



Technische Universität München

DEPARTMENT CHEMIE

LEHRSTUHL FÜR BIOCHEMIE

Biosynthese von Ginsenosiden und Polyacetylenen in *Panax ginseng* unter Feldbedingungen

Nihat Knispel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich
2. Univ. - Prof. Dr. Thomas Brück

Die Dissertation wurde am 07.10.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 10.11.2014 angenommen.

MEINER FAMILIE

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn apl. Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich für die interessante Aufgabenstellung, die vielseitigen wissenschaftlichen Anregungen, die stets gewährte Unterstützung meiner Arbeit und die sehr freundliche Atmosphäre. Sehr oft stand er mir geduldig mit seiner Erfahrung bei spektroskopischen und anderen Problemen mit Rat und Tat zur Seite.

Ebenfalls ein recht herzlicher Dank gilt Herrn Priv. - Doz. Dr. Luis M. Peña Rodriguez, der mich theoretisch und praktisch in vielen wissenschaftlichen Fragen mit seiner Routine und Erfahrung unterstützt hat, sowie seinem Doktoranden Alejandro Yam-Puc.

Herrn Prof. Dr. Michael Groll danke ich für die freundliche Atmosphäre und zahlreichen Anregungen in den Seminaren.

Frau Dr. Claudia Huber danke ich recht herzlich für die GC/MS-Messungen sowie für die wissenschaftliche Beratung und Auswertung der Daten.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Nicholas Schramek für die tatkräftige Unterstützung bei den Feldversuchen, bei der Einweisung der Geräte und bei seinen Messungen und Auswertungen am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit.

Meiner Laborkollegin, Frau Christine Schwarz, danke ich sehr für ihre tatkräftige Unterstützung bei allen NMR-spektroskopischen Messungen und den vielen Fragestellungen rundum die HPLC-Anlage.

Herrn Fritz Wendling gilt ein großer Dank für seine unschätzbare wichtige, schnelle und effektive Unterstützung bei allen anfallenden HPLC- und Computerproblemen.

Ferner bedanke ich mich bei meinen Laborkolleginnen Birgit Lange, Erika Kutzner, Dr. Stephanie Grubmüller, Dr. Nadine Gillmaier und Dr. Eva Eylert für die freundliche Zusammenarbeit und die vielfältigen wissenschaftlichen Diskussionen.

Vielen, vielen Dank an Gesine Wischmann und Henrike Rodemeier für das Interesse und die Unterstützung der Feldversuche sowie Dennis Koopmann und Volker Bostelmann für Ihre immer hilfsbereite Art und die schöne Zeit in Walsrode.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau A. König für Ihr Organisationstalent bei Bestellungen und vielen anderen Hilfestellungen bei Laborgeräten.

Herrn R. Feicht, Frau K. Gärtner und Herrn C. Graßberger danke ich für die vielen kleinen und größeren Hilfestellungen. Bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Groll bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die stetige Hilfsbereitschaft. Für ihre engagierte Mitarbeit bedanke ich mich bei Sabine Dvorski, Sabrina Senz, Christopher Scheidler, Stefanie Schmidt und Lukas Volk.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung und bei der Florafarm GmbH (Walsrode, Deutschland) für das ermöglichen der Experimente.

Mein ganz wichtiger Dank gilt natürlich meiner Frau und meinen beiden Töchtern sowie meinen Eltern, die mir das ermöglicht haben.

PUBLIKATIONSLISTE

- [1] Advanced methods for the study of the chemistry and the metabolism of lichens. W. Eisenreich, N. Knispel, A. Beck, *Phytochem. Rev.* **2011**, *10*, 445-456.
- [2] Isotopolog profiling – Toward a better understanding of metabolic pathways. W. Eisenreich, C. Huber, E. Kutzner, N. Knispel, N. Schramek, In *Handbook of Plant Metabolomics*; 1. ed.; W. Weckwerth, G. Kahl, *Wiley-Blackwell*, **2013**, pp. 25-56.
- [3] Biosynthesis of Panaxynol and Panaxydol in *Panax ginseng*. N. Knispel, E. Ostrozhenkova, N. Schramek, C. Huber, L. M. Peña-Rodríguez, M. Bonfill, J. Palazon, G. Wischmann, R. M. Cusidó, W. Eisenreich, *Molecules* **2013**, *18*, 7686-7698.
- [4] A case of mistaken identity: Lupeol-3-(3'*R*)-hydroxy-stearate can be mistakenly identified as lupeol acetate when only analyzed by GC–MS. A. Yam-Puc, F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa, F. G. Ramírez-Torres, M. J. Chan- Bacab, W. Eisenreich, C. Huber, N. Knispel, G. Godoy-Hernández, L. M. Peña-Rodríguez, *Phytochemistry Letters* **2013**, *6*, 649-652.
- [5] Isotopologue profiling of Triterpene Formation under Physiological Conditions. Biosynthesis of Lupeol-3-(3'-*R*-hydroxy)-stearate in *Pentalinon andrieuxii*. L. M. Peña-Rodríguez, A. Yam-Puc, N. Knispel, N. Schramek, C. Huber, C. Grassberger, F. G. Ramírez-Torres, F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa, M. R. Hiebert-Giesbrecht, M. J. Chan-Bacab, G. Godoy-Hernández, A. Bacher, W. Eisenreich, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 2864-2873.
- [6] Biosynthesis of Ginsenosides in Field-Grown *Panax Ginseng*. N. Schramek, C. Huber, S. Schmidt, S. EM Dvorski, N. Knispel, E. Ostrozhenkova, L. M. Peña-Rodríguez, R. M. Cusidó, G. Wischmann, W. Eisenreich, *JSM Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *2*, 106-121.

Teile dieser Dissertation wurden bereits in [2], [3] und [6] veröffentlicht.

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Ala	Alanin
bideest.	bidestilliert
bzw.	beziehungsweise
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
CDCl ₃	Chloroform, deuteriert
°C/min	Grad Celsius pro Minute
ca.	circa
cm	Zentimeter
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
CoA	Coenzym A
d	Tage
DE	Deutschland
dest.	Destilliert
DXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
EI	Elektronenstoßionisation
et al.	und andere
eV	Elektronenvolt
g	Gramm
GC/MS	Gaschromatographie/ Massenspektrometrie
h	Stunde
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HPLC	High-performance liquid chromatography
Hz	Hertz
Ile	Isoleucin
konz.	konzentriert
kPa	Kilopascal
L.	Linné, Carl von

Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	molar
m	Masse
m/s	Meter pro Sekunde
mbar	Millibar
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mL/min	Milliliter pro Minute
MTBSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl)trifluoracetamid
n	Gesamtanzahl der Kohlenstoffe
N ₂	Stickstoff
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
n. d.	nicht definiert
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
p. a.	pro analysi (für die Analyse)
ppm	parts per million (1:10 ⁻⁶)
R	Rest
Rt	Retentionszeit
TBDMSCI	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl chloride
TMCS	Chlorotrimethylsilan
TMSI	1-(Trimethylsilyl)imidazole
TMS	Trimethylsilyl
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Val	Valin
Vol.	Volumen
VIS	Sichtbares Licht (engl. <i>visible</i>)
y	Jahr

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ginseng	1
1.2	Polyacetylene in <i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	6
1.3	Biosynthese von Terpenoiden	8
1.3.1	Der Mevalonat-Biosyntheseweg	13
1.3.2	Der Methylerythritol (MEP)- Biosyntheseweg	13
1.4	Isotopolog-Profilng	16
2	Aufgabenstellung	18
3	Ergebnisse und Diskussion	20
3.1	Schnelle Qualitätskontrolle mittels Ribolyser-Extraktion	21
3.2	Gehaltsbestimmung der Ginsenoside	21
3.3	Isotopolog-Profilng	24
3.3.1	Einfluss der Puls- und Chasezeiten auf die ¹³ C-Einbaurate in Alanin	24
3.3.2	Analyse der proteinogenen Aminosäure Alanin aus der Wurzel	28
3.3.3	Analyse der Zucker	30
3.4	Biosynthese der Ginsenoside	34
3.4.1	Protopanaxatriol- und Protopanaxadiolanalyse	34
3.4.2	Isotopolog-Profilng der Ginsenoside Rb ₁ und Rg ₁ über NMR	35
3.4.3	Isotopolog-Profilng der Zuckerreste in Rg ₁ und Rb ₁ über NMR	46
3.5	Biosynthese von Panaxynol and Panaxydol	47
4	Zusammenfassung	54
5	Summary	55
6	Material und Methoden	56
6.1	Reagenzien und Lösungsmittel	56

6.2	Geräte	59
6.3	NMR-Spektroskopie	60
6.3.1	Berechnung der absoluten ^{13}C -Anreicherung	61
6.3.2	Quantitative ^{13}C -Bestimmung über $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplung	61
6.4	Messung der optischen Rotation	61
6.5	Verwendete Software	62
6.6	HPLC	62
6.6.1	HPLC-Anlage	62
6.6.2	Detektion	62
6.6.3	Analytische Säule	63
6.6.4	Präparative Säule	63
6.6.5	Isolierung der Ginsenoside über HPLC	64
6.7	^{13}C -Markierungsexperimente von <i>P. ginseng</i> C. A. Meyer	65
6.8	Analyse von Aminosäuren	70
6.8.1	Probenvorbereitung	70
6.8.2	GC/MS-Methode	72
6.8.3	Auswertung der Messergebnisse	73
6.9	Isolierung von Panaxynol und Panaxydol	73
6.10	Isolierung der Zucker	74
6.10.1	Glucose-Isolierung	76
6.11	Gehaltsbestimmung der Ginsenoside	77
6.12	Panaxadiol/Panaxatriol (alkalische Hydrolyse)	78
7	Literaturverzeichnis	80
8	Anhang	89

1 Einleitung

1.1 Ginseng

Die Gattung *Panax* gehört zu der Familie der Araliengewächse (Araliaceae, Efeugewächse) und ist mit dem heimischen Efeu (*Hedera*) verwandt. Sie wächst überwiegend in den tropischen bis subtropischen Gebieten Asiens und Amerikas. Vor allem die Wurzel der Gattung *Panax ginseng* C. A. Meyer (Carl Anton von Meyer, russischer Botaniker) kann auf über 4500 Jahre Geschichte zurückblicken. Die erste schriftliche Erwähnung stammt aus den Jahren zwischen 48 und 33 Jahre vor Christus. Sie gehört damit zu den bekanntesten Naturheilpflanzen der Erde.

Ihre weltweite Popularität rührt von ihrer vielseitigen Anwendbarkeit im medizinisch-pharmazeutischen Bereich her. In der traditionellen asiatischen Medizin, vor allem in China und Korea werden Wurzelextrakte von *P. ginseng* C. A. Meyer (Ginseng) als universales Heilmittel gegen viele Krankheiten eingesetzt. Sie steht für ein ausgewogenes Yin und Yang und soll somit ein langes Leben in Harmonie und Gesundheit begünstigen. Dieses Image hat die Pflanze bis heute. In der westlichen Welt sind Naturheilstoffe sehr beliebt, die eine „Anti-Aging“ und vitalisierende Wirkung versprechen und davon profitiert Ginseng überproportional. Auch den Indianern Nordamerikas war die Heilkraft der dort heimischen Ginsengart *P. ginseng quinquefolius* L. bekannt. Der Anbau in China reicht bis in das 12. Jahrhundert zurück.

Heute sind die wichtigsten Arten für den kommerziellen Anbau *P. ginseng* C. A. Meyer und *P. ginseng quinquefolius* L. (amerikanischer Ginseng). Die anderen in Tabelle 1 aufgelisteten Ginsengarten spielen hierbei kaum eine Rolle. Der Name *Panax* ist aus den griechischen Wörtern *pan* (All) und *akos* (Heilmittel) zusammengesetzt und weist auf seine vielseitige Heilwirkung hin. Ginseng wird im Handel in zahlreichen Formen wie z. B. Kapseln, Tabletten, Tinkturen, Getränken, Suppen und Kosmetika angeboten.¹⁻³ Wurzelextrakte von Ginseng enthalten zahlreiche pharmakologisch aktive Substanzen wie z. B. Ginsenoside, Polyacetylene, Sesquiterpene, Steroide, Flavonoide, Alkaloide, Phenole, Peptidoglykane (Panaxane), Polysaccharide, Vitamine und Mineralien.^{4,5} Hierbei werden für die gesundheitsfördernden Eigenschaften der Pflanze, obwohl noch nicht richtig verstanden, den Ginsenosiden die zentrale Rolle zugeschrieben. Die Ginsenoside gehören zur Gruppe der Saponine und kommen in der Natur aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt zahlreich vor. Man findet sie hauptsächlich in Pflanzen, aber auch in einigen Meeres-

organismen (z. B. Seesterne und Seegurken).⁶⁻⁸ Saponine sind polare Moleküle bestehend aus einem Triterpen- oder Steroidaglycon und aus Zuckereinheiten. Die Unterscheidung erfolgt über die Anzahl der Zuckermoleküle in den Seitenketten.

Tabelle 1: Wichtige Arten der Gattung *Panax*.^{1,3}

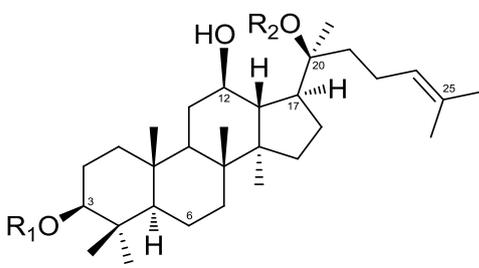
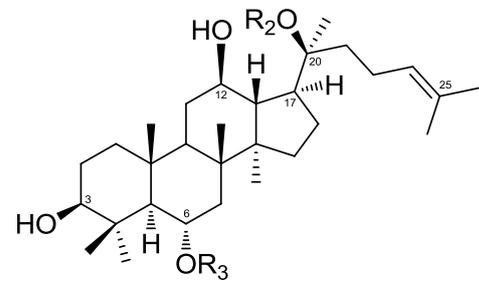
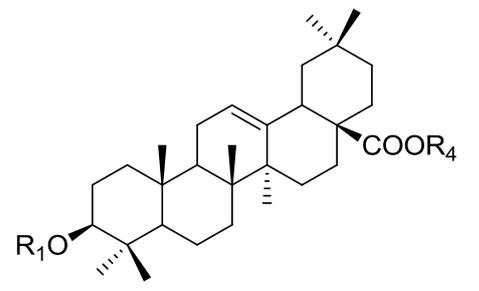
<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	Chinesischer/koreanischer Ginseng
<i>Panax quinquefolius</i> L.	amerikanischer Ginseng
<i>Panax trifolius</i> L.	amerikanischer Ginseng
<i>Panax notoginseng</i> (Burkill) F. H. Chen	südasiatischer Ginseng (Sanchi Ginseng)
<i>Panax japonicus</i> C. A. Meyer	japanischer Ginseng
<i>Panax pseudoginseng</i> ssp. <i>Himalaicus</i>	himalayischer Ginseng
<i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv.	vietnamesischer Ginseng

Der Name leitet sich von dem lateinischen Wort *sapo* ab, da Saponine die Eigenschaften von Seife zeigen.⁸

In Deutschland muss der Gehalt an Ginsenosiden in der Pflanze mindestens 1,5 % betragen, um nach dem "Deutschen Arzneibuch" als Heilpflanze eingestuft zu werden.⁹ Der Gesamtgehalt an Ginsenosiden in *P. ginseng* C. A. Meyer beträgt 0,2 bis 2 % für die Wurzel und 4 bis 9 % für die Haarwurzeln.¹⁰ Momentan sind mehr als 200 Ginsenoside bei der Spezies *Panax* bekannt.¹¹ Im koreanischen Ginseng sind bislang etwa 40 Ginsenoside wissenschaftlich belegt.¹² In der kultivierten Pflanze *P. ginseng* C. A. Meyer sind die wichtigsten Ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf und Rg₁. Im amerikanischen Ginseng *P. quinquefolius* L. kommt das Ginsenosid Rf nicht vor und kann unter anderem zur Unterscheidung der beiden Pflanzenarten herangezogen werden.^{4,13,14} Die Abkürzung R steht für Radix (lat. für Wurzel) und die Indizes (x = a, b usw.) geben die Reihenfolge der Rf-Werte in der Dünnschichtchromatographie wieder. Die Polarität nimmt von Index a zu Index h ab. Neuere Isolierungen aus den Blättern werden mit F für Folia bezeichnet.^{4,15,16} Mit Ausnahme von Ro, das ein Derivat der Oleanolsäure ist, treten die Ginsenoside hauptsächlich in dem tetracyclischen Dammarantyp auf. Sie werden entsprechend ihres Aglykon-Gerüsts in die Gruppen 20(S)-Protopanaxadiol und 20(S)-Protopanaxatriol (Tabelle 2) eingeteilt. Entscheidend für die Heilwirkung ist vermutlich das Zusammenspiel, weshalb man einzelne Ginsenoside für die pharmakologische Wirkung nicht isoliert betrachten sollte.

Obwohl die Araber die Pflanze als erste nach Europa brachten, konnte sie sich dort zu diesem Zeitpunkt nicht durchsetzen. Im 17. Jahrhundert versuchten niederländische Seeleute sie bekannter zu machen, jedoch wieder ohne Erfolg. Erst ab dem 20. Jahrhundert stieg die Nachfrage in Europa stetig. Gerade in den letzten Jahren ist ein Boom bei vielen Naturheilpflanzen festzustellen. Aufgrund seiner Vielseitigkeit und langen Historie der medizinischen Nutzung profitiert der Ginseng davon überproportional.

Tabelle 2: Ginsenosidstrukturen (Ara (p) = Arabinose, Pyranoseform, Ara (f) = Arabinose, Furanoseform, Glc = Glucose, GlcA = Glucuronsäure, Rha = Rhamnose, Xyl = Xylose).

20 (S)-Protopanaxadiol – Glycosid	R ₁	R ₂	
	Ra ₁	β -D-Glc ² - β -D-Glc	β -D-Glc ⁶ - α -L-Ara (p) ⁴ -Xyl
	Rb ₁	β -D-Glc ² - β -D-Glc	β -D-Glc ⁶ - β -D-Glc
	Rb ₂	β -D-Glc ² - β -D-Glc	β -D-Glc ⁶ - α -L-Ara (p)
	Rb ₃	β -D-Glc ² - β -D-Glc	β -D-Glc ⁶ -Xyl
	Rc	β -D-Glc ² - β -D-Glc	β -D-Glc ⁶ - α -L-Ara (f)
	Rd	β -D-Glc ² - β -D-Glc	β -D-Glc
20 (S)-Protopanaxatriol – Glycosid	R ₃	R ₂	
	Re	β -D-Glc ² - α -L-Rha	β -D-Glc
	Rf	β -D-Glc ² - β -D-Glc	H
	Rg ₁	β -D-Glc	β -D-Glc
	Rg ₂	β -D-Glc ² - α -L-Rha	H
	Rh ₁	β -D-Glc	H
	pentacycl. Oleanolsäure – Glycosid	R ₁	R ₄
	Ro	β -D-GlcA ² - β -D-Glc	β -D-Glc

Im Chinesischen wird die Ginsengwurzel *rénshēn* genannt, was übersetzt einerseits „Menschen-Wurzel“ bedeutet (Abbildung 1) und andererseits als Synonym für Manneskraft stehen kann.

Abbildung 1. Ginsengwurzeln (mit freundlicher Genehmigung der Wischmann Florafarm GmbH, Walsrode, Deutschland), Ginsengpflanze mit Wurzel und Ginsenganbau der Firma FloraFarm Ginseng in Walsrode.



Vor allem in Asien scheint der Ginseng eine medizinische Allzweckwaffe gegen viele Krankheiten zu sein. Die Wirkstoffe in der Pflanze sollen stimulierende, adaptogene sowie herzstärkende Eigenschaften haben und somit gegen Stress, Alterung (Rg_1 und Rb_1)¹⁷, Krebs, Impotenz, Allergien, Thrombose, Gedächtnisschwäche, Rekonvaleszenz, Arteriosklerose, Diabetes, Abwehrschwäche, Haut- und Haarproblemen usw. helfen.^{2,12,18-23} In der westlichen Welt werden einige Wirkungen kritisch betrachtet, da zahlreiche Studien aus Asien stammen und schwierig zu überprüfen sind.

Die Wirkung von Ginseng tritt nicht sofort ein. Positive Effekte hängen von der Qualität sowie einer Einnahmedauer von mehreren Monaten ab. Es kann quasi als ein Propy-

laktikum über einen längeren Zeitraum eingesetzt werden. Zu beachten sind Nebenwirkungen im Zusammenhang mit Diabetes und Bluthochdruck, da manche Inhaltsstoffe die Blutgerinnung verändern können.

Angeboten werden weißer und roter Ginseng. Die Einteilung hängt von der Verarbeitungsweise ab. Beim weißen Ginseng werden die frisch geernteten Wurzeln gewaschen und anschließend getrocknet. Die natürliche helle Farbe bleibt erhalten. Um den roten Ginseng zu erhalten, werden die weißen Wurzeln nach dem Waschen mit heißem Wasserdampf behandelt. Nach dem Trocknen färbt sich die Rinde rötlich, was durch das Karamellisieren des enthaltenen Zuckers hervorgerufen wird. Der rote Ginseng steht für die sexuelle Stimulation und Kraftsteigerung.^{1,3}

Ginseng bzw. Ginsengprodukte werden in 35 Ländern der Erde vertrieben. Die jährliche Produktion beträgt mehr als 80.000 Tonnen. Der Umsatz mit Ginsengprodukten erreicht ein Marktvolumen von mehr als 2 Mrd. Dollar.^{24,25} Ginseng gehört damit zu den wirtschaftlich wichtigsten Naturheilpflanzen auf der Welt. Die Wildform ist sehr selten geworden. Sehr große und gut erhaltene Pflanzen waren früher wertvoller als Gold und nur Herrschern vorbehalten. Auch heute noch werden stattliche Preise in Asien erzielt (bis zu 30.000 Dollar für sehr große und gut erhaltene Wildpflanzen). Der umsatzstärkste Markt für Ginseng und Ginsengprodukte ist Korea. Die Popularität in der koreanischen Kultur ist so stark verwurzelt, dass Ginseng aus dem Alltag nicht wegzudenken ist. Es existiert sogar ein eigenes Institut in Korea (Korean Research Institute, Daejeon) für die Erforschung von Ginseng sowie das Journal of Ginseng Research (ginsengres.org, Korea).

Um den stetig steigenden Bedarf zu decken, wird Ginseng hauptsächlich kommerziell angebaut. Die Hauptanbaugebiete sind China, Südkorea, Kanada und die USA.²⁴ In Deutschland wird Ginseng hauptsächlich in Walsrode von der Firma Florafarm angebaut und vertrieben. Ein sehr wichtiges Kriterium für die Qualität der Ginsengwurzeln ist die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe, die vor allem abhängig vom Alter und den Wachstumsbedingungen der Pflanze sind.²⁶⁻²⁸ Die Pflanze bevorzugt halbschattige Verhältnisse und muss deshalb künstlich beschattet werden. Die Konzentration der Ginsenosiden nimmt mit dem Alter der Pflanze zu. Obwohl man nach vier Jahren schon ernten kann und der Anbau mühsam sowie zeitintensiv ist, wird qualitativ hochwertiger Ginseng meist erst nach fünf bis sieben Jahren geerntet.²⁸

Um den hohen Bedarf an qualitativ hochwertigen Ginseng zu decken, wurde in Korea der hydroponische Anbau entwickelt. Diese Anbaumethode in Gewächshäusern ermöglicht eine verkürzte Kultivierungsperiode (drei Jahre). Hier sind viele Faktoren die den Anbau

negativ beeinflussen, wie z. B. Schädlinge, Licht, Temperatur, Feuchtigkeit, Pestizide und CO₂-Gehalt kontrollierbar. Der Unterschied zum Feldanbau liegt allerdings in der Komposition der Ginsenoside.¹⁹

In freier Natur bevorzugt die Pflanze nährstoffreiche und wasserspeichernde Böden an schattigen Berghängen mit hoher Luftfeuchtigkeit (Korea und Mandschurei). Ihre Wurzel wächst jährlich um ca. 1 cm und kann bis zu einer Tiefe von 50 cm reichen. Die Farbe der Rinde reicht von hellgelb bis hellbraun und das Wurzelinnere ist weiß. Sie blüht erst ab dem dritten Jahr mit gelb-weißen Blüten, die doldenförmig an der Sprossspitze angeordnet sind. Die maximale Wuchshöhe kann bis zu 80 cm betragen. Am Stängel trägt sie lange gestielte, handförmige Blätter. Die Früchte (Abbildung 1) haben eine intensive rote Farbe.³

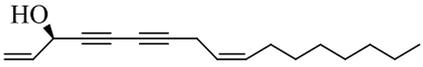
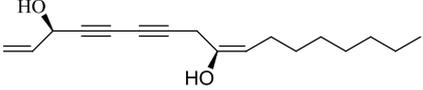
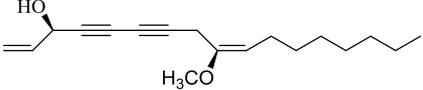
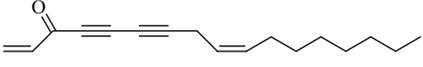
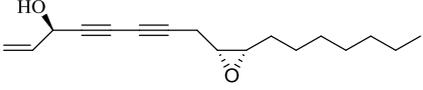
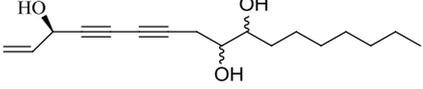
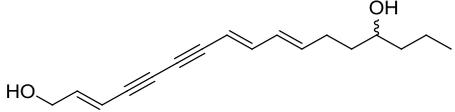
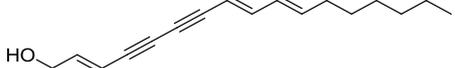
1.2 Polyacetylene in *Panax ginseng* C. A. Meyer

Ginseng enthält neben den Ginsenosiden weitere sehr interessante bioaktive Naturstoffe, darunter die Polyacetylene, die ebenfalls einen wichtigen Beitrag zur universalen Heilwirkung leisten. Polyacetylene sind pflanzeneigene Abwehrstoffe gegen Pilze und andere Pflanzenpathogene. Pflanzen, die z. B. Panaxynol und ähnliche Polyacetylene enthalten, zeigen eine gesteigerte Resistenz gegen Infektionen mit verschiedenen Pilzarten. Im Falle einer Infektion mit einem Pilz kommt es deshalb nur zu einer leichten Erhöhung der Konzentration an Polyacetylenen.^{29,30} Das besondere an dieser Substanzklasse sind dreifach Bindungen, die z. T. instabil sind und zu oxidativen, photolytischen und pH-abhängigen Zerfall neigen.

Bedeutende Vertreter dieser Stoffklasse sind Panaxynol, Panaxydol und Falcarindiol (Tabelle 3). Sie treten in Pflanzen, Moosen und Flechten, Meeresalgen, Meereschwämmen, Manteltieren, Insekten, Fröschen und in Spuren auch im Menschen auf.^{31,32}

In den letzten Jahren werden vor allem in Meeresorganismen faszinierende neue Polyacetylene entdeckt. Zurzeit sind mehr als 2000 Polyacetylene bekannt, davon kommen mehr als 1000 in der Pflanzenfamilie der Asteraceae vor. In hohen Konzentrationen findet man sie in der Gruppe der Apiaceae z. B. in Karotten, Fenchel, Petersilie und Sellerie und in der Gruppe der Araliaceae z. B. in *P. ginseng* C. A. Meyer.^{31,33} Bislang sind mehr als 16 Polyacetylene in *P. ginseng* C. A. Meyer bekannt.³⁴ Aufgrund ihrer starken Bioaktivität sind die C₁₇-Polyacetylene Panaxynol und die Epoxidvariante Panaxydol (Tabelle 3) lukrative Targetmoleküle für medizinische Zwecke.³⁵

Tabelle 3: Pharmakologisch interessante Polyacetylene.

<p>Panaxynol/Falcarinol^{29-31,35-48}</p> 	<p>Anti-Inflammatorisch Hemmung der Thrombozytenaggregation Anti-Bakteriell Anti-Fungal Cytotoxizität gegen viele Krebszellen (in vitro/ vivo) In hohen Dosen neurotoxisch Kontaktallergen</p>
<p>Falcarindiol^{29,31,35,37,46,49}</p> 	<p>Anti-Inflammatorisch Hemmung der Thrombozytenaggregation Anti-Bakteriell Anti-Fungal In hohen Dosen neurotoxisch Kontaktallergen</p>
<p>Falcarindiol-8-methylether³⁵</p> 	<p>Cytotoxizität gegen einige Krebszelllinien</p>
<p>Falcarinon^{29,35}</p> 	<p>Nicht Allergen Kaum Pharmakologische Aktivität</p>
<p>Panaxydol^{30,31,35}</p> 	<p>Cytotoxizität gegen viele Krebszellen</p>
<p>Panaxytriol^{30,31,35}</p> 	<p>Cytotoxizität gegen viele Krebszellen</p>
<p>Oenanthotoxin^{31,35}</p> 	<p>Hochgiftig → Neurotoxizität</p>
<p>Oenanthetol³⁵</p> 	<p>Strukturell verwandt zu Oenanthotoxin, aber keine Toxizität</p>

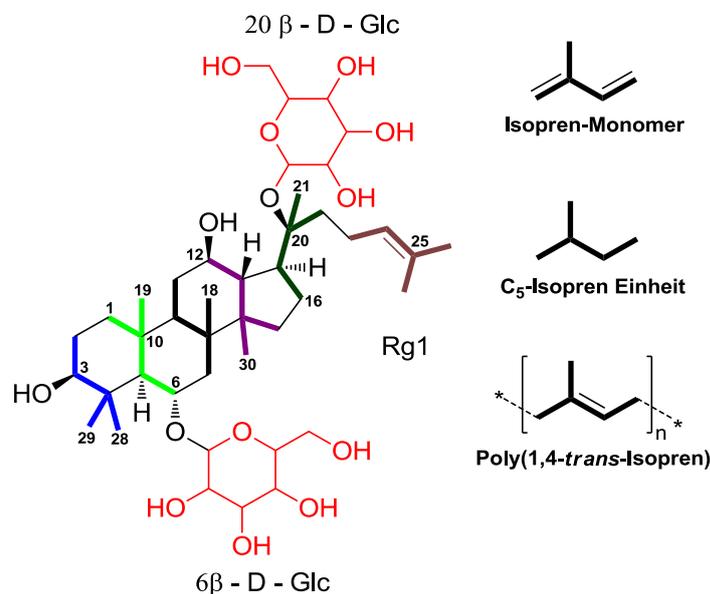
Einer der wichtigsten Vertreter dieser Substanzklasse, das Panaxynol, wurde zuerst 1964 von Takahashi et al. in den Wurzeln von *P. ginseng* C. A. Meyer isoliert und Panaxynol genannt.⁵⁰ 1966 wurde der gleiche Naturstoff von Bohlmann aus *Falcaria vulgaris* Bernh. isoliert und Falcarinol genannt.⁵¹ Schließlich wurde der Naturstoff ein Jahr später noch in *Daucus carota* L. gefunden und Carotatoxin genannt.^{52,53} Somit gibt es drei verschiedene Namen für den gleichen Naturstoff.

Die medizinische Anwendung von reinen Polyacetylenen ist nicht direkt möglich, da sie instabil sind und in höheren Konzentrationen Allergien auslösen. Panaxynol zeigt jedoch in physiologisch relevanten Konzentrationen *in vitro* einen ausgeprägten cytotoxischen Effekt gegen einige Krebslinien.

1.3 Biosynthese von Terpenoiden

Terpenoide (Isoprenoide) sind strukturell und stereochemisch sehr variabel und aus C₅-Isopreneinheiten (z. B. Ginsenoside; Abbildung 2) aufgebaut.

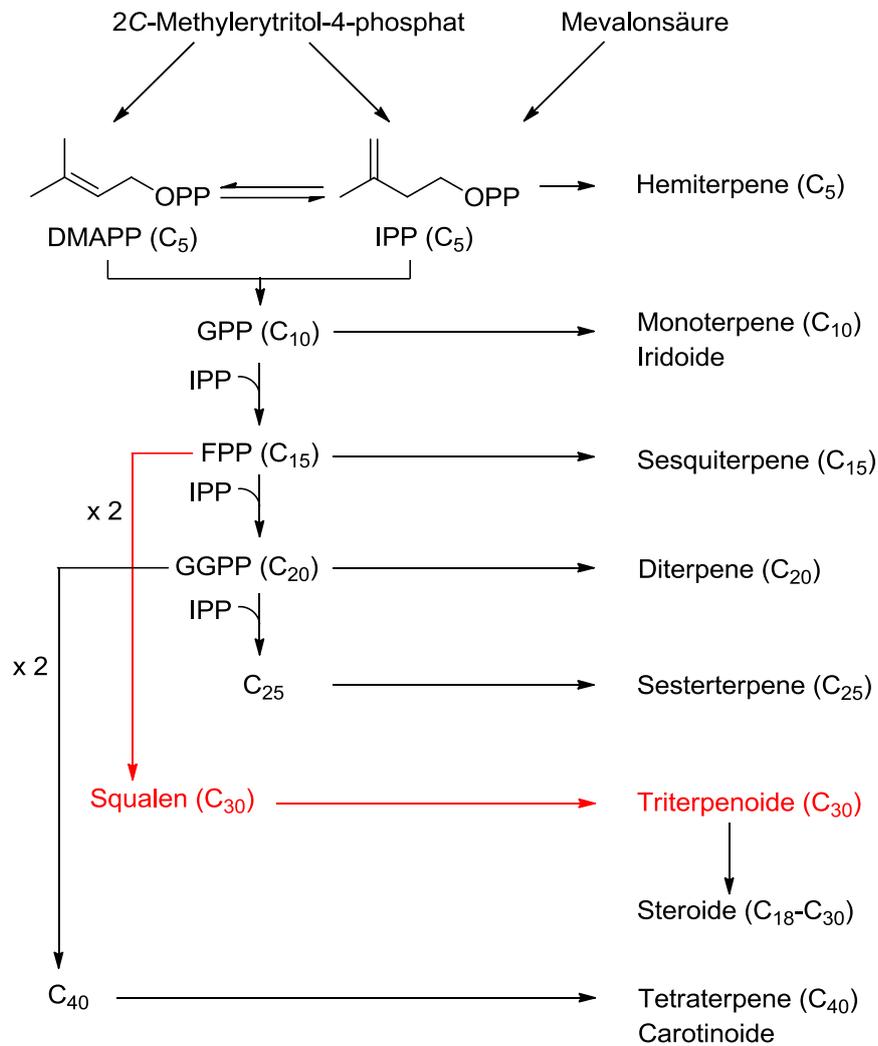
Abbildung 2. Ginsenosid (z. B. Rg₁) aufgebaut aus C₅-Isopreneinheiten (farbige Bindungen; Zuckereinheiten in rot).



Sie stellen die größte Gruppe der Naturstoffe dar und werden hauptsächlich in Hemiterpene (C₅), Monoterpene (C₁₀), Sesquiterpene (C₁₅), Diterpene (C₂₀), Sesterterpene (C₂₅), Triterpene (C₃₀; z. B. Ginsenoside) und Tetraterpene (C₄₀; z. B. Carotinoide) eingeteilt

(Abbildung 3). Bislang sind mehr als 70.000 Terpene bzw. terpenoide Strukturen in der Natur bekannt.⁵⁴⁻⁵⁶

Abbildung 3. Bildungsweg und Klassifikation der Terpenoide (rot: Bildungsweg der Ginsenoside).



