

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese  
von Sekundärmetaboliten aus den Höheren Pilzen  
*Austroboletus gracilis* und *Leucocoprinus birnbaumii*  
sowie der lipophilen Hefe *Malassezia furfur***

von

**Andrea Bartsch**

aus

Stralsund

**2003**



## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Wolfgang Steglich betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 08. September 2003

Dissertation eingereicht am 09. September 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Steglich
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Lindel

Mündliche Prüfung am 16. Oktober 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1999 bis April 2003 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Steglich am Institut für Organische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

## Dank

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Steglich, möchte ich sehr herzlich für sein großes Interesse an dieser Arbeit, den zahlreichen Anregungen, interessanten Diskussionen und das mir entgegen gebrachte Vertrauen danken. Seine Begeisterung für die Naturstoffchemie und insbesondere für die Pilzinhaltsstoffe hat dazu beigetragen, die Promotionszeit spannend und abwechslungsreich zu gestalten.

Herrn Prof. Dr. Thomas Lindel danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Besonders herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Peter Mayser und Herrn Dr. Hans-Joachim Krämer für die ausgezeichnete Zusammenarbeit auf dem Gebiet der *Malassezia*-Hefen bedanken. Es hat viel Freude bereitet, die Strukturen der von ihnen isolierten Substanzen zu entschlüsseln.

Mein Dank gilt weiterhin:

Claudia Dubler, Dr. David Stephenson, Dr. Bernhard Irlinger, Dr. Monika Winner und Dr. Peter Spiteller für zahlreiche, zum Teil sehr aufwendige NMR-Messungen von häufig empfindlichen Substanzen und viele wertvolle Hinweise zur NMR-Spektroskopie.

Waltraud Bogatsch, Dagmar Ewald, Dr. Gerd Fischer, Dr. Holger Lerche, Reinhard Seidl, Dr. Werner Spahl und Dr. Peter Spiteller für die Aufnahme von Massenspektren.

Besonders herzlich Prof. Dr. Michael Spiteller für die MS/MS-Messungen der Birnbaumine.

Helmut Schulz und Gertraud Käser für die Bestimmung der Elementaranalysen, Ivo Brück und Helmut Huber für die Aufnahme von IR- und UV-Spektren sowie Helmut Hartl für die AAS-Messungen.

Dr. Norbert Arnold für die Pilzkollektionen an *A. gracilis* und die Durchführung der Verimpfungsexperimente in den USA.

Den vielen aufmerksamen Beobachtern, die in ihren Blumentöpfen den Gelben Faltenschirmling erspäht und mir dann geschickt haben, besonders Till Hägele vom

Botanischen Garten München, Claudia Dubler, Dr. Franz von Nussbaum und Tina Hübscher, die sogar aus Griechenland Fruchtkörper mitbrachte.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises für ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima, im Besonderen meinen Laborkollegen Sabine Voß, Kathrin Hohnholt, Heike Klisa, Dr. Monika Winner, Dr. Bernhard Irlinger, Dr. Heiner Ebel, Dr. Christian Miksch, Dr. Marc Heidl und Dr. Christoph Stark.

Dr. Gertraud Gruber, Dr. Monika Winner, Dr. Bernhard Irlinger und Dr. Peter Spiteller für die vielen Diskussionen analytischer Probleme. Nadine Ermel, Dr. Bernhard Irlinger, Dr. Andreas Kreipl und Dr. Markus Heinrich für die wertvollen Anregungen zur Synthese.

Kathrin Hohnholt dafür, dass sie mir am Ende der Promotion viel Arbeit bei HPL-chromatographischen Trennungen und der Wartung der HPLC-Anlagen abgenommen hat. Sabine Voß für ihr großes Engagement bei der Bewältigung einiger kniffliger Syntheseprobleme.

Der Schlussmannschaft im Arbeitskreis mit Sabine Voß, Claudia Gräf, Nadine Ermel, Dr. Andreas Kreipl und Dr. Markus Heinrich für die beste Arbeitsatmosphäre, die man sich vorstellen kann.

Nadine Ermel, Dr. Gertraud Gruber, Dr. Bernhard Irlinger sowie Dr. Peter Mayser und Dr. Hans-Joachim Krämer für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Ganz herzlich meinen Eltern für ihre Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung und dafür, dass sie nie gefragt haben, wann ich endlich fertig bin.

Meinem lieben Mann Sören für seine Fürsorge, sein Verständnis und sein jederzeit offenes Ohr.

*Meinen Eltern und  
meinem Mann Sören*



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	1
<b>II</b>	<b>Allgemeiner Teil</b> .....	6
<b>1</b>	<b>Wichtige Biosynthesewege für Sekundärmetabolite</b> .....	6
1.1	Shikimatweg.....	6
1.1.1	Biosynthese von L-Tryptophan ( <b>18</b> ).....	8
1.1.2	Biosynthese von L-Phenylalanin ( <b>21</b> ) und L-Tyrosin ( <b>23</b> ) .....	9
1.2	Acetat-Malonat-Weg.....	11
<b>2</b>	<b>Biosynthese ausgewählter Aminosäuren</b> .....	13
2.1	Glycin ( <b>44</b> ) .....	13
2.2	Arginin ( <b>54</b> ).....	14
<b>III</b>	<b>Spezieller Teil</b> .....	17
<b>3</b>	<b><i>Austroboletus gracilis</i></b> .....	17
3.1	Der Pilz.....	17
3.2	Bisherige Arbeiten.....	18
3.3	Sekundärmetabolite aus Pilzen der Ordnung <i>Boletales</i> .....	18
3.3.1	Pulvinsäurederivate .....	19
3.3.2	Chalciporon ( <b>67</b> ) .....	21
3.3.3	Calopine .....	21
3.3.4	Retipolide .....	22
3.4	Aufarbeitung und Isolierung .....	23
3.5	Austrogracilin A ( <b>77</b> ) .....	24
3.5.1	Struktur von Austrogracilin A ( <b>77</b> ).....	24
3.5.2	Strukturbeweis durch Synthese .....	28
3.5.2.1	Methoden zur Synthese substituierter Naphthaline.....	28
3.5.2.1.1	Diels-Alder-Cycloadditionen .....	28
3.5.2.1.2	Metallorganische Methoden.....	30
3.5.2.1.3	Baseninduzierte Cyclisierungen.....	31
3.5.2.2	Synthese von Austrogracilin A ( <b>77</b> ).....	32
3.5.2.2.1	Intramolekulare Friedel-Crafts-Acylierung.....	32

---

3.5.2.2.2	Darstellung eines geeigneten Friedel-Crafts-Eduktes durch Stobbe-Kondensation.....	33
3.5.2.2.3	Cyclisierung zum Naphthalin-System.....	34
3.5.2.2.4	Entschützung zum Austrogracilin A ( <b>77</b> ).....	36
3.6	Austrogracilin B ( <b>114</b> ) .....	37
3.6.1	Struktur von Austrogracilin B ( <b>114</b> ) .....	37
3.6.2	Methylierung von Austrogracilin B ( <b>114</b> ).....	41
3.7	Weitere Naturstoffe mit Naphthalin-Struktur .....	42
3.7.1	Naphthalin-Derivate aus Ascomyceten.....	42
3.7.2	Naphthalin-Derivate aus Moosen.....	44
3.8	Überlegungen zur Biosynthese und erste Verimpfungsexperimente .....	46
3.9	Ausblick .....	48
<b>4</b>	<b><i>Leucocoprinus birnbaumii</i></b> .....	<b>49</b>
4.1	Der Pilz.....	49
4.2	Bisherige Arbeiten.....	50
4.3	Aufarbeitung und Isolierung der Inhaltsstoffe .....	50
4.4	Identifizierung der farblosen Verbindung .....	52
4.5	Birnbaumin A ( <b>281</b> ) und B ( <b>282</b> ).....	53
4.5.1	NMR-Spektroskopie von Birnbaumin A ( <b>281</b> ).....	55
4.5.2	NMR-Spektroskopie von Birnbaumin B ( <b>282</b> ).....	60
4.5.3	Schlussfolgerung .....	68
4.5.4	Ausschluss isomerer Chinolonstrukturen durch Vergleich mit synthetischen Modellverbindungen.....	72
4.5.5	Massenspektrometrie von Birnbaumin A ( <b>281</b> ) und B ( <b>282</b> ).....	76
4.5.6	Synthese von Modellverbindungen mit Amidinoharnstoff-Terminus (AHT).....	82
4.5.6.1	Desoxybirnbaumin A ( <b>III</b> , AHT).....	83
4.5.6.2	Birnbaumin A ( <b>Ig</b> , AHT) .....	86
4.5.6.2.1	Methoden zur Darstellung von 1-Hydroxyindol ( <b>184</b> ) .....	86
4.5.6.2.2	Versuche zur Synthese von Birnbaumin A ( <b>Ig</b> , AHT).....	89
4.5.6.2.3	Vergleich des Syntheseproduktes <b>201</b> mit dem natürlichen Birnbaumin A.....	93
4.5.6.2.4	Neue Strategie zur Einführung der Amidinoharnstoff-Funktion .....	96

---

4.5.6.2.4.1	Darstellung von 1-(3-Amidinoureido)-4-aminobutan-Hydrochlorid ( <b>204</b> ) .....	97
4.5.6.2.4.2	Verwendung von aktivierten Thioester-Verbindungen.....	99
4.5.6.2.5	Darstellung des Strukturvorschlags <b>Ig</b> nach der Thioester-Methode.....	101
4.5.6.3	4-Hydroxydesoxybirnbaumin B (AHT) .....	102
4.5.6.4	4-Hydroxybirnbaumin B (AHT) .....	104
4.5.6.5	7-Hydroxydesoxybirnbaumin B (AHT) .....	108
4.5.7	Reduktion von Birnbaumin B ( <b>282</b> ).....	109
4.5.8	Vergleich zwischen Reduktionsprodukt <b>234</b> und 7-Hydroxydesoxybirnbaumin B ( <b>233</b> , AHT) .....	114
4.5.9	Mögliche funktionelle Gruppen als Endgruppe in Birnbaumin A ( <b>281</b> ) und B ( <b>282</b> ).....	116
4.5.9.1	Synthese von Modellverbindungen mit Carbamoylguanidino-Terminus ...	117
4.5.9.2	Synthese von Modellverbindungen mit Amidrazon- bzw. Amidoxim- Terminus.....	120
4.5.9.3	<sup>15</sup> N-NMR-Spektroskopie.....	124
4.5.10	Endgültiger Strukturbeweis durch Derivatisierung.....	128
4.5.10.1	Methylierung von Birnbaumin A ( <b>281</b> ) .....	128
4.5.10.2	Methylierung von Birnbaumin B ( <b>282</b> ).....	133
4.5.11	Struktur der Birnbaumine A ( <b>281</b> ) und B ( <b>282</b> ) .....	136
4.6	Überlegungen zur Biosynthese.....	137
4.7	Naturstoffe mit 1-Hydroxyindol-Struktur .....	141
<b>5</b>	<b><i>Malassezia furfur</i></b> .....	147
5.1	Hefen der Gattung <i>Malassezia</i> .....	147
5.2	Pityriasis versicolor .....	148
5.3	Stand der Forschung und Problemstellung.....	149
5.4	Bisherige Arbeiten.....	151
5.5	Isolierung von Sekundärmetaboliten aus Kulturen von <i>M. furfur</i> .....	155
5.6	Neue Metabolite aus der Gruppe der Malasseziacarbazole .....	157
5.6.1	Malasseziacarbazol C ( <b>344</b> ) .....	157
5.6.2	Malasseziacarbazol D ( <b>346</b> ) .....	164
5.6.3	Weitere Verbindungen mit Indolo[3,2- <i>b</i> ]carbazol-Gerüst .....	169
5.7	Pityriacitrin B ( <b>356</b> ) - ein neues Pityriacitrin-Derivat.....	171
5.8	Weitere Sekundärmetabolite aus <i>Malassezia furfur</i> .....	177

5.8.1	Malasseziaketon ( <b>358</b> ).....	177
5.8.2	Identifizierung einer farblosen Verbindung .....	179
5.9	Überlegungen zur Biosynthese.....	182
5.10	Neue Erkenntnisse über die biologische Aktivität von Malassezin ( <b>326</b> ) ..	184
<b>IV</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	<b>188</b>
<b>6</b>	<b>Verwendete Geräte und Materialien</b> .....	<b>188</b>
6.1	Physikalische und spektroskopische Methoden .....	188
6.2	Chromatographische Methoden .....	190
6.3	Allgemeine Arbeitsmethoden.....	193
<b>7</b>	<b>Experimentelle Daten zu <i>Austroboletus gracilis</i></b> .....	<b>193</b>
7.1	Pilzmaterial.....	193
7.2	Gewinnung der Rohextrakte.....	194
7.3	Charakterisierung der isolierten Inhaltsstoffe aus <i>A. gracilis</i> .....	194
7.3.1	Austrogracilin A ( <b>77</b> , 4,6,7-Trihydroxy-2-naphthoesäure).....	194
7.3.2	Austrogracilin B ( <b>114</b> , 6,7-Dihydroxy-2,4-naphthalindicarbonsäure).....	195
7.4	Synthesvorschriften und experimentelle Daten zur Synthese von Austrogracilin A ( <b>77</b> ) .....	196
7.4.1	4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-methoxycarbonylbut-3-en-carbonsäure ( <b>108</b> ) .....	196
7.4.2	4-Acetoxy-6,7-dimethoxy-2-naphthoesäuremethylester ( <b>112</b> ) .....	197
7.4.3	4-Hydroxy-6,7-dimethoxy-2-naphthoesäure ( <b>113</b> ) .....	198
7.4.4	4,6,7-Trihydroxy-2-naphthoesäure ( <b>77</b> , Austrogracilin A synthetisch).....	199
7.5	Derivatisierung von Austrogracilin B ( <b>114</b> ).....	200
7.5.1	Methylierung mit Diazomethan .....	200
7.5.2	6,7-Dimethoxy-2,4-naphthalindicarbonsäuredimethylester ( <b>115</b> ) .....	200
7.6	Verfütterungsexperimente .....	201
<b>8</b>	<b>Experimentelle Daten zu <i>Leucocoprinus birnbaumii</i></b> .....	<b>202</b>
8.1	Pilzmaterial.....	202
8.2	Atomabsorptionsspektroskopie der getrockneten Fruchtkörper .....	203
8.3	Gewinnung der Rohextrakte.....	203
8.4	Chromatographische Aufarbeitung .....	203
8.5	Charakterisierung der isolierten Inhaltsstoffe aus <i>L. birnbaumii</i> .....	204
8.5.1	L-Tryptophan ( <b>18</b> ) aus <i>L. birnbaumii</i> .....	204
8.5.2	Birnbaumin A ( <b>281</b> ) .....	205

---

8.5.3	Birnbaumin B ( <b>282</b> ) .....	206
8.6	Synthesevorschriften und experimentelle Daten zu <i>L. birnbaumii</i> .....	207
8.6.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von (Indol-3-yl)glyoxylchloriden .....	207
8.6.2	Experimentelle Daten zur Synthese einfacher Indol- und Chinolin-Derivate .....	208
8.6.2.1	2-Phenylaminomethylenmalonsäurediethylester ( <b>149</b> ) .....	208
8.6.2.2	4-Oxo-1,4-dihydro-chinolin-3-carbonsäureethylester ( <b>150</b> ) .....	209
8.6.2.3	(Indol-3-yl)essigsäuremethylester ( <b>152</b> ) .....	210
8.6.2.4	3-(2-Formylamino-phenyl)-3-oxo-propionsäuremethylester ( <b>153</b> ) .....	210
8.6.2.5	4-Oxo-1,4-dihydro-chinolin-3-carbonsäuremethylester ( <b>154</b> ) .....	211
8.6.2.6	(Indol-3-yl)glyoxylchlorid ( <b>156</b> ) .....	212
8.6.2.7	2-(1 <i>H</i> -Indol-3-yl)-2-oxo- <i>N</i> -phenylethylacetamid ( <b>158</b> ) .....	213
8.6.3	Experimentelle Daten zur Synthese von 1-(3-Amidinoureido)-4-aminobutan-Hydrochlorid ( <b>204</b> ) .....	214
8.6.3.1	<i>N</i> -Boc-1,4-diaminobutan ( <b>168</b> ) .....	214
8.6.3.2	<i>N</i> -Amidino- <i>N'</i> -nitroharnstoff ( <b>172</b> ) .....	215
8.6.3.3	<i>N</i> -( <i>N''</i> -Boc-4-aminobutyl)- <i>N'</i> -amidinoharnstoff ( <b>207</b> ) .....	216
8.6.3.4	1-(3-Amidinoureido)-4-aminobutan-Hydrochlorid ( <b>204</b> ) .....	216
8.6.4	Experimentelle Daten zur Synthese von <i>N</i> -[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>178</b> ) .....	218
8.6.4.1	{4-[2-(1 <i>H</i> -Indol-3-yl)-2-oxo-acetylamino]butyl} carbaminsäure- <i>tert</i> -butylester ( <b>169</b> ) .....	218
8.6.4.2	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid-Hydrochlorid ( <b>177</b> ) .....	219
8.6.4.3	(1 <i>H</i> -Indol-3-yl)-oxo-thioessigsäure- <i>S</i> -phenylester ( <b>211</b> ) .....	220
8.6.4.4	<i>N</i> -[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>178</b> ) .....	221
8.6.5	Experimentelle Daten zur Synthese von <i>N</i> -[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(1-hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>201</b> ) .....	223
8.6.5.1	<i>N</i> -Acetoxyindol ( <b>193</b> ) .....	223
8.6.5.2	( <i>N</i> -Acetoxyindol-3-yl)glyoxylchlorid ( <b>194</b> ) .....	224
8.6.5.3	{4-[2-( <i>N</i> -Acetoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetylamino]butyl}-carbaminsäure- <i>tert</i> -butylester ( <b>195</b> ) .....	225

---

8.6.5.4	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)-2-(1-acetoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid-Hydrochlorid ( <b>200</b> ).....	226
8.6.5.5	(1-Acetoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-oxo-thioessigsäure- <i>S</i> -phenylester ( <b>212</b> ).....	227
8.6.5.6	<i>N</i> -[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(1-hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>201</b> ).....	228
8.6.5.7	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)-2-(1-hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>202</b> )....	230
8.6.6	Experimentelle Daten zur Synthese von <i>N</i> -[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(4-hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>222</b> ).....	231
8.6.6.1	2-Methyl-3-nitro-1-( $\alpha$ -tetrahydropyranyloxy)benzol ( <b>215</b> ).....	231
8.6.6.2	4-( $\alpha$ -Tetrahydropyranyloxy)indol ( <b>217</b> ).....	232
8.6.6.3	(4-Hydroxyindol-3-yl)glyoxylchlorid ( <b>218</b> ).....	233
8.6.6.4	(4-Hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-oxo-thioessigsäure- <i>S</i> -phenylester ( <b>219</b> ).....	233
8.6.6.5	(4-Acetoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-oxo-thioessigsäure- <i>S</i> -phenylester ( <b>220</b> ).....	234
8.6.6.6	<i>N</i> -[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(4-acetoxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>221</b> ).....	235
8.6.6.7	<i>N</i> -[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(4-hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>222</b> ).....	237
8.6.7	Experimentelle Daten zur Synthese von <i>N</i> -[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(1,4-dihydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>229</b> ).....	238
8.6.7.1	1-Acetoxy-4-( $\alpha$ -tetrahydropyranyloxy)indol ( <b>224</b> ).....	238
8.6.7.2	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyldimethylsiloxy)-4-( $\alpha$ -tetrahydropyranyloxy)indol ( <b>226</b> ).....	240
8.6.7.3	[ <i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyldimethylsiloxy)-4-hydroxyindol-3-yl]glyoxylchlorid ( <b>227</b> ).....	242
8.6.7.4	(1,4-Dihydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-oxo-thioessigsäure- <i>S</i> -phenylester ( <b>228</b> )...	242
8.6.7.5	<i>N</i> -[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(1,4-dihydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>229</b> ).....	243
8.6.8	Experimentelle Daten zur Synthese von <i>N</i> -[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(7-hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>233</b> ).....	245
8.6.8.1	(7-Hydroxyindol-3-yl)glyoxylchlorid ( <b>231</b> ).....	245
8.6.8.2	(7-Hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-oxo-thioessigsäure- <i>S</i> -phenylester ( <b>232</b> ).....	245
8.6.8.3	<i>N</i> -[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(7-hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>233</b> ).....	246
8.6.9	Experimentelle Daten zur Reduktion von Birnbaumin B ( <b>282</b> ).....	247
8.6.9.1	Arbeitsvorschrift.....	247

---

8.6.9.2	Reduktionsprodukt: <i>N</i> -{4-[(2,2-Diaminoacetimidoyl)amino]butyl}-2-(7-hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>234</b> ).....	248
8.6.10	Experimentelle Daten zur Synthese von <i>N</i> -[4-(3-Carbamoylguanidino)-butyl]-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>245</b> ).....	249
8.6.10.1	1-Benzoyl-2-thiobiuret ( <b>241</b> ) .....	249
8.6.10.2	Thiobiuret ( <b>242</b> ) .....	250
8.6.10.3	2-Methylthiopseudobiuret-Hydroiodid ( <b>236</b> ).....	250
8.6.10.4	<i>N</i> -( <i>N</i> '-Boc-4-aminobutyl)- <i>N</i> '-carbamoylguanidin ( <b>372</b> ).....	251
8.6.10.5	1-(3-Carbamoylguanidino)-4-aminobutan-Hydrochlorid ( <b>244</b> ).....	252
8.6.10.6	<i>N</i> -[4-(3-Carbamoylguanidino)butyl]-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxo-acetamid ( <b>245</b> ) .....	253
8.6.11	Experimentelle Daten zur Synthese der Modellverbindungen <b>262</b> , <b>263</b> , <b>265</b> und <b>266</b> .....	254
8.6.11.1	5-Tosyloxyimino-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion ( <b>257</b> ) .....	254
8.6.11.2	<i>N</i> -Benzyl-2-nitriloacetamid ( <b>260</b> ).....	255
8.6.11.3	2-Nitrilo- <i>N</i> -phenylethylacetamid ( <b>261</b> ).....	256
8.6.11.4	2-Amino- <i>N</i> -benzyl-2-hydrazonoacetamid ( <b>262</b> ).....	257
8.6.11.5	2-Amino-2-hydrazono- <i>N</i> -phenylethylacetamid ( <b>263</b> ).....	258
8.6.11.6	2-Amino- <i>N</i> -benzyl-2-hydroxyiminoacetamid ( <b>265</b> ).....	259
8.6.11.7	2-Amino-2-hydroxyimino- <i>N</i> -phenylethylacetamid ( <b>266</b> ).....	260
8.6.12	Experimentelle Daten zur Synthese von Benzimidazol-2-carboxamidoxim ( <b>271</b> ) .....	261
8.6.12.1	2-Trichloromethylbenzimidazol ( <b>269</b> ) .....	261
8.6.12.2	Benzimidazol-2-carbonitril ( <b>270</b> ).....	261
8.6.12.3	Benzimidazol-2-carboxamidoxim ( <b>271</b> ) .....	262
8.6.13	Experimentelle Daten zu Derivatisierungen von Birnbaumin A ( <b>281</b> ) und B ( <b>282</b> ).....	263
8.6.13.1	Methylierung von Birnbaumin A ( <b>281</b> ) .....	263
8.6.13.1.1	Arbeitsvorschrift.....	263
8.6.13.1.2	1. Fraktion .....	263
8.6.13.1.3	2. Fraktion .....	264
8.6.13.1.4	3. Fraktion: Dimethylbirnbaumin A ( <b>277</b> ) .....	265
8.6.13.2	Methylierung von Birnbaumin B ( <b>282</b> ).....	266
8.6.13.2.1	Arbeitsvorschrift.....	266

---

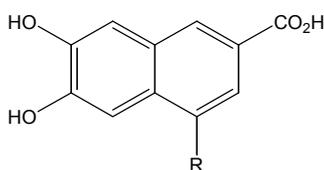
8.6.13.2.2	Trimethylbirnbaumin B (280).....	266
<b>9</b>	<b>Experimentelle Daten zu <i>M. furfur</i></b> .....	<b>267</b>
9.1	Kultivierung .....	267
9.2	Aufarbeitung und Isolierung .....	267
9.2.1	Analytische HPLC.....	268
9.2.2	Präparative HPLC .....	268
9.3	Charakterisierung der isolierten Inhaltsstoffe aus <i>M. furfur</i> .....	270
9.3.1	Malasseziacarbazol C (344) .....	270
9.3.2	Malasseziacarbazol D (346) .....	271
9.3.3	Pityriacitrin B (356) .....	272
9.3.4	Malasseziaketon (358).....	273
9.3.5	Vergleichsverbindung für Malasseziaketon (358): 3-Aminomethylindol (359) .....	275
9.3.6	3-(Hydroxyacetyl)indol (360) aus <i>M. furfur</i> .....	276
9.3.7	Experimentelle Daten zur Synthese von 3-(Hydroxyacetyl)indol (360).....	277
9.3.7.1	3-(Chloroacetyl)indol (362) .....	277
9.3.7.2	Synthese von 3-(Hydroxyacetyl)indol (360).....	278
9.4	Experimentelle Daten zur Synthese von Malassezin (326).....	279
9.4.1	<i>N</i> -(Toluol-4-sulfonyl)indol (368) .....	279
9.4.2	<i>N</i> -Boc-indol-3-carbaldehyd (335).....	280
9.4.3	3-{Hydroxy-[1-(toluol-4-sulfonyl)-1 <i>H</i> -indol-2-yl]methyl}indol-1- carbonsäure- <i>tert</i> -butylester (371).....	281
9.4.4	2,3'-Methylenbisindol (370).....	282
9.4.5	(2,3'-Methylenbisindol-3-yl)carbaldehyd (Malassezin, 326).....	283
<b>V</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>285</b>
<b>VI</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>288</b>

# I Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit stellt neue Sekundärmetabolite aus den Höheren Pilzen *Austroboletus gracilis* und *Leucocoprinus birnbaumii* sowie der lipophilen Hefe *Malassezia furfur* vor. Die Isolierung der Inhaltsstoffe erfolgt hauptsächlich durch hochauflösende Flüssigkeitschromatographie, die Strukturaufklärung mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Experimente, eingehender massenspektrometrischer Untersuchungen und gezielter Derivatisierungsreaktionen. Außerdem werden Synthesekonzepte bzw. geeignete Modellverbindungen für die gefundenen Naturstoffe beschrieben.

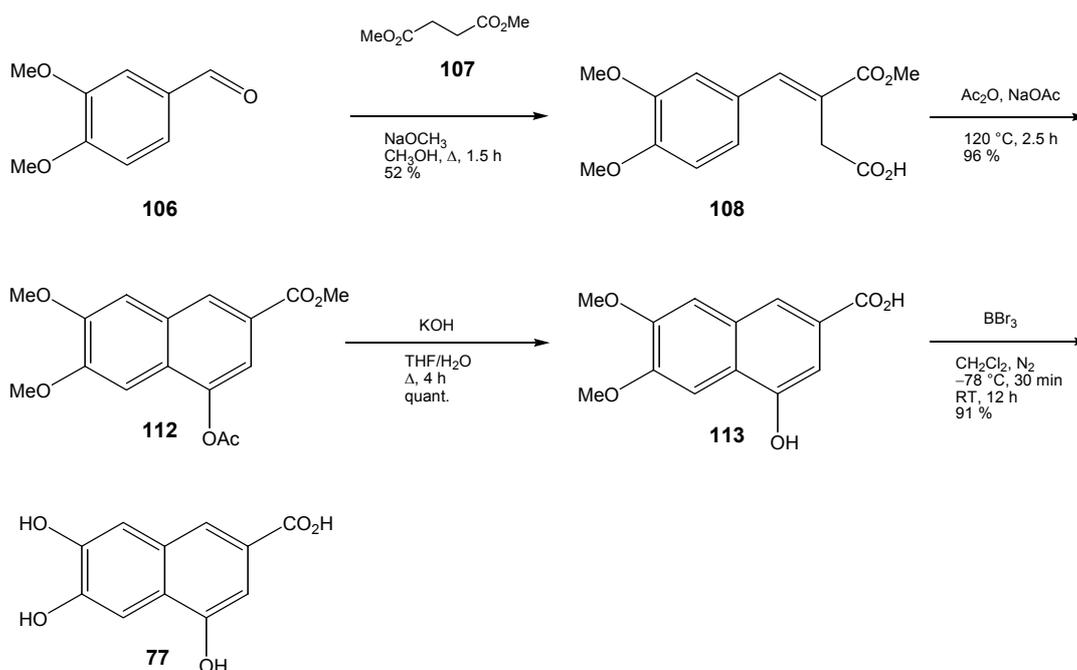
- *Austroboletus gracilis*

Aus dem amerikanischen Röhrling *Austroboletus gracilis* werden die beiden Hauptinhaltsstoffe Austrogracilin A (**77**) und B (**114**) isoliert, die eine für *Boletales*-Arten ungewöhnliche Naphthalin-Struktur aufweisen.



R = OH:            Austrogracilin A (**77**)  
R = CO<sub>2</sub>H:        Austrogracilin B (**114**)

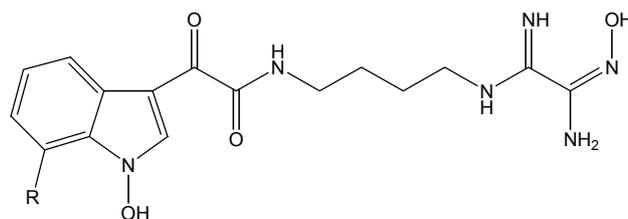
Es gelingt, Austrogracilin A (**77**) in vier Schritten in einer Gesamtausbeute von 45 % zu synthetisieren. Ein Vergleich aller analytischen Daten zeigt vollständige Übereinstimmung und eine abschließende Coinjektion von Syntheseprodukt und Naturstoff bestätigt die für **77** formulierte Struktur.



Die Struktur von Austrogracilin B (**114**) wird durch Überführung mit Diazomethan in 6,7-Dimethoxy-2,4-naphthalindicarbonsäuredimethylester (**115**) und dessen spektroskopische Charakterisierung bewiesen.

- *Leucocoprinus birnbaumii*

Die zitronengelben Fruchtkörper des Gelben Faltenschirmlings (*Leucocoprinus birnbaumii*) rufen durch ihr plötzliches Auftreten in Gewächshäusern und Blumentöpfen immer wieder Erstaunen bei Pflanzenliebhabern hervor. Für die kräftige Färbung der Pilze sind Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) verantwortlich, wobei **282** das Hauptpigment von *L. birnbaumii* darstellt. Die Strukturaufklärung erweist sich als schwierig, da man durch die gängigen spektroskopischen Methoden von Teilen der Struktur keine Informationen erhält. Mehrere mögliche Strukturen können durch ihre Synthese bzw. Darstellung von Modellverbindungen ausgeschlossen werden. Die entscheidenden Informationen zur Formulierung eines Strukturvorschlages liefern Derivatisierungen von Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) mit Diazomethan sowie die Reduktion von **282** mit Zink und Eisessig. Bei den Gelbfarbstoffen **281** und **282** handelt es sich um außergewöhnliche Indol-Derivate, die nicht nur eine sehr seltene *N*-Hydroxyindol-Einheit, sondern auch eine bisher noch nicht beschriebene Amidoxim-Funktion enthalten.



R = H: Birnbaumin A (**281**)  
 R = OH: Birnbaumin B (**282**)

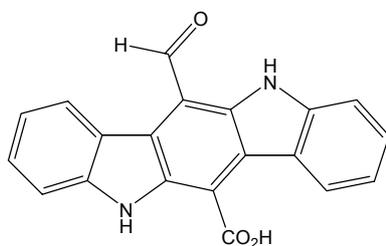
Eine freie OH-Gruppe am Indolstickstoff konnte bisher nur in komplexen Peptidantibiotika in der Natur gefunden werden.

Die Empfindlichkeit der Pigmente **281** und **282** aus *L. birnbaumii* wird sowohl durch die 1-Hydroxyindol-Struktur als auch durch die Amidoxim-Funktion hervorgerufen. Außerdem scheinen diese Strukturteile auch für den außergewöhnlich hohen Kaliumgehalt in Fruchtkörpern des Gelben Faltschirmlings verantwortlich zu sein. Möglicherweise dienen die Birnbaumine **281** und **282** der Mineralstoffspeicherung.

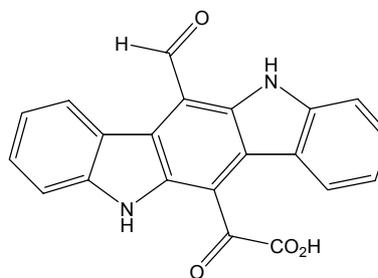
Das aus dem methanolischen Rohextrakt von *L. birnbaumii* isolierte L-Tryptophan (**18**) liefert ein erstes Indiz für die vorgeschlagene Biosynthese. Danach entstehen Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) wahrscheinlich aus L-Tryptophan (**18**) und Citrullin (**50**).

- *Malassezia furfur*

Aus Kulturen von *Malassezia furfur*, einer lipophilen Hefe der residenten Hautflora des Menschen, werden neue Sekundärmetabolite erhalten und in ihrer Struktur aufgeklärt. Malasseziacarbazol C (**344**) und D (**346**) weisen ein Indolo[3,2-*b*]carbazol-Gerüst auf. Aufgrund ihrer Strukturen lässt sich vermuten, dass **344** und **346** potente Liganden für den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR) darstellen.



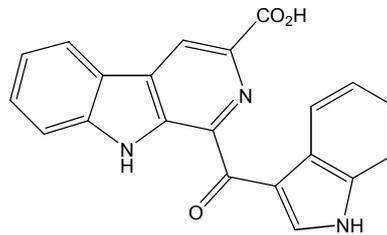
Malasseziacarbazol C (**344**)



Malasseziacarbazol D (**346**)

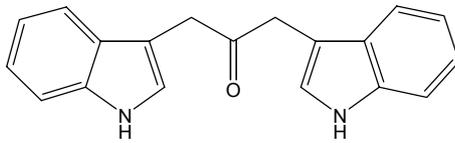
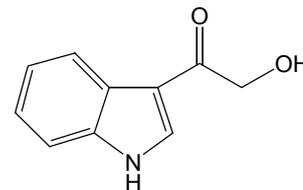
Mit Pityriacitrin B (**356**) kann ein weiterer UV-Filter aus *M. furfur* aufgeklärt werden. Die gelbe Verbindung mit  $\beta$ -Carbolin-Struktur besitzt große Ähnlichkeit mit dem von Irlinger

aufgeklärten Pityriacitrin (**337**) und wird wahrscheinlich durch Decarboxylierung in den Kulturen von *M. furfur* in **337** umgewandelt.

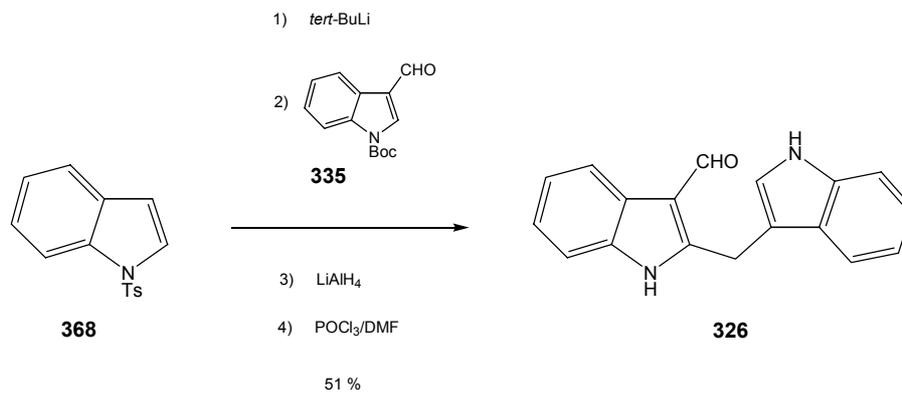
Pityriacitrin B (**356**)

Bereits sehr früh fällt in den biologischen Tests eine Verbindung **358** auf, die eine starke Wirkung als Tyrosinase-Inhibitor zeigt. Die NMR- und MS-Experimente ergeben für die Malasseziaketon genannte Verbindung **358** eine symmetrische Struktur.

Ein weiterer Inhaltsstoff aus *M. furfur* erweist sich als 3-(Hydroxyacetyl)indol (**360**), das bereits aus anderen Organismen isoliert werden konnte.

Malasseziaketon (**358**)3-(Hydroxyacetyl)indol (**360**)

In aktuellen biologischen Tests zeigt das von Wille aufgeklärte und isolierte Malassezin (**326**) nicht nur die bereits bekannte Wechselwirkung mit dem Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor, sondern auch Apoptose-Induktion bei menschlichen Melanozyten. Da sich die Isolierung ausreichender Mengen von **326** aus Kulturen von *M. furfur* äußerst langwierig gestaltet, wird synthetisches Malassezin (**326**) zur Verfügung gestellt. Bei der dazu durchgeführten Optimierung der von Wille vorgestellten Synthese gelingt die Verkürzung der Synthesesequenz um einen Reaktionsschritt und die Steigerung der Gesamtausbeute von 19 auf 51 %.



## II Allgemeiner Teil

### 1 Wichtige Biosynthesewege für Sekundärmetabolite

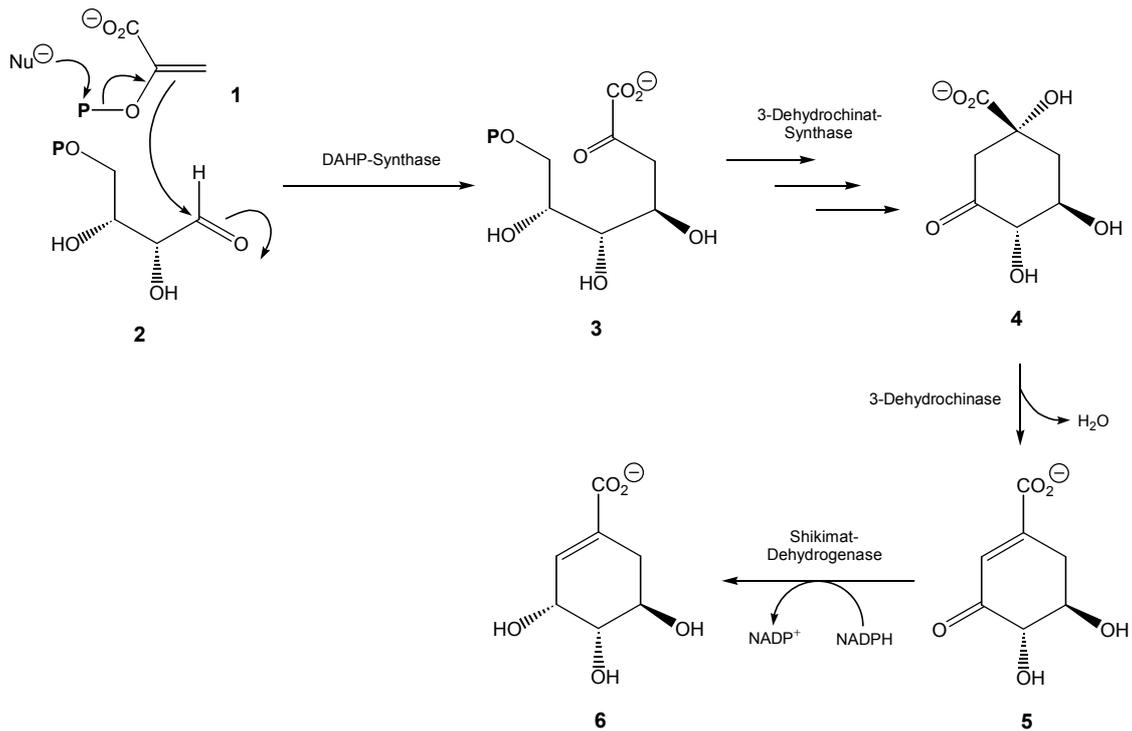
Verbindungen, die keine essentielle Rolle für die Aufrechterhaltung der grundlegenden Lebensfunktionen spielen, bezeichnet man als Sekundärmetabolite. Dabei handelt es sich oft um Farb-, Geschmacks- oder Geruchsstoffe bzw. auch um Abwehrstoffe, die gegen bestimmte Fressfeinde und Schädlinge vom Organismus produziert werden. Ihr Vorkommen ist häufig auf eine bestimmte Gattung oder Art beschränkt. Sekundärmetabolite besitzen oft antibakterielle, antifungische oder cytotoxische Wirkungen, wodurch sie für die Entwicklung neuer Medikamente oder Therapiemöglichkeiten in der Medizin bzw. im Pflanzenschutz interessant werden.

Trotz der großen strukturellen Vielfalt der Sekundärmetabolite werden sie ausgehend von nur wenigen wichtigen Primärmetaboliten gebildet. Dabei spielen in Pilzen vor allem der Shikimat- und der Acetat-Malonat-Weg bei der Biosynthese der zahlreichen Verbindungen eine Rolle.

#### 1.1 Shikimatweg

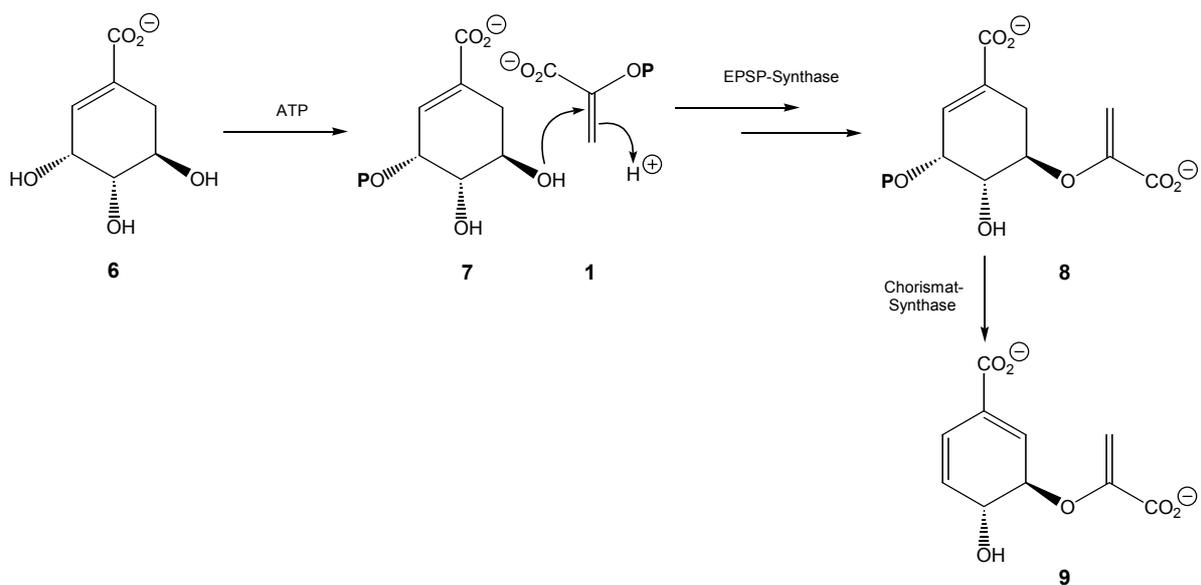
L-Tryptophan (**18**), ein Biosynthesevorläufer für einige in dieser Arbeit isolierte und aufgeklärte Naturstoffe, entsteht ebenso wie die aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin (**21**) und L-Tyrosin (**23**) über den Shikimatweg.<sup>[1,2]</sup> Dieser ist nach der Shikimisäure benannt, die erstmals in den Früchten des Sternanisbaumes (*Illicium religiosum*) gefunden wurde und einen wichtigen Baustein in der mehrfach verzweigten Biosynthesekette darstellt.<sup>[3]</sup>

Phosphoenolpyruvat (PEP, **1**) und Erythrose-4-phosphat (**2**), die Grundbausteine des Shikimatweges, werden aus Glucose gebildet. **1** und **2** reagieren aldolartig unter Enzymkatalyse (DAHP-Synthase) zum 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP, **3**).<sup>[4,5]</sup> In einer mehrstufigen Sequenz wird **3** durch Oxidation der 5-OH-Gruppe, Eliminierung von Phosphorsäure und intramolekulare Aldolreaktion zu 3-Dehydrochinat (**4**) umgewandelt.<sup>[6,7]</sup> Anschließend entsteht aus **4** durch Wasserabspaltung die 3-Dehydroshikimisäure (**5**),<sup>[8]</sup> die durch die Shikimat-Dehydrogenase zum Shikimat (**6**) reduziert wird.<sup>[9]</sup> Dabei benötigt die Shikimat-Dehydrogenase NADPH als Cofaktor.



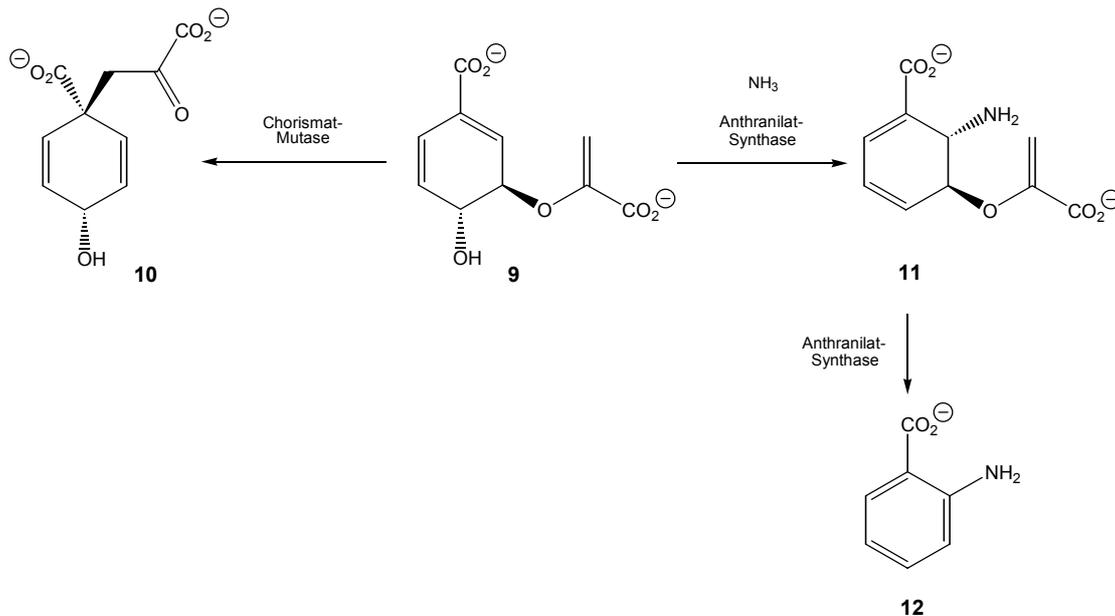
**Abb. 1.** Biosynthese von Shikimat (6)

ATP-katalysierte Phosphorylierung in 3-Position des Shikimats (6) zum Zwischenprodukt 7 und anschließende Reaktion von Phosphoenolpyruvat (1) mit der 5-OH-Gruppe in 7 unter Eliminierung von Phosphorsäure führt zu 5-Enolpyruvyl-shikimat-3-phosphat (EPSP, 8). Mit Hilfe der Chorismat-Synthase wird aus 8 durch Abspaltung des Phosphatrestes in 3-Stellung Chorismat (9), ein wichtiger Verzweigungspunkt in der Biosynthese, gebildet.<sup>[10-13]</sup>



**Abb. 2.** Entstehung von Chorismat (9)

Aus Chorismat (**9**) kann nun zum einen in einer durch die Chorismat-Mutase katalysierten Claisen-Umlagerung Prephenat (**10**) entstehen,<sup>[11-13]</sup> das Ausgangspunkt für die Bildung von L-Phenylalanin (**21**) und L-Tyrosin (**23**) ist. Zum anderen wird aus **9** durch Reaktion mit Ammoniak und anschließender Abspaltung des Pyruvat-Restes Anthranilat (**12**), der Biosynthesevorläufer von L-Tryptophan (**18**), gebildet. Dabei wird mit Hilfe der Anthranilat-Synthase der benötigte Ammoniak aus L-Glutamin freigesetzt.<sup>[14-18]</sup>



**Abb. 3.** Verzweigung des Biosyntheseweges zum Prephenat (**10**) und Anthranilat (**12**)

### 1.1.1 Biosynthese von L-Tryptophan (**18**)

Unter Katalyse durch Anthranilat-Phosphoribosyl-Transferase reagiert das Anthranilat (**12**) in einer  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit 5'-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat zum *N*-Ribosid **13**. Mit Hilfe der Phosphoribosyl-Anthranilat-Synthase entsteht aus **13** durch eine Amadori-Umlagerung 1-[(2-Carboxyphenyl)amino]-1-desoxy-D-ribulose-5-phosphat (**14**).<sup>[19-22]</sup> Anschließende Cyclisierung unter Verlust von  $\text{CO}_2$  und Wasser führt zum 3'-Indolylglycerin-3-phosphat (IGP, **15**), das durch die Tryptophan-Synthase in Indol (**16**) und Glycerinaldehyd-3-phosphat gespalten wird. Ebenfalls unter Katalyse durch die Tryptophan-Synthase wird Indol (**16**) mit L-Serin (**17**) zum L-Tryptophan (**18**) umgesetzt.<sup>[23-25]</sup>

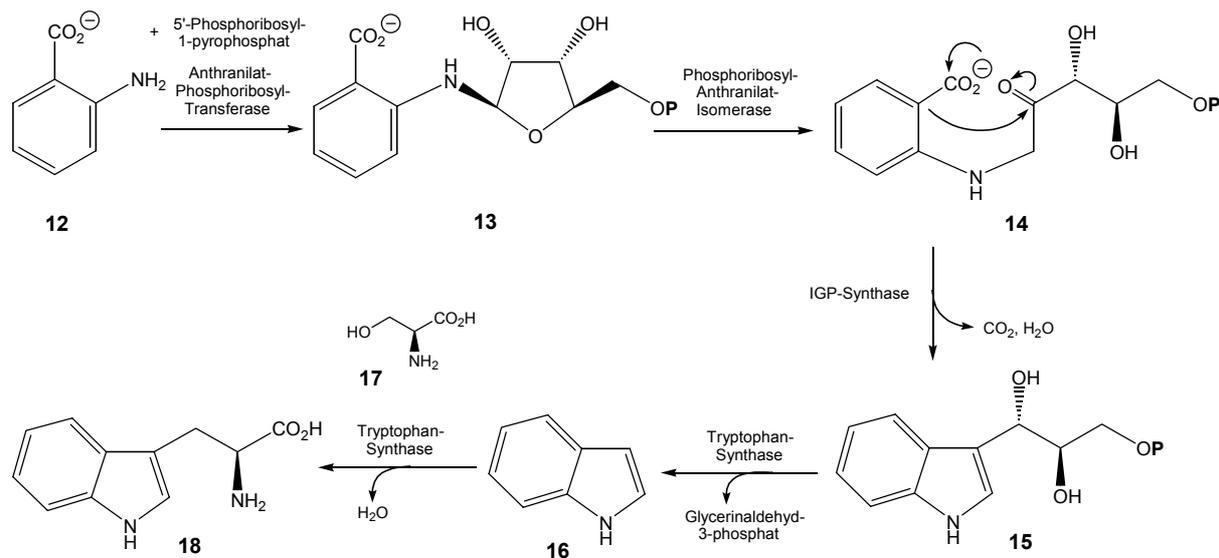
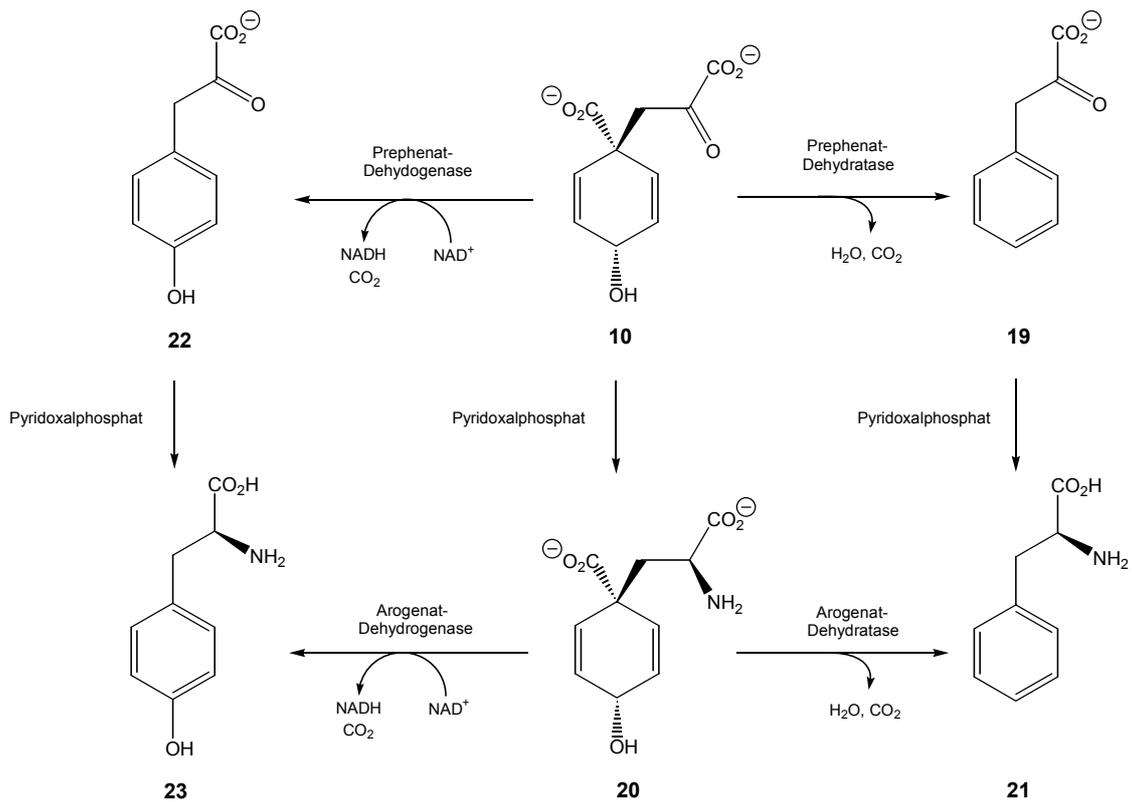


Abb. 4. Biosynthese von L-Tryptophan (18)

### 1.1.2 Biosynthese von L-Phenylalanin (21) und L-Tyrosin (23)

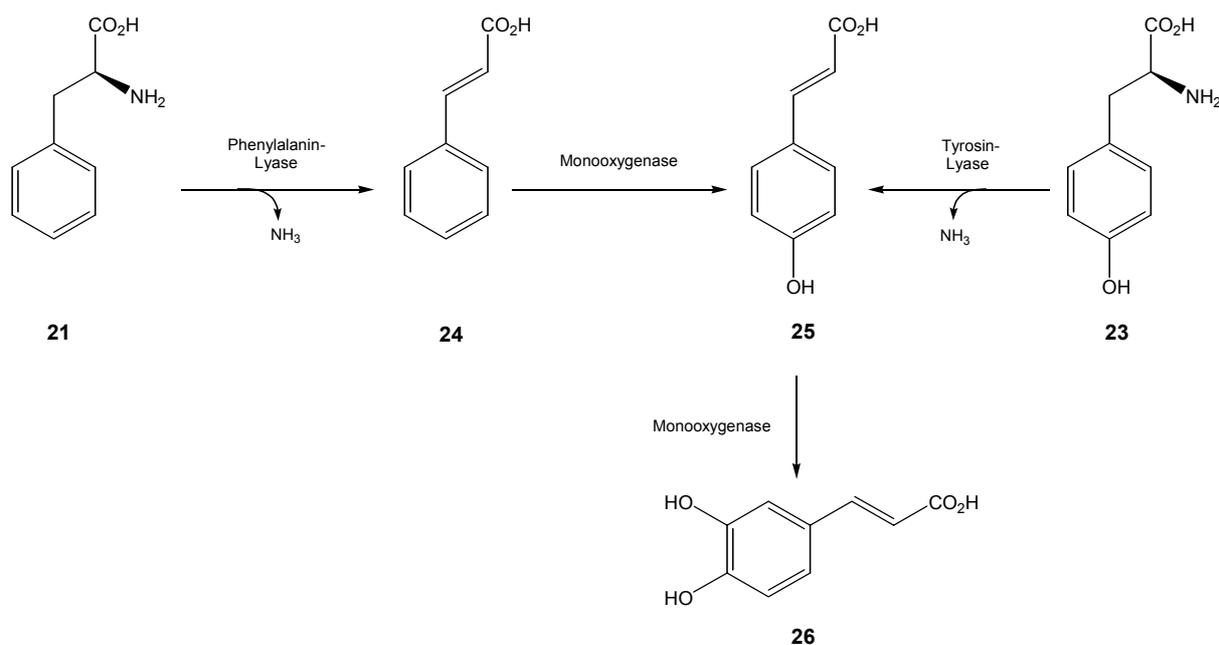
Wie bereits erwähnt, ist Prephenat (**10**) die Ausgangsverbindung für die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin (**21**) und L-Tyrosin (**23**). Dabei sind die nachfolgenden Syntheseschritte vom jeweiligen Organismus abhängig und können variieren. L-Phenylalanin (**21**) entsteht entweder aus Phenylpyruvat (**19**) durch Transaminierung mit Hilfe von Pyridoxalphosphat (PLP) oder aus Arogenat (**20**) unter Verlust von CO<sub>2</sub> und Wasser. Phenylpyruvat (**19**) wird unter katalytischem Einfluss der Prephenat-Dehydratase aus Prephenat (**10**) durch Decarboxylierung und Wasserabspaltung gebildet.<sup>[26]</sup> Arogenat (**20**) erhält man durch Transaminierung von **10** in Gegenwart von Pyridoxalphosphat.

Zur Darstellung von L-Tyrosin (**23**) wird **10** zuerst durch die NAD<sup>+</sup>-abhängige Prephenat-Dehydrogenase zum 4-Hydroxyphenylpyruvat (**22**) umgeformt. Dann erfolgt auch hier Übertragung einer Aminogruppe aus Glutamin auf **22** unter Bildung von L-Tyrosin (**23**). Alternativ kann **23** wie L-Phenylalanin (**21**) ebenfalls aus Arogenat (**20**) mit Hilfe der Arogenat-Dehydrogenase unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung entstehen.<sup>[27]</sup>



**Abb. 5.** Biosynthese von L-Phenylalanin (21) und L-Tyrosin (23) aus Prephenat (10)

L-Phenylalanin (21) und L-Tyrosin (23) selbst stellen ebenfalls biosynthetische Vorläufer für verschiedene Naturstoffe dar. So entsteht aus 21 durch Eliminierung von Ammoniak Zimtsäure (24), die weiter zur 4-Hydroxymzimtsäure (25) umgesetzt wird. 25 kann außerdem aus L-Tyrosin (23) unter Katalyse der Tyrosin-Ammonium-Lyase gebildet werden. Durch Hydroxylierung in 3-Position reagiert 25 dann weiter zur Kaffeesäure (26).<sup>[28]</sup>



**Abb. 6.** Biosynthese von Zimtsäure (**24**), 4-Hydroxizimtsäure (**25**) und Kaffeesäure (**26**)

Die Kaffeesäure (**26**) wird als möglicher Biosynthesevorläufer verschiedener, aus Lebermoosen isolierter Naphthalin-Derivate diskutiert, die in dieser Arbeit noch ausführlicher beschrieben werden (Kapitel 3.7.2).

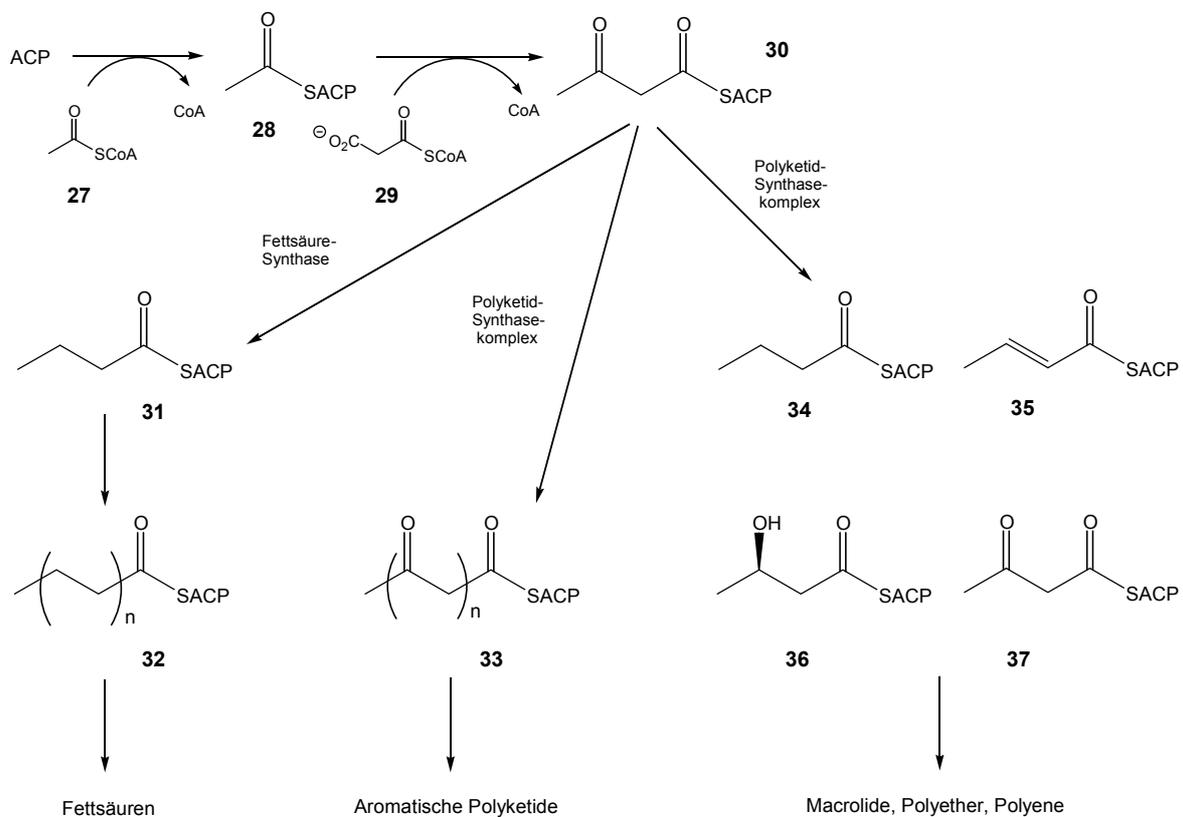
## 1.2 Acetat-Malonat-Weg

Der Acetat-Malonat-Weg besitzt hauptsächlich in Niederen Pilzen große Bedeutung für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten. In Höheren Pilzen findet man vor allem in den auf Holz lebenden Gattungen *Daldinia*, *Bulgaria* und *Hypoxyton* Naturstoffe, die als Polyketide bezeichnet werden und sich vom Acetat-Malonat-Weg ableiten.<sup>[29]</sup>

Polyketide entstehen ebenso wie Fettsäuren aus Acetat-Einheiten.<sup>[30]</sup> Zuerst kommt es zur Bildung von Malonyl-Coenzym A (**29**) aus Acetyl-Coenzym A (**27**) und  $\text{CO}_2$  mit Hilfe von Biotin.<sup>[31]</sup> Dann werden die Acylreste von **27** und **29** auf das Acyl-Carrier-Protein (ACP) übertragen. Unter Decarboxylierung entsteht Acetoacetyl-ACP (**30**), Verzweigungspunkt von Fettsäure- und Polyketid-Biosynthese. In der weiteren Fettsäuresynthese werden die  $\beta$ -Keto-Funktionen zu Methylene-Gruppen reduziert. Wiederholte Angriffe von Malonyl-ACP und nachfolgende Reduktionen führen schließlich zu den Fettsäuren.

In der Polyketidsynthese können die Kettenverlängerungen ohne Reduktion der  $\beta$ -Keto-Gruppen stattfinden. Durch Ringschlussreaktionen und Enolisierungen werden diese Poly- $\beta$ -Carbonyl-Verbindungen u. a. zu aromatischen Polyketiden umgeformt. Phenolische Sekundärmetabolite, die über den Acetat-Malonat-Weg entstehen, besitzen im Unterschied zu den vom Shikimatweg abgeleiteten Naturstoffen ein *meta*-Hydroxysubstitutionsmuster.

Durch vollständige, teilweise bzw. auch ohne Reduktion werden Verbindungen mit Methylen-, Hydroxyl- und Ketogruppen sowie Doppelbindungen gebildet, die zu Macroliden, Polyethern und Polyenen führen.<sup>[32,33]</sup>



**Abb. 7.** Bildung von Fettsäuren und Polyketiden

## 2 Biosynthese ausgewählter Aminosäuren

### 2.1 Glycin (44)

Die Biosynthese von Glycin (44) geht von 3-Phosphoglycerat (38), einem Glykolyseintermediat, aus. Umwandlung der 2-Hydroxy-Gruppe in 38 zum Keton führt zu 3-Phosphohydroxypyruvat (39). Transaminierung von 39 ergibt Phosphoserin (40), das zum Serin (41) hydrolysiert wird.

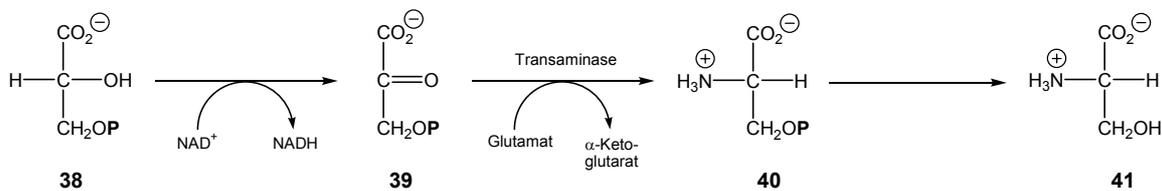


Abb. 8. Bildung von Serin (41)

Glycin (44) entsteht dann mit Hilfe der Serin-Hydroxymethyl-Transferase direkt aus 41. Dabei wird auch  $N^5,N^{10}$ -Methylen-Tetrahydrofolat (43) gebildet, das wiederum durch Kondensation mit  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_4^+$  unter Beteiligung der Glycin-Synthase zur Darstellung von Glycin (44) führt. 43 dient dabei als Donator für  $\text{C}_1$ -Einheiten.<sup>[34]</sup>

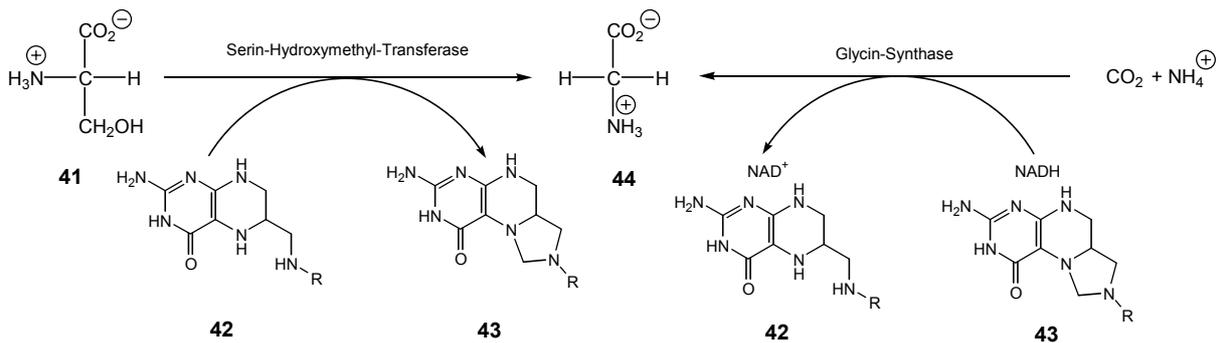
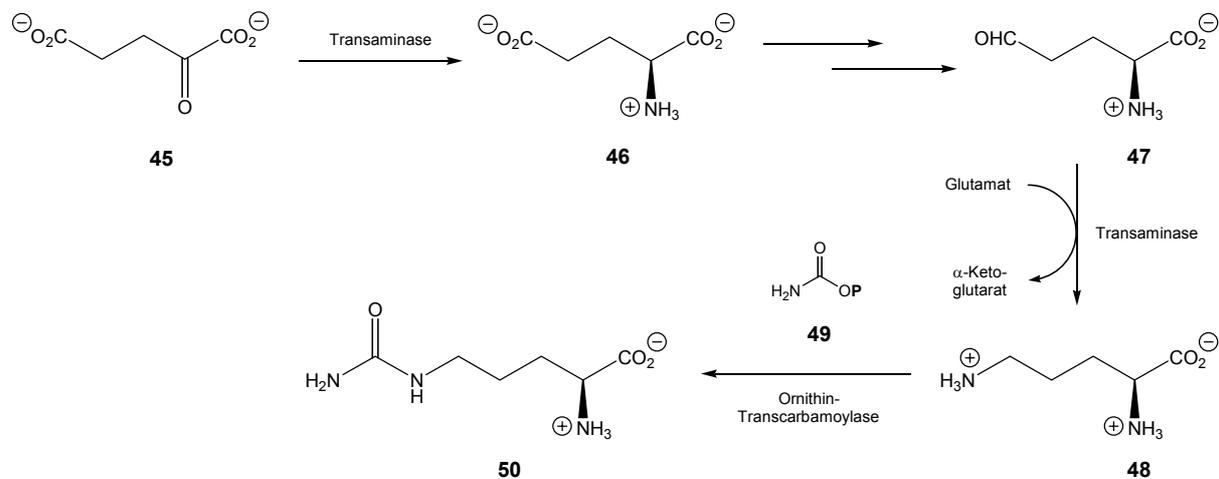


Abb. 9. Biosynthese von Glycin (44)

## 2.2 Arginin (54)

Ausgangspunkt der Biosynthese zum Arginin (**54**) ist  $\alpha$ -Ketoglutarat (**45**). In einer einstufigen Transaminierung entsteht aus **45** Glutamat (**46**), das zunächst durch Reaktion mit ATP aktiviert wird. Das instabile Glutamat-5-phosphat, das bisher nicht isoliert werden konnte, reagiert dann zum Glutamat-5-semialdehyd (**47**). **47** wird mit Hilfe der Ornithin- $\delta$ -Aminotransferase in Ornithin (**48**) umgewandelt. Aus **48** entsteht anschließend durch Übertragung einer Carbamoylgruppe aus Carbamoylphosphat (**49**) Citrullin (**50**).



**Abb. 10.** Entstehung von Citrullin (**50**)

Das entstehende Citrullin (**50**) kondensiert mit Aspartat (**51**) unter Katalyse durch die Argininosuccinat-Synthetase. Aus dem resultierenden Argininosuccinat (**52**) wird mit Hilfe der Argininosuccinase Fumarat (**53**) eliminiert und Arginin (**54**) gebildet.<sup>[34]</sup>

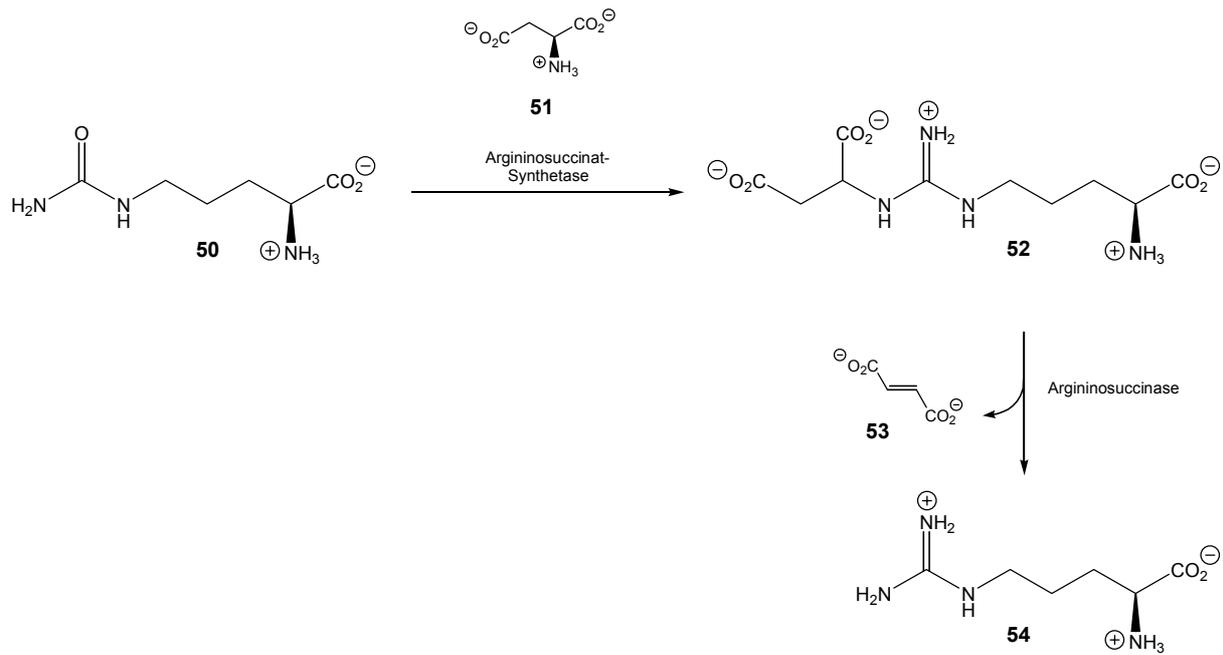


Abb. 11. Biosynthese von Arginin (54)

Arginin (54) dient u. a. als Vorstufe für die Erzeugung von Stickstoffmonoxid (56). Die Reaktion von 54 zu NO (56) und Citrullin (50) verläuft über ein enzymgebundenes Hydroxyarginin-Intermediat (55) und wird durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) katalysiert.

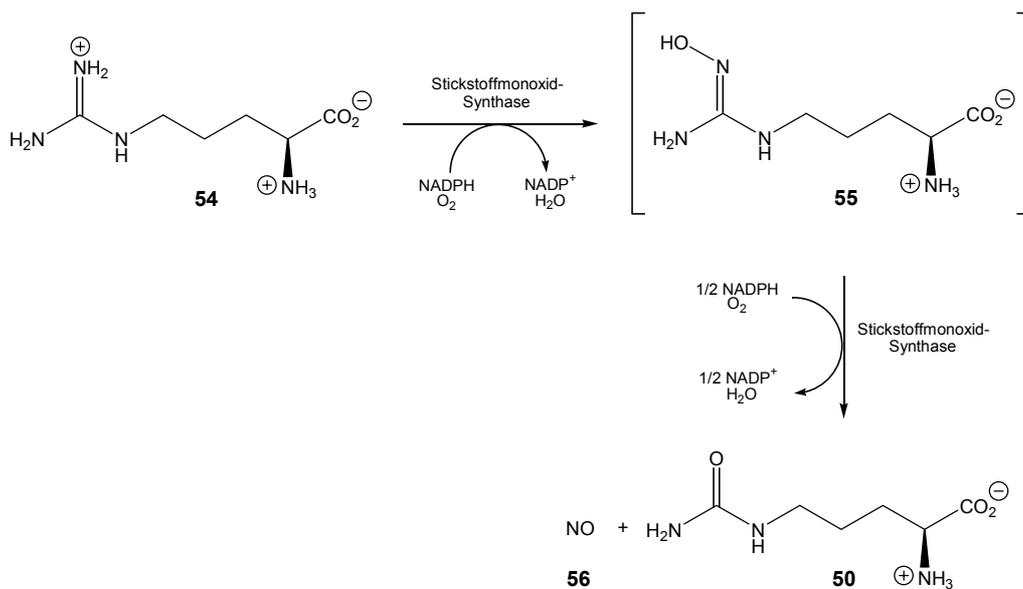


Abb. 12. Erzeugung von Stickstoffmonoxid (56)

---

Stickstoffmonoxid (**56**) verursacht Muskelrelaxation und daher Gefäßerweiterung im Körper. Auch die Schmerzlinderung durch Nitroglycerin bei Patienten mit Angina pectoris beruht auf der gefäßerweiternden Wirkung des freigesetzten Stickstoffmonoxids (**56**).<sup>[34]</sup>

### III Spezieller Teil

#### 3 *Austroboletus gracilis*

##### 3.1 Der Pilz

*Austroboletus gracilis* (Peck) Wolfe („Graceful Bolete“) findet man im Sommer und Herbst im Nordosten der Vereinigten Staaten von Amerika und in Japan sowohl unter Laub- als auch unter Nadelbäumen oft nur in einzelnen Exemplaren. Der Hut ist kastanien- bis rotbraun oder zimtfarben, gelegentlich auch gelbbraun und hat einen Durchmesser von 3–10 cm. Die Poren sind jung weiß, später dann rosa bis rosa-braun. Die Oberfläche der Sporen zeigt zerfurchte Strukturen, die eine Unterscheidung zur Gattung *Tylopilus* ermöglichen. Das weiß bis rosa farbene Fleisch hat einen milden bis herben, aber nicht bitteren Geschmack. Sowohl Fleisch als auch Poren zeigen keine Blau- oder Braunfärbung an Schnitt- und Druckstellen. Der Stiel ist fest, 7.5–18 cm lang und schlank im Verhältnis zum Hutdurchmesser. Er ist 6–10 mm dick mit einer erhöhten dunklen Netzzeichnung in der oberen Hälfte, die sich auch über den ganzen Stiel erstrecken kann.<sup>[35-37]</sup> An Fraßstellen am Stiel findet man oft eine gelbe Färbung. Der wenig bekannte Röhrenpilz nimmt aufgrund verschiedener Merkmale eine Sonderstellung in der Familie der *Boletaceae*, Ordnung *Boletales*, ein. Die Isolierung und Strukturaufklärung seiner Inhaltsstoffe ist von besonderem Interesse, da der Vergleich mit anderen, bereits bekannten Sekundärmetaboliten aus Arten der gleichen Ordnung oft neue Erkenntnisse über die Verwandtschaftsverhältnisse der Pilze untereinander liefert.



Abb. 13. *Austroboletus gracilis* (Peck) Wolfe<sup>[36,37]</sup>

### 3.2 Bisherige Arbeiten

In *Austroboletus gracilis* wurde bisher das Pigment Badion A (**57**) nachgewiesen,<sup>[29]</sup> das biosynthetisch wahrscheinlich durch [4+2]-Cycloaddition zweier Xerocomsäureeinheiten entsteht.<sup>[38]</sup> Die schwarzbraune Verbindung ist auch verantwortlich für die schokoladenbraune Hutfarbe des Maronenröhrlings (*Xerocomus badius* (Fr.) Kühner).<sup>[39,40]</sup>

Badion A (**57**) liegt im Pilz als Kaliumsalz vor. Anstelle von Kalium-Ionen können auch Cäsium-Ionen eingelagert werden. Die Fixierung von Cäsium-137 aus dem radioaktiven Fallout nach der Kernreaktorkatastrophe von Tschernobyl bedingte daher gerade beim Maronenröhrling eine erhöhte Radioaktivität.<sup>[41]</sup>

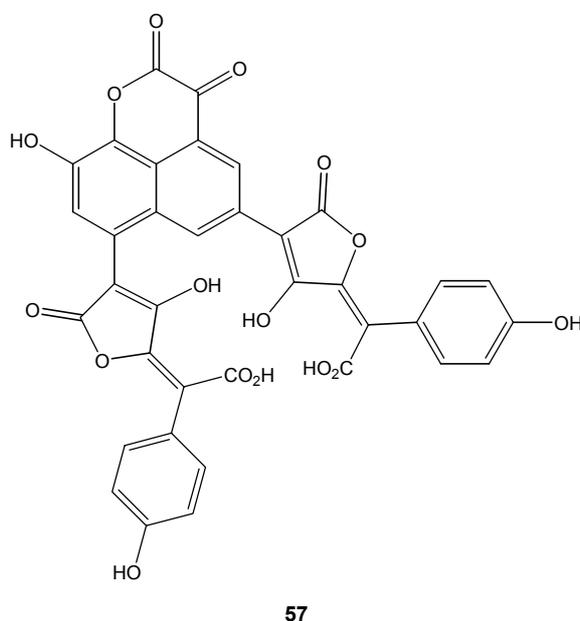


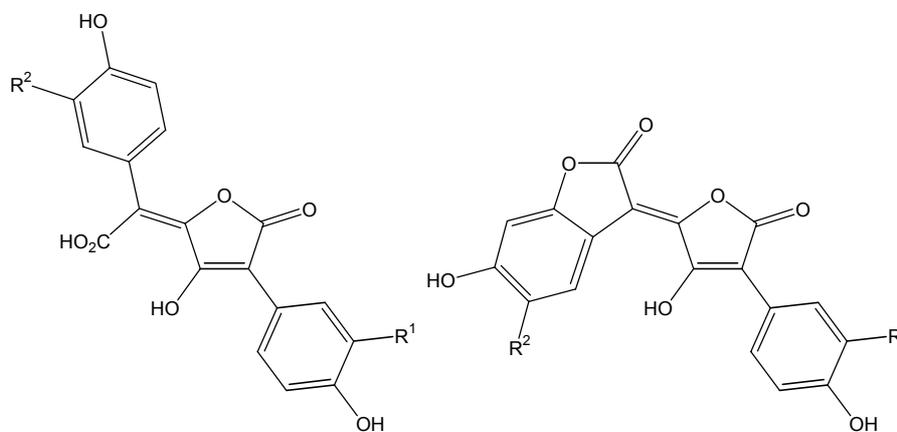
Abb. 14. Badion A (**57**)

### 3.3 Sekundärmetabolite aus Pilzen der Ordnung *Boletales*

Viele Inhaltsstoffe aus Pilzen der Ordnung *Boletales* können als charakteristisch innerhalb der Gattungen angesehen werden. Einige wichtige Verbindungsklassen sind die Pulvinsäurederivate, Grevilline, Terphenylchinone und Diarylcyclopentenone, die sich biosynthetisch vom Shikimatweg ableiten.<sup>[29]</sup> Andere, nicht weniger interessante Metabolite wie die Boletocrocine oder das Chalziporon (**67**), ein 2*H*-Azepin, entstehen auf dem Acetat-Malonat-Biosyntheseweg. Hier soll nur eine kleine Auswahl verschiedener *Boletales*-Inhaltsstoffe vorgestellt werden.

### 3.3.1 Pulvinsäurederivate

Die leuchtend roten und gelben Farben vieler Röhrlinge werden durch Hydroxypulvinsäuren und ihre Oxidationsprodukte hervorgerufen. Sie konnten unter anderem in den Gattungen *Boletus*, *Boletinus*, *Chalciporus*, *Gyrodon*, *Leccinum*, *Pulveroboletus*, *Suillus* und *Xerocomus* nachgewiesen werden.<sup>[29,42,43]</sup> Die wichtigsten Vertreter der Hydroxypulvinsäuren sind Atromentinsäure (**58**), Xerocomsäure (**59**), Isoxerocomsäure (**60**) und Variegatsäure (**61**). Die roten Pigmente Xerocomorubin (**62**) und Variegatorubin (**63**) entstehen durch Oxidation von **60** bzw. **61**.



$R^1, R^2 = H$ : Atromentinsäure (**58**)

$R^1 = OH, R^2 = H$ : Xerocomsäure (**59**)

$R^1 = H, R^2 = OH$ : Isoxerocomsäure (**60**)

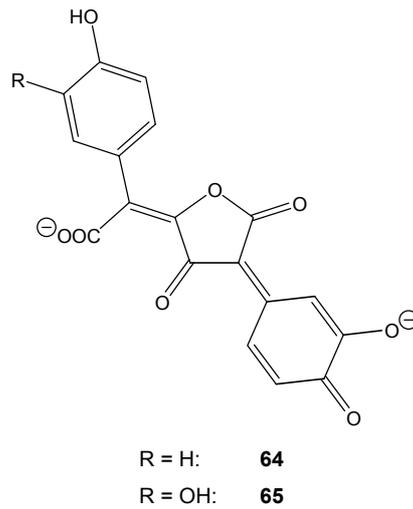
$R^1, R^2 = OH$ : Variegatsäure (**61**)

$R^1 = H, R^2 = OH$ : Xerocomorubin (**62**)

$R^1, R^2 = OH$ : Variegatorubin (**63**)

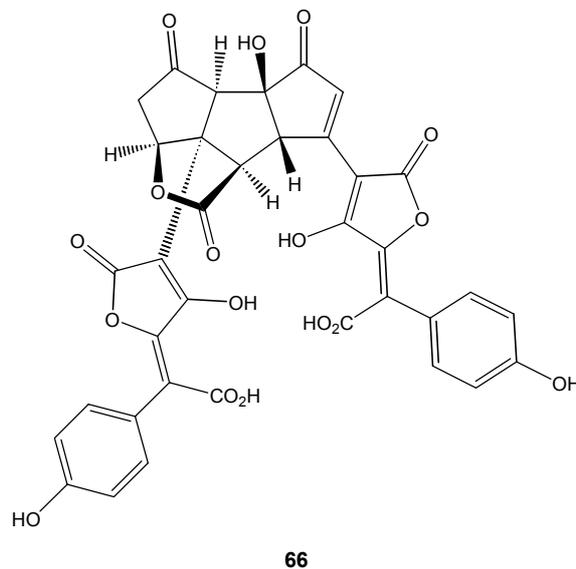
**Abb. 15.** Hydroxypulvinsäuren **58-61** und die Oxidationsprodukte **62** und **63**

Die oftmals beobachtete Blaufärbung der Fruchtkörper vieler *Boletales*-Arten bei Druck oder Verletzung, die beim *Austroboletus gracilis* jedoch nicht auftritt, wird ebenfalls durch Oxidation von Xerocom- (**59**) bzw. Variegatsäure (**61**) hervorgerufen. Hier kommt es unter Einwirkung von Enzymen zur Bildung von Hydroxychinonmethid-Dianionen **64** bzw. **65**.<sup>[44]</sup>



**Abb. 16.** Hydroxychinonmethid-Dianionen **64** und **65**

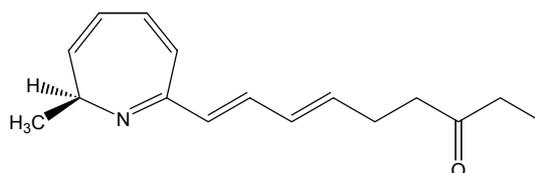
Beispielhaft für die strukturelle Vielfalt der Sekundärmetabolite aus *Boletales* sind die verschiedenen dimeren Pulvinsäurederivate, zu denen auch das bereits erwähnte Badion A (**57**) gehört. So findet man im Dickschaligen Kartoffelbovist (*Scleroderma citrinum*) und im Pfefferröhrling (*Chalciporus piperatus*) neben **57** und Norbadion A eine Sclerocitrin (**66**) genannte Verbindung, die eine ungewöhnliche Triquinan-Struktur aufweist. **66** stellt den Hauptinhaltsstoff von *S. citrinum* dar und entsteht aus zwei Einheiten Xerocomsäure (**59**).<sup>[45]</sup>



**Abb. 17.** Sclerocitrin (**66**)

### 3.3.2 Chalciporon (67)

Das bereits erwähnte Chalciporon (67) mit einer ungewöhnlichen 2*H*-Azepin-Struktur verursacht den scharfen Geschmack des Pfefferröhrlings (*Chalciporus piperatus*).<sup>[46]</sup> Umfangreiche Verfütterungsexperimente zeigten, dass 67 biosynthetisch aus Bausteinen des Polyketidweges und L-Alanin entsteht.<sup>[47]</sup>

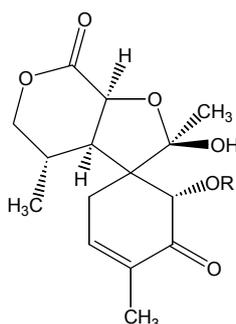


67

**Abb. 18.** Chalciporon (67)

### 3.3.3 Calopine

Ebenfalls zu den Geschmacksstoffen gehören die in den Röhrlingen *B. coniferarum*, *B. radicans* und *B. calopus* vorkommenden Calopine. Besonders Cyclocalopin A (68) und *O*-Acetylcyclocalopin A (69) verursachen den bitteren Geschmack der Fruchtkörper. Trotz umfangreicher Untersuchungen ist die Biosynthese der Calopine noch ungeklärt. Diskutiert wird aufgrund der Anzahl der Kohlenstoffe und des Substitutionsmusters die Entstehung über einen terpenoiden Biosyntheseweg.<sup>[48-51]</sup>

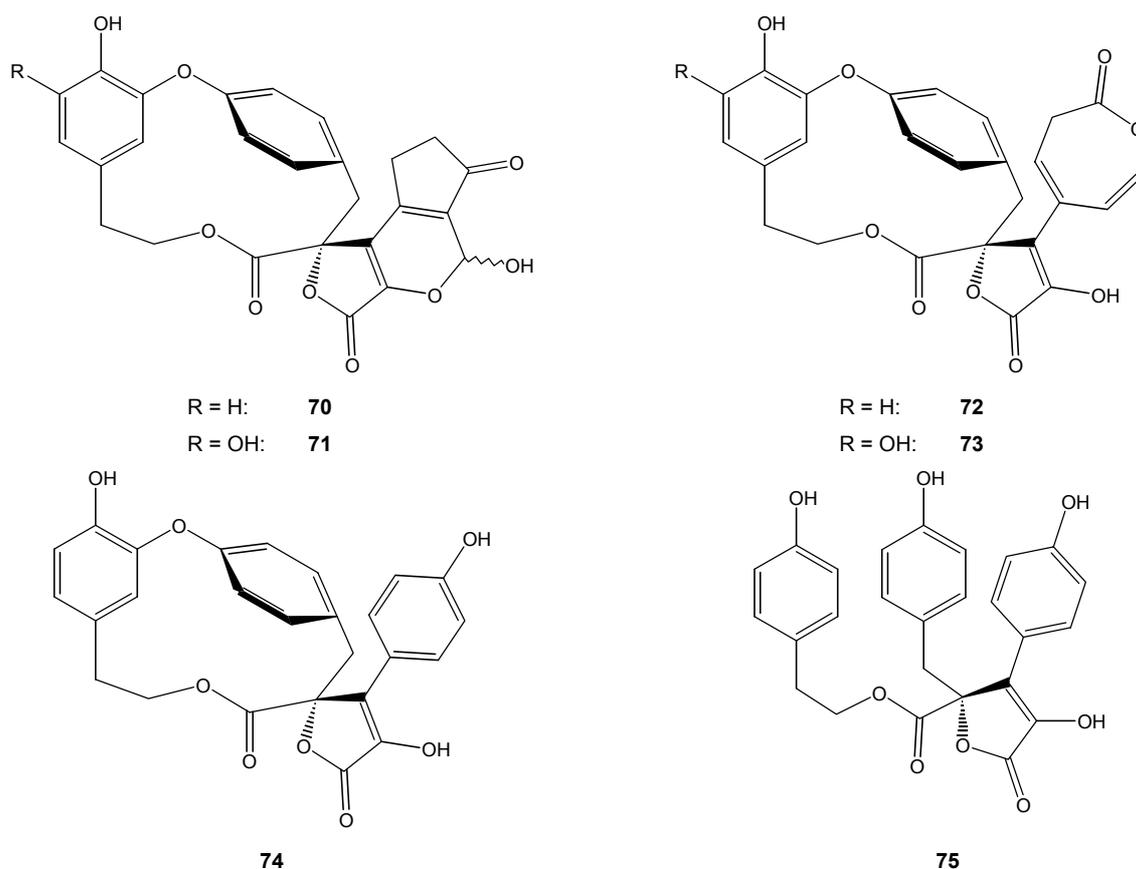


R = H: Cyclocalopin A (68)

R = Ac: *O*-Acetylcyclocalopin A (69)**Abb. 19.** Cyclocalopin A (68) und *O*-Acetylcyclocalopin A (69)

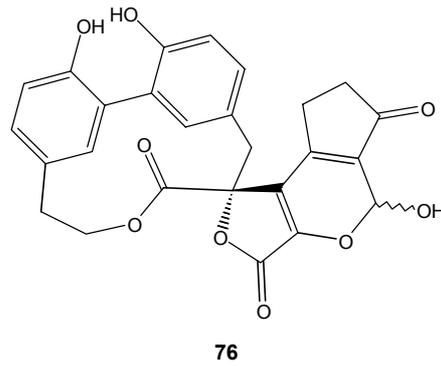
### 3.3.4 Retipolide

Aus den ebenfalls bitter schmeckenden Röhrlingen *Boletus ornatipes* und *B. retipes* wurden die ungewöhnlichen Retipolide A-E (**70-74**) und der mögliche biosynthetische Vorläufer *seco*-Retipolid E (**75**) isoliert, die auch für die gelbe Farbe der Fruchtkörper verantwortlich sind.<sup>[52-54]</sup> Die instabile Macrolacton-Einheit erschwerte die Strukturaufklärung, die erst Justus<sup>[54]</sup> mit Hilfe von Derivatisierungen gelang.



