

Tabelle 1. Koordinationszahl (CN), Spin und ermittelte M-O-Bindungslängen von Oxometaloporphyrinen [16–19, 22], Dimethoxy(tetraphenylporphyrinato)-mangan(IV) [6] und von einem makrocyclischen Tetraamidato-oxomangan(V)-Komplex [21].

Porphyrin	CN [a]	Spin S	M-O-Abstand [Å]	Methode	Lit.
[Ti ^{IV} O(OEP)]	5	0	1.613(5)	X-ray	16
[V ^{IV} O(OEP)]	5	1/2	1.620(2)	X-ray	17
[Cr ^{IV} O(TPP)]	5	0	1.572(6)	X-ray	18
[Mn ^{IV} O(T _{Ph} PP)]	5	3/2	1.69 ± 0.03	EXAFS	
[Fe ^{IV} O(THF) ₂ TPP)]	6	1	1.604(19)	X-ray	19
[Fe ^{IV} O(1-MeIm)(TPP)]	6	1	1.64 ± 0.03	EXAFS	22
[Mn ^{IV} (OCH ₃) ₂ TPP]	6	3/2	1.829(2)	X-ray	6
[Mn ^{IV} O(<i>n</i> ⁴ -L)][Et ₄ N]	5	0	1.555(4)	X-ray	21

[a] CN = Koordinationszahl.

Tabelle 2. Interpretation der EXAFS-Daten (Mangan-K-Kante) von 2.

Atom	CN [a]	r [Å] [b]	2σ ² [Å ²]
O	1	1.69 [c]	0.005
N	4	2.00 [c]	0.003
C [d]	8	3.00	0.003
C [e]	4	3.35	0.011
C [d]	8	4.17	0.013
C [f]	4	4.82	0.026

[a] Koordinationszahl, festgesetzt auf den angegebenen Wert. [b] Mn-Atom-Abstände. [c] Geschätzte Ungenauigkeit ± 0.03 Å. [d] Pyrrol-Kohlenstoffatom. [e] meso-Kohlenstoffatom. [f] α-Kohlenstoffatom der Pivalamidphenyl-Substituenten.

die Mehrfachstreuung der Prophyrinatome und die Lokalisierung des Mn-Zentrums 0.5 Å außerhalb der Ebene dieses Liganden^[16–18]. Die endgültigen Metall-Ligand-Abstände betragen Mn-O 1.69 ± 0.03 Å und Mn-N 2.00 ± 0.03 Å.

Die Ergebnisse der XAS-Untersuchung sind in Einklang mit dem postulierten, fünfach koordinierten Oxo(mangan(IV)-Derivat 2, in dem die Mn-O-Bindungslänge 1.69 ± 0.03 Å beträgt. Dieser Wert ist mit den Ergebnissen der einleitenden Untersuchung^[2] vereinbar und geringfügig kürzer als der Mn-O-Abstand von 1.84 ± 0.02 Å, der für den Prophyrinmangankomplex mit einem Wassermolekül als sechsten Liganden bestimmt wurde^[1]. Weiterhin werden in Tabelle 1 die M-O-Bindungslängen der bislang stukturell charakterisierten Oxo(porphyrinato)-metallkomplexe mit den Mn-O-Abständen in Dimethoxy(porphyrinato)mangan(IV) ohne Oxoligand verglichen. Die relativ intensitätsschwache Absorption vor der Kante (Abb. 3) für den Mn^{IV}=O-Komplex 2 ist mit der relativ langen Mn-O-Bindung, d.h. wie bei den Cr=O-, Cr=N- und Fe=O-Komplexen^[9] zu erklären. Die im Vergleich zu den M-O-Bindungen in Low-spin-Cr^{IV}=O- und Fe^{IV}=O-Porphyrinderivaten verlängerte Mn^{IV}=O-Bindung in 2 ist höchstwahrscheinlich auf den High-spin-Zustand von 2 und – wie Spiro et al. zeigten^[4] – auf die besondere Stabilität und geringe Polarisierbarkeit der halbgefüllten t_{2g}³-Unterschale zurückzuführen. Kürzlich ist ein makrocyclischer anionischer Tetraamidato-oxomangan(V)-Komplex durch eine Röntgenstrukturanalyse charakterisiert worden^[21]. Der in diesem fünfach koordinierten Low-spin-Mangan(V)-Derivat (S = 0) gefundene Mn=O-Abstand von 1.555(4) Å ist wie erwartet kleiner als der Abstand von 1.69 Å in 2.

