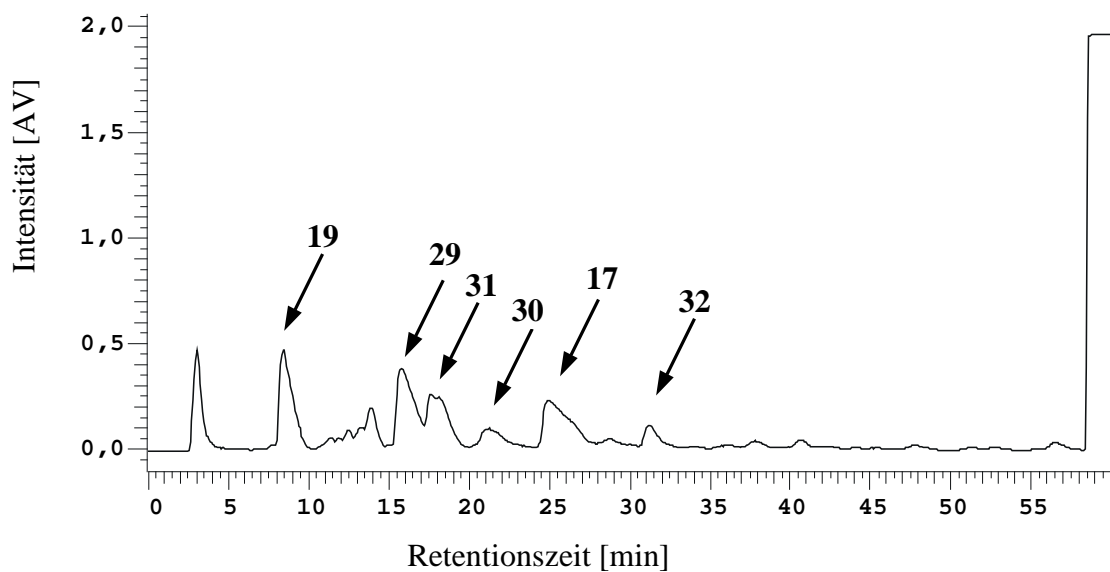
Aus der Pflanze *Euonimus europaeus* lassen sich neben Furanderivaten, Triterpenen und Flavonoiden polycyclische (3<sub>5</sub>, 3<sub>6</sub>) und Stickstoff-haltige Verbindungen (6<sub>5</sub>, 10<sub>5</sub>) (Abbildung 20) isolieren.



**Abbildung 20. Aus der Pflanze *Euonimus europaeus* isolierte Substanzen:**

1<sub>5</sub>: 3β-[O<sup>4</sup>-(O<sup>6</sup>-β-glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl)-α-L-rhamnopyranosyloxy]-14-hydroxy-5β.14β-cardo(22)-enolid<sup>[94]</sup>, 2<sub>5</sub>: Evonosolid<sup>[95]</sup>, 3<sub>5</sub>: 8-Benzoessäure-4,5,7,12-tetraacetoxy-6-acetoxymethyl-2,10,10-trimethyl-11-oxa-tricyclo[7.2.1.0<sup>1,6</sup>]dodec-8-ylester<sup>[96]</sup>, 4<sub>5</sub>: 5,8-Di-Benzoessäure-4-octansäure-7,12-diacetoxy-6-acetoxymethyl-2,10,10-trimethyl-11-oxa-tricyclo[7.2.1.0<sup>1,6</sup>]dodec-8-ylester<sup>[96]</sup>, 5<sub>5</sub>: Antheraxanthin<sup>[60]</sup>, 6<sub>5</sub>: 1,2,4,9,14-Penta-acetyl-perdeacylevolin<sup>[60]</sup>, 7<sub>5</sub>: Furan-3-carbonsäure<sup>[97]</sup>, 8<sub>5</sub>: 3-O-α-L-Rhamnopyranosyl-Quercimetrin<sup>[60]</sup>, 9<sub>5</sub>: 3-Hydroxymethyl-2-(5H)-furanon<sup>[1]</sup>, 10<sub>5</sub>: Frangufolin<sup>[60]</sup>.

### 2.2.5.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

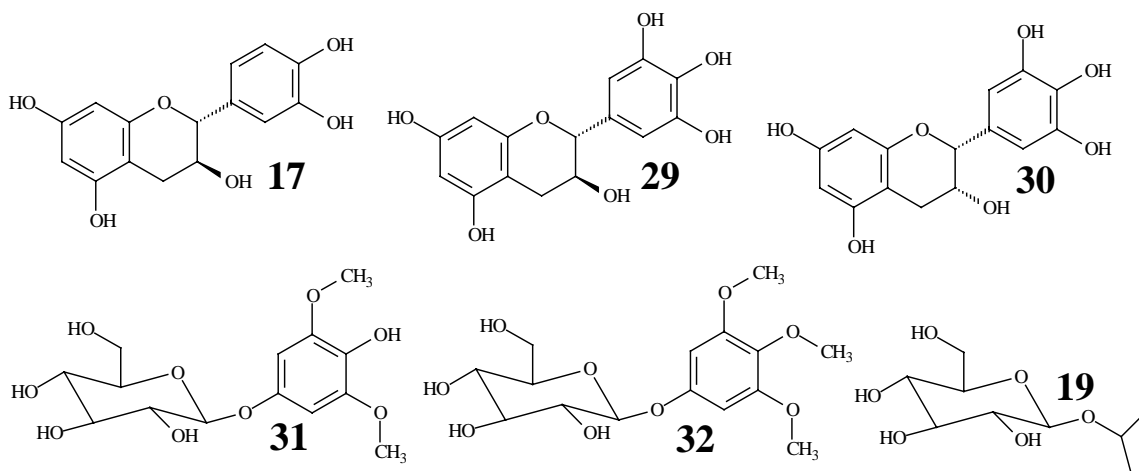


**Abbildung 21. Semipräparative Trennung des Extraktes von *Euonimus europaeus*, (Lichtstredetektion).**

Mit Hilfe der analytischen HPLC wurde als geeignetes Trennverfahren für die semipräparative HPLC das Fließmittelsystem 2 (siehe III.3.2.2; 5 – 75 % Methanol) ermittelt. Es wurden 320 mg des zuckerfreien Extraktes in zwei HPLC-Läufen getrennt. In Abbildung 21 ist das Chromatogramm einer der beiden Trennungen abgebildet.

### 2.2.5.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

Nach Vereinigung von Fraktionen mit identischem Chromatogramm der analytischen Kontrolle blieben 6 Proben, bei denen die Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe durchgeführt wurde. Es konnte Catechin<sup>[65]</sup> (**17**), Gallo catechin<sup>[65]</sup> (**29**), Epigallocatechin<sup>[65]</sup> (**30**), 1-O-β-D-Glucopyranosyl-2,4-dimethoxy-3-hydroxy-benzen<sup>[98]</sup> (**31**), 1-O-β-D-Glucopyranosyl-2,3,4-trimethoxy-benzen<sup>[99]</sup> (**32**) und Isopropylglucose<sup>[69]</sup> (**19**) durch Masenspektrometrie, <sup>1</sup>H-NMR und Vergleich mit Literaturdaten eindeutig identifiziert werden (siehe VI).



**Abbildung 22. Substanzen, die aus der Zellkultur von *Eunimus europaeus* isoliert wurden:**

**17:** Catechin, **19:** Isopropylglucose, **29:** Gallo catechin **30:** Epigallocatechin, **31:** 1-O-β-D-Glucopyranosyl-2,4-dimethoxy-3-hydroxy-benzen, **32:** 1-O-β-D-Glucopyranosyl-2,3,4-trimethoxy-benzen.

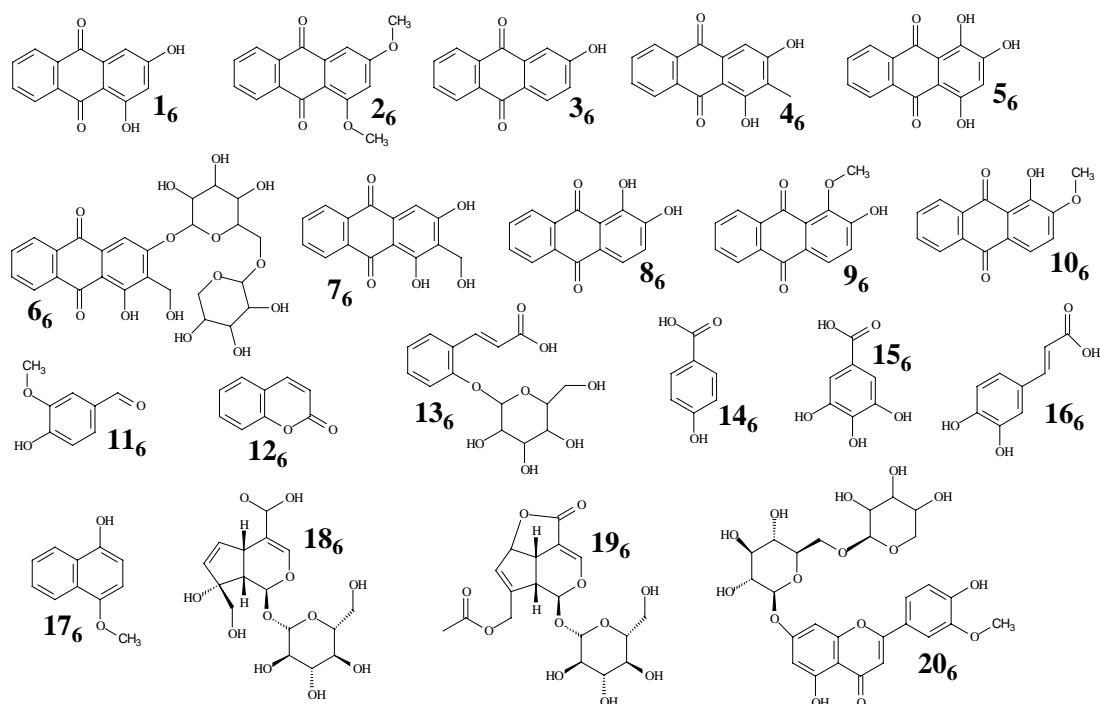
Auch wenn die Catechine bisher noch nicht als Inhaltsstoffe von *Euonimus europaeus* isoliert wurden, so ist die Tatsache, daß sie aus der Zellkultur isoliert werden konnten, nicht sehr bemerkenswert. Zum einen sind die Catechine in vielen Pflanzenfamilien zu finden und zum anderen sind die strukturell verwandten Flavonoide bereits in der Pflanze nachgewiesen worden.

Auch für die beiden Derivate von 1,2,3,5-Tetrahydroxybenzen (**31**, **32**) lassen sich keine ähnlichen Verbindungen in der Pflanze finden, sieht man einmal von den Benzoesäurederivaten ab.

Wie schon in den Suspensionskulturen von *Polygonum aubertii* und *Bryonia dioica* konnte auch aus der von *Epilobium angustifolium* Isopropylglucose isoliert werden. Auch für diese Art sind keine Verbindungen bekannt, die Isopropanol als Strukturelement enthalten (siehe V).

### 2.2.6 Untersuchung des Extraktes von *Galium odoratum*

Eine Anzahl verschiedener Substanzen konnte inzwischen aus der Pflanze *Galium odoratum* isoliert werden.



**Abbildung 23. Aus der Pflanze *Galium odoratum* isolierte Substanzen:**

**1<sub>6</sub>**: 1,3-Dihydroxy-anthrachinon<sup>[100]</sup>, **2<sub>6</sub>**: 1,3-Dimethoxy-anthrachinon<sup>[60]</sup>, **3<sub>6</sub>**: 2-Hydroxy-anthrachinon<sup>[100]</sup>, **4<sub>6</sub>**: 1,3-Dihydroxy-2-methyl-anthrachinon<sup>[100]</sup>, **5<sub>6</sub>**: 1,2,4-Trihydroxy-anthrachinon<sup>[100]</sup>, **6<sub>6</sub>**: 3-*O*-[β-D-Xylopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-1-hydroxy-2-hydroxymethyl-anthrachinon<sup>[60]</sup>, **7<sub>6</sub>**: 1,3-Dihydroxy-2-hydroxymethyl-anthrachinon<sup>[100]</sup>, **8<sub>6</sub>**: 1,2-Dihydroxy-anthrachinon<sup>[100]</sup>, **9<sub>6</sub>**: 2-Hydroxy-1-methoxy-anthrachinon<sup>[100]</sup>, **10<sub>6</sub>**: 1-Hydroxy-2-methoxy-anthrachinon<sup>[100]</sup>, **11<sub>6</sub>**: Vanillin<sup>[100]</sup>, **12<sub>6</sub>**: Coumarin<sup>[101]</sup>, **13<sub>6</sub>**: Melitoid<sup>[100]</sup>, **14<sub>6</sub>**: 4-Hydroxybenzoesäure<sup>[100]</sup>, **15<sub>6</sub>**: Gallsäure<sup>[100]</sup>, **16<sub>6</sub>**: Kaffeesäure<sup>[100]</sup>, **17<sub>6</sub>**: 1-Hydroxy-4-methoxy-naphtalin<sup>[60]</sup>, **18<sub>6</sub>**: (4a*S*)-1*c*-β-D-glucopyranosyloxy-7*t*-hydroxymethyl-(4*a**r*,7*a**c*)-1,4*a*,7,7*a*-tetrahydro-cyclopenta[*c*]pyran-4-carboxyl-säure<sup>[102]</sup>, **19<sub>6</sub>**: Asperulosid<sup>[102]</sup>, **20<sub>6</sub>**: 7-*O*-[β-D-Xylopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-3',5,7-trihydroxy-4'-methoxy-flavon<sup>[60]</sup>.

Die für den charakteristischen Geruch der Pflanze verantwortliche Substanz Cumarin (**12**<sub>6</sub>) entsteht beim Verwelken aus Melitosid (**13**<sub>6</sub>) unter Glukoseabspaltung und spontaner Laktonbildung. Neben Flavonoiden finden sich Vanillin (**11**<sub>6</sub>), Kaffeesäure (**16**<sub>6</sub>) und eine große Zahl von Anthrachinonderivaten. Abbildung 23 zeigt eine Auswahl der Inhaltsstoffe.

### 2.2.6.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Die semipräparative HPLC wurde mit Hilfe des Fließmittelsystem 1 (siehe: III.3.2.2; 0 – 50 % Methanol) durchgeführt. 600 mg des zuckerfreien Extraktes wurden in drei Chromatographien getrennt. In Abbildung 24 ist ein Chromatogramm dieser Trennungen zu sehen.

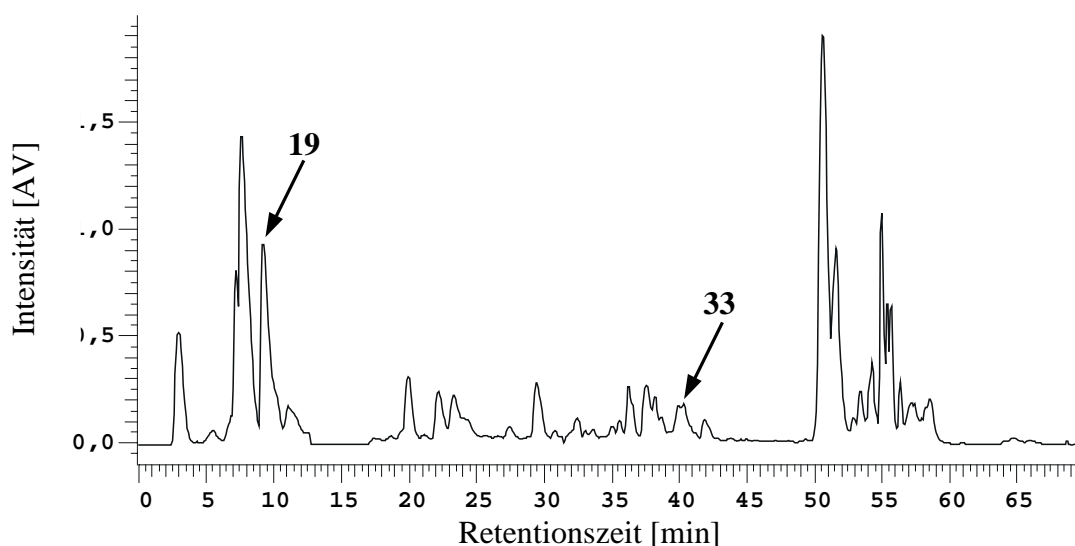


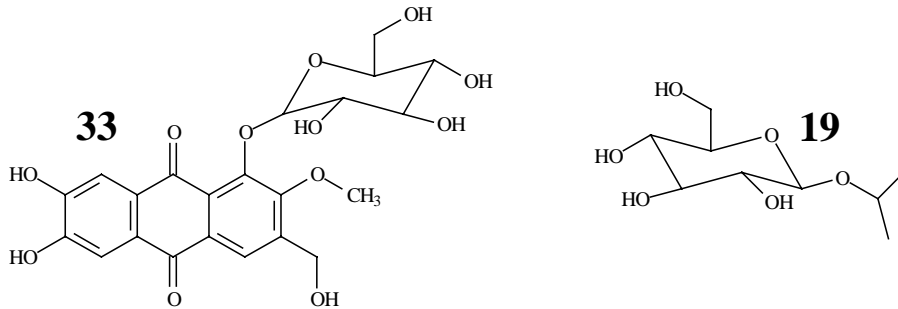
Abbildung 24. Semipräparative Trennung des Extraktes von *Galium odoratum*, (Lichtstredetektion).

### 2.2.6.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

Nach Vereinigung der Fraktionen gleicher Kurzgradienten-Chromatogramme wurde versucht, die Strukturen der isolierten Substanzen mit Hilfe von MS-Spektrometrie und NMR-Spektroskopie aufzuklären. Es zeigte sich, daß der Extrakt eine Reihe verschiedener Anthrachinone enthielt. Nur bei einer dieser Fraktionen gelang es aber die Struktur eindeutig aufzuklären. Durch H,H-Cosy-, HMBC- und HSQC-Messungen konnte

7,8-Dihydroxy-1-O- $\beta$ -D-glycopyranosyl-3-hydroxymethyl-2-methoxy-anthrachinon (**33**) und Isopropylglucose<sup>[69]</sup> (**19**) eindeutig identifiziert werden (siehe Abbildung 25).

Wie Abbildung 23 zeigt, enthält auch die Pflanze eine Reihe verschiedener Antrachinone. Dagegen sind auch aus dieser Pflanze Isopropanolderivate bisher nicht isoliert worden.



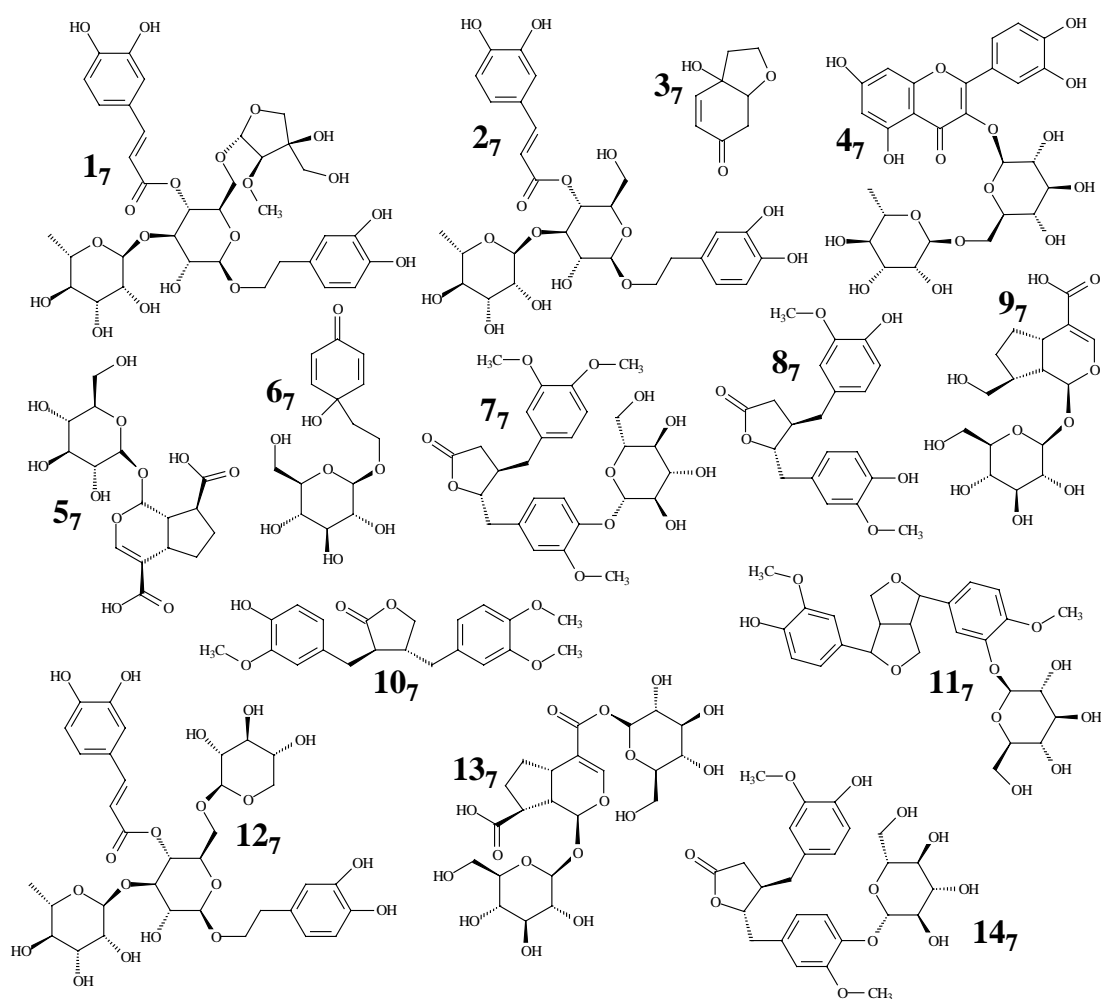
**Abbildung 25. Substanzen, die aus der Zellkultur von *Galium odoratum* isoliert wurden:**

**33:** 7,8-Dihydroxy-1-O- $\beta$ -D-glycopyranosyl-3-hydroxymethyl-2-methoxy-anthrachinon,

**19:** Isopropylglucose.

## 2.2.7 Untersuchung des Extraktes von *Forsythia viridissima*

Einige Substanzen, die aus der Pflanze *Forsythia viridissima* isoliert werden können, wurden nach der Gattung benannt, zum Beispiel Forsythid (**57**) und Forsythosid G (**17**); ferner lassen sich Flavonoide und Lignane wie Matairesinol (**87**) nachweisen. Inzwischen gibt es auch Substanzen, die aus Zellkulturen von *Forsythia viridissima* isoliert wurden. Diese sind zum Teil auch in der Pflanze zu finden oder aber zumindestens strukturell eng mit diesen verwandt (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 26. Aus der Pflanze und aus Zellkulturen von *Forsythia viridissima* isolierte Substanzen:**

**1<sub>7</sub>**: Forsythosid G<sup>[103]</sup>, **2<sub>7</sub>**: Acteosid<sup>[103,105]</sup> (+), **3<sub>7</sub>**: 3a-hydroxy-3,3a,7,7a-tetrahydro-2H-benzofuran-6-on<sup>[105]</sup>(\*), **4<sub>7</sub>**: Rutin<sup>[104]</sup>, **5<sub>7</sub>**: Forsythid<sup>[109]</sup>, **6<sub>7</sub>**: Cornosid<sup>[105]</sup>(\*), **7<sub>7</sub>**: Arctiin<sup>[104,105]</sup> (+), **8<sub>7</sub>**: Matairesinol<sup>[104]</sup>, **9<sub>7</sub>**: Adoxosidsäure<sup>[109]</sup>, **10<sub>7</sub>**: 4-Methyl-O-Matairesinol<sup>[104]</sup>, **11<sub>7</sub>**: 2-[5-[4-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-tetrahydro-furo[3,4-c]furan-1-yl]-2-methoxy-phenoxy]-6-hydroxymethyl-tetrahydro-pyran-e,4,5-triol<sup>[105]</sup>(\*) **12<sub>7</sub>**: Forsythosid F<sup>[103,105]</sup>(+) **13<sub>7</sub>**: 11-Glucosyl-forsythid<sup>[109]</sup>, **14<sub>7</sub>**: Matairesonid<sup>[105]</sup>(\*).

(+): sowohl aus der Pflanze als auch aus Zellkulturen von *F. viridissima* isoliert

(\*): nur aus Zellkulturen von *F. viridissima* isoliert.

### 2.2.7.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Durch analytische Vortests wurde das Fließmittelsystem 1 (siehe: III.3.2.2; 0 – 50 % Methanol) als geeignet ermittelt. Insgesamt wurden 800 mg des zuckerfreien Extraktes in vier chromatographischen Läufen getrennt. In Abbildung 27 ist das Chromatogramm einer dieser Trennungen abgebildet.

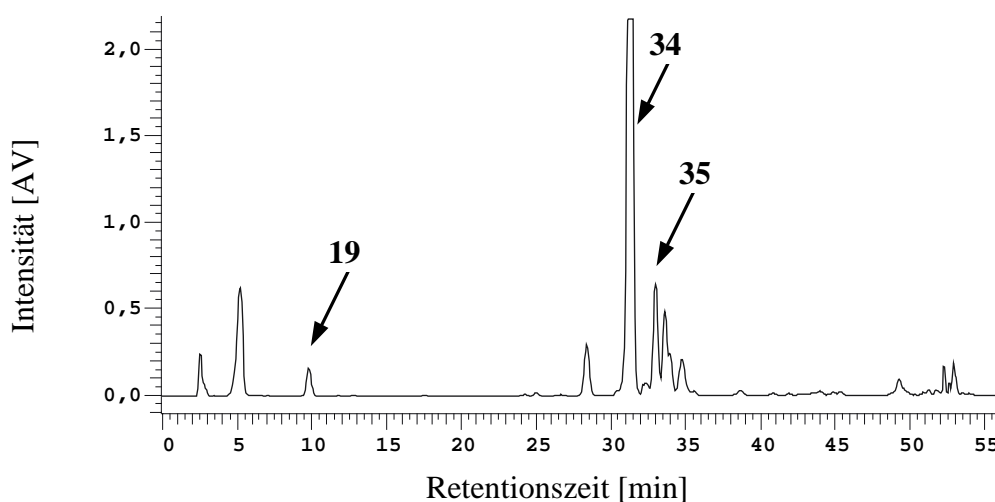


Abbildung 27. Semipräparative Trennung des Extraktes von *Forsythia viridissima* (Lichtstredetektion).

### 2.2.7.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

Nach Untersuchung der Fraktionen der semipräparativen Trennung mit Hilfe der analytischen Kurzgradienten-HPLC (siehe III.3.2.3) und Vereinigung von Fraktionen mit identischem Chromatogramm, konnte bei 4 Proben die Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe erfolgreich durchgeführt werden. Durch Vergleich mit Literaturdaten ließ sich die Struktur von Verbascosid<sup>[106]</sup> (34), Matairesinosid<sup>[107]</sup> (35) und Isopropylglucose<sup>[69]</sup> (19) eindeutig belegen.

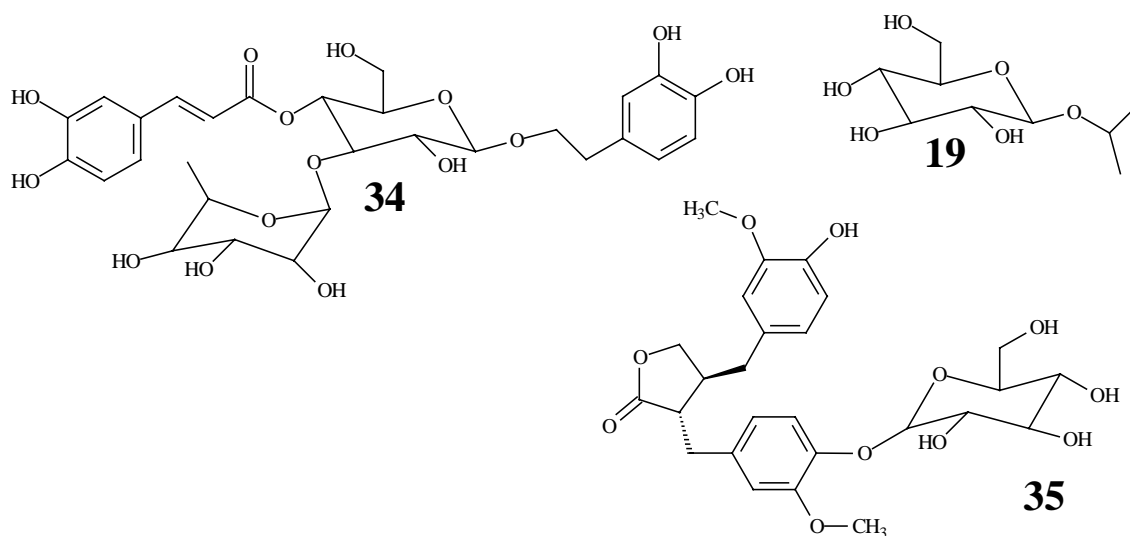


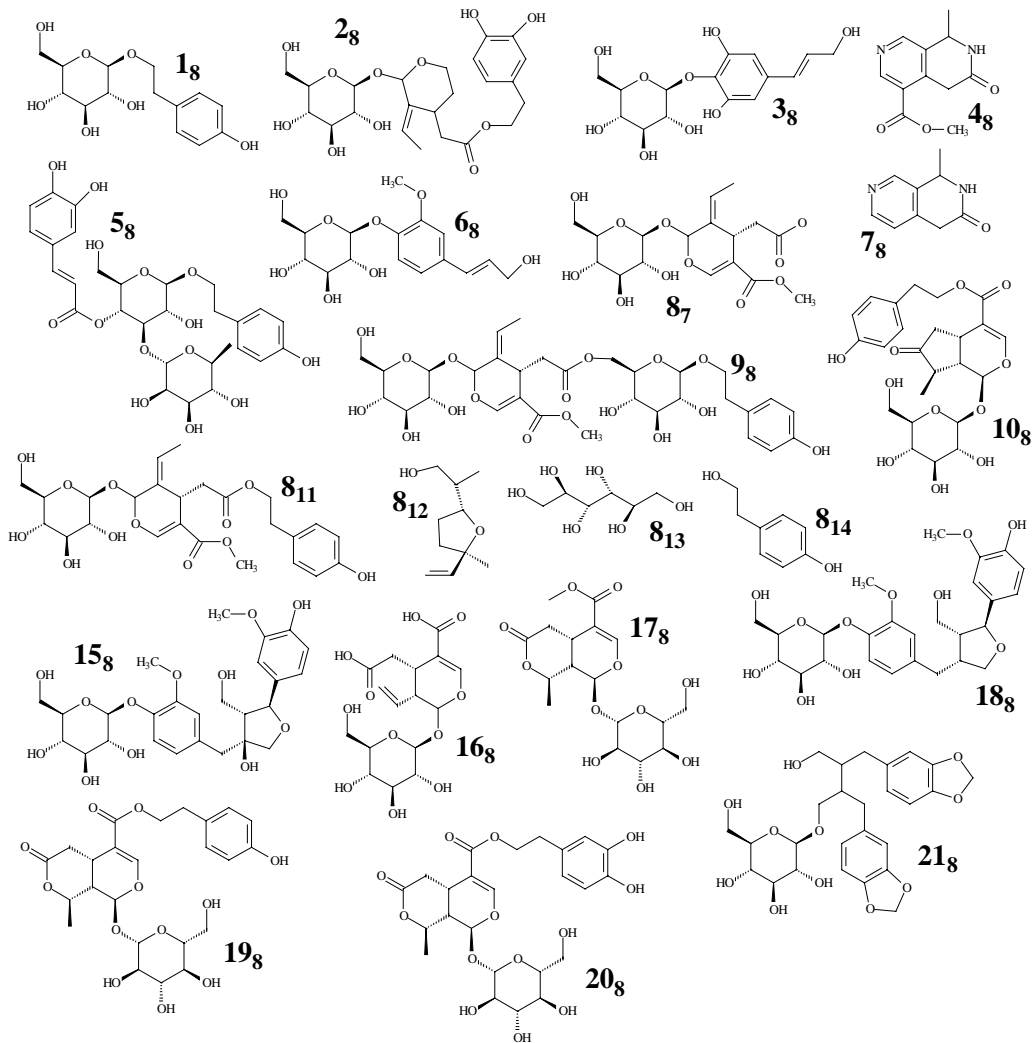
Abbildung 28. Substanzen, die aus der Zellkultur von *Forsythia viridissima* isoliert wurden: 34: Verbascosid, 35: Matairesinosid, 19: Isopropylglucose.



Während Lignane wie Matairesinosid für die Gattung *Forsythia* charakteristisch sind und auch aus *Forsythia viridissima* isoliert werden konnte und auch für Verbascosid analoge Strukturen wie Forsythosid G (**17**) und Acteosid (**27**) zu finden sind, wurden noch keine Isopropanolderivate aus der Pflanze isoliert (siehe V).

Abbildung 28 zeigt die aus der Zellkultur von *Forsythia viridissima* isolierten Substanzen.

### 2.2.8 Untersuchung des Extraktes von *Syringa vulgaris*



**Abbildung 29: Aus der Pflanze *Syringa vulgaris* isolierte Substanzen:**

- 18:** (4-Hydroxy-phenethyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid<sup>[108]</sup>, **28:** 4-[2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethoxycarbonylmethyl]-5-ethyliden-6-(3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyl-tetrahydro-pyran-2-yloxy)-5,6-dihydro-4H-pyran-3-carboxyl-säure-methyl-ester<sup>[109]</sup>, **38:** [4-(3-hydroxy-*trans*-propenyl)-2,6-dimethoxy-phenoxy]-tetrahydro-pyran-3,4,5-triol<sup>[110]</sup>, **48:** 8-Methyl-6-Oxo-5,6,7,8-tetrahydro-[2,7]naphthydrin-4-carboxylsäure-methylester<sup>[111]</sup>, **58:** Acteosid<sup>[108]</sup>, **88:** Coniferin<sup>[110]</sup>, **78:** Oleosid, **88:** 1-Methyl-1,4-dihydro-2H-[2,7]naphthydin-3-on<sup>[109]</sup>, **98:** Nuezhenid<sup>[110]</sup>, **108:** Syringopicrosid<sup>[112]</sup>, **118:** Ligistrosid<sup>[113]</sup>, **126:** Lilac-alkohol-a<sup>[114]</sup>, **138:** D-Mannit<sup>[115]</sup>, **146:** 4-Hydroxy-phenethyl alkohol<sup>[111]</sup>, **158:** (+)-Lariciresinol-4-O- $\beta$ -D-glucopyranosid<sup>[113]</sup>, **168:** Secologanosid<sup>[109]</sup>, **178:** 8-Epikingisid<sup>[116]</sup>, **188:** (-)-Olivil-4'-O- $\beta$ -D-glucopyranosid<sup>[117]</sup>, **198:** Lilacosid<sup>[109]</sup>, **208:** Fliederosid<sup>[109]</sup>, **218:** Neoacteosid<sup>[60]</sup>

Aus der Pflanze *Syringa vulgaris* konnte eine Reihe von Verbindungen isoliert werden, von denen viele Kaffeesäure, 4-Hydroxy-phenylethyl oder 3,4-Dihydroxyphenylethyl als Strukturelemente enthalten. Ferner finden sich Pyranlactone wie Fliederosid (**20<sub>8</sub>**) oder Strukturanaloga mit geöffnetem Lactonring wie Ligistrosid (**11<sub>8</sub>**) (siehe Abbildung 29).

### 2.2.8.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Mit Hilfe der analytischen HPLC ließ sich als geeignetes Trennsystem für die semipräparative HPLC das Fließmittel 1 (siehe III.3.2.2; 0 – 50 % Methanol) ermitteln. Es wurden 1000 mg des zuckerfreien Extraktes in fünf HPLC-Läufen getrennt. Abbildung 30 zeigt eines der Chromatogramme dieser Trennungen.

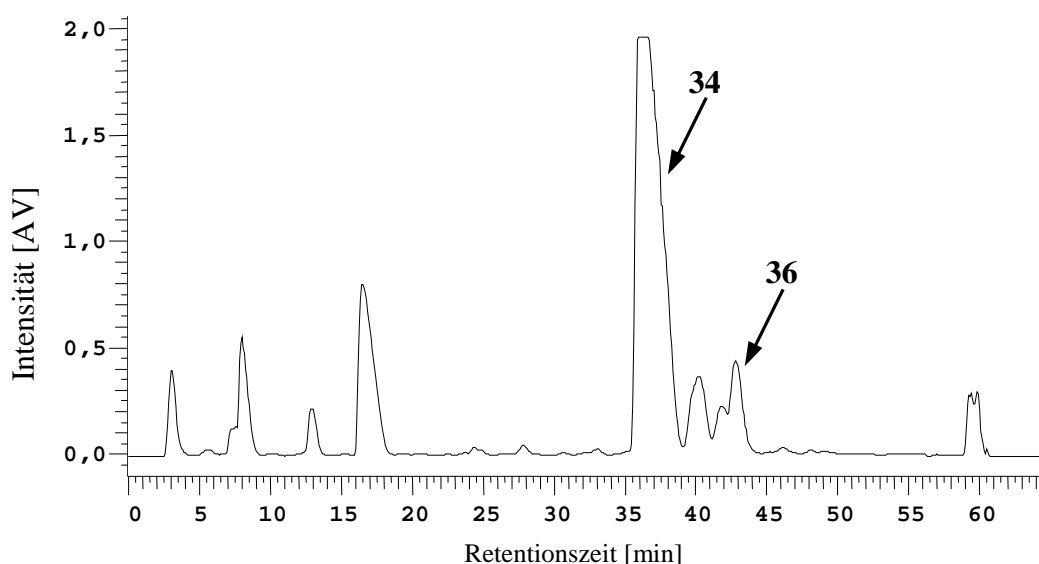
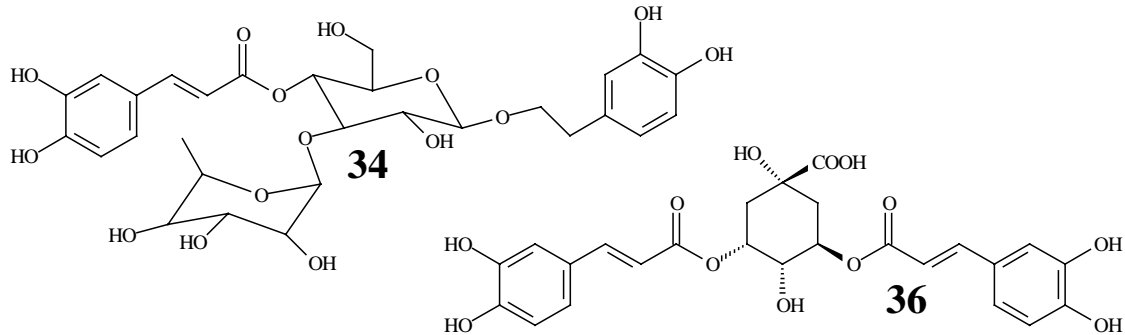


Abbildung 30. Semipräparative Trennung des Extraktes von *Syringa vulgaris*, (Lichtstreuendetektion).

### 2.2.8.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

Untersuchungen der Fraktionen der semipräparativen Trennung mit Hilfe der analytischen Kurzgradienten-HPLC (siehe III.3.2.3) ermöglichte durch den Vergleich der erhaltenen Chromatogramme die Vereinigung von Fraktionen mit identischen Inhaltsstoffen. Die Strukturaufklärung mit Hilfe von LC-MS und  $^1\text{H-NMR}$  ergab 2 Verbindungen, deren Struktur mit Hilfe von Literaturdaten bestätigt werden konnte. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um Verbascosid<sup>[106]</sup> (**34**) und 3,5-Dicaffeoyl-chinasäure<sup>[124]</sup> (**36**) (siehe ).

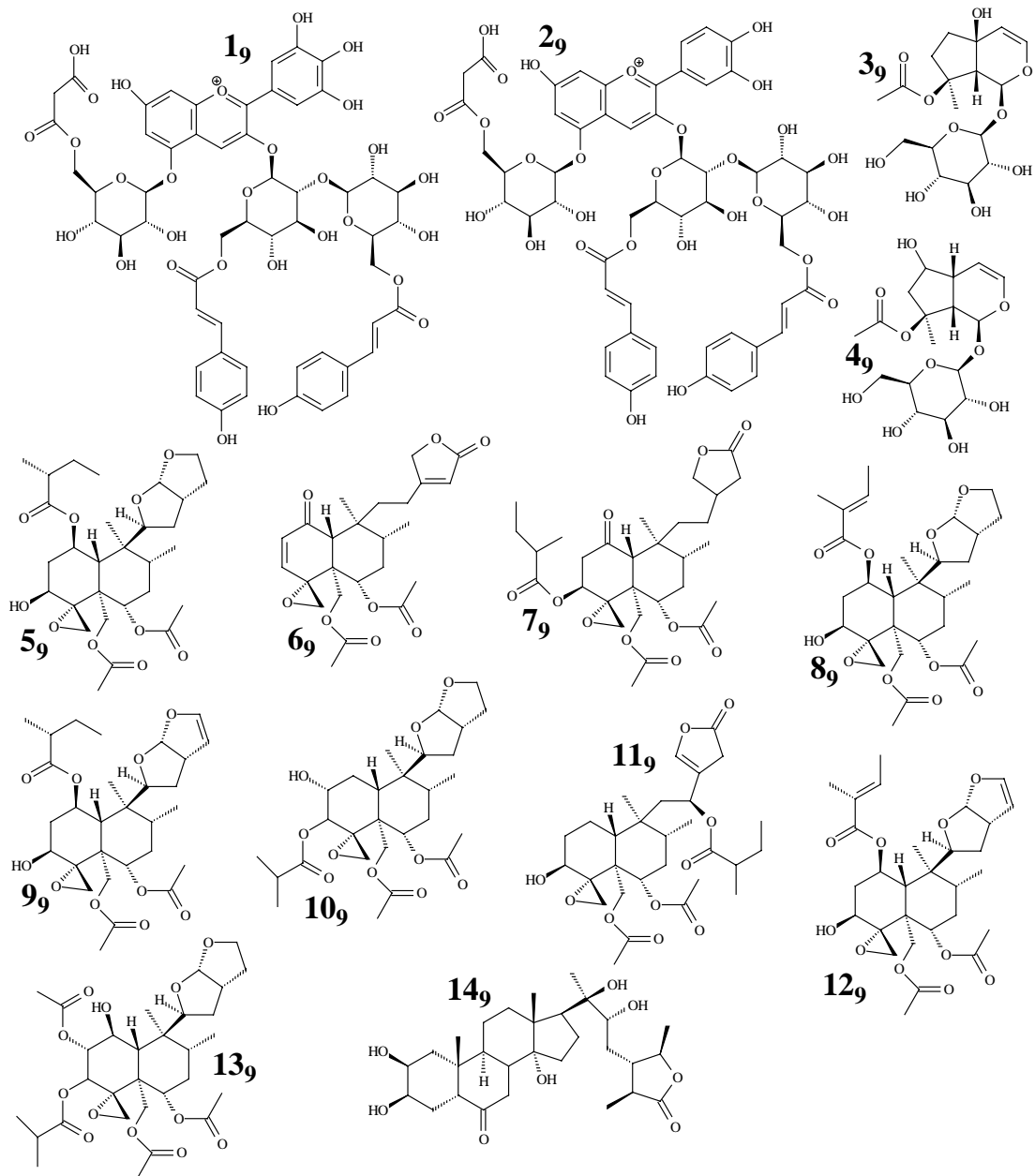
Diese Verbindungen sind bis heute nicht aus der Pflanze isoliert worden, aber die Bestandteile, wie Kaffeeäure und 3,4-Dihydroxyphenylethyl kommen auch in der differenzierten Pflanze vor.