Die Biosynthese von Terpenoiden ist essentiell für einen lebenden Organismus.⁵⁷ Man kann Naturstoffe in primäre und sekundäre Metabolite einteilen. Primäre Metabolite sind für den Organismus lebenswichtig, während sekundäre Metabolite für das Überleben des Organismus nicht zwingend notwendig sind.⁵⁸ Terpene treten in beiden Klassen auf. Das Interesse an dieser Naturstoffgruppe ist seit ihrer Entdeckung enorm, da sie zahlreiche Aufgaben im Organismus übernehmen wie z. B. in der Fortpflanzung, Regulation von Wachstum und Entwicklung, in der Verteidigung gegen Insekten, in der Photosynthese, bei Signalübertragungen und als Pheromone.⁵⁷⁻⁵⁹ Obwohl die Ginsenoside zahlreiche potente

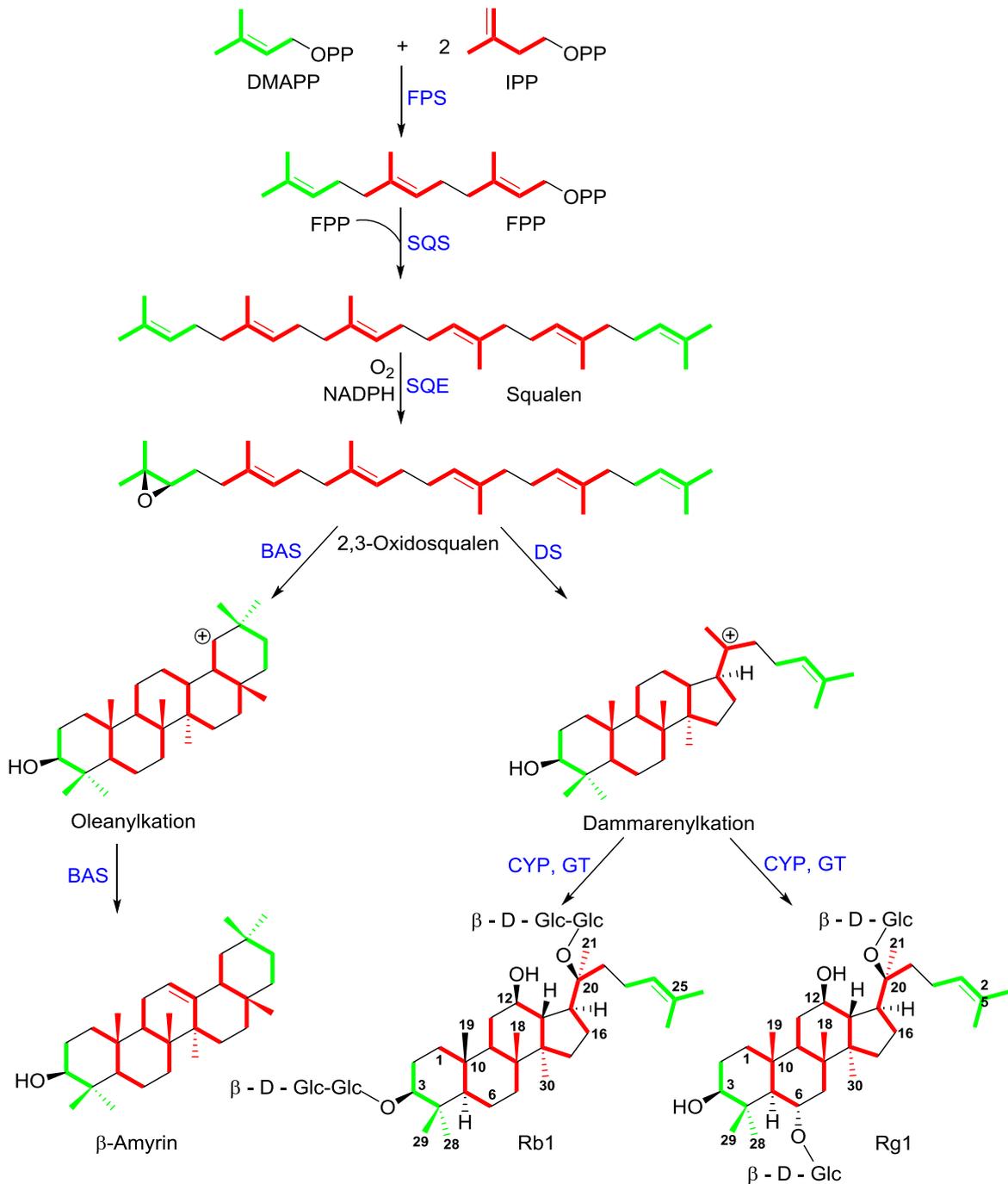
pharmakologische Effekte zeigen, ist die Biosynthese dieser Naturstoffe im Ganzen noch nicht verstanden.^{8,60-65}

Alle Terpenoide sind aus den zwei einfachen C₅ strukturisomeren Vorstufen Isopentenylidiphosphat (IPP) und dem Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) aufgebaut und können über zwei unabhängigen Biosynthesewegen erzeugt werden: den Mevalonat- (MVA-Weg) und den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg).⁶⁶ Diese Moleküle können über eine Kopf-Schwanz-Reaktion (1'-4-Reaktion) verknüpft werden.⁶⁷

Im ersten Schritt entsteht durch Kondensation Geranyldiphosphat (C₁₀; GPP), welches mit einem weiteren Molekül IPP zu Farnesyldiphosphat (C₁₅; FPP) reagieren kann. Das FPP kann mit einem weiteren Molekül IPP zu Geranylgeranyldiphosphat (C₂₀; GGPP) kondensieren. FPP und GGPP können anschließend in einer „Kopf-Kopf-“, oder „Schwanz-Schwanz-Reaktion“ zahlreiche Vorläufermoleküle wie z. B. das Squalen für viele wichtige Naturstoffe bilden (Abbildung 3).^{58,64,68,69} Squalen kann in einem sauerstoffabhängigen Prozess zu (*S*)-2,3-Oxidosqualen⁷⁰ oxidiert werden, das z. B. über ein Oleanyl-Kation zu β-Amyrin^{71,72} oder über ein Dammarenyl-Kation⁷³⁻⁷⁶ zu Triterpenoiden weiterreagiert (Abbildung 4). Der Hauptteil der zahlreichen Triterpengerüste in Pflanzen stammen aus der Cyclisierung der „chair-chair-chair-boat“-Konformation von (*S*)-2,3-Oxidosqualen, katalysiert durch die Oxidosqualen-Cyclase, zum C-20 Dammarenyl-Kation. Das Dammarenylintermediat (über Dammarenediol-II, katalysiert durch Dammarenediol-II-Synthase) wird über nachfolgende Oxidationsschritte (z. B. katalysiert über Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen)⁷⁷⁻⁷⁹ und Glycosylierungen^{62,63} zu den Ginsenosiden umgewandelt. Bei einigen dieser Prozesse bestehen große Wissenslücken. Die variablen Reaktionsmöglichkeiten in der Isoprenoidsynthese, katalysiert durch hochspezifische Enzyme, ermöglichen somit für den jeweiligen Organismus die Bedarfsdeckung mit relevanten Naturstoffen.⁵⁴

„Die Klassiker“ unter diesen häufig vorkommenden Naturstoffen (Abbildung 5) sind die Carotinoide wie z. B. das β-Carotin (Provitamin A), Phytol, Steroide wie z. B. das Cholesterin und die Hopanoide wie z. B. das Bacteriohopantetrol.⁵⁸ Die bekannteste Terpenoidverbindung ist das Cholesterin, das bereits im späten 18. Jahrhundert in Gallensteinen gefunden wurde. Dieses Molekül kommt in allen tierischen Zellen vor und ist ein wichtiger Vorläufer für viele Steroidhormone und Gallensäuren. Es ist ein wichtiger Baustein der Plasmamembran und trägt zur dessen Stabilität bei. Zusätzlich unterstützt es den Transport von Signalmolekülen zwischen dem intra- und extrazellulären Raum.^{56,80,81}

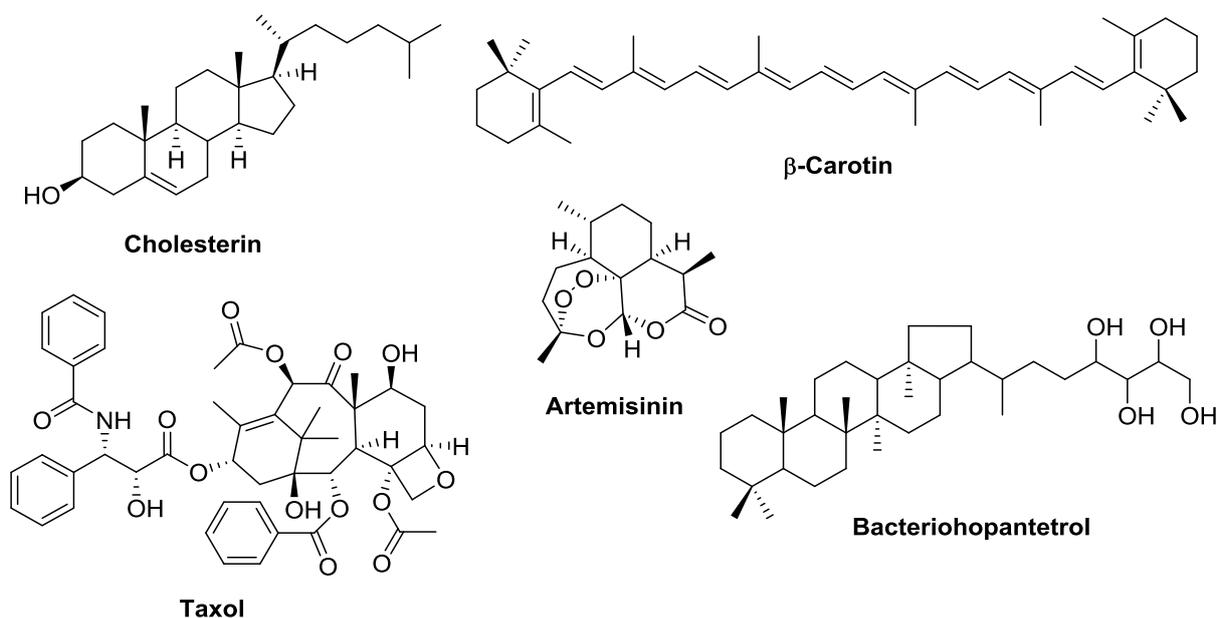
Abbildung 4. Biosyntheseweg von β -Amyrin und der Ginsenoside Rb₁ und Rg₁. Die Isoprenoideinheiten aus DMAPP sind grün und die aus IPP rot gekennzeichnet. Die an den verschiedenen Reaktionen beteiligten Enzyme^{60,64,71,75} sind (blaue Schrift): BAS, β -Amyrin-Synthase; CYP, Cytochrome P450 abhängige Oxygenasen; DS, Dammarenediol-II-Synthase; FPS, Farnesylpyrophosphat-Synthase; GT, Glycosyl-Transferasen; SQS, Squalen-Synthase; SQE, Squalen-Epoxidase (oder Monooxygenase).



Vom 19. bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts wurde wichtige Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Naturstoffchemie geleistet. Hervorzuheben sind die fundierten Arbeiten von Otto Wallach⁸², der die Isoprenregel zuerst erkannte und später zur Formulierung der *biogenetischen Isoprenregeln* durch Ruzicka ab den 20iger Jahren des 20. Jahrhunderts führte.⁸³ Allein die Strukturaufklärung von Cholesterin dauerte mehr als 100 Jahre.

Ein weiteres sehr wichtiges Ziel war und ist die Aufklärung der Biosynthese von Naturstoffen. Vor allem die Möglichkeit der Isotopenmarkierung ab den 30iger Jahren des 20. Jahrhunderts liefert in experimenteller Hinsicht viele wichtige Beiträge zur Aufklärung von Biosynthesewegen.^{54,84-86} Von historischer Bedeutung ist die Aufklärung der CO₂-Fixierung bei der Photosynthese durch Bassham und Calvin durch den Einsatz von radioaktiv markiertem ¹⁴CO₂.⁸⁷ Nach und nach setzte sich die Aufklärung von Biosynthesewegen mit stabilen Isotopen (vor allem Deuterium und ¹³CO₂), aufgrund stetig verbesserter NMR- und Massenspektrometrie-Techniken durch.

Abbildung 5. Wichtige medizinisch relevante Terpenoid-Verbindungen.



Viele dieser Naturstoffe sind von ökonomischen Interesse und werden als Pharmazeutika, Parfümstoffe, Gewürze, Pigmente, Agrochemikalien, Pestizide, Desinfektionsmittel usw. verwendet.^{88,89} Wichtige Vertreter im medizinischen Bereich (Abbildung 5) sind z. B. der Naturstoff Paclitaxel⁹⁰⁻⁹² (Handelsnamen Taxol[®]), der aus der pazifischen Eibe gewonnen und als Chemotherapeutikum in der Krebsbehandlung eingesetzt wird, sowie Artemisinin^{93,94} aus dem einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*) zur Behandlung von

Malaria. So sind in den letzten Jahren viele dieser Naturstoffe in den Fokus der Forschung und Industrie gekommen. Einige der Terpene stehen bereits in der „Warteschlange“ als potentielle Blockbuster in der Pharmaindustrie. Darunter auch die Ginsenoside. Deren Bedeutung hat aufgrund der vielseitigen pharmakologischen Wirkungen rasant zugenommen. Das Interesse an der Entschlüsselung der Biosynthesewege ist enorm, da man den hohen Bedarf an größeren Mengen bestimmter Terpene im industriellen Maßstab durch biotechnologische Verfahren ermöglichen möchte. So könnte es z. B. in Zukunft möglich sein, gentechnisch veränderte Ginsengpflanzen auf eine höhere Produktion der wichtigen Terpene und in Hinblick auf die Anbaumethode zu optimieren. Weitere Möglichkeiten sind der Anbau von gentechnisch veränderten Nutzpflanzen zum Zwecke der Produktion von bestimmten Terpenen und die Umsetzung von biotechnologischen Ideen in mikrobiellen Fermentationssystemen.⁸⁹

1.3.1 Der Mevalonat-Biosyntheseweg

Anfang der 50er Jahre führten die Entdeckungen einiger wichtiger Vorläufermoleküle in der Biosynthese der Isoprenoide zur Formulierung des Mevalonatweges (MVA).^{84,95-99} Dieser Biosyntheseweg kommt in den meisten Eukaryoten bevorzugt im Cytosol, in Archaeen und einigen Bakterien vor. Für die Entdeckungen des Mechanismus und der Regulation des Stoffwechsels von Cholesterin und Fettsäuren wurden Konrad Bloch und Feodor Lynen 1964 der Nobelpreis für Medizin verliehen. Zunächst entsteht durch Kondensation zweier Acetyl (Ac)-CoA Moleküle Acetoacetyl (Acac)-CoA. Durch Addition eines dritten Ac-CoA-Moleküls entsteht das 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA. Dieses Molekül wird dann durch die NADPH-abhängige HMG-CoA-Reduktase zu Mevalonsäure (MVA) reduziert. Durch zweifache Phosphorylierungsreaktionen (ATP-abhängig) und anschließender Decarboxylierungs-/Eliminierungsreaktionen wird MVA zu IPP umgesetzt. Das IPP kann durch Isomerisierung in DMAPP umgewandelt werden (Abbildungen 3 und 6).^{58,84,100,101}

1.3.2 Der Methylerythritolphosphatweg (MEP)-Biosyntheseweg

Der MVA-Biosyntheseweg wurde über Jahrzehnte als der einzige Syntheseweg in lebenden Organismen betrachtet. Doch diese Anschauung wurde in den frühen 90iger Jahren u. a durch die Pionierarbeiten von Rohmer und Arigoni revidiert und ein neuer

Biosyntheseweg, der MEP- bzw. Desoxyxylulose-5-phosphat (DXP)-Weg zur Bildung der wichtigen Vorläufermoleküle IPP und DMAPP etabliert.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Der MEP-Weg ist in höheren Pflanzen im Plastid der Zelle lokalisiert. Er tritt außerdem in vielen Bakterien, Algen, Cyanobakterien und apikomplexen Parasiten (z. B. *Plasmodium falciparum*) auf.^{104,106} In Pflanzen sind beide Biosynthesewege, der MVA- (Cytosol) und der MEP-Weg (Plastid) vorhanden.^{56,107} Dieser Biosyntheseweg startet mit der Kondensation von Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und einer C₂-Einheit aus Pyruvat zu 1-Desoxyxylulosephosphat (DXP), welches anschließend über Umlagerung und Reduktion zu 2-C-Methyl-D-erythrityl-4-phosphat (MEP) umgesetzt wird. Nach vier weiteren Reaktionsschritten erfolgt die Umsetzung zu (*E*)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyldiphosphat (HMBPP). Im letzten Schritt des DXP-Wegs wird HMBPP zu einer Mischung aus IPP und DMAPP reduziert (Abbildung 6).^{93,104,105,108-114}

Allgemein ist zu sagen, dass Pflanzenterpene im Cytosol der Zelle (z. B. Pytosterole) dem Mevalonatweg zugeschrieben werden. Stammen die Terpene (z. B. Monoterpene, Diterpene inklusive Phytol und Carotinoide) dagegen aus den Plastiden der Pflanze, so werden sie dem MEP-Weg zugeordnet.^{57,115,116} Diese Einteilung hat sich mittlerweile bewährt, da sie auch experimentell für viele Terpene untermauert worden ist. Die Ergebnisse stammen aber hauptsächlich aus Markierungsexperimenten mit Pflanzenzellkulturen.¹⁰⁵ Diese Klassifizierung kann aber nicht als starr betrachtet werden, da ein Austausch („Crosstalk“) der MVA und MEP abstammenden Vorläufermolekülen zwischen den Zellkompartimenten stattfinden kann. In diesem Fall erhält man Pflanzenterpene mit gemischten Bausteinen.^{93,117-121}

Die Biosynthese der Ginsenoside erfolgt vermutlich im Cytosol, was auf ein MVA-Weg basierendes Vorläufermolekül hinweist. Experimentelle Belege über die Biosynthese von Triterpenen sind aber recht spärlich. In einer aktuellen Arbeit wurde gezeigt, dass das Lupeolgerüst in Lupeol-3-(3'*R*-hydroxy)-stearat (Procrim b) in der Pflanze *Pentalinon andrieuxii* aus der Familie der Apocynaceae von der Halbinsel Yukatan in Mexiko ausschließlich über den MVA-Weg aufgebaut wird.¹²² Im sogenannten „Indischen Ginseng“ *Withania somnifera* wird der Aufbau der Withanolide dagegen anscheinend von beiden Biosynthesewegen unterstützt.¹²³ Zu einer ähnlichen Aussage kommt man in einer aktuelleren Untersuchung mit Haarwurzelkulturen von *P. ginseng*, denen jeweils Mevinolin oder Fosmidomycin, die spezifische Inhibitoren des MVA- bzw. MEP-Weges sind, zugesetzt wurde.¹²⁴ In einer anderen aktuellen Untersuchung wurde zur effizienten

Wie bereits erwähnt, erzeugt die Isoprenoidbiosynthese eine der größten Naturstoffklassen. Daher liegt es nahe, diese Naturstoffklasse auf medizinisch interessante Vertreter zu untersuchen, um die Entwicklung von neuen Wirkstoffen zu ermöglichen.

Obwohl der MEP-Weg in Säugern de facto nicht auftritt, ist er für das Überleben und Wachstum von vielen pathogenen Bakterien, Pflanzen und protozoen Parasiten essentiell. Die beteiligten Enzyme dieses Biosynthesewegs sind somit potentielle Ziele für die Entwicklung von antibakteriellen Arzneistoffen, Herbiziden und Antimalaria-Medikamenten.¹¹³ Ein interessantes Beispiel gegen Malaria ist das natürliche Antibiotikum Fosmidomycin, welches aus *Streptomyces lavendulae* isoliert wurde und das IspC-Enzym im MEP-Weg hemmt.

1.4 Isotopolog-Profilng

Die Untersuchungsmethoden zur Erforschung der Biosynthesewege inklusive der metabolen Flüsse haben in den letzten Jahrzehnten rasante Fortschritte gemacht. Das Verständnis der physiologischen Prozesse in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren hat dadurch zugenommen. Eine Schlüsseltechnologie zur Ermittlung der metabolischen Aktivitäten in biologischen Organismen ist das Isotopolog-Profilng, das auf den Einbau von stabilen isotoopenmarkierten Verbindungen (z. B. $^{13}\text{CO}_2$, Zucker und Aminosäuren) beruht und somit zentrale Informationen über den Markierungsgrad in den Schlüsselmetaboliten liefert.

Begünstigt wurde das Isotopolog-Profilng durch die kontinuierliche Verbesserung der Auflösung bei Strukturproblemen mittels NMR-Spektroskopie in Kombination mit einer hochsensitiven GC/MS-Analytik. Die NMR-Spektroskopie ermöglicht die Bestimmung und Quantifizierung der genauen Position der künstlich angereicherten ^{13}C -Isotope in einem markierten Molekül, wobei die Ermittlung der absoluten ^{13}C -Anreicherung im NMR-Spektrum über ^1H - ^{13}C -Satelliten oft schwierig ist (aufgrund von Überlagerungen, z. B. bei Vollmarkierung).

Die äußerst sensitive GC/MS (sehr geringe Probenmengen möglich) erlaubt die genaue Berechnung des absoluten ^{13}C -Überschuss in verschiedenen Metaboliten. Mit der GC/MS-Analytik kann man also recht gut die Isotopomer-Zusammensetzung ermitteln, dafür gestaltet sich die genaue positionelle Bestimmung der ^{13}C -Atome deutlich schwieriger. Die Kombination beider Techniken liefert bei den Perturbationsuntersuchungen in Verbindung

mit dem Isotopolog-Profilung sehr gute Ergebnisse, um Biosynthesewege von zahlreichen biologischen Systemen zu verstehen.^{86,127-134}

Naturstoffe enthalten von Natur aus stabile Isotope. Die wichtigsten sind Kohlenstoff (^{12}C und ^{13}C), Wasserstoff (^1H und ^2H), Stickstoff (^{14}N und ^{15}N) sowie Sauerstoff (^{16}O , ^{17}O und ^{18}O), wobei die Häufigkeit untereinander variiert und schwerere Isotope seltener vorkommen. So beträgt das Verhältnis zwischen den zwei stabilen Isotopen des Kohlenstoffs (^{12}C und ^{13}C) nahezu 99:1 (1,1 mol % für das ^{13}C -Isotop). Diese sind in der Regel zufällig in den verschiedenen Molekülpositionen anzutreffen. Naturstoffe oder Intermediate in Pflanzen bestehen aus einer komplexen Mischung von verschiedenen Isotopologen und Isotopomeren. Isotopologe sind Moleküle, die sich in ihrer Isotopenkomposition unterscheiden und Isotopomere sind Moleküle mit der gleichen Anzahl von Isotopen.¹²⁹

Die natürliche Häufigkeit in einem Isotopolog ein ^{13}C -Atom anzutreffen, liegt also bei 1,1 mol %. Diese sinkt für eine doppelte ^{13}C -Anreicherung in einem Isotopolog auf 0,012 mol %. Das Auftreten von zwei ^{13}C - ^{13}C -Atomen ist also ca. 1/100 so wahrscheinlich im Vergleich zu ^{13}C - ^{12}C und nur ca. 10^{-4} so wahrscheinlich wie ^{12}C - ^{12}C in einem natürlichen unmarkierten Molekül.¹³⁵ Die Anzahl der Isotopologe kann über die Formel $z = 2^n$ (n = Anzahl der Kohlenstoffatome im Molekül) berechnet werden. Dank dieser natürlichen statistischen Verteilung kann man davon ausgehen, dass bei Markierungsexperimenten der multiple Einbau von ^{13}C in den metabolen Stoffwechselprozess aus angereicherten ^{13}C -Quellen stammt.

Die NMR-Spektroskopie spielt ihre Stärken vor allem bei C_2 - und C_3 -Einheiten aus, da die unmittelbaren Auswirkungen von den Nachbaratomen ausgehen. Diese spezifischen Kopplungen von einem oder zwei direkten Nachbarn führen zu einer Aufspaltung des Signals (Satelliten um das Zentralsignal). Treten Fernkopplungen im ^{13}C -Spektrum auf, so sieht man (bei entsprechender Auflösung) Satelliten um die Hauptsatelliten des Zentralsignals. Für die untere Nachweisgrenze von ^{13}C -Markierungen genügt in der NMR-Spektroskopie eine 1,5-fache Anreicherung gegenüber der natürlichen Anreicherung (1,1 %) aus. Einen schnellen Überblick liefern Schlüsselmetabolite, insbesondere die Aminosäuren. Diese aussagekräftigen Metabolite kann man schnell aus den Zellen extrahieren und ihr ^{13}C -Isotopologprofil bestimmen.¹²⁹

2 Aufgabenstellung

Ginseng ist aufgrund seiner vielseitigen Anwendbarkeit gegen viele Krankheiten eine sehr begehrte Ressource für Naturheilstoffe in Forschung und Pharmazie geworden. Die Wirkungsmechanismen auf den menschlichen Stoffwechsel sind noch nicht voll entschlüsselt und werden deshalb rege erforscht. Die biologische Wirkung wird vor allem der Anwesenheit der Ginsenoside zugeschrieben.

Der kultivierte Anbau von Ginseng ist zeit- und kostenintensiv sowie von zahlreichen Bedingungen wie Boden, Klima, Lichtverhältnissen, Schädlingen usw. abhängig.¹³⁶ Wegen dieser Nachteile wurden in den letzten Jahren u. a. Wurzelkulturen von *P. ginseng* unter Laborbedingungen entwickelt, um einen höheren Gehalt an Ginsenosiden zu erzielen.¹³⁶⁻¹³⁸

Die Resultate sind unbefriedigend, da der Gehalt an Ginsenosiden in Kulturen unter Laborbedingungen deutlich niedriger ausfällt als bei Pflanzen unter natürlichen Wachstumsbedingungen.¹³⁹

Eine attraktive Alternative sind stoffwechseleränderte Mikroorganismen für die Produktion von wichtigen Naturstoffen, wie z. B. das zur Produktion von Ginsenosid-aglycone metabolisch veränderte *S. cerevisiae* (Backhefe).^{56,125,126} Es besteht ausserdem eine Wissenslücke bei dem Biosynthesemechanismus und den beteiligten Enzymen zur Bildung der Ginsenoside.^{8,60-65} Daher ist ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit die Untersuchung sowie das Verständnis des zentralen Bildungsweges der Ginsenoside in ganzen Pflanzen von *P. ginseng*. C. A. Meyer unter Feldbedingungen in einem retrobiosynthetischen Ansatz. Hierbei soll bestimmt werden, ob die C₅-Isopren-Einheiten in den Ginsenosiden vom MVA- oder vom MEP-Stoffwechsel stammen. Gleichzeitig soll untersucht werden, ob beide Stoffwechselprozesse ablaufen und ob ein „Crosstalk“ zwischen diesen stattfindet.^{93,117-121} Dafür wurden wachsende Pflanzen unterschiedlichen Alters (1 bis 6 Jahren) mit markiertem Kohlendioxid auf dem Feld begast (Pulsphase) und anschließend einige Tage unter normalen Bedingungen in ihrem natürlichen Umfeld belassen (Chasephase). Danach wurden die Pflanzen vorsichtig geerntet und die Isotopenverteilung in den Hauptginsenosiden Rg₁ und Rb₁¹⁴⁰, sowie weiteren Metaboliten (Aminosäuren, Zucker und Polacetylene) mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie im Labor bestimmt. Die so erhaltenen Daten sollten Informationen für den Bildungsweg von den frühen Photosyntheseprodukten bis hin zu den Triterpenen sowie Polyacetylenen liefern, um gleichzeitig den Erfolg der ¹³CO₂-Markierungsmethode unter Feldbedingungen zu belegen. Diese Informationen liefern außerdem wichtige Erkenntnisse

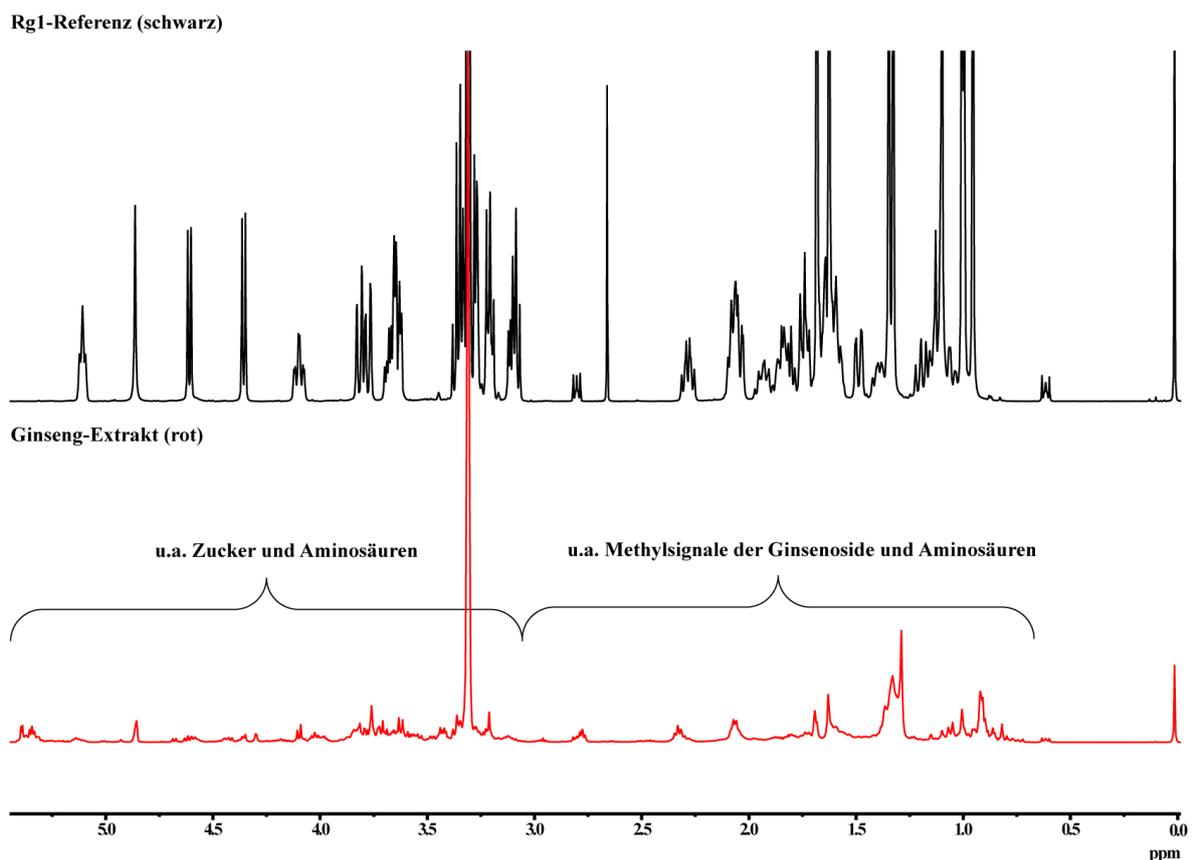
über den Einfluss von Puls- und Chasezeiten auf den Markierungsgrad in der Pflanze. Dadurch können zukünftige Markierungsexperimente besser geplant und optimiert werden. Die verwendete Untersuchungsmethode unter realen Wachstumsbedingungen soll Modellcharakter haben und Grundlage für das Verständnis der Biosyntheseprozesse von wichtigen Zielmolekülen in Naturheilpflanzen und Nutzpflanzen werden. Diese Erkenntnisse könnten dazu dienen, den Anbau zu optimieren oder biotechnische Verfahren zur Produktion von Ginsenosiden, Polyacetylenen und anderen Naturheilstoffen im Labormaßstab zu entwickeln.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Schnelle Qualitätskontrolle mittels Ribolyser-Extraktion

Zur schnellen und einfachen Überprüfung der Qualität von Pflanzenmetaboliten eignet sich sehr gut die Ribolyser-Extraktion mit anschließender ^1H -NMR-Spektroskopie. Für einen Überblick über die verschiedenen Metabolitgruppen, wie z. B. Aminosäuren, Zuckern, organischen Säuren und Terpenoiden (Abbildung 7) ist der Vergleich mit den Arbeiten von *Yang et al.* auf diesem Gebiet sehr nützlich.^{141,142}

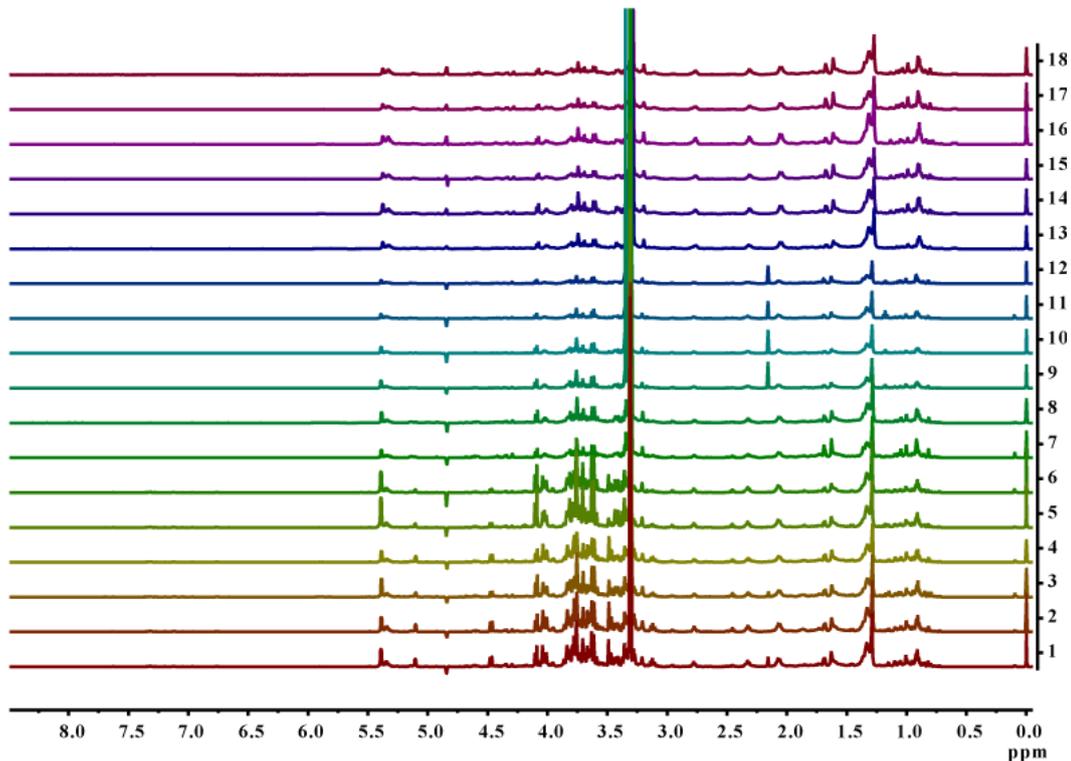
Abbildung 7. ^1H -NMR-Spektrum (in $\text{D}_4\text{-MeOD}$) für eine CO_2 -markierte Ginsengwurzel (rot: aus Ribolyser-Extraktion) sowie für das Ginsenosid Rg_1 als Referenz (schwarz).



Durch Standardisierung der Extraktionsbedingungen (Einwaage, Lösungsmittelmenge usw.) kann durch den Vergleich der ^1H -NMR-Spektren der Ginsengpflanzen vorab eine Vorauswahl der einzelnen Pflanzen für die weiteren Untersuchungen getroffen werden.

Wie in Abbildung 8 gut zu erkennen ist, sind Schwankungen in den charakteristischen Metabolitregionen (Zucker und Ginsenoside) ersichtlich.

Abbildung 8. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_4\text{-MeOD/TSP}$) der Ribolyser-Extrakte der sechsjährigen Ginsengpflanzen 1-18 (Wurzel; siehe auch Tabelle 12 im Anhang).



3.2 Gehaltsbestimmung der Ginsenoside

Für die Gehaltsbestimmungen wurden die Wurzeln und Blätter der Pflanzen (Tabelle 12, im Anhang) untersucht. Hierbei wurde der Gehalt der am häufigsten vorkommenden Ginsenoside (Rb_1 , Rg_1 , Rf und Re) über die HPLC bestimmt (Tabelle 4 und 5). Die Schwankungen innerhalb den Pflanzen beruhen auf natürliche Faktoren (z. B. Bodenqualität, Boden- und Luftfeuchtigkeit, Sonnenstrahlung und Schattenbedingungen). Im Einklang mit der Literatur sind auch die deutlich höheren Werte an Rg_1 und Re in den Blättern der Pflanze.^{27,143} In den verschiedenen Wachstumsphasen der Pflanze treten Schwankungen in der Zusammensetzung der Ginsenoside auf, die vermutlich auf die entsprechende Funktion bzw. Bedarf beruhen. Insgesamt nimmt der Gehalt aber mit zunehmendem Alter der Pflanze zu.²⁸ Der Ginsenosidgehalt im amerikanischen Ginseng ist deutlich höher als in *P. ginseng* C. A. Meyer. Das Ginsenosid Rf kommt nur im asiatischen

Ginseng vor, wohingegen das Ginsenosid 24(*R*)-Pseudoginseng F_{11} nur im amerikanischen Ginseng enthalten ist. Diese beiden Ginsenoside werden zur Unterscheidung herangezogen.^{13,144,145} Weiterhin unterscheidet sich das Verhältnis der Ginsenoside Rb_1 und Rg_1 im asiatischen Ginseng von dem im amerikanischen Ginseng. Die Menge an Rg_1 im amerikanischen Ginseng ist im Gegensatz zum asiatischen Ginseng sehr niedrig. Die hier ermittelten Werte zeigen, dass die Qualität der *P. ginseng* C. A. Meyer Pflanzen auf den Feldern in Walsrode (Florfarm GmbH, Deutschland), nach sechs Jahren geerntet, aufgrund des hohen Gehaltes von Ginsenosiden und anderen Naturstoffen von sehr hoher Qualität sind.^{146,147}

Tabelle 4: Ginsenosidgehalt in *P. ginseng* Pflanzen (unbegast und für je eine Pflanze bestimmt).

Ginsenosid-Gehalt [mg/g]					
Ginenosid	Rb_1	Rf	Rg_1	Re	Gesamt
Wurzel (1-jährig)	5.1	2.4	16.7	28.7	52.9
Wurzel (2-jährig)	3.8	3.9	16.2	3.4	54.6
Wurzel (3-jährig)	45.0	5.7	24.0	22.9	97.6
Wurzel (5-jährig)	25.5	4.2	26.7	32.8	89.2
Beeren (6-jährig)	9.1	0.8	4.3	224.7	238.9
Stiel (6-jährig)	8.1	1.7	38.8	28.7	77.3

Tabelle 5: Ginsenosidgehalt in 19 sechsjährigen *P. ginseng* Pflanzen für Wurzel und Blätter (begast, siehe auch Tabelle 12 im Anhang).

Ginsenosid-Gehalt [mg/g]											
Wurzel	Rb ₁	Rf	Rg ₁	Re	Gesamt	Blätter	Rb ₁	Rf	Rg ₁	Re	Gesamt
1	31.6	19.2	42.9	33.8	127.5	1	9.1	2.8	61.6	440.9	514.4
2	44.1	14.4	45.1	38.2	141.8	2	8.6	2.8	46.8	383.0	441.2
3	41.3	12.6	41.1	48.9	143.9	3	7.3	2.2	58.3	331.8	399.6
4	34.4	14.7	47.6	30.0	126.7	4	5.8	2.6	42.3	312.7	363.4
5	30.4	19.2	53.9	39.3	142.8	5	8.0	4.4	59.7	382.8	454.9
6	-	-	-	-		6	3.4	2.4	85.7	85.2	176.7
7	33.1	9.5	31.4	35.4	109.4	7	19.9	3.3	55.0	386.7	464.9
8	18.9	4.8	21.3	15.0	60.0	8	10.5	3.1	150.6	414.5	578.7
9	15.3	7.7	32.1	10.4	65.5	9	13.3	2.7	100.2	611.3	727.5
10	7.7	2.0	15.5	7.7	32.9	10	16.5	0.9	99.6	610.3	727.3
11	19.1	5.5	20.2	18.8	63.6	11	19.8	1.4	89.5	599.1	709.8
12	10.2	1.7	13.9	8.6	34.4	12	15.7	1.5	69.1	647.6	733.9
13	-	-	-	-		13	9.0	1.1	53.6	495.5	559.2
14	9.1	3.0	16.1	12.0	40.2	14	11.8	1.5	82.0	552.7	648.0
15	28.0	5.3	27.1	24.6	85.0	15	24.8	2.0	118.0	606.7	751.5
16	49.7	7.8	32.2	36.7	126.4	16	15.1	2.4	336.5	159.0	513.0
17	12.4	1.6	7.9	26.4	48.3	17	28.5	0.5	84.5	442.8	556.3
18	27.3	7.7	29.1	29.2	93.3	18	10.7	1.6	84.5	365.3	462.1
19	38.3	11.4	27.0	33.9	110.6	19	11.2	1.4	61.5	256.9	331.0

Wurzeln 6 und 13 komplett verbraucht

3.3 Isotopolog-Profilung

3.3.1 Einfluss der Puls- und Chasezeiten auf die ^{13}C -Einbauraten in Alanin

Experimente mit $^{13}\text{CO}_2$, vor allem unter Feldbedingungen, sind am besten geeignet um den Stoffwechsel von Pflanzen unter natürlichen physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Die Markierungsprofile in den sekundären Metaboliten repräsentieren quasi ungestörte Verhältnisse für den Stofffluss in der Pflanze (*in planta*). Ein weiterer Vorteil ist, dass weniger Artefakte entstehen, welche die Auswertung erschweren können. Artefakte werden von metabolen Stressreaktionen hervorgerufen, welche durch aktives Eingreifen (Abschneiden von Pflanzenteilen) in laufende Markierungsversuche oder durch das Verwenden von Nicht-physiologischen Substraten in Zellkulturexperimenten entstehen.