Die hohe Reaktivität der Oxo(porphyrinato)mangan(IV)-Komplexe gegenüber Olefinen und gesättigten Kohlenwasserstoffen beruht wahrscheinlich ebenfalls auf dem High-spin-Zustand dieser Verbindungen^[2–4]. Die höhere Stabilität des Picket-fence-Porphyrinderivats relativ zu der anderer Por-

phyrine (H₂TPP, H₂TPPPP, H₂TMP^[2, 3, 5]) deutet an, daß die Oxogruppe der Mn=O-Einheit von 2 wahrscheinlich in einem hydrophoben Hohlraum lokalisiert ist, der durch die Pivalamidgruppen des Porphyrins gebildet wird.

Eingegangen am 1. August 1994 [Z 7198]

Stichworte: ESR-Spektroskopie · Manganverbindungen · Metallocoporphyrine · Porphyrinoide · Röntgenabsorptionsspektroskopie

- [1] O. Bortolini, M. Ricci, B. Meunier, P. Friant, I. Ascone, J. Goulon, *Nouv. J. Chim.* **1986**, *10*, 39–49.
- [2] M. Schappacher, R. Weiss, *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 1189–1190.
- [3] J. T. Groves, M. K. Stern, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3812–3814.
- [4] R. S. Cernuszwic, Y. O. Su, M. K. Stern, K. A. Macor, D. Kim, J. T. Groves, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4158–4165.
- [5] J. T. Groves, M. K. Stern, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8628–8638.
- [6] M. J. Gamenzind, F. J. Hollander, C. L. Hill, *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 4301–4308.
- [7] T. D. Tullius, W. O. Gillam, R. M. K. Carlson, K. O. Hodgson, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5670–5676.
- [8] Diese Substanz wurde nach der Methode von C. L. Hill, F. J. Holländer, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7318–7319 hergestellt.
- [9] J. E. Penner-Hahn, M. Benfatto, B. Hedman, T. Takahashi, S. Doniach, J. T. Groves, K. O. Hodgson, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 2255–2259.
- [10] J. E. Penner-Hahn, T. J. McMurry, M. Renner, L. Latos-Grazynsky, K. S. Eble, I. M. Davis, A. L. Balch, J. T. Groves, J. H. Dawson, K. O. Hodgson, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 12761–12764.
- [11] P. Mackle, J. M. Charnock, C. D. Garner, F. C. Meldrum, S. Mann, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8471–8472.
- [12] N. Binsted, J. W. Campbell, S. J. Gurman, P. C. Stepheson, *SERC Daresbury Laboratory, EXCURV 90 and 92 Programs* **1990**, 1992.
- [13] P. A. Lee, J. B. Pendry, *Phys. Rev. B: Solid State* **1975**, *11*, 2795–2811.
- [14] S. J. Gurman, N. Binsted, I. Ross, *J. Phys. C* **1984**, *17*, 143–151.
- [15] S. J. Gurman, N. Binsted, I. Ross, *J. Phys. C* **1986**, *19*, 1845–1861.
- [16] R. Guillard, J. M. Latour, C. Lecompte, J. C. Marchon, J. Protas, D. Ripoll, *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 1228–1237.
- [17] F. S. Molinaro, J. A. Ibers, *Inorg. Chem.* **1976**, *15*, 2278–2283.
- [18] J. T. Groves, W. J. Kruper, Jr., R. C. Haushalter, W. M. Butler, *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 1363–1368.
- [19] M. Schappacher, R. Weiss, R. Montiel-Montoya, A. X. Trautwein, A. Tabard, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3736–3838.
- [20] N. Binsted, R. W. Strange, S. S. Hasnain, *Biochemistry* **1992**, *31*, 12117–12125.
- [21] T. J. Collins, R. D. Powell, C. Slednick, E. S. Uffelman, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 899–901.
- [22] J. E. Penner-Hahn, K. S. Eble, T. J. McMurry, M. Renner, A. L. Balch, J. T. Groves, J. H. Dawson, K. O. Hodgson, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7819–7825.