**Abbildung 31. Substanzen, die aus der Zellkultur von *Syringa vulgaris* isoliert wurden:**  
**34:** Verbascosid, **36:** Dicaffeoyl-chinasäure.

### 2.2.9 Untersuchung des Extraktes von *Ajuga reptans*

Die auffälligste Verbindung unter den Inhaltsstoffen der Pflanze *Ajuga reptans*, die die Abbildung 32 zeigt, ist ein Flavonyliumion (**19**). Die leicht veränderte Substanz **29** konnte dagegen bisher nur aus Zellkulturen isoliert werden. Ferner lassen sich aus der Pflanze ca. 20 verschiedene Triterpene mit steroidalem Gerüst wie Cyasteron (**149**) isolieren. Darüber hinaus enthält die Pflanze eine Reihe Verbindungen, die nach ihr benannt wurden und welche aus je zwei kondensierten Sechs- und zwei kondensierten Furanringen bestehen.



**Abbildung 32. Aus der Pflanze *Ajuga reptans* isolierte Substanzen:**

**1g**: Delphinidin 3-O-[2-O-(6-O-(E)-p-coumaryl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)]-(6-O-(E)-p-coumaryl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-5-O-(6-O-malonyl- $\beta$ -D-glucopyranosid)<sup>[118]</sup>(\*), **2g**: Cyanidin 3-O-[2-O-(6-O-(E)-p-coumaryl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)]-(6-O-(E)-p-coumaryl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-5-O-(6-O-malonyl- $\beta$ -D-glucopyranosid)<sup>[118]</sup>, **3g**: Reptosid<sup>[119]</sup>, **4g**: Ajugosid<sup>[119]</sup>, **5g**: Ajugareptansin<sup>[120]</sup>, **6g**: Ajugareptanson B<sup>[121]</sup>, **7g**: Ajugareptanson A<sup>[121]</sup>, **8g**: Ajugorientin<sup>[122]</sup>, **9g**: 14-15-Dehydroajugareptansin<sup>[120]</sup>, **10g**: Ajugachin<sup>[122]</sup>, **11g**: 3 $\alpha$ -Hydroxyajugamarin F4<sup>[120]</sup>, **12g**: Areptin B<sup>[122]</sup>, **13g**: Areptin A<sup>[122]</sup>, **14g**: Cyasteron<sup>[123]</sup>.  
 (\*): Substanz **2g** nur aus Zellkulturen isoliert.

### 2.2.9.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Für die Trennung des Extraktes von *Ajuga reptans* wurde Fließmittelsystem 2 (siehe III.3.2.2; 5 – 75 % Methanol) verwendet. In 5 HPLC-Läufen wurden insgesamt 1000 mg des zuckerfreien Extraktes getrennt. Das Chromatogramm einer dieser Trennungen zeigt Abbildung 33.

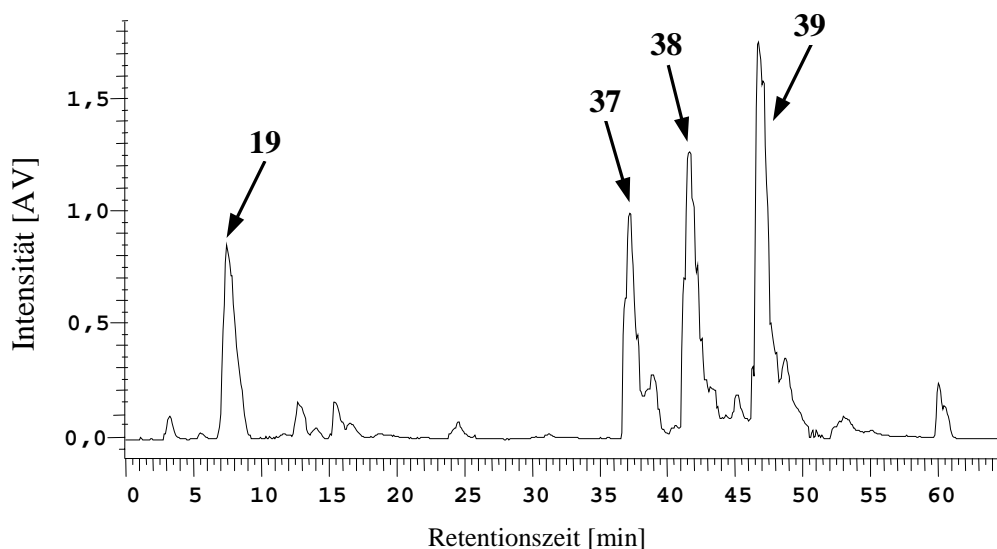


Abbildung 33. Semipräparative Trennung des Extraktes von *Ajuga reptans*, (Lichtstredetektion).

### 2.2.9.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

Nach Vereinigung der Fraktionen mit identischem Inhaltsstoffmuster, konnte bei 4 Proben die Struktur aufgeklärt und durch Literaturvergleich bestätigt werden. Es handelt sich bei den Verbindungen um Phlinosid A<sup>[125]</sup> (37), O-Methyl-Phlinosid A<sup>[125]</sup> (38), Di-O-methylphlinosid<sup>[125]</sup> (39) und Isopropylglucose<sup>[69]</sup> (19).

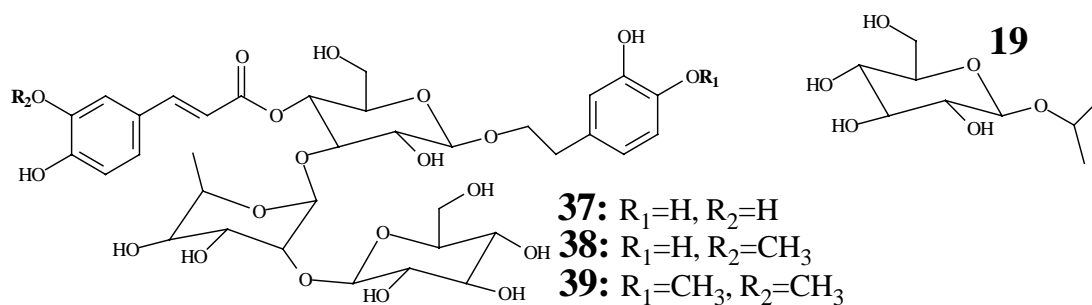


Abbildung 34. Substanzen, die aus der Zellkultur von *Ajuga reptans* isoliert wurden:  
 37: Phlinosid A, 38: O-methyl-phlinosid A, 39: Di-O-methylphlinosid A, 19: Isopropylglucose.

In Abbildung 34 sind die Verbindungen abgebildet. Phlinosid A, ein Derivat von Verbascosid, und die methylierten Abwandlungen konnten in der Pflanze bisher nicht nachgewiesen werden, aber die die Struktur mitbildende Kaffeesäure findet sich in vielen aus der Pflanze isolierten Verbindungen. Dagegen ist auch für diese Pflanze das Vorkommen von Isopropanolderivaten bis heute nicht beschrieben worden.

#### **2.2.10 Untersuchung des Extraktes von *Melissa officinalis***

Die Pflanze *Melissa officinalis* zeichnet sich durch ihren aromatischen Duft aus. Dieser ist im wesentlichen auf die enthaltenen Terpene zurückzuführen (**1<sub>10</sub>** - **10<sub>10</sub>**) zurückzuführen. Weitere Bestandteile sind Flavonoide, Derivate der Ölsäure, Kaffeesäure (**11<sub>10</sub>**), Rosmarinsäure (**13<sub>10</sub>**), und Melitrinsäure, (**14<sub>10</sub>**, **17<sub>10</sub>**). Abbildung 35 zeigt eine Reihe der Inhaltsstoffe.

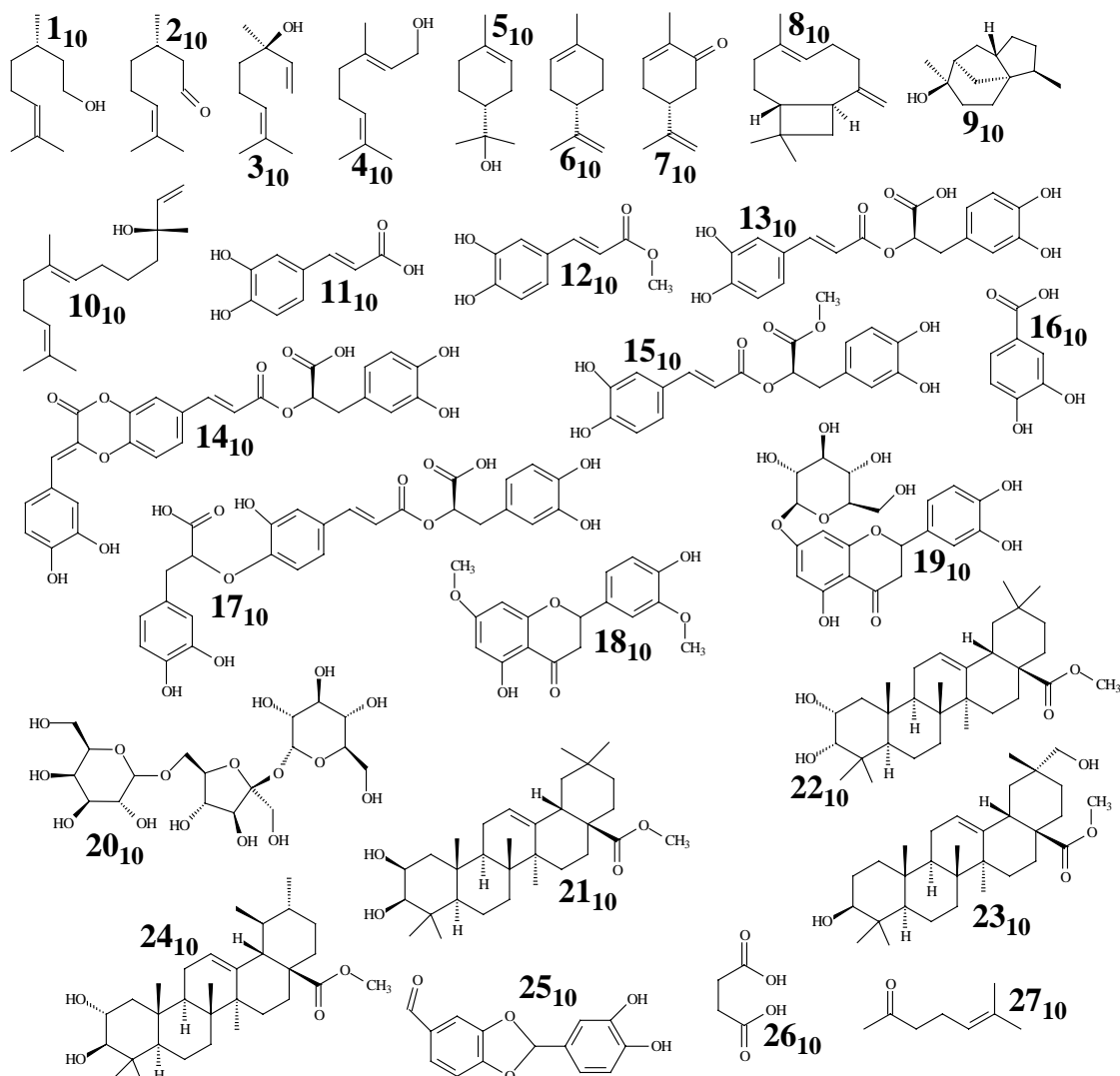


Abbildung 35. Aus der Pflanze *Melissa officinalis* isolierte Substanzen

- 1<sub>10</sub>**:  $\beta$ -Citronello[<sup>126</sup>], **2<sub>10</sub>**: (+)-Citronellal<sup>[126]</sup>, **3<sub>10</sub>**: (-)-Linalool<sup>[126]</sup>, **4<sub>10</sub>**: Geraniol<sup>[127]</sup>,  
**5<sub>10</sub>**:  $\alpha$ -Terpineol<sup>[128]</sup>, **6<sub>10</sub>**: (-)-Limonen<sup>[127]</sup>, **7<sub>10</sub>**: (-)-Carvon<sup>[128]</sup>, **8<sub>10</sub>**:  $\beta$ -Caryophyllen<sup>[128]</sup>,  
**9<sub>10</sub>**: (+)-Cedrol<sup>[128]</sup>, **10<sub>10</sub>**: (+)-*trans*-Nerolidol<sup>[128]</sup>, **11<sub>10</sub>**: Kaffeesäure<sup>[129]</sup>,  
**12<sub>10</sub>**: Kaffeesäuremethylester<sup>[129]</sup>, **13<sub>10</sub>**: Rosmarinsäure<sup>[129]</sup>, **14<sub>10</sub>**: Melitrinsäure B<sup>[130]</sup>,  
**15<sub>10</sub>**: Rosmarinsäuremethylester<sup>[129]</sup>, **16<sub>10</sub>**: 3,4-Dihydroxy-benzoesäure<sup>[129]</sup>, **17<sub>10</sub>**: Melitrinsäure A<sup>[130]</sup>,  
**18<sub>10</sub>**: 7,3'-Dimethyl-Luteolin<sup>[131]</sup>, **19<sub>10</sub>**: Luteolosid<sup>[131]</sup>, **20<sub>10</sub>**: O<sup>6</sup>- $\alpha$ -D-Galactopyranosyl- $\beta$ -  
fructofuranosyl)- $\alpha$ -D-glucopyranosid<sup>[132]</sup>, **21<sub>10</sub>**: 2 $\beta$ ,3 $\beta$ -Dihydroxy-ursol-12-en-28-säuremethylester<sup>[133]</sup>,  
**22<sub>10</sub>**: 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Dihydroxy-öl-12-en-28-säuremethylester<sup>[133]</sup>, **23<sub>10</sub>**: Oleanolsäuremethylester<sup>[133]</sup>,  
**24<sub>10</sub>**: 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -Dihydroxy-ursol-12-en-28-säuremethylester<sup>[133]</sup>, **25<sub>10</sub>**: 2-(3,4-Dihydroxy-  
phenyl)benzo[1,3]dioxol-5-carbaldehyd<sup>[129]</sup>, **26<sub>10</sub>**: Bernsteinsäure<sup>[134]</sup>, **27<sub>10</sub>**: 6-Methyl-hept-5-en-2-  
on<sup>[135]</sup>.

### 2.2.10.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Die analytischen Vortests ergaben, daß die semipräparative HPLC mit Hilfe des Fließmittelsystem 1 (siehe III.3.2.2; 0 – 50 % Methanol) durchgeführt wurde. Es wurden 600 mg des zuckerfreien Extraktes in einer Chromatographie getrennt.

Abbildung 36 zeigt eines der Chromatogramme der Trennungen.

Für die Trennung mit der analytischen HPLC, durchgeführt in Mainz, wurde 400 mg des Extraktes verwendet. Eine Fraktion enthielt für die anschließende Strukturaufklärung eine ausreichende Menge Substanz mit zufriedenstellender Reinheit (s.u.).

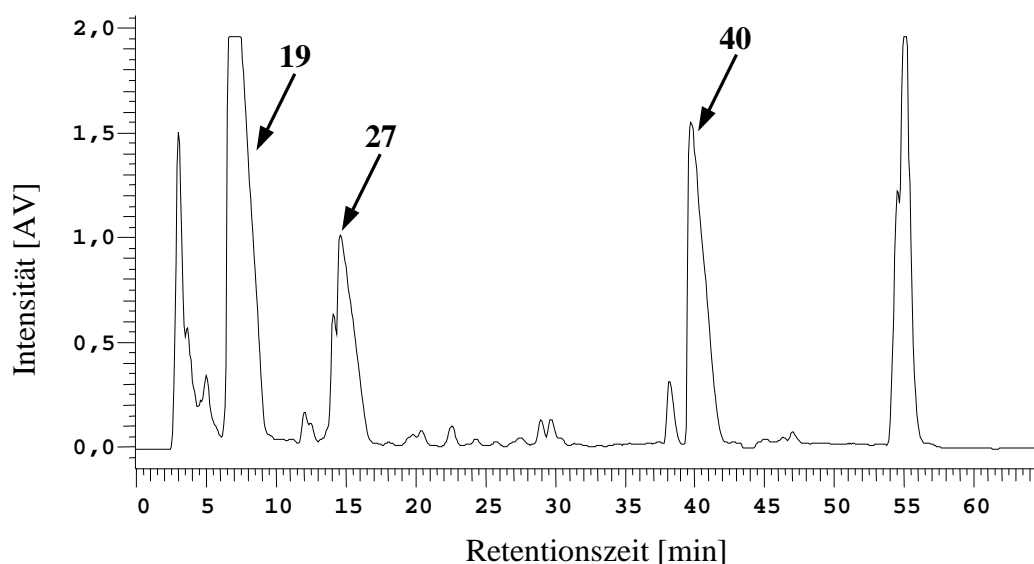


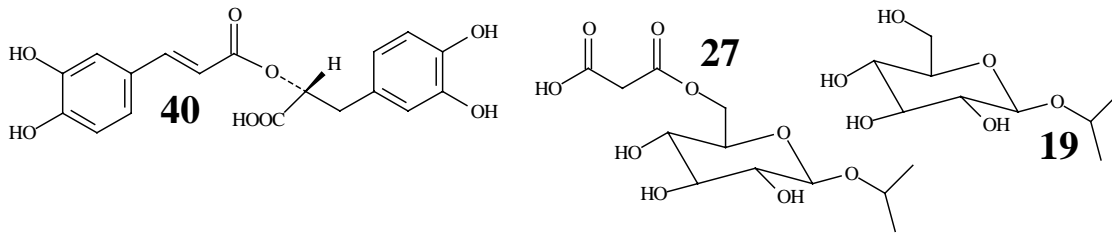
Abbildung 36. Semipräparative Trennung des Extraktes von *Melissa officinalis*, (Lichtstreuungsdetektion).

### 2.2.10.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

Die Fraktionen der semipräparativen Trennung wurden mit Hilfe der analytischen Kurzgradienten-HPLC (siehe III.3.2.3) untersucht und von Fraktionen mit identischem Chromatogramm muster vereinigt. Es blieben 3 Proben, für die die Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe erfolgreich durchgeführt wurde. Neben Rosmarinsäure<sup>[136]</sup> (**40**) konnten Isopropylglucose<sup>[69]</sup> (**19**) und Malonyl-isopropyl-glucose<sup>[69,93]</sup> (**27**) eindeutig durch Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie und Literaturdatenvergleich identifiziert werden (siehe Abbildung 37). Bei der im Institut für Pharmazie in Mainz isolierten Substanz handelte es sich ebenfalls um Rosmarinsäure, welche eine charakteristische Verbindung



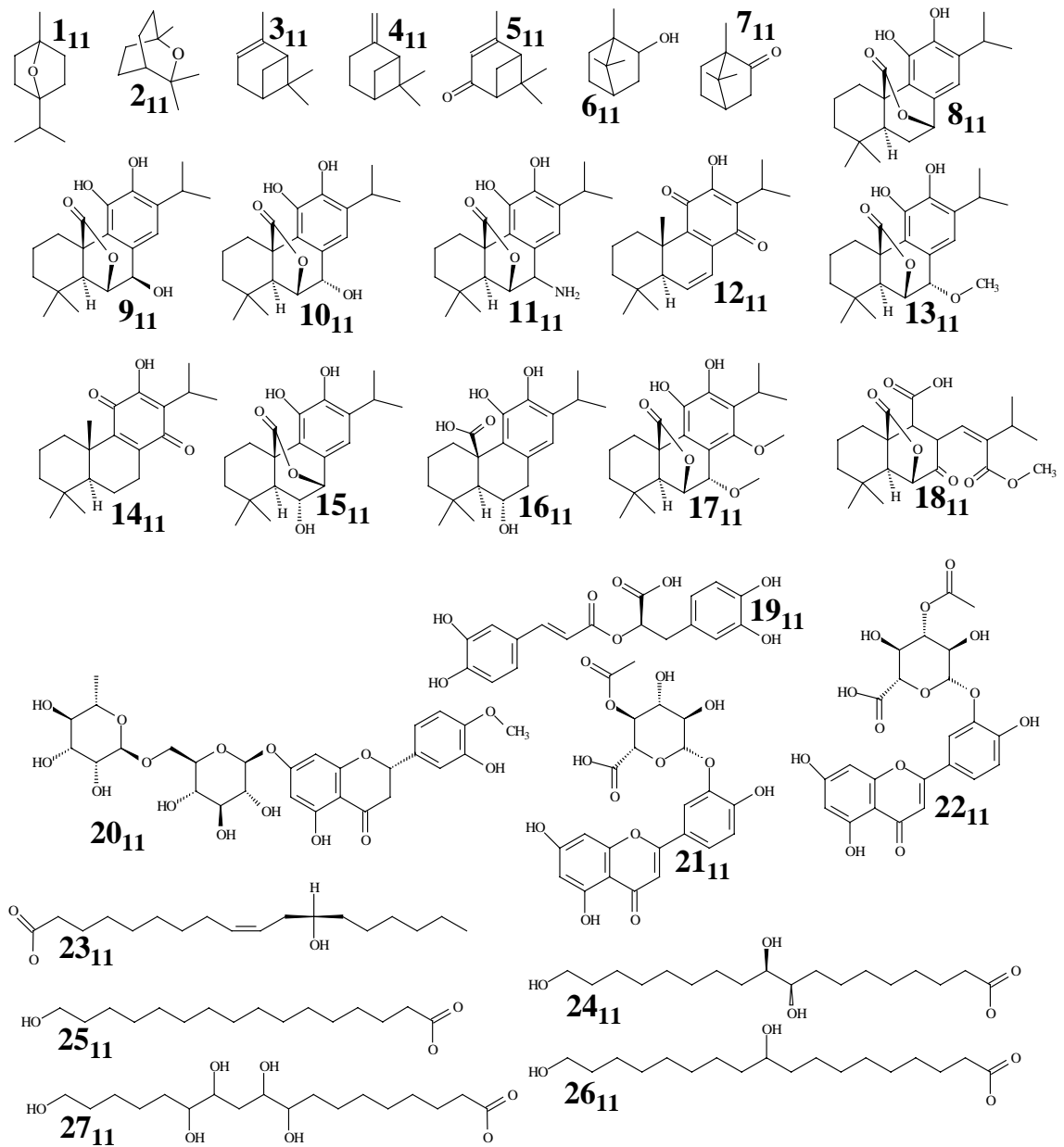
von *Melissa officinalis* darstellt (siehe Abbildung 35), wohingegen auch für diese Pflanze Isopropylderivate bisher unbekannt sind (siehe V).



**Abbildung 37. Substanzen, die aus der Zellkultur von *Melissa officinalis* isoliert wurden:**  
**40:** Rosmarinsäure, **27:** 1-O-Isopropyl-6-O-malonyl-β-D-glucose, **19:** 1-O-Isopropyl-β-D-glucose.

### 2.2.11 Untersuchung des Extraktes von *Rosmarinus officinalis*

Wie *Melissa officinalis* ist auch die Pflanze *Rosmarinus officinalis* eine Gewürzpflanze und zeichnet sich durch ihren aromatischen Duft aus. Dieser ist im wesentlichen auf die Terpene Cineol (**2<sub>11</sub>**), Borneol (**6<sub>11</sub>**) und Pinen (**3<sub>11</sub>**, **4<sub>11</sub>**) zurückzuführen. Weitere Bestandteile sind Rosmarinsäure, Flavonoide, ω-Hydroxy-Fettsäuren und eine Reihe polycyclischer Verbindungen wie Rosmanol (**11<sub>11</sub>**) (siehe Abbildung 38).



**Abbildung 38.** Aus der Pflanze und bereits aus Zellkulturen von *Rosmarinus officinalis* isolierte Substanzen:

**1<sub>11</sub>:** 1,4-epoxy-*p*-menthan<sup>[137]</sup>, **2<sub>11</sub>:** Cineol<sup>[138]</sup>, **3<sub>11</sub>:** α-Pinen<sup>[139]</sup>(+), **4<sub>11</sub>:** β-Pinen<sup>[139]</sup>(+), **5<sub>11</sub>:** Pin-2-en-4-on<sup>[140]</sup>, **6<sub>11</sub>:** DL-Borneol<sup>[137]</sup>, **7<sub>11</sub>:** Bornan-2-on<sup>[137]</sup>, **8<sub>11</sub>:** Carnosol<sup>[141]</sup>, **9<sub>11</sub>:** Epirosmanol<sup>[141]</sup>, **10<sub>11</sub>:** Rosmanol<sup>[141]</sup>, **11<sub>11</sub>:** Rosmaricin<sup>[142]</sup>, **12<sub>11</sub>:** 6-Dehydroroyleanon<sup>[143]</sup>, **13<sub>11</sub>:** 7-Methoxyrosmanol<sup>[144]</sup>, **14<sub>11</sub>:** Royleanon<sup>[143]</sup>, **15<sub>11</sub>:** Isorosmanol<sup>[145]</sup>, **16<sub>11</sub>:** Carnos-säure<sup>[141]</sup>, **17<sub>11</sub>:** 14-Methoxy-7-O-methyl-rosmanol<sup>[144]</sup>, **18<sub>11</sub>:** 9-(2-Methoxycarbonyl-3-methyl-but-1-enyl)-5,5-dimethyl-8,11-dioxo-12-oxa-tricyclo[5.3.2.0<sub>1,6</sub>]dodec-9-en-carbonsäure<sup>[144]</sup>, **19<sub>11</sub>:** Rosmarinsäure<sup>[146]</sup>, **20<sub>11</sub>:** Hesperidin<sup>[147]</sup>, **21<sub>11</sub>:** 3'-O-(4'-O-acetyl)-β-D-glucoronyl-luteolin<sup>[147]</sup>, **22<sub>11</sub>:** 3'-O-(3'-O-acetyl)-β-D-glucoronyl-luteolin<sup>[147]</sup>, **23<sub>11</sub>:** Ricinolsäure<sup>[148]</sup>, **24<sub>11</sub>:** (-)-*threo*-9,10,18-Trihydroxy-octadecansäure, **25<sub>11</sub>:** 16-Hydroxy-hexadecansäure<sup>[148]</sup>, **26<sub>11</sub>:** 10,18-Dihydroxy-Octadecansäure<sup>[148]</sup>, **27<sub>11</sub>:** 9,10,12,13,18-Pentahydroxy-octadecansäure<sup>[148]</sup>.  
 (+): neben der Pflanze auch aus Kallusgewebe isoliert.

### 2.2.11.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Mit dem Fließmittelsystem 1 (siehe III.3.2.2; 0 – 50 % Methanol) wurden die Trennungen per semipräparativer HPLC durchgeführt. Insgesamt wurden 1000 mg des zuckerfreien Extraktes in fünf Chromatographien getrennt. Abbildung 39 zeigt das Chromatogramm einer dieser Trennungen.

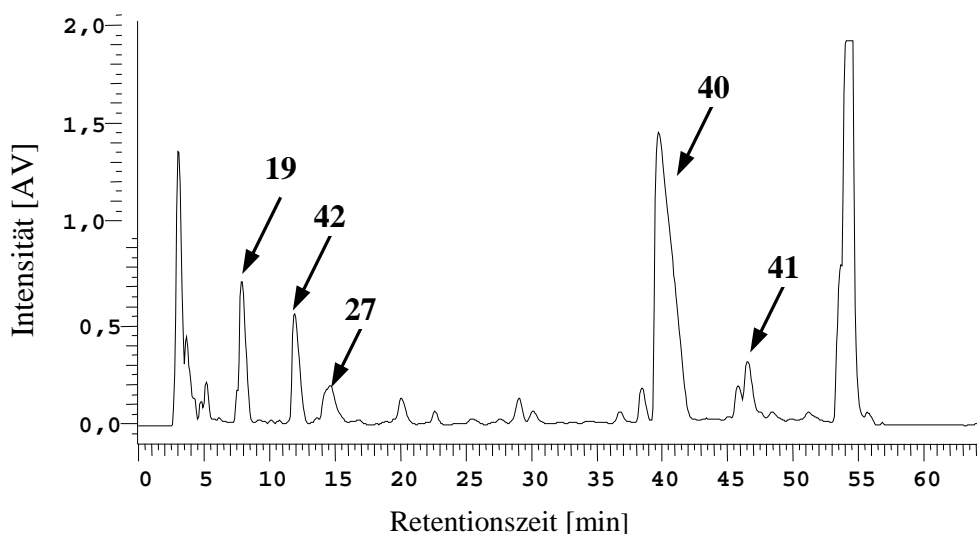


Abbildung 39. Semipräparative Trennung des Extraktes von *Rosmarinus officinalis*, (Lichtstredetektion).

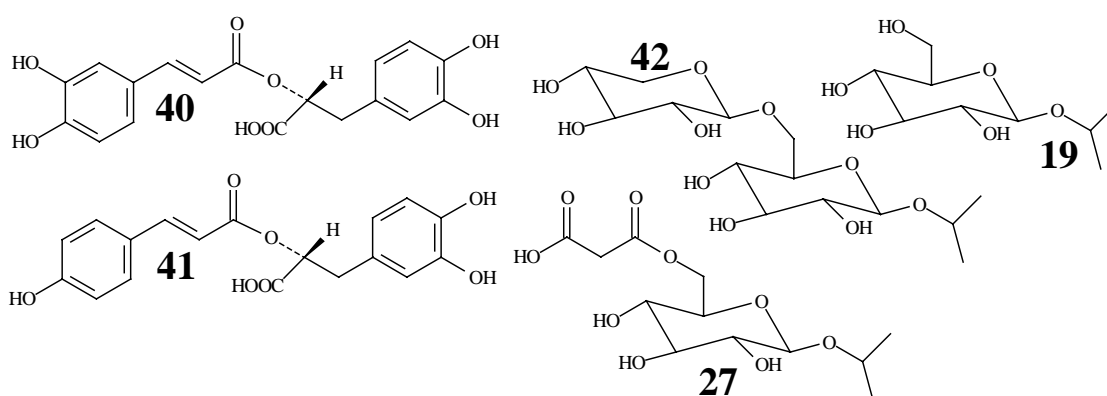
### 2.2.11.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

Nach Untersuchung der Fraktionen der semipräparativen Trennung mit Hilfe der analytischen Kurzgradienten-HPLC (siehe III.3.2.3) und Vereinigung von Fraktionen mit identischem Chromatogramm blieben 5 Proben, bei denen die Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe durchgeführt wurde. Die Strukturen konnten aufgrund ihrer Massen- und  $^1\text{H}$ -Spektren aufgeklärt (siehe V) und durch Vergleich mit Literaturdaten bestätigt werden. Es handelt sich um Rosmarinsäure<sup>[136]</sup> (**40**), 3-Deoxyrosmarinsäure<sup>[136]</sup> (**41**), Isopropylglucose (**19**)<sup>[69]</sup>, Malonyl-isopropyl-glucose<sup>[69,93]</sup> (**27**) und Isopropylprimverosid<sup>[149]</sup> (**42**).

Abbildung 40 zeigt die Strukturformeln dieser Verbindungen. Wie auch bei *Melisa officinalis* ist Rosmarinsäure, wie der Name schon verrät, in *Rosmarinus officinalis* eine charakteristische Substanz, dagegen ist die 3-Deoxyrosmarinsäure sowohl in der Pflanze als auch im gesamten Pflanzenreich bis heute nicht nachgewiesen worden. Der Benzolring,

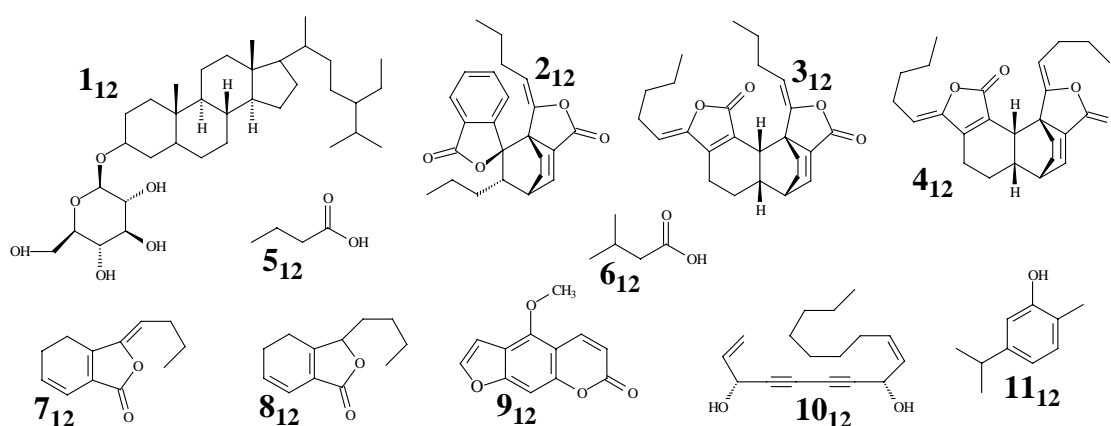
an dem die OH-Gruppe im Vergleich zur Rosmarinsäure fehlt, konnte über das Massenspektrum identifiziert werden. Sowohl bei der Rosmarinsäure als auch bei Deoxyrosmarinsäure ist in der negativen Ionisierung ein Massenfragment mit der Masse 197.2 (M-1) zu erkennen. Dies entsteht durch die Spaltung des Esters zwischen C-5 und dem Sauerstoffatom. Da das Fragment für beide Substanzen identisch ist, muß dieser Molekülteil unverändert sein.

Die Isopropanolderivate sind für die intakte Pflanze bisher nicht beschrieben worden.



**Abbildung 40.** Substanzen, die aus der Zellkultur von *Rosmarinus officinalis* isoliert wurden:  
 40: Rosmarinsäure, 41: 3-Desoxyrosmarinsäure, 42: Isopropylprimverosid,  
 27: 1-O-Isopropyl-6-O-malonyl-β-D-glucose, 19: 1-O-Isopropyl-β-D-glucose.

### 2.2.12 Untersuchung des Extraktes von *Levisticum officinale*



**Abbildung 41.** Aus der Pflanze *Levisticum officinale* isolierte Substanzen:  
 1<sub>12</sub>: O-β-D-Glucopyranosyl-β-sistosterol<sup>[150]</sup>, 2<sub>12</sub>: Angeolid<sup>[151]</sup>, 3<sub>12</sub>: Levistolid B<sup>[151]</sup>, 4<sub>12</sub>: Levistolid A<sup>[151]</sup>, 5<sub>12</sub>: Buttersäure<sup>[152]</sup>, 6<sub>12</sub>: 3-Methyl-Buttersäure<sup>[152]</sup>, 7<sub>12</sub>: Z-Ligustilid<sup>[151]</sup>, 8<sub>12</sub>: 3-Butyl-4,5-dihydro-3H-isobenzofuran-1-on<sup>[153]</sup>, 9<sub>12</sub>: Bergapten<sup>[154]</sup>, 10<sub>12</sub>: (+)-Falcarindol<sup>[151]</sup>, 11<sub>12</sub>: Carvacrol<sup>[154]</sup>.

Eine Anzahl verschiedener Substanzen konnten bis heute aus der Pflanze *Levisticum officinale* isoliert werden. Abbildung 41 zeigt eine Reihe dieser Inhaltsstoffe. Neben Triterpenen mit steroidalem Gerüst finden sich Monoterpene wie Carvacrol (**11**<sub>12</sub>) und Furanlactone wie Levistolid B (**3**<sub>12</sub>). Besonders auffällig ist die Verbindung Falcarindol (**10**<sub>12</sub>), die sich durch zwei konjugierte Dreifachbindungen auszeichnet.

### 2.2.12.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Mit Hilfe der analytischen HPLC wurde als geeignete Trennbedingung für die semipräparative HPLC das Fließmittelsystem 2 (siehe III.3.2.2; 5 – 75 % Methanol) ermittelt. 400 mg des zuckerfreien Extraktes wurden für zwei chromatographische Trennungen verwendet. In Abbildung 42 ist ein Chromatogramm einer dieser beiden Trennungen abgebildet.

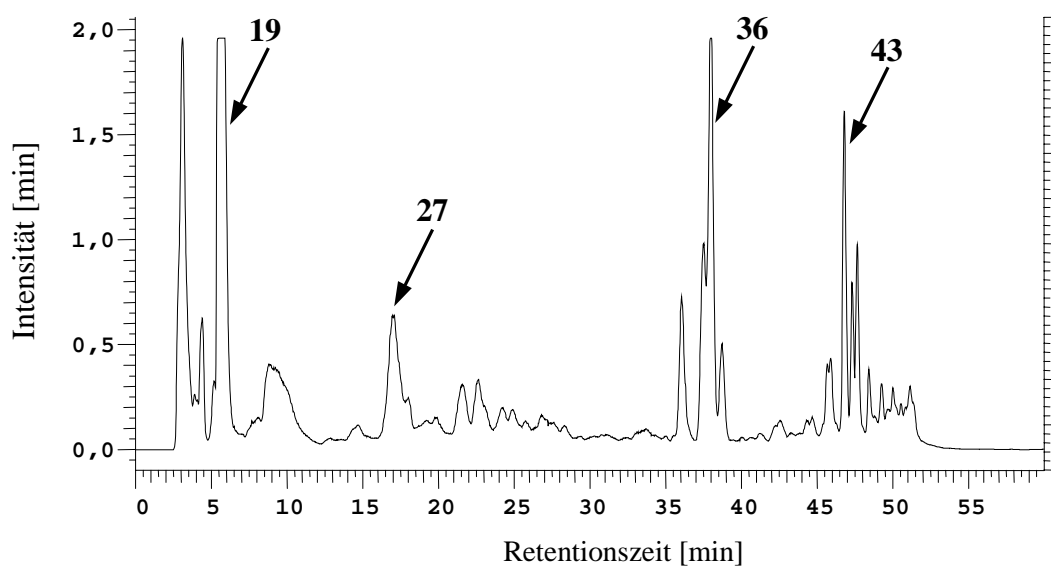
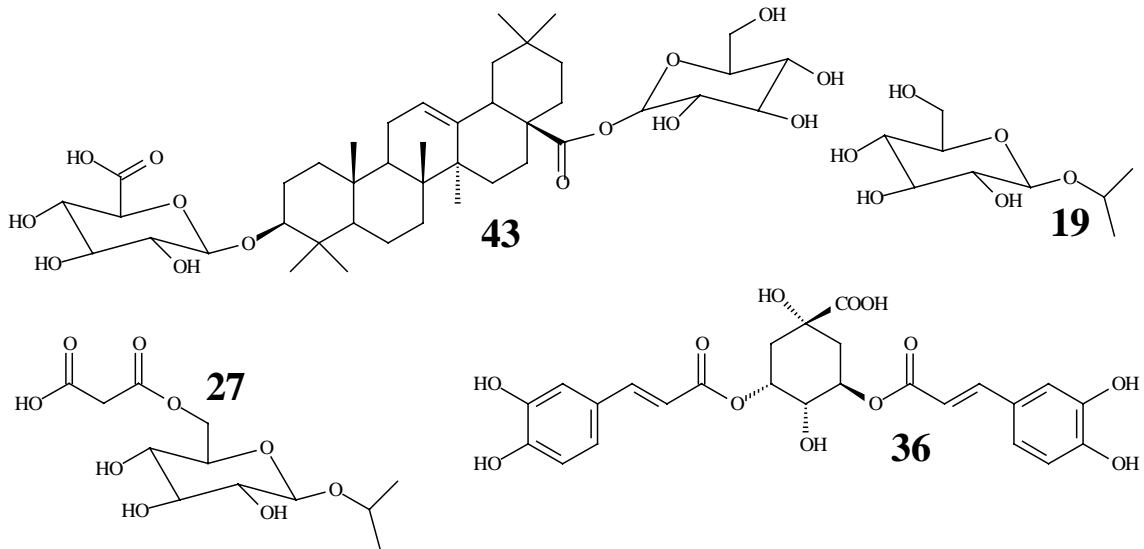


Abbildung 42. Semipräparative Trennung des Extraktes von *Levisticum officinale*, (Lichtstredetektion).