Die Kernstrategie hinter diesem $^{13}\text{CO}_2$ -Versuchsansatz ist die, im Zuge des Calvin-Zyklus, photosynthetische Erzeugung von ausreichend ^{13}C -vollmarkierten Zuckern wie z. B. [$^{13}\text{C}_3$]Triose - und Pentosephosphat, und anderer Zucker während der Inkubationszeit mit $^{13}\text{CO}_2$ („Pulse-Periode“). Diese ^{13}C -vollmarkierten Fixierungsmetabolite werden im Zuge des Metabolismus weiter verstoffwechselt. Die ^{13}C -Markierungen werden dann, aufgrund zahlreicher Biosyntheseprozesse, im Organismus verbreitet. Die anschließende „Chase-Periode“ erlaubt es der Pflanze einige Tage unter Normalbedingungen nichtmarkierte Intermediate zu produzieren. Diese ^{13}C - und ^{12}C -Intermediate von der entsprechenden Periode dienen der Pflanze als Vorläufer für weitere biosynthetische Prozesse. Die logische Konsequenz aus der Kombination von diesen Vorläufereinheiten ist eine spezifische Mischung aus nichtmarkierten und mehrfach markierten ^{13}C -Isotopologen in den Produkten. Die Untersuchung der Isotopologprofile erfolgt über die quantitative NMR-Spektroskopie und GC/MS-Spektrometrie. Der experimentelle Ansatz und die Untersuchungsmethode haben sich schon in vielen Experimenten bewährt.^{93,109,110,122,129} Auch hier lässt die Zuordnung der Isotopologprofile mittels GC/MS Rückschlüsse auf die benutzten biosynthetischen Bildungswege zu. Das Verständnis über die biosynthetischen Bildungswege ist die Voraussetzung, um die Produktion von interessanten Naturstoffen über optimierte biotechnologische Verfahren zu ermöglichen.¹⁴⁸

Zur Ermittlung der optimalen „Puls- und Chaseperiode“ wurden *P. ginseng* C. A. Meyer-Pflanzen einige Stunden in einer mit $^{13}\text{CO}_2$ (700 ppm) angereicherten Atmosphäre ausgesetzt. Über die Stomata der Blätter wird das $^{13}\text{CO}_2$ über Diffusion aufgenommen und

in verschiedenen Biosyntheseprozessen in wichtige organische Substanzen umgewandelt. Die Markierungsexperimente mit $^{13}\text{CO}_2$ wurden mit einer transportablen Einheit durchgeführt, die im Eigenbau durch Dr. N. Schramek vor einigen Jahren zusammengestellt wurde (Abbildung 9).¹²⁹

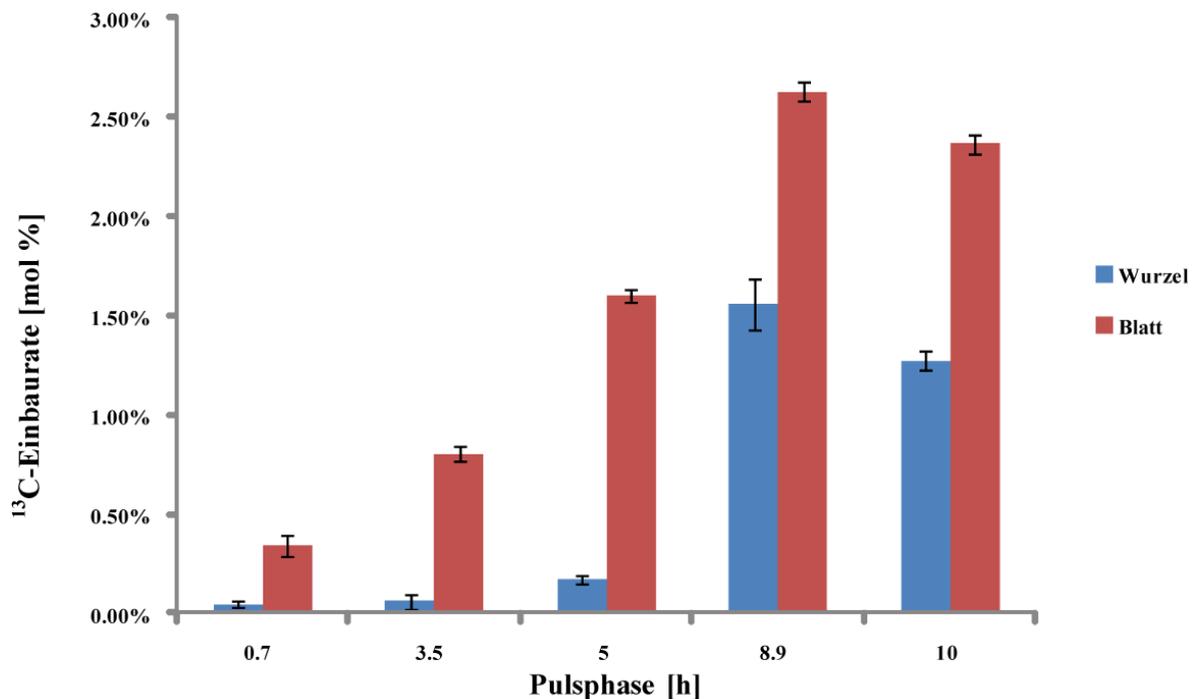
Abbildung 9. Transportable Einheit für die $^{13}\text{CO}_2$ -Markierungsexperimente von *P. ginseng* unter Feldbedingungen.



Das Endprodukt beim Glucoseabbau über Glycolyse ist Pyruvat, das ein wichtiger Zwischenmetabolit auf dem Bildungsweg zu den Ginsenosiden darstellt. Dieses kann direkt oder über den Citratsäurezyklus oder über AcetylCoA/Citratsäurezyklus (Abbildung 13) zur Aminosäure Alanin reagieren. Die Analyse des Markierungsmusters von Alanin liefert nicht nur indirekt wertvolle Informationen über die Vorläufermoleküle, sondern auch Informationen über den Einfluss der Puls- und Chasezeiten. Zunächst wurde der Einfluss der Pulsphase auf die ^{13}C -Einbaurrate in Wurzel und Blätter untersucht. Hierfür wurden Pflanzen, zur besseren Vergleichbarkeit, mit der gleichen Chasephase verwendet (Abbildung 10, Tabelle 12, im Anhang). Die graphische Auswertung der Ergebnisse zeigt sehr deutlich, dass eine kurze Pulsphase auch zu einer deutlich geringeren Anreicherung mit ^{13}C , vor allem in der Wurzel führt. Obwohl bei nahezu allen Pflanzen zu Beginn der Experimente morgens (vor allem in der ersten Stunde, Beobachtung) der Verbrauch an $^{13}\text{CO}_2$ am höchsten war, reicht die kurze Zeit nicht aus, um große Auswirkungen auf die ^{13}C -Einbaurrate zu haben. Morgens scheint die Pflanze eine verstärkte Photosynthese zu betreiben, die sich im Laufe des Tages einpendelt. Ein weiterer zusätzlicher Grund für die

verstärkte Photosynthese könnte vom Stressfaktor durch das Aufstülpen der Folie herühren. Die Blattgröße spielt für die Photosyntheserate zwar eine Rolle, aber die geringen Schwankungen in der Blattgröße sind für die sechsjährigen Pflanzen zu vernachlässigen. Weiterhin sieht man die Tendenz, dass die Anreicherung bei langen Pulsphasen (>7 h) wohl ein Maximum erreicht. Die Einbaurate in Alanin aus Blättern und Wurzeln ist bei Pflanzen, die mehr als 7 Stunden begast wurden, am höchsten. Die Werte für die Blätter sind durchwegs höher, da hier die Fixierung der ^{13}C -Atome im Zuge der Photosynthese stattfindet.

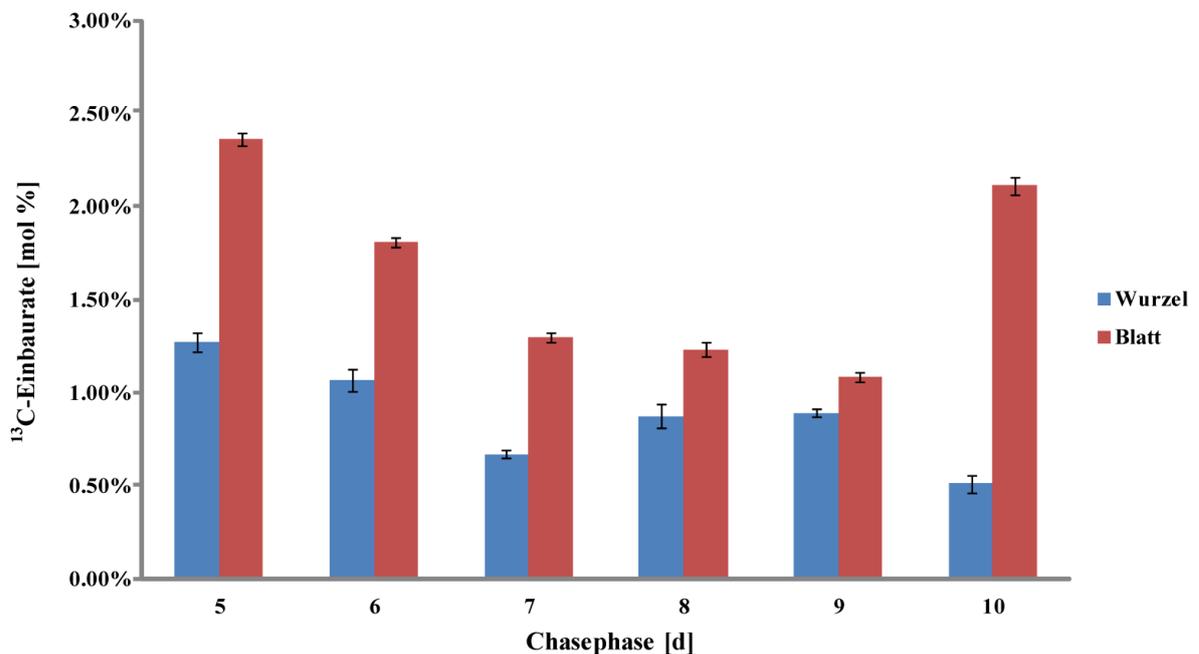
Abbildung 10. ^{13}C -Gesamtüberschuss in Alanin in Abhängigkeit von der Pulsphase. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben (aus drei unabhängigen GC/MS-Messungen).



Für den Einfluss der Chasephase (5 bis 10 Tage) wurden Pflanzen mit der gleichen Pulszeit untersucht. Ausnahme ist die Pflanze mit 5 Tagen Chasephase, die 10 Stunden mit $^{13}\text{CO}_2$ begast wurde. Die graphische Auswertung (Abbildung 11) für die ^{13}C -Gesamtüberschussrate für Alanin zeigt, dass lange Chaseperioden zu niedrigen Anreicherungen mit ^{13}C , vor allem in den Wurzeln, führt. Die Abnahme hängt wohl mit der „Verdünnung“ mit unmarkiertem $^{12}\text{CO}_2$ zusammen. In den Blättern findet nach 10 bis 19 Tagen (Abbildung 12) Chasephase eine scheinbar leicht erhöhte Biosynthese von markiertem Alanin statt. Die

stärkere Abnahme des ^{13}C -Gesamtüberschusses in den Blättern im Vergleich zu den Wurzeln resultiert wahrscheinlich aus der Tatsache, dass markierte Metabolite von ihrem Bildungsort in andere Teile der Pflanze (Stiele und Wurzel) transportiert werden (Abbildungen 11 und 12).

Abbildung 11. ^{13}C -Gesamtüberschuss in Alanin in Abhängigkeit von der Chasesphase. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben (aus drei unabhängigen GC/MS-Messungen).



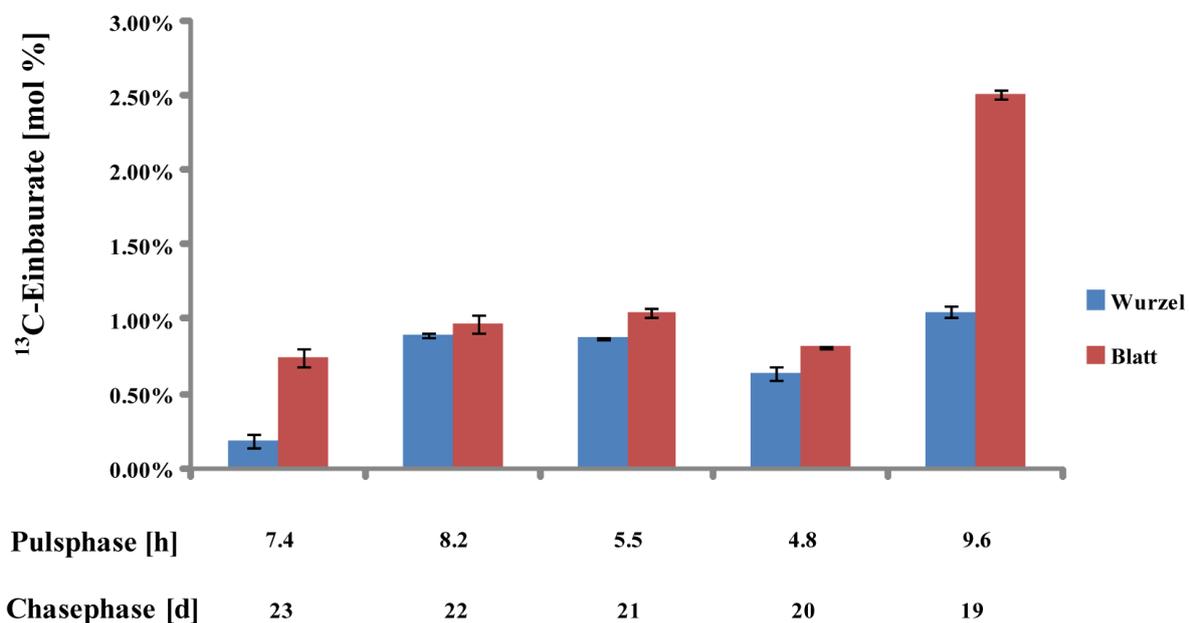
Sehr lange Chaseperioden führen zu einer niedrigen Anreicherung von ^{13}C in Alanin (Abbildung 12). Weiterhin führen lange Chaseperioden zu einer stärkeren „Verdünnung“ an ^{13}C -angereicherten Metaboliten (ab 23 Tagen).

Lange Pulszeiten (möglichst einen ganzen Tage) führen zu einer höheren Anreicherung in den Metaboliten. Die Wurzeln mit einer langen Pulsphase (> 7 h) und einer Chasephase zwischen 5 und 22 Tagen sind für die Untersuchung der Ginsenoside und anderer Sekundärmetabolite, im Hinblick auf einen hohen Markierungsgrad, am besten für die Untersuchung über die NMR-Spektroskopie geeignet.

Zu Beginn der Experimente war der Erfolg des experimentellen Ansatzes für die recht anspruchsvolle sechsjährige *P. ginseng* Pflanze nicht einzuschätzen, ob die relativ kurzen Pulsphasen zu spezifischen ^{13}C -Anreicherungen in den Wurzelmetaboliten und damit ihrer Detektierbarkeit führen. Diese Ergebnisse belegen das sehr schön und zeigen, dass die

Analyse der ^{13}C -Gesamtüberschussrate in Alanin (Aminosäuren) ein geeignetes Werkzeug für die Evaluierung von ^{13}C -Anreicherungen in Primär- und Sekundärmetabolite in der recht anspruchsvollen Pflanze *Panax* unter Feldbedingungen sind. Die Informationen über den Einfluss der Puls- und Chasezeiten auf die ^{13}C -Einbaurrate in Alanin können für zukünftige Feldexperimente verwendet werden und sind auf andere Pflanzen übertragbar.

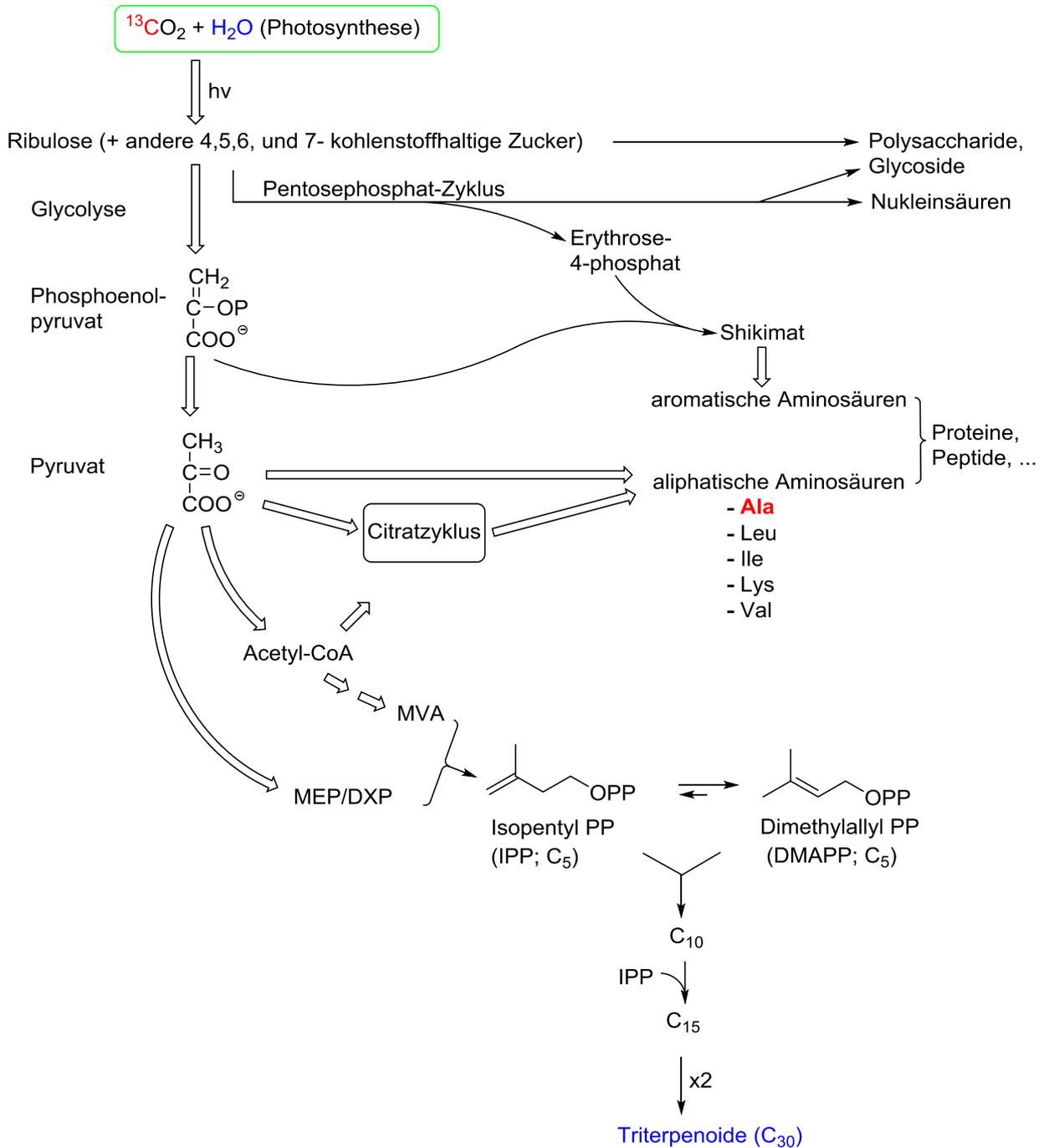
Abbildung 12. ^{13}C -Gesamtüberschuss in Alanin in Abhängigkeit von langen Chasephasen. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben (aus drei unabhängigen GC/MS-Messungen).



3.3.2 Analyse der proteinogenen Aminosäure Alanin aus der Wurzel

Einen schnellen qualitativen experimentellen Überblick bzw. die Überprüfung über den ^{13}C -Einbau von $^{13}\text{CO}_2$ in die Pflanze ist, wie bereits erwähnt, die Analyse von Aminosäuren über die GC/MS. Dafür wurden proteinogene Aminosäuren aus den Blättern und den Wurzeln in silylierte Derivate (Abbildungen 31 und 32, Material und Methoden) überführt und mittels GC/MS-Analyse untersucht. Die berechneten Daten aus der GC/MS-Analyse liefern wertvolle Informationen über den ^{13}C -Gesamtüberschuss in proteingebundenen Alanin. Das Ergebnis zeigt, dass Alanin dafür geeignet ist. Es wurde eine ^{13}C -Anreicherung zwischen 0,9 % und 1,6 % für Alanin aus der Wurzel berechnet, die nur leicht unter dem Wert für die Blätter liegen (Abbildungen 13 und 16).

Abbildung 13. Biosynthesesschema zur Bildung der Triterpenoide.



Sowohl in der Wurzel als auch in den Blättern rühren 50% des markierten Alanins von [U- $^{13}\text{C}_3$]Alanin her. Das ^{13}C -vollmarkierte Alanin kann als positive Kontrolle für die Bildung von [U- $^{13}\text{C}_3$]-Phosphoglycerat aus $^{13}\text{CO}_2$ während der Photosynthese betrachtet werden. Das [U- $^{13}\text{C}_3$]-Phosphoglycerat kann über [U- $^{13}\text{C}_3$]-GAP in [U- $^{13}\text{C}_3$]-Pyruvat umgewandelt werden, welches als Vorläufermolekül für [U- $^{13}\text{C}_3$]-Alanin und für [U- $^{13}\text{C}_2$]-Acetyl-CoA

dient (Abbildung 13). Aus den markierten [U- $^{13}\text{C}_2$]-Acetyl-CoA, [U- $^{13}\text{C}_3$]-Pyruvat sowie [U- $^{13}\text{C}_3$]-GAP stammen die Kohlenstoffeinheiten für die Bildung der Terpenoide über dem jeweiligen Biosyntheseweg (MEP- bzw. MVA-Weg). Die Daten belegen, dass das ^{13}C aus dem $^{13}\text{CO}_2$ in den Markierungsexperimenten, welches über die Blätter aufgenommen, innerhalb der Puls- und Chasephasen verstoffwechselt wurde und auch tatsächlich in die Wurzel von *P. ginseng* transportiert wurde. Die Analyse von Alanin liefert somit schnell einen Nachweis für den Erfolg des experimentellen Ansatzes und einen indirekten Anhaltspunkt für den möglichen Verlauf der Biosynthese der Terpenoide (Abbildung 13).

3.3.3 Analyse der Zucker

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der Aussagekraft von Markierungsexperimenten ist die Analyse der Zucker. Hierfür wurde Saccharose aus der Wurzel isoliert und mit ^{13}C -NMR und GC/MS analysiert.

Im ^{13}C -Spektrum (Abbildung 14; siehe auch Abbildungen 36 bis 40 im Anhang) sind die typischen Satelliten aus mehrfach ^{13}C -markierten Metaboliten (hier Saccharose) um die Zentralsignale klar zu sehen. In Abbildung 15 sieht man in einer vergrößerten Ansicht die ^{13}C -Satelliten und deren Zuordnungen. Anschließend wurden die beiden freien Zucker Glucose und Fructose, vorwiegend aus der Saccharose stammend, einer GC/MS-Analyse unterzogen, um einen zusätzlichen Hinweis für den Transfer von mehrfach ^{13}C -markierten Molekülen in der Photosynthese zu finden. Die GC/MS-Analyse zeigt, dass beide Zucker signifikante ^{13}C -Anreicherung mit ^{13}C -Überschusswerten von 2,3 % aufweisen. Somit sind ungefähr 30 % der markierten Glucose und Fructose vollständig ^{13}C -markiert (Abbildung 16). Der Aufbau dieser Zucker erfolgte also über $^{13}\text{C}_3$ -Substrate. Das ist ein schöner Hinweis dafür, dass die Bildung der Saccharose bzw. der freien Zucker Glucose und Fructose über mehrfach ^{13}C -markierte Fixierungsprodukte abgelaufen ist. Somit kann postuliert werden, dass diese Zucker-Isotopologe im Biosynthese-Prozess zu komplexen markierten Naturprodukten (z. B. Ginsenoside) weiterreagieren (Abbildung 13).

Die Daten belegen somit den Einbau von $^{13}\text{CO}_2$ in Wurzelmetabolite und zeigen dass mehrfach ^{13}C -markierte Vorstufen im Zentralstoffwechsel gebildet wurden, die zur Analyse der Ginsenosidbiosynthese notwendig sind.

Abbildung 14. ^{13}C -NMR-Spektrum von Saccharose aufgenommen in D_2O (die Satelliten sind mit Kreisen markiert).

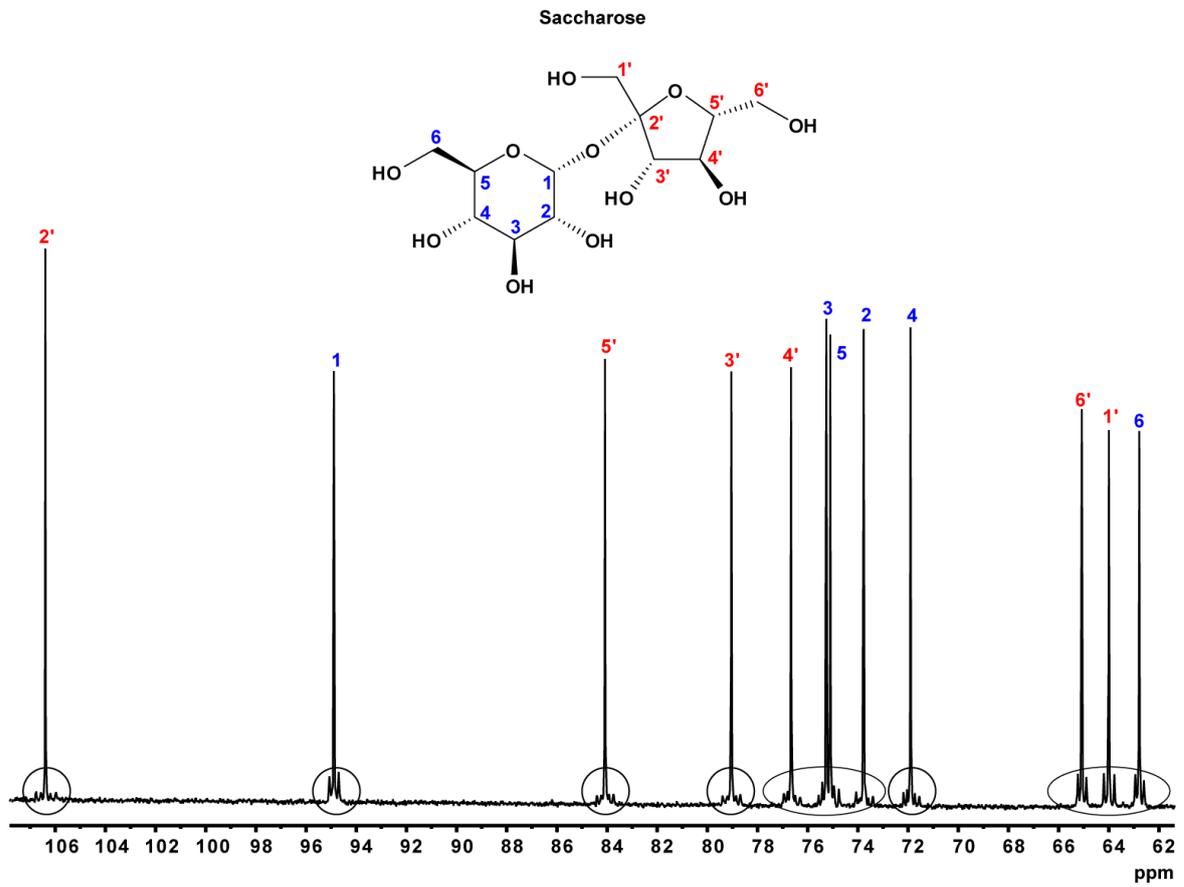


Abbildung 15. $^{13}\text{CO}_2$ -Markierte Saccharose. ^{13}C - ^{13}C -Kopplungen sind mit grün und schwarz angedeutet (grün: C_1 - C_2 -Kopplungen; schwarz: C_1 - C_2 - C_3 -Kopplungen). Diese ^{13}C - ^{13}C -Kopplungen sind in Form von Isotopologen mit den entsprechenden Farben in der Strukturformel von Saccharose angezeigt.

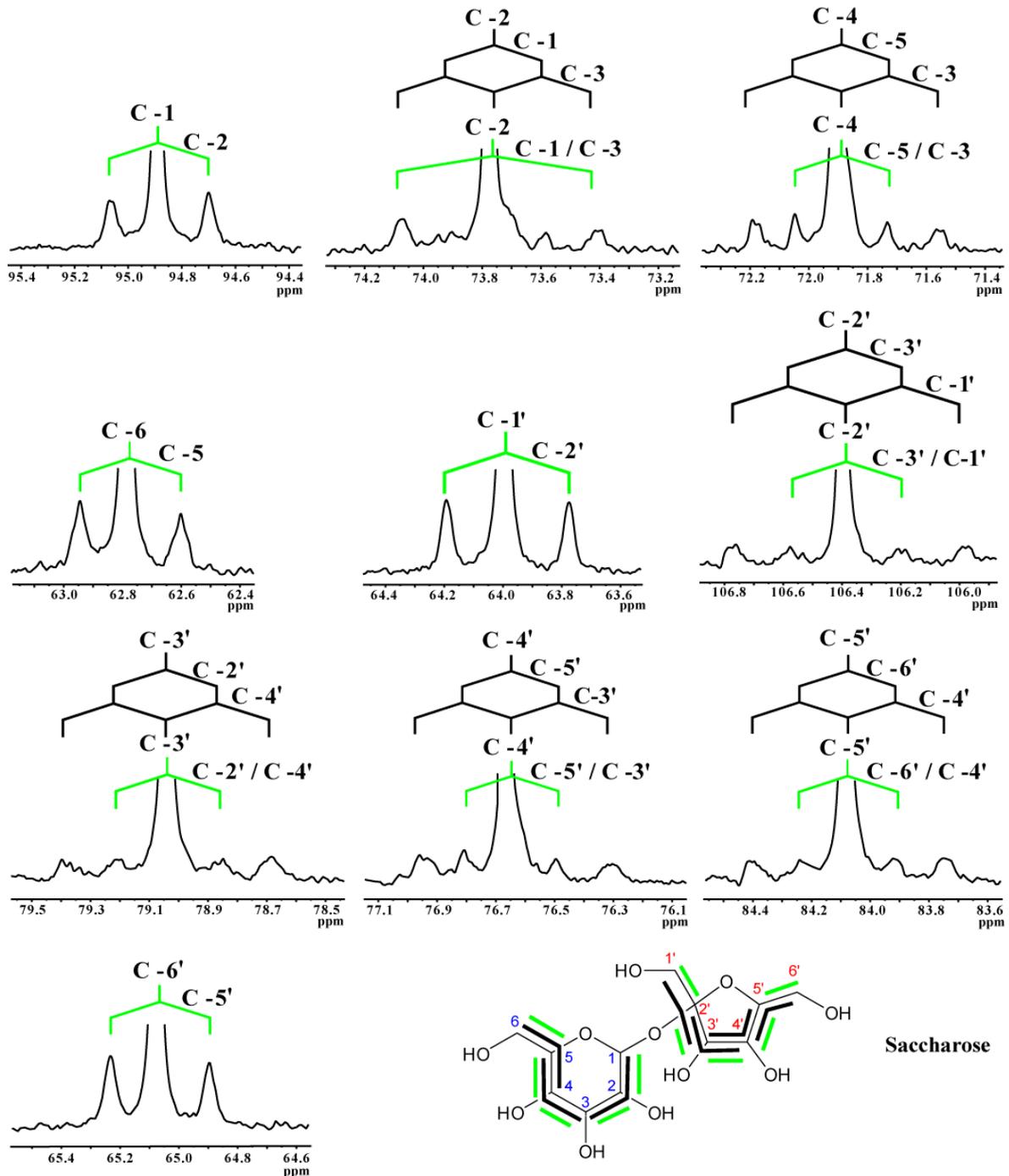
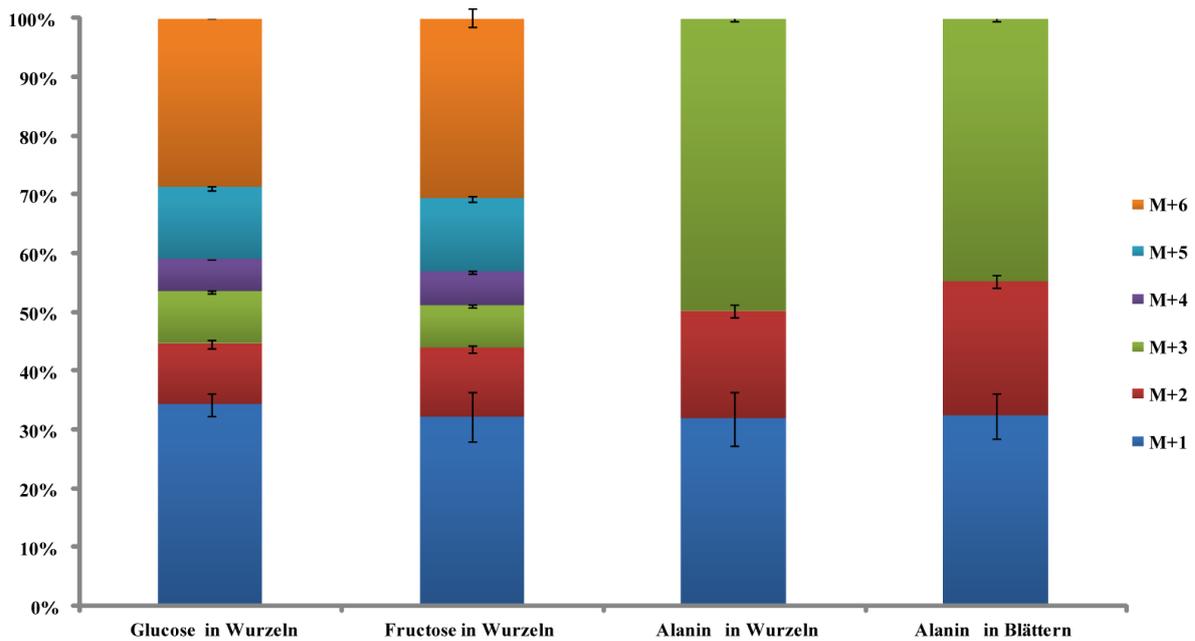


Abbildung 16. Hier sieht man den Beitrag der Isotopomere in proteingebundenem Alanin und der freien Zucker aus den Wurzeln und Blätter für $^{13}\text{CO}_2$ -markierte *P. ginseng*-Pflanzen (GC/MS-Analyse). Die Isotopomere sind mit M+1 bis M+6 angezeigt, die auch die Zahl der C-Atome im Molekül wiedergeben (in diesem Fall von C-1 bis C-6). Allgemein (M+X): ^{13}C -Excess(Überschuss)-Wert [mol%] des Fragmentions (M = Masse), in das X ^{13}C -Atome eingebaut wurden. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben (aus drei unabhängigen GC/MS-Messungen).

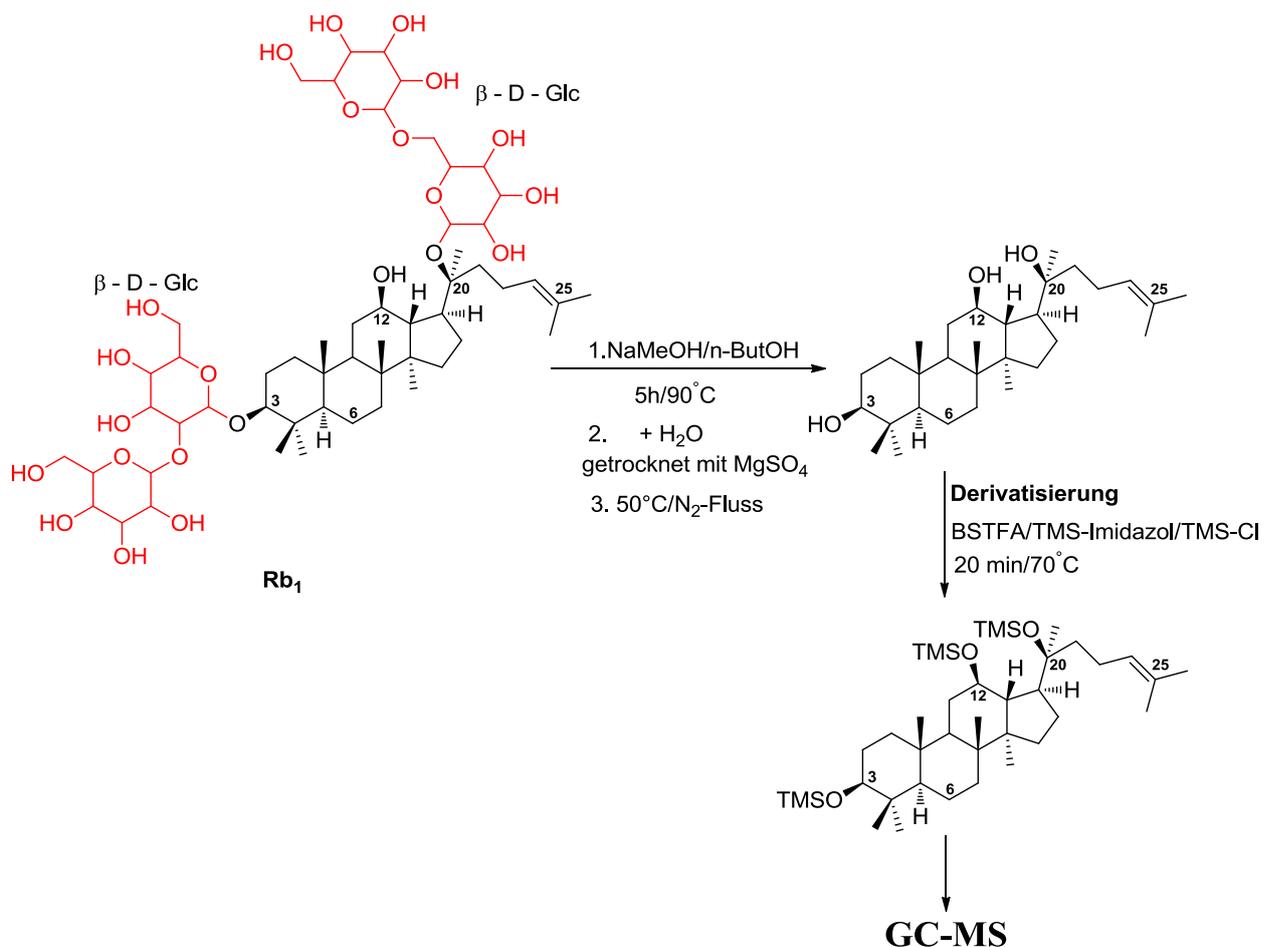


3.4 Biosynthese der Ginsenoside

3.4.1 Protopanaxatriol- und Protopanaxadiolanalyse

In den Wurzeln der sechs Jahre alten Pflanze *P. ginseng* C. A. Meyer sind die Ginsenoside Rb₁ (Protopanaxatrioltyp) und Rg₁ (Protopanaxadioltyp) am häufigsten vertreten. Es wurde in dieser Arbeit deshalb versucht eine Methode zur Untersuchung dieser zwei Grundtypen der Ginsenoside über die GC/MS zu etablieren. Die Analyse der GC/MS-Daten für die TMS-Derivate (Abbildungen 17 sowie 42 und 43, im Anhang) der Ginsenosidaglycone Protopanaxatriol und Protopanaxadiol (Rb₁ und Rg₁) lieferte einen ¹³C-Gesamtüberschuß von unter 1 %.