Effiziente heterogene Biokatalysatoren durch den Einschluß von Lipasen in hydrophoben Sol-Gel-Materialien

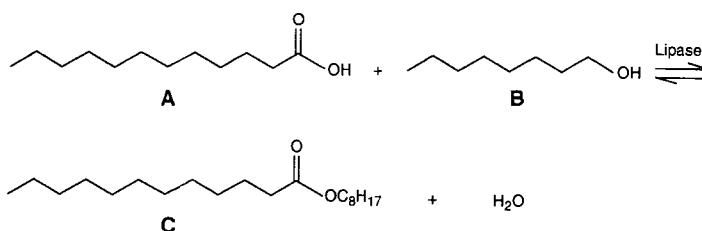
Manfred T. Reetz*, Albin Zonta und Jörg Simpelkamp

Lipasen gehören zu den am meisten verwendeten Enzymen in der Organischen Chemie^[1]. In wässrigen Emulsionen katalysieren sie die chemo-, regio- und stereoselektive Verseifung von Carbonsäureestern, und als Suspension in organischen Lösungsmitteln^[2] katalysieren sie die Rückreaktion und bewirken selektive Veresterungen^[1]. Um die Stabilität und Aktivität der Lipasen zu erhöhen und zugleich die Rückgewinnung zu erleichtern, wurde ihre Immobilisierung mehrfach untersucht^[3–5]. Wir berichten nun über den Einschluß von Lipasen in hydro-

[*] Prof. Dr. M. T. Reetz, Dipl.-Biochem. A. Zonta, Dr. J. Simpelkamp
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr
Telefax: Int. + 208/306-2985

phobe Sol-Gel-Materialien unter Bildung von hochaktiven, stabilen und wiederverwendbaren heterogenen Biokatalysatoren^[6].

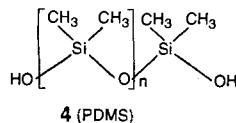
In Anlehnung an frühere Berichte über den Einschluß von Biomolekülen in Kieselgel (SiO_2) mit Hilfe des Sol-Gel-Versfahrens^[7, 8] wurde zunächst Tetramethoxysilan (TMOS) **1** in Gegenwart unterschiedlicher Lipasen (z.B. aus *Ps. cepacia*, Amano PS) hydrolysiert. Klassische Sol-Gel-Prozesse dieser Art werden durch Säuren oder Basen katalysiert, wobei Hydrolyse und Kondensation von TMOS zu nanometergroßen Sol-Partikeln führen, die dann zu unlöslichen amorphen SiO_2 -Gelen vernetzen^[8]. Leider zeigten die von uns nach dieser Methode hergestellten Enzymimmobilisate nur äußerst geringe Aktivitäten. So wurden bei der Veresterung von Laurinsäure **A** (0.05 M) mit *n*-Octanol **B** (0.1 M) in Isooctan unter Bildung von Laurinsäureester **C** relative Aktivitäten von nur 5% erzielt. Bei dieser



auch im folgenden verwendeten Testreaktion wird die relative Aktivität x durch v (immobilisiertes Enzym)/ v (kommerzielles Enzympräparat) definiert, wobei v die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion ist (in $\mu\text{mol}(\text{h mg Lipase})^{-1}$).

Da Lipasen interphasenaktive Enzyme mit hydrophoben Domänen sind, gehen sie mit anderen Substanzen nicht nur ionische, sondern auch hydrophobe Wechselwirkungen ein^[9]. Aus diesem Grund spekulierten wir, daß alkylmodifizierte Kieselgelle^[10] mit hydrophobem Charakter, hergestellt aus Silanen des Typs $\text{RSi(OCH}_3)_3$, besser geeignete Wirt-Matrizes für die Lipasen sein könnten. In orientierenden Versuchen immobilisierten wir deshalb Lipase aus *Ps. cepacia* (Amano PS) im Sol-Gel-Verfahren unter Verwendung von $\text{CH}_3\text{Si(OCH}_3)_3$ (MTMS) **2a** oder Mischungen aus TMOS **1** und MTMS **2a**. Als Katalysator dien-