### 2.2.12.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

Nach Vereinigung der Fraktionen gleicher Kurzgradienten-Chromatogramme wurde versucht, die Strukturen der isolierten Substanzen mit Hilfe von NMR-Spektroskopie und MS-Spektrometrie aufzuklären. Durch Vergleich mit Literaturdaten konnten Chikusetsusaponin<sup>[155]</sup> IVa (**43**), 1-O-Isopropyl- $\beta$ -D-glucose<sup>[69]</sup> (**19**), 1-O-Isopropyl-6-O-

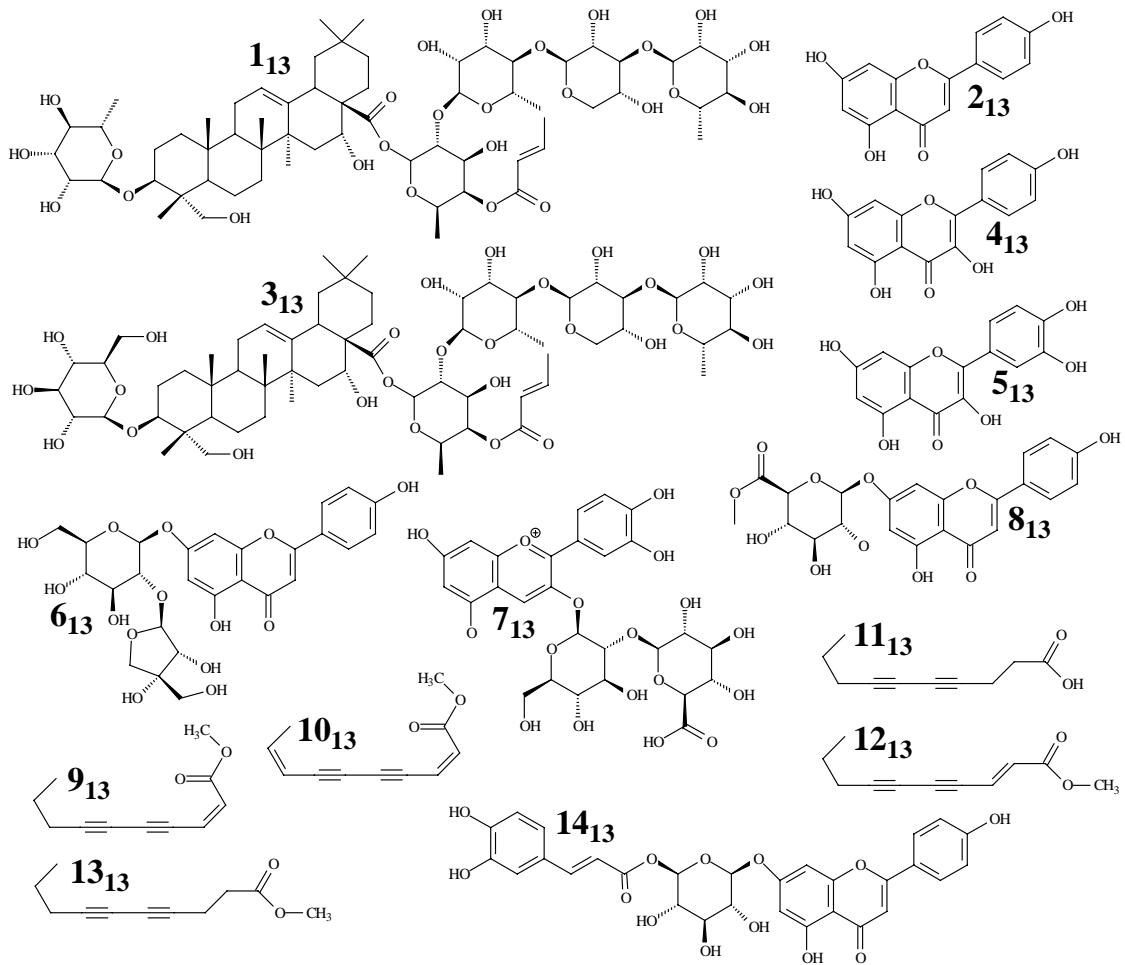
malonyl- $\beta$ -D-glucose<sup>[69,93]</sup> (**27**) 3,5-Dicaffeoyl-chinasäure<sup>[124]</sup> (**36**) eindeutig identifiziert werden (siehe Abbildung 43). Isopropylglucose und Isopropyl-malonyl-glucose sind für die intakte Pflanze sehr untypische Verbindungen; Derivate von Isopropanol sind als Inhaltsstoffe unbekannt. Auch 3,5-Dicaffeoyl-chinasäure und andere Kaffeesäurederivate wurden bis jetzt nicht aus der Pflanze isoliert. Dagegen konnten Triterpene (siehe Abbildung 41) bereits aus der Pflanze isoliert werden.



**Abbildung 43. Substanzen, die aus der Zellkultur von *Levisticum officinale* isoliert wurden:**  
**43:** Chikusetsusaponin IVa, **19:** 1-O-Isopropyl- $\beta$ -D-glucose, **27:** 1-O-Isopropyl-6-O-malonyl- $\beta$ -D-glucose, **36:** 3,5-Dicaffeoyl-chinasäure.

### 2.2.13 Untersuchung des Extraktes von *Bellis perennis*

Aus der Pflanze *Bellis perennis* wurden Substanzen mit unterschiedlichen Strukturtypen isoliert. Neben Derivaten der Ölsäure gibt es eine Reihe von Flavonen. Besonders auffällig sind die Verbindungen **9<sub>13</sub>** - **13<sub>13</sub>**. Diese Carbonsäuren enthalten zwei konjugierte Dreifachbindungen. Abbildung 44 zeigt eine Reihe der Inhaltsstoffe von *Bellis perennis*.



**Abbildung 44. Aus der Pflanze *Bellis perennis* isolierte Substanzen:**

1<sub>13</sub>: Bellissaponin BA<sub>1</sub><sup>[156]</sup>, 2<sub>13</sub>: Apigenin<sup>[157]</sup>, 3<sub>13</sub>: Bellissaponin BA<sub>2</sub><sup>[156]</sup>, 4<sub>13</sub>: Kaempferol<sup>[157]</sup>,  
 5<sub>13</sub>: Quercetin<sup>[157]</sup>, 6<sub>13</sub>: 7-(2-O-D-apio-β-D-furanosyl)-β-D-glucopyranosyl-apigenin<sup>[158]</sup>,  
 7<sub>13</sub>: 3-O-[2''-O(β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl]-cyanidin<sup>[159]</sup>, 8<sub>13</sub>: 3,4,5-Trihydroxy-6-[5-hydroxy-phenyl]-4-oxo-4H-chromen-7-yloxy]-tetrahydro-pyran-2-carboxylsäure-methylester<sup>[157]</sup>,  
 9<sub>13</sub>: Dec-2c-en-4,6-diin-säure-methylester<sup>[160]</sup>, 10<sub>13</sub>: Dec-2c,8c-dien-4,6-diin-säure-methylester<sup>[160]</sup>,  
 11<sub>13</sub>: Dec-4,6-diin-säure<sup>[161]</sup>, 12<sub>13</sub>: Dec-2t-en-4,6-diin-säure-methylester<sup>[162]</sup>, 13<sub>13</sub>: Dec-4,6-diin-säure-methylester<sup>[161]</sup>, 14<sub>13</sub>: 7-O-[6''-O-Kaffeesäureester)-β-D-glucopyranosyl]-cyanidin<sup>[157]</sup>.

### 2.2.13.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Für die Trennung des Extraktes der Zellkultur von *Bellis perennis* kam das Fließmittelsystem 1 (siehe III.3.2.2; 5 - 75 % Methanol) zum Einsatz. Insgesamt wurden 200 mg des zuckerfreien Extraktes in einem chromatographischen Lauf getrennt. Abbildung 45 zeigt das Chromatogramm dieser Trennung.

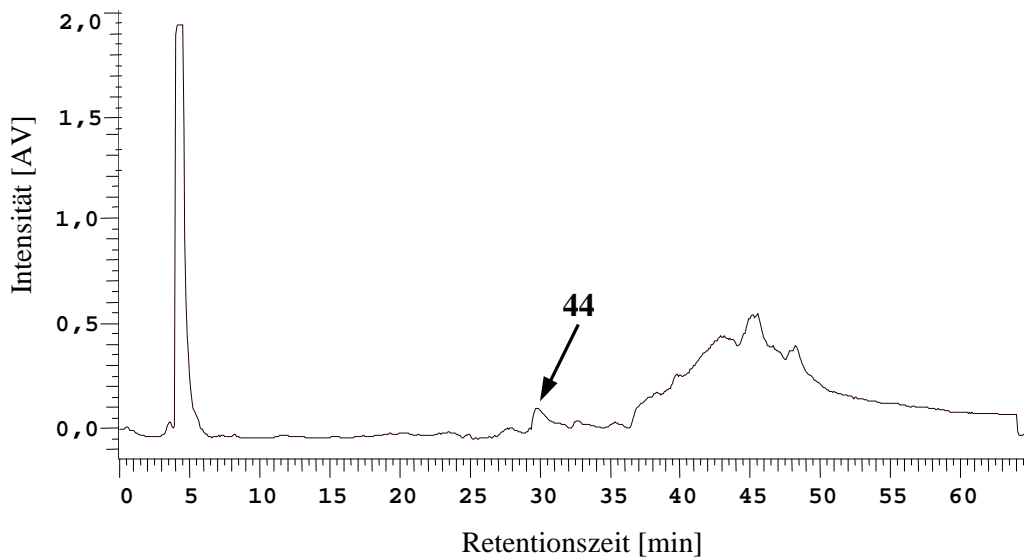


Abbildung 45. Semipräparative Trennung des Extraktes von *Bellis perennis*, (Lichtstredetektion).

### 2.2.13.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

Nach Untersuchung der Fraktionen der semipräparativen Trennung mit Hilfe der analytischen Kurzgradienten-HPLC (siehe III.3.2.3) und Vereinigung von Fraktionen mit identischem Inhaltsstoffmuster wurde die Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe bei einer Probe durchgeführt und Dimethylcrenatin<sup>[163]</sup> (**44**) identifiziert. Diese Substanz ist aus der Pflanze bisher nicht bekannt. Nur über das zentrale Strukturelement des Benzolrings lassen sich Analogien zu den Stoffwechselprodukten der intakten Pflanze erkennen. Isoliert wurde diese Substanz bisher aus *Pricasma quassioides* und den Früchten von *Foeniculum vulgare*.

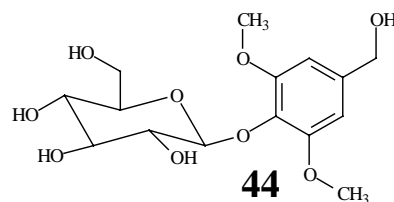


Abbildung 46. Substanz, die aus der Zellkultur von *Bellis perennis* isoliert werden konnte:  
**44**: Dimethylcrenatin.



2.2.14 Untersuchung des Extraktes von *Taraxacum officinale*

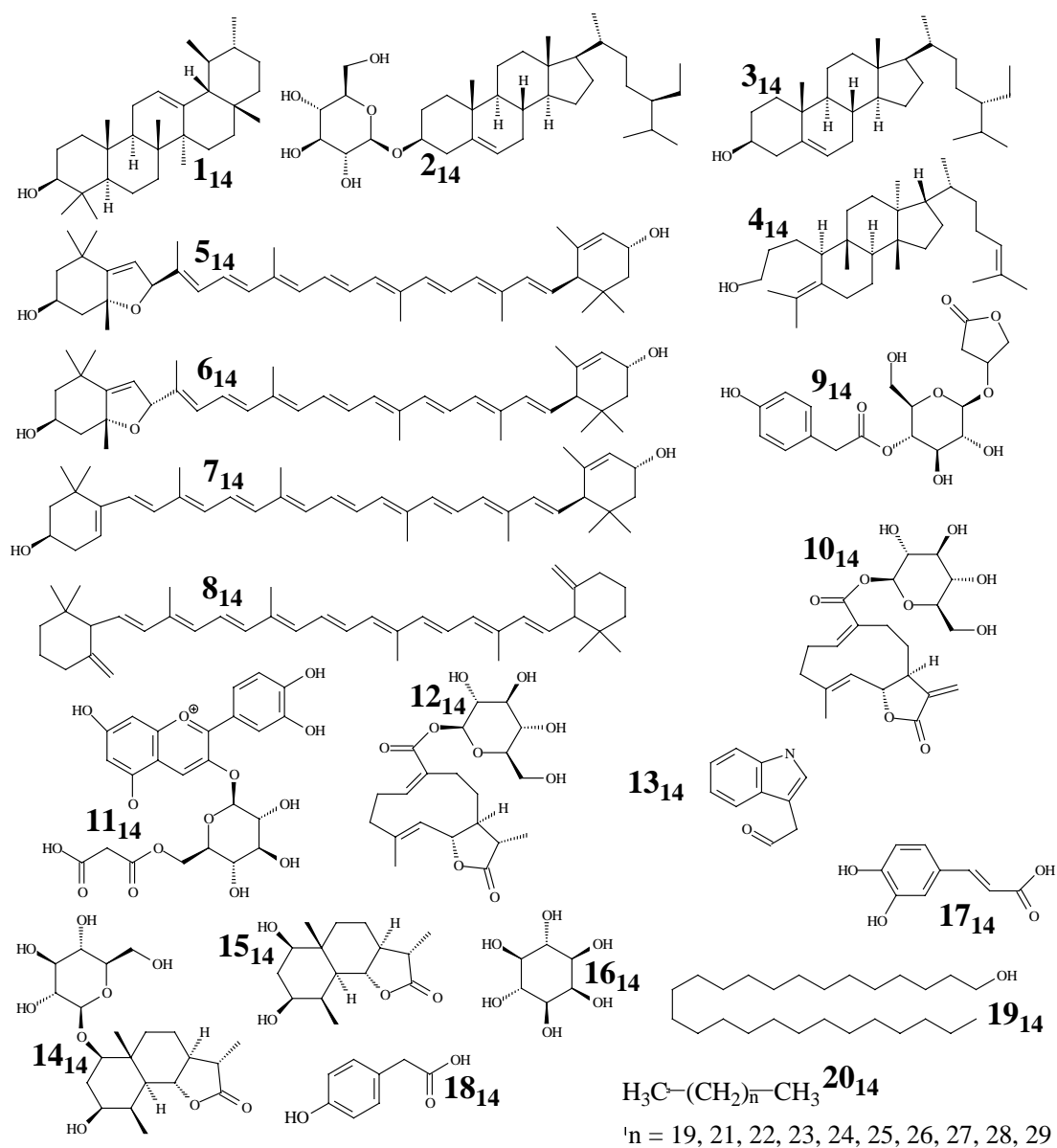


Abbildung 47. Aus der Pflanze *Taraxacum officinale* isolierte Substanzen:

1<sub>14</sub>: Urs-12-en-3 $\beta$ -ol<sup>[164]</sup>, 2<sub>14</sub>: 3-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-stigmast-5-en<sup>[165]</sup>, 3<sub>14</sub>: ( $\beta$ )-Sitosterol<sup>[164]</sup>, 4<sub>14</sub>: Isohelianol<sup>[164]</sup>, 5<sub>14</sub>: Chrysanthemaxanthin<sup>[166]</sup>, 6<sub>14</sub>: Flavoxanthin<sup>[166]</sup>, 7<sub>14</sub>: Lutein A<sup>[167]</sup>, 8<sub>14</sub>: *trans*- $\gamma$ , $\gamma$ -Caroten<sup>[168]</sup>, 9<sub>14</sub>: Taraxacosid<sup>[169]</sup>, 10<sub>14</sub>: Taraxinsäure- $\beta$ -D-glucopyranosylester<sup>[165]</sup>, 11<sub>14</sub>: 3-O-(6-O-Malonyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-cyanidin<sup>[170]</sup>, 12<sub>14</sub>: 11,13-Dihydro-taraxinsäure- $\beta$ -D-glucopyranosylester<sup>[165]</sup>, 13<sub>14</sub>: Indol-3-yl-acetaldehyd<sup>[171]</sup>, 14<sub>14</sub>: Taraxacolid<sup>[165]</sup>, 15<sub>14</sub>: 4 $\alpha$ ,15,11 $\beta$ ,13-Tetrahydridentin B<sup>[165]</sup>, 16<sub>14</sub>: *myo*-Inositol<sup>[172]</sup>, 17<sub>14</sub>: Kaffeesäure<sup>[173]</sup>, 18<sub>14</sub>: (4-Hydroxy-phenyl)-Essigsäure<sup>[173]</sup>, 19<sub>14</sub>: Hexacosan-1-ol<sup>[174]</sup>, 20<sub>14</sub>: n-Alkane (mit 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 und 31 C-Atomen)<sup>[174]</sup>.

Aus der Pflanze *Taraxacum officinale* konnten in der Vergangenheit eine Reihe von Naturstoffen isoliert und die Struktur aufgeklärt werden. In vielen Modifikationen sind die nach der Pflanze benannten Verbindungen Taraxacosid (9<sub>14</sub>), Taraxacolid (15<sub>14</sub>) und Taraxinsäureglycosid (13<sub>14</sub>) enthalten. Ferner finden sich – wie Abbildung 47 zeigt – Carotene, Flavonoide, Triterpene und n-Alkane.

### 2.2.14.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Die semipräparative HPLC wurde unter Verwendung des Fließmittelsystems 1 (siehe III.3.2.2; 0 - 50 % Methanol) durchgeführt. Insgesamt wurden 800 mg des zuckerfreien Extraktes in vier Chromatographien getrennt. Abbildung 48 zeigt das Chromatogramm einer dieser drei Trennungen.

Für die Trennung mit der analytischen HPLC, durchgeführt in Mainz, wurden 500 mg des Extraktes verwendet. Zwei Fraktionen enthielten eine für die anschließende Strukturaufklärung ausreichende Menge Substanz in zufriedenstellender Reinheit (s.u.).

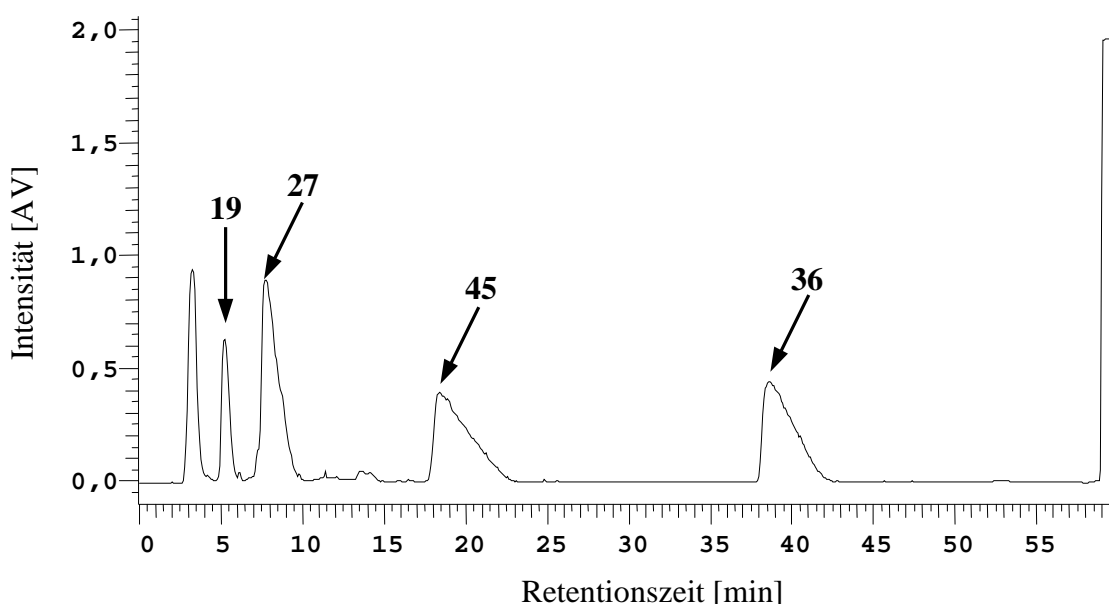


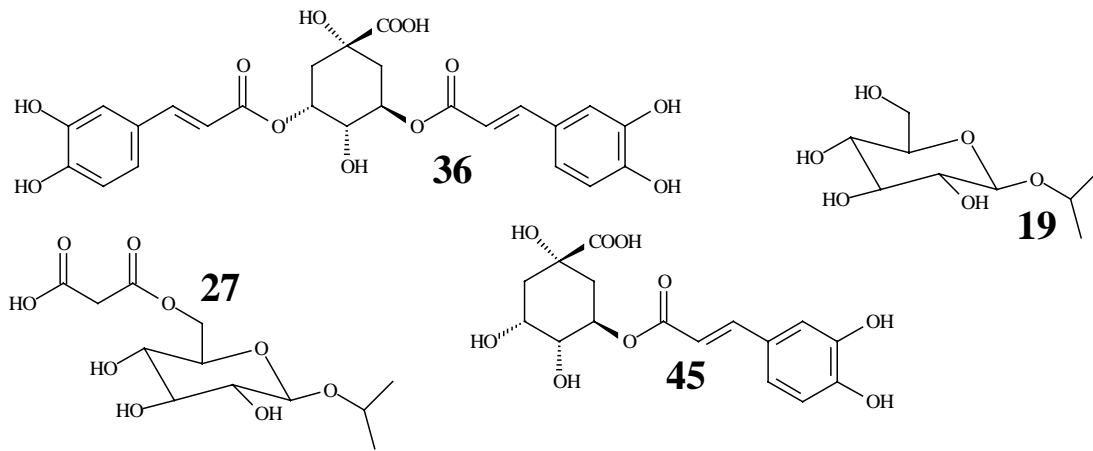
Abbildung 48. Semipräparative Trennung des Extraktes von *Taraxacum officinale*, (Lichtstreuendetektion).

### 2.2.14.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

Nach Untersuchung der Fraktionen der semipräparativen Trennung mit Hilfe der analytischen Kurzgradienten-HPLC (siehe III.3.2.3) und Vereinigung von Fraktionen mit identischem Chromatogramm, konnte bei 5 Proben die Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe erfolgreich durchgeführt werden. Durch Vergleich mit Literaturdaten ließ sich die Struktur von 3,5-Dicaffeoyl-chinasäure<sup>[124]</sup> (**36**), Chlorogensäure<sup>[175]</sup> (**45**), Isopropylglucose<sup>[69]</sup> (**19**) und Isopropyl-malonyl-glucose<sup>[69,93]</sup> (**27**) eindeutig identifizieren.

Bei den in Mainz isolierten Substanzen handelte es sich um Chlorogensäure und um 3,5-Dicaffeoyl-chinasäure.

Abbildung 49 zeigt die aus der Zellkultur von *Taraxacum officinale* isolierten Substanzen. Während Isopropanolderivate auch für diese Art nicht bekannt sind, ist die Isolierung von Chlorogensäure und 3,5-Dicaffeoyl-chinasäure, obwohl sie bis jetzt nicht in der Pflanze nachgewiesen wurden, nicht verwunderlich, da zum einen diese Stoffe weit verbreitet sind im Pflanzenreich und andererseits Kaffeesäure bereits in der intakten Pflanze nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 49: Substanzen, die aus der Zellkultur von *Taraxacum officinale* isoliert wurden:**

**36:** 3,5-Dicaffeoyl-chinasäure, **19:** 1-O-Isopropyl-β-D-glucose, **27:** 1-O-Isopropyl-6-O-malonyl-β-D-glucose, **45:** Chlorogensäure.

## V DISKUSSION

### 1 Etablierung von Pflanzenzellkulturen

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde versucht, von 140 Pflanzenarten Kalluskulturen anzulegen; bei 45 Arten war dies erfolgreich. Wie unter IV.1.1 bereits erläutert, konnte nur für Pflanzen der Klasse der Rosopsida Kallusbildung erreicht werden. Daraus läßt sich nicht schließen, daß die Pflanzen der anderen Klassen nicht oder schlechter zur Kallusbildung neigen, sondern nur, daß unter den angewandten Bedingungen und eingesetzten Medien keine Zellkultur gebildet wurde. Das zeigen auch die Bestandslisten anderer Zellkultursammlungen wie die der Deutschen Sammlung von Zellkulturen und Mikroorganismen in Braunschweig. Dort sind auch Zellkulturen erhältlich, die von Arten der Klasse der Liliopsida entstammen, aus der im Verlauf der Arbeit trotz Verwendung von 20 verschiedenen Arten kein Kalluswachstum erreicht wurde.

Auch von Arten, die bzgl. ihrer Verwandtschaft einen sehr großen Abstand zu der Klasse der Rosopsida aufweisen, wie z.B. von Arten der Pinopsida (Gymnospermae), konnten inzwischen Zellkulturen angelegt werden, wie das Beispiel der Paclitaxelherstellung mit Hilfe von Suspensionskulturen zeigt (siehe I.2).

Erfolgreiche Kallusbildung war vor allem von der Art des Pflanzenmaterials abhängig. Besonders durch Keime gering belastete Pflanzenteile erwiesen sich als geeignet, da die Sterilisationszeiten verkürzt und damit eine übermäßige Schädigung des Ausgangsgewebes verhindert wurde (IV.1.1). Die verhältnismäßig niedrige Ausbeute an Kalluskulturen (32 %)(32 %) ist vor allem auf eine zu hohe Keimbelastung des Ausgangsmaterials zurückzuführen.

Ziel des ersten Teils der Arbeit war es, möglichst viele Zellkulturen anzulegen, wobei der Arbeitsaufwand pro Pflanzenart möglichst gering bleiben sollte. So konnten insgesamt mehr Kalluskulturen angelegt werden, allerdings mit einer schlechteren prozentualen Erfolgsrate.

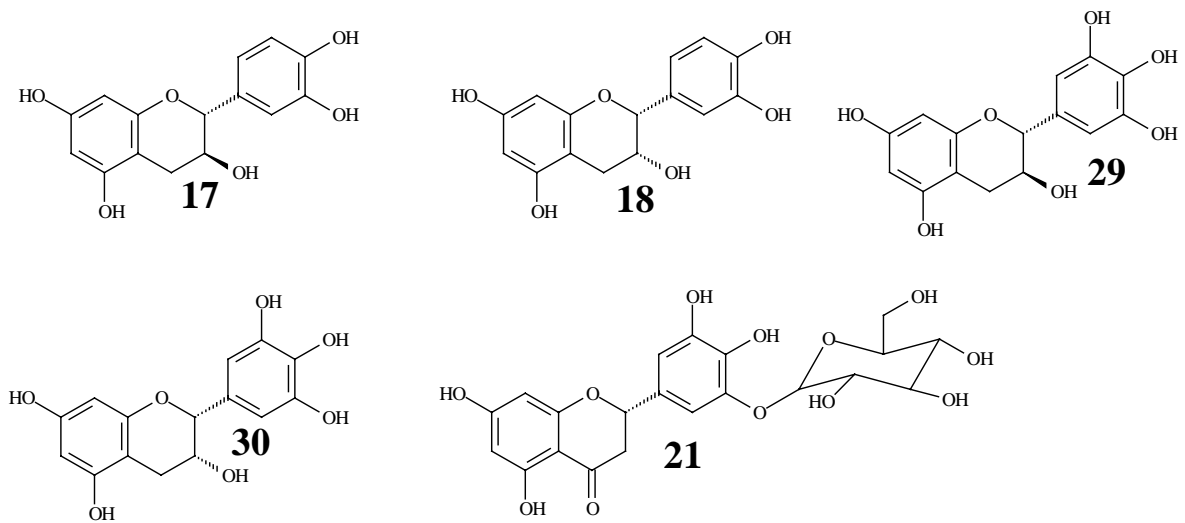
Wahrscheinlich läßt sich von nahezu jeder Pflanzenart eine Kalluskultur anlegen, sofern man die geeigneten Kultivierungsbedingungen durch Variation der Medienzusammensetzung ermittelt.

Im Gegensatz zur Kalluserzeugung verlief die Erstellung von Suspensionskulturen aus Kallusgewebe relativ unproblematisch. Dies liegt vor allem daran, daß eine Infektion durch Fremdkerne nicht auftreten kann und sich Kallus- von Suspensionsmedien nur im Zusatz von Agar unterscheiden.

## 2 Einteilung der isolierten Inhaltsstoffe nach Biosynthesewege

Aus den 14 auf ihre Inhaltsstoffe untersuchten Pflanzenzellkulturen konnten insgesamt 29 verschiedene Substanzen isoliert werden. Diese Verbindungen lassen sich aufgrund der Biosynthesewege, über die sie gebildet werden, in verschiedene Gruppen einteilen. Bei dieser Einteilung der Verbindungen sollen die in den Strukturen enthaltenen Zucker unberücksichtigt bleiben.

Die erste Gruppe von Substanzen, die sich zusammenfassen läßt, bilden die Flavonoide. Aus dieser Stoffklasse konnte mit Plantagosid (**21**) ein Flavanon und mit Catechin (**17**), Epicatechin (**18**), Gallocatechin (**29**) und Epigallocatechin (**30**) vier Flavanole isoliert werden (siehe Abbildung 50). Die Flavanone entstehen aus einer Coumaroyl-CoA-Startereinheit, welche aus dem Shikimat-Chorismat-Weg entstammt, und aus drei Malonyl-CoA-Einheiten<sup>[176]</sup>. Die Flavanole, von denen alle vier natürlich vorkommenden Formen isoliert werden konnten, entstehen aus der Flavanonstruktur durch enzymatische Hydrierungen<sup>[177]</sup>. Flavonoide kommen in allen höheren Pflanzen vor allem in den Blüten und Blättern vor und dienen wahrscheinlich dem Schutz photoreaktiver Zellbestandteile vor UV-Strahlung<sup>[177]</sup>. Obwohl die fünf isolierten Substanzen nur aus den Zellkulturen von *Polygonum aubertii*, *Hypericum perforatum* und *Euonymus europaeus* isoliert werden konnten, ist es demnach wahrscheinlich, daß sich dieser Strukturtyp bei der Strukturaufklärung der in geringeren Mengen vorkommender Verbindungen auch in weiteren Arten der 14 untersuchten Zellkulturen finden läßt (s.u.).

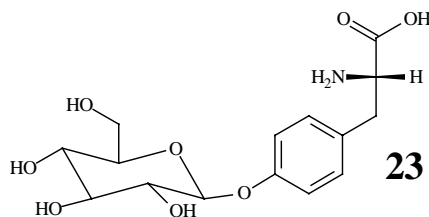


**Abbildung 50. Flavonoide**

**17:** Catechin, **18:** Epicatechin, **29:** Gallocatechin, **30:** Epigallocatechin, **21:** Plantagosid.

Viele der isolierten Substanzen enthalten im Gegensatz zu den Flavonoiden ausschließlich Bestandteile, die aus dem Shikimat-Chorismat-Weg stammen. Auf diesem Biosyntheseweg entstehen, ausgehend von Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat, über Shikimat und Chorismat die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan.

Mit dem Glucosid von Tyrosin (**23**) wurde somit ein unmittelbares Produkt des Shikimat-Chorismat-Weges aus der Zellkultur von *Bryonia dioica* isoliert (siehe Abbildung 51). Die Aminosäure Tyrosin ist in allen Lebewesen zu finden, so daß das Auftreten des Glucosids nicht besonders überrascht (s.u.).



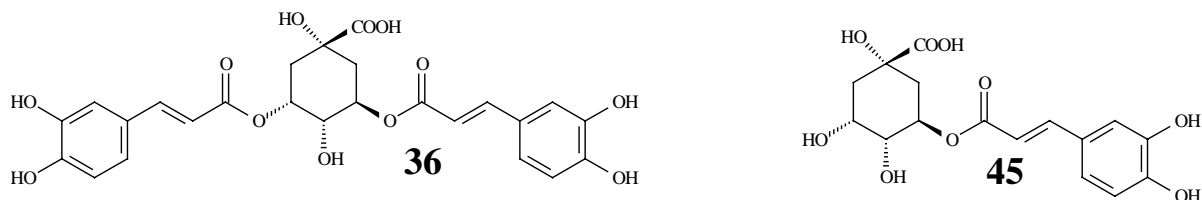
**Abbildung 51. Derivat eines Produktes des Shikimat-Chorismat-Weges**

**23:** Tyrosinylglucosid.

Direkt anschließend an den Shikimat-Chorismat-Weg wird aus Phenylalanin Zimtsäure gebildet, die der erste Vertreter der Phenylpropane ist<sup>[176]</sup>.

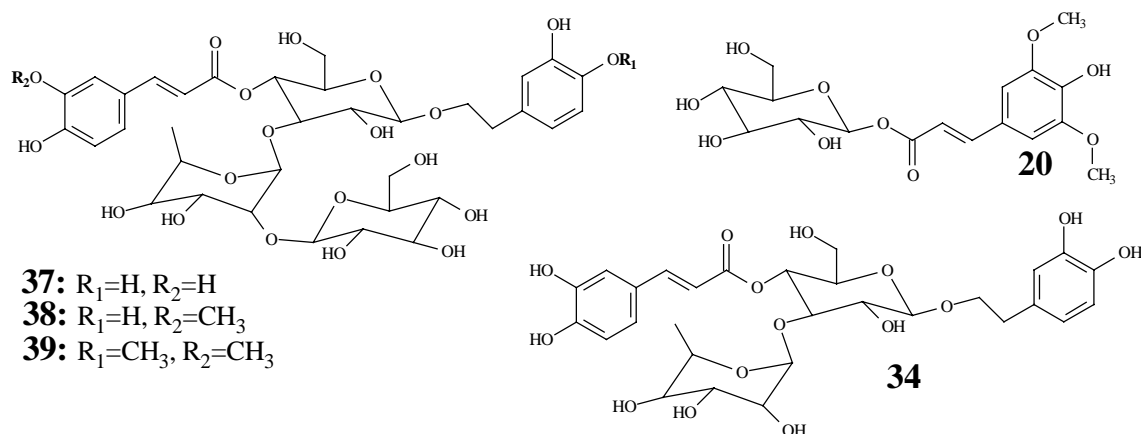
Ein Nebenweg dieses Biosyntheseweges führt zu Chinasäure. Neben Chlorogensäure (**45**), dem Einfachester von China- und Kaffeesäure, konnte auch der Diester 3,5-

Dicaffeoylchinasäure (**36**) isoliert werden (siehe Abbildung 52). Chlorogensäure und verwandte Depside kommen in nahezu allen pflanzlichen Geweben vor, wenn auch meist nur in geringen Konzentrationen<sup>[177]</sup>.



**Abbildung 52. Caffeoylchinasäuren**  
**36:** 3,5-Dicaffeoylchinasäure, **45:** Chlorogensäure.

Substanzen, die isoliert werden konnten und ausschließlich Phenylpropan als Bausteine enthalten, sind Sinapoylglucose (**20**), Rosmarinsäure (**40**), 3-Deoxy-rosmarinsäure (**41**), Matairesinosid (**35**), Episyningaresinol (**28**), Verbascosid (**34**), Phlinosid A (**37**) und dessen Methylderivate (**38**, **39**). Tyrosinylglucosid (**23**) läßt sich ebenfalls dieser Gruppe zuordnen (s.o.). Die Verbindungen dieser Gruppe unterscheiden sich im wesentlichen in der Art, wie die Phenylpropaneinheiten untereinander bzw. mit den Zuckermolekülen verbunden sind. Ester der Hydroxyzimtsäuren mit Mono- und Oligosacchariden kommen in der Natur weit verbreitet vor<sup>[178]</sup>, so daß sie oft als Leitsubstanzen in der Drogenanalytik verwendet werden. Neben Sinapoylglucose (**20**), Phlinosid A (**37**) und den Methylderivaten gehört Verbascosid (**34**) zu diesen Stoffen (siehe Abbildung 53).

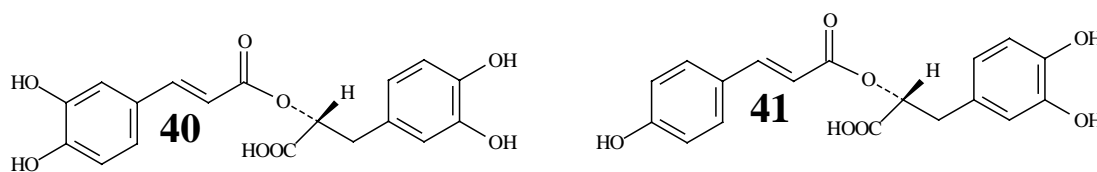


**Abbildung 53. Phenylpropanoid-Glucoside**  
**20:** Sinapoylglucose, **34:** Verbascosid, **37:** Phlinosid A, **38:** Methyl-phlinosid A,  
**39:** Dimethyl-phlinosid A.

Der Phenethylteil dieser Verbindungen entsteht ebenfalls durch Decarboxylierung aus der Kaffeesäure. Verbascosid kommt vor allem in den Pflanzenfamilien Lamiaceae, Oleaceae, Scrophulariaceae und Verbenaceae vor<sup>[179]</sup>. Phlinosid A unterscheidet sich von

Verbascosid nur durch ein weiteres Molekül Glucose. Es ist somit nicht erstaunlich, daß Verbascosid aus den beiden untersuchten Arten der Oleaceae-Familie, *Syringa officinalis* und *Forsythia viridissima*, und Phlinosid A aus der Lamiaceae *Ajuga reptans* isoliert werden konnte.

**Weitere Phenylpropanderivate sind Rosmarinsäure (40) und 3-Deoxy-rosmarinsäure (41) (siehe Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden).** Rosmarinsäure entsteht durch die enzymatische Veresterung von Kaffeesäure mit 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure, welche ebenfalls ein Phenylpropanderivat darstellt. Die Substanz konnte inzwischen aus vielen Arten der Lamiaceae isoliert werden und ist bereits aus den Pflanzen *Melissa officinalis* und *Rosmarinus officinalis* bekannt<sup>[177]</sup>, aus deren Zellkulturen sie ebenfalls isoliert werden konnte. Dagegen konnte die 3-Deoxy-rosmarinsäure bisher aus Pflanzen nicht isoliert werden (s.u.).



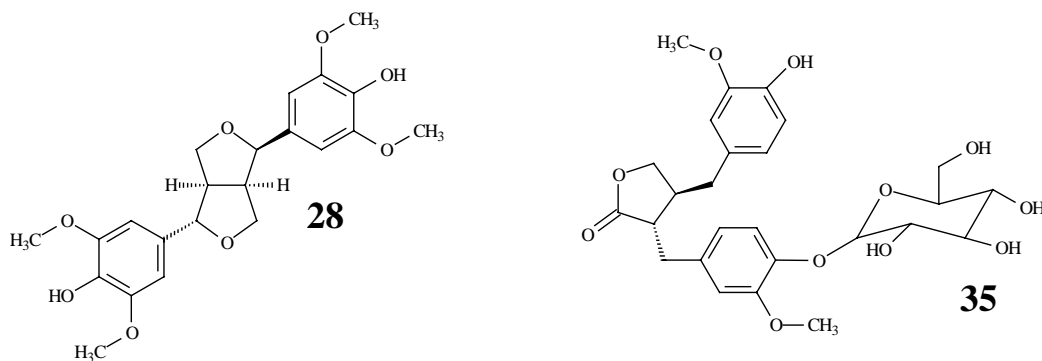
**Abbildung 54. Phenylpropan-Dimere**  
**40:** Rosmarinsäure, **41:** 3-Deoxy-rosmarinsäure.

Auch die Lignane entstehen durch Dimerisierung zweier Phenylpropaneinheiten. Im Gegensatz zur Rosmarinsäure erfolgt die Dimerisierung über die beiden  $\beta$ -C-Atome der Alkylseitenkette zweier Zimtsäurederivate. Durch sich anschließende weitere Reaktionen kommt es zu Ringschlüssen.

Im wesentlichen lassen sich sechs verschiedene Lignangrundtypen unterscheiden<sup>[177]</sup>. Vertreter zweier dieser Typen konnten mit Matairesinosid (**35**) (Dibenzylbutyrolactontyp) aus *Forsythia viridissima* und Episingarresinol (**28**) (Tetrahydrofurofurantyp) aus *Hypericum perforatum* isoliert werden (siehe Abbildung 55).

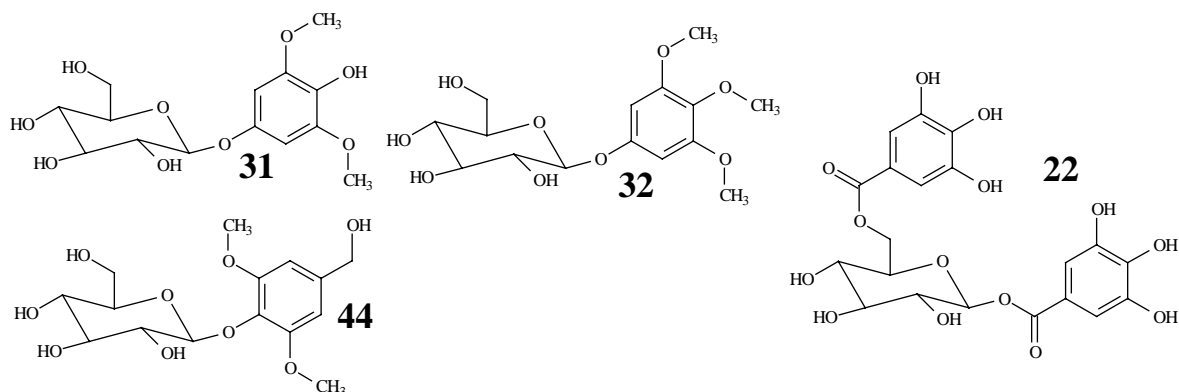
Lignane konnten bereits aus vielen Pflanzen isoliert werden. Besonders viele Vertreter lassen sich in den Arten der Gattung *Forsythia* finden<sup>[181]</sup>.





**Abbildung 55. Lignane**  
**28:** Episingaresinol, **35:** Matairesinosid.

Auch die aus den Zellkulturen isolierten Phenole 3,4,5-Trimethoxy-phenyl-O-glucosid (**32**), 4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-phenyl-O-glucosid (**31**) und Dimethylcrenatin (**44**) entstehen aus Zimtsäurederivaten (siehe Abbildung 56), entstammen also ebenfalls dem Shikimat-Chorismat-Biosyntheseweg.



**Abbildung 56. Phenole und Gallussäure**  
**31:** 4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-phenyl-O-glucosid, **32:** 3,4,5-Trimethoxy-phenyl-O-glucosid,  
**44:** Dimethylcrenatin, **22:** 1,6-Digallussäureglucosid.

Über mehrere Schritte werden zunächst aus Phenylpropanen Benzaldehydderivate gebildet. Die Aldehydgruppe wird im Falle von Dimethylcrenatin reduziert. Auf dem Weg zu den Hydrochinonderivaten (**31**, **32**) kommt es dagegen zu einer Oxidation zur entsprechenden Benzoesäure und einer anschließenden oxidativen Decarboxylierung zum Hydrochinonderivat<sup>[182]</sup>.