**Abb. 20.** Retipolide A (**70**), B (**71**), C (**72**), D (**73**), E (**74**) und *seco*-Retipolid E (**75**)

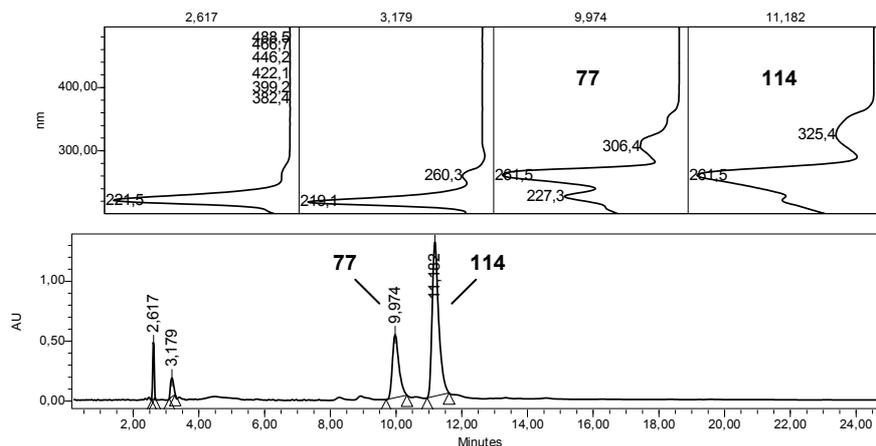
Hellwig<sup>[49]</sup> führte chemotaxonomische Untersuchungen durch, die eine Unterscheidung der beiden morphologisch sehr ähnlichen Arten ermöglichen sollte. Die dabei isolierte blassgelbe Nebenverbindung **76** konnte von Gruber<sup>[55]</sup> in ihrer Struktur aufgeklärt werden und ist als chemotaxonomisches Unterscheidungsmerkmal zu werten.



**Abb. 21.** Isoretipolid A (76)

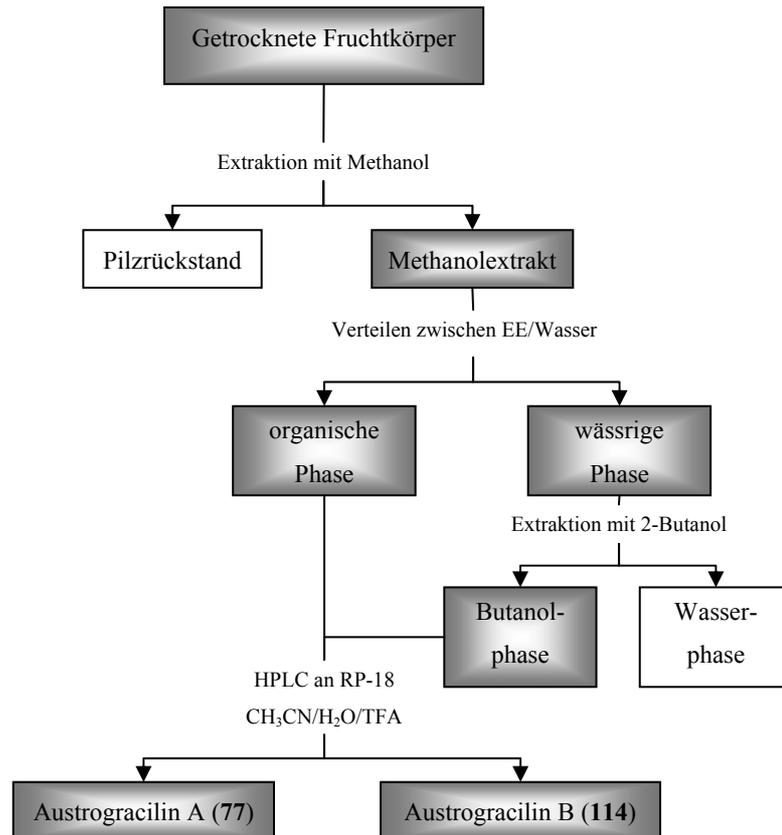
### 3.4 Aufarbeitung und Isolierung

Die im Rahmen mehrerer Exkursionen im Zeitraum von 1994 bis 1999 im Osten der USA gesammelten luftgetrockneten Fruchtkörper werden zuerst mit Petrolether entfettet und dann erschöpfend mit Methanol extrahiert. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und verteilt den braunen Rückstand zwischen Wasser und Essigsäureethylester. Anschließend wird die Wasserphase mit 2-Butanol extrahiert. Man engt die organischen Phasen bis zur Trockene ein und untersucht die Rückstände mittels analytischer HPLC an RP-18.



**Abb. 22.** HPL-Chromatogramm der EE-Phase (System 1)

Zur Gewinnung der beiden im HPL-Chromatogramm der EE-Phase erkennbaren Hauptinhaltsstoffe wird eine Trennung an der präparativen HPLC durchgeführt. Man erhält die Austrogracilin A (77) und B (114) genannten Verbindungen in reiner Form.



**Abb. 23.** Isolierung von Austrogracilin A (77) und B (114)

### 3.5 Austrogracilin A (77)

#### 3.5.1 Struktur von Austrogracilin A (77)

Austrogracilin A (77) fällt nach dem Lyophilisieren als farbloser Feststoff an, der gut in Methanol und DMSO löslich ist. Beim Stehen an Luft nimmt 77 allmählich eine gelbliche Färbung an, was auf eine Oxidation des Naturstoffes hindeutet. Das UV/Vis-Spektrum von 77 zeigt Absorptionsmaxima bei 229, 266 und 307 nm.

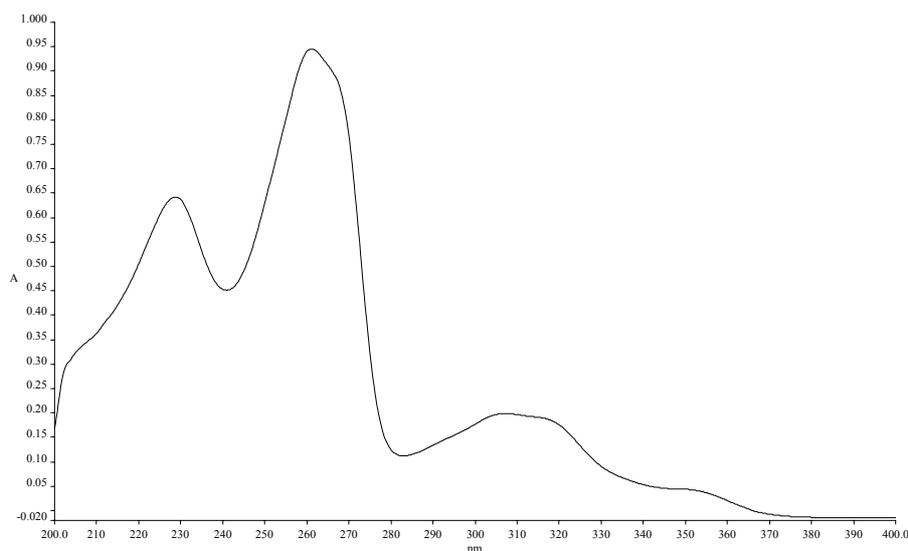


Abb. 24. UV/Vis-Spektrum in Methanol

Im IR beobachtet man neben einer für OH-Valenzschwingungen typischen Bande mit starker Intensität bei  $3392\text{ cm}^{-1}$  eine Carbonylbande bei  $1686\text{ cm}^{-1}$  und eine intensive Bande bei  $1243\text{ cm}^{-1}$ , charakteristisch für OH-Deformationsschwingungen.

Das hochaufgelöste EI-Massenspektrum zeigt einen Molekülpeak bei  $m/z = 220.0369$ , was einer Summenformel von  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_5$  entspricht.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$  erkennt man ausschließlich Signale im Bereich aromatischer Protonen. Neben drei Singulets mit chemischen Verschiebungen von  $\delta_{\text{H}}$  7.19, 7.52 (br) und 7.88 (br) erscheint ein Dublett bei  $\delta_{\text{H}}$  7.20 mit einer Kopplungskonstante  $J$  von 1.4 Hz, was für eine Anordnung in *meta*-Position spricht.

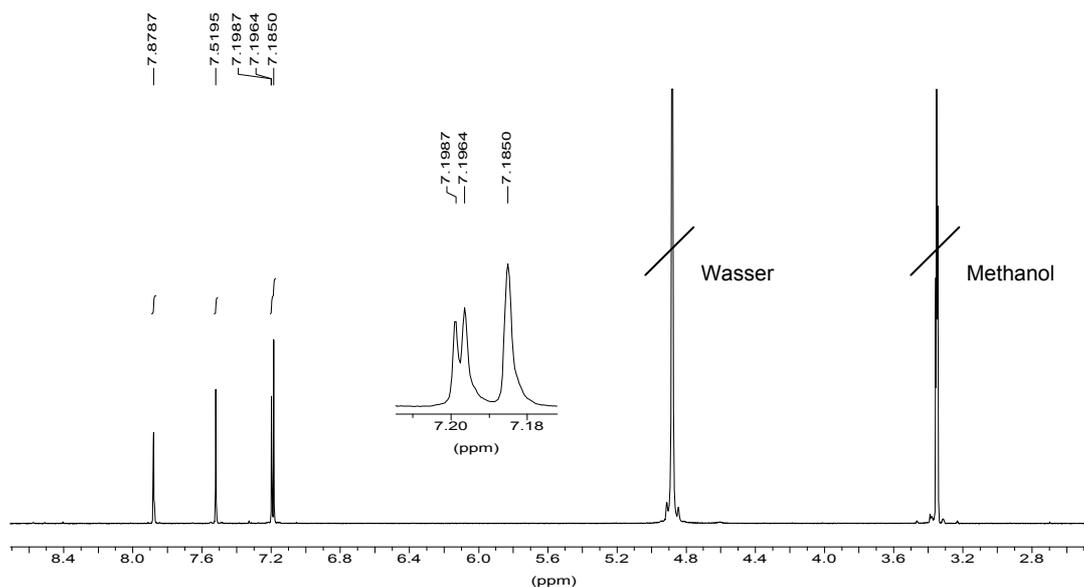
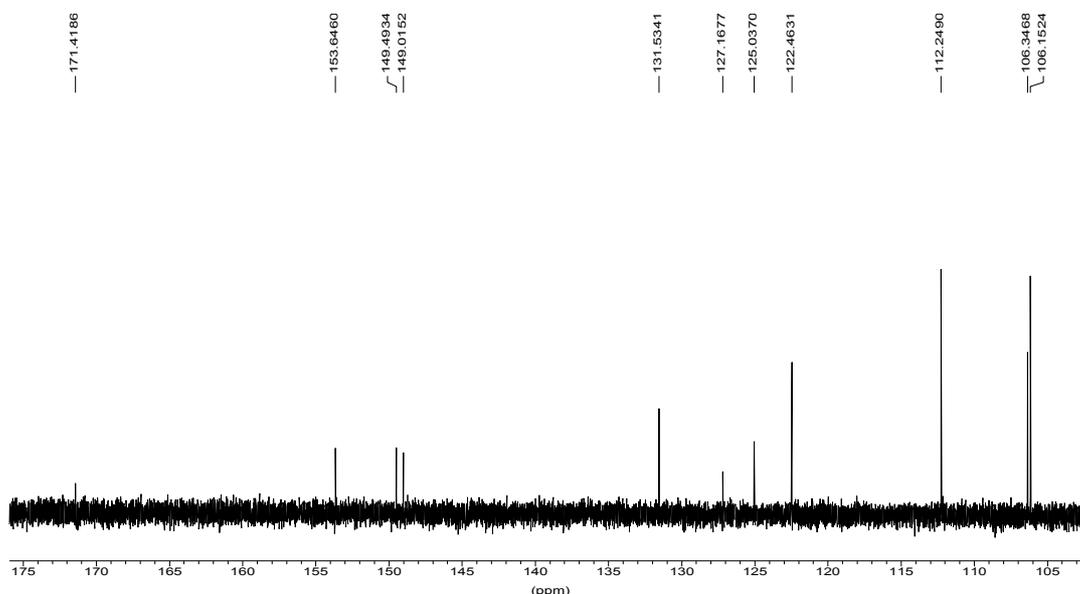


Abb. 25.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Austrogracilin A (77) (600 MHz,  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$ )

Durch Aufnahme eines ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )-COSY-Spektrums können nicht nur das Proton bei  $\delta_{\text{H}}$  7.88 als Kopplungspartner identifiziert, sondern noch weitere Fernkopplungen beobachtet werden, die die Verbreiterung der Singulettis bei  $\delta_{\text{H}}$  7.52 und 7.88 erklären.

Das  $^1\text{H}$ -breitbandenkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigt 11 Signale im Bereich von 100 bis 175 ppm, was sich mit der ermittelten Summenformel deckt. Neben den vier für aromatische CH-Gruppen typischen Signalen bei  $\delta_{\text{C}}$  106.2, 106.3, 112.2 und 122.5 erkennt man noch drei quartäre C-Atome bei  $\delta_{\text{C}}$  125.0, 127.2 und 131.5, die ebenfalls in den aromatisch-olefinischen Verschiebungsbereich fallen. Die bei  $\delta_{\text{C}}$  149.0, 149.5 und 153.6 detektierbaren Signale weisen auf entschirmte aromatische Kohlenstoff-Atome hin, wie das bei Verknüpfung mit Heteroatomen der Fall ist. Die deutliche Tieffeldverschiebung des C-Atoms bei  $\delta_{\text{C}}$  171.4 deutet auf eine Carboxy-Funktion im Naturstoff hin.



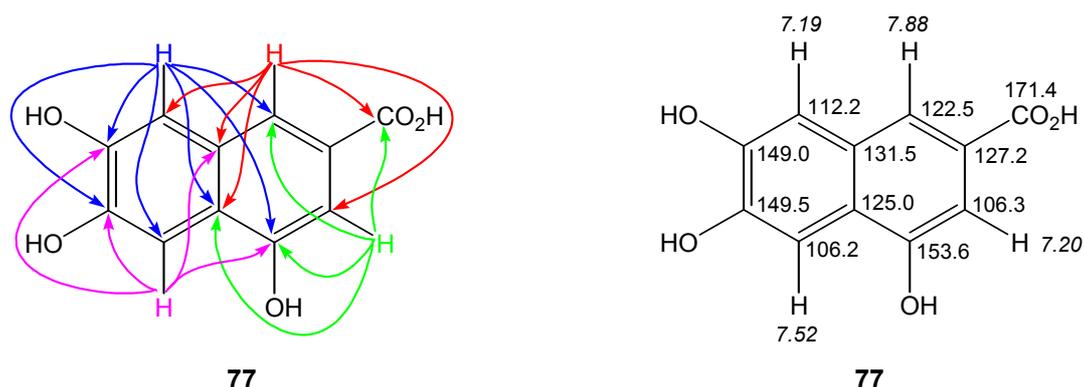
**Abb. 26.**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **77** (151 MHz,  $[\text{D}_4]$ Methanol)

Die Durchführung von HSQC- und HMBC-Experimenten ermöglicht die eindeutige Zuordnung der Protonen zu den entsprechenden Kohlenstoffatomen und liefert weitere Informationen über ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )-Korrelationen im Molekül. Die nachfolgende Tabelle enthält einen Überblick über die NMR-Daten von Austrogracilin A (**77**).

**Tab. 1.** NMR-Daten von **77** (600/151 MHz, [D<sub>4</sub>]Methanol)

$\delta_C$ [ppm]	Art	$\delta_H$ [ppm]	m	$J$ [Hz]	COSY	HMBC
					$\delta_H$ [ppm]	$\delta_H$ [ppm]
106.2	CH	7.52	s, br		7.19, 7.88	7.19
106.3	CH	7.20	d	1.4	7.88	7.88
112.2	CH	7.19	s		7.52, 7.88	7.88
122.5	CH	7.88	s, br		7.19, 7.20, 7.52	7.19, 7.20
125.0	C <sub>q</sub>					7.19, 7.20, 7.88
127.2	C <sub>q</sub>					
131.5	C <sub>q</sub>					7.52, 7.88
149.0	C <sub>q</sub>					7.19, 7.52
149.5	C <sub>q</sub>					7.19, 7.52
153.6	C <sub>q</sub>					7.19, 7.20, 7.52
171.4	CO <sub>2</sub> H					7.20, 7.88

Berücksichtigt man die ermittelte Summenformel und die in Tabelle 1 dargestellten NMR-Daten, so erkennt man, dass die aus *A. gracilis* isolierte Verbindung **77** die Struktur einer Naphthoesäure besitzt. Polarität und Lösungseigenschaften von Austrogracilin A (**77**) sowie die Tieffeldverschiebungen der C-Atome bei  $\delta_C$  149.0, 149.5 und 153.6 lassen auf Hydroxy-Substituenten schließen, so dass folgende Struktur vorgeschlagen werden kann:

**Abb. 27.** Struktur von Austrogracilin A (**77**) und HMBC-Korrelationen

Bestätigt wird dieser Vorschlag durch einen Kern-Overhauser-Effekt zwischen den Protonen bei  $\delta_H$  7.19 und 7.88, der bei Aufnahme eines NOESY-Spektrums zu beobachten ist.

Die erwähnte Gelbfärbung von Austrogracilin A (**77**) bei Einwirkung von Luft wird wahrscheinlich durch die Ausbildung eines chinoiden Systems durch Oxidation der Hydroxy-Gruppen in 4- und 6-Stellung hervorgerufen. Es wäre daher sinnvoll, die mögliche Verwendung von **77** als Antioxidans zu prüfen.

### **3.5.2 Strukturbeweis durch Synthese**

Zur endgültigen Bestätigung der vorgeschlagenen Struktur soll die 4,6,7-Trihydroxy-2-naphthoesäure (**77**) synthetisiert werden. Gleichzeitig erhält man dadurch ausreichend Material zur Durchführung verschiedener Tests, um eine eventuelle biologische Aktivität zu ermitteln. Da man in der Literatur bereits zahlreiche Naphthalin-Synthesen findet, werden hier zunächst einige vorgestellt.

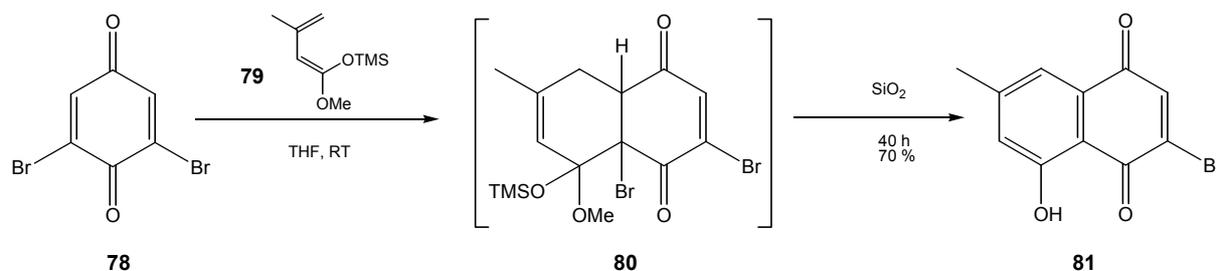
#### **3.5.2.1 Methoden zur Synthese substituierter Naphthaline**

Die unterschiedlichen Substitutionsmuster der zahlreichen Naturstoffe mit Naphthalin-Grundstruktur erforderten die Entwicklung verschiedener Synthesestrategien. Dabei unterscheidet man u.a. Diels-Alder-Cycloadditionen, Cyclisierungen unter Beteiligung von Übergangsmetallen und anionische Ringschlussreaktionen. Auf Methoden, die photochemische und thermische Cyclisierungen und Umlagerungen sowie Ringerweiterungen von Cyclopropanen und -butenonen beinhalten, wird hier nicht näher eingegangen. Ebenso sollen Reaktionen mit Phosphoryliden, wie intramolekulare Wittig- und intermolekulare Horner-Emmons-Reaktionen, die nur relativ selten für die Synthese von Naphthalin-Derivaten angewendet werden, aus diesem Kapitel ausgeklammert werden. Diese und weitere moderne Naphthalin-Synthesen werden in der Literatur ausführlich dargestellt.<sup>[56]</sup>

##### **3.5.2.1.1 Diels-Alder-Cycloadditionen**

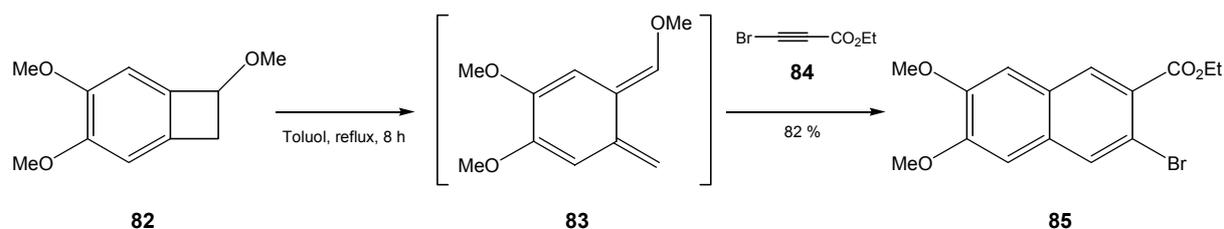
Diels-Alder-Reaktionen wurden sehr häufig zur Synthese von Naphthalinen und Naphthochinonen genutzt. Normalerweise ist die Bildung von mehr als einem Cycloaddukt bei der Verwendung unsymmetrischer Diene und Dienophile möglich, doch gibt es Beispiele mit einem hohen Grad an Regioselektivität.<sup>[57]</sup> So beschreiben Danishefsky<sup>[58]</sup> und Brassard<sup>[59]</sup> die Herstellung und Verwendung substituierter Diene, die bei der Addition an verschiedene Benzochinone regioselektiv zur Bildung jeweils eines Produktes führen.

Diese Methode findet vielfältige Anwendung, wie z. B. bei der Synthese der gegen HIV-wirksamen Michellamine A-C durch Bringmann et al.<sup>[60]</sup> Die Darstellung des Naphthochinons **81** gelingt durch Umsetzung des Benzochinons **78** mit dem unsymmetrischen Dien **79** und anschließende Eliminierung von HBr und Methanol in Gegenwart von Kieselgel in 70 % Ausbeute.



**Abb. 28.** Regioselektive Diels-Alder-Reaktion zum Naphthochinon **81**

Einen anderen Zugang zu substituierten Naphthalinen über Diels-Alder-Reaktionen bietet die Verwendung von *o*-Chinodimethanen als reaktive Intermediate.<sup>[61,62]</sup> Dabei kann das instabile *o*-Chinodimethan **83** aus Benzocyclobuten **82** *in situ* durch Erhitzen erzeugt werden. Die Reaktion mit dem Acetylen **84** und nachfolgende Eliminierung von Methanol liefert **85** in sehr guter Ausbeute.<sup>[63]</sup>



**Abb. 29.** Diels-Alder-Reaktion mit *o*-Chinodimethan **83**

Solche *o*-Chinodimethane und auch Derivate des Isobenzofurans sind ausgesprochen reaktive Diene, da bei der Cycloaddition das aromatische System wieder hergestellt wird.<sup>[64,65]</sup>

### 3.5.2.1.2 Metallorganische Methoden

Eine Reihe verschiedener Übergangsmetalle findet Anwendung bei der Synthese von Naphthalin-Derivaten. Stellvertretend werden hier nur einige Beispiele gezeigt.

Die am meisten genutzte Naphthalin-Synthese unter Beteiligung von Übergangsmetallen ist die Dötz-Reaktion. Dabei wird ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigter Chrom-Carben-Komplex, auch Fischer-Carben genannt, mit einem Alkin unter Komplexierung durch ein Chromzentrum verknüpft.<sup>[66]</sup> Als Primärprodukt erhält man den Chromtricarbonyl-Komplex eines Hydrochinon-Derivates, der sich problemlos unter Abspaltung des Chroms in ein Chinon- oder Hydrochinon-Derivat überführen lässt. Die Reaktionsbedingungen sind relativ mild, so dass zahlreiche funktionelle Gruppen die Reaktion nicht stören. Ein Austausch des Chroms gegen andere Metalle wie Molybdän, Wolfram oder Mangan erfordert im allgemeinen eine Verschärfung der Reaktionsbedingungen bzw. bewirkt eine Verringerung der Ausbeuten.<sup>[67]</sup>

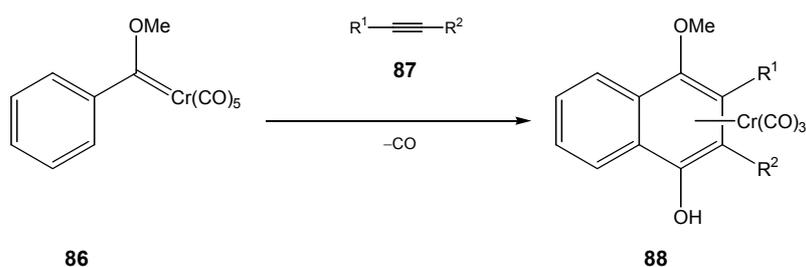
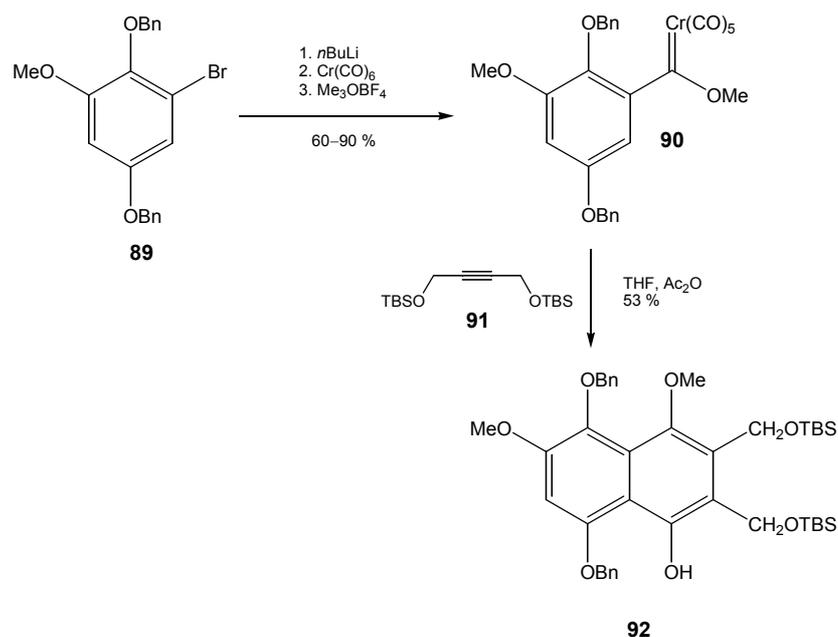


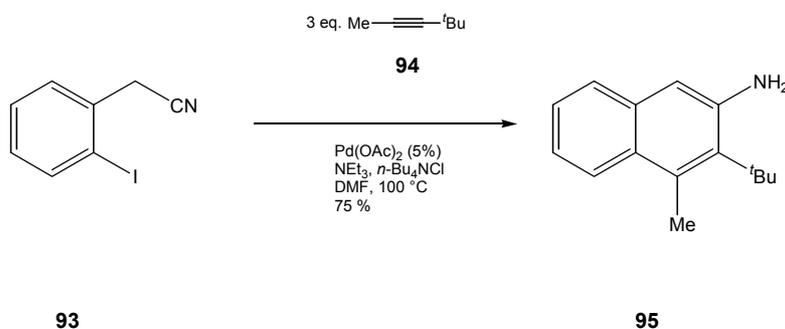
Abb. 30. Dötz-Reaktion

Verwendung findet die Dötz-Benzoanellierung z. B. bei der Synthese eines Vorläufers des Antibiotikums  $\gamma$ -Rubromycin.<sup>[68]</sup>



**Abb. 31.** Anwendung der Dötz-Benzoanellierung

Einen interessanten Weg zur Darstellung von substituierten 2-Aminonaphthalinen stellt die Arbeitsgruppe um Larock<sup>[69]</sup> vor. Dabei handelt es sich um die palladiumkatalysierte Umsetzung von Phenylacetonitrilen mit Alkinen.



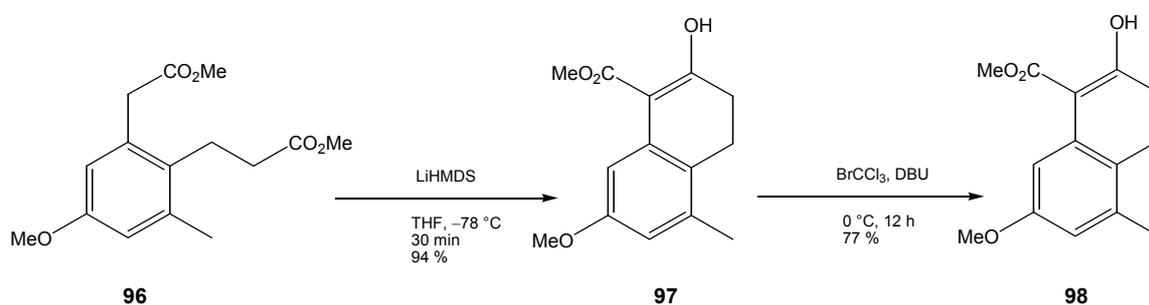
**Abb. 32.** Darstellung von 2-Aminonaphthalin **95**

Das resultierende 2-Aminonaphthalin **95** wird in guter Ausbeute erhalten.<sup>[69]</sup>

### 3.5.2.1.3 Baseninduzierte Cyclisierungen

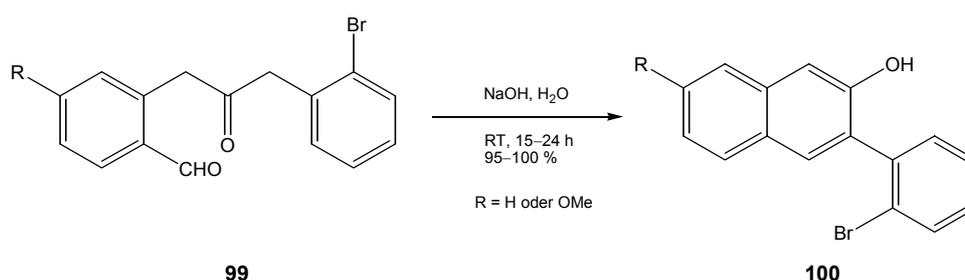
Ähnlich wie bei den bereits besprochenen Methoden gibt es auch hier zahlreiche Beispiele in der Literatur zur Darstellung substituierter Naphthaline. So synthetisieren Rucker und Brückner<sup>[70]</sup> einen Vorläufer **98** der Neocarzinostatine, die als Antitumor-Antibiotika Anwendung finden, über eine modifizierte Dieckmann-Kondensation. Während bei

Verwendung von Natriummethanolat keine Produktbildung zu beobachten ist, erhält man **97** bei Zusatz von Lithiumhexamethyldisilazid in guten Ausbeuten.



**Abb. 33.** Synthese von **98** über eine Dieckmann-Kondensation

Auch intramolekulare Aldolkondensationen stellen eine Möglichkeit dar, zu Naphthalin-Derivaten zu gelangen. Ausgegangen wird hierbei von den Benzaldehyden **99**.<sup>[71]</sup>

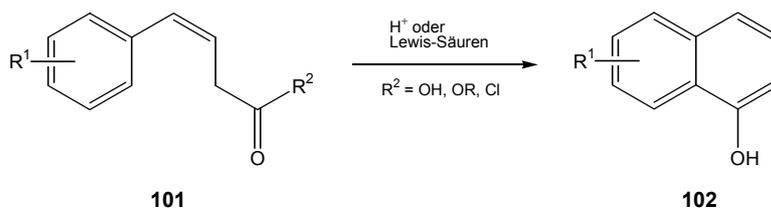


**Abb. 34.** Intramolekulare Aldolkondensation

### 3.5.2.2 Synthese von Austrogracilin A (**77**)

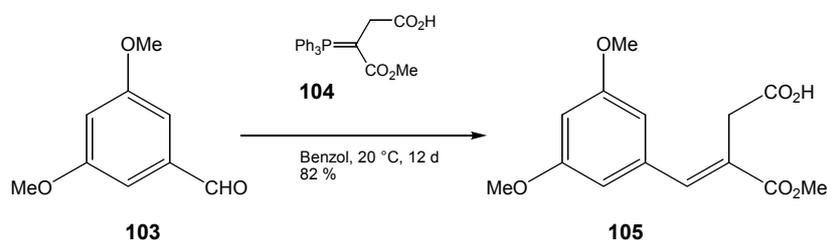
#### 3.5.2.2.1 Intramolekulare Friedel-Crafts-Acylierung

Bei der Synthese des aus *A. gracilis* isolierten Inhaltsstoffes **77** soll nun eine weitere wichtige, hier noch nicht erwähnte Methode Anwendung finden. Dabei handelt es sich um die intramolekulare Friedel-Crafts-Acylierung, bei der unter Einwirkung von Lewis- oder Protonensäuren aus dem aromatischen Vorläufer **101** das Naphthalin-Derivat **102** entsteht.



**Abb. 35.** Intramolekulare Friedel-Crafts-Acylierung

Zur Synthese geeigneter Vorläufer gibt es verschiedene Methoden. So gelingt es Greene et al.,<sup>[72]</sup> über eine Wittig-Reaktion die Carbonsäure **105** zu erhalten, die eine Vorstufe zum Pentamethylhypoxyxylon (siehe auch Kapitel 3.7.1) darstellt.



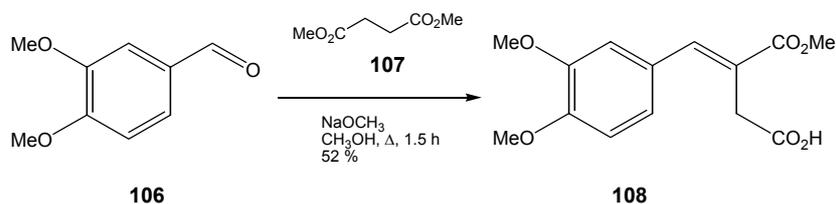
**Abb. 36.** Synthese von **105** über eine Wittig-Reaktion

Wittig-Reaktionen dieser Art werden auf Grund ihrer guten Ausbeuten als Ersatz für Stobbe-Kondensationen diskutiert, durch die man ebenfalls zu Friedel-Crafts-Vorläufern gelangt. Nachteilig wirkt sich die oft mehrtägige Reaktionsdauer aus, die wegen der thermischen Empfindlichkeit der Ylide durch Temperaturerhöhung nicht verkürzt werden kann.<sup>[73]</sup> Die Verwendung von Grignard-Reaktionen zur Darstellung weiterer Vorläufer wird ebenfalls beschrieben.<sup>[74,75]</sup>

### 3.5.2.2.2 Darstellung eines geeigneten Friedel-Crafts-Eduktes durch Stobbe-Kondensation

Für die Synthese von Austrogracilin A (**77**) wird vom käuflichen 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (**106**) ausgegangen, da hier bereits das notwendige Substitutionsmuster des einen aromatischen Ringes vorliegt. Nachdem eine Wittig-Reaktion analog der von Greene vorgestellten Methode (Abb. 36) nicht zum gewünschten Produkt führt, wird **106** in einer Stobbe-Kondensation mit Bernsteinsäuredimethylester (**107**) in Gegenwart von Natrium-

methanolat umgesetzt. Man erhält **108** nach Umkristallisation aus Methanol in kleinen gelben Prismen.<sup>[76]</sup>



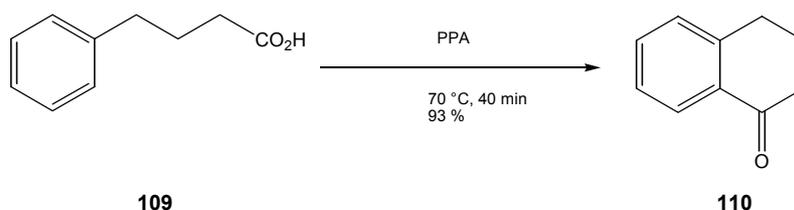
**Abb. 37.** Darstellung von **108** durch Stobbe-Kondensation

### 3.5.2.2.3 Cyclisierung zum Naphthalin-System

Für die anschließende Cyclisierung zum Naphthalin-Derivat kommen verschiedene Reagenzien in Frage. Bei der Durchführung der Friedel-Crafts-Acylierung unter klassischen Bedingungen werden Carbonsäurechloride bzw. -anhydride in Gegenwart von Lewis-Säuren wie Aluminiumchlorid eingesetzt. Die Herstellung und die für hohe Ausbeuten notwendige Reinheit des Säurechlorids als zusätzliche Reaktionsstufe sind Nachteile dieser Methode.<sup>[77]</sup> Außerdem verursacht Aluminiumchlorid häufig die Demethylierung von Phenolethern.<sup>[78]</sup> Da die an Luft zu beobachtende Gelbfärbung des natürlichen Austrogracilin A (**77**) jedoch auf eine Oxidationsempfindlichkeit hindeutet (siehe Kapitel 3.5.1), soll die Abspaltung der Methylgruppen erst im letzten Reaktionsschritt der Synthese erfolgen.

Ein weiteres Reagenz, bestehend aus einer Mischung aus konz. Schwefelsäure und 85-proz. Phosphorsäure, erweist sich ebenfalls als ungeeignet, da Esterspaltungen und Sulfonierungen als unerwünschte Nebenreaktionen auftreten können.<sup>[78]</sup>

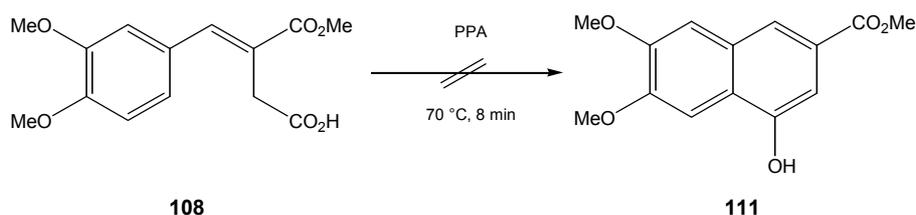
In der Literatur lassen sich zahlreiche Beispiele finden, in denen Polyphosphorsäure erfolgreich als Cyclisierungsreagenz verwendet wird. So gelingt Koo<sup>[78]</sup> die Cyclisierung von  $\gamma$ -Phenylbuttersäure (**109**) unter milden Bedingungen zum  $\alpha$ -Tetralon (**110**) in 93 % Ausbeute.



**Abb. 38.** Cyclisierung von  $\gamma$ -Phenylbuttersäure (**109**) mit PPA

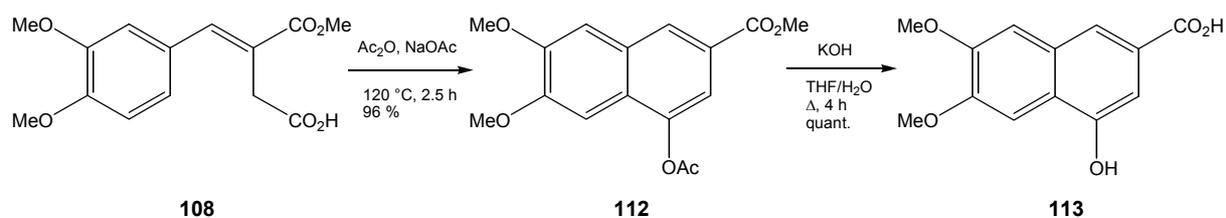
Die hygroskopische, sehr viskose Polyphosphorsäure ist ein gutes Lösungsmittel für sauerstoffhaltige organische Verbindungen und besitzt anders als die Schwefelsäure kaum Oxidationswirkung.<sup>[77]</sup>

In Anlehnung an obige Methode wird **108** unter Rühren in heiße PPA gegeben. Bereits nach wenigen Minuten beobachtet man einen Farbumschlag des Reaktionsgemisches von grün nach blau, woraufhin der Abbruch der Reaktion durch Zugabe von Eis erfolgt. Der erwartete Naphthoesäuremethylester **111** wird jedoch nicht erhalten.



**Abbildung 39.** Cyclisierungsversuch mit PPA

Auch Variation von Reaktionsdauer bzw. -temperatur führt nicht zum gewünschten Produkt. Der Versuch, **108** nach einer Methode von Ferrier und Tedder<sup>[79]</sup> mit einem Überschuss an Trifluoressigsäureanhydrid bei 60 °C zu cyclisieren, schlägt ebenfalls fehl. Schließlich gelingt der Ringschluss von **108** mit Acetanhydrid in Gegenwart von Natriumacetat bei 120 °C in 96 % Ausbeute zum 4-Acetoxy-6,7-dimethoxy-2-naphthoesäuremethylester (**112**).<sup>[80]</sup> Durch anschließende Verseifung mit Kaliumhydroxid in THF/Wasser erhält man quantitativ die freie Naphthoesäure **113**.

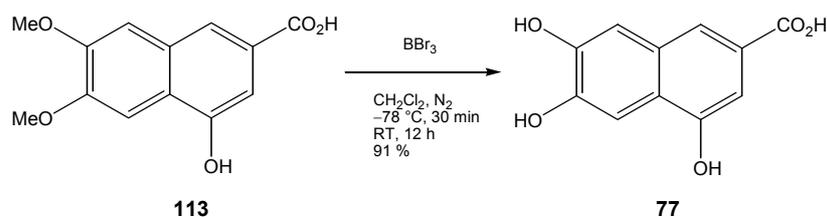


**Abb. 40.** Synthese der Naphthoesäure **113**

### 3.5.2.2.4 Entschützung zum Austrogracilin A (77)

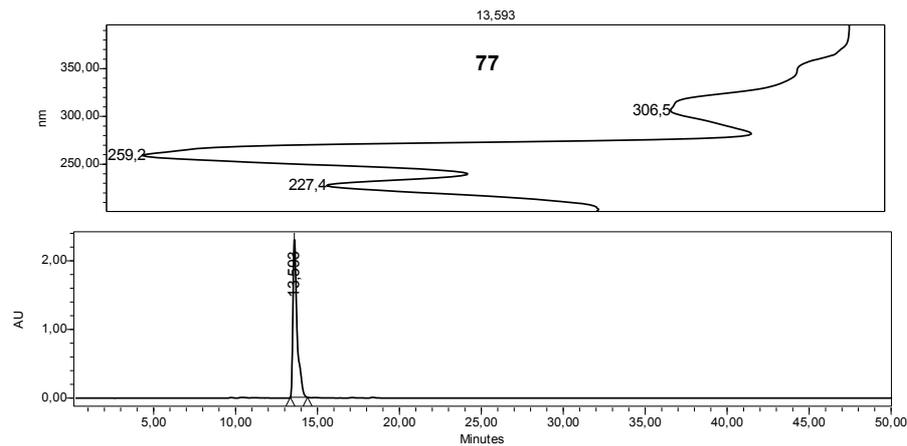
Wie bereits erwähnt, wird nun die Spaltung der Methylether als letzter Schritt in der Synthesesequenz vorgesehen. Typische Reagenzien dafür sind Lewis-Säuren, wobei sich Bortribromid als besonders effektiv in der Spaltung phenolischer Methylether erweist und gegenüber Reagenzien wie Trimethylsilyliodid vorzuziehen ist.<sup>[81,82]</sup>

Die Entschützung von **113** wird in wasserfreiem Dichlormethan bei  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Nach Zugabe des Bortribromids lässt man langsam auftauen und arbeitet auf. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes zeigt neben wenigen Verunreinigungen bereits die typischen Signale des Austrogracilin A (**77**). Die weitere Reinigung erfolgt an RP-18, da das entstandene Produkt zu polar für eine Chromatographie an Kieselgel ist. Man erhält das synthetische Austrogracilin A (**77**) in 91 % Ausbeute.



**Abb. 41.** Entschützung mit  $\text{BBr}_3$

Syntheseprodukt und Naturstoff stimmen in allen analytischen und spektroskopischen Daten überein. Eine Coinjektion des synthetischen Austrogracilins mit dem natürlichen an der analytischen HPLC bestätigt endgültig den in Kapitel 3.5.1 formulierten Strukturvorschlag.



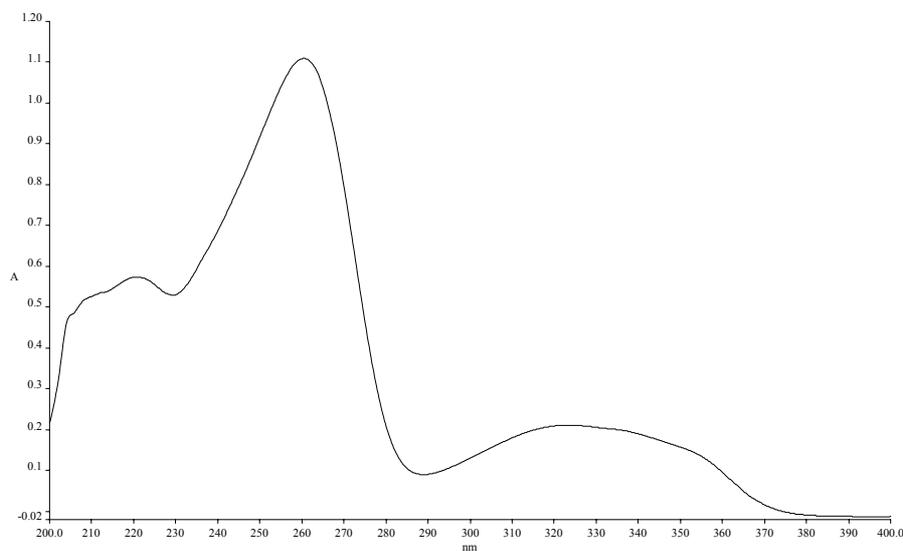
**Abb. 42.** Coinjektion von Syntheseprodukt und Naturstoff (System 2)

Austrogracilin A (**77**) kann somit in vier Syntheseschritten in einer Gesamtausbeute von 45 % dargestellt werden.

## 3.6 Austrogracilin B (**114**)

### 3.6.1 Struktur von Austrogracilin B (**114**)

Nach dem Lyophilisieren erhält man Austrogracilin B (**114**) ebenfalls als farblosen Feststoff, der anders als **77** an Luft keine gelbliche Färbung annimmt und gut in Methanol und DMSO löslich ist. Das UV/Vis-Spektrum zeigt Absorptionsmaxima bei 221, 261 und 323 nm und damit Ähnlichkeit mit dem des Austrogracilin A (**77**).



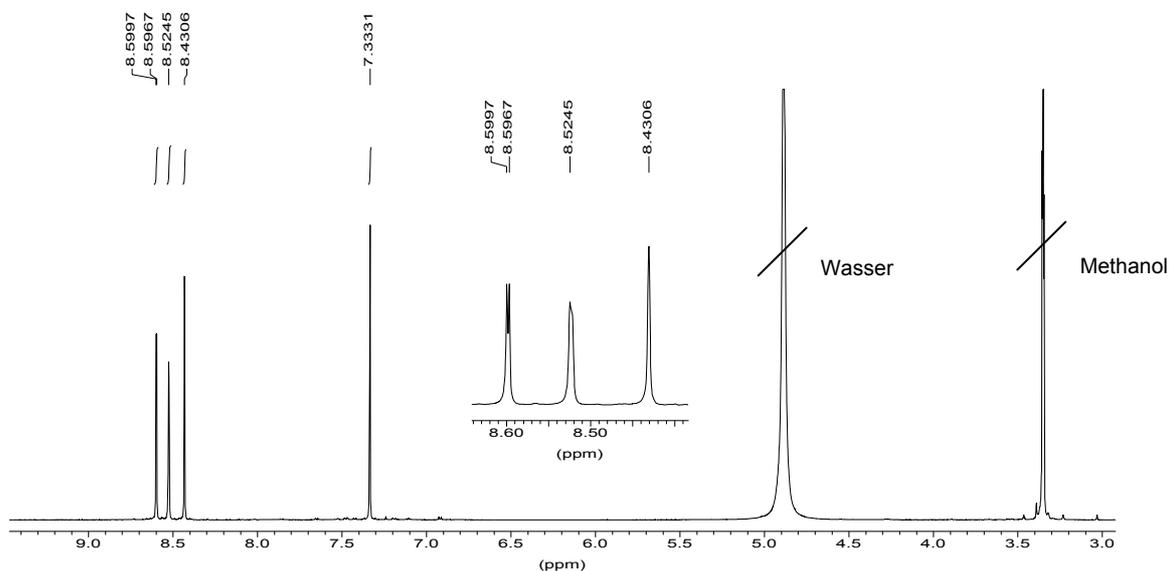
**Abb. 43.** UV/Vis-Spektrum von Austrogracilin B (**114**) (Methanol)

Im IR-Spektrum beobachtet man für OH-Valenzschwingungen typische Banden mit starker Intensität bei  $3458$  und  $3233\text{ cm}^{-1}$ , eine deutlich ausgeprägte Carbonylbande bei  $1687\text{ cm}^{-1}$  und eine intensive Bande bei  $1254\text{ cm}^{-1}$ .

Betrachtet man die starke Ähnlichkeit sowohl im Laufverhalten (siehe Abb. 22) als auch im UV- und IR-Spektrum, kann man davon ausgehen, dass **114** eine dem Austrogracilin A (**77**) eng verwandte Struktur besitzt.

Im Unterschied zu **77** erhält man von Austrogracilin B (**114**) im EI-Massenmodus keinen auswertbaren Molekülpeak. Erst im (-)-ESI-Massenspektrum sind sowohl der  $[2M-H]^-$ -Peak bei  $m/z = 495$  als auch der  $[M-H]^-$ -Peak bei  $m/z = 247$  erkennbar, dessen Hochoflösung eine Summenformel von  $C_{12}H_8O_6$  ergibt.

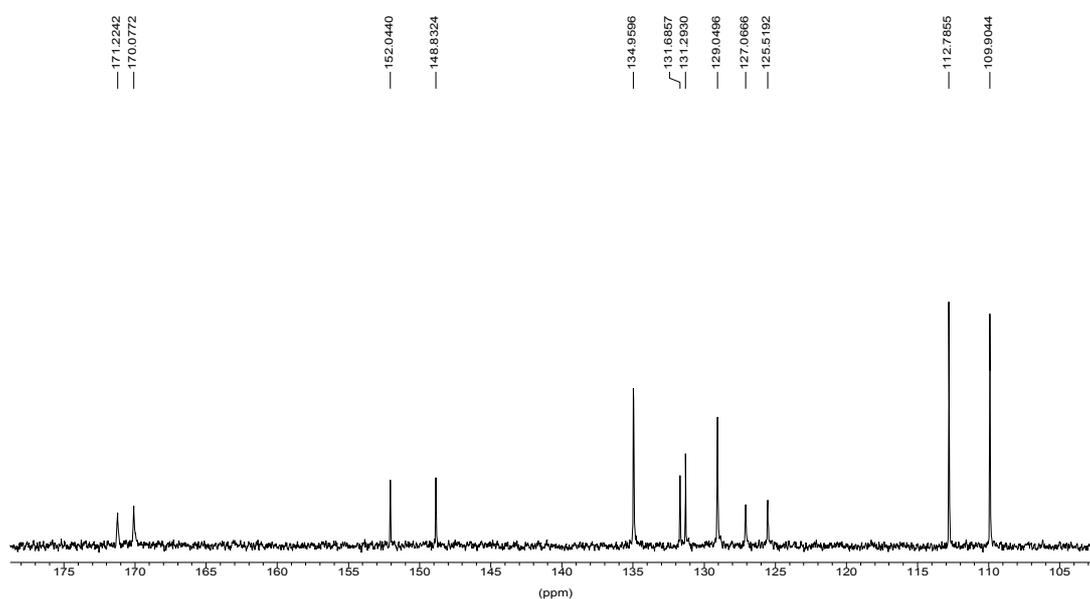
Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Austrogracilin B (**114**) in  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$  ist ebenfalls sehr einfach strukturiert. Wieder erkennt man vier Protonen im aromatischen Bereich, von denen drei aber im Vergleich zu **77** deutlich tieffeldverschoben sind. Dabei handelt es sich um zwei verbreiterte Singulets bei  $\delta_{\text{H}}$  8.43 und 8.52 und ein Dublett bei  $\delta_{\text{H}}$  8.60 mit einer Kopplungskonstante  $J$  von 1.3 Hz, was erneut für eine *meta*-Kopplung spricht. Das vierte aromatische Proton erscheint als Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  7.33.



**Abb. 44.**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **114** (600 MHz,  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$ )

Das ( $^1\text{H-}^1\text{H}$ )-COSY-Spektrum zeigt sowohl eine deutliche Korrelation zwischen den Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  8.52 und 8.60 als auch eine Fernkopplung zwischen den H-Atomen bei  $\delta_{\text{H}}$  8.43 und 8.52, die die Verbreiterung der Singulets erklärt.

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum beobachtet man 12 Signale, was im Einklang mit der ermittelten Summenformel steht. Ähnlich wie im Protonenspektrum ist auch hier eine Verschiebung zu tieferem Feld im Vergleich zu Austrogracilin A (**77**) zu erkennen. Vier Signale bei  $\delta_{\text{C}}$  109.9, 112.8, 129.0 und 135.0 lassen sich mit Hilfe eines DEPT-NMR-Spektrums aromatischen CH-Gruppen zuordnen, während es sich bei den Atomen bei  $\delta_{\text{C}}$  125.5, 127.1, 131.3 und 131.7 um quartäre aromatische Kohlenstoffe handeln muss. Zwei weitere Signale erscheinen bei  $\delta_{\text{C}}$  148.8 und 152.0, was wieder für eine Substitution durch phenolische OH-Gruppen spricht. Anders als bei **77** beobachtet man hier zwei sehr tieffeldverschobene Kohlenstoffatome bei  $\delta_{\text{C}}$  170.1 und 171.2, was auf zwei Carbonsäure-Funktionen im Molekül hindeutet.



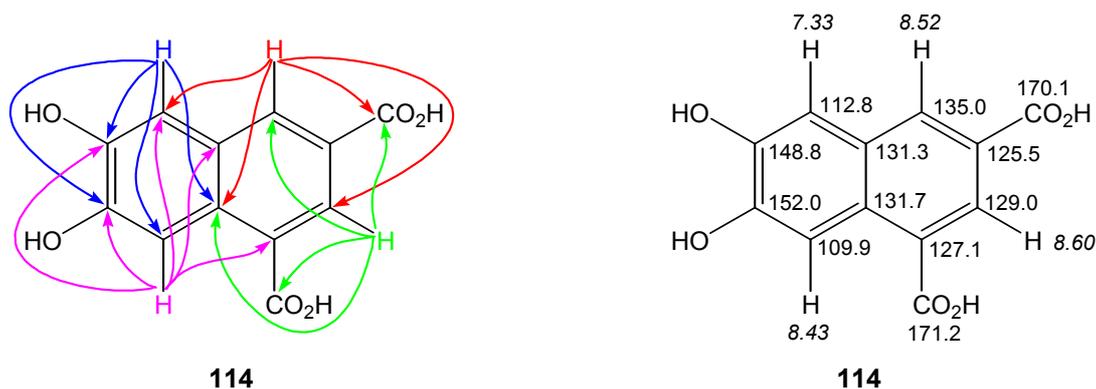
**Abb. 45.**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Austrogracilin B (**114**) (151 MHz,  $[\text{D}_4]$ Methanol)

Das erklärt nicht nur die oben erwähnte auffällige Entschirmung und damit Verschiebung zu tieferem Feld sowohl im  $^1\text{H}$ - als auch im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum, sondern deckt sich auch mit der ermittelten Masse und damit Summenformel. Zur genauen Zuordnung der chemischen Verschiebungswerte werden HSQC- und HMBC-Spektren aufgenommen. Die ermittelten NMR-Daten sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tab. 2.** NMR-Daten von **114** (600 bzw. 151 MHz, [D<sub>4</sub>]Methanol)

$\delta_C$ [ppm]	Art	$\delta_H$ [ppm]	m	$J$ [Hz]	COSY	HMBC
					$\delta_H$ [ppm]	$\delta_H$ [ppm]
109.9	CH	8.43	s, br		8.52	7.33
112.8	CH	7.33	s			8.43, 8.52
125.5	C <sub>q</sub>					
127.1	C <sub>q</sub>					8.43
129.0	CH	8.60	d	1.3	8.52	8.52
131.3	C <sub>q</sub>					8.43
131.7	C <sub>q</sub>					7.33, 8.52, 8.60
135.0	CH	8.52	s, br		8.43, 8.60	7.33, 8.60
148.8	C <sub>q</sub>					7.33, 8.43
152.0	C <sub>q</sub>					7.33, 8.43
170.1	CO <sub>2</sub> H					8.52, 8.60
171.2	CO <sub>2</sub> H					8.60

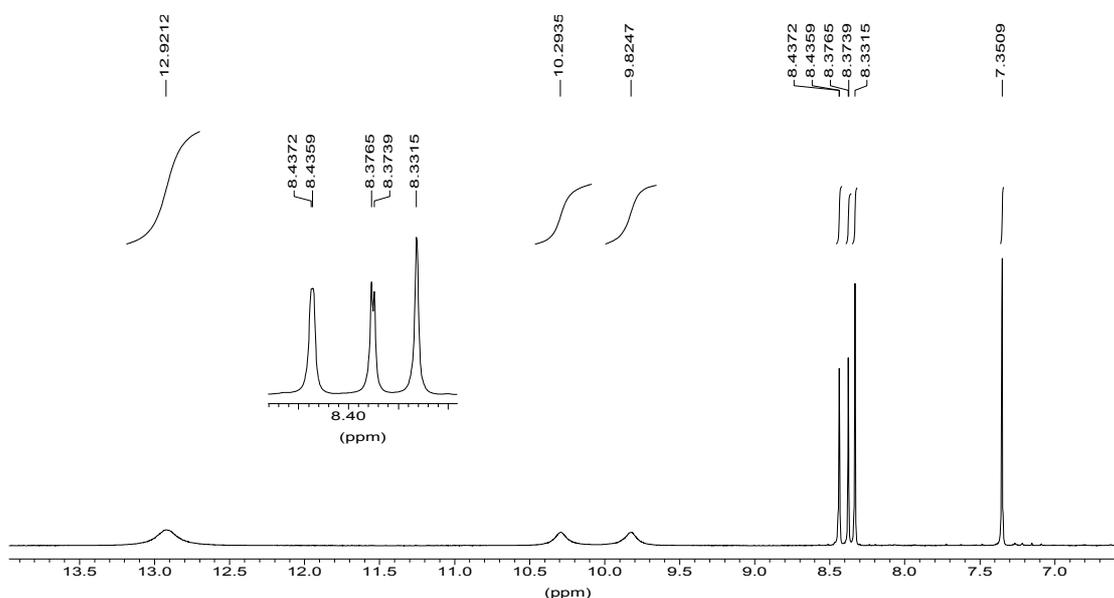
Unter Berücksichtigung aller genannten Informationen und der Vergleichsmöglichkeit mit Austrogracilin A (**77**) lässt sich für Austrogracilin B (**114**) die Struktur einer Naphthalin-dicarbonsäure formulieren:

**Abb. 46.** Struktur von Austrogracilin B (**114**) und HMBC-Korrelationen

Wie bei **77** kann man bei der Durchführung eines NOESY-Experimentes einen Kern-Overhauser-Effekt zwischen den Protonen bei  $\delta_H$  7.33 und 8.52 beobachten.

Das Vorliegen einer 2,4-Naphthalindicarbonsäure erklärt, warum bei Austrogracilin B (**114**) an Luft keine Gelbfärbung auftritt. Ausbildung eines chinoiden Systems durch Oxidation in 4- und in 6-Position wie in **77** ist in **114** nicht möglich.

Die Aufnahme eines  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  untermauert die vorgeschlagene Struktur, da hier die Protonen der Hydroxy- und der Carbonsäuregruppen nicht ausgetauscht werden. So erkennt man bei  $\delta_{\text{H}}$  9.82 und 10.29 zwei verbreiterte Signale, die charakteristisch für phenolische OH-Gruppen sind. Weiterhin erscheint bei  $\delta_{\text{H}}$  12.92 ein breites Signal, das zwei Protonen entspricht und den beiden Carbonsäure-Funktionen zuzuordnen ist.

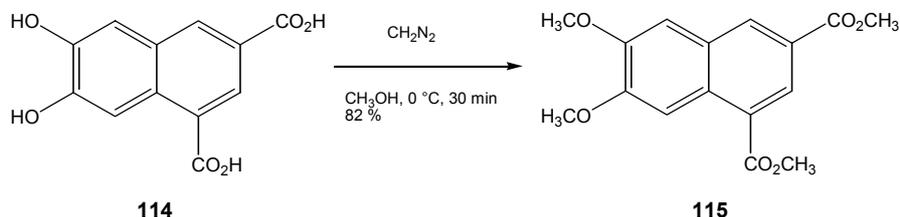


**Abb. 47.**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **114** (600 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )

### 3.6.2 Methylierung von Austrogracilin B (**114**)

Bestätigung für das Vorliegen der OH- und  $\text{CO}_2\text{H}$ -Funktionen in Austrogracilin B (**114**) erhält man durch Derivatisierung von **114** mit Diazomethan. Dazu versetzt man eine methanolische Lösung von **114** mit einer Spatelspitze Kieselgel und gibt bei  $0\text{ }^\circ\text{C}$  solange etherische Diazomethanlösung hinzu, bis man keine Gasentwicklung mehr beobachtet. Nach Entfernen des Lösungsmittels und dünnschichtchromatographischer Reinigung des Rückstandes mit Petrolether/Essigsäureethylester erhält man einen farblosen Feststoff **115**. Das EI-Massenspektrum zeigt einen  $[\text{M}]^+$ -Peak bei  $m/z = 304$ , was einer Summenformel von  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_6$  und damit vierfacher Methylierung entspricht. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in  $\text{CDCl}_3$  erkennt man bei  $\delta_{\text{H}}$  3.99, 4.01, 4.03 und 4.08 vier Singulets, die jeweils einer  $\text{OCH}_3$ -Gruppe zugeordnet werden können. Auch im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von **115** beobachtet man die

entsprechenden Signale für Methoxy-Kohlenstoffatome bei  $\delta_C$  52.2, 52.3, 55.9 und 56.1. Somit kann für das Derivatisierungsprodukt **115** die Struktur eines 6,7-Dimethoxy-2,4-naphthalindicarbonsäuredimethylesters formuliert werden.



**Abb. 48.** Derivatisierung von Austrogracilin B (**114**) mit Diazomethan

Aufgrund der erfolgreichen Derivatisierung von **114** kann nun auch die Struktur von Austrogracilin B (**114**) als erwiesen angesehen werden.

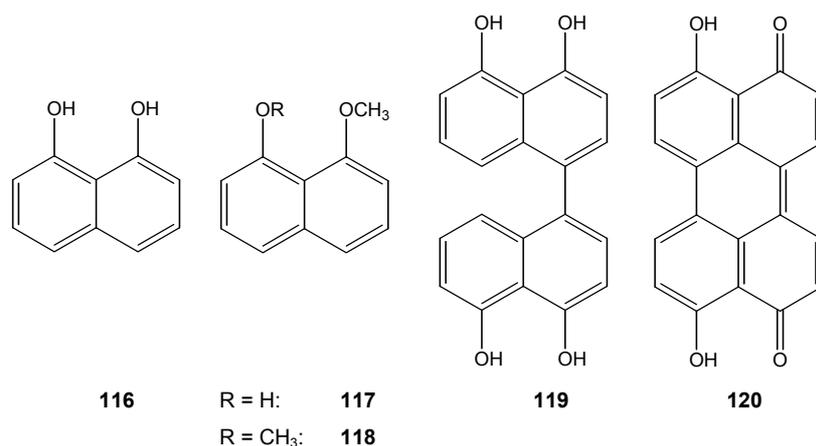
### 3.7 Weitere Naturstoffe mit Naphthalin-Struktur

Die Austrograciline A (**77**) und B (**114**) sind die ersten einfachen aus Basidiomyceten isolierten Naphthalin-Derivate. Dagegen konnten in Ascomyceten und verschiedenen Moosen und Pflanzen bereits Naturstoffe mit Naphthalin-Struktur gefunden und aufgeklärt werden.

#### 3.7.1 Naphthalin-Derivate aus Ascomyceten

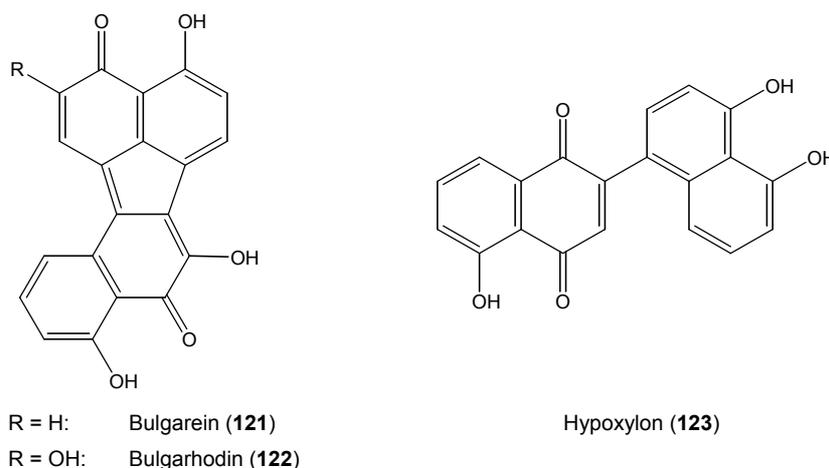
Untersuchungen des Ascomyceten *Daldinia concentrica*<sup>[83]</sup> führten zur Strukturaufklärung einer Reihe von Metaboliten, die biosynthetisch durch Oxidation von Naphthalin-1,8-diol (**116**) entstehen. Zwar konnte **116** selbst noch nicht in Pilzfruchtkörpern detektiert werden, doch fand man die Ether **117** und **118** in Submerskulturen von *D. concentrica*.<sup>[29,84]</sup>

Durch behutsame Extraktion wurde außerdem das oxidationsempfindliche 4,5,4',5'-Tetrahydroxy-1,1'-dinaphthyl (**119**) isoliert, das durch Kopplung das dunkelrote 4,9-Dihydroxy-3,10-perylendion (**120**) und höhere Polymere bildet. **120** ist daher auch Hauptinhaltsstoff von *Daldinia concentrica*.



**Abb. 49.** Naphthalin-Derivate aus *D. concentrica*

Ebenfalls zu den Ascomyceten-Farbstoffen gehören die in *Bulgaria inquinans*<sup>[85]</sup> vorkommenden Verbindungen Bulgarein (**121**) und Bulgarhodin (**122**) und die violette Verbindung Hypoxylon (**123**) aus dem Baumpilz *Hypoxylon sclerophaeum*.<sup>[86]</sup>

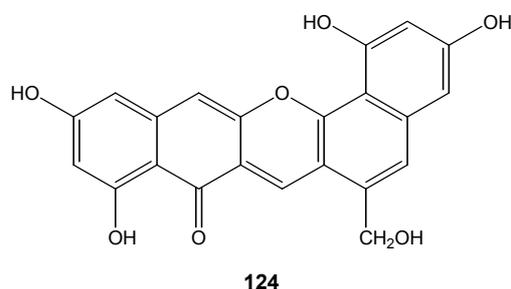


**Abb. 50.** Bulgarein (**121**), Bulgarhodin (**122**) und Hypoxylon (**123**)

Es existiert noch kein direkter Beweis, dass Naphthalin-1,8-diol (**116**) und damit die Verbindungen **117** bis **123** zu den Polyketiden gehören und biosynthetisch auf dem Acetat-Malonat-Weg gebildet werden. Unterstützt wird diese Hypothese jedoch durch die Detektion von Resorcin-Derivaten in farblosen Mutanten von *Daldinia concentrica*, die durch Cyclisierung einer Pentaketidkette entstehen.<sup>[29,84]</sup>

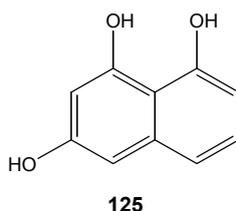
Bemerkenswert ist das Vorkommen des grünen Hypoxyxyleron (**124**) in *Hypoxylon fragiforme*, da aus Pilzen nur sehr wenig grüne Naturstoffe bekannt sind. **124** inhibiert die Topoisomerase I, die DNA-Brüche verursacht und deshalb zelluläres Target vieler

Antibiotika und Antitumor-Medikamente darstellt. Inzwischen gelang bereits die Synthese des Pentamethyl-Derivats von **124**.<sup>[72,87]</sup>



**Abb. 51.** Hypoxyxylon (**124**)

Aus Kulturen von *Lachnellula*-Arten wurde neben einigen einfachen Pentaketiden auch Naphthalin-1,3,8-triol (**125**), ein Inhibitor der Malat-Synthetase, isoliert.<sup>[88]</sup>



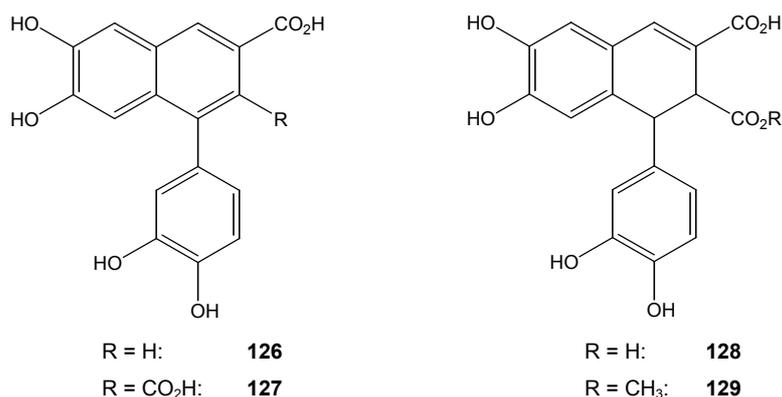
**Abb. 52.** Naphthalin-1,3,8-triol (**125**)

**125** zeigt außerdem schwache antibakterielle, antifungische und cytotoxische Wirkung.

### 3.7.2 Naphthalin-Derivate aus Moosen

Besonders Lebermoose sind als reichhaltige Quelle terpenoide und phenolischer Naturstoffe bekannt, die oftmals interessante biologische Wirkungen besitzen. Erwähnt werden hier einige Sekundärmetabolite, die aufgrund ihres Substitutionsmusters Ähnlichkeit mit Austrogracilin A (**77**) und B (**114**) aufweisen.

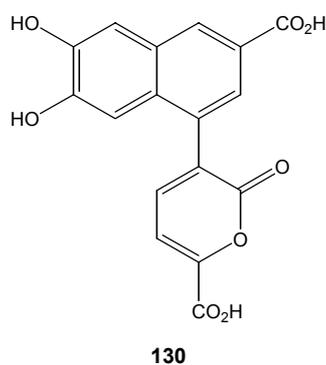
Aus *Pellia epiphylla* und aus Sterilkulturen von *Jamesoniella autumnalis* konnten die 6,7-Dihydroxy-2-naphthoesäuren **126** und **127** isoliert werden, die in 4-Position zusätzlich einen Phenyl-Substituenten tragen. Auch die Dihydroverbindungen **128** und **129** wurden in *Pellia epiphylla* gefunden und in ihrer Struktur aufgeklärt.<sup>[89-91]</sup>



**Abb. 53.** Metabolite aus *Pellia epiphylla* und *Jamesoniella autumnalis*

Es gelang außerdem, **126** auf synthetischem Weg zu gewinnen und dadurch die Struktur eindeutig zu beweisen.<sup>[89]</sup>

Die in dem Lebermoos *Scapania undulata* vorkommende gelbe Verbindung Scapaniapyron A (**130**) trägt im Unterschied zu den obigen Naturstoffen keinen Phenyl-Substituenten, sondern einen  $\alpha$ -Pyrone-Ring.<sup>[92]</sup>



**Abb. 54.** Scapaniapyron A (**130**)

Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit der hier gezeigten Verbindungen wird auch ein gemeinsamer Biosyntheseweg vorgeschlagen. Im Unterschied zu den Naphthalin-Derivaten aus verschiedenen Ascomyceten (Kapitel 3.7.1) diskutiert man die Entstehung der Metabolite **126** bis **129** aus Kaffeesäure (**26**).<sup>[89,90]</sup>

Diese wird auf dem Shikimatweg aus Phenylalanin (**21**) bzw. Tyrosin (**23**) und anschließender Hydroxylierung der entstehenden 4-Hydroxycimtsäure (**25**) gebildet (siehe Kapitel 1.1.2).

### 3.8 Überlegungen zur Biosynthese und erste Verimpfungsexperimente

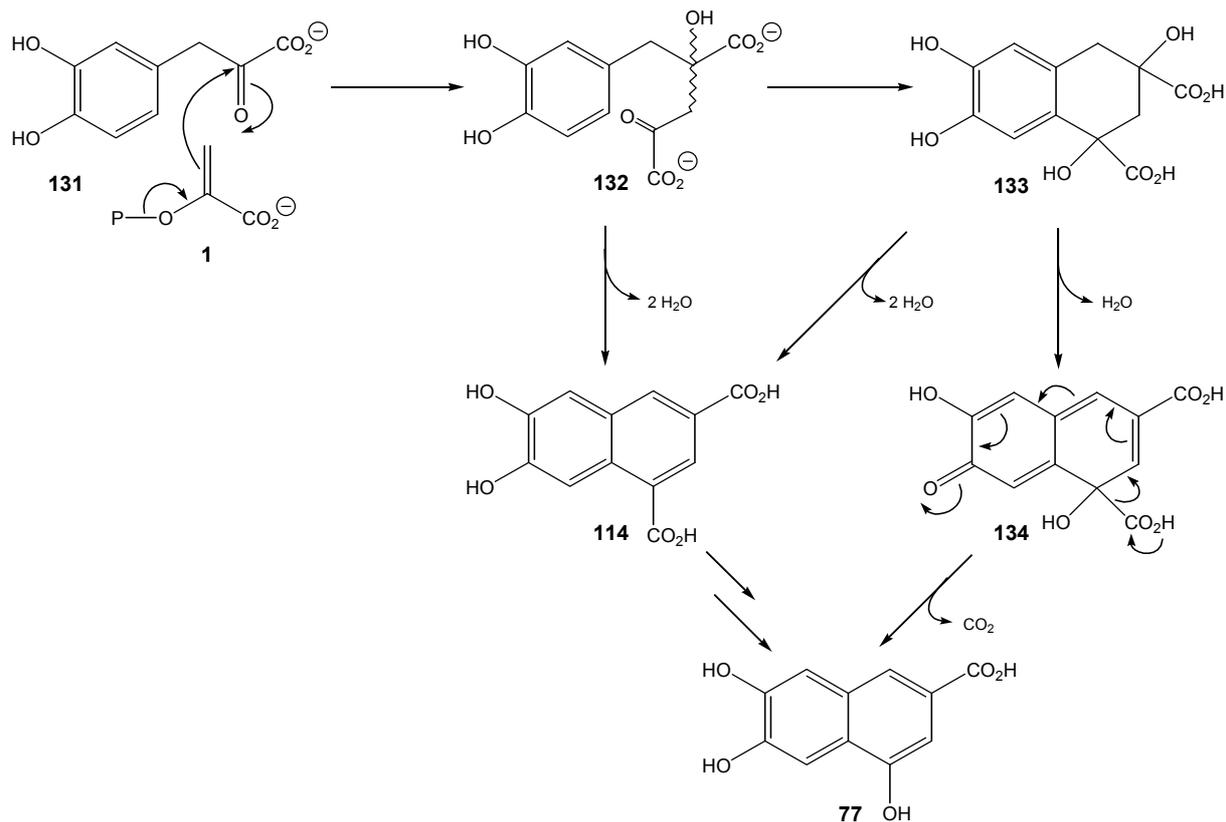
Das Auftreten der einfachen Naphthalin-Derivate **77** und **114** in *A. gracilis* und das Fehlen von Pulvinsäuren, obwohl Badion A (**57**) nachgewiesen werden konnte, bestätigen die Sonderstellung von *A. gracilis* in der Familie der *Boletaceae*. Außerdem werfen die für *Boletales*-Arten recht ungewöhnlichen Strukturen von Austrogracilin A (**77**) und B (**114**) Fragen bezüglich der Biosynthese auf. Wie bereits erwähnt (Kapitel 3.7.1), entstehen ähnliche Metabolite in Ascomyceten wahrscheinlich über den Acetat-Malonat-Weg. Bei Verimpfungsversuchen mit [1,2-<sup>13</sup>C]Natriumacetat bzw. [1-<sup>13</sup>C]Natriumacetat im Herbst 1999 während einer Pilzexkursion in den USA konnte jedoch kein Einbau festgestellt werden.<sup>a</sup> Auch spricht die in Austrogracilin A (**77**) und B (**114**) zu beobachtende *ortho*-Substitution der Hydroxy-Funktionen gegen die Biosynthese von **77** und **114** über den Acetat-Malonat-Weg.

Vorstellbar ist eine Entstehung von **77** und **114** über den Shikimatweg ausgehend von 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat (**131**). In einer aldolartigen Reaktion mit Phosphoenolpyruvat (**1**), das im Shikimatweg eine bedeutende Rolle spielt, könnte das Zwischenprodukt **132** gebildet werden. Anschließende Cyclisierung von **132** unter Abspaltung von Wasser würde zur Austrogracilin B (**114**) führen. Durch nachfolgende Decarboxylierung der 4-ständigen Säurefunktion und Hydroxylierung mit Hilfe einer Monooxygenase könnte **114** dann zum Austrogracilin A (**77**) umgeformt werden.

Ebenfalls vorstellbar wäre eine Cyclisierung von **132** zum Zwischenprodukt **133**, aus dem durch Wasserabspaltung und Oxidation **134** entstehen würde. Anschließende Decarboxylierung von **134** würde zur Bildung von Austrogracilin A (**77**) führen. Aus **133** könnte außerdem Austrogracilin B (**114**) durch zweifache Eliminierung von Wasser gebildet werden.

---

<sup>a</sup> Ich danke Herrn Dr. Norbert Arnold herzlich für die Durchführung der Verimpfungsexperimente.



**Abb. 55.** Mögliche Biosynthese von Austrogracilin A (77) und B (114)

Bisher gibt es noch keinen Beweis für die in Abb. 55 vorgeschlagene Biosynthese in *Austroboletus gracilis*. Auch müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob Austrogracilin A (77) aus Austrogracilin B (114) entsteht oder parallel im Pilz gebildet wird. Durch ein systematisches HPLC-Screening von Fruchtkörpern in verschiedenen Entwicklungsstadien könnte man Unterschiede im Verhältnis Austrogracilin A (77) zu Austrogracilin B (114) abhängig vom Alter der Pilze feststellen und dadurch weitere Anhaltspunkte für die Biosynthese erhalten. Außerdem ließe sich durch weitere Verimpfungsversuche, z. B. mit markierten Hydroxyphenylbrenztraubensäuren, die Entstehung von 77 und 114 über den Shikimatweg nachweisen. Mit ausreichend Pilzmaterial könnte darüber hinaus mit Hilfe der analytischen HPLC bzw. LC/MS-Kopplung und synthetischen Vergleichsverbindungen nach biosynthetischen Vorläufern gesucht werden.

### 3.9 Ausblick

Naphthalin-Derivate zeigen die verschiedensten biologischen Aktivitäten. Daher sollten das auch synthetisch gut zugängliche Austrogracilin A (**77**) und Austrogracilin B (**114**) auf ihre biologische Wirkung getestet werden. Eine mögliche Totalsynthese für Austrogracilin B (**114**) könnte von 4-Bromveratrol (**135**) ausgehen, das man zum 6-Bromveratraldehyd (**136**) umsetzen würde. Kondensation von **136** mit Glutaconsäurediester (**137**) würde zu **138** führen. Durch eine Palladium-katalysierte Cyclisierungsreaktion käme man zur geschützten Naphthalin-Verbindung **139**. Nach Esterverseifung und anschließender Spaltung der phenolischen Methylether mit Bortribromid würde man schließlich synthetisches Austrogracilin B (**114**) erhalten.

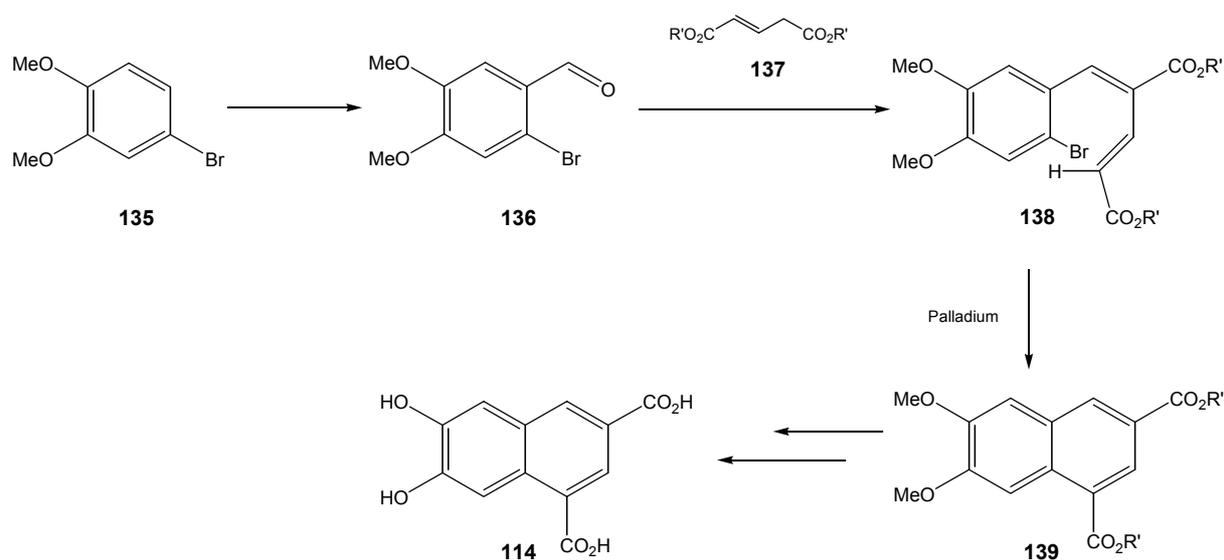


Abb. 56. Synthesevorschlag für Austrogracilin B (**114**)

## 4 *Leucocoprinus birnbaumii*

### 4.1 Der Pilz

Der Gelbe Faltenschirmling (*Leucocoprinus birnbaumii* [Corda] Singer, Synonym *L. luteus* [Sow.: Fr.] Locq., *L. flos-sulphuris* (Schniz. in Sturm) Cejp, *Lepiota lutea*) gehört zur Familie der *Agaricaceae*, Ordnung *Agaricales*. In unseren Breiten kommt der in allen Teilen zitronen- bis schwefelgelbe Pilz ausschließlich in Gewächshäusern, Blumen- oder Pflanztöpfen vor und erregt durch sein plötzliches Erscheinen oft die Aufmerksamkeit der Pflanzenliebhaber. Dabei kann man das Auftreten einzelner Exemplare oder sogar die Bildung von Hexenringen beobachten. Der Hut besitzt einen Durchmesser von 2–6 cm und ist zunächst eiförmig-geschlossen, dann glockig bis ausgebreitet mit meist gebuckelter Mitte. Die Hutoberfläche ist mit goldgelben, später bräunlich-gelben, schuppenartigen Flöckchen übersät. Der Stiel hat eine Länge von 4–6 cm bei einem Durchmesser von 2–5 mm mit einer keulig angeschwollenen Basis und einem kleinen nach unten abziehbaren Ring. Die Lamellen stehen mäßig dicht, sind ebenfalls gelb und am Stiel frei. Die Sporen sind zitronenförmig, das Sporenpulver ist weiß. Der sehr zerbrechliche Pilz besitzt sehr dünnes im Alter oft durchscheinendes Fleisch. In der Literatur wird der Gelbe Faltenschirmling als ungenießbar beschrieben.<sup>[93,94]</sup>

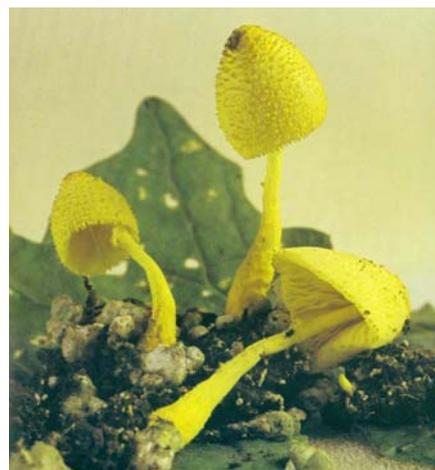


Abb. 57. *Leucocoprinus birnbaumii* [Corda] Singer<sup>[94,95]</sup>

## 4.2 Bisherige Arbeiten

Trotz der auffälligen Farbe ist bis heute wenig über die Inhaltsstoffe aus *L. birnbaumii* bekannt. Bross<sup>[96]</sup> konnte zeigen, dass durch Extraktion mit Methanol eine vollständige Entfärbung der Fruchtkörper eintrat. Bei der anschließenden Aufarbeitung des Rohextraktes wurden eine hohe Polarität und rasche Zersetzung der Pigmente beobachtet. So erwies sich eine Chromatographie an Kieselgel oder Cellulose als ungeeignet, da die Substanzen entweder nur bei Verwendung von sehr polaren Laufmitteln unter Säurezusatz eluiert werden konnten bzw. Braun- oder Grünfärbungen der ursprünglich gelben Substanzen eintraten. Durch mehrmalige Gelchromatographie an Sephadex<sup>®</sup> LH-20 mit Methanol gelang es, zwei Fraktionen zu erhalten, in denen zwei Gelbfarbstoffe im Verhältnis 4/1 bzw. 1/4 angereichert waren. Erste NMR-Untersuchungen deuteten auf aromatische Struktureinheiten und das Vorhandensein von Stickstoffatomen in beiden Pigmenten hin. Durch EI-Massenspektrometrie konnten keine aussagefähigen Spektren erhalten werden. Im FAB-Massenmodus des Substanzgemisches beobachtete man das Auftreten von Peaks bei  $m/z = 377$  und  $361$ , was auf Molmassen von  $376$  bzw.  $360$  für die Pigmente hindeutete. Derivatisierungsversuche mit Dimethylsulfat/Kaliumcarbonat oder etherischer Diazomethanlösung führten nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen. Bei der Methylierung mit Methyljodid/Kaliumcarbonat konnte eine Umsetzung verfolgt werden. Die entsprechenden FAB-Spektren zeigten Peaks, die auf acht- bzw. neunfache Methylierung der beiden Pigmente hindeuteten. Eine vollständige Auftrennung und Strukturaufklärung der beiden Gelbfarbstoffe gelang nicht. Außerdem wurde das Vorhandensein einer dritten nahezu farblosen Verbindung beobachtet, für die noch keine weiteren Informationen mit Hilfe von Massenspektrometrie bzw. NMR-Untersuchungen erhalten werden konnten.

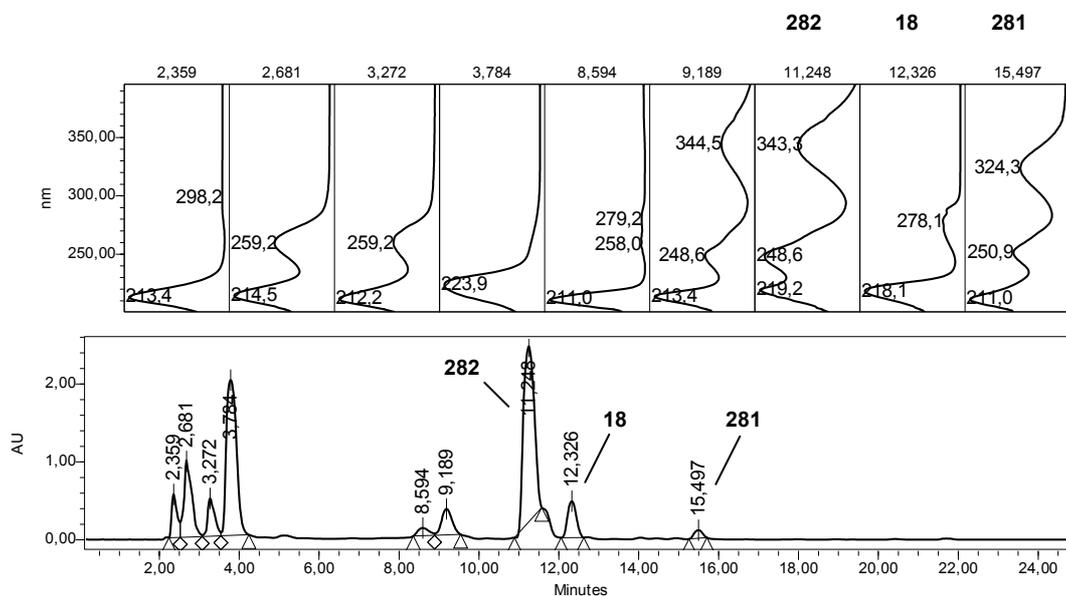
## 4.3 Aufarbeitung und Isolierung der Inhaltsstoffe

Die zur Verfügung stehenden Pilze stammen aus Blumentöpfen verschiedener Pflanzen wie *Ficus*-Arten, Grünstilbe, Schwertfarn und Yucca-Palmen aus dem botanischen Garten München, dem Chemischen Institut der Universität München und aus Privathaushalten. Aufgrund der beschriebenen Empfindlichkeit der Inhaltsstoffe werden die frischen, tiefgefrorenen oder luft- bzw. gefriergetrockneten Fruchtkörper mit stickstoffgesättigtem Methanol unter Lichtschutz mehrmals extrahiert, bis die zunächst kräftig gelben Fruchtkörper vollständig entfärbt sind.



**Abb. 58.** Methanolischer Rohextrakt

Die Extrakte werden vereinigt, im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Stickstoffatmosphäre gelagert. Erste Untersuchungen mit Hilfe der analytischen HPLC an RP-18 zeigen einen gelben Hauptinhaltsstoff **282** neben weiteren polaren Substanzen.



**Abb. 59.** HPL-Chromatogramm des Methanol-Rohextraktes von *L. birnbaumii* (System 3)

Nach Probenvorbereitung durch Festphasenextraktion an RP-18-Kartuschen mit Methanol als Eluent erfolgt die Auftrennung des Rohextraktes mittels präparativer HPL-Chromatographie an RP-18 mit Wasser/Acetonitril unter Zusatz von Trifluoressigsäure als Laufmittel. Die

dadurch erhaltenen Fraktionen werden bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren, lyophilisiert und anschließend bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Reinheit der isolierten Substanzen wird mit Hilfe der analytischen HPLC überprüft und gegebenenfalls die Trennung mittels präparativer HPL-Chromatographie wiederholt. Eine Vorreinigung an Sephadex<sup>®</sup> LH-20 mit Methanol erweist sich als unnötig, da keine vollständige Trennung erreicht werden kann und Substanzverlust durch Zersetzung eintritt. Auch sollte man eine zu lange Lagerung getrockneter Fruchtkörper vermeiden, da nach einigen Wochen eine deutliche Verblässung der Pilze zu beobachten ist.

#### 4.4 Identifizierung der farblosen Verbindung

Neben den bereits von Bross<sup>[96]</sup> beschriebenen Gelbfarbstoffen eluiert eine farblose Verbindung (**18**) von der RP-18-Säule, die gut in Methanol, DMSO und Wasser-Acetonitril-Gemischen löslich ist. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$  zeigt neben einem ABCD-Spinsystem und einem einzelnen scharfen Singulett im aromatischen Bereich auch aliphatische Signale. Dabei handelt es sich um zwei diastereotope Protonen einer  $\text{CH}_2$ -Gruppe bei  $\delta_{\text{H}}$  3.35 und 3.55 und einem einzelnen H-Atom bei  $\delta_{\text{H}}$  4.21, die gemeinsam ein ABC-Spinsystem bilden. Im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung beobachtet man 11 Kohlenstoff-Signale, von denen fünf aromatischen CH-Gruppen zugeordnet werden können. Auch die bereits erwähnte  $\text{CH}_2$ - und eine tieffeldverschobene aliphatische CH-Gruppe bei  $\delta_{\text{C}}$  55.3 sind zu erkennen. Weiterhin erscheint ein quartäres Kohlenstoffatom bei  $\delta_{\text{C}}$  172.6, das auf eine Carbonsäure hindeutet. Die Aufnahme und Auswertung von zweidimensionalen NMR-Spektren sowie die Bestimmung des Drehwertes führen schnell zu der Vermutung, dass es sich bei der farblosen Verbindung **18** um L-Tryptophan handelt. Diese Annahme wird durch ein ESI-Massenspektrum mit dem  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Peak bei  $m/z = 205$  bestätigt, was einer Summenformel von  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$  entspricht.

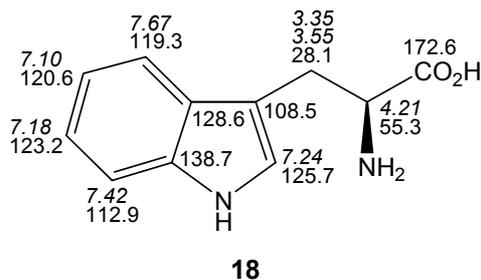


Abb. 60. L-Tryptophan (18) aus *L. birnbaumii*

Einen endgültigen Beweis erbringt eine Coinjektion von L-Tryptophan (18) mit dem methanolischen Rohextrakt von *L. birnbaumii*, bei der eine deutliche Peakerrhöhung im analytischen HPL-Chromatogramm (System 3) erkennbar ist.