$\text{Si(OCH}_3)_4$	$\text{RSi(OCH}_3)_3$	$(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}-\text{R}-\text{Si(OCH}_3)_3$
1 (TMOS)	2a R=CH₃ (MTMS)	3 (BTMS)
	b R=C₂H₅ (ETMS)	
	c R=n-C₃H₇ (PTMS)	
	d R=n-C₄H₉ (BTMS)	
	e R=n-C₁₈H₃₇ (ODTMS)	



te NaF ^[11]. Abbildung 1 zeigt die Abhängigkeit der Aktivität vom „Methylgehalt“ des Gels. Bei einem Mischgel mit 50% MTMS betrug die relative Aktivität immerhin 30%. Jede weitere Erhöhung des MTMS-Gehalts ließ die relative Aktivität stark ansteigen, bis zu 1300% für ein reines MTMS-Gel.

Wählt man ein konstantes TMOS/RSi(OCH₃)₃-Verhältnis von 1/1 und variiert den Rest R des Silans, so steigt die relative Aktivität in der Reihenfolge $\text{CH}_3 < \text{C}_2\text{H}_5 < \text{n-C}_3\text{H}_7 < \text{n-C}_4\text{H}_9$.

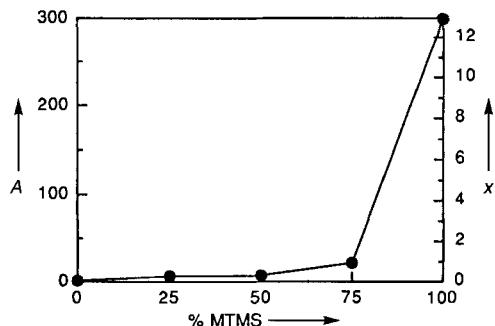


Abb. 1. Abhängigkeit der Aktivität A [$\mu\text{mol}(\text{h mg Lipase})^{-1}$] immobilisierter *Ps. cepacia*-Lipase in TMOS/MTMS-Mischgelen von der Gelzusammensetzung. Zur Definition der relativen Aktivität x siehe Text.

stark an, eine weitere Vergrößerung des Restes R und die Erhöhung der Lipophilie durch Verwendung von *n*-Octyl- oder *n*-Octadecylresten bewirken dagegen nur einen geringen weiteren Aktivitätsanstieg (Abb. 2).

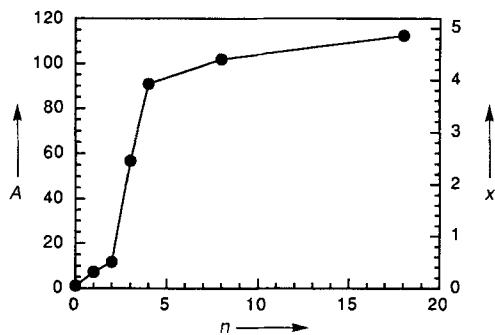


Abb. 2. Einfluß der Kettenlänge von R auf die Aktivität immobilisierter *Ps. cepacia*-Lipase in Gelen des Typs TMOS/RSi(OMe)₃ (1/1). n = Zahl der C-Atome in R.

Die in den Abbildungen 1 und 2 zusammengefaßten Ergebnisse verdeutlichen, daß die Silankomponente ein wichtiger Parameter zur Optimierung der Aktivität ist. Deshalb untersuchten wir die ebenfalls kommerziell erhältlichen Silane **3** und **4**, $n = 5-9$, als Gelvorstufen in Kombination mit TMOS und mehreren Lipasen^[12]. In allen Fällen wurden Gelmaterialien mit ausgezeichneten Aktivitäten erhalten. Der Protein-Immobilisierungsgrad betrug bis zu 93%.

Die in Abbildung 3 dargestellten repräsentativen Ergebnisse zeigen, daß es kein allgemeines Rezept für eine optimale Gelmatrix gibt, auch wenn sich in vielen Fällen die TMOS/PTMS-1/5-Gele als gut geeignet erwiesen. Bei vielen Lipasen läßt sich eine Steigerung der Aktivität um einen Faktor von 5 und mehr erreichen. Im Falle der Lipase SP 523 (Novo) ist der Faktor sogar 88, verglichen mit dem kommerziellen Enzympulver.

