



Institut für Biotechnologie

**Untersuchungen zur Biosynthese von
Biarylnaturstoffen in dem Filamentösen Pilz
*Penicillium citreo-viride***

Daniel Drochner

**Untersuchungen zur Biosynthese von
Biarylnaturstoffen in dem Filamentösen Pilz
*Penicillium citreo-viride***

Daniel Drochner

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4117

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-4117

D 5 (Diss., Bonn, Univ., 2003)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

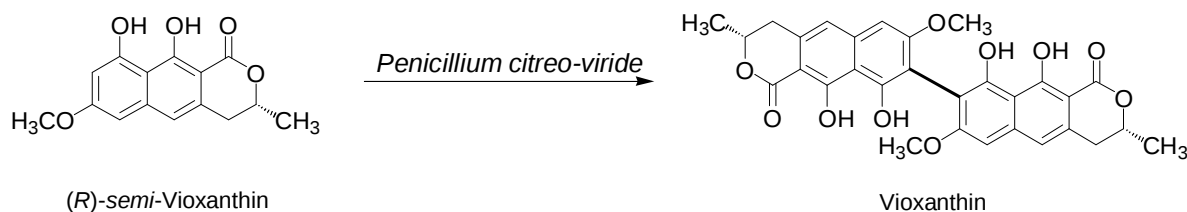
☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publication@fz-juelich.de

Untersuchungen zur Biosynthese von Biarylverbindungen in dem Filamentösen Pilz *Penicillium citreo-viride*

Biarylverbindungen stellen in der organischen Chemie wegen ihrer vielfältigen Eigenschaften als pharmakologisch aktive Naturstoffe oder chirale Reagentien sehr interessante Synthesziele dar. Die Vergabe des Chemie-Nobelpreises im Jahre 2001 an Ryoji Noyori hat die besondere Bedeutung dieser Verbindungsklasse nochmals verdeutlicht.

Die chemische Synthese von natürlich vorkommenden Biarylverbindungen ist häufig sehr aufwendig. Im Vergleich dazu verläuft die Biosynthese dieser Naturstoffe in biologischen Systemen in einem Schritt und beinhaltet radikalische Zwischenstufen. Diese sogenannte oxidative Phenolkupplung wird von den jeweiligen Organismen so dirigiert, daß Biarylverbindungen mit einer charakteristischen Regio- und Stereochemie entstehen.

Zur Untersuchung dieses Biosyntheseschrittes wurde ein interdisziplinärer Ansatz an der Schnittstelle zwischen organischer Chemie und Mikrobiologie gewählt. Als Modellorganismus wurde der filamentöse Pilz *Penicillium citreo-viride* ausgewählt und für diesen ein Protokoll zur reproduzierbaren Kultivierung erarbeitet. Dadurch wurde die Isolierung von Naturstoffen, der Aufbau eines Analytik-Assays und die Durchführung von Biosyntheseuntersuchungen. Es konnte gezeigt werden, daß die monomere Vorläufersubstanz *semi*-Vioxanthin während der Kultivierung vollständig metabolisiert wird und sich nur noch Biarylverbindungen in dem Mycel des Pilzes finden.



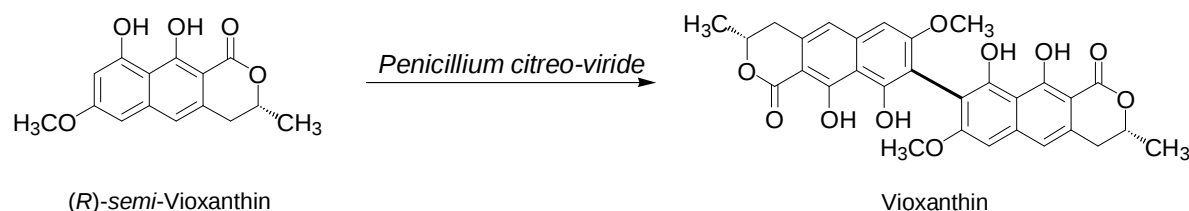
Die chemischen Arbeiten befassten sich mit der stereoselektiven Synthese von Naturstoffen, wie dem *semi*-Vioxanthin und Vioxanthin. Dabei konnten verschiedene Strategien zur Synthese von Biarylverbindungen erarbeitet werden. Darunter eine neuartige unselektive oxidative Phenolkupplung von Orsellinsäureestern mit Eisen(III)chlorid, die alle drei möglichen regioisomeren Kupplungsprodukte in Gesamtausbeuten von 70 % liefert. Zur Vorbereitung weiterer molekularbiologischer Arbeiten wurde ein innovatives Verfahren zum Screening von Lipasen entwickelt, welches auf der chiroptischen Methode des Circular dichroismus basiert.

Studies on the Biosynthesis of Biaryl Natural Products in the Filamentous Fungus *Penicillium citreo-viride*

Biaryl compounds are very interesting synthetic targets in organic chemistry because of their multifaceted properties as pharmacologically active natural products or chiral reagents. The awarding of the Nobel Prize to Ryoji Noyori in 2001 has highlighted the impact of this class of compounds.

Often, the chemical synthesis of naturally occurring biaryl compounds is very complex. In nature, these natural products are biosynthesized in one single step, which involves radical intermediates. The biaryl compounds produced by this oxidative phenolic coupling exhibit a regio- and stereochemistry characteristic for their individual biological origin.

To investigate the biosynthesis an interdisciplinary approach between organic chemistry and microbiology was chosen. At first, a protocol for the reproducible cultivation of the model organism *Penicillium citreo-viride* was elaborated which enabled the isolation of secondary metabolites, the development of an analytical assay and the performance of feeding experiments. It could be shown that the monomeric precursor *semi*-Vioxanthin is metabolized completely during fermentation and only biaryl natural products are present in the mycelium of the fungus.



The chemical work dealt with the total synthesis the natural products *semi*-Vioxanthin and Vioxanthin. Thereby, several strategies for the synthesis of biaryl compounds were developed. A novel unselective oxidative phenolic coupling of orsellinates with ferric chloride was established which furnished all three possible regioisomeric coupling products in overall yields of 70 %. In preparation for further molecular biological work an innovative screening for lipases was developed which bases on the chiroptical method of circular dichroism.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom November 1999 bis Mai 2003 am Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich GmbH, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Wandrey durchgeführt und von Herrn Priv. Doz. Dr. Michael Müller fachlich betreut.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Wamhoff bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Wandrey für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die stete Unterstützung während der gesamten Zeit in Jülich (besonders bei der Bewerbung für den DECHEMA-Studentenpreis, der Beantragung des Promotiosstipendiums des Fonds der Chemischen Industrie und der Unterstützung während des Aufenthalts in den USA) und die Übernahme des Referats.

Mein Dank gilt weiterhin

- Herrn Prof. K.-P. Stahmann und Frau U. Weber (Institut für Biotechnologie 1) für die Hilfestellung bei den mikrobiologischen Arbeiten und den fruchtbaren Gesprächen,
- Frau P. Geilenkirchen für den äußerst engagierten Arbeitseinsatz und die nette Zusammenarbeit,
- Herrn Dipl.-Chem. W. Hüttel für seine erfolgreichen Arbeiten im Rahmen seiner Tätigkeit als studentische Hilfskraft sowie das Korrekturlesen,
- der Schülerpraktikantin R. Graeven sowie dem Auszubildenden zum Chemielaboranten Herrn M. Reimann für die Unterstützung im Labor,
- Frau L. Kraus und Herrn K. Wertz für die freundliche Hilfe bei vielen organisatorischen Dingen,
- all meinen anderen Kollegen aus der Arbeitsgruppe „Bioorganische Chemie“, besonders meinen Bürokollegen Frau S. Bode, Frau L. Walter und Herrn Dipl.-Chem. V. Lorbach für die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre und die unterhaltsamen Pausen,
- Herrn Dr. R. Brückner und Herrn Dipl.-Chem. M. Oldiges für die LC-MS-Messungen,

- Herrn Dr. Martin Nieger (Institut für Anorganische Chemie der Universität Bonn) für die Durchführung der Röntgenstrukturanalyse,
- den Mitarbeitern der Infrastruktur des IBT, besonders Frau M. Heß für ihre stets hilfsbereite und freundliche Unterstützung,
- den Mitarbeitern der analytischen Abteilungen des Kekulé-Institutes für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn,
- Frau Prof. N. Berova, Herrn Prof. K. Nakanishi und Herrn Dr. G. Pescitelli (Columbia University New York) für die Betreuung während meines Forschungsaufenthaltes in den USA,
- der DECHEMA für die Verleihung des DECHEMA-Studentenpreis 2000 im Fachbereich Biotechnologie und den damit verbundenen Reisemitteln, dem Fonds der Chemischen Industrie für das großzügige Promotionsstipendium sowie dem DAAD und dem Verein der Freunde und Förderer der KFA für die Finanzierung des Aufenthaltes in den USA,
- meinen Eltern und Yvonne für die private Unterstützung während der Promotion.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. M. Müller für die interessante Themenstellung und die Freiheiten, die er mir bei der Bearbeitung des Themas gewährte, bedanken. Die intensive und ausgezeichnete Betreuung in allen Phasen der Promotion sowie die Begeisterung für die „Oxidative Phenolkupplung“, die er mir vermittelte, hat maßgeblich zu dem Erfolg der durchgeführten Arbeiten beigetragen.

*Wenn du ein Schiff bauen willst, dann
trommle nicht Männer zusammen, um
Holz zu beschaffen, Aufgaben zu
vergeben und die Arbeit einzuteilen,
sondern lehre die Männer die Sehnsucht
nach dem weiten, endlosen Meer.*

Antoine de Saint-Exupéry

für Yvonne

Lebenslauf

Persönliche Daten

Daniel Drochner

geb. am 16. Dezember 1973 in Bonn

verheiratet mit Yvonne Drochner, keine Kinder

Schule

1980-1982 Grundschule Bonn-Duisdorf

1982-1984 Katholische Grundschule Mondorf

1984-1993 Kopernikus-Gymnasium Niederkassel-Lülsdorf

Wehrdienst

07/1993 – 07/1994 Grundwehrdienst, Heeresführungskommando Koblenz

Studium

10/1994 – 10/1999 Chemiestudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

18.10.1994 Vordiplom

04/1999 – 09/1999 Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie 2 des Forschungszentrums Jülich „Totalsynthese von (R)- und (S)-semi-Vioxanthin“
Betreuer: Prof. Dr. C. Wandrey

29.10.1999 Diplom

Promotion

11/1999 – heute Promotion am Institut für Biotechnologie 2 des Forschungszentrums Jülich „Untersuchungen zur Biosynthese von Biarylnaturstoffen in dem filamentösen Pilz *Penicillium citreo-viride*“
Betreuer: Prof. Dr. C. Wandrey

Niederkassel, den 10.05.2003

Publikationen aus dieser Arbeit

Zeitschriftenbeiträge

D. Drochner, M. Müller, Total Synthesis of (*R*)- and (*S*)-semi-Vioxanthin, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 211-215.

D. Drochner, W. Hüttel, M. Müller, Unselective Phenolic Coupling of Methyl 2-Hydroxy-4-Methoxy-6-Methyl Benzoate – A Valuable Tool for the Total Synthesis of Natural Product Families, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 961-963.

D. Drochner, U. Karl, M. Nieger, M. Müller, W. Steglich, The Chemistry of Dimeric Orsellinates, *Chem. Eur. J.*, Manuskript in Vorbereitung.

Vorträge

D. Drochner, M. Müller, Stereoselektive Oxidative Phenolkupplungen in Filamentösen Pilzen, VCI-Stipendiatentreffen, 06.03.2001.

D. Drochner, M. Müller, Fluorescence Detected Circular Dichroism (FD CD) as a Screening Method in Asymmetric Synthesis and Biosynthesis, 11. Nachwuchswissenschaftler-Symposium „Bioorganische Chemie“, Bonn, 18.-20.09.2002.

D. Drochner, M. Müller, The Biosynthesis of Biaryl Natural Products in Filamentous Fungi – Development of Assay-Systems for Metabolite Detection and High-Throughput-Screening, 4. Kurt-Mothes-Doktoranden-Workshop, Jena, 03.-05.10.2002.

Posterpräsentationen

D. Drochner, M. Müller, Total Synthesis of (*R*)- and (*S*)-semi-Vioxanthin, 6th International Symposium on Progress in Natural Product Chemistry, Nottingham, 11.-13.07.2000.

D. Drochner, M. Müller, Enantiomerically Pure Dimeric Orsellinates: Building Blocks for Atroposelective Syntheses of Naturally Occurring Biaryl Compounds, 12th European Symposium on Organic Chemistry, Groningen, 13.-18.07.2001.

D. Drochner, M. Müller, Aufbau eines Assays-Systems zur Biosyntheseuntersuchung sekundärer Metabolite aus *Penicillium citreo-viride*, GDCh Jahrestagung 2001, Würzburg, 23.-29.09.2001.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Ziel der Arbeit	4
3.	Allgemeiner Teil.....	6
3.1	Die Oxidative Phenolkupplung	6
3.2	Zur Stereochemie von Biarylverbindungen.....	8
3.3	Die Oxidative Phenolkupplung als Biosyntheseweg	10
3.3.1	Pflanzen	10
3.3.2	Pilze.....	16
3.3.3	Bakterien	18
3.3.4	Oxidierende Enzyme	19
3.4	Synthese von Biarylverbindungen	22
3.4.1	Intermolekulare Arylkupplung zu symmetrischen Biarylen	22
3.4.2	Intermolekulare Kreuzkupplung zu unsymmetrischen Biarylen	24
3.4.3	Atropisomerenselektive Arylkupplungen.....	25
4.	Spezieller Teil	32
4.1	Auswahl des Biologischen Systems	32
4.1.1	Schimmelpilze – Eine kurze Einführung	33
4.1.2	<i>Penicillium citreo-viride</i> – Was aus der Literatur bekannt ist	35
4.2	Naturstoffsynthese	40
4.2.1	Synthese von <i>semi</i> -Vioxanthin	40
4.2.2	Synthese dimerer Orsellinsäureester	45
4.2.3	Versuche zur Synthese von Vioxanthin	62
4.2.4	Zusammenfassung	70
4.3	Biologische Arbeiten.....	72
4.3.1	Kultivierung von <i>Penicillium citreo-viride</i>	72
4.3.2	Aufbau eines Analytik-Assays	79
4.3.3	Zusammenfassung	87
4.4	Biosyntheseuntersuchungen	89
4.4.1	Stand der Forschung	89
4.4.2	Synthese von ¹³ C-markiertem <i>semi</i> -Vioxanthin	91
4.4.3	Verimpfungsexperimente.....	92
4.4.4	Zusammenfassung	94

5.	Zusammenfassung und Ausblick	95
5.1	Chemische Synthesen.....	95
5.2	Biologische Arbeiten.....	99
5.3	Biosyntheseuntersuchungen	100
5.4	Circular dichroismus als Screeningverfahren	102
5.4.1	Circular dichroismus – Eine Einführung.....	104
5.4.2	Überprüfung des Prinzips des CD-Screenings	107
5.4.3	Lipasen-katalysierte Acylierung von <i>meso</i> -Cyclohexandiol.....	108
5.4.4	Zusammenfassung	118
5.4.5	Fluoreszenz-detektierter Circular dichroismus	119
6.	Experimenteller Teil	124
6.1	Chemische Synthesen.....	124
6.1.1	Verwendete Geräte und Chemikalien.....	124
6.1.2	Synthese von <i>semi</i> -Vioxanthin	126
6.1.3	Synthese dimerer Orsellinsäureester	139
6.1.4	Synthese von Vioxanthin	150
6.2	Biologische Arbeiten.....	160
6.2.1	Verwendete Organismen und Medien	160
6.2.2	Stammhaltung und Kultivierung.....	160
6.2.3	Medienoptimierung.....	162
6.2.4	Wachstumscharakterisierung	163
6.2.5	Aufbau eines Analytik-Assays	163
6.3	Biosyntheseuntersuchungen	167
6.3.1	Synthese von ¹³ C-markiertem <i>semi</i> -Vioxanthin	167
6.3.2	Verimpfungsexperimente.....	170
6.4	Circular dichroismus als Screeningverfahren	172
6.4.1	Verwendete Geräte und Chemikalien.....	172
6.4.2	Lipasen-katalysierte Acylierung von <i>meso</i> -1,2-Cyclohexandiol.....	172
7.	Röntgenstrukturanalyse	179
8.	Literaturverzeichnis	185

Symbole für verwendete Größen

A	[1]	Absorption
c	[mol L ⁻¹]	Konzentration
de	[%]	Diastereomerenüberschuß
ee	[%]	Enantiomerenüberschuß
g	[1]	Anisotropiefaktor
J	[Hz]	Kopplungskonstante
K	[1]	Gerätekonstante des Spektralphotometers (= 3.49 × 10 ⁻⁵)
l	[cm]	Länge
Mol. CD	[deg cm ² dezimol ⁻¹]	Molekularer Circular dichroismus (= Δε)
S _F	[deg]	beim FD-CD gemessenes Signal
t	[sec, min, h, d]	Zeit
T	[°C]	Temperatur
[α] _λ ^T	[10 deg cm ² g ⁻¹]	Spezifische Drehung bei Temperatur T und Wellenlänge λ
Δε	[deg cm ² dezimol ⁻¹]	Molarer Circular dichroismus (= Mol. CD)
δ	[ppm]	chemische Verschiebung
ε	[cm ² mmol ⁻¹]	molarer Absorptionskoeffizient
λ	[nm]	Wellenlänge

Abkürzungen

+I-Effekt	positiver, induktiver Effekt
+M-Effekt	positiver, mesomerer Effekt
1,2-DME	1,2-Dimethoxyethan
abs	absolutiert
Ac	Acetylgruppe, -rest
ar	aromatisch
ber.	berechnet
BINAL-H	Binaphthol-modifiziertes Aluminiumhydrid
BINAP	2,2'-Bis(diphenylphosphanyl)-1,1'-binaphthyl
Bn	Benzylgruppe, -rest
BOM	Benzyloxymethyl
CD	Circular dichroismus
CIP	Cahn-Ingold-Prelog

DAD	Diodenarraydetektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Elektrophil
EI	Elektronenstoßionisation
Em	Emission
eq	Äquivalente
Et	Ethyl
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
Ex	Anregung (<i>excitation</i>)
FDCD	Fluoreszenz-detektierter Circular dichroismus
FLD	Fluoreszenzdetektor
FT	Fourier-Transformation
GC	Gaschromatographie, -chromatogramm
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie (<i>high resolution mass spectrometry</i>)
<i>i</i> -Bu	<i>iso</i> -Butylgruppe, -rest
IR	Infrarotspektroskopie, -spektrum
Kat	Katalysator
konz.	konzentriert
LBADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>
LC	Flüssigkeitschromatographie
LDA	Lithiumdiisopropylamid
<i>m/z</i>	Masse/Ladung-Verhältnis
M^+	Molekülion
Me	Methylgruppe, -rest
MeOH	Methanol
MOM	Methoxymethyl

MS	Massenspektrometrie, -spektrum
NADPH	1,4-Dihydronicotinamidadenindinucleotidphosphat
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
Nu	Nukleophil
ORD	Optische Rotationsdispersion
<i>p</i>	para
PEM	Piezoelastischer Modulator
PG	Schutzgruppe (<i>protecting group</i>)
Ph	Phenylgruppe, - rest
PIDA	Diacetoxiodphenol (<i>phenyliodine(III) diacetate</i>)
PIFA	Bis(trifluoracetoxy)iodphenol (<i>phenyliodine(III) bis(trifluoroacetate)</i>)
ppm	<i>parts per million</i>
<i>rac</i>	racemisch
rec	rekombinant
rel. Abs.	relative Absorption
R_f	Retentionsfaktor
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
R_t	Retentionszeit
<i>s</i> -BuLi	<i>sek</i> -Butyllithium
Schmelzpkt.	Schmelzpunkt
<i>sp.</i>	Spezies
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylgruppe, -rest
<i>tert</i>	tertiär
<i>t</i> -BuLi	<i>tert</i> -Butyllithium
Tf	Triflatgruppe, -rest
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
UV/Vis	Ultraviolett/ <i>Visible</i> , -spektrum

1 Einleitung

Axial chirale Biarylverbindungen besitzen in der organischen Synthese aufgrund ihrer interessanten Eigenschaften und vielseitigen Einsatzmöglichkeiten eine sehr große Bedeutung.^[1] Prominentester Vertreter dieser Substanzklasse ist das Binaphthol (**1**),* dessen Stereoisomere in enantiomerenreiner Form kommerziell erhältlich sind. Hauptsächlich wird es als chirales Reagenz **2**^[2] oder als chiraler Ligand **3**^[3] in der stereoselektiven Synthese eingesetzt (siehe **Abbildung 1-1**).

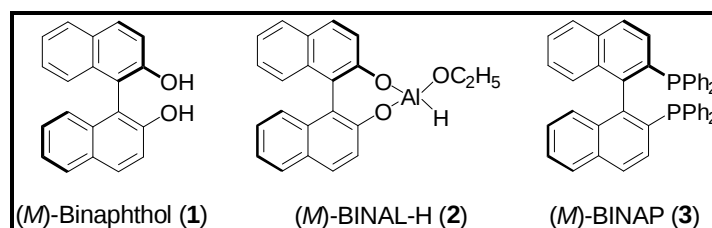


Abbildung 1-1: Binaphthol (**1**) und einige seiner in der organischen Synthese verwendeten Derivate.

Die Bedeutung dieser Verbindungsklasse wird dadurch hervorgehoben, daß die Biaryllachse ein gemeinsames Merkmal einer Vielzahl von strukturell, biosynthetisch sowie pharmakologisch interessanten Naturstoffen aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien ist.^[4] Da überall dort, wo in der Natur Phenole vorkommen, die entsprechenden Dimere entstehen können, existieren Biarylnaturstoffe mit großer struktureller Diversität, die sich von polyketidischen Vorläufern, von aromatischen Aminosäuren bzw. Shikimisäure oder von Terpenen ableiten können. Prinzipiell können diese Naturstoffe wie folgt klassifiziert werden (siehe **Abbildung 1-2**, S. 2):

➤ Biaryle, die aus zwei identischen Molekülhälften bestehen:

Es werden konstitutionell symmetrische und konstitutionell unsymmetrische Biarylverbindungen unterschieden, die durch eine intermolekulare Dimerisierung an identischen bzw. unterschiedlichen Positionen von zwei gleichen monomeren Vorläufersubstanzen entstehen. Typische Vertreter dieser Biarylklasse sind das Gossypol (**4**),^[5] ein Wirkstoff mit antispermato gener Aktivität, das Skyrin (**5**),^[6] ein Pigment aus Ständerpilzen, sowie das Desertorin C (**6**),^[7] ein Mycotoxin aus Schimmelpilzen.

* Zur Bezeichnung der absoluten Konfiguration von Biarylverbindungen siehe S. 8.

➤ Biaryle, die aus zwei unterschiedlichen Molekülhälften bestehen:

Diese Biarylverbindungen entstehen durch eine intermolekulare Dimersierung zweier nicht identischer, monomerer Vorläufersubstanzen. Naphthylisochinolinalkaloide,^[8] wie das Dioncophyllin C (7), sind Biarylnaturstoffe dieser Klasse.

➤ Biaryle, deren Biarylachse durch eine intramolekulare Reaktion aufgebaut wird:

Als prominenter Vertreter dieser Klasse ist das Glycopeptid-Antibiotikum Vancomycin (8) zu nennen.^[9]

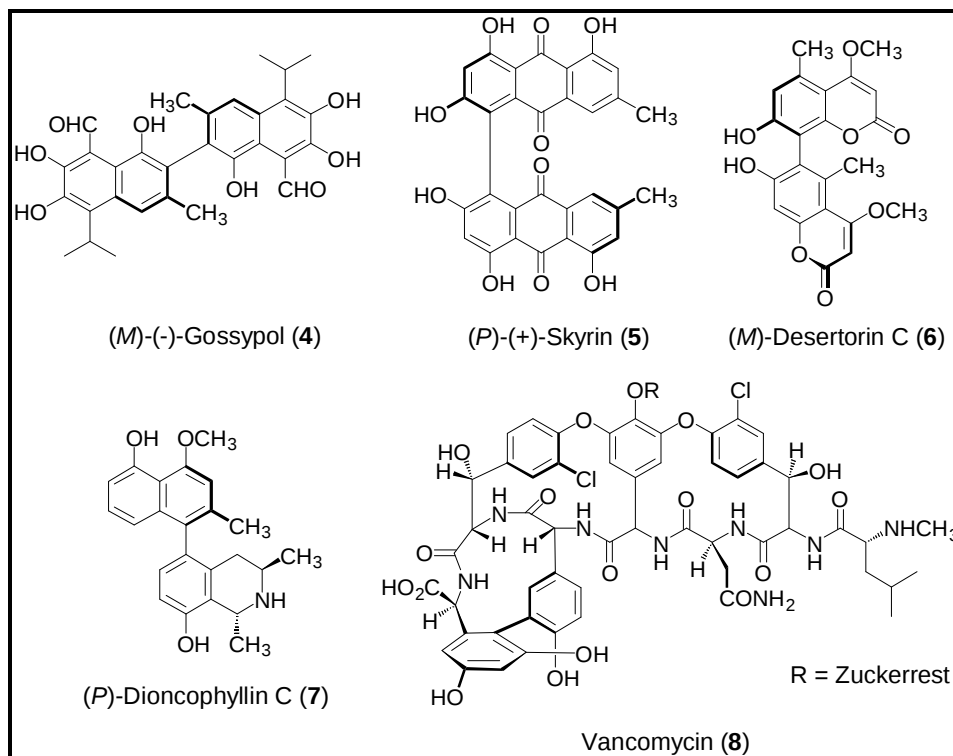
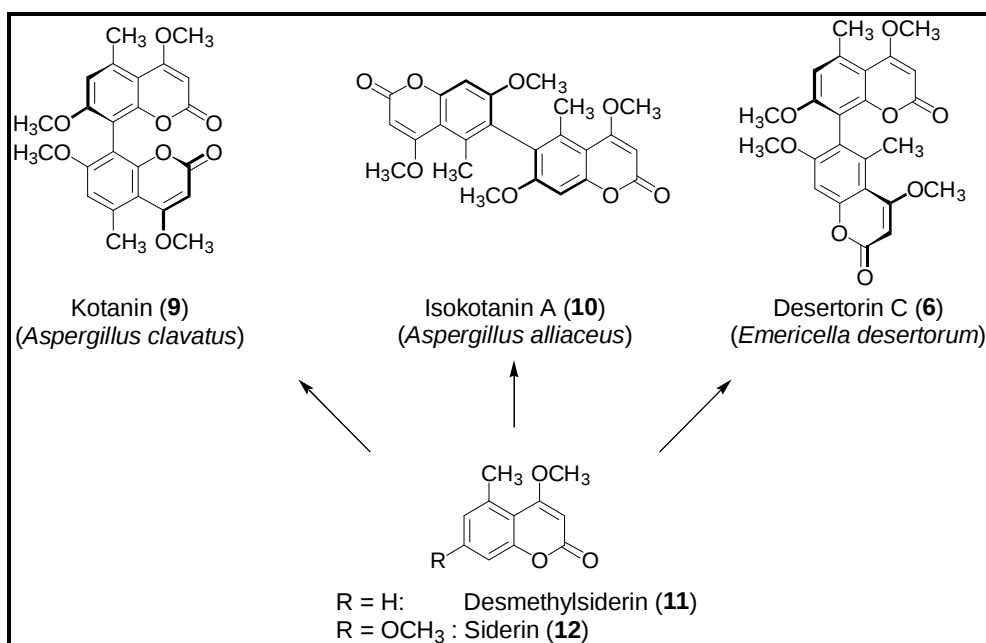


Abbildung 1-2: Ausgewählte, natürlich vorkommende Biarylverbindungen.

Natürlich vorkommende Biarylverbindungen weisen folgende Besonderheiten auf:

- Die Biosynthese erfolgt regio- und stereoselektiv. Daher besitzen Biarylnaturstoffe eine für ihre biologische Herkunft charakteristische Verknüpfung und räumliche Anordnung der Molekülhälften.
- Dadurch, daß in den biogenetischen, monomeren Vorläufern meist mehrere aktivierte Positionen vorhanden sind, existieren in der Natur Familien strukturell eng verwandter Biarylnaturstoffe. Diese Art der Biodiversität wird zum Beispiel bei den Naphthylisochinolinalkaloiden Dioncophyllin A, B und C aus der Pflanze *Triphyophyllum*

peltatum,^[10] bei den dimeren Dihydroanthracenonen Flavomannin (*Penicillium wortmannii*), Atrovirin (*Cortinarius atrovirens*) und Torosaol III (*Cassia torosa*)^[11] sowie bei den dimeren Cumarinen Kotanin (**9**) (*Aspergillus clavatus*), Isokotanin A (**10**) (*Aspergillus alliaceus*) und Desertorin C (**6**) (*Emericella desertorum*) beobachtet (siehe **Schema 1-1**).^[12] Diese dimeren Cumarine kommen nicht nebeneinander in demselben Organismus vor, sondern werden ausgehend von einem Substrat, Desmethylsiderin (**11**),^[13] in einem Schritt regio- und stereoselektiv von dem jeweiligen Pilz dimerisiert.



Schema 1-1: Die Familie der dimeren Cumarine Kotanin (**9**), Isokotanin A (**10**) und Desertorin C (**6**) aus filamentösen Pilzen.

Im Vergleich zu den chemischen Synthesen von Biaryl-naturstoffen, die oft eine Vielzahl von Stufen benötigen, ist die Natur in der Lage, diese Verbindungen ausgehend von einem Substrat, in einem Schritt regio- und stereoselektiv zu synthetisieren. Deswegen ist es für den organischen Chemiker besonders interessant, die Ursache dieser Selektivität bei der biologischen Bildung von Biaryl-lachsen zu untersuchen und diese Methoden auf die chemische Synthese zu übertragen.

2 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, in einem neuartigen, interdisziplinären Ansatz organisch-chemische, analytische und mikrobiologische Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen, die Biosynthese von Biaryl-naturstoffen zu untersuchen. Bei der Bearbeitung dieser Thematik ist eine systematische Planung der Vorgehensweise von großer Bedeutung:

- Auswahl und Kultur eines geeigneten biologischen Systems als Modellorganismus zur Durchführung der Biosyntheseuntersuchungen in Zusammenarbeit mit Mikrobiologen.
- Chemische Synthese der von dem ausgewählten Organismus produzierten Biaryl-naturstoffe und monomeren Vorläufern. Da der gezielte Aufbau der Biarylachse der entscheidende Schritt in der Synthese der Dimeren ist, soll eine vergleichende Untersuchung von verschiedenen Methoden zur Darstellung von Biarylen durchgeführt werden.
- Für die Biosyntheseuntersuchungen ist es notwendig einen Analytik-Assay zu etablieren, der die systematische Analyse der Metabolitzusammensetzung während der Kultur ermöglicht. Weiterhin sollen die Grundlagen für ein Screening-Verfahren erarbeitet werden, welches die Analyse eines hohen Probenaufkommens erlaubt. Dies würde dann weitergehende Biosyntheseuntersuchungen auf genetischer Ebene ermöglichen.
- Der Beweis der selektiven Dimerisierung soll durch Verfütterung des ^{13}C -markierten, potentiellen monomeren Vorläufers an den Modellorganismus und Nachweis der Markierung in dem vom biologischen System produzierten Biaryl-naturstoff erbracht werden.

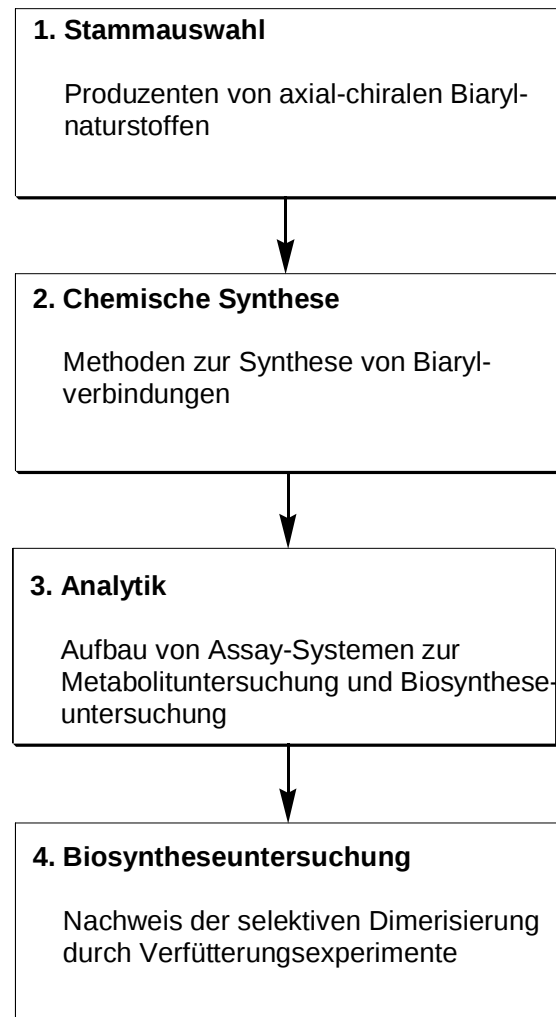


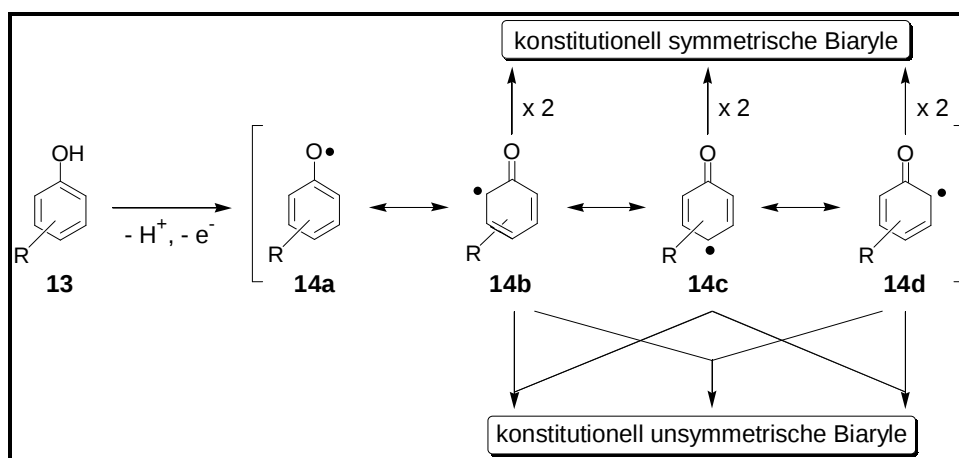
Abbildung 2-1: Die Untersuchung der Biosynthese von Biarylnaturstoffen soll in vier Arbeitsschritten erfolgen.

3 Allgemeiner Teil

3.1 Die oxidative Phenolkupplung

Wie in der Einleitung (siehe S. 1) erwähnt, können Biarylverbindungen in der Natur immer dort auftreten, wo die entsprechenden monomeren Phenole vorkommen. Die Ursache dafür liegt in der Neigung von Phenolen, durch Deprotonierung des phenolischen Protons und Ein-Elektronen-Oxidation sogenannte oxidative Phenolkupplungen einzugehen.

Mechanistisch betrachtet, wird unter dem Begriff „oxidative Phenolkupplung“ eine inter- oder intramolekulare Dimerisierung von zwei Aryleinheiten verstanden (siehe **Schema 3-1**). Die dabei intermediär auftretenden Radikale sind durch Delokalisation des ungepaarten Elektrons stabilisiert. Dieses kann sich am Sauerstoffatom (Verbindung **14a**), am Kohlenstoffatom in *para*-Position (Verbindung **14c**) oder an den beiden Kohlenstoffatomen in *ortho*-Position zum Sauerstoff (Verbindungen **14b** und **14d**) befinden. Durch Selbstkupplung identischer Radikale entstehen konstitutionell symmetrische und durch Kreuzkupplung unterschiedlicher Radikale entstehen konstitutionell unsymmetrische Biarylverbindungen. Intermediär treten zunächst Cyclohexadienone auf, die sich in die entsprechenden aromatischen Verbindungen umlagern. Die Kupplung von Sauerstoffradikalen spielt eine untergeordnete Rolle, da die höchsten Spindichten an den C-Atomen gefunden werden.^[14] Dies spiegelt sich in den typischen Substitutionsmustern der Biarylnaturstoffe wieder, da sie üblicherweise Sauerstofffunktionen in *ortho*- und/oder in *para*-Stellung zur Biarylachse besitzen (siehe Beispiele in **Abbildung 1-2**, S. 2).



Schema 3-1: Mechanismus der oxidativen Phenolkupplung über mesomeriestabilisierte Phenoxy-Radikale.

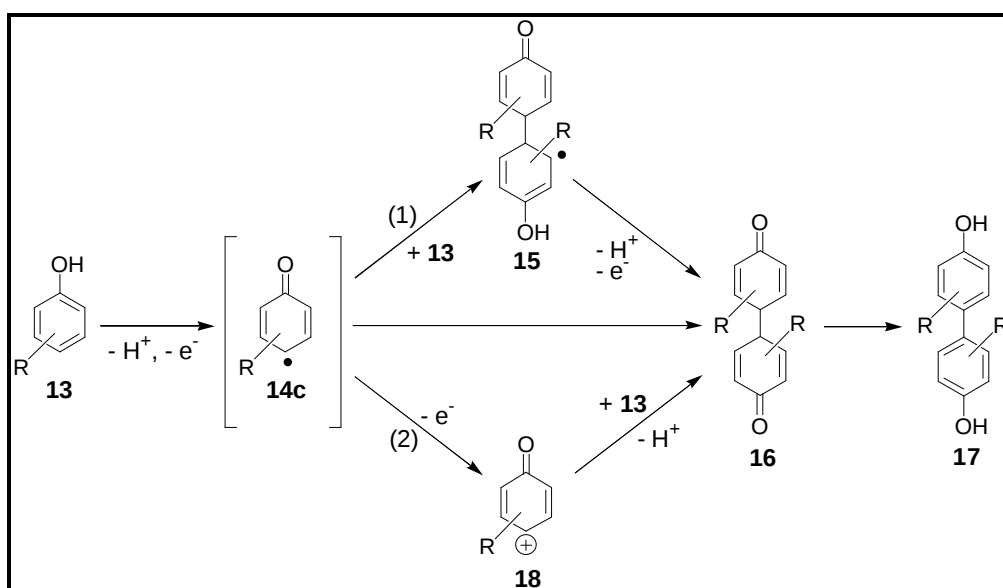
Neben dieser direkten Kupplung zweier Phenoxy-Radikale werden noch zwei weitere Mechanismen diskutiert, die ausgehend von Phenol **13** über radikalische Zwischenstufen zu den korrespondierenden Biarylverbindungen führen (siehe **Schema 3-2**).^[15]

➤ Homolytische aromatische Substitution (1):

Zunächst wird durch Abstraktion eines Protons und eines Elektrons das Phenoxy-Radikal **14** erzeugt, welches durch Reaktion mit dem Phenol **13** ein dimeres Radikal **15** bildet. Dies kann durch Deprotonierung und Ein-Elektronen-Oxidation das Cyclohexadienon **16** bilden und anschließend zu **17** rearomatisieren.

➤ Heterolytische Kupplung mit vorgelagerter, zweifacher Ein-Elektronen-Oxidation (2):

Das Phenoxy-Radikal **14** wird durch eine weitere Ein-Elektronen-Oxidation in das Phenoxy-Kation **18** überführt, welches anschließend mit Phenol **13** zum Cyclohexadienon **16** reagiert.



Schema 3-2: Mechanismen der radikalischen, oxidativen Phenolkupplung;^[15] Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden nur die möglichen Reaktionswege des *para*-Radikals **14c** beschrieben.

3.2 Zur Stereochemie von Biarylverbindungen

Biarylverbindungen (z. B. **19** in **Abbildung 3-1**) können axiale Chiralität aufweisen, wenn die Rotation um die Einfachbindung zwischen den beiden sp^2 -Atomen eingeschränkt ist. Diese Drehung ist von der Anzahl und dem sterischen Anspruch der Substituenten in *ortho*-Position zur Biarylachse abhängig. Üblicherweise ist bei der Anwesenheit von weniger als zwei Substituenten die Rotation bei Raumtemperatur nicht eingeschränkt, während sie beim Vorhandensein von vier Substituenten völlig blockiert ist. Die planare Konformation, bei der sich beide Ringe in einer Ebene befinden, stellt ein Energiemaximum dar. Das System weicht dieser energetisch ungünstigen Anordnung dadurch aus, daß ein Ring aus der Ebene herausgedreht wird. Dies kann in zwei unterschiedlichen Richtungen erfolgen (siehe **Abbildung 3-1**). Wenn diese beiden Konformationen stabil genug sind und wenn weiterhin gilt $U \neq V$ und $X \neq Y$, können zwei Enantiomere, **19a** und **19b** unterschieden werden, die als Atropisomere bezeichnet werden.^[16]

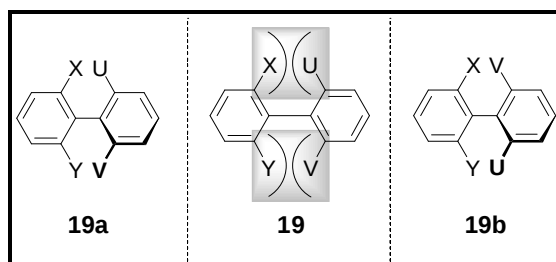


Abbildung 3-1: Eingeschränkte Rotation um die Achse von Biarylverbindungen.

Die Bezeichnung der absoluten Konfiguration von Atropisomeren erfolgt nach der empfohlenen (*P*)/(*M*)-Nomenklatur.^[17] Dies soll am Beispiel der beiden Enantiomere von Dinitrodiphensäure (**20**)^[18] erläutert werden (siehe **Abbildung 3-2**).

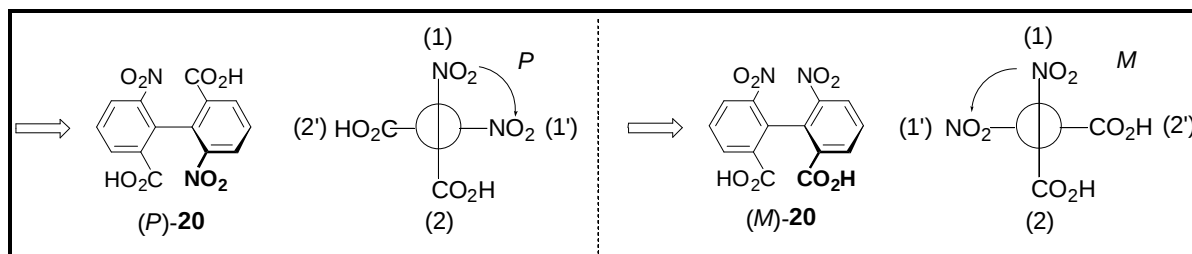


Abbildung 3-2: Erklärung der (*P*)/(*M*)-Nomenklatur für Biaryle am Beispiel der Dinitrodiphensäure (**20**). (1) und (1') kennzeichnen Substituenten mit höherer Priorität nach der CIP-Regel als Substituenten mit der Kennzeichnung (2) und (2').

Zunächst werden auf beiden Seiten der Achse die Substituenten mit der höchsten Priorität nach der Cahn-Ingold-Prelog-Regel bestimmt [(1) und (1')] für die beiden Nitrogruppen der Dinitrodiphensäure (**20**)]. Anschließend wird die Keilstrichformel in die *Newman*-Projektion überführt. Wenn eine 90°-Kurve im Uhrzeigersinn beschriftet werden muß, um auf dem kürzesten Weg vom nahegelegenen Substituenten (1) zum entfernten Substituenten (1') zu gelangen, wird die absolute Konfiguration als (*P*) (für *Plus*) bezeichnet. Muß die 90°-Kurve gegen den Uhrzeigersinn beschriftet werden, wird die absolute Konfiguration als (*M*) (für *Minus*) bezeichnet.^[17a]

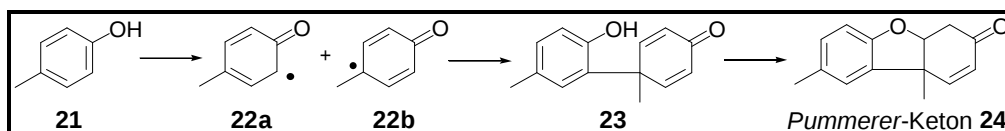
Alternativ können auch die Deskriptoren (*aR*) und (*aS*) (*a* für axial) verwendet werden. Dazu wird ein Weg von (1) über (2) und (1') zu (2') beschriftet. Im Falle einer Drehung dieser Kurve im Uhrzeigersinn wird (*aR*) verwendet, und im Falle einer Drehung gegen den Uhrzeigersinn (*aS*).

Die beiden Nomenklaturen korrelieren über die Beziehung (*aS*) = (*P*) und (*aR*) = (*M*) miteinander.^[17a]

3.3 Die Oxidative Phenolkupplung als Biosyntheseweg

Die oxidative Phenolkupplung als Biosyntheseweg, der über radikalische Zwischenstufen verläuft, wird schon seit langer Zeit untersucht. Ziel der Untersuchungen war es vor allem, die in der Natur vorkommende Selektivität zu verstehen und auf enzymatischer Ebene nachzuvollziehen.

Vor fast 80 Jahren beobachteten *Pummerer et al.*, daß die Oxidation von *p*-Kresol (**21**) zum sogenannten *Pummerer*-Keton **24** über eine *ortho-para*-Kupplung zweier phenolischer Radikale, **22a** und **22b**, verläuft (siehe **Schema 3-3**).^[19]



Schema 3-3: Oxidative Phenolkupplung von *para*-Kresol (**21**) zum sogenannten *Pummerer*-Keton **24**.

Diese Arbeiten dienten *Barton* und *Cohen*^[20] als Grundlage, um die Struktur einer Vielzahl phenol-gekuppelter Naturstoffe auf diesen Radikalmechanismus zurückzuführen. Es wurde postuliert, daß der Schlüsselschritt in der Morphin-Biosynthese, die Bildung von Salutaridin (**26**), über phenolische Radikale verläuft (siehe **Schema 3-4**, S. 11). So wurde von *Barton* das Reticulin (**25**), welches zur damaligen Zeit nicht als Naturstoff bekannt war, als logischer Vorläufer in der Biosynthese von Benzylisochinolinalkaloiden identifiziert. Für eine Reihe von Sekundärmetaboliten aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien^[21] ist mittlerweile der Nachweis einer Biosynthese über eine oxidative Phenolkupplung erbracht worden. Dabei müssen intramolekulare Prozesse, bei denen eine bestimmte räumliche Orientierung im Molekül vorgegeben ist, von intermolekularen Prozessen, bei denen durch den Kupplungsschritt Chiralität erzeugt wird, unterschieden werden.

3.3.1 Pflanzen

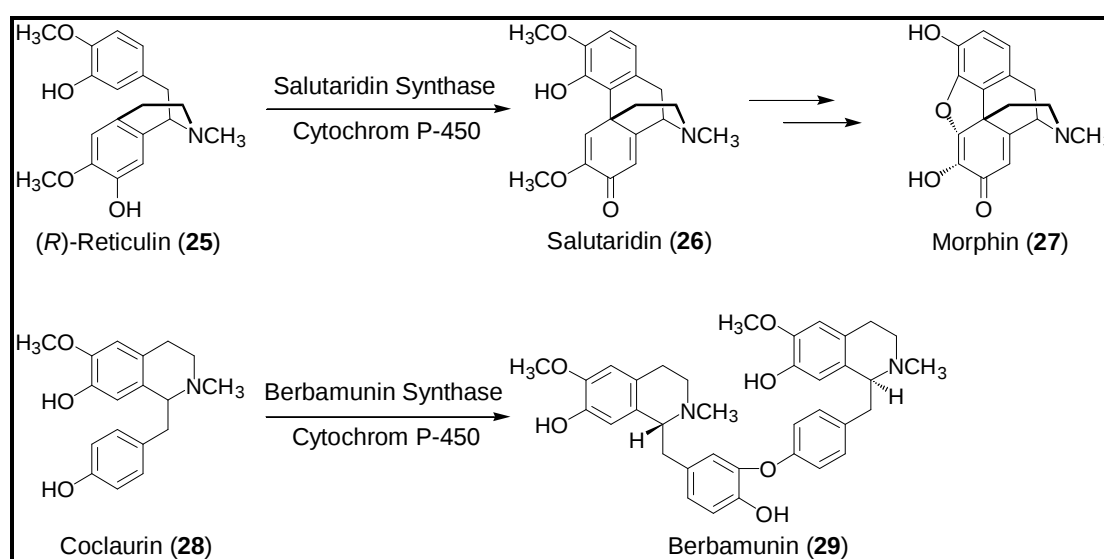
In Pflanzen ist die oxidative Phenolkupplung sehr gut untersucht. So konnte dieser Biosyntheseweg für diverse Alkaloide, für Lignine und Lignane sowie für Ellagitannine identifiziert werden.

Alkaloide

Für den Schlüsselschritt in der Biosynthese von verschiedenen Alkaloiden ist eine durch hochspezifische, membranständige Cytochrom P-450 Enzyme katalysierte oxidative Phenolkupplung verantwortlich. Diese Enzyme sind NADPH- und O₂-abhängig und zeigen eine strikte Substratspezifität.

Benzylisochinolinalkaloide:

Aus *Papaver somniferum* wurde eine Salutaridin Synthase isoliert, welche (*R*)-Reticulin (**25**) durch eine intramolekulare, in *ortho*- und *para*-Position stattfindende C-C-Kupplung in Salutaridin (**26**) überführt (siehe **Schema 3-4**).^[22] Eine Berbamin Synthase aus *Berberis stolonifera* katalysiert die intermolekulare C-O-Kupplung von zwei Coclaurin-Molekülen (**28**) zu Berbamin (**29**) (siehe **Schema 3-4**).^[23] Letzteres ist das erste Beispiel einer enzymatischen, intermolekularen, stereoselektiven jedoch nicht enantioselektiven oxidativen Phenolkupplung.

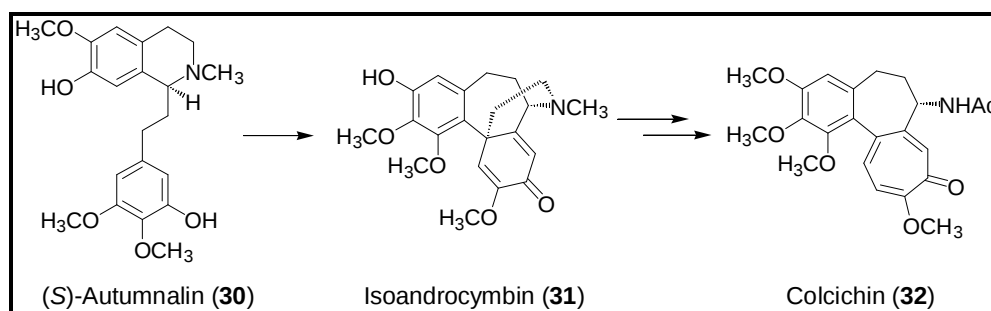


Schema 3-4: Biosynthese der Benzylisochinolinalkaloide Salutaridin (**26**) und Berbamin (**29**) durch eine von Cytochrom P-450 Enzymen katalysierte oxidative Phenolkupplung.^[22,23]

Tropolonalkaloide:

Der Schlüsselschritt in der Biosynthese des Tropolonalkaloids Colchicin (**32**) ist die intramolekulare oxidative Phenolkupplung von (*S*)-Autumnalin (**30**) zu Isoandrocymin (**31**). Dafür ist wie im Falle der oben erwähnten Benzylisochinolinalkaloide (siehe **Schema 3-4**) ein

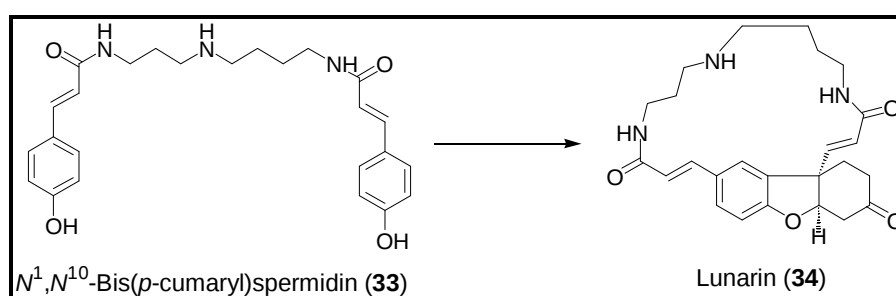
hochspezifisches Cytochrom P-450 Enzym verantwortlich. Im Gegensatz zur *ortho-para*-Kupplung von Reticulin (**25**) findet hier eine *para-para*-Kupplung statt (siehe **Schema 3-5**). Dies konnte durch Verfütterungsexperimente von radioaktiv markiertem Autumnalin nachgewiesen werden.^[24]



Schema 3-5: Die Biosynthese des Tropolonalkaloids Colcichin (**32**) verläuft über eine intramolekulare oxidative Phenolkupplung von (S)-Autumnalin (**30**).^[24]

Spermidinalkaloide:

Die Biosynthese von Spermidinalkaloiden verläuft ebenfalls über eine intramolekulare oxidative Phenolkupplung, die von Cytochrom P-450 Enzymen katalysiert wird. Dies konnte am Beispiel von Lunarlin (**34**) nachgewiesen werden.^[25] **34** weist eine große Ähnlichkeit mit dem *Pummerer*-Keton **24** auf und leitet sich von der oxidativen Phenolkupplung von N^1, N^{10} -Bis(*p*-cumaryl)spermidin (**33**) in *ortho*- und *para*-Position der aromatischen Reste ab (siehe **Schema 3-6**).

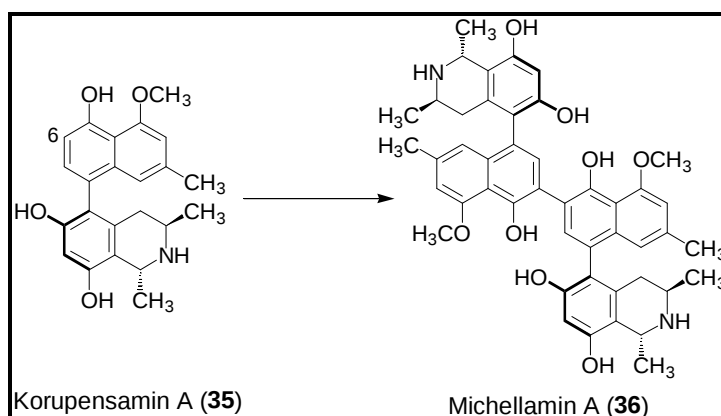


Schema 3-6: Biosynthese des Spermidinalkaloids Lunarlin (**34**) über eine intramolekulare oxidative Phenolkupplung.^[25]

Dimere Naphthylisochinolinalkaloide:

Bringmann et al. konnten nachweisen, daß die intermolekulare Dimerisierung von Korupensaminen zu Michellaminen aus *Ancistrocladus sp.* und *Triphyophyllum peltatum* durch

lösliche Peroxidasen katalysiert wird, die in Zellrohextrakten der jeweilige Pflanze gefunden wurden (siehe **Schema 3-7**).^[26] Im Gegensatz zu den Cytochrom P-450 Enzymen sind diese NADPH-unabhängig, weisen aber ebenfalls eine sehr hohe Substratspezifität auf. Weiterhin sind diese Enzyme hoch regioselektiv, so daß die Dimerisierung immer zu einer Verknüpfung an C-6 und C-6' der eingesetzten Substrate führt.

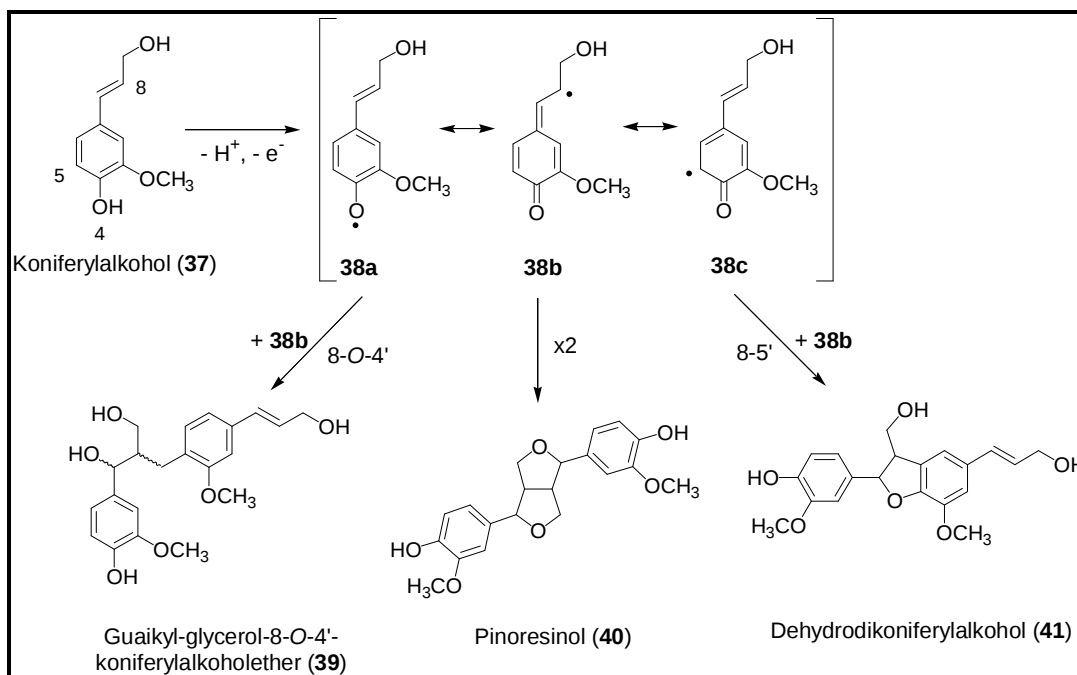


Schema 3-7: Die intermolekulare, oxidative Phenolkupplung von Korupensamin A (35) zu Michellamin A (36) mit aus *Ancistrocladus* sp. und *Triphyophyllum peltatum* isolierten Enzymen verläuft mit strikter Substratspezifität und Regioselektivität.^[26]

Lignane^[27]

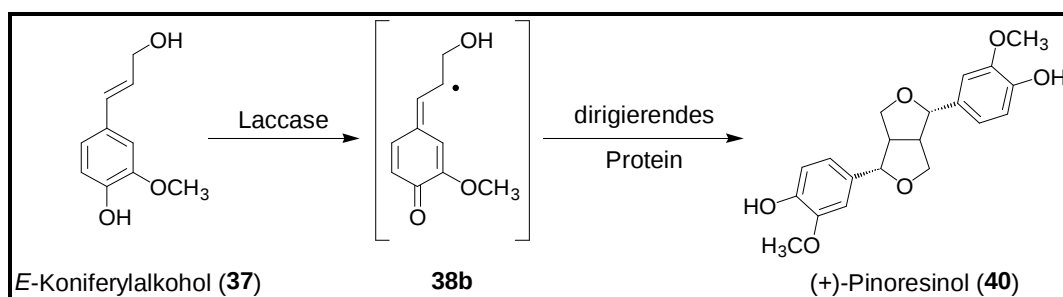
Lignane sind pflanzliche, dimere Phenylpropanoide, die durch Dimerisierung von Monolignolen, wie zum Beispiel Koniferylalkohol (37), entstehen.^[28] Weiterhin sind Lignane Zwischenprodukte in der Biosynthese von Lignin.^[29]

In ersten Untersuchungen bezüglich der Biosynthese von Lignanzen wurde von *Freudenberg* eine zufällige Radikalkupplung der Monomere postuliert, bei der zunächst enzymatisch eine Ein-Elektronen-Oxidation und anschließend eine Kupplung der radikalischen Zwischenstufen an unterschiedlichen Positionen stattfindet (siehe **Schema 3-8**, S. 14), die zu racemischen Produkten führt.^[30] Diese zufällige Radikalkupplung kann das Vorkommen von nicht-racemischen Lignanzen^[31] in Pflanzen nicht erklären.



Schema 3-8: Die zufällige Radikalkupplung von Koniferylalkohol (37) nach *Freudenberg* führt zu racemischen Lignan und steht im Widerspruch zu der in Pflanzen beobachteten optischen Aktivität von Lignan.^[30]

Lewis und Mitarbeiter untersuchten daher die Kontrolle der Selektivität bei der Dimerisierung von Monolignolen.^[27a,32] Dazu wurden aus einem Zellrohextrakt von *Forsythia* sp., welche Produzenten von großen Mengen (+)-Pinoresinol (40) sind, zwei Enzyme isoliert, die für die stereoselektive, oxidative Phenolkupplung von *E*-Koniferylalkohol (37) zu (+)-Pinoresinol (40) verantwortlich sind: Zum einen eine Laccase, die das Substrat oxidiert, und zum anderen ein dirigierendes Protein,^[32b-d] welches die Selektivität der Radikalkupplung kontrolliert (siehe **Schema 3-9**).



Schema 3-9: Die selektive Lignanbildung in *Forsythia* sp. ist ein Zwei-Enzym-Prozeß, bei dem ein dirigierendes Protein für die Kontrolle der Selektivität verantwortlich ist.^[27a,32]

Für die mögliche Wirkungsweise werden verschiedene Mechanismen diskutiert.^[32b]

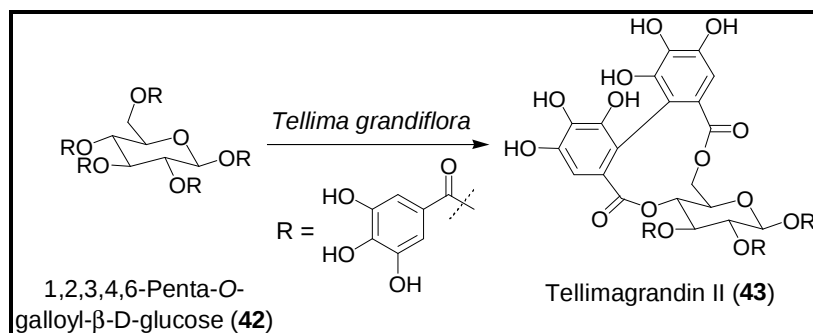
- Zunächst wird das Substrat durch eine nicht-spezifische Oxidase oder ein Oxidationsmittel oxidiert. Anschließend binden diese freien Radikale in einer bestimmten Orientierung zueinander an das dirigierende Protein. Dieser Mechanismus wird durch die experimentellen Daten gestützt. Danach sind die Geschwindigkeiten für den Substratabbau und die Produktbildung unabhängig von der Anwesenheit des dirigierenden Proteins.
- Zwei Substratmoleküle binden zunächst in einer bestimmten Orientierung an das dirigierende Protein und werden anschließend oxidiert. Dieser Mechanismus ist aber nur dann denkbar, wenn die Phenolgruppen so von dem dirigierenden Protein herausragen, daß sie leicht oxidiert werden können, und wenn ein Elektronenakzeptor am dirigierenden Protein existiert.

Dirigierende Proteine wurden mittlerweile auch in anderen Pflanzen (*Blechnum spicant*, *Linum flavum* und *Podophyllum peltatum*) identifiziert, die nicht-racemische Lignane produzieren.^[33]

Dirigierende Proteine scheinen eine in der Natur einzigartige Funktion zu besitzen, da sie keine Sequenzhomologien zu anderen Proteinen mit bekannter Funktion zeigen. Außerhalb des Pflanzenreiches gibt es keine Sequenzen, die Homologien zu der Sequenz des dirigierenden Proteins besitzen.^[27a] Deswegen ist zu vermuten, daß die selektive, intermolekulare, oxidative Phenolkupplung in Pilzen und Bakterien (siehe S. 16) über andere Mechanismen verlaufen könnte.

Ellagitannine

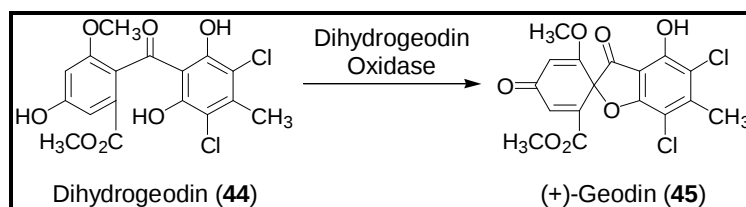
Ellagitannine sind eine weitverbreitete Klasse pflanzlicher Naturstoffe. Sie zeichnen sich strukturell durch die Anwesenheit mindestens eines axial-chiralen Hexahydroxydiphenoylrestes aus, der über eine Esterfunktion an eine Glucopyranose gebunden ist.^[34] Niemetz *et al.* konnten nachweisen, daß die Biosynthese von Ellagitanninen von 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose (**42**) ausgeht.^[35] Dazu isolierten sie ein Enzym aus der Pflanze *Tellima grandiflora*, welches die Umsetzung von **42** zu Tellimagrandin II (**43**) katalysiert (siehe **Schema 3-10**, S. 16).



Schema 3-10: Biosynthese von Ellagitanninen in der Pflanze *Tellima grandiflora*.

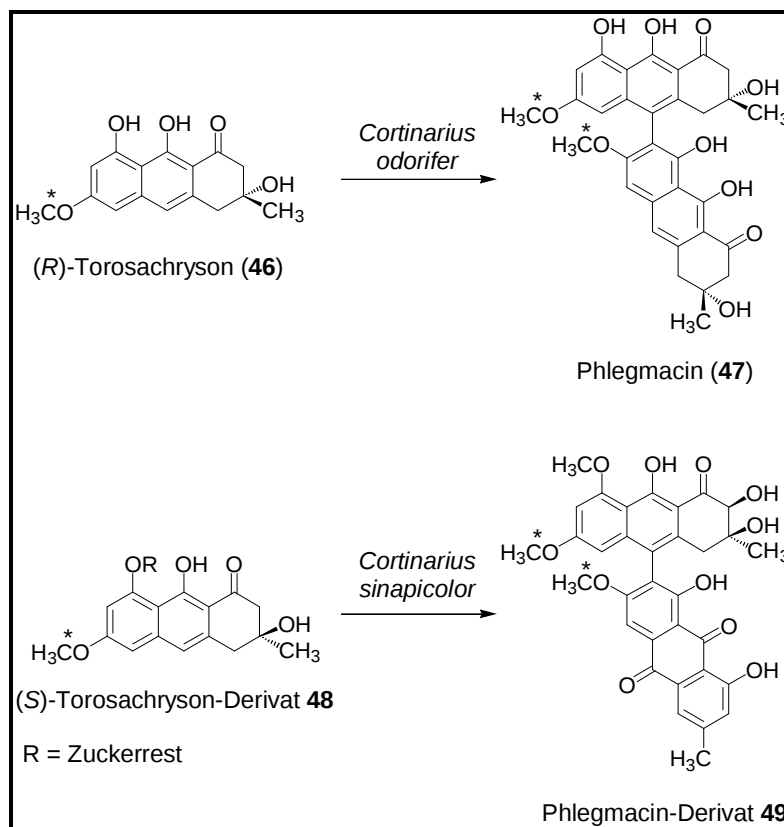
3.3.2 Pilze

In Pilzen ist die stereoselektive oxidative Phenolkupplung noch nicht so gut untersucht, wie es für Pflanzen der Fall ist. Es gibt bislang nur ein Beispiel, in dem die Biosynthese eines phenol-gekuppelten Metaboliten auf enzymatischer bzw. genetischer Ebene untersucht wurde. *Sankawa et al.* berichten über die Isolierung und Reinigung einer Kupfer-enthaltenden Oxidase (Dihydrogeodin Oxidase) aus *Aspergillus terreus*, die die regio- und stereospezifische, intramolekulare, oxidative Phenolkupplung von Dihydrogeodin (**44**) zu (+)-Geodin (**45**) katalysiert (siehe **Schema 3-11**).^[36] Dieses Enzym weist Ähnlichkeiten zu Laccasen auf, und es konnte in aktiver Form in *Aspergillus nidulans* heterolog exprimiert werden.^[37]



Schema 3-11: Regio- und stereospezifische, intramolekulare oxidative Phenolkupplung von Dihydrogeodin (**44**) zu (+)-Geodin (**45**) in *Aspergillus terreus*.^[36,37]

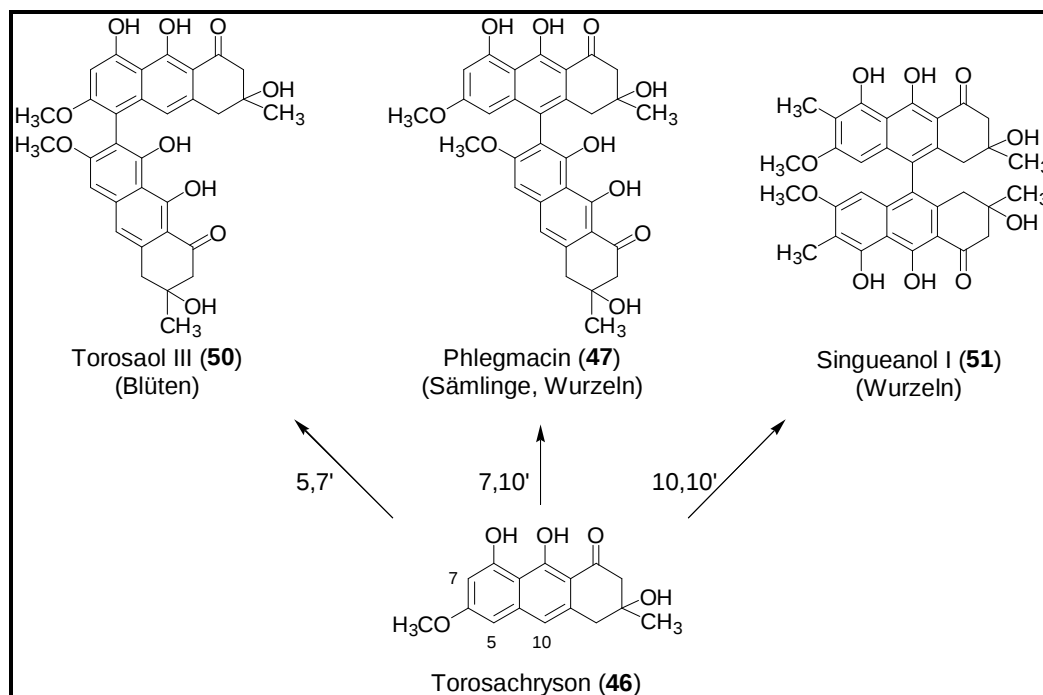
Die Arbeitsgruppen von *Steglich*^[38] und *Gill*^[11c] konnten durch Verimpfungsexperimente mit ¹³C-markierten Substanzen unabhängig voneinander nachweisen, daß die Biosynthese von dimeren Präanthrachinonen in Blätterpilzen der Gattung *Cortinarius* über eine selektive Dimerisierung der entsprechenden monomeren Vorläufermoleküle verläuft. So wird in *Cortinarius odorifer* (R)-Torosachryson (**46**) zu Phlegmacin (**47**) dimerisiert,^[38] und in *Cortinarius sinapicolor* wird das (S)-Torosachryson-Derivat **48** zu **49** umgesetzt (siehe **Schema 3-12**, S. 17).^[11c]



Schema 3-12: Selektive Dimerisierung von monomeren Präanthrachinonen in Blätterpilzen der Gattung *Cortinarius*.^[38,11c]

Dimere Dihydroanthracenone wie das Phlegmacin (47) kommen auch in Pflanzen als Sekundärmetabolite vor.^[11a,39] In *Cassia torosa* finden sich in den verschiedenen Organen Biaryl-naturstoffe, die sich von derselben monomeren Vorläufersubstanz ableiten, aber eine unterschiedliche regiochemische Verknüpfung der Vorläufer aufweisen. So tritt in den Sämlingen und Wurzeln das Phlegmacin (47) (7,10'-Verknüpfung), in den Blüten das Torosaol III^[40] (50) (5,7'-Verknüpfung) und ebenfalls in den Wurzeln das Singueanol I^[41] (51) (10,10'-Verknüpfung) auf (siehe **Schema 3-13**, S. 18).

