

Sparkling Science >  
Wissenschaft ruft Schule  
Schule ruft Wissenschaft

Michael Doppler und Stefan Lindner

**Glucuronyldonoren in der Synthese  
von Glycokonjugaten und Metaboliten**

Diplomarbeit der HBLVA für chemische Industrie, Wien

betreut von

**Prof. DI Dr. Otto Meixner**

HBLVA für chemische Industrie, Wien

**o. Univ.Prof. DI Dr. Johannes Fröhlich**

**DI Hannes Mikula**

Technische Universität Wien

Institut für angewandte Synthesechemie

**ao. Univ.Prof. DI Dr. Marko D. Mihovilovic**

Projektleitung „Grüne Chemie“

Technische Universität Wien

BMWF Schriftenreihe  
Abschlussarbeiten von Schüler/innen und  
Student/innen im Rahmen des Programms  
„Sparkling Science“  
Heft 8, Wien 2011

**BM.W.F<sup>a</sup>**

[www.bmwf.gv.at](http://www.bmwf.gv.at)  
[www.sparklingsscience.at](http://www.sparklingsscience.at)

Bundesministerium für Wissenschaft  
und Forschung

Diese Arbeit wurde am 28. Mai 2009 eingereicht,  
verfasst im Rahmen des Forschungsprojektes  
**„Grüne Chemie“ – Nachhaltige Strategien  
in der Wissenschaft**

PROJEKTLEITENDE EINRICHTUNG

Technische Universität Wien, Institut  
für Angewandte Synthesechemie  
Projektleitung: ao. Univ.Prof. DI Dr. Marko D. Mihovilovic  
Kontakt: mmihovil@pop.tuwien.ac.at

BETEILIGTE SCHULEN

BG/BRG St. Veit an der Glan, Kärnten  
BRG Feldkirchen, Kärnten  
BG/BRG Villach, Kärnten  
BG/BRG Tulln a.d. Donau, Niederösterreich  
GRG Sachsenbrunn, Niederösterreich  
HTL Dornbirn, Vorarlberg  
BG/BRG 11 Geringergasse, Wien  
BG/BRG 13 Wenzgasse, Wien  
GRG 11 Gottschalkgasse, Wien  
GRG 17 Parhamergymnasium, Wien  
BG/BRG 13 Fichtnergasse, Wien  
BRG 7 Kandlgasse, Wien  
HTL Rosensteingasse, Wien  
Wiedner Gymnasium, Wien  
TGM - Technologisches Gewerbemuseum, Wien



„Jede Reise beginnt mit dem ersten Schritt“ - Dies gilt ganz besonders auch für erfolgreiche Karrieren in Wissenschaft und Forschung. Dabei ist der erste Schritt oft der herausforderndste. Daher hat das Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung (BMWF) im Jahr 2007 ein unkonventionelles und in Europa einzigartiges Programm der wissenschaftlichen Nachwuchsförderung aus der Taufe gehoben: „Sparkling Science“ ermöglicht jungen Menschen bereits sehr früh hautnah Einblicke in die Welt der Wissenschaft und Forschung.

In den von „Sparkling Science“ geförderten Projekten sind Schülerinnen und Schüler als Juniorpartner in erfahrene Forschungsteams eingebunden. Sie arbeiten aktiv im Forschungsprozess mit und bringen eigene Fragestellungen, Denkanstöße und inhaltliche Beiträge ein. Die Schülerinnen und Schüler wirken an der Konzeption und Durchführung von Untersuchungen mit, führen Befragungen durch, erheben Daten, interpretieren diese gemeinsam mit den Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern und stellen die Ergebnisse an Schulen, Universitäten und sogar bei wissenschaftlichen Tagungen vor.

Diese Zusammenarbeit von Forschung 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 wiederum bekommen einen

einzigartigen Zugang zu neuen wissenschaftlichen Fragestellungen 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, sondern auch Schlüsselfertigkeiten in sämtlichen Berufsfeldern der modernen Arbeitswelt.

Eine der wichtigsten Grundregeln wissenschaftlichen Arbeitens besteht darin, Forschungsergebnisse zu publizieren und damit für andere Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler bzw. die Öffentlichkeit zugänglich zu machen. Mittlerweile liegen einige Publikationen in anerkannten wissenschaftlichen Fachzeitschriften vor, in denen an „Sparkling Science“-Projekten beteiligte Schülerinnen und Schüler als Co-Autorinnen und Co-Autoren vertreten sind.

Ein erster Schritt für das spätere erfolgreiche wissenschaftliche Publizieren sind mit Sicherheit die hier vorliegenden Abschlussarbeiten. Sie entstehen im Rahmen der Projekte von Schülerinnen, Schülern und Studierenden und bearbeiten eigenständig Teilbereiche des Forschungsprojektes. Und dies in beeindruckender Art und Weise. Das Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung gibt daher eine eigene Publikationsreihe für jene Forschungsergebnisse heraus, die im Rahmen von Maturaprojekten sowie Bakkalaureats- und Masterarbeiten aus „Sparkling Science“ erarbeitet werden.

Ich gratuliere allen jungen Nachwuchsforscherinnen und Nachwuchsforschern zu diesen ersten Schritten und wünsche viel Freude und Erfolg auf dem weiteren Weg in Wissenschaft und Forschung.

Herzlich,

Dr. Karlheinz Töchterle  
Bundesminister für Wissenschaft und  
Forschung





### **Chemie ist, wo es raucht und stinkt!**

Mit diesem Vorurteil ist leider nach wie vor die Wahrnehmung der Chemie in der breiten Öffentlichkeit verbunden. Und dies, obwohl wir uns die Annehmlichkeiten unserer modernen Gesellschaft ohne die massiven Beiträge der Chemie nicht mehr wirklich vorstellen können, denken wir doch nur an die Materialien unserer Smartphones und Laptops, die Kunstfasern unserer Funktionsportkleidung, die neue beschichtete Bratpfanne, die ganz leicht zu reinigen ist, oder auch an die Tablette, welche unlängst in kürzester Zeit den beginnenden Kopfschmerz vertrieben hat.

Das Projekt „Grüne Chemie“ ist angetreten, mit diesem Klischee über die umweltbelastende Chemie bereits bei Jugendlichen durch Aufklärung aufzuräumen. Moderne chemische Verfahren, insbesondere in den industrialisierten Nationen Europas, stehen heute im Einklang mit den ökologischen Anforderungen einer umweltbewussten Bevölkerung und laufende Forschungsarbeiten eröffnen stets weitere technologische Verbesserungen.

Im Rahmen von Sommerpraktika wird beim Projekt „Grüne Chemie“ bereits Schülerinnen und Schülern die Möglichkeit geboten, selbst in den Elfenbeinturm der Hochschulen und hinter die Vorhänge der universitären Forschung in diesem interdisziplinären Bereich zu blicken. Dabei können die Kandidatinnen und Kandidaten selbst Experimente durchführen und Teilbereiche von längerfristigen

Forschungsvorhaben gemeinsam mit und unter Anleitung von universitären Forscherinnen und Forschern bearbeiten. Die dabei gewonnen Erkenntnisse werden im nachfolgenden Schuljahr zu umfassenden Berichten und sogar Fachbereichsarbeiten ausgebaut.

Während der letzten drei Jahre konnten dabei über 60 Schülerinnen und Schüler von 17 Partnerschulen an derartigen Projekten innerhalb der Fakultät für Technische Chemie der TU Wien teilnehmen. Die Themenbereiche erstreckten sich dabei von erneuerbaren Rohstoffen und alternativer Energieerzeugung, über neue Materialien für Anwendungen in der Medizintechnik und Unterhaltungsindustrie, bis hin zu Studien zur Lebensmittelsicherheit. Eine Vielzahl von Würdigungspreisen dokumentiert die hohe Qualität der erbrachten Leistungen und als Betreuer konnte man sehr häufig den sprichwörtlichen Funken überspringen sehen.

Ich hoffe, dass wir mit unserer Initiative die Begeisterungsfähigkeit der nachfolgenden Jungforscherinnen- und Jungforschergeneration stimulieren konnten, vor allem um sich die jugendliche Neugierde zu erhalten und vermeintlich Bekanntes stets zu hinterfragen, um letztendlich zu Innovationen zu gelangen.

Es sind genau die Fragen unserer Schülerinnen und Schüler, die uns häufig am meisten herausgefordert haben, betrachteten sie doch viele Problemstellungen aus neuen Blickwinkeln und eröffneten damit unerwartete Perspektiven. Und was sie bereits jetzt erkannt haben, hoffen wir in Zukunft noch klarer der Allgemeinheit zu vermitteln: Die richtige Chemie stinkt nicht!

ao. Univ.Prof. DI Dr. Marko D. Mihovilovic  
Technische Universität Wien  
Institut für Angewandte Synthesechemie





Die HBLVA für chemische Industrie war schon immer bestrebt, ihre Schülerinnen und Schüler bestmöglich auszubilden und die jungen Absolventinnen und Absolventen mit möglichst hoher Qualifikation ins Arbeitsleben zu entlassen. Um dieses Ziel besonders effektiv zu erreichen, besteht für sehr gute und begabte Schülerinnen und Schüler die Möglichkeit, während der letzten Semester ihrer Ausbildung eine Diplomarbeit durchzuführen. Anders als bei universitären Diplomarbeiten steht bei den entsprechenden HTL-Arbeiten besonders die Arbeit im Team und Kooperationsfähigkeit in der Bearbeitung eines gemeinsamen Projektes im Vordergrund.

Die „Sparkling Science“-Initiative des BMWF bietet dazu besonders attraktive Möglichkeiten zur aktiven Teilnahme und Mitarbeit an universitären Forschungsprojekten renommierter Hochschulen, wobei dafür eigene Teilprojekte aus dem Rahmen größerer Arbeitskomplexe formuliert werden und den Schülerinnen und Schülern die Möglichkeit gegeben wird, in die Königsdisziplin naturwissenschaftlichen Arbeitens, nämlich in die universitäre Forschung, Einblick zu nehmen.

Im Abschlussjahrgang 2008/2009 wurden auf Initiative der Abteilungsvorständin der biochemischen Abteilung DI Dr. Bibiana Meixner zwei hervorragende Schüler mit der Diplomarbeit „Glucuronyldonoren in der Synthese von Glycokonjugaten und Metaboliten“ unter der Betreuung von Institutsvorstand o. Univ.Prof. DI Dr. Johannes Fröhlich und DI Hannes

Mikula vom Institut für Angewandte Synthesechemie der Technischen Universität Wien betraut. Beide Schüler hatten bereits im März 2008 mit der Themensuche begonnen. Stefan Lindner, ein hochbegabter Schüler, der auf Grund seiner Leistungen bereits einen Jahrgang übersprungen hatte und Michael Doppler, ein ebenfalls sehr begabter und hochinteressierter Schüler, nahmen die ihnen gestellte Aufgabe mit Feuereifer an.

In der weiteren Folge bearbeiteten sie die Diplomarbeit, deren Inhalt im Wesentlichen auf eine Gruppe stoffwechselaktiver Substanzen im Rahmen des Giftabbaus fokussiert war, mit Freude, verlässlich, zielstrebig, fleißig und kompetent. Sie zeigten großes Engagement, Teamgeist und hohe Eigeninitiative und konnten sehr informative und wertvolle Ergebnisse erzielen.

Großer Dank gebührt an dieser Stelle allen am Institut für Synthesechemie beteiligten Wissenschaftlern, allen voran den externen Kooperationspartnern, Prof. Johannes Fröhlich und DI Hannes Mikula, dem direkten Betreuer. Sie standen den Schülern nicht nur stets bei den praktischen Arbeiten mit Rat und Tat zur Seite, sondern vermittelten auch das theoretische Umfeld, sodass unseren Schülern damit ein wertvoller Wegweiser in ihre weitere naturwissenschaftliche Laufbahn mitgegeben wurde. Nicht zuletzt soll hier auch neben der hervorragenden fachlichen Betreuung das angenehme Umfeld und Arbeitsklima am Institut hervorgehoben werden.

Als Betreuer von Seiten der HBLVA Rosensteingasse freue ich mich besonders über die ausgezeichneten Ergebnisse, die durch das Zusammenspiel zwischen den engagierten Schülern, den kompetenten betreuenden Wissenschaftlern und dem vorbildlichen Arbeitsumfeld am Institut für Synthesechemie zustande kamen. Ich bin überzeugt, dass den beiden nunmehrigen Absolventen nicht zuletzt auch mit den gewonnenen wertvollen Erfahrungen während ihrer Diplomarbeit das Rüstzeug für eine beachtliche berufliche Karriere mitgegeben wurde.

Prof. DI Dr. Otto Meixner  
HBLVA für chemische Industrie, Wien

*Non scholae sed vitae discimus.*



**HBLVA für chemische Industrie**

**Höhere Lehranstalt für Chemie**

Ausbildungsschwerpunkt Biochemie, Bio- und Gentechnologie



# DIPLOMARBEIT

## Glucuronyldonoren in der Synthese von Glycokonjugaten und Metaboliten

Ausgeführt im Schuljahr 2008/09 von:

Michael Doppler      5YHCHT - 02

Stefan Lindner      5YHCHT - 06

Betreuer:

Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn.

Otto MEIXNER (HBLVA)

O. Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn.

Johannes FRÖHLICH (IAS-TUW)

Dipl.-Ing. Hannes MIKULA (IAS-TUW)

Wien, am 28.05.2009

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

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



## VORWORT

Als Schüler der Höheren Bundeslehr- und Versuchsanstalt für chemische Industrie im Ausbildungszweig Biochemie, Bio- und Gentechnologie haben wir die Möglichkeit, im Rahmen unserer Ausbildung an einem Diplomprojekt zu arbeiten. Da wir diese Chance unbedingt wahrnehmen wollten und wir an wissenschaftlicher Arbeit, die über die Möglichkeiten unserer Schule hinausgeht interessiert waren haben wir im März des Jahres 2008 mit der Themensuche begonnen.

Gemeinsam mit Prof. Dr. Bibiana MEIXNER führte uns diese Suche auf das Gebiet der organisch-präparativen Chemie. Sie kontaktierte Dipl.-Ing. Hannes MIKULA vom Institut für angewandte Synthesechemie der Technischen Universität Wien dessen Forschungsgebiet, die Zuckerchemie und die Metabolitensynthese, sich mit unserem Unterrichtsgegenstand Biotechnologie und Fermentationstechnik verbinden ließ. Die Verbindbarkeit des Diplomprojektes mit einem Unterrichtsgegenstand des 5. Jahrganges war Voraussetzung für die Genehmigung desselben durch das Bundesministerium für Unterricht, Kunst und Kultur. Nachdem Institutsvorstand O.Univ-Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Johannes FRÖHLICH freundlicherweise dem Vorhaben sein Einverständnis erteilte und im Rahmen der Projektinitiative „Sparkling Science“ vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung die Finanzierung des Projektes deutlich erleichtert wurde, begannen wir im August des Jahres 2008 mit der praktischen Arbeit am Institut.

Am 28.05.2009 wurde das Projekt vollständig abgeschlossen und die Arbeit abgegeben.

## **DANKSAGUNG**

Ohne Unterstützung hätten wir gar nicht die Möglichkeit gehabt, dieses Projekt durchzuführen. All jenen Personen die uns mit Rat und Tat zur Seite standen, möchten wir an dieser Stelle herzlich danken.

Allen voran möchten wir uns bei unserem direkten Betreuer Dipl.-Ing. Hannes MIKULA bedanken, der uns nicht nur während der praktischen Arbeit von Anfang an stets zur Seite stand, sondern uns auch die so wichtigen theoretischen Hintergründe erklärte und bis zum Abschluss der schriftlichen Arbeit immer erster und verlässlicher Ansprechpartner für allerlei Probleme war. Darüber hinaus sorgte er immer für ein sehr angenehmes Arbeitsklima. Danke für alles.

Weiters gilt O.Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Johannes FRÖHLICH, Vorstand des Institutes für angewandte Synthesechemie an der Technischen Universität Wien unser Dank. Er war es, der mit seiner Einverständnis überhaupt die Grundlage für diese Arbeit geschaffen hat.

Bei Prof. Dr. Bibiana MEIXNER möchten wir uns dafür bedanken, dass sie mit uns diese interessante Möglichkeit zur Durchführung einer Diplomarbeit gefunden hat.

Auch Prof. Dipl.-Ing. Dr. Otto MEIXNER, unserem Betreuer an der Schule möchten wir unseren Dank aussprechen. Er hat sich unter anderem um die Abwicklung der organisatorischen Tätigkeiten gekümmert und war uns auch beim Schreiben der Arbeit eine große Hilfe.

Nicht zuletzt möchten wir uns bei Univ. Ass. Dipl.-Ing. Dr. techn. Ernst HORTEL, BSc. Phillip FRUHMANN und BSc. Daniel LUMPI für das gute Arbeitsklima am Institut und dafür, dass sie uns oft den Weg zur Lösung eines Problems zeigten bedanken.

Abschließend möchten wir uns bei all unseren Mitschülern des Jahrganges 5HBb für Verständnis und Geduld im Laboratorium bei Fragen zu unserer Diplomarbeit bedanken, allen voran Silvia FIBI und Michael NOHAVA sowie aus der Parallelklasse Bernhard KLÖSCH und Hans Peter KARL, die zur selben Zeit am selben Ort an ihren Diplomprojekten arbeiteten.

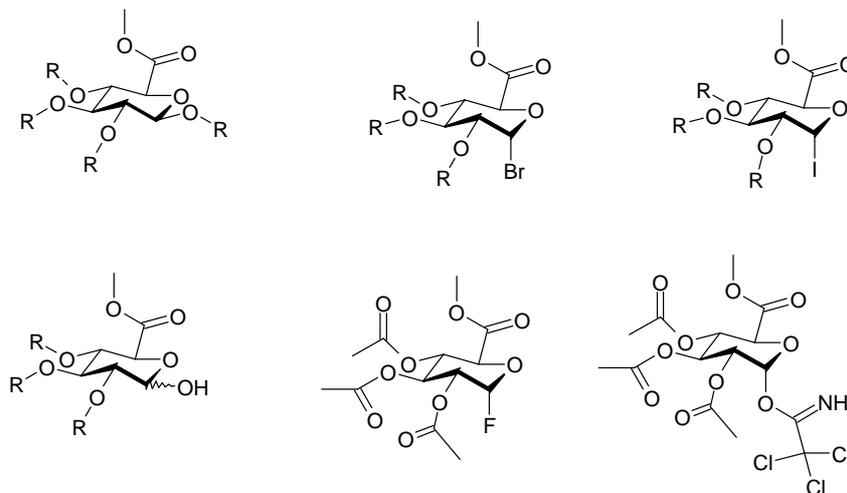
## KURZFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit werden verschiedene Glucuronyldonoren synthetisiert. Sie unterscheiden sich im Aufbau, der Struktur und den chemischen Eigenschaften der Schutzgruppen. Begonnen wird mit Tetra-O-Acetylglucuronsäuremethylester und den analogen Pivaloyl- und Benzoylgeschützten Glucuronsäuremethylestern. Ausgehend von diesen Grundkörpern wird jeweils die geschützte 1-OH-Gruppe durch andere Gruppen wie -Br, -F, -I, oder  $-OC(NH)CCl_3$  ersetzt oder die 1-OH-Gruppe entschützt.

Das so gewonnene Spektrum an Glucuronyldonoren wird nun zur Darstellung von Glucuroniden eingesetzt. Diese organischen Synthesen werden anschließend mit enzymatisch katalysierten Glucuronidierungen verglichen.

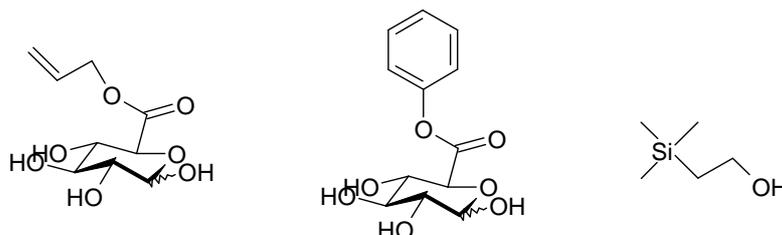
Abschließend werden die Synthesen dahingehend optimiert, um die Produkte wirtschaftlicher zu erhalten.

Folgende Glucuronyldonoren und Grundkörper wurden hergestellt:



Wobei R= Acetyl, Pivaloyl und Benzyl

Folgende Substanzen für weitere Untersuchungen wurden synthetisiert:

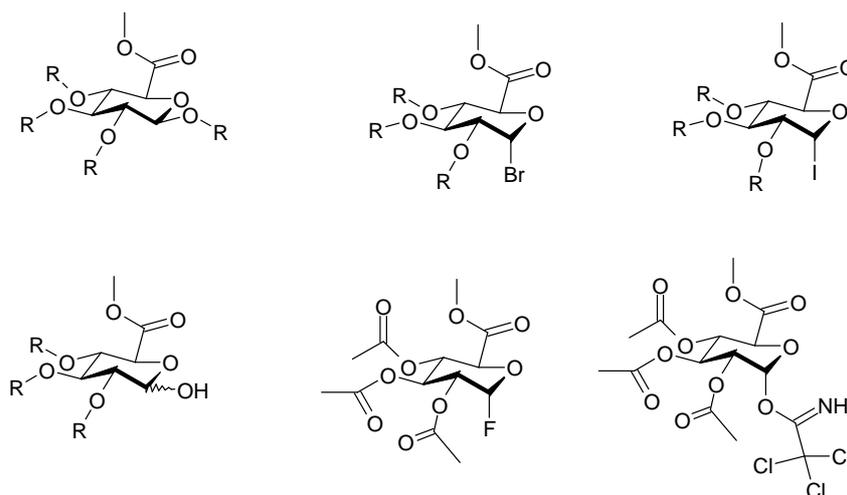


## ABSTRACT

In this project different glucuronyl donors are synthesized. They differ because of their structure and their chemical characteristics of the protecting groups. The first substance, which is synthesized, is tetra-O-acetylglucuronic acid methylester and its pivaloyl- and benzoylprotected analogons. Starting with these substances each 1-OH-group gets substituted by other groups like -Br, -F, -I, or  $-\text{OC}(\text{NH})\text{CCl}_3$ , or the 1-OH-group gets disprotected. Afterwards the spectrum of glucuronyldonors which has been won by this way, now is used for synthesizing glucuronides. Then this organic syntheses get compared to enzymatic catalyzed glucuronidations.

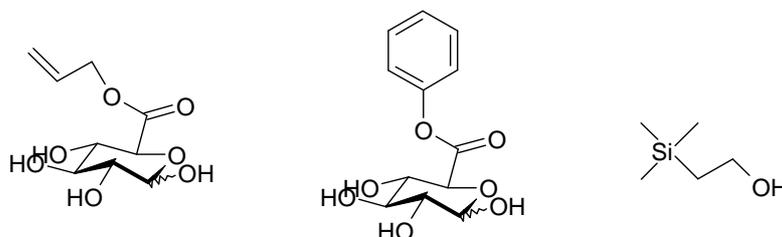
Farer the syntheses get optimized to obtain the products in a more economic way.

The following glucuronyldonors were synthesized:



R= acetyl, pivaloyl, benzoyl

The following substances were synthesized for further studies:



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I FORMELSCHEMATA</b> .....	<b>1</b>
<b>II EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
2.1. <i>Allgemeines</i> .....	8
2.2. <i>Problemstellung und Zielsetzung</i> .....	8
2.2.1. <i>Problemstellung</i> .....	8
2.2.2. <i>Zielsetzung</i> .....	8
2.3. <i>Ressourcen</i> .....	9
2.4. <i>Forschungs- und Bildungskooperation „Grüne Chemie“</i> .....	10
<b>III THEORETISCHER TEIL</b> .....	<b>13</b>
3.1. <i>Enzymkatalyse</i> .....	14
3.1.1. <i>Aufbau von Enzymen</i> .....	14
3.1.2. <i>Katalyse</i> .....	16
3.1.3. <i>Enzymkinetik</i> .....	17
3.2. <i>Metabolismus</i> .....	18
3.2.1. <i>Phase-I – Metabolismus</i> .....	18
3.2.2. <i>Phase-II – Metabolismus</i> .....	21
3.3. <i>Gaschromatographie</i> .....	22
3.4. <i>Massenspektrometrie</i> .....	24
3.4.1. <i>Physikalische Grundlagen</i> .....	24
3.4.2. <i>Gerätetechnik</i> .....	27
3.5. <i>NMR - Spektroskopie</i> .....	29
3.5.1. <i>Physikalische Grundlagen</i> .....	29
3.5.2. <i>Kernspin und Nukleonenspin</i> .....	32
3.5.3. <i>Anregung und chemische Verschiebung</i> .....	33
3.5.4. <i>Spin-Spin-Kopplung</i> .....	38
3.5.5. <i>Weitere Spektrencharakterisierungen</i> .....	41
3.5.6. <i>Spektrometer und Aufnahmetechniken</i> .....	42
3.5.7. <i>Deuterierung</i> .....	46
3.5.8. <i>Beispiel zu dieser Arbeit</i> .....	47

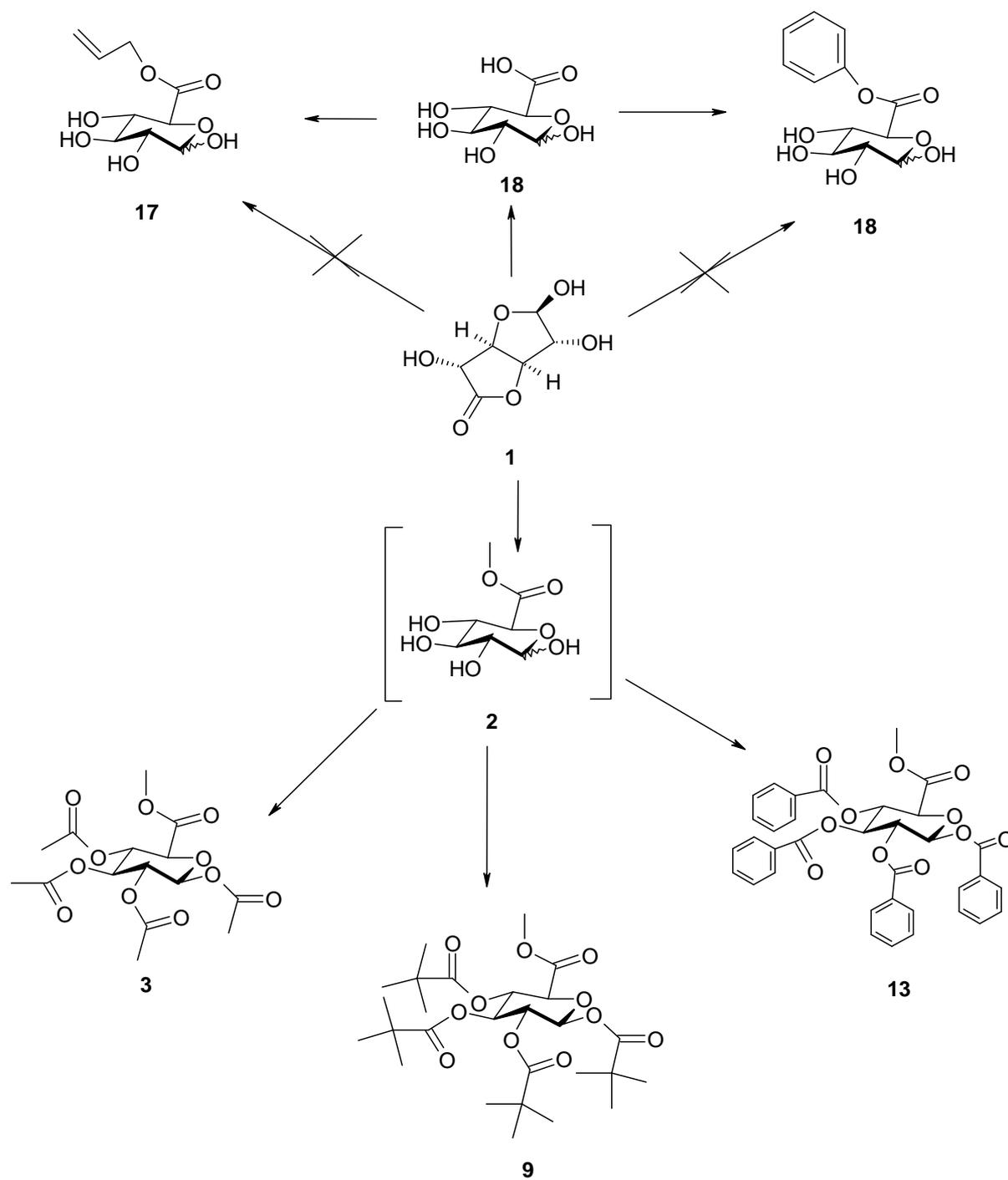
<b>IV SPEZIELLER TEIL</b> .....	<b>52</b>
4.1. <i>Grundkörpersynthese</i> .....	53
4.1.1. Lactonöffnung: Umesterung mit primären Alkoholen.....	53
4.1.2. Esterbildung an alkoholischen OH-Gruppen mit Säurechlorid.....	54
4.1.3. Esterbildung an alkoholischen OH-Gruppen mit Säureanhydrid.....	55
4.1.4. Glucuronsäureesterbildung mit freier Säure und Alkylbromiden .....	56
4.1.5. Lactonöffnung: Glucuronsäuresynthese.....	57
4.2. <i>Chlorameisensäure-(2-trimethylsilyl)-ethylester</i> .....	58
4.2.1. Reformatzky-Reaktion: 2-Trimethylsilylessigsäureethylester .....	58
4.2.2. Lithiumaluminiumhydrid-Reduktion: 2-Trimethylsilylethanol .....	59
4.2.3. Veresterung: Chlorameisensäure-(2-Trimethylsilyl)-ethylester.....	60
4.3. <i>Synthese von Glucuronyldonoren</i> .....	61
4.3.1. 1-Bromozucker .....	61
4.3.2. Iodozucker .....	62
4.3.3. 1-OH-Zucker .....	63
4.3.4. 1-O-Trichloracetimidat-2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-Glucuronsäuremethylester .....	65
4.3.5. 1-Fluoro-1-deoxy-2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucuronic acid methyl ester (7) .....	66
4.4. <i>Organisch-chemische Glucuronidierung</i> .....	67
4.4.1. Königs-Knorr-Methode .....	67
4.5. <i>Proteinreinigung</i> .....	69
4.6. <i>Enzymatische Hydrolyse und Glucuronidierung</i> .....	75
4.6.1. Hydrolyse - Glucuronidase.....	75
4.6.2. Glucuronidierung – UDP-Glucuronyltransferase.....	80
<b>V EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....	<b>86</b>
5.1. <i>General informations</i> .....	87
5.1.1. Further abbreviations.....	88
5.2. <i>Synthesis of Glucuronyldonors</i> .....	89
5.2.1. Synthesis of Acetyl-protected glucuronyldonors .....	89
5.2.2. Synthesis of Pivaloyl-protected glucuronyldonors.....	96
5.2.3. Synthesis of Benzoyl-protected glucuronyldonors.....	101
5.3. <i>Preparation of intermediate products for further studies</i> .....	105
5.3.1. Intermediate products for Carbonat-protected Glucuronyldonors .....	105
5.4. <i>Synthesis of glykokonjugates and metabolites</i> .....	110
5.4.1. Organic-chemical Glucuronidation .....	110

5.5. <i>Enzymatical Methods</i> .....	112
5.5.1. Isolation of UDP-Glucuronyltransferase.....	112
5.5.2. Electrophoretical Analysis of the Iso-enzymes of UDP-Glucuronyltransferase. 114	
5.5.3. Enzymatical Glucuronidation of p-Nitrophenole and 4-Methylumbelliferone.. 118	
5.5.4. Isolation of Glucuronidase .....	121
5.5.5. Enzymatical Hydrolysis of 1-(4-nitrophenol)- $\beta$ -D-tetra-O-acetyl-glucuronic acid methyl ester .....	123
<b>VI LITERATUR –.....</b>	<b>124</b>
<b>UND ABBILDUNGS-VERZEICHNIS .....</b>	<b>124</b>
6.1. <i>Literatur</i> .....	125
6.2. <i>Abbildungen</i> .....	125
<b>VII ANHANG .....</b>	<b>127</b>
7.1. <i>Erklärung</i> .....	128
7.2. <i>Zeitplanung</i> .....	129

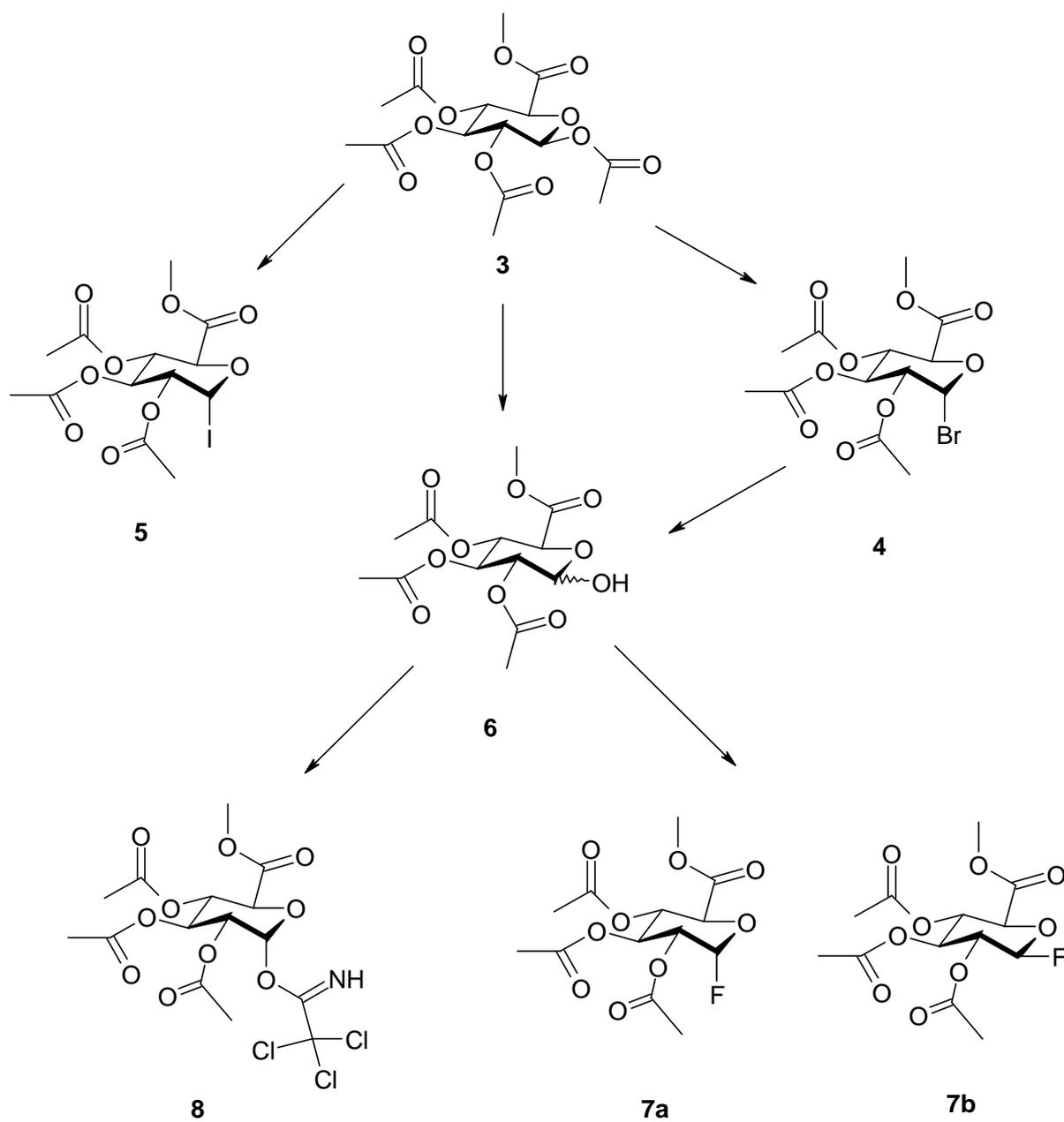
# I

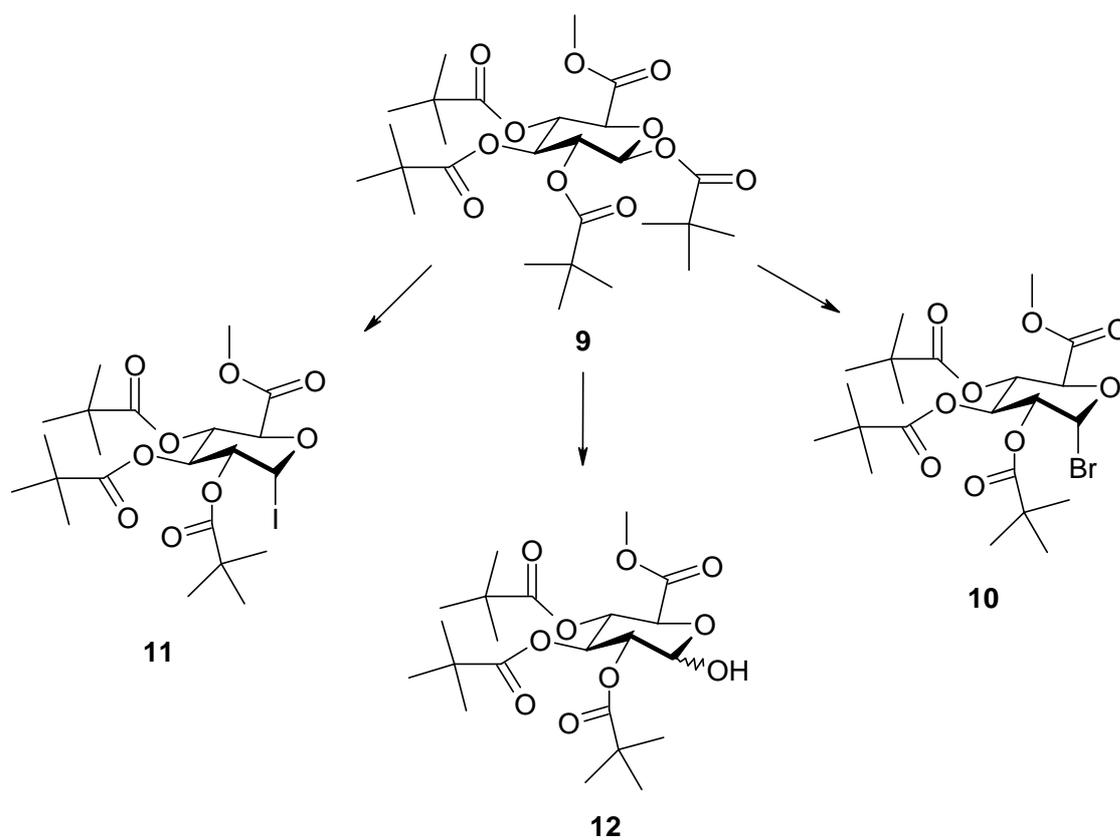
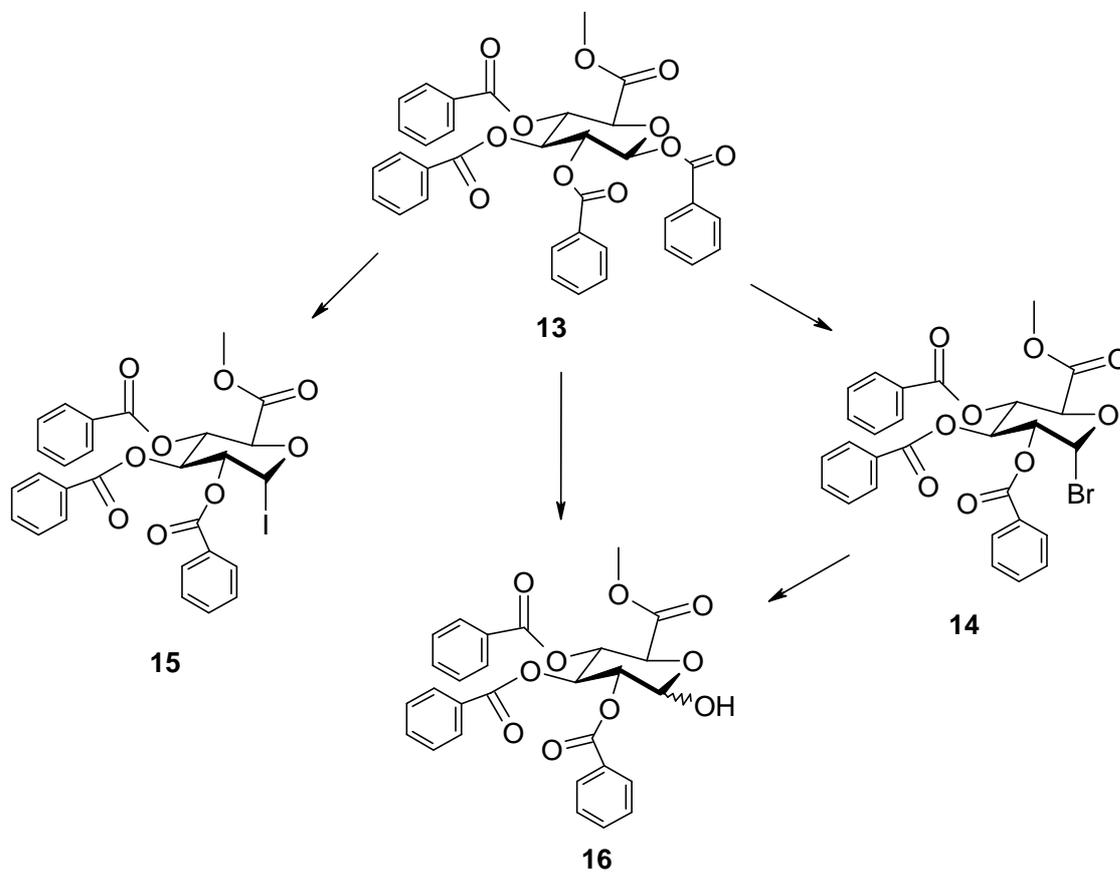
# FORMELSCHEMATA