Die Langzeitstabilität der eingeschlossenen Lipasen ist ungewöhnlich hoch. Die Testreaktion wurde über einen Zeitraum von 30 Tagen im Batch-Betrieb durchgeführt, wobei nach jeweils 22 h der feste Katalysator abfiltriert, gewaschen und danach wieder eingesetzt wurde^[13]. Typischerweise ging die Aktivität nach den ersten zwei bis drei Reaktionsschritten lediglich um 15–20% zurück und blieb dann konstant bei 80–85% der Anfangsaktivität, so z.B. bei Amano-PS-Lipase in reinem MTMS- oder MTMS/PDMS-6/1-Gel. Die gleiche Lipase, adsorbiert auf reinem MTMS-Gel, verlor dagegen mehr als 75% der Anfangsaktivität nach nur acht Schritten. Somit ist wahrscheinlich, daß

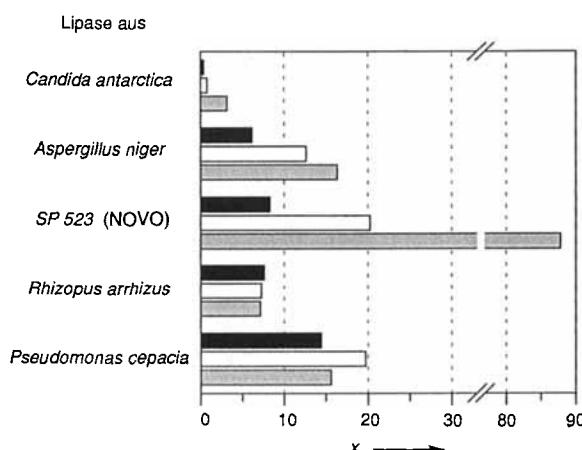
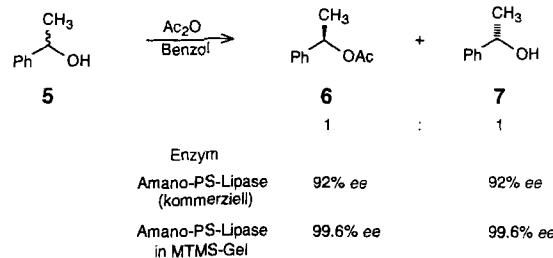


Abb. 3. Relative Aktivität x immobilisierter Lipasen in drei verschiedenen Gelmaterialien. Schwarze Balken: MTMS; weiße Balken: MTMS/PDMS (6:1); graue Balken: PTMS/TMOS (5:1)

nur ein kleiner Anteil der Lipase (15–20 %) beim Sol-Gel-Verfahren lediglich adsorbiert oder nur schwach stabilisiert ist und daher leichter deaktiviert wird oder verloren geht.

Die Morphologie der Sol-Gel-Immobilisate wurde elektromikroskopisch (REM) untersucht^[14]. Abbildung 4 zeigt eine typische Aufnahme eines Lipase-haltigen MTMS-Gels mit amorphen Bereichen sowie sphärischen Partikeln.



Die von uns hier beschriebene Methode führt zu Lipase-Immobilisaten mit exzellenter Aktivität und Stabilität. Die erhaltenen Biokatalysatoren sind leicht wiederverwendbar^[13] und bieten sich auch für den Einsatz in kontinuierlichen Prozessen an. Ein besonderer Vorteil ist die Möglichkeit, durch Variation einer Reihe von Parametern^[17] maßgeschneiderte Immobilisate für jede Lipase zu erhalten^[6].

Eingegangen am 14. Juli,
veränderte Fassung am 17. September 1994 [Z 7125]

Stichworte: Enzymkatalyse · Immobilisierung · Lipasen · Sol-Gel-Prozesse

- [1] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, **1992**; *Enzymes as Catalysts in Organic Synthesis* (Hrsg.: M. P. Schneider), Reidel, Dordrecht, **1986**; W. Boland, C. Fröbl, M. Lorenz, *Synthesis* **1991**, 1049.

[2] A. Zaks, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 3192; A. M. Klibanov, *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 114.