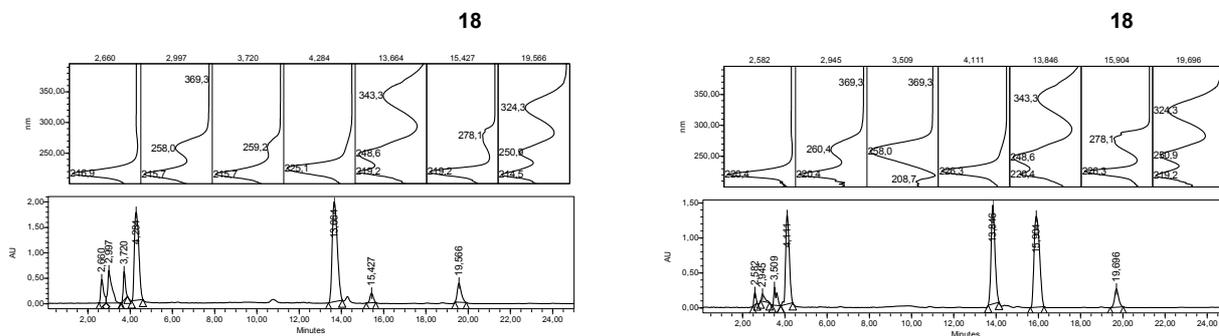


Abb. 61. Methanolischer Rohextrakt (links) und Coinjektion von L-Tryptophan (18) und Rohextrakt (rechts)

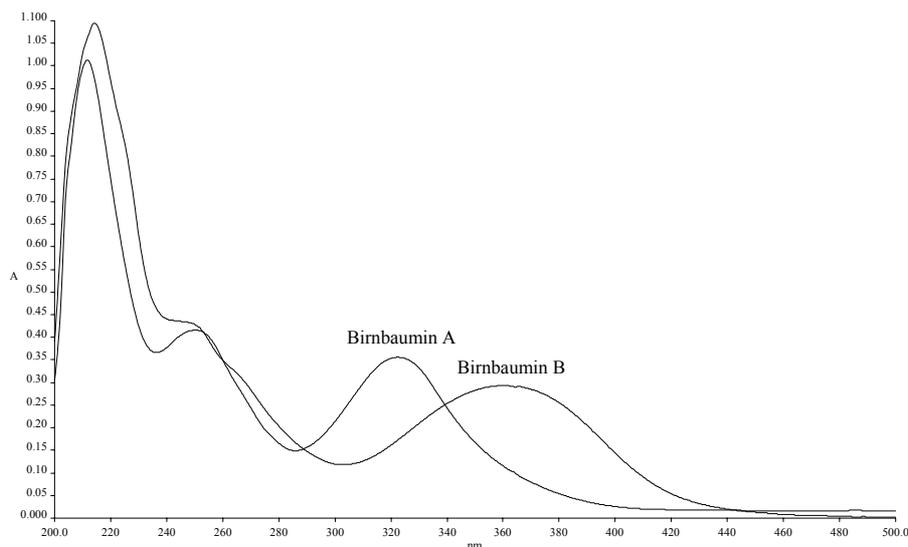
Die Aminosäure bildet damit einen der drei Hauptinhaltsstoffe des Gelben Faltschirmlings. Natürlich kommt L-Tryptophan (18) als Metabolit aus dem Shikimat-Biosyntheseweg (siehe auch Kapitel 1.1.1) häufig in Pilzen vor, doch ist es ungewöhnlich, die Aminosäure in diesen Mengenverhältnissen isolieren zu können. Das weist auf eine besondere Bedeutung entweder des L-Tryptophans (18) oder aber des Shikimatweges für *L. birnbaumii* hin.

#### 4.5 Birnbaumin A (281) und B (282)

Nach dem Lyophilisieren erhält man zwei Verbindungen als gelbe Feststoffe, die Birnbaumin A (281) und B (282) genannt werden. Die polaren Pigmente sind sehr gut in Methanol, DMSO und Wasser löslich. Aufgrund der bereits von Bross<sup>[96]</sup> beobachteten Empfindlichkeit und der mikrokristallinen Struktur bleiben verschiedene Versuche, für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Kristalle zu erzeugen, erfolglos.

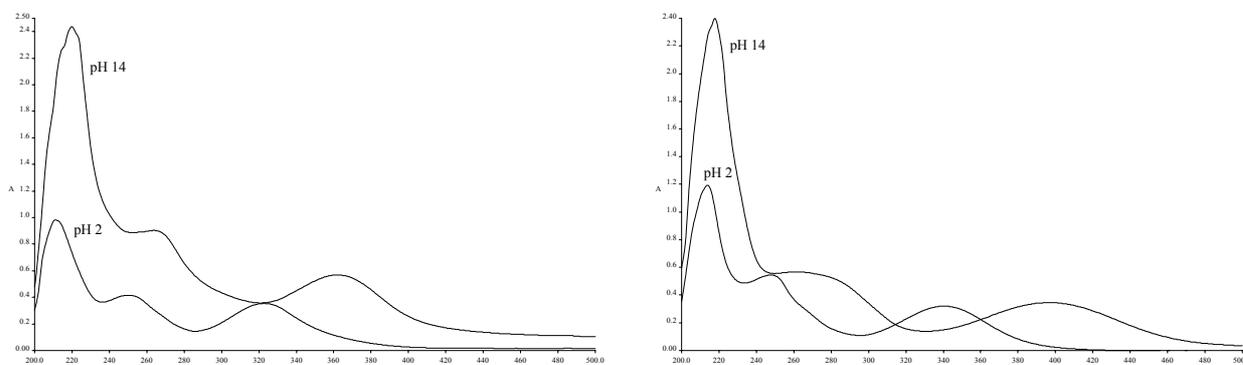
Die IR-Spektren beider Verbindungen zeigen große Ähnlichkeit. So beobachtet man neben einer starken für OH- oder NH-Valenzschwingungen typischen Bande bei 3403 bzw. 3415  $\text{cm}^{-1}$  auch jeweils eine intensive Carbonylbande bei 1666  $\text{cm}^{-1}$  und zwei Banden bei 1203 und 1140  $\text{cm}^{-1}$ , die bei CO-Valenzschwingungen auftreten.

Die UV/Vis-Spektren von Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) ähneln sich ebenfalls sehr stark, wobei das kräftiger gelbe Birnbaumin B (**282**) eine Absorption bei größeren Wellenlängen zeigt.



**Abb.62.** UV/Vis-Spektren von Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) in Methanol

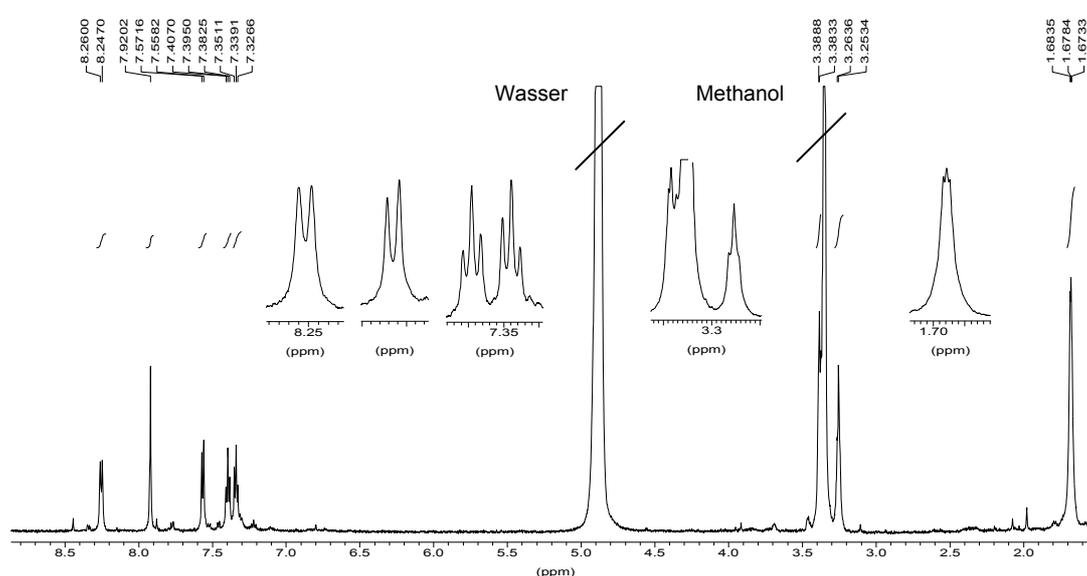
Gibt man zu einer methanolischen Lösung von Birnbaumin A (**281**) oder B (**282**) wässrige Salzsäure, beobachtet man bei pH 2 nur eine geringe hypsochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima. Bei Zugabe von Natronlauge tritt dagegen ein deutlicher bathochromer Effekt ein, wobei vor allem das langwelligste Absorptionsmaximum stark verschoben wird. Zusätzlich erkennt man eine Intensitätserhöhung.



**Abb. 63.** UV/Vis-Spektren von Birnbaumin A (**281**, links) und B (**282**, rechts) bei pH 2 und pH 14

#### 4.5.1 NMR-Spektroskopie von Birnbaumin A (281)

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum in  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$  zeigt ähnlich wie beim Tryptophan (**18**) (siehe Kapitel 4.4) ein ABCD-Spinsystem und ein einzelnes scharfes Singulett im aromatischen Bereich, das jedoch mit  $\delta_{\text{H}}$  7.92 wie auch ein Dublett des Spinsystem bei  $\delta_{\text{H}}$  8.25 tieffeldverschoben ist. Außerdem erkennt man zwei aliphatische  $\text{CH}_2$ -Gruppen bei  $\delta_{\text{H}}$  3.25 und 3.38, die jeweils zu einem Triplet aufspalten und deren chemische Verschiebungen auf Verknüpfung mit einem Heteroatom wie Stickstoff hindeuten. Bei  $\delta_{\text{H}}$  1.68 erscheint ein verbreitertes Signal, das vier Protonen entspricht und ebenfalls zu Methylengruppen gehören könnte.

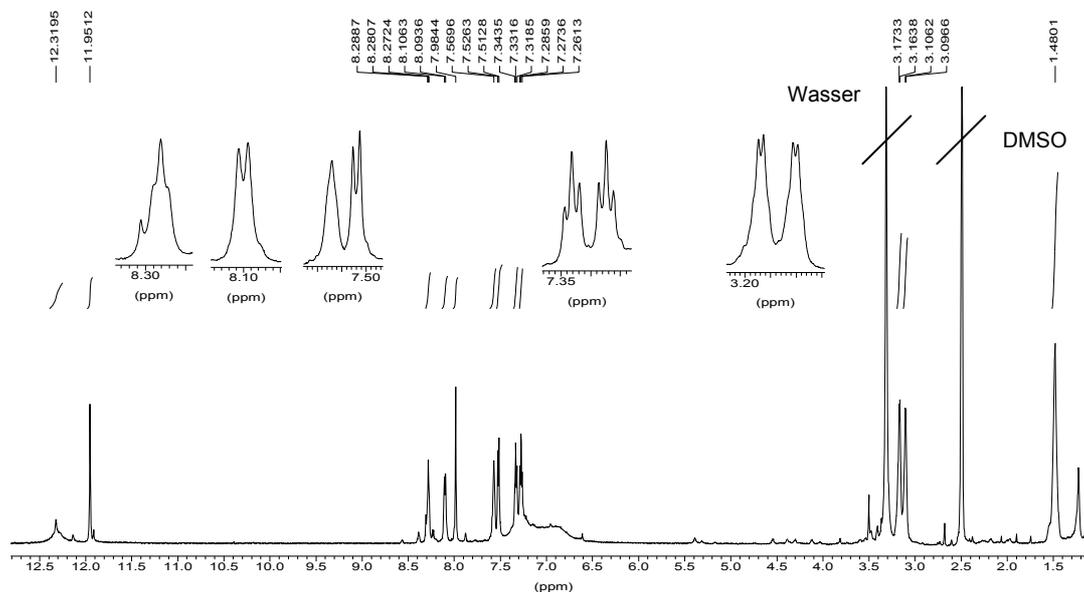


**Abb. 64.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Birnbaumin A (**281**) (600 MHz,  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$ )

Das  $(^1\text{H}-^1\text{H})$ -COSY-Spektrum zeigt Korrelationen des Signals bei  $\delta_{\text{H}}$  1.68 mit den beiden  $\text{CH}_2$ -Gruppen bei  $\delta_{\text{H}}$  3.25 und 3.38 und ermöglicht auch die eindeutige Zuordnung der Kopplungspartner im ABCD-Spinsystem. Darüber hinaus liefert es aber keine Informationen über die Verknüpfung von aliphatischem und aromatischem Teil des Moleküls und die Position des einzelnen Protons bei  $\delta_{\text{H}}$  7.92.

Zusätzliche Informationen erhält man durch die Aufnahme eines  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ . So erscheinen im tiefen Feld ein verbreitertes Signal bei  $\delta_{\text{H}}$  12.32 und ein scharfes Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  11.95, die beide entweder einer OH- oder einer NH-Funktion zugeordnet werden können. Dabei sollte es sich bei dem scharfen Signal um ein wasserstoffbrückengebundenes acides Proton handeln. Weiterhin beobachtet man bei  $\delta_{\text{H}}$  7.57

und 8.28 zwei etwas verbreiterte Signale, deren Triplet-Struktur aber noch erkennbar ist und die jeweils einem austauschbaren Proton zuzuordnen sind. Zusätzlich erscheinen die Methylen-Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  3.10 und 3.17 ( $\delta_{\text{H}}$  3.25 und 3.38 in Methanol) nicht mehr als Triplet, sondern als Quartett.



**Abb. 65.**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Birnbaumin A (**281**) (600 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )

Die Auswertung des ( $^1\text{H-}^1\text{H}$ )-COSY-Spektrums zeigt deutlich Korrelationen der  $\text{CH}_2$ -Gruppe bei  $\delta_{\text{H}}$  3.10 mit dem Triplet bei  $\delta_{\text{H}}$  7.57 und zwischen den Methylen-Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  3.17 und dem Signal bei  $\delta_{\text{H}}$  8.28. Aus den bisherigen Daten lässt sich ableiten, dass das Molekül eine Kette aus vier  $\text{CH}_2$ -Gruppen, die jeweils am Ende mit einer  $\text{NH}$ -Einheit verknüpft sind, enthält.

Im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum beobachtet man 16 Signale, wovon eines teilweise unter dem DMSO-Signal verborgen liegt, im DEPT-Spektrum dann aber gut sichtbar ist. Im Einklang mit dem Protonenspektrum können fünf aromatische  $\text{CH}$ - und vier aliphatische  $\text{CH}_2$ -Gruppen identifiziert werden. Zwei der Methylen-Kohlenstoffe erscheinen bei  $\delta_{\text{C}}$  38.3 und 40.6, was erneut für eine Verknüpfung mit jeweils einem Stickstoffatom spricht. Bei den restlichen C-Atomen handelt es sich um quartäre Kohlenstoffe, von denen vier tieffeldverschoben bei  $\delta_{\text{C}}$  151.7, 156.9, 161.8 und 184.0 zu beobachten sind. Vermutlich handelt es sich bei dem Atom bei  $\delta_{\text{C}}$  184.0 um eine Keto-Funktion, während sich die anderen mit den bisherigen Informationen noch nicht zuordnen lassen.

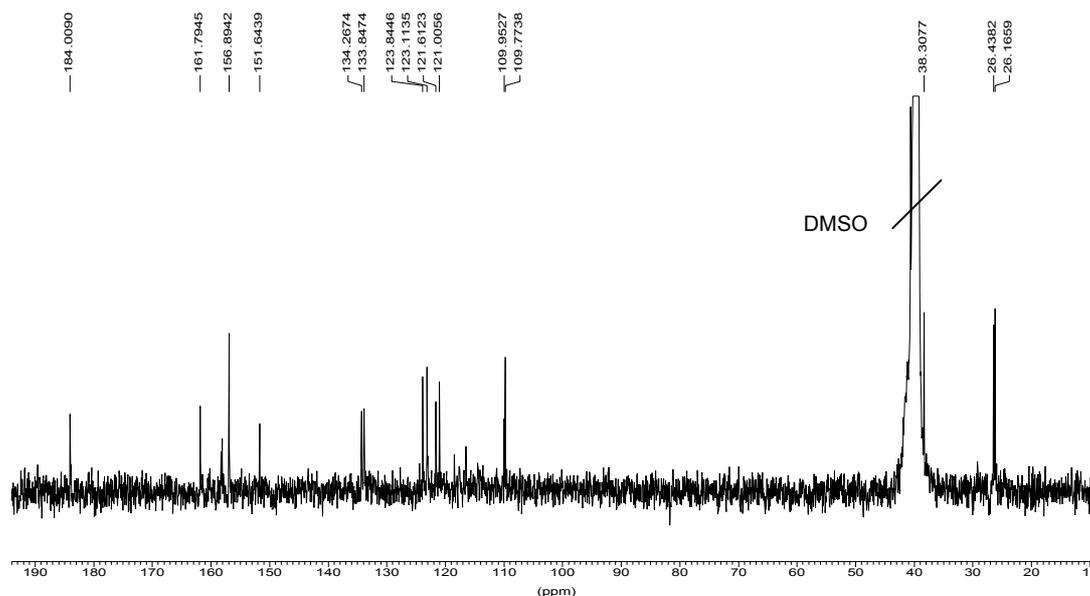
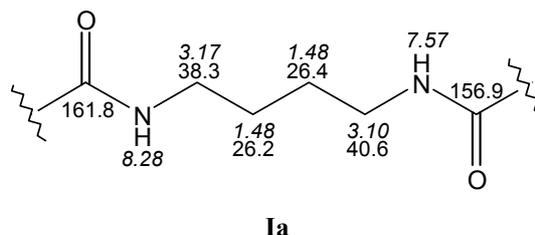


Abb. 66.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **281** (151 MHz,  $[\text{D}_4]\text{DMSO}$ )

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum erkennt man außer den beschriebenen Signalen auch noch ein Quartett bei  $\delta_{\text{C}}$  158, das zu Trifluoressigsäure gehört. TFA wird als Zusatz bei Trennung des Rohextraktes mittels HPL-Chromatographie benutzt und eigentlich durch das Hochvakuum bei der Gefriertrocknung entfernt. Anscheinend besitzt Birnbaummin A (**281**) polare Gruppen, wie z. B. Aminogruppen, die die Säure binden können und somit Trifluoracetate bilden.

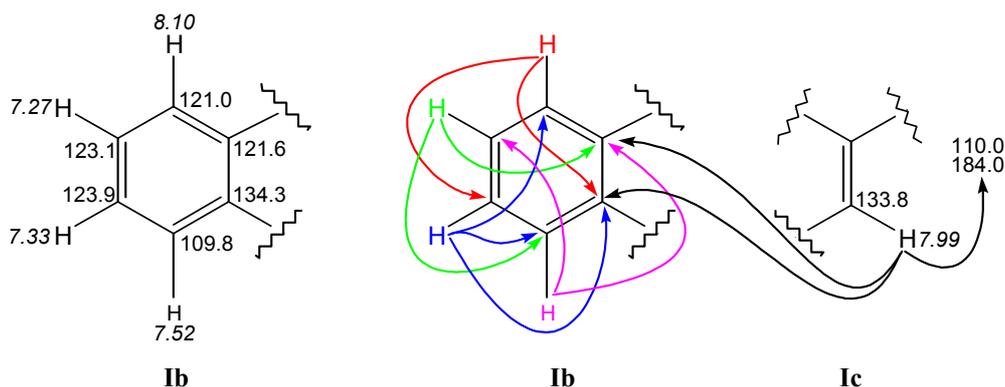
Weiteren Aufschluss über die Struktur erhält man durch verschiedene zweidimensionale NMR-Experimente. So gelingt die Bestimmung aller direkten CH-Kopplungen durch Auswertung des HSQC-Spektrums.

Bestätigung der bereits vermuteten Teilstruktur gibt die HMBC-Korrelation des austauschbaren Protons bei  $\delta_{\text{H}}$  8.28 mit dem Methylen-Kohlenstoff bei  $\delta_{\text{C}}$  38.3. Zusätzlich beobachtet man die erwarteten Kopplungen zwischen den einzelnen  $\text{CH}_2$ -Gruppen, was erneut für eine Kette aus vier Methylen-Einheiten spricht. Die Crosspeaks, die sowohl zwischen den Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  3.10 und dem Kohlenstoff bei  $\delta_{\text{C}}$  156.9 als auch zwischen den H-Atomen bei  $\delta_{\text{H}}$  3.17 und dem C-Signal  $\delta_{\text{C}}$  161.8 zu erkennen sind, lassen außerdem auf je eine Amid-Funktion an beiden Enden der aliphatischen Kette schließen. So kann folgende Teilstruktur vorgeschlagen werden.



**Abb. 67.** Teilstruktur **Ia** (600/151 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO)

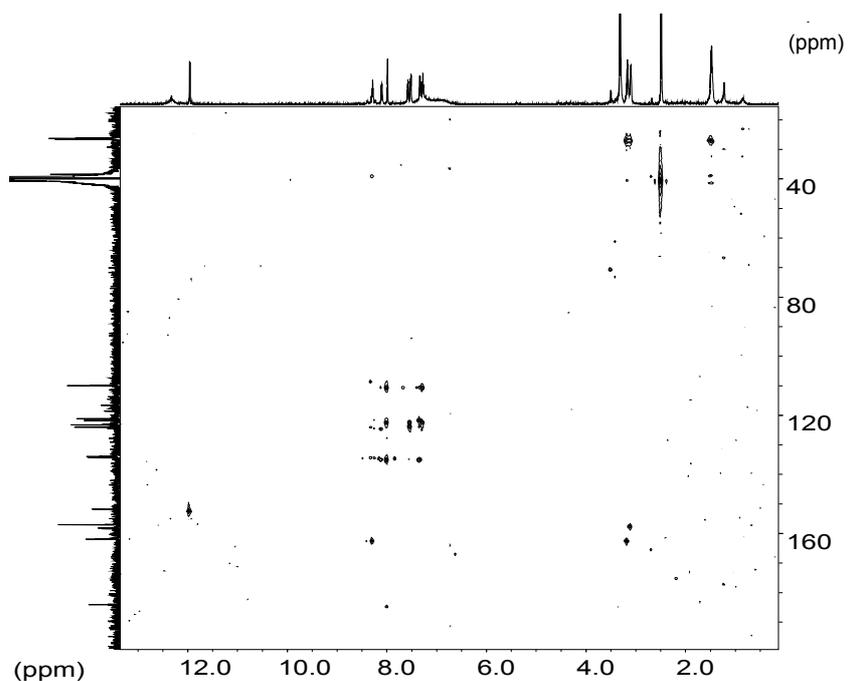
Von den weiteren HMBC-Korrelationen besitzen die des Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  7.99 besondere Bedeutung für die weitere Strukturaufklärung. Man beobachtet nicht nur Kopplungen zwischen diesem Signal und den Kohlenstoffen bei  $\delta_{\text{C}}$  121.6 und 134.3, die bereits durch die Korrelationen der Protonen des ABCD-Spinsystems auf den aromatischen Ring festgelegt sind, sondern auch Crosspeaks zu den C-Atomen bei  $\delta_{\text{C}}$  110.0 und 184.0. Damit lassen sich weitere Teilstrukturen formulieren.



**Abb. 68.** Chemische Verschiebungen und HMBC-Korrelationen weiterer Teilstrukturen

Aufgrund der chemischen Verschiebungen lässt sich vermuten, dass Birnbaumin A (**281**) einen heteroaromatischen Ring enthält. Da im Pilz größere Mengen Tryptophan (**18**) vorkommen, handelt es sich vielleicht um eine indolartige Teilstruktur. Es ist aber auch denkbar, dass Tryptophan (**18**) in *L. birnbaumii* als Biosynthesevorläufer verschiedene Ringverengungs- oder Ringerweiterungsreaktionen eingeht und somit möglicherweise eine Chinolin-Struktur vorliegt. Für die Klärung dieser Frage waren deshalb weitere Untersuchungen und Vergleiche mit entsprechenden Strukturen notwendig.

Das HMBC-Spektrum zeigt außer den beschriebenen Korrelationen auch noch eine interessante Kopplung des scharfen Singulettts bei  $\delta_{\text{H}}$  11.95 mit dem quartären C-Atom bei  $\delta_{\text{C}}$  151.7. Darüber hinaus liefert es keine Informationen über die Verknüpfung der bisherigen Teilstrukturen bzw. über die Position der austauschbaren Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  11.95 und 12.32 und des Kohlenstoffs bei  $\delta_{\text{C}}$  151.7.



**Abb. 69.** HMBC-Spektrum von Birnbaumin A (**281**) (600/151 MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO)

Die folgende Tabelle fasst alle bisherigen NMR-Daten zusammen.

**Tab. 3.** NMR-Daten von Birnbaumin A (**281**) (600/151 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO)

$\delta_C$ [ppm]	Art	$\delta_H$ [ppm]	M	$J_{HH}$ [Hz]	COSY $\delta_H$ [ppm]	HMBC $\delta_H$ [ppm]
26.2	CH <sub>2</sub>	1.48	breit		3.10, 3.17	1.48, 3.10, 3.17
26.4	CH <sub>2</sub>	1.48	breit		3.10, 3.17	1.48, 3.10, 3.17
38.3	CH <sub>2</sub>	3.17	q, breit	5.6	1.48, 8.28	1.48, 8.28
40.6	CH <sub>2</sub>	3.10	q, breit	5.6	1.48, 7.57	1.48
109.8	CH	7.52	d	7.8	7.33	7.27, 7.33
110.0	C <sub>q</sub>					7.99
121.0	CH	8.10	d	7.4	7.27	7.33
121.6	C <sub>q</sub>					7.27, 7.52, 7.99
123.1	CH	7.27	dd*	7.4/7.5	8.10	7.52
123.9	CH	7.33	dd*	7.4/7.8	7.52	8.10
133.8	CH	7.99	s			
134.3	C <sub>q</sub>					7.33, 7.99, 8.10
151.7	C <sub>q</sub>					11.95
156.9	C <sub>q</sub>					3.10
161.8	C <sub>q</sub>					3.17, 8.28
184.0	C <sub>q</sub>					7.99
	NH	7.57	t, breit		3.10	
	NH	8.28	t	5.6	3.17	
		11.95	s			
		12.32	breit			

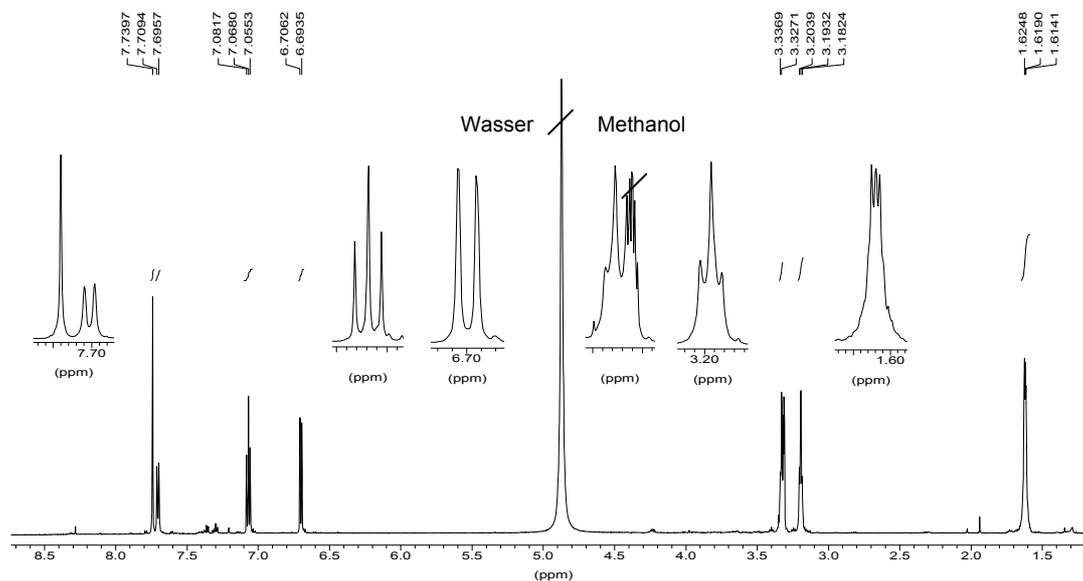
\*: Signale erscheinen als Triplett.

Die bisherigen Informationen reichen nicht aus, um einen vollständigen Strukturvorschlag zu formulieren. Weitere Hinweise kann eventuell die Untersuchung des zweiten Gelbfarbstoffes aus *L. birnbaumii* bringen, da dieser in deutlich größeren Mengen im Pilz vorkommt.

#### 4.5.2 NMR-Spektroskopie von Birnbaumin B (**282**)

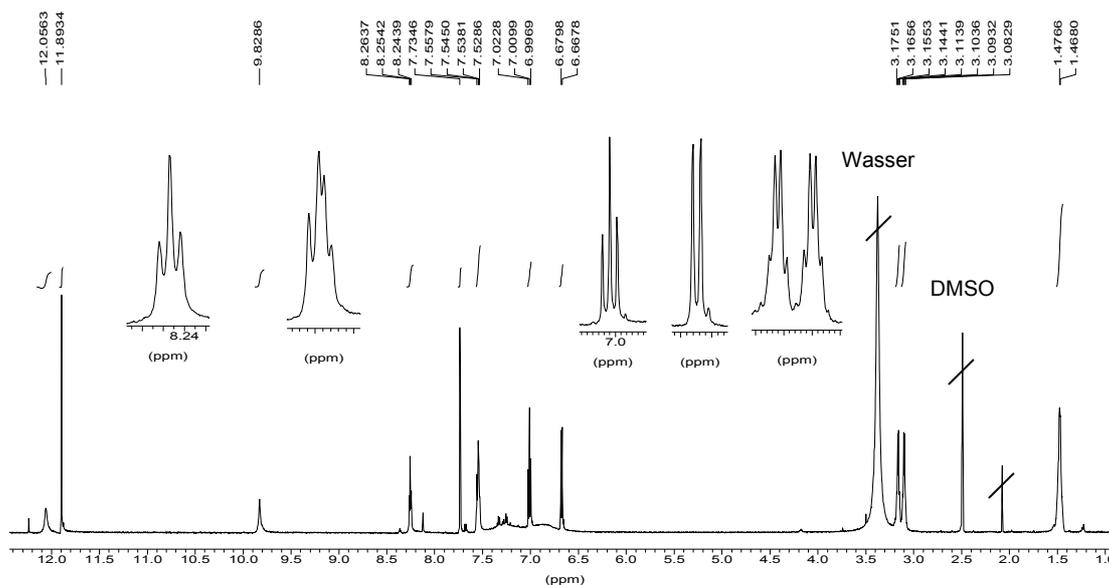
Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum in [D<sub>4</sub>]Methanol zeigt ähnlich wie beim Birnbaumin A (**281**) ein Signal bei  $\delta_H$  1.62, das vier Protonen entspricht und zwei Triplets bei  $\delta_H$  3.19 und 3.33, die wieder auf stickstoffverknüpfte CH<sub>2</sub>-Gruppen hindeuten. Im aromatischen Bereich findet man

bei Birnbaumin B (**282**) kein ABCD-, sondern nur ein ABC-Spinsystem und erneut ein einzelnes scharfes Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  7.74. Anscheinend besitzt die Verbindung einen zusätzlichen Substituenten am aromatischen Ring.



**Abb. 70.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Birnbaumin B (**282**) (600 MHz,  $[\text{D}_4]$ Methanol)

Bei Aufnahme des Protonenspektrums in  $[\text{D}_6]$ DMSO erscheinen im tiefen Feld bei  $\delta_{\text{H}}$  11.89 und 12.06 zwei Signale, von denen das erste ein scharfes Singulett darstellt, wie es von wasserstoffbrückengebundenen aciden Protonen hervorgerufen wird. Wie beim Birnbaumin A (**281**) beobachtet man bei  $\delta_{\text{H}}$  7.53 und 8.25 zwei Triplets, die hier aber deutlich schärfer erscheinen. Auch die Quartett-Struktur der Methylengruppen bei  $\delta_{\text{H}}$  3.10 und 3.16 ( $\delta_{\text{H}}$  3.19 und 3.33 in  $[\text{D}_4]$ Methanol) ist sehr gut zu erkennen. Anders als bei Birnbaumin A (**281**) beobachtet man beim zweiten gelben Pigment ein zusätzliches Signal bei  $\delta_{\text{H}}$  9.83, das ebenfalls einem austauschbaren Proton entspricht. Die chemische Verschiebung ist charakteristisch für phenolische OH-Gruppen. Daher kann man vermuten, dass es sich bei dem zusätzlichen Substituenten am aromatischen Ring um eine Hydroxy-Funktion handelt.



**Abb. 71.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Birnbaumin B (**282**) (600 MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO)

Das ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )-COSY-Spektrum in  $[\text{D}_6]$ DMSO zeigt Korrelationen, die auch für Birnbaumin B (**282**) wieder eine aliphatische Kette aus vier  $\text{CH}_2$ -Gruppen und jeweils einer NH-Funktion an deren Ende annehmen lassen. Das einzelne Proton bei  $\delta_{\text{H}}$  7.73 ( $\delta_{\text{H}}$  7.74 in  $[\text{D}_4]$ Methanol) koppelt zu keinem der anderen H-Atome, doch kann man bei Aufnahme eines NOESY-Spektrums in  $[\text{D}_6]$ DMSO eine NOE-Wechselwirkung zu dem NH-Proton bei  $\delta_{\text{H}}$  8.25 beobachten. Diese Korrelation ist der erste Hinweis auf eine Verknüpfung der aliphatischen Kette mit dem aromatischen Ring.

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum erkennt man 16 Signale, von denen vier aromatischen CH- und vier aliphatischen  $\text{CH}_2$ -Gruppen mit Hilfe des DEPT-Experimentes zugeordnet werden können. Wie bei Birnbaumin A (**281**) sind auch hier im tiefen Feld vier Signale bei  $\delta_{\text{C}}$  151.8, 156.9, 161.9 und 183.7 zu sehen. Außerdem erscheint bei  $\delta_{\text{C}}$  144.3 ein quartäres C-Atom, das vermutlich mit der phenolischen OH-Gruppe verknüpft ist.

Das Quartett der Trifluoressigsäure findet man auch im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Birnbaumin B (**282**), was wieder für die Bildung von Trifluoracetaten spricht.

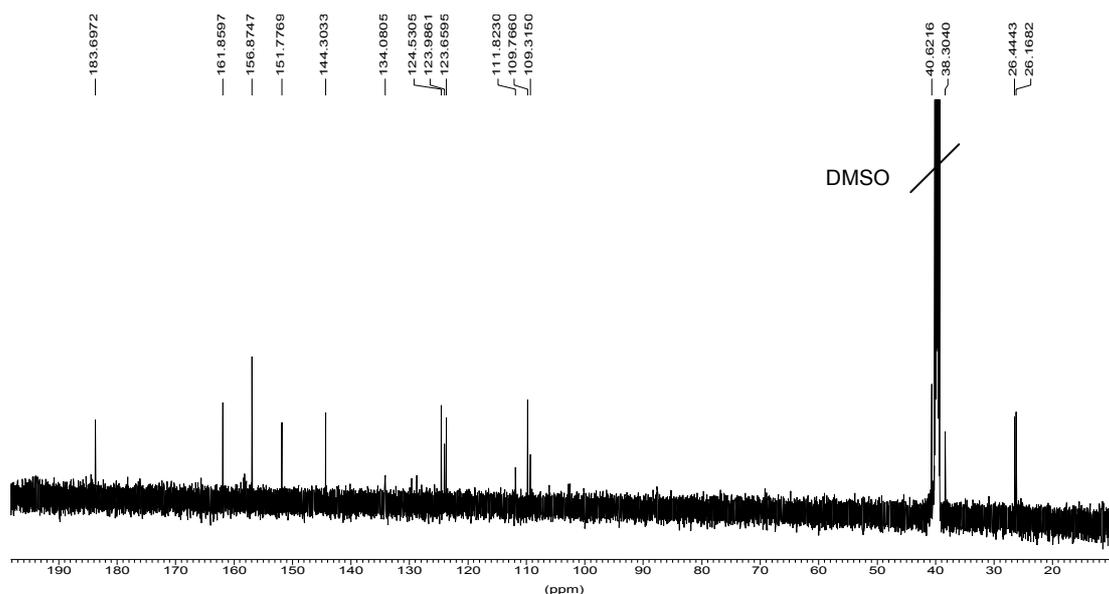


Abb. 72.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **282** (151 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )

Um zu überprüfen, ob Birnbaumin B (**282**) symmetrische Teilstrukturen enthält, wird ein quantitatives  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum aufgenommen. Die Messung wird in deuteriertem Methanol durchgeführt, da eine Methylengruppe im obigen Spektrum unter dem  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ -Signal verborgen liegt. Im Unterschied zu dem ersten Gelbfarbstoff gelingt es, 20 mg Reinsubstanz von Birnbaumin B (**282**) zu erhalten, so dass die Messung möglich wird.

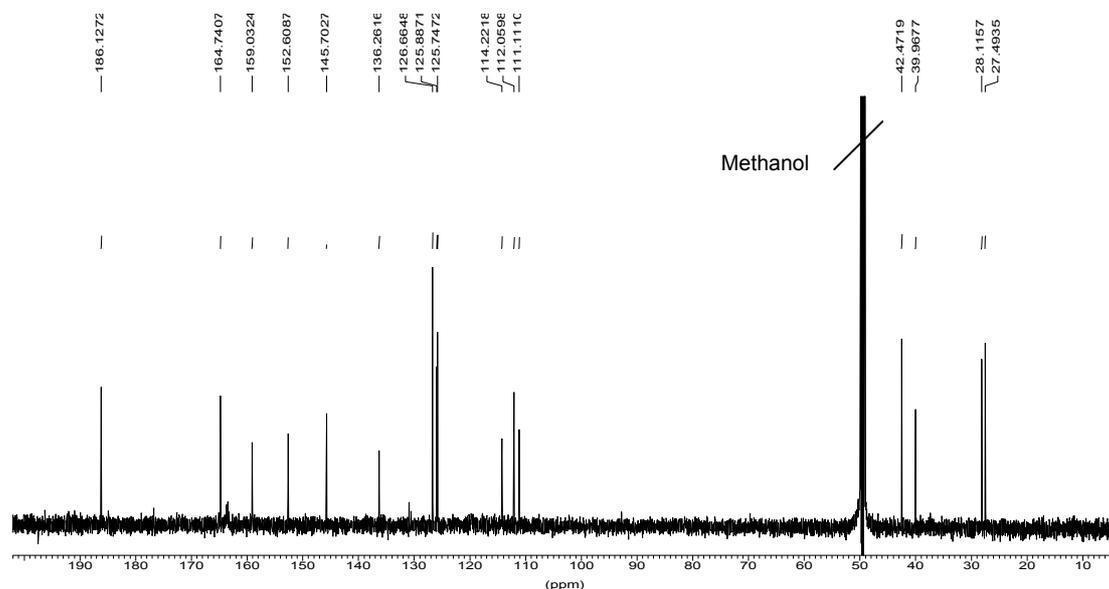
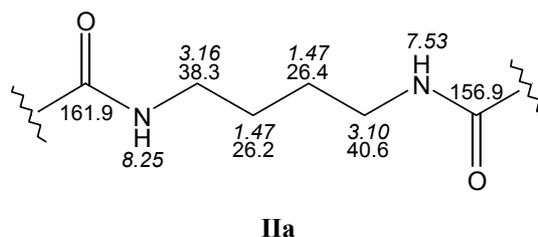


Abb. 73. Quantitatives  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **282** (151 MHz,  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$ )

Die Integration der Signale zeigt eindeutig, dass es sich um 16 Kohlenstoffe handelt und kein Signal mehr als einem C-Atom entspricht.

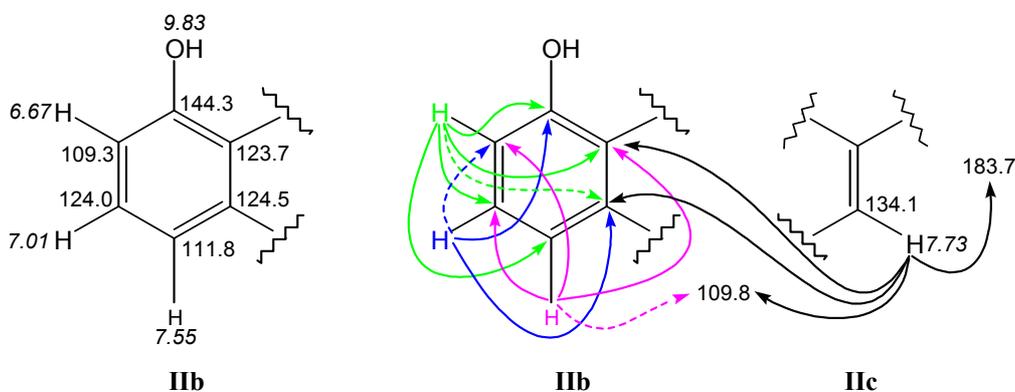
Weitere Informationen über die Struktur des gelben Hauptinhaltsstoffes erhält man durch verschiedene zweidimensionale NMR-Experimente. So gelingt die Zuordnung der direkten CH-Kopplungen mit Hilfe des HSQC-Spektrums. Im HMBC-Spektrum beobachtet man Korrelationen sowohl ausgehend von den Protonen der Methylen-Gruppen als auch von den beiden austauschbaren Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  7.53 und 8.25, so dass man wie für Birnbaumin A (**281**) folgende Teilstruktur formulieren kann.



**Abb. 74.** Teilstruktur mit NMR-Daten (600/151 MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO)

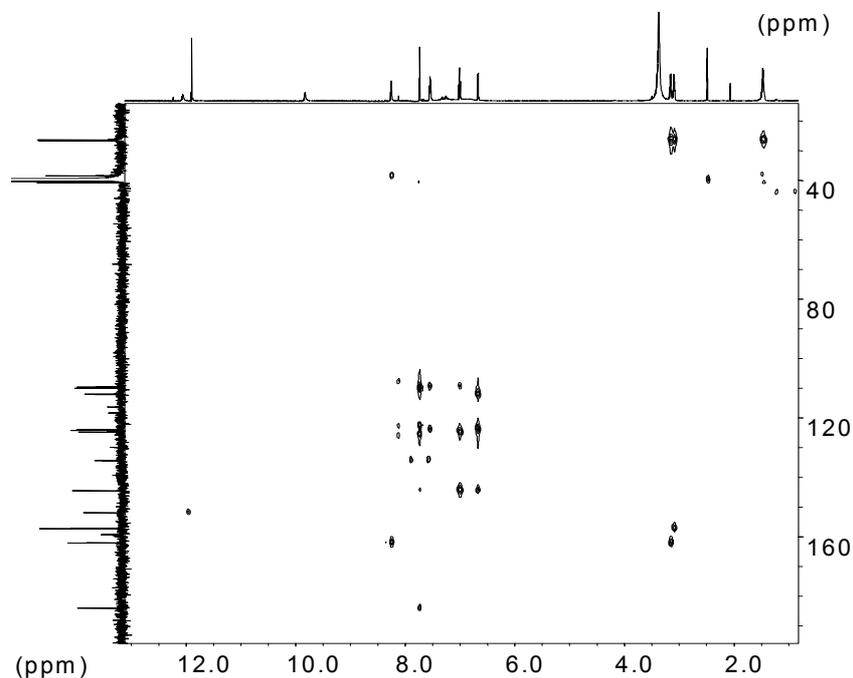
Das aromatische Proton bei  $\delta_{\text{H}}$  7.73 zeigt HMBC-Korrelationen zu quartären C-Atomen bei  $\delta_{\text{C}}$  109.8, 123.7, 124.5 und 183.7, wovon die beiden Kohlenstoffe bei  $\delta_{\text{C}}$  123.7 und 124.5 durch Kopplungen mit den Protonen des ABC-Spinsystems dem aromatischen Ring zugeordnet werden können. Zu dem C-Atom bei  $\delta_{\text{C}}$  109.8 beobachtet man außerdem noch eine schwache Korrelation von dem Wasserstoff-Atom bei  $\delta_{\text{H}}$  7.55.

Die Teilstruktur **IIb**, die sich aufgrund dieser Wechselwirkungen formulieren lässt, ähnelt stark dem für Birnbaumin A (**281**) vorgeschlagenen Teilstück **Ib**. Unterschiede in den chemischen Verschiebungen werden durch den zusätzlichen Substituenten am Aromaten hervorgerufen.



**Abb. 75.** Chemische Verschiebungen und HMBC-Korrelationen weiterer Teilstrukturen (schwache Korrelationen mit gestrichelten Pfeilen dargestellt)

Wie bei Birnbaumin A (**281**) erkennt man auch beim zweiten Pigment **282** eine Kopplung des scharfen Singuletts bei  $\delta_{\text{H}}$  11.89 mit dem Kohlenstoff-Atom bei  $\delta_{\text{C}}$  151.8, die auf weitere Gemeinsamkeiten der beiden Inhaltsstoffe hindeutet.

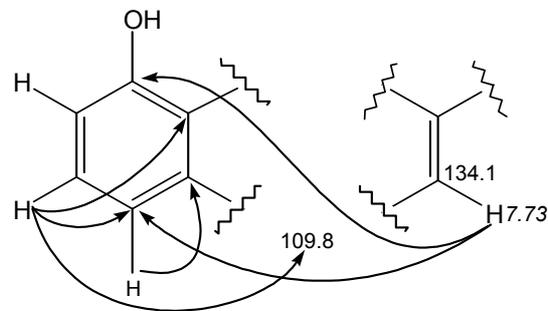


**Abb. 76.** HMBC-Spektrum von Birnbaumin B (**282**) (600/151 MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO)

Entscheidende Informationen über die Verknüpfung der einzelnen Teilstrukturen fehlen noch und lassen sich auch aus dem HMBC-Spektrum nicht ermitteln. Da von Birnbaumin B (**282**) mehr Substanz zur Verfügung steht, als von Birnbaumin A (**281**), sollen damit weitere NMR-Experimente durchgeführt werden. Zuerst wird ein ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )-TOCSY-Spektrum in  $[\text{D}_6]$ DMSO aufgenommen. Im Unterschied zur normalen COSY-Technik wird die Magnetisierung nicht von einem Kern auf die koppelnden Kerne übertragen, sondern der Magnetisierungstransfer erfolgt entlang eines Spinsystems, selbst wenn die Protonen nicht miteinander koppeln. Im TOCSY-Spektrum von Birnbaumin B (**282**) erkennt man zusätzlich zu den bereits aus dem COSY-Spektrum bekannten Korrelationen Crosspeaks zwischen den beiden Methylen-Gruppen bei  $\delta_{\text{H}}$  1.47 und den austauschbaren Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  7.53 und 8.25. Das bestätigt die formulierte aliphatische Teilstruktur, ergibt aber keine neuen Hinweise auf ihre Verknüpfung mit dem Rest des Moleküls.

Weitere Informationen sollen durch Aufnahme von HMBC-Spektren mit verschiedenen Delayzeiten  $D_6$  erhalten werden. Normalerweise beträgt die Relaxationszeit  $D_6$  70 ms, bei der einige Korrelationen aufgrund kleinerer Kopplungskonstanten oft nicht sichtbar werden.

Dabei kann es sich um  $^2J$ - und  $^4J$ -CH-Kopplungen oder auch um  $^3J$ -CH-Kopplungen bei ungünstigen geometrischen Verhältnissen handeln. In mehreren Versuchen wird deshalb die Delayzeit schrittweise um 35 ms erhöht. Das beste Resultat wird bei einer Relaxationszeit  $D_6$  von 140 ms erreicht.



**Abb. 77.** Nur bei  $D_6 = 140$  ms sichtbare HMBC-Korrelationen

In der folgenden Tabelle ist eine Übersicht aller bisherigen NMR-Daten dargestellt.

**Tab. 4.** NMR-Daten von Birnbaumin B (**282**) (600/151 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO)

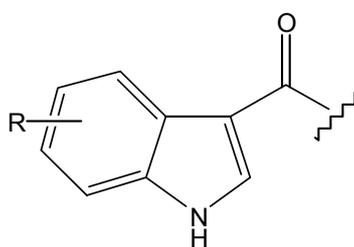
$\delta_C$ [ppm]	Art	$\delta_H$ [ppm]	M	$J_{HH}$ [Hz]	COSY $\delta_H$ [ppm]	NOESY $\delta_H$ [ppm]	HMBC $\delta_H$ [ppm]
26.2	CH <sub>2</sub>	1.47	breit		3.10, 3.16, 7.53*, 8.25*		1.47, 3.10, 3.16
26.4	CH <sub>2</sub>	1.47	breit		3.10, 3.16, 7.53*, 8.25*		1.47, 3.10, 3.16
38.3	CH <sub>2</sub>	3.16	q	5.7	1.47, 8.25	8.25	1.47, 8.25
40.6	CH <sub>2</sub>	3.10	q	6.2	1.47, 7.53		1.47
109.3	CH	6.67	d	7.5	7.01, 7.55 <sup>s</sup>	7.01, 7.55 <sup>s</sup>	7.01 <sup>s</sup> , 7.55
109.8	C <sub>q</sub>						7.01 <sup>#</sup> , 7.55 <sup>s</sup> , 7.73
111.8	CH	7.55	d	7.8	6.67 <sup>s</sup> , 7.01	6.67 <sup>s</sup> , 7.01	6.67, 7.01 <sup>#</sup> , 7.73 <sup>#</sup>
123.7	C <sub>q</sub>						6.67, 7.01 <sup>#</sup> , 7.55 <sup>s</sup> , 7.73
124.0	CH	7.01	dd	7.5/7.8	6.67, 7.55	6.67, 7.55	6.67, 7.55
124.5	C <sub>q</sub>						6.67 <sup>s</sup> , 7.01, 7.55 <sup>#</sup> , 7.73
134.1	CH	7.73	s			8.25 <sup>s</sup>	
144.3	C <sub>q</sub>						6.67, 7.01, 7.73 <sup>#</sup>
151.8	C <sub>q</sub>						11.89
156.9	C <sub>q</sub>						3.10
161.9	C <sub>q</sub>						3.16, 8.25
183.7	C <sub>q</sub>						7.73
	NH	7.53	t	5.7	1.47*, 3.10		
	NH	8.25	t	5.7	1.47*, 3.16		
	OH	9.83	s				
		11.89	s				
		12.06	s				

„s“ = schwach

\*: Korrelationen nur im (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H)-TOCSY-Spektrum sichtbar#: Korrelationen nur im HMBC-Spektrum mit D<sub>6</sub> = 140 ms sichtbar.

### 4.5.3 Schlussfolgerung

Aus der großen Übereinstimmung der NMR-Daten von Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) lässt sich ableiten, dass beide Pigmente den gleichen Strukturtyp enthalten. Wie bereits erwähnt, könnte es sich bei der aromatischen Einheit von **281** und **282** um ein Indol-Ringsystem handeln. Aufgrund der Singulett-Struktur und der fehlenden COSY-Korrelationen kann man davon ausgehen, dass das Proton bei  $\delta_{\text{H}}$  7.99 (in **281**) bzw.  $\delta_{\text{H}}$  7.73 (in **282**) isoliert im Indol-Ring vorliegt, wie das bei einer Substitution in 3-Position für das Wasserstoffatom in 2-Position der Fall ist. Betrachtet man jeweils die weiteren Korrelationen dieser Protonen, so kann man folgende aromatische Teilstruktur formulieren.

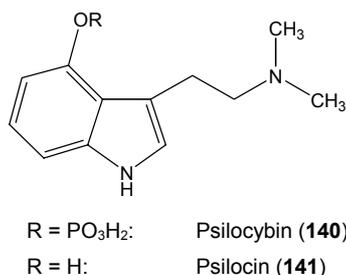


R = H (**Id**) oder OH (**IId**)

**Abb. 78.** Aromatische Teilstruktur **Id** für Birnbaumin A und **IId** für Birnbaumin B

Die phenolische OH-Gruppe in **282** muss sich entweder in 4- oder 7-Position befinden, da man im Protonenspektrum ein ABC-Spinsystem beobachtet.

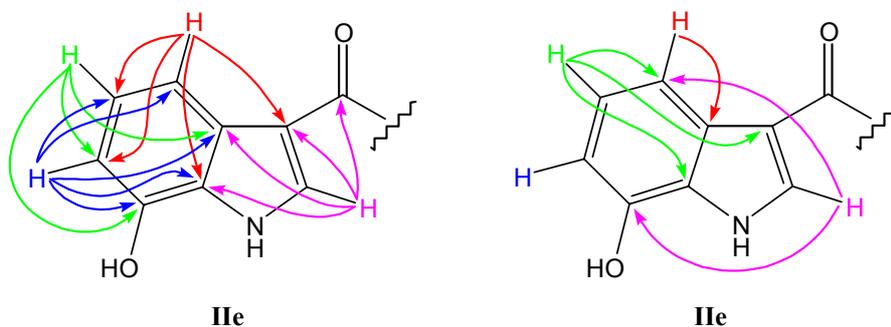
Da Naturstoffe mit 4-Hydroxyindol-Grundstruktur auch in anderen Pilzen der Ordnung *Agaricales* vorkommen, lässt sich vermuten, dass Birnbaumin B (**282**) ebenfalls eine solche Struktureinheit enthält. Bei den bisher isolierten Inhaltsstoffen handelt es sich um die halluzinogenen Indol-Alkaloide Psilocybin (**140**) und Psilocin (**141**), die erstmals von Hofmann et al.<sup>[97]</sup> in dem mexikanischen Pilz *Psilocybe mexicana* gefunden und in ihrer Struktur aufgeklärt wurden. In den letzten Jahren gelang der Nachweis von Psilocybin (**140**) in zahlreichen Pilzen in Nordamerika, Europa, Asien und auch in Australien.<sup>[98]</sup>



**Abb. 79.** Psilocybin (**140**) und Psilocin (**141**)

In ihrer Wirkung unterscheiden sich **140** und **141** nicht sehr von Mescaline oder LSD. Dabei stellt Psilocin (**141**), biosynthetischer Vorläufer von **140**, das ZNS-aktive Wirkprinzip dar und wird zur Stabilisierung im Pilz phosphoryliert. Beide Alkaloide entstehen aus L-Tryptophan (**18**) über *N,N*-Dimethyltryptamin als bereits halluzinogenes Intermediat.

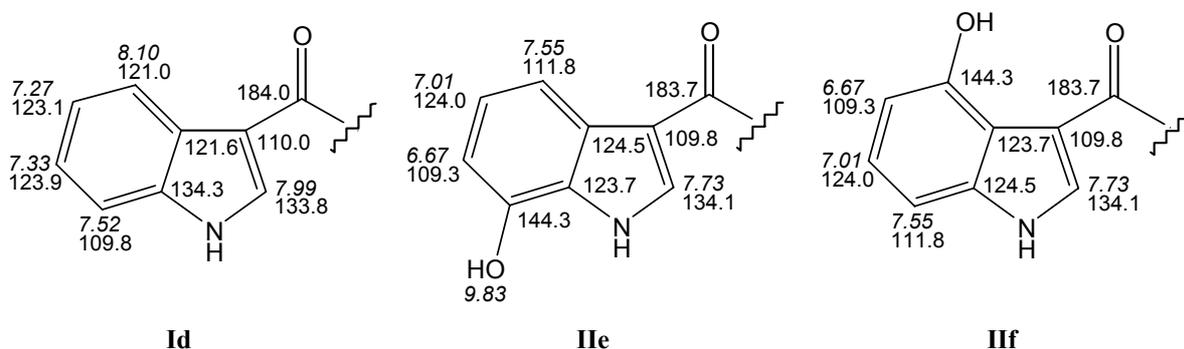
Für eine 7-Stellung der OH-Gruppe sprechen die beschriebenen HMBC-Korrelationen (Kapitel 4.5.2). Auch die zusätzlichen, erst bei veränderter Delayzeit ermittelten CH-Kopplungen unterstützen den folgenden Vorschlag für die aromatische Teilstruktur von Birnbaumin B (**282**).



**Abb. 80.** HMBC-Korrelationen bei  $D_6 = 70$  ms (links) und zusätzliche Korrelationen bei  $D_6 = 140$  ms

Hydroxy-Substituenten an aromatischen Systemen rufen durch mesomere Effekte einen Elektronenüberschuss und damit eine Hochfeldverschiebung in *ortho*- bzw. *para*-Position hervor. Gleichzeitig wird das C-Atom, das die OH-Gruppe trägt, durch die hohe Elektronegativität des Sauerstoffs entschirmt und dadurch tieffeldverschoben. Birnbaumin B (**282**) sollte daher in *ortho*- und *para*-Stellung der Hydroxy-Funktion Abweichungen in den chemischen Verschiebungen im Vergleich zu Birnbaumin A (**281**) aufweisen. Abbildung 81

zeigt die NMR-Daten der Teilstruktur **Id** für Birnbaumin A (**281**) und der möglichen Teilstrukturen **Ile** und **IIf** bei 7- bzw. 4-Hydroxylierung für Birnbaumin B (**282**).



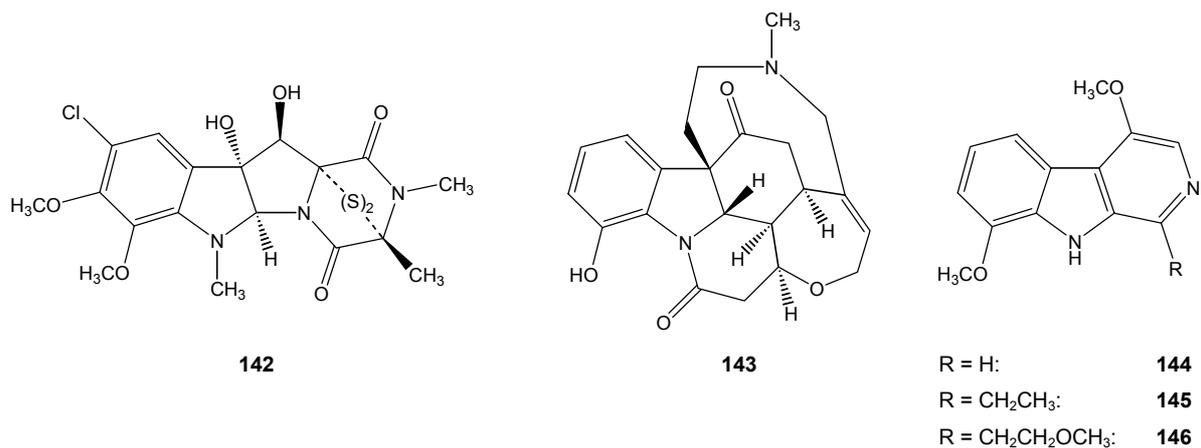
**Abb. 81.** Vergleich zwischen der vorgeschlagenen Teilstruktur **Id** für Birnbaumin A und Teilstruktur **Ile** mit 7- und Teilstruktur **IIf** mit 4-Hydroxy-Substitution für Birnbaumin B

Man erkennt, dass sich die OH-Gruppe in **282** wahrscheinlich in 7-Position am Aromaten befindet, was im Weiteren noch durch Synthese bzw. Derivatisierung bewiesen werden soll.

7-Hydroxylierung an Indolen kann auch bei anderen Naturstoffen beobachtet werden, wie z. B. in den Sporidesminen. Dabei handelt es sich um Mycotoxine, die von *Pithomyces chartarum* gebildet werden und vor allem in Neuseeland für eine bei Schafen auftretende Mycotoxikose verantwortlich sind.<sup>[99]</sup>

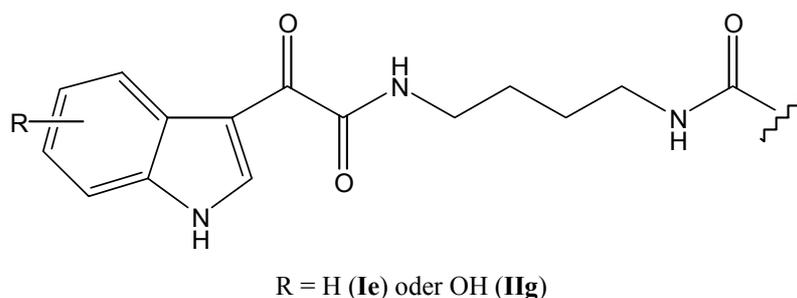
Verschiedene Pflanzen produzieren ebenfalls Sekundärmetabolite mit 7-Hydroxyindol-Struktureinheit. Aus den Samen des Krähenaugenbaumes (*Strychnos nux-vomica*) konnte neben Strychnin das extrem stark Brechreiz-erzeugende Vomycin (**143**) isoliert werden.<sup>[100-102]</sup>

Im Holz der japanischen Pflanze *Picrasma quassioides* fand man verschiedene  $\beta$ -Carbolin-Alkaloide **144-146**, die als Inhibitoren der cAMP-Phosphodiesterase wirken.<sup>[103-106]</sup>



**Abb. 82.** Sporidesmin A (**142**), Vomycin (**143**) und  $\beta$ -Carbolin-Alkaloide **144-146**

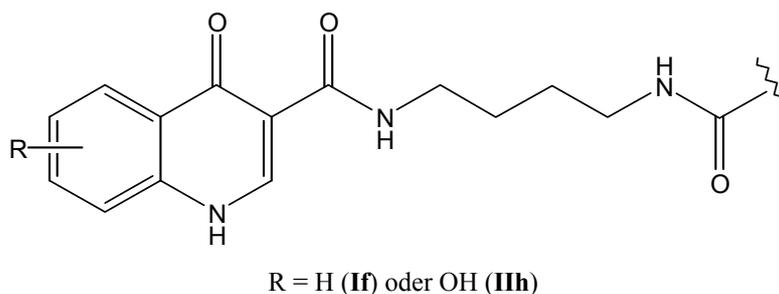
Außer den bereits vorgeschlagenen Teilstrukturen findet man in Birnbaumin B (**282**) nur noch das Kohlenstoffatom bei  $\delta_C$  151.8 und eine unbekannte Anzahl von Heteroatomen. Aufgrund der einzigen Korrelation des C-Atoms bei  $\delta_C$  151.8 mit dem scharfen Singulett bei  $\delta_H$  11.89 kann man ausschließen, dass dieses Kohlenstoff zwischen der aromatischen und der aliphatischen Einheit positioniert ist und diese miteinander verbindet. Wahrscheinlicher ist eine direkte Verknüpfung des aromatischen mit dem aliphatischen Teil, so dass eine Glyoxyleinheit entsteht. Auch für Birnbaumin A (**281**) kann man eine analoge Teilstruktur formulieren. Biosynthetisch ließe sich eine solche Einheit von Tryptophan (**18**) ableiten.



**Abb. 83.** Teilstruktur **Ie** für Birnbaumin A und **IIg** für Birnbaumin B

Zu der fehlenden Endgruppe des Moleküls lassen sich mit den bisherigen Informationen keine konkreten Aussagen treffen.

Außer einer Indolstruktur kann auch eine Chinolin-Einheit als aromatischer Teil in Betracht kommen. Um das gleiche Substitutionsmuster wie in den Pigmenten aus *L. birnbaumii* zu erhalten, muss man eine 3,4-Disubstitution für Birnbaumin A (**281**) und eine 3,4,5- bzw. 3,4,8-Trisubstitution für Birnbaumin B (**282**) annehmen. Unter Einbeziehung der übrigen NMR-Daten lässt sich die Struktur eines 4-Chinolons bzw. die tautomere Form eines 4-Hydroxychinolins formulieren.

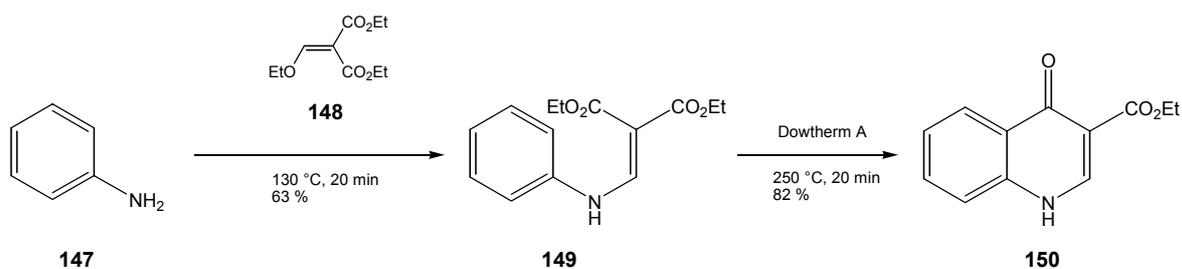


**Abb. 84.** 4-Chinolon-Struktur als aromatische Einheit von Birnbaumin A (Teilstruktur **If**) und B (Teilstruktur **Ih**)

Durch einen Vergleich der chemischen Verschiebungen von synthetischen Verbindungen mit Indol- bzw. Chinolin-Struktur soll eine weitere Klärung erfolgen.

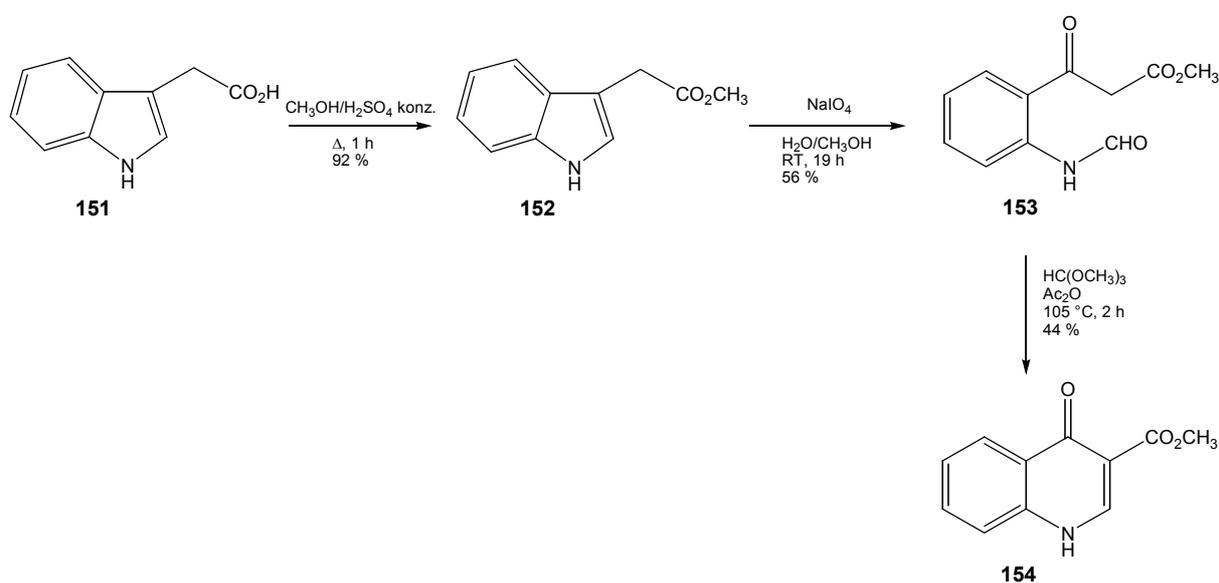
#### 4.5.4 Ausschluss isomerer Chinolonstrukturen durch Vergleich mit synthetischen Modellverbindungen

Einen schnellen Zugang zu 3,4-disubstituierten Chinolinen erhält man durch thermische Cyclisierung von 2-Phenylaminomethylenmalonsäurediethylester (**149**).<sup>[107-111]</sup> Dieser entsteht bei der Umsetzung von Anilin (**147**) mit Ethoxymethylenmalonsäurediethylester (**148**) unter Abspaltung von Ethanol in hoher Reinheit.<sup>[112]</sup> Anschließend erhitzt man **149** für 20 Minuten in Dowtherm A auf 250 °C und erhält 4-Oxochinolin-3-carbonsäureethylester (**150**) in 82 % Ausbeute. Die Produktbildung wird gefördert, wenn man den entstehenden Alkohol durch einen steten Stickstoffstrom aus dem Reaktionsgemisch entfernt.<sup>[109]</sup>



**Abb. 85.** Synthese von 4-Oxochinolin-3-carbonsäureethylester (**150**)

Eine andere Chinolin-Synthese geht von (Indol-3-yl)essigsäure (**151**) aus, die im ersten Schritt mit Methanol und konzentrierter Schwefelsäure verestert wird. Anschließend erfolgt Ringöffnung durch oxidative Spaltung der C=C-Doppelbindung in 2,3-Position. Die Oxidation kann durch Ozonolyse<sup>[113]</sup>, Umsetzung mit Persäuren<sup>[114]</sup> oder photochemisch<sup>[115]</sup> erfolgen. Unter besonders milden Bedingungen verläuft die Reaktion mit Natriumperiodat.<sup>[116]</sup> Das in 56 % entstehende Oxidationsprodukt **153** wird in einer Mischung aus Orthoameisensäuretrimethylester und Acetanhydrid zum 4-Oxochinolin-3-carbonsäuremethylester (**154**) umgesetzt.



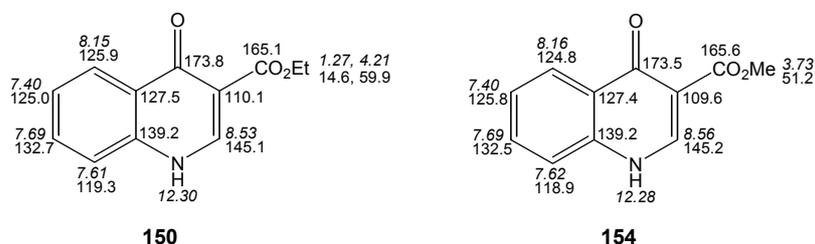
**Abb. 86.** Synthese von 4-Oxochinolin-3-carbonsäuremethylester (**154**)

In ähnlicher Form könnte man sich die biosynthetische Entstehung von Chinolinen aus indolartigen Biosynthesevorläufern vorstellen.

Umfangreiche Tautomerie-Studien zeigen, dass die Verbindungen **150** und **154** in Lösung (DMSO) ausschließlich in der 4-Oxo-Form vorliegen. Auch bei anderen Chinolin-Derivaten,

die ebenfalls am Stickstoff unsubstituiert sind, beobachtet man bei Röntgenstrukturanalysen nur die 4-Chinolon-Struktur.<sup>[117]</sup>

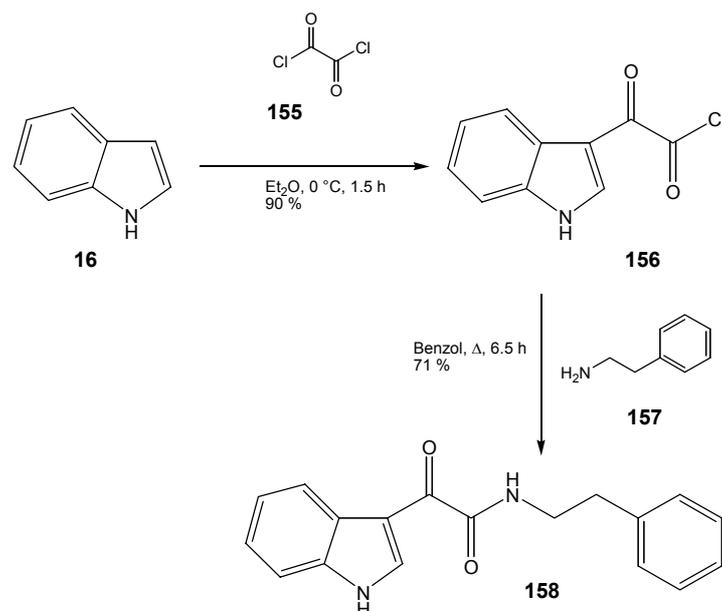
Somit ergeben sich folgende chemische Verschiebungen für die Vergleichsverbindungen **150** und **154**.



**Abb. 87.** NMR-Daten der Vergleichsverbindungen **150** und **154** ([D<sub>6</sub>]DMSO)

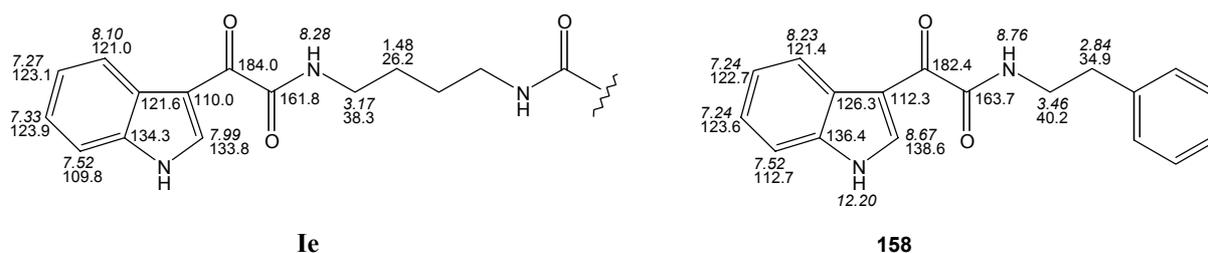
Vergleicht man nun die chemischen Verschiebungen von Birnbaumin A (**281**) mit denen von **150** und **154**, so erkennt man vor allem in 2- und in 8a-Position der 4-Oxochinoline starke Abweichungen. Während diese Werte im Vergleich zu Birnbaumin A (**281**) bei zu tiefem Feld liegen, erscheint die Keto-Funktion in 4-Position um 10 ppm zu hochfeldverschoben.

Zur Darstellung einer weiteren Vergleichsverbindung wird Indol (**16**) mit Oxalylchlorid (**155**) in etherischer Lösung bei 0 °C umgesetzt.<sup>[118,119]</sup> Dabei entsteht (Indol-3-yl)glyoxylchlorid (**156**) in 90 % Ausbeute als zitronengelber, kristalliner Feststoff, der anschließend mit 2-Phenylethylamin (**157**) zum Amid **158** reagiert.<sup>[120]</sup>



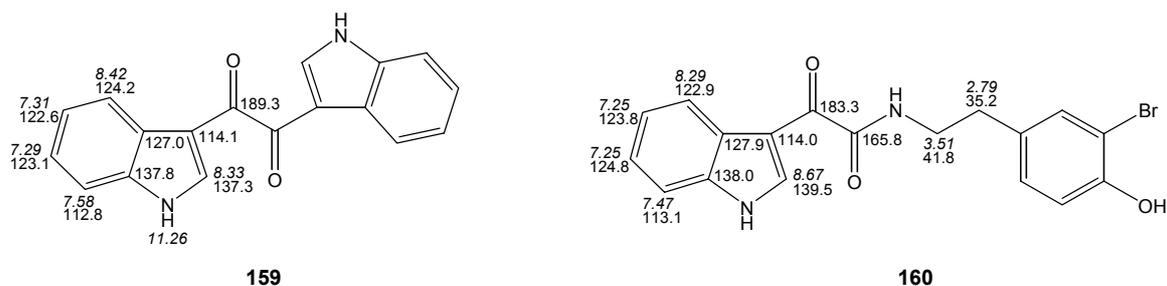
**Abb. 88.** Darstellung von 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxo-*N*-phenylethylacetamid (**158**)

Ein Vergleich von **158** mit der für **281** vorgeschlagenen Teilstruktur **Ie** zeigt für das ABCD-Spinsystem des aromatischen Molekülteils gute Übereinstimmung. Auch die chemischen Verschiebungen der nebeneinanderliegenden Carbonyl-Gruppen bestätigen die glyoxylartige Teilstruktur. Auffällig jedoch ist die Abweichung sowohl der  $^1\text{H}$ - als auch der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten für die 2-Position im Indol-Ring.



**Abb. 89.** Vergleich der NMR-Daten von Birnbaum A (Teilstruktur **Ie**) und **158** ( $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )

Betrachtet man zwei weitere natürliche Indol-Derivate **159** und **160** mit sehr ähnlichen Teilstrukturen, die in verschiedenen Meeresorganismen vorkommen, so erkennt man auch hier eine deutliche Tieffeldverschiebung in 2- und in 7a-Position im Vergleich zu Birnbaum A (**281**).



**Abb. 90.** NMR-Daten von **159**<sup>[121]</sup> ( $[\text{D}_6]$ Aceton) und **160**<sup>[122]</sup> ( $[\text{D}_4]$ Methanol)

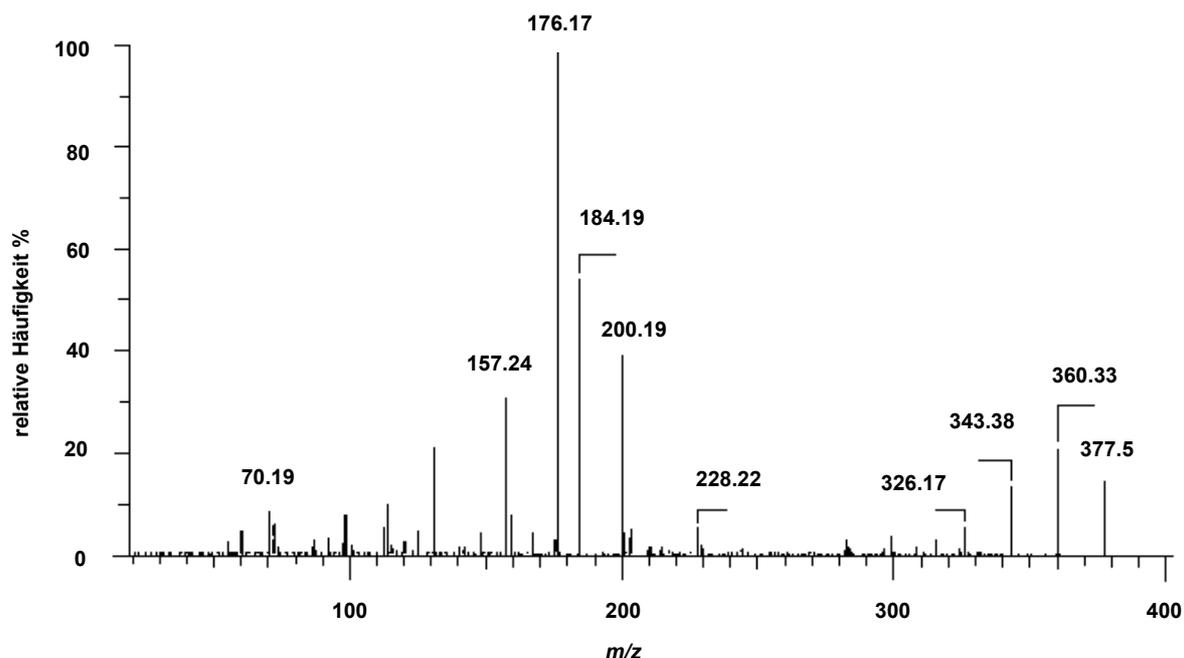
Die Abweichungen der chemischen Verschiebungen in *ortho*-Stellung zur indolischen NH-Funktion deuten darauf hin, dass Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) noch eine andere Struktureinheit enthalten. Denkbar ist eine Substitution am Indol-Stickstoff, was nun durch massenspektrometrische Untersuchungen geklärt werden soll.

#### 4.5.5 Massenspektrometrie von Birnbaumin A (**281**) und B (**282**)

Die Aufnahme eines EI-Massenspektrums von Birnbaumin B (**282**) ergibt keinen auswertbaren Molpeak. Deutlich erkennbar bei  $m/z = 69$  und  $m/z = 97$  sind die Ionen  $\text{CF}_3^+$  und  $\text{CF}_3\text{CO}^+$ , was das Vorliegen der Birnbaumine als Trifluoracetate bestätigt.

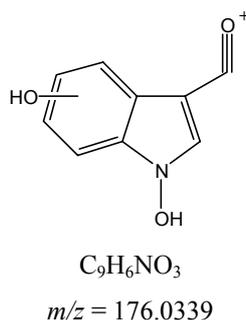
Um aussagekräftige Massenspektren zu erhalten, wird versucht, Birnbaumin B (**282**) zu silylieren. Dafür versetzt man den getrockneten Naturstoff **282** bei Raumtemperatur mit MSTFA. Obwohl eine Umsetzung zu beobachten ist, ergibt die nachfolgende Massenspektrometrie weder einen entsprechenden Molpeak noch auswertbare Bruchstücke.

Auch im CI- und im APCI-Massenmodus erhält man keinen Molekülpeak. Erst das ESI-Spektrum von **282** zeigt einen  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Peak bei  $m/z = 377$ , der hochaufgelöst einer Summenformel von  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_5$  entspricht. Die ermittelte Summenformel steht im Einklang mit dem quantitativen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum, in dem ebenfalls 16 C-Atome zu sehen sind. Da man im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum nur 17 H-Atome erkennt, enthält Birnbaumin B (**282**) offenbar noch drei weitere austauschbare Protonen. Erstaunlich ist die hohe Anzahl an Stickstoffatomen. Da die NMR-Daten der bereits vorgeschlagenen Teilstrukturen von Birnbaumin B (**282**) keine weiteren Hinweise auf N-Atome liefern, müssen sich die drei verbleibenden Stickstoffe in der noch unbekanntem Endgruppe befinden. Weiteren Aufschluss erhält man durch die Durchführung von MS/MS-Messungen im ESI-Modus.



**Abb. 91.** ESI-MS/MS-Spektrum von Birnbaumin B (**282**)

Man beobachtet mehrere MS/MS-Bruchstücke, deren Zusammensetzung durch Hochauflösung bestimmt wird. Betrachtet man die bisher ermittelten Teilstrukturen, erwartet man eine Spaltung zwischen den beiden Carbonyl-Kohlenstoffen der Glyoxyleinheit. Tatsächlich findet man ein Fragment mit  $m/z = 176.0339$  und einer Zusammensetzung von  $C_9H_6NO_3$ , das dem aromatischen Teil zugeordnet werden kann. Dabei zeigt sich, dass der Indol-Stickstoff in Birnbaumin B (**282**) kein Proton trägt, sondern durch eine OH-Gruppe substituiert ist.



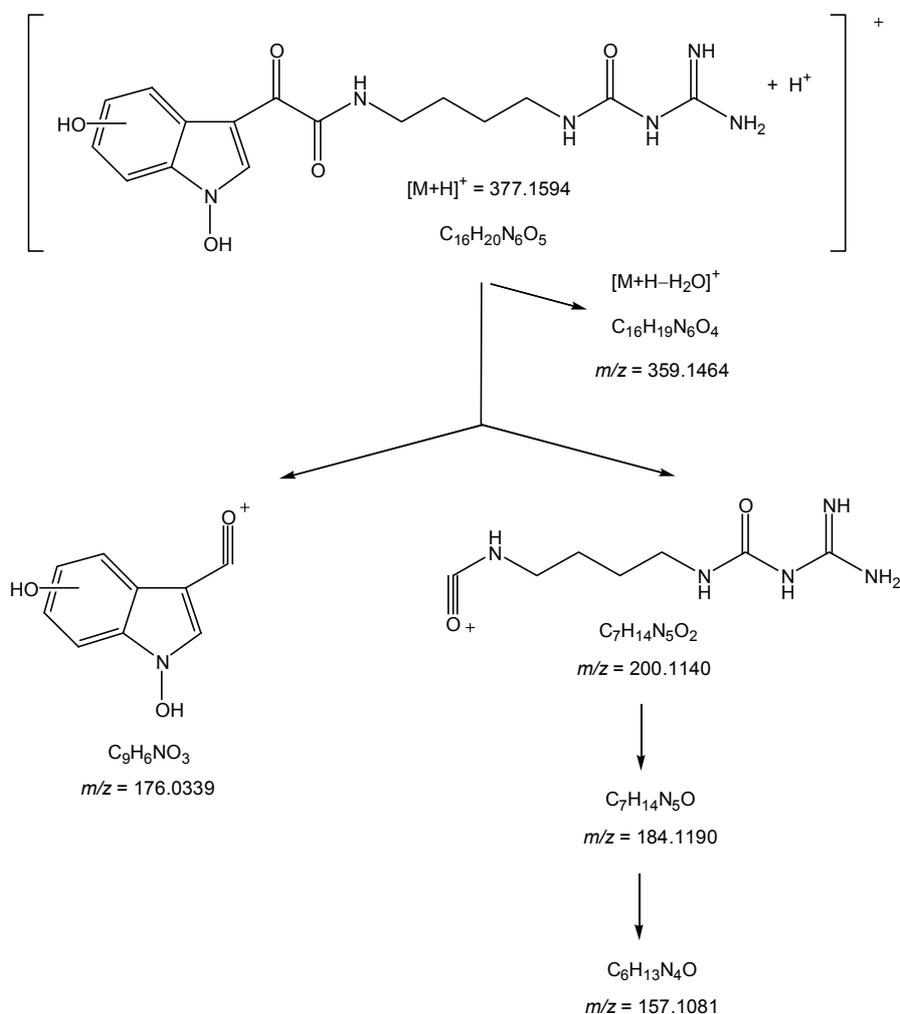
**Abb. 92.** MS/MS-Fragment aus Birnbaumin B (**282**)

Das Vorliegen einer *N*-Hydroxy-indol-Einheit würde die Abweichungen der chemischen Verschiebungen im Vergleich zu den im Kapitel 4.5.4 beschriebenen Indol-Derivaten

erklären, da die Hydroxy-Funktion sowohl in 2- als auch in 7a-Position eine Hochfeldverschiebung verursacht.

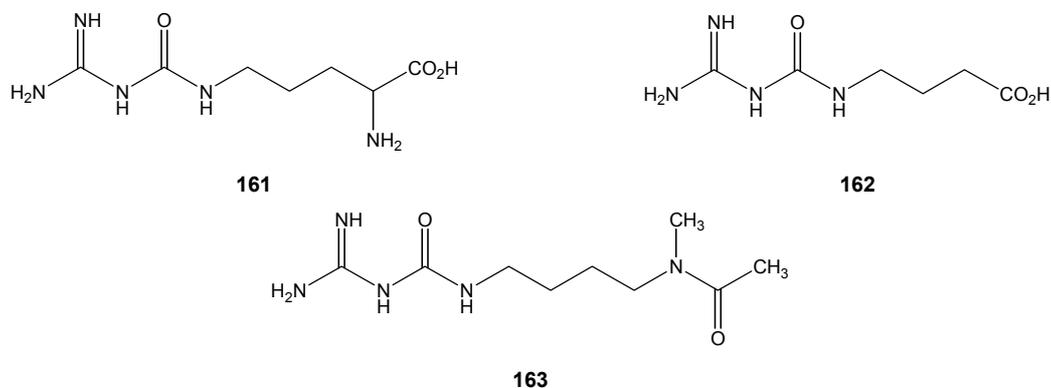
Im MS/MS-Spektrum beobachtet man außerdem ein weiteres Spaltstück bei  $m/z = 200.1140$  und mit einer Zusammensetzung von  $C_7H_{14}N_5O_2$ , das der zweiten Hälfte des Moleküls nach der Spaltung der Bindung zwischen den beiden Carbonyl-Funktionen entspricht.

Betrachtet man die bisher formulierten Teilstrukturen und die Erkenntnisse aus der Massenspektrometrie, so ergibt sich für die unbekannte Endgruppe laut Summenformel eine Zusammensetzung von  $CH_4N_3$ . Die verbleibenden Atome lassen sich in Form einer Amidinoharnstoff-Gruppe sinnvoll anordnen und mit der durch die NMR-Spektroskopie ermittelten Teilstruktur verknüpfen. Damit lassen sich nun der Strukturvorschlag **III** und folgende Fragmentierung für Birnbaumin B (**282**) formulieren.



**Abb. 93.** Strukturvorschlag **III** und mögliche ESI-Fragmentierung für Birnbaumin B

Eine solche Amidinoharnstoff-Funktion ist bereits für einige in Rotalgen vorkommende Naturstoffe bekannt.

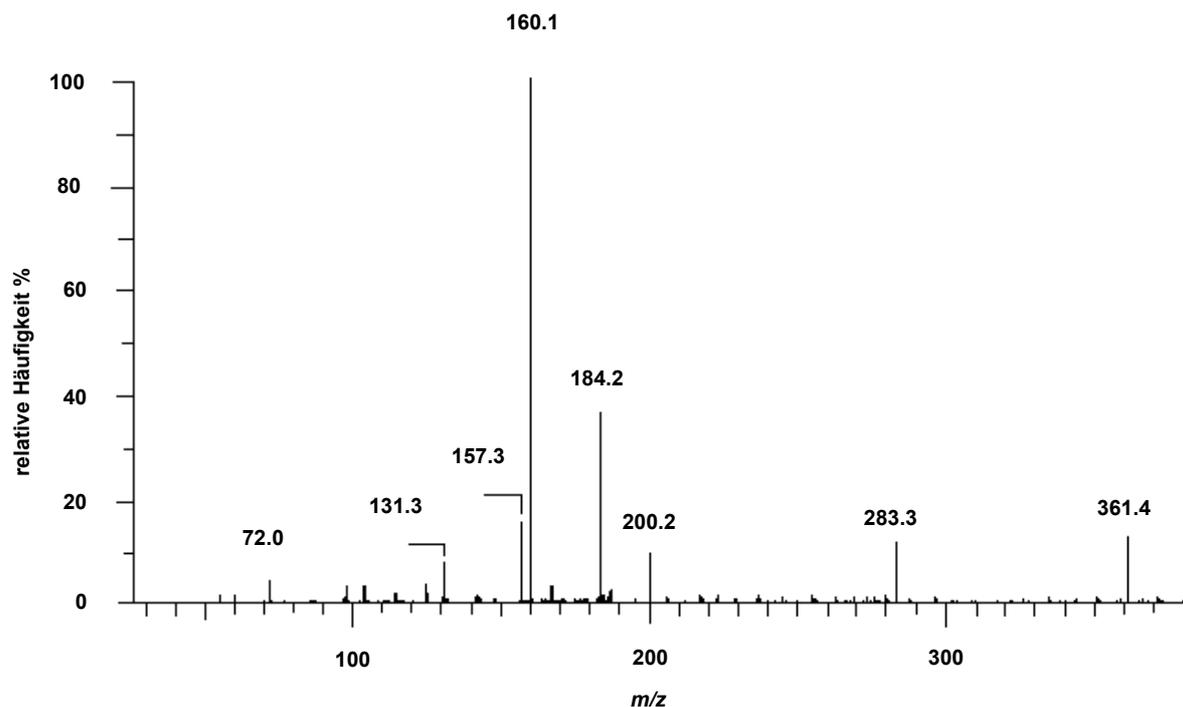


**Abb. 94.** Gigartinin (**161**)<sup>[123-125]</sup>, Gongrin (**162**)<sup>[125,126]</sup> und Nicaeensin (**163**)<sup>[127]</sup> aus verschiedenen Rotalgen

Das Vorkommen dieser Endgruppe in den Birnbauminen könnte auch die hohe Polarität und die Schwierigkeiten bei der Massenspektrometrie erklären.

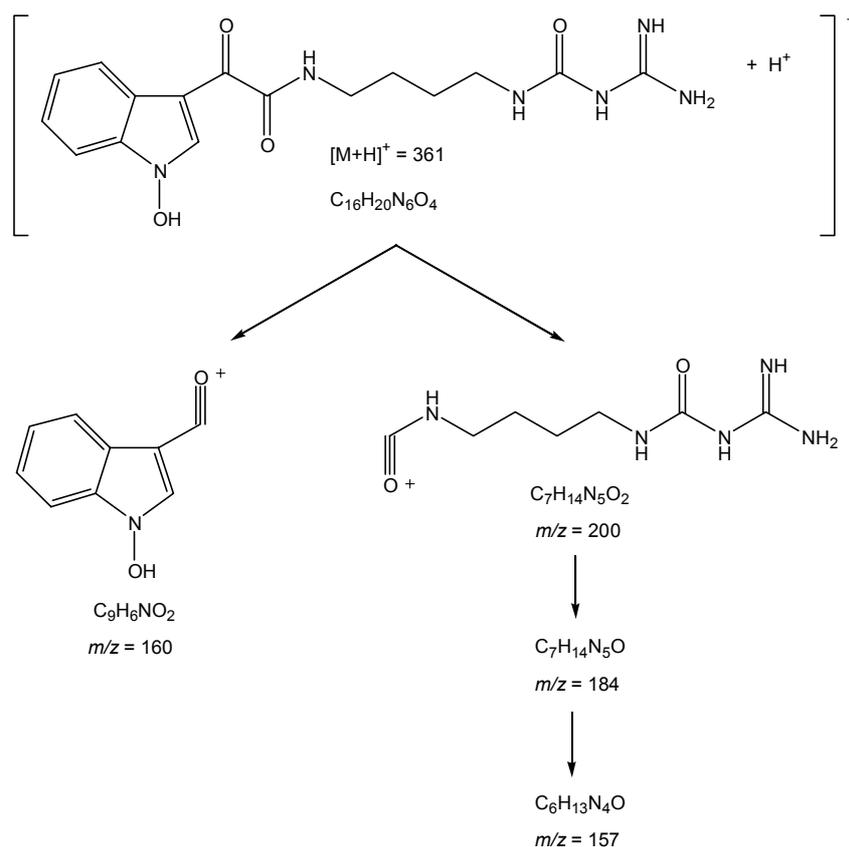
Bei der massenspektrometrischen Untersuchung von Birnbaumin A (**281**) wird ebenfalls erst im ESI- bzw. im FAB-Modus ein auswertbares Spektrum erhalten. Dabei erkennt man den  $[M+H]^+$ -Peak bei  $m/z = 361$ , dessen Hochauflösung eine Summenformel von  $C_{16}H_{20}N_6O_4$  ergibt.

Wie bereits aufgrund der sehr ähnlichen NMR-Daten vermutet, unterscheiden sich Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) nur durch ein zusätzliches Sauerstoffatom, das in Birnbaumin B (**282**) in Form einer phenolischen OH-Gruppe vorliegt. Bestätigung erhält man durch die Aufnahme von ESI-MS/MS-Spektren.