Abbildung 17. Alkalische Hydrolyse und anschließende Derivatisierung von Rb₁ für die GC/MS.



Gründe für die niedrige Anreicherung könnten unter anderem darin liegen, dass die alkalische Hydrolyse bzw. die anschließende Derivatisierung unvollständig ablaufen. Aufgrund dieser niedrigen ^{13}C -Anreicherung, die mit einer hohen Standardabweichung einhergeht und unter der Detektionsgrenze von 0,5 % liegt, wurde stattdessen die ^{13}C -Isotopenverteilung in den Ginsenosiden über die NMR-Spektroskopie bestimmt.

3.4.2 Isotopolog-Profilung der Ginsenoside Rb₁ und Rg₁ über NMR

Die hohe Reinheit der Ginsenoside Rg₁ und Rb₁, die über die HPLC (siehe Material und Methoden) isoliert wurden, sieht man sehr deutlich in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren (hier nur von Rg₁ gezeigt; Abbildungen 18 und 19). Zur Unterstützung der Signalzuordnungen wurden noch zweidimensionale Spektren (COSY, TOCSY, HMQC und HMBC) sowie noch INADEQUATE und 1,1-ADEQUATE Experimente (Abbildungen 21 und 22) verwendet. Die Signalzuordnungen für die Ginsenoside Rg₁ (Tabelle 7) und Rb₁ (Tabelle 8) stehen im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten in der Literatur.¹⁴⁹⁻¹⁵²

Abbildung 18. ^1H -NMR-Spektrum von Rg₁ aus dem $^{13}\text{CO}_2$ -Markierungsexperiment mit *P. ginseng* (in D₄-MeOD).

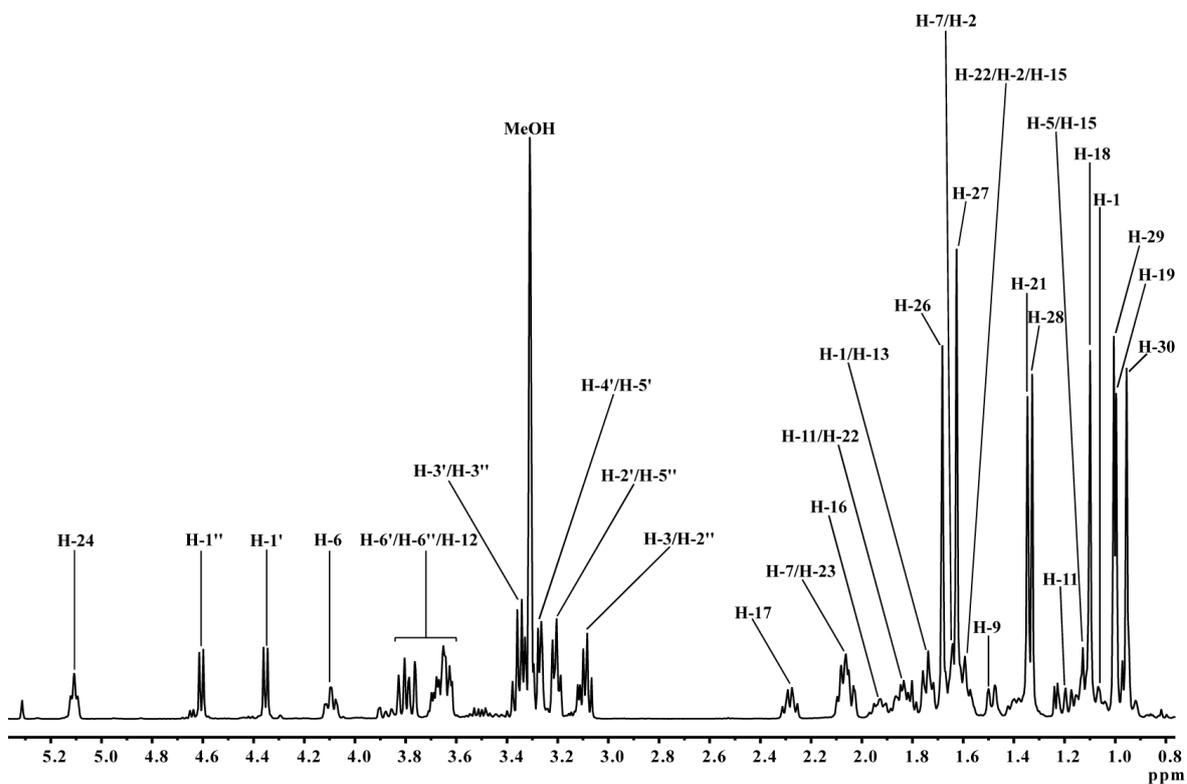
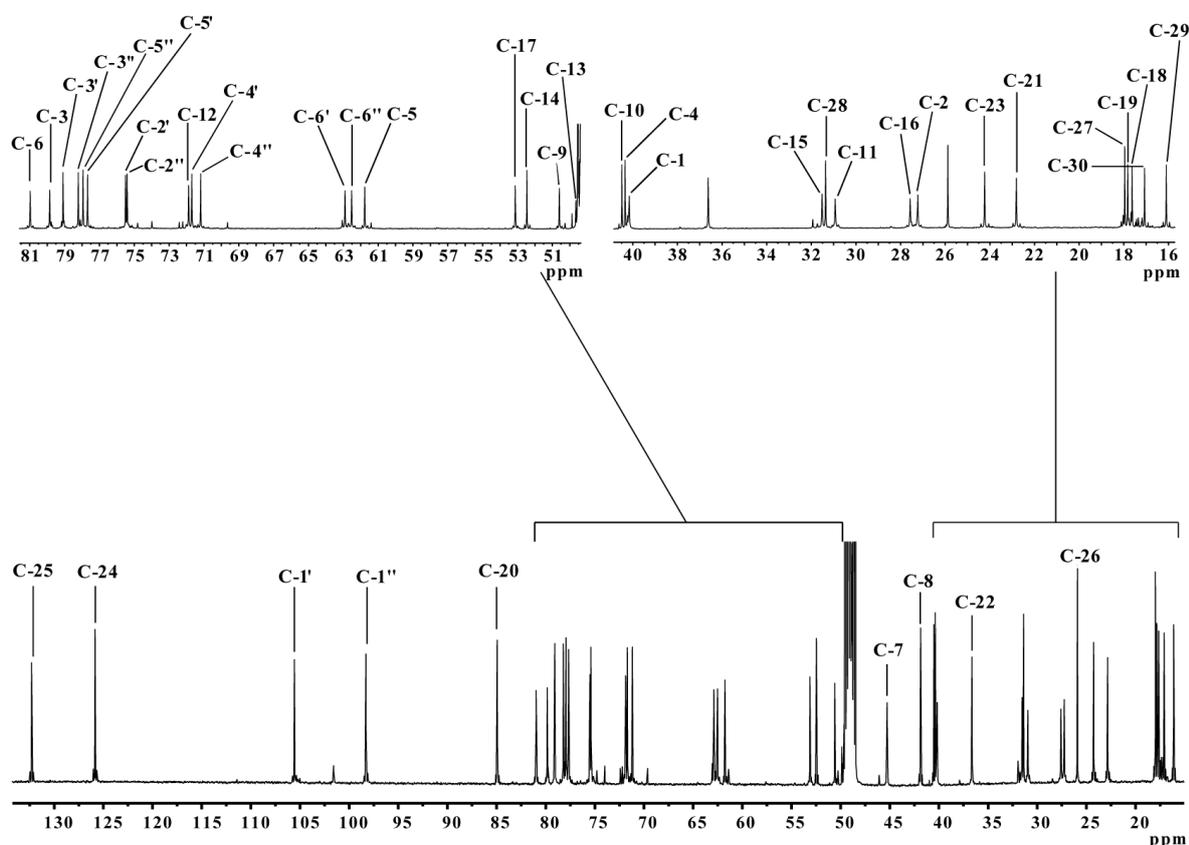


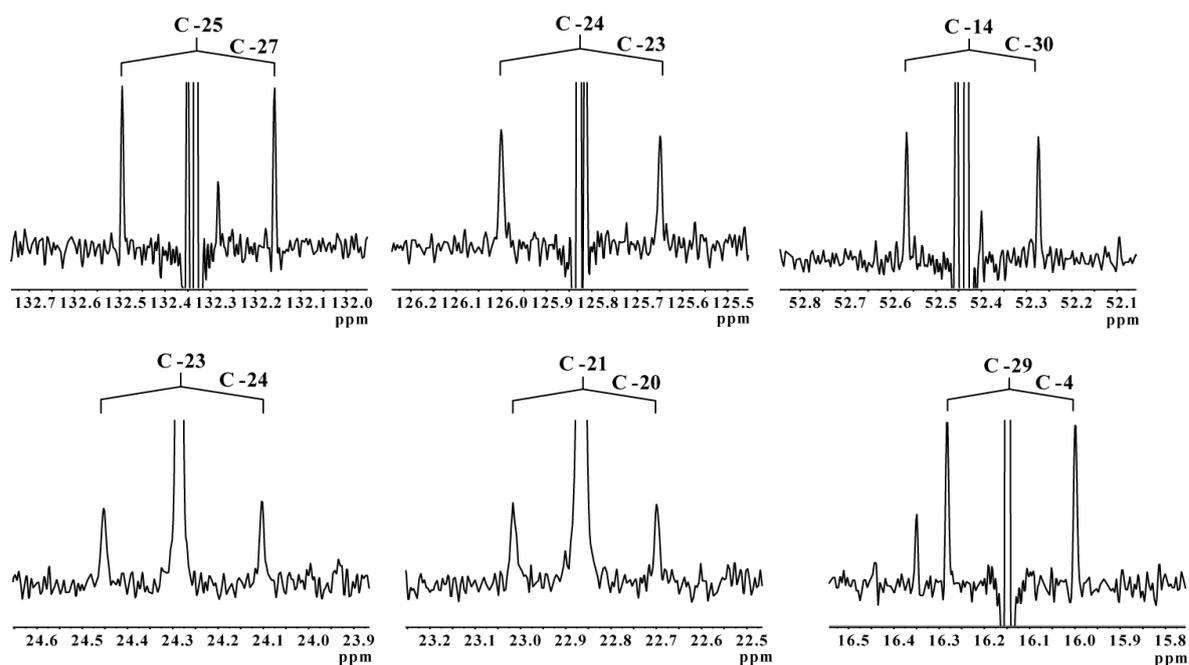
Abbildung 19. ^{13}C -NMR-Spektrum von Rg_1 aus dem $^{13}\text{CO}_2$ -Markierungsexperiment mit *P. ginseng* (in $\text{D}_4\text{-MeOD}$).



Die Auswertungen der ^{13}C -NMR-Signale der beiden Ginsenoside zeigen sehr deutlich Satelliten (Tief- und Hochfeld) um das Zentralsignal (Abbildung 20). Diese Aufspaltungen beruhen auf Kopplungen direkt benachbarter ^{13}C -Atome (Tabellen 7 und 8) im Molekül und zeigen keine weiteren Feinaufspaltungen, die durch Fernkopplungen mit weiter entfernt liegenden ^{13}C -Atomen hervorgerufen werden. Das Auftreten von Fernkopplungen im Spektrum würde den MEP-Weg oder zumindest einen sogenannten „Cross-Talk“ (beide Biosynthesewege beteiligt) vermuten. Hier in dieser Untersuchung fehlen diese Fernkopplungen, so dass ein Beitrag von $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{-GAP}$ aus dem MEP-Weg (welches zu Fernkopplungen in den MEP-abgeleiteten Terpenen führen würde) für das Aglycongerüst der hier untersuchten Ginsenoside ausgeschlossen werden kann. Man sieht auch sehr deutlich an den relativen Intensitäten der Satelliten (zwischen 8 % und 17 %) im Bezug zur Gesamtintensität eines gegebenen ^{13}C -Zentralsignals, dass hier ein Einbau von ^{13}C aus $^{13}\text{CO}_2$ stattgefunden hat. Diese übertreffen die statistisch erwarteten Werte (1,1 %) für eine natürlich angereicherte Verbindung (ohne Begasung mit $^{13}\text{CO}_2$) deutlich. Das bedeutet,

dass die Biosynthese (*de novo*) der Ginsenoside Rg₁ und Rb₁ während der Markierungsexperimente in der sechsjährigen Pflanze stattgefunden hat und der Aufbau über mehrfach markierte Vorläufermoleküle aus ¹³CO₂ stammt.

Abbildung 20. Einige ¹³C-NMR-Signale vom Ginsenosid Rg₁ aus dem ¹³CO₂-Markierungsexperiment. Sehr gut zu erkennen sind die Satelliten um das Zentralsignal, hervorgerufen durch ¹³C-¹³C-Kopplungen von direkt benachbarten Kohlenstoffatomen. Simultane Kopplungen zwischen drei ¹³C-Atomen sind nicht zu beobachten. Weiterhin sind die für den MEP-Weg typischen ¹³C-Fernkopplungen ebenfalls nicht zu beobachten. Zur besseren Auflösung und um schärfere Signale zu erhalten, wurden ein „Zero-Filling“ sowie die Multiplikation des FID's mit einer Gauss-Funktion durchgeführt.



Bei genauer Betrachtung und Vergleich der Intensitäten für die Satellitenpaarsignale im ¹³C-NMR zwischen den beiden Ginsenosiden fällt auf, dass diese für Rg₁ (14,2 % ± 4,1 %) durchwegs höher sind wie die entsprechenden Paare in Rb₁ (8,9 % ± 2,6 %). Das lässt die berechnete Vermutung zu, dass der Aufbau von Protopanaxatrioltyp-Ginsenosiden (Rg₁) biosynthetisch während des Markierungsexperiments mit sechsjährigen Pflanzen effizienter abläuft. Im Falle des Ginsenosids Rg₁ könnte eine mögliche Erklärung in der geringeren sterischen Hinderung durch die Zuckerreste liegen (Abbildungen 34 und 35 im Anhang).

Tabelle 7: ^1H - und ^{13}C - NMR-Daten von Rg_1 aus dem $^{13}\text{CO}_2$ -Experiment.

C-Atom (Rg_1)	^1H (δ) [ppm]	^{13}C (δ) [ppm]	J_{CC} [Hz]	rel. Signalintensität der $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ - Satelliten	Korrelationen (beobachtet)	
					INADEQUATE	ADEQUATE
1	1.06 1.74	40.31	< 3	< 3	-	-
2	1.59	27.38	32.6	12.6	3	3
3	3.11	79.98	36.5	12.3	2	2
4	-	40.50	36.0	13.3	-	29
5	1.12	61.90	38.7	12.5	6	6
6	4.09	81.01	38.8	14.2	5	5
7	1.64 2.04	45.35	< 3	< 3	-	-
8	-	42.00	36.6	10.3	-	18
9	1.48	50.73	34.5	12.0	11	11
10	-	40.64	35.5	12.8	-	19
11	1.19 1.85	31.08	34.9	17.1	9	9
12	3.68	72.01	37.2	13.5	13	13
13	1.74	49.78	37.8	7.5	12	12
14	-	52.58	36.6	10.5	30	30
15	1.13 1.60	31.67	-	< 3	-	-
16	1.40 1.93	27.72	36.4	16.6	17	17
17	2.29	53.26	32.5	9.5	16	16
18	1.10	17.78	38.7	16.8	-	8
19	0.99	17.97	43.7	28.5	-	10
20	-	85.06	39.9	13.1	21	21
21	1.35	22.97	39.9	13.4	20	20
22	1.62 1.81	36.77	38.6	3.1	-	-
23	2.07	24.39	44.3	13.4	24	24
24	5.11	125.98	44.2	18.0	23	23
25	-	132.43	42.4	17.8	27	27
26	1.68	26.04	-	< 3	-	-
27	1.63	18.11	42.4	13.6	25	25
28 (α -Me)	1.33	31.51	35.0	4.0	-	-
29 (β -Me)	1.02	16.25	36.2	16.5	-	4
30	0.95	17.22	36.6	16.8	14	14
Zucker						
1'	4.35	105.7	48.2	17.5	2'	2'
2'	3.21	75.63	47.7	8.0	1'	1'
3'	3.34	79.21	42.1	3.1	-	-
4'	3.27	71.82	41.4	18.2	-	-
5'	3.27	77.81	42.1	8.1	6'	6'
6'	3.68 3.80	63.03	43.1	27.9	5'	5'
1''	4.61	98.43	47.6	15.6	2''	2''
2''	3.08	75.53	46.9	6.1	1''	1''
3''	3.36	78.34	-	-	-	-
4''	3.31	71.32	41.0	10.5	-	-
5''	3.21	78.07	-	-	-	6''
6''	3.65 3.82	62.65	42.6	15.7	-	5''

Tabelle 8: ^1H - und ^{13}C - NMR-Daten von Rb_1 aus dem $^{13}\text{CO}_2$ -Experiment (unten Zuckersignale).

C-Atom (Rb_1)	^1H (δ) [ppm]	^{13}C (δ) [ppm]	J_{CC} [Hz]	rel. Signalintensität der $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ - Satelliten	Korrelationen (beobachtet)	
					INADEQUATE	ADEQUATE
1	1.03 1.74	40.31	< 3	< 3	-	-
2	1.74 2.02	27.38	36.5	3.0	3	3
3	3.21	79.98	37.4	6.6	2	2
4	-	40.50	35.5	10.4	-	29
5	0.79	61.90	36.1	9.5	-	6
6	1.58	81.00	38.7	12.0	-	5
7	1.31 1.56	45.35	< 3	< 3	-	-
8	-	42.00	36.8	7.0	-	18
9	1.44	50.73	36.8	5.9	11	11
10	-	40.64	35.5	8.9	-	19
11	1.25 1.80	31.08	36.5	8.9	9	9
12	3.74	72.01	n.d.	n.d.	13	13
13	1.75	49.78	n.d.	n.d.	12	-
14	-	52.58	36.5	8.3	-	30
15	1.05 1.59	31.67	-	< 3	-	-
16	1.35 1.91	27.72	39.0	7.6	-	17
17	2.30	53.26	33.5	4.4	-	16
18	1.01	17.78	36.7	10.4	-	8
19	0.87	17.97	40.3	9.8	-	10
20	-	85.06	39.6	10.1	21	21
21	1.38	22.97	38.9	9.3	20	20
22	1.56 1.81	36.77	-	< 3	-	-
23	2.05 2.15	24.39	44.1	7.3	-	24
24	5.16	125.98	44.0	10.2	-	23
25	-	132.43	42.3	14.1	-	27
26	1.71	26.04	-	< 3	-	-
27	1.65	18.11	42.5	12.2	-	25
28 (α -Me)	1.09	31.51	-	< 3	-	-
29 (β -Me)	0.87	16.25	39.2	11.7	-	4
30	0.93	17.22	36.7	7.8	-	14

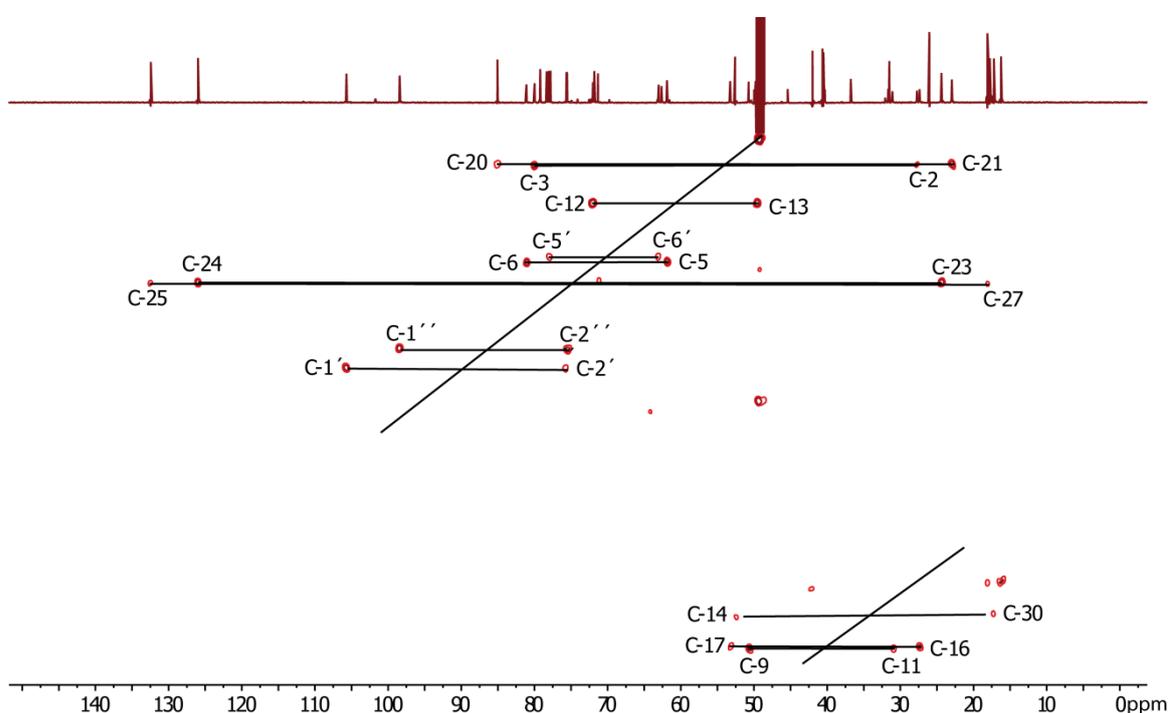
n. d. = nicht definiert, da Signalüberlappung

Zucker						
C-Atom (Zucker)	¹ H (δ) [ppm]	¹³ C (δ) [ppm]	J _{CC} [Hz]	rel. Signalintensität der ¹³ C ¹³ C- Satelliten	Korrelationen (beobachtet)	
					INADEQUATE	ADEQUATE
1'	4.45	105.7	47.0	12.3	-	2'
2'	3.58	75.63	-	-	-	-
3'	3.37	79.21	-	-	-	-
4'	3.22	71.82	-	-	-	-
5'	-	77.81	-	-	-	-
6'	3.87	63.03	-	-	-	-
1''	4.61	98.23	48.3	7.4	-	2''
2''	3.13	-	-	-	-	-
3''	-	-	-	-	-	-
4''	-	-	-	-	-	-
5''	3.44	-	-	-	-	-
6''	3.81	70.35	-	-	-	-
1'''	4.69	104.57	47.2	13.0	-	2'''
2'''	3.24	76.44	-	-	-	-
3'''	3.58	78.64	-	-	-	-
4'''	3.36	71.61	-	-	-	-
5'''	3.28	78.02	-	-	-	-
6'''	3.65	63.26	-	-	-	-
1''''	4.37	105.14	44.3	14.0	-	2''''
2''''	3.23	-	-	-	-	-
6''''	3.67	62.94	-	-	-	-

Es könnte aber auch sein, dass die Biosynthese der Protopanaxatrioltyp-Ginsenoside (Rg₁) in der Wurzel (sechsjährige Pflanzen) bevorzugt später bzw. erneut stärker (siehe Gehaltsbestimmung) stattfindet. Ein anderer Grund für die niedrigeren Intensitäten für protopanaxadiolbasierte Ginsenoside (Rb₁) könnte darin liegen, dass zu Beginn der Markierungsexperimente schon ein größerer Teil der diolbasierten Ginsenoside vorliegt. Die Intensität für einige der Satellitenpaare der beiden Ginsenoside sind wesentlich niedriger (3 bis 4 %) bzw. liegen unterhalb (< 3 %) der Detektionsgrenze der NMR-Empfindlichkeit (Tabellen 7 und 8). Diese ¹³C-Atome sind sehr niedrig markiert und zeigen sehr schwache Kopplungen zu den benachbarten ¹³C₂-Einheiten. Betrachtet man nur die spezifischen Kopplungskonstanten oberhalb der Detektionsgrenze (Tabellen 7 und 8) sowie die spezifischen ¹³C,¹³C-Korrelationen, welche über die zweidimensionalen INADEQUATE- und ADEQUATE-Spektren detektiert wurden (Abbildungen 21 und 22), so erhält man zwölf ¹³C₂-Isotopologe ([2,3-¹³C₂]-, [4,29-¹³C₂]-, [5,6-¹³C₂]-, [8,18-¹³C₂]-, [9,11-¹³C₂]-, [10,19-¹³C₂]-, [12,13-¹³C₂]-, [14,30-¹³C₂]-, [16,17-¹³C₂]-, [20,21-¹³C₂]-,

[23,24- $^{13}\text{C}_2$]- und [25,27- $^{13}\text{C}_2$]-Isotopologe) mit benachbarten ^{13}C -Atomen im Aglycongerüst von Rg₁ und Rb₁ (Abbildung 20, Tabellen 7 und 8).

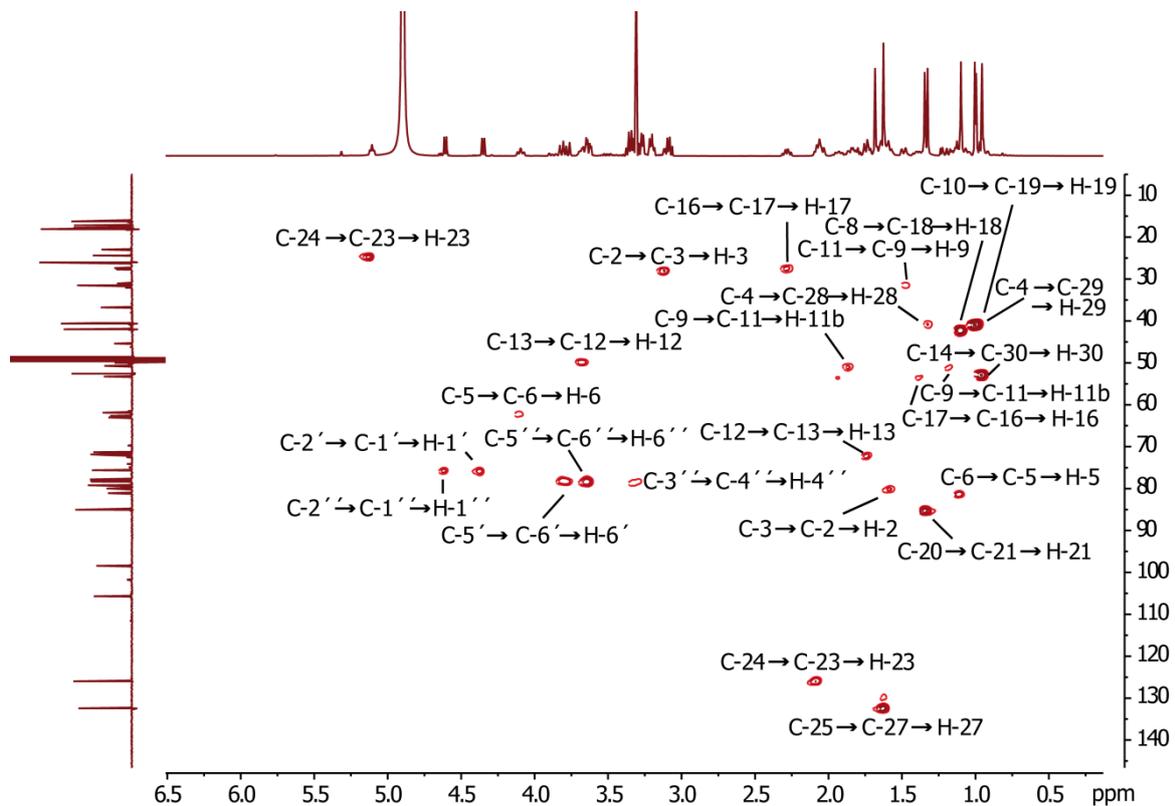
Abbildung 21. INADEQUATE-Spektrum von Rg₁. Hier sieht man die Spin-Korrelationen zweier direkt einander gebundenen ^{13}C -Atomen. Diese sind durch horizontale Linien, die gleichmäßig durch eine diagonale Linie geschnitten werden, in der zweidimensionalen Ebene angedeutet. Diese Korrelationen (siehe auch die grünen Balken in Abbildung 23) reflektieren die biosynthetische Geschichte der Ginsenoside aus $^{13}\text{CO}_2$. Das ein-dimensionale ^{13}C -Spektrum ist als Projektion gezeigt.



Das hier über die NMR-Messergebnisse erhaltene ^{13}C - ^{13}C -Kopplungsmuster deckt sich sehr gut mit dem vorhergesagten Kopplungsmuster zur Bildung von Triterpenen (Ginsenoside) aus [U- $^{13}\text{C}_2$]-Acetyl-CoA über dem MVA-Weg (Abbildung 24) und dem etablierten Mechanismus für Ringbildungen, der beginnend von einer „chair-chair-chair-boat“-Konformation des (*S*)-2,3-Oxidosqualens über das Intermediat Dammarenyl-Kation zu den Ginsenosiden führt (Abbildung 25).^{62,153,154} Der Verlauf über den MEP-Weg, mit [U- $^{13}\text{C}_3$]-GAP als Vorläufermolekül würde zu den folgenden sechs $^{13}\text{C}_3$ -Isotopologen führen: [2,3,28- $^{13}\text{C}_3$]-, [1,5,6- $^{13}\text{C}_3$]-, [7,9,11- $^{13}\text{C}_3$]-, [12,13,15- $^{13}\text{C}_3$]-, [16,17,22- $^{13}\text{C}_3$]- und [23,24,26- $^{13}\text{C}_3$]-Isotopologe (Abbildung 24). Keiner dieser vorhergesagten $^{13}\text{C}_3$ -Iso-

topologe konnte, weder über die ^{13}C -NMR-Spektren (Kriterium: Fernkopplungen) noch über zweidimensionale Experimente (n,1-ADEQUATE-Experimente), beobachtet werden.

Abbildung 22. 1,1-ADEQUATE-Spektrum von Rg_1 . Hier sieht man die Spin-Korrelationen zweier direkt einander gebundenen ^{13}C -Atomen und die an einem dieser ^{13}C -Atome gebundenes Proton (siehe rote Pfeile in Abbildung 23). Diese Korrelationen reflektieren die biosynthetische Geschichte der Ginsenoside aus $^{13}\text{CO}_2$. Die eindimensionalen ^1H - und ^{13}C -Spektren sind als Projektionen gezeigt.



Die für den MVA-Weg vorausgesagten zwölf $^{13}\text{C}_2$ -Isotoplogpaare konnten dagegen in den NMR-Daten von Rg_1 and Rb_1 detektiert werden. In den Markierungsmustern von Alanin, von freien Zuckern und den Zuckerresten in den Ginsenosiden konnte aber ein experimenteller Hinweis für die Bildung von $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ -GAP während der Pulsperiode und dessen Transport zu den Wurzeln, wo die Ginsenoside gebildet werden, gefunden werden. Das Gebildete $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ -GAP wird aber für die Biosynthese der Ginsenoside Rg_1 und Rb_1 in den Wurzeln nicht verwendet. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass in sechs Jahre alten *P. ginseng* Pflanzen IPP und DMAPP als Vorläufer für die Aglycone von Rg_1 und Rb_1 hauptsächlich oder sogar ausschließlich über den MVA-Weg

gebildet werden. Der Beitrag von IPP und DMAPP über den MEP-Weg kann, wegen der limitierten Detektionsgrenzen in dem Experiment, auf unter 5 % geschätzt werden. In einer aktuelleren Untersuchung mit Haarwurzelkulturen von *P. ginseng* konnte ein deutlicher Beitrag des MEP-Weges zur Ginsenosidbiosynthese gezeigt werden.¹²⁴ Diese Ergebnisse geben aber die Situation in Haarwurzel-Zellkulturen von *Panax* unter künstlichen Wachstumsbedingungen, denen jeweils Mevinolin oder Fosmidomycin, die spezifische Inhibitoren des MVA- bzw. MEP-Weges zugesetzt wurde, wieder. Diese Faktoren spielen aber wohl für ungestörte und natürliche Wachstumsbedingungen (*in planta*-Bedingungen) keine Rolle.

Abbildung 23: Markierungsmuster von Rg₁ aus dem ¹³CO₂-Feldexperiment. Die aus der Biosynthese beigesteuerten ¹³C-Atom-Paare sind in den Farben blau und grün angedeutet. Die ¹³C-Paare, die im INADEQUATE-Spektrum beobachtet wurden, sind mit breiten grünen Balken angedeutet. Die Kopplungsmuster für die ¹³C-Paare bzw. Tripel, die aus der Analyse des eindimensionalen ¹³C-Spektrums stammen, sind mit breiten blauen Balken angedeutet. Die roten Pfeile zeigen Spin-Spin-Wechselwirkungen zwischen ¹³C-Atomen und Protonen, die im ADEQUATE-Spektrum beobachtet wurden. Das schwache Signal zwischen dem ¹³C-4 und H-28 ist mit einem gestrichelten roten Pfeil angezeigt.

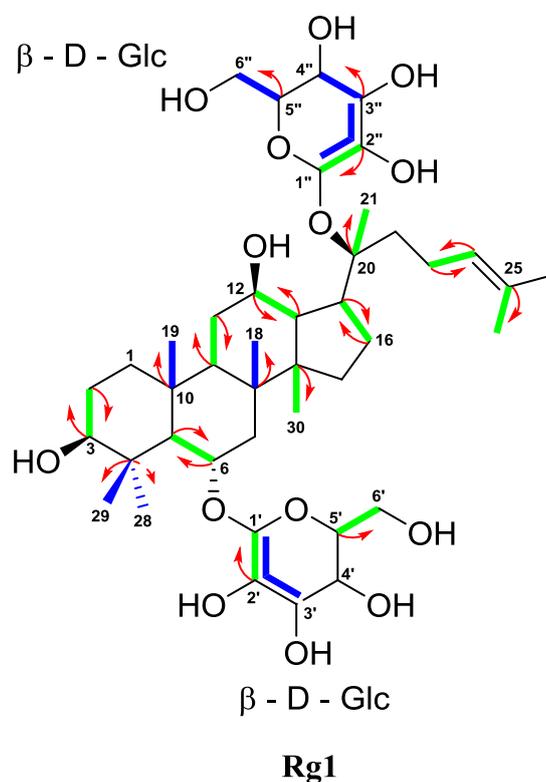


Abbildung 24. Vorhergesagtes Markierungsmuster für das Ginsenosid Rg₁ aus dem Feldversuch mit *P. ginseng*. Die farbig hervorgehobenen Bindungen stehen für benachbarte ¹³C-Atome aus dem jeweiligen Bildungsweg (**MVA**: über ¹³C₂-Acetyl-CoA und Mevalonat, Magenta; **MEP**: ¹³C₃-Pyruvat, rot und ¹³C₃-GAP, grün; wobei ein isoliertes ¹³C-Atom aus ¹³C₃-GAP während der Bildung von MEP entsteht, grüner Punkt).