[3] E. Guibe-Jampel, G. Rousseau, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 112; F. X. Malcata, H. R. Reyes, H. S. Garcia, C. G. Hill, Jr., C. H. Amundson, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, 67, 890; M. Arroyo, J. M. Moreno, J. V. Sinisterra, *J. Mol. Catal.* **1993**, 83, 261; siehe auch R. V. Parthasarathy, C. R. Martin, *Nature* **1994**, 369, 298.

[4] J. A. Bosley, J. C. Clayton, *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, 43, 934; M. Norin, J. Boutelje, E. Holmberg, K. Hult, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, 28, 527.

[5] Y. Kimura, A. Tanaka, K. Sonomoto, T. Nihira, S. Fukui, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1983**, 17, 107.

[6] „Immobilisierte Lipasen in hydrophoben Sol-Gel-Materialien“: M. T. Reetz, A. Zonta, J. Simpelkamp (Max-Planck-Institut für Kohlenforschung), DE-A 4408152.9, **1994**.

[7] F. H. Dickey, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 59, 695; P. Johnson, T. L. Whateley, *J. Colloid Interface Sci.* **1971**, 557; L. M. Ellerby, C. R. Nishida, F. Nishida, S. A. Yamanaka, B. Dunn, J. Silverstone Valentine, J. J. Zink, *Science* **1992**, 255, 1113; Y. Tatsu, K. Yamashita, M. Yamaguchi, S. Yamamura, H. Yamamoto, S. Yoshikawa, *Chem. Lett.* **1992**, 1615; S. Braun, S. Rappoport, S. Shtelzer, R. Zusman, S. Druckmann, D. Avnir, M. Ottolenghi in *Biotechnology: Bridging Research and Applications* (Hrsg.: D. Kamely, A. Shakrabarty, S. E. Korn-guth), Kluwer, Boston, **1991**, S. 205; H. Weetall, B. Robertson, D. Cullin, J. Brown, M. Welch, *Biochem. Biophys. Acta* **1993**, 142, 211.

[8] L. L. Hench, J. K. West, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 33; C. J. Brinker, W. Scherer, *Sol-Gel-Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel-Processing*, Academic Press, Boston, **1990**.

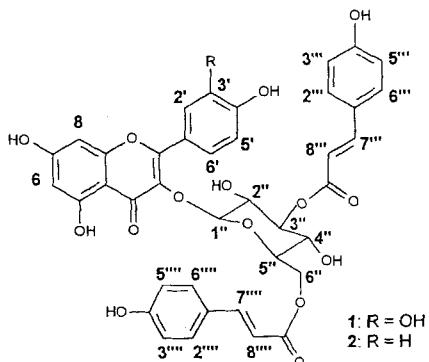
[9] A. M. Brzozowski, U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Turkenburg, F. Björklund, B. Huge-Jensen, S. A. Patkar, L. Thim, *Nature (London)* **1991**, 351, 491; K.-E. Jaeger, S. Ransac, B. W. Dijkstra, C. Colson, M. van Hevel, O. Misset, *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, 15, 29.

[10] F. Schwertfeger, W. Glaubitt, U. Schubert, *J. Non-Cryst. Solids* **1992**, 145, 85; Y. Haruvy, A. Heller, S. E. Weber in *Supramolecular Architecture-Synthetic Control in Thin Films and Solids* (Hrsg.: T. Bein) (*ACS Symp. Ser.* **1992**, 499), S. 405.

[11] Die Lipase wird in Wasser oder Puffer gelöst, zur Abtrennung fester Rückstände zentrifugiert und mit wässrigen Lösungen von Polyvinylalkohol und Na-triumfluorid vermischt. Anschließend werden die Silane in der Reihenfolge