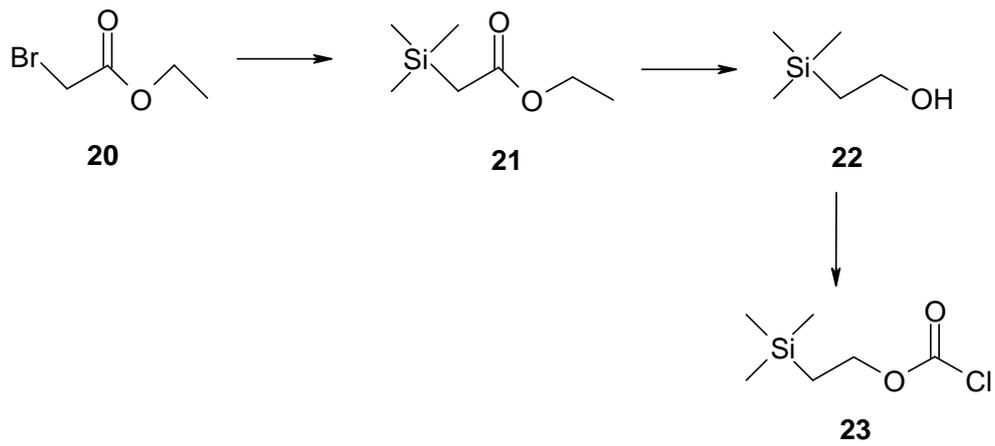
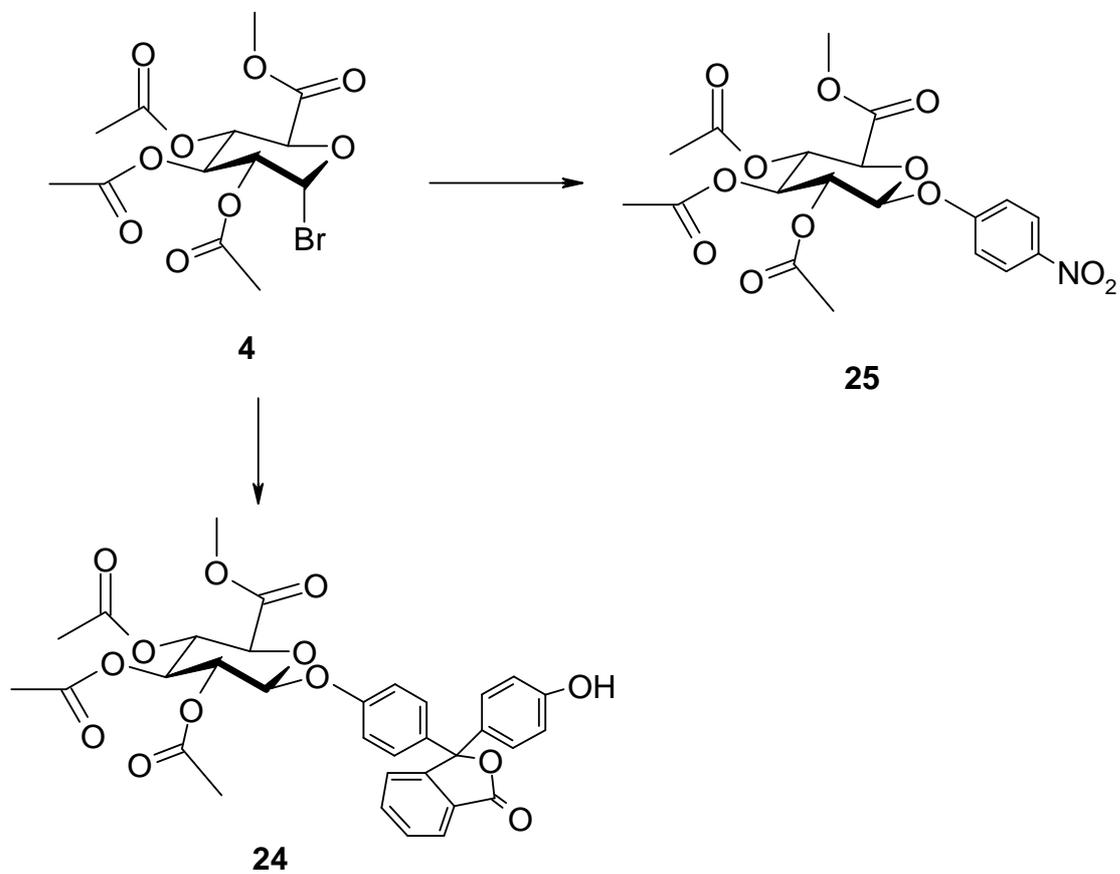
## Grundkörper

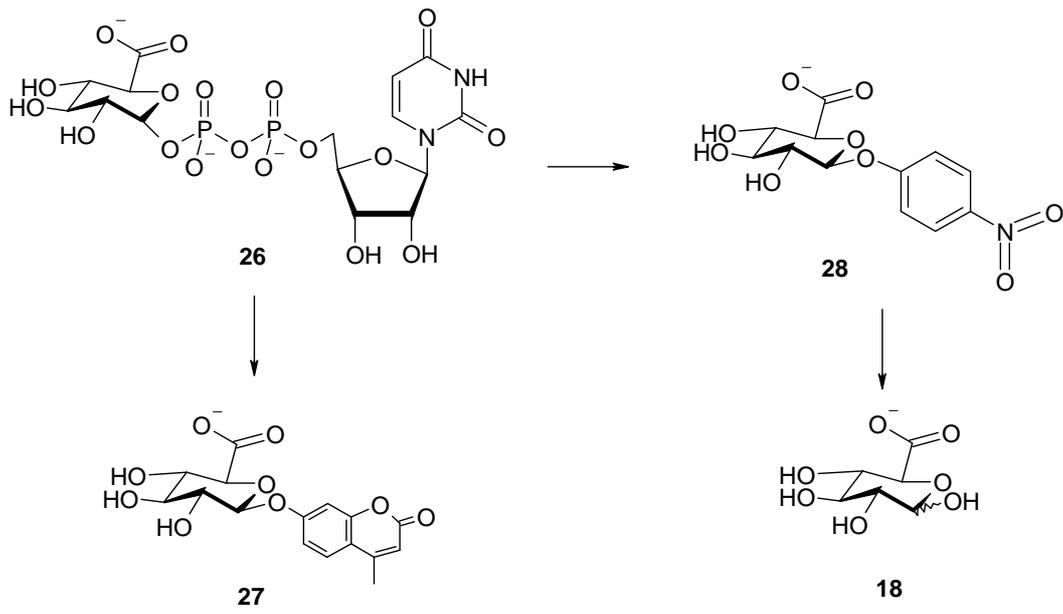


## Acetylgeschützte Glucuronyldonoren



**Pivaloylgeschützte Glucuronyldonoren****Benzoylgeschützte Glucuronyldonoren**

**Chlorameisensäure-(2-Trimethylsilyl)-ethylester****Organisch-chemische Glucuronidierung**

**Enzymatische Glucuronidierung / Hydrolyse**

# **II**

# **EINLEITUNG**

## ***2.1. Allgemeines***

Die Bereitstellung eines möglichst weiten Spektrums an Glucuronyldonoren ermöglicht die Durchführung verschiedener an die chemischen Eigenschaften des Akzeptors angepassten Glucuronidierungen. Diese Glucuronidierungen sind wichtiger Bestandteil des Phase II – Metabolismus. Durch sie werden Xenobiotika zu wasserlöslichen Verbindungen umgewandelt, die anschließend über die Nieren ausgeschieden werden. Noch ist dieses Forschungsgebiet und damit auch diese Arbeit der Grundlagenforschung zuzurechnen. In einigen Jahren oder Jahrzehnten könnten sich jedoch bereits erste Anwendungen, vor allem pharmazeutischer Art, etablieren. Eine viel versprechende Einsatzmöglichkeit wäre z.B. die Krebstherapie. So könnten geschützte Glucuronyldonoren über die Blutbahn in Tumorzellen eingebracht werden, wo sie dann von Enzymen, welche nur in den Tumorzellen vorkommen, entschützt werden und für die Zelle lebensnotwendige Teile dem Stoffwechsel zuführen und so die Tumorzelle zum Absterben bringen. Eine solche Therapie käme ohne größere Nebenwirkungen für den Patienten aus.

## ***2.2. Problemstellung und Zielsetzung***

### **2.2.1. Problemstellung**

Glucuronyldonoren stellen eine grundlegende Voraussetzung für die Erforschung des Mechanismus von Glucuronidierungen dar. Glucuronide stellen ihrerseits wiederum einen wichtigen Teil des Stoffwechsels dar. Der Abbau von Giften wie Mykotoxinen oder nicht biologischen Giften wie Aromaten erfolgt über die Bildung von Glucuroniden als wasserlösliche Derivate, die über die Nieren ausgeschieden werden können. Im Fall der Aromaten erfolgt allerdings die Epoxidierung zum Phenol, das im Anschluss glucuronidiert wird als Zwischenstufe.

### **2.2.2. Zielsetzung**

Es sollen Glucuronsäurederivate synthetisiert werden, die möglichst vielseitig einsetzbar sind. Das bedeutet, dass die Glucuronsäure auf verschiedene Arten mit Schutzgruppen versehen werden soll, um sie dann, spezifisch und möglichst individuell auf die zu metabolisierende Verbindung abgestimmt, nach erfolgter Glucuronidierung wieder entfernen zu können.

### ***2.3. Ressourcen***

Sämtliche organisch-präparativen Arbeiten wurden am Institut für angewandte Synthesechemie der Technischen Universität Wien durchgeführt. Die benötigten Reagenzien wurden dort zur Verfügung gestellt und über die Projektinitiative „Sparkling Science“ vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung sowie vom Budget der Forschungsgruppe Univ. Prof. Fröhlichs finanziert.

Die biochemischen Arbeiten wurden an der HBLVA Rosensteingasse durchgeführt und die Mittel über das Laborbudget finanziert.

## **2.4. Forschungs- und Bildungskooperation „Grüne Chemie“**

„Grüne Chemie“? Für so manchen Umweltschützer scheint dies auf den ersten Blick undenkbar. Doch die Zeiten rauchender Industrieschlote, die ohne Rücksicht auf die Umwelt stur ihrem Produktionsplan folgen, sind – bis auf wenige Ausnahmen – vorbei. In jedem Land gibt es bereits strenge Umweltauflagen, an die sich die Unternehmer zu halten haben. Leider ist es nur all zu oft so, dass es nicht nur im Fall der Chemiegegner, sondern ganz allgemein bei diesem ersten Blick bleibt, wodurch sich teils fatale Vorurteile etablieren, wie die Geschichte schon zu oft zeigte. Aus diesem Grund wurde diese Kooperation eingerichtet. Um unüberlegten und dem Fortschritt hinderlichen Vorurteilen vorzubeugen.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung initiierten Projektes „Sparkling Science“ durchgeführt. Im ersten Jahr diese Projektinitiative gab es sechs Schwerpunkte:

- Alternative Energieträger und moderne Chemiereaktoren
- Nachwachsende Rohstoffe und Biomaterialien
- Bioorganische Chemie und weiße Biotechnologie
- Moderne Katalyse
- Chemie in Lebensmittelsicherheit und Umwelt
- Alternative Reaktionsumgebungen

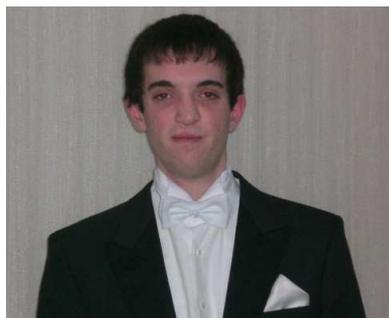
Das vorliegende Projekt „Glucuronyldonoren in der Synthese von Glucokonjugaten und Metaboliten“ ist Teil des Schwerpunktfeldes „Chemie in Lebensmittelsicherheit und Umwelt“.

Auch in der Umwelttechnologie könnten Glucuronyldonoren zur Anwendung kommen. So bieten sie, aus ihrer natürlichen Aufgabe im menschlichen und tierischen Körper folgend, die Möglichkeit, mit bestimmten Schad- und Giftstoffen wasserlösliche Konjugate zu bilden, die dann leicht ausgewaschen werden können. Dies aber bedeutet keine Verlagerung der Schadstoffbelastung wie es durch reines Auswaschen entstünde. Die glucuronidierte Form wird von vielen Mikroorganismen, die sich in jedem natürlichen Gewässer befinden, erkannt und aufgenommen. Diese sind dann in der Lage das Glucokonjugat abzubauen und so in den eigenen Stoffwechsel zu integrieren.

Die Glucuronidierung ist weiters wesentlicher Bestandteil des Stoffwechsels (Phase-II-Metabolismus). Es ist also auch erklärtes Ziel dieser Arbeit und des Projektschwerpunktes „Chemie in Lebensmittelsicherheit und Umwelt“, durch die Erforschung der Chemie der Glucuronyldonoren den Stoffwechsel besser verstehen zu können und Möglichkeiten der

technologischen Anwendung kontrollierter Stoffwechselsysteme zu finden. Das mag auf den ersten Blick zwar klingen, als wolle man in den Grundmotor des Lebens eingreifen, doch haben Überlegungen und Entwicklungen dieser Art in der Vergangenheit schon viel geschaffen, was der Menschheit heute äußerst dienlich ist. Als Beispiele sei die Citronensäureproduktion mit *Aspergillus niger* durch Unterbrechung des Citratzyklus, einem weiteren zentralen Bestandteil des Stoffwechsels genannt, die es uns heute ermöglicht, Citronensäure in großer Menge zu produzieren. Die weite Verbreitung und große Verfügbarkeit beliebter Limonaden wie Coca Cola<sup>®</sup>, Fanta<sup>®</sup> oder Sprite<sup>®</sup> wurde erst dadurch ermöglicht.

Wir haben von diesem Projekt auf jeden Fall profitiert. Die Möglichkeit, eine Diplomarbeit im Rahmen unserer Ausbildung an der HBLVA für chemische Industrie, Wien XVII durchführen zu können, haben wir gerne wahrgenommen. Dass wir, derer beider Hauptinteresse mehr auf wissenschaftlichem als technologischem Gebiet liegt, auch noch die Möglichkeit hatten, an moderner Forschungsarbeit an der Technischen Universität Wien teilhaben zu können, machte dieses Projekt für uns noch ein Stück wertvoller. Das Projekt Sparkling Science ist, so sind wir uns einig, auf jeden Fall ein Erfolg und wir wünschen allen Interessierten ebenfalls die Möglichkeit zu bekommen, an solch einem spannenden Projekt arbeiten zu können:



Die Möglichkeit eine Diplomarbeit durchzuführen, habe ich gerne wahrgenommen. Die Arbeit am Institut für angewandte Synthesechemie der Technischen Universität Wien, wo ich meine Diplomarbeit durch Sparkling Science durchführen konnte, bereitete mir viel Freude. Ich hatte in der Schule bereits ein Jahr lang praktischen Unterricht im organisch-präparativen Laboratorium und war daher mit der Materie schon etwas vertraut. Daher profitierte ich noch mehr von den vier Wochen am Institut, da ich gleich mit den ersten Synthesen beginnen konnte. Die Möglichkeiten an der Universität sind noch viel ausgedehnter als die an der Schule, sodass ich nicht nur viel Theorie sondern auch einiges an Praxis dazulernte.

Jetzt, wo ich durch das Projekt Sparkling Science die Möglichkeit hatte, wissenschaftliches Arbeiten zu erleben, bin ich mir ganz sicher, nächstes Jahr ein naturwissenschaftliches Studium zu beginnen, um dann nach Möglichkeit auch in der Forschung tätig zu werden.

*Stefan Lindner*



Ich entschied mich, eine Diplomarbeit statt einer Projektwoche an der Rosensteingasse durchzuführen, da bei einer Diplomarbeit die Forschung im Vordergrund steht. Der Einblick in die Forschung sollte mich in meiner Entscheidung, Technische Chemie an der Technischen Universität Wien zu studieren um danach in der Forschung zu arbeiten, gegebenenfalls bestätigen. Die Möglichkeit, die Durchführung der Diplomarbeit an genau dieser Fakultät im Rahmen des Sparkling Science-Projekt durchzuführen, kam mir dementsprechend gelegen. Durch die chemischen Vorkenntnisse und vor allem den Erfahrungen aus dem organisch-präparativen Laboratorium konnten die Arbeiten sofort beginnen und die theoretischen Hintergründe waren verständlich und interessant. Dieses Projekt hat aber nicht nur meine theoretischen Kenntnisse ergänzt, auch die Fertigkeiten zum Durchführen von Synthesen wurden erweitert.

Die Teilnahme am Projekt Sparkling Science hat mein Bestreben, in der Forschung zu arbeiten, noch verstärkt. Ich werde nach Ableistung des Präsenzdienstes mein Studium der Technischen Chemie an der Technischen Universität Wien beginnen.

*Michael Doppler*

# **III**

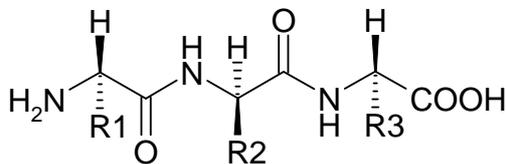
# **THEORETISCHER TEIL**

### 3.1. Enzymkatalyse

#### 3.1.1. Aufbau von Enzymen

Enzyme sind Proteine. Als solche besitzen sie einen in vier Ebenen gliederbaren Aufbau. Die Primärstruktur beschreibt die Grundbausteine des Enzyms, die Aminosäuresequenz. Jedes Protein ist aus Aminosäuren-Monomeren aufgebaut. Diese sind durch eine Amid-Bindung miteinander verknüpft (Abbildung III.1.):

Abbildung III.1.:  
Amidbindung



Bei Proteinen wird diese Bindung Peptidbindung genannt. Daher rührt auch die für Proteine übliche Bezeichnung „Polypeptide“. Die Reste R<sub>n</sub> sind je nach Aminosäure unterschiedlich. So hat Glycin beispielsweise nur ein Wasserstoffatom als Rest, Phenylalanin einen Benzylrest, oder Valin einen Isopropylrest. Wird die Primärstruktur angeschrieben, verwendet man aus drei Buchstaben bestehende Kürzel für die einzelnen Aminosäuren, von denen es 20 verschiedene natürlich vorkommende gibt. Der N-Terminus, also jene Aminosäure, die eine freie NH<sub>2</sub>-Gruppe besitzt wird dabei links angeschrieben, der C-Terminus ist immer rechts. Betrachtet man die DNA, in der die Proteine durch den genetischen Code durch vier verschiedene Nucleinbasen codiert sind, so würden sich eigentlich mehr mögliche Aminosäuren ergeben. Je drei Basen codieren für eine Aminosäure, es gibt also  $4^3 = 64$  Möglichkeiten. Zwei davon sind durch das Start- und das Stopp-Codon belegt, die Anfang und Ende der Aminosäurenkette codieren. Es bleiben allerdings immer noch 62 Möglichkeiten, denen nur 20 Aminosäuren gegenüberstehen. Das liegt daran, dass für den Organismus besonders wichtige Aminosäuren zwei oder sogar mehr Kombinationen codieren. Die Sekundärstruktur beschreibt die räumliche Ausbildung eines Teilabschnittes der Aminosäurenkette. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten. Einerseits die  $\alpha$ -Helix-Struktur, andererseits die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (Abbildung III.2.):

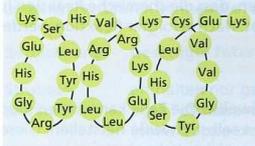
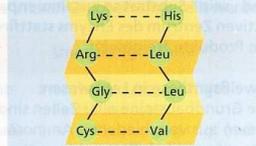
Helixstruktur	Faltblattstruktur
– Aminosäureketten sind schraubenförmig gewunden ( $\alpha$ -Helix)	– Aminosäureketten sind ähnlich einem gefalteten Blatt angeordnet ( $\beta$ -Faltblatt)
	

Abbildung III.2.:  
 $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt

Die Tertiärstruktur erklärt die räumliche Struktur einer ganzen Aminosäurekette. Sie zeigt die Abfolge von  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblatt-Abschnitten. Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen alle Proteine.

Über eine Quartärstruktur verfügen nur solche Proteine, die aus mehreren Untereinheiten bestehen. Sie zeigt die räumliche Anordnung dieser Untereinheiten zueinander. Das bekannteste Beispiel für eine Quartärstruktur ist die des Hämoglobins (Abbildung III.3.):

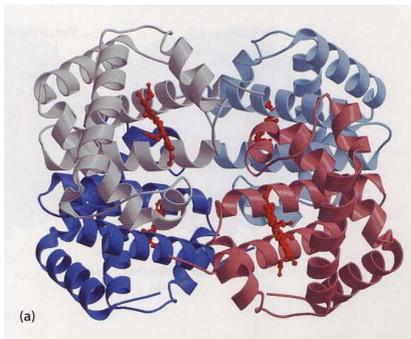


Abbildung III.3.:  
Quartärstruktur Hämoglobin

Die rote und die graue sowie die hell- und dunkelblaue Kette stellen zwei jeweils idente Untereinheiten dar. Die roten Moleküle sind die Sauerstoff tragenden Häm-Gruppen. Viele Enzyme aber auch manche anderen Proteine, wie das eben genannte Hämoglobin haben prosthetische Gruppen. Beim Hämoglobin ist dies die Häm-Gruppe. Dies sind nicht-Protein-Anteile, die aber dennoch wichtige Aufgaben erfüllen. Die Funktion mancher Proteine wird überhaupt fast ausschließlich von den prosthetischen Gruppen ausgeführt. Diese Gruppen können verschiedenartig an die Polypeptidketten gebunden sein. Wasserstoffbrücken, koordinationschemische oder auch kovalent gebundene prosthetische Gruppen kommen vor. Weiters für den Aufbau von Proteinen von Bedeutung sind die Disulfidbrücken. Die eine SH-Gruppe tragende Aminosäure Cystein kann mit einem weiteren Cystein-Monomer oxidativ zu einer Disulfidbrücke kondensieren (Abbildung III.4.):

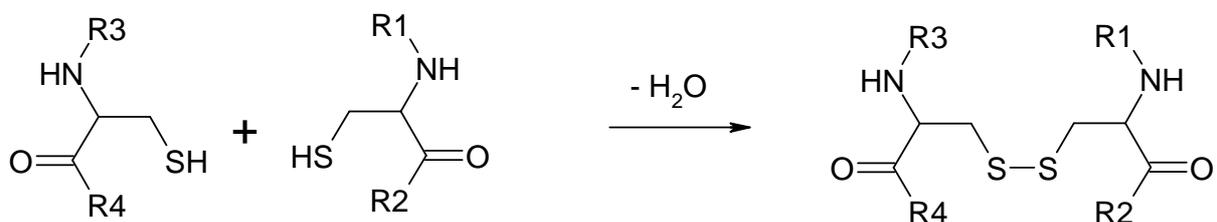


Abbildung III.4.:

Ausbildung einer Disulfidbrücke

Enzyme besitzen ein aktives Zentrum. Das ist jene Stelle im Molekül, die für die Katalyse verantwortlich ist. Oft sind dies prosthetische Gruppen oder Metallkationen.

### 3.1.2. Katalyse

Unter einem Katalysator versteht man einen Stoff, der in den Reaktionsverlauf eingreift, ohne dabei selbst verbraucht zu werden. Meist ist dieser Eingriff eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit. Manche Reaktionen werden überhaupt erst durch das Einwirken von Katalysatoren ermöglicht, da die Aktivierungsenergie der Reaktion herabgesetzt wird (Abbildung III.5.):

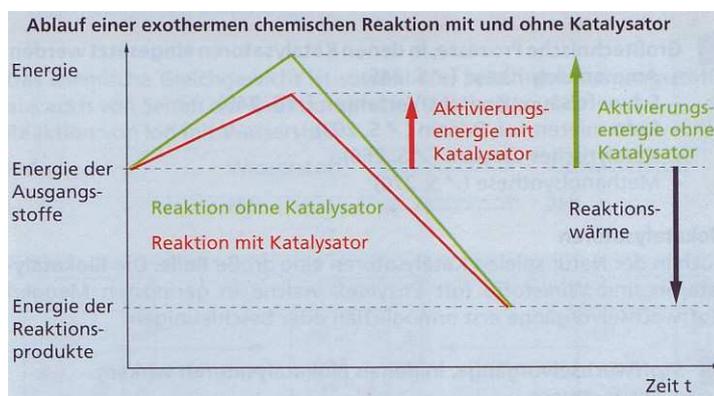


Abbildung III.5.:  
Katalysatorwirkung

Läge im gezeigten Beispiel nun die prozessbedingt maximal erreichbare Aktivierungsenergie (Reaktionstemperatur) zwischen dem Maximum der roten und der grünen Kurve, weil sich bei Überschreiten dieser Temperatur beispielsweise die Edukte zersetzen würden, so wäre diese Reaktion überhaupt nur mit Katalysatoreinwirkung möglich.

Es gibt aber auch die Möglichkeit, dass durch das Eingreifen bestimmter Stoffe eine Reaktion verlangsamt wird. Solche Stoffe werden Inhibitoren genannt. Oft werden Katalysatoren auch dazu eingesetzt, um von mehreren möglichen Reaktionen eine zu bevorzugen und so die Konzentration der Nebenprodukte zu minimieren.

Eine katalysierte Reaktion läuft nach folgendem Schema ab, wobei A und B die Edukte, K der Katalysator und AB das Produkt ist (Abbildung III.6.):

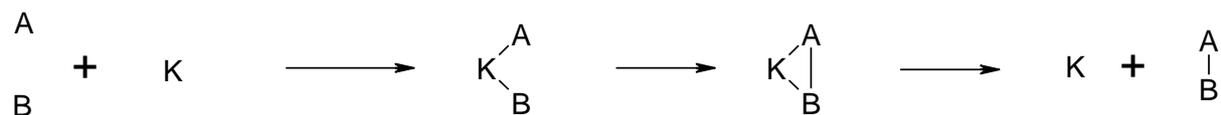


Abbildung III.6.:

Ablauf einer katalysierten Reaktion

### 3.1.3. Enzymkinetik

Enzyme haben eine Sonderstellung unter den Katalysatoren. Während die meisten technisch verwendeten Katalysatoren Edelmetalle sind, sind Enzyme organische Makromoleküle. Sie arbeiten unter den richtigen Bedingungen um viele Größenordnungen effizienter als andere Katalysatoren, ihre Aktivität ist also viel höher. Als Einheit für die Aktivität eines Katalysators wird vor allem bei Enzymen fast ausschließlich noch die alte Einheit „Unit“ mit der Definition  $1U = 1 \mu\text{mol [umgesetztes Substrat]} / \text{Minute}$ . Die SI-Einheit Katal ( $1\text{kat} = 1 \text{ mol/s}$ ) würde für die bei Enzymen oft verwendete spezifische Aktivität (U/mg Protein) unanschaulich kleine Werte liefern.

Der Nachteil von Enzymen ist jedoch, dass sie, um ihre Aktivität vollständig entfalten zu können, sehr definierte Bedingungen brauchen. Ihr Aktivitätsmaximum erreichen sie nur in sehr engen pH-, Temperatur-, Ionenstärken-, Substratkonzentrations-, und Enzymkonzentrationsbereichen. Will man ein Enzym präparativ oder gar technisch anwenden, muss man all diese Parameter relativ aufwändig ermitteln.

Die Eigenschaft, die in der Anwendung am häufigsten zum Problem wird ist, dass die Enzymaktivität mit der Produktkonzentration abnimmt. In der natürlichen Umgebung des Enzyms, im Organismus, ist dies durchaus verständlich. Ist von einem Produkt genügend da, muss nicht noch mehr davon produziert und somit wertvoller Nährstoff verbraucht werden. Die Phosphofruktokinase beispielsweise wird durch ihr Produkt ATP gehemmt, durch ihre Ausgangsprodukte AMP und ADP angeregt. So wird der Energiehaushalt der Zelle effizient reguliert.

Diese Tatsache, dass viele Enzyme durch ihre Edukte gehemmt werden, ist in der Anwendung oft störend. Daher sucht man die maximal mögliche Substratkonzentration, die man einsetzen kann, ohne das Enzym in seiner Aktivität zu beeinträchtigen. Praktisch geschieht dies so, dass man das Enzym eine bestimmte (Inkubations-) Zeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen arbeiten lässt, die Aktivität bestimmt und anschließend gegen die Substratkonzentration aufträgt (Endwertmethode, Auftragung nach Michaelis-Menten; Abbildung III.7.):

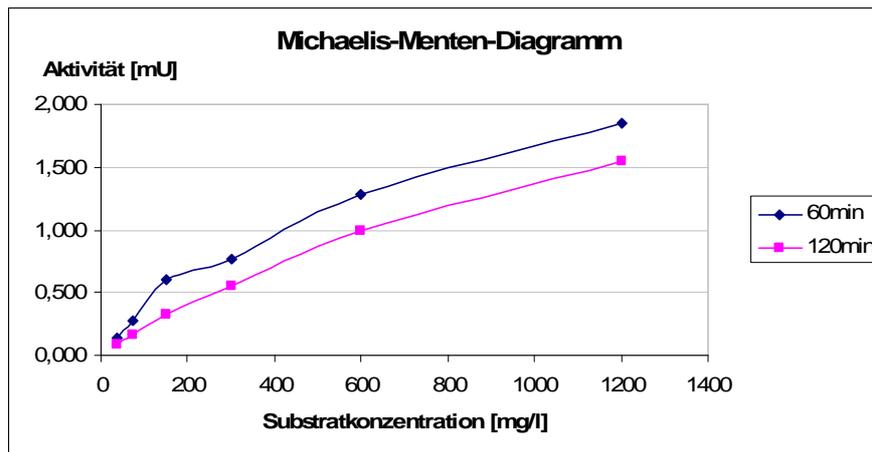


Abbildung III.7.:  
Michaelis-Menten-  
Diagramm Glucuronidase

Dies ist das Beispiel der Glucuronidase. Es wurde bei zwei verschiedenen Inkubationszeiten gemessen (1 und 2 Stunden)

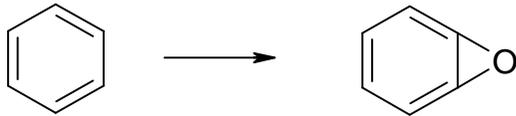
## 3.2. *Metabolismus*

Unter Metabolismus, zu Deutsch dem Stoffwechsel, versteht man die Überführung aufgenommener Substanzen in körpereigene Stoffe, die vom Körper verwendet und zu Energie oder Körpersubstanz umgesetzt werden oder die Unschädlichmachung von Fremdstoffen (xenobiotischer Metabolismus). Letzteres läuft darauf hinaus, dass der Fremdstoff in einer Weise modifiziert wird, sodass er wasserlöslich wird und in dieser Form über die Nieren ausgeschieden werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit ist die zweite Stufe dieser Entsorgung, das Erhöhen der Löslichkeit in Wasser, von Bedeutung.

### 3.2.1. Phase-I – Metabolismus

Zu Beginn ist zu klären, was vor dem Start des Phase-II – Metabolismus geschieht. Dazu soll Phase I kurz erläutert werden.

Im Phase-I – Metabolismus werden an das abzuführende Xenobiotikum funktionelle Gruppen gebunden, sodass eine Weiterreaktion möglich wird. Das Ziel ist es, Wechselwirkungen mit dem Stoffwechselsystem des Körpers zu ermöglichen (functional group interaction, FGI) und die Fremdstoffe für den weiteren Stoffwechselweg vorzubereiten. Die Reaktionen des Phase-I – Metabolismus sind relativ einfacher chemischer Natur. Die entsprechenden Enzyme sind auch wesentlich weniger substratspezifisch als die Enzyme anderer Körperfunktionen. Eine Beispielreaktion ist die Epoxidierung von Aromaten:



Betrachtet man das Produkt dieser Reaktion, wird die Giftigkeit von Aromaten klar: Das Benzol selbst könnte im Körper nicht viel Schaden anrichten. Es würde als schlecht wasserlöslicher Stoff im Fettgewebe gespeichert werden.

Doch das Produkt dieser ersten Stoffwechselphase, das Epoxid, ist deutlich gefährlicher als das ursprüngliche Xenobiotikum. Epoxide sind sehr reaktive Verbindungen. Der Grund dafür ist, dass der Bindungswinkel von  $60^\circ$  sowohl für den Sauerstoff als auch für den Kohlenstoff sehr überspannt ist. Letzterer bindet bevorzugt in einem Winkel von  $120^\circ$ , also einem doppelt so gestreckten Winkel.

Im günstigsten Fall erfolgt die anschließende Epoxidöffnung mit Wasser als Reaktionspartner und im Fall des Benzols entsteht das Brenzkatechin. Phenole können weiter metabolisiert, z.B. glucuronidiert und in der Folge ausgeschieden werden.

Doch die Epoxidöffnung kann nicht nur mit Wasser vollzogen werden. Als Reaktionspartner können unter anderem auch die Aminogruppen von Proteinen oder Nucleinbasen dienen (Abbildung III.8.):

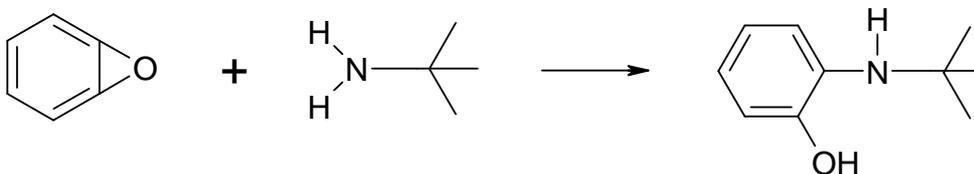


Abbildung III.8.:

Epoxidöffnung an Aminogruppen

Vor allem die Reaktion mit Nucleinbasen ist problematisch. Durch sie werden Fehlerstellen in der DNA verursacht. Treten sie in nur geringer Zahl auf, ist die Zelle im Stande, sie auszubessern. Entstehen durch mehrfache Epoxidöffnung entsprechend viele Fehler in der DNA, kann sie die Zelle nicht mehr korrigieren. Nun gibt es zwei Möglichkeiten. Die günstigere der beiden ist, dass die Zelle abstirbt. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass die Stelle zerstört wird, die für Enzyme zur Replikationsregulierung codiert. In diesem Fall teilt sich die Zelle unreguliert so schnell und lange es das Nährstoffangebot erlaubt, ähnlich wie bei Bakterien (diese haben allerdings wesentlich kürzere Generationszeiten als die betrachteten eukaryotischen Körperzellen). Dies ist der Ablauf einer Krebserkrankung. Geht nur die Replikationsregulierung verloren, wächst der Tumor nur an der einen betroffenen Stelle und kann leicht operativ entfernt werden. Wird aber auch die Information zum Verbleib

im Zellverband zerstört, lösen sich die Tumorzellen aus demselben und gelangen über die Blutbahn in den ganzen Körper. So entstehen Metastasen. Ein metastasierender Tumor kann, wenn überhaupt, nur noch durch schwere medikamentöse Behandlung eliminiert werden (Chemotherapie). Diese Therapien stellen für den Patienten eine enorme körperliche und psychische Belastung dar und sind mit weitreichenden Nebenwirkungen verbunden.

Die Epoxidierung ist nicht die einzige Möglichkeit des Phase-I – Metabolismus. So können Verbindungen auch hydrolysiert, reduziert oder oxidiert werden. Fremdproteine werden meist hydrolysiert. Die so entstehenden Aminosäuren werden zur Synthese körpereigener Proteine verwendet. Auf diesem Weg gelangen die essentiellen Aminosäuren, also jene, die der Körper nicht selbst herstellen kann, in den Körper. Toluol kann im Gegensatz zu Benzol auch leicht oxidiert werden. Die dabei entstehende Benzoesäure ist gut wasserlöslich und wird direkt ausgeschieden. Das ist der Grund, warum Benzol giftig und Toluol „nur“ gesundheitsschädlich ist.

### 3.2.2. Phase-II – Metabolismus

Entstehen nun im Zuge des Phase-I – Metabolismus Verbindungen mit funktionellen Gruppen, die allein allerdings noch eine zu geringe Löslichkeit in Wasser haben, um ausgeschieden zu werden, so werden im Phase-II-Metabolismus Konjugate synthetisiert, die die Wasserlöslichkeit erhöhen. Die häufigsten sind Sulfate, Glutathionkonjugate und Glucuronide, welche nur in Mensch und Tier vorkommen (hier am Beispiel des zuvor beschriebenen Brenzkatechin; Abbildung III.9.):

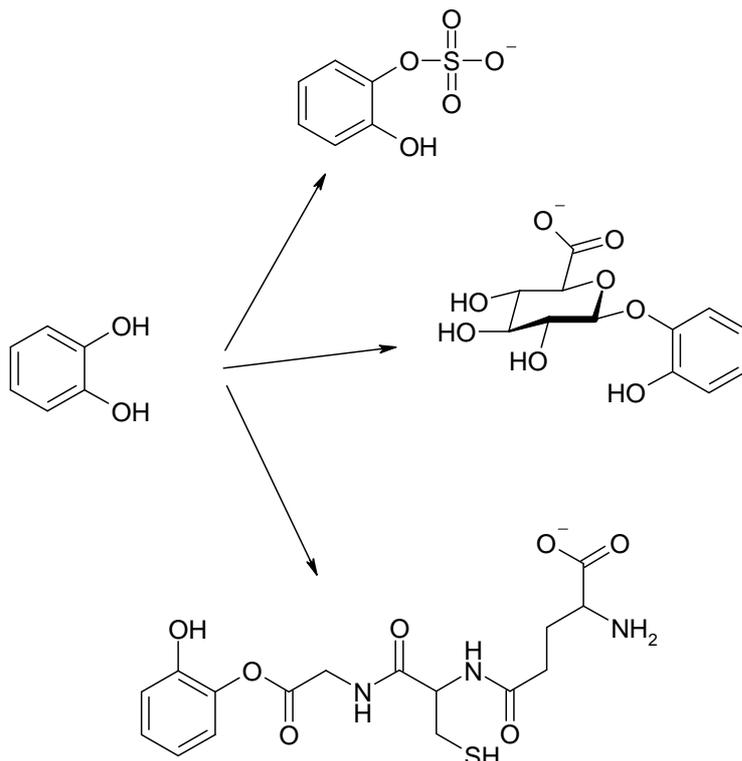


Abbildung III.9.:

Konjugate des Phase-II – Metabolismus

Die entstehenden Verbindungen weisen eine sehr gute Löslichkeit in Wasser auf und können so über die Nieren ausgeschieden werden. Diese letzte Stufe des Stoffwechsels wird auch oft als Phase-III – Metabolismus bezeichnet. Streng genommen ist das aber kein Stoffwechsel mehr, denn die Substanzen werden nicht mehr modifiziert und unverändert ausgeschieden.

### 3.3. Gaschromatographie

Die Gaschromatographie ist das effektivste chromatographische Trennverfahren. Eine GC-Säule hat je nach Packung und Länge ca. 10000 bis 100000 theoretische Böden. Im Vergleich dazu haben HPLC-Säulen etwa 5000 theoretische Böden. Voraussetzung dafür, dass eine Substanz gaschromatographisch untersuchbar ist, ist dass sie unzersetzt verdampfbar ist. Der Aufbau eines Gaschromatographen ist relativ einfach. Er besteht aus einem beheizten Injektorblock, einer Säule in einem programmierbaren Ofen und dem Detektor. Als Trägergas wird meist Helium, manchmal noch Stickstoff verwendet (Abbildung III.10.).

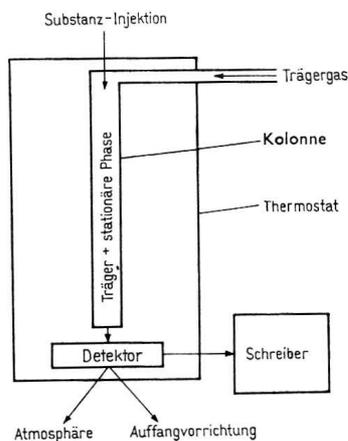


Abbildung III.10.:  
Schema eines Gaschromatographen

Die Säule kann entweder als gepackte Säule oder als Kapillarsäule ausgeführt sein. Erstere sind etwa 2-4mm dick, haben eine Länge von 0,5 bis 5m und sind mit Trägermaterial gefüllt. Auf dem Trägermaterial ist die (flüssige) stationäre Phase gebunden. Kapillarsäulen haben einen Innendurchmesser von 0,1 bis 0,3mm und sind 10 bis 100 Meter lang. Die stationäre Phase ist ein auf der Kapillarinenseite angelegter Flüssigkeitsfilm. Mit Ihnen ist eine effektivere Trennung möglich, sie sind allerdings weniger robust als gepackte Säulen. Für die Ausführung der Detektoren gibt es vielerlei Möglichkeiten. Der einfachste Detektor ist der Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD). Er besteht aus drei Widerstandsdrähten, zwei davon ( $R_1$  und  $R_2$ ) werden vom Trägergas und einer ( $R_x$ ) von mit Probe beladenem Gas von der Säule umspült.  $R_3$  ist ein regelbarer Widerstand. Alle vier Widerstände sind in einer Wheatstone'schen Brücke geschaltet (Abbildung III.11.):

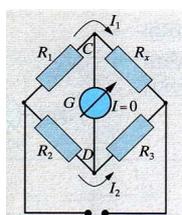


Abbildung III.11.:  
Wheatstone'sche Brückenschaltung

$R_3$  wird nun so eingestellt, dass über das Amperemeter kein Strom fließt. So kann nach den Kirchhoff'schen Gesetzen  $R_x$  berechnet werden. Metalle wie die Drähte des Detektors haben einen positiven Widerstandstemperaturkoeffizient. Das bedeutet, dass die Drahttemperatur und damit der Widerstand umso höher ist, je schlechter die Probe die Wärme abführt, je tiefer also ihre Wärmeleitfähigkeit liegt.

Ein weiterer häufig eingesetzter Detektor ist der FID, der Flammenionisationsdetektor. Er besteht aus einer Elektrode und einer Düse, die selbst als Elektrode fungiert. An Düse und zweite Elektrode wird eine hohe Spannung angelegt. Die Säule mündet direkt in die Düse. Dem probebeladenen Trägergas wird Wasserstoff und Luft zugemischt. So entsteht ein brennbares Gemisch, das entzündet wird. Die Probe verbrennt in der Flamme, die sich im elektrostatischen Feld befindet. Da in ihr die Redoxreaktion des Kohlenstoffs zum Kohlenstoffdioxid stattfindet, erzeugt der FID somit ein der Kohlenstoffmenge proportionales Signal. Der FID kann daher im Gegensatz zum WLD, der alle Verbindungen erfasst, nur Verbindungen mit oxidierbarem Kohlenstoffatom erfassen.

Ein sehr empfindlicher Detektor ist der ECD, der Elektroneneinfangdetektor. Hier wird das probebeladene Trägergas mit  $\beta$ -Strahlen, die ein entsprechender Strahler wie  $^{63}\text{Ni}$  erzeugt, durchstrahlt. Es wird die Ladungsmenge gemessen, die das Gas passiert. Je mehr elektrophile Substanzen im Trägergasstrom sind, desto stärker schlägt der Detektor aus. Ein ECD ist somit ein selektiver Detektor, der meist zur Bestimmung von Halogenen verwendet wird.

Man kann einen Gaschromatographen auch mit anderen Instrumenten koppeln. Neben der Koppelung mit einem FTIR-Spektrometer ist vor allem die GC/MS-Kopplung sehr gebräuchlich. Hier ist an die Säule über eine Überführungseinheit direkt ein (Quadrupol)-Massenspektrometer angeschlossen. So erhält man zu jeder Stelle im Chromatogramm ein Massenspektrum und kann die Peaks auch gleich identifizieren. Zur Erstellung des Chromatogramms werden alle registrierten Massen addiert (TIM, Total Ion Mode). Gleichzeitig kann man aber auch die Massenspektren zu jedem Zeitpunkt des Chromatogramms untersuchen (SIM, Single Ion Mode) und so zum Beispiel überlagerte Peaks im Chromatogramm „auseinanderdividieren“. Gemeinsam mit der NMR-Spektroskopie stellt die GC/MS das wichtigste Instrument in der organischen Strukturaufklärung dar.

