مقاله تحقیقی

شناسایی ساختمان مولکولی و ارزیابی بیولوژیک کاپرووردین، استخراج‌شده از یک غلاف‌دار دریایی در دریای عمان

رامین زیباسرشت *

- دانشگاه علوم دریایی امام خمینی(ره)، نوشهر

***مسؤول مکاتبات:** دانشگاه علوم دریایی امام خمینی(ره) نوشهر، دانشکده علوم، بخش شیمی و فیزیک، مازندران، ایران، پُست الکترونیک: rzi12@uclive.ac.nz

محل انجام تحقیق: بخش شیمی و فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه علوم دریایی امام خمینی(ره)، نوشهر، مازندران - آزمایشگاه بیومتریال دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۲

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۰ - شماره ۱ - بهار ۱۳۹۴

چکیده

برای انجام این تحقیق، نمونه‌ای از غلاف‌دار دریایی (آب‌پاش دریایی) متعلق به رده Acidiacea از پایه اسکله پایگاه نیروی دریایی ارتش در کنارک در فصل پاییز ۱۳۹۲ جمع‌آوری گردید. سپس، نمونه‌ها منجمد شده و برای انجام آزمایشات به آزمایشگاه دانشکده علوم در دانشگاه علوم دریایی امام خمینی(ره) نوشهر منتقل شد. ترکیبات شیمیایی خاصی از نمونه موردنظر با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی استخراج گردید و ساختمان مولکولی یکی از ترکیبات موردنظر به نام کاپرووردین با استفاده از روش‌های طیف‌نگاری NMR، طیف‌نگاری جرمی، طیف‌سنجی IR و UV شناسایی شد. در این مطالعه ، ارزیابی بیولوژیک کاپرووردین در مقابل تعدادی از رده‌های سلولی تومور انسانی و جانوری نیز مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی‌ها نشان دادند که این ترکیب در مقابل آن دسته از رده‌های سلولی تومور انسانی و جانوری موردنظر در این مطالعه خاصیت ضد توموری دارد.

کلید واژه‌ها: کاپرووردین، شناسایی، طیف‌نگاری NMR، طیف‌نگاری جرمی

مقدمه

در راستای کارهای تحقیقاتی رو به توسعه که توسط محققین انجام می‌پذیرد و به دلیل گسترش انواع بیماری‌های سرطان در جوامع انسانی، به منظور یافتن ترکیبات جدید ضدسرطان، گستره وسیعی از انواع موجودات دریایی موردتوجه قرار گرفته‌اند. بر اساس تحقیقات انجام‌شده، به‌ویژه در سال‌های اخیر،

انواع مختلفی از این‌نوع موجودات می‌توانند گزینه مناسبی جهت استخراج ترکیبات ضد سرطانی باشند. آب‌پاش‌های دریایی (اسیدیاسه) متعلق به رده Acidiacea، زیرشاخه Urochordata و شاخه طنابداران (Chordata) می‌باشند. این جانوران، به صورت کلنی و یا انفرادی یافت می‌شوند. دوره لاروی کوتاهی از چند دقیقه تا چند روز را دارند. در طول چرخه زندگی، با ترشح ترکیبات چسبناک، لارو آن‌ها به یک تکیه‌گاه سخت از قبیل تخته‌سنگ‌ها و پایه اسکله‌ها می‌چسبند. نمونه بالغ دارای دو سیفون درون‌کش و برون‌ریزنده می‌باشد. فوران آب از سیفون خروجی علت نام‌گذاری آن‌ها به عنوان آبپاش دریایی است. این دسته از جانوران از طریق فیلتر نمودن آب تغذیه می‌نمایند (۱).

طول این آبزیان بر حسب گونه می‌تواند بین ۰/۲ تا ۴ اینچ متغیر بوده و به رنگ‌های مختلفی مانند سبز، زرد، قرمز، قهوه‌ای یا سیاه دیده می‌شوند. دشمنان طبیعی آن‌ها جانورانی مانند مارماهی‌ها، حلزون‌ها، ستاره‌های دریایی و برخی از سخت‌پوستان هستند. طول عمر آن‌ها بر حسب گونه تقریبا بین ۷ تا ۳۰ سال می‌باشد.