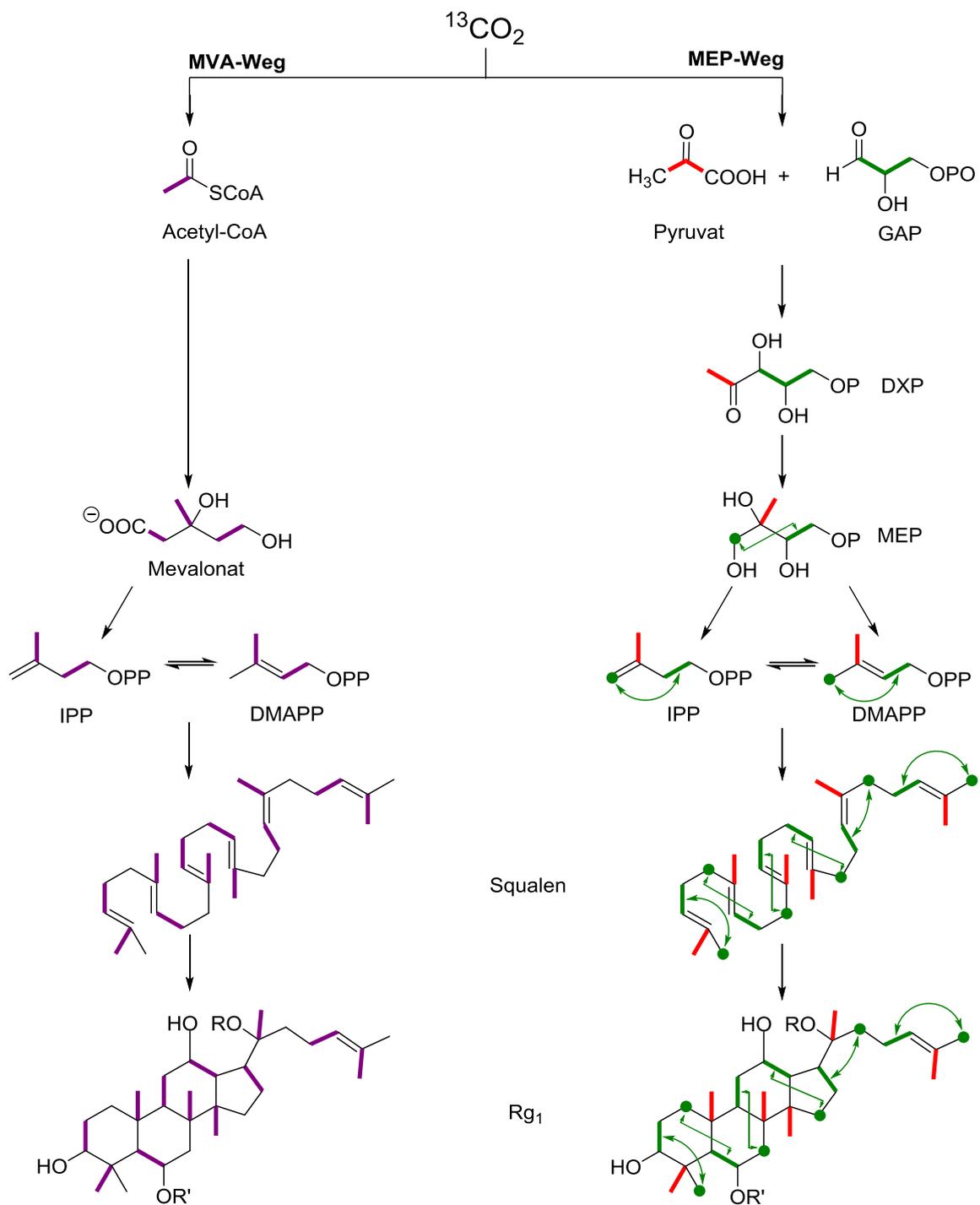
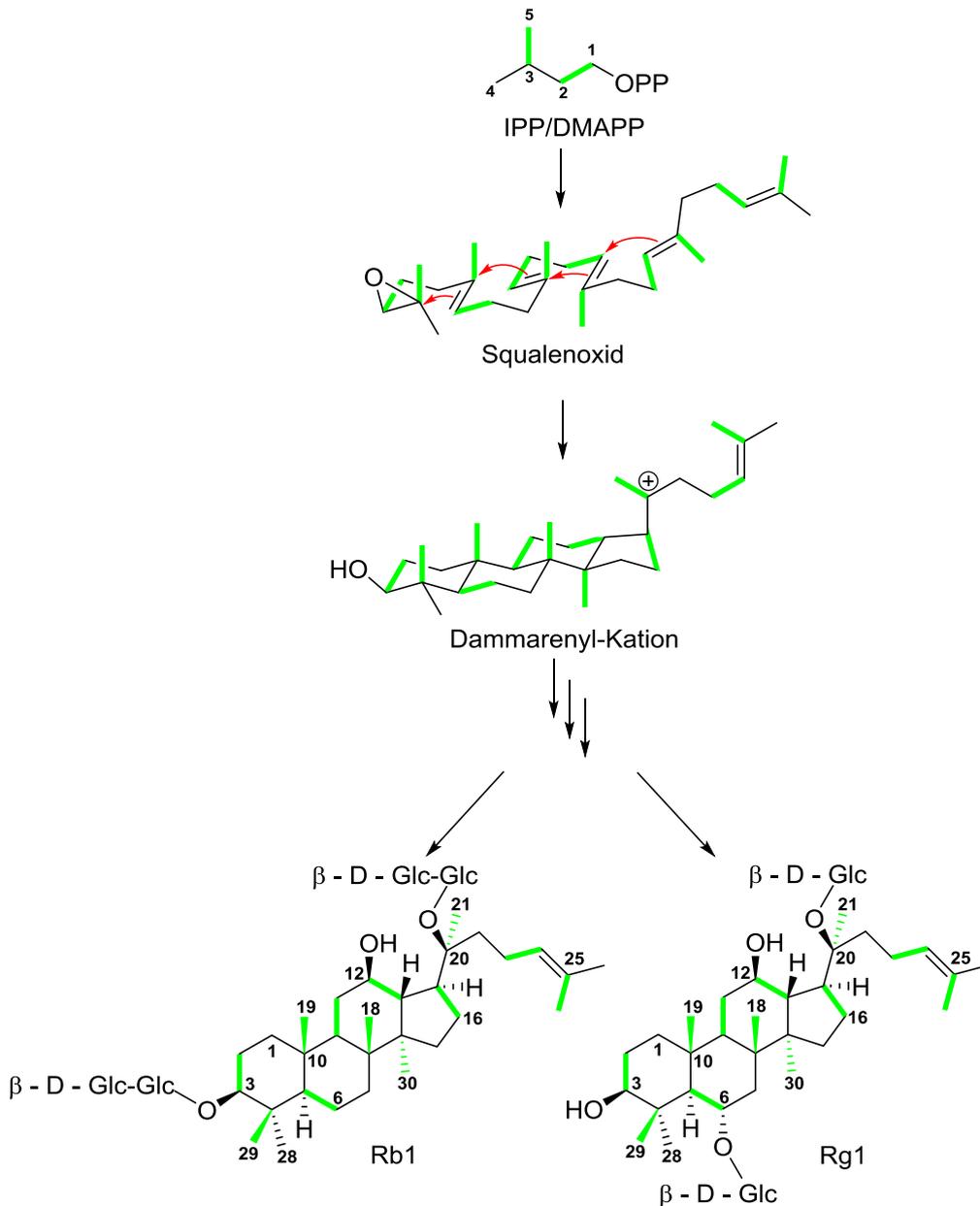


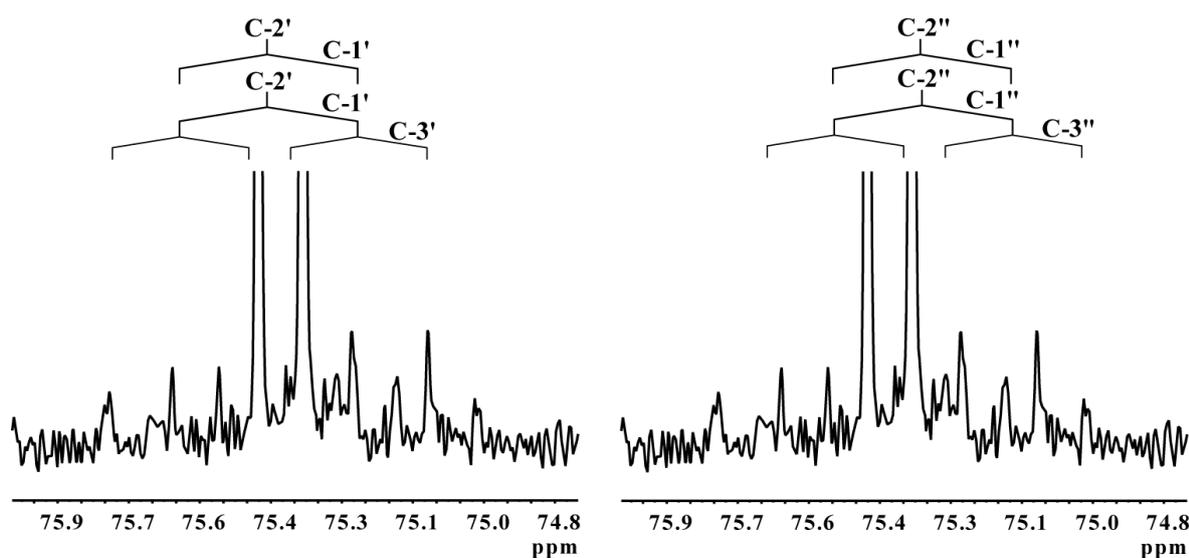
Abbildung 25. Biosynthese der Ginsenoside Rb₁ and Rg₁ aus *P. ginseng* unter Feldbedingungen. Das Markierungsmuster der beiden Ginsenoside wurde über die NMR-Spektroskopie ermittelt. Die grün hervorgehobenen Bindungen stehen für benachbarte ¹³C-Atompaare, die aus ¹³CO₂ über [1,2-¹³C₂]-Acetyl-CoA und [1,2-¹³C₂]-, [3,5-¹³C₂]-IPP/DMAPP beigesteuert wurden. Das detektierte ¹³C₂-Paar in C-4 und C-29 (β-Methylgruppe am C-4) kann zur stereospezifischen Unterscheidung herangezogen werden.



3.4.3 Isotopolog-Profilung der Zuckerreste in Rg₁ und Rb₁ über NMR

Einige Signale in den Zuckerresten in Rg₁ und Rb₁ waren gut aufgelöst und zeigten ¹³C-Kopplungen zu untersuchen. Bei genauerer Analyse sieht man für die C-1-Positionen auch ¹³C-Fernkopplungen (z. B. zwischen C-1 und C-3), die aus der Präsenz von [1,2,3-¹³C]-Zuckern oder Isotopologen mit mehr als drei ¹³C-Atomen herrühren. Die Kopplungsmuster für die C-2'- und C-2''-Signale im Glucoserest in Rg₁ bestätigen diesen Befund zusätzlich, da die hier auftretenden Dubletts von Dubletts von simultanen ¹³C-Kopplungen zwischen drei ¹³C-Atomen (z. B. ¹³C-2' mit seinen Nachbarn C-1' und C-3') herrühren (Abbildungen 23 und 26). Die NMR-Analyse der ¹³C-Atome in den Zuckerresten der ¹³C-angereicherten Ginsenoside sind ein weiterer Beleg dafür, dass der Transfer von mehrfach markierten Vorläufermolekülen (enthalten z. B. drei und mehr ¹³C-Atomen im Molekül) zu den Wurzeln stattfindet und unterstützen somit das Verständnis für die Biosynthese der Ginsenoside. Nach den Ergebnissen dieser Daten sollte die Biosynthese der Ginsenoside demnach über den MVA-Weg verlaufen.

Abbildung 26. Hier sind einige ¹³C-NMR-Zuckersignale in Rg₁ aus dem ¹³CO₂-Markierungsexperiment zu sehen. Satellitenpaare, hervorgerufen durch ¹³C-¹³C-Kopplungen, sowie im Bereich der koppelnden Paaren (Tief- bzw. Hochfeld) simultane Kopplungen zwischen drei ¹³C-Atomen sind gut zu erkennen (siehe die breiten blauen Balken in Abbildung 23).



3.5 Biosynthese von Panaxynol and Panaxydol

Panaxynol und Panaxydol sowie verwandte Polyacetylene sind wie bereits erwähnt faszinierende Naturstoffe und das nicht nur aufgrund ihrer chemischen Struktur. Diese Metabolite zeigen neben ihrer starken Bioaktivität auch vielseitige pharmakologische Eigenschaften (Tabelle 3), was ihre Bedeutung für wissenschaftliche Untersuchungen hervorhebt.

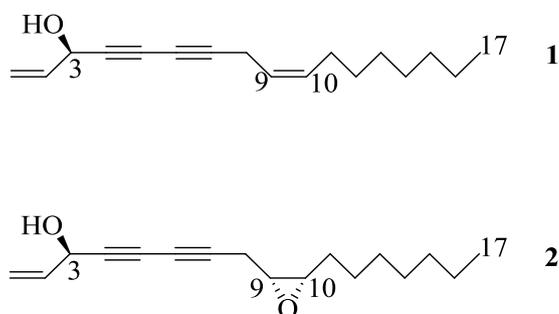
So ist es nicht verwunderlich, dass das Verständnis für den Bildungsweg dieser Metabolite ebenfalls von starkem Interesse dieser Arbeit ist. Polyacetylene zeigen strukturelle Ähnlichkeiten zu den Fettsäuren, weshalb schon recht früh in Experimenten mit radioaktiv markierten Fettsäuren der Bildungsweg zu den linearen C₁₇-Polyacetylenen aus ungesättigten C₁₈-Fettsäuren formuliert wurde.^{31,35,155,156} Es wurde weiterhin vorgeschlagen, dass die 3-Hydroxyölsäure als Vorläuferintermediat in der Panaxynolbiosynthese fungiert und dass Arylpolyacetylene vom Shikimatweg stammen.^{31,155} Die experimentellen Befunde auf diesem Gebiet sind allerdings nicht eindeutig, da sie auf niedrige Einbauraten der radioaktivmarkierten Vorläufermolekülen in die Zielmoleküle beruhen.

In dieser Arbeit soll deshalb auch die Frage geklärt werden, ob der Bildungsweg über Fettsäuren der einzige Weg zu diesen einzigartigen Sekundäremetaboliten ist. Zur Aufklärung des Biosyntheseweges zu den C₁₇-Polyacetylenen wurden *in vivo* ¹³CO₂ und in einem früheren Experiment ¹³C-markierte Glucose für die Isotopenmarkierung von *P. ginseng* Pflanzen und Wurzelkulturen verwendet.¹⁵⁷ Die Markierungsexperimente mit ¹³CO₂ wurden mit einer transportablen Einheit durchgeführt (Abbildung 9).¹²⁹ Die Isolierung der Polyacetylene Panaxynol (**1**) und Panaxydol (**2**) erfolgte aus einer sechs Jahre alten Pflanze (Pflanze 19, Tabelle 11 sowie Tabelle 12 im Anhang). Der Verbrauch an ¹³CO₂ war bei dieser Pflanze der höchste von allen durchgeführten Markierungsexperimenten. Aus diesem hohen Verbrauch kann man vorab aber keine Rückschlüsse auf den Markierungsgrad schließen. Gründe für den hohen Verbrauch könnten in der ungenügenden Abdichtung der Pflanze von der Umgebungsatmosphäre sein, aber auch die Wetterbedingungen an diesem Tag sind als zusätzlicher Faktor möglich. Die Pflanze wurde für 9,5 Stunden (Pulsperiode) einer ¹³CO₂-Atmosphäre ausgesetzt und anschließend für 19 Tage (Chaseperiode) unter Normalbedingungen belassen.

Die Isolierung der Polyacetylene Panaxynol (**1**) und Panaxydol (**2**) (Abbildung 27) aus den jeweiligen Versuchen erfolgte über die Extraktion mit Hexan und anschließender Reinigung der Extrakte über Säulenchromatographie. Es wurden für eine NMR-Aus-

wertung ausreichende Mengen (2-3 mg) an reinem weniger polaren Panaxynol (**1**) und dem etwas stärker polaren Panaxydol (**2**) erhalten.

Abbildung 27. Struktur von (-)-(*R*)-panaxynol (**1**) und panaxydol (**2**)



Die Identifizierung der beiden Polyacetylene konnte durch den Vergleich der NMR-Daten (Tabellen 9 und 10) mit denen aus der Literatur sichergestellt werden.¹⁵⁸⁻¹⁶¹

Die absolute Konfiguration von (+) und (-) Panaxynol (**1**), das wie bereits erwähnt in verschiedenen Pflanzen isoliert wurde, war lange Zeit nicht bestimmt. Der erste Anlauf zur Etablierung der absoluten Konfiguration am C-3 Atom kam von Larsen *et al.*, der Falcarinol aus *Seseli gummiferum* isolierte und diesem auf der Basis von chemischen Korrelationsstudien die 3-(*R*) Konfiguration zuordnete.¹⁶² Der zweite Anlauf kam von Shim *et al.*, der Panaxynol aus Wurzeln vom koreanischen Ginseng isolierte und diesem auf Basis von CD-Messungen die 3-(*S*) Konfiguration zuwies.^{163,164} In einer modifizierten Moshermethode wurde Falcarinol, isoliert aus *Dendropanax arboreus*, als rechtsdrehend mit der 3-(*S*) Konfiguration formuliert.¹⁶⁵ Das Panaxynol aus *P. ginseng* wurde dagegen als linksdrehend und mit der 3-(*R*) Konfiguration angegeben.¹⁶¹ Die hier erwähnten letzten zwei Publikationen wurden schließlich von Zheng *et al.* bestätigt, indem er die absolute Konfiguration von Panaxynol (**1**) durch die stereoselektive Totalsynthese der beiden Enantiomere bestimmte.¹¹⁴ Für das Panaxynol in diese Arbeit konnte durch die Messung der optischen Rotation ein negativer Wert für die optische Aktivität ermittelt werden, welcher nach Zheng *et al.* auf die 3-(*R*) Konfiguration hinweist. Dieser Aspekt ist wichtig, da aus der Sicht der biologischen bzw. pharmakologischen Aktivität die *R*-Konfiguration am wirksamsten ist.^{48,166}

Die ¹³C-Gesamtanreicherung, berechnet aus den jeweiligen ¹H-NMR Spektren (siehe Abbildungen 44 bis 47 im Anhang) von Panaxynol und Panaxydol, beträgt 1,5–2 % für alle C-Atome. Die relativen Intensitäten der Singulettsignale aus den ¹³C-NMR-Spektren für

markierte und unmarkierte Proben rühren von $^{13}\text{C}_1$ -Isotopologen her und sind identisch. Die ^{13}C -NMR Spektren der markierten Polyacetylene (**1**) sowie (**2**) zeigen, mit Ausnahme des Signals des Methyl-C-Atoms (bei 14.3 ppm), ^{13}C -koppelnde Satellitenpaare ($^{13}\text{C}_2$ -Isotopologe; Tabellen 9 und 10; Abbildung 28) mit einer relativen Intensität von ca. 15 % am Gesamtintegral des jeweiligen C-Atom. Nichtmarkierte Proben würden am entsprechenden Signal lediglich eine relative Intensität von 1 % zeigen, die von der natürlichen ^{13}C -Isotopenhäufigkeit in einem $^{13}\text{C}_2$ -Isotopolog (ca. 0.01 mol %) herrührt. Aufgrund der niedrigen Ausbeuten (hier: 2-3 mg) hat die Detektierbarkeit von Satelliten aus nichtmarkierten Pflanzen, hervorgerufen durch die natürliche Isotopenhäufigkeit, ihre Grenzen in der intrinsischen Empfindlichkeit der ^{13}C -NMR-Spektroskopie.⁸⁶

Tabelle 9: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten von ^{13}C -markiertem Panaxynol (**1**) (CDCl_3 ; δ in ppm).

Atom	^1H (δ)	J_{HH} (Hz)	Atom	^{13}C (δ)	J_{CC} (Hz)
1a	5.26	1H, ddd; 10.2, 1.5, 1.0	1	117.4	70.9
1b	5.47	1H, ddd; 17.1, 1.5, 1.0	2	136.1	70.9
2	5.95	1H, ddd; 16.8, 10.2, 5.4	3	63.7	75.8
3	4.92	1H, br d; 5.2	4	75.0	75.8
8a	2.39	1H, ddd; 17.7, 7.1, 0.9	5	71.0	156.9
8b	2.70	1H, ddd; 17.7, 5.5, 0.9	6	66.4	157.0
9	3.14	1H, ddd; 7.1, 5.5, 4.2	7	77.4	nd *
10	2.96	1H, br td; 6.1, 4.1	8	19.6	68.2
11	1.45–1.55	2H, m	9	54.4	29.9
12	1.25–1.40	10H, m	10	57.1	29.9
13	1.25–1.40	10H, m	11	27.7	33.8
14	1.25–1.40	10H, m	12	26.6	33.9
15	1.25–1.40	10H, m	13	29.6	45.7
16	1.25–1.40	10H, m	14	29.3	45.3
17	0.89	3H, br t; 6.8	15	31.9	34.5
			16	22.8	34.5
			17	14.3	-

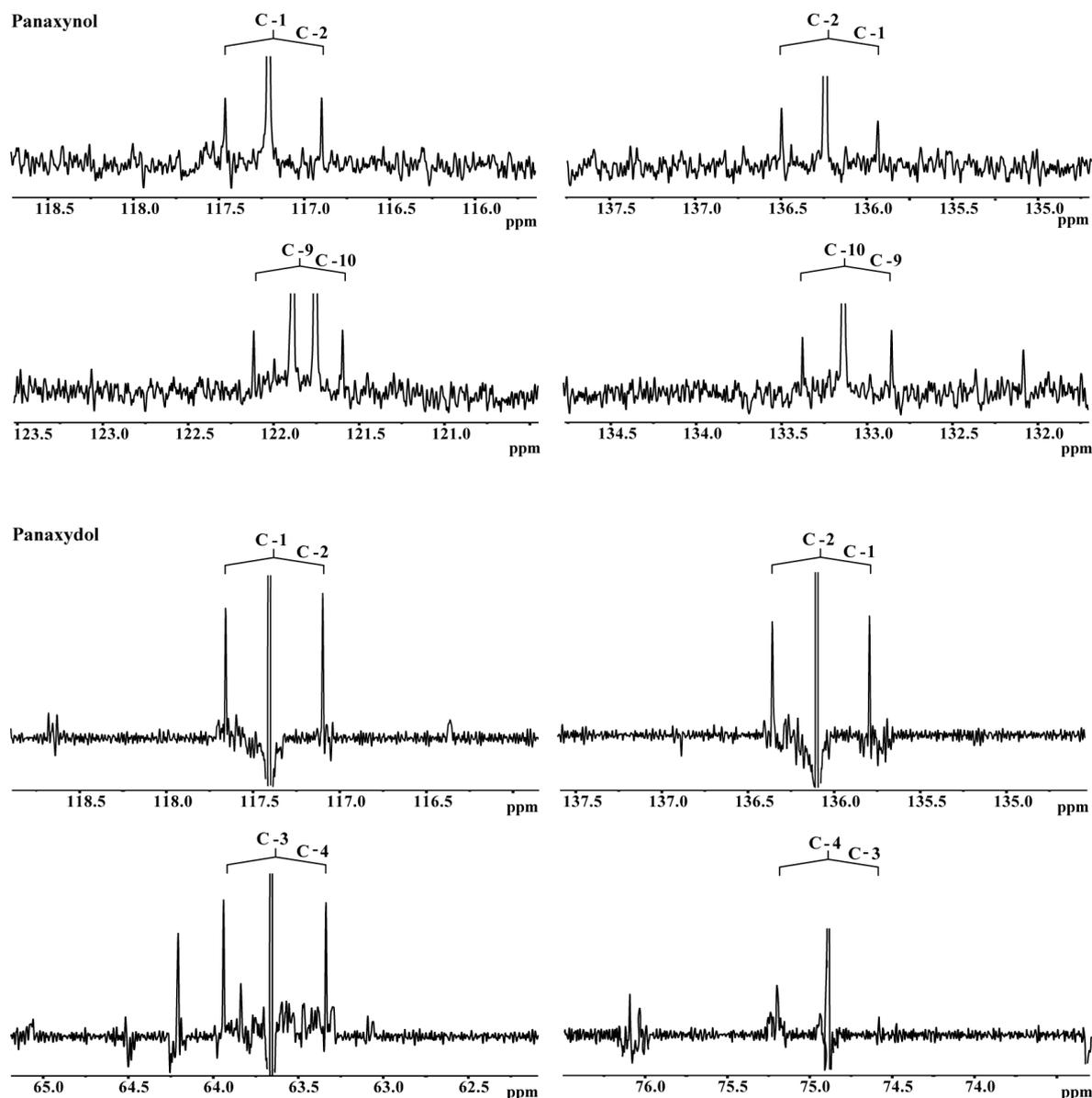
Tabelle 10: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten von ^{13}C -markiertem Panaxydol (**2**) (CDCl_3 ; δ in ppm).

Atom	^1H (δ)	J_{HH} (Hz)	Atom	^{13}C (δ)	J_{CC} (Hz)
			1	117.2	71.0
1a	5.47	1H, ddd; 17.1, 1.2	2	136.3	70.7
1b	5.24	1H, ddd; 10.1, 1.2	3	63.7	76.0
2	5.94	1H, ddd; 17.0, 10.2, 5.4	4	74.9	76.0
3	4.91	3H, t; 5.9	5	71.5	156.6
8	3.03	2H, d; 6.9	6	64.1	nd *
9	5.39	1H, ddddd; 11.3, 6.1, 1.6	7	80.5	68.1
10	5.52	1H, ddddd; 9.8, 8.1, 1.7	8	17.8	67.8
11	2.03	2H, ddd; 10.7, 6.9	9	122.0	71.4
12	1.24–1.39	10H, m	10	133.3	71.3
13	1.24–1.39	10H, m	11	27.4	34.0
14	1.24–1.39	10H, m	12	29.3	34.0
15	1.24–1.39	10H, m	13	29.3	34.6
16	1.24–1.39	10H, m	14	29.3	34.6
17	0.88	3H, t; 6.9	15	31.7	34.5
			16	22.8	34.5
			17	14.3	-

* nicht definiert bzw. kann nicht gemessen werden, da Signalüberlappung.

Die Satelliten der ^{13}C -angereicherten Polyacetylene (**1**) und (**2**) können dagegen recht gut detektiert werden. Die Analyse der Kopplungskonstanten für die $^{13}\text{C}_2$ -Signale der Polyacetylene (**1**) und (**2**) ergab die Zuordnung von folgenden jeweils acht $^{13}\text{C}_2$ -markierten Isotopologpaaren: $[1,2-^{13}\text{C}_2]$, $[3,4-^{13}\text{C}_2]$, $[5,6-^{13}\text{C}_2]$, $[7,8-^{13}\text{C}_2]$, $[9,10-^{13}\text{C}_2]$, $[11,12-^{13}\text{C}_2]$, $[13,14-^{13}\text{C}_2]$ und $[15,16-^{13}\text{C}_2]$, die eine ähnlich bzw. identische Isotopenhäufigkeit von ca. 0,2 mol% aufweisen. Diese Isotopologe sind in der Struktur (Abbildung 29) durch breite blaue Balken angezeigt. Das hier erhaltene Isotopologprofil mit benachbarten ^{13}C -Paaren weist auf eine Polyketid-Biosynthese hin. Diese beginnt mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA/Malonyl-CoA (**3**) über ein Gemisch aus $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -, $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ -, $[5,6-^{13}\text{C}_2]$ -, $[7,8-^{13}\text{C}_2]$ -, $[9,10-^{13}\text{C}_2]$ -, $[11,12-^{13}\text{C}_2]$ -, $[13,14-^{13}\text{C}_2]$ -, $[15,16-^{13}\text{C}_2]$ -, und $[17,18-^{13}\text{C}_2]$ -Fettsäuren, das dann über mehrere Zwischenschritte schließlich in das hier erhaltene Isotopologprofil von **1** und **2** überführt werden (Abbildung 29). Dieses Isotopologprofil führt zu der Schlussfolgerung, dass die Decarboxylierung am vermeintlichen C_{18} -Intermediat ausschließlich auf der Seite wo die ungekoppelte Methylgruppe (Panaxynol und Panaxydol) auftritt, stattfindet (Abbildung 29).

Abbildung 28. ^{13}C -NMR-Signale von Panaxynol (**1**) und Panaxydol (**2**) vom $^{13}\text{CO}_2$ -Feldversuch. Kopplungen zwischen den ^{13}C -Atomen sind angezeigt. Fernkopplungen zwischen drei benachbarten ^{13}C -Atomen sind in dem jeweiligen Bereich der Dubletts nicht zu beobachten.

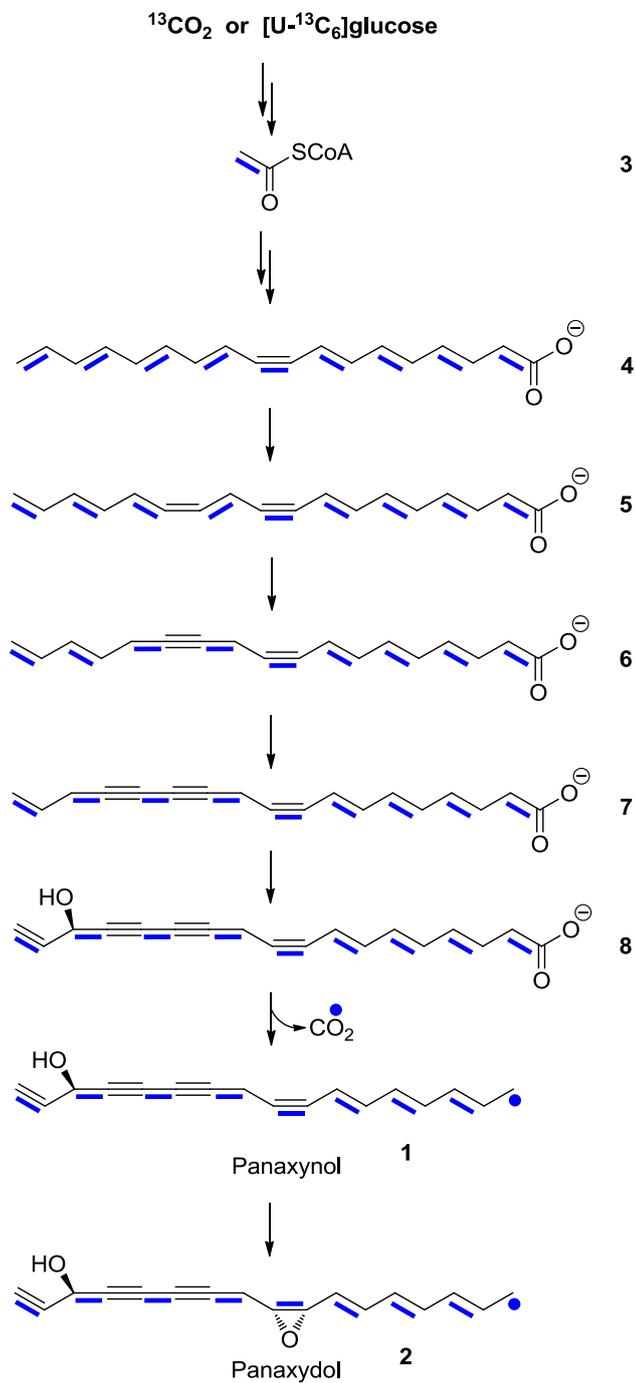


Weiterhin sieht man, dass die Dreifach- und Zweifachbindungen in den C_{17} -Polyacetylenen nach der Decarboxylierung an der gleichen Position lokalisiert sind. Somit sind die Ölsäure (**4**) und Crepenynsäure (**6**) als logische potentielle Intermediate vorzuschlagen. Die Decarboxylierung könnte somit über das Intermediat (**8**) (3*R*, 9*Z*)-16-Hydroxyoctadeca-9,17-dien-12,14-diyn-carbonsäure) zu den finalen Produkten (Abbildung 29) stattfinden. Die Reaktion zu Panaxydol (**2**) läuft vermutlich über eine Oxygenierung an der

Doppelbindung zwischen C-9 und C-10 in Panaxynol. Es ist aber auch denkbar, dass die Decarboxylierung an anderer Stelle des Biosyntheseweges, mit z. B. 3-Hydroxyölsäure oder 3-Hydroxylinolsäure als auftretende Intermediate, stattfindet. Das Ungewöhnliche an diesem Szenario wäre die Einführung von Drei- und Doppelbindungen in Panaxynol und Panaxydol über nichtcarboxylierte Moleküle durch Denaturase-Enzyme. Theoretisch ist es auch möglich, dass der Aufbau über die Decarboxylierung von markierten C₁₆-Fettsäureintermediate mit anschließendem Aufbau zu den hier beschriebenen Polyacetylenen abläuft. Diese Hypothese steht aber im Widerspruch zu früheren Ergebnissen, die von C₁₈-Ausgangsprodukten für C₁₇-Polyacetylene ausgehen. So konnten z. B. Bohlmann et al. durch die Verfütterung von markierten Verbindungen zeigen, dass C₁₇-Polyine (z. B. Dehydrofalcarinon) aus langkettigen Fettsäuren (z. B. Ölsäure) gebildet werden.^{31,167}

Bemerkenswert sind diese Ergebnisse schon deshalb, da sie sich mit den früheren Ergebnissen aus den Kulturmedierversuchen von Elena Ostrozhenkova decken. Das Markierungsmuster ist identisch. Beide Resultate zeigen, dass die Biosynthese der Polyacetylene, wie früher postuliert, über Fettsäuren abläuft. Diese in zwei unabhängigen Versuchen erzielten identischen Ergebnisse zeigen einmal mehr die Qualität dieser Markierungsexperimente, auch unter Feldbedingungen.^{93,109,110,122,129}

Abbildung 29. Vorgeschlagener Biosynthese Weg von Panaxynol (**1**) and Panaxydol (**2**). Die Kopplungen zwischen ^{13}C -Nachbaratomen aus den Experimenten mit $^{13}\text{CO}_2$ oder $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{-Glucose}$ sind durch breite blaue Balken angezeigt.



4 Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigen, dass $^{13}\text{CO}_2$ -Markierungsexperimente wichtige Werkzeuge für die Erforschung der biosynthetischen Herkunft von sekundären Pflanzenmetaboliten unter physiologischen Feldbedingungen sind. Die Verwendung von Puls- und Chaseperioden in $^{13}\text{CO}_2$ -Markierungsexperimenten mit sechsjährigen *Panax ginseng* Pflanzen unter Feldbedingungen zeigen, dass während der Wurzelentwicklung der Pflanze Protopanaxatriol-basierte Ginsenoside im Vergleich zu Panaxadiol-basierten Ginsenosiden später biosynthetisiert werden, und dass die Bildung der Hauptginsenoside Rg₁ und Rb₁ über den Mevalonatweg und über (S)-2,3-Oxidosqualen und das Dammarenylkation erfolgt. Ebenso erlauben die $^{13}\text{CO}_2$ -Markierungsexperimente die Untersuchung der biosynthetischen Herkunft von Polyacetylenen in *P. ginseng*. In diesem Fall zeigen die Ergebnisse, dass Panaxynol und Panaxydol über den erwarteten Fettsäurevorläufer Acetyl-CoA gebildet werden und sehr wahrscheinlich über Ölsäure und Crepenynsäure synthetisiert werden.

Es ist bekannt, dass die höchsten Ausbeuten von Ginsenosiden in sechsjährigen Feldpflanzen auftreten. Diese langandauernde Kultivierungsphase ist zeit- und kostenintensiv und deshalb sind Produzenten von Ginseng an kürzeren Kultivierungsphasen bei ähnlichen oder höheren Ausbeuten der ökonomisch wichtigen Ginsengwirkstoffe interessiert. Versteht man den Ort, den Zeitpunkt sowie die Biosynthesewege, die zur Bildung der Ginsenoside und anderer interessanter Metabolite in *P. ginseng* führen, so ist deren Produktion durch Modifizierung der Kultivierungsbedingungen oder auch durch die Entwicklung effizienter biotechnologischer Strategien mit Zellkulturen oder rekombinanten Organismen optimierbar. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass der $^{13}\text{CO}_2$ -Ansatz für die Erforschung, Optimierung und das bessere Verständnis der metabolen Flüsse von interessanten Naturstoffen in *P. ginseng* und vermutlich auch in anderen Pflanzen unter physiologischen Feldbedingungen verwendet werden kann. Die Daten zeigen die prinzipiellen Biosyntheserouten der wichtigen Inhaltsstoffe von *P. ginseng* als Voraussetzung für spätere molekularbiologische und biotechnologische Anwendungen.

5 Summary

The results from this investigation confirmed that $^{13}\text{CO}_2$ labeling experiments are important tools for studying the biosynthetic origin of plant secondary metabolites under physiological field conditions. The use of pulse and chase periods in $^{13}\text{CO}_2$ labeling experiments with six years old *Panax ginseng* under field conditions showed that protopanaxatriol-based ginsenosides are biosynthesized late during the root development of the plant when compared to panaxadiol-based ginsenosides, and that the formation of the main ginsenosides Rg₁ and Rb₁ follows the mevalonate pathway via the intermediates (S)-2,3-oxidosqualene and the dammarenyl cation. Similarly, the $^{13}\text{CO}_2$ labeling experiments allowed the study of the biosynthetic origin of the polyacetylenes produced by *P. ginseng*. In this case, the results showed that both panaxynol and panaxydol are formed from the fatty acid precursor acetyl-CoA and most likely are synthesized via oleic acid and crepenynic acid.

It is well known that the highest yield of ginsenosides occurs in six years old field plants; these long term cultivation periods are time consuming and expensive and, consequently, producers of Ginseng drugs are interested in shorter cultivation periods with similar or higher yields of economically important pharmaceutical agents of Ginseng. Understanding the location, the timing and the biosynthetic pathways that result in the formation of ginsenosides and other metabolites of interest produced by *P. ginseng*, allows the optimization of their production by modifying the cultivation conditions of the plants or by developing more efficient biotechnical strategies using cell cultures or recombinant organisms. The results of this investigation demonstrate that the $^{13}\text{CO}_2$ -approach can be used to study, optimize and better understand the metabolic fluxes of interesting natural products in many plants cultivated under physiological field conditions. With this study, the principle biosynthetic routes of the important compounds in *P. ginseng* were identified as a basis for future enzymatic and biotechnological applications.

6 Material und Methoden

6.1 Reagenzien und Lösungsmittel

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den kommerziellen Anbietern AppliChem (Darmstadt, DE), Biomol (Hamburg, DE), Fluka (Neu-Ulm, DE), Merck (Darmstadt, DE), Sigma-Aldrich (Steinheim, DE), Serva (Heidelberg, DE), Roth (Karlsruhe, DE) und VWR (Darmstadt, DE) bezogen.

Aceton (99,8 %, HPLC-Qualität)	VWR (Darmstadt, DE)
Acetonitril (99,9 %, HPLC-Qualität)	VWR (Darmstadt, DE)
Ammoniak-Lösung (25%ig)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
1-Butanol (99,9 %, HPLC-Qualität)	VWR (Darmstadt, DE)
Chloroform (99.0 – 99.4 % p. a.)	Merck (Darmstadt, DE)
Dichlormethan (100 %)	VWR (Darmstadt, DE)
Dikaliumhydrogenphosphat	VWR (Darmstadt, DE)
Essigsäureanhydrid (≥ 99 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Ethylacetat (99,5 %)	VWR (Darmstadt, DE)
Glasperlen (0,25 – 0,50 mm)	Roth (Karlsruhe, DE)
n-Hexan (98,1 %)	VWR (Darmstadt, DE)
Kaliumhydrogenphosphat	VWR (Darmstadt, DE)
Magnesiumsulfat, wasserfrei (97 %)	Acros Organics (New Jersey, USA)
Natriumcarbonat	VWR (Darmstadt, DE)
Natriumchlorid	VWR (Darmstadt, DE)
Natriummethanolat (95 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Salzsäure (37 %)	VWR (Darmstadt, DE)
Schwefelsäure (95 – 97 %)	Merck (Darmstadt, DE)
Toluol (100 %)	VWR (Darmstadt, DE)
Tetramethylsilan (99,7 %)	Merck (Darmstadt, DE)
(zur Kalibrierung von Kernresonanzspektren)	
Wasser (bidest., $\sigma = 0,064 \mu\text{s/cm}$)	GenPure TKA (Niederelbert, DE)

Deuterierte Lösungsmittel für die NMR

Methanol-d ₄ (99,8 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Aceton-d ₆ (99,8 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Chloroform (99,8 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Deuteriumoxid (99,8 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
TSP (98%; interner Standard) (3-(Trimethylsilyl)propion-2,2,3,3-d ₄ -säure-Natriumsalz)	Merck Millipore (Darmstadt, DE)

Derivatisierungsreagenzien

MTBSTFA (mit 1% TBDMSCl; 97 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
BSTFA (R ≥ 98.0 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
TMCS (R ≥ 99.0 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
TMSI (R ≥ 94.0 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

Darstellung von TSP

Es wurden 5 mg des 3-(Trimethylsilyl)-propionsäure-D₄ Natriumsalz (TSP) in einem Eppendorfcap in 1 mL D₂O gelöst und über Nacht gefriergetrocknet. Anschließend wurde erneut mit 1 mL D₂O gelöst und erneut über Nacht gefriergetrocknet. Nun wurde in 5 mL D₂O gelöst und die Lösung im Kühlschrank aufbewahrt.

KPO-Puffer

68 mg Kaliumhydrogenphosphat und 87 mg Dikaliumhydrogenphosphat wurden in einem Eppendorfcap in 5 mL D₂O gelöst. Die neutrale Lösung (pH = 7,2) wurde über Nacht gefriergetrocknet und im Kühlschrank aufbewahrt.

Ginsenoside als Standard

Die verwendeten Ginsenoside als Standardsubstanzen zur Kalibrierung der HPLC und für die NMR-Spektroskopie, sowie GC/MS stammen von der Firma Roth und haben HPLC-Reinheit.