Daraus ergeben sich zwei interessante Fragestellungen: (1) Da die Sequenz der für die dirigierenden Proteine codierenden Gene keine Homologien zu Sequenzen pilzlicher Systeme aufweist (siehe S. 13), könnte die Evolution zur enantioselektiven oxidativen Phenolkupplung in Pflanzen und Pilzen unterschiedlich verlaufen sein. Trotzdem finden sich Biaryl-naturstoffe, die in Pflanzen und Pilzen gleichermaßen auftreten. (2) Die Biosynthese der oben vorgestellten Biaryl-naturstoffe in der Pflanze *Cassia torosa* ist organabhängig. Sind dafür gleiche Mechanismen mit unterschiedlicher Spezifität oder grundsätzlich unterschiedliche Mechanismen verantwortlich?



Schema 3-13: Organabhängige Biosynthese der dimeren Präanthrachinone Torosaol III^[40] (50), Phlegmacin^[39] (47) und Singueanol I^[41] (51) in der Pflanze *Cassia torosa*.

3.3.3 Bakterien

Auch in Bakterien werden axial-chirale, phenol-gekuppelte Sekundärmetabolite gefunden. Unklar war bislang, ob diese durch eine regio- und stereoselektive oxidative Phenolkupplung biosynthetisiert werden. Am Beispiel des Glycopeptidantibiotikums Vancomycin (8)^[9] (siehe **Abbildung 1-2**, S. 2), welches von *Amycolaptosis orientalis* produziert wird und zwei Biaryletherbrücken sowie eine Biaryleinheit besitzt, konnte nachgewiesen werden, daß die Biosynthese dieser Strukturmerkmale über einen radikalischen Mechanismus verläuft (siehe **Abbildung 3-3**).^[21] Dafür sind Hämprotein-Gene verantwortlich, die für Cytochrom P-450 homologe Enzyme codieren.

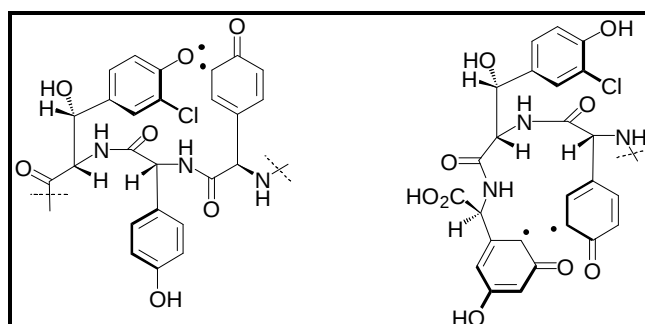


Abbildung 3-3: Bildung der Biarylethereinheit (links) und der Biaryleinheit (rechts) von Vancomycin (8) in *Amycolaptosis orientalis*.^[21]

Das Auftreten der beiden dimeren, phenolischen Metabolite Actinorhodin (**52**) aus *Streptomyces coelicolor*^[42,43] und Julichrom Q_{6,6} (**53**) aus *S. shiodaensis*^[44] (siehe **Abbildung 3-4**) legt den Verdacht nahe, daß diese Verbindungen über eine selektive oxidative Phenolkupplung biosynthetisiert werden. Untersuchungen dazu stehen noch aus.

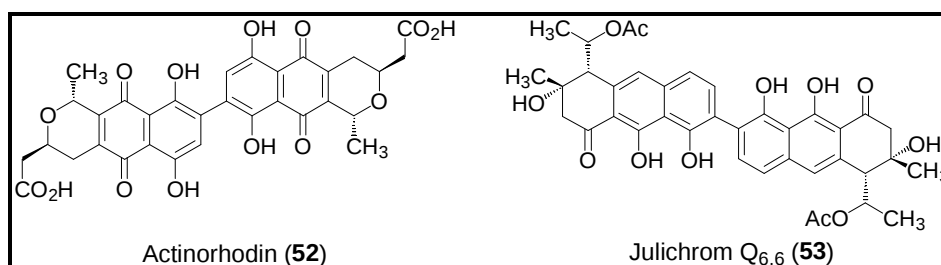


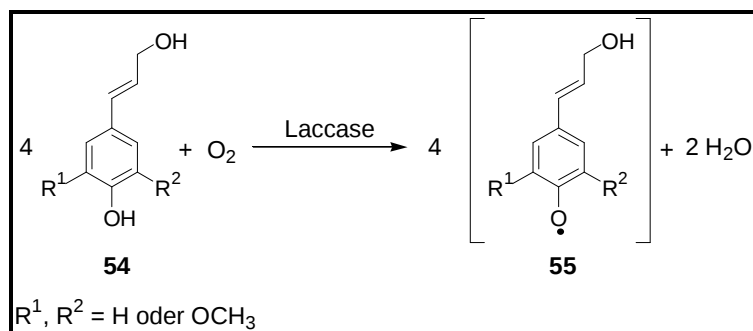
Abbildung 3-4: Phenol-gekuppelte Sekundärmetabolite aus Bakterien der Gattung *Streptomyces*.

3.3.4 Oxidierende Enzyme

Enzyme, die bei Phenolkupplungen für die Ein-Elektronen-Oxidation verantwortlich sind, besitzen als aktives Zentrum ein Metallatom, und sie benötigen ein Cosubstrat für die Redoxreaktion. So können zum Beispiel Kupfer-enthaltende Oxidasen, wie Laccasen, von Eisen-enthaltenden Oxidasen, wie Peroxidasen oder Cytochrome P-450 Enzyme, unterschieden werden.

Laccasen

Laccasen gehören zur Gruppe der „*multicopper enzymes*“ und sind in der Lage Chinol unter gleichzeitiger Aufnahme von Sauerstoff zu oxidieren.^[45] Obwohl der Katalysezyklus intensiv untersucht wurde, gibt es bis heute keine genaue Kenntnis über den Mechanismus des Elektronentransfers. Gesichert ist, daß Laccasen vier Kupfer-Zentren besitzen, die in den Katalysezyklus involviert sind.^[46] **Schema 3-14** auf Seite 20 zeigt den Katalysezyklus der Reaktion eines Monolignols **54** mit einer Laccase. Hier gehen vier aufeinanderfolgende Ein-Elektronen-Oxidationen mit einer gleichzeitigen Reduktion von Sauerstoff zu Wasser einher.^[27b]

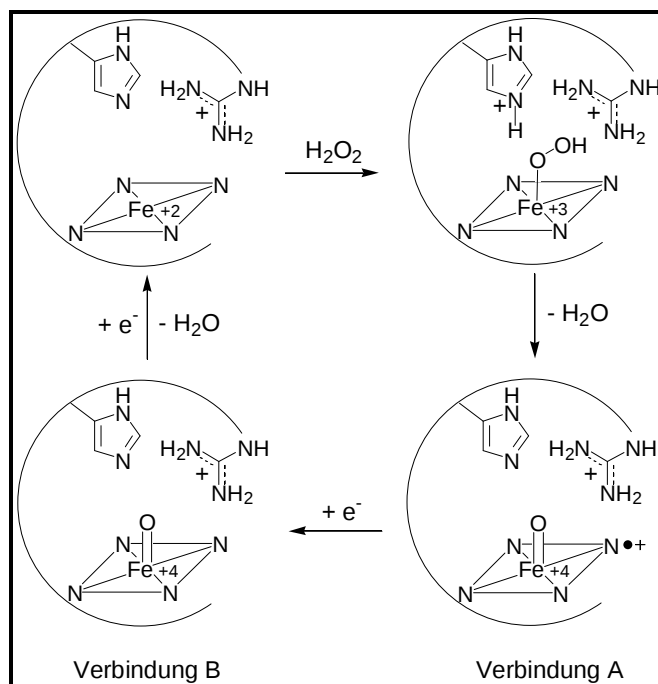


Schema 3-14: Ein-Elektronen-Oxidation eines Monolignols **54** durch eine Laccase.^[27b]

Peroxidasen

Die Peroxidasen sind eine weitverbreitete Gruppe von Eisen-enthaltenden Glycoproteinen, die ein Häm als prosthetische Gruppe besitzen und Wasserstoffperoxid als Cosubstrat verwenden. Die Peroxidasensuperfamilie kann in drei Klassen unterteilt werden.^[47] Klasse I-Peroxidasen sind intrazelluläre Proteine, wie z. B. Cytochrom c-Peroxidase aus Hefen.^[48] Peroxidasen der Klassen II und III sind extrazelluläre Proteine. Zu letzterer gehört zum Beispiel die Meerrettich-Peroxidase.^[49]

Der Mechanismus^[50] für die Peroxidase-Katalyse (siehe **Schema 3-15**, S. 21) beginnt mit dem Binden von Wasserstoffperoxid an das Eisenatom im aktiven Zentrum des Proteins. Anschließend wird unter Abspaltung eines Wassermoleküls die Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung gespalten und intermediär ein Radikal-Kation erzeugt (Verbindung A). Durch Aufnahme eines Elektrons von dem eigentlich Substrat wird Verbindung B erzeugt, die von einem weiteren Substratmolekül ein Elektron erhält, und unter Wasserabspaltung in den Ausgangszustand zurückkehrt.



Schema 3-15: Allgemeiner Katalysezyklus für eine Peroxidase. Die Häm-Gruppe ist durch den Eisen-Stickstoff-Komplex dargestellt.^[50]

3.4 Synthese von Biarylverbindungen

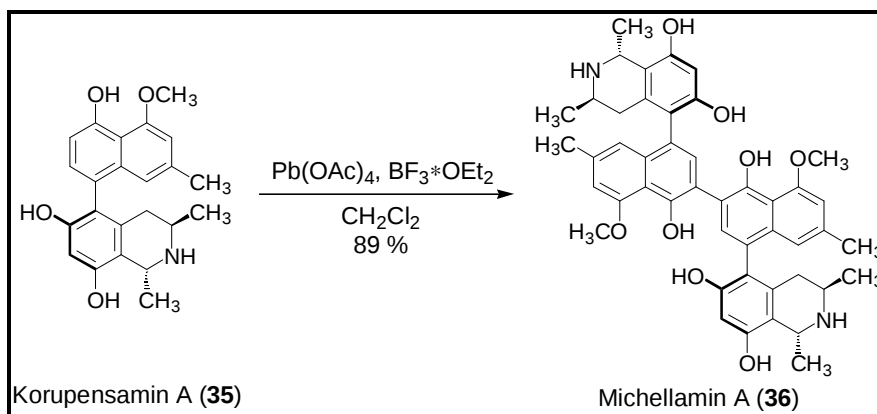
Biarylverbindungen stellen aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften als chemische Reagenzien und pharmakologisch wirksame Naturstoffe (siehe S. 1) interessante Syntheseziele dar. Für den gezielten Aufbau der Biarylachse existieren mittlerweile verschiedene Konzepte und Strategien.^[4a,51] Prinzipiell lassen sich diese Verfahren folgendermaßen gliedern:

- Intermolekulare Arylkupplung zu konstitutionell symmetrischen Biarylen
- Intermolekulare Kreuzkupplung zu konstitutionell unsymmetrischen, racemischen Biarylen
- Atropisomerenselektive, inter- und intramolekulare Arylkupplungen

3.4.1 Intermolekulare Arylkupplung zu konstitutionell symmetrischen Biarylen

Biomimetische Verfahren

Die Oxidation von Phenolen hat biomimetischen Charakter, da sie sich an die Biosynthese von Biarylverbindungen anlehnt.^[20] Nach den ersten Arbeiten von *Pummerer et al.*^[19] wurden zahlreiche Versuche unternommen, die Biosynthese chemisch^[52] mit Oxidationsmitteln oder biokatalytisch^[30a] mit oxidierenden Enzymen (siehe S. 19) nachzuahmen. Im Gegensatz zur strikten Regio- und Stereoselektivität, die in der Natur beobachtet wird, lassen diese chemischen und biokatalytischen Methoden oft eine Regio- oder Stereoselektivität vermissen. Dies liegt vor allem daran, daß im Substrat mehrere aktivierte Positionen vorhanden sind, an denen die Phenolkupplung stattfinden kann.^[53] Trotzdem existieren einige Anwendungen in der Naturstoffsynthese, die mit sehr guten Ausbeuten verlaufen. So konnten *Bringmann* und Mitarbeiter die Biosynthese von Michellaminen (siehe **Schema 3-7**, S. 13) chemisch nachvollziehen (siehe **Schema 3-16**, S. 23).^[54]

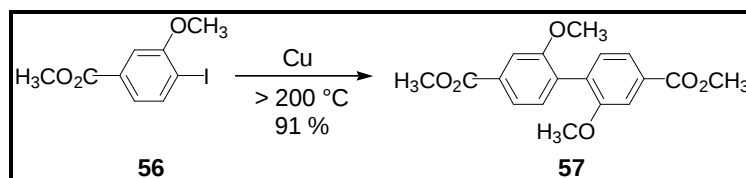


Schema 3-16: Biomimetische Synthese von Michellamin A (**35**) durch Oxidation von Korupensamin A (**36**) mit Bleitetraacetat.^[54]

Für die Phenoxidation können eine Vielzahl von Oxidationsmitteln verwendet werden, zum Beispiel FeCl_3 (siehe S. 47), Kaliumhexacyanoferrat(III), Silberoxid, *tert*-Butylperoxid, Bleitetraacetat sowie Kaliumdichromat. Bei der Phenolkupplung mit oxidierenden Enzymen besitzt das System Meerrettichperoxidase/ H_2O_2 die größte Bedeutung.^[55]

Die Ullmann-Reaktion und verwandte Verfahren

Die *Ullmann*-Reaktion ist das klassische Verfahren zur Darstellung von symmetrischen Biarylen durch eine reduktive Dimerisierung von Arylhalogeniden mit Kupferbronze bei hohen Temperaturen.^[56] Da die Kupplungsposition durch die Position des Halogenatoms bestimmt wird, ist die regioselektive Halogenierung des Aromaten entscheidend. Die höchsten Kupplungsausbeuten werden mit elektronenarmen Aryliodiden, z. B. **56**, erreicht (siehe **Schema 3-17**). Bei diesem Verfahren werden freie Hydroxy- oder Aminogruppen nicht toleriert.^[57]



Schema 3-17: Darstellung konstitutionell symmetrischer, sterisch nicht zu stark gehinderter Biarylverbindungen, wie z. B. **57**, durch *Ullmann*-Reaktion.^[58]

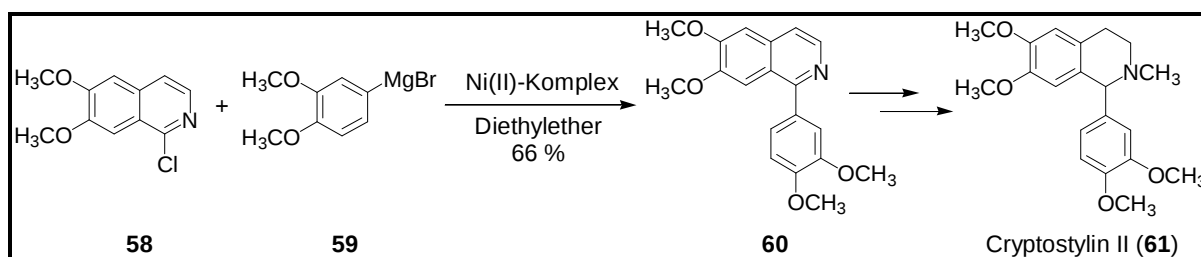
Basierend auf Arbeiten von *Semmelhack et al.* wurden Verfahren entwickelt, bei denen stöchiometrische Mengen von Ni(0)-Komplexen, wie Bis(1,5-cyclooctadien)nickel(0) oder Tetrakis(triphenylphosphin)nickel(0), die Funktion des Kupfers übernehmen.^[59] Dadurch können die Temperaturen bei der Kupplungsreaktion auf 40-50 °C gesenkt werden.

3.4.2 Intermolekulare Kreuzkupplung zu konstitutionell unsymmetrischen, racemischen Biarylen^[51b,60]

Regioselektive, intermolekulare Kreuzkupplungen können nur dann in guten Ausbeuten durchgeführt werden, wenn sich die beiden eingesetzten Aromaten sehr stark elektronisch oder funktionell unterscheiden. Dies gelingt zum Beispiel dadurch, daß die beiden Arene in Form eines Elektrophil/Nukleophil-Paares eingesetzt werden. Die unten beschriebenen Verfahren sind dadurch limitiert, daß sie bei der Anwesenheit von mehreren Substituenten in *ortho*-Position zur Kupplungsposition schlechte Ausbeuten liefern oder gänzlich versagen.^[61]

Kharash-Reaktionen

Als *Kharash*-Reaktion wird die Umsetzung von Grignard-Arylverbindungen mit Halogeniden verstanden.^[62] Durch die Entdeckung von *Kumada*^[63] und *Corriu*,^[64] daß sich diese Reaktionen durch Nickelkatalysatoren beschleunigen lassen, wird diese Methode häufig zur C-C-Bindungsknüpfung eingesetzt, zum Beispiel in der Synthese des Isochinolinalkaloids Cryptostylin II (**61**) ausgehend von Arylhalogenid **58** und Grignardverbindung **59** (siehe **Schema 3-18**).^[65]



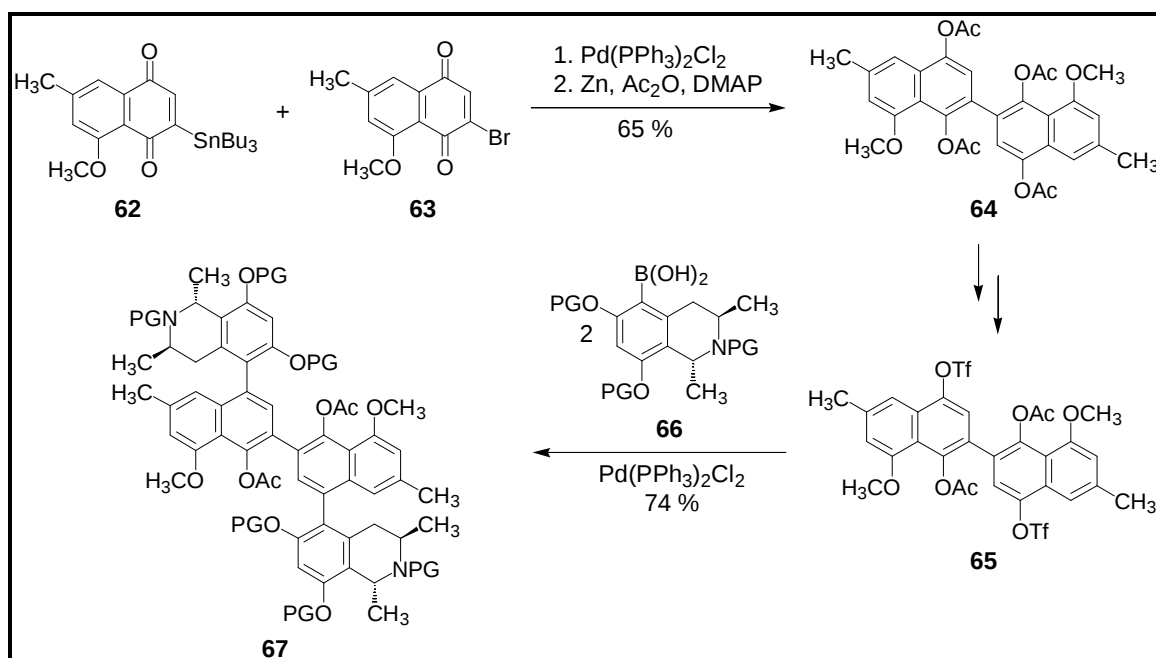
Schema 3-18: Synthese des Isochinolinalkaloids Cryptostylin II (**61**) über eine Nickel-katalysierte *Grignard*-Kupplung.^[65]

Eine weitere Variante der *Kharash*-Reaktion ist die *Negishi*-Kupplung^[66] von Arylzinkverbindungen mit Arylhalogeniden. Arylzinkverbindungen können durch Transmetallierung der entsprechenden Arylmagnesiumchloride oder Aryllithiumverbindungen mit Zink(II)chlorid dargestellt werden.

Mögliche Limitierungen dieser Verfahren liegen in der hohen Nukleophilie der Arylmetallhalogenide. Dies kann durch Addition an im Molekül eventuell vorhandene Carbonylgruppen zu der Bildung unerwünschter Nebenprodukte führen.^[67]

Suzuki- und Stille-Kupplungen

Durch Verwendung der schwächer nukleophilen^[68] Arylmetallverbindungen der weniger elektropositiven (Halb-)Metalle Bor und Zinn kann die Nebenproduktbildung bei den verschiedenen Varianten der *Kharash*-Reaktion unterdrückt werden. Die Palladium-katalysierte Kupplung von Arylboronsäuren (Verbindung **66** in **Schema 3-19**) mit Arylhalogeniden wird als *Suzuki*-Kupplung^[67] und die Palladium-katalysierte Kupplung von Arylzinnverbindungen (Verbindung **62** in **Schema 3-19**) mit Arylhalogeniden wird als *Stille*-Kupplung^[69] bezeichnet. *Bringmann et al.* wendeten beide Verfahren in der Synthese der dimeren Naphthylisochinolinalkaloide Michellamin A, B und C an (siehe **Schema 3-19**).^[70,71]



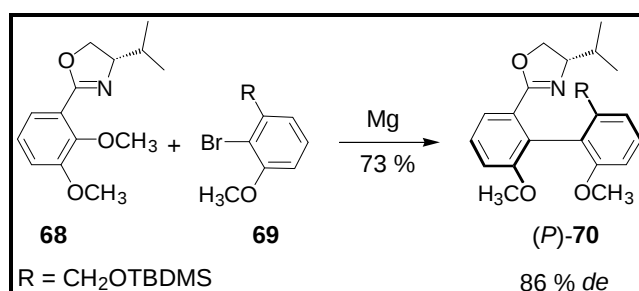
Schema 3-19: *Suzuki*- und *Stille*-Kupplung in der Synthese von dimeren Naphthylisochinolinalkaloiden.^[70,71]

3.4.3 Atropisomerenselektive, inter- und intramolekulare Arylkupplungen

Nukleophile aromatische Substitution

Bei der Oxazolin-Methode nach *Meyers* wird der Arylrest in Form einer *Grignard*-Verbindung durch nukleophile aromatische Substitution einer kernständigen Methoxygruppe des Reaktionspartners eingeführt.^[72] Bei dieser Reaktion muß eine Oxazolingruppe in *ortho*-Position zur Methoxygruppe vorhanden sein, die die Elektrophilie am Reaktionszentrum erhöht und als dirigierender Substituent für die angreifende *Grignard*-Spezies dient (Verbindung **68**

in **Schema 3-20**). Durch die Verwendung enantiomerenreiner Oxazoline kann die Reaktion atropisomerenselektiv durchgeführt werden (siehe **Schema 3-20**).^[73]



Schema 3-20: Atropisomerenselektive, nukleophile aromatische Substitution nach Meyers.^[74]

Bei der nukleophilen aromatischen Substitution der zur Oxazolineinheit *ortho*-ständigen Methoxygruppe in **68** durch die aus **69** entstandene *Grignard*-Verbindung wird Biarylverbindung **70** mit Diastereomerüberschüssen von bis 86 % gebildet.^[74] Durch günstige Komplexierungsmöglichkeiten von Substituenten an das Metallkation der Grignardverbindung **69** wird die Geometrie des intermediär auftretenden Anlagerungskomplexes und somit die Stereoselektion gesteuert (siehe **Abbildung 3-5**).^[74]

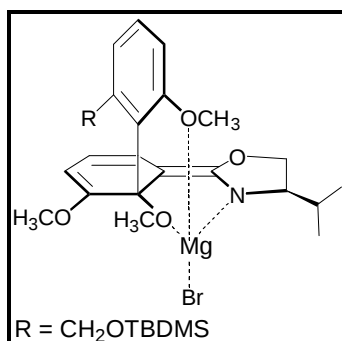


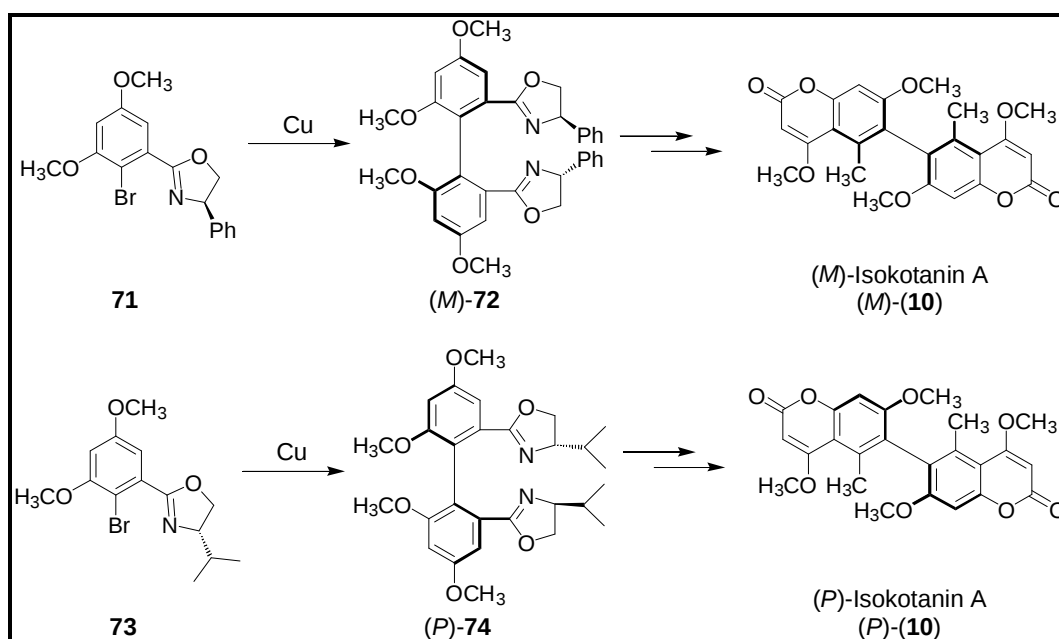
Abbildung 3-5: Mutmaßlicher Anlagerungskomplex bei der Arylierung zu **70** nach Meyers.^[74]

Dieses Verfahren ist dadurch limitiert, daß eine Arylverbindung mit einer geeigneten Oxazolineinheit synthetisiert werden muß und daß die Oxazolingruppe nur unter drastischen Bedingungen (saure oder basische Hydrolyse, Reduktion) abgespalten werden kann.^[73]

Ullmann-Reaktion

Die oben beschriebene Oxazolin-Methode kann auch auf die atropisomerenselektive *Ullmann*-Reaktion übertragen werden.^[75] Dieses Prinzip wurde von Lin und Zhong als

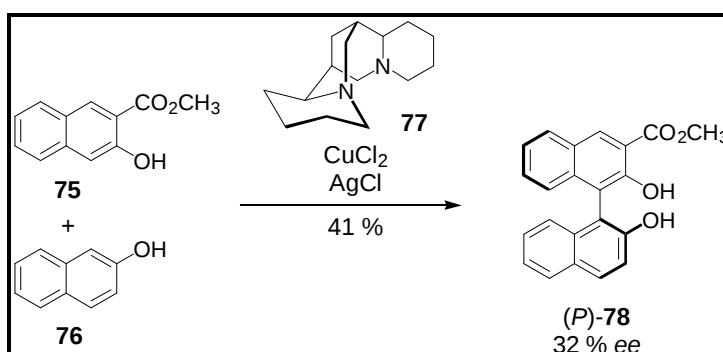
Schlüsselschritt in der ersten Totalsynthese beider Atropisomere von Isokotanin A (**10**) verwendet (siehe **Schema 3-21**).^[76]



Schema 3-21: Synthese von beiden Atropisomeren von Isokotanin A (**10**) über eine Oxazolin-vermittelte, atropisomerenselektive *Ullmann*-Reaktion der Arylbromide **71** und **73**.^[76]

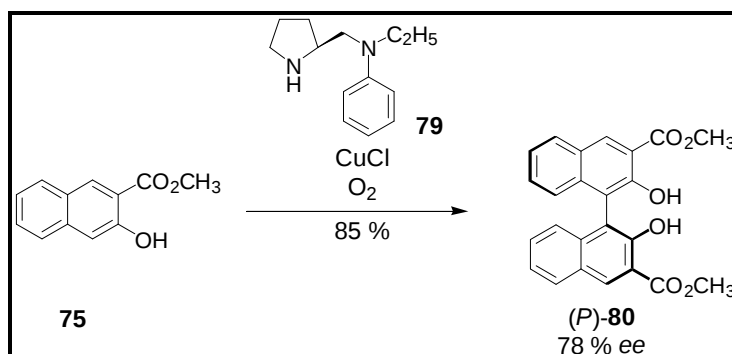
Atropisomerenselektive, intermolekulare Phenoloxidation

Die Gruppen um *Smrčina*^[77] und *Nakajima*^[78] berichten über die Oxidation von nicht-chiral modifizierten Naphtholderivaten mit chiralen Kupferkomplexen zu den entsprechenden atropisomeren Binaphtholen. So liefert die durch einen *in situ* generierten Kupfer(II)-(-)-spartein-Komplex **77** katalysierte Kreuzkupplung der Naphthole **75** und **76** das Binaphthol-derivat (**78**) in 41 % Ausbeute und 32 % Enantiomerenüberschuß (siehe **Schema 3-22**).^[77]



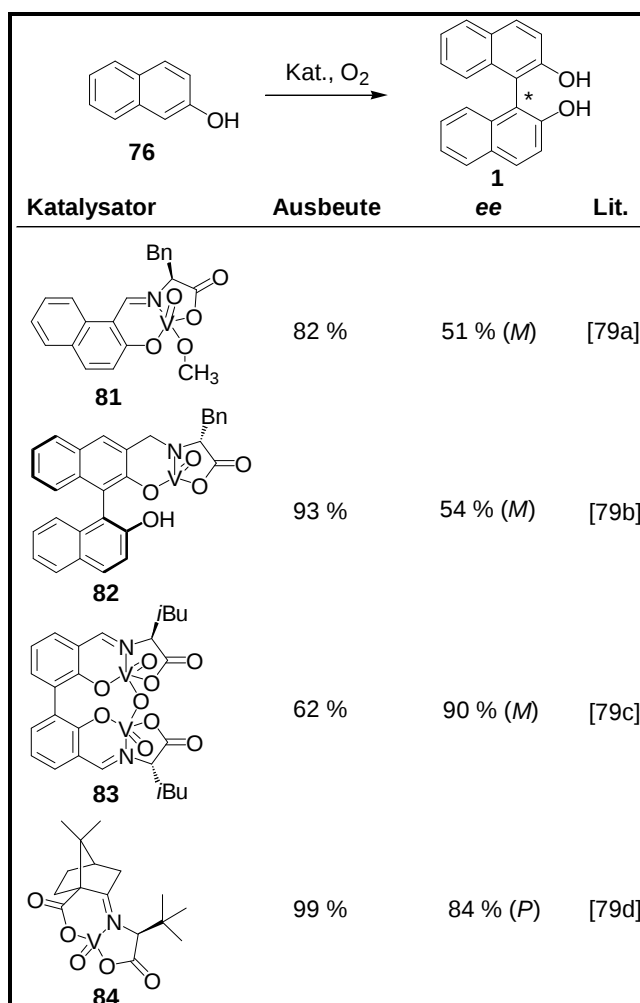
Schema 3-22: Atropisomerenselektive, oxidative Naphtholkupplung nach *Smrčina*.^[77]

Die Verwendung des Kupferkomplexes **79** liefert für die Selbstkupplung von **75** eine Ausbeute von 85 % und einen Enantiomerenüberschuß von 78 % (siehe **Schema 3-23**).^[78]



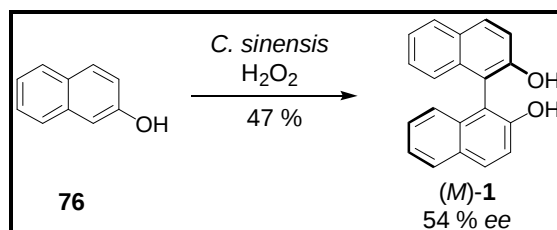
Schema 3-23: Atropisomerenselektive oxidative Naphtholkupplung nach Nakajima.^[78]

Für die Darstellung von Binaphthol (**1**) wurden diverse chirale Oxovanadium(IV)-Katalysatoren **81-84** entwickelt, die die atropisomerenselektive oxidative Phenolkupplung von 2-Naphthol (**76**) ermöglichen (siehe **Schema 3-24**).^[79]



Schema 3-24: Vanadium(V)-katalysierte, atropisomerenselektive Kupplung von 2-Naphthol (**76**).^[79]

Takemoto *et al.* berichten über die Ganzzellbiotransformation von 2-Naphthol (**76**) zu atropisomerenangereicherten Binaphthol (**1**) mit Zellkulturen von *Camellia sinensis* unter Zusatz von Wasserstoffperoxid (siehe **Schema 3-25**).^[80]



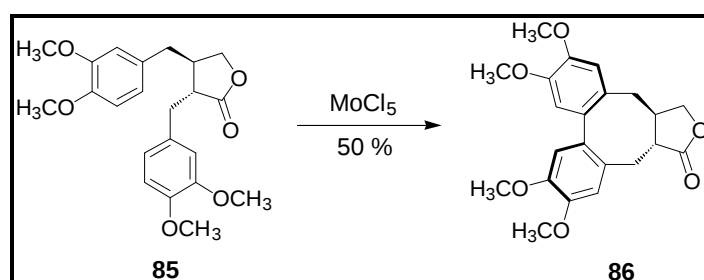
Schema 3-25: Ganzzellbiotransformation von 2-Naphthol (**76**) zu Binaphthol (**1**) durch *Camellia sinensis*.^[80]

Es werden Enantiomerenüberschüsse von bis zu 54 % erreicht. Die Autoren führen diese Phenolkupplung auf Peroxidasenenzyme zurück, die von der Pflanze produziert werden. Der Grund für die beobachtete Regio- und Stereoselektivität wird nicht diskutiert.

Der Mechanismus der in diesem Abschnitt vorgestellten atropisomerenselektiven, intermolekularen Phenoloxidationen ist bislang noch unbekannt.

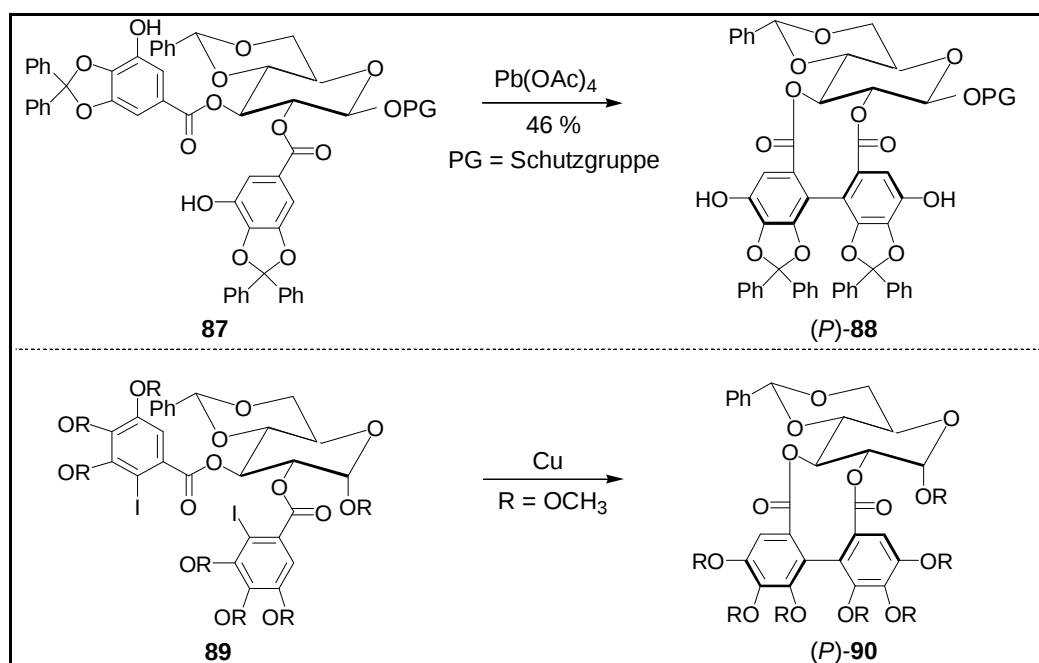
Kupplung unter Verwendung im Zielmolekül vorhandener Brücken

Durch eine intramolekulare Reaktionsführung lässt sich nicht nur eine gekreuzte und regio-selektive Kupplung zweier Arene erzwingen, sondern auch eine sterische Steuerung durch die im Molekül vorhandene Brücke erreichen. Dieses Prinzip wird zum Beispiel bei der intramolekularen, oxidativen Kupplung zu Lignaneneingesetzt. Die Gruppe um Waldvogel berichtet über die Kupplung von (-)-Dimethylmatairesinol (**85**) zu dem 2,2'-Cyclolignan **86** (siehe **Schema 3-26**) mit Molybdänpentachlorid.^[81]



Schema 3-26: Kupplung von (-)-Dimethylmatairesinol (**85**) zum 2,2'-Cyclolignan **86** durch Molybdänpentachlorid.^[81]

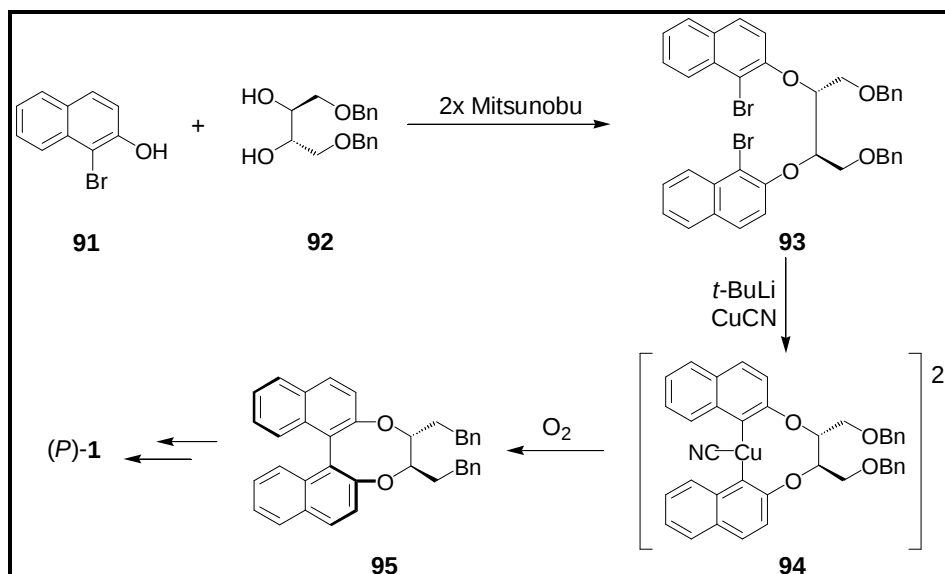
Das gleiche Prinzip wurde auch bei der chemischen Synthese diverser Ellagitannine (siehe S. 15) angewendet.^[82] Als chirales Templat werden D-Glucopyranosederivate **87** und **89** verwendet, die an zwei vicinalen Hydroxygruppen mit Galloyleinheiten verestert sind. Nach dem *Feldman*-Verfahren^[83] wird die Biarylbindung durch eine stereoselektive, intramolekulare Phenolkupplung mit Bleitetraacetat aufgebaut (siehe **Schema 3-27** oben). Das Verfahren nach *Martin*^[84] beinhaltet die intramolekulare *Ullmann*-Reaktion von zwei Galloylderivaten (siehe **Schema 3-27** unten). Beide Verfahren sind aufgrund der Konformation der D-Glucopyranosederivate (*P*)-atropselektiv.



Schema 3-27: Aufbau von Ellagitannineinheiten durch atropisomerenselektive, intramolekulare Kupplungen.^[83,84]

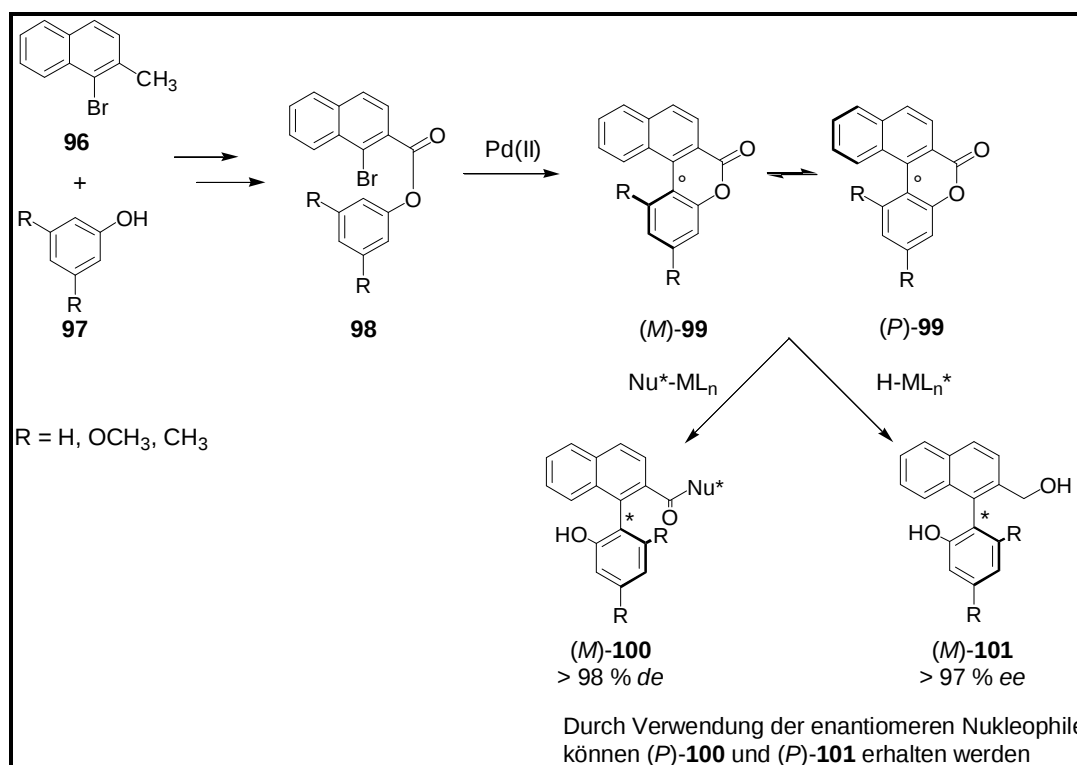
Kupplung in Anwesenheit künstlicher Hilfsbrücken

Zur Induktion der Atropisomerenselektivität können auch chirale Hilfsbrücken aus dem *chiral pool* verwendet werden (Milch-, Mandel- oder Weinsäure), die nicht Bestandteil des Zielmoleküls sind. *Lipshutz et al.* führten eine atropisomerenselektive, intramolekulare, oxidative Kupplung von Cyanocupraten ein.^[85] Dies wurde zur Synthese von Binaphthol (**1**) (siehe **Schema 3-28**, S. 31)^[85] sowie in der Synthese der Naturstoffe Kotanin^[86] (**9**) und Desertorin C^[87] (**6**) verwendet.



Schema 3-28: Atropisomerenselektive, intramolekulare oxidative Kupplung von Cyanocupraten.^[85]

Bringmann et al. etablierten das sogenannte Lacton-Konzept zur atropisomerenselektiven Synthese von Biarylverbindungen.^[88] Dieses Prinzip beruht auf der stereoselektiven Öffnung von konfigurativen labilen Biaryllactonen des Typs **99** (siehe **Schema 3-29**) mit chiralen Nukleophilen im Sinne einer dynamischen kinetischen Racematspaltung. Die dabei gebildeten Biaryle sind konfigurativen stabil. Es können sehr gute chemische Ausbeuten (>80 %) und hohe Diastereomerenüberschüsse (siehe **Schema 3-29**) erreicht werden.^[88b]



Schema 3-29: Das Prinzip des Lacton-Konzepts von *Bringmann et al.*^[88]

4 Spezieller Teil

4.1 Auswahl des Biologischen Systems

Der erste Arbeitsschritt zur Untersuchung der Biosynthese von Biaryl-naturstoffen ist die Auswahl eines geeigneten biologischen Systems. Dieses System soll die folgenden Bedingungen erfüllen:

- Zur Untersuchung der regio- und stereoselektiven, intermolekularen oxidativen Phenolkupplung muß das biologische System axial-chirale Biaryl-naturstoffe in enantiomeren-reiner oder enantiomerenangereicherter Form produzieren, die sich von zwei (identischen) monomeren Vorläufersubstanzen ableiten.
- Der ausgewählte Organismus soll sich jederzeit leicht im Labor kultivieren lassen. Ein Wachstum des Organismus auf Agar-Platten und in Schüttelkolben wäre wünschenswert, damit die Untersuchungen unabhängig von Ort und Jahreszeit möglich sind.
- Weiterhin sollte der Organismus kommerziell erhältlich und nicht höher als S 1 bzw. L 1 klassifiziert sein.

Von Pflanzen ist bekannt, daß sie dimere phenolische Metabolite über stereo- und regio-selektive Phenolkupplungen produzieren.^[4] Die Kultivierung von Pflanzen im Labor durch Kalluskulturen ist etabliert, aber weitaus aufwendiger als die Kultivierung von Bakterien oder filamentösen Pilzen auf Agar-Platten oder in Schüttelkolben. Darüber hinaus weisen manche Pflanzen eine organabhängige Biosynthese auf, dies bedeutet, daß in unterschiedlichen Organen der Pflanze (Sämlinge, Wurzel, Blüten) unterschiedliche Biarylverbindungen produziert werden. Daher wurden Pflanzen für die Biosyntheseuntersuchungen ausgeschlossen.

Bakterien sind in Bezug auf Kultivierung und genetische Information sehr gut charakterisiert. Weiterhin produzieren sie mitunter auch Biaryl-naturstoffe.^[4] Da nicht gesichert ist, ob die Biosynthese dieser Metabolite über eine regio- und stereoselektive, intermolekulare oxidative Phenolkupplung verläuft, scheiden Bakterien als Modellorganismus ebenfalls aus. Die Biosynthese von Vancomycin verläuft über intramolekulare Phenoloxidationen (siehe S. 18).

Pilze, insbesondere Schimmelpilze, vereinigen die Bedingungen der einfachen Kultivierung sowie der stereo- und regioselektiven Biosynthese von Biaryl-naturstoffen.^[4] Um einen geeigneten Pilzstamm auszuwählen wurden auf der Grundlage des „*Dictionary of Natural Products*“ verschiedene Substanzklassen von Biaryl-naturstoffen (Naphthopyranone, Naphthyle, Cumarine, Anthracene) den jeweiligen Organismen zugeordnet.^[89] Auf der Basis dieser Vorarbeiten wurde der filamentöse Pilz *Penicillium citreo-viride* ausgewählt.

4.1.1 Schimmelpilze – Eine kurze Einführung

Schimmelpilze zeichnen sich durch eine ausgeprägte Variabilität bzw. Anpassungsfähigkeit an ihr natürliches Habitat aus. Dies ist darauf zurückzuführen, daß sie über Verwachsungen der Pilzfäden, sogenannte Hyphenanastomosen, mit Vertretern der gleichen oder einer verwandten Art Kerne austauschen können. Daher werden die Schimmelpilze nur nach ihren morphologischen Eigenschaften systematisch eingeordnet.^[90] Darunter fallen das Mycel und die Fortpflanzungsorgane:

➤ Mycel:

In der Wachstumsphase bildet der Pilz fadenartige Zellstrukturen (Hyphen), die durch Auskeimen von Sporen entstehen. Die Gesamtheit aller Hyphen wird Mycel genannt. Dieses kann sich im Substrat entwickeln (Substratmycel) oder auf der Substratoberfläche wachsen (Oberflächenmycel). Weiterhin wird zwischen einem septierten Mycel, welches durch Querwände in einzelne Zellen unterteilt ist, und einem völlig unseptierten Mycel unterschieden (siehe **Abbildung 4-1**).

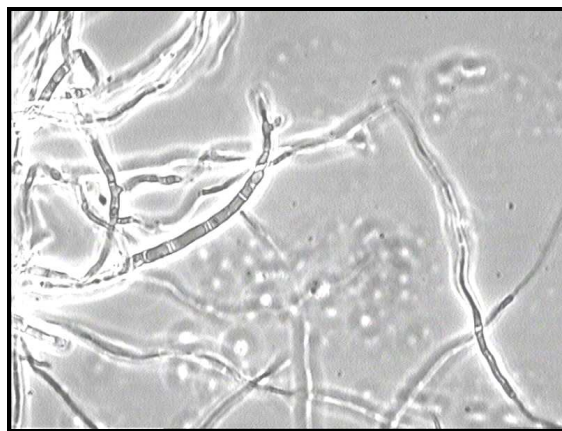


Abbildung 4-1: Lichtmikroskopische Aufnahme des Mycels von *P. citreo-viride*: Auf dem Bild ist der äußere Rand des Mycels gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Hyphen septiert sind. Dieses Bild stammt aus eigenen Arbeiten.

➤ Fortpflanzungsorgane:

In der Vermehrungsphase bildet der Pilz Fortpflanzungszellen. Diese Sporen können geschlechtlich oder ungeschlechtlich sein. Bei den meisten Schimmelpilzen findet eine ungeschlechtliche Fortpflanzung statt (Deuteromycetes, Fungi Imperfecti).

Im System der Pilze wird der hier verwendete Organismus, *Penicillium citreo-viride*, wie folgt klassifiziert (siehe **Abbildung 4-2**):

➤ Abteilung: Eumycota

➤ Klasse: Deuteromycetes (Fungi Imperfecti) (Mycel septiert)

➤ Ordnung: Moniliales (Hyphomycetes)

➤ Familie: Moniliaceae (Mycel blaß oder ungefärbt)

➤ Gattung: *Penicillium*

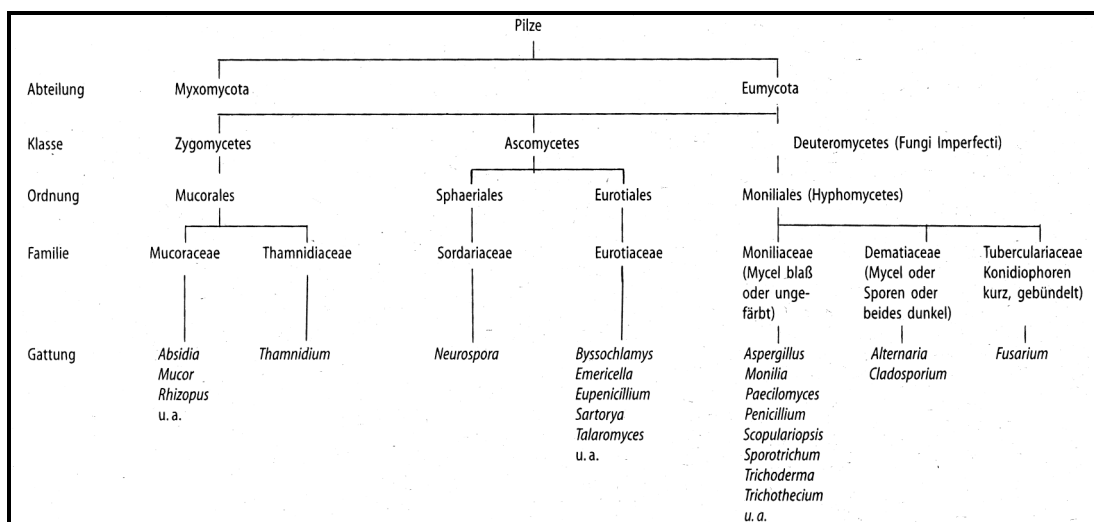


Abbildung 4-2: Einordnung einiger Gattungen der Schimmelpilze in das System der Pilze (Abbildung entnommen aus [90b]).

Penicillia sind dadurch gekennzeichnet, daß ihre Konidiophoren (Sporenträger) in einem Büschel von verzweigten Ästen (Penicillus) enden. An deren Ende sitzen die Konidienbildenden Phialiden. Weiterhin werden je nach Bau des Penicillus vier Sektionen unterschieden (siehe **Abbildung 4-3**, S. 35). *P. citreo-viride* gehört zur Sektion der Monoverticillata, bei der der Penicillus unverzweigt ist und nur einen Wirtel* aus Phialiden trägt.

* aus der Botanik: Aststellung in Form eines Quirls.

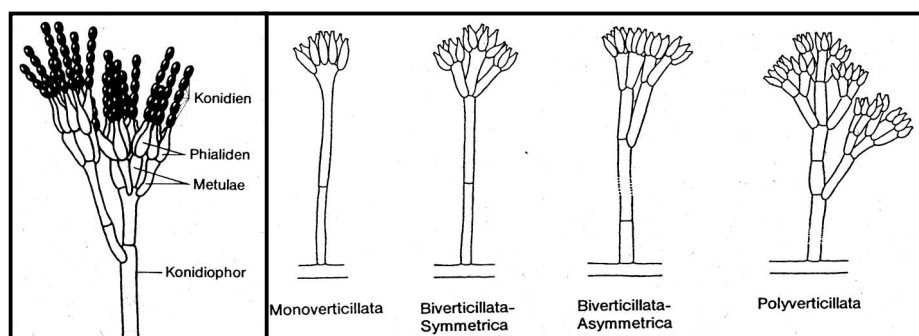


Abbildung 4-3: links: Sporenbildung bei Penicillia; rechts: verschiedene Penicillusformen (Abbildung entnommen aus [90b])

4.1.2 *Penicillium citreo-viride* - Was aus der Literatur bekannt ist

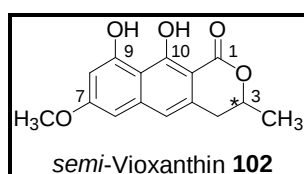
Der hier verwendete Pilzstamm *Penicillium citreo-viride* (ATCC No. 42743) stammt ursprünglich aus einer Bodenprobe aus der afrikanischen Savanne (Guinea). Zeeck *et al.* berichten über die Fermentation des Organismus im 100 L Maßstab und die Isolierung von Sekundärmetaboliten aus dem Mycel des Pilzes.^[91] Dabei werden unter Verwendung eines Mediums aus 1 % Malzextrakt, 0,4 % Hefeextrakt und 0,4 % Glucose die in **Tabelle 4-1** aufgeführten Pigmente isoliert. Als Folge der Produktion dieser Farbstoffe verfärbt sich das Mycel des Pilzes während der Inkubation von drei Tagen von farblos zu rot-violett.

Metabolit	Struktur	Konzentration [mg/L]	Farbe
(<i>R</i>)-semi-Vioxanthin 102		120	gelb
Vioxanthin 103		2.5	grün
Viomellein 104		20	violett
Xanthomegnin 105		115	orange

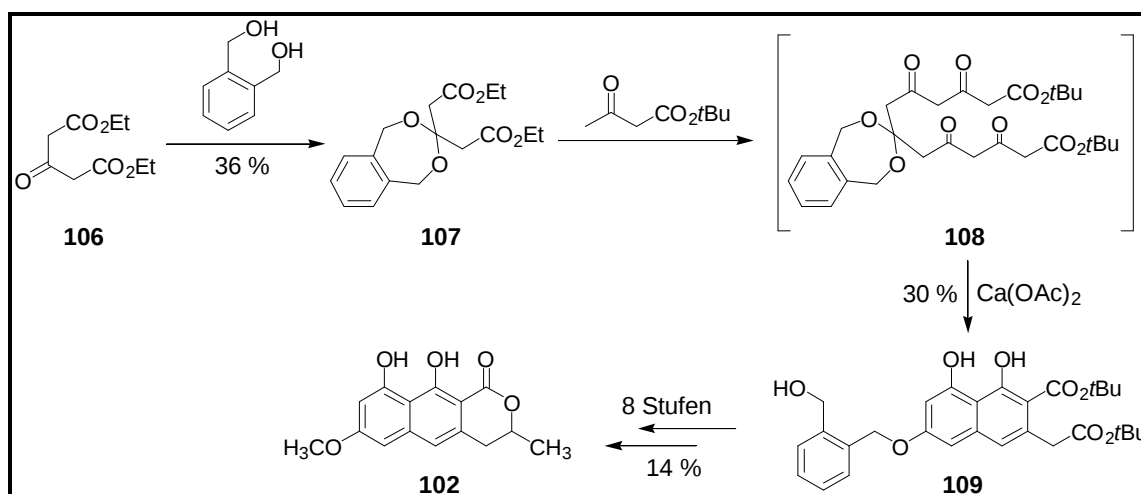
Tabelle 4-1: Übersicht über die von Zeeck *et al.*^[91] aus dem Pilz *P. citreo-viride* isolierten Sekundärmetabolite. (*R*)-semi-Vioxanthin (*R*)-**102** wird unter Verwendung eines anderen Nährmediums erhalten: 6 % Mannit, 1,5 % Glutaminsäure, 0,75 % (NH₄)₂SO₄, 0,9 % NaCl, 0,6 % K₂HPO₄, 0,3 % MgSO₄×7H₂O, 0,12 % CaCl₂, 0,006 % FeSO₄×7H₂O, 0,003 % ZnSO₄×7H₂O.

Die oben aufgeführten Biaryl-naturstoffe sind eng miteinander verwandt: Zum einen leiten sie sich alle vom monomeren (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102** ab, und zum anderen unterscheiden sich Vioxanthin **103**, Viomellein **104** und Xanthomegnin **105** nur durch ihre Oxidationsstufe. Weiterhin sind die beiden Molekülhälften dieser Naturstoffe durch eine Biaryl-lachse verknüpft, die eine für dieses biologische System charakteristische Stereo- und Regiochemie aufweist. Im Folgenden werden diese Sekundärmetabolite näher vorgestellt:

semi-Vioxanthin

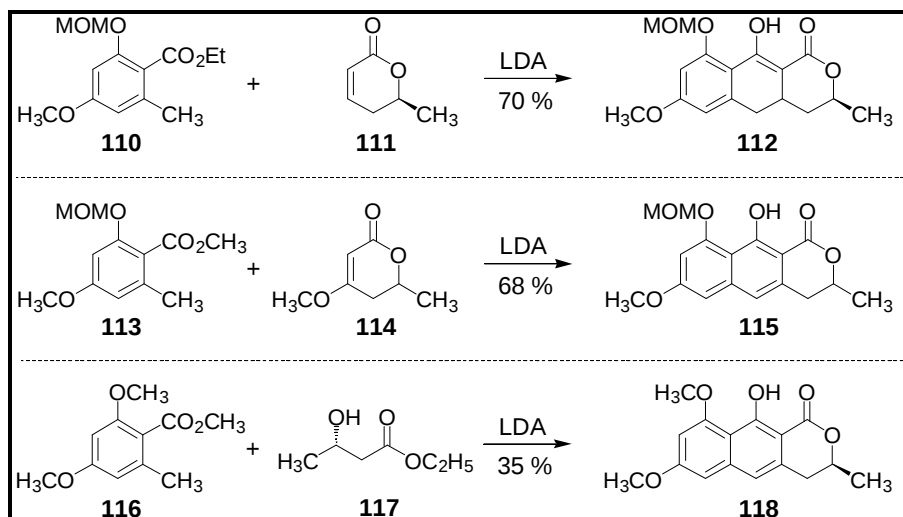


Semi-Vioxanthin **102** wird neben *P. citreo-viride* auch in dem Pilz *Pyricularia oryzae*^[92] sowie als Glycosid in den Pflanzen *Paepalanthus vellozoides* und *P. latipes*^[93] gefunden. Basierend auf einem Vergleich der Circular-dichroismusspektren des Naturstoffes und (*R*)-Mellein konnte dem Stereozentrum an C-3 die (*R*)-Konfiguration zugeordnet werden.^[91] Während (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102** als Fungizid wirkt, zeigt das (*S*)-Enantiomer, welches aus *Cryptosporiosis abietina* isoliert wurde, zusätzlich noch eine entlaubende Wirkung.^[94] Die erste chemische Synthese von racemischen *semi*-Vioxanthin (*rac*)-**102** geht auf Yamaguchi zurück.^[95] Diese 13-stufige Synthese verläuft über die polyketidische Zwischenstufe **108** mit einer Gesamtausbeute von 2 % (siehe **Schema 4-1**).



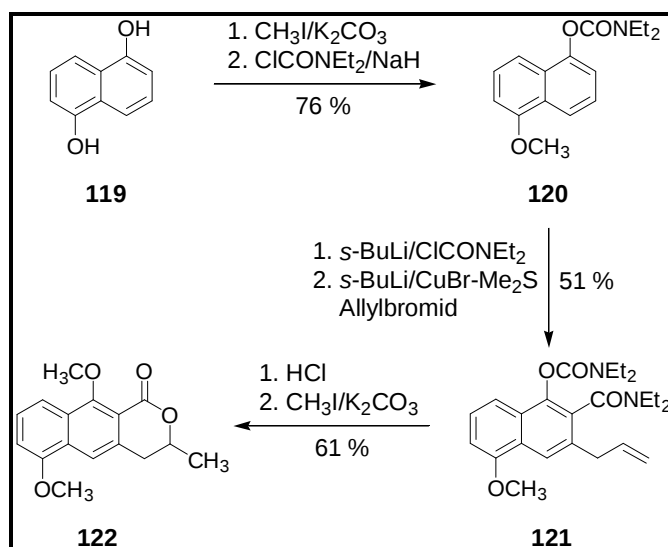
Schema 4-1: Synthese von racemischen *semi*-Vioxanthin (*rac*)-**102** nach Yamaguchi et al.^[95]

In Arbeiten von *Broka*^[96] und der Arbeitsgruppe von *Deshpande*^[97] wurde **102** oder Derivate davon durch die Kondensation von Orsellinsäurederivaten mit chiralen Pyranonen, (S)-**111** und (rac)-**114**, sowie (S)-3-Hydroxybuttersäureethylester (S)-(**117**), zum Teil auch in enantiomerenreiner Form, dargestellt (siehe **Schema 4-2**).



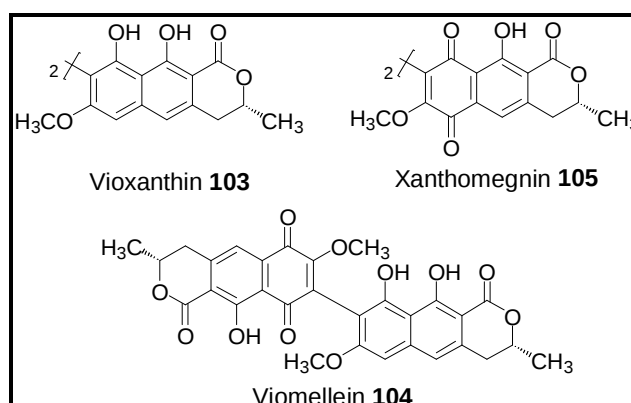
Schema 4-2: *Semi-Vioxanthin-Synthesen* durch Kondensation von Orsellinsäureestern mit chiralen Pyranonen (oben und mitte)^[96,97a] bzw. Hydroxybuttersäureester (unten).^[97b]

De et al. verwendeten das Konzept der Heteroatom dirigierten *ortho*-Metallierung zur Synthese von *semi-Vioxanthin*-Analoga, wie zum Beispiel **122** (siehe **Schema 4-3**).^[98]



Schema 4-3: Synthese des *semi-Vioxanthin*-Analogons **122** nach *De et al.*^[98]

Vioxanthin, Viomellein, Xanthomegnin

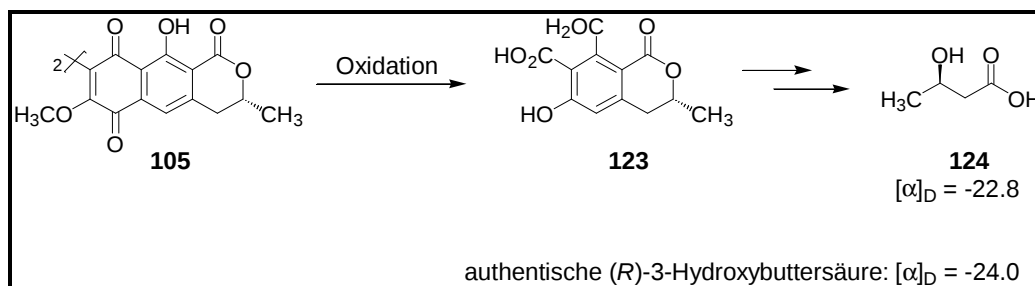


Diese drei Biarylnaturstoffe aus *P. citreo-viride* kommen auch in anderen Pilzstämmen vor (siehe **Tabelle 4-2**).^[99] Neben ihrer Farbigkeit besitzen diese Sekundärmetabolite eine Funktion als Mycotoxine. Verfütterungsexperimente von Viomellein **104** und Xanthomegnin **105** an Mäuse führten zu tödlichen Veränderungen in der Leber der Tiere.^[99]

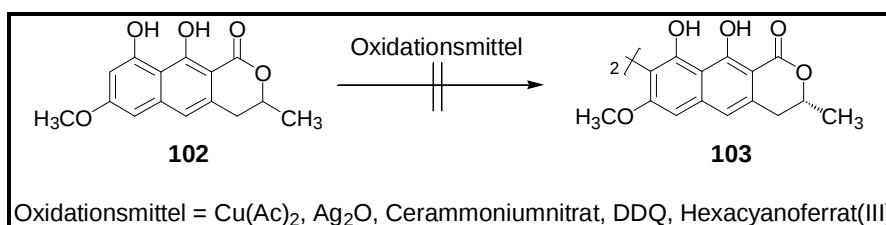
Naturstoff	alternative Quelle	Literatur
Vioxanthin 103	<i>Trichophyton violaceum</i>	[100]
Viomellein 104	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>P. cyclopium</i>	[101,102,103]
Xanthomegnin 105	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>T. megnini</i> , <i>T. violaceum</i> , <i>Microsporium cookei</i>	[101,103,104, 105,106,107]

Tabelle 4-2: Übersicht über alternative Quellen neben *P. citreo-viride* für Vioxanthin **103**, Viomellein **104** und Xanthomegnin **105**.

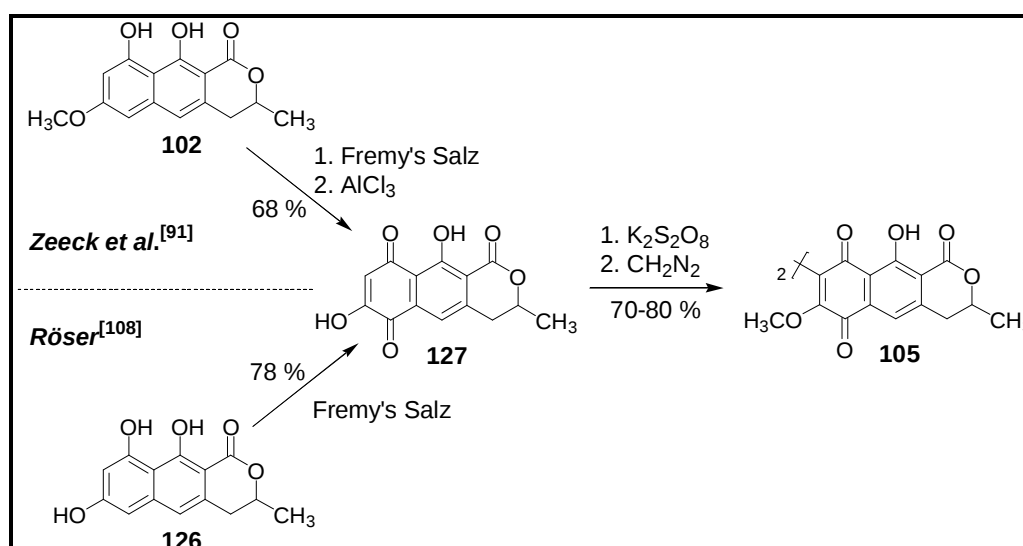
Korrelation des Drehwertes von 3-Hydroxybuttersäure (**124**), die durch chemische Abbaureaktion von Xanthomegnin **105** erhalten wurde, mit dem Drehwert von authentischer (*R*)-3-Hydroxybuttersäure (*R*)-(**124**) führte zur Bestimmung der absoluten Konfiguration des Stereozentrum im Lactonring (siehe **Schema 4-4**, S. 39).^[106]


 Schema 4-4: Bestimmung der absoluten Konfiguration des Stereozentrums von **105** nach Ng *et al.*^[106]

Zeeck *et al.* berichten, daß die Darstellung von Vioxanthin **103** durch oxidative Phenolkupplung von *semi*-Vioxanthin **102** mit diversen Oxidationsmitteln nicht gelingt (siehe **Schema 4-5**).^[91]


 Schema 4-5: Versuchte oxidative Phenolkupplung von *semi*-Vioxanthin **102** nach Zeeck *et al.*^[91]

Die Gruppe um Zeeck^[91] sowie Röser^[108] konnten Xanthomegnin **105** durch oxidative Phenolkupplung des Hydroxychinons **127** synthetisieren. **127** ist entweder durch Oxidation von *semi*-Vioxanthin **102** zum *semi*-Xanthomegnin **125**^[109] und anschließender Demethylierung der Methoxygruppe an C-7^[91] oder durch Oxidation des Naphthalintriols **126**^[108] zugänglich (siehe **Schema 4-6**, S. 39).


 Schema 4-6: Xanthomegnin-Synthese nach Zeeck *et al.*^[91] und Röser.^[108]

4.2 Naturstoffsynthese

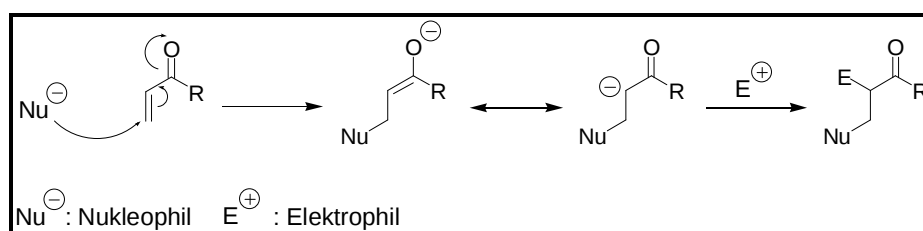
Als Referenzsubstanzen zur Etablierung eines Analytik-Assays wurden die Verbindungen (*rac*)-, (*R*)- und (*S*)-*semi*-Vioxanthin **102** sowie (*rac*)-*semi*-Xanthomegnin **125** chemisch synthetisiert. Im Rahmen von Versuchen zur Synthese von (*P*)- und (*M*)-Vioxanthin (*P*)-, (*M*)-**103** wurden verschiedene Strategien zur Darstellung von dimeren Orsellinsäureestern, zum Teil auch in enantiomerenreiner Form, entwickelt.