Prinzipiell ist also auch die Synthese der Gallussäure, enthalten im Digallussäureglucosid (**22**) (siehe Abbildung 56), als Zwischenprodukt denkbar, sie entsteht aber direkt aus Shikimat<sup>[176]</sup>.

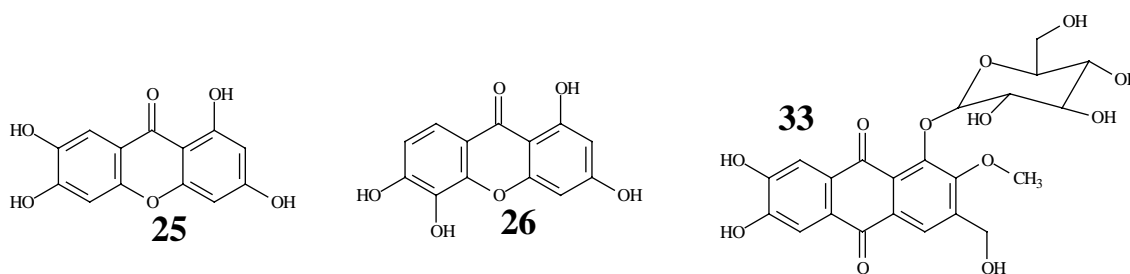
Gallussäure kommt wie die Hydrochinonderivate weitverbreitet im Pflanzenreich vor<sup>[180]</sup>, besonders viele Derivate lassen sich in *Epilobium angustifolium* finden, aus dessen Zellkultur auch das Digallussäureglucosid isoliert werden konnte (siehe IV.2.2.2).

Auch die Biosynthese der aus der Zellkultur von *Hypericum perforatum* isolierten Xanthonderivate Magniferitin (**25**) und 1,3,5,6-Tetrahydroxy-xanthenon (**26**) könnte wie die Flavonoidbiosynthese (s.o.) mit einem Zimtsäurederivat als Startereinheit unter Kondensation von zwei Malonsäureeinheiten ablaufen. Da aus der Pflanze keine Xanthere, mit Hypericin jedoch ein Kondensationsprodukt zweier Anthrachinone bekannt ist, ist nicht auszuschließen, daß die Xanthere aus Anthrachinonderivaten gebildet werden. Xanthonderivate, die über diesen Biosyntheseweg gebildet werden, zeichnen sich durch eine Methylgruppe an der Position 3 aus<sup>[182]</sup>. Diese müßte also in diesen Fällen (**25**, **26**) durch oxidative Decarboxylierung entfernt worden sein.

Bei dem aus *Galium odoratum* isolierten Anthrachinon ist die aus diesem Biosyntheseweg stammende Methylgruppe noch als Hydroxymethylgruppe erhalten geblieben. Die Anthrachinone werden somit über den Acetat-Malonat-Weg gebildet. An eine Acetyl-CoA-Startereinheit werden 7 Malonateinheiten kondensiert. Unter Zyklisierung, Reduktionen und Sauerstoffübertragungen entsteht schließlich das Anthrachinongerüst, aus dem durch Öffnung des mittleren Ringes an einem der carbonylischen C-Atome, erneute Zyklisierung über ein Sauerstoffatom und durch anschließende enzymatische Modifikationen auch ein Xanthonderivat entstehen kann<sup>[182]</sup>.

Untersuchungen der Biosynthese an Zellkulturen von *Hypericum androsaemum* ergaben eine dritte Variante für die Bildung der Xanthere. Die hier beobachtete Biosynthese beginnt mit Benzoesäure oder 3-Hydroxy-benzoesäure als Startereinheit, an die drei Malonyl-CoA kondensiert werden. Durch weitere enzymatische Veränderungen entsteht auch in diesem Fall das Xanthongerüst<sup>[183]</sup>.

*Hypericum androsaemum* und *Hypericum perforatum* gehören der gleichen Gattung an. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, daß die Xanthere in der untersuchten Zellkultur über den von Benzoesäure ausgehenden Biosyntheseweg gebildet werden. Engültige Gewißheit könnten aber Fütterungsexperimente mit radioaktiv markiertem Phenylalanin, Benzoesäure oder Essigsäure erbringen.



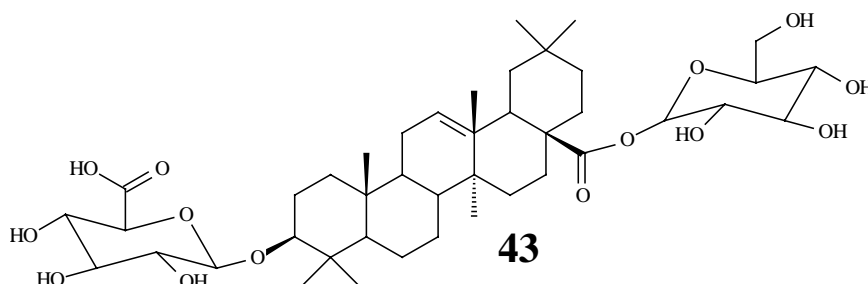
**Abbildung 57. Xanثone und Anthrachinone**

**25:** Magniferitin, **26:** 1,3,5,6-Tetrahydroxy-xanthenon,

**33:** 1-Glucosyl-6,7-dihydroxy-3-hydroxymethyl-2-methoxy-anthrachinon.

Das Auftreten von 1-Glucosyl-6,7-dihydroxy-3-hydroxymethyl-2-methoxy-anthrachinon (**33**) (siehe Abbildung 57) und weiterer Anthrachinonderivate, deren Strukturen bis jetzt nicht endgültig aufgeklärt werden konnten, war in der Zellkultur von *Galium odoratum* zu erwarten. Einerseits konnten schon aus der Pflanze viele Anthrachinone isoliert werden (siehe IV.2.2.6), andererseits zeigten viele untersuchte Zellkulturen anderer Rubiaceen eine ausgesprochen starke Bildung von Anthrachinonen. So konnten aus den Zellkulturen der Arten *Cinchona ledgeriana*<sup>[184,185]</sup>, *Cinchona robusta*<sup>[186]</sup>, *Cinchona pubescens*<sup>[187]</sup>, *Morinda citrifolia*<sup>[188]</sup> und *Ophiorrhiza pumila*<sup>[189]</sup> neben bereits bekannten Anthrachinonderivate 38 bis dahin unbekannte isoliert werden. Auch das Anthrachinonderivat, das aus der Zellkultur von *Galium odoratum* isoliert werden konnte, ist aus dem Pflanzenreich bisher noch nicht bekannt.

Bei der aus *Levisticum officinale* isolierten Substanz Chikusetsusaponin IVa (**43**) handelt es sich um ein Triterpen (siehe Abbildung 58). Für die Biosynthese dieser Stoffklasse wird zunächst aus 3 Isopentenylidiphosphat-Molekülen Farnesyldiphosphat gebildet. Zwei dieser Moleküle bilden in einem nächsten Schritt Squalen, das schließlich zu einem Pentazyklus weiterreagiert.

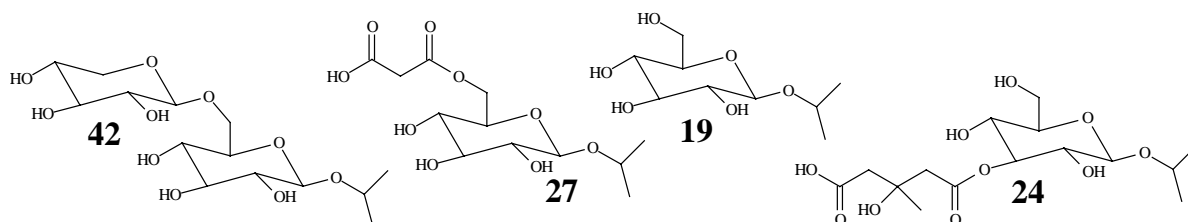


**Abbildung 58. Triterpen**

**43:** Chikusetsusaponin Iva.

Das Grundgerüst des isolierten Triterpensaponins entspricht der Oleanolsäure. Da an zwei Seiten Zuckerreste über OH-Gruppen konjugiert sind, handelt es sich um ein bisdesmosides Triterpensaponin. Saponine sind im Pflanzenreich außerordentlich weit verbreitet<sup>[177]</sup>. Aus diesem Grund ist die Isolierung aus *Levisticum officinale* nicht als ungewöhnlich anzusehen.

Die letzte Gruppe, zu der sich die isolierten Substanzen zusammenfassen lassen, bilden die Isopropanolderivate. Neben 1-O-Isopropylglucosid (**19**) konnte 1-O-Isopropylprimverosid (**42**), 1-O-Isopropyl-6-O-malonyl-glucosid (**27**) und 1-O-Isopropyl-4-O-(3'-methyl)-glutaryl-glucosid (**24**) isoliert werden (siehe Abbildung 59).



**Abbildung 59. Isopropylderivate**

**19:** 1-O-Isopropylglucosid, **42:** 1-O-Isopropylprimverosid, **27:** 1-O-Isopropyl-6-O-malonyl-glucosid, **24:** 1-O-Isopropyl-4-O-(3'-methyl)-glutaryl-glucosid.

Isopropanol und abgeleitete glucosidische Derivate sind bisher nur in wenigen Pflanzenarten entdeckt worden. So konnte z.B. Isopropylglucosid in *Anoectochilus formosanus*<sup>[69]</sup> und in den Früchten von *Foeniculum vulgare*<sup>[149]</sup> nachgewiesen werden. Das Primverosid wurde aus *Passiflora moriflora* isoliert<sup>[149]</sup>. Der Biosyntheseweg, auf dem diese Verbindungen gebildet werden, ist ziemlich unklar. Für *Passiflora moriflora* scheint aber ein Zusammenhang mit dem in der Pflanze ablaufenden Cyanhydrin-Biosyntheseweg wahrscheinlich<sup>[149]</sup>. In dieser Pflanze ließ sich Linamarin (**46**) isolieren, das Analogon zu Isopropylglucose, das statt des Protons am sekundären Kohlenstoffatom des Isopropanols eine Cyanogruppe besitzt (siehe Abbildung 60). Auch für andere cyanogene Pflanzen wurde ein entsprechendes Stoffpaar beschrieben<sup>[191,192,193]</sup>.



**Abbildung 60. Postuliertes Stoffpaar in *Passiflora moriflora***  
**46:** Linamarin **19:** 1-O-Isopropylglucosid.

Auch wenn sich, wie oben beschrieben, das Auftreten von Isopropylglucosiden in cyanogenen Pflanzen erklären läßt, so bleibt dennoch die Frage, warum sich in fast allen Zellkulturen mit Ausnahme von *Epilobium angustifolium* und *Bellis perennis* Isopropylderivate finden ließen.

Wahrscheinlicher als die Annahme, daß es sich bei Isopropanol in den Zellkulturen um einen endogenen Stoff handelt, ist die Vermutung, daß diese Verbindung durch den Überimpfvorgang in das Nährmedium gelangt ist.

Um eine Infektion der Zellkulturen zu vermeiden, wurden die Kolben vor dem Überimpfen mit Isopropanol eingesprüht (siehe III.1.3). Dabei blieb wahrscheinlich ein Teil der Lösung an der Grenzfläche zwischen Schaumstoffstopfen und Kolbenwand haften, der dann beim Übergießen in die Zellsuspension gelangte.

Da Isopropanol wie alle einfachen Alkohole neben hydrophilen auch lipophile Eigenschaften zeigt, vermag es die Zellwände der Zellkulturen ohne aktiven Transport zu passieren. Die Zellen steuern einer solchen Kontamination entgegen, indem sie versuchen, diese Stoffe aus dem Cytosol auszuschleusen. Da aber Isopropanol aufgrund seiner Lipophilie erneut die Membranen passieren kann, muß es zunächst metabolisiert werden. Der erste Schritt der Metabolisierung ist in den meisten Fällen, sofern die Substanz bereits eine OH-Gruppe besitzt, eine Glucosilierung. Danach werden die Verbindungen per aktivem Transport durch die Tonoplasten in die Vakuolen geschleust, aus denen sie aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften kaum noch herausdiffundieren können.

Die Glucosilierung wenden Pflanzen sowohl für endogene Substanzen an, die an definierten Orten gespeichert werden sollen, aber auch für Xenobiotika wurde diese Metabolisierung beobachtet<sup>[194]</sup>. In diesem Fall dienen diese Reaktionen demnach einer Entgiftung der Pflanzen<sup>[195]</sup>.

Glucosilierungsreaktionen mit pflanzlichen Zellkulturen gehören zu den am besten untersuchten Biotransformationsreaktionen. Sie ermöglichen sogar, wie das Beispiel der Arbutinproduktion in *Rauwolfia serpentina* ausgehend von Hydrochinon zeigt, die

Produktbildung im Gramm-Maßstab. Innerhalb von 7 Tagen können 18 g/l Arbutin gewonnen werden<sup>[196]</sup>.

Auch die Bildung von Primverosiden ließ sich schon für endogene als auch exogene Substrate beobachten. So wurde bei der oben beschriebenen Glucosilierung von Hydrochinon auch das entsprechende Primverosid identifiziert<sup>[197]</sup>. Beispiele für Isolierungen von Primverosiden endogener Substanzen sind Swertianin-Primverosid aus *Gentianella nitida*<sup>[198]</sup>, (S)-Linalyl- $\beta$ -primverosid aus Oolong-Teeblättern<sup>[199]</sup> und Alizarin-1-methylether-2-O-primverosid aus den Wurzeln von *Galium sinaicum*<sup>[200]</sup>. Wahrscheinlich soll durch die Bildung des Primverosids eine zusätzliche Erhöhung der Hydrophilie gegenüber dem einfachen Glucosid und damit eine verbesserte Lokalisation in der Vakuole erreicht werden.

Wie Abbildung 59 zeigt, wurden noch zwei weitere Derivate der Isopropanolglucose isoliert: 1-O-Isopropyl-6-O-malonyl-glucosid (**27**) und 1-O-Isopropyl-4-O-(3'-methyl)-glutaryl-glucosid (**24**).

Bei der Untersuchung intakter Pflanzen wurde nachgewiesen, daß neben den einfachen Glucosiden auch acetylierte Glucoside in Vakuolen akkumuliert werden<sup>[201]</sup>. Als Grund für die Bildung der Malonsäurehalbester der Glucoside wird eine Variation des Ionenfallenmechanismus postuliert. Während der pH-Wert im Cytosol pH 7.1 - 7.6 beträgt, ist er in der Vakuole mit 5.3 - 6.0 deutlich niedriger<sup>[202,203]</sup>. Für das aus Zellkulturen von *Petroselinum hortense*- isolierte Apigenin-7-O-( $\beta$ -D-O-6-O-malonyl-glucosid) konnte mit <sup>1</sup>H-NMR-Messungen in organischen Lösungsmitteln eine pH-abhängige Konformationsänderung nachgewiesen werden<sup>[204]</sup>. Diese Konformationsänderung wird auch für wäßrige Milieus erwartet.

Der Tonoplast wirkt wahrscheinlich wie ein Konformationsfilter. Während er für die Konformation, die im Cytosol bei höherem pH-Wert vorliegt, durchlässig ist, ist er undurchlässig für die in der Vakuole vorkommende Konformation. Dadurch wird eine Anreicherung in der Vakuole entgegen dem Konzentrationsgradienten ermöglicht<sup>[205]</sup>.

Wahrscheinlich zeigt auch der 3'-Methyl-glutaryl-halbester dieses Verhalten. Beispiele für Verbindungen dieses Typus ,die aus differenzierten Pflanzen isoliert wurden, sind die 6-O-Halbester Rutarensin aus *Edgeworthia chrysantha*<sup>[206]</sup> und *Daphne mezereum*<sup>[207]</sup> und Palustrosid aus *Ledum palustre*<sup>[79]</sup>. Aber auch 4-O-Halbester wurden isoliert, wie 7-O-(4'-O-(3''-Methyl)-glutaryl)-glucopyranosyl-6-hydroxy-luteolin aus *Frullania muscicola*<sup>[208]</sup>.

### 3 Bewertung der Ergebnisse

Viele Substanzen, die aus den 14 untersuchten Zellkulturen isoliert wurden, sind Verbindungen, die weit im Pflanzenreich verbreitet sind oder sogar in allen Pflanzenarten vorkommen. Nur das Anthrachinonderivat und die 3-Deoxy-rosmarinsäure, sieht man einmal von den Isopropanolderivaten ab, waren zuvor aus Pflanzen nicht isoliert worden. Die meisten Substanzen sind Produkte bzw. Folgeprodukte des Shikimat-Chorismat-Weges.

Wie bereits erwähnt (siehe I.3), werden in Zellkulturen im Gegensatz zur Pflanze nicht alle Enzyme exprimiert. Wird ein Enzym nicht gebildet, kommt es zum Abbruch des entsprechenden Biosyntheseweges; das Endprodukt wird nicht gebildet.

Im Gegensatz zum Sekundärstoffwechsel ist der Primärstoffwechsel für die Zellkultur essentiell. Falls ein Enzym des Primärstoffwechsels nicht mehr exprimiert wird und der Ausfall der dadurch katalysierten Bildung einer Substanz nicht über andere Biosynthesewege kompensiert oder die Verbindung nicht aus dem Nährmedium aufgenommen werden kann, stirbt die Zellkultur ab bzw. sie bildet sich erst gar nicht. Das heißt andererseits, daß in jeder Zellkultur die zum Überleben notwendigen Enzyme gebildet werden.

Im Gegensatz dazu ist der Ausfall der Expression eines Enzyms, welches nicht für das Überleben der Zelle essentiell ist, ohne Nachteil für das Zellwachstum. Die fehlende Expression kann sogar ein Selektionsvorteil sein. Die Wachstumsrate einer Zelle ist im wesentlichen begrenzt durch die Energiemenge, welche ihre Mitochondrien pro Zeit umsetzen können. Dieser Umsatz kann limitiert sein durch die maximale Leistung der Mitochondrien oder durch die Diffusionsgeschwindigkeiten und das absolute Angebot an Sauerstoff und Zucker. Zunächst sind alle Zellen, sieht man einmal von ihrem Alter ab, in einer Zellkultur identisch, wachsen unter gleichen Bedingungen und haben deshalb wahrscheinlich den gleichen Energieumsatz pro Zeit.

Zellen, die durch spontane Veränderungen einen geringeren Aufwand für die Produktion von Sekundärstoffen betreiben, besitzen höhere Zellteilungsraten, da sie einen höheren Anteil des Energieumsatzes für das Wachstum verwenden können. Aus dem permanent höheren Fortpflanzungserfolg ergibt sich, daß nach und nach die Zellen verdrängt werden, die einen höheren Aufwand bzgl. ihres Sekundärstoffwechsels betreiben.

Dieser Ansatz vermag zu erklären, warum es in Zellkulturen zum Nachlassen bishin zum vollständigen Verschwinden von Expressionen bestimmter Enzyme und damit zum Verschwinden einzelner Inhaltsstoffe kommt. Wahrscheinlich entstehen durch Punktmutationen zunächst einzelne Zellen, die – zumindestens im entdifferenzierten Status - ein bestimmtes Enzym nicht mehr bilden und sich deshalb nach und nach durchsetzen können.

Der Ausfall der Expression eines bestimmten Gens kann aber nicht nur auf eine echte Veränderung der genetischen Information zurückgeführt werden. Einen anderen Erklärungsansatz bietet die Epigenetik. Durch die Methylierung (statt Cytosin enthält die DNA verstärkt Methylcytosin) des Retroposons eines Gens wird dieses Gen weniger stark abgelesen, wobei das Ausmaß der Reduktion der Expression vom Grad der Methylierung abhängt. Bei der Verdopplung der DNA vor der Zellteilung bleibt die Methylierung erhalten<sup>[209]</sup>. Deshalb zeichnen sich auch die Tochterzellen durch die verringerte Expression dieses Gens aus, so daß sie einen Selektionsvorteil besitzen. Durch eine weitere Methylierung kann es dann zu einer weiteren Reduzierung kommen (u.s.w.). Mit diesem Modell läßt sich ein sehr langsames Nachlassen der Biosynthese von Sekundärstoffwechselprodukten erklären. Denn die Verdrängung der Zellen, welche diese Stoffe noch produzieren, erfolgt in kleinen Schritten und der Selektionsvorteil der veränderten Zellen ist bei nur verringerter im Vergleich zur fehlenden Expression kleiner. Selbstverständlich ist der Ausfall der Expression eines Sekundärstoffwechsellzyms nur dann ein Selektionsvorteil, wenn der sich dadurch akkumulierende Stoff keine Nachteile wie zum Beispiel Toxizität für die Zelle mit sich bringt.

Natürlich entstehen durch zufällige Veränderungen nicht nur Zellen mit geringerem, sondern auch mit einem erhöhten Sekundärstoffwechsel. Aus den bereits geschilderten Gründen besitzen diese aber zunächst einen Selektionsnachteil. Selektiert man diese Zellen aber mit Methoden, die der der Monocolony-Isolation bei Mikroorganismen entsprechen, so lassen sich Zelllinien erhalten, die eine deutlich höhere Produktionsrate an Sekundärstoffen und teilweise sogar eine stabilere Produktion aufweisen als die zunächst verwendeten Zelllinien<sup>[210,211]</sup>.

Beispielsweise konnte durch 24 aufeinanderfolgende Selektionen eine Zelllinie von *Euphorbia milli* erhalten werden, die eine 7fach höhere Akkumulation von Anthocyaninen zeigte als die Ausgangszelllinie<sup>[212]</sup>.

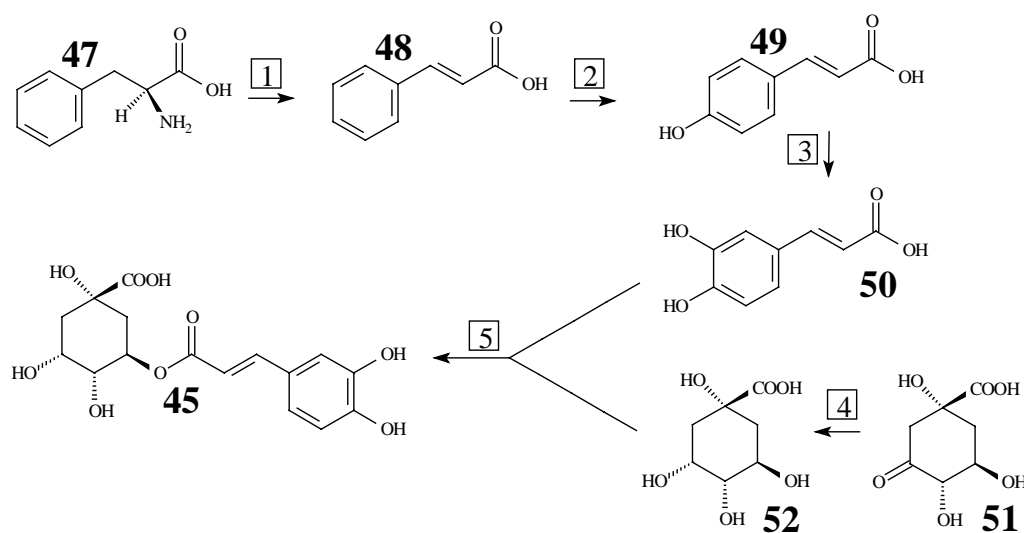


Ausgehend von der Vorstellung, daß die Wahrscheinlichkeit der unterbleibenden Expression für jedes Enzym gleich groß ist, bedeutet dies, daß statistisch gesehen die Synthese einer Verbindung um so unwahrscheinlicher wird, je mehr Enzyme an ihr beteiligt sind.

Über den Shikimat-Chorismat-Weg werden die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gebildet (s.o.), die für die Pflanze lebensnotwendig sind. Das heißt, daß die Biosynthese bis zu diesen Produkten aus den bereits oben genannten Gründen auf jeden Fall ablaufen muß.

Betrachtet man die aus den Zellkulturen isolierten Verbindungen, deren Vorstufen über den Shikimat-Chorismat-Weg gebildet werden, so fällt auf, daß für die Bildung der meisten dieser Verbindungen verhältnismäßig wenig weitere Enzyme notwendig sind. Beispielsweise sind an der Bildung der Chlorogensäure ausgehend von Phenylalanin (**47**) und 5-Dehydro-chinasäure (**51**) (Zwischenstufe des Shikimat-Chorismat-Wegs) nur fünf Enzyme beteiligt: Phenylalanin Ammonium-Lyase, Zimtsäure 4-Monooxygenase, Phenoloxidase, Chinasäure Dehydrogenase und Chlorogensäuresynthase<sup>[182]</sup> (siehe Abbildung 61).

Gleichermaßen relativ kurze Biosynthesewege haben viele der isolierten Verbindungen.



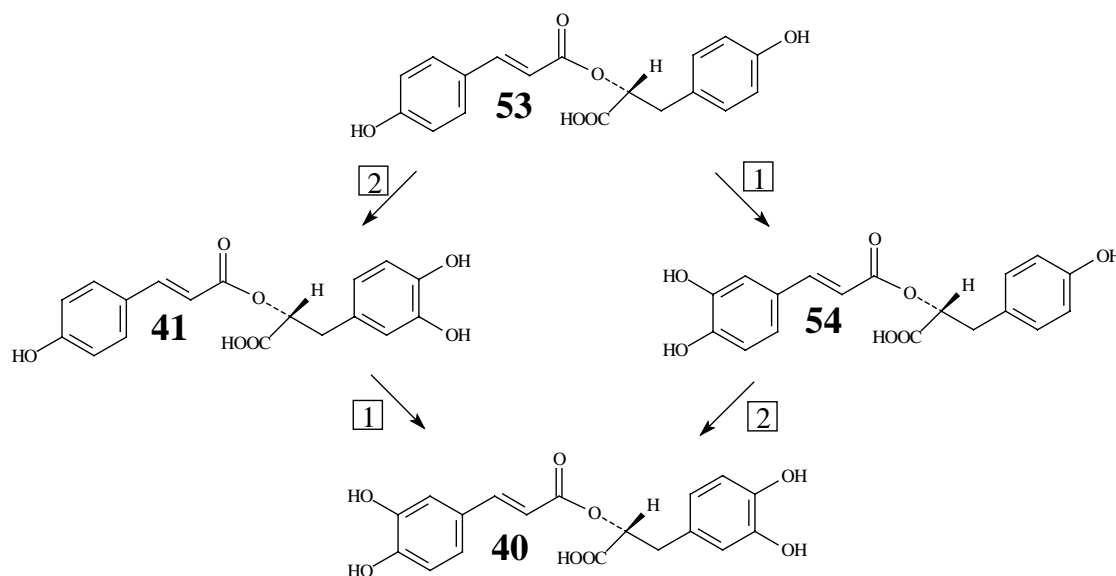
**Abbildung 61. Biosyntheschema von Chlorogensäure**

**47:** Phenylalanin, **48:** Zimtsäure, **49:** Paracumarsäure, **50:** Kaffeesäure, **51:** Dehydrochinasäure, **52:** Chinasäure.

Zahlen in den Kästen stehen für die Enzyme: 1: Phenylalanin Ammonium-Lyase, 2: Zimtsäure 4-Monooxygenase, 3: Phenoloxidase, 4: Chinasäure Dehydrogenase, 5: Chlorogensäuresynthase.

Eine interessante Verbindung, isoliert aus der Zellkultur von *Rosmarinus officinalis*, ist 3-Deoxy-rosmarinsäure (**41**). Die Bildung dieser Substanz, die aus der Pflanze noch nicht isoliert werden konnte, läßt sich am besten mit einer quantitativen Veränderung der Enzymexpression erklären.

Die Biosynthese von Rosmarinsäure wurde durch Untersuchungen an Suspensionskulturen von *Coleus blumei* aufgeklärt. Ein Zwischenprodukt der Biosynthese ist 3,3'-Dideoxy-rosmarinsäure (4-Coumaroyl-4'-hydroxyphenyllactat) (**53**). Rosmarinsäure wird aus dieser Verbindung mit Hilfe zweier membrangebundener, Cytochrom-P450 abhängiger Hydroxylasen, 4-Coumaroyl-hydroxyphenyllactat 3-Hydroxylase und 4-Coumaroyl-hydroxyphenyllactat 3'-Hydroxylase gebildet. Es konnte aber bislang nicht geklärt werden, ob die Biosynthese über 3'-Deoxyrosmarinsäure (Caffeoyl-4'-hydroxyphenyllactat) (**54**), über 3-Deoxyrosmarinsäure (4-Coumaroyl-3',4'-dihydroxyphenyllactat) (**41**) oder über beide Verbindungen parallel erfolgt<sup>[213]</sup> (siehe Abbildung 62).



**Abbildung 62. Entstehung von 3-Deoxy-rosmarinsäure neben der Bildung von Rosmarinsäure**

**53:** 3,3'-Dideoxy-rosmarinsäure (4-Coumaroyl-4'-hydroxyphenyllactat), **54:** 3'-Deoxyrosmarinsäure (Caffeoyl-4'-hydroxyphenyllactat), **41:** 3-Deoxyrosmarinsäure (4-Coumaroyl-3',4'-dihydroxyphenyllactat), **40:** Rosmarinsäure (Caffeoyl-3',4'-dihydroxyphenyllactat).  
Zahlen in den Kästen stehen für die Enzyme: 1: 4-Coumaroyl-hydroxyphenyllactat 3-Hydroxylase, 2: 4-Coumaroyl-hydroxyphenyllactat 3'-Hydroxylase.

Wahrscheinlich wird in *Rosmarinus officinalis* und in *Coleus blumei* die Rosmarinsäure auf dem gleichen Biosyntheseweg gebildet. Die Isolierung der 3-Deoxy-rosmarinsäure gibt

den Hinweis, daß die Biosynthese der Rosmarinsäure in der Pflanze wahrscheinlich – zumindestens zum Teil – über diese Verbindung abläuft.

Die Isolierung von Rosmarinsäure aus der Zellkultur zeigt, daß die 3'-Hydroxylase exprimiert werden muß. Wahrscheinlich ist die Expression dieses Enzyms aber geringer als in der Pflanze, so daß die Vorstufe akkumuliert. So ist diese Substanz ein Beispiel dafür, wie veränderte Expressionsmuster in Zellkulturen zu neuen Substanzen führen können.

In IV.2.2 wurden für jede Art die aus der Pflanze isolierten Substanzen denen aus der Zellkultur gegenübergestellt. Dabei mag die Tatsache, daß aus den Zellkulturen jeweils nur 1 bis 6 Substanzen isoliert wurden, aus der Pflanze aber teilweise über 50 Verbindungen bekannt sind, zu der Vermutung führen, daß die Zellkulturen deutlich weniger Verbindungen enthalten als die intakten Pflanzen. Hier muß aber berücksichtigt werden, daß fast ausschließlich nur die am stärksten gebildeten Substanzen isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden konnten. Die in IV.2.2 abgebildeten Chromatogramme der semipräparativen Trennungen zeigen, daß die methanolischen Extrakte zum Teil eine Vielzahl weiterer weniger konzentrierter Substanzen enthalten. Erst wenn eine größere Zahl dieser Verbindungen identifiziert ist, lassen sich die Inhaltsstoffmuster der Zellkulturen mit denen der differenzierten Pflanzen endgültig vergleichen.

Eines der Ziele der Arbeit war es, zu untersuchen, ob Zellkulturen eine Quelle neuer Verbindungen darstellen können.

Geht man davon aus, daß Zellkulturen maximal den Enzymsatz besitzen, der auch die Pflanze auszeichnet, so sind die Kulturen nicht in der Lage, biosynthetische Reaktionen durchzuführen, die es in den Pflanzen nicht gibt. Daraus ergibt sich zwangsläufig, daß in Zellkulturen im Vergleich zu den differenzierten Pflanzen keine völlig anderen Verbindungsklassen zu erwarten sind. Durch Veränderung der Expressionsmuster und durch fehlende oder andere Kompartimentierung können sie aber Varianten der im Pflanzenreich zu findenden Syntheseklassen bilden.

Diese Theorie wird durch die isolierten Verbindungen bestätigt. So stellen das aus *Galium odoratum* isolierte Anthrachinon und die 3-Deoxy-rosmarinsäure aus *Romarinus officinalis* beispielhaft Varianten der aus diesen Pflanzen bekannten Stoffgruppen dar.

Aus der Vermutung, daß vor allem Varianten der aus der intakten Pflanze bekannten Stoffklassen zu erwarten sind, ergibt sich, daß es sinnvoll ist, von solchen Pflanzen

Zellkulturen anzulegen und anschließend das Inhaltsstoffspektrum zu untersuchen, von denen bereits interessante Stoffgruppen bekannt sind, um auf diesem Wege zu neuen und vielleicht sogar zu pharmazeutisch wirksameren Variationen dieser Substanzklassen zu gelangen.

Nach der Entdeckung von Paclitaxel als Antitumormittel wurden sowohl Pflanzen als auch Zellkulturen auf Taxane untersucht. Berücksichtigt man die hohe Anzahl von Forschungsgruppen, die sich mit der phytochemischen Untersuchung von *Taxus*-Pflanzen beschäftigen<sup>[214]</sup>, so zeigt die Isolierung von 17 neuen Taxanen aus Zellkulturen durch nur vier Arbeitsgruppen<sup>[215,216,217,218,219]</sup>, daß der Einsatz von Zellkulturen sinnvoll für das Auffinden von Strukturvarianten ist.

## VI SPEKTROSKOPISCHE DATEN

### Abkürzungen:

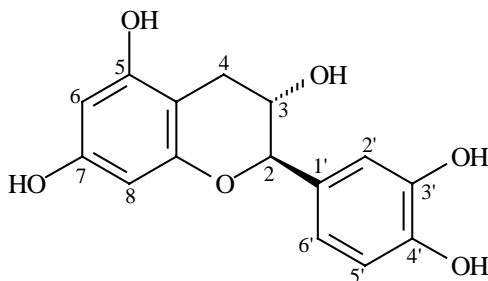
s:	Singulett	dq:	Dublett vom Quartett
d:	Dublett	m:	Multiplett
t:	Triplett	eq:	equatorial
q:	Quartett	ax:	axial
dd:	Dublett vom Dublett	J:	Kopplungskonstante als  J  in Hz

### Catechin

Summenformel:  $C_{15}H_{14}O_6$

MW: 290.27

Strukturformel:



Retentionszeit: 28-31 min (FM-system 1), 23-24 min (FM-system 2)

MS: pos. Ionis.: 291.1 (+1)  
neg. Ionis.: 289.1 (+1)

### $^1\text{H-NMR}$

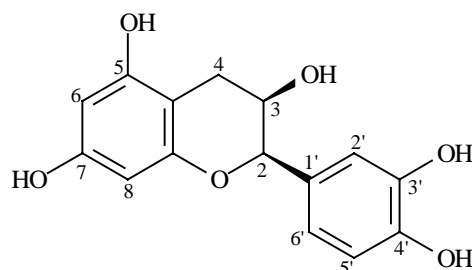
(400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] 6.89 (s, 1 H, H-2'), 6.79 (d, 1 H,  $J_{\text{H-6'}/\text{H-5'}} = 8.1$ , H-6')  
6.74 (d, 1 H,  $J_{\text{H-5'}/\text{H-6'}} = 8.1$ , H-5') 5.95 (s, 1 H, H-8), 5.88 (s, 1 H, H-6), 4.59 (d, 1 H,  
 $J_{\text{H-2}/\text{H-3}} = 7.7$ , H-2), 4.00 (m, 1 H, H-3), 2.87 (dd, 1 H,  $J_{\text{H-4A'}/\text{H-4B'}} = 16.2$ ,  $J_{\text{H-4A'}/\text{H-3'}} = 5.2$ ,  
H-4A'), 2.55 (dd, 1 H,  $J_{\text{H-4B'}/\text{H-4A'}} = 16.2$ ,  $J_{\text{H-4B'}/\text{H-3'}} = 8.0$ , H-4B')

## Epicatechin

Summenformel:  $C_{15}H_{14}O_6$

MW: 290.27

Strukturformel:



Retentionszeit: 37-38 min (FM-system 1), 32-33 min (FM-system 2)

MS: pos. Ionis.: 291.1 (+1)  
neg. Ionis.: 291.1 (-1)

### $^1H$ -NMR

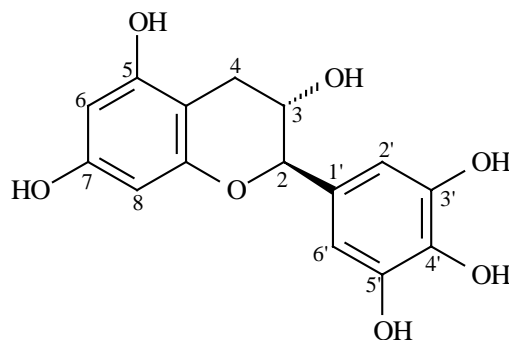
(400 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  [ppm] 6.99 (s, 1 H, H-2'), 6.81 (d, 1 H,  $J_{H-6'/H-5'} = 8.1$ , H-6') 6.77 (d, 1 H,  $J_{H-5'/H-6'} = 8.1$ , H-5') 5.95 (s, 1 H, H-8), 5.92 (s, 1 H, H-6), 4.83 (d, 1 H,  $J_{H-2/H-3} = 1.5$ , H-2), 4.19 (m, 1 H, H-3), 2.90 (dd, 1 H,  $J_{H-4A'/H-4B'} = 17.0$ ,  $J_{H-4A'/H-3'} = 4.6$ , H-4'), 2.55 (dd, 1 H,  $J_{H-4B'/H-4A'} = 17.0$ ,  $J_{H-4B'/H-3'} = 2.9$ , H-4B')

## Gallocatechin

Summenformel:  $C_{15}H_{14}O_7$

MW: 306.27

Strukturformel:



Retentionszeit: 16-18 min (FM-system 1), 32-33 min (FM-system 2)

MS: pos. Ionis.: 307.4 (+1), 324.4 (+18)  
neg. Ionis.: 305.3 (-1)

### <sup>1</sup>H-NMR

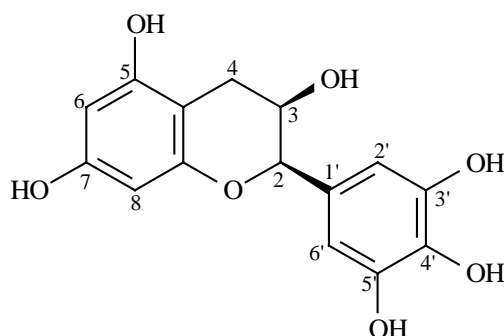
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 6.42 (s, 2 H, H-2', H-6'), 5.94 (s, 1 H, H-8), 5.88 (s, 1 H, H-6), 4.55 (d, 1 H, J<sub>H-2/H-3</sub> = 7.1, H-2), 3.99 (m, 1 H, H-3), 2.83 (dd, 1 H, J<sub>H-4A'/H-4B'</sub> = 16.2, J<sub>H-4A'/H-3'</sub> = 5.6, H<sub>A-4'</sub>), 2.55 (dd, 1 H, J<sub>H-4B'/H-4A'</sub> = 16.2, J<sub>H-4B'/H-3'</sub> = 7.8, H-4<sub>B'</sub>)

## Epigallocatechin

Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>

MW: 306.27

Strukturformel:



Retentionszeit: 25 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 307.3 (+1)  
neg. Ionis.: 305.3 (-1)

### <sup>1</sup>H-NMR

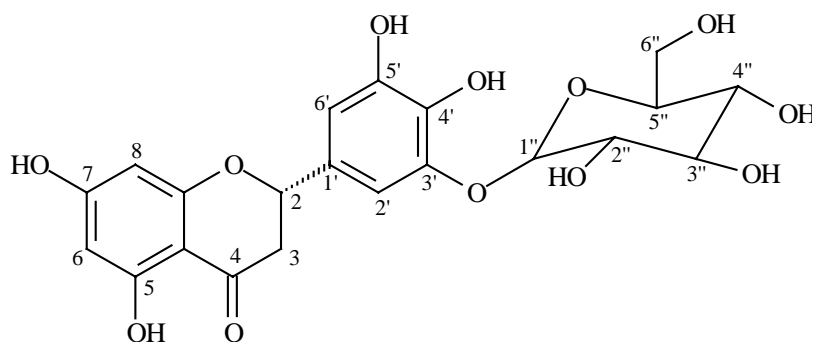
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 6.61 (s, 2 H, H-2', H-6'), 5.95 (s, 1 H, H-8), 5.92 (s, 1 H, H-6), 4.77 (d, 1 H, J<sub>H-2/H-3</sub> = 1.5, H-2), 4.19 (m, 1 H, H-3), 2.87 (dd, 1 H, J<sub>H-4A'/H-4B'</sub> = 16.7, J<sub>H-4A'/H-3'</sub> = 4.6, H-4<sub>A'</sub>), 2.75 (dd, 1 H, J<sub>H-4B'/H-4A'</sub> = 16.7, J<sub>H-4B'/H-3'</sub> = 2.4, H-4<sub>B'</sub>)

## Plantagosid

Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>12</sub>

MW: 466.39

Strukturformel:



Retentionszeit: 56-57 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 467.5 (+1)  
 neg. Ionis.: 465.5 (-1), 511.5 (+45)

<sup>1</sup>H-NMR

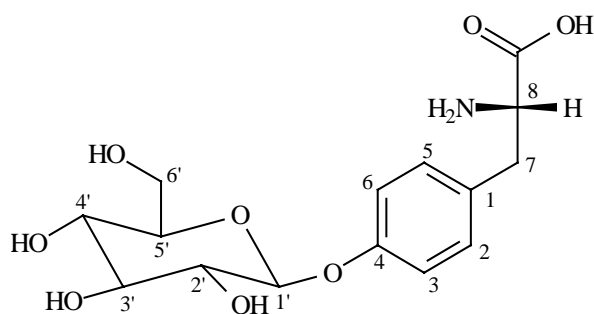
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 6.90 (s, 1 H, H-2'), 6.72 (s, 1 H, H-6'), 5.92 (s, 1 H, H-8), 5.90 (s, 1 H, H-6), 5.30 (dd, 1 H, J<sub>H-2/H-3ax</sub> = 12.7, J<sub>H-2/H-3eq</sub> = 3.0, H-2), 4.81 (d, 1 H, J<sub>H-1''/H-2''</sub> = 7.1, H-1''), 3.90 (dd, 1 H, J<sub>H-6A''/H-6B''</sub> = 12.5, J<sub>H-6A''/H-5''</sub> = 2.5, H-6A''), 3.71 (dd, 1 H, J<sub>H-6B''/H-AB''</sub> = 12.5, J<sub>H-BA''/H-5''</sub> = 5.6, H-6B''), 3.55 – 3.37 (m, 4 H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5''), 3.11 (dd, 1 H, J<sub>H-3ax/H-3eq</sub> = 17.1, J<sub>H-3ax/H-2</sub> = 12.7, H-3<sub>ax</sub>), 2.74 (dd, 1 H, J<sub>H-3eq/H-3ax</sub> = 17.1, J<sub>H-3eq/H-2</sub> = 3.0, H-3<sub>eq</sub>)

