

Max-Planck-Institut für Biochemie

**Neue Hemmstoffe der Na⁺/K⁺-ATPase
aus *Helleborus purpurascens*
Isolierung und Entwicklung neuer Synthesestrategien**

Frank Freudenmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. St. J. Glaser

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. L. Moroder
2. Univ.-Prof. Dr. Th. Bach

Die Dissertation wurde am 11.06.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 17.07.2003 angenommen.

*Meinen Eltern, Carmen
und Karen*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1998 bis Juni 2003 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Anleitung von Prof. Dr. Luis Moroder angefertigt.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Luis Moroder, der mir diese vielfältige und abwechslungsreiche Aufgabe gestellt hat. Durch sein fortwährendes Interesse und seine ständige Diskussionsbereitschaft an meiner Arbeit gab er mir wertvolle Anregungen. Er ließ mir den nötigen Freiraum meine Ideen selbstständig umzusetzen und unterstützte mich dabei stets.

Mein weiterer Dank gilt:

Dr. Franz Kerek danke ich für die fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit. Als „Entdecker“ der makrozyklischen Kohlensuboxid-Oligomere hat sein stetes Interesse, seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Die Einblicke in die philosophischen Hintergründe der Naturwissenschaften, die mir in vielen Gesprächen zuteil wurden, werden mir unvergesslich bleiben.

Robert Stimac und Prof. Dr. Hans-Jürgen Appel von der Universität Konstanz danke ich für die Etablierung und Durchführung der Aktivitätstests der Na^+/K^+ -ATPase.

Dietmar Schmied und Prof. Dr. Günther Jung von der Universität Tübingen danke ich für die FT-ICR-MS-Messungen.

Aus der Arbeitsgruppe Bioorganische Chemie danke ich Dr. Christian Renner, Dr. Stella Fiori und Alexander Milbradt für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Der gesamten Arbeitsgruppe Bioorganische Chemie danke ich für die freundliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre in den letzten Jahren.

Besonders hervorheben möchte ich dabei Dr. Norbert Schaschke, der mich nicht nur mit Gemüse seines Gartens versorgt, sondern immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir mit seinem Fachwissen oft weiterhalf. Und Hans-Jürgen Musiol, die Kulturfraktion unserer Arbeitsgruppe. Kein Restaurant, kein noch so ausgefallenes Gericht, das er nicht kennt.

Des weiteren danke ich Markus Schütt und José Pfizer aus dem „Chaos“-Lab HL2 für den Beweis, dass Chemie durchaus auch in einem eingeschränkt aufgeräumten Labor funktioniert. Den Jungs aus dem HL1 Dirk Barth, Markus Kaiser und Markus Müller danke ich für unzählige, tiefgründige Gespräche über Fußball, den Sinn der Forschung und das Leben an sich. Alexander Milbradt danke ich für „Last-Minute“-Aktionen.

Meiner ehemaligen Laborpartnerin Dr. Alina Ariosa-Alvarez für das Leben, das sie in mein ausgestorbenes Labor brachte und die Einführung in kubanische Gaumenfreuden. Meinen neuen Laborkollegen Dr. Cyril Boulegue und Silvia Andric danke ich für die mir entgegengebrachte Geduld und Hilfsbereitschaft während des Entstehens dieser Arbeit.

Lissy Weyher-Stingel danke ich für die Aufnahme unzähliger Massenspektren und die moralische Unterstützung in schwierigen Zeiten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden schon teilweise in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht bzw. auf Fachkongressen präsentiert:

Kerek, Franz; Stimac, Robert; Appel, Hans-Jürgen; Freudenmann, Frank; Moroder, Luis *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2002**, 1567, 213-220.

Kerek, Franz; Appel, Hans-Jürgen; Stimac, Robert; Freudenmann, Frank; Moroder, Luis *Phytomedicine (Jena)* **2000**, 7, Supplement II.

Kerek, Franz; Stimac, Robert; Freudenmann, Frank; Moroder, Luis *10th International Conference on Na⁺/K⁺-ATPase and Related Cation Pumps*, Kopenhagen, 8-14 August 2002.

1	Einleitung	1
1.1	Die Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	1
1.1.1	Die Proteinfamilie der P-Typ ATPasen	1
1.1.2	Der Aufbau der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	3
1.1.3	Der Funktionsmechanismus der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase: Albers-Post Zyklus	6
1.1.4	Die Inhibitoren der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	7
1.2	Chemische Eigenschaft der Pyran-4-one.....	12
1.3	Vorkommen in der Natur.....	13
1.4	Synthese von Pyran-4-onen.....	16
1.4.1	Synthesen von Pyran-4-onen mit 1,3,5-Triketonen	16
1.4.2	Synthesen von Pyran-4-onen aus Furan-Derivaten.....	18
1.4.3	Synthesen von Pyran-4-onen aus Zucker-Derivaten.....	19
1.5	Synthese von Chromonen (Benzopyran-4-onen)	21
1.5.1	Synthese von Chromonen mit 2-Hydroxyacetophenonen.....	21
1.5.2	Synthese von Chromonen mit Phenolen – Simonis-Reaktion	26
1.5.3	Synthese von Chromonen mit Enaminen	27
1.5.4	Synthese von Flavonen mit Chalcon-Dibromiden	27
1.6	Pyranopyrane.....	28
1.6.1	Synthese von Pyranopyran-dionen.....	29
2	Aufgabenstellung	34
3	Ergebnisse und Diskussion	35
3.1	Herstellung des Extraktes aus <i>Helleborus purpurascens</i>	35
3.2	Untersuchung des Extraktes mittels HPLC	35
3.3	Säulenchromatographie des Extraktes.....	39
3.4	Reinigung des Extraktes mittels semipräparativer HPLC.....	40
3.5	Untersuchung der gereinigten HP-Fractionen mit physikalisch-chemischen Methoden	42
3.5.1	IR-spektroskopische Untersuchungen.....	42
3.5.2	UV-spektroskopische Untersuchungen	44
3.5.3	Massenspektrometrische Untersuchungen	48
3.5.4	NMR-spektroskopische Untersuchungen.....	49
3.6	Untersuchung der biologischen Aktivität der HP-Fractionen.....	50

3.6.1	Inhibierung der Enzymaktivität der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	50
3.6.2	Enzym Immunoassay mit <i>anti</i> -Ouabain Antikörpern	51
3.7	Alkalische Hydrolyse der HP-Fractionen	52
3.8	Herstellung und Untersuchung des MCS-Faktors	54
3.8.1	Darstellung des MCS-Faktors	54
3.8.2	Massenspektrometrische Untersuchung des MCS-Faktors	55
3.8.3	Aktivitätstests des MCS-Faktors – Vergleich mit Ouabain	56
3.8.4	Aktivitätstests mit aus unterschiedlichen Geweben isolierten Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	57
3.9	Abschließende Bemerkungen	58
3.10	Synthesestrategien allgemein	60
3.11	Ergebnisse der Literaturrecherche	61
3.11.1	Pyranopyrandione aus Dihydroxyaceton	61
3.11.2	Woods Synthesen von Pyranopyrandionen	62
3.12	Eigene Versuche zu Woods Synthesen	66
3.12.1	Reaktion der Kojisäure mit Malonsäurediethylester unter der Einwirkung von Trifluoressigsäure	67
3.12.2	Reaktion der Kojisäure mit Malonsäuredinitril unter der Einwirkung von Trifluoressigsäure	68
3.13	Simonis-Reaktion mit Kojisäure	70
3.14	Synthesestrategie A (Pyruvat Strategie)	72
3.14.1	Synthesestrategie – Retrosynthetische Analyse	72
3.14.2	Umsetzung von Kojisäure mit 3-Brom-pyruvat	73
3.15	Synthesestrategie B (Biskojiat Strategie)	78
3.15.1	Synthesestrategie – Retrosynthetische Analyse	78
3.15.2	Umsetzung zum Bis(3-hydroxy-6-hydroxymethyl-4-oxo-4H-pyran-2-yl)-methan	79
3.15.3	Versuche zur Zyklisierung; Synthese eines Ethers aus zwei 3-Hydroxypyronen	84
3.16	Synthesestrategie C (DMAD Strategie)	87
3.16.1	Synthesestrategie – Retrosynthetische Analyse	87
3.16.2	Umsetzung der Kojisäure mit den ungesättigten Verbindungen	88

3.16.3	Versuche zur Zyklisierung	92
3.17	Synthesestrategie D (PCPE Strategie).....	93
3.17.1	Synthesestrategie – Retrosynthetische Analyse	93
3.17.2	Darstellung der Bausteine	95
3.18	Synthesestrategie E (Biomimetischer Ansatz)	99
3.18.1	Synthesestrategie – Retrosynthetische Analyse	99
3.18.2	Claisen-Esterkondensation zur Synthese von Oligoketonen.....	100
3.18.3	Modellreaktion zur Hydroxylierung der Methylengruppe	102
3.19	Synthesestrategie F (Dibromid Ansatz)	104
3.19.1	Synthesestrategie – Retrosynthetische Analyse	104
3.19.2	Synthese des Allyl-Ethers	105
3.19.3	Claisen-Umlagerung des Allyl-Ethers	106
3.19.4	Möglichkeiten zum Ringschluss – Fortführung der Synthesestrategie.	107
3.19.5	Epoxidierung des 2-Allyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-ons.....	108
3.19.6	Bromierung des 2-Allyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-ons	109
3.19.7	Ringschluss des 2-(2,3-Dibrompropyl)-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-ons	110
4	Zusammenfassung	113
5	Experimenteller Teil.....	120
5.1	Material und Methoden	120
5.2	Isolierung und Untersuchung des Extraktes	127
5.2.1	Herstellung des Extraktes aus <i>Helleborus purpurascens</i>	127
5.2.2	Säulenchromatographie des Extraktes.....	127
5.2.3	Semipräparative Reinigung des Extraktes.....	128
5.2.4	Untersuchung der gereinigten HP-Fractionen mit physikalisch-chemischen Methoden	129
5.2.5	Enzym Immunoassay mit <i>anti-Ouabain</i> Antikörpern	134
5.2.6	Alkalische Hydrolyse der HP-Fractionen	136
5.2.7	Herstellung des aktiven MCS-Faktors	137
5.3	Synthesevorschriften	138
6	Literaturverzeichnis	149

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AIBN	α,α' -Azo-isobutyronitril
amu	atomic mass unit
aq.	wässrig
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEAD	Azodicarbonsäure-diethylester
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionenzyklotron-Resonanz
HP	<i>Helleborus purpurascens</i>
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
MS	Massenspektrometrie
NBS	N-Bromsuccinimid
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	magnetische Kernresonanzspektroskopie
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
pip	Piperidin
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
SC	Säulenchromatographie
SSA	Schafserumalbumin
TBDMS	tert-Butyldimethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
Tft	Triflat; Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMOF	Trimethyl-orthoformiat

1 Einleitung

1.1 Die Na^+/K^+ -ATPase

Die Na^+/K^+ -ATPase oder Natriumpumpe ist ein Membranprotein, welches praktisch in allen eukaryotischen Zellen zu finden ist. Sie ist für den aktiven Transport von Natrium- und Kalium-Ionen durch die Zellmembran verantwortlich. Die dafür benötigte Energie wird aus der Hydrolyse von ATP bezogen. Durch diesen Transport wird ein chemischer und ein elektrischer Gradient über die Zellmembran hinweg erzeugt. Der elektrische Gradient ist essentiell für die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials der Zellen und die Aktivität bei der Anregung von Muskel- und Nervengewebe. Der chemische Gradient ermöglicht zahlreiche Transportprozesse, dient also der Verteilung wichtiger Nährstoffe.

Ein breites Spektrum wichtiger Zellfunktionen wird durch die Na^+/K^+ -ATPase kontrolliert, wie z.B. die Homeostasis von Ionen, Membranpotential, intrazellulären pH, Zellvolumen, Konzentration an freien Calcium-Ionen u.a. Durch die Natriumpumpe werden mehrere wichtige physiologische Prozesse reguliert oder maßgeblich beeinflusst, wie z.B. Muskelkontraktion, Signalleitung der Nerven, Retention von Natrium-Ionen in der Niere, Blutdruck usw. Die Na^+/K^+ -ATPase wird von kardiotonischen Glykosiden pflanzlicher Herkunft, wie z.B. Ouabain, Digoxin usw., spezifisch gehemmt.

1.1.1 Die Proteinfamilie der P-Typ ATPasen

Die Na^+/K^+ -ATPase gehört zur Proteinfamilie der P-Typ ATPasen, die für den aktiven Transport geladener Substrate durch biologische Membrane verantwortlich sind. Der Name leitet sich von einer Gemeinsamkeit dieser Familie ab, nämlich dass während eines Pumpzyklus die Phosphorylierung durch die γ -Phosphatgruppe des ATP an der Asparaginsäure der stark konservierten Sequenz DKTG stattfindet. Wegen dieses

gemeinsamen Phosphorylierungs-Mechanismus werden alle P-Typ ATPasen von Vanadat-Ionen gehemmt, welche isoelektronisch zu Phosphat-Ionen sind.

Die insgesamt acht konservierten Regionen sind vermutlich für die Basisfunktionen aller P-type ATPasen verantwortlich: Bindung von ATP, Phosphorylierung, Konformationsänderung durch Energiezufuhr aus der ATP-Hydrolyse und Ionen-transport. Der Vergleich von Hydropathie-Profilen legt den Schluss nahe, dass die Membrantopologie der P-Typ ATPasen mit dem transportierten Ion korreliert. Dies führte zu einer Einteilung in drei Gruppen:

- P1-ATPasen → Schwermetalionen-Pumpen
- P2-ATPasen → andere Metalionen-Pumpen und Phospholipid Translokasen
- P3-ATPasen → K^+ -Pumpen von Bakterien

Die P1- und P2-ATPasen unterscheiden sich stark in ihren Hydropathie-Profilen, während die P3-ATPasen strukturelle Gegebenheiten der P1- und P2-ATPasen aufweisen.[1,2]

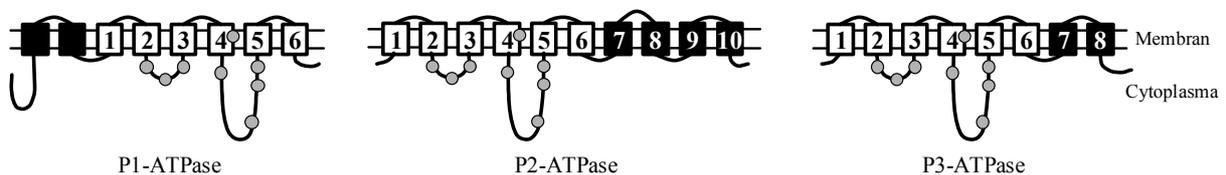


Abbildung 1-1: Membran Topologie der α -Untereinheit der verschiedenen P-Typ ATPasen. Die sechs Transmembran-Domänen der Kernstruktur sind in Weiß und die zusätzlichen Segmente sind in Schwarz dargestellt. Die Kreise geben die vermutliche Position der acht konservierten Sequenzen der P-Typ ATPasen an.

Neben diesen transmembranen Helices bestehen die P-Typ ATPasen noch aus drei weiteren Domänen, die sich alle im Cytosol befinden; den A (*actuator*), P (*phosphorylation*) und N (*nucleotide-bindung*) Domänen. Die P-Domäne enthält die Stelle für die Phosphorylierung, die N-Domäne die für die Bindung von ATP. Die

A-Domäne stellt den beweglichen Teil des Enzyms bei einer E_1 - E_2 Konformationsänderung dar.[3]

1.1.2 Der Aufbau der Na^+/K^+ -ATPase

Bei der Na^+/K^+ -ATPase handelt es sich um ein oligomeres Enzym, das aus einer α - und β -Untereinheit im Verhältnis 1:1 aufgebaut ist. Eine dritte γ -Untereinheit scheint in einigen Geweben die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase und die Wechselwirkung mit Na^+ - und K^+ -Ionen zu regulieren.

Für die Entfaltung der Enzymaktivität ist die Bildung des $\alpha\beta$ -Komplexes maßgeblich. Das gelöste Protein hat aber eine starke Tendenz zur Assoziation und man erhält es bei der Aufreinigung meist als $(\alpha\beta)_2$ -Komplex. Es ist allerdings noch nicht geklärt, ob das Protein als $\alpha\beta$ -, $(\alpha\beta)_2$ - oder höherer Komplex in den Zellmembranen vorliegt.[4]

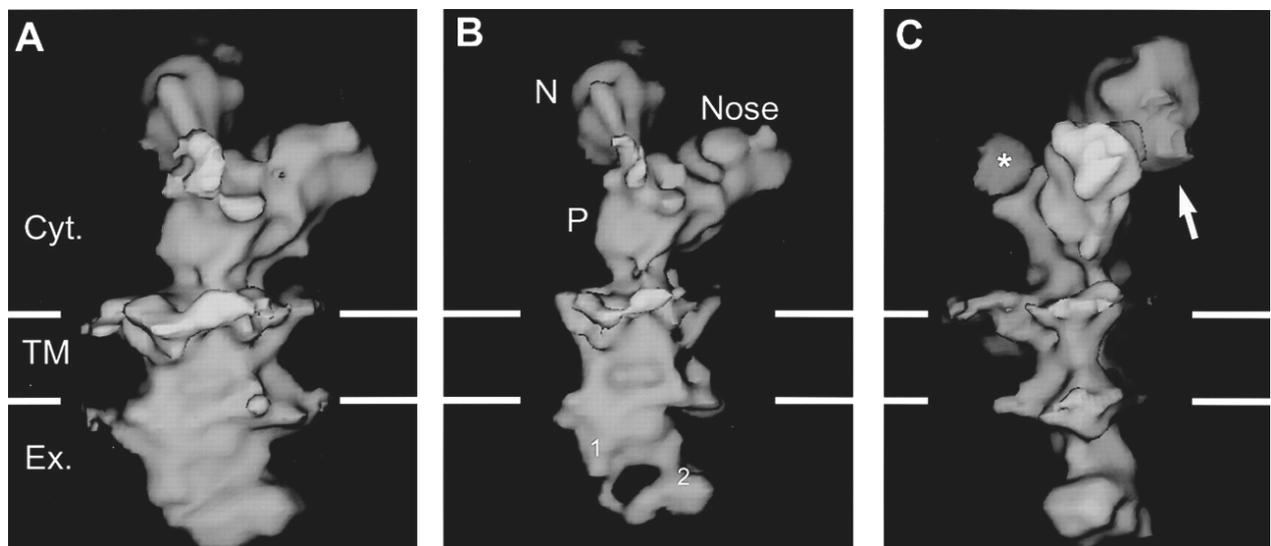


Abbildung 1-2: Räumliche Struktur der Na^+/K^+ -ATPase. Die Darstellung zeigt die Kristallstruktur des Heterodimers in einer Auflösung von 11 Å (entnommen aus [5]).

Die Kristallisation der Na^+/K^+ -ATPase gelang in ihrer mit Vanadat gehemmten E_2 Konformation. Die Abbildung 1-2 zeigt das Heterodimer der α - und β -Untereinheit

und dessen Lage in der Membran, (A) ergibt bei einer 90° Drehung im Uhrzeigersinn (C), (B) wurde mit einem höheren Schwellenwert für die Dichte gezeichnet. Im cytoplasmatischen Kopf sind drei Bereiche zu sehen: Die Nase (*nose*) und die P- und N-Domänen. Eine Störung der P-Domäne (*) beruht auf einem Kontakt innerhalb des Kristalls mit der N-Domäne benachbarter Moleküle (Pfeil).[5]

1.1.2.1 Die α -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase

Die α -Untereinheit, die auch die katalytische Einheit des Enzyms darstellt, hat ein Molekulargewicht von 110–113 kDa, abhängig von der vorliegenden Isoform $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ oder $\alpha 4$. Sie besteht aus zehn transmembranen Domänen M1 bis M10, wobei der N- und der C-Terminus sich im Cytosol befinden. Eine der Stellen für die Interaktion zwischen der α - und β -Untereinheit ist zwischen M7 und M8 lokalisiert. Die α -Untereinheit enthält außerdem die Stellen für die ATP-Bindung, die Phosphorylierung und die Bindung von Kationen und kardiotonischen Glykosiden.

1.1.2.2 Die β -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase

Die β -Untereinheit ist mehrfach glykosyliert und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 60 kDa. Der Proteinanteil liegt dabei zwischen 36 und 38 kDa, abhängig von der Isoform $\beta 1$, $\beta 2$, oder $\beta 3$. Die β -Untereinheit durchquert die Membran nur einmal und der N-Terminus befindet sich auf der intrazellulären Seite der Membran. Die genaue Funktion dieser Untereinheit ist noch nicht vollständig geklärt. Es konnte aber gezeigt werden, dass sie bei der Entwicklung des Enzyms eine wichtige Rolle spielt. Durch den direkten Kontakt der α - und β -Untereinheit wird der Transport vom endoplasmatischen Reticulum zur Zellmembran erleichtert und die α -Untereinheit stabilisiert. Die β -Untereinheit sorgt für die richtige Faltung und den korrekten Einbau in die Membran, wodurch der Abbau des Enzyms verhindert wird.[2,6] Eine Vielzahl an Experimenten zeigten zudem, dass die β -Untereinheit auch bei der Hydrolyse von

ATP, beim Ionentransport und bei der Bindung von Inhibitoren, wie z.B. Ouabain, eine wichtige Rolle spielt.[7]

1.1.2.3 Die γ -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase

Dies stellt die dritte Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase dar. Sie weist ein Molekulargewicht von 7-11 kDa auf und wurde zuerst als Komponente des Enzyms im Zusammenhang mit der Bindung von [^3H]Ouabain identifiziert. Die spezifische Assoziation der γ -Untereinheit mit der Natriumpumpe geschieht wahrscheinlich über eine Wechselwirkung mit der C-terminalen Domäne der α -Untereinheit. Sie stellt ein Typ I Membranprotein dar, ist verwandt mit Phospholemman und MAT-8 (*Mammary Tumor*) und gehört wie diese zu einer Familie kleiner Membranproteine, die wie der sie kodierende Gencluster FXYD („*fix-id*“) genannt wird.[8] Die Expression der γ -Untereinheit konnte nicht in allen Gewebearten bestätigt werden, in denen die α - oder β -Untereinheiten leicht nachgewiesen werden konnten. In heterologen Expressionssystemen entwickelte die Na^+/K^+ -ATPase auch in Abwesenheit der γ -Untereinheit ihre Aktivität. Deshalb ist die Rolle dieser Komponente vielmehr in der Modulation der Affinität der Na^+/K^+ -ATPase gegenüber ATP oder Na^+ - und K^+ -Ionen zu sehen.[9] Diese Daten, zusammen mit den Fakten, dass auch andere Peptide die strukturelle Ähnlichkeiten mit der γ -Untereinheit aufweisen, wie z.B. CHIF (*Corticosteroid-Induced Factor*)[10], die Na^+/K^+ -ATPase beeinflussen und mit ihr interagieren können, bestätigen, dass sich die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase durch Typ I Membranproteine regulieren lässt.

1.1.3 Der Funktionsmechanismus der Na^+/K^+ -ATPase: Albers-Post Zyklus

Die Na^+/K^+ -ATPase kann zwei Konformationszustände E_1 und E_2 einnehmen, die sich nicht nur in ihrer Affinität und Interaktion gegenüber Na^+ - und K^+ -Ionen, ATP oder endogenen Liganden unterscheiden, ihre Unterschiede zeigen sich auch deutlich bei tryptischen Spaltungsexperimenten.

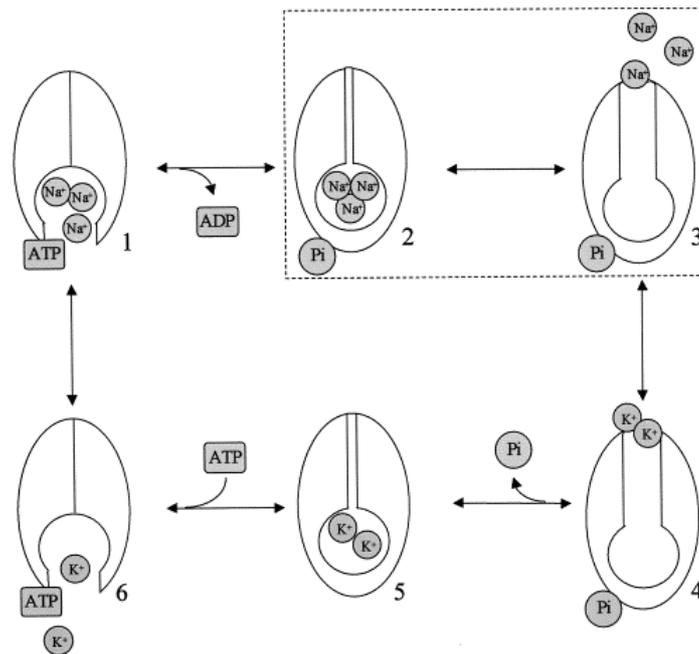


Abbildung 1-3: Der Reaktionszyklus der Na^+/K^+ -ATPase (entnommen aus Lit. [7]).

Im ersten Schritt der Reaktionssequenz binden Na^+ und ATP mit einer sehr hohen Affinität an das Enzym in der E_1 Konformation, anschließend erfolgt die Phosphorylierung der Asparaginsäure durch die γ -Phosphatgruppe des ATP ((1) in Abbildung 3). Bei dieser Reaktion spielt Magnesium eine wichtige Rolle. Noch während sich das Enzym in seinem phosphorylierten Zustand befindet werden die drei Na^+ -Ionen eingeschlossen (2). Nachdem die $E_2\text{-P}(\text{Na}_3)$ Konformation erreicht ist verliert das Enzym seine Affinität gegenüber Na^+ und erhöht die gegenüber K^+ , die drei Na^+ -Ionen werden daher in das extrazelluläre Medium abgegeben (3) und im Gegenzug zwei K^+ -Ionen gebunden (4). Die Bindung von K^+ an das Enzym induziert eine spontane Dephosphorylierung, welche zu einem Einschluss der K^+ -Ionen und

damit zum $E_2(K^+_2)$ Zustand führt (5). Intrazelluläres ATP führt zu einer erhöhten Abgabe von K^+ -Ionen aus der $E_2(K^+_2)$ Konformation (6) und somit auch zu einer Rückkehr in die E_1ATPNa Konformation.

Dieses Model berücksichtigt nicht, dass die Na^+/K^+ -ATPase auch als Diprotomer mit kooperativen $(\alpha\beta)_2$ Einheiten existieren könnte und somit zwei Bindungsstellen für ATP besitzen müsste.

1.1.4 Die Inhibitoren der Na^+/K^+ -ATPase

Im Jahre 1953 entdeckte Schatzmann, dass Herzglykoside, insbesondere Ouabain (Abbildung 1-4), den aktiven Na^+/K^+ -Transport in roten Blutkörperchen hemmen.[11] Das für diesen Ionen-Transport verantwortliche Membranenzym wurde erstmals von Skou 1957 aus Krabbennerven isoliert und als Na/K -abhängige ATPase beschrieben.[12] Die Inhibierung der isolierten Na^+/K^+ -ATPase durch Ouabain, und dass diese folglich einen Rezeptor für Herzglykoside aufweisen muss, wurde vom Skou ebenfalls bestätigt.

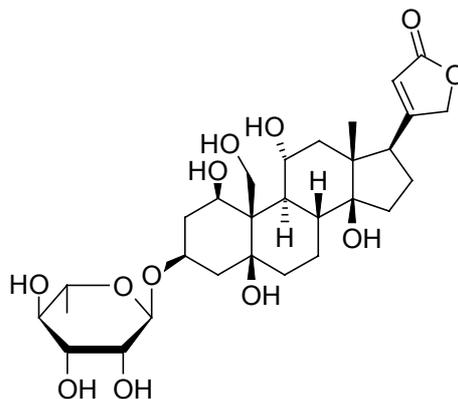


Abbildung 1-4: Struktur des Herzglykosids Ouabain

1.1.4.1 Die Herzglykoside als Inhibitoren der Na^+/K^+ -ATPase

Die Herzglykoside, wie z.B. Digoxin oder Ouabain, sind die wohl bekanntesten Inhibitoren der Na^+/K^+ -ATPase. Diese Substanzen sind aus zwei Teilen aufgebaut, einem Zuckeranteil und dem sogenannten Aglykon, welches ein Steroidgerüst und ein ungesättigtes γ -Lacton (Cardenolide) oder δ -Lacton (Bufadienolide) umfasst. Kardiotonische Glykoside kommen in einigen Pflanzenarten vor, während die Bufadienolide bisher vor allem in der Tierwelt gefunden wurden, z.B. im Hautdrüsensekret einiger Kröten.[13-15]

Die Nutzung von Pflanzenextrakten, die Herzglykoside beinhalten, reicht dabei weit zurück. Naturvölker verwendeten solche Extrakte schon früh als Pfeilgifte und tun dies heute noch, ebenso waren den Ägyptern, Römern oder Chinesen der medizinische Nutzen dieser Extrakte wohl bekannt. Um 1550 wurde Digitalis oder der rote Fingerhut von Fuchsius erstmals botanisch als *Digitalis purpurea* beschrieben. Withering veröffentlichte 1775 ein Buch, in dem er zur Behandlung der „Fallsucht“ Extrakte des Fingerhuts empfahl, allerdings stand bei ihm die diuretische Wirkung im Vordergrund. Erst 1799 erkannte Ferriar die primäre therapeutische Wirkung auf das Herz.[13]

Die Steigerung der Kontraktionskraft der Herzmuskulatur (positiv inotrope Wirkung) beruht nach dem heutigen Stand der Erkenntnisse auf dem folgenden Mechanismus: Herzglykoside binden an den extrazellulären Teil der Na^+/K^+ -ATPase und hemmen dabei vollständig oder teilweise ihre Aktivität. Dies führt zu einer Steigerung der intrazellulären Na^+ -Konzentration und durch den damit verbundenen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher steigt auch die Ca^{2+} -Konzentration, was wiederum die Kontraktibilität der Gefäß- und Herzmuskulatur beeinflusst.[16]

1.1.4.2 Die Endogenen Inhibitoren der Na^+/K^+ -ATPase

Die Existenz einer allgegenwärtigen Digitalis-ähnlichen endogenen Substanz mit einer wichtigen physiologischen Funktion wurde von Szent-Györgyi[17] bereits im Jahre 1953 postuliert und seitdem auch mehrfach bestätigt. Diese Substanzen werden

zumeist unter dem Sammelbegriff Endogenous Digitalis-Like Faktors (EDLF) zusammengefasst.

Die Suche nach dem endogenen Hemmstoff der Na^+/K^+ -ATPase in Säugetieren hat in den letzten 30 Jahren eine Reihe sich widersprechender Publikationen hervorgebracht. Schon kurz nach der Entdeckung, dass Herzglykoside die Na^+/K^+ -ATPase inhibieren, wurden erste Bedenken geäußert, dass diese Substanzen auch die endogenen Liganden darstellen könnten. Die starke Toxizität dieser Substanzen bei Säugetieren wird dabei meist als Hauptargument dieser kritischen Stimmen angeführt. Die Frage, ob nun Herzglykoside in tierischen Organismen zu finden sind, und diese dann auch als endogene Liganden agieren, wird auch heute noch kontrovers diskutiert. Mitunter wurde auch versucht, Parallelen zu der Problematik des „endogenen Morphiums“ heranzuziehen, die ja durch die Entdeckung der Endorphin-Peptide (*endogenous morphine*) relativ schnell beantwortet werden konnte. Die Suche nach einem „Digitalis-Like“ Peptid blieb bisher allerdings erfolglos.

Die aus tierischen Geweben und Flüssigkeiten isolierten EDLF waren zumeist starke Na^+/K^+ -ATPase-Inhibitoren. Die chemische und genaue physiologische Charakterisierung war dabei allerdings oftmals durch die sehr geringen Substanzmengen behindert. Dies ist sicherlich auch als Hauptgrund für die widersprüchlichen Ergebnisse zu sehen. Anstelle konkreter Strukturaussagen trat daher meist der Versuch, die EDLF in eine bereits bekannte Naturstoffklasse einzugliedern bzw. davon auszuschließen (Tabelle 1).

Tabelle 1-1: Zusammenstellung der als endogene Liganden der Na⁺/K⁺-ATPase vorgeschlagenen Substanzen.

Jahr	Autor	Ursprung	Substanz/Substanzklasse
1953	Szent-Györgyi [18]	Herzmuskel	Nicht Digitalis
1979	Hauptert [19]	Hypothalamus	Polare Substanz – nicht peptidisch
1980	Lichtstein [20]	Gehirn	Kein Peptid
1980	Gruber [21]	Plasma	Peptid
1984	Cloix [22]	Urin	Glykosteroid
1984	Akagawa [23]	Hypophyse	Peptid
1986	Kelly [24]	Plasma	Fettsäure
1987	DeWardener [25]	Hypothalamus	Kein Peptid
1990	Goto [26]	Gehirn	Digoxin
1991	Hamlyn [27-29]	Blut	Ouabain
1991	Valdes [30]	Adrenal	Dihydro-Digoxin
1995	Kramer [31]	Urin	Vanadium-Ascorbat
1995	Bagrov [32]	Urin	Bufadienolide
1995	Nakanishi [33]	Hypothalamus	iso-Ouabain
1998	Schoner [34,35]	Adrenal	Herzglykosid

1.1.4.3 Makrozyklische Kohlenstoff-Derivate als endogene Liganden der Na^+/K^+ -ATPase

Die von F. Kerek 1996 erstmals beschriebenen makrozyklischen Kohlenstoff-Oligomere stellen eine neue Substanzgruppe dar. Die in Abbildung 1-5 dargestellte hypothetische Struktur zeigt ein Molekül, welches sowohl als organische wie auch als anorganische Substanz eingestuft werden könnte. Betrachtet man das Molekül als einen aus sechs linear kondensierten Pyran-4-onen geschlossenen Makrozyklus, so kann es als eine Verbindung organischer Natur bezeichnet werden; betrachtet als sechs makrozyklisch kondensierte Kohlenstoff-Bausteine, wäre es dagegen als eine Verbindung anorganischer Natur zu sehen.

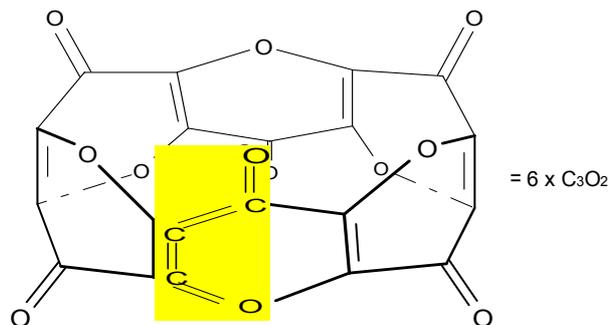


Abbildung 1-5: Hypothetische Struktur des makrozyklischen Kohlenstoff-Zyklus-Hexamers

Diese vorerst aus Pflanzen isolierte Kohlenstoff Oligomere wurden als besonders starke Inhibitoren der Na^+/K^+ -ATPase identifiziert.[36]

1.2 Chemische Eigenschaft der Pyran-4-one

Die 6-gliedrigen Heterozyklen mit einem Sauerstoffatom als Heteroatom sind im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet und einige davon erlangten als Wirkstoffe oder zumindest aufgrund ihrer biologischen Aktivität eine gewisse Bedeutung. Die unterschiedlichen Vertreter dieser Verbindungsklasse lassen sich alle auf die drei Stammkörper: *2H*-Pyran, *4H*-Pyran und das Pyrylium-Kation in Abbildung 1-6 zurückführen. Die anderen Substanzklassen, Pyranone, Chromone, Isocoumarine, Flavene, Flavone usw., lassen sich daraus z.B. durch Kondensation von Benzolringen ableiten.[37,38]

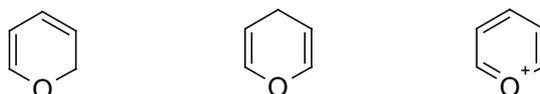


Abbildung 1-6: Die drei Stammkörper der 6-gliedrigen Heterozyklen.

Die Ketone, die sich von den Pyranen ableiten, werden als Pyranone bezeichnet, für das Pyran-2-on und Pyran-4-on findet man auch die Bezeichnung α - bzw. γ -Pyron. Bei den benzokondensierten Pyranonen haben sich Trivialnamen (s. Abbildung 1-7) durchgesetzt.

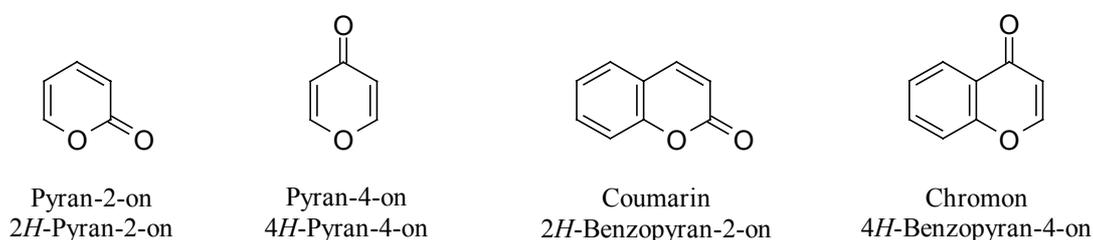


Abbildung 1-7: Bezeichnungen für die verschiedenen Pyranone.

Die Pyran-4-one gehen keine der typischen Carbonyl-Reaktionen ein. Von ihnen sind z.B. keine Phenylhydrazone bekannt und die beiden Doppelbindungen können nicht

mit Zink in Eisessig reduziert werden. Diese beiden Tatsachen lassen sich mit der Resonanztheorie erklären, wonach für die Struktur des Pyran-4-ons auch polare Grenzstrukturen formuliert werden können. Pyran-4-on weist einen gewissen aromatischen Charakter auf und besitzt auch ein Dipolmoment. Aus diesen Grenzformeln kann man auch die bevorzugten Ringpositionen für einen nucleophilen und electrophilen Angriff ableiten; so erfolgt eine Bromierung in 3- bzw. 5-Position und die Ringöffnung durch Alkalien in 2-Position. Eine Ringöffnung der Pyran-4-one mit Säuren ist nicht möglich, vielmehr werden mit starken Säuren Pirylium-Salze gebildet. Mit Ammoniak und primären Aminen erhält man unter milden Bedingungen Pyridone.[39]

1.3 Vorkommen in der Natur

Pyran-4-one sind in vielen Naturstoffen als Strukturelement enthalten und in zahlreichen Tier- und Pflanzenarten anzutreffen. Zu den einfachsten nicht kondensierten Pyran-4-one gehört z.B. die Chelidonsäure, welche aus den Wurzeln der *Chelidonium majus* und anderen *Papaveraceae* isoliert wurde, oder die Mekonsäure aus Opium. Als natürlich vorkommende Pyran-4-one wären noch Kojisäure, Maltol oder Allixin[40] zu erwähnen.

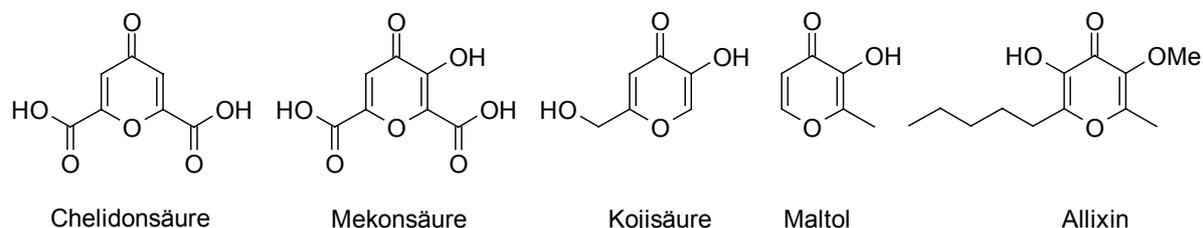


Abbildung 1-8: Pyran-4-one als Naturstoffe.

Die aus marinen Organismen isolierten Verbindungen haben dabei aufgrund ihrer oft ungewöhnlichen Struktur und ihrer biologischen Aktivität das Interesse der Chemiker geweckt. In wirbellosen Weichtieren konnte eine Reihe von Sekundärmetaboliten

gefunden werden, die sich durch ihre antimikrobielle Aktivität und Zytotoxizität auszeichnen.[41] Zwei Beispiele zur Veranschaulichung der Strukturvielfalt dieser Pyran-4-one, welche biosynthetisch als Polypropionate aufgefaßt werden können, werden nachfolgend kurz vorgestellt.

Bei Auripyron A in Abbildung 1-9 handelt es sich um eine Spiroverbindung mit einem Dihydro- und Tetrahydropyran. Die Substanz konnte aus *Dolabella auricularia* isoliert werden.[42] Vallartanone B wurde in der Lungenschnecke *Siphonaria maura* gefunden und dient dort wahrscheinlich als Fraßschutz vor bestimmten Fischarten.[43] Die Struktur und absolute Konfiguration der Verbindung (Abbildung 1-9) konnte durch ihre Totalsynthese geklärt werden.[44,45]

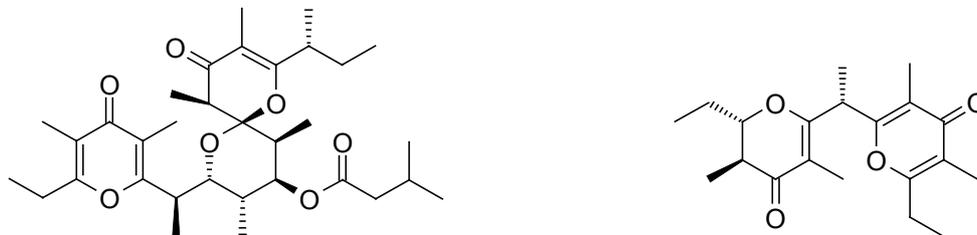


Abbildung 1-9: Auripyron A (links) und Vallartanone B (rechts).

Die Verbreitung komplexer Pyran-4-one ist natürlich nicht auf marine Organismen beschränkt. Die wohl größte Gruppe sind die hauptsächlich in Pflanzen vorkommenden Flavonoide, wie z.B. die Flavone, Flavonole, Isoflavone und Biflavone. Die Flavonoide nehmen in den Pflanzen vielfache Funktionen wahr, die Farbgebung, UV-Schutz, Schutz vor Insekten-, Mikroben- oder Pilzbefall beinhalten. Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften und des sich daraus ergebenden Nutzens für den Menschen in medizinischer und ernährungswissenschaftlicher Hinsicht sind sie Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.[46] In Abbildung 1-10 wird ein Biflavon und ein umgelagertes Chalcon-Flavon Dimer gezeigt. Diese Verbindungen konnten aus den Stengeln der *Aristolochia ridicula* isoliert werden.[47]

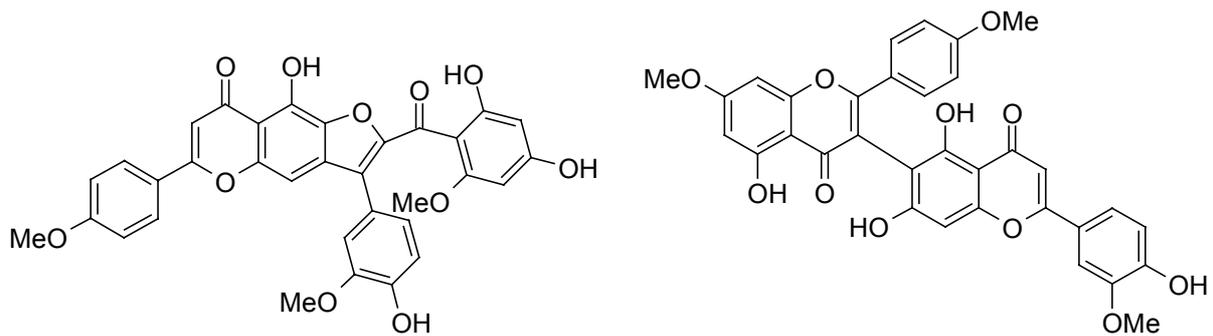


Abbildung 1-10: Biflavon (links) und Chalcon-Flavon Dimer (rechts) aus *Aristolochia ridicula*.

Eine weitere ergiebige Quelle für Flavonoide sind Moose. In der in Europa verbreiteten Spezies *Aulacomnium palustre* konnte im wäßrigen Aceton-Extrakt das Triflavon Aulacomniumtriluteolin (Abbildung 1-11) gefunden werden.[48]

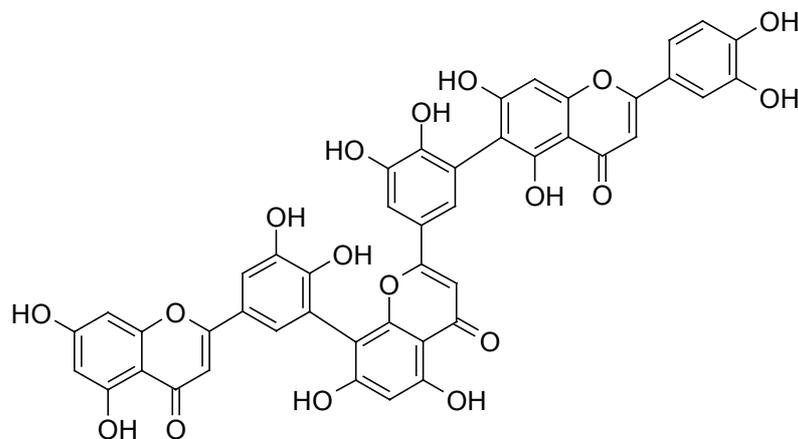


Abbildung 1-11: Das Triflavon Aulacomniumtriluteolin aus *Aulacomnium palustre*.

1.4 Synthese von Pyran-4-onen

Die meisten Publikationen befassen sich mit strukturellen Aspekten der Pyran-4-one und weniger mit den Möglichkeiten ihrer Synthese. Die wenigen existierenden Methoden sind allerdings verlässlich und auch vielseitig anwendbar. In dem folgenden Abschnitt soll nun kurz auf diese Methoden eingegangen werden.

1.4.1 Synthesen von Pyran-4-onen mit 1,3,5-Triketonen

Eine der gängigsten Methoden ist der säurekatalysierte Ringschluß von 1,3,5-Triketonen zu Pyran-4-onen. Viele Synthesen basieren auf dieser Reaktion, unterscheiden sich allerdings beim Syntheseansatz für die Carbonyl-Komponente. In Abbildung 1-12 ist eine solche Synthesefolge dargestellt. Die Zyklisierung des Triketons erfolgt hier in kalter Schwefelsäure, vermutlich über die Enol-Form und das Hemiacetal.[49]

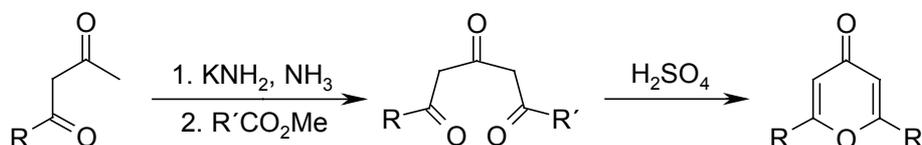


Abbildung 1-12: Darstellung eines Triketons und säurekatalysierte Zyklisierung zum Pyran-4-on.

Die klassische Synthese der Chelidonsäure erfolgt nach demselben Prinzip. Von Aceton und Oxalsäurediethylester ausgehend, wird zuerst mit Hilfe von Natriumethanolat das Triketon dargestellt, welches dann unter der Einwirkung von Mineralsäuren zyklisiert.[50-52]

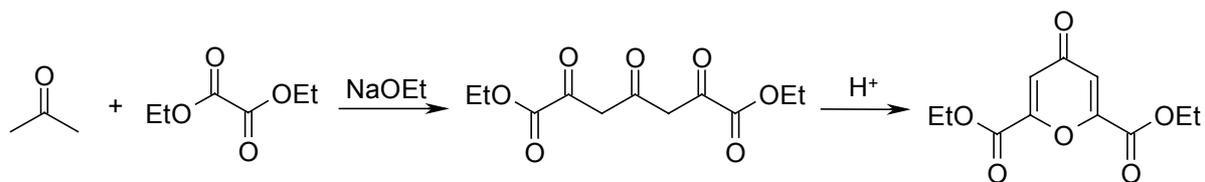


Abbildung 1-13: Darstellung des Chelidonsäurediethylesters.

Die Verwendung der Reagenzien DMSO-(COCl)₂ (**A**) oder Ph₃P-CCl₄ (**B**) erlaubt eine sehr milde Zyklisierung von Triketonen.[53] Mit dieser Methode lassen sich Pyran-4-one synthetisieren, ohne dass dabei die Gefahr einer Epimerisierung oder Verlust benachbarter Stereozentren besteht. Sie fand daher vielfach Anwendung bei der Totalsynthese mariner Naturstoffe und der Aufklärung ihrer absoluten Konfiguration.[54-56]

Die Zyklisierung wird durch den Angriff der aktiven Spezies, (CH₃)₂S⁺Cl im Falle der Swern Oxidation (**A**) bzw. die Phosphoniumsalze Ph₃P⁺CCl₃ oder Ph₃P⁺Cl (**B**), am Carbonyl-Sauerstoff eingeleitet (Abbildung 1-14). Das daraus resultierende Dihydropyran-4-on Intermediat ergibt dann unter Verlust eines Sauerstoffatoms in Form eines Sulfoxids (**A**) bzw. Phosphinoxids (**B**) das Pyran-4-on.