Was sind die Gründe für die erhöhten relativen Enzymaktivitäten? Da sich die Vergleiche auf Suspensionen in organischen Lösungsmitteln beziehen, ist wohl die primäre Ursache eine feinere Verteilung und damit eine erhöhte Zugänglichkeit des Enzyms. Man kann zudem spekulieren, daß die hydrophoben Reste R in der Sol-Gel-Matrix stabilisierende und aktivierende Wechselwirkungen mit den hydrophoben Domänen der Lipasen eingehen. Der beobachtete „Alkyleffekt“ kann aber auch in der eigentlichen Gelbildung seinen Ursprung haben, etwa in einer geringeren enzymschädigenden Wirkung von hydrophoben Silanmonomeren. Auch eine Aktivitätserhöhung durch lokale Erhöhung der Substratkonzentration in der hydrophoben Matrix ist denkbar^[5]. Ein günstiger Einfluß von möglichen hydrophoben Wechselwirkungen bei der Immobilisierung von Lipasen auf anderen Trägern, wenn auch mit deutlich geringerer Aktivitätssteigerung, ist beschrieben worden^[4].

- zunehmender Reaktivität hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wird intensiv gemischt und bis zum Gelieren ca. 1 min geschwenkt. Die erhaltenen Gele werden 24 h verschlossen stehen gelassen, 3 d bei 37 °C getrocknet, mit Wasser, Aceton und Pentan gewaschen, getrocknet und gemahlen.
- [12] Wir danken Novo Nordisk A/S (Dänemark) für eine Probe von SP 523 (Novo) und Amano Enzyme Europe Ltd. (England) für eine Charge von PS Lipase.
- [13] Während sich das kommerzielle Enzympulver bei der Testreaktion mit dem entstehenden Reaktionswasser zu einem schleimigen, schwer abtrennbaren Rückstand verband, ließ sich das Sol-Gel-Immobilisat problemlos recyclieren.
- [14] Wir danken Herrn Dr. B. Tesche (Fritz Haber Institut, Berlin) für die REM-Aufnahmen.
- [15] D. Bianchi, P. Cesti, E. Battistel, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5531.
- [16] Nach Cesti et al. [15] liefert die untersuchte Reaktion 95% ee. Es ist jedoch bekannt, daß die Enantioselektivität von enzymatisch katalysierten Reaktionen von Enzym-Charge zu Enzym-Charge variieren kann.
- [17] Der Einfluß weiterer Parameter, z.B. des Zusatzes von Additiven, der Stöchiometrie Wasser/Silan, der Katalysatormenge, sowie der Einsatz weiterer Silanmonomere werden derzeit von uns intensiv untersucht.



Die Verbindungen **1** und **2** wurden durch Gegenstromchromatographie (MLCCC), Gelchromatographie an Sephadex LH-20 und préparative RP-HPLC gereinigt und isoliert. Die Strukturaufklärung erfolgte mittels UV- und ¹H-NMR-Spektroskopie (2D-¹H-¹H-COSY und NOESY), moderner massenspektrometrischer Techniken (TOF-SIMS, Electrospray-MS in Kombination mit MS/MS) sowie selektiver chemischer Abbaureaktionen. Danach handelt es sich bei **1** um 3",6"-Di-O-(*para*-cumaroyl)isoquercitrin und bei **2** um 3",6"-Di-O-(*para*-cumaroyl)astragalin.

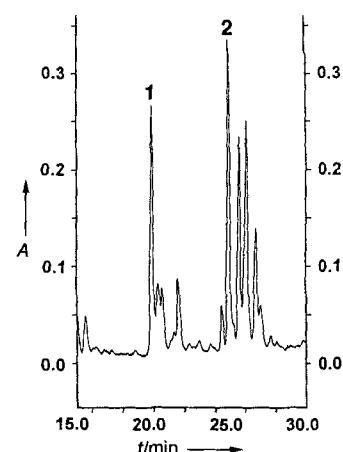


Abb. 1. RP-HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extraktes aus Keimnadeln (Verbindung **1** induziert) von Kiefernkeimlingen nach vier tägiger UV-B-Bestrahlung; detektiert bei 280 nm. t = Retentionszeit, A = Absorption in beliebiger Einheit.

Die beiden Metabolite gehören zu einer Gruppe bisher selten erwähnter diacylierter Flavonolmonoglycoside. Verbindung **1** wurde bereits beschrieben, allerdings mit Unsicherheiten im Substitutionsmuster am Zucker^[8]. Verbindung **2** konnte hier zum ersten Mal isoliert und charakterisiert werden.