### 3.4. Massenspektrometrie

#### 3.4.1. Physikalische Grundlagen

Genau genommen ist die Massenspektroskopie gar keine spektroskopische Methode, da kein Grundzustand und kein angeregter Zustand existiert. Demnach wird auch nichts angeregt. Die zu untersuchenden Teilchen werden „abgemessen“, genauer, es wird ihre Masse bestimmt. Daher ist es auch richtiger, von Massenspektrometrie zu sprechen.

##### 3.4.1.1. Thomsons Parabelversuch

Man betrachte einen Strahl geladener Teilchen.

Im Magnetfeld wirkt auf sie die Lorentz-Kraft  $F = Qv \times B$ . Ihre Ablenkbarkeit hängt von ihrem Impuls  $p = mv$ , der magnetischen Feldstärke  $B$ , und der Ladung des Teilchens  $Q = ze$  ab, wobei  $z$  die Ionenwertigkeit und  $e$  die Elementarladung  $1,602 \cdot 10^{-19}$  ist. Die Ablenkbarkeit drückt man am besten als Bahnkrümmung, also dem reziproken Bahnradius aus:

$$\frac{1}{r} = \frac{zeB}{mv}$$

Im elektrischen Feld wirkt die Coulomb-Kraft  $F = QE$ . Die Ablenkbarkeit des Teilchens in diesem Feld hängt von der elektrischen Feldstärke  $E$ , der kinetischen Energie  $E = \frac{1}{2}mv^2$  und der Ladung des Teilchens ab. Da das E-Feld im Gegensatz zum B-Feld nicht quellenfrei ist (Die Pole der Elektroden bilden die Quellen, während die Polschuhe eines Magneten keine Quellen darstellen), ergibt sich ein anderer Zusammenhang:

$$\frac{\tan \alpha}{l} = \frac{zeE}{mv^2}$$

Der linke Term, die Ablenkbarkeit, ist im elektrischen Fall der Tangens des Ablenkungswinkels pro Wegeinheit. Abbildung III.12. macht dies deutlich:

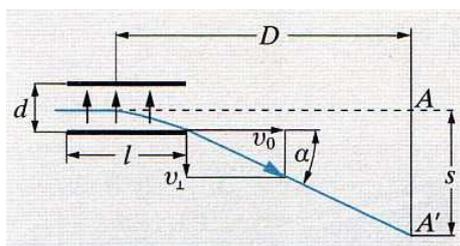


Abbildung III.12.:  
Skizze zur Herleitung der  
Ablenkbarkeit im Magnetfeld

Ohne elektrisches Feld würde der Ladungsträger in A am Schirm eintreffen, durch die Ablenkung trifft er in A' ein.

J.J. THOMSON setzte diese Gedanken in seinem Parabelversuch praktisch um, von ASTON wurden sie zum Massenspektrographen vervollkommen.

Thomson ließ einen Strahl unbekannter Teilchen im Hochvakuum in ein vertikales E-Feld und ein horizontales B-Feld eintreten (Abbildung III.14.):

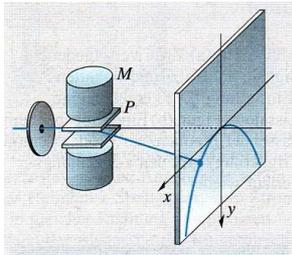


Abbildung III.13.:

Schema von Thomsons Parabelversuch

Für die Gesamtablenkung gilt, dass die beiden Felder unabhängig und vor allem unbeeinflusst voneinander auf den Ladungsträger wirken. Entlang der Vertikalen, wirkt das E-Feld und lenkt das Teilchen auf der Strecke D um

$$y = \frac{zeEID}{mv^2}$$

ab. Entlang der Horizontalen, wo das B-Feld wirkt, wird das Teilchen um

$$x = \frac{zeBID}{mv}$$

abgelenkt. Formt man diese Gleichung auf v um und setzt sie in die obere Gleichung ein, erhält man folgenden Zusammenhang zwischen den Koordinaten x und y:

$$y = \frac{mE}{zeB^2ID} x^2,$$

eine Parabelgleichung. Tatsächlich erhält man, sind die unbekanntes Teilchen ionisierte Alkane, eine Schar von Parabeln, denen man eindeutig das jeweilige Ion bei einer sehr guten Auflösung zuordnen kann (Abbildung III.14.):

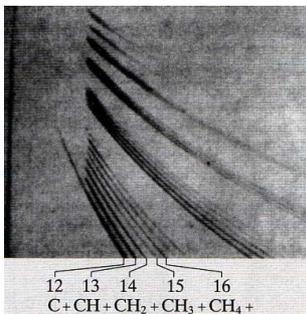


Abbildung III.14.:

Entwickelte Fotoplatte,

Massenspektrometrische Analyse

der niederen Alkane nach Thomson

Bei der Masse ist ebenfalls Vorsicht geboten: Wie aus EINSTEINs spezieller Relativitätstheorie hervorgeht, nimmt die Masse eines Körpers nach

$$m_v = \frac{m_0}{\sqrt{1 - v^2 / c^2}}$$

zu. Für große Geschwindigkeiten geht die Masse somit gegen unendlich. Dieser Faktor ist aber, wenn überhaupt, nur bei kleinen Massen, die höhere Geschwindigkeiten erreichen, von Bedeutung. In der organisch-chemischen Analytik stört dieser Faktor nie, denn Massenspektren werden üblicherweise erst ab einem m/z-Verhältnis von 50 aufgenommen.

#### 3.4.1.2. Ionisierung

Sollen Teilchen in einem Massenspektrometer analysiert werden, so müssen sie davor ionisiert werden. Bei größeren Molekülen tritt dabei fast immer auch eine Fragmentierung auf, was aber durchaus erwünscht ist, denn auch die Bruchstücke können charakteristisch für ein Molekül sein und Aufschluss über dessen Aufbau geben.

Bei der einfachsten Methode, der Elektrospray-Ionisation bedient man sich der Tatsache, dass das elektrische Feld E im Bereich der Quelle sehr schnell zunimmt. Es gilt angenähert eine 1/r-Abhängigkeit. Diese gilt exakt nur für Punktladungen, für die verwendeten Drähte gilt eine noch etwas steilere Abhängigkeit (Abbildung III.15.):

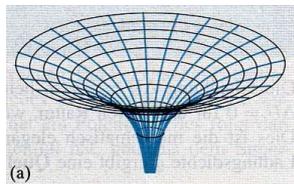


Abbildung III.15.:  
elektrostatisches Feld:  
schwarz: Potentiallinien  
blau: Feldlinien

Es werden also sehr dünne Drähte verwendet, an die eine hohe Spannung angelegt wird. Damit erhält man in der Nähe der Drähte ein sehr starkes E-Feld und die Moleküle werden ionisiert.

Andere Methoden arbeiten nach einem indirekten Prinzip. Es werden beispielsweise Methan-Moleküle ionisiert und die Probemoleküle dann mit diesen beschossen (FAB – Methode → Fast Atom Bombardement). Auch Metalle wie Bismut können als Primärionen verwendet werden.

#### 3.4.1.3. Beschleunigung

Die erhaltenen Ionen müssen nun beschleunigt werden. Dies geschieht elektrostatisch mit geladenen Lochblenden. Durch eine äußere Spule wird ein Magnetfeld parallel zum Ionenstrahl angelegt. Dieses trägt klarerweise nicht zur Beschleunigung bei, sondern hält die Ionen nur auf ihrer Bahn und fokussiert sie.

### 3.4.2. Gerätetechnik

Eine relativ alte, wegen der guten Auflösung allerdings nach wie vor angewandte Methode, die ionisierten Teilchen zu untersuchen ist die Sektorfeldmethode. Hier werden die Teilchen in einem großen, unter Hochvakuum stehenden Raum durch ein Magnetfeld auf eine Kreisbahn gezwungen. Nach einem halben Umlauf treffen die Teilchen auf den Detektor. Früher wurden Photoplatten verwendet, heute tastet man die Strecke mit einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) ab, der unten näher beschrieben ist. Sektorfeldgeräte haben den Nachteil, dass sie sehr groß sind. Sie füllen oft ganze Räume. Man verwendet nur ein Magnetfeld, das bedeutet dass nur eine eindimensionale Trennung erfolgt. Man kann also nur nach  $m/z$  – Verhältnissen auftrennen, was aber in der organisch-chemischen Strukturanalytik nicht stört. Vor allem deshalb, weil man Massenspektren meist in Kombination mit NMR-Spektren auswertet. Diese beiden Verfahren ergänzen einander sehr gut.

Die kompakteste Möglichkeit, die ionisierten Teilchen zu untersuchen ist die Verwendung eines Quadrupols. Er besteht aus vier, etwa 10-20cm langen Metallstäben. An diese ist eine hohe Gleichspannung angelegt, der eine Wechselspannung überlagert ist. Diese Wechselspannung wird moduliert, so dass den Teilchen normal zu ihrer Flugbahn eine Schwingung aufgezwungen wird. Die Frequenz der Wechselspannung wird so moduliert, dass sie den Bereich abdeckt, in dem für jedes zu untersuchende  $m/z$  – Verhältnis genau eine Frequenz existiert, die das Teilchen den Quadrupol passieren lässt. Für Teilchen mit anderen  $m/z$  – Verhältnissen ist der Schwingungsstand so beschaffen, dass sie die Blende am Ende des Quadrupols nicht erreichen, im Quadrupol verbleiben und abgesaugt werden. Nach dem Quadrupol werden die Teilchen wiederum mit einem SEV erfasst. Wegen der kompakten Bauart und der Möglichkeit des sehr schnellen Abtastens des gesamten relevanten Massenspektrums (ca. 5 Spektren pro Sekunde möglich) wird diese Analysatorausführung in GC/MS-Kopplungen und in der Routineanalytik verwendet.

Eine weitere sehr empfindliche Methode stellt das TOF-System dar (Time of flight). Hier wird wie bei den anderen Methoden die Trägheit der Teilchen ausgenutzt. Sie erfahren alle dieselbe Beschleunigungsenergie in eine Röhre, an deren Ende sie um 180 ° umgelenkt werden. Am Eintritt und am Austritt werden die Teilchen durch Spulen erfasst, in der sie einen Stromimpuls induzieren. Die Zeit zwischen den beiden Impulsen wird sehr genau gemessen und damit die Masse berechnet:

$$s = \frac{a}{2} t^2,$$

wobei s die zurückgelegte Wegstrecke, die für alle Teilchen gleich ist, t die benötigte Zeit und a die Beschleunigung ist.

Der Detektor bei allen anderen Methoden, der SEV besteht aus einem Glashrichter von spezieller Form mit einer starken Bleidotierung, an die eine hohe Spannung angelegt ist. Trifft nun ein Teilchen auf diese Beschichtung auf, löst es einen Schwall von Elektronen aus, der wiederum auftrifft, usw. Am Ende erhält man einen gut messbaren Stromimpuls (Abbildung III.16.).

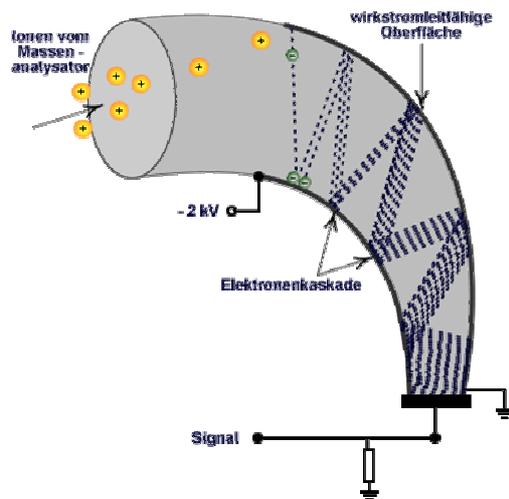


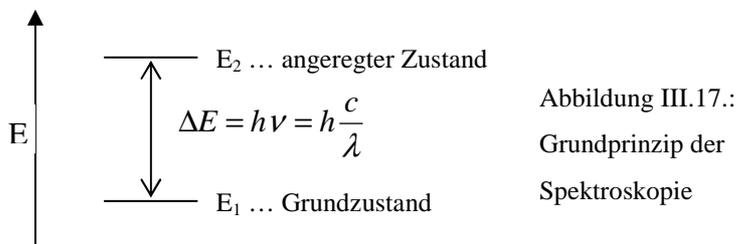
Abbildung III.16.:  
Schema eines  
kontinuierlichen SEVs

## 3.5. NMR - Spektroskopie

### 3.5.1. Physikalische Grundlagen

#### 3.5.1.1. Spektroskopie

Um Spektroskopie betreiben zu können, müssen die zu untersuchenden Teilchen zumindest zwei Energiezustände besitzen, zwischen denen die Teilchen wechseln können. Die Energiezufuhr, die Anregung, erfolgt mit elektromagnetischer Strahlung und im Überschuss, um sicherzustellen, dass sich möglichst viele Teilchen im angeregten Zustand befinden. In welchem Frequenzbereich diese liegt, hängt von der Art der Spektroskopie ab. Die zweite Voraussetzung für spektroskopische Untersuchungen ist, dass der angeregte Zustand kein stabiler ist und die Teilchen ihn leicht wieder in den ursprünglichen Zustand, den Grundzustand, verlassen können. Dabei geben sie genau die Energie wieder ab, die sie bei der Anregung aufgenommen haben. Diese Energie ist spezifisch vom Teilchen abhängig. Ihre Messung erlaubt Rückschlüsse auf die Art und Beschaffenheit der untersuchten Teilchen (Abbildung III.17.).



Die Energiedifferenz  $\Delta E$  ist gequantelt. Sie kann nur diskrete Werte, nämlich Vielfache von  $h$ , dem Planck'schen Wirkungsquantum ( $6,626 \cdot 10^{-34}$  Js), annehmen. Aufgrund der von HEISENBERG formulierten Unschärferelation von Zeit und Energie kann diese Energie jedoch, abhängig von der Halbwertszeit des angeregten Zustands, also jener Zeit  $t$ , innerhalb derer die Hälfte aller Teilchen in den Grundzustand zurückgekehrt sind, geringfügig schwanken. Es gilt  $\tau \Delta \hat{E} = h$ ,

wobei  $\Delta \hat{E}$  diese Schwankungsbreite der Energiedifferenz ist.

Für eine mittlere Halbwertszeit von 10min, wie sie bei der NMR-Spektroskopie auftritt, ergibt sich somit eine Schwankungsbreite von  $1,1 \cdot 10^{-36}$ J. Vergleicht man dies mit der mittleren bei

der NMR auftretenden Energiedifferenz von  $5,96 \cdot 10^{-26} \text{ J}$  ( $^1\text{H}$ ,  $B_0 = 2,115 \text{ T}$ ), so ergibt sich eine jedoch weit vernachlässigbare prozentuelle Abweichung von  $1,8 \cdot 10^{-9} \%$ .

### 3.5.1.2. Erzeugung von Magnetfeldern und Supraleitung

Die beiden unterscheidbaren Energiezustände in der NMR-Spektroskopie sind parallel, bzw. antiparallel zu einem äußeren Magnetfeld ausgerichtete Kernspinnmomente. Dieses Magnetfeld muss sehr stark sein, damit die Energiedifferenz, die direkt von der Stärke dieses Magnetfeldes abhängt, messbar wird. Diese mehrere Tesla starken Magnetfelder kann man nur mit Elektromagneten erzeugen:

Man macht sich das von LORENTZ beschriebene Phänomen zu Nutze, wonach auf bewegte Ladungen eine Kraft normal auf die Bewegungsrichtung und ein zu dieser Ebene normales Feld, dem Magnetfeld, die Lorentz-Kraft wirkt:  $F_L = Q \vec{v} \times \vec{B}$

Im Umkehrschluss kann man durch bewegte Ladungen, also Ströme, ein solches Magnetfeld erzeugen. Da dieses Feld, wie MAXWELL zeigt, divergenzfrei, ist werden die Beiträge einzelner Wicklungen einer Spule im Inneren der derselben aufsummiert (Abbildung III.18.):

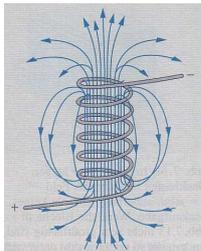


Abbildung III.18.:  
B-Feld einer Spule

Füllt man zusätzlich das Innere einer Spule mit einem Ferromagnetikum hoher Permeabilität  $\mu$ , wird das Feld um diesen Faktor weiter verstärkt. Für die NMR-Spektroskopie muss allerdings der Kern der Spule unterbrochen sein, denn dort wird das Proberöhrchen eingeführt. Es interessiert also die Feldstärke innerhalb dieses Luftspaltes. Da das Magnetfeld divergenzfrei ist, muss alles, was aus dem einen Polschuh austritt, in den anderen wieder eintreten. Das Magnetfeld  $\mathbf{B}$  ist somit im Kern und im Luftspalt gleich groß.  $\mathbf{H}$ , das definiert ist über  $\vec{H} = \vec{B}/(\mu\mu_0)$  und von der Permeabilität  $\mu$  des durchsetzten Mediums abhängt, ist außerhalb des Kerns um diesen Faktor größer. Integriert man längs einer Feldlinie, so erhält man (ohne Herleitung):  $NI = \vec{H}_K l + \vec{H}_L d$ , wobei  $d$  die Breite des Spaltes und  $l$  die gestreckte Kernlänge ist. Im Luftspalt ist  $B = \mu_0 \vec{H}_L$ , im Kern  $B = \mu\mu_0 \vec{H}_K$ . Damit erhält man

$$\vec{B} = \mu_0 \vec{H}_L = \frac{\mu_0 NI}{d + l/\mu}.$$

NI wird somit bei den benötigten mehreren Tesla ( $1\text{T} = \text{Vs m}^{-2}$ ) sehr groß, denn die Influenzkonstante  $\mu_0$  hat mit  $1,26 \cdot 10^{-6} \text{ Vs A}^{-1} \text{ m}^{-1}$  einen sehr kleinen Wert.

Das Produkt aus Windungszahl und Stromstärke, NI, kann man bei gegebenem **B** gerätetechnisch nicht gut beeinflussen. Reduziert man die Windungszahl, kann man zwar dickere Drähte und damit höhere Ströme verwenden. Um dasselbe Feld zu erzeugen, braucht man jedoch einen umso höheren Strom, um die verlorenen Windungen zu ersetzen. Man bräuchte ein Material mit sehr kleinem Ohm'schen Widerstand (dieser ist direkt proportional zum Drahtquerschnitt). Damit würde die Joule'sche Wärme klein bleiben und man kann auch dünnere Drähte verwenden.

Glücklicherweise gibt es einen quantenmechanischen Effekt, der dies ermöglicht. Bei bestimmten Materialien fällt der Ohm'sche Widerstand bei Unterschreiten einer bestimmten Temperatur auf unmessbar kleine Werte. Das Material wird supraleitend. Interessanterweise werden gerade gute Leiter wie die Münzmetalle Kupfer, Silber und Gold nicht supraleitend. Quecksilber war das erste Material, bei dem Supraleitung festgestellt wurde. Seine Sprungtemperatur liegt bei 4,183 K.

Die Supraleitung stellt aber nicht die Realisierung eines „perfekten Leiters“ dar, der über einen spezifischen Widerstand  $\rho = 0$  definiert ist. Ein solcher Leiter würde einem Magnetfeld ausgesetzt von den Feldlinien einfach durchsetzt werden. Supraleitendes Material wird jedoch nicht vom Magnetfeld durchsetzt. Die Feldlinien verlaufen um den Leiter herum (Meißner-Ochsenfeld-Effekt). Das aber wird wiederum zu einem Problem in der Anwendung: Schon bei relativ kleinen **B**-Feldern bricht die Supraleitung zusammen. Aus der Theorie des Meißner-Ochsenfeld-Effektes ergibt sich aber eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen. Um den Effekt zu erklären, nimmt man an, dass auf der Oberfläche des Supraleiters Wirbelströme zirkulieren. Das von ihnen erzeugte Feld hindert ein äußeres Magnetfeld am Eindringen in den Draht. Wird das äußere Feld zu stark, dringt es „mit Gewalt“ in den Leiter ein und zerstört die Supraleitung. Die Wirbelstrom führende Schicht ist einige 10nm dick. Stellt man nun supraleitende Drähte dieser Dicke her, wird der Meißner-Ochsenfeld-Effekt unvollständig. Das äußere Magnetfeld kann nirgends mehr eindringen, wo es „Schaden anrichten“ könnte und der Draht bleibt auch bei stärkeren Feldern supraleitend.

Dies kommt der Anwendung doppelt zugute: Es erlaubt, ja fordert sogar extrem dünne Drähte und diese produzieren selbst bei hohen Strömen kaum Joule'sche Wärme, die man abführen muss. Einziger Nachteil ist die extrem tiefe Betriebstemperatur des Magneten. Sie muss mit flüssigem Helium aufrecht erhalten bleiben, das alle Teile der Spule benetzt, denn bereits eine winzige Gasblase kann lokal dazu führen, dass die Sprungtemperatur überschritten wird und

die Spule durchbrennt. Doch unterhalb von 2,186 K wird  $^4\text{He}$  suprafluid und gewährleistet somit die vollständige Benetzung. Diese Temperatur kann durch Abpumpen des Dampfes über der Flüssigkeit erreicht werden, denn unter Normaldruck siedet Helium bei 4,211 K.

### 3.5.2. Kernspin und Nukleonenspin

#### 3.5.2.1. Kernspin

Spätestens seit EINSTEIN weiß man, dass absolute Ruhe nicht existiert. Es gibt kein Objekt, das relativ zu jedem beliebigen Bezugssystem ruht. Dies gilt für translatorische Bewegung ebenso wie für Rotation.

Die Atomkerne einer Probe rotieren also im Laborsystem. Wie jede rotierende Masse hat auch der Atomkern ein Drehmoment (Abbildung III.19.):

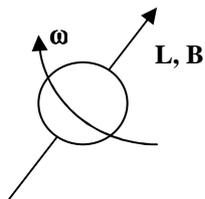


Abbildung III.19.:

Drehimpuls und Magnetfeld des Atomkerns

$v$  ist die translatorische Umdrehungsgeschwindigkeit des Kerns (Nach  $\omega = v/(2r\pi)$  umgerechnet: Larmor-Frequenz). Die Stärke dieses Drehmomentes hängt von der Feldstärke des äußeren Magnetfeldes ab. Je stärker es ist, desto schneller dreht sich Kern und desto höher sind damit die Resonanzfrequenzen. Die Richtungen der Drehmomente einer Probe, die ja unzählbar viele Atome enthält, aber sind über den ganzen Raum verteilt. Legt man nun ein starkes äußeres Magnetfeld an, so zeigt sich, dass sich diese Spins ausrichten (Abbildung III.20.):

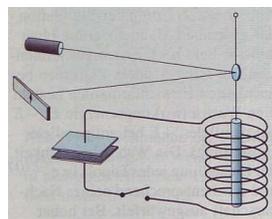


Abbildung III.20.:

Versuchsanordnung zur Messung der Spinausrichtung

Experiment: Der Stromkreis wird geschlossen, der Kondensator entlädt sich und durch die Spule wird ein starker Magnetimpuls erzeugt. Da die Kerne sich ausrichteten und die Mehrheit im Grundzustand verbleibt, dreht sich aufgrund der Impulserhaltung der Stab geringfügig. Da dieser über einen Spiegel aufgehängt ist, kann die Bewegung mit dem Laser gemessen werden.

Dieser Effekt ist damit zu erklären, dass der Atomkern ja auch bewegte Ladung ist und somit ein Magnetfeld erzeugt. Der Spin eines Kernes kann sich nun entweder parallel oder antiparallel zum äußeren Magnetfeld ausrichten, wobei die parallele Ausrichtung energetisch günstiger ist. So muss sich der Stab als Ganzes gemäß der Impulserhaltung in die entgegengesetzte Richtung drehen.

Damit erhält man zwei verschiedene Zustände, was Voraussetzung für das Betreiben von Spektroskopie ist. Die Anregung erfolgt mit elektromagnetischer Strahlung im Radiowellenbereich.

### 3.5.2.2. Nukleonenspin

Woher aber kommt der Kernspin? Was hat den Kern „angeschubst“, dass er sich dreht? Die nahe liegende Vermutung, dass der Kernspin sich als Summe der Spins von den Nukleonen ergibt, wurde bestätigt. Doch warum haben die Nukleonen einen Spin? Auch sie bestehen aus noch kleineren Partikeln, den Quarks. Eigentlich könnte man wieder meinen, der Spin ergibt sich als Summe der Quarkspins. Aber die Quarks sind nicht fest an „ihr“ Nukleon gebunden. Sie sind über den ganzen Kern delokalisiert.

Damit die Rechnung dennoch stimmt, werden einige virtuelle Teilchen, z.B. die Resonanzteilchen (Resonen) postuliert. Sie existieren nur so kurz, dass sie im Rahmen der Heisenberg'schen Unschärferelation spontan „aus dem Nichts“ entstehen können. Für einige  $10^{-23}$  s kann so die Erhaltung der Masse gebrochen werden.

Diese und ähnlich rätselhaften Teilchen versucht man im CERN mit dem LHC erstmals nachzuweisen. Theoretische Zugänge wie die Quantenchromodynamik, die das Zusammenspiel der Quarks erklären soll, könnten so erste grundlegende Betätigungen erhalten.

## **3.5.3. Anregung und chemische Verschiebung**

### 3.5.3.1. Kernresonanz

Im äußeren Magnetfeld werden die Spins der Kerne ausgerichtet. Bei Energiezufuhr, im Fall der NMR bei der Absorption von elektromagnetischer Strahlung im Bereich von 100 bis 950 MHz, klappt der Spin um, richtet sich also antiparallel zum äußeren Magnetfeld aus. Nach der Relaxationszeit, die bei der NMR etwa 1-10min beträgt, klappt der Kern wieder in seinen ursprünglichen Spinzustand zurück. Durch die Messspule wird dies registriert. Das Prinzip ist denkbar einfach: Der rotierende Kern ist mit einem Stabmagneten zu vergleichen. Dieser

befindet sich innerhalb der Spule. Durch das Umklappen dreht sich das Magnetfeld des Kerns mit. In der Spule, die im System des Spektrometers in Ruhe bleibt, wird daher ein Strom gemäß

$$Q = \int \dot{\Phi} dt = \int \Phi_E - \Phi_A dt,$$

wobei  $\Phi$  der Magnetfluss ausgehend vom Kern ist, der die Spule durchsetzt, induziert und aufgezeichnet. Aufgrund der langen Relaxationszeit werden allerdings alle Wellenlängen des aufzunehmenden Spektralbereiches zugleich eingestrahlt und die Summenresonanz registriert. Dieses Signal wird durch eine Fourier-Analyse mit einem Computer in die Resonanzen der einzelnen Wellenlängen mathematisch zerlegt.

Wie stark der Energieunterschied zwischen den beiden Spinzuständen ist, hängt direkt von der Stärke des äußeren Magnetfeldes ab. Je stärker das Feld ist, desto fester wird der Kern im parallelen Spinzustand gehalten und umso mehr Energie muss man aufwenden, um ihn umzuklappen.

Neben den für die organische Chemie wichtigsten Kernen  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  sind noch viele weitere Kerne zur Kernresonanz befähigt. Allerdings nur solche, bei denen entweder die Protonen- oder die Neutronenzahl ungerade ist. Sind beide gleich, heben sich die Beiträge der beiden Nukleonensorten auf: Der Gesamtspin wird null und der Kern ist somit nicht NMR-aktiv.

### 3.5.3.2. Spektrenaufnahme

Zur Aufnahme eines  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums wird die zu untersuchende Substanz in deuterierten Lösungsmitteln gelöst, also Lösungsmittel, die so gut wie ausschließlich  $^2\text{H}$ -Atome im Molekül haben. Die wenigen  $^1\text{H}$ -Moleküle sind jedoch auch hilfreich. Sie dienen als interner Standard, die ein eindeutig zuordnungsfähiges Signal liefern. Für die Aufnahme eines  $^{13}\text{C}$ -Spektrums können auch nicht-deuterierte Lösungsmittel verwendet werden.

Die eingesetzte Probemenge von etwa 10mg ist relativ hoch im Vergleich zu anderen instrumentellen Methoden. Sie kann aber nach Aufnahme des Spektrums durch Abdestillieren des Lösungsmittels rückgewonnen werden. Das NMR-Proberöhrchen bildet den „Kern“ der Radiowellenempfängerspule.

Die Senderspule ist in der gleichen Ebene gewickelt wie die Spule zur Erzeugung des äußeren Magnetfeldes. Wäre sie in derselben Ebene wie die Empfängerspule, würde sie in dieser Strom in dem Ausmaß induzieren, wie sie Energie einstrahlt, man hätte einen Transformator vorliegen.

Die Proberöhrchen sind nicht wie die Küvetten für andere spektroskopische Methoden plan sondern rund. Üblicherweise sind es Röhrchen mit präzisen 5mm Durchmesser. Zusätzlich

wird das Röhrchen während der Messung in Rotation um die eigene Achse versetzt um die Moleküle gleichmäßig auszurichten.

### 3.5.3.3. chemische Verschiebung

Geht man den gesamten Frequenzbereich durch, so zeigen die verschiedenen Kerne bei unterschiedlichen Frequenzen Resonanz. Je leichter der Kern ist, desto kleiner ist seine Resonanzfrequenz. Das alleine würde die NMR-Spektroskopie aber noch nicht für organische Strukturanalysen brauchbar machen. Man könnte lediglich feststellen, welche Elemente in einer Probe vorhanden sind. Der hohe Wert der NMR-Spektren wird erst bei sehr hoher Auflösung sichtbar.

Betrachtet man die Resonanzkurve eines Elementes (Im Folgenden wird als Beispiel der Kern  $^1\text{H}$  näher beschrieben), so stellt man fest, dass sie nicht einheitlich ist, sondern aus kleineren Signalen bei (geringfügig) unterschiedlichen Frequenzen zusammengesetzt ist.

Die Resonanzfrequenz hängt nämlich nicht nur von der Art des Kernes, sondern auch davon ab, wie dieser Kern gebunden ist. Betrachtet man nicht nur den Kern sondern das ganze Atom, so wird dies verständlich:

Der Kern ist von Elektronen umgeben. Je nachdem, an welche anderen Atome das betrachtete Atom gebunden ist, befinden sich mehr oder weniger Elektronen um dieses Atom. Das Wasserstoffatom einer Carboxylgruppe beispielsweise wird weniger Elektronen in seiner Nähe haben als die Wasserstoffatome eines Alkans, da Sauerstoff elektronenziehend wirkt. Elektronen sind ebenfalls bewegte Ladungen und erzeugen ein Magnetfeld. Dieses Feld schirmt das des Kernes ab. Wie stark, hängt davon ab, wie viele Elektronen in der Umgebung des betreffenden Kernes sind. Das Feld der Elektronen schwächt nun das des Kernes ab, da es diesem entgegengerichtet ist. Damit lässt sich der Spin des Kernes schwerer oder leichter umklappen und die verschiedenartig gebundenen Kerne ein und derselben Art werden im NMR-Spektrum unterscheidbar. Damit wird die NMR-Spektroskopie zu einem ausgezeichneten Werkzeug in der (organischen) Strukturanalyse (Abbildung III.21.).

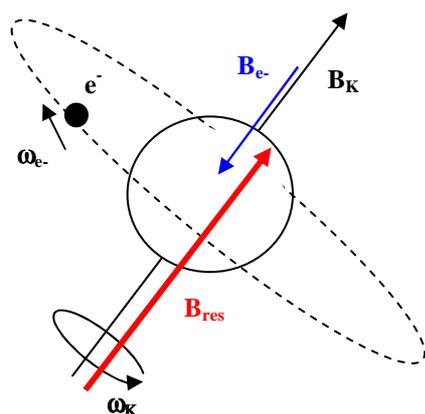


Abbildung III.21.:  
Schwächende Wirkung des Elektronenmagnetfeldes

Die Lage der Resonanzfrequenz eines Kernes erlaubt also Rückschlüsse auf die Art, wie er gebunden ist. Die Angabe dieser Lage ist allerdings schwierig. Sie hängt von der Stärke des äußeren Magnetfeldes und damit von der Einstrahlungsfrequenz ab. Je höher die Feldstärke, desto größer wird die Energiedifferenz zwischen den Spinzuständen und damit die Auflösung. Man gibt daher nicht die Resonanzfrequenz, sondern die chemische Verschiebung zur Charakterisierung an. Sie ist definiert als der Frequenzabstand des Probesignals zum Signal einer Standardsubstanz, dem Tetramethylsilan (TMS), dividiert durch die Messfrequenz des Spektrometers (Es ist einfacher, die Feldstärke des äußeren Magneten zu variieren und dabei die Einstrahlungsfrequenz konstant zu halten, anstatt umgekehrt):

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{TMS}}{\nu_0}$$

Sinngemäß wird die chemische Verschiebung, die eine Relation darstellt und somit dimensionslos ist, in ppm (parts per million) angegeben, da der Frequenzunterschied im Vergleich zur Einstrahlungsfrequenz sehr klein ist (vgl. oben, Steigerung der Auflösung). In ppm angegeben, liegt die chemische Verschiebung bei  $^1\text{H}$ -Spektren ca. zwischen 0 und 15. Wie oben beschrieben hängt der Wert der chemischen Verschiebung von den eigenen Substituenten und der der Nachbaratome ab (Bei  $^1\text{H}$ : Substituenten der Kohlenstoffatome, an das das betreffende Wasserstoffatom gebunden ist).

Im Folgenden sind für  $^1\text{H}$ -Spektren einige Beispiele angeführt (Abbildung III.22.; aus „Organicum“; Werte in  $\tau$ -Skala,  $\tau = 10 - \delta$ ):

Tabelle A.147. Chemische Verschiebung relativ zu Tetramethylsilan (TMS)<sup>1)</sup>

Gruppe	Chemische Verschiebung	Gruppe	Chemische Verschiebung
$(\text{CH}_3)_4\text{Si}$	10	$\text{>C-CH}_2\text{-Cl}$	6,7...6,3
$\text{CH}_3\text{-C} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \begin{smallmatrix} \diagdown \\ \diagup \end{smallmatrix} \text{ } ^{2)}$	9,2...8,7	$\text{>C-CH}_2\text{-NO}_2$	5,7...5,4
$\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{C-}$	8,2...7,9	$\text{Ar-CH}_2\text{-O-}$	5,7...4,7
$\text{CH}_3\text{-C}=\text{C} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \text{ } ^{2)}$	8,4...7,9	$\text{>CH-} ^{2)}$	8,7
$\text{CH}_3\text{-C}=\text{O}$	8,1...7,3	$\begin{smallmatrix} \text{X} \\ \text{Y} \end{smallmatrix} \text{>CH}$	8,0...4,0
$\text{CH}_3\text{-S-}$	8,0...7,4	$\equiv\text{CH}$	7,6
$\text{CH}_3\text{-Ar}$	7,9...7,3	$\text{R} \begin{smallmatrix} \diagdown \\ \diagup \end{smallmatrix} \text{C}=\text{CH}_2 \text{ (a)}$	a: 5,3...5,0
$\text{CH}_3\text{-N} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \text{ } ^{2)}$	7,9...6,9	$\text{H} \begin{smallmatrix} \diagdown \\ \diagup \end{smallmatrix} \text{C}=\text{CH}_2 \text{ (b)}$	b: 4,2...4,4
$\text{CH}_3\text{-O-}$	6,7...6,0	$\text{R-CH}=\text{CH-}$ (cis/trans)	4,5
$\text{CH}_3\text{-O-C}=\text{O}$	6,4	$=\text{C}=\text{C}=\text{CH}_2$	4,7...4,3
$\text{CH}_3\text{-J}$	7,8	$\text{Ar-SH}$	7,2...6,4 <sup>3)</sup>
$\text{CH}_3\text{-Br}$	7,3	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-OH}$	5,5 <sup>3)</sup>
$\text{CH}_3\text{-Cl}$	6,95	$\text{R-OH}$	9,3...4,5 <sup>3)</sup>
$\text{CH}_3\text{-F}$	5,7	$\text{Ar-H}$	1...4
$\text{CH}_3\text{-NO}_2$	5,7	$\text{C}_6\text{H}_6$	2,73
$-\text{CH}_2- ^{2)}$	8,0...8,5	$\text{R}-\text{C}-\text{H}$ $\text{O}$	0,3...-0,1
$\text{>C-CH}_2\text{-C}=\text{ } ^{2)}$	8,9...7,6	$\text{R}-\text{C}-\text{OH}$ $\text{O}$	0,3...-3,0 <sup>3)</sup>
$\text{>C-CH}_2\text{-S-}$	7,6...7,0	$\text{>C=N-OH}$	1,2...-0,2 <sup>3)</sup>
$\text{>C-CH}_2\text{-N} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \text{ } ^{2)}$	7,7...6,4	$\text{>C}=\text{C}-\text{OH}$	-5...-6 <sup>3)</sup>
$\text{>C-CH}_2\text{-Ar}$	7,3...6,7		
$\text{>C-CH}_2\text{-O-}$	6,7...5,5		

<sup>1)</sup> Eine umfangreiche Zusammenstellung chemischer Verschiebungen von Protonen organischer Moleküle findet sich bei NEURDA, K., u. a., *Analyt. Chem.* **35** (1963), 1892.

<sup>2)</sup> in gesättigten Kohlenwasserstoffen <sup>3)</sup> monomer

<sup>4)</sup> Die Lage des Signals ist stark vom Assoziationsgrad abhängig.

<sup>5)</sup> Das Signal verschwindet beim Schütteln der Probe mit  $\text{D}_2\text{O}$ .

Abbildung III.22.:

Tabelle zur chemischen Verschiebung

Die hohe chemische Verschiebung von Aromaten im Vergleich zu Aliphaten ist damit zu erklären, dass die  $\pi$ -Elektronen des Ringes zwei „kurzgeschlossene Leiterschleifen“ bilden, die in der Lage sind, ein zusätzliches abschirmendes Magnetfeld zu erzeugen (Abbildung III.23.):

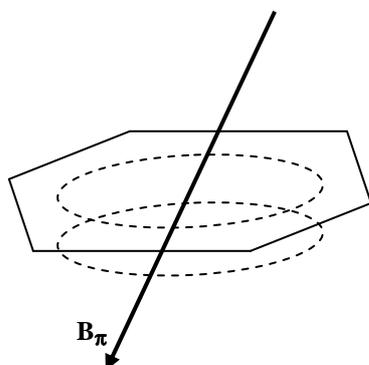


Abbildung III.23.:

Magnetfeldschwächung im Aromaten

### 3.5.4. Spin-Spin-Kopplung

Dieser Effekt wird im Folgenden nur für  $^1\text{H}$ -Kerne beschrieben. Er hat auch nur für diese wirklich große Bedeutung.

Sind in einem Molekül nur gleichwertige (äquivalente) Wasserstoffatome enthalten, so ist sein NMR-Spektrum relativ einfach: Pro „Sorte“ eines H-Atoms gibt es einen Resonanzpeak. So hat beispielsweise Methan eine ( $\text{CH}_4$ ), Essigsäure zwei Resonanzen ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Die H-Atome dieser Moleküle sind entweder alle äquivalent oder jeweils äquivalent und voneinander durch mehr als ein anderes Atom getrennt.

Wenn nun aber in einem Molekül H-Atome an benachbarten C-Atomen vorkommen, werden die Spektren komplizierter. Die benachbarten H-Atome beeinflussen mit ihrem Feld das der Nachbar-H-Atome im Raum, also jener, die am nächsten C-Atom gebunden sind. So entstehen keine scharfen Peaks, wie bei einzelnen Resonanzen sondern Gruppen von zwei, drei, vier oder mehreren Peaks eines definierten Höhenverhältnisses (Dupletts, Tripletts, Quadrupletts, bzw. Multipletts).

Wie viele Peaks eine Gruppe enthält, hängt davon ab, wie die verschiedenen, nicht äquivalenten H-Atome gebunden sind. Damit erhält man eine wertvolle Zusatzinformation, mit der gemeinsam mit anderen Größen (chemische Verschiebung, Kopplungskonstante und integriertes Spektrum) in vielen Fällen bereits eine vollständige Strukturaufklärung für das untersuchte Molekül möglich ist.

Die Spin-Spin-Kopplung von  $^1\text{H}$ -Atomen soll nun anhand des Beispiels 4-Methylbenzoesäureethylester (Abbildung III.24.) erklärt werden.

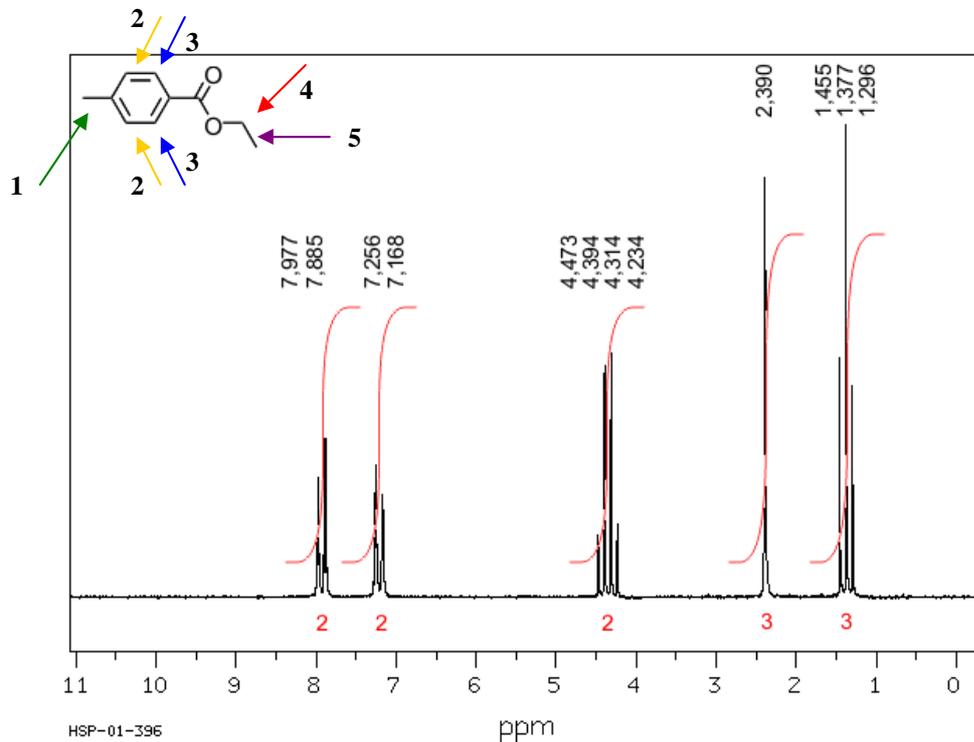


Abbildung III.24.:  
 $^1\text{H}$ -NMR – Spektrum  
4-Methylbenzoesäure-  
ethylester

In diesem Molekül gibt es fünf verschiedene, untereinander, jedoch nicht zueinander äquivalente Sorten von H-Atomen (nummeriert).