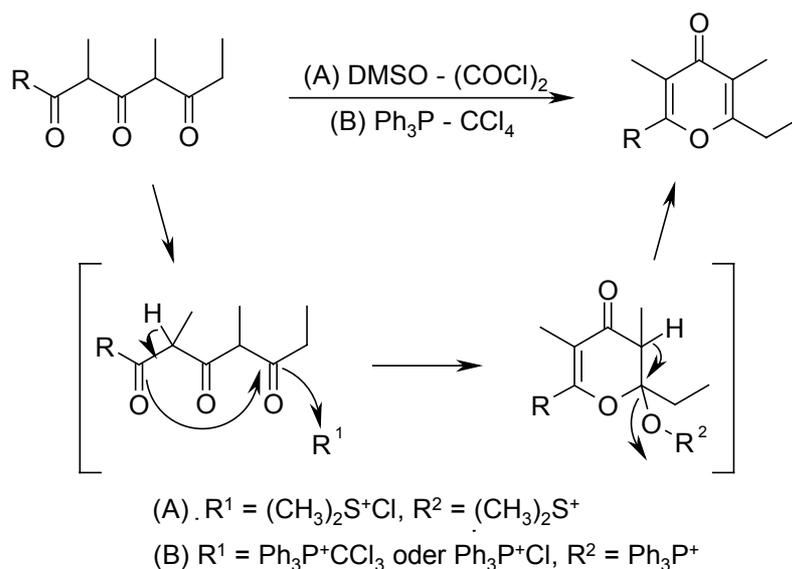


Abbildung 1-14: Reaktionsbedingungen und Mechanismus der Pyran-4-on Synthese nach Yamamura *et al.*

Eine allgemein anwendbare Route für die Darstellung von Pyranonen, bei welcher stark saure Reaktionsbedingungen vermieden werden, ist die C-Acylierung von Enolaten mit Acyl-Derivaten. Beschrieben ist die Reaktion von Lithium-Enolaten mit Säurechloriden[57,58] und die Umsetzung eines Kalium-Enolats mit Säurechloriden, -anhydriden und -imidazoliden.[59] Beide Methoden verlaufen ohne nennenswerte O-Acylierung über eine Enol-Zwischenstufe und ergeben gute Ausbeuten der Pyranonverbindungen.

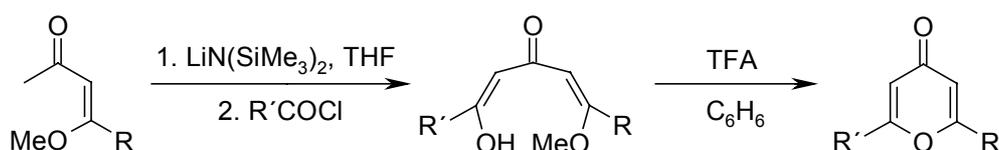


Abbildung 1-15: Umsetzung eines Lithium-Enolats mit einem Säurechlorid.

1.4.2 Synthesen von Pyran-4-onen aus Furan-Derivaten

Maltol (3-Hydroxy-2-methyl-pyran-4-on) ist ein wichtiger Aromastoff für die Nahrungsmittelindustrie, da er Lebensmitteln einen angenehmen malzigen Geruch verleiht. Für die Ausarbeitung effektiver Synthesen dieser Substanz wurden daher beträchtliche Anstrengungen unternommen. Ein großer Anteil der Routen, die entwickelt wurden, gehen dabei von Furan-Derivaten aus. Generell lässt sich sagen, dass diese Methoden auf der durch Säuren katalysierten Umlagerung des Dihydrofurfurylalkohols in ein Dihydropyran-3-on (Abbildung 1-16) basieren.[60] Der Syntheseweg beginnend mit dem Furan-2-aldehyd ist in Abbildung 1-16 zu sehen.[61,62] Obwohl es sich dabei um eine mehrstufige Synthese handelt, liegt die Gesamtausbeute bei etwa 20% und die Reaktionen sind vorwiegend einfach in ihrer Durchführung. Es besteht auch die Möglichkeit, den Furfurylalkohol direkt in ein 6-Alkoxy-pyran-3-on zu überführen.[63,64]

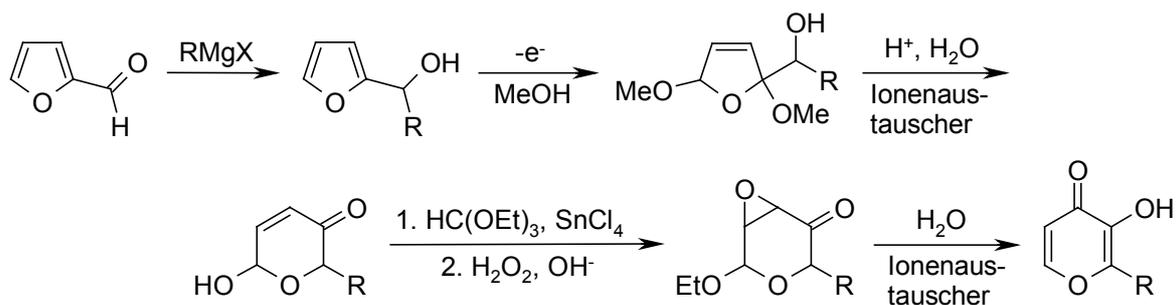


Abbildung 1-16: Syntheseweg für die Darstellung von 3-Hydroxy-2-alkyl-pyran-4-onen.

Die oxidative Umlagerung kann alternativ auch mit Chlor bzw. Brom als Oxidationsmittel in einer Eintopfreaktion durchgeführt werden.[65-67] Die Reaktion verläuft über das instabile 3,4-Dihalogen- und das 4-Halogen-Derivat und ergibt nach einer *in-situ* säurekatalysierten Hydrolyse das Pyran-4-on. Die Gesamtausbeute an Maltol beträgt dabei über 60% und diese Reaktion ist auch für die Herstellung von Ethylmaltol aus Ethyl-furfurylalkohol geeignet.

Der oben in Abbildung 1-16 aufgezeigte Syntheseweg kann durch eine Abwandlung auch zur Synthese von 3,5-Dihydroxy- bzw. 5-Halogen-3-hydroxy-pyran-4-onen genutzt werden. Ausgehend vom 6-Alkoxy-pyran-3-on gelangt man über eine Halogenierung und eine nachfolgende Epoxidierung unter milden basischen Bedingungen mit Wasserstoffperoxid zu einem 4,5-Epoxy-4-halogen-6-methoxy-tetrahydropyran-3-on. Dieses wird dann im sauren Medium hydrolysiert und lagert sich dabei in das entsprechende Pyron-Derivat um.[68]

Die 5-Brom-3-hydroxy-pyran-4-one lassen sich in einer durch Palladium katalysierten Abwandlung der Suzuki-Kupplung mit Phenylborsäure zu den entsprechenden 5-Aryl-3-hydroxy-pyran-4-onen umsetzen.[69]

1.4.3 Synthesen von Pyran-4-onen aus Zucker-Derivaten

Zucker bzw. ihre Derivate eignen sich ebenso zur Darstellung von Pyran-4-onen. 1,3,4-Triacetyl- α -D-xylopyranose[70] kann durch die Behandlung mit

Dimethylsulfoxid und Essigsäureanhydrid in einer Eintopfreaktion in das 3-Acetoxy-pyran-4-on überführt werden. Die in Abbildung 1-17 dargestellte Reaktionssequenz umfasst eine Oxidation, Umesterung und Eliminierung und verläuft mit einer Ausbeute von 79%. Eine einfache thermische Hydrolyse ergibt dann das 3-Hydroxypyran-4-on (Pyromekonsäure).[71]

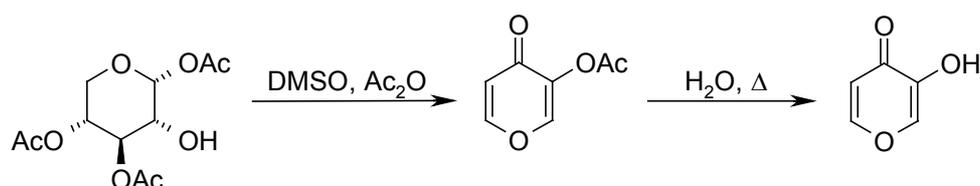


Abbildung 1-17: Synthese der Pyromekonsäure aus 1,3,4-Triacetyl- α -D-xylopyranose.

Diese Synthesemethode wurde schon für die Darstellung von Kojisäure verwendet.[72]

Die Darstellung von Hydroxymaltol-Derivaten ist nach dieser Methode ebenso möglich und der Reaktionsverlauf soll nun etwas näher betrachtet werden (Abbildung 1-18). Der Ausgangspunkt ist erneut ein Zucker-Derivat, die Methyl-2,3,6-tri-*O*-benzoyl- α -D-galactopyranose. Die Dimethylsulfoxid/Essigsäureanhydrid-Oxidation führt über ein intermediäres 4-Ulosid und eine sich anschließende β -Eliminierung zum 3,4-Enolon. Basische und saure Bedingungen überführen die 3,4-Enolon-Struktur unter Verlust des anomeren Substituenten glatt in das Pyran-4-on System, wobei die erwähnten Hydroxymaltol-Derivate gebildet werden.

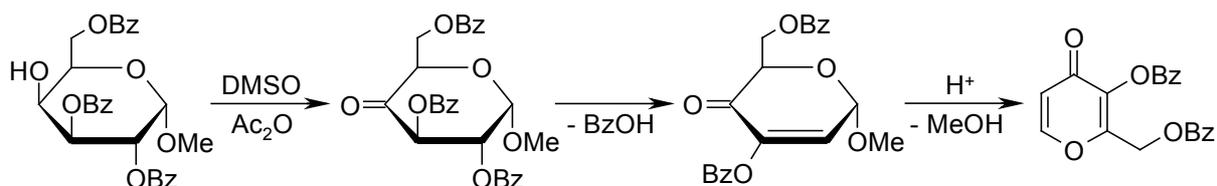


Abbildung 1-18: Reaktionsfolge der Umsetzung von Zucker-Derivaten zu Pyran-4-onen.

1.5 Synthese von Chromonen (Benzopyran-4-onen)

Die beiden am häufigsten verwendeten Ausgangssubstanzen für die Darstellung von Chromonen sind 2-Hydroxyacetophenone und Phenole. In beiden Fällen wird eine Seitenkette am Substrat aufgebaut und das sich ergebende Produkt wird zyklisiert. Die Synthesen unterscheiden sich meist nur beim Ursprung der Seitenkette.

1.5.1 Synthese von Chromonen mit 2-Hydroxyacetophenonen

Bei den Synthesen die von 2-Hydroxyacetophenonen ausgehen, benötigt man einen C₁-Baustein, bevor man die Zyklisierung herbeiführen kann. Dieser Baustein bildet dann das neue C-2 Atom des Heterozyklus. Die direkte C-Formylierung ist nicht trivial, und die folgenden Synthesen sollen einen Einblick in die unterschiedlichen Techniken zur Einführung dieses Fragments geben.

1.5.1.1 Mit 2-Hydroxyacetophenonen und Estern – Claisen-Kondensation

Durch die Behandlung mit einer Base wird die aktivierte Methylgruppe des 2-Hydroxyacetophenons in ein Carbanion überführt. Die Claisen-Kondensation mit einem Ester führt zu einem 1,3-Diketon, dessen Natriumsalz isoliert werden kann, was allerdings meist unnötig ist. Die Zyklisierung zum Chromon gelingt in saurer Lösung dann recht leicht (Abbildung 1-19).

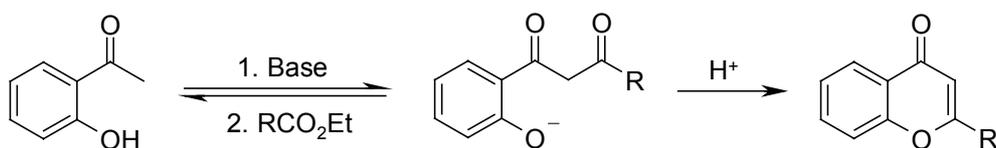


Abbildung 1-19: Darstellung eines Chromons ausgehend von 2-Hydroxyacetophenon.

Diese Methode und ihre Varianten wurde seit ihrer Einführung[73] zur Herstellung zahlreicher Chromone verwendet, was sich deutlich in der Fülle der Literaturbeispiele niederschlägt.[74-80] Substituenten am aromatischen Ring des Acetophenons haben dabei nur minimalen Einfluss auf den Reaktionsverlauf, sowohl Elektronen schiebende als auch ziehende Substituenten lassen sich in die Synthese einbinden.

Bei der Wahl der Esterkomponente ist man synthesebedingt etwas eingeschränkt. Der C-2 Substituent ist dabei meist eine Alkyl- oder Ethoxycarbonyl-Gruppe oder gar nicht vorhanden. Eine Claisen-Kondensation mit einem Hydroxy-substituierten Ester, wie z.B. (2-Iod-phenoxy)-essigsäureethylester, ist auch möglich.[81]

Nicht unerwartet hat ein Substituent an der Acetylgruppe des 2-Hydroxyacetophenons einen Einfluss auf die Kondensation, aber auch hier gibt es Beispiele für die erfolgreiche Synthese 3-substituierter Chromone.[74,82] Eine interessante Alternative zur Synthese 3-substituierter Chromone besteht darin, die intermediären Diketone zu alkylieren und anschließend zu zyklisieren.[83]

1.5.1.2 Mit 2-Hydroxyacetophenonen und Säurechloriden

Hier beginnt die Synthese der 1,3-Diketon-Intermediate mit der O-Acylierung der 2-Hydroxyacetophenone. Durch die Behandlung mit Kaliumcarbonat wird eine intramolekulare Umlagerung des entstandenen Acyloxyacylbenzol-Derivats induziert, wobei die Acylgruppe vom O-Atom zum α -C-Atom der zweiten Acylgruppe wandert. Dies ist die sogenannte Baker-Venkataraman Umlagerung. Die wandernde Acylgruppe kann dabei aromatisch oder aliphatisch sein, der Syntheseansatz ist daher für die Darstellung von Flavonen als auch Chromonen geeignet.[84-87]

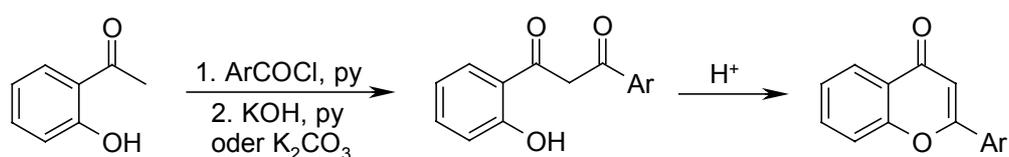


Abbildung 1-20: O-Acylierung von 2-Hydroxyacetophenonen und Baker-Venkataraman Umlagerung zur Synthese von Flavonen.

1.5.1.3 Mit 2-Hydroxyacetophenonen und Säureanhydriden - Kostanecki-Robinson Synthese

Bei der Kostanecki-Robinson Synthese von Chromonen und Flavonen wird ein 2-Hydroxyacetophenon mit dem Anhydrid und dem Natriumsalz einer aliphatischen Carbonsäure erhitzt.[88-90] Die 3-Acyl Gruppe lässt sich einfach alkalisch abspalten. Dies geschieht oft schon während der Aufarbeitung bzw. Isolierung des Produkts, da sie Teil eines 1,3-Diketon Systems ist.

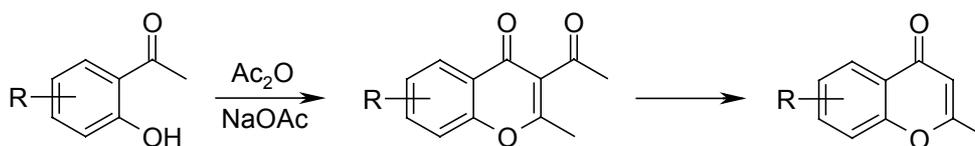


Abbildung 1-21: Kostanecki-Robinson Synthese von Chromonen und Flavonen.

Die Reaktion fand vielfache Anwendung und ist eine wichtige Synthesemethode für Flavone. Der aromatische Ring kann dabei fast jede Gruppe tragen, sofern er nicht unter den gegebenen Bedingungen reagiert, und eine Reihe von Chromonen mit Alkyl-, Acyl-, Alkoxy-, Halogen-, Nitro- und Cyano-Gruppen wurden nach dieser Methode synthetisiert.

Werden sehr reaktive, gemischte Essigsäure-/Ameisensäureanhydride verwendet, so ist die Synthese auch schon bei Raumtemperatur möglich und führt zu Chromonen mit einem unsubstituierten C-2 Atom. Mit einer elektronenziehenden Gruppe an der Acylfunktion des Ketons ergeben sich besonders gute Ausbeuten.[91]

Die Anwendungen dieser wertvollen Reaktion zur Synthese von Chromonen und Flavonen sind so vielfältig und zahlreich, dass an dieser Stelle nur auf die grundlegenden Eigenschaften dieser Reaktion eingegangen wurde, ein detaillierter Überblick ist in der Literatur zu finden.[92,93]

Bei der Kostanecki-Robinson Reaktion folgt einer O-Acylierung eine Baker-Venkataraman Umlagerung zum 1,3-Diketon, welches dann zum Chromon zyklisiert. Erste Untersuchungen kamen zu dem Schluss, dass die Reaktion über das gemeinsame

Intermediat verläuft (Abbildung 1-22). Das basierte auf der Beobachtung, dass sich dasselbe Chromon aus den beiden Anhydriden ergab.[94]

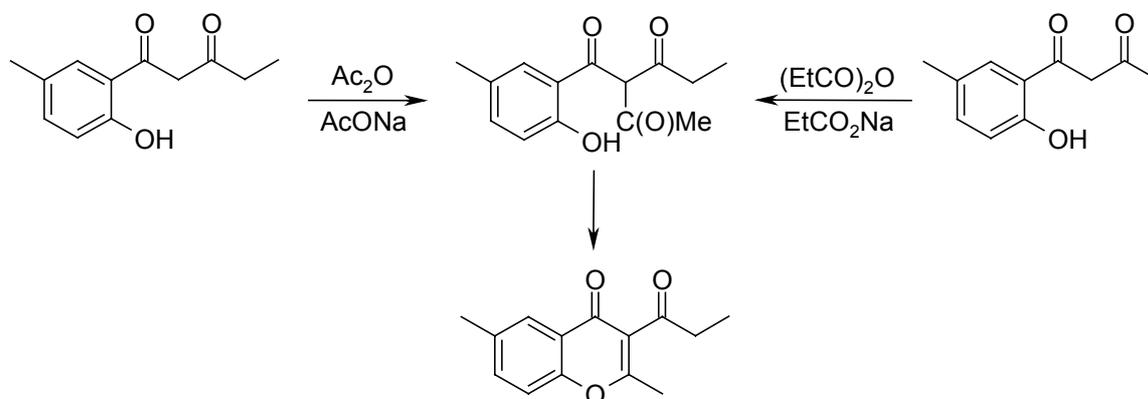


Abbildung 1-22: Postulierter Reaktionsverlauf der Kostanecki-Robinson Reaktion.

Inzwischen konnte aber gezeigt werden, dass es sich bei dem Intermediat in der Synthese um einen Enolester handelt.[95] Diese Ester bilden bei der Behandlung mit Alkalien tatsächlich sehr leicht Chromone und die *ortho*-Acyloxy Gruppe wird dabei durch eine Baker-Venkataraman Umlagerung Teil des Pyranon-Rings (Abbildung 1-23).[96]

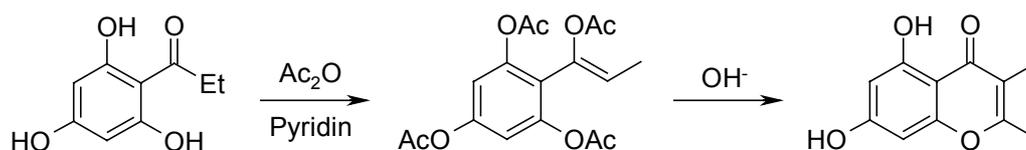


Abbildung 1-23: Reaktionsverlauf der Kostanecki-Robinson Reaktion.

Im Zusammenhang mit der Kostanecki-Robinson Synthese von Chromonen besteht ein Problem. Gelegentlich wird über die gleichzeitige Bildung von Cumarinen berichtet, sogar schon mit einfachen Hydroxyacetophenonen.[97] In welchem Ausmaß die beiden Benzopyranone jeweils gebildet werden, lässt sich schwer vorhersagen. Mitunter wird nur wenig oder gar kein Cumarin gebildet, in anderen Fällen ist es das Hauptprodukt.[83,98] Das Cumarin entsteht dabei wahrscheinlich aus dem anfänglich

acylierten Hydroxyacetophenon, welches neben der Baker-Venkataraman Umlagerung auch eine intramolekulare Aldolkondensation eingehen kann. Nach der Wasserabspaltung entsteht daraus dann das Coumarin (Abbildung 1-24).

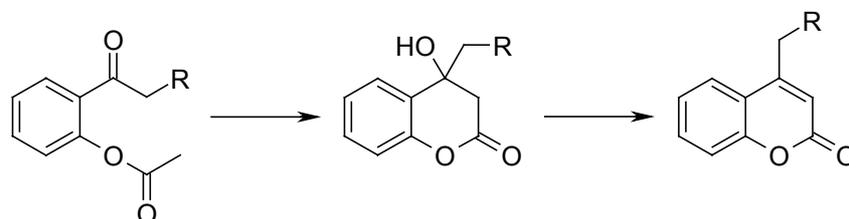


Abbildung 1-24: Coumarinbildung durch Aldolkondensation als Nebenreaktion.

1.5.1.4 Synthese von 3-Halogen substituierten Chromonen mit 2-Hydroxyacetophenonen

Für die Synthese von 3-Halogen substituierten Chromonen wurden ebenso Synthesemethoden ausgearbeitet.[80,99,100] Die zweistufige Synthese (Abbildung 1-25) verläuft über ein Enamino-Keton Intermediat, welches aus käuflich erhältlichen 2-Hydroxyacetophenonen leicht hergestellt werden kann. Daran schließt sich die Reaktion mit einer Quelle positiver Halogenionen (Brom, Iod, *t*-Butylhypochlorit) an und man erhält die 3-Halogen-Chromone.

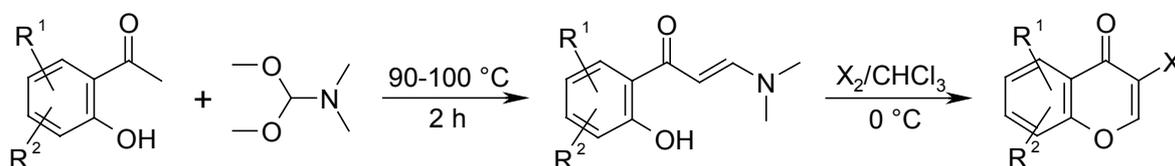


Abbildung 1-25: Synthese von 3-Halogen substituierten Chromonen.

1.5.2 Synthese von Chromonen mit Phenolen – Simonis-Reaktion

Die Simonis-Reaktion ist eng verwandt mit der Pechman-Synthese von Cumarinen und beinhaltet die Reaktion eines Phenols mit einem 3-Ketoester.[101] Im Zusammenhang mit dieser Synthese sind zwei Nachteile bekannt, zu nennen wäre da zum einen die niedrige bis moderate Ausbeute und zum anderen die Möglichkeit der gleichzeitigen Bildung von Cumarinen.

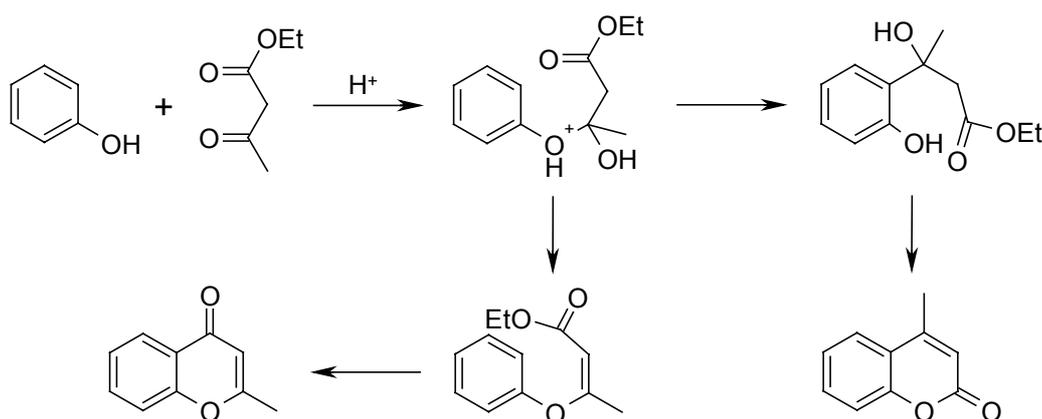


Abbildung 1-26: Simonis-Reaktion von Phenol mit Acetessigsäure-ethylester.

Die verwendeten Kondensationsmittel, wie Phosphorpentoxid, Polyphosphorsäure, Phosphorylchlorid oder Schwefelsäure, lassen dabei keine klare Linie über ihre Auswirkung auf die Produktverteilung zwischen Chromon und Cumarin erkennen. Dabei war die Erkenntnis, dass ein Kondensationsmittel für die Zyklisierung von Chromonen unnötig, ja sogar eher hinderlich ist, der wohl wichtigste Schritt.[102] Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine kurze Reaktionszeit und ein hochsiedendes Lösungsmittel die bevorzugten Bedingungen sind, was dann allerdings nur noch die Verwendung von reaktiveren Phenolen erlaubt.

1.5.3 Synthese von Chromonen mit Enaminen

Synthesen von Chromonen, bei denen Enamine verwendet werden, wurden von mehreren Gruppen beschrieben. Aus der Reaktion von Salicylaldehyd mit 1-Morpholinocyclohexen resultiert zuerst ein Chromanol. Die sich anschließende einfach verlaufende Oxidation mit Chromtrioxid ergibt dann das Chromon.[103] Weitere Beispiele sind die Umsetzung mit 1-Morpholino-1-phenylethylen, woraus ein Flaven hervorgeht, während sich mit *N*-Styrylmorpholin ein Isoflavon ergibt. Der Reaktionsverlauf (Abbildung 1-27) entspricht einer gewöhnlichen Reaktion eines Carbonyls mit einem Enamin, gefolgt von einer Zyklisierung mit der benachbarten phenolischen OH-Gruppe.

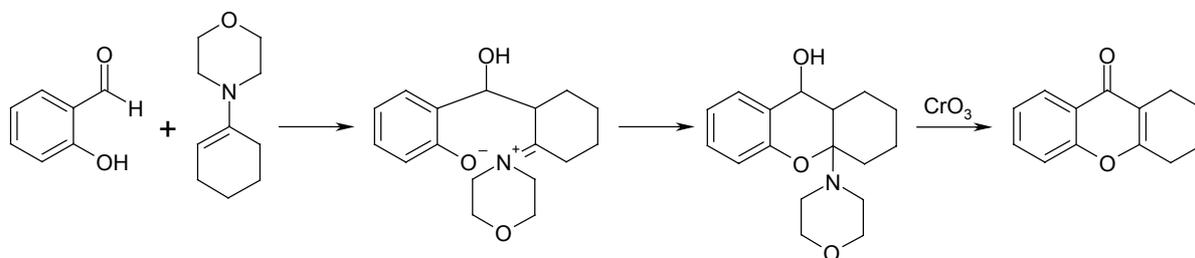


Abbildung 1-27: Synthese von Chromonen mit Enaminen.

Aus der Reaktion von Enaminen mit Diketenen gehen ebenso Chromone hervor.[104] Der Nachteil der Methode ist die Verwendung von 2,3-Dihydro-*N,N*-dimethyl-*p*-toluidin, welches durch eine Birch-Reduktion des entsprechenden aromatischen Amins hergestellt werden muss. Dies hat zur Konsequenz, dass das vorläufig erhaltene Produkt, ein reduziertes Chromon, anschließend noch aromatisiert werden muss.

1.5.4 Synthese von Flavonen mit Chalcon-Dibromiden

Die Zyklisierung einer Reihe an Chalcon-Dibromide zu Flavonen konnte durch die Behandlung mit Pyridin erreicht werden.[105] Es wird angenommen, dass die Reaktion über das entsprechenden Chalcon und Bromchalcon abläuft (Abbildung

1-28), welche durch eine Debromierung bzw. Dehydrobromierung entstanden sind. Die Bildung von Pyridin-hydrobromid-perbromid würde die kernbromierten Flavone erklären, die mitunter neben den Flavonen beobachtet wurden.[106]

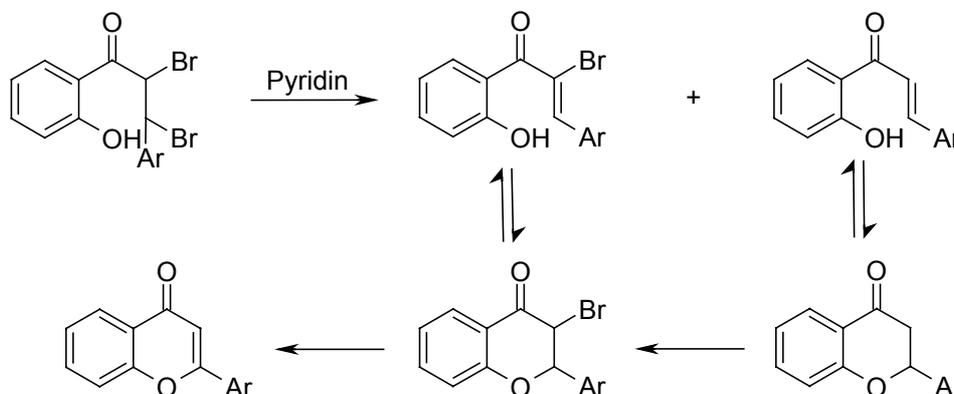


Abbildung 1-28: Flavonsynthese mit Chalcon-Dibromiden.

1.6 Pyranopyrane

Systematisch betrachtet gehören die Pyranopyrane zu den bicyklischen 6–6-Systeme, bei denen jeder Ring je ein Heteroatom trägt. Die Kombinationsmöglichkeiten aus denen sich die verschiedenen Bicyklen ergeben, lassen sich abschätzen, wenn man zwei passende monozyklische Heterozyklen kondensiert. Die vollständig konjugierten 6–6-Systeme ohne eine exozyklische Konjugation mit Sauerstoff als Heteroatom sind in Abbildung 1-29 gezeigt.[107]

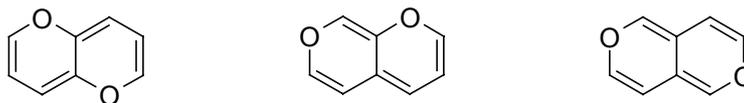


Abbildung 1-29: Pyranopyrane; Bicyklische 6–6-Systeme mit Sauerstoff als Heteroatom.

Diese Strukturen sind allerdings 12π -Systeme und daher formal antiaromatisch. Das hat zur Folge, dass Heterozyklen mit Sauerstoff oder auch Schwefel als Heteroatome und zwei vollständig konjugierten Ringen, zwangsläufig immer eine exozyklische Konjugation aufweisen müssen. Diese Dione (Abbildung 1-30) sind dann 14π -Systeme und formal wieder aromatisch.

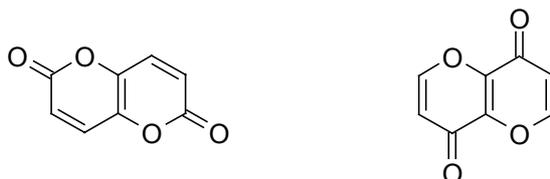


Abbildung 1-30: Bicyklische 6–6-Systeme mit Sauerstoff als Heteroatom und exozyklischer Konjugation.

1.6.1 Synthese von Pyranopyran-dionen

Neben den oben beschriebenen formal aromatischen Pyranopyran-dionen, gibt es insgesamt 20 Möglichkeiten zwei Pyran-2-on- und/oder Pyran-4-on-Systeme zu kondensieren. Viele davon sind aber nicht einfach zu erhalten und nur wenige davon wurden auch tatsächlich synthetisiert. Der folgende Abschnitt gibt eine Zusammenstellung dieser Verbindungen wieder.[108]

Das wohl erste Pyranopyran-dion wurde von Fleischmann beschrieben.[109] Er benannte das bei der Kondensation von 4-Hydroxy-6-methyl-pyran-2-on mit Acetessigsäure-ethylester erhaltene Produkt allerdings als ‚pyrone-lactone‘ (Abbildung 1-31).

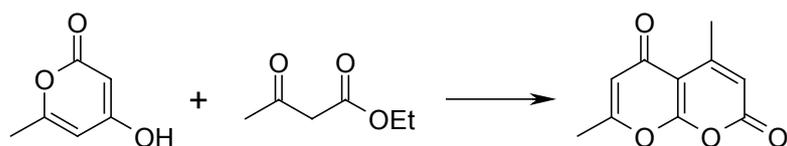


Abbildung 1-31: Fleischmanns Vorschlag des Kondensationsprodukts: „pyrone-lactone“.

Erst über 50 Jahre später berichtete Prail über ein anderes Produkt, welches er aus einem Diketon durch Einwirkung von Perchlorsäure erhalten hatte und das er als α,γ -Bispyron bezeichnete.[110] Das α,γ -Bispyron entsteht dabei wahrscheinlich aus dem γ,γ -Bispyron durch eine säurekatalysierte Umlagerung (Abbildung 1-32). Seine Ergebnisse veranlassten Prail zu der Schlussfolgerung, dass Fleischmann wohl ein α,α -Bispyron synthetisiert haben müsste (Abbildung 1-33, links).

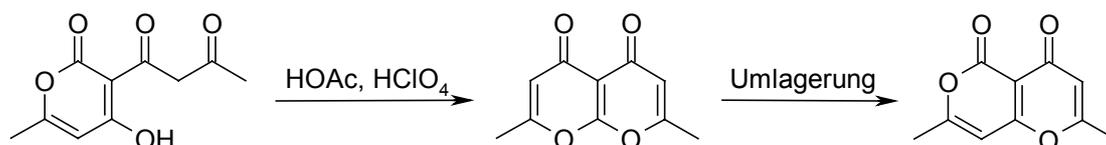


Abbildung 1-32: Prails Synthese eines α,γ -Bispyrons.

In den folgenden Jahren beschrieben zwei Gruppen die Reaktion der Dehydracetsäure mit Acetessigsäureethylester, allerdings mit einer widersprüchlichen Produktzuordnung. Tan[111] beschrieb sein Produkt als das α,α -Bispyron, während Talapatra[112] seinem die Struktur des α,γ -Bispyrons zuordnete (Abbildung 1-33) und dafür auch die ersten ¹H NMR Daten lieferte.

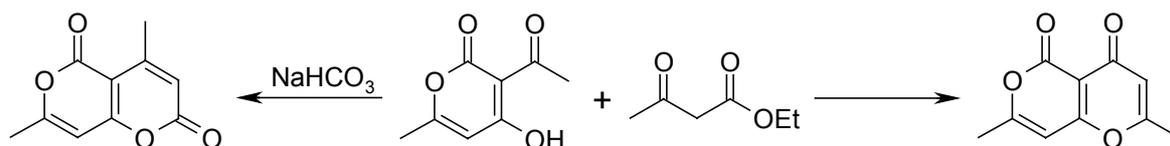


Abbildung 1-33: Die vorgeschlagenen Bispyrone von Tan (links) und Talapatra (rechts).

Allerdings sind die ^1H NMR Daten Talapatras unterschiedlich zu denen, die später dann von Crombie[113] erhalten wurden. Dieser berichtete über die Darstellung des α,γ -Bispyrons, indem er Dehydracetsäure mit Essigsäureanhydrid und Perchlorsäure umsetzte (Abbildung 1-34).

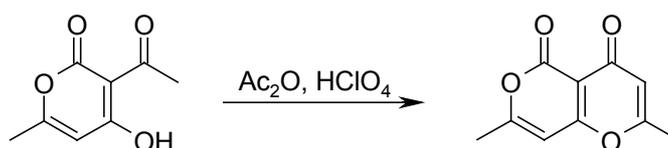


Abbildung 1-34: Crombies Synthese eines α,γ -Bispyrons.

Welches Pyranopyran-dion nun von Fleischmann oder Praill erhalten wurde, lässt sich leider auch nicht mechanistisch ableiten, da beide Bispyrone bei jeder der beiden Reaktionen entstehen könnten.[114,115]

Erst kürzlich konnte die Gruppe um Hsung eine eindeutige Zuordnung für Fleischmanns α,α -Bispyrone und Praills α,γ -Bispyrone treffen.[116] Dies gelang durch die Ausarbeitung eines neuen Synthesewegs für das α,γ -Bispyron. In dieser Eintopfreaktion ermöglicht die Einwirkung von Lewis-Säuren eine Kondensation von α,β -ungesättigten Carbonsäuren und 4-Hydroxy-pyran-2-on (Abbildung 1-35). Zusätzlich wurde auch eine schrittweise Reaktionssequenz für die Synthese des α,α -Bispyrons ausgearbeitet (Abbildung 1-36).

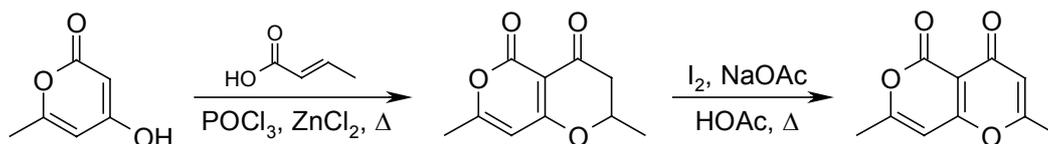


Abbildung 1-35: Hsungs Synthese des α,γ -Bispyrons.

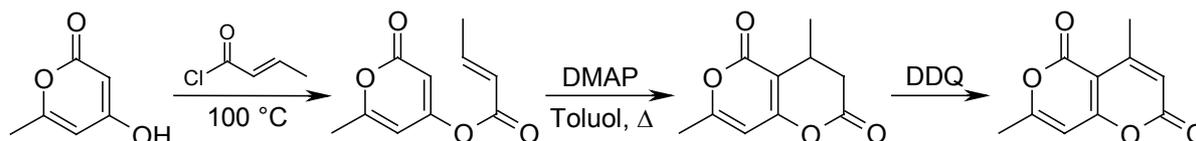


Abbildung 1-36: Hsungs Synthese des α,α -Bispyrons.

Die ^1H NMR Daten der synthetisierten Verbindungen halfen dabei, letzte Unklarheiten zu beseitigen. Fleischmann hatte tatsächlich das α,α -Bispyron synthetisiert, welches dieselben ^1H NMR Daten wie jenes von Talapatra aufweist. Dessen Behauptung ein α,γ -Bispyron synthetisiert zu haben, muss daher angezweifelt werden. Man kann allerdings davon ausgehen, dass Prail und Crombie die Synthese des α,γ -Bispyrons gelang.

Money und Scott, deren Interesse der biomimetischen Synthese von Phenolverbindungen galt, synthetisierten eine Reihe an Pyranopyranen.[117-119] Diese dienten ihnen als maskierte Form linearer β -Polyketosäuren, die sie als Modellverbindungen für natürliche Polyketide verwendeten. Die Synthese erfolgte schrittweise durch Umsetzung der jeweiligen Vorstufe mit Malonsäuredichlorid in Trifluoressigsäure.

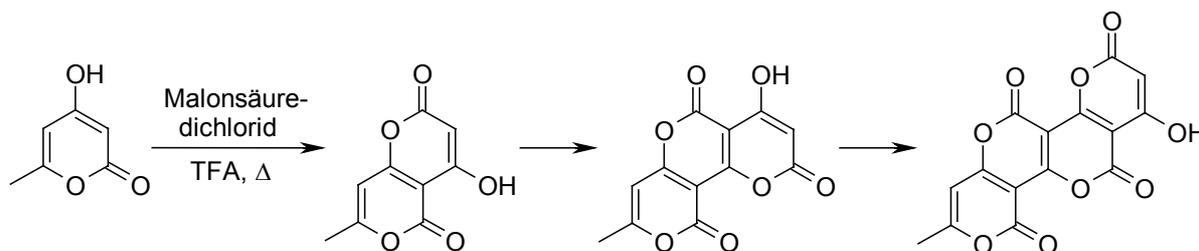


Abbildung 1-37: Schrittweiser Aufbau der Pyranopyrane.

Pyranopyran-dione wurden noch im Zusammenhang mit der Reaktion von Dihydroxyaceton in leicht sauren wässrigen Lösungen erwähnt.[120] Neben zahlreichen anderen Verbindungen konnten zwei Pyranopyran-dione isoliert werden, die mittels ^1H NMR charakterisiert wurden und als γ,γ -Bispyrone bezeichnet werden können. Allerdings waren die Mengen zu gering, um eine eindeutige Entscheidung über die genaue Orientierung der Ringe zu treffen. Die Tatsache, dass auch 3-Hydroxy-pyran-4-one in der Reaktionsmischung gefunden wurden, legt aber die Vermutung nahe, dass es sich um die „Kopf-Schwanz“-Annelierung handeln könnte (Abbildung 1-38).

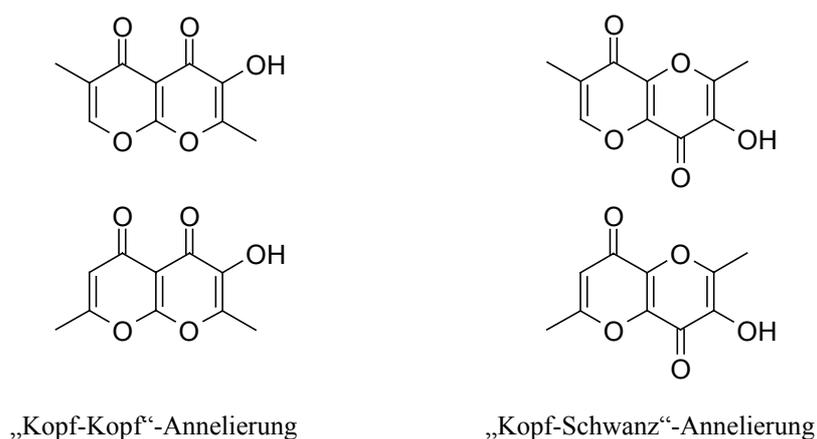


Abbildung 1-38: Möglichkeiten der Kondensation bei γ,γ -Bispyronen.

2 Aufgabenstellung

Wie in der Einleitung schon erwähnt wurde, existieren in der Literatur eine Vielzahl von Vorschlägen für die Identität des endogenen Liganden der Na^+/K^+ -ATPase. Bei diesen Arbeiten, in denen die endogenen Hemmstoffe überwiegend aus tierischen Geweben und Flüssigkeiten isoliert wurden, wurde zumeist versucht, die isolierten Verbindungen einer bekannten Stoffgruppe zuzuordnen. Ein eindeutiger Strukturbeweis mit einer vollständigen chemischen Charakterisierung konnte dabei allerdings nie erbracht werden. Dafür konnte aus diesen biologischen Quellen meist nicht genügend Substanz isoliert werden.

Die Pflanzen der Gattung *Helleborus* fanden schon früh in der Volksmedizin ihre Verwendung, und sind dort auch unter dem Namen Christrose oder Nieswurz bekannt. Aus der Pflanze *Helleborus purpurascens* konnte ein Extrakt gewonnen werden, welcher die Enzymaktivität der Na^+/K^+ -ATPase hemmte. Die bei der Untersuchung dieses Extraktes erhaltenen ersten Ergebnisse, führten F. Kerek zur Formulierung einer hypothetischen Struktur für diesen Inhibitor der Na^+/K^+ -ATPase. Diese neue Substanzklasse wurde als makrozyklische Kohlensuboxid-Oligomere mit der allgemeinen Summenformel $(\text{C}_3\text{O}_2)_n$ bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher weitere Untersuchungen am Extrakt aus *Helleborus purpurascens* vorgenommen werden, insbesondere hinsichtlich der biologischen Aktivität. Ziel wäre es, die aktive Verbindung aus dem Extrakt zu isolieren bzw. weiter aufzureinigen. Die Charakterisierung der Substanz sollte dann zusätzliche Hinweise über die Identität dieses Hemmstoffes und weitere experimentelle Belege für die hypothetische Struktur erbringen.

Da es sich bei den makrozyklischen Kohlensuboxid-Oligomeren um eine neue Substanzklasse handelt, sollten erste Anhaltspunkte für die Entwicklung von Synthesestrategien für Modellverbindungen erarbeitet werden, um die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Substanzen kennen zu lernen, was wiederum die Isolierung und strukturelle Charakterisierung erleichtern könnte.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Herstellung des Extraktes aus *Helleborus purpurascens*

Aus der Pflanze *Helleborus purpurascens* konnte ein Extrakt gewonnen werden, welcher die Enzymaktivität der Na^+/K^+ -ATPase hemmte. Die Isolierung aus dieser Pflanze hatte den Vorteil, dass damit eine Quelle des Hemmstoffes zugänglich wurde, wodurch eine ausreichende Substanzmenge für die weiteren Untersuchungen zur Verfügung stand.

Als Ausgangsmaterial wurden die getrockneten Wurzeln von *Helleborus purpurascens* verwendet. Die mit Hexan entfettete Droge wurde mit wässrigem Ethanol bei Raumtemperatur extrahiert. Durch mehrere flüssig/flüssig Extraktionen erhielt man eine gereinigte Vorstufe des Extraktes. Dieser konnte noch weiter gereinigt werden, indem er in Aceton gelöst und durch Zutropfen in Hexan wieder gefällt wurde. Dieser Niederschlag wurde nach dem Zentrifugieren im Vakuum getrocknet und stellte den in den weiteren Untersuchungen verwendeten Extrakt dar.

3.2 Untersuchung des Extraktes mittels HPLC

Nach der Aufarbeitung und der Voreinigung des Extraktes wurde dieser mittels HPLC untersucht. Dabei stand am Anfang die Entwicklung einer Methode, mit der möglichst alle Bestandteile des Extraktes aufgetrennt werden können. Zudem sollte sie dann auch als Ausgangspunkt für die präparative Reinigung des Extraktes dienen.

Bei Naturstoffextrakten, die meist doch sehr komplexe Mischungen darstellen, ist eine Gradientenelution oft unumgänglich, diese ist an *Reversed Phase* (RP) Materialien sehr leicht durchführbar, wobei *Normal Phase* Materialien nur bedingt dazu geeignet sind. Für die Vorversuche wurde daher auf ein Standard C_{18} RP-Material zurückgegriffen.

Bei der Methodenentwicklung wurde zuerst ein Gradientenprogramm gesucht, welches eine bestmögliche Auftrennung der Bestandteile des Extraktes ermöglicht. Ausgangspunkt bei der Methodenentwicklung war das einfache, einstufige Gradientenprogramm A. Die genauen Beschreibungen der einzelnen Gradienten sind im experimentellen Teil dieser Arbeit zu finden. Als Fließmittel wurden Wasser und Acetonitril verwendet, welche beide mit 0,05% TFA versetzt wurden. Das resultierende Chromatogramm bei 260 nm ist in Abbildung 3-1 zu sehen. Der Zusatz der TFA in den Eluenten erwies sich als unerlässlich, da ohne TFA eine deutliche Peakverbreiterung auftrat (Abbildung 3-2).

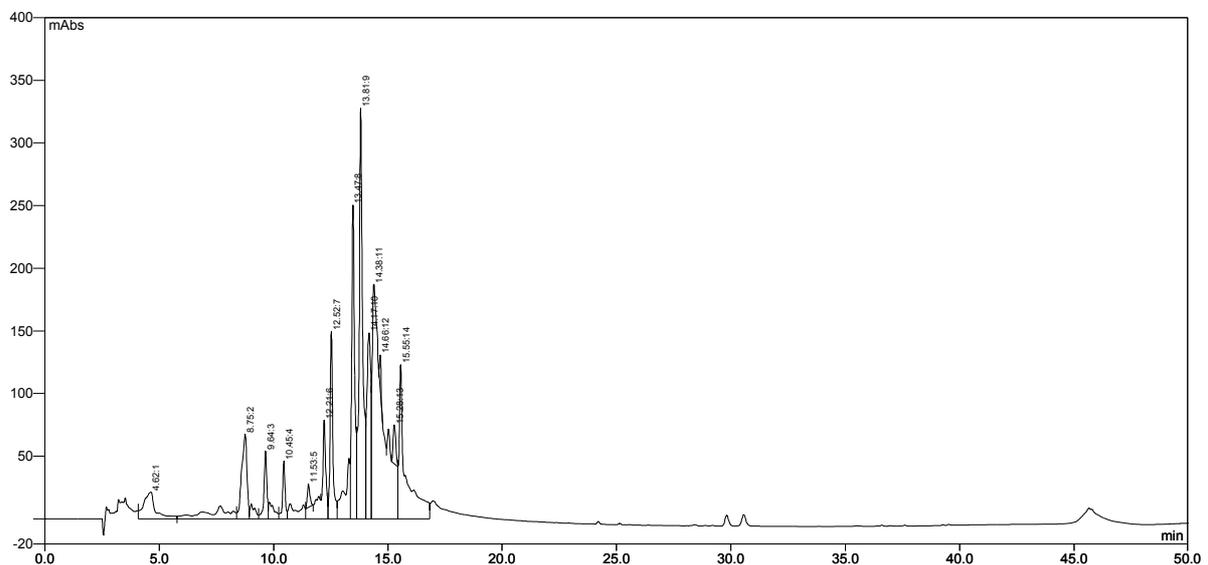


Abbildung 3-1: HPLC des Extraktes HP32 mit dem Gradienten A und Zusatz von 0,05% TFA in den Fließmitteln bei 260 nm.