این موجودات دارای منابع غنی از متابولیت‌های ثانویه هستند که گروه بزرگی از این ترکیبات، ساختار آلکالوییدی دارند. این موجودات دارای ظرفیت نسبتا بالایی برای کشف و شناسایی ترکیبات دارویی جدید از دریا هستند (۲). بسیاری از ترکیبات آلکالوییدی به دلیل داشتن فعالیت‌های بیولوژیک از قبیل خواص ضدویروسی، ضدالتهابی، ضدلوسمی و ضدتوموری موردتوجه می‌باشند.

این تحقیق با هدف جداسازی و شناسایی ترکیبات طبیعی در گونه‌ای آبپاش دریایی در اسکله پایگاه نیروی دریایی ارتش در کنارک انجام پذیرفت که امید است نتایج به‌دست‌آمده بتواند راه‌گشای تحقیقات آینده باشند.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق، نمونه‌ای از آب‌پاش دریایی متعلق به رده Acidiacea از پایه اسکله نیروی دریایی کنارک در پاییز ۱۳۹۲ جمع‌آوری گردید. سپس نمونه‌های منجمدشده برای انجام آزمایشات به آزمایشگاه‌های دانشکده علوم در دانشگاه علوم دریایی امام خمینی(ره) نوشهر و آزمایشگاه بیومتریال دانشگاه علوم پزشکی ارتش در تهران منتقل گردید.

تمامی حلال‌ها قبل از مصرف، تقطیر شدند یا به صورت HPLC grade مورد استفاده قرار گرفتند. بسته فاز برگشتی BakerBond Octadecyl C18 (40µm) برای کروماتوگرافی خلاء و کروماتوگرافی نفوذ ژل Sephadex LH-20 استفاده شد. طیف‌های NMR بر روی دستگاه‌های اسپکترومتر Varian UNITY, XL 300 MHz یا INOVA 500 MHz ثبت شدند.

طیف‌های جرمی الکترواسپری (ESIMS) در هر دو مُد مثبت و منفی بر روی یک اسپکترومتر جرمی Micromass LCT و اسپکترومتری جرمی ضربه الکترون (EIMS) روی یک اسپکترومتر جرمی Kratos MS 80 RFA ثبت شدند. FABMS و HRFABMS نیز بر روی دستگاه اسپکترومتر جرمی Kratos MS 80 RFA ثبت شدند. LC/ESIMS بر روی یک دستگاه Agilent technologies

1100 HPLC-MSD با استفاده از یک ستون Zorbax C8 (2.1mm × 15 cm) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. اسپکترومتر جرمی با استفاده از API-ES (+ve) به کار گرفته شد. طیف UV با استفاده از یک اسپکتروفوتومتر Hewlett-Packard 3452A انجام شد و طیف‌های IR با استفاده از یک اسپکتروفوتومتر Shimadzu FTIR-8201PC ثبت گردیدند. آنالیزهای HPLC بر روی یک ستون Phonomenex Prodigy 5µ ODS با ابعاد (100 Å: 250 × 4.6 mm) انجام شد. فاز برگشتی بر روی دستگاه HPLC Shimadzu LC-4A انجام پذیرفت. خالص‌سازی نهایی بر روی یک ستون Phonomenex Prodigy 5µ ODS با ابعاد 100 Å: 250 × 10 mm و با سرعت جریان ۴ میلی‌لیتر در دقیقه انجام شد.

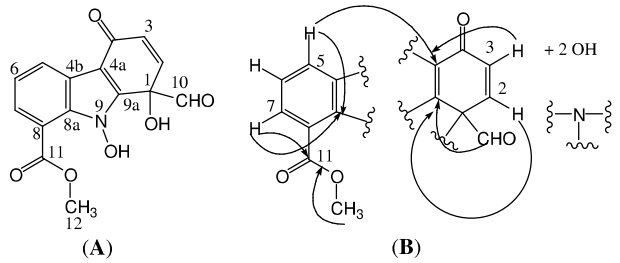
کاپرووردین (تصویر ۱A) [۸-فرمیل-۸،۹-دی‌هیدروکسی-۵-اُکسو-۹،۸-دی‌هیدرو-*5H*-کاربازول-۱-کربوکسیلیک اسید متیل استر]: روغن زردرنگ:

IR ($CHCl_3$) υ_{max} 3690 (sharp), 3500 (br), 1665, 1603, 1556, 1290 cm^{-1}; UV (EtOH) λ_{max} (ε) 208 (20000), 270 (6700), 302 (4800), 382 (16000) nm; ^1H NMR data (CD_3OD, 300 MHz), see Table 1; ^{13}C NMR data (CD_3OD, 75 MHz), see Table 1; ESIMS (-ve) (30 V) *m/z* 300 $[MH]^-$, 272 $[(MH)-CO]^-$; ESIMS (+ve) (20 V) *m/z* 942 $[M_3K]^+$, 926 $[M_3Na]^+$, 641 $[M_2K]^+$, 625 $[M_2Na]^+$, 472 $[M_3HK]^{2+}$, 340 $[MK]^+$, 324 $[MNa]^+$, 302 $[MH]^+$; EI (70 eV) *m/z* 301 (M^+, 35), 285 (75), 273 (24), 253 (48), 225 (100), 213 (28), 197 (26), 169 (28), 146 (20); FABMS (glycerol matrix, positive ion) *m/z* 302 $[MH]^+$, 277, 185; LC/MS *m/z* 625 $[M_2Na]^+$, 324 $[MNa]^+$, 302 $[MH]^+$; HREIMS *m/z* 301.05910 ($[M]^+$, calculated for $C_{15}H_{11}NO_6$, 301.05864); HRFABMS *m/z* 302.0673 ($[MH]^+$, calculated for $C_{15}H_{12}NO_6$, 302.0665).

واکنش کاهش کاپرووردین: مقدار ۰/۲ میلی‌گرم کاپرووردین و ۳/۵ میلی‌گرم $NaBH_4$ در ۳ میلی‌لیتر متانول خشک به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه هم زده می‌شوند. مخلوط واکنش تحت خلاء غلیظ شده و مجددا در ۲ میلی‌لیتر متانول حل می‌شود و سپس توسط RPHPLC و طیف‌نگاری جرمی آنالیز می‌شود. آنالیز HPLC حضور دو ماده را نشان داد که کمی از کاپرووردین قطبی‌تر اما پروفایل UV یکسان دارند. این دو ترکیب مشکوک به دو ترکیب C و D بودند اما طیف جرمی الکترواسپری این مخلوط فقط جرمی را که متناظر با ترکیب ۴ است، نشان داد (جرم بر بار m/z ۲۸۸/۲۱ $[MH]^+$) که پیشنهاددهنده فرمول ساختمانی محتمل $C_{15}H_{13}NO_5$ بوده که جرم محاسبه‌شده آن، m/z ۲۸۷/۲۶۷۵ است.

بحث و نتیجه‌گیری

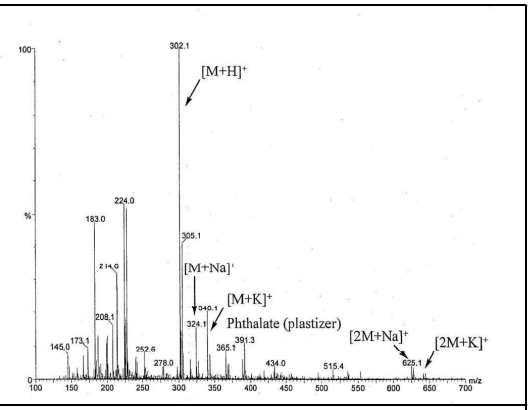
نمونه ۳۴ گرمی از غلاف‌دار منجمدشده توسط مخلوط متانول/ دی‌کلرومتان استخراج گردید. جداسازی اولیه مخلوط استخراج‌شده توسط کروماتوگرافی مایع خلاء RP و سپس توسط کروماتوگرافی نفوذی ژل (LH-20) انجام شد. خالص‌سازی نهایی به وسیله HPLC فاز برگشتی انجام شد که منجر به تولید متابولیت اصلی کاپرووردین (تصویر ۱) به صورت یک روغن زردرنگ (با بازده ۰/۰۱ درصد، ۵ میلی‌گرم) گردید.



