

Sparkling Science >
Wissenschaft ruft Schule
Schule ruft Wissenschaft

Hanns-Peter KARL, Bernhard KLÖSCH

**Modellierung der Glucuronidierung am
Fusarium Mykotoxin Zearalenon**

Diplomarbeit Schuljahr 2008/09

betreut von
Dipl.-Ing. Dr. Bibiana Meixner
HBLVA für chem.Industrie

Dipl.-Ing. Hannes Mikula
Technische Universität Wien

BMWF Schriftenreihe:
Matura- und Bakkalaureatsarbeiten
im Rahmen des Programms Sparkling Science
Heft 2/2009

www.bmwf.gv.at

BM.W.F^a

Bundesministerium für Wissenschaft
und Forschung

Verfasst im Rahmen des Forschungsprojektes
„Grüne Chemie“
Nachhaltige Strategien in der Wissenschaft

PROJEKTLEITENDE EINRICHTUNG

Technische Universität Wien
Fakultät für Technische Chemie
Projektleitung: A.o. Univ.-Prof. DI Dr. Marko D. Mihovilovic
Kontakt: mmihovil@pop.tuwien.ac.at

WISSENSCHAFTLICHER KOOPERATIONSPARTNER

Universität für Bodenkultur Wien, IFA Tulln
Department für Agrarbiotechnologie, Analytikzentrum

BETEILIGTE SCHULEN

Gymnasium und Realgymnasium Sachsenbrunn, GRg17
Parhamnergymnasium, BG/BRG St. Veit an der Glan, Wiedner
Gymnasium – Sir Karl Popper Schule, HTL Rosensteingasse,
BRG Feldkirchen, BG/BRG Villach, BG/BRG Wenzgasse,
Technologisches Gewerbemuseum Wien, BG/BRG 11 Geringergasse,
GRg11 Gottschalkgasse, BG/BRG Tulln a. d. Donau, BG/BRG
Fichtnergasse, BRG Kandlgasse, BG/BRG Hagenmüllergasse,
HTL Dornbirn



BM Johannes Hahn

Österreichs Nachwuchsförderung ist einzigartig in Europa

Spitzenwissenschaft ist gewissermaßen wie Spitzensport – die Basis wird in der Nachwuchsförderung gelegt. Daher ist es mir ein großes Anliegen, Neugier und Faszination für Wissenschaft und Forschung bei Kindern und Jugendlichen bereits möglichst früh zu wecken!

Mit dem Forschungsprogramm „Sparkling Science“, das vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung 2007 aus der Taufe gehoben wurde, beschreiten wir einen unkonventionellen und in Europa einzigartigen Weg, um unseren wissenschaftlichen Nachwuchs zu fördern.

In sämtlichen Forschungsvorhaben, die im Rahmen des Programms gefördert werden, arbeiten Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler partnerschaftlich mit Jugendlichen zusammen. Dabei schauen die Jugendlichen den Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern nicht nur über die Schulter, sondern arbeiten selbst aktiv mit. Die Schülerinnen und Schüler bringen in ihrer Rolle als Juniorkolleginnen und Juniorkollegen zusätzliche Fragestellungen und Denkanstöße ein, sie wirken an der Konzeption und Durchführung von Untersuchungen mit, machen Befragungen, erheben Daten, interpretieren diese gemeinsam mit den Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern und stellen die Ergebnisse an Schulen, Universitäten und sogar bei wissenschaftlichen Tagungen vor. Die jungen Nachwuchsforscherinnen und Nachwuchsforscher lernen also bereits sehr früh das vielfältige Spektrum von Wissenschaft und Forschung kennen.

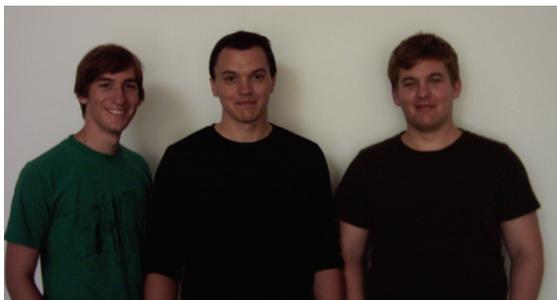
Die Zusammenarbeit von Wissenschaft und Schule bringt für beide Seiten einen großen Mehrwert: Die Wissenschaft profitiert, weil die Jugendlichen innovative Ideen und erfrischende Beiträge einbringen, die dann in neue wissenschaftliche Erkenntnisse einfließen. Die Jugendlichen bekommen einen einzigartigen Zugang zu neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen und erwerben Kompetenzen in den Bereichen Teamarbeit, Projektplanung und Projektpräsentation. Sorgfältig und eigenverantwortlich an komplexen Themenstellungen zu arbeiten und sich dabei auch mutig in Neuland vorzuwagen, sind dabei nicht nur entscheidende Basiskompetenzen für wissenschaftliches Arbeiten. Es sind Schlüsselfertigkeiten für erfolgreiche Karrieren in sämtlichen Berufsfeldern der modernen Arbeitswelt.

Ganz besonders freut es mich als Wissenschaftsminister, wenn Forschungsbeiträge unserer „Sparkling Science“ Teilnehmerinnen und Teilnehmer über das Stadium von ersten wissenschaftlichen Gehversuchen hinaus wachsen und die Gestalt eigenständiger, kleiner Forschungsberichte annehmen. Eine der wichtigsten Grundregeln wissenschaftlichen Arbeitens besteht schließlich darin, Forschungsergebnisse zu publizieren und damit für andere Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler bzw. der Öffentlichkeit zugänglich zu machen. Das Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung gibt daher eine eigene Publikationsreihe für jene Forschungsergebnisse heraus, die im Rahmen von Maturaprojekten und Bakkalaureatsarbeiten aus „Sparkling Science“ entstehen.

Ich danke allen Beteiligten an „Sparkling Science“ für ihr Engagement und wünsche Ihnen viel Freude mit den folgenden Seiten. Sie können sich nun selbst von den erstaunlichen und beeindruckenden Ergebnissen überzeugen!

Herzlich

Johannes Hahn
Bundesminister für Wissenschaft
und Forschung



v.l.n.r. Bernhard Klösch, Hannes Mikula, Peter Karl

Die Glykochemie ist ein sehr umfangreicher und moderner Themenkomplex der aktuellen Forschung, vor allem im Bereich der Synthesechemie, der Bioanalytik und der Molekularbiologie (Glykobiologie). Allgemein als Glykowissenschaften zusammengefasst bezeichnet man sämtliche Forschungsbereiche, die sich allgemein mit dem Thema „Zucker, Kohlenhydrate und Glykokonjugate“ beschäftigen. Diese Bereiche beinhalten mittlerweile Themen wie die Herstellung von Biomarkern, Bioreferenzmaterialien, neuen Antibiotika, die Erforschung von molekularen Vorgängen im Organismus (z.B. post-translationale Modifikationen von Proteinen) bis hin zu neuen Entwicklungen in der Krebsforschung und -therapie.

Die Forschungsgruppe von Dekan Univ.-Prof. Dr. Johannes Fröhlich am Institut für Angewandte Synthesechemie an der Technischen Universität Wien beschäftigt sich in Kooperation mit dem Interuniversitären Department für Agrarbiotechnologie (IFA Tulln) und der Universität für Bodenkultur Wien unter anderem mit der Herstellung von wichtigen Mykotoxin-Metaboliten. Mykotoxine sind Sekundärstoffwechselprodukte von Schimmelpilzen und sind von besonderem Interesse in der Agrarbiotechnologie und Lebensmittelchemie. Der Befall von Getreide mit derartigen Schimmelpilzen und die damit verbundene Aufnahme von Mykotoxinen in die Pflanze verursacht weltweit jährliche Schäden in Milliarden € Höhe. Diese Toxine können nicht nur über befallenes Getreide bis hin zum Menschen gelangen, sondern auch über den „Umweg“ des Nutztieres, da klarerweise auch entsprechende Futtermittel Toxine enthalten können. Da diese Schimmelpilzgifte in Pflanze, Tier und Mensch im Zuge des Fremdstoffmetabolismus biochemisch weiter modifiziert werden, sind diese möglichen Stoffwechselprodukte ebenfalls von hoher Bedeutung. Die Erforschung dieser zahlreichen Stoffwechselwege ist nicht nur für den Nachweis der entsprechenden Substanzen wichtig, sondern gibt der Wissenschaft auch die Möglichkeit Strategien zur Detoxifikation auszuarbeiten.

Eine sehr häufig auftretende Modifikation im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus ist die Glykosylierung, im speziellen die Glucosylierung

und die Glucuronidierung, also die Verknüpfung einer Substanz mit einem Molekül Glucose oder einem Molekül Glucuronsäure, wobei letzteres nur in Tier und Mensch geschieht. Es werden also Glykokonjugate gebildet, welche erst seit nicht allzu langer Zeit mithilfe von modernen analytischen Verfahren nachgewiesen werden können. Die Erforschung dieser Thematik erfordert die Verfügbarkeit von Vergleichssubstanzen, sogenannten Bioreferenzmaterialien und genau hier ist die Synthesechemie gefordert.

Die Arbeit von Hanns-Peter Karl und Bernhard Klösch beschäftigt sich exakt mit dieser Problematik und beinhaltet die Synthese von Modellsubstanzen für das sehr häufig nachgewiesene *Fusarium*-Mykotoxin Zearalenon und erste Versuche zur gezielten chemischen sowie biotechnologischen Glucuronidierung dieser Verbindungen.

Beide Schüler haben sich ausgezeichnet in die Forschungsgruppe integriert und begeistert an diesem Projekt gearbeitet. Mit Interesse, Engagement und vor allem Spaß an der Sache konnten sie ihre Arbeit in eindrucksvoller Manier abschließen. Jetzt bleibt mir nur noch zu hoffen, dass sie ihr Interesse an synthetischer organischer Chemie nicht allzu schnell wieder verlieren und eventuell später selbst wieder beginnen in diesem umfangreichen und spannenden Gebiet zu arbeiten bzw. zu forschen.

Den „Erfindern“ von Sparkling Science gilt mein großer Dank, dass Kooperationen dieser Art gefördert und unterstützt werden. Ich selbst konnte mein Diplomprojekt ebenfalls an der TU Wien durchführen (2002). Schirmherr dieser damaligen Kooperation war Dekan Fröhlich und mein direkter Betreuer war Prof. Dr. Marko Mihovilovic, der heute Projektleiter von „Grüne Chemie“ im Rahmen von Sparkling Science ist. Man sieht also, dass eine derartige Zusammenarbeit sehr nachhaltig sein kann.

Univ.-Ass. Dipl.-Ing. Hannes Mikula
Technische Universität Wien



DI Dr. Bibiana Meixner

Begabte Schüler zu fördern, ihnen die Möglichkeit zu schaffen, im Rahmen ihrer HTL-Ausbildung eine Zusatzqualifikation (z.B. in Form einer Diplomarbeit) zu erwerben, ist mir ein besonderes Anliegen.

Als im Februar 2008 BSc Philipp Fruhmann, DI Dr. Ernst Horkel und DI Hannes Mikula mir den Vorschlag unterbreiteten, mit Schülern des 5. Jahrgangs der HBLVA für chemische Industrie und dem Institut für Angewandte Synthesechemie der TU-Wien am Forschungsprogramm *Sparkling Science* teilzunehmen, sagte ich sofort zu.

Einerseits hatten wir beste Erfahrung in der Zusammenarbeit mit dem Institut für Angewandte Synthesechemie, andererseits gab es die Option, die bearbeiteten Projekte als Diplomarbeit einzureichen.

Schlussendlich wurden 5 Diplomarbeiten im Rahmen des Projekts *Sparkling Science* im Schuljahr 2008/09 approbiert.

Ich hatte auch schon die passenden Teams aus der Abteilung für Biochemie und Bioanalytik geistig vor Augen.

Eines dieser Teams bildeten Bernhard Klösch und Hanns-Peter Karl, begeisterte Synthesechemiker, auf die der Funken meiner Euphorie nach nur kurzer Zeit übersprang.

Sie starteten die Bearbeitung ihres Projekts *Modellierung der Glucuronidierung am Fusarium Mykotoxin Zearalenon* bereits im Sommer 2008 und setzten diese mit großem Engagement während des laufenden Schuljahres fort.

Durch die ausgezeichneten Rahmenbedingungen (hervorragende fachliche Betreuung, optimale Arbeitsbedingungen und angenehmes Klima) wurden beide Schüler zu überdurchschnittlichen Leistungen angespornt. Ihr Wissensdurst (bekannt aus dem Unterricht) war groß und konnte kaum gestillt werden.

Im Rahmen des Forschungsprogramms *Sparkling Science* haben Bernhard und Hanns-Peter nicht nur den universitären Forschungsbereich kennengelernt, sondern nutzten Analysetechniken, die gerätetechnisch an der HBLVA nicht möglich sind. Sie vertieften ihr chemisches Wissen und sammelten wertvolle Basics im Projektmanagement.

Ich bin überzeugt, dass diese erfolgreiche Kooperation entscheidenden Einfluss auf ihre berufliche Laufbahn haben wird.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen externen Kooperationspartnern bedanken, insbesondere beim Betreuer der vorliegenden Arbeit, DI Hannes Mikula und dem Projektleiter Prof. DI Dr. Marko Mihovilovic.

Es bereitete mir große Freude, Bernhard und Hanns-Peter als Lehrerin, Betreuerin der Diplomarbeit und Jahrgangsvorstand während der letzten 2 Jahre begleiten zu dürfen und wünsche ihnen alles Gute für ihre berufliche Laufbahn.

DI Dr. Bibiana Meixner

Abteilungspräsidentin
HBLVA für chemische Industrie
Abteilung: Biochemie und Bioanalytik



HBLVA für chemische Industrie

Höhere Lehranstalt für Chemie

Ausbildungsschwerpunkt: Biochemie, Bio- und Gentechnologie



DIPLOMARBEIT

Modellierung der Glucuronidierung am *Fusarium* Mykotoxin Zearalenon

Ausgeführt im Schuljahr 2008/09 von:

Betreuer/Betreuerin:

Hanns-Peter Karl 5AHCHB-4

Dipl. Ing. Dr. Bibiana Meixner

Bernhard Klösch 5AHCHB-6

Dipl.-Ing. Hannes Mikula

Wien, 28.Mai 2009

Entstanden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Angewandte Synthesechemie
der Technischen Universität Wien.

Ein Projekt der Initiative **Sparkling Science** des BMWF



EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche erkenntlich gemacht habe.

Wien, am 28.05.2009

Hanns-Peter Karl

Bernhard Klösch

	HÖHERE TECHNISCHE BUNDES - LEHR- UND VERSUCHSANSTALT für chemische Industrie Rosensteingasse 79, 1170 Wien	
	Abteilung:	Chemie
	Ausbildungsschwerpunkt:	Biochemie, Bio- und Gentechnologie

DIPLOMARBEIT

DOKUMENTATION

Namen der Verfasser	Hanns-Peter KARL Bernhard KLÖSCH
Jahrgang / Klasse Schuljahr	5AHCHB 2008/2009
Thema der Diplomarbeit	Modellierung der Glucuronidierung am Fusarium Mykotoxin Zea-ralenon
Kooperationspartner	Institut für Angewandte Synthesechemie der TU Wien Sparkling Science, Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung

Aufgabenstellung	Dieses Projekt befasst sich mit der Synthese von Modellverbindungen von Zearalenon, einem Mykotoxin, welches große Probleme in der Agrarindustrie bereitet, sowie die Glucuronidierung dieser Modellverbindungen mittels organischer Synthesechemie und auf bioorganischem Weg.
------------------	---

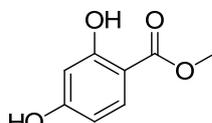
Realisierung	Es wurden 6 verschiedene Modellverbindungen für Zearalenon synthetisiert und eine Auswahl dieser Verbindungen glucuronidiert. Die bioorganische Synthese schlug leider fehl.
--------------	--

Ergebnisse

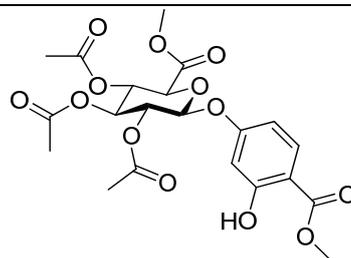
6 verschiedene Modellverbindungen, sowie drei Glucuronide wurden über den organisch-synthetischen Weg hergestellt.

Die bioorganische Methode führte zu keinem Ergebnis.

Typische Grafik, Foto etc.
(mit Erläuterung)



(3)



(26)

Glucuronidierung einer Modellverbindung mittels Königs-Knorr Methode.

Teilnahme an Wettbewerben,
Auszeichnungen

Keine

Möglichkeiten der Einsicht-
nahme in die Arbeit

Bibliothek der HBLVA für chemische Industrie
www.htl-innovativ.at

Approbation

(Datum / Unterschrift)

Prüfer/in

Abteilungsvorstand / Direktor/in

DIPLOMA THESIS

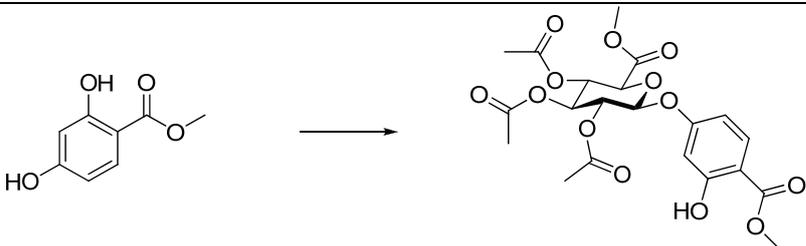
Documentation

Author(s)	Hanns-Peter KARL Bernhard KLÖSCH
Form	5AHCHB
Academic year	2008/2009
Topic	Synthesis and O-Glucuronidation of Zearalenon mimics.
Co-operation partners	Institute of Applied Synthetic Chemistry, Vienna University of Technology Sparkling Science, Federal Ministry for Science and Research

Assignment of tasks	This thesis is about the synthesis of zearalenone model compounds as well as the following glucuronidation of these compounds. The synthesis is done with the use of organic synthetic chemistry and bioorganic methods.
---------------------	---

Realization	6 different model compounds have been successfully synthesised and a few selected ones have been glucuronidated. The bioorganic pathway did not lead to success.
-------------	---

Results	<p>As a result six different mimics have been successfully synthesized and a few selected ones have been glucuronidated.</p> <p>The bioorganic method was not successful.</p>
---------	---

<p>Illustrative graph, photo (incl. explanation)</p>	<div style="text-align: center;">  <p>(3) (26)</p> </div> <p>Glucuronidation of a model compound by Koenigs-Knorr method.</p>
--	---

<p>Participation in competitions Awards</p>	None
---	------

<p>Accessibility of diploma thesis</p>	<p>The thesis is available in the library of HBLVA of chemical industry Rosensteingasse 79, 1170 Vienna Austria.</p> <p>www.htl-innovativ.at</p>
--	--

<p>Approval (Date / Sign)</p>	<p>Examiner</p>	<p>Head of Department / College</p>
-----------------------------------	-----------------	-------------------------------------

DANKSAGUNG:

Unserem Klassenvorstand *Dipl.-Ing. Dr. Bibiana Meixner* (Bibi) danken wir für die Vermittlung an die TU Wien, und uns somit diese Diplomarbeit ermöglicht hat aber auch immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist und auch den Teil, der an der Schule durchgeführt wurde betreut hat.

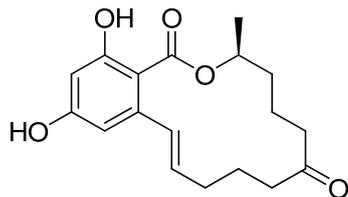
Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Johannes Fröhlich danken wir für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Forschungsgruppe durchführen zu können.

Aber auch bei der gesamten Forschungsgruppe: *Univ.Ass. Dipl.-Ing. Dr. Ernst Horkel*, *Philipp Fruhmann* (Fru) und *Daniel Lumpi* (Lumpi), die uns sehr nett aufgenommen haben und uns interessante Einblicke in die Welt der Synthesechemie zeigten, möchten wir uns sehr herzlich bedanken.

Der größte Dank gilt unserem Meister *Dipl.-Ing. Hannes Mikula* aka „El Diabolo“, der uns mit seinem sehr interessanten Projekt die faszinierenden Seiten der organischen Synthesechemie gezeigt und ermöglicht hat (vor allem in die hohe Kunst der DC). Auch abseits der Universität stand er uns mit seinem Wissen jederzeit zu Verfügung, auch wenn er uns schon nach dem 3. Tag rauswerfen wollte.

ZUSAMMENFASSUNG

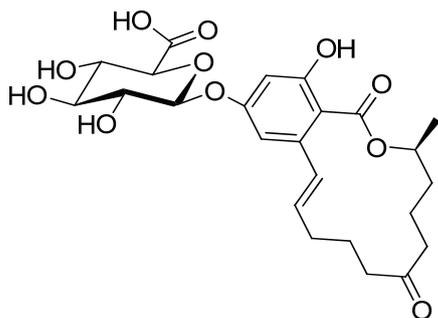
Das Thema dieser Arbeit beschäftigt sich, im weiteren Sinn mit der Problematik von Mykotoxinen in Lebensmitteln, genauer mit der Synthese von Mykotoxin-Metaboliten. Zearalenon ist ein Mykotoxin (Schimmelpilzgift), welches von bestimmten Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium* als Sekundärmetabolit gebildet wird.



Zearalenon

Aufgrund der östrogenen Eigenschaften, des vermehrten Vorkommens in diversen Getreidesorten (Mais, Weizen und andere) und des dadurch verursachten Schadens in Milliarden € Höhe stieg das Interesse an dieser Substanz in den letzten Jahren enorm.

Auch die Stoffwechselprodukte von Zearalenon welche, aufgrund des Vorkommens in Futtermitteln und somit in der Nahrungskette des Menschen, in Nutztieren entstehen, sind von Interesse. Besonders die Konjugatbildung im Zuge des Phase-II-Metabolismus. In den Focus der Forschung ist hierbei vor allem Zearalenon-4-β-D-Glucuronid gerückt. Ein Glucuronsäure-Konjugat welches während des Phase-II-Metabolismus (Detoxifikation) in Mensch und Tier gebildet wird.



Zearalenon-4-β-D-Glucuronid

Die Synthese dieser Verbindung erfordert mehrere Stufen und ist daher sehr aufwendig zudem ist der Preis für Zearalenon, welches aus dem Pilz isoliert wird, sehr hoch. Deshalb ist es nötig, geplante Synthesewege zuerst an Modellverbindungen zu optimieren, bevor sie an Zearalenon durchgeführt werden können.

Ziel dieser Arbeit war die Synthese von Zearalenon Modellverbindungen sowie die anschließende Glucuronidierung dieser Modellverbindungen. Für die Synthese der Modellverbindungen wurden mehrere Synthesewege durchgeführt. Die Glucuronidierung erfolgte einerseits „klassisch“ durch organische Synthese unter Verwendung der Königs-Knorr-Methode. Andererseits wurden die Glucuronide der Modellverbindungen auch durch bioorganische Synthese unter Verwendung von mikrosomalen Enzymen (UDP-Glucuronosyltransferasen) und UDP-Glucuronsäure durchgeführt, welche jedoch zu keinem befriedigenden Ergebnis führten.

Neben einigen „klassischen“ organisch-chemischen Reaktionen wurden auch sehr moderne Synthesen sowie moderne Synthesetechniken wie z.B. Mikrowellen-Synthese angewandt.

Für die Analytik standen moderne Techniken wie GC-MS und NMR zur Verfügung

Durch die Erkenntnisse dieser Arbeit, soll es in Zukunft möglich sein, Referenzsubstanzen für die Forschung und Lebensmittelanalytik herzustellen.

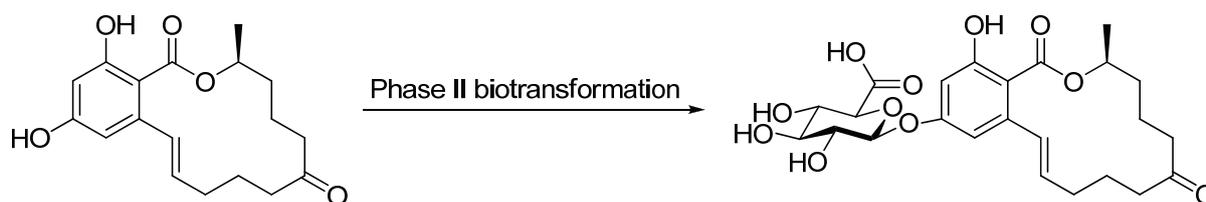
Somit wird zukünftig die Mykotoxin-Analytik im Tier und auch im Menschen besser möglich sein.

ABSTRACT

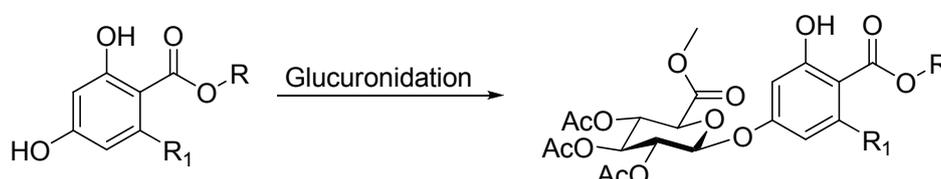
This thesis is a contribution to a larger study on the synthesis of mycotoxin mimics and mycotoxin metabolites.

Model compounds of zearalenone are synthesised and afterwards the model compounds are glucuronidated. This step will give us an idea if this method could be used for zearalenone too.

Zearalenone is a mycotoxin which is produced by certain *Fusarium sp.* It is getting into the focus of research because of its estrogenic property and its occurrence in cereals like maize, wheat, barley and others. Especially in the agricultural technology it is getting a serious problem because the mycotoxin causes major damage to the agrobusiness (about \$1 billion) and it is also found in animal feeds. If animals are feed with contaminated food, zearalenone-conjugates are produced due to metabolic pathways (Phase II biotransformation). One of these conjugates is zearalenone-4- β -D-glucuronide which has been detected in analytical studies.



The aim of the project is the synthesis of model compounds of the mycotoxin zearalenone. In the next step the model compounds will be used for glucuronidation. If this reaction works well, the method can be used for the glucuronidation of zearalenone. Without an optimized method the glucuronidation of zearalenone would be too expensive due to the high price of this toxin.



R ... Methyl-, Ethyl-, Isopropyl
R₁ ... (E)-prop-1-enyl, (E)-but-1-enyl

For the synthesis of the model compounds modern synthetic chemistry was applied. The products were analyzed per GC-MS and NMR.

As a result six different mimics have been successfully synthesised and a few selected ones have been glucuronidated.

Inhaltsverzeichnis

A) FORMELSCHEMATA.....	1
A.1. Synthese der Modellverbindungen	2
A.1.1. Synthese ohne Methylschutzgruppen	2
A.1.1.1. 2,4-Dihydroxybenzoesäuremethyl- und isopropylester.....	2
A.1.1.2. 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester	2
A.1.2. Synthese via Methylschutzgruppen	3
A.1.2.1. 2,4-Dihydroxy-6-(1E-propenyl)benzoesäureethylester	3
A.1.2.2. (E)-methyl-2-(but-1-enyl)-4,6-dihydroxybenzoat	4
A.2. Synthese des Glucuronyl-Donors	5
A.3. Glucuronidierungen nach Königs-Knorr	6
A.3.1. 2,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester-4- β -D-methyl-tri-O-acetyl-glucuronid..	6
A.3.2. 2,4-Dihydroxybenzoesäureisopropylester-4- β -D-methyl-tri-O-acetyl-glucuronid	
A.3.3. 2,4-Dihydroxy-6methyl-benzoesäureethylester-4- β -D-methyl-tri-O-acetyl-	
glucuronid	8
A.4. Bioorganische Glucuronidierungen	9
A.4.1. 2,4-Dimethoxybenzoesäuremethylester- β -D-glucuronid	9
A.4.2. 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester- β -D-glucuronid.....	9
B) ALLGEMEINER TEIL	10
B.1. <i>Fusarium</i> Mykotoxine - Zearalenon.....	11
B.1.1.1. Allgemeines zu Zearalenon.....	12

B.1.1.2.	Biosynthese von ZON (4)	14
B.1.1.3.	Toxizität von ZON (1)	15
B.2.	Metabolismus von Fremdstoffen (Xenobiotika) (5)	18
B.2.1.	Biotransformation von Fremdstoffen.....	18
B.2.2.	Ort der Biotransformation	19
B.2.3.	Reaktionen der Biotransformation von Xenobiotika	19
B.2.4.	Phase-I-Metabolismus	20
B.2.5.	Phase-II-Metabolismus	21
B.2.5.1.	Mechanismus der Phase-II-Reaktionen	22
B.2.5.2.	Bildung von UDP-Glucuronsäure im Metabolismus (5)	24
B.2.5.3.	Glucuronosyl-Transferasen.....	25
B.2.6.	Der Phase-III-Metabolismus.....	26
C)	SPEZIELLER TEIL	27
C.1.	Allgemeines zu den Modellverbindungen.....	28
C.2.	Synthese der Modellverbindungen	29
C.2.1.	2,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester (3).....	29
C.2.2.	2,4-Dihydroxybenzoesäureisopropylester (5)	31
C.2.3.	N,N-Diethyl-2,4-dihydroxymethylbenzamid (Variante 1) (4)	32
C.2.4.	N,N-Diethyl-2,4-dihydroxymethylbenzamid (Variante 2) (4)	34
C.2.5.	N,N-Diethyl-2-formyl-4,6-dimethoxybenzamid (9)	35
C.2.6.	Transmetallierung	37
C.2.7.	Isomerisierung.....	37
C.2.8.	(E)-2-(But-1-enyl)-N,N-diethyl-4,6-dimethoxybenzamid (16)	38
C.2.9.	(E)-N,N-diethyl-2,4-dihydroxy-6-(prop-1-enyl)-benzamid (20) und (E)-2-(but-1-enyl)-N,N-diethyl-4,6-dihydroxybenzamid (21)	39
C.2.10.	(E)-methyl-2,4-dihydroxy-6-(prop-1-enyl)benzoat (22) und (E)-methyl-2-(but-1-enyl)-4,6-dihydroxybenzoat (23).....	40
C.2.11.	2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester (15) und 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureisopropylester (19).....	41
C.2.12.	Aromatisierung mit Chinonen (DDQ) (8).....	42
C.3.	Synthese der Glucuronyldonoren (9)	44

C.3.1.	O-Glucuronidierung (11).....	45
D)	ANALYTISCHER TEIL	46
D.1.	Chromatographie	47
D.1.1.	Dünnschichtchromatographie	47
D.1.2.	Säulenchromatographie.....	48
D.1.3.	Detektion mittels Massenspektrometrie (MS).....	49
D.1.3.1.	Aufbau eines Massenspektrometers	49
D.1.3.2.	Ionenquelle	49
D.1.3.3.	Analysator	49
D.1.3.4.	Detektor	49
D.1.3.5.	Quadrupol-Massenspektrometer	49
D.2.	NMR (Kernspinresonanzspektroskopie).....	51
D.2.1.	Theorie	51
D.2.1.1.	Methoden zur Strukturaufklärung in der organischen Chemie	52
D.2.1.2.	Chemische Verschiebung δ	52
D.2.1.3.	Spin-Spin Kopplung.....	53
D.2.1.4.	Integration	54
D.2.1.5.	^{13}C Spektrum	54
D.2.2.	Beispiel zur Auswertung eines ^1H Spektrums	55
E)	EXPERIMENTELLER TEIL.....	58
E.1.	Allgemeine Anmerkungen	59
E.2.	Chromatographische Methoden	59
E.2.1.	Dünnschichtchromatographie	59
E.2.2.	Säulenchromatographie.....	59
E.3.	Physikalische Analysenmethoden	60
E.3.1.	GC/MS Messungen	60
E.3.2.	NMR-Spektroskopie	60
E.4.	Synthese der Modelverbindungen (11).....	61
E.4.1.	2,4-Dimethoxybenzoesäuremethylester (3).....	61
E.4.2.	N,N-Diethyl-2,4-dimethoxybenzamid (4) (Variante1)	62
E.4.3.	N,N-Diethyl-2,4-dimethoxybenzamid (4) (Variante2)	63
E.4.4.	2,4-Dimethoxybenzoesäureisopropylester (5)	64

E.4.5.	2,4-Dimethoxybenzoesäureisopropylester (Mikrowellenversuch 1) (5)	65
E.4.6.	2,4-Dimethoxybenzoesäureisopropylester (Mikrowellenversuch 2) (5)	66
E.4.7.	Ethyl-2,4-dihydroxy-6-methylcyclohexa-2,4-dien-carboxylat (8).....	67
E.4.8.	Isopropyl-2,4-dihydroxy-6-methylcyclohexa-2,4-dien-carboxylat (12).....	68
E.4.9.	2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester (15).....	69
E.4.10.	2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureisopropylester (19)	70
E.4.11.	N,N-Diethyl-2-formyl-4,6-dimethoxybenzamid (9)	72
E.4.12.	2-Allyl-N,N-dieethyl-4,6-dimethoxybenzamid (10).....	74
E.4.13.	Bis(acetonitril)palladium(II)chlorid (13).....	75
E.4.14.	(E)- N,N-diethyl-2,4-dimethoxy-6-(prop-1-enyl)-benzamid (14).....	76
E.4.15.	(E)-2-(but-1-enyl)-N,N-diethyl-4,6-dimethoxybenzamid (16).....	77
E.4.16.	Triphenyl-propyl-phosphoniumbromid(18).....	78
E.4.17.	(E)-N,N-diethyl-2,4-dihydroxy-6-(prop-1-enyl)-benzamid (20).....	79
E.4.18.	(E)-2-(but-1-enyl)-N,N-diethyl-4,6-dihydroxybenzamid (21).....	80
E.4.19.	(E)-methyl-2,4-dihydroxy-6-(prop-1-enyl)benzoat (22).....	81
E.4.20.	(E)-methyl-2-(but-1-enyl)-4,6-dihydroxybenzoat (23).....	82
E.5.	Synthese des Glucuronyldonors (11)	83
E.5.1.	1,2,3,4-Tetra-O-acetyl- β -D-glucuronsäuremethylester (24).....	83
E.5.2.	1-Brom-1-deoxy-2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-glucuronsäuremethylester (25).....	84
E.6.	Glucuronidierungen (11)	85