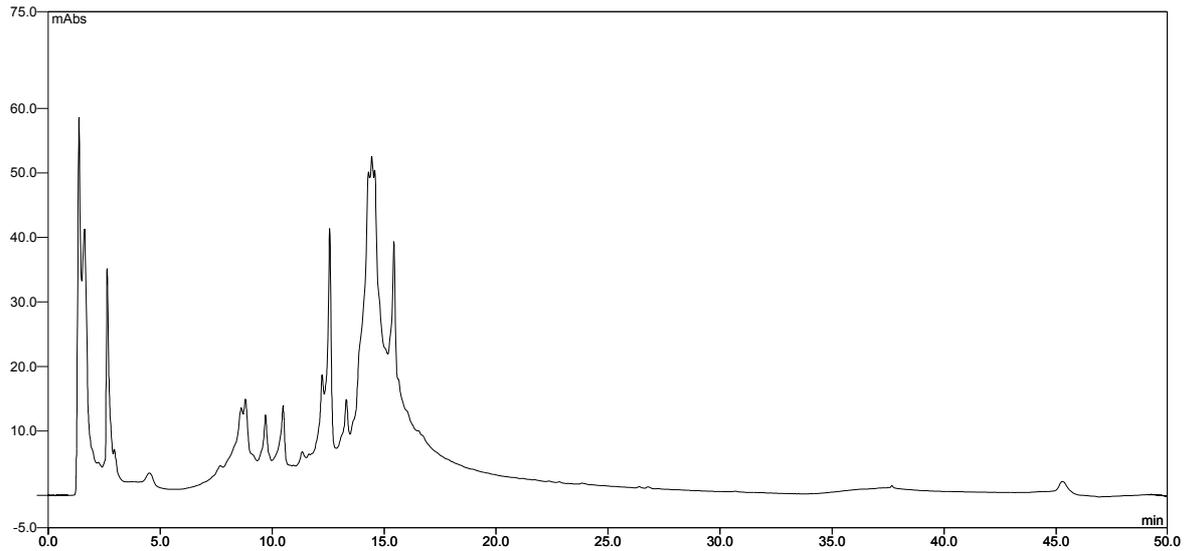


Abbildung 3-2: HPLC des Extraktes HP32 mit dem Gradienten A und neutralen Fließmitteln bei 260 nm.

Da dieser einfache lineare Gradient A nur unbefriedigende Ergebnisse lieferte, wurde an dessen Verbesserung gearbeitet. Es wurde angestrebt, die Auflösung durch einen geeigneten mehrstufigen Gradienten zu verbessern. Das mit einer C_{18} -Säule beste Trennergebnis in Abbildung 3-3 konnte dabei mit dem Gradienten B erzielt werden.

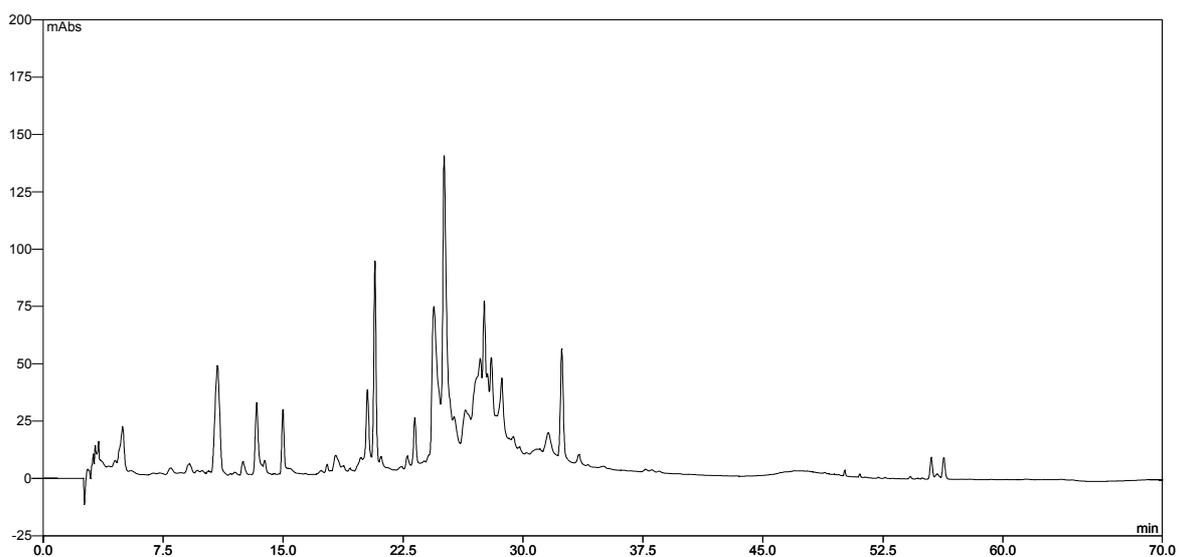


Abbildung 3-3: HPLC des Extraktes HP32 mit dem mehrstufigen Gradienten B.

Durch die Verwendung eines neuen Säulenmaterials (Nucleosil 100-5 C₁₈ HD) konnte nochmals eine Verbesserung erzielt werden. Mit dem zuvor entwickelten Gradienten B konnte bei dieser Säule die Auflösung erhöht und die Peakbreite deutlich reduziert werden (Abbildung 3-4).

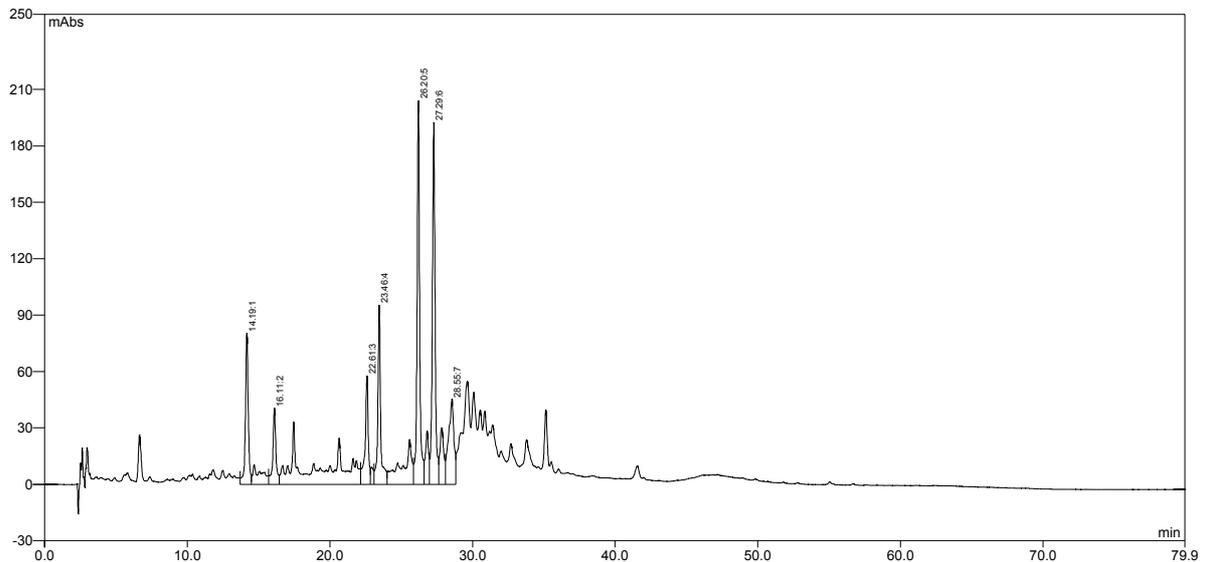


Abbildung 3-4: HPLC des Extraktes HP32 mit dem mehrstufigen Gradienten B und C₁₈ HD-Säule bei 260 nm.

In Abbildung 3-4 ist zu sehen, dass mit dem bisherigen Gradienten die Peaks im Bereich von 27-36 Minuten noch nicht getrennt werden konnten. Eine letzte Anpassung des Gradienten an die Trennleistung der C₁₈ HD-Säule ermöglichte die Auftrennung dieser Peaks. Das mit diesem Gradienten C resultierende Chromatogram ist der Abbildung 3-5 zu entnehmen.

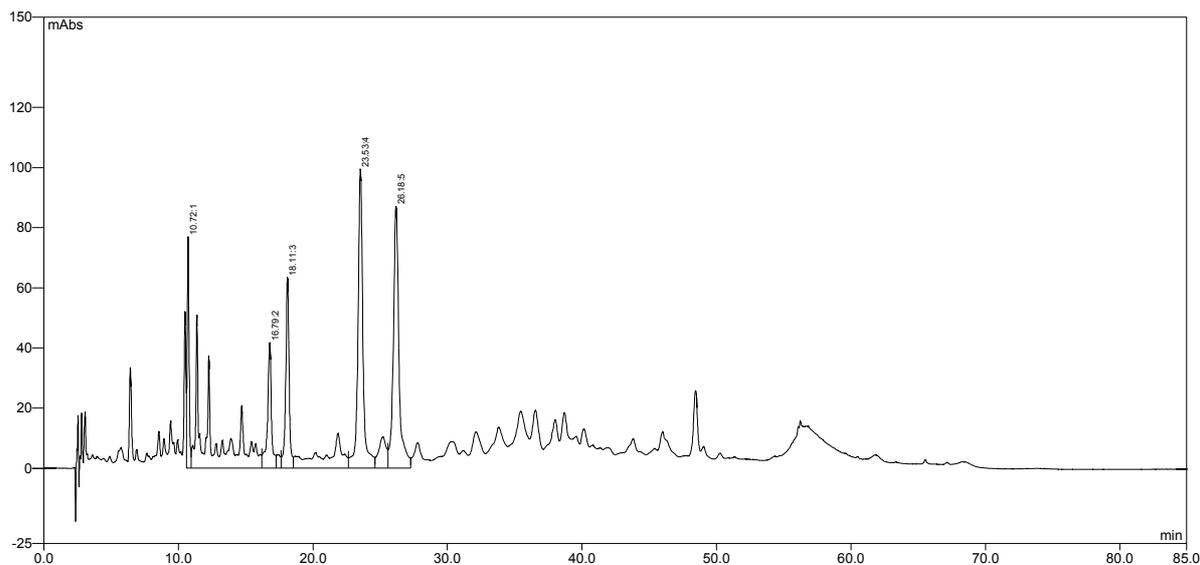


Abbildung 3-5: HPLC des Extraktes HP32 mit verbesserten mehrstufigen Gradienten C und C₁₈ HD-Säule bei 260 nm.

3.3 Säulenchromatographie des Extraktes

Nach den Untersuchungen des Extraktes mittels analytischer HPLC konnten dabei die ersten Anhaltspunkte über dessen Zusammensetzung gewonnen werden. Das Rohextrakt stellte sich dabei als recht komplexe Mischung heraus. Eine präparative Auftrennung dieses Extraktes mittels HPLC würde sich voraussichtlich sehr aufwändig gestalten. Im Vorfeld sollte daher geklärt werden, ob sich durch eine vorangestellte Reinigung des Extraktes an Kieselgel eventuell eine Vereinfachung für die angestrebte präparative HPLC-Reinigung ergeben könnte.

Die Ergebnisse der DC zeigten, dass es sich bei dem Extrakt um eine Mischung von Substanzen mittlerer bis hoher Polarität handelte. Als Eluent wurde daher Chloroform mit einem steigenden Methanolanteil verwendet. Das Extrakt wurde in Aceton gelöst und an einer kleinen Menge Kieselgel adsorbiert. Nach einer Equilibrierungsphase der Säule mit Chloroform wurde das Eluentengemisch in Portionen zugegeben, wobei der Methanolgehalt schrittweise erhöht wurde. Bei einem Chloroform/Methanol-

Verhältnis von 1:1 wurde der Methanolgehalt in größeren Schritten erhöht, bis am Ende mit reinem Methanol eluiert wurde.

Insgesamt wurden 70 Fraktionen zu je 100 ml erhalten, welche mittels DC untersucht wurden. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzauslöschung bzw. durch Besprühen mit Sprühreagenz B. Die Fraktionen, welche im DC eine vergleichbare Zusammensetzung aufwiesen, wurden anschließend vereinigt. Man erhielt so am Ende die acht Fraktionen I bis VIII.

Die Fraktionen II bis V, welche die Hauptmenge des Extraktes ausmachten, ergaben in der DC recht homogene Spots. Bei der analytischen HPLC stellte sich allerdings heraus, dass diese Fraktionen immer noch ein Gemisch vieler Substanzen darstellten.

3.4 Reinigung des Extraktes mittels semipräparativer HPLC

Die Extrakte wurden an einer semipräparativen Säule (250/10 Nucleosil 300-5 C₁₈ HD) gereinigt. Bei den Vorversuchen mit dieser Säule stellte sich heraus, dass das analytische Gradientenprogramm C mit kleinen Modifikationen auch bei der semipräparativen Säule verwendet werden konnte. Diese Modifikationen führten zum Gradienten D und ermöglichten eine deutliche Reduzierung der Programmlaufzeit, ohne dass dabei eine Einbuße der Trennleistung beobachtet werden konnte.

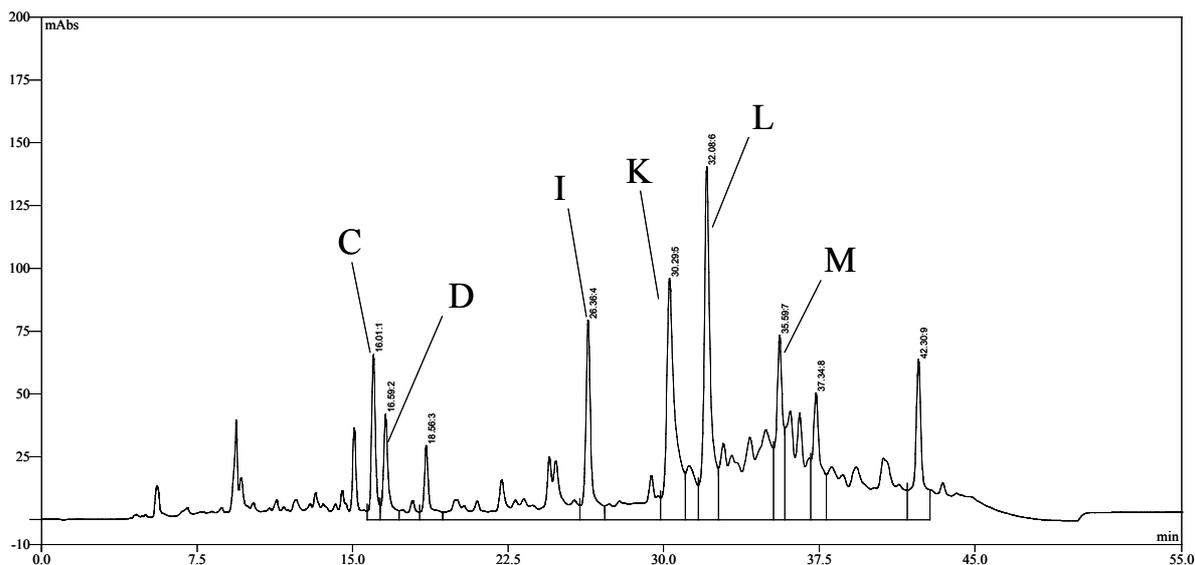


Abbildung 3-6: HPLC des Extraktes HP32 mit dem Gradienten D und der semipräparativen C₁₈ HD-Säule. Eingezeichnet sind die dominanten Peaks, welche bei der Fraktionierung gesammelt wurden.

Die Fraktionierung erfolgte nach zwei Kriterien:

1. Bei den dominanten Peaks wurde eine weitgehende Separierung anvisiert.
2. Zwischen diesen Peaks wurden Zwischenfraktionen genommen.

Die präparative HPLC-Reinigung soll exemplarisch an der Charge HP33 gezeigt werden. Die Reinigung der Chargen HP34, HP35, HP36, HP37 und HP38 erfolgte prinzipiell gleich. Mitunter ergaben sich kleine Unterschiede beim Gradienten- bzw. Fraktionierungsprogramm.

Das getrocknete Extrakt wurde in einer Mischung von Acetonitril/Wasser erneut gelöst und nach dem Filtrieren mit einem automatischen Probengeber in das HPLC-System injiziert. Die Fraktionierung erfolgte mit einem automatischen Fraktionensammler, welcher durch das UV-Signal bei 260 nm bzw. 300 nm gesteuert wurde. Die Peaks wurden von hydrophil bis lipophil alphabetisch gekennzeichnet (s.a. Abbildung 3-6).

Es wurden insgesamt 15 Fraktionen gesammelt. Die Rechromatographie der einzelnen Fraktionen zeigte, dass die Reinigung bei den dominanten Peaks C, D, I, K und M sehr erfolgreich war. Diese Fraktionen wurden nahezu HPLC-rein erhalten. Bei den Fraktionen L, N und O konnten jeweils noch leichte Verunreinigungen der zuvor eluierenden Verbindung beobachtet werden. Bei den Fraktionen PW und XZ handelte es sich um ein Substanzgemisch.

3.5 Untersuchung der gereinigten HP-Fraktionen mit physikalisch-chemischen Methoden

3.5.1 IR-spektroskopische Untersuchungen

Von den reinen Extrakt-Fraktionen wurden IR-Spektren der KBr-Preßlinge aufgenommen. Wie aus Tabelle 3-1 ersichtlich, weisen die verschiedenen Fraktionen analoge, charakteristische IR Banden auf.

Tabelle 3-1: IR-Daten der HP-Fraktionen.

HP-Fraktion	IR Banden [cm^{-1}]
H	3412, 2930, 1682, 1609, 1271, 1205, 1138
I	3426, 2930, 1703, 1609, 1269, 1168
L	3414, 2933, 1682, 1609, 1269, 1207, 1168, 1140
M	3417, 2934, 1707, 1608, 1267, 1168, 1093
N	3422, 2933, 1708, 1610, 1268, 1205, 1168, 1136
PW	3416, 2932, 2860, 1715, 1609, 1268, 1167, 1096
XZ	3420, 2930, 2858, 1720, 1609, 1266, 1168, 1081

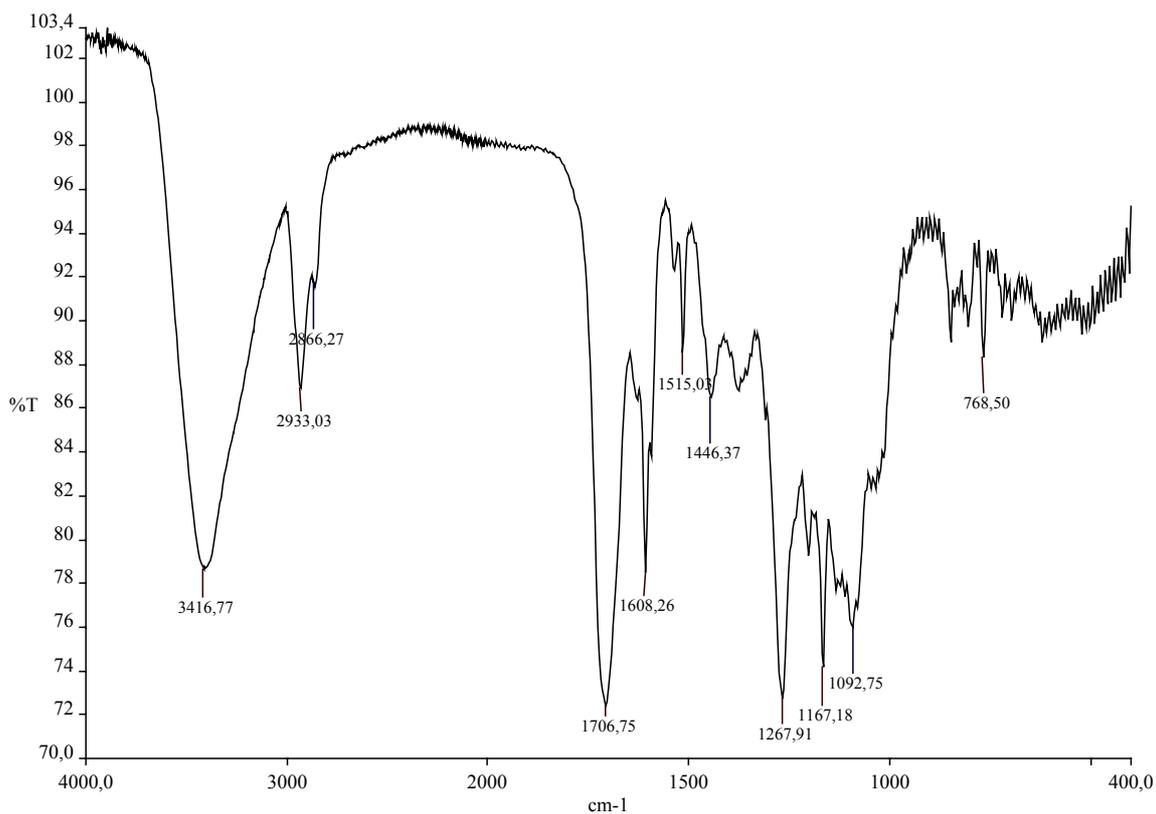


Abbildung 3-7: IR-Spektrum der Fraktion M, aufgenommen in KBr.

Am Beispiel der Fraktion M sollen diese Banden kurz besprochen werden:

- 3417 cm⁻¹ : (O-H)-Valenzschwingung assoziierter H-Brücken.
- 2934 cm⁻¹ : (C-H)-Valenzschwingung; eine zweite schwächere Bande ist bei 2866 cm⁻¹ erkennbar.
- 1707 cm⁻¹ : Carbonyle oder Enole, eventuell überlagert mit Bande einer C=C.
- 1608 cm⁻¹ : (C=C)-Valenzschwingung von Aromaten.
- 1267 cm⁻¹ : (O-H)-Deformationsschwingung.
- 1168; 1093 cm⁻¹ : (C-O)-Valenzschwingung und Aromatenschwingungen.

3.5.2 UV-spektroskopische Untersuchungen

Bei den UV-Untersuchungen mehrerer HP-Fractionen ergab sich, dass auch die UV-Spektren große Ähnlichkeiten aufwiesen.. Sie zeigten ein ausgeprägtes Maximum im Bereich von 250 nm und 260 nm. Einige der Verbindungen wiesen noch ein schwächeres Maximum um 330 nm auf. Dies kann als weiterer Hinweis für den aromatischen oder phenolischen Charakter der Substanzen aufgefasst werden.

Zudem konnte bei der Zugabe von Natronlauge bei mehreren HP-Fractionen ein bathochromer Effekt der Absorptionsmaxima beobachtet werden. Das Ausmaß der Verschiebung richtete sich dabei nach der untersuchten Fraktion und dem pH-Wert der Lösung. Dies warf die Frage nach der pH-Abhängigkeit des Absorptionsverhaltens der Substanzen auf.

Für diese Untersuchungen wurden die aus dem Extrakt abgetrennten Fraktionen M, PW und XZ herangezogen. Eine Stammlösung der jeweiligen Fraktion wurde auf eine für die UV-Spektroskopie geeignete Konzentration von 50 µg/ml verdünnt. Diese Lösung wurde dann mit verdünnter Natronlauge versetzt, wobei zu geeigneten Zeitpunkten der pH-Wert gemessen und das dazugehörige UV-Spektrum aufgezeichnet wurde.

Im untersuchten pH-Bereich von 5,60 bis 11,08 weisen die UV-Spektren der Fraktion M (Abbildung 3-8) fünf isobestische Punkte bei 220 nm, 235 nm, 276 nm, 330 nm und 345 nm auf. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei von 261 nm auf 302 nm. Im Alkalischen tritt zudem deutlich ein zweites Absorptionsmaximum bei 376 nm hervor.

Die bathochrome Verschiebung ist ein Hinweis dafür, dass die Verbindung vermutlich über eine phenolische OH-Gruppe verfügt, die bei einer Deprotonierung zur Erweiterung des delokalisierten π -Systems führt. Das Auftreten der Isosbesten wiederum lässt darauf schließen, dass diese Deprotonierung mit einer einheitlichen Gleichgewichtsreaktion verbunden ist und nur eine funktionelle Gruppe bzw. Protonierungsstufe involviert ist.

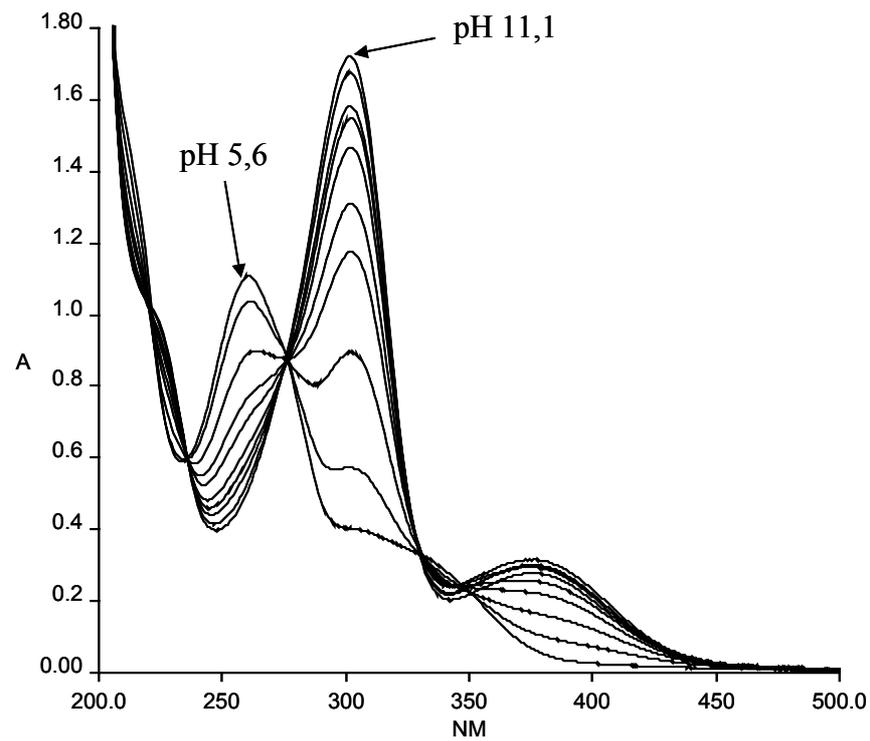


Abbildung 3-8: UV-Spektren der Fraktion M.

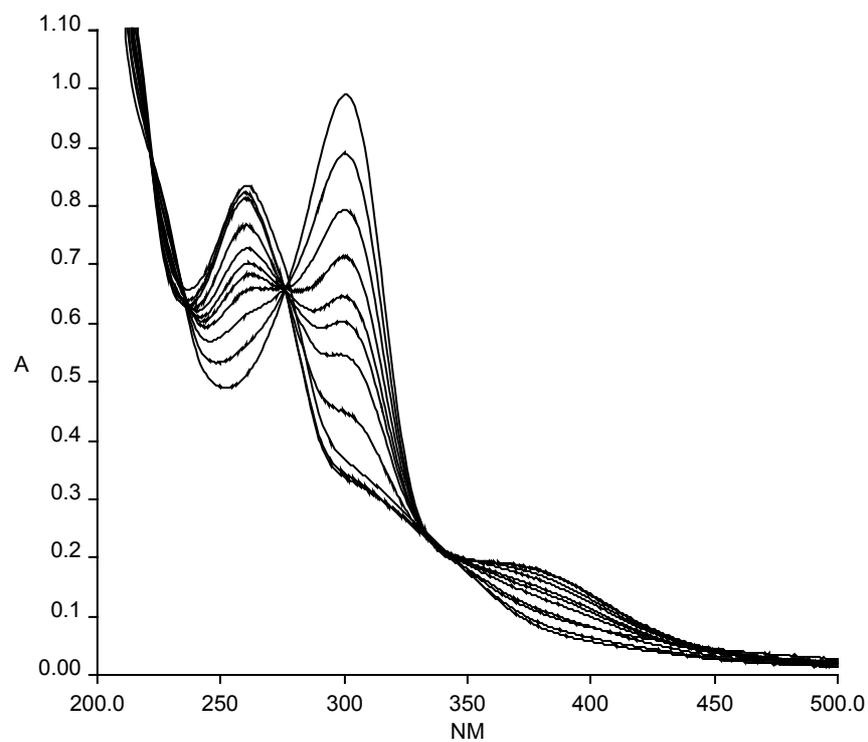


Abbildung 3-9: UV-Spektren der Fraktion PW.

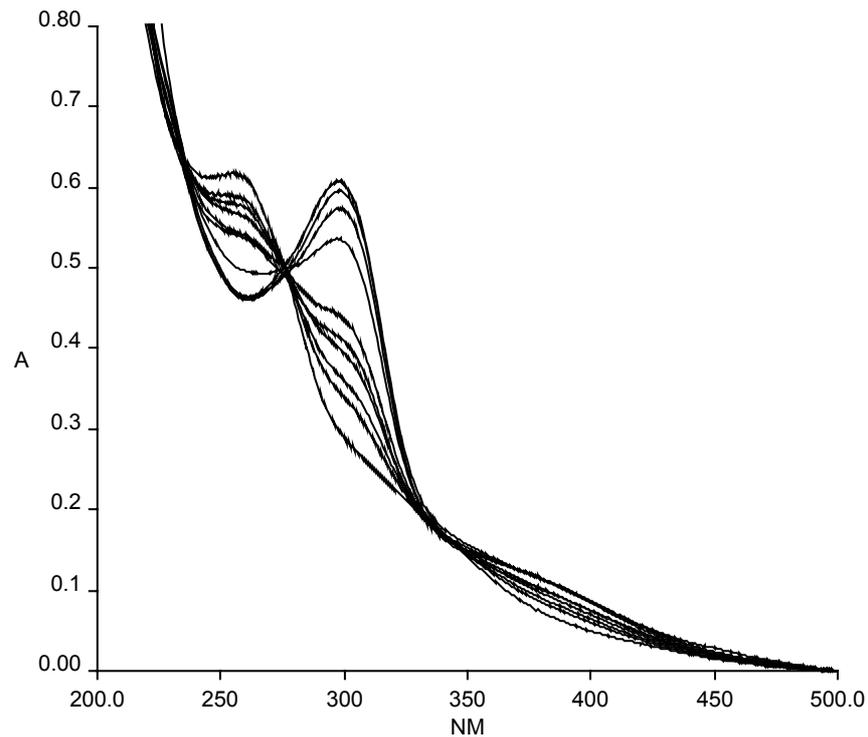


Abbildung 3-10: UV-Spektren der Fraktion XZ.

Wie zuvor schon erwähnt, handelt es sich bei der Fraktion M um eine HPLC-reine Substanz. Die Fraktionen PW und XZ dagegen sind eigentlich Substanzgemische. Um so erstaunlicher war es, als bei diesen Fraktionen ebenso Isosbesten beobachtet werden konnten. Betrachtet man allerdings die Abbildung 3-9 und Abbildung 3-10 genauer, so sind Unterschiede zu erkennen.

Bei allen drei Fraktionen wurde für die UV-Untersuchungen dieselbe Konzentration von 50 µg/ml gewählt. Verdünnungseffekte wurden durch Multiplikation der Spektren mit einem entsprechenden Faktor eliminiert. Die Intensität der Banden nimmt allerdings von M über PW nach XZ ab. Das zweite Absorptionsmaximum im Alkalischen bei 376 nm ist bei XZ kaum mehr erkennbar.

Die bei den Fraktionen PW und XZ beobachteten Effekte sind daher vermutlich auf Verunreinigung durch die Substanz M zurückzuführen, die das eigentliche Chromophor enthält.

Die pH-Abhängigkeit der UV-Spektren der *p*-Hydroxy-benzoessäure, die aus dem Hydrolysat der Fraktionen PW und XZ isoliert werden konnte, wurde ebenso untersucht. Die UV-Spektren in Abbildung 3-11 wurden im pH-Bereich zwischen 2,1 und 10,1 aufgenommen.

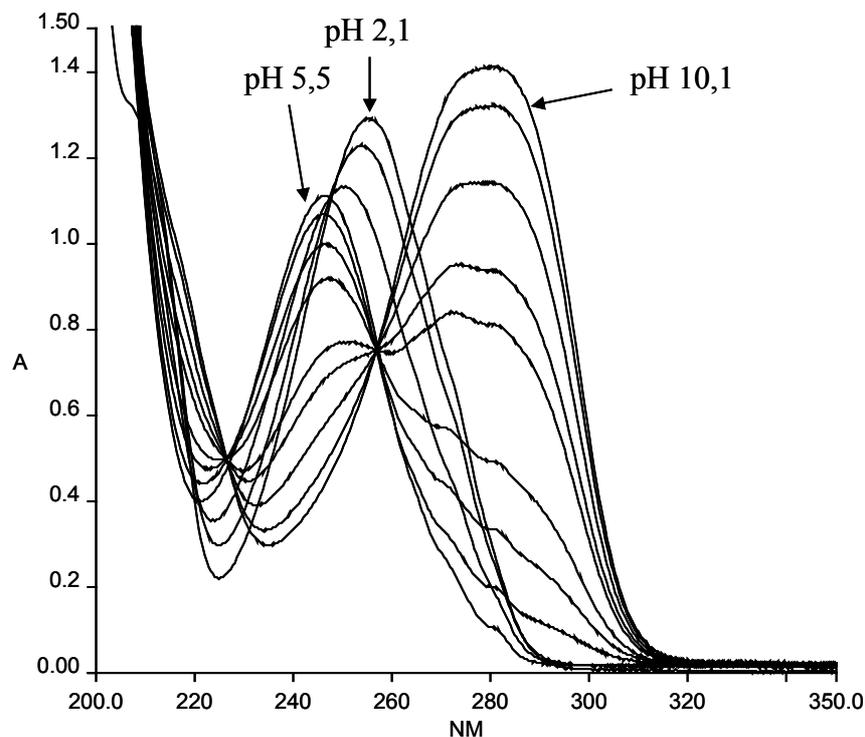


Abbildung 3-11: UV-Spektren der *p*-Hydroxy-benzoessäure.

Die Verbindung zeigt im Bereich oberhalb von pH 5,5 zwei isosbestische Punkte bei 226 nm und 256 nm. Das Absorptionsmaximum bei diesem pH von 246 nm erfährt bei der pH-Titration eine bathochrome Verschiebung. Das neue Maximum bei pH 10,1 liegt dann bei 280 nm. Unterhalb des pH-Wertes von 5,5 sind ebenso zwei isosbestische Punkte bei 218 nm und 246 nm auszumachen. Hier ist beim Absorptionsmaximum ein hypsochromer Effekt zu beobachten.

Dies beiden Effekte sind den beiden funktionellen Gruppen, phenolische Hydroxy-Gruppe und Carbonsäure, der *p*-Hydroxy-benzoessäure zu zuschreiben.

Wie zuvor schon erwähnt wurde, konnte bei der alkalischen Hydrolyse der Fraktionen M, PW und XZ jeweils im Hydrolysat die *p*-Hydroxy-benzoessäure gefunden werden. Zudem weisen die *p*-Hydroxy-benzoessäure und die Substanz M vergleichbare spektroskopische Eigenschaften in Bezug auf eine pH-Änderung auf. Man kann daher annehmen, dass die Substanz M das Chromophor der *p*-Hydroxy-benzoessäure enthält.

3.5.3 Massenspektrometrische Untersuchungen

Die Fraktionen wurden mittels ESI-MS analysiert. Von den HPLC-reinen Fraktionen I, K und M konnten dabei auch Massen erhalten werden. Bei diesen Fraktionen handelt es sich wohl um definierte Verbindungen. Von den Fraktionen PW und XZ konnte auch durch Variation verschiedenster Messparameter kein aussagekräftiges Massenspektrum erhalten werden.

Tabelle 3-2: Tabelle der Molekülonen der Fraktionen I, K und M.

Fraktion	Molekülion $[M+H]^+$ m/z
I	661,4
K	865,2
M	823,0

Von der Fraktion M wurde eine hochaufgelöste Masse aufgenommen. Die dabei erhaltene Masse der Verbindung von 823,1641 führte zum Vorschlag einer Summenformel von $C_{43}H_{35}O_{17}$.

3.5.4 NMR-spektroskopische Untersuchungen

3.5.4.1 Fraktionen I, K und M

Von diesen drei Fraktionen konnten ^1H NMR Spektren aufgenommen werden, von der Fraktion M konnte ein ^{13}C NMR erhalten werden. Die erhaltenen NMR Daten bestätigten die HPLC-Analysen, dass es sich bei diesen Fraktionen um saubere Verbindungen handelte.

Alle drei Verbindungen zeigten ähnliche ^1H NMR Spektren. Die Interpretation der spektroskopischen Daten lässt vermuten, dass es sich bei diesen drei Verbindungen eventuell um Vertreter einer Gruppe kondensierter Phenole aus der Klasse der Flavonoide handeln könnte. Dafür sprechen die Signale aromatischer CH- und OH-Protonen. Bei der Substanz M konnte dies auch durch die Signale aromatischer Kohlenstoffatome im entsprechenden ^{13}C NMR Spektrum bestätigt werden. In den Spektren konnten dagegen keine typischen Signale der glykosidischen CH- und OH-Gruppen gefunden werden, die Möglichkeit von Glykosid-Resten bei diesen Substanzen kann daher mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Im experimentellen Teil dieser Arbeit sind das ^1H NMR und ^{13}C NMR Spektrum der Verbindung M abgebildet.

Durch eine hochauflösende Masse konnte für die Verbindung eine Summenformel von $\text{C}_{43}\text{H}_{35}\text{O}_{17}$ vorgeschlagen werden. Dies kann als weiterer Hinweis gewertet werden, dass es sich bei der Verbindung um einen Vertreter der Klasse der kondensierten Flavonoide handeln könnte. Proanthocyanidine weisen z.B. eine Summenformel von $\text{C}_{45}\text{H}_{38}\text{O}_{18}$ entsprechend einem Molekulargewicht von 866 Da auf. Diese Verbindungen gehören zu einer in Pflanzen weit verbreiteten Klasse der oligomeren Flavonoide. Diese treten meist als Dimere bis Pentamere auf, wobei z.B. Flavan-3-ol Einheiten über $4 \rightarrow 6$ oder $4 \rightarrow 8$ C-C-Bindungen miteinander verknüpft sind.[121,122] Die Substanzen I, K und M könnten zu einer Untergruppe dieser Verbindungsklasse gehören.

Bei den Untersuchungen konnte kein Hinweis darauf gefunden werden, dass es sich bei diesen Verbindungen um Vorstufen oder Derivate eines Polypyrons handeln

könnte. Zudem zeigten diese Verbindungen bzw. die Fraktionen I, K und M, dass sie die Na^+/K^+ -ATPase Aktivität nicht besonders stark inhibierten. Daher kann die Vermutung geäußert werden, dass diese Fraktionen mit dem gesuchten Hemmstoff nichts zu tun haben.

3.5.4.2 Fraktionen PW und XZ

Die bei den NMR Untersuchungen dieser beiden Fraktionen erhaltenen ^1H NMR Spektren zeigten keine deutlichen Signale über dem Rauschen. Diese Beobachtung bei den aktivsten Fraktionen ist nicht verwunderlich. Sollte es sich bei den Verbindungen dieser Fraktionen um die makrozyklischen Polypyrrone handeln, so ist zumindest im ^1H NMR kein Signal zu erwarten.

3.6 Untersuchung der biologischen Aktivität der HP-Fraktionen

Die isolierten Fraktionen des Extraktes wurden auf ihre biologische Aktivität mit zwei unterschiedlichen Testverfahren untersucht:

1. Inhibierung der Enzymaktivität der Na^+/K^+ -ATPase aus Kaninchen- und Rattennieren
2. ELISA mit *anti*-Ouabain Antikörpern

3.6.1 Inhibierung der Enzymaktivität der Na^+/K^+ -ATPase

Die für diese Test benötigte Na^+/K^+ -ATPase wurden aus der äußeren Medulla der Kaninchen- und Rattennieren nach der Prozedur C von Jørgensen gewonnen.[123] Gemessen wurde die Enzymaktivität in Gegenwart der isolierten HP-Fraktionen. Die Enzymaktivität in Abwesenheit eines Inhibitors diente als Referenz. Sämtliche Tests wurden an der Universität Konstanz von R. Stimac durchgeführt.

Zu Beginn mussten bei dem Enzymtest noch einige Parameter angepasst werden. Die Ergebnisse der ersten Extraktpräparationen wurden daher vor allem in qualitativer Hinsicht berücksichtigt. Sie dienten als Auswahlkriterium bei der Suche nach den aktiven Fraktionen des Extraktes.

Aus diesen Tests gingen die Fraktionen M, PW und XZ als diejenigen hervor, die die Enzymaktivität der Na^+/K^+ -ATPase am stärksten inhibierten. Ihre Aktivität lag mit einem IC_{50} von 0,5-5,0 $\mu\text{g/ml}$ im Bereich des Ouabain, das mit einem IC_{50} von 0,6 $\mu\text{g/ml}$ zur Zeit einer der stärksten bekannten Inhibitoren der Na^+/K^+ -ATPase darstellt. Die Fraktionen wurden auch bezüglich ihrer Hemmung der Enzymaktivität der aus Ratten isolierten Na^+/K^+ -ATPase untersucht, welche von Ouabain schlecht inhibiert wird. Die Ergebnisse zeigten, dass dies bei den getesteten Fraktionen nicht zutraf. Dies kann als weiterer Beleg dafür gesehen werden, dass die isolierten und auch getesteten HP-Fraktionen kein Ouabain enthielten.

3.6.2 Enzym Immunoassay mit *anti*-Ouabain Antikörpern

Die Interaktion mit diversen Antikörpern wurde schon des öfteren zur Charakterisierung und Identifizierung von Na^+/K^+ -ATPase Inhibitoren herangezogen. Die Wahl fiel auf eine Prozedur von di Bartolo *et al.*, welcher ein ELISA-Protokoll zur Identifizierung sogenannter OLC's (*Ouabaine like compounds*) mit *anti*-Ouabain Antikörpern entwickelte.[124]

Bei diesem Test handelt es sich um einen indirekten, kompetitiven ELISA. Hierbei konkurriert der Inhibitor mit einem auf der Platte immobilisierten Ouabain-Konjugat um die *anti*-Ouabain Antikörper. Die Antikörper, welche nicht mit einem Inhibitor interagieren, können sich also an das Ouabain-Konjugat binden. Je besser nun der Inhibitor bzw. je höher dessen Konzentration ist, desto weniger Antikörper binden sich an das Konjugat, da die Antikörperkonzentration immer gleich ist. An die gebundenen Antikörper kann sich dann ein zweites Enzym-Konjugat binden, meist ein Antikörper, welcher spezifisch mit dem ersten Antikörper interagieren kann. In unserem Fall handelte es sich um ein Protein A-Alkaline Phosphatase Konjugat. Die Farbreaktion wird dann durch Zusatz eines Substrats, welches vom Enzym gespalten werden kann,

hervorgerufen. Die Farbintensität verhält sich dabei antiproportional zur Inhibitorstärke bzw. dessen Konzentration.

Sämtliche bei der präparativen Reinigung des Extraktes erhaltenen Fraktionen, das Extrakt selbst und Proben der alkalischen Hydrolyse wurden mit diesem ELISA-Test untersucht. Bei keiner der Proben konnte eine Interaktion mit den *anti*-Ouabain Antikörpern beobachtet werden. Der Test selbst scheint dafür nicht die Ursache zu sein, wie die Interaktion der *anti*-Ouabain Antikörpern mit dem Standard Ouabain zeigt (s. experimenteller Teil). Ein Einfluss der Lösemittel der Probenstammlösungen auf das Testergebnis konnte durch entsprechende Blindproben ausgeschlossen werden.

Das Ausbleiben einer Kreuzreaktion der Proben mit den *anti*-Ouabain Antikörpern kann daher zu dem Schluss führen, dass die Proben keine Verbindungen enthielten, die strukturelle Ähnlichkeiten mit Ouabain aufwiesen. Es wäre allerdings auch möglich, dass die Konzentration der Ouabain-ähnlichen Substanzen unterhalb der Nachweisgrenze dieses ELISA-Tests lag.

3.7 Alkalische Hydrolyse der HP-Fractionen

Bei den Versuchen mit den Extraktfraktionen wurden auch eine saure und alkalische Hydrolyse durchgeführt. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass die Proben, welche der alkalischen Hydrolyse der Fraktionen PW und XZ entnommen wurden, die Enzymaktivität der Na^+/K^+ -ATPase noch stärker inhibierten, als die ursprünglichen Fraktionen. Besonders stark fiel dieser Effekt bei der Fraktion XZ auf.

HPLC Untersuchungen dieser Hydrolyse zeigten, dass dabei eine Reihe neuer Verbindungen gebildet wurden. In Abbildung 3-12 ist beispielhaft der zeitliche Verlauf einer solchen Hydrolyse dargestellt. Die Hydrolyse erfolgte in einer 0,2 molaren Natronlauge bei Raumtemperatur. Das Erhitzen der Reaktionsmischung beschleunigte den Prozess.

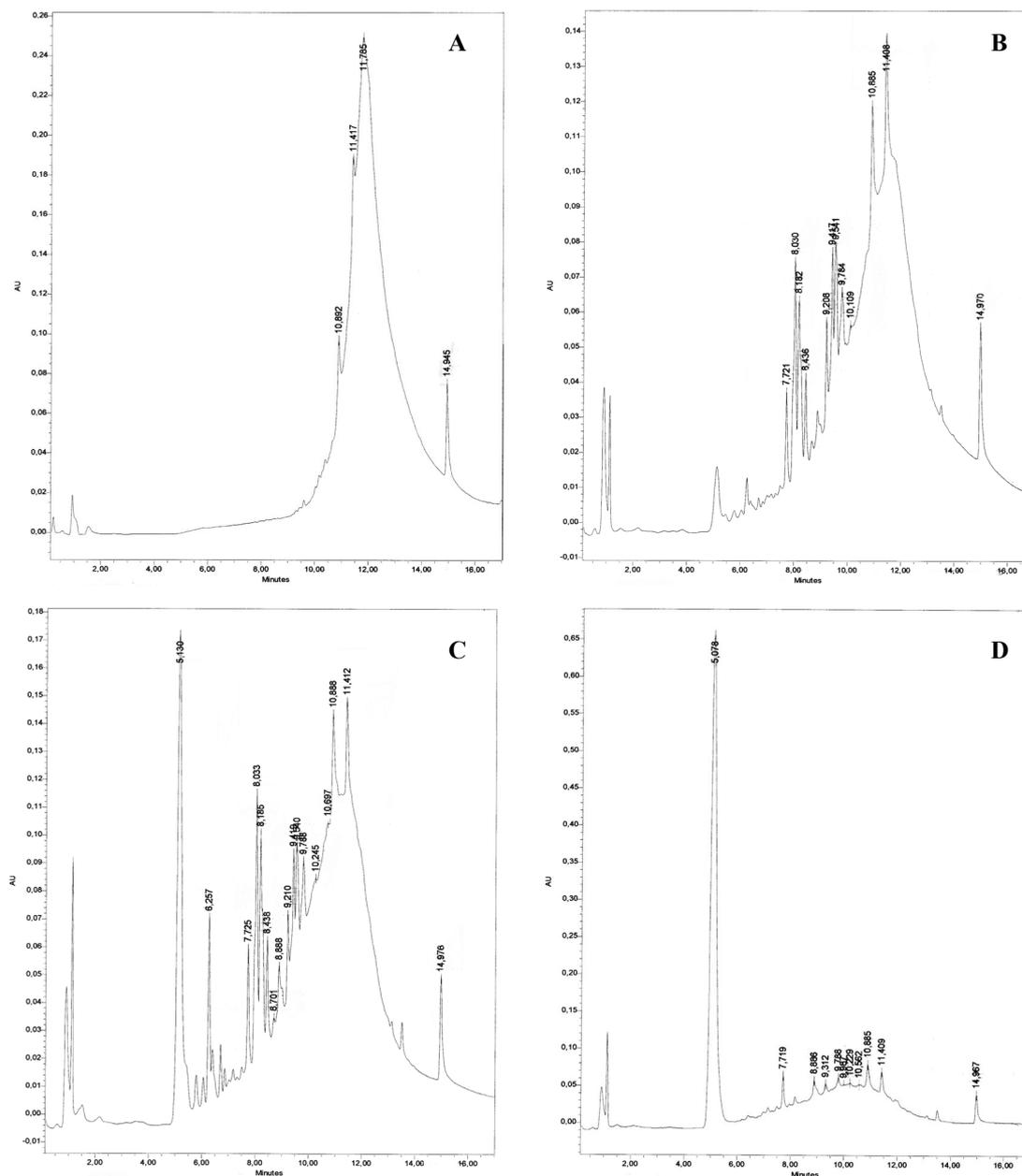


Abbildung 3-12: Zeitlicher Verlauf der alkalischen Hydrolyse der Fraktion XZ (Reaktionsbeginn (A), 5 min (B), 30 min (C), Reaktionsende (D)).

In der Abbildung sind schon nach kurzer Zeit deutlich die neu auftretenden Peaks zu sehen. Eines der Endprodukte der Hydrolyse war die Verbindung mit dem Peak bei $t_R = 5,08$. Diese Verbindung konnte isoliert werden und mittels IR, UV, EI-MS und NMR wurde sie als *p*-Hydroxy-benzoesäure identifiziert.

Neben den Fraktion PW und XZ wurden auch die Fraktionen I, K und M und das Extrakt selbst diesen Hydrolysebedingungen unterworfen. Bei ihnen konnte die *p*-Hydroxy-benzoessäure ebenfalls nachgewiesen werden.

Die aus den Hydrolysaten isolierte *p*-Hydroxy-benzoessäure wurde auch hinsichtlich ihrer Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase untersucht. Sie beeinflusste die Enzymaktivität der Na⁺/K⁺-ATPase nicht. Zudem schwankten die aus den unterschiedlichen Chargen der Fraktionen PW und XZ isolierten Mengen. Es ist daher anzunehmen, dass die Entstehung der *p*-Hydroxy-benzoessäure bei den Fraktionen PW und XZ auf eine Verunreinigung durch die Fraktionen I, K oder M zurückzuführen ist. Bei diesen könnte sie durch die Hydrolyse des Flavonoid-Körpers entstehen.