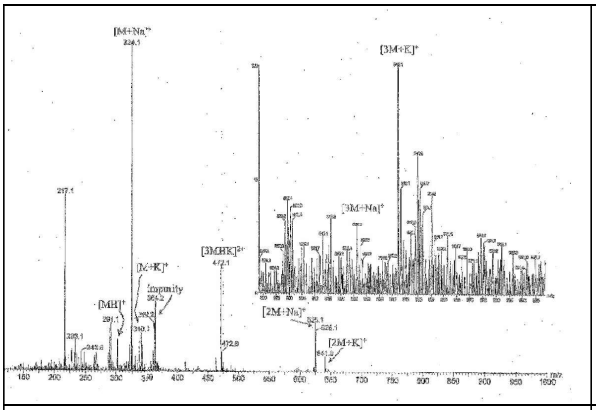
تصویر ۱- ساختار مولکولی کاپروردین.

فرمول مولکولی این ترکیب با استفاده از HRFABMS و HREIMS به صورت $C_{15}H_{11}NO_6$ تعیین گردید (تصویر ۲).

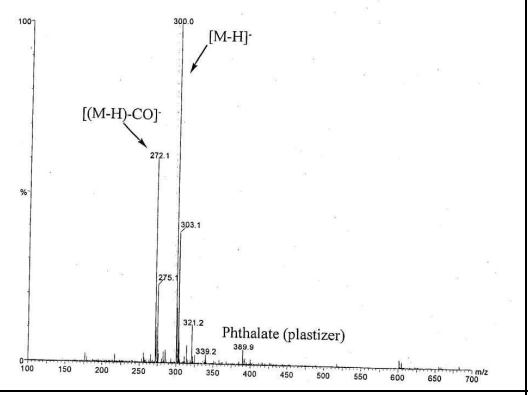
طیف ^{13}C NMR ماده **A** دارای ۱۵ سیگنال بود که مشتمل بر یک گروه متیل، شش گروه متین و هشت اتم کربن چهارتایی بود که به وسیله روش gHSQC NMR تایید شدند. طیف IR ماده **A** دارای یک جذب در ناحیه $3690\ cm^{-1}$ (تیز) و یک جذب در ناحیه $3500\ cm^{-1}$ (پهن) داشت که نشان‌دهنده گروه‌های هیدروکسیل آزاد و پیوندشده هیدروژنی بودند. در طیف ^1H NMR (تصویر ۳) یکی از پروتون‌های قابل تعویض [σ8.50(bs)] مشاهده شد؛ درحالی‌که، دیگری، احتمالا به دلیل تعویض سریع مشاهده نشد.



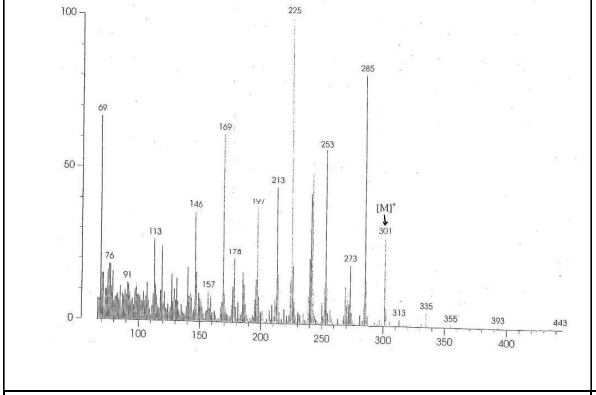
تصویر ۲-الف- طیف جرمی الکترواسپری کاپروردین در مُد ve+.



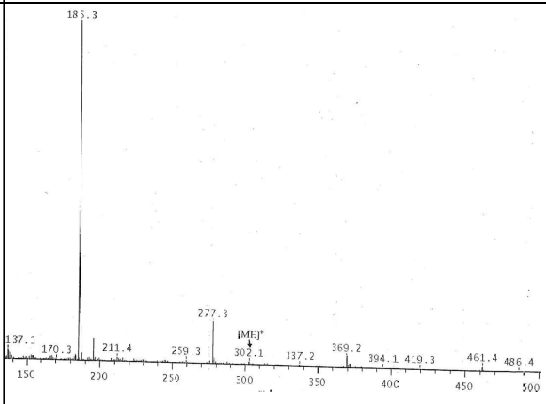
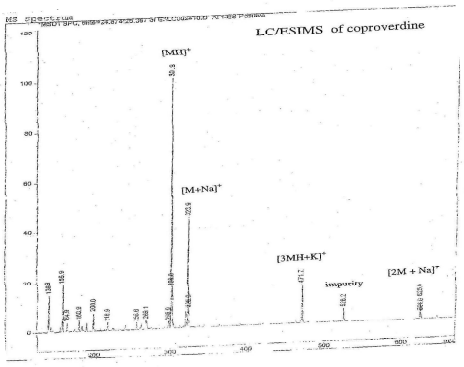
تصویر ۲-ب- طیف جرمی الکترواسپری کاپروردین در مُد ve+ ولتاژ مخروط ۶۰ ولت.