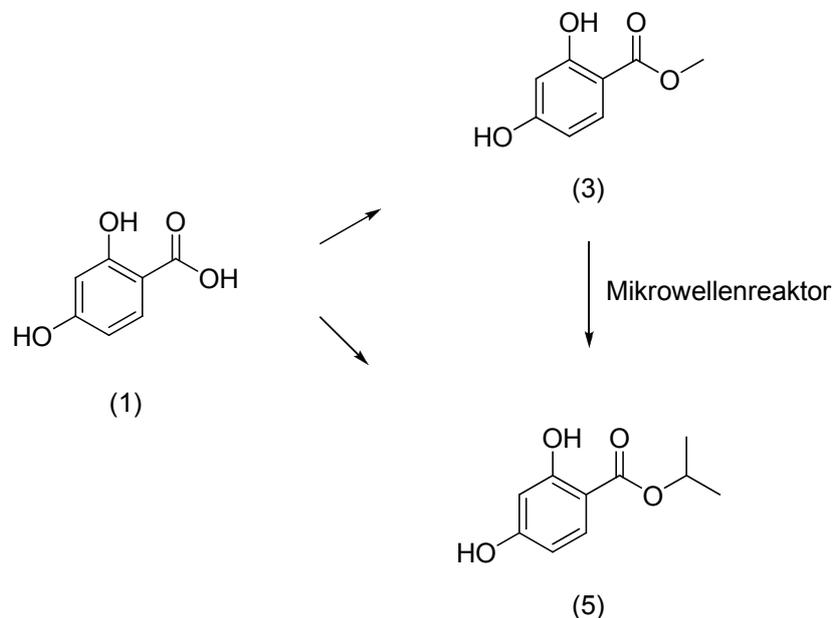
E.6.1.	2,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester-4- β -D-methyl-tri-O-acetyl-glucuronid	
(26)		85
E.6.2.	2,4-Dihydroxybenzoesäureisopropylester-4- β -D-methyl-tri-O-acetyl-glucuronid	
(27)		86
E.6.3.	2,4-Dihydroxy-6methyl-benzoesäureethylester-4- β -D-methyl-tri-O-acetyl-glucuronid (28)	87
E.7.	Bioorganische Synthesen:	88
E.7.1.	Isolierung und Aufreinigung von Lebermikrosomen:	88
E.7.1.1.	Benötigte Reagenzien:	88
E.7.1.2.	Gewebe- und Zellaufschluss (12):	88
E.7.1.3.	Gelfiltration (13)	89
E.7.1.4.	Immobilisierung (14):	89
E.7.2.	2,4-Dimethoxybenzoesäuremethylester- β -D-glucuronid (Variante 1) (29)	90
E.7.3.	2,4-Dimethoxybenzoesäuremethylester- β -D-glucuronid (Variante 2) (29)	91
E.7.4.	2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester- β -D-glucuronid (Variante 1)	
(30)		92
E.7.5.	2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester- β -D-glucuronid (Variante 2)	
(30)		93
F)	ABKÜRZUNGEN:	94
G)	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	95
H)	TABELLENVERZEICHNIS	95
I)	FORMELVERZEICHNIS	96
J)	FORMELSCHEMAVERZEICHNIS	96
K)	LITERATURVERZEICHNIS	98

A) FORMELSCHEMATA

A.1. Synthese der Modellverbindungen

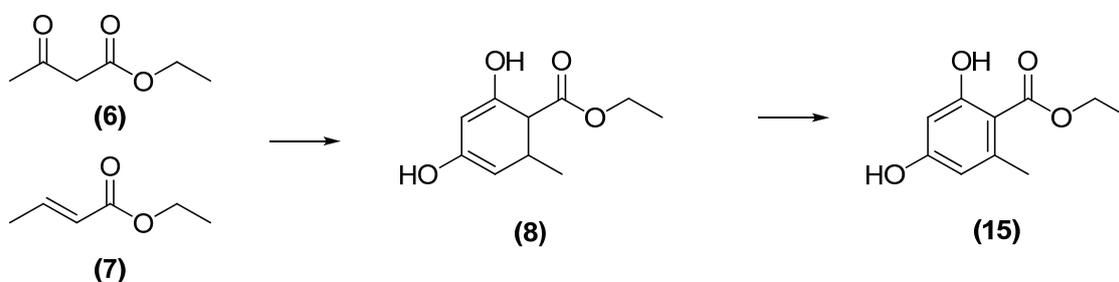
A.1.1. Synthese ohne Methylschutzgruppen

A.1.1.1. 2,4-Dihydroxybenzoesäuremethyl- und isopropylester

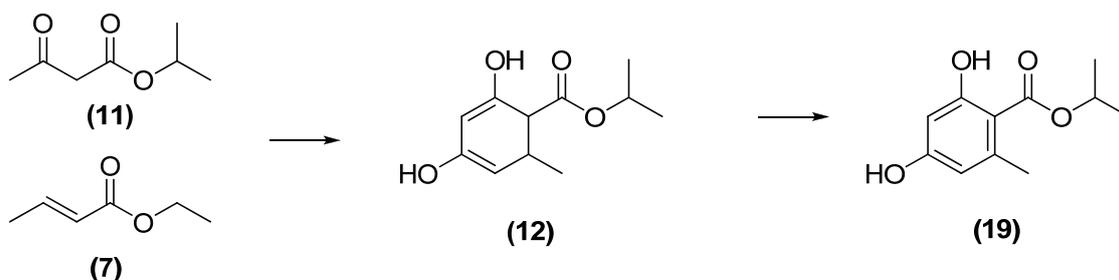


Formelschema 1: 2,4-Dihydroxybenzoesäuremethyl- und isopropylester

A.1.1.2. 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester



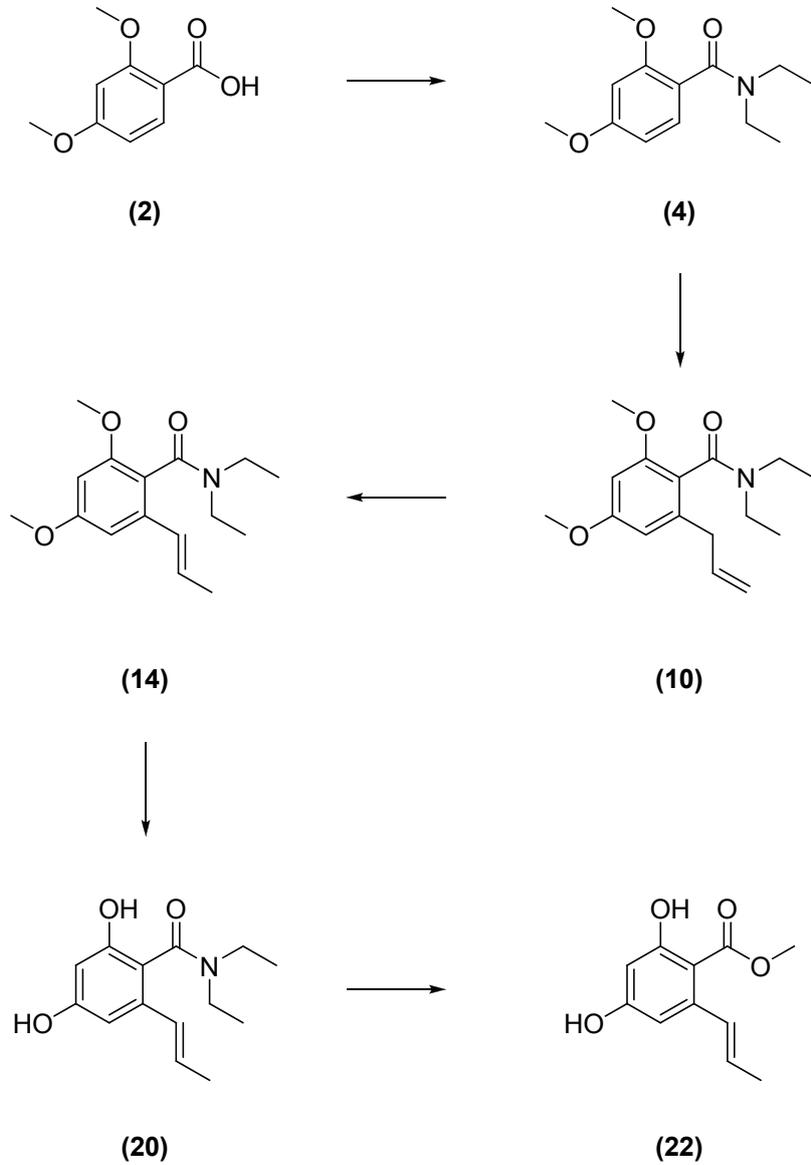
Formelschema 2: 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester



Formelschema 3: 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureisopropylester

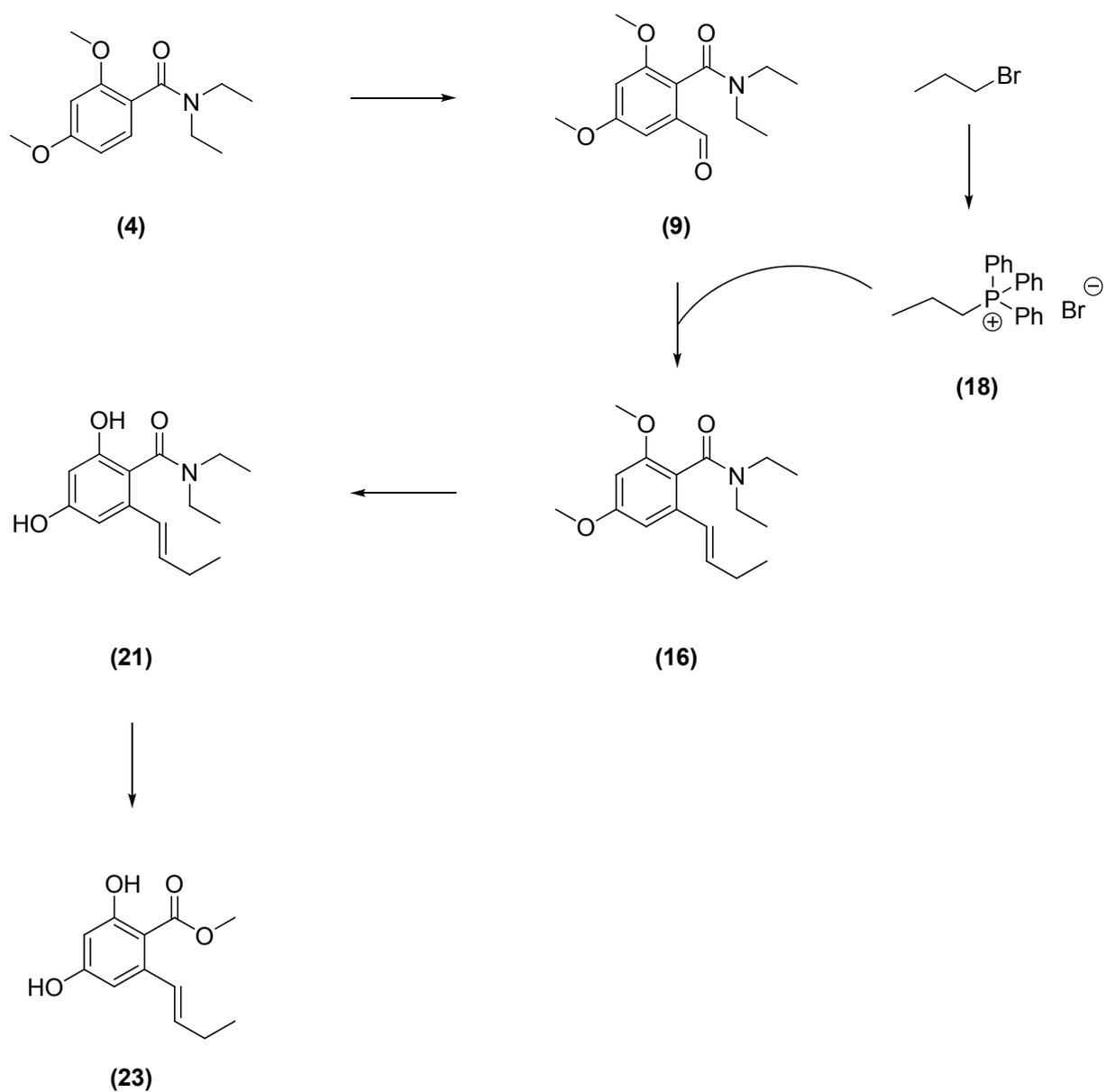
A.1.2. Synthese via Methylschutzgruppen

A.1.2.1. 2,4-Dihydroxy-6-(1E-propenyl)benzoesäureethylester



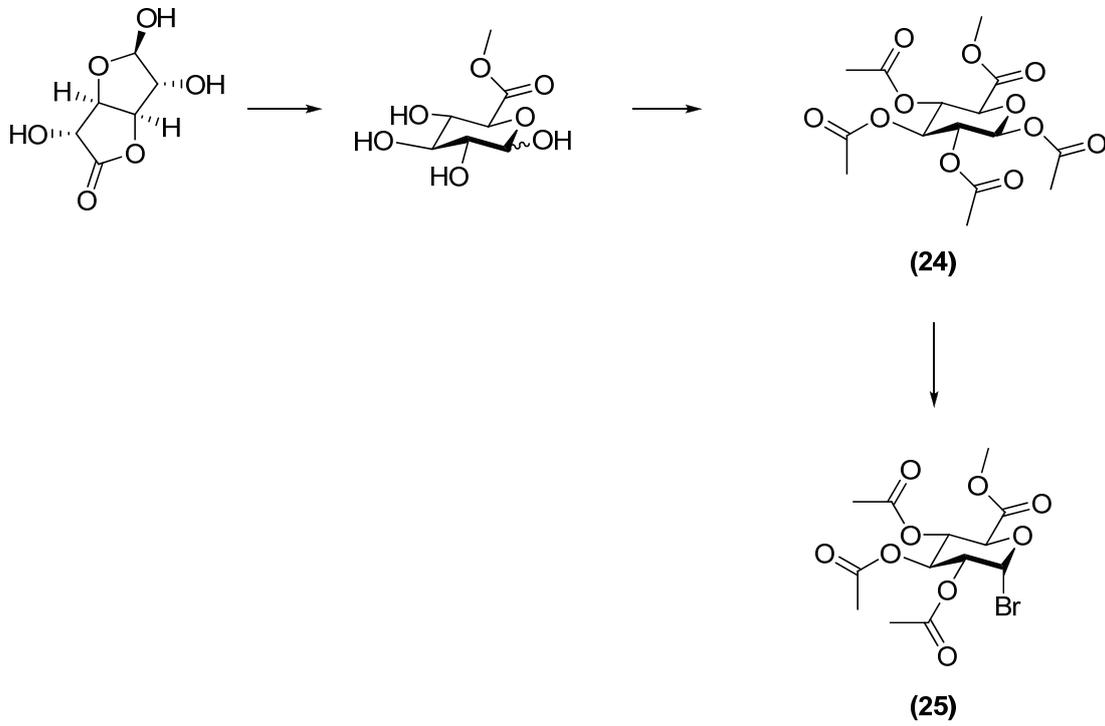
Formelschema 4: 2,4-Dihydroxy-6-(1E-propenyl)benzoesäureethylester

A.1.2.2. (E)-methyl-2-(but-1-enyl)-4,6-dihydroxybenzoat



Formelschema 5: (E)-methyl-2-(but-1-enyl)-4,6-dihydroxybenzoat

A.2. Synthese des Glucuronyl-Donors

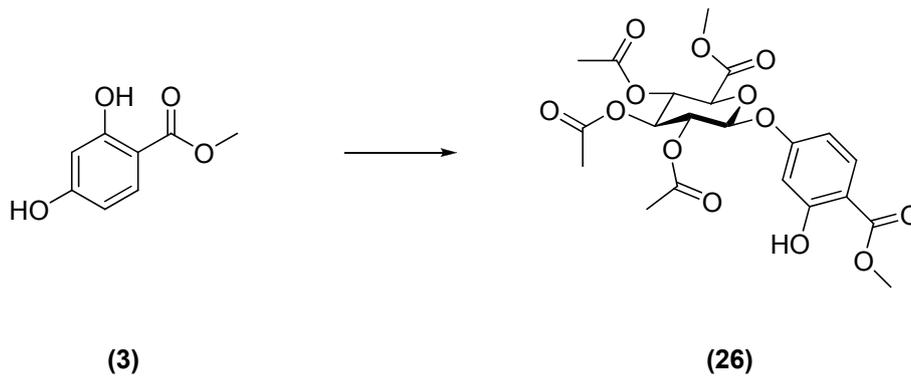


Formelschema 6: Synthese des Glucuronyl-Donors

A.3. Glucuronidierungen nach Königs-Knorr

A.3.1. 2,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester-4-β-D-methyl-tri-O-acetyl-

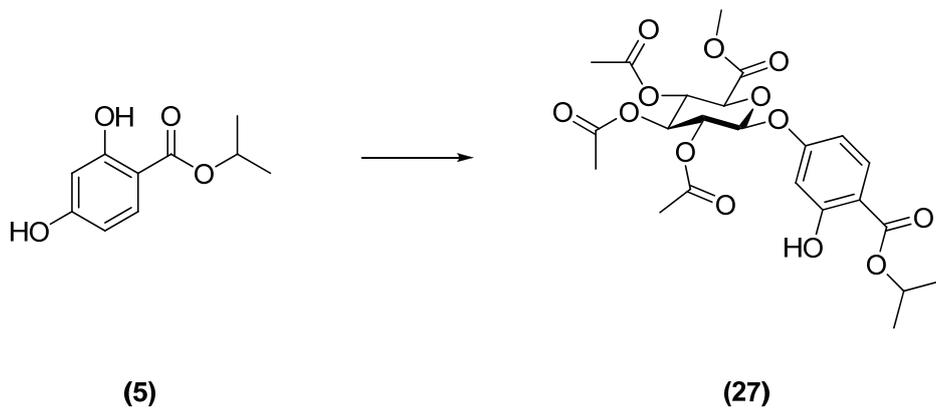
glucuronid



Formelschema 7: 2,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester-4-β-D-methyl-tri-O-acetyl-glucuronid

A.3.2.2,4-Dihydroxybenzoesäureisopropylester-4- β -D-methyl-tri-O-

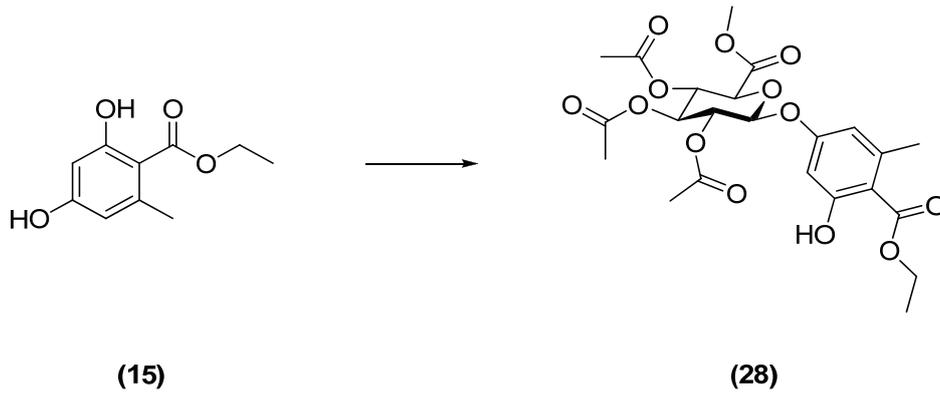
acetyl-glucuronid



Formelschema 8: 2,4-Dihydroxybenzoesäureisopropylester-4- β -D-methyl-tri-O-acetyl-glucuronid

A.3.3. 2,4-Dihydroxy-6methyl-benzoesäureethylester-4-β-D-methyl-tri-O-

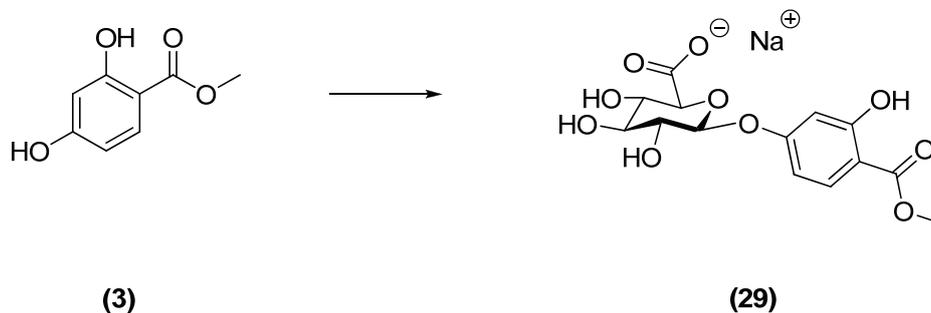
acetyl-glucuronid



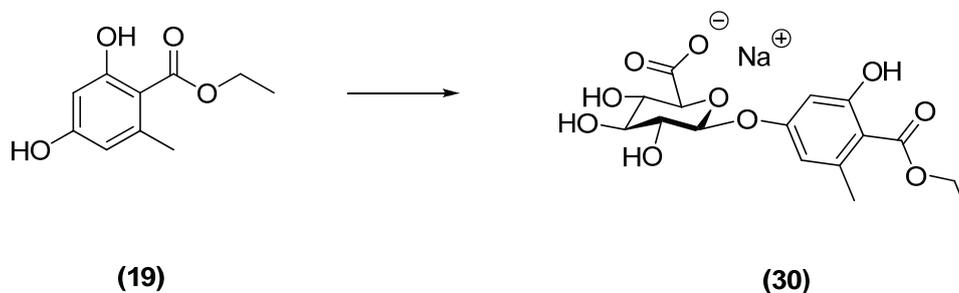
Formelschema 9: 2,4-Dihydroxy-6methyl-benzoesäureethylester-4-β-D-methyl-tri-O-acetyl-glucuronid

A.4. Bioorganische Glucuronidierungen

A.4.1. 2,4-Dimethoxybenzoesäuremethylester-β-D-glucuronid



A.4.2. 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester-β-D-glucuronid



Formelschema 10: 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester-β-D-glucuronid

B) ALLGEMEINER TEIL

B.1. *Fusarium* Mykotoxine - Zearalenon

Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, die bereits in geringen Konzentrationen toxisch auf Mensch und Tier aber auch auf Mikroorganismen wirken. Mykotoxine werden definitionsgemäß auf sehr nährstoffreichen Substraten und nicht im Erdboden gebildet, daher zählen die besser bekannten Toxine der Giftpilze nicht zur Klasse der Mykotoxine.

Zearalenon (ZON) und Deoxynivalenol (DON) sind Mykotoxine, die von verschiedenen Fusarienarten, wie zum Beispiel: *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) und *Fusarium culmorum*, gebildet werden.

Die farblosen Sporen der Fusarien sind kahnförmig und durch einige Querwände untergliedert (Abb.1). Die Verbreitung der Sporen erfolgt im Gegensatz zu vielen anderen Schimmelpilzarten nicht durch den Wind, sondern durch Tiere. Hierzu werden die Sporen in eine klebrige Flüssigkeit eingehüllt,

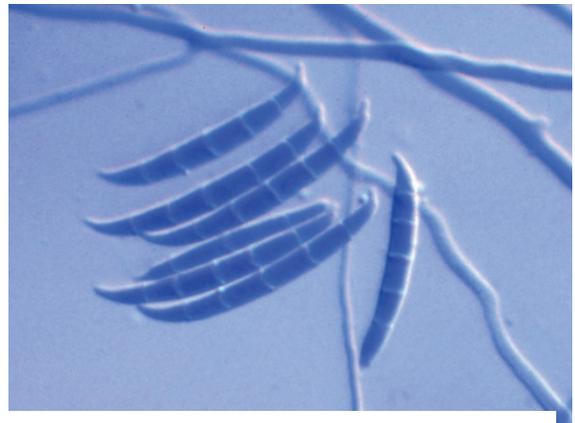


Abbildung 1: Kahnförmige Sporen von *Fusarium*

wodurch sich größere, zusammenklebende Ansammlungen von Sporen bilden.

Als Wirt dient diesen Schimmelpilzen Pflanzengewebe, insbesondere Mais, Weizen, Gerste und andere Getreidearten. Aber auch Lebensmittel auf Getreidebasis wirken als optimales Medium für *Fusarium sp.*. Zearalenon wird in den betroffenen Pflanzen immer von Mykotoxinen aus der Gruppe der Trichothecene wie Deoxynivalenol begleitet.

Vor allem ungünstige Witterungsverhältnisse, wie z.B. hohe Feuchtigkeit und relativ niedrige Temperaturen im Sommer aber auch landwirtschaftliche Maßnahmen können den Befall der Pflanzen mit Fusarien bzw. Toxinbildung begünstigen. So kam es in den vergangenen Jahren immer wieder zu regional sehr hohen Belastungen des Getreides mit Fusarientoxinen (1).

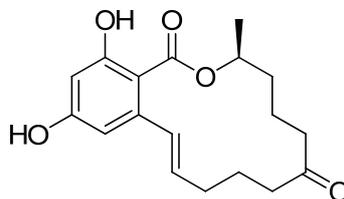
Der Befall einer Pflanze wird als Fusariose bezeichnet (Abb.2: links gesunde Weizenähre; rechts: eine Fusarium befallene Ähre). Oft betrifft sie den Wurzel- oder Stängelbereich der Pflanze. Die Bindung der *Fusarium sp.* an ihre Wirtspflanze ist oft sehr eng, weshalb manchmal der wissenschaftliche Name der Wirtspflanze in den Artnamen eingeflossen ist.



Abbildung 2: links gesunde Weizenähre; rechts befallene Ähre

Da ZON und seine Derivate sehr stabile Verbindungen sind, kann mit Fusarientoxinen kontaminiertes Speisegetreide in die Nahrungskette gelangen. Um einer Belastung des Verbrauchers vorzubeugen, wurden in der EU vor kurzem Höchstmengen für eine Reihe von Fusarientoxinen festgelegt.

B.1.1.1. Allgemeines zu Zearalenon



Formel 1: Zearalenon

Summenformel: $C_{18}H_{22}O_5$

$M = 318,36 \text{ g/mol}$

IUPAC-Name: 6-[(10 S)-10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl]- β -resorcylsäurelaktone

Synonym: F-2 Toxin

Trotz seiner östrogenartigen Eigenschaft gehört Zearalenon zu den nichtsteroidalen Mykotoxinen, zu der Stoffgruppe der phenolischen Makrolide. Zearalenon weist eine geringe Löslichkeit in Wasser auf, während es in Aceton, Acetonitril, Alkoholen, Chloroform und wässrigen Alkalien gut löslich ist. (2).

Bereits in den späten 20er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde über das Auftreten von Vulvo-vaginitiden (gleichzeitige Entzündung der äußeren Geschlechtsteile, Vulva, und der Scheide, Vagina), bei weiblichen Schweinen im Zusammenhang mit Futtermitteln berichtet (3).

Im Jahr 1962 wurde eine Substanz aus Kulturen von *Fusarium graminearum* isoliert, die nach Applikation an ovariektomierten Mäusen eine Größenzunahme des Uterus hervorrief und bei weiblichen Jungschweinen zu einer Vergrößerung von Vulva und Gesäuge führte. Kurze Zeit später gelang die Aufklärung der chemischen Struktur dieser nun als Zearalenon bezeichneten Substanz. In den darauf folgenden Jahren nahmen die Kenntnisse über die Bedeutung östrogenartiger Substanzen in Lebensmitteln bei der Entstehung verschiedener Krankheitsbilder zu. Neben ZON kommen auch verschiedene von Pflanzen gebildete Phytoöstrogene (Isoflavone in Soja und Klee) als mögliche Ursache in Frage. (1)

Zearalenon ist eine weiße, kristalline Substanz mit derart hoher chemischer und thermischer Stabilität, dass der Gehalt in kontaminierten Lebensmitteln weder durch Lagerung noch durch Zubereitung (Kochen, Backen) wesentlich verringert wird.

Vor allem die Lebensmittelgruppen Brot bzw. Backwaren, Mehl, Speisegetreide und Frühstückszerealien, Teigwaren, Säuglings- und Kleinkindernahrung sowie Bier sind aufgrund der hohen Verzehrsmengen im Hinblick auf den Schutz des Verbrauchers vor diesen Toxinen wichtig. Untersuchungen mit repräsentativen Probenzahlen und vereinfachten Untersuchungsverfahren zur Belastung dieser Lebensmittelgruppen, vor allem der Säuglings und Kleinkindernahrung, mit DON und ZON fehlen derzeit noch. (4)

In letzter Zeit hat aber auch der Nachweis von ZON-Metaboliten (z.B. ZON-Glucuronide) immer mehr an Bedeutung gewonnen. Da sich somit auch der Weg des Mykotoxins im Metabolismus von Pflanze, Tier und Menschen nachweisen und verfolgen lässt.

B.1.1.2. Biosynthese von ZON (4)

Zearalenon ist ein Resorcylsäure-Lacton, welches von *Fusarium spp.* durch sogenannte Polyketidsynthasen (PKSs) synthetisiert wurde. Diese Multienzymkomplexe katalysieren in Analogie zur Fettsäure-Biosynthese. An die Startereinheit Acetyl-CoA werden dabei schrittweise unter Decarboxylierung Bausteine wie Malonyl-CoA angehängt. Im Unterschied zur Fettsäure-Biosynthese müssen aber die Reaktions-Intermediate vor der nächsten Kondensation nicht vollständig reduziert werden: in Abhängigkeit von der zu synthetisierenden Verbindung kommen Ketoreduktase- (KR), Dehydrogenase- (DH) bzw. Enoylreduktase- (ER) in bestimmten Stufen der Kettenverlängerung zur vor. Im Genom von *Fusarium graminearum* finden sich zumindest 16 Gene, die für putative PKSs kodieren.

Ein Schema des vermutlichen Biosyntheseweges ist in Abbildung 3 ersichtlich.

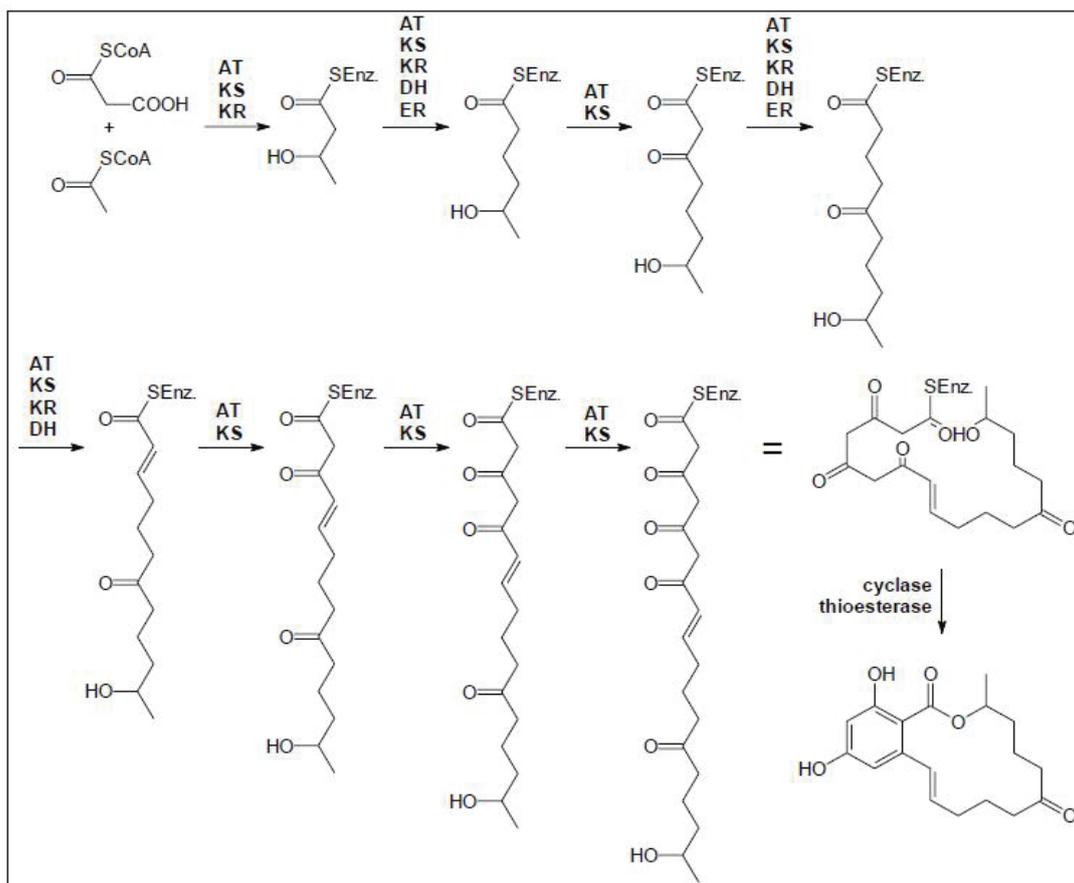
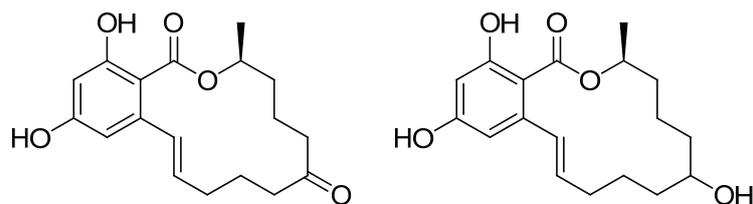


Abbildung 3: Biosyntheseweg von ZON

AT (Acyltransferase), KS (Ketosynthase), (KR) Ketoreduktase, (DH) Dehydrogenase, (ER) Enoylreduktase

B.1.1.3. Toxizität von ZON (1)

Zearalenon und seine Metaboliten sind Östrogenagonisten und binden an die Östrogenrezeptoren der Zellen. Die Bindungsaffinität ist dabei abhängig von der Tierart. ZON hat beim Schwein wahrscheinlich die größte Affinität an die Östrogenrezeptoren. Der Zearalenon-Östrogen-Rezeptor-Komplex aktiviert die DNA zur Bildung von m-RNA und r-RNA, somit wird in den Ribosomen der Zellen die Proteinbiosynthese angeregt (2). Durch diesen östrogenartigen Effekt besitzt Zearalenon eine anabole Wirkung, die zu einer Gewichtszunahme führen kann. So kann es nach Fütterung von zearalenonhaltigen Futtermitteln an Schweine zu einer größeren Gewichtszunahme kommen. Auch alle anderen ZON-Analoga besitzen in unterschiedlichem Ausmaß östrogenartige Wirkungen. Dabei besitzt die reduzierte Form des Zearalenon, das α -Zearalanol deutlich höhere Wirksamkeit, weshalb es in einigen Ländern auch gezielt als Leistungsförderer bei Mastriindern eingesetzt wurde.