H1 sind von den anderen H-Atomen isoliert, es ist mehr als ein C-Atom dazwischen (zwei). Daher gibt es nur eine einfache Resonanz, ein Singulett.

Betrachtet man nun H2 (siehe Beispielspektrum), so stellt man fest, dass am jeweiligen Nachbar-C-Atom ein einziges H-Atom (3) gebunden ist. Dessen Spin und damit sein Magnetfeld kann nun parallel oder antiparallel zum Spin des H-Atoms 3 sein. Das sind 2 Zustände, auf die die Intensität des Peaks aufgeteilt wird, es entsteht ein Duplett. Die Resonanz von H2 wurde von H3 beeinflusst, es „koppelte“ mit H3.

Am Nachbar-C-Atom von H5 sind zwei Wasserstoffatome gebunden. Damit ergeben sich folgende Möglichkeiten der Kopplung, wobei die Pfeile die Ausrichtung des Magnetfeldes darstellen (Abbildung III.25.):

	H5	H4
Zustand 1	↑	↑
Zustand 2	↑	↓
Zustand 3	↓	↑
Zustand 4	↓	↓

Abbildung III.25.:  
Mögliche Spinausrichtungen von H4 und H5

Die Intensität der H5-Resonanz wird also auf vier Zustände aufgeteilt. Zwei davon, nämlich Zustand 2 und 3 sind gleich, da die Ausrichtungen des Magnetfeldes der H-Atome jeweils zueinander antiparallel sind. Sie zeigen bei derselben Frequenz Resonanz und werden somit in ihrer Intensität addiert. Das Höhenverhältnis (eigentlich Flächenverhältnis) der Peaks der Teilresonanzen beträgt somit 1:2:1, ein Triplett entsteht.

Abschließend soll H4 betrachtet werden. An sein Nachbar-C-Atom sind drei H-Atome gebunden. Damit ergeben sich  $2^3 = 8$  Zustände, auf die die Intensität verteilt wird. Je drei davon fallen zusammen und ein Quadruplett entsteht. Das Höhenverhältnis desselben beträgt demnach 1:3:3:1.

Höhere Multipletts entstehen in derselben Weise. Allgemein kann man aus der Anzahl der Teilpeaks (= Multiplizität) die Anzahl der H-Atome am benachbarten C-Atom ablesen:

$$n_H = n_P - 1$$

Die Aufteilung der Peakintensität erfolgt, wie bereits aus dem behandelten Beispiel ersichtlich ist, nach dem Pascal'schen Dreieck. Dieses, nach BLAISE PASCAL benannte mathematische Gebilde, hat einige interessante Eigenschaften, die ihre Anwendungen in allen Bereichen der Naturwissenschaften finden. Das wohl bekannteste Beispiel dafür ist die Bestimmung des Binomialkoeffizienten. Entwickelt wird es, indem man, beginnend bei 1 – 1 immer die links und rechts oben stehenden Zahlen addiert und an das linke und rechte Ende jeweils 1 anschreibt (Abbildung III.26.):

I		1					
II		1	1				
III		1	2	1			
IV	1	3	3	1			
V	1	4	6	4	1		
...							
n							

Abbildung III.26.:

Pascal'sches Dreieck

Zwei Eigenschaften sind nun, dass die durch die n-te Zeile repräsentierte Zahl stets  $11^{n-1}$  und die Quersumme dieser Zeile die (n-1)-te Potenz von 2 darstellt.

Doch beim Überprüfen eines NMR-Spektrums auf Multipletts ist Vorsicht geboten: Nicht alle dicht beieinander stehenden Peaks sind tatsächlich Multipletts. Denn haben zwei koppelnde H-Atome ihre Resonanzfrequenz nebeneinander, so überlagern sie sich und der Eindruck eines höheren Multipletts könnte entstehen. Wären die Resonanzfrequenzen von H2 und H3 im obigen Beispiel so dicht beieinander, dass sich die beiden Dupletts überlagern, entstünde folgendes Gebilde (Abbildung III.27.; Peaks durch Linien abstrahiert):

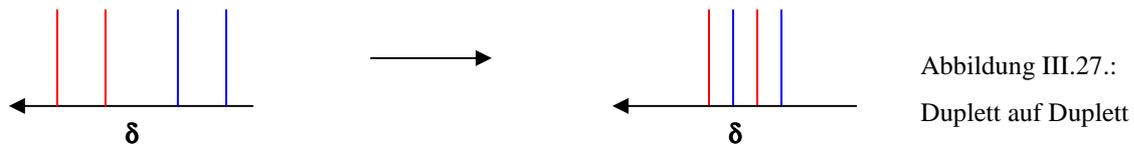


Abbildung III.27.:  
Duplett auf Duplett

Dieses so genannte „Duplett auf Duplett“, abgekürzt im NMR-Code „dd“, kann man leicht mit einem höheren Multiplett, in diesem Fall einem Quadruplett verwechseln. Der Unterschied liegt in der Intensitätsverteilung, also den Höhen der einzelnen Teilpeaks (Abbildung III.28.):

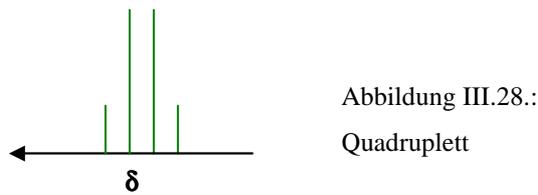


Abbildung III.28.:  
Quadruplett

Abschließend ist noch zu klären, warum überhaupt Peaks entstehen und keine Resonanzlinien. Der Grund liegt in der von HEISENBERG beschriebenen Unschärferelation von Zeit und Energie:

$$\tau \Delta E = h,$$

wobei  $\Delta E$  die Schwankungsbreite der Energiedifferenz zwischen angeregtem Zustand und dem Grundzustand und  $\tau$  die mittlere Relaxationszeit der Kerne ist. Somit wird die Energie über diesen Bereich  $E_{Resonanz} \pm \Delta E$  „verschmiert“ und somit entsteht ein Peak.

### 3.5.5. Weitere Spektrencharakterisierungen

#### 3.5.5.1. Kopplungskonstante

Auch der Abstand zwischen den Teilpeaks eines Multipletts, die Stärke der Aufspaltung, ist charakteristisch für eine Bindung und kann zur Charakterisierung derselben verwendet werden. Dieser Abstand ist innerhalb eines Multipletts immer gleich und wird als Kopplungskonstante J bezeichnet (Abbildung III.29.):

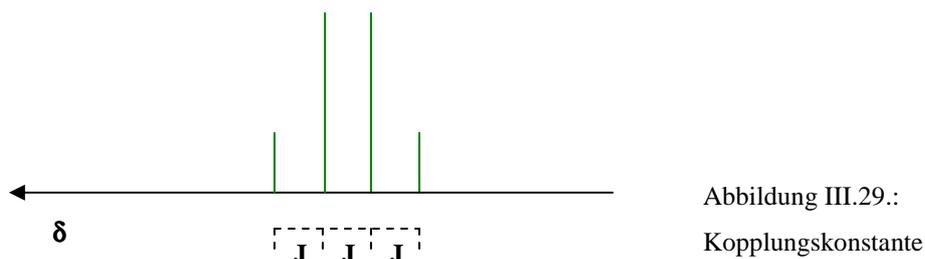


Abbildung III.29.:  
Kopplungskonstante

Die Kopplungskonstante ist unabhängig vom äußeren Magnetfeld und der eingestrahelten Wellenlänge und wird daher direkt in Hertz angegeben. In der folgenden Tabelle sind einige Beispiele für Kopplungskonstanten angeführt (Abbildung III.30.):

Tabelle A.150

Kopplungskonstanten  $J$  einiger an Kohlenstoff gebundener Protonen

Strukturelement	$J/\text{Hz}$	Strukturelement	$J/\text{Hz}$
	10...20		4...10
	2...9		1...3
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$	6,7...7,2		2...3
	5,7...6,8		o 7...10 m 2...3 p 1
	0...3,5	Cyclohexan a-a <sup>2)</sup>	8...10
	11...18	a-e	2...3
	6...14	e-e	2...3
	0,5...2		

1) bei Nichtäquivalenz der beiden Protonen

2) S. D.3.1.3.

Abbildung III.30.:

Tabelle

Kopplungskonstanten

### 3.5.5.2. Integration

Das NMR-Spektrum kann man auch integrieren, um die Flächen unter den Peaks zu ermitteln. Das Flächenverhältnis der Peaks (hierbei sind Multiplikts als ein Peak anzusehen) erlaubt Rückschlüsse auf die Anzahl der H-Atome dieser Sorte.

Jedes H-Atom trägt gleichermaßen zur Intensität des Peaks bei. Das Signal einer  $\text{CH}_3$ -Gruppe ist beispielsweise so beschaffen, dass seine Fläche stets durch drei teilbar ist.

### 3.5.6. Spektrometer und Aufnahmetechniken

#### 3.5.6.1. Spektrometernaufbau

Ein NMR-Spektrometer besteht im Wesentlichen aus einem starken Elektromagneten, einem Radiowellensender (Schwingkreis) und einem Empfänger (Abbildung III.31.). Die heute erreichbare Einstrahlungsfrequenz reicht bis 950 MHz. Die dafür benötigte Magnetfeldstärke beträgt etwa 6-8 Tesla.

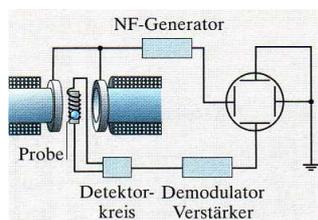


Abbildung III.31.:

Aufbau eines NMR-Spektrometers

Aufnahme und Auswertung von  $^1\text{H}$ -Spektren wurden bereits ausführlich beschrieben. Im Folgenden werden die Besonderheiten dreier weiterer wichtiger NMR-Anwendungen beschrieben.  $^{13}\text{C}$ -Spektren, sowie die APT und DEPT-Aufnahmetechnik.

### 3.5.6.2. $^{13}\text{C}$ -Spektren

Das Kohlenstoffisotop mit der Massenzahl 13, das NMR-aktiv ist (im Gegensatz zum wesentlich häufigeren  $^{12}\text{C}$ -Isotop) kommt nur mit einer relativen Häufigkeit von 1,11% in der Natur vor. Das bedeutet, dass C-C-Kopplungen im Spektrum nicht aufscheinen, da ein Zusammentreffen zweier  $^{13}\text{C}$ -Atome höchst unwahrscheinlich ist ( $0,0111^2 = 0,000123 = 0,012\%$ ). Damit eine Kopplung möglich wird, müssen die beiden C-Atome ja unmittelbar benachbart sein.

Mit  $^1\text{H}$ -Atomen treten allerdings sehr wohl Kopplungen auf. Für sie gelten dieselben Regeln wie bei  $^1\text{H}$ -Spektren. Aus der Multiplizität lässt sich die Anzahl der H-Atome am Nachbar-Atom bestimmen.

Das Auftreten von C-H-Kopplungen ist allerdings unerwünscht. Deren Information kann man auch aus dem entsprechenden  $^1\text{H}$ -Spektrum ablesen. Aus diesem Grund führt man meist eine  $^1\text{H}$ -Breitbandenkoppelung durch. Dazu strahlt man zusätzlich zur Anregungsfrequenz für die  $^{13}\text{C}$ -Atome einen Frequenzbereich ein, der alle H-Atome anregt und so während der gesamten Messung ständig zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand wechseln lässt. So ergibt sich ein Zeitmittel der Felder der H-Atome und es tritt keine effektive Kopplung mit den C-Atomen auf. Jede C-Resonanz tritt als einzelner Peak auf. Dies soll am Beispiel der Äpfelsäure veranschaulicht werden (Abbildung III.32.):

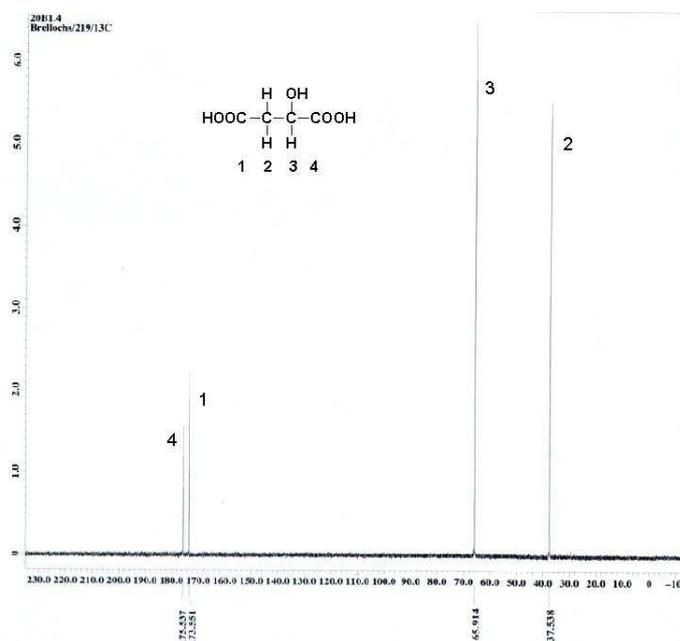


Abbildung III.32.:

$^{13}\text{C}$ -NMR – Spektrum Äpfelsäure

Diese Entkoppelung ist möglich, da der absorbierte Frequenzbereich der  $^1\text{H}$ -Atome im Vergleich zu dem der  $^{13}\text{C}$ -Atome viel höher liegt und außerdem viel enger ist. Die Skala der chemischen Verschiebung von  $^{13}\text{C}$ -Atomen reicht von 0 bis 200 ppm (zum Vergleich: Die  $^1\text{H}$ -Skala reicht von 0 bis 15 ppm).

Ein Nachteil der  $^{13}\text{C}$ -Spektroskopie ist, dass die Spektren nicht integrierbar sind. Das liegt daran, dass das  $^{13}\text{C}$ -Isotop mit einer nur sehr geringen Häufigkeit von 1,11% vorkommt und das Signal außerdem etwa um das 6000-fache schwächer ist als das von  $^1\text{H}$  unter denselben Bedingungen. Das bedeutet, dass trotz der Fourier-Transformations-Methode, die es erlaubt, auf einmal das gesamte Messspektrum einzustrahlen, viel mehr Messungen nötig sind.

Während einer Messung werden nicht genügend Kerne angeregt, das Spektrum wird im Lauf der Messungen „aufgebaut“. Das erhaltene Spektrum ist somit ein Mittelwert aus den einzelnen Spektren. Es kann durchaus sein, dass bei der ersten Messung C-Kern A angeregt wird, dann wieder nur andere. Würde man nun dennoch integrieren, erhielte man wenig sinnvolle Werte, da die Intensitäten der einzelnen Peaks nach wie vor zu sehr zufällig sind. Die geringe Aktivität des  $^{13}\text{C}$ -Kerns äußert sich auch in der erforderlichen Dauer zur Aufnahme von Spektren. Während die Aufnahme eines  $^1\text{H}$ -Spektrums etwa 3 Minuten dauert, dauert die eines  $^{13}\text{C}$ -Spektrums etwa eine Stunde.

### 3.5.6.3. APT-Methode

Die APT-Methode (Attached Proton Test) ist ebenfalls eine  $^{13}\text{C}$ -Methode. Ein APT-Spektrum ist  $^1\text{H}$ -Breitbandentkoppelt. Man verwendet heute nicht mehr TMS als internen Standard sondern bedient sich des Deuterolocks. Dazu verwendet man ein deuteriertes Lösungsmittel, am besten  $\text{CDCl}_3$ . Somit kennt man ein Signal, nämlich das ziemlich starke des Chloroforms. Dieses hat im deuterierten Fall gar kein H-Atom gebunden.

Alle Kohlenstoff-Signale mit ungerader Anzahl an H-Atomen zeigen von der Grundlinie nach oben, die mit gerader Anzahl nach unten oder eben umgekehrt.

Die Entwicklung solcher Methoden ist ziemlich aufwendig und kompliziert. Man verwendet bei der Einstrahlungsfrequenz verschiedene Impulssequenzen, die nur C-Atome mit bestimmten Eigenschaften, wie eben solche mit verschieden vielen gebundenen H-Atomen anregen. Ausgewählte davon kann man dann im Spektrum nach oben oder nach unten zeigen lassen. Diese mathematischen Änderungen werden vom Computer vorgenommen. Das physikalische Grundprinzip ist die Messung des Spinechos, die Resonanz, hervorgerufen durch einen sehr kurzen Magnetimpuls. Der Kern reagiert nicht sofort auf den Impuls und das Signal tritt somit verzögert auf. Anschließend klingt es mit der Zeit exponentiell ab, ähnlich

wie ein mechanischer Oszillator. Die folgende Abbildung zeigt ein solches Spinecho (Abbildung III.33.), aufgenommen über eine sehr empfindliche Oszilloskop-Schaltung wie in Abschnitt 3.6.6.1.:

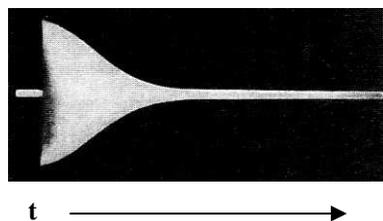


Abbildung III.33.:  
Spinecho

Der Impuls selbst ist auf dem Oszillogramm nicht zu sehen. Er steht ganz links am Beginn der Aufzeichnung

Da man nun bei der APT-Methode das Signal des Deuteriochloroforms kennt, weiß man, in welche Richtung die Signale der C-Atome mit gerader H-Anzahl zeigen. Diese Aufteilung der Signale erleichtert die Auswertung erheblich (Abbildung III.34.):

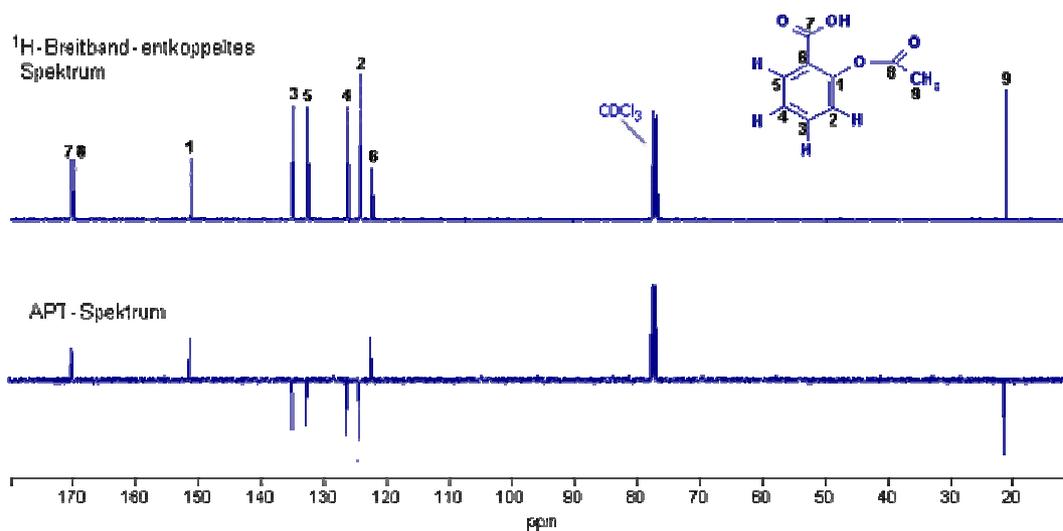


Abbildung III.34.:  
 $^{13}\text{C}$ -Spektrum und  
APT-Spektrum im  
Vergleich

#### 3.5.6.4. DEPT-Methode

Auch diese Methode (DEPT ... Distortionless Enhanced Polarisation Transfer) bedient sich der Überlagerung mehrerer Spektren. Es besteht aus einem gewöhnlichen  $^1\text{H}$ -breitbandentkoppelten Spektrum und je einem Spektrum, das durch verschiedene Impulssequenzen nur die C-Atome mit einem und drei, bzw. jene mit 2 H-Atomen zeigt. Quartäre Kohlenstoffatome werden ausgeblendet. Diese werden in einem meist zusätzlich aufgenommen einfachen entkoppelten  $^{13}\text{C}$ -Spektrum gesondert erfasst und lassen sich so einfacher ausfindig machen. Dennoch ist dies heute wenig sinnvoll, denn die gesamte Information, die das DEPT-Spektrum gemeinsam mit dem einfach entkoppelten  $^{13}\text{C}$ -Spektrum liefert, kann man vereint einem APT-Spektrum entnehmen.

### 3.5.7. Deuterierung

Ohne deuterierte Lösungsmitteln wäre NMR-Spektroskopie gar nicht möglich. Die Herstellung deuterierter Verbindungen soll im Folgenden kurz erläutert werden.

Um ein  $^2\text{H}$ -Atom (D-Atom) einzuführen, geht man immer vom  $\text{D}_2\text{O}$ , dem schweren Wasser aus. Es ist die einzige Verbindung des Wasserstoffs, die verhältnismäßig leicht isotenrein zu gewinnen ist.  $\text{D}_2\text{O}$  unterscheidet sich vom  $\text{H}_2\text{O}$  durch einen geringfügig verschiedenen Siedepunkt (101,42 °C). Der Schmelzpunkt liegt mit 3,8 °C zwar noch weiter von dem des  $\text{H}_2\text{O}$  entfernt, aber ein „Ausfrieren“ des  $\text{D}_2\text{O}$  ist nicht möglich, da es im  $\text{H}_2\text{O}$  nicht kristallisieren würde. Dafür ist die Konzentration viel zu klein (Anteil  $^2\text{H}$  vom Gesamtvorkommen des Wasserstoffs auf der Erde: 0,015%).  $\text{D}_2\text{O}$  wird durch Destillation gewonnen.

Es gibt chemisch viele Möglichkeiten, ein Wasserstoffatom in ein organisches Molekül einzuführen. Die einfachste ist die katalytische Hydrierung mit Palladium als Katalysator. Aber auch die sonst höchst unerwünschte Reaktion einer Grignard-Verbindung mit Wasser (in diesem Fall schwerem Wasser) ist eine solche Möglichkeit (Abbildung III.35):

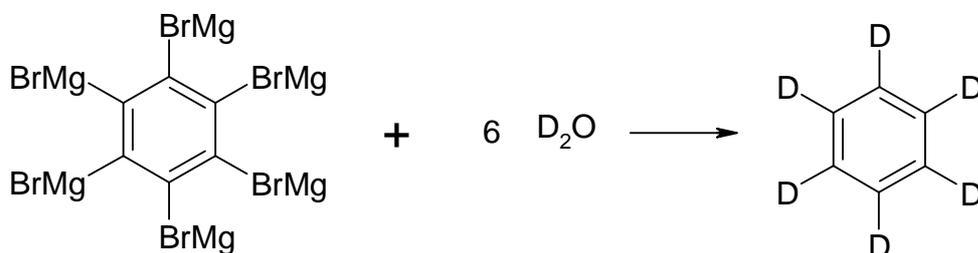


Abbildung III.35.:

Deuterierung nach Grignard

### 3.5.8. Beispiel zu dieser Arbeit

Um die großen Möglichkeiten der NMR-Spektroskopie weiter zu verdeutlichen, soll abschließend das Spektrum einer Verbindung aus der vorliegenden Arbeit untersucht werden: 1-Iodo-1-deoxy-2,3,4-tri-O-Pivaloyl- $\alpha$ -D-Glucuronsäuremethylester (Abbildung III.36):

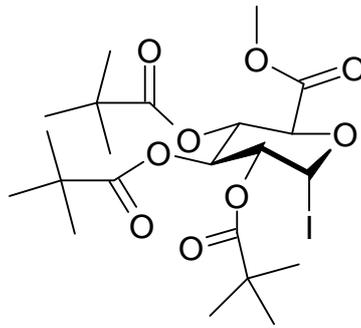


Abbildung III.35: 1-Iodo-1-deoxy-2,3,4-tri-O-Pivaloyl- $\alpha$ -D-Glucuronsäuremethylester

Etwa 50mg des Zuckers werden in  $\text{CDCl}_3$  gelöst. Die Aufnahme des  $^1\text{H}$ -Spektrums erfolgte bei 200MHz. Das folgende Spektrum (Abbildung III.37.) ist bereits kalibriert:

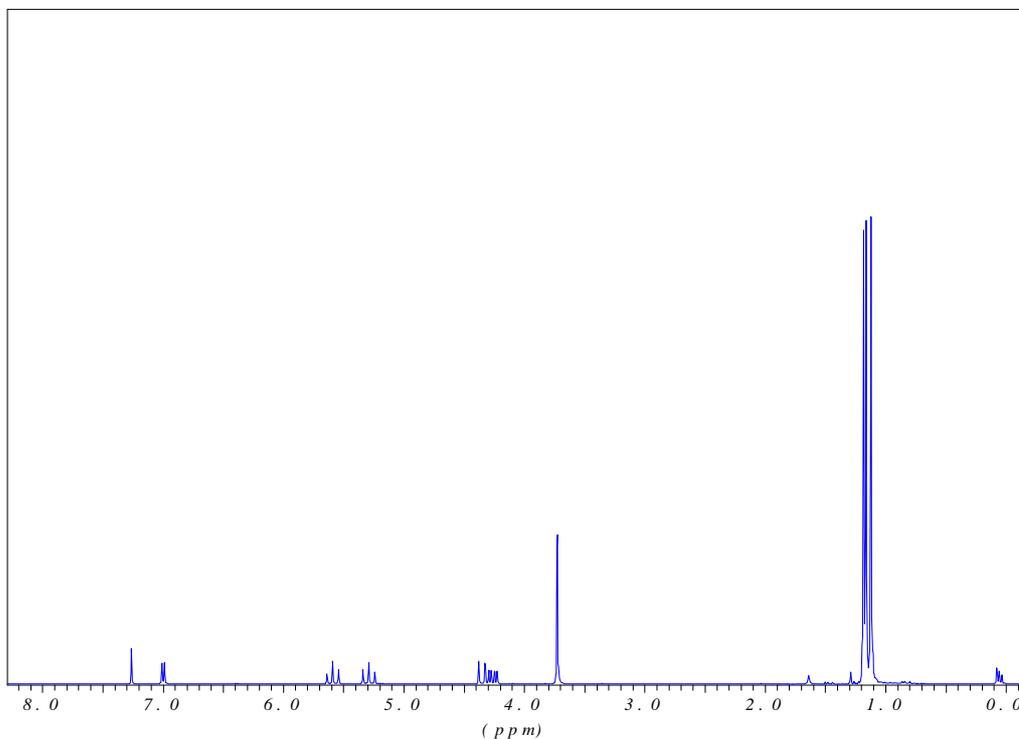


Abbildung III.37.: Kalibriertes Spektrum des pivaloylgeschützten Idozuckers

Als erster Schritt wird das Spektrum kalibriert. Die chemische Verschiebung des  $^1\text{H}$ -Atoms am Chloroform, das in geringen Mengen auch im verwendeten  $\text{CDCl}_3$  vorkommt, ist mit 7,26 ppm bekannt. Die Lage dieses Singulett wird der Software mit eben dieser chemischen Verschiebung vorgegeben und das gesamte Spektrum wird danach ausgerichtet.

Anschließend wird integriert. Dazu wird ein Multiplett ausgewählt, bei dem bekannt ist, wie viele H-Atome es hervorbrachte. Außerdem sollte es beidseitig möglichst gut mit der Grundlinie abschließen, damit Start- und Endpunkt der Integration gut festgelegt werden können. Die Integration wird auf dieses Multiplett normiert. In diesem Beispiel kann dies das H-Atom am  $\text{C}_2$  des Zuckers sein, das mit den beiden H-Atomen von  $\text{C}_1$  und  $\text{C}_3$  koppelt und somit das Triplet bei 5,29 ppm erzeugt. (Abbildung III.38.). Eindeutig zuzuordnen sind in diesem Beispiel allerdings nur die beiden Dupletts und das Duplett auf Duplett. Die Triplets liegen zu nahe beieinander. Da aber die beiden Triplets beide genau von einem H-Atom stammen, wird aufgrund der besseren Abgrenzung dennoch eines dieser Signale verwendet.

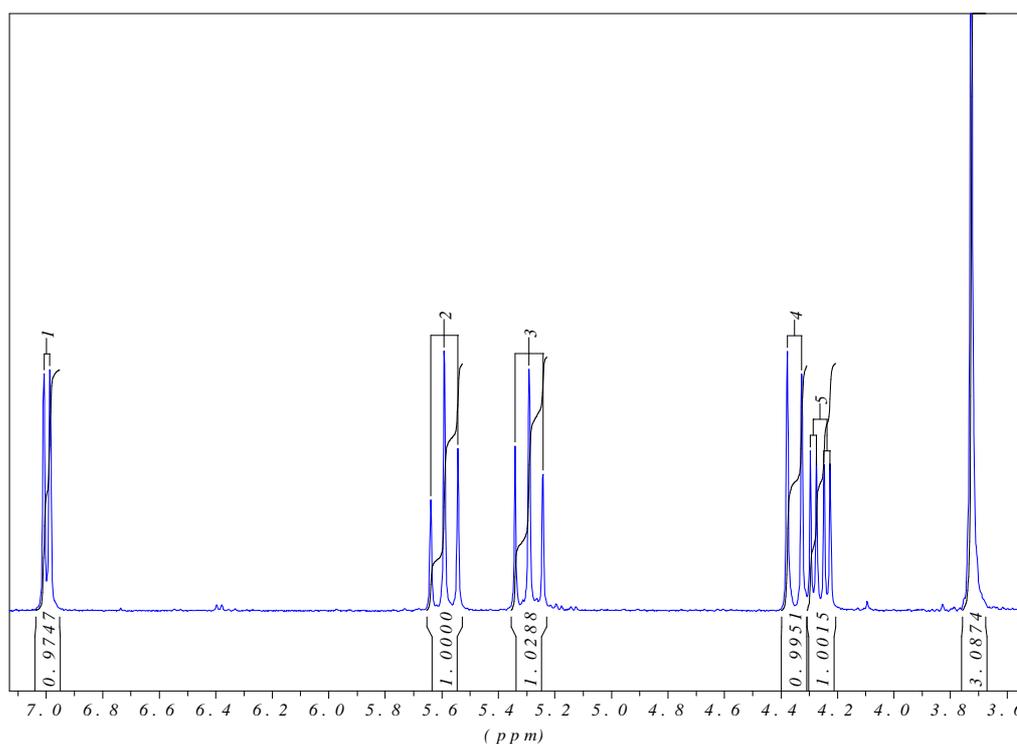


Abbildung III.38.: Nahaufnahme I

Das andere Triplet bei 5,59 ppm wird vom H am  $\text{C}_4$  erzeugt (Dieses Signal hat von den beiden Triplets die größere chemische Verschiebung, da es in der Nähe der Carboxylgruppe liegt, die stärker schirmt als das Iod). Auch dieses hätte für die Normierung verwendet werden

können. Alle anderen Multipletts werden dann ebenfalls integriert, wobei über die Fläche auf die Anzahl der H-Atome hochgerechnet wird.

Nun müssen alle Signale den jeweils magnetisch verschiedenen H-Atomen zugeordnet werden. Die beiden Triplets wurden bereits zugeordnet. Üblicherweise beginnt man mit der Auswertung der Signale bei dem Signal mit der höchsten chemischen Verschiebung.

Bei 7,01 ppm steht ein Duplett, hervorgerufen von einem einzelnen H-Atom. Letztere Information erhält man aus der Integration. Der errechnete Wert weicht, vor allem bei kleinen Anzahlen an H-Atomen meist nur um wenige „hundertstel H-Atome“ ab, bei größeren Anzahlen kann die Abweichung höher sein. Meistens aber sind Signale von so vielen H-Atomen gut zuzuordnen, da es im Molekül nur wenige magnetisch verschiedene H-Atome gibt, von denen so viele vorkommen. Das H-Atom mit der großen chemischen Verschiebung von 7,01 ist das am C<sub>5</sub> gebundene: Es kann nur mit dem H am C<sub>4</sub> koppeln, auf der anderen Seite ist der Sauerstoff gebunden, an dem kein H liegt – es erzeugt ein Duplett.

Das Duplett bei 4,35 ppm wird vom H am C<sub>1</sub> erzeugt. Dieses kann nur mit jenem H am C<sub>2</sub> koppeln und hat eine kleinere chemische Verschiebung als das vom C<sub>5</sub>, das gegenüber der Carboxylgruppe liegt.

Das H am C<sub>3</sub> erzeugt ein Duplett auf Duplett bei 4,27 ppm: Es koppelt separat mit den H-Atomen an C<sub>4</sub> und an C<sub>2</sub>. Anhand dieses Beispiels soll noch einmal der Unterschied zwischen Duplett auf Duplett und Quadruplett erläutert werden: Ersteres besteht aus vier gleich hohen (gleich intensiven) Einzelsignalen, das Quadruplett bestünde aus vier verschieden intensiven Signalen mit dem Höhenverhältnis (eigentlich Flächenverhältnis) 1:3:3:1. Dazu sei das in diesem Beispiel auftretende Duplett auf Duplett abgebildet (Abbildung III.39.):

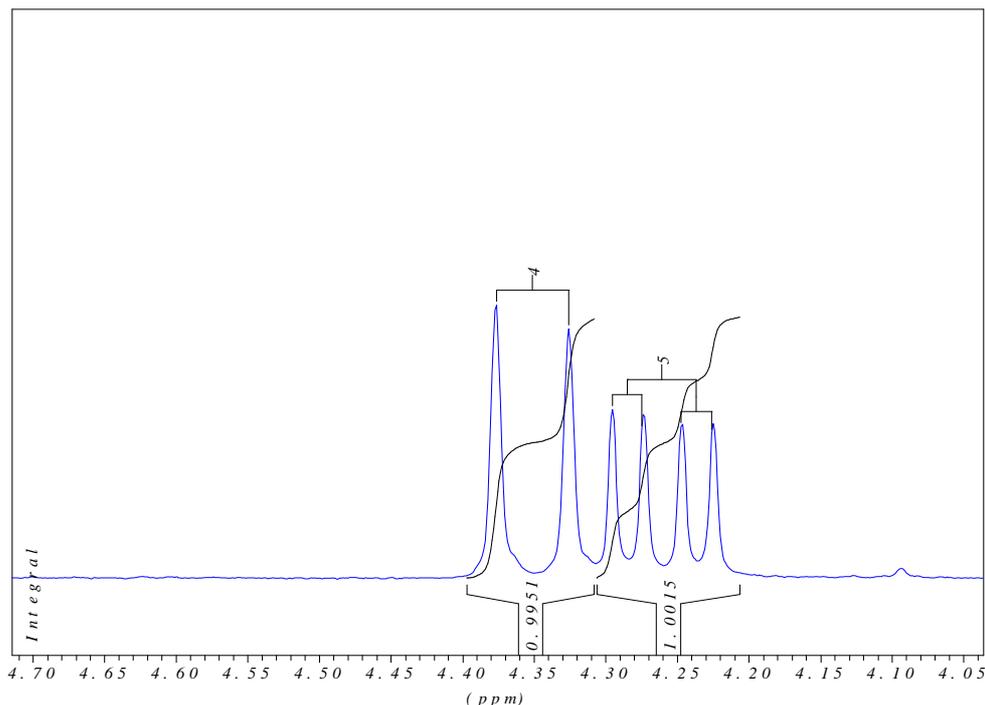


Abbildung III.39.: Duplett auf Duplett

Das Singulett bei 3,73 ppm wird von den drei magnetisch gleichwertigen H-Atomen der Methylgruppe erzeugt.

Die H-Atome der drei Pivaloylgruppen sind jeweils ebenso magnetisch gleichwertig und von anderen H-Atomen isoliert. Daher erzeugen sie, wie in Abbildung III.40. zu sehen, drei 9H-Singulett bei 1,19, 1,16 und 1,12 ppm. Die Reihenfolge ergibt sich aus den jeweiligen umgebenden Gruppen (mit fallender chemischer Verschiebung): C<sub>4</sub> (Carboxylgruppe daneben) – C<sub>2</sub> (Iod daneben) – C<sub>3</sub> (links und rechts Pivaloylgruppen).

Eine weitere Möglichkeit, das NMR-Spektrum schnell zu interpretieren ist, die Kopplungskonstanten näher zu betrachten. Die Größe derselben hängt von der räumlichen Stellung der betreffenden H-Atome im Raum zueinander ab (KARPLUS – Beziehung):

$$J_{aa} > J_{ae} > J_{ee},$$

wobei a für axial und e für äquatorial steht. Diese Tatsache, dass die Kopplungskonstanten von der räumlichen Anordnung der H-Atome abhängen erklärt auch, warum ein Duplett auf Duplett statt einem Triplett entsteht. Es liegen zwei sterisch ungleichwertige H-Atome an den Nachbaratomen des C<sub>3</sub> vor, mit denen das H-Atom am C<sub>3</sub> separat koppelt.

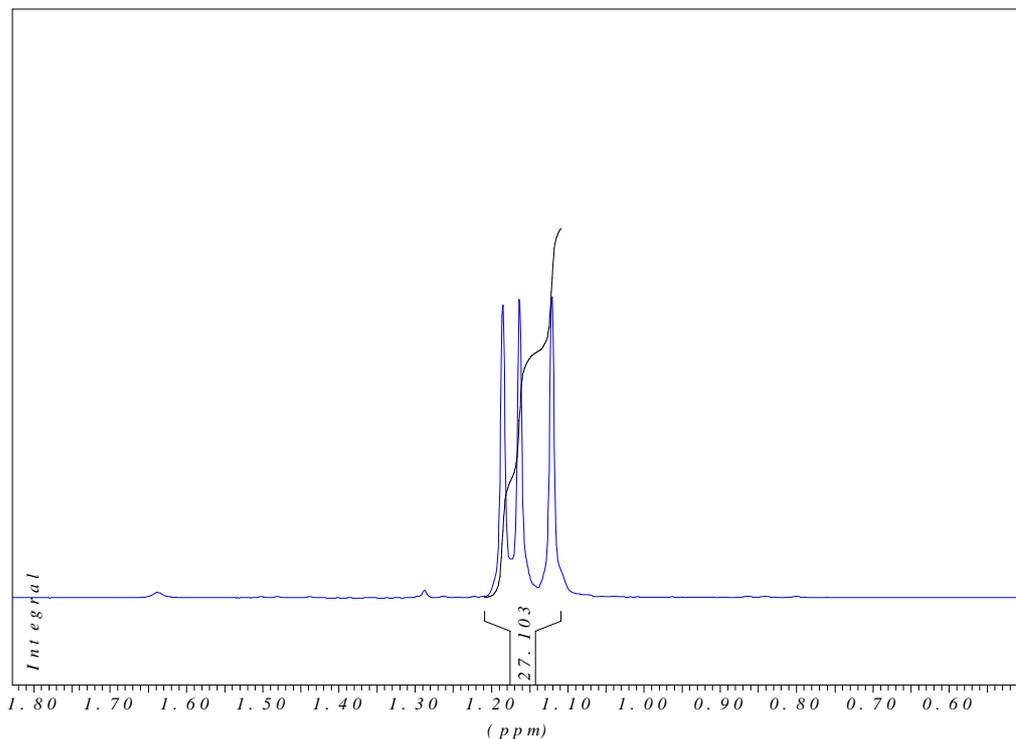


Abbildung III.40.: Pivaloyl-Singulett

Angegeben wird nur der „NMR-Code“: Zu Beginn steht, um welches Spektrum es sich handelt ( $^1\text{H}$ ), dann in Klammer die Messfrequenz und das Lösungsmittel und anschließend die Signale mit fallender chemischer Verschiebung. Bei jedem Signal steht in Klammer die Kopplungskonstante in Hertz und die Anzahl der H-Atome. Für dieses Beispiel würde der NMR-Code also wie folgt lauten:

$^1\text{H}$ -NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.01$  (d,  $J = 4.3$  Hz, 1H), 5.59 (t,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 5.29 (t,  $J = 9.9$  Hz, 1H), 4.35 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H), 4.27 (dd,  $J = 9.8, 4.3$  Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 1.19 (s, 9H), 1.16 (s, 9H), 1.12 (s, 9H) ppm

# **IV**

# **SPEZIELLER TEIL**

## 4.1. Grundkörpersynthese

### 4.1.1. Lactonöffnung: Umesterung mit primären Alkoholen

Zur Synthese der Grundkörper wird vom Glucuronolacton (**1**) ausgegangen. Dieses wird mit Methanol umgesetzt, wobei Natriummethylat als Katalysator dient. Dieses greift am Kohlenstoff der Lactonbindung an und öffnet den Ring (Abbildung IV.1.):

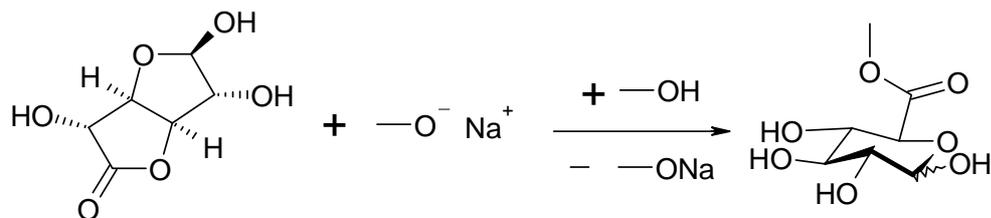


Abbildung IV.1.: Lactonöffnung durch Umesterung

Das Methylglucuronat wurde nicht eigens aufgearbeitet sondern nach Entfernen des überschüssigen Methanols, das auch als Lösungsmittel diente, gleich zur Weiterreaktion zum 1,2,3,4-Tetraacetyl-, 1,2,3,4-Tetrapivaloyl- und 1,2,3,4-Tetrabenzoylglucuronsäuremethylester verwendet.

Die gleiche Reaktion sollte auch mit Allylalkohol und Benzylalkohol zum Allyl- bzw. Benzylglucuronat (**17**, **18**) durchgeführt werden, doch in beiden Fällen konnte kein Produkt isoliert werden. Vom Benzylglucuronat ist nie Produkt entstanden (DC-Kontrolle), ebenso vom Allylglucuronat.

#### 4.1.2. Esterbildung an alkoholischen OH-Gruppen mit Säurechlorid

Tetrapivaloat (**9**) und Tetrabenzoat (**13**) werden ausgehend von Methylglucuronat hergestellt. Dieses wird nicht gesondert aufgearbeitet, sondern nach der Herstellung nur das Methanol, das als Lösungsmittel und Reagenz dient, im Vakuum abdestilliert. Das so erhaltene Produkt ist für die folgende Veresterung der OH-Gruppen bereits rein genug.