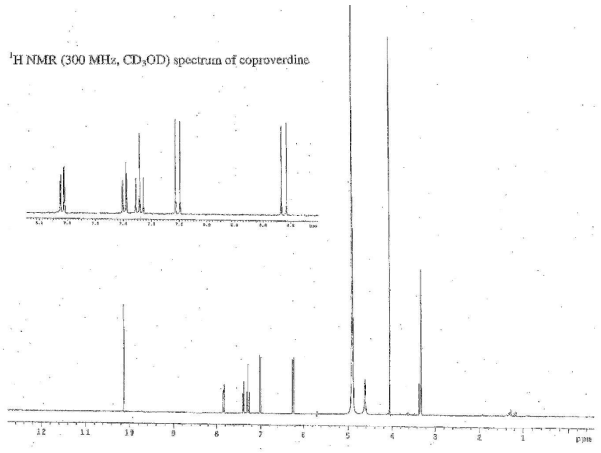
تصویر ۲-پ- طیف جرمی الکترواسپری کاپروردین



تصویر ۲-ت- طیف جرمی EI کاپروردین در مُد ve+

در مُد ve-.	(70 eV).
	
تصویر ۲-ث- طیف جرمی FAB کاپرووردین.	تصویر ۲-ج- طیف جرمی LC/ESIMS کاپرووردین.

تصویر ۲- طیف‌های جرمی HRFABMS و HREIMS مربوط به ترکیب کاپرووردین.



تصویر ۳- طیف ^{1}H NMR مربوط به کاپرووردین در حلال CD_3OD (300 MHz).

جذب UV در ۳۸۲ نانومتر نشان‌دهنده یک بخش ایندول کانجوگه بود (۳) در حالی‌که، جذب IR در $1665\ cm^{-1}$ به همراه داده NMR [σ10.13(s); 192.7] نشان‌دهنده حضور گروه فُرمیل بودند. همچنین حضور یک گروه متیل استر [σ4.06(s); 53.4, 168.2] و یک گروه کتون [σ186.4] مشاهده گردید.

دو جزء کلیدی ساختمان مولکولی با استفاده از داده‌های ^{1}H NMR و COSY NMR شناسایی شدند. اولی، یک حلقه آروماتیک که در موقعیت‌های ۱، ۲ و ۳ جایگزین شده است [σ7.84(dd), 7.28(dd), 7.39(dd)]. و دومی، یک پیوند دوگانه سیس [σ6.25(d), 7.01(d)]. اتصال این دو جزء به هم‌دیگر برای تشکیل ساختمان مولکولی **B** (تصویر ۲) از تفسیر طیف‌های COSY و gHSQC و آزمایش‌های مختلف gHMBC NMR به همراه یک آزمایش CIGAR HMBC (جدول ۱) (۴) نشات گرفته بود. همبستگی HMBC از H7 تا C11 تایید کرد که بخش متیل استر به سیستم حلقه آروماتیک جایگزین شده ۱، ۲ و ۳ متصل شده است. اتصال در مجاورت گروه اولفین سیس از همبستگی HMBC از H2 تا C1، کتون C4، C9a و فرمیل C10 و همچنین از H3 تا C1 و C4a حاصل شد. همبستگی‌های کلیدی