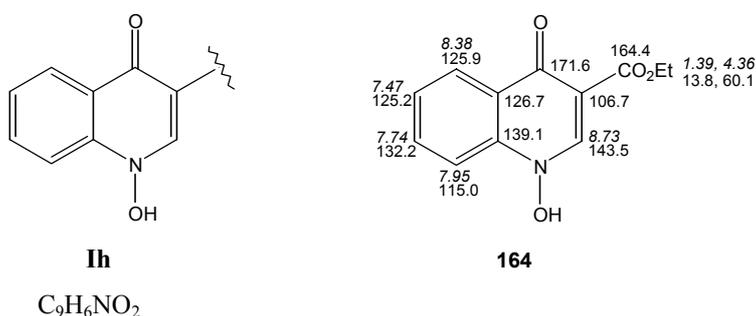
**Abb. 95.** ESI-MS/MS-Spektrum von Birnbaumin A (**281**)

Dabei ist deutlich ein Fragment bei  $m/z = 160$  erkennbar, was einer Zusammensetzung von  $C_9H_6NO_2$  entspricht und der im Vergleich zu Birnbaumin B (**282**) um 16 Masseneinheiten verringerten Indol-Teilstruktur zugeordnet werden kann. Wie bei **282** kommt es auch hier zu einer Spaltung des Moleküls zwischen den beiden Carbonyl-Gruppen der Glyoxyleinheit. Es zeigt sich, dass der aliphatische Teil von Birnbaumin A (**281**) die gleichen MS/MS-Fragmente wie der des Birnbaumin B (**282**) liefert. Dadurch wird bestätigt, dass in den Gelbfarbstoffen **281** und **282** der gleiche Strukturtyp vorliegt. Nun lässt sich auch für Birnbaumin A (**281**) ein vollständiger Strukturvorschlag **Ig** formulieren.



**Abb. 96.** Strukturvorschlag **Ig** und mögliche ESI-Fragmentierung für Birnbaum A

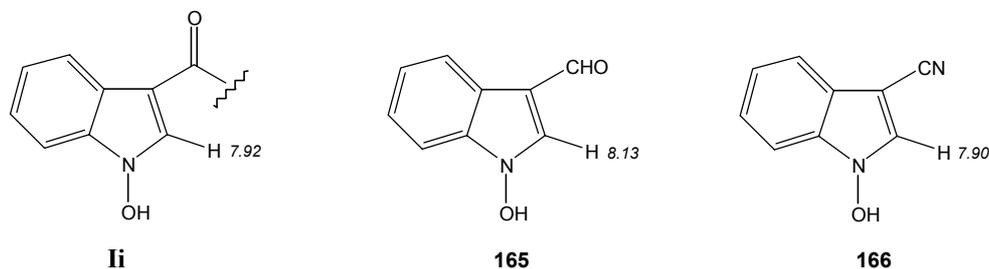
Man kann auch eine *N*-Hydroxy-chinolon-Teilstruktur **Ih** mit der Zusammensetzung  $C_9H_6NO_2$  formulieren, jedoch zeigen NMR-Messungen von ähnlichen Verbindungen durch Kim et al.<sup>[128]</sup> zu große Abweichungen zu den Daten der Birnbaumine.



**Abb. 97.** Mögliche 4-Oxochinolin-Teilstruktur **Ih** und **164** mit NMR-Daten<sup>[128]</sup>

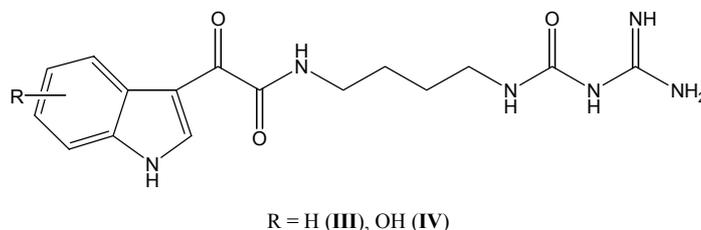
Gute Übereinstimmung in der chemischen Verschiebung des Protons in 2-Position zeigt ein Vergleich zwischen Birnbaum A (**281**) und den synthetischen Indolverbindungen 1-Hydroxyindol-3-carbaldehyd (**165**)<sup>[129]</sup> und 1-Hydroxyindol-3-carbonitril (**166**)<sup>[130]</sup> Damit

wird die Hydroxy-Substitution des Indol-Stickstoffes in den Birnbauminen **281** und **282** erneut bestätigt.



**Abb. 98.**  $\delta_{\text{H}}$  in 2-Position bei Birnbaumin A (Teilstruktur **Ii**), **165** und **166** ( $[\text{D}_4]$ Methanol)

Bemerkenswert ist außerdem das Auftreten von  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Peaks in den ESI-Spektren von Birnbaumin A (**281**) bei  $m/z = 345$  bzw. von Birnbaumin B (**282**) bei  $m/z = 361$ . Dabei handelt es sich nicht um Fragmente der beiden Gelbfarbstoffe, sondern laut Hochauflösung um die Molpeaks der jeweiligen Desoxy-Verbindung, die in kleinen Mengen ebenfalls im Pilz vorkommen und sich nicht immer vollständig abtrennen lassen. Auch in den NMR-Spektren kann manchmal das Auftreten eines zweiten Signalsatzes beobachtet werden, der deutlich weniger intensiv und mit leicht verschobenen  $\delta$ -Werten auftritt.



**Abb. 99.** Strukturvorschlag für Desoxybirnbaumin A (**III**) und B (**IV**)

#### 4.5.6 Synthese von Modellverbindungen mit Amidinoharnstoff-Terminus (AHT)

Die Strukturvorschläge **Ig** und **III** für die Birnbaumine A und B weisen mit der Amidinoharnstoff-Funktion und der *N*-Hydroxyindol-Einheit ungewöhnliche Elemente auf, die bisher sehr selten in Naturstoffen nachgewiesen wurden. Da die spektroskopischen Untersuchungen nur unzureichende Aussagen über diese Teilstrukturen gestatten, sollte versucht werden, diese durch Synthese zu beweisen. Aufgrund der Instabilität und Oxidationsempfindlichkeit von

1-Hydroxyindol-Derivaten wird zuerst eine Methode zur Darstellung der vorgeschlagenen Strukturen für die Desoxybirnbaumine **III** und **IV** entwickelt und diese dann auf die Birnbaumine A (**Ig**) und B (**III**) übertragen.

#### 4.5.6.1 Desoxybirnbaumin A (**III**, AHT)

Zur Darstellung des einfacheren Desoxybirnbaumin A (**III**, AHT) kann, wie in Kapitel 4.5.4 beschrieben, von Indol (**16**) ausgegangen werden, das in sehr guter Ausbeute mit Oxalylchlorid (**155**) zu (Indol-3-yl)glyoxylchlorid (**156**) reagiert (Abb. 88). Betrachtet man den Strukturvorschlag für Desoxybirnbaumin A (**III**, AHT), so erkennt man 1,4-Diaminobutan (**167**) als geeigneten Baustein zur Erzeugung der Amidfunktion und der aus vier CH<sub>2</sub>-Gruppen bestehenden aliphatischen Kette. **167** wird dazu zuerst mit (Boc)<sub>2</sub>O zu *N*-Boc-1,4-diaminobutan (**168**)<sup>[131]</sup> umgesetzt und dann mit dem Säurechlorid **156** in Benzol für drei Stunden refluxiert. Man erhält **169** dabei in 97 % Ausbeute. Verwendet man statt **168** das ungeschützte Diamin **167**, kommt es zur Bildung der zweifach acylierten Verbindung **170**.

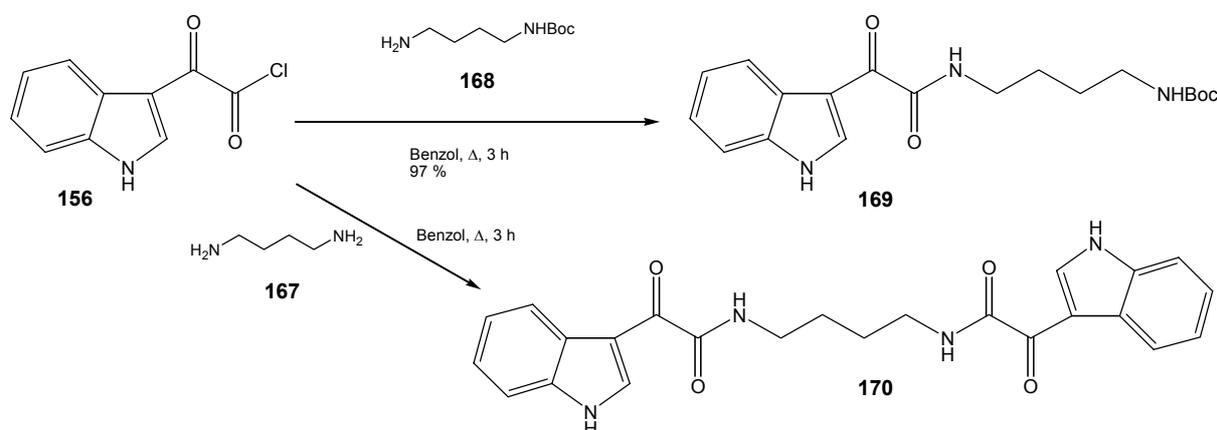


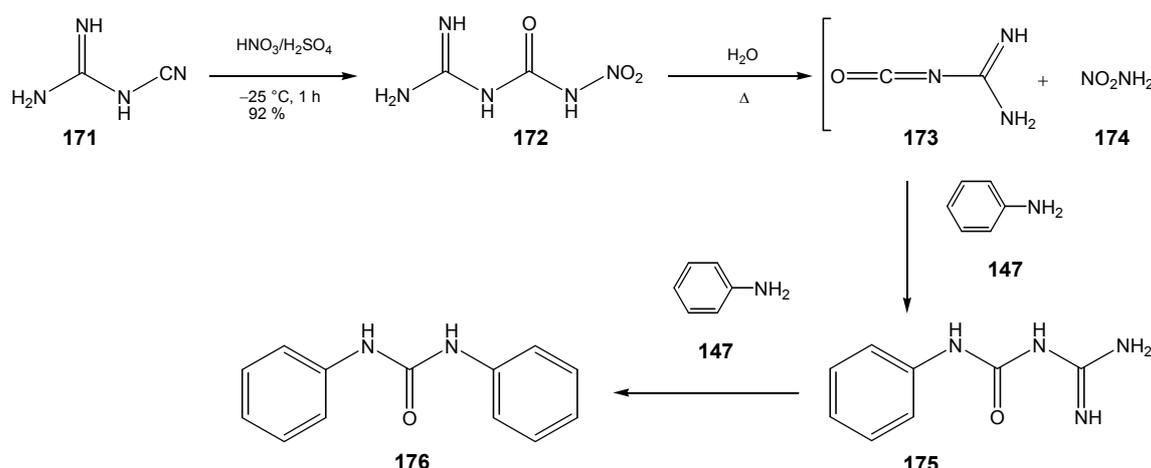
Abb. 100. Umsetzung von **156** mit geeigneter Aminoskomponente **168**

Mit dem Amid **169** erhält man eine synthetische Verbindung, in der die für Desoxybirnbaumin A (**III**, AHT) vorgeschlagene Struktur bis auf die Amidinoharnstoff-Funktion bereits vorliegt. Amidinoharnstoff selbst lässt sich einfach durch Erwärmen von Dicyandiamid (**171**) in 50-proz. Schwefelsäure unter Anlagerung von Wasser herstellen,<sup>[132]</sup> doch für die Einführung als funktionelle Gruppe gibt es in der Literatur wenig Hinweise. Urbański et al.<sup>[133-135]</sup> synthetisieren aromatische Amidinoharnstoffe durch Umsetzung der entsprechenden Aniline mit Dicyandiamid (**171**) in Gegenwart von 22-proz. Salzsäure.

Versuche, diese Methode auf die Darstellung von Desoxybirnbaumin A (**III**, AHT) zu übertragen, scheiterten.

Boivin et al.<sup>[136]</sup> beschreiben eine weitere Methode mit milderen Reaktionsbedingungen. *N*-Amidino-*N'*-nitroharnstoff (**172**) wird in siedendem Wasser mit primären Aminen zu den *N*-substituierten Produkten umgesetzt. Dabei zerfällt **172** zuerst in Guanylisocyanat (**173**) und Nitramid (**174**). Im weiteren Reaktionsverlauf wird das Nitramid (**174**) zu Wasser und N<sub>2</sub>O abgebaut, während das instabile Isocyanat **173** mit einem primären Amin wie Anilin (**147**) zum *N*-Phenyl-*N'*-amidinoharnstoff (**175**) reagiert. Den als Ausgangsstoff benötigten *N*-Amidino-*N'*-nitroharnstoff (**172**) erhält man durch Nitrierung von Dicyandiamid (**171**) mit einem Gemisch aus konzentrierter Salpeter- und Schwefelsäure.<sup>[137]</sup>

Boivin et al.<sup>[136]</sup> erwähnen außerdem die Entstehung von Diphenylharnstoff (**176**) sowohl als Nebenprodukt bei der obigen Reaktion als auch bei Verwendung eines Überschusses an Anilin (**147**). Anscheinend reagiert **175** in ähnlicher Weise wie *N*-Amidino-*N'*-nitroharnstoff (**172**) über ein Isocyanat mit einem weiteren Äquivalent des primären Amins.

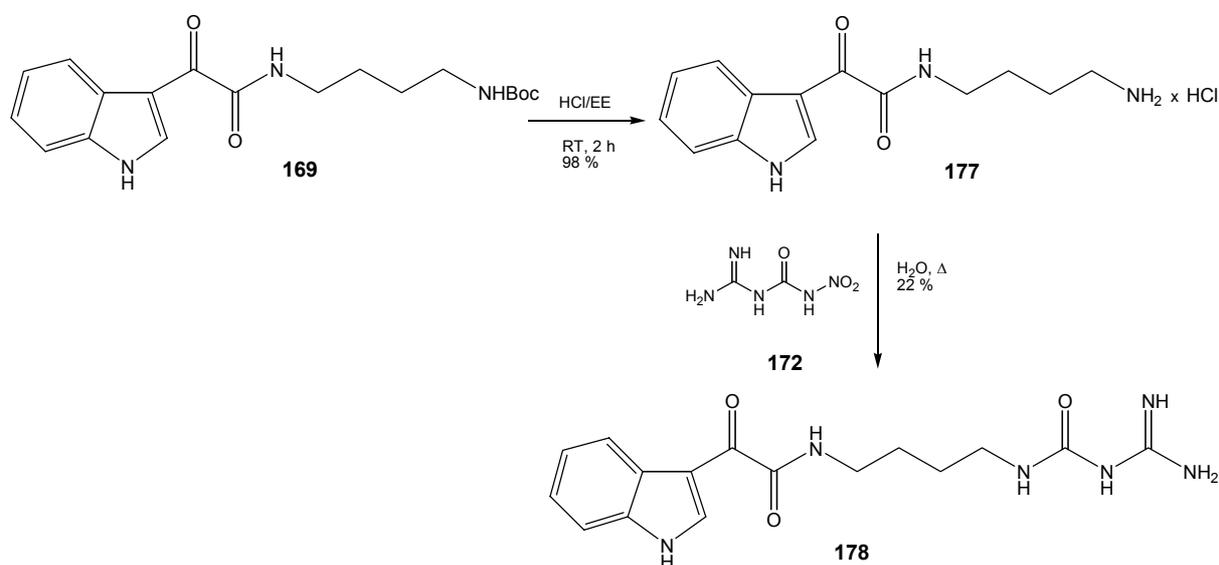


**Abb. 101.** Umsetzung von **172** mit Anilin (**147**) in Gegenwart von Wasser

Im Unterschied dazu erhalten Frankel und Sheradsky<sup>[138]</sup> bei Anwendung dieser Methode zur Darstellung des in Rotalgen vorkommenden Gongrins (**162**) nur das mono-substituierte Produkt in 47 % Ausbeute.

Zur Übertragung dieser Methode auf die Synthese des Desoxybirnbaumins A (**III**, AHT) ist eine primäre Amino-Funktion in dem Amid **169** erforderlich. Diese erhält man durch Abspaltung der Boc-Schutzgruppe in salzsaurem Essigsäureethylester. Das resultierende Amin **177** liegt als Hydrochlorid vor und kann anschließend mit *N*-Amidino-*N'*-nitroharnstoff

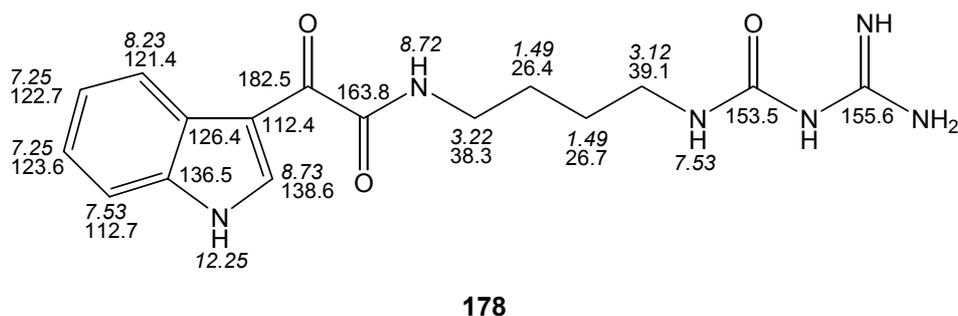
(**172**) in Wasser zu dem in *L. birnbaumii* vermuteten Desoxybirnbaum A (**178**, AHT) umgesetzt werden.



**Abb. 102.** Einführung der Amidinoharnstoff-Funktion

Die Isolierung von **178** erfolgt mittels präparativer HPL-Chromatographie an RP-18, da die hohe Polarität ebenso wie bei den Birnbauminen A (**281**) und B (**282**) eine Reinigung an Kieselgel verhindert. Dabei erhält man **178** in 22 % Ausbeute, die sich auch durch eine Variation der Reaktionsdauer nicht erhöhen lässt. Die Freisetzung der Aminofunktion in **177** vor der Umsetzung mit **172** durch Zusatz von Triethylamin hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Ausbeute.

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen ermöglichen die genaue Zuordnung der chemischen Verschiebungen und zeigen außerdem, dass auch **178** nach der HPL-chromatographischen Reinigung als Trifluoracetat vorliegt.



**Abb. 103.** NMR-Daten des synthetischen Desoxybirnbaumin A (**178**, AHT)  
(600/151 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO)

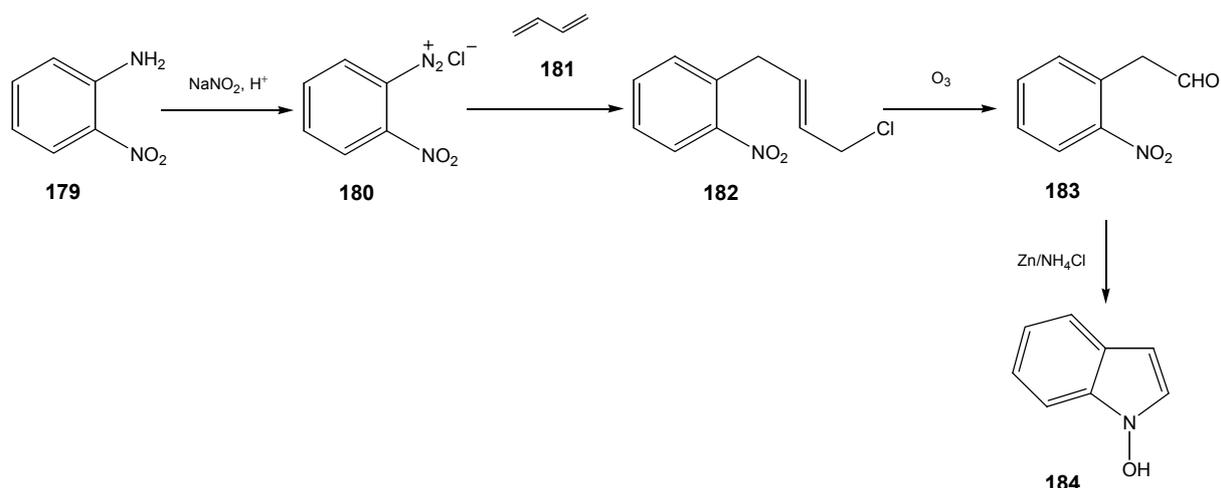
Wie bereits bei vorherigen Modellverbindungen zeigt ein Vergleich der chemischen Verschiebungen von **178** mit denen von Birnbaumin A (**281**) gute Übereinstimmung für das aromatische ABCD-Spinsystem und auch für den aliphatischen Strukturteil. Abweichungen sind wiederum in der 2-Position des Indolrings erkennbar, die auf das Fehlen der Hydroxyfunktion in 1-Position zurückgeführt werden können.

#### 4.5.6.2 Birnbaumin A (**Ig**, AHT)

Die zur Synthese von **178** ausgearbeitete Methode soll nun auf die Darstellung der vorgeschlagenen Struktur **Ig** für Birnbaumin A übertragen werden. Dazu benötigt man *N*-Hydroxyindol (**184**) als Ausgangsstoff.

##### 4.5.6.2.1 Methoden zur Darstellung von 1-Hydroxyindol (**184**)

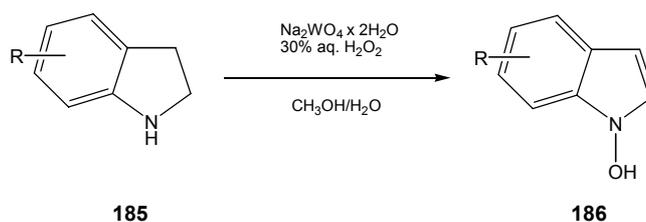
Generell gibt es drei Methoden zur Darstellung von 1-Hydroxyindol (**184**). Acheson et al.<sup>[139]</sup> gehen von 2-Nitroanilin (**179**) aus, welches diazotiert und anschließend mit Butadien (**181**) gekuppelt wird. Nach Ozonolyse des Kupplungsproduktes **182** erfolgt reduktive Cyclisierung mit Zink und Ammoniumchlorid zum gewünschten 1-Hydroxyindol (**184**).



**Abb. 104.** Darstellung von 1-Hydroxyindol (**184**) nach Acheson<sup>[139]</sup>

Acheson erhält mit dieser Methode auch einige *N*-Hydroxyindol-Derivate, die durch elektronenziehende Gruppen in 3-Position stabilisiert sind. Als generelle Methode zur Darstellung von 1-Hydroxyindol-Verbindungen, wie z. B. 1-Hydroxytryptophan-Derivaten, kann die obige Synthesesequenz u. a. wegen der Instabilität und teilweise schlechten Zugänglichkeit des Aldehyds **183** nicht genutzt werden.

Allgemeineren Zugang zu verschiedenen 1-Hydroxyindolen erhalten Somei et al.<sup>[140]</sup> durch die sogenannte Wolframat-Methode. Dabei gelingt die Einführung der OH-Gruppe durch Oxidation von Indolin bzw. substituierten 2,3-Dihydroindolen mit 30-proz. wässriger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung und katalytischen Mengen Natriumwolframat.



**Abb. 105.** Darstellung von substituierten 1-Hydroxyindol-Derivaten nach Somei<sup>[140]</sup>

Als Oxidationsmittel können auch *m*-Chlorperbenzoesäure<sup>[141]</sup> oder Ozon genutzt werden, doch erhält man mit Natriumwolframat bis auf wenige Ausnahmen höhere Ausbeuten.<sup>[142]</sup> Diese Wolframatmethode findet bereits Anwendung bei der Synthese verschiedener Naturstoffe wie z. B. dem Lespedamin (**299**), einem 1-Methoxy-*N,N'*-dimethyltryptamin.<sup>[143]</sup> Bei der Darstellung der *N*-Alkyloxy-Derivate von Bisindolylmaleinimiden und

Indolo[2,3-a]carbazolen gelingt die Einführung der *N*-Hydroxy-Funktion mit einer modifizierten Wolframatmethode in Dichlormethan unter Verwendung von Phasentransferkatalysatoren.<sup>[144]</sup>

In Anlehnung an die Leimgruber-Batcho-Indolsynthese geht man in der dritten Methode zur Darstellung von 1-Hydroxyindol (**184**) von 2-Nitrotoluol (**187**) aus, das mit *N,N*-Dimethylformamidmethylacetal (**188**, DMFDMA) in DMF zum  $\beta$ -Dimethylamino-*o*-nitrostyrol (**189**) umgesetzt wird. Anschließend wird **189** mit Zink/Ammoniumchlorid in einem 2-Phasensystem aus Wasser und Diethylether reduktiv zum 1-Hydroxyindol (**184**) cyclisiert.<sup>[145]</sup> Umfangreiche Untersuchungen zeigen, dass die Ausbeute bei größeren Ansätzen stark von den Reaktionsbedingungen abhängt. So gelingt es, durch Zusatz von DBU zur Umsetzung von 2-Nitrotoluol (**187**) mit **188** eine reproduzierbare Ausbeute von 62-69 % an 1-Hydroxyindol (**184**) zu erreichen, unabhängig von der Ansatzgröße (100 mg bis 14.0 g).<sup>[146]</sup> Nachteile dieser Methode sind die hohen Kosten des DMFDMA (**188**) und die erforderlichen absoluten Bedingungen beim ersten Reaktionsschritt.<sup>[142]</sup>

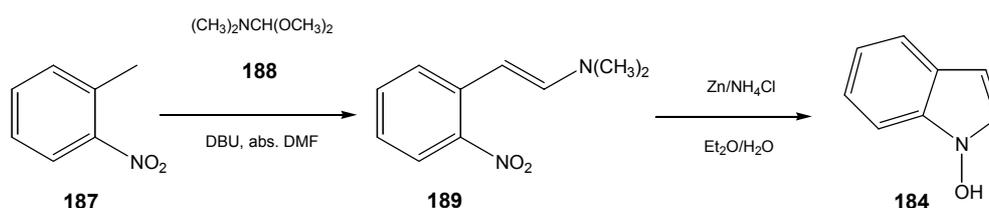


Abb. 106. Darstellung von 1-Hydroxyindol (**184**) nach Somei<sup>[145]</sup>

Die reduktive Cyclisierung von **189** kann auch mit TiCl<sub>3</sub> in Eisessig/Wasser durchgeführt werden. Dabei zeigt sich, dass man die höchsten Ausbeuten an **184** bei Verwendung von vier Äquivalenten TiCl<sub>3</sub> erhält.<sup>[147]</sup>

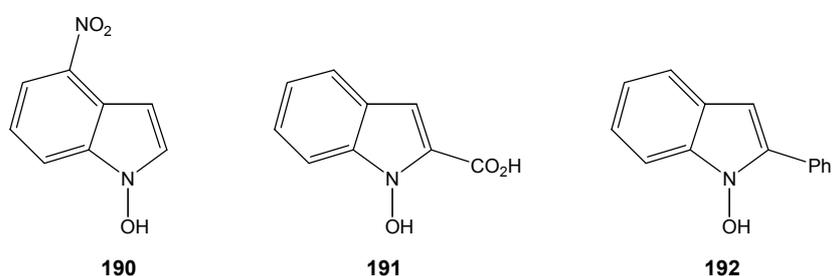
Clark und Repke<sup>[148]</sup> finden bei der Untersuchung der Leimgruber-Batcho-Indolsynthese, dass es auch bei der katalytischen Reduktion von **189** mit Palladium/Kohle und Wasserstoff zur Bildung von 1-Hydroxyindol (**184**) kommt. Das Verhältnis von gebildeten 1-Hydroxyindol (**184**) zu Indol (**16**) ist dabei abhängig von der Katalysatormenge, dem Wasserstoffdruck und dem Lösungsmittel. So erhalten Clark und Repke die höchsten Ausbeuten an **184** bei einem Massenverhältnis **189** zu Katalysator von 53, Atmosphärendruck und Tetrahydrofuran als Lösungsmittel.

Bei allen Methoden wird aufgrund der von Acheson<sup>[139]</sup> beschriebenen Instabilität und raschen Polymerisation von 1-Hydroxyindol (**184**) zu einem grünen Feststoff auf eine

Isolierung oder Aufreinigung verzichtet und die OH-Gruppe sofort mit geeigneten Reagenzien wie Methyljodid oder Acetanhydrid geschützt.

Während sich **184** aus dem resultierenden 1-Acetoxyindol (**193**) durch alkalische Hydrolyse regenerieren lässt, ist die Demethylierung von 1-Methoxyindol zu **184** bisher noch nie gelungen. Daher nutzt man 1-Acetoxyindol-Verbindungen als Quelle zur Darstellung von freien 1-Hydroxyindol-Derivaten.<sup>[139,147,149]</sup>

Stabile 1-Hydroxyindol-Derivate mit freier OH-Funktion erhält man entweder durch Einführung von elektronenziehenden Substituenten am Fünfring<sup>[147]</sup> oder zur Bildung von Wasserstoffbrücken befähigter oder sterisch anspruchsvoller Gruppen in 2-Position.<sup>[139]</sup>



**Abb. 107.** Stabile 1-Hydroxyindol-Derivate

#### 4.5.6.2.2 Versuche zur Synthese von Birnbaumin A (Ig, AHT)

Zur Darstellung des erforderlichen 1-Hydroxyindols (**184**) als Ausgangsstoff zur Synthese von Birnbaumin A (**Ig**, AHT) wird die letzte der beschriebenen Methoden genutzt. Dazu geht man von 2-Nitrotoluol (**187**) aus, das mit DMFDMA (**188**) in absolutem DMF umgesetzt wird. Anschließende Reduktion mit Zink/Ammoniumchlorid führt zum 1-Hydroxyindol (**184**), welches sofort ohne weitere Reinigung mit Acetanhydrid und DMAP in Diethylether zum 1-Acetoxyindol (**193**) reagiert. Zur Erzielung guter Ausbeuten ist es dabei notwendig, das Zinkpulver in kleinen Portionen unter intensivem Rühren in das auf 0 °C gekühlte Zweiphasensystem aus Wasser und Diethylether einzutragen.

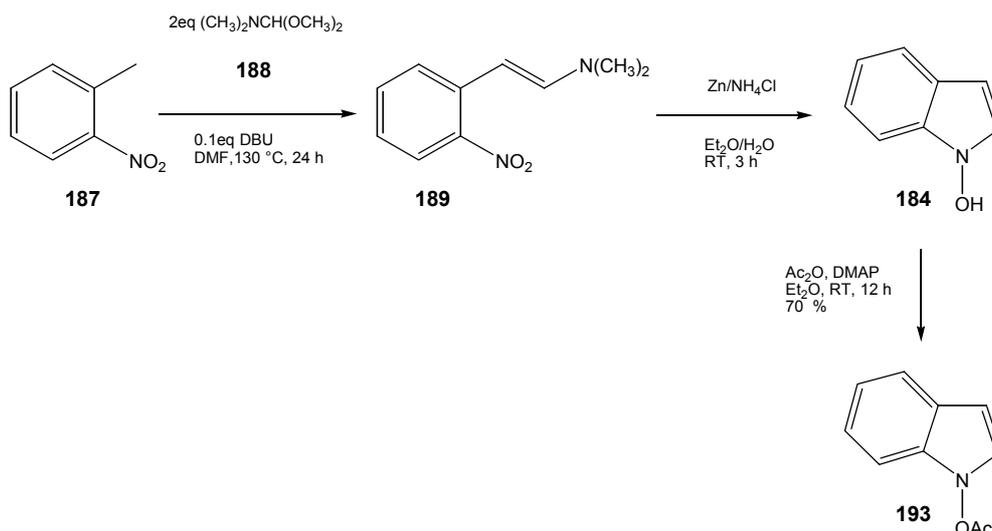
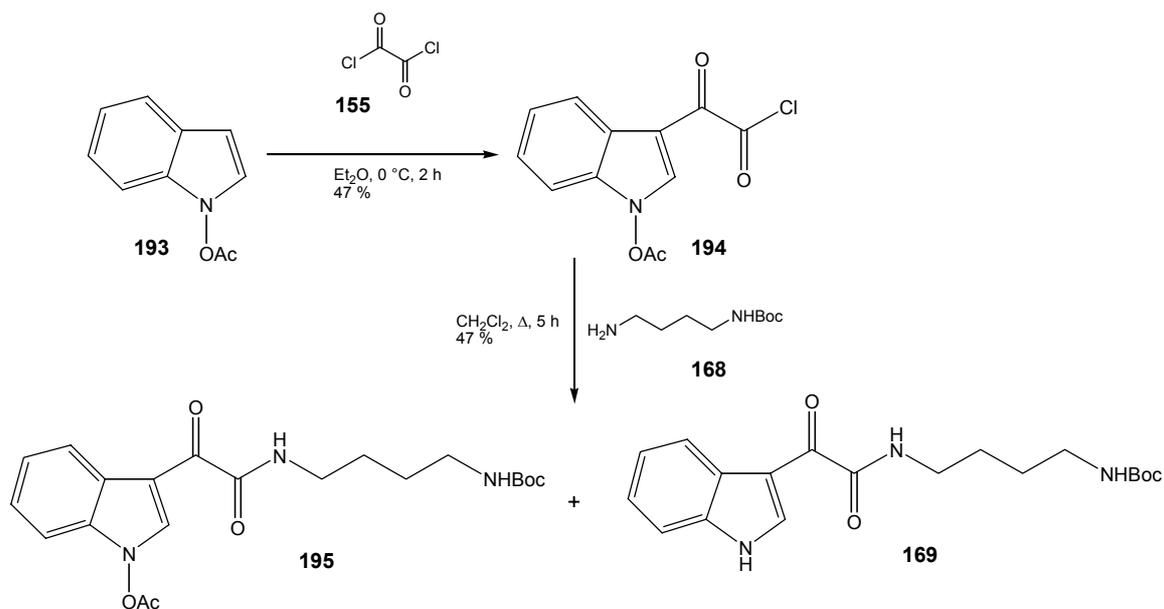


Abb. 108. Darstellung von 1-Acetoxyindol (**193**)

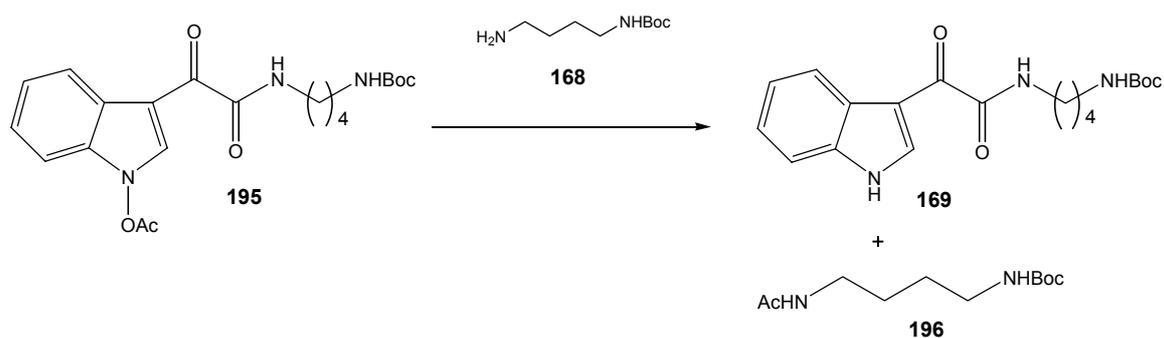
Neben dem gewünschten 1-Acetoxyindol (**193**) entsteht in geringer Menge auch Indol (**16**), das durch Farbreaktionen mit Eisen(III)chlorid/Schwefelsäure identifiziert und mittels Säulenchromatographie an Kieselgel abgetrennt wird. Das analysenreine *N*-Acetoxyindol (**193**) kann anschließend einige Monate unzersetzt bei  $-20\text{ °C}$  unter Lichtausschluss gelagert werden.

Ebenso wie Indol (**16**) reagiert 1-Acetoxyindol (**193**) mit Oxalylchlorid (**155**) zum Glyoxylchlorid **194**<sup>[139]</sup> und kann anschließend mit *N*-Boc-1,4-diaminobutan (**168**) in absolutem Dichlormethan zum Amid **195** umgesetzt werden.



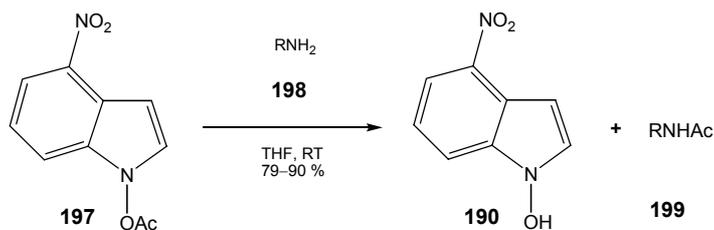
**Abb. 109.** Umsetzung von **193** mit Oxalylchlorid (**155**) und mit *N*-Boc-1,4-diaminobutan (**168**)

Dabei kommt es auch zur Bildung geringer Mengen an *N*-Desoxy-Verbindung **169**, da **195** als aktivierter Ester fungiert und die Acetyl-Gruppe auf das Amin **168** überträgt. Das dabei entstehende Indolderivat mit freier OH-Funktion in 1-Position ist nicht ausreichend stabil, so dass man letztlich die 1-Desoxy-Verbindung **169** erhält.



**Abb. 110.** Entstehung von **169** bei der Darstellung von **195**

Somei<sup>[142]</sup> nutzt diese Eigenschaft von 1-Acetoxyindolen zur Darstellung verschiedener Amide und Ester. Wird dabei 1-Acetoxy-4-nitroindol (**197**) verwendet, erhält man aufgrund der Stabilisierung durch die Nitro-Gruppe das freie 1-Hydroxy-4-nitroindol (**190**).

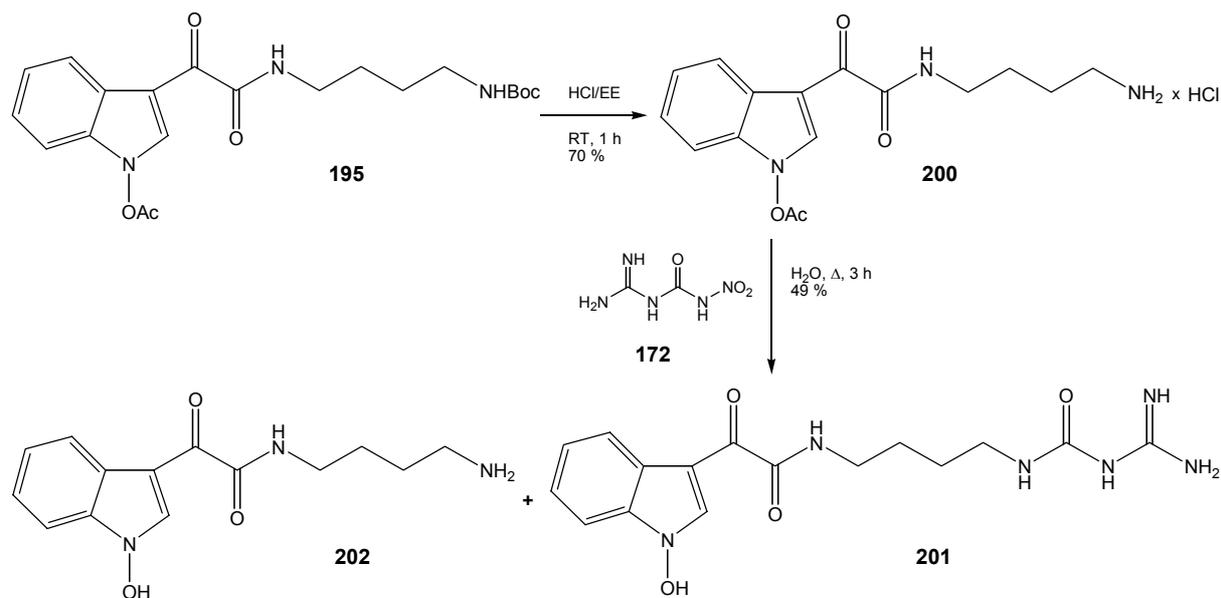


**Abb. 111.** Verwendung von 1-Acetoxy-4-nitroindol (**197**) als Aktivester

Außerdem können 1-Hydroxy-5-nitroindol bzw. 1-Hydroxy-6-nitroindol in ähnlicher Weise wie 1-Hydroxy-1,2,3-benzotriazol in Gegenwart von DCC leicht mit verschiedenen Säuren umgesetzt werden. Mit Hilfe der resultierenden Aktivester gelingt die Übertragung des Säurerestes auf verschiedene Amine bzw. Alkohole, so dass man die entsprechenden Amide bzw. Ester erhält.<sup>[150]</sup>

Bei der Trennung von **169** und **195** an Kieselgel beobachtet man Ausbeuteverluste an **195**, da anscheinend die Acetoxy-Funktion teilweise abgespalten wird und somit der Anteil an **169** zunimmt. Durch verschiedene Umkristallisationsversuche gelingt die Reinigung von **195** ebenfalls nicht. Selbst die Verwendung anderer Materialien zur Säulenchromatographie wie RP-18 und  $\text{Al}_2\text{O}_3$  führt zu keinem besseren Trennergebnis. Letztendlich erweist sich eine schnelle Flashchromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 2/1 als die beste Methode zur Isolierung von **195**.

Analog zur Synthese der 1-Desoxy-Verbindung **178** folgt nun die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit HCl in Essigsäureethylester. Das entstehende Hydrochlorid **200** wird anschließend in Wasser mit *N*-Amidino-*N'*-nitroharnstoff (**172**) refluxiert. Dabei erhält man bereits die entschützte 1-Hydroxyindol-Verbindung **201**, da die Acetylgruppe unter diesen Reaktionsbedingungen abgespalten wird. Bei der Auftrennung des Reaktionsgemisches mittels präparativer HPL-Chromatographie an RP-18 mit Wasser/Acetonitril unter Zusatz von TFA als Eluent wird außerdem noch **202** als Nebenprodukt isoliert.

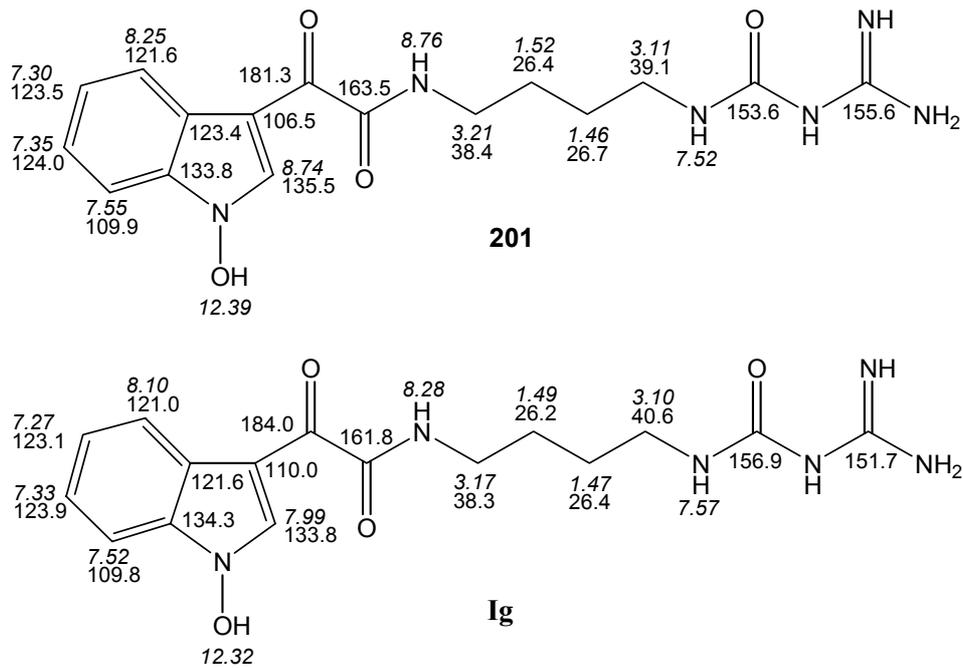


**Abb. 112.** Einführung der Amidinoharnstoff-Funktion

Bei der NMR-spektroskopischen Charakterisierung der Produkte ist im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum erneut erkennbar, dass sowohl **201** als auch **202** als Trifluoracetate vorliegen.

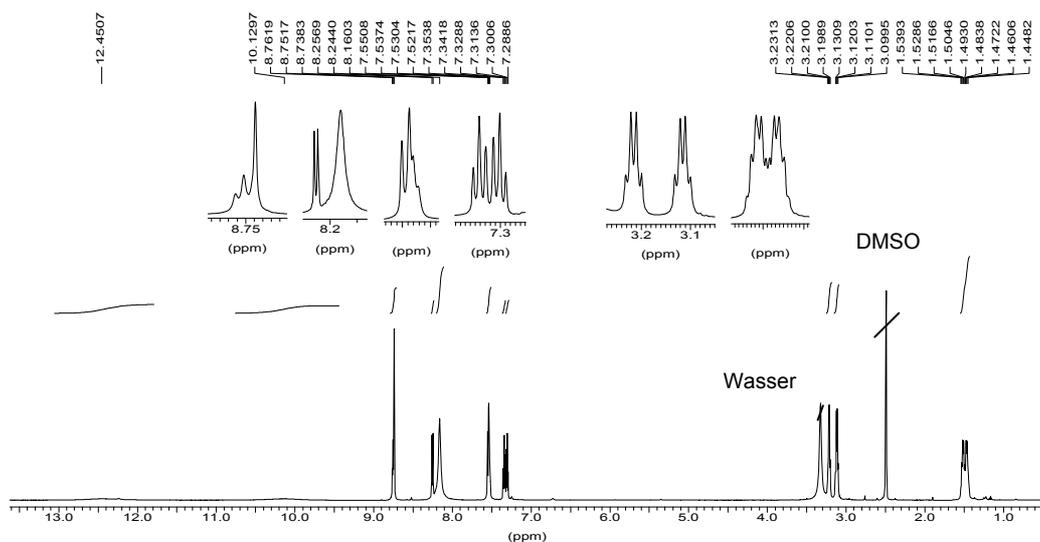
#### 4.5.6.2.3 Vergleich des Syntheseproduktes **201** mit dem natürlichen Birnbaumin A

Die *N*-Hydroxy-Verbindung **201** fällt nach der Reinigung als hellgelber Feststoff an und sollte die gleiche Struktur wie der aus *L. birnbaumii* isolierte Naturstoff Birnbaumin A (**281**) aufweisen. Ein Vergleich der ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren zeigt jedoch Abweichungen, die nicht auf das Messverfahren zurückgeführt werden können. Besonders das Proton in 2-Position erscheint im Vergleich zum Birnbaumin A (**281**) in **201** deutlich tieffeldverschoben.



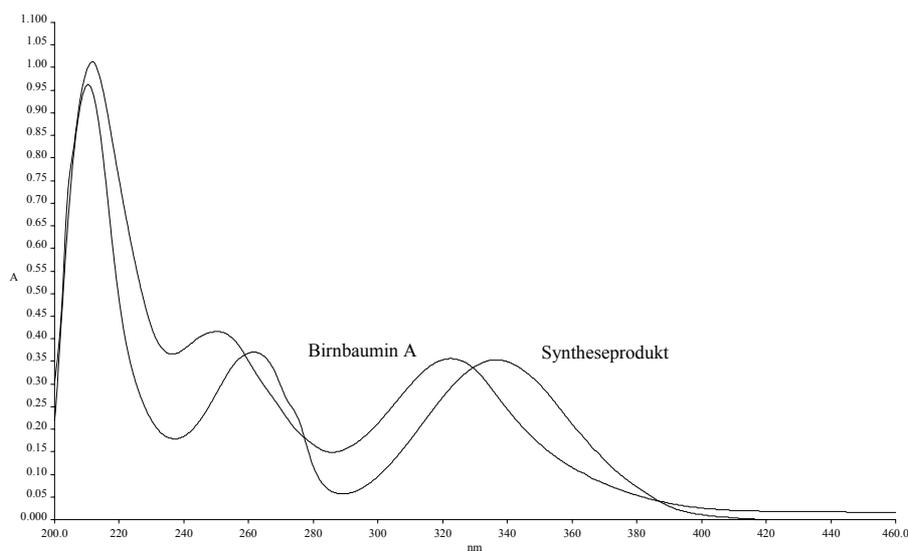
**Abb. 113.** NMR-Daten (600/151 MHz,  $[D_6]DMSO$ ) von synthetischer Verbindung **201** und Strukturvorschlag **Ig** für Birnbaumin A

Ebenfalls Abweichungen sind in der Amidinotharnstoff-Funktion zu erkennen. Auch fehlt im Protonenspektrum der synthetischen Verbindung **201** das scharfe Singulett bei ca.  $\delta_H$  11.9, das sowohl in Birnbaumin A (**281**) als auch in Birnbaumin B (**282**) auf ein wasserstoffbrückengebundenes NH oder OH hinweist.



**Abb. 114.**  $^1H$ -NMR-Spektrum von **201** (600 MHz,  $[D_6]DMSO$ )

Unterschiede zwischen beiden Verbindungen sind ebenfalls im UV/Vis-Spektrum und im Laufverhalten auf RP-18-Material zu erkennen. Die Vermutung, dass diese Abweichungen im NMR und UV auf Salzeffekte zurückgeführt werden können, wird durch eine Coinjektion an der analytischen HPLC widerlegt. Da wieder mit einem Laufmittelsystem aus Wasser und Acetonitril unter Zusatz von Trifluoressigsäure gearbeitet wird, liegen die Substanzen protoniert vor und unterschiedliche Verschiebungen durch Salzbildung können nicht auftreten.



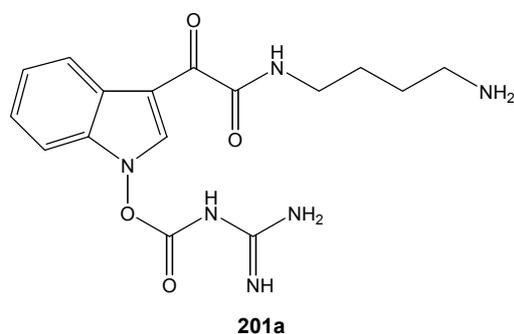
**Abb. 115.** UV/Vis-Spektren von **201** und Birnbaumin A (**281**) in Methanol

Vergleicht man die NMR-Verschiebung des Protons in 2-Position in **201** mit der in der synthetischen Desoxy-Verbindung **178** (siehe Kapitel 4.5.6.1), kann man vermuten, dass der Indol-Stickstoff in **201** keine freie Hydroxy-Funktion trägt, sondern diese vielleicht während der Synthese abgespalten wird. Das ESI-MS-Spektrum von **201** zeigt aber den  $[M+H]^+$ -Peak bei  $m/z = 361$ , der hochaufgelöst einer Summenformel von  $C_{16}H_{20}N_6O_4$  entspricht, wodurch diese Vermutung ebenfalls widerlegt wird.

Die Auswertung von ESI-MS/MS-Spektren zeigt eine andere Fragmentierung als bei Birnbaumin A (**281**). Zwar erkennt man deutlich ein Spaltstück mit  $m/z = 160$ , was für die 1-Hydroxy-Struktur spricht, jedoch fehlen die anderen, für die Seitenkette typischen Fragmente.

Dadurch stellt sich nun die Frage, ob die synthetische Verbindung **201** die in Abb. 113 dargestellte Struktur besitzt und der Strukturvorschlag **Ig** für das natürliche Birnbaumin A (**281**) nicht zutrifft oder ob bei der beschriebenen Synthesesequenz ein anderes als das erwartete Produkt entstanden ist. Denkbar wäre, dass die Amidinoharnstoff-Gruppe nicht an

der freien Amino-, sondern an der *N*-Hydroxy-Funktion eingeführt wird. Damit würde das Syntheseprodukt dann folgende Struktur aufweisen.

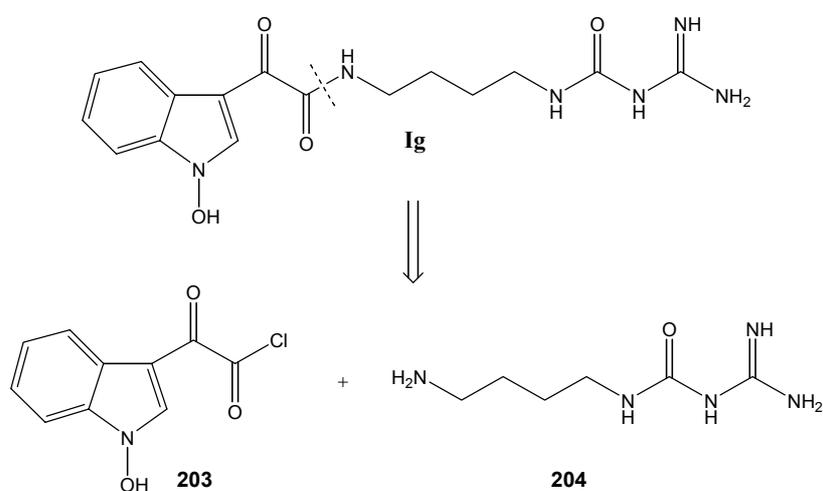


**Abb. 116.** Mögliche Struktur der synthetischen Verbindung

Zur eindeutigen Klärung dieser Frage soll eine andere Methode zur Einführung der Amidinoharnstoff-Funktion entwickelt werden. Außerdem wird versucht, durch Derivatisierungsreaktionen weitere Informationen über die Struktur der gelben Pigmente aus *L. birnbaumii* zu erhalten.

#### 4.5.6.2.4 Neue Strategie zur Einführung der Amidinoharnstoff-Funktion

Um die Möglichkeit einer Einführung der Amidinoharnstoff-Gruppe an der *N*-Hydroxy-Funktion auszuschließen, wird der retrosynthetische Schnitt am Strukturvorschlag **Ig** für Birnbaumin A folgendermaßen durchgeführt.

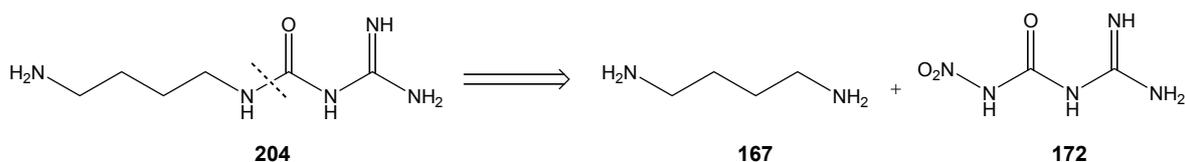


**Abb. 117.** Retrosynthetische Überlegung

Somit beinhaltet die Schlüsselreaktion zur Darstellung von **Ig** die Knüpfung einer amidischen Bindung durch Reaktion eines Carbonsäurechlorids **203** mit dem Amin **204**. Dabei stellt die Säurechlorid-Funktion eindeutig die reaktivere Position in **203** für den Angriff des primärenamins **204** dar. Zusätzlich liegt die *N*-Hydroxy-Funktion in Form einer Acetoxy-Gruppe vor, so dass das Risiko von Nebenreaktionen vermindert wird. Die Darstellung des benötigten Säurechlorids gelingt in mäßiger Ausbeute aus 1-Acetoxyindol (**193**) und Oxalylchlorid (**155**) wie in Kapitel 4.5.6.2.2 beschrieben.

#### 4.5.6.2.4.1 Darstellung von 1-(3-Amidinoureido)-4-aminobutan-Hydrochlorid (**204**)

Zur Gewinnung des zweiten Bausteins für die obige Synthese kann erneut von *N*-Amidino-*N'*-nitroharnstoff (**172**) und 1,4-Diaminobutan (**167**) ausgegangen werden, wie folgende Abbildung zeigt.



**Abb. 118.** Retrosynthese von **204**

Dabei ist es notwendig, eine Aminofunktion in **167** zu schützen, um die doppelte Einführung der Amidinoharnstoff-Gruppe zu verhindern. Aufgrund der geforderten Reaktionstemperaturen von ca. 100 °C bei der Umsetzung desamins mit **172** (Kapitel 4.5.6.1) erscheint die Boc-Schutzgruppe wegen ihrer Thermolabilität ungeeignet, und die Fmoc-Gruppe wird daher verwendet. Dazu setzt man *N*-Boc-1,4-diaminobutan (**168**) mit Fmoc-Chlorid in Gegenwart von Natriumcarbonat um und spaltet anschließend die Boc-Gruppe mit Trifluoressigsäure ab.<sup>[151]</sup> Die folgende Reaktion von **205** mit *N*-Amidino-*N'*-nitroharnstoff (**172**) in Wasser zum gewünschten Produkt **206** gelingt jedoch nicht.

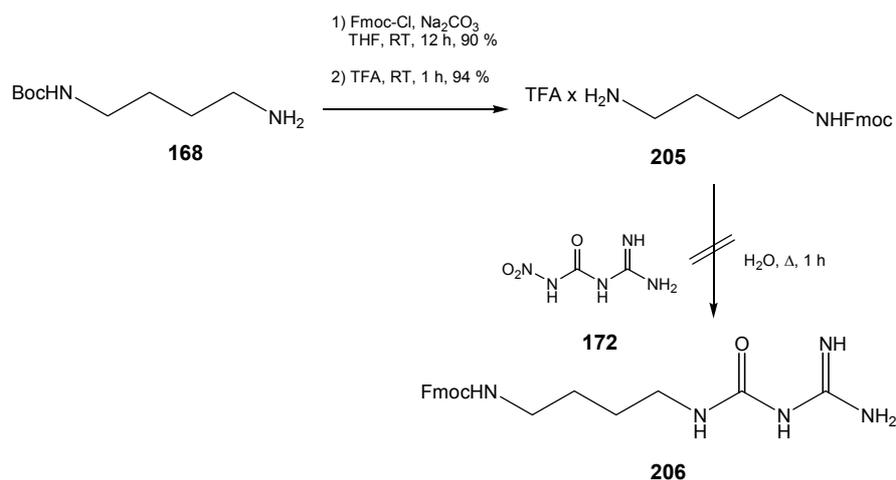


Abb. 119. Syntheseversuch von 206

Auch eine Variation der Reaktionsbedingungen wie Dauer und Temperatur führen nicht zur Bildung von 206.

Daraufhin wird versucht, *N*-Boc-1,4-diaminobutan (168) direkt mit *N*-Amidino-*N'*-nitroharnstoff (172) umzusetzen. Dabei gelingt die Einführung der Amidinharnstoff-Funktion in 90 % Ausbeute ohne Verlust der Boc-Gruppe, obwohl diese ab Temperaturen von 80 °C thermisch abgespalten werden sollte. Da das entstehende Produkt 207 in Essigsäureethylester schlecht löslich ist, erfolgt die Entschützung bei Raumtemperatur in 5N HCl/*iso*-Propanol.

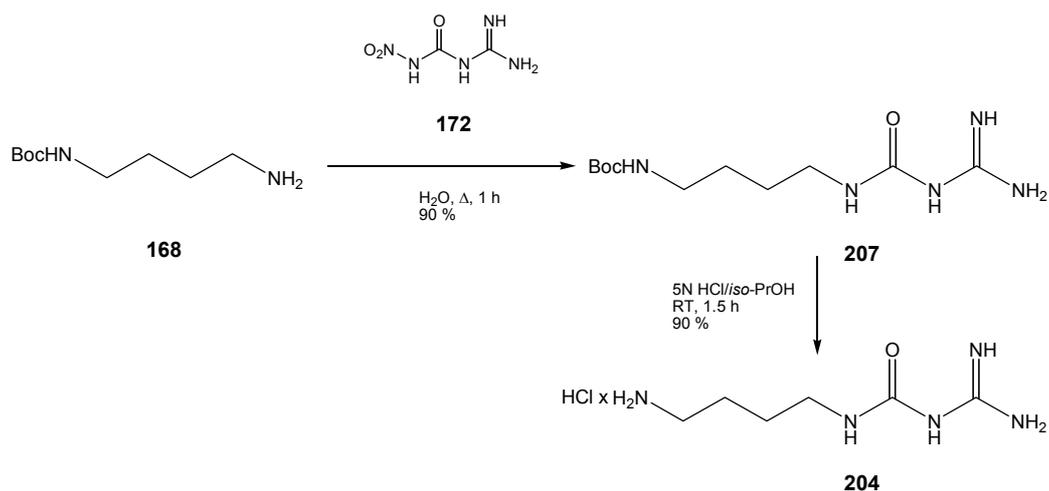
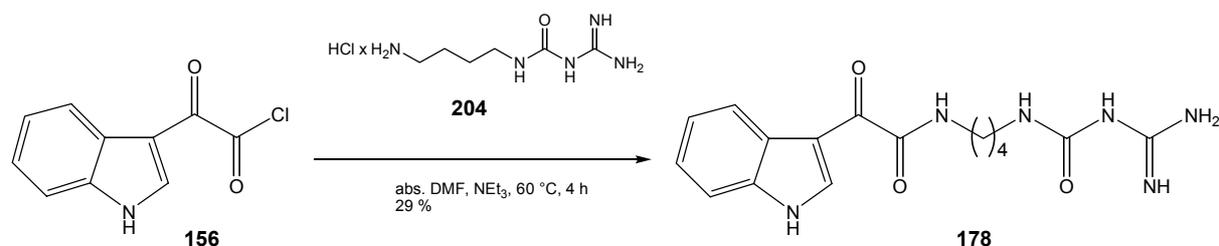


Abb. 120. Darstellung von 204

Anschließende Versuche, (1-Acetoxyindol-3-yl)glyoxylchlorid (194) mit der Aminkomponente 204 in Benzol oder Dichlormethan amidisch zu verknüpfen, führen jedoch zu keinem Produkt. Aufgrund der hohen Polarität von 204 ist es notwendig, andere, besser

geeignete Bedingungen zu finden. Dafür werden verschiedene Kupplungsversuche nicht mit dem Säurechlorid **194**, sondern mit dem wesentlich leichter zugänglichen (Indol-3-yl)glyoxylchlorid (**156**) durchgeführt. Es zeigt sich, dass THF und Acetonitril ebenso ungeeignet für die Umsetzung sind wie Dichlormethan und Benzol. Erst bei Verwendung von abs. DMF und Zusatz von  $\text{NEt}_3$  lässt sich eine Produktbildung beobachten.



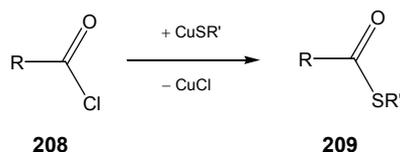
**Abb. 121.** Umsetzung von (Indol-3-ylglyoxyl)chlorid (**156**) und **204**

Die Reaktionskontrolle mittels analytischer HPL-Chromatographie an RP-18 zeigt jedoch auch die Entstehung von Nebenprodukten. Anscheinend führt die hohe Reaktivität des Säurechlorids **156** zu Nebenreaktionen, die die Übertragung dieser Methode auf die Synthese von **Ig** zunächst noch verhindern. Es erscheint sinnvoller, das Säurechlorid durch ein geeigneteres Carbonsäurederivat zu ersetzen.

#### 4.5.6.2.4.2 Verwendung von aktivierten Thioester-Verbindungen

Weniger reaktiv und dadurch leichter zu handhaben sind Carbonsäureester. Speziell aktivierte Ester wie z. B. Thiophenylester finden Anwendung sowohl in der Peptid- als auch in der Naturstoffsynthese.<sup>[152]</sup> Im Vergleich zu den korrespondierenden Sauerstoff-Analoga zeichnen sich Thioester dabei durch eine höhere Selektivität gegenüber Nucleophilen aus. Sie werden dadurch auch zum universellen Acylierungsreagens in biochemischen Prozessen.

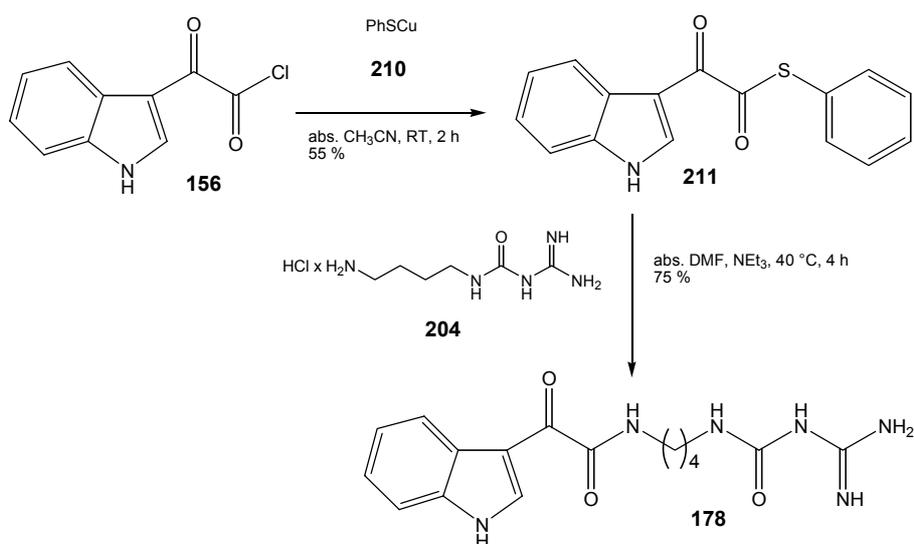
In einer klassischen Methode werden Thioester durch Umsetzung eines Säurechlorids mit dem entsprechenden Thiol in Anwesenheit einer Base wie  $\text{NEt}_3$  und katalytischen Mengen DMAP dargestellt.<sup>[153]</sup> Der Nachteil dieser Methode ist sicher die nicht unerhebliche Geruchsbelästigung durch die Thiole. Außerdem sind die häufig sehr flüchtigen Verbindungen auch oft giftig, wodurch ihre Verwendung eingeschränkt wird. Eine Alternative zum direkten Einsatz der Thiole beschreiben Reißig und Scherer.<sup>[154]</sup> Sie erhalten Thioester durch Umsetzung der Säurechloride mit den Kupfer(I)-Salzen der entsprechenden Thioalkohole.



**Abb. 122.** Thioestersynthese nach Reißig und Scherer<sup>[154]</sup>

Zu den Vorteilen dieser Methode zählt die Unempfindlichkeit der Kupfer(I)thiolate gegen Wasser und Luftsauerstoff. Sie können ohne Reaktivitätsverlust über Monate gelagert werden und sind zudem geruchlos und ungiftig. Außerdem lässt sich die Reaktion meistens bei Raumtemperatur in aprotischen Lösungsmitteln wie Diethylether, Toluol, Acetonitril oder Tetrahydrofuran ohne großen apparativen Aufwand durchführen. Die Isolierung des Produktes ist recht einfach, da das unlösliche Kupferchlorid durch Filtration aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden kann. Anders als bei der Verwendung von Thalliumthiophenolaten<sup>[155]</sup> wird Diphenyldisulfid bei dieser Methode nicht als Nebenprodukt gefunden und die Thioester im Allgemeinen in hoher Reinheit erhalten.

Bei der Anwendung dieser Methode auf die Synthese der Birnbaumine bzw. Desoxybirnbaumine erweist sich absolutes Acetonitril als das geeignetste Lösungsmittel. Die Umsetzung von (Indol-3-yl)glyoxylchlorid (**156**) mit Kupfer(I)thiophenolat (**210**) bei Raumtemperatur liefert den Thioester **211** nach zwei Stunden in 55 % Ausbeute. **211** reagiert anschließend in DMF mit der Aminkomponente **204** zur gewünschten 1-Desoxy-Verbindung **178** in 75 % Ausbeute.



**Abb. 123.** Synthese von **178** nach der Thioester-Methode

Dabei zeigt die Reaktionskontrolle mittels analytischer HPLC an RP-18 kaum Nebenprodukte, so dass eine schnelle Reinigung durch Flashchromatographie an RP-18 zur Abtrennung des entstandenen Thiophenols durchgeführt werden kann. Damit erhält man mit dieser Thioester-Methode nicht nur höhere Ausbeuten an **178**, auch fällt der Reinigungsaufwand deutlich geringer aus.

#### 4.5.6.2.5 Darstellung des Strukturvorschlags Ig nach der Thioester-Methode

Analog zur Synthese von **211** wird nun (1-Acetoxyindol-3-yl)glyoxylchlorid (**194**) mit Kupfer(I)thiophenolat (**210**) verestert. Der entstehende Thioester **212** wird mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt, wobei ebenfalls ein Ausbeuteverlust durch teilweise Abspaltung der Acetoxy-Gruppe eintritt (siehe Kapitel 4.5.6.2.2). Trotzdem ist die erhaltene Ausbeute mit 73 % zufriedenstellend. Anschließend erfolgt die Reaktion von **212** mit dem Amin **204** unter den ausgearbeiteten Reaktionsbedingungen, wobei das gewünschte Produkt in deutlich geringeren Ausbeuten als erwartet entsteht. Die Reinigung wird erneut mit Hilfe der präparativen HPLC durchgeführt.

Massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Messungen zeigen für das entstandene Produkt die gleiche Struktur wie die nach der ersten Methode synthetisierte Verbindung **201**.

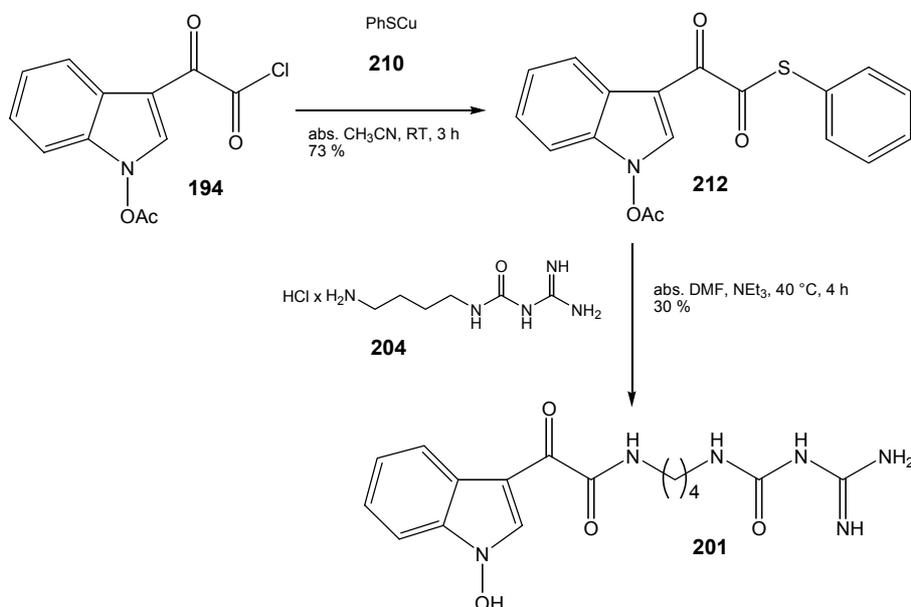
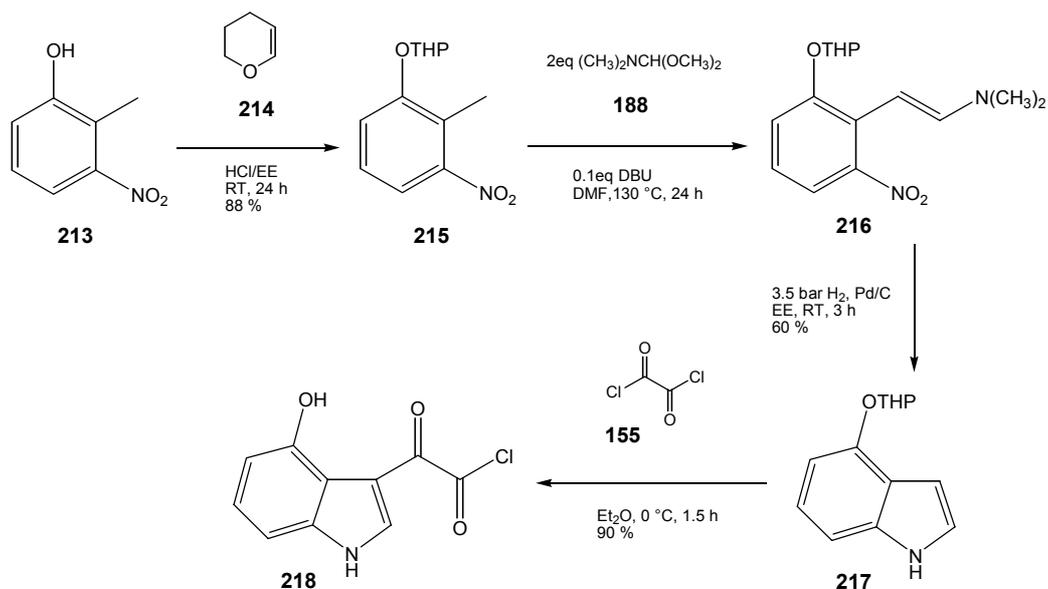


Abb. 124. Darstellung von **201** nach der Thioester-Methode

Damit lassen sich die beobachteten Abweichungen der chemischen Verschiebungen zwischen Syntheseprodukt **201** und natürlichem Birnbaumin A (**281**) nicht auf die Entstehung der vermuteten Struktur **201a** zurückführen (siehe Kapitel 4.5.6.2.3), sondern der aus *L. birnbaumii* isolierte Farbstoff weist anscheinend eine andere als die vorgeschlagene Struktur **Ig** auf.

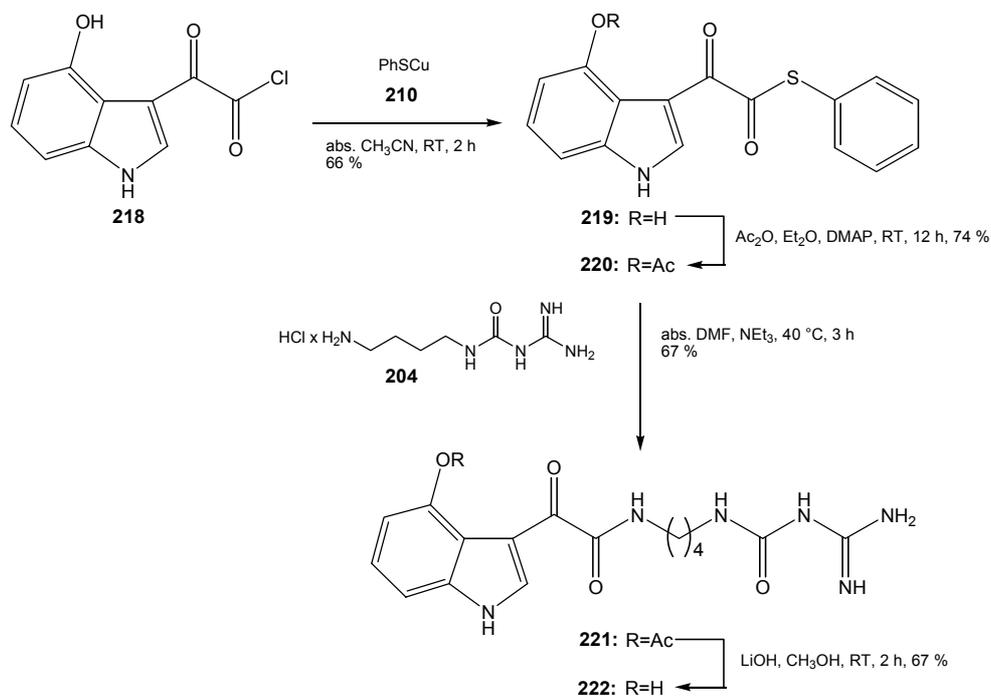
#### 4.5.6.3 4-Hydroxydesoxybirnbaumin B (AHT)

Da die Position der phenolischen OH-Gruppe in Birnbaumin B (**282**) noch eindeutig bewiesen werden muss, sollen sowohl 4-Hydroxydesoxybirnbaumin B (**222**, AHT) als auch 7-Hydroxydesoxybirnbaumin B (**233**, AHT) mit Hilfe der Thioester-Methode dargestellt werden. Für die Synthese von 4-Hydroxydesoxybirnbaumin B (**222**, AHT) kann man nicht von Indol (**16**) ausgehen, sondern benötigt 4-Hydroxyindol als Ausgangsstoff. Eine geeignete Möglichkeit zur Darstellung von 4-substituierten Indolen findet man in der Leimgruber-Batcho-Indolsynthese.<sup>[156]</sup> Dazu erzeugt man zuerst aus 2-Methyl-3-nitrophenol (**213**) und 3,4-Dihydropyran (**214**) den Ether **215** und setzt diesen mit *N,N*-Dimethylformamid-dimethylacetal (**188**) in DMF zum Enamin **216** um. Ohne weitere Reinigung wird **216** durch Reduktion mit Wasserstoff unter Palladium-Katalyse zum THP-geschützten 4-Hydroxyindol **217** cyclisiert.<sup>[157,158]</sup> Anschließend kann analog zum unsubstituierten Indol (**16**) die Umsetzung mit Oxalylchlorid (**155**) in Diethylether bei 0 °C erfolgen. Dabei erhält man das ungeschützte (4-Hydroxyindol-3-yl)glyoxylchlorid (**218**), da der säureempfindliche Tetrahydropyranylether durch die bei der Reaktion entstehende HCl gespalten wird.



**Abb. 125.** Synthese von 4-( $\alpha$ -Tetrahydropyranyloxy)indol (**218**)

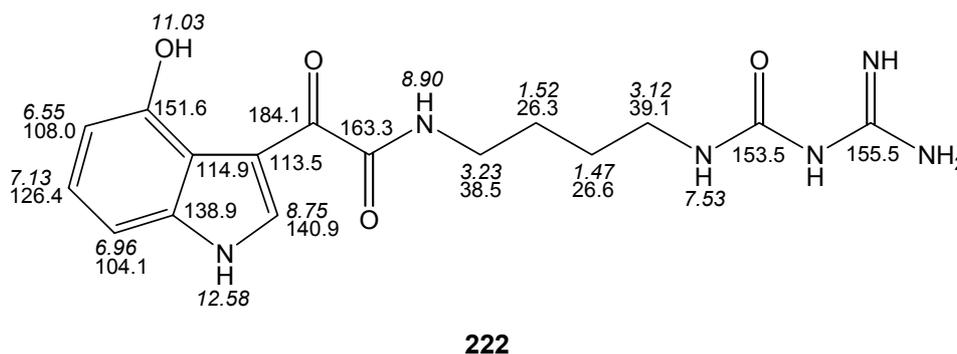
Der rote Feststoff **218** wird mit Kupfer(I)thiophenolat (**210**) verestert und der in 66 % entstehende Thioester **219** anschließend an der Hydroxy-Funktion mit Acetanhydrid und DMAP zu **220** acetyliert. Umsetzung mit **204** bei 40 °C in DMF liefert die in 4-Position acetylierte 1-Desoxy-Verbindung **221**, deren Acetyl-Schutzgruppe entweder durch Hydrazin-Monohydrat oder Lithiumhydroxid in Methanol abgespalten werden kann.



**Abb. 126.** Synthese von **222** nach der Thioestermethode

Weitere Versuche zeigen, dass **222** auch direkt in 39 % Ausbeute aus dem ungeschützten Thioester **219** durch Umsetzung mit **204** erzeugt werden kann. Die Einführung der Acetyl-Schutzgruppe erweist sich also in diesem Fall als nicht notwendig.

Mit Hilfe der ein- und zweidimensionalen NMR-Experimente gelingt die genaue Zuordnung der chemischen Verschiebungen. Außerdem erkennt man im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum, dass auch **222** als Trifluoracetat vorliegt.



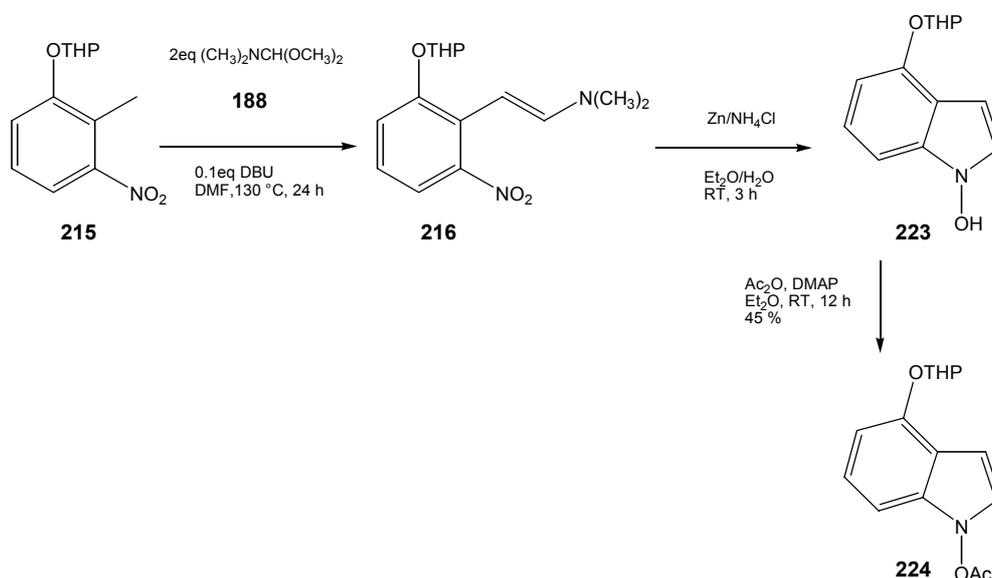
**Abb. 127.** NMR-Daten des synthetischen 4-Hydroxydesoxybirnbaumin B (**222**, AHT) (600/151 MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO)

Vergleicht man die NMR-Daten von Birnbaumin B (**282**) mit denen von **222**, erkennt man besonders in 3a-, 4- und 7a-Position deutliche Abweichungen. Diese Unterschiede werden nicht nur durch die fehlende Substitution am indolischen NH hervorgerufen und sprechen gegen eine 4-Stellung der OH-Gruppe im natürlichen Birnbaumin B (**282**). Zur Bestätigung soll außerdem auch die entsprechende *N*-Hydroxy-Verbindung dargestellt und mit **282** verglichen werden.

#### 4.5.6.4 4-Hydroxybirnbaumin B (AHT)

Zur Darstellung von 4-Hydroxybirnbaumin B (**229**, AHT) wird ebenfalls von 2-Methyl-3-nitrophenol (**213**) ausgegangen, dessen OH-Gruppe zuerst wieder mit 3,4-Dihydropyran (**214**) geschützt wird (siehe Kapitel 4.5.6.3).<sup>[157]</sup> Umsetzung von **215** mit DMFDMA (**188**) in absolutem DMF und anschließende Reduktion mit Zink/Ammoniumchlorid führt zu 1-Hydroxy-4-( $\alpha$ -tetrahydropyranlyoxy)indol (**223**), welches sofort ohne weitere Reinigung mit Acetanhydrid und DMAP in Diethylether zum 1-Acetoxy-4-( $\alpha$ -tetrahydropyranlyoxy)indol (**224**) reagiert. Analog zur Darstellung von 1-Hydroxyindol (**184**) ist es auch hier

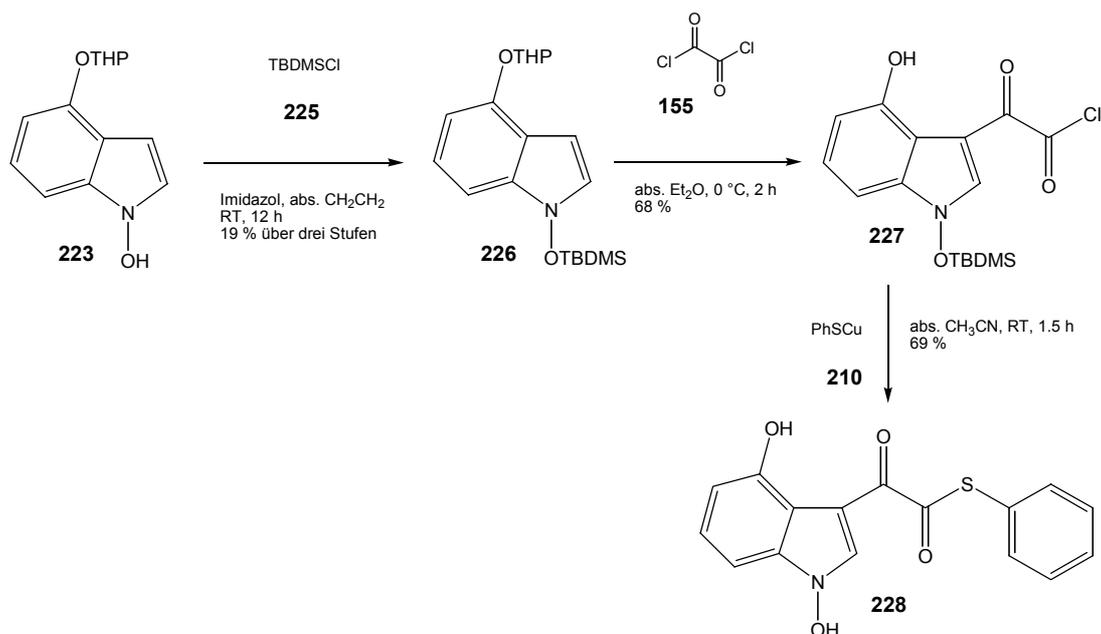
notwendig, das Reaktionsgemisch unter Eiskühlung intensiv zu rühren und das Zinkpulver in kleinen Portionen zuzugeben.



**Abb. 128.** Darstellung von 1-Acetoxy-4-( $\alpha$ -tetrahydropyranyloxy)indol (**224**)

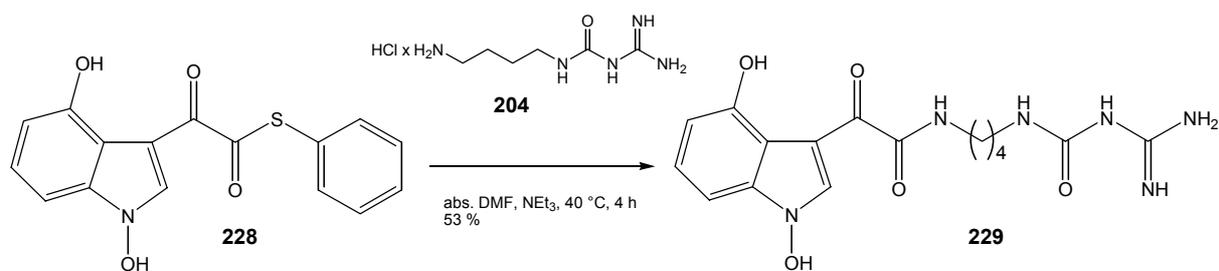
1-Acetoxy-4-( $\alpha$ -tetrahydropyranyloxy)indol (**224**) wird anschließend mit Oxalylchlorid (**155**) in Diethylether bei 0 °C umgesetzt, wobei die THP-Gruppe durch die entstehende HCl abgespalten wird. Man erhält (1-Acetoxy-4-hydroxyindol-3-yl)glyoxylchlorid in nur 21 % Ausbeute als roten Feststoff. Bei der nachfolgenden Veresterung mit Kupfer(I)thiophenolat (**210**) in abs. Acetonitril kann der gewünschte Thioester nur in unbefriedigenden 18 % Ausbeute isoliert werden. Ursache dafür scheint die Instabilität der 1-Acetoxy-Gruppe zu sein, die während der flashchromatographischen Reinigung an Kieselgel abgespalten wird. Bei verschiedenen Versuchen mit anderen Schutzgruppen erweist sich die TBDMS-Gruppe als bester Ersatz für die Acetyl-Gruppe.

Die Einführung der TBDMS-Gruppe gelingt durch Umsetzung von 1-Hydroxy-4-( $\alpha$ -tetrahydropyranyloxy)indol (**223**) mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (**225**) und Imidazol als Base in abs. Dichlormethan. Dafür wird **223** in beschriebener Weise (Abb. 128) durch Reaktion von 2-Methyl-3-nitro-1-( $\alpha$ -tetrahydropyranyloxy)benzol (**215**) mit DMFDMA (**188**) und anschließender Reduktion mit Zn/NH<sub>4</sub>Cl dargestellt. Weitere Umsetzung von **226** mit Oxalylchlorid (**155**) und nachfolgende Veresterung mit Kupfer(I)thiophenolat (**210**) in abs. Acetonitril erzeugt den Thioester **228** in 69 % Ausbeute.



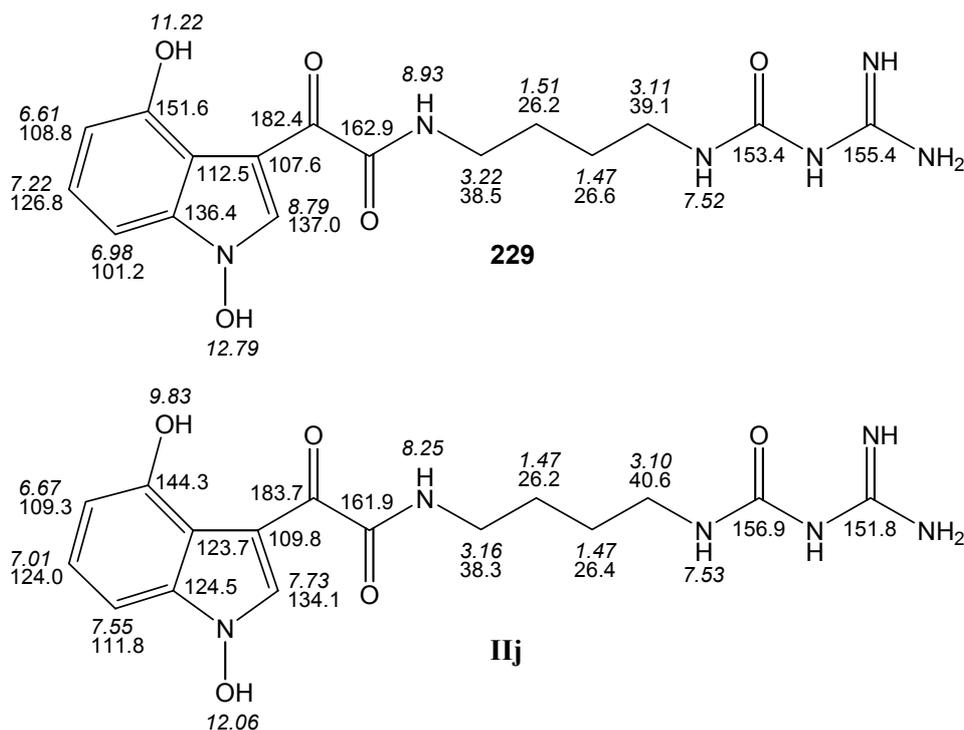
**Abb. 129.** Darstellung von **228**

Das Laufverhalten auf Kieselgel und nachfolgende NMR-Messungen von **228** zeigen, dass sowohl die THP- als auch die TBDMS-Gruppe bei dieser Synthesesequenz verloren gehen. Der resultierende Thioester **228** besitzt nur geringe Stabilität und wird deshalb möglichst schnell mit dem Amin **204** zur Reaktion gebracht.



**Abb. 130.** Darstellung von **229** nach der Thioester-Methode

Im FAB-Massenspektrum des mittels präparativer HPL-Chromatographie an RP-18 gereinigten Produktes **229** erkennt man den  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Peak bei  $m/z = 377$  und damit eindeutig das Vorhandensein zweier OH-Gruppen im Molekül. Außerdem lassen sich mit Hilfe der zweidimensionalen NMR-Messungen die chemischen Verschiebungen eindeutig zuordnen.



**Abb. 131.** NMR-Daten (600/151 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO) von synthetischer Verbindung **229** und Strukturvorschlag **IIj** für Birnbaumine B

Vergleicht man nun die NMR-Daten von **229** mit denen des natürlichen Birnbaumine B (**282**), erkennt man noch größere Abweichungen als im Fall von Birnbaumine A (**281**) und Syntheseprodukt **201**. Besonders in 2-, 3a-, 4- und 7a-Position erreichen die Unterschiede in den  $\delta_{\text{H}}$ -Werten eine Größenordnung von einem ppm und in den  $\delta_{\text{C}}$ -Werten sogar von 10 ppm und mehr. Aufgrund der Tieffeldverschiebung des Protons in 2-Position sowohl in **201** als auch in **229** müsste man annehmen, dass der Indol-Stickstoff in den synthetischen Verbindungen nicht durch eine OH-Gruppe substituiert ist. Diese Vermutung wird jedoch durch die massenspektrometrischen Ergebnisse widerlegt. Auch können mit den bisherigen ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten keine anderen als die dargestellten Strukturen für **201** und **229** formuliert werden, obwohl die Ursache für die starken Abweichungen in der Synthesesequenz liegen müsste. Aus Zeitgründen ist es nicht möglich, das geschilderte Problem im Rahmen dieser Arbeit näher zu untersuchen. Stattdessen soll im Folgenden die *N*-Hydroxyindol-Struktur in Birnbaumine A (**281**) und B (**282**) durch Derivatisierung bewiesen werden.

#### 4.5.6.5 7-Hydroxydesoxybirnbaumin B (AHT)

Zur Darstellung von 7-Hydroxydesoxybirnbaumin B (**233**, AHT) kann von 7-Hydroxyindol (**230**) ausgegangen werden. Dabei handelt es sich bei **230** um eine lichtempfindliche, nicht sehr stabile Substanz, die unter Schutzgasatmosphäre und Lichtausschluss bei  $-20\text{ °C}$  gelagert wird. Analog zu den bisherigen Synthesen setzt man **230** zuerst mit Oxalylchlorid (**155**) in Diethylether bei  $0\text{ °C}$  um und erhält (7-Hydroxyindol-3-yl)glyoxylchlorid (**231**) als orangefarbenen Feststoff in 81 % Ausbeute. Bei der anschließenden Reaktion mit Kupfer(I)thiophenolat (**210**) in abs. Acetonitril entsteht der Thioester **232** ebenfalls in sehr guten Ausbeuten. **232** wird dann mit dem Amin **204** in DMF unter Zusatz von  $\text{NEt}_3$  umgesetzt, wobei ein Farbwechsel von rot nach gelb zu beobachten ist. Die Reaktionskontrolle mittels analytischer HPLC zeigt die Bildung hauptsächlich eines Produktes an. Dieses wird mit Hilfe der präparativen HPLC an RP-18 isoliert.