Formel 2: Zearalenon und Zearalanol

Insbesondere Ferkel und weibliche Schweine sind vom Zearalenon-induzierten Hyperöstrogenismus betroffen, welcher sich durch Symptome wie verringerter Fruchtbarkeit bemerkbar macht. Auch erhöhte Raten an Totgeburten werden häufig beobachtet.

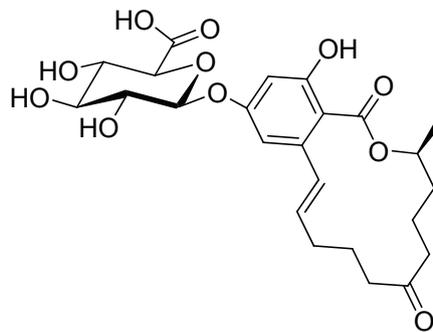
Ferkel zeigen Schwellungen an Vulva und Gesäuge, sowie Bewegungsstörungen (Zittern, Grätschen der Hintergliedmaßen). Rinder reagieren weniger sensitiv auf die östrogenen Effekte von ZON. Geflügel scheint weitgehend unempfindlich gegenüber Zearalenon zu sein. Hormonelle und andere negative Wirkungen konnten auch bei hohen Dosen (50 mg/kg KGW) nicht beobachtet werden (2).

Da Toxizität von Zearalenon sehr gering ist (LD_{50} (Maus) > 2000mg/kg), wird die Zuteilung zu den Mykotoxinen oft hinterfragt.

Gesicherte Daten bezüglich der Wirkung von Zearalenon beim Menschen liegen nicht vor. Einige Autoren vermuteten allerdings einen Zusammenhang zwischen diätärer Zearalenon-Aufnahme und Hyperplasien des Endometriums oder sexueller

Frühreife bei Pubertierenden. Generell muss aber davon ausgegangen werden, dass ZON beim Menschen ähnliche Wirkung besitzt wie beim Tier.

Die Tatsache, dass Zearalenon häufig in Futtermitteln vorkommt, erhöht das Interesse an Stoffwechselprodukten, welche im Organismus des Nutztiers entstehen können, wie zum Beispiel Zearalenon-4- β -D-glucuronid.



Formel 3: Zearalenon-4- β -D-glucuronid

Die Leber ist eines der wichtigsten Organe im Metabolismus und somit befinden sich auch die wichtigsten Stoffwechsellzyme in diesem Organ. Genauer, in den Bereichen des **rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER)**.

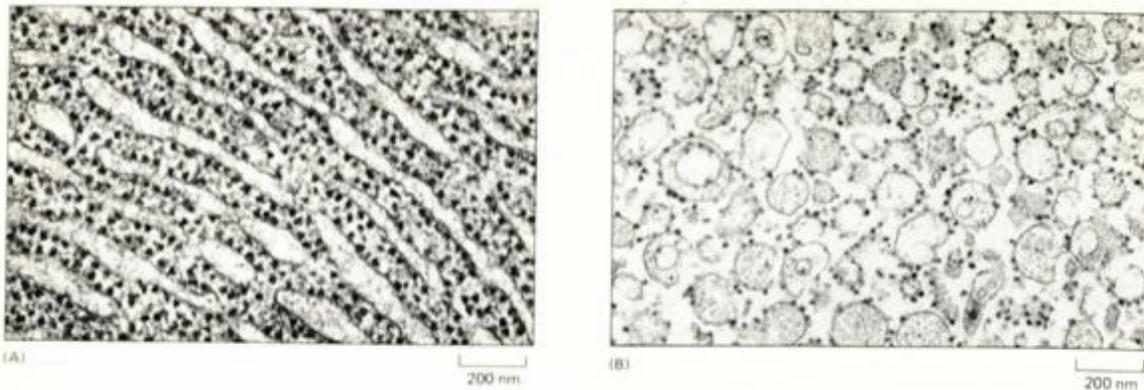


Abbildung 4: (A) Rauhes ER; (B) Rauhe Mikrosomen, Elektronenmikroskopische Aufnahme

Um diese Enzyme des ER biochemisch und im weiteren Sinne auch bioorganisch zu nutzen, ist es notwendig, es aus der umliegenden Matrix zu entfernen. Da das ER stark mit anderen Cytoplasmabestandteilen durchsetzt ist, scheint dies auf den ersten Blick als hoffnungsloses Unterfangen. Das ER wird jedoch beim Gewebe- oder Zellaufschluss durch Homogenisierung in viele kleine, geschlossene Vesikel (Durchmesser ca. 100nm) aufgebrochen, die sogenannten **Mikrosomen**, welche verhältnismäßig leicht zu reinigen sind.

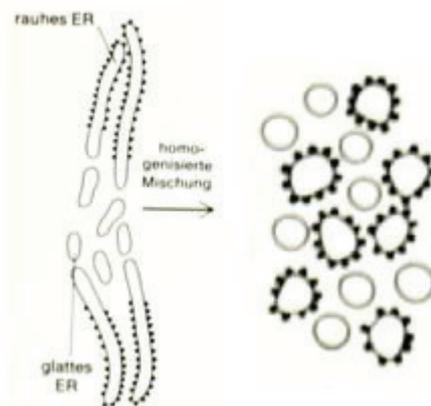


Abbildung 5: Rauhe und glatte Mikrosomen

Mikrosomen, die aus dem rauhen ER stammen, sind dicht mit Ribosomen besetzt und werden rauhe Mikrosomen genannt. Die Ribosomen befinden sich stets auf der Außenseite des Mikrosoms, dessen Inneres biochemisch dem Innenraum des ER entspricht.

In Hepatocyten gibt es besonders viel glattes ER, aus dem daher auch in Leberhomogenaten die meisten Mikrosomen stammen. Rauhe Mikrosomen, die man aus Leberzellen isoliert enthalten mehr als 20 verschiedene Proteine, die man bei den glatten Mikrosomen nicht findet. Für diese Arbeit waren besonders die Isoenzyme der Glucuronyltransferase von Bedeutung, welche eine entscheidende Aufgabe bei der Detoxifikation im Phase-II-Metabolismus (Glucuronidierung von Fremdstoffen) haben.

B.2. Metabolismus von Fremdstoffen (Xenobiotika) (5)

Unter Metabolismus versteht man grundsätzlich die biochemische Modifikation oder den Abbau von Substanzen, üblicherweise durch spezielle enzymatische Systeme. Handelt es sich dabei um körperfremde Stoffe (Xenobiotika), so spricht man von Fremdstoffmetabolismus, Detoxifikation oder xenobiotischem Metabolismus. Dieser lässt sich in verschiedene Phasen einteilen.

Xenobiotika (griech. xenos bios für "der Natur fremd") sind natürliche oder chemische Substanzen, die in biologischen Systemen fremd und wenig abbaubar sind.

Neben den lebensnotwendigen Nährstoffen nimmt der Mensch mit der Nahrung eine große Zahl an nicht verwertbaren chemischen Stoffen auf, die aus natürlichen oder anthropogenen Quellen, z.B. der chemischen Industrie, der Landwirtschaft oder aus der Umwelt stammen können. Im besten Fall werden diese Xenobiotika unverändert ausgeschieden, mitunter wirken sie aber im Körper als Giftstoff und können eine Gesundheitsgefährdung für den Organismus darstellen.

B.2.1. Biotransformation von Fremdstoffen

Viele der Fremdstoffe, die über die Nahrung oder auf anderen Wegen in den Körper gelangen, werden im Blut reversibel an Plasmaproteine gebunden, transportiert und können so verschiedene Organe erreichen.

Größtenteils erfolgt dies an das Transportprotein Albumin, welches ca. 50% des Blutes ausmacht. Aber auch die Proteine des Blutgerinnungssystems, Immunglobuline, Proteaseinhibitoren, Lipoproteine und Proteine des Komplementsystems können Fremdstoffe binden und transportieren. Neben dem Serumalbumin sind die Lipoproteine (LDL, VLDL, HDL und das saure α 1-Glycoprotein) für die Bindung von lipophilen Fremdstoffmolekülen verantwortlich, die so mit dem Blut in alle Organe gelangen.

Diese oft lipophilen Stoffe können den Körper praktisch nicht verlassen. Um derartige Schadstoffe über eine Exkretion im Harn aus dem Körper entfernen zu können, ist eine gewisse Wasserlöslichkeit der betreffenden Substanzen erforderlich, die über eine enzymatische Modifikation der lipophilen Fremdstoffe erreicht wird.

Fast alle fettlöslichen Stoffe unterliegen einer Biotransformation. Unter diesem Begriff versteht man eine enzymatisch katalysierte Umwandlung von lipophilen Stoffen im

Organismus unter Bildung von wasserlöslichen Produkten. Die toxischen Eigenschaften des Metaboliten unterscheiden sich von der des Ausgangsproduktes. Oft ist das wasserlösliche Produkt weniger toxisch, das ist aber nicht immer so. Mitunter wird ein harmloses Ausgangsprodukt durch diese Enzyme erst in einen sehr reaktiven und toxischen Metaboliten umgewandelt.

Diese so genannten Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme bauen auf die gleiche Art und Weise auch andere Schadstoffe wie Medikamente, Drogen, Konservierungsmittel oder Pestizide ab und spielen daher eine sehr wichtige Rolle für die Entgiftung des Körpers. Je nachdem, auf welchem Prinzip die Detoxifikation beruht, wird dabei nach Phase-I- und Phase-II-Reaktionen unterschieden.

B.2.2. Ort der Biotransformation

Fast alle Biotransformationsreaktionen laufen intrazellulär ab und werden durch Enzyme katalysiert, die in vielen Organen vorkommen. Die Leber ist das wichtigste Organ für die Biotransformation, aber auch in anderen Organen wie Haut, Lunge, Magen-Darm-Trakt, Niere, Gehirn, Hoden, Eierstock und Nasenschleimhaut werden Fremdstoffe umgewandelt, wenn auch in geringerem Maße als in der Leber.

Die metabolisierenden Enzyme sind in den meisten Fällen im endoplasmatischen Retikulum oder der löslichen Fraktion des Cytoplasmas (Cytosol) lokalisiert. Auch die Enzyme der bakteriellen Dickdarm-Flora spielen eine beträchtliche Rolle bei der Biotransformation bestimmter Fremdstoffe.

B.2.3. Reaktionen der Biotransformation von Xenobiotika

Die große Zahl enzymatisch katalysierter Umwandlungen von lipophilen Fremdstoffen (Biotransformation) wird in zwei Phasen eingeteilt. Im Phase-I-Metabolismus wird in das lipophile Fremdstoffmolekül durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse (Funktionalisierung) eine polare Gruppe eingeführt. Diese Transformation führt in den meisten Fällen zu einer Substanz mit geringerer Toxizität und erhöhter Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln wie Wasser.

Diejenigen Metaboliten, die nicht ausreichend wasserlöslich genug sind, um ausgeschieden zu werden, beziehungsweise, die Substanzen die während des Phase I verändert werden sind dann Substrate für Enzyme des Phase-II-Metabolismus, die alle zu den Transferasen (EC 2.X.X.X.) gehören. In der Phase II wird der Metabolit

mit einem körpereigenen, aus dem Zellstoffwechsel stammenden hydrophilen Stoff gekoppelt (Konjugation), so z.B. einem Zucker, einer Aminosäure, Sulfat oder Glutathion, so dass ein gut wasserlösliches, leicht ausscheidbares Produkt entsteht. Für eine effiziente Entgiftung von Schadstoffen ist das Zusammenspiel beider Detoxifikationssysteme notwendig.

Phase I	Phase II
Oxidation	Glucuronidierung
Reduktion	Sulfatierung
Dehalogenierung	Acetylierung
Hydrolyse	Glutathion-Konjugation
Epoxiddehydroxylierung	Aminosäure-Konjugation
	Methylierung

Tabelle 1: Übersicht der Reaktionen des Phase I und II Metabolismus

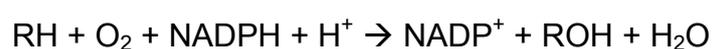
B.2.4. Phase-I-Metabolismus

Phase-I-Reaktionen führen funktionelle Gruppen in das lipophile Fremstoffmolekül ein oder verändern allgemein das Molekül enzymatisch in einer Art und Weise, dass die Wasserlöslichkeit steigt.

Beispiele für Reaktionen des Phase-I-Metabolismus sind die Einführung oder Freisetzung von funktionellen Gruppen wie Hydroxy-Gruppen (OH-), SH-, NH₂- oder auch COOH-Gruppen.

Typische Phase-I-Reaktionen sind z.B. mikrosomale Monooxygenierungen, cytosolische und mitochondriale Oxidationsreaktionen, Reduktionen, Dehalogenierungen, Epoxidhydroxylierungen und Hydrolysen. All diese Reaktionen führen eine polare Gruppe in das Fremstoffmolekül ein.

Die wichtigsten Phase-I-Enzyme gehören alle zur großen Gruppe der Cytochrom P450-Monooxygenasen. Monooxygenasen, die auch als mischfunktionelle Oxidasen bezeichnet werden, fügen ein Sauerstoff-Atom in das xenobiotische Substrat ein. Der Elektronendonator in dieser Reaktion ist NADPH, die ein Atom aus dem Sauerstoff-Molekül auf das Substrat übertragen, während das andere Atom zu Wasser reduziert wird:



B.2.5. Phase-II-Metabolismus

Durch Phase-II-Reaktionen werden polare, negativ geladene körpereigene Moleküle an das lipophile Fremdstoffmolekül gebunden (Konjugationsreaktion). Durch diese Kopplung steigt die Wasserlöslichkeit des Fremdstoffs erheblich an.

Das Ziel der Phase-I- und Phase-II-Reaktionen ist es, eine höhere Wasserlöslichkeit des betreffenden Metaboliten zu erreichen. Dieses Ziel wird nicht immer erreicht. Die Methylierung, Acetylierung oder eine Konjugation mit Fettsäuren im Phase-II-Metabolismus kann auch eine polare Gruppe maskieren, so dass die Wasserlöslichkeit der gebildeten Konjugate gegenüber ihren Substraten sogar noch vermindert ist und sich die Ausscheidung verzögert.

Der Phase-II-Metabolismus erhält vor allem dort eine enorme Bedeutung, wo im Phase-I-Metabolismus reaktive Produkte entstanden sind, die der Organismus aber aufgrund einer noch immer zu geringen Wasserlöslichkeit nicht entsorgen kann. Das Cytochrom P450-Enzymsystem ist zwar eigentlich ein Entgiftungssystem, erzeugt aber trotzdem auch zahlreiche reaktive Metaboliten, die potenziell Proteine, die DNA oder andere Zellstrukturen schädigen könnten. Durch die Phase-II-Kopplungsreaktionen werden diese reaktiven Metaboliten unschädlich gemacht und aus dem Organismus entfernt.

Oftmals entstehen in Zuge des Phase-I-Metabolismus reaktive und deshalb schädliche Produkte wie zum Beispiel im Phase I Metabolismus von Benzol. Den Reaktionen des Phase I-Metabolismus liegt die enorme Toxizität von Benzol zugrunde. Es wird ein Epoxid gebildet, welches eine erheblich höhere Reaktivität, als die ursprüngliche Verbindung zeigt. Substituenten verändern das Reaktionsverhalten der Metaboliten. So, aufgrund der sogenannten Functional Group Interaction aus Toluol, im Phase I Metabolismus statt der Bildung eines Epoxids, die Methylgruppe zur Säure oxidiert. Weshalb Toluol erheblich weniger toxisch ist als Benzol

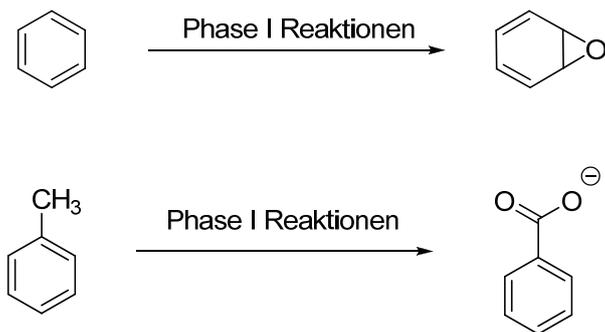


Abbildung 6: Reaktionsverhalten von Benzol und Toluol im Phase I Metabolismus

B.2.5.1. Mechanismus der Phase-II-Reaktionen

Bei Phase-II-Reaktionen werden Fremdstoffe oder Phase-I-Metabolite mit funktionellen Gruppen wie Hydroxy-Gruppen oder Carboxy-, Epoxid- oder Halogen-Gruppen in Konjugationsreaktionen mit körpereigenen Stoffen verknüpft. Als Konjugate können die Fremdstoffe dann über die Nieren oder die Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden. Die beteiligten zelleigenen Stoffe sind in der Regel Monosaccharide, Aminosäuren, Sulfat, Glutathion aber auch andere Verbindungen.

Damit die Konjugationsreaktionen thermodynamisch möglich werden, muss einer der beteiligten Reaktionspartner in aktivierter Form vorliegen. Beispiele dieser aktivierten Reaktionspartner sind: Uridin-diphosphat-glucuronsäure (UDPGA), 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und S-Adenosylmethionin (SAM), die bereits in aktivierter Form aus dem Zellstoffwechsel stammen.

Bei Konjugationsreaktionen von Carboxy-Gruppen tragenden Fremdstoffen bzw. Metaboliten wird zuerst unter ATP-Verbrauch ein CoA-Thioester der zu konjugierenden Fremdstoffe durch die CoA-Ligase gebildet. Die Thioester werden dann mit der Amino-Gruppe der Aminosäuren (oft mit der Aminosäure Glycin) verbunden und so zu Aminosäurekonjugaten umgesetzt.

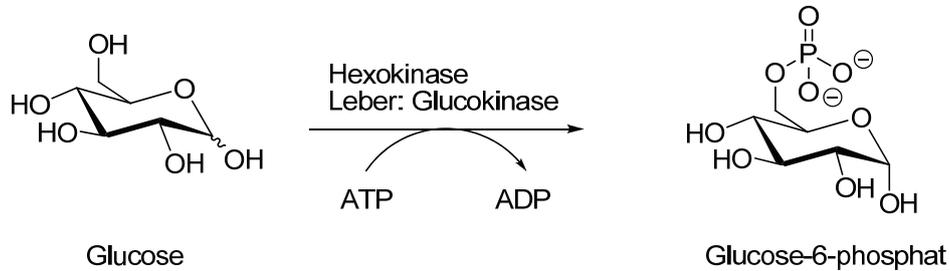
Allgemeiner Teil

Reaktion	Enzym	Übertragung von	Substrat
Glucuronidierung	UDP-Glucuronosyl- Transferase (UDPGT)	Glucuronsäure aus Uridin- diphosphat-glucuronsäure	-OH, -NH ₂ , -SH, - COOH
Sulfatierung	Sulfotransferase (SulT)	Sulfat-Gruppe aus 3'-Phospho- adenosin-5'-phosphosulfat	-OH, -NH ₂
Methylierung	Methyltransferase (MT)	Methyl-Gruppe aus S-Adenosyl- methionin	-OH, -NH ₂
Acetylierung	N-Acetyltransferase (NAT)	Acetyl-Rest aus Acetyl-CoA	-OH, -NH ₂
Aminosäure- Konjugation	Aminosäuren-N- Acyltransferasen	Glycin oder Glutamin (Amino- Gruppe)	-COOH-Gruppe, mit Acetyl-CoA als Thioester aktiviert
Glutathion- Konjugation	Glutathion-S- Transferase (GST)	Glutathion; Glutamin und Glycin wird später abgespalten und das Cystein acyliert	Epoxide, haloge- nierte und unge- sättigte Verbin- dungen
Fettsäure- Konjugation	Acyltransferasen	Fettsäure, mit Acetyl-CoA als Thioester aktiviert	-OH
Glycosidierung	UDP-Glycosyl- Transferase	Glucose aus Uridin-diphosphat- glucose	-OH

Tabelle 2: Übersicht der Konjugate

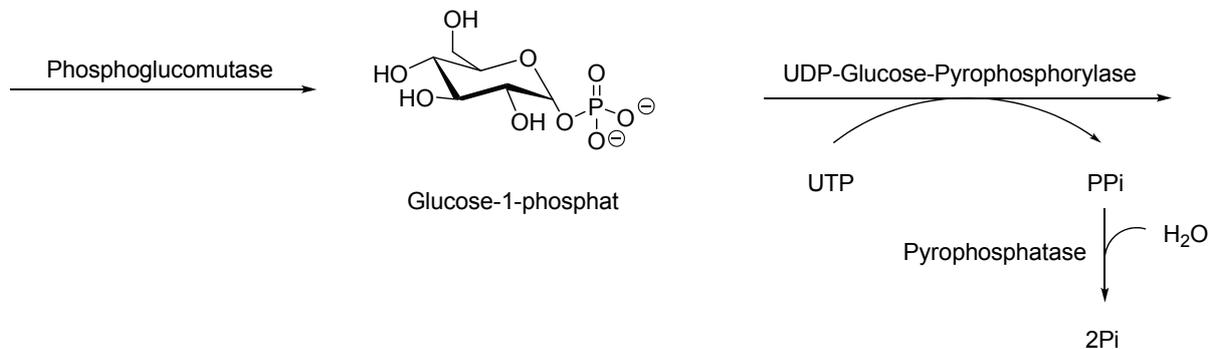
B.2.5.2. Bildung von UDP-Glucuronsäure im Metabolismus (5)

Ausgehend von D-Glucose, wird Glucose-6-Phosphat gebildet. Diese Reaktion erfolgt, unter ATP Verbrauch, durch das Enzym Hexokinase (EC 2.7.1.2) beziehungsweise in Leberzellen mittels Glucokinase.



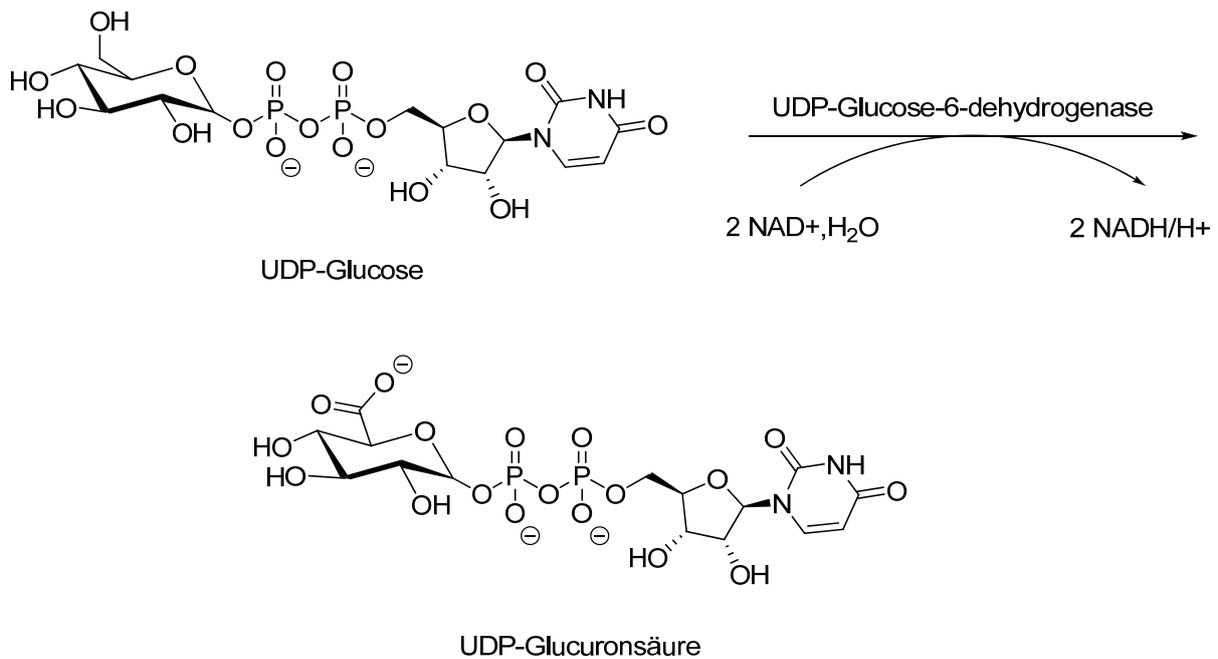
Formelschema 11: Bildung von UDP-Glucuronsäure

Das, so gebildete Glucose-6-phosphat wird anschließend durch Phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2.) in Glucose-1-phosphat überführt. Das Enzym UDP-Glucose-Pyrophosphatase verknüpft nun die, mit Phosphat aktivierte Glucose, mit Uridindiphosphat. Das, als Nebenprodukt dieser Reaktion entstehende Pyrophosphat wird durch Spaltung in zwei Moleküle Phosphat (anorganisch) mittels Pyrophosphatase dem Gleichgewicht entzogen.



Formelschema 12: Bildung von Glucose-1-phosphat

Die, dadurch entstandene UDP-Glucose wird schließlich durch UDP-Glucose-6-dehydrogenase (EC 1.1.1.22) zur UDP-Glucuronsäure beziehungsweise zum entsprechenden Salz oxidiert.



Formelschema 13: Bildung von UDP-Glucuronsäure

B.2.5.3. Glucuronosyl-Transferasen

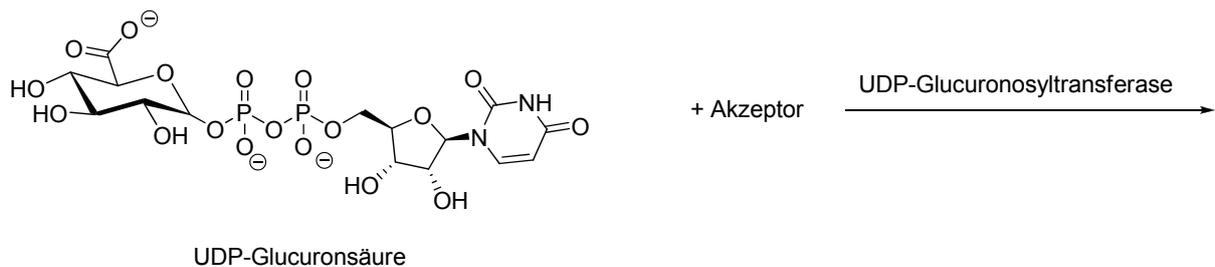
Die ubiquitär in Tieren, Pflanzen und Bakterien vorkommenden UDP-Glucuronosyl-Transferasen (UGT) bilden eine große Superfamilie von Enzymen, die aktivierte Glucuronsäure (α -D-UDP-Glucuronsäure oder UDPGA) auf ein nucleophiles Substrat wie Hydroxy-, Carboxy-, Amino- oder SH-Gruppen übertragen. Durch diese Enzyme werden z.B. Medikamente wie Paracetamol, Phenylbutazon oder Thyroxin entgiftet, aber auch Steroidhormone, Gallensäuren oder fettlösliche Vitamine. Das Produkt aus dieser Reaktion

ist fast immer biologisch inaktiv und wird schnell ausgeschieden. UGT-Enzyme kommen vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum der Leber vor, finden sich aber auch in Darm-, Nieren-, Lungen- und Hautzellen.

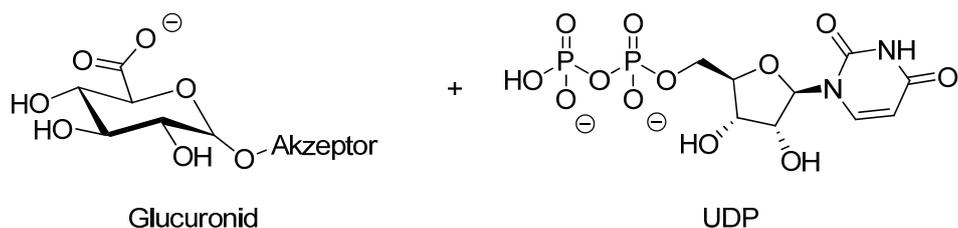
An die, durch UDP aktivierte Glucuronsäure (UDP-Glucuronsäure) werden nun im Zuge des Phase II Metabolismus bestimmte Xenobiotika geknüpft. Diese Reaktion, welche im rauen ER stattfindet wird durch UDP-Glucuronosyltransferase (EC 2.4.1.17) und deren Isoenzyme katalysiert



Abbildung 7: Röntgenfluoreszenzaufnahme einer Glucuronosyltransferase (5)



Formelschema 14: Reaktion UDP-Glucuronsäure mit Akzeptor



Formelschema 15: Glucuronid

Die Nomenklatur der UDPGT entspricht der Nomenklatur der Cytochrom P450-Enzyme. UGT1A5 ist beispielsweise eine UGT aus der Genfamilie 1, Subfamilie A und das Isoenzym 5. Bisher sind 17 menschliche UDPGT-Enzyme identifiziert worden.

B.2.6. Der Phase-III-Metabolismus

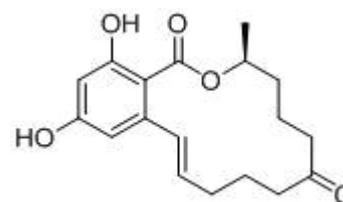
Was geschieht nun mit den Produkten des Phase-I- und Phase-II-Metabolismus in den Zellen? Für alle nachfolgenden Schritte hat sich der Begriff "Phase-III" eingebürgert. Unter Phase-III-Reaktion versteht man sowohl den Export der Fremdstoff-Konjugate mit Hilfe von Transportproteinen oder Effluxpumpen aus der Zelle, aber auch den finalen Export aus dem Organismus. Bei Pflanzen ist die Phase-III-Reaktion eine Ablagerung der gebildeten Konjugate in Kompartimenten (lokale Exkretion), während Tiere eine direkte Exkretion über verschiedene Wege erreichen können:

- Exkretion über die Niere (renal), tubuläre Sekretion oder Resorption bei wasserlöslichen, polaren Stoffen
- Exkretion über die Galle (biliär) bei wasserlöslichen, polaren Stoffe
- intestinale Sekretion
- Atemluft-Exkretion bei flüchtigen Stoffen
- Exkretion mit der Muttermilch bei fettlöslichen Stoffen

C) SPEZIELLER TEIL

C.1. Allgemeines zu den Modellverbindungen

Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese von Zearalenon-Modellverbindungen (Zearalenon-Mimics). Dies sind Verbindungen, welche ZON im Aufbau und den funktionellen Gruppen mehr, oder weniger ähnlich sind. Wie bereits erwähnt ist die eigentliche Verbindung ZON zu kostspielig um damit neue Synthesen zu entwickeln. An den Modellverbindungen, welche um einiges günstiger herzustellen sind, können so neue Synthesen geplant und verbessert werden. Die optimierten Synthesewege werden dann am ZON angewandt.



Formel 4: Zearalenon

Es wurden, über verschiedene Wege 6 unterschiedliche Modellverbindungen für ZON hergestellt.

Typ I Modellverbindungen:

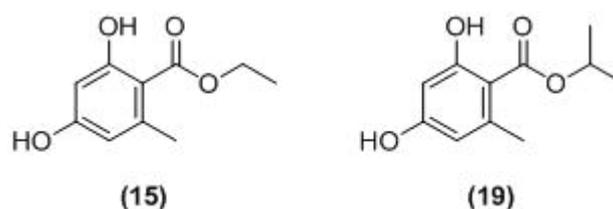
Die Modellverbindungen dieses Typs konnten auf einfachem Wege durch Veresterung von 2,4-Dihydroxybenzoesäure beziehungsweise durch Umesterung von 2,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester erhalten werden.



Formel 5: Typ I Modellverbindungen

Typ II Modellverbindungen:

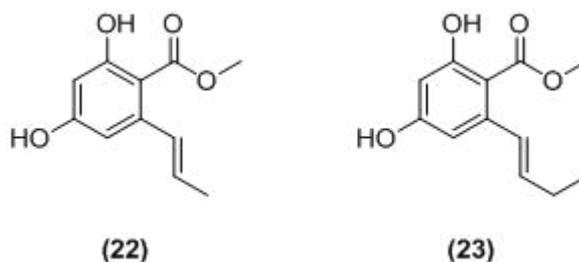
Diese, ebenfalls sehr einfach aufgebauten Verbindungen wurden durch eine Reaktions-Kaskade aus Michael-Addition und anschließender Kondensation aus Ethylcrotonat und Ethylacetoacetat/Isopropylacetoacetat und anschließender Aromatisierung des cyclischen Intermediats hergestellt.



Formel 6: Typ II Modellverbindungen

Typ III Modellverbindungen:

Hinter der Herstellung dieser Verbindungen steht ein komplexer Syntheseweg, welcher über mehrere Stufen verläuft. Neben anderen Syntheseschritten kamen auch Methylschutzgruppen für die phenolischen OH-Gruppen des aromatischen Ringes, sowie metallorganische Methoden zum Einsatz.



Formel 7: Typ II Modellverbindungen

C.2. Synthese der Modellverbindungen

C.2.1. 2,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester (3)

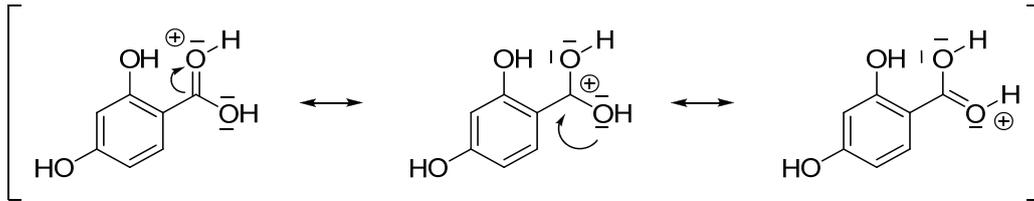
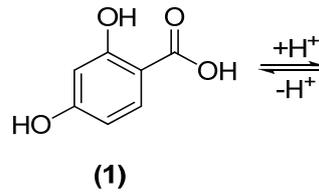
Die kommerziell erhältliche 2,4-Dihydroxybenzoesäure wurde mit Methanol und katalytischen Mengen an konzentrierter Schwefelsäure verestert und somit der entsprechende 2,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester hergestellt. Nach anschließender Aufarbeitung wurde das Rohprodukt aus Toluol umkristallisiert. Es wurden 75% 2,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester (**3**) erhalten.