### Tyrosinyl-O-β-D-glucopyranosid

Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>O<sub>8</sub>

MW: 343.33

Strukturformel:



Retentionszeit: 13-14 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 344.3 (+1)  
 neg. Ionis.: 342.2 (-1), 388.4 (+45)



<sup>1</sup>H-NMR

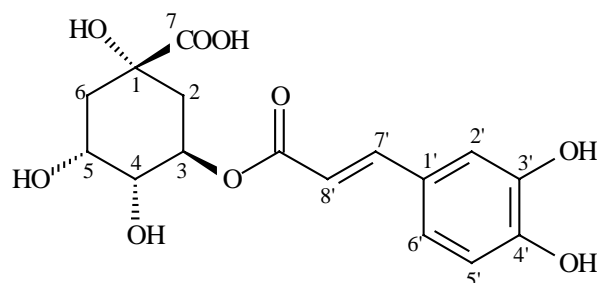
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 7.74 (d, 2 H,  $J_{H-2/H-3} = J_{H-6/H-5} = 8.6$ , H-2, H-6), 6.84 (d, 2 H,  $J_{H-3/H-2} = J_{H-5/H-6} = 8.6$ , H-3, H-5), 4.34 (d, 1 H,  $J_{H-1'/H-2'} = 6.5$ , H-1'), 4.05 (m, 1 H, H-8), 3.87 (d, 1 H,  $J_{H-6'A/H-6'B} = 11.5$ , H-6'<sub>A</sub>), 3.78 (m, 1 H, H-7<sub>A</sub>), 3.69 (m, 1 H, H-6'<sub>B</sub>), 3.54 (m, 1 H, H-7<sub>B</sub>), 3.38 – 3.25 (m, 3 H, H-2', H-3', H-5'), 3.23 (t, 1 H,  $J_{H-4'/H-3'} = J_{H-4'/H-5'} = 8.4$ , H-4')

**Chlorogensäure**

Summenformel: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>

MW: 354.31

Strukturformel:



Retentionszeit: 17-21 min (FM-system 2)

MS: pos. Ionis.: 355.2 (+1), 373.3 (+18)  
neg. Ionis.: 353.4 (-1)

<sup>1</sup>H-NMR

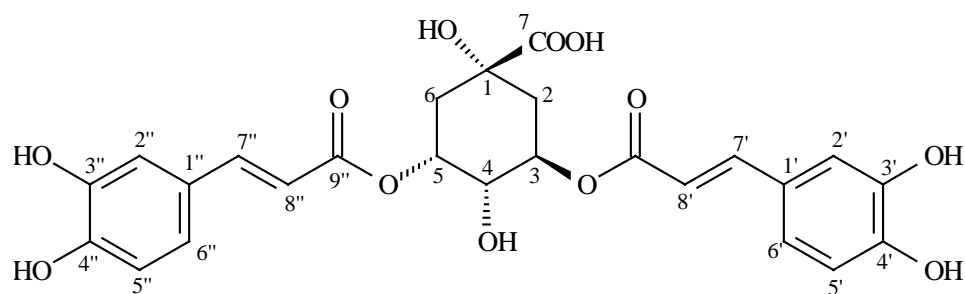
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 7.58 (d, 1 H,  $J_{H-7'/H-8'} = 16.0$ , H-7'), 7.06 (s, 1 H, H-2'), 6.98 (d, 1 H,  $J_{H-6'/H-5'} = 8.0$ , H-6'), 6.80 (d, 1 H,  $J_{H-5'/H-6'} = 8.0$ , H-5'), 6.32 (d, 1 H,  $J_{H-8'/H-7'} = 16.0$ , H-8'), 5.35 (m, 1 H, H-3), 4.19 (m, 1 H, H-5), 3.74 (dd, 1 H,  $J_{H-4/H-3} = 8.5$ ,  $J_{H-4/H-5} = 3.0$ , H-4), 2.22 (m, 2 H, H-2<sub>A</sub>, H-2<sub>B</sub>), 2.09 (m, 2 H, H-6<sub>A</sub>, H-6<sub>B</sub>)

**3,5-DI-O-CAFFEOYL-CHINASÄURE**

Summenformel: C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>

MW: 516.45

Strukturformel:



Retentionszeit: 37-40 min (FM-system 2)

MS: pos. Ionis.: 517.2 (+1), 534.3 (+18), 539.2 (+23)  
 neg. Ionis.: 515.1 (-1)

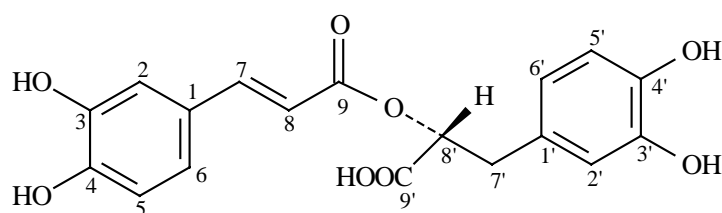
<sup>1</sup>H-NMR

(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 7.58 (d, 1 H,  $J_{H-7'/H-8'} = 15.8$ , H-7'), 7.54 (d, 1 H,  $J_{H-7''/H-8''} = 15.5$ , H-7''), 7.06 (s, 2 H, H-2', H-2''), 6.97 (d, 2 H,  $J_{H-6'/H-5'} = J_{H-6''/H-5''} = 8.6$ , H-6', H-6''), 6.84 (d, 2 H,  $J_{H-5'/H-6'} = J_{H-5''/H-6''} = 8.0$ , H-5', H-5''), 6.28 (d, 1 H,  $J_{H-8'/H-7'} = 15.8$ , H-8'), 6.23 (d, 1 H,  $J_{H-8''/H-7''} = 15.5$ , H-8''), 5.33 (m, 2 H, H-3, H-5), 4.16 (m, 1 H, H-4), 2.22 (m, 2 H, H-2<sub>A</sub>, H-2<sub>B</sub>), 2.05 (m, 2 H, H-6<sub>A</sub>, H-6<sub>B</sub>)

## Rosmarinsäure

Summenformel: C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>  
 MW: 360.32

Strukturformel:



Retentionszeit: 37-43 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 361.4 (+1), 383.4 (+23)  
 neg. Ionis.: 359.3 (-1), Fragment: 197.2 (-1)

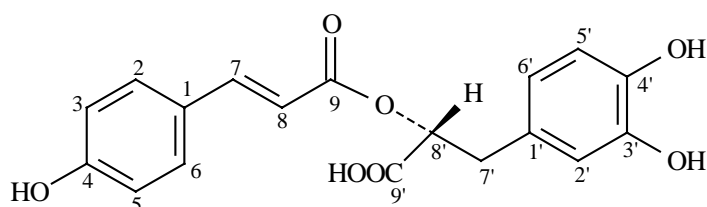
<sup>1</sup>H-NMR

(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 7.57 (d, 1 H,  $J_{H-7/H-8} = 15.8$ , H-7), 7.06 (s, 1 H, H-2), 6.97 (d, 1 H,  $J_{H-6/H-5} = 8.0$ , H-6), 6.80 (d, 1 H,  $J_{H-5/H-6} = 8.0$ , H-5), 6.72 (s, 1 H, H-2'), 6.67 (d, 1 H,  $J_{H-6'/H-5'} = 8.0$ , H-6'), 6.63 (d, 1 H,  $J_{H-5'/H-6'} = 8.0$ , H-5'), 6.32 (d, 1 H,  $J_{H-8/H-7} = 15.8$ , H-8), 5.21 (dd, 1 H,  $J_{H-8'/H-7B'} = 8.1$ ,  $J_{H-8'/H-7A'} = 4.1$ , H-8'), 3.21 (dd, 1 H,  $J_{H-7A'/H-7B'} = 14.2$ ,  $J_{H-7A'/H-8'} = 4.1$ , H-7<sub>A</sub>'), 3.03 (dd, 1 H,  $J_{H-7B'/H-7A'} = 14.2$ ,  $J_{H-7B'/H-8'} = 8.1$ , H-7<sub>B</sub>')

**3-DEOXY-ROSMARINSÄURE**Summenformel:  $C_{18}H_{16}O_7$ 

MW: 344.23

Strukturformel:



Retentionszeit: 44 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 367.1 (+23)  
 neg. Ionis.: 343.1 (-1), Fragment: 197.2 (-1)

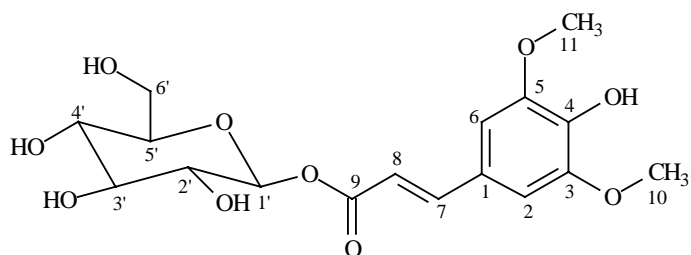
<sup>1</sup>H-NMR

(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] 7.64 (d, 1 H,  $J_{H-7/H-8} = 15.7$ , H-7), 7.49 (d, 2 H,  $J_{H-2/H-3} = J_{H-6/H-5} = 8.5$ , H-2, H-6), 6.82 (d, 2 H,  $J_{H-3/H-2} = J_{H-5/H-6} = 8.5$ , H-3, H-5), 6.77 (s, 1 H, H-2'), 6.71 (d, 1 H,  $J_{H-6'/H-5'} = 7.9$ , H-6'), 6.68 (d, 1 H,  $J_{H-5'/H-6'} = 8.0$ , H-5'), 6.36 (d, 1 H,  $J_{H-8/H-7} = 15.7$ , H-8), 5.21 (dd, 1 H,  $J_{H-8'/H-7B'} = 8.5$ ,  $J_{H-8'/H-7A'} = 4.0$ , H-8'), 3.12 (dd, 1 H,  $J_{H-7A'/H-7B'} = 14.2$ ,  $J_{H-7A'/H-8'} = 4.0$ , H<sub>A</sub>-7'), 3.03 (dd, 1 H,  $J_{H-7B'/H-7A'} = 14.2$ ,  $J_{H-7B'/H-8'} = 8.5$ , H-7<sub>B</sub>')

**1-O-SINAPOYL- $\beta$ -D-GLUCOPYRANOSID**Summenformel:  $C_{17}H_{22}O_{10}$ 

MW: 386.35

Strukturformel:



Retentionszeit: 43-45 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 409.5 (+23)  
 neg. Ionis.: 385.5 (-1)

<sup>1</sup>H-NMR

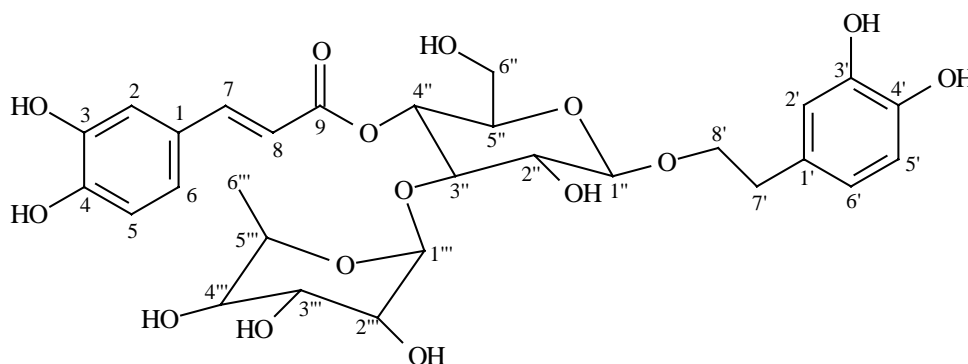
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 7.75 (d, 1 H,  $J_{H-7/H-8} = 15.8$ , H-7), 7.96 (s, 2 H, H-2, H-6), 6.46 (d, 1 H,  $J_{H-8/H-7} = 15.8$ , H-8), 5.60 (d, 1 H,  $J_{H-1'/H-2'} = 7.6$ , H-1'), 3.90 (s, 6 H, H-10, H-11), 3.80 (m, 1 H, H-6<sub>A</sub>'), 3.71 (dd, 1 H,  $J_{H-6B'/H-6A'} = 12.0$ ,  $J_{H-6B'/H-5'} = 4.8$ , H-6<sub>B</sub>'), 3.50 – 3.30 (m, 3 H, H-3', H-4', H-5'), 3.29 (m, 1 H, H-2')

**Verbascosid**

Summenformel: C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>

MW: 624.59

Strukturformel:



Retentionszeit: 31-38 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 625.4 (+1), 642.6 (+18)  
neg. Ionis.: 623.2 (-1)

<sup>1</sup>H-NMR

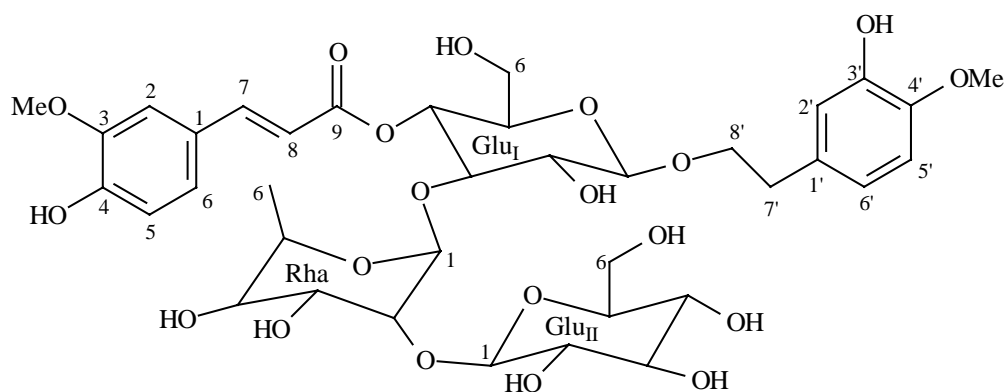
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 7.62 (d, 1 H,  $J_{H-7/H-8} = 15.6$ , H-7), 7.09 (s, 1 H, H-2), 6.98 (d, 1 H,  $J_{H-6/H-5} = 8.1$ , H-6), 6.81 (d, 1 H,  $J_{H-5/H-6} = 8.1$ , H-5), 6.72 (s, 1 H, H-2'), 6.71 (d, 1 H,  $J_{H-5'/H-6'} = 8.1$ , H-5'), 6.59 (d, 1 H,  $J_{H-6'/H-5'} = J_{H-5''/H-6''} = 8.1$ , H-6), 6.30 (d, 1 H,  $J_{H-8/H-7} = 15.6$ , H-8), 5.21 (s, 1 H, H-1'''), 4.40 (d, 1 H,  $J_{H-1''/H-2''} = 7.8$ , H-1''), 4.06 (m, 2 H, H-8<sub>A</sub>', H-8<sub>B</sub>'), 4.16 (m, 1 H, H-4), 3.90 – 3.30 (m, 9 H, H-2'', H-3'', H-5'', H-6<sub>A</sub>'', H-6<sub>B</sub>'', H-2''', H-3''', H-4''', H-5'''), 2.81 (t, 2 H,  $J_{H-7A',H-7B'/H-7B',H-7A'} = J_{H-7A',H-7B'/H-8A',H-8B'} = 6.2$ , H-7<sub>A</sub>', H-7<sub>B</sub>'), 1.12 (d, 3 H,  $J_{H-6'''/H-5'''} = 6.1$ , H-6''')

**3,4'-O-DIMETHYL-PHLINOSID A**

Summenformel: C<sub>37</sub>H<sub>50</sub>O<sub>20</sub>

MW: 814.79

Strukturformel:



Retentionszeit: 36-37 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 832.3 (+18), 835.2 (+23)  
 neg. Ionis.: 813.2 (-1)

NMR-Daten (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

Pos.	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> C-NMR*	HMBC
<b>1</b>	-	126,6	-
<b>2</b>	7.19 d (2)	110,7	6, 4, 3, 7
<b>3</b>	-	148,3	-
<b>4</b>	-	146,7	-
<b>5</b>	6,80 d (7)	115,5	1, 3
<b>6</b>	7,07 dd (7; 2)	123,2	2, 4, 7
<b>OMe</b>	3,88 s	55,0	3
<b>7</b>	7,66 d (16)	149,7	9
<b>8</b>	6,37 d (16)	114,5	9
<b>9</b>	-	168	-
<b>1'</b>	-	131,9	-
<b>2'</b>	6,73 d (2)	116,0	4', 6'
<b>3'</b>	-	146,3	-
<b>4'</b>	-	146,4	-
<b>5'</b>	6,81 d (7)	111,9	7
<b>6'</b>	6,68 dd (7; 2)	120,1	4', 2'
<b>OMe</b>	3,80 s	55,0	4'
<b>7'</b>	2.81 m	36,5	8'
<b>8'<sub>a</sub></b>	3,72 m	71,0	Glu <sub>I</sub> -1
<b>8'<sub>b</sub></b>	4,05 m		Glu <sub>I</sub> -1
<b>Glu<sub>I</sub>-1</b>	4,38 d (8)	102,8	8', Glu <sub>I</sub> -3
<b>Glu<sub>I</sub>-2</b>	3,38 dd (7; 8)	75,9	Glu <sub>I</sub> -3

<b>Glu<sub>I</sub>-3</b>	3,78 m	81,5	Glu <sub>I</sub> -2, Rha-1
<b>Glu<sub>I</sub>-4</b>	4.92 dd (9;8)	69,5	9, Glu <sub>I</sub> -5, Glu <sub>I</sub> -3,
<b>Glu<sub>I</sub>-5</b>	3,53 m	75,3	Glu <sub>I</sub> -2
<b>Glu<sub>I</sub>-6<sub>a</sub></b>	3,62 m	62,5	Glu <sub>I</sub> -5
<b>Glu<sub>I</sub>-6<sub>b</sub></b>	3,52 m		Glu <sub>I</sub> -5
<b>Rha-1</b>	5,58 brs	101,4	Rha-5, Glu <sub>I</sub> -3, Rha-3
<b>Rha-2</b>	3,98 brs	82,5	Rha-3, Glu <sub>II</sub> -1
<b>Rha-3</b>	3,64 m	72,0	Rha-4
<b>Rha-4</b>	3,27 dd (10, 10)	73,0	Rha-5, Rha-3, Rha-6
<b>Rha-5</b>	3,52 m	69,5	
<b>Rha-6</b>	1,05 d (6,5)	18,0	Rha-5, Rha-4
<b>Glu<sub>II</sub>-1</b>	4.34 d (8)	106,5	Rha-2
<b>Glu<sub>II</sub>-2</b>	3,58 m	71,5	
<b>Glu<sub>II</sub>-3</b>	3,45 dd (7; 2)	74,0	Glu <sub>II</sub> -2
<b>Glu<sub>II</sub>-4</b>	3,78 brs	69,0	Glu <sub>II</sub> -2
<b>Glu<sub>II</sub>-5</b>	3,52 m	71,0	
<b>Glu<sub>II</sub>-6<sub>a</sub></b>	3,70 m	63,0	
<b>Glu<sub>II</sub>-6<sub>b</sub></b>	3,80 m		

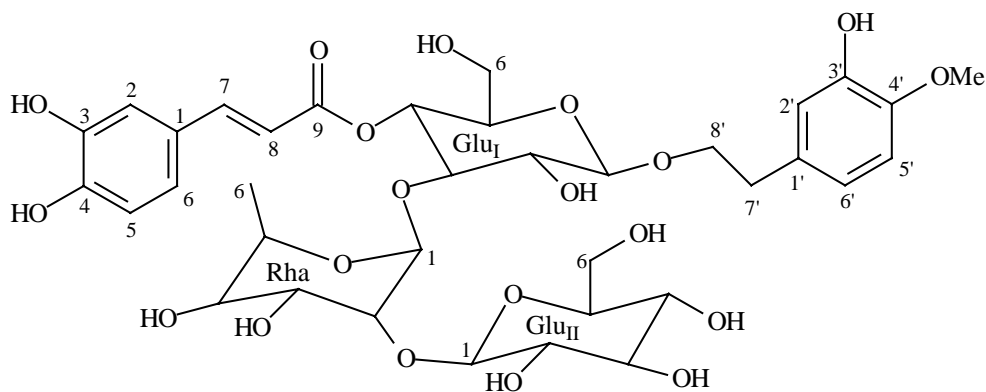
\* abgeschätzt aus HMBC-Daten

#### 4'-O-METHYL-PHLINOSID A

Summenformel: C<sub>36</sub>H<sub>48</sub>O<sub>20</sub>

MW: 800.76

Strukturformel:



Retentionszeit: 41-43 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 818.3 (+18), 823.3 (+23)  
neg. Ionis.: 799.2 (-1)

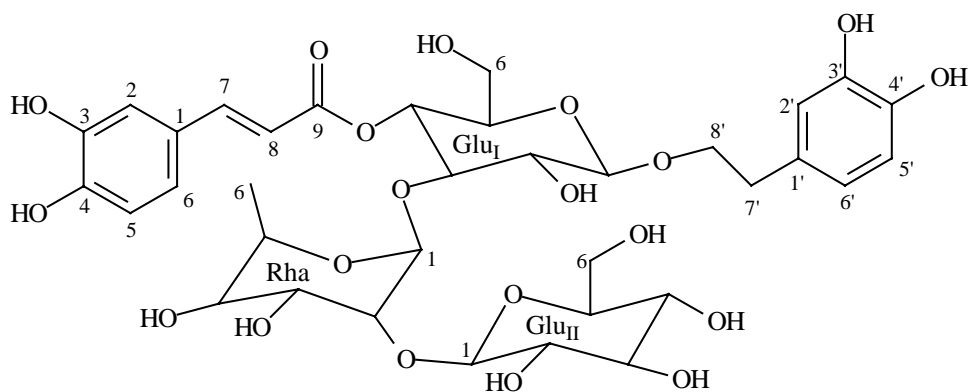
NMR-Daten: Nahezu identisch mit Dimethyl-phlinosid A (siehe oben), das  $^1\text{H}$ -Signal für die Methylgruppe bei  $\delta$  [ppm] 3.88 fehlt.

### Phlinosid A

Summenformel:  $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{O}_{20}$

MW: 786.73

Strukturformel:



Retentionszeit: 46-48 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 804.2 (+18), 809.2 (+23)  
neg. Ionis.: 795.2 (-1)

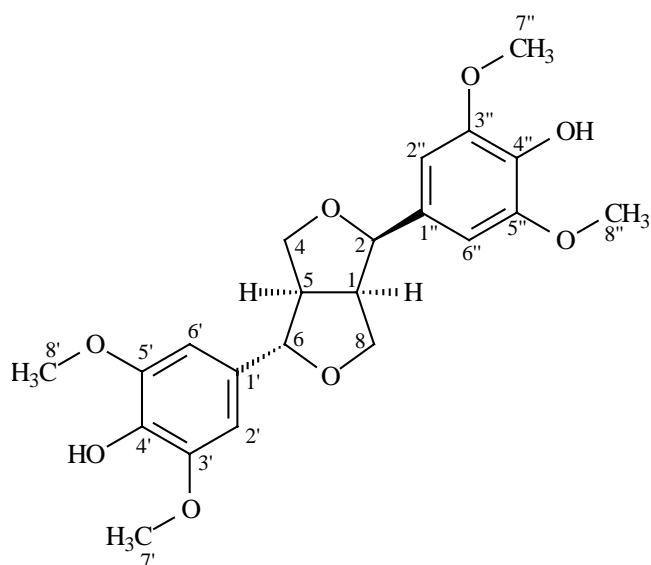
NMR-Daten: Nahezu identisch mit Dimethyl-phlinosid A (siehe oben), die  $^1\text{H}$ -Signale für die Methylgruppen bei  $\delta$  [ppm] 3.88 und 3.80 fehlen.

### Episingaresinol

Summenformel:  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8$

MW: 418.44

Strukturformel:



Retentionszeit: 47 min (FM-system 2)

MS: pos. Ionis.: 419.2 (+1)  
 neg. Ionis.: 417.2 (-1)

<sup>1</sup>H-NMR

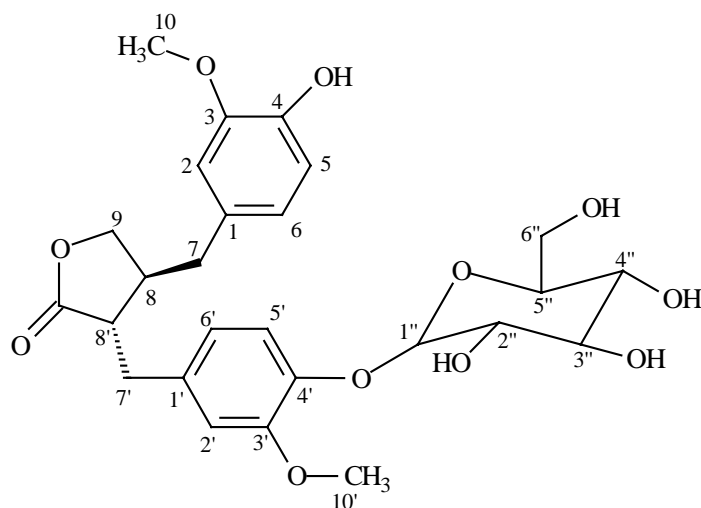
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 6.72 (s, 1 H, H-2'', H-6''), 6.68 (s, 1 H, H-2', H-6'), 4.83 (m, 1 H, H-6), 4.32 (m, 1 H, H-2), 3.95 (m, 1 H, H-4<sub>eq</sub>), 3.92 (m, 1 H, H-4<sub>ax</sub>), 3.87 (s, 12 H, H-7', H-8', H-7'', H-8''), 3.51 (m, 1 H, H-8<sub>eq</sub>), 3.92 (m, 1 H, H-8<sub>ax</sub>), 3.40 (m, 1 H, H-1), 3.17 (m, 1 H, H-5)

## Matairesinosid

Summenformel: C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>O<sub>11</sub>

MW: 520.53

Strukturformel:





Retentionszeit: 33 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 538.2 (+18)  
neg. Ionis.: 519.3 (-1), 565.2 (+45)

### <sup>1</sup>H-NMR

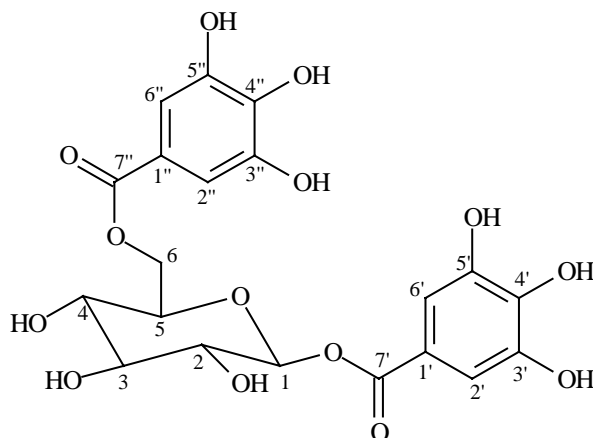
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 7.07 (d, 1 H, J<sub>H-5'/H-6'</sub> = 8.5, H-5'), 7.05 (d, 1 H, J<sub>H-5/H-6</sub> = 8.5, H-5), 6.76 (s, 1 H, H-2'), 6.74 (d, 1 H, J<sub>H-6'/H-5'</sub> = 8.5, H-6'), 6.71 (d, 1 H, J<sub>H-6/H-5</sub> = 8.5, H-6), 6.70 (s, 1 H, H-2), (4.9 (m, 1 H, H-1'')), 4.22-4.17 (m, 1 H, H-9<sub>A</sub>), 3.95 (dd, 1 H, J<sub>H-9B/H-9A</sub> = J<sub>H-9B/H-8</sub> = 7.8, H-9<sub>B</sub>), 3.90 (dd, 1 H, J<sub>H-6A''/H-6B''</sub> = 11.5, J<sub>H-6A''/H-5''</sub> = 3.0, H-6<sub>A</sub>''), 3.82, 3.80 (s, s, 3 H, 3 H, H-10, H-10'), 3.73 (dd, 1 H, J<sub>H-6B''/H-6A''</sub> = 11.5, J<sub>H-6B''/H-5''</sub> = 4.5, H-6<sub>B</sub>''), 3.50 – 3.30 (m, 4 H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5''), 2.95 – 2.50 (m, 6 H, H-7, H-7', H-8, H-8')

## 1,6-DI-O-GALLOYL-β-D-GLUCOSE

Summenformel: C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>14</sub>

MW: 484.37

Strukturformel:



Retentionszeit: 37 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 502.2 (+18)  
neg. Ionis.: 483.3 (-1)

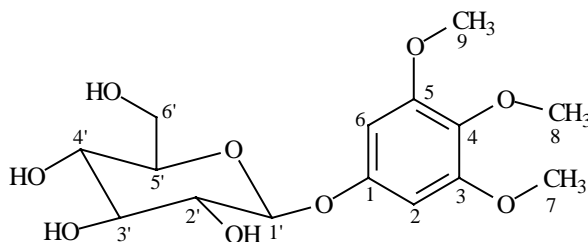
### <sup>1</sup>H-NMR

(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 7.14 (s, 2 H, H-2'', H-6''), 7.14 (s, 2 H, H-2', H-6'), 5.70 (d, 1 H, J<sub>H-1/H-2</sub> = 5.9, H-1), 4.86 (d, 1 H, J<sub>H-6A/H-6B</sub> = 12.0, H-6<sub>A</sub>), 4.42 (dd, 1 H, J<sub>H-6B/H-6A</sub> = 12.0, J<sub>H-6B/H-5</sub> = 5.2, H-6<sub>B</sub>), 3.87 – 3.53 (m, 4 H, H-2, H-3, H-4, H-5)

**3,4,5-TRIMETHOXYPHENYL- $\beta$ -D-GLUCOPYRANOSID**Summenformel:  $C_{15}H_{22}O_9$ 

MW: 346.33

Strukturformel:

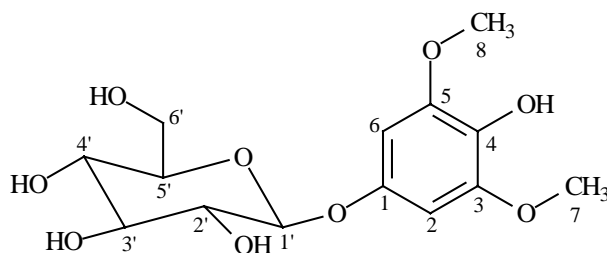


Retentionszeit: 31 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 369.2 (+23)  
neg. Ionis.: 345.2 (-1), 391.1 (+45) $^1H$ -NMR(400 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  [ppm] 6.51 (s, 2 H, H-2, H-6), 4.89 (d, 1 H,  $J_{H-1'/H-2'} = 6.9$ , H-1'), 3.94 (d, 1 H,  $J_{H-6A'/H-6B'} = 12.1$ , H-6A'), 3.83 (s, 6 H, H-7, H-9), 3.72 (s, 3 H, H-8), 3.68 (dd, 1 H,  $J_{H-6B'/H-6A'} = 12.1$ ,  $J_{H-6B'/H-5'} = 6.5$ , H-6B'), 3.50 – 3.42 (m, 4 H, H-2', H-3', H-4', H-5') $^{13}C$ -NMR(400 MHz,  $D_3COD$ ):  $\delta$  [ppm] 55.4 (C-7, C-9), 60.3 (C-8), 94.8 (C-2, C-6), 133.2 (C-4), 155.0 (C-1), 155.7 (C-3, C-5),**4-HYDROXY-3,5-DI-METHOXYPHENYL- $\beta$ -D-GLUCOPYRANOSID**Summenformel:  $C_{15}H_{22}O_9$ 

MW: 332.30

Strukturformel:



Retentionszeit: 30 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 355.31 (+23)  
neg. Ionis.: 305.3 (-1), 367.2 (+45)

<sup>1</sup>H-NMR

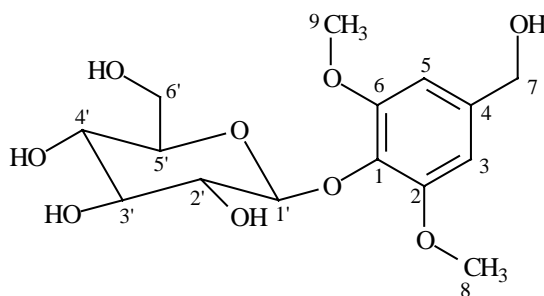
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 6.15 (s, 2 H, H-2, H-6), 4.69 (d, 1 H, J<sub>H-1'/H-2'</sub> = 7.1, H-1'), 3.94 (m, 1 H, H-6<sub>A</sub>'), 3.81 (s, 6 H, H-7, H-9), 3.69 (dd, 1 H, J<sub>H-6B'/H-6A'</sub> = 11.8, J<sub>H-6B'/H-5'</sub> = 5.1, H-6<sub>B</sub>'), 3.50 – 3.30 (m, 4 H, H-2', H-3', H-4', H-5')

**Dimethylcrenatin**

Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>

MW: 346.33

Strukturformel:



Retentionszeit: 12 min (FM-system 2)

MS: pos. Ionis.: 347.2 (+1)  
neg. Ionis.: 345.2 (-1)

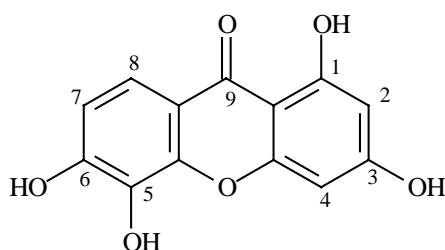
<sup>1</sup>H-NMR

(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 6.72 (s, 2 H, H-3, H-5), 4.86 (d, 1 H, J<sub>H-1'/H-2'</sub> = 7.4, H-1'), 4.57 (s, 2 H, H-7), 3.87 (s, 6 H, H-8, H-9), 3.80 (d, 1 H, J<sub>H-6A'/H-6B'</sub> = 12.1, H-6<sub>A</sub>'), 3.69 (dd, 1 H, J<sub>H-6B'/H-6A'</sub> = 12.2, J<sub>H-6B'/H-5'</sub> = 5.1, H-6<sub>B</sub>'), 3.50 – 3.30 (m, 3 H, H-3', H-4', H-5'), 3.23 (m, 1 H, H-2')

**1,3,5,6-Tetrahydroxy-xanthen-9-on**Summenformel:  $C_{13}H_8O_6$ 

MW: 260.20

Strukturformel:

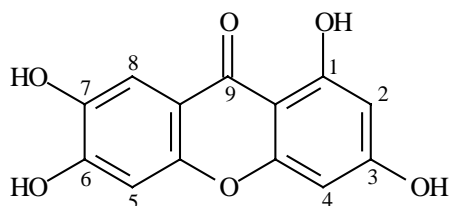


Retentionszeit: 55 min (FM-system 2)

MS: pos. Ionis.: 261.2 (+1)  
neg. Ionis.: 259.1 (-1), 315.2 (+45) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] 7.60 (d, 1 H,  $J_{\text{H-8/H-9}} = 8.8$ , H-8), 6.90 (d, 1 H,  $J_{\text{H-9/H-8}} = 8.8$ , H-9), 6.46 (s, 1 H, H-4), 6.19 (s, 1 H, H-2)**Magniferitin (1,3,6,7-Tetrahydroxy-xanthen-9-on)**Summenformel:  $C_{13}H_8O_6$ 

MW: 260.20

Strukturformel:



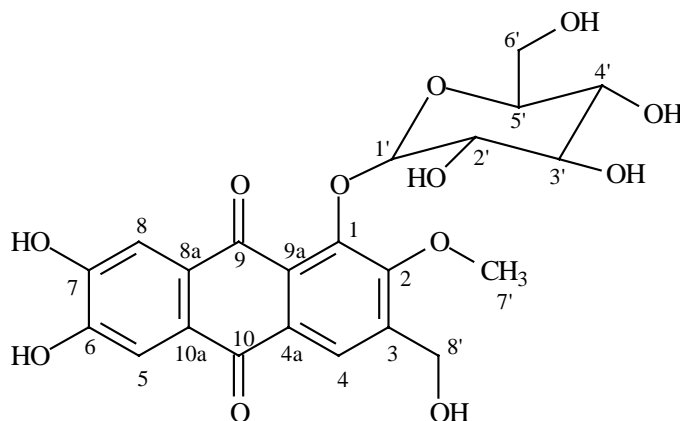
Retentionszeit: 56 min (FM-system 2)

MS: pos. Ionis.: 261.0 (+1)  
neg. Ionis.: 259.0 (-1) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  [ppm] 7.46 (s, 1 H, H-8), 6.96 (s, 1 H, H-5), 6.46 (s, 1 H, H-4), 6.19 (s, 1 H, H-2),

**1-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-6,7-dihydroxy-3-hydroxymethyl-2-methoxy-anthrachinon**Summenformel: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>12</sub>

MW: 478.40

Strukturformel:



Retentionszeit: 39-40 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 479.4 (+1), 501.2 (+23)  
neg. Ionis.: 477.0 (-1)<sup>1</sup>H-NMR

(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] 7.79 (s, 1 H, H-4), 7.51 (s, 1 H, H-5), 7.46 (s, 1 H, H-8), 5.20 (d, 1 H,  $J_{H-1'/H-2'} = 7.1$ , H-1'), 4.84 (d, 1 H,  $J_{H-8A'/H-8B'} = 10.9$ , H-8<sub>A</sub>'), 4.75 (d, 1 H,  $J_{H-8B'/H-8A'} = 10.9$ , H-8<sub>B</sub>'), 4.10 (d, 1 H,  $J_{H-6A'/H-6B'} = 11.4$ , H-6<sub>A</sub>'), 3.93 (s, 3 H, H-7'), 3.73 (dd, 1 H,  $J_{H-6B'/H-6A'} = 11.4$ ,  $J_{H-6B'/H-5'} = 6.4$ , H-6<sub>B</sub>'), 3.40 – 3.21 (m, 4 H, H-2', H-3', H-4', H-5'),

<sup>13</sup>C-NMR

(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] 53 (C-8'), 62 (C-7'), 78.5 (C-6'), 102 (C-1'), 109 (C-4), 112 (C-8), 113 (C-5), 121 (C-4a), 127 (C-10a), 129 (C-8a), 130 (C-9a), 137 (C-3), 150 (C-6), 152 (C-7), 161 (C-1, C-2), 181 (C-9), 182 (C-10)

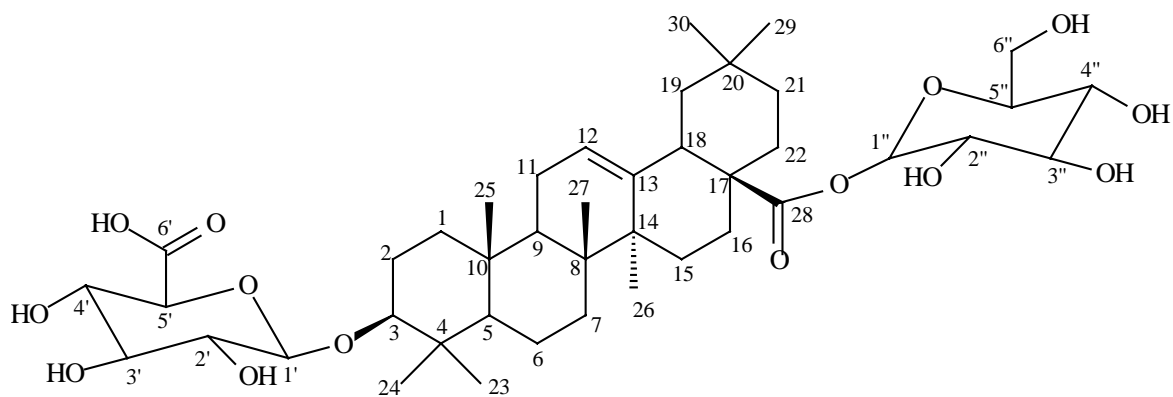
## HMBC-Korrelationen (ausgewählte)

C-4: (C-1, C-2, C-3, C-4, C-4a, C-10), C-5: (C-6, C-7, C-8, C-10a), C-8: (C-6, C-7, C-8a, C-9), C-1': (C-1), C-7': (C-2), C-8': (C-3, C-2)

**Chikusetsusaponin IVa**Summenformel:  $C_{42}H_{66}O_{14}$ 

MW: 794.97

Strukturformel:



Retentionszeit: 47 min (FM-system 2)

MS: pos. Ionis.: 812.5 (+18)  
 neg. Ionis.: 793.3 (-1), 839.5 (+45)

<sup>1</sup>H-NMR

(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] 5.39 (d, 1 H,  $J_{H-1''/H-2''} = 8.2$ , H-1), 5.26 (m, 1 H, H-12)  
 4.39 (d, 1 H,  $J_{H-1'/H-2'} = 7.1$ , H-1'), 2.78 (m, 1 H, H-18), 1.08 (s, 3 H, H-27), 0.97 (s, 3 H, H-23),  
 0.87 (s, 3 H, H-25), 0.86 (s, 3 H, H-30), 0.84 (s, 3 H, H-29), 0.77 (s, 3 H, H-24),  
 0.72 (s, 3 H, H-26)

<sup>13</sup>C-NMR

(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] 48.0 (C-9), 55.9 (C-5), 89.8 (C-3), 122.8 (C-12), 143.0 (C-13)

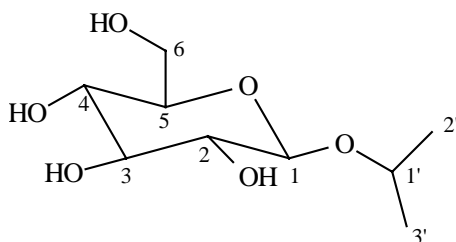
## HMBC-Korrelationen (ausgewählte)