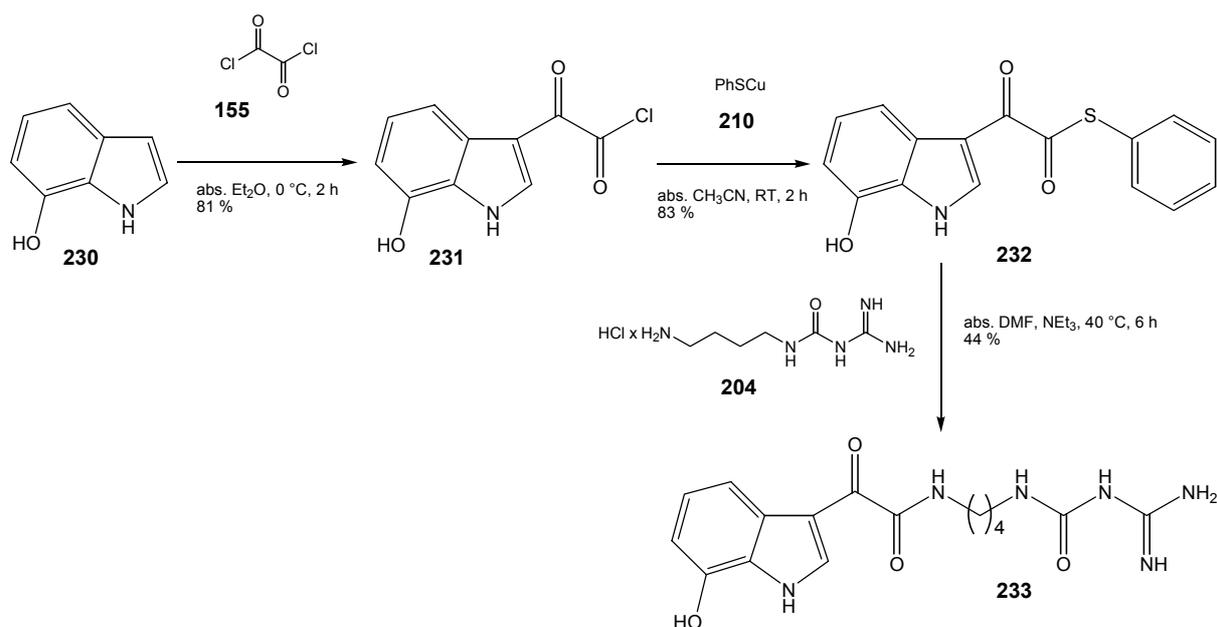
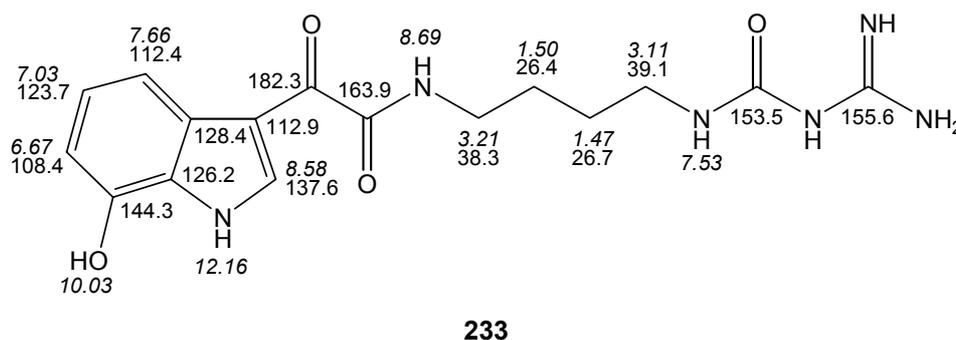


Abb. 132. Synthese von **233**

Acetylierung der Hydroxy-Funktion in **230** mit Acetanhydrid und DMAP in Diethylether ermöglicht die Durchführung der obigen Synthesesequenz ohne Lichtschutz. Da man dann jedoch geringere Ausbeuten beobachtet und zwei zusätzliche Syntheseschritte durch Aufbringen und Abspalten der Schutzgruppe benötigt, wird darauf verzichtet.

Die chemischen Verschiebungen werden wieder mit Hilfe der ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren eindeutig zugeordnet.



**Abb. 133.** NMR-Daten von **233** (600/151 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO)

Um eine Möglichkeit zum genauen Vergleich der NMR-Daten von **233** mit Birnbaumin B (**282**) und damit Absicherung der 7-Hydroxylierung zu erhalten, soll nun versucht werden, das natürliche Birnbaumin B (**282**) durch Reduktion in die *N*-Desoxy-Verbindung zu überführen.

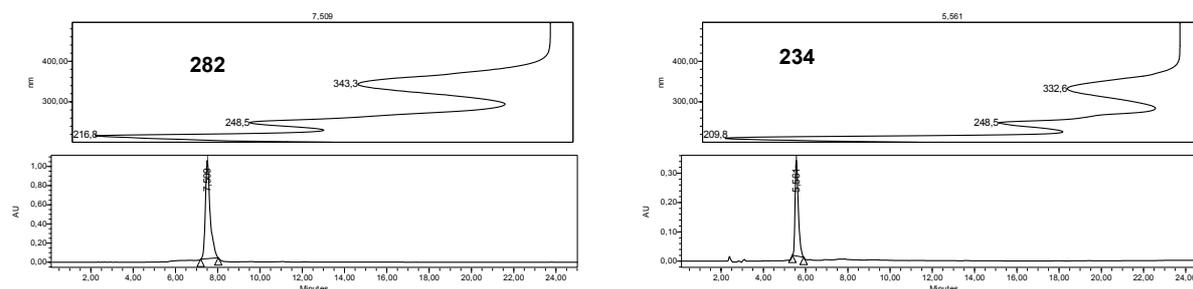
#### 4.5.7 Reduktion von Birnbaumin B (**282**)

Zahlreiche Synthesen von Naturstoffen oder biologisch aktiven Indol-Derivaten beruhen auf 1-Hydroxyindol-Chemie.<sup>[142,159]</sup> In diesen Synthesen wird meistens als einer der letzten Reaktionsschritte die 1-Hydroxyindol-Verbindung zum gewünschten 1-Desoxy-Derivat reduziert. Daher findet man in der Literatur bereits einige Methoden zur Reduktion verschiedener *N*-Hydroxyindol-Verbindungen. So verwenden Somei et al.<sup>[160]</sup> bei der Totalsynthese des marinen Alkaloids Chelonin A Palladium auf Kohle und Wasserstoff bei Atmosphärendruck zur Entfernung der *N*-Methoxy-Funktion. Andere Reduktionsmittel sind Titan(III)chlorid,<sup>[161]</sup> Trimethylphosphit,<sup>[162]</sup> Zink in Eisessig<sup>[149]</sup> oder auch Raney-Nickel/Natriumphosphit.<sup>[148]</sup> Mit Lithiumaluminiumhydrid oder Natriumborhydrid findet aufgrund von Salzbildung mit der OH-Gruppe jedoch keine Reduktion statt.<sup>[149]</sup>

Die Reduktion von Birnbaumin B (**282**) wird zuerst mit einer 15-proz. salzsauren TiCl<sub>3</sub>-Lösung versucht. Dazu löst man den Gelbfarbstoff in Methanol und rührt nach Zugabe der TiCl<sub>3</sub>-Lösung bei Raumtemperatur zwei Stunden. Die Reaktionskontrolle mittels analytischer HPLC zeigt die Entstehung einer Substanz, in deren UV/Vis-Spektrum man eine hypsochrome Verschiebung des langwelligen Absorptionsmaximums um 10 nm beobachtet. Die Isolierung dieser Verbindung in ausreichenden Mengen gelingt jedoch nicht, so dass weder NMR- noch MS-Messungen auswertbare Spektren liefern.

Da eventuell der saure Charakter und damit verbundene Salzbildung die Isolierung der reduzierten Verbindung verhindert bzw. Birnbaumin B (**282**) unter diesen Bedingungen nicht ausreichend stabil ist, wird nun versucht, die Reduktion katalytisch durchzuführen. Man versetzt den in Methanol gelösten Naturstoff **282** mit Palladium auf Aktivkohle und lässt bei einem Wasserstoffdruck von einer Atmosphäre bei Raumtemperatur rühren.<sup>[163]</sup> Bereits nach kurzer Zeit wird die zuerst gelbe Lösung nahezu farblos, was auf eine erfolgte Reduktion hindeutet. Wie bereits beim Versuch mit Titan(III)chlorid gelingt es aber auch hier nicht, aussagekräftige NMR-Spektren des Produktes zu erhalten. Anscheinend wird der sehr polare Naturstoff an die Aktivkohle gebunden und lässt sich auch nicht durch Verwendung von angesäuerten Lösungsmitteln von der Kohle ablösen.

Im dritten Reduktionsversuch gibt man zur methanolischen Lösung von Birnbaumin B (**282**) Zink und einige Tropfen Eisessig hinzu. Auch hier tritt nach kurzer Zeit eine Entfärbung der Reaktionslösung ein, und das analytische HPL-Chromatogramm zeigt die Bildung einer Verbindung, deren UV/Vis-Spektrum die bereits beschriebene hypsochrome Verschiebung aufweist.

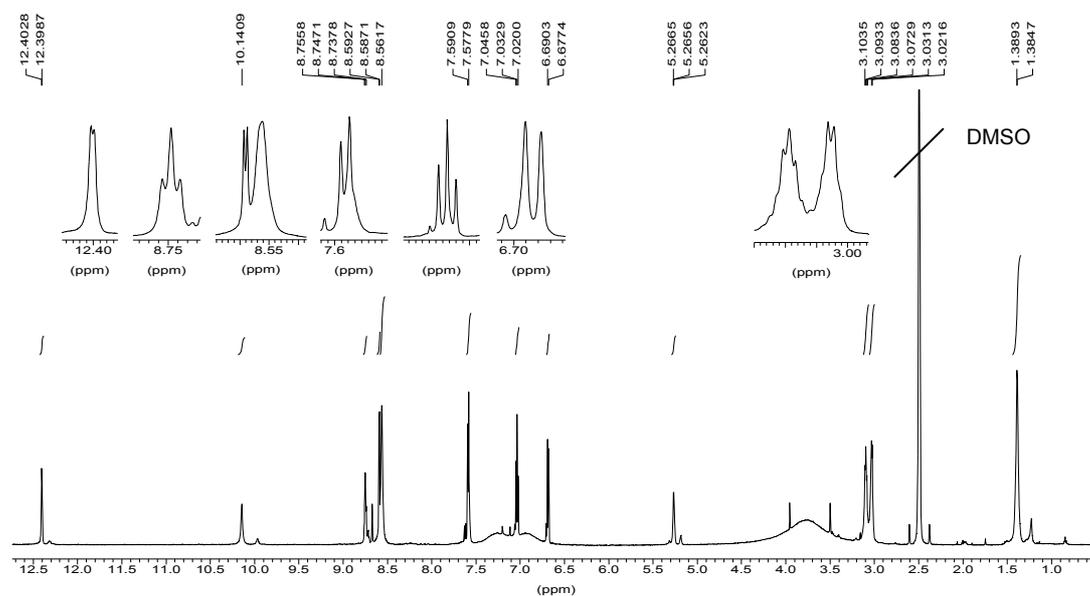


**Abb. 134.** HPL-Chromatogramm vor der Reduktion (links) und nach der Reduktion (rechts)

Die Reinigung des Reduktionsproduktes **234** erfolgt mittels HPL-Chromatographie an RP-18, da sich die Verbindung aufgrund ihrer hohen Polarität nur so von den entstandenen Zinksalzen abtrennen lässt. Es gelingt, ausreichend Substanz für die Durchführung der ein- und zweidimensionalen NMR-Experimente zu erhalten.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  zeigt wie erwartet ein aromatisches ABC-Spinsystem sowie zwei Quartetts und ein verbreitertes Multiplett im Aliphatenbereich, die den vier  $\text{CH}_2$ -Gruppen zugeordnet werden können. Außerdem erkennt man ein Dublett bei  $\delta_{\text{H}}$  8.59 mit einer Kopplungskonstanten von  $J = 2.9$  Hz, das einem aromatischen Proton entspricht. Bei  $\delta_{\text{H}}$  12.40 erscheint ein weiteres Dublett mit  $J = 2.9$  Hz, dessen Verschiebung charakteristisch für ein indolisches NH ist. Weiterhin beobachtet man bei  $\delta_{\text{H}}$  7.58, 8.56, 8.75 und 10.14 Signale, die

bei Aufnahme des Protonenspektrums in  $[D_4]$ Methanol nicht erscheinen und somit zu austauschbaren Protonen gehören. Bemerkenswert ist ein weiteres, etwas verbreitertes Signal bei  $\delta_H$  5.27, das einem Proton entspricht und noch nicht genauer zugeordnet werden kann. Das scharfe Singulett, das im  $^1H$ -NMR-Spektrum von Birnbaumin B (**282**) bei  $\delta_H$  11.89 auftritt, kann man hier nicht mehr beobachten.

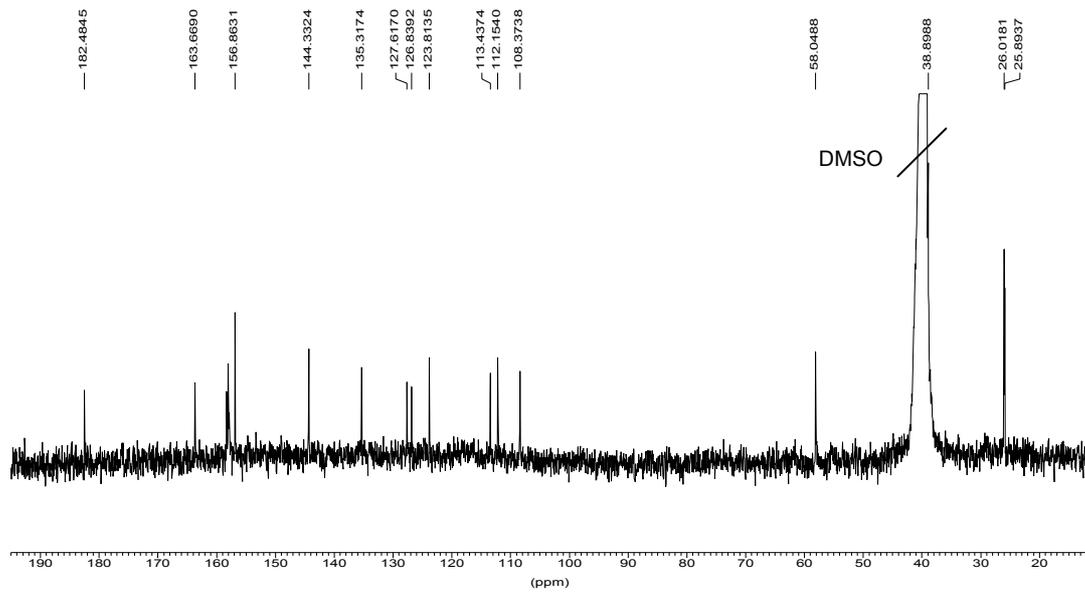


**Abb. 135.**  $^1H$ -NMR-Spektrum des Reduktionsproduktes **234** (600 MHz,  $[D_6]$ DMSO)

Im  $(^1H-^1H)$ -COSY-Spektrum erkennt man deutlich Korrelationen zwischen der  $CH_2$ -Gruppe bei  $\delta_H$  3.03 und dem Signal bei  $\delta_H$  7.58 und zwischen den Methylen-Protonen bei  $\delta_H$  3.09 und dem Triplet bei  $\delta_H$  8.75. Das spricht dafür, dass die aliphatische Kette aus vier  $CH_2$ -Gruppen, am Ende jeweils mit einer  $NH$ -Funktion verknüpft, genauso wie im Birnbaumin B (**282**) bei der Reduktion erhalten bleibt.

Außer den erwarteten Kopplungen zwischen den Protonen des ABC-Spinsystems und der Korrelation zwischen den H-Atomen bei  $\delta_H$  8.59 und 12.40 findet man noch einen weiteren Crosspeak zwischen dem Signal bei  $\delta_H$  5.27 und dem bei  $\delta_H$  8.56.

Das  $^{13}C$ -NMR-Spektrum zeigt 16 Signale, von denen vier aromatischen  $CH$ - und vier aliphatischen  $CH_2$ -Gruppen mit Hilfe eines DEPT-Spektrums zugeordnet werden können. Anders als beim Birnbaumin B findet man im tiefen Feld nur drei Signale bei  $\delta_C$  182.5, 163.7 und 156.9. Zusätzlich erscheint bei  $\delta_C$  58.0 eine  $CH$ -Gruppe, die im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum von Birnbaumin B (**282**) nicht auftritt.



**Abb. 136.**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **234** (151 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )

Mit Hilfe der zweidimensionalen NMR-Experimente werden weitere Daten erhalten, die in folgender Tabelle zusammengefasst sind.

**Tab. 5.** NMR-Daten von **234** (600/151 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO)

$\delta_C$ [ppm]	Art	$\delta_H$ [ppm]	M	$J_{HH}$ [Hz]	COSY $\delta_H$ [ppm]	HMBC $\delta_H$ [ppm]
25.9	CH <sub>2</sub>	1.39	m, breit		1.39, 3.04, 3.09	1.39, 3.04, 3.09
26.0	CH <sub>2</sub>	1.39	m, breit		1.39, 3.04, 3.09	1.39, 3.04, 3.09
38.9	CH <sub>2</sub>	3.09	q	5.8	1.39, 8.75	8.75
40.4	CH <sub>2</sub>	3.03	q	5.8	1.39, 7.58	
58.0	CH	5.27			8.56	
108.4	CH	6.68	d	7.8	7.03	7.03 <sup>s</sup> , 7.58
112.2	CH	7.58	d	7.8	7.03	6.68
113.4	C <sub>q</sub>					8.59, 12.40
123.8	CH	7.03	dd*	7.8, 7.8	6.68, 7.58	6.68 <sup>s</sup>
126.8	C <sub>q</sub>					6.68, 7.58, 8.59, 12.40
127.6	C <sub>q</sub>					7.03, 8.59
135.3	CH	8.59	d	2.9	12.40	
144.3	C <sub>q</sub>					6.68, 7.03
156.9	C <sub>q</sub>					3.04
163.7	C <sub>q</sub>					8.75
182.5	C <sub>q</sub>					
	NH	7.58	t, breit		3.04	
		8.56	s, breit		5.27	
	NH	8.75	t	5.8	3.09	
	OH	10.14	s			
	NH	12.40	d	2.9	8.59	

\*: Signal erscheint als Triplett

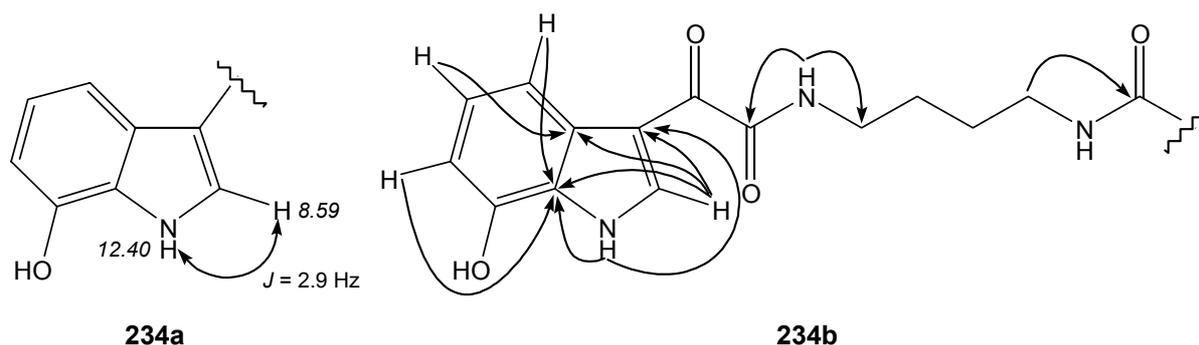
s: schwache Korrelation

Die Auswertung der HSQC- und HMBC-NMR-Spektren ermöglicht u. a. die genaue Zuordnung der Atome im aromatischen Molekülteil. So erkennt man, dass es sich bei dem Dublett bei  $\delta_H$  8.59 um das Proton in 2-Position des Indol-Systems handelt. Dieses Wasserstoff-Atom erscheint beim natürlichen Birnbaumrin **282** als Singulett bei  $\delta_H$  7.73 und zeigt keine COSY-Korrelation (Kapitel 4.5.2). Die zu beobachtende Tieffeldverschiebung, die Kopplung mit dem Proton bei  $\delta_H$  12.40 und ihre Größe mit  $J = 2.9$  Hz sind charakteristisch für Indol-Verbindungen. Damit erhält man einen indirekten Beweis, dass das indolische

Stickstoffatom im Birnbaumin B (**282**) eine OH-Gruppe trägt, die durch die Reduktion abgespalten wird. Auch die hypsochrome Verschiebung im UV/Vis-Spektrum deutet auf den Verlust einer OH-Gruppe am aromatischen System hin.

Anhand der NMR-Daten erkennt man außerdem, dass die Glyoxyleinheit bei der Reduktion ebenso erhalten bleibt wie die aliphatische Seitenkette. Im Unterschied dazu ist an der Endgruppe eine weitere Reduktion erfolgt. Das C-Signal, das im Birnbaumin B (**282**) bei  $\delta_C$  151.8 erscheint und eine Kopplung mit dem scharfen Singulett bei  $\delta_H$  11.89 zeigt, tritt im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum der reduzierten Verbindung **234** nicht mehr auf. Dafür findet man nun das bereits erwähnte Signal bei  $\delta_C$  58.0, das direkt mit dem Proton bei  $\delta_H$  5.27 verbunden ist. Die Tieffeldverschiebung des Wasserstoffatoms deutet auf eine Verknüpfung des Kohlenstoffs mit Heteroatomen hin, doch eine genaue Aussage über die Position im Molekül lässt sich noch nicht treffen.

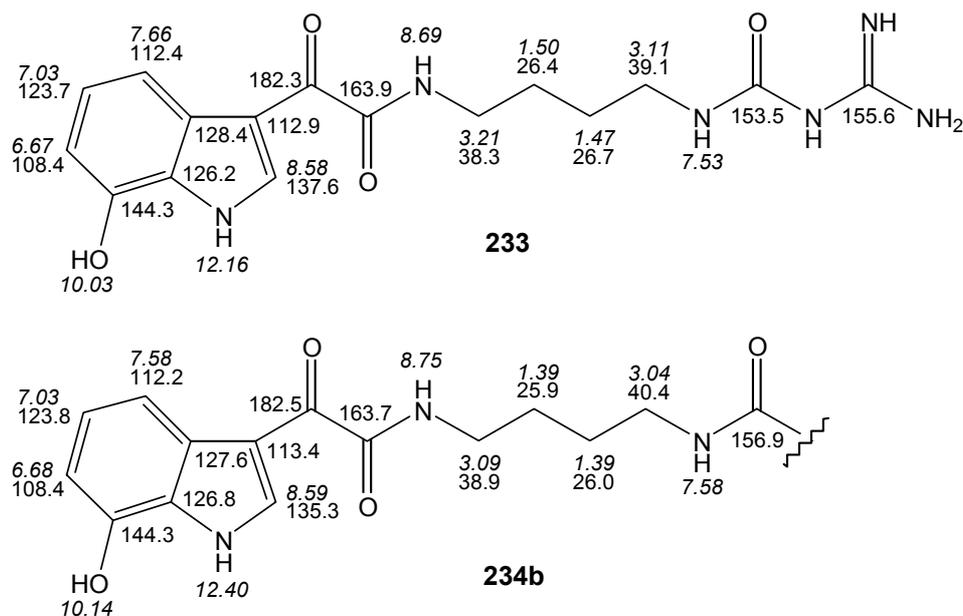
Mit den bisherigen Informationen kann man folgende Teilstruktur des Reduktionsproduktes formulieren.



**Abb. 137.** Ausgewählte COSY- (links) und HMBC-Korrelationen (rechts)

#### 4.5.8 Vergleich zwischen Reduktionsprodukt **234** und 7-Hydroxydesoxybirnbaumin B (**233**, AHT)

Diese Teilstruktur wird nun mit der synthetischen 1-Desoxy-Verbindung **233** verglichen. Vor allem im aromatischen Teil zeigt sich dabei sehr gute Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen. Damit ist zum einen bewiesen, dass sich die phenolische OH-Gruppe im natürlichen Birnbaumin B (**282**) an 7-Position befindet. Zum anderen dienen die Reduktion und die beobachteten Verschiebungseffekte und Kopplungen als indirekter Beweis für eine N-Hydroxy-Funktion in Birnbaumin B (**282**).



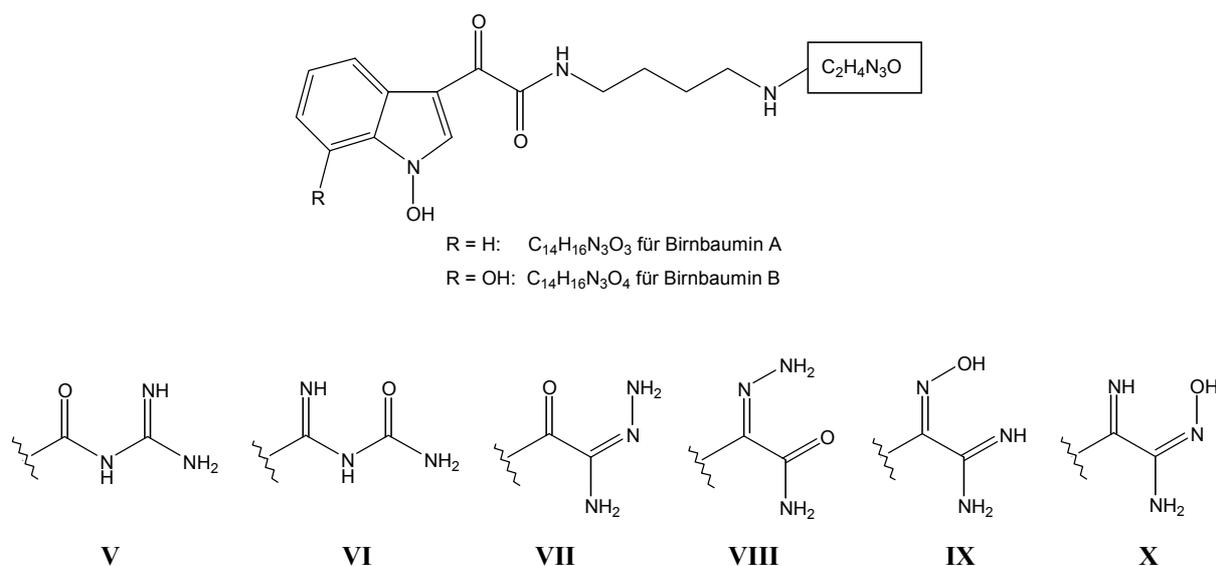
**Abb. 138.** NMR-Daten (600/151 MHz,  $[D_6]$ DMSO) von **233** und Teilstruktur **234b** für reduziertes Birnbaumine B (**234**)

Durch die Synthese der 1-Desoxy-Verbindung **233** und die Reduktion von Birnbaumine B (**282**) entstehen erhebliche Zweifel an der Korrektheit der bisher angenommenen Amidinoharnstoff-Funktion. Wie bereits erwähnt (Kapitel 4.5.6.2.3), fehlt in den synthetischen Verbindungen mit Amidinoharnstoff-Gruppe das scharfe Singulett, das in den Protonenspektren von Birnbaumine A (**281**) und Birnbaumine B (**282**) auftritt. Außerdem weichen die  $\delta$ -Werte der beiden quartären C-Atome in der Endgruppe der Syntheseverbindungen zu stark von denen in den natürlichen Birnbauminen **281** und **282** ab. Auch wird eine Amidinoharnstoff-Funktion durch Reduktion mit Zink in Eisessig nicht angegriffen, so dass das Auftreten der CH-Gruppe bei  $\delta_H/\delta_C$  5.27/58.0 vorerst nicht erklärt werden kann.

Selbst durch massenspektrometrische Messungen gelingt die Klärung dieses Problems zunächst nicht. Statt des erwarteten Molpeaks bei  $m/z = 360$ , was der Reduktion einer OH-Gruppe entsprechen würde, findet man im ESI-Modus von **234** den  $[M+H]^+$ -Peak bei  $m/z = 347$ . Die Hochauflösung dieses Peaks ergibt eine Summenformel von  $C_{16}H_{22}N_6O_3$ . Da Birnbaumine B (**282**) eine Zusammensetzung von  $C_{16}H_{20}N_6O_5$  zukommt, ergibt sich daraus ein Verlust von zwei Sauerstoffatomen bei der Reduktion. Die Ursache dafür muss durch weitere Untersuchungen und Derivatisierungen gefunden werden.

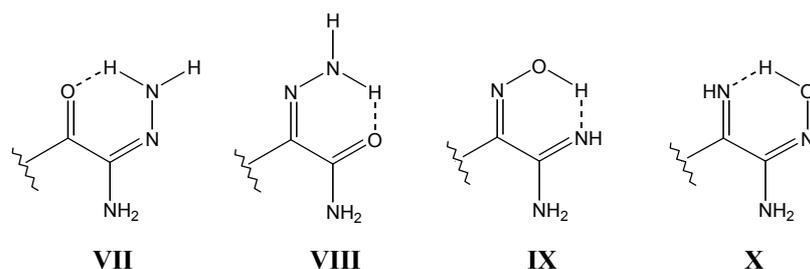
#### 4.5.9 Mögliche funktionelle Gruppen als Endgruppe in Birnbaumin A (281) und B (282)

Da durch Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie bereits die Summenformel und große Teile der Struktur sowohl von Birnbaumin A (281) als auch von Birnbaumin B (282) festgelegt sind, bleibt für die Endgruppe nur noch ein Rest mit der Zusammensetzung  $C_2H_4N_3O$  übrig. Dafür bestehen prinzipiell folgende Möglichkeiten:



**Abb. 139.** Mögliche Endgruppen in Birnbaumin A (281) und B (282)

Die Teilstruktur **V** kommt zwar in einigen aus Rotalgen isolierten Naturstoffen vor (Kapitel 4.5.5), kann aber aufgrund der stark abweichenden chemischen Verschiebungen ausgeschlossen werden. Die Vorschläge **VII**, **VIII**, **IX** und **X** erklären eventuell das im Protonenspektrum beobachtete Singulett bei  $\delta_H$  ca. 11.9, da man die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke in folgender Weise annehmen kann.

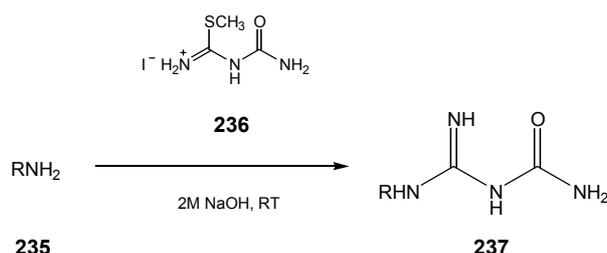


**Abb. 140.** Mögliche Ausbildung einer Wasserstoffbrücke in **VII-X**

Der Strukturvorschlag **VI** lässt sich mit den bisherigen Informationen ebenfalls nicht völlig ausschließen. Da es für die in Abbildung 139 dargestellten Teilstrukturen kaum Vergleiche in der Literatur gibt, soll versucht werden, sowohl durch Synthese von Modellverbindungen, als auch durch weitere Derivatisierungen die korrekte Struktur des unbekannten Teilstücks zu ermitteln. Aufgrund der großen Übereinstimmung in den chemischen Verschiebungen, den Massenspektren und den Eigenschaften zwischen Birnbaum A (**281**) und B (**282**) kann man davon ausgehen, dass beide Naturstoffe die gleiche Endgruppe enthalten.

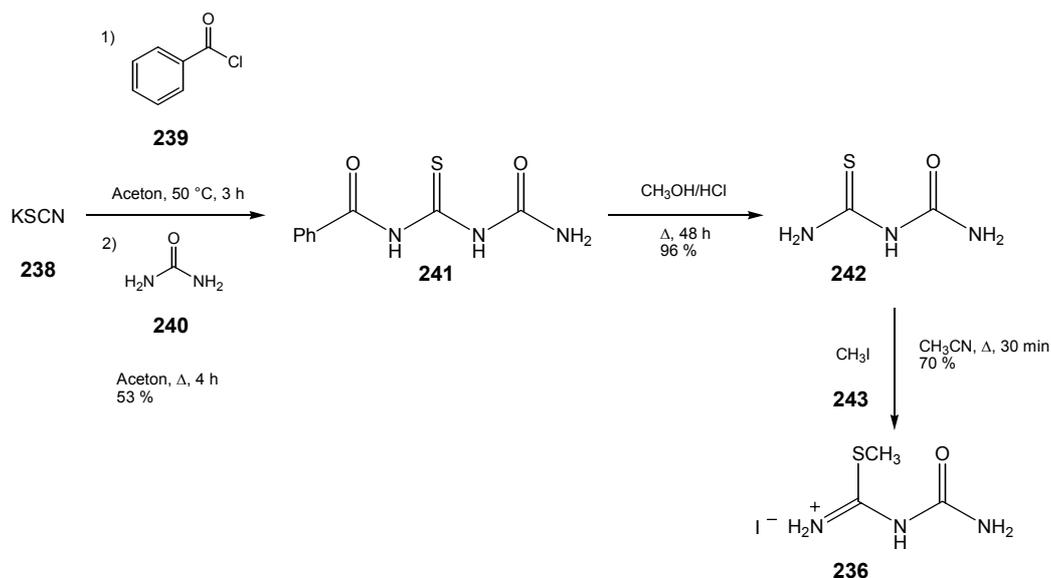
#### 4.5.9.1 Synthese von Modellverbindungen mit Carbamoylguanidino-Terminus

Bei der Darstellung von antibiotisch wirksamen Dipeptiden beschreiben de Meijere et al.<sup>[164]</sup> die Umsetzung eines primären Amins **235** mit 2-Methylthiopseudobiuret-Hydroiodid (**236**) zur Verbindung **237**, die den Carbamoylguanidino-Terminus (**VI**) als funktionelle Gruppe enthält.



**Abb. 141.** Einführung von **VI** als funktionelle Gruppe

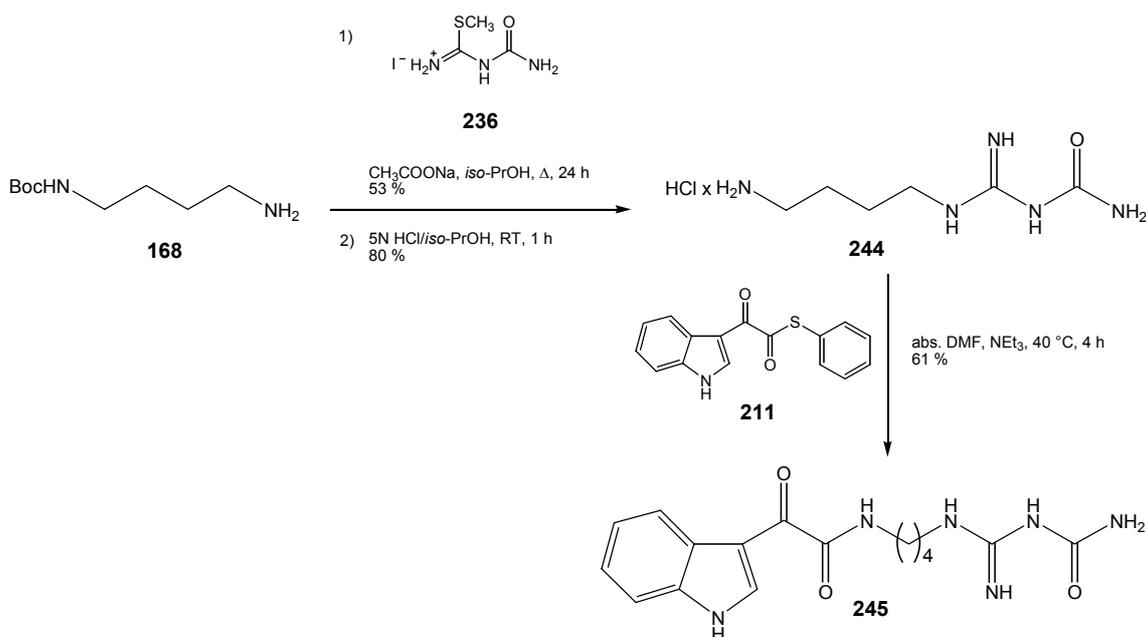
Das dafür benötigte 2-Methylthiopseudobiuret-Hydroiodid (**236**) gewinnt man durch Methylierung von Thiobiuret (**242**) mit Methyljodid (**243**) in Acetonitril.<sup>[165]</sup> Die Darstellung von **242** erfolgt durch Umsetzung von Kaliumisothiocyanat (**238**) mit Benzoylchlorid (**239**) zum Benzoylisothiocyanat und anschließender Reaktion mit Harnstoff (**240**) zum 1-Benzoyl-2-thiobiuret (**241**). Die Benzoylgruppe wird dann durch Erhitzen in salzsaurem Methanol abgespalten und man erhält **242** als farblosen Feststoff.<sup>[165,166]</sup>



**Abb. 142.** Darstellung von 2-Methylthiopseudobiuret-Hydroiodid (**236**)

**236** soll nun unter den von de Meijere beschriebenen Bedingungen mit *N*-Boc-1,4-diaminobutan (**168**) umgesetzt werden. Dazu bringt man eine Suspension aus **168** und **236** in Wasser durch Zugabe von 2N Natronlauge auf pH 11 und lässt bei Raumtemperatur 19 Stunden rühren. Bei der anschließenden Aufarbeitung kann das erwartete Produkt jedoch nicht isoliert werden.

Werden stattdessen Natriumacetat als Base und *iso*-Propanol als Lösungsmittel verwendet,<sup>[167]</sup> erhält man nach 24stündigem Refluxieren einer Suspension aus **168** und **236** die gewünschte Verbindung in 53 % Ausbeute. Analog zur Einführung der Amidinoharnstoff-Funktion erfolgt nun die Abspaltung der Boc-Gruppe durch 5N HCl/*iso*-Propanol. Das resultierende Hydrochlorid **244** wird anschließend mit dem Thioester **211** in DMF und  $\text{NEt}_3$  zur Modellverbindung **245** umgesetzt.

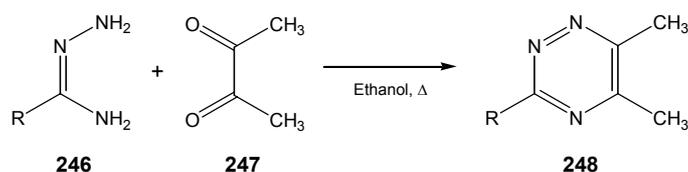


**Abb. 143.** Darstellung der Modellverbindung **245**

Die Auswertung der ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren von **245** zeigt schnell, dass auch der Carbamoylguanidino-Terminus (**VI**) als Endgruppe in Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) nicht in Frage kommt. Bereits im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  sind signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Protonenspektren der Birnbaumine **281** und **282** zu erkennen. So fehlt nicht nur das scharfe Singulett bei  $\delta_{\text{H}} \sim 11.9$ , sondern auch das Triplett bei  $\delta_{\text{H}} \sim 7.5$ , das in Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) zu einem der beiden amidischen NH-Gruppen gehört. Außerdem erscheint die mit dieser NH-Funktion verknüpfte  $\text{CH}_2$ -Gruppe als Triplett bei  $\delta_{\text{H}} 2.96$  und nicht wie in den Birnbauminen als Quartett bei  $\delta_{\text{H}} 3.10$ . Dafür findet man im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **245** bei  $\delta_{\text{H}} 5.31$  und  $5.97$  stark verbreiterte Signale, die den NH- und  $\text{NH}_2$ -Protonen der Endgruppe zugeordnet werden können. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome zeigt ebenfalls deutliche Abweichungen. Auffällig ist ebenfalls, dass **245** erst bei Temperaturen über  $260^\circ\text{C}$  zersetzt wird, während die natürlichen Birnbaumine **281** und **282** und auch die synthetischen *N*-Desoxy-Verbindungen **178**, **222** und **233** im Bereich von  $90\text{--}110^\circ\text{C}$  schmelzen.

#### 4.5.9.2 Synthese von Modellverbindungen mit Amidrazon- bzw. Amidoxim-Terminus

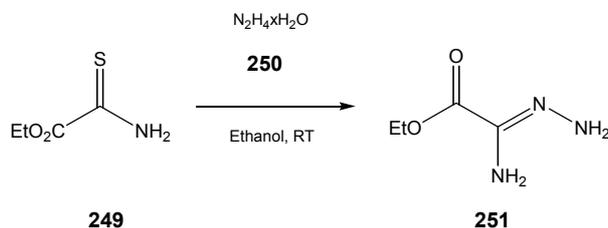
Durch die bisherigen Synthesen können bereits zwei der sechs möglichen Strukturen für die Endgruppe der Birnbaumine ausgeschlossen werden. Betrachtet man die verbleibenden Teilstrukturen, so erkennt man, dass die Amidrazon-Struktur **VII** die Darstellung von 1,2,4-Triazininen durch Umsetzung mit 1,2-Dicarbonylverbindungen wie Diacetyl (**247**) ermöglichen würde.<sup>[168,169]</sup>



**Abb. 144.** Umsetzung der Amidrazone **246** mit Diacetyl (**247**)

Ein entsprechender Derivatisierungsversuch, Birnbaumin B (**282**) mit Diacetyl (**247**) in Ethanol umzusetzen, führt jedoch zu keinem isolierbaren Produkt. Da nicht eindeutig zu klären ist, ob mangelnde Stabilität oder das Fehlen einer entsprechenden Amidrazon-Struktur die Ursache für das Misslingen der Reaktion ist, werden erneut Modellverbindungen synthetisiert.

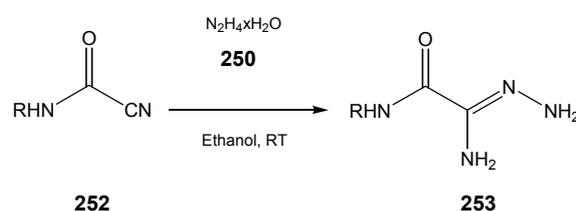
Amidrazone können auf verschiedene Weise, z. B. aus Amiden, Thioamiden oder Imidoestern, dargestellt werden.<sup>[170]</sup> So entsteht das Amidrazon **251** bei der Umsetzung von Oxalsäureethylesterthioamid (**249**) mit einem Äquivalent Hydrazin-Monohydrat (**250**).<sup>[168,171]</sup>



**Abb. 145.** Darstellung von Amidrazonen aus **249** und **250**

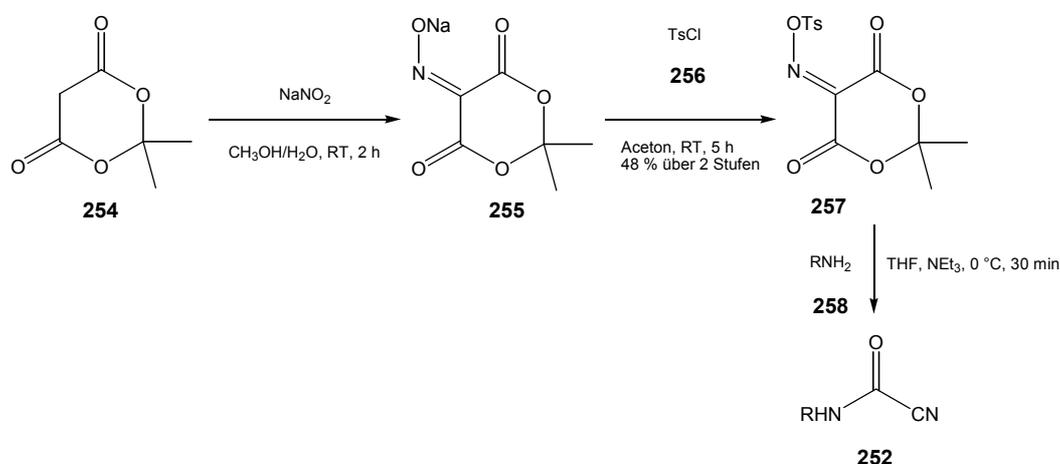
Auch  $\alpha$ -Ketonitrile stellen geeignete Ausgangsstoffe dar und reagieren mit Hydrazin-Monohydrat (**250**) zu den entsprechenden Amidrazon-Derivaten.<sup>[172]</sup> Verwendet man Nitrile

von Oxalamidsäuren, erzeugt man Verbindungen, die bereits die geforderte Teilstruktur **VII** enthalten.



**Abb. 146.** Amidrazonsynthese aus Nitrilen

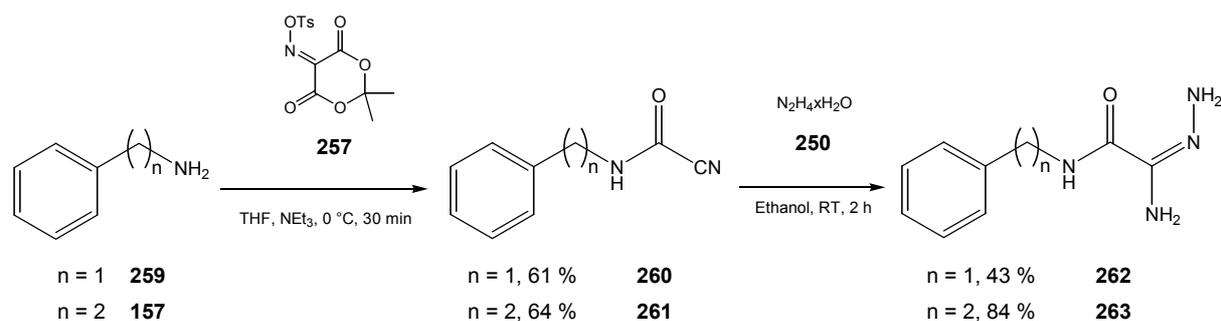
Katagiri et al.<sup>[173]</sup> beschreiben eine dreistufige Synthese zur Darstellung der benötigten Nitrile ausgehend von 2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**254**, Meldrums Säure). **254** wird im ersten Schritt mit Natriumnitrit zum Natriumsalz **255** der Isonitroso-Verbindung und anschließend mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (**256**) umgesetzt. Das resultierende Oximinosulfonat **257** reagiert in THF unter Zusatz von  $\text{NEt}_3$  mit primären Aminen **258** zu den gewünschten Nitrilen **252**.<sup>[173-175]</sup>



**Abb. 147.** Darstellung der Nitrile **252**

Ein Vorteil dieser Methode ist die Vermeidung des giftigen Kaliumcyanids, das mit den entsprechenden Halogeniden ebenfalls zu Nitrilen reagiert. Außerdem ermöglicht die Verwendung verschiedenster Amine vielfältige Einsatzmöglichkeiten der Methode.

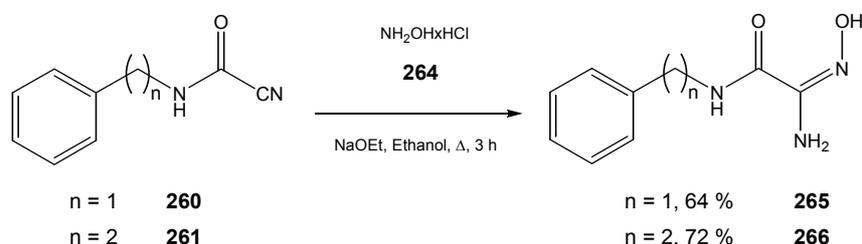
Nach Katagiri werden die Nitrile **260** und **261** aus Benzylamin (**259**) bzw. 2-Phenylethylamin (**157**) und **257** hergestellt und anschließend mit Hydrazin-Monohydrat (**250**) bei Raumtemperatur zu den Amidrazonen **262** und **263** umgesetzt.



**Abb. 148.** Darstellung von **262** und **263**

Die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Amidrazone **262** und **263** in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  zeigen nicht wie erwartet ein scharfes Singulett eines wasserstoffbrückengebundenen Protons. Anscheinend erfolgt keine Ausbildung einer solchen Brücke zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff und der  $\text{NH}_2$ -Gruppe (Abb. 140). Damit kann der Amidrazon-Terminus **VII** als Endgruppe der Birnbaumine A (**281**) und B (**282**) ausgeschlossen werden.

Setzt man die Nitrile **260** und **261** statt mit Hydrazin (**250**) mit Hydroxylamin-Hydrochlorid (**264**) in Gegenwart einer Base wie Natriumethanolat um, erhält man die Verbindungen **265** und **266** mit einer Amidoxim-Struktur.

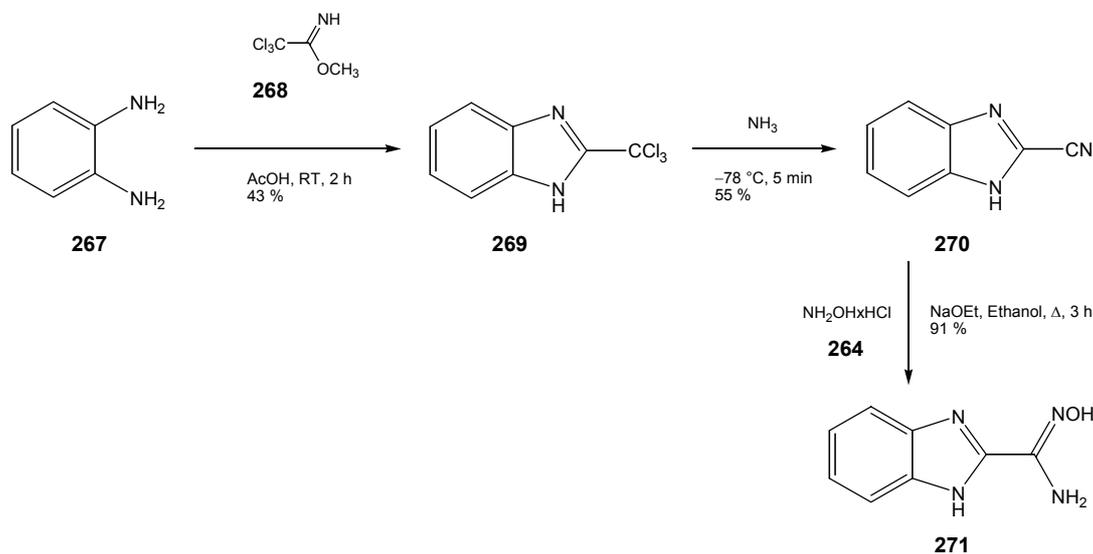


**Abb. 149.** Darstellung der Amidoxime **265** und **266**

In den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **265** und **266** in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  fallen sofort die äußerst scharfen Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  9.86 (in **265**) bzw. 9.80 (in **266**) auf, die der OH-Gruppe zugeordnet werden können. Es kommt in **265** und **266** also zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung wie in den Birnbauminen. Da die Amidoxime **265** und **266** aber statt der NH-Gruppe wie in der vorgeschlagenen Teilstruktur **X** (siehe Kapitel 4.5.9) eine Carbonylfunktion besitzen, werden weitere Modellverbindungen zum Vergleich herangezogen.

Benzimidazol-2-carboxamidoxim (**271**) wird u. a. durch Berndt et al.<sup>[176]</sup> im Rahmen eines Screening-Programms auf der Suche nach biologisch wirksamen Benzimidazolen dargestellt. Die Synthese geht von *o*-Phenylendiamin (**267**) aus, das mit 2,2,2-Trichloroacetimido-

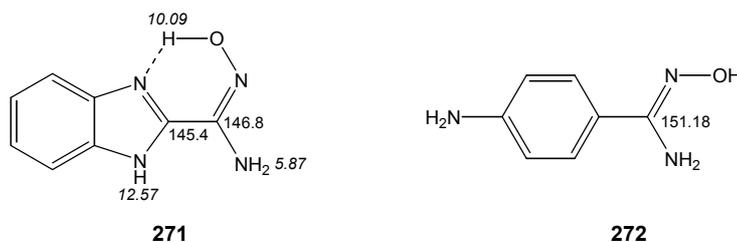
methylester (**268**) in Essigsäure zum 2-Trichloromethylbenzimidazol (**269**) umgesetzt wird.<sup>[177]</sup> Aus **269** erzeugt man anschließend unter wasserfreien Bedingungen in flüssigem Ammoniak das Benzimidazol-2-carbonitril (**270**), das mit Hydroxylamin-Hydrochlorid (**264**) zum gewünschten Benzimidazol-2-carboxamidoxim (**271**) hydrolysiert wird.<sup>[176,178,179]</sup>



**Abb. 150.** Darstellung von Benzimidazol-2-carboxamidoxim (**271**)

Im Protonenspektrum von **271** in [D<sub>6</sub>]DMSO beobachtet man ein scharfes Signal bei  $\delta_{\text{H}}$  10.09, was bedeutet, dass auch hier das H-Atom der OH-Gruppe über eine Wasserstoffbrücke fixiert ist. Die Aufnahme von auswertbaren <sup>13</sup>C-NMR-Spektren zum Vergleich der chemischen Verschiebungen gelingt erst bei Temperaturen von -30 °C, da bei Raumtemperatur die Signale stark verbreitert erscheinen. Die beiden quartären C-Atome der Amidoxim-Struktur erkennt man im Vergleich zu den Birnbauminen hochfeldverschoben bei  $\delta_{\text{C}}$  145.4 und 146.8, was aber durch die strukturellen Unterschiede erklärbar ist.

Ähnliche chemische Verschiebungen wie in den Birnbauminen **281** und **282** beobachtet man in verschiedenen Benzamidoximen, die von Clement et al.<sup>[180,181]</sup> als potentielle Prodrugs für pharmazeutisch bedeutende Amidin-Derivate eingehend <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-NMR-spektroskopisch untersucht worden sind. Clement konnte so auch eindeutig feststellen, dass tatsächlich eine Amidoxim- und keine hydroxylaminartige Struktur vorliegt.



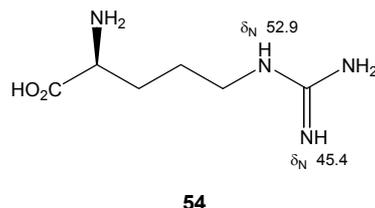
**Abb. 151.** Ausgewählte NMR-Verschiebungen von **271** ([D<sub>6</sub>]DMSO/[D<sub>4</sub>]Methanol) und **272** ([D<sub>6</sub>]DMSO)<sup>[181]</sup>

Durch den Vergleich mit den synthetischen Modellverbindungen können bereits die Teilstrukturen **V**, **VI** und **VII** als Endgruppe für Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) ausgeschlossen werden. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke in **265**, **266** und **271** deutet auf eine Amidoxim-Struktur (**X**) als Terminus hin. Da die Endgruppe in **281** und **282** sehr stickstoffreich ist, wird weiterer Aufschluss durch die Aufnahme und Auswertung von <sup>15</sup>N-NMR-Experimenten erwartet.

#### 4.5.9.3 <sup>15</sup>N-NMR-Spektroskopie

Die breiten, für die Strukturaufklärung wenig brauchbaren Signale des <sup>14</sup>N-Isotops bzw. die geringe natürliche Häufigkeit von 0.37 % und das niedrige gyromagnetische Verhältnis des <sup>15</sup>N-Kernes erschweren die direkte Stickstoff-NMR-Spektroskopie erheblich. Deutlich bessere Ergebnisse erzielt man bei Anwendung von invers detektierenden Methoden.<sup>[182]</sup> Schwierig kann sich auch ein Vergleich von experimentellen Daten mit Literaturwerten gestalten, da die chemische Verschiebung von Stickstoffatomen in einem größeren Maße als bei Kohlenstoffen vom Lösungsmittel und von der Protonierung abhängt.<sup>[183,184]</sup> Außerdem benötigt man deutlich größere Substanzmengen als für <sup>1</sup>H- bzw. <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie. Im Fall der Birnbaumine ist es schwierig, ausreichend Substanz zur Verfügung zu stellen, da meistens nicht mehr als zwei Fruchtkörper von *L. birnbaumii* gleichzeitig erhalten und aufgearbeitet werden können. Schließlich gelingt es, von Birnbaumin B (**282**) auswertbare <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC- und HMBC-Spektren aufzunehmen.

Im HSQC-Spektrum von Birnbaumin B (**282**) in [D<sub>6</sub>]DMSO erkennt man deutlich jeweils eine Korrelation zwischen dem Proton bei  $\delta_{\text{H}}$  7.53 und einem Stickstoff-Atom bei  $\delta_{\text{N}}$  55.1 bzw. zwischen dem Wasserstoff bei  $\delta_{\text{H}}$  8.25 und dem N-Atom bei einer für Amide typischen Verschiebung von  $\delta_{\text{N}}$  83.8. Das erste Stickstoff-Atom erscheint etwas hochfeldverschoben, wie man es z. B. auch in der Guanidino-Funktion von Arginin (**54**) findet.



**Abb. 152.**  $^{15}\text{N}$ -Verschiebungen in der Guanidino-Funktion von Arginin (**54**)<sup>[184]</sup>  
(bezogen auf  $\delta_{\text{N}} = 0$  ppm für  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )

Das  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum von **282** zeigt u. a. eine Wechselwirkung zwischen dem Proton bei  $\delta_{\text{H}}$  7.53 und einem Stickstoff-Atom bei  $\delta_{\text{N}}$  47.0, dessen chemische Verschiebung ebenfalls große Ähnlichkeit mit der Guanidino-Struktureinheit im Arginin (**54**) aufweist.

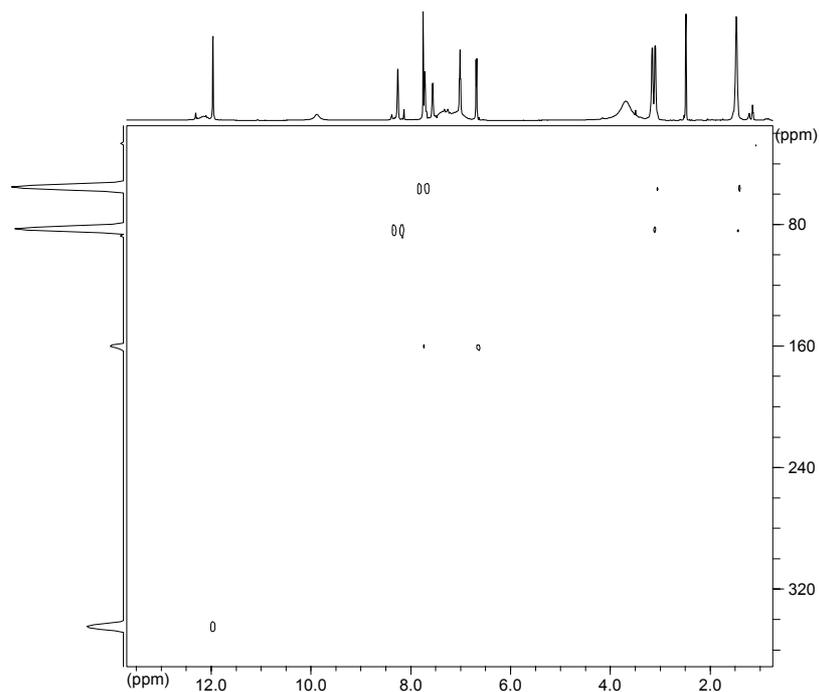
Weiterhin sieht man ein Stickstoff-Atom bei  $\delta_{\text{N}}$  161.0, das mit den aromatischen Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  6.67 und 7.73 koppelt. Es kann sich dabei also nur um den Indol-Stickstoff handeln. Normalerweise erscheinen die Signale von Indol-Stickstoffen im Bereich von 120 bis 150 ppm,<sup>[182]</sup> doch erfolgt ähnlich wie bei Kohlenstoff-Signalen durch die *N*-Hydroxy-Funktion eine Tieffeldverschiebung.<sup>[184]</sup>

Interessant ist außerdem eine Korrelation zwischen dem Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  11.89 und einem N-Atom bei  $\delta_{\text{N}}$  344.5. Eine solche Tieffeldverschiebung findet man bei verschiedenen Oximen, deren Stickstoff-Atome im Bereich von ca. 300 bis 350 ppm erscheinen.<sup>[185]</sup>



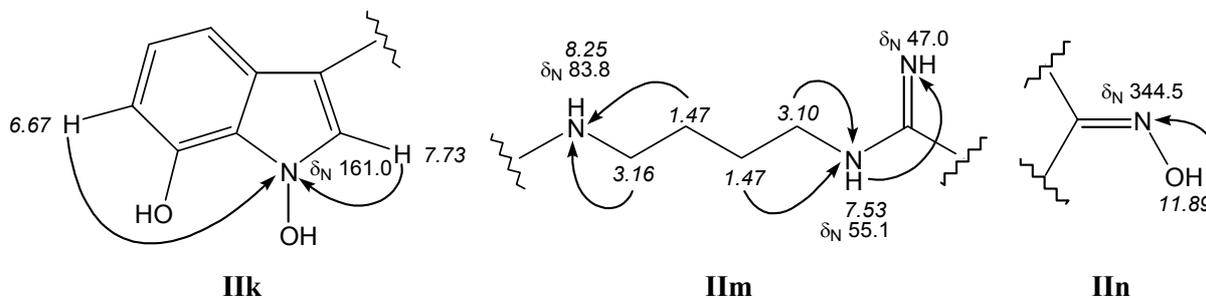
**Abb. 153.** Oxime **273-276** mit  $^{15}\text{N}$ -Daten<sup>[180,184,186]</sup>

Weitere Kopplungen zwischen den bereits im HSQC erkennbaren N-Atomen bei  $\delta_{\text{N}}$  55.1 und 83.8 und den Methylengruppen bei  $\delta_{\text{H}}$  1.47, 3.10 und 3.16 bestätigen erneut die Struktur der aliphatischen Kette. Ähnlich wie in den  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektren sieht man hier zudem Artefakte, die durch nicht vollständig unterdrückte  $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungen hervorgerufen werden.



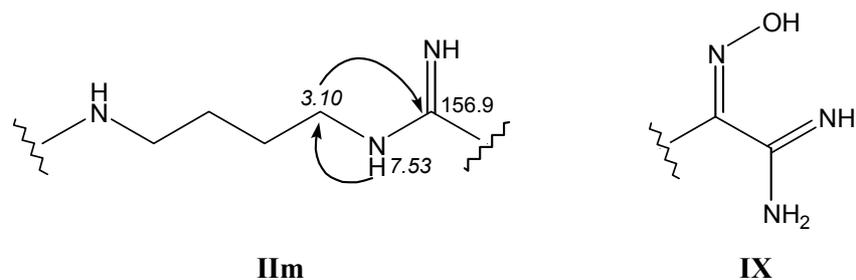
**Abb. 154.**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum von **282** (600/60.8 MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO)

Die beobachteten Korrelationen lassen damit die Zuordnung der Stickstoff-Atome zu den entsprechenden Teilstrukturen von Birnbaumin B (**282**) zu.



**Abb. 155.** Teilstrukturen aus Birnbaumin B (**282**) mit HMBC-Korrelationen (600/60.8 MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO)

Zieht man nun die CH-Korrelationen mit in die Betrachtung ein (Kapitel 4.5.2), so kann man die Teilstruktur **IX** als mögliche Endgruppe für die Birnbaumine **281** und **282** ausschließen.



**Abb. 156.** Ausgewählte CH-Korrelationen der Teilstruktur **II** in Birnbaumin B (**282**) und mögliche Endgruppe **IX**

Die Positionen des Kohlenstoffs bei  $\delta_C$  156.9 und der Stickstoff-Atome bei  $\delta_N$  47.0 und 55.1 sind durch die Korrelationen mit den Protonen der CH<sub>2</sub>- bzw. der NH-Gruppe festgelegt. Wie bereits beschrieben, beobachtet man in Birnbaumin B (**282**) zusätzlich Korrelationen von einem wasserstoffbrückengebundenen Wasserstoff bei  $\delta_H$  11.89 mit einem C-Atom bei  $\delta_C$  151.8 und einem Stickstoff bei  $\delta_N$  344.5. Würde die Endgruppe **IX** in **282** enthalten sein, müssten die Methylen-Protonen und das H-Atom bei  $\delta_H$  11.89 zum gleichen Kohlenstoff bzw. Stickstoff koppeln. Auch **VIII** erscheint als Endgruppe von **282** unwahrscheinlich, da die ermittelten chemischen Verschiebungen der N-Atome von **282** im Widerspruch zur formulierten Teilstruktur **VIII** stehen.

Wie bereits die Daten der synthetisierten Modellverbindungen weisen nun auch die Erkenntnisse aus der <sup>15</sup>N-NMR-Spektroskopie auf eine Amidoxim-Funktion **X** als Terminus in Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) hin.

Die gesamten, aus HSQC- und HMBC-Experimenten erhaltenen Stickstoff-NMR-Daten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tab. 6.**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Korrelationen in Birnbaumin B (**282**) (bezogen auf  $\delta_{\text{N}} = 0$  ppm für  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 60.8 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )

N-Atome	HSQC	HMBC
$\delta_{\text{N}}$ [ppm]	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]
47.0		7.53
55.1	7.53	1.47, 3.10
83.8	8.25	1.47, 3.16
161.0		6.67, 7.73
344.5		11.89

Da bislang aber ein echter Beweis für das Vorkommen der Teilstruktur **X** in den Naturstoffen fehlt, werden verschiedene Derivatisierungsversuche durchgeführt, die zur Klärung beitragen sollen. Auch die bisher durch Reduktion nur indirekt bestimmte *N*-Hydroxy-Funktion am Indolring soll durch Derivatisierung eindeutig nachgewiesen werden.

#### 4.5.10 Endgültiger Strukturbeweis durch Derivatisierung

Im ersten Versuch wird Birnbaumin B (**282**), das in größeren Mengen als Birnbaumin A (**281**) zur Verfügung steht, mit Acetanhydrid acetyliert. Dabei kann jedoch kein Produkt isoliert werden. Ebenso wenig gelingt eine Umsetzung von Birnbaumin B (**282**) mit  $(\text{Boc})_2\text{O}$  und DMAP in Acetonitril bzw. Silylierung mit MSTFA (siehe Kapitel 4.5.5).

##### 4.5.10.1 Methylierung von Birnbaumin A (**281**)

Da es sich bei 1-Methoxyindol-Verbindungen meistens um stabile Substanzen handelt, soll nun versucht werden, das etwas einfacher strukturierte Birnbaumin A (**281**) mit Diazomethan zu methylieren. Aufgrund der Beobachtungen von Bross<sup>[96]</sup> wird dieser Derivatisierungsversuch jedoch nicht bei Raumtemperatur, sondern unter Eiskühlung durchgeführt. Man versetzt eine methanolische Lösung von Birnbaumin A (**281**) bei 0 °C solange mit etherischer Diazomethanlösung, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Nach weiterem 30minütigem Rühren zeigt die Reaktionskontrolle mittels analytischer HPLC keine Ausgangsverbindung mehr. Dafür erkennt man zwei Hauptverbindungen, die eine erhöhte Retentionszeit auf RP-18-Material und eine hypsochrome Verschiebung im UV/Vis-Spektrum aufweisen. Die Isolierung dieser beiden Fraktionen gelingt mit Hilfe der präparativen HPL-

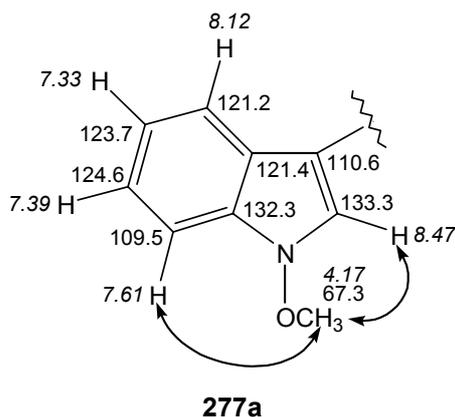
Chromatographie an RP-18 mit Wasser/Acetonitril unter Zusatz von TFA, wobei die unpolarere, später eluierende Fraktion das Hauptprodukt der Methylierung darstellt. Die NMR-spektroskopische Untersuchung der beiden Fraktionen zeigt, dass die etwas stärker polare ein Gemisch aus zwei Methylierungsprodukten **278** und **279** enthält, während die zweite, weniger polare, aus nur einer Verbindung **277** besteht.

Außerdem wird noch eine dritte Verbindung, die im HPL-Chromatogramm als Schulter der ersten Fraktion detektierbar ist, in sehr geringer Menge erhalten.

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Hauptproduktes **277** in  $[\text{D}_6]$ DMSO erkennt man sofort bei  $\delta_{\text{H}}$  3.89 und 4.17 zwei Singulets, die jeweils drei Protonen entsprechen. Außerdem zeigt das Spektrum das bekannte aromatische ABCD-Spinsystem und das einzelne aromatische Proton, das aber im Vergleich zu Birnbaumin A (**281**) ( $\delta_{\text{H}}$  7.99) mit  $\delta_{\text{H}}$  8.47 deutlich tieffeldverschoben ist. Weiterhin erscheinen im Aliphatenbereich vier  $\text{CH}_2$ -Gruppen und bei  $\delta_{\text{H}}$  7.56 und  $\delta_{\text{H}}$  8.46 die verbreiterten Triplets der NH-Protonen. Auffällig jedoch ist das Fehlen des im Protonenspektrum von Birnbaumin A (**281**) bei  $\delta_{\text{H}}$  11.95 erscheinenden scharfen Singulets und des Signals bei  $\delta_{\text{H}}$  12.32, das in Birnbaumin A (**281**) der OH-Gruppe am Indolstickstoff zugeordnet werden kann.

Das  $^{13}\text{C}$ -Spektrum in  $[\text{D}_6]$ DMSO zeigt 18 Signale, davon zwei für  $\text{CH}_3$ -, vier für  $\text{CH}_2$ - und fünf für CH-Gruppen. Die Signale für die Methyl-Protonen erscheinen bei  $\delta_{\text{C}}$  63.1 und 67.3, was auf eine Verknüpfung mit Sauerstoffatomen hindeutet. Damit unterscheidet sich **277** von Birnbaumin A (**281**) nur durch die zwei zusätzlichen  $\text{CH}_3$ -Gruppen, die im Molekül als Methoxy-Funktionen vorliegen.

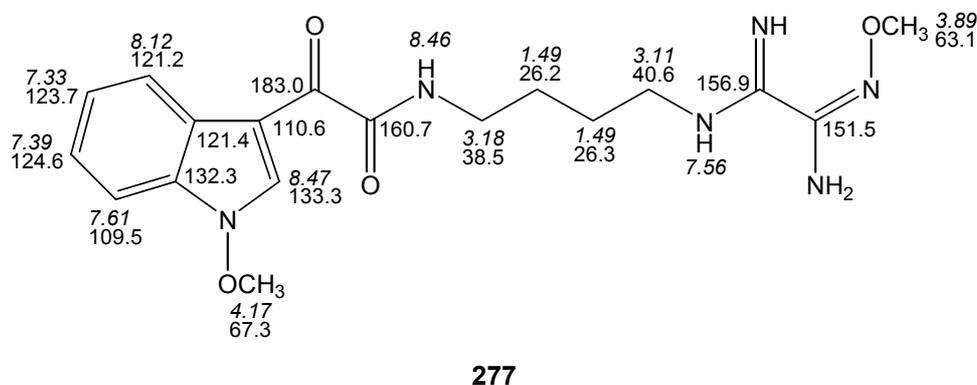
Besonders wichtig für die Strukturaufklärung des Methylierungsproduktes **277** und damit auch des nativen Gelbfarbstoffs **281** erweist sich die Durchführung eines NOESY-Experimentes. So erkennt man deutlich einen Kern-Overhauser-Effekt zwischen den Protonen der Methoxy-Funktion bei  $\delta_{\text{H}}$  4.17 und dem Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  8.47. Eine weitere NOE-Korrelation lässt sich zwischen der gleichen Methoxy-Gruppe und dem Wasserstoffatom bei  $\delta_{\text{H}}$  7.61 in 7-Position des Indolringes beobachten.



**Abb. 157.** Indolische Teilstruktur mit ausgewählten NOE-Korrelationen und NMR-Verschiebungen (600/151 MHz,  $[D_6]$ DMSO)

Damit ist der Beweis für die Substitution des Indolstickstoffs durch eine Hydroxy-Funktion erbracht. Interessant ist dabei auch die zu beobachtende Tieffeldverschiebung des Protons in 2-Position, hervorgerufen durch die Einführung der Methyl-Gruppe an der Hydroxy-Funktion.

Nun muss noch geklärt werden, an welcher Position im Molekül sich die zweite Methoxy-Funktion mit  $\delta_H$  3.89 befindet. Aufschluss darüber liefert eine HMBC-Korrelation zwischen den Protonen dieser  $CH_3$ -Gruppe und dem quartären Kohlenstoffatom bei  $\delta_C$  151.5. Ebenfalls zu diesem C-Atom koppelt in Birnbaumin A (**281**) das scharfe Singulett bei  $\delta_H$  11.95. Da dieses Signal im Protonenspektrum von **277** nicht mehr erscheint, befindet sich an dieser Position nun die Methoxy-Funktion. Berücksichtigt man noch die Fixierung des Protons bei  $\delta_H$  11.95 in Birnbaumin A (**281**) über eine Wasserstoffbrücke, so kann folgender Strukturvorschlag für das Methylierungsprodukt **277** formuliert werden.



**Abb. 158.** Struktur von **277** mit chemischen Verschiebungen (600/151 MHz,  $[D_6]$ DMSO)

Die zu beobachtenden CH-Korrelationen im Derivat **277** stehen im Einklang mit den in Kapitel 4.5.9.3 dargestellten Erkenntnissen aus der  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie. Aufgrund der Vergleiche mit verschiedenen Modellverbindungen, den gesamten NMR-Daten und der Methylierung ist das Vorkommen einer Amidoxim-Struktur (**X**) als Terminus in Birnbaumin A (**281**) bewiesen.

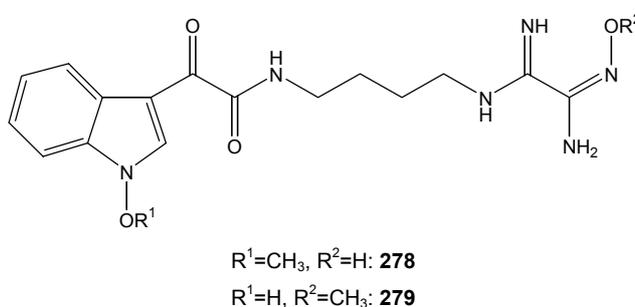
Alle aus den ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten erhaltenen Daten von **277** sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

**Tab. 7.** NMR-Daten von Dimethylbirnbaumin A (**277**) (600/151 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )

$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	Art	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	M	$J_{\text{HH}}$ [Hz]	COSY $\delta_{\text{H}}$ [ppm]	NOESY $\delta_{\text{H}}$ [ppm]	HMBC $\delta_{\text{H}}$ [ppm]
26.2	CH <sub>2</sub>	1.49	m		3.11, 3.18	3.11, 3.18, 7.56, 8.46	1.49, 3.11
26.3	CH <sub>2</sub>	1.49	m		3.11, 3.18	3.11, 3.18, 7.56, 8.46	1.49, 3.18
38.5	CH <sub>2</sub>	3.18	q	6.1	1.49, 8.46	1.49, 8.46	1.49, 8.46
40.6	CH <sub>2</sub>	3.11	q	6.1	1.49, 7.56	1.49, 7.56	1.49, 7.56
63.1	CH <sub>3</sub>	3.89	s				
67.3	CH <sub>3</sub>	4.17	s			7.61, 8.47	
109.5	CH	7.61	d	8.1	7.39	4.17, 7.39	7.33, 7.39
110.6	C <sub>q</sub>						8.12, 8.47
121.2	CH	8.12	d	7.8	7.33	7.33	7.33, 7.39, 7.61
121.4	C <sub>q</sub>						8.12, 8.47
123.7	CH	7.33	dd	7.8/7.8	7.39, 8.12		7.39, 7.61
124.6	CH	7.39	dd	7.8/8.1	7.33, 7.61		7.33, 8.12
132.3	C <sub>q</sub>						7.33, 7.39, 7.61, 8.12, 8.47
133.3	CH	8.47	s			4.17	
151.5	C <sub>q</sub>						3.89
156.9	C <sub>q</sub>						3.11, 7.56
160.7	C <sub>q</sub>						3.18, 8.46
183.0	C <sub>q</sub>						8.47
	NH	7.56	breit		3.11	1.49, 3.11	
	NH	8.46	t, breit		3.18	1.49, 3.18	

Bei der massenspektrometrischen Untersuchung von **277** erkennt man im ESI-Spektrum sowohl den  $[2M+H]^+$ -Peak bei  $m/z = 777$  als auch den  $[M+H]^+$ -Peak bei  $m/z = 389$ , der hochaufgelöst einer Zusammensetzung von  $C_{18}H_{24}N_6O_4$  entspricht und nochmals den Strukturvorschlag bestätigt.

Das ESI-Massenspektrum der Mischfraktion aus **278** und **279** zeigt einen  $[2M+H]^+$ -Peak bei  $m/z = 749$  und einen  $[M+H]^+$ -Peak bei  $m/z = 375$ , der hochaufgelöst eine Summenformel von  $C_{17}H_{22}N_6O_4$  ergibt. Da in den NMR-Spektren aber eindeutig zwei Verbindungen zu erkennen sind, handelt es sich also um Strukturisomere. Anhand der ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren gelingt die Zuordnung der einzelnen Atome zu jeweils einer der beiden Verbindungen, so dass für **278** und **279** folgende Strukturen formuliert werden können.



**Abb. 159.** Methylierungsprodukte **278** und **279**

**278** und **279** sind jeweils nur einfach methyliert und lassen sich aufgrund der sehr ähnlichen Polarität mittels präparativer HPLC nicht weiter auftrennen.

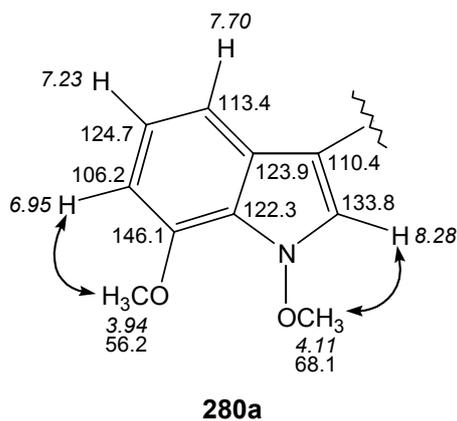
Von der dritten Verbindung, von der weniger als 1 mg zur Verfügung steht, wird ebenfalls ein Massenspektrum im ESI-Modus erhalten. Dabei findet man bei  $m/z = 359$  den  $[M+H]^+$ -Peak, der hochaufgelöst einer Zusammensetzung von  $C_{17}H_{22}N_6O_3$  entspricht. Offensichtlich handelt es sich bei der Verbindung um das Methylierungsprodukt des 1-Desoxybirnbaumin A, das als Nebenpigment bereits bei der Massenspektrometrie der Birnbaumine A (**281**) und B (**282**) gefunden wurde.

#### 4.5.10.2 Methylierung von Birnbaumin B (282)

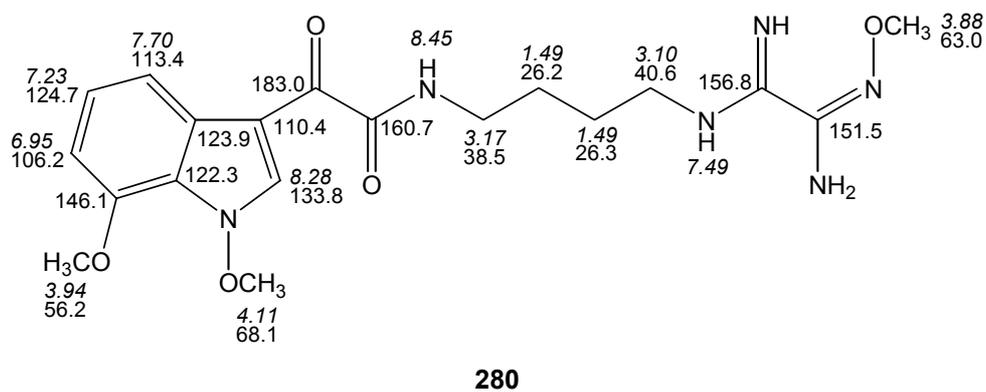
Aufgrund der gelungenen Derivatisierung von Birnbaumin A (**281**) soll nun auch der zweite Gelbfarbstoff **282** aus *L. birnbaumii* mit Diazomethan umgesetzt werden. Da Birnbaumin B (**282**) zusätzlich eine phenolische OH-Gruppe enthält, fügt man eine Spatelspitze Kieselgel zur methanolischen Lösung von **282** hinzu. Dann wird bei 0 °C solange etherische Diazomethan-Lösung zugegeben, bis man keine Gasentwicklung mehr beobachtet. Die Reaktionskontrolle mit Hilfe der analytischen HPLC zeigt die Entstehung einer unpolareren Verbindung **280** mit größerer Retentionszeit und einem im Vergleich zu Birnbaumin B (**282**) um ca. 10 nm hypsochrom verschobenen Absorptionsmaximum im UV/Vis-Spektrum. Mittels präparativer HPL-Chromatographie an RP-18 mit Wasser/Acetonitril und TFA-Zusatz gelingt die Isolierung von **280**.

Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **280** in [D<sub>6</sub>]DMSO erkennt man sofort bei  $\delta_{\text{H}}$  3.88, 3.94 und 4.11 drei Singulets, die Methoxy-Funktionen zugeordnet werden können. Wie im Protonenspektrum von Dimethylbirnbaumin A (**277**) fehlen hier ebenfalls die tieffeldverschobenen Signale, die in Birnbaumin B (**282**) bei  $\delta_{\text{H}}$  11.89 und 12.06 erscheinen. Auch das Singulett der phenolischen OH-Gruppe tritt nicht auf. Bei **280** handelt es sich offensichtlich um ein dreifach methyliertes Birnbaumin B-Derivat.

Diese Vermutung wird durch die drei Signale für CH<sub>3</sub>-Gruppen im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum bei  $\delta_{\text{C}}$  56.2, 63.0 und 68.1 bestätigt. Auch beobachtet man im HMBC-Spektrum eine Korrelation zwischen den Methyl-Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  3.94 und dem quartären C-Atom bei  $\delta_{\text{C}}$  146.1 in 7-Position des Indolrings. Einen Beweis für die Hydroxy-Funktion am Indolstickstoff wird hier ebenfalls durch die Durchführung und Auswertung eines NOESY-Experimentes erhalten. So erkennt man eine NOE-Korrelation zwischen den Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  4.11 und dem aromatischen Wasserstoffatom bei  $\delta_{\text{H}}$  8.28, das in 2-Position des Indolrings sitzt. Interessant ist dabei wieder die Tieffeldverschiebung dieses Protons gegenüber Birnbaumin B (**282**) ( $\delta_{\text{H}}$  7.73). Auch die Methyl-Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  3.94 zeigen einen Kern-Overhauser-Effekt zu dem Dublett bei  $\delta_{\text{H}}$  6.95, das dem Proton in 6-Position zugeordnet werden kann. Damit lässt sich für das Methylierungsprodukt **280** folgende Struktur vorschlagen.



**Abb. 160.** Indolische Teilstruktur von **280** mit ausgewählten NOE-Korrelationen und NMR-Verschiebungen (600/151 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO)



**Abb. 161.** Trimethylbirnbaumin B (**280**) mit chemischen Verschiebungen (600/151 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO)

Sämtliche NMR-Daten des Methylierungsproduktes **280** sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tab. 8.** NMR-Daten von Trimethylbirnbaumin B (**280**) (600/151 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO)

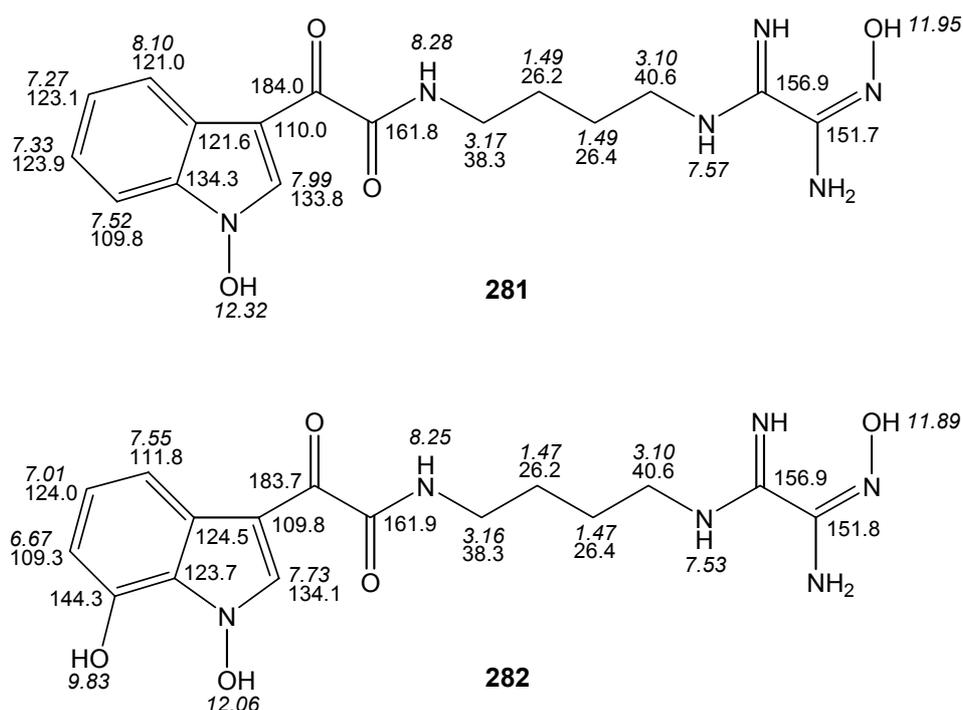
$\delta_C$ [ppm]	Art	$\delta_H$ [ppm]	M	$J_{HH}$ [Hz]	COSY $\delta_H$ [ppm]	NOESY $\delta_H$ [ppm]	HMBC $\delta_H$ [ppm]
26.2	CH <sub>2</sub>	1.49	br		3.10, 3.17	3.10, 3.17	1.49, 3.10, 3.17
26.3	CH <sub>2</sub>	1.49	br		3.10, 3.17	3.10, 3.17	1.49, 3.10, 3.17
38.5	CH <sub>2</sub>	3.17	q	6.1	1.49, 8.45	1.49, 8.45	1.49
40.6	CH <sub>2</sub>	3.10	q	5.7	1.49, 7.49	1.49, 7.49	1.49
56.2	CH <sub>3</sub>	3.94	s			6.95	
63.0	CH <sub>3</sub>	3.88	s				
68.1	CH <sub>3</sub>	4.11	s			8.28	
106.2	CH	6.95	d	8.1	7.23	3.94, 7.23	7.23, 7.70
110.4	C <sub>q</sub>						7.23 <sup>s</sup> , 7.70, 8.28
113.4	CH	7.70	d	8.0	7.23	7.23	6.95, 7.23 <sup>s</sup> , 8.28 <sup>s</sup>
122.3	C <sub>q</sub>						6.95, 7.23 <sup>s</sup> , 7.70, 8.28
123.9	C <sub>q</sub>						7.23, 7.70, 8.28
124.7	CH	7.23	dd	8.0/8.1	6.95, 7.70	6.95, 7.70	
133.8	CH	8.28	s			4.11	
146.1	C <sub>q</sub>						3.94, 6.95, 7.23, 7.70 <sup>s</sup> , 8.28 <sup>s</sup>
151.5	C <sub>q</sub>						
156.8	C <sub>q</sub>						3.10
160.7	C <sub>q</sub>						3.17, 8.45
183.0	C <sub>q</sub>						8.28
	NH	7.49	t	5.7	3.10		
	NH	8.45	t	6.1	3.17		

„s“ = schwach

Das ESI-Massenspektrum zeigt sowohl den [2M+H]<sup>+</sup>-Peak bei  $m/z = 837$  als auch den [M+H]<sup>+</sup>-Peak bei  $m/z = 419$ , dessen Zusammensetzung mittels Hochauflösung bestimmt wird. Die ermittelte Summenformel von C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> bestätigt den formulierten Strukturvorschlag für Trimethylbirnbaumin B (**280**).

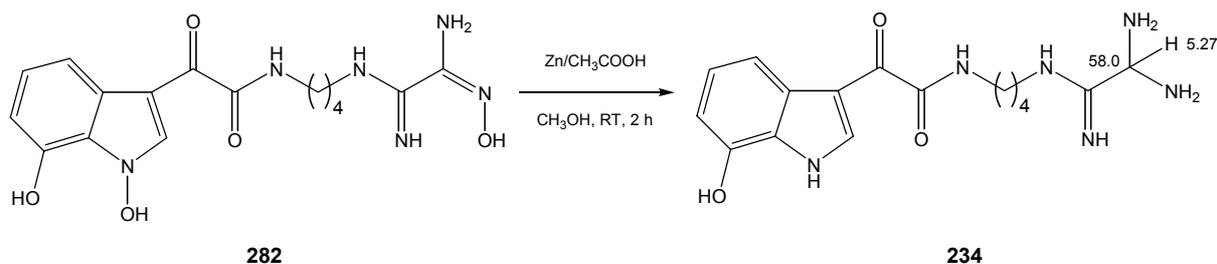
#### 4.5.11 Struktur der Birnbaumine A (281) und B (282)

Aufgrund der Synthesen von Modellverbindungen und der erfolgreichen Derivatisierung mit Diazomethan kann nun für die aus *L. birnbaumii* isolierten Pigmente **281** und **282** jeweils eine Struktur formuliert werden, die im Einklang mit allen bisherigen Erkenntnissen aus NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie steht.



**Abb. 162.** Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) mit chemischen Verschiebungen (600/151 MHz,  $[D_6]$ DMSO)

Mit den in Abbildung 162 dargestellten Strukturen für **281** und **282** lassen sich sowohl die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke als auch das Auftreten der CH-Gruppe bei  $\delta_H/\delta_C$  5.27/58.0 bei der Reduktion von Birnbaumin B (**282**) erklären (Kapitel 4.5.7). Anscheinend wird die Amidoxim-Gruppe in **282** nicht zur Amidin-Funktion reduziert, sondern zum Aminoal **234**. Die Entstehung von **234** wird auch durch die durch hochauflösende Massenspektrometrie ermittelte Summenformel von  $C_{16}H_{22}N_6O_3$  untermauert. Überraschend ist dabei, dass sich **234** in Form des Aminoals isolieren lässt, für das man eigentlich nur eine geringe Stabilität erwarten würde. Vielleicht tritt eine Stabilisierung des Reduktionsproduktes **234** durch Komplexierung mit Zink oder Salzbildung mit Eisessig ein.



**Abb. 163.** Reduktion von Birnbaumin B (**282**)

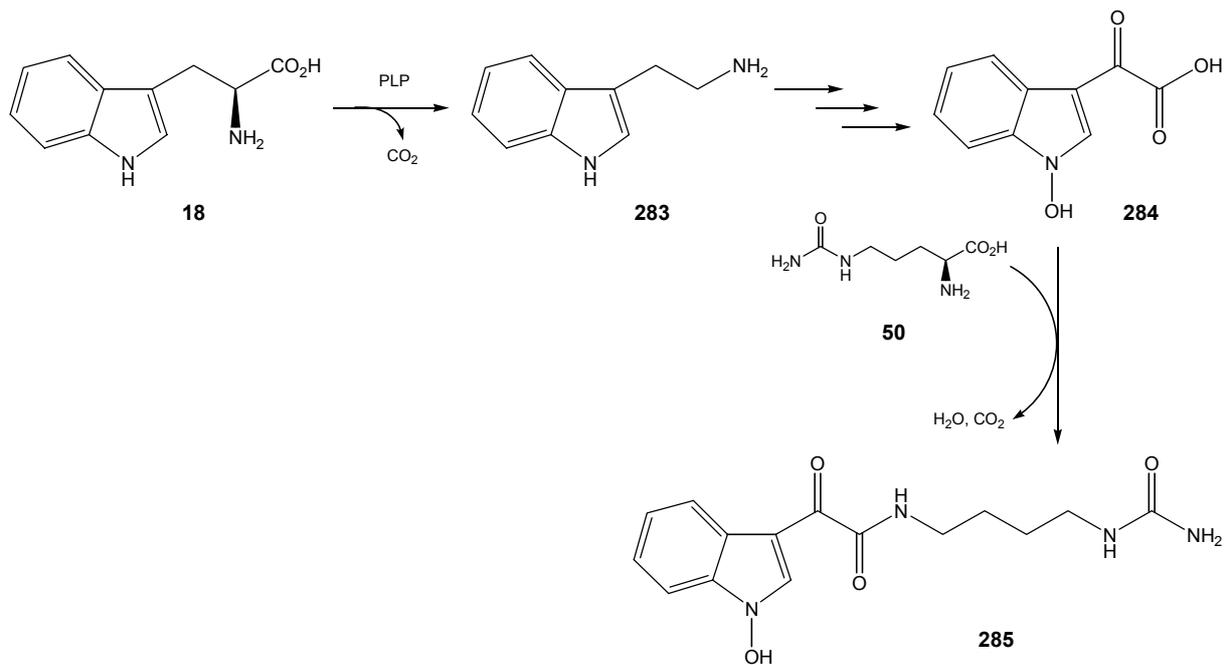
Die beiden Gelbfarbstoffe Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) enthalten somit nicht nur eine ungewöhnliche *N*-Hydroxyindol-Einheit, sondern auch eine Amidoxim-Funktion, die beide zum großen Teil für die Empfindlichkeit der Naturstoffe **281** und **282** aus *L. birnbaumii* verantwortlich sind.