4.2.1 Synthese von *semi*-Vioxanthin^[110]

Einleitung

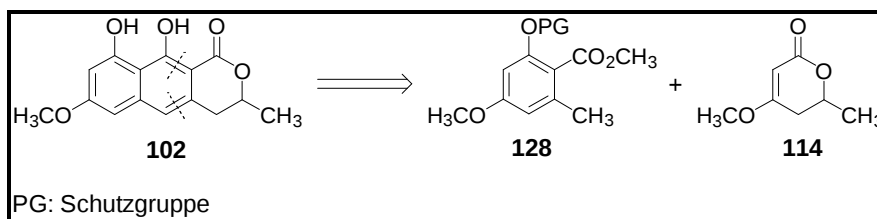
In Analogie zu den Verfahren von *Broka*^[96], *Deshpande et al.*^[97] sowie *Stroech*^[111] werden sowohl racemisches *semi*-Vioxanthin (*rac*)-**102** als auch die beiden Enantiomere (*R*)- und (*S*)-**102** über eine Tandem-*Michael*-Reaktion^[38,112] synthetisiert. Dieser Reaktionstyp führt zu einer regioselektiven Disubstitution an einem *Michael*-Akzeptor und kann in zwei Teilschritte zerlegt werden (siehe **Schema 4-7**):

1. *Michael*-Addition eines Nukleophils (Nu) an eine aktivierte Doppelbindung
2. Reaktion des intermediär auftretenden Enolats mit einem Elektrophil (E)



Schema 4-7: Schematischer Ablauf der Tandem-*Michael*-Reaktion.

Gehören Enolat und Elektrophil demselben Molekül an, kann durch *Dieckmann*-Kondensation ein Ringschluß erfolgen. Zu diesem Synthesekonzept gehört auch die Tandem-*Michael*-Reaktion von Benzylanionen mit β -alkoxysubstituierten α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen. Der Alkoxysubstituent in β -Position erhöht zum einen die Reaktivität gegenüber Carbanionen und zum anderen ermöglicht er durch spontane Alkoholeliminierung nach der Tandem-Reaktion die Bildung des aromatischen Ringsystems.^[111]



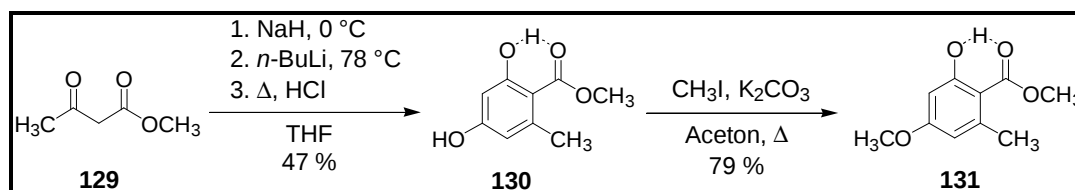
Schema 4-8: Retrosynthetische Analyse von *semi*-Vioxanthin **102**.

Auf diese Weise lässt sich die Darstellung von *semi*-Vioxanthin **102** auf die Tandem-*Michael*-Reaktion von Orsellinsäurederivat **128** mit dem chiralen Pyranon **114** zurückführen (siehe **Schema 4-8**).

Eigene Arbeiten und Diskussion

Synthese der Orsellinsäurederivate

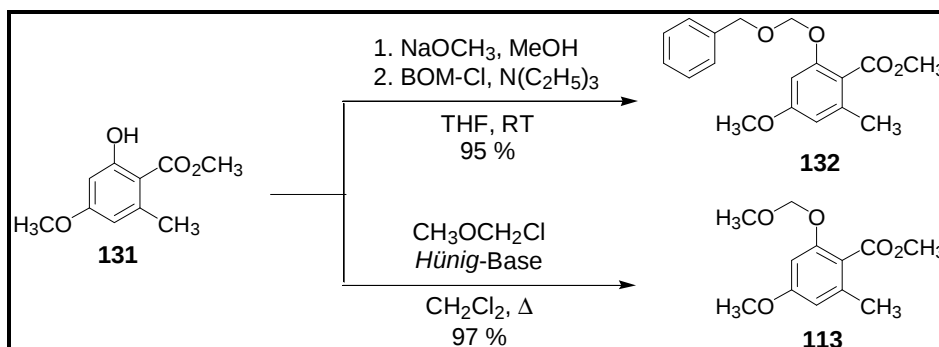
Orsellinsäuremethylester (**130**) wird in einer einstufigen Reaktion nach *Chiarello* und *Joullie*^[113] durch Kondensation von zwei Molekülen Acetessigsäuremethylester (**129**) in 47 % Ausbeute erhalten (siehe **Schema 4-9**). Dieses Verfahren ist anderen, mehrstufigen Synthesen vorzuziehen, da diese bei vergleichbarer Gesamtausbeute einen wesentlich höheren Arbeitsaufwand erfordern.^[114] Durch die Chelatisierung des Protons der Hydroxygruppe in *ortho*-Position zur Esterfunktion, welche durch die starke Tieffeldverschiebung des Protons im ¹H-NMR-Spektrum belegt wird (11.77 ppm), kann die *para*-Hydroxygruppe selektiv methyliert werden.^[115] Dies gelingt durch Umsetzung von **130** mit Iodmethan unter basischen Bedingungen (K₂CO₃) in 79 % Ausbeute.



Schema 4-9: Synthese von 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**131**).

Als Schutzgruppen für die Hydroxyfunktion an C-2 werden die Benzyloxymethyl- (BOM) und Methoxymethylgruppe (MOM) verwendet. Diese sind im Gegensatz zur Benzylgruppe unter den Bedingungen der Tandem-*Michael*-Reaktion stabil^[116] und lassen sich selektiv unter milden Bedingungen entfernen. Zur Einführung der BOM-Schutzgruppe wird **131** zunächst mit Natriummethylat zum Natriumsalz umgesetzt, welches anschließend mit einem Überschuß von Triethylamin und Benzylchlormethylether zur Reaktion gebracht wird (siehe

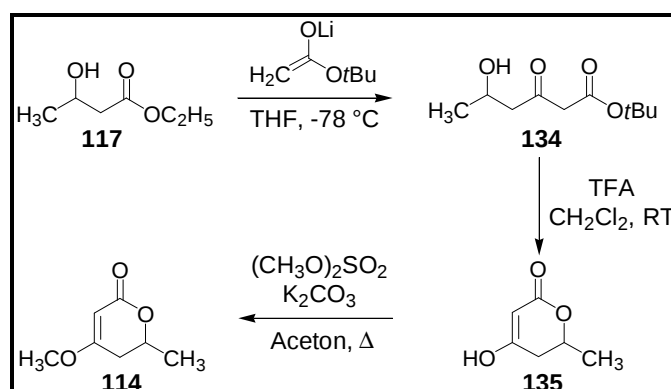
Schema 4-10). Der dabei entstehende 2-Benzyloxymethoxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**132**) kann in 95 % Ausbeute isoliert werden. Das Methoxymethylderivat **113** wird durch Erhitzen von **131** mit *Hünig*-Base (*N*-Ethyl-isopropylamin) und Chlor-dimethylether in 97 % Ausbeute synthetisiert (siehe **Schema 4-10**).



Schema 4-10: Einführung der BOM- und MOM-Schutzgruppe.

Synthese der chiralen Michael-Akzeptoren

Die Darstellung des chiralen 5,6-Dihydro-4-methoxy-6-methyl-2*H*-pyran-2-ons (**114**) erfolgt sowohl im Falle der racemischen Form (*rac*)-**114** als auch im Falle der beiden Stereoisomere (*R*)- und (*S*)-**114** über ähnliche Syntheserouten. Zunächst wird in einer *Claisen*-Esterkondensation von 3-Hydroxybuttersäureethylester (**117**) mit Essigsäure-*tert*-butylester (**133**) der 5-Hydroxy-3-oxo-hexansäure-*tert*-butylester (**134**) synthetisiert.^[117] Da **117** racemisch, als (*R*)-Enantiomer (99 % *ee*) und als (*S*)-Enantiomer (96 % *ee*) kommerziell erhältlich ist, kann durch Wahl des Eduktes die Stereochemie des Produktes bestimmt werden. Das Zwischenprodukt **134** wird anschließend durch Lactonisierung mit Trifluoressigsäure (TFA)^[118] und nachfolgende Methylierung mit Dimethylsulfat in **114** überführt (siehe **Schema 4-11**).



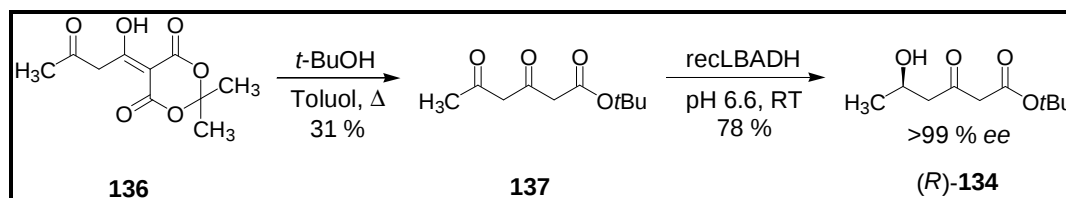
Schema 4-11: Synthese des chiralen *Michael*-Akzeptors **114**.

Tabelle 4-3 gibt einen Überblick über die Ausbeuten für den *Michael*-Akzeptor **114** als racemisches Gemisch und in Form der beiden Stereoisomere.

Stereo-isomer	Claisen-Kondensation Verbindung 134	Lactonisierung Verbindung 135	Methylierung Verbindung 114	Gesamt- ausbeute
(rac)	88 %	80 %	74 %	52 %
(R)	85 %	72 %	68 %	42 %
(S)	85 %	58 %	74 %	36 %

Tabelle 4-3: Übersicht über die Ausbeuten bei der Darstellung der chiralen *Michael*-Akzeptoren **114**.

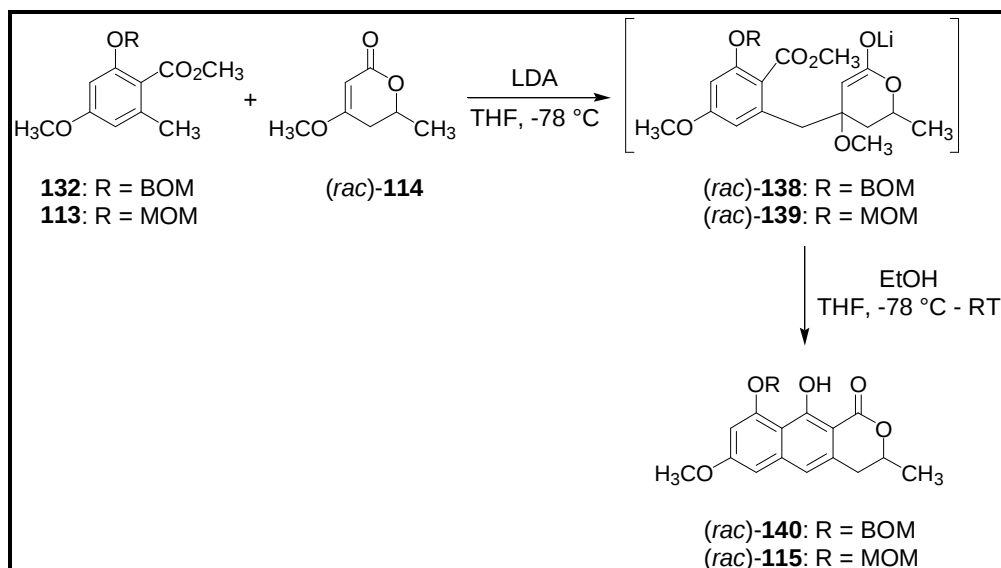
Im Falle des (*R*)-Enantiomers (*R*)-**114** gelingt die Synthese des Hydroxyketons (*R*)-**134** auch nach einer von *Wolberg et al.* entwickelten Methode.^[119] Dabei wird 3,5-Dioxohexansäure-*tert*-butylester (**137**) mit einer Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LBADH) regio- und enantioselektiv an C-5 reduziert. Diese Reaktion liefert (*R*)-5-Hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester (*R*)-(**134**) in 78 % Ausbeute und einem Enantiomerenüberschuß von >99 % (siehe **Schema 4-12**).



Schema 4-12: Enzymatische Synthese von (*R*)-5-Hydroxy-5-oxo-hexansäure-*tert*-butylester (*R*)-(**134**).^[119]

Tandem-Michael-Reaktion

Die Naphthopyranonstruktur von *semi*-Vioxanthin **102** wird durch Tandem-*Michael*-Reaktion der geschützten Orsellinsäureester **132** und **113** mit dem *Michael*-Akzeptor **114** aufgebaut. Zunächst werden durch Deprotonierung mit Lithiumdiisopropylamid (LDA) bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ die tiefroten Benzylanionen von **132** und **113** erzeugt. 1,4-Addition der Kohlenstoffnukleophile an das Pyranon **114** liefert intermediär die Enolate **138** und **139** welche bei Erwärmen auf Raumtemperatur durch intramolekulare *Dieckmann*-Kondensation und Methanoleliminierung zu den gewünschten aromatischen Ringsystemen **140** und **115** cyclisieren (siehe **Schema 4-13**, S. 44).



Schema 4-13: Mechanismus der Tandem-*Michael*-Reaktion zur Synthese von benzyloxymethyl- und methoxymethyl-geschütztem *semi*-Vioxanthin **140** und **115**.

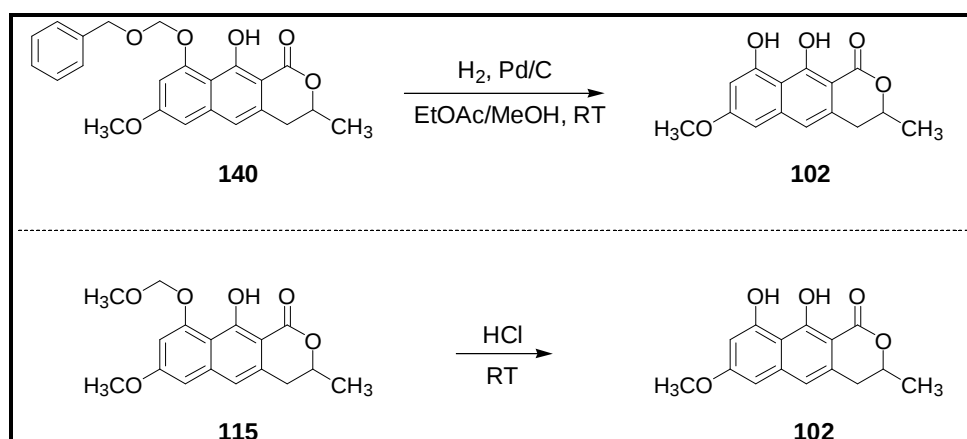
Die Ausbeuten der durchgeführten Tandem-*Michael*-Reaktionen sind in **Tabelle 4-4** zusammengefasst.

Orsellinsäurederivat	Michael-Akzeptor	Produkt	Ausbeute
132	(rac)-114	(rac)-140	38 %
132	(R)-114	(R)-140	38 %
132	(S)-114	(S)-140	27 %
113	(rac)-114	(rac)-115	25 %
113	(R)-114	(R)-115	35 %

Tabelle 4-4: Übersicht über die Ausbeuten der Tandem-*Michael*-Reaktionen.

Schutzgruppenabspaltung

Die selektive Entfernung der Schutzgruppe unter milden Reaktionsbedingungen gelingt im Falle der BOM-Schutzgruppe durch Hydrogenolyse unter Wasserstoffatmosphäre katalysiert durch Palladium auf Aktivkohle, und im Falle der MOM-Schutzgruppe durch Hydrolyse mit konz. Salzsäure (siehe **Schema 4-14** und **Tabelle 4-5**, S. 45).



Schema 4-14: Selektive Abspaltung der Schutzgruppen.

geschütztes <i>semi</i> -Vioxanthin	<i>semi</i> -Vioxanthin	Ausbeute
(<i>rac</i>)- 140	(<i>rac</i>)- 102	63 %
(<i>R</i>)- 140	(<i>R</i>)- 102	44 %
(<i>S</i>)- 140	(<i>S</i>)- 102	39 %
(<i>R</i>)- 115	(<i>R</i>)- 102	55 %

Tabelle 4-5: Ausbeuten der Schutzgruppenabspaltungen.

4.2.2 Synthese dimerer Orsellinsäureester

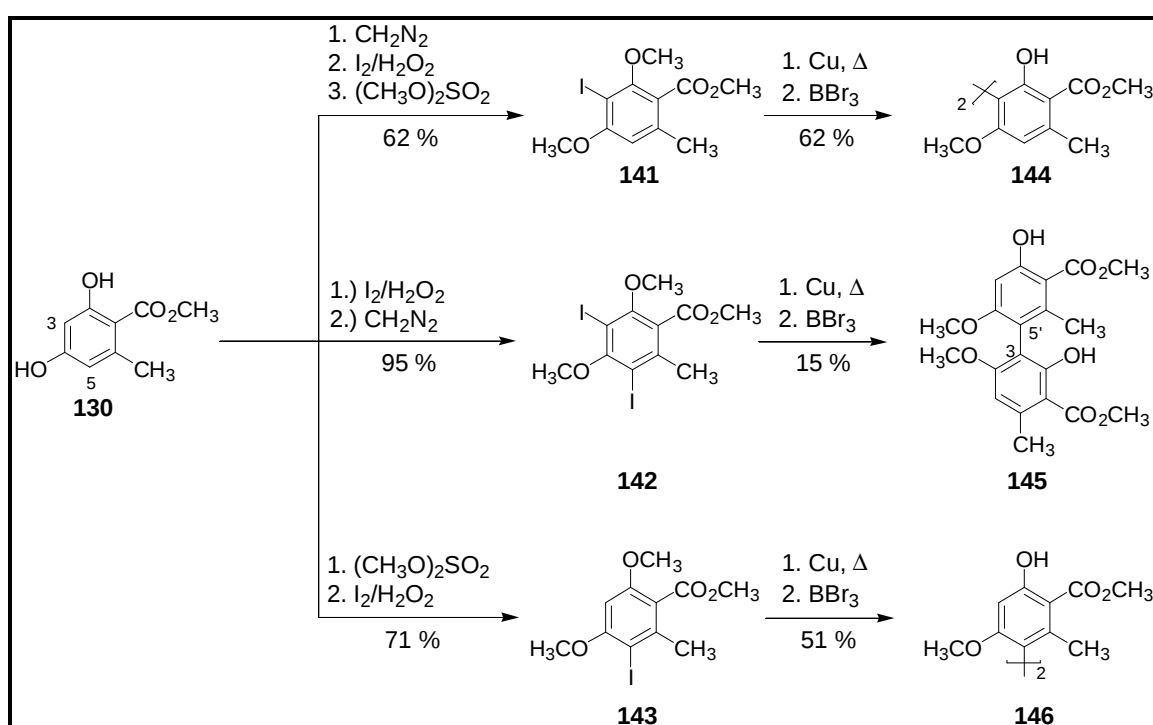
Einleitung

Die Synthese von Biarylverbindungen, die aus zwei identischen Molekülhälften bestehen, kann prinzipiell durch zwei unterschiedliche Dimerisierungsprozesse erfolgen: Zum einen über die klassische *Ullmann*-Reaktion (siehe S. 23) oder verwandte Prozesse, die unter Reduktion verlaufen, und zum anderen über oxidative Phenolkupplungen mit Oxidationsmitteln wie Kupfer(II)-, Thallium(III)-, Eisen(III)-, Ruthenium(IV)- oder Vanadium(V)salzen (siehe S. 22). Weiterhin ist die Verwendung von hypervalenten Iodverbindungen wie Bis-(trifluoracetoxy)iodphenol (PIFA) möglich.

Synthese durch Ullmann-Reaktion

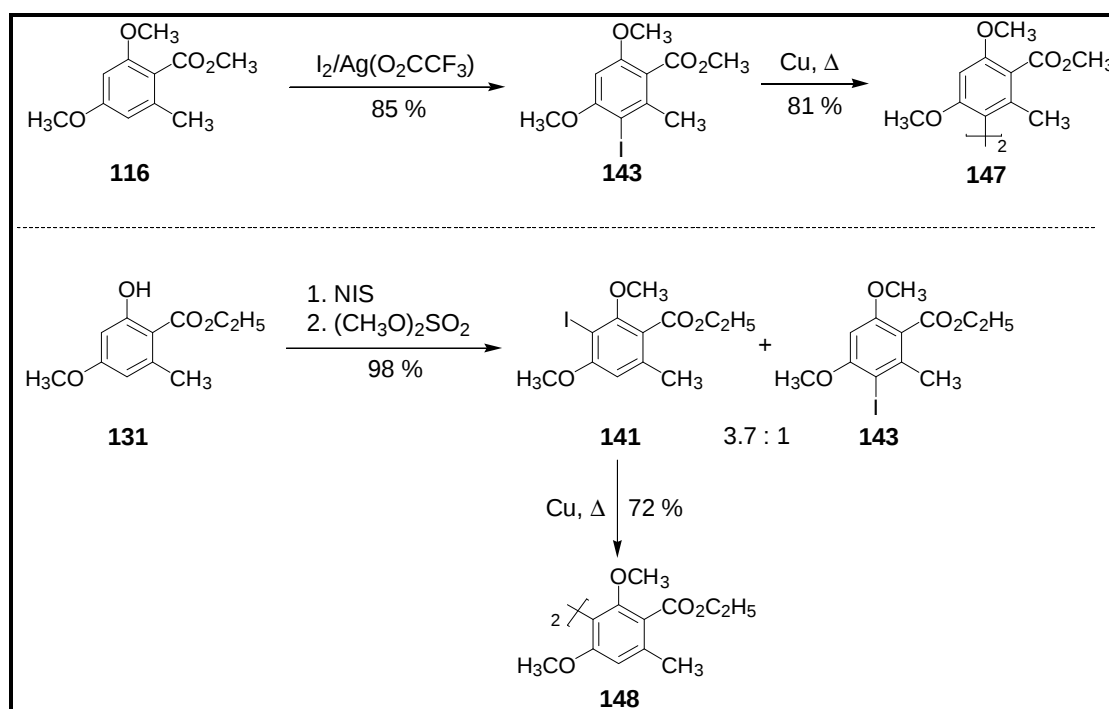
Ausgehend von monomeren, iodierten Orsellinsäurederivaten verwendete *Karl*^[6e,120] in der Gruppe von *Steglich* die *Ullmann*-Reaktion zur Synthese von dimeren Orsellinsäureestern (siehe **Schema 4-15**, S. 46). Da die Kupplungsposition durch den Iodsubstituenten im Substrat determiniert wird, kommt der regioselektiven Iodierung der monomeren

Orsellinsäureester entscheidende Bedeutung zu. Dieses Verfahren ist auf die vollständig methylierten Derivate limitiert, da freie Hydroxygruppen bei der *Ullmann*-Reaktion nicht toleriert werden. Ausgehend von 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**130**) konnte *Karl*^[6e,120] durch die Reaktionsfolge Methylierung-Iodierung-Methylierung selektiv das 3-Iod-Derivat **141** und durch die Reaktionsfolge Methylierung-Iodierung selektiv das 5-Iod-Derivat **143** synthetisieren. Diese Verbindungen wurden dann unter *Ullmann*-Bedingungen dimerisiert und die so erhaltenen symmetrischen dimeren Orsellinsäureester, **144** und **146**, regioselektiv demethyliert (siehe **Schema 4-15**). Durch Verwendung des Diiod-Derivates **142** ist die Darstellung des unsymmetrischen Biaryls **145** möglich.



Schema 4-15: Synthese dimerer Orsellinsäureester nach *Karl*.^[6e,120]

Ähnliche Ergebnisse wurden von *Giles* und *Sargent*^[121] durch die selektive Iodierung von 2,4-Dimethoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**116**) an C-5 mit Iod und Silbertrifluoracetat (siehe **Schema 4-16** oben, S. 47) und von *Hauser* und *Gauuan*^[122] durch die nicht-selektive Iodierung von 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäureethylester (**131**) an C-3 und C-5 mit *N*-Iod-succinimid erhalten (siehe **Schema 4-16** unten, S. 47).

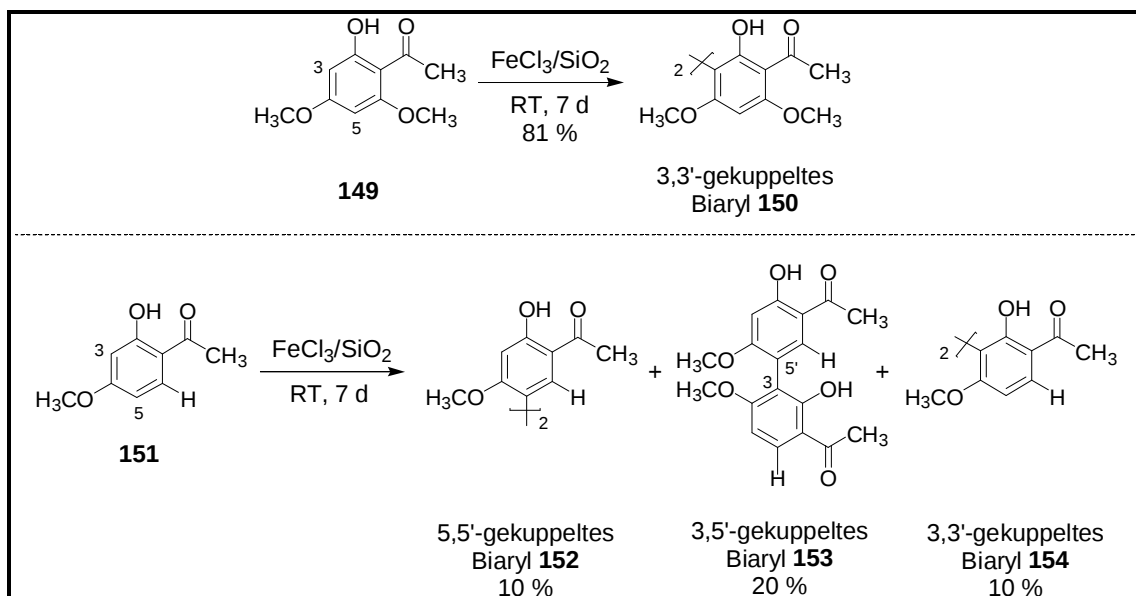


Schema 4-16: Ullmann-Reaktion von iodierten Orsellinsäurederivaten nach Sargent^[121] und Hauser.^[122]

Synthese durch oxidative Phenolkupplung

Weiterhin wurde von *Karl* auch die Darstellung von dimeren Orsellinsäureestern durch oxidative Phenolkupplung eines monomeren Orsellinsäurederivates versucht.^[120] Die Oxidation von 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**130**) sowie 2,4-Dimethoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**116**) mit diversen Oxidationsmitteln (Kupfer(III)- Eisen(III)-, Cer(III)- und Thallium(III)-Salze) war nicht erfolgreich.

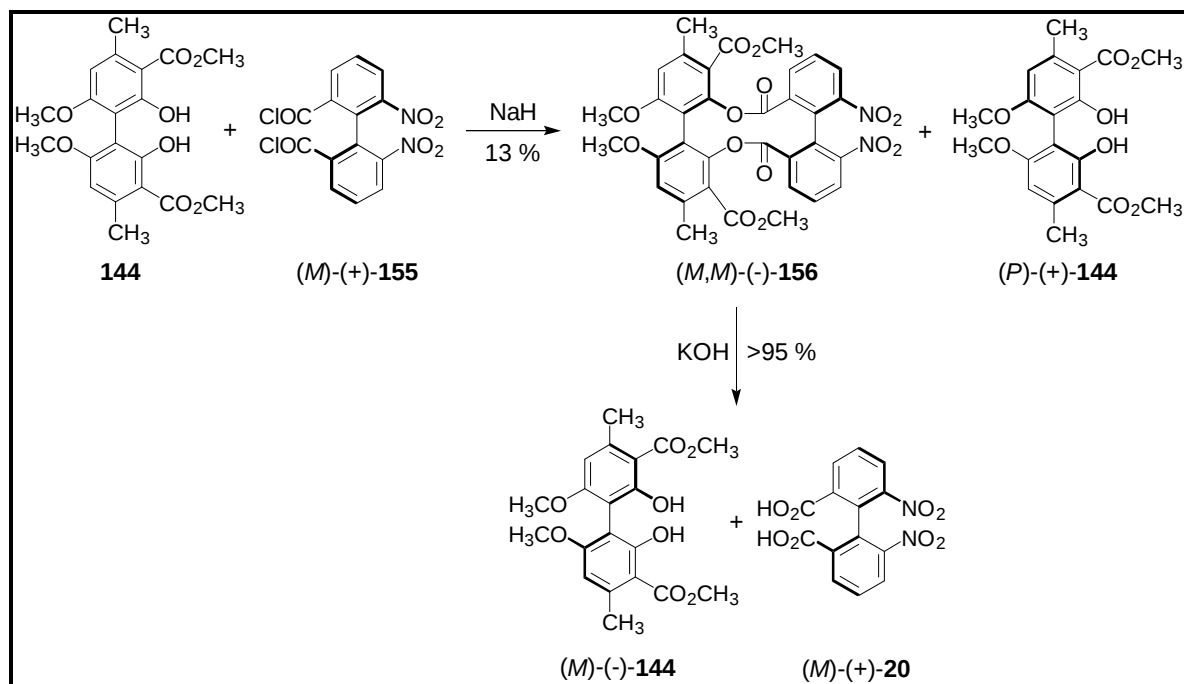
In der Literatur existieren Verfahren, bei denen Phenole mit Orsellinsäureester-ähnlichen Strukturen oxidativ dimerisiert wurden. So berichten *Parthasarathy* und *Gupta*^[123] sowie die Gruppe um *Harada*^[126] von einer oxidativen Phenolkupplung von 2-Hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenon (**149**) mit auf Kieselgel adsorbiertem Eisen(III)chlorid, die selektiv zur Bildung des an C-3 gekuppelten Biaryls **150** führt (siehe **Schema 4-17** oben, S. 48). Die Reaktion verläuft hingegen regiochemisch völlig unselektiv, wenn als Substrat 2-Hydroxy-4-methoxyacetophenon (**151**) eingesetzt wird. Dabei entstehen die symmetrischen Biaryle **152** und **154** in jeweils 10 % und das unsymmetrische Biaryl **153** in 20 % Ausbeute (siehe **Schema 4-17** unten, S. 48).^[123] Diese fehlende Selektivität bei der chemischen oxidativen Phenolkupplung mit Eisen(III)chlorid ist schon lange bekannt.^[124] Die Festkörperreaktion wurde ursprünglich von *Mazur* eingeführt und dient sowohl zur oxidativen Dimerisierung von Phenolen als auch zur Dehydratisierung von Alkoholen.^[125]



Schema 4-17: Selektive und unselektive oxidative Phenolkupplung von Acetophenonen nach *Parthasarathy* und *Gupta* ^[123] sowie *Harada et al.* ^[126]

Atropisomerentrennung

Karl konnte die beiden Atropisomeren des 3,3'-dimeren Orsellinsäureesters **144** durch Anwendung der sogenannten „Dinitrodiphenylsäurelacton-Methode“ trennen (siehe **Schema 4-18**). ^[6e,120]

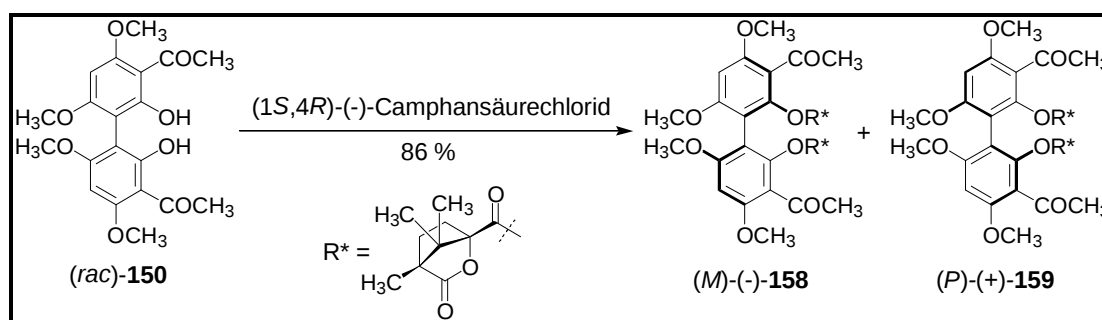


Schema 4-18: Trennung der Atropisomeren des 3,3'-dimeren Orsellinsäureesters **144** nach der Lactonmethode. ^[6e,120]

Dazu wird racemisches **144** mit optisch aktivem (*M*)-Dinitrodiphenensäuredichlorid (*M*)-(**155**) umgesetzt. Neben dem entsprechenden Dilacton (*M,M*)-**156** wird nicht umgesetztes, optisch aktives (*P*)-**144** erhalten. Die basische Hydrolyse von (*M,M*)-**156** liefert den optisch aktiven dimeren Orsellinsäureester (*M*)-**144** und das ursprünglich eingesetzte (*M*)-**155** (siehe **Schema 4-18**, S. 48). Die Umsetzung von racemischen **144** mit (*P*)-**155** liefert analoge Ergebnisse.

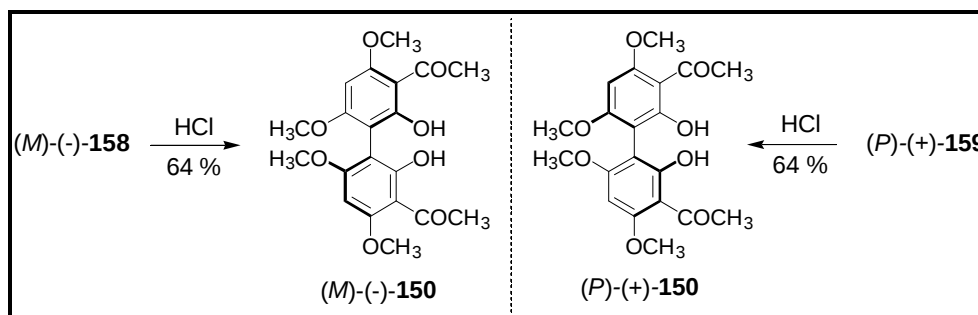
Weiterhin führte er mit den racemischen dimeren Orsellinsäureestern **147** und **148** eine säulenchromatographische Trennung an Triacetylcellulose durch. Es wurde eine Aufspaltung der Substanzen in die jeweiligen Atropisomere beobachtet. Durch das Auftreten von langgezogenen, einander überlappenden Elutionszonen wurden nur geringe Enantiomerenüberschüsse (6.7 % *ee*) erreicht.^[120]

Harada *et al.*^[126] konnten die Atropisomeren des Biphenols **150** durch Derivatisierung mit enantiomerenreinem (1*S*,4*R*)-(-)-Camphansäurechlorid^[127] (**157**) trennen. Dabei entstehen zwei diastereomere Biscamphansäureester, (*M*)-**158** und (*P*)-**159**, die sich chromatographisch voneinander trennen lassen (siehe **Schema 4-19**).



Schema 4-19: Atropisomerentrennung nach Harada *et al.*^[126]

Anschließend werden die atropisomeren Biphenole, (*M*)-**150** und (*P*)-**150**, durch Abspaltung des chiralen Derivatisierungsreagenzes erhalten (siehe **Schema 4-20**, S. 50). Bei der sauren Hydrolyse wurde eine partielle Racemisierung beobachtet, welches sich in der optischen Reinheit (79 % *ee* für das jeweilige Atropisomer) widerspiegelt.



Schema 4-20: Abspaltung des Camphansäurerestes durch saure Hydrolyse.^[126]

Eigene Arbeiten und Diskussion

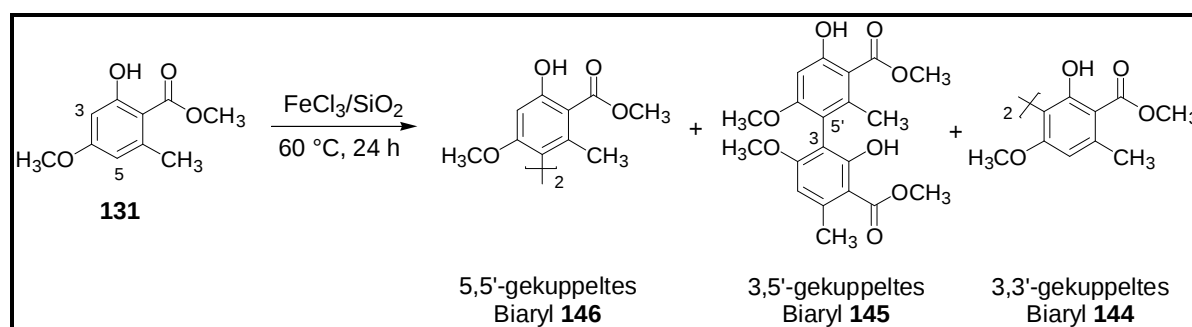
Dimerisierung durch oxidative Phenolkupplung mit Eisen(III)chlorid^[128]

Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**131**) mit den Acetophenonen **149** und **151** wurde die oxidative Phenolkupplung mit auf Kieselgel adsorbiertem Eisen(III)chlorid erprobt.

Zur Präparation des Kupplungsreagenzes wird Eisen(III)chlorid Hexahydrat in einem Gemisch aus Diethylether und Methanol gelöst und mit Kieselgel versetzt. Bei Verwendung von Ethanol findet während der Kupplungsreaktion eine Umesterung des Methylesters zum Ethylester statt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das zurückbleibende gelbe Pulver 8 h bei 0.4 mbar und 70 °C getrocknet. Bei höherer Temperatur oder längerer Trocknungszeit wird eine Braunfärbung des Rückstandes beobachtet, die auf eine Zersetzung des adsorbierten Eisenchlorids zurückzuführen ist.^[125] Das Massenverhältnis von Metallsalz zu Kieselgel beträgt 1:2. Damit ist sichergestellt, daß das FeCl₃ vollständig auf dem Trägermaterial adsorbiert wird. Zur Durchführung der eigentlichen Kupplungsreaktion wird eine Lösung von 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**131**) in Dichlormethan mit dem auf Kieselgel adsorbierten Eisen(III)chlorid versetzt, wobei eine Schwarzfärbung beobachtet wird. Das Mengenverhältnis von Substrat zu Kupplungsreagenz beträgt 1:10. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird ein schwarzes Pulver erhalten, das für 24 h bei 60 °C inkubiert wird. Der Reaktionsverlauf kann durch Dünnschichtchromatographie verfolgt werden.

Bei der säulenchromatographischen Produktisolierung wird neben den Produktfraktionen auch stets nicht umgesetztes Edukt zurückgewonnen. Außerdem wird die Bildung von nicht-identifizierbaren Nebenprodukten beobachtet, die wahrscheinlich auf die Reaktion des Metallsalzes mit dem Orsellinsäureester **131**, Esterhydrolyse oder Halogenierung

zurückzuführen sind.^[126] Zuerst eluiert der 5,5'-gekuppelte dimere Orsellinsäureester **146** als einheitliche Fraktion, anschließend eine Mischfraktion aus den 3,5'- und 3,3'-gekuppelten dimeren Orsellinsäureestern **145** und **144**. Aus dieser Mischung kristallisiert **144** aufgrund seiner geringeren Löslichkeit* in dem Laufmittelgemisch (Isohexan/Essigester) quantitativ aus.



Schema 4-21: Unselektive oxidative Phenolkupplung von Orsellinsäureester **131** (Ausbeuten siehe Tabelle 4-7, S. 52).

Die drei Kupplungsprodukte können anhand ihrer NMR-Spektren eindeutig identifiziert werden. Aufgrund einer intramolekularen Spiegelebene zeigen die Spektren der beiden symmetrischen Biaryle **144** und **146** nur den Signalsatz einer Molekülhälfte. Dabei können sie vom Edukt **131** dadurch unterschieden werden, daß nur ein aromatisches Proton bei 6.41 ppm vorhanden ist, welches mit den Methoxygruppen im Intensitätsverhältnis von 1:3 steht. Der 3,3'- und der 5,5'-dimere Orsellinsäureester unterscheiden sich im ^1H -NMR-Spektrum durch die Verschiebung der jeweiligen Methylgruppe an C-6. Bei **146** ist das Signal bei 2.10 ppm zu finden während es bei **144** deutlich tieffeldverschoben ist (2.59 ppm). Weiterhin weisen die Signale der aromatischen Ringkohlenstoffe im ^{13}C -NMR-Spektrum deutliche Verschiebungsunterschiede auf (siehe **Tabelle 4-6**, S. 52). Das unsymmetrisch verknüpfte Biaryl **145** zeigt durch das Fehlen einer intramolekularen Symmetrieebene den vollständigen Signalsatz beider Molekülhälften.

* Lösungsversuche haben gezeigt, daß **144** in Isohexan und Essigsäureethylester nur in sehr geringer Konzentration löslich ist. Nur in Chloroform kann **144** gelöst werden.

		146	144	145
		5,5'-Dimeres 146	3,3'-Dimeres 144	3,5'-Dimeres 145
Schmelzpkt. [°C]		183	246	190
¹ H-NMR (CDCl ₃)	6-CH ₃	2.10	2.59	2.60
	[ppm]			
	6'-CH ₃	-	-	2.22
¹³ C-NMR (CDCl ₃)	C-3	97.3	107.8	111.2
	[ppm]			
	C-5	119.1	106.7	106.5
	C-3'	-	-	97.5
	C-5'	-	-	115.7

Tabelle 4-6: Eigenschaften der dimeren Orsellinsäureester **144**, **145** und **146**.

Die Reaktion wird in Maßstäben von 146 mg, 500 mg und 1 g an eingesetztem Edukt **131** durchgeführt. Dabei nimmt die Gesamtausbeute an isolierten dimeren Orsellinsäureestern von 70 % über 52 % zu 49 % ab. In **Tabelle 4-7** sind die Ausbeuten der Phenolkupplung dargestellt.

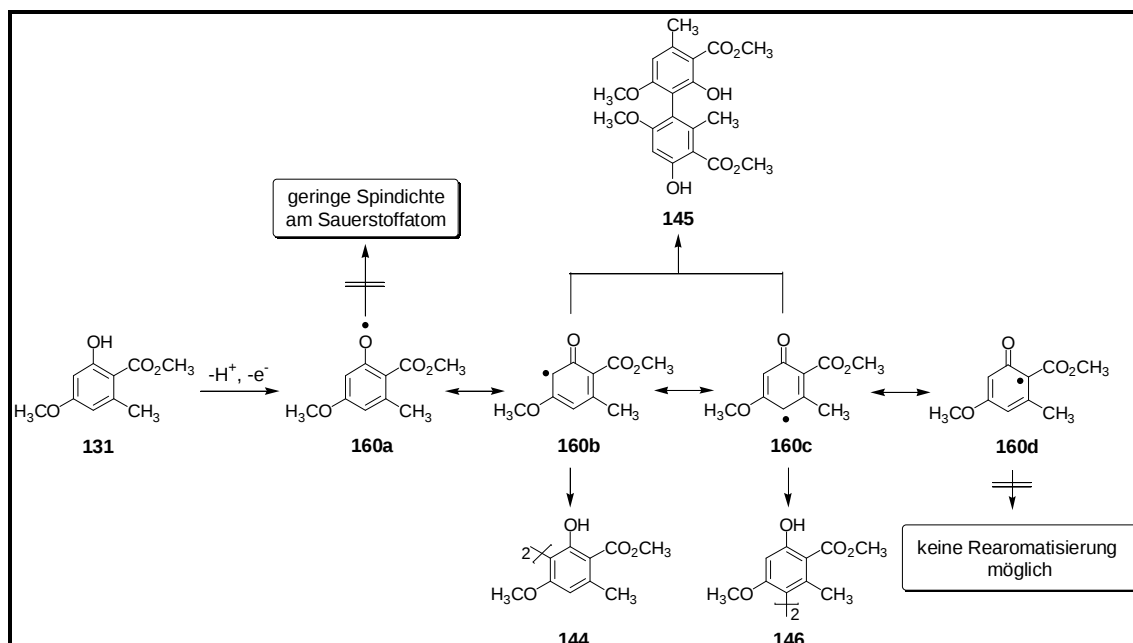
Eingesetztes	Zurückgewonnenes	5,5'-Biaryl	3,5'-Biaryl	3,3'-Biaryl
Edukt 131	Edukt 131	146	145	144
146 mg	20 mg	42 mg	38 mg	22 mg
	(14 %)	(29 %)	(26 %)	(15 %)
500 mg	100 mg	97 mg	89 mg	68 mg
	(20 %)	(20 %)	(18 %)	(14 %)
1000 mg	126 mg	167 mg	172 mg	147 mg
	(13 %)	(17 %)	(17 %)	(15 %)

Tabelle 4-7: Ausbeuten der oxidativen Phenolkupplung von Orsellinsäureester **131**.

Die oxidative Phenolkupplung von **131** mit auf Kieselgel adsorbiertem Eisen(III)chlorid verläuft unselektiv* in Bezug auf die Kupplungsposition, so daß alle denkbaren dimeren Orsellinsäureester **144**, **145** und **146** isoliert werden können. Durch einen Vergleich mit den oben beschriebenen selektiven bzw. unselektiven Dimerisierungen der Acetophenone **149** und **151** (siehe **Schema 4-17**, S. 48) kann gefolgert werden, daß die Selektivität der Reaktion insbesondere durch den Substituenten an C-6 bestimmt wird. Ein Methoxysubstituent stabilisiert durch seinen +M-Effekt das reaktive Zentrum der oxidativen Phenolkupplung an C-3 und somit die Kupplung in dieser Position. Durch den +I-Effekt eines Methylsubstituenten wird die Reaktivität des Phenols erhöht und somit die Geschwindigkeit der Dimerisierung beschleunigt aber gleichzeitig die Selektivität erniedrigt. Als ein weiterer möglicher Grund für die schnellere Reaktion ist die Esterfunktion in **131** gegenüber der Ketonfunktion in **149** und **151** zu nennen.

Die Reaktion verläuft vermutlich über radikalische Zwischenstufen (siehe **Schema 4-22**, S. 54). Dazu werden zunächst ein Proton und ein Elektron von der freien Hydroxygruppe des Substrats **131** abstrahiert. Das ungepaarte Elektron ist delocalisiert und kann sich nach dem Modell der mesomeren Grenzstrukturen am Sauerstoffatom und an den Kohlenstoffatomen in Position eins, drei und fünf aufhalten. Da in Phenolradikalen die höchsten Spindichten an den Kohlenstoffatomen gefunden werden, spielt die Kupplung von Radikalen mit dem ungepaarten Elektron am Sauerstoffatom **160a** eine untergeordnete Rolle.^[14a] Entsprechend werden bei der hier durchgeführten oxidativen Phenolkupplung keine über das O-Atom verbrückte Kupplungsprodukte isoliert (siehe **Schema 4-21**, S. 51 und **Tabelle 4-7**, S. 52). Verbindungen, die bei der Dimerisierung von Radikalen mit dem ungepaarten Elektron an C-1 von **160d** entstehen, können durch die Anwesenheit eines Substituenten an dieser Position nicht rearomatisieren (siehe **Schema 4-22**, S. 54). Die beiden anderen mesomeren Grenzstrukturen, **160b** und **160c**, sind in etwa gleichberechtigt vertreten, so daß durch Radikal-Radikal-Kupplung die drei regioisomeren Biaryle **144**, **145** und **146** entstehen (siehe **Schema 4-22**, S. 54). Als Zwischenstufen treten vermutlich Cyclohexadienone auf, die sich in die entsprechenden Phenole umlagern.

* Bei einer völligen Unselektivität der Reaktion wäre ein statistisches Produktverhältnis der dimeren Orsellinsäureester von 1(5,5') : 2(3,5') : 1(3,3') zu erwarten. Bei einer selektiven Reaktion wäre die Bildung eines einzigen Reaktionsproduktes zu erwarten. Hier werden in Abhängigkeit von der Ansatzgröße Produktverhältnisse von 1.9(5,5') : 1.7(3,5') : 1(3,3') bis zu 1.1(5,5') : 1.1(3,5') : 1(3,3') beobachtet.



Schema 4-22: Mechanismus der oxidativen Phenolkupplung von 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**131**).

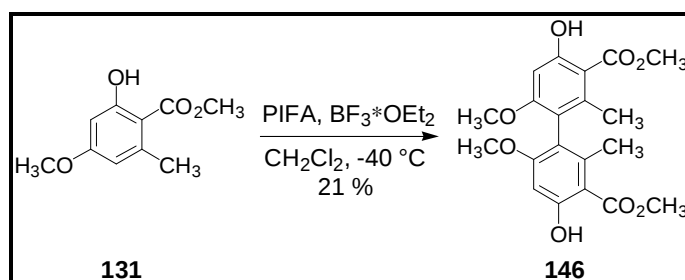
Die Dimerisierung anderer Orsellinsäurederivate gelingt mit dieser Methode nicht. So führt die Umsetzung von 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**130**) oder 2,4-Dimethoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**116**) zu Zersetzungs- und Halogenierungsprodukten.*

Dimerisierung durch oxidative Phenolkupplung mit Bis(trifluoracetoxy)iodphenol (PIFA)

Hypervalente Iodverbindungen sind mittlerweile als nicht oder nur wenig giftige Alternativen zu Schwermetallreagenzien in der organischen Synthese etabliert.^[129] Gerade in der inter- und intramolekularen Oxidation von Phenolen ersetzen Verbindungen wie Diacetoxyiodphenol (PIDA) oder Bis(trifluoracetoxy)iodphenol (PIFA) giftige Thallium(III)salze.

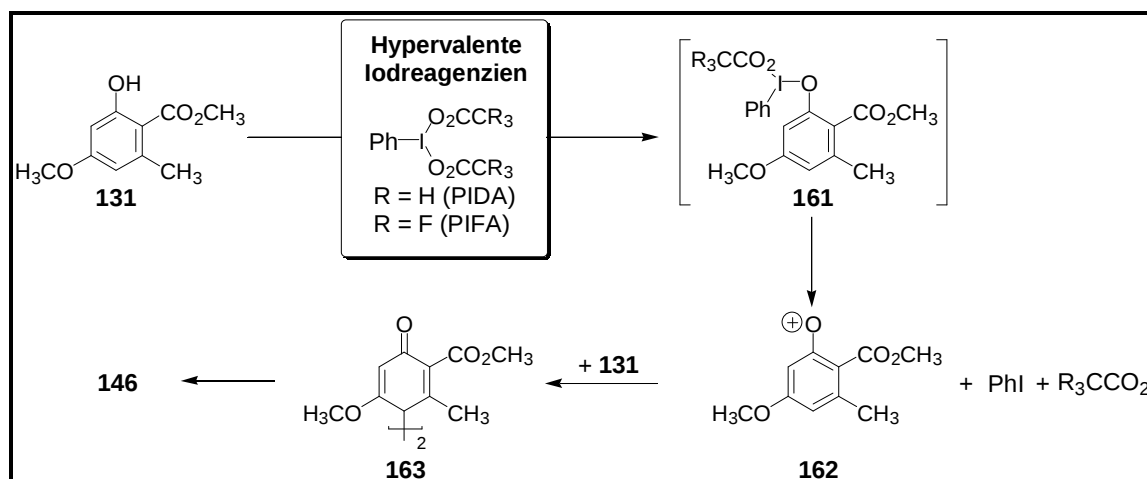
Die Möglichkeit zur intermolekularen Reaktionsführung der oxidativen Phenolkupplung wird am Beispiel der Umsetzung des Orsellinsäureesters **131** mit PIFA und Bortrifluorid-Etherat aufgezeigt. Im Gegensatz zur Dimerisierung mit $\text{FeCl}_3/\text{SiO}_2$ entsteht selektiv der 5,5'-gekuppelte dimere Orsellinsäureester **146** in 21 % Ausbeute (siehe **Schema 4-23**, S. 55).

* Bei der Reaktion von **116** mit $\text{FeCl}_3/\text{SiO}_2$ kann in 2 % Ausbeute ein Produkt isoliert werden, bei dem ein Proton durch einen Chlorsubstituenten ersetzt worden ist. Dies konnte durch ein Massenspektrum verifiziert werden ($M = 244$ g/mol). Die Position des Halogenatoms konnte nicht aufgeklärt werden.



Schema 4-23: Selektive, oxidative Phenolkupplung von Orsellinsäureester **131**.

Die hier beobachtete Selektivität ist auf einen Reaktionsmechanismus zurückzuführen, bei dem keine freien Radikale auftreten.^[130] Typischerweise verläuft die Reaktion über eine nicht isolierbare Zwischenstufe **161**, bei der das phenolische Sauerstoffatom des Substrats **131** an das Iodatom der hypervalenten Iodverbindung koordiniert. Dieses Intermediat zerfällt in das Phenoxeniumion **162**, Iodbenzen und das entsprechende Carboxylat-Ion. Durch einen intermolekularen Angriff eines zweiten Phenols bildet sich das Cyclohexadienonsystem **163**, welches sich anschließend in das Biaryl **146** umlagert (siehe **Schema 4-24**). Der Angriff findet bevorzugt an dem Kohlenstoffatom statt, welches die höchste Elektronendichte besitzt. Durch den +M-Effekt der Methoxygruppe an C-4 und den +I-Effekt der Methylgruppe an C-6 ist C-5 das Kohlenstoffatom mit der höchsten Elektronendichte.



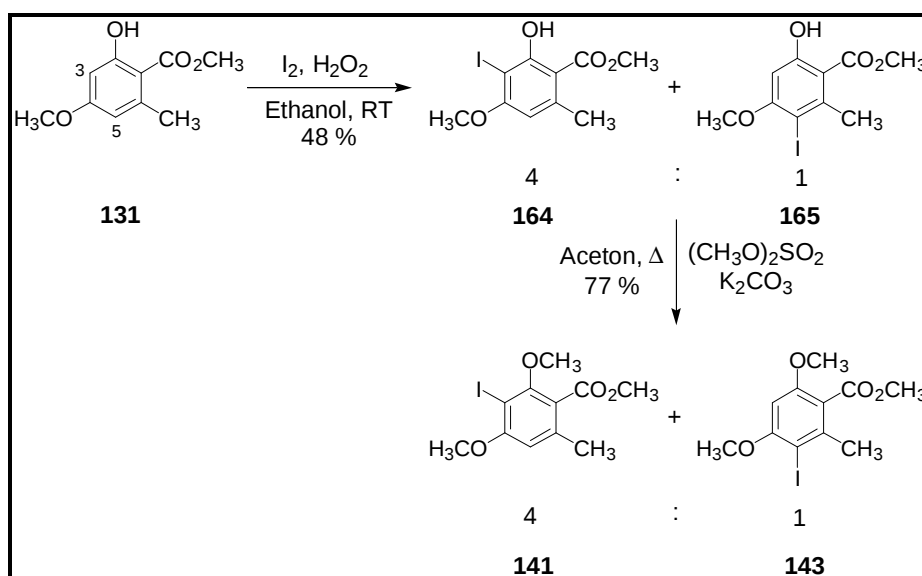
Schema 4-24: Möglicher Mechanismus der selektiven, intermolekularen Dimerisierung von Orsellinsäureester **131** mit hypervalenten Iodreagenzien.^[130]

Dimerisierung durch Ullmann-Reaktion

Zentrales Problem bei der Synthese von dimeren Orsellinsäureestern ist die regioselektive Halogenierung (Iodierung) von den monomeren Vorläufern, da durch die Position des Iod-

substituenten die Kupplungsposition bestimmt wird. Außerdem müssen die Hydroxygruppen der monomeren Orsellinsäureester vollständig methyliert sein, da freie OH-Funktionen bei der Kupplungsreaktion nicht toleriert werden.

Zur regioselektiven Iodierung sollte eine Methode verwendet werden, die zuvor auch von *Karl*^[6e,120] benutzt und ursprünglich von *Marsh*^[131] zur Iodierung von Naphthol etabliert wurde: Iod und Wasserstoffperoxid werden zu einer Lösung von Orsellinsäureester **131** in Ethanol gegeben. Durch Zugabe von Wasser zur Reaktionslösung fällt ein Gemisch der beiden an C-3 und C-5 monoiodierten Orsellinsäurederivate **164** und **165** (Verhältnis 4:1) mit einer Gesamtausbeute von 48 % aus. Eine säulenchromatographische Trennung der beiden Verbindungen ist erst nach Methylierung der freien Hydroxygruppe an C-2 möglich (siehe **Schema 4-25**). Die an C-3 und C-5 iodierten Derivate des 2,4-Dimethoxy-6-methylbenzoesäureester **141** und **143** werden mit einer Ausbeute von 77 % im Verhältnis 4:1 isoliert.



Schema 4-25: Iodierung von 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**131**).

Obwohl die Reaktion unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, die auch *Karl*^[6e,120] verwendete, wird keine selektive Iodierung an C-3 sondern lediglich eine bevorzugte Bildung des 3-Iod-Derivates **141** beobachtet (siehe **Schema 4-25**). Eine mögliche Ursache dafür ist die Reversibilität der Iodsubstitution an Aromaten, die zur „Wanderung“ der Iodatome führen kann.^[132] *Hauser* berichtet von ähnlichen Ergebnissen.^[122]

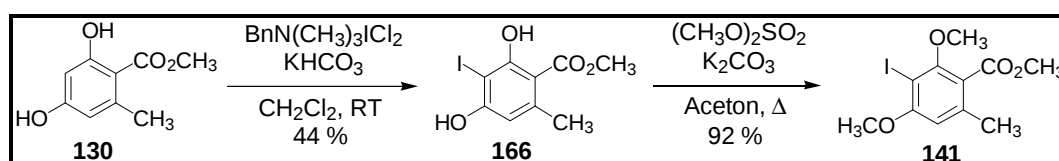
Die NMR-Spektren der beiden Regioisomeren **141** und **143** weisen deutliche Unterschiede auf. Besonders die Verschiebungen der jeweiligen Methylgruppe an C-6 und des aroma-

tischen Protons bzw. des mit ihm verknüpften Kohlenstoffatoms sind für die Verbindungen charakteristisch (siehe **Tabelle 4-8**).

		141	143
		3-Iod-Derivat 141	5-Iod-Derivat 143
Schmelzpkt. [°C]		72	133
¹ H-NMR (CDCl ₃)	6-CH ₃	2.28	2.40
	[ppm]		
	3-H	-	6.31
	5-H	6.44	-
¹³ C-NMR (CDCl ₃)	6-CH ₃	19.7	26.0
	[ppm]		
	C-3	121.7	92.8
	C-5	108.4	117.4

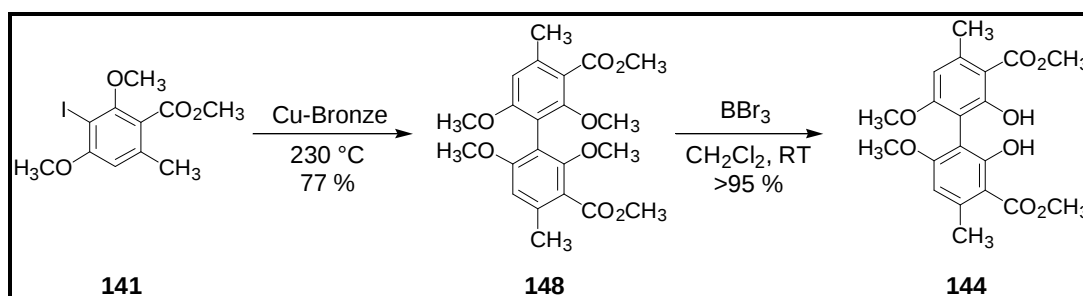
Tabelle 4-8: Eigenschaften der iodierten Orsellinsäureester **141** und **143**.

Durch Verwendung von Benzyltrimethylammoniumdichloriodat ist es möglich 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**130**) regioselektiv in 44 % Ausbeute an C-3 zu iodieren (siehe **Schema 4-26**).^[133] Die besten Ergebnisse bezüglich der Ausbeute (48 % über zwei Stufen) werden erreicht, wenn das Rohprodukt ohne weitere Reinigung mit Dimethylsulfat methyliert wird.



Schema 4-26: Selektive Iodierung von 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**130**).

2,4-Dimethoxy-3-iodo-6-methylbenzoesäuremethylester (**141**) wird als Substrat in der *Ullmann*-Reaktion eingesetzt. Dazu wird es innig mit aktivierter Kupferbronze^[134] vermischt und für 6 h im Metallbad auf 230 °C erhitzt. Aus dem Schmelzkuchen wird durch Extraktion und säulenchromatographische Reinigung das 3,3'-gekoppelte Dimer **148** in 77 % Ausbeute isoliert. Durch regioselektive und quantitative Demethylierung mit Bortribromid wird der dimere Orsellinsäureester **144** erhalten (siehe **Schema 4-27**, S. 58). Eine Synthese des 5,5'-gekoppelten dimeren Orsellinsäureesters wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.



Schema 4-27: Ullmann-Reaktion von 3-Iod-2,4-dimethoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**141**).

Vergleich der beiden Kupplungsmethoden

➤ Regioselektivität:

Die oxidative Phenolkupplung mit Eisen(III)chlorid liefert drei regioisomere Kupplungsprodukte. Die Produktverteilung ist nicht völlig statistisch, so daß nicht von einer völlig unselektiven Reaktion gesprochen werden kann. Bei der oxidativen Dimerisierung mit PIFA als Oxidationsmittel wird selektiv der 5,5'-gekuppelte dimere Orsellinsäureester **146** erhalten. Die Ullmann-Reaktion verläuft ebenfalls regioselektiv, da die Kupplungsposition durch den Iodsubstituenten im Substrat vorgegeben ist. Hier wird das Problem der Selektivität auf die Halogenierung des monomeren Orsellinsäureesters vorverlagert. Die regioselektive Iodierung kann durch unterschiedliche Iodierungsreagenzien erreicht werden.

➤ Anzahl der Stufen und Atomökonomie:^[135]

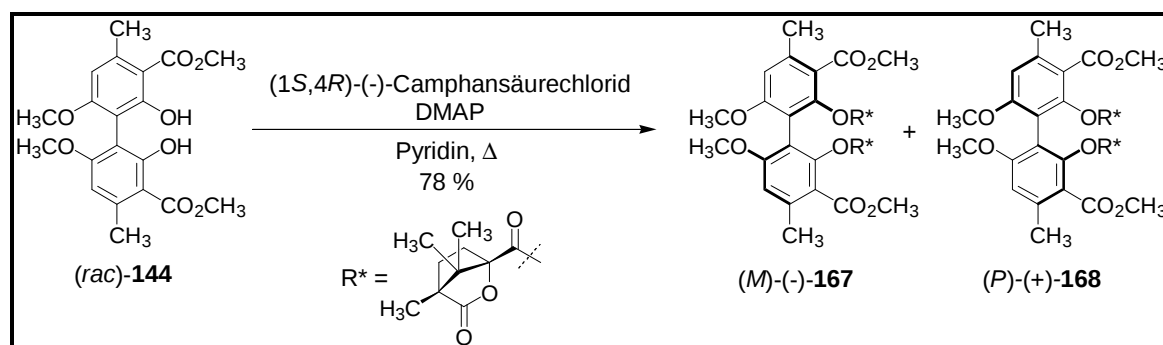
Die Ullmann-Reaktion verläuft im Falle des 3,3'-gekuppelten Biaryls **144** ausgehend von 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**131**) über vier Stufen mit einer Gesamtausbeute von 30 %. Nach Karl ist für die beiden anderen regioisomeren dimeren Orsellinsäureester **146** und **145** jeweils eine vierstufige Syntheseroute notwendig, die mit einer Ausbeute von 36 % (**146**) bzw. 15 % (**145**) verläuft. Im Vergleich dazu liefert die oxidative Phenolkupplung alle drei Regioisomere in nur zwei Reaktionsstufen mit einer Ausbeute von 56 %. Im Sinne der Atomökonomie ist die reduktive Kupplungsmethode ineffizient, da der schwere Iodsubstituent des Substrats kein Bestandteil des Produkts ist.

➤ Synthetischer Nutzen:

Da in der *Ullmann*-Reaktion weder freie Hydroxygruppen noch sterisch anspruchsvolle Substituenten akzeptiert werden, ist diese Kupplungsmethode auf die vollständig methylierten Orsellinsäurederivate beschränkt. Die bei der oxidativen Dimerisierung fehlende Regioselektivität kann von großem präparativen Nutzen sein, da alle drei hochfunktionalisierten Biarylverbindungen durch Säulenchromatographie und Kristallisation in reiner Form isoliert werden können. Diese dimeren Orsellinsäureester können daher als wertvolle Bausteine zu der Synthese von strukturell eng verwandten Biarylnaturstoffen verwendet werden.

Atropisomerentrennung^[128]

Zur Trennung der Atropisomere wird der racemische 3,3'-dimere Orsellinsäureester (*rac*)-**144** in Analogie zu dem Verfahren nach *Harada et al.*^[126] an seinen beiden freien Hydroxygruppen mit kommerziell erhältlichem, enantiomerenreinem (1*S*,4*R*)-(-)-Champhansäurechlorid (**157**) verestert und somit in zwei Diastereomere überführt (siehe **Schema 4-28** und **Tabelle 4-9**). Bei der säulenchromatographischen Trennung dieses Diastereomerengemisches wird zuerst Biscamphanat (*M*)-(-)-**167** und dann (*P*)-(+)-**168** eluiert. Beide Diastereomere können in jeweils 39 % Ausbeute isoliert werden.



Schema 4-28: Veresterung von (*rac*)-**144** mit (-)-Camphansäurechlorid (**157**) und Trennung der dabei entstehenden Diastereomere.

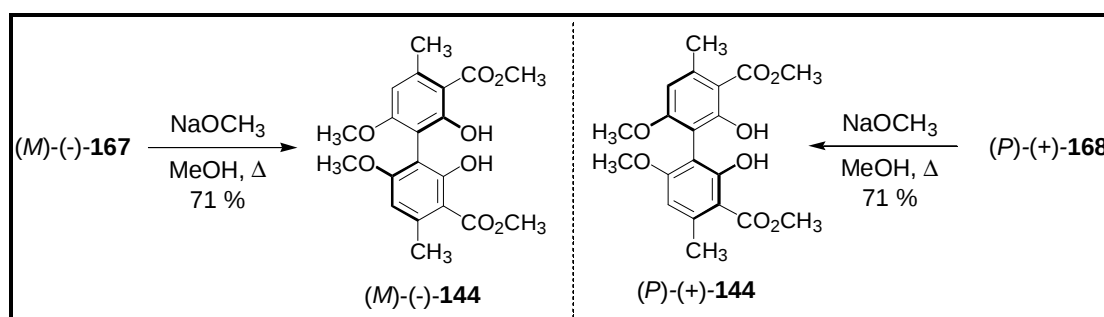
	(<i>M</i>)-(-)- 167	(<i>P</i>)-(+)- 168
Schmelzpkt. [°C]	127	223
R_f (Isohexan/EE = 1:1)	0.38	0.31
$[\alpha]_D^{20}$ (CHCl ₃)	-16.2 (c = 1.1)	15.0 (c = 1.3)
¹ H-NMR (CDCl ₃) [ppm]	3 × CH ₃ 0.47, 0.81, 0.99	0.82, 0.88, 1.03

Tabelle 4-9: Physikalische Eigenschaften der Diastereomere (*M*)-(-)-**167** und (*P*)-(+)-**168**.

Die beiden Diastereomere werden durch die Verschiebungen der sechs Methylgruppen der beiden Camphansäurereste im NMR-Spektrum unterschieden. Bei dem zuerst eluierenden Biscamphanat (*M*)-(-)-**167** weisen die entsprechenden Signale eine Verschiebung von 0.47, 0.81 und 0.99 ppm auf. Bei (*P*)-(+)-**168** liegen diese bei 0.82, 0.88 und 1.03 ppm (siehe **Tabelle 4-9**).

Die Diastereomerenreinheit beträgt jeweils >95 %, da in den ^1H -NMR-Spektren der beiden Verbindungen nur Signale von je einem Diastereomer aufgelöst sind. Durch Umkristallisation des Biscamphanats (*M*)-(-)-**167** aus *n*-Hexan/Essigsäureethylester werden farblose Prismen erhalten ($0.40 \times 0.35 \times 0.30$ mm), die röntgenkristallographisch untersucht werden.* Die absolute Konfiguration der Biarylachse wird dabei unter Berücksichtigung der bekannten Stereochemie der Camphansäurereste als interner Standard zu *M* bestimmt.

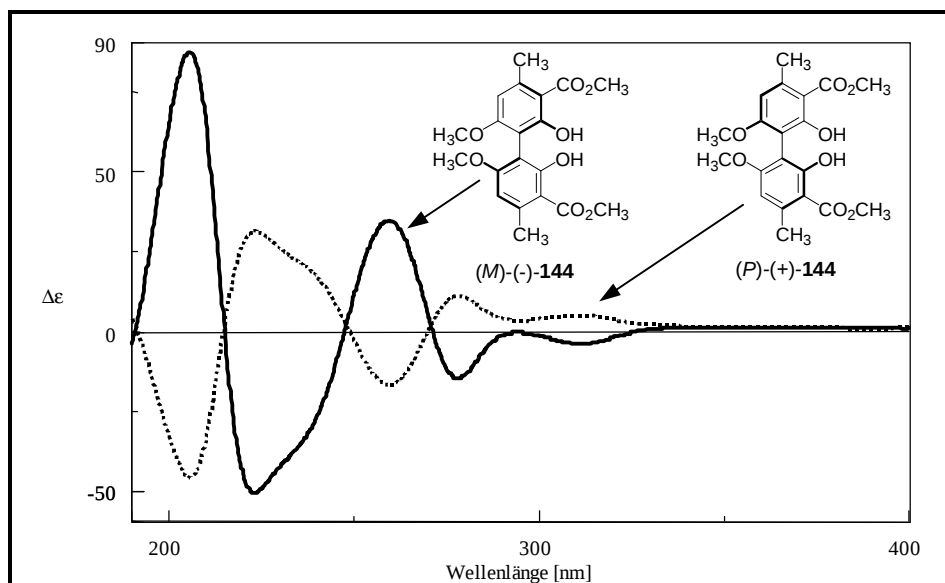
Die Abspaltung des Camphansäurerestes nach der Diastereomerentrennung erfolgt durch Umesterung mit Natriummethylat, wobei die beiden atropisomeren Orsellinsäureester (*M*)-(-)-**144** und (*P*)-(+)-**144** in jeweils 71 % Ausbeute erhalten werden (siehe **Schema 4-29**).