C-23: (C-3, C-5), C-24: (C-3, C-5), C-25: (C-5, C-9), C-26: (C-9), C-27: (C-13),  
 C-1': (C-3), C-1'': (C-28)

**1-O-Isopropyl- $\beta$ -D-glucopyranosid**Summenformel:  $C_9H_{18}O_6$ 

MW: 222.23

Strukturformel:



Retentionszeit: 6-11 min (FM-system 1), 4-8 min (FM-system 2)

MS: pos. Ionis.: 223.1 (+1), 246.1 (+23)  
neg. Ionis.: 221.1 (-1) **$^1H$ -NMR**

(400 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  [ppm] 4.36 (d, 1 H,  $J_{H-1/H-2} = 7.6$ , H-1), 4.05 (dq, 1 H,  $J_{H-1'/H-2'} = J_{H-1'/H-3'} = 6.3$ , H-1'), 3.88 (dd, 1 H,  $J_{H-6A/H-6B} = 11.6$ ,  $J_{H-6A/H-5} = 1.7$ , H-6<sub>A</sub>), 3.70 (dd, 1 H,  $J_{H-6B/H-6A} = 11.6$ ,  $J_{H-6B/H-5} = 5.0$ , H-6<sub>B</sub>), 3.35 – 3.22 (m, 3 H, H-3, H-4, H-5), 3.23 (m, 1 H, H-2), 1.24 (d, 1 H,  $J_{H-2'/H-1'} = 6.3$ , H-2'), 1.21 (d, 1 H,  $J_{H-3'/H-1'} = 6.3$ , H-3')

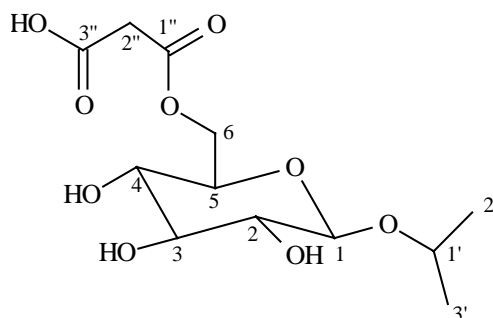
 **$^{13}C$ -NMR**

(400 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  [ppm] 24.5 (C-2', C-3'), 61.1 (C-6), 65.2 (C-1'), 70.8 (C-4), 73.5 (C-2), 78.4 (C-5), 78.6 (C-3), 102.5 (C-1)

**1-O-ISOPROPYL-6-O-MALONYL- $\beta$ -D-GLUCOPYRANOSID**Summenformel:  $C_{12}H_{20}O_9$ 

MW: 308.28

Strukturformel:



Retentionszeit: 14-20 min (FM-system 1), 13-14 min (FM-system 2)

MS: pos. Ionis.: 326.3 (+18)  
neg. Ionis.: 307.4 (-1), 253.3 (+45)

### <sup>1</sup>H-NMR

(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 4.48 (d, 1 H,  $J_{H-6A/H-6B} = 11.6$ , H-6<sub>A</sub>), 4.35 (d, 1 H,  $J_{H-1/H-2} = 7.4$ , H-1), 4.28 (dd, 1 H,  $J_{H-6B/H-6A} = 11.6$ ,  $J_{H-6B/H-5} = 6.4$ , H-6<sub>B</sub>), 4.03 (dq, 1 H,  $J_{H-1'/H-2} = J_{H-1'/H-3'} = 6.2$ , H-1'), 3.74 (s, 2 H, H-2''), 3.70 – 3.25 (m, 3 H, H-3, H-4, H-5), 3.16 (m, 1 H, H-2), 1.24 (d, 1 H,  $J_{H-2'/H-1'} = 6.2$ , H-2'), 1.21 (d, 1 H,  $J_{H-3'/H-1'} = 6.2$ , H-3'),

### <sup>13</sup>C-NMR

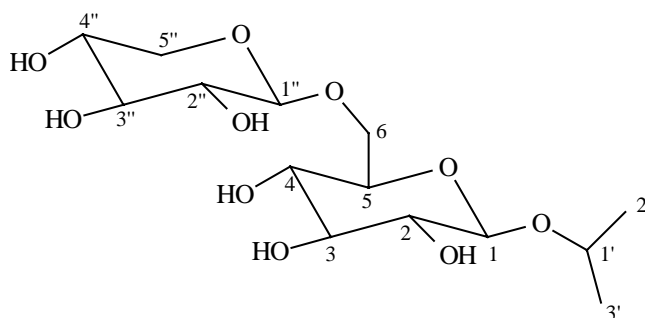
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 23.5 (C-2', C-3'), 69.5 (C-6), 70.8 (C-4), 72.5 (C-1'), 73.5 (C-2), 78.4 (C-5), 78.6 (C-3), 102.3 (C-1), 167.0 (C-1'', C-3'')

## Isopropyl-primverosid

Summenformel: C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>O<sub>13</sub>

MW: 402.35

Strukturformel:



Retentionszeit: 12 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 425.2 (+23)  
neg. Ionis.: 401.1 (-1)

### <sup>1</sup>H-NMR

(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 4.51 (d, 1 H,  $J_{H-1/H-2} = 7.7$ , H-1), 4.47 (d, 1 H,  $J_{H-1''/H-2''} = 7.7$ , H-1''), 4.03 (dq, 1 H,  $J_{H-1'/H-2} = J_{H-1'/H-3'} = 6.2$ , H-1'), 3.91 (dd, 1 H,  $J_{H-5''A/H-5''B} = 11.7$ ,  $J_{H-5''A/H-4''} = 5.4$ , H-5''<sub>A</sub>), 3.86 (d, 1 H,  $J_{H-6A/H-6B} = 11.8$ , H-6<sub>A</sub>), 3.67 (dd, 1 H,  $J_{H-6B/H-6A} = 11.8$ ,  $J_{H-6B/H-5} = 5.6$ , H-6<sub>B</sub>), 3.55 (t, 1 H,  $J_{H-4''/H-5B''} = J_{H-4''/H-3''} = 9.0$ , H-4''), 3.49 (m, 1 H, H-5), 3.37 (m, 1 H, H-3), 3.35 – 3.14 (m, 5 H, H-2, H-4, H-2'', H-3'', H-5B''), 1.25 (d, 1 H,  $J_{H-2'/H-1'} = 6.0$ , H-2'), 1.21 (d, 1 H,  $J_{H-3'/H-1'} = 6.0$ , H-3')



<sup>13</sup>C-NMR

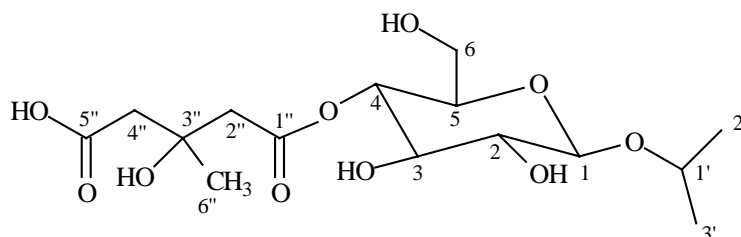
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 23.1 (C-2', C-3'), 62.0 (C-6), 65.5 (C-5''), 70.0 (C-5), 71.5 (C-1'), 76.5 (C-4''), 102.5 (C-1, C-1'')

### 1-O-ISOPROPYL-4-O-(3-METHYL-)-GLUTARYL-β-D-GLUCOPYRANOSID

Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>10</sub>

MW: 366.36

Strukturformel:



Retentionszeit: 19 min (FM-system 1)

MS: pos. Ionis.: 367.2 (+1), 389.3 (+23)  
neg. Ionis.: 365.3 (-1)

<sup>1</sup>H-NMR

(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] 4.97 (d, 1 H, J<sub>H-4/H-5</sub> = J<sub>H-4/H-3</sub> = 9.5, H-4), 4.45 (d, 1 H, J<sub>H-1/H-2</sub> = 8.2, H-1), 4.07 (dq, 1 H, J<sub>H-1'/H-2</sub> = J<sub>H-1'/H-3'</sub> = 6.2, H-1'), 3.87 (d, 1 H, J<sub>H-6A/H-6B</sub> = 11.8, H-6<sub>B</sub>), 3.70 (dd, 1 H, J<sub>H-6B/H-6A</sub> = 11.8, J<sub>H-6B/H-5</sub> = 5.4, H-6<sub>B</sub>), 3.49 (m, 1 H, J<sub>H-3/H-2</sub> = J<sub>H-3/H-4</sub> = 9.7, H-3), 3.41 - 3.27 (m, 2 H, H-2, H-5), 2.82 (d, 1 H, J<sub>H-2A''/H-2B''</sub> = 14.5, H-2<sub>A''</sub>), 2.76 (d, 1 H, J<sub>H-2B''/H-2A''</sub> = 14.5, H-2<sub>B''</sub>), 2.70 (s, 2 H, H-4''), 1.44 (s, 3 H, H-6), 1.24 (d, 1 H, J<sub>H-2'/H-1'</sub> = 6.2, H-2'), 1.21 (d, 1 H, J<sub>H-3'/H-1'</sub> = 6.2, H-3')

## VII ZUSAMMENFASSUNG

### 1 Etablierung von Pflanzenzellkulturen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, möglichst viele Kalluskulturen aus zufällig ausgewählten Pflanzen anzulegen und dabei Variationen der bereits etablierten Verfahren zu entwickeln, mit denen sich der dafür notwendige Arbeitsaufwand reduzieren läßt.

Im Verlauf der Arbeit wurde versucht, Kalluskulturen aus 140 verschiedenen Samenpflanzen zu erzeugen. Dies gelang bei 45 (32 %) der eingesetzten Arten, die ausschließlich der Klasse der Rosopsida entstammten. Wahrscheinlich liegt diese Tatsache nur in der Auswahl der Kultivierungsbedingungen begründet.

Der Erfolg der Kallusbildung und damit der Arbeitsaufwand waren unmittelbar abhängig von der Qualität des verwendeten Pflanzenmaterials. Bei Einsatz von Pflanzenteilen mit geringer Keimbelastung und hoher Zellteilungsrate ließ sich neben der Erhöhung des Erfolges auch der Arbeitsaufwand infolge der Reduzierung der notwendigen Anzahl an Petrischalen senken. Von Pflanzen, die im Verlauf der Arbeit ausreichend Kallusmaterial gebildet hatten, wurde versucht, Suspensionskulturen zu erhalten. Dies gelang für alle 21 eingesetzten Kalluskulturen.

### 2 Isolierung und Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen der Zellkulturen

Aus 14 Zellsuspensionskulturen wurden Extrakte hergestellt, und aus ihnen mit Hilfe semipräparativer HPLC die Inhaltsstoffe isoliert. Insgesamt konnte die Struktur von 29 isolierten Substanzen mit Hilfe von LC-MS-Spektrometrie, <sup>1</sup>H-NMR- und 2-dimensionaler NMR-Spektroskopie (H,H-COSY, HMBC, HSQC) aufgeklärt werden.

Bei den meisten Substanzen handelte es sich um Verbindungen, die bereits in vielen Pflanzen nachgewiesen werden konnten, wie z. B. Catechine. Besonders häufig konnten Kaffeesäurederivate wie Verbascosid, Chlorogensäure und Rosmarinsäure isoliert werden. Die neben Rosmarinsäure aus *Rosmarinus officinalis* isolierte 3-Deoxy-rosmarinsäure ist ein Beispiel für eine Verbindung, die zuvor noch nicht in einer Pflanze nachgewiesen

wurde. Sie wurde bisher nur auf chemischem Wege erzeugt und als ein mögliches Zwischenprodukt in der Biosynthese von Rosmarin postuliert. In der Zellkultur akkumuliert sie wahrscheinlich durch eine quantitative Veränderung der Enzymexpression im Vergleich zur differenzierten Pflanze.

Die Zellkultur von *Galium odoratum* produziert eine Reihe verschiedener Anthrachinonderivate. Von diesen konnte eine Verbindung in ausreichender Menge und Reinheit isoliert und anschließend die Struktur aufgeklärt werden. Auch das Vorhandensein dieses Anthrachinonderivats scheint in Pflanzen bisher nicht bekannt zu sein.

Besonders auffällige Verbindungen sind die isolierten Isopropanolderivate, von denen sich Vertreter in fast allen Pflanzenzellkulturen finden ließen. Bei dem somit indirekt nachgewiesenen Isopropanol handelt es sich sehr wahrscheinlich nicht um ein endogenes sondern um ein exogenes Substrat. Es gelangt wahrscheinlich beim Überimpfen der Suspensionskulturen in das Medium, wird anschließend von den Zellen aufgenommen und metabolisiert.

### **3 Abschließende Bewertung**

Der Arbeitsaufwand für die Erstellung der Kalluskulturen ließ sich durch Verwendung besonders geeigneten Zellmaterials halbieren.

Eine besondere Eignung der Zellkulturen als Quelle neuer pharmazeutisch geeigneter Substanzen konnte nicht nachgewiesen werden, da es sich bei den isolierten Verbindungen fast ausnahmslos um aus der Pflanze bereits isolierte oder im Pflanzenreich weit verbreitete Substanzen handelte. Berücksichtigt werden muß dabei, daß ausschließlich die Strukturen der von den Zellkulturen am stärksten gebildeten Substanzen aufgeklärt werden konnte. Erst die Identifizierung, der in geringerer Menge gebildeten Substanzen ermöglicht es, das Inhaltsstoffspektrum der Zellkulturen im Vergleich zu denen der differenzierten Pflanze abschließend zu bewerten.

Die Isolierung von 3-Deoxy-rosmarinsäure und des zuvor unbekanntes Anthrachinonderivats zeigt, daß neue Varianten der aus den Pflanzen bekannten Inhaltsstoffe in Zellkulturen zu finden sind. Aus diesem Grunde sollten für das Naturstoffscreening vor allem aus den Pflanzen, aus denen bereits Verbindungen mit besonders interessanten Strukturelementen isoliert wurden, Zellkulturen angelegt werden.

**VIII LITERATURVERZEICHNIS**

- 1 ROTH, L.; DAUNDERER, M.; KORMANN, K.; Giftpflanzen – Pflanzengifte, 4. Auflage, Encomed Verlagsgesellschaft, Landsberg (1994).
- 2 KUSCHINSKY, G.; LÜLLMANN, H.; Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 12. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1989).
- 3 DROMBOWSKI, K.; ALFERMANN, A.W.; Pharm. in unserer Zeit; 5,6; 275-285 (1993).
- 4 SCHRÖR, K.; Acetylsalicylsäure; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1992).
- 5 STEGLICH, W.; FUGMANN, B.; LANG-FUGMANN, S.; Römpf Lexikon Naturstoffe; Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York (1997).
- 6 QUADBEEK-SEEGER, H.-J.; Nachr. Chem. Tech. Lab.; 46; 111-115; (1998).
- 7 PLUNKETT, M.J.; ELLMANN, J.A.; Spektrum d. Wissenschaft Spezial; 6; 28 (1998).
- 8 KUBINYI, H.; Pharmazie in unserer Zeit; 27; 158-172 (1998).
- 9 ZÄHNER, H.; Angew. Chem.; 89; 696-703 (1977).
- 10 BECHTHOLD A.; Pharmazie in unserer Zeit; 1; 12-16 (1997)
- 11 ENDREß, R.; Plant Cell Biotechnology; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg; 121-142 (1942).
- 12 CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M.; J. Nat. Prod.; 60; 52 (1997).
- 13 SCHMIDT, G.; HOFHEINZ, W., J. Am. Chem. Soc.; 105; 624-625 (1983).
- 14 KLAYMAN, D.L.; Science; 228; 1049 (1985).
- 15 LUO, X.D.; SHEN, C.C.; Med. Res. Rev.; 7; 29 (1987).
- 16 LAATSCH, H.; 19. Göttinger-Tübinger Gespräche; Blaubeuren (1998).
- 17 CLARKE, H.T.; JOHNSON, J.R.; ROBINSON, R.; The Chemistry of Penicillin, Princeton University Press, Princeton, New York (1949).
- 18 NICOLAOU, K.C.; DAI, W.-M.; GUY, R.K.; Angew. Chem.; 106; 38-69 (1994).
- 19 NICOLAOU, K.C.; GUY, R.K.; POTIER, P.; Spekr. d. Wissenschaften; 8; 76-80 (1996).
- 20 WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A.T.; J. Am. Chem. Soc.; 93; 2325-2327 (1971).
- 21 BYRNE, L.M; WILSON, P.M.; BUCKS, R.S.; HUGHES, A.O.; WILCOCK, G.K.; Int. J. Geriatr. Psychiatry; 15; 656-661 (2000).
- 22 MAELICKE, A.; ALBUQUERQUE, E.X.; Eur. J. Pharmacol.; 393; 165-170 (2000).
- 23 RASKIND, M.A.; PESKIND, E.R., WESSEL, T.; YUAN, W., Neurology; 54; 2261-2268 (2000).

- 24 HOSTETTMANN, K.; TERREAUX, C.; *Chimia*; 54; 652-657 (2000).
- 25 POTTERAT, O.; HOSTETTMANN, K.; *Encyclopedia of Environmental Biology*; Academic Press London; 3; 139 (1995).
- 26 HAMBURGER, M.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; *Advanced in Drug Research*, Academic Press London; 20; 167 (1991).
- 27 Option Editorial, *Nature biotechnologie*; 14; 1055; (1996).
- 28 YUKIMUNE, Y., TABATA, H.; HIGASHI, Y.; HARA, Y., *Nature Biotechnologie*; 14, 1083 (1996).
- 29 TEUSCHER, E.; LINDEQUIST, U.; *Biogene Gifte: Biologie – Chemie – Pharmakologie*; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1987).
- 30 HABERLANDT, G.; *Sitz Akad. Wiss. Wien*; 111; 69-92 (1902).
- 31 WHITE, P.R.; *Plant. Physiol.*; 9; 585-600 (1934).
- 32 GAUTHERET, R.J.; *C.R. Acad. Sci.*; 208; 118-130 (1939).
- 33 STREET, H.E.; Blackwell Scientific Publications, Oxford (1977).
- 34 LINSMAIER, E.M.; SKOOG, F.; *Physiol. Plant.*; 18; 100-127 (1965).
- 35 DEUS-NEUMANN, B.; ZENK, M.H.; *Planta Med.*; 50; 427-431 (1984).
- 36 MATSUBARA, K.; SHIGEKAZU, K.; YOSHIOKA, T.; MORIMOTA, T.; FUJITA, Y.; YAMADA, Y.; *J. Chem. Tech. Biotech.*; 46; 61-69 (1989).
- 37 ULBRICH, B.; WEISNER, W.; ARENS, H.; *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*; Springer-Verlag, Berlin; 293-303 (1985).
- 38 FONTANEL, A.; TABATA, M.; *Nestlé Research News*; 1986/1987; 92-103 (1987).
- 39 WALL, M.E.; *Chronicles of Drug Discovery*; ACS Professional Reference Books, Washington DC; 3; 327 (1993).
- 40 HOLTON, R.A.; SOMOZA, C.; KIM, H.-B.; LIANG, F.; BIEDIGER, R.J.; BOATMAN, P.D.; SHINDO, M.; SMITH, C.C.; KIM, S.; NADIZADEH, H.; SUZUKI, Y., TAO, C.; VU, P.; TANG, S.; ZHANG, P.; MURTHI, K.K.; GENTILE, L.N.; LIU, J.H.; *J. Am. Chem. Soc.*; 115; 1597-1598 (1994).
- 41 HOLTON, R.A.; KIM, H.-B.; SOMOZA, C.; LIANG, F.; BIEDIGER, R.J.; BOATMAN, P.D.; SHINDO, M.; SMITH, C.C.; KIM, S.; NADIZADEH, H.; SUZUKI, Y., TAO, C.; VU, P.; TANG, S.; ZHANG, P.; MURTHI, K.K.; GENTILE, L.N.; LIU, J.H.; *J. Am. Chem. Soc.*; 115; 1599-1600 (1994).
- 42 GRABLEY, S.; THIERICKE, R.; *Drug Discovery from Nature*; Springer Verlag New York (1999).

- 43 YKIMUNE, Y.; TABATA, H.; HIGASHI, Y.; HARA, Y.; *Nature Biotechnology*; 14; 1129-1135 (1996).
- 44 SCHNEIDER, B.; *Progress in Botany*; 62; 266-304 (2000).
- 45 MURASHIGE, T.; SKOOG, F.; *Physiol. Plant.*; 15; 473-497 (1962).
- 46 GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K.; *Exp. Cell Res.*; 50; 151-158 (1968).
- 47 FROHNE, D.; JENSEN, U.; *Systematik des Pflanzenreichs*; 5. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; Stuttgart (1998).
- 48 KUROYANAGI, M.; FUKUSHIMA, S.; *Chem. Pharm. Bull.*; 30; 1163-1168 (1982).
- 49 ISOBE, T.; ITO, N.; NODA, Y.; *Phytochemistry*; 19; 1877 (1980).
- 50 HOERHAMMER, W.; *Arch. Pharm. (Weinheim Ger.)*; 290; 224-226 (1957).
- 51 RATHORE, A.; SHARMA, S.C.; TANDON, J.S.; *Phytochemistry*; 25; 2223-2226 (1986).
- 52 ONO, K.; NAKAO, M.; TOYOTA, M.; TERASHI, Y.; YAMADA, M.; *Phytochemistry*; 49; 1935-1940 (1998).
- 53 HATA M.; *Yakugaku Zasshi*; 95; 211 (1975); (*Chem. Abstr.*; 83; 15536).
- 54 AHMED, M.; KHALEDUZZAMAN, M.; ISLAM, M.S.; *Phytochemistry*; 29; 2009-2011 (1990).
- 55 GESTIRNER, K.; *Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges.*; 299; 640 (1966).
- 56 CHEN, Y.; WANG, M.; ROSEN, R.T.; HO, C.-T.; *J. Agric. Food Chem.*; 47; 2226 – 2228 (1999).
- 57 DATTA, B.K.; DATTA, S.K.; RASHID, M.A.; NASH, R.J.; SARKER, S.D.; *Phytochemistry*; 54; 201–206 (2000).
- 58 JANKOV, D.; *Pharmazie*; 24; 696-698 (1969).
- 59 LEVASHOVA, I.G.; ZHDANOVA, V.P.; *Chem. Nat. Compd.*; 26; 469 (1990).
- 60 *Dictionary of Natural Products on CD-ROM*; Chapman & Hall (1999).
- 61 ASAKAWA, T.; *Experientia*; 35; 1420 (1979).
- 62 KUROYANAGI, M.; YAMAMOTO, Y.; FUKUSHIMA, S.; UENO, A.; NORO, T.; MIYASE, T.; *Chem. Pharm. Bull.*; 30; 1602-1608 (1982).
- 63 TOZYU, T.; YASUDA, F.; NAKAI, H.; TADA, H.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1*; 14; 1859-1866 (1992).
- 64 DUWIEJUA, M.; ZEITLIN, I.J.; GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G.; *Planta Med.*; 65; 371–374 (1999).
- 65 FOO, L.Y.; MCNABB, W.C., WAGHORN, G.; ULYATT, M.J.; *Phytochemistry*; 45; 1689-1696 (1997).
- 66 PAULI, G.F.; JUNIOR, P.; *Phytochemistry*; 38; 1245-1250 (1995).

- 67 ENDO, T.; TAGUCHI, H.; YOSIOKA, I.; *Chem. Pharm. Bull.*; 29; 1000-1004 (1981).
- 68 BENNININ, B.; CHULIA, A.J.; KAOUADJI, M.; DELAGE, C.; *Phytochemistry*; 33; 1233-1236 (1993).
- 69 DU, X.-M.; YOSHIZAWA, T.; SHOYAMA, Y.; *Phytochemistry*; 49; 1925-1928 (1998).
- 70 HADDOCK, E.A.; GUPTA, R.K.; AL-SHAFI, S.M.K.; HASLAM, E.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*; 11; 2515-2524; (1982).
- 71 DUCREY, B.; WOLFENDER, J.L.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; *Phytochemistry*; 38; 129-138 (1995).
- 72 FOO, L.Y.; *Phytochemistry*; 33; 487-492 (1993).
- 73 AKIHISIA, T.; KIMURA, Y.; KOKKE, W.C.M.C.; TAKASE S.; YASUKAWA, K.; TAMURA, T.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*; 19; 2379-2384; (1996).
- 74 BIGLINO; NANO; *Farmaco Ed. Sci.*; 22; 140-141 (1967).
- 75 HYLANDS, P.J.; MANSOUR, E.S.; OSKOU, M.T.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*; 1; 2933-2936; (1980).
- 76 ZELLNER, M.; *Ach. Pharm.*; 34 (1927).
- 77 KRAUZE-BARANOWSKA, M.; CISOWSKI, W.; *Phytochemistry*; 39; 727-730 (1995).
- 78 ISOBE, M.; KONDO, N.; IMAI, K.; YAMASHITA, O.; GOTO, T.; *Agric. Biol. Chem.*; 45; 687-692 (1981).
- 79 KRAUT, L.; MUES, R.; SIM-SIM, M.; *Phytochemistry*; 34; 211-218 (1993).
- 80 HANSEN, S.H.; JENSEN A.G.; CORNETT, C.; BJOERNSDOTTIR, I.; TAYLOR, S.; WRIGHT, B.; WILSON, I.; *Anal. Chem.*; 71; 5235-5241 (1999).
- 81 ORTH, H.C.J.; RENTEL, C.; SCHMIDT, P.C.; *J. Pharm. Pharmacol.*; 51; 193-200 (1999).
- 82 TRIFUNOVIC, S.; VAJS, V.; MACURA, S.; JUNARIC, N.; DJARMATI, Z.; *Phytochemistry*; 49; 1305-1310 (1995).
- 83 RUECKER, G.; MANNS, D.; HARTMANN, R.; BONSELS, U.; *Arch. Pharm.*; 10; 725-730 (1995)
- 84 MAKOVETSKAYA, E.Y.; .; *Chem. Nat. Compd.*; 35; 671-673 (1999).
- 85 OMAROVA, M.A.; ARTAMONOVA, N.A.; *Chem. Nat. Compd.*; 33; 691-692 (1997).
- 86 DIAS, A.C.P.; TOMAS-BARBERAN, F.A.; FERNANDES-FERREIRA, M.; FERRERES, F.; *Phytochemistry*; 48; 1165-1168 (1998).
- 87 BRONDZ, I.; GREIBROKK, T.; AASEN, A.; *Phytochemistry*; 22; 295-296 (1983).
- 88 BRODA K.; *Acta. Pol. Pharm.*; 17; 301-304 (1960).
- 89 SIA, G.-L.; BENNETT, G.J.; HARRISON, L.J.; SIM, K.-Y.; *Phytochemistry*; 38; 1521-1528 (1995).

- 90 HATTORI, M.; SHU, Y.-Z.; TOMIMORI, T.; KOBASHI, K.; NAMBA, T.; *Phytochemistry*; 28; 1289-1290 (1989).
- 91 CHANGZENG, W.; ZHONGJIANG, J.; *Phytochemistry*; 45; 159-166 (1997).
- 92 CHEN, C.-Y.; WU, T.-Y.; CHANG, F.-R.; WU, Y.-C.; *Journal of the Chinese Chemical Society*; 45; 629-634 (1998).
- 93 TOKI, K.; SAITO, N.; KAWANO, K.; LU, T.S., SHIGIHARA, A.; HONDA, T.; *Phytochemistry*; 36; 609-612 (1994).
- 94 MEYRAT; REICHSTEIN; *Pharm. Acta. Helv.*; 23; 135-142 (1948).
- 95 KISLICHENKO ET AL.; *Chem. Nat. Compd.*; 3; 202 (1967).
- 96 ROEMER F.; *Z. Naturforsch. B.*; 31; 607-609 (1976).
- 97 RAMSTAD, J.; *J. Am. Pharm. Assoc.*; 42; 119 (1953).
- 98 YOSHIKAWA, K.; SUGAWARA, S., ARIHARA, S., *Phytochemistry*; 40; 253-256 (1995).
- 99 STEINBECK, C.; SCHNEIDER, C.; ROTSCHEIDT, K.; BREITMAIER, E., *Phytochemistry*; 40; 1313-1316 (1995).
- 100 BURNETT, A.R.; THOMSON, R.H.; *J. Chem. Soc. C.*; 854-857 (1968).
- 101 STEINWEG, L.; *Liebigs Ann. Chem.*; 52; 378; (1844).
- 102 STICHER, S.; *Pharm. Acta. Helv.*; 46; 123-127 (1971).
- 103 ENDO, K.; TAKAHASHI, K.; *HETEROCYCLES*; 30; 291-294 (1990).
- 104 KITAGAWA, S.; HISADA, S.; NISHIBE, S.; *Phytochemistry*; 23; 1635-1636 (1984).
- 105 YAMAMOTO, H.; YOSHIDA, K.; KONDO, Y. INOUE, K.; *Phytochemistry*; 48; 273-278 (1998).
- 106 LIU, Y.; WAGNER, H.; BAUER, R.; *Phytochemistry*; 48; 339-343 (1998).
- 107 ABE, F.; YAMAUCHI, T.; *Chem. Pharm. Bull.*; 34; 4340-4345 (1986).
- 108 BIRKOFER, L.; KAISER, M.; *Z. Naturforsch. B.*; 23; 1051-1058 (1976).
- 109 DAMTOFT, S.; FRANZYK, H.; JENSEN, S.R.; *Phytochemistry*; 40; 785-792 (1995).
- 110 KURKIN, V.A., GRINENKO, N.A.; ZAPESCOCHNAYA, G.G.; DUBICHEV, A.G.; VORONTSOV, E.D.; *Chem. Nat. Compd.*; 28; 36-39 (1992).
- 111 RIPPERBERGER, K.; *Phytochemistry*; 17; 1069 (1978).
- 112 ASAKA M.; *Tetrahedron*; 26; 2365-2368 (1970).
- 113 KURKIN, V.A., ZAPESCOCHNAYA, G.G.; GRINENKO, N.A.; *Chem. Nat. Compd.*; 26; 592-593 (1990).
- 114 WAKAYAMA ET AL.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*; 43; 3319 (1970).
- 115 DE LUCA, L.; *Jahresber. Fortschr. Chem. Verw. Theile Anderer Wiss.*; 740-742 (1861).
- 116 DAMTOFT, S.; FRANZYK, H.; JENSEN, S.R.; *Phytochemistry*; 45; 743-750 (1997).



- 117 KURKIN, V.A., ZAPESCOCHNAYA, G.G.; GRINENKO, N.A.; Chem. Nat. Compd.; 27; 678-680 (1990).
- 118 TERAHA, N.; CALLEBAUT, A.; OHBA, R.; NAGATA, T.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; SUZUKI, M.; Phytochemistry; 42; 199-204 (1996).
- 119 GUISO K.; Gazz. Chim. Ital.; 104; 403-404 (1974).
- 120 BREMNER, P.D.; SIMMONDS, M.S.J.; BLANEY, W.M.; VEITCH, N.C.; Phytochemistry; 47; 1227-1237 (1998).
- 121 CAMPS, F.; COLL, J.; CORTEL, A.; Chem. Lett.; 1093-1096 (1981).
- 122 MALAKOV, P.Y.; PAPANOV, G.Y.; Phytochemistry; 49; 2443-2448 (1998).
- 123 CALCAGNA, M.-P.; CAMPS, F.; COLL, J.; MELE, E.; SANCHEZ-BAEZA, F.; Tetrahedron, 52; 10137-10146 (1996).
- 124 WALD, B.; WRAY, V.; GALENSA, R.; Herrmann, K.; Phytochemistry; 28; 663-664 (1989).
- 125 CALIS, I.; BASARAN, A.A.; SARACOGLU, I.; STICHER, O.; RÜEDI, P.; Phytochemistry; 29; 1253-1257 (1990).
- 126 SALGUES, K.; Rev. gen. Sci; 52; 35-41 (1942).
- 127 RUTOWSKI, L.; WINOGRADOWA, F.; Chem.Zentralbl.; 101; 3618 (1930).
- 128 IGOLEN F.; IGOLEN D.; Chem. Zentralbl.; 110; 4542-4545 (1939).
- 129 TAGASHIRA, M.; OHTAKE, Y.; Planta Med.; 64; 555-558 (1998).
- 130 AGATA, I.; KUSAKABE, H; HATANO, T.; NISHIBE, S.; OKUDA, T.; Chem. Pharm. Bull.; 41, 1608-1611 (1993).
- 131 THIEME, L.; KITZE, R.; Pharmazie; 28; 69 (1973).
- 132 FRENCH K.; Arch. Biochem.; 85; 471 (1957).
- 133 BRIESKORN, C.H.; KRAUSE, W.; Arch. Pharm.; 307; 603-612 (1974).
- 134 SCHENCK; BRIESKORN; Arch. Pharm; 5 (1944).
- 135 RUTOWSKI; WINOGRADOWA; Chem.Zentralbl.; 100; 156 (1929).
- 136 EICHER, T.; OTT, M.; Speicher, A.; Synthesis; 6; 755-762 (1996).
- 137 SALEH; MOHAMED; J. Pharm. Sci; 6; 137-141 (1965).
- 138 WEBER; Liebigs Ann. Chem.; 238; 93 (1887).
- 139 WEBB, J.K.; BANTHORPE, D.V.; WATSON, D.G.; Phytochemistry; 23; 903-904 (1984).
- 140 BATTERSBY; J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1; 2743-2746 (1972).
- 141 HARAGUCHI, H.; SAITO, T.; OKAMURA, N.; YAGI, A.; Planta Med.; 61; 333-336 (1995).
- 142 JACHONTOWA; ANISIMOVA; J. Gen. Chem.; 32; 1313-1316 (1962).

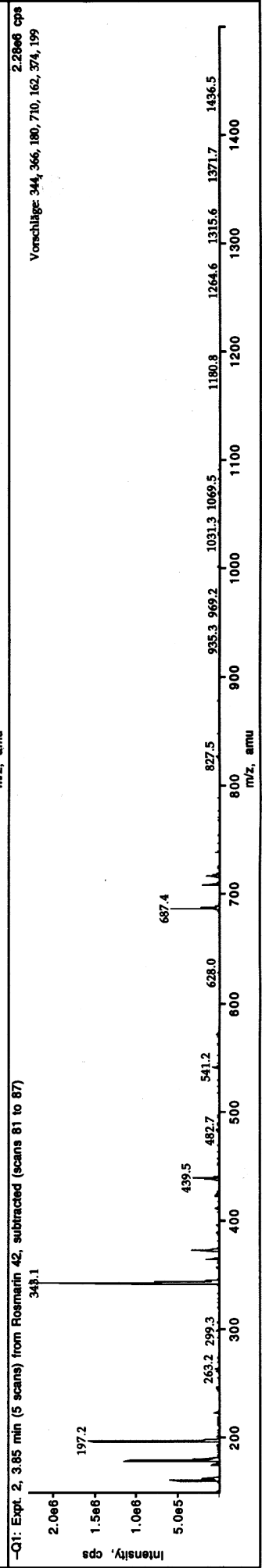
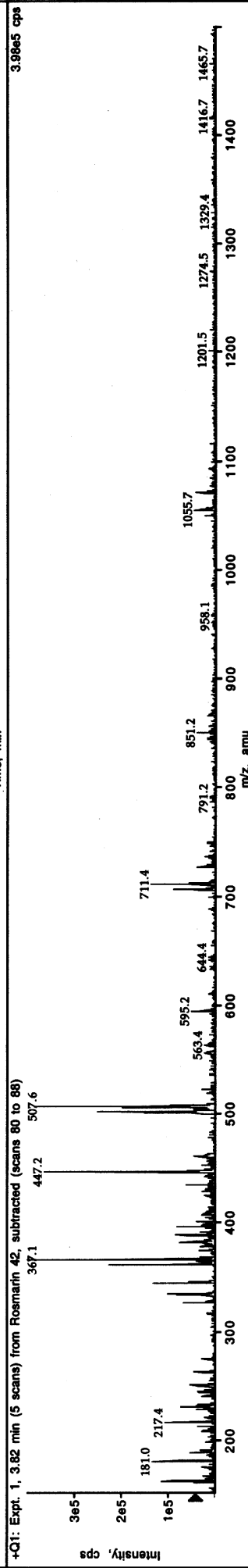
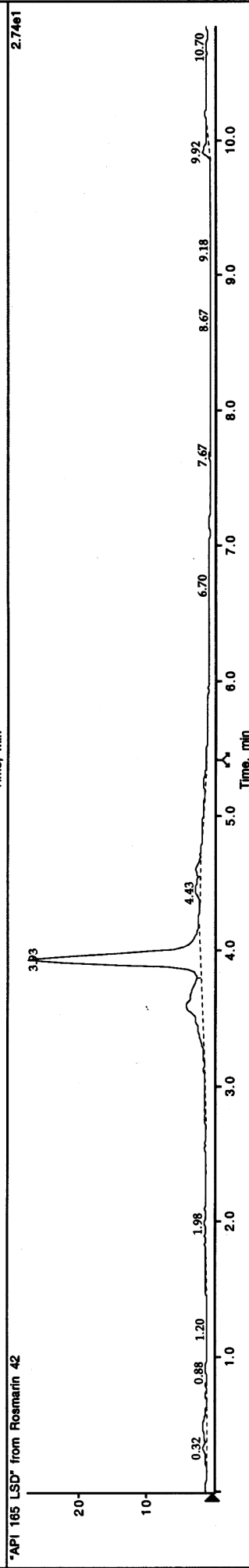
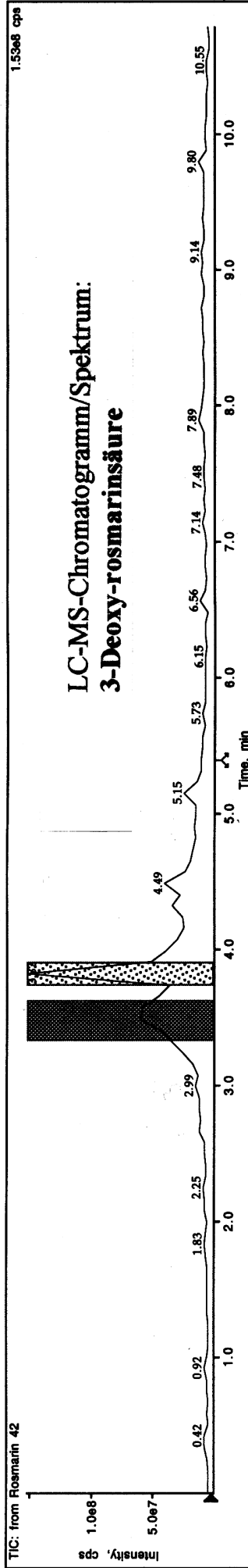
- 143 BRIESKORN; BUSCHBERGER; *Planta Med.*; 24; 190-193 (1973).
- 144 TAKENAKA, M.; WATANABE, T.; SUGAHARA, K.; HARADA, Y.; YOSHIDA, S.; SHIGEO, F.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*; 61; 1440-1444 (1997).
- 145 NAKATANI, N.; INATANI, R.; *Agric. Biol. Chem.*; 48; 2081-2086 (1984).
- 146 SCARPARTI; ORIENTE; *Ric. Sci.*; 28; 2329 (1958).
- 147 OKAMURA, N.; HARAGUSHI, H.; HASHIMOTO, K.; YAGI, A.; *Phytochemistry*; 37; 1463-1466 (1994).
- 148 BRIESKORN, C.H.; KABELITZ, L.; *Phytochemistry*; 10; 3195-3204 (1971).
- 149 JAROSZEWSKI, J.W.; BOLDINGRASMUSSEN, A.; BREGENDORF-RASMUSSEN, H.; OLSEN, C.E., JØRGENSEN, L.B.; *Phytochemistry*; 42; 649-654 (1996).
- 150 NIELSEN; KOFOD; *Acta Chem. Scand.*; 17; 1167 (1963).
- 151 CICHY, M.; WRAY, V.; HOEFLE, G.; *Liebigs Ann. Chem.*; 2; 397-400 (1984).
- 152 BRAUN, F.; *Arch. Pharm.*; 10; 235-238(1897).
- 153 MITSUHASHI, K.; NOMURA, M.; *Chem. Pharm. Bull.*; 14; 777 (1966).
- 154 NAVES, H.; *Helv. Chim. Acta*; 26; 1281-1295 (1943).
- 155 KAWAMURA, N.; WATANABE, H., OSHIO, H.; *Phytochemistry*; 27; 3585-3591 (1988).
- 156 SCHOEPKE, T.; WRAY, V.; RAZEWSKA, B.; HILLER, K.; *Phytochemistry*; 30; 627-631 (1991).
- 157 GUDEJ, J.; NAZARUK, J.; *Acta Pol. Pharm.*; 54; 233-235 (1997).
- 158 WAGNER, L.; KIRMAYER, M.; *Naturwissenschaften*; 44; 307 (1957).
- 159 TOKI, K.; SAITO, N.; HONDA, T.; *Phytochemistry*; 30; 3769-3772 (1991).
- 160 BOHLMANN G.; *Chem. Ber.*; 102; 1669-1683 (1969).
- 161 AVATO, P.; TAVA, A.; *Phytochemistry*; 40; 141-148 (1995).
- 162 HOLME; SOERENSEN; *Acta Chem. Scand.*; 280-282 (1954).
- 163 KITAJIMA, J.; ISHIKAWA, T.; TANAKA, Y.; ONO, M.; *Chem. Pharm. Bull.*; 46; 1587-1590 (1998).
- 164 AKIHISIA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; *Phytochemistry*, 43; 1255-1260 (1996).
- 165 HAENSEL, R.; KARTARAHARDJA, M.; HUANG, J.; BOHLMANN, F.; *Phytochemistry*; 19; 857-862 (1980).
- 166 CADOSCH, H.; *Helv. Chim. Acta*; 61; 783-794 (1978).
- 167 BUCHECKER, R.; *Helv. Chim. Acta*; 59; 1360-1364 (1976).