Die Ergebnisse der ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchung der Verbindungen **1** und **2** sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Molekülgerüste wurden durch ¹H-NMR- und 2D-¹H-¹H-COSY-NMR-Spektroskopie etabliert. Die zweifelsfreie Zuordnung der aromatischen Protonen wurde durch NOESY-Experimente und den Vergleich mit den Spektren der durch Solvolyse erhaltenen einfach acylierten Verbindungen bestätigt. Selektive Entkopplungsexperimente ermöglichen eine eindeutige Zuordnung der Zuckerprotonen und zeigten die Acylierung in den Positionen 3" und 6" an.

Die aus den ¹H-NMR-Spektren gewonnenen Strukturdaten wurden durch massenspektrometrische Messungen bestätigt. Eine erste Molmassenbestimmung mit Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (TOF-SIMS), die hier erstmals für die Analytik sekundärer Pflanzenstoffe eingesetzt wurde, war in Einklang mit den postulierten Strukturen^[9]. Im Negativ-Ionen-Modus zeigten sich für **1** und **2**, neben den jeweiligen Quasimolekülien $[M - H]^-$ bei *m/z* 755 bzw. 739, Fragment-Ionen bei *m/z* 301 bzw. 285, entsprechend dem jeweiligen $[A\text{glycon}]^-$ -Ion, als Basissignale. Weitere wichtige Strukturinformationen wurden mit Elektrospray(ES)-MS- und MS/MS-Untersuchungen nach kollisionsinduzierter Dissoziation der protonierten Molekülien in einem Tripelquadrupol-Massenspektrometer erhalten.

Die Strukturen UV-B-induzierter Sonnenschutzpigmente der Kiefer (*Pinus sylvestris* L.)**

Tim P. Jungblut, Jörg-P. Schnitzler, Werner Heller*, Norbert Hertkorn, Jörg W. Metzger, Wilfried Szymczak und Heinrich Sandermann, Jr.

Eine Zunahme der globalen UV-B-Strahlung als Folge des Ozonabbaus in der Stratosphäre^[1] fordert für das sichere Überleben von Lebewesen effektive Schutzmechanismen^[2, 3]. Die meisten Experimente zur Wirkung von UV-B-Strahlung auf Pflanzen wurden an Nutzpflanzen^[4], nur wenige mit Bäumen durchgeführt^[5]. Wir berichten nun über die Struktur von Schutzpigmenten, die spezifisch als Reaktion auf UV-B-Strahlung, die der natürlichen entsprach, in Kiefernkeimlingen (*Pinus sylvestris* L.) gebildet wurden^[6, 7].

Die RP-HPLC-Analyse (RP-HPLC = Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie) methanolischer Extrakte von Nadeln UV-B-behandelter Kiefernkeimlinge zeigte, daß insbesondere Verbindung **1** in Keimnadeln und Verbindung **2** in Primärnadeln stark induziert worden waren (**1** von kleiner 0.1 auf ca. 0.9 µmol pro g Frischgewicht und **2** von 0.8 auf 2.4 µmol pro g Frischgewicht)^[6]. Abbildung 1 zeigt das typische HPLC-Elutionsprofil eines methanolischen Extraktes aus Keimnadeln nach vier Tagen UV-B-Bestrahlung.

[*] Dr. W. Heller, Dipl.-Chem. T. P. Jungblut, Dr. J.-P. Schnitzler, Prof. Dr. H. Sandermann, Jr.
GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH
Institut für Biochemische Pflanzenpathologie
Postfach 11 29, D-85758 Oberschleißheim
Telefax: Int. + 89/3187-3383; E-mail: heller@gsf.de

Dr. N. Hertkorn
GSF-Institut für Ökologische Chemie
Dr. W. Szymczak
GSF-Institut für Strahlenschutz
Dr. J. W. Metzger
Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der chemischen Industrie und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 323, C-3 Metzger) gefördert. Den Herren Dipl.-Phys. M. Köfferlein und Dr. H. Seiditz (GSF-Arbeitsgruppe Expositionskammern) danken wir für das Aufzeichnen der UV-B-Strahlung während der Experimente. Dr. A. Marston und Prof. Dr. K. Hostettmann (Université de Lausanne, Schweiz) für die Einführung in die fortgeschrittenen Handhabung der Gegenstromchromatographie.