3.8 Herstellung und Untersuchung des MCS-Faktors

3.8.1 Darstellung des MCS-Faktors

Wie zuvor erwähnt, zeigten die Proben der Fraktion XZ nach einer alkalischen Hydrolyse eine deutliche Steigerung bei der Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase. Es konnte eine Prozedur gefunden werden, mit deren Hilfe die Aktivierung der XZ Fraktion reproduzierbar wurde. Dazu wurde die Fraktion in Ethanol/Wasser gelöst und mit Natronlauge versetzt. Die alkalische Lösung wurde dann für 8 bis 14 Stunden erhitzt. Anschließend wurde die Lösung mit Salzsäure zuerst auf einen pH-Wert zwischen 8,0 und 9,6 und danach erst auf einen endgültigen pH von etwa 3,0 eingestellt. Um überschüssige Na⁺-Ionen zu entfernen, wurde die Lösung noch mit einem starken Kationenaustauscher-Harz behandelt. Das Hydrolysat bzw. Proben dieser Lösung wurden dem Aktivitätstest zugeführt. Lag der IC₅₀ dieser Fraktion noch im Bereich von 0,5-2,5 µg/ml, so konnte er durch die alkalische Hydrolyse auf einen Wert von 0,015 µg/ml gesteigert werden.

Das Hydrolysat wurde mittels präparativer HPLC in sechs Fraktionen unterteilt, die alle auf ihre Aktivität untersucht wurden. Keine dieser Fraktionen konnte die Enzymaktivität der Na⁺/K⁺-ATPase inhibieren, obwohl das entsprechende

Gesamthydrolysat eine gesteigerte Aktivität aufwies. Der Grund dafür ist wahrscheinlich in der Behandlung des Hydrolysats während der Aufreinigung zu suchen. Es wurde vermutet, dass es sich bei der aktiven Form des Hemmstoffes um eine flüchtige Verbindung handeln könnte.

3.8.2 Massenspektrometrische Untersuchung des MCS-Faktors

Bei der Untersuchung des Hydrolysats mittels ESI-MS konnte erstmals eine Masse für diesen Inhibitor erhalten werden. Im positiven Modus konnte ein Molekülion der Masse $m/z = 431,2$ entsprechend dem $[M+Na]^+$ -Ion beobachtet werden. Diese Masse von $408,2$ Da lässt sich mit dem makrozyklischen Hexamer des Kohlensuboxids $(C_3O_2)_6$ erklären. An anderer Stelle wurde über die Isolierung eines endogenen Liganden aus tierischen Geweben berichtet, der auch diese Masse aufwies.[125] Daneben wurde u.a. noch die Masse des Zyklooctamers $(C_3O_2)_8$ gefunden. In Abbildung 3-13 ist das ESI-MS einer solchen aktivierten Probe zu sehen.

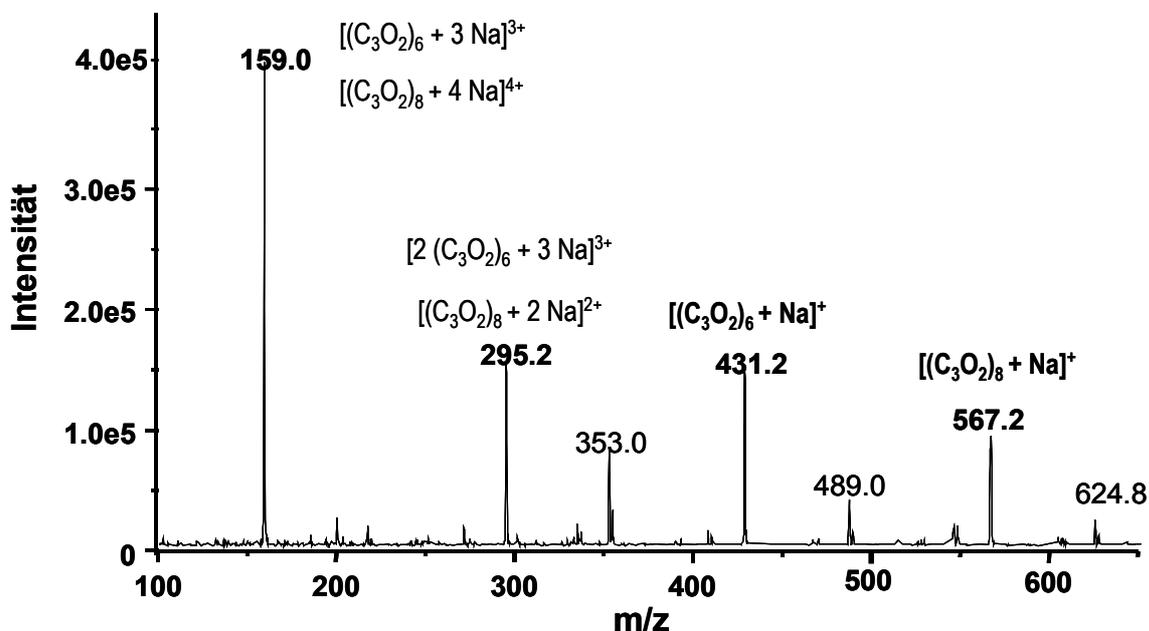


Abbildung 3-13: ESI-MS einer aktivierten Hydrolysat-Probe. Die Molekülionen-Peaks sind den entsprechenden Komplexen der mit Na^+ -Ionen assoziierten makrozyklischen Kohlensuboxid-Oligomere zugeordnet.

Aus diesem Extrakt konnte die lipophile Vorstufe des Hemmstoffes isoliert werden, woraus durch eine Basen/Säure Behandlung die eigentlich aktive Form entsteht. Die aktive Form des Hemmstoffes wurde auch als MCS-Faktor (*macrocylic carbon suboxide*) bezeichnet. Die Verbindungen scheinen eine große Tendenz zur Assoziation mit Na^+ -Ionen aufzuweisen.

3.8.3 Aktivitätstests des MCS-Faktors – Vergleich mit Ouabain

In Abbildung 3-14 ist der Vergleich der beiden Inhibitoren der Na^+/K^+ -ATPase Ouabain und MCS-Faktor zu sehen. Die Na^+/K^+ -ATPase für diese Versuche stammte aus der Kaninchenniere. In der Darstellung wurde für die Berechnung des K_1 -Werts des MCS-Faktors nur das Molekulargewicht des Hexamers von 408,2 Da berücksichtigt. Dies stellt eine konservative Rechnung dar, da eine Berücksichtigung der höherer Masse des Octamers einen niedrigeren K_1 ergeben würde.

Aus der Abbildung geht hervor, dass es sich beim MCS-Faktor ($K_1 = 38 \text{ nM}$) um den potenteren Inhibitor der Na^+/K^+ -ATPase handelt. Ouabain weist nur einen K_1 von $1 \mu\text{M}$ auf.

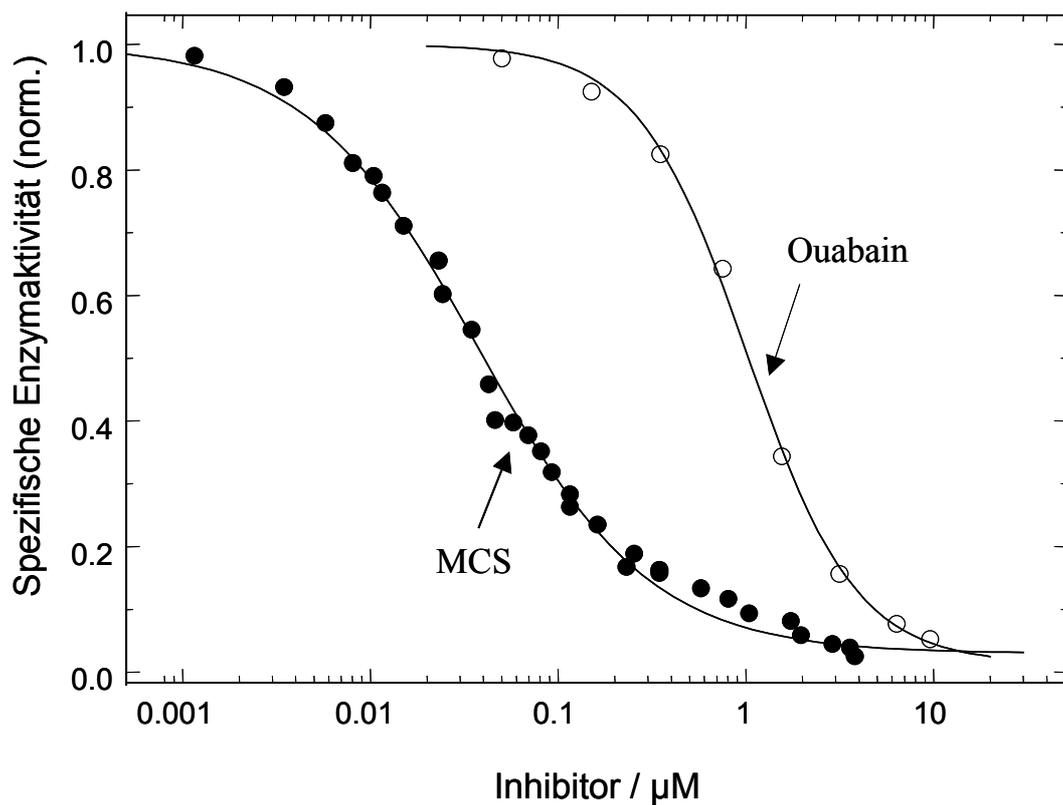


Abbildung 3-14: Vergleich der beiden Inhibitoren der Na^+/K^+ -ATPase Ouabain und MCS-Faktor.

3.8.4 Aktivitätstests mit aus unterschiedlichen Geweben isolierten Na^+/K^+ -ATPase

Es ist bekannt, dass Ouabain eine unterschiedliche Affinität gegenüber den Isoformen der Na^+/K^+ -ATPase aufweist.[126] Diese gegenüber kardiotonischer Steroide niederaffine Form kann z.B. aus Rattennieren isoliert werden.[123]

Aus Abbildung 3-15 geht hervor, dass dies beim MCS-Faktor nicht zutrifft. Es zeigte sich, dass der MCS-Faktor beide Enzyme in etwa gleich stark hemmen konnten.

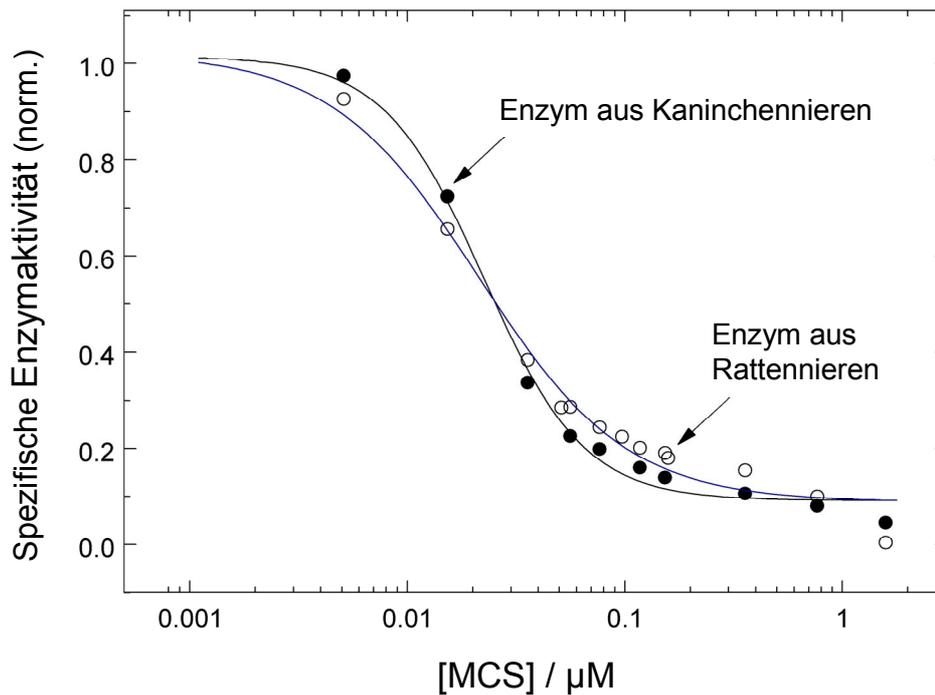


Abbildung 3-15: Aktivität des MCS-Faktors gegenüber der aus Ratten- bzw. Kaninchennieren isolierten Na^+/K^+ -ATPase.

3.9 Abschließende Bemerkungen

Es lässt sich sagen, dass die aus der Pflanze isolierte Fraktion XZ eine Vorstufe des Hemmstoffes der Na^+/K^+ -ATPase darstellt. Diese Vorstufe konnte durch eine Basen/Säuren-Behandlung reproduzierbar in die als MCS-Faktor bezeichnete aktive Form überführt werden. Bei der massenspektrometrischen Untersuchung konnte ein erster Hinweis erhalten werden, dass es sich dabei um makrozyklische Kohlenstoff-Oligomere handeln könnte. Das Hexamer bzw. Octamer konnte dabei als mit Na^+ -Ionen assoziierte Molekülonen nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass der MCS-Faktor ein potenter Inhibitor der Na^+/K^+ -ATPase darstellt, stärker sogar als Ouabain. Zudem hemmt der MCS-Faktor auch beide Isoformen des aus Ratten- bzw. Kaninchennieren isolierten Enzyms.

Allerdings konnte bisher noch keine Erklärung für die Entstehung des MCS-Faktors aus seiner lipophilen Vorstufe gefunden werden. Auch der Verlust der Aktivität dieser Verbindung bei einer erneuten Aufreinigung bleibt rätselhaft. Diese Fragen konnten bisher nicht beantwortet werden, da die physikalischen und chemischen Eigenschaften der makrozyklischen Kohlensuboxid-Oligomere noch unbekannt sind.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte daher versucht werden, eine Modellverbindung zu synthetisieren, die es erlauben würde die Eigenschaften dieser Verbindungen zu studieren. Die dabei gewonnen Erkenntnisse könnten wichtige Rückschlüsse ermöglichen, die wiederum bei der Beantwortung der aufgeworfenen Fragen hilfreich wären.

3.10 Synthesestrategien allgemein

Bei der Suche nach einer geeigneten Synthesestrategie für den Aufbau von Polypyronen zeichneten sich zwei Konzepte ab:

(A) Schrittweiser Aufbau

(B) Synthese von geeigneten „building blocks“

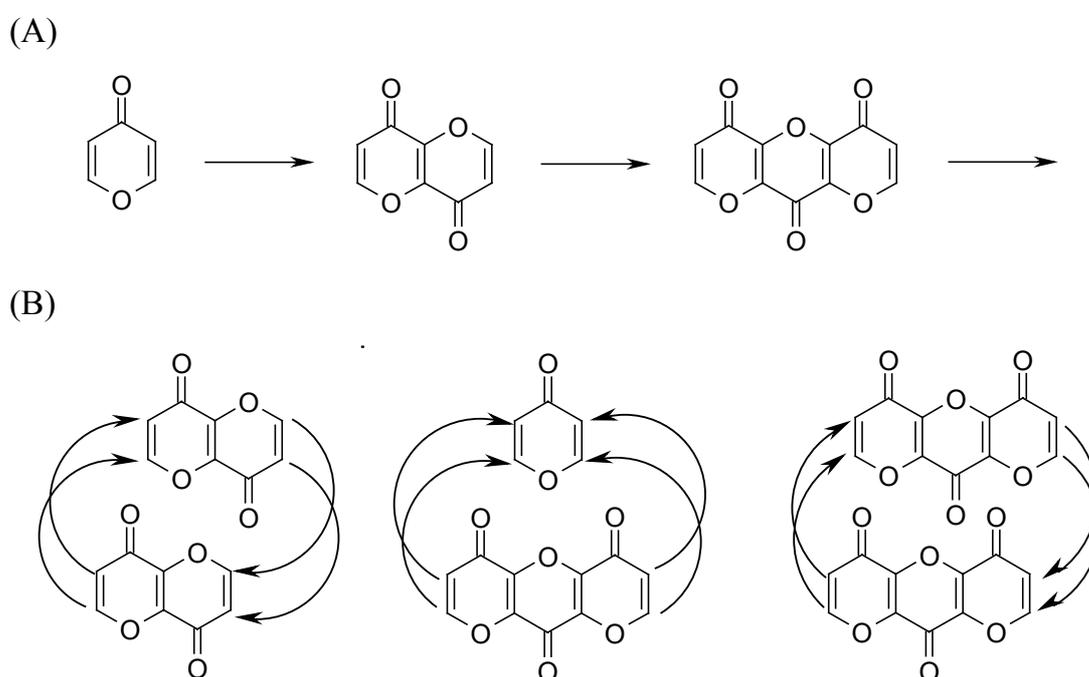


Abbildung 3-16: Die zwei Konzepte für den Aufbau von Polypyronen: Schrittweiser Aufbau (A), Synthese von „building blocks“ (B).

Bei diesen beiden Konzepten werden schon vor einem Synthesebeginn Vor- und Nachteile deutlich. So kann der schrittweise Aufbau, mit der Möglichkeit der repetitiven Abfolge der einzelnen Synthesestufen, ein einfaches und leichtes Synthesekonzept darstellen. Zudem können die aus dem einzelnen Schritten hervorgehenden Zwischenprodukte, wie Dipyron oder Tripyron, auch als „building blocks“ für Synthesestrategien nach dem zweiten Konzept dienen. Als Nachteil sind

dabei die Probleme, die bei den Folgegliedern auftreten könnten, zu nennen. Es ist leider unklar, ob ein Dipyrone noch die nötige Stabilität gegenüber den Reaktionsbedingungen aufweist, die für den Aufbau des Pyronsystems angewendet wurden.

Bei dem Konzept der „building blocks“ liegen Vor- und Nachteile eng beieinander. Durch die Kombinationsmöglichkeiten der Pyrone, Dipyrone oder Tripyrone ließen sich recht einfach die verschiedenen Makrozyklen, wie Hexamer oder Octamer, realisieren. Die Hauptprobleme dieses Konzepts dürften darin liegen, geeignete Reaktionen für die Verknüpfung der „building blocks“ zu finden, und die dafür benötigten Derivate zu synthetisieren.

Ohne die Reaktivität eines Di- oder Tripyrons zu kennen, schien die Suche nach möglichen Reaktionen für eine Verknüpfung der „building blocks“, wenig aussichtsreich. Besonders die Publikationen, welche sich mit der Reaktivität oder Synthese von Pyranopyrandionen beschäftigen, erscheinen dazu geeignet, diese Problematik in Angriff zu nehmen. Diese Verbindungen, die als „kleinstes Glied“ einer Polypyron-Kette betrachtet werden können, wären bei der Beantwortung der offenen Fragen unerlässlich.

Am Anfang der Überlegungen zu den Synthesestrategien von Polypyronen stand daher eine Literaturrecherche nach solche Verbindungen. Dabei wurden auch die Struktur- und Literaturdatenbanken wie Beilstein Crossfire, SciFinder oder Ovid berücksichtigt.

3.11 Ergebnisse der Literaturrecherche

3.11.1 Pyranopyrandione aus Dihydroxyaceton

Die Gruppe um Popoff beschrieb zwei Pyranopyrandione bei ihrer Untersuchung der Reaktion von Dihydroxyaceton in einem Acetat-Puffer mit pH 4,5 bei 96 °C.[120] Neben diversen aromatischen Verbindungen, wie Phenole und Pyranone, wurden die zwei besagten Pyranopyrandione isoliert und mittels IR, MS und ¹H NMR (nach Methylierung) charakterisiert. Aufgrund der geringen Substanzmenge, konnte allerdings keine eindeutige Zuordnung bei der Orientierung der Annelierung getroffen werden. Die Tatsache, dass auch 3-Hydroxy-pyran-4-one in der Reaktionsmischung

gefunden wurde, legt aber die Vermutung nahe, dass es sich um die „Kopf-Schwanz“-Annelierung (Abbildung 1-38) handeln könnte.

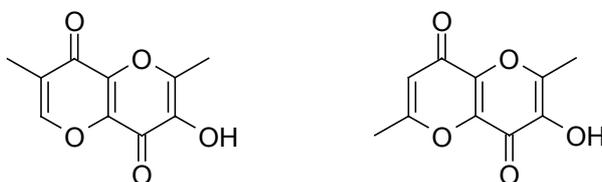


Abbildung 3-17: „Kopf-Schwanz“-Annelierung der beiden isolierten Pyranopyrandonen bzw. γ,γ -Bispyronen.

Dieser Ansatz wurde für die folgenden Strategien nicht berücksichtigt, da bei dieser Synthese sicherlich nicht ausreichende Mengen für nachfolgende Untersuchungen gewonnen werden könnten.

3.11.2 Woods Synthesen von Pyranopyrandonen

Woods berichtete zwischen 1959 und 1964 mehrmals über die Darstellung von Pyranopyrandonen, wobei sich zwei unterschiedliche Methoden abzeichnen:

Die erste von Woods veröffentlichte Methode geht von einem C-acylierten Kojisäure-Derivat aus, welches unter der Einwirkung von Kaliumacetat und Essigsäureanhydrid das Pyranopyrandon ergeben soll (Abbildung 3-18). Die Zyklisierung sollte dabei als Beweis für die erfolgreiche C-Acylierung dienen.[127,128]

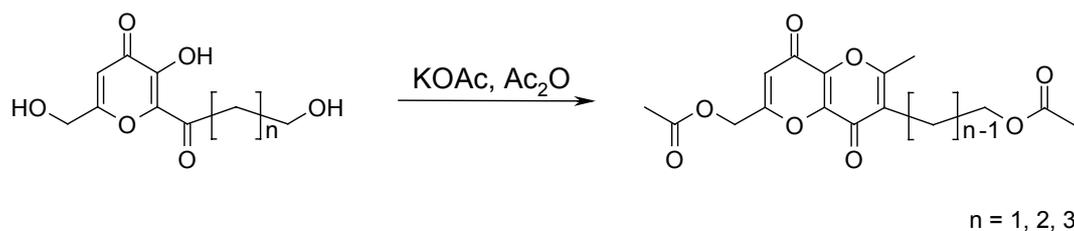


Abbildung 3-18: Reaktionsschema der Pyranopyrandon-Synthese mit Kaliumacetat und Essigsäureanhydrid.

Ob es Woods gelang unter den von ihm beschriebenen Bedingungen wirklich ein Pyranopyrandion herzustellen, muss jedoch aus mehreren Gründen bezweifelt werden. So ging Woods noch davon aus, dass Trifluoressigsäure aus den eingesetzten Lactonen ein „hydroxy-acyl radical“ als acylierendes Agens erzeugt [129], dies widerspricht allerdings dem heutigen Wissensstand. Folglich ist schon seine Darstellung der C-acylierten Pyrone fraglich. Der im weiteren Reaktionsverlauf anvisierte Schritt analog der Kostanecki-Robinson Chromon-Synthese [88-90], wäre allerdings nur mit diesen Verbindungen möglich.

In einer weiteren Publikation[130] geht Woods von C-acylierten Derivaten der Chlor-Kojisäure aus. Diese unterwirft er den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen mit Kaliumacetat und Essigsäureanhydrid, um dabei Pyranopyrandione zu erhalten. Die C-Acylierung der Chlor-Kojisäure soll dabei durch eine Umsetzung mit Säurehalogeniden in siedendem Benzol erfolgen. Woods macht in der besagten Publikation auch keine Angaben über die Reaktivität seiner Acylierungsprodukte gegenüber einer FeCl₃-Lösung, wodurch sich leicht die freie 3-Hydroxy-Funktion beweisen ließe.

Neuere Untersuchungen dieser Reaktion zeigten dann auch, dass Säurehalogenide unter den besagten Bedingungen zu keiner C-Acylierung in der Lage sind. Es findet vielmehr eine Acylierung der 3-Hydroxy-Funktion statt, was sich eindeutig durch spektroskopische Daten (¹H NMR) belegen lässt.[131]

Als weiteren Beweis für die erfolgreiche C-Acylierung und Zyklisierung führte Woods die Darstellung eines Pyranopyrandions mit einer zweiten Synthesesequenz an (Abbildung 3-19). Das auf zwei unterschiedlichen Wegen dargestellte C-acylierte Kojisäure-Derivat, sollte bei der Reaktion mit Kaliumacetat und Essigsäureanhydrid jeweils wieder das Pyranopyrandion ergeben.

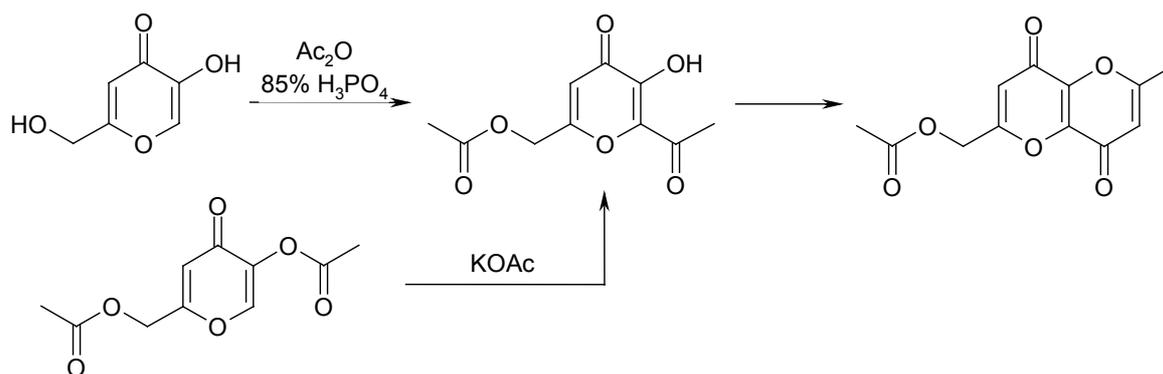


Abbildung 3-19: Woods angenommene, alternative Synthesesequenz für das Pyranopyrandion.

Die Reaktion von Kojisäure und Essigsäureanhydrid in konzentrierter Phosphorsäure wurde auch von Kagan untersucht.[131] Dabei zeigte sich, dass das Produkt dieser Reaktion kein C-acyliertes Kojisäure-Derivat ist. Vielmehr entsteht dabei die 6-Acetyl-Kojisäure, welche mittels ^1H NMR charakterisiert wurde. Diese Verbindung zeigte auch den von Woods angegebenen Schmelzpunkt von $137\text{ }^\circ\text{C}$ und ergab mit FeCl_3 -Lösung eine positive Farbreaktion. Man kann somit davon ausgehen, dass Woods tatsächlich die 6-Acetyl-Kojisäure dargestellt hatte.

Auch die von ihm behauptete Umlagerung der Diacetyl-Kojisäure bei der Behandlung mit Kaliumacetat konnte nicht eintreten. Kagan konnte zeigen, dass diese Verbindung hydrolysierbar ist, wobei ein Gemisch aus Kojisäure und wiederum 6-Acetyl-Kojisäure entstand. Genau dies mag Woods widerfahren sein, da seine Aufarbeitung basische Bedingungen umfasste. Der von Woods angegebene Schmelzpunkt des vermeintlichen Pyranopyrandions von $102\text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $105\text{ }^\circ\text{C}$ lässt sich damit erklären, dass tatsächlich die Diacetyl-Kojisäure vorlag, die genau diesen Schmelzpunkt aufweist.

Es gelang Woods also in keinen der Fällen eine C-Acylierung der Kojisäure oder ihrer Derivate und die Reaktionsfolge lässt sich somit wie in Abbildung 3-20 gezeigt formulieren.

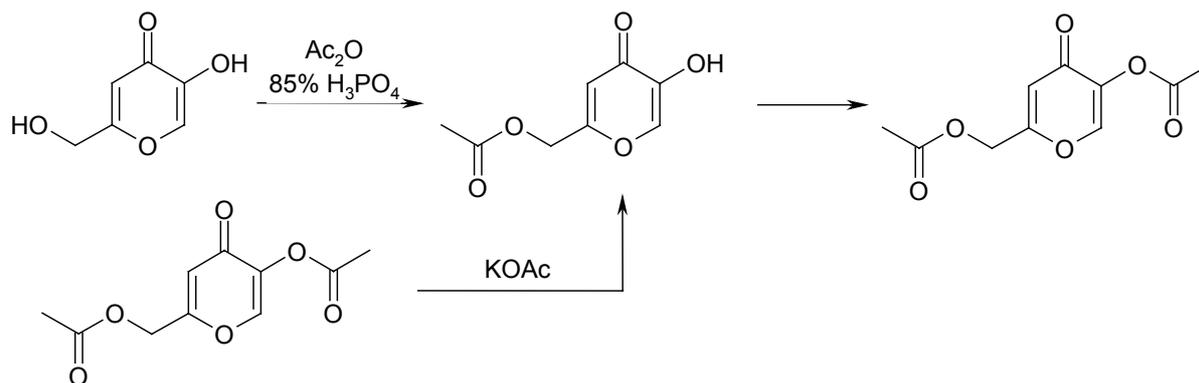


Abbildung 3-20: Reaktionsfolge der vermeintlichen Pyranopyrandion-Synthese.

Die zweite von Woods beschriebene Methode zur Synthese von Pyranopyrandionen, beruhte erneut auf der C-Acylierung von Pyronen, im speziellen Kojisäure, unter der Einwirkung von Trifluoressigsäure und einer anschließenden Zyklisierung.

Die Trifluoressigsäure sollte als Katalysator aus dem Ester das acylierende Agens erzeugen und danach die intramolekulare Zyklisierung zum Pyranopyrandion einleiten.[132] Die vorgeschlagenen Reaktionsfolge ist in Abbildung 3-21 zu sehen.

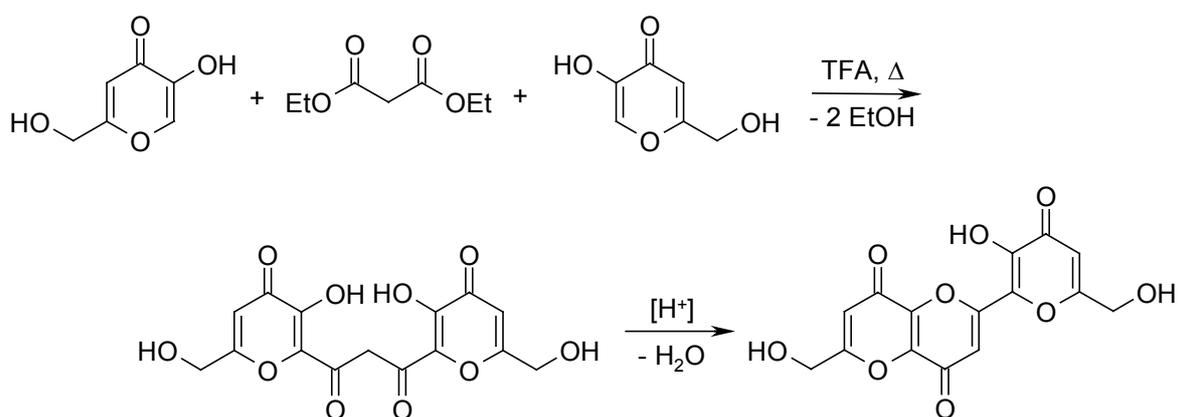


Abbildung 3-21: Reaktionsfolge der zweiten Methode für die Synthese der Pyranopyrandione.

Die in diesem Zusammenhang stehende zweite Arbeit befasst sich mit der Variation dieser Methode, indem sie auf die Verwendung von Malonsäuredinitril ausgedehnt

wurde.[133] Die Reaktionsbedingungen wurden dabei leicht abgeändert, so wurde das Molverhältnis des Pyran-4-ons zu Acylierungskomponente auf 2:1 angepasst und es erfolgte der Zusatz von Wasser während dem Erhitzen. Die in Abbildung 3-22 gezeigte Reaktionsfolge entspricht dem Vorschlag von Woods.

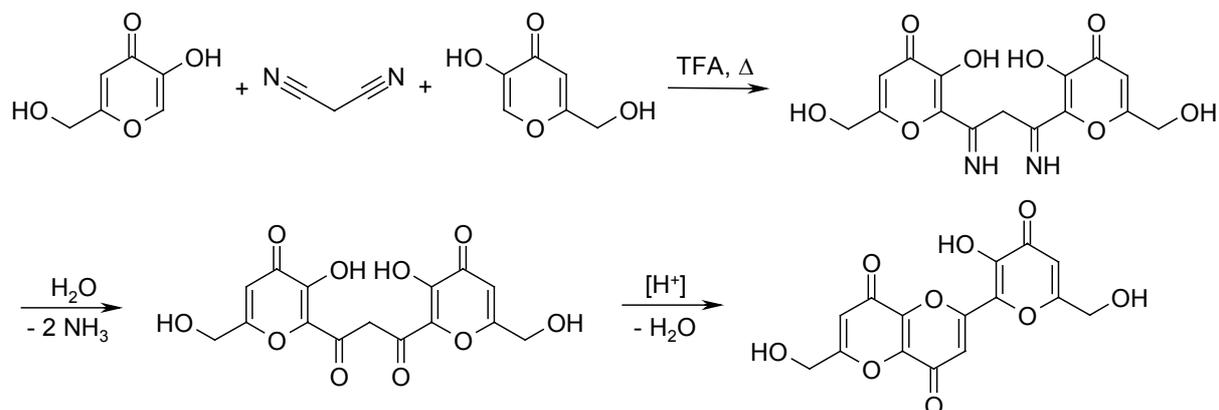


Abbildung 3-22: Reaktionsfolge der modifizierten zweiten Methode der Pyranopyrandion-Synthese von Woods.

3.12 Eigene Versuche zu Woods Synthesen

Die im obigen Abschnitt präsentierten Synthesen boten sich als Einstieg in die Problematik der Pyranopyrandion-Synthese an. Die in den Arbeiten von Woods beschriebenen Synthesen wurde mit größtmöglicher Sorgfalt wiederholt. Dabei konnte aber in keinem der Fälle ein Pyranopyrandion als Reaktionsprodukt gefunden werden, weder bei der Umsetzung der Kojisäure mit Malonsäurediethylester, noch bei der mit Malonsäuredinitril. Im folgenden Abschnitt wird nun konkreter auf die Ergebnisse, die bei der Durchführung dieser beiden Synthesen gewonnen wurden, eingegangen.

3.12.1 Reaktion der Kojisäure mit Malonsäurediethylester unter der Einwirkung von Trifluoressigsäure

Wie in der Synthesevorschrift von Woods beschrieben, wurden äquimolare Mengen Malonsäurediethylester und Kojisäure mit Trifluoressigsäure versetzt und für 15 Stunden erhitzt. Nach dem Abkühlen gab man zu der Reaktionslösung absolutes Ethanol und die Lösung wurde über Nacht im Tiefkühlschrank bei -18 °C belassen. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und über Phosphorpentoxid getrocknet, wobei ein cremefarbenes Pulver erhalten wurde.

Die chromatographische Untersuchung dieses Pulvers zeigte allerdings, dass es sich dabei nicht um eine einheitliche Verbindung handelt, sondern vielmehr ein Stoffgemisch aus vier unterschiedlichen Substanzen vorliegt. Die Abbildung 3-23 gibt ein HPLC dieses Stoffgemisches wieder. In der Abbildung sind ebenso die Ergebnisse eines ESI LC-MS dargestellt.

Keine der Substanzen dieses Reaktionsgemisches wies den Molekülionenpeak ($[M+H]^+$) mit der Masse von $m/z = 335$ für das von Woods beschriebene Pyranopyrandion auf. Dem LC-MS ist zu entnehmen, dass es sich bei dem Niederschlag hauptsächlich um Kojisäure ($m/z = 143$) handelte. Weiterhin sind bei dieser Reaktion vermutlich folgende Verbindungen entstanden:

- Malonsäure bis-(5-hydroxy-4-oxo-4H-pyran-2-ylmethyl)-ester ($m/z = 353$)
- Malonsäure ethylester 5-hydroxy-4-oxo-4H-pyran-2-ylmethylester ($m/z = 257$)
- Malonsäure mono-(5-hydroxy-4-oxo-4H-pyran-2-ylmethyl)-ester ($m/z = 229$)

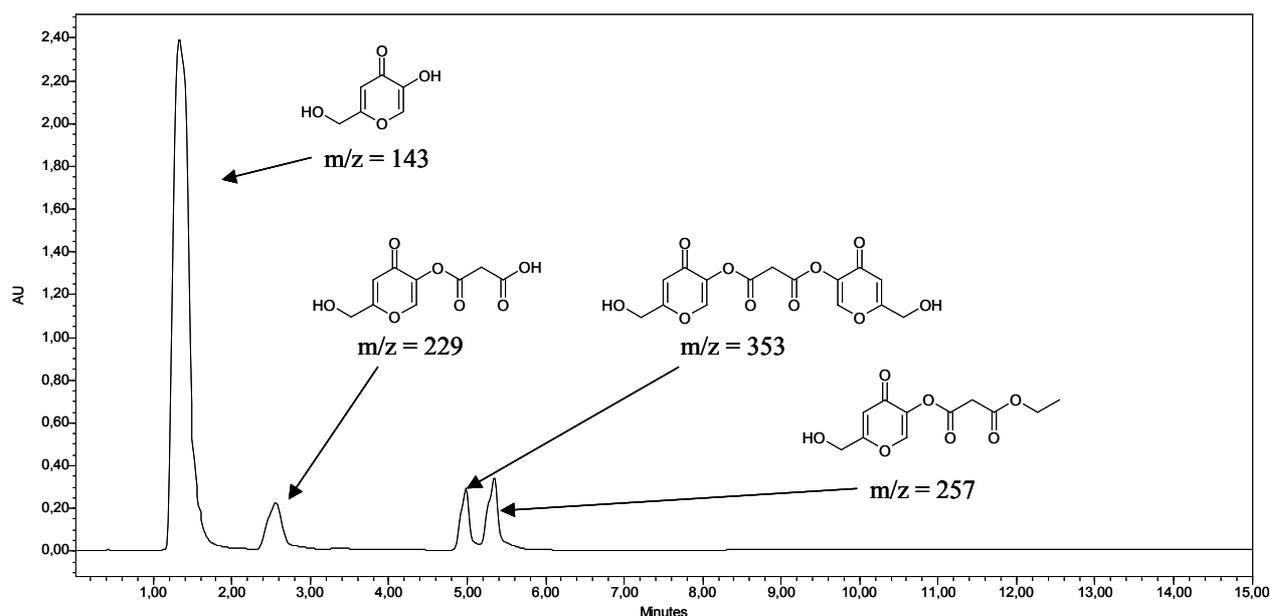


Abbildung 3-23: HPLC des Reaktionsgemisches der Umsetzung von Kojisäure und Malonsäurediethylester in Trifluoressigsäure. Die Peaks sind mit den Massen und Strukturvorschlägen für die dazu gehörenden Substanzen versehen.

Da die Reaktion nicht zum gewünschten Produkt führte, wurde eine genauere Untersuchung mit spektroskopischen Methoden nicht unternommen. Die dargestellten Strukturen für die Verbindungen sind daher nicht bewiesen. Ihnen liegen die Überlegungen zu Grunde, dass die Reaktionsbedingungen eine Veresterung oder Umesterung einzuleiten vermögen, so ist z.B. das Endprodukt der Umsetzung von Kojisäure mit Benzoesäure in Gegenwart von Trifluoressigsäure die 6-Benzoyl-Kojisäure.[131]

3.12.2 Reaktion der Kojisäure mit Malonsäuredinitril unter der Einwirkung von Trifluoressigsäure

Trotz der wenig ermutigenden Ergebnisse bei der Durchführung von Woods erster Pyranopyrandion-Synthese, sollte auch noch die Variante betrachtet werden. Dazu wurden Malonsäuredinitril und Kojisäure in Trifluoressigsäure gelöst und zum Sieden gebracht. Nach vier Stunden wurde etwas Wasser zugesetzt und für weitere 18

Stunden erhitzt. Anschließend wurde nochmals Wasser zugegeben und die Lösung über Nacht im Kühlschrank belassen. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Phosphorpentoxid erhielt man braune, feine Nadeln.

Ein HPLC dieses Niederschlags konnte allerdings keinen Hinweis auf die mögliche Entstehung eines Pyranopyrandions liefern. Aus dem entsprechenden LC-MS war ersichtlich, dass es sich bei dem Niederschlag wiederum hauptsächlich um Kojisäure handelte. Der zweite Peak mit $t_R = 9,3$ ergab bei der LC-MS Untersuchung keinen entsprechenden Peak im TIC. Es stellte sich heraus, dass es sich dabei um eine Verunreinigung aus dem Autosampler der analytischen HPLC handelte.

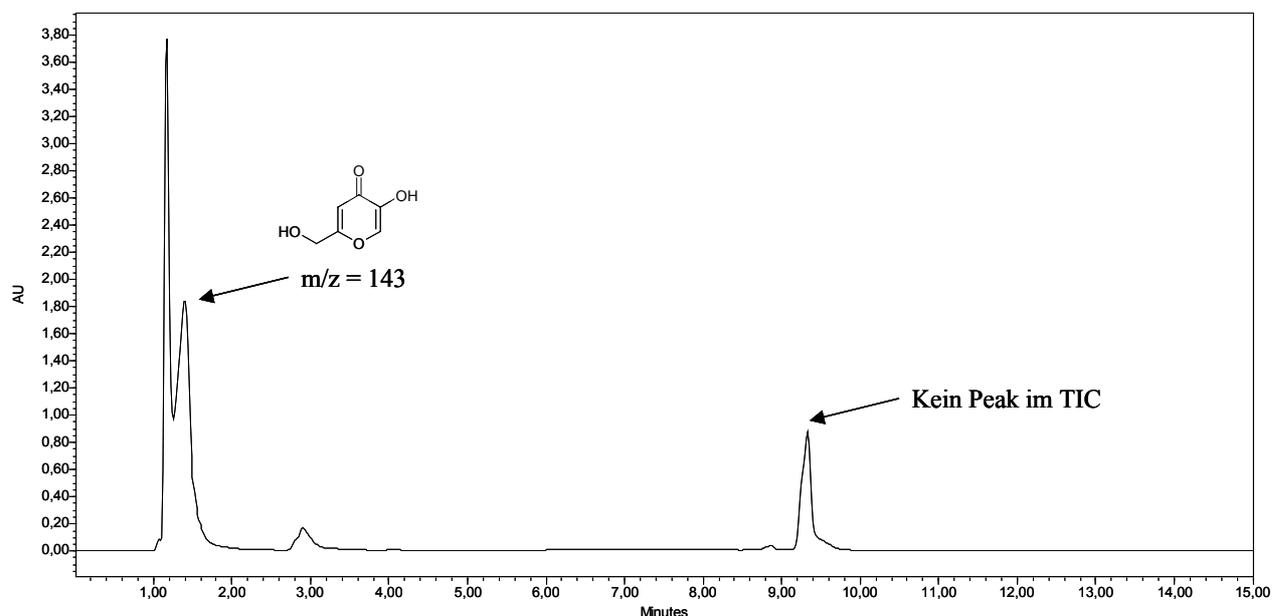


Abbildung 3-24: HPLC der Reaktion Malonsäuredinitril und Kojisäure. Die Peaks sind mit den Massen dazu gehörenden Substanzen versehen.

3.13 Simonis-Reaktion mit Kojisäure

Analog der Chromon-Synthese nach Simonis, bei der ein Phenol mit einem 3-Ketoester umgesetzt wird, sollte die Möglichkeit der Übertragung dieser Methode auf die Synthese eines Pyranopyrandions untersucht werden. Dazu wurden Kojisäure und Malonsäurediethylester unter Eiskühlung in 80%-iger Schwefelsäure gelöst und anschließend bei Raumtemperatur gerührt.

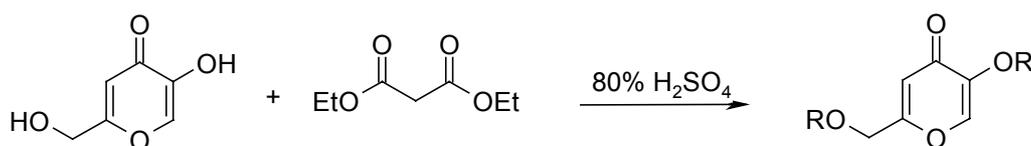


Abbildung 3-25: Simonis-Reaktion mit Kojisäure.

Wie schon in Abbildung 3-25 angedeutet, konnte mit dieser Methode kein Pyranopyrandion synthetisiert werden. Ein HPLC der Reaktion zeigte, dass dabei kein eindeutiges Produkt entstand, vielmehr erkennt man neben dem Edukt noch vier weitere Peaks. Mit Hilfe einer LC-MS Analyse fand man für diese Peaks die in Abbildung 3-26 gezeigten Massen. Die möglichen Strukturformeln für diese Verbindungen sind ebenso in die Abbildung eingezeichnet, wobei die dort gezeigten Reste entweder als Ester mit der 3- oder 6-Hydroxy-Funktion vorliegen könnten.

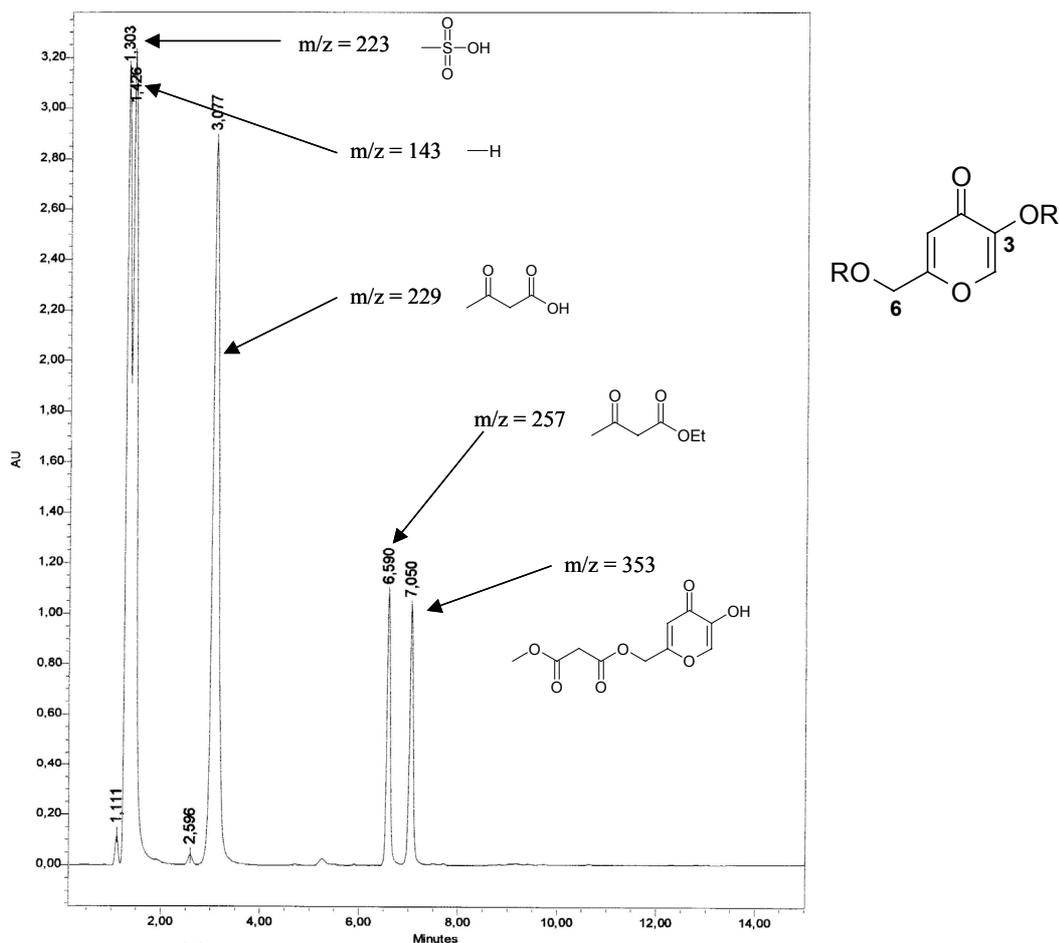


Abbildung 3-26: HPLC der Umsetzung von Kojisäure mit Malonsäurediethylester unter Bedingungen der Simonis-Reaktion. Die eingezeichneten Strukturformeln sollen die Reste an der Kojisäure nach erfolgter Veresterung darstellen.

Anstelle eines zyklisierten Produkts traten vier durch Veresterung entstandene Produkte, die selbst keine Zyklisierung mehr eingingen. Dies änderte sich auch nicht bei der Verlängerung der Reaktionszeit, die auf eine Woche ausgedehnt wurde, oder einer Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 60 °C.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass auch diese Reaktionsbedingungen kein C-Acylierung der Kojisäure ermöglichen können.

3.14 Synthesestrategie A (Pyruvat Strategie)

3.14.1 Synthesestrategie – Retrosynthetische Analyse

Die Strategie sollte einen schrittweisen Aufbau einer Polypyron-Kette ermöglichen, und das Endprodukt eines Synthesesyklus sollte möglichst direkt als Edukt eines neuen Zyklus verwendet werden können. Die retrosynthetischen Überlegungen zu dieser Strategie sind in Abbildung 3-27 zusammengefasst. Ihr liegt die Idee zu Grunde, dass sich der zweite Pyran-4-on-Ring durch die Verknüpfung zweier Bausteine zusammensetzen lässt. Die beiden Bindungen, die dafür gebildet werden müssen, sind in der Abbildung gestrichelt eingezeichnet.