Schema 4-29: Abspaltung des Camphansäurerestes durch Umesterung mit Natriummethylat.

In **Abbildung 4-4** und **Tabelle 4-10** auf S. 61 sind die chiroptischen Eigenschaften der Atropisomere (*M*)- und (*P*)-**144** dargestellt. Die Kurven der beiden CD-Spektren verlaufen nicht völlig achsensymmetrisch. Offensichtlich besitzt (*P*)-(+)-**144** einen geringeren Enantiomerenüberschuß als (*M*)-(-)-**144**, da bei der chromatographischen Trennung der Diastereomere (*M*)-(-)-**167** und (*P*)-(+)-**168** die Elutionszonen teilweise überlappen.

* Die kristallographischen Daten sind in Kapitel 7 ab S. 179 zu finden und zusätzlich beim Cambridge Crystallographic Data Centre unter CCDC-197800 hinterlegt.

Abbildung 4-4: Circulardichroismusspektren von (M)-(-)-**144** (durchgezogen) und (P)-(+)-**144** (punktiert).

		(M)-(-)- 144	(P)-(+)- 144
Schmelzpkt. [°C]		229	229
$[\alpha]_D^{20}$ (CHCl ₃)		-53.3 (c = 0.15)	36.4 (c = 0.11)
Mol. CD (TFE)	205 nm	96.6	-51.0
	224 nm	-56.1	35.3
	260 nm	37.9	-18.5
	278 nm	-17.1	12.6
	311 nm	-5.0	6.3

Tabelle 4-10: Chiroptische Eigenschaften der Atropisomeren (M)-(-)-**144** und (P)-(+)-**144**.

Diese Methode stellt im Vergleich zu dem Verfahren von *Karl*^[6e,120] (siehe **Schema 4-18**, S. 48) einen sehr effizienten Zugang zu beiden Atropisomeren des 3,3'-gekoppelten dimeren Orsellinsäureesters **144** in guten Ausbeuten dar. Die Umsetzung von Camphansäurechlorid mit dem 5,5'-Dimeren **146** und dem 3,5'-Dimeren **145** führt ebenfalls zu den entsprechenden Biscamphansäureestern. Die jeweiligen Diastereomere lassen sich aber nicht säulen- oder dünnschichtchromatographisch an Kieselgel trennen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß sich die beiden Camphansäurereste nicht in direkter Nachbarschaft zur Biarylachse befinden. Somit sind sie sterisch weniger gehindert und haben einen geringeren Einfluß auf die Konformation der Diastereomere. Die Unterschiede in den physikalischen Eigenschaften sind dann zu gering, um eine Trennung zu ermöglichen. Für die Atropisomerentrennung könnten zum Beispiel noch folgende Methoden verwendet werden:

- Durch Demethylierung der Biaryle **145** und **146** würden zusätzlich jeweils zwei *ortho*-Hydroxyfunktionen entstehen, an denen die Derivatisierung erfolgen kann.
- Es können andere enantiomerenreine Auxiliare wie z. B. Mandelsäure verwendet werden. Als Beispiel sei hier die von *Gill et al.* durchgeführte Bestimmung der absoluten Konfiguration sowie des Enantiomerenüberschuß von natürlich vorkommenden Dihydroanthracenonen durch Derivatisierung mit (*S*)-*O*-Methylmandelsäure genannt.^[136]
- Alternativ ist auch eine Trennung der racemischen Biaryle ohne Derivatisierung oder der diastereomeren Bisester durch LC-Verfahren mit chiralen, stationären Phasen möglich. Dies kann, wie *Karl*^[120] gezeigt hat, durch Säulenchromatographie an Triacetylcellulose oder durch HPLC erfolgen. Für letztere Methode haben *Tobler et al.* eine chirale stationäre Phase entwickelt, die auf einem Chinin-Derivat als chiralen Selektor beruht.^[137]

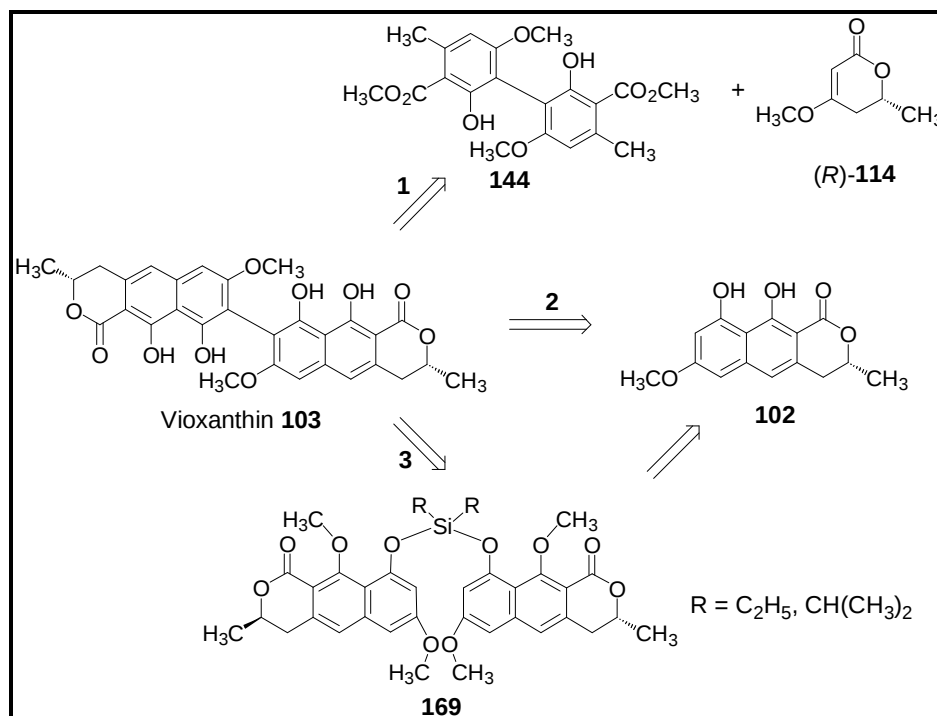
4.2.3 Versuche zur Synthese von Vioxanthin

Einleitung

Zur Synthese des Biaryl-naturstoffes Vioxanthin **103** wurden drei verschiedene Strategien verfolgt (siehe **Schema 4-30**, S. 63):

- (1) Das zur Synthese von *semi*-Vioxanthin **102** analoge Verfahren der Tandem-*Michael*-Reaktion eines dimeren Orsellinsäureesters **144** mit dem chiralen Pyranon **114**. In Arbeiten von *Karl*,^[120] *Hauser*^[122] und *Müller*^[38b] wurde bereits von Anellierungen diesen Typs mit dimeren Orsellinsäureestern berichtet.
- (2) Die direkte Umsetzung von *semi*-Vioxanthin **102** mit einem Oxidationsmittel im Sinne einer oxidativen Phenolkupplung. Diese Reaktion wurde von *Zeeck et al.* mit diversen Oxidationsmitteln erfolglos versucht (siehe **Schema 4-5**, S. 39). In Arbeiten von *Bringmann et al.* wird von der oxidativen Dimerisierung von Korupensaminen zu Michellaminen mit Bis(trifluoracetoxy)iodphenol (PIFA) berichtet.^[138] Diese Vorgehensweise soll auf **102** übertragen werden.

- (3) Die intramolekulare oxidative Phenolkupplung eines verbrückten *semi*-Vioxanthin-Derivates **169** mit PIFA: Dazu soll ein von *Kita et al.* eingeführtes Verfahren verwendet werden, bei dem eine intramolekulare oxidative Dimerisierung zweier Phenole, welche über eine Silylbrücke miteinander verbunden sind, in *ortho*-Position zur OH-Funktion erzwungen wird.^[139]

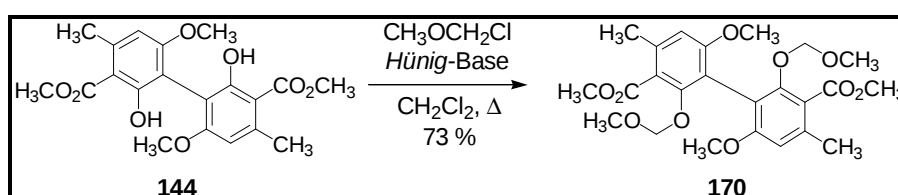


Schema 4-30: Retrosynthetische Analyse von Vioxanthin **103**.

Eigene Arbeiten und Diskussion

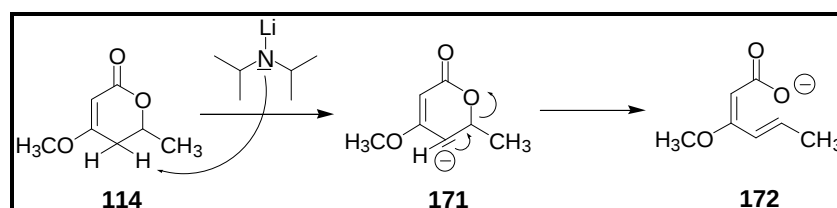
(1) Tandem-Michael Reaktion

In **Schema 4-30** ist zu erkennen, daß Vioxanthin **103** durch eine Tandem-Michael-Reaktion des 3,3'-dimeren Orsellensäureesters **144** mit dem chiralen Pyranon (*R*)-**114** zugänglich sein sollte. Dazu werden zunächst die beiden freien Hydroxygruppen des Biaryls **144** mit einer Methoxymethylgruppe geschützt. Nach erfolgter Reaktion wird **170** in 73 % Ausbeute isoliert (siehe **Schema 4-31**, S. 63).



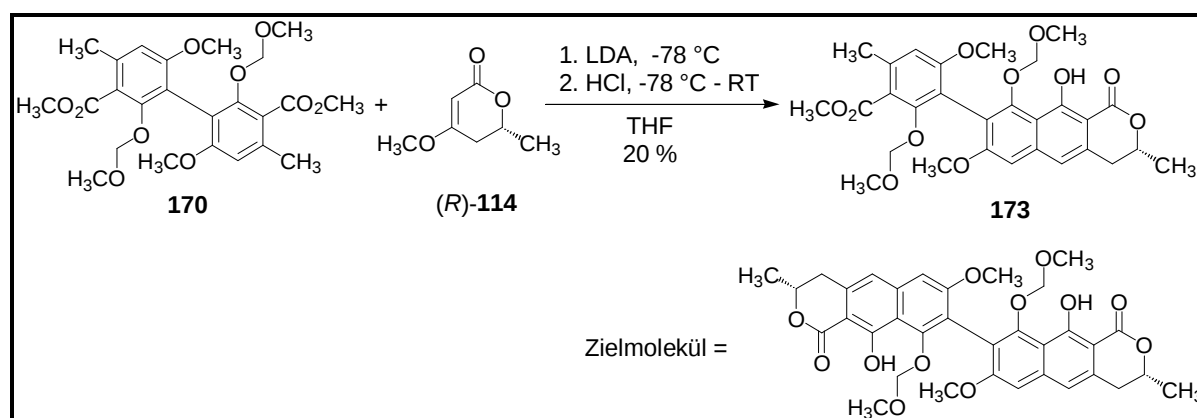
Schema 4-31: Einführung der MOM-Schutzgruppe.

Bei der Tandem-*Michael*-Reaktion des MOM-geschützten dimeren Orsellinsäureesters **170** mit dem *Michael*-Akzeptor (*R*)-**114** ist auf einen ausreichenden Überschuß an Base (LDA) zu achten, um eine Deprotonierung der beiden benzylichen Methylgruppen zu gewährleisten. Andererseits unterliegt das Pyranon bei zu großem Basenüberschuß (8 Äquivalente bezogen auf **170**) einer Zersetzungsreaktion. Dabei wird zunächst ein Proton an C-5 abstrahiert und anschließend das Lacton **171** zur β -Methoxysorbinsäure (**172**) geöffnet (siehe **Schema 4-32**).



Schema 4-32: Zersetzungsreaktion von Pyranon **114** zu β -Methoxysorbinsäure (**172**).

Es musste daher ein optimales Verhältnis von Base (LDA) (6 Äquivalente) zu *Michael*-Akzeptor **114** (3 Äquivalente) ermittelt werden. Bei der nun stattfindenden Tandem-*Michael*-Reaktion kann ein Anellierungsprodukt **173** isoliert werden, dessen ^1H -NMR-Spektrum drei aromatische Signale bei 6.63, 6.88 und 6.96 ppm zeigt. Da das eigentliche Zielmolekül zwei Signale im aromatischen Bereich zeigen sollte, liegt hier das Monoanellierungsprodukt **173** vor (siehe **Schema 4-33**). Dies wird dadurch bestätigt, daß im ^1H -NMR-Spektrum insgesamt fünf Methoxygruppen und eine zusätzliche Methylgruppe bei 2.40 ppm zu finden sind.



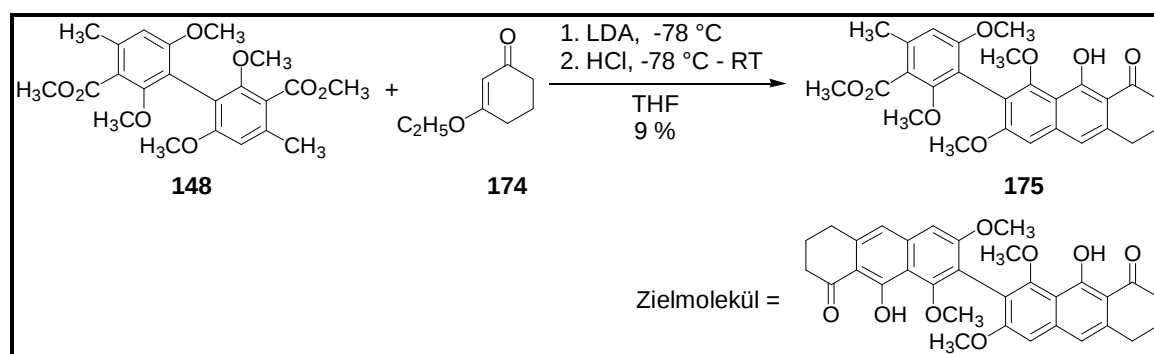
Schema 4-33: Tandem-*Michael*-Reaktion des dimeren Orsellinsäureesters **170** mit dem chiralen Pyranon (*R*)-**114**.

In **Tabelle 4-11** sind die verschiedenen Basen- und *Michael*-Akzeptor-Konzentrationen sowie das daraus resultierende Produktverhältnis* von β -Methoxysorbinsäure (**172**) zu Monoanellierungsprodukt **173** gegenübergestellt.

LDA (eq)	Pyranon (<i>R</i>)- 114 (eq)	Verhältnis LDA:(<i>R</i>)- 114	Produktverhältnis 172 : 173
8	8	1.0	16:1
8	6	1.3	18:1
6	6	1.0	15:1
4	3	1.3	13:1
6	3	2.0	1:1

Tabelle 4-11: Übersicht über die verwendeten Konzentrationsverhältnisse bei der Tandem-*Michael*-Reaktion des dimeren Orsellinsäureesters **170** und des chiralen Pyranons (*R*)-**114**.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der oben beschriebenen Monoanellierung um ein spezielles Problem bei der Verwendung dieser Reaktanden handelt, wird ein Modellsystem verwendet, mit dem bereits eine vollständige Anellierung beobachtet wurde.^[38b] Hierbei wird als dimerer Orsellinsäureester das Tetramethoxyderivat **148** und als *Michael*-Akzeptor das kommerziell erhältliche 3-Ethoxycyclohex-2-en-1-on (**174**) verwendet, welches auch gegenüber einem großen Basenüberschuß stabil ist. Bei diesem System kann ebenfalls ausschließlich das Monoanellierungsprodukt **175** in 9 % Ausbeute isoliert werden (siehe **Schema 4-34**).

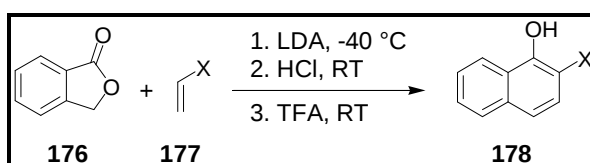


Schema 4-34: Tandem-*Michael*-Reaktion des dimeren Orsellinsäureesters **148** mit dem Cyclohexenon **174**.

* Das Produktverhältnis wurde im ¹H-NMR-Spektrum des isolierten Rohproduktes bestimmt. Dazu wurde das Integral des Signals bei 7.22 ppm für β -Methoxysorbinsäure (**172**) im Verhältnis zu dem Integral des Signals bei 13.06 ppm für das Monoanellierungsprodukt **173** bestimmt. Beide Signale entsprechen jeweils einem Proton.

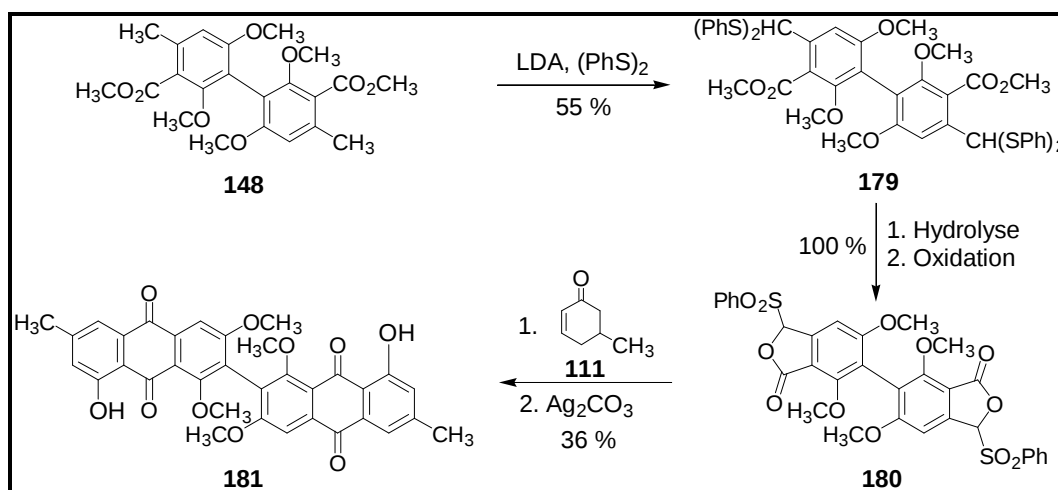
Versuche zur Tandem-*Michael*-Reaktion mit dem isolierten Monoanellierungsprodukt **175** führten nicht zu einer Anellierung der zweiten Hälfte des dimeren Orsellinsäureesters.

Es ist bislang unklar, ob dieses Reaktionsverhalten durch Deprotonierung nur einer benzyli-schen Methylgruppe oder durch ein Problem bei dem nukleophilen Angriff des Benzylanions an das *Michael*-System und der folgenden Cyclisierungsreaktion verursacht wird. Als alternatives Anellierungsverfahren könnte die auf *Broom* und *Sammes*^[140] zurückgehende „Phthalid-Methode“ angewendet werden (siehe **Schema 4-35**).



Schema 4-35: Reaktionsschema der Anellierung von Phthaliden **176** mit *Michael*-Akzeptoren **177**.^[140]

Basierend auf diesem Prinzip wurde von *Hauser*^[122] ausgehend von dem dimeren Orsellinsäureester **148** der Biarylnaturstoff Biphyscion **181** synthetisiert (siehe **Schema 4-36**). Schlüsselschritte sind dabei die Thiophenylierung des Biaryls **148** und die Kondensation des Phthalides **180** mit dem Cyclohexenon **111** gefolgt von der Oxidation zum Chinon.

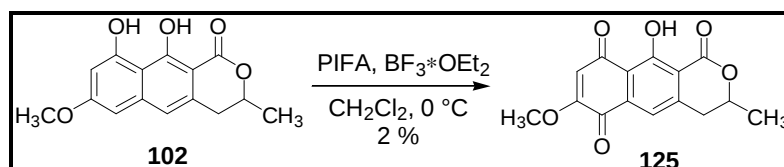


Schema 4-36: Biphyscion-Synthese nach *Hauser*.^[122]

(2) Oxidative Phenolkupplung von semi-Vioxanthin

Wie auf S. 50 bei der oxidativen Phenolkupplung monomerer Orsellinsäureester erläutert, kommt der Wahl des richtigen Oxidationsmittels entscheidende Bedeutung zu. In Analogie zu einem Verfahren von *Bringmann et al.*^[138] wird racemisches semi-Vioxanthin **102** mit

Bis(trifluoracetoxy)iodphenol (PIFA) und Bortrifluorid-Etherat ($\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$) bei 0 °C umgesetzt. In dem resultierenden Reaktionsgemisch werden hauptsächlich Zersetzungsprodukte gefunden, die keiner Struktur zugeordnet werden können. Als einzig charakterisierbares Oxidationsprodukt wird *semi*-Xanthomegnin **125** isoliert (siehe **Schema 4-37**), welches als Referenzsubstanz für den Analytik-Assay zur Identifizierung der Pilzmetabolite verwendet werden kann.



Schema 4-37: Umsetzung von *semi*-Vioxanthin **102** mit PIFA.

Dieses Reaktionsverhalten spiegelt die Tendenz von *semi*-Vioxanthin **102** wieder, mit Oxidationsmitteln zum Chinon oxidiert zu werden. Dieses wurde bereits von Zeeck *et al.*^[91] und Röser^[108] zur Synthese von Xanthomegnin **105** ausgenutzt (siehe **Schema 4-6**, S. 39). Trotzdem wird *semi*-Xanthomegnin **125** nicht im zellfreien Rohextrakt von *Penicillium citreo-viride* gefunden. Dies ist entweder darauf zurückzuführen, daß es in dem biologischen System nicht gebildet wird, oder daß es als reaktives Intermediat direkt weiter metabolisiert wird, so daß es nur in sehr geringer Konzentration vorliegt, oder daß es nicht aus der Zelle ausgeschleust wird.

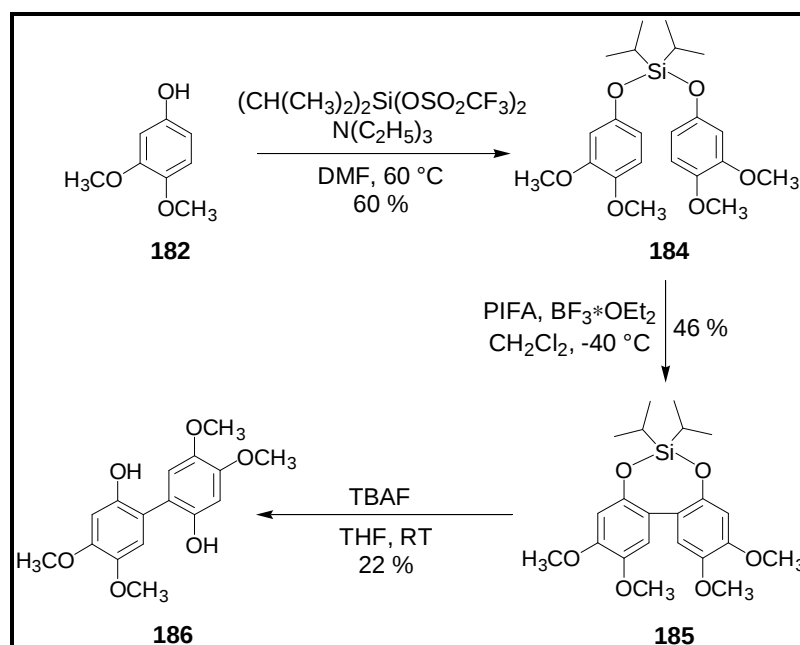
Bei Versuchen zur oxidativen Dimerisierung von **102** mit auf Kieselgel adsorbiertem Eisen(III)chlorid wurde kein Umsatz festgestellt und **102** unverändert wieder zurückerhalten.

Die Versuche zur Phenolkupplung können auch an einem Derivat von **102** durchgeführt werden, welches an C-7 eine freie Hydroxygruppe trägt. Dieses Naphthalentriol **126** wurde von Röser^[108] in der Synthese von Xanthomegnin **105** eingesetzt.

(3) Oxidative Phenolkupplung eines verbrückten *semi*-Vioxanthin-Derivates

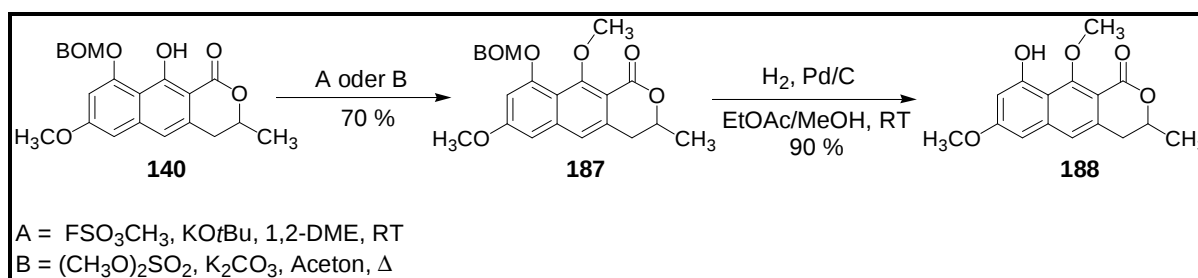
Als Modellreaktion wird in eigenen Arbeiten in Analogie zu dem Verfahren von Kita *et al.*^[139] 3,4-Dimethoxyphenol (**182**) mit Diisopropylsilyl bis(trifluormethansulfonat) (**183**) unter stark basischen Bedingungen in 60 % Ausbeute in das Silylketal **184** überführt. Dieses wird bei –40 °C mit PIFA und Bortrifluorid-Etherat ($\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$), welches durch Koordination an die Trifluoracetoxy-Liganden als Aktivator fungiert, in 46 % Ausbeute zum Biaryl **185**

umgesetzt (siehe **Schema 4-38**). Alternativ gelingt diese Umsetzung auch bei Raumtemperatur mit der Kombination aus PIFA und einer Heteropolysäure.^[139g,h] Nach Abspaltung der Silylgruppe mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) wird Biphenyl **186** in 22 % Ausbeute erhalten (siehe **Schema 4-38**).^[139d]



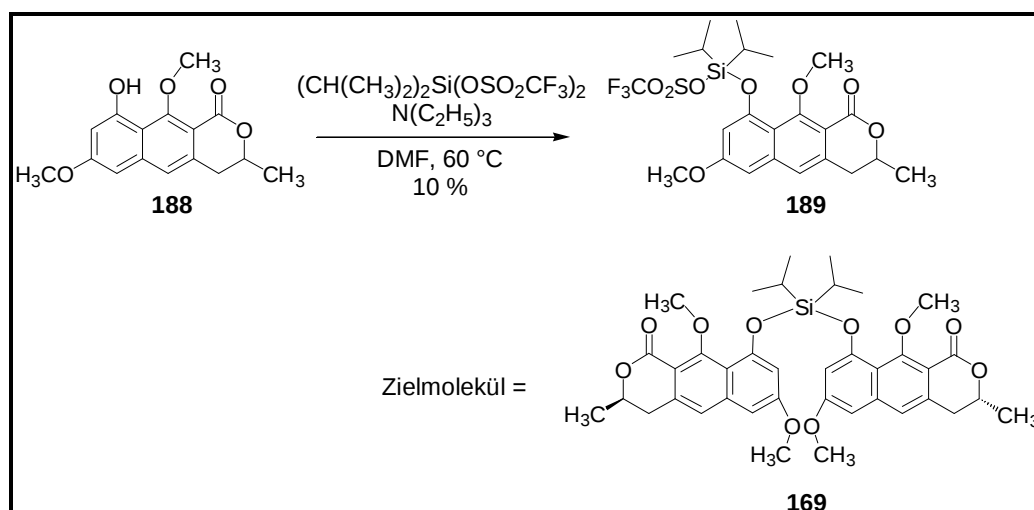
Schema 4-38: PIFA-vermittelte, intramolekulare Phenolkupplung nach Kita *et al.*^[139]

Um dieses Verfahren auf die Synthese von Vioxanthin **103** zu übertragen, wird zunächst BOM-geschütztes *semi*-Vioxanthin **140** mit Fluorsulfonsäuremethylester und Kalium-*tert*-butylat in 1,2-Dimethoxyethan^[141] oder mit Dimethylsulfat und Kaliumcarbonat methyliert. Diese Reaktion erfolgt in beiden Fällen mit einer Ausbeute von 70 %. Anschließend wird die Schutzgruppe durch Hydrogenolyse unter Wasserstoffatmosphäre katalysiert durch Palladium auf Aktivkohle entfernt (siehe **Schema 4-39**).



Schema 4-39: Methylierung der OH-Gruppe an C-10 von BOM-geschütztem *semi*-Vioxanthin **140** sowie nachfolgende Abspaltung der Schutzgruppe.

In Analogie zu der Synthese der Modellverbindung **182** (siehe **Schema 4-38**, S. 68) wird **188** mit Diisopropylsilyl bis(trifluormethansulfonat) (**183**) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung wird neben Edukt und nicht identifizierbaren Reaktionsprodukten Verbindung **189** in 10 % Ausbeute isoliert (siehe **Schema 4-40**).



Schema 4-40: Umsetzung des *semi*-Vioxanthin-Derivates **188** mit Diisopropylsilyl bis(trifluormethansulfonat) (**183**).

187 kann anhand der NMR- sowie Massenspektren charakterisiert werden und ist durch die nukleophile Substitution nur eines Triflatrestes des Silyreagenz **183** durch die freie Hydroxygruppe an C-9 des *semi*-Vioxanthin-Derivates **188** entstanden. Die Erhöhung von Temperatur und Basenüberschuß, sowie die wiederholte Umsetzung von **189** mit **188** führen nicht zu einer Substitution des zweiten Triflatrestes, sondern lassen **189** unverändert. Die Ursache für dieses Reaktionsverhalten liegt möglicherweise in der starken sterischen Abschirmung des zweiten Triflatrestes durch die beiden Diisopropylgruppen und das Naphthopyranogerüst. Diese Vermutung wird auch dadurch gestützt, daß die Triflatgruppe bei der wäßrigen Aufarbeitung nicht hydrolysiert wird.

Als mögliche Variante könnte zur Einführung der Silylbrücke das sterisch nicht so anspruchsvolle Diethyldichlorsilan verwendet werden. Dazu ist es aber wiederum notwendig, die Reaktionssequenz an einer Modellverbindung in Bezug auf die Silylierung, die intramolekulare oxidative Phenolkupplung sowie die nachfolgende Abspaltung der Silylgruppe zu optimieren.

4.2.4 Zusammenfassung

Es wurde eine konvergente Synthesestrategie erarbeitet, die die Darstellung beider Stereoisomere von *semi*-Vioxanthin **102** ermöglicht. Schlüsselschritt dabei ist die Tandem-*Michael*-Reaktion von einem Orsellinsäurederivat und einem chiralen, nicht-racemischen Pyranon. Dabei werden Ausbeuten von bis 38 % erreicht. Die chiralen Pyranone **114** können entweder durch die Verwendung enantiomerenangereicherter Ausgangsverbindungen oder im Falle des *R*-Enantiomers durch Anwendung einer neuartigen, chemoenzymatischen Route gewonnen werden.

Die Synthese von dimeren Orsellinsäurederivaten erfolgte in einer vergleichenden Untersuchung sowohl durch die klassische *Ullmann*-Reaktion von Iodorsellinsäureestern als auch durch eine neuartige, biomimetische oxidative Phenolkupplung des 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylesters (**131**) mit auf Kieselgel adsorbiertem Eisen(III)chlorid bzw. dem hypervalenten Iodreagenz PIFA. Die *Ullmann*-Reaktion lieferte selektiv, in Abhängigkeit von der Position des Iodsubstituenten im Substrat, den 3,3'-gekuppelten dimeren Orsellinsäureester **144**. Die oxidative Phenolkupplung mit FeCl₃ dagegen ist bezüglich der Regiochemie unselektiv und erzeugt in einer Reaktion mit einer Gesamtausbeute von bis zu 70 % neben den beiden symmetrischen Kupplungsprodukten auch das 3,5'-Dimere **145**. Bei der *Ullmann*-Kupplung wird jedes der drei Biaryle auf drei verschiedenen Syntheserouten dargestellt, welche insgesamt 12 Stufen benötigen. Die Umsetzung von **131** mit PIFA lieferte selektiv das 5,5'-dimere Orsellinsäurederivat **146**. In Bezug auf Atomökonomie und Anzahl der Stufen ist die oxidative Dimerisierung der Orsellinsäureester der *Ullmann*-Reaktion überlegen.

Weiterhin wurde ein Verfahren etabliert, welches die Trennung der Atropisomeren des 3,3'-dimeren Orsellinsäureesters **144** ermöglicht. Durch Röntgenstrukturanalyse eines der als Zwischenprodukte auftretenden diastereomeren Biscamphansäureestern wurde die absolute Konfiguration der Biarylachse bestimmt.

Die Synthese von Vioxanthin wurde über drei verschiedene Routen versucht:

- Die Tandem-*Michael*-Reaktion des dimeren Orsellinsäureesters **148** führte sowohl mit einem kommerziell erhältlichen 3-Ethoxycyclohex-2-enon (**174**) als auch mit dem chiralen Pyranon **114** nur zu den Monoanellierungsprodukten **175** und **173**.

- Die biomimetische oxidative Phenolkupplung von *semi*-Vioxanthin **102** mit PIFA führt durch Oxidation des aromatischen Systems zum Naphthochinon **125**. Es konnte keine Biarylverbindung isoliert werden.
- Weiterhin wurde durch eine Verknüpfung zweier *semi*-Vioxanthin-Derivate über eine Silylbrücke versucht, eine intramolekulare oxidative Phenolkupplung zu erzwingen. Es war aber nicht möglich das dazu erforderliche Silylketal **169** zu synthetisieren.

4.3 Biologische Arbeiten

Im Rahmen der biologischen Arbeiten wurden zunächst Kultivierungsbedingungen etabliert, die ein reproduzierbares Wachstum des Organismus im Schüttelkolben ermöglichen. Darauf aufbauend konnten verschiedene Naturstoffe aus dem Mycel des Pilzes isoliert werden, die zusammen mit den chemisch synthetisierten Verbindungen zum Aufbau eines Analytik-Assays verwendet wurden.

4.3.1 Kultivierung von *Penicillium citreo-viride*

Medienvergleich

Die Kultivierung von *Penicillium citreo-viride* gelingt sowohl auf Agar-Platten als auch in Schüttelkolben als Flüssigkultur. Zunächst wird ein Medienvergleich basierend auf der Wachstumsgeschwindigkeit des Organismus auf Agar-Platten durchgeführt. Dazu werden die Agar-Platten mit dem Pilz angeimpft und 14 Tage bei 30 °C inkubiert. Zur Bestimmung der Wachstumsrate wird der Durchmesser des gebildeten Mycels in Abhängigkeit von der Zeit vermessen. Dieses Experiment wird mit den folgenden Medien durchgeführt:

➤ Malz-Medium (1):

Dieses Medium dient als Referenz, da bekannt ist, daß sich der Pilz darauf mit der typischen Verfärbung kultivieren läßt.^[91]

Zusammensetzung: 1 % Malzextrakt, 0.4 % Hefeextrakt, 0.4 % Glucose

➤ Czapek-Dox-Medium (2):

Hierbei handelt es sich um ein Medium, welches für die Stammhaltung einer Reihe von filamentösen Pilzen verwendet wird.^[90a]

Zusammensetzung: 0.3 % NaNO₃, 0.05 % KCl, 0.05 % MgSO₄×7H₂O, 0.001 % FeSO₄×7H₂O, 0.1 % K₂HPO₄, 3 % Sucrose

➤ ATCC Culture Medium 313 (3):

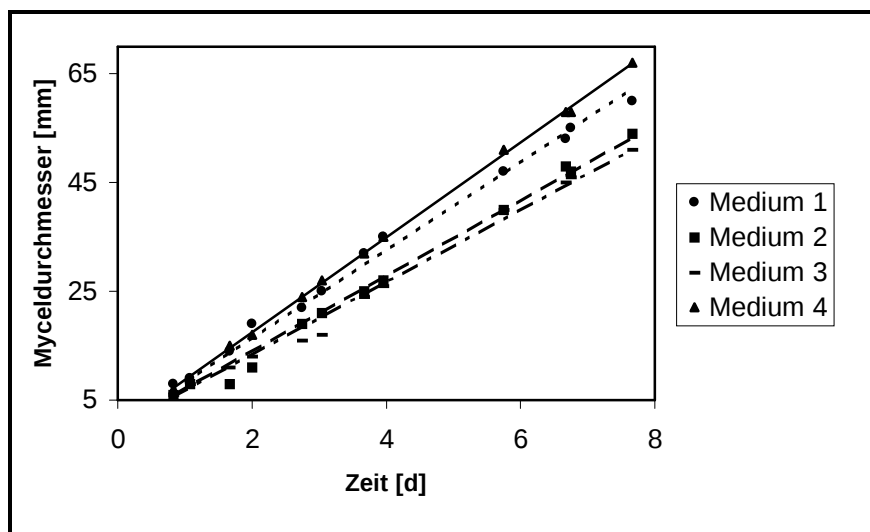
Die American Type Culture Collection empfiehlt dieses Medium zur Kultivierung von *Penicillium citreo-viride*.

Zusammensetzung: 0.3 % NaNO_3 , 0.05 % KCl , 0.05 % $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001 % $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 % K_2HPO_4 , 20 % Sucrose

➤ Steep-Medium (4):

Dieses Medium basiert auf dem Czapek-Dox-Medium und ist mit Corn Steep Liquor supplementiert.

Zusammensetzung: 0.3 % NaNO_3 , 0.05 % KCl , 0.05 % $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001 % $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 % K_2HPO_4 , 3 % Sucrose, 1 % Corn Steep Liquor



Medium	Wachstumsrate [mm/d]
Malz-Medium (1)	8.13
Czapek-Dox-Medium (2)	6.95
ATCC Culture Medium 313 (3)	6.68
Steep-Medium (4)	8.72

Abbildung 4-5: Medienvergleich basierend auf der Wachstumsgeschwindigkeit von *Penicillium citreo-viride* auf Agar-Platten. Verwendete Medien: Agar-Medium (1), Czapek-Dox-Medium (2), ATCC Culture Medium 313 (3) und Steep-Medium (4).

Abbildung 4-5 zeigt, daß der Organismus auf dem Steep-Medium (4) am schnellsten wächst. Am langsamsten verläuft die Kultivierung auf dem ATCC Culture Medium 313 (3). Weiterhin sind die verschiedenen Mycelbildungsraten zusammengefasst, die über die Steigung einer Regressionsgeraden ermittelt werden. Für die Auswahl einer geeigneten Nährlösung ist aber nicht nur die Wachstumsgeschwindigkeit relevant, sondern auch die Farbänderung des Mycels während der Inkubation zu rot-violett, da diese Farbänderung ein Beleg für die Bildung der oben beschriebenen Farbstoffe mit Biarylstruktur ist.* Diese Bedingung wird aber nur von Malz-Medium (1) erfüllt, während bei den anderen Medien keine Verfärbung des Mycels auftritt. Daher wird dieses Medium für die folgenden Experimente verwendet.

Medienoptimierung

Bei der Kultivierung filamentöser Pilze im Schüttelkolben können zwei Arten des Wachstums unterschieden werden. Zum einen ein Wachstum als disperses, filamentöses Mycel bei dem die Hyphen vollständig dem Medium ausgesetzt sind und einer exponentiellen Wachstums-kinetik folgen.^[142] Zum anderen ein Wachstum in Form von Pellets, die aus dicht verwobenen Hyphen bestehen und eine sphärische Form besitzen.^[143] Zellen, die sich innerhalb dieser Pellets befinden, sind in der Nährstoffzufuhr stark limitiert. Das Wachstum ist daher auf einen begrenzten Bereich an der Oberfläche des Pellets beschränkt und folgt einer Quadratwurzel-Kinetik.^[144] Bei den meisten Pilzen entstehen diese Mycelkügelchen durch eine Aggregation von Sporen.^[145] Weiterhin können sich auch mehrere Hyphen^[143] oder kleine Pellets^[146] zusammenlagern, so daß in Flüssigkulturen einiger Pilze, z. B. *Neurospora crassa*, am Ende der Kultivierung nur ein einziges Mycelpellet gefunden wird. Im Folgenden werden verschiedene Methoden vorgestellt, mit denen die Größe und Anzahl der Mycelpellets beeinflusst werden kann. Für weitergehende Untersuchungen ist es von fundamentaler Bedeutung, durch die Kontrolle der Pelletgröße und -anzahl, ein reproduzierbares Wachstum zu erreichen.

Als Referenzexperiment wird von einer mit dem Pilz dicht bewachsenen Agar-Platte ein 2 cm² großes Stück des Mycels entnommen. Damit wird ein Schüttelkolben, der 100 mL Malzmedium enthält, angeimpft und bei 30 °C und 120 rpm für sieben Tage inkubiert. Aus dem als Inokkulum verwendeten Mycelstück bildet sich ein Mycelpellet, dessen Durchmesser

* Das Mycel von den bewachsenen Platten wurde extrahiert und der Extrakt mittels HPLC untersucht. Nur in Kulturen, bei denen sich das Mycel verfärbte, konnten Biarylnaturstoffe nachgewiesen werden.

sich im Verlauf der Kultivierung vergrößert. Es wird weder eine Verfärbung des Mycels noch die Bildung von Biaryl-naturstoffen beobachtet. Ziel der Optimierung ist es, Kultivierungsbedingungen zu finden, die ein Wachstum mit einer großen Anzahl sehr kleiner Mycelpellets, im besten Fall ein disperses Mycelwachstum, ermöglichen. Die dazu verwendeten Methoden basieren zum einen auf der Veränderung des Inokkulum und zum anderen auf der Veränderung der Nährlösung.

➤ *Methode A: Zerkleinerung des Inokkulum mit Glasperlen*

Das 2 cm² große Mycelstück einer Agar-Platte wird zusammen mit Glasperlen und Nährlösung in einem Zentrifugenröhrchen durch Schütteln agitiert. Von dieser Nährlösung wird 1 mL zum Inokkulieren einer Flüssigkultur verwendet. Bei der Inkubation bei 30 °C und 120 rpm bilden sich innerhalb von sieben Tagen einige wenige Mycelpellets, die sich im Verlaufe der Kultivierung vergrößern. Es ist weder eine Verfärbung des Mycels noch die Produktion von Biaryl-naturstoffen festzustellen.

➤ *Methode B: Zerkleinerung des Inokkulum mit einem Dispergierwerkzeug*

Die Flüssigkultur wird zunächst wie im Referenzexperiment mit einem Mycelstück von einer Agar-Platte angeimpft und inkubiert. Nach drei, vier und fünf Tagen werden die gebildeten Mycelpellets mit einem Dispergierwerkzeug (IKA-Ultra-Turrax) für eine Minute bei 28000 rpm zerkleinert. Das so behandelte Mycel verfärbt sich innerhalb von sieben Tagen rot-violett (siehe **Abbildung 4-6**). Außerdem können Frabstoffe mit Biarylstruktur im Mycel nachgewiesen werden.



Abbildung 4-6: Fotografie einer sieben Tage alten Kultur von *Penicillium citreo-viride* nach Zerkleinerung des Mycels mit einem Dispergierwerkzeug.

➤ *Methode C: Animpfen mit Sporen*

Um ein Inokkulum zu erhalten, das beim Animpfen eine maximale Zelldichte gewährleistet, werden von einer Agar-Kultur Sporen isoliert. Dazu wird die Platte zunächst mit einer Kochsalzlösung versetzt, die 0.05 % eines Detergenz (Tween 80) enthält, und anschließend die Sporen mit einem Glasspatel abgeschabt. Da diese in der reinen Kochsalzlösung nicht löslich sind, wird das Detergenz als Lösungsvermittler eingesetzt. Charakteristisch für die so erhaltene Sporenlösung ist die Lebendkeimzahl. Diese wird bestimmt, indem ein definiertes Volumen (100 µL) der hinreichend verdünnten Sporenlösung auf einer Agar-Platte ausgestrichen wird. Nach Inkubation werden die gebildeten Kolonien ausgezählt und die Lebendkeimzahl mit folgender Formel bestimmt:*

$$\text{Lebendkeimzahl} = \text{Kolonienzahl} \times \text{Verdünnung} \times 10$$

Gleichung 4-1: Bestimmung der Lebendkeimzahl in einer Sporenlösung.

In typischen Experimenten werden Lebendkeimzahlen im Bereich von $1-4 \times 10^7$ pro mL Sporenlösung gefunden. Für ein Wachstumsexperiment werden 100 mL Nährlösung mit 1 mL Sporenlösung angeimpft. Es wird beobachtet, daß sich eine sehr große Anzahl kleiner Mycelpellets ausbildet, die sich während der Kultivierung bei 30 °C und 120 rpm innerhalb von sieben Tagen rot-violett verfärben. Weiterhin werden Biaryl-naturstoffe in dem Mycel gefunden.

➤ *Methode D: Supplementierung der Nährlösung mit Polymeren*

Der Effekt von Polymeren auf die Wachstumsart von filamentösen Pilzen in Flüssigkulturen wird schon seit langem untersucht.^[147] Dabei wurde von *Jones et al.* festgestellt, daß durch eine Supplementierung des Mediums mit hochmolekularen Polyanionen wie den Polyacrylaten Carbopol und Junlon die Bildung von Mycelpellets vermieden werden konnte.^[148] Dies wird damit begründet, daß diese Polymere eine elektrostatische Abstoßung zwischen den Sporen oder Zellen induzieren. Die anfängliche Aggregation von Sporen im Inokkulum und das darauffolgende Verklumpen des Mycels während der Kultivierung werden so verhindert. In dem hier beschriebenen Verfahren wird Carbopol 974 PNF in einer Konzentration von 2 g/L als Supplementierung für das Malz-Medium verwendet. Die Kultur wird mit Sporenlösung angeimpft und bei 30 °C und 120 rpm in-

* Der Verdünnungsfaktor wird zur Umrechnung der Lebendkeimzahl von 100 µL auf 1 mL benötigt.

kubiert. Es wird ein disperses Wachstum beobachtet, bei dem sich das Mycel innerhalb von sieben Tagen braun verfärbt (siehe **Abbildung 4-7**). In dem Mycel werden Biaryl-naturstoffe nachgewiesen.



Abbildung 4-7: Fotografie einer sieben Tage alten Kultur von *Penicillium citreo-viride* unter Verwendung des mit Carbopol supplementierten Mediums.

➤ Vergleich der verschiedenen Methoden:

Als Methode zur reproduzierbaren Kultivierung von *Penicillium citreo-viride* im Schüttelkolben wird Methode C ausgewählt. Im Vergleich zu den anderen Methoden ist diese weniger aufwendig und ermöglicht zudem einen Vergleich der Ergebnisse mit dem literaturbekannten Verfahren nach Zeeck *et al.*^[91]

Wachstumscharakterisierung

Zur Charakterisierung der Kultur von *P. citreo-viride* wird eine Wachstumskurve erstellt und der pH-Wert während der Inkubation verfolgt (siehe **Abbildung 4-8** und **Abbildung 4-9**, S. 78). Da der Organismus in Form von Mycelpellets wächst, ist eine Bestimmung der optischen Dichte nicht möglich. Die Wachstumskurve wird deshalb durch Messung der Biotrockenmasse bestimmt. Dabei muß für jeden Messpunkt jeweils eine Schüttelkolben-Kultur ausgewertet werden, so daß es, bedingt durch Schwankungen im Verlauf dieser Kulturen, zu Streuungen der Messwerte kommen kann.

Aus der Wachstumskurve ist zu erkennen, daß eine maximale Biotrockenmasse von 6.6 g/L nach 120 h erreicht wird (siehe **Abbildung 4-8**, S. 78). Dies ist auch der Zeitpunkt, bei dem die Farbstoffentwicklung im Mycel einsetzt. Anschließend verringert sich die Biotrockenmasse aufgrund von absterbenden Zellen wieder. Dadurch, daß zwischen 50 h und 120 h kein Messwert vorliegt, ist es möglich, daß in diesem Zeitraum eine maximale Biotrockenmasse erreicht wird, die größer als 6.6 g/L ist.

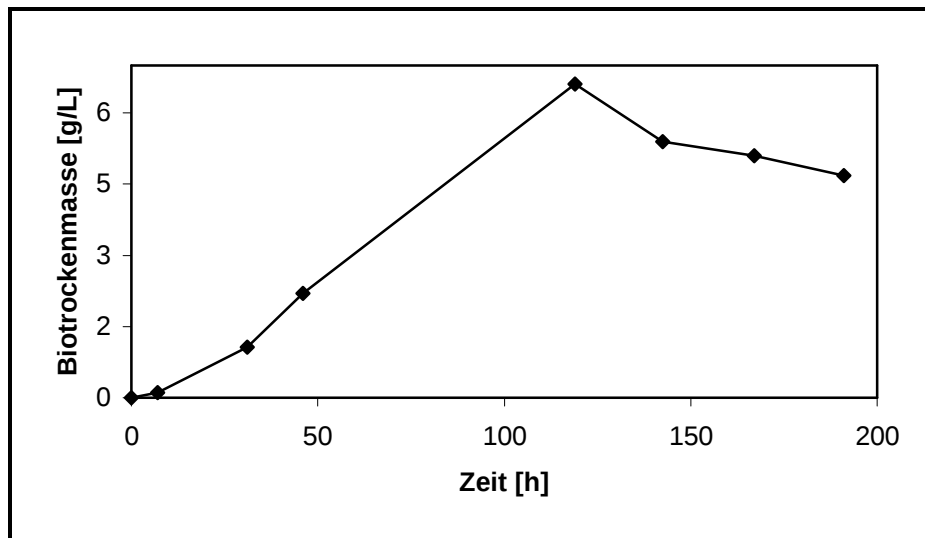


Abbildung 4-8: Wachstumskurve von *P. citreo-viride* basierend auf Biotrockenmasse.

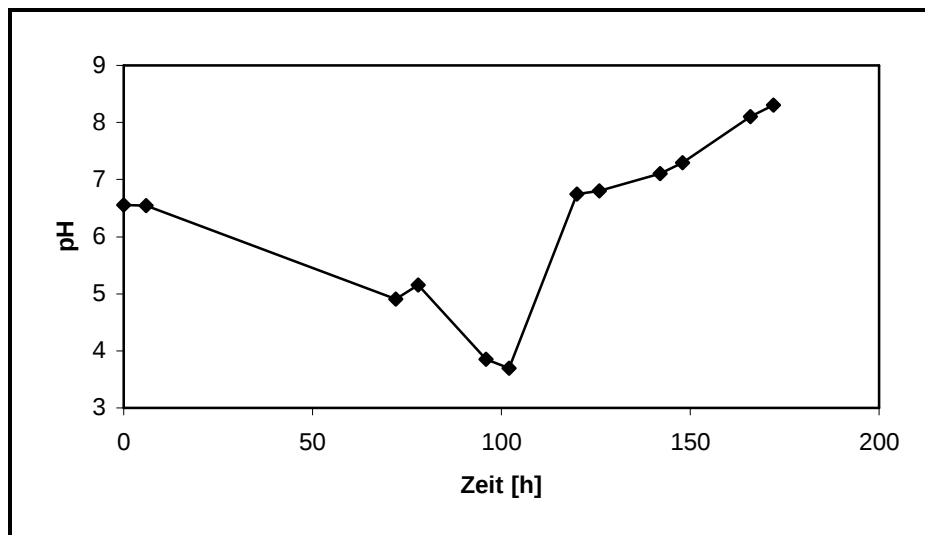


Abbildung 4-9: pH-Wert während der Kultivierung von *P. citreo-viride*.

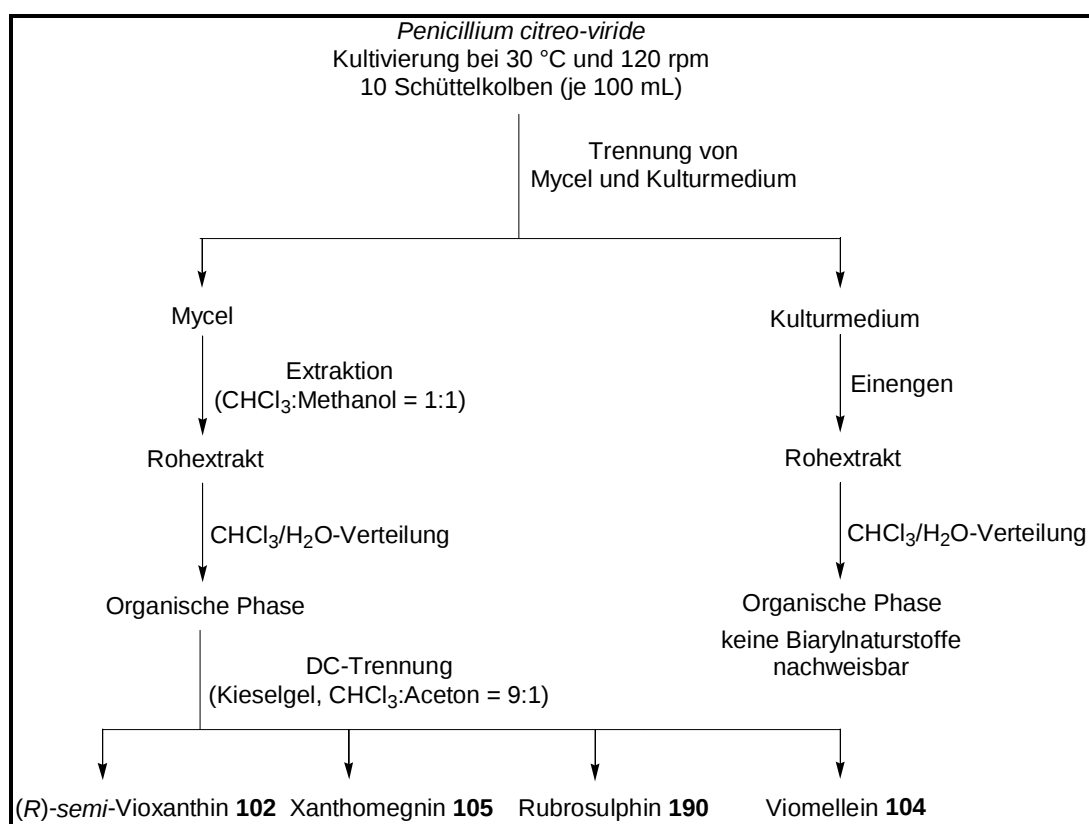
Der pH-Wert erreicht, beginnend bei 6,5, ein Minimum von 3,7 nach 100 h (siehe **Abbildung 4-9**). Dies fällt ungefähr mit dem Zeitpunkt zusammen, bei dem die Verfärbung des Mycels einsetzt und die maximale Biotrockenmasse erreicht ist. Anschließend ist ein starker Anstieg des pH-Wertes zu verzeichnen.

Durch Verwendung von Schüttelkolben, die eine Kontrolle des pH-Wertes gestatten, würden sich möglicherweise höhere Biomassekonzentrationen erzielen lassen. Für die weiteren Untersuchungen war aber die eigentliche Zielgröße die reproduzierbare Produktion von Biarylnaturstoffen.

4.3.2 Aufbau eines Analytik-Assays

Isolierung von Naturstoffen

Für die Etablierung eines Analytik-Assays werden entsprechende Referenzsubstanzen benötigt. Da die Metabolite aus *P. citreo-viride* bisher chemisch nicht zugänglich sind, ist ihre Isolierung aus dem Mycel notwendig. Dazu wird zunächst ein reproduzierbares Protokoll für die Aufarbeitung des Mycels und die Isolierung der Naturstoffe im präparativen Maßstab entwickelt (siehe **Schema 4-41**).



Schema 4-41: Isolierung der Naturstoffe aus *Penicillium citreo-viride*.

Die Kultur des Organismus erfolgt im 1 L Maßstab mit zehn Schüttelkolben je 100 mL Nährlösung mit den oben beschriebenen Bedingungen. Die Inkubation erfolgt bei 30 °C und 120 rpm für zwei bzw. sieben Tage, abhängig davon welcher Metabolit isoliert werden soll. Anschließend wird das Mycel durch Filtration vom Kulturmedium getrennt, mit Wasser entsalzt und mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol (1:1, v/v) extrahiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird der braune Rückstand in Wasser aufgenommen und mehrfach mit Chloroform extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Extrakte und Einengen des Lösungsmittels wird ein rotbrauner

Feststoff erhalten. Durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Chloroform/Aceton = 9:1) können die einzelnen Naturstoffe voneinander getrennt werden, wobei sie sich leicht an ihrer charakteristischen Färbung unterscheiden lassen.

Insgesamt können aus dem rot-violett gefärbten Mycel des Pilzes vier Metabolite in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer isoliert werden (siehe **Tabelle 4-12**). Nach einem Zeitraum von zwei Tagen können die Metabolite (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102** und Xanthomegnin **105** in einer Konzentration von 22 mg/L bzw. 10 mg/L isoliert werden. Nach sieben Tagen werden Rubrosulphin **190** und Viomellein **104** in einer Konzentration von 6 mg/L bzw. <1 mg/L gefunden. Die Identifizierung erfolgt im Falle von **102**, **105** und **188** durch UV/Vis-, und NMR-Spektroskopie. Bei Verbindung **104** kann aufgrund der geringen Konzentration nur ein Vergleich des UV/Vis-Spektrums mit einem Referenzspektrum durchgeführt werden.

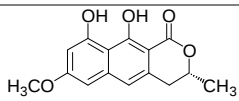
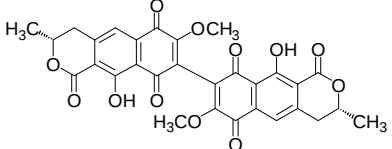
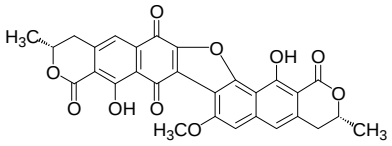
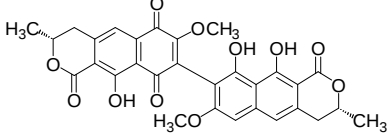
Metabolit	Struktur	Konzentration [mg/L]	Kultivierungs- dauer [d]
(<i>R</i>)- <i>semi</i> -Vioxanthin 102		22	2
Xanthomegnin 105		10	2
Rubrosulphin 190		6	7
Viomellein 104		<1	7

Tabelle 4-12: Aus *Penicillium citreo-viride* isolierte Naturstoffe.

Im Vergleich zu den von Zeeck *et al.*^[91] isolierten Naturstoffen sind drei Unterschiede festzustellen:

- (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102** kann unter den gleichen Kultivierungsbedingungen wie für die anderen Naturstoffe isoliert werden, wenn die Kultur in einem frühen Stadium abge-

brochen wird. Das Circular dichroismusspektrum zeigt zwei intensive, negative Cotton-Effekte bei 266 und 240 nm. Durch den Vergleich des CD-Spektrums von isoliertem **102** mit den CD-Spektren von chemisch synthetisiertem (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102**, kann dem Stereozentrum an C-3 des Naturstoffes die (*R*)-Konfiguration zugeordnet werden (siehe **Abbildung 4-10**).*

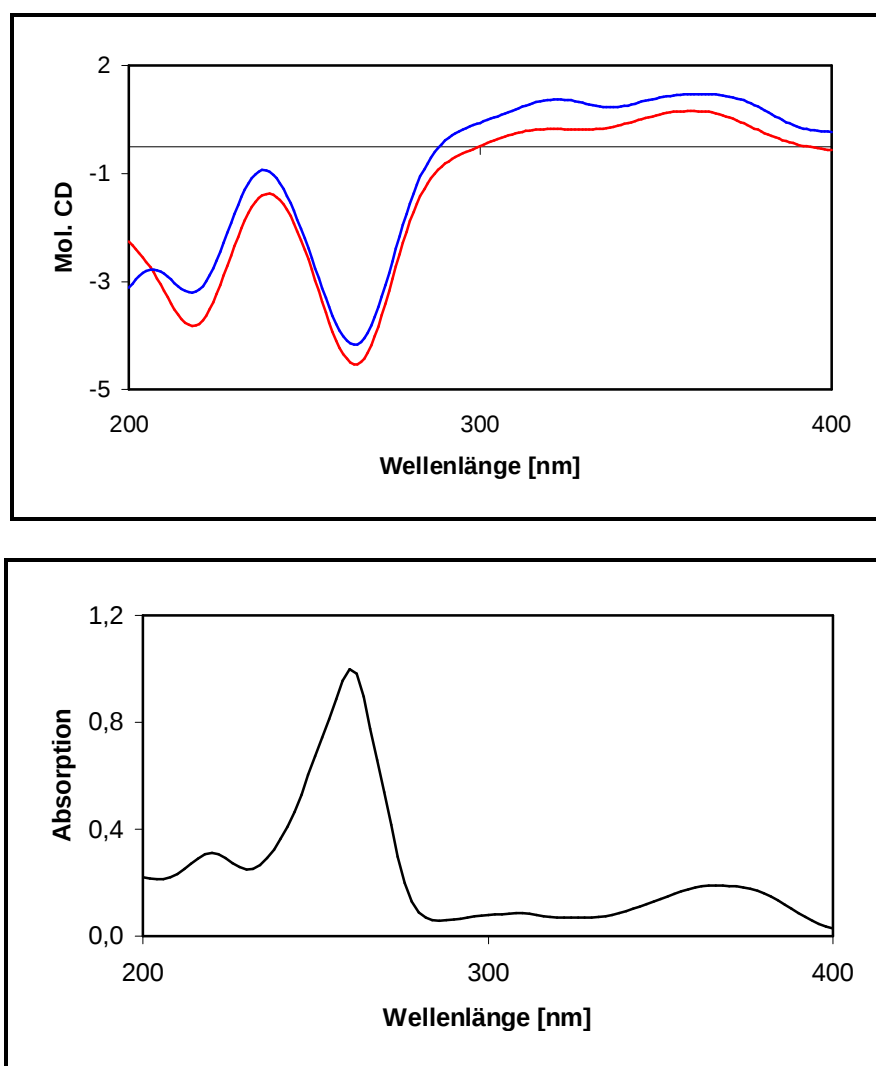


Abbildung 4-10: oben: CD-Spektrum von isoliertem (blau) und synthetisiertem (rot) (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102**; unten: UV-Spektrum von (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102**.

- Der Biarylnaturstoff Vioxanthin **103** kann nicht isoliert werden. Dies ist vermutlich auf die geringe Konzentration, in der dieser Metabolit vorliegt, oder möglicherweise auf die Oxidationsempfindlichkeit zurückzuführen.

* Die absolute Konfiguration von natürlichem *semi*-Vioxanthin **102** wurde von Zeeck *et al.*^[91] durch Vergleich der CD-Spektren des Naturstoffes und (*R*)-Mellein bestimmt. Außerdem synthetisierte Deshpande *et al.*^[97] das unnatürliche (*S*)-Methyletherderivat **118** (siehe **Schema 4-2**, S. 37).

- Rubrosulphin **190** ist bislang nicht als Sekundärmetabolit aus *Penicillium citreo-viride* bekannt. Als typische Produzenten sind die Pilze *Aspergillus sulphureus*, *A. melleus* und *P. viridicatum* beschrieben.^[101,102] Im CD-Spektrum des Naturstoffes aus *P. citreo-viride* sind drei Cotton-Effekte bei 280, 260 und 210 nm zu erkennen (siehe **Abbildung 4-11**). Die geringe Intensität der Cotton-Effekte ist auf das Vorhandensein einer zusätzlichen Brücke neben der Biarylachse zurückzuführen. Diese Brücke führt zu einer Erniedrigung der Atropisomerisierungsenergie.^[4a]

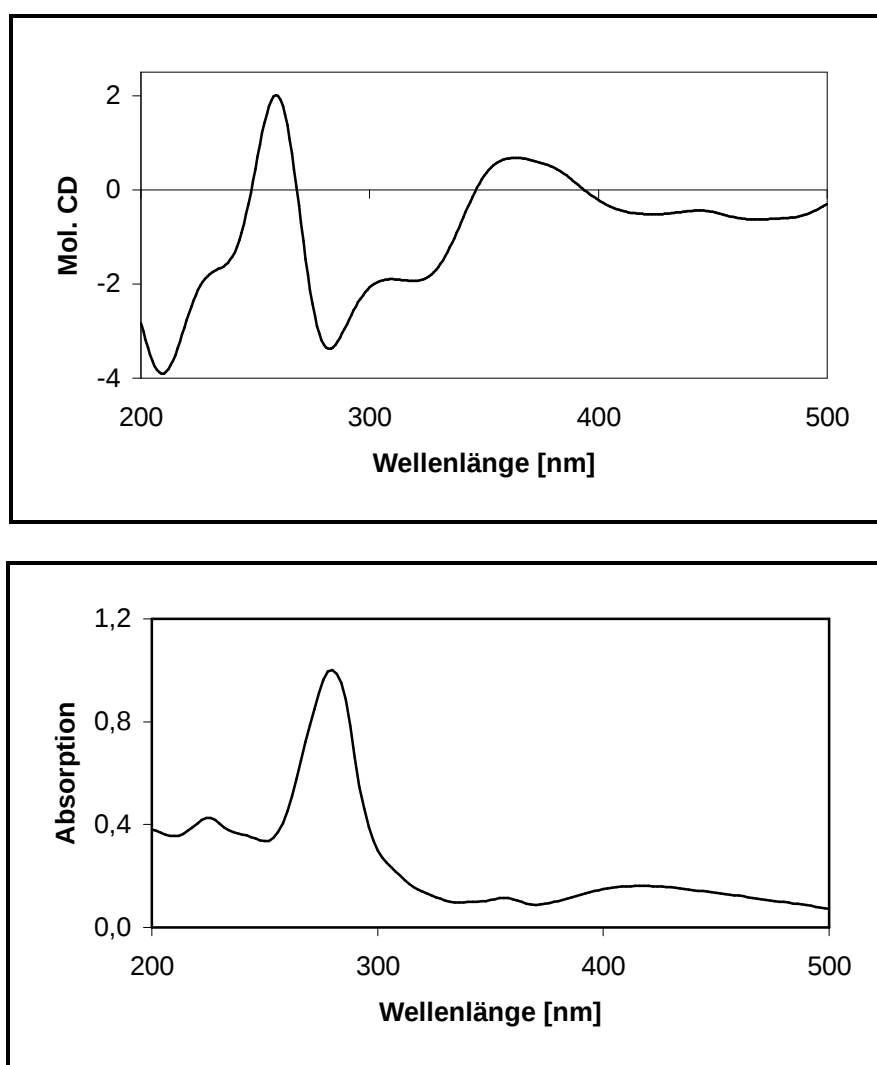


Abbildung 4-11: CD- (oben) und UV- (unten) Spektrum von Rubrosulphin **190** ($c = 2.9 \times 10^{-5}$ M, Acetonitril).

HPLC-Assay

Die bei der Naturstoffisolierung beobachtete Zeitabhängigkeit der Produktion von Sekundärmetaboliten wird systematisch untersucht. Dazu wird *P. citreo-viride* unter Standardbedingungen in Schüttelkolben kultiviert und das Mycel zu verschiedenen Zeitpunkten der In-

kubation nach dem oben beschriebenen Verfahren extrahiert. Die so erhaltenen Mycel-rohextrakte werden über eine kurze Kieselgelsäule vorgereinigt und anschließend mittels HPLC untersucht, die folgende Parameter aufweist:

- Die Trennung der Substanzen erfolgt an LiChrospher 100 RP 18 EC (5 μm , 250 $\times$ 3 mm) als stationäre Phase.
- Als Laufmittel wird ein Acetonitril/Wasser-Gradient (65:35 zu 75:25 innerhalb 10 min) mit einem Fluß von 0.5 mL/min verwendet.
- Die Detektion der Metabolite erfolgt sowohl mit einem Diodenarray- (DAD), Detektionswellenlänge $\lambda = 270 \text{ nm}$, als auch mit einem Fluoreszenzdetektor (FLD), $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$.

Abbildung 4-12 zeigt die Chromatogramme der Mycelextrakte nach 48 h und 168 h Inkubation. Die Metabolite können anhand ihrer UV-Spektren eindeutig zugeordnet werden.

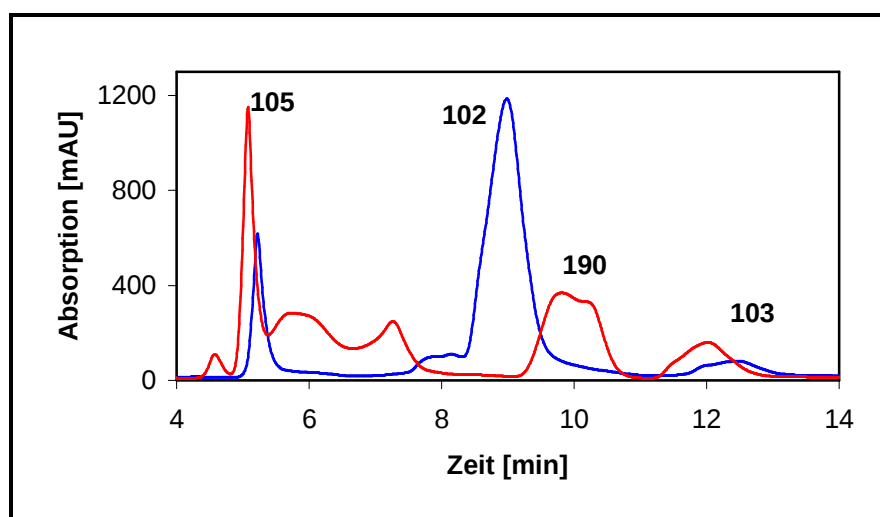


Abbildung 4-12: Chromatogramme der Mycelextrakte nach 48 h (blau) und 168 h (rot) Inkubation.

Metabolit	Retentionszeit [min]	UV-Absorptionsmaxima [nm] (relative Absorption)
(<i>R</i>)- <i>semi</i> -Vioxanthin 102	8.9	220 (0.3), 260 (1.0), 310 (0.1), 370 (0.2)
Xanthomegnin 105	5.2	230 (1.0), 290 (0.3), 406 (0.2)
Rubrosulphin 190	10.2	226 (0.4), 280 (1.0), 360 (0.1), 420 (0.2)
Vioxanthin 103	12.4	222 (0.3), 270 (1.0), 312 (0.1), 376 (0.2)

Tabelle 4-13: Retentionszeiten und UV-Absorptionsmaxima der Sekundärmetabolite aus *P. citreo-viride*.