Das Chlor und vor allem der Carbonyl-Sauerstoff im Säurechlorid ziehen die Elektronen des benachbarten Kohlenstoffatoms zu sich und gibt ihm so eine positive Partiaalladung. So wird ein Angriff auf den eine negative Partiaalladung tragenden Sauerstoff der OH-Gruppe ermöglicht. Das Wasserstoffatom wird als Abgangsgruppe abgespalten, was das durch Pyridin verursachte basische Milieu erleichtert. Das Chlor des Säurechlorides wird ebenfalls abgespalten und fungiert als Gegenion des entstandenen Pyridiniumions.

In Summe wird der bei der Reaktion entstehende Chlorwasserstoff von Pyridin gebunden, das zum Pyridiniumchlorid umgesetzt wird und so wird das Gleichgewicht auf die Seite des jeweiligen Eduktes verschoben (Abbildung 2. IV.):

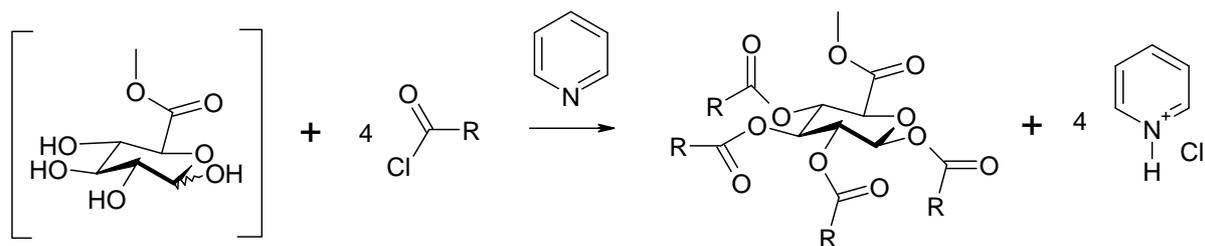


Abbildung IV.2.: Esterbildung mit Säurechlorid

Es wurden folgende Ausbeuten erhalten:

R = Pivaloyl- : 56,7 %

R = Benzoyl- : 77,4 %

### 4.1.3. Esterbildung an alkoholischen OH-Gruppen mit Säureanhydrid

Die Darstellung des Tetraacetats (**3**) erfolgt analog der des Tetrapivaloats und –benzoats (siehe 4.1.2.). Beim Tetraacetat wird das Methylglucuronat allerdings mit Acetanhydrid anstelle von Acetylchlorid umgesetzt. Dieses ist zwar weniger reaktiv als das Säurechlorid, hat aber den Vorteil, dass weniger unerwünschte Nebenprodukte entstehen. Das liegt daran, dass das Säureanhydrid an sich schon weniger aggressiv ist, vor allem aber daran, dass als Nebenprodukt keine hochaggressive Mineralsäure (HCl), sondern nur Essigsäure entsteht. Es muss deshalb auch kein Pyridin zugesetzt werden. Als Katalysator dient wenig Perchlorsäure, ein Protonendonator, der das Säureanhydrid aktiviert (Abbildung IV.3.):

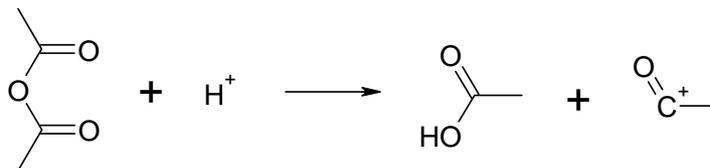


Abbildung IV.3.: Aktivierung des Säureanhydrids

Das so entstandene Elektrophil greift nun am Sauerstoff der OH-Gruppen an (Abbildung IV.4.):

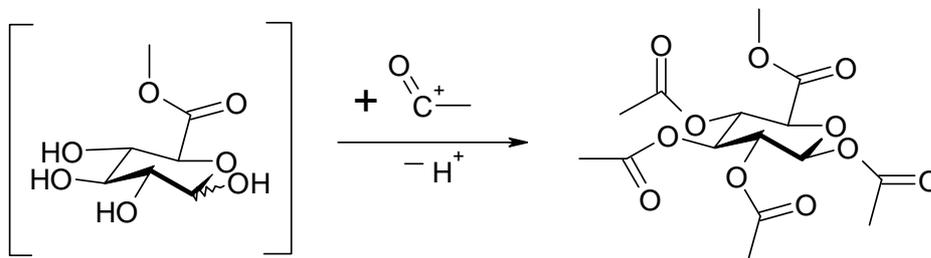


Abbildung IV.4.: Bildung des Zuckeresters

Es wurde eine Ausbeute an Tetraacetat von 69,7% erhalten.

#### 4.1.4. Glucuronsäureesterbildung mit freier Säure und Alkylbromiden

Da die Darstellung von Allyl- und Benzylglucuronat (**17**, bzw. **18**) über Glucuronolacton und den jeweiligen Alkohol nicht gelang, wurde ein Syntheseweg über das Alkylbromid besprochen.

Das Wasserstoffatom an der Carboxylgruppe der Glucuronsäure wird durch das vom 1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en, einer sterisch gehinderten Base, geschaffene basische Milieu gelockert (Abbildung IV.5.):

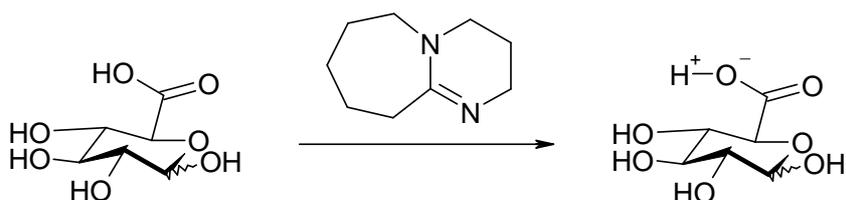


Abbildung IV.5.: Lockerung des Carboxylwasserstoffs

Dadurch wird ein Angriff des positiv geladenen Alkylrestes am Sauerstoffatom der Carboxylgruppe ermöglicht, wobei das Bromid der Base entsteht (Abbildung IV.6.):

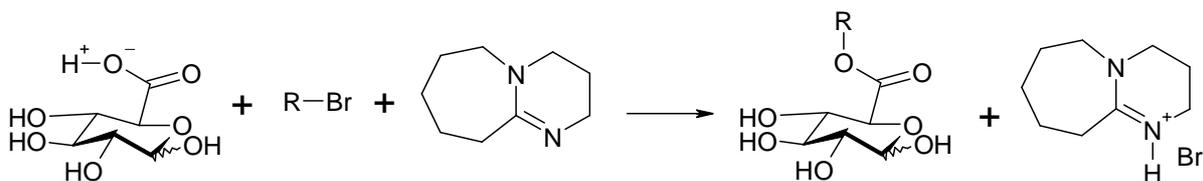


Abbildung IV.6.: Bildung des Glucuronsäureesters

Die beiden Glucuronsäureester konnten in folgenden Ausbeuten isoliert werden:

R = Allyl- : 87,9 %

R = Benzyl- : 70,4 %

#### 4.1.5. Lactonöffnung: Glucuronsäuresynthese

Die Darstellung freier Glucuronsäure aus dem Lacton (**1**) wurde durchgeführt, da die Grundkörper Allylglucuronat (**17**) und Benzylglucuronat (**18**) aus dem Lacton nicht direkt herstellbar waren, wie das beim als Zwischenprodukt gebildeten Methylglucuronat möglich war. Da die freie Glucuronsäure im Vergleich zum Lacton sehr kostenintensiv ist (das Lacton wird zu etwa dem Zehntel des Preises der freien Säure angeboten), wurde ein Weg gesucht, aus dem Lacton die freie Säure herzustellen. Das gelang mit einem stark basischen Ionentauscher des Typs Amberlite IRA 400 (Matrix: Styroldivinylbenzol).

Zwischen Lacton und freier Säure liegt in wässriger Lösung ein Gleichgewicht vor, das allerdings auf der Seite des Lactons liegt. Durch den Einsatz eines stark basischen Anionentauschers wird das Gleichgewicht verschoben: Das Lacton wird durch die  $\text{OH}^-$ -Ionen geöffnet und die freie Säure an den Ankergruppen des Harzes (quartäre Ammoniumgruppen) gebunden. Sie bildet sich in der Lösung entsprechend der Lage des Gleichgewichtes nach (Abbildung IV.7.):

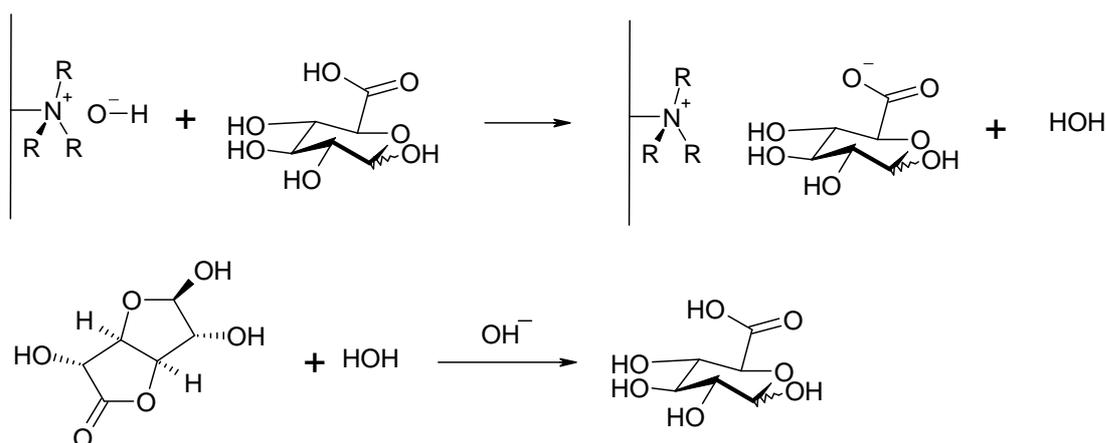


Abbildung IV.7.: Bindung von Glucuronsäure an die quartär-Ammonium-Ankergruppen und Nachbildung der Säure aus dem Lacton

Nach dem Beladen des Harzes wird mit Wasser nachgewaschen um restliches Lacton zu entfernen und die freie Glucuronsäure mit verdünnter Schwefelsäure eluiert (Abbildung IV.8.):

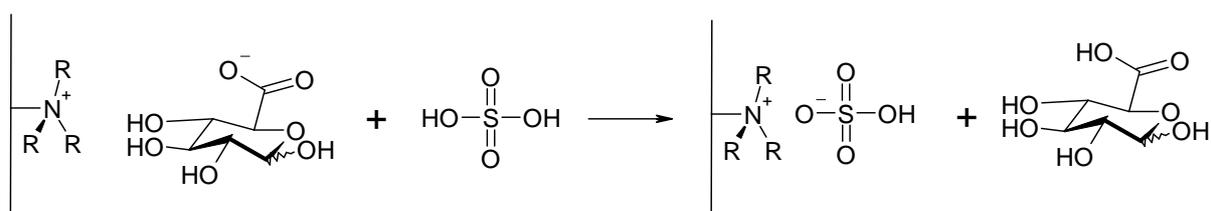


Abbildung IV.8.: Elution freier Säure

Die freie Säure wurde mit einer Ausbeute von 66,7 % erhalten.

## 4.2. Chlorameisensäure-(2-trimethylsilyl)-ethylester

Der Chlorameisensäure-(2-trimethylsilyl)ester ist Ausgangsprodukt zur Herstellung carbonatgeschützter Glucuronyldonoren, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr hergestellt wurden (Abbildung IV.9.):

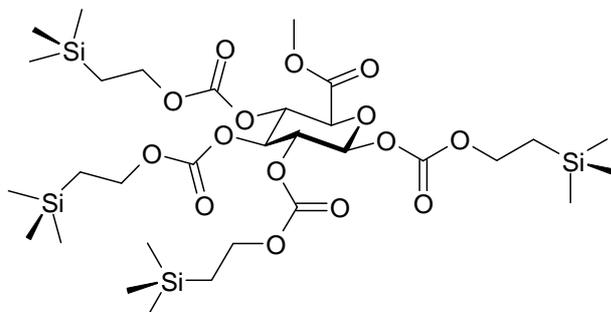


Abbildung IV.9.: Beispiel für einen Carbonatgeschützten Glucuronyldonor

### 4.2.1. Reformatsky-Reaktion: 2-Trimethylsilylessigsäureethylester

Die Reformatsky-Reaktion ist der Grignard-Reaktion sehr ähnlich. Während aber bei letzterer der nukleophile Angriff auf das Kohlenstoffatom einer Carbonylgruppe erfolgt, greift das Nukleophil der Reformatsky-Reaktion an einem aliphatischen Kohlenstoff (oder in diesem Fall am homologen Silicium) an, der durch ein Halogen als Substituent eine starke positive Partialladung erhält. Außerdem wird Zink statt Magnesium als metallisches Reagenz verwendet., das weniger reaktiv ist. Die Reformatsky-Reaktion greift zwar auch Carbonylgruppen an, jedoch keine Ester. Durch die Anwendung dieser Reaktion wird verhindert, dass der Bromessigsäureethylester mit sich selbst reagiert. Auch das Anspringen der Reformatsky-Reaktion kann durch Zugabe geringer Mengen Iod, das das Zink anätzt, erleichtert werden. Das folgende Schema zeigt den Ablauf der Reaktion am im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Beispiel des 2-Trimethylsilylessigsäureethylesters (**21**) (Abbildung IV.10.):

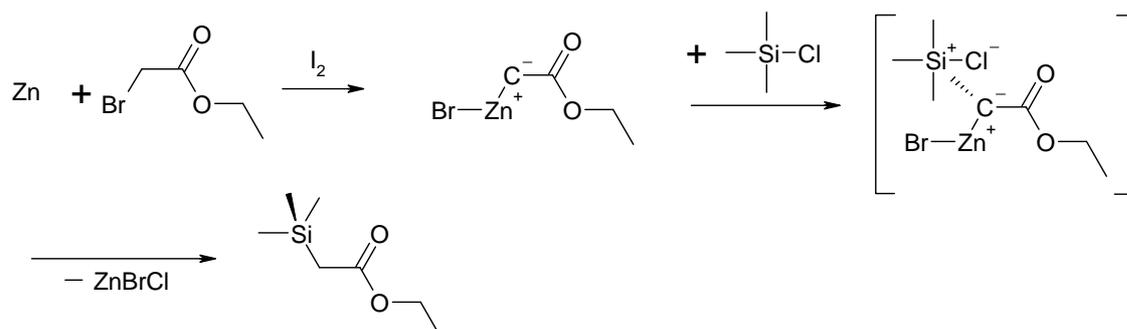


Abbildung IV.10.: Reformatsky-Reaktion

Der Ester wurde mit 30,3 % Ausbeute erhalten. Der Ansatz wurde anschließend mit der fünffachen Ausgangsstoffmenge wiederholt, wo allerdings nur eine deutlich schlechtere Ausbeute erzielt werden konnte. Außerdem konnte das Produkt destillativ nicht rein gewonnen werden.

#### 4.2.2. Lithiumaluminiumhydrid-Reduktion: 2-Trimethylsilylethanol

Lithiumaluminiumhydrid ist ein starkes Reduktionsmittel, das in der Lage ist, Carbonylgruppen zum Alkohol zu reduzieren. Im Gegensatz zum ebenfalls oft verwendeten Natriumborhydrid reduziert es allerdings auch Ester zu Alkoholen.

Eines der negativ geladenen Wasserstoffatome greift am Carboxyl-Kohlenstoffatom der Estergruppe an und bindet über den Mechanismus der Hydridübertragung (Abbildung IV.11., erste Zeile):

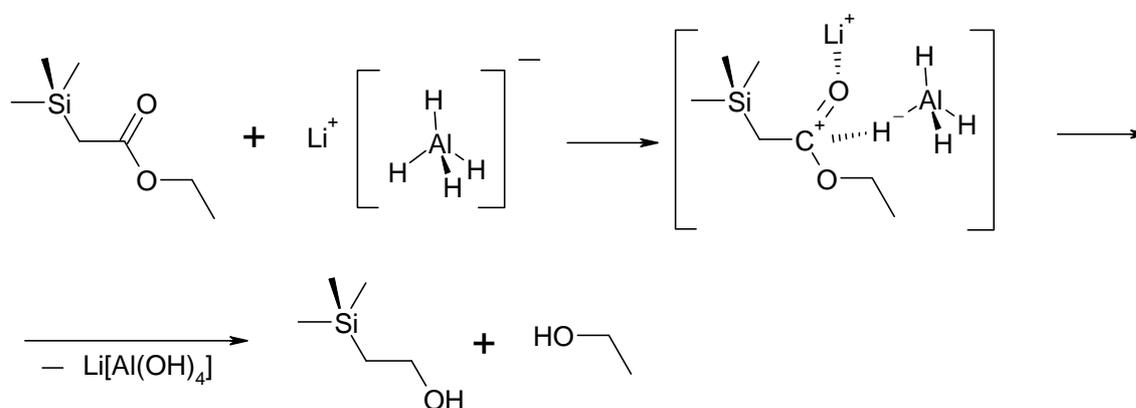


Abbildung IV.11.: Lithiumaluminiumhydrid-Reduktion

Von der anderen Seite greift ein zweites Wasserstoffatom an. Auch am Sauerstoff der Carbonylgruppe, der im  $60^\circ$ -Winkel zur Angriffsebene der beiden unteren Wasserstoffatome und im  $120^\circ$ -Winkel zur Bindung des Carbonylkohlenstoffs zum benachbarten  $\alpha$ -Kohlenstoff steht, greift ein Wasserstoffatom an. Die negative Partialladung wurde vom Lithium, das sich an dieses Sauerstoffatom anlagerte, kompensiert, sodass das negative Wasserstoffatom angreifen kann. Das letzte Wasserstoffatom des Lithiumaluminiumhydrids, das auf der der Carbonylgruppe abgewandten Seite liegt, hat seine negative Ladung wegen der Bindungen der anderen Wasserstoffatome bereits soweit verloren, dass es sich elektrophil an die abgespaltene Ethoxygruppe anlagert und mit ihr das Ethanol bildet (Abbildung IV.13., 2. Zeile).

Das Produkt Trimethylsilylethanol (**22**) wurde mit 82,1 % Ausbeute erhalten.

### 4.2.3. Veresterung: Chlorameisensäure-(2-Trimethylsilyl)-ethylester

Um das Endprodukt (**23**) zu erhalten, wird (**22**) mit der stöchiometrischen Menge ( $n:n = 1:1$ ) Phosgen verestert (Abbildung IV.12.):

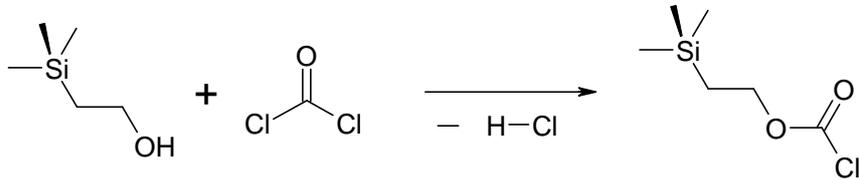


Abbildung IV.12.: Monoesterbildung mit TMS-Ethanol und Phosgen

Dass das stöchiometrische Äquivalent oder noch mehr Phosgen eingesetzt wird, ist wichtig, dass eine Weiterreaktion zum Diester (Abbildung IV.13.) verhindert wird, der zur Darstellung carbonatgeschützter Glucuronyldonoren wie jener in Abbildung IV.9. nicht mehr verwendbar wäre.

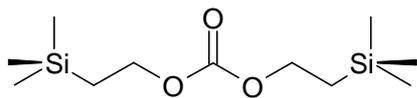


Abbildung IV.13.: Bis(2-(trimethylsilyl)ethyl)carbonat

Die Darstellung dieses Produktes konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgrund seiner begrenzten Haltbarkeit nicht mehr ausgeführt werden, ist aber für weiterführende Studien von Bedeutung.

### 4.3. Synthese von Glucuronyldonoren

#### 4.3.1. 1-Bromozucker

Die Bromozucker (**4**, **10**, **14**) werden aus dem jeweiligen Tetraacetat (**3**, **9**, **13**) hergestellt. Dazu wird mit Bromwasserstoffsäure 33% in Eisessig, versetzt und bei Raumtemperatur rühren gelassen. Die Reaktion verläuft nach einem S<sub>N</sub>2-Mechanismus mit freier Säure als Abgangsgruppe (Abbildung IV.14.):

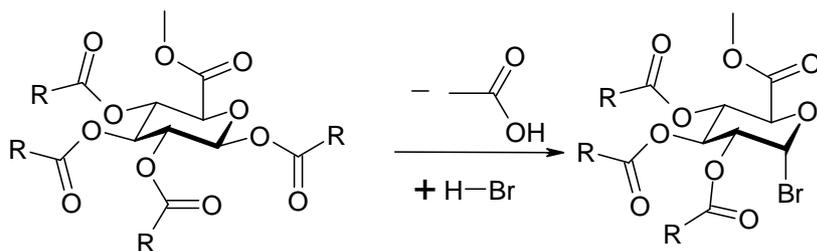


Abbildung IV.14.: Bildung der Bromozucker

Zur Aufarbeitung werden die überschüssige Bromwasserstoffsäure und der Eisessig im Vakuum abdestilliert. Das pivaloyl- und benzoylgeschützte Produkt kristallisierte nach Lagerung bei 4 °C aus, der acetylgeschützte Bromozucker (**4**) musste noch durch Kieselgelfiltration von verfärbenden Substanzen gereinigt werden. Erst dann kristallisierte auch dieses Produkt. Das erklärt die geringere Ausbeute beim acetylgeschützten Bromozucker. Abschließend wurden die Produkte durch Umkristallisieren gereinigt.

Erhaltene Ausbeuten:

R = Acetyl- :	34,9 %
R = Pivaloyl- :	63,1 %
R = Benzoyl- :	85,8 %

### 4.3.2. Iodozucker

Die Iodozucker (**5**, **11**, **15**) wurden ausgehend vom jeweiligen Grundkörper (**3**, **9**, **13**) durch Umsetzung mit Trimethylsilyliodid ebenfalls über einen  $S_N2$ -Mechanismus dargestellt (Abbildung IV.15.):

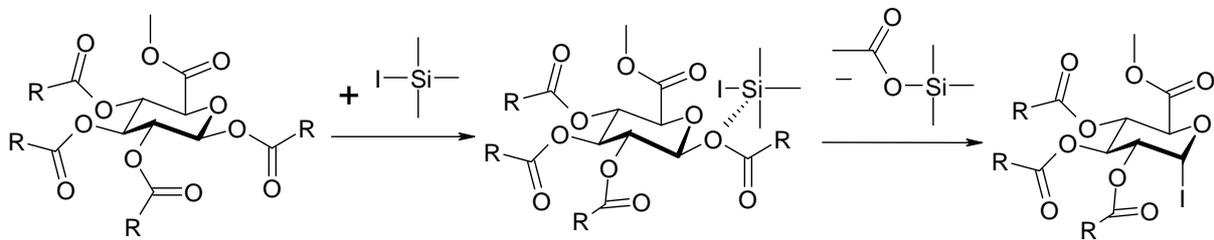


Abbildung IV.15.: Bildung der Iodozucker

Da sich Teile des Trimethylsilyliodids während der Reaktion, die bei 50 °C in Acetonitril stattfindet, zersetzen, muss vor dem Einengen mit Hydrogensulfitlösung ausgeschüttelt werden, um das freie Iod zu entfernen. Die dabei entstehende Schwefelsäure wird durch Ausschütteln mit Bicarbonatlösung entfernt.

Die Iodozucker wurden mit folgenden Ausbeuten erhalten:

R = Acetyl- :	54,1 %
R = Pivaloyl- :	52,6 %
R = Benzoyl- :	50,8 %

### 4.3.3. 1-OH-Zucker

Diese Zucker wurden mit Acetyl-, Pivaloyl- und Benzoylschutzgruppen dargestellt. Der Reaktionsmechanismus ist allerdings bei allen drei Resten gleich und wird daher allgemein beschrieben. Im Folgenden wird in den Reaktionsgleichungen nur „R“ geschrieben, das für alle drei oben angeführten Reste stehen kann. Alle drei Methoden führten zu Mischungen aus der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Form.

Zur Darstellung der OH-Zucker (**6**, **12** und **16**) werden drei Methoden verwendet.

#### 4.3.3.1. Hydrazinmethode

Es wird vom jeweiligen Tetracarboxylat (**3**, **9**, **13**) ausgegangen. Die Umsetzung findet unter Wasserausschluss statt. Zuerst erfolgt ein Angriff der Säure am anomeren Sauerstoffatom, wobei das Produkt und ein Säureanhydrid gebildet wird. (Abbildung IV.16.):

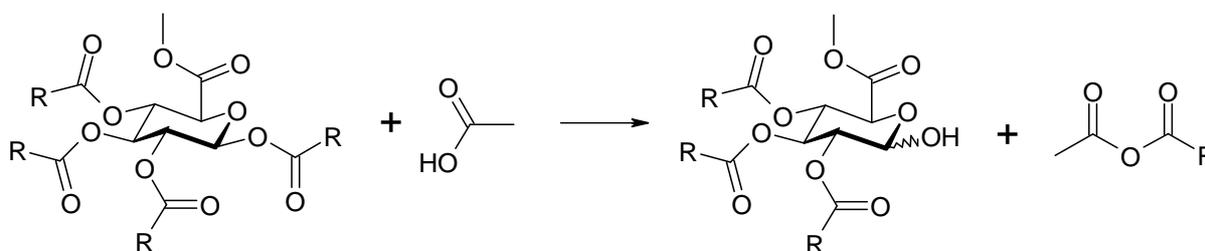


Abbildung IV.16.: Säureangriff auf das Tetracarboxylat

Das sehr reaktive Säureanhydrid wird sofort durch Hydrazin unter Bildung des stabilen und unreaktiven Hydrazids zersetzt (Abbildung IV.17.):

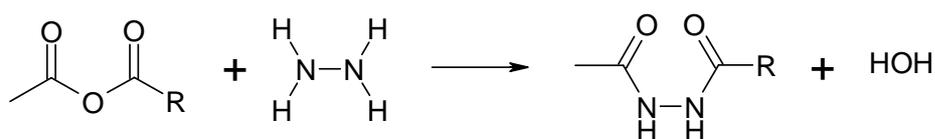


Abbildung IV.17.: Zersetzung des Säureanhydrids unter Hydrazidbildung

Das bei dieser Reaktion gebildete Wasser wird wiederum von weiterem Säureanhydrid unter Bildung der freien Säure absorbiert. Die freien Säuren können dann vom Hydrazin unter Bildung der jeweiligen Ammoniumsalze gebunden werden.

Die 1-OH-Zucker wurden in folgenden Ausbeuten erhalten:

R = Acetyl- :	Qualitative Ausbeute (auf DC sichtbar, allerdings kein Produkt isolierbar)
R = Pivaloyl- :	50,0 %
R = Benzoyl- :	5,8 %

#### 4.3.3.2. Bromozuckermethode

Bei dieser Methode konnten deutlich höhere Ausbeuten, unabhängig von der jeweiligen Schutzgruppe, erreicht werden. Es wird vom Bromzucker ausgegangen (**4**, **10**, **14**) und dieser mit der stöchiometrischen Menge Wasser versetzt. Als Aktivator wird ein Schwermetallsalz verwendet, das mit Brom ein schwerlösliches Salz bildet (hier wurde Silbercarbonat verwendet). Die Reaktion verläuft nach einem S<sub>N</sub>2- Mechanismus (Abbildung IV.18.):

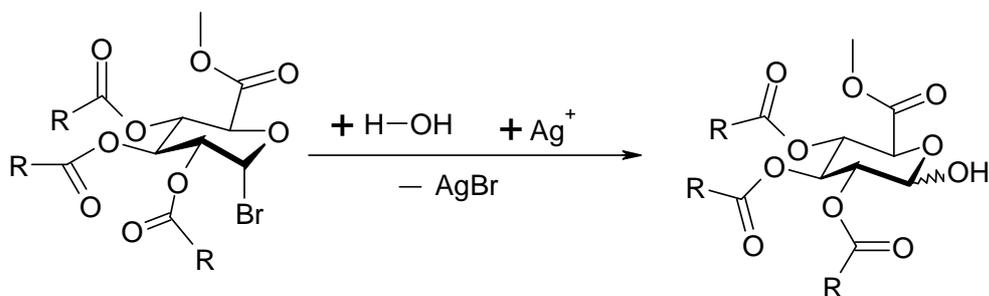


Abbildung IV.18.: Hydrolyse des Bromzuckers

Die 1-OH-Zucker wurden in folgenden Ausbeuten erhalten:

R = Acetyl- :	77,5 %
R = Pivaloyl- :	100 %
R = Benzoyl- :	73,2 %

#### 4.3.3.3. Bis-(Tributylzinnoxid)-Methode

Diese Methode wird nur beim Acetylgeschützten Zucker (**6**) angewandt (Abbildung IV.19.).

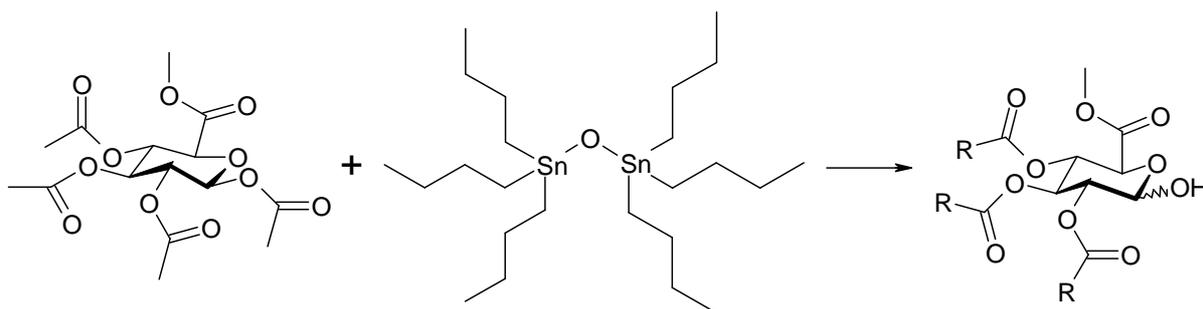


Abbildung IV.19.: Triacetatbildung mit Bis-(Tributylzinnoxid)

Es wurde zwar Produkt erhalten, wie die DC-Kontrolle zeigte, jedoch ließ es sich nicht von der restlichen Zinnverbindung trennen.

#### 4.3.4. 1-O-Trichloracetimidat-2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-Glucuronsäuremethylester

Zur Darstellung des Imidats (**8**) wird vom 1-OH-Zucker (**6**) ausgegangen und mit Trichloracetonitril umgesetzt. Dem Kohlenstoffatom der Nitrilgruppe werden von beiden Seiten Elektronen entzogen, es trägt somit eine stark positive Partialladung und lagert sich an die freie OH-Gruppe des Zuckers an (Abbildung IV.20.):

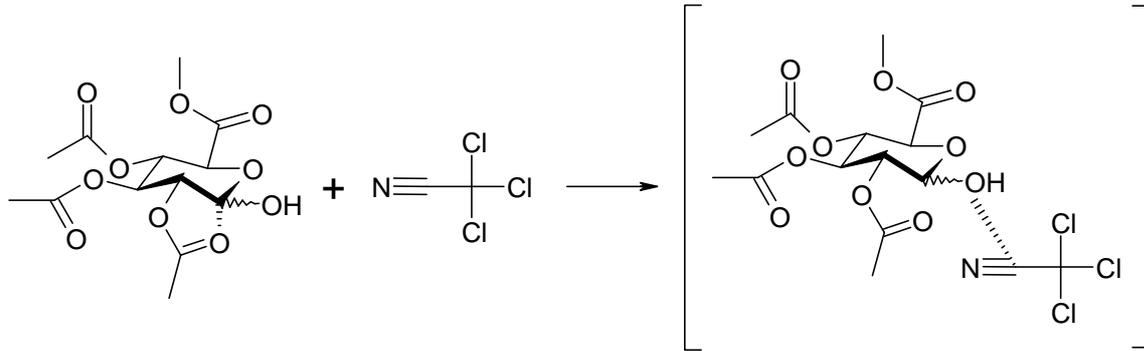


Abbildung IV.20.: nukleophiler Angriff des Trichloracetonitrils

Es kommt zur Bindung unter Ausbildung eines Imidates (Abbildung IV.21.):

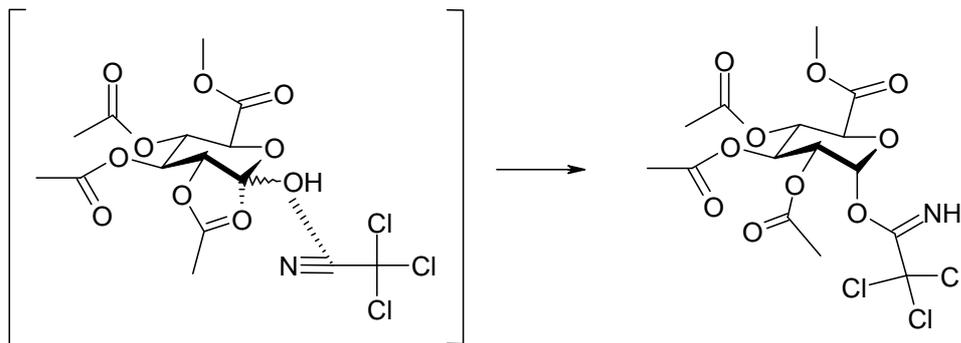


Abbildung IV.21.: Bildung des Trichloracetimidats

Das Produkt wurde in qualitativer Ausbeute erhalten (NMR-Daten siehe 5.2.1.).

#### 4.3.5. 1-Fluoro-1-deoxy-2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucuronic acid methyl ester (7)

Die Darstellung des Fluorozuckers (7) erfolgt ausgehend vom trisubstituierten Zucker (6). Dieser Zucker wird mit Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) umgesetzt. Im ersten Schritt erfolgt ein Angriff des auf die freie OH-Gruppe unter Abspaltung von HF (Abbildung IV.22.).

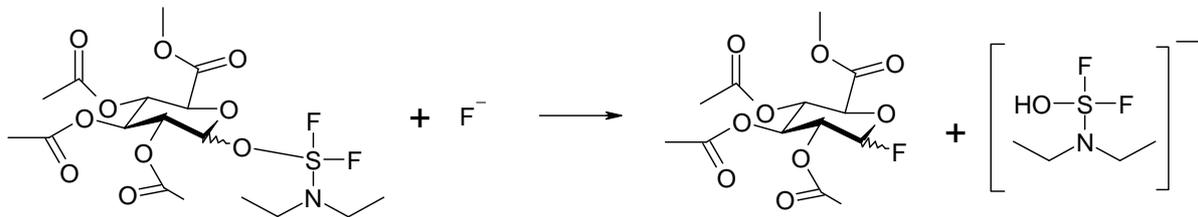


Abbildung IV.22.: Angriff des DAST

Im zweiten Schritt bildet sich der Fluorozucker über einen  $S_N2$ -Mechanismus (Abbildung IV.23.):

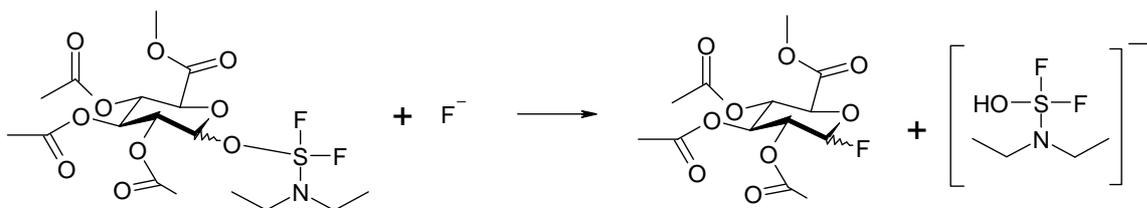


Abbildung IV.23.: Bildung des Fluorozuckers

Im letzten Schritt zerfällt der instabile negative Komplex (Abbildung IV.24.):

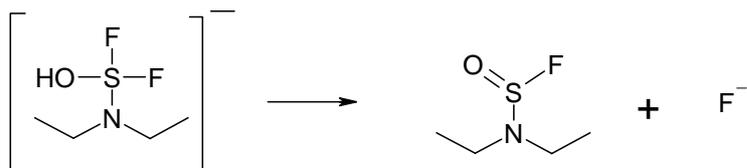


Abbildung IV.24.: Zerfall des Komplexes

Das Produkt konnte mit einer Gesamtausbeute von 80,3% erhalten werden.

## 4.4. Organisch-chemische Glucuronidierung

### 4.4.1. Königs-Knorr-Methode

Im Rahmen dieser Arbeit war diese Methode, durchgeführt mit acetylgeschütztem Bromozucker (**4**) bzw. Nitrophenol und Phenolphthalein als Glucuronylakzeptor die einzige organisch-chemische Glucuronidierung.

Die Methode basiert auf der Aktivierung des betreffenden Bromozuckers mit einem Metallkation wie Quecksilber, Cadmium oder Silber, das mit Brom ein schwer lösliches, stabiles Salz bildet. Hier wurde Silbercarbonat verwendet.

Das Brom am Zucker steht in  $\alpha$ -Stellung (Abbildung IV.25.):

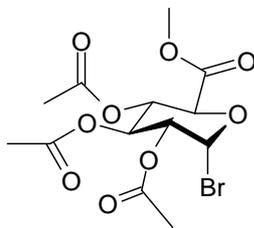


Abbildung IV.25.: Stellung des Broms im Bromozucker

Dadurch wird eine Reaktion mit Brom als Abgangsgruppe möglich (Abbildung IV.26.):

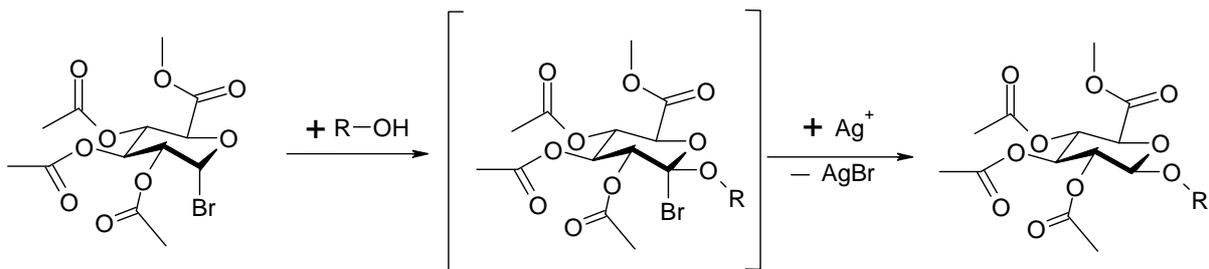
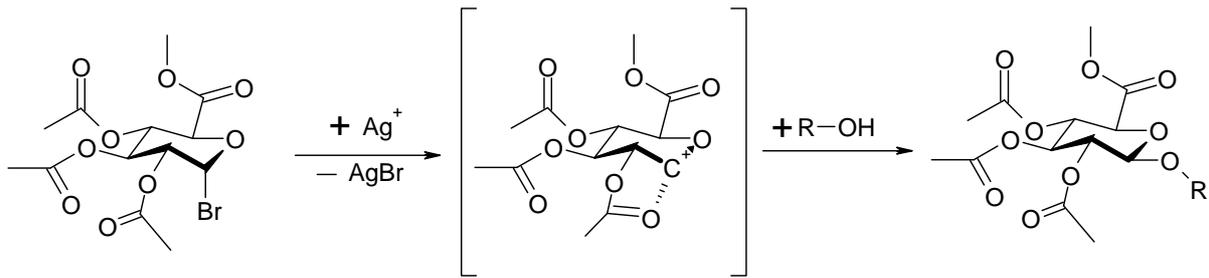
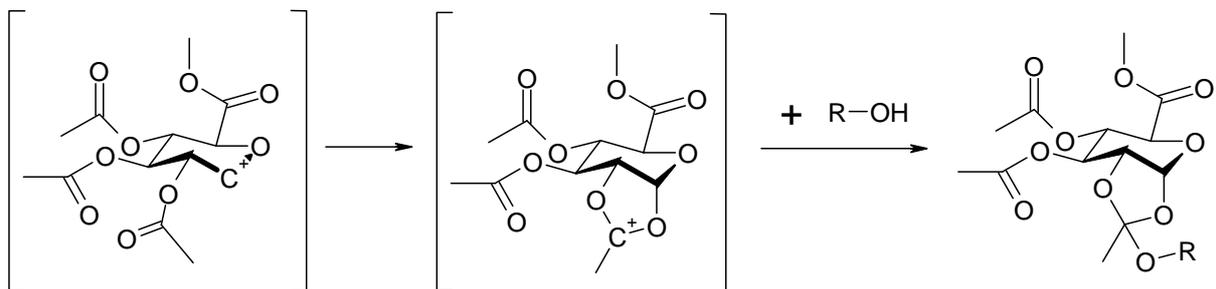


Abbildung IV.26.:  $S_N2$ -Weg der Königs-Knorr-Methode

Dies ist die günstigere von zwei Möglichkeiten, denn so wird das Glucuronid immer in der natürlich vorkommenden  $\beta$ -Stellung erhalten und außerdem gibt es keine Möglichkeit von Nebenprodukten. Es gibt aber noch einen zweiten Reaktionsweg, der über eine  $S_N1$ -Reaktion verläuft (Abbildung IV.27.):

Abbildung IV.27.: Glucuronidbildung nach Königs-Knorr,  $\text{S}_{\text{N}}1$ -Weg

Das Problem dieses Reaktionsweges ist, dass als Nebenprodukt ein Orthoester entstehen kann (Abbildung IV.28.):

Abbildung IV.28.: Nebenreaktion des  $\text{S}_{\text{N}}1$ -Weges: Orthoesterbildung

Da aber bei der Durchführung der Synthese gar kein Produkt erhalten wurde, kann es gar nicht zur Reaktion gekommen sein. Warum dem so war, konnte aus Zeitgründen nicht ergründet werden. Aus demselben Grund konnte die Reaktion auch nicht wiederholt werden.

## 4.5. Proteinreinigung

Ziel jeder Proteinreinigung ist es, das Protein aus seiner natürlichen Umgebung zu isolieren. Dabei ist es neben der möglichst hohen zu erzielenden Konzentration auch wichtig, möglichst alle unerwünschten Bestandteile (Nicht-Protein, Fremdproteine) zu entfernen. Oft sind diese Bestandteile schädlich für das zu isolierende Protein (Proteasen). Werden Enzyme gereinigt, ist vor allem der Erhalt der Enzymaktivität von Bedeutung. Im Lauf der Reinigung sollte die spezifische Enzymaktivität, also die Aktivität pro Masseneinheit Protein stark steigen.

Die Reinigung der beiden im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme

Glucuronyltransferase und Glucuronidase verläuft sehr ähnlich. Deshalb werden im Folgenden die einzelnen Reinigungsschritte allgemein behandelt. Unterschiede zwischen den beiden Enzymen sind gesondert angeführt.