Ginsenosid-Rb ₁	Roth (Karlsruhe, DE)
Ginsenosid-Rb ₂	Roth (Karlsruhe, DE)
Ginsenosid-Rc	Roth (Karlsruhe, DE)
Ginsenosid-Rd	Roth (Karlsruhe, DE)

Ginsenosid-Re	Roth (Karlsruhe, DE)
Ginsenosid-Rf	Roth (Karlsruhe, DE)
Ginsenosid-Rg ₁	Roth (Karlsruhe, DE)

Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurden Kieselgel 60 (pH = 6,5 – 7,5; Korngröße 0,063 bis 0,200 mm; 70 – 230 mesh ASTM) und Kieselgel 60 (Korngröße 0,040 bis 0,063 mm; 230 – 400 mesh ASTM) der Firma Merck (Darmstadt, DE) verwendet. Laufmittel wurden nur in p. a. bzw. HPLC-Qualität verwendet. Die Abmessungen der Säulen finden sich in den jeweiligen Versuchsbeschreibungen.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Die analytische DC wurde auf Macherey Nagel Fertigfolien Alugram[®] SIL G/UV₂₅₄ und Silica Gel (60 F₂₅₄) Platten der Firma Merck (0.2 mm Durchmesser) durchgeführt (Abbildung 33).

Laufmittel für DC, Säulenchromatographie und Vakuumflüssigkeitschromatographie (VLC)

1-Butanol/Ethylacetat/H ₂ O (obere Phase)	5:1:4 (v/v)
--	-------------

In einem Schütteltrichter wurden 50 mL 1-Butanol, 10 mL Ethylacetat und 40 mL bidest. Wasser geschüttelt. Die obere Phase wurde abgetrennt und für die DC verwendet.¹⁶

Methanol/Wasser	70:30 (v/v)
Hexan/Aceton/Methanol	80:18:2 (v/v)
Chloroform/Methanol/Wasser	70:35:5 (v/v)
Chloroform/Methanol/Wasser	50:50:5 (v/v)
Chloroform/Methanol/Wasser (untere Phase)	65:35:10 (v/v) ¹⁶⁸

Gase für die Markierungsexperimente

Synthetische Luft (20,5 Vol. % O ₂ , Rest N ₂ , KW frei)	Westfalen AG (Münster, DE)
---	----------------------------

$^{13}\text{CO}_2$ -Gas IsotecTM, Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
 (Mindestens 99 Atom % ^{13}C , 3 Atom % ^{18}O)

6.2 Geräte

GC/MS	GCMS – QP 2010 Plus, AOC-20i Autoinjector, GCMSsolution (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) Säule Equity TM-5; 30 m x 0.25 mm, 0.25 μm Filmdicke (SUPLECO, Bellafonte, PA, USA) Pumpe RV-3 (Edwards, Crawley, West Sussex, Großbritannien)
Gasanalysator	Advance Optima Gas Analyser, ABB (Mannheim, De)
Heizblock	Techne [®] Dri-Block [®] DB-2A (Techne Inc., Burlington, NJ, USA)
Heizrührer	MR Hei-Tec, MR Hei-Standard (Heidolph, Schwabach, DE)
Kontaktthermometer	EKT HeiCON (Heidolph, Schwabach, DE)
Lichtmessgerät	Voltcraft MS-1300 (Conrad Electronic SE, Hirschau, DE)
Lyophilisator	Alpha 1 – 4 Christ (Christ, Osterode am Harz, DE)
Mühle	Siebgröße 0.30 Retsch GmbH (Haan, DE)
Pipetten	VWR (Darmstadt, DE)
Rotationsverdampfer	Heizbad HB digit (Heidolph, Schwabach, DE) Membran-Vakuumpumpe (Vacuubrand GmbH & Co., Wertheim, DE) Verdampfer ROTAVAPUR-R (Büchi, Flawil, Schweiz)
Ribolyser	Hybaid Ribolyser (Obiogene, Illkirch, Frankreich)
Thermometer	EKT HeiCON (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
Trockenschrank	Typ E 28 (Binder, Tuttlingen, DE)
Ultraschallgerät	Ultrasonic Cleaner USC 300T (VWR, Leuven, Belgien)

Vakuumzentrifuge	Membran-Vakuumpumpe (Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE) Vacuum Concentrator (Bachhofer GmbH, Reutlingen, DE)
Vakuumpumpe	Membran-Vakuumpumpe (Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE)
Vakuumpumpe	RC 5 (Vacuubrand GmbH & Co., Wertheim, DE)
Vortexer	REAX 2000 (Heidolph, Schwabach, DE)
Waage (5 g – 2,22 kg)	sartorius laboratory (Sartorius AG, Göttingen, DE)
Waage (1 mg – 120 g)	SBA 32 (Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, DE)
Wasseraufbereitungssystem	GenPure (TKA, Niederelbert, DE)
Zentrifuge	Biofuge primo R (Heraeus, Eppendorf, DE)

6.3 NMR-Spektroskopie

^1H -NMR-Spektren wurden mit einem Avance-I 500 MHz Gerät der Firma Bruker (Karlsruhe, DE) ausgestattet mit einem Inversen Probenkopf (5 mm SEI, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$; Z-gradient), bei 300 K und der Resonanzfrequenz von 500.1 MHz aufgenommen.

^{13}C -NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance-III 500 MHz Spektrometer, ausgerüstet mit einem hochempfindlichen Kryo-Probenkopf (5 mm CPQNP, $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}/^{19}\text{F}/^{29}\text{Si}$; Z-gradient), bei 300 K und der Resonanzfrequenz von 125.8 MHz aufgenommen. Alle Messungen (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, INADEQUATE und 1,1-ADEQUATE-Spektren) wurden mit „Bruker-Standardparametern“ durchgeführt. Weiterhin wurden DEPT-135-Spektren (125.8 MHz) als zusätzliche Zuordnungshilfe auf einem Bruker Avance-III 500 MHz Spektrometer, ausgerüstet mit einem hochempfindlichen Kryo-Probenkopf (5 mm CPQNP, $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}/^{19}\text{F}/^{29}\text{Si}$; Z-gradient), bei 300 K aufgenommen.

Die Auswertung und Analyse der Spektrendaten erfolgte durch die Software MestreNova oder mit TOPSPIN 3.0 (Bruker). Die chemischen Verschiebungen δ werden in ppm relativ zu TMS oder TSP (bei 0 ppm) als internen Standard angegeben. Die Integrale der Satelliten aus den Markierungsexperimenten wurden zum entsprechenden Zentralsignal referenziert. Zur Bezeichnung der Multiplizität der Signale werden folgende Abkürzungen

verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, sept = Septett und m = Multipllett.

6.3.1 Berechnung der absoluten ^{13}C -Anreicherung

Die absolute ^{13}C -Anreicherung (Isotopenhäufigkeit) einzelner Kohlenstoffatome (Gleichung 1) lässt sich aus den Integralen der ^1H - ^{13}C -Kopplungssatelliten berechnen. Bedingung dabei ist, dass die ^1H -Spektren mit einfachen Kopplungen gut aufgelöst sowie eine eindeutige Zuordnung der Signale möglich ist.

$$\% \text{ } ^{13}\text{C}_{\text{abs}} = \frac{H_{\text{IS}}}{H_{\text{IS}} + H_{\text{IZ}}} \cdot 100\% \quad (\text{Gleichung 1})$$

$H_{\text{IS}} = H_{\text{IS1}} + H_{\text{IS2}}$: Summe der Integrale der beiden ^{13}C -Satelliten eines Protonensignals im ^1H -NMR-Spektrum.

H_{IZ} : Integral des entsprechenden Zentralsignals im ^1H -NMR-Spektrum.

6.3.2 Quantitative ^{13}C -Bestimmung über $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplung

Mehrfach markierte Isotopologe weisen $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kupplungen auf. Vergleicht man nun die Integrale der Kopplungssatelliten ($^{\text{c}}\text{I}_{\text{S}}$) mit der Summe der Integrale des gesamten Signals ($^{\text{c}}\text{I}_{\text{S}} + ^{\text{c}}\text{I}_{\text{Z}}$), so erhält man den prozentualen Anteil der $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplung (Gleichung 2). Damit kann also die prozentuale ^{13}C -Anreicherung von mehrfach ^{13}C -markierten Isotopologen bestimmt werden.

$$\% \text{ } ^{13}\text{C}^{13}\text{C} = \frac{C_{\text{IZ}}}{C_{\text{IS}} + C_{\text{IZ}}} \cdot 100\% \quad (\text{Gleichung 2})$$

C_{IS} : Integral der ^{13}C -Satelliten im ^{13}C -NMR-Spektrum

C_{IZ} : Integral des Zentralsignals im ^{13}C -NMR-Spektrum

6.4 Messung der optischen Rotation

Die optische Rotation wurde bei Raumtemperatur auf einem Perkin Elmer 241 MC Polarimeter (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) gemessen. Es wurden zehn Werte aufgenommen und der Mittelwert ermittelt.

6.5 Verwendete Software

ChemDraw Ultra 12.0 CambridgeSoft	PerkinElmer (Cambridge, USA)
GC/MS Postrun	GC/MS Solution Release 2.50 SU3 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)
MestreNova MestreLab	(Santiago de Compostela, Spanien)
TOPSPIN 3.0	(Bruker, Karlsruhe, DE)
Adobe Illustrator CS4 Adobe Systems GmbH	(München, DE)
Microsoft Office 2007/2010	Microsoft (Redmond, USA)
EndNote X7	Adept Scientific GmbH (Frankfurt, DE)

6.6 HPLC

Die eingesetzten Lösungsmittel hatten HPLC-Qualität und wurden vor dem Einsatz filtriert und entgast. Das eingesetzte bidestillierte Wasser hatte eine Leitfähigkeit von 0,060 – 0,086 μS . Die Proben wurden vor dem Einsatz mit einem Spritzenvorsatzfilter 13 mm w/0.45 μm PTFE Membran (VWR, Darmstadt, DE) gefiltert.

6.6.1 HPLC-Anlage

Probengeber	ASI-100 T	Dionex (Germering, DE)
Pumpe	P580A HPG/U	Dionex (Germering, DE)

6.6.2 Detektion

Detektor: UV-Vis Detektor	UVD340U Dionex (Germering, DE)
Wellenlänge: 203 \pm 4 nm	
Referenz: 600 \pm 8 nm	
Deuterium-Lampe	Hamamatsu Photonics (Hamamatsu, Japan)

6.6.3 Analytische Säule

Säule: Phenomenex
Typ: Luna C18(2)
Größe (Dimension): 150 x 4,6 mm
Partikelgröße: 5 µm, 100Å
Temperatur: 26 °C
Flussrate: 0,8 mL
Injektionsvolumen: 10 µL
ChromaDex (Los Angeles, USA)

6.6.4 Präparative Säule

Säule: Phenomenex
Typ: Luna C18(2)
Größe (Dimension): 150 x 21,2 mm, AXIA Packed
Partikelgröße: 5 µm, 100Å
Temperatur: 26 °C
Flussrate: 0,8 mL
Injektionsvolumen: 10 µL
Spritzenvorsatzfilter: 13 mm w/0.45 µm
(Polytetrafluorethylen (PTFE) Membran)
ChromaDex (Los Angeles, USA)
VWR (Darmstadt, DE)

Gradient^{9,169} :

Zeit (Minuten)	Mobile Phase % A	Mobile Phase % B
8	80	20
40	60	40
45	40	60
47	0	100
52	0	100
55	80	20

6.6.5 Isolierung der Ginsenoside über HPLC

Mobile Phase

A: bidest. Wasser

B: Acetonitril/bidest. Wasser (80:20; v/v)

In einer braunen 1 L Drehverschlussflasche wurden zu 800 mL Acetonitril 200 mL bidest. Wasser dazugegeben. Die Lösung wurde zum Vermischen stark gerührt.

Methanol/bidest. Wasser (70:30; v/v)

In einer braunen 1 L Drehverschlussflasche wurden zu 700 mL Methanol 300 mL bidest. Wasser dazugegeben. Die Lösung wurde zur guten Durchmischung stark gerührt.

Vorbereitung der Einzelstandards

In einer braunen 5 mL Drehverschlussflasche wurden folgende Lösungen hergestellt (70:30; v/v):

2,5 mg Ginsenosid-Rb₁ + 4 mL Methanol/Wasser

2,5 mg Ginsenosid-Rb₂ + 4 mL Methanol/Wasser

2,5 mg Ginsenosid-Rc + 4 mL Methanol/Wasser

1,0 mg Ginsenosid-Rd + 2 mL Methanol/Wasser

2,5 mg Ginsenosid-Re + 4 mL Methanol/Wasser

2,5 mg Ginsenosid-Rf + 4 mL Methanol/Wasser

2,5 mg Ginsenosid-Rg₁ + 4 mL Methanol/Wasser

Anschließend wurden die Lösungen für 30 Minuten in das Ultraschallbad gestellt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde den Lösungen jeweils 1 mL Methanol/Wasser (70:30; v/v) zugegeben und gut geschüttelt.

Vorbereitung des Mixstandards

Es wurden jeweils 1 mL des Einzelstandards in eine 10 mL Flasche gegeben und auf 10 mL mit Methanol/Wasser (70:30; v/v) aufgefüllt. Die Lösung wurde gut geschüttelt.¹⁶⁹

Probenvorbereitung für die HPLC

Die Extraktion der Wurzeln wurde nach der im Deutschen Arzneibuch beschriebenen Extraktion von Ginsengwurzeln zur Gehaltsbestimmung von Ginsenosiden durchgeführt.⁹ In einem 500 mL Rundhalskolben wurden zu 5,5 g feingemörserter Wurzel Droge 385 mL 50%iges Methanol gegeben und im Wasserbad für eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurde der Rückstand filtriert und erneut mit 385 mL 50%igem Methanol unter Rückfluss gekocht. Diese Prozedur wurde noch ein drittes Mal wiederholt. Die vereinigten Lösungen wurden vorsichtig bei 40 °C und vermindertem Druck einrotiert. Die eingeeengte gelbe Lösung wurde bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert. Nach der Abtrennung von dem Feststoff wurde das Lösungsmittel abrotiert. Der braun-orange zähflüssige Rückstand wurde in 5 mL Wasser/Acetonitril (80:20, v/v) gelöst. Anschließend wurde die Lösung 5 Minuten bei Raumtemperatur und 3.500 U/min zentrifugiert. Die Lösung wurde dann durch einen Spritzenvorsatzfilter (13 mm w/ 0,45 µm PTFE Membran) in eine 4 mL braune Gewindeflasche filtriert. Für die HPLC wurde ein Teil der Probe in eine kleine Gewindeflasche überführt. Die aufgesammelten Ginsenoside wurden vorsichtig bei 38 °C einrotiert. Zu den farblosen Rückständen wurden deuteriertes Methanol und 5 µL TSP (5,8 mmol) als interner Standard zugegeben und für 5 Minuten zum besseren Lösen in das Ultraschallbad gestellt. Zur Charakterisierung der Proben wurde NMR durchgeführt.

6.7 ¹³C-Markierungsexperimente von *P. ginseng* C. A. Meyer

Die Markierungsexperimente der *P. ginseng* C. A. Meyer Pflanzen wurden im Mai und August 2010 sowie August 2011 auf den Feldern der Firma FloraFarm Ginseng (Walsrode, Deutschland) durchgeführt. Einen Überblick über die Details der Markierungsexperimente gibt die Tabelle 11. Die Experimente konnten nicht zu den gleichen Zeiten gestartet werden, aufgrund von Wetterbedingungen, Aufbau, Boden und anderen Umständen.

Tabelle 11: $^{13}\text{CO}_2$ -Markierungsexperimente mit *P. ginseng* C. A. Meyer Pflanzen.

26.05.2010 – 29.05.2010						
Pflanze	1	2	3	4	5	6
Alter [a]	6	6	6	6	6	6
Höhe [cm]	52	46	45	46	33	43
Pulsphase [h]	40 min	5	3.29	3.52	2.43	8.54
Chasephase [d]	5	5	5	1	0	5
$^{13}\text{CO}_2$ Verbrauch [mL]	-	1699	1114	1098	0,349	2670
Wetter	bewölkt	bewölkt/ sonnig	bewölkt	bewölkt/ sonnig	bewölkt/ sonnig	sonnig
Lichtstärke neben Pflanze [Lux*100]; mittags	60	59	36	66	74	15
Lichtstärke (freies Feld) [Lux*100]; mittags	356	880	204	238	344	760

02.08.2010 – 13.08.2010								
Pflanze	7	8	9	10	11	12	13*	14*
Alter [a]	6	6	6	6	6	6	3	4
Höhe [cm]	55	45	44	41	43	53	27	27
Pulsphase [h]	7	7	7	7	7	10	8.16	8.16
Chasephase [d]	10	9	8	7	6	5	3	3
¹³ CO ₂ Verbrauch [mL]	2147	2006	1966	2278	1813	2590	2136	2136
Wetter	bewölkt/ sonnig	bewölkt	bewölkt (Regen)	bewölkt	sonnig	bewölkt (Regen)	sonnig	sonnig
Lichtstärke neben Pflanze [Lux*100]; mittags	60	84	72	107	151	38	15	15
Lichtstärke (freies Feld) [Lux*100]; mittags	313	455	316	525	803	198	920	920

* Pflanzen 13 und 14 wurden zusammen begast.

22.08.2011 – 26.08.2011						
Pflanze	15	16	17	18	19	
Alter [a]	6	6	6	6	6	
Höhe [cm]	43	48	48	62	58	
Pulsphase [h]	7.25	8.10	5.30	4.50	9.33	
Chasephase [d]	23	22	21	20	19	
¹³ CO ₂ Verbrauch [mL]	4437	5110	4900	-*	11221	
Wetter	sonnig	bewölkt (windig)	sonnig	bewölkt (Nebel)	bewölkt	
Lichtstärke neben Pflanze [Lux*100]; mittags	71	60	124	44	134	
Lichtstärke (freies Feld) [Lux*100]; mittags	823	395	792	243	829	

* Rechner ausgefallen

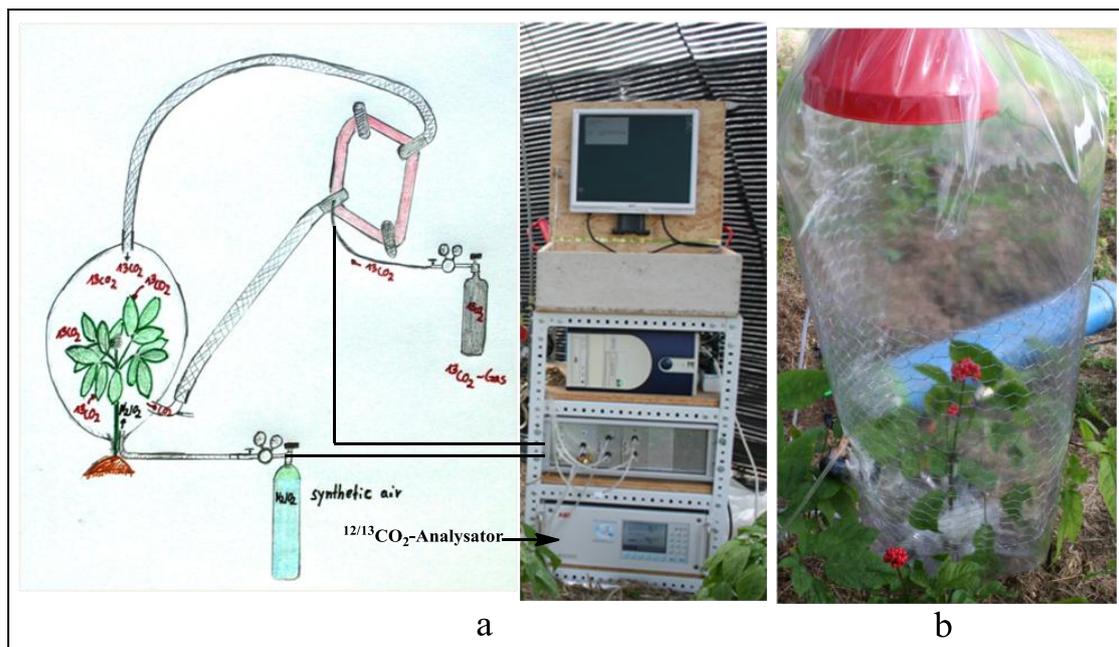
Die Pflanzen wurden vor Ort übergangsweise im Kühlschrank zwischen -3 °C und -5 °C gelagert. Für den Transport nach München wurde eine Kühlbox mit Kühlaggregaten verwendet. Im Labor wurden die Blätter, Stiele und Wurzeln (vorsichtig gewaschen und trockengetupft) der Pflanze in kleine Stücke geschnitten. Anschließend wurden die Pflanzenmaterialien mit flüssigem Stickstoff behandelt und über Nacht gefriergetrocknet. Die Pflanzenmaterialien wurden fein gemörsert^[1], gewogen und in Falcon-Tubes im Tiefkühlfach bei -20 °C aufbewahrt (Tabelle 12, im Anhang).

^[1]Am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim wurden einige der Proben maschinell sehr fein gemahlen (Retsch ZM 1 mill, Haan, DE) und zur Verfügung gestellt.

Die mobile Einheit (Abbildung 9 und 30) ist ein Eigenbau von Dr. Nicholas Schramek. Aufgrund der unterschiedlichen Pflanzengrößen wurde eine transparente Plastikfolie als Kammer, die Innen durch einen Maschendrahtzylinder stabilisiert ist, verwendet. Die Kammer sollte die Pflanze unten am Stiel (vorsichtig!) fest umschließen, um sie möglichst vor der $^{12}\text{CO}_2$ -haltigen Außenatmosphäre abzuschotten. Der Auslassschlauch befindet sich am oberen Ende und der Einlassschlauch im unteren Teil der Kammer. Über ein Druckminderungsventil wird die $^{13}\text{CO}_2$ -Dosierung reguliert. Der $^{13}\text{CO}_2$ -Druck wird am Auslass auf 300 bis 500 mbar reduziert. Für die Feinregulierung der Gasströme wird ein hochpräzises Regelventil verwendet. Ein elektrisches Ventil reguliert den Einlass von $^{13}\text{CO}_2$ in die Inkubationskammer (z. B. 700 ppm $^{13}\text{CO}_2$) gemäß der gewünschten Zielkonzentration. Die Speicherung der Daten und die Kontrolle des Gasstroms erfolgt über einen Linux-basierten Computer. Die Daten werden mit einer Messkarte (ME-Jekyll ME-4610, Meilhaus GmbH, Puchheim, DE) von Analog in Digital umgewandelt. Um den $^{12}\text{CO}_2$ -Gehalt während der Begasung mit $^{13}\text{CO}_2$ so gering wie möglich zu halten, kann die Kammer mit synthetischer Luft gespült werden. Die Regulierung des synthetischen Luftstroms erfolgt elektronisch und liegt für $^{12}\text{CO}_2$ typischerweise bei < 70 ppm.

Abbildung 30. a) schematische Darstellung der mobilen $^{13}\text{CO}_2$ -Inkubationseinheit

b) Inkubationskammer



Mit diesen Parametern wurden die Pflanzen in einer $^{13}\text{CO}_2$ -Atmosphäre (99,9 % ^{13}C -Anreicherung) von ca. 700 ppm in der Kammer mehrere Stunden („Pulsephase“) begast (Tabelle 11 sowie 12 im Anhang). Die Pflanzen wurden dann für einige Tage bis Wochen („Chasephase“) unter normalen Feldbedingungen belassen und anschließend geerntet.

6.8 Analyse von Aminosäuren

6.8.1 Probenvorbereitung

Extraktion von freien Aminosäuren

Für die schnelle Extraktion mittels Ribolyser wurden zunächst in einem 1,5 mL Eppendorfcap 500 μL Glasperlen (0,25 – 0,50 mm; Roth, Karlsruhe, DE) abgemessen und in ein Ribolysergefäß gefüllt. Auf diese Glasperlen wurden 60 mg gefriergetrocknetes und fein gemörstertes Pflanzenmaterial gegeben. Danach wurde 1 mL Methanol zu der so vorbereiteten Probe dazugegeben und dreimal für 20 Sekunden im Ribolyser bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s aufgeschlossen. Die Probe wurde dann bei 10.000 U/min und 20 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Lösungsmittel wurde in ein Autosampler-Gläschen überführt und unter einem konstanten N_2 -Strom bei Raumtemperatur bis zur Trockne abgeblasen. Die Probe wurde bei -20 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Saure Hydrolyse von Protein

Für die saure Hydrolyse wurden in einem 1,5 mL Autosampler-Gläschen 10 mg lyophilisiertes und gemörstertes Pflanzenmaterial (Wurzel und Blätter) eingewogen. Danach wurden 500 μL 6M Salzsäure zur Probe pipettiert und diese für 24 Stunden im Trockenschrank bei 105 °C hydrolysiert. Die Salzsäure wurde im Heizblock bei 70 °C unter N_2 -Strom vollständig entfernt. Der trockene Rückstand wurde mit 200 μL 50%iger Essigsäure versetzt und zum Lösen für eine Minute in das Ultraschallbad gestellt.

Aufreinigung

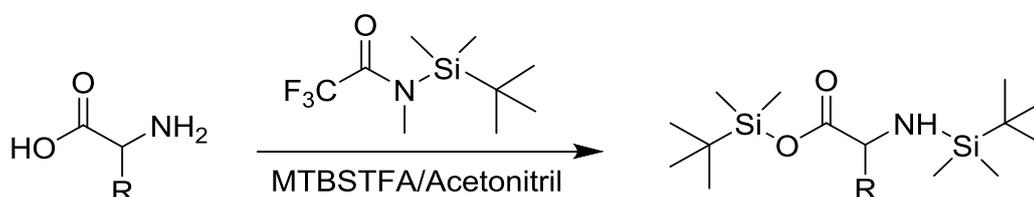
Für die Aufreinigung der Aminosäuren wurde eine 1 mL Pipettenspitze als Säule verwendet. Diese wurde mit etwas Glaswolle versehen und vorsichtig mit Hilfe eines Glasstabes verdichtet. Anschließend wurden 300 μL Kationentauscher (Dowex 50WX8, 200-400 mesh (= 37-74 μm), H^+ -Form) auf die Glaswolle gegeben und nacheinander mit je 1 mL 70%igem Methanol und bidest. Wasser gespült. Danach wurde die Probe vorsichtig

mit einer Glaspipette auf die Säule gegeben. Nach dem Einsickern wurde die Probe zweimal mit je 1 mL bidest. Wasser (erst ins Autosampler-Gläschen pipettiert und dann auf die Säule gegeben) nachgewaschen. Das Eluat wurde verworfen. Die Elution der Aminosäuren wurde mit 1 mL einer 4M Ammoniaklösung durchgeführt und die Fraktion in einem 1,5 mL Eppendorfcap aufgefangen. Von der Fraktion wurden 200 μL in ein Autosampler-Gläschen überführt und bei 70 °C unter N_2 -Zufuhr trocken geblasen.

Derivatisierung

Für die GC/MS-Analyse wurden die so gereinigten Aminosäuren zum Schutz der Carboxyl- sowie der Aminogruppen derivatisiert (Abbildung 31). Hierfür wurden je 50 μL wasserfreies Acetonitril und 50 μL MTBSTFA zur Probe pipettiert und für 30 Minuten auf 70 °C erhitzt. Die Lösung wurde für die GC/MS-Messung in ein Autosampler-Gläschen überführt.

Abbildung 31. Derivatisierungsreaktion zum Schutz der Carboxyl- sowie der Aminogruppen mit TBDMS-Gruppen (*tert*-Butyldimethylsilyl).



^[2]Teile der GC/MS-Messungen sowie der Auswertungen wurden von Dr. Claudia Huber durchgeführt und dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

6.8.2 GC/MS-Methode

Für die Gaschromatographie können nur gasförmige Substanzen verwendet werden. Zu Erstellung des Isotopologprofils der Aminosäuren wurden die derivatisierten Proben durch dreimaliges Messen^[2] der Proben im SIM (Single Ion Monitoring) Betrieb mit den folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt:

Anfangstemperatur der Säule: 150 °C (3 min)

Temperaturgradient: 7 °C/min

Endtemperatur der Säule: 280 °C (3 min)

Injektor: 260 °C

Ionenquelle: 200 °C

Interface: 260 °C

Druck: 102,6 kPa

Total Flow: 9,7 mL/min

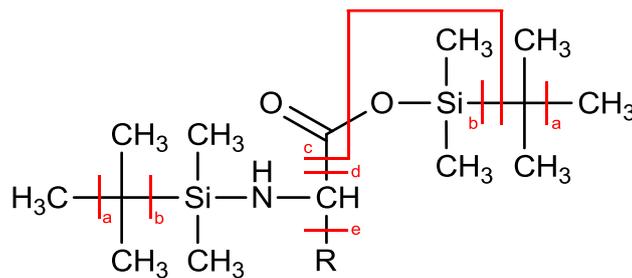
Column Flow: 1,11 mL/min

Split: 1:5

Detektorspannung: angepasst an aktuellen Tuning-Lauf

Solvent Cut: 3 min

Abbildung 32. Derivatisierte Aminosäure mit Fragmentierung.¹⁷⁰



- a: [M-15]⁺ eine Methylgruppe ist abgespalten
- b: [M-57]⁺ eine *tert*-Butylgruppe ist abgespalten
- c: [M-85]⁺ eine *tert*-Butylgruppe inklusive CO ist abgespalten
- d: [M-159]⁺ das C(O)-TBDMS-Ion ist abgespalten
- e: [f302]⁺ entspricht dem doppelt silylierten C1-C2 Fragment ohne Rest R
- f: [M-159-57-1]⁺ das C(O)-TBDMS-Ion, die zweite *tert*-Butylgruppe und ein Proton sind abgespalten

6.8.3 Auswertung der Messergebnisse

Die Auswertung der GC/MS-Messergebnisse (Chromatogramme und Massenspektren) erfolgte mit der Software *GCMS Postrun Analysis* aus dem Gerätehersteller-Softwarepaket *GC/GCMSsolution*. Die Auswertung der Rohdaten, die Berechnungen der ^{13}C -Überschüsse eines Metaboliten und die Bestimmung des Isotopologmusters ($m+1$, $m+2$, ..., $m+n$ mit n = Anzahl der C-Atome im Molekül) werden entsprechend *Lee et al.* verarbeitet.¹⁷¹ Für die praxistaugliche Anwendung werden die relativen Intensitäten der entsprechenden Massen für Standard und Probe mit Microsoft Excel (spezielles *Excel* Makro der Arbeitsgruppe) prozessiert und ausgewertet.¹⁷⁰ Bei der Prozessierung und Auswertung der Daten wird die natürliche Anreicherung von ^{13}C mit 1,1 % berücksichtigt (durch Vergleich der Daten mit unmarkiertem und derivatisiertem Referenzmaterial (Metabolitstandard oder unmarkierte Probe). Weiterhin wird der Einfluss des Derivatisierungsmittels berücksichtigt. Für die Berechnungen der ^{13}C -Überschussrate (Overall Excess) werden die Annahmen von *Pickup* und *McPherson* berücksichtigt.¹⁷² Die Berechnung der absoluten ^{13}C -Anreicherung (^{13}C -Excess in mol%) erfolgt nach folgender Gleichung:

$$\text{Overall Excess (mol\%)} = \frac{[1 * (M+1) + 2 * (M+2) + 3 * (M+3) + \dots X * (M+X)]}{X}$$

(Gleichung 3)

- M: Masse des betrachteten Fragmentions
X: Gesamtzahl der Kohlenstoffatome des betrachteten Fragments
M+X: ^{13}C -Excess Wert [mol%] des Fragmentions, in das X ^{13}C -Atome eingebaut wurden

6.9 Isolierung von Panaxynol und Panaxydol

22,25 g des feingemörserten Wurzelmaterials der Pflanze 19 wurden jeweils zweimal für drei Stunden bei 70 °C unter Rückfluss mit Hexan (300 mL) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde bei einer Badtemperatur von 35 °C und unter verminderten Druck zur Trockne eingedampft. Es wurden 209 mg (schwach gelb) Rohmaterial erhalten. Die Aufreinigung erfolgte über Säulenchromatographie (3 × 25 cm) mit Kieselgel 60 (pH = 6,5 – 7,5; Korngröße 0,063 bis 0,200 mm; 70 – 230 mesh ASTM; Darmstadt, DE) und einem

Lösungsmittelgemisch aus Hexan/Aceton/Methanol (80:18:2; v/v) als Eluenten (Fraktionsvolumen, 5 mL). Es wurden 2.3 mg Panaxynol (**1**) bei einem Retentionsvolumen von 155 mL sowie 2.0 mg Panaxydol (**2**) bei einem Retentionsvolumen von 205 mL erhalten.

Die NMR-Spektren wurden in CDCl_3 aufgenommen und die Identität der jeweiligen Naturstoffe konnte durch Vergleich der spektroskopischen Daten (^1H - und ^{13}C -NMR) mit den Daten aus der Literatur bestätigt werden.¹⁵⁸⁻¹⁶¹ Die Chiralität an der Position C-3 von Panaxynol (**1**) wurde mit (*R*) durch Vergleich des gemessenen Wertes der optischen Aktivität ($[\alpha]_D -28,5^\circ$; c 0,17; CHCl_3) mit dem Wert aus der Literatur ($[\alpha]_D -31,5^\circ$; c 1,0; CHCl_3) bestätigt.¹⁶⁶

6.10 Isolierung der Zucker

Analyse der Zucker als Diisopropyliden-Acetatderivate:

a)

10 mg der gefriergetrockneten Wurzel- oder Blattprobe wurden für 1 h bei Raumtemperatur mit 1 mL Aceton, die 20 μL H_2SO_4 enthält, inkubiert. Anschließend wurden zu dieser Mischung jeweils 2 mL gesättigte NaCl- und Na_2CO_3 -Lösung zugegeben. Diese Lösung wurde zweimal mit 3 mL Ethylacetat extrahiert (starkes Schütteln) und die vereinigten organischen Phasen in einem GC/MS-Gläschen unter einem konstanten Stickstoff-Strom bis zur Trockne abgeblasen. Dem so getrockneten Rückstand wurde eine Lösung aus Ethylacetat und Acetanhydrid im Verhältnis 1:1 zugegeben und über Nacht bei 60 °C inkubiert. Die GC/MS-Analyse erfolgte in einem Split Mode (1:5) und einem Temperaturgradienten von 150 °C (3 min) – 280 °C (10 °C/min). Die anderen Messparameter entsprechen denen der Aminosäureanalyse. Unter diesen Bedingungen hydrolysiert die Saccharose zu Glucose und Fructose. Die Retentionszeiten für die Glucose- und Fructosederivate betragen 8,4 min und 7,9 min.

b)

Fritte 2 (Durchmesser: 4 cm; Höhe: 5 cm)

Schott (Mainz, DE)

Für die VLC wurde Kieselgel 60 (pH = 6,5 – 7,5; Korngröße 0,063 bis 0,200 mm; 70 – 230 mesh ASTM) der Firma Merck (Darmstadt, DE) verwendet.

Die Extraktion der Wurzeln wurde nach der im Deutschen Arzneibuch beschriebenen Extraktion von Ginsengwurzeln zur Gehaltsbestimmung von Ginsenosiden durchgeführt (siehe Probenvorbereitung für die HPLC).

Zu 201 mg Extrakt in einer 4 mL braunen Gewindeflasche wurden 2 mL 50%iges Methanol gegeben und für 10 Sekunden in das Ultraschallbad gehalten. Aus dieser Lösung wurden 50 µL als Referenz entnommen und im Kühlschrank aufbewahrt. Nun wurde die gelöste Probe in einem kleinen Becherglas zu etwas Kieselgel gegeben. Reste aus der Gewindeflasche wurden mit 500 µL 50%igem Methanol in das Becherglas nachgespült. Nach sehr gutem Verrühren wurde die Mischung am Rand des Becherglases verteilt, gut gepresst und anschließend mit einem Fön getrocknet. Die Fritte wurde mit 3 cm Kieselgel aufgefüllt (4 bis 5 cm für 0,5 g Extraktionsprodukt). Die Säule wurde zum besseren Packen (möglichst gerade) sehr gut geklopft und gestopft (geschützt durch ein Filterpapier). Danach wurden 30 mL Chloroform auf die Fritte gegeben und das Lösungsmittel mittels Vakuum abgezogen. Die Säule wurde erneut kompakt geklopft und vorsichtig planar mit einem Becherglas gedrückt. Die Probenmischung wurde auf die Säule gegeben und möglichst planar geklopft. Auf diese Schicht wurde als Schutz vor dem Lösungsmittel eine ca. 0,5 cm Kieselgelschicht gegeben und ebenfalls vorsichtig planar geklopft. Zum Schluss wurde ein Rundfilter auf die oberste Schicht gelegt. Zunächst wurden vorsichtig mit 30 mL Chloroform/Methanol/Wasser (70:35:5; v/v) eluiert und drei Fraktionen gesammelt. Anschließend wurde erneut mit Chloroform/Methanol/Wasser (50:50:5; v/v) eluiert und ebenfalls drei Fraktionen gesammelt. Die Kontrolle erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie und den Laufmitteln 1-Butanol/Ethylacetat/H₂O (5:1:4; v/v; obere Phase) und Chloroform/Methanol/Wasser (65:35:10; v/v; untere Phase).

Die Proben wurden mit Stickstoff bei 40 °C bis zur Trockne (schwach gelb) abgeblasen. Für die NMR-Messung wurde deuteriertes Methanol mit TSP als interner Standard verwendet. Über Nacht fielen farblose Kristalle aus (87 mg; entspricht 44 % Ausbeute). Die Kristalle lösten sich am besten in deuteriertem Wasser. Es wurden zur Charakterisierung der Probe ein ¹H, ¹³C, COSY, TOCSY, HSQC, HMBC sowie ein INADEQUATE gemessen. Die NMR-Daten zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten von Saccharose.¹⁷³⁻¹⁷⁵

6.10.1 Glucose-Isolierung

Die Saccharoseprobe wurde aus dem NMR-Röhrchen in ein Reagenzglas überführt und bei 70 °C/N₂-Strom bis fast zur Trockne abgeblasen. Zum Einfrieren wurde die Probe in das Tiefkühlfach gestellt und danach über Nacht am Lyophilisator gefriergetrocknet. Es wurden 8 mg der farblosen Saccharose erhalten.

Zur Herstellung der Stammlösung wurde in einem Becherglas 5 mL Aceton vorgelegt und dann 100 µL konz. Schwefelsäure dazugegeben (Isopropylidenbildung). Zunächst wurden 10 µL bidest. Wasser zur Probe gegeben und anschließend 1 mL der frisch hergestellten Stammlösung. Man lässt die Lösung für eine Stunde im Abzug inkubieren. In einem zweiten Reagenzglas wurde die organische Phase vorbereitet. Hierfür wurden zunächst in einem Reagenzglas nacheinander zu einer 2 mL gesättigten Natriumchloridlösung 2 mL Natriumcarbonatlösung und 3 mL Ethylacetat gegeben. Die Lösung wurde mehrmals geschüttelt (Septumstopfen) und zwischendurch belüftet. Nach der Phasentrennung wurde die obere organische Phase entnommen und in das zweite Reagenzglas überführt. Diese Prozedur wurde durch erneute Zugabe von 3 mL Ethylacetat zu der wässrigen Lösung wiederholt, die organische Phase abgetrennt und mit der organischen Phase im zweiten Reagenzglas vereinigt. Das Ethylacetat wurde bei Raumtemperatur eingeeengt (im N₂-Strom abgeblasen), anschließend in eine GC/MS-Gewindeflasche überführt und dort bis zur Trockne abgeblasen. Für die Acetylierung wurden der Probe 200 µL einer Lösung Ethylacetat/Essigsäureanhydrid (1:1) zugegeben und bei 60 °C im Trockenschrank über Nacht inkubiert. Die Probe wurde in ein Autosampler-Gläschen überführt und in der GC/MS (Glucose scan, Glucose sim Methode; siehe Bedingungen unter a) gemessen.