Die Veresterung verläuft über eine säurekatalysierte Additions-Eliminierungs-Reaktion (7):

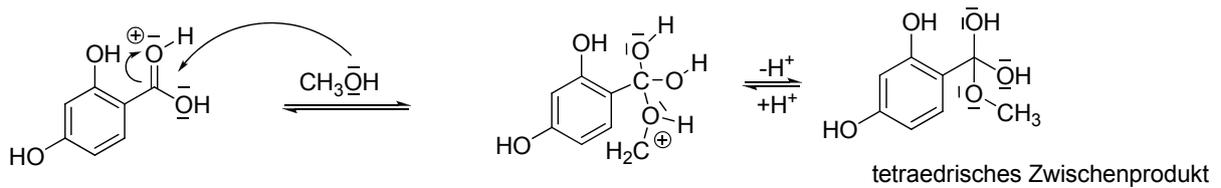
Die saure Katalyse mittels Schwefelsäure spielt im Mechanismus der Esterbildung eine entscheidende Rolle: es induziert den nucleohilen Angriff des Alkohols (Methanol) an die Carbonylgruppe und den Abgang der Hydroxygruppe als Wasser.

Durch das Proton der Säure wird ein delokalisiertes Dihydroxycarbeniumion gebildet (Schritt 1). Dadurch wird der nucleophile Angriff des Methanols an das positiv polarisierte Carbonyl-C-Atom ermöglicht. Durch die Abspaltung eines Protons aus dem ersten Addukt entsteht das tetraedrische Zwischenprodukt der nucleophilen Addition (Schritt 2). Dieses Intermediat stellt den entscheidenden Punkt im Mechanismus dar, denn es kann, bedingt durch das Gleichgewicht in beide Richtungen reagieren. Die Protonierung (Verschiebung des Gleichgewichts nach rechts) führt letztendlich, nach der Abspaltung von Wasser zu dem gewünschten Ester. Bei der Veresterung sind alle Schritte reversibel die Esterbildung wird daher durch einen Überschuss an Alkohol oder das Entfernen des entstandenen Wassers begünstigt. Analog zu diesem Mechanismus verläuft die Esterhydrolyse.

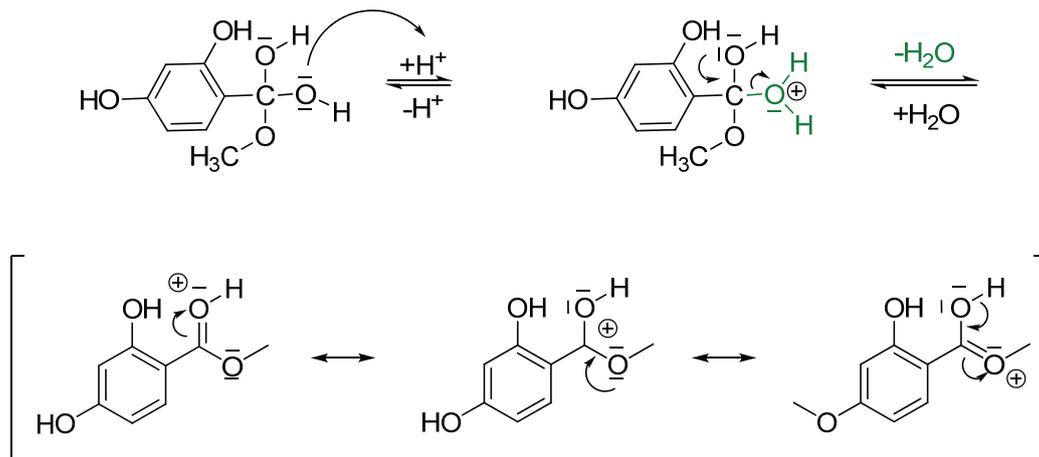
Schritt 1: Protonierung der Carboxygruppe

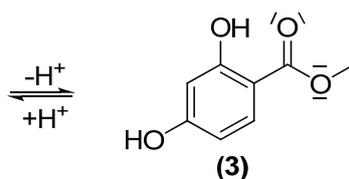


Schritt 2: Nucleophiler Angriff des Alkohols



Schritt 3: Wasserabspaltung:



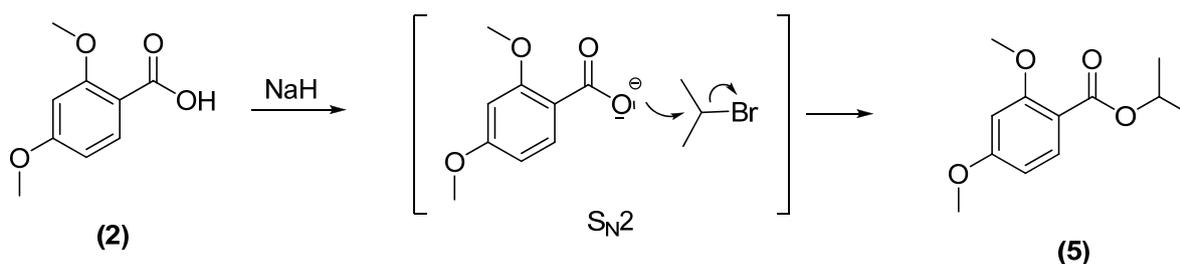


Formelschema 16: Säurekatalysierte Methylesterung

C.2.2.2,4-Dihydroxybenzoesäureisopropylester (5)

Da die direkte Veresterung der 2,4-Dihydroxybenzoesäure im sauren Milieu mit Isopropanol nicht funktionierte, wurde hier eine andere Strategie gewählt.

Die 2,4-Dihydroxybenzoesäure (**2**) wurde im ersten Schritt durch Natriumhydrid, welches als starke Base agiert, deprotoniert. Durch den nucleophilen Angriff des so gebildeten Carboxylat-Anions an 2-Brompropan (S_N2) wird schließlich der Isopropylester gebildet.



Formelschema 17: S_N2 Veresterung von (5) mit iPrBr

Nach entsprechender Aufarbeitung und Reinigung mittels SC wurden 69% (**5**), als weißer Feststoff erhalten.

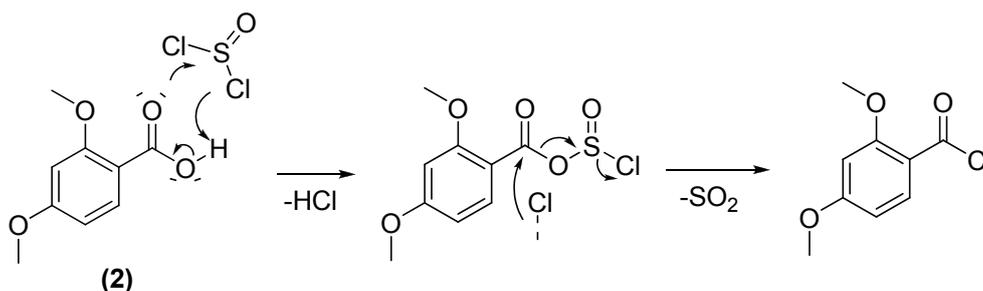
C.2.3. N,N-Diethyl-2,4-dihydroxymethylbenzamid (Variante 1) (4)

Die Reaktion erfolgte in 2 Stufen: Als Erstes wurde die 2,4-Dimethoxybenzoesäure in das Säurechlorid überführt, welches danach mit einem Amin zu einem Amid reagiert:

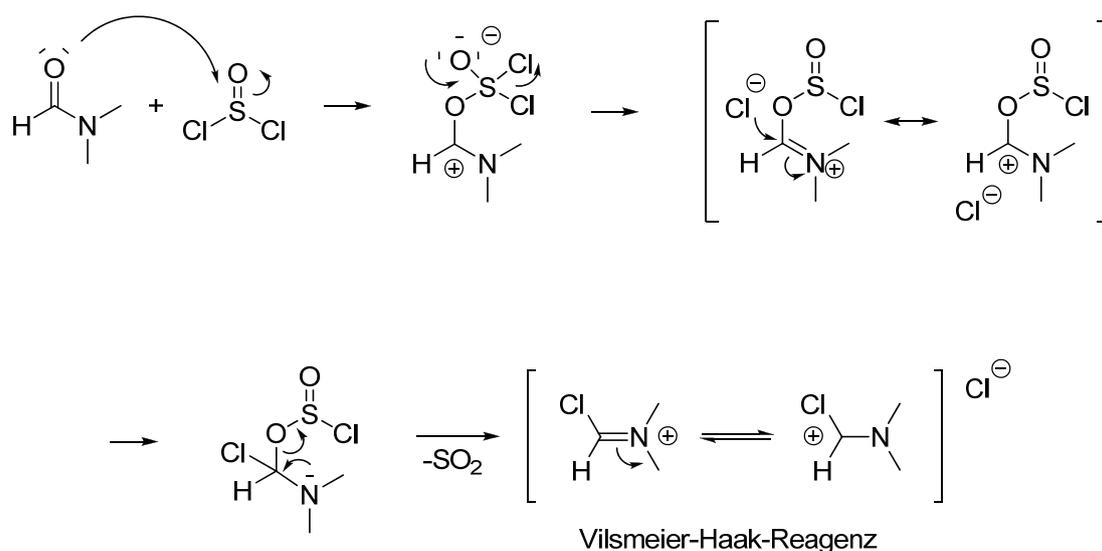
Die kommerziell erhältliche 2,4-Dimethoxybenzoesäure wurde mit Thionylchlorid und katalytischen Mengen DMF versetzt. Als Übergangsprodukt bildete sich ein tief violettes Säurechlorid, welches durch anschließende Reaktion mit Diethylamin in das entsprechende Amid überführt wurde. Diethylamin wurde in 3-fach molarem Überschuss zugegeben, um einerseits die Ausbeute zu erhöhen und andererseits, da Diethylamin als Base das frei werdende H^+ - Ion abfängt und somit die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht, das Gleichgewicht auf die rechte Seite verschoben wird.

Stufe1: Bildung des Säurechlorids

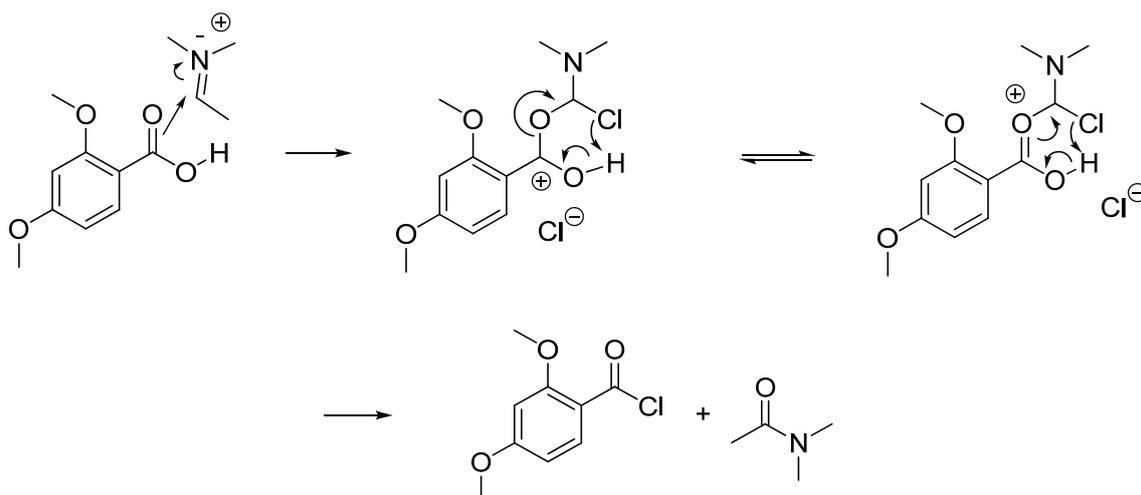
Im ersten Schritt erfolgte eine Aktivierung der Carbonsäure durch Thionylchlorid:



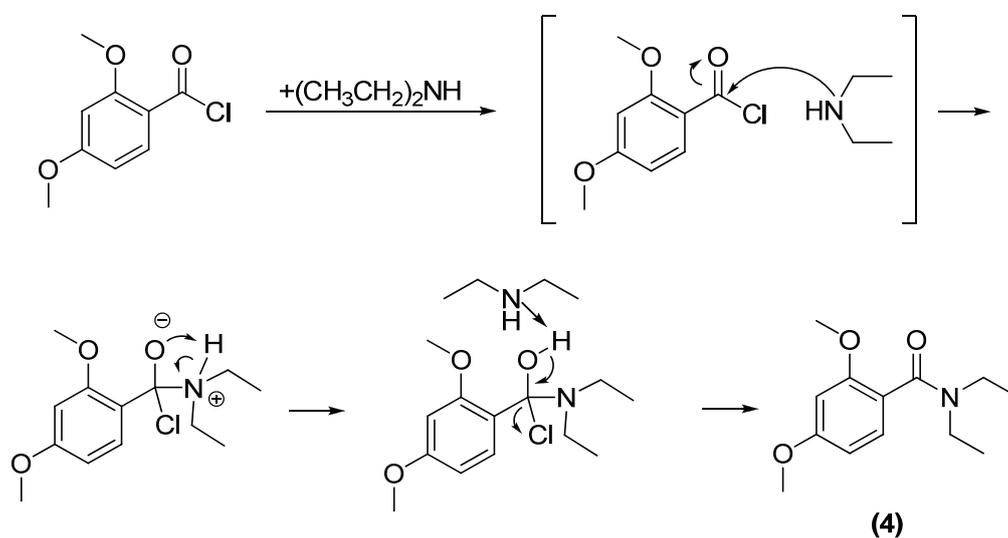
Mechanismus der katalytischen Reaktion von DMF mit der Carbonsäure:



Das dadurch Gebildete Vilsmeier-Haak-Reagenz reagiert nun weiter mit der Carbonsäure und führt diese in ihr Säurechlorid über.



Stufe 2: Bildung des Amids:

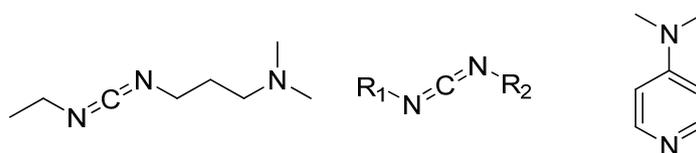


Formelschema 18: Synthese des Amids über das Säurechlorid

Nach Aufreinigung des Rohproduktes mittels Säulenchromatographie konnten 79% an **(4)** erhalten werden.

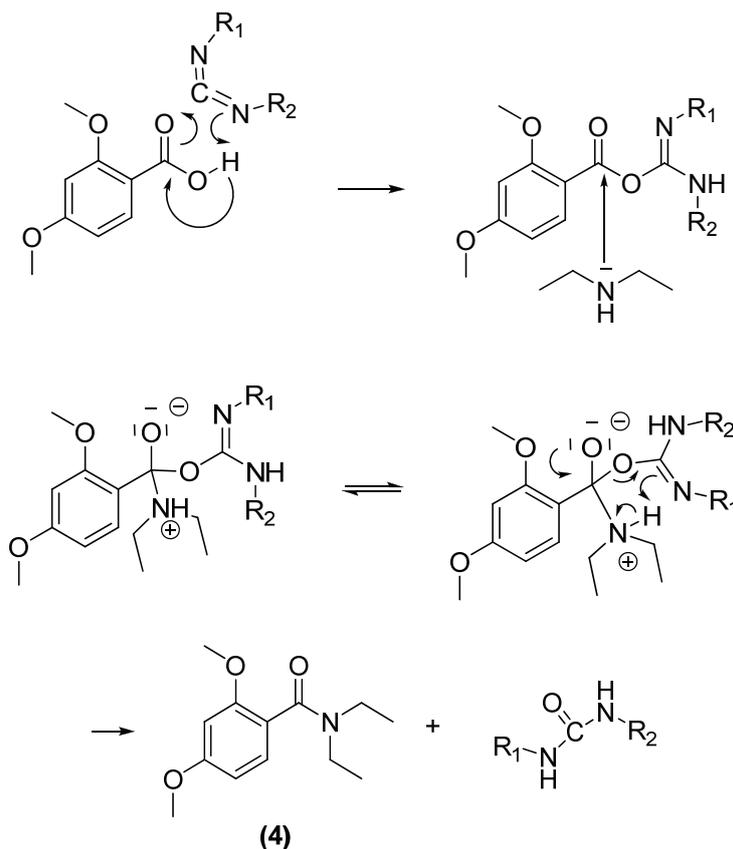
C.2.4. N,N-Diethyl-2,4-dihydroxymethylbenzamid (Variante 2) (4)

In Variante 2 wurde zur Synthese des N,N-Diethyl-2,4-dimethoxybenzamids eine Methode, analog der Steglich-Veresterung angewandt. Bei dieser Variante der Veresterung wird N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid (EDCI) als Kopplungsreagenz und 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) katalytisch als Base für einen besseren H^+ -Transfer eingesetzt.



Formel 8: links EDCI; rechts DMAP

Bei der Steglich-Amidierung handelt es sich um eine sehr milde Reaktion, welche meist bei RT durchgeführt wird. Somit wird diese Synthese von sterisch gehinderten und säurelabilen Edukten ermöglicht.



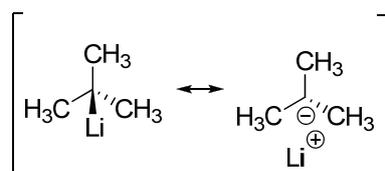
Formelschema 19: Katalysierte Amidsynthese mit EDCI und DMAP

C.2.5. N,N-Diethyl-2-formyl-4,6-dimethoxybenzamid (9)

Im ersten Schritt erfolgte eine ortho-dirigierene-Lithiierung an das C6-Atom von N,N-Diethyl-2,4-dimethoxybenzamid (**4**), welche aufgrund der hohen Reaktivität des t-BuLi bei sehr tiefen Temperaturen (-80°C) und unter Inertgas (Ar) durchgeführt wird. Da das C6-Atom das einzige ohne +M-Effekt von den beiden Methoxygruppen sowie das einzige mit -M-Effekt von der Amid-Gruppe ist, ist dieser Kohlenstoff der „positivste“ im System. An diesem Kohlenstoff befindet sich somit auch das „azideste H-Atom“, welches durch das Lithierungsreagenz (t-BuLi), einer sehr starken Base angegriffen wird.

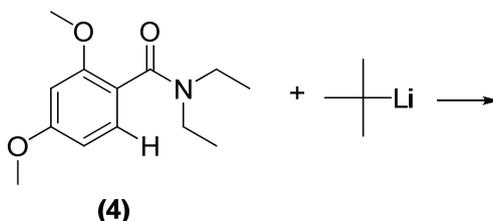
Die enorme Basizität kommt durch die elektronenschiebenden Eigenschaften (+ I-Effekt) der Nachbargruppen zustande.

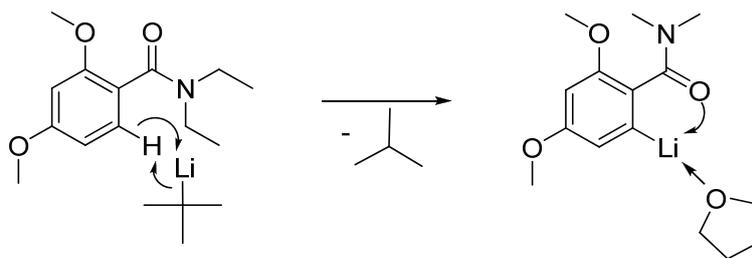
Die Lithium-Kohlenstoff-Bindung im tert-Butyllithiummolekül ist stark polarisiert. Das Kohlenstoffatom trägt dabei eine negative und das Lithiumatom eine positive Partialladung. tert-Butyllithium verhält sich daher chemisch ähnlich wie ein entsprechendes Carbanion.



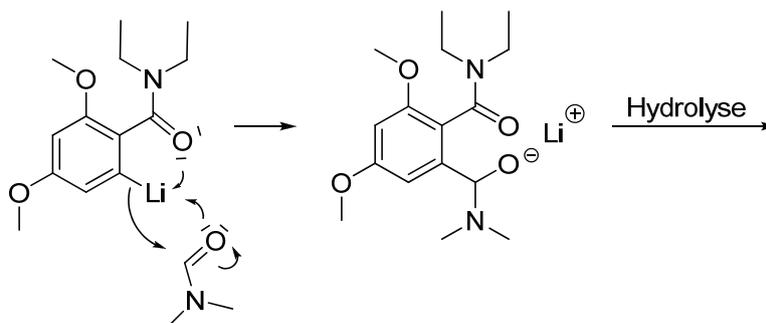
Formel 9: Mesomere Grenzstruktur t-BuLi

Der Angriff und die Bindung des Lithiums werden außerdem durch die Carbonylgruppe des Amids zusätzlich stabilisiert. Zusätzlich kann diese Reaktion durch die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels positiv beeinflusst werden. In diesem Fall wurde THF verwendet, welches durch freie Elektronenpaare am Sauerstoff das Lithium stabilisiert.

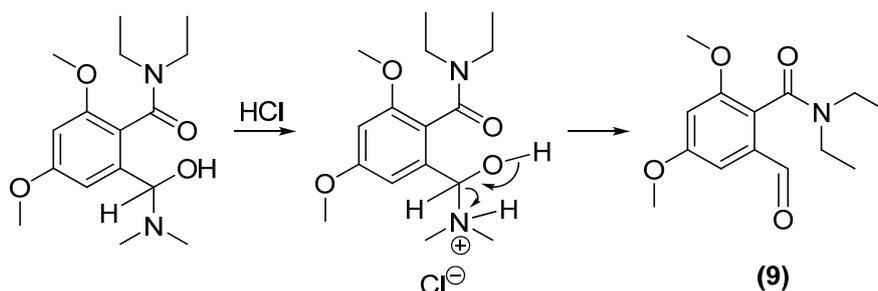




Im nächsten Schritt erfolgt der nucleophile Angriff des Lithiumorganyls an DMF.



Durch anschließende Hydrolyse wird das Intermediärprodukt in ein Aminoal überführt, welches schließlich in das Endprodukt gespalten wird.

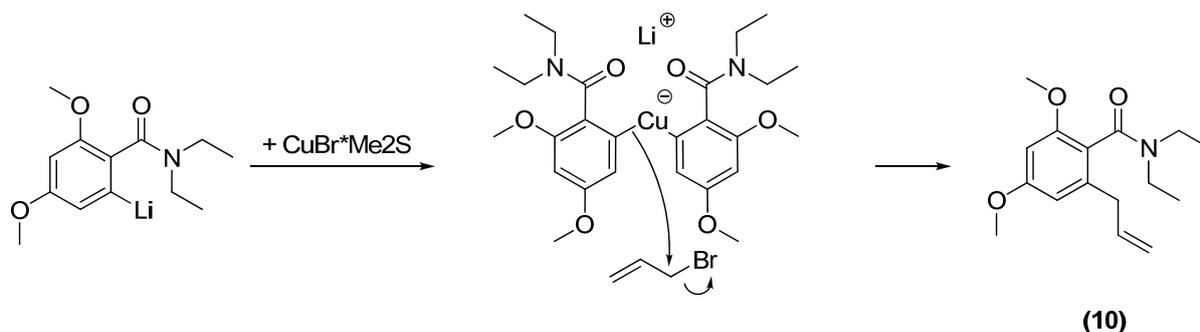


Formelschema 20: DMF Lithierung

Als Ausbeute wurden nach Extraktion und säulenchromatographischer Reinigung 69% **(9)** als gelbes Harz erhalten.

C.2.6. Transmetallierung

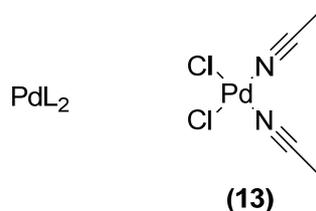
Das lithiierte Intermediat wird durch Zugabe von Kupfer I ($\text{CuBr} \cdot \text{Me}_2\text{S}$) transmetalliert. Es wird das stark elektropositive Lithium gegen weniger elektropositives Kupfer ausgetauscht, was eine Verminderung der Reaktivität zufolge hat und somit den nucleophilen Angriff ($\text{S}_{\text{N}}2$) an Allylbromid begünstigt.



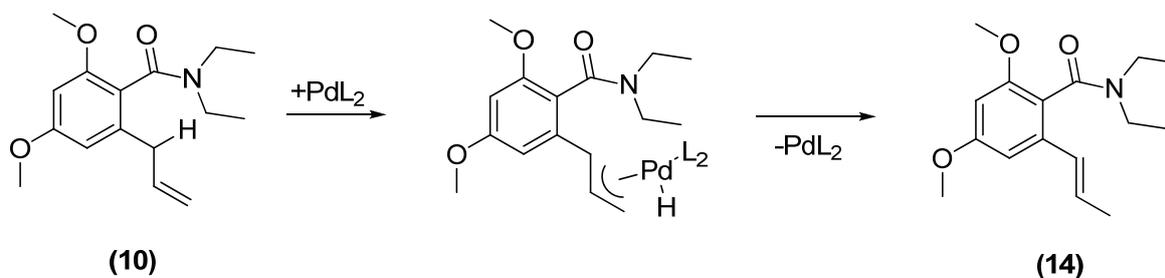
Formelschema 21: Transmetallierung

C.2.7. Isomerisierung

Durch die Anlagerung des Palladium-Katalysators kommt es quasi zur Ausbildung eines Gleichgewichts. Die konjugierte Doppelbindung in E-Konfiguration ist dabei thermodynamisch stabiler als die Z-Konfiguration. Wodurch diese Isomer bevorzugt gebildet wird.



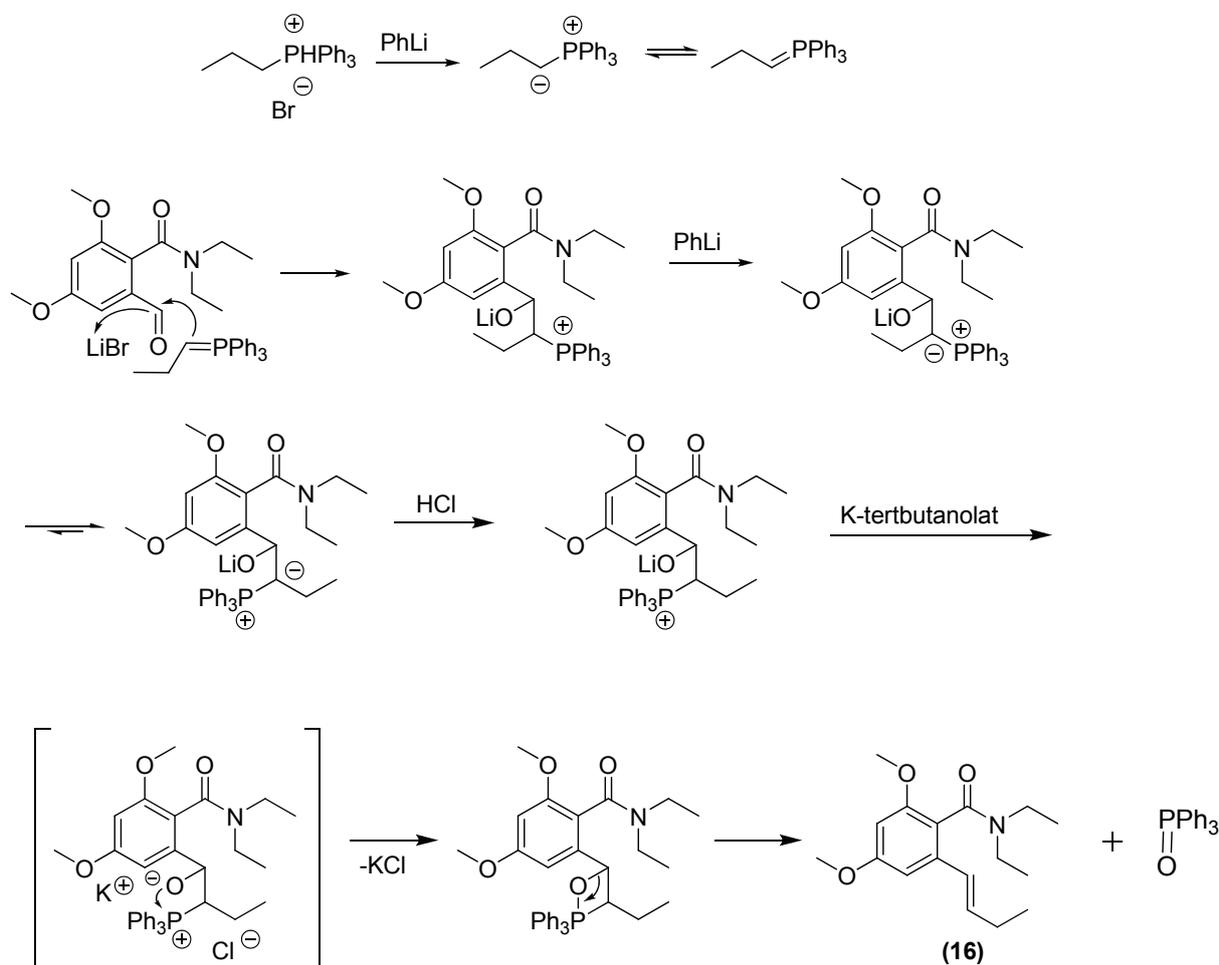
Formel 10: Palladiumkatalysator



Formelschema 22: Isomerisierung

C.2.8. (E)-2-(But-1-enyl)-N,N-diethyl-4,6-dimethoxybenzamid (16)

Ausgehend von **(9)** wurde eine Wittig-Schlosser-Synthese angewandt um eine noch komplexere Modellverbindung zu erhalten. Als Wittigsalz wurde Triphenylpropylphosphoniumbromid verwendet.

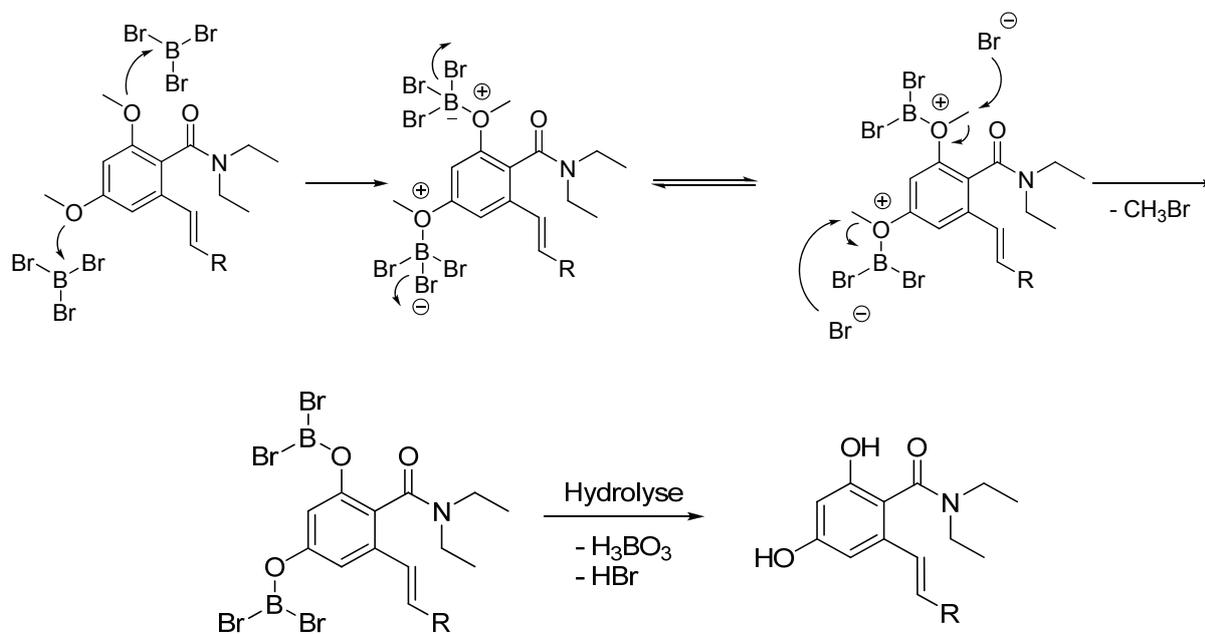


Formelschema 23: Wittig-Schlosser Methode

Die Schlosser Variante ermöglicht es gezielt E-Konfigurierte-Alkene aus Carbonylverbindungen zu synthetisieren. Durch die Verwendung von Phenyllithium als Base und Lithiumbromid können α -lithierte Betaine in situ hergestellt werden. Diese neigen in einer Gleichgewichtsreaktion die E-Konformation zu bilden. Die Verwendung der Schlosser Variante ermöglichte es in diesem Fall ein E/Z Verhältnis von 9:1 zu erhalten.

**C.2.9. (E)-N,N-diethyl-2,4-dihydroxy-6-(prop-1-enyl)-benzamid (20) und
(E)-2-(but-1enyl)-N,N-diethyl-4,6-dihydroxybenzamid (21)**

Da eine direkte Umsetzung von (14) und (16) zu (20) bzw. (21) nicht möglich war, musste man zuerst die Methylschutzgruppen entfernt werden. Hierfür wurde Bortribromid verwendet.