Die Pigmente **281** und **282** mit ihrer ungewöhnliche Struktur verursachen vermutlich auch den sehr hohen Gehalt an Kalium- und Natrium-Ionen in *Leucocoprinus birnbaumii*, der durch Atomabsorptionsspektroskopie der getrockneten Fruchtkörper festgestellt werden kann (Kapitel 8.2, Tab. 13). Es ist vorstellbar, dass sowohl die Amidoxim-Einheit als auch die benachbarten Hydroxy-Gruppen am Aromaten mit Alkalimetall-Ionen Chelatkomplexe ausbilden und somit vor allem der Hauptinhaltsstoff Birnbaumin B (**282**) als Mineralstoffspeicher in *L. birnbaumii* dient.

## 4.6 Überlegungen zur Biosynthese

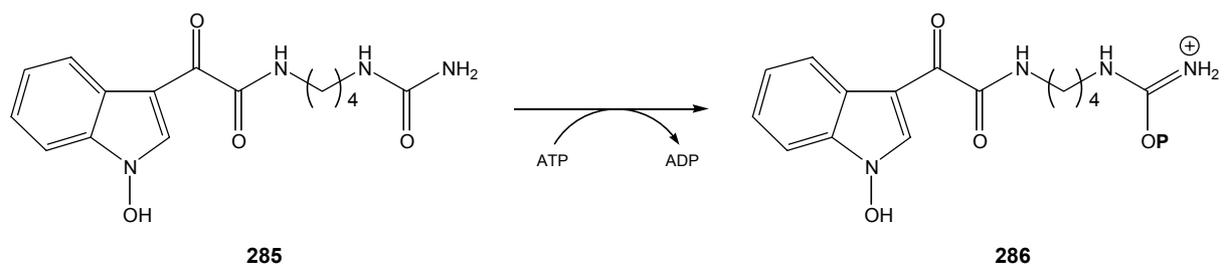
Bei der Betrachtung der Strukturen von Birnbaumin A (**281**) und B (**282**) liegt die Vermutung nahe, dass **281** und **282** aus L-Tryptophan (**18**) als Biosynthesevorläufer aufgebaut werden. Die Isolierung von **18**, das über den Shikimatweg entsteht (Kapitel 1.1.1), aus dem methanolischen Rohextrakt von *L. birnbaumii* liefert einen weiteren Hinweis für diese Vermutung.

Es ist vorstellbar, dass L-Tryptophan (**18**) wie bei der Biosynthese von Serotonin zuerst mit Hilfe einer Pyridoxalphosphat-abhängigen Decarboxylase zum Tryptamin (**283**) umgewandelt wird. Weitere Reaktionen führen zur (1-Hydroxy-indol-3-yl)glyoxylsäure (**284**), wobei die Reihenfolge der einzelnen Reaktionsschritte und der Zeitpunkt der *N*-Hydroxylierung nicht festgelegt werden kann. **284** reagiert dann mit dem zweiten Biosynthesebaustein Citrullin (**50**) unter Wasserabspaltung und nachfolgender Decarboxylierung zu **285**.



**Abb. 164.** Mögliche Bildung von **285**

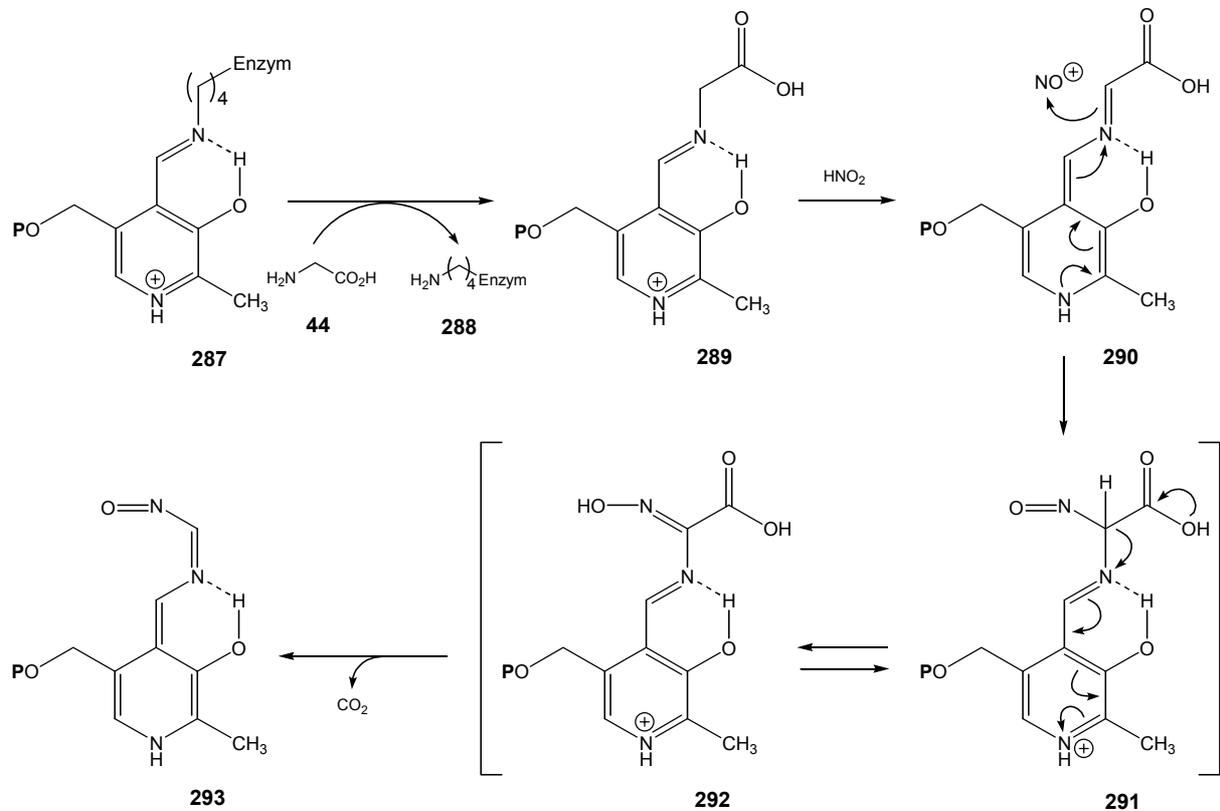
Durch Übertragung eines Phosphatrestes auf **285** durch ATP erfolgt Aktivierung und man erhält das Zwischenprodukt **286**, an dessen aktiviertem Kohlenstoff-Atom die ungewöhnliche Endgruppe der Birnbaumine eingeführt werden kann.



**Abb. 165.** Phosphorylierung durch ATP

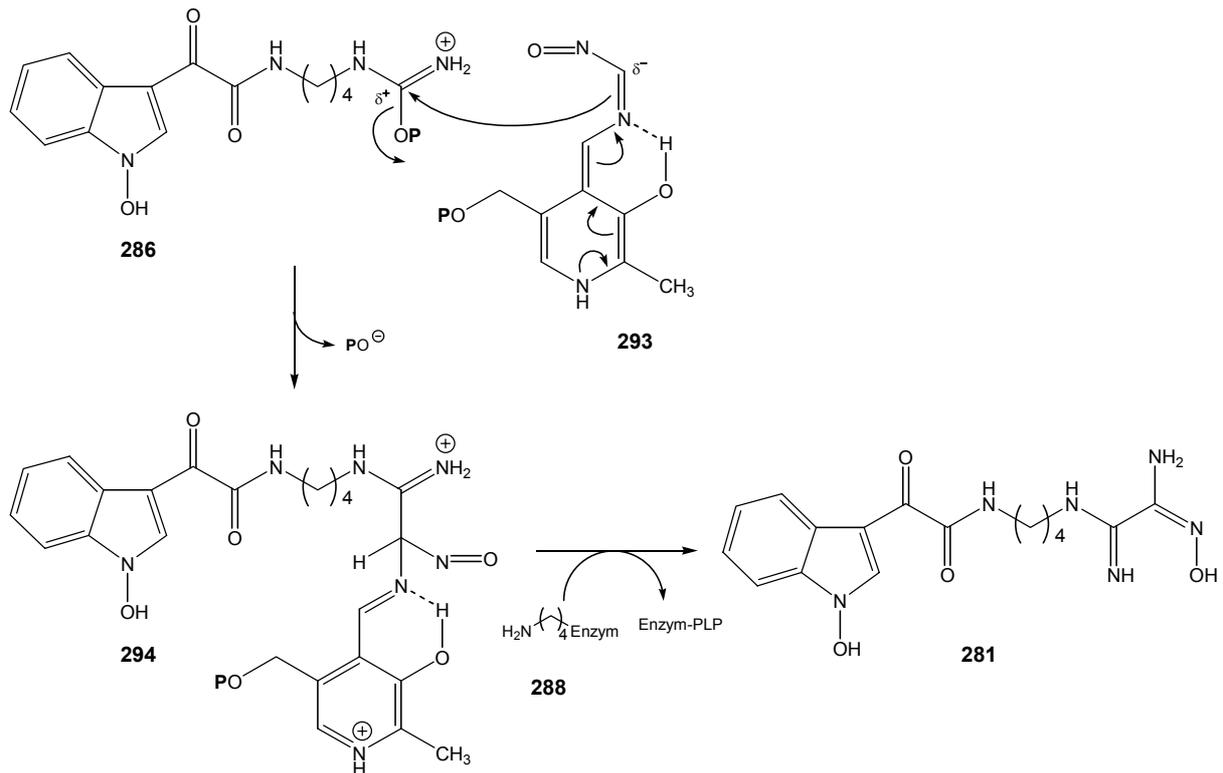
Man kann annehmen, dass bei der Darstellung und Einführung der Endgruppe Pyridoxalphosphat (PLP) eine wichtige Rolle spielt. Der weitere Biosynthesevorschlag sieht einen nucleophilen Angriff der Aminogruppe von Glycin (**44**) an das Kohlenstoffatom der Schiff'schen Base (**287**) aus PLP und Enzym vor.<sup>[34,187]</sup> Dabei wird die Lys-Aminogruppe des Enzyms freigesetzt und gleichzeitig eine Schiff'sche Base (**289**) aus Glycin (**44**) und PLP

gebildet. Diese reagiert mit dem Nitrosyl-Kation zur Nitrosoverbindung **291**, aus der  $\text{CO}_2$  eliminiert wird.



**Abb. 166.** Vorschlag zur Bildung des Zwischenproduktes **293**

In einer Additions-Eliminierungs-Reaktion greift das Zwischenprodukt **293** am aktivierten Kohlenstoffatom in **286** an, wobei gleichzeitig Phosphat abgespalten wird. In umgekehrter Weise zum ersten Reaktionsschritt erfolgt nun ein Angriff der Lys-Aminogruppe des Enzyms, wodurch die Schiff'sche Base aus PLP und Enzym regeneriert wird und Birnbaumin A (**281**) entsteht.



**Abb. 167.** Mögliche Entstehung von Birnbaumin A (**281**)

Durch Hydroxylierung in 7-Position kann dann aus **281** Birnbaumin B (**282**) gebildet werden, doch lässt sich nicht sicher festlegen, zu welchem Zeitpunkt die Hydroxylierung tatsächlich stattfindet.

Die vorgeschlagene Biosynthese ließe sich durch verschiedene Verimpfungsexperimente beweisen. So wäre es sinnvoll,  $^{15}\text{N}$ -markiertes Glycin (**44**) und Citrullin (**50**) zu verfüttern. Auch eine Gabe von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Tryptophan (**18**) sollte zu weiteren Aussagen führen, jedoch müsste die Markierung an anderer Position als an der Carboxyl-Gruppe stattfinden. Da L-Tryptophan (**18**) im Shikimatweg aus Anthranilat (**12**) entsteht, könnte auch  $^{13}\text{C}$ - bzw.  $^{15}\text{N}$ -markierte Anthranilsäure verfüttert werden.

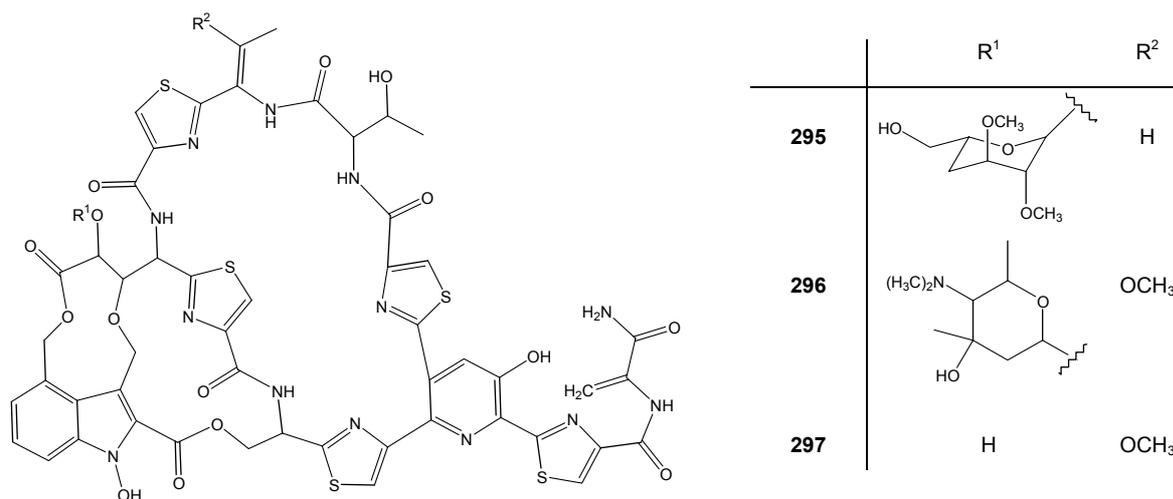
In Anbetracht der zerbrechlichen Fruchtkörper von *Leucocoprinus birnbaumii* und ihrer geringen Lebensdauer, sind Biosyntheseuntersuchungen an Kulturen sicher vorzuziehen. Beobachtungen zeigen, dass *L. birnbaumii* ein ausgedehntes Mycel ausbildet, das wie die Fruchtkörper eine kräftige gelbe Färbung besitzt.

## 4.7 Naturstoffe mit 1-Hydroxyindol-Struktur

Die 1-Hydroxyindol-Struktureinheit fand man bis heute nur in einigen wenigen komplexen Naturstoffen mit elektronenziehenden Substituenten in 2-Position des Indolrings. **295** wird in Kulturen des Actinomyceten *Micromonospora globosa* produziert und ist antibiotisch hoch wirksam gegen gram-positive Bakterien wie Staphylo- und Streptokokken. So hemmt **295** *in vivo* u. a. das Wachstum von *Staphylococcus aureus*, eines durch seine Antibiotika-Resistenz gefährlichen Bakterienstammes.<sup>[188]</sup>

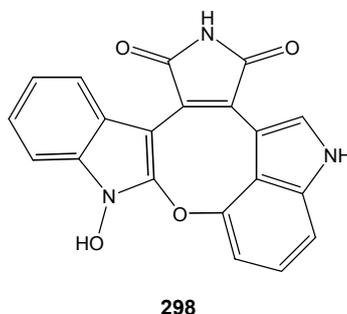
Die Nocathiacine I (**296**) und III (**297**) erhält man durch Fermentation des Bakterienstammes *Nocardia* sp. (ATCC-202099), der ebenfalls zur Ordnung *Actinomycetales* gehört. **296** und **297** zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sehr hohe Aktivität gegen gram-positive Bakterien. Da Nocathiacin I (**296**) und III (**297**) bereits in nanomolaren Konzentrationen auf resistente Enterokokken (*Enterococcus faecium*) wirken, erhofft man sich, mit **296** und **297** neue Antibiotika zur Bekämpfung des weltweiten Gesundheitsrisikos der mehrfachresistenten Erreger zu erhalten.<sup>[189,190]</sup>

Nocathiacin I (**296**) wird außerdem noch von dem aus einer japanischen Bodenprobe gewonnenen Actinomyceten *Amycolatopsis* sp. MJ347-81F4 gebildet. *In vitro* zeigt **296** stärkere Wirkung gegen Methicillin-resistente Staphylokokken (*Staphylococcus aureus*) als das bisher am besten wirksame Vancomycin. Zusätzlich beobachtet man fungizide Aktivität gegen *Candida krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. glabrata* und *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>[191]</sup>



**Abb. 168.** Antibiotikum S 54832A (**295**), Nocathiacin I (**296**) und III (**297**)

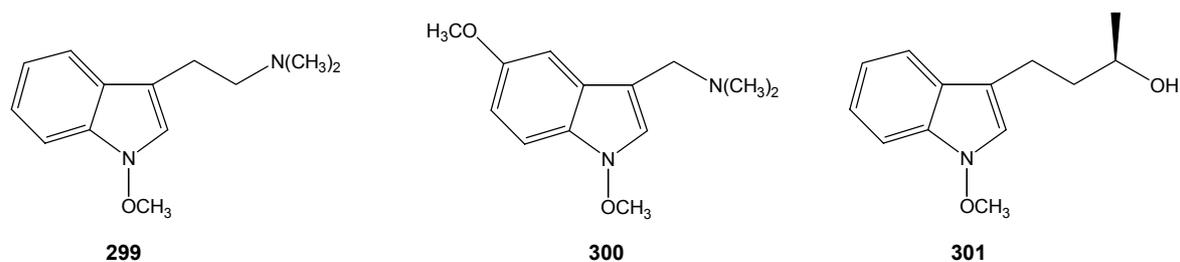
Das erste natürliche *N*-Hydroxyindol-Derivat konnte von Steglich et al.<sup>[192]</sup> aus dem Schleimpilz *Arcyria denudata* isoliert werden. Dabei handelt es sich um das rote Nebenzpigment Arcyroxepin A (**298**), dessen 1-Hydroxy-Gruppe beim Stehen in Aceton bzw. beim Erhitzen in Toluol verloren geht.



**Abb. 169.** Arcyroxepin A (**298**)

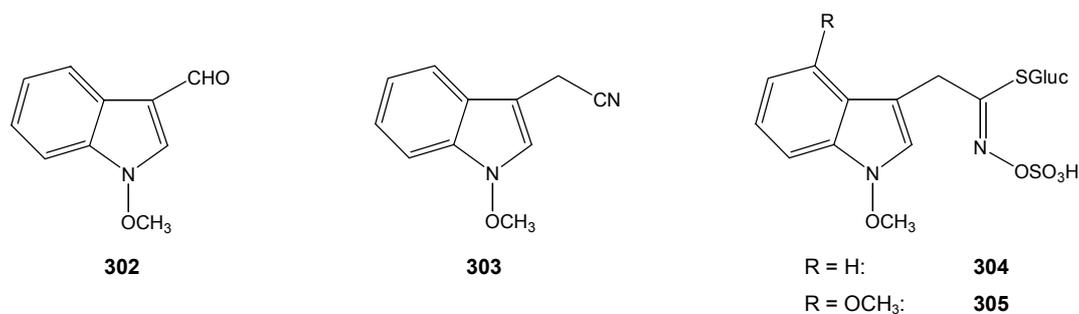
Einfache Verbindungen wie 1-Hydroxytryptophan, -tryptamin oder -indol-3-yllessigsäure, die biosynthetische Vorläufer für die komplexen Naturstoffe **295-298** darstellen können, wurden noch nicht aus natürlichen Quellen isoliert. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Verbindungen in lebenden Organismen auftreten, jedoch sind sie durch die elektronenschiebende Seitenkette in 3-Position zu instabil und reagieren anscheinend unter den Isolierungsbedingungen zu verschiedenen Artefakten. Stabilisierung der 1-Hydroxyindol-Funktion tritt bei Alkylierung und besonders bei Methylierung ein, was Ursache dafür ist, dass viele Naturstoffe mit *N*-Methoxyindol-Struktureinheit isoliert wurden.<sup>[159]</sup>

Bereits 1965 gelang Morimoto und Oshio<sup>[193]</sup> die Aufklärung von Lespedamin (**299**), einem Tryptamin-Alkaloid aus dem japanischen Wildstrauch *Lespedeza bicolor* var. *japonica*. Wenig später fand man 1,5-Dimethoxygramin (**300**) als Hauptalkaloid in *Gymnacranthera paniculata*, einem Baum des Regenwaldes in Neuguinea.<sup>[194]</sup> Ebenfalls in Neuguinea kommt der Strauch *Murraya paniculata* vor, dessen Blätter und Rinde in der Volksmedizin gegen Magen- und Zahnschmerzen, Gicht und gegen Prellungen verwendet werden. Aus der Wurzelrinde dieser Pflanze isolierte die Arbeitsgruppe um Kinoshita<sup>[195,196]</sup> Paniculidin B (**301**), ein optisch aktives Indol-Derivat.



**Abb. 170.** Lespedamin (**299**), 1,5-Dimethoxygramin (**300**) und Paniculidin B (**301**)

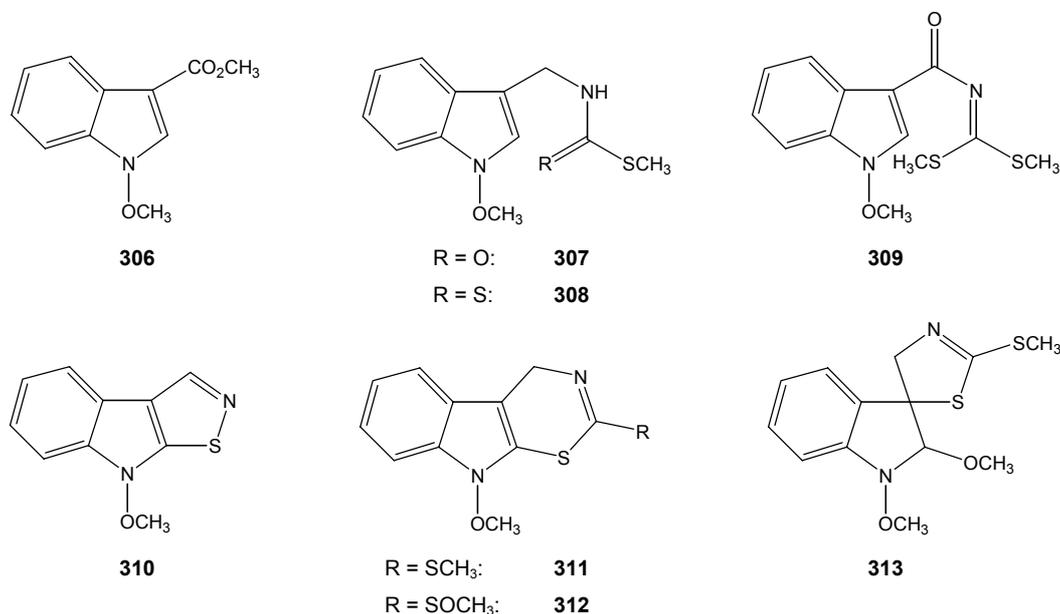
1-Methoxyindol-Verbindungen kommen auch in einigen ökonomisch bedeutsamen Nutzpflanzen vor, z. B. in Raps, Kohlrarten, Senf und Rettich, die zu den Kreuzblütlern (Crucifereae) gehören. Dabei handelt es sich u. a. um (1-Methoxyindol-3-yl)carbaldehyd (**302**),<sup>[197,198]</sup> (1-Methoxyindol-3-yl)acetonitril (**303**)<sup>[198,199]</sup> und die Glucosinolate **304** und **305**.<sup>[200-202]</sup> Erste Untersuchungen lassen für den im Blumenkohl (*Brassica oleracea*) zu findenden Carbaldehyd **302** inhibierende Aktivität gegenüber chemisch induzierter Karzinombildung vermuten.<sup>[197]</sup> Auch das Vorkommen von Neoglucobrassicin (**304**) wird mit dieser Inhibierung verbunden,<sup>[201]</sup> jedoch sind die Glucosinolate auch biogenetische Vorläufer der toxischen Senföle, weshalb man ihren Gehalt in Gemüsesorten durch gezielte Züchtung zu verringern versucht.



**Abb. 171.** (1-Methoxyindol-3-yl)carbaldehyd (**302**), (1-Methoxyindol-3-yl)acetonitril (**303**), Neoglucobrassicin (**304**) und 1,4-Dimethoxyglucobrassicin (**305**)

Eine weitere Gruppe von in Kreuzblütlern vorkommenden Naturstoffen mit 1-Methoxyindol-Struktureinheit gehört zu den Phytoalexinen. Darunter versteht man Substanzen, die von Pflanzen aufgrund einer Infektion zur Abwehr von Schadorganismen, z. B. Pilzen, gebildet werden. Auslöser für die Produktion dieser Abwehrstoffe können aber auch Einwirkungen von Bakterien, Viren oder Nematoden bzw. Verletzung, Kälte oder UV-Strahlung sein. Es wird angenommen, dass die Akkumulation von Phytoalexinen bei bestimmten Pflanzen

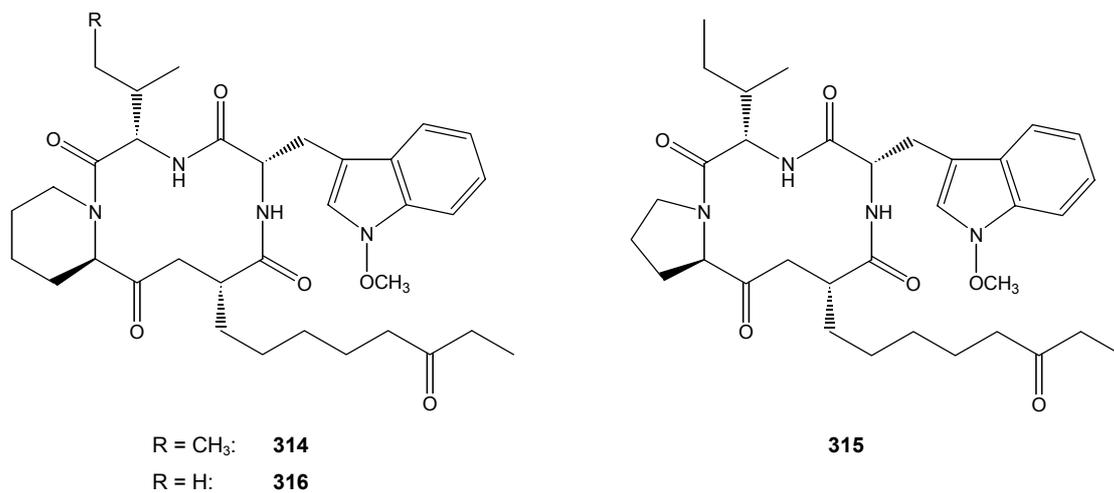
Resistenz gegenüber pathogenen Pilzen hervorruft. So scheint Sinalexin (**310**) für die Resistenz des weißen Senfes (*Sinapis alba*) gegen die Schwarzfleckenkrankheit, verursacht durch den Pilz *Alternaria brassicae*, verantwortlich zu sein.<sup>[203]</sup>



**Abb. 172.** Phytoalexine aus Kreuzblütlern<sup>[198,203-209]</sup>

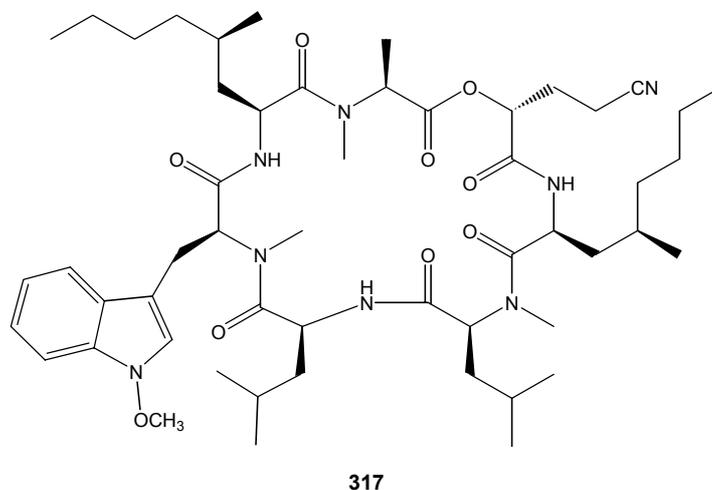
Die meisten der in Abbildung 172 dargestellten Phytoalexine zeigen eine breite fungizide Aktivität gegenüber zahlreichen Spezies. Außerdem scheinen einige das Wachstum von menschlichen Krebszellkulturen zu hemmen, weshalb ihr Einsatz in der Chemotherapie vorstellbar wäre.<sup>[210]</sup>

Wirkstoffe ganz anderer Art stellen die Apicidine **314**, **315** und **316** dar, die aus Kulturen des endophytischen, in Costa Rica beheimateten Pilzes *Fusarium pallidoroseum* (ATCC 74289) isoliert wurden. Die cyclischen Tetrapeptide mit der 1-Methoxyindol-Struktureinheit besitzen hohe Wirkung gegen verschiedene Parasiten. So gibt ihre *in vivo* Aktivität gegen *Plasmodium berghei* in Mäusen Anlass zur Hoffnung, dass die Apicidine in Zukunft als Medikamente gegen Malaria Anwendung finden.<sup>[211-213]</sup>



**Abb. 173.** Apicidin (**314**), Apicidin B (**315**) und C (**316**)

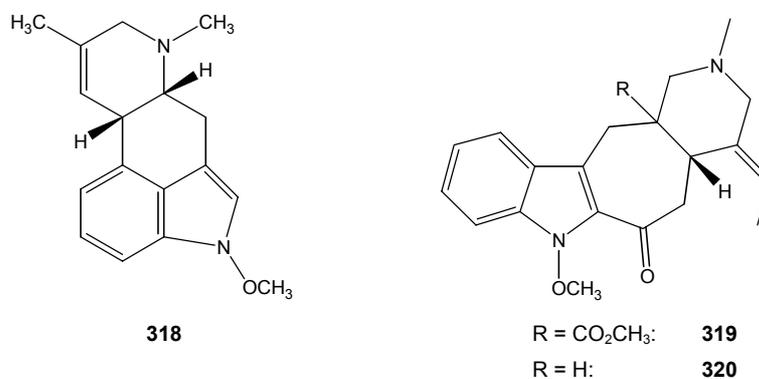
Ebenfalls von Pilzen (*Bartalinia* sp. F924471, *Pestalotiopsis* sp. RF5890) wird das cyclische Heptadepsipeptid Pestahivin (**317**) produziert. **317** wirkt entzündungshemmend und stellt somit ein potentielles Therapeutikum bei chronisch-entzündlichen Funktionsstörungen oder Autoimmunkrankheiten dar.<sup>[214]</sup>



**Abb. 174.** Pestahivin (**317**)

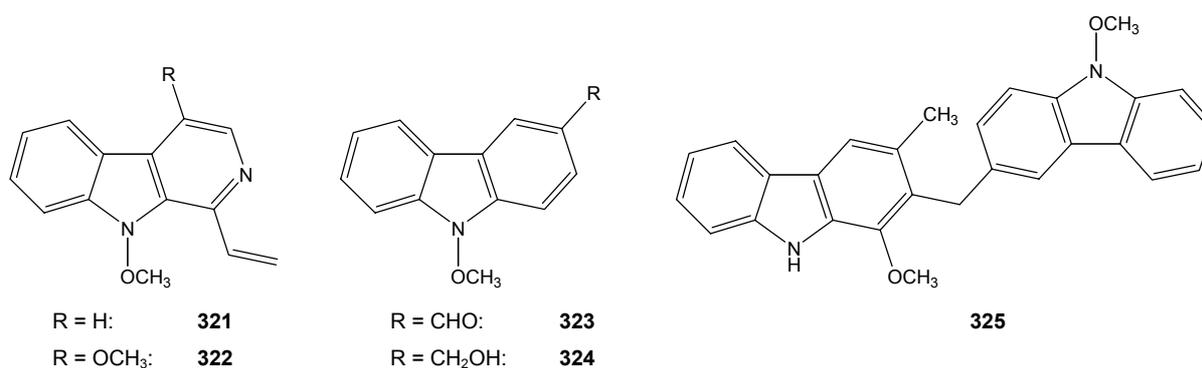
Auf der Suche nach Tyrosinkinase-Inhibitoren durch High-Throughput-Screening gelang die Entdeckung eines neuen Ergot-Alkaloids **318**. 1-Methoxyagroclavin I (**318**) wird vom Schimmelpilz *Penicillium* sp. (WC75209) gebildet und zeigt inhibierende Wirkung auf p56<sup>lck</sup>-Tyrosinkinase.<sup>[215]</sup>

Zwei ungewöhnliche Verbindungen **319** und **320** konnten in dem in der Volksmedizin verwendeten, asiatischen Baum *Ervatamia malaccensis* gefunden werden. Extrakte aus Blättern und Borke des Baumes zeigten kurzzeitige Beeinflussung des Blutdrucks bei Ratten, doch über die biologische Wirksamkeiten von **319** und **320** ist bisher nichts bekannt.<sup>[216]</sup>



**Abb. 175.** 1-Methoxyagroclavin I (**318**), 1-Methoxy-19,20-dehydroervatamin (**319**) und 1-Methoxymethuenin (**320**)

Ebenfalls aus asiatischen Pflanzen wurde eine Reihe von Carbazol- und  $\beta$ -Carbolin-Derivaten isoliert, die ebenfalls eine Methoxy-Funktion am indolischen Stickstoff aufweisen. So fand man in *Picrasma exelsa* und in *Picrasma quassioides* die Alkaloide **321** und **322**,<sup>[217,218]</sup> während sich *Murraya euchrestifolia* als reichhaltige Quelle für die Carbazole **323**, **324** und **325** erwies.<sup>[219,220]</sup>



**Abb. 176.**  $\beta$ -Carboline- und Carbazol-Alkaloide **321-325**

## 5 *Malassezia furfur*

### 5.1 Hefen der Gattung *Malassezia*

*Malassezia*-Hefen sind allgemein verbreitet und mit Ausnahme von *M. pachydermatitis* von der Versorgung mit längerkettigen Fettsäuren abhängig.<sup>[221,222]</sup> Aufgrund des multilamellären Aufbaus der Zellhülle und einer positiven Diazoniumblau-Reaktion werden sie zu den *Basidiomyceten* gezählt.<sup>[223,224]</sup>

Hefen der Gattung *Malassezia* gehören zur residenten Hautflora des Menschen und vieler Warmblüter. *In vitro* können sie aus Schuppenmaterial oder Abstrichen gezüchtet werden, wobei ein lipidhaltiges Nährmedium erforderlich ist. Auf Dixon-Agar bilden sie cremefarbene bis gelbliche Kolonien, die einen fruchtig-hefigen Geruch ausströmen.<sup>[225,226]</sup>

Die Wachstumsoptima liegen zwischen 32 und 37 °C bei einem pH-Wert von 5.5–6.5. Da die *Malassezia*-Hefen gegen Cycloheximid im Bereich von 400–1000 ppm resistent sind, verringert sich das Risiko einer Kontamination der Kultur durch Bakterien. Die Vermehrung erfolgt durch eine wiederholte Sprossung unter Ausbildung einer manchmal lichtmikroskopisch sichtbaren Collarette.<sup>[221,224,227-229]</sup>

Die Sproßzellen sind rund (2.5–5.0 µm Durchmesser), oval oder zylindrisch (1.5–3.0 × 2.8–8.0 µm). Die ca. 0.12 µm dicke Zellhülle von *M.*-Hefen zeigt einen einzigartigen Aufbau bestehend aus Außenlamelle, mehrschichtiger, multilamellös untergliederter Wand und Plasmamembran. Unter dem Lichtmikroskop ist ein zur Oberfläche vertikales Streifenmuster in den inneren Wandabschnitten erkennbar, welches einer spiraligen Struktur entspricht.<sup>[224,230-232]</sup>

Der mit 15 % ungewöhnlich hohe Lipidanteil in der Zellwand von *Malassezia*-Arten sorgt wahrscheinlich für die große Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen.<sup>[233,234]</sup>

Wie bereits erwähnt, sind die meisten *M.*-Hefen von der Versorgung mit Fettsäuren abhängig und siedeln sich deshalb besonders in den talgdrüsenreichen Körperarealen an. Bei den meisten Menschen lassen sie sich im äußeren Gehörgang nachweisen.<sup>[235]</sup>

Die Besiedlung der Hautoberfläche steigt vor allem während der Pubertät, da in dieser Zeit eine vermehrte Talgproduktion stattfindet. Mit zunehmenden Alter lässt sich ein Rückgang der Talgproduktion und damit verbunden ein Rückgang der Keimzahlen feststellen. Die aktuelle Feuchtigkeit der Haut spielt bei der Besiedlung ebenfalls eine Rolle.<sup>[236]</sup>

## 5.2 Pityriasis versicolor

Die Pityriasis versicolor (synonym: Tinea versicolor, Kleienflechte) gilt als eine der häufigsten Mykosen der Haut und wird durch lipophile Hefen der Gattung *Malassezia* hervorgerufen.<sup>[237]</sup> Sie tritt vermutlich nur beim Menschen auf und ist weltweit verbreitet, wobei die Häufigkeit der Pityriasis versicolor in tropischem Klima erhöht ist. Die Erkrankung befällt vorzugsweise den Bereich der vorderen und hinteren Schweißrinne des Oberkörpers. In tropischen Klimazonen sind auch oft Gesicht, Hals und die Beugen der großen Gelenke betroffen.<sup>[238-241]</sup>

Man unterscheidet zwischen der hyperpigmentierten Pityriasis versicolor und der hypopigmentierten Pityriasis versicolor alba.<sup>[237,242]</sup> Beide Formen können nebeneinander auftreten, wobei die hyperpigmentierte die häufigere Erscheinungsform ist. Besonders unter dem Einfluß von UV-Strahlung wandeln sich hyperpigmentierte in hypopigmentierte Regionen um, was bei Menschen mit dunkler Haut besonders auffällig ist.<sup>[235]</sup>



**Abb. 177.** Pityriasis versicolor: bräunliche Flecken im Bereich der vorderen Schweißrinne (links) und Pityriasis versicolor alba: depigmentierte Areale (rechts)

Das Krankheitsbild besteht aus milchkaffee-farbenen, schwach kleieförmig schuppenden Flecken, die zu Beginn etwa linsengroß sind, aber später zu großen unregelmäßigen Bereichen zusammenfließen. Vor allem beim Schwitzen bemerkt ca. ein Drittel der Patienten Juckreiz oder Brennen an den betroffenen Stellen.<sup>[237,238]</sup>

Neben einem feucht-warmen Klima spielen noch weitere Faktoren eine Rolle für den Ausbruch von Pityriasis versicolor. Dazu zählen u. a. das Tragen enger, nicht atmungsaktiver Kleidung,<sup>[237]</sup> Erkrankungen, die eine Störung des Schweißhaushaltes zur Folge haben,<sup>[243]</sup> Schwangerschaft, orale Einnahme von Kontrazeptiva<sup>[244]</sup> und Fehlernährung.<sup>[236]</sup>

Die Krankheit selbst ist gut behandelbar, jedoch kommt es häufig zu starken Rückfällen. Zu den allgemeinen Maßnahmen zur Bekämpfung zählen häufiges Duschen mit Syndets, Vermeidung zu enger, nicht atmungsaktiver Kleidung sowie Ausschaltung der Faktoren, die mit dem Ausbruch der Krankheit in Verbindung stehen können.

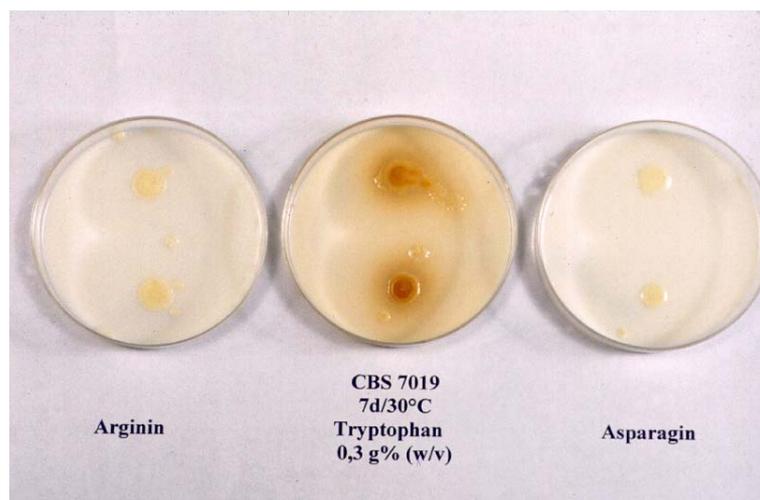
### 5.3 Stand der Forschung und Problemstellung

Obwohl Hefen der Gattung *Malassezia* zur residenten Hautflora des Menschen und vieler Warmblüter gehören, sind sie doch auch mit einer Vielzahl von pathogenetisch bislang ungeklärten Erkrankungen verbunden.<sup>[222,229]</sup> Besonders die Pityriasis versicolor ist durch eine charakteristische Farbvarianz der befallenen Bereiche gekennzeichnet, für die es noch keine Erklärung gibt.<sup>[237]</sup> Die bräunlichen Verfärbungen der betroffenen Hautpartien wurden zunächst auf eine Umverteilung des Melanins zurückgeführt,<sup>[245]</sup> doch konnte diese Hypothese bereits widerlegt werden.<sup>[246]</sup> Auch für die zu beobachtende Depigmentierung bedarf es noch einer hinreichenden Erklärung. Die bisher publizierten Mechanismen gehen hauptsächlich von zwei Ursachen aus. Die erste Theorie beinhaltet eine postinflammatorische Hypopigmentierung, wie sie auch bei Syphilis, Neurodermitis oder Lepra auftritt.<sup>[247]</sup> Aufgrund der fehlenden Entzündungen bei Pityriasis versicolor scheint diese These unwahrscheinlich.<sup>[248]</sup> Die zweite Theorie geht vom Vorliegen eines Pseudoleukoderms aus als Folge einer rein physikalischen Filterwirkung der Schuppen gegenüber ultravioletter Strahlung.<sup>[249]</sup> Dagegen sprechen die Beobachtungen einer Depigmentierung auch an unbelichteten Körperstellen,<sup>[250]</sup> vollständige Depigmentierung bei dunkelhäutigen Menschen<sup>[251]</sup> und eine stark verzögerte Repigmentierung nach Abklingen der Krankheit, was auf toxische Einflüsse auf die Melaninsynthese schließen lässt. So gelingt durch ultrastrukturelle Untersuchungen der Nachweis einer selektiv-toxischen Schädigung der Melanozyten<sup>[252]</sup> verbunden mit einem gestörten Pigmenttransport<sup>[221,253]</sup> in den Bereichen einer Pityriasis versicolor alba. Außerdem lässt sich die Dopa-Tyrosinase-Reaktion mit Biopsiematerial aus den depigmentierten Hautbereichen einer Pityriasis versicolor alba nicht durchführen.<sup>[254,255]</sup> Das kann unmittelbare Folge der melanozytotoxischen Wirkung sein oder auf Anwesenheit von Inhibitoren der Tyrosinase hinweisen. *In vitro* kann eine Hemmung der Dopa-Tyrosinase-Reaktion durch Ether-Extrakte aus Schuppenmaterial von Pityriasis versicolor beobachtet werden.<sup>[256]</sup> Die von Nazzaro-Porro<sup>[257]</sup> als Tyrosinase-Inhibitoren postulierten Dicarbonsäuren wie Azelainsäure zeigen jedoch in ihrer angenommenen *in vivo*-Konzentration auf gesunde Melanozyten weder *in vivo* noch *in vitro* eine entsprechende

Wirkung.<sup>[258,259]</sup> Auch bleiben therapeutische Versuche in der Melanomtherapie und bei Hyperpigmentierungen erfolglos.<sup>[257]</sup> Außerdem kann dieses Modell weder die Farbvarianz noch die Fluoreszenz der hyperpigmentierten Bereiche erklären.

Ebenfalls ohne hinreichende Erklärung ist die sehr geringe Immunantwort auf die sehr hohe Pilzdichte seitens des Patienten. Guého et al.<sup>[260]</sup> bieten als Begründung lediglich die besondere Membranstruktur der Hefe an.

Da die Substanzmengen, die aus menschlichen Hautschuppen isoliert werden können, bei weitem nicht ausreichen, um Aussagen über den Stoffwechsel von *M.*-Hefen zu treffen, ist die Entdeckung der Kultivierung von großer Bedeutung. So gelang es der Arbeitsgruppe um PD Dr. Peter Mayser,<sup>[261,262]</sup> bei der Kultivierung von *M. furfur* auf einem selektiven Agarmedium die Bildung bräunlich-rötlicher Pigmente, die außerdem auch im UV-Licht fluoreszieren, zu induzieren. Während die Pigmentbildung spezifisch abhängig von der Aminosäure L-Tryptophan (**18**) ist, kann die Lipidquelle variiert werden.



**Abb. 178.** Pigmentbildung in Abhängigkeit von der Aminosäure

Die Fähigkeit zur Pigmentbildung ist hauptsächlich auf die Referenz- und aus Krankheitsherden isolierten Wildstämmen von *M. furfur* beschränkt. Einige *M. pachydermatis*-Stämme bilden auch Pigmente, jedoch mit geringerer Ausbeute und nach deutlich längerer Inkubationszeit.

Ziel dieser Kooperation mit PD Dr. Peter Mayser und Dr. Hans-Joachim Krämer von der Hautklinik der Universität Giessen ist es nun, Sekundärmetabolite aus *M. furfur* zu isolieren und in ihrer Struktur aufzuklären. Anschließende Untersuchungen sollen zeigen, ob die isolierten Inhaltsstoffe zur Klärung der klinischen Phänomene beitragen können. Außerdem

besteht natürlich ein Bedarf an wirksamen, aber auch verträglichen Tyrosinase-Inhibitoren zur Behandlung von Pigmentstörungen. Weiterhin sollen neue Einblicke in den Stoffwechsel der lipophilen Hefe und möglicherweise in die Regulationsvorgänge des Hautorgans erhalten werden.

## 5.4 Bisherige Arbeiten

Wille<sup>[263,264]</sup> gelang neben dem Nachweis einiger einfacher Indol-Derivate<sup>[262]</sup> mittels GC/MS die Strukturaufklärung und Synthese von Malassezin (**326**), dass eine Wechselwirkung mit dem Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR) zeigt.

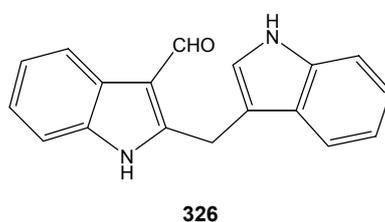


Abb. 179. Malassezin (**326**)

In der Weiterführung dieser Kooperation konnte Irlinger<sup>[265]</sup> einige sehr ungewöhnliche Metabolite aus Kulturen von *M. furfur* in ihrer Struktur aufklären und Synthesekonzepte für deren Totalsynthese entwickeln. So fand er neben den beiden Bisindolylen **327** und **328** mit den Pityriarubinen A-C (**329-331**) einen völlig neuen Strukturtyp. Im biologischen Test erwiesen sich die Spiroverbindungen **329**, **330** und **331** als potente und selektive Inhibitoren der menschlichen Protein-Kinase C-Isoformen, insbesondere der Isoform  $\beta$ II.

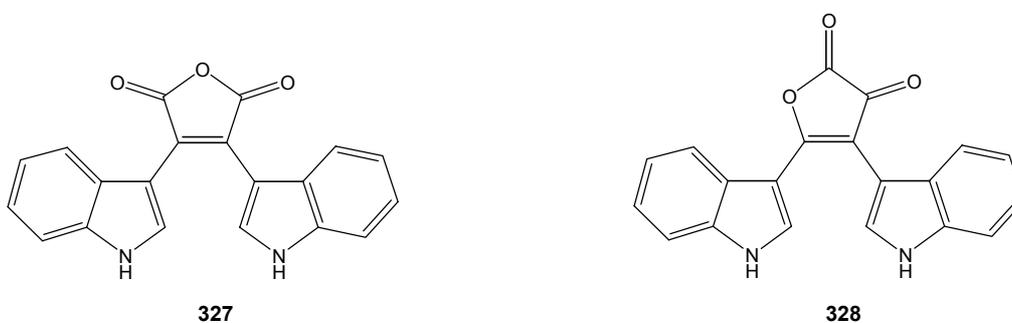
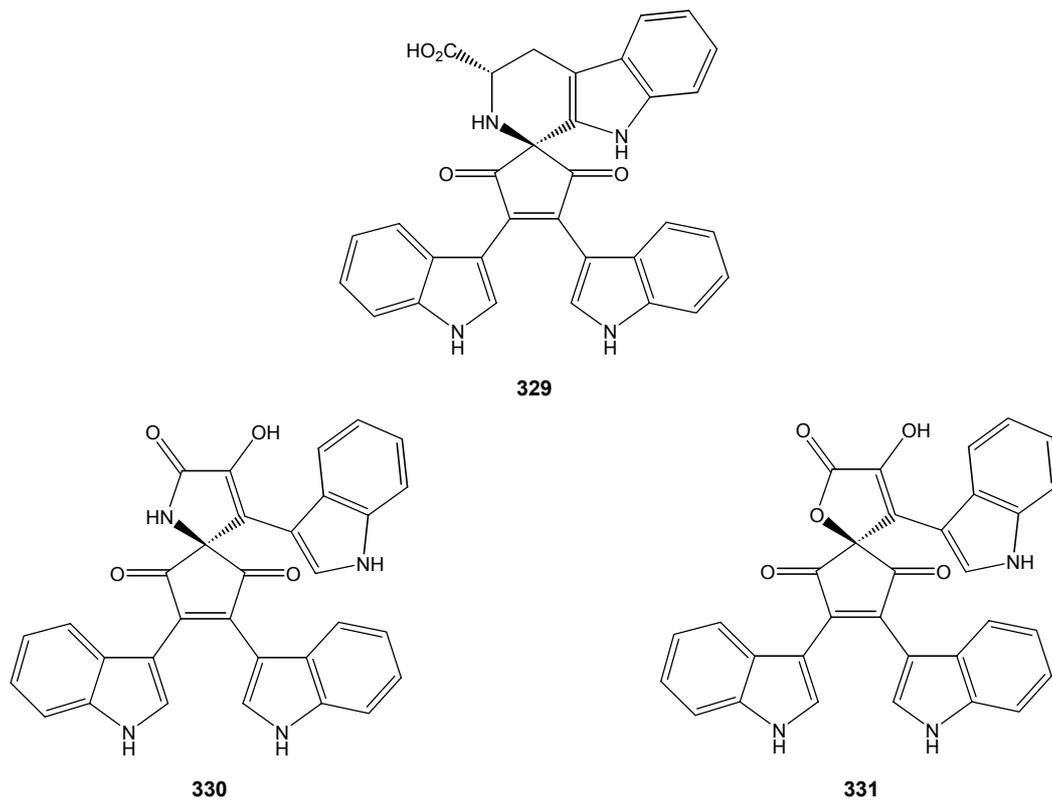


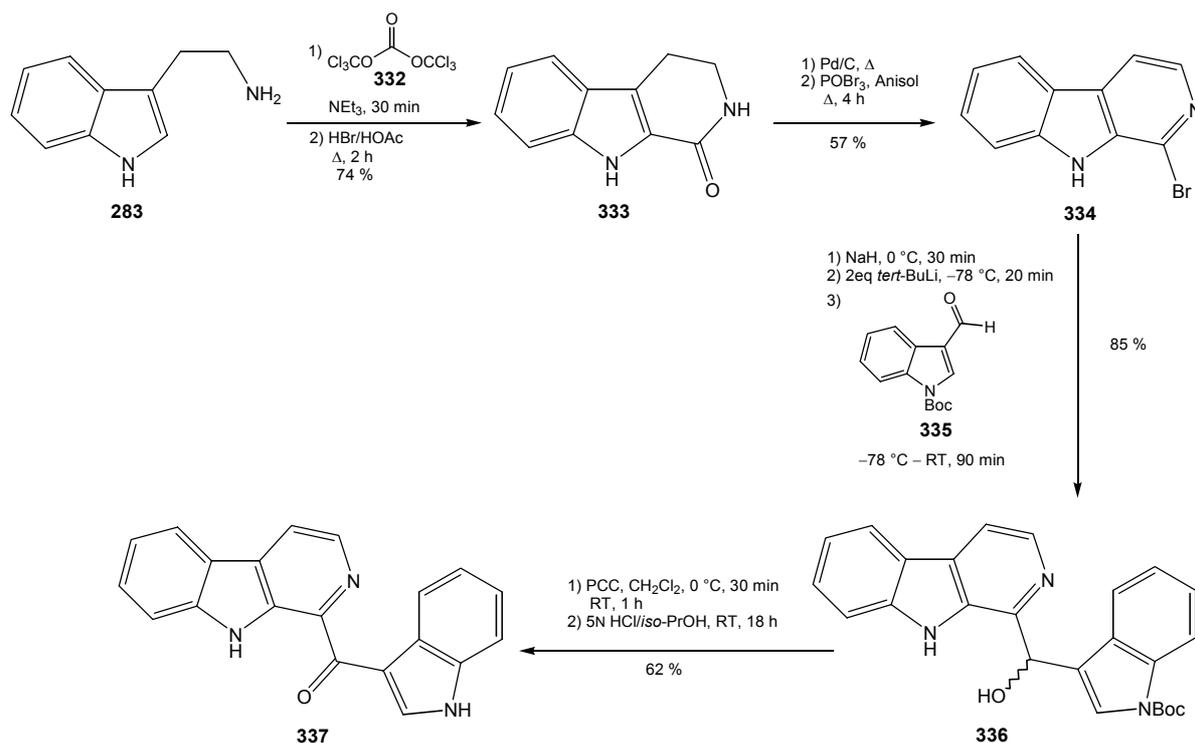
Abb. 180. Pityrianhydrid (**327**), und Pityrialacton (**328**)



**Abb. 181.** Pityriarubine A-C (329-331)

In nachfolgenden Biosyntheseuntersuchungen konnte durch Verfütterung von  $[1-^{13}\text{C}]$ -DL-Tryptophan bewiesen werden, dass das Spiro-Kohlenstoffatom aus der Carboxylgruppe des Tryptophans stammt.

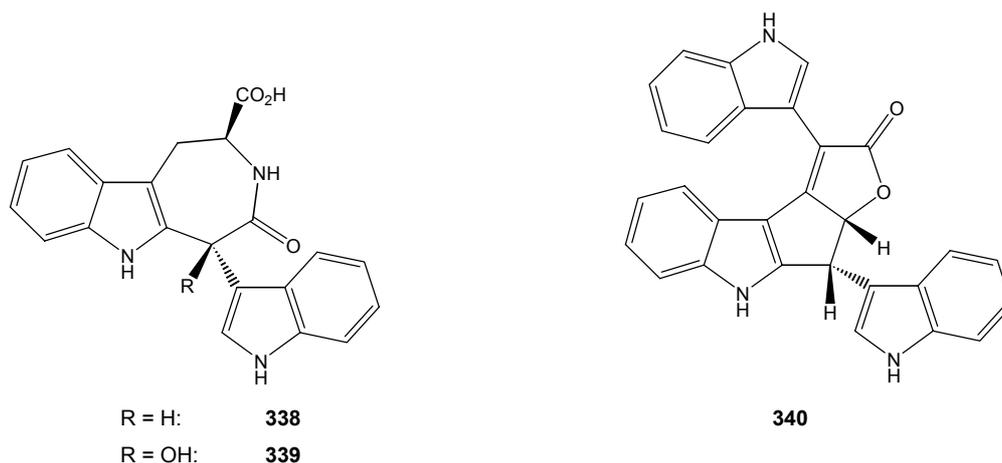
Weiterhin gelang Irlinger die Strukturaufklärung und anschließend die Totalsynthese von Pityriacitrin (337), einem potenten UV-Filter,<sup>[266]</sup> in sechs Schritten mit 22 % Gesamtausbeute.



**Abb. 182.** Totalsynthese von Pityriacitrin (**337**)

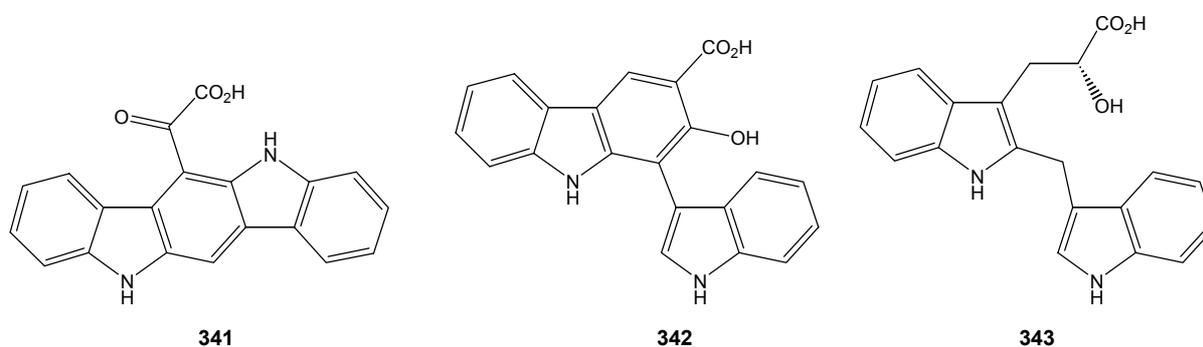
Für *M. furfur* scheint **337** als Lichtschutzfaktor von großer Bedeutung zu sein, da UV-Strahlung das Wachstum bei *Malassezia*-Hefen hemmt.<sup>[267]</sup> Die UV-Filterwirkung von Pityriacitrin (**337**) kann möglicherweise ebenfalls erklären, warum man bei Pityriasis versicolor alba keinen Sonnenbrand als Begleiterscheinung beobachtet, obwohl es zu einer Depigmentierung der Haut kommt und die Krankheit gerade in heißen Klimazonen auftritt (siehe Kapitel 5.2).

Ganz andere, aber ebenfalls neue Strukturen stellen die Malasseziaindole A (**338**) und B (**339**) und das Malasseziacitrin (**340**) dar, dessen Struktur sich aus drei Einheiten L-Tryptophan zusammensetzt. In biologischen Tests wirkt **338** als Inhibitor der Mushroom-Tyrosinase.<sup>[265]</sup>



**Abb. 183.** Malasseziaindole A (**338**) und B (**339**) sowie Malasseziacitrin (**340**)

Weitere Beispiele für die strukturelle Vielfalt der Metabolite aus *M. furfur* sind die Malasseziacarbazole A (**341**) und B (**342**) und die Malasseziamilchsäure (**343**), die neben der bekannten D-Indolylmilchsäure isoliert und in ihrer Struktur von Irlinger<sup>[265]</sup> aufgeklärt wurden. **343** besitzt wie das Malassezin (**326**) ein 2,3'-Methylenbisindolyl-Grundgerüst.

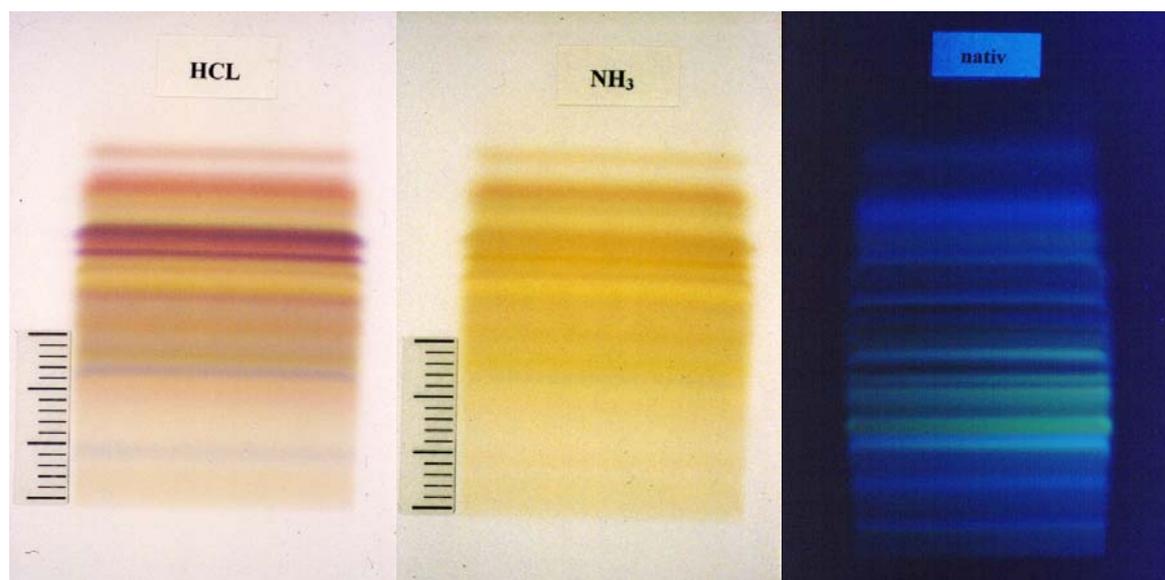


**Abb. 184.** Malasseziacarbazole A und B (**341**, **342**) und Malasseziamilchsäure (**343**)

Da Malasseziacarbazol A (**341**) große strukturelle Ähnlichkeit mit sehr potenten Liganden für den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR) aufweist, kann vermutet werden, dass **341** ebenfalls Wechselwirkungen mit diesem Rezeptor zeigt.

## 5.5 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus Kulturen von *M. furfur*

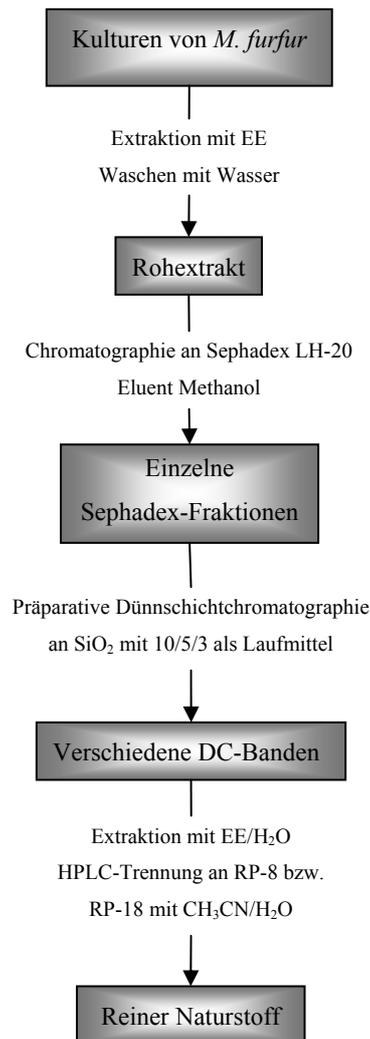
Im Rahmen dieser Kooperation erfolgt die Isolierung der Sekundärmetabolite aus *M. furfur* ausschließlich durch PD Dr. Peter Mayser und Dr. Hans-Joachim Krämer an der Universitätsklinik in Giessen. Dazu wird der *M. furfur*-Referenzstamm CBS 1878 nach der Methode von Guého et al.<sup>[268]</sup> auf Dixon-Agar mit Modifikationen nach Mayser<sup>[261]</sup> kultiviert. Nach Autoklavieren und Abkühlen auf 50 °C versetzt man das Kulturmedium mit L-Tryptophan (**18**) und gießt es in Petrischalen. Der Referenzstamm CBS 1878 wird mit einem sterilen Tupfer auf das Medium gestrichen und anschließend 14 Tage bei 30 °C inkubiert. Durch Extraktion mit Essigsäureethylester erhält man einen Rohextrakt mit einer Vielzahl an Substanzen, der durch Gelchromatographie an Sephadex<sup>®</sup> LH-20 mit Methanol als Laufmittel vorfraktioniert wird. Teilweise können bereits diese Vorfraktionen in Bioassays eingesetzt werden, um erste Hinweise auf aktive Komponenten zu erhalten.



**Abb. 185.** Dünnschichtchromatogramm des Rohextraktes ( $\text{SiO}_2$ , Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10/5/3); links nach Einwirkung von Salzsäuredampf, Mitte nach Einwirkung von Ammoniak, rechts unter UV-Licht (366 nm)

Die weitere Trennung der Substanzgemische erfolgt durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittel Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10/5/3 und anschließender Extraktion der Banden mit Essigsäureethylester und Wasser. Durch

analytische HPLC-Untersuchungen an RP-8 und RP-18 wird die Zusammensetzung der bis dahin erhaltenen Fraktionen bestimmt und Trennsysteme zur Isolierung der Reinsubstanzen erarbeitet. Mittels präparativer HPLC gelingt es, die trotz Vorreinigung noch recht komplexen Substanzgemische aufzutrennen und die verschiedenen Komponenten in hoher Reinheit für die Strukturaufklärung und biologischen Untersuchungen zur Verfügung zu stellen. Dabei erfolgt die Überprüfung des Reinheitsgrades erneut mit Hilfe der analytischen HPLC.

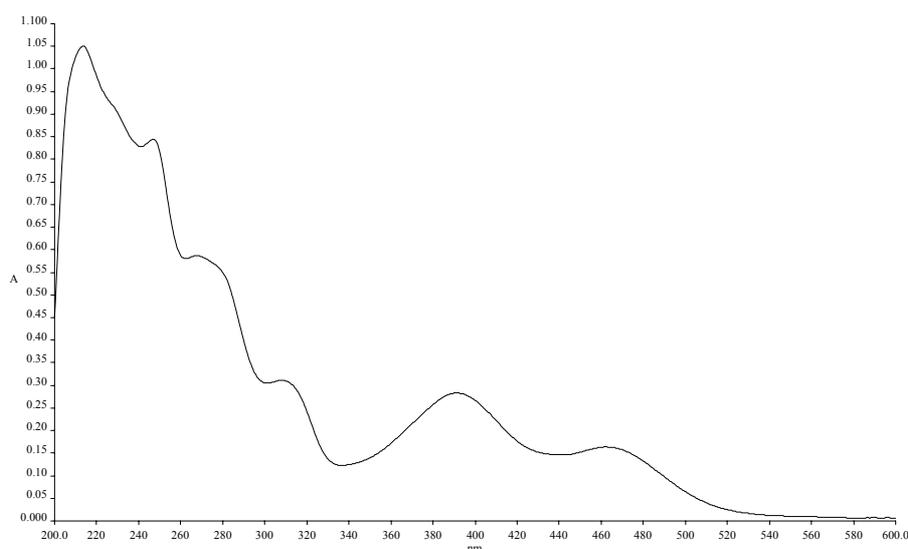


**Abb. 186.** Schematische Darstellung der Isolierung von Inhaltsstoffen aus Kulturen von *M. furfur*

## 5.6 Neue Metabolite aus der Gruppe der Malasseziacarbazole

### 5.6.1 Malasseziacarbazol C (344)

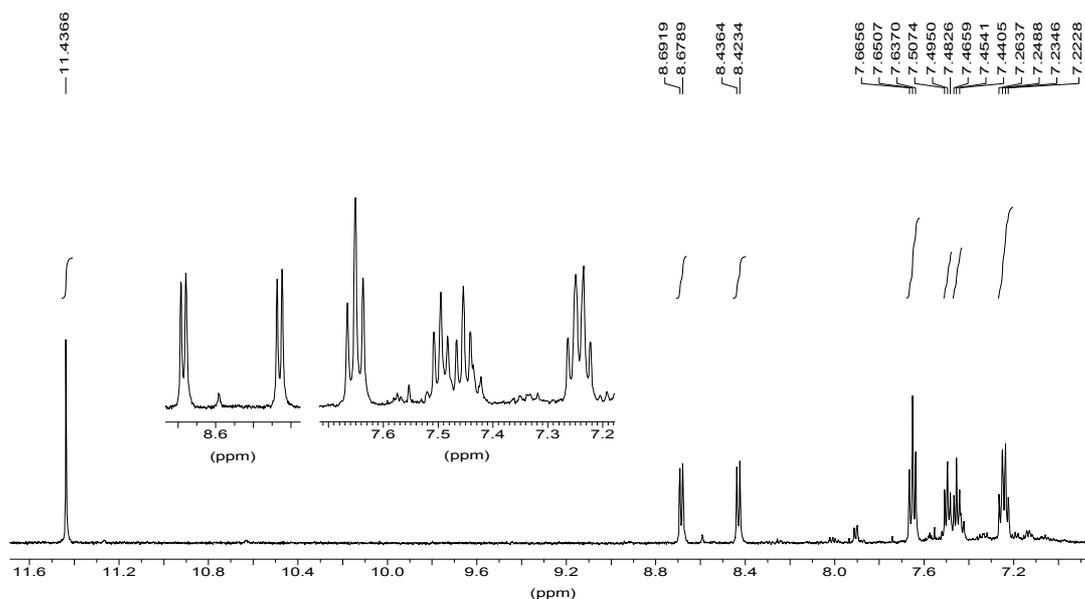
Malasseziacarbazol C (**344**) fällt nach dem Lyophilisieren als orangefarbener Feststoff an, der gut in Methanol und DMSO löslich ist. Das interessante UV/Vis-Spektrum zeigt mehrere Absorptionsmaxima bei 214, 247, 268, 308, 391 und 462 nm.



**Abb. 187.** UV/Vis-Spektrum von **344** in Methanol

Im IR-Spektrum erkennt man eine für OH- oder NH-Valenzschwingungen typische Bande mit starker Intensität bei  $3430\text{ cm}^{-1}$ , eine Doppelbande bei  $2926$  und  $2855\text{ cm}^{-1}$ , die auf Aldehyde hindeutet und eine deutlich ausgeprägte Carbonylbande bei  $1681\text{ cm}^{-1}$ . Im EI-Massenmodus erhält man keinen auswertbaren Molekülpeak. Erst im (-)-ESI- bzw. im (-)-FAB-Massenspektrum beobachtet man bei  $m/z = 327$  einen  $[M-H]^-$ -Peak, dessen Hochauflösung die Summenformel  $C_{20}H_{12}N_2O_3$  ergibt. Die bereits von Irlinger<sup>[265]</sup> aufgeklärten Metabolite Pityriaanhydrid (**327**), Pityrialacton (**328**) und Malasseziacarbazol A (**341**) aus *M. furfur* besitzen die gleiche Summenformel, jedoch zeigt ein Vergleich der Massenspektren, dass es sich bei **344** um eine neue Verbindung handelt.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$  zeigt zwei ABCD-Spinsysteme im Aromatenbereich, wobei mit  $\delta_{\text{H}}$  8.43 und 8.69 zwei tieffeldverschobene Dubletts erscheinen. Auffällig ist außerdem ein nicht austauschbares scharfes Singulett bei  $\delta_{\text{H}}$  11.44. Dieses Signal könnte einem Aldehyd-Proton zugeordnet werden, das durch zusätzliche Entschirmung durch Heteroatome tieffeldverschoben ist.

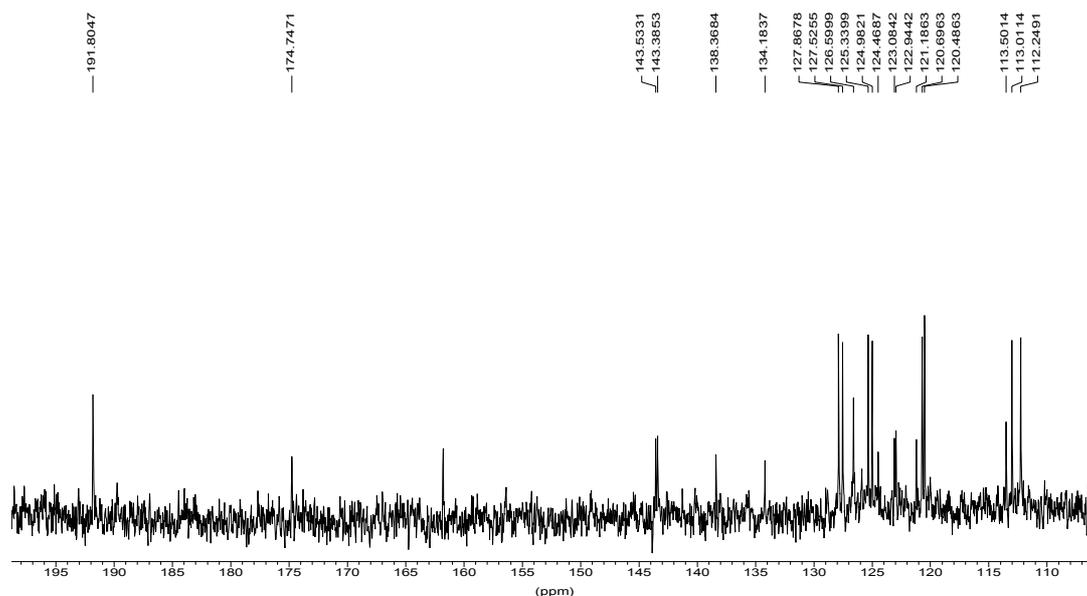


**Abb. 188.**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **344** (600 MHz,  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$ )

Durch Aufnahme eines ( $^1\text{H-}^1\text{H}$ )-COSY-Spektrums lassen sich die Protonen eindeutig zu jeweils einem ABCD-Spinsystem zuordnen. Wird das Protonenspektrum in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  gemessen, erkennt man außerdem noch zwei leicht verbreiterte Singulets bei  $\delta_{\text{H}} 11.35$  und  $11.66$ , was für indolische NH-Gruppen typisch ist.

Die bisherigen Informationen lassen darauf schließen, dass **344** zwei Indole enthält, die jeweils in 2- und 3-Position substituiert sind. Über die verknüpfende Einheit kann noch keine Aussage getroffen werden, da im COSY-Spektrum in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  weder das Singulett bei  $\delta_{\text{H}} 11.44$  noch die beiden NH-Protonen Fernkopplungen zeigen.

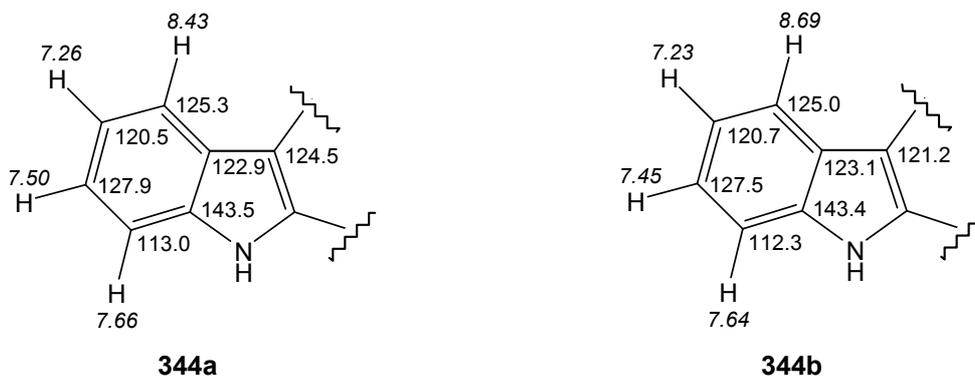
Im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum beobachtet man 20 Signale, wovon mit Hilfe eines DEPT-NMR-Spektrums acht als aromatische CH-Gruppen identifiziert werden. Das Signal bei  $\delta_{\text{C}} 191.8$  bestätigt die Vermutung, dass Malasseziacarbazol C (**344**) eine Aldehyd-Funktion enthält. Bei tiefem Feld erscheint ein Signal bei  $\delta_{\text{C}} 174.7$ , was auf eine Carbonsäure im Molekül hindeutet.



**Abb. 189.**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **344** (151 MHz,  $[\text{D}_4]$ Methanol)

Weitere Informationen über die Struktur von **344** erhält man aus HSQC- und HMBC-NMR-Experimenten.

Anhand der zweidimensionalen NMR-Spektren gelingt es, die C-Atome der beiden Indol-Teilstrukturen **344a** und **344b** genau zuzuordnen und alle direkten Kopplungen der aromatischen CH-Gruppen zu bestimmen.

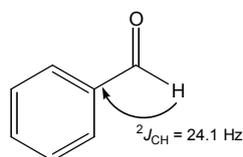


**Abb. 190.** Teilstrukturen **344a** und **344b**

Außerdem kann durch das Auftreten von symmetrischen Artefakten im HMBC-Spektrum zwischen dem Proton bei  $\delta_{\text{H}}$  11.44 und dem C-Atom bei  $\delta_{\text{C}}$  191.8 bestätigt werden, dass es sich dabei um eine Aldehyd-Funktion handelt. Diese Artefakte werden durch die direkte CH-Kopplung zwischen den beiden genannten Atomen hervorgerufen und sind für die

Strukturaufklärung sehr hilfreich, wenn wie in diesem Fall die  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung im HSQC-Spektrum nicht zu beobachten ist.

Für die Aufklärung des fehlenden Verbindungsstückes sind die HMBC-Korrelationen des Aldehyd-Protons bei  $\delta_{\text{H}}$  11.44 von entscheidender Bedeutung. So erkennt man einen Crosspeak zwischen dem Aldehydwasserstoffs und einem quartären C-Atom bei  $\delta_{\text{C}}$  121.2, dessen Position bereits durch eine weitere Wechselwirkung mit dem Proton bei  $\delta_{\text{H}}$  8.69 in der Teilstruktur **344b** festgelegt ist. Weiterhin erscheint eine starke Korrelation zu einem quartären C-Atom bei  $\delta_{\text{C}}$  138.4, das durch ein Heteroatom entschirmt wird. Besonders auffällig ist das Auftreten zweier nebeneinanderliegender Crosspeaks zwischen dem Proton bei  $\delta_{\text{H}}$  11.44 und einem quartären C-Atom bei  $\delta_{\text{C}}$  113.5. Die zu beobachtende Aufspaltung des Signals ist mit  $J = 23.3$  Hz nicht so groß wie bei einer  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung. Es muss sich also um eine geminale Kopplung handeln. Vergleiche mit literaturbekannten Verbindungen wie dem Benzaldehyd (**345**) zeigen bei Aldehyden sehr große  $^2J_{\text{CH}}$ -Kopplungen des an das  $\text{sp}^2$ -C-Atom gebundenen Protons. Diese werden durch die hohe Elektronegativität und die freien Elektronenpaare des Sauerstoffs hervorgerufen, die positive Beiträge zur geminalen Kopplung leisten.<sup>[269]</sup> Da die geminalen Kopplungen bei anderen Strukturelementen meistens viel kleiner sind, kommt es im HMBC-Spektrum im Allgemeinen nicht mehr zu einer Aufspaltung der Signale.

**345****Abb. 191.** Geminale Kopplung im Benzaldehyd (**345**)

Aufgrund dieser Beobachtung lässt sich die Verknüpfung der Aldehyd-Funktion mit dem C-Atom bei  $\delta_{\text{C}}$  113.5 eindeutig belegen. Im vorliegenden Molekül ist sie besonders wichtig, da der mittlere, verknüpfende Teil keine Protonen trägt und somit keine weiteren CH-Korrelationen erhalten werden.

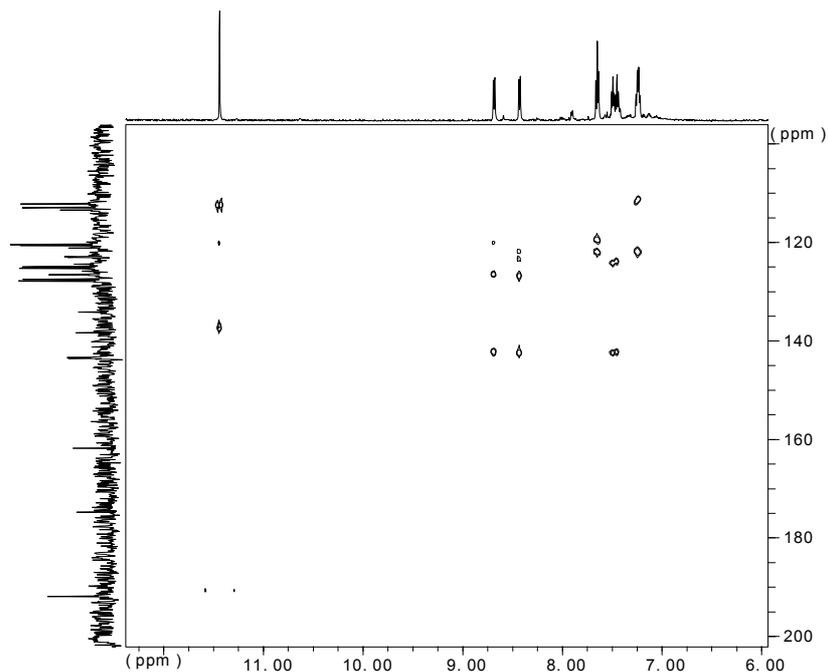


Abb. 192. HMBC-Spektrum von **344** (600/151 MHz, [D<sub>4</sub>]Methanol)

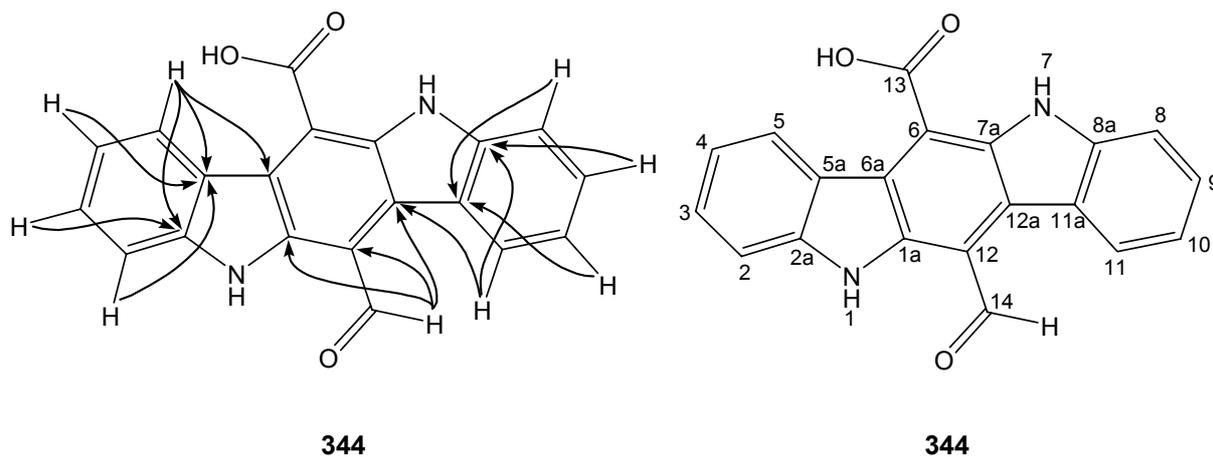
Berücksichtigt man die bisherigen Erkenntnisse über die Teilstrukturen **344a** und **344b** und die durch Massenspektrometrie ermittelte Summenformel, so verbleibt für den unbekanntem Strukturteil noch die Zusammensetzung C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Davon entfällt CHO auf die Aldehyd-Funktion. Bei dem letzten Proton muss es um ein austauschbares handeln, das auch im in [D<sub>6</sub>]DMSO aufgenommenen <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum nicht sichtbar wird. Wie bereits erwähnt, enthält **344** zudem eine Carbonsäure-Gruppe, deren <sup>13</sup>C-Signal bei δ<sub>C</sub> 174.7 erscheint. Mit Hilfe der in der nachfolgenden Tabelle zusammengefassten Daten lässt sich nun folgender Strukturvorschlag für das Malasseziacarbazol C (**344**) erarbeiten.

**Tab. 9.** NMR-Werte von Malasseziacarbazol C (**344**) (600/151 MHz, [D<sub>4</sub>]Methanol)

Position	$\delta_C$ [ppm]	Art	$\delta_H$ [ppm]	m	$J$ [Hz]	COSY $\delta_H$ [ppm]	HMBC $\delta_H$ [ppm]
8	112.3	CH	7.64	d	8.2	7.45	7.23
2	113.0	CH	7.66	d	8.2	7.50	7.26
12	113.5	C <sub>q</sub>					11.44
4	120.5	CH	7.26	m*		8.43	7.66
10	120.7	CH	7.23	m*		7.45, 8.69	7.64
12a	121.2	C <sub>q</sub>					8.69, 11.44
5a	122.9	C <sub>q</sub>					7.26, 7.66, 8.43
11a	123.1	C <sub>q</sub>					7.23, 7.64
6a	124.5	C <sub>q</sub>					8.43
11	125.0	CH	8.69	d	7.8	7.23	7.45
5	125.3	CH	8.43	d	7.8	7.26	7.50
6	126.6	C <sub>q</sub>					
9	127.5	CH	7.45	dd	7.4/8.2	7.23, 7.64	8.69
3	127.9	CH	7.50	dd	7.4/8.2	7.26, 7.66	8.43
7a	134.2	C <sub>q</sub>					
1a	138.4	C <sub>q</sub>					11.44
8a	143.4	C <sub>q</sub>					7.45, 8.69
2a	143.5	C <sub>q</sub>					7.50, 8.43
13	174.7	CO <sub>2</sub> H					
14	191.8	CHO	11.44	s			

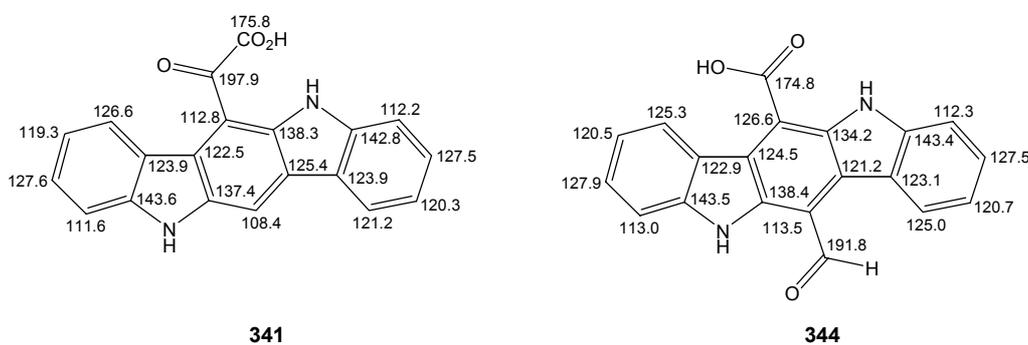
NH-Protonen in [D<sub>4</sub>]Methanol nicht sichtbar

\*: Die Signale der Protonen bei  $\delta_H$  7.23 und 7.26 fallen zusammen. Daher lassen sich die Kopplungskonstanten nicht bestimmen.



**Abb. 193.** Struktur von Malasseziacarbazol C (**344**) und ausgewählte HMBC-Korrelationen

Bei **344** liegt wie im von Irlinger<sup>[265]</sup> aufgeklärten Malasseziacarbazol A (**341**) ein Indolo[3,2-*b*]carbazol-Grundgerüst vor, das im Unterschied zu **341** jedoch an der 6-Position durch eine Carbonsäure und an der 12-Position zusätzlich durch eine Aldehyd-Funktion substituiert ist. Ein Vergleich der NMR-Daten zeigt gute Übereinstimmung der beiden Strukturen.



**Abb. 194.** δ<sub>C</sub>-Werte von Malasseziacarbazol A (**341**)<sup>[265]</sup> und Malasseziacarbazol C (**344**)  
(151 MHz, [D<sub>4</sub>]Methanol)

### 5.6.2 Malasseziacarbazol D (346)

Nach dem Lyophilisieren erhält man Malasseziacarbazol D (**346**) als roten Feststoff. Die Verbindung, die auf Kieselgel eine lachsfarbene Fluoreszenz bei 366 nm zeigt, ist gut in Methanol löslich. Im UV/Vis-Spektrum beobachtet man Absorptionsmaxima bei 209, 306, 409 und 482 nm.

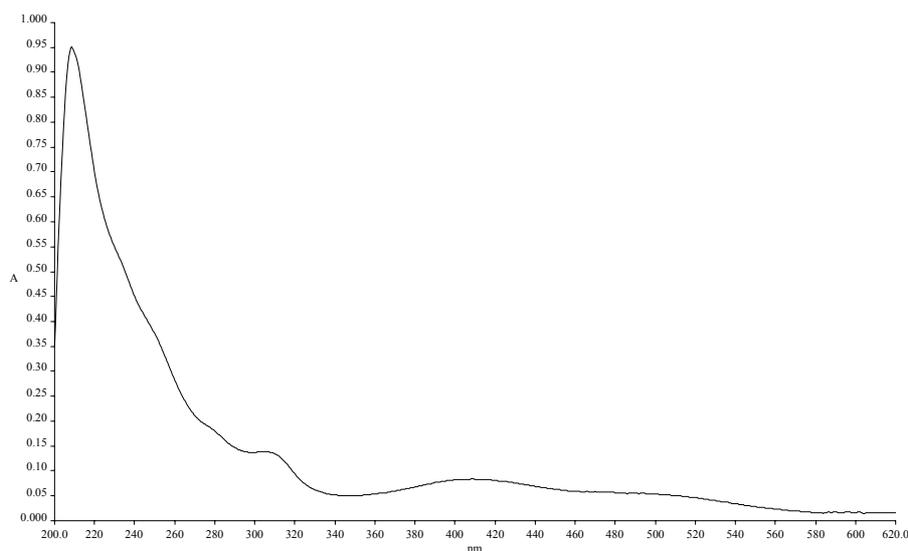
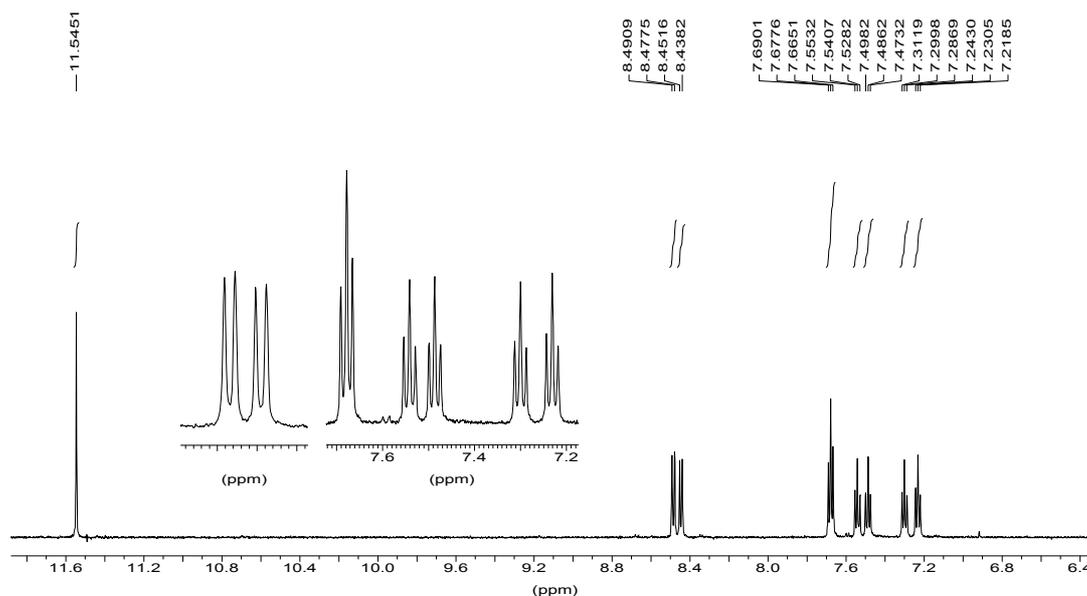


Abb. 195. UV/Vis-Spektrum von **346** in Methanol

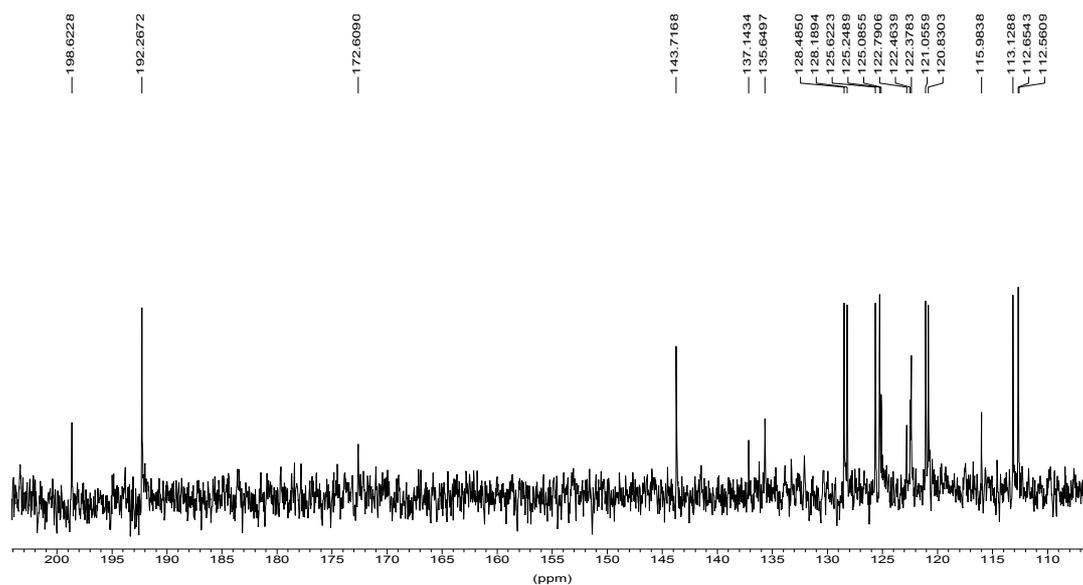
Das IR-Spektrum besitzt Ähnlichkeit mit dem von **344** und zeigt neben zwei für NH- bzw. OH-Valenzschwingungen typische Banden bei  $3434$  und  $3384\text{ cm}^{-1}$  auch die Doppelbande bei  $2925$  und  $2854\text{ cm}^{-1}$ . Außerdem erkennt man eine starke Carbonylbande bei  $1634\text{ cm}^{-1}$ . Im hochaufgelösten (-)-ESI-Massenspektrum findet man den  $[M-H]^-$ -Peak bei  $m/z = 355.0707$ , was einer Summenformel von  $C_{21}H_{12}N_2O_4$  entspricht. Damit ist Malasseziacarbazol D (**346**) um 28 Masseneinheiten schwerer als **344** und besitzt je ein Kohlenstoff- und ein Sauerstoffatom mehr. Betrachtet man das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$ , fällt sofort die große Ähnlichkeit mit dem des Malasseziacarbazol C (**344**) auf. Erneut sind zwei ABCD-Spinsysteme mit je einem tieffeldverschobenen Dublett bei  $\delta_{\text{H}} 8.44$  und  $8.48$  und ein scharfes Singulett bei  $\delta_{\text{H}} 11.55$  vorhanden.