Die Chromatogramme zeigen in Abhängigkeit vom Kultivierungsstadium einen deutlichen Unterschied in der Metabolitzusammensetzung der Mycelextrakte. Um diese Veränderung zeitlich darzustellen, wird der relative Anteil der einzelnen Stoffwechselprodukte durch Integration der Peaks im Chromatogramm bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen (siehe **Abbildung 4-13**).*

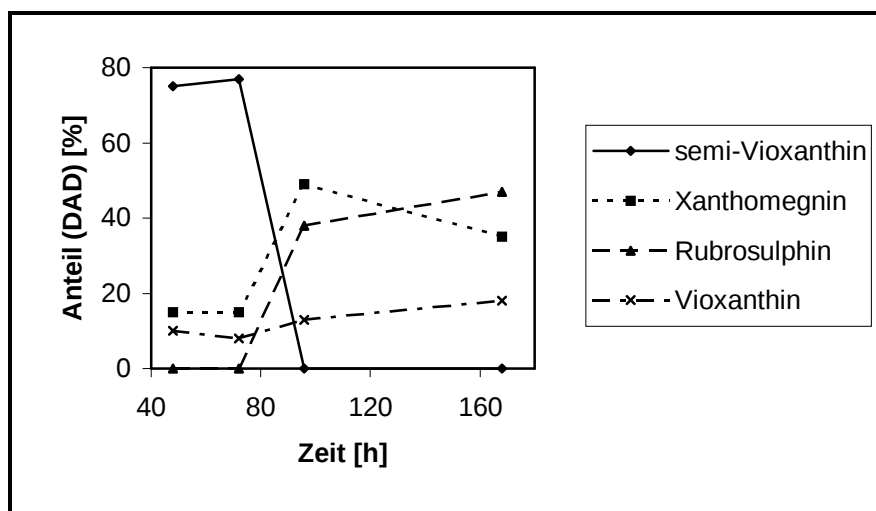


Abbildung 4-13: Zeitlicher Verlauf der prozentualen Metabolitzusammensetzung während der Kultivierung von *P. citreo-viride*.

In **Abbildung 4-13** ist zu erkennen, daß zu Beginn der Kultur hauptsächlich (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102** und ein geringer Prozentsatz der beiden Biaryl-naturstoffe Vioxanthin **103** und Xanthomegnin **105** im Mycel des Pilzes vorhanden ist. Durch die beginnende Metabolisierung von **102** nach ca. 75 h wird die Bildung des Biaryl-naturstoffes **190** induziert und der Anteil von **103** und **105** erhöht. Nach 168 h ist **102** vollständig abgebaut und im rot-violett gefärbten Mycel sind nur noch die dimeren Verbindungen zu finden.

Durch Verwendung eines Fluoreszenzdetektors ist es möglich, die beiden Metabolite (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102** und Vioxanthin **103** hochselektiv und hochempfindlich aus dem Mycelextrakt zu detektieren. Die Selektivität dieser Detektionsmethode wird in **Abbildung 4-14** auf S. 85 anhand der beiden Chromatogramme, der nach 96 h und 168 h gewonnenen Extrakte, verdeutlicht. Es sind jeweils nur zwei Peaks bei 9.0 min und 12.4 min vorhanden, die den Verbindungen **102** und **103** entsprechen.

* Die Integration erfolgt ohne Berücksichtigung der Absorptionskoeffizienten der Absorptionsbanden der jeweiligen Metabolite. Die Detektionswellenlänge beträgt für alle Naturstoffe 270 nm.

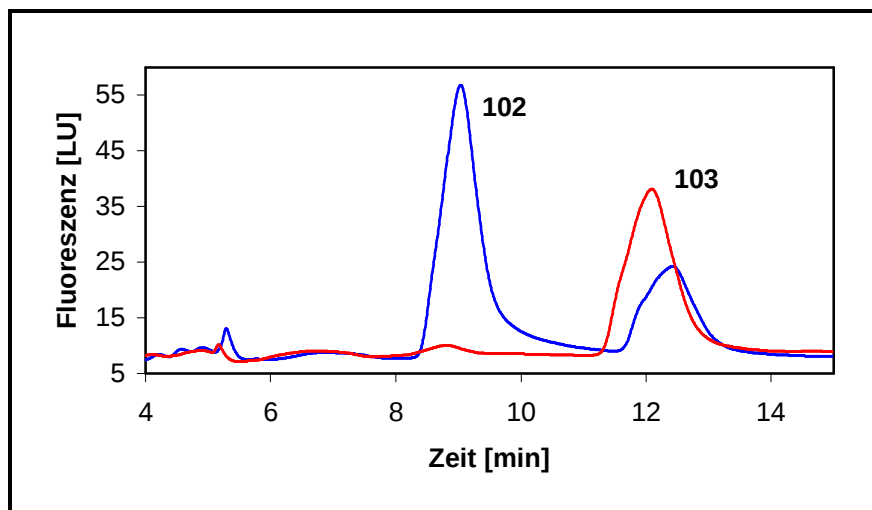


Abbildung 4-14: Chromatogramme der Mycelextrakte nach 96 h (blau) und 168 h (rot) Inkubation; selektive Detektion der Metabolite (R)-semi-Vioxanthin (R)-102 und Vioxanthin 103.

Die erhöhte Empfindlichkeit kann durch Betrachtung der HPLC-Analyse des Mycelextraktes nach 96 h Inkubation veranschaulicht werden. Das DAD-Signal weist bei einer Retentionszeit von 9,0 min keinen Peak auf, während das *semi*-Vioxanthin zugeordnete FLD-Signal deutlich zu erkennen ist (siehe **Abbildung 4-15**).

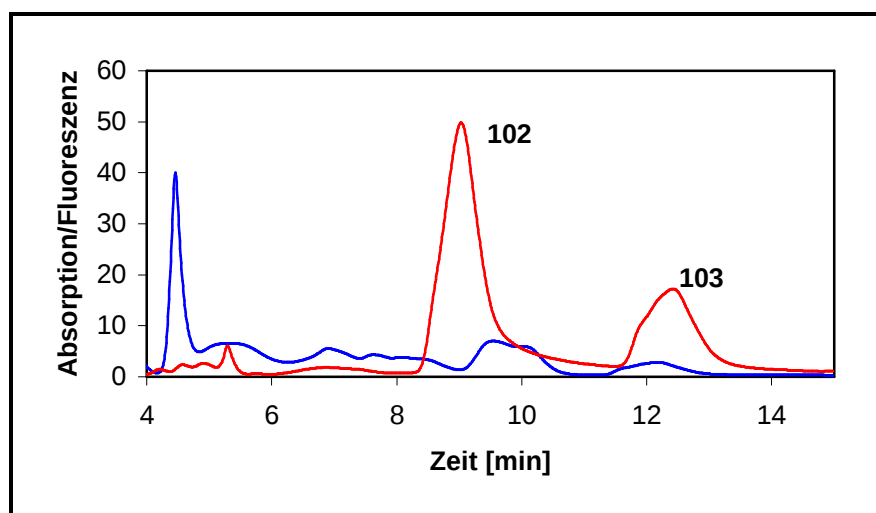
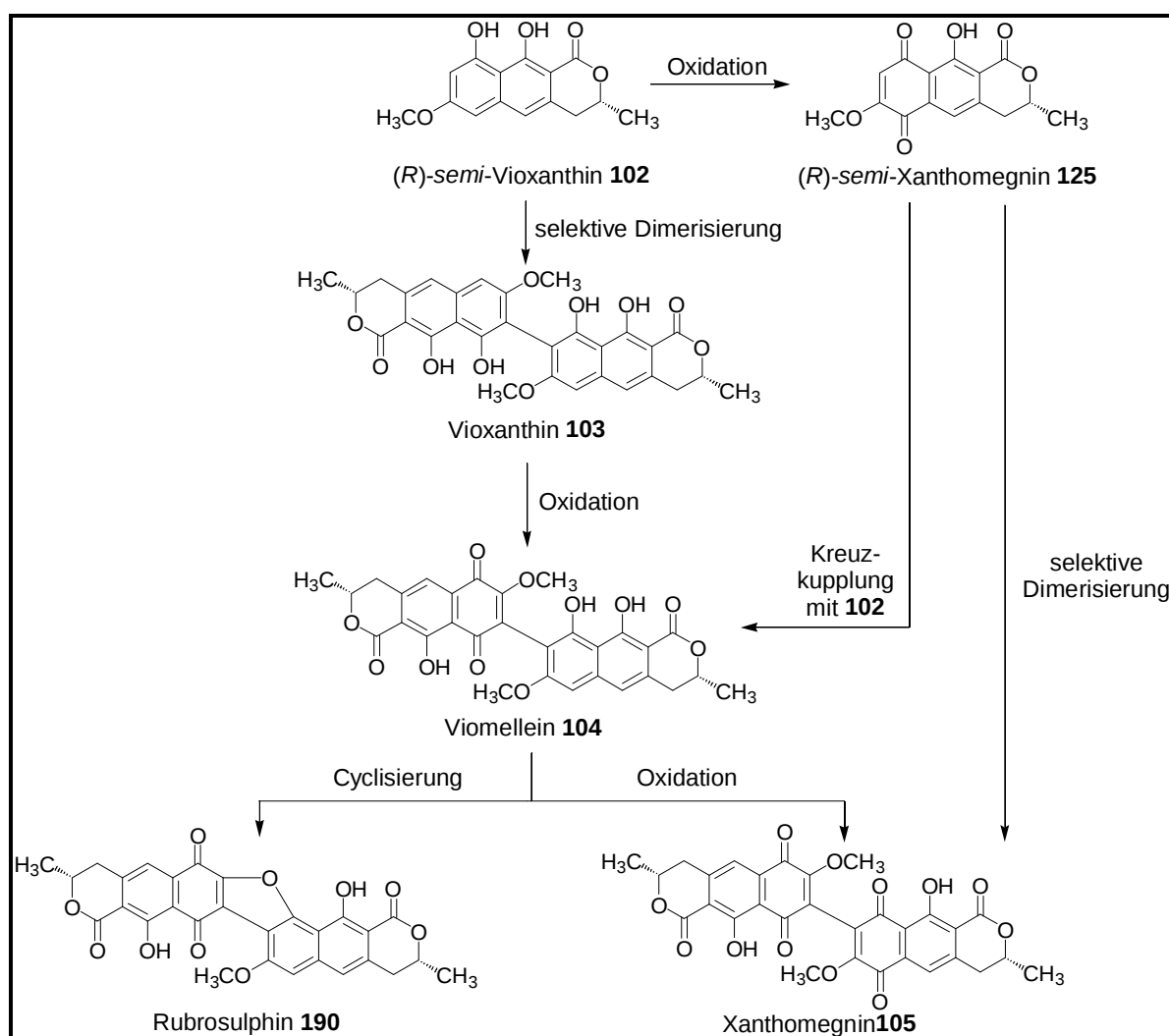


Abbildung 4-15: Chromatogramm des Mycelextraktes nach 96 h Inkubation; DAD-Signal (blau) und FLD-Signal (rot).

Diskussion möglicher Mechanismen für den semi-Vioxanthin-Metabolismus

Die Untersuchung der Metabolitzusammensetzung im Mycel von *Penicillium citreo-viride* in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit ermöglicht die Diskussion mehrerer potentieller Stoffwechselwege (siehe **Schema 4-42**, S. 86).



Schema 4-42: Postulierter Stoffwechselweg in *P. citreo-viride* ausgehend von **(R)-semi-Vioxanthin (R)-102** zu den Biaryl-naturstoffen **103**, **104**, **105** und **190**.

➤ **(1) semi-Vioxanthin als einziger biosynthetischer Vorläufer**

Zunächst wird **(R)-semi-Vioxanthin (R)-102** durch eine selektive Dimerisierungsreaktion in **Vioxanthin 103** umgewandelt. Da dieser Biaryl-naturstoff während der gesamten Kultivierung in nur geringer Konzentration vorhanden ist, stellt **103** ein Intermediat dar, welches durch Oxidation zu **Viomellein 104** schnell metabolisiert wird. An dieser Stelle verzweigt sich der Stoffwechselweg. Zum einen erfolgt eine Oxidation zum **Xanthomegnin 105** und zum anderen eine Cyclisierung zu **Rubrosulphin 190**. Chemisch kann diese letzte Reaktion durch Umsetzung von **Viomellein 104** mit einer Base (K_2CO_3) nachvollzogen werden.^[101]

➤ (2) *semi-Vioxanthin und semi-Xanthomegnin als biosynthetische Vorläufer*

Alternativ kann die Biosynthese der Pigmente Viomellein **104**, Xanthomegnin **105** sowie Rubrosulphin **190** auch über den monomeren Vorläufer *semi*-Xanthomegnin **125** erfolgen. Dazu würde *semi*-Vioxanthin **102** durch Oxidation* in **125** überführt. Anschließend kann eine Kreuzkupplung von **102** und **125** zu Viomellein **104** oder eine Dimerisierung von **125** zu Xanthomegnin **105** stattfinden. Da *semi*-Xanthomegnin **125** nicht in den Mycelextrakten gefunden werden kann, könnte es wie Vioxanthin **103** und Viomellein **104** ein sehr reaktives Intermediat im Stoffwechselweg sein, oder es wird nicht aus der Zelle herausgeschleust und tritt deswegen nicht im Mycel des Pilzes auf.

4.3.3 Zusammenfassung

Zur Untersuchung der Biosynthese von Biaryl-naturstoffen wurde der filamentöse Pilz *P. citreo-viride* ausgewählt. Dieser produziert neben den Pigmenten mit Biarylstruktur Vioxanthin **102**, Viomellein **104**, Xanthomegnin **105** und Rubrosulphin **190** auch deren potentiellen biogenetischen Vorläufer (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102**.

Zur Isolierung der Naturstoffe und für den Aufbau eines Analytik-Assays wurden zunächst reproduzierbare Kultivierungsbedingungen durch Medienoptimierung etabliert und diese durch Wachstums- und pH-Verlaufskurven charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, daß sich Größe und Anzahl der Mycelpellets bei der Kultivierung im Schüttelkolben sowohl durch mechanische Zerkleinerung der gebildeten Mycelpellets mit einem Dispergierwerkzeug als auch durch Inokulieren mit einer Sporenlösung oder Supplementieren der Nährlösung mit einem Polymer beeinflussen lassen.

Die Naturstoffe (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102**, Viomellein **104**, Xanthomegnin **105** und Rubrosulphin **190** konnten nach einem einfachen Protokoll aus dem Mycel des Organismus isoliert werden. Es ist hervorzuheben, daß Rubrosulphin **190** zwar als Sekundärmetabolit aus anderen Pilzen bekannt ist, bislang aber nicht in *P. citreo-viride* gefunden wurde.

Die zeitabhängige, systematische Untersuchung der Metabolitzusammensetzung im Mycel des Pilzes durch chromatographische Trennung mit HPLC-Technik und Detektion der Sub-

* Die Oxidationsempfindlichkeit von *semi*-Vioxanthin **102** wurde durch Umsetzung mit PIFA zum Naphthochinon *semi*-Xanthomegnin **125** verdeutlicht (siehe **Schema 4-37**, S. 67).

stanzen mit Diodenarray- und Fluoreszenzdetektoren, führte zum Postulat eines möglichen Stoffwechselweges. Die fluoreszierenden Eigenschaften von (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102** und Vioxanthin **103** erlauben eine hochselektive und hochempfindliche Erfassung dieser Metabolite im Mycelextrakt.

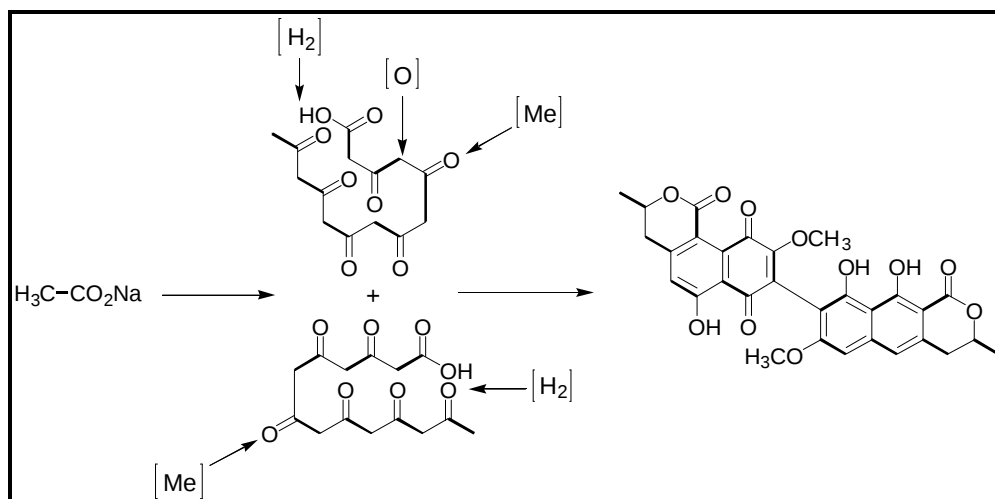
4.4 Biosyntheseuntersuchungen

Der entscheidende Schritt des auf S. 85 postulierten Stoffwechselweges zur Bildung der Biaryl-naturstoffe ist die regio- und stereoselektive Dimerisierung von (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102** zu Vioxanthin **103**. Der Nachweis, daß **102** der biogenetische Vorläufer der von *Penicillium citreo-viride* produzierten Biarylverbindungen ist, soll durch Verfütterung des potentiellen Vorläufers an den Organismus erbracht werden. Dazu soll (*R*)-[O¹³CH₃]-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**191** verwendet werden. Verimpfungsexperimente mit ¹³C-markierten Substanzen besitzen folgende Vorteile:

- Selbst geringe Einbauraten können durch ¹³C-NMR und massenspektrometrische Techniken (MS, GC-MS, LC-MS) detektiert werden.
- Durch das festgelegte Stereozentrum an C-3 der markierten Vorläufersubstanz [(*R*)- bzw. (*S*)-**191**] kann im Falle eines Einbaus auf die absolute Konfiguration der Biaryl-naturstoffe geschlossen werden. Haben die Sekundärmetabolite dieselbe Konfiguration an C-3 und C-3', sollte nur eines der monomeren Enantiomere eingebaut werden. Ist die Konfiguration an C-3 und C-3' spiegelbildlich zueinander, wird bei Einbau eines enantiomerenreinen Monomers nur eine der Methoxygruppen eine Intensitätserhöhung im ¹³C-NMR-Spektrum aufweisen.

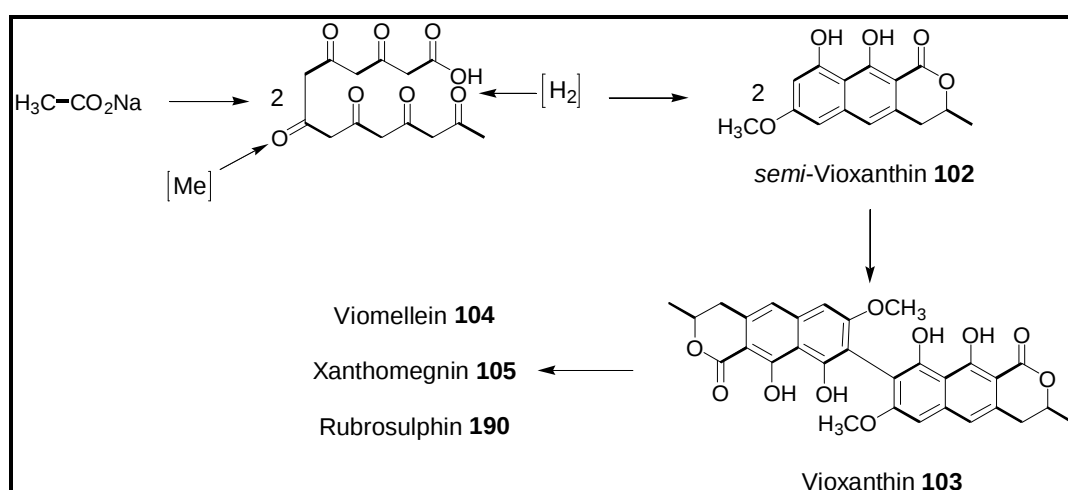
4.4.1 Stand der Forschung

Bislang ist nur eine Untersuchung zur Biosynthese der Sekundärmetabolite **104** und **105**, die neben *P. citreo-viride* auch in anderen Pilzen vorkommen, bekannt. *Simpson* berichtet über die Verfütterung von [1-¹³C]- und [1,2-¹³C]-Acetat an den Organismus *Aspergillus melleus*, der ein Produzent der Pigmente Viomellein **104**, Xanthomegnin **105** und Rubrosulphin **190** ist (siehe **Schema 4-43**, S. 90).^[149] Die Markierungsstudien mit [1-¹³C]-Acetat führten bei Xanthomegnin **105** zu sieben markierten und bei Viomellein **104** zu 14 markierten Kohlenstoffatomen. Aus der alternierenden Abfolge der markierten C-Atome kann geschlossen werden, daß die beiden Sekundärmetabolite polyketidischen Ursprungs sind. Das Markierungsexperiment mit [1,2-¹³C]-Acetat zeigte, daß Viomellein **104** aus 14 intakten Acetateinheiten abgeleitet werden kann. Demnach erfolgt die Bildung von **104** aus zwei unterschiedlichen Heptaketideinheiten.



Schema 4-43: Einbau von Acetat in Viomellein **104** nach Simpson.^[149]

Da Simpson von einer falschen Struktur von Xanthomegnin **105** und Viomellein **104** ausgeht, bei der eine angulare Verknüpfung der Ringe vorliegt,^[150] ist die von ihm angenommene Biosynthese aus zwei unterschiedlich gefalteten Vorläufersubstanzen falsch. Die Gruppen um Zeeck^[91] und Höfle^[151] sowie Himes^[152] konnten unabhängig voneinander zeigen, daß die Ringsysteme bei Viomellein **104** und Xanthomegnin **105** linear miteinander verknüpft sind (siehe Schema 4-44). So wurde gefolgert, daß sich beide Verbindungen vom Vioxanthin **103** ableiten, welches vermutlich aus einer einzigen Vorläufersubstanz, dem (*R*)-*semi*-Vioxanthin **102**, gebildet wird.



Schema 4-44: Revidierte Biosynthese von Vioxanthin **103**, Viomellein **104**, Xanthomegnin **105** und Rubrosulphin **190** nach Zeeck,^[91] Höfle^[151] und Himes.^[152]

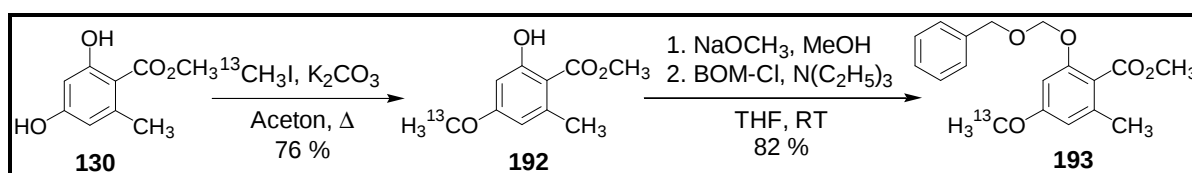
Diese Untersuchungen belegen, daß sowohl (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102** als auch die Biaryl-naturstoffe Vioxanthin **103**, Viomellein **104**, Xanthomegnin **105** und Rubrosulphin **190** aus

dem Polyketidbiosyntheseweg stammen. Ungeklärt ist jedoch der Biosyntheseschritt der Dimerisierung des monomeren Vorläufers.

4.4.2 Synthese von ^{13}C -markiertem *semi*-Vioxanthin

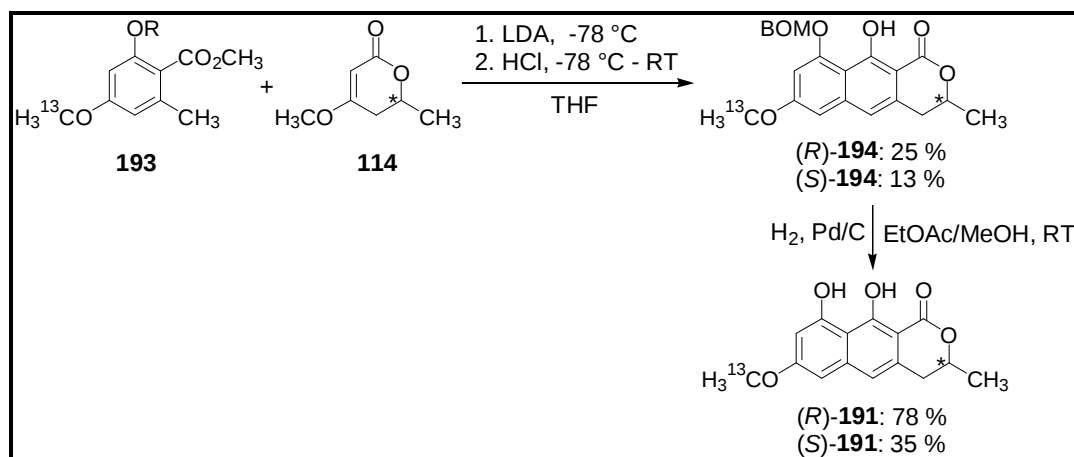
Die Synthese des an der C-7-Methoxygruppe ^{13}C -markierten *semi*-Vioxanthins in nahezu enantiomerenreiner Form erfolgt analog zur Darstellung der unmarkierten Verbindungen (*R*)- und (*S*)-**102** durch Tandem-*Michael*-Reaktion.

Durch Methylierung des 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylesters (**130**) mit [^{13}C]-Iodmethan (>99 % ^{13}C) wird die Markierung eingeführt.^[38a] [O^{13}CH_3]-2-Benzzyloxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**193**) wird ausgehend von Orsellinsäureester **130** in einer zweistufigen Reaktionssequenz mit einer Gesamtausbeute von 62 % erhalten werden (siehe **Schema 4-45**).



Schema 4-45: Synthese von [O^{13}CH_3]-2-Benzzyloxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**193**).

Tandem-*Michael*-Reaktion des markierten Orsellinsäureesters **193** mit den beiden Pyranonen (*R*)- und (*S*)-**114**, gefolgt von Schutzgruppenabspaltung durch Hydrogenolyse, liefert beide Enantiomere des ^{13}C -markierten *semi*-Vioxanthins in einer Ausbeute von 20 % für das *R*-Enantiomer (*R*)-**191** und 5 % für *S*-Enantiomer (*S*)-**191** (siehe **Schema 4-46**).



Schema 4-46: Synthese beider Enantiomere von ^{13}C -markiertem *semi*-Vioxanthin **191** durch Tandem-*Michael*-Reaktion.

Die NMR-Spektren der markierten Verbindungen unterscheiden sich von den unmarkierten Verbindungen im ^1H -NMR-Spektrum durch die direkte ^1H - ^{13}C -Kupplung von 144.5 Hz, die das Signal der ^{13}C -markierten Methoxygruppe als Dublett erscheinen läßt, und durch die im ^{13}C -NMR-Spektrum erhöhte Intensität des entsprechenden Signals. Aufgrund seiner hohen Reinheit (>99 % *ee*, $\geq 99\%$ ^{13}C) entspricht das erhaltene (*R*)-[O- $^{13}\text{CH}_3$]-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**191** den Anforderungen für die Biosyntheseuntersuchungen.

4.4.3 Verimpfungsexperimente

Für die Verimpfungsexperimente soll folgende Strategie angewendet werden:

- Kultivierung von *Penicillium citreo-viride* in einer Nährlösung, welche ^{13}C -markiertes *semi*-Vioxanthin (*R*)-**191** enthält.
- Isolierung der Sekundärmetabolite aus dem Mycel des Pilzes nach dem oben vorgestellten Protokoll (siehe **Schema 4-41**, S. 79).
- Nachweis der Markierung in den NMR- bzw. Massenspektren der Biaryl-naturstoffe.

Verimpfungsexperimente mit Malz-Medium

Zunächst muß ^{13}C -markiertes *semi*-Vioxanthin (*R*)-**191** in der zur Kultivierung verwendeten Nährlösung vollständig aufgelöst werden. Da (*R*)-**191** in Wasser in nur sehr geringer Konzentration löslich ist, werden zu dem verwendeten Medium Lösungen von (*R*)-**191** in Dimethylsulfoxid (DMSO) gegeben und anschließend autoklaviert.

Für die Experimente wird Malz-Medium verwendet, das pro 100 mL Medium eine Lösung von 3 mg (*R*)-**191** in 2 mL DMSO enthält. Die so erhaltene Nährlösung wird mit 1 mL Sporenlösung angeimpft und für sieben Tage bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Als Kontrollexperimente werden eine Kultur, die nur Malz-Medium enthält, sowie eine Kultur, die Malz-Medium mit DMSO enthält, unter denselben Bedingungen wie das Markierungsexperiment inkubiert.

Bei dem Kontrollexperiment mit unbehandeltem Malz-Medium ist ein Wachstum des Pilzes in einer großen Anzahl kleiner Mycelpellets zu beobachten, die sich während der Kultivierung rot-violett verfärben. Im Mycel des Pilzes kann die für diese Inkubationsdauer typische Metabolitzusammensetzung gefunden werden (siehe **Abbildung 4-12**, S. 83).

Die beiden anderen Kulturen, die DMSO enthalten, weisen ein Wachstum in wenigen, großen Mycelpellets auf, die sich nicht verfärben. Aus dem Mycel dieser Experimente kann weder *semi*-Vioxanthin **102** noch ein Biaryl-naturstoff isoliert werden. Aus dem Kulturmedium wird durch Extraktion mit Chloroform das für die Verimpfung verwendete (*R*)-**191** unverändert zurückerhalten.

Verimpfungsexperimente mit Carbopol-supplementiertem Malz-Medium

Um die Bildung von großen Mycelpellets bei der Verwendung DMSO zu verhindern, wird auf die Supplementierung des Malz-Mediums mit dem Polyacrylat Carbopol zurückgegriffen (siehe S. 74).

Für die Experimente wird Carbopol-supplementiertes Malz-Medium verwendet, das pro 100 mL Medium eine Lösung von 3 mg (*R*)-**191** in 2 mL DMSO enthält. Die so erhaltene Nährlösung wird mit 1 mL Sporenlösung angeimpft und für sieben Tage bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Als Kontrollexperimente werden eine Kultur, die nur Carbopol-supplementiertes Malz-Medium enthält, sowie eine Kultur, die Carbopol-supplementiertes Malz-Medium mit DMSO enthält, unter denselben Bedingungen wie das Markierungsexperiment inkubiert.

Die beiden Kontrollexperimente weisen ein disperses Wachstum des Pilzes auf, wobei sich das Mycel während der Kultivierung rot-violett verfärbt (siehe **Abbildung 4-7**, S. 77). Wiederum kann im Mycel des Pilzes die für diese Inkubationsdauer typische Metabolitzusammensetzung gefunden werden (siehe **Abbildung 4-12**, S. 83).

Bei dem Markierungsexperiment ist ein Wachstum des Pilzes in Form von sehr vielen, kleinen Pellets zu beobachten. Diese Mycelkügelchen verfärben sich während der Kultivierung nicht. Aus dem Mycel dieser Experimente kann mittels HPLC sowie im Dünnschichtchromatogramm der Biaryl-naturstoff Viomellein **104** in sehr geringer Konzentration nachgewiesen werden. Durch präparative HPLC wird der korrespondierende Peak isoliert und

massenspektrometrisch untersucht. Die Massenspektren zeigen weder einen Peak, dessen Masse dem Molekölion entspricht, noch können Fragmente dieses Metaboliten gefunden werden.

Aus dem Kulturmedium kann durch Extraktion mit Chloroform das für die Verimpfung verwendete (*R*)-**191** unverändert zurückerhalten werden.

4.4.4 Zusammenfassung

Für die Verimpfungsexperimente wurde an der C-7-Methoxygruppe ^{13}C -markiertes (*R*)- und (*S*)-*semi*-Vioxanthin **191** synthetisiert. Dazu wurde eine Tandem-*Michael*-Reaktion des ^{13}C -markierten Orsellinsäureesters **193** mit dem chiralen Pyranon **114** verwendet. Die Einführung des markierten Kohlenstoffatoms erfolgt durch Methylierung von 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester **130** mit ^{13}C -Iodmethan.

Bei den durchgeführten Verimpfungsexperimenten wurde durch die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel für die zu verimpfende Substanz ein Wachstum des Pilzes in wenigen, großen Mycelpellets beobachtet, welches sich durch die Supplementierung des Nährmediums mit Carbopol verhindern ließ. Außerdem wurde keine Produktion von Biaryl-naturstoffen beobachtet. Die eingesetzte, markierte Verbindung (*R*)-**191** konnte jeweils unverändert aus dem Kulturmedium zurückerhalten werden.

Diese Ergebnisse lassen keinen eindeutigen Schluss zu, ob die markierte Verbindung in die Biaryl-naturstoffe eingebaut wurde oder nicht. Dadurch, daß das eingesetzte ^{13}C -markierte *semi*-Vioxanthin (*R*)-**191** aus dem Kulturmedium unverändert zurückerhalten werden konnte, liegt die Vermutung nahe, daß die verimpfte Substanz erst gar nicht durch die Zellmembran des Pilzes gelangt ist und somit nicht metabolisiert wurde.

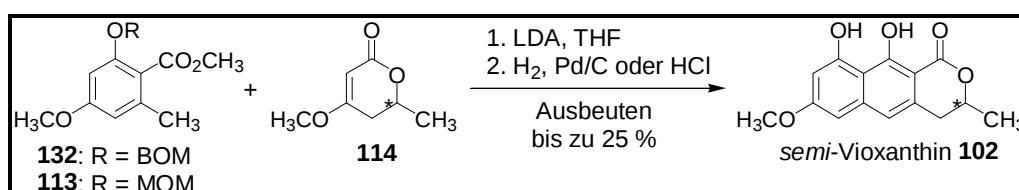
Ein möglicher Ausweg ist die Verwendung eines Ring-markierten *semi*-Vioxanthin-Derivates, welches eine höhere Wasserlöslichkeit besitzt. Dazu bietet sich z. B. **126** mit drei freien Hydroxygruppen an (siehe **Schema 4-6**, S. 39).^[153] Die Ringmarkierung könnte bei der Synthese von **126** durch eine Tandem-*Michael*-Reaktion entweder über das Orsellinsäurederivat oder den *Michael*-Akzeptor eingeführt werden. Diese Substanz hat weiterhin den Vorteil, daß sie ein potentieller biogenetischer Vorläufer von *semi*-Vioxanthin **102** aus dem Polyketidweg ist.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Chemische Synthesen

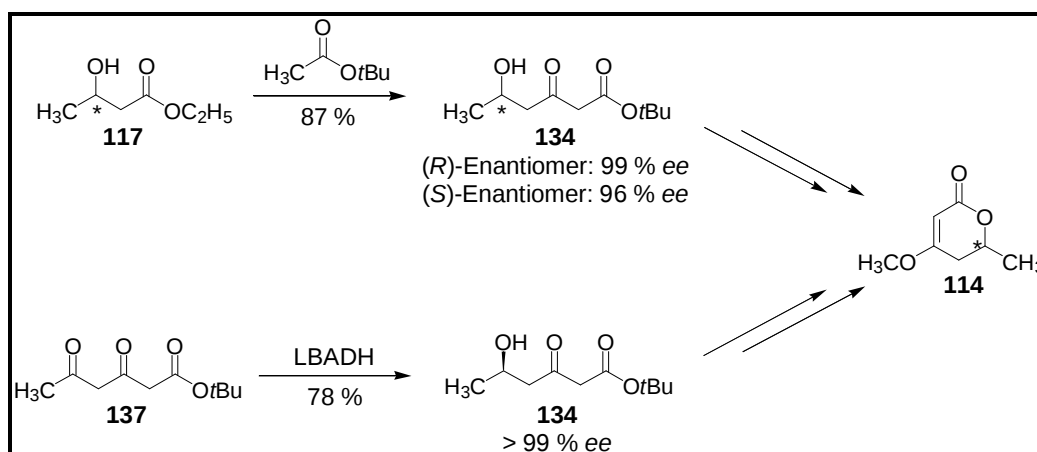
semi-Vioxanthin

Durch eine Tandem-*Michael*-Reaktion der Orsellinsäurederivate **113** und **132** mit den chiralen Pyranonen (*R*)-**114** und (*S*)-**114** gefolgt von Schutzgruppenabspaltung konnten beide Enantiomere von *semi*-Vioxanthin **102** in Ausbeuten von bis 25 % dargestellt werden (siehe **Schema 5-1**).



Schema 5-1: Synthese von *semi*-Vioxanthin **102** durch Tandem-*Michael*-Reaktion.

Bei der stereoselektiven Synthese der chiralen *Michael*-Akzeptoren ist die gezielte Einführung des chiralen Zentrums entscheidend. Dies kann durch Verwendung der chiralen, nicht-racemischen 3-Hydroxybuttersäureethylester (*R*)-(**117**) und (*S*)-(**117**) oder im Falle des (*R*)-Enantiomers alternativ durch eine regio- und enantioselective, enzymatische Reduktion des prochiralen Hexanoats **137** geschehen (siehe **Schema 5-2**).^[119]



Schema 5-2: Synthese der chiralen, nicht-racemischen Pyranone (*R*)- und (*S*)-**114**.

Diese Syntheseroute stellt den bislang einzigen Zugang zu beiden Enantiomeren von *semi*-Vioxanthin **102** dar.^[110] Ähnliche Verfahren führen durch Verwendung von racemischen

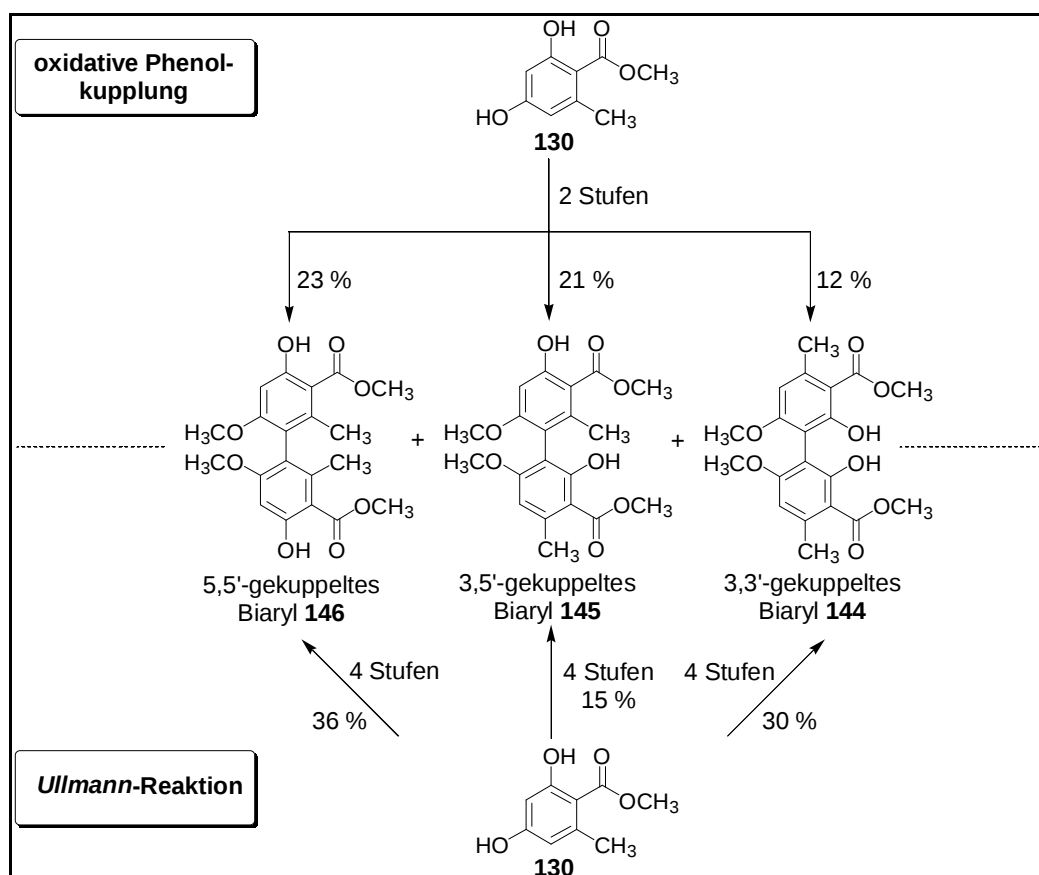
Michael-Akzeptoren entweder zu (*rac*)-**102** oder durch Verwendung der Methylschutzgruppe zum Methyletherderivat von **102**.^[96,97]

Dimere Orsellinsäureester

Dimere Orsellinsäureester konnten durch zwei verschiedene Methoden dargestellt werden:

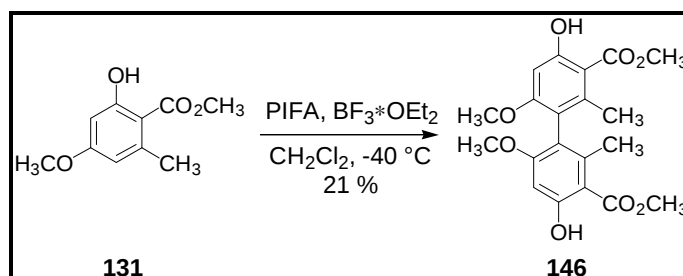
- Ausgehend von 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**130**) können nach Methylierung der OH-Gruppe an C-4 durch eine unselektive, oxidative Phenolkupplung mit auf Kieselgel adsorbierten Eisen(III)chlorid alle denkbaren regioisomeren, dimeren Orsellinsäureester, **144**, **145** und **146**, erhalten werden.^[128] Diese zweistufige Reaktionssequenz erfolgt mit Ausbeuten von 23 % für den 5,5'-dimeren Orsellinsäureester **146**, 12 % für den 3,3'-dimeren Orsellinsäureester **144** sowie 21 % für den 3,5'-dimeren Orsellinsäureester **145** (siehe **Schema 5-3**, S. 97). Die Kupplungsreaktion kann im 2 g-Maßstab durchgeführt werden und die Trennung der isomeren Biaryle erfolgt durch Säulenchromatographie und Kristallisation.
- Das klassische Verfahren der *Ullmann*-Kupplung, welches von *Karl* zur Darstellung von dimeren Orsellinsäureestern bereits etabliert wurde,^[6e,120] wurde in dieser Arbeit zur Synthese des 3,3'-dimeren Orsellinsäureesters **144** verwendet. Die Reaktionssequenz erfordert ausgehend von **130** unter Verwendung einer neuartigen, selektiven Iodierungsmethode insgesamt vier Stufen und verläuft mit einer Gesamtausbeute von 30 %. Nach *Karl* erfolgt die Synthese der beiden anderen Regioisomeren in jeweils vier Stufen und einer Ausbeute von 36 % für das 5,5'-Dimere **146** und 15 % Ausbeute für 3,5'-Dimere **145** (siehe **Schema 5-3**, S. 97).

Das neuartige Verfahren zur Darstellung der dimeren Orsellinsäureester durch eine biomimetische, unselektive oxidative Phenolkupplung ist bezüglich des Arbeitsaufwandes durch die geringe Anzahl der Stufen dem klassischen Verfahren der *Ullmann*-Reaktion überlegen. Weiterhin werden durch die neue Methode alle drei Regioisomere in einer Reaktion mit Gesamtausbeuten von bis zu 70 % gebildet, während beim klassischen Verfahren drei unterschiedliche Reaktionswege mit insgesamt 12 Stufen notwendig sind. Außerdem ist die *Ullmann*-Reaktion atomökonomisch sehr ineffizient,^[135] da die schweren Iodatome nicht im Zielmolekül enthalten sind.



Schema 5-3: Vergleich der beiden Verfahren zur Darstellung von dimeren Orsellinsäureestern bezüglich Anzahl der Stufen und Ausbeute.

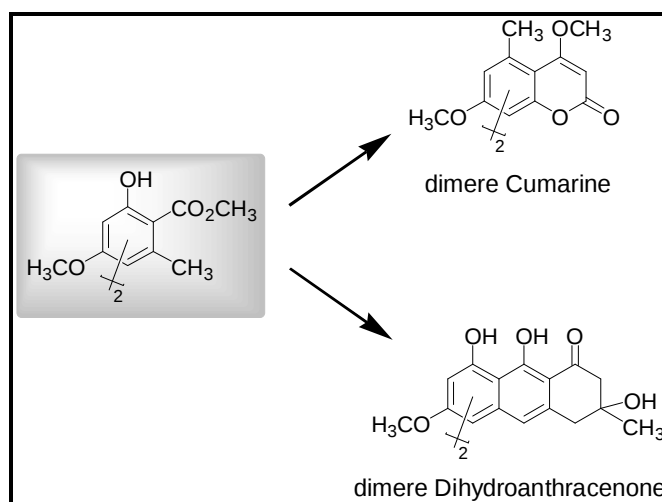
Durch die Verwendung eines anderen Oxidationsmittels (PIFA) ist es möglich, die Selektivität der Kupplungsreaktion zu beeinflussen. So bildet sich bei der Umsetzung des Orsellinsäureesters **131** ausschließlich das 5,5'-gekuppelte Dimer **146** in 21 % Ausbeute (siehe **Schema 5-4**). Die Ursache für dieses Reaktionsverhalten liegt darin, daß bei Oxidationen mit hypervalenten Iodreagenzien keine Radikale auftreten und die Kupplung ausschließlich an dem Kohlenstoffatom stattfindet, welches die höchste Elektronendichte besitzt.^[130]



Schema 5-4: Selektive oxidative Phenolkupplung von Orsellinsäureester **131**.

Die unselektive oxidative Phenolkupplung kann in der Totalsynthese von Biaryl-naturstoffen eine große Bedeutung spielen, da die resultierenden Produkte hochfunktionalisiert sind. So

konnte *Hüttel* aufbauend auf den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen eine neuartige, biomimetische Synthese der Naturstofffamilie der dimeren Cumarine Kotanin (**9**), Isokotanin A (**10**) und Desertorin C (**6**) etablieren.^[128,154] Außerdem sollten auch andere Biarylnaturstoffe, wie z. B. dimere Dihydroanthracenone, zugänglich sein.



Schema 5-5: Zur Verwendung von dimeren Orsellinsäureestern.

Atropisomerentrennung

Die Trennung der Atropisomeren des 3,3'-dimeren Orsellinsäureesters **144** durch die „Camphansäuremethode“^[126] ermöglicht durch die sehr guten chemischen und optischen Ausbeuten (für beide Atropisomere 21 % Ausbeute über zwei Stufen und >95 % *ee*) sowie die einfache säulenchromatographische Trennung der Diastereomere einen präparativen Zugang zu den beiden Atropisomeren (*M*)- und (*P*)-**144**. Die absolute Konfiguration des (*M*)-Enantiomers konnte durch Röntgenstrukturanalyse des Biscamphansäureesters (*M*)-**167** bestimmt werden. Damit wurde die von *Karl*^[6e,120] vorgenommene Zuordnung der absoluten Konfiguration durch Verwendung sogenannter Dinitrodiphenylsäurelactone bestätigt. Letzteres Verfahren bietet ebenfalls einen Zugang zu den atropisomerenreinen dimeren Orsellinsäureestern (*M*)- und (*P*)-**144**, ist wegen der geringen Ausbeuten aber präparativ nicht nutzbar.

Versuche zur Synthese von Vioxanthin

Die Synthese von Vioxanthin war auch durch Verwendung von insgesamt drei verschiedenen Synthesestrategien nicht erfolgreich:

- Die ursprünglich angedachte Route über die Tandem-*Michael*-Reaktion des geschützten dimeren Orsellinsäureesters **170** mit dem chiralen Pyranon (*R*)-**114** lieferte auch nach Optimierung der Konzentrationsverhältnisse von eingesetztem *Michael*-Akzeptor und eingesetzter Base nur das Monoanellierungsprodukt **173**.
- Die biomimetische oxidative Phenolkupplung von (*R*)-*semi*-Vioxanthin **102** mit PIFA führte zum entsprechenden Pyranonaphthochinon und belegt damit die Oxidationsempfindlichkeit dieser Verbindungen, die auch im biologischen System beobachtet wird. Das dabei entstehende (*R*)-*semi*-Xanthomegnin **125** kann als Referenzsubstanz für den HPLC-Assay verwendet.
- Auch der Versuch der intramolekularen Phenolkupplung eines verbrückten *semi*-Vioxanthin-Derivates verlief ohne Erfolg, da die Einführung der Brücke zwischen zwei *semi*-Vioxanthin-Molekülen aus sterischen Gründen nicht möglich war.

5.2 Biologische Arbeiten

Kultivierung von Penicillium citreo-viride

Für die Kultivierung des filamentösen Pilzes *P. citreo-viride* in Schüttelkolben und auf Agar-Platten wurde ein Malz-Medium verwendet, welches aus der Literatur bekannt war.^[91] Ein Vergleich mit drei anderen Nährlösungen (Czapek-Dox-, ATCC Culture Medium 313, Steep-Medium) basierend auf dem Wachstum auf Agar-Platten zeigte, daß der Organismus auf dem Malz-Medium eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit besitzt und sich das Mycel während der Kultur von farblos zu rot-violett verfärbt. In Kombination mit HPLC-Untersuchungen ist diese Verfärbung eine Qualitätskontrolle für die Produktion der Biaryl-naturstoffe.

Bei Flüssig-Kulturen von *P. citreo-viride* in Schüttelkolben wurde ein pelletierendes Wachstum beobachtet, wenn mit Mycelstücken von Agar-Platten angeimpft wurde. Diese Art des Wachstums ist für die weiteren Untersuchungen nachteilig, da nur wenig Biomasse gebildet wird, keine Verfärbung des Mycels und somit keine Produktion von Biaryl-naturstoffen beobachtet werden kann. Durch das Animpfen einer Flüssig-Kultur mit einer Sporenlösung oder die Supplementierung der verwendeten Nährlösung mit einem Polymer (Carbopol) kann eine Bildung von sehr vielen kleinen Mycel-pellets bzw. ein völlig disperses Wachstum erreicht werden.

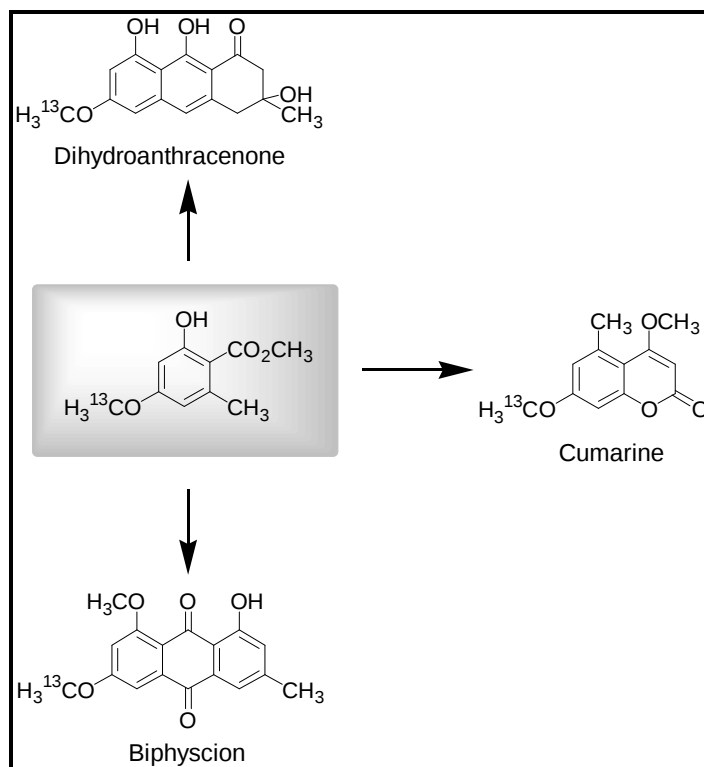
Aufbau eines Analytik-Assays

Als Referenzsubstanzen für einen HPLC-Assay wurden chemisch synthetisiertes *semi*-Vioxanthin **102** sowie *semi*-Xanthomegnin **125** und die aus dem Mycel des Pilzes isolierten Naturstoffe *semi*-Vioxanthin **102**, Viomellein **104**, Xanthomegnin **105** und Rubrosulphin **190** verwendet. Die Isolierung basiert auf einer Extraktion des Pilzmycels mit einem Methanol/Chloroform-Gemisch und der säulen- oder dünnschichtchromatographischen Reinigung der Rohextraktes. Da die Biaryl-naturstoffe Vioxanthin **103** und Viomellein **104** nur in geringer Konzentration isoliert werden können, würde sich dafür die Fermentation des Pilzes im großen Maßstab anbieten. Weiterhin konnte Rubrosulphin **190** als neuer Sekundärmetabolit aus *P. citreo-viride* isoliert werden.

Der eigentliche Assay beruht auf der Trennung der Metabolite an einer RP-18-Phase und Detektion mit einem UV- sowie Fluoreszenzdetektor. Erstere Detektionsmethode erlaubt eine systematische Analyse der Metabolitzusammensetzung während der Kultur. Durch die Fluoreszenzdetektion kann eine hochselektive und hochempfindliche Erfassung von **102** und **103** erreicht werden. Da unter den gewählten Bedingungen (Anregungswellenlänge = 270 nm, Emissionswellenlänge = 600 nm) nur die beiden Verbindungen fluoreszieren, kann dieses Selektionsprinzip für ein mögliches Hochdurchsatzscreening verwendet werden.

5.3 Biosyntheseuntersuchungen

Für die Biosyntheseuntersuchungen wurde ^{13}C -markiertes (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**191** eingesetzt, welches analog zu **102** durch Tandem-*Michael*-Reaktion synthetisiert wurde. Die Einführung der Markierung erfolgte durch Methylierung von 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**130**) mit ^{13}C -Iodmethan. Da sich diverse Naturstoffe von Orsellinsäureestern ableiten, können ^{13}C -markierte Orsellinsäurederivate zur Darstellung einer Vielzahl von markierten, potentiellen Vorläuferverbindungen von Biaryl-naturstoffen verwendet werden. Dies bildet wiederum die Grundlage für Biosyntheseuntersuchungen einer Reihe von Sekundärmetaboliten.



Schema 5-6: Zur Verwendung der ^{13}C -markierten Orsellinsäureester.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Biosyntheseuntersuchungen mit ^{13}C -markiertem (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**191** konnte auch nach Variation der Kultivierungsbedingungen keine markierten Biarylverbindungen isoliert werden. Die eingesetzte markierte Substanz konnte bei den verschiedenen Verfütterungsexperimenten unverändert zurückerhalten werden.

Die Bereitstellung der markierten Verbindungen kann als sinnvolle Vorarbeit zur Verwendung dieser Substanzen mit Zellrohextrakten oder permeabilisierten Zellen dienen.

5.4 Circular dichroismus als Screeningverfahren

Der HPLC-Assay (siehe S. 82) ermöglicht die Analyse der Metabolitzusammensetzung im Mycel von *Penicillium citreo-viride* zu jedem beliebigen Zeitpunkt der Kultivierung. Die Verwendung des Fluoreszenzdetektors erlaubt die hochempfindliche und hochselektive Erfassung der beiden Metabolite (*R*)-*semi*-Vioxanthin (*R*)-**102** und Vioxanthin **103**, da diese die einzigen Sekundärmetabolite aus dem Organismus sind, die Fluoreszenz aufweisen. Dadurch, daß dieses analytische System auf der chromatographischen Trennung der Metabolite beruht, werden lange Analysezeiten von mehr als 15 Minuten benötigt, weswegen dieser Assay für die Analyse einer großen Anzahl von Proben nicht geeignet ist.

Ein möglicher Ansatzpunkt, um an die genetische Information zu gelangen, die für die stereo- und regioselektive, oxidative Phenolkupplung in *P. citreo-viride* verantwortlichen Enzyme codiert, ist der Aufbau einer Cosmid-Bibliothek. Diese Bibliothek kann durch DNA-Fragmentierung und Expression dieser Fragmente in einem heterologen Wirt erzeugt werden. Als Wirte bieten sich zum Beispiel andere filamentöse Pilze oder Hefen an, die bezüglich Wachstum und Genetik gut untersucht sind und außerdem als Wildstamm die zu untersuchenden Metabolite selbst nicht biosynthetisieren. Da bei Anwendung dieser Methode eine sehr große Anzahl von Proben erzeugt wird, ist die Etablierung einer geeigneten Screening-Methode notwendig.

Als wichtigste Eigenschaft muß dieser Assay das Screening der Bibliothek nach Aktivität und Selektivität gleichzeitig ermöglichen, da nach der regio- und stereoselektiven Bildung von Biaryl-naturstoffen gesucht werden soll. **Abbildung 5-1** auf S. 103 verdeutlicht dieses Prinzip am Beispiel der Dimerisierung von (*R*)-*semi*-Vioxanthin **102** zu Vioxanthin **103**.

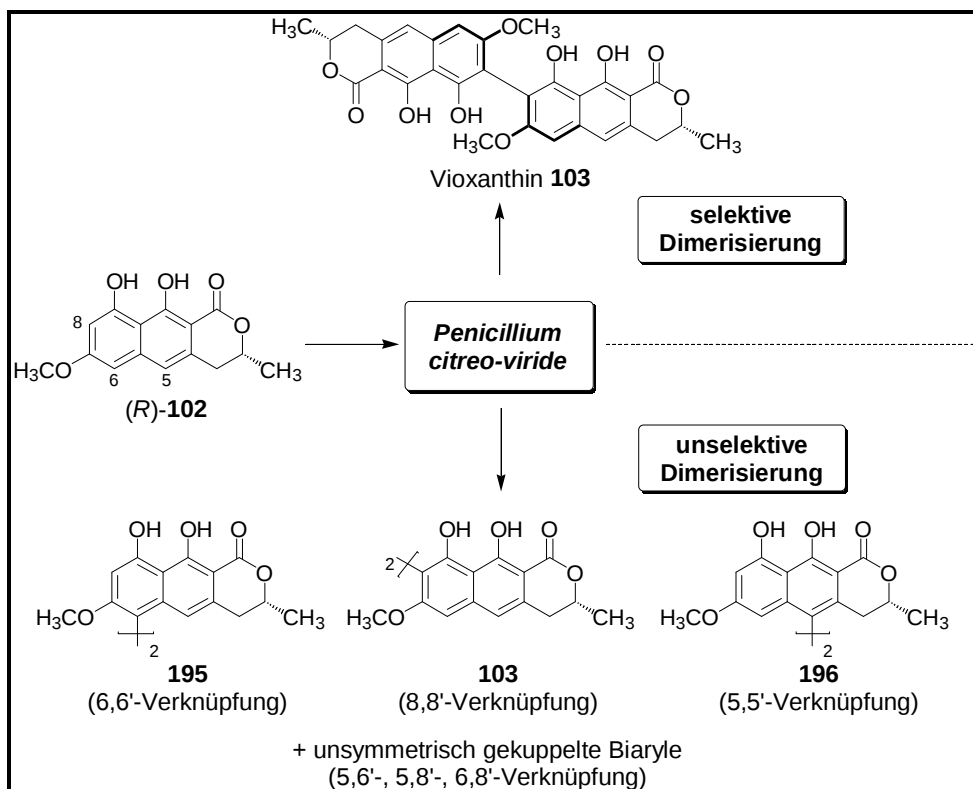


Abbildung 5-1: Zusammenhang von Aktivität und Selektivität zur Untersuchung der selektiven oxidativen Phenolkupplung.

Hier wird vorausgesetzt, daß neben der stereo- und regioselektiven Kupplungsreaktion, die zu nicht-racemischem Vioxanthin **103** führt, noch ein unselektiver Mechanismus existiert, der zu regioisomeren bzw. racemischen Kupplungsprodukten führt. Bei dem Screening der Bibliothek ausschließlich nach Aktivität würde jeder Stamm bzw. Extrakt einen Treffer ergeben, der ausgehend von *semi*-Vioxanthin **102** eine Biarylverbindung produziert. Wird als zusätzliches Selektionsprinzip die Stereoselektivität berücksichtigt, führen nur die Stämme bzw. Extrakte zu Treffern, die Biarylverbindungen in nicht-racemischer Form erzeugen.

Als weiteres Auswahlkriterium sollen nur fluoreszierende Substanzen detektiert werden. Da der HPLC-Assay mit Erfassung der Metabolite durch einen Fluoreszenzdetektor zeigte, daß nur *semi*-Vioxanthin **102** und Vioxanthin **103** bei der Anregungswellenlänge von 270 nm fluoreszieren, würde dadurch eine direkte Analyse der beiden Metabolite aus der Reaktionsmischung ohne chromatographische Reinigung ermöglicht. Dies führt gleichzeitig zu einer Verkürzung der Analysezeiten.

Es ist möglich, daß die von den Stämmen der Bibliothek produzierten Biarylverbindungen in sehr geringen Konzentration und niedrigen Enantiomerenüberschüssen vorliegen. Daher ist

die Entwicklung einer Methode notwendig, die Messungen mit sehr hoher Empfindlichkeit erlaubt.

Um diesen Selektionsprinzipien zu genügen, wurde eine Detektionsmethode ausgewählt, die auf der chiroptischen Technik des Circular dichroismus beruht.

5.4.1 Circular dichroismus – Eine Einführung

Chiroptische Methoden

Chiroptische Methoden sind spektroskopische Verfahren, die aufgrund der unterschiedlichen Wechselwirkung von links und rechts zirkular polarisiertem Licht mit chiralen Molekülen für zwei Enantiomere jeweils Messwerte entgegengesetzten Vorzeichens liefern. Voraussetzung für das Auftreten eines chiroptischen Effektes ist das Vorliegen eines chiralen, nicht-racemischen Moleküls. Unter diese Methoden fallen die optischen Rotationsdispersion (ORD), die Abhängigkeit der optischen Drehung von der Wellenlänge, sowie der Circular dichroismus (CD), die ungleiche Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht.

Circular dichroismus und Elliptizität^[155]

Der Circular dichroismus ist definiert als die Differenz zwischen den molaren Absorptionskoeffizienten für links und rechts zirkular polarisiertes Licht, ϵ_L und ϵ_R :

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$$

Gleichung 5-1: Definition des Circular dichroismus $\Delta\epsilon$; ϵ_L : molarer Absorptionskoeffizient des Chromophors für links zirkular polarisiertes Licht; ϵ_R : molarer Absorptionskoeffizient des Chromophors für rechts zirkular polarisiertes Licht.

Durch den direkten Zusammenhang des molaren Absorptionskoeffizienten mit der Absorption über das Lambert-Beer'sche Gesetz

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \times c \times l$$

Gleichung 5-2: Lambert-Beer'sches Gesetz; I_0 : Intensität des einfallenden Lichts; I : Intensität des ausfallenden Lichts; c : Konzentration der Probe; l : Länge der Zelle.

ergibt sich folgende Beziehung zwischen $\Delta\epsilon$ und ΔA :

$$\Delta A = A_L - A_R = \Delta \epsilon \times c \times l$$

Gleichung 5-3: Zusammenhang zwischen ΔA und $\Delta \epsilon$.

Ein weiterer Effekt, der durch den Circular dichroismus erzeugt wird, ist die Elliptizität. Wenn der elektrische Feldvektor des linear polarisierten Lichts in eine links zirkular polarisierte und eine rechts zirkular polarisierte Komponente zerlegt wird, so besitzen diese beiden Komponenten vor der Wechselwirkung mit einer chiralen, nicht-racemischen Probe die gleiche Größe und Phase (**Abbildung 5-2a**). Beim Durchgang durch die Probe wird nun beispielsweise die rechts zirkular polarisierte Komponente stärker absorbiert als die links zirkular polarisierte Komponente. Da nun die beiden Komponentenvektoren unterschiedliche Größen besitzen, beschreibt der resultierende elektrische Feldvektor eine Ellipse (**Abbildung 5-2b**). Die beiden Halbachsen dieser Ellipse formen ein Dreieck **Abbildung 5-2c**). Der Winkel gegenüber der kleinen Halbachse, Ψ , wird als Elliptizität bezeichnet und ist proportional zum Circular dichroismus:

$$\Psi = 33 \times \Delta \epsilon$$

Gleichung 5-4: Zusammenhang zwischen Elliptizität Ψ und Circular dichroismus $\Delta \epsilon$. Der Proportionalitätsfaktor resultiert aus der mathematischen Beziehung $\Psi = a/b$ (siehe **Abbildung 5-2**).

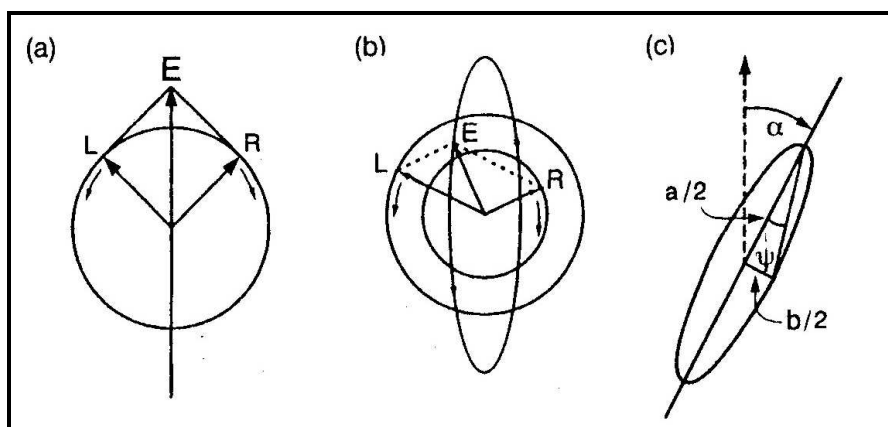


Abbildung 5-2: Zur Wechselwirkung von linear polarisiertem Licht mit einem optisch aktiven Medium (Abbildung entnommen aus [155]).

Anwendungen des Circular dichroismus

Circular dichroismus wird hauptsächlich zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von organischen Molekülen und Naturstoffen sowie zur Konformationsanalyse von Proteinen verwendet. Eines der wichtigsten Verfahren ist die von *Nakanishi* und *Harada* entwickelte

Exciton-Chirality-Methode.^[156,157] Sie dient zur Bestimmung des absoluten Drehsinns zwischen zwei benachbarten Substituenten und beruht auf dem Prinzip, daß die elektrischen Übergangsmomente zweier räumlich benachbarter Chromophore miteinander wechselwirken. In **Abbildung 5-3** ist dieses Phänomen am Beispiel der *para*-substituierten Bisbenzoate eines vicinalen Cyclohexandiols illustriert.

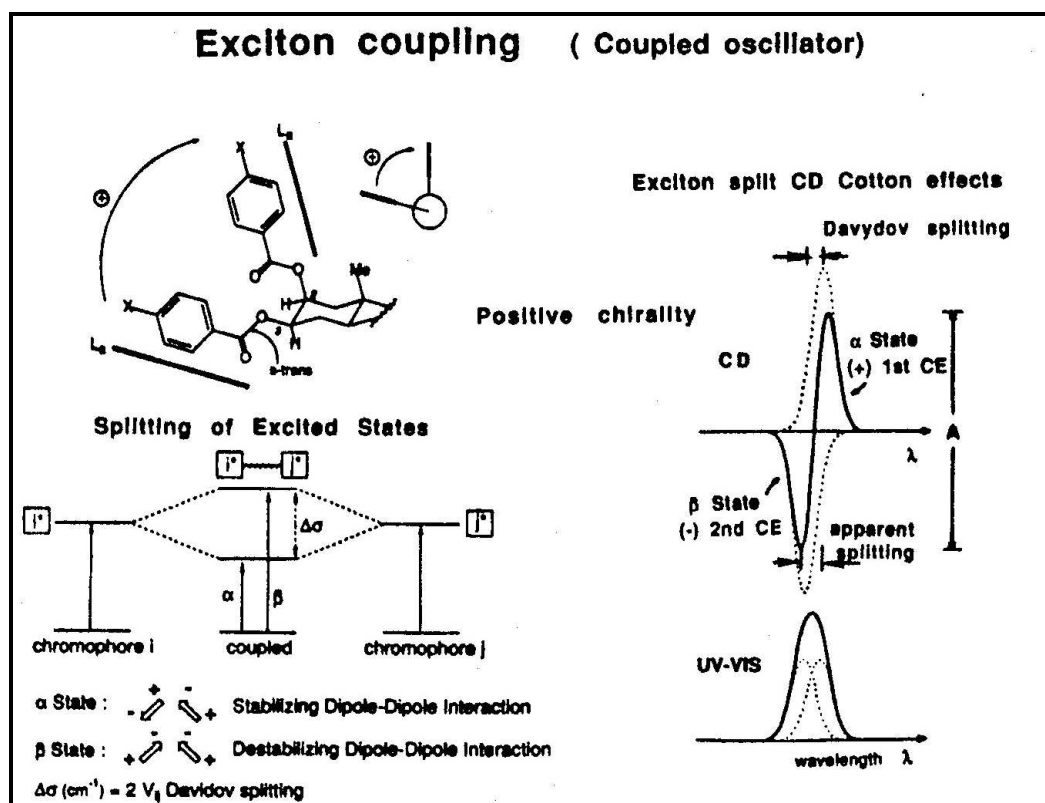


Abbildung 5-3: Zur Erläuterung der Exciton-Chirality-Methode (Abbildung entnommen aus [156]).

Diese Wechselwirkung verursacht eine Aufspaltung der Energieniveaus des angeregten Zustands in ein rot-verschobenes und ein blau-verschobenes Energieniveau. Das resultierende UV-Spektrum setzt sich aus zwei Komponenten mit demselben Vorzeichen zusammen. Dies führt dann zu einem einzigen Absorptionsmaximum mit doppelter Intensität. Im CD-Spektrum erzeugt die Wechselwirkung einen positiven und einen negativen Cotton-Effekt. Da die Hauptübergangsmomente der bei der Exciton-Chirality-Methode verwendeten Chromophore (Benzoessäurederivate) parallel zu den C-O-Bindungen der untersuchten Chiralitätszentren orientiert sind, kann anhand des CD-Spektrums die relative Konfiguration der beiden benachbarten Hydroxylgruppen zueinander bestimmt werden. So erzeugen im Uhrzeigersinn orientierte Übergangsmomente ein CD-Spektrum, welches durch das Auftreten eines ersten positiven Cotton-Effekts gefolgt von einem zweiten negativen Cotton-Effekt charakterisiert ist, welches auch als positive Chiralität bezeichnet wird. Analog erfolgt die

Definition von negativer Chiralität. Dabei wird das CD-Spektrum von hohen zu niedrigen Wellenlängen (in Richtung steigender Energie) ausgewertet.

Weiterhin wird der Circular dichroismus in Kombination mit UV/Vis-Spektroskopie als Detektionsprinzip in der Flüssigkeitschromatographie (HPLC) eingesetzt. Die parallele Messung des Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) und der Absorption (ϵ) einer Probe bei einer festgelegten Wellenlänge ermöglicht den Aufbau eines Screening-Systems zur schnellen Bestimmung der Enantiomerenreinheit. Durch Berechnung des Anisotropiefaktors g ist es möglich ohne Trennung der beiden Enantiomere den Enantiomerenüberschuß zu bestimmen, da das CD-Signal nur von dem Verhältnis der Stereoisomere abhängt und die Absorption die Konzentration beider Enantiomere berücksichtigt.^[158]

$$g = \frac{\Delta\epsilon}{\epsilon}$$

Gleichung 5-5: Definition des Anisotropiefaktors g .