Nachweisreagenz

Zur Visualisierung der Polyacetylene und Ginsenoside auf den Platten (Silica Gel (60 F₂₅₄), 0.2 mm Durchmesser; Merck, Darmstadt, DE) wurde eine Mischung aus H₂SO₄/MeOH (1:10; v/v) verwendet. Für die Herstellung wurden 10 mL konz. Schwefelsäure vorsichtig in 90 mL eisgekühltes Methanol gegeben. Die DC-Platte wurde mit Watte (durchtränkt mit Nachweisreagenz) betupft und für ca. 5 Minuten bis zur optimalen Farbbildung zwischen 90-105 °C entwickelt und bei Tageslicht ausgewertet.⁴

6.11 Gehaltsbestimmung der Ginsenoside

Die Isolierung der Ginsenoside Rg₁ und Rb₁ und Gehaltsbestimmung aus den Feldversuchen wurden am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in der Abteilung von Dr. N. Schramek durchgeführt. Diese Daten wurden für diese Arbeit zu Verfügung gestellt.

Analytische HPLC

Die Analyse der Ginsenoside erfolgte nach der Arbeitsanleitung im europäischen Arzneibuch.¹⁷⁶ Hierfür wurden 100 mg der feingemahlene getrocknete Wurzeln zweimal mit 50%igem Methanol unter Rückfluss extrahiert. Die vereinigten Fraktionen wurden bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 20 mL einer 20%igen Acetonitrillösung gelöst. Die HPLC-Analyse wurde auf einer symmetrischen C₁₈ 150 x 3.9 mm Säule der Firma Waters mit einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 20 µL. Der Gradient wurde innerhalb von 40 Minuten von 20 zu 40%igen Acetonitril und anschließend noch für 7 Minuten auf 100 % Acetonitril erhöht. Das Eluat wurde bei 203 nm mit einem UV-Detektor kontrolliert.

Präparative HPLC

Für die Soxhletextraktion mit 100 mL Methanol (2 h) wurden 10 g feingemahlene und getrocknete Wurzelmaterial genommen. Der Extrakt wurde unter Vakuum auf 5 mL aufkonzentriert und anschließend für 3 Minuten bei 14.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde für die präparative HPLC (Merck Hitachi) zum Isolieren der Hauptginsenoside Rg₁ und Rb₁ verwendet. Als Säule ("reversed phase") wurde eine Luna® 5 µm C₁₈(2) 100Å AX; 150 x 21.2 mm; Phenomenex) mit einer Flussrate von 8 ml/min verwendet. Der Gradient wurde innerhalb von 40 Minuten von 15 zu 40%igen Acetonitril und anschließend noch für 5 Minuten auf 100 % Acetonitril erhöht. Das Eluat wurde bei 206 nm mit einem UV-Detektor kontrolliert. Die Retentionsvolumina betrugen für Rg₁ und Rb₁ 200 sowie 305 mL. Die Fraktionen wurden unter verminderten Druck bis zur Trockne eingedampft. Es wurden 100 mg Rg₁ (10 mg/g Wurzelmaterial) und 50 mg Rb₁ (5 mg/g Wurzelmaterial) erhalten. Für ein- bzw. zweidimensionale NMR-Messungen (¹H-, ¹³C-, COSY-, TOCSY-, HMQC-, HMBC- sowie noch INADEQUATE und 1,1-ADEQUATE-Experimente) wurden beide Ginsenoside jeweils in 600 µL Methanol-D₄ gelöst.

6.12 Panaxadiol/Panaxatriol (alkalische Hydrolyse)

Für die schnelle Extraktion mittels Ribolyser wurden zunächst in einem 1,5 mL Eppendorfcap 500 μ L Glasperlen abgemessen und in ein Ribolysergefäß gefüllt. Auf diese Glasperlen wurden 100 mg gefriergetrocknetes und fein gemörsertes Pflanzenmaterial gegeben. Danach wurden 1 mL Methanol zur der so vorbereiteten Probe dazugegeben und dreimal für 20 Sekunden im Ribolyser bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s extrahiert. Die Probe wurde dann bei 10.000 U/min und 20 °C für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Lösungsmittel wurde in eine braune Drehverschlussflasche überführt und unter einem N₂-Strom bei Raumtemperatur bis zur Trockne abgeblasen. Nun wurden für die alkalische Derivatisierung 70 mg Natriummethanolat in 2,5 mL 1-Butanol bei 90 °C im Trockenschrank für 15 Minuten (zwischendurch immer wieder geschüttelt) gelöst. Die so hergestellte Lösung wurde auf die wie oben beschriebene vorbereitete, bis zur Trockne abgeblasene Probe gegeben und für 3 Stunden bei 90 °C in den Trockenschrank gestellt. Nach dem Abkühlen wurde zur Abtrennung der organischen Phase 1,2 mL bidest. Wasser zugegeben, anschließend gut geschüttelt und nach der Phasentrennung (Kühlen beschleunigt die Phasentrennung) die organische Phase vorsichtig abgetrennt. Diese Prozedur wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und im Heizblock bei 70 °C im N₂-Strom bis zur Trockne abgeblasen.

GC/MS-Messung

Zu den Proben wurden nun für die GC/MS-Messung nacheinander 40 μ L BSTFA, 40 μ L TMSI sowie 30 μ L TMCS zugegeben und anschließend für 20 Minuten bei 70 °C im Heizblock derivatisiert. Die Lösung wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur für die GC/MS-Messung in ein Autosampler-Gläschen überführt. Die derivatisierten Proben wurden durch dreimaliges Messen der Proben im SIM Betrieb mit den folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt:

Anfangstemperatur der Säule: 200 °C (1 min)

Temperaturgradient: 7 °C/min

Endtemperatur der Säule: 280 °C (3 min)

Injektor: 260 °C

Ionenquelle: 200 °C

Interface: 260 °C

Druck: 118,7 kPa

Total Flow: 9,4 mL/min

Column Flow: 1,07 mL/min

Split: 1:5

Detektorspannung: angepasst an aktuellen Tuning-Lauf

Solvent Cut: 11 min

7 Literaturverzeichnis

- (1) Yun, T. K. *J Korean Med Sci* **2001**, *16 Suppl*, S3.
- (2) Lee, T.-K.; Johnke, R. M.; Allison, R. R.; O'Brien, K. F.; Dobbs, L. J., Jr. *Mutagenesis* **2005**, *20*, 237.
- (3) Jia, L.; Zhao, Y. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2475.
- (4) Richter, R. PhD, Hamburg, 2008.
- (5) Cho, I.-H. PhD, Siegen, 2001.
- (6) Tang, H.-F.; Cheng, G.; Wu, J.; Chen, X.-L.; Zhang, S.-Y.; Wen, A.-D.; Lin, H.-W. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 284.
- (7) Van Dyck, S.; Gerbaux, P.; Flammang, P. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 173.
- (8) Osbourn, A.; Goss, R. J. M.; Field, R. A. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1261.
- (9) *Deutsches Arzneibuch*; 6. Ausgabe Grundwerk ed.; Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2008.
- (10) Fuzzati, N. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *812*, 119.
- (11) Qi, L.-W.; Wang, C.-Z.; Yuan, C.-S. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 467.
- (12) Christensen, L. P. *Adv. Food Nutr. Res.* **2009**, *55*, 1.
- (13) Dou, D.-Q.; Hou, W.-B.; Chen, Y.-J. *Planta Med.* **1998**, *64*, 585.
- (14) Chan, T. W. D.; But, P. P. H.; Cheng, S. W.; Kwok, I. M. Y.; Lau, F. W.; Xu, H. X. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2329.
- (15) Sanada, S.; Kondo, N.; Shoji, J.; Tanaka, O.; Shibata, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, *22*, 2407.
- (16) Shibata, S.; Tanaka, O.; Ando, T.; Sado, M.; Tsushima, S.; Ohsawa, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1966**, *14*, 595.
- (17) Cheng, Y.; Shen, L.-h.; Zhang, J.-t. *Acta Pharmacol. Sin.* **2005**, *26*, 143.
- (18) Attele, A. S.; Wu, J. A.; Yuan, C. S. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 1685.
- (19) Kim, Y.-J.; Jeon, J.-N.; Jang, M.-G.; Oh, J. Y.; Kwon, W.-S.; Jung, S.-K.; Yang, D.-C. *J. Ginseng Res.* **2014**, *38*, 66.
- (20) Zhang, Y.; Sun, K.; Liu, Y.-Y.; Zhang, Y.-P.; Hu, B.-H.; Chang, X.; Yan, L.; Pan, C.-S.; Li, Q.; Fan, J.-Y.; He, K.; Mao, X.-W.; Tu, L.; Wang, C.-S.; Han, J.-Y. *Am. J. Physiol.* **2014**, *306*, G289.

- (21) Liang, J.; Yu, Y.; Wang, B.; Lu, B.; Zhang, J.; Zhang, H.; Ge, P. *Molecules* **2013**, *18*, 12777.
- (22) Ni, N.; Liu, Q.; Ren, H.; Wu, D.; Luo, C.; Li, P.; Wan, J.-B.; Su, H. *Molecules* **2014**, *19*, 3012.
- (23) Huang, S.-L.; He, X.-J.; Li, Z.-F.; Lin, L.; Cheng, B. *Pharmazie* **2014**, *69*, 208.
- (24) Baeg, I.-H.; So, S.-H. *J. Ginseng Res.* **2013**, *37*, 1.
- (25) Park, H.-W.; In, G.; Cho, B.-G.; Han, G.-H.; Chang, I.-M.; Kim, J.-H. *J. Ginseng Res.* **2014**, *38*, 59.
- (26) Lee, S. Y.; Kim, Y. K.; Park, N. I.; Kim, C. S.; Lee, C. Y.; Park, S. U. *J. Med. Plants Res.* **2010**, *4*, 349.
- (27) Liu, C.; Xiao, P. *J. Ethnopharmacol.* **1992**, *36*, 27.
- (28) Soldati, F.; Tanaka, O. *Planta Med.* **1984**, *50*, 351.
- (29) Hansen, L.; Boll, P. M. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 285.
- (30) Matsunaga, H.; Katano, M.; Yamamoto, H.; Fujito, H.; Mori, M.; Takata, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 3480.
- (31) Minto, R. E.; Blacklock, B. J. *Prog. Lipid Res.* **2008**, *47*, 233.
- (32) Shun, A. L. K. S.; Tykwinski, R. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1034.
- (33) Zidorn, C.; Joehrer, K.; Ganzera, M.; Schubert, B.; Sigmund, E. M.; Mader, J.; Greil, R.; Ellmerer, E. P.; Stuppner, H. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2518.
- (34) Hirakura, K.; Takagi, H.; Morita, M.; Nakajima, K.; Niitsu, K.; Sasaki, H.; Maruno, M.; Okada, M. *Nat. Med. (Tokyo)* **2000**, *54*, 342.
- (35) Christensen, L. P. *Recent Pat. Food, Nutr. Agric.* **2011**, *3*, 64.
- (36) Otsuka, H.; Komiya, T.; Fujioka, S.; Goto, M.; Hiramatsu, Y.; Fujimura, H. *Yakugaku Zasshi* **1981**, *101*, 1113.
- (37) Baba, K.; Tabata, Y.; Kozawa, M.; Kimura, Y.; Arichi, S. *Shoyakugaku Zasshi* **1987**, *41*, 189.
- (38) Teng, C. M.; Kuo, S. C.; Ko, F. N.; Lee, J. C.; Lee, L. G.; Chen, S. C.; Huang, T. F. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1989**, *990*, 315.
- (39) Alanko, J.; Kurahashi, Y.; Yoshimoto, T.; Yamamoto, S.; Baba, K. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1979.
- (40) Harding, V. K.; Heale, J. B. *Physiol. Plant Pathol.* **1980**, *17*, 277.
- (41) Xu, L.-L.; Han, T.; Wu, J.-Z.; Zhang, Q.-Y.; Zhang, H.; Huang, B.-K.; Rahman, K.; Qin, L.-P. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 609.

- (42) Hansen, S. L.; Purup, S.; Christensen, L. P. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 1010.
- (43) Kuo, Y.-C.; Lin, Y.-L.; Huang, C.-P.; Shu, J.-W.; Tsai, W.-J. *Cancer Invest.* **2002**, *20*, 955.
- (44) Gafner, F.; Epstein, W.; Reynolds, G.; Rodriguez, E. *Contact Dermatitis* **1988**, *19*, 125.
- (45) Machado, S.; Silva, E.; Massa, A. *Contact Dermatitis* **2002**, *47*, 113.
- (46) Bernart, M. W.; Cardellina, J. H., II; Balaschak, M. S.; Alexander, M.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 748.
- (47) Saita, T.; Katano, M.; Matsunaga, H.; Yamamoto, H.; Fujito, H.; Mori, M. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1993**, *41*, 549.
- (48) Kobk-Larsen, M.; Christensen, L. P.; Vach, W.; Ritskes-Hoitinga, J.; Brandt, K. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1823.
- (49) Kemp, M. S. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1002.
- (50) Takahashi, M.; Isoi, K.; Kimura, Y.; Yoshikura, M. *Yakugaku Zasshi* **1964**, *84*, 752.
- (51) Bohlmann, F.; Niedballa, U.; Rode, K. M. *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 3552.
- (52) Crosby, D. G.; Aharonson, N. *Tetrahedron* **1967**, *23*, 465.
- (53) Bentley, R. K.; Thaller, V. *Chem. Commun.* **1967**, 439.
- (54) Christianson, D. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 141.
- (55) Thulasiram, H. V.; Erickson, H. K.; Poulter, C. D. *Science* **2007**, *316*, 73.
- (56) Vickers, C. E.; Bongers, M.; Liu, Q.; Delatte, T.; Bouwmeester, H. *Plant, Cell Environ.* **2014**, *37*, 1753.
- (57) Vranova, E.; Coman, D.; Gruissem, W. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2013**, *64*, 665.
- (58) Chappell, J. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1995**, *46*, 521.
- (59) Sacchettini, J. C.; Poulter, C. D. *Science* **1997**, *277*, 1788.
- (60) Liang, Y.; Zhao, S. *Plant Biol.* **2008**, *10*, 415.
- (61) Augustin, J. M.; Kuzina, V.; Andersen, S. B.; Bak, S. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 435.
- (62) Haralampidis, K.; Trojanowska, M.; Osbourn, A. E. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2002**, *75*, 31.
- (63) Jenner, H.; Townsend, B.; Osbourn, A. *Planta* **2005**, *220*, 503.

- (64) Thimmappa, R.; Geisler, K.; Louveau, T.; O'Maille, P.; Osbourn, A. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2014**.
- (65) Sawai, S.; Saito, K. *Front Plant Sci.* **2011**, 2, 25.
- (66) Lee, M.-H.; Jeong, J.-H.; Seo, J.-W.; Shin, C.-G.; Kim, Y.-S.; In, J.-G.; Yang, D.-C.; Yi, J.-S.; Choi, Y.-E. *Plant Cell Physiol.* **2004**, 45, 976.
- (67) Christianson, D. W. *Science* **2007**, 316, 60.
- (68) Oldfield, E.; Lin, F.-Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 51, 1124.
- (69) Bouvier, F.; Rahier, A.; Camara, B. *Prog. Lipid Res.* **2005**, 44, 357.
- (70) Han, J.-Y.; In, J.-G.; Kwon, Y.-S.; Choi, Y.-E. *Phytochemistry* **2010**, 71, 36.
- (71) Kushiro, T.; Shibuya, M.; Ebizuka, Y. *Eur. J. Biochem.* **1998**, 256, 238.
- (72) Xue, Z.; Duan, L.; Liu, D.; Guo, J.; Ge, S.; Dicks, J.; Omaille, P.; Osbourn, A.; Qi, X. *New Phytol.* **2012**, 193, 1022.
- (73) Han, J. Y.; Kwon, Y. S.; Yang, D. C.; Jung, Y. R.; Choi, Y. E. *Plant Cell Physiol.* **2006**, 47, 1653.
- (74) Hu, W.; Liu, N.; Tian, Y.; Zhang, L. *BioMed Res. Int.* **2013**, 285740.
- (75) Tansakul, P.; Shibuya, M.; Kushiro, T.; Ebizuka, Y. *FEBS Lett.* **2006**, 580, 5143.
- (76) Kushiro, T.; Ohno, Y.; Shibuya, M.; Ebizuka, Y. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, 20, 292.
- (77) Han, J.-Y.; Kim, H.-J.; Kwon, Y.-S.; Choi, Y.-E. *Plant Cell Physiol.* **2011**, 52, 2062.
- (78) Han, J.-Y.; Hwang, H.-S.; Choi, S.-W.; Kim, H.-J.; Choi, Y.-E. *Plant Cell Physiol.* **2012**, 53, 1535.
- (79) Han, J.-Y.; Kim, M.-J.; Ban, Y.-W.; Hwang, H.-S.; Choi, Y.-E. *Plant Cell Physiol.* **2013**, 54, 2034.
- (80) D.Voet, J. G. V., C. W. Pratt *Lehrbuch der Biochemie*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2002.
- (81) Holstein, S. A.; Hohl, R. J. *Lipids* **2004**, 39, 293.
- (82) Wallach, O. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1885**, 227, 277.
- (83) Ruzicka, L. *Experientia* **1953**, 9, 357.
- (84) Bloch, K. *Steroids* **1992**, 57, 378.
- (85) Rittenberg, D.; Schönheimer, R. *J. Biol. Chem.* **1937**, 121, 235.
- (86) Eisenreich, W.; Bacher, A. *Phytochemistry* **2007**, 68, 2799.

- (87) Bassham, J. A.; Shibata, K.; Steenberg, K.; Bourdon, J.; Calvin, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 4120.
- (88) Bohlmann, J.; Keeling, C. I. *Plant J* **2008**, *54*, 656.
- (89) Bohlmann, J.; Keeling, C. I. *Plant J.* **2008**, *54*, 656.
- (90) Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. *J. Amer. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325.
- (91) Holton, R. A.; Somoza, C.; Kim, H. B.; Liang, F.; Biediger, R. J.; Boatman, P. D.; Shindo, M.; Smith, C. C.; Kim, S.; et, a. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1597.
- (92) Nicolaou, K. C.; Yang, Z.; Liu, J. J.; Ueno, H.; Nantermet, P. G.; Guy, R. K.; Claiborne, C. F.; Renaud, J.; Couladouros, E. A.; et, a. *Nature (London)* **1994**, *367*, 630.
- (93) Schramek, N.; Wang, H.; Römisch-Margl, W.; Keil, B.; Radykewicz, T.; Winzenhörlein, B.; Beerhues, L.; Bacher, A.; Rohdich, F.; Gershenzon, J.; Liu, B.; Eisenreich, W. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 179.
- (94) Liu, J.-M.; Ni, M.-Y.; Fan, J.-F.; Tu, Y.-Y.; Wu, Z.-H.; Wu, Y.-L.; Chou, W.-S. *Hua Hsueh Hsueh Pao* **1979**, *37*, 129.
- (95) Little, H. N.; Bloch, K. *J. Biol. Chem.* **1950**, *183*, 33.
- (96) Lynen, F.; Reichert, E.; Rueff, L. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1951**, *574*, 1.
- (97) Chaykin, S.; Law, J.; Phillips, A. H.; Tchen, T. T.; Bloch, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, *44*, 998.
- (98) Wolf, D. E.; Hoffman, C. H.; Aldrich, P. E.; Skeggs, H. R.; Wright, L. D.; Folkers, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 4499.
- (99) Cornforth, J. W.; Popjak, G. *Biochem. J.* **1954**, *58*, 403.
- (100) Bach, T. J. *Lipids* **1995**, *30*, 191.
- (101) Eisenreich, W.; Rohdich, F.; Bacher, A. *Trends Plant Sci.* **2001**, *6*, 78.
- (102) Rohmer, M. *Prog Drug Res* **1998**, *50*, 135.
- (103) Rohmer, M. *Nat Prod Rep* **1999**, *16*, 565.
- (104) Rohmer, M. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565.
- (105) Eisenreich, W.; Bacher, A.; Arigoni, D.; Rohdich, F. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 1401.
- (106) Lichtenthaler, H. K. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*, 47.
- (107) Lombard, J.; Moreira, D. *Mol. Biol. Evol.* **2011**, *28*, 87.
- (108) Rohmer, M. *Prog. Drug Res.* **1998**, *50*, 135.

- (109) Römisch-Margl, W.; Schramek, N.; Radykewicz, T.; Ettenhuber, C.; Eylert, E.; Huber, C.; Römisch-Margl, L.; Schwarz, C.; Dobner, M.; Demmel, N.; Winzenhörlein, B.; Bacher, A.; Eisenreich, W. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2273.
- (110) Ostrozhenkova, E.; Eylert, E.; Schramek, N.; Golan-Goldhirsh, A.; Bacher, A.; Eisenreich, W. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2816.
- (111) Gräwert, T.; Groll, M.; Rohdich, F.; Bacher, A.; Eisenreich, W. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 3797.
- (112) Rohmer, M. *Lipids* **2008**, *43*, 1095.
- (113) Kuzuyama, T.; Seto, H. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2012**, *88*, 41.
- (114) Zheng, G.; Lu, W.; Aisa, H. A.; Cai, J. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2181.
- (115) Vranova, E.; Coman, D.; Gruissem, W. *Mol. Plant* **2012**, *5*, 318.
- (116) Rohmer, M. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 375.
- (117) Hemmerlin, A.; Höffler, J.-F.; Meyer, O.; Tritsch, D.; Kagan, I. A.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M.; Bach, T. J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 26666.
- (118) Hemmerlin, A.; Harwood, J. L.; Bach, T. J. *Prog. Lipid Res.* **2012**, *51*, 95.
- (119) Arigoni, D.; Sagner, S.; Latzel, C.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Zenk, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 10600.
- (120) Aharoni, A.; Jongsma, M. A.; Bouwmeester, H. J. *Trends Plant Sci.* **2005**, *10*, 594.
- (121) Flügge, U. I.; Gao, W. *Plant Biol.* **2005**, *7*, 91.
- (122) Peña-Rodríguez, L. M.; Yam-Puc, A.; Knispel, N.; Schramek, N.; Huber, C.; Grassberger, C.; Ramírez-Torres, F. G.; Escalante-Erosa, F.; García-Sosa, K.; Hiebert-Giesbrecht, M. R.; Chan-Bacab, M. J.; Godoy-Hernández, G.; Bacher, A.; Eisenreich, W. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 2864.
- (123) Chaurasiya, N. D.; Sangwan, N. S.; Sabir, F.; Misra, L.; Sangwan, R. S. *Plant Cell Rep.* **2012**, *31*, 1889.
- (124) Zhao, S.; Wang, L.; Liu, L.; Liang, Y.; Sun, Y.; Wu, J. *Plant Cell Rep.* **2014**, *33*, 393.
- (125) Dai, Z.; Wang, B.; Liu, Y.; Shi, M.; Wang, D.; Zhang, X.; Liu, T.; Huang, L.; Zhang, X. *Sci. Rep.* **2014**, *4*.
- (126) Dai, Z.; Liu, Y.; Zhang, X.; Shi, M.; Wang, B.; Wang, D.; Huang, L.; Zhang, X. *Metab. Eng.* **2013**, *20*, 146.
- (127) Eisenreich, W.; Dandekar, T.; Heesemann, J.; Göbel, W. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 401.

- (128) Eisenreich, W.; Slaghuis, J.; Laupitz, R.; Bussemer, J.; Stritzker, J.; Schwarz, C.; Schwarz, R.; Dandekar, T.; Göbel, W.; Bacher, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 2040.
- (129) Eisenreich, W.; Huber, C.; Kutzner, E.; Knispel, N.; Schramek, N. In *Handbook of Plant Metabolomics*; 1. ed.; Weckwerth, W. K., Günter Ed.; Wiley-Blackwell: 2013; Vol. 1, p 25.
- (130) Joseph, B.; Göbel, W. *Microbes Infect.* **2007**, *9*, 1188.
- (131) Zamboni, N.; Fendt, S.-M.; Ruhl, M.; Sauer, U. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 878.
- (132) Szyperski, T. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *232*, 433.
- (133) Bacher, A.; Rieder, C.; Eichinger, D.; Arigoni, D.; Fuchs, G.; Eisenreich, W. *FEMS Microbiol. Rev.* **1998**, *22*, 567.
- (134) Glawischnig, E.; Gierl, A.; Tomas, A.; Bacher, A.; Eisenreich, W. *Plant Physiol.* **2001**, *125*, 1178.
- (135) M. Hesse, H. M., B. Zeeh; *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; 6. ed.; Thieme: Stuttgart, 2002.
- (136) Paek, K.-Y.; Murthy, H. N.; Hahn, E.-J.; Zhong, J.-J. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2009**, *113*, 151.
- (137) Moyano, E.; Osuna, L.; Bonfill, M.; Cusidó, R. M.; Palazón, J.; Tortoriello, J.; Piñol, M. T. *Recent Res. Dev. Plant Sci.* **2005**, *3*, 195.
- (138) Woo, S.-S.; Song, J.-S.; Lee, J.-Y.; In, D. S.; Chung, H.-J.; Liu, J. R.; Choi, D.-W. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2751.
- (139) Palazón, J.; Cusidó, R. M.; Bonfill, M.; Mallol, A.; Moyano, E.; Morales, C.; Piñol, M. T. *Plant Physiol. Biochem.* **2003**, *41*, 1019.
- (140) Qi, L.-W.; Wang, C.-Z.; Yuan, C.-S. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 689.
- (141) Yang, S.-O.; Shin, Y.-S.; Hyun, S.-H.; Cho, S.; Bang, K.-H.; Lee, D.; Choi, S. P.; Choi, H.-K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *58*, 19.
- (142) Yang, S. Y.; Kim, H. K.; Lefeber, A. W. M.; Erkelens, C.; Angelova, N.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. *Planta Med.* **2006**, *72*, 364.
- (143) Soldati, F.; Sticher, O. *Planta Med.* **1980**, *39*, 348.
- (144) Chan, T. W. D.; But, P. P. H.; Cheng, S. W.; Kwok, I. M. Y.; Lau, F. W.; Xu, H. X. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1281.
- (145) Li, L.; Luo, G.-A.; Liang, Q.-L.; Hu, P.; Wang, Y.-M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *52*, 66.
- (146) Choi, K.-t. *Acta Pharmacol. Sin.* **2008**, *29*, 1109.

- (147) Chuang, W.-C.; Sheu, S.-J. *J. Chromatogr. A* **1994**, *685*, 243.
- (148) Eisenreich, W.; Bacher, A. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2799.
- (149) Lin, M.-C.; Wang, K.-C.; Lee, S.-S. *J. Chin. Chem. Soc.* **2001**, *48*, 113.
- (150) Matsuura, H.; Kasai, R.; Tanaka, O.; Saruwatari, Y. I.; Fuwa, T.; Zhou, J. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 2281.
- (151) Yang, T. R.; Kasai, R.; Zhou, J.; Tanaka, O. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1473.
- (152) Ma, W. G.; Mizutani, M.; Malterud, K. E.; Lu, S. L.; Ducrey, B.; Tahara, S. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 1133.
- (153) Dewick, P. M.; Becker, H. *J. Plant Physiol.* **2002**, *159*, 1387.
- (154) Abe, I.; Sakano, Y.; Tanaka, H.; Lou, W.; Noguchi, H.; Shibuya, M.; Ebizuka, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3426.
- (155) Bohlmann, F.; Burkhardt, T. *Chem Ber* **1969**, *102*, 1702.
- (156) Bu'Lock, J. D.; Smith, G. N. *J. Chem. Soc. C* **1967**, 332.
- (157) Knispel, N.; Ostrozhenkova, E.; Schramek, N.; Huber, C.; Peña-Rodríguez, L. M.; Bonfill, M.; Palazón, J.; Wischmann, G.; Cusidó, R. M.; Eisenreich, W. *Molecules* **2013**, *18*, 7686.
- (158) Seger, C.; Godejohann, M.; Spraul, M.; Stuppner, H.; Hadacek, F. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1136*, 82.
- (159) Hirakura, K.; Morita, M.; Nakajima, K.; Ikeya, Y.; Mitsushashi, H. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3327.
- (160) Poplawski, J.; Wrobel, J. T.; Glinka, T. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 1539.
- (161) Kobayashi, M.; Mahmud, T.; Umezome, T.; Wang, W.; Murakami, N.; Kitagawa, I. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15691.
- (162) Larsen, P. K.; Nielsen, B. E.; Lemmich, J. *Acta Chem. Scand.* **1969**, *23*, 2552.
- (163) Shim, S. C.; Koh, H. Y.; Chang, S. K.; Moon, S. K.; Min, T. J. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1986**, *7*, 106.
- (164) Shim, S. C.; Koh, H. Y.; Chang, S. K. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 5775.
- (165) Bernart, M. W.; Hallock, Y. F.; Cardellina, J. H., II; Boyd, M. R. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 993.
- (166) McLaughlin, N. P.; Butler, E.; Evans, P.; Brunton, N. P.; Koidis, A.; Rai, D. K. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9681.
- (167) Bohlmann, F.; Burkhardt, T. *Chem. Ber.* **1969**, *102*, 1702.

- (168) Sanada, S.; Kondo, N.; Shoji, J.; Tanaka, O.; Shibata, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, *22*, 421.
- (169) Kimberly Eastman, S. B., Elizabeth T. Moody Irvine CA, 2008, p 1
- (170) Eylert, E. PhD, Technische Universität München, 2009.
- (171) Lee, W. N. P.; Byerley, L. O.; Bergner, E. A.; Edmond, J. *Biol. Mass Spectrom.* **1991**, *20*, 451.
- (172) Pickup, J. F.; McPherson, K. *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1885.
- (173) Ettenhuber, C.; Radykewicz, T.; Kofler, W.; Koop, H.-U.; Bacher, A.; Eisenreich, W. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 323.
- (174) Eisenreich, W.; Ettenhuber, C.; Laupitz, R.; Theus, C.; Bacher, A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 6764.
- (175) Glawischnig, E.; Gierl, A.; Tomas, A.; Bacher, A.; Eisenreich, W. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 1717.
- (176) Union, E. *Ginseng*; 8 th Edition ed.; European Union, 2014.

8 Anhang

Tabelle 12. Überblick über die markierten Pflanzen.

26.05.2010 – 29.05.2010						
Pflanze	Pflanzengröße [cm]	Pulsperiode [h]	Chaseperiode [d]	¹³ CO ₂ - Verbrauch [mL]	Alter [y]	Menge [g]
						Wurzel
1	52	40 min	5	-	6	13,4701
2	46	5	5	1699	6	20,2257
3	45	3,29	5	1114	6	3,3480
4	46	3,52	1	1098	6	18,1240
5	33	2,43	0	0,349	6	6,3400
6	43	8,54	5	2670	6	-
02.08.2010 – 13.08.2010						
7	55	7	10	2146,7	6	20,8544
8	48	7	9	2006,35	6	11,6892
9	45	7	8	1966,27	6	12,2761
10	51	7	7	2278,01	6	17,9025
11	46	7	6	1813,87	6	15,7252
12	49	10	5	2589,52	6	17,8627
13	23	8,16	3	2136,22	3	-
14	24	8,16	3	2136,22	4	9,8798
22.08.2011 – 26.08.2011						
15	43	7,25	23	4435,84	6	57,0347
16	48	8,10	22	5109,98	6	98,0782
17	48	5,30	21	4900,31	6	40,7481
18	62	4,50	20	-	6	34,4337
19	58	9,33	19	11221,28	6	19,3501

Abbildung 33. Dünnschichtchromatogramm (eindimensional) der Ginsenoside. Eluent: ButOH:EtAc:H₂O (5:1:4) (obere Phase).¹⁶⁸

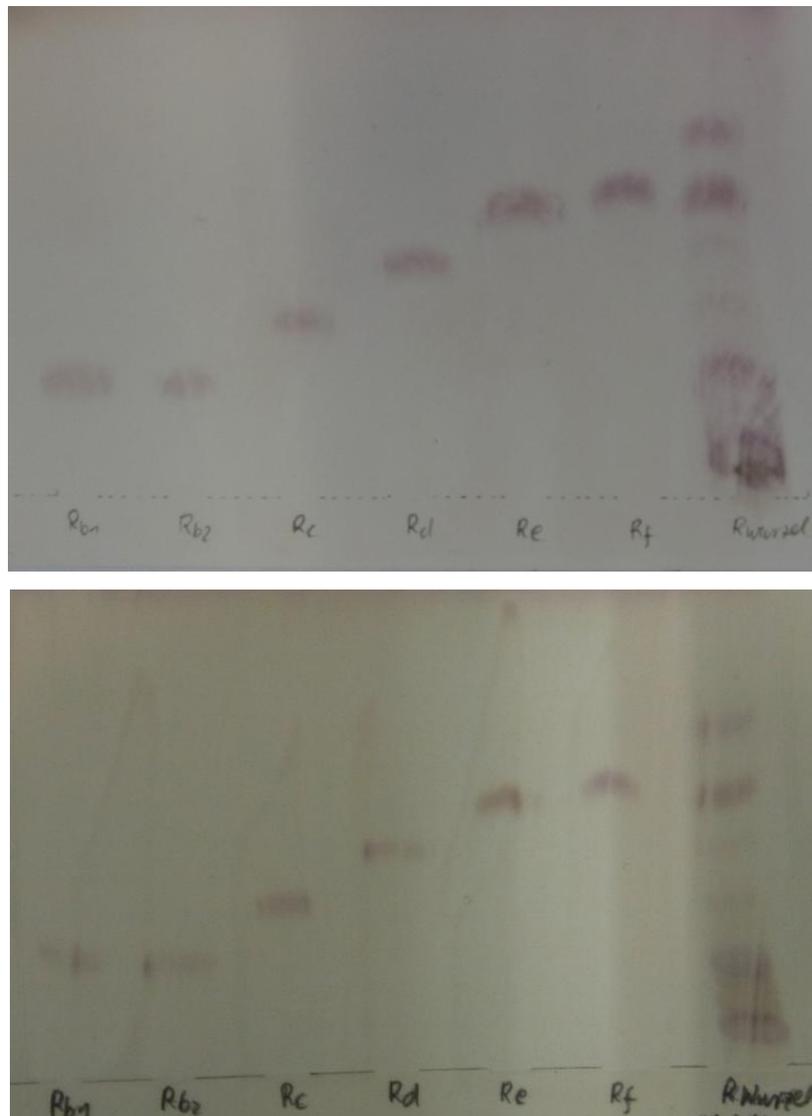


Tabelle 13: R_f-Werte der Ginsenoside (Mittelwert aus drei Läufen).

Ginsenoside	Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	Re	Rf
R _f -Werte	0.20	0.20	0.30	0.41	0.51	0.53

Abbildung 34. Protopanaxadiole.

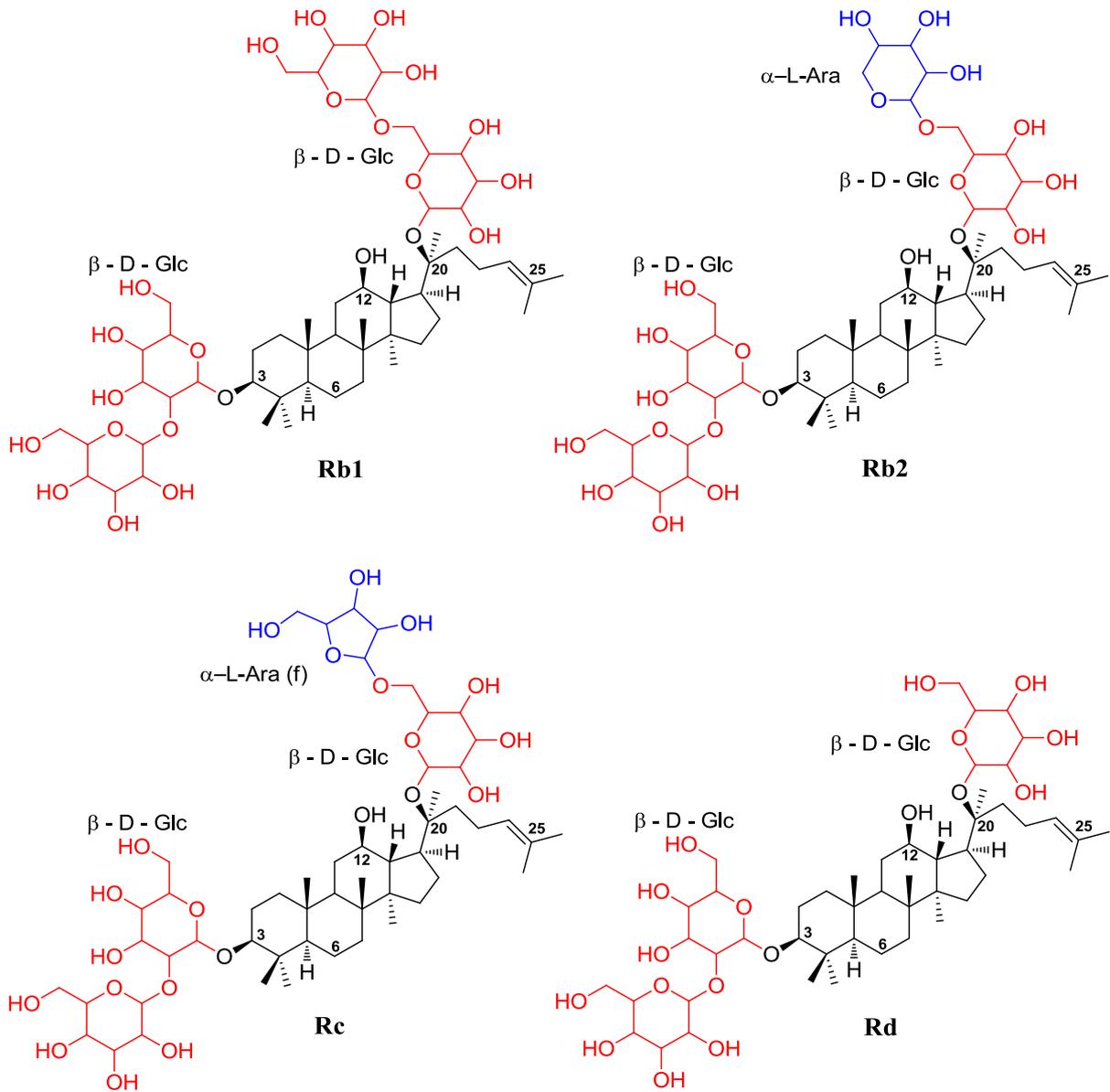


Abbildung 35. Protopanaxatriole.