- 168 SERGEEVA, N.V.; BANDYUKOVA, V.A.; SHAPIRO, D.K.; *Chem. Nat. Compd.*; 20; 634 (1984).
- 169 RAUWALD, H.-W.; HUANGS, J.-T.; *Phytochemistry*; 24; 1557-1560 (1985).
- 170 AKASHI, T.; SAITO, N.; HIROTA, H.; AYABE, S.; *Phytochemistry*; 46; 283-288 (1997).
- 171 GORDON; NIEVA; *Arch. Biochem.*; 20, 356-368 (1949).
- 172 MARME; *Liebigs Ann. Chem.*; 129; 223 (1864).
- 173 POWER; BROWNING; *J. chem. Soc.*; 101; 2414-2417 (1912).
- 174 GNECCO, S.; BARTULIN, J.; BECERRA, J.; MARTICORENA, C.; *Phytochemistry*; 28; 1254-1256 (1989).
- 175 GEROTHANASSIS, I.P.; EXARCHOU, V.; LAGOURI, V.; TROGANIS, A.; TSIMIDOU, M.; BOSKOU, D.; *J. Agric. Food Chem.*; 46; 4185-4192 (1998).
- 176 RIMPLER, H.; *Biogene Arzneistoffe*; Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York; 1. Auflage (1990).
- 177 HÄNSEL, R.; STICHER, O.; STEINEGGER, E.; *Pharmakognosie-Phytopharmazie*; Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg; 6. Auflage (1999).
- 178 WROBLEWSKI, K., *J. Nat. Prod.*; 127-129 (1999).
- 179 JIMÉNEZ, C.; RIGUERA R.; *Nat. Prod. Rep.*; 11, 591-606 (1994).
- 180 SCHNEIDER, G.; HILLER, K.; *Arzneidrogen*; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin; 4. Auflage (1999).
- 181 RAHMAN, M.M.A.; DEWICK, P.M.; JACKSON, D.E.; LUCAS, J.A.; *Phytochemistry*; 29; 1971-1980 (1990).
- 182 LUCKNER, M.; *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals*; 3. Auflage; Gustav Fischer Verlag; Jena (1990).
- 183 SCHMIDT, W.; BEERHUES, L.; *FEBS Letters*; 420; 143-146 (1997).
- 184 WIJNSMA, R.; VERPOORTE, R.; MULDER-KRIEGER, T.; BAERHEIM-SVENDSEN, A.; *Phytochemistry*; 23; 2307-2311 (1984).
- 185 ROBINS, R.J.; PAYNE, J.; RHODES, M.J.C.; *Phytochemistry*; 25; 2327-2334 (1986).
- 186 SCHRIPSEMA J.; RAMOS-VALDIVIA, A.; VERPOORTE R.; *Phytochemistry*; 42; 1039-1046 (1996).
- 187 WIJNSMA, R.; GO, J.T.K.A.; HARKES, P.A.A.; VERPOORTE, R.; BAERHEIM-SVENDSEN, A.; *Phytochemistry*; 25; 1123-1126 (1986).
- 188 INOUE, K.; NAYESHIRO, H.; INOUE, H.; ZENK, M.; *Phytochemistry*; 20; 1693-1700 (1981).

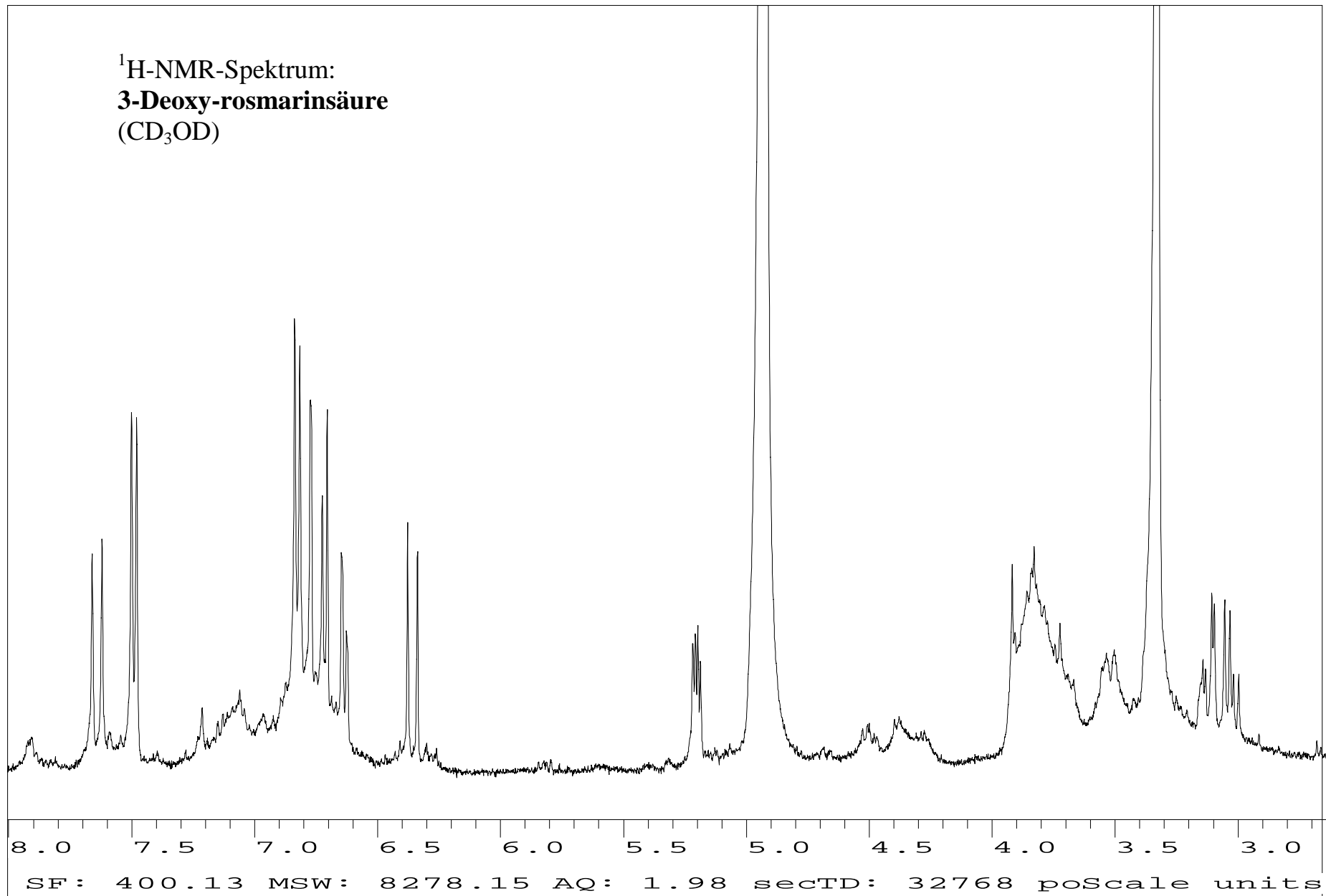
- 189 KITAJIMA M.; FISCHER U.; NAKAMURA, M.; OHSAWA, M.; UENO, M.; TAKAYAMA, H.; UNGER, M.; STÖCKIGT, J.; AIMI, N.; *Phytochemistry*; 48; 107-111 (1998).
- 190 KITAJIMA, J.; ISHIKAWA, T.; TANAKA, Y., *Chem. Pharm. Bull.*; 46; 1643-1646 (1998).
- 191 WEINGES, K.; SCHICK, H.; LAUTENSCHLÄGER, M.; SCHILLING, G.; *Liebigs Ann. Chem.* 703-705 (1991).
- 192 JENSEN, S.R.; NIELSEN, B.J.; *Phytochemistry*; 25; 2349-2353 (1986)
- 193 BRIMER, L.; CHRISTENSEN, S.B.; NARTEY, F.; *Phytochemistry*; 21; 2005-2009 (1982).
- 194 MATERN, U.; *Biologie in unserer Zeit*; 17; 148-152 (1987).
- 195 HÖSEL, W.; *The Biochemistry of Plants*; Vol. 7; Academic Press; New York (1981).
- 196 LUTTERBACH, R.; STÖCKIGT, J.; *Helv. Chim. Acta*; 75; 2009-2011 (1992).
- 197 SCHROEDER, C.; LUTTERBACH, R.; STÖCKIGT, J.; *Tetrahedron*; 55; 925-934 (1996).
- 198 LECAILLE-DUBOIS, M.A.; GALLE, K.; WAGNER, H.; *Planta Med.*; 62; 365-368 (1996).
- 199 GUO, W.; HOSOI, R.; SAKATA, K.; WATANABE, M.; YAGI, A.; INA, K.; LUO, S.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*; 1532-1543 (1994).
- 200 EL GAMAL, A.A.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; HALIM, A.F.; AMER, M.M.; SAAD, H.E.A.; AWAD, S.A.; *Phytochemistry*; 42; 1149-1155 (1996).
- 201 HARBORNE, J.B.; BOARDLEY M.; *Z. Naturforschung*; 40c; 305-308 (1985).
- 202 MARTIN, J.-B.; BLIGNY, R.; REBEILLE, F.; DOUCE, R.; LEGUAY, J.-J.; MATHIEU, Y.; GUERN, J.; *Plant Physiol*; 70; 1151-1161 (1982).
- 203 STRASSE, H.; TIETJEN, K.G.; HIMELSPACH, K.; MATERN, U.; *Plant Cell Reports*; 2; 140-143 (1983).
- 204 MATERN, U.; HELLER, W.; HIMELSPACH, K.; *Eur. J. Biochem.*; 133, 439-448 (1983).
- 205 MATERN, U.; REICHENBACH, C.; HELLER, W.; *Planta*; 167; 183-189 (1986).
- 206 BABA, K.; TANIGUTI, M.; YONEDA, Y.; KOZAWA, M.; *Phytochemistry*; 29; 247-249 (1990).
- 207 KREHER, B.; NESZMELYI, A.; WAGNER, H.; *Phytochemistry*; 29; 3633-3637 (1990).
- 208 DUBOIS, M.-A.; WIERER, M.; WAGNER, H.; *Phytochemistry*; 29; 3369-3371 (1990).
- 209 *Laborjournal*; LJ-Verlag Herfort und Sailer, Merzhausen; 5; 30 (2001).
- 210 *Plant Tissue culture; An Alternative for Production of useful metabolites*; Editor: Misawa, M.; Bio. Intern. Inc.; Toronto; *FAO Agric. Serv. Bull.*; 108 (1994).
- 211 DEUS, B.; ZENK, M.H.; *Biotech. Bioeng.*; 24; 1965-1974 (1982).
- 212 YAMAMOTO, Y.; MIZUGUCHI, R.; YAMADA, Y.; *Theor. Appl. Genet.*; 61; 113 (1982).
- 213 PETERSEN, M.; *Phytochemistry*; 45; 1165-1172 (1997).

- 214 PARMAR, V.S., JHA, A., BISHT, K.S.; TANEJA, P.; SINGH, S.K.; KUMAR, A.; POONAM, J.; JAIN, R.; OLSEN, C.E.; *Phytochemistry*; 50; 1267-1304 (1999).
- 215 MA, W.; PARK, G.L.; GOMEZ, G.A.; NIEDER, M.H.; ADAMS, T.L.; AYNSLEY, J.S.; SAHAI, O.P.; SMITH, R.J.; STAHLHUT, R.W.; HYLANDS, P.J.; *J. Nat. Prod.*; 57; 116-122 (1994).
- 216 MA, W.; STAHLHUT, T.L.; ADAMS, R.W.; PARK, G.L.; EWANS, W.A., BLUMENTHAL, S.G.; GOMEZ, G.A.; NIEDER, M.H.; HYLANDS, P.J.; *J. Nat. Prod.*; 57; 1320-1324 (1994).
- 217 CHENG, K.; FANG, W.; YANG, Y.; XU, H.; MENG, C.; KONG, M.; HE, W.; FANG, Q.; *Phytochemistry*; 42, 73-75 (1996).
- 218 FEDOREYEV, S.A.; VASILEVSKAYA, N.A.; VESELOVA, M.V.; DENISENKO, V.A.; DMITRENOK, P.S.; OZHIGOVA, I.T.; MUZAROK, T.I.; ZHURAVLEV, Y.N.; *Fitoterapia*; 69; 430-432 (1998).
- 219 MENHARD, B.; EISENREICH, W.; HYLANDS, P.J.; BACHER, A.; ZENK, M.H.; *Phytochemistry*; 49; 113-125 (1998).

**IX SPEKTROSKOPISCHER ANHANG**

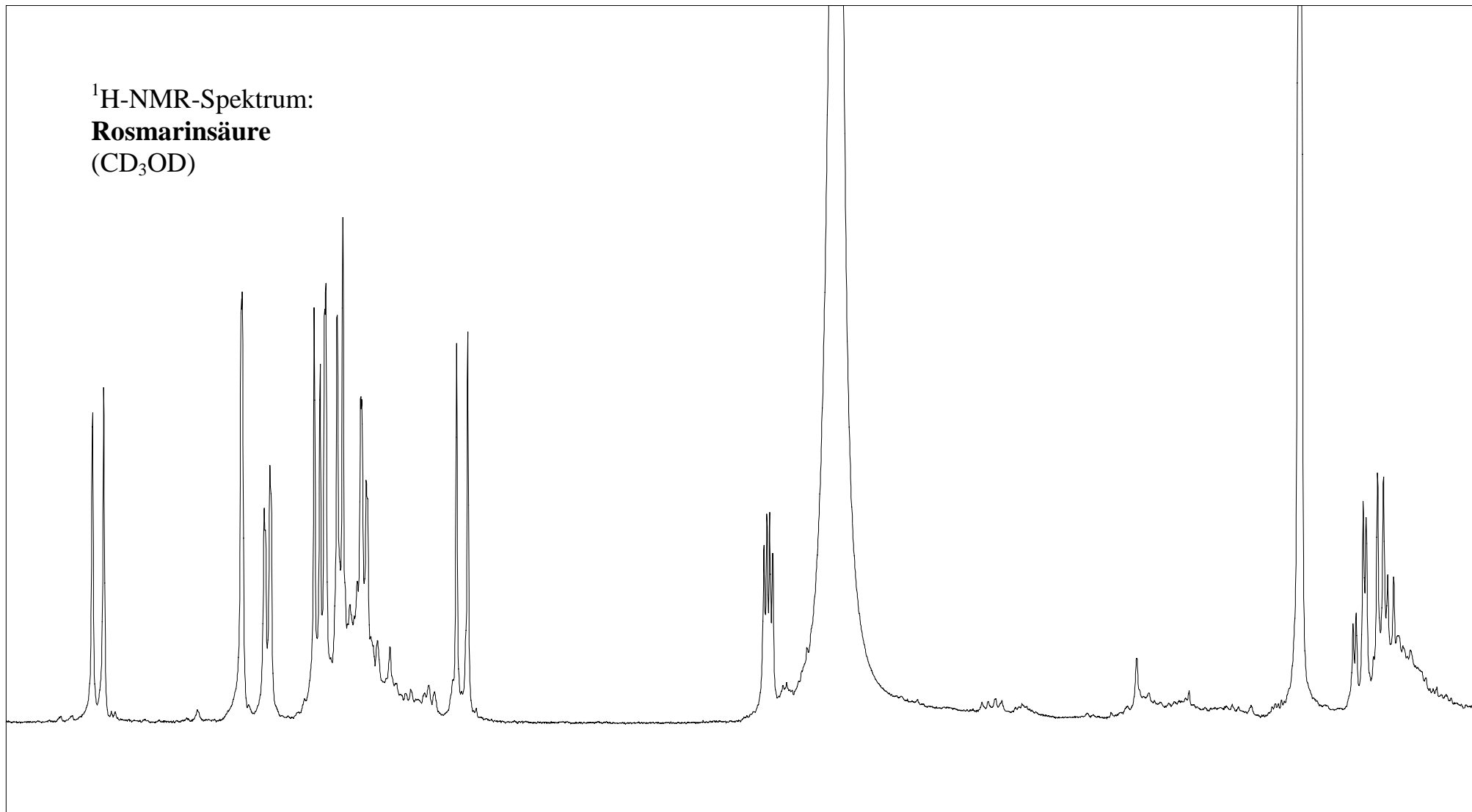


<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum:  
**3-Deoxy-rosmarinsäure**  
(CD<sub>3</sub>OD)

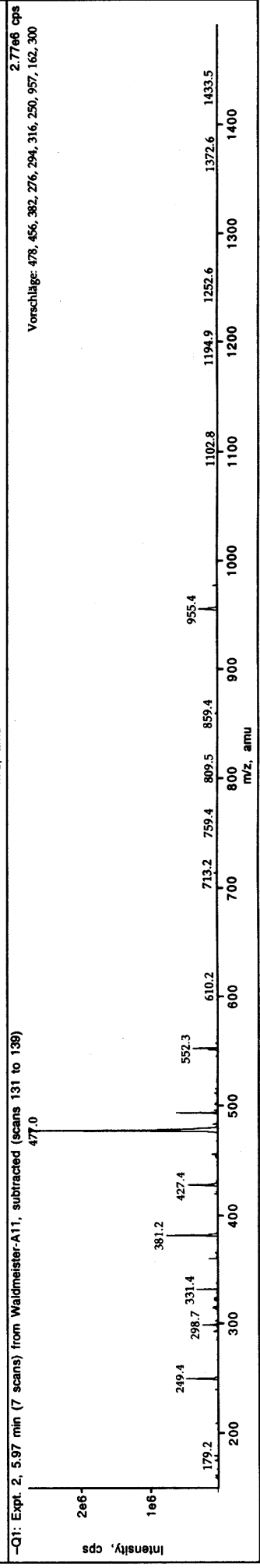
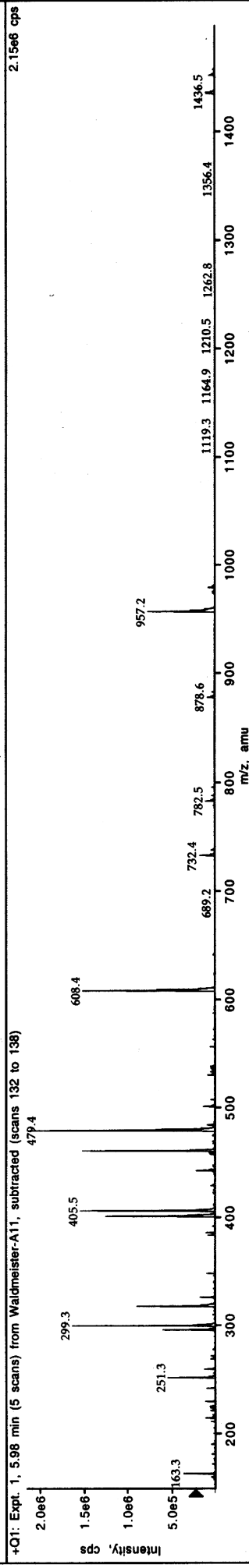
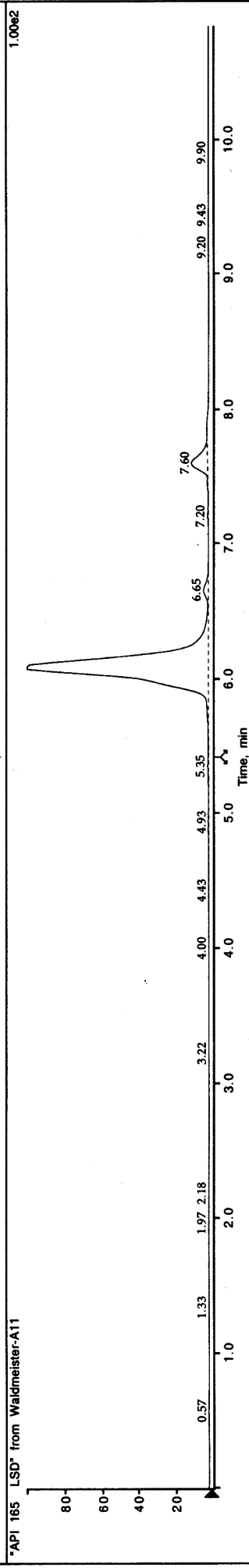
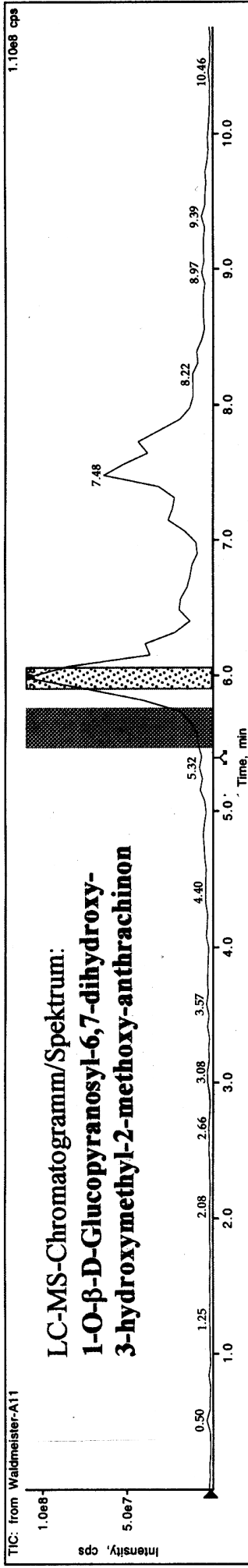




<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum:  
**Rosmarinsäure**  
(CD<sub>3</sub>OD)



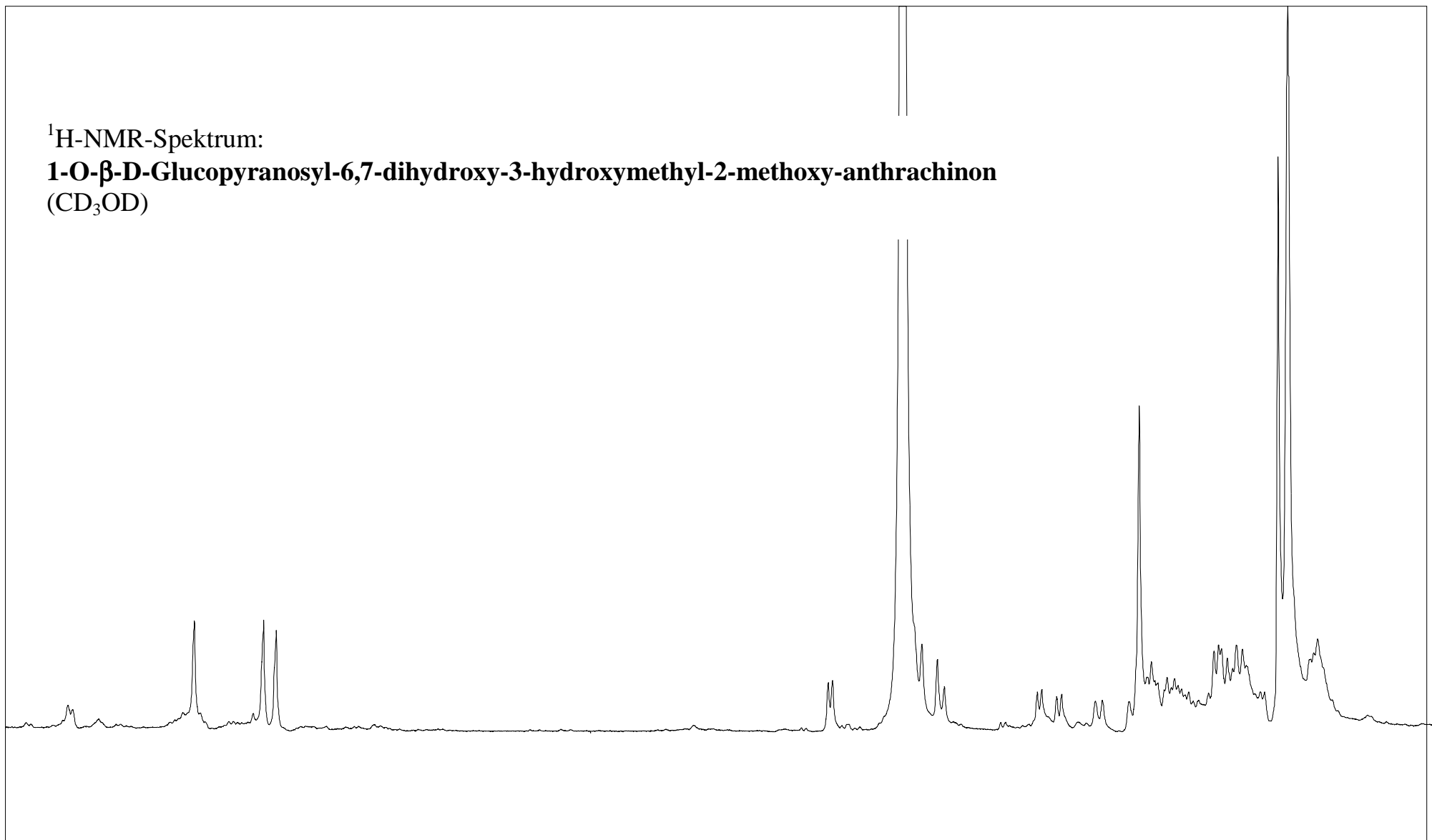
SF: 400.13 MSW: 8278.15 AQ: 1.98 secTD: 32768 poScale units



<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum:

**1-O-β-D-Glucopyranosyl-6,7-dihydroxy-3-hydroxymethyl-2-methoxy-anthrachinon**

(CD<sub>3</sub>OD)



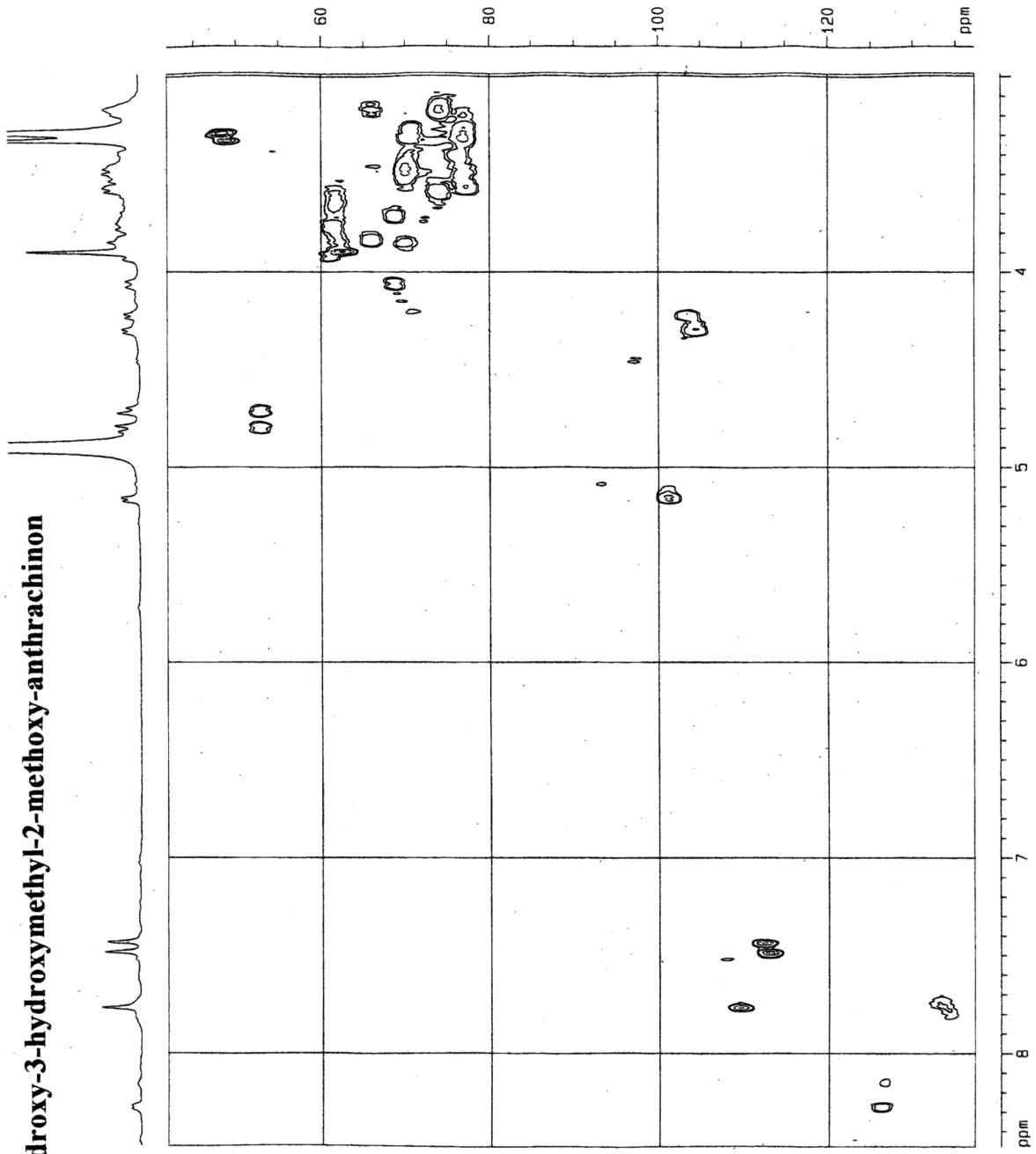
8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0

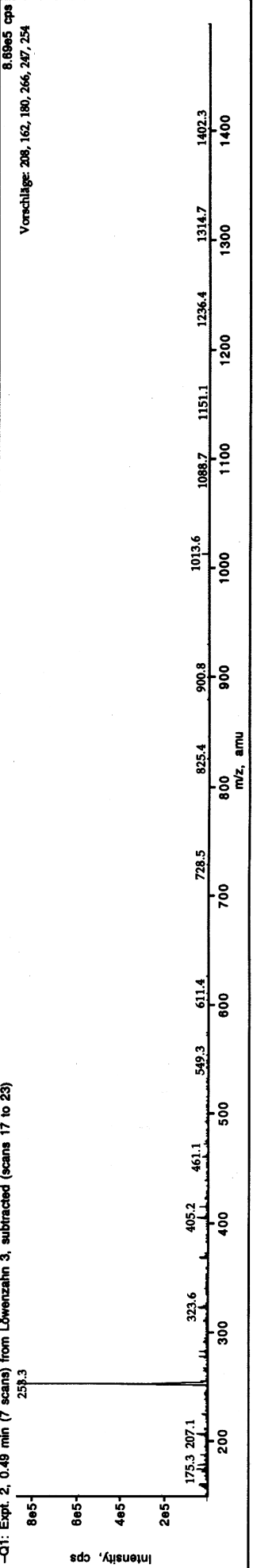
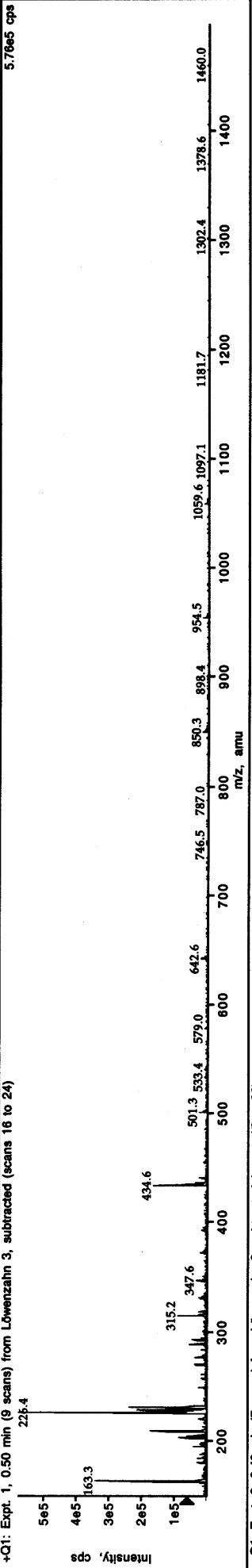
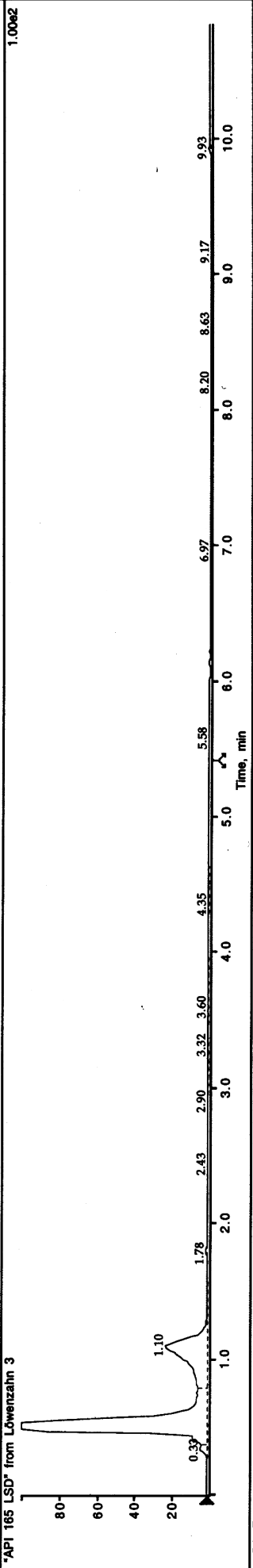
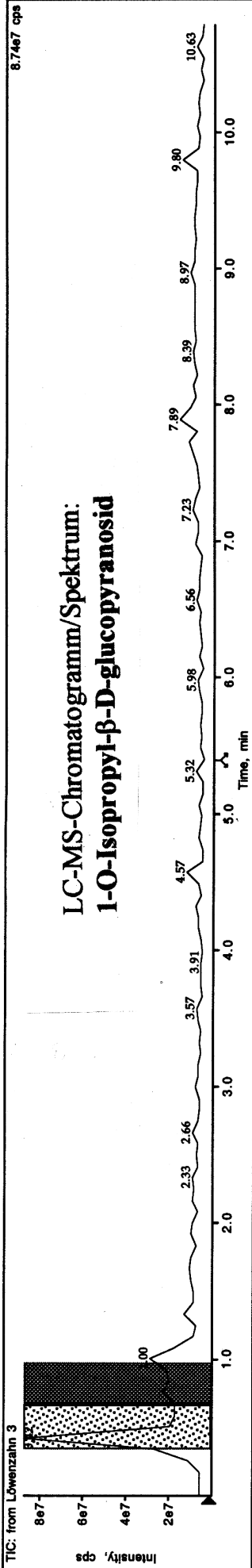
SF: 400.13 MSW: 8278.15 AQ: 1.98 secTD: 32768 poScale units

HSQC-Spektrum:

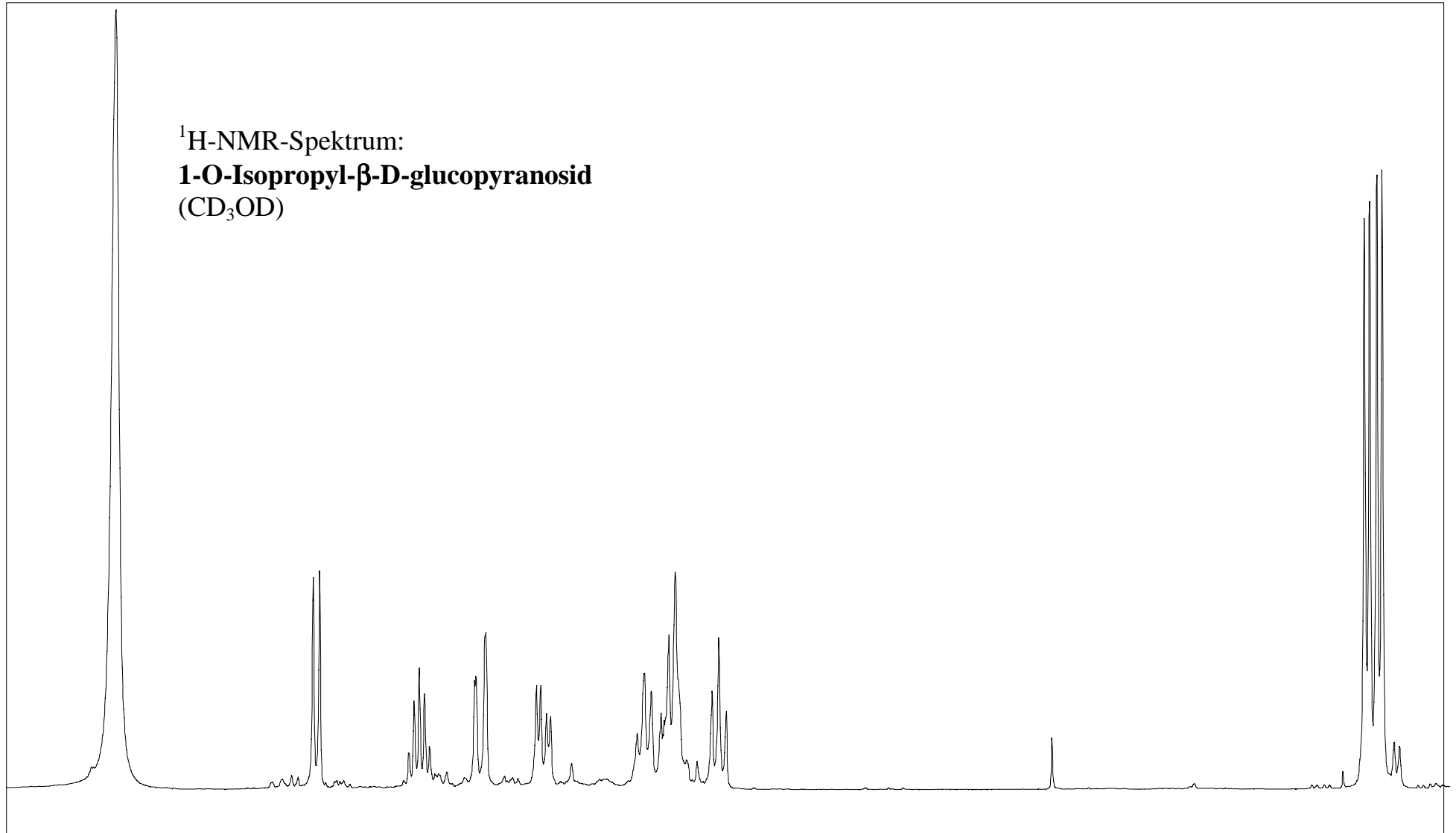
1-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-6,7-dihydroxy-3-methoxymethyl-2-methoxy-anthrachinon

(CD<sub>3</sub>OD)