**Abb. 196.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Malasseziacarbazol D (**346**) (600 MHz,  $[\text{D}_4]$ Methanol)

Die Aufnahme eines ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )-COSY-Spektrums ermöglicht auch hier wieder die genaue Zuordnung der Protonen zu jeweils einem Spinsystem. Malasseziacarbazol D (**346**) enthält wie **344** zwei an 2- und 3-Position substituierte Indole und eine Aldehyd-Funktion.

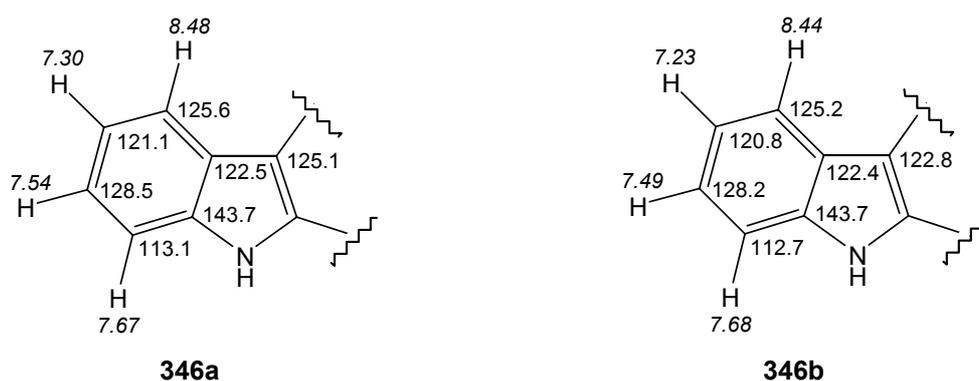
Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum beobachtet man statt der erwarteten 21 nur 19 Signale, von denen acht als aromatische CH-Gruppen identifiziert werden. Man erkennt dann an der im Vergleich zu den anderen quartären Signalen doppelten Höhe des Signals bei  $\delta_{\text{C}}$  143.7, dass es sich um zwei Kohlenstoff-Atome handelt. Auch im Malasseziacarbazol C (**344**) gibt es zwei quartäre C-Atome, die sich mit Verschiebungen von  $\delta_{\text{C}}$  143.4 und 143.5 fast nicht voneinander unterscheiden (siehe Kapitel 5.6.1). Auffällig im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum sind zwei Kohlenstoff-Atome im tiefen Feld bei  $\delta_{\text{C}}$  192.3 und 198.6, wovon das erste der Aldehyd-Funktion zugeordnet werden kann. Außerdem findet man bei  $\delta_{\text{C}}$  172.6 ein quartäres C-Atom, das wahrscheinlich zu einer Carbonsäure gehört.



**Abb. 197.**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **346** (151 MHz,  $[\text{D}_4]$ Methanol)

Weiteren Aufschluss über die Struktur erhält man wieder durch die Auswertung der HSQC- und HMBC-Spektren.

So gelangen auch hier die Bestimmung der direkten CH-Kopplungen und die Formulierung zweier Indol-Teilstrukturen **346a** und **346b**. Im HMBC-Spektrum ist eindeutig zu erkennen, dass es sich bei dem Signal bei  $\delta_{\text{C}}$  143.7 um zwei Kohlenstoffatome handelt, da Korrelationen von Protonen beider Indol-Teilstrukturen mit diesem Signal vorhanden sind.



**Abb. 198.** Indol-Teilstrukturen **346a** und **346b**

Wie bereits bei Malasseziacarbazol C (**344**) sind die HMBC-Korrelationen des Aldehyd-Protons bei  $\delta_{\text{H}}$  11.55 für die Aufklärung der verknüpfenden Einheit von entscheidender Bedeutung. Man beobachtet Kopplungen dieses Protons mit C-Atomen bei  $\delta_{\text{C}}$  122.8 und 137.1. Auffällig ist auch hier wiederum das Auftreten von doppelten Crosspeaks zwischen

dem Aldehyd-Proton und einem Kohlenstoffatom bei  $\delta_C$  116.0, die durch eine große geminale Kopplung mit  $^2J_{CH} = 23.8$  Hz hervorgerufen werden. Die Position der Aldehyd-Funktion ist dadurch eindeutig festgelegt.

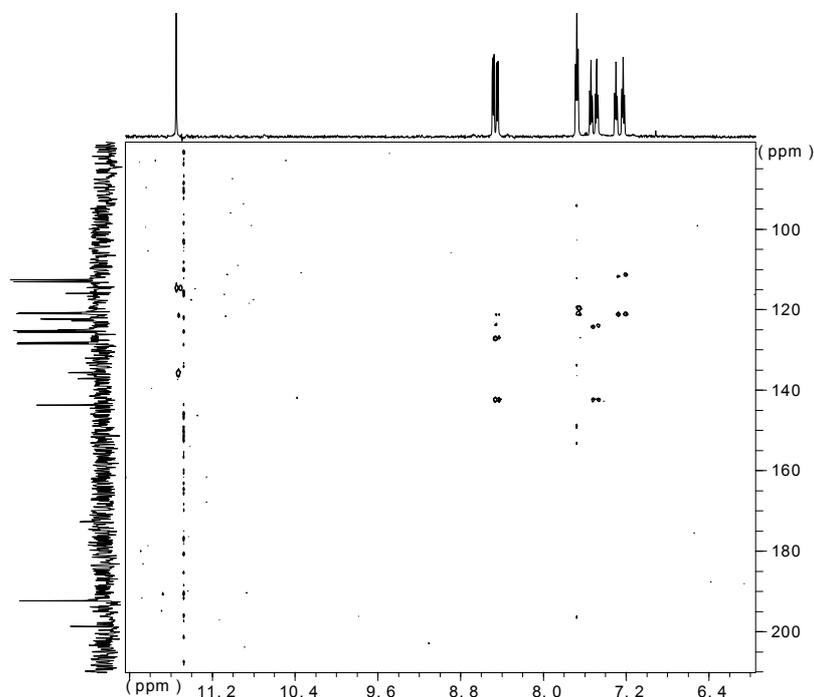


Abb. 199. HMBC-Spektrum von **346** (600/151 MHz,  $[D_4]$ Methanol)

Zieht man nun die NMR-Daten von Malasseziacarbazol A (**341**) und C (**344**) zu einem Vergleich heran, kann man davon ausgehen, dass **346** eine analoge Indolo[3,2-*b*]carbazol-Struktur besitzt. Ebenso wie **344** ist Malasseziacarbazol D (**346**) an 12-Position durch eine Aldehyd-Funktion substituiert. Im Unterschied zu **344** findet man in 6-Position aber keine einfache Carbonsäure als Substituenten, sondern wie in **341** eine  $\alpha$ -Ketosäure. Betrachtet man die NMR-Daten von Malasseziacarbazol A (**341**), so gelingt es, das fehlende C-Atom zu finden. Irlinger<sup>[265]</sup> beschreibt für die 6-Position eine chemische Verschiebung von  $\delta_C$  112.8. Bei ausreichender Vergrößerung lässt sich im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum von **346** ein quartäres C-Atom bei  $\delta_C$  112.6 erkennen. Bei Malasseziacarbazol A (**341**) erhält Irlinger den Nachweis der Verknüpfung an dieser Position erst bei Aufnahme eines HMBC-Spektrums mit vergrößerter Delay-Zeit. Dadurch wird eine  $^4J_{CH}$ -Kopplung mit dem Proton an Position 12 sichtbar. Da im Malasseziacarbazol D (**346**) der mittlere Teil des Moleküls aber keine Protonen mehr trägt, ist diese Methode hier nicht anwendbar. Auch kann die Messzeit nicht beliebig verlängert werden, um eventuell weitere Fernkopplungen zu erhalten, da sich **346** als relativ empfindlich erweist.

In der folgenden Tabelle sind alle NMR-Daten von **346** zusammengefasst.

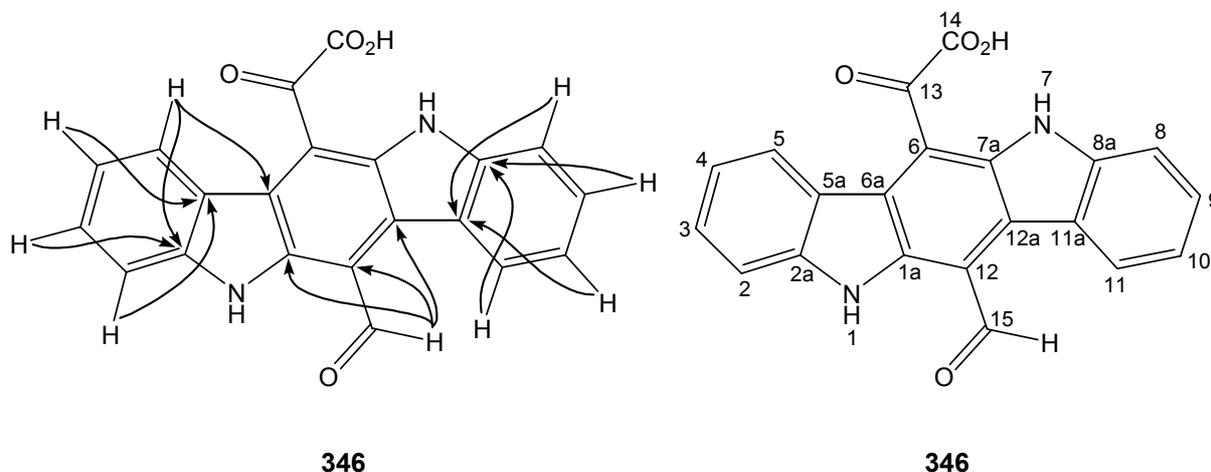
**Tab. 10.** NMR-Werte von Malasseziacarbazol D (**346**) (600/151 MHz, [D<sub>4</sub>]Methanol)

Position	$\delta_C$ [ppm]	Art	$\delta_H$ [ppm]	m	$J$ [Hz]	COSY $\delta_H$ [ppm]	HMBC $\delta_H$ [ppm]
6	112.6	C <sub>q</sub>					
8	112.7	CH	7.68	d	7.5	7.49	7.23
2	113.1	CH	7.67	d	7.5	7.54	7.30
12	116.0	C <sub>q</sub>					11.55
10	120.8	CH	7.23	dd*	7.5/7.9	7.49, 8.44	7.68
4	121.1	CH	7.30	dd*	7.5/7.9	7.54, 8.48	7.67
11a	122.4	C <sub>q</sub>					7.23, 7.68
5a	122.5	C <sub>q</sub>					7.30, 7.67
12a	122.8	C <sub>q</sub>					11.55
6a	125.1	C <sub>q</sub>					8.48
11	125.2	CH	8.44	d	7.9	7.23	7.49
5	125.6	CH	8.48	d	7.9	7.30	7.54
9	128.2	CH	7.49	dd*	7.5/7.5	7.23, 7.68	8.44
3	128.5	CH	7.54	dd*	7.5/7.5	7.30, 7.67	8.48
7a	135.6	C <sub>q</sub>					
1a	137.1	C <sub>q</sub>					11.55
2a + 8a	143.7	2 × C <sub>q</sub>					7.49, 7.54, 8.44, 8.48
14	172.6	CO <sub>2</sub> H					
15	192.3	CHO	11.55	s			
13	198.6	C=O					

\*: Signale erscheinen als Triplet.

Carbonsäure- und NH-Protonen in [D<sub>4</sub>]Methanol nicht sichtbar.

Unter Einbeziehung der in der Tabelle dargestellten NMR-Daten und der Vergleiche mit Malasseziacarbazol A (**341**) und C (**344**) lässt sich für **346** folgende Struktur formulieren:

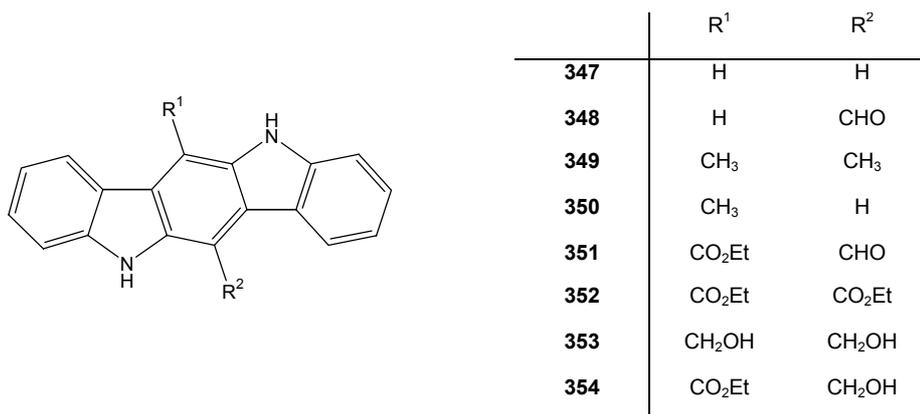


**Abb. 200.** Struktur von Malasseziacarbazol D (**346**) und ausgewählte HMBC-Korrelationen

Die oxidationsempfindliche Aldehyd-Funktion und die  $\alpha$ -Ketosäure in der Struktur von **346** erklären auch die beobachtete Instabilität der Verbindung.

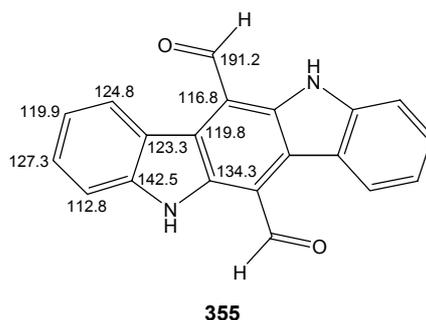
### 5.6.3 Weitere Verbindungen mit Indolo[3,2-*b*]carbazol-Gerüst

Die Strukturen von Malasseziacarbazol C (**344**) und D (**346**) werden in der Literatur noch nicht beschrieben. Aus natürlichen Quellen konnte außer dem von Irlinger<sup>[265]</sup> aufgeklärten Malasseziacarbazol A (**341**) bislang nur das unsubstituierte Indolo[3,2-*b*]carbazol (**347**) isoliert werden,<sup>[270]</sup> doch gibt es bereits einige synthetische Verbindungen mit diesem Grundgerüst. So gelang der schwedischen Arbeitsgruppe um Bergman<sup>[271-273]</sup> die Synthese der in 6- bzw. 6- und 12-Position substituierten Indolo[3,2-*b*]carbazole **348** bis **355**.



**Abb. 201.** Indolocarbazole **347** bis **354**

Ein Vergleich der NMR-Daten von **355**<sup>[273]</sup> mit denen von Malasseziacarbazol C (**344**) und D (**346**) zeigt gute Übereinstimmung.

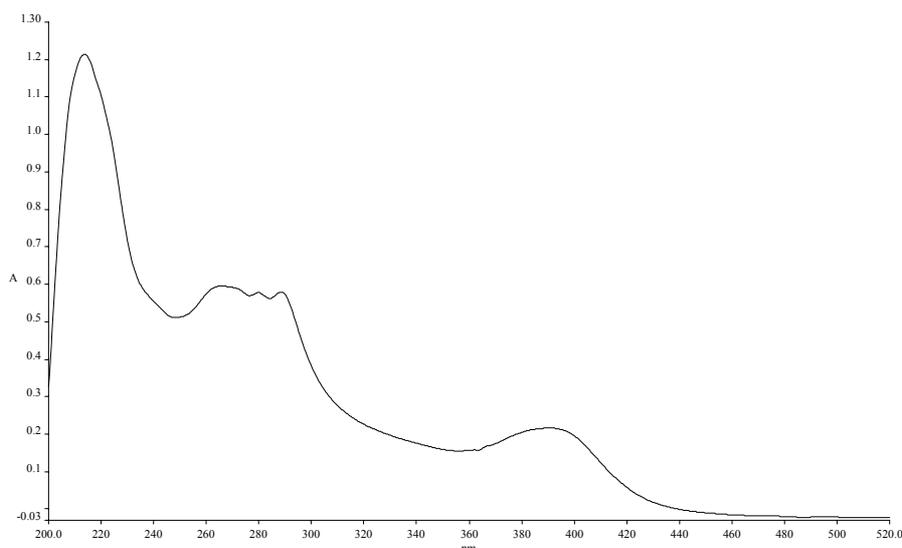


**Abb. 202.** NMR-Daten von **355**<sup>[273]</sup>

Die Verbindungen **348** und **355** gelten als extrem effiziente Liganden für den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR).<sup>[271]</sup> Da Malasseziacarbazol C (**344**) und D (**346**) sehr ähnliche Strukturen besitzen, besteht eine große Wahrscheinlichkeit, dass **344** und **346** sich ebenfalls als potente Liganden dieses Rezeptors erweisen.

## 5.7 Pityriacitrin B (356) - ein neues Pityriacitrin-Derivat

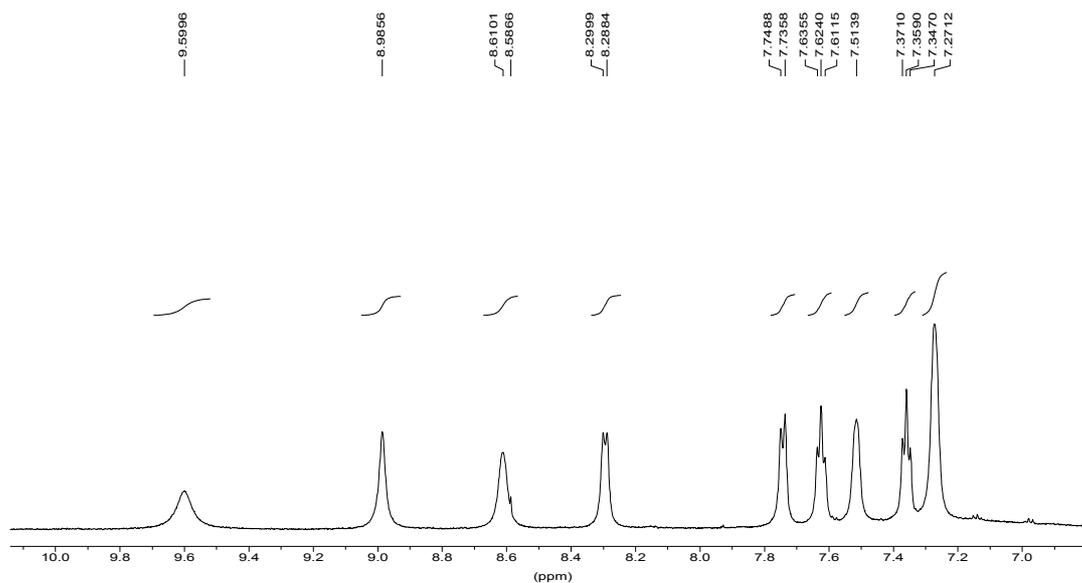
Pityriacitrin B (**356**) fällt nach dem Lyophilisieren als gelber Feststoff an, der gut in Methanol und DMSO löslich ist. Das UV/Vis-Spektrum zeigt einen breiten Absorptionsbereich mit Maxima bei 214, 266, 280, 289 und 391 nm. Im IR-Spektrum erkennt man außer der Bande für die NH- bzw. OH-Valenzschwingungen bei  $3414\text{ cm}^{-1}$  auch eine starke Carbonylbande bei  $1603\text{ cm}^{-1}$ .



**Abb. 203.** UV/Vis-Spektrum von **356** in Methanol

Im EI-Massenspektrum beobachtet man einen Molekülpeak bei  $m/z = 355$ , der hochaufgelöst einer Summenformel von  $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$  entspricht. Außerdem tritt ein Massenverlust von 44 auf, was auf eine Carbonsäure im Molekül hindeutet, bei der rasch  $\text{CO}_2$  abgespalten wird.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum in  $[\text{D}_4]$ Methanol zeigt zehn Protonen, von denen vier tieffeldverschoben bei  $\delta_{\text{H}}$  8.29, 8.61, 8.99 und 9.60 erscheinen. Aufgrund der starken Verbreiterung einiger Signale lassen sich aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum die Kopplungspartner und vorliegenden Spinsysteme nicht eindeutig bestimmen.



**Abb. 204.**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **356** (600 MHz,  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$ )

Die Aufnahme und Auswertung eines ( $^1\text{H-}^1\text{H}$ )-COSY-Spektrums ermöglicht die Zuordnung von acht Signalen zu den ABCD-Spinsystemen zweier Indole. Unklar bleibt weiterhin die deutliche Tieffeldverschiebung der Protonen bei  $\delta_{\text{H}} 8.99$  und  $9.60$  und deren Position im Molekül. Weiteren Aufschluss soll die Aufnahme des Protonenspektrums in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  geben. Zusätzlich zu den bereits bekannten Signalen erkennt man nun drei Singulets bei  $\delta_{\text{H}} 12.26$ ,  $12.38$  und  $13.12$ , von denen die ersten beiden jeweils einem Indol-NH zugeordnet werden können. Das dritte Proton bei  $\delta_{\text{H}} 13.12$  ist verbreitert und deutet auf eine Carbonsäure im Molekül hin. Außerdem beobachtet man nun viel schärfere Signale mit deutlicher Aufspaltung. So erscheint das Proton bei  $\delta_{\text{H}} 9.72$  als Dublett mit einer Kopplungskonstanten von  $J = 2.7$  Hz, die typisch für eine  $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplung zwischen dem Indol-NH und dem Proton in 2-Position ist. Das Auftreten eines Crosspeaks zwischen den Protonen bei  $\delta_{\text{H}} 9.72$  und  $12.26$  im ( $^1\text{H-}^1\text{H}$ )-COSY-Spektrum in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  bestätigt diese Annahme. Keine weiteren Erkenntnisse erhält man dagegen über das Proton mit der für Stickstoff-Heterocyclen typischen Verschiebung von  $\delta_{\text{H}} 9.13$  ( $8.99$  in  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$ ), das als scharfes Singulett erscheint und auch im COSY-Spektrum keine Korrelationen zeigt.

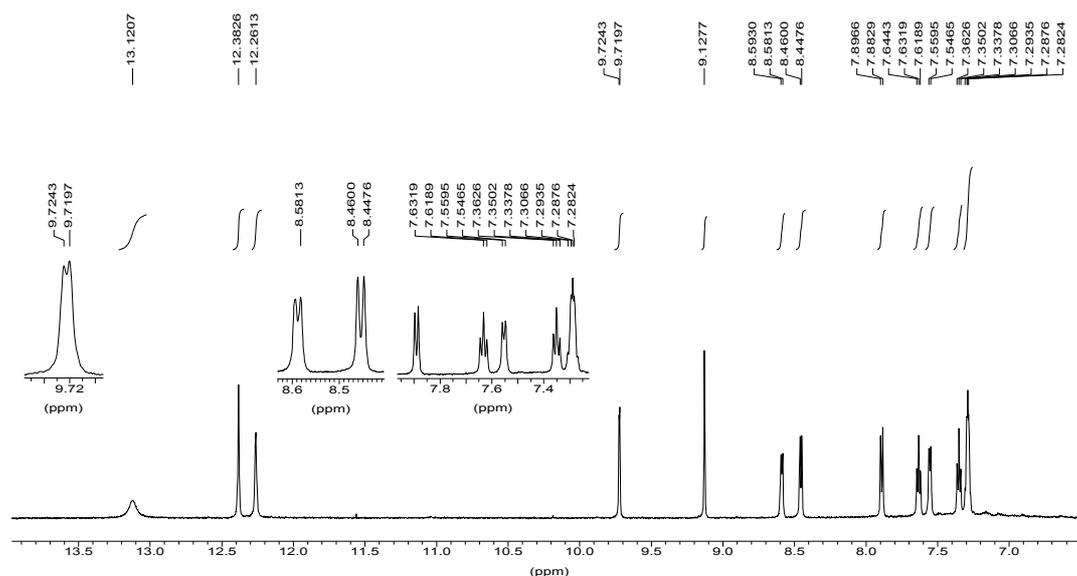


Abb. 205.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **356** (600 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )

Im  $^1\text{H}$ -breitbandenkoppelten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **356** beobachtet man 21 Signale im Bereich von 110 bis 195 ppm, was im Einklang mit der ermittelten Summenformel steht. Außer den zehn aromatischen CH-Gruppen erkennt man auch zwei tieffeldverschobene Signale bei  $\delta_{\text{C}}$  174.6 und 190.1, wobei das erste einer Carbonsäure und das zweite vermutlich einer Carbonyl-Funktion zuzuordnen ist.

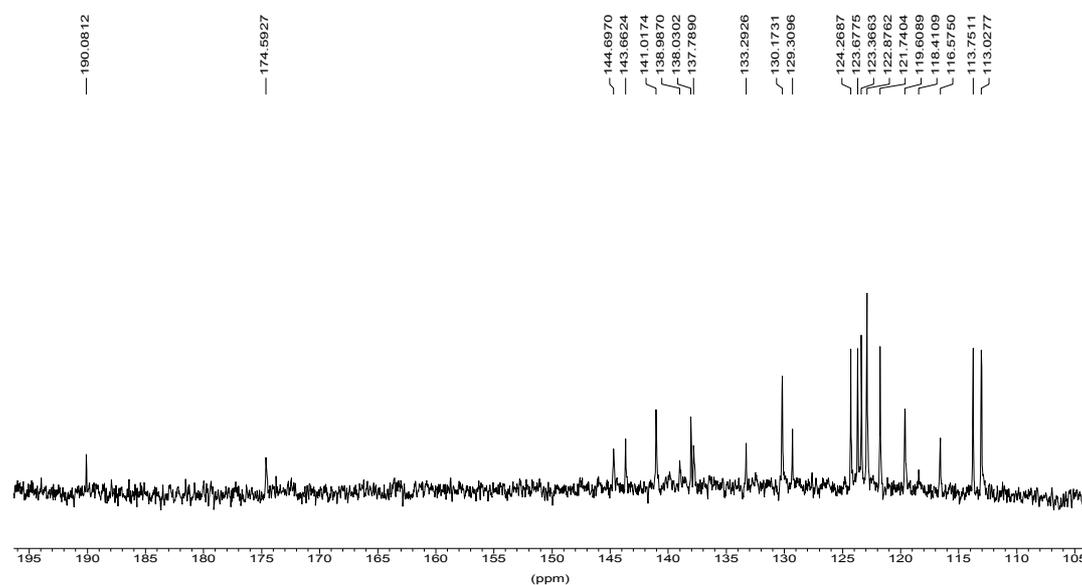
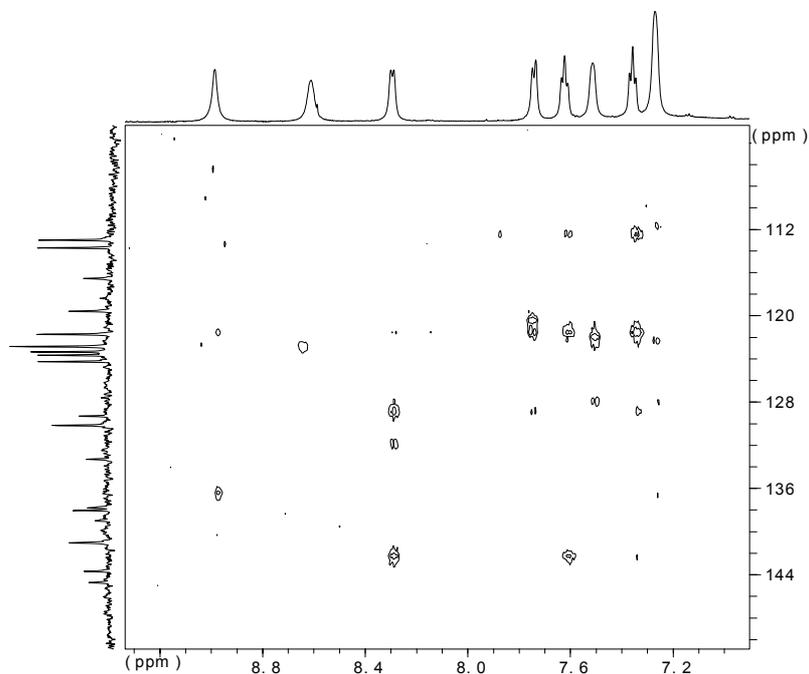


Abb. 206.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **356** (151 MHz,  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$ )

Mit Hilfe der HSQC- und HMBC-Experimente lässt sich eindeutig feststellen, dass in **356** zwei Indol-Teilstrukturen vorliegen, wobei eine in 2- und 3-Position und die andere nur in

2-Position substituiert ist. Weiteren Aufschluss über die Struktur erhält man durch die Korrelationen des Protons bei  $\delta_H$  8.99. So beobachtet man Kopplungen zwischen diesem Proton und Kohlenstoffatomen bei  $\delta_C$  122.9, 137.8 und 174.6.



**Abb. 207.** HMBC-Spektrum von **356** (600/151 MHz,  $[D_4]$ Methanol)

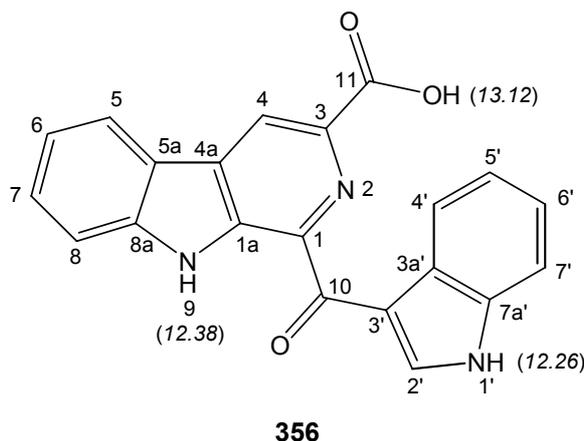
Zusammen mit den bisherigen Informationen und den in der folgenden Tabelle dargestellten NMR-Daten lässt sich nun für **356** ein Strukturvorschlag formulieren.

**Tab. 11.** NMR-Werte von Pityriacitrin B (**356**) (600/151 MHz, [D<sub>4</sub>]Methanol)

Position	$\delta_C$	Art	$\delta_H$	m	$J$ [Hz]	COSY	HMBC
	[ppm]		[ppm]			$\delta_H$ [ppm]	$\delta_H$ [ppm]
7'	113.0	CH	7.51	s, breit		7.27	7.27
8	113.8	CH	7.74	d	7.8	7.62	7.36, 7.62
3'	116.6	C <sub>q</sub>					
5a	118.4	C <sub>q</sub>					
4	119.6	CH	8.99	s, breit			
6	121.7	CH	7.36	dd*	7.2/7.2	7.62, 8.29	7.74
5	122.9	CH	8.29	d	6.9	7.36	7.36, 7.62, 7.74, 8.99
5'	123.4	CH	7.27	s, breit		7.51, 8.61	7.51
4'	123.7	CH	8.61	s, breit		7.27	7.27
6'	124.3	CH	7.27	s, breit		7.51, 8.61	8.61
3a'	129.3	C <sub>q</sub>					7.51
7	130.2	CH	7.62	dd*	7.5/6.9	7.36, 7.74	7.36, 7.74, 8.29
4a	133.3	C <sub>q</sub>					8.29
1a	137.8	C <sub>q</sub>					8.99
2'	138.0	CH	9.60	s, breit			
7a'	139.0	C <sub>q</sub>					
1	141.0	C <sub>q</sub>					
8a	143.7	C <sub>q</sub>					7.62, 8.29
3	144.7	C <sub>q</sub>					
11	174.6	CO <sub>2</sub> H					8.99
10	190.1	C=O					

\*: Signale erscheinen als Triplet.

Carbonsäure- und NH-Protonen in [D<sub>4</sub>]Methanol nicht sichtbar.

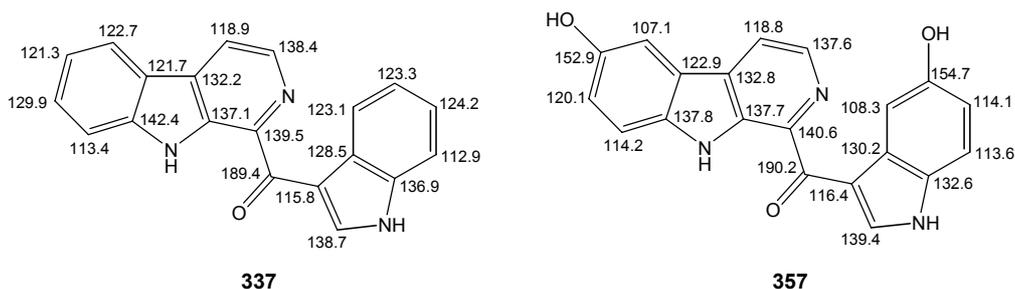


**Abb. 208.** Struktur von Pityriacitrin B (**356**)

Werte in Klammern nur in  $[D_6]DMSO$  sichtbar

Der Anisotropiekegel der Keto-Funktion in Position 10 verursacht die starke Tieffeldverschiebung des Protons in 2'-Position bei  $\delta_H$  9.60.

Der Naturstoff **356** besitzt wie das von Irlinger<sup>[265]</sup> aufgeklärte und auch synthetisierte Pityriacitrin (**337**) ein  $\beta$ -Carboline-Grundgerüst, welches hier jedoch zusätzlich in 3-Position durch eine Carbonsäure substituiert ist. Der indonesische Schwamm *Hyrtios erectus* enthält das Hyrtiosulawesin (**357**) genannte Alkaloid, das ebenso wie Pityriacitrin (**337**)  $\beta$ -Carboline-Struktur aufweist und zusätzlich zwei Hydroxy-Funktionen trägt.<sup>[274]</sup> Ein Vergleich der jeweiligen NMR-Daten zeigt gute Übereinstimmung mit denen von **357**.



**Abb. 209.** NMR-Daten von Pityriacitrin (**337**)<sup>[265]</sup> (600/151 MHz,  $[D_3]Acetonitril$ ) und Hyrtiosulawesin (**357**)<sup>[274]</sup> (600/151 MHz,  $[D_4]Methanol$ )

Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von Pityriacitrin B (**356**) und **337**, ist zu vermuten, dass sich **356** ebenso wie **337** als potenter UV-Filter erweist. Wahrscheinlich wird **356** in den Kulturen von *M. furfur* durch Decarboxylierung in Pityriacitrin (**337**) umgewandelt.

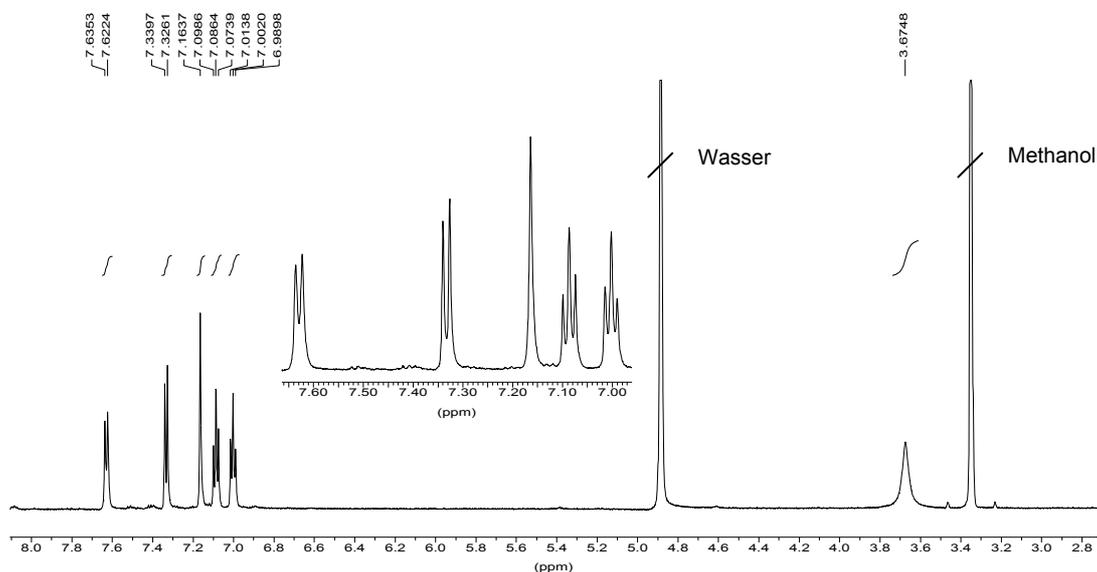
## 5.8 Weitere Sekundärmetabolite aus *Malassezia furfur*

### 5.8.1 Malasseziaketon (358)

Bei ersten biologischen Testungen von Fraktionen aus der Gelchromatographie des Rohextraktes von *M. furfur* fällt eine Fraktion mit deutlicher Inhibierung von Tyrosinase auf. Weitere Trennung, wie in Kapitel 5.5 beschrieben, führt zu einer reinen Verbindung **358**, die in erneuten Tests ihre Wirkung als Tyrosinase-Inhibitor bestätigt.

Die farblose Substanz ist gut in Aceton, Methanol und DMSO löslich. Im UV/Vis-Spektrum erkennt man Maxima bei 207, 216, 266, 280 und 289 nm. Das IR-Spektrum zeigt neben der für Indol-Derivate typischen intensiven Bande bei  $3421\text{ cm}^{-1}$  für die NH-Valenzschwingungen eine Carbonylbande bei  $1583\text{ cm}^{-1}$ .

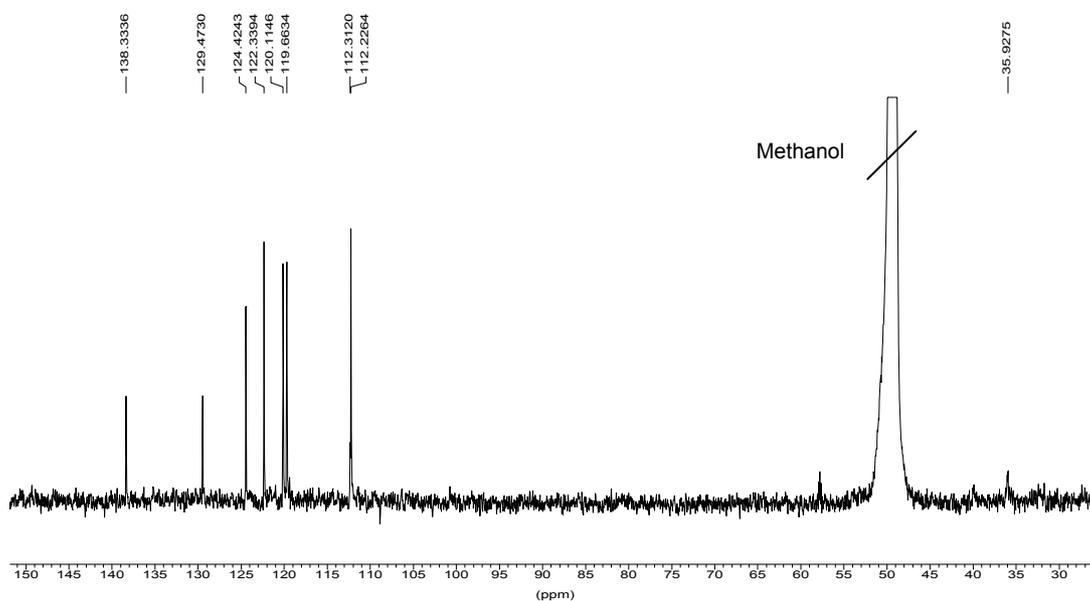
Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **358** in  $[\text{D}_4]$ Methanol beobachtet man ein ABCD-Spinsystem und ein einzelnes Singulett im aromatischen Bereich, was auf eine in 3-Position substituierte Indol-Struktur hindeutet. Außerdem erscheint bei  $\delta_{\text{H}}$  3.67 ein verbreitertes Signal, das einer  $\text{CH}_2$ -Gruppe entspricht.



**Abb. 210.**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **358** (600 MHz,  $[\text{D}_4]$ Methanol)

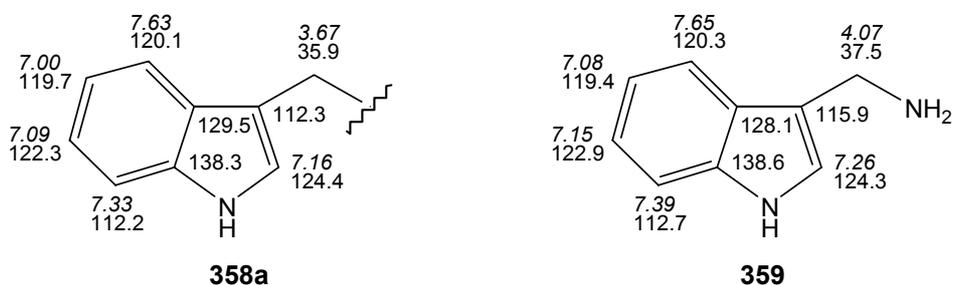
Zusätzlich zu den genannten Signalen erkennt man bei Aufnahme des Protonenspektrums in  $[\text{D}_6]$ DMSO bei  $\delta_{\text{H}}$  10.66 ein Singulett, das einem austauschbaren H-Atom zugeordnet werden kann.

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum in  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$  zeigt neun Signale, von denen fünf als aromatische CH-Gruppen und eines bei  $\delta_{\text{C}}$  35.9 als  $\text{CH}_2$ -Gruppe identifiziert werden. Dabei fällt auf, dass das Kohlenstoff-Signal der Methylen-Gruppe wie schon das Protonen-Signal stark verbreitert und dadurch mit geringer Intensität erscheint.



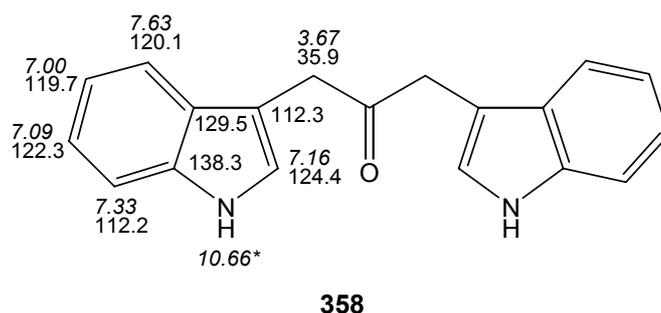
**Abb. 211.**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **358** (151 MHz,  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$ )

Durch Aufnahme und Auswertung der zweidimensionalen COSY-, HSQC- und HMBC-Experimente gelangen die eindeutige Zuordnung der beschriebenen Signale und die Formulierung einer indolischen Teilstruktur von **358**. Die Vermutung, bei **358** könnte es sich um das einfache 3-Aminomethylindol (**359**) handeln, wird durch einen Vergleich der NMR-Daten von **358a** mit synthetischem Material von **359**<sup>[275]</sup> widerlegt.



**Abb. 212.** Teilstruktur von **358** und 3-Aminomethylindol (**359**) mit chemischen Verschiebungen (600/151 MHz,  $[\text{D}_4]\text{Methanol}$ )

Weiteren Aufschluss über die Struktur von **358** erhält man durch die Massenspektrometrie. Im EI-Spektrum ist der Molpeak bei  $m/z = 288$  zu erkennen und die Zusammensetzung von **358** kann mit Hilfe der Hochauflösung mit  $C_{19}H_{16}N_2O$  bestimmt werden. Damit zeigt sich, dass **358** nicht wie angenommen eine einfache Indol-Einheit besitzt, sondern eine symmetrische Struktur aus zwei 3-Indolylmethylen-Bausteinen aufweist. Die beiden identischen Strukturteile sind über eine Carbonylfunktion miteinander verknüpft, so dass folgende Struktur für die Malasseziaketon genannte Verbindung **358** vorgeschlagen wird.



**Abb. 213.** Struktur von Malasseziaketon (**358**) mit NMR-Daten (600/151 MHz,  $[D_4]$ Methanol) (\*: NH-Signal nur in  $[D_6]$ DMSO erkennbar)

Zwar fehlt das entsprechende Signal im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum, doch beobachtet man im Dünnschichtchromatogramm bei der Umsetzung von **358** mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, einem Nachweisreagens für Carbonyl-Gruppen, die Entstehung einer neuen Verbindung. Auch erklärt sich nun die Verbreiterung des Signals für die  $CH_2$ -Gruppe, da in methanolischer Lösung anscheinend eine Keto-Enol-Tautomerie auftritt. Damit erscheint natürlich auch das Signal des Carbonyl-Kohlenstoffs verbreitert, das ohnehin im Vergleich zu den übrigen verdoppelten Signalen deutlich kleiner ausfallen sollte. Die geringe Substanzmenge erschwert zusätzlich die NMR-Messungen und somit die Detektion des fehlenden C-Atoms.

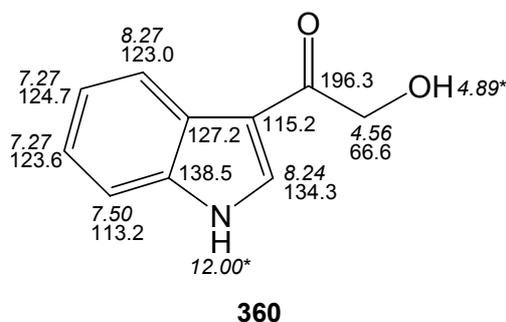
Die vorgeschlagene Struktur ist bisher weder als Naturstoff noch auf synthetischem Gebiet beschrieben.

### 5.8.2 Identifizierung einer farblosen Verbindung

Aus den Kulturen von *M. furfur* kann eine farblose, polare Substanz (**360**) isoliert werden, die gut in Methanol und DMSO löslich ist. Im EI-Massenspektrum erkennt man bei  $m/z = 175$  den Molpeak, der hochaufgelöst eine Summenformel von  $C_{10}H_9NO_2$  ergibt. Das  $^1H$ -NMR-

Spektrum in  $[D_6]$ DMSO zeigt neben den typischen Signalen für ein in 3-Position substituiertes Indol im aromatischen Bereich ein Singulett bei  $\delta_H$  4.56, das zwei Protonen entspricht. Ein breites Signal bei  $\delta_H$  12.00, das dem indolischen NH zugeordnet werden kann und ein Singulett bei  $\delta_H$  4.89 verschwinden bei Aufnahme des Spektrums in  $[D_4]$ Methanol. Im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum beobachtet man die erwarteten 10 Signale, wovon fünf als aromatische CH-Gruppen und ein Signal bei  $\delta_C$  66.6 als  $CH_2$ -Gruppe identifiziert werden. Auffällig ist ein tieffeldverschobenes Signal bei  $\delta_C$  196.2, das vermutlich zu einer Carbonyl-Funktion gehört.

Da es sich bei **360** um ein einfaches Indol-Derivat handelt, kann aus den vorliegenden Informationen bereits folgender Strukturvorschlag formuliert und durch Aufnahme der zweidimensionalen NMR-Spektren bestätigt werden.



**Abb. 214.** Struktur und NMR-Daten von **360** ( $[D_4]$ Methanol, 600/151 MHz)

\*: Signale nur in  $[D_6]$ DMSO sichtbar

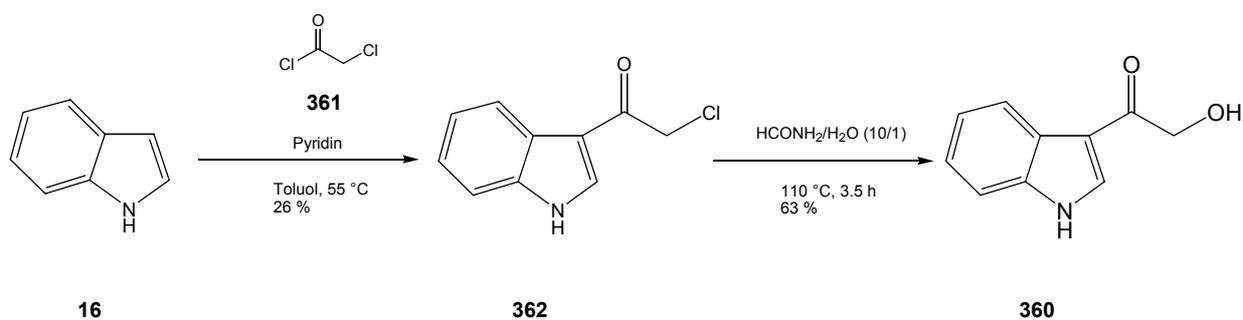
Anders als bei der recht einfachen Struktur vermutet, gibt es wenig Berichte über ein Vorkommen von **360** in der Natur. Bernart und Gerwick<sup>[276]</sup> konnten erstmals 3-(Hydroxyacetyl)indol (**360**) aus der Rotalge *Prionitis lanceolata* isolieren. Sie fanden heraus, dass **360** das Wurzelwachstum von Salatsämlingen fördert.

Wenig später wurde 3-(Hydroxyacetyl)indol (**360**) außerdem in Flüssigkulturen von *Lactarius deliciosus*,<sup>[277]</sup> im marinen Schwamm *Tedania ignis*<sup>[278]</sup> und in dem Myxobakterium *Archangium gephyra*<sup>[279]</sup> nachgewiesen.

Weiterhin konnte **360** als Produkt im Metabolismus von Tryptophan (**18**) in *Streptomyces staurosporeus* gefunden werden. Um die Biosynthese des Protein-Kinase-Inhibitors Staurosporin zu untersuchen und eventuell neue Staurosporin-Derivate zu erhalten, wurde Tryptophan (**18**) an Kulturen von *S. staurosporeus* verimpft und **360** als einer der Metabolite isoliert.<sup>[280]</sup>

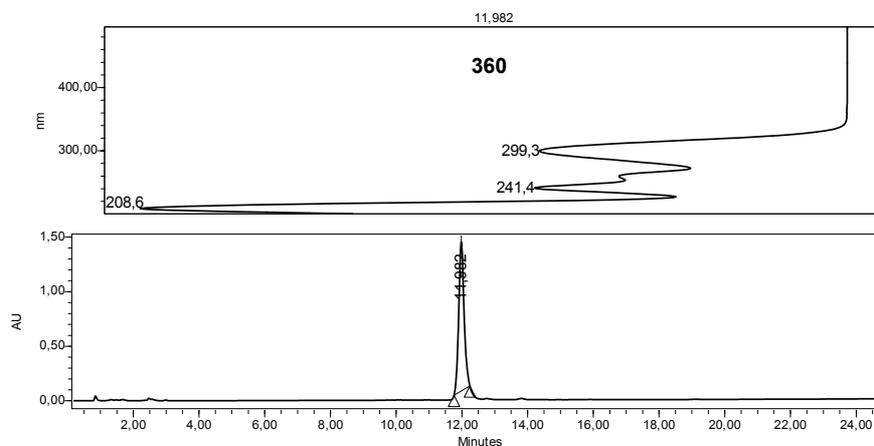
Die Verbindung **360** scheint trotz ihrer einfachen Struktur verschiedene biologische Aktivitäten zu besitzen. So ergaben Forschungen, dass synthetisches 3-(Hydroxyacetyl)indol (**361**) ähnlich wie Amphetamine stimulierend auf das menschliche Zentralnervensystem wirkt.<sup>[281]</sup>

Um für biologische Tests über genügend Substanz zu verfügen, wird **360** synthetisiert. Die zweistufige Synthese geht von Indol (**16**) aus, welches mit Chloracetylchlorid (**361**) und Pyridin in Toluol bei 55 °C umgesetzt wird.<sup>[282]</sup> Man erhält 3-(Chloroacetyl)indol (**362**), das durch Erhitzen in Formamid/Wasser zu 3-(Hydroxyacetyl)indol (**360**) in 16 % Gesamtausbeute hydrolysiert.<sup>[283]</sup>



**Abb. 215.** Synthese von 3-(Hydroxyacetyl)indol (**360**)

Das Syntheseprodukt stimmt in allen analytischen Daten mit dem natürlichen 3-(Hydroxyacetyl)indol (**360**) überein. Eine Coinjektion an der analytischen HPLC bestätigt damit auch den Strukturvorschlag für **360**.



**Abb. 216.** Coinjektion von Syntheseprodukt und Naturstoff (System 4)

## 5.9 Überlegungen zur Biosynthese

Betrachtet man die Sekundärmetabolite aus *M. furfur*, erkennt man, dass sie letztendlich aus einfachen Indol-Derivaten aufgebaut sind. Wahrscheinlich wird zuerst das verfütterte L-Tryptophan (**18**) in diese einfachen Verbindungen umgewandelt, die dann wiederum Bausteine für die Biosynthese der komplexeren Inhaltsstoffe darstellen.

So kann (Indol-3-yl)glyoxylsäure (**363**) durch Decarboxylierung, Transaminierung und Oxidation aus **18** entstehen und mit einem weiteren Molekül L-Tryptophan (**18**) zu **364** reagieren. Erneute Transaminierung und reduktive Entfernung der Hydroxy-Funktion würde zu **365** führen, das dann durch Reduktion und Oxidation in **366** umgewandelt wird. In einer Ringschlussreaktion könnte Malasseziacarbazol D (**346**) gebildet und durch Decarboxylierung und anschließender Oxidation zu Malasseziacarbazol C (**344**) umgeformt werden.

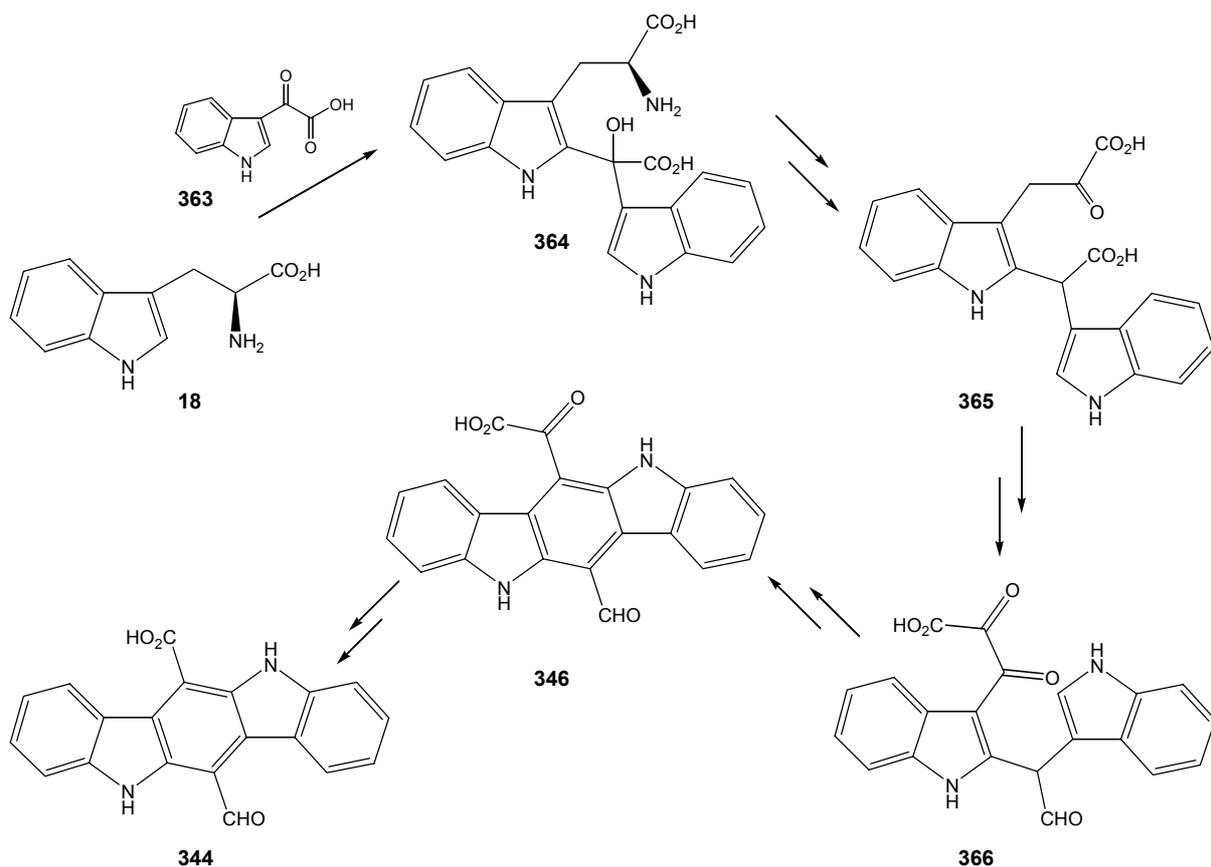
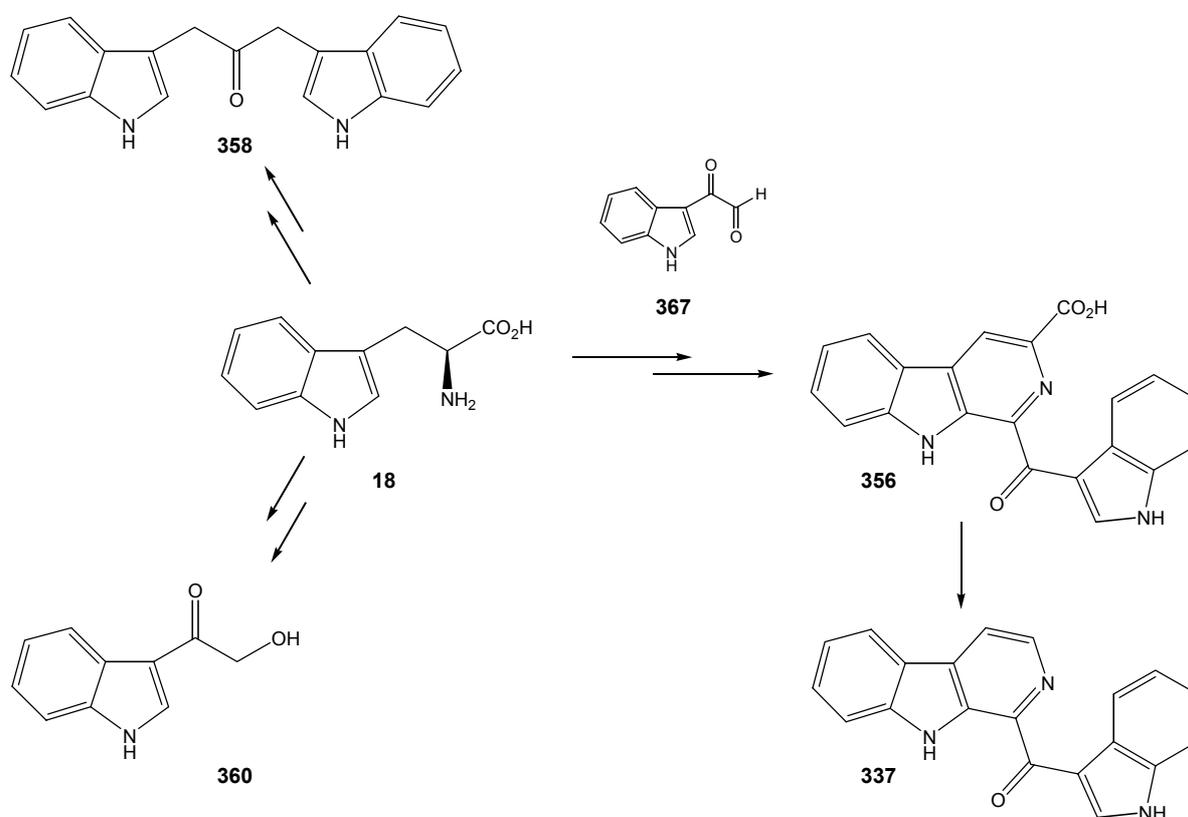


Abb. 217. Mögliche Biosynthese für Malasseziacarbazol C (**344**) und D (**346**)

Die Biosynthese von Pityriacitrin B (**356**) könnte über eine Pictet-Spengler-Reaktion zwischen L-Tryptophan (**18**) und (Indol-3-yl)glyoxylaldehyd (**367**) erfolgen. Decarboxylierung würde dann zu der von Irlinger<sup>[265]</sup> aufgeklärten Verbindung **337** führen.

Auch die Bildung der einfachen Metabolite **358** und **360** lässt sich von L-Tryptophan (**18**) ableiten. So könnte Malasseziaketone (**358**) aus (Indol-3-yl)acetaldehyd und Skatol, einem Abbauprodukt von **18**, entstehen.

Durch Transaminierung von **18** zur (Indol-3-yl)brenztraubensäure, Abspaltung von CO<sub>2</sub>, Reduktion und erneute Oxidation ließe sich die Entstehung von 3-(Hydroxyacetyl)indol (**360**) erklären.

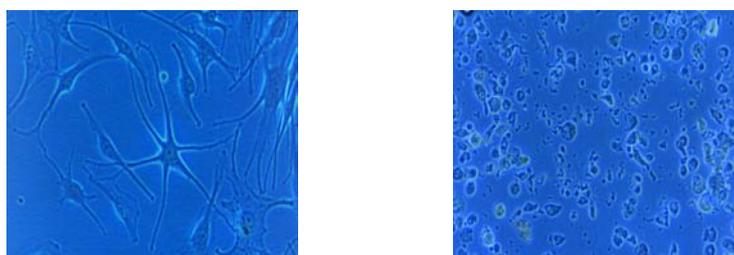


**Abb. 218.** Biosynthetische Überlegungen zu **356**, **358** und **360**

Bestätigung der vorgeschlagenen Biosynthesewege könnte durch weitere Verfütterungsversuche erreicht werden. Dazu ist es sinnvoll, in den Extrakten von *M. furfur* nach einfachen Biosynthesebausteinen zu suchen, diese dann markiert darzustellen und an die Hefe zu verimpfen.

## 5.10 Neue Erkenntnisse über die biologische Aktivität von Malassezin (326)

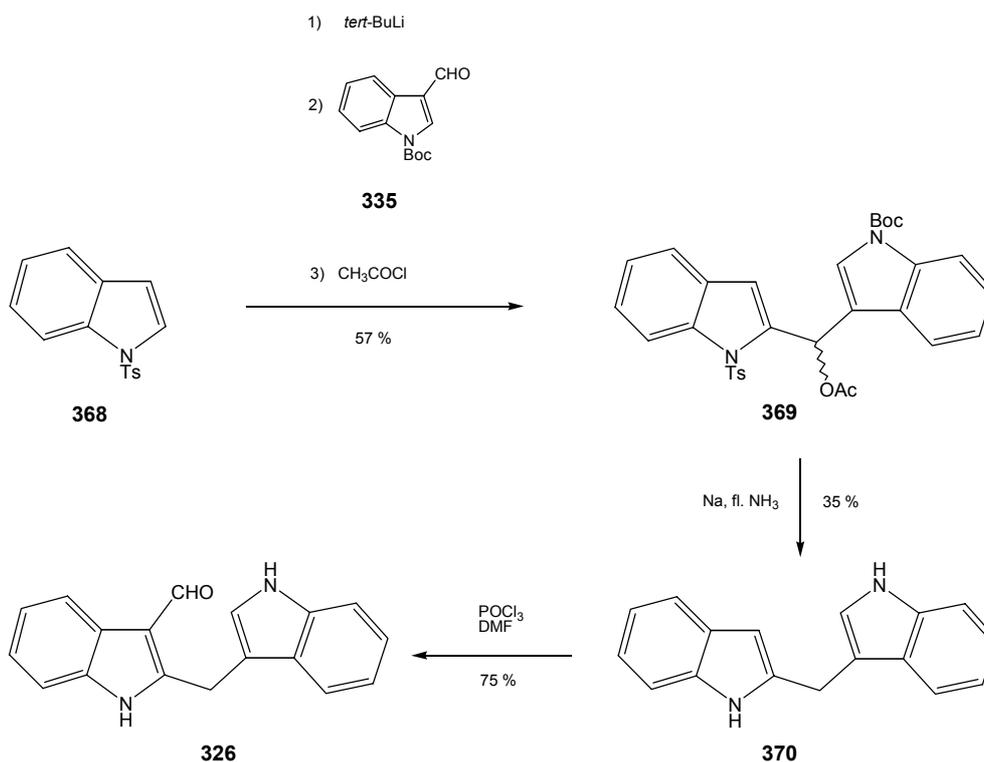
Um möglichst frühzeitig erste Hinweise auf eine mögliche biologische Aktivität von Sekundärmetaboliten aus *M. furfur* zu erhalten, wird bereits der Rohextrakt (Kapitel 5.5) in verschiedenen Bioassays eingesetzt. Gibt man den Extrakt zu Kulturen von menschlichen Melanozyten, beobachtet man bereits nach vier Stunden charakteristische Veränderungen in der Zellgestalt (Abb. 219).



**Abb. 219.** Aufnahme der Melanozyten: Kontrollversuch ohne Rohextrakt (links) und Melanozyten nach Einwirkung des Extraktes (rechts)

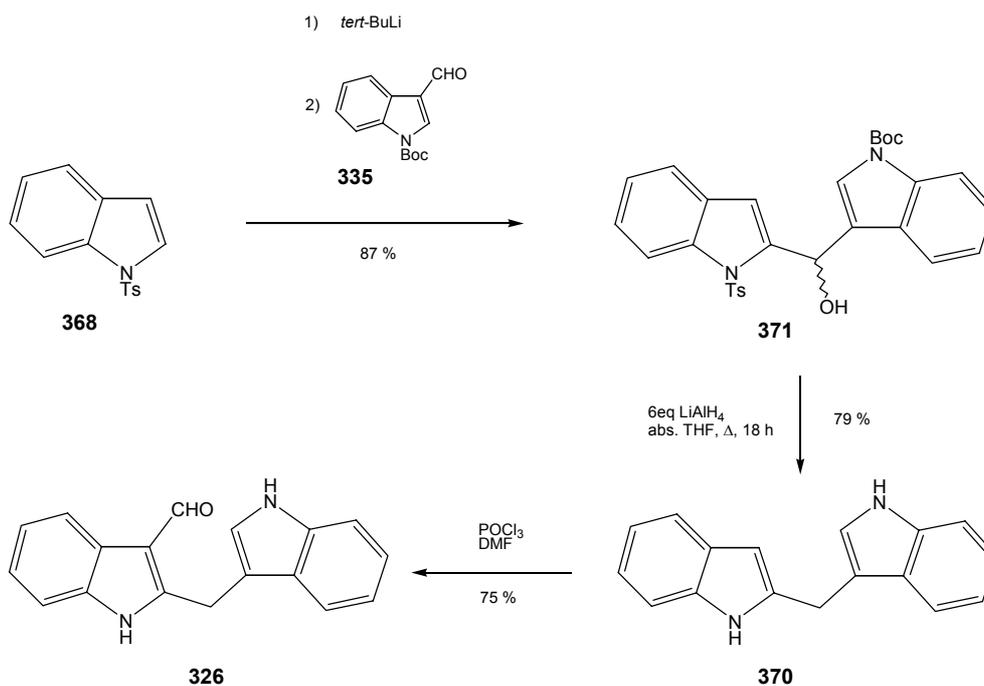
Durch weitere Trennung, wie in Kapitel 5.5 beschrieben, und wiederholte biologische Tests gelingt es, die aktive Komponente zu isolieren und mit Hilfe von NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie zu identifizieren. Bei der wirksamen Verbindung handelt es sich um Malassezin (**326**), das von Wille<sup>[263,264]</sup> aufgeklärt und synthetisiert wurde. Wie in Kapitel 5.4 erwähnt, ist zudem bereits die Aktivität von **326** als Agonist des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AHR) bekannt.

Um den Einfluss auf humane Melanozyten weiter untersuchen zu können, soll synthetisches Malassezin (**326**) zur Verfügung gestellt werden. Die von Wille<sup>[263]</sup> vorgestellte Synthese liefert **326** in 19 % Gesamtausbeute. Dabei erweist sich die gleichzeitige Abspaltung der Schutzgruppen und der Acetoxy-Funktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak als problematisch, da die Ausbeuten stark vom sparsamen Einsatz an Natrium abhängen und sich die Dosierung des Metalls sehr schwierig gestaltet.<sup>[263]</sup>



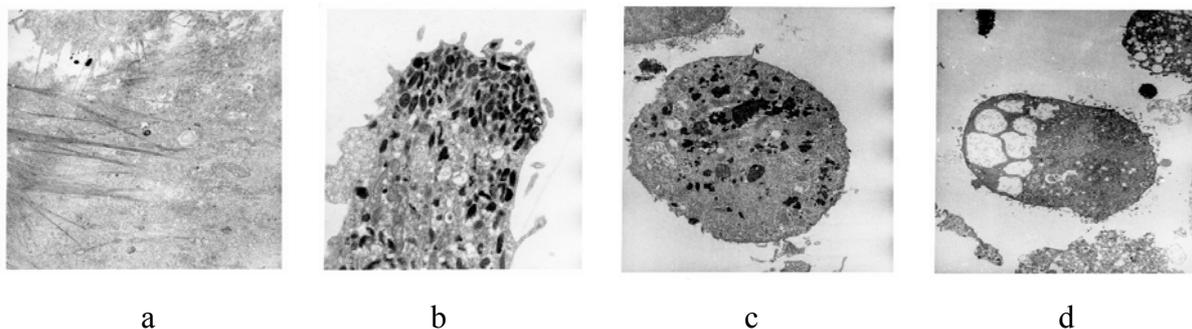
**Abb. 220.** Synthese von Malassezin (**326**) nach Wille<sup>[263]</sup>

Aus diesem Grund wird versucht, eine Alternative zur Entschützung zu finden. Durch eine Methode von Bergman et al.<sup>[272]</sup> gelingt es nicht nur, **370** in 79 % Ausbeute zu erhalten, sondern, auch den zusätzlichen Acylierungsschritt zu **369** einzusparen. Dazu wird der Alkohol **371**, Produkt aus der Kupplung von *N*-(Toluol-4-sulfonyl)indol (**368**) und *N*-Boc-indol-3-carbaldehyd (**335**), mit Lithiumaluminiumhydrid in absolutem Tetrahydrofuran reduziert. Anschließende Vilsmeier-Formylierung, wie bei Wille<sup>[263]</sup> beschrieben, liefert Malassezin (**326**) in 51 % Gesamtausbeute.



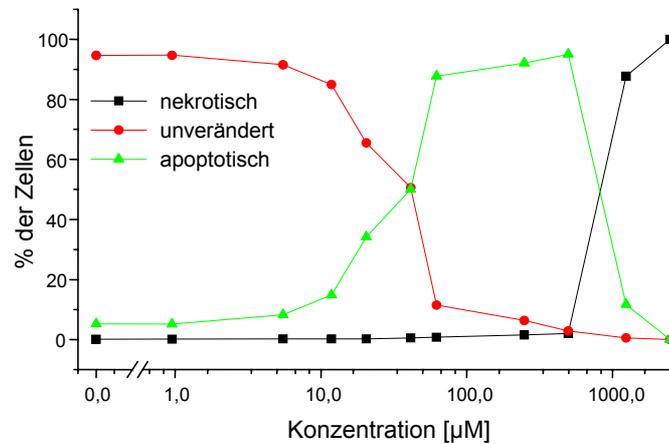
**Abb. 221.** Optimierte Synthese von Malassezin (**326**)

Mit dieser Synthese kann ausreichend Material für weitere biologische Tests zur Verfügung gestellt werden. Das synthetisierte Malassezin (**326**) induziert Apoptose bei Einwirkung auf menschliche Melanozyten-Kulturen. **326** verursacht Veränderung im Cytoskelett der Melanozyten, Reduktion der Melanosomen und Bildung von Vakuolen (Abb. 222).



**Abb. 222.** Aufnahme von unbehandelten Zellen (a und b) und nach Einwirkung von Malassezin (**326**) (c und d)

Dabei zeigen weitere Untersuchungen, dass die Apoptose-Induktion von der Dosierung an **326** abhängt und bei den höchsten Konzentrationen Nekrose zu beobachten ist.



**Abb. 223.** Dosierungsabhängige Apoptose-Induktion (Bestimmung mittels FACS-Analyse, markiert mit Annexin-V-FLUOS und Propidiumiodid)

Es wird vermutet, dass die veränderte Struktur des Cytoskeletts zu Schädigungen im Melanosom-Transport führt und damit an der bei Pityriasis versicolor alba zu beobachtenden Depigmentierung beteiligt ist.

Weitere Versuche zur Apoptose-Induktion befinden sich noch in der Auswertung, haben aber bisher die in diesem Kapitel beschriebenen Erkenntnisse bestätigt.

## IV Experimenteller Teil

### 6 Verwendete Geräte und Materialien

#### 6.1 Physikalische und spektroskopische Methoden

$^1\text{H-NMR-Spektren}$  werden mit den Geräten BRUKER ARX 300 (300.1 MHz), BRUKER AMX 600 (600.2 MHz) der Bruker-Physik AG, Karlsruhe und Varian VXR 400 (399.9 MHz) bei 300 K aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta_{\text{H}}$  wird in ppm angegeben, wobei TMS oder das Signal des Lösungsmittels (Kalibrierungswerte nach Hesse, Meier und Zeeh<sup>[284]</sup>) als interner Standard verwendet wird. Die Multiplizitäten werden mit s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett) oder m (Multipllett) abgekürzt.

$^{13}\text{C-NMR-Spektren}$  werden mit den Geräten BRUKER ARX 300 (75.5 MHz), BRUKER AMX 600 (150.9 MHz) der Bruker-Physik AG, Karlsruhe und Varian VXR 400 (100.6 MHz) gemessen. Die chemische Verschiebung  $\delta_{\text{C}}$  wird bezogen auf TMS bzw. auf das Lösungsmittel als interner Standard in ppm angegeben.<sup>[284]</sup>

$^{15}\text{N-NMR-Spektren}$  werden mit dem BRUKER-Gerät AMX 600 (60.8 MHz) aufgenommen. Die Kalibrierung erfolgt mit Benzamid ( $\delta_{\text{N}} = 73.6$ ) als externen Standard, so dass Ammoniumchlorid der Nullpunkt der Verschiebungsskala ist.

*Zweidimensionale NMR-Spektren* werden ebenfalls mit den Geräten BRUKER ARX 300 (300.1 MHz) und AMX 600 (600.2 MHz) der Bruker-Physik AG, Karlsruhe, gemessen.

*IR-Spektren* werden mit einem Perkin-Elmer FT 1000 Fourier-Spektrometer (Fa. Perkin-Elmer, Worwork, USA), einem Bruker IFS 45 Fourier-Spektrometer oder einem Perkin-Elmer 1420 Ratio Recording Infrared Spectrometer aufgenommen. Die Substanzen werden als KBr-Preßlinge im Bereich von 4000 bis 400  $\text{cm}^{-1}$  gemessen. Die Intensitäten der Banden werden als s (stark, < 30% Transmittance), m (mittel, 30-65% Transmittance), w (schwach, > 65% Transmittance), br (breit) und sh (Schulter) angegeben.

Die Aufnahme der *UV/VIS-Spektren* erfolgt mit einem Perkin-Elmer Lambda 16 oder einem HP 8452 A Dioden Array Spectrometer der Firma Hewlett Packard bei Raumtemperatur in 1 cm Standard-Quarzküvetten. Die Absorptionsmaxima werden in nm angegeben. Qualitative Spektren werden mit dem HPLC Photodiode Array Detector 990+ (Fa. Waters) gemessen.

*Optische Drehwerte* werden mit dem Perkin-Elmer 241 Polarimeter mit Natriumdampfampe als Lichtquelle bestimmt. Angegeben werden die Temperatur, das Lösungsmittel sowie die Konzentration  $c$  in g/100 ml.

*Massenspektren* werden an den Geräten Finnigan MAT 90 und Finnigan MAT 95 Q aufgenommen. Im EI- und im CI-Modus werden ein Elektronenstrahl mit einer Energie von 70 eV und eine Quellentemperatur von 200 °C verwendet. Für CI dient Isobutan als Reaktandgas mit einem Quellenaußendruck von  $4 \times 10^{-4}$  bar. EI- und CI-Proben werden auf einen Platinfaden aufgetragen und mit einer Rate von 60 °C/min von 20 °C bis 800 °C geheizt. GC/EI-MS wird an einem direkt gekoppelten Varian 3400 Gaschromatographen (Firma Varian, Darmstadt) mit split-splitlos Injektor und Autosampler A200S durchgeführt. Als Trägergas wird Helium mit einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die Injektortemperatur beträgt 300 °C. Es werden jeweils 0.2 bis 1 µl Probenlösung injiziert. FAB-Proben werden auf einem Stahl-Target in *m*-Nitrobenzylalkohol-, Glycerin- oder Thioglycerin-Matrix gelöst und mit einer 8 kV Argon-Kanone (Finnigan MAT 90) oder mit einer 20 kV Cäsium-Kanone (Finnigan MAT 95 Q) ionisiert. ESI-MS wird mit einem quellengekoppelten API-Interface II der Firma Finnigan mit ESI- und APCI-Kopf durchgeführt. Die Spraykapillarspannung beträgt 3 kV und die Heizkapillarentemperatur 250 °C. Als Lösungsmittel werden Methanol und Methanol/Wasser 9/1 mit einem Fluß von 10 µl/min und einem Sheathgasdruck von 5 psi Stickstoff verwendet.

Für ESI- und APCI-MS im Arbeitskreis Prof. M. Spiteller, Universität Dortmund, wird ein Triplequadrupol-Massenspektrometer Finnigan TSQ 7000 verwendet. Der Massenbereich erstreckt sich von  $m/z = 50$  bis 800. Im APCI-Modus wird eine APCI2-Ionenquelle mit 4.5 kV Ionisationsspannung, einer Kapillartemperatur von 180 °C und einer Verdampfungstemperatur von 450 °C eingesetzt. Als Schießgas wird Stickstoff mit 40 psi verwendet. Für MS/MS-Messungen dient Argon mit einem Druck von 2.0 Torr als Stoßgas. Zur Aufnahme von LC/APCI- bzw. LC/ESI-Spektren wird das Massenspektrometer mit einer Dionex-HPLC mit RP-18-Säule der Firma Machery & Nagel (Nucleosil, 250 × 2 mm, Porengröße 5 µm) gekoppelt. Die Flussrate beträgt 250 µl, die Temperatur 35 °C.

*Schmelzpunkte* werden mit einem Leica Galen III Mikroheiztisch bestimmt. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

*Elementaranalysen* werden in den Mikroanalytischen Laboratorien des Departments für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Die Durchführung der *Atomabsorptionsspektroskopie* erfolgt im AAS-Labor des Departments für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München

## 6.2 Chromatographische Methoden

*Analytische Dünnschichtchromatographie* wird auf DC Alufolien der Firma Merck, Kieselgel 60 F<sub>254</sub> oder RP-18, durchgeführt. Angegeben werden die  $R_f$ -Werte und das entsprechende Laufmittel. Die Detektion erfolgt bei 254 nm (Fluoreszenzlöschung) bzw. 366 nm (Fluoreszenzanregung).

*Säulenchromatographie* erfolgt in zylindrischen Glassäulen mit G3-Keramikfritten. Für die Gelchromatographie wird Sephadex<sup>®</sup> LH-20 der Firma Pharmacia verwendet. Flash-Chromatographie wird an Kieselgel bzw. RP-18 (Lichroprep<sup>®</sup>) der Fa. Merck (Korngröße 40-63  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt.

*Analytische HPLC* wird an zwei Anlagen der Firma Waters durchgeführt. Eine Anlage besteht aus zwei Pumpen Waters 510, einem Autosampler Waters 717 plus (10 °C), einem Säulenofen K5 (Fa. Techlab, Erkerode; 20 °C) und einem Photodioden-Array-Detektor 996. Bei der zweiten Anlage handelt es sich um eine Waters Alliance<sup>™</sup> mit Waters 2690 Separations Module und ebenfalls einem Photodioden-Array-Detektor 996. Beide Anlagen werden durch einen Rechner mit Millennium 32 Software gesteuert.

Es werden folgende Systeme verwendet:

System 1: Säulenmaterial: Nucleosil 100 C18, 5  $\mu$ m  
Säulendimension: 4  $\times$  250 mm (Fa. Knauer), Nr. 98  
Laufmittel A: Acetonitril/Wasser (1/9) + 0.1 % TFA  
Laufmittel B: Acetonitril  
Gradient: Start: 100 % A, 0 % B; 25 min: 50 % A, 50 % B.  
Flußrate: 1.00 ml/min

System 2: Säulenmaterial: Nucleosil 100 C18, 5  $\mu$ m  
Säulendimension: 4  $\times$  250 mm (Fa. Knauer), Nr. 97  
Laufmittel A: Acetonitril/Wasser (1/9) + 0.1 % TFA  
Laufmittel B: Acetonitril  
Gradient: Start: 100 % A, 0 % B; 50 min: 0 % A, 100 % B.  
Flußrate: 1.00 ml/min

System 3: Säulenmaterial: Nucleosil 100 C18, 5  $\mu$ m  
Säulendimension: 4  $\times$  250 mm (Fa. Knauer), Nr. 98  
Laufmittel A: Acetonitril/Wasser (1/9) + 0.25 % TFA  
Laufmittel B: Acetonitril  
Gradient: Start: 100 % A, 0 % B; 25 min: 50 % A, 50 % B.  
Flußrate: 1.00 ml/min

System 4: Säulenmaterial: Nucleosil 100 C18, 5  $\mu$ m  
Säulendimension: 4  $\times$  250 mm (Fa. Knauer), Nr. 98  
Laufmittel A: Acetonitril/Wasser (1/9)  
Laufmittel B: Acetonitril  
Gradient: Start: 100 % A, 0 % B; 25 min: 50 % A, 50 % B.  
Flußrate: 1.00 ml/min

*Präparative HPLC* wird an einer Anlage der Firma Merck Hitachi bestehend aus einer L-6200 Intelligent Pump, einem 655A Variable Wavelength UV Monitor und einem D-7500 Integrator durchgeführt.

Es werden folgende Trennsysteme verwendet:

System 5: Säulenmaterial: Nucleosil 100 C18, 7  $\mu$ m

Säulendimension: 20  $\times$  250 mm (Fa. Knauer), Nr. 100

Laufmittel A: Acetonitril/Wasser (1/9) + 0.1 % TFA

Laufmittel B: Acetonitril

Gradient: Start: 100% A, 0% B; 30 min: 50% A, 50% B;  
55 min: 50% B.

Flußrate: 6.75 ml/min

System 6: Säulenmaterial: Nucleosil 100 C18, 7  $\mu$ m

Säulendimension: 16  $\times$  250 mm (Fa. Macherey-Nagel), Nr. 110

Laufmittel A: Acetonitril/Wasser (1/9) + 0.25 % TFA

Laufmittel B: Acetonitril

Gradient: Start: 100 % A, 0 % B; 35 min: 50 % A, 50 % B.

Flußrate: 5.00 ml/min

System 7: Säulenmaterial: Nucleosil 100 C18, 7  $\mu$ m

Säulendimension: 16  $\times$  250 mm (Fa. Macherey-Nagel), Nr. 110

Laufmittel A: Acetonitril/Wasser (1/9) + 0.25 % TFA

Laufmittel B: Acetonitril

Gradient: Start: 100 % A, 0 % B; 40 min: 35 % A, 65 % B.

Flußrate: 5.00 ml/min

System 8: Säulenmaterial: Nucleosil 100 C18, 7  $\mu$ m

Säulendimension: 16  $\times$  250 mm ( Fa. Macherey-Nagel), Nr. 110

Laufmittel A: Acetonitril/Wasser (1/9) + 0.25 % TFA

Laufmittel B: Acetonitril

Gradient: Start: 100 % A, 0 % B; 25 min: 50 % A, 50 % B.

Flußrate: 5.00 ml/min

Es werden HPLC-grade Lösungsmittel (Fa. Acros Organics, Geel/ Belgien bzw. Fa. Merck, Darmstadt) verwendet, die vor Gebrauch filtriert und entgast werden. Wasser wird mit der

Reinstwasseranlage Milli-Qplus der Firma Millipore aufbereitet. Zur Probenvorbereitung erfolgt eine Festphasenextraktion an C-18-Chromabond-Kartuschen.

Die angegebenen Retentionszeiten  $R_t$  sind Richtwerte, da Druck- und Temperaturschwankungen sich auf die Trenneigenschaften der HPLC-Systeme auswirken.

### 6.3 Allgemeine Arbeitsmethoden

Feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen werden unter Argon in Glasapparaturen durchgeführt, die vorher im Vakuum mit einem Heißluftfön ausgeheizt werden.

Abs. Methylenchlorid wird von Sicapent<sup>®</sup> (Fa. Merck) und abs. Tetrahydrofuran von Kalium abdestilliert.

Lösungsmittel für Extraktion und Chromatographie werden vorher durch Destillation gereinigt.

## 7 Experimentelle Daten zu *Austroboletus gracilis*

### 7.1 Pilzmaterial

Die folgenden aufgeführten Kollektionen wurden auf Pilzexkursionen in den Jahren 1994, 1996, 1997 und 1999 im Osten der Vereinigten Staaten in Maine, der Umgebung von Boston, Massachusetts, bzw. in den Highlands, North Carolina, gesammelt. Die Fruchtkörper wurden luftgetrocknet und bis zur Extraktion bei Raumtemperatur aufbewahrt.

USA 57/94 Aug. 94 Highlands, NC, leg./det. Steglich et al.

USA 117/94 Aug. 94 Highlands, NC, leg./det. Steglich et al.

USA 80/96 Aug. 96 Standing Indian, Macon Ct., NC, leg./det. Arnold et al.

USA 165/96 Sep. 96 Blue Valley, Macon Ct., NC, leg./det. Arnold et al.

USA 72/97 Aug. 97 Rt 711, Nantahala Lake, Macon Ct., NC, leg./det. Arnold et al.

USA 157/97 Aug. 97 Park Creek Trail, Macon Ct., NC, leg./det. Arnold et al.

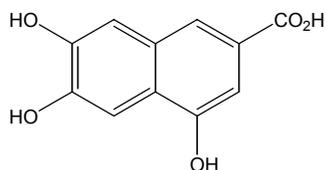
USA 49/99 Aug. 99 White Mts, Maine, leg./det. Arnold et al.

## 7.2 Gewinnung der Rohextrakte

Die luftgetrockneten Fruchtkörper werden pulverisiert und mit Petrolether entfettet. Anschließend extrahiert man das Pilzmaterial erschöpfend mit entgastem Methanol im Ultraschallbad unter Argonatmosphäre. Die Extrakte werden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rohextrakt wird zuerst zwischen Wasser und Essigsäureethylester verteilt, die organische Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend extrahiert man die Wasserphase mit 2-Butanol und befreit die organische Phase vom Lösungsmittel. Die weitere Trennung der erhaltenen Rückstände erfolgt nach Festphasenextraktion an RP-18-Kartuschen (Chromabond, 100 bzw. 500 mg, Macherey & Nagel) über präparative HPLC an RP-18 mit Wasser/Acetonitril und Zusatz von 0.1 % Trifluoressigsäure (System 5). Die dabei erhaltenen Fraktionen werden lyophilisiert.

## 7.3 Charakterisierung der isolierten Inhaltsstoffe aus *A. gracilis*

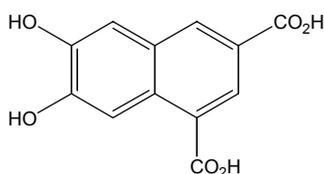
### 7.3.1 Austrogracilin A (77, 4,6,7-Trihydroxy-2-naphthoesäure)



Ausbeute	14.0 mg (ca. 0.14 % des Trockengewichtes)
Schmp.	Zersetzung > 190 °C
$R_f$ -Wert	0.33 ( $\text{SiO}_2$ , Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3) 0.70 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)
$R_t$ -Wert	(HPLC): 10.0 min (System 1) (HPLC): 13.6 min (System 2)
UV	( $\text{CH}_3\text{OH}$ ): $\lambda_{\text{max}}$ (log $\epsilon$ ) = 205 nm (sh, 3.74), 229 nm (4.04), 261 nm (4.20), 266 nm (sh, 4.19), 307 nm (3.53), 316 nm (sh, 3.51), 349 nm (sh, 2.87).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3392 (s, br), 2926 (m), 2854 (m), 1686 (s), 1632 (m), 1617 (m), 1594 (m), 1540 (m), 1499 (m), 1410 (s), 1243 (s), 1201 (s), 1159 (m), 1108 (m), 1056 (m), 956 (w), 894 (m), 866 (m), 775 (m), 717 (m), 626 (m).

$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ): $\delta$ [ppm] = 7.19 (s, 1 H, CH), 7.20 (d, 1 H, $J = 1.4$ Hz, CH), 7.52 (s, br, 1 H, CH), 7.88 (s, br, 1 H, CH).
$^{13}\text{C-NMR}$	(151 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ): $\delta$ [ppm] = 106.2 (CH), 106.3 (CH), 112.2 (CH), 122.5 (CH), 125.0 ( $\text{C}_q$ ), 127.2 ( $\text{C}_q$ ), 131.5 ( $\text{C}_q$ ), 149.0 ( $\text{C}_q$ ), 149.5 ( $\text{C}_q$ ), 153.6 ( $\text{C}_q$ ), 171.4 ( $\text{C}_q$ ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 220 [ $[\text{M}]^+$ , 100], 203 [10], 191 [6], 175 [12], 163 [4], 147 [11].
HR-EI-MS	für $[\text{M}]^+$ ber.: 220.0372, gef.: 220.0369.
Summenformel	$\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_5$ ( $M = 220.18$ g/mol)

### 7.3.2 Austrogracilin B (114, 6,7-Dihydroxy-2,4-naphthalindicarbonsäure)

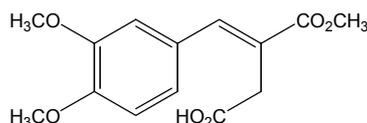


Ausbeute	15.0 mg (ca. 0.15 % des Trockengewichtes)
Schmp.	Zersetzung > 250 °C
$R_f$ -Wert	0.26 ( $\text{SiO}_2$ , Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3) 0.75 (RP-18, $\text{CH}_3\text{OH} + 2$ Tropfen TFA)
$R_t$ -Wert	(HPLC): 11.2 min (System 1)
UV	( $\text{CH}_3\text{OH}$ ): $\lambda_{\text{max}}$ ( $\log \epsilon$ ) = 205 nm (sh, 4.27), 208 nm (sh, 4.30), 214 nm (sh, 4.32), 221 nm (4.35), 261 nm (4.63), 323 nm (3.91), 348 nm (sh, 3.81).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3458 (s), 3233 (m), 1687 (s), 1642 (m), 1534 (m), 1477 (m), 1432 (m), 1382 (m), 1254 (s), 1229 (m), 1200 (m), 1144 (m), 1010 (w), 923 (w), 871 (m), 794 (w), 766 (w), 736 (w), 671 (w), 657 (w), 626 (m), 593 (w), 554 (w).
$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ): $\delta$ [ppm] = 7.33 (s, 1 H, CH), 8.43 (s, br, 1 H, CH), 8.52 (s, br, 1 H, CH), 8.60 (d, 1 H, $J = 1.3$ Hz, CH). (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ): $\delta$ [ppm] = 7.35 (s, 1 H, CH), 8.33 (s, 1 H, CH), 8.38 (d, $J = 1.6$ Hz, 1 H, CH), 8.44 (d, br, $J = 0.8$ Hz, 1 H, CH), 9.82 (s, br, 1 H, OH), 10.29 (s, br, 1 H, OH), 12.92 (s, br, 2 H, $2 \times \text{CO}_2\text{H}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR	(151 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ): $\delta$ [ppm] = 109.9 (CH), 112.8 (CH), 125.5 ( $\text{C}_q$ ), 127.1 ( $\text{C}_q$ ), 129.0 (CH), 131.3 ( $\text{C}_q$ ), 131.7 ( $\text{C}_q$ ), 135.0 (CH), 148.8 ( $\text{C}_q$ ), 152.0 ( $\text{C}_q$ ), 170.1 ( $\text{C}_q$ ), 171.2 ( $\text{C}_q$ ).
(-)-ESI-MS	$m/z$ [%] = 495 $[[2\text{M}-\text{H}]^-]$ , 58], 247 $[[\text{M}-\text{H}]^-]$ , 100].
HR-(-)-ESI-MS	für $[\text{M}-\text{H}]^-$ ber.: 247.0243, gef.: 247.0243.
Summenformel	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_6$ ( $M = 248.19$ g/mol)

## 7.4 Synthesevorschriften und experimentelle Daten zur Synthese von Austrogracilin A (77)

### 7.4.1 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-methoxycarbonylbut-3-en-carbonsäure (108)<sup>[76]</sup>

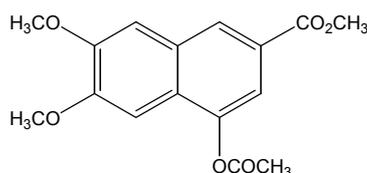


Zu einer siedenden Lösung von 4.54 g (84.0 mmol) Natriummethanolat in 70.0 ml Methanol fügt man 11.6 g (70.0 mmol) 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (**106**) und 10.2 g (70.0 mmol) Bernsteinsäuredimethylester (**107**) hinzu. Das Reaktionsgemisch wird 1.5 h unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit verdünnter HCl angesäuert, im Vakuum aufkonzentriert und zweimal mit je 100 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die verbliebene Wasserphase wird verworfen. Die Etherphase extrahiert man mit wäßriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (3 x 50.0 ml). Nach Ansäuern der  $\text{NaHCO}_3$ -Phase mit konz. HCl und Ausschütteln mit Chloroform wird die organische Phase über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Chloroform im Vakuum entfernt. Man erhält einen gelben Feststoff. Umkristallisation aus Methanol ergibt gelbe Prismen.