### a) Aufschluss

Die Glucuronyltransferase kommt in höherer Konzentration in der Leber (*Hepar*), die Glucuronidase in der Niere (*Ren*) vor. Beide Organe werden vom Hausschwein (*porcus domesticus*) verwendet. Es wird ein mechanischer Aufschluss durchgeführt. Dazu wird das Organ mit Pufferlösung und Eis überschichtet und durch schnell rotierende Messer zerkleinert (Ultra Turrax-Mixer). Die Zellen müssen zerstört werden, um die Enzyme, die im Zytoplasma enthalten sind, freizusetzen. Das Eis muss zugesetzt werden, damit die Temperatur nicht zu hoch wird. Das könnte ein thermisches Denaturieren aller Proteine, einschließlich des zu isolierenden Enzyms bewirken.

### b) Säurefällung

Dieser Schritt wird nur bei der Glucuronidase durchgeführt.

Proteine bestehen aus Aminosäuren. Da diese Zwitterionen sind (COOH- und NH<sub>2</sub>-Gruppen), existiert für jede Aminosäure ein pH-Wert, bei dem sie nach außen elektrisch neutral ist (isoelektrischer Punkt). Gleiches gilt für Proteine, nur dass sie aus vielen Aminosäuren bestehen. Ihre Löslichkeit hängt somit vom pH-Wert ab. Am isoelektrischen Punkt des Proteins erreicht die Löslichkeit ihr Minimum. Doch auch bei anderen pH-Werten verringert sich die Löslichkeit: Je nach pH-Wert verändern sich die Partialladungen des Proteins und damit seine räumliche Ausrichtung. Fällt der pH-Wert so ungünstig für ein Protein, dass es „zusammenklumpt“, also die Angriffsfläche für Wassermoleküle, die seine Hydrathülle

verursachen, minimiert, sinkt die Löslichkeit ebenfalls und das Protein fällt aus. Am pH-Optimum eines Enzyms ist selbiges mit Sicherheit gut löslich, denn die von ihm katalysierten Reaktionen finden im wässrigen Medium statt. Alles, was bei jenem pH-Wert nicht gelöst ist, kann entfernt (abzentrifugiert) werden.

### c) Ammoniumsulfatfällung

Das Prinzip dieses Reinigungsschrittes ist die Entfernung, bzw. Verringerung der Hydrathülle. Durch sehr hohe Salzkonzentrationen (z.B. 60% Sättigung bei Glucuronidase) wird dem Protein seine Hydrathülle entzogen (Abbildung IV.29.):

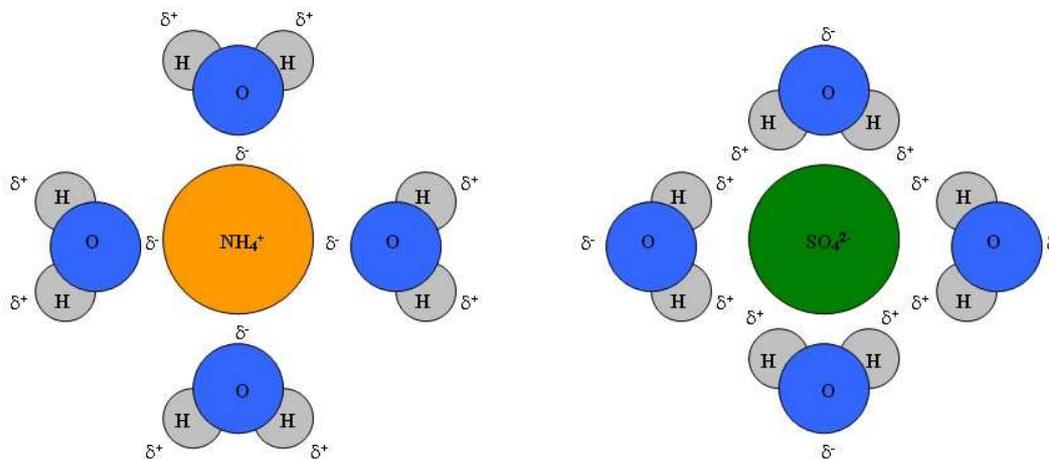


Abbildung IV.29.: Wirkungsweise von Ammoniumsulfat

Dadurch klumpen die Proteine zusammen, fallen aus und können abzentrifugiert werden. Der Überstand enthält vorrangig Nicht-Protein-Bestandteile, meist kleinere Moleküle, und wird meist verworfen.

### d) Hitzefällung

Wurde nur bei der Glucuronidase verwendet. Die Glucuronidase hat ein relativ hohes Temperaturoptimum von 48 °C. Dies ist eine Temperatur, bei der viele Proteine bereits denaturiert sind. So kann man sich diese Hitzeresistenz zu Nutze machen und die Aufschlusslösung einige Minuten bei dieser Temperatur belassen. Viel Fremdprotein denaturiert, koaguliert damit, fällt aus und kann abzentrifugiert und verworfen werden.

### e) Ultrafiltration

Die Proteinlösung wird in ein zweiteiliges Zentrifugenröhrchen eingebracht, das an der Unterseite der oberen Kammer mit einer Membran verschlossen ist. Die Poren dieser

Membran sind so beschaffen, dass Moleküle ab einer bestimmten Größe (Molmasse) nicht mehr passieren können. So wird das gewünschte Enzym (und alle größeren Proteine) aufkonzentriert.

#### f) Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

In diesem Schritt wird die Proteinlösung auf eine mit Sephadex<sup>®</sup>-Gel gefüllte Säule aufgebracht und mit einem geeigneten Puffer eluiert. Die Proteine werden nach Ihrer Größe (Molmasse) aufgetrennt. Kleinere Proteine können tiefer in die Poren eindringen und werden so länger zurückgehalten. (Abbildung IV.30.):

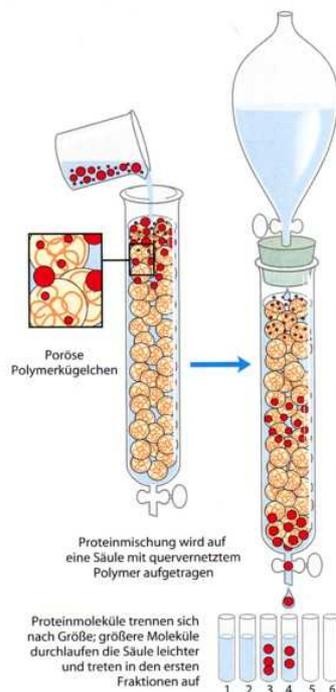


Abbildung IV30.: Größenausschlusschromatographie

Das Eluat wird in einem Fraktionskollektor gesammelt. Zur Detektion wird ein UV-Detektor verwendet. Dieser registriert indirekt proteinreiche Fraktionen, denn die im Molekül enthaltenen aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin absorbieren UV-Licht. Die hauptsächliche Wirkung der Gelfiltration im Fall der Glucuronyltransferase ist die Entfernung von Ammoniumsulfat aus der Proteinlösung, das als anorganisches Ionenpaar, das sehr klein ist die Säule erst mit starker Verzögerung verlässt.

#### g) Ionenauschromatographie

Dieser Reinigungsschritt wird einerseits zum Entsalzen nach der Ammoniumsulfatfällung verwendet (Beide im Rahmen dieser Arbeit isolierte Enzyme werden durch Gelfiltration entsalzt), andererseits aber auch zum Trennen verschiedener Proteinfractionen. Als stationäre Phase dienen verschieden starke Ionentauscher. Zum Entsalzen werden stärkere Ionentauscher

(Quartäre Ammoniumsalze, bzw. Sulfonsäuregruppen als Ankergruppen), zum Trennen von Proteinen schwächere wie DEAE-Cellulose (Diethylaminoethyl-Cellulose, zur Anionenauschromatographie) oder CM-Cellulose (Carboxymethyl-Cellulose, für Kationen) verwendet. Bei der Kationenauschromatographie werden Proteine mit positiver Nettoladung beim pH-Wert des Elutionspuffers zurückgehalten (Abbildung IV.31.), bei der Anionenauschromatographie solche mit negativer Nettoladung.

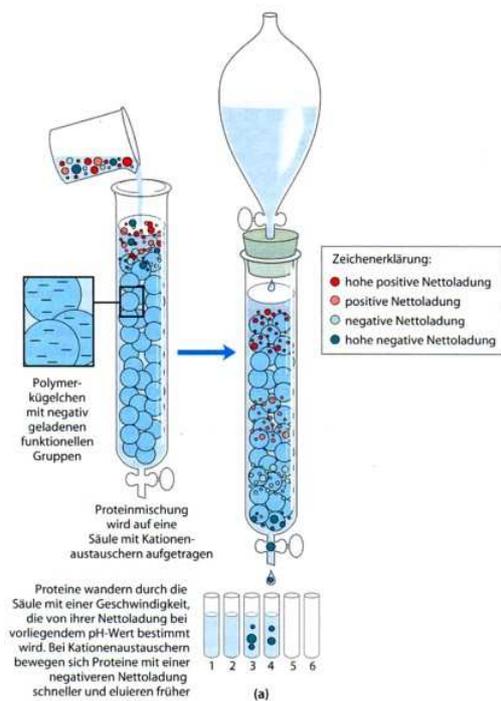


Abbildung IV.31.: Ionenauschromatographie

Daraus ergibt sich die Möglichkeit der Verwendung eines pH-Gradienten oder Salzgradienten (Salze haben eine höhere Affinität zum Ionenaustauscher) zur Elution. Zur Detektion werden zwei Detektoren eingesetzt. Ein UV-Detektor zum Erfassen der proteinreichen Fraktionen und ein Leitfähigkeitsdetektor, um die Fraktionen mit hoher Ionenstärke zu registrieren.

Reinigung von Glucuronidase und Glucuronyltransferase (Anreicherungsschemen)

## Glucuronidase:

Anreicherungsschema Glucuronidase

Anreicherungsschritt	Volumen [ml]	Proteingehalt [mg/ml]	Aktivität [mU/ml]	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [mU]	spez. Aktivität [mU/mg]	Anreicherungsgrad []	Ausbeute [%]
Rohextrakt	280	1,19	2,688	333,20	752,64	2,26	1,00	100,0
Säurefällung	230	0,99	1,746	227,70	401,58	1,76	0,78	53,4
Ammoniumsulfatfällung	25	1,25	5,148	31,25	128,70	4,12	1,82	17,1
Hitzefällung	20	1,15	4,487	23,00	89,74	3,90	1,73	11,9
Gelfiltration	11	0,84	5,169	9,24	56,86	6,15	2,72	7,6
Hydroxyapatit-Chromatographie	3	0,12	2,033	0,36	6,10	16,94	7,50	0,8

## Ultrafiltration:

Dass das Enzym die Membran passieren konnte, ist nur durch einen Fehler in der Verarbeitung der Membran zu erklären: Es wurde eine fertige 10kD- Zentrifugationsmembran verwendet

## IEC:

Möglicherweise war der Ionentauscher zu stark und das Enzym konnte nicht eluiert werden. Fremdprotein wurde jedoch sehr wohl eluiert (siehe Chromatogramm im Anhang)

## Anreicherungsschema:

Es konnte keine all zu große Anreicherung erzielt werden (7,5-fach). Möglicherweise liegt dies daran, dass das Enzym Glucuronidase in seiner Umgebung nicht besonders stabil ist und so durch die relativ langen Standzeiten von jeweils einer Woche zwischen den Laboreinheiten rasch an Aktivität verlor. Vor allem in späteren Stadien der Reinigung wurde das Enzym durch die Nicht-Protein-Umgebung in seiner Aktivität stark beeinträchtigt.

Aktivitätsmessung: Siehe Abschnitt 5.5.5.

## Glucuronyltransferase:

Anreicherungsschema Glucuronyltransferase

Anreicherungsschritt	Volumen [ml]	Proteingehalt [mg/ml]	Aktivität [mU/ml]	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [mU]	spez. Aktivität [mU/mg]	Anreicherungsgrad []	Ausbeute [%]
Rohextrakt	260	23,559	332,1	6125,4	86335	14,09	1,00	100,0
Ammoniumsulfatfällung, 0-30%	250	7,467	145,4	1866,8	36350	19,47	1,38	42,1
Gelfiltration	675	1,398	118,3	943,4	79824	84,61	6,00	92,5
DEAE-Cellulose-Chromatographie	810	0,551	64,4	446,6	52137	116,75	8,28	60,4

Weiterverarbeitung der dritten Fällungsfraction

Anreicherungsschritt	Volumen [ml]	Proteingehalt [mg/ml]	Aktivität [mU/ml]	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [mU]	spez. Aktivität [mU/mg]	Anreicherungsgrad []	Ausbeute [%]
Rohextrakt	260	23,559	332,1	6125,4	86335	14,09	1,00	100,0
Ammoniumsulfatfällung, >70%	170	0,985	82,4	167,5	14014	83,69	5,94	16,2
Gelfiltration	153	0,115	103,8	17,6	15881	901,96	63,99	18,4

Da im Überstand der Ammoniumsulfatfällung ebenfalls noch Glucuronyltransferaseaktivität gemessen wurde, wurde dieser nicht verworfen, sondern ebenfalls chromatographisch weiter aufgearbeitet.

Auffällig an den Anreicherungsschemen ist, dass die Gesamtaktivität nach der Entsalzung steigt. Eine Erklärung wäre, dass beim Entsalzen natürliche Substrate, wie etwa das Bilirubin, in der Säule länger verbleiben (dringen als kleines vergleichsweise kleines Molekül tiefer in die Poren des Materials ein) und so abgetrennt werden. Dadurch wird nur mehr das Nitrophenol umgesetzt, wodurch die tatsächliche Aktivität gemessen wird (siehe Abschnitt 5.5.3.), die zuvor auf beide Substrate aufgeteilt wurde und geringer erschien. Eventuell könnten auch Inhibitoren durch die Entsalzung wegfallen.

Unter Berücksichtigung des Blindwertes (dieser betrug bei der Gelfiltration und der IEC ca. die Hälfte der maximalen Aktivität) ist das Enzym relativ stabil, da die Aktivität bei den Reinigungsschritten Entsalzung und IEC kaum abnahm. Diese Beobachtung entspricht nicht den Ergebnissen der Literaturstelle ([5], siehe VI, Anhang), was ein Anzeichen für verschiedene Isoenzyme ist.

Der Nebenreinigungsweg zeigt zwar eine wesentlich bessere Anreicherung (Fällung und Entsalzung bringen jeweils eine Erhöhung des Anreicherungsgrades um ca. den Faktor 8), die Ausbeute ist allerdings wesentlich geringer. Durch die Entsalzung konnte eine gute Aufreinigung erzielt werden, jedoch befanden sich die aktiven Fraktionen im Bereich zweier sich überlappender Peaks. Da der zweite Peak Aktivität zeigte, müsste dieses Isoenzym eine kleine molare Masse besitzen, da es in die Poren des Gels diffundieren konnte. Eine anschließende elektrophoretische Untersuchung soll die Isoenzyme der Glucuronyltransferase erfassen (Abschnitt 4.6.2.1.).

## 4.6. Enzymatische Hydrolyse und Glucuronidierung

### 4.6.1. Hydrolyse - Glucuronidase

Die Glucuronidase gehört zu der Gruppe der Hydrolasen. Ihre Substrate sind Glucuronide, die katalysierte Reaktion ist die Hydrolyse der Etherbindung, die den Glucuronylrest an das auszuscheidende Xenobiotikum bindet (siehe 3.2.2.). Die Reaktion erfolgt unter Wassereinwirkung (Abbildung IV.32):

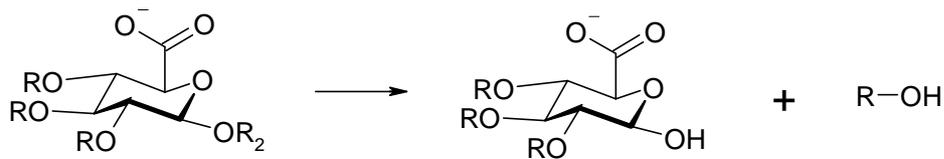


Abbildung IV.32.: Katalysierte Reaktion der Glucuronidase

Da die Reaktion exotherm ist, benötigt das Enzym kein Energie lieferndes Co-Substrat. Die Glucuronidase besteht aus 2 Untereinheiten. Die folgende Abbildung (IV.33.) zeigt die Quartärstruktur des Enzyms:

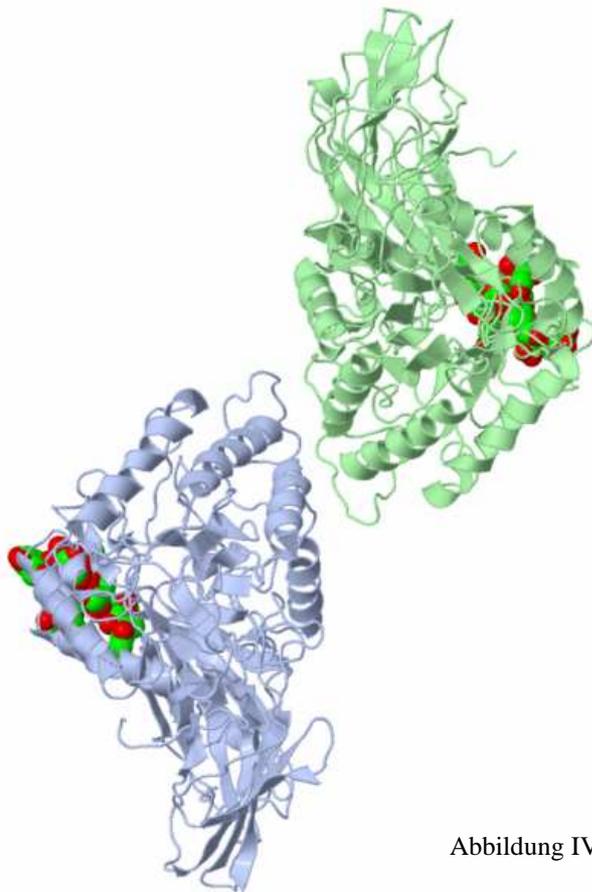


Abbildung IV.33.: Quartärstruktur der Glucuronidase

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Glucuronidase näher untersucht und folgende Parameter auf das Aktivitätsmaximum hin optimiert: Enzym-Konzentration, Temperatur, pH-Wert und Substratkonzentration (Michaelis-Menten-Kinetik).

Zur Aktivitätsmessung wurde p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucuronid als Substrat verwendet. Dieses wird in Glucuronsäure und Nitrophenol gespalten. Nitrophenol färbt sich im Basischen gelb, was eine einfache Bestimmung der Aktivität durch photometrische Absorptionsmessung bei 420nm ermöglicht. Der Grund für die Farbänderung ist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in einen Bereich größerer Wellenlänge. Das wird klar, wenn man die mesomeren Grenzformen des p-Nitrophenols betrachtet. Während im sauren Milieu das Wasserstoffatom der OH-Gruppe gebunden ist und somit folgende mesomere Grenzform bevorzugt vorliegt (Abbildung IV.34.):

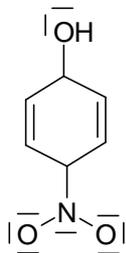


Abbildung IV.34.: Mesomere Grenzform von p-Nitrophenol im Neutralen

ist dieses H-Atom im basischen Milieu abgespalten. Dadurch hat das Sauerstoffatom mehr Elektronen zu Verfügung. So wird mehr Ladung in den Ring verlagert und das durch die Nitrogruppe verursachte Elektronendefizit ausgeglichen. Eine andere mesomere Grenzform wird bevorzugt (Abbildung IV.35.):

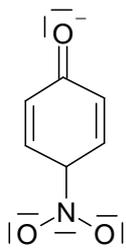


Abbildung IV.35.: Mesomere Grenzform von p-Nitrophenol im Basischen

Dadurch wird nicht nur die elektronenreiche Grenzform der Nitrogruppe stabilisiert, es entsteht zusätzlich noch ein System aus konjugierten Doppelbindungen. Die Elektronen im vorliegenden Molekül können viel leichter angeregt werden. Die Anregungsenergie sinkt und damit steigt wegen

$$E = h \frac{c}{\lambda}$$

auch die Anregungswellenlänge.

Als erster Parameter wurde die Enzymkonzentration optimiert. Ziel ist es, die Enzymkonzentration zu finden, bei der die Aktivität über die Zeit gerade noch konstant bleibt.

Dazu wird die Substratkonzentration konstant gehalten und verschiedene Enzymkonzentrationen eingesetzt. In regelmäßigen Abständen wird die Aktivität gemessen (Da nach der Endwertmethode gearbeitet wird, also die Enzymaktivität über die in einem bestimmten Zeitintervall umgesetzte Substratmenge berechnet wird, muss für jede Messzeit ein eigener Ansatz inkubiert werden.) und dann über der Zeit aufgetragen. Die erhaltenen Geraden sollten möglichst parallel zur Abzisse (Zeitachse) und möglichst weit von ihr entfernt sein ( $\rightarrow$  höhere Aktivität); Abbildung IV.36.:

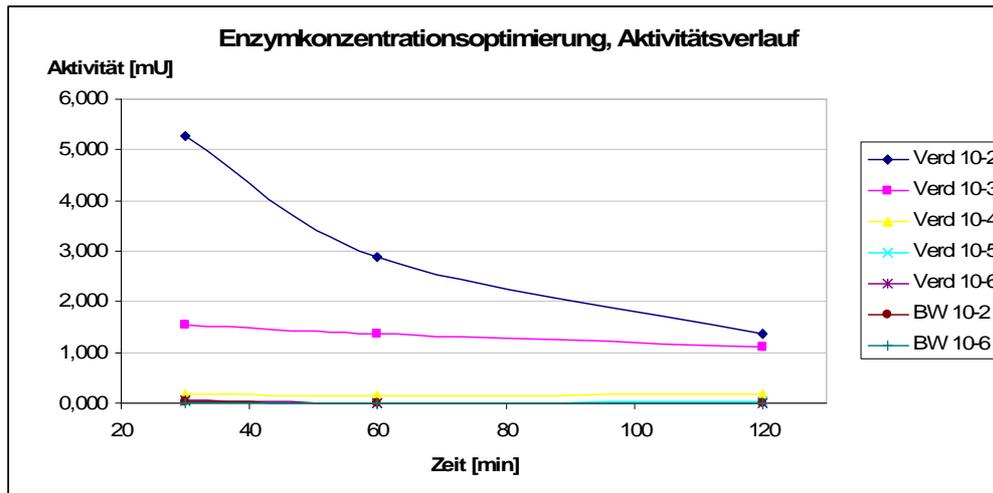


Abbildung IV.36.: Konzentrationsabhängiger, zeitlicher Aktivitätsverlauf von Glucuronidase

Im Fall der Glucuronidase beträgt das Optimum der Enzymkonzentration somit 18 U/ml (Enzymlösung: Stammlösung 90000U/ml, Verdünnung 1:1000; im Ansatz 100  $\mu$ l Enzymlösung von 500  $\mu$ l, Arbeitsverdünnung also 1:5000): Die blaue Kurve (Enzymlösung 1:100 verdünnt) zeigt einen zu starken Aktivitätsverlust mit der Zeit, die gelbe Kurve (1:10000) zeigt zwar eine bessere zeitliche Konstanz, hat aber einen zu kleinen Ordinaten (Aktivitäts-) –wert.

Jedes Enzym hat auch ein Temperaturoptimum. Je höher die Temperatur ist, desto schneller verläuft die katalysierte Reaktion. Doch ist die Temperatur zu hoch, denaturiert das Enzym und die Aktivität geht gänzlich verloren (Abbildung IV.37.):

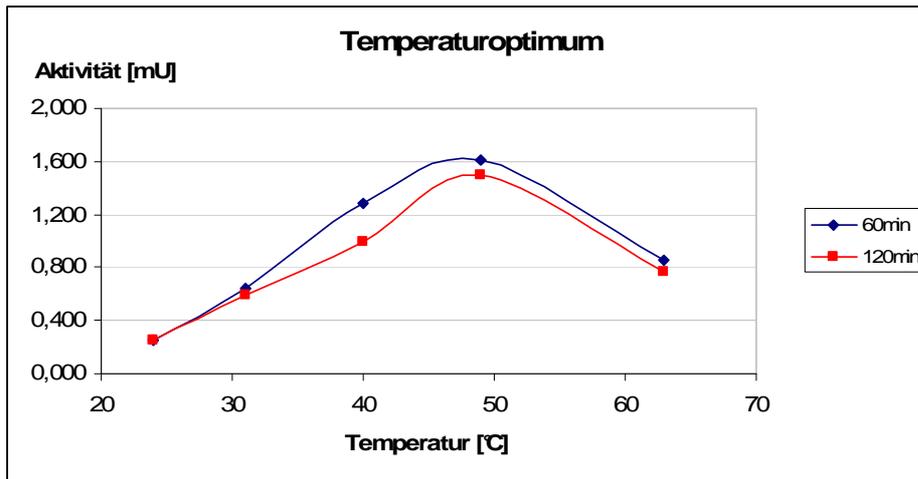


Abbildung IV.37.: Temperaturabhängigkeit der Aktivität von Glucuronidase

Die Glucuronidase hat also ein Temperaturoptimum von etwa 40-60 °C.

Auch vom pH-Wert ist die Aktivität eines Enzyms abhängig. Das liegt daran, dass ein Enzym als Protein aus Aminosäuren besteht. Diese sind Zwitterionen, sie haben mindestens eine Carboxylgruppe, die leicht Wasserstoffionen abgibt und dann negativ geladen ist, und es ist mindestens eine Aminogruppe im Molekül, die wiederum leicht besagte Ionen aufnimmt. Wo Wasserstoffionen abdissoziieren oder aufgenommen werden hängt also vom pH-Wert des umgebenden Mediums ab. Damit hängen also die Partialladungen im Enzymmolekül und damit die räumliche Ausrichtung vom pH-Wert ab. Das Enzym kann aber nur in einer bestimmten Konformation arbeiten, daher existiert ein pH-Optimum (Abbildung IV.38.):

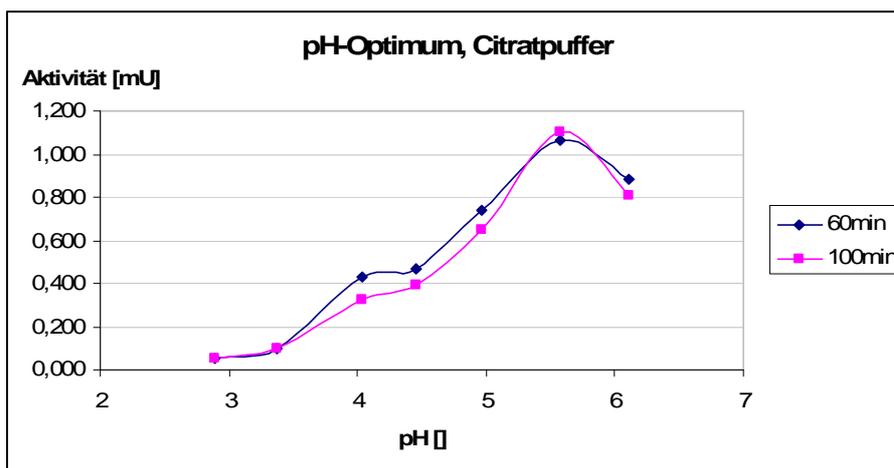


Abbildung IV.38.: pH-Abhängigkeit der Glucuronidaseaktivität

Die Glucuronidase hat ihr pH-Optimum also bei etwa pH 5-6.

Auch von der Substratkonzentration hängt die Aktivität eines Enzyms ab. Ein Enzym hat eine „maximale Arbeitsgeschwindigkeit“. Legt man zu wenig Substrat vor, verarbeitet es weniger

Substrat in einer Zeiteinheit als es eigentlich könnte und täuscht somit eine geringere Aktivität vor. Irgendwann ist aber die Substratkonzentration erreicht, bei der das Enzym gerade noch mit der Verarbeitung nachkommt. Die Aktivität bleibt konstant, egal wie hoch die Substratkonzentration wird. Trägt man nun die Aktivität über der vorgelegten Substratkonzentration auf, erhält man eine hyperbolische Kurve (Michaelis-Menten-Diagramm; Abbildung IV.39.):

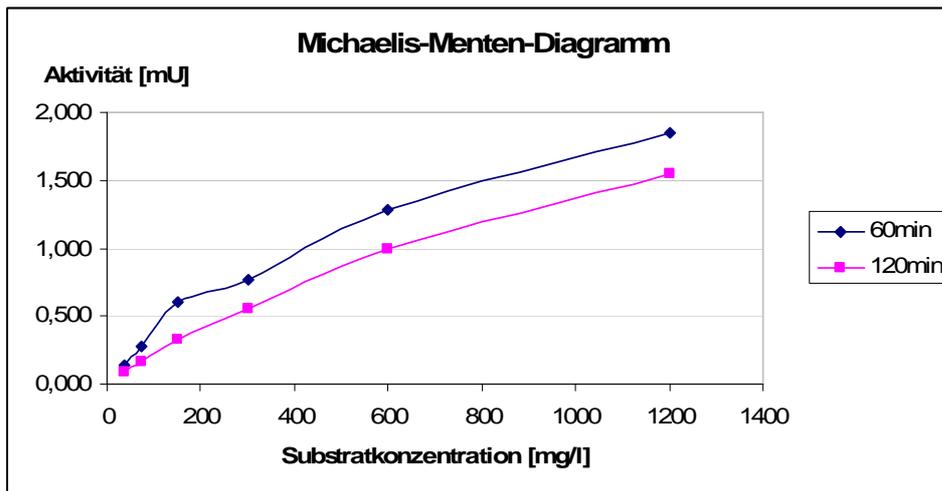


Abbildung IV.39.: Michaelis-Menten-Diagramm der Glucuronidase

Die Substratkonzentration sollte am oberen Ende des linearen Bereichs liegen, bei der Glucuronidase also bei etwa 600 mg/l p-Nitrophenyl-β-D-Glucuronid. Damit ergibt sich eine Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$ , die als Substratkonzentration bei der halben Maximalaktivität definiert ist. (Abbildung IV.40):

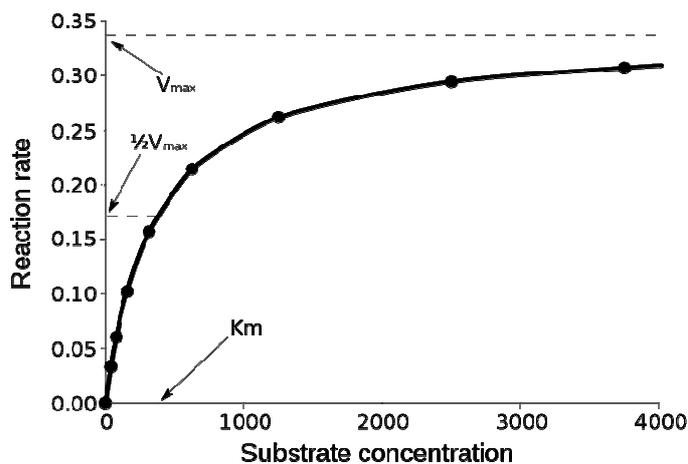


Abbildung IV.40.: Schema Michaelis-Menten-Diagramm

Diese wiederum ist, mathematisch betrachtet, der Grenzwert der logistischen Funktion. Sie wird abgeschätzt auf ca. 2,5mU, damit ergibt sich bei 1,25mU eine Substratkonzentration und damit Michaelis-Menten-Konstante von ca.  $K_M = 600$  mg/l.

#### 4.6.2. Glucuronidierung – UDP-Glucuronyltransferase

Die Glucuronyltransferase katalysiert die Glucuronidierung von alkoholischen, bzw. phenolischen Xenobiotika. Sie transferiert Glucuronylgruppen. Die katalysierte Reaktion ist also genau die Umkehrreaktion der von der zuvor beschriebenen Glucuronidase katalysierten Hydrolyse der Etherbindung im Glucuronid. Dennoch kommen beide Enzyme oft im selben Organ, beispielsweise der Leber vor. Das dient dazu, um die betroffene Reaktion besser kontrollieren zu können. Damit die beiden Enzyme einander nicht stören, kommt Glucuronidase in den Lysosomen und Glucuronyltransferase im Cytoplasma vor. Sie sind also räumlich getrennt. Anders als die Glucuronidase, die zur Gruppe der Transferasen gehört, ist die Glucuronyltransferase, was der Name schon verrät, eine Transferase. Diese benötigen meist Energie liefernde Cofaktoren, denn die von ihnen katalysierten Reaktionen sind meist endotherm. So auch die Glucuronidierung: Die Glucuronyltransferase braucht Uridindiphosphat (UDP) als Energielieferant. Dieses ist bereits kovalent an eines der Substrate, die Glucuronsäure gebunden (Abbildung IV.41.):

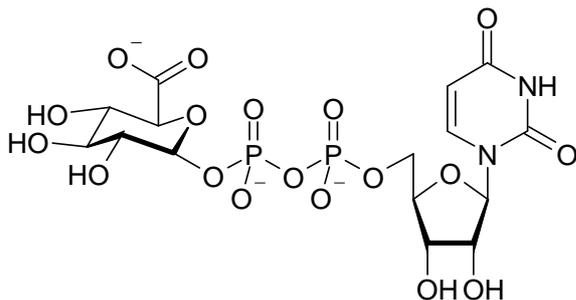


Abbildung IV.41.: UDP-Glucuronsäure

Auch die Glucuronyltransferase besteht aus 2 Untereinheiten. Als zusätzlicher Cofaktor wird  $Mn^{2+}$  benötigt (Abbildung IV.42.):

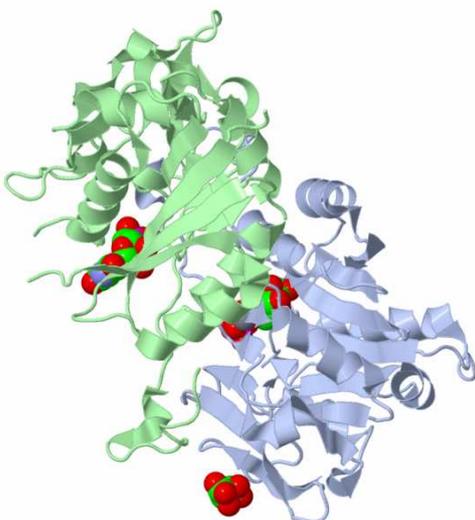


Abbildung IV.42.: Quartärstruktur der Glucuronyltransferase

Die Aktivitätsbestimmung wurde im Rahmen dieser Arbeit auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Letzten Endes wurde die Methode mit p-Nitrophenol als Substrat verwendet, da diese instrumentell wesentlich weniger aufwändig ist. Die Messung erfolgt photometrisch durch Bestimmung der Steigung der Zeit/Extinktionsfunktion. Die zweite Methode verwendet 4-Methylumbelliferon als Substrat. (Abbildung IV.43.):

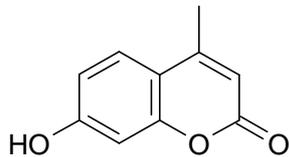


Abbildung IV.43.: 4-Methylumbelliferon

Die Bestimmung erfolgt nach der Endwert-Methode, allerdings fluorimetrisch. Dazu wird das Molekül mit einer kurzen Wellenlänge (im UV-Bereich) angeregt. Die Energie wird aber nicht wie bei absorbierenden Molekülen als Wärmestrahlung abgegeben. Die Emission erfolgt in einem Wellenlängenbereich, der über der eingestrahelten Anregungswellenlänge liegt. Meist ist diese Emissionswellenlänge im sichtbaren Bereich. Dazu wird eine auf allen vier Seiten geschliffene Quarzküvette verwendet. Der Detektor steht im rechten Winkel zur Lichtquelle (Abbildung IV.44.):

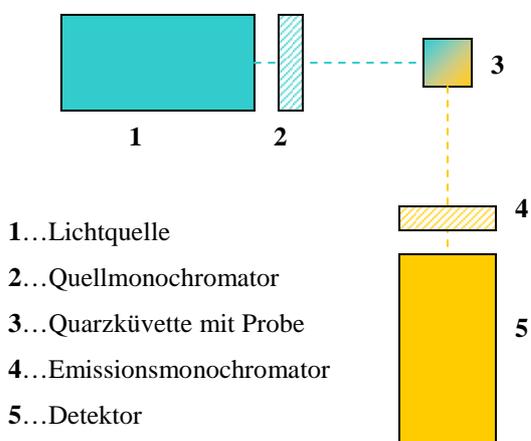


Abbildung IV.44.: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers

Es wurden wiederum die Enzymparameter Enzymkonzentration, Temperatur, pH-Wert und Substratkonzentration optimiert. Da die Theorie dieser Optimierungen bereits bei der Glucuronidase erläutert wurde, werden nur mehr die erhaltenen Diagramme angegeben. Die angegebenen Diagramme sind die Ergebnisse der Messreihe mit p-Nitrophenol als Substrat.

Optimierung der Enzymkonzentration (Abbildung IV.45.):

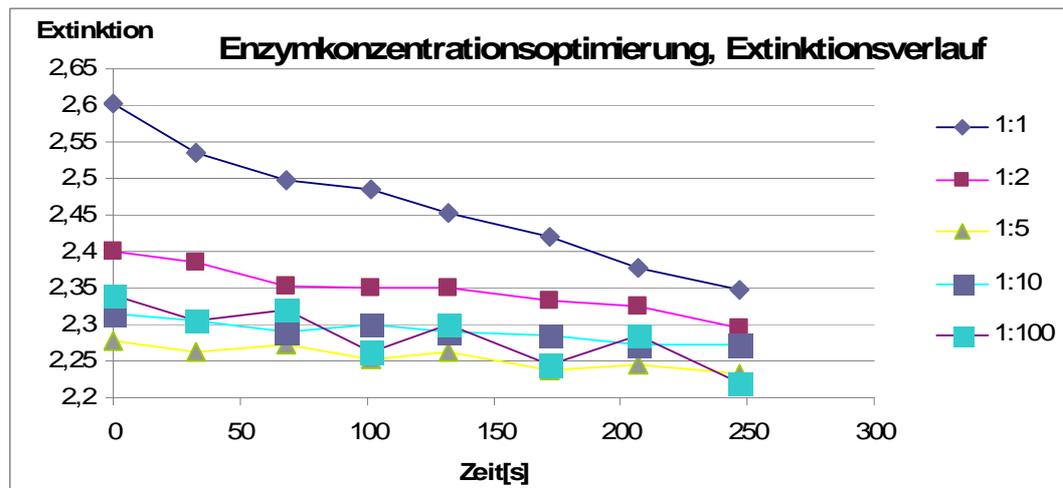


Abbildung IV.45.: Konzentrationsabhängiger, zeitlicher Extinktionsverlauf von Glucuronyltransferase

optimale Enzymkonzentration: 256 U/ml (unverdünnt)

Der unverdünnte Extrakt wurde gewählt, da dieser im Vergleich zu den anderen den idealsten Extinktionsverlauf zeigte.

Die Temperaturoptimierung konnte aus gerätetechnischen Gründen nicht durchgeführt werden, der optimale pH-Wert konnte ebenfalls nicht ermittelt werden, da das Nitrophenol eine pH-abhängige Absorption hat. Bei der Glucuronidase war dies möglich, da eine stark alkalische Stopp-Puffer-Lösung zugesetzt werden muss, die den Mess-pH-Wert unabhängig vom pH des Ansatzes hoch hält.

Optimierung der Substratkonzentration – Michaelis-Menten-Diagramm (Abbildung IV.46.):

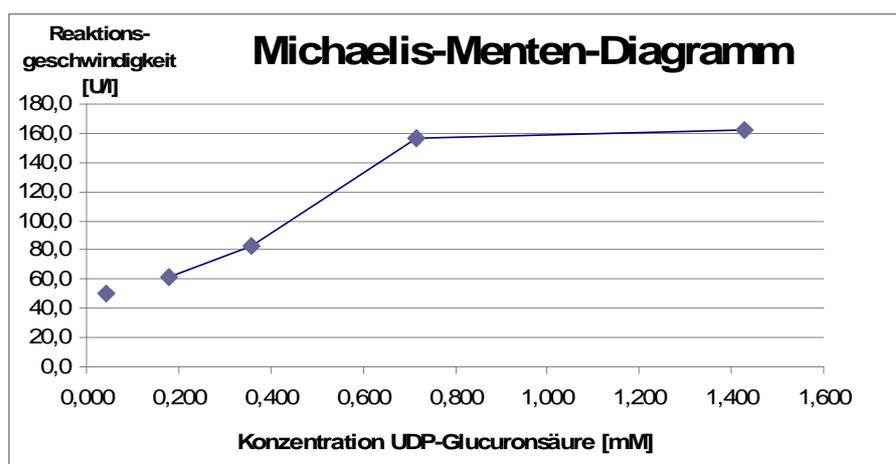


Abbildung IV.46.: Michaelis-Menten-Diagramm der Glucuronyltransferase

maximale Substratkonzentration: ca. 0,8 mmol/l UDP-Glucuronsäure

Michaelis-Menten-Konstante:  $K_M = 0,496$  mmol/l UDP-Glucuronsäure



Da mit dieser Färbemethode die Enzymbanden nicht gut sichtbar gemacht werden konnten, wurde die Färbung auch nach der Silver-Staining-Methode durchgeführt. Hier wird das Gel mit einer Silbersalzlösung behandelt, das sich im Protein einlagert. Dieses wird anschließend mit Formaldehyd zum metallischen Silber reduziert. Wo sich Protein im Gel befindet erscheint somit ein dunkel gefärbter Fleck. Abbildung IV. 49. zeigt das nach dieser Methode gefärbte Gel:



Abbildung IV.49.: Isoenzymbanden im Silver Stain-gefärbten Polyacrylamid-Gel

Aufgetragene Lösungen von links nach rechts: Kaleidoskop - Marker, entsalzte Fällungsfraktion >70%, IEC-Pool, entsalzter Pool (Fällungsfraktion 0-30%), Fällungsfraktion 0-30%, Rohextrakt, High protein - Marker, Low protein - Marker, Kaleidoskop - Marker, alle Fa. BioRad

Die folgende Tabelle zeigt die Molmassen der nach den beiden verschiedenen Methoden erhaltenen möglichen Isoenzymbanden, die nicht näher untersucht wurden:

<b>Reinigung Fällungsfraction &gt;70%</b>	
ID	Molmasse [Da]
1	63448
2	45268
3	40223
4	15110

<b>Reinigung Fällungsfraction 0-30%</b>	
ID	Molmasse [Da]
5	63448
6	58313
7	55433
8	50946
9	47620
10	43765

Nur das Protein mit 15kDa bei der Reinigung der Fällungsfraction >70% ist wahrscheinlich eine Glucuronyltransferase. Die anderen, schwächeren Banden wurden von anderen Proteinen hervorgerufen (Siehe Entsalzung).

Der Grund, warum von der Glucuronyltransferase mehrere Isoenzyme existieren liegt darin, dass diese Enzymgruppe viele Substrate erkennen und entsprechend verschiedene Molekülregionen um das -OH erkennen muss.