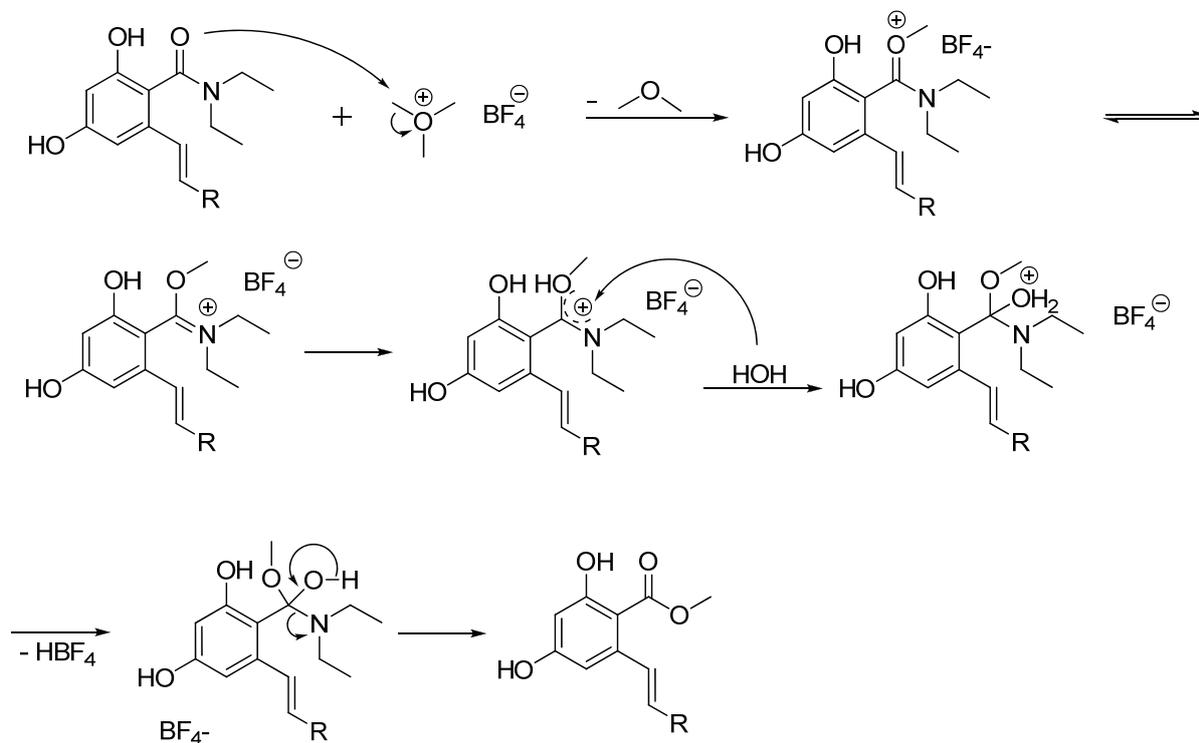


R ... Methyl- oder Ethyl-

Formelschema 24: Entfernung der Methylschutzgruppen

Die freien Elektronenpaare der Methoxygruppen greifen an der Lewisäure BBr₃ an, was eine Abspaltung eines Bromid-Ions nach sich zieht. Durch anschließenden S_N2-Angriff des Bromids an die Methylgruppe und Hydrolyse erhält man das gewünschte Endprodukt.

C.2.10. (E)-methyl-2,4-dihydroxy-6-(prop-1-enyl)benzoat (22) und (E)-methyl-2-(but-1-enyl)-4,6-dihydroxybenzoat (23)



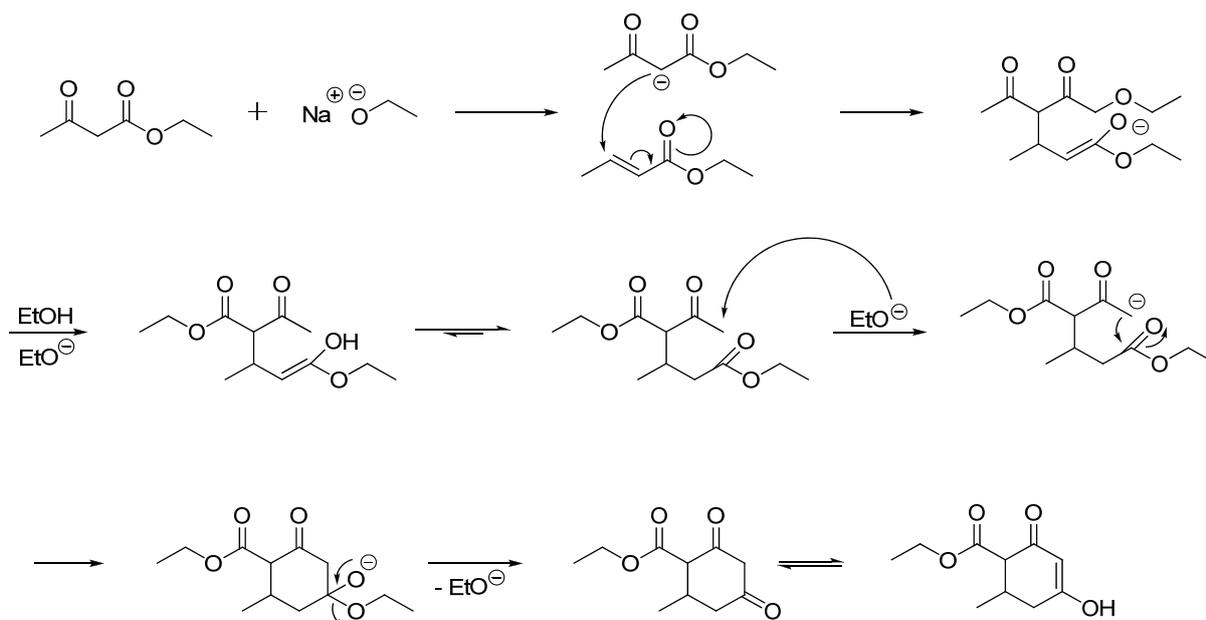
R ... Methyl- oder Ethyl-

Formelschema 25: Umsetzung eines Amids zum Ester

Die Carbonylgruppe greift durch ihre hohe Elektronendichte das positiv geladene Trimethyloxoniumion an. Durch gleichzeitige Abspaltung von Dimethylether erhält man eine delokalisierte positive Ladung (siehe Abbildung 3). Durch anschließenden Angriff von Wasser und Abspaltung von Diethylamin erhält man das gewünschte Endprodukt.

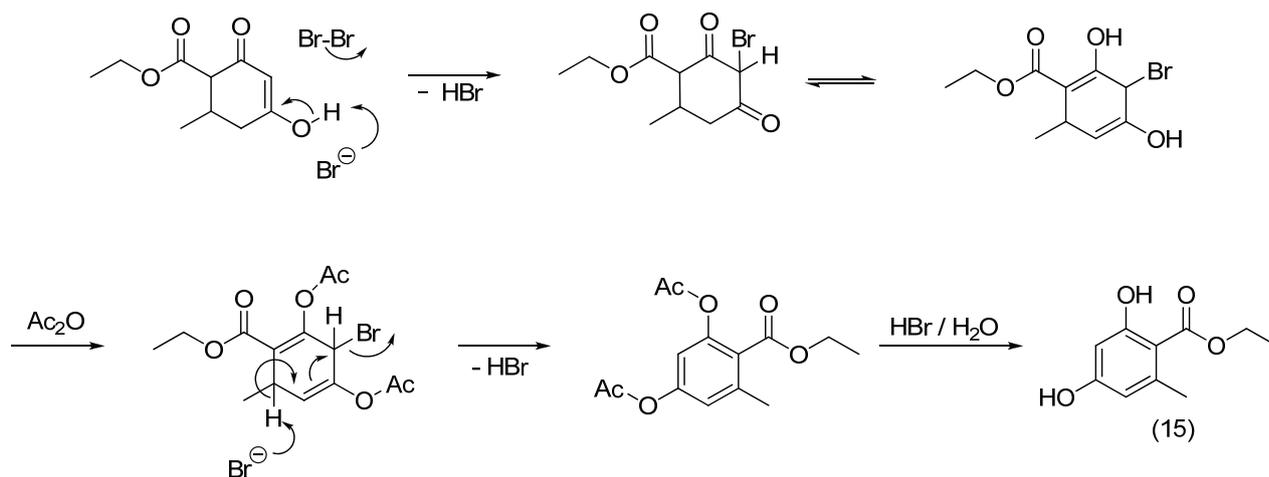
C.2.11. 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester (15) und 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureisopropylester (19)

Ausgehend von Ethylacetoacetat und Ethylcrotonat wurde durch Michael-Addition, einer Kondensation des Zwischenprodukts und anschließender Aromatisierung eine neue Modellverbindung hergestellt. Analog wurde die Reaktion mit Propylacetoacetat und Ethylcrotonat durchgeführt.



Formelschema 26: Bildung eines Sechseringes durch Michaelkondensation und Claisenumlagerung

Im ersten Schritt wurde durch eine starke Base, in dem Fall Na-Ethanolat, der Acetoessigsäureester deprotoniert. Durch die anschließende Ankopplung des Carboanions an das Ethylcrotonat (= Michaeladdition) und nachfolgender tautomerer Umlagerung, wird ein Zwischenprodukt erhalten, welches durch das Ethanolat wieder am endständigen C-Atom des Ethylacetoacetat deprotoniert wird. Diese Deprotonierung hat einen Ringschluss und die Abspaltung eines Ethanolat zu Folge. Man erhält das nicht aromatische Zwischenprodukt, welches durch anschließende Bromierung und Eliminierung von HBr zum aromatischen Endprodukt umgesetzt wird.



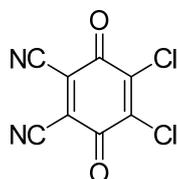
Formelschema 27: Aromatisierung eines Sechseringes durch Bromierung

Im Ersten Brom am C_3 addiert. Das so erhaltene Zwischenprodukt wird weiters durch Reaktion mit Essigsäureanhydrid verestert und durch einen Angriff von Bromid, am C_6 Atom die Aromatisierung abgeschlossen. Im letzten Schritt werden die Ester mittels HBr und H_2O gespalten.

Dieser Syntheseweg wurde auch für (19) gewählt, wobei erst im Nachhinein bemerkt wurde, dass auch (15) als Nebenprodukt anfiel. Nach einigen theoretischen Versuchen wurde erkannt, dass einen Konkurrenzmechanismus möglich ist und es besser wäre auch Isopropylcrotonat und Na-Isopropylat zu verwenden, um diesen Faktor gänzlich zu eliminieren.

C.2.12. Aromatisierung mit Chinonen (DDQ) (8)

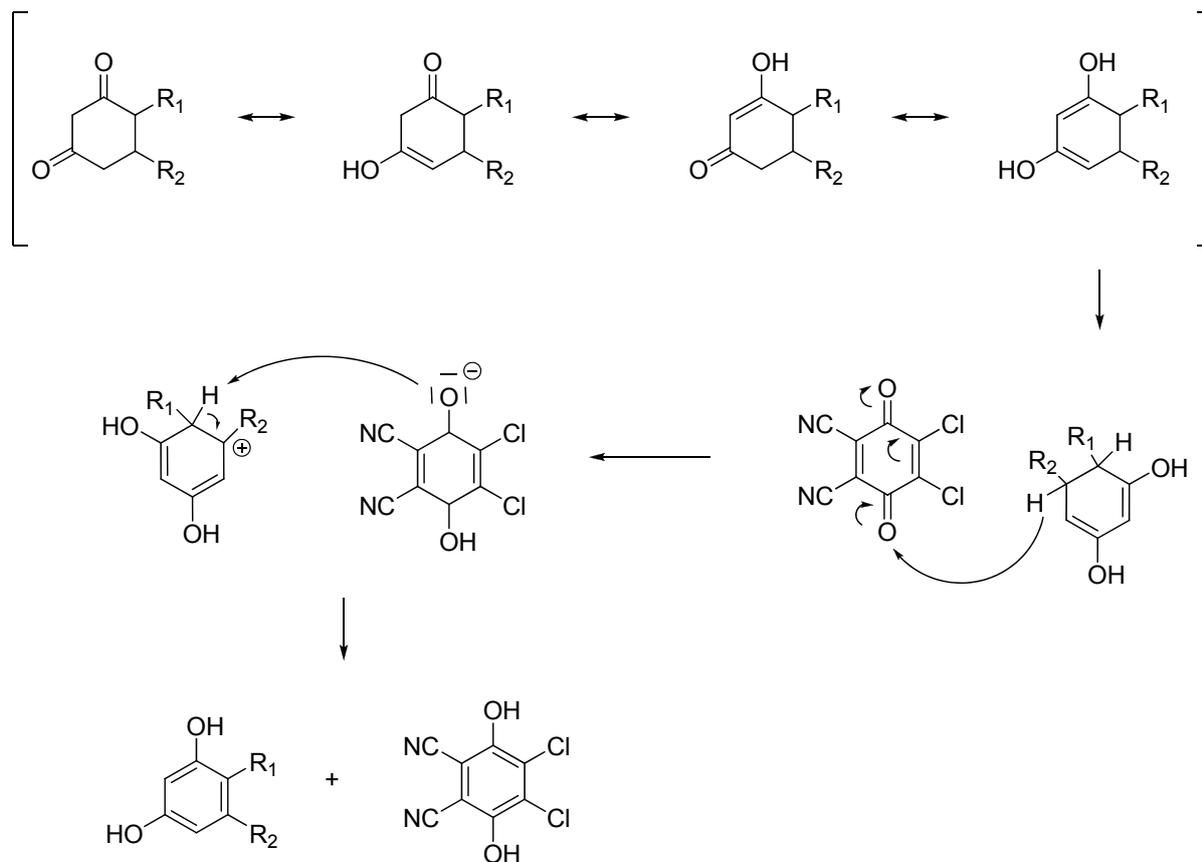
Eine Beliebte Variante zur Aromatisierung von Sechseringen bietet die Verwendung von Chinonen.



Formel 11: DDQ (2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon)

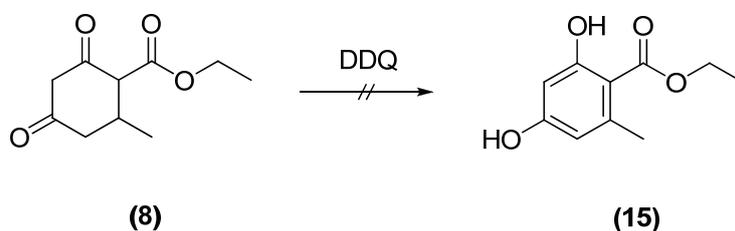
Hierbei werden cyclische Systeme mittels Chinonen (DDQ) oxidiert, welche dadurch zu den entsprechenden Hydrochinonen reduziert werden. Mechanistisch gesehen wird vermutlich ein Hydrid-Ion auf einen Chinon-Sauerstoff, gefolgt von einem Proton auf das entstandene Phenolat-Ion übertragen wird. Andere Ansätze sind Elektronentransfermechanismen.

Besonders reaktiv sind elektronenarme Chinone, wie Chloranil (2,3,5,6-Tetrachlor-1,4-benzochinon) und das noch stärkere DDQ.



Formelschema 28: Aromatisierung eines Sechseringes mit DDQ

Im Fall der Aromatisierung von Ethyl-2,4-dihydroxy-6-methylcyclohexa-2,4-dien-carboxylat (**8**) bzw. Isopropyl-2,4-dihydroxy-6-methylcyclohexa-2,4-dien-carboxylat (**12**) zu: 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäureethylester (**15**) bzw. 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureisopropylester (**19**) schlug die Reaktion jedoch fehl.



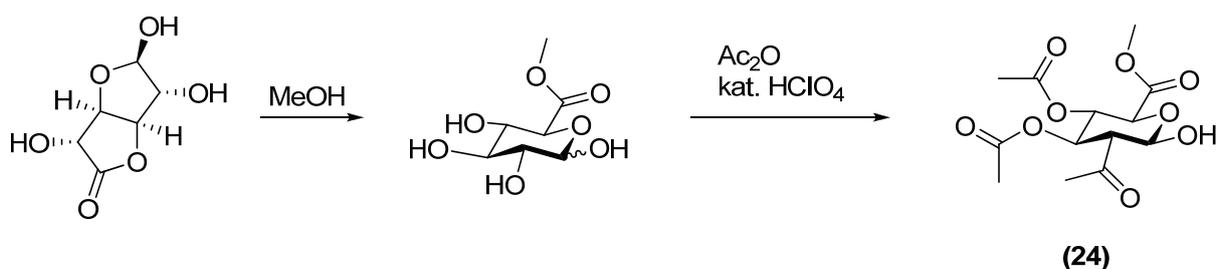
Formelschema 29: Gescheiterter Versuch der Aromatisierung mit DDQ

C.3. Synthese der Glucuronyldonoren (9)

Die Synthese von Glukokonjugaten nach Königs und Knorr bietet eine relativ einfache und daher gerne verwendete Methode zur diastereoselektiven Darstellung durch die Reaktion von Glucuronyl-Halogeniden mit Alkoholen, oder wie in diesem Fall mit Phenolen unter Aktivierung durch Metallsalze (wie zum Beispiel Ag_2CO_3 oder auch Ag_2O). Klassisch werden hierbei die entsprechenden acetyl- geschützten Bromozucker oder Chlorozucker eingesetzt. Die Diastereoselektivität dieser Reaktion liegt dem anchimeren Effekt zugrunde.

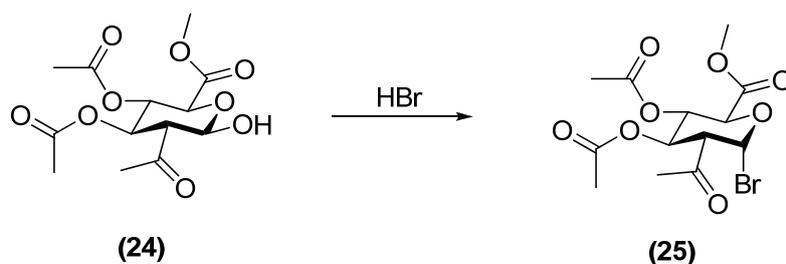
Für die Synthese der Glucuronyl-Donoren wurde in dieser Arbeit ausschließlich diese Methode verwendet und ein, durch Brom aktivierter Donor eingesetzt. Als Schutzgruppen für die Synthese dieses G-Donors wurden Acetyl-Schutzgruppen, sowie eine Methyl-Schutzgruppe für die COOH -Gruppe der Glucuronsäure verwendet.

Die Synthesen dieser Glucuronsäure-Derivate sind allgemein literaturbekannt. Ausgehend von (+)-D-Glucofuranurono-6,3-lacton wurde nach (9) 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranuronsäuremethylester (**24**) synthetisiert. Als Zwischenprodukt der Reaktion des Zuckers mit Natriummethanolat und Methanol entsteht D-Glucopyranuronsäuremethylester, welcher durch die anschließende Acetylierung mit Essigsäureanhydrid unter Katalyse von Perchlorsäure zum gewünschten Produkt führt. Die Ausbeute lag bei 75% β -Anomer.



Formelschema 30: Synthese des acetylgeschützten Glucuronsäuremethylesters

Die Umsetzung von **(24)** zu 1-Brom-1-deoxy-2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-glucopyranuronsäure-methylester (**25**) mit Bromwasserstoff in Eisessig mit einer Ausbeute von 85 % wurde nach [8] durchgeführt.



Formelschema 31: Synthese des acetylgeschützten G-Donors

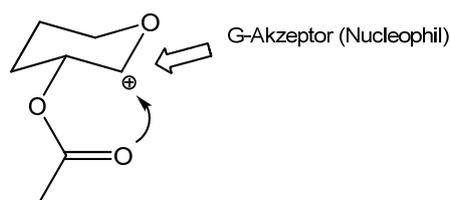
C.3.1. O-Glucuronidierung (11)

Unter O-Glucuronidierung (kurz Glucuronidierung) versteht man die Reaktion eines G-Donors mit einem G-Akzeptor zu einem Glucuronid.

Distereoselektivität der Glucuronidierung- der anchimere Effekt

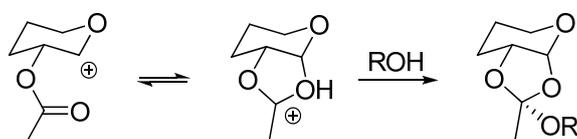
In dieser Arbeit liegt, wie schon erwähnt großes Interesse an der Synthese von β -Glucuroniden. Aufgrund des anchimeren Effekts (Nachbargruppeneffekt) der Acetyl-Schutzgruppe am C-2-Atom lassen sich diese mit ausgezeichneten Diastereoselektivitäten synthetisieren. Der Diastereomerenüberschuss liegt oft bei über 95 % (10).

Das Carbonyl-Sauerstoffatom der Acetyl-Schutzgruppe hat einen stabilisierenden Effekt auf die Carbokationspezies am anomeren Zentrum. Dadurch ist die α -Position quasi blockiert und der Angriff des Nucleophils bzw. des G-Akzeptors lediglich in β -Position möglich.



Formelschema 32: Stereoselektivität des G-Donors

Ein Nachteil dieses Effekts ist jedoch die mögliche Bildung von Orthoestern, welche als unerwünschte Nebenprodukte entstehen können. Als Abhilfe bedient man sich der sterisch anspruchsvollen Pivaloyl-Schutzgruppe welche aber schwerer abzuspalten ist



Formelschema 33: Bildung eines Orthoesters

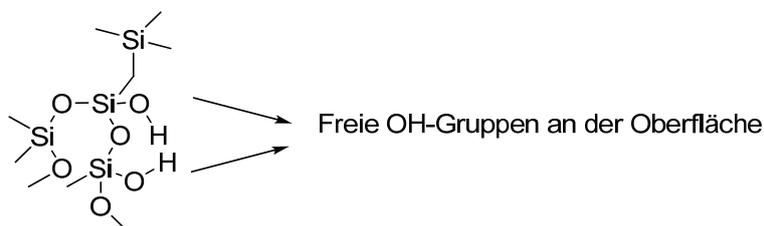
D) ANALYTISCHER TEIL

D.1. Chromatographie

Die Chromatographie ist heute eines der wichtigsten Instrumente der Chemiker um qualitative und quantitative Analysen durchführen zu können. Heutzutage gibt es schon viele verschiedene Varianten, doch bei allen ist das Prinzip mehr oder weniger das gleiche. Die Probe wird in einer mobilen Phase (kann gasförmig oder flüssig sein) durch eine stationäre Phase (Säulenchromatographie) oder über eine Oberfläche (Dünnschichtchromatographie) geführt. Durch die unterschiedliche Wechselwirkung der einzelnen Komponenten mit der stationären und mobilen Phase erlaubt einem diese zu trennen. Je stärker die Komponente mit der stationären Phase wechselwirkt, desto länger verweilt es in der Säule bzw. auf einem Punkt an der Oberfläche. Die Verweilzeit einer Komponente nennt man Retentionszeit. Um zu wissen wann eine Substanz die Säule verlässt, ist immer ein geeigneter Detektor angeschlossen. Bei einer Dünnschichtchromatographie erfolgt die Detektion an der Oberfläche (inneres Chromatogramm).

D.1.1. Dünnschichtchromatographie

Die einfachste Variante der Chromatographie und auch die ist die DC. Als stationäre Phase wird meist amorphes Kieselgel ($\text{Si}(\text{OH})_4$) verwendet. Die freien $-\text{OH}$ Gruppen erlauben es polare Verbindungen zu binden. Je polarer die Substanz ist desto stärker bindet diese an dem Kieselgel. Es kann sogar soweit gehen, dass die Verbindung nicht wandert. Als mobile Phase werden mehr oder weniger apolare Lösungsmittel verwendet. Die Kombination polare stationäre und apolare mobile Phase nennt man „Normalphasen-Chromatographie“.



Formel 12: Silicagel

Die Detektion erfolgt direkt auf der Platte, meist unter UV (254 oder 366 nm). Bei dieser Detektion gibt es 3 Möglichkeiten:

1. Die Substanz fluoresziert bei 254 oder 366 nm oder
2. auf das Kieselgel ist ein Fluoreszenzmarker (manganaktiviertes Zinksilikat; F₂₅₄) aufgebracht und die Komponenten schwächen die Fluoreszenz des Markers ab (=dunkle Flecken).
3. Färbung der Substanzen mit Cer-Molybdätdiphosphorsäure (starkes Oxidationsmittel)

D.1.2. Säulenchromatographie

In der Säulenchromatographie gibt es im grundlegenden 2 verschiedene Arten, die in wiederum viele unterschiedliche Methoden eingeteilt werden können.

Die erste Variante ist, wenn die Mobile Phase flüssig ist. Hier werden die Probenkomponenten in einem geeigneten Laufmittel (= mobile Phase) gelöst und auf die Säule, welche fest oder zähflüssig sein kann, aufgetragen. Das Prinzip ist jenes welches bereits beschrieben wurde. Die Komponenten verweilen unterschiedlich lang auf der stationären Phase, wodurch sie sich trennen. Die Detektoren werden je nach Probenkomponente gewählt (UV/VIS Detektor, RI Detektor, usw...).

Wie bei der Dünnschichtchromatographie beschrieben kann die stationäre Phase polar und die Mobile apolar sein (= normal Phase). Bei Trennproblemen mit sehr polaren Komponenten werden gegenteilige Systeme werden. Die stationäre Phase ist apolar und die mobile Phase polar. Diese Methode nennt man „Umkehrphasen-Chromatographie“. Die stationäre Phase ist eine auf Kieselgel basierende Matrix, wobei die fast alle –OH Gruppen durch Kohlenwasserstoffe besetzt sind. In der Regel sind dies C4, C8 und C18 Einheiten.

Weiters findet man heute Flüssig-Fest/Flüssig Chromatographie die bei kleinen Drücken (LC) oder bei Drücken bis zu einigen 100 bar (=HPLC; High Performance Liquid Chromatographie) arbeiten.

Die zweite Variante ist die Gas-Fest/Flüssig Chromatographie. Hier ist die mobile Phase gasförmig (meist Helium, da es sehr inert ist). Diese Chromatographie kann nur verwendet werden, wenn die Substanzen einen Siedepunkt bis 400°C haben. Das Trennprinzip ist wie bei LC und HPLC.

D.1.3. Detektion mittels Massenspektrometrie (MS)

D.1.3.1. Aufbau eines Massenspektrometers

Ein Massenspektrometer ist aus drei großen Bauteilen aufgebaut, Ionenquelle, Analysator und Detektor.

D.1.3.2. Ionenquelle

In der Ionenquelle wird das zu Analysierende ionisiert. Bei Gasen und verdampfba- ren Flüssigkeiten erfolgt dies über Elektronenstöße. Diese beschleunigten Elektronen schlagen aus dem Molekül weitere Elektronen heraus. Die dadurch entstandenen Radikalkationen zerfallen in kleinere Massenfragmente. Diese werden im Analysator nach dem Masse/Ladungs-Verhältnis getrennt und detektiert. Die Anzahl an Frag- menten und deren Masse/Ladungs-Verhältnis ist charakteristisch für jede Verbin- dung.

D.1.3.3. Analysator

Im Analysator werden die Massefragmente nach dem Masse/Ladungs-Verhältnis getrennt. Das Maß der Trennbarkeit hängt von der Auflösung des Massenspektrome- ters ab. Die Auflösung gibt die minimale Massendifferenz zweier Ionen an, die noch trennbar sind.

D.1.3.4. Detektor

Als Detektor wird meist ein Photomultiplier, ein Sekundärionenvervielfacher (SEV) oder ein Faraday-Auffänger verwendet.

D.1.3.5. Quadrupol-Massenspektrometer

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wird nur kurz auf einen Typ der Massenspektrometer eingegangen, der Quadrupol-Massenspektrometer, welcher auch für die Analysen bereit stand.

Das Quadrupol-Massenspektrometer ist ein Partialdruckmessgerät und arbeitet bei Hoch- bzw. Ultrahochvakuum. Die Ionisation erfolgt über Elektronenstöße. Die er- zeigten Ionen werden durch ein statisches, elektrisches Feld beschleunigt und flie- gen durch vier zentral und parallel zu einander liegenden Stabelektroden, deren Schnittpunkt mit einer Ebene ein Quadrat bilden → Quadrupol.

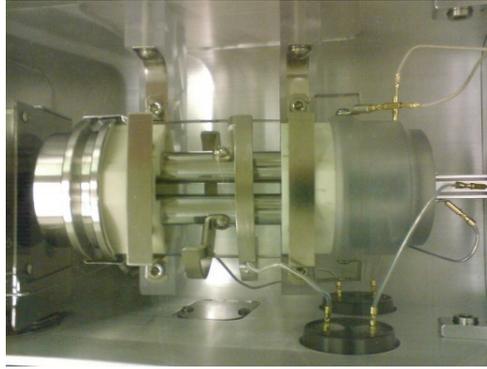


Abbildung 8: Quatrupol

Im Wechselfeld findet die Selektierung nach dem Masse/Ladungs-Verhältnis statt, sodass nur definierte Massefragmente das Feld durchlaufen und detektiert werden können.

Nach der Säulenchromatographie werden die Analyten vom Lösungsmittel getrennt und ionisiert. Das Entstehende Masse/Ladungsverhältnis lässt die Ionen in unterschiedlichen Bahnen in einem bewegten Magnetfeld Kreisen. Kreisen die Ionen in für sie spezifischen Bahnen können diese detektiert werden.

D.2. NMR (Kernspinresonanzspektroskopie)

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) untersucht die elektronische Umgebung einzelner Atome und die Wechselwirkung mit benachbarten Atomen. Dies ermöglicht es in der organischen und Biochemie eine Strukturaufklärung zu tätigen. Leider kann man nicht alle Isotope mittels NMR untersuchen. Nur Atome mit einem Kernspin ungleich Null können mittels NMR erfasst werden, das heißt nur Atome mit ungerader Nukleonen- oder Ordnungszahl können im NMR untersucht werden.

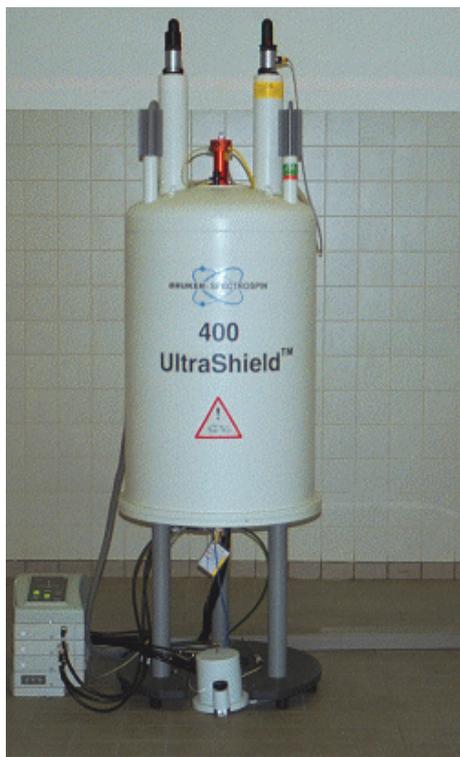


Abbildung 9: Bruker Avance DRX-400 Fouriertransfom Spektrometer

D.2.1. Theorie

Atomkerne sind nicht statisch sondern haben eine Eigenbewegung um ihre eigene Achse. Diese Rotation liegt der Kernspin jeden Atoms zugrunde und das magnetische Moment μ zugrunde. Die Atome können sich in einem Raum oder Lösung frei bewegen, doch sobald man die Atome einem äußeres Magnetfeld aussetzt, kann es im Prinzip zwei Orientierungen annehmen: Parallel oder Antiparallel zum äußeren Magnetfeld. Der energieärmere Zustand ist die parallele Orientierung und die energetisch weniger vorteilhafte Orientierung ist die Antiparallele. Mit der Existenz dieser beiden energetisch unterschiedlichen Zustände ist die Voraussetzung für Spektroskopie erfüllt. Der Übergang in den antiparallelen Zustand erfordert Energie. Ver-

wendet man Energie geeigneter Frequenz kommt es zur Resonanz, d.h. die Atomkerne absorbieren die benötigte Energie um vom parallelen in den antiparallelen Zustand zu wechseln.

D.2.1.1. Methoden zur Strukturaufklärung in der organischen Chemie

Um die Struktur einer Probe zu ermitteln, misst man die chemische Verschiebung von ^1H und ^{13}C Kernen gegen eine Standardsubstanz. Als Standardsubstanz setzte sich Trimethylsilan (TMS) durch. Die Methylgruppen haben nach Definition eine Verschiebung von Null.

Speziell in organischen Molekülen hängt die Verschiebung stark von den Funktionellengruppen im Molekül ab, daher ist ein NMR Spektrum charakteristisch für jede Substanz.

D.2.1.2. Chemische Verschiebung δ

Die Wasserstoffatome in einem organischen Molekül unterliegen nicht immer der gleichen elektronischen Umgebung. Diese wird durch funktionelle Gruppen, wie OH-, Halogene, oder anderen Heteroatomen verursacht. Durch diese Änderung der elektronischen Umgebung kann ein ^1H mehr Energien um vom parallelen zum antiparallelen Zustand zu wechseln. Dieser Unterschied zeigt sich in der chemischen Verschiebung wieder.

Wasserstoffatom	Chemische Verschiebung δ
Primäres Alkyl	0,8-1,0
Sekundäres Alkyl	1,2-1,4
Halogenalkane	3,1-3,8
Ether	3,3-3,9
Alkohole	3,3-4,0
Ketone	2,1-2,6
Aldehyde	9,5-9,6
Aromatische	6,0-9,5

Tabelle 3: Chemische Verschiebung einiger Funktioneller Gruppen

Je elektronegativer die benachbarten Heteroatome sind, desto stärker wird das ^1H entschirmt und desto größer ist die chemische Verschiebung.

Heteroatome beeinflussen nur die chemische Verschiebung des ^1H Atoms. Doch diese können auch miteinander in Wechselwirkung treten. Diese Wechselwirkung wird als Spin-Spin Kopplung bezeichnet.

D.2.1.3. Spin-Spin Kopplung

Bei der NMR kann man über den Spin, den jedes Atom in einem Molekül hat, Aufschluss über die Reinheit und/oder Struktur einer Verbindung ermitteln. In der organischen Chemie sind die Atome ^1H und ^{13}C von größter Bedeutung. Auch weitere Kerne zeigen NMR-Aktivität:

Kern	NMR-Aktivität	Natürliche Häufigkeit in %	Kern	NMR-Aktivität	Natürliche Häufigkeit in %
^1H	ja	99,985	^{16}O	nein	99,759
^2H (D)	ja	0,015	^{17}O	ja	0,037
^3H (T)	ja	0	^{18}O	nein	0,204
^{12}C	nein	98,98	^{19}F	ja	100
^{13}C	ja	1,11	^{31}P	ja	100

Tabelle 4: Überblick der NMR aktiven Kerne

Damit entsteht bei der charakteristischen chemischen Verschiebung eines Atoms eine für seine Umgebung charakteristische Aufspaltung des Signals, aus der Informationen über die Molekülstruktur abgeleitet werden können.