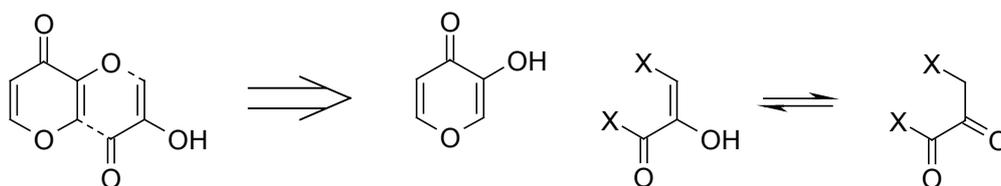


Abbildung 3-27: Retrosynthetische Analyse; Bildung des zweiten Pyran-4-on-Rings aus einem 3-Hydroxy-pyran-4-on und einem C₃-Baustein.

Als „key steps“ für die beiden zu knüpfenden Bindungen bieten sich eine nucleophile Substitution zur Bildung der Etherbindung und eine Acylierung zum Ringschluss an. Die dafür geeigneten Bausteine könnten z.B. ein 3-Hydroxy-pyran-4-on und der C₃-Baustein ein 3-Halogen-brenztraubensäure sein. Dieser C₃-Baustein hätte zudem den Vorteil, dass nach erfolgter Zyklisierung die Zwischenstufe entsteht, welche durch eine anschließende Umlagerung (Keto-Enol Tautomerie) eine passende Ausgangsverbindung für die Wiederholung der Reaktionssequenz ergeben würde. Der Synthesesyklus (Abbildung 3-28) würde dann zwei bzw. drei Schritte umfassen und man sollte so leicht eine Polypyron-Kette aufbauen können.

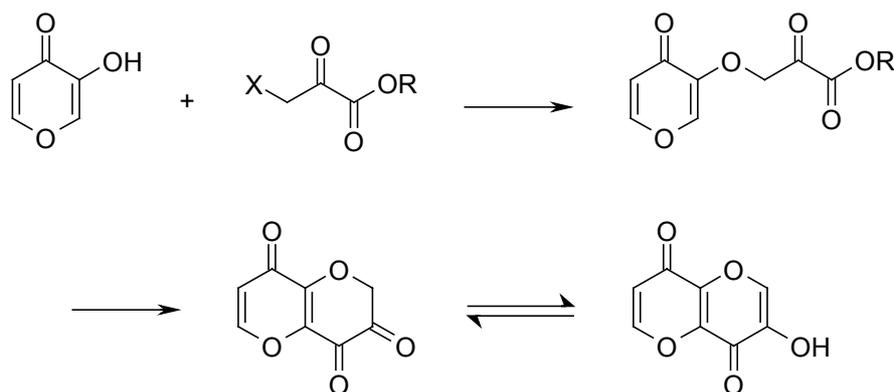


Abbildung 3-28: Schematische Darstellung der Pyruvat-Synthesestrategie.

3.14.2 Umsetzung von Kojisäure mit 3-Brom-pyruvat.

Es gibt recht wenige 3-Hydroxy-pyran-4-one zu kaufen, und von diesen schien die Kojisäure für diese Synthese besonders geeignet zu sein. In der Literatur wurde schon mehrfach ihre Umsetzung mit Halogenalkanen beschrieben, wobei verschieden Basen, wie Carbonate oder Kalium- bzw. Natriumhydroxid, verwendet wurden.[134-136] Für die ersten Versuche sollte Cäsiumcarbonat verwendet werden, welches eine besonders starke Base darstellt und sich in Methanol auch vollständig umsetzt.[137] Im Gegensatz z.B. zu Kaliumcarbonat in Dimethylformamid, welches immer im Überschuss zugegeben werden muss, da das bei der Deprotonierung entstehende Kaliumhydrogencarbonat sich nicht weiter umsetzt. Als Reaktionspartner wurde der schon oben erwähnte C₃-Baustein 3-Brom-brenztraubensäure-methylester verwendet.

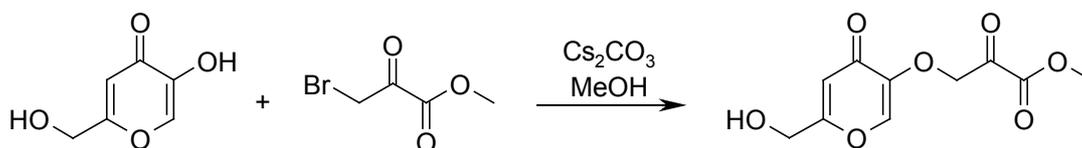


Abbildung 3-29: Reaktionsgleichung der Umsetzung von Kojisäure mit 3-Brom-pyruvat.

Kojisäure wurde in Methanol unter Argon gelöst und mit Cäsiumcarbonat versetzt, welches sich unter Gasentwicklung auflöste. Nach dem vollständigen Auflösen erfolgte der Zusatz des 3-Brom-brenztraubensäure-methylesters. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf mittels HPLC verfolgt.

Auffällig war dabei, dass sich die Reaktionslösung nach Zugabe des 3-Brom-brenztraubensäure-methylesters schon nach einiger Zeit braun verfärbte. Das HPLC zeigte außerdem, dass die Umsetzung nicht vollständig verlief. Die Ausdehnung der Reaktionszeit auf bis zu zwei Tage veränderte die Zusammensetzung der Reaktionsmischung leider nur geringfügig zu Gunsten der Produktpeaks. Man konnte vielmehr erkennen, dass neben dem zunächst einzigen Peak, welcher durch eine LC-MS Untersuchung als Produktpeak mit der gesuchten Masse von $m/z = 243$ identifiziert werden konnte, noch weitere Nebenprodukte entstanden. Eines dieser Nebenprodukte zeigte dabei dieselbe Masse von $m/z = 243$ wie das gewünschte Produkt.

Dies lässt vermuten, dass die Reaktion leider nicht vollständig und auch nicht selektiv verlief. Die Ursache für die mangelnde Selektivität ist wahrscheinlich durch die Kojisäure bedingt, welche sich nicht wie ein Phenol verhält, sondern nach der Deprotonierung einem Enolat-Ion entspricht. Bei einem solchen ambidenten Ion ist nun sowohl eine O- als auch C-Alkylierung durch die Halogenverbindung möglich.

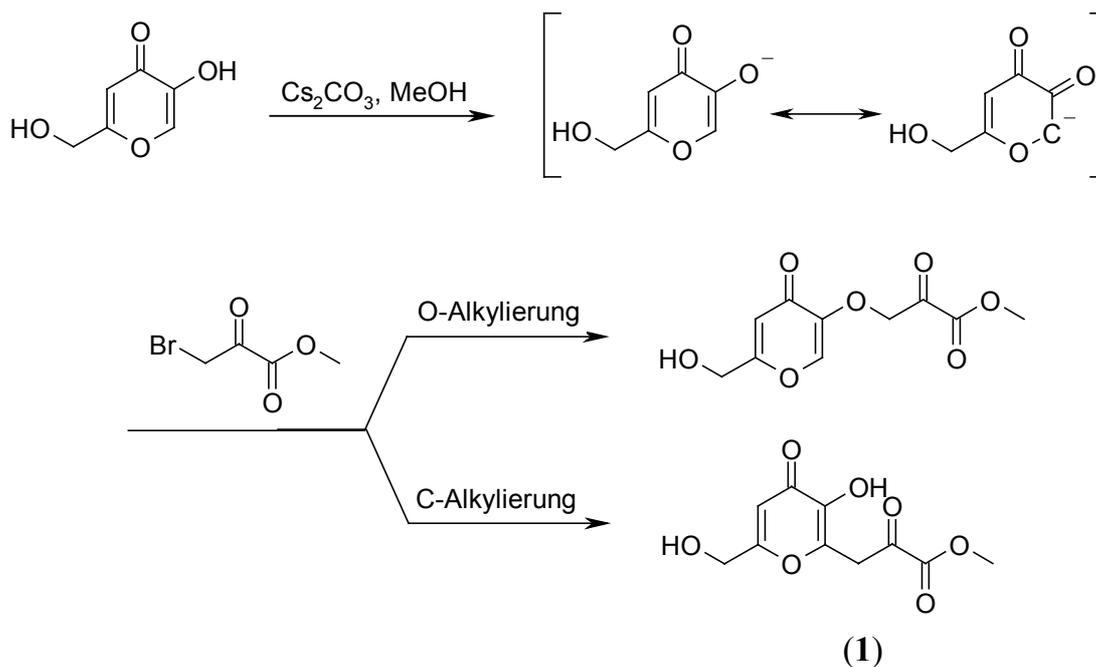


Abbildung 3-30: Mögliche O-/C-Alkylierung der Kojisäure.

Die NMR-Analyse eines der beiden Produkte, sollte nun klären, welche Alkylierung in diesem Fall bevorzugt eintrat. Dazu wurde nach Beendigung der Reaktion das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert. Als Eluent wurde dabei Ethylacetat mit einem steigenden Methanol-Anteil verwendet. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden mittels HPLC und ESI-MS untersucht. Es gelang eine saubere Fraktion des Hauptprodukts zu isolieren und von dieser wurden dann NMR-Spektren aufgenommen.

Die Interpretation dieser Spektren zeigte, dass es sich dabei um das C-Alkylierungsprodukt (1) handelt, welches in der geplanten Synthese leider nicht verwendet werden kann.

Somit war klar, dass das eigentlich gewünschte Produkt in der Reaktion nur in untergeordneten Mengen entstand. Im weiteren Verlauf wurde nun untersucht, ob sich durch Variation verschiedener Reaktionsparameter, wie Base, Molverhältnisse der Reaktionspartner, Lösemittel und Temperatur, zum einen die Effizienz der Reaktion, als auch deren Selektivität positiv beeinflussen lassen (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Zusammenstellung der Variationen der Reaktionsparameter.

Base	Äquivalente Base	Äquivalente Brom-pyruvat	Lösemittel	Reaktions- temperatur
Cs ₂ CO ₃	0,5	0,5	MeOH	RT
Cs ₂ CO ₃	0,5	1,0	MeOH	RT
Cs ₂ CO ₃	0,5	1,5	MeOH	RT
Cs ₂ CO ₃	1,0	1,0	MeOH	RT
Cs ₂ CO ₃	1,5	1,0	MeOH	RT
Cs ₂ CO ₃	0,5	1,0	MeOH	40 °C
NaOH	1,5	1,5	MeOH	RT
K ₂ CO ₃	1,1	1,1	DMF	RT
K ₂ CO ₃	1,1	1,1	DMF	50 °C

Diese Versuche zeigten, dass durch Erhöhung der Menge an Cäsiumcarbonat, sich keine signifikante Steigerung des Reaktionsumsatzes erzielen ließ. Der subjektive Eindruck ging eher in die Richtung, dass durch die erhöhte Basenkonzentration auch eine verstärkte Zersetzung des 3-Brom-brenztraubensäure-methylesters eintrat. Die schon zuvor erwähnte Beobachtung der Braunverfärbung der Reaktionsmischung wurde als Anzeichen einer Zersetzung interpretiert, welche allerdings nicht näher untersucht wurde. Dies führte zu der Überlegung, dass durch eine portionsweise Zugabe des 3-Brom-brenztraubensäure-methylesters, verbunden mit einer Erhöhung der Äquivalente, dem entgegen gewirkt werden könnte. Die Reaktionsumsetzung ließ sich durch diese Maßnahmen allerdings nur im geringen Umfang steigern.

Durch Variation der Base sollte noch deren Einfluss auf den Reaktionsverlauf untersucht werden. Insbesondere, ob der Reaktionsumsatz noch gesteigert werden kann. Dies konnte allerdings in diesem Zusammenhang nicht bestätigt werden. Gerade bei der Verwendung von Kaliumcarbonat in Dimethylformamid fand ein sehr schnelle Zersetzung des 3-Brom-brenztraubensäure-methylesters statt.

Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur zeigte erneut, dass die Stabilität des 3-Brom-brenztraubensäure-methylesters ein entscheidender Punkt dieser Reaktion ist, da die Zersetzung dieser Verbindung alle anderen positiven Effekte überwog.

Als nächster logischer Schritt stand nun die Verbesserung der Stabilität des 3-Brom-brenztraubensäure-methylesters bzw. dessen Ersatz an. Zu diesem Zweck wurden der 3-Brom-2,2-dimethoxy-propansäure-methylester und das entsprechende Chlor-Derivat dargestellt. Beim ambidenten Enolat-Ion stellt das Sauerstoffatom ein „hartes“ Reaktionszentrum dar und sollte bevorzugt mit dem „harten“ α -Kohlenstoffatom des Chlorids reagieren. Daher sollte das Chlor-Derivat nach dem HSAB-Konzept eine bessere Ausbeute an O-Alkylierungsprodukt ergeben.

Die 3-Chlor-brenztraubensäure wurde aus der Brenztraubensäure durch Umsetzung mit Sulfurylchlorid dargestellt.[138] Die Chlor- bzw. Brom-brenztraubensäure wurde dann mit Trimethyl-orthoformiat in Methanol zum entsprechenden Ketal umgesetzt (Abbildung 3-31).[139]

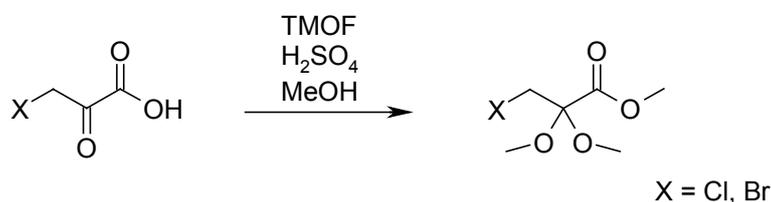


Abbildung 3-31: Darstellung der 3-Halogen-2,2-dimethoxy-propansäure-methylester.

Der so erhaltene 3-Brom-2,2-dimethoxy-propansäure-methylester wurde unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen mit Kojisäure umgesetzt. Dabei konnte schon beim Zutropfen des Alkylierungsmittels eine Braunverfärbung der Reaktionslösung beobachtet werden. Ein HPLC der Reaktionslösung zeigte, dass leider keine Umsetzung stattgefunden hatte.

Der 3-Chlor-2,2-dimethoxy-propansäure-methylester konnte nicht auf diese Weise dargestellt werden. Bei der Synthese erhielt man zwar ein sauberes Produkt, dieses

wies allerdings eine um 5,0 amu zu hohe Masse auf, und zeigte auch nicht mehr das Isotopenmuster einer Monohalogen-Verbindung.

An diesem Punkt wurde die Synthesestrategie nicht weiter verfolgt, da durch die mangelnde Effizienz und Selektivität des ersten Syntheseschritts das gewünschte O-Alkylierungsprodukt nicht in ausreichender Menge und Reinheit darstellbar war. Zudem ergaben sich anhand der Erfahrungen mit der Pyranopyrandion-Synthese nach Woods (s. voriger Abschnitt) Bedenken, ob der zweite Syntheseschritt dieser Strategie, die C-Acylierung zum Ringschluss, überhaupt möglich ist.

3.15 Synthesestrategie B (Biskojiat Strategie)

3.15.1 Synthesestrategie – Retrosynthetische Analyse

Eine sehr einfach und elegante Möglichkeit zum Aufbau von Polypyronen wäre die Bildung einer Etherbindung zwischen zwei 3-Hydroxy-Pyran-4-onen. Die retrosynthetische Analyse dieses Ansatzes ist Abbildung 3-32 zu entnehmen.

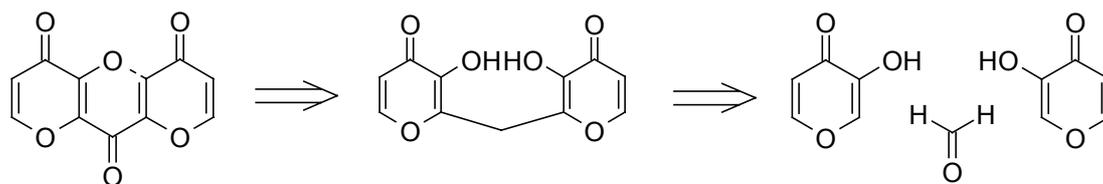


Abbildung 3-32: Retrosynthetische Analyse.

Die Umsetzung des Ansatzes führt zu folgender Synthesestrategie: im ersten Schritt wird ein methylenverbrücktes Bis(3-hydroxy-pyran-4-on) dargestellt, welches im zweiten Schritt zum Trizyklus umgesetzt und zum Schluss nach erfolgter Oxidation ein Tripyrone ergeben sollte (Abbildung 3-33).

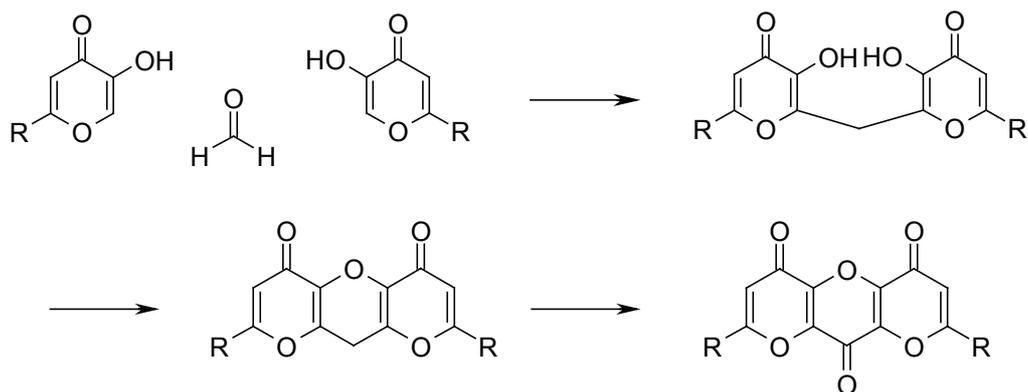


Abbildung 3-33: Synthesestrategie zum Aufbau eines Tripyrones.

3.15.2 Umsetzung zum Bis(3-hydroxy-6-hydroxymethyl-4-oxo-4H-pyran-2-yl)-methan

Die Reaktion eines 3-Hydroxy-pyran-4-ons, speziell Kojisäure, mit Formaldehyd, welche zum ersten Zwischenprodukt dieser Synthesestrategie führt, wurde zuvor schon in der Literatur beschrieben.[140-142]

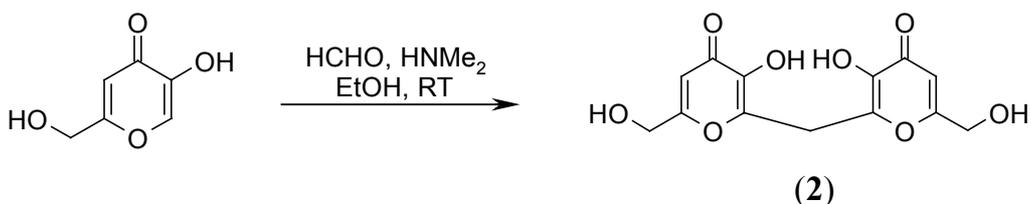


Abbildung 3-34: Umsetzung der Kojisäure mit Formaldehyd und Dimethylamin zum Bis(3-hydroxy-6-hydroxymethyl-4-oxo-4H-pyran-2-yl)-methan (2).

Die Reaktion der Kojisäure (1,0 Äquivalente) erfolgte mit Formalinlösung (0,5 Äquivalente) und Dimethylaminlösung (0,5 Äquivalente) in Ethanol und bei Raumtemperatur. Diese von der Gruppe um Fox[142] beschriebenen Reaktionsbedingungen ergaben leider nur geringe Ausbeuten des Produkts, mitunter blieb sogar dessen Ausbildung ganz aus.

Bei der Durchführung der Syntheseversuchen zeigte sich, dass es vorteilhaft war, zuerst nur die Hälfte der Kojisäure mit der Formaldehyd/Dimethylamin-Mischung umzusetzen. Mit Hilfe einer HPLC-Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Bildung des primären Additionsproduktes relativ schnell abgeschlossen war. So konnte schon etwa 20 min nach Zugabe der Formaldehyd/Dimethylamin-Mischung, die zweite Hälfte der Kojisäure zugegeben werden. Durch eine erneute Zugabe von Formalinlösung konnte die Produktausbeute nochmals leicht angehoben werden.

Die modifizierten Reaktionsbedingungen lassen sich wie folgt beschreiben. Kojisäure wurde in wässrigen Ethanol gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Dazu tropfte man die Mischung einer Formalinlösung und einer wässrigen Dimethylaminlösung in Ethanol, welche zuvor für 30 min bei Raumtemperatur belassen wurde. Nach 20 min wurde erneut ein Äquivalent Kojisäure und nochmals Formalinlösung zugesetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde der Ansatz gekühlt, der dabei ausgefallene Niederschlag abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Nach der Umkristallisation aus Wasser und Trocknen über Phosphorpentoxid erhielt man das gewünschte Produkt als farbloses Pulver.

Die Substanz wurde mittels HPLC, ESI-MS und NMR charakterisiert. Die NMR-Daten des erhaltenen Produkts entsprachen den Literaturdaten.[142]

Durch Erhitzen der Verbindung in Essigsäureanhydrid erhält man überwiegend das entsprechende Tetra-Acetat, welches mit Hilfe eines LC-MS-Laufs identifiziert wurde.

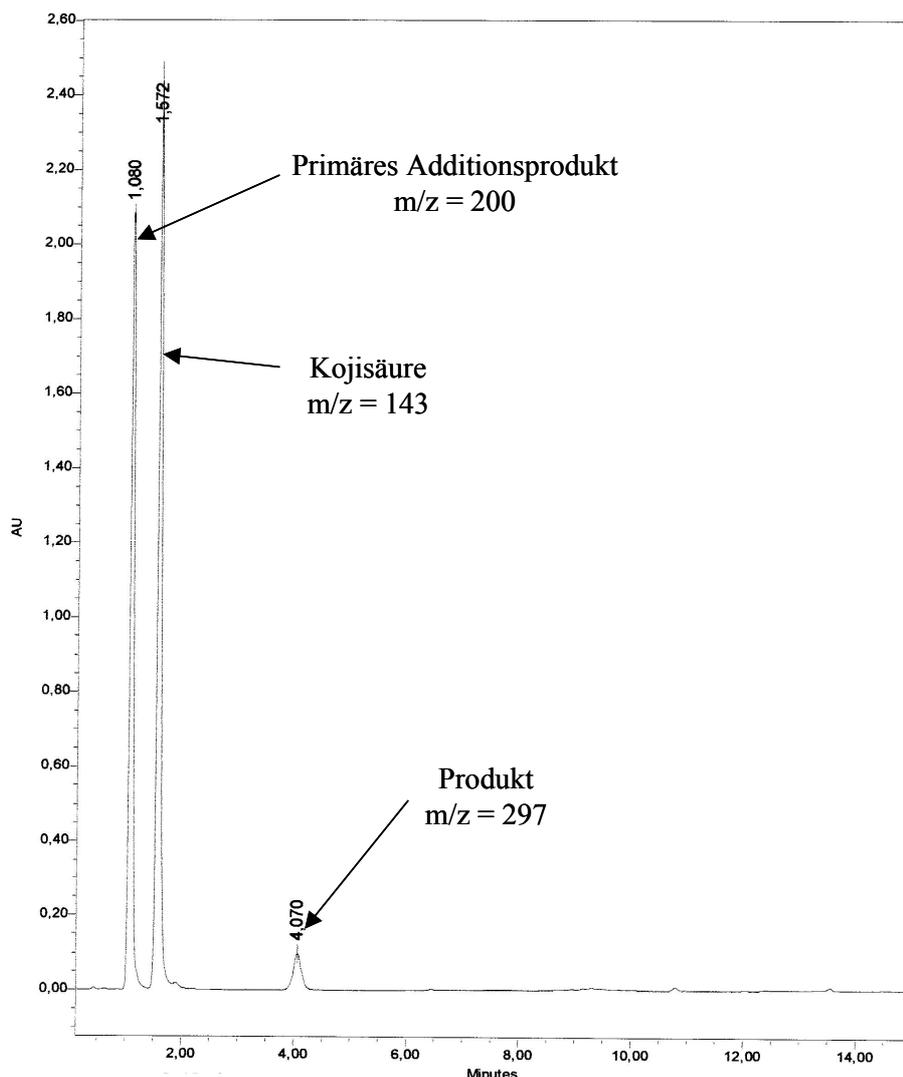


Abbildung 3-35: HPLC der Reaktion.

Der Verlauf der Reaktion dürfte größtenteils dem einer Mannich-Reaktion entsprechen. Bei dieser entsteht in einem vorgelagerten Hydrolysegleichgewicht aus dem Formaldehyd und einem primären oder sekundären Amin, hier Dimethylamin, zuerst ein Immoniumion.

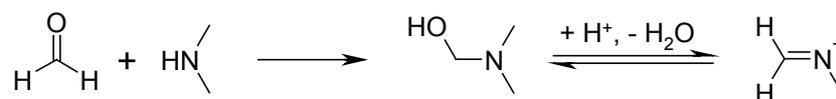


Abbildung 3-36: Bildung des Immoniumions.

Dieses Immoniumion, ein Kation mit einer delokalisierten positiven Ladung, kann auch als stickstoffanaloges Formaldehyd aufgefasst werden und lässt sich mit CH-aciden Verbindungen im Sinne einer Aldolreaktion umsetzen. Die CH-acide Komponente wird bei dieser Reaktion somit aminomethyliert, wobei eine Mannich-Base bzw. deren Salz entsteht (Abbildung 3-37).

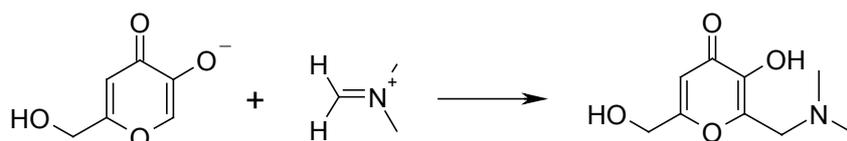


Abbildung 3-37: Bildung des primären Additionsprodukts: Umsetzung des Immoniumions mit der CH-acider Komponente Kojisäure.

Dieses primäre Additionsprodukt ist auch im HPLC der Reaktion (Abbildung 3-35; $t_R = 1,08$) zu sehen, und mit Hilfe eines LC-MS konnte diesem Peak ein Molekülion mit $m/z = 200$ zugeordnet werden. Dies entspricht der in Abbildung 3-37 gezeigten aminomethylierten Kojisäure. Diese Mannich-Base ist als solche unter diesen Reaktionsbedingungen nicht isolierbar, da sie aufgrund der größeren Nucleophilie des Kojisäure-Anions im Vergleich zum Dimethylamin mit einem weiteren Molekül Kojisäure unter Bildung des gewünschten Produkts weiter reagiert.

Für die nachfolgenden Versuche wurde neben dem Bis(3-hydroxy-6-hydroxymethyl-4-oxo-4H-pyran-2-yl)-methan (**2**) auch noch das Bis(3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-pyran-2-yl)-methan (**5**) benötigt, welches sich ebenso durch die Umsetzung des Allomaltols (3-Hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-pyran) mit Formaldehyd und Dimethylamin darstellen lässt.

Die Synthese des Allomaltols ausgehend von Kojisäure ist in Abbildung 3-38 zu sehen.[143] Zuerst setzte man die Kojisäure mit Thionylchlorid um, wobei die Chlor-Kojisäure erhalten wurde. Diese musste vor einer weiteren Umsetzung unbedingt aus Wasser umkristallisiert werden, obwohl die Verbindung DC- und HPLC-rein war.

Geschah dies nicht, so war in der folgenden Clemmensen-Reduktion mit Zink und konzentrierter Salzsäure ein deutlicher Ausbeuteverlust zu beobachten.

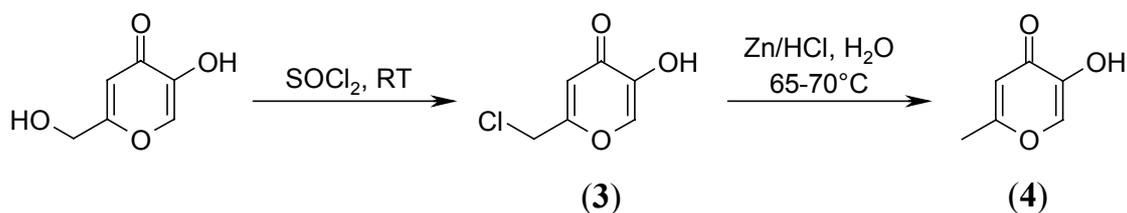


Abbildung 3-38: Darstellung des Allomaltols (4) ausgehend von Kojisäure.

Nach Umkristallisation aus *i*-Propanol erhielt man lange, farblose Nadeln. Die Reinheit der Verbindung wurde mit DC und HPLC überprüft, und ihre Identität durch ESI-MS und NMR als Allomaltol bestätigt.

Das erhaltene Allomaltol wurde dann analog der Kojisäure mit der Mischung von Formalin- und Dimethylaminlösung zum Bis-Allomaltol (Bis(3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-pyran-2-yl)-methan) umgesetzt (Abbildung 3-39).

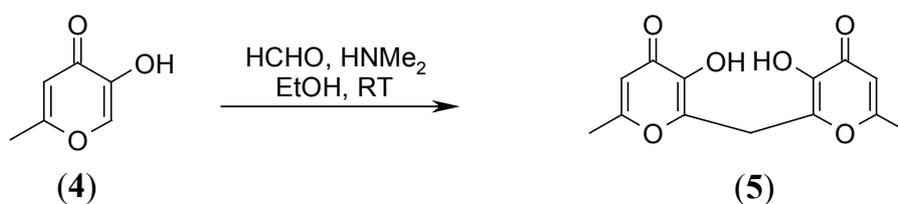


Abbildung 3-39: Umsetzung des Allomaltols mit Formaldehyd und Dimethylamin zum Bis(3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-pyran-2-yl)-methan (5).

Bei der Umsetzung des Allomaltols ergaben sich im Gegensatz zur Kojisäure die besten Ausbeuten, wenn die Reaktionsbedingungen der Literatur eingehalten wurden. Nach der Reaktion wurde der Ansatz über Nacht kühl gestellt, der dabei ausgefallene Niederschlag abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die neue Verbindung wurde dann mittels HPLC, ESI-MS und NMR charakterisiert.

3.15.3 Versuche zur Zyklisierung; Synthese eines Ethers aus zwei 3-Hydroxy-pyronen

Die Frage, ob die Etherbrücke bei den Bis-Verbindungen verwirklicht werden könnte, hing davon ab, ob diese Verbindungen eher als Phenol oder als Enol reagieren würden. Die ersten Versuche mit der Ethersynthese nach Williamson sollten bei der Beantwortung dieser Frage helfen. Diese zeichnet sich durch eine nucleophile Substitution aus, bei denen eine Halogen- oder Pseudohalogen-Verbindung mit einem Alkoholat oder Phenolat umgesetzt wird.

Zu diesem Zweck wurde das Tosylat (6) des Allomaltols und der 3-Brom-Chelidonsäure-diethylester (7)[144] dargestellt, welche anschließend unter Zusatz von Base (NaOH, K₂CO₃) jeweils mit Allomaltol zur Reaktion gebracht wurden.

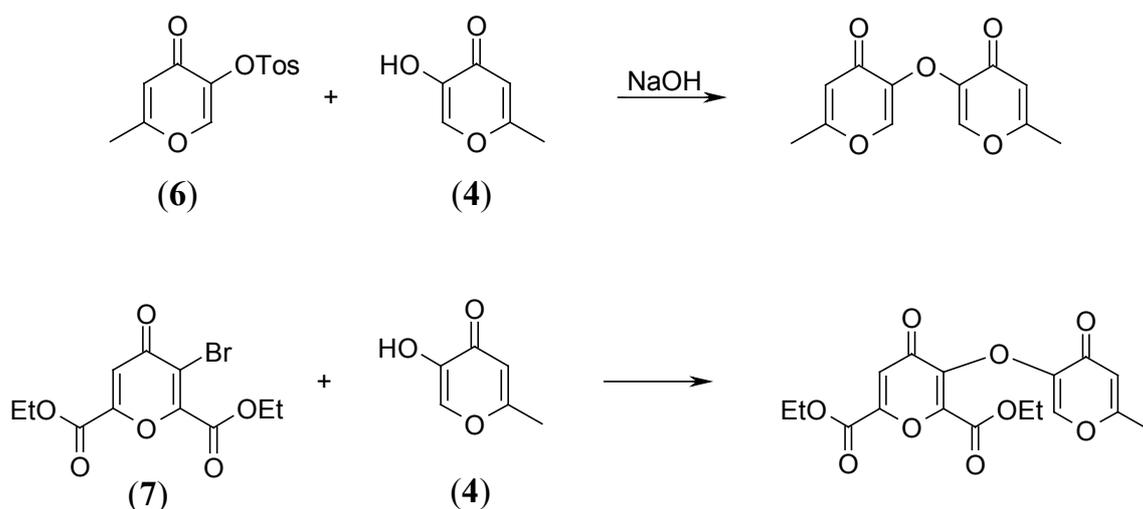


Abbildung 3-40: Versuche zu Synthese einer Etherbindung bei 3-Hydroxy-pyronen.

Bei diesen Versuchen konnte in den Reaktionsmischungen keine entsprechenden Reaktionsprodukte gefunden werden. Die Verbindungen scheinen sich also eher wie ein Enol zu verhalten, bei denen eine nucleophile Substitution nur schwer möglich ist.

Da durch Standardmethoden keine Zyklisierung unter Ausbildung einer Etherbrücke möglich war, sollten noch einige letzte Versuche unternommen werden. Bei der Suche nach passenden Methoden und Reaktionsbedingungen, welche die Zyklisierung zum

Trizyklus realisieren könnten, sollten zunächst jene, welche zur Synthese von Xanthenen bzw. Xanthonen, näher betrachtet werden. Diese Methoden umfassen vor allem die Zyklisierung von Phenolderivaten unter Erhitzen mit und ohne Kondensationsmitteln. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Methode mit der schon Alkyl-Diole unter der Einwirkung von Triphenylphosphin und Tetrachlorkohlenstoff zyklisiert wurden. Auch die Mitsunobu-Reaktion wurde schon bei einem ähnlichen Syntheseproblem eingesetzt.

3.15.3.1 Versuche analog der Synthesemethoden von Xanthenen und Xanthonen

Die ersten Versuche befassten sich mit dem Verhalten der beiden Bis-Verbindungen, Bis-Kojisäure (**2**) und Bis-Allomaltol (**5**) beim Erhitzen ohne jeglichen Zusatz eines Kondensationsmittels. In diesem Fall konnte bei den Verbindungen in einem aufgenommenen HPLC keine Veränderung, aber auch keine Zyklisierung beobachtet werden. Bei den Reaktionen unter Verwendung von Kondensationsmitteln, wie Polyphosphorsäure, Methansulfonsäure oder 80%-ige Schwefelsäure, sowohl bei Raumtemperatur als auch beim Erhitzen, konnten ebenso keine Zyklisierungsprodukte in der Reaktionsmischung gefunden werden. Im Falle der Polyphosphorsäure und der Schwefelsäure konnten allenfalls verschiedene Phosphat- bzw. Sulfatester der eingesetzten Bis-Verbindung mit Hilfe eines LC-MS identifiziert werden.

3.15.3.2 Versuche mit den Reagenzien Triphenylphosphin und Tetrachlorkohlenstoff

Bei verschiedenen Diolen konnte eine Cyclokondensation durch die Verwendung der Reagenzienkombination Triphenylphosphin und Tetrachlorkohlenstoff herbeigeführt werden.[145,146] Bei den beiden Bis-Verbindungen (**2**) und (**5**) führte diese Methode allerdings nicht zum Ziel. Die Variation verschiedener Reaktionsparameter, als auch die Verwendung von Tetrabromkohlenstoff konnte daran leider nichts ändern. Die Methode scheint sich nicht auf dieses Syntheseproblem übertragen zu lassen, und auf die Verwendung bei Alkyl-Diolen beschränkt zu sein.

3.15.3.3 Mitsunobu-Reaktion

Für die Synthese eines 3,6,9-Trioxanthracen-Ringsystems fand die Mitsunobu-Reaktion ihre Anwendung.[147,148] Dabei wurde unter anderen ein Bis(5-hydroxy-3-methyl-2-oxo-2H-pyran-6-yl)-methan mit Triphenylphosphin und Diethylazodicarboxylat in Benzol umgesetzt (Abbildung 3-41).

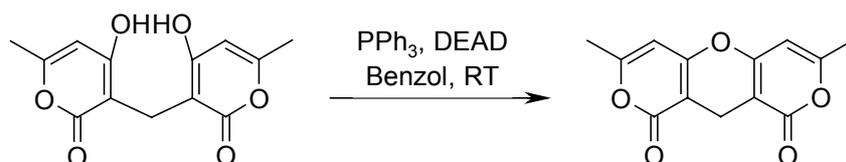


Abbildung 3-41: Syntheschema der Mitsunobu-Reaktion des Bis(5-hydroxy-3-methyl-2-oxo-2H-pyran-6-yl)-methans.

Die für eine Mitsunobu-Reaktion nötigen Funktionalitäten, wie Hydroxy- und Säure-Funktion, sind bei dieser Verbindung durch die beiden Hydroxygruppen vertreten, wodurch eine intramolekulare Zyklisierung möglich wird. Die Frage war nun, ob sich die Reaktion auch auf das vorliegende Syntheseproblem übertragen lassen würde.

Dies war leider nicht möglich. In den durchgeführten Versuchen konnte mit dem Mitsunobu-Reagenz kein Zyklisierungsprodukt der Bis-Kojisäure (**2**) bzw. des Bis-Allomaltols (**5**) gefunden werden. Dabei wurde bei der Zugabe der Reaktionspartner die Reihenfolge variiert und verschiedene Lösemittel (Toluol, Benzol, Acetonitril) verwendet. In keinem der Fälle gelang eine Umsetzung.

Die Synthesestrategie wurde an dieser Stelle nicht weiter verfolgt, da keine Methode gefunden werden konnte, mit deren Hilfe sich die nötige Etherbindung zur Zyklisierung der Bis(3-hydroxy-4-oxo-4H-pyran-2-yl)-methane bilden ließ.

Abschließend lässt sich sagen, dass die 3-Hydroxy-pyrone vermutlich eine Sonderstellung einnehmen. Ihre Reaktivität ist im Vergleich zu den Phenolen herabgesetzt, so dass analoge Synthesemethoden wie für die Xanthone und Xanthane nicht angewandt werden können. Sie dürfte wohl eher der Reaktivität eines Enols entsprechen. Bei den Enolen ist wiederum eine nucleophile Substitution am α -C-Atom

erschwert, und wenn überhaupt dann meist erst unter harscheren Reaktionsbedingungen (Druck, Temperaturen über 200°C) möglich.

3.16 Synthesestrategie C (DMAD Strategie)

3.16.1 Synthesestrategie – Retrosynthetische Analyse

Diese Synthesestrategie basiert auf einer Arbeit von Connor *et al.*[149] In dieser Veröffentlichung wird die Kondensation verschieden substituierter Aminochromone und Aminocumarine mit Ethoxy-methylenmalonsäurediethylester bzw. Acetylen-dicarbon säuredimethylester und deren anschließende Zyklisierung zu den entsprechenden Heterozyklen beschrieben. In diesem Zusammenhang ist vor allem die in Abbildung 3-42 beschriebene Reaktion des 3-Aminochromons mit den beiden ungesättigten Verbindungen von Interesse.

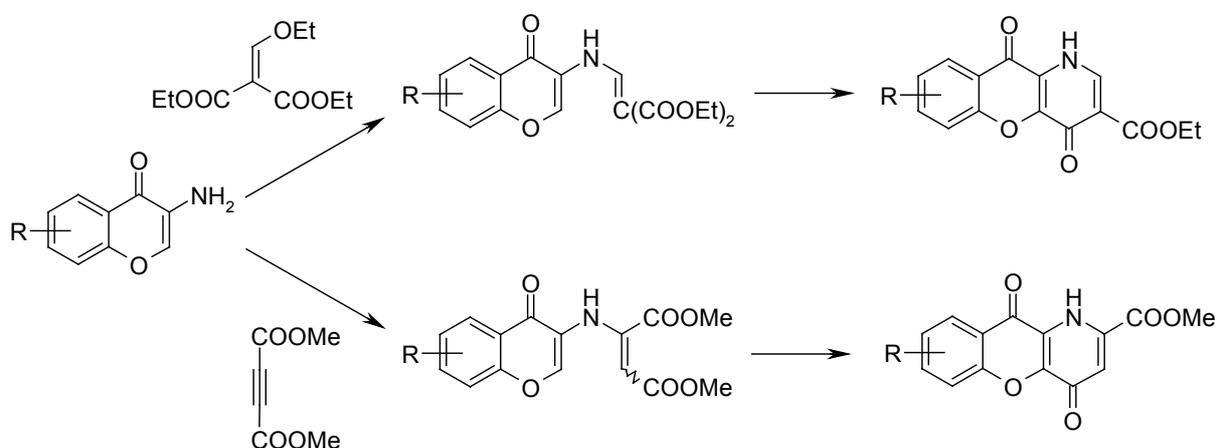


Abbildung 3-42: Syntheschema der Umsetzung des 3-Aminochromons mit Ethoxy-methylenmalonsäurediethylester bzw. Acetylen-dicarbon säuredimethylester.

Die davon abgeleitete Strategie für die Synthese eines Dipyrone entspricht fast vollständig diesem Ansatz. Ein 3-Hydroxy-pyron wird mit einer der beiden ungesättigten Verbindungen umgesetzt und anschließend zyklisiert (Abbildung 3-43).

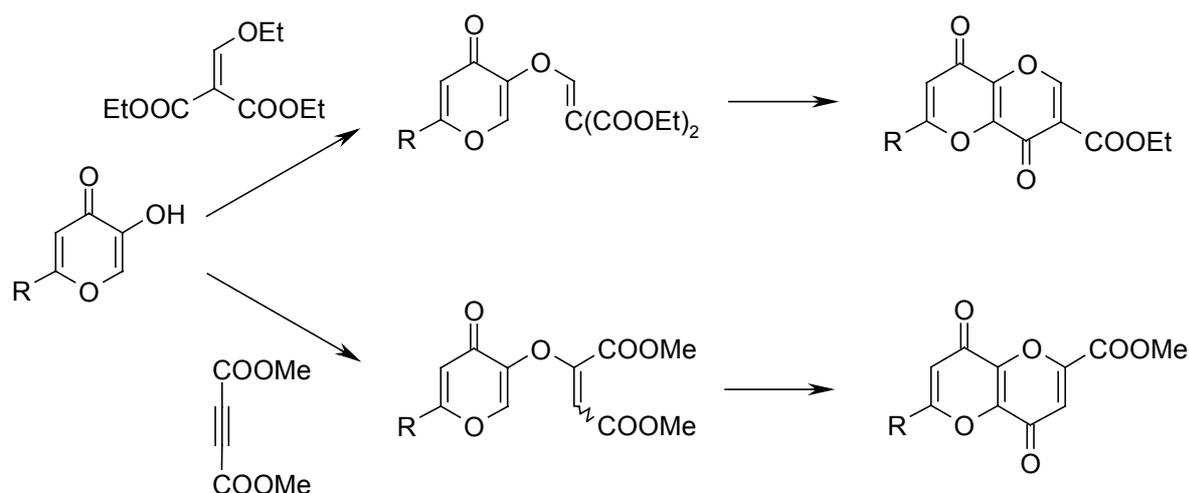


Abbildung 3-43: Synthesestrategie für die Umsetzung eines 3-Hydroxy-pyrone mit Ethoxy-methylenmalonsäurediethylester bzw. Acetylen-dicarbonsäuredimethylester.

3.16.2 Umsetzung der Kojisäure mit den ungesättigten Verbindungen

Bei der Umsetzung der Synthesestrategie zeigten sich im Vergleich zur Literaturvorlage schon zu Beginn erste Unterschiede. Während die 3-Aminochromone sehr reaktive Nucleophile darstellen, welche sich mit Ethoxy-methylenmalonsäurediethylester bzw. Acetylen-dicarbonsäuredimethylester schon beim Erhitzen umsetzten, war das bei den 3-Hydroxy-pyronen nur beim Zusatz einer Hilfsbase möglich.

In Abbildung 3-44 ist das Reaktionsschema für die Umsetzung der Kojisäure mit Acetylen-dicarbonsäuredimethylester gezeigt. Die Umsetzung erfolgte bei Raumtemperatur in Dimethylformamid mit *N*-Methylmorpholin als Hilfsbase.

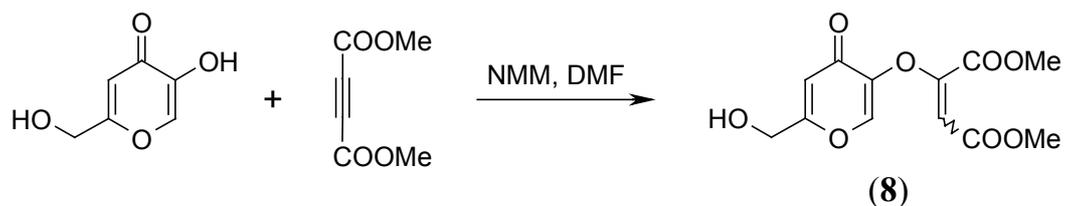


Abbildung 3-44: Reaktion der Kojisäure mit Acetylen-dicarbonsäuredimethylester.

Nach der Reaktion erfolgte zuerst eine wässrige Aufarbeitung. Die dabei erhaltene organische Phase wurde nach dem Trocknen mit Natriumsulfat im Vakuum zur Trockene eingengt und an Kieselgel chromatographiert. Die Elution erfolgte mit Ethylacetat, die Fraktionen mit dem vermutlichen Produkt wurden vereinigt, das Lösemittel entfernt und man erhielt eine DC-reine, farblose Festsubstanz.

Die Untersuchung dieses Feststoffes mittels HPLC ergab, dass es sich dabei leider um ein Gemisch zweier Verbindungen im Verhältnis 9:1 handelte. Mit einem LC-MS konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen beiden Verbindungen jeweils um ein Additionsprodukt der Kojisäure und dem Acetylen-dicarbonsäuredimethylester handeln musste. Beide Verbindungen wiesen die gesuchte Masse von 284,2 amu auf.

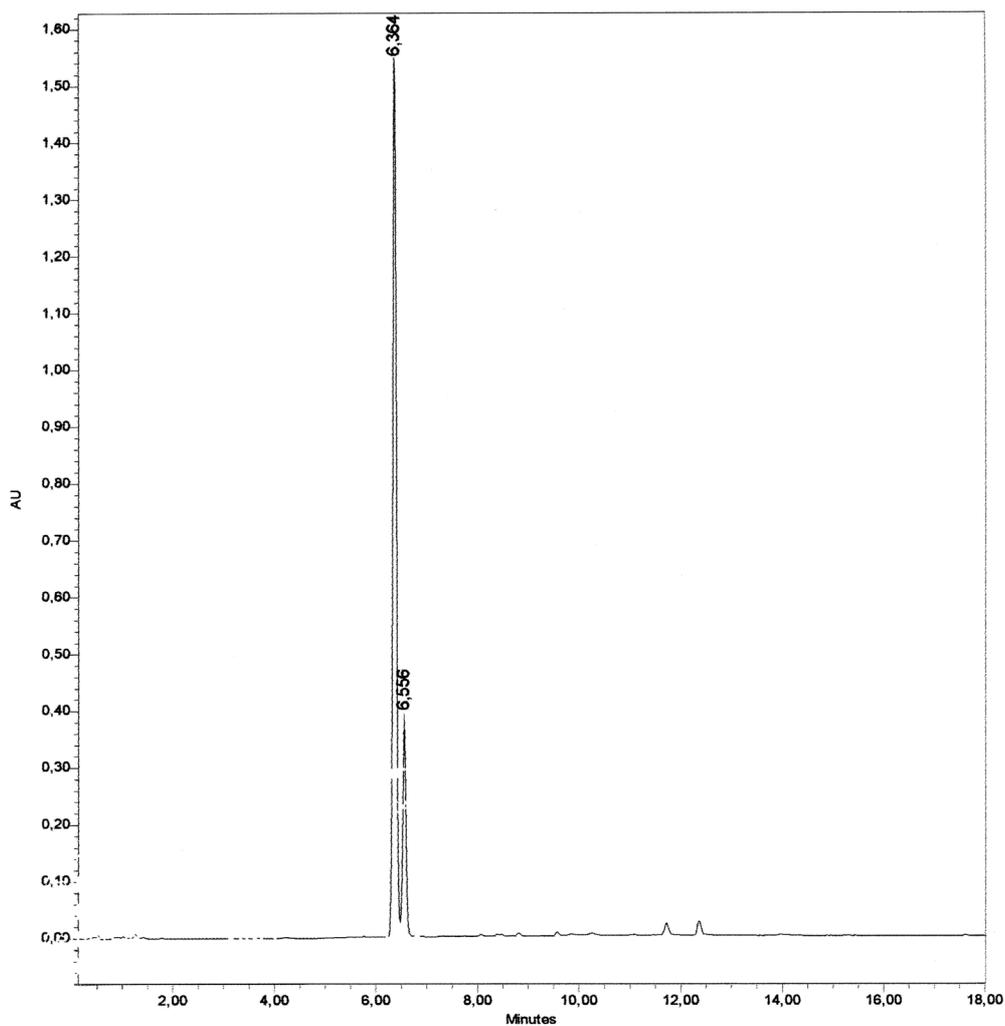


Abbildung 3-45: HPLC des Feststoffes nach der Säulenchromatographie.

Dabei konnte es sich nur um die *Z*- und *E*-Isomere handeln (Abbildung 3-46). Die Frage war nur, welches der beiden mögliche Additionsprodukte, Fumarsäure- bzw. Maleinsäureesterderivat, bevorzugt entstanden war.