**V**

**EXPERIMENTELLER**

**TEIL**

## 5.1. *General informations*

For the resources see 2.3.

All used reagents are from commercial suppliers. The solvents got distilled before using. Absolute N,N-Dimethylformamide and absolute ethanol from Merck were stored over molecular sieve, 4. Absolute acetone was prepared by distillation over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, absolute pyridine was distilled over KOH, absolute toluene, methanol, dichloromethane, diethylether and tetrahydrofurane were prepared with a PURESOLV-apparatus by innovative technology inc. Sodium hydride, offered as an 60% suspension with mineral oil, was washed with absolute THF before using.

Boiling points were measured during the distillation of the product.

GC-MS-measurements were done with a GC/MS-Instrument by Thermo Finnigan (GC: GC8000 Top with BGB5 coloumn; MS: Voyager Quadrupol, EI)

NMR-spectra were measured in CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD or D<sub>6</sub>-Acetone with a Bruker AC DPX-200 (200MHz) NMR-instrument or a Bruker Avance UltraShield DRX-400(400MHz) NMR-instrument.

Purifications by MPLC (Medium pressure liquid chromatography) were done with a Büchi Sepacore<sup>TM</sup> Flash System with the following components:

Pump:	2 x Büchi Pump Module C-605 Büchi Pump Manager C-615
Detector:	Büchi UV Photometer C-635
Fraction collector:	Büchi Fraction collector C-660

For NMR-characterization, the following abbreviations are used:

s	singulet
d	dublet
t	triplet
q	quadruplet
m	multiplet

### 5.1.1. Further abbreviations

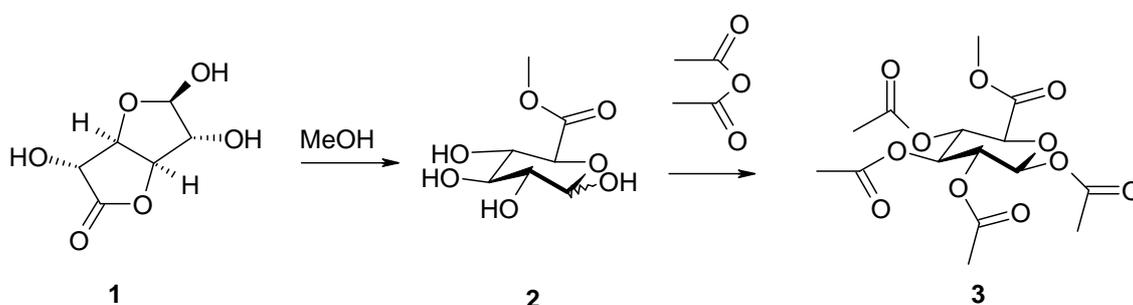
TLC	thin-layer-chromatography
Ac <sub>2</sub> O	acetic anhydride
Et <sub>2</sub> O	diethyl ether
IPA	isopropanol
PE	benzine
EE	ethyl acetate
DCM	dichloromethane
EtOH	ethanol
TMS-Cl	trimethylsilylchloride
TMS-I	trimethylsilyliodide
Bu <sub>3</sub> SnOMe	bis(tributyltin)oxide
THF	tetrahydrofuran
DBU	1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ene
DAST	diethylaminosulfurtrifluoride
NMR	nuclear magnetic resonance
NaOAc	sodium acetate
HOAc	acetic acid
SDS	sodiumdodecylsulfate
DMSO	dimethylsulfoxide
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
DTT	dithiothreitol

All of the following syntheses were done under argon-atmosphere.

## 5.2. Synthesis of Glucuronoyldonors

### 5.2.1. Synthesis of Acetyl-protected glucuronoyldonors

#### 5.2.1.1.) 1,2,3,4 Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucuronic acid methyl ester (3)



Molecular Weight =176,13  
Molecular Formula =C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>

Molecular Weight =208,17  
Molecular Formula =C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>

Molecular Weight =376,32  
Molecular Formula =C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>

D-Glucuronic acid- $\gamma$ -lactone (**1**) (284 mmol, 50 g) was suspended in 300 ml of methanol and ca. 300 mg of Sodium methoxide was added. The mixture was stirred at room temperature for 2 h and methanol was removed by distillation. The residue was dissolved in 400 ml Ac<sub>2</sub>O and stirred at room temperature for 24 h. Under cooling ( $T < 25$  °C) 3 ml of perchloric acid were added in 100 ml Ac<sub>2</sub>O and the mixture was stirred for 24 h. 0.5 ml of perchloric acid were added and the mixture was cooled in the refrigerator overnight. After evaporation of the solvent, the residue was purified by silica gel chromatography (mobile phase: PE:EE = 1:1). Then the product was recrystallized from Isopropanol.

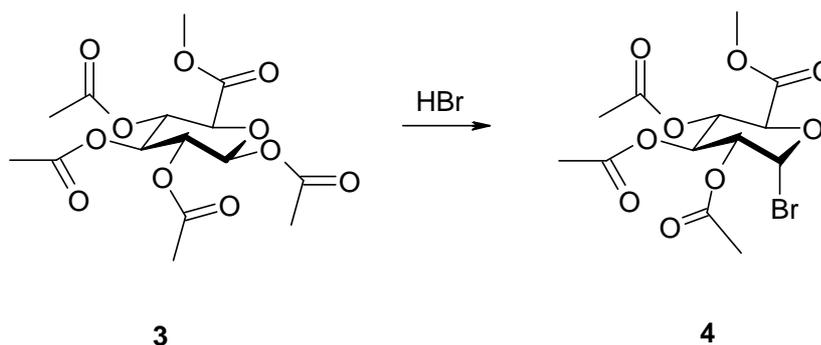
**Yield:** 71.4 g (69,7 %)

**TLC:**  $R_F = 0,44$  (PE:EE = 1:1)

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 5.74$  (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

**<sup>13</sup>C NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 170.0$  (s, 1C), 169.6 (s, 1C), 169.3 (s, 1C), 169.0 (s, 1C), 166.9 (s, 1C), 91.5 (d, 1C), 73.1 (d, 1C), 71.9 (d, 1C), 70.3 (d, 1C), 69.0 (d, 1C), 53.2 (q, 1C), 20.9 (q, 1C), 20.71 (q, 1C), 20.68 (q, 1C), 20.6 (q, 1C) ppm

5.2.1.2.) 1-Bromo-2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucuronic acid methylester (4)



**3**  
Molecular Weight =376,32  
Molecular Formula =C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>

**4**  
Molecular Weight =397,18  
Molecular Formula =C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>BrO<sub>9</sub>

Tetraacetate (**3**) (3.61 g, 9 mmol) was dissolved in 20 ml of HBr (30% in glacial acetic acid) and stored at 4 °C overnight. The solvent was removed by distillation, the residue was dissolved in 50 ml of DCM, washed with saturated NaHCO<sub>3</sub>-solution as well as water and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed by distillation and the residue was recrystallised from EtOH.

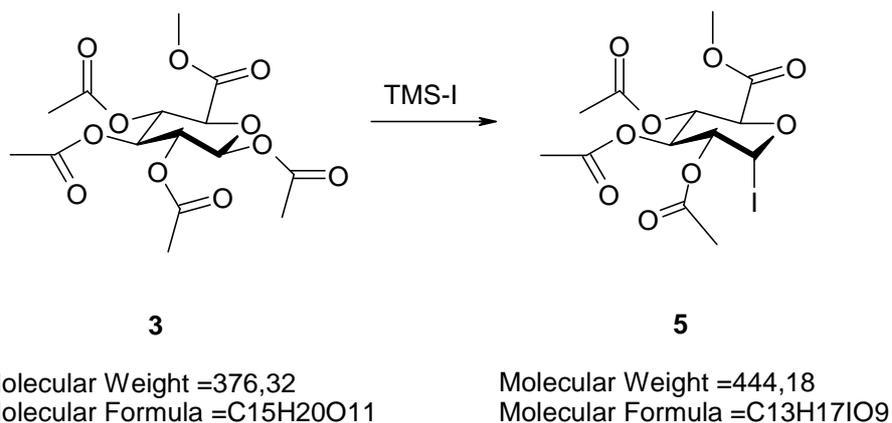
**Yield:** 3,36 g (34,9 %)

**TLC:** R<sub>F</sub> = 0,38 (PE:EE = 2:1)

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 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

**<sup>13</sup>C NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 169.80 (s, 1C), 169.78 (s, 1C), 169.6 (s, 1C), 166.8 (s, 1C), 85.5 (d, 1C), 72.2 (d, 1C), 70.4 (d, 1C), 69.4 (d, 1C), 68.6 (d, 1C), 53.3 (q, 1C), 20.7 (q, 2C), 20.6 (q, 1C) ppm

5.2.1.3.) 1-Iodo-1-deoxy-2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucuronic acid methyl ester (5)



Tetraacetate (**3**) (1.81 g, 5 mmol), TMS-I (7.5 mmol, 1.1 ml) and 5 ml of acetonitrile were mixed and stirred at 50 °C for 2.5 h. 25 ml of EE were added and washed with saturated Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-solution, saturated NaHCO<sub>3</sub>-solution and water. The solution was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the solvent was removed by distillation and the residue purified by silica gel chromatography (mobile phase: PE:EE = 2:1)

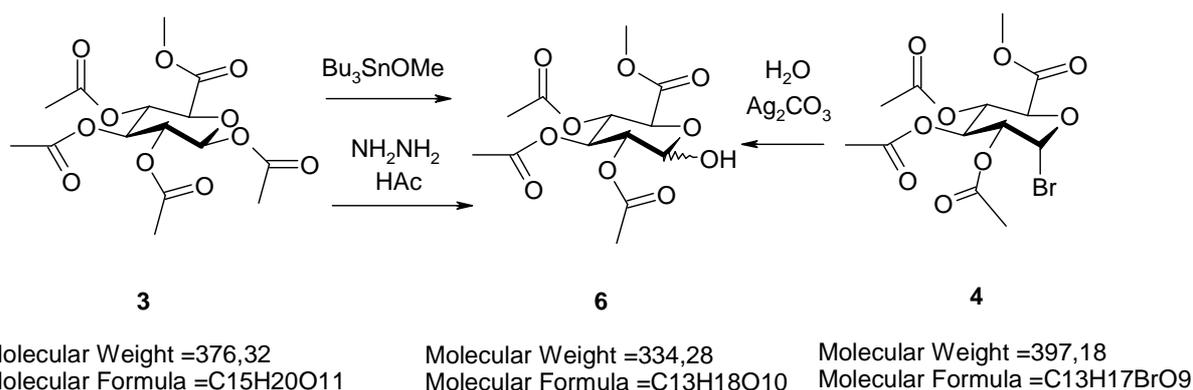
**Yield:** 1,2 g (54,1 %)

**TLC:** F1: R<sub>F</sub> = 0,18 (PE:EE = 2:1)

F2: R<sub>F</sub> = 0,32 (PE:EE = 2:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.00 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 5.52 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 5.25 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 4.37 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 4.21 (dd, J = 9.9, 4.4 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H) ppm

### 5.2.1.4.) 2,3,4 tri-O-acetyl-D-glucuronic acid methylester (6)



#### Method 1:

Tetraacetate (**3**) (5.46 g, 15 mmol) was dissolved in 350 ml of THF and 8 ml of Bu<sub>3</sub>SnOMe were added. The solution was refluxed for 6h and the THF was removed by distillation. The residue was purified by silica gel chromatography (DCM:acetone = 95:5).

Yield: not determined; product could not be isolated.

**TLC:** R<sub>F</sub> = 0,42 (DCM:acetone = 95:5)

#### Method 2:

Tetraacetate (**3**) (3.6 g, 10 mmol) was dissolved in 60 ml of DMF and cooled down to -10 °C. 0.54 g of hydrazinemonohydrate and 0,64 g of glacial acetic acid were added simultaneously. After stirring at room temperature for 45 min, no educt appeared in the TLC, so 25 ml citric acid (5%) were added and the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O. The ether was washed with water twice and with brine once. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent removed by distillation.

**Method 3:**

Bromosugar (**4**) (4.77 g, 12 mmol) was dissolved in 60 ml of absolute acetone and 3.6 g of Silver carbonate and 220 mg of water were added. The mixture was stirred overnight and filtrated through silicagel. The solvent was removed by distillation and purified by silica gel chromatography (PE:EE = 1:1).

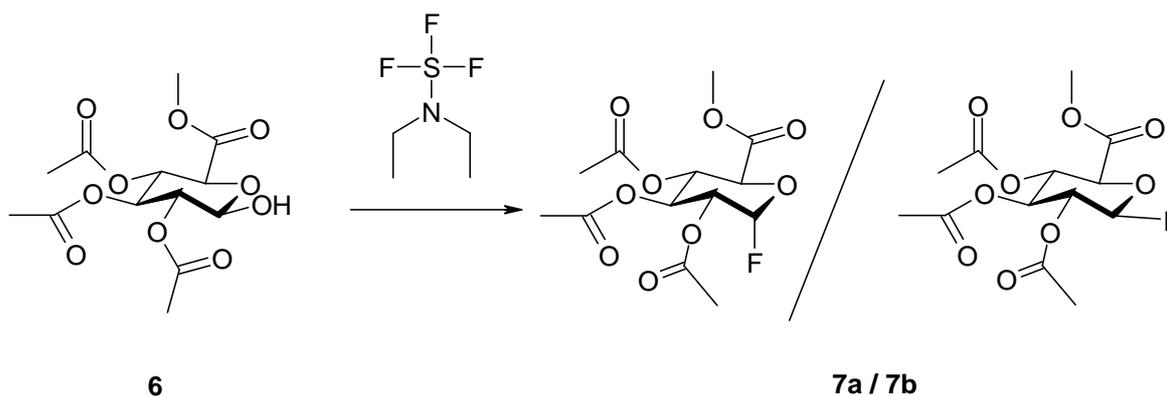
**Yield:** 3.1g (34,9 %)

**TLC:**  $R_F = 0,26$  (PE:EE = 1:1)

**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  **$\alpha$ -(6)**:  $\delta = 5.56$  (t,  $J = 9.8$  Hz, 1H), 5.53 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 5.17 (t,  $J = 9.7$  Hz, 1H), 4.89 (dd,  $J = 10.1, 3.7$  Hz, 1H), 4.58 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.023 (s, 3H), 2.018 (s, 3H) ppm;  **$\beta$ -(6)**:  $\delta = 5.29$  (t,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 5.21 (t,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 4.91 (t,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 4.80 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 4.10 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.023 (s, 3H), 2.018 (s, 3H) ppm

**$^{13}\text{C}$  NMR** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  **$\alpha$ -(6)**:  $\delta = 170.4$  (s, 1C), 170.2 (s, 1C), 169.9 (s, 1C), 168.6 (s, 1C), 90.4 (d, 1C), 70.9 (d, 1C), 69.7 (d, 1C), 69.2 (d, 1C), 68.2 (d, 1C), 53.1 (q, 1C), 20.9 (q, 2C), 20.7 (q, 1C) ppm;  **$\beta$ -(6)**:  $\delta = 170.8$  (s, 1C), 170.2 (s, 1C), 169.8 (s, 1C), 167.8 (s, 1C), 95.7 (d, 1C), 73.1 (d, 1C), 72.8 (d, 1C), 71.7 (d, 1C), 69.6 (d, 1C), 53.2 (q, 1C), 20.9 (q, 1C), 20.8 (q, 1C), 20.7 (q, 1C) ppm

5.2.1.5.) 1-Fluoro-1-deoxy-2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucuronic acid methyl ester (7)



Molecular Weight =334,28  
Molecular Formula =C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>

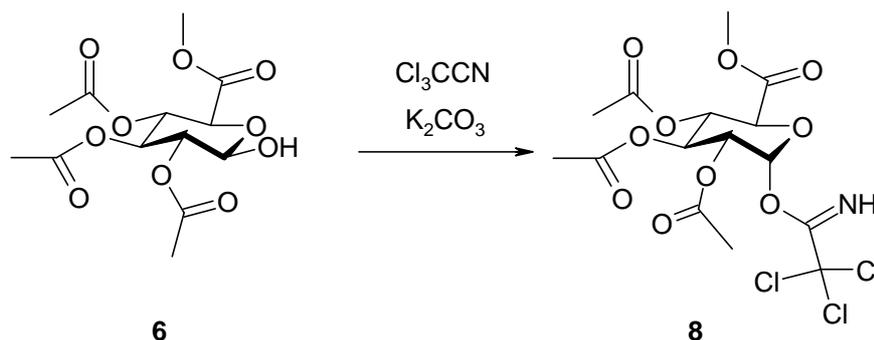
Molecular Weight =336,27  
Molecular Formula =C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>FO<sub>9</sub>

OH-sugar (**6**) (1.3 g, 3.9mmol) was dissolved in 25 ml of DCM and cooled down to -30 °C. DAST (1.1 ml, 7.4mmol) was added and the solution was allowed to regain room temperature. After no educt was present, (controlled by TLC) Et<sub>2</sub>O was added and the solution was washed with water. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the solvent was removed by distillation, the residue was purified by silica gel chromatography (PE:EE = 2:1) and three fractions were collected.

**Yield:** 1,1g (80,3 %)

**TLC:** R<sub>F</sub> = 0,39 u. 0.30 (PE:EE = 2:1)

5.2.1.6.) 1-O-Trichloroacetimidate-2,3,4-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucuronic acid methyl ester (8)



Molecular Weight =334,28  
Molecular Formula =C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>

Molecular Weight =478,67  
Molecular Formula =C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>10</sub>

OH-sugar (**6**) (1.6 g, 5 mmol) was dissolved in 25 ml of DCM, 3.6 ml of trichloroacetonitrile and 3.8 g of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> were added and the mixture was stirred at room temperature for 2 days. The mixture was filtered, the filtrate was washed with saturated sodium carbonate solution and water. Then the organic phase was separated by a separation flask and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Then the salt was filtered off and the solvent got distilled off.

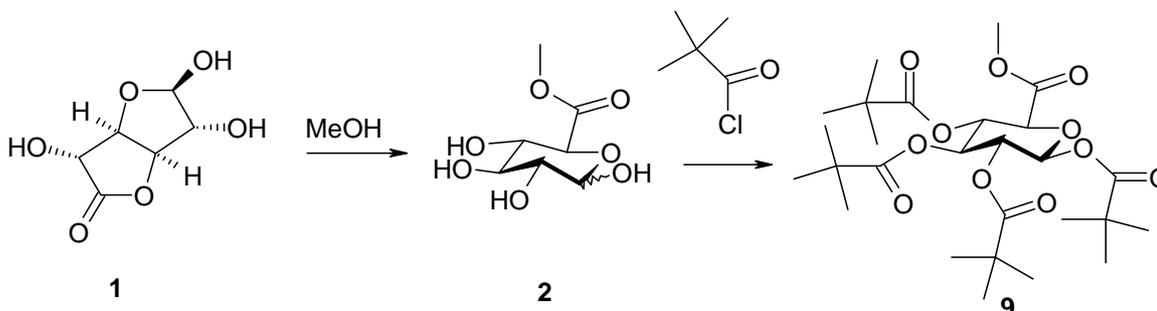
**TLC:** RF = 0,39 (PE:EE = 2:1)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-Acetone): δ = 9.59 (s, 1H), 6.63 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 5.62 (t, J = 9.9 Hz, 1H), 5.26 (t, J = 9.8 Hz, 1H), 5.20 (dd, J = 10.1, 3.7 Hz, 1H), 4.48 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H) ppm

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, d<sub>6</sub>-Acetone): δ = 170.4 (s, 1C), 170.2 (s, 1C), 170.0 (s, 1C), 167.8 (s, 1C), 160.3 (s, 1C), 93.5 (d, 1C), 87.7 (s, 1C), 71.5 (d, 1C), 70.3 (d, 1C), 69.9 (d, 1C), 69.6 (d, 1C), 53.2 (q, 1C), 20.6 (q, 1C), 20.5 (q, 1C), 20.4 (q, 1C) ppm

## 5.2.2. Synthesis of Pivaloyl-protected glucuronyldonors

### 5.2.2.1.) 1,2,3,4 Tetra-O-pivaloyl- $\beta$ -D-glucuronic acid methyl ester (9)



Molecular Weight =176,13  
Molecular Formula =C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>

Molecular Weight =208,17  
Molecular Formula =C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>

Molecular Weight =544,65  
Molecular Formula =C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>11</sub>

D-Glucuronic acid- $\gamma$ -lactone (**1**) (100 mmol, 18 g) was suspended in 100 ml of methanol and ca. 200 mg of Sodium methoxide was added. The mixture was stirred at room temperature for 2h and methanol was removed by distillation. The residue was dissolved in 120 ml of CHCl<sub>3</sub> and 70 ml of Pyridine, 75 ml of Pivaloyl chloride were added dropwise (temperature war kept below 50 °C) and the mixture was stirred at room temperature for 7 days. The solution was concentrated and the residue was mixed with 200 ml of Et<sub>2</sub>O, filtered and washed with 200 ml of 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, saturated NaHCO<sub>3</sub>-solution and water. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the solvent removed by distillation and the residue was recrystallized from about 50 ml of EtOH.

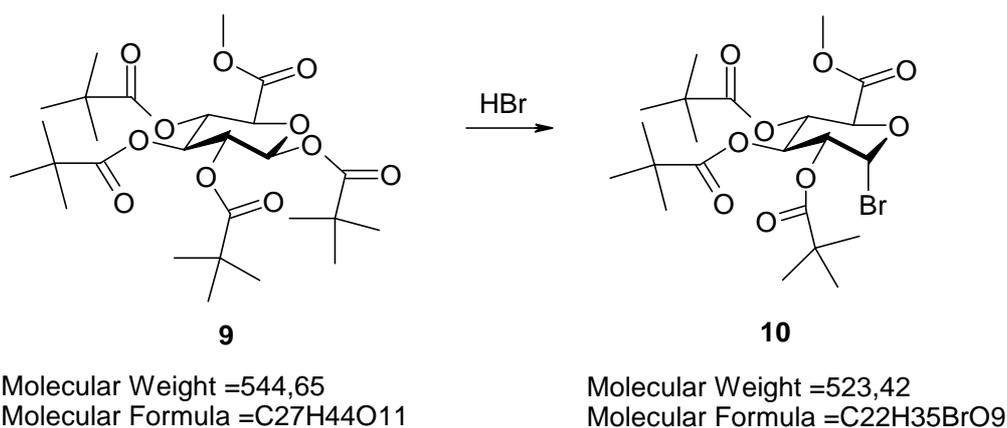
**Yield:** 30.9 g (56,7 %)

**TLC:** R<sub>F</sub> = 0,74 (PE:EE = 4:1)

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 5.76 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.41 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 5.31 - 5.16 (m, 2H), 4.16 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 1.16 (s, 9H), 1.11 (s, 9H), 1.09 (s, 18H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 177.0 (s, 1C), 176.7 (s, 1C), 176.5 (s, 1C), 176.3 (s, 1C), 167.0 (s, 1C), 91.7 (d, 1H), 73.3 (d, 1C), 71.7 (d, 1C), 69.9 (d, 1C), 69.3 (d, 1C), 52.9 (q, 1C), 38.9 (s, 1C), 38.8 (s, 3C), 27.21 (q, 3C), 27.19 (q, 3C), 27.1 (q, 3C), 27.0 (q, 3C) ppm

5.2.2.2.) 1-Bromo-2,3,4-tri-O-pivaloyl- $\alpha$ -D-glucuronic acid methyl ester (10)



Tetrapivaloate (**9**) (10,9 g, 20 mmol) was dissolved in 50 ml of HBr(33% in glacial acetic acid) and stirred at room temperature for 8h. Then the solution was stored at 4 °C overnight and the solvent was removed by distillation. The residue was recrystallized from EtOH.

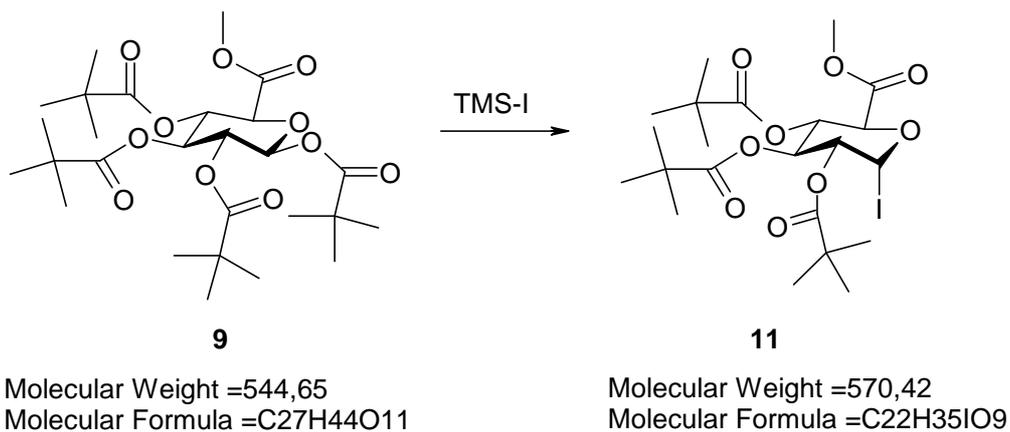
**Yield:** 6.6 g (63,1 %)

**TLC:** R<sub>F</sub> = 0,72 (PE:EE = 4:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6.68 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 6.65 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 5.26 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 4.85 (dd, J = 10.0, 10.1 Hz, 1H), 4.69 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.12 (s, 3H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 177.3 (s, 1C), 176.82 (s, 1C), 176.79 (s, 1C), 167.0 (s, 1C), 85.8 (d, 1C), 72.5 (d, 1C), 70.6 (d, 1C), 69.0 (d, 1C), 68.4 (d, 1C), 53.2 (q, 1C), 38.96 (s, 1C), 38.93 (s, 1C), 38.8 (s, 1C), 27.3 (q, 3C), 27.2 (q, 3C), 27.1 (q, 3C) ppm

5.2.2.3.) 1-Iodo-1-deoxy-2,3,4-tri-O-pivaloyl- $\alpha$ -D-glucuronic acid methyl ester (11)



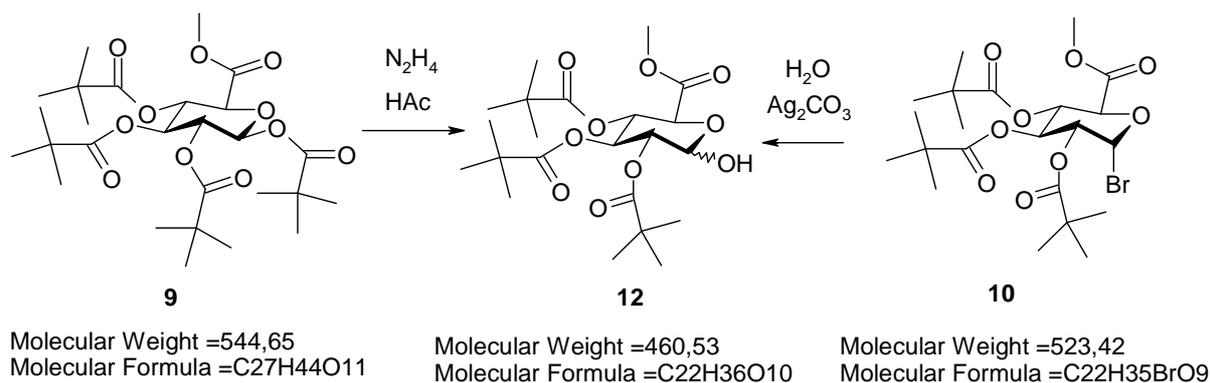
Tetrapivaloylate (**9**) (2.72 g, 5 mmol), TMS-I (7.5 mmol, 1.1 ml) and 5 ml of Acetonitrile were mixed and stirred at 50 °C for 2.5h. 25 ml of EE were added and washed with saturated Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-solution, saturated NaHCO<sub>3</sub>-solution and water. The solution was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the solvent was removed by distillation and the residue purified by silica gel chromatography (mobile phase: PE:EE = 6:1)

**Yield:** 1,5 g (52,6 %)

**TLC:** R<sub>F</sub> = 0,42 (PE:EE = 6:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.01 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 5.59 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 5.29 (t, J = 9.9 Hz, 1H), 4.35 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 4.27 (dd, J = 9.8, 4.3 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 1.19 (s, 9H), 1.16 (s, 9H), 1.12 (s, 9H) ppm

#### 5.2.2.4.) 2,3,4 tri-O-pivaloyl-D-glucuronic acid methyl ester (12)



#### Method 1:

Tetraacetate (**3**) (5.45 g, 10 mmol) was dissolved in 60 ml of DMF and cooled down to -10 °C. 0.54 g of hydrazine monohydrate and 0,64 of glacial acetic acid were added simultaneously. After stirring at room temperature for 74h, no educt appeared in the TLC, so 25 ml of citric acid (5%) were added and the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O. The ether was washed twice with water and once with saturated NaCl-solution. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the solvent removed by distillation and purified by silica gel chromatography (PE:EE = 6:1).

**Yield:** 2,3 g (50,0 %)

**TLC:** R<sub>F</sub> = 0,28 (PE:EE = 3:1)

**Method 2:**

Bromosugar (**4**) (5.2 g, 10 mmol) was dissolved in 50 ml of absolute acetone and 3 g of silver carbonate and 180 mg of water were added. The mixture was stirred overnight and the product was isolated per silica gel filtration.

**Yield:** 4,6 g (100 %)

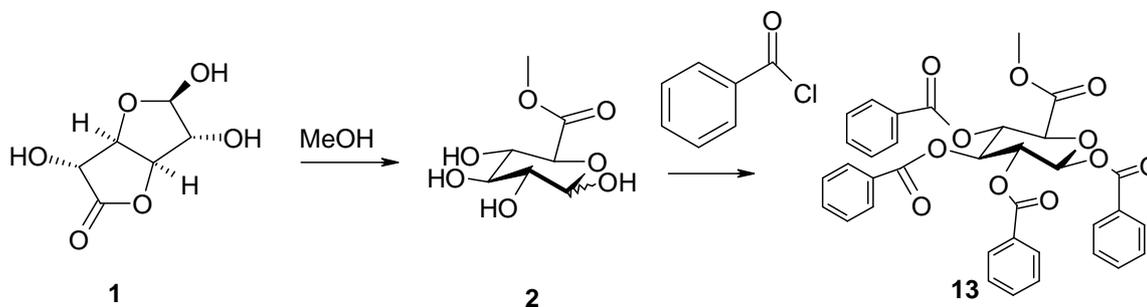
**TLC:**  $R_F = 0,26$  (PE:EE = 3:1)

**$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  **$\alpha$ -(**12**):**  $\delta = 5.66$  (t,  $J = 9.7$  Hz, 1H), 5.54 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 5.19 (t,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 4.86 (dd,  $J = 10.3, 3.7$  Hz, 1H), 4.58 (d,  $J = 10.3$ , 1H), 3.71 (s, 3H), 1.16 (s, 9H), 1.14 (s, 9H), 1.12 (s, 9H) ppm;  **$\beta$ -(**12**):**  $\delta = 5.41$  (t,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 5.23 (t,  $J = 9.7$  Hz, 1H), 4.96 (t,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 4.78 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 4.11 (d,  $J = 9.9$  Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 1.14 (s, 9H), 1.13 (s, 9H), 1.11 (s, 9H) ppm

**$^{13}\text{C NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  **$\alpha$ -(**12**):**  $\delta = 177.8$  (s, 1C), 177.1 (s, 1C), 177.0 (s, 1C), 168.8 (s, 1C), 90.3 (d, 1C), 71.1 (d, 1C), 69.5 (d, 1C), 68.9 (d, 1C), 68.3 (d, 1C), 53.0 (q, 1C), 38.9 (s, 3C), 27.4 (q, 3C), 27.3 (q, 3C), 27.2 (q, 3C) ppm;  **$\beta$ -(**12**):**  $\delta = 177.2$  (s, 1C), 177.1 (s, 1C), 176.9 (s, 1C), 167.7 (s, 1C), 96.1 (d, 1C), 73.1 (d, 1C), 73.0 (d, 1C), 71.1 (d, 1C), 69.5 (d, 1C), 53.1 (q, 1C), 39.1 (s, 3C), 27.3 (q, 3C), 27.25 (q, 3C), 27.21 (q, 3C) ppm

### 5.2.3. Synthesis of Benzoyl-protected glucuronyldonors

#### 5.2.3.1.) 1,2,3,4 Tetra-O-benzoyl – $\beta$ -D-glucuronic acid methyl ester (13)



Molecular Weight =176,13  
Molecular Formula =C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>

Molecular Weight =208,17  
Molecular Formula =C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>

Molecular Weight =624,61  
Molecular Formula =C<sub>35</sub>H<sub>28</sub>O<sub>11</sub>

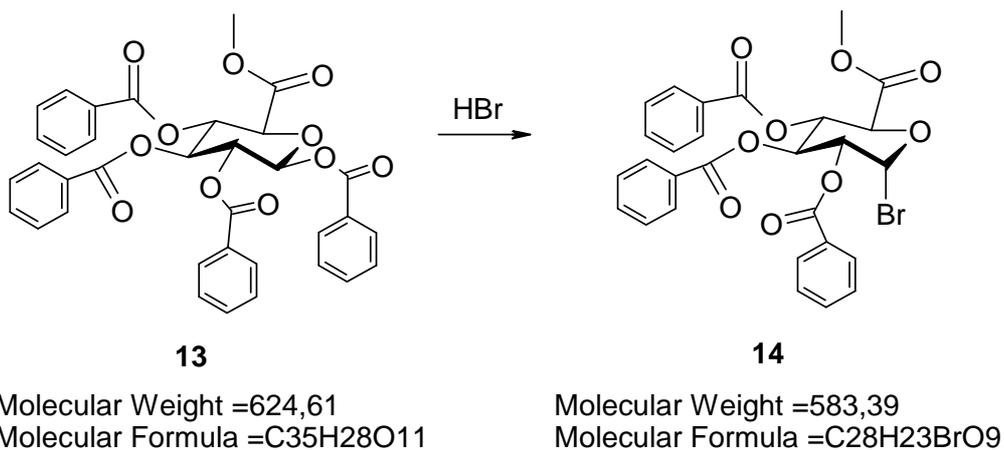
D-Glucuronic acid- $\gamma$ -lactone (**1**) (56 mmol, 10 g) was suspended in 100 ml of methanol and ca. 50 mg sodium methoxide was added. The mixture was stirred at room temperature for 2h and methanol was removed by distillation. The residue was dissolved in 125 ml of pyridine and 40 ml of distilled benzoylchloride(bp: 73 °C/11mbar) was dropped into the solution at 0 °C. 100 ml of ice-cold water was added and the mixture was extracted twice with 500 ml of DCM. The DCM-phase was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub>-solution as well as water and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The DCM was removed by distillation and the residue purified by silica gel chromatography (PE:EE = 3:2).

**Yield:** 27,0 g (77,4 %)

**TLC:** R<sub>F</sub> = 0,50 (PE:EE = 3:2)

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.30-8.20 (m, 20H), 6.83 (d, J = 3.5 Hz, 1H <sub>$\alpha$</sub> ), 6.35 (d, J = 7.5 Hz, 1H <sub>$\beta$</sub> ), 6.33 (dd, J = 9.0, 10.0 Hz, 2H <sub>$\alpha$</sub> ), 6.01 (t, J = 9.0 Hz, 3H <sub>$\beta$</sub> ), 5.84 (t, J = 9.0 Hz, 2H <sub>$\beta$</sub> ), 5.82 (dd, J = 7.5, 9.0 Hz, 2H <sub>$\beta$</sub> ), 5.78 (dd, J = 9.0, 10.0 Hz, 4H <sub>$\beta$</sub> ), 5.61 (dd, J = 3.5, 10.0 Hz, 2H <sub>$\alpha$</sub> ), 4.78 (d, J = 10.0 Hz, 5H <sub>$\beta$</sub> ), 4.62 (d, J = 9.0 Hz, 5H <sub>$\alpha$</sub> ), 3.69 and 3.61 (s, 3H) ppm

5.2.3.2.) 1-Bromo-2,3,4-tri-O-benzoyl- $\alpha$ -D-glucuronic acid methyl ester (14)

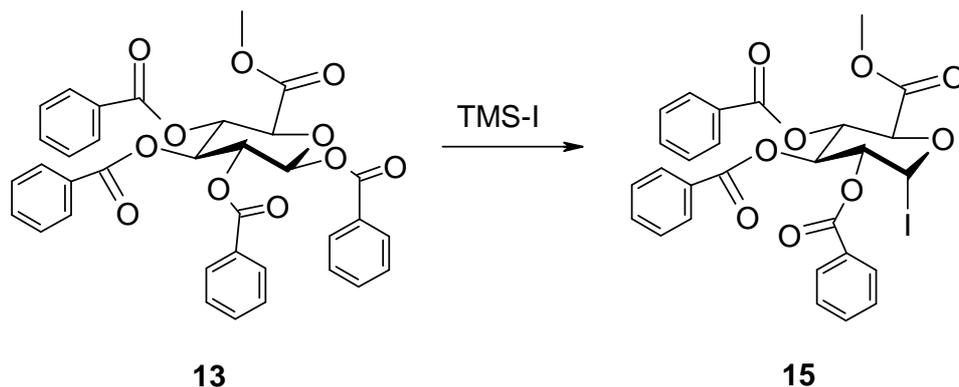


Tetrabenzoate (**13**) (12.5 g, 20 mmol) was dissolved in 50 ml of HBr (33% in glacial acetic acid) and stirred at room temperature for 8h. Then the solution was stored at 4 °C overnight, the solvent was removed by distillation and the residue was recrystallized from EtOH.

**Yield:** 10 g (85,8 %)

**TLC:**  $R_F$  = 0,22 (PE:EE = 6:1)

**$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.30-8.00 (m, 15H), 6.88 (d,  $J$  = 4.0 Hz, 1H), 6.26 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 3H), 5.73 (t,  $J$  = 10.0 Hz, 4H), 5.33 (dd,  $J$  = 4.0, 10.0 Hz, 2H), 4.85 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 5H), 3.68 (s, 3H) ppm

5.2.3.3.) 1-Iodo-1-deoxy-2,3,4-tri-O-benzoyl- $\alpha$ -D-glucuronic acid methyl ester (15)

Molecular Weight = 624.61  
Molecular Formula = C<sub>35</sub>H<sub>28</sub>O<sub>11</sub>

Molecular Weight = 630.39  
Molecular Formula = C<sub>28</sub>H<sub>23</sub>IO<sub>9</sub>

Tetrabenzoate (**13**) (3,13 g, 5 mmol), TMS-I (7.5 mmol, 1.1 ml) and 5 ml of Acetonitrile were mixed and stirred at 50 °C for 2.5 h. 25 ml of EE were added and washed with saturated Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-solution, saturated NaHCO<sub>3</sub>-solution and water. The solution was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the solvent was removed by distillation and the residue purified by silica gel chromatography (mobile phase: PE:EE = 5:1)

**Yield:** 1,5 g (50,8 %)

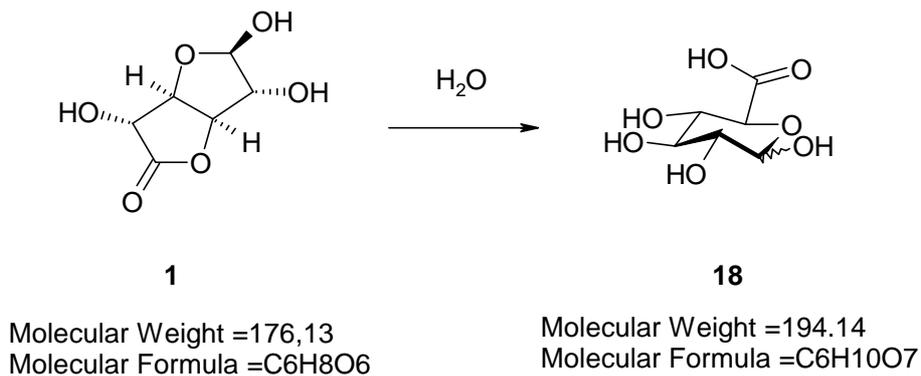
**TLC:** R<sub>F</sub> = 0,34 (PE:EE = 5:1)



### 5.3. Preparation of intermediate products for further studies

#### 5.3.1. Intermediate products for Carbonat-protected Glucuronyldonors

##### 5.3.1.1.) Glucuronic acid (18)

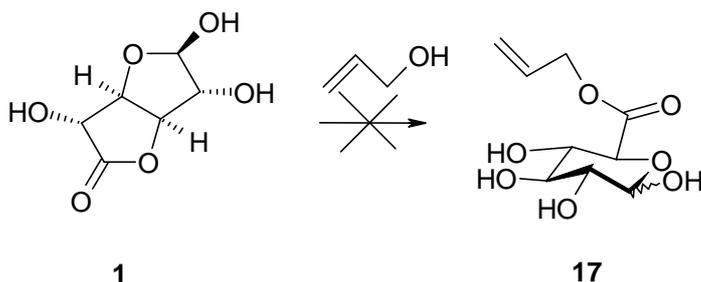


D-Glucuronolactone (**1**) (10 g, 0.0568 mol) was dissolved in 100 ml of water and passed through 60 ml of Amberlite IRA-410. The ion exchange resin got washed with 100 ml of water. The free acid was eluted with 0.1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, was fractionally concentrated and crystallized.

**Yield:** 7,35 g (66,7 %)

### 5.3.1.2.) Glucuronic acid allyl ester (17)

#### Method 1:

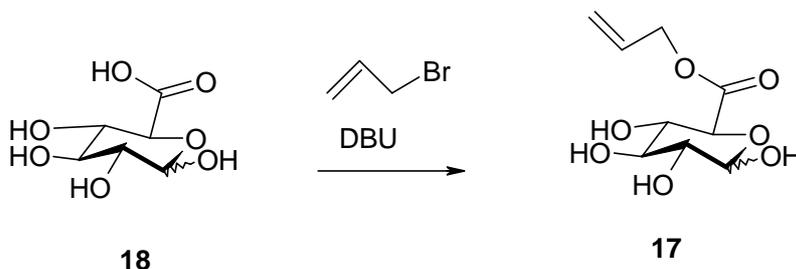


Molecular Weight =176,13  
Molecular Formula =C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>

Molecular Weight =234.21  
Molecular Formula =C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>

100 mg of NaH was mixed with 60 ml of allyl alcohol and Glucuronic acid- $\gamma$ -lactone (**1**) (17mmol, 3 g) was added. The mixture was stirred at room temperature for 24h and the alcohol was removed by distillation. The TLC showed no product but lactone (educt).