Der Kern eines Atoms kann mit einem benachbarten Atomkern in Wechselwirkung treten. Das kann entweder direkt (durch den Raum) oder indirekt (über die Bindungselektronen zwischen den Kernen) geschehen. Bei einer flüssigen Probe spielt die direkte Kopplung nur eine untergeordnete Rolle, hier treten vor allem Kopplungseffekte über die Bindungen hinweg auf. Die Kopplung entsteht, weil sich die Spins der Bindungselektronen in Nachbarschaft zu einem Kernspin in charakteristischer Weise

ausrichten. Der Kern am anderen Ende der Bindung erfährt seinerseits diese Einflussnahme auf die Elektronenspins und nimmt dazu eine antiparallele oder parallele Orientierung ein. Damit gibt es für zwei Kernspins A und B vier Möglichkeiten der Ausrichtung zueinander: ($\uparrow\downarrow$), ($\downarrow\uparrow$), ($\uparrow\uparrow$) und ($\downarrow\downarrow$).

Abhängig von der Orientierung zum äußeren Magnetfeld wird das effektive Magnetfeld am Kern selber entweder verstärkt (beide Elektronenspins parallel zum Magnetfeld ausgerichtet), abgeschwächt (beide Elektronenspins antiparallel zum Magnetfeld ausgerichtet) oder nicht beeinflusst. Da die Kombinationen ($\uparrow\downarrow$) und ($\downarrow\uparrow$) energetisch identisch sind, zeigt der Kern Resonanz bei drei Frequenzen. Im Spektrum führt das zu einer Aufspaltung des Signals in drei einzelne Signale. Sind außer dem einen benachbarten Kern noch weitere vorhanden, führt das entsprechend den zusätzlichen Kombinationsmöglichkeiten zu einer weiteren Aufspaltung des Signals. Dabei lässt sich die Anzahl der Signale, die sogenannte Multiplizität, allgemein mit der Formel $2 \cdot n \cdot I + 1$ berechnen. Darin ist I der Kernspin des betrachteten Kerns und n die Anzahl chemisch äquivalenter koppelnder Kerne. Die relative Intensität der einzelnen Signale kann man dem Pascalschen Dreieck entnehmen.

Die Stärke der Kopplung wird durch die Kopplungskonstante J wiedergegeben. Diese ist charakteristisch für die Kopplung zweier unterschiedlicher ^1H Atome.

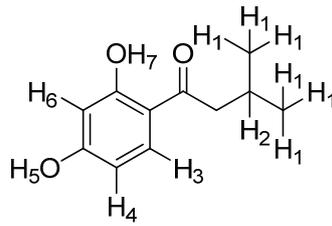
D.2.1.4. Integration

Die Integration ist denkbar einfach bei der NMR. Wie bei jeder anderen Spektroskopie erhält man Peaks. Stellt man die Fläche der Probenpeaks in Relation zum Standard kann man die Anzahl an ^1H Atomen bestimmen, die auf einem C-Atom sind.

D.2.1.5. ^{13}C Spektrum

Neben der ^1H kann man auch das ^{13}C messen. Der Nachteil an dieser Methode ist, das ^{13}C viel seltener als ^1H Atome sind. Das bedeutet erstens die Messung dauert erheblich länger und man benötigt mehr Probensubstanz, um ein ^{13}C Spektrum aufzunehmen. Der Vorteil wiederum ist das eine Kopplung von zwei ^{13}C Atomen sehr unwahrscheinlich und daher auch vernachlässigbar ist.

D.2.2. Beispiel zur Auswertung eines ^1H Spektrums



Formel 13: 2,4-Dimethoxybenzoesäureisopropylester

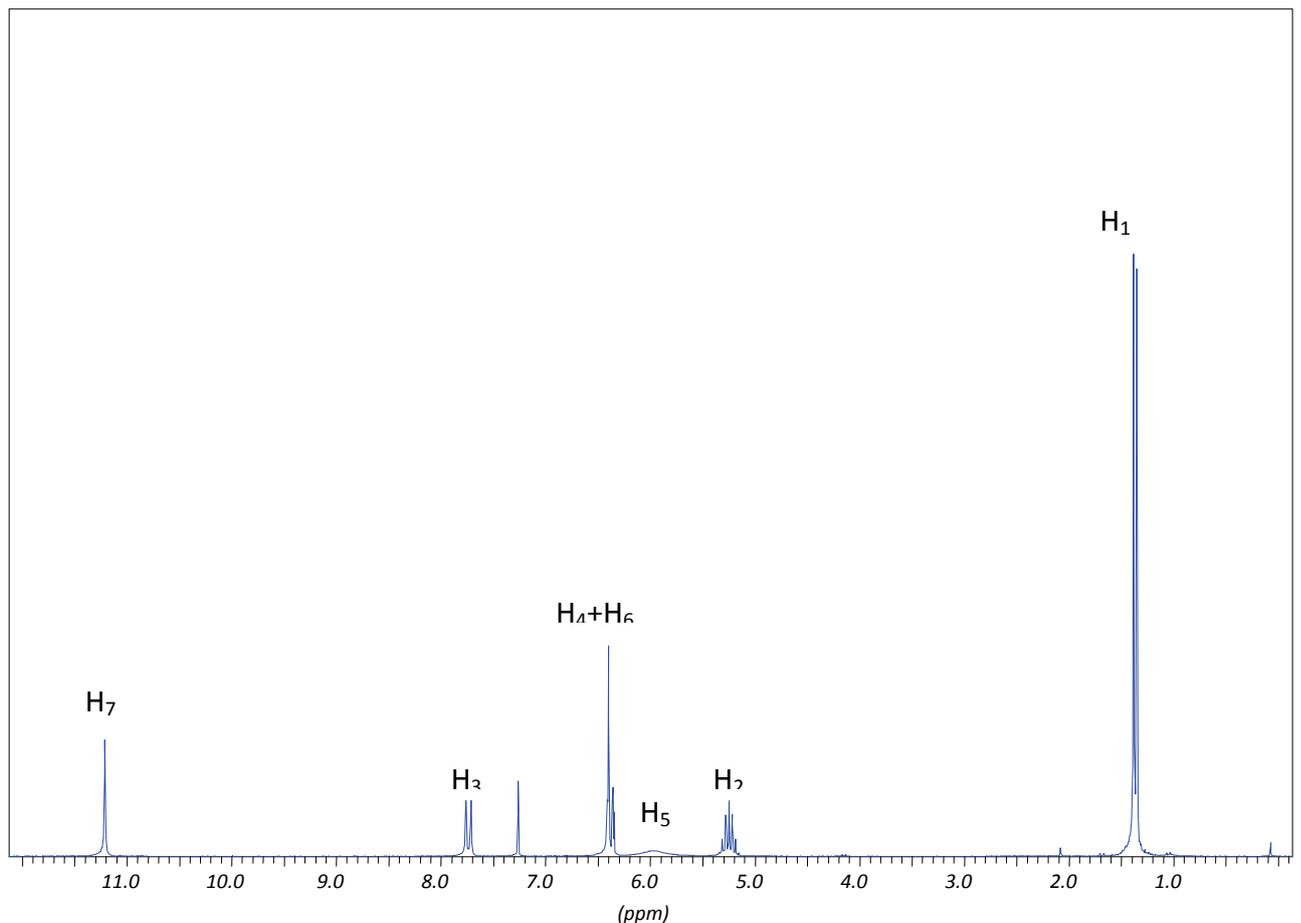
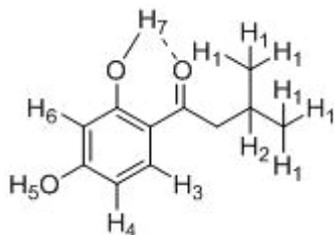


Abbildung 10: Gesamtes NMR-Spektrum von 2,4-Dimethoxybenzoesäureisopropylester

Beginnen wir von links nach rechts mit der Identifikation der Peaks. Der erste Peak ist ein Singulett, sprich das H-Atom koppelt mit keinem anderen H-Atom. In diesem Fall kommen nur 2 Hs in Frage und zwar H₅ und H₇. Da das H₇ Atom eine partielle Bindung zum Carboxylsauerstoff hat, ist es nicht so delokalisiert wie das H₅ Atom und daher ergibt erstens einen sehr scharfen Peak und zweitens erklärt es die sehr

hohe Verschiebung, da es durch die zusätzliche Wasserstoff-Brücke azider ist (siehe Formel 14).



Formel 14: 2,4-Dimethoxybenzoesäureisopropylester, Wechselwirkung zwischen dem phenolischen H-Atom und dem Carbonyl O-Atom

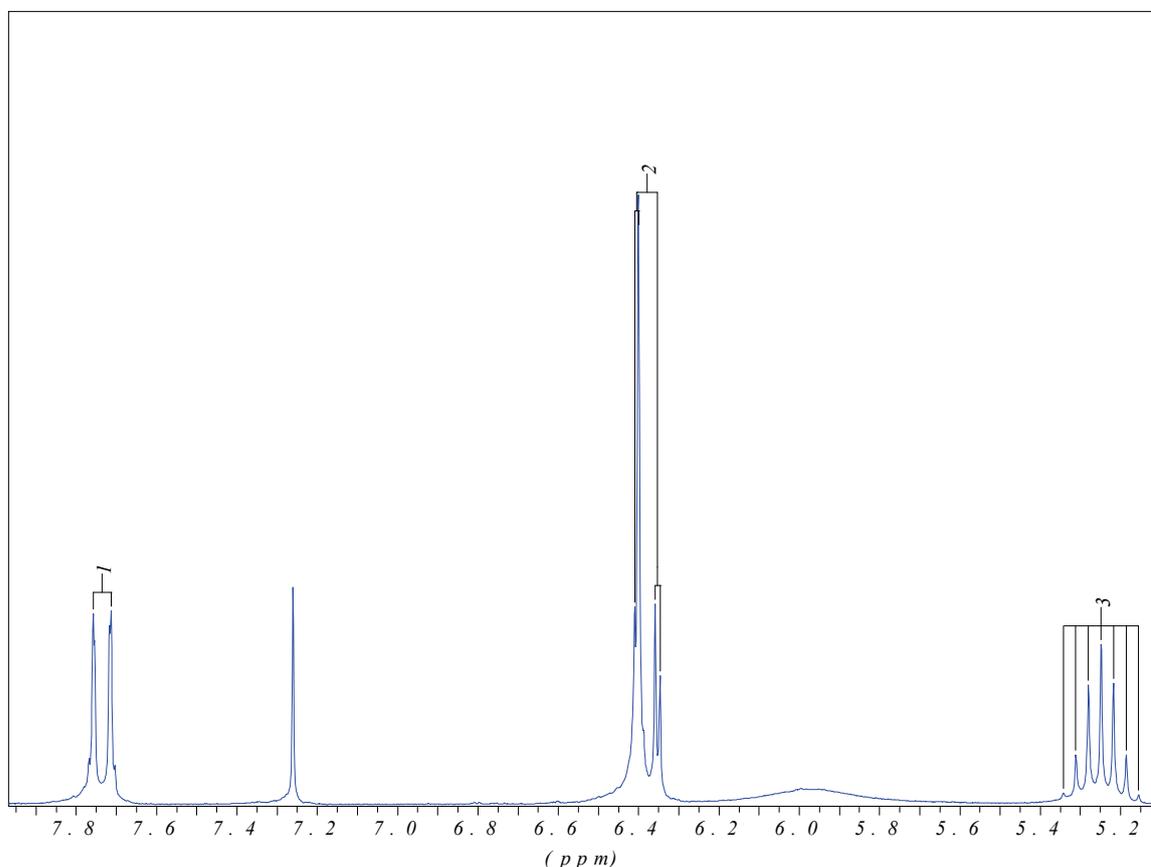
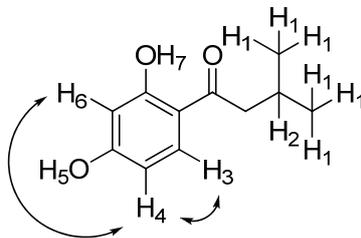


Abbildung 11: Ausschnitt des NMR Spektrums (Duplett, Duplett auf Duplett und Heptett)

Zoomt man nun weiter rein erkennt man beim nächsten Peak, dass dieser ein schönes Duplett ist. Die Wahl fällt deshalb auf H₃ da dieser nur mit H₄ koppeln kann. Eine Parakopplung mit H₆ ist durch die große Distanz nicht möglich. Der nächste Peak ist ein sogenanntes Duplett auf Duplett, welches beim Koppeln mit 2 verschiedenen Partnern auftritt. In diesem Fall koppelt H₄, welches mit H₃ und H₆ koppelt. Wie man sieht ist eine Metakopplung in einem Ring möglich, obwohl diese kaum zu sehen ist.

Zusätzlich fällt in diesen Peak auch H₆, welches durch Kopplung mit H₄ ein Duplett ergibt.



Formel 15: Kopplung von H₄ mit H₃ bzw. mit H₆

Ein Laie würde den Hügel gar nicht beachten, aber auch dieser ist durch ein H-Atom entstanden und zwar von H₅. Da dieses sehr delokalisiert ist, entsteht ein sehr breiter Peak (breites Singulett).

Als Nächstes kommt das Heptett. Man sieht hier schon, je größer die Moleküle und je komplexer sie werden, desto höher wird die Multiplizität in einem Spektrum. Dieses Heptett kann man eindeutig H₂ zuweisen, da es mit 6 gleichen H Atomen koppelt. Man würde annehmen, dass die H Atome die näher beim Sauerstoff sind, eine andere Kopplung zulassen würden. Doch Aufgrund der freien Drehbarkeit der Bindung sind alle H₁ Atome gleich.

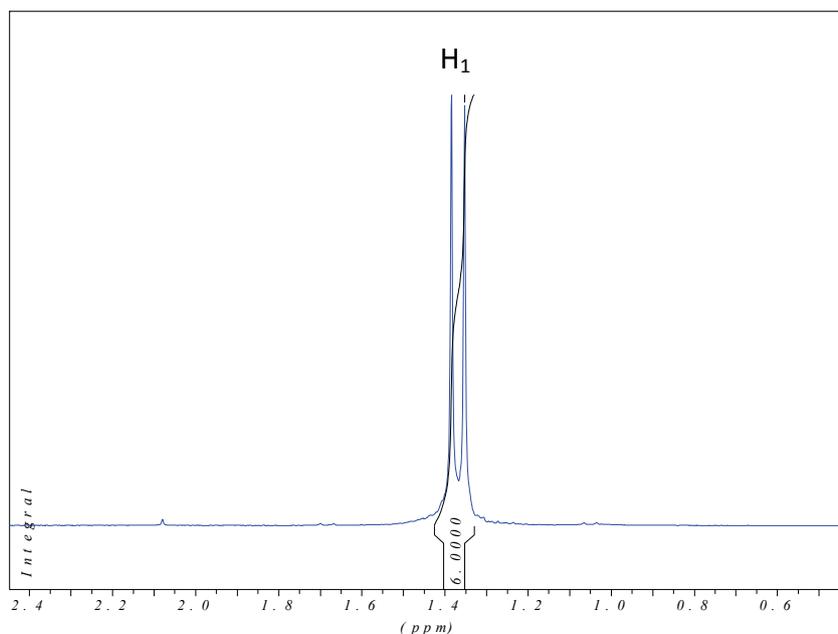


Abbildung 12: NMR Spektrum (Duplett), Integriert

Der letzte Peak ist ebenfalls ein Duplett. Die Höhe zeigt schon eindeutig, dass dieser Peak dem H₁ zu zuschreiben ist. H₁ kann nur mit H₂ koppeln, deshalb das Duplett.

E) EXPERIMENTELLER TEIL

E.1. Allgemeine Anmerkungen

Falls nichts Gegenteiliges vermerkt ist, wurden alle Reagenzien von kommerziellen Anbietern ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Absolutes N,N'-Dimethylformamid (Acros) und absolutes Ethanol (Merck) wurden über Molekularsieb 4 Å gelagert. Die Lösungsmittel Toluol, Methanol, Dichlormethan, Diethylether und Tetrahydrofuran wurden in einer PURESOLV-Anlage von *it – innovative technology inc.* absolutiert. Die kommerziell erhältlichen Lithierungsreagenzien PhLi und t-BuLi wurden ohne weitere Gehaltsbestimmungen unter Verwendung des deklarierten Wertes eingesetzt. Natriumhydrid als 60 %ige Dispersion in Mineralöl wurde vor dem Gebrauch mit absolutem PE gewaschen und anschließend in reiner Form eingesetzt.

E.2. Chromatographische Methoden

E.2.1. Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographie wurde auf DC-Alufolien (Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄) durchgeführt.

E.2.2. Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Aufreinigung wurde grundsätzlich auf einem *Büchi Sepacore™ Flash System* mit folgenden Komponenten durchgeführt:

- Pump-System: 2 x Büchi Pump Module C-605
 Büchi Pump Manager C-615
- Detektor: Büchi UV Photometer C-635
- Fraktionssammler: Büchi Fraction Collector C-660

Die dazugehörigen PP- bzw. Glas-Kartuschen wurden mit Kieselgel 60 (Si-OH, Merck, 40-63 µm) befüllt.

Als Laufmittel wurden destillierte Lösungsmittel verwendet. Die Zusammensetzung der jeweiligen mobilen Phase sowie die verwendete Menge an Kieselgel sind bei der jeweiligen Synthese angeführt.

E.3. Physikalische Analysemethoden

E.3.1. GC/MS Messungen

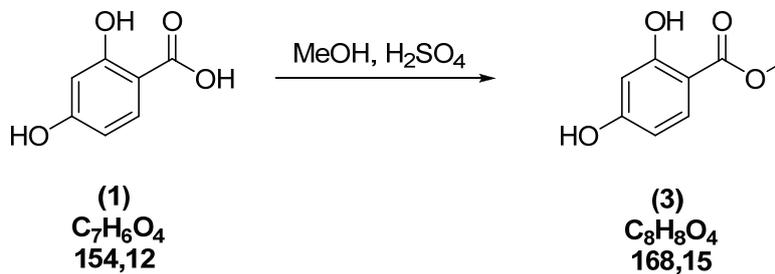
GC/MS Messungen erfolgten auf einer GC/MS Kopplung von Thermo Finnigan; Gaschromatograph: GC 8000 Top mit einer BGB5 Säule ($l=30$ m, $d_i=0,32$ mm, 1 μ m Schichtdicke); Massenspektrometer: Voyager Quadrupol (Elektronenstoßionisation)

E.3.2. NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden auf einem Bruker DPX-200 bzw. Avance DRX-400 Fouriertransform-Spektrometer gemessen. Die Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan referenziert und in ppm angegeben. Zur Kalibrierung wurden die Lösungsmittelsignale [29] herangezogen. Die Multiplizitäten sind wie folgt ausgewiesen: s=Singulett, d=Dublett, t=Triplett, q=Quartett, m=Multipllett, b=breites Signal.

E.4. Synthese der Modelverbindungen (11)

E.4.1. 2,4-Dimethoxybenzoesäuremethylester (3)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
2,4-Dihydroxybenzoesäure (1)		130mmol	154,12g/mol	20g
Methanol				300mL
Schwefelsäure (konz.)			98%	3mL

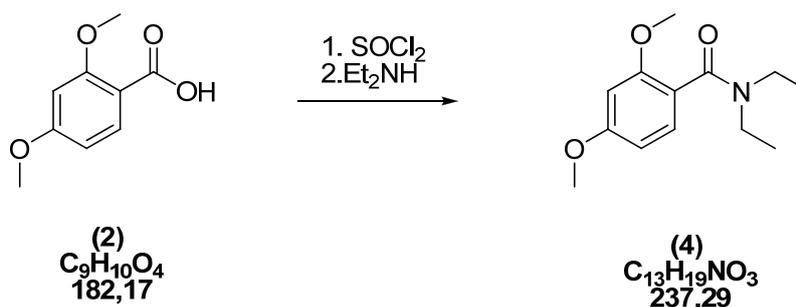
2,4-Dihydroxybenzoesäure (1) wurde in einen 500mL Rundkolben eingewogen, in 300mL Methanol gelöst, mit ca. 2mL Schwefelsäure (Konz.) als Katalysator versetzt und die Lösung für 48h auf Rückfluss gekocht. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mittels Rotavapor auf die Hälfte eingengt, und die Mischung im Scheidetrichter mit 400mL Wasser versetzt, sodass das Produkt ausfiel. Danach wurde dreimal mit 200mL Chloroform extrahiert. Da sich das Produkt nur schwer im Chloroform löste, musste lange und intensiv geschüttelt werden. Der, nach der Extraktion übrig gebliebene Feststoff wurde mit 150mL EE in Lösung gebracht und separat aufgehoben. Die organisch(en) Phase(n) wurden dann mit Na-Bicarbonatlösung neutral gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Rohausbeute betrug nach abfiltrieren des Na_2SO_4 und abdampfen des LSM: 18,88g (86,4% der Theorie). Das Rohprodukt wurde zur Reinigung aus Toluol umkristallisiert und der NS ab mit PE gewaschen.

Als Ausbeute erhält man: 16,4g (75%) weiß, grauen Feststoff.

Rf-Wert (PE/EE = 5:1): 0,290

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 11.02 (bs, 1H), 7.73 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.33 - 6.44 (m, 2H), 5.79 (bs, 1H), 3.91 (s, 3H) ppm

E.4.2. N,N-Diethyl-2,4-dimethoxybenzamid (4) (Variante1)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
2,4-Dimethoxybenzoesäure (2)	1	80mmol	98%	14,57g
Thionylchlorid	>1	/	~99%	100mL
Diethylamin	3	240	p.a. 99%	17,55g

2,4-Dimethoxybenzoesäure (**2**) wurde im Dreihalskolben eingewogen, in Thionylchlorid gelöst, mit 3 Tropfen DMF (als Katalysator) versetzt und für 12-15h bei RT gerührt. Das entweichende Gas (SO₂, HCl) wurde abgeleitet.

Als Übergangsprodukt bildete sich ein tiefviolettes Säurechlorid, welches nach Abdampfen des Thionylchlorids teilweise fest wurde. Das eingeeengte Zwischenprodukt wurde dann mit ca. 160mL abs. Methylenchlorid verdünnt, im Eisbad gekühlt und eine Lösung aus 17,55g Diethylamin in 80mL abs. Methylenchlorid langsam zugegeben. Nach Ende der Zugabe wurde für 15h auf RT unter Argon Atmosphäre gerührt.

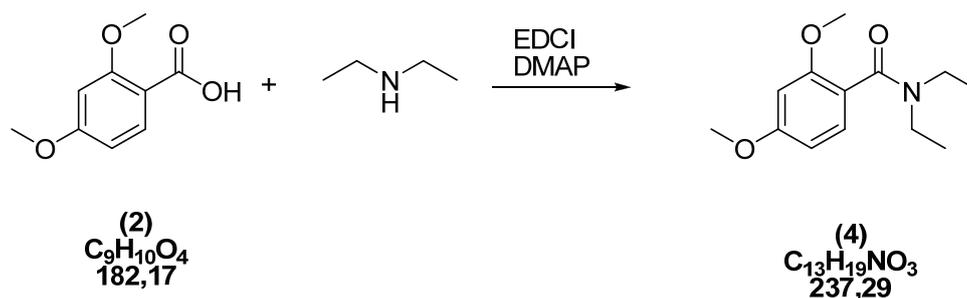
Die Reaktionsmischung wurde dann mit 400mL Methylenchlorid in einen Scheidetrichter überführt und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotavapor abdestilliert und mittels SC (90g Kieselgel als Vorsäule; 440g als Hauptsäule) gereinigt, PE/EE von 2:1 auf 1:1.

Ausbeute: 15g (79%) gelbes Öl/Harz.

DC: PE/EE: 2:1 Rf-Wert: 0,207

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 7.11 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.52 - 6.42 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.55 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 3.15 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.02 (t, J = 7.2 Hz, 3H) ppm

E.4.3. N,N-Diethyl-2,4-dimethoxybenzamid (4) (Variante2)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
2,4-Dimethoxybenzoesäure (2)	1	0,099	182,18g/mol	18,0g
Et ₂ NH	1,5	0,148	73,14 g/mol	10,86g
EDCI	1,2	0,119	191,70 g/mol	22,77g
DMAP	0,2	0,019	122,17 g/mol	2,41g
Abs. CH ₂ Cl ₂	>1	/		500mL

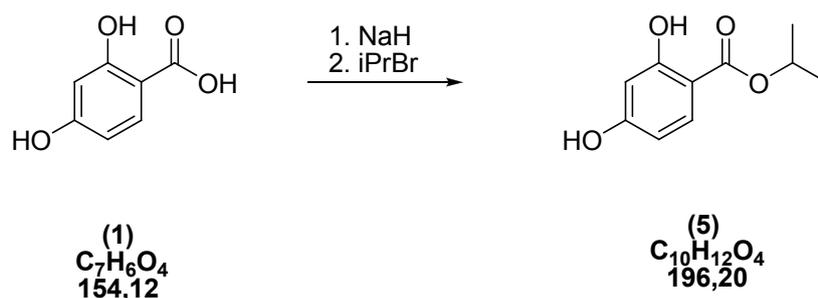
Alle Reagenzien wurden zusammen in einen 1000mL Rundkolben eingewogen und in 500mL abs. CH₂Cl₂ gelöst. Die orange Lösung wurde für 24h bei RT unter Ar-Atmosphäre gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit ca. 200mL Wasser und 200mL 2N HCl im Scheidetrichter extrahiert. Die organische Phase wurde danach mit ca. 200mL 2N NaOH gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet.

Die Reaktionsmischung wurde dann mit 400mL Methylenchlorid in einen Scheidetrichter überführt und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotavapor abdestilliert und mit SC (90g Kieselgel als Vorsäule; 440g als Hauptsäule), mittels Gradientenelution mit PE/EE von 2:1 auf 1:1 gereinigt.

Als Ausbeute wurden 16,8g (72%) gelbes Öl erhalten.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 7.11 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.52 - 6.42 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.55 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 3.15 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.02 (t, J = 7.2 Hz, 3H) ppm

E.4.4. 2,4-Dimethoxybenzoesäureisopropylester (5)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
2,4-Dihydroxybenzoesäure (1)	1	32,4mmol		5,0g
Natriumhydrid	1	32,4mmol		0,78g
Isopropylbromid	1,1	35,7mmol		4,38g
DMF				150mL

2,4-Dihydroxybenzoesäure **(1)** wurde in einen 250mL Rundkolben eingewogen und in 150mL DMF und auf 0°C abgekühlt. Bevor das NaH der Reaktionsmischung zugegeben wurde, wurde es in einer Nutsche mit THF gewaschen. Das gewaschene NaH wurde dann portionsweise hinzugegeben und die Lösung langsam auf RT aufgewärmt. Anschließend wurden 3mL Isopropylbromid zugefügt und die Lösung auf 80°C erhitzt. Die Mischung wurde dann o/n unter Rückfluss erhitzt.

Nachdem das DMF mittels Rotavapor vollständig abgetrennt wurde, wurde der Rückstand in 200mL Chloroform aufgenommen, mit 200mL 1N HCl angesäuert und die organische Phase mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend noch mit 100mL Chloroform extrahiert und die gesammelte organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Das Chloroform am Rotavapor vollständig entfernt und das Rohprodukt mittels SC (PE/EE5:1) aufgereinigt.

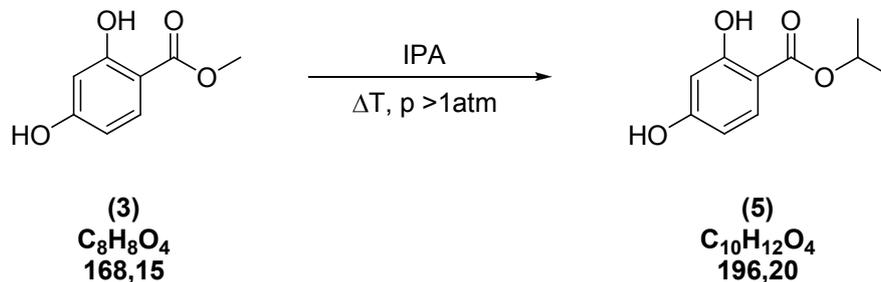
Ausbeute: 4,4g (69%) weißer Feststoff.

DC: PE/EE/HAc 2:1:0,001; Rf-Wert: 0,529

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 11.27 (s, 1H), 7.73 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.44 - 6.34 (m, 2H), 5.24 (sept., J = 6.3 Hz, 1H), 1.37 (d, J = 6.1 Hz, 6H) ppm

E.4.5. 2,4-Dimethoxybenzoesäureisopropylester (Mikrowellenversuch 1)

(5)



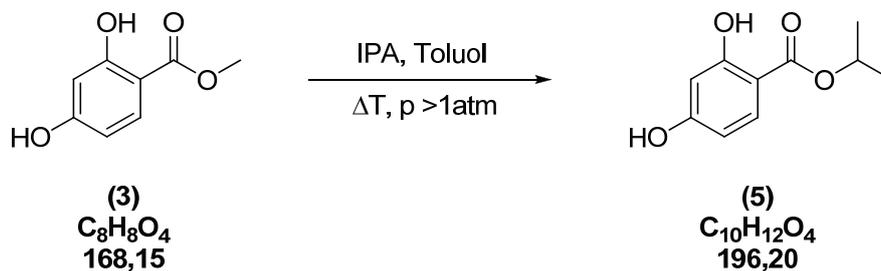
Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(3)	1	0,29mmol	168,15g/mol	50mg
IPA			61,19g/mol	4mL
K ₂ CO ₃			138,20g/mol	1SpSp

50mg **(3)** wurden in ein Mikrowellen-Vial eingewogen, mit 4mL IPA gelöst und mit einer Spatelspitze K₂CO₃ versetzt. Nach Zugabe eines Magnetkerns wurde das Vial mit einem Septum verschlossen. Die Reaktion erfolgte in einem Mikrowellen-Reaktionsapparat bei: 28W (max. 50W), 130°C, 4,4bar, 30sec.

Nach Ende der Reaktion wurde das Produkt nicht aufgearbeitet, es wurde lediglich eine Analyse mittels DC (PE/EE = 5:1) und LC-MS durchgeführt.

E.4.6. 2,4-Dimethoxybenzoesäureisopropylester (Mikrowellenversuch 2)

(5)

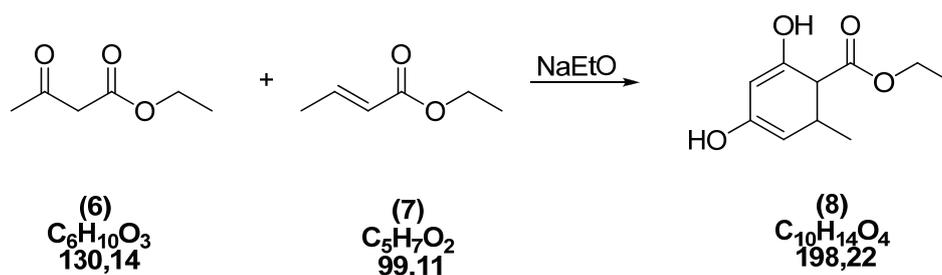


Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(3)	1	0,29mmol	168,15g/mol	50mg
IPA	~90	26,0mmol	61,19g/mol	2mL
Toluol			92,14g/mol	2mL
K ₂ CO ₃			138,20g/mol	1SpSp

50mg **(3)** wurden in ein Mikrowellen-Vial eingewogen, in 4mL eines 1:1 Gemisches aus: IPA und Toluol gelöst und mit einer Spatelspitze K₂CO₃ versetzt. Nach Zugabe eines Magnetskerns wurde das Vial mit einem Septum verschlossen. Die Reaktion erfolgte in einem Mikrowellen-Reaktionsapparat bei: 28W (max. 50W), 130°C, 5,0bar, 60min.

Nach Ende der Reaktion wurde das Produkt nicht aufgearbeitet, es wurde lediglich eine Analyse mittels DC (PE/EE = 5:1) und LC-MS durchgeführt.

E.4.7. Ethyl-2,4-dihydroxy-6-methylcyclohexa-2,4-dien-carboxylat (8)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
Natrium	1	1mol		23g
Ethanol abs.				300mL
Ethylacetoacetat (6)	1	1mol		126g
Ethylcrotonat (7)	0,9	0,9mol		102g

Das Natrium wurde, mit einem Messer in kleine Stücke geschnitten und portionsweise im EtOH „gelöst“ danach der 1L Dreihalskolben mit einem mechanischem Rührer, einem Rückflusskühler und einem Tropftrichter versehen. Nachdem sich das Na-Ethanolat auf RT abgekühlt hatte, wurde langsam Ethylacetoacetat zugetropft und die Mischung für 40min auf RT gerührt, bevor das Ethylcrotonat folgte. Im Anschluss wurde das Gemisch für 2h auf Rückfluss gekocht. Die Mischung wurde dann zuerst mittels Wasserbad und anschließend mittels Eisbad gekühlt, mit ca. 200mL H_2SO_4 ($\omega=20\%$) neutralisiert und mit 200mL Wasser verdünnt. Der entstandene NS wird abfiltriert und die wässrige Phase mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das LSM ab Rotavapor entfernt, sodass ein weißer NS entstand. Die vereinten NS wurden aus PE umkristallisiert, bei -18°C ausgefroren und der Feststoff bei 30°C in vacuo getrocknet. Ausbeute: 128g (65%) schmutzig weißer Feststoff.