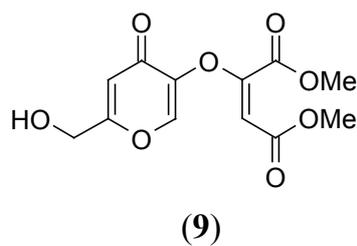
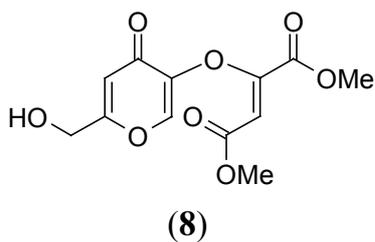


Abbildung 3-46: Fumarsäure- bzw. Maleinsäureesterderivate.

Schon an anderer Stelle wurde erwähnt, dass die Addition von Alkoholen bzw. Phenolen an Dreifachbindungen nicht stereospezifisch verläuft.[150] Bei Reaktionsbedingungen wie in diesem Fall, welche unter kinetischer Kontrolle, also z.B. basenkatalysiert, verlaufen, wird im Allgemeinen bevorzugt das *trans*-Additionsprodukt gebildet. Genau dieses *E*-Isomer würde für die anvisierte Zyklisierung benötigt. Ob das bei der Kojisäure auch zutrifft, sollte durch NMR-Spektroskopie geklärt werden. Im aufgenommenen ¹H NMR-Spektrum sind die beiden Signalsätze der Isomere klar zu erkennen. Entscheidend für die Zuordnung der Isomere ist das Signal des olefinischen Protons, welches beim Signalsatz mit hoher Intensität bei $\delta = 4,82$ liegt. Diese chemische Verschiebung ist charakteristisch für das Fumarsäureesterderivat.

Um das Verhältnis der beiden Isomere zu bestimmen, wurden jeweils die Signalintensitäten der beiden Methylester-Gruppen miteinander verglichen. Somit lässt sich sagen, dass das bevorzugt entstandene Diastereomer das Fumarsäureesterderivat (**8**) war, und bei der Reaktion in einem *de* von 89% entstand. Dieses Ergebnis wich leicht von dem der HPLC- Analyse ab, wonach das *de* etwa 81% betrug. Die Addition der Kojisäure an Acetylen-dicarbon säuredimethylester verläuft also unter Bevorzugung einer *trans*-Addition.

Nachdem die Umsetzung der Kojisäure mit dem Acetylen-dicarbon säuredimethylester das gewünschte Produkt (**8**) ergab, sollte noch die zweite ungesättigte Verbindung, der Ethoxy-methylenmalonsäurediethylester, betrachtet werden.

Erstaunlicherweise gelang es aber bei dieser Verbindung nicht, eine Umsetzung unter den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen, *N*-Methylmorpholin in Dimethylformamid bei Raumtemperatur (Abbildung 3-47, (A)), zu erreichen. Eine Abänderungen der Bedingungen, Piperidin in Ethanol bei Raumtemperatur (Abbildung 3-47, (B))[151], erbrachte auch kein positives Ergebnis, eine Erhöhung der Reaktionstemperatur ebenso nicht.

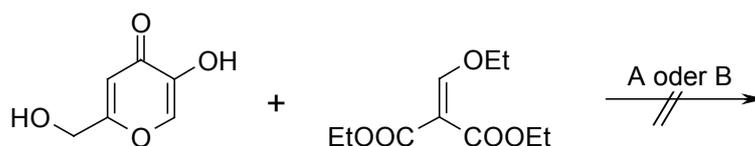


Abbildung 3-47: Umsetzung der Kojisäure mit Ethoxy-methylenmalonsäure-diethylester unter verschiedene Reaktionsbedingungen ((A): NMM, DMF, RT; (B): pip., EtOH, RT):

Nach diesen Erfahrungen wurde die Reaktion nicht weiter verfolgt. Bei den 3-Aminochromonen zeigten die beiden ungesättigten Verbindungen schon Unterschiede. Während der Acetylen-dicarbon säuredimethylester mit den Nucleophilen meist schon bei Raumtemperatur innerhalb weniger Stunden reagierte, benötigte der Ethoxy-methylenmalonsäurediethylester mitunter sogar über einen Tag bei Reaktions-temperaturen von 120-180°C.[149] Dies mag erklären, warum mit den weitaus weniger reaktiven Nucleophil Kojisäure die Umsetzung mit dem Ethoxy-methylenmalonsäurediethylester nicht gelang.

3.16.3 Versuche zur Zyklisierung

Durch die aufgenommenen NMR-Spektren konnte die Identität der erhaltenen Verbindung zweifelsfrei als Fumarsäureester-Derivat bestimmt werden. Dieses *trans*-Isomer (**8**) sollte nun wie in der Literatur beschrieben, einer thermischen Zyklisierung unterworfen werden. Die Verbindung wurde dazu in Diphenylether gegeben und auf 170-180°C erhitzt (Abbildung 3-48).

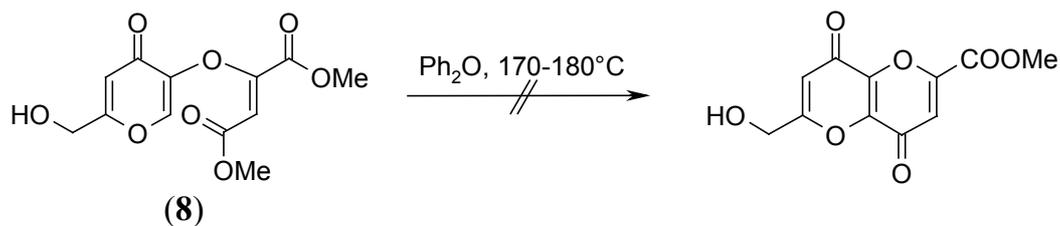


Abbildung 3-48: Versuch zur thermischen Zyklisierung des Fumarsäureester-Derivats.

Durch das Erhitzen konnte allerdings keine neue Verbindung in der Reaktionsmischung gefunden werden. Weder im DC noch HPLC konnte eine Veränderung beobachtet werden. Das Fumarsäureester-Derivat ging unverändert aus der Reaktion hervor. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf bis zu zwei Tage konnte leider auch nicht die gewünschte Umsetzung erbringen. Dies traf ebenso auf das in der Mischung enthaltene Maleinsäureester-Derivat zu.

Für die Zyklisierung, welche als eine intramolekulare, elektrophile Acylierung eines Enamins (3-Aminochromon) bzw. Enols (Kojisäure) aufgefasst werden kann, hat die Elektronendichte am C-2-Atom einen entscheidenden Einfluss. Ein Grund für die fehlgeschlagene Zyklisierung könnte daher das Fehlen der Amino-Gruppe sein. Eventuell kann die Deaktivierung durch die Carbonylgruppe des Pyran-4-on beim Enol-System der Kojisäure, im Gegensatz zum Enamin, nicht ausreichend kompensiert werden, so dass die Acylierung zum Ringschluß thermisch nicht mehr möglich ist. Die Strategie wurde an dieser Stelle nicht weiter verfolgt.

3.17 Synthesestrategie D (PCPE Strategie)

3.17.1 Synthesestrategie – Retrosynthetische Analyse

Eine Gruppe von Naturstoffen weist eine gewisse Ähnlichkeit mit den Polypyronen auf: Es handelt sich dabei um die sogenannten *polycyclic polyethers* (PCPE). Diese fünf- bis siebengliedrigen, zyklischen Ether sind zumeist in der *trans*-Konformation

miteinander verknüpft und die Ringe können dabei auch noch ungesättigte Bindungen enthalten. Die wohl bekanntesten Vertreter dieser Klasse dürften das Brevetoxin A und B sein, die zu den stärksten bekannten Toxinen gehören.

Die Synthese dieser Verbindungen gestaltet sich zumeist recht aufwändig und es wurden eine ganze Reihe unterschiedliche Strategien dafür entwickelt. Die in Abbildung 3-49 gezeigte Synthese eines PCPE zeichnet sich dabei besonders durch ihre Effizienz und Einfachheit aus.[152,153] Sind die Bausteine dargestellt, so gelangt man mit dieser Strategie in nur wenigen Schritten, zu einem 6,6,6,6-Polyzyklischen Polyether.

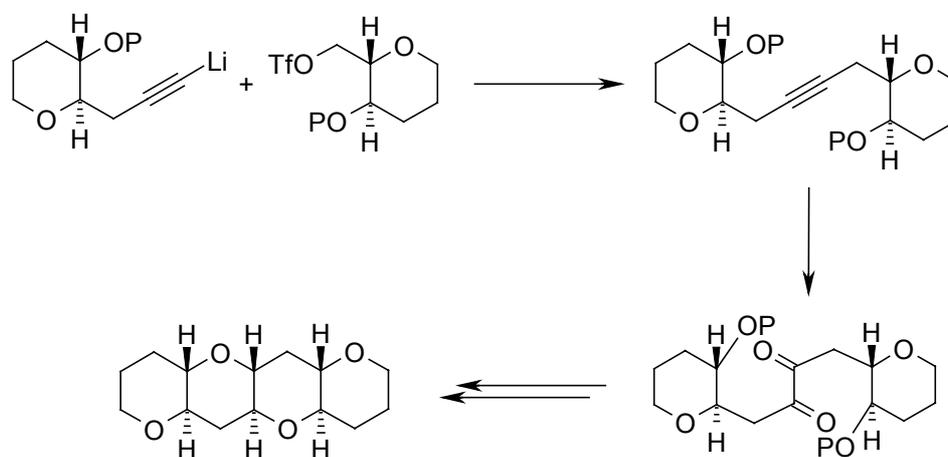


Abbildung 3-49: Synthese eines 6,6,6,6-Polyzyklischen Polyethers.

Möchte man nun diese Strategie auf die Synthese eines Polypyrons übertragen, so vereinfacht sich das Problem noch um einige Schritte. Im Gegensatz zu den PCPE benötigt man keine chiralen Bausteine und das Problem der *all-trans* verknüpften Ringsysteme fällt zudem auch weg. Die Synthesestrategie ist in Abbildung 3-50 zu sehen.

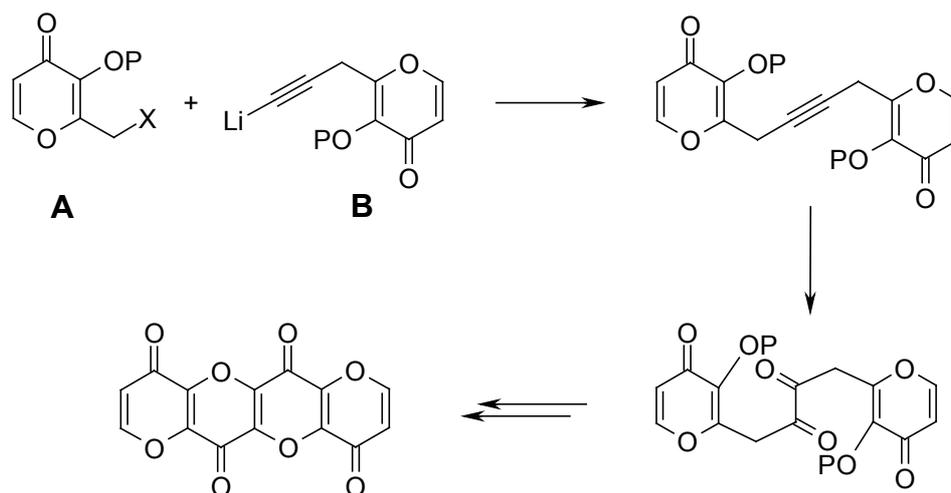


Abbildung 3-50: Synthesestrategie zur Darstellung eines Tetrapyrons.

Für diese Strategie muss zuerst eine Synthese der beiden Bausteine A und B ausgearbeitet werden. Der Baustein B sollte sich allerdings dann aus A darstellen lassen. Die oben angesprochenen Vereinfachung durch die Achiralität der Bausteine, ermöglicht einen konvergenter Ansatz. Denkbar wäre auch die Umsetzung eines bifunktionellen Alkins mit dem Baustein A, wodurch sich gleich die erste Zwischenstufe ergeben würde.

3.17.2 Darstellung der Bausteine

3.17.2.1 Synthese des Bausteins A1 ($P = \text{TBDMS}$; $X = \text{OTf}$)

Als Ausgangspunkt für die Bausteine bietet sich die Kojisäure nicht an, da sie bereits die Hydroxymethyl-Gruppe in der 2-Position trägt. Daher wurde für diese Strategie das Allomaltol (**4**) verwendet, dessen Darstellung zuvor schon beschrieben wurde.

Im ersten Schritt musste am Allomaltol die Hydroxymethyl-Gruppe aufgebaut werden. Dafür bot sich die Methode an, welche schon zur Darstellung der Bis-Kojisäure- bzw. Bis-Allomaltol-Verbindung diente. Es waren allerdings noch leichte Modifikationen der Reaktionsbedingungen nötig. Führte man nämlich die Umsetzung des Allomaltols

mit Formaldehyd in Wasser mit Natriumhydroxid als Base anstelle von Dimethylamin durch, so fand nur eine Hydroxymethylierung des Allomaltols statt.[154,155]

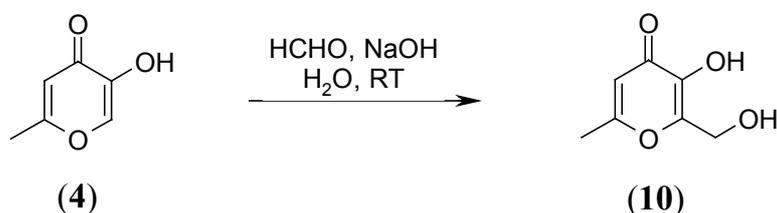


Abbildung 3-51: Darstellung des 3-Hydroxy-2-hydroxymethyl-6-methyl-pyran-4-ons.

Die Reaktion selbst war ohne Probleme durchführbar. Die Umsetzung erfolgte in Wasser mit einem geringen Überschuss von 1,1 Äquivalenten an Natriumhydroxid. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH Wert von 1 eingestellt und kühl gelagert. Der dabei entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Die kristalline Verbindung (10) war HPLC-rein und wurde mittels ESI-MS und NMR als 3-Hydroxy-2-hydroxymethyl-6-methyl-pyran-4-on identifiziert.

Der zweite Schritt für die Darstellung des Bausteins A1 sollte in einer Eintopfreaktion erfolgen. Dabei sollte das 3-Hydroxy-2-hydroxymethyl-6-methyl-pyran-4-on zuerst mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid umgesetzt werden und anschließend die TBDMS-Gruppe eingeführt werden (Abbildung 3-52).[156]

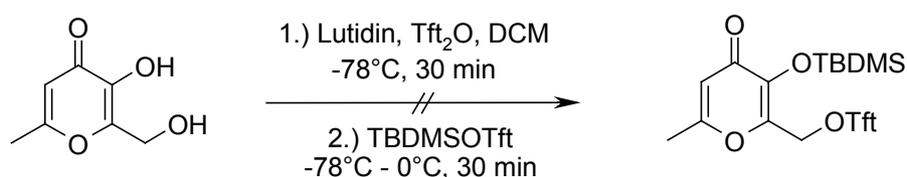


Abbildung 3-52: Versuch zur Darstellung des Bausteins A1.

Bei der Zugabe des Trifluormethansulfonsäureanhydrids konnte allerdings schon eine Verfärbung der Lösung beobachtet werden. Die Reaktionsmischung wurde trotzdem aufgearbeitet und das erhaltene Öl mittels LC-MS analysiert.

Dabei konnten allerdings nur zwei Peaks der Masse $m/z = 240$ und $m/z = 271$ gefunden werden. Bei dem Peak mit $m/z = 271$ handelte es sich vermutlich um ein TBDMS-geschütztes 3-Hydroxy-2-hydroxymethyl-6-methyl-pyran-4-on. Die Frage, ob eventuell doch das gewünschte Triflat entstanden war, konnte daher nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Sollte die Verbindung entstanden sein, so war sie offensichtlich für eine effiziente Aufarbeitung und Analytik zu instabil. Eine weitere Verwendung der Substanz erschien aus diesen Gründen nicht sinnvoll. Die Synthese wurde daher an dieser Stelle nicht weiter verfolgt.

3.17.2.2 Synthese des Bausteins A2 ($P = \text{TBDMS}$; $X = \text{Br}$)

Nachdem die Darstellung des Bausteins A1 nicht gelang, sollte noch ein alternativer Weg untersucht werden. Ausgangspunkt der Synthese war diesmal das Maltol. Dort musste zuerst die Hydroxy-Funktion mit einer passenden Schutzgruppe versehen werden. Anschließend sollte an der Methyl-Gruppe ein elektrophiles Zentrum erzeugt werden, welches die Addition an ein lithiertes Alkin erlauben würde.

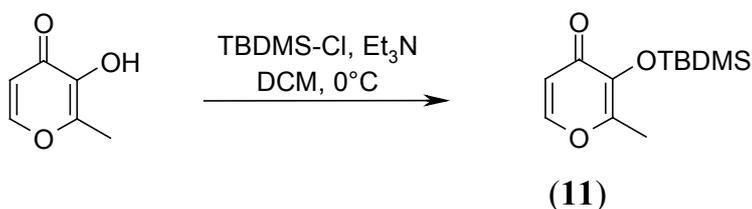


Abbildung 3-53: Einführung der TBDMS-Schutzgruppe am Maltol.

Als Schutzgruppe wurde die *t*-Butyl-dimethylsilyl-Gruppe (TBDMS) gewählt. Diese lässt sich beim Maltol einfach mit Standardmethoden einführen. Dazu wurde das Maltol mit TBDMS-Cl und Triethylamin in Dichlormethan bei 0°C umgesetzt

(Abbildung 3-53). Nach wässriger Aufarbeitung wurde das Rohprodukt (**11**) noch einer Säulenchromatographie an Kieselgel unterworfen.

Eine zweite Methode zur Einführung der TBDMS-Gruppe wurde ebenso versucht. Dabei wurde als Base Imidazol und als Lösemittel Dimethylformamid verwendet. Die Aufarbeitung und Ausbeute sind ähnlich.

Das elektrophile Zentrum sollte an der Methyl-Gruppe des Maltols erzeugt werden. Da sich diese dort in einer Art Allyl-Position befindet, ist sie aktiviert und sollte sich in einer radikalischen Substitution mit *N*-Bromsuccinimid bromieren lassen.[157,158] Diese auch als Wohl-Ziegler Bromierung bekannte Reaktion findet meist in einem unpolaren Solvens wie z.B. Tetrachlorkohlenstoff und unter Zusatz eines Radikalstarters wie AIBN statt (Abbildung 3-54).

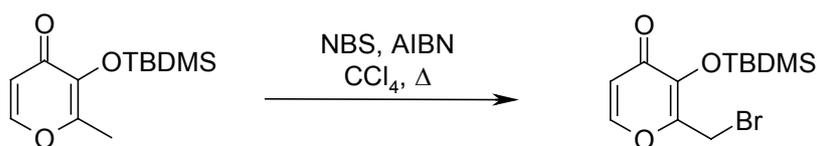


Abbildung 3-54: Bromierung des TBDMS-geschützten Maltols mit NBS.

Die erfolgreiche Synthese der Verbindung konnte durch ein LC-MS nicht bewiesen werden. Keiner der Molekülionen-Peaks wies die gewünschte Masse des Produkts auf. Rodríguez *et al.* haben auf die Instabilität dieser Verbindung hingewiesen. Ihnen gelang eine anschließende Umsetzung nur dadurch, dass sie die Substanz gleich für die nächste Stufe ohne Aufarbeitung einsetzten.[157]

Die zu Synthesebeginn nicht absehbaren Schwierigkeiten mit der Stabilität der Bausteine A1 und A2, führten zu eine Neubewertung dieser Synthesestrategie. Die Einführung einer Abgangsgruppe bei diesen Verbindungen, scheint mit einer Instabilität gegenüber Nucleophilen, verbunden zu sein. Dieses Verhalten erschwerte eine Aufarbeitung, Reinigung und Charakterisierung, so dass eine weiter Verfolgung der Strategie nicht angezeigt erschien.

3.18 Synthesestrategie E (Biomimetischer Ansatz)

3.18.1 Synthesestrategie – Retrosynthetische Analyse

Die Biosynthese von Naturstoffen erfolgt oft über sogenannte Polyketide. Diese werden in den jeweiligen Organismen mit Hilfe von Multienzymkomplexen aus Acetat- und/oder Malonat-Einheiten aufgebaut. Auf diese Art entstehen z.B. auch die Flavonoide in den Pflanzen, aber auch die schon erwähnte Brevetoxine werden von den Algen über den Polyketid-Weg synthetisiert. Bei vielen Naturstoffen konnte die Kenntnis über ihre Biosynthese wertvolle Rückschlüsse für deren Totalsynthese liefern. Dieser Syntheseansatz wird auch als *Biomimetic Approach* bezeichnet.

Vermutlich werden die Polypyrrone in der Helleborus-Pflanze auch über Polyketide aufgebaut. Die Frage war, ob diese Vermutung eine Synthesemöglichkeit aufzeigen könnte. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass zyklische Verbindungen aus Polyketiden meist durch eine Aldoladdition bzw. -kondensation entstehen.[159,160]

Führt man unter diesen Gesichtspunkten eine retrosynthetische Analyse des makrozyklischen, hexameren Polypyrrons durch, so erkennt man, wie der Makrozyklus aus einem Monozyklus aufgebaut sein könnte (Abbildung 3-55).

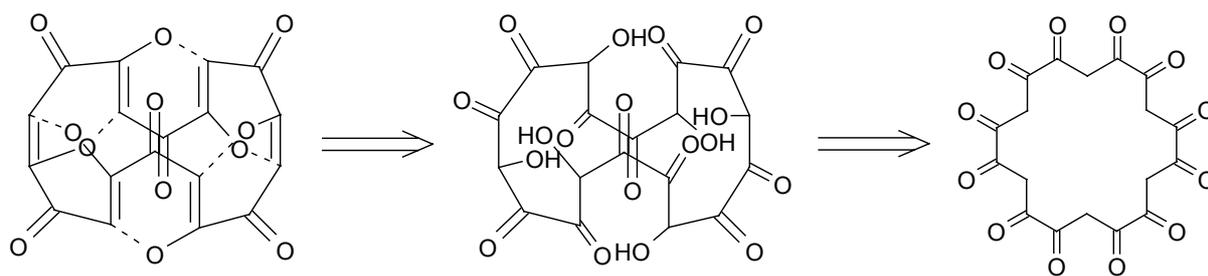


Abbildung 3-55: Retrosynthetische Betrachtung des makrozyklischen, hexameren Polypyrrons.

Im ersten Schritt der Retrosynthese sollte zunächst der Makrozyklus aufgelöst werden. Der dazu nötige, gedachte Bindungsbruch bei den Pyran-4-on Einheiten erfolgte in

Abbildung 3-55 analog zur Bildung einer solchen Einheit aus 1,3,5-Triketonen durch Aldolkondensation. Der folgende Schritt berücksichtigt die Einführung der Hydroxy-Funktion an der verbleibenden Methylen-Gruppe.

Die Synthese des Monozyklus mit zwölf Carbonyl-Funktionen stellt für sich eine Herausforderung dar. Alleine aufgrund der Anzahl, und der damit zu erwartenden unterschiedlichen Reaktivität, dieser Carbonyl-Funktionen wird dafür sicherlich eine komplexe Schutzgruppen-Strategie benötigt. Für die Synthese azyklischer Oligocarbonyle steht eine Reihe von Methoden zur Verfügung, die sowohl die Darstellung von α - als auch β -Diketonen erlauben. Problematisch dürfte allerdings die Einführung der Hydroxy-Funktion an der Methylengruppe sein. Eine einfache Oxidation dieser Gruppe dürfte dafür nicht geeignet sein, da dabei zumeist das Keton entsteht. Vielmehr müsste die Methylengruppe hydroxyliert werden. Das Reagenz Diacetoxy-iodosobenzol könnte genau dies erfüllen.

Es wurde daher für sinnvoll erachtet, das Problem zunächst auf eine Kette mit geringerer Anzahl, aber demselben Muster an Carbonyl-Funktionen zu reduzieren. An dieser Verbindung sollte dann die Verwendungsmöglichkeiten bzw. die Effizienz des Diacetoxy-iodosobenzols untersucht werden.

3.18.2 Claisen-Esterkondensation zur Synthese von Oligoketonen

3.18.2.1 *Synthese des 2,4,6-Trioxo-heptan-1,7-dicarbonsäurediethylesters*

Wie schon eingangs bei den Synthesemöglichkeiten der Pyran-4-one erwähnt, ist die Claisen-Esterkondensation sehr gut zur Darstellung von Oligoketonen geeignet. Die Synthese eines Triketons aus Aceton und Oxalsäure-diethylester, welches anschließend zur Chelidonsäure zyklisiert wurde, ist dafür ein gutes Beispiel.

Bei seinen ersten Versuchen gelang es Claisen nicht, den „Acetondioxaläther“ zu erhalten. Er vermutete, dass beim zunächst entstandenen „Acetonoxaläther“ mit den beiden Methyl- und Methylen-Gruppen, die reaktivere Methylen-Gruppe den Oxalsäureester abfängt.[161] Durch eine Modifikation der Reaktionsbedingungen gelang dann allerdings die Synthese.[162] Wird nämlich nur ein Teil der Base zu den

Reaktionspartnern gegeben, so entsteht nur der Acetbrenztraubensäureethylester, welcher sich dann beim Erhitzen und Zugabe des zweiten Teils Base, in gewünschter Weise umsetzt. Diese klassische Synthese wurde nachvollzogen und mit ihrer Hilfe die Vorstufe der Chelidonsäure, der 2,4,6-Trioxo-heptan-1,7-dicarbon säurediethylester, dargestellt (Abbildung 3-56).

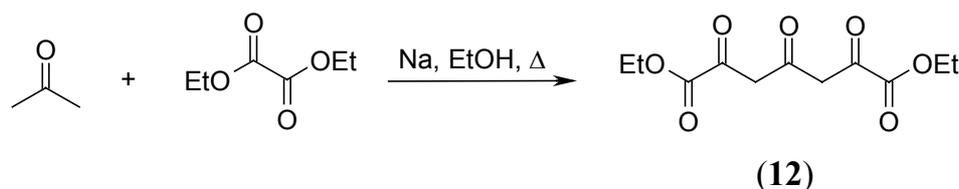


Abbildung 3-56: Synthese des 2,4,6-Trioxo-heptan-1,7-dicarbon säurediethylesters aus Aceton und Oxalsäure-diethylester.

Eine aus Natrium und absoluten Ethanol hergestellte Alkoholat-Lösung wurde in zwei Teile geteilt. Zu der ersten Hälfte wurde unter Eiskühlung ein Teil Aceton und zwei Teile Oxalsäurediethylester zugetropft. Diese Mischung wurde für 30 min unter Rückfluß erhitzt und dann die zweite Hälfte der Alkoholat-Lösung zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Ethanol wurde bei 110 °C weitgehend abdestilliert, danach wurde mit der äquimolaren Menge Eisessig neutralisiert und in Eiswasser gegossen. Der Niederschlag wurde abgesaugt und aus Petrolether umkristallisiert, wobei man lange, feine Nadeln erhielt. Die Charakterisierung von (12) erfolgte mit Hilfe von HPLC, ESI-MS und NMR.

3.18.2.2 Synthese des Octan-2,4,5,7-tetraons

Neben dem 2,4,6-Trioxo-heptan-1,7-dicarbon säurediethylester wurde auch ein Tetraketon dargestellt, welches dann im Weiteren als Modellverbindung für die Hydroxylierung der Methylengruppe dienen sollte.

Durch Anpassung der Reaktionsbedingungen und der Molverhältnisse der Reaktionspartner ist mit derselben Methode auch die Synthese des Octan-2,4,5,7-tetraon, eines Tetraketons, möglich (Abbildung 3-57).

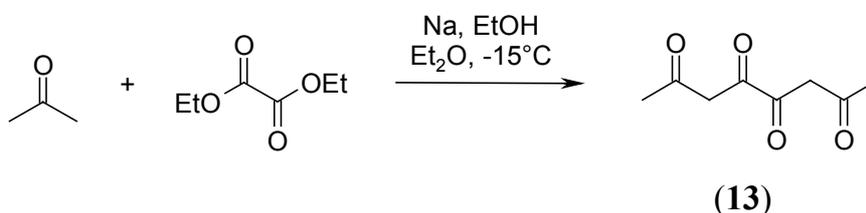


Abbildung 3-57: Synthese des Octan-2,4,5,7-tetraon aus Aceton und Oxalsäure-diethylester.

In eine zuvor aus Natrium und Ethanol hergestellten Alkoholat-Lösung in Diethylether wird zuerst ein Teil Aceton und danach eine Mischung aus je einem Teil Aceton und Oxalsäure-diethylester zugetropft. Aus der Reaktionslösung scheidet sich bald darauf ein gelbes Natriumsalz ab, welches nach zwei Tagen Rühren abgesaugt und getrocknet wurde. Dieses Natriumsalz kann durch Eintragen in gekühlte 1N Salsäure zersetzt werden. Der dabei entstanden Niederschlag wurde abgesaugt und gleich aus Methanol umkristallisiert, wobei man die gewünschte Verbindung als feine, leicht gelbliche Nadeln erhält.

Die Charakterisierung von (13) erfolgte mit Hilfe von HPLC, ESI-MS und NMR. Die NMR Spektren entsprechen den Literaturdaten.[163]

Im ^1H NMR sieht man, dass das Octan-2,4,5,7-tetraon in Lösung vollständig in seiner Enol-Form vorliegt.

3.18.3 Modellreaktion zur Hydroxylierung der Methylengruppe

Für die Modellreaktion wurde das Octan-2,4,5,7-tetraon ausgewählt. Es zeigt ein vergleichbares Substitutionsmuster der Carbonyl-Funktionen wie das zyklische

Oligoketon aus Abbildung 3-55. Für die angestrebte α -Hydroxylierung der Methylengruppe sollte das Reagenz Diacetoxy-iodosobenzol verwendet werden.

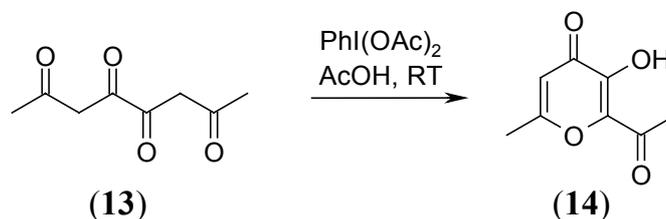


Abbildung 3-58: Umsetzung des Octan-2,4,5,7-tetraon mit Diacetoxy-iodosobenzol.

Das Tetraketon (13) wurde in Eisessig gelöst und das Diacetoxy-iodosobenzol portionsweise zugegeben. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Eisessig im Vakuum entfernt. Die Zugabe von Ethanol leitete die Kristallisation nur langsam ein. Eine Reinigung des Produkts mittels Säulenchromatographie wurde ebenfalls durchgeführt. Die dabei erhaltene Ausbeute an sauberer Verbindung war allerdings mit 15% sehr gering. Die erhaltene Verbindung (14) wurde mittels HPLC, ESI-MS und NMR analysiert und ihre Identität als 2-Acetyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-on bestätigt. Diese Verbindung kann auch als das Regioisomere der Dehydroessigsäure aufgefasst werden.[164]

Die α -Hydroxylierung verläuft wahrscheinlich über das Enol der Carbonylverbindung. Durch Dissoziation entsteht im Säuren aus dem Diacetoxy-iodosobenzol das $\text{PhI}^+(\text{OAc})$, welches sich an das Enol anlagert. Diese Zwischenstufe wird dann durch ein Nucleophil angegriffen, wobei letztendlich das hydroxylierte Produkt entsteht. Die Zyklisierung zum 2-Acetyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-on erfolgt anschließend. Neben der α -Hydroxylierung im Säuren sind noch eine ganze Reihe weiterer Reaktion möglich.[165-168]

Die Reaktion verlief in diesem Fall nicht einheitlich, und es wurden eine ganze Reihe an Nebenprodukte beobachtet. Unter anderem konnte dabei auch eine Verbindung der doppelten Masse des gewünschten Produkts gefunden werden, was auf eine intermolekulare Kondensation zweier Tetraketone schließen lässt. Die Nebenprodukte wurden aus Zeitgründen nicht im Detail untersucht.

Die geringe Ausbeute der Reaktion konnte nicht durch Variation der Reaktionsparameter angehoben werden. Bedenkt man den geringen Reaktionsumsatz bei der Modellverbindung, so ist zu vermuten, dass eine erfolgreiche Synthese des Monozyklus mit dieser Methode nicht möglich sein wird. Es sind daher noch weitere Versuche notwendig. Eventuell steht auch die erneute Suche nach besseren Synthesemethoden an.

3.19 Synthesestrategie F (Dibromid Ansatz)

3.19.1 Synthesestrategie – Retrosynthetische Analyse

Wie sich bei den durchgeführten Synthesen herausstellte, ist für eine erfolgreiche Synthese eines Polypyrones die Bildung der C-C-Bindung in 2-Position des Pyran-4-ons von entscheidender Bedeutung. Die unternommenen Versuche zur Acylierung in dieser Position führten nicht zum erhofften Ziel, so dass nach alternativen Möglichkeiten Ausschau gehalten wurde. Bei den ersten Versuchen zur Alkylierung von 3-Hydroxy-pyran-4-onen konnte eine C-Alkylierung mit 3-Brom-brenztraubensäureestern beobachtet werden, diese Möglichkeit zur Knüpfung der C-C-Bindung scheidet jedoch aufgrund ihrer Ineffizienz aus. Allerdings stellte sich bei der Literaturrecherche eine interessante Eigenschaft dieser Systeme heraus: Unter Beteiligung der π -Elektronen gehen sie leicht Cycloadditionen bzw. Claisen-Umlagerungen ein. Die Cycloadditionen sind in diesem Zusammenhang leider von geringem Wert, da es sich dabei meist um intramolekulare, thermische [5C+2C] Pyran-4-on/Alken Reaktionen handelt.[169-173] Die Claisen-Umlagerung könnte allerdings eine interessante Alternative eröffnen.

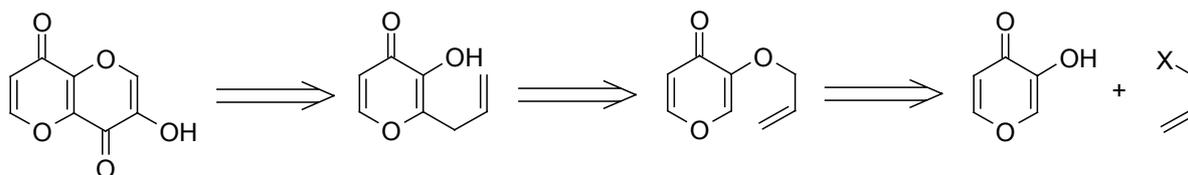


Abbildung 3-59: Retrosynthetische Analyse der Synthesestrategie.

In Abbildung 3-59 ist die Retrosynthese dieser Strategie dargestellt. Dabei wurde die Möglichkeit für eine Wiederholung der einzelnen Syntheseschritte berücksichtigt, wodurch weitere Folgeglieder möglich wären. Zu bemerken sind dabei folgende Punkte:

- Der erste Schritt der Synthese, die Alkylierung mit einem Allylhalogenid, dürfte nicht allzu problematisch sein.
- Die Claisen-Umlagerung wurde schon für analoge Verbindungen beschrieben.[174,175]
- Die weiteren Schritte zum Ringschluss und die erneute Schaffung der Ausgangssituation eines 3-Hydroxy-pyran-4-ons wurden in der Abbildung nicht berücksichtigt.

3.19.2 Synthese des Allyl-Ethers

Wie zuvor schon erwähnt wurde, sind schon eine ganze Reihe solcher 5-Allyloxy-Pyran-4-one dargestellt worden, zumeist wurde dabei von der Kojisäure ausgegangen. Bei diesen ersten Versuchen sollte allerdings Allomaltol verwendet werden, wodurch eine Schutzgruppe für die Hydroxymethyl-Funktion der Kojisäure umgangen werden kann.

Wie bei der Darstellung der 5-Allyloxy-Kojisäure wurde zuerst die Reaktion mit Allylbromid und Natriummethylat in Methanol versucht. Dabei gelang es allerdings nicht, eine gute Umsetzung der Kojisäure zu erzielen. Die Reaktion wurde daher in Dimethylformamid mit Kaliumcarbonat als Base durchgeführt (Abbildung 3-60).

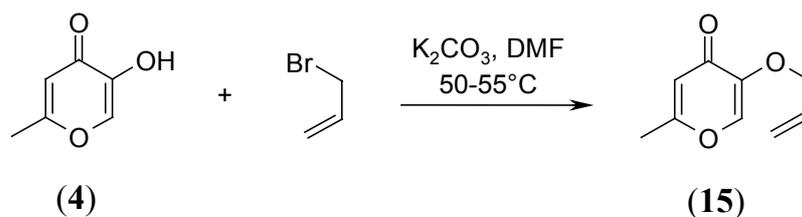


Abbildung 3-60: Umsetzung des Allomaltols mit Allylbromid.

Im Gegensatz zur Base Natriummethylat in Methanol hat die Verwendung von Kaliumcarbonat in Dimethylformamid den Vorteil, dass bei Raumtemperatur schon nach zwei Stunden ein guter Reaktionsumsatz mittels HPLC beobachtet werden konnte. Führt man die Reaktion dann noch unter Erwärmen durch, so ist das Allomaltol schon nach vier bis fünf Stunden vollständig umgesetzt.

Die nach wässriger Aufarbeitung analytisch reine Verbindung (15) (DC und HPLC) wurde in sehr guter Ausbeute von 95% erhalten. Die weitere Charakterisierung erfolgte mittels ESI-MS und NMR, wobei die Identität der Verbindung als die des gewünschten Produkts, 5-Allyloxy-2-methyl-pyran-4-on, sichergestellt werden konnte.

3.19.3 Claisen-Umlagerung des Allyl-Ethers

Die Umlagerung des Allyl-Ethers geht analog einer Claisen-Umlagerung vonstatten. Diese Reaktion beschreibt die Umlagerung beim Erhitzen eines Allyl-Aryl Ethers in ein *ortho*-Allylphenol. Mechanistisch handelt es sich dabei um eine konzertierte, perizyklische [3,3] sigmatrope Umlagerung. In Abbildung 3-61 ist die Umlagerung des 5-Allyloxy-2-methyl-pyran-4-ons in das 2-Allyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-on schematisch dargestellt.

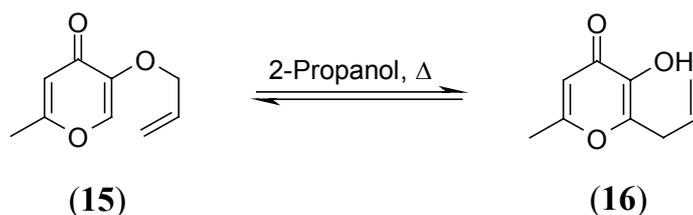


Abbildung 3-61: Claisen-Umlagerung des 5-Allyloxy-2-methyl-pyran-4-ons.

Die Durchführung der Reaktion gestaltete sich folgendermaßen: **(15)** wurde in 2-Propanol gelöst und für fünf Tage bei 100 °C erhitzt. Der Ansatz wurde für mehrere Stunden bei -18 °C gekühlt, der Niederschlag abfiltriert und mit wenig kaltem 2-Propanol gewaschen, wobei man farblose, kleine Nadeln erhielt.

Die Reaktion ließ sich sehr gut mittels HPLC verfolgen, da sich die Retentionszeit aufgrund der zusätzlichen Hydroxy-Funktion des 2-Allyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-ons deutlich vom Edukt unterscheidet. Die Charakterisierung von **(16)** erfolgte mittels ESI-MS und NMR.

Im ^1H NMR ist zudem das Signal der zuvor angesprochenen Hydroxy-Funktion zu sehen. Betrachtet man das Signalmuster der Allyl-Gruppe, so lässt sich dies nur mit einer endständigen Doppelbindung erklären. Eine Verschiebung der Doppelbindung fand also nicht statt und die Identität der Verbindung ist somit bestätigt.

3.19.4 Möglichkeiten zum Ringschluss – Fortführung der Synthesestrategie

Nachdem die Synthese an diesem Punkt angelangt war, musste über Möglichkeiten des Ringschlusses nachgedacht werden. Zwei Reaktionen schienen dafür in Frage zu kommen:

- Epoxidierung der Doppelbindung mit Peroxysäuren
- Bromierung der Doppelbindung mit elementarem Brom

Die Strategien sind in den nachfolgenden Abbildungen näher ausgeführt. Mit der Epoxidierung sollte an der endständigen Doppelbindung der Allyl-Gruppe eine neue funktionelle Gruppe eingeführt werden. Der Ringschluss könnte dann durch eine intramolekulare nucleophile Substitution am Epoxid erfolgen. Die Schaffung des 3-Hydroxy-pyran4-on Systems könnte dann mit einer ein- oder zweistufigen Oxidation erfolgen.

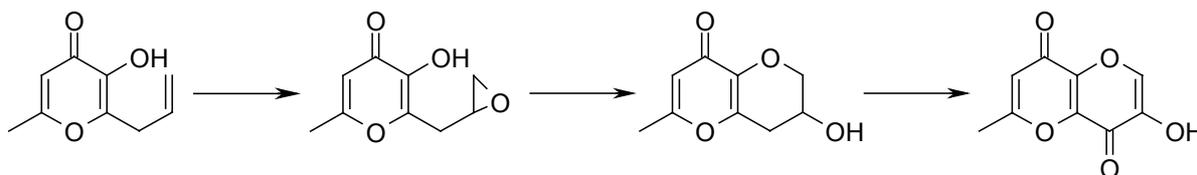


Abbildung 3-62: Umsetzung des 2-Allyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-ons zum Epoxid mit anschließendem Ringschluss und Oxidation.

Die Strategie in welcher die Doppelbindung zuerst bromiert werden soll, folgt einem ähnlichen Muster. Das Dibromid könnte durch eine elektrophile Addition elementaren Broms gebildet werden. Der intramolekularen, nucleophilen Substitution zum Ringschluss folgt eine Dehydrobromierung. Die dabei entstandene Doppelbindung müsste dann noch oxidiert werden.

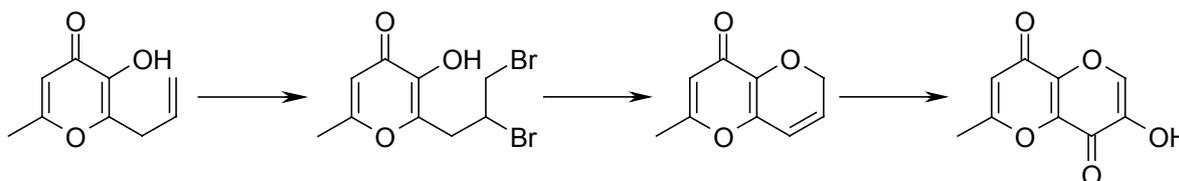


Abbildung 3-63: Umsetzung des 2-Allyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-ons zum Dibromid mit anschließendem Ringschluss und Oxidation.

3.19.5 Epoxidierung des 2-Allyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-ons

Für die bevorstehenden Reaktion wurde die *m*-Chlorperbenzoesäure ausgewählt. Die Durchführung erfolgte unter Eiskühlung in Chloroform.

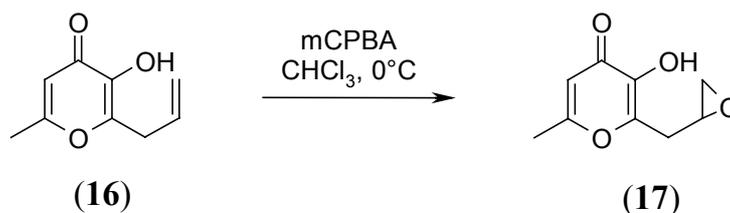


Abbildung 3-64: Umsetzung des 2-Allyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-ons mit *m*-Chlorperoxybenzoesäure.

Mit Hilfe eines LC-MS konnte gezeigt werden, dass es sich bei der neu entstandenen Verbindung um das gesuchte Produkt (17) handelte. Die Verbindung zeigte den Molekülionen-Peak $[M+H]^+$ der gesuchten Masse von $m/z = 183,0$. Die Schwierigkeit bei dieser Reaktion bestand darin, die entstandene neue Verbindung vom Nebenprodukt der Reaktion, der *m*-Chlorbenzoesäure, zu reinigen. Für eine vollständige Charakterisierung wurde daher eine Reinigung mittels präparativer HPLC durchgeführt. Die dabei erhaltene, lyophilisierte Substanz wurde mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Die Auswertung der erhaltenen Spektren ergab, dass es sich dabei um ein Gemisch des Epoxids und des entsprechenden Diols handelte. Das Epoxid wurde also während der Aufarbeitung von Wasser, vermutlich katalysiert durch die in der präparativen HPLC verwendeten Trifluoressigsäure, nucleophil angegriffen und dabei teilweise der Epoxidring zerstört.

Aufgrund dieser Erfahrungen und der positiven Ergebnisse, die bei der parallel durchgeführten Dibromid-Strategie gewonnen werden konnten, wurde diese Strategie nicht weiter verfolgt.

3.19.6 Bromierung des 2-Allyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-ons

Die Bromierung der Doppelbindung folgt dem Mechanismus einer elektrophilen Addition des elementaren Broms. Der Zusatz des Lithiumbromids wirkt sich positiv auf die Reaktionsgeschwindigkeit aus.

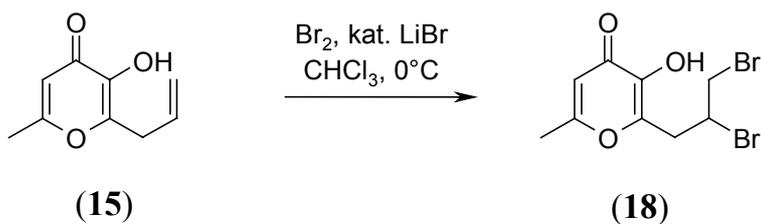


Abbildung 3-65: Umsetzung des 2-Allyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-ons zum 2-(2,3-Dibrompropyl)-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-on.

(15) wurde in Chloroform gelöst und bei 0 °C gerührt. Dazu tropfte man eine Lösung von Brom in Chloroform. Anschließend wurde noch eine katalytische Menge Lithiumbromid zugesetzt und für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde wässrig aufgearbeitet. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 96%. Eine weitere Reinigung mittels Säulenchromatographie, an Kieselgel mit Chloroform als Eluent wurde ebenso durchgeführt, sie ist nicht unbedingt erforderlich. Zu bemerken ist, dass sich die Ausbeute dabei beträchtlich verringerte. Sie betrug dann nur noch 57%.

Die in beiden Fällen erhaltene Festsubstanz (18) wurde mit HPLC, ESI-MS und NMR analysiert und als das gewünschte Produkt 2-(2,3-Dibrompropyl)-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-on bestätigt.

3.19.7 Ringschluss des 2-(2,3-Dibrompropyl)-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-ons

In anderem Zusammenhang wurde der Ringschluss analoger Verbindungen bei der Synthese von Flavonen eingesetzt.[105] Die Umsetzung sollte allerdings in Dimethylformamid mit Kaliumcarbonat als Base erfolgen (Abbildung 3-66). Unter diesen Reaktionsbedingungen sollte sowohl die intramolekulare nucleophile Substitution zum Ringschluss, als auch eine Dehydrobromierung möglich sein.

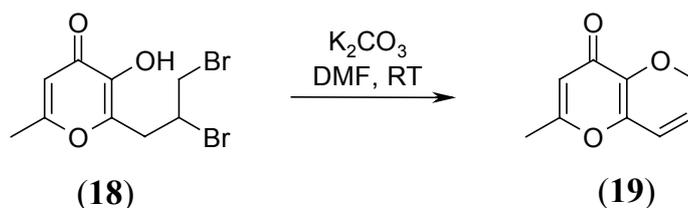


Abbildung 3-66: Ringschluss zum 2-Methyl-6H-pyrano[3,2-b]pyran-4-on.

Zu einer Suspension von Kaliumcarbonat in absolutem Dimethylformamid wurde das 2-(2,3-Dibrompropyl)-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-on gegeben und für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Abbildung 3-67 zeigt den zeitlichen Verlauf der Reaktion.

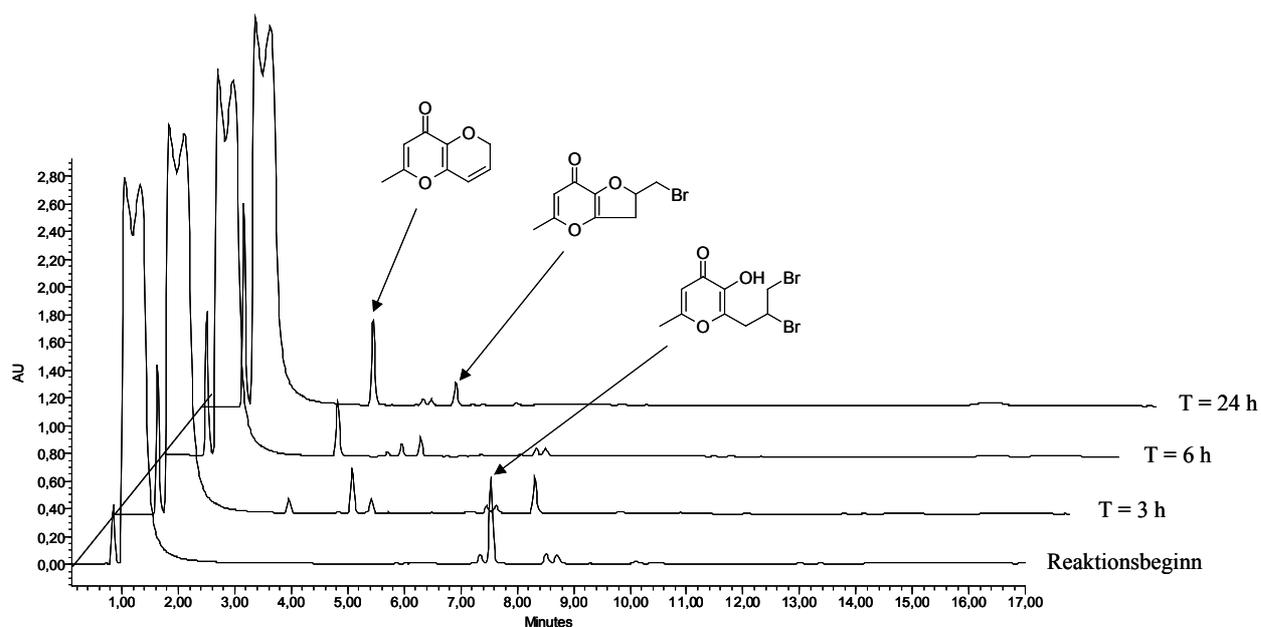


Abbildung 3-67: Zeitlicher Verlauf der Zyklisierung. Die Strukturen der beiden Hauptprodukte sind ebenso eingezeichnet.