HMBC که اجازه بسته‌شدن اسکلت ساختمان مولکولی **B** را داد، از H7 تا C8a و از H5 تا C4a و C8a و از H10 تا C9a نشات گرفت. برخی از همبستگی‌های HMBC ضعیف بودند و نیاز به دستیابی مجدد (reacquisition) با استفاده از بهبودهای متفاوت ثابت جفت‌شدن داشتند. اسکلت ساختمانی مولکولی **B** همه این موارد را در برداشت و همه اتم‌ها به غیر از H_2NO_2 را پاسخگو بود. بر اساس داده‌های UV و محاسبات جابجایی شیمیایی کربن، ساختمان مولکولی **B** به صورت یک سیستم کاربازول درنظر گرفته شد و اتم‌های باقی‌مانده (H_2O_2) به عنوان دو گروه OH– متصل به موقعیت‌های C1 و Na پیش‌بینی گردید که منجر به تشکیل مولکول کاپروردین گردید (۵). کربن چهارتایی (σ90.5) با جایگزینی کربن C1 با یک گروه هیدروکسیل و یک گروه فُرمیل همخوانی داشت (۶).

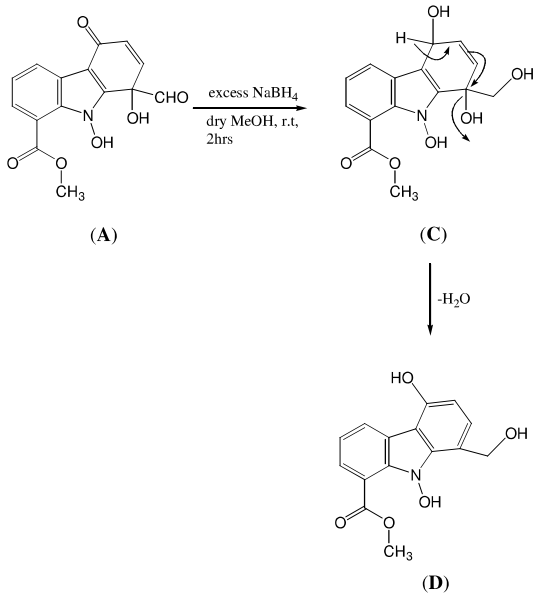
جدول ۱- داده‌های NMR مربوط به کاپروردین. طیف‌ها در حلال CD_3OD انجام شد. ^{13}C NMR در فرکانس ۷۵ MHz و ^{1}H NMR در فرکانس‌های ۳۰۰ MHz و ۵۰۰ MHz ثبت گردیدند. پیک‌ها نسبت به پیک مرجع باقیمانده حلال CHD_2OD (σ3.3) تنظیم شدند.

اتم مولکول **A**	^{13}C NMR σ	^{1}H NMR σ	gCOSY	gHMBC
1	۹۰/۵			
2	۱۴۳/۶	۷/۰۱	H3	C1, C4, C9a, C10
3	۱۲۸/۵	۶/۲۵	H2	C1, C2, C4, C4a, C10
4	۱۸۶/۶			
4a	۱۰۵/۷			
4b	۱۲۷/۷			
5	۱۲۵/۱	۷/۳۹	H6	C4a, C4a, C6
6	۱۲۶/۴	۷/۲۸	H5, H7	C8a
7	۱۲۵/۹	۷/۸۴	H6	C4b, C5, C7, C8, C8b
8	۱۱۸/۳			
8a	۱۴۴/۹			
9				
9a	۱۵۷/۲			
10	۱۹۲/۷	۱۰/۱۳		C1, C4a, C9a
11	۱۶۸/۲			
12	۵۳/۴	۴/۰۶		C11
1-OH		۸/۵۰		
9-OH		۸/۵۰		

اگرچه اسکلت کاربازول در کاپروردین به وسیله داده‌های NMR و UV تعریف شد؛ اما بررسی بیشتر به وسیله مطالعه کامپیوتری با استفاده از نرم‌افزار CONON انجام شد (۷). تعداد ۵۱۰ ساختمان مولکولی در ابتدا محاسبه شدند که به تعداد ۸ مولکول کاهش یافتند که همگی با داده‌های آزمایشگاهی مطابقت داشتند. از این تعداد ۸ ساختمان، آن ساختمان مولکولی که برای کاپروردین پیشنهاد شده بود، بر اساس همبستگی‌های HMBC و نزدیک‌ترین جابجایی شیمیایی ^{1}H و ^{13}C NMR، بهترین تطابق را داشت. شیمی فضایی مطلق کاپروردین تعیین نگردید.