#### Method 2:



Molecular Weight =194.14  
Molecular Formula =C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>

Molecular Weight =234.21  
Molecular Formula =C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>

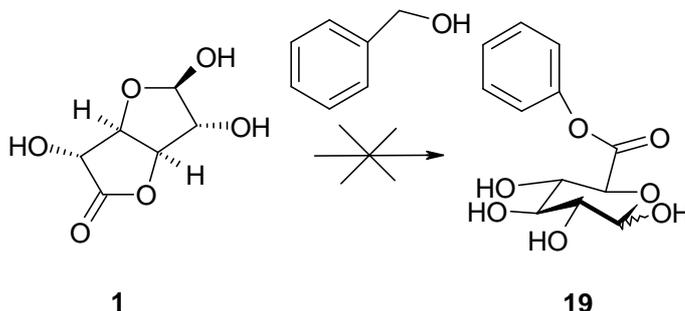
Glucuronic acid (**18**) (5 g, 25.8mmol) was dissolved in 50 ml of DMF, 4.25 ml of DBU was added and the solution was stirred for 15min. 2.75 ml of allyl bromide was added and the mixture stirred overnight. The solvent was removed by distillation and the residue was purified by silica gel chromatography (DCM:IPA = 4:1).

**Yield:** 5,3 g (87,9 %)

**TLC:** R<sub>F</sub> = 0,32 (DCM:IPA = 4:1)

### 5.3.1.3.) Glucuronic acid benzyl ester (19)

#### Method 1:

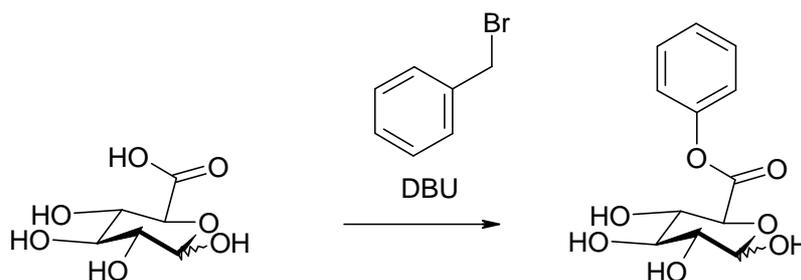


Molecular Weight = 176,13  
Molecular Formula = C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>

Molecular Weight = 270,24  
Molecular Formula = C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>

100 mg of NaH was mixed with 100 ml of benzyl alcohol and Glucuronic acid- $\gamma$ -lactone (**1**) (17mmol, 3 g) was added. The mixture was stirred at room temperature for 24h and alcohol was removed by distillation. The TLC showed no product, only lactone (educt).

#### Method 2:



Molecular Weight = 194,14  
Molecular Formula = C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>

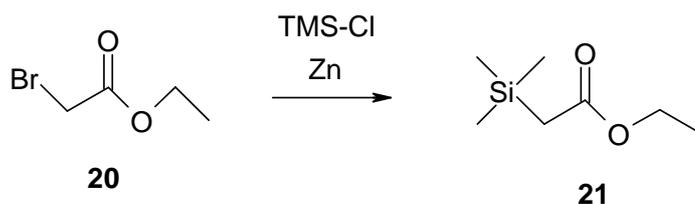
Molecular Weight = 270,24  
Molecular Formula = C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>

Glucuronic acid (**18**) (3 g, 15.5mmol) was dissolved in 30 ml of DMF, 2.58 ml of DBU was added and the solution was stirred for 15min. 3.1 ml of benzyl bromide was added and the mixture stirred overnight. The solvent was removed by distillation and the residue was purified by silica gel chromatography (DCM:IPA = 4:1).

**Yield:** 3,0 g (70,4 %)

**TLC:** R<sub>F</sub> = 0,38 (DCM:IPA = 4:1)

## 5.3.1.4.) Ethyl trimethylsilylacetate (21)



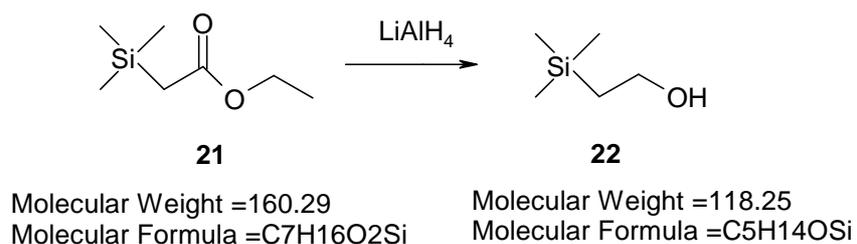
Molecular Weight =167.00  
Molecular Formula =C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>BrO<sub>2</sub>

Molecular Weight =160.29  
Molecular Formula =C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>Si

31.7 g of Zn-powder was suspended in 500 ml of dry toluene, nitrogen was flushed through the apparatus and the suspension was refluxed. A solution made of 43.5 g of TMS-Cl, Ethyl-bromoacetate (**20**) (83.5 g, 0.5 mol), 100 ml of toluene and 100 ml of Et<sub>2</sub>O were added within a 30min period. While the solution was added, some iodine crystals were added. The reaction was controlled by GC-MS and stopped after 1.5h refluxing, when almost no educt appeared in the chromatogram. The mixture was cooled (ice bath) and 400 ml of 1M HCl was added. After 5min of stirring the organic phase was washed with 5% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-solution, saturated NaHCO<sub>3</sub>-solution and water. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the solvent was removed by distillation(60 °C, 100mbar) and the product was distilled at 76-77 °C / 52mbar.

**Yield:** 19,4 g (30,3 %)

**<sup>1</sup>H-NMR** (200MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4.08 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.86 (s, 2H), 1.21 (t, J = 1.2 Hz, 3H), 0.09 (s, 9H) ppm

5.3.1.5.) 2-(Trimethylsilyl)-ethanol (22)

8.9 g of  $\text{LiAlH}_4$  were suspended in 300 ml of ice-cold absolute diethylether. Ethyl-trimethylsilylacetate (**21**) (16.0 g, 100mmol), diluted in 200 ml of diethylether, was added slowly. The mixture was heated under reflux overnight. 5 ml of 10% NaOH were added, 6 ml of water were added, the mixture was filtrated and washed with THF. The solvent of the organic phase was removed by distillation. For purification the product got distilled under vacuum (94 mbar, 87-89 °C).

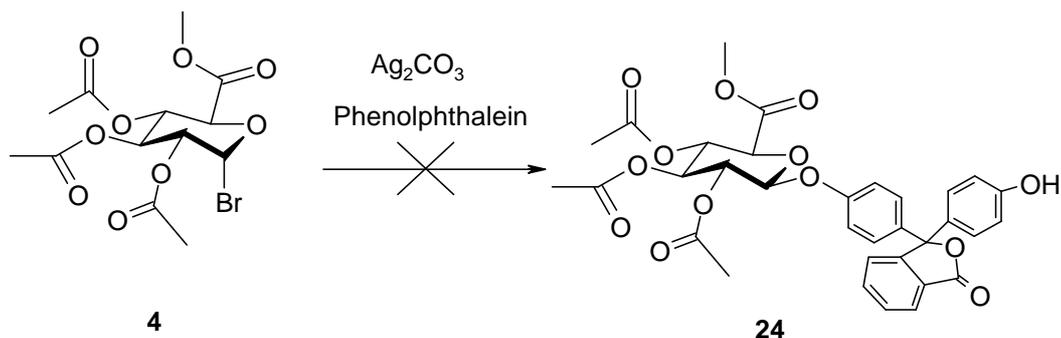
**Yield:** 9,70 g (82,1 %)

**$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 3.65-3.80 (m, 2H), 1.82 (s, 1H), 1.03-0.88 (m, 1H), 0.00 (s, 9H) ppm

## 5.4. Synthesis of glycoconjugates and metabolites

### 5.4.1. Organic-chemical Glucuronidation

#### 5.4.1.1.) 1-Phenolphthalein- $\beta$ -D-Tetra-O-Acetyl-glucuronic acid methyl ester (24)

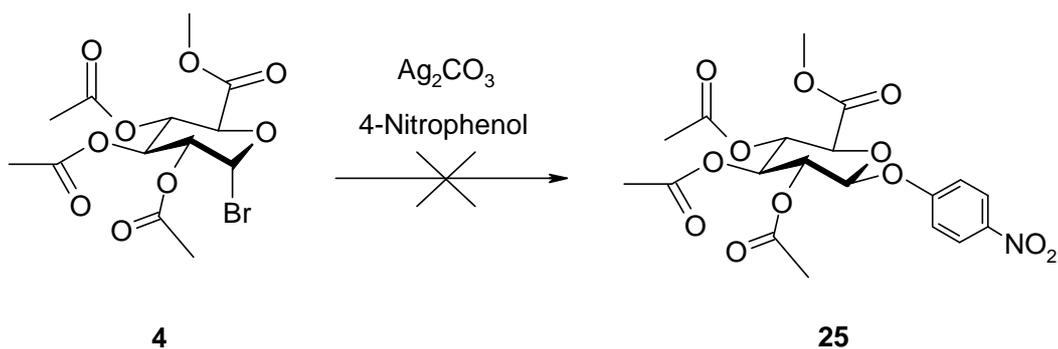


Molecular Weight = 397,18  
 Molecular Formula = C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>BrO<sub>9</sub>

Molecular Weight = 634,60  
 Molecular Formula = C<sub>33</sub>H<sub>30</sub>O<sub>13</sub>

Bromosugar (**4**) (0.5 g, 1.26mmol) was dissolved in 3.5 ml of DCM, 0.6 g of molecular sieve and 0.31 g of silver carbonate was added and the mixture was stirred for 30min. 2,2 g of Phenolphthalein was added and stirred at room temperature for 96h. The mixture was filtered through silica gel and the solution was concentrated.

There was no product found by TLC.

5.4.1.2.) 1-(4-Nitrophenol)- $\beta$ -D-Tetra-O-Acetyl-glucuronic acid methyl ester (25)

Molecular Weight =397,18  
Molecular Formula =C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>BrO<sub>9</sub>

Molecular Weight =455.38  
Molecular Formula =C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>12</sub>

Bromosugar (**4**) (0.1 g, 2.5 mmol) was dissolved in 7.5 ml of DCM, 1.3 g of molecular sieve and 0,62 g of silver carbonate was added and the mixture was stirred for 30min. 3,48 g of 4-nitrophenol was added and stirred at room temperature for 96h. The mixture was filtrated through silica gel, the solution concentrated.

There was no Product found by TLC.

## 5.5. *Enzymatical Methods*

The kinetic methods were only done qualitatively, so no yield, TLC and NMR data were measured. The yields of the enzyme purifications are shown in a table (see part 4.5.).

### 5.5.1. Isolation of UDP-Glucuronyltransferase

#### Reagents

Extraction buffer (0.125M Phosphate, 2mM PMSF, 1mM DTT, pH 7.4)

3 g of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 70 mg of phenylmethylsulphonyl fluorid(dissolved in DMSO) and 31 mg of Dithiothreitol were dissolved in water, the pH was adjusted to 7.4 with NaOH and the solution was filled up to 200 ml.

Desalting buffer (0.01M Phosphate, 10% Glycerol, 1mM DTT, pH 7.4)

1.2 g of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 154 mg of DTT and 100 ml of Glycerol were dissolved in water, the pH was adjusted to 7.4 with NaOH and the solution was filled up to 1000 ml.

Equilibration buffer (0.01M Phosphate, 10% Glycerol, 1mM DTT, 0.25% Brij 25, pH 7.4)

1.2 g of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 154 mg of DTT, 2.5 g of Brij 25 and 100 ml of Glycerol were dissolved in water, the pH was adjusted to 7.4 with NaOH and the solution was filled up to 1000 ml.

Elution buffer (0.01M Phosphate, 10% Glycerol, 1mM DTT, 0.25% Brij 25, 1M NaCl, pH 7.4)

11.7 g of NaCl were added to 200 ml of equilibration buffer.

NaCl-solution(1M)

11.7 g of NaCl were dissolved in 200 ml of water.

#### Conduction

100 g of pork liver (*hepar, sus scrofa domestica*) and 200 ml of ice-cold extraction buffer were blended and centrifuged at 15krpm for 5 minutes.

To the supernatant (260 ml) 45.76 g of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (30% saturation) were added slowly under cooling. The mixture was centrifuged and the residue was dissolved in 250 ml of desalting buffer (residue was discarded) . 273 g/L (70% saturation) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were added to the supernatant, the mixture was centrifuged and the residue was dissolved in 125 ml of desalting buffer.

The activity of all fractions was measured and active fractions (fraction 1 and 3) were desalted. Therefore, a HiPrep 26/10 desalting column was equilibrated with desalting buffer and 5 ml of the fraction were put on the column. Fractions of 4.5 ml were collected and active

fractions (precipitation fraction 0-30%: 4,5,6; precipitation fraction 70%+: 6) were pooled.

The pool from the precipitation fraction 70%+ was not further purified.

A DEAE Sepharose column was flushed with NaCl-solution and equilibrated with equilibration buffer. 5 ml of desalted pool was put on the column and eluted with a linear elution buffer-gradient. Active fractions were pooled (pool 1: 10,11; pool 2: 25,26,27).

The determination of the Protein amount (Bradford-method): 10 $\mu$ L of the protein-solution (dilution) and standards (bovine serum albumin) were filled into a cavity of an ELISA-reader plate and 200 $\mu$ L bradford-reagents were added. The mixture was shaken and after 1h the absorption was measured at 600nm.

For the determination of the enzyme activity see: 5.5.3.

### 5.5.2. Electrophoretical Analysis of the Iso-enzymes of UDP-Glucuronyltransferase

#### Reagents

Acrylamide stock solution (T = 30%, C = 2.7%)

29.2 g of Acrylamide, 0.81 g of N,N'-methylenebisacrylamide were dissolved in 100 ml of water.

Resolving gel buffer (1.5M TRIS, pH 8.8)

18.5 g of TRIS were dissolved in water, the pH was adjusted to 8.8 and the solution was filled up to 100 ml.

Stacking gel buffer (0.5M TRIS, pH 6.8)

6.05 g of TRIS were dissolved in water, the pH was adjusted to 6.8 and the solution filled up to 100 ml.

Sample treatment buffer (0.125M TRIS/HCl, 4% SDS, 20% glycerol, 10% ethanethiol, 0.025% bromophenol blue, pH 6.8)

1.5 g of TRIS, 4 g of SDS, 20 ml of glycerol, 10 ml of ethanethiol and 25 mg of bromophenol blue were dissolved in water, the pH was adjusted to 6.8 and the solution was filled up to 100 ml.

Tank buffer (0.0125M TRIS/HCl, 0.192M Glycin, pH 8.3)

1.5 g of TRIS and 14.4 g of glycine were dissolved, the pH was adjusted to 8.3 and the solution was filled up to 1000 ml.

High protein marker (co. BioRad)

myosin (rabbit muscle)	220 000 Da	25µg
α <sub>2</sub> -macroglobulin (bovine plasma)	170 000 Da	100µg
β-galactosidase (E. coli)	116 000 Da	16µg
transferring (human)	76 000 Da	17µg
gluctamic dehydrogenase (bovine liver)	53 000 Da	18µg

Low protein marker (co. BioRad)

phosphorylase b (rabbit muscle)	97 000 Da	67µg
albumin (bovine serum)	66 000 Da	83µg
ovalbumin (chicken egg white)	45 000 Da	147µg
carbonic anhydrase (bovine erythrocyte)	30 000 Da	83µg
trypsin inhibitor (soybean)	20 100 Da	80µg
α-lactalbumin (bovine milk)	14 400 Da	116µg

## Kaleidoscope marker

blue	250 kDa
purple	150 kDa
blue	100 kDa
pink	75 kDa
blue	50 kDa
green	37 kDa
pink	25 kDa
blue	20 kDa
blue	15 kDa
yellow	10 kDa

Coomassie staining solution (0.1% Coomassie blue R-250, 30% MeOH, 10% acetic acid)

Coomassie destaining solution I (50% MeOH, 10% acetic acid)

Coomassie destaining solution II (5% MeOH, 7% acetic acid)

Gel preserving solution (5% glycerol, 10% acetic acid)

Silver stain fixation solution I (50% MeOH, 10% acetic acid)

Silver stain fixation solution II (10% EtOH, 2% acetic acid)

Silver stain sensitizing solution (20 mg/l  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )

Silver stain reaction solution (0,1%  $\text{AgNO}_3$ , 0.028% formaldehyde)

100 mg of  $\text{AgNO}_3$  were dissolved in 100 ml of water and shortly before using the solution 75 $\mu\text{L}$  of formalin (37% formaldehyde) were added.

Silver stain development solution (0.0037% formaldehyde, 3%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.01 g/l  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )

3 g of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  were dissolved in 100 ml of water and shortly before using the solution 100 $\mu\text{L}$  formalin and 100 $\mu\text{L}$  of 10 g/l Thiosulfate-solution were added.

Silver stain stopping solution (50 g/l TRIS, 25 ml/l acetic acid)

Gel dry solution (40% MeOH, 10% glycerol, 10% acetic acid)

Conduction

Gel preparation (for 2 gels):

Resolving gel:

<b>substance</b>	<b>V[ml]</b>
acrylamide stock solution	5.00
resolving gel buffer	3.75
10% SDS	0.15
60% glycerol	6.00
10% APS	0.15
TEMED	0.012

The polymerisation was started with APS and TEMED and immediately filled into the gel apparatuses. The polymerisation mixture was covered with isopropanol and when the gel was polymerised, the isopropanol was poured off and the gel was washed with water.

Stacking gel:

<b>substance</b>	<b>V[ml]</b>
acrylamide stock solution	0.67
stacking gel buffer	1.25
10% SDS	0.05
water	3.00
10% APS	0.08
TEMED	0.01

The polymerisation was started with APS and TEMED and immediately filled on the resolving gel. The comb was put into the liquid mixture to form cavities for the samples.

Sample treatment: 100 $\mu$ L sample were mixed with 100 $\mu$ L 2x sample treatment buffer and incubated in a boiling water bath for 3min.

The gel-developing apparatus was filled with tank buffer and 10 $\mu$ L sample resp. marker (see above) was filled into the cavities. The gels were run with constant 50mA (200V; 25mA for each gel) until the bromophenol blue-marker was at the bottom of the gel. The stacking gel was removed.

Coomassie staining: The gel was put into coomassie staining solution for one day, then into coomassie destaining solution I until further treatment. The gel was put into coomassie destaining solution II for ca. 6h. The gel was put into gel preserving solution until it was dried.

Silver staining: The gel was put into silver stain fixation solution I until further treatment. Then gel was shaken in silver stain fixation solution II for 6min. Then the gel was washed twice with water for 9min. Afterwards, the gel was agitated in fresh silver stain sensitizing

solution for 9min. The solution was changed to silver stain reaction solution and agitated for 9min. The gel was rinsed with water to remove excess  $\text{Ag}^+$  and put the into silver stain development solution. When the staining was satisfactory, the solution was poured off and silver stain stopping solution was added. After some minutes, the solution was changed to gel preserving solution and left there until further treatment.

Gel drying: The gel was swelled thrice in water for 15min. Then the gel was shaken in gel dry solution for 20min and 2 cellophane sheets were soaked in gel dry solution. One sheet was put on the first part of the frame, the gel was laid on the sheet (no air bubbles), the second sheet was laid on the gel and the frame was closed.

### 5.5.3. Enzymatical Glucuronidation of p-Nitrophenole and 4-Methylumbelliferone

#### Reagents

##### TRIS/HCl-buffer (0.15M, pH7.5)

1.8 g of TRIS were dissolved, the pH adjusted to 7.5 with 0.5M HCl and were filled up to 100 ml.

##### MgCl<sub>2</sub>-solution (0.4M)

1.61 g of MgO were dissolved in HCl, neutralised with NaOH and filled up to 100 ml.

##### Stop-solution

0.2 g of NaWO<sub>4</sub> were dissolved in 19 ml of water and 37µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(conz. 98%) were added.

##### 2-Amino-2methyl-propanol-buffer (0.1M, pH 10.3)

0.89 g of Aminomethylpropanol were dissolved, the pH was adjusted with HCl to 10.3 and filled up to 100 ml.

##### Uridin-5'-diphosphoglucuronat-solution (8mM)

2.5 mg of UDP-Glucuronsäure were dissolved in 500µL water.

##### 4-Methylumbelliferon- solution (7-Hydroxy-4-methylcumarin, 1mM)

8.8 mg of Methylumbelliferone were dissolved in 50 ml of boiling water.

##### 4-Nitrophenol-solution (1mM)

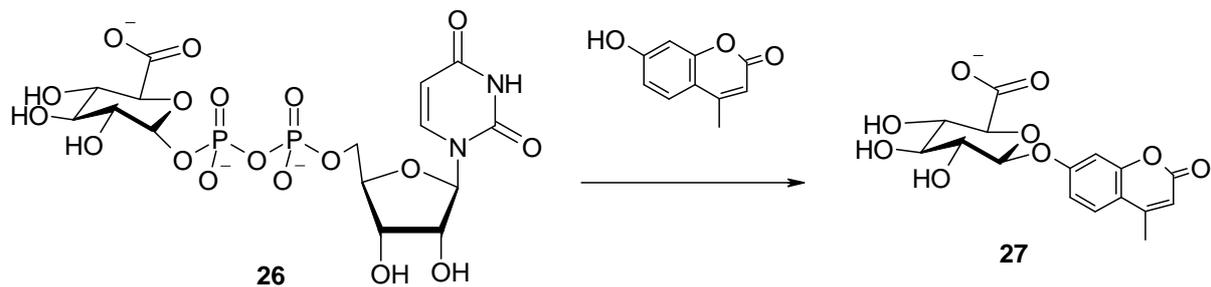
13.9 g of 4-Nitrophenol and 12.1 g of TRIS were dissolved in water, the pH was adjusted to 7.5 with 1M NaOH and filled up to 100 ml.

##### Enzyme/liver extract

5.5 g of liver from pork (*hepar, sus scrofa domestica*) were mixed with 20 ml of TRIS/HCl-buffer by an Ultra-Turrax (Ultra-Turrax T25; company Janke & Kunkel, IKA-laboratory technology) for 5min under cooling and centrifuged for 5min. The supernatant was used.

Conduction

## 4-Methylumbelliferone



Molecular Weight =577.27  
Molecular Formula =C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub>P<sub>2</sub>

Molecular Weight =351.29  
Molecular Formula =C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>O<sub>9</sub>

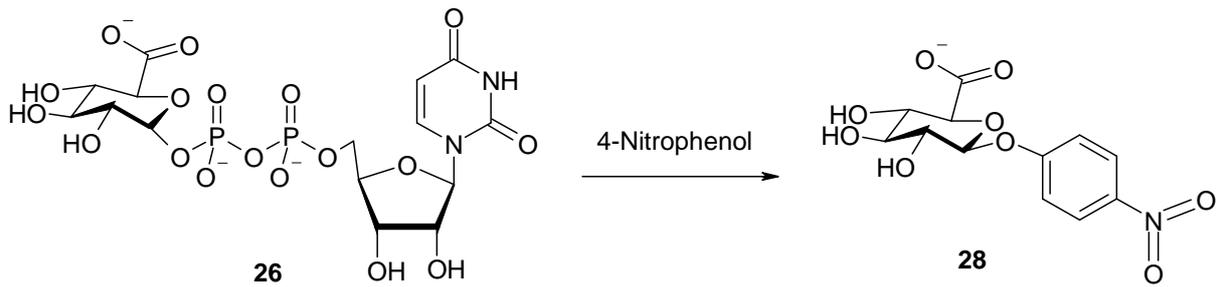
operating solution:

substance	c(stock sol.)[mM]	c(batch)[mM]	n(substrate) [μmol]	volume[μL]
TRIS/HCl	150	53.57	-	20
MgCl <sub>2</sub>	400	14.29	-	2
belliferone	1	0.36	0.06	20
UDP-glucuronic acid	8	1.43	0.24	10
enzyme				4
			sum	56

The reaction was started with 4μL enzyme and incubated at 37 °C. After 0min (stop-solution added before the enzyme), 10min, 20min, 30min and 40min the reaction was stopped with 500μL stop-solution, put on ice and centrifuged. 200μL supernatant was filled into a quartz-cuvette and 1000μL aminopropanol-buffer was added. The fluorescence was measured by a Fluorescence Spectrophotometer F-4500(Hitachi) with an excitation wave-length of 340nm and an emission wave-length of 440nm.

For results see: special part, section 4.6.2.

## 4-Nitrophenol



Molecular Weight =577.27  
Molecular Formula =C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub>P<sub>2</sub>

Molecular Weight =314.23  
Molecular Formula =C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>9</sub>

operating solution:

substance	c(stock sol.)[mM]	c(batch)[mM]	n(substrate) [μmol]	volume[μL]
TRIS/HCl	150	107.14	-	60
MgCl <sub>2</sub>	400	14.29	-	6
Nitrophenol	1	0.36	0.022	60
UDP-Glucuronsäure	8	1.43	0.043	30
enzyme				12
			sum	168

The mixture was prepared in a cavity of an ELISA-reader plate and the reaction was started with 12μL of enzyme. The mixture was incubated at 37 °C and the absorption was measured at 405nm in an ELISA-reader EL340 Bio kinetics reader(Bio-Tek instruments) 10 times every 30 seconds.

For results see: special part, section 4.6.2.

#### 5.5.4. Isolation of Glucuronidase

##### Reagents

Extraction buffer (0.1M TRIS/HCl, 0.25M sucrose, 0.1mM EDTA, pH 7.4)

12.1 g of TRIS, 85.5 g of sucrose and 29.2 mg of EDTA were dissolved in water, the pH was adjusted to 7.4 with HCl and the solution was filled up to 1000 ml.

Heat precipitation buffer (0.1M TRIS/HCl, 0.1mM EDTA, pH 7.4)

12.1 g of TRIS and 29.2 mg of EDTA were dissolved in water, the pH was adjusted to 7.4 with HCl and the solution was filled up to 1000 ml.

Desalting buffer (0.025M TRIS/HCl, 0.1mM EDTA, pH 7.4)

3 g of TRIS/HCl and 29.2 mg of EDTA were dissolved in water, the pH was adjusted to 7.4 with HCl and the solution was filled up to 1000 ml.

IEC-equilibration buffer (0.025M TRIS/HCl, 0.1mM EDTA, 0.05M NaCl, pH7.4)

3 g of TRIS/HCl, 2.92 g of NaCl and 29.2 mg of EDTA were dissolved in water, the pH was adjusted to 7.4 with HCl and the solution was filled up to 1000 ml.

IEC-elution buffer (0.025M TRIS/HCl, 0.1mM EDTA, 0.1M NaCl, pH 7.4)

3 g of TRIS/HCl, 5.84 g of NaCl and 29.2 mg of EDTA were dissolved in water, the pH was adjusted to 7.4 with HCl and the solution was filled up to 1000 ml.

Hydroxyapatite equilibration buffer (0.05M Phosphate, pH 8.0)

6.8 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  were dissolved in water, the pH was adjusted to 8.0 with KOH and the solution was filled up to 1000 ml.

Hydroxyapatite elution buffer (0.4M Phosphate, pH 8.0)

54.4 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  were dissolved in water, the pH was adjusted to 8.0 with KOH and the solution was filled up to 1000 ml.

Bradford reagent

100 mg of Coomassie-Brillant-blue G250 were dissolved in 50 ml of EtOH, 100 ml of 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  were added and filled up to 1000 ml.

### Conduction

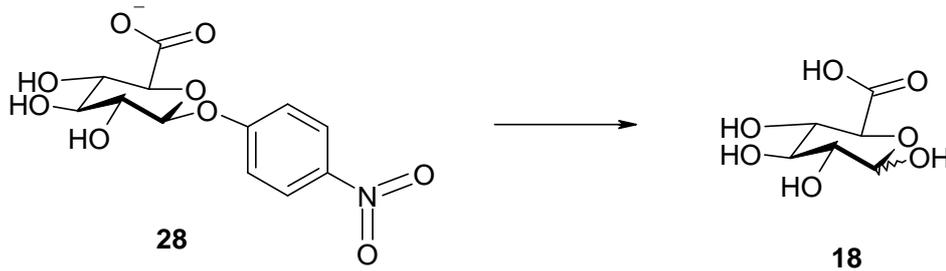
100 g of pork kidney (*ren, sus scrofa domestica*) were blended with 100 ml of cool extraction buffer in a mixer for 2min. The mixture was filtered through gauze and centrifuged at 10000g and 4 °C for 15min. The supernatant was discarded and the precipitate was resuspended in 500 ml of extraction buffer, frozen, thawed and homogenized. 3 g of Sodium deoxycholate per liter were added while stirring in ice for 1h. Then the pH was adjusted to 5.0 with ice-cold 10% acetic acid and the precipitate was discarded after centrifugation (15min at 15000 g). The pH was adjusted to 7.4 with 0.1M NaOH.

94 g of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  were added to the solution (60% saturation). After centrifugation at 15000 g the supernatant was discarded and the precipitate was dissolved in 25 ml of heat precipitation buffer. The solution was heated to 50 °C and the temperature was kept for 10min. Then the mixture was cooled in an ice bath and centrifuged. The supernatant was ultrafiltrated to 5 ml in an amicon cell with a PM-30 membrane filter.

5 ml of the filtrate (the ultra-filtration did not work, there was as much activity in the filtrate as there was in the concentrate) was applied to a Sephacryl S200 HR column, equilibrated with desalting buffer and eluted with desalting buffer. Active fractions were pooled and 2 ml of the solution were applied to a DEAE cellulose column which was equilibrated with IEC equilibration buffer. The enzyme was eluted with a linear increasing IEC elution buffer gradient. There was no Glucuronidase activity found. So 2 ml of the SEC-Pool were applied to a hydroxyapatite column equilibrated with hydroxyapatite equilibration buffer. The enzyme was eluted with a linear hydroxyapatite elution buffer gradient. Active fractions were pooled. The determination of the Protein amount (Bradford-method): 10 $\mu$ L of the protein-solution (dilution) and standards (bovine serum albumin) were filled into a cavity of an ELISA-reader plate and 200 $\mu$ L of bradford-reagents were added. The mixture was shaken and after 1h the absorption was measured at 600nm.

For the determination of the enzyme activity see: 5.5.5.

### 5.5.5. Enzymatical Hydrolysis of 1-(4-nitrophenol)- $\beta$ -D-tetra-O-acetyl-glucuronic acid methyl ester



Molecular Weight = 314.23  
Molecular Formula = C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>9</sub>

Molecular Weight = 194.14  
Molecular Formula = C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>

#### Reagents

Acetate buffer(1M, pH4.5)

17.5 g of NaOAc were dissolved, the pH was adjusted with HOAc and the solution was filled up to 500 ml

p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucuronid(40mM, substrate)

6 mg of p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucuronid, Aldrich was dissolved in 10 ml of acetate buffer.

SDS-Glycine buffer(0.2M, pH 11.7)

7.5 g of glycine and 1 g of SDS were dissolved, the pH was adjusted with 1M NaOH and filled up to 500 ml

$\beta$ -Glucuronidase, 90000 U/ml, Sigma-Aldrich

#### Conduction

Operating solution:

substance	conc. SL[mM]	conc. CS[mM]	Volume[ $\mu$ L]
substrate(buffer)	40	8	100
acetate buffer	1000	600	200
water	-	-	100
enzyme(1:1000)	-	-	100
		sum	500

The mixture was incubated at 37 °C and the reaction was stopped after 30, 60 and 90 min. Therefore, 0.5 ml of water and 2 ml of SDS-Glycine buffer were added and the absorption was measured at 405nm.

For results see: special part, section 4.6.1.

**VI**  
**LITERATUR –**  
**UND ABBILDUNGS-**  
**VERZEICHNIS**

## 6.1. Literatur

- [1] D. Meschede, Gerthsen Physik, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 2002, 21.Auflage
- [2] Organikum, Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin 1981, 15.Auflage
- [3] H.P. Latscha/ H.A. Klein, Anorganische Chemie, Springer Verlag Berlin-Heidelberg 2007, 9. Auflage
- [4] H.U. Bergmayer, Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim 1974, 3.Auflage, Band 1, Seite 954ff
- [5] Breuer, Rao u.a., Partial Purification and Kinetics of Oestriol 16 $\alpha$ -Glucuronyltransferase from the Cytosol Fraction of Human Liver, Publikation des Instituts für Klinische Biochemie der Universität Bonn
- [6] H. Mikula, Masterarbeit: Regioselektive O-Glucuronidierung untersucht am Beispiel des *Fusarium* Mycotoxins Zearalenon, Institut für angewandte Synthesechemie, TU Wien, 2008

## 6.2. Abbildungen

Alle hier nicht eigens angeführten Abbildungen wurden selbst erstellt. Zur Erstellung der Diagramme und Tabellen wurde Microsoft<sup>®</sup> Office Excel verwendet und die Strukturformeln wurden mit MDL ISIS Draw 2.5 erstellt.

- [III.2.] Ernst, Gruber, Hartmann u.a., DUDEN Chemie, Paetec Verlag für Bildungsmedien Berlin, 2001, Seite 217
- [III.3.] Nelson, Cox, Lehninger Biochemie, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2005, 3. Auflage, Seite 197
- [III.5.] Ernst, Gruber, Hartmann u.a., DUDEN Chemie, Paetec Verlag für Bildungsmedien Berlin, 2001, Seite 103
- [III.10.] Organikum, Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin 1981, 15.Auflage, Seite 87
- [III.11.] D. Meschede, Gerthsen Physik, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 2002, 21.Auflage, Seite 322
- [III.12.] D. Meschede, Gerthsen Physik, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 2002, 21.Auflage, Seite 451
- [III.13.] D. Meschede, Gerthsen Physik, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 2002, 21.Auflage, Seite 454

- [III.14.] D. Meschede, Gerthsen Physik, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 2002, 21. Auflage, Seite 455
- [III.15.] D. Meschede, Gerthsen Physik, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 2002, 21. Auflage, Seite 302
- [III.16.] [http://www.chemgapedia.de/vsengine/media/vsc/de/ch/3/anc/masse/2\\_massenspektrometer/2\\_5\\_detektor\\_ms/2\\_5\\_5\\_sev/sev\\_kont\\_ms4bi0802.gif](http://www.chemgapedia.de/vsengine/media/vsc/de/ch/3/anc/masse/2_massenspektrometer/2_5_detektor_ms/2_5_5_sev/sev_kont_ms4bi0802.gif)
- [III.18.] D. Meschede, Gerthsen Physik, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 2002, 21. Auflage, Seite 366
- [III.20.] D. Meschede, Gerthsen Physik, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 2002, 21. Auflage, Seite 393
- [III.22.] Organikum, Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin 1981, 15. Auflage, Seite 129
- [III.24.] [http://www.chemie.uni-kl.de/forschung/oc/kubik/img/oc3\\_nmr\\_2.gif](http://www.chemie.uni-kl.de/forschung/oc/kubik/img/oc3_nmr_2.gif)
- [III.30.] Organikum, Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin 1981, 15. Auflage, Seite 131
- [III.31.] D. Meschede, Gerthsen Physik, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 2002, 21. Auflage, Seite 634
- [III.32.] [http://www.cup.uni-muenchen.de/studium/lafprak/gr1\\_versuch3/Aepfel13C.png](http://www.cup.uni-muenchen.de/studium/lafprak/gr1_versuch3/Aepfel13C.png)
- [III.33.] D. Meschede, Gerthsen Physik, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 2002, 21. Auflage, Seite 635
- [III.34.] [http://www.chemgapedia.de/vsengine/media/vsc/de/ch/3/anc/nmr\\_spek/m\\_42/nmr\\_7\\_1\\_2/spektrassapt\\_m42gr0902.gif](http://www.chemgapedia.de/vsengine/media/vsc/de/ch/3/anc/nmr_spek/m_42/nmr_7_1_2/spektrassapt_m42gr0902.gif)
- [IV.30.] Nelson, Cox, Lehninger Biochemie, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2005, 3. Auflage, Seite 139
- [IV.31.] Nelson, Cox, Lehninger Biochemie, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2005, 3. Auflage, Seite 138
- [IV.33.] <http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Image:1bhg.png>
- [IV.40.] [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/99/Michaelis-Menten\\_saturation\\_curve\\_of\\_an\\_enzyme\\_reaction.svg/800px-Michaelis-Menten\\_saturation\\_curve\\_of\\_an\\_enzyme\\_reaction.svg.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/99/Michaelis-Menten_saturation_curve_of_an_enzyme_reaction.svg/800px-Michaelis-Menten_saturation_curve_of_an_enzyme_reaction.svg.png)
- [IV.42.] <http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Image:1v83.png>

# **VII**

# **ANHANG**

## **7.1. Erklärung**

LINDNER Stefan

DOPPLER Michael

Hiermit erklären wir, dass wir die vorliegende Arbeit mit dem Titel

### **Glucuronyldonoren in der Synthese von Glucokonjugaten und Metaboliten**

selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und die Stellen, die anderen Werken im Wortlaut und Sinn nach entnommen sind, mit Quellenangaben deutlich gemacht haben.

Die Arbeit enthält folgende geforderte Inhaltskriterien:

- a) Team- und Themafindung (siehe Vorwort)
- b) Ziel des Projektes (siehe Zielsetzung)
- c) Ressourcenplanung
- d) Zeitplanung mit Meilensteinen

Wien, am 28.05.2009

---

Lindner Stefan  
Lagerhausstraße 7  
2432 Schwadorf

---

Doppler Michael  
Am Rosenhügel 16/7  
3500 Krems

## ***7.2. Zeitplanung***

### **32. Kalenderwoche (04.08.2008 – 10.08.2008)**

40 Stunden

Platzübernahme, allgemeine Einweisungen, Beginn der ersten Synthesen (Grundkörper)

### **33. Kalenderwoche (04.08.2008 – 10.08.2008)**

40 Stunden

Fortführung der Grundkörpersynthesen, Isolation erster Grundkörper Beginn der Synthese erster Glucuronyldonoren

### **34. Kalenderwoche (04.08.2008 – 10.08.2008)**

40 Stunden

Isolation der restlichen Grundkörper, Beginn der Optimierung der Reformatsky-Reaktion von TMS-Cl und Bromessigsäureethylester, Beginn der Synthese weiterer Glucuronyldonoren

### **35. Kalenderwoche (04.08.2008 – 10.08.2008)**

40 Stunden

Isolation einiger Glucuronyldonoren, Einschulung in Computersoftware zur Erstellung von Strukturformeln und zur Literatursuche (SciFinder).

### **36. Kalenderwoche (11.08.2008 – 17.08.2008)**

20 Stunden

Beendigung der begonnenen Synthesen

### **42. Kalenderwoche (13.10.2008 – 19.10.2008)**

10 Stunden

Synthese und Isolation eines weiteren Glucuronyldonors (2,3,4-Tri-O-Acetyl – 1-Trichlormethylimidatoglucuronsäuremethylester)

**45. Kalenderwoche (03.11.2008 – 09.11.2008)**

20 Stunden

Synthese des letzten Glucuronyldonors (2,3,4-Tri-O-Acetyl – 1-Fluoroglucuronsäuremethylester), durchführung der organisch-präparativen Glucuronidierungen von Phenolphthalein und p- Nitrophenol sowie Theorieeinheiten zum Phase – II – Metabolismus

**12.11.2008, 19.11.2008, 26.11.2008, 03.12.2008 und 10.12.2008**

45 Stunden

Durchführung der enzymatischen Glucuronidierung von p- Nitrophenol, Isolierung der Glucuronidase und der Glucuronyltransferase im Biochemisch-Technologischen Laboratorium der HBLVA Rosensteingasse

**17.11.2008 und 01.12.2008**

5 Stunden

Theorieeinheiten zu Chromatographie und NMR-Spektroskopie

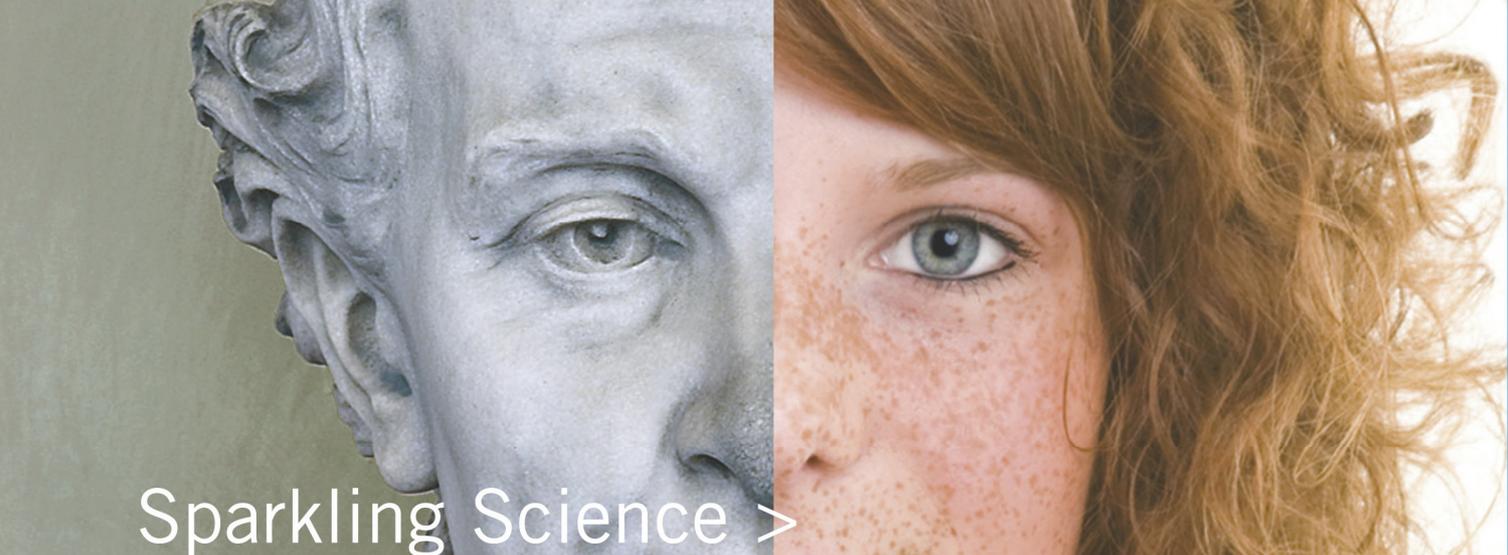
**Gesamtzeitbedarf: 260 Stunden (pro Schüler)**

Die schriftliche Abfassung der Arbeit erfolgte außerhalb der Arbeitszeit in den Kalenderwochen 1 und 6. Die Korrekturen wurden in Kalenderwoche 22 eigearbeitet. An den schriftlichen Arbeiten waren beide Kandidaten gleichermaßen beteiligt.

**Meilensteine:**

- |   |            |
|---|------------|
| 1) Präsentation der Ergebnisse:             | 07.01.2009 |
| 2) Vorlage der Rohfassung der Diplomarbeit: | 29.01.2009 |
| 3) Vorlage der fertigen Diplomarbeit        | 28.05.2009 |





Sparkling Science >  
Wissenschaft ruft Schule  
Schule ruft Wissenschaft

oead 

[www.bmwf.gv.at](http://www.bmwf.gv.at)  
[www.sparklingsscience.at](http://www.sparklingsscience.at)

BMWF<sup>a</sup>

Bundesministerium für Wissenschaft  
und Forschung