Es folgte eine wässrige Aufarbeitung der Reaktionsmischung. Der dabei erhaltene Rückstand wurde an Kieselgel mit Chloroform chromatographiert.

Bei dieser Säulenchromatographie konnten die beiden Hauptprodukte der Reaktion isoliert werden. Ein ESI-MS ergab für die erste Verbindung die Massen von 164,2

amu. Die zweite Verbindung mit der Masse von 244,0 amu zeigte das Isotopenmuster der Monobrom-Verbindung (**20**). Beide Verbindungen wurden daraufhin mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Die davon abgeleiteten Strukturen der Verbindungen sind in Abbildung 3-67 eingezeichnet.

Mit Hilfe dieser Strategie gelang somit die Synthese der wichtigen, letzten Vorstufe eines Pyranopyran-dions. Die Ausbeute an 2-Methyl-6H-pyrano[3,2-b]pyran-4-on der nicht optimierten Reaktion fiel mit 11% gering aus. Die erhaltene Produktmenge war daher nicht ausreichend, um den letzten anstehenden Schritt, die Oxidation der Doppelbindung, in Angriff zu nehmen. Man kann allerdings in Anbetracht der Fülle an unterschiedlichen Oxidationsmitteln und Reaktionsbedingungen zuversichtlich sein, dass dieser Schritt letztendlich gelingen könnte.

4 Zusammenfassung

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Isolierung und Charakterisierung eines neuen Hemmstoffes der Na⁺/K⁺-ATPase. Dieser ist Bestandteil eines Extraktes aus den Wurzeln der Pflanze *Helleborus purpurascens*. Der methanolische Auszug der Droge konnte durch mehrfache flüssig/flüssig Extraktionen und Umfällen vorgereinigt werden. Diese Pflanzenquelle erlaubte es zudem, genügend Ausgangssubstanz für die nachfolgenden weiteren Reinigungsschritte zu isolieren.

Bei den ersten Reinigungsversuchen mittels Säulenchromatographie stellte sich heraus, dass diese Reinigungsmethode für den Extrakt weniger geeignet ist. Ein Großteil der im Extrakt enthaltenen Verbindungen zeigt an Kieselgel ein ähnliches Elutionsverhalten und konnte daher nicht aufgetrennt werden.

Im Rahmen der weitem Aufbereitung des Extraktes wurde daher eine analytische HPLC Methode mit *Reversed Phase* Materialien entwickelt. Mit dieser Methode konnten dann die einzelnen Bestandteile des Extraktes erfasst werden. Es zeigte sich, dass der Extrakt aus einer Vielzahl an Verbindungen bestand, bei denen zumindest 15 dominante Komponenten zu erkennen waren.

Die analytische HPLC Methode war der Ausgangspunkt für die Entwicklung eines präparativen Verfahrens, welches dann für eine im semipräparativen Maßstab durchgeführte Reinigung und Auftrennung der einzelnen Bestandteile des Extraktes eingesetzt wurde. Mit diesem Isolierungsverfahren konnte der Extrakt effizient und reproduzierbar in seine Komponenten aufgetrennt werden. Ermöglicht wurde dies auch durch die Automatisierung der Probenaufgabe und der Fraktionierung. Der Extrakt wurde in insgesamt 15 Fraktionen unterteilt, wobei sich durch weitere Untersuchungen ergab, dass neun Fraktionen als eine Einzelsubstanz vorlagen.

Die Charakterisierung dieser Fraktionen erfolgte mit physikalisch-chemischen Methoden. Die Analyse mittels IR-Spektroskopie ergab, dass es sich bei den sauberen Fraktionen wahrscheinlich um Vertreter einer Substanzklasse handelt. Diese IR-Spektren zeigten nahezu alle die gleichen charakteristischen Banden. Als funktionelle

Gruppen ließen sich dabei Phenole, Aromaten, Carbonyle, Enole und Ether ausmachen.

Auch die UV-Spektren der Verbindungen waren alle recht ähnlich. Sie zeigten ein ausgeprägtes Maximum im Bereich von 250 nm und 260 nm. Einige der Verbindungen wiesen noch ein schwächeres Maximum um 330 nm auf. Dies sind weitere Hinweise für den aromatischen oder phenolischen Charakter der Substanzen.

Bei den UV-Untersuchungen der Substanz M konnten bei einer pH-Änderung ins Alkalische ein bathochromer Effekt beobachtet werden. Das Absorptionsmaximum verschob sich dabei von 261 nm auf 302 nm. Im Alkalischen tritt zudem deutlich ein zweites Absorptionsmaximum bei 376 nm hervor. Die bathochrome Verschiebung ist ein Hinweis dafür, dass die Verbindung vermutlich über eine phenolische OH-Gruppe verfügt, die durch Deprotonierung zu einer Erweiterung des delokalisierten π -Systems beitragen kann. Im untersuchten pH-Bereich von 5,60 bis 11,08 weisen die UV-Spektren außerdem fünf isobestische Punkte bei 220 nm, 235 nm, 276 nm, 330 nm und 345 nm auf. Das Auftreten der Isobesten wiederum lässt darauf schließen, dass diese Deprotonierung mit einer einheitlichen Reaktion verbunden ist, d.h. nur eine funktionelle Gruppe bzw. Protonierungsstufe involviert ist.

Unterstützt wurden diese Ergebnisse der UV-Studie durch die Untersuchung eines Hydrolyseprodukts dieser Fraktionen. Bei einer alkalischen Hydrolyse verschiedener Fraktionen konnte nämlich die *p*-Hydroxy-benzoesäure im Hydrolysat nachgewiesen werden. Diese Substanz wurde isoliert und zeigt dieselben Effekte bei einer pH-Titration wie die Substanz M. Man kann daher annehmen, dass die Substanz M das Chromophor der *p*-Hydroxy-benzoesäure enthält.

Die Fraktionen wurden mittels ESI-MS analysiert. Von den HPLC-reinen Fraktionen I, K und M konnten dabei auch Massen erhalten werden. Bei diesen Fraktionen handelt es sich wohl um definierte Verbindungen. Von den Fraktionen PW und XZ konnte auch durch Variation verschiedenster Messparameter kein aussagekräftiges Massenspektrum erhalten werden.

Die Untersuchung der Substanzen I, K und M mittels NMR-Spektroskopie ergab für alle drei Verbindungen ähnliche ^1H NMR Spektren. Eine vorläufige Interpretation der Spektren lässt vermuten, dass es sich bei diesen drei Verbindungen eventuell um Vertreter der Gruppe kondensierter Flavonoide handeln könnte. Es gelang den NMR Signalen einzelne Strukturelemente zu zuordnen. Für die vollständige Strukturaufklärung stand allerdings nicht genügend Substanz zur Verfügung. Diese vorläufigen Untersuchungen konnten jedoch keinen Hinweis erbringen, dass es sich bei diesen Verbindungen um Vorstufen oder Derivate eines Polypyrons handeln könnte. Zudem zeigten diese Verbindungen bzw. die Fraktionen I, K und M, dass sie die Na^+/K^+ -ATPase Aktivität nicht besonders stark inhibierten. Daher kann die Vermutung geäußert werden, dass diese Verbindungen nicht den gesuchten Inhibitor darstellten. Vielmehr scheinen sie zu einer Gruppe der in Pflanzen weit verbreiteten, kondensierten Flavonoide zu zählen. Bei dieser Klasse sind z.B. verschieden substituierte Flavanol-Einheiten in 2- oder 6-Position miteinander verknüpft.

Sämtliche Fraktionen wurden auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Dabei wurde an der Universität Konstanz die Enzymaktivität der Na^+/K^+ -ATPase aus Kaninchen- und Rattennieren bestimmt. Bei den ersten Tests gingen drei dieser Fraktionen, nämlich M, PW und XZ, als die Fraktionen hervor, die die Enzymaktivität der Na^+/K^+ -ATPase am stärksten inhibierten. Ihre Aktivität lag mit einem IC_{50} von 0,5-5,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im Bereich des Ouabains.

Die erhaltenen Fraktionen, das Extrakt selbst und Proben der alkalischen Hydrolyse wurden zudem mit einem Enzym Immunoassay (ELISA) mit *anti*-Ouabain Antikörpern untersucht. Bei keiner dieser Proben konnte eine Interaktion mit diesen Antikörpern beobachtet werden. Das Ausbleiben einer Kreuzreaktion der Proben mit den *anti*-Ouabain Antikörpern erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Proben keine Verbindungen enthielten, die strukturelle Ähnlichkeiten mit Ouabain aufweisen.

Eine alkalische Hydrolyse verschiedener Extrakt-Fraktionen wurde durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Proben, welche der alkalischen Hydrolyse der Fraktionen PW und XZ entnommen wurden, die Enzymaktivität der Na^+/K^+ -ATPase noch stärker

inhibierten als die ursprünglichen Fraktionen. Besonders stark fiel dieser Effekt bei der Fraktion XZ auf. Lag der IC_{50} dieser Fraktion noch im Bereich von 0,5-2,5 $\mu\text{g/ml}$, so konnte er durch diese Behandlung auf einen Wert von 0,015 $\mu\text{g/ml}$ gesteigert werden. Es konnte eine Prozedur gefunden werden, mit deren Hilfe die Aktivierung der XZ Fraktion reproduzierbar wurde. Es wird angenommen, dass durch die alkalische Hydrolyse die in der Fraktion XZ enthaltene Vorstufe in die eigentliche aktive Verbindung überführt wird.

Die biologische Aktivität des Extraktes aus den Wurzeln von *Helleborus purpurascens* hinsichtlich der Hemmung der Enzymaktivität der Na^+/K^+ -ATPase konnte unter Beweis gestellt werden. Aus diesem Extrakt konnte die Fraktion XZ isoliert werden, die eine lipophile Vorstufe enthält. Aus dieser entsteht durch eine Basen/Säure-Behandlung die eigentlich aktive Form. Durch massenspektrometrische Analysen konnte der Hinweis erbracht werden, dass es sich bei dieser aktiven Form des Hemmstoffes um Vertreter der neuen Substanzklasse der makrozyklischen Kohlensuboxid-Oligomere handelt. Bei der Untersuchung des Hydrolysats mittels ESI-MS konnte erstmals eine Masse für diesen Inhibitor erhalten werden. Im positiven Modus konnte ein Molekülion der Masse $m/z = 431,2$, entsprechend dem $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Ion, beobachtet werden. Dieses lässt sich dem makrozyklischen Hexamer des Kohlensuboxids $(\text{C}_3\text{O}_2)_6$ mit einem Molekulargewicht von 408,2 Da zuordnen. Daneben wurde auch noch die Masse des Zyklooctamers $(\text{C}_3\text{O}_2)_8$ gefunden. Diese aktive Form wurde auch als MCS-Faktor (*macrocyclic carbon suboxide*) bezeichnet. Die erneute Reinigung dieses MCS-Faktors aus dem Hydrolysat gelang nicht. Bei dessen Auftrennung mittels semipräparativer HPLC und den anschließenden Aktivitätstest zeigte keine der erhaltenen Fraktionen eine vergleichbare Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Entwicklung geeigneter Synthesemethoden für die makrozyklischen Kohlensuboxid-Oligomere. Diese lassen sich auch als kondensierte Pyran-4-one auffassen. Eine Literaturrecherche ergab, dass bisher wenig Synthesen zur Darstellung der verschiedenen Pyranopyran-dione

entwickelt wurden. Viele Vertreter dieser Klasse der bityklischen 6-6-Systeme wurden nur theoretisch beschrieben. Die wenigen veröffentlichten Synthesen befassten sich zumeist mit der Darstellung gemischt kondensierter Pyran-2-one und Pyran-4-one.

Die Arbeiten, die die Darstellung kondensierter Pyran-4-one oder auch γ,γ -Bispyrone beschrieben, stammen bisher alle aus der Gruppe Woods *et al.* Diese Synthesen wurden nachvollzogen, dabei konnte allerdings keine der beschriebenen Verbindungen erhalten werden. Es zeigte sich, dass der entscheidende Schritt in solchen Synthesen, die C-Acylierung eines Pyran-4-ons in 2-Position, unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen nicht möglich ist.

Es wurde eine Synthesestrategie für den iterativen Aufbau eines linear kondensierten Polypyrons entwickelt. Durch Umsetzung eines 3-Hydroxy-pyran-4-ons mit 3-Brombrenztraubensäureestern sollte schrittweise ein Pyran-4-on Ring nach dem anderen aufgebaut werden. Dabei erwies sich das ambidente Verhalten des Kojat-Anions als schwierig, da bevorzugt eine C-Alkylierung der Kojisäure eintrat. Unter den angewandten Reaktionsbedingungen entspricht die Reaktivität eines 3-Hydroxy-pyran-4-ons nicht wie gehofft einem Phenol, sondern der eines Enols.

Bei der Entwicklung neuer Synthesestrategien wurde versucht, analoge Verfahren zur Synthese der Pyran-4-one, Chromone bzw. Xanthone einzubinden. Dafür wurden Methylen-verbrückte Bis-Verbindungen der Kojisäure und des Allomaltols dargestellt. Diese sollten unter verschiedenen Reaktionsbedingungen zum Tripyron zyklisiert werden. Die dazu benötigte Etherbindung konnte allerdings nicht erhalten werden.

Analog einer Arbeit, die die Umsetzung von Amino-Chromonen mit ungesättigten Verbindungen, wie z.B. Acetylen-dicarbon säuremethylester, beschrieb, wurde eine weitere Strategie entwickelt. Die Reaktion der Kojisäure mit dieser Verbindung gelang, die erhaltenen Diastereomere wurden charakterisiert. Das Fumarsäurederivat wurde dabei mit einem *de* von 89% erhalten. Die Verbindung konnte allerdings nicht zyklisiert werden. Dies kann als weiterer Hinweis für die Schwierigkeit der Acylierung von Pyran-4-onen in 2-Position gesehen werden.

Es wurde eine Synthesestrategie untersucht, die den Synthesen der sogenannten *polycyclic polyethers* (PCPE) angepasst war. Diese Gruppe fünf- bis siebengliedriger, zyklischer Ether weist eine gewisse Ähnlichkeit mit den Polypyronen auf. Für diese Strategie musste zuerst die Synthese zweier Bausteine A und B ausgearbeitet werden. Bedingt durch die Achiralität der Bausteine könnte der Baustein B aus A dargestellt werden, wodurch sich ein konvergenter Ansatz anbieten würde. Denkbar wäre auch die Umsetzung eines bifunktionellen Alkins mit dem Baustein A, wodurch gleich die erste Zwischenstufe erhältlich wäre. Bei der Durchführung der Synthese der Bausteine ergaben sich Schwierigkeiten mit deren Stabilität. Die Einführung einer Abgangsgruppe bei diesen Verbindungen scheint mit einer Instabilität gegenüber Nucleophilen verbunden zu sein. Dieses Verhalten erschwerte eine Aufarbeitung, Reinigung und Charakterisierung, wodurch kein Beweis für die erfolgreiche Synthese dieser Baustein erbracht werden konnte.

Es wurde eine Synthesestrategie mit einem biomimetischen Ansatz entworfen. Die retrosynthetische Betrachtung führte zur Formulierung eines monozyklischen Polyketids. Für diese Verbindungen wurden Modellsubstanzen synthetisiert und an diesen die angestrebte α -Hydroxylierung der Methylengruppe mit dem Reagenz Diacetoxy-iodosobenzol untersucht. Dabei zeigte sich, dass dieses Reagenz nicht die erwünschte Effizienz besaß, wodurch weitere Versuche notwendig sind.

Man kann aus den bislang durchgeführten Syntheseversuchen ablesen, dass für eine erfolgreiche Synthese eines Polypyrons die Bildung der C-C-Bindung in 2-Position des Pyran-4-ons von entscheidender Bedeutung ist. Eine Acylierung in dieser Position ist nicht möglich. Auch die alternative Möglichkeiten durch Alkylierung von 3-Hydroxy-pyran-4-onen, wobei eine C-Alkylierung mit 3-Brom-brenztraubensäureestern beobachtet wurde, scheidet aufgrund ihrer Ineffizienz aus. Die Eigenschaft der Pyran-4-on Systeme, unter Beteiligung der π -Elektronen eine Cycloaddition bzw. Claisen-Umlagerung einzugehen, eröffnet allerdings eine neue Möglichkeit.

Über die Claisen-Umlagerung des 5-Allyloxy-2-methyl-pyran-4-ons in das 2-Allyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-on gelang die Darstellung einer aussichtsreichen Verbindung für die intramolekulare Zyklisierung. Diese gelang über das entsprechende

Epoxid nicht, allerdings konnte das dargestellte 2-(2,3-Dibrompropyl)-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-on erfolgreich unter Einwirkung von Kaliumcarbonat in Dimethylformamid zum 2-Methyl-6H-pyrano[3,2-b]pyran-4-on zyklisiert werden. Mit Hilfe dieser Strategie gelang somit die Synthese der wichtigen letzten Vorstufe eines Pyranopyran-dions.

In Anbetracht der Fülle an unterschiedlichen Oxidationsmitteln und Reaktionsbedingungen kann man zuversichtlich sein, dass dieser Schritt letztendlich gelingen sollte. Mit dieser Synthesestrategie könnte damit die Synthese einer ersten Modellverbindung der neuen Substanzklasse der makrozyklischen Kohlensuboxid-Oligomere ermöglicht werden. Diese Modellverbindung könnte dann bei der Beantwortung der Fragen über die physikalischen und chemischen Eigenschaften wertvolle Hinweise erbringen, wodurch letztendlich die Natur des endogenen Liganden der Na^+/K^+ -ATPase aufgeklärt werden könnte.

5 Experimenteller Teil

5.1 Material und Methoden

Lösungsmittel und Chemikalien

Die verwendeten Lösungsmittel wurden von den Firmen Aldrich, Baker, Fluka und Merck in p.a. Qualität bezogen und falls nötig nach den üblichen Standardverfahren[178] gereinigt. Für die analytische sowie präparative HPLC wurde LiChrosolv Acetonitril der Firma Merck verwendet. Weitere gängige Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Fluka, Lancaster und Merck bezogen. Die *anti-Ouabain* Antikörper aus Kaninchenserum wurden von den Firma Chemicon International (Hofheim/Ts) bezogen. Die Protein A Alkaline-Phosphatase und die Sigma-Fast Tabletten stammten von der Firma Sigma.

Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-60-Fertigplatten mit Fluoreszenzindikator der Firma Merck verwendet. Die eingesetzten Fließmittelsysteme werden bei den Synthesen erläutert. Zur Detektion der Substanzen wurde verwendet:

- Fluoreszenz bei 254 nm
- 3-Hydroxy-4*H*-pyran-4-one: Sprühreagenz A (1 M FeCl₃-Lösung in 1 M HCl)
- Extrakte und Fraktionen davon: Sprühreagenz B (Anisaldehyd (0,1 ml); AcOH (2,0 ml); MeOH (12 ml); konz. H₂SO₄ (1,0 ml))
- Oxidation mit Kaliumpermanganat (2%-Lösung in Wasser)

Präparative Säulenchromatographie

Für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieslegel 60 (230-400 mesh ASTM) der Firma Merck verwendet.

Analytische HPLC

Zur analytischen HPLC wurden verschiedene Trennsysteme eingesetzt, welche als Laufmittel den Eluent A (5% Acetonitril in 2%iger wässriger Phosphorsäure) und den Eluent B (90% Acetonitril in 2% wässriger Phosphorsäure) verwendeten.

- *System I:* Verwendet wurde eine HPLC-Anlage von Waters (Eschborn) bestehend aus einer Hochdruck Chromatographie-Pumpanlage Waters 515, einem Autosampler Waters 717plus, einem Photodioden Array Module Waters 996 und einem Controller Waters 600S; als Software zur Datenaufarbeitung fand Millennium 32 von Waters seine Anwendung. Als analytische Säule wurde eine X-Terra-MS C₈ 5 µm, 150×3,9 mm von Waters bei einem Fluss von 1,5 ml/min verwendet. Es wurde ein Gradient von 100% A nach 100% B in 15 min und 2 min Spülen bei 100% B gefahren.

Grundlage für die *Systeme II-V* war ein HPLC-System von Waters, bestehend aus dem Waters 2690 Separations Module und einem Photodioden Array Module Waters 996. Als Software wurde Millennium 32 von Waters verwendet. Dabei wurden folgende unterschiedliche Säulen und Flüsse eingesetzt:

- *System II:* X-Terra-MS C₈ 5 µm, 150×3,9 mm von Waters mit einem Fluss von 1 ml/min; Gradient: von 100% A nach 100% B in 15 min, dann 1 min Spülen bei 100% B.
- *System III:* Luna C₁₈ 5 µm, 150×4,6 mm von phenomenex (Aschaffenburg) mit einem Fluss von 1,5 ml/min. Gradient: von 100% A nach 100% B in 15 min, dann 1 min Spülen bei 100% B.
- *System IV:* Symmetry C₁₈ 5 µm, 150×3,9 mm von Waters mit einem Fluss von 1,5 ml/min. Gradient: von 100% A nach 100% B in 15 min, dann 1 min Spülen bei 100% B.
- *System V:* Chromolith C₁₈ 5 µm, 100×4,6 mm von Merck mit einem Fluss von 3 ml/min. Gradient: von 100% A nach 100% B in 6 min, dann 1 min Spülen bei 100% B.

Präparative HPLC

Präparative HPLC wurde an einer integrierten HPLC-Anlage von Abimed-Gilson (Langenfeld), bestehend aus den Teilsystem Pump 321, UV-VIS 152, Interface 506C und dem Fraction-Collector Model 202, durchgeführt. Als Software zur Systemsteuerung und Datenaufarbeitung fand UniPoint V2.10 von Gilson Anwendung. Als Säule wurde eine X-Terra-MS C₁₈ 5 µm, 100×19 mm von Waters bei einem Fluss von 10 ml/min verwendet. Dabei wurde als Eluent A 0,1%ige wässrige TFA und als Eluent B Acetonitril mit 0,1% TFA verwendet.

Analytische und semipräparative HPLC für die Extrakte

Hier wurde eine Anlage der Firma Kontron, bestehend aus: Autosampler SA 560, Niederdruck Pumpensystem 525 und einem Photodioden Array Modul 440, verwendet. Als Software zur Systemsteuerung und Datenaufarbeitung fand Kromasystem 2000 von Kontron Anwendung. Die Fraktionierung erfolgte mit einem Fraktionensammler Frac-100 der Firma Pharmacia. Es wurde als Eluent A 0,1%ige wässrige TFA und als Eluent B Acetonitril mit 0,1% TFA verwendet.

Als analytische Säulen mit einem Fluss von 1 ml/min wurden verwendet:

- MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C₁₈ HD von Macherey & Nagel (Düren)
- MN ET 250/4 Nucleosil 300-5 C₁₈ von Macherey & Nagel (Düren)

Die dabei verwendeten Gradienten waren:

- Gradient A:

Zeit [min]	B [%]
0	20
20	80
30	80
32	100
40	100
45	20

- Gradient B:

Zeit [min]	B [%]
0	20
20	40
40	50
45	80
65	80
70	20

- Gradient C:

Zeit [min]	B [%]
0	20
5	35
25	35
50	45
55	80
65	80
70	20

Als semipräparative Säule mit einem Fluss von 3 ml/min wurde verwendet:

- MN SP 250/10 Nucleosil 300-5 C₁₈ HD von Macherey & Nagel (Düren)

Der dabei verwendete Gradient war:

- Gradient D:

Zeit [min]	B [%]
0	20
5	35
25	35
50	45
55	45
60	20

Bei den einzelnen Präparationen ergaben sich mitunter Änderungen an diesem Gradientenprogramm.

Massenspektrometrie

LC-ESI-Massenspektrometrie wurde an einem PE Sciex API165 (Langen) Massenspektrometer durchgeführt. Als HPLC-System wurde eingesetzt: Das Microgradient System 140C von Applied Biosystems, PE 785A UV-VIS-Detector von Perkin Elmer (Rodgau), PE Series 200 Autosampler von Perkin Elmer und PE Nelson 200 Interface von Perkin Elmer. Als Software wurde BioMultiView 1.3.1 von PE Sciex und als HPLC-Trennsäule eine Nucleosil C₈ 100/5, 125×2 mm bei einem Fluss von 250 µl/min verwendet. Dabei wurde ein Gradient von 5% Acetonitril in 0,05%iger wässriger TFA nach 90% Acetonitril in 0,05%iger wässriger TFA in 15 min gefahren.

NMR-Spektroskopie

Alle Spektren wurden bei 295K an einem Bruker AMX400 und an einem Bruker DRX500 Spektrometer, mit jeweils 400,13 MHz und 500,13 MHz Feldstärke, in deuterierten Lösungsmitteln gemessen. Die chemische Verschiebung wurde auf das Restprotonensignal des verwendeten Lösungsmittels geeicht und sind in [ppm] angegeben.

IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden als KBr-Preßlinge an einem FT-IR Spektrometer 1760 X der Firma Perkin Elmer aufgenommen. Charakteristische Absorptionsbanden sind in Wellenzahlen ν [cm^{-1}] angegeben.

UV-Spektroskopie

Die UV-Spektren wurden in den jeweils angegebenen Lösungsmitteln an einem UV/Vis Spektrometer Lambda 19 der Firma Perkin Elmer aufgenommen.

Enzymtest mit Na⁺/K⁺-ATPase

Membranpräparationen mit einer hohen Konzentration an Na⁺/K⁺-ATPase (ca. 5000 Einheiten pro μm^2) wurden aus der äußeren Medulla der Kaninchen- und Rattennieren nach der Prozedur C von Jørgensen[123] gewonnen. Die spezifische Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität bewegte sich im Bereich von 2000 bis 2400 $\mu\text{mol P}_i/\text{h}/\text{mg}$ Protein bei 37 °C für das Enzym aus Kaninchen und 2000 $\mu\text{mol P}_i/\text{h}/\text{mg}$ Protein bei 37 °C für das Enzym aus Ratten. Zur Bestimmung der Enzymaktivität[176] der Na⁺/K⁺-ATPase wurde folgender Puffer verwendet: 25 mM Imidazol (pH 7,2); 100 mM NaCl; 10 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1,5 mM Na₂ATP; 2 mM PEP; 450 units/ml an Pyruvat Kinase und Lactat Dehydrogenase und anfänglich 80 μM NADH. Alle Messungen erfolgten bei 37 °C. Die Enzymaktivität in Abwesenheit eines Inhibitors diente als Referenz.

Enzym Immunoassay mit anti-Ouabain Antikörpern

Puffer und Reagenzien:

- *Coating*-Puffer, Na₂CO₃-Puffer (0,1 M) – pH 9,6: Na₂CO₃ (4,24 g; 0,04 mol) und NaHCO₃ (5,04 g; 0,06 mol) werden in einem 1 l Maßkolben eingewogen und es wird mit Wasser (Millipore) fast bis zum Maßstrich aufgefüllt. Nachdem die Salze sich gelöst haben, wird der pH-Wert kontrolliert und falls nötig auf pH = 9.6 eingestellt, erst danach wird bis zum Maßstrich aufgefüllt.
- PBS-Puffer: NaH₂PO₄ (wasserfrei; 1,9 mM; 0,23 g), Na₂HPO₄ (wasserfrei; 8,1 mM; 1,15 g), NaCl (154 mM; 9,00 g) werden mit H₂O (900 ml) gelöst, der pH (7,2 bis 7,4) mit 1 M NaOH oder 1 M HCl eingestellt und mit H₂O auf 1 l aufgefüllt.
- PBS-T-Puffer (Wasch- und Verdünnungslösung) – pH 7,4: 200 ml der Stammlösung werden mit Wasser (Millipore) auf 2 l verdünnt, der pH wird kontrolliert und falls nötig auf pH 7,4 eingestellt. Danach wird Tween 20 (1,0 ml; 0,05 % v/v) zugesetzt.
- *Blocking*-Lösung: Rindergelatine (5,0 g) wird in H₂O (95 ml) unter kurzem Aufkochen gelöst und mit NaN₃ (200 mg) versetzt (→ Stammlösung). Die eigentliche *Blocking*-Lösung ist eine 1 %-ige Gelatine-Lösung, sie wird aus dieser Stammlösung durch Verdünnen mit Wasser (Millipore) hergestellt.
- Ouabain-SSA-Konjugat: Stammlösung des Konjugats in Wasser (2 mg/ml).
- Ouabain (Standard-Substanz): Stammlösung (10⁻² M) in DMSO.
- Testsubstanzen
- Ouabain-Antikörper: Serum in 1/500 Verdünnung in PBS in 500 µl Aliquote, eingefroren.
- Protein A Alkaline-Phosphatase-Konjugat (Enzym): 1/100 in PBS in 100 µl Aliquote, eingefroren.
- Sigma-Fast (Puffer + Substrat-Kit)

5.2 Isolierung und Untersuchung des Extraktes

5.2.1 Herstellung des Extraktes aus *Helleborus purpurascens*

Die mit Hexan entfettete Droge (1,0 kg), die Wurzeln von *Helleborus purpurascens*, wurden für 24 h bei RT mit wässrigen Ethanol (70 %; v/v; 8,0 l) gerührt und die dabei erhaltene Lösung wurde im Vakuum auf ein Volumen von 1,5 l eingengt. Diese wässrige Emulsion wurde anschließend zweimal mit einer Mischung aus Hexan/Chloroform (4/1; v/v; 1,5 l) gewaschen, die wässrige Phase wurde abgetrennt, angesäuert bis pH = 1,5 und dann zweimal mit MTB (1,2 l) extrahiert. Die organische Phase wurde mit NaCl-Lösung (0,2 M) bis zur neutralen Reaktion gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Das so erhaltene braune Rohprodukt (1,8 – 3,5 g) konnte noch weiter gereinigt werden, in dem es in Aceton (50 mg/ml) gelöst und durch Zutropfen in Hexan (10-faches Volumen) wieder gefällt wurde. Der Niederschlag wurde nach dem Zentrifugieren im Vakuum getrocknet.

5.2.2 Säulenchromatographie des Extraktes

Die Ergebnisse der DC zeigten, dass es sich bei dem Extrakt um eine Mischung von Substanzen mittlerer bis hoher Polarität handelte. Als Eluent wurde daher Chloroform mit einem steigenden Methanolanteil verwendet. Das Extrakt wurde in Aceton gelöst und an einer kleinen Menge Kieselgel adsorbiert. Nach einer Equilibrierungsphase der Säule mit Chloroform wurde das Eluentengemisch in 100 ml Portionen zugegeben, wobei der Methanolgehalt 2,5% Schritten erhöht wurde. Bei einem Chloroform/Methanol-Verhältnis von 1:1 wurde der Methanolgehalt in 10% Schritten erhöht, bis am Ende mit reinem Methanol eluiert wurde.

Insgesamt wurden 70 Fraktionen zu je 100 ml erhalten, welche mittels DC untersucht wurden. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzauslöschung bzw. durch Besprühen mit Sprühreagenz B. Die Fraktionen, welche im DC eine vergleichbare Zusammensetzung aufwiesen, wurden anschließend vereinigt. Man erhielt so am Ende die acht Fraktionen I bis VIII (Tabelle 5-1).

Eingesetzt wurden 13,50 g des Extraktes, die Gesamtmenge der vereinigten Fraktionen betrug 9,93 g. In den Fraktionen 1, 2, 11-14 konnten keine Verbindung detektiert werden. Die Auswage der vereinigten Fraktionen 46-70 war mit 80 mg sehr gering. Im weiteren Verlauf wurden sie daher vernachlässigt.

Tabelle 5-1: Zusammenstellung der bei der Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen.

Fraktion	Fraktionsnr. aus SC	Auswage [g]
I	3-10	0.34
II	15-17	1.82
III	18-21	3.52
IV	22-24	1.62
V	25-28	1.49
VI	29-33	0.56
VII	34-39	0.31
VIII	40-45	0.19

Die Fraktionen II bis V, welche die Hauptmenge des Extraktes ausmachten, ergaben in der DC recht homogene Spots. Bei der analytischen HPLC stellte sich allerdings heraus, dass diese Fraktionen immer noch ein Gemisch vieler Substanzen darstellten.

5.2.3 Semipräparative Reinigung des Extraktes

Die präparative HPLC-Reinigung ist exemplarisch an der Charge HP33 mit Gradient D gezeigt werden. Die Reinigung der Chargen HP34, HP35, HP36, HP37 und HP38 erfolgte prinzipiell gleich. Mitunter ergaben sich kleine Unterschiede beim Gradienten- bzw. Fraktionierungsprogramm.

Das getrocknete Extrakt wurde in einer Mischung von Acetonitril/Wasser erneut gelöst und nach dem Filtrieren mit einem automatischen Probengeber in das HPLC-System injiziert. Die Fraktionierung erfolgte mit einem automatischen Fraktionensammler, welcher durch das UV-Signal bei 260 nm bzw. 300 nm gesteuert wurde. Die Peaks wurden von hydrophil bis lipophil alphabetisch gekennzeichnet.

Die folgenden Fraktionen wurden gesammelt: AC, C, D, DH, H, HI, I, IK, K, L, M, N, O und PW. Nach jeweils zehn HPLC-Läufen wurde ein Spülschritt mit 95% Acetonitril durchgeführt. Die dabei eluierenden Verbindungen wurden als Fraktion XZ bezeichnet.

5.2.4 Untersuchung der gereinigten HP-Fraktionen mit physikalisch-chemischen Methoden

5.2.4.1 IR-spektroskopische Untersuchungen

Von den reinen Extrakt-Fraktionen wurden IR-Spektren der KBr-Preßlinge aufgenommen (Tabelle 3-1).

Tabelle 5-2: IR-Daten der HP-Fraktionen.

HP-Fraktion	IR Banden [cm^{-1}]
H	3412, 2930, 1682, 1609, 1271, 1205, 1138
I	3426, 2930, 1703, 1609, 1269, 1168
L	3414, 2933, 1682, 1609, 1269, 1207, 1168, 1140
M	3417, 2934, 1707, 1608, 1267, 1168, 1093
N	3422, 2933, 1708, 1610, 1268, 1205, 1168, 1136
PW	3416, 2932, 2860, 1715, 1609, 1268, 1167, 1096
XZ	3420, 2930, 2858, 1720, 1609, 1266, 1168, 1081

5.2.4.2 *UV-spektroskopische Untersuchungen*

Für diese pH-Titrationen wurden die aus dem Extrakt abgetrennten Fraktionen M, PW und XZ herangezogen. Eine Stammlösung der jeweiligen Fraktion wurde auf eine für die UV-Spektroskopie geeignete Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Diese Lösung wurde dann mit verdünnter Natronlauge versetzt, wobei zu geeigneten Zeitpunkten der pH-Wert gemessen und das dazugehörige UV-Spektrum aufgezeichnet wurde.

Die erhaltenen UV-Spektren sind im Ergebnis-Teil abgebildet.

5.2.4.3 Massenspektrometrische Untersuchungen

Die Fraktionen wurden mittels ESI-MS analysiert (Tabelle 5-3).

Tabelle 5-3: Tabelle der Molekülonen der Fraktionen I, K, M, PW und XZ.

Fraktion	Molekülon $[M+H]^+$ m/z
I	661,4
K	865,2
M	823,0
PW	-
XZ	-

FT-ICR-MS von Fraktion M: m/z 823,1641 ($M+H^+$); nach externer Kalibrierung: m/z 823,1882. Berechnete Masse für $C_{43}H_{35}O_{17}$: 823,1868761.

5.2.4.4 NMR-spektroskopische Untersuchungen

Abgebildet sind die von der Fraktion M erhaltenen Spektren in DMSO- d_6 ; 1H NMR (Abbildung 5-1) und ^{13}C NMR (Abbildung 5-2).

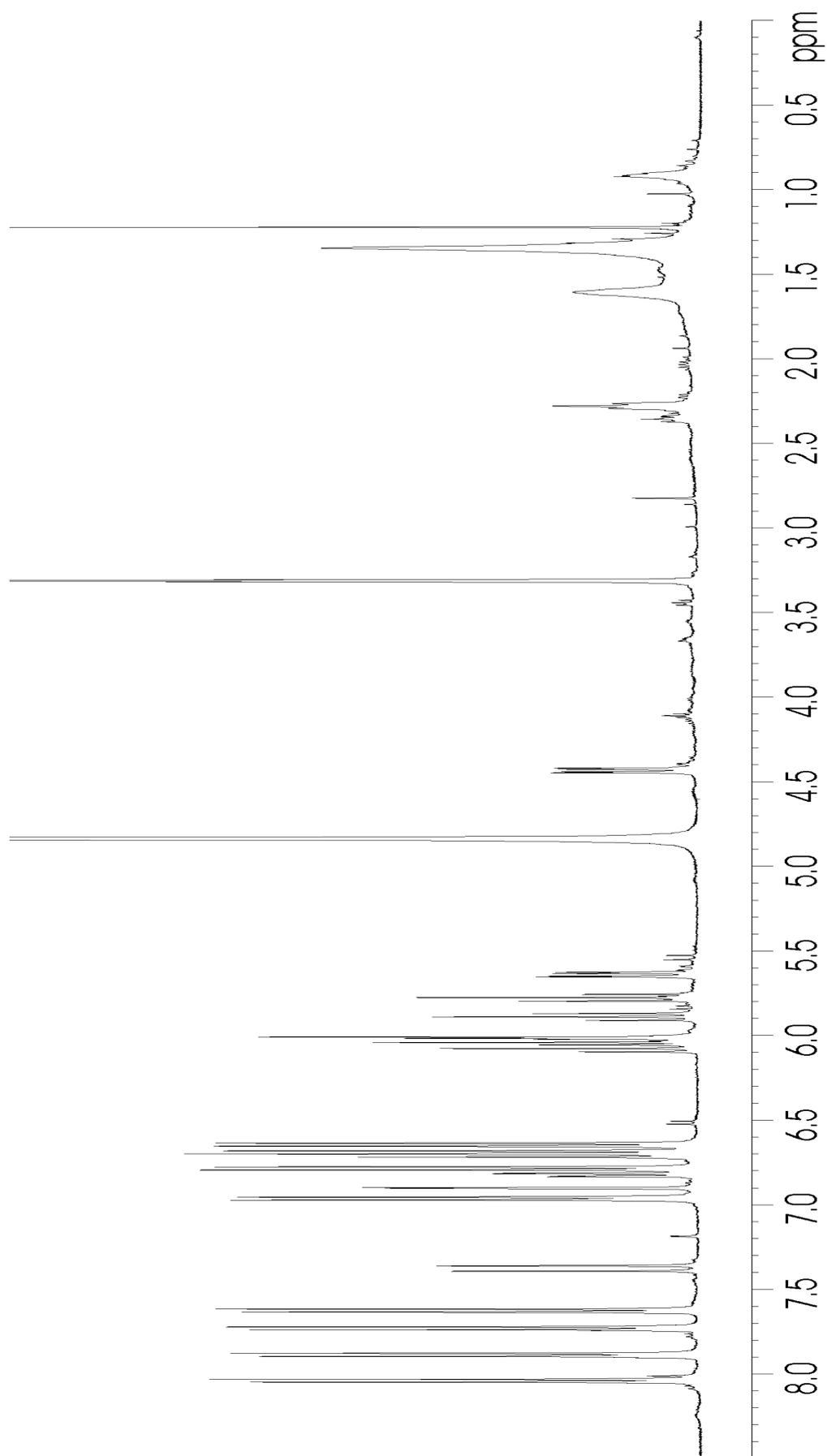


Abbildung 5-1: ^1H NMR der Fraktion M in DMSO-d_6 .

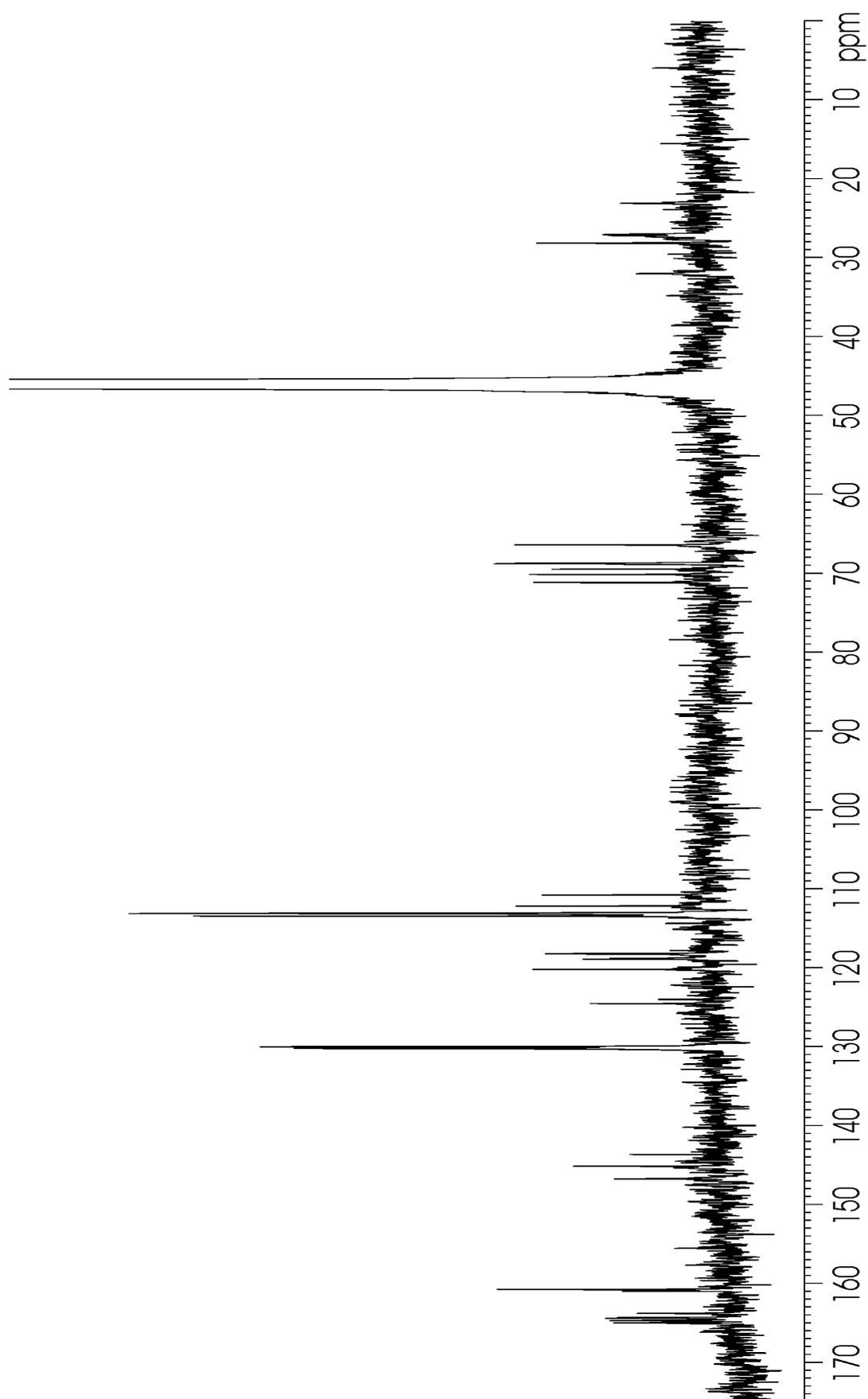


Abbildung 5-2: ^{13}C NMR der Fraktion M in DMSO-d_6 .

5.2.5 Enzym Immunoassay mit *anti*-Ouabain Antikörpern

Das für das coating benötigte Ouabain-SSA-Konjugat wurde nach einer Literaturvorschrift dargestellt.[177]

5.2.5.1 Durchführung des indirekten ELISA:

- *Coating*: Die Mikrotiter-Platte (12 Spalten, 8 Zeilen; 96-well Platte) wird mit dem Ouabain-SSA-Konjugat belegt. Dazu wird aus der Stammlösung des Konjugates mit dem *Coating*-Puffer eine 2 µg/ml enthaltende Lösung hergestellt, wovon jeweils 100 µl pro *well* pipettiert wird. Die Platte wird zugedeckt über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.
- *Blocking*: Die Coating-Lösung wird entfernt und die Platte zweimal mit PBS-T gewaschen. Pro well werden 150 µl der 1%-igen Gelatine-Lösung pipettiert und die Platte wird mindestens 1 h bei RT belassen.
- *Competition*: Die Blocking-Lösung wird durch dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Dann werden die Testlösungen aus der Verdünnungsreihe (s. u.) entsprechend dem Belegungsschema auf die Testplatte übertragen, die 2. Spalte enthält die Anfangskonzentration der Proben. Beginnend mit der 2. Spalte wird dann die Antikörperlösung (50 µl/well) aufgegeben, die Arbeitskonzentration der Antikörperlösung muß zuvor in einem direkten ELISA ermittelt werden (s. u.). Die erste Spalte bleibt frei für *blank* (Bestimmung des Hintergrundsignals, 100 µl PBS-T/well) und Referenz (maximale Inhibition, 50 µl PBS-T und 50 µl Antikörperlösung/well). Die Platte wird dann für 3 h bei RT stehen gelassen.
- *Verdünnungsreihe*: Die Verdünnungsreihe wird in einer separaten Mikrotiter-Platte durchgeführt. Dazu wird, beginnend mit der 3. Spalte, in jedes *well* 100 µl PBS-T pipettiert. Anhand des Belegungs-schemas werden nun 50 µl der Testsubstanzen und des Standards in die 3. Spalte gegeben. Dann

werden 50 μl für die Testplatte entnommen und weitere 50 μl in die nächste Spalte gegeben usw. bis die 12. Spalte erreicht ist. Dies ergibt eine Verdünnungsreihe mit dem „Verdünnungsfaktor“ $1/3$, d.h. die Konzentration der Substanz verringert sich pro Spalte um den Faktor 3.

- *Enzym*: Die Platte wird fünfmal mit PBS-T gewaschen, dann gibt man 100 $\mu\text{l/well}$ der Enzymlösung zu und lässt die Platte 2 h bei RT stehen. Die Enzymlösung wird meist in einer $1/100$ Verdünnung verwendet, d.h. 100 μl Aliquote werden mit 9.9 ml PBS-T verdünnt.
- *Substratreaktion*: Die Platte wird zweimal mit PBS-T und dreimal mit Wasser (Millipore) gewaschen. Dann werden 100 $\mu\text{l/well}$ der Substratlösung zugegeben und die Platte für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad inkubiert. Die Platte wird auf Luftbläschen untersucht, welche beseitigt werden sollten, und nach dem Abtrocknen im Plattenreader ausgelesen.

5.2.5.2 Direkter ELISA

Er dient zur Bestimmung des Antikörper-Titers und somit der Arbeitskonzentration der Antikörperlösung. Dafür werden die Schritte 1 und 2 des indirekten ELISA ausgeführt, dann werden in die *wells* absteigende Verdünnungen der Antikörperlösung ($1/500$ bis $1/10^6$) gegeben und mit den Schritten 4 und 5 fortgefahren. Die Arbeitskonzentration ergibt sich aus der Verdünnung welche 50-75 % des Maximalsignals entspricht.

Die Fraktionen, das Extrakt selbst und Proben der alkalischen Hydrolyse wurden mit diesem ELISA-Test untersucht. Die Proben ergaben negative Reaktionen mit dem verwendeten Antikörper. Der Test selbst scheint dafür nicht die Ursache zu sein, wie die Interaktion der *anti-Ouabain* Antikörpern mit dem Standard Ouabain zeigt (Abbildung 5-3). Ein Einfluss der Lösemittel der Probenstammlösungen auf das Testergebnis konnte durch entsprechende Blindproben ausgeschlossen werden.

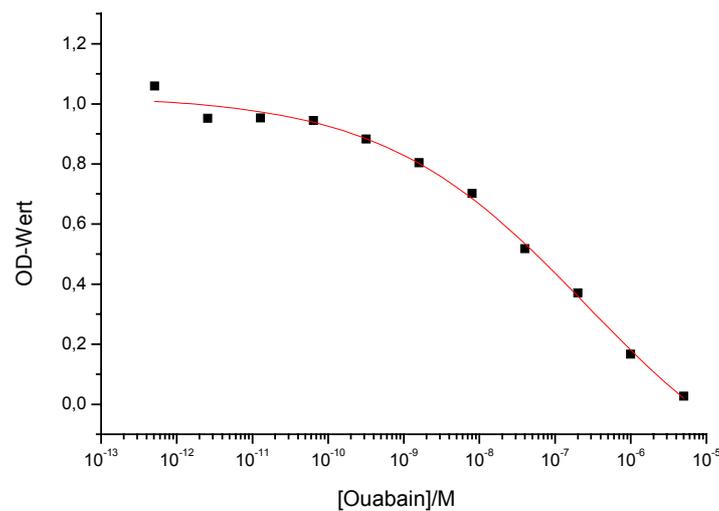


Abbildung 5-3: Ouabain Standard Kurve des ELISA mit *anti*-Ouabain Antikörpern.