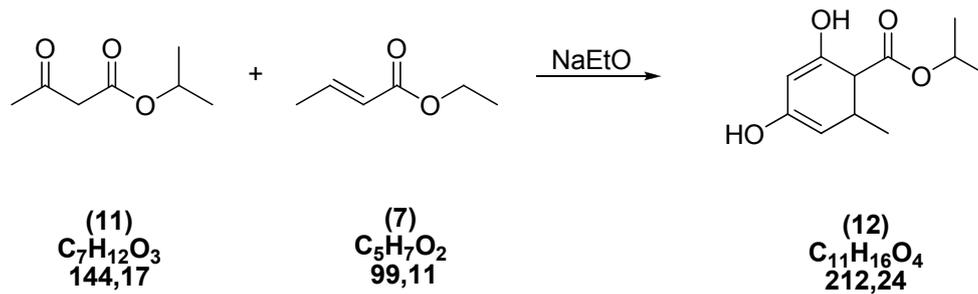


Abbildung 14: Versuchsaufbau für (8)



Abbildung 13: Na-Ethanolatherstellung

E.4.8. Isopropyl-2,4-dihydroxy-6-methylcyclohexa-2,4-dien-carboxylat (12)

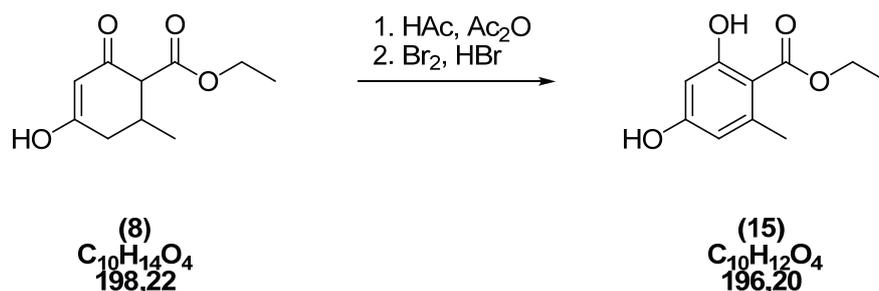


Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
Natrium		1mol		23g
Isopropylacetoacetat (11)		1mol		126g
Ethylcrotonat (7)		0,9mol		102g
Ethanol abs.				300mL

Das Natrium wurde, mit einem Messer in kleine Stücke geschnitten und portionsweise im EtOH „gelöst“. Danach wurde der 1L Dreihalskolben mit einem mechanischem Rührer, einem Rückflusskühler und einem Tropftrichter versehen. Nachdem sich das Na-Ethanolat auf RT abgekühlt hatte, wurde langsam Isopropylacetoacetat (11) zutropft, sodass sich die Mischung gelb färbte. Die breiige Masse wurde dann für 40min auf RT gerührt, bevor das Ethylcrotonat (7) folgte. Im Anschluss wurde das Gemisch für 2h unter Rückfluss gekocht. Die Mischung wurde dann zuerst mittels Wasserbad und anschließend mittels Eisbad gekühlt, mit ca. 150mL H₂SO₄ (ω=20%) neutralisiert pH~2. Der entstandene NS (Natriumsulfat) wurde abfiltriert, das Filtrat mit 200mL Wasser verdünnt und die wässrige Phase mit 2x150mL Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das LSM ab Rotavapor entfernt, sodass ein weißer NS entstand.

Die vereinten NS wurden aus einer Mischung aus PE/Toluol (2:1) umkristallisiert, bei -18°C ausgefroren, abgenutscht und mit eisgekühltem PE gewaschen. Nachdem der Feststoff bei 30°C in vacuo getrocknet wurde, wurden 106,78g (50,3%) als Ausbeute erhalten.

E.4.9. 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoessäureethylester (15)



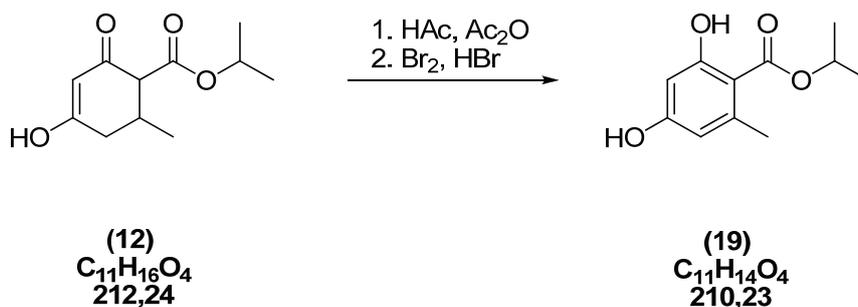
Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(8)	1	0,1mol		19,82g
Brom	1	0,1mol	159,8g/mol, in 10mL HAc	16,0g
Bromwasserstoffsäure	0,1	0,1mol	48% ($\rho=1,482\text{g/mL}$)	1,04mL
Essigsäureanhydrid	3	0,3mol		30mL
Essigsäure	10	1mol	99%	60mL
Wasser	33	3,3mol		60mL

(8) wurde in der HAc gelöst, Ac₂O zugegeben und leicht erwärmt. Anschließend wurde die Lösung im Kryostat auf 12°C abgekühlt und das Br₂, welches in HAc gelöst war, langsam zugegeben. Nach Beendigung der Zugabe wurde das entstandene HBr_(g) mit N₂ ausgetrieben (45min). Die Mischung wurde dann in einen Rundkolben überführt und für 2h auf Rückfluss gesiedet. Als nächstes wurden 60mL Wasser und 1,04mL HBr(48%) zugegeben und für weitere 2h auf Rückfluss gesiedet. Nachdem die Lösung auf RT abgekühlt war, wurde sie mit 400mL Wasser verdünnt und mit 2x200mL Ether extrahiert. Die gesammelte organische Phase wurde mit 2x150mL Wasser und 5x100mL ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das LSM mittels Rotavapor entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittel SC (90g Kieselgel 60; PE/EE 2:1) aufgereinigt. Es wurden 5,7g (29%) Feststoff erhalten.



Abbildung 15: Kryostat

E.4.10. 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureisopropylester (19)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(12)	1	0,2mol	212,24g/mol	42,45g
Brom	1	0,2mol	132g in 20mL HAc	31,96g
Bromwasserstoffsäure	0,1	20mmol	48% ($\rho=1,482\text{g/mL}$)	2,08mL
Essigsäureanhydrid	3	0,6mol		60mL
Essigsäure	10	2mol	99%	120mL
Wasser	33	6,6mol		120mL

(12) wurde in HAc gelöst, Ac₂O zugegeben und leicht erwärmt. Anschließend wurde die Lösung im Kryostat auf 12°C abgekühlt und das, welches in HAc gelöst war Br₂ zugegeben langsam zugegeben. Nach Beendigung der Zugabe wurde das entstandene HBr_(g) mit N₂ ausgetrieben (ca. 45min). Die Mischung wurde dann in einen Rundkolben überführt und für 2h unter Rückfluss gesiedet. Als nächstes werden

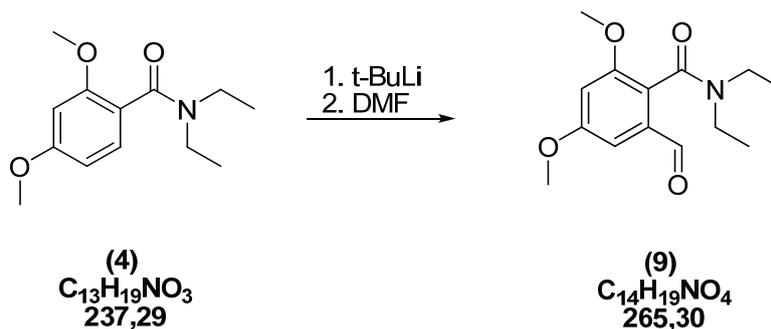
Experimenteller Teil

120mL Wasser und 2,08mL HBr (48%) zugegeben und für weitere 2h unter Rückfluss gesiedet. Nachdem die Lösung auf RT abgekühlt war, wurde sie mit 500mL Wasser verdünnt und mit 3x300mL Ether extrahiert. Die gesammelte organische Phase wurde mit 3x200mL Wasser und 5x200mL ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das LSM mittels Rotavapor entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels SC (90g Kieselgel 60; PE/EE 2:1) aufgereinigt. Es wurden 4,6 (11%) Feststoff erhalten.



Abbildung 16: Der Brominator

E.4.11. N,N-Diethyl-2-formyl-4,6-dimethoxybenzamid (9)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
N,N-Diethyl-2,4-dimethoxybenzamid (4)	1	30mmol		7,12g
Tertiärbutyl-Lithium	2,5	75mmol	1,7M in THF	44,3mL
DMF	3	90mmol		6,6g
THF abs.				70mL

(4) wurde in einen 250mL Dreihalskolben eingewogen, in 70mL THF gelöst und unter Ar-Atmosphäre in einer Aceton/N₂ (1)- Kältemischung auf -75°C abgekühlt. Durch ein Septum wurde dann langsam, tropfenweise t-BuLi zugegeben. Die Reaktion war stark exotherm und es musste darauf geachtet werden, dass die Temperatur nicht wesentlich über -60°C anstieg. Nach der Zugabe wurde die Mischung für 2h bei -60—75°C gerührt. Anschließend wurde DMF, zugegeben und das Gemisch innerhalb von 2h auf 0°C erwärmt. Zur Aufarbeitung wurde die Mischung in einen Scheidetrichter überführt, mit 300mL NH₄Cl-Lsg. versetzt und mit 3x100mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die gesammelte organische Phase wurde mit 150mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen und mit 100mL CH₂Cl₂ rückextrahiert. Danach wurde sie über Na₂SO₄ getrocknet, das Trocknungsmittel abfiltriert und das LSM an Rotavapor abgedampft. Das Rohprodukt wurde dann säulenchromatographisch über 90g Kieselgel, mit PE/EE 2:1gereinigt.

Als Ausbeute erhält man 5,52g (69%) gelbes Harz.

DC: (PE/EE 2:1) Rf-Wert: 0,594



Abbildung 18: Flüssigstickstoff



Abbildung 17: Herstellung einer flüssig Stickstoff / Aceton Kältemischung

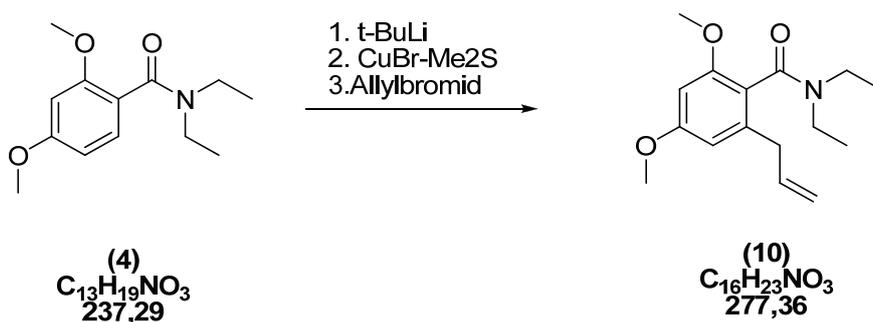


Abbildung 20: Stickstoff / Aceton Kältemischung



Abbildung 19: Versuchsaufbau für Lithiierung

E.4.12. 2-Allyl-N,N-diethyl-4,6-dimethoxybenzamid (10)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
N,N-Diethyl-2,4-dimethoxybenzamid (4)	1	30mmol		7,12g
Tertiärbutyl-Lithium	2,5	75mmol	1,7M in THF	44,3mL
CuBr-Me ₂ S	2	60mmol		12,3g
Allylbromid	3	90mmol		11,0g
THF abs.				70mL

(4) wurde in einen Dreihalskolben eingewogen und in ca. 50mL THF gelöst und unter Ar-Atmosphäre in einer Aceton/N₂(l) - Kältemischung auf -75°C abgekühlt. Durch ein Septum wurde dann langsam, tropfenweise t-BuLi zugegeben. Die Reaktion ist stark exotherm und es muss darauf geachtet werden, dass die Temperatur nicht wesentlich über -60°C ansteigt. Nach der Zugabe wurde die Mischung für 2h bei -60 bis -75°C gerührt. Anschließend wurde das Gemisch innerhalb von 1h auf -10°C erwärmt, für weitere 30min auf dieser Temperatur gerührt. Danach wurde die Lösung wieder auf -80°C abgekühlt und das Allylbromid zugetropft. Die Lösung wurde dann langsam auf RT erwärmt.

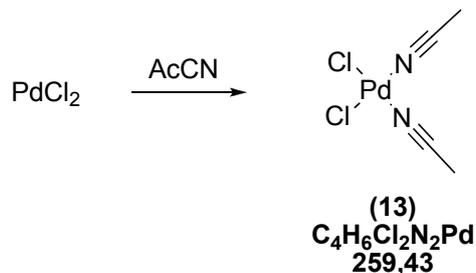
Zur Aufarbeitung wurde die Mischung über Kieselgel filtriert, mit 100mL Ether gewaschen und mit Wasser solange extrahieren, bis kein Feststoff mehr ausfällt (insgesamt 2L). Die wässrige Phase wurde danach 4x mit 250mL Ether extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet, das Trocknungsmittel abfiltriert und das LSM an Rotavapor abgedampft. Das Rohprodukt 3,52g (39%) wurde dann säulenchromatographisch gereinigt: 90g Kieselgel 60, PE/EE 2:1

Als Ausbeute erhält man 3,52g gelbes Öl (ca.39%).

DC: PE/EE 21;Rf-Wert: 0,348

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 6.36 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.32 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 5.91 (ddt, J = 17.0, 10.0, 6.9 Hz, 1H), 5.12 - 5.02 (m, 2H), 3.82 – 3.72 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.45 - 3.25 (m, 3H), 3.20 - 3.00 (m, 2H), 1.23 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.02 (t, J = 7.2 Hz, 3H), ppm

E.4.13. Bis(acetonitril)palladium(II)chlorid (13)



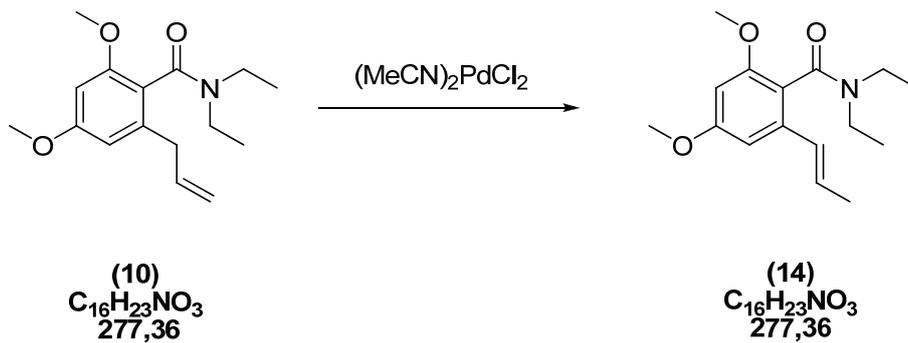
Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
Palladiumchlorid		2mmol	177,33g/mol	0,356g
Acetonitril abs.				10mL

PdCl_2 wird in einen 25mL Rundkolben eingewogen und mit AcCN unter Ar-Atmosphäre 24h bei RT gerührt. Der entstandene Feststoff wird abgenutscht, mit PE gewaschen und bei 30°C in vacuo getrocknet.

Ausbeute: 408mg gelbes Pulver (79%).

^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ = 2.07 (s, 6H) ppm

E.4.14. (E)- N,N-diethyl-2,4-dimethoxy-6-(prop-1-enyl)-benzamid (14)

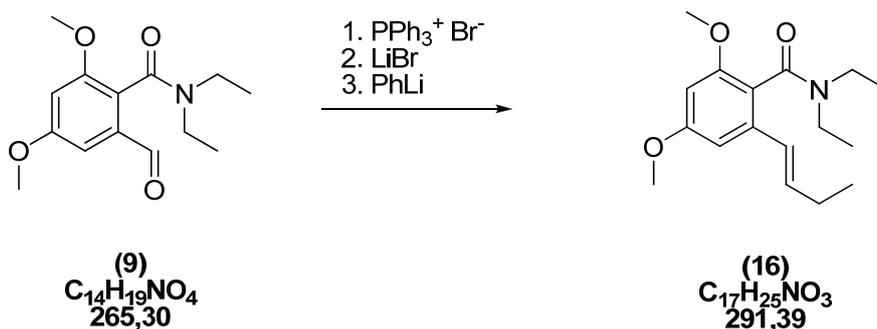


Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(10)	1	0,01mol	277,36g/mol	2,77g
(13)	0,1	0,001mol	259,43g/mol	260mg
Ethanol abs.				50mL

(10) wurde in 50mL EtOH gelöst und mit dem Katalysator (13) versetzt. Anschließend wurde die Lösung bei RT unter Ar-Atmosphäre für 2 Tage gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Mischung über Hyflow filtriert, mit Ether nachgewaschen und säulenchromatographisch gereinigt (90g Kieselgel 60, PE/EE 2:2). Es wurden 1,85g (76%) farbloses Harz erhalten.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 6.57 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.29 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.28 (dq, J = 15.6, 1.1 Hz, 1H), 6.18 (dq, J = 15.5, 6.3 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.76 - 3.65 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.46 - 3.36 (m, 1H), 3.05 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.80 (dd, J = 6,3, 1.3 Hz, 3H), 1.21 (t, J = 7.2 Hz, 3 H), 0.95 (t, J = 7.2 Hz, 3H) ppm

E.4.15. (E)-2-(but-1-enyl)-N,N-diethyl-4,6-dimethoxybenzamid (16)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(9)	1	15mmol		2,4g
PPh ₃ Br	1,2	18mmol		6,94g
Phenyl-Lithium	1,2	18mmol	1,9M in Dibutylether	19mL
Chlorwasserstoff in Diethylether	1,2	18mmol	1,0M	19mL
Kalium-Tertiärbutanolat	1,3	20mmol		2,24g
Lithiumbromid (wasserfrei)				3,12g

PPh₃Br und LiBr wurden in 150mL abs. THF gelöst, auf -75°C abgekühlt (Aceton/ N_{2(l)}) und mit PhLi versetzt. Danach wurde, für 30min auf 20°C erwärmt, wieder auf -75°C abgekühlt und (9) zugegeben. Anschließend wurde erneut PhLi zugegeben und folgendes Temperaturschema vollzogen: 30min auf -75°C gefolgt von: 30min bei 20°C und danach wieder: 30min auf -75°C. Anschließend wurde HCl (siehe oben) und K-tert-Butanolat zugegeben und die Mischung für 24h in der Kältemischung belassen, sodass sie sich langsam auf RT aufwärmen konnte. Im nächsten Schritt wurde die Mischung auf 500mL Wasser geleert und anschließend mit 3x 250mL Methylenchlorid extrahiert. Die gesammelte organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das LSM mittels Rotavapor abdestilliert.

Das Rohprodukt wurde mittels SC gereinigt (90g Kieselgel 60; PE/EE 1:1).

3,3g (74%) wurden als Ausbeute erhalten.

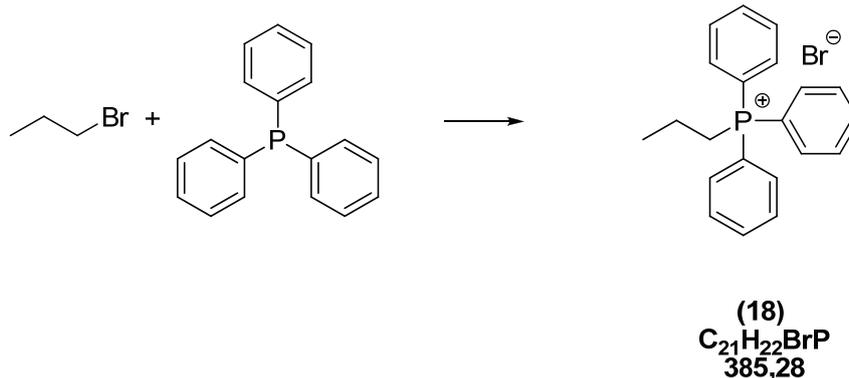


Abbildung 22: Aufbau der Apparatur für die Wittig-Reaktion



Abbildung 21: Wittig-Reaktion

E.4.16. Triphenyl-propyl-phosphoniumbromid(18)

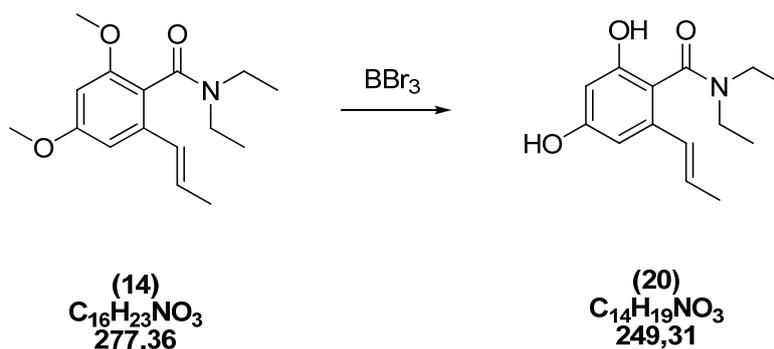


Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
1-Brompropan	1	150mmol	122,99g/mol	18,45g
Triphenylphosphin	1,2	180mmol	262,28g/mol	42,21g
Toluol abs.				600mL

In 600mL Toluol wurden 42,21g Triphenylphosphin gelöst und das 1-Brompropan zugegeben. Die Mischung wurde dann, unter Verwendung eines Trockenrohres 72h unter Rückfluss gesiedet. Der weiße NS wurde danach abfiltriert, mit PE gewaschen und bei 50°C in vacuo getrocknet. Es wurden 26,1g (45%) als Ausbeute erhalten.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.86 - 7.56$ (m, 15H), $3.73 - 3.54$ (m, 2H), $1.80 - 1.50$ (m, 2H), $1.24 - 1.10$ (m, 3H) ppm

E.4.17. (E)-N,N-diethyl-2,4-dihydroxy-6-(prop-1-enyl)-benzamid (20)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(14)	1	10mmol	277,36g/mol	2,78g
BBr ₃	6	60mmol	~1M in CH ₂ Cl ₂	60mL
Methylenchlorid abs.				150mL

In einen Dreihalskolben wurde **(14)** in 150mL CH₂Cl₂ gelöst und mit einer Aceton/ N₂(l) Kältemischung auf -78°C temperiert. Unter Ar-Atmosphäre wurde dann das BBr₃ langsam zugegeben. Nach Ende der Zugabe wurde für 30min auf -78°C gerührt und anschließend auf 0°C erwärmt. Bei dieser Temperatur rührte die Lösung für weitere 4h gefolgt von 1h bei RT.

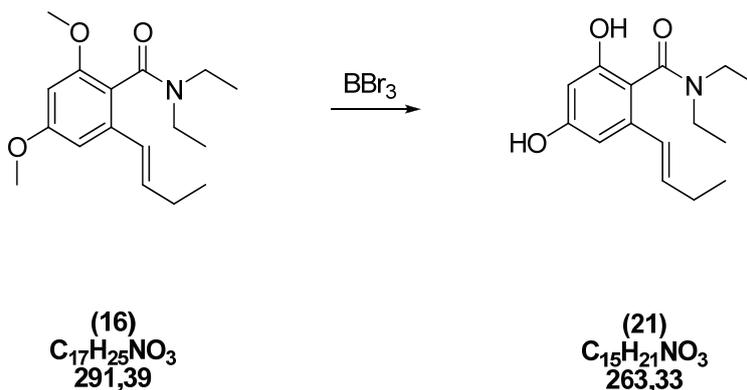
Nachdem die Mischung erneut auf 0°C abgekühlt war, wurden ca. 100mL Wasser zugegeben und zur Aufarbeitung die Reaktionsmischung 4x mit je 150mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die gesammelte organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet.

Um die Ausbeute von zu erhöhen (die Reaktionsmischung enthielt noch ca. 50% monomethyliertes/monodemethyliertes Produkt), wurde das LSM abgedampft und mit dem Rohprodukt erneut eine Reaktion, durch Zugabe von Methylenchlorid und BBr₃ angesetzt.

Das daraus gewonnene Rohprodukt wurde anschließend mittels SC (90g Kieselgel 60; Gradient von: 20%EE / 80% CH₂Cl₂ auf 20%EE / 80% CH₂Cl₂) gereinigt.

Es wurden 0,64g (26%) watteartiger, blassgelber Feststoff erhalten.

E.4.18. (E)-2-(but-1enyl)-N,N-diethyl-4,6-dihydroxybenzamid (21)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(16)	1	4mmol	277,36g/mol	1,17g
BBr ₃	6	24mmol	~1M in CH ₂ Cl ₂	24mL
Methylenchlorid abs.				70mL

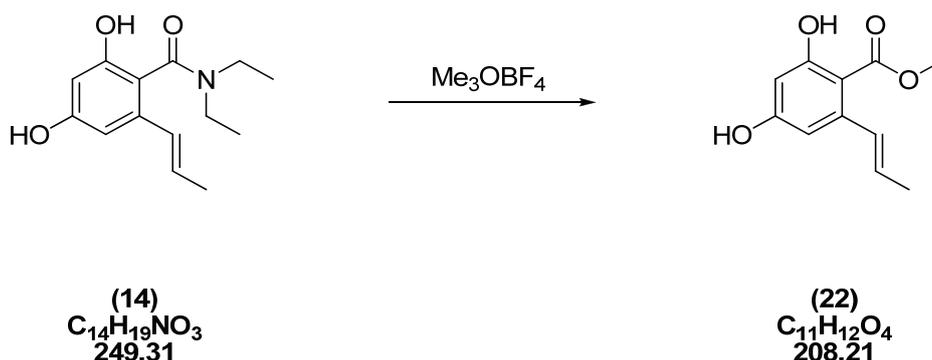
(16) wurde in einen Dreihalskolben eingewogen, mit 70mL abs. CH₂Cl₂ gelöst und mittels Aceton/ N_{2(l)} Kältemischung auf -78°C temperiert. Unter Ar-Atmosphäre wurde dann das BBr₃ langsam zugegeben. Nach Ende der Zugabe wurde für 30min auf -78°C gerührt und anschließend auf 0°C erwärmt. Bei dieser Temperatur rührt die Lösung für weitere 4h gefolgt von 1h bei RT. Nachdem die Mischung erneut auf 0°C abgekühlt war, werden ca. 50mL Wasser zugegeben und zur Aufarbeitung die Reaktionsmischung 3x mit je 100mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die gesammelte organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet.

Um die Ausbeute von zu erhöhen (die Reaktionsmischung enthielt noch ca. 50% monomethyliertes/monodemethyliertes Produkt), wurde das LSM abgedampft und mit dem Rohprodukt erneut eine Reaktion, durch Zugabe von Methylenchlorid und BBr₃ angesetzt.

Das daraus gewonnene Rohprodukt wurde anschließend mittels SC (90g Kieselgel 60; Gradient von: 20%EE / 80% CH₂Cl₂ auf 20%EE / 80% CH₂Cl₂) gereinigt.

Es wurden 0,26g (25%) rot-brauner Feststoff erhalten.

E.4.19. (E)-methyl-2,4-dihydroxy-6-(prop-1enyl)benzoat (22)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(14)		2,2mmol	249,30g/mol	0,55g
Me_3OBF_4		3,5mmol	147,91g/mol	0,52g
Methylenchlorid				17mL
Methanol				8mL
Ges. Natriumcarbonat-Lösung				8mL
Diethylether				

(14) wurde in einen 50mL Rundkolben eingewogen, gelöst und mit Me_3OBF_4 versetzt. Der Ansatz wurde danach, unter Argonatmosphäre 24h bei Raumtemperatur gerührt.

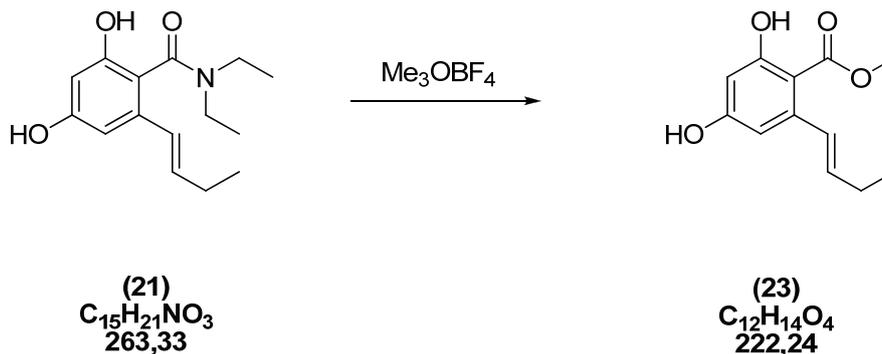
Anschließend wurden 8mL MeOH, 8mL Na_2CO_3 -Lsg. zugegeben und bei Raumtemperatur weitere 6h gerührt.

Zur Aufarbeitung wurden dann ca.40mL Ether zugegeben und die wässrige Phase mit verd. HCl (0,5N) auf pH=2 eingestellt. Der Rohextrakt wurde als nächstes 3x mit Ether extrahiert und die gesammelten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Das, am Rotavapor eingegangte Rohprodukt wurde anschließend mittels SC gereinigt: 90g Kieselgel 60, 254nm, Aufgebrachtes Volumen: 2mL, Laufmittel: Gradient von 9:1 auf 5:1 PE/EE.

Ausbeute: 50mg (11%).

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 11.65 (s, 1H), 6.92 (dq, J = 15.4, 1.3 Hz, 1H), 6.41 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.33 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 5.92 (dq, J = 15.3, 6.6 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 1.86 (dd, J = 6.7, 1.8 Hz, 3H) ppm

E.4.20. (E)-methyl-2-(but-1-enyl)-4,6-dihydroxybenzoat (23)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(21)		0,76mmol	263,33g/mol	0,2g
Me ₃ OBF ₄		1,22mmol	147,91g/mol	0,18g
Methylenchlorid				6mL
Methanol				2,75mL
Ges. Natriumcarbonat-Lösung				2,75mL
Diethylether				

(21) wurde in einen 50mL Rundkolben eingewogen, gelöst und mit Me₃OBF₄ versetzt. Der Ansatz wurde danach, unter Argonatmosphäre 24h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 8mL MeOH, 8mL Na₂CO₃-Lsg. zugegeben und bei Raumtemperatur weitere 6h gerührt.

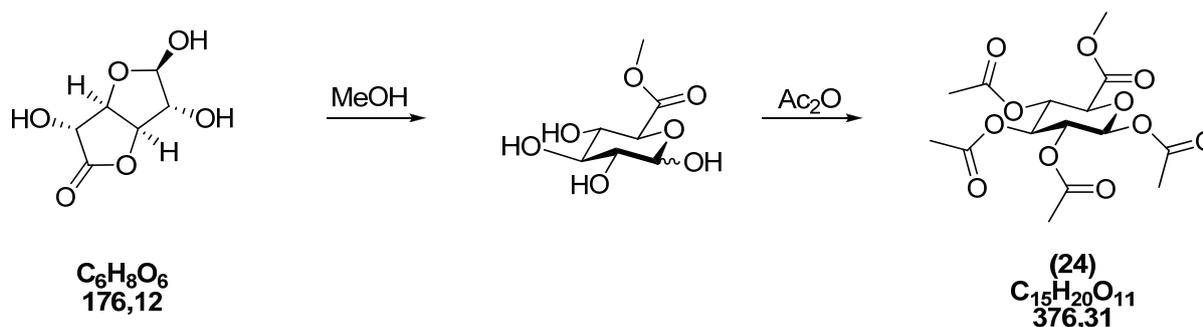
Zur Aufarbeitung wurden dann ca.20mL Ether zugegeben und die wässrige Phase mit verd. HCl (0,5N) auf pH=2 eingestellt. Der Rohextrakt wurde als nächstes 3x mit Ether extrahiert und die gesammelten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das, am Rotavapor eingegangte Rohprodukt wurde anschließend mittels SC gereinigt: 90g Kieselgel 60, 254nm, Aufgebrachtes Volumen: 2mL, Laufmittel: Gradient von 9:1 auf 5:1 PE/EE.

Ausbeute: 117mg (69,2%).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 6.89 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 6.42 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.33 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 5.96 (dt, J = 15.5, 6.3 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 2.30 - 2.10 (m, 2H), 1.09 (t, J = 7.4 Hz, 3H) ppm

E.5. Synthese des Glucuronyldonors (11)

E.5.1. 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-β-D-glucuronsäuremethylester (24)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(+)-D-Glucofuranurono-6,3-lacton	1	568mmol	176,12g/mol	100g
Natrium			22g/mol	300mg
MeOH abs.				600mL
Essigsäureanhydrid				400mL
Perchlorsäure (70%)				2mL

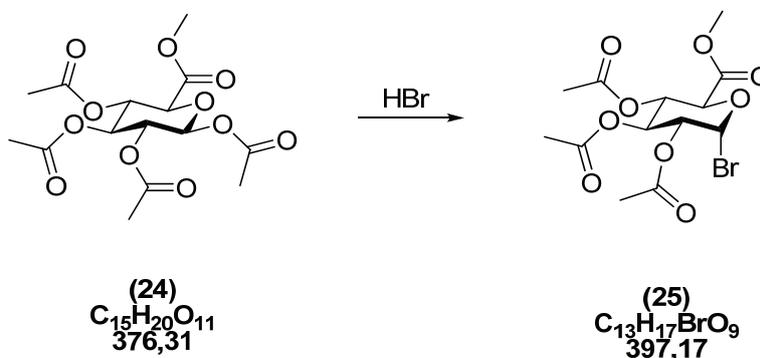
In einem 1000mL Rundkolben wurden zu 600mL abs. MeOH portionsweise 300mg Natrium zugegeben, und gerührt bis sich das Natrium als Na-Methanolat gelöst hatte. Anschließend wurden 100g D-(+)-Glucuronsäure-γ-lacton zugegeben und durch starkes rühren gelöst. Die gelbe Lösung wurde danach 100min, weiter gerührt, sodass das Lacton vollständig in Lösung gehen konnte. Danach wurde das MeOH am Rotavapor abdestilliert (Temperatur < 35°C). Der nahezu MeOH-freie Rückstand wurde in Ac₂O aufgenommen und unter Ar-Atmosphäre bei RT über Nacht gerührt. Die Lösung wurde danach mittels Eis/NaCl-Kältemischung auf -10°C gekühlt und 60mL Perchlorsäure-Lsg. (2mL Perchlorsäure in 60mL Ac₂O) zugetropft. Nach vollendeter Zugabe wurde die Lösung noch weitere 60min bei -10°C (Eis-Kochsalz-

Kältemischung) gerührt, sodass sich ein gelblich-weißer NS bildete. Der NS wurde abfiltriert und getrocknet und 75,8g (76%) weißer, kristallner Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.74$ (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.36 - 5.04 (m, 3H), 4.16 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.01 (s, 6H), 2.00 (s, 3H) ppm

E.5.2. 1-Brom-1-deoxy-2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-glucuronsäuremethylester

(25)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(24)	1	11mmol	376,31g/mol	4,2g
HBr			(30% in HAc)	20mL

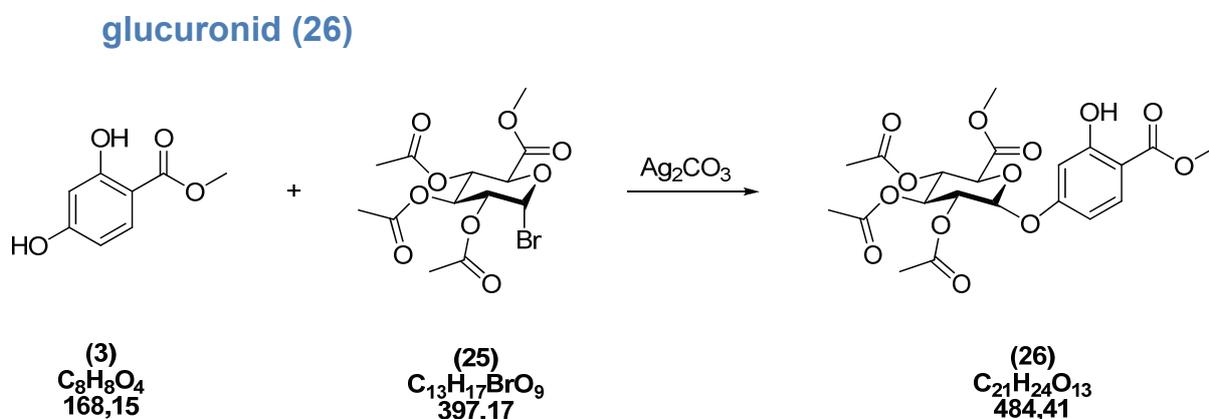
In 20mL HBr, welche in einem Eisbad auf 0°C gekühlt wurde, wurden 4,2g (24) portionsweise zugegeben und bei RT unter Ar-Atmosphäre für 2-3h weiter gerührt, bis (24) vollständig gelöst hatte und anschließend über Nacht bei 4°C gelagert.