با توجه به مقدار بسیار محدود کاپروردین جداشده (۵ میلی‌گرم)، فقط مقادیر بسیار کمی از این ماده جهت تایید ساختمان مولکولی این ترکیب با استفاده از واکنش‌های شیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. واکنش‌های به کار گرفته

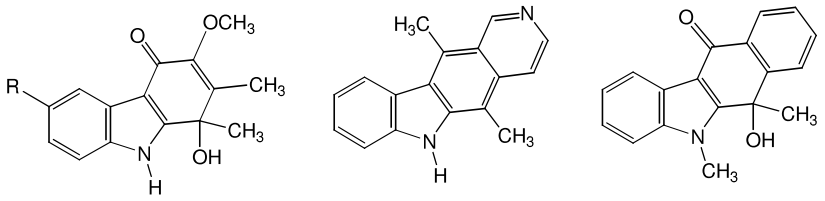
شده به منظور متیلاسیون و آسیلاسیون فقط مخلوط‌های پیچیده حاصل از تخریب این ماده را ایجاد نمود. واکنش کاپرووردین با اسید منجر به ایجاد تغییرات جالب رنگی (از زرد به سبز) گردید، هرچند که خصلت این تبدیل درونی با استفاده از روش طیف جرمی مشخص نشد. روش دیگر جهت تایید ساختمان مولکولی پیشنهادی، کاهش مولکول کاپرووردین با استفاده از مقدار اضافی $NaBH_4$ در متانول خشک بود. در اثر این واکنش، فقط یک محصول تشکیل گردید. بر اساس آنالیزهای ESIMS (288 MH^+)، فرضیه تشکیل ترکیب **D** از محصول اولیه کاهش **C** در اثر از دست دادن یک مولکول آب، قوت گرفت (تصویر ۴).



(**A**) (**C**) (**D**)

تصویر ۴- واکنش کاهش کاپرووردین با استفاده از $NaBH_4$ در حلال متانول و مکانیزم ازدست‌دادن مولکول آب و آروماتیسیته‌شدن حلقه فنول.

ارزیابی بیولوژیک کاپرووردین در مقابل تعدادی از رده‌های سلولی تومور انسانی و جانوری (موش) از قبیل P388، A549، HT29، MEL28 و DU145 پروفایل سایتوتوکسیسیتی این ترکیب را به ترتیب با مقادیر IC_{50} برابر با ۱/۶ μM، ۰/۳، ۰/۳، ۰/۳ و ۰/۳ نشان داد. نزدیک‌ترین ترکیب‌های مرتبط ترکیب‌های کاربازومایسین G (تصویر **۵E**) و کاربازومایسین H (تصویر **۵F**) هستند که در سال ۱۹۸۸ از *Streptoverticillium chimense* جدا شدند. کاربازومایسین G دارای خواص ضدمیکروبی بوده و سنتز کل آن در سال ۱۹۹۷ گزارش شد (۸،۹). سایتوتوکسیسیتی ترکیب الیپتیسین (تصویر **۵G**) نیز که یک آلکالوییید گیاهی است، به‌خوبی شناخته شده است (۱۰،۱۱). هم‌خانواده‌های کاربا از ترکیب **G** نیز سنتز شده‌اند که از این میان ترکیب (تصویر **۵H**) یکی از هم‌خانواده‌های **G** بوده که شباهت ساختمانی زیادی با کاپرووردین دارد.



(**E**) R = H
(**F**) R = OCH_3

(**G**)

(**H**)

تصویر ۵- کاربازومایسین G (**E**) و کاربازومایسین H (**F**)، الیپتیسین (**G**) و یکی از هم‌خانواده‌های کاربا از ترکیب (**G**).

نتیجه گیری

در این تحقیق، نمونه‌ای از آب‌پاش دریایی متعلق به رده Acidiacea از پایه اسکله نیروی دریایی کنارک در پاییز ۱۳۹۲ جمع‌آوری و استخراج گردید. ترکیب کاپرووردین که یکی از ترکیبات استخراج‌شده از این نمونه بود، مورد توجه قرار گرفت و با استفاده از روش‌های متعارف NMR و طیف‌نگاری جرمی شناسایی شد. ارزیابی بیولوژیک کاپرووردین در مقابل تعدادی از رده‌های سلولی تومور انسانی و جانوری (موش) از قبیل P388، A549، HT29، MEL28 و DU145 پروفایل سایتوتوکسیسیتی این ترکیب را به ترتیب با مقادیر IC_{50} برابر با µM ۱/۶، ۰/۳، ۰/۳، ۰/۳ و ۰/۳ نشان داد.