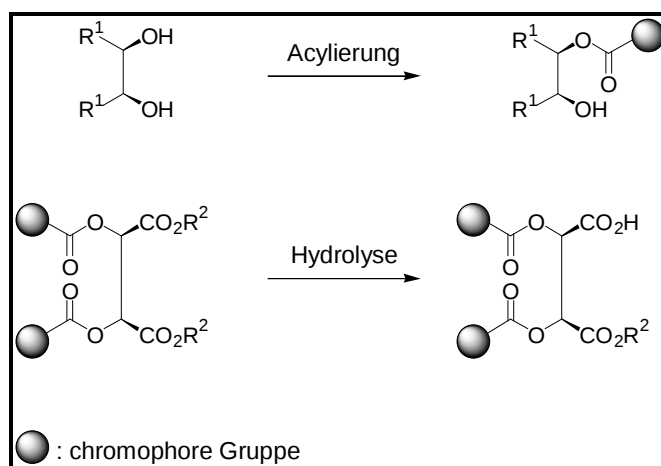
Dieses Prinzip wurde von *Mikami et al.*^[159] bei der stereoselektiven Addition von Diethylzink an Benzaldehyd und von *Reetz et al.*^[160] bei der Enzym- oder Übergangsmetall-katalysierten Reduktion von Acetophenon zu (*R*)- und (*S*)-Phenylethanol als Screeningmethode angewendet.

5.4.2 Überprüfung des Prinzips des CD-Screenings

Das Prinzip den Circular dichroismus als allgemein anwendbare, direkte Screeningmethode ohne vorhergehenden Reinigungsschritt (chromatographische Trennung) zu nutzen, soll zunächst an einer Modellreaktion überprüft werden. Dazu können zum Beispiel enzym-katalysierte Reaktionen herangezogen werden. Diese sollen folgende Bedingungen erfüllen:

- Die Reaktion muß zu chiralen, nicht-racemischen Produkten führen, die eine chromophore Gruppe tragen, um eine Detektion mit CD zu ermöglichen.
- Für eine Erfassung der Produkte ohne chromatographische Aufarbeitung soll das Reaktionsprodukt die einzig chirale bzw. nicht-racemische Verbindung im Reaktionsgemisch sein.

Hierfür bieten sich Racematspaltungen unter Verwendung des sogenannten „Meso-Tricks“ an (siehe **Schema 5-7**). Diese Methode ermöglicht die Überführung einer *meso*-Verbindung in ein einziges Stereoisomer mit einer theoretischen Ausbeute von 100 %. Andere Verfahren diesen Typs verlaufen über dynamische kinetische Racematspaltungen, cyclische Deracemisierung oder enantiokonvergente Umsetzungen.^[161]

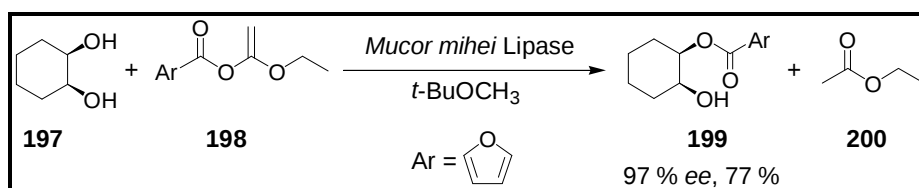


Schema 5-7: Acylierung (oben) und Hydrolyse (unten) einer *meso*-Verbindung, die zu einem chiralen, nicht-racemischen Reaktionsprodukt führt. Das Chromophor wird bei der Reaktion eingeführt (Acylierung) oder ist bereits im Substrat vorhanden (Hydrolyse).

5.4.3 Lipasen-katalysierte Acylierung von *meso*-Cyclohexandiol

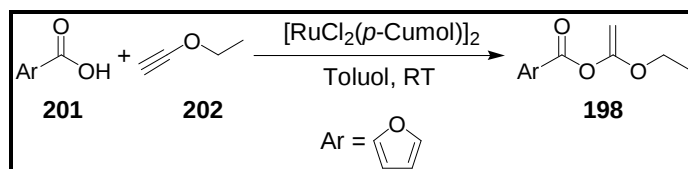
Einleitung

Die Gruppe um *Kita* berichtet von irreversiblen, enzymatischen Deracemisierungen von *meso*-1,2-Diolen.^[162] Dazu wird *meso*-1,2-Cyclohexandiol (**197**) mit einem aromatischen Ethoxyvinylester **198** unter Lipasen-Katalyse zu dem monoacylierten Cyclohexandiol **199** und flüchtigem Essigsäureethylester (**200**) umgesetzt (siehe **Schema 5-8**). Die hier verwendeten, aktivierten Acylierungsreagenzien besitzen gegenüber den häufig benutzten Vinylestern und Isopropenylestern den Vorteil, daß sie keine der für manche Lipasen toxischen Nebenprodukte (Acetaldehyd, Aceton) bilden.



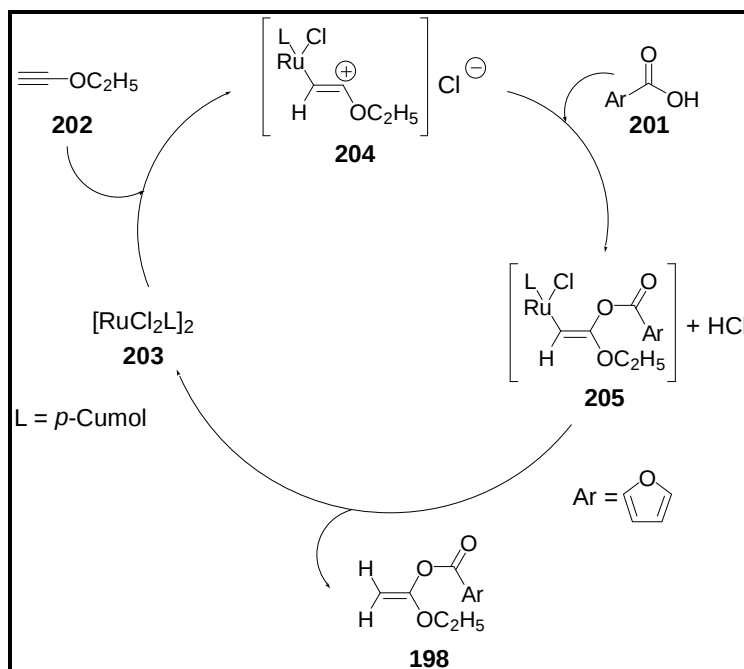
Schema 5-8: Irreversible, Lipasen-katalysierte Veresterung von *meso*-1,2-Cyclohexandiol (**197**) mit aromatischen Ethoxyvinylestern **198** nach *Kita et al.*^[162]

Die Darstellung der Acylierungsreagenzien erfolgt durch katalytische Veresterung einer Carbonsäure **201** mit Ethoxyacetylen (**202**) unter milden Bedingungen (siehe **Schema 5-9**).^[163]



Schema 5-9: Synthese aromatischer Ethoxyvinylester **198** nach Kita *et al.*^[163]

Als Katalysator wird ein Rutheniumkomplex **203** verwendet, der oxidativ an das unsubstituierte Kohlenstoffatom der Dreifachbindung von **202** addiert. Anschließend erfolgt der Angriff des Carboxylsauerstoffs der Carbonsäure an das positiv geladene C-Atom von **204**. Unter Regeneration des Katalysators wird der Ethoxyvinylester **198** dann freigesetzt (siehe **Schema 5-10**).

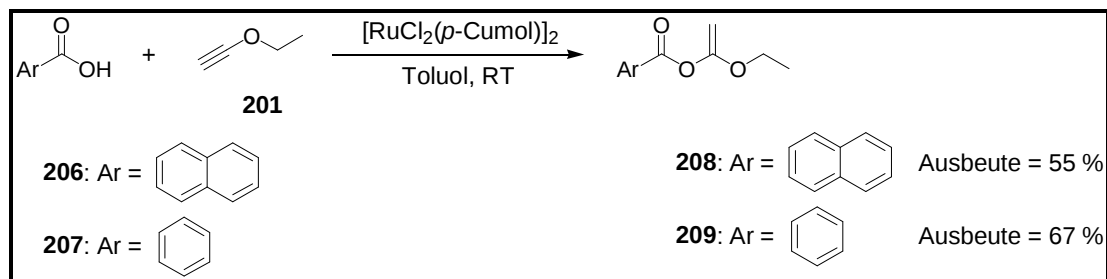


Schema 5-10: Zyklus der katalytischen Veresterung von aromatischen Carbonsäuren **201** mit Ethoxyacetylen (**202**).^[163]

Eigene Arbeiten und Diskussion

Darstellung der Acylierungsreagenzien

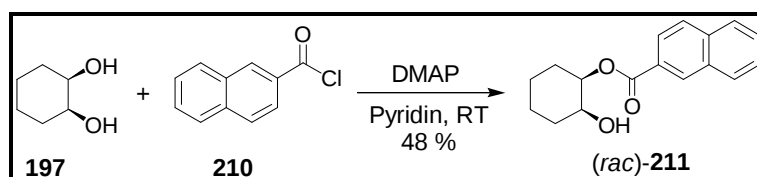
Die Synthese der aromatischen Ethoxyvinylester **208** und **209** erfolgt analog zu dem oben beschriebenen Verfahren von *Kita et al.*^[163] **Schema 5-11** auf gibt eine Übersicht über die dabei erzielten Ausbeuten.



Schema 5-11: Synthese der Ethoxyvinylester **208** und **209**.

Synthese von Vergleichsverbindungen

Die Etablierung einer HPLC-Methode zur Enantiomerentrennung erfolgt mit dem racemischen Mononaphthoat (*rac*)-**211** als Modellverbindung. Zu dessen Darstellung wird *meso*-1,2-Cyclohexandiol (**197**) mit 2-Naphthoylchlorid (**210**) und DMAP als Katalysator in Pyridin umgesetzt, wobei das Produkt in einer Ausbeute von 48 % isoliert wird (siehe **Schema 5-12**).

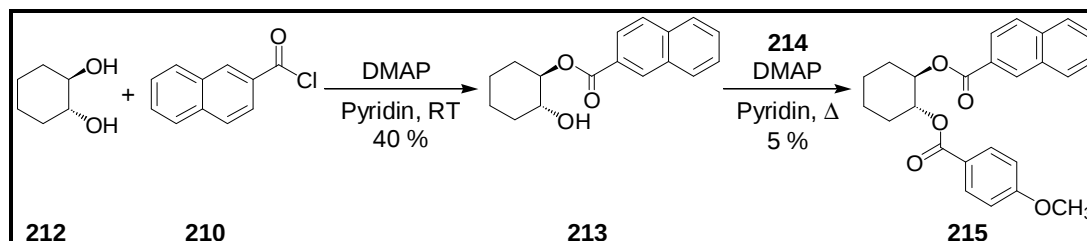


Schema 5-12: Chemische Acylierung von *meso*-1,2-Cyclohexandiol (**197**).

Die Trennung der Enantiomere von (*rac*)-**211** erfolgt durch HPLC an einer chiralen stationären Phase (Chiralcel OD-H) mit Isohexan/2-Propanol = 95:5 als Laufmittel. Die Retentionszeiten betragen 41.9 und 49.8 min.

Als Referenzsubstanzen für die CD-Messungen werden (1*R*,2*R*)-*trans*-1,2-Cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (**213**) und (1*R*,2*R*)-*trans*-1,2-cyclohexandiol 1-(*p*-methoxybenzoat)-2-(2-naphthoat) (**215**) eingesetzt. Für deren Synthese wird zunächst kommerziell erhältliches, enantiomerenreines (1*R*,2*R*)-*trans*-1,2-Cyclohexandiol (**212**) mit 2-Naphthoylchlorid (**210**) in

Analogie zur Synthese von (*rac*)-**211** verestert. Das monoacylierte Reaktionsprodukt **213** wird dabei in einer Ausbeute von 40 % isoliert. Daran schließt sich die Umsetzung mit *p*-Methoxybenzoylchlorid (**214**) zu **215** an (siehe **Schema 5-13**).



Schema 5-13: Synthese von (*1R,2R*)-*trans*-1,2-cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (**213**) und (*1R,2R*)-*trans*-1,2-cyclohexandiol 1-(*p*-methoxybenzoat)-2-(2-naphthoat) (**215**).

Das CD-Spektrum des monoacylierten Cyclohexandiols **213** ist durch die geringe Intensität, $\Delta\epsilon = -2.2$, des negativen Cotton-Effekts bei 240 nm gekennzeichnet (siehe **Abbildung 5-4**).

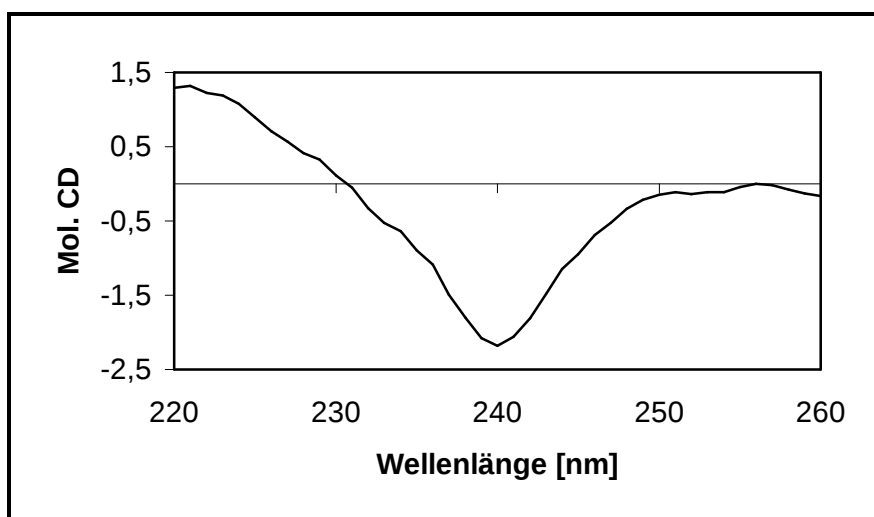


Abbildung 5-4: CD-Spektrum von (*1R,2R*)-*trans*-1,2-cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (**213**) ($c = 1 \times 10^{-5}$ M, Acetonitril).

Das CD-Spektrum des Systems **215** weist ein typisches Exciton-Coupling auf. Die beiden Cotton-Effekte zeigen eine sehr viel höhere Intensität, $\Delta\epsilon = -35/+40$, als das Mononaphthoat **213** (siehe **Abbildung 5-5**, S. 112).

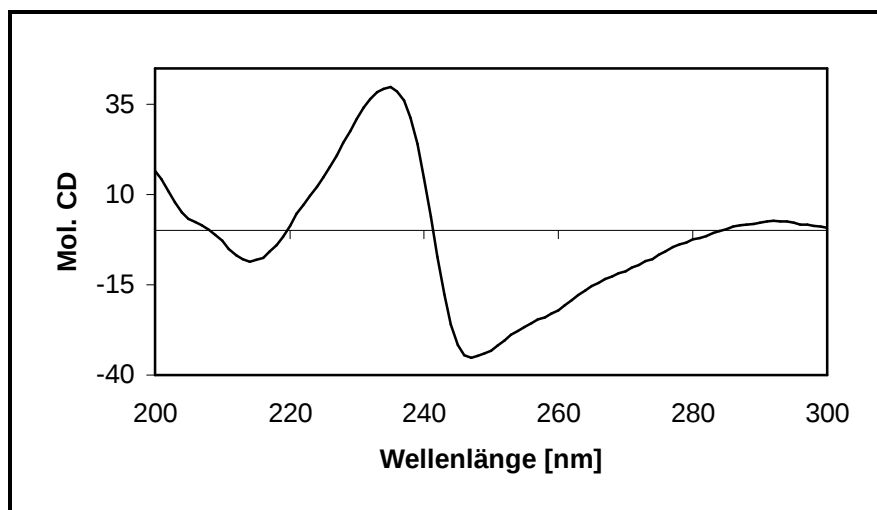


Abbildung 5-5 CD-Spektrum von (1*R*,2*R*)-*trans*-1,2-cyclohexandiol 1-(*p*-methoxybenzoat)-2-(2-naphthoat) (**215**) ($c = 5 \times 10^{-6}$ M, Acetonitril).

Ein Vergleich der CD-Spektren von **213** und **215** verdeutlicht die Intensitätssteigerung, die durch Verwendung eines bischromophorigen Systems mit Exciton-Coupling erreicht wird (siehe **Abbildung 5-6**).

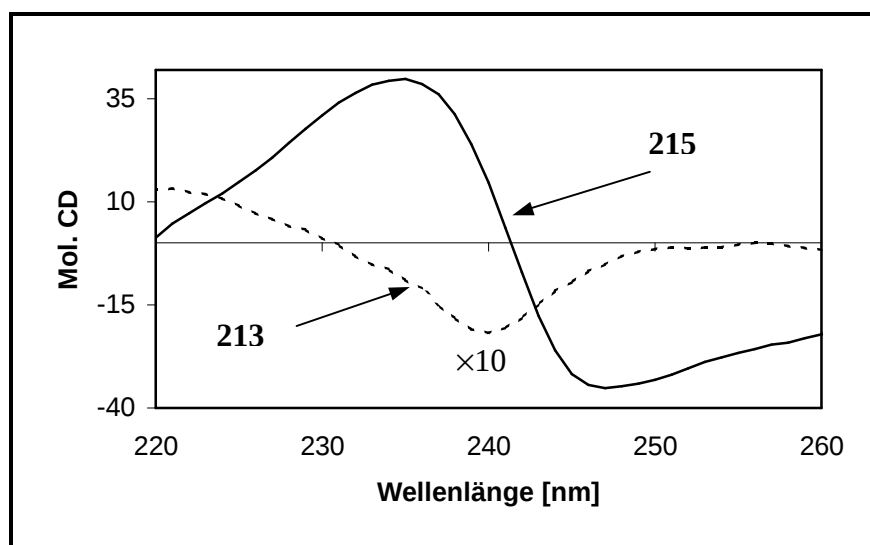


Abbildung 5-6: Vergleich der CD-Spektren von (1*R*,2*R*)-*trans*-1,2-cyclohexandiol 1-(*p*-methoxybenzoat)-2-(2-naphthoat) (**215**) (durchgezogen, $c = 5 \times 10^{-6}$ M, Acetonitril) und (1*R*,2*R*)-*trans*-1,2-cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (**213**) (punktiert, $c = 1 \times 10^{-5}$ M, Acetonitril).

Enzymscreening

In dem Enzymscreening werden Lipasen auf ihre Aktivität bei der Veresterung von *meso*-1,2-Cyclohexandiol (**197**) mit Benzoessäureethoxyvinylester (**209**) und 2-Naphthoesäure-

ethoxyvinylester (**208**) untersucht. Dazu werden Substrat ($c = 30 \text{ mM}$) und Reagenz ($c = 60 \text{ mM}$) im Verhältnis 1:2 in wasserfreiem Methyl-*tert*-butylether* mit 50 mg der entsprechenden Lipase bei 45°C und 800 rpm im Eppendorf-Thermomixer inkubiert. In dem Screening werden Lipasen aus insgesamt neun verschiedenen Organismen getestet:

Pseudomonas cepacia, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus arrhizus*, *Candida cylindracea*, *Candida antarctica*, *Mucor mihei*, *Aspergillus niger*, *Schweinepankreas*.

1,2-Cyclohexandiol 1-benzoat (**216**):

Die Umsetzung von **197** mit Benzoessäureethoxyvinylester (**209**) wird ausschließlich von *Candida antarctica* Lipase katalysiert. Eine gaschromatographische Analyse des Reaktionsgemisches nach drei Tagen zeigt, daß als einziges Produkt das monoacylierte Cyclohexandiol **216** gebildet wird und der Umsatz 58 % bezogen auf das Substrat **197** beträgt (siehe **Abbildung 5-7**).

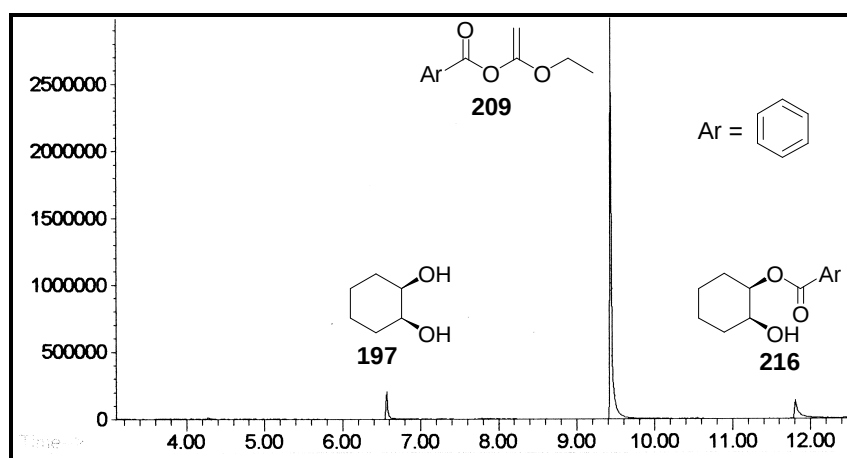


Abbildung 5-7: Gaschromatogramm des Reaktionsgemisches der Lipasen-katalysierten Veresterung von *meso*-Cyclohexandiol (**197**) (6.6 min) mit Benzoessäureethoxyvinylester (**209**) (9.4 min) zu 1,2-Cyclohexandiol 1-benzoat (**216**) (11.8 min).

Aus dem Reaktionsgemisch wird durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel Ester **216** in Spuren isoliert. Das Circular dichroismusspektrum zeigt ein Maximum bei 235 nm mit geringer Intensität (siehe **Abbildung 5-8**, S. 114).

* Die Verwendung von nicht absolutiertem Lösungsmittel führt dazu, daß der eingesetzte Ethoxyvinylester durch die Lipase zur entsprechenden Carbonsäure hydrolysiert wird, da diese Reaktion sehr viel schneller verläuft als die Veresterung von *meso*-1,2-Cyclohexandiol (**197**).

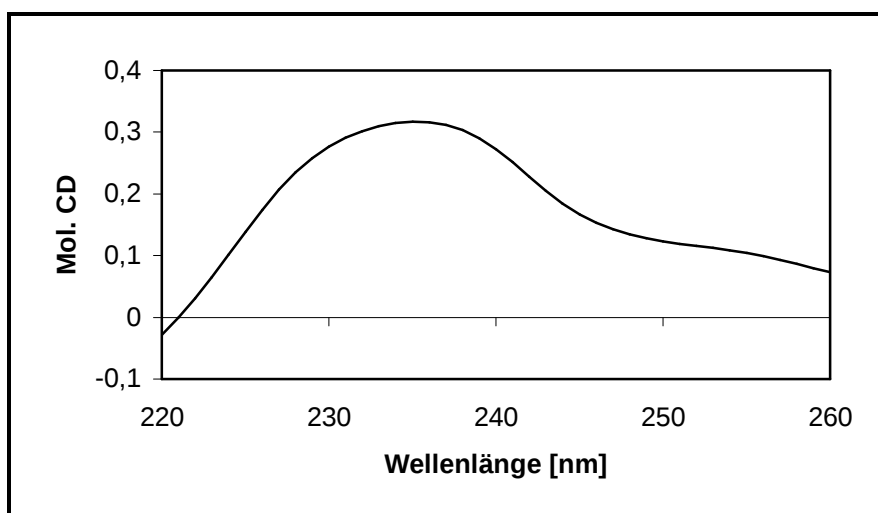


Abbildung 5-8: CD-Spektrum des enzymatisch synthetisierten 1,2-Cyclohexandiol 1-benzoat (**216**) ($c = 6,5 \times 10^{-5}$ M, Acetonitril).

1,2-Cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (**217**):

Eine Lipase aus *Candida cylindracea* ist das einzige der getesteten Enzyme, welches die Veresterung von *meso*-1,2-Cyclohexandiol (**197**) mit 2-Naphthoesäureethoxyvinylester (**208**) zu dem Produkt **217** katalysiert (siehe **Abbildung 5-9**). Der Umsatz bleibt nach 17,5 h konstant und beträgt 75 % bezogen auf das Substrat **197** (siehe **Abbildung 5-10**, S. 115).

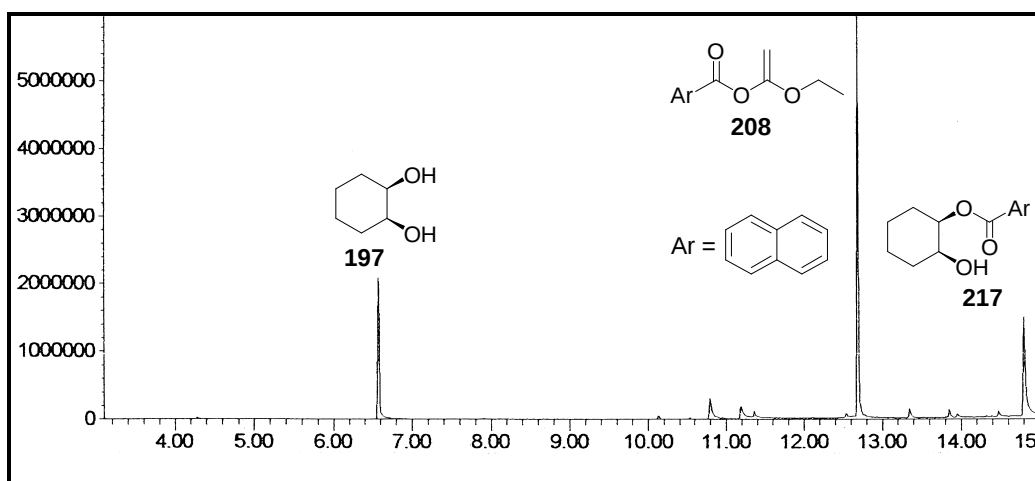


Abbildung 5-9: Gaschromatogramm des Reaktionsgemisches der Lipasen-katalysierten Veresterung von *meso*-1,2-Cyclohexandiol (**197**) (6,6 min) mit 2-Naphthoesäureethoxyvinylester (**208**) (12,7 min) zu 1,2-Cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (**217**) (14,8 min).

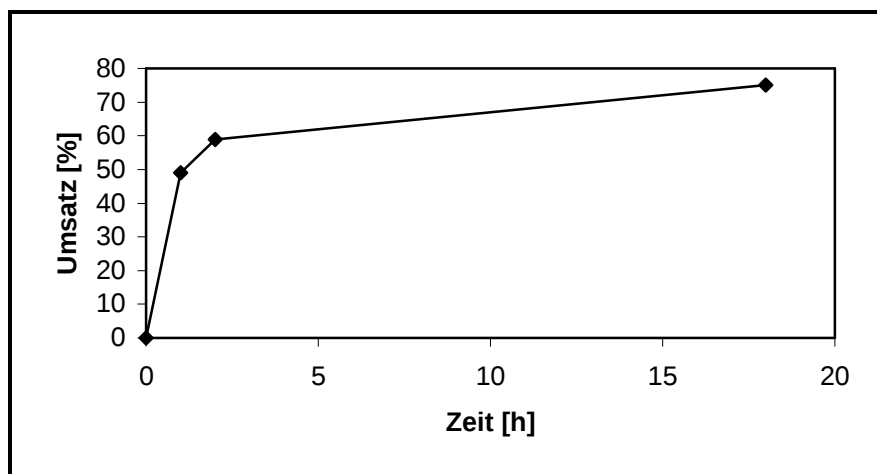


Abbildung 5-10: Umsatz der Lipase-katalysierten Veresterung von *meso*-1,2-Cyclohexandiol (**197**) mit 2-Naphthoesäureethoxyvinylester (**208**) zu 1,2-Cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (**217**) in Abhängigkeit von der Zeit.

Unter Verwendung der oben vorgestellten HPLC-Methode (siehe S. 110) wird der Enantiomerenüberschuß des enzymatisch synthetisierten 1,2-Cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (**217**) bestimmt. Dazu wird das Reaktionsgemisch ohne vorherige Reinigung analysiert. Es ergibt sich ein Enantiomerenüberschuß von 35 %.

Aus dem Reaktionsgemisch der enzymatischen Veresterung wird durch präparative Dünnschichtchromatographie **217** isoliert. In dem CD-Spektrum dieser Verbindung ist deutlich ein positiver Cotton-Effekt mit geringer Intensität bei 240 nm zu erkennen (siehe **Abbildung 5-11**).

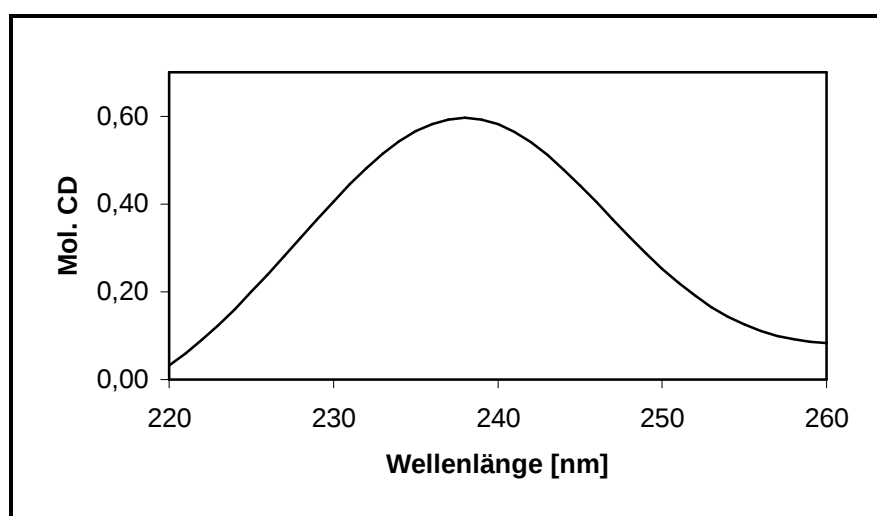


Abbildung 5-11: CD-Spektrum des enzymatisch synthetisierten 1,2-Cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (**217**) ($c = 1 \times 10^{-5}$ M, Acetonitril).

Durch Anwendung der oben vorgestellten Exciton-Chirality-Methode soll eine Aussage über die absolute Konfiguration der enzymatisch synthetisierten Verbindung **217** getroffen werden. Dazu wird das monoacylierte Produkt mit Methoxybenzoesäurechlorid (**214**) in das bis-chromophorige System **218** umgewandelt. In **Abbildung 5-12** ist das Circular dichroismus-Spektrum der so erhaltenen Verbindung dargestellt.

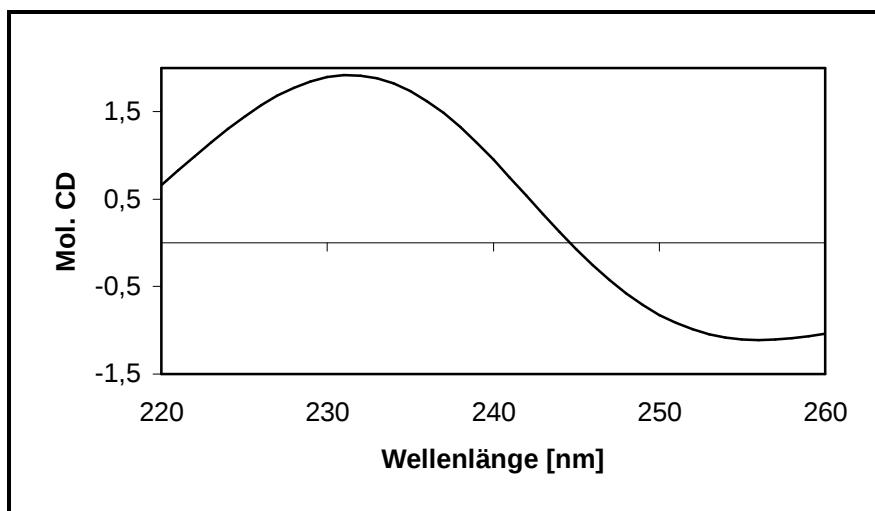


Abbildung 5-12: CD-Spektrum von 1,2-Cyclohexandiol 1-(*p*-methoxybenzoat)-2-(2-naphthoat) (**218**) ($c = 5 \times 10^{-5}$ M, Acetonitril), welches aus der Umsetzung des enzymatischen Acylierungsproduktes **217** mit Methoxybenzoesäurechlorid (**214**) stammt.

Die Abfolge eines negativen Cotton-Effektes bei höherer Wellenlänge und eines positiven Cotton-Effektes bei niedrigerer Wellenlänge entspricht einer sogenannten negativen Chiralität.

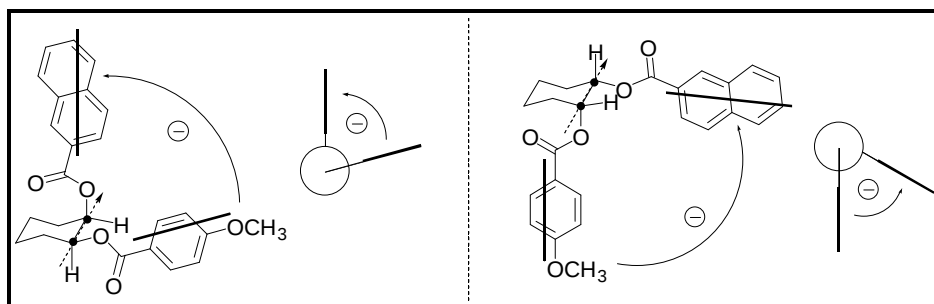


Abbildung 5-13: Mögliche Konformationen des substituierten Cyclohexandiols **218**, die zu einer negativen Chiralität im Sinne der Exciton-Chirality-Methode führen. Die schwarzen Balken geben die Richtung des Hauptübergangsmomentes an.

Für das hier betrachtete substituierte *cis*-Cyclohexandiol **218** gibt es zwei mögliche Konformationen, die zu einer negativen Chiralität führen (siehe **Abbildung 5-13**). Da nicht bekannt ist, welche aus energetischen Gründen bevorzugt wird, ist die eindeutige Bestimmung der

absoluten Konfiguration der beiden Stereozentren nicht möglich. Mit Hilfe einer computer-gestützten, quantenmechanischen Konformationsanalyse wäre es möglich, die wahrscheinlichste Konformation zu ermitteln.

In situ-Bestimmung des Circular dichroismus

Um zu überprüfen, ob eine Bestimmung des Circular dichroismus direkt aus der Reaktionsmischung möglich ist, wird der CD des bei der Veresterung von **197** mit **208** erhaltenen Gemisches vermessen. Durch die geringe Intensität des zu erwartenden Cotton-Effektes bei 240 nm (siehe **Abbildung 5-11**, S. 115) ist in dem CD-Spektrum des Reaktionsgemisches lediglich ein Basislinienrauschen zu erkennen.

Deswegen ist zu zeigen, daß bei einem System, welches schon in geringen Konzentrationen einen starken Cotton-Effekt zeigt, die Bestimmung in einer Mischung mit anderen Substanzen möglich ist. Dies können chirale, nicht-racemische Substanzen mit zwei Chromophoren sein, die Exciton-Coupling aufweisen (siehe **Abbildung 5-3**, S. 106). Da durch die Wechselwirkung der beiden Chromophore eine höhere Intensität der Cotton-Effekte zu erwarten ist (siehe **Abbildung 5-6**, S. 112), sollte eine *in situ*-Bestimmung realisierbar sein.

Eine CD-Titration, bei der dem Reaktionsgemisch sukzessive eine steigende Konzentration an enantiomerenreinem (1*R*,2*R*)-*trans*-Cyclohexandiol 1-(*p*-methoxybenzoat)-2-(2-naphthoat) (**215**) zudosiert wurde, zeigt, daß es möglich ist, den CD in einer Mischung anderer Substanzen zu bestimmen.

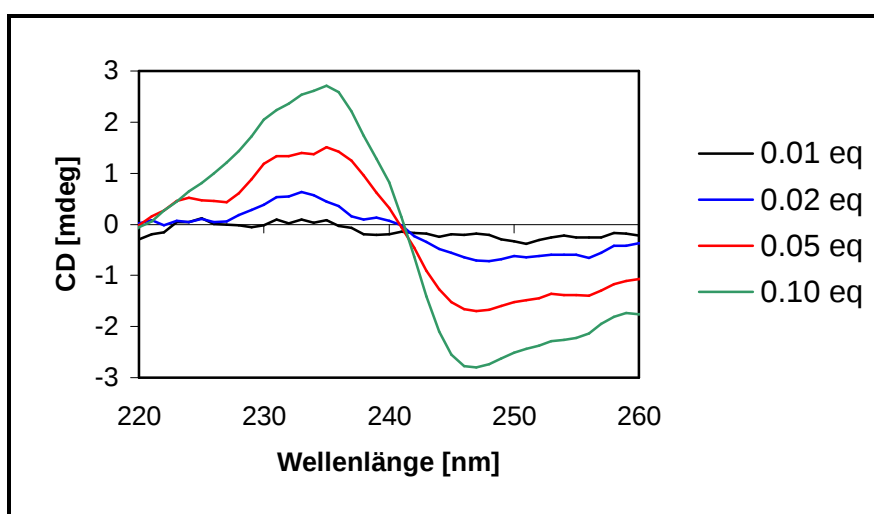


Abbildung 5-14: CD-Titration des enzymatisch dargestellten **217** ($c = 1.5 \times 10^{-5}$ M, Acetonitril) mit **215** ($c = 4.5 \times 10^{-4}$ M, Acetonitril).

In **Abbildung 5-14** auf S. 117 sind die CD-Spektren des Titrationsexperiments gezeigt. Es wird das Reaktionsgemisch vorgelegt, welches **217** in einer Konzentration 1.5×10^{-5} M beinhaltet. Dazu werden bestimmte Mengen einer Lösung von **215** in Acetonitril (4.5×10^{-4} M) titriert. Die Spektren verdeutlichen, daß bereits nach Zugabe von 0.02 Äquivalenten **215** bezogen auf **217** das typische CD-Couplet des zweichromophorigen Systems zu erkennen ist.

5.4.4 Zusammenfassung

Es wurde eine neuartige Anwendung für die chiroptische Technik des Circular dichroismus (CD) als Screeningmethode etabliert. Als Modellreaktion wurde eine von Lipasen aus *Candida antarctica* und *C. cylindracea* katalysierte Veresterung von *meso*-1,2-Cyclohexandiol (**197**) mit Benzoessäureethoxyvinylester (**209**) und Naphthoesäureethoxyvinylester (**208**) zu den monoacylierten Cyclohexandiolen **216** und **217** ausgewählt.

Nach Isolierung der enzymatisch dargestellten Produkte **216** und **217** aus dem Reaktionsgemisch wurde deren Circular dichroismus-Spektrum bestimmt. Die absolute Konfiguration der Verbindung **217** kann durch Umsetzung mit *p*-Methoxybenzoessäurechlorid (**214**) und Messung des CD-Spektrums nicht eindeutig bestimmt werden, da es zwei mögliche Konformationen gibt, die jeweils zu einer negativen Chiralität im Sinne des Exciton-Couplings führen.

Die Bestimmung des CD der nur mit einem Chromophor substituierten Verbindungen **216** und **217** aus der Reaktionsmischung ist nicht möglich, da die Intensität des Cotton-Effektes zu gering ist. Durch eine Titration der Reaktionsmischung der enzymatischen Acylierung von *meso*-1,2-Cyclohexandiol (**197**) mit Naphthoesäureethoxyvinylester (**208**) mit der Modellverbindung **215** konnte gezeigt werden, daß die Bestimmung der chiroptischen Eigenschaften direkt aus der Reaktionsmischung möglich ist, wenn Verbindungen mit Exciton-Coupling verwendet werden.

5.4.5 Fluoreszenz-detektierter Circular dichroismus

Die Untersuchung der Enzym-katalysierten Monoacylierungen von *meso*-1,2-Cyclohexandiol (**197**) mit aromatischen Ethoxyvinylestern, **208** und **209**, haben gezeigt, daß zur *in situ*-Bestimmung des Circular dichroismus chirale, nicht-racemische Verbindungen, die zwei Chromophore besitzen und somit Exciton-Coupling aufweisen, notwendig sind. Beim Vorhandensein lediglich eines Chromophores ist die Intensität des zu erwartenden Cotton-Effektes zu gering, um eine Analyse aus der Reaktionsmischung zu ermöglichen.

Dong et al. berichten über eine Selektivitäts- und Empfindlichkeitserhöhung des Exciton-Couplings bei Verwendung der Technik des fluoreszenz-detektierten Circular dichroismus (FD CD).^[164] Wenn dies auch auf Systeme ohne Exciton-Coupling, also mit nur einem Chromophor, zutrifft, könnte durch diese Fluoreszenzdetektion eine Messung des CD direkt aus der Reaktionsmischung möglich sein.

Grundlagen

Beim fluoreszenz-detektierten Circular dichroismus (FD CD) wird die Differenz in der Fluoreszenzintensität gemessen, die durch Anregung eines chiralen, nicht-racemischen Fluorophors mit links und rechts zirkular polarisiertem Licht entsteht.^[165] Dabei wird vom Instrument folgendes Signal detektiert:

$$S_F = K \times \frac{F_L - F_R}{F_L + F_R}$$

Gleichung 5-6: S_F : detektiertes Signal; K : Proportionalitätskonstante des Instruments; F_L : Fluoreszenzintensität durch Anregung mit links zirkular polarisierten Licht; F_R : Fluoreszenzintensität durch Anregung mit rechts zirkular polarisierten Licht.

Dieses gemessene Signal kann nicht direkt mit dem regulären Circular dichroismus verglichen werden. Deshalb werden diese Rohdaten durch mathematische Verfahren in die Größe

$$\Delta \epsilon_F = \epsilon_{FL} - \epsilon_{FR}$$

Gleichung 5-7: ϵ_{FL} : molarer Absorptionskoeffizient des Fluorophors für links zirkular polarisiertes Licht; ϵ_{FR} : molarer Absorptionskoeffizient des Fluorophors für rechts zirkular polarisiertes Licht.

umgewandelt. Wenn angenommen wird, daß die Quantenausbeute des Fluorophores unabhängig von der Wellenlänge und Polarisierung des anregenden Lichts ist, kann der CD einer Lösung, die nur eine fluoreszierende Spezies enthält, mit folgender Formel berechnet werden:

$$\Delta \epsilon_F = \frac{-S_F(1-10^{-A})}{c \times l \times 10^{-A}}$$

Gleichung 5-8: S_F : vom Instrument detektiertes Signal; A : Absorption der Probe; c : Konzentration der Probe; l : Länge der Zelle.

Vergleich von Circular dichroismus und fluoreszenz-detektierten Circular-dichroismus

In **Abbildung 5-15** sind die instrumentellen Unterschiede von regulärem CD und FDCD dargestellt.

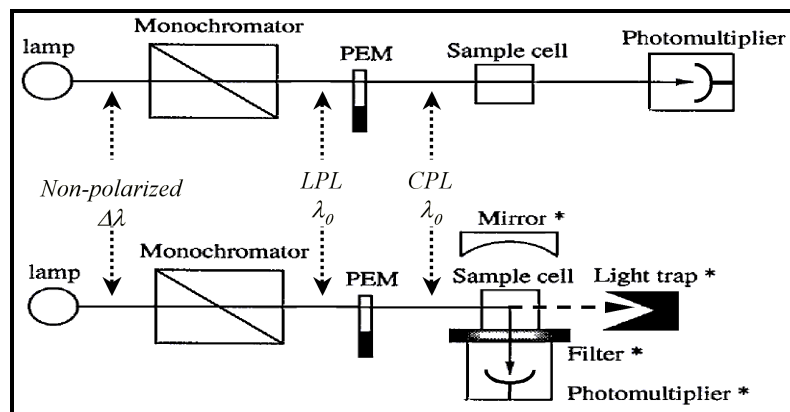


Abbildung 5-15: Instrumentelle Unterschiede zwischen regulärem CD und FDCD; oben: regulärer CD; unten: FDCD.

Bei beiden Methoden wird zunächst durch einen Monochromator aus nicht-polarisiertem Licht linear polarisiertes erzeugt. Dieses wird anschließend durch einen piezoelastischen Modulator (PEM) in zirkular polarisiertes Licht umgewandelt und durch die Probenkammer geleitet. Bei regulärem CD wird die Absorptionsdifferenz in Transmission hinter der Probe gemessen. Im Gegensatz dazu wird die Differenz der Fluoreszenzintensität beim FDCD in einem Winkel von 90° zur Probe detektiert. Aus diesen Unterschieden ergeben sich folgende Konsequenzen:

- Die Verwendung des FD CD erlaubt im Vergleich zum regulären CD eine Detektion mit höherer Intensität, da eine emittierte Lichtmenge gegen einen Nullhintergrund gemessen wird.
- Der FD CD ermöglicht eine Messung mit höherer Selektivität, da aus einer Mischung chiraler, nicht-racemischer Chromophore nur die fluoreszierenden detektiert werden.

Anwendungen des FD CD

Im Vergleich zu konventionellem Circular dichroismus, der zur Bestimmung der absoluten Konfiguration verwendet wird, gibt es noch keine Anwendung, wo der fluoreszenz-detektierte Circular dichroismus routinemäßig eingesetzt wird. Der Grund dafür sind nicht nur die höheren Anschaffungskosten, sondern vor allem die Limitierung durch das Phänomen der Photo Selektion.^[166] Diese kann immer dann auftreten, wenn die Rotationsbewegung des Chromophors während der Lebensdauer des angeregten Zustands eingefroren oder gehindert ist. Als typische Beispiele sind hier Makromoleküle (Biopolymere) oder die Verwendung von viskosen Lösungsmitteln (Glykol) zu nennen. Physikalisch kann die Photo Selektion folgendermaßen erklärt werden:

Vom einfallenden Licht werden nur die Chromophore des untersuchten Systems angeregt, deren elektrische und magnetische Übergangsmomente eine bestimmte Orientierung zum Vektorpotential und Ausbreitungsrichtung der einfallenden Lichtwelle besitzen. Wenn die Rotationsbewegung des Chromophores nicht schnell genug ist, um die durch die Anregung entstandene molekulare Orientierung vor der Emission von Licht wieder aufzuheben, tragen unterschiedliche, anisotrope Populationen von angeregten Molekülen zur Fluoreszenz bei. Dadurch hängt die beobachtete Intensität des emittierten Lichts nicht nur von der Anzahl der angeregten Moleküle, sondern auch von der räumlichen Verteilung ihrer Übergangsmomente ab. Aus diesem Grund entspricht die Differenz in der Fluoreszenzintensität durch Anregung mit links und rechts zirkular-polarisiertem Licht nicht der Differenz, die durch Absorption von links und rechts zirkular-polarisiertem Licht entsteht.

Einen wichtigen Beitrag zur Etablierung des FD CD als Alternative zum konventionellen CD leistete die Arbeitsgruppe um *Nakanishi* und *Berova*,^[167] in dem sie über die 100-fach empfindlichere Detektion des Circular dichroismus von Systemen mit Exciton Coupling mit einem kommerziell erhältlichen Gerät berichten. Weiterhin gibt es noch Beispiele in der Be-

stimmung von Enantiomerenüberschüssen ohne physikalische Trennung der Enantiomere^[168] und die Chiralitätsanalyse von natürlich vorkommenden Pteridinen.^[169]

Empfindlichkeitsvergleich von CD und FD CD

In eigenen Arbeiten wurde zunächst überprüft, ob das in dieser Arbeit verwendete Gerät, ein Jasco J-810 Spektralphotometer, ähnliche Empfindlichkeitssteigerungen wie in der Literatur beschrieben aufweist. Dazu wurde das CD- und FD CD-Spektrum von (1*R*,2*R*)-*trans*-1,2-Cyclohexandiol 1-(*p*-methoxybenzoat)-2-(2-naphthoat) (**215**) bei einer Konzentration 5×10^{-6} M gemessen (siehe **Abbildung 5-16**).

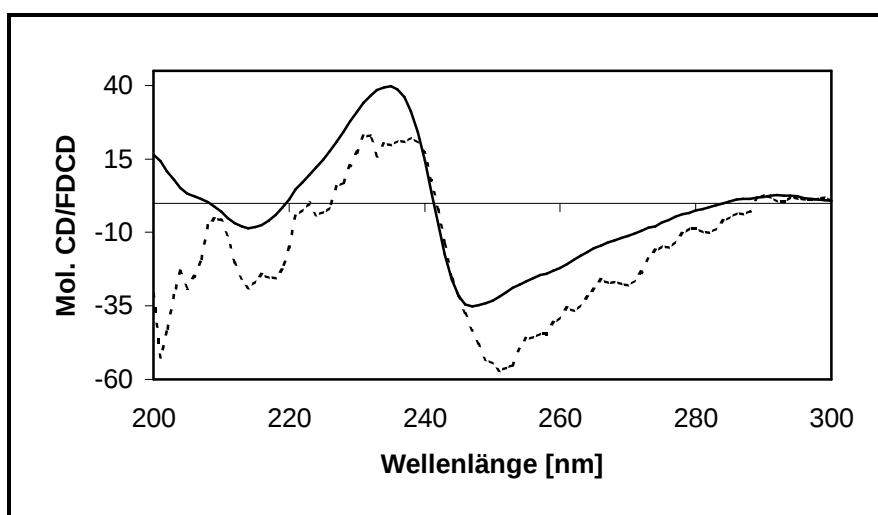


Abbildung 5-16: Vergleich des CD- (durchgezogen) und FD CD-Spektrums (gestrichelt) von (1*R*,2*R*)-*trans*-1,2-cyclohexandiol 1-(*p*-methoxybenzoat)-2-(2-naphthoat) (**215**) ($c = 5 \times 10^{-6}$ M, Acetonitril).

Aus **Abbildung 5-16** ist zu erkennen, daß das FD CD-Spektrum (gestrichelte Linie) im Vergleich zum CD-Spektrum (durchgezogene Linie) bei gleichen Messbedingungen ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis aufweist. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den publizierten Daten, die eine höhere Empfindlichkeit des FD CD zeigen. Die Ursache für diese gegensätzlichen Beobachtungen liegt in einer unterschiedlichen Anordnung von Probe und Detektor (Photomultiplier) in den Probenkammern der verwendeten Geräte (siehe **Abbildung 5-17**, S. 123).

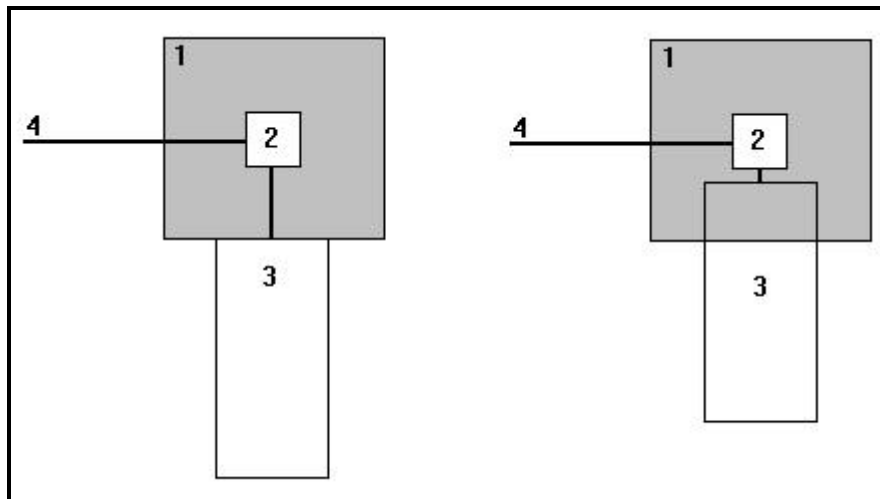


Abbildung 5-17: Schematische Zeichnung der Probekammern des in dieser Arbeit (links) und des von *Nakanishi* und *Berova*^[164] (rechts) verwendeten Spektropolarimeters; 1: Probekammer, 2: Probe, 3: Detektor (Photomultiplier), 4: einfallender Lichtstrahl.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät ist der Photomultiplier außerhalb der eigentlichen Probekammer angeordnet. Dies hat zur Folge, daß das emittierte Licht auf dem Weg von der Probe zum Detektor streut und einen Großteil seiner Intensität verliert. Von *Nakanishi* und *Berova* wurde eine modifizierte Probekammer verwendet bei der der Detektor in unmittelbarer Nähe zur Probe angeordnet ist. Dadurch ist das emittierte Licht stärker fokussiert und besitzt eine höhere Intensität.

Um die erhöhte Intensität ausnutzen zu können, ist eine Umrüstung des kommerziell erhältlichen Gerätes notwendig. Dies kann durch eine neue, kommerziell erhältliche Probekammer, die den in der Literatur beschriebenen Verhältnissen entspricht, oder durch einen Eigenumbau der vorhandenen Probekammer erreicht werden. Beides ist mit einem erheblichen Aufwand verbunden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Chemische Synthesen

6.1.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

NMR-Spektren werden auf einem NMR-Spektrometer AMX 300 (^1H -NMR 300 MHz, ^{13}C -NMR 75.5 MHz) der Firma Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten, aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind angegeben in δ -Werten [ppm], gemessen in CDCl_3 (^1H -NMR, $\delta = 7.27$ (CHCl_3); ^{13}C -NMR, $\delta = 77.0$ (CDCl_3)). Abkürzungen der Multiplizitäten: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), m (Multiplett).

GC-MS-Spektren werden mit einem Gaschromatographen HP 6890 (Säule: HP-5MS, 5 % Phenylmethylsiloxan, 30 m $\times$ 250 μm), $T_{\text{GC}}(\text{Injektor}) = 250\text{ }^\circ\text{C}$, $T_{\text{MS}}(\text{Ionenquelle}) = 200\text{ }^\circ\text{C}$, Temperaturprogramm A: $T_{0\text{min}} = 60\text{ }^\circ\text{C}$, $T_{3\text{min}} = 60\text{ }^\circ\text{C}$, $T_{14\text{min}} = 280\text{ }^\circ\text{C}$ (Aufheizrate: $20\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$), $T_{19\text{min}} = 280\text{ }^\circ\text{C}$, Temperaturprogramm B: $T_{0\text{min}} = 60\text{ }^\circ\text{C}$, $T_{3\text{min}} = 60\text{ }^\circ\text{C}$, $T_{14\text{min}} = 280\text{ }^\circ\text{C}$ (Aufheizrate: $20\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$), $T_{30\text{min}} = 280\text{ }^\circ\text{C}$, und einem „mass selective detector“ HP 5973 der Firma Hewlett Packard Company, Palo Alto, USA, aufgenommen.

IR-Spektren werden mit einem Avatar 360 FT-IR der Firma Thermo Nicolet Corporation, Madison, USA, gemessen. Die Substanzen wurden als KBr-Presslinge vermessen. Angegeben werden die Wellenzahlen in cm^{-1} ; die Intensitäten als ss (sehr stark), s (stark), m (mittel), w (schwach).

Drehwerte werden mit einem Polarimeter 241 der Firma Perkin-Elmer Corporate, Wellesley, USA, bestimmt. Alle Werte werden mit der D-Linie einer Na-Lampe gemessen.

CD-Spektren werden mit einem Spektralpharmimeter J-810 der Firma Jasco International Co. Ltd., Tokyo, Japan mit folgenden Parametern gemessen: Länge der Zelle = 0.5 cm, Empfindlichkeit = Standard, Messgeschwindigkeit = 100 nm/min, Data Pitch = 1 nm, Bandbreite 2 nm, Response = 2 sec, Akkumulation = 4. Angegeben ist der Molekulare Circular dichroismus (Mol. CD).

Einkristall-Röntgenstrukturanalyse wird mit einem Vierkreisdiffraktometer KappaCCD der Firma Nonius, Delft, Niederlande, am Institut für Anorganische Chemie der Universität Bonn durchgeführt.

Massenspektren werden mit einem MS-50 (EI-MS) der Firma A.E.I., Manchester, Großbritannien aufgenommen.

Elementaranalysen werden mit einem Vario EL der Firma Heraeus, Hanau, in der mikroanalytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn durchgeführt.

Schmelzpunkte werden mit der Schmelzpunktapparatur B-540 der Firma Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz, bestimmt.

Analytische Dünnschichtchromatographie erfolgt auf DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₄₅ der Firma Merck, Darmstadt.

Präparative Dünnschichtchromatographie erfolgt auf DC-Glasplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ 1.0 mm oder 0.5 mm der Firma Merck, Darmstadt.

Flash-Säulenchromatographie erfolgt an Kieselgel 60 der Firma Merck, Darmstadt, Korngröße 0.04-0.063 mm.

Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien werden von den Firmen Aldrich, Fluka, Merck und TCI bezogen (Reinheitsgrad p.a.) und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben, werden Lösungsmittel analytischer Qualität benutzt, die vor Gebrauch nach literaturüblichen Methoden getrocknet werden.

6.1.2 Synthese von *semi*-Vioxanthin

Synthese der monomeren Orsellinsäurederivate

2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (130). Unter Schutzgas (Ar) wird Acetessigsäuremethylester (**129**) (10 mL, 92.8 mmol) bei 0 °C zu einer Suspension von Natriumhydrid (5.56 g, 232 mmol) in trockenem THF (200 mL) gegeben. Anschließend wird 2.5 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan (35 mL, 87.5 mmol) bei –78 °C zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird für 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für weitere 24 h zum Sieden erhitzt. Bei 0 °C wird die Suspension dann mit 2 N Salzsäure auf pH 1-2 angesäuert und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Trennung der Phasen wird die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert (3 × 200 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 3:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 136-138 °C erhalten. Ausbeute: 4.00 g (22.0 mmol, 47 %).

R_f : 0.31 (Isohexan/Essigsäureethylester = 3:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.48 (s, 3H, CH_3), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 5.39 (s, 1H, OH), 6.22 (d, 4J = 2.7 Hz, 1H, ar-H), 6.24 (d, 4J = 2.7 Hz, 1H, ar-H), 11.77 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 24.3 (CH_3), 51.8 (OCH_3), 101.2, 105.5, 111.4, 144.0, 160.4, 165.2 (ar-C), 172.2 (CO).

GCMS: R_t = 10.3 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 182 (47) [M^+], 150 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_4\text{O}$], 122 (50) [$\text{M}^+ - \text{CH}_4\text{O} - \text{CO}$].

$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$ 182.17

2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (131). Zu einer Lösung von *2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (131)* (5.32 g, 29.2 mmol) in Aceton (100 mL) werden Kaliumcarbonat (8.06 g, 58.4 mmol) und Iodmethan (2.7 mL, 43.8 mmol) gegeben und 20 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Vakuum ent-

fernt, der Rückstand in Wasser (50 mL) aufgenommen und die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert (3×100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 8:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 66 °C erhalten. Ausbeute: 4.50 g (23.0 mmol, 79 %).

R_f : 0.31 (Isohexan/Essigsäureethylester = 8:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.48 (s, 3H, CH_3), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 6.27 (d, 4J = 2.7 Hz, 1H, ar-H), 6.32 (d, 4J = 2.7 Hz, 1H, ar-H), 11.78 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 24.4 (CH_3), 51.8 (OCH_3), 55.3 (OCH_3), 98.6, 105.2, 111.2, 143.1, 163.9, 166.0 (ar-C), 172.2 (CO).

GCMS: R_t = 10.6 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 196 (46) [M^+], 164 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_4\text{O}$], 136 (39) [$\text{M}^+ - \text{CH}_4\text{O} - \text{CO}$].

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$ 196.20

2-Methoxymethoxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (113). Unter Schutzgas (Ar) werden zu einer Lösung von 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**131**) (1.00 g, 5.10 mmol) in trockenem Dichlormethan (500 mL) *N*-Ethyl-isopropylamin (4.0 mL, 23.0 mmol) und Chlordimethylether (1.2 mL, 15.3 mmol) gegeben und 20 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch mit Essigsäureethylester (100 mL) verdünnt und mit 0.2 M Salzsäure (40 mL) hydrolysiert. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert (3×100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird ein farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 1.19 g (4.96 mmol, 97 %).

R_f : 0.22 (Isohexan/Essigsäureethylester = 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2.26$ (s, 3H, CH_3), 3.44 (s, 3H, OCH_3), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 5.13 (s, 2H, CH_2), 6.37 (d, $^4J = 2.2$ Hz, 1H, ar-H), 6.53 (d, $^4J = 2.2$ Hz, 1H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 19.8$ (CH_3), 51.9 (OCH_3), 55.3 (OCH_3), 56.1 (OCH_3), 94.7 (CH_2), 99.1, 108.5, 117.2, 138.0, 155.6, 161.1 (ar-C), 168.5 (CO).

GCMS: $R_t = 10.7$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 240 (42) [M^+], 209 (32) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O}$], 179 (42) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{CH}_2\text{O}$], 164 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{CH}_2\text{O} - \text{CH}_3$], 136 (20) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{CH}_2\text{O} - \text{CH}_3 - \text{CO}$].

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5$ 240.25

2-Benzylloxymethoxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (132). Eine Lösung von *2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (131)* (900 mg, 4.59 mmol) in trockenem Methanol (20 mL) wird mit Natriummethylat (868 mg, 16.1 mmol) versetzt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand unter Schutzgas (Ar) in trockenem Tetrahydrofuran (20 mL) suspendiert. Die Suspension wird bei nacheinander mit Triethylamin (1.3 mL, 9.18 mmol) und Benzylchlormethylether (0.9 mL, 6.89 mmol)* versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit halbges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (100 mL) und ges. Natriumchlorid-Lösung (100 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit Essigsäureethylester (3×100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 1.38 g (4.37 mmol, 95 %).

R_f : 0.29 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1).

* Diese Angaben beziehen sich auf eine 60 %ige Benzylchlormethylether-Lösung.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.30 (s, 3H, CH_3), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 4.71 (s, 2H, CH_2), 5.26 (s, 2H, CH_2), 6.40 (d, 4J = 2.6 Hz, 1H, ar-H), 6.63 (d, 4J = 2.6 Hz, 1H, ar-H), 7.31-7.34 (m, 5H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 19.9 (CH_3), 52.0 (OCH_3), 55.3 (OCH_3), 69.9 (CH_2), 92.5 (CH_2), 99.1, 108.7, 117.3, 127.8, 128.0, 128.4, 137.0, 138.1, 155.7, 161.1 (ar-C), 168.6 (CO).

GCMS: R_t = 14.5 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 316 (18) [M^+], 286 (67) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O}$], 254 (44) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{CH}_3\text{O}$], 226 (30) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{CH}_3\text{O} - \text{CO}$], 163 (39) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{CH}_3\text{O} - \text{C}_7\text{H}_7$], 91 (100) [C_7H_7^+], 65 (24) [C_5H_5^+].

$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_5$ 316.35

Synthese der chiralen Michael-Akzeptoren

Hexanoate:

(*rac*)-5-Hydroxy-3-oxo-hexansäure-*tert*-butylester (*rac*)-(134). Unter Schutzgas (Ar) wird zu einer aus Diisopropylamin (2.2 mL, 15.9 mmol) und 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan (8.4 mL, 13.3 mmol) frisch hergestellten Lithiumdiisopropylamid-Lösung in trockenem Tetrahydrofuran (12 mL) bei -78°C eine Lösung von Essigsäure-*tert*-butylester (2.0 mL, 13.3 mmol) in trockenem Tetrahydrofuran (3 mL) getropft und für 15 min gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf -40°C erwärmt und mit einer Lösung von (*rac*)-3-Hydroxybuttersäureethylester (*rac*)-(117) (500 mg, 3.79 mmol) in trockenem Tetrahydrofuran (3 mL) versetzt. Nach 3 h wird das Reaktionsgemisch auf -30°C erwärmt und mit einer Lösung von Eisessig (2 mL) in Wasser (5 mL) hydrolysiert. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert (3×50 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden nacheinander mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (50 mL) und ges. Natriumchlorid-Lösung (50 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 672 mg (3.33 mmol, 88 %).

R_f : 0.19 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.17$ (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.45 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 2.60 (dd, $^3J = 16.4$ Hz, $^3J = 8.4$ Hz, 1H, CH), 2.70 (dd, $^3J = 16.4$ Hz, $^3J = 8.4$ Hz, 1H, CH), 2.96 (br, 1H, OH), 3.35 (s, 2H, CH_2 , Ketoform), 4.23 (m, 1H, CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 22.3$ (CH_3), 27.9 (CH_3), 50.9 (CH_2), 51.1 (CH_2 , Ketoform), 63.7 (CH), 82.3 (C_q), 166.1 (CO), 204.2 (CO).

$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_4$ 202.25

(*R*)-5-Hydroxy-3-oxo-hexansäure-*tert*-butylester (*R*)-(134). Die Synthese erfolgt analog zu der von (*rac*)-134. (Diisopropylamin (9.5 mL, 68.1 mmol), 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan (43 mL, 68.1 mmol), Essigsäure-*tert*-butylester (9.1 mL, 68.1 mmol) und (*R*)-3-Hydroxybuttersäureethylester (*R*)-(117) (99 % *ee*, Aldrich-Nr.: 34,732-9) (3.00 g, 22.7 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 3.88 g (19.2 mmol, 85 %).

$[\alpha]_D^{20}$: -39.3 ($c = 1.30$, CHCl_3).

Die übrigen analytischen Daten stimmen mit den bei (*rac*)-134 angegebenen Daten überein.

(*S*)-5-Hydroxy-3-oxo-hexansäure-*tert*-butylester (*S*)-(134). Die Synthese erfolgt analog zu der von (*rac*)-134. (Diisopropylamin (9.5 mL, 68.1 mmol), 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan (43 mL, 68.1 mmol), Essigsäure-*tert*-butylester (9.1 mL, 68.1 mmol) und (*S*)-3-Hydroxybuttersäureethylester (*S*)-(117) (96 % *ee*, Aldrich-Nr.: 34,470-9) (3.00 g, 22.7 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 3.88 g (19.2 mmol, 85 %).

$[\alpha]_D^{20}$: +39.4 ($c = 1.39$, CHCl_3).

Die übrigen analytischen Daten stimmen mit den bei (*rac*)-**134** angegebenen Daten überein.

Hydroxylactone:

(*rac*)-5,6-Dihydro-4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-on (*rac*)-(**135**). Unter Schutzgas (Ar) wird eine Lösung von (*rac*)-5-Hydroxy-3-oxo-hexansäure-*tert*-butylester (*rac*)-(**134**) (672 mg, 3.33 mmol) in trockenem Dichlormethan (40 mL) bei 0 °C mit Trifluoressigsäure (0.3 mL, 3.33 mmol) versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und 24 h gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Aceton/Essigsäure = 1:1:0.01) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 135 °C erhalten. Ausbeute: 341 mg (2.66 mmol, 80 %).

R_f: 0.50 (Isohexan/Aceton/Essigsäure = 1:1:0.01).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.50 (d, ³J = 6.3 Hz, 3H, CH₃), 2.35 (dd, ²J = 18.4 Hz, ³J = 11.4 Hz, 1H, CH), 2.69 (dd, ²J = 18.4 Hz, ³J = 2.6 Hz, 1H, CH), 3.40 (d, ²J = 18.9 Hz, 1H, CH, Ketoform), 3.56 (d, ²J = 18.9 Hz, 1H, CH, Ketoform), 4.79 (m, 1H, CH).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 20.4 (CH₃), 44.92 (CH₂), 46.8 (CH₂, Ketoform), 71.9 (CH), 167.3 (CO), 200.1 (CO, Ketoform).

GCMS: R_t = 7.7 min (Temperaturprogramm A)
m/z (%) = 128 (37) [M⁺], 69 (100) [M⁺ – C₂H₃O₂].

C₆H₈O₃ 128.13

(*R*)-5,6-Dihydro-4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-on (*R*)-(**135**). Die Synthese erfolgt analog zu der von (*rac*)-**135**. ((*R*)-5-Hydroxy-3-oxo-hexansäure-*tert*-butylester (*R*)-(**134**) (3.00 g, 14.9 mmol) und Trifluoressigsäure (1.1 mL, 14.9 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Aceton/Essigsäure = 1:1:0.01) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 135 °C erhalten. Ausbeute: 1.38 g (10.8 mmol, 72 %).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -125.0 ($c = 2.02$, Ethanol).

Die übrigen analytischen Daten stimmen mit den bei (*rac*)-**135** angegebenen Daten überein.

(*S*)-5,6-Dihydro-4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-on (*S*)-(**135**). Die Synthese erfolgt analog zu der von (*rac*)-**135**. ((*S*)-5-Hydroxy-3-oxo-hexansäure-*tert*-butylester (*S*)-(**134**) (1.50 g, 7.43 mmol) und Trifluoressigsäure (0.6 mL, 7.43 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Aceton/Essigsäure = 1:1:0.01) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 135 °C erhalten. Ausbeute: 556 mg (4.34 mmol, 58 %).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +145.4 ($c = 2.06$, Ethanol).

Die übrigen analytischen Daten stimmen mit den bei (*rac*)-**135** angegebenen Daten überein.

Methoxylactone:

(*rac*)-5,6-Dihydro-4-methoxy-6-methyl-2H-pyran-2-on (*rac*)-(**114**). Unter Schutzgas (Ar) wird eine Lösung von (*rac*)-5,6-Dihydro-4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-on (*rac*)-(**135**) (640 mg, 5.00 mmol) in trockenem Aceton (50 mL) bei Raumtemperatur mit Kaliumcarbonat (1.38 g, 10.0 mmol) und Dimethylsulfat (0.7 mL, 7.50 mmol) versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch für 8 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Wasser (50 mL) aufgenommen und mit Essigsäureethylester extrahiert (3×100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Aceton = 1:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 61 °C erhalten. Ausbeute: 525 mg (3.70 mmol, 74 %).

R_f : 0.43 (Isohexan/Aceton = 1:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.41$ (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 2.32 (dd, $^2J = 17.0$ Hz, $^3J = 4.2$ Hz, 1H, CH), 2.43 (ddd, $^2J = 17.0$ Hz, $^3J = 11.4$ Hz, $^3J = 1.5$ Hz, 1H, CH), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 4.50 (m, 1H, CH), 5.11 (d, $^3J = 1.5$ Hz, 1H, CH).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 20.5$ (CH_3), 34.5 (CH_2), 56.0 (OCH_3), 72.3 (CH), 90.1 (CH), 167.5 (C_q), 172.8 (CO).

GCMS: $R_t = 8.3$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 142 (100) [M^+], 127 (69) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 98 (81) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CHO}$], 68 (95) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CHO} - \text{CH}_2\text{O}$].

$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_3$ 142.15

(R)-5,6-Dihydro-4-methoxy-6-methyl-2H-pyran-2-on (*R*)-(114). Die Synthese erfolgt analog zu der von *(rac)*-114. ((*R*)-5,6-Dihydro-4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-on (*R*)-(135) (230 mg, 1.80 mmol), Kaliumcarbonat (496 mg, 3.60 mmol) und Dimethylsulfat (0.3 mL, 2.70 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Aceton = 1:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 61°C erhalten. Ausbeute: 175 mg (1.23 mmol, 68 %).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -168.1 ($c = 1.15$, CHCl_3).

Die übrigen analytischen Daten stimmen mit den bei *(rac)*-114 angegebenen Daten überein.

(S)-5,6-Dihydro-4-methoxy-6-methyl-2H-pyran-2-on (*S*)-(114). Die Synthese erfolgt analog zu der von *(rac)*-114. ((*S*)-5,6-Dihydro-4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-on (*S*)-(135) (450 mg, 3.52 mmol), Kaliumcarbonat (970 mg, 7.03 mmol) und Dimethylsulfat (0.5 mL, 5.28 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Aceton = 1:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 61°C erhalten. Ausbeute: 370 mg (2.61 mmol, 74 %).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $+163.9$ ($c = 1.04$, CHCl_3).