Die HBr und HAc wurden anschließend am Rotavapor bis zu Trocknen eingengt. Der feste, rötlich-braune Rückstand wurde in 50mL CHCl_3 aufgenommen und mit ges. NaHCO_3 -Lsg. sowie mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, und das LSM am Rotavapor entfernt. Das Rohprodukt wurde aus 20mL abs. EtOH umkristallisiert. Nachdem das Lösungsmittel abfiltriert und der Feststoff getrocknet wurde, konnten 3,76g (85%) als Ausbeute erhalten werden.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 6.62 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 5.58 (t, J = 9.8 Hz, 1H), 5.21 (t, J = 9.9 Hz, 1H), 4.83 (dd, J = 10.0, 4.1 Hz, 1H), 4.55 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H) ppm

E.6. Glucuronidierungen (11)

E.6.1. 2,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester-4- β -D-methyl-tri-O-acetyl-



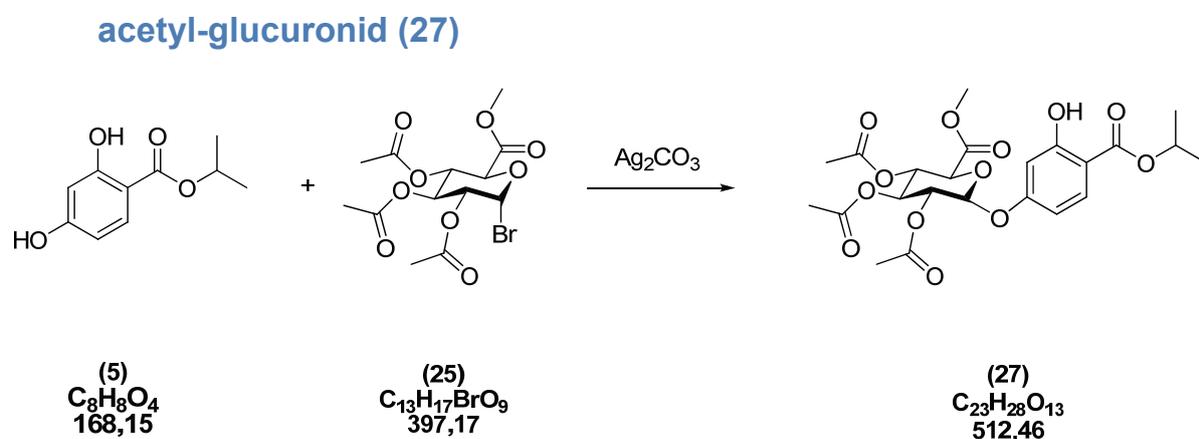
Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(3)	1	1,2mmol	168,15g/mol	0,2g
(25)	2	2,4mmol	397,17g/mol	0,945g
Silbercarbonat	2	2,4mmol		0,662g
Molekularsieb 3Å (gerieben)				Ca. 0,5g
Dicholmethan (abs.)				5mL

In 5mL Dichlormethan wurden **(3)**, **(25)** und Silbercarbonat gelöst und mit ca.0,5g Molsieb versetzt. Der Ansatz wurde anschließend bei RT, unter Ar-Atmosphäre gerührt. Am 8. Tag wurde der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft (PE/EE= 2:1) und 1eq. Bromozucker (0,45g) zugegeben und weitere 7 Tage gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde in periodischen Abständen mittels DC und GC-MS verfolgt. Die Aufarbeitung und Reinigung per SC des Produktes wurde von einem Mitarbeiter der TU Wien („El Diabolo“) übernommen.

Ausbeute: 73% der Theorie.

^1H NMR (400 MHz, d_6 -Aceton): δ = 10.92 (s, 1H), 7.79 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.64 - 6.58 (m, 2H), 5.69 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 5.46 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 5.23 (dd, J = 9.7, 7.7 Hz, 1H), 5.22 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 4.67 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (s, 3H) ppm

E.6.2. 2,4-Dihydroxybenzoesäureisopropylester-4- β -D-methyl-tri-O-



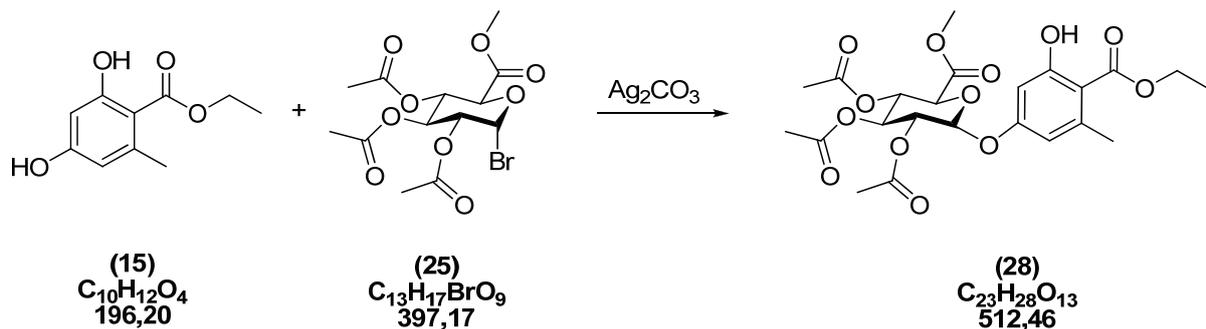
Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(5)	1	1mmol	168,15g/mol	0,2g
(25)	2	2mmol	397,17g/mol	0,810g
Silbercarbonat	2	2mmol		0,552g
Molekularsieb 3A (gerieben)				Ca. 0,5g
Dicholmethan (abs.)				5mL

In 5mL Dichlormethan wurden **(3)**, **(25)** und das Silbercarbonat gelöst und mit ca.0,5g Molsieb versetzt. Der Ansatz wurde anschließend bei RT, unter Ar-Atmosphäre gerührt. Am 8. Tag wurde der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft (PE/EE= 2:1) und 1eq. Bromozucker (0,4g) zugegeben und weitere 7 Tage gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde in periodischen Abständen mittels DC und GC-MS verfolgt. Die Aufarbeitung und Reinigung per SC des Produktes wurde von einem Mitarbeiter der TU Wien („El Diabolo“) übernommen.

Ausbeute: 73% der Theorie.

^1H NMR (400 MHz, d_6 -Aceton): δ = 11.07 (s, 1H), 7.79 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.63 - 6.57 (m, 2H), 5.68 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 5.46 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 5.33 - 5.18 (m, 3H), 4.67 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.36 (d, J = 6.1 Hz, 6H) ppm

E.6.3. 2,4-Dihydroxy-6methyl-benzoesäureethylester-4- β -D-methyl-tri-O-acetyl-glucuronid (28)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(15)	1	1mmol	168,15g/mol	0,2g
(25)	2	2mmol	397,17g/mol	0,810g
Silbercarbonat	2	2mmol		0,552g
Molekularsieb 3A (gerieben)				Ca. 0,5g
Dicholmethan (abs.)				5mL

In 5mL Dichlormethan wurden **(15)**, **(25)** und das Silbercarbonat gelöst und mit ca.0,5g Molsieb versetzt. Der Ansatz wurde anschließend bei RT, unter Ar-Atmosphäre gerührt. Am 8. Tag wurde der Reaktionsverlauf mittels DC überprüft (PE/EE= 2:1) und 1eq. Bromozucker (0,4g) zugegeben und weitere 7 Tage gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde in periodischen Abständen mittels DC und GC-MS verfolgt. Die Aufarbeitung und Reinigung per SC des Produktes wurde von einem Mitarbeiter der TU Wien („El Diabolo“) übernommen.

Ausbeute: 70% der Theorie.

E.7. Bioorganische Synthesen:

Bevor die Bioorganischen Reaktionen durchgeführt werden konnten, mussten zuerst die benötigten Enzyme, in Form der Mikrosomen isoliert und gereinigt werden:

E.7.1. Isolierung und Aufreinigung von Lebermikrosomen:

E.7.1.1. Benötigte Reagenzien:

- 0,25M Saccharose-Lösung
- Eluent: 0,15M KCl/ 0,05M Kaliumphosphatpuffer pH:7,5
- Na-Alginat-Lösung $\omega=6\%$ in Deionat: Sigma; Alginic acid Sodium Salt from *Macrocystis pyrifera*
- Bariumchlorid-Lösung: 82mM
- 0,1M TRIS/HCl mit 10mM MgCl₂
- DTT-Lösung (10mg/mL)

E.7.1.2. Gewebe- und Zellaufschluss (12):

Von einer möglichst frischen Schweineleber (am Vortag geschlachtet) wurden 10g mit einer Schere in ca. 0,5cm dicke Stücke geschnitten und in 80mL eisgekühlter 0,25M Saccharose-Lsg. eingelegt. Die folgenden Schritte wurden alle bei einer Temperatur zwischen 0-4°C durchgeführt.

Die eingelegte Leber wurde nach ca. 5min der Kühlung erneut mit einer Schere zerkleinert und dann in einen Potter-Elvehjem Homogenisator gefüllt. Zur Homogenisation wurde der Teflonmörser mit einer Bohrmaschine in mehreren, 30-40sek. Intervallen bei 0-4°C aufgeschlossen. Zwischen den einzelnen Intervallen wurden etwa 5min pausiert, um Abkühlung der Suspension zu gewährleisten.

Die rote Suspension wurde danach 10min bei 1000rpm (0-4°C) zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen, Zellkerne und größere Zellfragmente zu entfernen.

Der leicht rötlich, trübe Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgehoben und, um noch vorhandene Mitochondrien abzutrennen, für 10min bei 14000rpm (0-4°C) zentrifugiert.

E.7.1.3. Gelfiltration (13)

Der vom Pellet getrennte Überstand (enthält die Mikrosomen) wurde auf Eis gekühlt und anschließend mittels Gelfiltration gereinigt: Hierzu wurde eine Pharmacia Säule (25/45; 2,5cm i.d. x45cm), mit Sepharose 2B-C Füllhöhe: 43cm; Flussrate: mL/min verwendet.

Da keine Aktivitätsbestimmung der einzelnen Fraktionen durchgeführt werden konnte, wurden die zu immobilisierenden Fraktionen anhand des Chromatogramms bzw. anhand der Trübung der Fraktionen gewählt. Fraktion die erste und letzte Fraktion, welche den Peak begrenzten, wurden verworfen.

E.7.1.4. Immobilisierung (14)

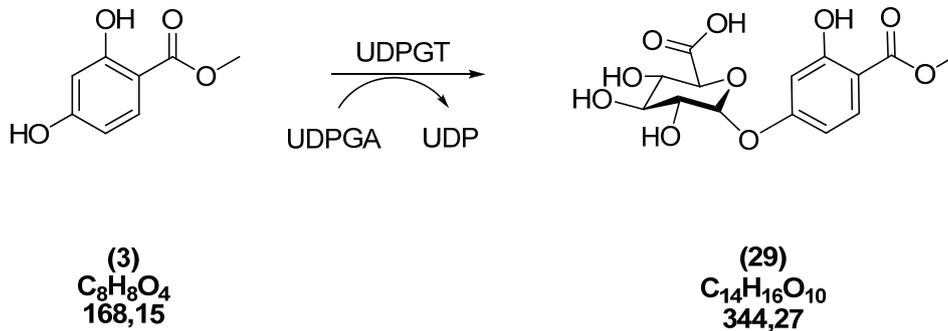
Zu der, so erhaltenen 30mL Mikrosomen-Suspension wurde 1mL DTT-Lösung zugegeben und die Suspension anschließend mit 15mL Alginatlösung vermischt. Bei 4°C (Kühlraum) wurde, die Mikrosomen/Alginat-Mischung, mit einer 10mL Spritze (mit Luer-Lock) durch eine Subcutannadel und das BaCl₂-Fällbad getropft. Das Fällbad wurde dabei von Zeit zu Zeit geschwenkt. Nach Beendigung der Fällung wurde das BaCl₂ vorsichtig abdekantiert und die Alginat-Beads zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung und zweimal mit TRIS/MgCl₂-Puffer gewaschen. Die so erhaltenen immobilisierten Mikrosomen (Alginat-Beads) wurden für die nachfolgenden Reaktionen (15) herangezogen.

Für die Ansätze wurden folgende Lösungen benötigt:

- **(3)**: 20mg in 100µL DMSO
- **(19)**: 19,5mg in 100µL DMSO
- UDP-GA: 28mg in 200µL Deionat
- Glucuronsäure: 48,3mg in 200µL Deionat

E.7.2. 2,4-Dimethoxybenzoesäuremethylester- β -D-glucuronid (Variante 1)

(29)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(3)-Lösung	1	0,02mmol	154,12g/mol	10,0mg
UDP-GA	1	0,02mmol	646,23g/mol	14mg
Glucuronsäure		0,062mmol	194.14g/mol	12,075mg
Mikrosomen-Alginat-Beads				ca. 5mL
Puffer				5mL

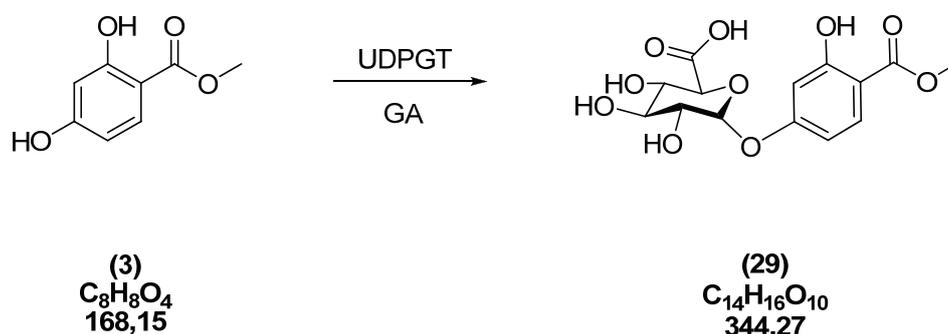
In eine saubere Glasschraubeprouvette wurden 5mL Puffer pipettiert und ein Spatel (ca.5mL) Mikrosomen-Beads zugegeben. Anschließend wurden 50 μ L Glucuronsäurelösung und 100 μ L UDP-GA-Lösung hinzu pipettiert. Nachdem die Mischung durch mehrmaliges Überkopfschwenken homogenisiert wurde, wurden langsam, tropfenweise 50 μ L KUK001-Lösung zugegeben. Die Epruvette wurde dann mit verschlossen und für 24h bei 37°C unter Schütteln (130rpm) inkubiert.

Zur Aufarbeitung wurde der Überstand von den Alginat-Beads abdekantiert und die Beads mit ca. 5mL Deionat gewaschen. Die gesammelten wässrigen Phasen (ca.10mL) wurden danach mit 1M HCl auf pH~3 eingestellt und danach mit ca. 30mL EE extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend von der wässrigen getrennt und die organische Phase wurde mittels Rotavapor eingengt, wobei die Temperatur möglichst niedrig gehalten wurde, da Glucuronide bei zu hohen Temperaturen gespalten werden. Es wurde keine weitere Aufreinigung unternommen; es wurde lediglich mittels DC und HPLC das Vorhandensein von Glucuroniden überprüft.

Es konnten keine Glucuronide nachgewiesen werden.

E.7.3. 2,4-Dimethoxybenzoesäuremethylester- β -D-glucuronid (Variante 2)

(29)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(3)-Lösung		0,02mmol	154,12g/mol	10,0mg
Glucuronsäure		0,062mmol	194,14g/mol	12,075mg
Mikrosomen-Alginat-Beads				ca. 5mL
Puffer				5mL

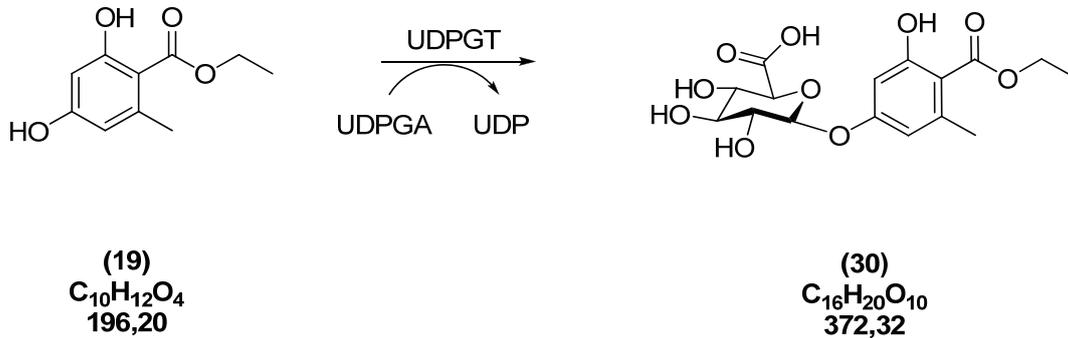
In eine saubere Glasschraubeprovette wurden 5mL Puffer pipettiert und ein Spatel (ca. 5mL) Mikrosomen-Beads zugegeben. Anschließend wurden 50 μ L Glucuronsäurelösung und danach langsam, tropfenweise 50 μ L (3)-Lösung zugegeben. Die Eprouvette wurde dann verschlossen und für 24h bei 37°C unter Schütteln (130rpm) inkubiert.

Zur Aufarbeitung wurde der Überstand von den Alginat-Beads abdekantiert und die Beads mit ca. 5mL Deionat gewaschen. Die gesammelten wässrigen Phasen (ca.10mL) wurden danach mit 1M HCl auf pH~3 eingestellt und danach mit ca. 30mL EE extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend von der wässrigen getrennt und die organische Phase mittels Rotavapor eingengt, wobei die Temperatur möglichst niedrig gehalten wurde, da Glucuronide bei zu hohen Temperaturen gespalten werden. Es wurde keine weitere Aufreinigung unternommen; es wurde lediglich mittels DC und HPLC das Vorhandensein von Glucuroniden überprüft.

Es konnten keine Glucuronide nachgewiesen werden.

E.7.4. 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester-β-D-glucuronid

(Variante 1) (30)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(19)-Lösung	1	0,02mmol	154,12g/mol	10,0mg
UDP-GA	1	0,02mmol	646,23g/mol	14mg
Glucuronsäure		0,062mmol	194.14g/mol	12,075mg
Mikrosomen-Alginat-Beads				ca. 5mL
Puffer				5mL

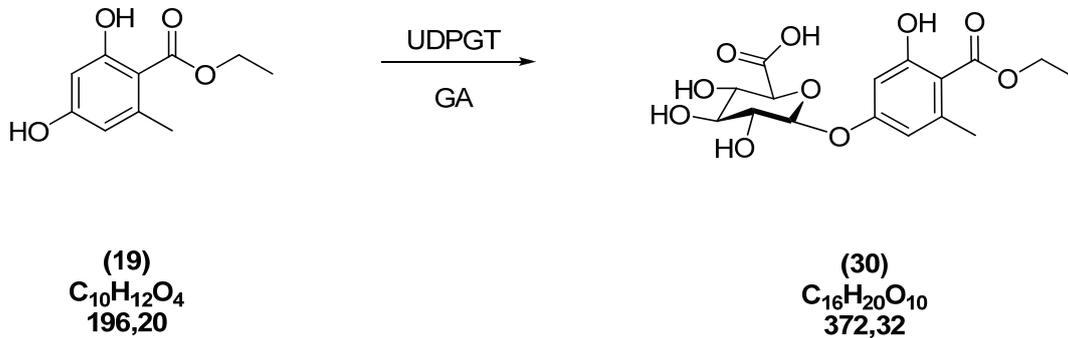
In eine saubere Glasschraubeprovette wurden 5mL Puffer pipettiert und ein Spatel (ca.5mL) Mikrosomen-Beads zugegeben. Anschließend wurden 50µL Glucuronsäurelösung und 100µL UDP-GA-Lösung hinzu pipettiert. Nachdem die Mischung durch mehrmaliges Überkopfschwenken homogenisiert wurde, wurden langsam, tropfenweise 50µL KUK024-Lösung zugegeben. Die Eprovette wurde dann mit verschlossen und für 24h bei 37°C unter Schütteln (130rpm) inkubiert.

Zur Aufarbeitung wurde der Überstand von den Alginat-Beads abdekantiert und die Beads mit ca. 5mL Deionat gewaschen. Die gesammelten wässrigen Phasen (ca.10mL) wurden danach mit 1M HCl auf pH~3 eingestellt und danach mit ca.30mL EE extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend von der wässrigen getrennt und die organische Phase mittels Rotavapor eingengt, wobei die Temperatur möglichst niedrig gehalten wurde, da Glucuronide bei zu hohen Temperaturen gespalten werden. Es wurde keine weitere Aufreinigung unternommen; es wurde lediglich mittels DC und HPLC das Vorhandensein von Glucuroniden überprüft.

Es konnten keine Glucuronide nachgewiesen werden.

E.7.5. 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester-β-D-glucuronid

(Variante 2) (30)



Substanz	equ.	n	M/Konz.	m/V
(19)-Lösung		0,02mmol	154,12g/mol	10,0mg
Glucuronsäure		0,062mmol	194.14g/mol	12,075mg
Mikrosomen-Alginat-Beads				ca. 5mL
Puffer				5mL

In eine saubere Glasschraubeprovette wurden 5mL Puffer pipettiert und ein Spatel (ca.5mL) Mikrosomen-Beads zugegeben. Anschließend wurden 50µL Glucuronsäurelösung und danach langsam, tropfenweise 50µL (19)-Lösung zugegeben. Die Eprouvette wurde dann mit verschlossen und für 24h bei 37°C unter Schütteln (130rpm) inkubiert.

Zur Aufarbeitung wurde der Überstand von den Alginat-Beads abdekantiert und die Beads mit ca. 5mL Deionat gewaschen. Die gesammelten wässrigen Phasen (ca.10mL) wurden danach mit 1M HCl auf pH~3 eingestellt und danach mit ca.30mL EE extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend von der wässrigen getrennt und die organische Phase mittels Rotavapor eingengt, wobei die Temperatur möglichst niedrig gehalten wurde, da Glucuronide bei zu hohen Temperaturen gespalten werden. Es wurde keine weitere Aufreinigung unternommen; es wurde lediglich mittels DC und HPLC das Vorhandensein von Glucuroniden überprüft.

Es konnten keine Glucuronide nachgewiesen werden.

F) ABKÜRZUNGEN:

Ac-	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcCN	Acetonitril
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlorethan
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-Dicyanobenzoquinon
DMAP	4-(N,N-Dimethylamino)pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDCI	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EE	Ethylacetat (Essigsäureethylester)
Et ₂ NH	Diethylamin
Et ₂ O	Diethylether
Ether	Diethylether
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
G-Akzeptor	Glucuronylakzetor
GC-MS	Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor
G-Donor	Glucuronyldonor
HAc	Essigsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPA	Isopropylalkohol (Isopropanol)
iPrBr	Isopropylbromid
LSM	Lösungsmittel
MeOH	Methanol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PE	Petrolether, Siedebereich 45 – 60 °C
PhLi	Phenyllithium
RT	Raumtemperatur (20-25°C)
SC	Säulenchromatographie
t-BuLi	Tertiärbutyllithium
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP-GA	Uridin-diphosphat-glucuronsäure
UDPGT	Uridin-diphosphat-Glucuronosyltransferase
ZON	Zearalenon

G) ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Kahnförmige Sporen von <i>Fusarium</i>	1
Abbildung 2: links gesunde Weizenähre; rechts befallene Ähre	1
Abbildung 3: Biosyntheseweg von ZON	14
Abbildung 4: (A) Rauhes ER; (B) Rauhe Mikrosomen, Elektronenmikroskopische Aufnahme	16
Abbildung 5: Rauhe und glatte Mikrosomen	17
Abbildung 6: Reaktionsverhalten von Benzol und Toluol im Phase I Metabolismus	22
Abbildung 7: Röntgenfluoreszenzaufnahme einer Glucuronosyltransferase (5)	1
Abbildung 8: Quatrupol	50
Abbildung 9: Bruker Avance DRX-400 Fouriertransfom Spektrometer.....	51
Abbildung 10: Gesamtes NMR-Spektrum von 2,4-Dimethoxybenzoesäureisopropylester	1
Abbildung 11: Ausschnitt des NMR Spektrums (Duplett, Duplett auf Duplett und Heptett)....	56
Abbildung 12: NMR Spektrum (Duplett), Integriert.....	57
Abbildung 13: Na-Ethanolatherstellung	1
Abbildung 14: Versuchsaufbau für (8).....	1
Abbildung 15: Kryostat.....	70
Abbildung 16: Der Brominator	71
Abbildung 17: Herstellung einer flüssig Stickstoff / Aceton Kältemischung.....	1
Abbildung 18: Flüssigstickstoff	1
Abbildung 19: Versuchsaufbau für Lithiierung	1
Abbildung 20: Stickstoff / Aceton Kältemischung	1
Abbildung 21: Wittig-Reaktion	1
Abbildung 22: Aufbau der Apparatur für die Wittig-Reaktion	1

H) TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht der Reaktionen des Phase I und II Metabolismus	20
Tabelle 2: Übersicht der Konjugate	23
Tabelle 3: Chemische Verschiebung einiger Funktioneller Gruppen	52
Tabelle 4: Übericht der NMR aktiven Kerne	53

I) FORMELVERZEICHNIS

Formel 1: Zearalenon	12
Formel 2: Zearalenon und Zearalenol	15
Formel 3: Zearalenon-4- β -D-glucuronid	16
Formel 4: Zearalenon	1
Formel 5: Typ I Modellverbindungen	1
Formel 6: Typ II Modellverbindungen	1
Formel 7: Typ II Modellverbindungen	1
Formel 8: links EDCI; rechts DMAP	34
Formel 9: Mesomere Grenzstruktur t-BuLi	35
Formel 10: Palladiumkatalysator	37
Formel 11: DDQ (2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benochinon)	42
Formel 12: Silicagel	47
Formel 13: 2,4-Dimethoxybenzoesäureisopropylester	55
Formel 14: 2,4-Dimethoxybenzoesäureisopropylester, Wechselwirkung	56
Formel 15: Kopplung von H ₄ mit H ₃ bzw. mit H ₆	57

J) FORMELSCHEMAVERZEICHNIS

Formelschema 1: 2,4-Dihydroxybenzoesäuremethyl- und isopropylester	2
Formelschema 2: 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester	2
Formelschema 3: 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureisopropylester	2
Formelschema 4: 2,4-Dihydroxy-6-(1E-propenyl)benzoesäureethylester	3
Formelschema 5: (E)-methyl-2-(but-1-enyl)-4,6-dihydroxybenzoat.....	4
Formelschema 6: Synthese des Glucuronyl-Donors	5

Formelschema 7: 2,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester-4- β -D-methyl-tri-O-acetyl- glucuronid.....	6
---	---

Formelschema 8: 2,4-Dihydroxybenzoesäureisopropylester-4- β -D-methyl-tri-O-acetyl- glucuronid.....	7
--	---

Verzeichnis

Formelschema 9: 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester-4- β -D-methyl-tri-O-acetyl-glucuronid.....	8
Formelschema 10: 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäureethylester- β -D-glucuronid	9
Formelschema 11: Bildung von UDP-Glucuronsäure	24
Formelschema 12: Bildung von Glucose-1-phosphat	24
Formelschema 13: Bildung von UDP-Glucuronsäure	25
Formelschema 14: Reaktion UDP-Glucuronsäure mit Akzeptor	26
Formelschema 15: Glucuronid	26
Formelschema 16: Säurekatalysierte Methylveresterung	31
Formelschema 17: S _N 2 Veresterung von (5) mit iPrBr	31
Formelschema 18: Synthese des Amids über das Säurechlorid.....	33
Formelschema 19: Katalysierte Amidsynthese mit EDCI und DMAP	34
Formelschema 20: DMF Lithiierung	36
Formelschema 21: Transmetallierung.....	37
Formelschema 22: Isomerisierung	37
Formelschema 23: Wittig-Schlosser Methode.....	38
Formelschema 24: Entfernung der Methylschutzgruppen.....	39
Formelschema 25: Umsetzung eines Amids zum Ester.....	40
Formelschema 26: Bildung eines Sechseringes durch Michaelkondensation und Claisenumlagerung	41
Formelschema 27: Aromatisierung eines Sechseringes durch Bromierung	42
Formelschema 28: Aromatisierung eines Sechseringes mit DDQ	43
Formelschema 29: Gescheiterter Versuch der Aromatisierung mit DDQ.....	43
Formelschema 30: Synthese des acetylgeschützten Glucuronsäuremethylesters	44
Formelschema 31: Synthese des acetylgeschützten G-Donors	45
Formelschema 32: Stereoselektivität des G-Donors.....	45
Formelschema 33: Bildung eines Orthoesters	45

K) LITERATURVERZEICHNIS

1. **Seidler, Caroline.** *Nachweis der Fusarientoxine Deoxynivalenol und Zearalenon in Lebensmitteln.* Gießen : Justus-Liebig-Universität Gießen, 2007.
2. **Kuiper-Goodmann, T.P.M. Scott und H. Watanabe.** *Risk Assesment of mycotoxin zearalenone.* s.l. : Regul. Toxikol. Pharmacol. 7, 253-306, 1987.
3. **Mc Nutt, S.H. P. Purwin und C. Murray.** *Vulvovaginitis in swine; preliminary report.* s.l. : J. Amer. Vet. Med. 73, 448-492, 1928.
4. **R. MITTERBAUER, Katharina WONDRASCH, Michaela PERUCI, F. BERTHILLER, R. SCHUHMACHER, R. KRSKA, Gabriela NAGL-NEUHOLD, M. LEMMENS, Frances TRAIL und G. ADAM.** *Biosynthese und Metabolismus von Zearalenon.* 2005.
5. **Michael J. Miley¹, Agnieszka K. Zielinska², Jeffrey E. Keenan¹, Stacie M. Bratton², Anna Radominska-Pandya² and Matthew R. Redinbo^{1, 3, 4},** „ *Crystal Structure of the Cofactor-Binding Domain of the Human Phase II Drug-Metabolism Enzyme UDP-Glucuronosyltransferase 2B7.*
6. **www.wikibooks.org. [Online]**
http://de.wikibooks.org/wiki/Biochemie_und_Pathobiochemie:_Urons%C3%A4uren-Stoffwechsel.
7. **K.Peter C. Vollhardt, Neil E. Schore.** s.l. : Wiley-VCH, 4.Aflage 2005.
8. **chemgapedia.de.** *Aromatisierung von Sechsringen: Oxidation mit Chinon.* [Online]
http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/2/vlu/oxidation_reduktion/aroma_ringe.vlu/Page/vsc/de/ch/2/oc/reaktionen/formale_systematik/oxidation_reduktion/oxidation/entfernen_wasserstoff/aromatisierung_6_ringe/chinonaromatisierung.vscml.html.
9. **Scheffler, Rouven.** *O-Glycosidsynthese.* 2005.
10. **Bollenback, G. N., et al.** s.l. : Chem. Soc. 1955, 77, 3310-3315.
11. **Mikula, Hannes.** *Masterarbeit: Regioselektive O-Glucuronidierung am Fusarium Mykotoxin Zearalenon.* 2008.
12. **Stachulski, A. V. und Jenkins, G. N.** s.l. : Nat. Prod. Rep. 1998, 15(2), 173-186.

13. **Hogeboom, George H.** Fractionation of Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* 1949.
14. **O. Tangen, J. Johnsson and S. Orrenius.** Isolation of Rat Liver Mikrosomes by Gel Filtration. *Analytical Biochemistry* . 54, 597-603, 1973.
15. **Marc Haumont, Jacques Magdalou, Jean-Claude Ziegler, Roselyne Bidault, Jean-Pascal Siest and Gerard Siest.** Immobilisation of microsomes into alginate beads is a convient method for producing glucuronides from drugs. *Appl. Microbiol Biotechnology*. 35: 440-446, 1991.
16. *Optimisation of UDP-glucuronyl transferase-catalysed synthesis of testosterone-beta-D-glucuronide by inhibition of contaminating beta-glucuronidase.* **Stevenson, David E.** s.l. : Biotechnology Techniques, Kluwer Academic Publishers, 1998, Bde. 13: 17-21, 1999.



Sparkling Science >
Wissenschaft ruft Schule
Schule ruft Wissenschaft

BMWF^a

www.bmwf.gv.at

Bundesministerium für Wissenschaft
und Forschung