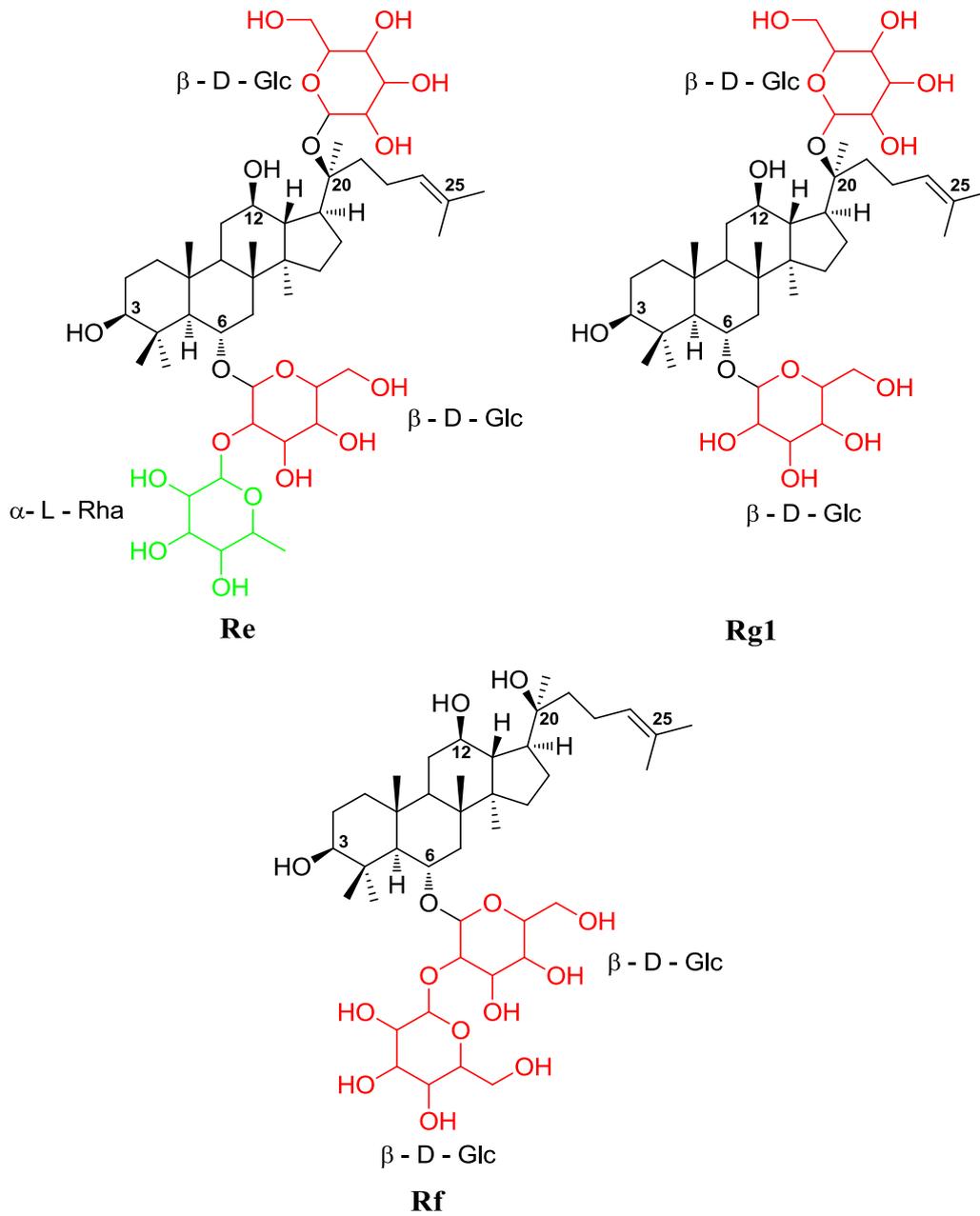


Abbildung 36. ^1H -NMR-Spektrum von markierter Saccharose (D_2O).

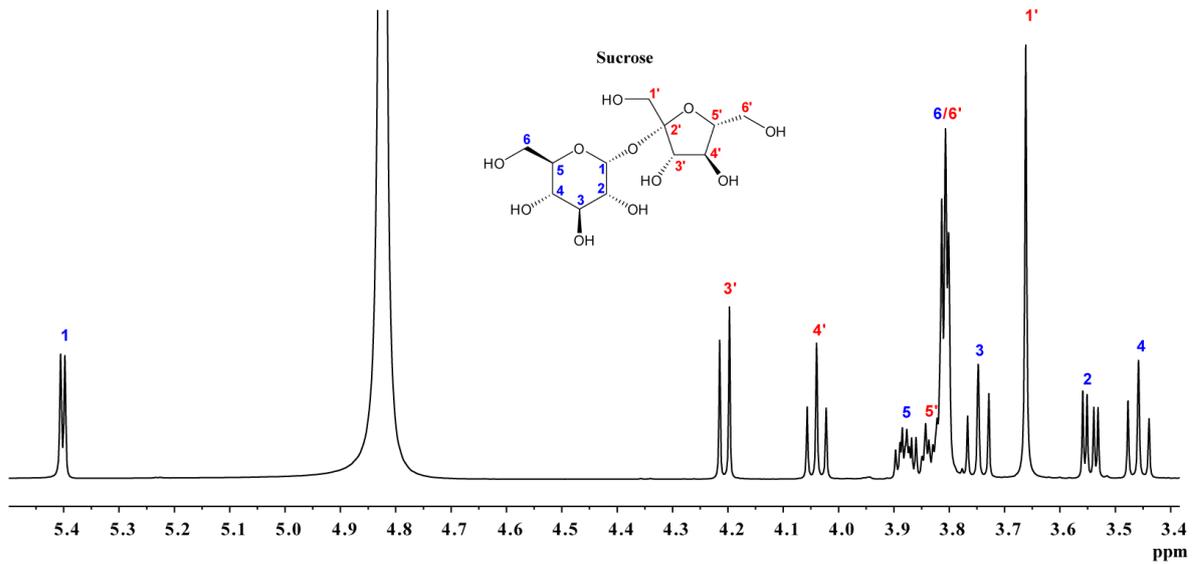


Abbildung 37. COSY-Experiment von markierter Saccharose (homonuclear; D_2O).

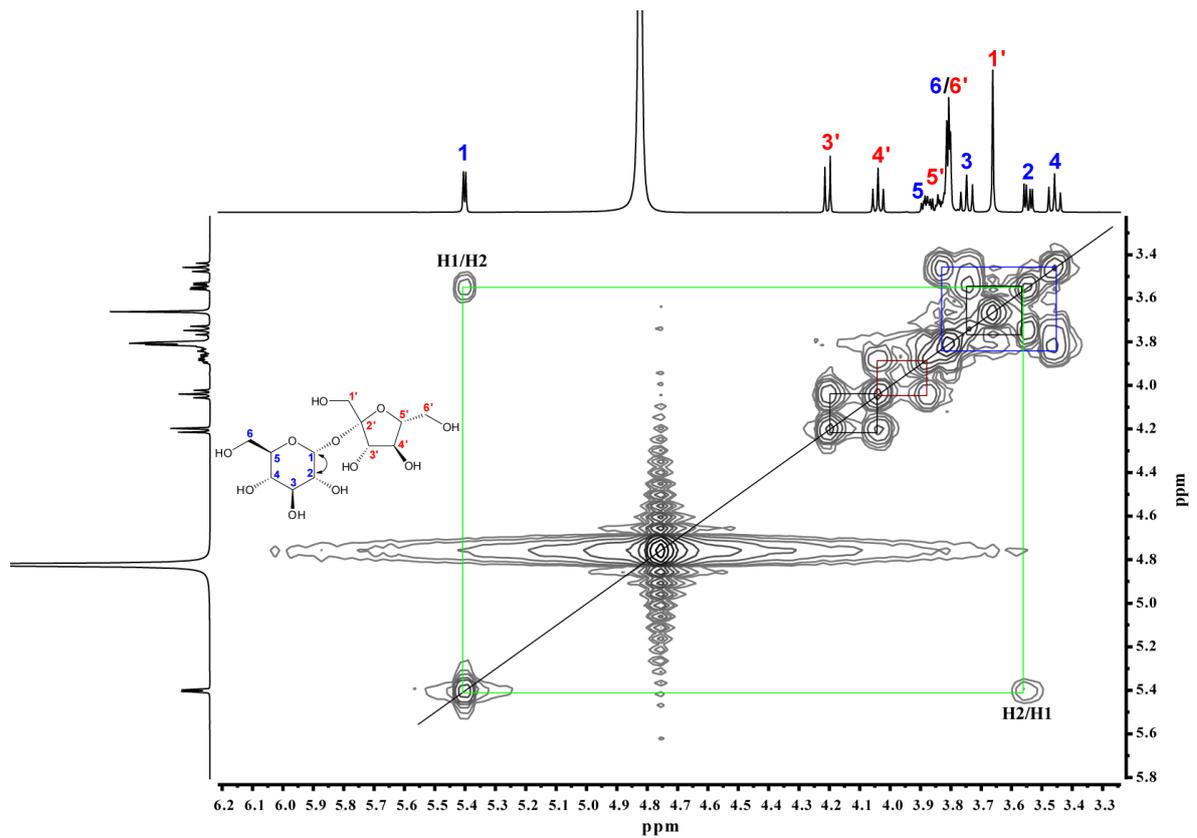


Abbildung 38. TOCSY-Experiment von markierter Saccharose (D₂O).

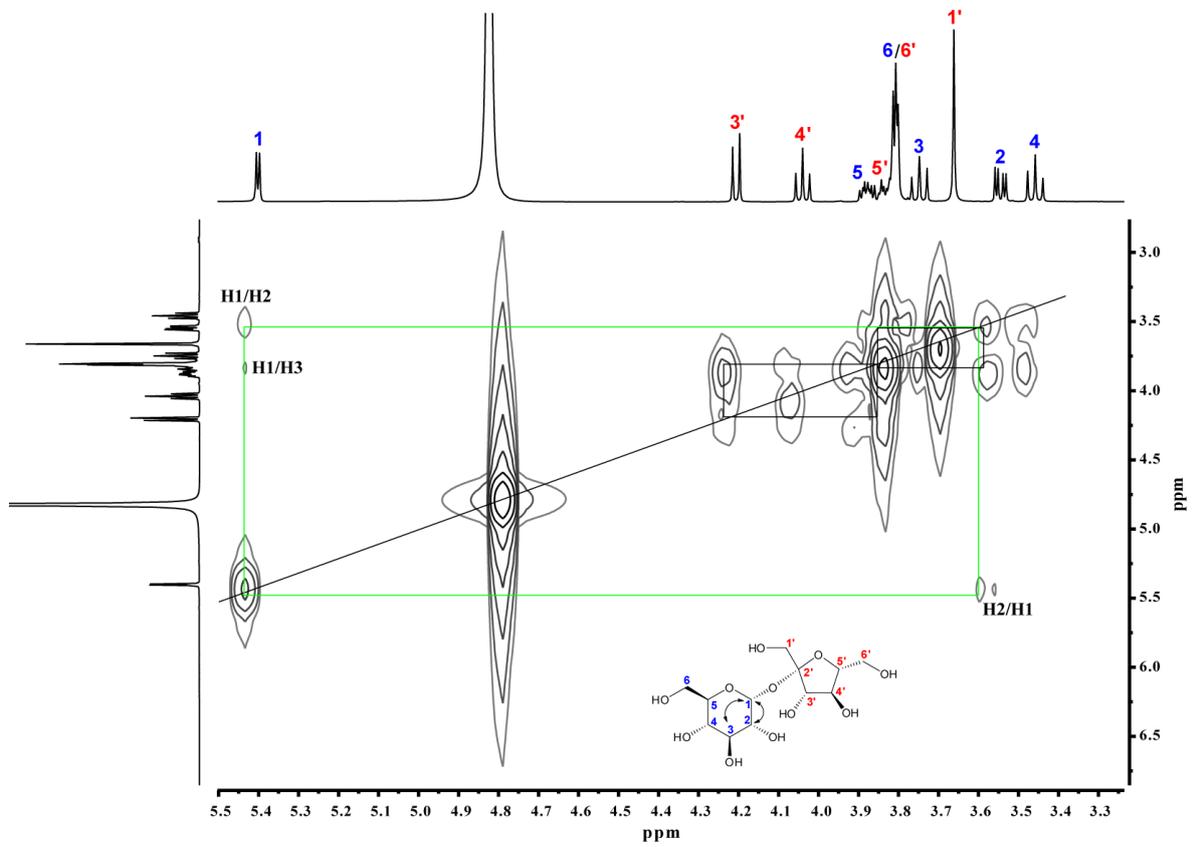


Abbildung 39. HMBC-Experiment von markierter Saccharose (D_2O).

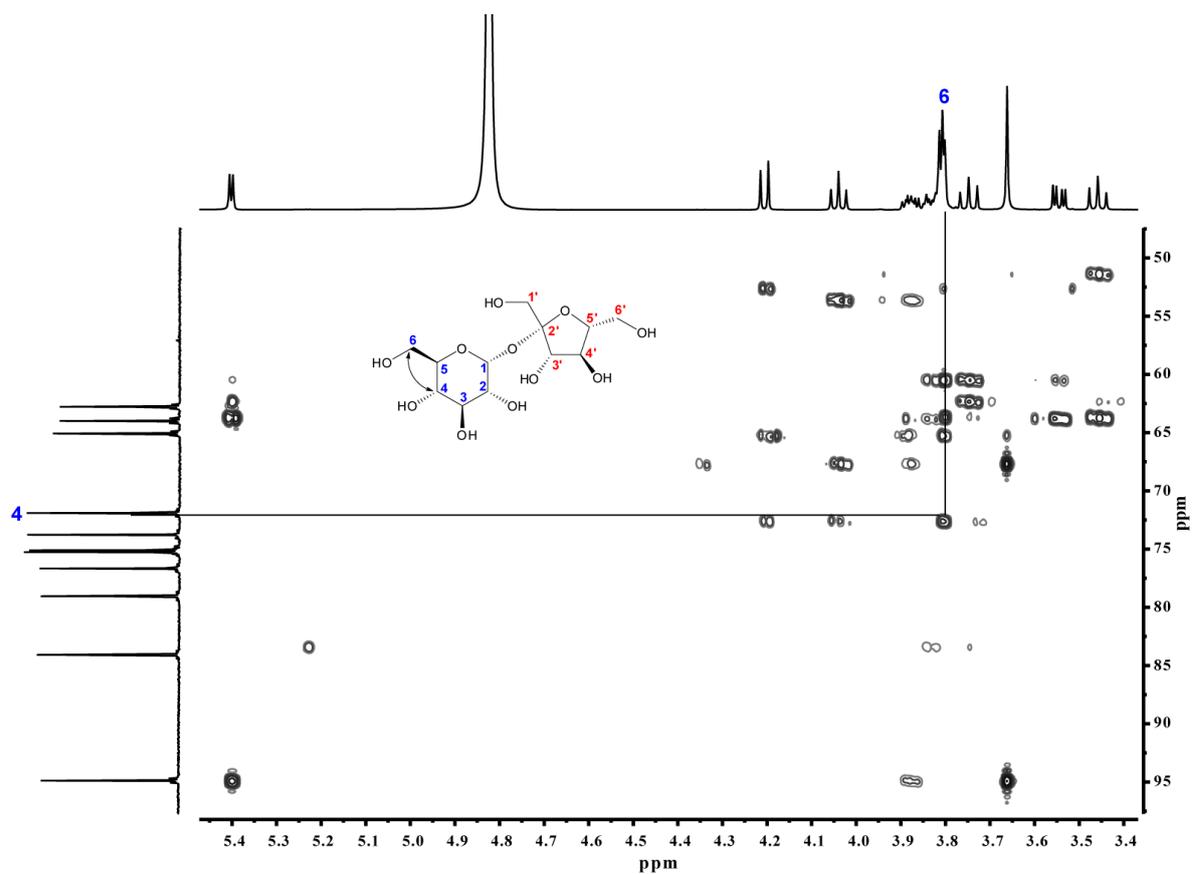


Abbildung 40. HSQC-Experiment von markierter Saccharose (D₂O).

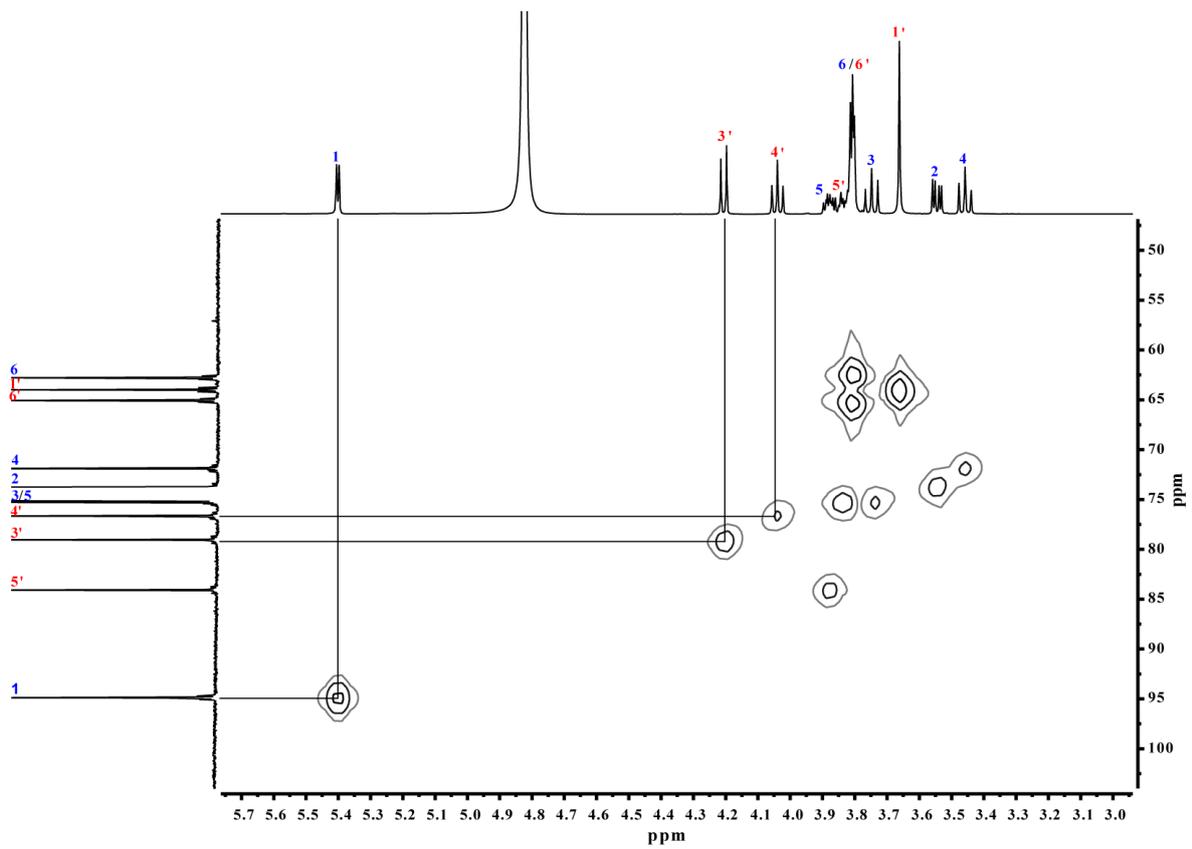


Abbildung 41. ¹H-NMR-Spektrum (D₄-MeOD/TSP) der Ribolysier-Extrakte der Ginsengpflanzen 1-14 (Blatt).

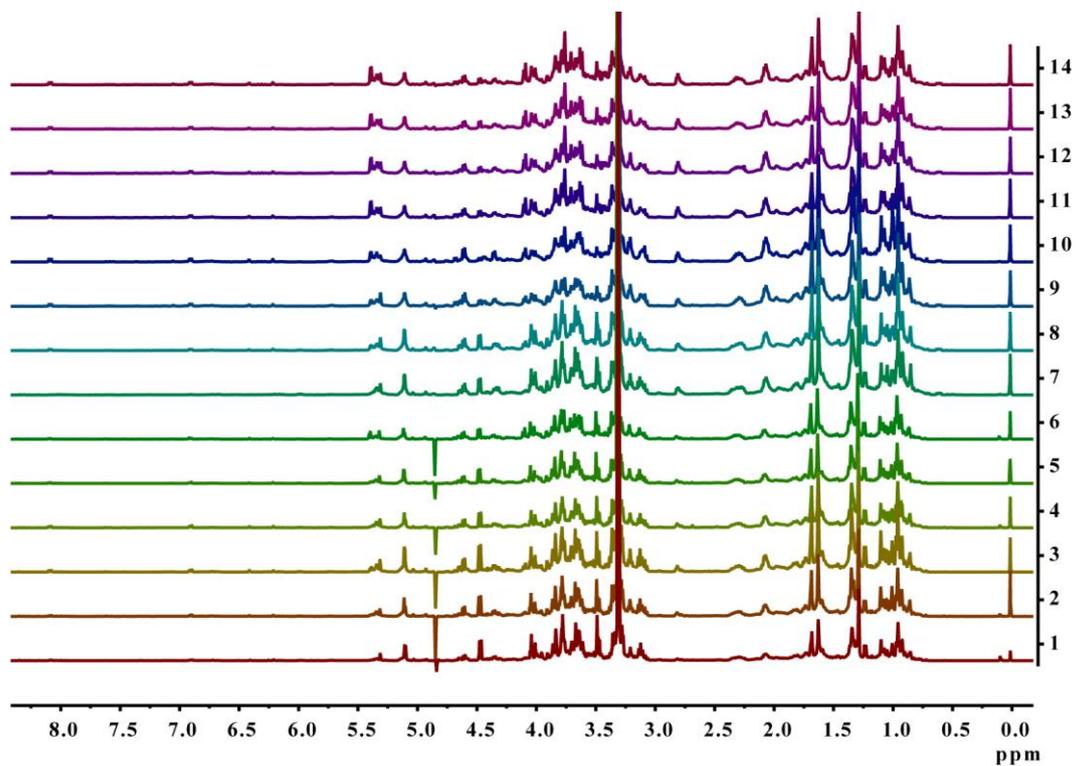


Abbildung 42. GC/MS-Analyse von Panaxadiol und seine markanten Fragmentierungsmuster.

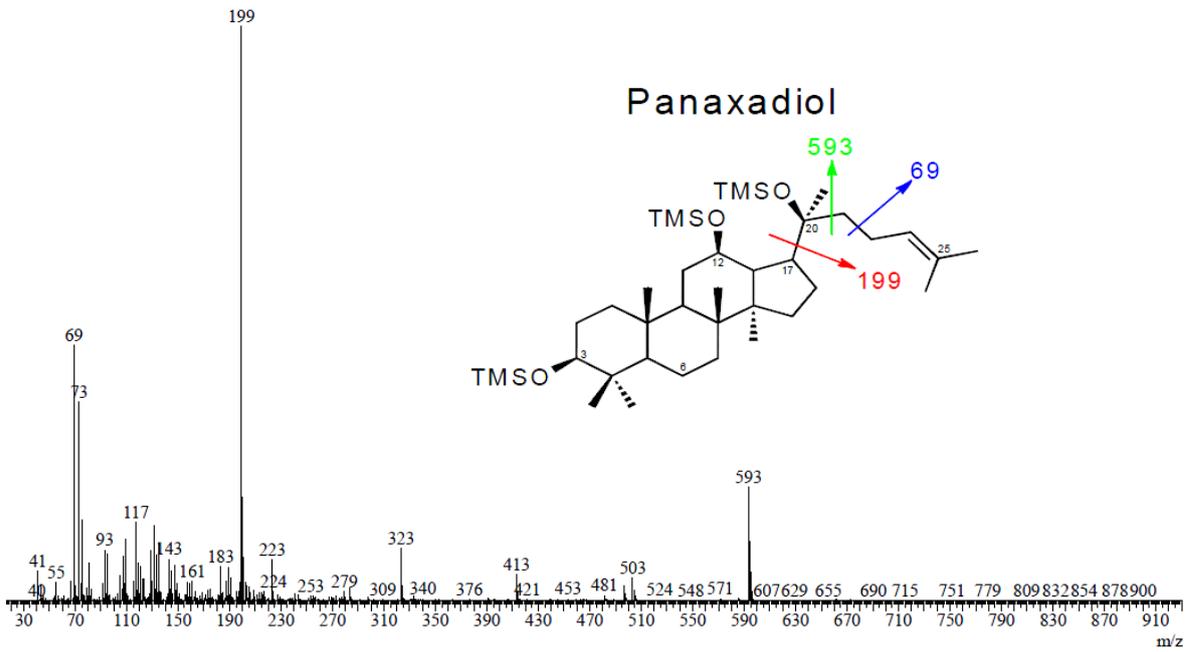


Abbildung 43. GC/MS-Analyse von Panaxatriol und seine markanten Fragmentierungsmuster.

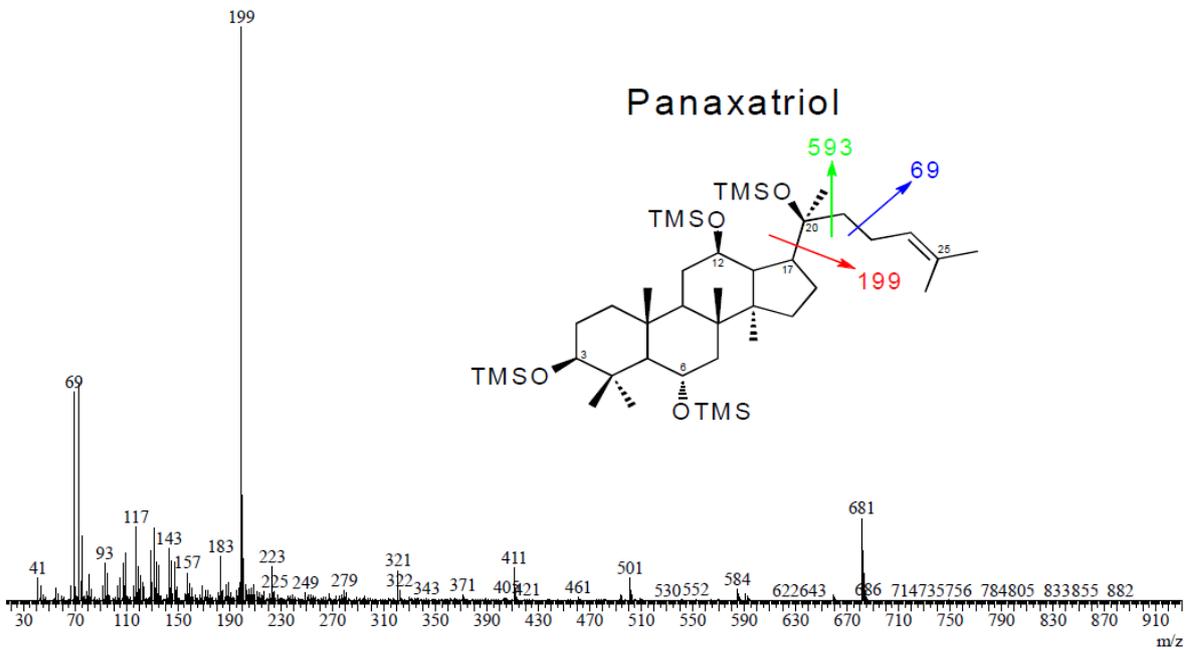


Abbildung 44. ^1H -NMR-Spektrum von Panaxydol (CDCl_3).

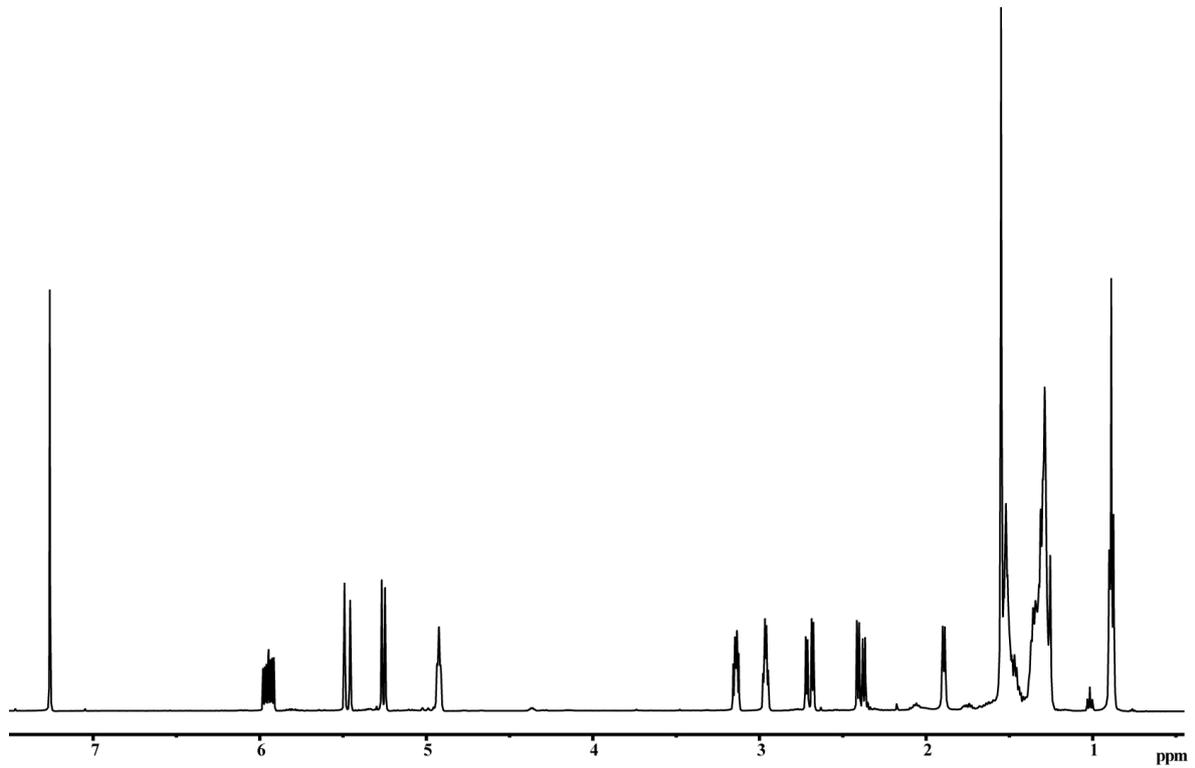


Abbildung 45. ^{13}C -NMR-Spektrum von Panaxydol (CDCl_3).

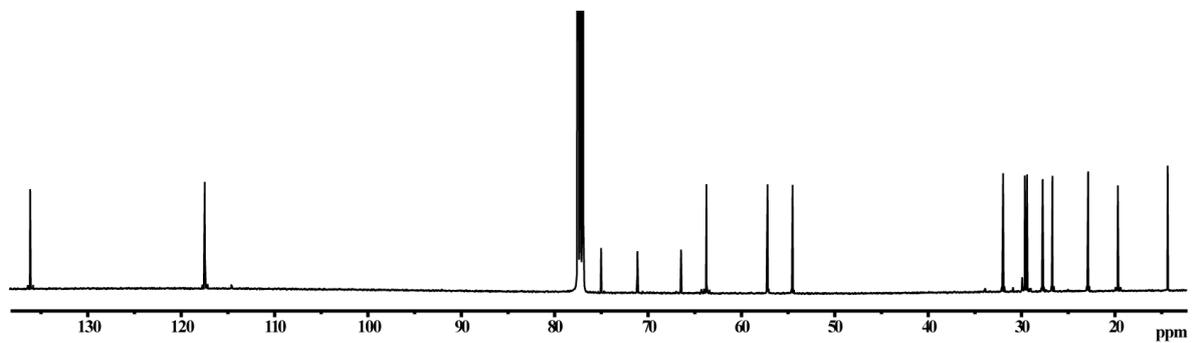


Abbildung 46. ^1H -NMR-Spektrum von Panaxynol (CDCl_3).

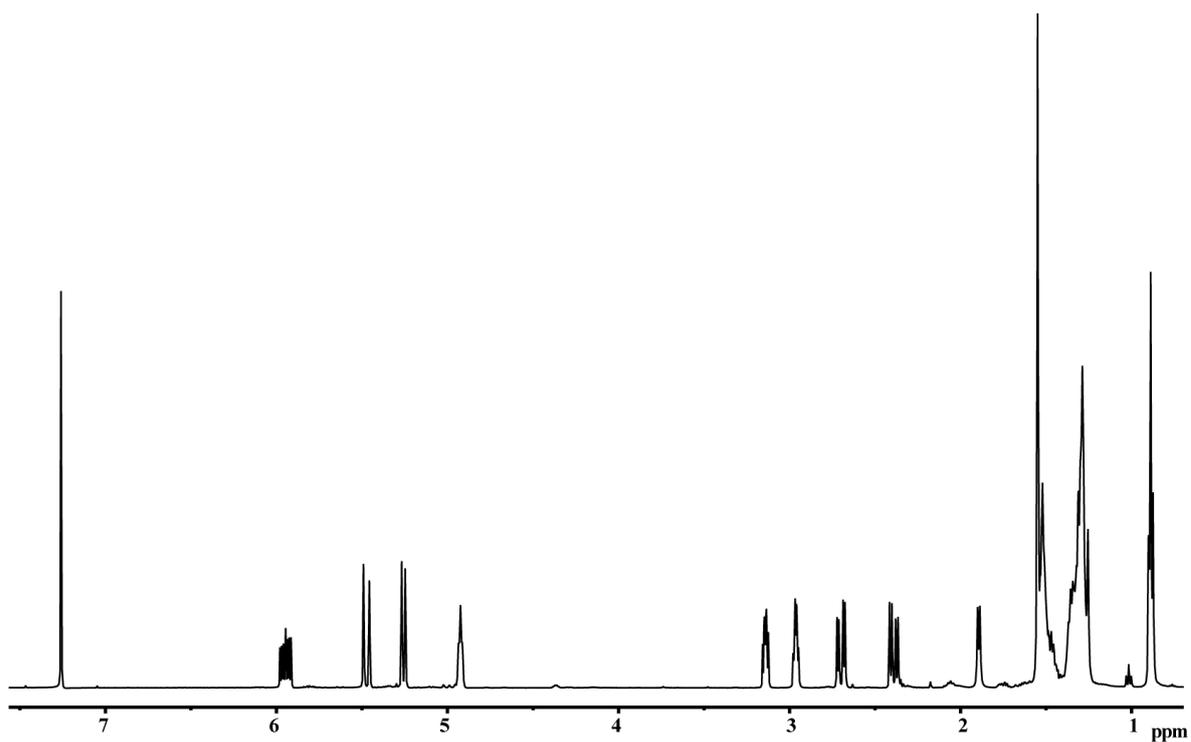


Abbildung 47. ^{13}C -NMR-Spektrum von Panaxynol (CDCl_3).

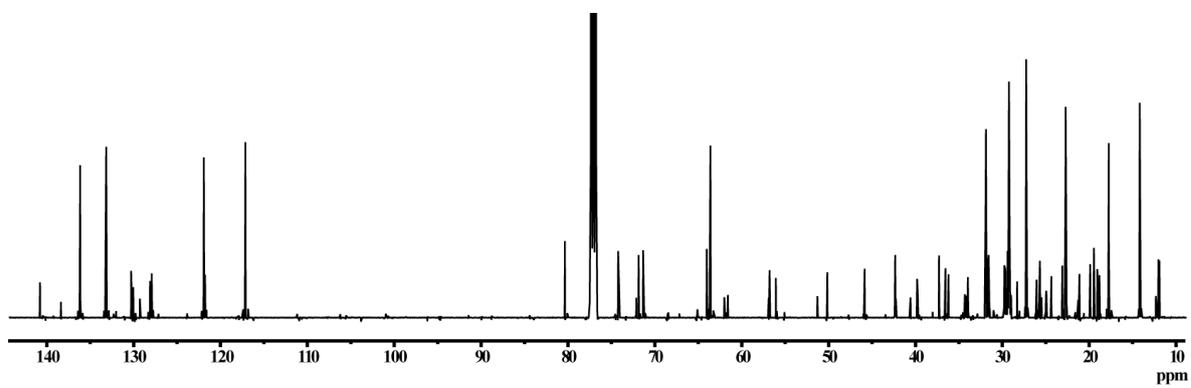
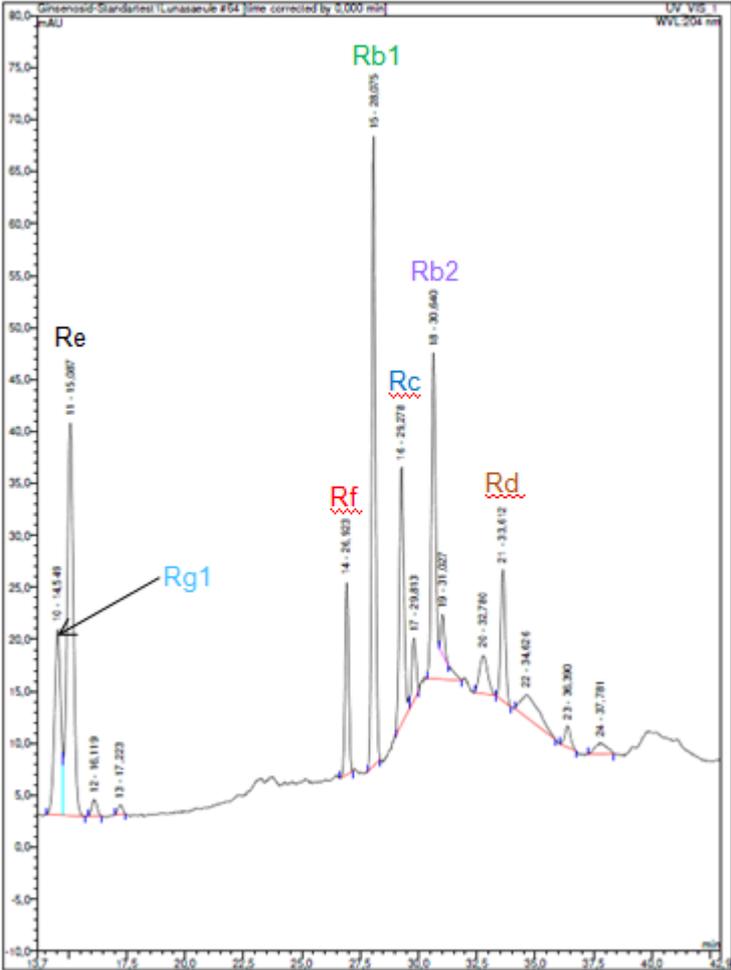


Abbildung 48. HPLC-Chromatogram der Ginsenoside (Mix-Standard; analytische Säule).



Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von mir, Nihat Knispel, selbstständig in der Zeit von November 2009 bis Dezember 2012 am Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.