Die übrigen analytischen Daten stimmen mit den bei *(rac)*-114 angegebenen Daten überein.

Tandem-Michael-Reaktionen

(*rac*)-3,4-Dihydro-9-benzyloxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*rac*)-(140). Unter Schutzgas (Ar) wird zu einer aus Diisopropylamin (1.8 mL, 12.5 mmol) und 2.5 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan (5.0 mL, 12.5 mmol) frisch hergestellten Lithiumdiisopropylamid-Lösung in trockenem Tetrahydrofuran (60 mL) bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine Lösung von 2-Benzyloxymethoxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (132) (1.65 g, 5.22 mmol) in trockenem Tetrahydrofuran (5 mL) getropft und 30 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wird die tiefrote Reaktionslösung mit einer Lösung von (*rac*)-5,6-Dihydro-4-methoxy-6-methyl-2*H*-pyran-2-on (*rac*)-(114) (1.11 g, 7.82 mmol) in trockenem Tetrahydrofuran (5 mL) versetzt und 15 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Es wird mit Ethanol (5 mL) hydrolysiert und auf Raumtemperatur erwärmt. Nach dem Ansäuern mit 2 N Salzsäure wird die Lösung auf ges. Ammoniumchlorid-Lösung (200 mL) gegeben, und die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert ($3 \times 200\text{ mL}$). Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 782 mg (1.98 mmol, 38 %).

R_f : 0.20 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.52$ (d, $^3J = 6.3\text{ Hz}$, 3H, CH_3), 2.96 (m, 2H, CH_2), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 4.71 (m, 1H, CH), 4.84 (s, 2H, CH_2), 5.44 (s, 2H, CH_2), 6.64 (d, $^4J = 2.3\text{ Hz}$, 1H, ar-H), 6.65 (d, $^4J = 2.3\text{ Hz}$, 1H, ar-H), 6.85 (s, 1H, ar-H), 7.29-7.36 (m, 5H, ar-H), 13.10 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 20.7$ (CH_3), 35.0 (CH_2), 55.4 (OCH_3), 70.0 (CH_2), 75.7 (CH), 93.2 (CH_2), 100.6, 100.7, 103.1, 111.3, 115.2, 127.8, 128.1, 128.4, 134.1, 137.0, 141.3, 157.6, 161.5, 164.0 (ar-C), 171.2 (CO).

IR: KBr, $\nu = 3445$ (w), 3060 (w), 2935 (w), 1649 (ss), 1608 (ss), 1578 (s).

$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$ 394.42

(*R*)-3,4-Dihydro-9-benzyloxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*R*)-(140). Die Synthese erfolgt analog zu der von (*rac*)-140. (Diisopropylamin (0.4 mL, 2.88 mmol), 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan (1.5 mL, 2.40 mmol), 2-Benzyloxymethoxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (132) (379 mg, 1.20 mmol) und (*R*)-5,6-Dihydro-4-methoxy-6-methyl-2*H*-pyran-2-on (*R*)-(114) (170 mg, 1.20 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein oranger Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 103 °C erhalten. Ausbeute: 182 mg (0.46 mmol, 38 %).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -3.2 (*c* = 1.01, CHCl₃).

CD (Trifluorethanol): λ (Mol. CD) [nm] = 214 (-4.8), 237 (1.1), 265 (-4.1).

MS: m/z (%) = 394 (3) [M^+], 363 (28) [$M^+ - \text{CH}_3\text{O}$], 346 (5) [$M^+ - \text{CH}_4\text{O} - \text{H}_2\text{O}$], 271 (7) [$M^+ - \text{CH}_4\text{O} - \text{C}_7\text{H}_7$], 91 (100) [C_7H_7^+].

$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$ 394.42
ber. (%): C 70.04 H 5.62
gef. (%): C 70.01 H 5.63

Die übrigen analytischen Daten stimmen mit den bei (*rac*)-140 angegebenen Daten überein.

(*S*)-3,4-Dihydro-9-benzyloxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*S*)-(140). Die Synthese erfolgt analog zu der von (*rac*)-140. (Diisopropylamin (0.3 mL, 2.28 mmol), 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan (1.2 mL, 1.90 mmol), 2-Benzyloxymethoxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (132) (300 mg, 0.95 mmol) und (*S*)-5,6-Dihydro-4-methoxy-6-methyl-2*H*-pyran-2-on (*S*)-(114) (135 mg, 0.95 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein oranger Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 103 °C erhalten. Ausbeute: 100 mg (0.25 mmol, 27 %).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +3.1 (*c* = 1.03, CHCl₃).

CD (Trifluorethanol): λ (Mol. CD) [nm] = 215 (5.7), 238 (-0.7), 264 (4.1).

$C_{23}H_{22}O_6$ 394.42

Die übrigen analytischen Daten stimmen mit den bei (*rac*)-**140** angegebenen Daten überein.

(*rac*)-3,4-Dihydro-9-methoxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*rac*)- (**115**). Die Synthese erfolgt analog zu der von (*rac*)-**140**. (Diisopropylamin (0.3 mL, 2.43 mmol), 2.5 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan (0.8 mL, 2.00 mmol), 2-Methoxymethoxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**113**) (240 mg, 1.00 mmol) und (*rac*)-5,6-Dihydro-4-methoxy-6-methyl-2*H*-pyran-2-on (*rac*)-(**114**) (142 mg, 1.00 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 137 °C erhalten. Ausbeute: 78 mg (0.25 mmol, 25 %).

R_f : 0.22 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1).

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 1.50 (d, 3J = 6.3 Hz, 3H, CH_3), 2.93 (m, 2H, CH_2), 3.56 (s, 3H, OCH_3), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 4.68 (m, 1H, CH), 5.32 (s, 2H, CH_2), 6.62 (d, 4J = 2.4 Hz, 1H, ar-H), 6.71 (d, 4J = 2.4 Hz, 1H, ar-H), 6.82 (s, 1H, ar-H), 13.05 (s, 1H, OH).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ = 20.7 (CH_3), 35.0 (CH_2), 55.4 (OCH_3), 56.5 (OCH_3), 75.7 (CH), 95.5 (CH_2), 100.5, 100.7, 103.2, 111.3, 115.2, 134.0, 135.3, 141.2, 161.4, 163.9 (ar-C), 171.2 (CO).

$C_{17}H_{18}O_6$ 318.32

(*R*)-3,4-Dihydro-9-methoxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*R*)-(**115**). Die Synthese erfolgt analog zu der von (*rac*)-**140**. (Diisopropylamin (0.3 mL, 2.43 mmol), 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan (1.3 mL, 2.00 mmol), 2-Methoxymethoxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**113**) (240 mg, 1.00 mmol) und (*R*)-5,6-Dihydro-4-methoxy-6-methyl-2*H*-pyran-2-on (*R*)-(**114**) (142 mg, 1.00 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester =

2:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 137 °C erhalten. Ausbeute: 112 mg (0.35 mmol, 35 %).

Die analytischen Daten stimmen mit den bei (*rac*)-**115** angegebenen Daten überein.

Schutzgruppenabspaltungen

Abspaltung der Benzyloxymethylgruppe:

(*rac*)-3,4-Dihydro-9,10-dihydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*rac*)-**(102)**. Eine Lösung von (*rac*)-3,4-Dihydro-9-benzyloxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*rac*)-**(140)** (116 mg, 0.29 mmol) in einem Gemisch von Essigsäureethylester und Methanol (10 mL, 2:3, v/v) wird mit 10 % Pd/C (20 mg) versetzt und für 20 h bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck gerührt. Es wird über Celite filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Toluol/Essigsäureethylester/Essigsäure = 50:49:1) wird ein grüner Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 166 °C erhalten. Ausbeute: 50 mg (0.18 mmol, 63%).

R_f: 0.62 (Toluol/Essigsäureethylester/Essigsäure = 50:49:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.55 (d, ³J = 6.3 Hz, 3H, CH₃), 2.96 (m, 2H, CH₂), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 4.73 (m, 1H, CH), 6.51 (d, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, ar-H), 6.55 (d, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, ar-H), 6.87 (s, 1H, ar-H), 9.46 (s, 1H, OH), 13.75 (s, 1H, OH).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 20.8 (CH₃), 34.7 (CH₂), 55.4 (OCH₃), 76.5 (CH), 99.4, 101.5, 108.1, 116.0, 133.1, 140.5, 158.5, 162.9 (ar-C), 171.5 (CO).

GCMS: R_t = 14.7 min (Temperaturprogramm A)
m/z (%) = 274 (100) [M⁺], 256 (67) [M⁺ – H₂O], 228 (33) [M⁺ – C₂H₆O].

C₁₅H₁₄O₅ 274.27

(R)-3,4-Dihydro-9,10-dihydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*R*)-**(102)**. Die Synthese erfolgt analog zu der von (*rac*)-**102**. ((*R*)-3,4-Dihydro-9-benzyloxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*R*)-**(140)** (73 mg, 0.19 mmol), und Pd/C (15 mg)). Nach Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Toluol/Essigsäureethylester/Essigsäure = 50:49:1) wird ein grüner Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 176 °C erhalten. Ausbeute: 23 mg (0.08 mmol, 44 %).

CD (Trifluorethanol): λ (Mol. CD) [nm] = 213 (-7.2), 240 (1.6), 266 (-4.4).

Die übrigen analytischen Daten stimmen mit den bei (*rac*)-**102** angegebenen Daten überein.

(S)-3,4-Dihydro-9,10-dihydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*S*)-**(102)**. Die Synthese erfolgt analog zu der von (*rac*)-**102**. ((*S*)-3,4-Dihydro-9-benzyloxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*S*)-**(140)** (65 mg, 0.16 mmol), und Pd/C (13 mg)). Nach Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Toluol/Essigsäureethylester/Essigsäure = 50:49:1) wird ein grüner Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 176 °C erhalten. Ausbeute: 17 mg (0.06 mmol, 39 %).

CD (Trifluorethanol): λ (Mol. CD) [nm] = 216 (6.0), 239 (-0.8), 267 (3.0).

Die übrigen analytischen Daten stimmen mit den bei (*rac*)-**102** angegebenen Daten überein.

Abspaltung der Methoxymethylgruppe:

(R)-3,4-Dihydro-9,10-dihydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*R*)-**(102)**. Eine Lösung von (*R*)-3,4-Dihydro-9-methoxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*R*)-**(115)** (534 mg, 1.68 mmol) in Tetrahydrofuran (25 mL) wird mit 32 %iger Salzsäure (10 Tropfen) versetzt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abgetrennt und das Filtrat mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (50 mL) versetzt. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan extrahiert (3 $\times$ 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. Natriumchlorid-Lösung (100 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach

Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Toluol/Essigsäureethylester/Essigsäure = 50:49:1) wird ein grüner Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 176 °C erhalten. Ausbeute 255 mg (0.93 mmol, 55 %).

CD (Trifluorethanol): λ (Mol. CD) [nm] = 213 (-7.2), 240 (1.6), 266 (-4.4).

Die übrigen analytischen Daten stimmen mit den bei (*rac*)-**102** angegebenen Daten überein.

6.1.3 Synthese dimerer Orsellinsäureester

Oxidative Phenolkupplung mit Eisen(III)chlorid

2,2'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (144), *4,4'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (146)* und *2,4'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-2',4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (145)*. Das Kieselgel-gebundene Eisen(III)chlorid wird folgendermaßen präpariert: zu einer Lösung von $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (3.52 g, 13.0 mmol) in einem Gemisch aus Diethylether (190 mL) und Methanol (10 mL) wird Kieselgel (7.24 g) gegeben. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wird ein gelbes Pulver erhalten, welches für 8 h bei 70 °C und 0.4 mbar getrocknet wird. Für die oxidative Phenolkupplung wird Kieselgel-gebundenes Eisen(III)chlorid (1.40 g) zu einer Lösung von 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**131**) (146 mg, 0.74 mmol) in Dichlormethan (30 mL) gegeben. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, wodurch ein schwarzer Feststoff erhalten wird, der für 24 h auf 60 °C erhitzt wird. Anschließend wird der Rückstand in Methanol (50 mL) aufgenommen und über Celite filtriert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird der schwarze Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 5:1→2:1) gereinigt. Es werden drei farblose Feststoffe erhalten.

2,2'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (144):

Ausbeute: 22 mg (0.06 mmol, 15%)

Schmelzpunkt: 246 °C

R _f :	0.22 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1).
¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 2.59 (s, 6H, 2 × CH ₃), 3.77 (s, 6H, 2 × OCH ₃), 3.91 (s, 6H, 2 × OCH ₃), 6.41 (s, 2H, 2 × ar-H), 11.81 (s, 2H, 2 × OH).
¹³ C-NMR (CDCl ₃):	δ = 25.0 (2 × CH ₃), 51.9 (2 × OCH ₃), 55.8 (2 × OCH ₃), 106.0, 106.7, 107.8, 143.1, 161.5, 161.9 (ar-C), 172.4 (2 × CO).
MS	m/z (%) = 390 (67) [M ⁺], 358 (70) [M ⁺ – CH ₄ O], 327 (65) [M ⁺ – CH ₄ O – CH ₃ O], 295 (100) [M ⁺ – CH ₄ O – CH ₃ O – CH ₄ O].
HRMS (M ⁺)	ber.: 390.1315 gef.: 390.1311
C ₂₀ H ₂₂ O ₈ :	390.38

4,4'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester
(146):

Ausbeute:	42 mg (0.11 mmol, 29%)
Schmelzpunkt:	183 °C
R _f :	0.33 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1).
¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 2.10 (s, 6H, 2 × CH ₃), 3.67 (s, 6H, 2 × OCH ₃), 3.91 (s, 6H, 2 × OCH ₃), 6.41 (s, 2H, 2 × ar-H), 11.77 (s, 2H, 2 × OH).
¹³ C-NMR (CDCl ₃):	δ = 19.4 (2 × CH ₃), 51.8 (2 × OCH ₃), 55.7 (2 × OCH ₃), 97.3, 105.6, 119.2, 141.4, 162.3, 164.5 (ar-C), 172.5 (2 × CO).
MS	m/z (%) = 390 (47) [M ⁺], 358 (31) [M ⁺ – CH ₄ O], 327 (100) [M ⁺ – CH ₄ O – CH ₃ O], 295 (100) [M ⁺ – CH ₄ O – CH ₃ O – CH ₄ O].

HRMS (M^+) ber.: 390.1315
 gef.: 390.1314

$C_{20}H_{22}O_8$: 390.38

2,4'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-2',4-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester
(145):

Ausbeute: 38 mg (0.10 mmol, 26%)

Schmelzpunkt: 190 °C

R_f : 0.24 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1).

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 2.22 (s, 3H, CH_3), 2.60 (s, 3H, CH_3), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 3.92 (s, 3H, OCH_3), 6.38 (s, 1H, ar-H), 6.44 (s, 1H, ar-H), 11.74 (s, 1H, OH), 11.79 (s, 1H, OH).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ = 19.7 (CH_3), 24.9 (CH_3), 51.8 (OCH_3), 51.9 (OCH_3), 55.7 (OCH_3), 55.8 (OCH_3), 97.5, 105.7, 105.9, 106.5, 111.2, 115.7, 141.6, 142.8, 161.4, 161.9, 162.3, 164.7 (ar-C), 172.4 (CO), 172.5 (CO).

HRMS (M^+) ber.: 390.1315
 gef.: 390.1323

$C_{20}H_{22}O_8$: 390.38

Oxidative Phenolkupplung mit Bis(trifluoracetoxy)iodphenol (PIFA)

4,4'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester **(146)**. Bei -40 °C wird unter Schutzgas (Ar) zu einer Lösung von 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester **(131)** (40 mg, 0.20 mmol) in trockenem Dichlormethan (2 mL) eine Lösung von Bis(trifluoracetoxy)iodphenol (86 mg, 0.20 mmol) und $BF_3 \cdot OEt_2$ (0.5 mL, 4.00 mmol) in trockenem Dichlormethan (5 mL) getropft. Nach 30 min wird die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt und für 30 min bei dieser Temperatur

gerührt. Anschließend wird mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert (3×50 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 3:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 183 °C erhalten. Ausbeute: 8 mg (0.02 mmol, 21 %).

Die analytischen Daten stimmen mit den bei **146** angegebenen Daten überein.

Ullmann-Reaktion

Synthese der iodierten Orsellinsäurederivate:

2-Hydroxy-3-iod-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (164) und 2-Hydroxy-5-iod-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (165). Zu einer Lösung von 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**131**) (570 mg, 2.91 mmol) in Ethanol (5 mL) werden nacheinander eine Lösung von Iod (886 mg, 3.49 mmol) in Ethanol (15 mL) und über einen Zeitraum von 30 min eine 30 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung (200 mL) gegeben. Die Produkte werden durch Versetzen der Suspension mit Wasser (200 mL) vollständig ausgefällt und anschließend abfiltriert. Nach Waschen des Rückstandes mit Ethanol (10 mL) wird ein farbloser Feststoff erhalten, der die beiden regioisomeren Iodderivate im Verhältnis von 4:1 (**164:165**) enthält.* Ausbeute: 454 mg (1.41 mmol, 48 %).

2-Hydroxy-3-iod-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (164):

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.56 (s, 3H, CH_3), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 3.97 (s, 3H, OCH_3), 6.30 (s, 1H, ar-H), 12.64 (s, 1H, OH).

GCMS: R_t = 12.9 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 322 (32) [M^+], 290 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_4\text{O}$], 247 (11) [$\text{M}^+ - \text{CH}_4\text{O} - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}$], 163 (12) [$\text{M}^+ - \text{CH}_4\text{O} - \text{I}$].

* Die Unterscheidung der beiden Derivate erfolgt anhand der Verschiebung des Signal der Methylgruppe an C-6 (2.56 ppm für **164** und 2.78 ppm für **165**). Die Trennung erfolgt auf der Stufe der Dimethoxyderivate **141** und **143**.

$C_{10}H_{11}IO_4$ 322.10

2-Hydroxy-5-iod-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (165):

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 2.78 (s, 3H, CH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 6.37 (s, 1H, ar-H), 11.53 (s, 1H, OH).

GCMS: R_t = 12.6 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 322 (38) [M^+], 290 (100) [$M^+ - CH_4O$], 247 (13) [$M^+ - CH_4O - C_2H_3O$], 163 (13) [$M^+ - CH_4O - I$].

$C_{10}H_{11}IO_4$ 322.10

3-Iod-2,4-dimethoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (141) und 5-Iod-2,4-dimethoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (143). Eine Lösung von 2-Hydroxy-3-iod-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**164**) und 2-Hydroxy-5-iod-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**165**) (454 mg, 1.41 mmol) in Aceton (15 mL) wird mit Kaliumcarbonat (584 mg, 4.23 mmol) und Dimethylsulfat (0.3 mL, 2.82 mmol) versetzt und 24 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser (30 mL) aufgenommen. Nach Extraktion mit Essigsäureethylester (3×100 mL) werden die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 4:1) werden zwei farblose Feststoffe erhalten.

3-Iod-2,4-dimethoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (141):

Ausbeute: 287 mg (0.85 mmol, 61%)

Schmelzpunkt: 72 °C

R_f : 0.31 (Isohexan/Essigsäureethylester = 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.28 (s, 3H, CH_3), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 6.44 (s, 1H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 19.7 (CH_3), 52.1 (OCH_3), 56.5 (OCH_3), 62.1 (OCH_3), 80.2, 108.4, 121.7, 138.5, 158.3, 159.8 (ar-C), 167.5 (CO).

GCMS R_t = 12.3 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 336 (85) [M^+], 305 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O}$], 289 (28) [$\text{M}^+ - \text{CH}_4\text{O} - \text{CH}_3$].

$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{IO}_4$: 336.12

5-Iod-2,4-dimethoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (143):

Ausbeute: 77 mg (0.23 mmol, 16%)

Schmelzpunkt: 133 °C

R_f : 0.16 (Isohexan/Essigsäureethylester = 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.40 (s, 3H, CH_3), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$), 6.31 (s, 1H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 26.0 (CH_3), 52.3 (OCH_3), 56.0 (OCH_3), 56.4 (OCH_3), 82.8, 92.8, 117.4, 140.0, 157.7, 159.5 (ar-C), 168.3 (CO).

GCMS R_t = 12.8 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 336 (100) [M^+], 305 (70) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O}$].

$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{IO}_4$: 336.12

2,4-Dihydroxy-3-iod-6-methylbenzoesäuremethylester (166). Zu einer Lösung von 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**130**) (100 mg, 0.55 mmol) in Dichlormethan (10 mL) werden Benzyltrimethylammoniumdichloriodat (191 mg, 0.55 mmol) und

Kaliumhydrogencarbonat (330 mg, 3.30 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (20 mL) hydrolysiert. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan extrahiert (3×50 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Toluol/Aceton = 60:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 143 °C erhalten. Ausbeute: 75 mg (0.24 mmol, 44 %).

R_f: 0.23 (Toluol:Aceton = 60/1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 2.47 (s, 3H, CH₃), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 5.82 (s, 1H, OH), 6.45 (s, 1H, ar-H), 12.77 (s, 1H, OH).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 24.1 (CH₃), 52.4 (OCH₃), 74.1, 105.6, 110.3, 143.4, 159.5, 163.4 (ar-C), 171.8 (CO).

IR: KBr, ν = 3406 (s), 2953 (w), 1630 (ss), 1408 (ss), 1316 (ss), 1267 (s), 798 (ss).

GCMS R_t = 12.0 min (Temperaturprogramm A)
m/z (%) = 308 (33) [M⁺], 276 (100) [M⁺ – CH₄O], 248 (9) [M⁺ – CH₄O – CO], 149 (16) [M⁺ – CH₄O – I].

HRMS (M⁺) ber.: 307.9546
gef.: 307.9541

C₉H₉IO₄ 308.07
ber. (%): C 35.09 H 2.94
gef. (%): C 35.38 H 2.88

Ullmann-Reaktion:

2,2',6,6'-Tetramethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (**148**).
Kupferbronze wird auf folgende Weise aktiviert: zu einer 2 %igen Lösung von Iod in Aceton (50 mL) wird Cu-Bronze (5.00 g) gegeben und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Der

Niederschlag wird abgetrennt und in einer Mischung von konzentrierter Salzsäure und Aceton (25 mL, 1:1, v/v) aufgenommen. Nach Filtration wird der Rückstand mit Aceton gewaschen und anschließend getrocknet. Die *Ullmann*-Reaktion erfolgt durch inniges Vermischen von Cu-Bronze (2.16 g) mit 3-Iod-2,4-dimethoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**141**) (1.08 g, 3.21 mmol) und Erhitzen dieses Gemisches im Metallbad bei 230 °C für 6 h. Anschließend wird der Rückstand in Essigsäureethylester (100 mL) aufgenommen und für 1 h zum Sieden erhitzt. Es wird filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 185 °C erhalten. Ausbeute 519 mg (1.24 mmol, 77%).

R_f : 0.24 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.39 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 3.46 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$), 3.74 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$), 3.88 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$), 6.57 (s, 2H, $2 \times \text{ar-H}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 20.2 ($2 \times \text{CH}_3$), 52.0 ($2 \times \text{OCH}_3$), 55.8 ($2 \times \text{OCH}_3$), 61.5 ($2 \times \text{OCH}_3$), 108.2, 114.3, 121.0, 137.7, 157.0, 159.0 (ar-C), 168.7 ($2 \times \text{CO}$).

GCMS R_t = 15.8 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 418 (81) [M^+], 386 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_4\text{O}$], 355 (24) [$\text{M}^+ - \text{CH}_4\text{O} - \text{CH}_3\text{O}$].

$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8$: 418.44

Regioselektive Demethylierung:

2,2'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (**144**). Eine Lösung von 2,2',6,6'-Tetramethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (**148**) (386 mg, 0.92 mmol) in trockenem Dichlormethan (10 mL) werden auf 0 °C abgekühlt und mit einer 1 M Lösung von Bortribromid in Dichlormethan (1.8 mL, 1.84 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 8 h bei -10 °C gerührt und anschließend mit Wasser (20 mL) hydrolysiert. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert (3×100 mL), und die vereinigten organischen Extrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester

= 2:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 246 °C erhalten. Ausbeute: 343 mg (0.88 mmol, 95 %).

Die analytischen Daten stimmen mit den bei **144** (siehe S. 139) angegebenen Daten überein.

Atropisomerentrennung

(*M*)-2,2'-Bis(Camphanat)-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (*M*)-(167) und (*P*)-2,2'-Bis(Camphanat)-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (*P*)-(168). Unter Schutzgas (Ar) wird zu einer Lösung von (*rac*)-2,2'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyldicarbonsäuredimethylester (*rac*)-(144) (93 mg, 0.24 mmol) in trockenem Pyridin (6 mL) (1*S*, 4*R*)-(-)-Camphansäurechlorid (157) (430 mg, 1.98 mmol) und 4-Dimethylaminopyridin (10 mg, 0.08 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 4 h zum Sieden erhitzt und anschließend mit Dichlormethan (80 mL) verdünnt. Das Reaktionsgemisch wird nacheinander mit 2 N Salzsäure (2 × 45 mL), ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (45 mL) und Wasser (45 mL) gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 1:1) werden zwei farblose Feststoffe erhalten.

(*M*)-2,2'-Bis(Camphanat)-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (*M*)-(167):

Ausbeute: 70 mg (0.09 mmol, 39%)

Schmelzpunkt: 127 °C

R_f: 0.38 (Isohexan/Essigsäureethylester = 1:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.47 (s, 6H, 2 × CH₃), 0.81 (s, 6H, 2 × CH₃), 0.99 (s, 6H, 2 × CH₃), 1.60 (ddd, ²J = 13.6 Hz, ³J = 9.3 Hz, ³J = 4.5 Hz, 2H, 2 × CH), 1.81 (ddd, ²J = 13.6 Hz, ³J = 10.9 Hz, ³J = 4.5 Hz, 2H, 2 × CH), 1.97 (ddd, ²J = 13.6 Hz, ³J = 9.3 Hz, ³J = 4.5 Hz, 2H, 2 × CH), 2.19 (ddd, ²J = 13.6

Hz, $^3J = 10.9$ Hz, $^3J = 4.5$ Hz, 2H, 2 $\times$ CH), 2.41 (s, 6H, 2 $\times$ CH₃), 3.76 (s, 6H, 2 $\times$ OCH₃), 3.77 (s, 6H, 2 $\times$ OCH₃), 6.67 (s, 2H, 2 $\times$ ar-H).

^{13}C -NMR (CDCl₃): $\delta = 9.6$ (2 $\times$ CH₃), 15.1 (2 $\times$ CH₃), 16.0 (2 $\times$ CH₃), 21.5 (2 $\times$ CH₃), 28.8 (2 $\times$ CH₂), 31.0 (2 $\times$ CH₂), 52.1 (2 $\times$ OCH₃), 54.1 (2 $\times$ C_q), 54.8 (2 $\times$ C_q), 56.3 (2 $\times$ OCH₃), 90.8 (2 $\times$ C_q), 111.3, 113.4, 118.4, 140.7, 147.7, 159.6 (ar-C), 164.8 (2 $\times$ CO), 166.3 (2 $\times$ CO), 178.2 (2 $\times$ CO).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -16.2 (c = 1.1, CHCl₃).

MS m/z (%) = 750 (7) [M⁺], 718 (100) [M⁺ – CH₄O], 341 (14) [M⁺ – CH₄O – C₂₁H₂₉O₆].

HRMS (M⁺) ber.: 750.2888
gef.: 750.2940

C₄₀H₄₆O₁₄: 750.78

(*P*)-2,2'-Bis(Camphanat)-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (*P*)-(168):

Ausbeute: 70 mg (0.09 mmol, 39%)

Schmelzpunkt: 223 °C

R_f: 0.31 (Isohexan/Essigsäureethylester = 1:1).

^1H -NMR (CDCl₃): $\delta = 0.82$ (s, 6H, 2 $\times$ CH₃), 0.88 (s, 6H, 2 $\times$ CH₃), 1.03 (s, 6H, 2 $\times$ CH₃), 1.50 (m, 4H, 2 $\times$ CH₂), 1.80 (ddd, $^2J = 13.6$ Hz, $^3J = 9.3$ Hz, $^3J = 4.5$ Hz, 2H, 2 $\times$ CH), 2.15 (ddd, $^2J = 13.6$ Hz, $^3J = 10.9$ Hz, $^3J = 4.5$ Hz, 2H, 2 $\times$ CH), 2.44 (s, 6H, 2 $\times$ CH₃), 3.74 (s, 6H, 2 $\times$ OCH₃), 3.80 (s, 6H, 2 $\times$ OCH₃), 6.70 (s, 2H, 2 $\times$ ar-H).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 9.6$ ($2 \times \text{CH}_3$), 16.0 ($2 \times \text{CH}_3$), 16.0 ($2 \times \text{CH}_3$), 21.3 ($2 \times \text{CH}_3$), 28.8 ($2 \times \text{CH}_2$), 30.4 ($2 \times \text{CH}_2$), 52.2 ($2 \times \text{OCH}_3$), 54.1 ($2 \times \text{C}_q$), 54.9 ($2 \times \text{C}_q$), 56.2 ($2 \times \text{OCH}_3$), 91.0 ($2 \times \text{C}_q$), 111.2 , 113.3 , 119.2 , 140.0 , 147.3 , 159.4 (ar-C), 164.6 ($2 \times \text{CO}$), 166.5 ($2 \times \text{CO}$), 178.2 ($2 \times \text{CO}$).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: 15.0 ($c = 1.3$, CHCl_3).

MS m/z (%) = 750 (5) [M^+], 718 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_4\text{O}$], 341 (19) [$\text{M}^+ - \text{CH}_4\text{O} - \text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{O}_6$].

HRMS (M^+) ber.: 750.2888
gef.: 750.2871

$\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{O}_{14}$: 750.78

(*M*)-2,2'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (*M*)-(144). Unter Schutzgas (Ar) wird eine Lösung von (*M*)-2,2'-Bis(Camphanat)-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyldicarbonsäuredimethylester (*M*)-(167) (28 mg, 0.04 mmol) und Natriummethylat (20 mg, 0.37 mmol) in trockenem Methanol (5 mL) für 1 h zum Sieden erhitzt. Die Reaktionsmischung wird mit 1 N Schwefelsäure hydrolysiert und mit Dichlormethan (3×15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 229 °C erhalten. Ausbeute: 11 mg (0.03 mmol, 71 %).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -53.3 ($c = 0.15$, CHCl_3).

CD (Trifluorethanol): λ (Mol. CD) [nm] = 205 (96.6), 224 (-56.1), 260 (37.9), 278 (-17.1), 311 (-5.0).

Die übrigen analytischen Daten stimmen mit den bei (*rac*)-144 angegebenen Daten überein.

(*P*)-2,2'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (*P*)-(144). Die Synthese erfolgt analog zu der von (*M*)-144. ((*P*)-2,2'-Bis(Camphanat)-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyldicarbonsäuredimethylester (*P*)-(168) (28 mg, 0.04 mmol) und Natriummethylat (20 mg, 0.37 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 229 °C erhalten. Ausbeute: 11 mg (0.03 mmol, 71 %).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +36.4 ($c = 0.11$, CHCl_3).

CD (Trifluorethanol): λ (Mol. CD) [nm] = 206 (-51.0), 222 (35.3), 260 (-18.5), 279 (12.6), 312 (6.3).

Die übrigen analytischen Daten stimmen mit den bei (*rac*)-144 angegebenen Daten überein.

6.1.4 Versuche zur Synthese von Vioxanthin

Tandem-Michael-Reaktion

2,2'-Methoxymethoxy-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (170). Unter Schutzgas (Ar) wird eine Lösung von (*rac*)-2,2'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (*rac*)-(144) (253 mg, 0.65 mmol) in trockenem Dichlormethan (20 mL) bei Raumtemperatur mit *N*-Ethyl-isopropylamin (2.0 mL, 11.68 mmol) und Chlordimethylether (0.6 mL, 7.78 mmol) versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch für 48 h zum Sieden erhitzt. Die Reaktionslösung wird mit Essigsäureethylester (30 mL) verdünnt und mit 0.2 N Salzsäure (10 mL) hydrolysiert. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert (3 × 75 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloses Öl erhalten. Ausbeute 228 mg (0.48 mmol, 73 %).

R_f : 0.19 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.34 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 3.06 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$), 3.70 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$), 3.84 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$), 4.62 (d, 2J = 5.7 Hz, 2H, $2 \times \text{CH}$), 4.70 (d, 2J = 5.7 Hz, 2H, $2 \times \text{CH}$), 6.56 (s, 2H, $2 \times \text{ar-H}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 20.3 ($2 \times \text{CH}_3$), 52.0 ($2 \times \text{OCH}_3$), 55.9 ($2 \times \text{OCH}_3$), 56.6 ($2 \times \text{OCH}_3$), 99.7 ($2 \times \text{CH}_2$), 108.7, 115.1, 121.8, 137.7, 153.9, 159.2 (ar-C), 168.5 ($2 \times \text{CO}$).

GCMS: R_t = 28.6 min (Temperaturprogramm B)
 m/z (%) = 478 (55) [M^+], 447 (38) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O}$], 402 (54) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{C}_2\text{H}_5\text{O}$], 371 (13) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{C}_2\text{H}_5\text{O} - \text{CH}_3\text{O}$], 343 (18) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{C}_2\text{H}_5\text{O} - \text{CH}_3\text{O} - \text{CO}$], 326 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{C}_2\text{H}_5\text{O} - \text{CH}_3\text{O} - \text{C}_2\text{H}_5\text{O}$].

$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$ 478.49

3-(2,3,4-Trihydro-9-hydroxy-6,8-dimethoxy-1-oxo-anthracen-7-yl)-2,4-dimethoxy-6-methylbenzoessäuremethylester (**175**). Unter Schutzgas (Ar) wird zu einer aus Diisopropylamin (0.3 mL, 2.41 mmol) und 2.5 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan (0.8 mL, 2.01 mmol) frisch hergestellten LithiumdiisopropylamidLösung in trockenem Tetrahydrofuran (30 mL) bei -78°C eine Lösung von 2,2',6,6'-Tetramethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (**148**) (1.65 g, 5.22 mmol) in trockenem Tetrahydrofuran (5 mL) getropft und 30 min bei -78°C gerührt. Anschließend wird die tiefrote Lösung mit einer Lösung von 3-Ethoxycyclohexanon (**174**) (0.2 mL, 1.51 mmol) in trockenem Tetrahydrofuran (5 mL) versetzt und 15 min bei -78°C gerührt. Es wird mit Ethanol (5 mL) hydrolysiert und auf Raumtemperatur erwärmt. Nach dem Ansäuern mit 2 N Salzsäure wird die Lösung auf ges. Ammoniumchlorid-Lösung (200 mL) gegeben, und die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert (3×100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie und präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 1:2) wird ein gelber Feststoff erhalten. Ausbeute: 11 mg (0.02 mmol, 9 %).

R_f : 0.33 (Isohexan/Essigsäureethylester = 1:2).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.12 (m, 2H, CH_2), 2.42 (s, 3H, CH_3), 2.75 (m, 2H, CH_2), 2.99 (m, 2H, CH_2), 3.50 (s, 3H, OCH_3), 3.66 (s, 3H, OCH_3), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 6.61 (s, 1H, ar-H), 6.84 (s, 1H, ar-H), 6.96 (s, 1H, ar-H), 15.05 (s, 1H, OH).

$\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_8$ 480.51

3-[(3R)-3,4-Dihydro-9-hydroxy-6-methoxy-8-methoxymethoxy-3-methyl-1H-naphtho[2,3-c]-pyran-1-on-7-yl]-2-methoxymethoxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (173). Die Synthese erfolgt analog zu der von **175**. ((Diisopropylamin (0.2 mL, 1.11 mmol), 2.5 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan (0.4 mL, 0.93 mmol), 2,2'-Methoxymethoxy-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (**170**) (74 mg, 0.15 mmol) und (*R*)-5,6-Dihydro-4-methoxy-6-methyl-2H-pyran-2-on (*R*)-(**114**) (66 mg, 0.46 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester/Essigsäure = 1:2:0.1) und Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 3:1) wird ein grünes Öl erhalten. Ausbeute: 17 mg (0.03 mmol, 20 %).

R_f : 0.54 (Isohexan/Essigsäureethylester/Essigsäure = 1:2:0.1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.57 (d, 3J = 6.3 Hz, 3H, CH_3), 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.91 (s, 2H, CH_2), 3.00 (s, 3H, OCH_3), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 4.71-4.73 (m, 3H), 4.92 (d, 2J = 5.7 Hz, 1H, CH), 5.10 (d, 2J = 5.7 Hz, 1H, CH), 6.63 (s, 1H, ar-H), 6.88 (s, 1H, ar-H), 6.96 (s, 1H, ar-H), 13.04 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 20.3 (CH_3), 20.8 (CH_3), 35.1 (CH_2), 52.0 (OCH_3), 55.9 (OCH_3), 56.1 (OCH_3), 56.4 (OCH_3), 56.5 (OCH_3), 75.8 (CH), 99.7 (CH_2), 100.7 (CH_2), 100.9, 102.3, 108.7, 115.3, 115.4, 118.9, 121.6, 133.7, 133.8, 137.5, 140.7, 154.4, 159.6, 160.3, 163.1 (ar-C), 168.6 (CO), 171.3 (CO).

MS	m/z (%) = 556 (4) [M ⁺], 512 (38) [M ⁺ – C ₂ H ₄ O], 480 (13) [M ⁺ – C ₂ H ₄ O – CH ₄ O], 450 (18) [M ⁺ – C ₂ H ₄ O – CH ₄ O – CH ₂ O], 434 (100) [M ⁺ – C ₄ H ₁₀ O ₄], 402 (31) [M ⁺ – C ₅ H ₁₄ O ₅], 371 (55) [M ⁺ – C ₆ H ₁₇ O ₆], 327 (76) [M ⁺ – C ₈ H ₂₁ O ₇], 295 (75) [M ⁺ – C ₉ H ₂₅ O ₈].
HRMS (M ⁺)	ber.: 556.1945 gef.: 556.1940
C ₂₉ H ₃₂ O ₁₁	556.56

Oxidative Phenolkupplung von semi-Vioxanthin

3,4,5,9-Tetrahydro-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1,6,9-trioxo-1H-naphtho[2,3-c]pyran (**125**). Unter Schutzgas (Ar) wird eine Lösung von (*rac*)-3,4-Dihydro-9,10-dihydroxy-7-methoxy-3-methyl-1H-naphtho[2,3-c]-pyran-1-on (*rac*)-(**102**) (43 mg, 0.16 mmol) in trockenem Dichlormethan (5 mL) bei 0 °C tropfenweise mit BF₃ · OEt₂ (40 µL, 0.32 mmol) versetzt. Anschließend wird bei 0 °C eine Lösung von Bis(trifluoracetoxy)iodphenol (86 mg, 0.20 mmol) in Dichlormethan (2 mL) zugegeben und bei gleicher Temperatur 2 h gerührt. Es wird mit Wasser (5 mL) verdünnt, und die organische Phase wird mit einem Gemisch aus Wasser und Methanol (8:2, v/v) gewaschen (3 × 20 mL). Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Chloroform:Aceton = 9:1) und Säulenchromatographie an RP-18 Phase (Methanol:Wasser = 5:1) wird ein gelber Feststoff erhalten. Ausbeute: 1 mg (3.47 µmol, 2 %).

R_f: 0.45 (Chloroform)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.57 (d, ³J = 6.3 Hz, 3H, CH₃), 3.02 (m, 2H, CH₂), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 4.66 (m, 1H, CH), 6.15 (s, 1H, ar-H), 7.50 (s, 1H, ar-H), 13.37 (s, 1H, OH).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 20.6 (CH₃), 36.1 (CH₂), 56.8 (OCH₃), 74.3 (CH), 110.4, 114.6, 118.0, 134.0, 148.2, 160.3, 161.8 (ar-C), 162.0 (CO), 179.1 (CO), 189.1 (CO).

MS	m/z (%) = 288 (100) [M^+], 244 (99) [$M^+ - CO_2$].
HRMS (M^+)	ber.: 288.0634 gef.: 288.0628
$C_{15}H_{12}O_6$	288.25

Oxidative Phenolkupplung eines verbrückten semi-Vioxanthin-Derivates

Modellsystem:

Bis(3,4-dimethoxyphenoxy)diisopropylsilan (184). Unter Schutzgas (Ar) wird eine Lösung von 3,4-Dimethoxyphenol (**182**) (500 mg, 3.25 mmol) und Triethylamin (0.5 mL, 3.25 mmol) in trockenem Dimethylformamid (13 mL) mit Diisopropylsilyl bis(trifluoromethansulfonat) (**183**) (0.2 mL, 0.81 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 16 h zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen mit Diethylether (20 mL) und Wasser (10 mL) verdünnt. Die wässrige Phase wird mit Diethylether extrahiert (3×100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. Natriumchlorid-Lösung (100 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloses Öl erhalten. Ausbeute 204 mg (0.49 mmol, 60 %).

R_f : 0.44 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1).

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 1.10 (d, 3J = 5.8 Hz, 12H, $4 \times CH_3$), 1.26 (m, 2H, $2 \times CH$), 3.76 (s, 6H, $2 \times OCH_3$), 3.82 (s, 6H, $2 \times OCH_3$), 6.50-6.54 (m, 4H, ar-H), 6.71 (d, 4J = 8.4 Hz, 2H, $2 \times$ ar-H).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ = 12.4 ($2 \times CH$), 17.1 ($4 \times CH_3$), 55.6 ($2 \times OCH_3$), 56.2 ($2 \times OCH_3$), 104.4, 110.2, 111.7, 143.9, 148.8, 149.4 (ar-C).

GCMS R_t = 16.1 min (Temperaturprogramm A)
m/z (%) = 420 (100) [M^+].

C₂₂H₃₂O₆Si: 420.57

6,6-Diisopropyl-2,3,9,10-tetramethoxy-6,7-dihydro-5H-6-siladibenzo[a,c]cyclohepten (185).

Methode A: Bei –40 °C wird unter Schutzgas (Ar) zu einer Lösung von Bis(3,4-dimethoxyphenoxy)diisopropylsilan (**184**) (54 mg, 0.13 mmol) in trockenem Dichlormethan (2 mL) eine Lösung von Bis(trifluoracetoxyl)iodphenol (55 mg, 0.13 mmol) und BF₃·OEt₂ (0.3 mL, 2.00 mmol) in trockenem Dichlormethan (2 mL) getropft. Nach 5 min wird die Reaktionsmischung mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 mL) hydrolysiert und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert (3 × 20 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach dünnschichtchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 133 °C erhalten. Ausbeute: 25 mg (0.06 mmol, 46 %).

Methode B: Bei –20 °C wird eine Lösung von Bis(3,4-dimethoxyphenoxy)diisopropylsilan (**184**) (42 mg, 0.10 mmol) in Acetonitril (4 mL) mit Bis(trifluoracetoxyl)iodphenol (43 mg, 0.10 mmol) und der Heteropolysäure H₄SiO₄·10MoO₃·H₂O (20 mg) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird auf Raumtemperatur erwärmt und 17 h gerührt. Anschließend wird über basischem Al₂O₃ filtriert, mit Acetonitril gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) und Säulenchromatographie an RP-18 Material (Methanol:Wasser = 5:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 133 °C erhalten. Ausbeute: 2 mg (4.78 µmol, 5 %).

R_f: 0.42 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.10 (d, ³J = 5.4 Hz, 12H, 4 × CH₃), 1.20 (m, 2H, 2 × CH), 3.91 (s, 12H, 4 × OCH₃), 6.63 (s, 2H, 2 × ar-H), 6.82 (s, 2H, 2 × ar-H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 12.4 (2 × CH), 17.0 (4 × CH₃), 56.0 (2 × OCH₃), 56.5 (2 × OCH₃), 105.0, 113.3, 120.3, 144.7, 146.4, 149.3 (ar-C).

GCMS R_t = 17.5 min (Temperaturprogramm A)

$$m/z (\%) = 418 (100) [M^+].$$

$C_{22}H_{30}O_6Si$: 418.56

4,4',5,5'-Tetramethoxybiphenyl-2,2'-diol (**186**). Unter Schutzgas (Ar) wird eine Lösung von 6,6-Diisopropyl-2,3,9,10-tetramethoxy-6,7-dihydro-5*H*-6-siladibenzo[*a,c*]cyclohepten (**185**) (25 mg, 0.06 mmol) in trockenem Tetrahydrofuran (1 mL) tropfenweise mit einer 1 M Tetra-butylammoniumfluorid-Lösung versetzt (60 μ L, 0.06 mmol) und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 183 °C erhalten. Ausbeute: 4 mg (0.01 mmol, 22 %).

R_f : 0.10 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1).

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 3.86 (s, 6H, 2 $\times$ OCH_3), 3.91 (s, 6 H, 2 $\times$ OCH_3), 6.65 (s, 2H, 2 $\times$ ar-H), 6.74 (s, 2H, 2 $\times$ ar-H).

$C_{16}H_{18}O_6$: 306.31

Synthese des 10-O-Methylethers von semi-Vioxanthin:

(rac)-3,4-Dihydro-9-benzyloxymethoxy-7,10-dimethoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*rac*)-(**187**).

Methode A: Eine Lösung von *(rac)*-3,4-Dihydro-9-benzyloxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*rac*)-(**140**) (782 mg, 1.98 mmol) in 1,2-Dimethoxyethan (7 mL) wird bei Raumtemperatur nacheinander mit Kalium-*tert*-butylat (333 mg, 2.97 mmol) und Fluorsulfonsäuremethylester (0.2 mL, 2.08 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 4 h gerührt, anschließend mit Dichlormethan (50 mL) verdünnt und nacheinander mit 5 %iger Natriumhydroxid-Lösung (50 mL) sowie ges. Natriumchlorid-Lösung (50 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 565 mg (1.39 mmol, 70 %).

Methode B: Unter Schutzgas (Ar) wird eine Lösung von (*rac*)-3,4-Dihydro-9-benzyloxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*rac*)-**(140)** (118 mg, 0.30 mmol) in trockenem Aceton (10 mL) bei Raumtemperatur mit Kaliumcarbonat (83 g, 0.60 mmol) und Dimethylsulfat (85 μ L, 0.90 mmol) versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch für 20 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Wasser (50 mL) aufgenommen und die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert (3 $\times$ 100 mL). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 86 mg (0.21 mmol, 70 %).

R_f : 0.51 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.49 (d, 3J = 6.3 Hz, 3H, CH_3), 2.96 (m, 2H, CH_2), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 4.02 (s, 3H, OCH_3), 4.57 (m, 1H, CH), 4.85 (s, 2H, CH_2), 5.43 (s, 2H, CH_2), 6.73 (d, 4J = 2.3 Hz, 1H, ar-H), 6.87 (d, 4J = 2.3 Hz, 1H, ar-H), 7.22 (s, 1H, ar-H), 7.31-7.40 (m, 5H, ar-H).

$\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_6$ 408.44

(*rac*)-3,4-Dihydro-9-hydroxy-7,10-dimethoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*rac*)-**(188)**. Die Synthese erfolgt analog zu der von (*rac*)-**102** (siehe S. 137). ((*rac*)-3,4-Dihydro-9-benzyloxymethoxy-7,10-dimethoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*rac*)-**(187)** (92 mg, 0.23 mmol), und Pd/C (20 mg)). Nach Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 161 °C erhalten. Ausbeute: 60 mg (0.21 mmol, 90 %).

R_f : 0.23 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.53 (d, 3J = 6.3 Hz, 3H, CH_3), 2.99 (m, 2H, CH_2), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 4.15 (s, 3H, OCH_3), 4.66 (m, 1H, CH), 6.58 (d, 4J = 2.3 Hz, 1H, ar-H), 6.62 (d, 4J = 2.3 Hz, 1H, ar-H), 7.22 (s, 1H, ar-H), 9.88 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 20.7 (CH_3), 36.2 (CH_2), 55.4 (OCH_3), 64.4 (OCH_3), 74.5 (CH), 98.4, 102.5, 109.6, 112.5, 120.7, 136.0, 139.6, 157.2, 161.6, 161.9 (ar-C), 162.8 (CO).

GCMS: R_t = 16.3 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 288 (100) [M^+], 270 (10) [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$], 242 (13) [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}$], 229 (24) [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{CO} - \text{CH}_3$].

HRMS (M^+) ber.: 288.0998
 gef.: 288.1000

$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$ 288.30

Umsetzung von **188** mit Diisopropylsilyl bis(trifluormethansulfonat):

(*rac*)-3,4-Dihydro-9-(1,1-diisopropyl-1-trifluormethansulfonyl-silyloxy)-7,10-dimethoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*rac*)-(**189**). Unter Schutzgas (Ar) wird eine Lösung von (*rac*)-3,4-Dihydro-9-hydroxy-7,10-dimethoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*rac*)-(**188**) (158 mg, 0,55 mmol) und Triethylamin (80 μL , 0,55 mmol) in trockenem Dimethylformamid (2 mL) mit Diisopropylsilyl bis(trifluormethansulfonat) (**183**) (40 μL , 0,14 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 48 h zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen mit Diethylether (20 mL) und Wasser (10 mL) verdünnt. Die wässrige Phase wird mit Diethylether extrahiert (3×100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. Natriumchlorid-Lösung (100 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan : Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 32 mg (0,06 mmol, 10 %).

R_f : 0.29 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1)

^1H -NMR (CDCl_3): δ = 0.89-1.16 (m, 15 H, $2 \times \text{CH}$, $4 \times \text{CH}_3$), 1.49 (d, 3J = 6.3 Hz, 3H, CH_3), 2.95 (m, 2H, CH_2), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 3.95 (s, 3H, OCH_3), 4.57 (m, 1H, CH), 6.71 (d, 4J = 2.3 Hz, 1H, ar-H), 6.73 (d, 4J = 2.3 Hz, 1H, ar-H), 7.20 (s, 1H, ar-H).

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ = 13.2 ($2 \times \text{CH}$), 17.1 ($4 \times \text{CH}_3$), 20.7 (CH_3), 36.3 (CH_2), 55.4 (OCH_3), 63.8 (OCH_3), 74.1 (CH), 100.9, 108.5, 112.4, 117.3, 120.3, 136.1, 140.3, 154.1, 160.4, 162.3 (ar-C), 163.1 (CO).

MS: m/z (%) = 550 (9) [M^+], 505 (100) [$\text{M}^+ - \text{CHO}_2$], 447 (23) [$\text{M}^+ - \text{CHO}_2 - \text{F}_3$].

$\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{O}_8\text{Si}$ 550.62

6.2 Biologische Arbeiten

6.2.1 Verwendete Organismen und Medien

Organismus

Alle Experimente erfolgen mit dem Stamm *Penicillium citreo-viride* ATCC 42743.

Nährmedien

Die für die Stammhaltung und Kultivierung des Organismus verwendeten Nährlösungen sind in **Tabelle 6-1** zusammengefasst. Sie werden je 30 min bei 121 °C autoklaviert. Zur Kultur auf Agar-Platten werden die Medien jeweils vor dem Autoklavieren mit Agar (20 g/L) versetzt.

Substanz		Malz-Medium	Czapek-Dox-Medium	ATCC Culture Medium 313	Steep-Medium
Malzextrakt	(g/L)	10.0	-	-	-
Hefeextrakt	(g/L)	4.00	-	-	-
Glucose	(g/L)	4.00	-	-	-
NaNO ₃	(g/L)	-	3.00	3.00	3.00
KCl	(g/L)	-	0.50	0.50	0.50
MgSO ₄ ×7H ₂ O	(g/L)	-	0.50	0.50	0.50
FeSO ₄ ×7H ₂ O	(g/L)	-	0.01	0.01	0.01
K ₂ HPO ₄	(g/L)	-	1.00	1.00	1.00
Sucrose	(g/L)	-	30.0	200	30.0
Corn Steep Liquor	(g/L)	-	-	-	10.0

Tabelle 6-1: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien.

6.2.2 Stammhaltung und Kultivierung

Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgt auf Agar-Platten mit Medium 1. Der Organismus wird alle vier Wochen auf eine neue Agar-Platte überimpft und 10 d bei 30 °C inkubiert. Die Lagerung der dicht bewachsenen Platte erfolgt bei Raumtemperatur.

Sporenisolierung

Eine mit dem Organismus bewachsene Agar-Platte wird mit einer 0.9 %igen Salinelösung (8 mL) versetzt, und die Sporen werden mit einem Glasspatel abgeschabt. Die so erhaltene Sporenlösung wird mit Glycerin (30 %, v/v) versetzt und bei –20 °C gelagert.

Bestimmung der Lebendkeimzahl

Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wird die Sporenlösung verdünnt und jeweils 100 µL der Lösung auf eine Agar-Platte ausgestrichen. Nach Inkubation für 5 d bei 30 °C werden die gebildeten Kolonien ausgezählt. Die Lebenkeimzahl berechnet sich dann folgendermaßen:

$$\text{Lebendkeimzahl} = \text{Kolonienzahl} \times \text{Verdünnung} \times 10$$

Gleichung 6-1: Bestimmung der Lebendkeimzahl in einer Sporenlösung.

In einem repräsentativen Experiment werden Lebendkeimzahlen in der Größenordnung von $1\text{--}4 \times 10^7$ pro mL Sporenlösung gefunden.

Agar-Kultur

Eine Agar-Platte aus Malz-Medium wird mit Sporenlösung (100 µL) angeimpft und für 10 d bei 30 °C inkubiert. Es bildet sich farbloses Mycel, welches sich innerhalb des Kultivierungszeitraums auf der Unterseite rot-violett verfärbt.

Flüssigkultur

Malzmedium (100 mL) in einem Erlenmeyerkolben mit 2 Schikanen wird mit Sporenlösung (1 mL) angeimpft und für 10 d bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Es bildet sich eine große Anzahl kleiner Mycelpellets, die sich innerhalb des Kultivierungszeitraums rot-violett verfärben.

6.2.3 Medienoptimierung

Medienvergleich

Zum Vergleich der vier oben aufgeführten Nährlösungen werden Agar-Platten aus den jeweiligen Medien mit Sporenlösung (10 µL) angeimpft und bei 30 °C für 14 d inkubiert. Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit wird der Durchmesser des Mycels zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten vermessen. In **Tabelle 6-2** sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Medium	Wachstumsrate [mm/d]	Verfärbung
Malz-Medium	8.13	rot-violett
Czapek-Dox-Medium	6.95	-
ATCC Culture Medium 313	6.68	-
Steep-Medium	8.72	-

Tabelle 6-2: Medienvergleich.

Versuche zur Beeinflussung der Größe der Mycel-Pellets

Methode A: Ein von einer Agar-Kultur entnommenes, 2 cm² großes Mycelstück wird in einem Zentrifugenröhrchen mit Malz-Medium (10 mL) sowie Glasperlen versetzt und anschließend 1 min in der Hand geschüttelt. Ein 500 mL Erlenmeyerkolben mit Malz-Medium (100 mL) wird mit 1 mL der so behandelten Nährlösung angeimpft und für 10 d bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Es bilden sich wenige farblose Mycelpellets von bis zu 25 mm Durchmesser aus.

Methode B: Ein 500 mL Erlenmeyerkolben mit Malz-Medium (100 mL) wird mit einem aus einer Agar-Kultur entnommenes, 2 cm² großen Mycelstück angeimpft und für 10 d bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Nach 3, 4 und 5 d werden die gebildeten Mycelpellets mit Hilfe eines Dispergierwerkzeuges (IKA-Ultra-Turrax) für 1 min bei 28000 rpm zerkleinert. Das so behandelte Mycel verfärbt sich während der Kultur rot-violett.

Methode C: Ein 500 mL Erlenmeyerkolben mit Malz-Medium (100 mL) wird mit Sporenlösung (1 mL) angeimpft und für 10 d bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Es bildet sich eine große Zahl kleiner Mycelpellets, die sich während der Kultur rot-violett verfärben.

Methode D: Ein 500 mL Erlenmeyerkolben mit Malz-Medium (100 mL), welches mit Carbopol 974 PNF* (2 g/L) supplementiert ist, wird mit Sporenlösung (1 mL) angeimpft und für 10 d bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Es wird ein disperses Wachstum beobachtet, bei dem sich das Mycel während der Kultur braun verfärbt.

6.2.4 Wachstumscharakterisierung

Bestimmung einer Wachstumskurve über die Biotrockenmasse

Erlenmeyerkolben (500 mL) mit Malz-Medium (100 mL) werden mit Sporenlösung (je 1 mL) angeimpft und für 14 d bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Zur gravimetrischen Biotrockenmassenbestimmung werden zu bestimmten Zeitpunkten die Mycelpellets vom Kulturmedium getrennt und bis zur Gewichtskonstanz bei 110 °C getrocknet.

Bestimmung einer pH-Kurve

Erlenmeyerkolben (500 mL) mit Malz-Medium (100 mL) werden mit Sporenlösung (je 1 mL) angeimpft und für 14 d bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wird Kulturmedium (3 mL) entnommen und der pH-Wert bestimmt.

6.2.5 Aufbau eines Analytik-Assays

Verwendete Geräte

Reversed-Phase HPLC erfolgt auf einem HP Serie 1100 System der Firma Hewlett Packard Company, Palo Alto, USA, mit einer LiChrospher® 100 RP-18-EC Säule (250 × 3 mm; 5 µm Partikelgröße) der Firma CS Chromatographie Service GmbH verwendet. Als Vorsäule wird eine LiChrospher® 100 RP-18-EC Säule (20 × 3 mm; 5 µm Partikelgröße) der Firma CS Chromatographie Service GmbH eingesetzt. Die Säulentemperatur beträgt 20 °C. Die Metabolite werden über einen Photodiodenarraydetektor (DAD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 270$ nm und über einen Fluoreszenzdetektor (FLD) mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 270$ nm und einer Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 600$ nm detektiert. Das Injektionsvolumen beträgt 5 µL. Als mobile Phase wird ein Acetonitril/Wasser-Gemisch (65 % : 35 %) bei einer Flussrate von 0.5 mL/min verwendet.

* Carbopol wurde freundlicherweise von der Noveon Pharma GmbH & Co. KG, Raubling zur Verfügung gestellt.

Isolierung von Naturstoffen

10 Erlenmeyerkolben (500 mL) mit Malz-Medium (100 mL) werden mit Sporenlösung (je 1 mL) angeimpft und für 14 d bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Anschließend wird das Mycel vom Kulturmedium getrennt und mit Wasser gewaschen (1000 mL). Der Rückstand wird mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol (1:1, v/v) extrahiert (1000 mL). Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Chloroform (250 mL) aufgenommen und mit Wasser (100 mL) versetzt. Die wässrige Phase wird mit Chloroform extrahiert (3×100 mL), die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Chloroform:Aceton = 9:1) werden folgende Metabolite isoliert:

(R)-semi-Vioxanthin (R)-102:

Kulturdauer: 2 d

Konzentration: 22 mg/L

R_f: 0.56 (Chloroform:Aceton = 9:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.55 (d, ³J = 6.3 Hz, 3H, CH₃), 2.96 (m, 2H, CH₂), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 4.73 (m, 1H, CH), 6.51 (d, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, ar-H), 6.56 (d, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, ar-H), 6.87 (s, 1H, ar-H), 9.47 (s, 1H, OH), 13.76 (s, 1H, OH).

HPLC: R_t = 8.9 min
UV (Acetonitril) [nm] (rel. Abs.) = 220 (0.3), 260 (1.0), 310 (0.1), 370 (0.2).

CD (Acetonitril): λ (Mol. CD) [nm] = 363 (+2.9), 322 (+2.6), 264 (-11.0), 218 (-8.1).

Xanthomegnin 105:

Kulturdauer: 2 d

Konzentration: 10 mg/L

R_f: 0.26 (Chloroform:Aceton = 9:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.55 (d, ³J = 6.3 Hz, 6H, 2 × CH₃), 3.03 (m, 4H, 2 × CH₂), 4.14 (s, 6H, 2 × OCH₃), 4.66 (m, 2H, 2 × CH), 7.49 (s, 2H, 2 × ar-H), 13.17 (s, 2H, 2 × OH).

HPLC: R_t = 5.2 min

UV (Acetonitril) [nm] (rel. Abs.) = 230 (1.0), 290 (0.3), 406 (0.2).

Rubrosulphin 190:

Kulturdauer: 7 d

Konzentration: 6 mg/L

R_f: 0.23 (Chloroform:Aceton = 9:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.55 (d, ³J = 6.3 Hz, 6H, 2 × CH₃), 3.06 (m, 4H, 2 × CH₂), 4.17 (s, 3H, OCH₃), 4.68-4.81 (m, 2H, 2 × CH), 6.93 (s, 1H, ar-H), 7.06 (s, 1H, ar-H), 7.68 (s, 1H, ar-H), 12.79 (s, 1H, OH), 13.41 (s, 1H, OH).

HPLC: R_t = 9.9 min

UV (Acetonitril) [nm] (rel. Abs.) = 226 (0.4), 280 (1.0), 360 (0.1), 420 (0.2).

IR: KBr, ν = 3423 (s), 2924 (s), 1729 (ss), 1640 (ss), 1255 (ss), 1123 (s).

CD (Acetonitril): λ (Mol. CD) [nm] = 469 (-0.6), 425 (-0.5), 364 (+0.7), 282 (-3.4), 259 (+2.0), 209 (-3.9).

Viomellein 104:

Kulturdauer: 7 d

Konzentration: <1 mg/L

R_f : 0.10 (Chloroform:Aceton = 9:1).

HPLC: R_t = 3.5 min
UV (Acetonitril) [nm] (rel. Abs.) = 225 (0.8), 264 (1.0), 395 (0.4).

HPLC-Assay

Erlenmeyerkolben (500 mL) mit Malz-Medium (100 mL) werden mit Sporenlösung (je 1 mL) angeimpft und für 7 d bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Nach verschiedenen Kultivierungszeiten wird das Mycel vom Kulturmedium getrennt und mit Wasser gewaschen (2×50 mL). Anschließend wird der Rückstand mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol (1:1, v/v) extrahiert (100 mL), und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Chloroform/Essigsäure = 98:2) und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in Chloroform (1 mL) aufgenommen und auf der HPLC untersucht.

6.3 Biosyntheseuntersuchungen

6.3.1 Synthese von ^{13}C -markiertem *semi*-Vioxanthin

Synthese der ^{13}C -markierten Orsellinsäurederivate

[O $^{13}\text{CH}_3$]-2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (192). Die Synthese erfolgt analog zu der von **131** (siehe S. 126). (2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**130**) (1.00 g, 5.50 mmol), Kaliumcarbonat (1.52 g, 11.0 mmol) und [^{13}C]-Iodmethan (>99 % ^{13}C) (0.3 mL, 5.50 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 8:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 53 °C erhalten. Ausbeute: 827 mg (4.20 mmol, 76 %).

R_f : 0.16 (Isohexan/Essigsäureethylester = 8:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.51 (s, 3H, CH_3), 3.81 (d, $^1J_{\text{CH}} = 144.6$ Hz, 3H, O^{13}CH_3), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 6.29 (d, $^4J = 2.6$ Hz, 1H, ar-H), 6.34 (d, $^4J = 2.6$ Hz, 1H, ar-H), 11.80 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 24.3 (CH_3), 51.8 (OCH_3), 55.3* (OCH_3), 98.6, 105.2, 111.2, 143.1, 163.9, 165.2 (ar-C), 172.2 (CO).

GCMS: R_t = 10.6 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 197 (44) [M^+], 165 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_4\text{O}$], 137 (39) [$\text{M}^+ - \text{CH}_4\text{O} - \text{CO}$].

$\text{C}_9^{13}\text{CH}_{12}\text{O}_4$ 197.19

[O $^{13}\text{CH}_3$]-2-Benzoyloxymethoxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (193). Die Synthese erfolgt analog zu der von **132** (siehe S. 126). ([O $^{13}\text{CH}_3$]-2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**192**) (700 mg, 3.55 mmol), Natriummethylat (675 mg, 12.5 mmol), Triethylamin (1.0 mL, 7.14 mmol) und Benzylchlormethylether (0.7 mL, 5.36

mmol)*). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 918 mg (2.90 mmol, 82 %).

R_f : 0.29 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.32 (s, 3H, CH_3), 3.79 (d, $^1J_{\text{CH}} = 144.2$ Hz, 3H, O^{13}CH_3), 3.92 (s, 3H, OCH_3), 4.74 (s, 2H, CH_2), 5.29 (s, 2H, CH_2), 6.43 (d, $^4J = 2.2$ Hz, 1H, ar-H), 6.50 (d, $^4J = 2.2$ Hz, 1H, ar-H), 7.32-7.39 (m, 5H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 19.9 (CH_3), 52.0 (OCH_3), 55.3* (OCH_3), 69.9 (CH_2), 92.5 (CH_2), 99.1, 108.7, 117.3, 127.8, 128.0, 128.4, 137.0, 138.1, 155.7, 161.1 (ar-C), 168.6 (CO).

GCMS: R_t = 14.5 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = m/z (%) = 317 (18) [M^+], 287 (67) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O}$], 255 (44) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{CH}_3\text{O}$], 227 (30) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{CH}_3\text{O} - \text{CO}$], 164 (39) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O} - \text{CH}_3\text{O} - \text{C}_7\text{H}_7$], 91 (100) [C_7H_7^+], 65 (24) [C_5H_5^+].

$\text{C}_{17}^{13}\text{CH}_{20}\text{O}_5$ 317.34

Tandem-Michael-Reaktionen

(*R*)-[O^{13}CH_3]-3,4-Dihydro-9-benzyloxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*R*)-(194). Die Synthese erfolgt analog zu der von (*rac*)-140 (siehe S. 134). (Diisopropylamin (0.7 mL, 4.80 mmol), 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan (3.0 mL, 4.80 mmol), [O^{13}CH_3]-2-Benzyloxymethoxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (193) (632 mg, 1.99 mmol) und (*R*)-5,6-Dihydro-4-methoxy-6-methyl-2*H*-pyran-2-on (*R*)-(144) (426 mg, 3.00 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 197 mg (0.50 mmol, 25 %).

R_f : 0.20 (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1).

* Diese Angabe beziehen sich auf eine 60 %ige Benzylchlormethylether-Lösung.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.53$ (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 2.96 (m, 2H, CH_2), 3.88 (d, $^1J_{\text{CH}} = 144.2$ Hz, 3H, OCH_3), 4.70 (m, 1H, CH), 4.86 (s, 2H, CH_2), 5.46 (s, 2H, CH_2), 6.65 (d, $^4J = 2.3$ Hz, 1H, ar-H), 6.66 (d, $^4J = 2.3$ Hz, 1H, ar-H), 6.85 (s, 1H, ar-H), 7.30-7.38 (m, 5H, ar-H), 13.12 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 20.8$ (CH_3), 35.0 (CH_2), 55.4* (OCH_3), 70.3 (CH_2), 75.7 (CH), 93.2 (CH_2), 100.6, 100.7, 103.1, 111.3, 115.2, 127.8, 128.1, 128.4, 134.1, 137.1, 141.3, 157.6, 161.5, 164.0 (ar-C), 171.3 (CO).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -3.2 ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_{22}^{13}\text{CH}_{22}\text{O}_6$ 395.41

(S)-[O $^{13}\text{CH}_3$]-3,4-Dihydro-9-benzyloxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1H-naphtho[2,3-c]-pyran-1-on (S)-(194). Die Synthese erfolgt analog zu der von (rac)-140 (siehe S. 134). (Diisopropylamin (0.8 mL, 6.00 mmol), 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan (3.1 mL, 5.00 mmol), [O $^{13}\text{CH}_3$]-2-Benzyloxymethoxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (193) (632 mg, 1.99 mmol) und (S)-5,6-Dihydro-4-methoxy-6-methyl-2H-pyran-2-on (S)-(114) (426 mg, 3.00 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 2:1) wird ein farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 103 mg (0.26 mmol, 13 %).

Die analytischen Daten stimmen mit den bei (R)-218 angegebenen Daten überein.

Schutzgruppenabspaltungen

(R)-[O $^{13}\text{CH}_3$]-3,4-Dihydro-9,10-dihydroxy-7-methoxy-3-methyl-1H-naphtho[2,3-c]-pyran-1-on (R)-(191). Die Synthese erfolgt analog zu der von (rac)-102 (siehe S. 137). ((R)-[O $^{13}\text{CH}_3$]-3,4-Dihydro-9-benzyloxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1H-naphtho[2,3-c]-pyran-1-on (R)-(194) (128 mg, 0.32 mmol), und Pd/C (30 mg)). Nach Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Toluol/Essigsäureethylester/Essigsäure = 50:49:1) wird ein grüner Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 163 °C erhalten. Ausbeute: 69 mg (0.25 mmol, 78 %).

R_f : 0.62 (Toluol/Essigsäureethylester/Essigsäure = 50:49:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.54 (d, 3J = 6.3 Hz, 3H, CH_3), 2.95 (m, 2H, CH_2), 3.88 (d, $^1J_{\text{CH}}$ = 144.2 Hz, 3H, OCH_3), 4.73 (m, 1H, CH), 6.50 (d, 4J = 2.2 Hz, 1H, ar-H), 6.54 (d, 4J = 2.2 Hz, 1H, ar-H), 6.85 (s, 1H, ar-H), 9.44 (s, 1H, OH), 13.75 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 20.7 (CH_3), 36.6 (CH_2), 55.4* (OCH_3), 70.0 (CH_2), 76.5 (CH), 99.2, 101.4, 108.1, 115.9, 133.0, 140.4, 158.4, 162.7 (ar-C), 171.4 (CO).

GCMS: R_t = 14.7 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 275 (100) [M^+], 257 (67) [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$], 229 (33) [$\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_6\text{O}$].

$\text{C}_{14}^{13}\text{CH}_{14}\text{O}_5$ 275.26

(*S*)-[O^{13}CH_3]-3,4-Dihydro-9,10-dihydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*S*)-(**191**). Die Synthese erfolgt analog zu der von (*rac*)-**102** (siehe S. 137). ((*S*)-[O^{13}CH_3]-3,4-Dihydro-9-benzyloxymethoxy-10-hydroxy-7-methoxy-3-methyl-1*H*-naphtho[2,3-*c*]-pyran-1-on (*S*)-(**194**) (103 mg, 0.26 mmol), und Pd/C (20 mg)). Nach Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Toluol/Essigsäureethylester/Essigsäure = 50:49:1) wird ein grüner Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 163 °C erhalten. Ausbeute: 25 mg (0.09 mmol, 35 %).

Die analytischen Daten stimmen mit den bei (*R*)-**191** angegebenen Daten überein.

6.3.2 Verimpfungsexperimente

Verwendete Nährmedien

Die für die Verimpfungsexperimente verwendeten Nährlösungen sind in **Tabelle 6-3** zusammengefasst. Pro 100 mL des verwendeten Mediums wird eine Lösung von ^{13}C -markiertem *semi*-Vioxanthin (*R*)-**191** (3 mg) in DMSO (2 mL) zugesetzt und 30 min bei 121 °C autoklaviert.

Substanz		Malz-Medium	Carbopol-supplementiertes Malz-Medium
Malzextrakt	(g/L)	10.0	10.0
Hefeextrakt	(g/L)	4.00	4.00
Glucose	(g/L)	4.00	4.00
Carbopol	(g/L)	-	2.00

Tabelle 6-3: Übersicht der für die Verimpfungsexperimente verwendeten Nährlösungen.