تقدیر و تشکر

از دانشکده علوم، دانشگاه علوم دریایی امام خمینی(ره) قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱. جورج، سی. کنت-لری میلر، ۱۳۸۹، (مترجم: محمد حسین صدرزاده طباطبایی)، کالبدشناسی مقایسه‌ای مهره‌داران، انتشارات دانشگاه تهران، ۷۸۹ صفحه.

۲. محبی غ،ارشدی س.، نبی‌پور خلیلی خ. ۱۳۹۴، تونیکات دریایی، معجون میتریداتس، دوماهنامه طب جنوب، پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر، سال هجدهم، شماره ۴، صفحات ۸۴۵ تا ۸۹۷.

3. Scott, A. I., 1964. Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products; Pergamon Press: Oxford; Vol. 7, pp 297-298.
4. Fattorusso, E., Forenza, S., Minale, L., Sodano, G., 1971. Isolation of 3,4-dihydroxyquinoline-2-carboxylic acid from sponge *aplisina aerophoba*. Gazzetta Chimica Itaiana 101: 104-105.
5. Kobayashi, A., Kajiyama, S., Inawaka, K., Kanzaki, H., Kawazu, K. Z., Nostodione, A., 1994. A novel mitotic spindle poison from a blue-green alga *Nostoc commune*. Zeitschrift für Naturforschung C – A. Journal of Biosciences 49: 464.
6. Hadden, C. E., Martin, G. E., Krishnamurthy, V. V., 2000. Constant time inverse-detection gradient accordion rescaled heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy: CIGAR-HMBC. Magnetic Resonance Chemistry 38: 143-147.

7. 1H and 13C NMR estimation functions in Advanced Chemical Development Inc (ACD), 1994-2000.
8. Patil, A. D., Freyer, A. J., Killmer, L., Offen, P., Carte, B., Jurewicz, A. J., Johnson, R. K., 1997. Frondosins, five new sesquiterpene hydroquinone derivatives with novel skeletons from the sponge *Dysidea frondosa*: Inhibitors of interleukin-8 receptors. Tetrahedron 53: 5047-5060.
9. Junker, J., Maier, W., Lindel, T., Koeck, M., 1999. Computer-assisted constitutional assignment of large molecules: COCON analysis of ascomycin. Organic Letters 1: 737-740.
10. Koeck, M., Junker, J., Maier, W., Will, M., Lindel, T., 1999. A COCON analysis of proton-poor heterocycles – application of carbon chemical shift predictions for the evaluation of structural proposals. European Journal of Organic Chemistry 3: 579-586.
11. Lindel, T., Junker, J., Koeck, M., 1999. 2D-NMR-Guided constitutional analysis of organic compounds employing the computer program COCON. European Journal of Organic Chemistry 3: 573-577.
12. Lindel, T., Junker, J., Koeck, M., 1997. COCON: From NMR correlation data to molecular constitutions. Journal of Molecular Modelling, 3: 364-368.
13. Kaneda, M., Naid, T., Kitahara, T., Nakamura, S., Hirata, T., Suga, T., 1988. Carbazomycins G and H, novel carbazomycin-congeners containing a quinol moiety. Journal of Antibiotics 41(5): 603-608.
14. Knölker, H. J., Fröhner, W., 1997. First total synthesis of carbazomycin G and H. Tetrahedron Letters 38: 4051-4054.
15. Dalton, L. K., Demerac, S., Elmes, B. C., Loder, J. W., Swan, J. M., Teitei, T., 1967. Synthesis of the tumour-inhibitory alkaloids, ellipticine, 9-methoxyellipticine, and related pyrido[4,3-b] carbazoles. Australian Journal of Chemistry 20(12): 2715-2727.
16. Svoboda, G. H., Poore, G. A., Montfort, J., 1968. Alkaloids of Ochrosia maculata Jacq. (Ochrosia borbonica Gmel.). Isolation of the alkaloids and study of the antitumor properties of 9-methoxyellipticine. Journal of Pharmaceutical Sciences 57(10): 1720-1725.