5.2.6 Alkalische Hydrolyse der HP-Fractionen

Die Hydrolyse erfolgte in einer 0,2 molaren Natronlauge bei Raumtemperatur. Das Erhitzen der Reaktionsmischung beschleunigte den Prozess. Aus dieser Reaktionsmischung konnte die *p*-Hydroxy-benzoessäure isoliert werden.

p-Hydroxy-benzoessäure: HPLC (System I) t_R 5,08 min; ESI-MS: m/z 139,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_7H_6O_3$: 138; 1H NMR (DMSO- d_6): δ = 6,82 (s, 2H; 3-H, 5-H); 7,80 (d, 2H; 2-H, 6-H); 10,0-10,5 (br s, 1H; -OH); 12,0-12,5 (br s, 1H; COOH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 115,1; 121,3; 131,5; 162,0; 168,2.

5.2.7 Herstellung des aktiven MCS-Faktors

Der gereinigte und lyophilisierte lipophile Precursor (1,0 mg) wurde in Ethanol/Wasser (1/1; v/v; 1,0 ml) gelöst und mit NaOH (1,2 M; 5,0 ml) versetzt. Die alkalische Lösung wurde dann für 8 – 14 h im Ölbad (116 °C) erhitzt. Anschließend wurde die Lösung mit HCl (1,0 M) zuerst auf einen pH-Wert zwischen 8,0 und 9,6 und danach erst auf einen endgültigen pH von etwa 3,0. Um überschüssige Na⁺-Ionen zu entfernen, wurde die Lösung noch mit einem starken Kationenaustauscher-Harz (Amberlyst 15) behandelt.

5.3 Synthesevorschriften

5.3.1.1 *Versuch 1 der Synthese des 2-(3-Hydroxy-6-hydroxymethyl-4-oxo-4H-pyran-2-yl)-6-hydroxymethyl-pyrano[3,2-b]pyran-4,8-dion:*

Malonsäuredinitril (0,66 g; 10,0 mmol) und Kojisäure (2,84 g; 20,0 mmol) wurden in Trifluoressigsäure (2,5 ml) gelöst und unter Rückfluß erhitzt. Nach 4 h wurde Wasser (5 ml) zugesetzt und für weitere 18 h erhitzt. Anschließend wurde nochmals Wasser (10 ml) zugesetzt und die Lösung über Nacht im Kühlschrank belassen. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über P₂O₅ erhielt man 0,33 g braune, feine Nadeln,

5.3.1.2 *Versuch 2 der Synthese des 2-(3-Hydroxy-6-hydroxymethyl-4-oxo-4H-pyran-2-yl)-6-hydroxymethyl-pyrano[3,2-b]pyran-4,8-dion:*

Malonsäurediethylester (1,52 ml; 10,0 mmol) und Kojisäure (2,84 g; 20,0 mmol) wurden mit Trifluoressigsäure (2,0 ml) versetzt und 15 h unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen gab man zu der Reaktionslösung absolutes Ethanol (4 ml) und die Lösung wurde über Nacht im Tiefkühlschrank bei -18 °C belassen. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und über P₂O₅ getrocknet. Man erhielt 1,14 g eines cremefarbenen Pulvers.

5.3.1.3 *3-(3-Hydroxy-6-hydroxymethyl-4-oxo-4H-pyran-2-yl)-2-oxo-propansäuremethylester (I):*

Kojisäure (284,2 mg; 2 mmol) wurde in Methanol (10 ml) unter Argon gelöst und mit Cs₂CO₃ (325,8 mg; 1 mmol) versetzt. Mit dem Auflösen des Cs₂CO₃ geht eine Gasentwicklung einher. Nach dem vollständigen Auflösen erfolgt der Zusatz des Methyl-brompyruvats (213 µl bzw. 237 µl (90% Reinheit der Verbindung); 2 mmol). Die Reaktionslösung wurde bei RT für 16 h gerührt, anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand (388 mg) an Kieselgel

chromatographiert. Als Eluent wurde dabei EE mit einem steigenden Methanol-Anteil verwendet.

ESI-MS: m/z 243,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{10}H_{10}O_7$: 242; 1H NMR (DMSO- d_6): δ = 3,76 (s, 3H; $-CH_3$); 4,34 (d, J = 5,9 Hz, 2H; $-CH_2OH$); 4,39 (d, J = 5,9 Hz, 1H; $-CH_2-$); 4,79 (d, J = 5,9 Hz, 1H; $-CH_2-$); 5,74 (t, J = 5,9 Hz, 1H; $-CH_2OH$); 6,37 (d, J = 0,7 Hz, 1H; 5-H); 7,12 (s, 21H; 3-OH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 53,05; 59,25; 79,51; 79,96; 112,35; 144,64; 148,69; 168,18; 169,58; 169,71;

5.3.1.4 *Bis(3-hydroxy-6-hydroxymethyl-4-oxo-4H-pyran-2-yl)-methan ((2); Bis-Kojisäure):*

Kojisäure (711 mg; 5,0 mmol) wurde in wäßrigen Ethanol (96%; 50 ml) gelöst und bei RT gerührt. Dazu tropfte man die Mischung einer Formalinlösung (37%; 373 μ l; 5,0 mmol) und einer wäßrigen Dimethylaminlösung (40%; 633 μ l; 5,0 mmol) in Ethanol (4 ml), welche zuvor für 30 min bei RT belassen wurde. Nach 20 min wurde erneut Kojisäure (711 mg; 5,0 mmol) und Formalinlösung (37%; 373 μ l; 5,0 mmol) zugesetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde der Ansatz gekühlt, der dabei ausgefallene Niederschlag abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Nach der Umkristallisation aus Wasser und Trocknen über P_2O_5 erhielt man 625 mg (42%) des gewünschten Produkts als farbloses Pulver.

HPLC (System I) t_R 2,80 min; ESI-MS: m/z 297,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{13}H_{12}O_8$: 296; 1H NMR (DMSO- d_6): δ = 4,03 (s, 2H; $-CH_2-$), 4,24 (s, 4H; $-CH_2OH$), 5,61 (br s, 2H; $-CH_2OH$), 6,30 (s, 2H; 5-H), 9,03 (br s, 2H; 3-OH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 26,75, 59,34, 108,91, 142,46, 145,22, 167,22, 173,23.

5.3.1.5 *2-Chlormethyl-5-hydroxy-pyran-4-on ((3); Chlor-Kojisäure):*

Kojisäure (14,21 g; 0,10 mol) wurde in eisgekühltes Thionylchlorid (70 ml) eingetragen und für etwa 1 h gerührt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert, mit n-Hexan gewaschen, aus Wasser umkristallisiert und anschließend im Vakuum

über KOH getrocknet. Man erhielt so 12,96 g (81%) der gewünschten Verbindung als farbloses Pulver.

HPLC (System II) t_R 3,31 min; ESI-MS: m/z 161,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_6H_5O_3Cl$: 160; 1H NMR (DMSO- d_6): δ = 4,65 (s, 2H; $-CH_2Cl$), 6,56 (s, 1H, 5-H), 8,12 (s, 1H, 2-H), 9,28 (s, 1H, 3-OH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 112,97, 139,79, 145,80, 161,51, 173,45.

5.3.1.6 5-Hydroxy-2-methyl-pyran-4-on ((4); Allomaltol):

Chlor-Kojisäure (12,48 g; 0,078 mol) wurde zu 100 ml destillierten Wasser gegeben und unter Rühren auf 50 °C erhitzt. Zinkstaub (10,20 g; 0,156 mol) wurde zugesetzt und dann mit dem Zutropfen von konzentrierter HCl (23,3 ml) begonnen. Während dieser Zeit (ca. 1 h) wurde darauf geachtet, daß sich die Temperatur zwischen 70-80 °C bewegt. Danach wurde für 3 h bei 70 °C gerührt. Die Lösung wurde noch heiß filtriert und das Filtrat nach dem Abkühlen mit DCM (3×100 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeengt. Nach der Umkristallisation aus 2-Propanol erhielt man 6,03 g (62%) des gewünschten Produkts als farblose Plättchen.

HPLC (System II) t_R 2,43 min; ESI-MS: m/z 127,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_6H_6O_3$: 126; 1H NMR (DMSO- d_6): δ = 2,24 (s, 3H; $-CH_3$), 6,23 (s, 1H, 5-H), 7,96 (s, 1H, 2-H), 8,93 (s, 1H, 3-OH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 18,11, 111,74, 138,96, 145,09, 164,96, 173,49.

5.3.1.7 Bis(3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-pyran-2-yl)-methan ((5); Bis-Allomaltol):

Die Mischung einer Formalinlösung (37%; 188 μ l; 2,5 mmol) und einer wäßrigen Dimethylaminlösung (40%; 319 μ l; 2,5 mmol) in Ethanol (2 ml) wurde für 30 min bei RT geschüttelt und anschließend zu einer Lösung von Allomaltol (795 mg; 6,3 mmol) in wäßrigen Ethanol (96%; 35 ml) langsam zugetropft. Der Ansatz wurde nach Rühren

über Nacht kühl gestellt, der dabei ausgefallene Niederschlag abfiltriert und mit Ethanol gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum erhielt man 380 mg (46%) der gewünschten Verbindung.

HPLC (System II) t_R 4,40 min; ESI-MS: m/z 265,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{13}H_{12}O_6$: 264; 1H NMR (DMSO- d_6): δ = 2,20 (s, 6H; $-CH_3$), 3,99 (s, 2H; $-CH_2-$), 6,21 (s, 2H; 5-H), 8,94 (s, 2H; 3-OH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 18,87, 26,70, 110,61, 110,98, 142,02, 145,29, 164,19, 173,08.

5.3.1.8 *Toluolsulfonsäure-(6-methyl-4-oxo-4H-pyran-3-yl)-ester (6):*

Allomaltol (1 mmol; 126 mg) wurde in DCM (5 ml) gelöst und mit 2,6-Lutidin (3 mmol; 350 μ l) und Tosylchlorid (1,03 mmol; 196 mg) versetzt. Die Mischung wurde bei RT für drei Tage gerührt. Die Mischung wurde mit DCM auf 20 ml gebracht und dann mit ges. $NaHCO_3$ -Lösung, Wasser und ges. NaCl gewaschen. Die Lösung wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt 210 mg (75%) des gewünschten Produkts.

HPLC (System II) t_R 7,42 min; ESI-MS: m/z 281,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{13}H_{12}O_5S$: 280.

5.3.1.9 *3-Brom-4-oxo-4H-pyran-2,6-dicarbonsäurediethylester (7):*

2,4,6-Trioxo-heptan-1,7-dicarbonsäurediethylester (516,4 mg; 2,0 mmol) wurde in $CHCl_3$ (10 ml) gelöst und bei RT gerührt. Brom (639,2 mg; 4,0 mmol) wurden mit $CHCl_3$ (0,5 ml) verdünnt und langsam zugetropft. Der Ansatz wurde anschließend noch für 24 h gerührt. Zur Aufarbeitung wurde dann mit $CHCl_3$ auf das doppelte Volumen verdünnt, mit 5%-iger $Na_2S_2O_3$ -Lösung und Wasser (2 \times) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde nochmals aus Et_2O umgefällt und man erhielt 195,0 mg (31%) des Produktes.

HPLC (System I): t_R 10,42 min; ESI-MS: m/z 319,0; 321,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{11}H_{11}BrO_6$: 319; 321; 1H NMR ($CDCl_3$): $\delta = 1,38-1,45$ ($2\times t$, $J = 7,1$ Hz, 6H; $2\times -CH_3$), $4,40-4,51$ ($2\times qt$, $J = 7,1$ Hz, 4H; $2\times -CH_2-$), $7,17$ (s, 1H; 5-H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): $\delta = 14,61, 14,66, 64,11, 64,31, 117,33, 118,92, 152,62, 152,96, 159,52, 159,74, 173,99$.

5.3.1.10 (6-Hydroxymethyl-4-oxo-4H-pyran-3-yloxy)-fumarsäuredimethylester (**8**):

Kojisäure (3 mmol; 426 mg) wurden in DMF (2,5 ml) gelöst und dazu eine Mischung von NMM (3 mmol; 331 μ l) und Acetylen-dicarbonsäuredimethylester (3 mmol; 369 μ l) in DMF (2,5 ml) gegeben. Der Ansatz wurde für 3 h bei RT gerührt und zur Aufarbeitung mit Wasser (50 ml) versetzt. Diese Lösung mit 1N HCl auf pH 6 eingestellt und mit DCM (3×50 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser und ges. NaCl gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde an Kieselgel mit EE als Eluenten chromatographiert. Man erhielt 550 mg (65%) des Gemisches der beiden Diastereomere (**8**) und (**9**).

HPLC (System I): t_R 6,36 min (**8**); 6,56 min (**9**); ESI-MS: m/z 285,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{12}H_{12}O_8$: 284; Die NMR-Daten sind für (**8**) angegeben: 1H NMR ($DMSO-d_6$): $\delta = 3,62$ (s, 3H; $-OCH_3$); $3,81$ (s, 3H; $-OCH_3$); $4,35$ (d, $J = 5,9$ Hz, 2H; $-CH_2OH$); $5,48$ (s, 1H, $-C=CH-$); $5,78$ (t, $J = 5,9$ Hz, 1H; $-CH_2OH$); $6,46$ (s, 1h, C-2); $8,65$ (s, 1H, C-5); ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$): $\delta = 51,46; 52,69; 59,12; 99,54; 107,60; 112,55; 141,28; 149,80; 156,79; 161,83; 164,70; 169,00; 169,39; 170,90$.

5.3.1.11 3-Hydroxy-2-hydroxymethyl-6-methyl-pyran-4-on (**10**):

NaOH (11 mmol; 440 mg) wurde in Wasser (10 ml) gelöst, dazu wurde Allomaltol (10 mmol; 1,26 g) gegeben. Nach 5 min wurde Formalinlösung (37%; 11 mmol; 820 μ l) zugetropft und über Nacht bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit konz HCl auf pH 1 gebracht und kühl gestellt. Der ausgefallene Niederschlag wurde mit kaltem Wasser

gewaschen und über P_2O_5 getrocknet. Man erhielt 0,78 g (50%) des gesuchten Produkts.

HPLC (System IV): t_R 2,76 min; ESI-MS: m/z 157,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_7H_8O_4$: 156; 1H NMR (DMSO- d_6): δ = 2,26 (s, 3H; $-CH_3$); 4,39 (s, 2H; $-CH_2OH$); 5,0-6,0 (br s; 1H; $-CH_2OH$); 6,21 (s, 1H, 5-H); 7,7-9,5 (br s, 1H, 3-OH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 19,27; 54,98; 77,21; 111,14; 141,27; 149,04; 164,60; 173,88.

5.3.1.12 Versuch zur Darstellung des TBDMS-geschützten Triflats von (**10**):

(**10**) (1 mmol; 156 mg) wurde mit 2,6-Lutidin (3 mmol; 348 μ l) in DCM (3 ml) gelöst und bei -78 °C gerührt. Tf_2O (1,03 mmol; 170 μ l) wurde zugesetzt und nach 30 min das TBDMSOTf (1,1 mmol; 253 μ l) zugegeben. Die Lösung wurde innerhalb von 30 min auf RT gebracht und mit ges. $NaHCO_3$ -Lösung versetzt. DCM (10 ml) wurde zugegeben und die organische Phase wurde mit Wasser und ges. NaCl gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Bei einem LC-MS des öligen Rückstandes konnte der Molekülonen-Peak des gesuchten Produkts nicht nachgewiesen werden.

5.3.1.13 2-Methyl-3-(dimethyl-*t*-butyl-silanyloxy)-pyran-4-on (**11**):

Maltol (10 mmol; 1,26 g), TBDMS-Cl (12 mmol; 1,81 g) und Et_3N (20 mmol; 2,79 ml) wurden in DCM (40 ml) gelöst und bei 0 °C für 3 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde dann mit ges. NH_4Cl (50 ml) aufgenommen und es wurde nochmals mit DCM (2*50 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde an Kieselgel mit Et_2O als Eluenten chromatographiert. Man erhielt 2,36 g (98%) des gewünschten Produkts.

HPLC (System III): t_R 3,23 min; ESI-MS: m/z 241,2 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_{12}H_{20}O_3Si$: 240; 1H NMR (DMSO- d_6): δ = 0,18 (s, 6H; $-SiCH_3$); 0,93 (s, 9H; *t*-Bu); 2,27 (s, 3H; $-CH_3$); 6,32 (d, J = 5,5 Hz, 1H, 5-H); 8,02 (d, J = 5,5 Hz, 1H, 6-H);

^{13}C NMR (DMSO- d_6): $\delta = -3,99; -3,42; 14,30; 18,15; 25,64; 113,33; 114,70; 141,66; 154,23$.

5.3.1.14 Versuch zur Bromierung von (**11**) mit NBS:

(**11**) (7,3 mmol; 1,75 g) wurde in CCl_4 (35 ml) gelöst und mit NBS (7,3 mmol; 1,30 g) und kat. Mengen an AIBN versetzt und zum Sieden gebracht. Nach 5 h fand keine Umsetzung statt, es erfolgte nochmals eine Zugabe von AIBN und erneutes Erhitzen für weitere 5 h. Ein LC-MS der Reaktion zeigte nicht den Moleküllionen-Peak des gesuchten Produkts.

5.3.1.15 2,4,6-Trioxo-heptan-1,7-dicarbonsäurediethylester (**12**):

Eine aus Natrium (6,90 g; 0,3 mol) und absoluten Ethanol (250 ml) hergestellte Alkoholat-Lösung wurde in zwei Teile geteilt. Zu der ersten Hälfte wurde unter Eiskühlung Aceton (11,0 ml; 0,15 mol) und Oxalsäurediethylester (40,7 ml; 0,3 mol) zugetropft. Diese Mischung wurde für 30 min unter Rückfluß erhitzt und dann die zweite Hälfte der Alkoholat-Lösung zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht bei RT stehen gelassen. Das Ethanol wurde bei 110 °C weitgehend abdestilliert, danach wurde mit der äquimolaren Menge Eisessig neutralisiert und in Eiswasser gegossen. Der Niederschlag wurde abgesaugt, aus PE umkristallisiert und man erhielt 17,6 g (46%) der gewünschten Verbindung.

HPLC (System I): t_R 9,35 min; ESI-MS: m/z 259,0 ($\text{M}+\text{H}^+$), monoisotopische Masse für $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_7$: 258; ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 1,7$ (t, $J = 7,1$ Hz, 6H; $2\times\text{-CH}_3$); 4,35 (qt, $J = 7,1$ Hz, 4H; $2\times\text{-CH}_2\text{-}$); 6,35 (s, 2H; $2\times\text{=CH-}$); 12,8-13,8 (br s, 2H; $2\times\text{-OH}$); ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 14,67; 63,33; 104,59; 162,18; 162,87; 196,93$.

5.3.1.16 Octan-2,4,5,7-tetraon (**13**); Tetraketon):

Natriumdraht (9,20 g; 0,4 mol) wurde in absoluten Et₂O (200 ml) eingetragen, dazu ließ man Ethanol (11,7 ml; 0,2 mol) langsam zutropfen und rührt den Ansatz noch über Nacht. Am folgenden Tag wurde unter Kühlung (-20 °C) zuerst Aceton (14,7 ml; 0,2 mol) und dann eine Mischung aus Aceton (14,7 ml; 0,2 mol) und Oxalsäurediethylester (27,1 ml; 0,2 mol) zugetropft und der Ansatz noch für zwei Tage bei RT gerührt. Das entstandene gelbe Natriumsalz wurde abgesaugt, im Vakuum getrocknet und anschließend durch Eintragen in kalte HCl zersetzt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und gleich aus Methanol umkristallisiert. Man erhielt 5,6 g (17%) der gewünschten Verbindung als gelbliche, feine Nadeln.

HPLC (System I): t_R 2,18 min; ESI-MS: m/z 171,2 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₈H₁₀O₄: ¹H NMR (CDCl₃): δ = 2,25 (s, 6H; 2×-CH₃), 6,34 (s, 2H; 2×=CH-), 14,63 (br s, 2H; 2×-OH); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 28,45, 100,23, 171,81, 200,87.

5.3.1.17 2-Acetyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-on (**14**):

Das Tetraketon (**13**) (2 mmol; 340 mg) wurde in Eisessig (2 ml) gelöst und innerhalb von 6 h wurde portionsweise PhI(OAc)₂ (4 mmol; 1,29 g) zugegeben. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt, EtOH zugegeben und kühl gestellt. Der ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Man erhielt 158 mg (47%) der gewünschten Verbindung.

HPLC (System I): t_R 4,33 min; ESI-MS: m/z 169,2 (M+H⁺), monoisotopische Masse für C₈H₈O₄: 168; ¹H NMR (CDCl₃): δ = 2,38 (s, 3H; -CH₃), 2,59 (s, 3H; -COCH₃), 6,30 (s, 1H; 5-H), 9,5-11,0 (br s, 1H; 3-OH); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 20,90, 27,31, 113,71, 140,69, 150,11, 165,90, 175,04, 197,86.

5.3.1.18 5-Allyloxy-2-methyl-pyran-4-on (**15**):

Allomaltol (5,04 g; 40 mmol) wurde in absoluten DMF (60 ml) gelöst und mit K_2CO_3 (11,06 g; 80 mmol) versetzt. Nach 5 min Rühren bei RT wurde Allylbromid (5,07 ml; 60 mmol) zugegeben und der Ansatz für 4 h bei 55 °C erhitzt. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde das DMF im Hochvakuum entfernt und der Rückstand mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung aufgenommen, welche anschließend mit DCM (3×100 ml) extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung (50 ml), Wasser (2×100 ml) und gesättigter $NaCl$ -Lösung (50 ml) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt 6,32 g (95%) der analytisch reinen Verbindung.

HPLC (System II) t_R 4,19 min; ESI-MS: m/z 167,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_9H_{10}O_3$: 166; 1H NMR (DMSO- d_6): δ = 2,24 (s, 3H; - CH_3), 4,38-4,41 (m, 2H; - CH_2 -), 5,24-5,28 (m, 1H; = CH_2), 5,33-5,39 (m, 1H; = CH_2), 5,92-6,01 (m, 1H; = CH -), 6,21 (s, 1H, 5-H), 8,05 (s, 1H, 2-H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 18,82, 69,55, 113,22, 117,74, 132,90, 141,62, 145, 94, 164,79, 172,89.

5.3.1.19 2-Allyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-on (**16**):

5-Allyloxy-2-methyl-pyran-4-on (6,32 g; 38 mmol) wurde in 2-Propanol (100 ml) gelöst und für 5 Tage bei 100 °C erhitzt. Der Ansatz wurde für mehrere Stunden bei -18 °C gekühlt, der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und mit wenig kaltem 2-Propanol gewaschen. Man erhielt 5,65 g (90%) der gewünschten Verbindung als farblose, kleine Nadeln.

HPLC (System II) t_R 5,21 min; ESI-MS: m/z 167,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $C_9H_{10}O_3$: 166; 1H NMR (DMSO- d_6): δ = 2,23 (s, 3H; - CH_3), 3,34-3,37 (m, 2H; - CH_2 -), 5,10-5,17 (m, 2H; = CH_2), 5,82-5,93 (m, 1H; = CH -), 6,19 (s, 1H, 5-H), 8,73 (s, 1H, 3-OH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 18,87, 31,58, 110,83, 117,17, 132,13, 141,09, 148,49, 164,05, 173,12.

5.3.1.20 3-Hydroxy-6-methyl-2-oxiranyl-pyran-4-on (**17**):

2-Allyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-on (**16**) wurde in CHCl_3 (5 ml) gelöst und unter Eiskühlung und Rühren wurde mCPBA (0,5 mmol; 173 mg) zugesetzt. Sofern das Edukt noch vorhanden war (HPLC Kontrolle), wurde weiter mCPBA portionsweise zugesetzt. Das Epoxid wurde mittels präparativer HPLC gereinigt.

HPLC (System II) t_R 3,30 min; ESI-MS: m/z 183,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$: 182; Die NMR-Spektren zeigen ein Gemische des Epoxids und des durch Hydrolyse entstandenen Diols.

5.3.1.21 2-(2,3-Dibrompropyl)-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-on (**18**):

2-Allyl-3-hydroxy-6-methyl-pyran-4-on (**16**) (1,66 g; 10 mmol) wurde in CHCl_3 (60 ml) gelöst und bei 0 °C gerührt. Dazu tropfte man eine Lösung von Brom (3,20 g; 20 mmol) in CHCl_3 (10 ml). Anschließend wurde noch eine katalytische Menge LiBr (30 mg) zugesetzt und für 12 h bei RT gerührt. Der Ansatz wurde mit CHCl_3 auf das doppelte Volumen verdünnt, mit 5%-iger $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Es wurden 3,12 g (96%) des Rohprodukts erhalten.

HPLC (System II) t_R 7,31 min; ESI-MS: m/z 327,0 ($M+H^+$), monoisotopische Masse für $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Br}_2\text{O}_3$: 326; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 2,25 (s, 3H; $-\text{CH}_3$), 3,21 (dd, J = 15,3 Hz, J = 9,7 Hz, 1H; $-\text{CH}_2-$), 3,40 (dd, J = 15,3 Hz, J = 4,3 Hz, 1H; $-\text{CH}_2-$), 3,99-4,08 (m, 2H; $-\text{CH}_2\text{Br}$), 4,65-4,73 (m, 1H; $-\text{CHBr}-$), 6,22 (s, 1H; 5-H);

5.3.1.22 2-Methyl-6H-pyrano[3,2-b]pyran-4-on (**19**):

K_2CO_3 wurde in DMF (5 ml) suspendiert und dazu das Dibromid (**16**) (2 mmol; 653 mg) gegeben. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde die Mischung mit Na_2CO_3 (5%; 50 ml) aufgenommen und mit CHCl_3 (3*50 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde mit ges. NaCl gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt.

Der Rückstand wurde an Kieselgel mit CHCl_3 chromatographiert. Man erhielt 35 mg (11%) der gesuchten Verbindung.

HPLC (System IV) t_R 3,22 min; ESI-MS: m/z 165,2 ($\text{M}+\text{H}^+$), monoisotopische Masse für $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$: 164; ^1H NMR (DMSO-d_6): δ = 2,24 (s, 3H; $-\text{CH}_3$); 4,73 (dd, J = 3,8 Hz, J = 1,9 Hz, 2H; 6-H), 6,15 (dt, J = 10,2 Hz, J = 3,8 Hz, 1H; 7-H), 6,16 (s, 1H; -3-H), 6,42 (dt, J = 10,2 Hz, J = 1,9 Hz, 1H; 8-H); ^{13}C NMR (DMSO-d_6): δ = 18,65, 64,69, 113,88, 118,38, 127,59, 139,36, 147,90, 162,66, 170,69.

5.3.1.23 2-Bromomethyl-5-methyl-2,3-dihydro-furo[3,2-b]pyran-7-on (**20**):

Wurde bei der Darstellung von (**19**) erhalten.

HPLC (System IV) t_R 4,68 min; ESI-MS: m/z 245,0; 247,0 ($\text{M}+\text{H}^+$), monoisotopische Masse für $\text{C}_9\text{H}_9\text{BrO}_3$: 244; 246; ^1H NMR (DMSO-d_6): 2,27 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 3,09 (dd, J = 7,4 Hz, J = 17 Hz, 1H, $-\text{CH}_2-$); 3,44 (dd, J = 10,3 Hz, J = 17 Hz, 1H, $-\text{CH}_2-$); 3,80 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{Br}$); 5,03 (m; 1H, $-\text{CH}-$); 6,18 (s, 1H, 5-H).

6 Literaturverzeichnis

- [1] K. B. Axelsen, M. G. Palmgren, *J. Mol. Evol.* **1998**, *46*, 84-101.
- [2] K. Geering, *J. Membr. Bio.* **2000**, *174*, 181-190.
- [3] P. L. Jørgensen, K. O. Hakansson, S. J. D. Karlish, *Ann. R. Physl.* **2003**, *65*, 817-849.
- [4] Läger, Peter. Electrogenic Ion Pumps. [5], 168ff. 1991. *Distinguished Lecture Series of the Society of General Physiologists.*
- [5] W. J. Rice, H. S. Young, D. W. Martin, J. R. Sachs, D. L. Stokes, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2187-2197.
- [6] U. Hasler, G. Crambert, J. D. Horisberger, K. Geering, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 16356-16364.
- [7] G. Scheiner-Bobis, *Eur. J. Bioch.* **2002**, *269*, 2424-2433.
- [8] K. J. Sweadner, E. Rael, *Genomics* **2000**, *68*, 41-56.
- [9] E. Arystarkhova, R. K. Wetzel, N. K. Asinovski, K. J. Sweadner, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33183-33185.
- [10] P. Beguin, G. Crambert, S. Guennoun, H. Garty, J. D. Horisberger, K. Geering, *Embo J.* **2001**, *20*, 3993-4002.
- [11] H. J. Schatzmann, *Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta* **1953**, *11*, 346-354.

- [12] J. C. Skou, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2452-2461.
- [13] Hoffman, B. F., Jr. Bigger, J. T. "Digitalis and Allied Cardiac Glycosides" in *The Pharmacological Basis of Therapeutics 8th ed*, Goodman Gilman, A., Nies, A. S., Rall, T. W., und Taylor, P. (Editors), Pergamon Press New York **1990**, 814-839.
- [14] M. Gobbin, P. Barassi, A. Cerri, S. De Munari, G. Fedrizzi, M. Santagostino, A. Schiavone, M. Torri, P. Melloni, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3821-3830.
- [15] C. D. Farr, C. Burd, M. R. Tabet, X. Wang, W. J. Welsh, W. J. Ball, *Biochem.* **2002**, *41*, 1137-1148.
- [16] E. Mutschler, *Arzneimittelwirkungen*, WVG-Stuttgart, **1996**, pp. 447-454.
- [17] A. Szent-Györgyi, *Chemical Physiology of Contraction of body and Heart Muscle*, Academic Press, New York **1953**, 86-91.
- [18] A. Szent-Györgyi, *Chemical Physiology of Contraction of body and Heart Muscle*, Academic Press, New York **1953**, pp. 86-91.
- [19] G. T. Hauptert, J. M. Sancho, *PNAS* **1979**, *76*, 4658-4660.
- [20] D. Lichtstein, S. Samuelov, *Bioc. Biop. R.* **1980**, *96*, 1518-1523.
- [21] K. A. Gruber, J. M. Whitaker, V. M. Buckalew, *Nature* **1980**, *287*, 743-745.
- [22] J. F. Cloix, G. Dagher, M. Crabos, M. G. Pernollet, P. Meyer, *Experientia* **1984**, *40*, 1380-1382.
- [23] K. Akagawa, N. Hara, Y. Tsukada, *J. Neurochem.* **1984**, *42*, 775-780.

- [24] R. A. Kelly, D. S. O'Hara, W. E. Mitch, T. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1704-1711.
- [25] J. A. Millett, S. M. Holland, J. Alaghbandzadeh, H. E. De Wardener, *J. Endocr.* **1987**, *112*, 299-303.
- [26] A. Goto, K. Yamada, M. Ishii, T. Sugimoto, *Nephron* **1990**, *54*, 99-100.
- [27] J. M. Hamlyn, M. P. Blaustein, S. Bova, D. W. Ducharme, D. W. Harris, F. Mandel, W. R. Mathews, J. H. Ludens, *PNAS* **1991**, *88*, 6259-6263.
- [28] J. H. Ludens, M. A. Clark, D. W. Ducharme, D. W. Harris, B. S. Lutzke, F. Mandel, W. R. Mathews, D. M. Sutter, J. M. Hamlyn, *Hypertension* **1991**, *17*, 923-929.
- [29] W. R. Mathews, D. W. Ducharme, J. M. Hamlyn, D. W. Harris, F. Mandel, M. A. Clark, J. H. Ludens, *Hypertension* **1991**, *17*, 930-935.
- [30] I. M. Shaikh, B. W. C. Lau, B. A. Siegfried, R. Valdes, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 13672-13678.
- [31] H. J. Kramer, G. Krampitz, A. Backer, G. Krampitz, H. Meyerlehnert, *Bioc. Biop. R.* **1995**, *213*, 289-294.
- [32] A. Y. Bagrov, O. V. Fedorova, J. L. Austinlane, R. I. Dmitrieva, D. E. Anderson, *Hypertension* **1995**, *26*, 781-788.
- [33] N. Zhao, L. C. Lo, N. Berova, K. Nakanishi, A. A. Tymiak, J. H. Ludens, G. T. Haupt, *Biochem.* **1995**, *34*, 9893-9896.

- [34] S. Q. Li, C. Eim, U. Kirch, R. E. Lang, W. Schoner, *Life Sci.* **1998**, *62*, 1023-1033.
- [35] R. Schneider, V. Wray, M. Nimtz, W. D. Lehmann, U. Kirch, R. Antolovic, W. Schoner, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 784-792.
- [36] F. Kerek, *Hypertension Research* **2000**, *23*, 33-38.
- [37] "Pyrans and fused Pyrans" Boulton, A. J. and McKillop, A. in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry [3]*, Katritzky, A. R. and Rees, C. W., Pergamon Press **1984**.
- [38] "Pyrans and their Benzo Derivatives" McKillop, A. in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II [5]*, Katritzky, A. R., Rees, C. W., Pergamon Press **1984**.
- [39] "Compounds Containing a Six Membered Ring with One Hetero Atom", Campbell, N. in *Chemistry of Carbon Compounds [4b]*, Rodd, E. H., Elsevier Publishing Company **1959**.
- [40] H. Arimoto, S. Asano, D. Uemura, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7761-7762.
- [41] S. Yamamura, S. Nishiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, *70*, 2025-2037.
- [42] K. Suenaga, H. Kigoshi, K. Yamada, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5151-5154.
- [43] D. C. Manker, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5374.
- [44] H. Arimoto, R. Yokoyama, K. Nakamura, Y. Okumura, D. Uemura, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13901-13908.

- [45] H. Arimoto, R. Yokoyama, Y. Okumura, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4749-4750.
- [46] J. B. Harborne, C. A. Williams, *Phytochemistry* **2000**, *55*, 481-504.
- [47] F. J. C. Carneiro, N. Boralle, D. H. S. Silva, L. M. X. Lopes, *Phytochemistry* **2000**, *55*, 823-832.
- [48] H. Hahn, T. Seeger, H. Geiger, H. D. Zinsmeister, K. R. Markham, H. Wong, *Phytochemistry* **1995**, *40*, 573-576.
- [49] R. J. Light, C. R. Hauser, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 538-546.
- [50] L. Claisen, N. Stylos, *Chem. Ber.* **1887**, *20*, 2188-2191.
- [51] L. Claisen, N. Stylos, *Chem. Ber.* **1888**, *21*, 1141-1143.
- [52] L. Claisen, *Chem. Ber.* **1891**, *24*, 116-120.
- [53] H. Arimoto, S. Nishiyama, S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5619-5620.
- [54] H. Arimoto, S. Nishiyama, S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9581-9584.
- [55] H. Arimoto, Y. Okumura, S. Nishiyama, S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5357-5358.
- [56] H. Arimoto, J. F. Cheng, S. Nishiyama, S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5781-5784.

- [57] M. Koreeda, H. Akagi, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1197-1200.
- [58] D. M. Springer, B. Y. Luh, J. J. Bronson, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* **2001**, *11*, 797-801.
- [59] T. A. Morgan, B. Ganem, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 2773-2774.
- [60] O. Achmatowicz Jr., P. Bukowski, B. Szechner, Z. Zwierzchowska, A. Zamojski, *Tetrahedron* **1971**, *27*, 1973-1996.
- [61] T. Shono, Y. Matsumura, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 1363-1364.
- [62] S. Torii, H. Tanaka, T. Anoda, Y. Simizu, *Chem. Lett.* **1976**, 495-498.
- [63] Allingham, Robert P. and Weeks, P. D. , Belgisches Patent **1977**, [843953].
- [64] P. D. Weeks, D. E. Kuhla, R. P. Allingham, A. Harry, B. Wlodecki, *Carbohydrate Research* **1977**, *56*, 195-199.
- [65] T. M. Brennan, P. D. Weeks, D. P. Brannegan, D. E. Kuhla, M. L. Elliott, H. A. Watson, B. Wlodecki, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 331-334.
- [66] P. D. Weeks, T. M. Brennan, D. P. Brannegan, D. E. Kuhla, M. L. Elliott, H. A. Watson, B. Wlodecki, R. Breitenbach, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1109-1113.
- [67] J. Arnarp, J. Bielawski, B. M. Dahlin, O. Dahlmann, C. R. Enzell, T. Pettersson, *Acta Chem. Scan.* **1990**, *44*, 916-926.
- [68] H. Takao, Y. Endo, T. Horie, *Heterocycles* **1992**, *34*, 1803-1812.
- [69] H. Takao, Y. Endo, T. Horie, *Heterocycles* **1993**, *36*, 1803-1808.

- [70] B. Helferich, W. Ost, *Chem. Ber. Recueil* **1962**, *95*, 2616-2622.
- [71] E. V. Dehmlow, R. Westerheide, *Heterocycles* **1994**, *37*, 355-366.
- [72] G. J. F. Chittenden, *Carbohydrate Research* **1969**, *11*, 424-427.
- [73] S. von Kostanecki, L. Paul, J. Tambor, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 2475-2479.
- [74] G. J. P. Becket, G. P. Ellis, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 719-720.
- [75] Ellis, G. P. "Chromenes, Chromanones and Chromones" in *The Chemistry of Heterocyclic Compounds [31]*, Ellis, G. P., John Wiley & Sons Inc., **1977**, 496.
- [76] K. Görlitzer, E. Engler, *Arch. Pharm.* **1980**, *313*, 385-398.
- [77] Gammill, Ronald B., *Antiatherosclerotic furochromones*, US. Patent [4,284,569], **1981**.
- [78] R. B. Gammill, C. E. Day, P. E. Schurr, *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1672-1674.
- [79] R. E. Mewshaw, K. L. Marquis, X. Shi, G. McGaughey, G. Stack, M. B. Webb, M. Abou-Gharbia, T. Wasik, R. Scerni, T. Spangler, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7081-7108.
- [80] R. Hong, J. Feng, R. Hoen, G. Q. Lin, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8685-8689.
- [81] C. D. Gabbutt, J. D. Hepworth, B. M. Heron, J. L. Thomas, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 881-884.

- [82] S. A. Ahmadjunan, D. A. Whiting, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1990**, 418-419.
- [83] I. M. Heilbron, D. H. Hey, A. Lowe, *J. Chem. Soc.* **1934**, 1311-1315.
- [84] T. S. Wheeler, *Organic Reactions Collective Volume 4* **1963**, 478.
- [85] M. Marder, J. Zinzuk, M. I. Colombo, C. Wasowski, H. Viola, C. Wolfman, J. H. Medina, E. A. Ruveda, A. C. Paladini, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* **1997**, 7, 2003-2008.
- [86] E. El Telbani, S. El Desoly, M. A. Hammad, A. R. Hassan, A. R. H. A. Rahman, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2317-2322.
- [87] A. Fougerousse, E. Gonzalez, R. Brouillard, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 583-586.
- [88] S. von Kostanecki, A. Rózycki, *Chem. Ber.* **1901**, 34, 102-109.
- [89] S. von Kostanecki, L. LLOYD, *Chem. Ber.* **1901**, 34, 2942-2950.
- [90] J. Allan, R. Robinson, *J. Chem. Soc.* **1924**, 125, 2192-2195.
- [91] G. J. P. Becket, G. P. Ellis, M. I. U. Trindade, *J. Chem. R. (M)* **1978**, 865-872.
- [92] C. R. Hauser, F. W. Swamer, J. T. Adams, *Organic Reactions* **1954**, 8, 59-196.
- [93] Ellis, G. P. "Chromenes, Chromanones and Chromones" in *The Chemistry of Heterocyclic Compounds [31]*, Ellis, G. P., John Wiley & Sons Inc., **1977**, 515.

- [94] W. Baker, *J. Chem. Soc.* **1933**, 1381-1389.
- [95] T. Szell, L. Dozsai, M. Zarandy, K. Menyharth, *Tetrahedron* **1969**, *25*, 715-724.
- [96] T. Szell, G. Schobel, L. Balaspiri, *Tetrahedron* **1969**, *25*, 707-714.
- [97] G. Wittig, *Chem. Ber.* **1924**, *57*, 88-95.
- [98] I. M. Heilbron, D. H. Hey, B. Lythgoe, *J. Chem. Soc.* **1934**, 1581-1585.
- [99] R. B. Gammill, *Synthesis* **1979**, 901-903.
- [100] Y. Sugita, T. Iwaki, M. Okamoto, I. Yokoe, *Heterocycles* **2001**, *55*, 881-888.
- [101] S. Sethna, R. Phadke, *Organic Reactions* **1953**, *7*, 1-58.
- [102] C. Mentzer, D. Molho, P. Vercier, *Bull. Soc. Chim. France* **1952**, *19*, 91-93.
- [103] L. A. Paquette, H. Stucki, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1232-1235.
- [104] B. B. Millward, *J. Chem. Soc.* **1960**, 26-30.
- [105] N. J. Reddy, M. Bokadia, T. Sharma, J. A. Donnelly, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 638-641.
- [106] K. R. Kutumbe, M. G. Marathe, *Chem. Ber. Recueil* **1963**, *96*, 913-917.
- [107] Stanforth, S. P., "Bicyclic 6-6 Systems: Two Heteroatoms 1:1" in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II [7]*, Katritzky, A. R., Rees, C. W., and Scriven, E. F. V.; Pergamon Press **1996**, 527-528.

- [108] Boulton, A. J. and McKillop, A. in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* [3], Katritzky, A. R. and Rees, C. W., Pergamon Press **1984**, 639-640.
- [109] F. N. A. Fleischmann, *J. Chem. Soc.* **1907**, 250-257.
- [110] P. F. G. Prail, A. L. Whitear, *Proc. Chem. Soc. London* **1961**, 112.
- [111] A. K. Kiang, S. F. Tan, *J. Chem. Soc.* **1965**, 2283-2284.
- [112] S. K. Talapatra, A. Basak, B. C. Maiti, B. Talapatra, *Indian J. Chem. Sect. B* **1980**, 19, 546-548.
- [113] L. Crombie, D. E. Games, A. W. G. James, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1996**, 2715-2724.
- [114] A. K. Müller, F. Raninger, E. Ziegler, *Ann. Chem.* **1976**, 400-406.
- [115] R. Verhé, L. De Buyck, N. De Kimpe, W. De Wispelaere, N. Schamp, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1980**, 89, 57-65.
- [116] L. R. Zehnder, J. W. Dahl, R. P. Hsung, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 1901-1905.
- [117] T. Money, F. W. Comer, G. R. B. Webster, I. G. Wright, A. I. Scott, *Tetrahedron* **1967**, 23, 3435-3448.
- [118] T. Money, *Chem. Rev.* **1970**, 70, 553-560.
- [119] A. L. Scott, H. Guilford, J. J. Ryan, D. Skingle, *Tetrahedron* **1971**, 27, 3025-3038.

- [120] T. Popoff, O. Theander, E. Westerlund, *Acta Chem. Scan. B* **1978**, *32*, 1-7.
- [121] S. A. Lazarus, G. E. Adamson, J. F. Hammerstone, H. H. Schmitz, *J. Agr. Food* **1999**, *47*, 3693-3701.
- [122] C. G. Krueger, N. C. Dopke, P. M. Treichel, J. Folts, J. D. Reed, *J. Agr. Food* **2000**, *48*, 1663-1667.
- [123] Jørgensen, P. L., "Preparation, Purification of NKA" in *Methods in Enzymology [32]*, San Diego, Academic Press **1974**, 277-290.
- [124] V. DiBartolo, S. Balzan, L. Pieraccini, S. Ghione, S. Pegoraro, P. Biver, R. Revoltella, U. Montali, *Life Sci.* **1995**, *57*, 1417-1425.
- [125] E. W. Weiler, F. Khalil-Manesh, H. C. Gonick, B. A. Prins, R. E. Purdy, D. K. Sensharma, *Am. J. Hypertens.* **1999**, *12*, 364-373.
- [126] J. B. Lingrel, T. A. Kuntzweiler, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 19659-19662.
- [127] L. L. Woods, P. A. Dix, *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 1148-1151.
- [128] L. L. Woods, H. C. Smitherman, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2987-2989.
- [129] L. L. Woods, H. C. Smitherman, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2987-2989.
- [130] L. L. Woods, P. A. Dix, *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 1148-1151.
- [131] L. Tolentino, J. Kagan, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 1444-1447.
- [132] L. L. Woods, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 696-698.

- [133] L. L. Woods, J. Sapp, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 3445-3447.
- [134] N. S. Poonia, A. K. Arora, A. V. Bajaja, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1980**, *53*, 569-570.
- [135] P. S. Dobbin, R. C. Hider, S. K. Rizvi, K. L. Maki, D. Vanderhelm, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 451-455.
- [136] I. Tamburlin-Thumin, M. Crozet, J. C. Barrière, *Synthesis* **1999**, *7*, 1149-1154.
- [137] B. J. van Keulen, R. M. Kellogg, O. Piepers, *J. Chem. Soc. Chem. Com.* **1979**, *6*, 285-286.
- [138] Cragoe and Robb, *Organic Synthesis Collective Volumes [5]*, 636. 1973.
- [139] R. V. J. Chari, J. W. Kozarich, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 2355-2358.
- [140] H. N. Barham, G. N. Reed, *J. Amer. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 1541-1545.
- [141] R. C. Fox, P. D. Taylor, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* **1998**, *8*, 443-446.
- [142] R. C. Fox, P. D. Taylor, *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 1575-1583.
- [143] Z. D. Liu, S. Piyamongkol, D. Y. Liu, H. H. Khodr, S. L. Lu, R. C. Hider, *Bioorg. Medicinal Chem.* **2001**, *9*, 563-573.
- [144] F. Feist, E. Baum, *Chem. Ber.* **1905**, *38*, 3562-3574.
- [145] R. Appel, *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 863-874.

- [146] C. N. Barry, S. A. Evans Jr., *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3361-3364.
- [147] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, *1*, 1-28.
- [148] M. Moreno-Manas, J. Ribas, A. Virgili, *Synthesis* **1985**, *5*, 699-701.
- [149] D. T. Connor, P. A. Young, M. von Strandtmann, *J. Heterocycl. Chem.* **1981**, *18*, 697-702.
- [150] E. Winterfeldt, H. Preuss, *Chem. Br.* **1966**, *99*, 450-458.
- [151] M. Z. Piao, K. Imafuku, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5301-5302.
- [152] Y. Mori, S. Mitsuoka, H. Furukawa, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4161-4164.
- [153] G. Matsuo, H. Hinou, H. Koshino, T. Suenaga, T. Nakata, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 903-906.
- [154] B. L. Ellis, A. K. Duhme, R. C. Hider, M. B. Hossain, S. K. Rizvi, D. Vanderhelm, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3659-3670.
- [155] Z. D. Liu, H. H. Khodr, D. Y. Liu, S. L. Lu, R. C. Hider, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4814-4823.
- [156] Y. Mori, K. Yaegashi, H. Furukawa, *J. Amer. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8158-8159.
- [157] J. R. Rodriguez, A. Rumbo, L. Castedo, J. L. Mascarenas, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 966-970.

- [158] G. Bringmann, T. Pabst, P. Henschel, M. Michel, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1269-1275.
- [159] T. Money, F. W. Comer, G. R. B. Webster, I. G. Wright, A. I. Scott, *Tetrahedron* **1967**, *23*, 3435-3448.
- [160] A. L. Scott, H. Guilford, J. J. Ryan, D. Skingle, *Tetrahedron* **1971**, *27*, 3025-3038.
- [161] L. Claisen, N. Stylos, *Chem. Ber.* **1888**, *21*, 1141-1143.
- [162] L. Claisen, *Chem. Ber.* **1891**, *24*, 116-120.
- [163] R. W. Saalfrank, N. Löw, B. Demleitner, D. Stalke, M. Teichert, *Chem-Eur. J.* **1998**, *4*, 1305-1311.
- [164] M. Poje, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1575-1576.
- [165] F. Mizukami, M. Ando, T. Tanaka, J. Imamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1978**, *51*, 335-336.
- [166] A. Varvoglis, *Chem. Soc. Rev.* **1981**, *10*, 377-407.
- [167] A. Varvoglis, *Synthesis* **1984**, 709-726.
- [168] R. M. Moriarty, O. Prakash, *Acc. Chem. Re.* **1986**, *19*, 244-250.
- [169] M. E. Garst, B. J. McBride, J. G. Douglass, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1675-1678.
- [170] P. A. Wender, J. L. Mascarenas, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6267-6269.

- [171] B. J. McBride, M. E. Garst, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 2839-2854.
- [172] A. Rumbo, A. Mourino, L. Castedo, J. L. Mascarenas, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6114-6120.
- [173] J. L. Mascarenas, I. Perez, A. Rumbo, L. Castedo, *Synlett* **1997**, 81.
- [174] W. M. McLamore, E. Gelblum, A. Bavley, *J. Amer. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2816-2818.
- [175] S. Gester, P. Metz, O. Zierau, G. Vollmer, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1015-1018.
- [176] Schwartz, A. K., Nagano, M., Nakao, M., Lindenmayer, G. E., and Allen, J. C., *Methods in Pharmacology [1]* **1971**, 361-388.
- [177] D. W. Harris, M. A. Clark, J. F. Fisher, J. M. Hamlyn, K. P. Kolbasa, J. H. Ludens, D. W. Ducharme, *Hypertension* **1991**, *17*, 936-943.
- [178] W. Bunge in *Houben-Weyl, Meth. d. Org. Chem., Bd. 1 und 2*, Thieme, Stuttgart, **1959**, 769-867.