Kultivierung auf Malz-Medium

5 Erlenmeyerkolben (500 mL) mit Malz-Medium (100 mL), welche jeweils eine Lösung von (*R*)-**191** (3 mg) in DMSO (2 mL) enthalten, werden mit Sporenlösung (1 mL) angeimpft und für 10 d bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Es bildet sich eine geringe Zahl großer Mycelpellets, die sich während der Kultur nicht verfärben.

Durch Extraktion des Kulturmediums mit Chloroform konnte das eingesetzte ¹³C-markierte *semi*-Vioxanthin zurückerhalten werden.

Kultivierung auf Carbopol-supplementiertem Malz-Medium

5 Erlenmeyerkolben (500 mL) mit Carbopol-supplementiertem Malz-Medium (100 mL), welche jeweils eine Lösung von (*R*)-**191** (3 mg) in DMSO (2 mL) enthalten, werden mit Sporenlösung (1 mL) angeimpft und für 10 d bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Es bildet sich eine große Zahl kleiner Mycelpellets, die sich während der Kultur nicht verfärben.

Durch Extraktion des Kulturmediums mit Chloroform konnte das eingesetzte ¹³C-markierte *semi*-Vioxanthin zurückerhalten werden.

6.4 Circular dichroismus als Screeningverfahren

6.4.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

CD-Spektren werden mit einem Spectralpolarimeter J-810 der Firma Jasco International Co. Ltd., Tokyo, Japan mit folgenden Parametern gemessen: Länge der Zelle = 0.5 cm, Empfindlichkeit = Standard, Messgeschwindigkeit = 100 nm/min, Data Pitch = 1 nm, Bandbreite 2 nm, Response = 2 sec, Akkumulation = 4. Angegeben ist der Molekulare Circular dichroismus (Mol. CD).

FDCD-Spektren werden mit einem Spectralpolarimeter J-810 der Firma Jasco International Co. Ltd., Tokyo, Japan mit folgenden Parametern gemessen: Länge der Zelle = 1 cm (spezielle Zelle für die Fluoreszenzmessungen), Empfindlichkeit = Standard, Messgeschwindigkeit = 100 nm/min, Data Pitch = 1 nm, Bandbreite 4 nm, Response = 2 sec, Akkumulation = 4. Angegeben ist der Molekulare Circular dichroismus (Mol. CD).

Die verwendeten **Enzyme** werden von der Firma Fluka aus dem „*Lipasen Basic Kit*“ (Fluka-Nr.: 62327) bezogen.

6.4.2 Lipasen-katalysierte Acylierung von *meso*-Cyclohexandiol

Darstellung der Acylierungsreagenzien

2-Naphthoesäureethoxyvinylester (**208**). Unter Schutzgas (Ar) wird eine Lösung von 2-Naphthoesäure (**206**) (861 mg, 5.00 mmol) und $[\text{RuCl}_2(p\text{-Cumol})]_2$ (15 mg, 0.02 mmol) in trockenem Toluol (8 mL) bei 0 °C tropfenweise mit einer Lösung von Ethoxyacetylen (1.2 mL, 5.00 mmol) in trockenem Toluol (2 mL) versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und 20 h gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 4:1) wird ein gelber Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 50 °C erhalten. Ausbeute: 664 mg (2.74 mmol, 55 %).

R_f: 0.57 (Isohexan/Essigsäureethylester = 4:1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.41$ (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 3.93 (d, $^2J = 3.4$ Hz, 1H, CH), 4.00 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 4.03 (d, $^2J = 3.4$ Hz, 1H, CH), 7.54-7.66 (m, 2H, ar-H), 7.91 (dd, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 2.9$ Hz, 2H, ar-H), 7.98 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1H, ar-H), 8.11 (dd, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, 1H, ar-H), 8.70 (s, 1H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 14.2$ (CH_3), 65.1 (CH_2), 72.2 (CH_2), 125.4, 126.1, 126.8, 127.8, 128.3, 128.7, 129.5, 132.1, 132.4, 135.9 (ar-C), 157.5 (C_q), 163.9 (CO).

GCMS: $R_t = 12.7$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 242 (6) [M^+], 200 (3) [$\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}$], 172 (9) [$\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4$], 155 (100) [$\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{OH}$], 127 (92) [$\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{OH} - \text{CO}$], 77 (30) [C_6H_5^+].

$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ 242.27

Benzoessäureethoxyvinylester (**209**). Die Synthese erfolgt analog zu der von **208**. (Benzoessäure (**207**) (610 mg, 5.00 mmol), $[\text{RuCl}_2(p\text{-Cumol})]_2$ (15 mg, 0.02 mmol) und Ethoxyacetylen (1.2 mL, 5.00 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 10:1) wird ein gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 646 mg (3.36 mmol, 67 %).

R_f : 0.41 (Isohexan/Essigsäureethylester = 10:1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.38$ (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 3.89 (d, $^2J = 3.7$ Hz, 1H, CH), 3.96 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 3.97 (d, $^2J = 3.7$ Hz, 1H, CH), 7.48 (t, $^3J = 7.8$ Hz, 2H, ar-H), 7.62 (m, 1H, ar-H), 8.12 (dd, $^3J = 6.8$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, 2H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 14.1$ (CH_3), 65.0 (CH_2), 72.1 (CH_2), 128.5, 128.9, 130.2, 133.7 (ar-C), 157.4 (C_q), 163.9 (CO).

GCMS: $R_t = 9.5$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 192 (2) [M^+], 105 (100) [$\text{C}_7\text{H}_5\text{O}^+$], 77 (61) [C_6H_5^+].

$C_{11}H_{12}O_3$ 192.21

Synthese von Vergleichsverbindungen

(*rac*)-1,2-Cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (**211**). Unter Schutzgas (Ar) wird eine Lösung von *meso*-1,2-Cyclohexandiol (**197**) (58 mg, 0.50 mmol), 2-Naphthoylchlorid (**210**) (96 mg, 0.50 mmol) und *N,N*-Dimethylaminopyridin (30 mg, 0.25 mmol) in trockenem Pyridin (5 mL) bei Raumtemperatur 6 h gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan (50 mL) verdünnt und nacheinander mit 2 N Salzsäure (2×100 mL) sowie ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (100 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 3:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 96 °C erhalten. Ausbeute: 65 mg (0.24 mmol, 48 %).

R_f : 0.27 (Isohexan/Essigsäureethylester = 3:1)

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 1.44-1.50 (m, 2H, CH_2), 1.69-1.78 (m, 4H, $2 \times CH_2$), 1.98-1.99 (m, 1H, CH), 2.01-2.06 (m, 1H, CH), 2.40 (br, 1H, OH), 4.02 (dt, $^3J = 7.6$ Hz, $^3J = 2.7$ Hz, 1H, CH), 5.28 (dt, $^3J = 7.6$ Hz, $^3J = 2.7$ Hz, 1H, CH), 7.53-7.59 (m, 2H, ar-H), 7.86 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, ar-H), 7.93 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1H, ar-H), 8.06 (dd, $^3J = 8.2$ Hz, $^3J = 1.8$ Hz, 1H, ar-H), 8.61 (s, 1H, ar-H).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ = 21.5 (CH_2), 21.8 (CH_2), 27.3 (CH_2), 30.4 (CH_2), 69.5 (CH), 74.7 (CH), 125.1, 126.6, 127.5, 127.7, 128.1, 128.2, 129.3, 131.0, 132.4, 135.5 (ar-C), 166.4 (CO).

GCMS: R_t = 14.8 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 270 (23) [M^+], 172 (27) [$C_{11}H_8O_2^+$], 155 (100) [$C_{11}H_7O^+$], 127 (47) [$C_{10}H_7^+$], 98 (31) [$C_6H_{10}O^+$].

$C_{17}H_{18}O_3$ 270.32

Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralcel OD-H Säule (Isohexan/2-Propanol = 95:5), R_t = 41.9 min und 49.8 min.

(1*R*,2*R*)-*trans*-1,2-Cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (**213**). Die Umsetzung erfolgt analog zu der von (*rac*)-**211**. ((1*R*,2*R*)-*trans*-Cyclohexandiol (**212**) (58 mg, 0.50 mmol), 2-Naphthoylchlorid (**210**) (96 mg, 0.50 mmol) und *N,N*-Dimethylaminopyridin (30 mg, 0.25 mmol)). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 3:1) wird ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 135 °C erhalten. Ausbeute: 53 mg (0.20 mmol, 40 %).

R_f : 0.19 (Isohexan/Essigsäureethylester = 3:1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.36-1.49 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.75-1.80 (m, 2H, CH_2), 2.12-2.19 (m, 2H, CH_2), 2.54 (br, 1H, OH), 3.88 (ddd, $^3J = 9.6$ Hz, $^3J = 9.6$ Hz, $^3J = 4.7$ Hz, 1H, CH), 4.93 (ddd, $^3J = 9.6$ Hz, $^3J = 9.6$ Hz, $^3J = 4.7$ Hz, 1H, CH), 7.53-7.59 (m, 2H, ar-H), 7.86 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, ar-H), 7.92 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1H, ar-H), 8.06 (dd, $^3J = 8.2$ Hz, $^3J = 1.8$ Hz, 1H, ar-H), 8.61 (s, 1H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 23.7 (CH_2), 23.8 (CH_2), 30.0 (CH_2), 33.0 (CH_2), 72.7 (CH), 78.8 (CH), 125.2, 126.6, 127.5, 127.7, 128.0, 128.2, 129.3, 131.1, 132.4, 135.5 (ar-C), 166.8 (CO).

CD (Acetonitril): λ (Mol. CD) [nm] = 240 (-2.2).

$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_3$ 270.32

(1*R*,2*R*)-*trans*-1,2-Cyclohexandiol 1-(*p*-methoxybenzoat)-2-(2-naphthoat) (**215**). Die Umsetzung erfolgt analog zu der von (*rac*)-**211**. ((1*R*,2*R*)-*trans*-1,2-Cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (**213**) (27 mg, 0.10 mmol), *p*-Methoxybenzoylchlorid (**214**) (34 mg, 0.20 mmol) und *N,N*-Dimethylaminopyridin (12 mg, 0.10 mmol)). Nach Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 3:1) wird ein gelbliches Öl erhalten. Ausbeute: 2 mg (5 μmol , 5 %).

R_f: 0.19 (Isohexan/Essigsäureethylester = 3:1)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.52-1.66 (m, 4H, 2 × CH₂), 1.87 (m, 2H, CH₂), 2.29 (m, 2H, CH₂), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 5.28 (m, 2H, 2 × CH), 6.83 (d, ³J = 9.0 Hz, 2H, ar-H), 7.54-7.57 (m, 2H, ar-H), 7.84 (m, 2H, ar-H), 7.92-7.98 (m, 4H, ar-H), 8.54 (s, 1H, ar-H).

CD (Acetonitril): λ (Mol. CD) [nm] = 247 (-35.1), 235 (+39.8).

FDCD (Acetonitril): λ (Mol. CD) [nm] = 251 (-56.9), 232 (+23.1).

C₂₅H₂₄O₅ 404.46

Enzymscreening

Lipasen aus folgenden Organismen wurden untersucht: *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus arrhizus*, *Candida cylindracea*, *Candida antarctica*, *Mucor mihei*, *Aspergillus niger*, Schweinepankreas

Allgemeine Arbeitsvorschrift. Unter Schutzgas (Ar) wird eine Lösung von meso-1,2-Cyclohexandiol (**197**) (3 mg, 0.03 mmol) und Carbonsäureethoxyvinylester **208** und **209** (0.06 mmol) in trockenem Methyl-*tert*-butylether (1 mL) mit einer Lipase (50 mg) versetzt und für 3 d bei 45 °C und 800 rpm inkubiert. Für den Aktivitätstest werden 50 µL Probe entnommen, auf 1 mL mit Dichlormethan verdünnt und gaschromatographisch untersucht:

1,2-Cyclohexandiol 1-(benzoat) (216):

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.67-1.85 (m, 8H, 4 × CH₂), 3.99 (dt, ³J = 7.7 Hz, ³J = 3.0 Hz, 1H, CH), 5.24 (dt, ³J = 7.7 Hz, ³J = 3.0 Hz, 1H, CH), 7.48 (t, ³J = 7.8 Hz, 2H, ar-H), 7.58 (m, 1H, ar-H), 8.07 (dd, ³J = 6.8 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 2H, ar-H).

GCMS: R_t = 11.8 min (Temperaturprogramm A)

m/z (%) = 115 (8) [$C_6H_{11}O_2^+$], 105 (100) [$C_7H_5O^+$], 98 (86) [$C_6H_{10}O^+$], 77 (57) [$C_6H_5^+$].

CD (Acetonitril): λ (Mol. CD) [nm] = 235 (+0.3).

$C_{13}H_{16}O_3$ 220.26

1,2-Cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (217):

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 1.47-1.52 (m, 2H, CH_2), 1.74-1.80 (m, 4H, $2 \times CH_2$), 2.05-2.18 (m, 2H, CH_2), 4.05 (m, 1H, CH), 5.29 (m, 1H, CH), 7.57-7.62 (m, 2H, ar-H), 7.90 (d, 3J = 8.2 Hz, 2H, ar-H), 7.98 (d, 3J = 8.2 Hz, 1H, ar-H), 8.07 (dd, 3J = 8.2 Hz, 3J = 1.8 Hz, 1H, ar-H), 8.63 (s, 1H, ar-H).

GCMS: R_t = 14.8 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 270 (23) [M^+], 172 (27) [$C_{11}H_8O_2^+$], 155 (100) [$C_{11}H_7O^+$], 127 (47) [$C_{10}H_7^+$], 98 (31) [$C_6H_{10}O^+$].

CD (Acetonitril): λ (Mol. CD) [nm] = 238 (+0.6).

$C_{17}H_{18}O_3$ 270.32

Umsetzung von enzymatisch-synthetisiertem 1,2-Cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (217) mit p-Methoxybenzoesäurechlorid

Die Umsetzung erfolgt analog zu der von (*R,R*)-**215**. ((1,2-Cyclohexandiol 1-(2-naphthoat) (**217**) (3 mg, 0.01 mmol), *p*-Methoxybenzoylchlorid (**214**) (7 mg, 0.04 mmol) und *N,N*-Dimethylaminopyridin (1.2 mg, 0.01 mmol)). Nach Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Isohexan/Essigsäureethylester = 3:1) wird ein gelbliches Öl erhalten. Ausbeute: 2 mg (5 μ mol, 50 %).

R_f : 0.19 (Isohexan/Essigsäureethylester = 3:1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.56-1.63 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.87-1.91 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 2.13 (m, 2H, CH_2), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 5.44 (m, 2H, $2 \times \text{CH}$), 6.89 (d, $^3J = 9.0$ Hz, 2H, ar-H), 7.56-7.60 (m, 2H, ar-H), 7.88 (m, 2H, ar-H), 7.98-8.05 (m, 4H, ar-H), 8.56 (s, 1H, ar-H).

CD (Acetonitril): λ (Mol. CD) [nm] = 256 (-1.1), 231 (+1.9).

$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_5$ 404.46

CD-Titrationsexperiment

Eine Lösung des Reaktionsgemisches der enzymatischen Acylierung von *meso*-1,2-Cyclohexandiol (**197**) mit 2-Naphthoesäureethoxyvinylester (**208**) ($c = 1.5 \times 10^{-5}$ M bezogen auf das Acylierungsprodukt in der Mischung) in Acetonitril (3 mL) wird mit 1 μL , 2 μL , 5 μL und 10 μL einer Lösung von (1*R*,2*R*)-*trans*-1,2-Cyclohexandiol 1-(*p*-methoxybenzoat)-2-(2-naphthoat) (**215**) ($c = 4.5 \times 10^{-4}$ M) in Acetonitril versetzt und die jeweiligen CD-Spektren gemessen.

7 Röntgenstrukturanalyse

Kristallographische Daten der Verbindung (M)-(-)-167

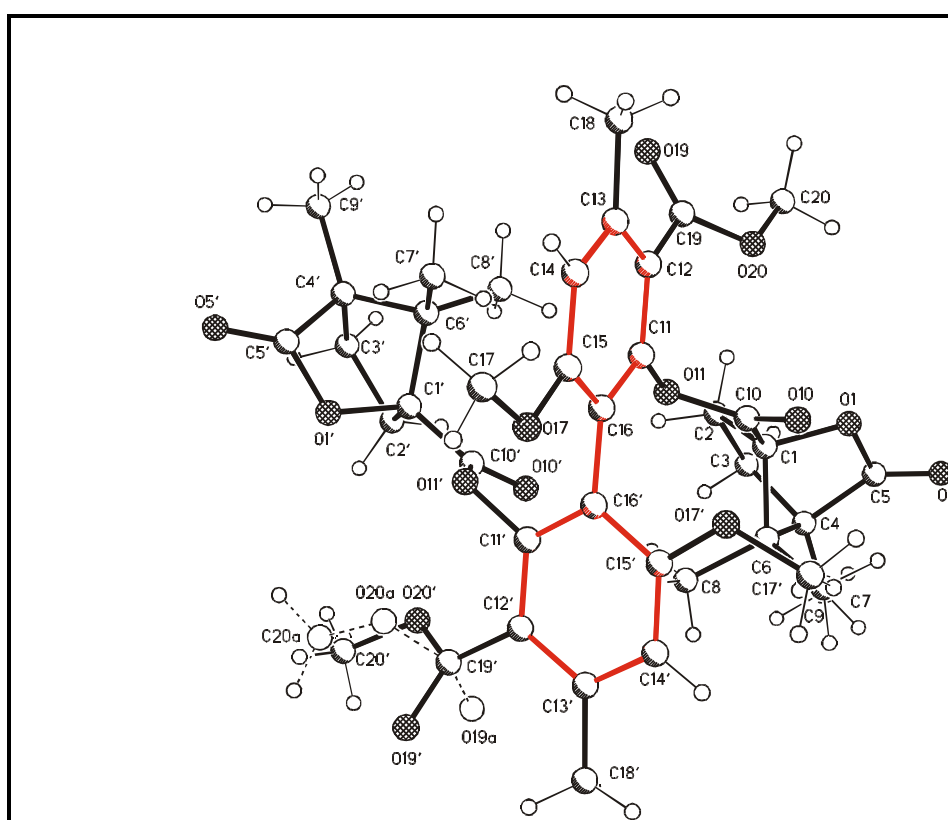
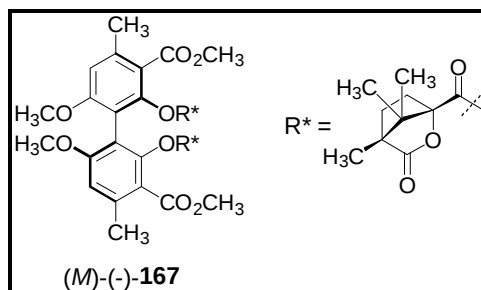


Abbildung 7-1: Kristallstruktur von (M)-(-)-167.

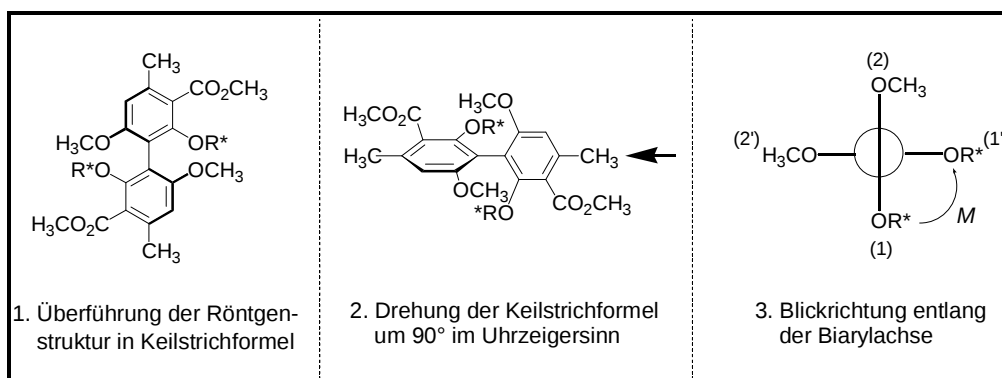


Abbildung 7-2: Bestimmung der absoluten Konfiguration von Verbindung (M)-(-)-167.

Crystal data and structure refinement:

Empirical formula	$\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{O}_{14}$
Formula weight	750.77
Temperature	123(2) K
Wavelength	0.71073 Å (MoK α)
Crystal system, space group	Monoclinic, $P2_1$ (No.4)
Unit cell dimensions	$a = 10.5732(2)$ Å $\alpha = 90$ deg. $b = 16.5829(3)$ Å $\beta = 105.317(1)$ deg. $c = 11.0339(2)$ Å $\gamma = 90$ deg.
Volume	1865.90(6) Å ³
Z, Calculated density	2, 1.336 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.101 mm ⁻¹
F(000)	796
Crystal size	0.40 x 0.35 x 0.30 mm
Diffractometer	Nonius KappaCCD
Theta range for data collection	2.67 to 25.35°
Limiting indices	$-12 \leq h \leq 12$, $-19 \leq k \leq 19$, $-10 \leq l \leq 13$
Reflections collected / unique	20007 / 6614 [R(int) = 0.0353]
Completeness to $\Theta = 25.35$	99.1 %
Absorption correction	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2
Data / restraints / parameters	6614 / 165 / 483
Goodness-of-fit on F^2	1.061
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0428, wR2 = 0.1092
R indices (all data)	R1 = 0.0486, wR2 = 0.1132
Absolute structure parameter	0.2(8); cannot be determined reliabl.
Largest diff. peak and hole	0.390 and -0.432 e. Å ⁻³

Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$). U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
O(1)	549(2)	4419(1)	2609(2)	38(1)
C(1)	1808(2)	4820(2)	3126(2)	31(1)
C(2)	2738(3)	4187(2)	3886(3)	39(1)
C(3)	2898(3)	3612(2)	2821(2)	39(1)
C(4)	2108(2)	4029(1)	1594(2)	30(1)
C(5)	687(3)	3959(2)	1616(3)	33(1)
O(5)	-227(2)	3607(1)	954(2)	43(1)
C(6)	2299(2)	4943(1)	1929(2)	27(1)
C(7)	1416(3)	5493(2)	958(3)	37(1)
C(8)	3706(3)	5235(2)	2152(3)	40(1)
C(9)	2401(3)	3739(2)	395(3)	35(1)
C(10)	1496(2)	5572(2)	3761(2)	33(1)
O(10)	527(2)	5969(1)	3383(2)	54(1)
O(11)	2464(2)	5752(1)	4802(2)	24(1)
C(11)	2223(2)	6406(1)	5523(2)	22(1)
C(12)	1669(2)	6238(1)	6520(2)	24(1)
C(13)	1525(2)	6877(2)	7300(2)	28(1)
C(14)	1921(2)	7653(2)	7066(2)	27(1)
C(15)	2489(2)	7794(1)	6088(2)	23(1)
C(16)	2662(2)	7160(1)	5304(2)	20(1)
O(17)	2911(2)	8530(1)	5808(2)	28(1)
C(17)	2825(3)	9191(2)	6621(3)	33(1)
C(18)	942(3)	6767(2)	8395(3)	48(1)
C(19)	1327(2)	5399(2)	6796(2)	28(1)
O(19)	1630(2)	5105(1)	7849(2)	46(1)
O(20)	646(2)	5003(1)	5794(2)	38(1)
C(20)	337(3)	4172(2)	6003(3)	47(1)
O(1')	7381(2)	6554(1)	7585(2)	25(1)
C(1')	6554(2)	5901(1)	6925(2)	22(1)
C(2')	7501(2)	5203(2)	6886(2)	31(1)
C(3')	7930(3)	4935(2)	8281(2)	35(1)
C(4')	7157(2)	5509(1)	8930(2)	28(1)
C(5')	7754(2)	6327(1)	8828(2)	25(1)
O(5')	8457(2)	6737(1)	9619(2)	36(1)
C(6')	5830(2)	5624(1)	7911(2)	25(1)
C(7')	4996(2)	6290(2)	8273(2)	32(1)
C(8')	5011(3)	4869(2)	7529(3)	37(1)
C(9')	7128(3)	5276(2)	10255(3)	42(1)
C(10')	5730(2)	6154(1)	5661(2)	25(1)
O(10')	5384(2)	5677(1)	4822(2)	54(1)
O(11')	5361(1)	6933(1)	5561(1)	20(1)
C(11')	4587(2)	7187(1)	4369(2)	19(1)
C(12')	5166(2)	7332(1)	3382(2)	25(1)
C(13')	4354(2)	7578(1)	2215(2)	25(1)
C(14')	3022(2)	7687(2)	2084(2)	26(1)
C(15')	2485(2)	7576(2)	3090(2)	27(1)
C(16')	3273(2)	7309(1)	4250(2)	20(1)
O(17')	1211(2)	7706(1)	3056(2)	42(1)
C(17')	284(2)	7761(2)	1841(3)	43(1)
C(18')	4871(3)	7723(2)	1086(2)	37(1)
C(19')	6589(3)	7261(3)	3544(3)	71(1)
O(19')	7136(4)	7933(2)	3223(4)	47(1)
O(20')	7215(3)	6769(2)	4252(4)	35(1)
C(20')	8623(5)	6822(4)	4524(6)	39(1)

Bond lengths [Å]			
O(1)-C(5)	1.374(3)	O(1')-C(5')	1.376(3)
O(1)-C(1)	1.463(3)	O(1')-C(1')	1.460(3)
C(1)-C(10)	1.508(3)	C(1')-C(10')	1.496(3)
C(1)-C(2)	1.528(3)	C(1')-C(2')	1.539(3)
C(1)-C(6)	1.554(3)	C(1')-C(6')	1.556(3)
C(2)-C(3)	1.558(4)	C(2')-C(3')	1.551(4)
C(3)-C(4)	1.552(4)	C(3')-C(4')	1.548(3)
C(4)-C(5)	1.513(3)	C(4')-C(5')	1.513(3)
C(4)-C(9)	1.515(3)	C(4')-C(9')	1.520(3)
C(4)-C(6)	1.561(3)	C(4')-C(6')	1.560(3)
C(5)-O(5)	1.198(3)	C(5')-O(5')	1.198(3)
C(6)-C(8)	1.522(3)	C(6')-C(8')	1.518(3)
C(6)-C(7)	1.525(3)	C(6')-C(7')	1.530(3)
C(10)-O(10)	1.197(3)	C(10')-O(10')	1.198(3)
C(10)-O(11)	1.354(3)	C(10')-O(11')	1.346(3)
O(11)-C(11)	1.408(3)	O(11')-C(11')	1.417(3)
C(11)-C(16)	1.377(3)	C(11')-C(16')	1.376(3)
C(11)-C(12)	1.404(3)	C(11')-C(12')	1.404(3)
C(12)-C(13)	1.399(3)	C(12')-C(13')	1.405(3)
C(12)-C(19)	1.488(3)	C(12')-C(19')	1.472(3)
C(13)-C(14)	1.398(3)	C(13')-C(14')	1.389(3)
C(13)-C(18)	1.505(3)	C(13')-C(18')	1.505(3)
C(14)-C(15)	1.387(3)	C(14')-C(15')	1.386(3)
C(15)-O(17)	1.361(3)	C(15')-O(17')	1.355(3)
C(15)-C(16)	1.404(3)	C(15')-C(16')	1.402(3)
C(16)-C(16')	1.493(3)	O(17')-C(17')	1.439(3)
O(17)-C(17)	1.434(3)	C(19')-O(20')	1.200(4)
C(19)-O(19)	1.222(3)	C(19')-O(19')	1.345(5)
C(19)-O(20)	1.323(3)	O(20')-C(20')	1.442(6)
O(20)-C(20)	1.450(3)		

Bond angles [°]			
C(5)-O(1)-C(1)	106.60(19)	C(5')-O(1')-C(1')	105.68(17)
O(1)-C(1)-C(10)	105.56(19)	O(1')-C(1')-C(10')	112.47(18)
O(1)-C(1)-C(2)	106.80(02)	O(1')-C(1')-C(2')	105.26(18)
C(10)-C(1)-C(2)	120.00(02)	C(10')-C(1')-C(2')	114.00(02)
O(1)-C(1)-C(6)	101.67(18)	O(1')-C(1')-C(6')	102.17(17)
C(10)-C(1)-C(6)	116.80(02)	C(10')-C(1')-C(6')	117.53(19)
C(2)-C(1)-C(6)	104.20(02)	C(2')-C(1')-C(6')	103.96(18)
C(1)-C(2)-C(3)	100.90(02)	C(1')-C(2')-C(3')	102.13(19)
C(4)-C(3)-C(2)	104.20(02)	C(4')-C(3')-C(2')	103.33(19)
C(5)-C(4)-C(9)	115.00(02)	C(5')-C(4')-C(9')	114.40(02)
C(5)-C(4)-C(3)	105.10(02)	C(5')-C(4')-C(3')	103.62(19)
C(9)-C(4)-C(3)	115.70(02)	C(9')-C(4')-C(3')	115.90(02)
C(5)-C(4)-C(6)	97.91(19)	C(5')-C(4')-C(6')	98.63(18)
C(9)-C(4)-C(6)	118.10(02)	C(9')-C(4')-C(6')	118.80(02)
C(3)-C(4)-C(6)	102.68(19)	C(3')-C(4')-C(6')	103.09(19)
O(5)-C(5)-O(1)	121.20(02)	O(5')-C(5')-O(1')	122.00(02)
O(5)-C(5)-C(4)	132.20(02)	O(5')-C(5')-C(4')	130.30(02)
O(1)-C(5)-C(4)	106.60(02)	O(1')-C(5')-C(4')	107.71(19)
C(8)-C(6)-C(7)	108.30(02)	C(8')-C(6')-C(7')	109.99(19)
C(8)-C(6)-C(1)	115.90(02)	C(8')-C(6')-C(1')	113.50(02)
C(7)-C(6)-C(1)	113.30(02)	C(7')-C(6')-C(1')	113.12(19)
C(8)-C(6)-C(4)	114.10(02)	C(8')-C(6')-C(4')	115.90(02)
C(7)-C(6)-C(4)	113.50(02)	C(7')-C(6')-C(4')	111.79(19)
C(1)-C(6)-C(4)	91.30(18)	C(1')-C(6')-C(4')	91.45(17)
O(10)-C(10)-O(11)	124.00(02)	O(10')-C(10')-O(11')	123.20(02)
O(10)-C(10)-C(1)	124.40(02)	O(10')-C(10')-C(1')	121.30(02)
O(11)-C(10)-C(1)	111.54(19)	O(11')-C(10')-C(1')	115.45(19)
C(10)-O(11)-C(11)	116.13(17)	C(10')-O(11')-C(11')	116.42(16)
C(16)-C(11)-C(12)	123.20(02)	C(16')-C(11')-C(12')	122.40(02)
C(16)-C(11)-O(11)	118.74(19)	C(16')-C(11')-O(11')	116.96(18)
C(12)-C(11)-O(11)	117.70(02)	C(12')-C(11')-O(11')	120.56(18)
C(13)-C(12)-C(11)	117.80(02)	C(13')-C(12')-C(11')	118.40(02)
C(13)-C(12)-C(19)	120.70(02)	C(13')-C(12')-C(19')	122.20(02)
C(11)-C(12)-C(19)	121.30(02)	C(11')-C(12')-C(19')	119.50(02)
C(14)-C(13)-C(12)	119.80(02)	C(14')-C(13')-C(12')	119.30(02)
C(14)-C(13)-C(18)	117.80(02)	C(14')-C(13')-C(18')	118.20(02)
C(12)-C(13)-C(18)	122.40(02)	C(12')-C(13')-C(18')	122.50(02)
C(15)-C(14)-C(13)	120.80(02)	C(15')-C(14')-C(13')	121.20(02)
O(17)-C(15)-C(14)	124.20(02)	O(17')-C(15')-C(14')	124.90(02)
O(17)-C(15)-C(16)	115.36(19)	O(17')-C(15')-C(16')	114.90(02)
C(14)-C(15)-C(16)	120.40(02)	C(14')-C(15')-C(16')	120.20(02)
C(11)-C(16)-C(15)	117.90(02)	C(11')-C(16')-C(15')	118.40(02)
C(11)-C(16)-C(16')	121.50(02)	C(11')-C(16')-C(16)	122.34(19)
C(15)-C(16)-C(16')	120.60(02)	C(15')-C(16')-C(16)	119.30(19)
C(15)-O(17)-C(17)	117.67(18)	C(15')-O(17')-C(17')	117.53(19)
O(19)-C(19)-O(20)	123.00(02)	O(20')-C(19')-O(19')	122.20(03)
O(19)-C(19)-C(12)	123.40(02)	O(20')-C(19')-C(12')	120.30(03)
O(20)-C(19)-C(12)	113.60(02)	O(19')-C(19')-C(12')	113.50(03)
C(19)-O(20)-C(20)	115.80(02)	C(19')-O(20')-C(20')	117.10(04)

Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$). The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2[(h a^*)^2 U_{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U_{12}]$

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
O(1)	40(1)	46(1)	29(1)	-10(1)	13(1)	-1(1)
C(1)	33(1)	35(1)	21(1)	-8(1)	-1(1)	6(1)
C(2)	57(2)	31(1)	26(2)	-5(1)	5(1)	12(1)
C(3)	52(2)	33(1)	26(2)	-7(1)	3(1)	10(1)
C(4)	34(1)	29(1)	25(1)	-9(1)	5(1)	1(1)
C(5)	40(2)	33(1)	27(2)	-3(1)	9(1)	-3(1)
O(5)	42(1)	49(1)	38(1)	-9(1)	12(1)	-14(1)
C(6)	27(1)	31(1)	20(1)	-8(1)	0(1)	2(1)
C(7)	46(2)	36(1)	25(2)	-7(1)	4(1)	5(1)
C(8)	35(1)	42(2)	38(2)	-15(1)	4(1)	-3(1)
C(9)	38(1)	37(1)	30(2)	-17(1)	9(1)	-4(1)
C(10)	38(2)	39(2)	18(1)	-3(1)	2(1)	14(1)
O(10)	50(1)	66(1)	32(1)	-19(1)	-14(1)	34(1)
O(11)	25(1)	29(1)	19(1)	-1(1)	6(1)	8(1)
C(11)	18(1)	31(1)	15(1)	-1(1)	3(1)	6(1)
C(12)	20(1)	33(1)	19(1)	-2(1)	6(1)	-2(1)
C(13)	26(1)	37(1)	24(1)	-5(1)	11(1)	-2(1)
C(14)	23(1)	36(1)	22(1)	-6(1)	9(1)	3(1)
C(15)	16(1)	30(1)	22(1)	-2(1)	2(1)	3(1)
C(16)	14(1)	32(1)	14(1)	3(1)	1(1)	6(1)
O(17)	32(1)	29(1)	26(1)	-3(1)	12(1)	0(1)
C(17)	37(1)	33(1)	34(2)	-8(1)	15(1)	-3(1)
C(18)	68(2)	43(2)	47(2)	-8(1)	42(2)	-8(2)
C(19)	28(1)	35(1)	26(2)	-3(1)	13(1)	1(1)
O(19)	69(1)	38(1)	36(1)	-2(1)	24(1)	-9(1)
O(20)	34(1)	37(1)	40(1)	-8(1)	7(1)	-6(1)
C(20)	45(2)	35(2)	62(2)	-8(1)	17(2)	-9(1)
O(1')	23(1)	29(1)	20(1)	2(1)	-2(1)	-4(1)
C(1')	19(1)	23(1)	22(1)	0(1)	0(1)	-1(1)
C(2')	28(1)	33(1)	29(2)	-2(1)	3(1)	9(1)
C(3')	32(1)	36(1)	32(2)	4(1)	1(1)	12(1)
C(4')	26(1)	32(1)	23(1)	5(1)	1(1)	3(1)
C(5')	18(1)	34(1)	22(1)	1(1)	2(1)	5(1)
O(5')	29(1)	46(1)	28(1)	-7(1)	-2(1)	-4(1)
C(6')	23(1)	30(1)	22(1)	6(1)	4(1)	1(1)
C(7')	24(1)	46(2)	25(1)	3(1)	4(1)	8(1)
C(8')	34(1)	35(1)	41(2)	7(1)	8(1)	-8(1)
C(9')	40(2)	52(2)	30(2)	14(1)	5(1)	1(1)
C(10')	27(1)	20(1)	26(1)	1(1)	3(1)	-1(1)
O(10')	80(2)	24(1)	35(1)	-6(1)	-25(1)	8(1)
O(11')	18(1)	23(1)	17(1)	-1(1)	2(1)	3(1)
C(11')	23(1)	17(1)	15(1)	-1(1)	1(1)	1(1)
C(12')	27(1)	27(1)	22(1)	-2(1)	9(1)	-3(1)
C(13')	34(1)	20(1)	21(1)	-1(1)	10(1)	-2(1)
C(14')	32(1)	30(1)	14(1)	3(1)	4(1)	8(1)
C(15')	27(1)	33(1)	20(1)	0(1)	2(1)	12(1)
C(16')	24(1)	22(1)	14(1)	-1(1)	4(1)	6(1)
O(17')	28(1)	77(1)	18(1)	7(1)	3(1)	27(1)
C(17')	28(1)	71(2)	24(2)	4(1)	-1(1)	16(1)
C(18')	48(2)	44(2)	25(2)	4(1)	18(1)	1(1)
C(19')	31(2)	160(4)	25(2)	26(2)	16(1)	-9(2)

8 Literaturverzeichnis

- [1] R. Noyori, *Chem. Soc. Rev.* **1989**, *18*, 187-208.
- [2] a) R. Noyori, I. Tomino, Y. Tanimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3129-3131; b) R. Noyori, I. Tomino, M. Yamada, M. Nishizawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6717-6725.
- [3] a) A. Miyashita, H. Takaya, T. Souchi, R. Noyori, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 1245-1253; b) H. Takaya, K. Mashima, K. Koyano, M. Yagi, H. Kumobayashi, T. Taketomi, S. Akutagawa, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 629-635.
- [4] Übersichtsartikel zur Biosynthese und zum natürlichen Auftreten phenol-gekuppelter Naturstoffe: a) G. Bringmann, C. Günther, M. Ochse, O. Schupp, S. Tasler, *Biaryls in Nature: A Multi-Faceted Class of Stereochemically, Biosynthetically, and Pharmacologically Intriguing Secondary Metabolites in Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Hrsg.: W. Herz, H. Falk, G. W. Kirby, R. E. Moore), Vol. 82, Springer, New York, **2001**, S. 1-249; b) G. M. Keserü, M. Nógrádi, *Natural Products by Oxidative Phenolic Coupling – Phytochemistry, Biosynthesis and Synthesis in Studies in Natural Products Chemistry* (Hrsg.: Atta-ur-Rahman), Vol. 20, Elsevier, Amsterdam, **1998**, S. 263-323; c) D. A. Whiting, *Oxidative Coupling of Phenols and Phenol Ethers in Comprehensive Organic Synthesis, Vol. III* (Hrsg.: B. M. Trost, I. Fleming), Pergamon, Oxford, **1991**, S. 659-701.
- [5] a) L. Marchlewski, *J. Prakt. Chem.* **1899**, *60*, 84-91; b) R. Adams, T. A. Geissman, J. D. Edwards, *Chem. Rev.* **1960**, *60*, 555-574; c) Z. D. Kai, S. Y. Kang, M. J. Ke, Z. Jin, L. Huang, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 168-169; d) L. Huang, Y.-K. Si, G. Snatzke, D.-K. Zheng, J. Zhou, *Collection Czechoslovak Chem. Commun.* **1988**, *53*, 2664-2666; e) Q. B. Cass, A. L. Bassi, S. A. Matlin, *Chirality* **1999**, *11*, 46-49.
- [6] a) J. D. Bu'Lock, J. R. Smith, *J. Chem. Soc (C)* **1968**, 1941-1945; b) I. Yosioka, K. Morimoto, K. Murata, H. Yamauchi, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1971**, *19*, 2420-2426; c) J. P. Devlin, M. M. Mahandru, W. D. Ollis, C. Smith, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1986**, 1491-1494; d) J. Santesson, *Acta Chem. Scand.* **1970**, *24*, 3331-3336; e) G. Billen, U. Karl, T. Scholl, K. D. Stroeck, W. Steglich, *Stereochemical Studies on Pre-Anthraquinones and Dimeric Anthraquinone Pigments in Natural Products Chemistry III* (Hrsg.: Atta-ur-Rahman, P. W. LeQuesne), Springer, Berlin, **1988**, S. 305-315.

- [7] a) K. Nozawa, H. Seyea, S. Nakjima, S.-i. Udagawa, K.-i. Kawai, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, 1735-1738; b) K.-i. Kawai, M. Shiro, K. Nozawa, *J. Chem. Research (S)* **1995**, 92-93.
- [8] a) G. Bringmann, F. Pokorny, *The Naphthylisoquinoline Alkaloids in The Alkaloids* (Hrsg.: G. A. Cordell), Vol. 46, Academic Press, London, **1995**, S. 127; b) G. Bringmann, G. François, L. Aké Assi, J. Schlauer, *Chimia* **1998**, 52, 18-28; c) G. Bringmann, *The Naphthyl Isoquinoline Alkaloids in The Alkaloids* (Hrsg.: A. Brossi), Vol. 29, Academic Press, London, **1986**, S. 127.
- [9] H. R. Perkins, *Pharmac. Ther.* **1982**, 16, 181-197.
- [10] G. Bringmann, C. Günther, E.-M. Peters, K. Peters, *Tetrahedron* **2001**, 57, 1253-1259.
- [11] a) M. Gill, W. Steglich, *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.* **1987**, 51, 1-317; b) S. Kitanaka, M. Takido, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 2588-2590; c) C. Elsworth, M. Gill, A. Giménez, N. M. Milanovic, E. Raudies, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 119-125; d) M. Gill, A. Giménez, A. G. Jhingran, N. M. Milanovic, A. R. Palfreyman, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3431-3436.
- [12] G. Büchi, D. H. Klaubert, R. C. Shank, S. M. Weinreb, G. N. Wogan, *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 1143-1147; b) J. A. Laakso, E. D. Narske, J. B. Gloer, D. T. Wicklow, P. F. Dowd, *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 128-133.
- [13] a) V. R. Shah, J. L. Bose, R. C. Shah, *J. Chem. Soc.* **1960**, 677-678; b) P. Venturella, A. Bellino, F. Piozzi, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 15, 979-981; c) R. D. Lapper, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 15, 4293-4296; d) B. A. Nagasampagi, M. C. Siriraman, L. Yankov, S. Dev, *Phytochem. Rep.* **1975**, 14, 1673.
- [14] a) D. R. Armstrong, C. Cameron, D. C. Nonhebel, P. G. Perkins, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1983**, 563-569; b) D. R. Armstrong, C. Cameron, D. C. Nonhebel, P. G. Perkins, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1983**, 569-575; c) D. R. Armstrong, C. Cameron, D. C. Nonhebel, P. G. Perkins, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1983**, 575-581; d) D. R. Armstrong, C. Cameron, D. C. Nonhebel, P. G. Perkins, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1983**, 581-587; e) D. R. Armstrong, C. Cameron, D. C. Nonhebel, P. G. Perkins, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1983**, 587-593.
- [15] P. D. McDonald, G. A. Hamilton, *Mechanisms of Phenolic Oxidative Coupling Reactions in Oxidation in Organic Chemistry* (Hrsg.: W. S. Trahanovsky), Academic Press, London, **1973**, S. 97-134.
- [16] E. L. Eliel, S. H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, Wiley, New York, **1994**, S. 1119-1155.

- [17] a) G. Helmchen, *Stereoselective Synthesis in Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl)* (Hrsg.: G. Helmchen, R. W. Hoffmann, J. Mulzer, E. Schaumann), Vol. E21a, Thieme, Stuttgart, **1995**, S. 1; b) V. Prelog, G. Helmchen, *Angew. Chem.* **1982**, 94, 614-630.
- [18] a) J. Kenner, W. V. Stubbings, *J. Chem. Soc.* **1921**, 593-599; b) F. Kaufler, *Liebigs Ann.* **1901**, 351-356; c) F. Kaufler, *Chem. Ber.* **1907**, 40, 3250-3253; d) F. Kaufler, H. Borel, *Chem. Ber.* **1907**, 40, 3253-3257; e) G. H. Christie, J. Kenner, *J. Chem. Soc.* **1922**, 121, 614.
- [19] a) R. Pummerer, H. Puttfarcken, P. Schopflocher, *Chem. Ber.* **1925**, 58, 1808-1810; b) D. H. R. Barton, A. M. Deflorin, O. E. Edwards, *J. Chem. Soc.* **1956**, 530-534.
- [20] D. H. R. Barton, T. Cohen, *Some Biogenetic Aspects of Phenol Oxidation in Festschrift Prof. A. Stoll zum siebzigsten Geburtstag*, Birkhäuser, Basel, **1957**, S. 117-143.
- [21] B. K. Hubbard, C. T. Walsh, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 752-789 und zitierte Literatur.
- [22] a) T. Amann, M. H. Zenk, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 3675-3678; b) R. Gerardy, M. H. Zenk, *Phytochemistry* **1993**, 32, 79-86; c) T. A. P. H. Roos, H. Huh, M. H. Zenk, *Heterocycles* **1995**, 40, 425-440.
- [23] a) M. H. Zenk, R. Gerardy, R. Stadler, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1989**, 1725-1727; b) R. Stadler, M. H. Zenk, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 823-831.
- [24] a) U. H. Maier, M. H. Zenk, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7357-7360; b) E. McDonald, R. Ramage, R. N. Woodhouse, E. W. Underhill, L. R. Wetter, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 2979-2987.
- [25] a) S. Sagner, Z.-W. Shen, B. Deus-Neumann, M. H. Zenk, *Phytochemistry* **1998**, 47, 375-387; b) L. Nezbedová, M. Hesse, K. Drandarov, C. Werner, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 7859-7862; c) L. Nezbedová, M. Hesse, K. Drandarov, L. Bigler, C. Werner, *Planta* **2001**, 213, 411-417.
- [26] J. Schlauer, M. Rückert, B. Wiesen, M. Herderich, L. Ake Assi, R. D. Haller, S. Bär, K.-U. Fröhlich, G. Bringmann, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 350, 87-94.
- [27] Übersichtsartikel zu Lignanen und Ligninen: a) N. G. Lewis, L. B. Davin, *Lignans: Biosynthesis and Function in Comprehensive Natural Product Chemistry* (Hrsg.: D. H. R. Barton, K. Nakanishi), Vol. 1, Pergamon, London, **1999**, S. 639-712; b) N. G. Lewis, L. B. Davin, S. Sarkanen, *The Nature and Function of Lignins in Comprehensive Natural Product Chemistry* (Hrsg.: D. H. R. Barton, K. Nakanishi), Vol. 2, Pergamon, London, **1999**, S. 617-745.

- [28] L. B. Davin, N. G. Lewis, in *Recent Advances in Phytochemistry* (Hrsg.: H. A. Stafford, R. K. Ibrahim), Vol. 26, Plenum, New York, **1992**, S. 325.
- [29] K. Freudenberg, C.-L. Chen, J. M. Harkin, H. Nimz, H. Renner, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1965**, 224-225.
- [30] a) K. Freudenberg, *Science* **1965**, 148, 595-600; b) K. Freudenberg, in *Constitution and Biosynthesis of Lignin* (Hrsg.: K. Freudenberg, A. C. Neish), Springer, New York, **1968**, S. 47.
- [31] N. G. Lewis, L. B. Davin, in *Plant Polyphenols* (Hrsg.: R. W. Hemingway, P. E. Laks), Plenum, New York, **1992**, S. 73.
- [32] a) S. Ozawa, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Phytochemistry* **1993**, 32, 643-652; b) L. B. Davin, H.-B. Wang, A. Crowell, D. L. Bedgar, D. M. Martin, S. Sarkanen, N. G. Lewis, *Science* **1997**, 275, 362-366; c) D. R. Gang, M. A. Costa, M. Fujita, A. T. Dinkova-Kostova, H.-B. Wang, V. Burlat, W. Martin, S. Sarkanen, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 143-151; d) S. Halls, N. G. Lewis, *Biochemistry* **2002**, 41, 9455-9461.
- [33] a) Z.-Q. Xia, M. A. Costa, J. Proctor, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Phytochemistry* **2000**, 55, 537-549; b) C.-Z. Wang, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Chem. Commun.* **2001**, 113-114.
- [34] a) O. T. Schmidt, W. Mayer, *Angew. Chem.* **1956**, 68, 103-105; b) R. K. Gupta, S. M. K. Al-Shafi, K. Layden, E. Haslam, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, 2525-2534; c) E. A. Haddock, R. K. Gupta, S. M. K. Al-Shafi, K. Layden, E. Haslam, D. Magnolato, *Phytochemistry* **1982**, 21, 1049-1062; d) R. F. Helm, L. Zhentian, T. Ranatunga, J. Jervis, T. Elder, in *Plant Polyphenols 2. Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology* (Hrsg.: G. G. Gross, R. W. Hemingway, T. Higuchi), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **1999**, S. 83.
- [35] R. Niemetz, G. Schilling, G. G. Gross, *Chem. Commun.* **2001**, 35-36.
- [36] a) I. Fujii, H. Iijima, S. Tsukita, Y. Ebizuka, U. Sankawa, *J. Biochem.* **1987**, 101, 11-18; b) I. Fujii, Z. G. Chen, Y. Ebizuka, U. Sankawa, *Biochem. Int.* **1991**, 25, 1043-1049; c) I. Fujii, Y. Ebizuka, U. Sankawa, *J. Biochem.* **1988**, 103, 878-883; d) Z. G. Chen, I. Fujii, Y. Ebizuka, U. Sankawa, *Phytochemistry* **1995**, 38, 373-380; e) Z. G. Chen, I. Fujii, Y. Ebizuka, U. Sankawa, *Arch. Microbiol.* **1992**, 158, 29-34.
- [37] K.-x. Huang, I. Fujii, Y. Ebizuka, K. Gomi, U. Sankawa, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 21495-21502.

- [38] a) M. Müller, K. Lamottke, E. Löw, E. Magor-Veenstra, W. Steglich, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **2000**, 2483-2489; b) M. Müller, *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität München **1995**.
- [39] a) M. Gill, *Nat. Prod. Rep.* **1994**, *11*, 67; b) M. Gill, *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13*, 513-528; c) M. Gill, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 301-317.
- [40] S. Kitanaka, M. Takido, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 2588-2590.
- [41] S. Kitanaka, M. Takido, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1292-1294.
- [42] a) C. P. Gorst-Allman, B. A. M. Rudd, C. Chang, H. G. Floss, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 455-456; b) D. Hopwood, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2465-2481.
- [43] Zur Problematik der Konstitution von Actinorhodin siehe: Ref [4a], S. 56-57 und zitierte Literatur.
- [44] A. M. Clark, C. D. Hufford, R. K. Puri, J. D. McChesney, *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, *47*, 540-543.
- [45] A. M. Mayer, R. C. Staples, *Phytochemistry* **2002**, *60*, 551-565.
- [46] B. Reinhammer, in *Copper Proteins and Copper Enzymes* (Hrsg.: R. Lontie), Vol. 3, **1984**, S. 1.
- [47] a) A. Henriksen, K. G. Welinder, M. Gajhede, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2241-2248; b) K. G. Welinder, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, *2*, 388-394.
- [48] T. L. Poulos, S. T. Freer, R. A. Alden, S. L. Edwards, U. Skogland, K. Takio, B. Eriksson, N.-h. Xuong, T. Yonetani, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 575-580.
- [49] M. Gajhede, D. J. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith, T. L. Poulos, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 1032-1038.
- [50] P. R. Ortiz de Montellano, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1992**, *32*, 89-99.
- [51] a) G. Bringmann, R. Walter, R. Weirich, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1006-1019; b) J. Hassan, M. Sévignon, C. Gozzi, E. Schulz, M. Lemaire, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1359-1469.
- [52] J. Iqbal, B. Bhati, N. K. Nayyar, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 519-564.
- [53] D. A. Young, E. Young, D. G. Roux, E. V. Brandt, D. Ferreira, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, 2345-2351.
- [54] G. Bringmann, S. Tasler, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 331-343 und zitierte Literatur.
- [55] H. L. Holland, *Organic Synthesis with Oxidative Enzymes*, Verlag Chemie, Weinheim, **1992**, S. 341-364.
- [56] a) F. Ullmann, J. Bielecki, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 2176-2184; b) P. E. Fanta, *Synthesis* **1974**, 9-21.

- [57] S. Gauthier, J. M. J. Frechet, *Synthesis* **1987**, 383-386.
- [58] M. A. Rizzacasa, M. V. Sargent, *Aust. J. Chem.* **1988**, *41*, 1087-1097.
- [59] M. F. Semmelhack, P. Helquist, L. D. Jones, L. Keller, L. Mendelson, L. Speltz Ryono, J. Gorzynski Smith, R. D. Stauffer, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6460-6471.
- [60] S. P. Stanforth, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 263-303.
- [61] D. A. Widdowson, Y.-Z. Zhang, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 2111-2116.
- [62] M. S. Kharasch, E. K. Fields, *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 2316-2318.
- [63] K. Tamao, K. Sumitani, M. Kumada, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4373-4374.
- [64] K. J. P. Corriu, J. P. Masse, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 144-145.
- [65] K. Tamao, S. Kodama, I. Nakajima, M. Kumada, A. Minato, K. Suzuki, *Tetrahedron* **1982**, *38*, 3347-3354.
- [66] a) E.-I. Negishi, A. O. King, N. Okukado, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1821-; b) E.-I. Negishi, *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*, 340-348.
- [67] N. Miyaoura, T. Yanagi, A. Suzuki, *Synth. Commun.* **1981**, *11*, 513-519.
- [68] I. P. Beletskaya, *J. Organomet. Chem.* **1983**, *250*, 551-564.
- [69] D. Milstein, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4992-4998.
- [70] G. Bringmann, R. Götz, P. A. Keller, R. Walter, M. R. Boyd, F. Lang, A. Garcia, J. J. Walsh, I. Tellitu, K. V. Bhaskar, T. R. Kelly, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1090-1097.
- [71] für weitere Anwendungen der Suzuki- und Stille-Kupplung in der Synthese von Naphthylisochinolinalkaloiden siehe: a) G. Bringmann, R. Götz, S. Harmsen, J. Holenz, R. Walter, *Liebigs Ann.* **1996**, 2045-2058; b) P. D. Hobbs, V. Upender, J. Lu, D. J. Pollart, D. W. Thomas, M. I. Dawson, *Chem. Commun.* **1996**, 923-924; c) G. Bringmann, C. Günther, *Synlett* **1999**, 216-218; d) T. R. Hoye, M. Chen, B. Hoang, L. Mi, O. P. Priest, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7184-7201; e) C. B. de Koning, J. P. Michael, W. A. L. van Otterlo, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3037-3040; f) C. B. de Koning, J. P. Michael, W. A. L. van Otterlo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 799-811; g) M. A. Rizzacasa, *Total Synthesis of Naphthylisoquinoline Alkaloids in Studies in Natural Products Chemistry* (Hrsg.: Atta-ur-Rahman), Vol. 20, Elsevier, Amsterdam, **1998**, S. 407-455.
- [72] a) A. I. Meyers, E. D. Mihelich, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 7383-7385; b) A. I. Meyers, R. Gabel, E. D. Mihelich, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1372-1379; c) T. G. Gant, A. I. Meyers, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2297-2360.
- [73] a) A. I. Meyers, K. A. Lutomski, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 879-881; b) A. I. Meyers, R. J. Himmelsbach, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 682-685.

- [74] H. Moorlag, A. I. Meyers, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 6989-6992.
- [75] T. D. Nelson, A. I. Meyers, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 3061-3062.
- [76] G.-Q. Lin, M. Zhong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3015-3018.
- [77] a) M. Smrčina, M. Lorenc, V. Hanuš, P. Sedmera, P. Kočovský, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1917-1920; b) M. Smrčina, J. Poláková, S. Vyskočil, P. Kočovský, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 4534-4538.
- [78] M. Nakajima, I. Miyoshi, K. Kanayama, S.-i. Hashimoto, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 2264-2271.
- [79] a) C.-Y. Chu, D.-R. Hwang, S.-K. Wang, B.-J. Uang, *Chem. Commun.* **2001**, 980-981; b) C.-Y. Chu, B.-J. Uang, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 53-55; c) Z. Luo, Q. Liu, L. Gong, X. Cui, A. Mi, Y. Jiang, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4714-4717; d) N. B. Barhate, C.-T. Chen, *Org. Lett.* **2002**, 4, 2529-2532.
- [80] M. Takemoto, Y. Suzuki, K. Tanaka, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 8499-8501.
- [81] B. Kramer, A. Averhoff, S. R. Waldvogel, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 3103-3104.
- [82] K. Khanbabaee, T. van Ree, *Synthesis* **2001**, 1585-1610.
- [83] a) K. S. Feldman, S. M. Ensel, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 3357-3366; b) S. Quideau, K. S. Feldman, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 475-503.
- [84] D. Dai, O. R. Martin, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7628-7635.
- [85] B. H. Lipshutz, F. Kayser, Z.-P. Liu, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1962-1964.
- [86] G.-Q. Lin, M. Zhong, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 1369-1372.
- [87] R. V. Kyasnoor, M. V. Sargent, *Chem. Commun.* **1998**, 2713-2714.
- [88] a) G. Bringmann, M. Breuning, S. Tasler, *Synthesis* **1999**, 525-558; b) G. Bringmann, D. Menche, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 615-624.
- [89] D. Drochner, *Diplomarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn **1999**.
- [90] a) K. B. Raper, C. Thom, *A Manual of the Penicillia*, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, **1949**; b) J. Reiß, *Schimmelpilze*, Springer, Berlin, **1995**.
- [91] A. Zeeck, P. Ruß, H. Laatsch, W. Loeffler, H. Wehrle, H. Zähler, H. Holst, *Chem. Ber.* **1979**, 112, 957-978.
- [92] Y. Jun, Q. Xiulan, S. Gang, Y. Xinsheng, *Chin. J. Med. Chem.* **1998**, 8, 203-204.
- [93] W. Vilegas, A. L. Dokkeddal, S. Piacente, L. Rastrelli, C. Pizza, *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 746-749.
- [94] H. Yada, H. Sate, H. Toshima, M. Dewra, A. Ichihara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, 65, 484-486.

- [95] M. Yamaguchi, T. Okuma, S. Nakamura, T. Minami, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 183-185.
- [96] C. A. Broka, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 859-862.
- [97] a) V. H. Deshpande, R. A. Khan, B. Rai, N. R. Ayyangar, *Synth. Commun.* **1993**, 23, 2337-2345; b) V. H. Deshpande, B. Rai, R. A. Khan, *Tetrahedron* **1996**, 52, 7159-7162.
- [98] a) S. Kamila, C. Mukherjee, A. De, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 5955-5957; b) S. Kamila, C. Mukherjee, S. S. Mondal, A. De, *Tetrahedron* **2003**, 59, 1339-1348.
- [99] Für eine Übersicht über die spektroskopischen und biologischen Eigenschaften dieser Mycotoxine siehe: R. J. Cole, R. H. Cox, *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, Academic Press, New York, **1981**.
- [100] F. Blank, A. S. Ng, G. Just, *Can. J. Chem.* **1966**, 44, 2873-2879.
- [101] R. C. Durley, J. MacMillan, T. J. Simpson, A. Glen, W. B. Turner, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1975**, 163-167.
- [102] M. E. Stack, R. M. Eppley, P. A. Dreifuss, A. E. Pohland, *Appl. Environ. Microbiol.* **1977**, 33, 351-355.
- [103] M. E. Stack, P. B. Mislivec, *Appl. Environ. Microbiol.* **1978**, 36, 552-554.
- [104] F. Blank, W. C. Day, G. Just, *J. Invest. Dermatol.* **1963**, 40, 133-137.
- [105] Y. Ito, K. Kawai, Y. Nozawa, *J. Biochem.* **1973**, 74, 805-810.
- [106] A. S. Ng, G. Just, F. Blank, *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 1223-1227.
- [107] J. G. Wirth, T. E. Beesley, S. R. Anand, *Phytochemistry* **1964**, 4, 505-512.
- [108] K. Röser, *Dissertation*, Technische Universität Berlin **1980**.
- [109] Für andere Synthesen von *semi*-Xanthomegnin **125** siehe [97a] sowie: A. S. Cotterill, C. D. Donner, M. Gill, J. M. White, *Aust. J. Chem.* **2003**, 56, 49-57.
- [110] Teile der hier aufgeführten Arbeiten wurden publiziert in: D. Drochner, M. Müller, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 211-215.
- [111] K. D. Stroeck, *Dissertation*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn **1995**.
- [112] a) F. J. Leeper, J. Staunton, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 406-407; b) G. E. Evans, F. J. Leeper, J. A. Murphy, J. Staunton, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 205-206; c) J. H. Dodd, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3593-3596; d) J. H. Dodd, R. S. Garigipati, S. M. Weinreb, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 4045-4049; e) T. A. Carpenter, G. E. Evans, F. J. Leeper, J. Staunton, M. R. Wilkinson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 1043-1051; f) F. J. Leeper, J. Staunton, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 1053-1059; g) M. J. Chapeldaine, M. Hulce, *Tandem Vicinal Difunctionalization in Org. React.*, Vol. 38, **1990**, S. 225-290; h) T. Nishizuka, S.

- Hirosawa, S. Kondo, D. Ikeda, T. Takeuchi, *J. Antibiotics* **1997**, *50*, 755-764; i) E. V. Gorobets, M. S. Miftakhov, F. A. Valeev, *Russ. Chem. Rev.* **2000**, *69*, 1001-1019; j) K. Tatsua, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 143-159
- [113] J. Chiarello, M. M. Joullié, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 41-48.
- [114] a) J. Santesson, *Acta Chem. Scand.* **1970**, *24*, 3373-3378; b) M. V. Sargent, P. Vogel, J. A. Ellix, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1975**, 1986-1990.
- [115] a) T. Takahashi, K. Kasuga, J. Tsuji, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 4917-4920; b) T. Sala, M. V. Sargent, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1981**, 855-869.
- [116] G. Billen, *Dissertation*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn **1990**.
- [117] P.-F. Deschenaux, T. Kallimopoulos, H. Stoeckli-Evans, A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 731-737.
- [118] H. Tabuchi, T. Hamamoto, S. Miki, T. Tejima, A. Ichihara, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4749-4759.
- [119] M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, M. Müller, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4476-4478.
- [120] U. Karl, *Dissertation*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn **1988**.
- [121] R. G. F. Giles, M. V. Sargent, *Aust. J. Chem.* **1986**, *39*, 2177-2181.
- [122] F. M. Hauser, P. J. F. Gauuan, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 671-672.
- [123] M. R. Parthasarathy, S. Gupta, *Ind. J. Chem.* **1984**, *23B*, 227-230.
- [124] J. D. Edwards, J. L. Cashaw, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 6141-6143.
- [125] a) E. Keinan, Y. Mazur, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1020-1022; b) T. C. Jemphy, L. L. Miller, Y. Mazur, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 749-751.
- [126] H.-Y. Li, T. Nehira, M. Hagiwara, N. Harada, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7222-7227.
- [127] a) D. Kappes, H. Gerlach, *Synth. Commun.* **1990**, *20*, 581-587; b) R. Zehnter, H. Gerlach, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 2779-2786.
- [128] Teile der hier aufgeführten Arbeiten wurden publiziert in: D. Drochner, W. Hüttel, M. Nieger, M. Müller, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 961-963.
- [129] a) A. Varvoglis, *Hypervalent Iodine in Organic Synthesis*, Academic Press, San Diego, **1997**; b) T. Wirth, U. H. Hirt, *Synthesis* **1999**, 1271-1287.
- [130] Für eine Übersicht über den Mechanismus von Zwei-Elektronen-Oxidation mit hypervalenten Iodverbindungen siehe: A. Pelter, R. S. Ward, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 273-282.
- [131] J. E. Marsh, *J. Chem. Soc.* **1927**, 3164.
- [132] F. Effenberger, *Chem. unserer Zeit* **1979**, *13*, 87-94.

- [133] a) S. Kajigaeshi, T. Kakinami, H. Yamasaki, S. Fujisaki, M. Kondo, T. Okamoto, *Chem. Lett.* **1987**, 2109-2112; b) H. Tsujimori, M. Bando, K. Mori, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 297-302.
- [134] R. C. Fuson, E. A. Cleveland, *Org. Synth. Coll. Vol. III*, **1955**, 339.
- [135] B. M. Trost, *Science* **1991**, 254, 1471-1477.
- [136] S. N. Eagle, M. Gill, S. Saubern, J. Yu, *Nat. Prod. Lett.* **1993**, 2, 151-157.
- [137] E. Tobler, M. Lämmerhofer, G. Mancini, W. Lindner, *Chirality* **2001**, 13, 641-647.
- [138] a) G. Bringmann, S. Harmsen, J. Holenz, T. Geuder, R. Götz, P. A. Keller, R. Walter, Y. F. Hallock, J. H. Cardelina II, M. R. Boyd, *Tetrahedron* **1994**, 50, 9643-9648; b) G. Bringmann, W. Saeb, J. Kraus, R. Brun, G. François, *Tetrahedron* **2000**, 56, 3523-3531; c) G. Bringmann, W. Saeb, J. Mies, K. Messer, M. Wohlfarth, R. Brun, *Synthesis* **2000**, 1843-1847.
- [139] a) Y. Kita, T. Takada, M. Ibaraki, M. Gyoten, S. Mihara, S. Fujita, H. Tohma, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 223-227; b) Y. Kita, T. Takada, M. Gyoten, H. Tohma, M. H. Zenk, J. Eichhorn, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 5857-5864; c) Y. Kita, M. Arisawa, M. Gyoten, M. Nakajima, R. Hamada, H. Tohma, T. Takada, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 6625-6633; d) T. Takada, M. Arisawa, M. Gyoten, R. Hamada, H. Tohma, Y. Kita, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7698-7706; e) M. Arisawa, S. Utsumi, M. Nakajima, N. G. Ramesh, H. Tohma, Y. Kita, *Chem. Commun.* **1999**, 469-470; f) H. Tohma, H. Morioka, S. Takizawa, M. Arisawa, Y. Kita, *Tetrahedron* **2001**, 57, 345-352; g) H. Hamamoto, G. Anilkumar, H. Tohma, Y. Kita, *Chem. Commun.* **2002**, 450-451; h) H. Hamamoto, G. Anilkumar, H. Tohma, Y. Kita, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 5377-5383.
- [140] N. J. P. Broom, P. G. Sammes, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 162-163.
- [141] R. P. Hatch, J. Shringarpure, S. M. Weinreb, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 4172-4177.
- [142] A. P. J. Trinci, *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **1972**, 58, 467-473.
- [143] P. R. Burkholder, E. W. Sinnott, *Am. J. Bot.* **1945**, 32, 424-431.
- [144] a) K. C. Marshall, M. Alexander, *J. Bacteriol.* **1960**, 80, 412-416; b) S. J. Pirt, *Proc. R. Soc.* **1966**, B166, 369-373.
- [145] a) A. P. J. Trinci, *Arch. Mikrobiol.* **1970**, 73, 353-367; b) J. C. Galbraith, J. E. Smith, *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **1979**, 52, 237-246.
- [146] D. S. Clark, *Can. J. Microbiol.* **1962**, 8, 126-133.
- [147] a) H. Elmayergi, J. M. Scharer, M. Moo-Young, *Biotechnol. Bioeng.* **1973**, 15, 845-859; b) B. Metz, N. W. F. Kossen, *Biotechnol. Bioeng.* **1977**, 19, 781-799; c) A. P. J.

- Trinci, *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **1983**, 58, 467-473; d) G. Hobbs, C. M. Frazer, D. C. J. Gardner, J. A. Cullum, S. G. Oliver, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989**, 31, 272-277.
- [148] P. Jones, D. Moore, A. P. J. Trinci, *J. Gen. Microbiol.* **1988**, 134, 235-240.
- [149] T. J. Simpson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 592-595.
- [150] a) G. Just, W. C. Day, F. Blank, *Can. J. Chem.* **1963**, 41, 74-79; b) A. S. Ng, G. Just, F. Blank, *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 1223-1227.
- [151] G. Höfle, K. Röser, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1978**, 611-612.
- [152] V. L. Himes, A. D. Mighell, S. W. Page, M. E. Stack, *Acta. Cryst.* **1981**, B37, 1932-1935.
- [153] S. Bode, *Diplomarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, in Vorbereitung.
- [154] a) W. Hüttel, *Diplomarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn **2001**; b) W. Hüttel, *Dissertation*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, in Vorbereitung.
- [155] G. Snatzke, *Circular Dichroism: An Introduction*, in *Circular Dichroism* (Hrsg.: K. Nakanishi, N. Berova, R. W. Woody), VCH, Weinheim, New York, **1994**, S. 1-38.
- [156] N. Harada, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 3989-3991.
- [157] K. Nakanishi, N. Berova, *The Exciton Chirality Method*, in *Circular Dichroism* (Hrsg. K. Nakanishi, N. Berova, R. W. Woody), VCH, Weinheim, New York, **1994**, S. 361-398.
- [158] a) A. F. Drake, J. M. Gould, S. F. Mason, *J. Chromatogr.* **1980**, 202, 239-245; b) P. Salvadori, C. Bertucci, C. Rosini, *Chirality* **1999**, 11, 376-385; c) A. Mannschreck, *Trends Anal. Chem.* **1993**, 12, 220-225.
- [159] K. Mikami, R. Angelaud, K. Ding, A. Ishii, A. Tanaka, N. Sawada, K. Kudo, M. Senda, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 730-737.
- [160] M. T. Reetz, K. M. Kühling, H. Hinrichs, A. Deege, *Chirality* **2000**, 12, 479-482.
- [161] K. Faber, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 5004-5010.
- [162] a) S. Akai, T. Naka, T. Fujita, Y. Takebe, Y. Kita, *Chem. Commun.* **2000**, 1461-1462; b) S. Akai, T. Naka, T. Fujita, Y. Takebe, T. Tsujino, Y. Kita, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 411-419.
- [163] Y. Kita, H. Maeda, K. Omori, T. Okuno, Y. Tamura, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 2999-3005.
- [164] J.-Q. Dong, A. Wada, T. Takakuwa, K. Nakanishi, N. Berova, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12024-12025.

- [165] a) D. H. Turner, I. Tinoco, M. Maestre, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 4340-4342; b) I. Tinoco, D. H. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 6453-6456.
- [166] B. Ehrenberg, I. Z. Steinberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 1293-1295.
- [167] T. Nehira, C. A. Parish, S. Jokusch, N. J. Turro, K. Nakanishi, N. Berova, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8681-8691.
- [168] L. Geng, L. B. Gown, *Anal. Chem.* **1996**, 66, 3243-3246.
- [169] N. Chen, K. Ikemoto, T. Sugimoto, S. Murata, H. Ichinose, T. Nagatsu, *Heterocycles* **2002**, 56, 387-392.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jüli-4117
März 2004
ISSN 0944-2952