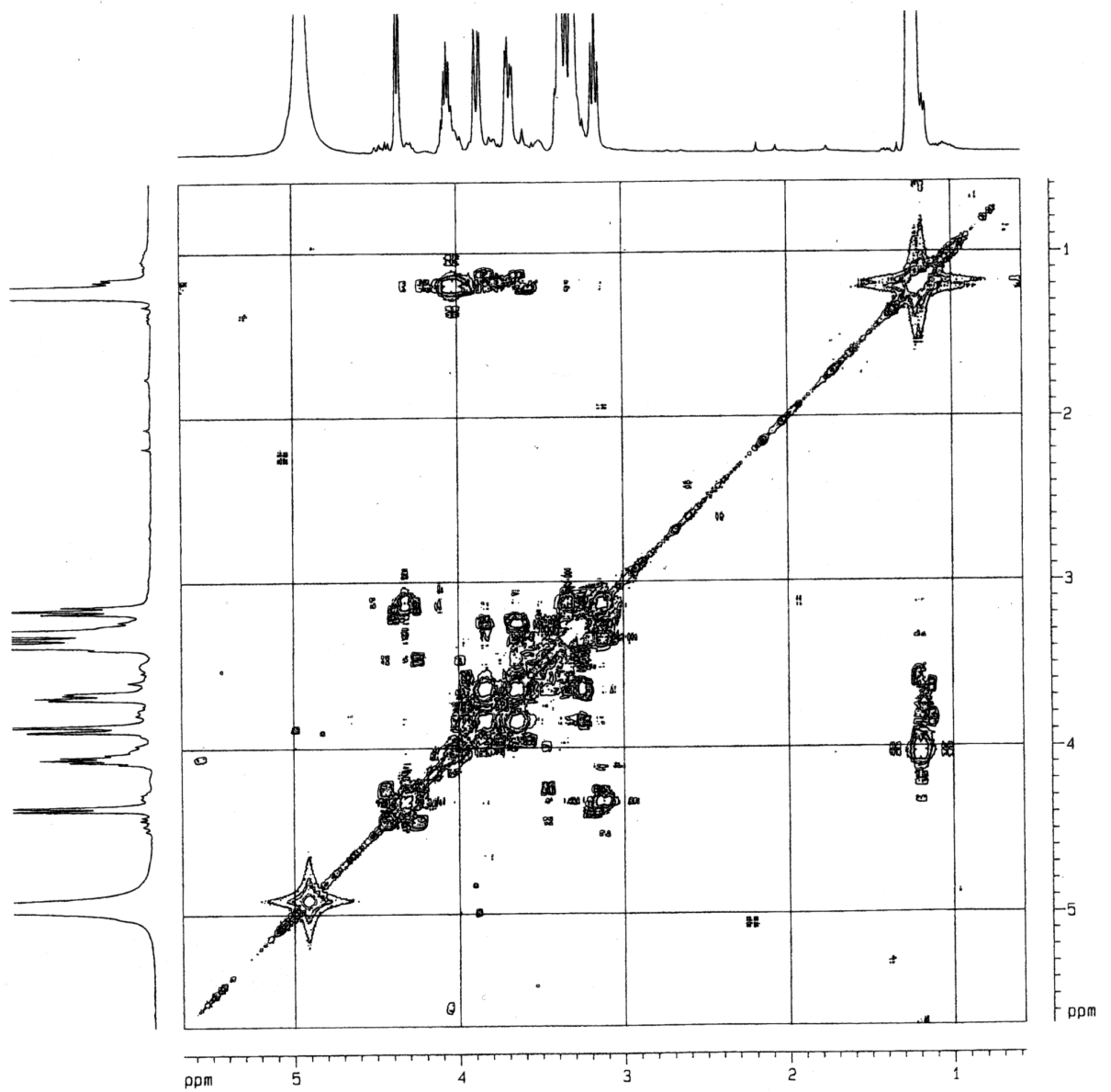


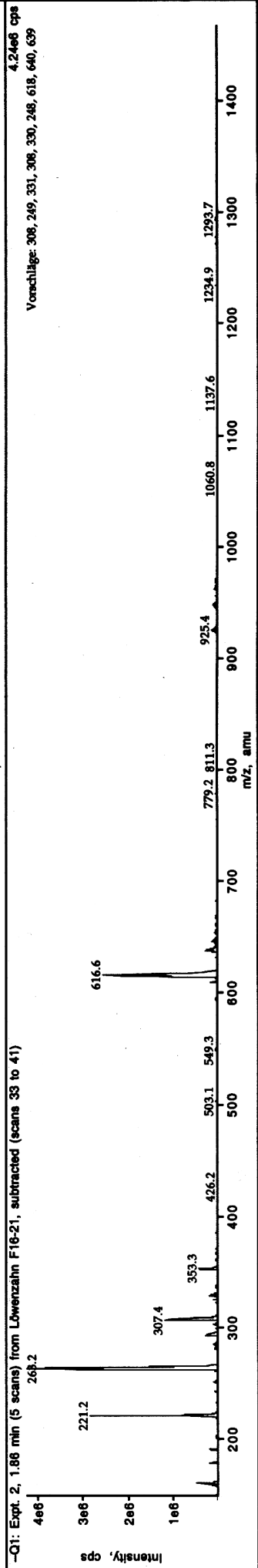
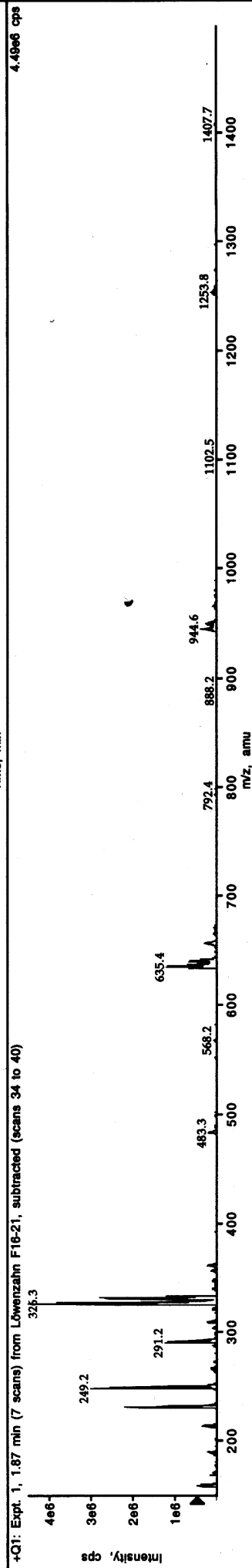
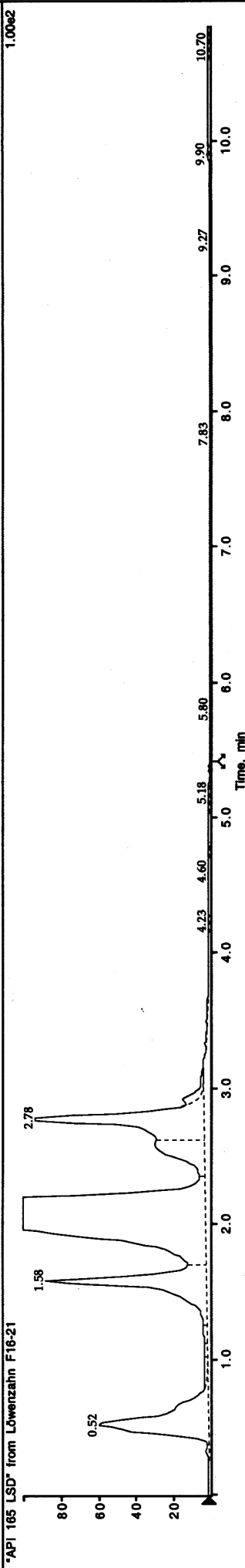
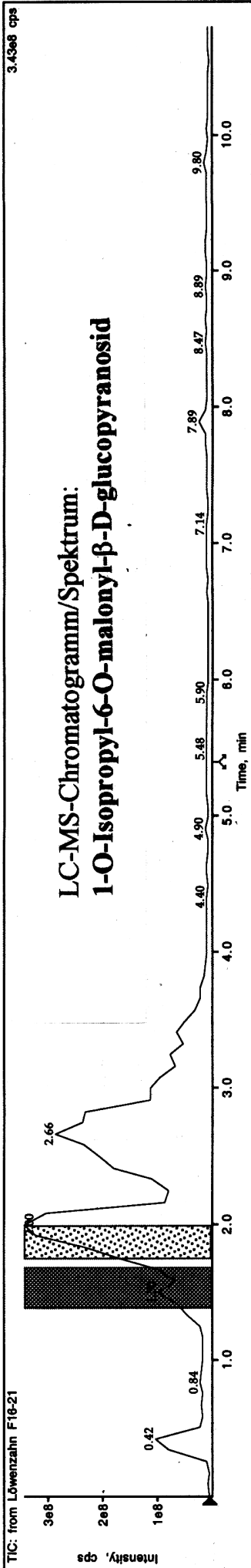
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum:  
**1-O-Isopropyl-β-D-glucofuranosid**  
(CD<sub>3</sub>OD)



5.25 .04 .84 .64 .44 .24 .03 .83 .63 .43 .23 .02 .82 .62 .42 .22 .01 .81 .61 .41 .2  
SF: 400.13 MSW: 8278.15 AQ: 1.98 secTD: 32768 poScale units

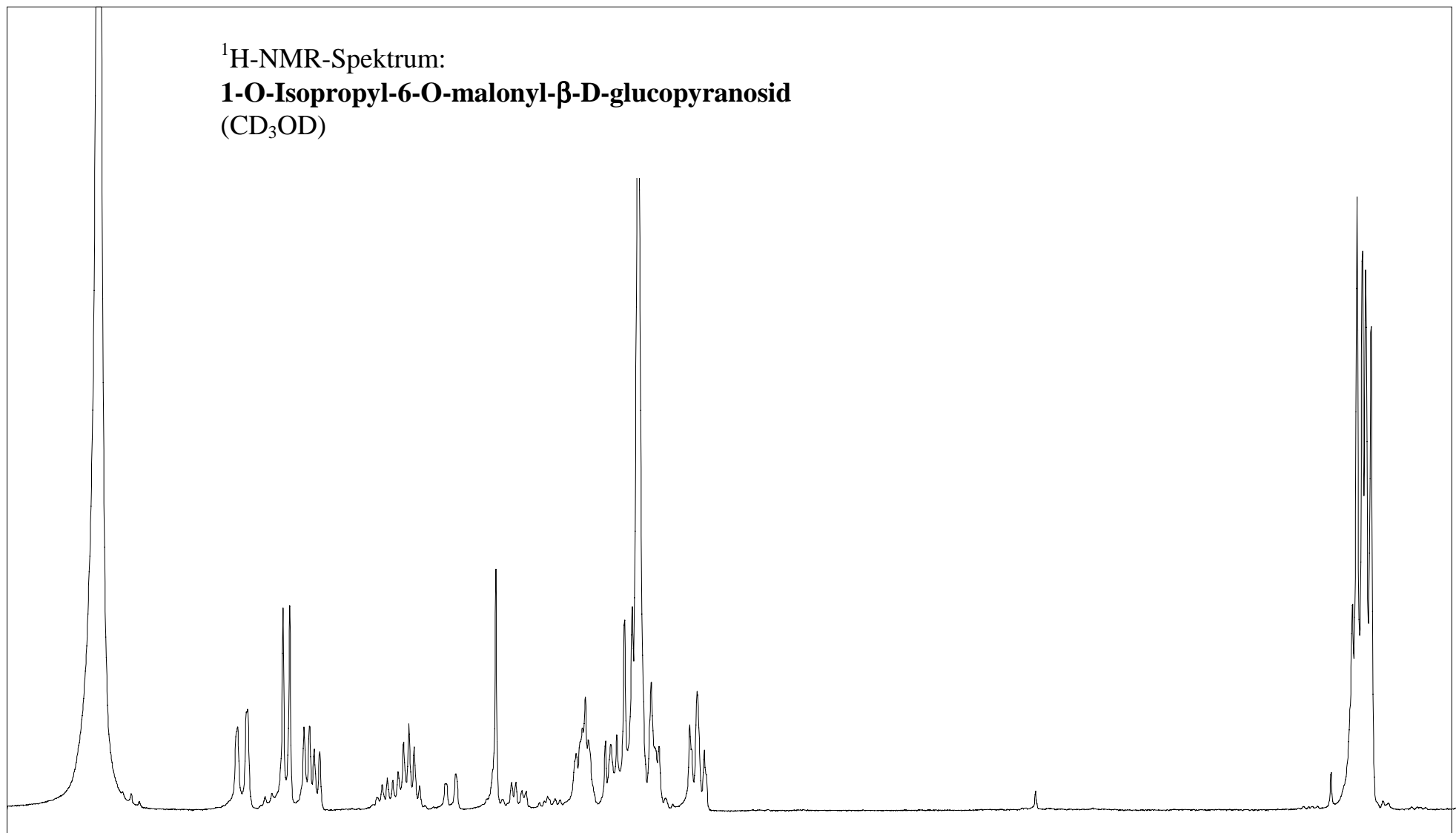
H,H-COSY-Spektrum:  
**1-O-Isopropyl- $\beta$ -D-glucopyranosid**  
(CD<sub>3</sub>OD)







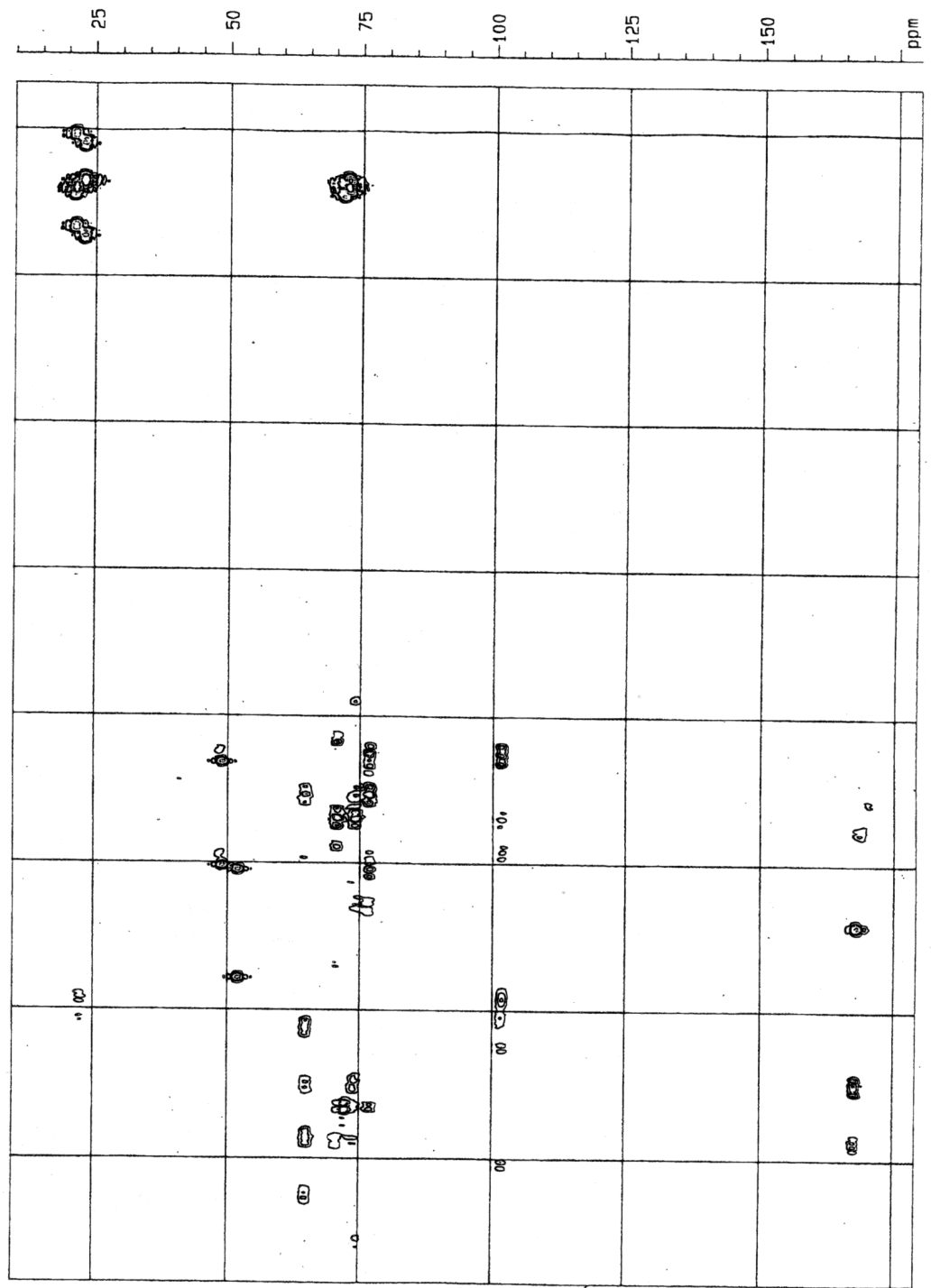
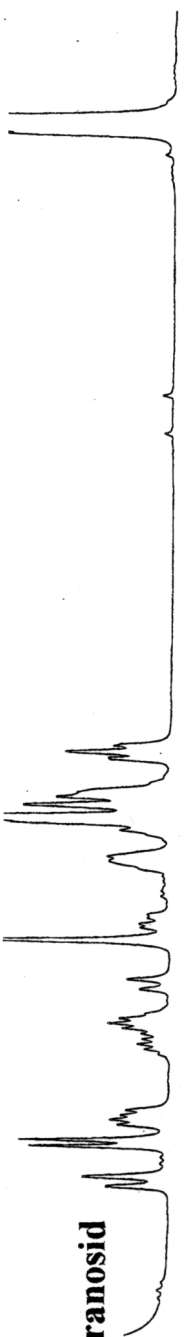
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum:  
**1-O-Isopropyl-6-O-malonyl-β-D-glucopyranosid**  
(CD<sub>3</sub>OD)

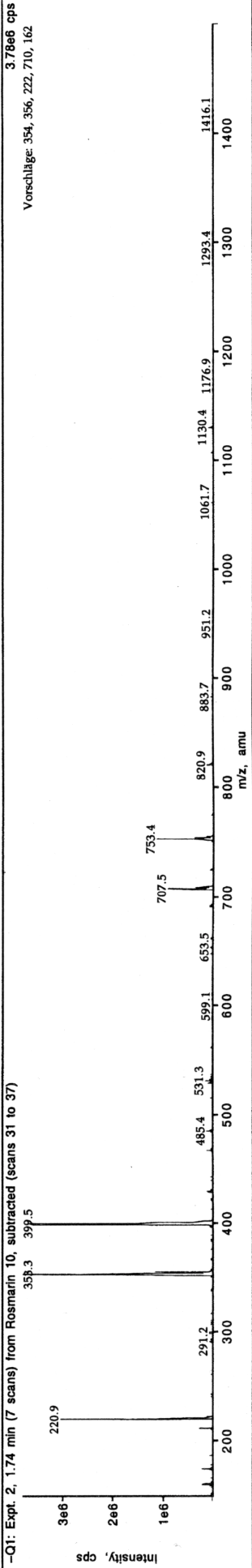
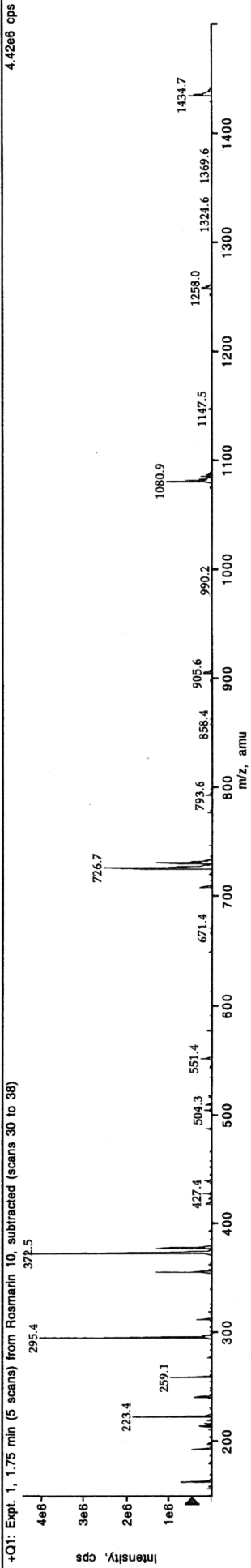
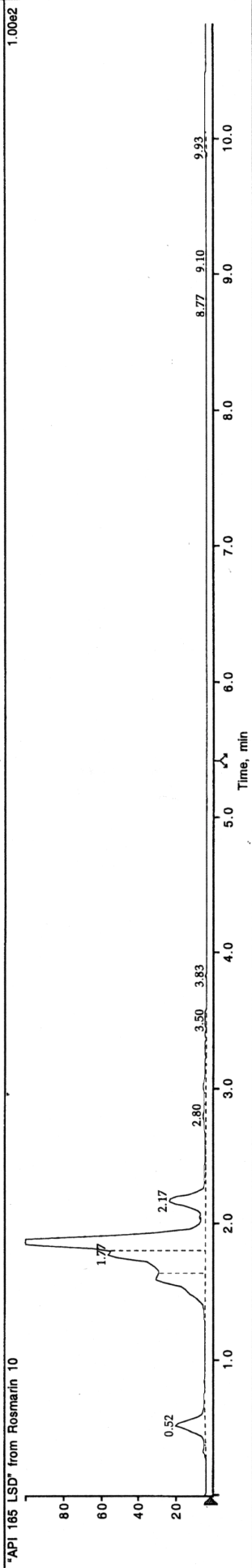
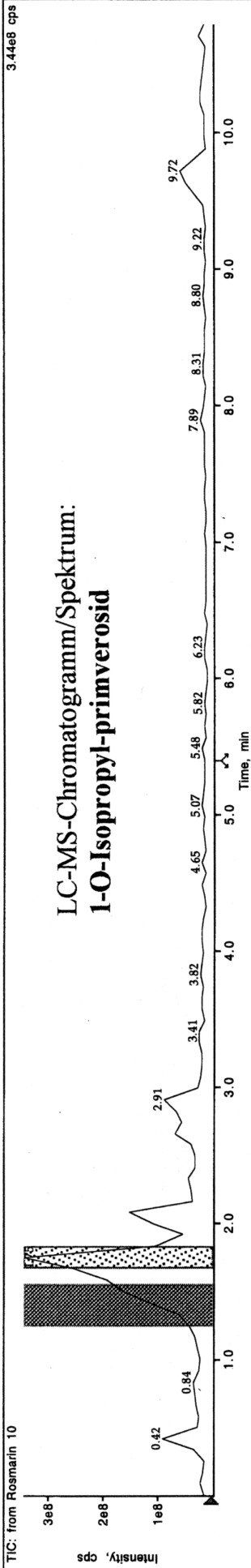


5 . 04 . 84 . 64 . 44 . 24 . 03 . 83 . 63 . 43 . 23 . 02 . 82 . 62 . 42 . 22 . 01 . 81 . 61 . 41 . 21  
SF: 400.13 MSW: 8278.15 AQ: 1.98 secTD: 32768 poScale units

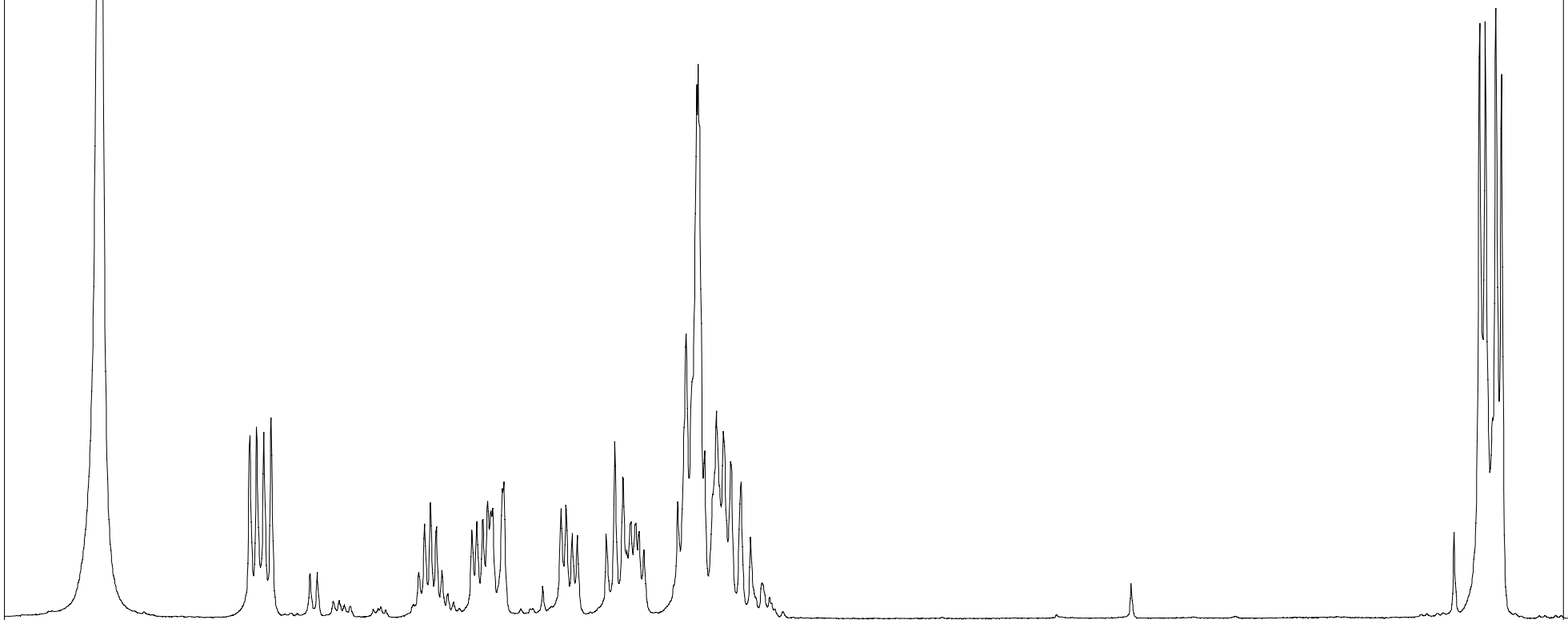
HMBC-Spektrum:

**1-O-Isopropyl-6-O-malonyl-β-D-glucopyranosid**  
(CD<sub>3</sub>OD)



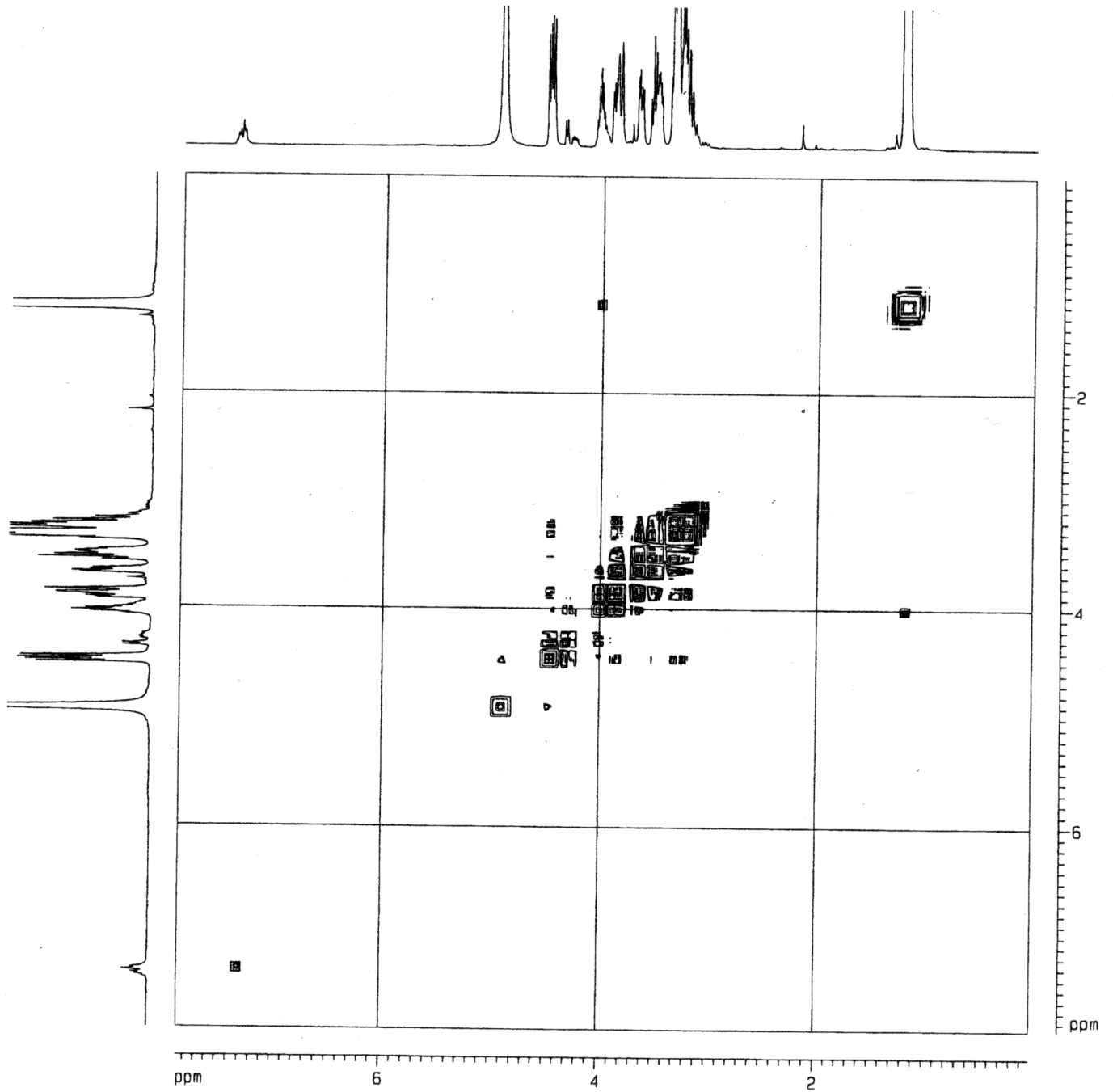


<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum:  
**1-O-Isopropyl-primverosid**  
(CD<sub>3</sub>OD)

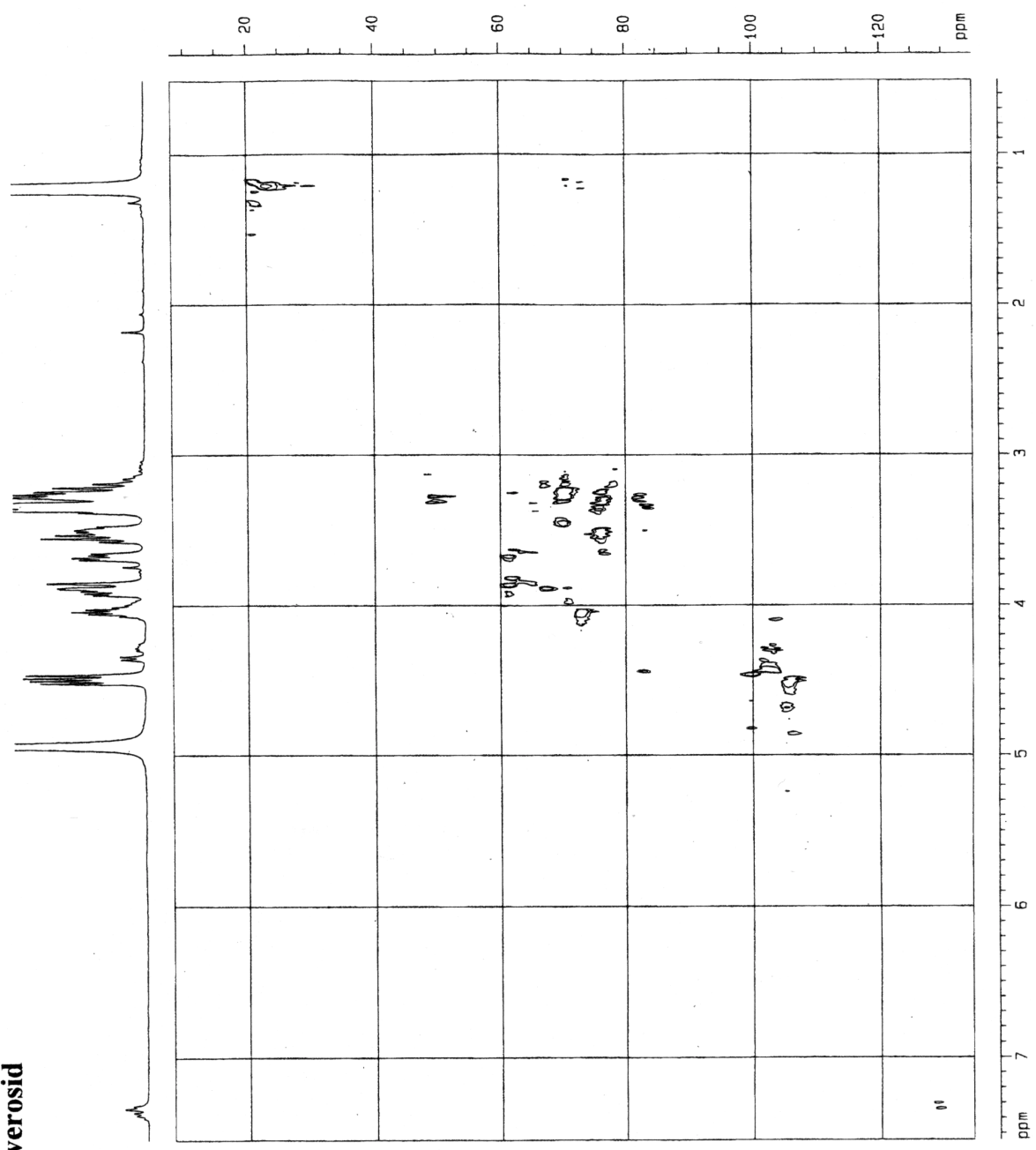


5 . 04 . 84 . 64 . 44 . 24 . 03 . 83 . 63 . 43 . 23 . 02 . 82 . 62 . 42 . 22 . 01 . 81 . 61 . 41 . 2  
SF: 400.13 MSW: 8278.15 AQ: 1.98 secTD: 32768 poScale units

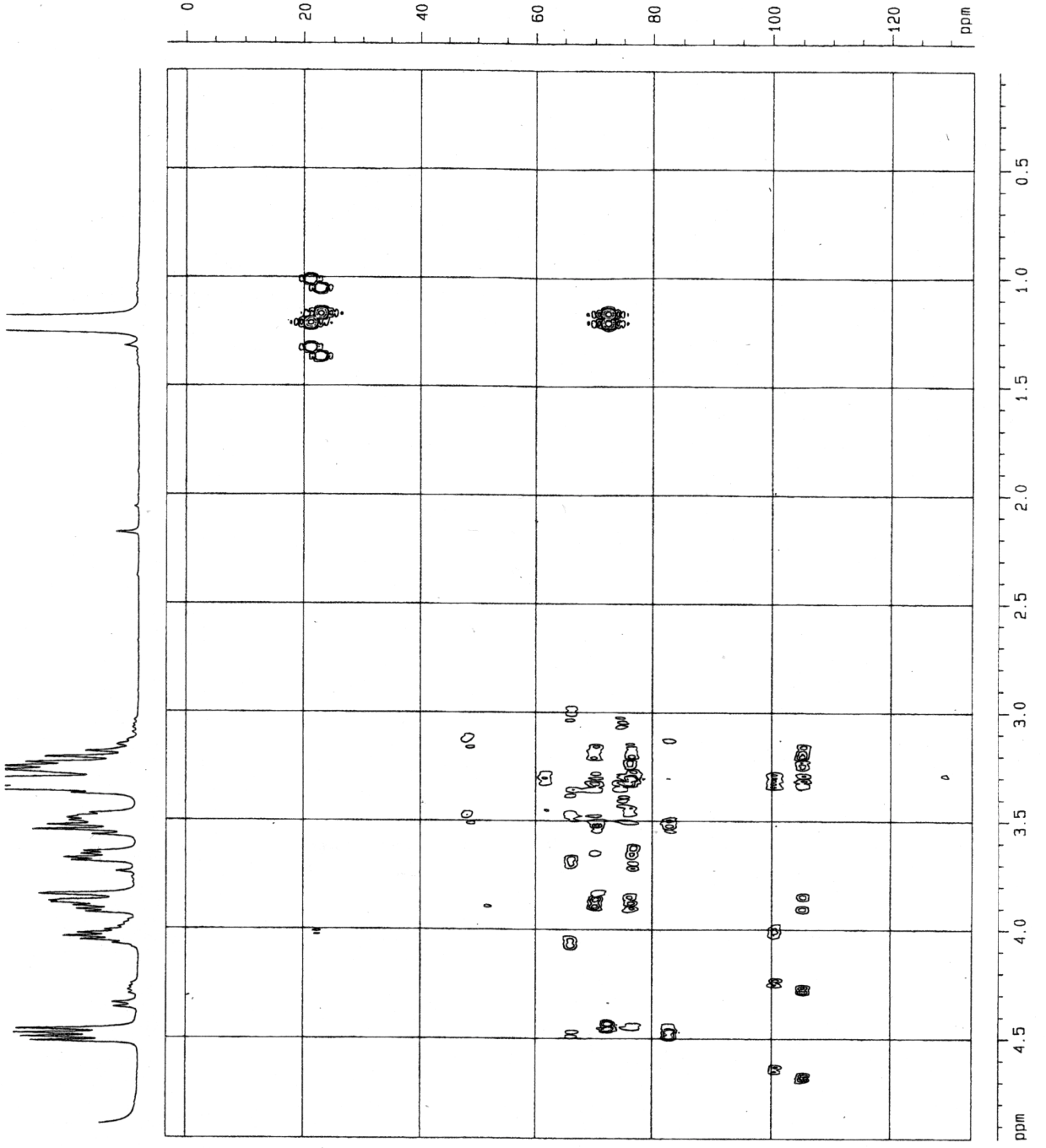
H,H-Cosy-Spektrum:  
**1-O-Isopropyl-primverosid**  
(CD<sub>3</sub>OD)

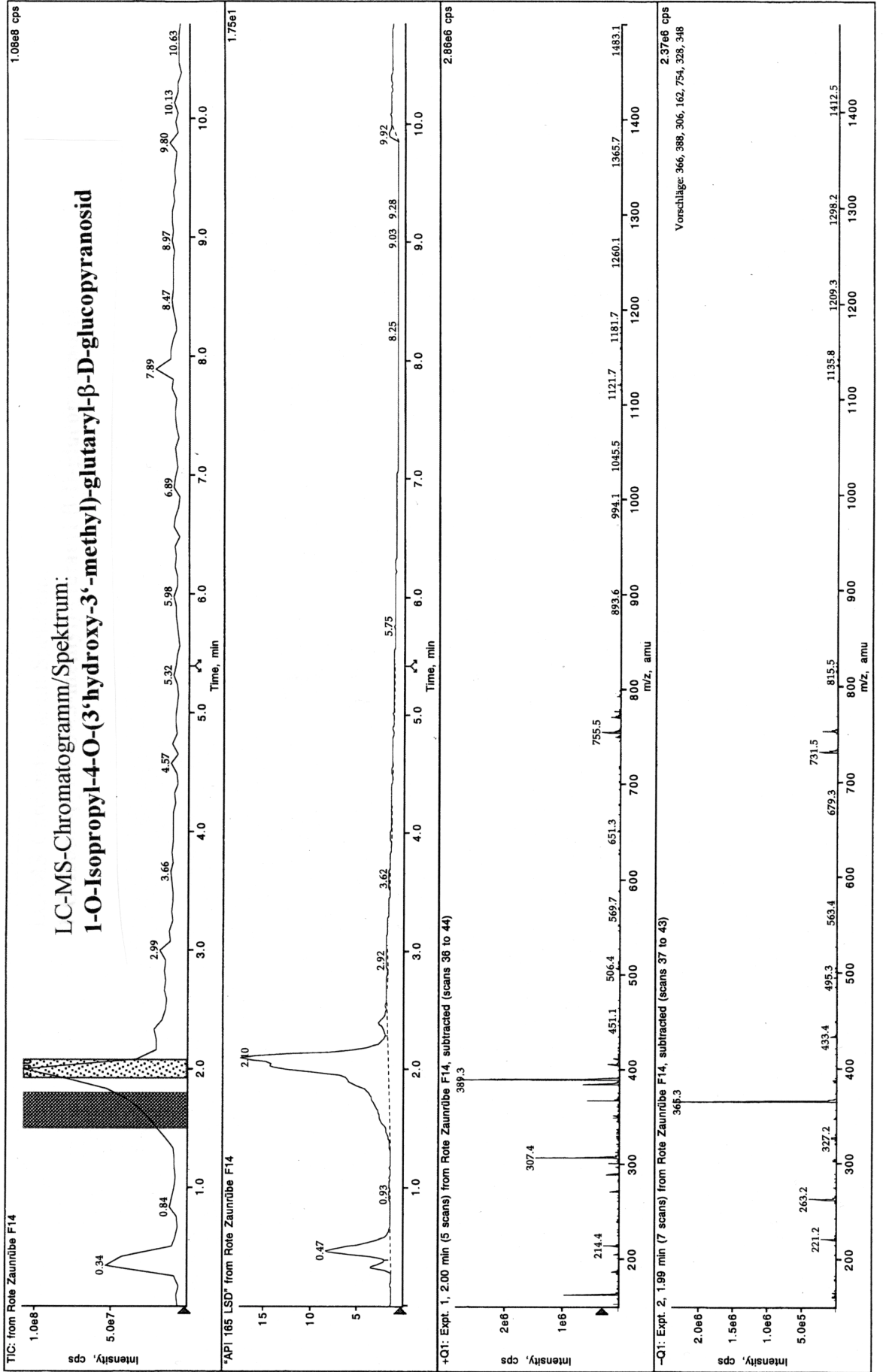


HSQC-Spektrum:  
1-O-Isopropyl-primverosid  
(CD<sub>3</sub>OD)



HMBC-Spektrum:  
1-O-Isopropyl-primverosid  
(CD<sub>3</sub>OD)



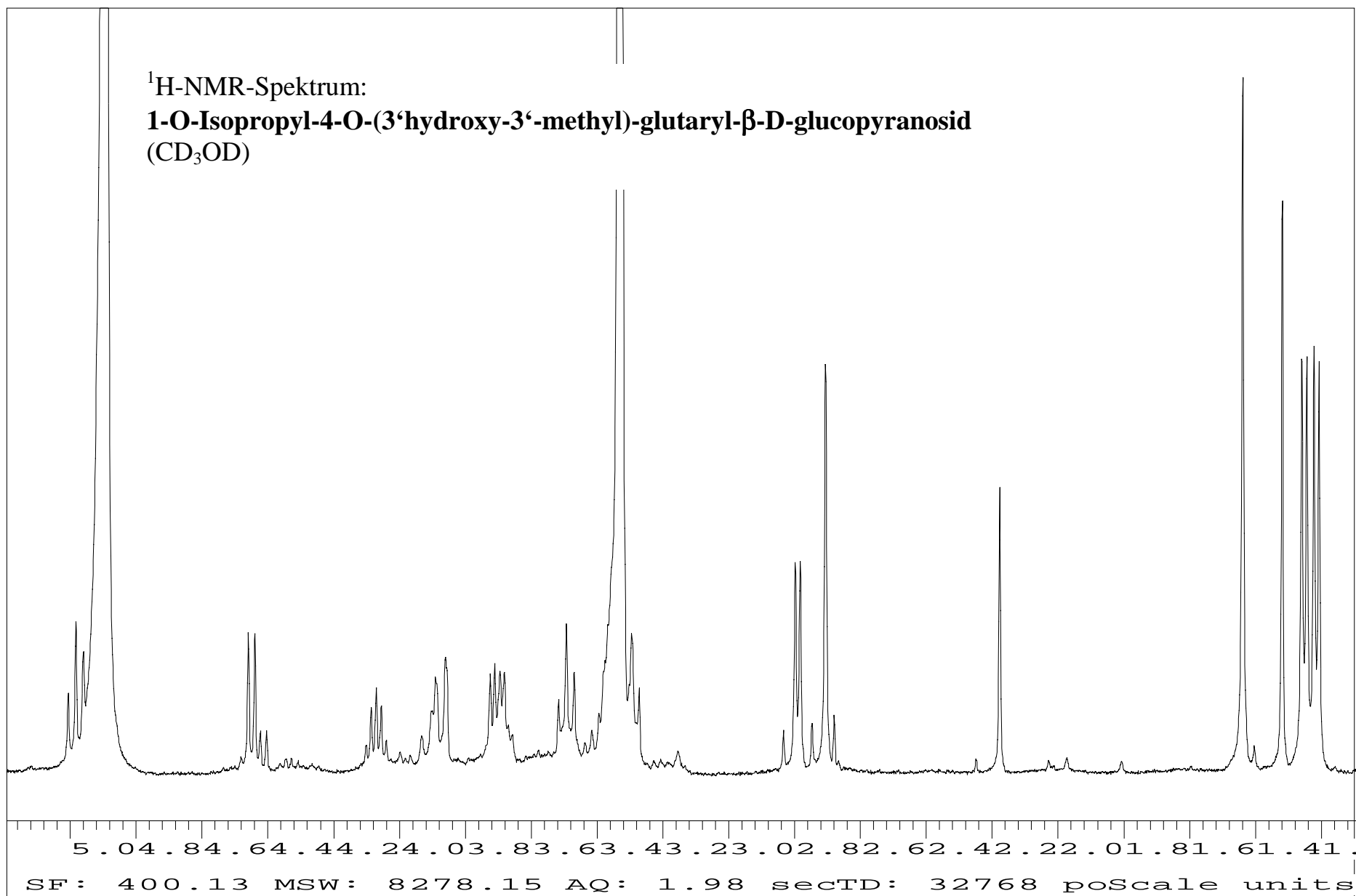




<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum:

**1-O-Isopropyl-4-O-(3'-hydroxy-3'-methyl)-glutaryl-β-D-gluco**

**pyranosid**  
(CD<sub>3</sub>OD)



H,H-Cosy-Spektrum:

**1-O-Isopropyl-4-O-(3'-hydroxy-3'-methyl)-glutaryl- $\beta$ -D-glucopyranosid**  
(CD<sub>3</sub>OD)