Ausbeute	10.2 g (52 %, Lit. <sup>[76]</sup> 48 %) gelber Feststoff
Schmp.	149 °C (Lit. <sup>[76]</sup> 149–150 °C)
$R_f$ -Wert	0.37 ( $\text{SiO}_2$ , Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3)

$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ [ppm] = 3.64 (s, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 3.85 (s, 3 H, $\text{CH}_3$ ), 3.89 (s, 3 H, $\text{CH}_3$ ), 3.91 (s, 3 H, $\text{CH}_3$ ), 6.91 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, CH), 6.98 (s, 1 H, CH), 7.01 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, CH), 7.87 (s, 1 H, CH), 9.85 (s, 1 H, $\text{CO}_2\text{H}$ ).
$^{13}\text{C-NMR}$	(75.5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ [ppm] = 34.3 ( $\text{CH}_2$ ), 52.8 ( $\text{CH}_3$ ), 56.3 ( $2 \times \text{CH}_3$ ), 111.5 (CH), 112.7 (CH), 123.2 (CH), 123.4 ( $\text{C}_q$ ), 127.7 ( $\text{C}_q$ ), 143.1 (CH), 149.4 ( $\text{C}_q$ ), 150.4 ( $\text{C}_q$ ), 168.9 ( $\text{C}_q$ ), 176.8 ( $\text{C}_q$ ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 281 [ $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 11], 280 [ $[\text{M}]^+$ , 77], 262 [11], 236 [59], 176 [100], 161 [41].
EA	ber. [%]: C 60.00 H 5.75 gef. [%]: C 60.14 H 5.89
Summenformel	$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_6$ ( $M = 280.27$ g/mol)

#### 7.4.2 4-Acetoxy-6,7-dimethoxy-2-naphthoesäuremethylester (112)

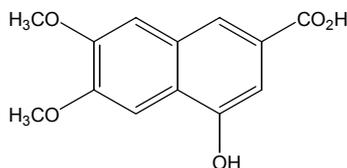


5.74 g (20.5 mmol) 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-methoxycarbonyl-but-3-en-carbonsäure (**108**), 2.18 g (26.6 mmol) Natriumacetat und 6.28 g (61.5 mmol, 5.81 ml) Acetanhydrid werden für 2.5 Stunden auf 120 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur nimmt man das Reaktionsgemisch in Wasser auf, schüttelt mit Essigsäureethylester aus und wäscht die organische Phase mit wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung. Die EE-Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält einen beigefarbenen Feststoff, der aus Methanol umkristallisiert wird.

Ausbeute	5.98 g (96 %) beigefarbener Feststoff
Schmp.	137–138 °C
$R_f$ -Wert	0.61 ( $\text{SiO}_2$ , Petrolether/Essigsäureethylester 1/1)
UV	( $\text{CHCl}_3$ ): $\lambda_{\text{max}}$ ( $\log \epsilon$ ) = 251 nm (4.73), 258 nm (4.76), 302 nm (4.05), 323 nm (sh, 3.53), 339 nm (sh, 3.17).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3431 (br), 3148 (w), 3072 (w), 3002 (m), 2961 (m), 2835 (m), 1758 (s), 1712 (s), 1626 (s), 1610 (m), 1582 (m), 1511 (s), 1487 (s), 1466 (s), 1435 (s), 1398 (m), 1370 (s), 1318 (s), 1282 (s), 1267 (s), 1245 (s),

	1229 (s), 1213 (s), 1162 (s), 1101 (s), 1072 (m), 1035 (m), 1010 (s), 988 (m), 924 (m), 899 (m), 886 (m), 868 (m), 847 (m), 790 (m), 772 (s), 752 (m), 700 (w), 661 (w), 599 (w), 552 (m), 530 (m), 506 (w), 413 (m).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ [ppm] = 2.46 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 3.94 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 3.99 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 4.01 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 7.08 (s, 1 H, CH), 7.22 (s, 1 H, CH), 7.70 (d, 1 H, <i>J</i> = 1.6 Hz, CH), 8.34 (s, br, 1 H, CH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ [ppm] = 20.9 (CH <sub>3</sub> ), 52.1 (CH <sub>3</sub> ), 55.8 (CH <sub>3</sub> ), 55.9 (CH <sub>3</sub> ), 99.7 (CH), 107.6 (CH), 116.3 (CH), 125.1 (C <sub>q</sub> ), 125.6 (C <sub>q</sub> ), 127.0 (CH), 129.7 (C <sub>q</sub> ), 145.4 (C <sub>q</sub> ), 150.4 (C <sub>q</sub> ), 151.8 (C <sub>q</sub> ), 166.6 (C <sub>q</sub> ), 169.1 (C <sub>q</sub> ).
EI-MS	<i>m/z</i> [%] = 304 [[M] <sup>+</sup> , 16], 262 [100], 231 [11], 203 [5], 160 [2], 131 [2].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 304.0947, gef.: 304.0952.
EA	ber. [%]: C 63.15 H 5.30 gef. [%]: C 63.08 H 5.21
Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> (M = 304.29 g/mol)

#### 7.4.3 4-Hydroxy-6,7-dimethoxy-2-naphthoesäure (113)

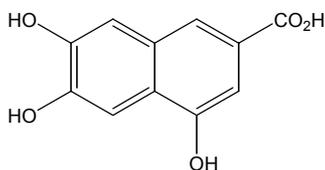


1.00 g (3.29 mmol) 4-Acetoxy-6,7-dimethoxy-2-naphthoesäuremethylester (**112**) in 40.0 ml THF und 1.29 g (23.0 mmol) KOH in 15 ml Wasser werden vier Stunden refluxiert. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch in Wasser aufgenommen und gegen Ether ausgeschüttelt. Die Wasserphase wird mit 2N HCl angesäuert, wobei ein Feststoff ausfällt. Man extrahiert mit Essigsäureethylester, trocknet die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das Produkt wird aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute	815 mg (quant.) beigefarbener Feststoff
Schmp.	Zersetzung > 195 °C
R <sub>F</sub> -Wert	0.52 (SiO <sub>2</sub> , Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): λ <sub>max</sub> (log ε) = 228 nm (4.42), 257 nm (4.56), 264 nm (4.55), 288 nm (sh, 3.87), 300 nm (3.95), 308 nm (sh, 3.91), 347 (sh, 3.41).

IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3436 (s), 3078 (m), 3002 (m), 2970 (m), 2837 (m), 2638 (m), 1678 (s), 1627 (m), 1610 (m), 1588 (m), 1497 (s), 1440 (s), 1420 (s), 1367 (m), 1301 (m), 1259 (s), 1210 (s), 1163 (s), 1107 (m), 1069 (w), 1033 (w), 999 (m), 958 (m), 885 (m), 861 (m), 775 (m), 754 (w), 726 (m), 710 (w), 677 (w), 647 (w), 583 (w), 544 (m), 446 (w), 408 (w).
$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ): $\delta$ [ppm] = 3.87 (s, 3 H, $\text{CH}_3$ ), 3.89 (s, 3 H, $\text{CH}_3$ ), 7.25 (d, 1 H, $J = 1.6$ Hz, CH), 7.40 (s, 1 H, CH), 7.42 (s, 1 H, CH), 7.92 (s, br, 1 H, CH), 10.22 (s, 1 H, OH).
$^{13}\text{C-NMR}$	(75.5 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ): $\delta$ [ppm] = 55.6 ( $\text{CH}_3$ ), 55.7 ( $\text{CH}_3$ ), 101.0 (CH), 106.1 (CH), 108.0 (CH), 120.3 (CH), 122.5 ( $\text{C}_q$ ), 126.8 ( $\text{C}_q$ ), 129.6 ( $\text{C}_q$ ), 150.1 ( $\text{C}_q$ ), 150.4 ( $\text{C}_q$ ), 152.3 ( $\text{C}_q$ ), 168.1 ( $\text{C}_q$ ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 248 [ $[\text{M}]^+$ , 100], 205 [14], 175 [6], 162 [8], 105 [2], 89 [2].
HR-EI-MS	für $[\text{M}]^+$ ber.: 248.0685, gef.: 248.0688.
Summenformel	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_5$ ( $M = 248.23$ g/mol)

#### 7.4.4 4,6,7-Trihydroxy-2-naphthoesäure (77, Austrogracilin A synthetisch)



497 mg (2.00 mmol) 4-Hydroxy-6,7-dimethoxy-2-naphthoesäure (**113**) werden in 20.0 ml abs. Dichlormethan suspendiert. Bei  $-78$  °C gibt man eine Lösung aus 1.50 g (6.00 mmol, 577  $\mu\text{l}$ ) Bortribromid und 10.0 ml abs. Dichlormethan zu, läßt 30 Minuten rühren und dann innerhalb von 12 Stunden auf Raumtemperatur kommen. Die Reaktionslösung wird mit Wasser gequench, die wässrige Phase abgetrennt und mit 2-Butanol ausgeschüttelt. Aus der organischen Phase wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der resultierende braune Feststoff wird mittels präparativer HPLC an RP-18 (System 5) gereinigt. Man erhält ein farbloses Produkt, das sich schnell braun färbt.

Ausbeute	400 mg (91 %) farbloser Feststoff
Schmp.	Zersetzung $> 190$ °C
$R_f$ -Wert	0.33 ( $\text{SiO}_2$ , Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3)
$R_t$ -Wert	(HPLC): 13.6 min (System 2)

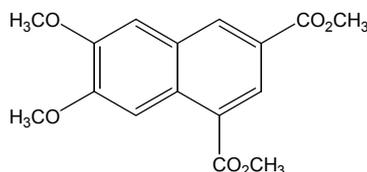
$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ): $\delta$ [ppm] = 7.19 (s, 1 H, CH), 7.20 (d, 1 H, $J = 1.4$ Hz, CH), 7.52 (s, br, 1 H, CH), 7.88 (s, br, 1 H, CH).
$^{13}\text{C-NMR}$	(151 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ): $\delta$ [ppm] = 106.2 (CH), 106.3 (CH), 112.2 (CH), 122.5 (CH), 125.0 ( $\text{C}_q$ ), 127.2 ( $\text{C}_q$ ), 131.5 ( $\text{C}_q$ ), 149.0 ( $\text{C}_q$ ), 149.5 ( $\text{C}_q$ ), 153.6 ( $\text{C}_q$ ), 171.4 ( $\text{C}_q$ ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 220 [ $[\text{M}]^+$ , 100], 203 [10], 191 [6], 175 [12], 163 [4], 147 [11].
HR-EI-MS	für $[\text{M}]^+$ ber.: 220.0372, gef.: 220.0388.
Summenformel	$\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_5$ ( $M = 220.18$ g/mol)

## 7.5 Derivatisierung von Austrogracilin B (114)

### 7.5.1 Methylierung mit Diazomethan

Eine Lösung aus 5.00 mg (0.02 mmol) Austrogracilin B (**114**) in 5.00 ml Methanol wird mit einer Spatelspitze Kieselgel versetzt und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren gibt man so lange etherische Diazomethanlösung hinzu, bis man keine Gasentwicklung mehr beobachtet. Man rührt anschließend noch 30 Minuten, lässt die Reaktionslösung auf Raumtemperatur kommen, zerstört das überschüssige Diazomethan mit Eisessig und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird zwischen Wasser und Essigsäureethylester verteilt, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Man reinigt das Rohprodukt dünnschichtchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 1/1. Das Produkt wird als farbloser Feststoff erhalten.

### 7.5.2 6,7-Dimethoxy-2,4-naphthalindicarbonsäuredimethylester (115)



Ausbeute	5.00 mg (82 %) farbloser Feststoff
Schmp.	159–161 °C
$R_f$ -Wert	0.76 ( $\text{SiO}_2$ , Petrolether/Essigsäureethylester 1/1)

---

UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 210 nm (4.33), 219 nm (4.34), 262 nm (4.59), 318 nm (3.90), 333 nm (sh, 3.83), 352 nm (sh, 3.68).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3436 (s), 2962 (m), 2924 (m), 2854 (m), 1708 (s), 1624 (m), 1580 (m), 1509 (m), 1484 (m), 1434 (m), 1375 (m), 1332 (m), 1295 (m), 1262 (m), 1195 (m), 1141 (m), 1105 (s), 1029 (s), 1013 (m), 993 (m), 906 (w), 867 (m), 861 (m), 801 (m), 765 (m), 709 (m), 573 (w).
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ [ppm] = 3.99 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 4.01 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 4.03 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 4.08 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 7.24 (s, 1 H, CH), 8.55 (s, 1 H, CH), 8.61 (d, $J$ = 1.6 Hz, 1 H, CH), 8.71 (d, 1 H, $J$ = 1.6 Hz, CH).
<sup>13</sup> C-NMR	(151 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ [ppm] = 52.2 (CH <sub>3</sub> ), 52.3 (CH <sub>3</sub> ), 55.9 (CH <sub>3</sub> ), 56.1 (CH <sub>3</sub> ), 104.9 (CH), 107.8 (CH), 124.5 (C <sub>q</sub> ), 124.8 (C <sub>q</sub> ), 128.5 (CH), 129.5 (C <sub>q</sub> ), 130.5 (C <sub>q</sub> ), 134.0 (CH), 150.0 (C <sub>q</sub> ), 152.9 (C <sub>q</sub> ), 166.7 (C <sub>q</sub> ), 167.7 (C <sub>q</sub> ).
GC/EI-MS	$m/z$ [%] = 304 [[M] <sup>+</sup> , 100], 273 [50], 230 [12].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 304.0947, gef.: 304.0936.
Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> (M = 304.29 g/mol)

## 7.6 Verfütterungsexperimente

Die Verfütterungsexperimente wurden im August 1999 während einer Pilzexkursion in den White Mountains, Langdon Brouk, USA durchgeführt. Dazu wurden die markierten Substanzen in Wasser gelöst und mit Einmalspritzen (1 ml) in den Pilzhut und in den -stiel injiziert. Die Ernte der Fruchtkörper erfolgte nach vier Tagen.

Zur Isolierung der Inhaltsstoffe entfettete man die fein gemahlene, luftgetrocknete Fruchtkörper zuerst mit Petrolether und extrahierte anschließend erschöpfend mit Methanol. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rohextrakt zwischen Wasser und Essigsäureethylester verteilt und die EE-Phase über Natriumsulfat getrocknet. Durch HPL-Chromatographie an RP-18 (System 5) isolierte man reine Verbindungen (Tabelle 12), die NMR-spektroskopisch untersucht wurden.

**Tab. 12.** Verimpfungsexperimente an *A. gracilis*

verimpfte Verbindung	eingesetzte Masse	Trockenpilz- masse	Isolierte Substanzen Austrogracilin A/B	Einbau
[1,2- <sup>13</sup> C]Natriumacetat	16 mg	1.30 g	2 mg/1 mg	–
[1- <sup>13</sup> C]Natriumacetat	19 mg	1.24 g	1 mg/1 mg	–

## 8 Experimentelle Daten zu *Leucocoprinus birnbaumii*

### 8.1 Pilzmaterial

Die unten aufgeführten Kollektionen stammen aus Blumentöpfen bzw. Gewächshäusern des Botanischen Gartens München, des Chemischen Instituts der Universität München, eines Forschungslabors der Bayer AG in Wuppertal und verschiedener Privathaushalte. Oftmals handelte es sich bei den Kollektionen um einzelne Fruchtkörper. In den meisten Fällen wurden die Pilze sofort in Methanol eingelegt und möglichst schnell weiter verarbeitet. Stand kein Methanol zur Verfügung, wurden die Fruchtkörper luft- oder gefriergetrocknet bzw. tiefgefroren. Auch getrocknete Fruchtkörper wurden schnell extrahiert, da eine Verblässung der Farbe zu beobachten war.

01/2000	01.08.00	Chemieinstitut, LMU, Ficus-Pflanze
32/2000	16.08.00	Chemieinstitut, LMU, Ficus-Pflanze
36/2000	18.09.00	Chemieinstitut, LMU, Ficus-Pflanze
01/2001	12.06.01	Chemieinstitut, LMU, Schwertfarn
02/2001	27.06.01	Chemieinstitut, LMU, Grönlilie
03/2001	12.07.01	Chemieinstitut, LMU, Grönlilie
05/2001	08.08.01	Privathaushalt, Palme
06/2001	29.08.01	Chemieinstitut, LMU, Grönlilie
07/2001	04.09.01	getrocknet, Bayer AG, F. v. Nussbaum
11/2001	18.09.01	Ficus-Pflanze, Griechenland, T. Hübscher
01/2002	25.03.02	Botanischer Garten München, Gewächshaus
02/2002	17.05.02	Botanischer Garten München, Gewächshaus
03/2002	05.07.02	Botanischer Garten München, Gewächshaus
04/2002	15.07.02	Chemieinstitut, LMU, Begonie

07/2002	17.09.02	Botanischer Garten München, Gewächshaus
08/2002	17.09.02	Privathaushalt, Kaktus, M. Winner

## 8.2 Atomabsorptionsspektroskopie der getrockneten Fruchtkörper

Angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen aus getrocknetem Pilzmaterial in mg/g Festsubstanz.

**Tab. 13.** Metallgehalt in getrockneten Fruchtkörpern von *L. birnbaumii*

Al	B	Ca	Cu	Fe	K	Li	Mg	Mn	Na	Zn
0.017	0.009	0.340	0.079	0.090	46.6	0.005	1.51	0.013	15.0	0.081

## 8.3 Gewinnung der Rohextrakte

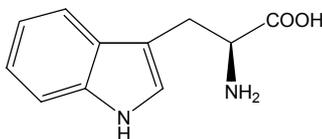
Die frischen, tiefgefrorenen bzw. luft- oder gefriergetrockneten Pilze werden in Stickstoff gesättigtem Methanol unter Lichtschutz mehrmals auf dem Schüttler extrahiert, bis das Filtrat farblos bleibt und die vorher kräftig gelben Fruchtkörper vollständig entfärbt sind. Die Extrakte werden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Rohextrakt bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Stickstoff bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

## 8.4 Chromatographische Aufarbeitung

Der Rohextrakt wird in Methanol (HPLC-grade) aufgenommen und zuerst durch Festphasenextraktion an C18-Chromabond-Kartuschen (100 bzw. 500 mg, Macherey & Nagel) vorgereinigt. Die Auftrennung erfolgt über präparative HPL-Chromatographie an einer C18-Säule mit Wasser/Acetonitril und Zusatz von 0.25 % Trifluoressigsäure als Eluent (System 6). Die erhaltenen Fraktionen werden in einem Aceton-Trockeneis-Bad eingefroren, lyophilisiert und anschließend bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Reinheit der isolierten Substanzen wird mittels analytischer HPLC an RP-18 überprüft (System 3). Bei nicht ausreichender Reinheit wird die HPL-Chromatographie wiederholt.

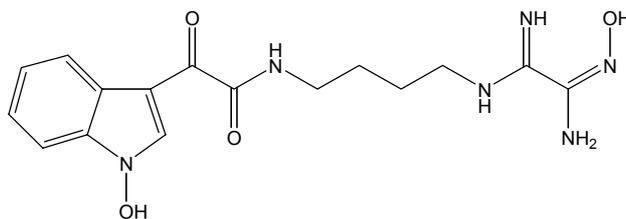
## 8.5 Charakterisierung der isolierten Inhaltsstoffe aus *L. birnbaumii*

### 8.5.1 L-Tryptophan (18) aus *L. birnbaumii*



Ausbeute	58.0 mg (ca. 0.14 % des Frischgewichtes)
Schmp.	279–280 °C (Lit. <sup>[285]</sup> 281–282 °C)
$R_f$ -Wert	0.71 (RP-18, Methanol)
$R_t$ -Wert	(HPLC): 12.3 min (System 3)
Drehwert	(H <sub>2</sub> O): $[\alpha]_D^{25} = -31$ ( $c = 0.5$ ) (Lit. <sup>[285]</sup> $[\alpha]_D^{25} = -32.1$ , $c = 0.5$ , H <sub>2</sub> O).
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 3.35 (dd, $J = 8.4$ Hz, 1 H, CH <sub>2</sub> ) Signal teilweise verdeckt durch Methanol-Signal, 3.55 (dd, $J = 15.2$ Hz, $J = 4.7$ Hz, 1 H, CH <sub>2</sub> ), 4.21 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 4.7$ Hz, 1 H, CH), 7.10 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 7.3$ Hz, 1 H, CH), 7.18 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 7.3$ Hz, 1 H, CH), 7.24 (s, 1 H, CH), 7.42 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, CH), 7.67 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, CH). (600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 3.30 (CH <sub>2</sub> , verdeckt durch Wasser-Peak), 3.92 (s, breit, 1 H, CH), 6.99 (dd, $J = 7.6$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 1 H, CH), 7.08 (dd, $J = 7.6$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 1 H, CH), 7.20 (s, 1 H, CH), 7.35 (d, $J = 7.6$ Hz, 1 H, CH), 7.55 (d, $J = 7.6$ Hz, 1 H, CH), 10.98 (s, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(151 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 28.1 (CH <sub>2</sub> ), 55.3 (CH), 108.5 (C <sub>q</sub> ), 112.9 (CH), 119.3 (CH), 120.6 (CH), 123.2 (CH), 125.7 (CH), 128.6 (C <sub>q</sub> ), 138.7 (C <sub>q</sub> ), 172.6 (CO <sub>2</sub> H).
(+)-ESI-MS	$m/z$ [%] = 205 [[M+H] <sup>+</sup> , 100].
Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (M = 204.23 g/mol)

## 8.5.2 Birnbaumin A (281)



Ausbeute	59.0 mg (ca. 0.14 % des Frischgewichtes)
Schmp.	89–91 °C
$R_f$ -Wert	0.84 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)
$R_f$ -Wert	(HPLC): 15.5 min (System 3)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 212 nm (4.42), 250 nm (4.03), 322 nm (3.96).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3403 (s), 3205 (m), 2945 (m), 2863 (m), 1665 (s), 1625 (m), 1575 (m), 1537 (m), 1508 (m), 1483 (m), 1452 (m), 1438 (m), 1371 (m), 1340 (m), 1324 (m), 1250 (m), 1203 (s), 1139 (m), 1066 (m), 1009 (m), 890 (m), 842 (m), 801 (m), 751 (m), 722 (m), 674 (m), 600 (m), 426 (m).
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 1.68 (br, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.25 (t, $J$ = 6.6 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.38 (t, $J$ = 6.6 Hz, CH <sub>2</sub> , teilweise verdeckt durch MeOH-Signal), 7.34 (dd, $J$ = 8.0 Hz, $J$ = 7.5 Hz, 1 H, CH), 7.39 (dd, $J$ = 8.0 Hz, $J$ = 7.5 Hz, 1 H, CH), 7.57 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1 H, CH), 7.92 (s, 1 H, CH), 8.25 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1 H, CH). (600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.48 (br, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.10 (q, breit, $J$ = 5.6 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.17 (q, breit, $J$ = 5.6 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 7.27 (dd, $J$ = 7.5 Hz, $J$ = 7.4 Hz, 1 H, CH), 7.33 (dd, $J$ = 7.8 Hz, $J$ = 7.4 Hz, 1 H, CH), 7.52 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 7.57 (t, br, $J$ = 5.6 Hz, 1 H, NH), 7.99 (s, 1 H, CH), 8.10 (d, $J$ = 7.5 Hz, 1 H, CH), 8.28 (t, $J$ = 5.6 Hz, 1 H, NH), 11.95 (s, 1 H, OH), 12.32 (br, 1 H, OH).
<sup>13</sup> C-NMR	(151 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 27.4 (CH <sub>2</sub> ), 28.0 (CH <sub>2</sub> ), 39.8 (CH <sub>2</sub> ), 42.4 (CH <sub>2</sub> ), 110.7 (CH), 112.1 (C <sub>q</sub> ), 122.8 (CH), 123.8 (C <sub>q</sub> ), 124.8 (CH), 125.4 (CH), 135.9 (CH), 136.5 (C <sub>q</sub> ), 152.5 (C <sub>q</sub> ), 158.9 (C <sub>q</sub> ), 164.6 (C <sub>q</sub> ), 186.2 (C <sub>q</sub> ). (151 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 26.2 (CH <sub>2</sub> ), 26.4 (CH <sub>2</sub> ), 38.3 (CH <sub>2</sub> ), 40.6 (CH <sub>2</sub> ), 109.8 (CH), 110.0 (C <sub>q</sub> ), 121.0 (CH), 121.6 (C <sub>q</sub> ), 123.1 (CH), 123.9 (CH), 133.8 (CH), 134.3 (C <sub>q</sub> ), 151.7 (C <sub>q</sub> ), 156.9 (C <sub>q</sub> ), 161.8 (C <sub>q</sub> ), 184.0 (C <sub>q</sub> ).

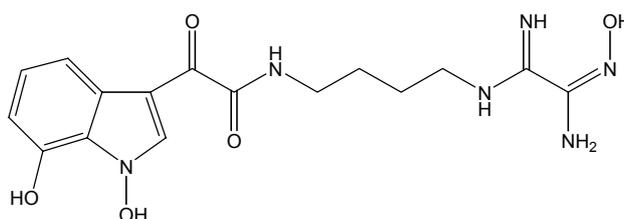
(+)-FAB-MS  $m/z$  [%] = 361 [[M+H]<sup>+</sup>, 100].

HR-(+)-FAB-MS für [M+H]<sup>+</sup> ber.: 361.1624, gef.: 361.1576.

(+)-ESI-MS/MS  $m/z$  = 200 [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>], 184 [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O], 160 [C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>2</sub>], 157 [C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O],  
132 [C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>NO].

Summenformel C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (M = 360.37 g/mol)

### 8.5.3 Birnbaumin B (282)



Ausbeute	228 mg (ca. 0.54 % des Frischgewichtes)
Schmp.	99–101 °C
R <sub>F</sub> -Wert	0.88 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA) 0.25 (SiO <sub>2</sub> , Butanol/Wasser/Ethanol/Essigsäure 4/1/1/1)
R <sub>T</sub> -Wert	(HPLC): 11.2 min (System 3)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): λ <sub>max</sub> (log ε) = 214 nm (4.74), 248 nm (4.34), 267 nm (sh, 4.19), 356 nm (4.16).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3415 (m), 3210 (m), 2930 (m), 2856 (m), 1666 (s), 1628 (m), 1538 (m), 1493 (m), 1436 (m), 1374 (m), 1332 (m), 1279 (m), 1144 (m), 1086 (w), 1045 (w), 986 (w), 865 (m), 837 (m), 799 (m), 723 (m), 673 (m).
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, CD <sub>3</sub> OD): δ [ppm] = 1.62 (breit, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.19 (t, breit, J = 6.5 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.33 (CH <sub>2</sub> , teilweise verdeckt durch MeOH-Signal), 6.69 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, CH), 7.06 (dd, J = 7.9 Hz, J = 7.9 Hz, 1 H, CH), 7.70 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, CH), 7.74 (s, 1 H, CH). (600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): δ [ppm] = 1.47 (br, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.10 (q, J = 5.7 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.16 (q, J = 6.2 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 6.67 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, CH), 7.01 (dd, J = 7.8 Hz, J = 7.5 Hz, 1 H, CH), 7.53 (t, br, J = 5.7 Hz, 1 H, NH), 7.55 (d, J = 7.8 Hz, 1 H, CH), 7.73 (s, 1 H, CH), 8.25 (t, J = 6.2 Hz, 1 H, NH), 9.83 (s, 1 H, OH), 11.89 (s, 1 H, OH), 12.06 (s, 1 H, OH).

---

<sup>13</sup> C-NMR	(151 MHz, CD <sub>3</sub> OD): δ [ppm] = 27.4 (CH <sub>2</sub> ), 28.0 (CH <sub>2</sub> ), 39.8 (CH <sub>2</sub> ), 42.3 (CH <sub>2</sub> ), 111.0 (CH), 111.9 (C <sub>q</sub> ), 114.1 (CH), 125.6 (C <sub>q</sub> ), 125.7 (CH), 126.5 (C <sub>q</sub> ), 136.1 (CH), 145.6 (C <sub>q</sub> ), 152.5 (C <sub>q</sub> ), 158.9 (C <sub>q</sub> ), 164.6 (C <sub>q</sub> ), 186.0 (C <sub>q</sub> ). (151 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): δ [ppm] = 26.2 (CH <sub>2</sub> ), 26.4 (CH <sub>2</sub> ), 38.3 (CH <sub>2</sub> ), 40.6 (CH <sub>2</sub> ), 109.3 (CH), 109.8 (C <sub>q</sub> ), 111.8 (CH), 123.7 (C <sub>q</sub> ), 124.0 (CH), 124.5 (C <sub>q</sub> ), 134.1 (CH), 144.3 (C <sub>q</sub> ), 151.8 (C <sub>q</sub> ), 156.9 (C <sub>q</sub> ), 161.9 (C <sub>q</sub> ), 183.7 (C <sub>q</sub> ).
<sup>15</sup> N-NMR	(60.8 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): δ [ppm] = 47.0, 55.1, 83.8, 161.0, 344.5.
(+)-ESI-MS	<i>m/z</i> [%] = 377 [[M+H] <sup>+</sup> , 100].
HR-(+)-ESI-MS	für [M+H] <sup>+</sup> ber.: 377.1573, gef.: 377.1594.
HR-ESI-MS/MS	<i>m/z</i> = 359.1464 [C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ], 200.1140 [C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ], 184.1190 [C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O], 176.0339 [C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>3</sub> ], 157.1081 [C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> O].
Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> (M = 376.37 g/mol)

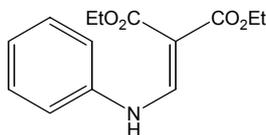
## 8.6 Synthesevorschriften und experimentelle Daten zu *L. birnbaumii*

### 8.6.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von (Indol-3-yl)glyoxylchloriden

Zu einer Lösung des entsprechenden Indol-Derivats in abs. Diethylether wird unter Rühren und Eisbadkühlung langsam Oxalylchlorid (**155**, 1.4 eq) zugetropft. Man läßt noch 1.5 bis 2 Stunden bei 0 °C rühren und saugt den ausgefallenen Feststoff zügig ab. Die erhaltenen Produkte lassen sich zeitlich begrenzt bei –20 °C unter Stickstoffatmosphäre und Lichtschutz lagern und werden ohne weitere analytische Untersuchungen möglichst sofort weiter umgesetzt.

## 8.6.2 Experimentelle Daten zur Synthese einfacher Indol- und Chinolin-Derivate

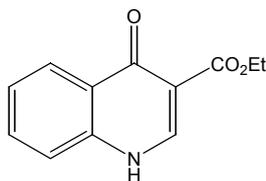
### 8.6.2.1 2-Phenylaminomethylenmalonsäurediethylester (149)



1.00 g (10.7 mmol, 0.98 ml) Anilin (**147**) und 2.32 g (10.7 mmol, 2.15 ml) Ethoxymethylenmalonsäurediethylester (**148**) werden für 20 Minuten auf 130 °C erwärmt. Das Einsetzen der Reaktion ist am entstehenden Ethanol erkennbar, der anschließend im Vakuum entfernt wird. Beim Abkühlen der Reaktionslösung auf Raumtemperatur fällt ein farbloser Feststoff aus, der aus Petrolether umkristallisiert wird.

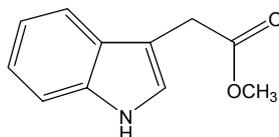
Ausbeute	1.78 g (63 %) farbloser kristalliner Feststoff.
Schmp.	44–46 °C (Lit. <sup>[117]</sup> 49–50 °C)
$R_f$ -Wert	0.82 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/1)
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ [ppm] = 1.33 (t, $J$ = 7.1 Hz, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 1.38 (t, $J$ = 7.1 Hz, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 4.25 (q, $J$ = 7.1 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 4.32 (q, $J$ = 7.1 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 7.14 (d, $J$ = 6.9 Hz, 2 H, 2 $\times$ CH), 7.16 (t, $J$ = 6.9 Hz, 1 H, CH), 7.39 (t, $J$ = 6.9 Hz, 2 H, 2 $\times$ CH), 8.53 (d, $J$ = 13.5 Hz, 1 H, CH), 11.00 (d, $J$ = 13.5 Hz, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ [ppm] = 14.3 (CH <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub> Et), 14.4 (CH <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub> Et), 60.0 (CH <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> Et), 60.3 (CH <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> Et), 93.5 (C <sub>q</sub> ), 117.1 (2 $\times$ CH), 124.9 (CH), 129.8 (2 $\times$ CH), 139.2 (C <sub>q</sub> ), 151.9 (CH), 165.7 (C <sub>q</sub> , CO <sub>2</sub> Et), 169.0 (C <sub>q</sub> , CO <sub>2</sub> Et).
EI-MS	$m/z$ [%] = 263 [[M] <sup>+</sup> , 100], 217 [93], 172 [26], 161 [78], 144 [64], 117 [40], 104 [14], 77 [21].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 263.1158, gef.: 263.1157.
EA	ber. [%]: C 63.87 H 6.51 N 5.32 gef. [%]: C 63.89 H 6.50 N 5.32
Summenformel	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub> (M = 263.29 g/mol)

### 8.6.2.2 4-Oxo-1,4-dihydro-chinolin-3-carbonsäureethylester (150)<sup>[108]</sup>



1.50 g (5.70 mmol) 2-Phenylaminomethylenmalonsäurediethylester (**149**) und 15 ml Dowtherm A (eutektische Mischung aus 26.5 % Diphenyl und 73.5 % Diphenyloxid) werden in einem Luftbad auf 250 °C erhitzt. Man läßt die Reaktionslösung 20 Minuten refluxieren und vertreibt den entstehenden Ethanol mit einem leichten Stickstoff-Strom aus dem Reaktionsgefäß. Der beim Abkühlen auf Raumtemperatur ausfallende Feststoff wird abgesaugt und mit n-Hexan gewaschen. Man erhält ein farbloses, kristallines Produkt, das in DMSO und Ethanol wenig löslich und unlöslich in den meisten Lösungsmitteln wie Aceton, Chloroform und Essigsäureethylester ist.

Ausbeute	1.02 g (82 %, Lit. <sup>[108]</sup> 95 %) farbloser kristalliner Feststoff
Schmp.	267–269 °C (Lit. <sup>[108]</sup> 269–270 °C)
$R_f$ -Wert	0.17 (SiO <sub>2</sub> , Chloroform/Methanol 20/1)
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.27 (t, $J$ = 6.98 Hz, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 4.21 (q, $J$ = 6.98 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 7.40 (t, $J$ = 7.6 Hz, 1 H, CH), 7.61 (d, $J$ = 7.6 Hz, 1 H, CH), 7.69 (t, $J$ = 7.6 Hz, 1 H, CH), 8.15 (d, $J$ = 7.6 Hz, 1 H, CH), 8.53 (s, 1 H, CH), 12.30 (s, br, 1 H, OH).
<sup>13</sup> C-NMR	(151 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 14.6 (CH <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub> Et), 59.9 (CH <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> Et), 110.1 (C <sub>q</sub> ), 119.0 (CH), 125.0 (CH), 125.9 (CH), 127.5 (C <sub>q</sub> ), 132.7 (CH), 139.2 (C <sub>q</sub> ), 145.2 (CH), 165.1 (C <sub>q</sub> ), 173.8 (C <sub>q</sub> , CO <sub>2</sub> Et).
EI-MS	$m/z$ [%] = 217 [[M] <sup>+</sup> , 46], 171 [100], 144 [8], 115 [9], 89 [5], 77 [1], 63 [2].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 217.0739, gef.: 217.0738.
EA	ber. [%]: C 66.35 H 5.10 N 6.45 gef. [%]: C 66.56 H 5.06 N 6.60
Summenformel	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> (M = 217.22 g/mol)

**8.6.2.3 (Indol-3-yl)essigsäuremethylester (152)**

1.75 g (10.0 mmol) (Indol-3-yl)essigsäure (**151**) werden in 30.0 ml Methanol gelöst. Man gibt drei Tropfen konz. Schwefelsäure hinzu und erhitzt für eine Stunde unter Rückfluß. Das Lösungsmittel wird anschließend im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen und mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung säurefrei gewaschen. Man trocknet die EE-Phase über Natriumsulfat, engt bis zur Trockene ein und erhält das Produkt als Öl. Eine weitere Reinigung ist nicht notwendig.

Ausbeute 1.73 g (92 %) braunes Öl

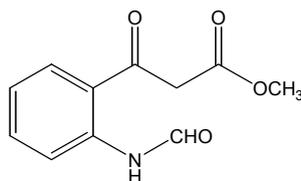
R<sub>F</sub>-Wert 0.77 (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Essigsäureethylester 1/1)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 3.67 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 3.75 (d, *J* = 0.7 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 6.97 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, CH), 7.12 (m, 2 H, 2 × CH), 7.21 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1 H, CH), 7.59 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1 H, CH), 8.12 (s, breit, 1 H, NH).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 31.0 (CH<sub>2</sub>), 51.9 (CH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>Me), 108.0 (C<sub>q</sub>), 111.2 (CH), 118.6 (CH), 119.5 (CH), 122.0 (CH), 123.2 (CH), 127.1 (C<sub>q</sub>), 136.0 (C<sub>q</sub>), 172.7 (C<sub>q</sub>, CO<sub>2</sub>Me).

GC/EI-MS *m/z* [%] = 189 [[M]<sup>+</sup>, 80], 130 [100], 103 [12], 77 [13], 51 [4].

Summenformel C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub> (M = 189.21 g/mol)

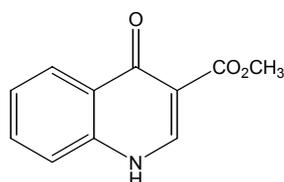
**8.6.2.4 3-(2-Formylamino-phenyl)-3-oxo-propionsäuremethylester (153)**

Eine Lösung aus 856 mg (4.00 mmol) Natriumperodat in 20.0 ml Wasser wird im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Innerhalb einer Stunde lässt man 189 mg (1.00 mmol) (Indol-3-yl)essigsäureethylester (**152**) in 10.0 ml Methanol zutropfen. Nach 19stündigem Rühren bei

Raumtemperatur zeigt die DC-Kontrolle kein Edukt mehr. Das Methanol wird aus der Reaktionslösung im Vakuum entfernt. Der wässrige Rückstand wird mit Chloroform extrahiert, die organische Phase mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhält man das Produkt als Öl, das langsam fest wird.

Ausbeute	123 mg (56 %) beigefarbener Feststoff
Schmp.	68–70 °C (Lit. <sup>[286]</sup> 44 °C)
R <sub>F</sub> -Wert	0.65 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/1)
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ [ppm] = 3.77 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 4.07 (s, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 7.18 (dd, <i>J</i> = 7.9 Hz, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1 H, CH), 7.59 (dd, <i>J</i> = 7.9 Hz, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1 H, CH), 7.83 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H, CH), 8.48 (s, 1 H, CHO), 8.76 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1 H, CH), 11.33 (s, breit, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ [ppm] = 46.9 (CH <sub>2</sub> ), 52.5 (CH <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub> Me), 120.9 (C <sub>q</sub> ), 121.7 (CH), 123.1 (CH), 131.2 (CH), 135.8 (CH), 140.2 (C <sub>q</sub> ), 159.8 (CHO), 167.4 (C <sub>q</sub> , CO <sub>2</sub> Me), 196.6 (C=O).
EI-MS	<i>m/z</i> [%] = 221 [[M] <sup>+</sup> , 55], 203 [7], 193 [20], 161 [100], 148 [65], 120 [67], 92 [32], 77 [13], 65 [32].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 221.0688, gef.: 221.0686.
Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub> (M = 221.21 g/mol)

#### 8.6.2.5 4-Oxo-1,4-dihydro-chinolin-3-carbonsäuremethylester (154)<sup>[287,288]</sup>

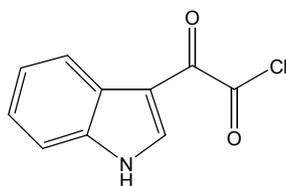


49.0 mg (0.22 mmol) 3-(2-Formylamino-phenyl)-3-oxo-propionsäuremethylester (**153**) werden mit 1.00 ml Orthoameisensäuretrimethylester und 58.0 mg (0.57 mmol, 54.0 μl) Acetanhydrid versetzt. Man erwärmt die Reaktionslösung auf 105 °C (Ölbadtemperatur), wobei der Feststoff allmählich in Lösung geht. Nach einer Stunde bei der angegebenen Temperatur beobachtet man das Ausfallen eines Niederschlages. Man lässt eine weitere Stunde reagieren. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches auf Raumtemperatur wird das

Produkt abgesaugt, mit Essigsäureethylester gewaschen und getrocknet. Man erhält farblose Kristalle.

Ausbeute	20.0 mg (44 %) farbloser Feststoff
Schmp.	228–230 °C (Lit. <sup>[287]</sup> 230 °C)
$R_f$ -Wert	0.15 (SiO <sub>2</sub> , Chloroform/Methanol 20/1)
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 3.73 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 7.40 (dd, $J$ = 7.3 Hz, $J$ = 7.0 Hz, 1 H, CH), 7.62 (s, breit, 1 H, CH), 7.69 (dd, $J$ = 7.0 Hz, $J$ = 7.0 Hz, 1 H, CH), 8.16 (s, breit, 1 H, CH), 8.56 (d, $J$ = 7.9 Hz, 1 H, CH), 12.28 (s, breit, 1 H, OH).
<sup>13</sup> C-NMR	(151 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 51.2 (CH <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub> Me), 109.6 (C <sub>q</sub> ), 118.9 (CH), 124.8 (CH), 125.8 (CH), 127.4 (C <sub>q</sub> ), 132.5 (CH), 139.2 (CH), 145.2 (C <sub>q</sub> ), 165.6 (C <sub>q</sub> , CO <sub>2</sub> Me), 173.5 (C <sub>q</sub> ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 203 [[M] <sup>+</sup> , 64], 171 [100], 143 [19], 115 [24], 89 [7].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 203.0582, gef.: 203.0575.
Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> (M = 203.19 g/mol)

#### 8.6.2.6 (Indol-3-yl)glyoxylchlorid (**156**)<sup>[118]</sup>



Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von (Indol-3-yl)glyoxylchloriden

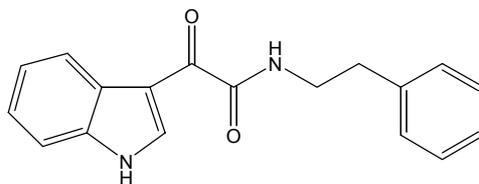
3.51 g (30.0 mmol) Indol (**16**) in 50.0 ml abs. Diethylether

5.33 g (42.0 mmol, 3.55 ml) Oxalylchlorid (**155**) in 10.0 ml abs. Diethylether

Reaktionsdauer 1.5 h

Ausbeute 5.60 g (90 %) zitronengelber kristalliner Feststoff

Summenformel C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>ClNO<sub>2</sub> (M = 207.62 g/mol)

8.6.2.7 2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxo-*N*-phenylethylacetamid (**158**)<sup>[120]</sup>

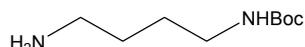
Zu 312 mg (1.50 mmol) (Indol-3-yl)glyoxylchlorid (**156**) in 10.0 ml abs. Benzol werden unter Rühren langsam 206 mg (1.70 mmol, 214  $\mu$ l) 2-Phenylethylamin (**157**) gegeben. Die Suspension wird für 6.5 Stunden refluxiert, wobei die gelbe Farbe der Suspension allmählich verblaßt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der entstandene Feststoff aus Methanol umkristallisiert. Man erhält hellgelbe Plättchen.

Ausbeute	310 mg (71 %, Lit. <sup>[120]</sup> 74 %) hellgelber kristalliner Feststoff
Schmp.	208–209 °C (Lit. <sup>[120]</sup> 208-210 °C)
$R_f$ -Wert	0.37 (SiO <sub>2</sub> , Chloroform/Methanol 20/1)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 207 nm (4.58), 255 nm (4.13), 267 nm (4.08), 273 nm (4.03), 326 nm (4.04).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3432 (m), 3337 (m), 3203 (m), 3180 (m), 3114 (m), 3027 (w), 2936 (w), 2863 (w), 1659 (m), 1609 (s), 1542 (m), 1504 (m), 1495 (m), 1458 (m), 1446 (m), 1366 (w), 1309 (w), 1263 (w), 1240 (m), 1194 (w), 1178 (w), 1159 (m), 1138 (m), 1102 (w), 1054 (w), 1034 (w), 1011 (w), 918 (w), 831 (w), 798 (m), 772 (w), 745 (m), 698 (m), 651 (w), 627 (w), 606 (w), 514 (w), 424 (w), 411 (w).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 2.84 (t, $J$ = 7.0 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.46 (q, $J$ = 7.0 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 7.24 (m, 7 H, 7 $\times$ CH), 7.52 (m, 1 H, CH), 8.23 (m, 1 H, CH), 8.67 (s, 1 H, CH), 8.76 (t, $J$ = 7.0 Hz, 1 H, NH), 12.20 (s, 1 H, NH)
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 34.9 (CH <sub>2</sub> ), 40.2 (CH <sub>2</sub> ), 112.3 (C <sub>q</sub> ), 112.7 (CH), 121.4 (CH), 122.7 (CH), 123.6 (CH), 126.3 (CH), 126.3 (C <sub>q</sub> ), 128.5 (2 $\times$ CH), 128.8 (2 $\times$ CH), 136.4 (C <sub>q</sub> ), 138.6 (CH), 139.4 (C <sub>q</sub> ), 163.7 (C=O), 182.4 (C=O).
APCI-MS	$m/z$ [%] = 293 [[M+H] <sup>+</sup> , 100], 144 [10].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 292.1212, gef.: 292.1218.

EA	ber. [%]:	C 73.95	H 5.52	N 9.58
	gef. [%]:	C 73.91	H 5.69	N 9.62
Summenformel	$C_{18}H_{16}N_2O_2$ (M = 292.34 g/mol)			

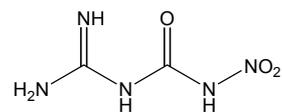
### 8.6.3 Experimentelle Daten zur Synthese von 1-(3-Amidinoureido)-4-aminobutan-Hydrochlorid (204)

#### 8.6.3.1 *N*-Boc-1,4-diaminobutan (168)<sup>[131]</sup>



1.94 g (22.0 mmol) 1,4-Diaminobutan (**167**) werden in 100 ml Chloroform gelöst und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren tropft man 960 mg (4.40 mmol) (Boc)<sub>2</sub>O in 50.0 ml Chloroform zu. Die Reaktionslösung wird drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, der entstandene Niederschlag abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeeengt. Das resultierende Öl wird in Essigsäureethylester aufgenommen, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und erhält ein farbloses Öl, das allmählich fest wird. Das Produkt muss im Gefrierfach gelagert werden, da bei Raumtemperatur nach wenigen Tagen Zersetzung eintritt.

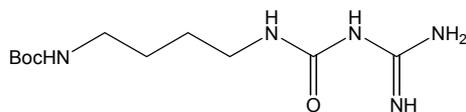
Ausbeute	750 mg (91 %, bezogen auf (Boc) <sub>2</sub> O, Lit. <sup>[131]</sup> 90 %) farbloser Feststoff
Schmp.	61–63 °C (Lit. <sup>[131]</sup> farbloses Öl)
<i>R<sub>f</sub></i> -Wert	0.78 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/3)
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ [ppm] = 1.44 (s, 9 H, 3 × CH <sub>3</sub> ), 1.53 (m, br, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 2.77 (br, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 2.99 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.12 (s, br, 2 H, NH <sub>2</sub> ), 4.81 (s, br, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ [ppm] = 27.3 (CH <sub>2</sub> ), 28.4 (3 × CH <sub>3</sub> ), 29.7 (CH <sub>2</sub> ), 40.3 (CH <sub>2</sub> ), 41.3 (CH <sub>2</sub> ), 79.0 (C <sub>q</sub> ), 156.0 (C=O).
ESI-MS	<i>m/z</i> [%] = 189 [[M+H] <sup>+</sup> , 100].
Summenformel	$C_9H_{20}N_2O_2$ (M = 188.27 g/mol)

**8.6.3.2** *N*-Amidino-*N'*-nitroharnstoff (172)<sup>[137]</sup>

8.00 ml konz. Salpetersäure und 20.0 ml konz. Schwefelsäure werden vorgelegt und mit einer Eis-Kochsalz-Mischung auf  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Unter Rühren gibt man 5.00 g (59.5 mmol) Dicyandiamid (171) portionsweise hinzu. Nachdem der Feststoff in Lösung gegangen ist, lässt man noch eine Stunde unter Kühlung rühren. Anschließend wird die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gebracht und auf Eis gegossen. Allmählich fällt ein farbloser Feststoff aus, der abgesaugt und getrocknet wird. Das feinkristalline Produkt löst sich wenig in Wasser, DMSO und Methanol und ist unlöslich in den meisten Lösungsmitteln wie Aceton, Chloroform und Essigsäureethylester.

Ausbeute	8.02 g (92 %, Lit. <sup>[137]</sup> 95 %) farbloser kristalliner Feststoff			
Schmp.	Zersetzung $> 300\text{ }^{\circ}\text{C}$			
$R_f$ -Wert	0.76 (RP-18, Methanol)			
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3406 (s), 3371 (s), 3305 (s), 3244 (s), 3203 (s), 1695 (s), 1641 (m), 1605 (m), 1547 (m), 1445 (m), 1404 (s), 1308 (s), 1227 (s), 1139 (s), 1042 (m), 979 (w), 855 (w), 783 (m), 755 (m), 740 (m), 716 (m), 631 (m), 418 (w).			
$^{13}\text{C}$ -NMR	(151 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ): $\delta$ [ppm] = 156.3 ( $\text{C}_q$ ), 157.9 ( $\text{C}_q$ ).			
(-)-ESI-MS	$m/z$ [%] = 145.9 $[[\text{M}-\text{H}]^-]$ , 100].			
HR-(+)-ESI-MS	für $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber.: 148.0471, gef.: 148.0709.			
EA	ber. [%]:	C 16.33	H 3.43	N 47.61
	gef. [%]:	C 16.20	H 3.29	N 47.38
Summenformel	$\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_5\text{O}_3$ (M = 147.09 g/mol)			

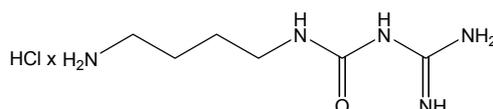
### 8.6.3.3 *N*-(*N*'-Boc-4-aminobutyl)-*N*'-amidinoharnstoff (207)



1.41 g (7.49 mmol) *N*-Boc-1,4-Diaminobutan (**168**) und 1.10 g (7.49 mmol) *N*-Amidino-*N*'-nitroharnstoff (**172**) werden in 30.0 ml Wasser suspendiert und unter Rückfluß erhitzt. Sobald eine klare Lösung entstanden ist, wird noch 30 Minuten auf 100 °C gehalten und dann die heiße Reaktionslösung filtriert. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und trocknet das farblose Produkt, welches gut in Methanol und DMSO löslich ist.

Ausbeute	1.85 g (90 %) farbloser Feststoff
Schmp.	91–93 °C
$R_f$ -Wert	0.79 (RP-18, Methanol)
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3357 (s), 2981 (m), 2939 (m), 2871 (m), 1686 (s), 1606 (s), 1583 (s), 1520 (s), 1455 (m), 1404 (m), 1392 (m), 1366 (m), 1300 (m), 1254 (m), 1240 (m), 1170 (m), 1044 (m), 1010 (w), 994 (m), 943 (w), 870 (m), 792 (m), 780 (m), 745 (m), 618 (m).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 1.47 (s, 9 H, 3 × CH <sub>3</sub> ), 1.53 (m, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.08 (br, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.15 (br, 2 H, CH <sub>2</sub> ).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 28.6 (CH <sub>2</sub> ), 28.8 (CH <sub>2</sub> ), 29.1 (3 × CH <sub>3</sub> ), 40.8 (CH <sub>2</sub> ), 41.4 (CH <sub>2</sub> ), 80.1 (C <sub>q</sub> ), 158.8 (C <sub>q</sub> ), 160.4 (C <sub>q</sub> ), 167.3 (C <sub>q</sub> ).
FAB-MS	$m/z$ [%] = 274 [[M+H] <sup>+</sup> , 66].
HR-FAB-MS	für [M+H] <sup>+</sup> ber.: 274.1879, gef.: 274.1913.
Summenformel	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> (M = 273.33 g/mol)

### 8.6.3.4 1-(3-Amidinoureido)-4-aminobutan-Hydrochlorid (204)



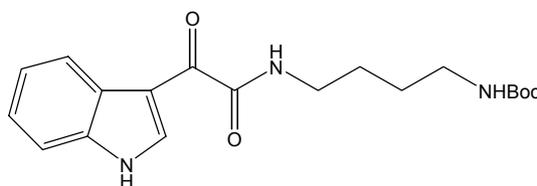
137 mg (0.50 mmol) **207** werden in 2.00 ml Methanol gelöst. Man gibt 5.00 ml einer 5N HCl/*iso*-Propanol-Lösung hinzu und rührt 1.5 Stunden bei Raumtemperatur. Das

Lösungsmittel wird anschließend im Vakuum entfernt und das farblose Produkt getrocknet. **204** ist wenig in Methanol und DMSO löslich.

Ausbeute	95 mg (90 %) farbloser Feststoff
Schmp.	157–159 °C
$R_f$ -Wert	0.83 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3391 (s), 3081 (m), 3011 (m), 2632 (w), 2031 (w), 1717 (m), 1692 (s), 1646 (m), 1556 (m), 1472 (m), 1448 (m), 1404 (w), 1384 (w), 1267 (m), 1244 (m), 1155 (w), 1117 (m), 1077 (w), 1056 (w), 1035 (w), 1025 (w), 1010 (w), 964 (w), 922 (w), 900 (w), 873 (m), 766 (m), 600 (m), 522 (m), 500 (w).
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 1.62 (m, breit, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.28 (t, breit, $J$ = 5.4 Hz, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ). (300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.49 (m, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 2.72 (br, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.04 (q, br, $J$ = 5.4 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 7.19 (s, 3 H, NH + NH <sub>2</sub> ), 7.80 (t, $J$ = 5.4 Hz, 1 H, NH), 8.24 (s, 2 H, NH <sub>2</sub> ), 10.48 (s, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 24.5 (CH <sub>2</sub> ), 26.3 (CH <sub>2</sub> ), 38.7 (CH <sub>2</sub> ), 38.8 (CH <sub>2</sub> ), 153.6 (C <sub>q</sub> ), 155.7 (C <sub>q</sub> ).
FAB-MS	$m/z$ [%] = 174 [[M+H] <sup>+</sup> , 100].
HR-FAB-MS	für [M+H] <sup>+</sup> ber.: 174.1355, gef.: 174.1360.
Summenformel	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O×HCl (M = 209.68 g/mol)

### 8.6.4 Experimentelle Daten zur Synthese von *N*-[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-acetamid (**178**)

#### 8.6.4.1 {4-[2-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxo-acetylamino]butyl}carbaminsäure-*tert*-butylester (**169**)

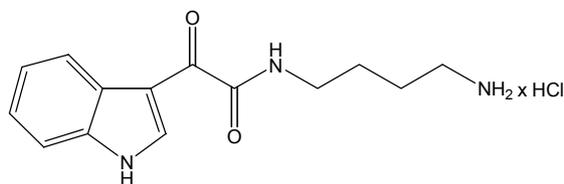


208 mg (1.00 mmol) (Indol-3-yl)glyoxylchlorid (**156**) in 20.0 ml abs. Dichlormethan und 226 mg (1.20 mmol) *N*-Boc-1,4-Diaminobutan (**168**) werden unter Rühren drei Stunden refluxiert, wobei die gelbe Farbe der Reaktionslösung allmählich verblaßt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der entstandene Feststoff aus Methanol umkristallisiert. Man erhält ein hellgelbes kristallines Pulver.

Ausbeute	360 mg (100 %) kristalliner Feststoff
Schmp.	171–173 °C
$R_f$ -Wert	0.43 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/2)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 207 nm (4.44), 255 nm (4.08), 267 nm (4.02), 273 nm (3.97), 324 nm (4.01).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3358 (s), 3327 (s), 3249 (s), 3071 (m), 3026 (m), 3005 (m), 2979 (m), 2947 (m), 2875 (m), 1682 (s), 1653 (s), 1634 (m), 1602 (s), 1582 (s), 1526 (s), 1506 (s), 1494 (s), 1460 (s), 1437 (s), 1388 (m), 1366 (s), 1338 (m), 1281 (s), 1236 (s), 1194 (m), 1158 (s), 1128 (s), 1096 (m), 1050 (m), 1002 (m), 942 (m), 934 (m), 865 (m), 817 (m), 785 (m), 741 (s), 656 (m), 632 (m), 597 (m), 545 (m), 507 (m), 480 (m), 449 (m), 428 (m).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.36 (s, 9 H, 3 × CH <sub>3</sub> ), 1.40 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 1.51 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 2.92 (q, $J$ = 6.0 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.20 (q, $J$ = 6.3 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 6.77 (t, $J$ = 6.0 Hz, 1 H, NH), 7.25 (m, 2 H, 2 × CH), 7.52 (m, 1 H, CH), 8.22 (m, 1 H, CH), 8.69 (t, $J$ = 6.3 Hz, 1 H, NH), 8.74 (s, 1 H, CH), 12.20 (s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C}$ -NMR	(75.5 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ): $\delta$ [ppm] = 26.5 ( $\text{CH}_2$ ), 27.2 ( $\text{CH}_2$ ), 28.4 ( $3 \times \text{CH}_3$ ), 38.5 ( $\text{CH}_2$ ), 39.8 ( $\text{CH}_2$ ), 77.5 ( $\text{C}_q$ ), 112.4 ( $\text{C}_q$ ), 112.7 ( $\text{CH}$ ), 121.4 ( $\text{CH}$ ), 122.7 ( $\text{CH}$ ), 123.6 ( $\text{CH}$ ), 126.4 ( $\text{C}_q$ ), 136.4 ( $\text{C}_q$ ), 138.6 ( $\text{CH}$ ), 155.8 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 163.8 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 182.5 ( $\text{C}=\text{O}$ ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 359 $[[\text{M}]^+, 2]$ , 144 [100].
HR-EI-MS	für $[\text{M}]^+$ ber.: 359.1845, gef.: 359.1863.
EA	ber. [%]: C 63.49 H 7.01 N 11.69 gef. [%]: C 63.30 H 6.82 N 11.58
Summenformel	$\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$ ( $M = 359.43$ g/mol)

#### 8.6.4.2 *N*-(4-Aminobutyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-acetamid-Hydrochlorid (177)



360 mg (1.00 mmol) **169** werden mit 40.0 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man ein farbloses, kristallines Produkt.

Ausbeute	290 mg (98 %) farbloser Feststoff
Schmp.	182–183 °C
$R_f$ -Wert	0.81 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)
UV	( $\text{CH}_3\text{OH}$ ): $\lambda_{\text{max}}$ ( $\log \epsilon$ ) = 208 nm (4.33), 254 nm (3.96), 266 nm (3.91), 273 nm (3.87), 324 nm (3.87).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3414 (m), 3321 (m), 3222 (m), 3196 (m), 3070 (m), 3055 (m), 2991 (m), 2941 (m), 2878 (m), 2031 (w), 1653 (m), 1600 (m), 1584 (m), 1532 (w), 1508 (m), 1495 (m), 1461 (m), 1441 (m), 1340 (w), 1311 (w), 1284 (w), 1236 (m), 1165 (m), 1131 (m), 1118 (w), 1100 (w), 1036 (w), 1026 (w), 1011 (w), 943 (w), 922 (w), 873 (m), 790 (w), 772 (w), 742 (m), 661 (m), 629 (w), 600 (w), 548 (w), 500 (w), 449 (w), 428 (w).
$^1\text{H}$ -NMR	(300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ): $\delta$ [ppm] = 1.57 (m, 4 H, $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.82 (s, br, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 3.23 (q, br, $J = 6.0$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 7.24 (m, 2 H, $2 \times \text{CH}$ ), 7.53 (m, 1

H, CH), 7.84 (br, 2 H, NH<sub>2</sub>), 8.23 (m, 1 H, CH), 8.75 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1 H, CH), 8.77 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1 H, NH), 12.37 (s, 1 H, NH).

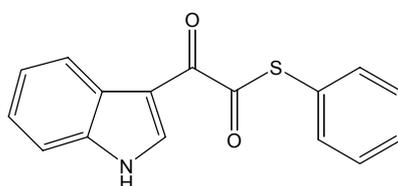
<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  [ppm] = 24.7 (CH<sub>2</sub>), 26.0 (CH<sub>2</sub>), 38.1 (CH<sub>2</sub>), 38.8 (CH<sub>2</sub>), 112.4 (C<sub>q</sub>), 112.8 (CH), 121.4 (CH), 122.7 (CH), 123.6 (CH), 126.4 (C<sub>q</sub>), 136.5 (C<sub>q</sub>), 138.7 (CH), 163.9 (C=O), 182.4 (C=O).

(+)-APCI-MS  $m/z$  [%] = 260 [[M+H]<sup>+</sup>, 100].

HR-(+)-ESI-MS für [M+H]<sup>+</sup> ber.: 260.1399, gef.: 260.1404.

Summenformel C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>×HCl (M = 295.77 g/mol)

### 8.6.4.3 (1*H*-Indol-3-yl)-oxo-thioessigsäure-*S*-phenylester (211)



207 mg (1.00 mmol) (Indol-3-yl)glyoxylchlorid (**156**) und 190 mg (1.10 mmol) Kupferthiophenolat (**210**) werden in 15.0 ml abs. Acetonitril suspendiert und zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand flash-chromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 1/2 gereinigt. Man erhält ein gelbes, kristallines Produkt.

Ausbeute 154 mg (55 %) gelber Feststoff

Schmp. 223–225 °C

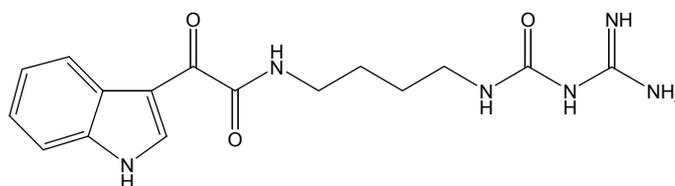
$R_f$ -Wert 0.82 (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Essigsäureethylester 1/2)

UV (CH<sub>3</sub>OH):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) = 206 nm (4.63), 231 nm (sh, 4.10), 270 nm (4.04), 277 nm (4.00), 342 nm (3.97).

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3436 (m), 3223 (s), 3053 (m), 2932 (m), 2869 (m), 1729 (m), 1692 (s), 1614 (s), 1584 (m), 1508 (m), 1488 (m), 1480 (m), 1459 (m), 1436 (m), 1374 (m), 1336 (m), 1312 (m), 1264 (m), 1235 (s), 1180 (m), 1152 (m), 1136 (s), 1100 (m), 1024 (m), 1004 (m), 965 (m), 930 (m), 912 (w), 878 (m), 780 (s), 758 (m), 738 (s), 688 (m), 673 (m), 617 (m), 596 (m), 558 (m), 533 (m), 476 (w), 437 (w), 426 (m), 418 (m).

$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ): $\delta$ [ppm] = 7.31 (m, 2 H, 2 $\times$ CH), 7.50 (m, 5 H, $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 7.55 (m, 1H, CH), 8.22 (m, 1 H, CH), 8.58 (d, $J = 3.4$ Hz, 1 H, CH), 12.51 (s, br, 1 H, NH).
$^{13}\text{C-NMR}$	(75.5 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ): $\delta$ [ppm] = 109.8 ( $\text{C}_q$ ), 113.1 (CH), 121.5 (CH), 123.3 (CH), 124.3 (CH), 126.2 ( $\text{C}_q$ ), 127.4 ( $\text{C}_q$ ), 129.6 (2 $\times$ CH), 129.8 (CH), 134.8 (2 $\times$ CH), 136.8 ( $\text{C}_q$ ), 139.1 (CH), 177.8 ( $\text{C}_q$ ), 191.6 (C=O).
EI-MS	$m/z$ [%] = 282 $[[\text{M}+\text{H}]^+, 1]$ , 144 [76], 43 [100].
HR-EI-MS	für $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber.: 282.0589, gef.: 282.0567.
Summenformel	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$ (M = 281.33 g/mol)

#### 8.6.4.4 *N*-[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-acetamid (**178**)



Methode A: 65.0 mg (0.22 mmol) **177** und 32.0 mg (0.22 mmol) *N*-Amidino-*N'*-nitroharnstoff (**172**) werden in 5.00 ml Wasser suspendiert und am Rückfluß erhitzt, bis eine klare Lösung entsteht. Anschließend lässt man weitere 30 Minuten sieden. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC an RP-18 (System 6) aufgetrennt. Man erhält **178** als farblosen Feststoff.

Ausbeute 17.0 mg (22 %)

Methode B: Zu einer Lösung aus 48.0 mg (0.23 mmol) (Indol-3-yl)glyoxylchlorid (**156**) in 5.00 ml abs. DMF gibt man 47.0 mg (0.46 mmol, 64.0  $\mu\text{l}$ )  $\text{NEt}_3$  und 48.0 mg (0.23 mmol) **204**. Man erwärmt die Reaktionslösung für vier Stunden unter Rühren auf 60 °C und entfernt anschließend das Lösungsmittel im Vakuum. Die Reinigung erfolgt mit Hilfe der präparativen HPLC an RP-18 (System 7). Das Produkt wird als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute 23.0 mg (29 %)

Methode C: Eine Suspension aus 48.0 mg (0.23 mmol) **204** in 2.00 ml abs. DMF und 23.0 mg (0.23 mmol, 32.0  $\mu\text{l}$ )  $\text{NEt}_3$  wird bei Raumtemperatur 15 Minuten gerührt. Anschließend gibt man 65.0 mg (0.23 mmol) **211** in 2.00 ml abs. DMF hinzu und erwärmt für vier Stunden unter

Rühren auf 40 °C, wobei eine klare Lösung entsteht. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Produkt flashchromatographisch an RP-18 mit Methanol als Laufmittel gereinigt. Man erhält einen farblosen Feststoff.

Ausbeute 60.0 mg (75 %)

Schmp. 105–107 °C

$R_f$ -Wert 0.75 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)

$R_t$ -Wert (HPLC): 16.5 min (System 3)

UV (CH<sub>3</sub>OH):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) = 210 nm (4.39), 256 nm (3.96), 267 nm (sh, 3.92), 273 nm (sh, 3.87), 327 nm (sh, 3.88).

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3400 (s), 2944 (w), 2868 (w), 1726 (m), 1695 (m), 1619 (m), 1541 (m), 1507 (m), 1457 (w), 1437 (m), 1373 (w), 1312 (w), 1240 (m), 1204 (m), 1186 (m), 1157 (m), 1134 (m), 1012 (w), 839 (w), 802 (w), 772 (w), 750 (w), 722 (w), 650 (w), 600 (w), 426 (w).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  [ppm] = 1.49 (m, 4 H, 2 × CH<sub>2</sub>), 3.12 (q,  $J$  = 6.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.22 (q,  $J$  = 6.0 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.25 (m, 2 H, 2 × CH), 7.53 (m, 2 H, CH, NH), 8.20 (br, 3 H, NH + NH<sub>2</sub>), 8.23 (m, 1 H, CH), 8.72 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1 H, NH), 8.73 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 1 H, CH), 10.21 (s, 1 H, NH), 12.25 (s, 1 H, NH).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  [ppm] = 26.4 (CH<sub>2</sub>), 26.7 (CH<sub>2</sub>), 38.3 (CH<sub>2</sub>), 39.1 (CH<sub>2</sub>), 112.4 (C<sub>q</sub>), 112.7 (CH), 121.4 (CH), 122.7 (CH), 123.6 (CH), 126.4 (C<sub>q</sub>), 136.5 (C<sub>q</sub>), 138.6 (CH), 153.5 (C<sub>q</sub>), 155.6 (C<sub>q</sub>), 163.8 (C<sub>q</sub>), 182.5 (C=O).

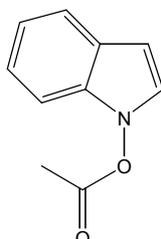
(+)-ESI-MS  $m/z$  [%] = 689 [[2M+H]<sup>+</sup>, 4], 345 [[M+H]<sup>+</sup>, 100].

HR-(+)-ESI-MS für [M+H]<sup>+</sup> ber.: 345.1675, gef.: 345.1673.

Summenformel C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (M = 344.37 g/mol)

## 8.6.5 Experimentelle Daten zur Synthese von *N*-[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(1-hydroxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-acetamid (**201**)

### 8.6.5.1 *N*-Acetoxyindol (**193**)<sup>[139,145,146]</sup>

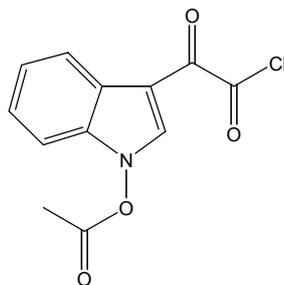


Eine Lösung aus 6.95 g (50.7 mmol, 5.98 ml) 2-Nitrotoluol (**187**), 12.7 g (107 mmol, 14.2 ml) *N,N*-Dimethylformamidmethylacetal (**188**) und 773 mg (5.00 mmol, 759  $\mu$ l) DBU in 55.0 ml abs. DMF wird für 35 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und erhält das Enamin **190** in Form eines tiefroten Öls, welches in 325 ml Diethylether aufgenommen und ohne weitere Reinigung sofort weiter umgesetzt wird. Nach Zugabe von 10.0 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in 70.0 ml Wasser zur etherischen Lösung von **190** kühlt man auf 0 °C und gibt portionsweise 31.5 g Zink-Pulver unter Rühren dazu. Anschließend wird noch drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann über Kieselgel abfiltriert. Das Filtrat wird mit wäßriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und dann im Vakuum etwas eingeeengt. Zu der etherischen Lösung gibt man dann 7.76 g (76.0 mmol, 7.19 ml) Essigsäureanhydrid und rührt 12 Stunden bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wird zuerst mit wäßriger  $\text{NaHCO}_3$ - und dann mit  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und reinigt das erhaltene Öl flash-chromatographisch an Kieselgel mit Chloroform/Methanol 100/1 als Laufmittel. Das Produkt erstarrt allmählich zu einem rosafarbenen Feststoff und wird bei -20 °C unter Lichtausschluss gelagert.

Ausbeute	6.18 g (70 % über drei Stufen, Lit. <sup>[145]</sup> 61 %) rosafarbener Feststoff
Schmp.	31–33 °C (Lit. <sup>[139]</sup> orangefarbenes Öl)
$R_f$ -Wert	0.77 ( $\text{SiO}_2$ , Chloroform/Methanol 100/1)
$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ [ppm] = 2.33 (s, 3 H, $\text{CH}_3$ ), 6.47 (dd, $J = 3.4$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1 H, CH), 7.13 (m, 2 H, 2 $\times$ CH), 7.21 (m, 2 H, 2 $\times$ CH), 7.59 (dt, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1 H, CH).

$^{13}\text{C}$ -NMR	(75.5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ [ppm] = 18.0 ( $\text{CH}_3$ ), 100.0 (CH), 108.2 (CH), 120.7 (CH), 121.3 (CH), 123.0 (CH), 124.6 ( $\text{C}_q$ ), 125.1 (CH), 133.9 ( $\text{C}_q$ ), 168.5 (C=O).
EI-MS	$m/z$ [%] = 175 [ $[\text{M}]^+$ , 33], 133 [100], 116 [55], 104 [37], 89 [29], 77 [17], 63 [15], 51 [10], 43 [24].
HR-EI-MS	für $[\text{M}]^+$ ber.: 175.0633, gef.: 175.0635.
EA	ber. [%]: C 68.56 H 5.18 N 8.00 gef. [%]: C 68.50 H 5.20 N 8.00
Summenformel	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$ (M = 175.19 g/mol)

### 8.6.5.2 (*N*-Acetoxyindol-3-yl)glyoxylchlorid (**194**)



Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von (Indol-3-yl)glyoxylchloriden

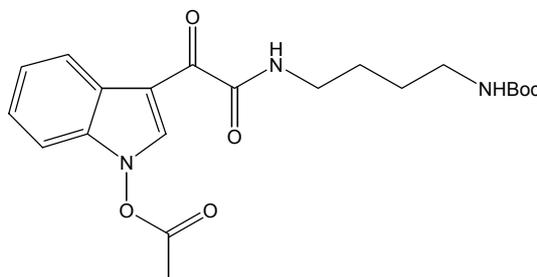
876 mg (5.00 mmol) *N*-Acetoxyindol (**193**) in 5.00 ml abs. Diethylether

889 mg (7.00 mmol, 595  $\mu\text{l}$ ) Oxalylchlorid (**155**) in 5.00 ml abs. Diethylether

Reaktionsdauer 2 h

Ausbeute 620 mg (47 %) gelber Feststoff

Summenformel  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{ClNO}_4$  (M = 265.65 g/mol)

**8.6.5.3**      **{4-[2-(*N*-Acetoxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-acetylamino]butyl}-carbaminsäure-*tert*-butylester (195)**

Eine Suspension aus 266 mg (1.00 mmol) (*N*-Acetoxyindol-3-yl)glyoxylchlorid (**194**) und 264 mg (1.40 mmol) *N*-Boc-1,4-Diaminobutan (**168**) in 20.0 ml abs. Dichlormethan wird fünf Stunden am Rückfluß erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der resultierende Feststoff durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 1/2 gereinigt.

Ausbeute	198 mg (47 %) hellgelber Feststoff
Schmp.	117–119 °C
$R_f$ -Wert	0.74 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/ Essigsäureethylester 1/2)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 210 nm (4.21), 255 nm (3.93), 270 nm (sh, 3.73), 323 nm (3.85).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3384 (m), 3348 (m), 3153 (m), 3053 (s), 2976 (m), 2936 (m), 2869 (w), 1815 (m), 1681 (s), 1636 (s), 1499 (s), 1484 (m), 1451 (m), 1369 (s), 1342 (m), 1326 (m), 1272 (m), 1251 (m), 1162 (s), 1113 (m), 1080 (w), 1053 (w), 1003 (w), 833 (m), 772 (m), 746 (m), 687 (w), 624 (w), 607 (w), 569 (w), 557 (w), 537 (w).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.36 (s, 9 H, 3 × CH <sub>3</sub> ), 1.46 (m, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 2.46 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 2.91 (q, $J$ = 5.8 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.20 (q, $J$ = 6.0 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 6.77 (t, $J$ = 5.8 Hz, 1 H, NH), 7.36 (m, 2 H, 2 × CH), 7.56 (dd, $J$ = 7.7 Hz, $J$ = 1.2 Hz, 1 H, CH), 8.29 (dd, $J$ = 6.7 Hz, $J$ = 1.4 Hz, 1 H, CH), 8.80 (t, $J$ = 6.0 Hz, 1 H, NH), 8.98 (s, 1 H, CH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 18.2 (CH <sub>3</sub> ), 26.4 (CH <sub>2</sub> ), 27.2 (CH <sub>2</sub> ), 28.4 (3 × CH <sub>3</sub> ), 38.5 (CH <sub>2</sub> ), 39.7 (CH <sub>2</sub> ), 77.5 (C <sub>q</sub> ), 108.0 (C <sub>q</sub> ), 109.5 (CH),

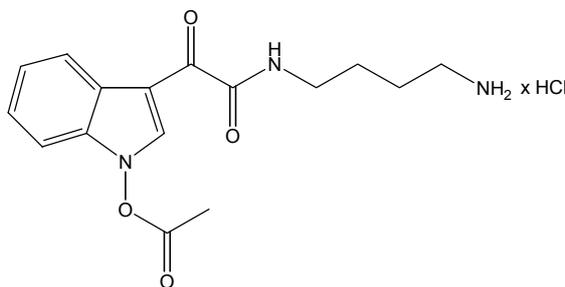
121.7 (CH), 122.8 (C<sub>q</sub>), 123.9 (CH), 124.8 (CH), 132.9 (C<sub>q</sub>), 136.2 (CH), 155.8 (C=O), 163.0 (C=O), 168.6 (C=O), 182.4 (C=O).

(+)-FAB-MS  $m/z$  [%] = 418 [[M+H]<sup>+</sup>, 12].

HR-FAB-MS für [M+H]<sup>+</sup> ber.: 418.1978, gef.: 418.1970.

Summenformel C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (M = 417.46 g/mol)

#### 8.6.5.4 *N*-(4-Aminobutyl)-2-(1-acetoxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-acetamid-Hydrochlorid (200)



Man versetzt 125 mg (0.30 mmol) **195** mit 20.0 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester und rührt bei Raumtemperatur eine Stunde. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Produkt getrocknet.

Ausbeute 74.0 mg (70 %) farbloser Feststoff

Schmp. 119–121 °C

$R_f$ -Wert 0.77 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)

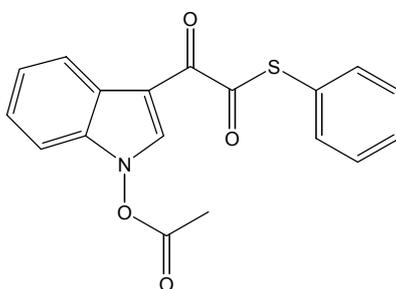
UV (CH<sub>3</sub>OH):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) = 210 nm (4.51), 256 nm (4.22), 274 nm (sh, 4.01), 328 nm (4.14).

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3436 (s), 2931 (w), 1815 (w), 1679 (s), 1635 (m), 1499 (m), 1483 (m), 1449 (w), 1429 (w), 1374 (m), 1340 (w), 1205 (m), 1183 (m), 1158 (m), 1136 (m), 1080 (w), 1010 (w), 836 (w), 802 (w), 748 (w), 722 (w), 601 (w), 426 (w).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  [ppm] = 1.56 (m, 4 H, 2 × CH<sub>2</sub>), 2.47 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 2.81 (s, breit, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.23 (q,  $J$  = 5.8 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.37 (m, 2 H, 2 × CH), 7.57 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1 H, CH), 7.66 (s, breit, 2 H, NH<sub>2</sub>), 8.29 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 1 H, CH), 8.87 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1 H, NH), 8.99 (s, 1 H, CH).

$^{13}\text{C}$ -NMR	(75.5 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ): $\delta$ [ppm] = 18.2 (CH <sub>3</sub> ), 24.7 (CH <sub>2</sub> ), 25.9 (CH <sub>2</sub> ), 38.1 (CH <sub>2</sub> ), 38.8 (CH <sub>2</sub> ), 108.0 (C <sub>q</sub> ), 109.5 (CH), 121.6 (CH), 122.8 (C <sub>q</sub> ), 124.0 (CH), 124.8 (CH), 132.9 (C <sub>q</sub> ), 136.3 (CH), 163.0 (C=O), 168.7 (C=O), 182.2 (C=O).
(+)-FAB-MS	$m/z$ [%] = 318 $[[\text{M}+\text{H}]^+$ , 100].
HR-FAB-MS	für $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber.: 318.1454, gef.: 318.1444.
Summenformel	$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4 \times \text{HCl}$ (M = 353.80 g/mol)

#### 8.6.5.5 (1-Acetoxy-1*H*-indol-3-yl)-oxo-thioessigsäure-*S*-phenylester (212)

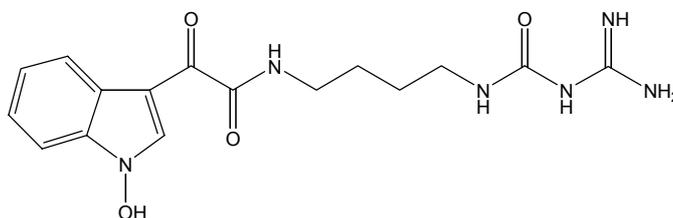


64.0 mg (0.24 mmol) (*N*-Acetoxy-indol-3-yl)glyoxylchlorid (**194**) und 46.0 mg (0.27 mmol) Kupferthiophenolat (**210**) werden in 7.00 ml abs. Acetonitril suspendiert und drei Stunden bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand flash-chromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 1/1 gereinigt. Man erhält ein gelbes Produkt.

Ausbeute	60 mg (73 %) gelber Feststoff
Schmp.	78–80 °C
$R_f$ -Wert	0.82 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/1)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\text{max}}$ (log $\epsilon$ ) = 209 nm (4.54), 262 nm (3.96), 270 nm (sh, 3.92), 278 nm (3.85), 343 nm (3.95).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3436 (s), 3142 (w), 3057 (w), 2958 (w), 2931 (w), 1809 (m), 1686 (s), 1638 (s), 1580 (m), 1508 (m), 1479 (m), 1449 (m), 1440 (m), 1347 (m), 1342 (m), 1326 (m), 1247 (m), 1208 (m), 1149 (m), 1113 (m), 1071 (m), 1024 (m), 999 (m), 986 (m), 843 (m), 775 (m), 744 (s), 688 (m), 594 (m), 559 (m), 533 (m), 419 (m).

$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ [ppm] = 2.39 (s, 3 H, $\text{CH}_3$ ), 7.24 (m, 1 H, CH), 7.37 (m, 2 H, $2 \times \text{CH}$ ), 7.46 (m, 6 H, CH, $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 8.47 (s, 1H, CH). (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ): $\delta$ [ppm] = 2.46 (s, 3 H, $\text{CH}_3$ ), 7.42 (m, 2 H, $2 \times \text{CH}$ ), 7.51 (m, 5 H, $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 7.61 (m, 1 H, CH), 8.30 (m, 1 H, CH), 8.88 (s, 1 H, CH).
$^{13}\text{C-NMR}$	(75.5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ [ppm] = 17.7 ( $\text{CH}_3$ ), 106.8 ( $\text{C}_q$ ), 108.5 (CH), 122.7 (CH), 123.4 ( $\text{C}_q$ ), 124.4 (CH), 125.2 (CH), 127.4 ( $\text{C}_q$ ), 129.3 ( $2 \times \text{CH}$ ), 129.6 (CH), 133.0 ( $\text{C}_q$ ), 134.6 ( $2 \times \text{CH}$ ), 134.8 (CH), 167.3 ( $\text{C}_q$ ), 177.8 ( $\text{C}_q$ ), 192.2 ( $\text{C}_q$ ).
(+)-FAB-MS	$m/z$ [%] = 340 $[[\text{M}+\text{H}]^+, 35]$ .
HR-FAB-MS	für $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber.: 340.0644, gef.: 340.0464.
Summenformel	$\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$ ( $M = 339.37$ g/mol)

#### 8.6.5.6 *N*-[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(1-hydroxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamid (**201**)



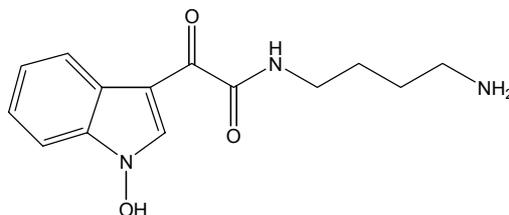
Methode A: Man suspendiert 212 mg (0.60 mmol) **200** und 88.0 mg (0.6 mmol) *N*-Amidino-*N'*-nitroharnstoff (**172**) in 15.0 ml Wasser und lässt drei Stunden refluxieren. Die noch warme Lösung wird filtriert, das Filtrat vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird mittels präparativer HPLC an RP-18 (System 6) aufgetrennt. Man erhält **201** als Hauptprodukt als hellgelben Feststoff. Außerdem wird **202** als Nebenprodukt isoliert.

Ausbeute 106 mg (49 %)

Methode B: Eine Suspension aus 15.0 mg (0.07 mmol) **204** in 1.50 ml abs. DMF und 7.00 mg (0.07 mmol, 10.0  $\mu\text{l}$ )  $\text{NEt}_3$  wird bei Raumtemperatur 15 Minuten gerührt. Anschließend gibt man 25.0 mg (0.07 mmol) **212** in 1.50 ml abs. DMF hinzu und rührt für vier Stunden bei 40 °C, wobei sich eine klare Lösung bildet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Produkt mittels präparativer HPLC an RP-18 isoliert (System 6). Man erhält einen hellgelben Feststoff.

---

Ausbeute	8.00 mg (30 %)
Schmp.	163–165 °C
$R_f$ -Wert	0.73 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)
$R_t$ -Wert	(HPLC): 16.4 min (System 3)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 210 nm (4.41), 262 nm (3.99), 273 nm (sh, 3.82), 336 nm (3.97).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3400 (s), 2936 (m), 2863 (m), 1685 (s), 1628 (s), 1496 (m), 1436 (m), 1366 (m), 1340 (m), 1323 (m), 1284 (m), 1235 (m), 1204 (m), 1186 (m), 1138 (m), 1080 (w), 1007 (w), 836 (w), 804 (m), 748 (m), 723 (m), 605 (m).
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.46 (m, breit, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 1.52 (m, br, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.11 (q, $J$ = 6.2 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.21 (q, $J$ = 6.2 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 7.30 (dd, $J$ = 7.7 Hz, $J$ = 7.4 Hz, 1 H, CH), 7.35 (dd, $J$ = 8.0 Hz, $J$ = 7.4 Hz, 1 H, CH), 7.52 (t, breit, 1 H, NH), 7.55 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1 H, CH), 8.09 (s, breit, 3 H, NH + NH <sub>2</sub> ), 8.25 (d, $J$ = 7.7 Hz, 1 H, CH), 8.74 (s, 1 H, CH), 8.76 (t, $J$ = 6.2 Hz, 1 H, NH), 9.82 (s, 1 H, NH), 12.39 (s, 1 H, OH). (300 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 1.67 (m, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.30 (t, $J$ = 6.5 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.41 (t, $J$ = 6.6 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 7.33 (dd, $J$ = 7.9 Hz, $J$ = 7.3 Hz, 1 H, CH), 7.38 (dd, $J$ = 7.9 Hz, $J$ = 7.3 Hz, 1 H, CH), 7.57 (d, $J$ = 7.9 Hz, 1 H, CH), 8.36 (d, $J$ = 7.9 Hz, 1 H, CH), 8.81 (s, 1 H, CH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 26.4 (CH <sub>2</sub> ), 26.7 (CH <sub>2</sub> ), 38.4 (CH <sub>2</sub> ), 39.1 (CH <sub>2</sub> ), 106.5 (C <sub>q</sub> ), 109.9 (CH), 121.6 (CH), 123.4 (C <sub>q</sub> ), 123.5 (CH), 124.0 (CH), 133.8 (C <sub>q</sub> ), 135.5 (CH), 153.6 (C <sub>q</sub> ), 155.6 (C <sub>q</sub> ), 163.5 (C <sub>q</sub> ), 181.3 (C=O). (75.5 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 27.9 (CH <sub>2</sub> ), 28.2 (CH <sub>2</sub> ), 40.0 (CH <sub>2</sub> ), 40.7 (CH <sub>2</sub> ), 108.5 (C <sub>q</sub> ), 110.6 (CH), 123.3 (CH), 124.8 (C <sub>q</sub> ), 125.4 (CH), 125.5 (CH), 135.8 (C <sub>q</sub> ), 137.3 (CH), 155.3 (C <sub>q</sub> ), 157.8 (C <sub>q</sub> ), 165.8 (C <sub>q</sub> ), 182.1 (C=O).
(+)-ESI-MS	$m/z$ [%] = 721 [[2M+H] <sup>+</sup> , 4] 361 [[M+H] <sup>+</sup> , 100].
HR-(+)-ESI-MS	für [M+H] <sup>+</sup> ber.: 361.1624, gef.: 361.1859.
ESI-MS/MS	$m/z$ = 276, 259, 241, 160.
Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> (M = 360.37 g/mol)

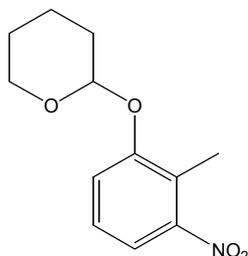
**8.6.5.7 N-(4-Aminobutyl)-2-(1-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-acetamid (202)**

**202** entsteht bei der Darstellung von **201** nach Methode A und wird als Reinsubstanz bei der präparativen HPL-Chromatographie an RP-18 (System 6) erhalten.

Ausbeute	50.0 mg (30 %) hellgelber Feststoff
Schmp.	168–170 °C
$R_f$ -Wert	0.84 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)
$R_f$ -Wert	(HPLC): 22.9 min (System 6)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 211 nm (4.54), 261 nm (4.21), 273 nm (sh, 4.04), 337 nm (4.14).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3412 (m), 3332 (m), 3145 (m), 2951 (m), 1663 (s), 1634 (s), 1536 (m), 1496 (s), 1453 (m), 1429 (m), 1390 (m), 1342 (m), 1326 (m), 1276 (w), 1232 (m), 1200 (s), 1185 (s), 1160 (m), 1140 (m), 1130 (m), 1084 (w), 1010 (w), 936 (w), 884 (m), 837 (w), 808 (m), 772 (w), 746 (m), 717 (m), 642 (m), 602 (m), 550 (w), 518 (w), 468 (w), 424 (m).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.56 (m, br, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 2.82 (s, breit, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.23 (q, $J$ = 6.0 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 7.32 (m, 2 H, 2 × CH), 7.55 (dd, $J$ = 6.6 Hz, $J$ = 1.5 Hz, 1 H, CH), 7.80 (s, breit, 2 H, NH <sub>2</sub> ), 8.25 (dd, $J$ = 6.6 Hz, $J$ = 1.5 Hz, 1 H, CH), 8.75 (s, 1 H, CH), 8.79 (t, $J$ = 6.0 Hz, 1 H, NH), 12.79 (s, 1 H, OH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 26.7 (CH <sub>2</sub> ), 26.0 (CH <sub>2</sub> ), 38.1 (CH <sub>2</sub> ), 38.9 (CH <sub>2</sub> ), 106.4 (C <sub>q</sub> ), 109.9 (CH), 121.5 (CH), 123.5 (C <sub>q</sub> ), 123.5 (CH), 124.0 (CH), 133.8 (C <sub>q</sub> ), 135.6 (CH), 163.5 (C <sub>q</sub> ), 181.1 (C=O).
(+)-ESI-MS	$m/z$ [%] = 551 [[2M+H] <sup>+</sup> , 3] 276 [[M+H] <sup>+</sup> , 100].
HR-(+)-ESI-MS	für [M+H] <sup>+</sup> ber.: 2,76.1348 gef.: 276.1354.
ESI-MS/MS	$m/z$ = 259, 241, 160.
Summenformel	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> (M = 275.31 g/mol)

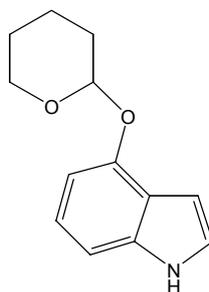
## 8.6.6 Experimentelle Daten zur Synthese von *N*-[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(4-hydroxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-acetamid (**222**)

### 8.6.6.1 2-Methyl-3-nitro-1-( $\alpha$ -tetrahydropyranloxy)benzol (**215**)<sup>[157,158]</sup>



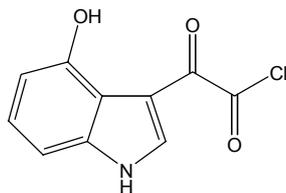
Zu einer Lösung aus 1.53 g (10.0 mmol) 2-Methyl-3-nitrophenol (**213**) in 11.0 ml Essigsäureethylester werden 3.07 g (36.5 mmol, 3.33 ml) 3,4-Dihydropyran (**214**) und 2.00 ml mit HCl-gesättigter Essigsäureethylester gegeben. Man lässt 24 Stunden bei Raumtemperatur rühren und gießt anschließend das Reaktionsgemisch in 50.0 ml 2%iger NaOH-Lösung. Die organische Phase wird je zweimal mit NaOH, H<sub>2</sub>O und mit NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und reinigt das erhaltene Öl flash-chromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 3/1.

Ausbeute	2.09 g (88 %, Lit. <sup>[158]</sup> 82 %) farbloses Öl			
R <sub>F</sub> -Wert	0.73 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 3/1)			
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ [ppm] = 1.49–2.06 (m, 6 H, 3 $\times$ CH <sub>2</sub> ), 2.40 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 3.65–3.47 (m, 1 H, CH <sub>2</sub> ), 3.81–3.90 (m, 1 H, CH <sub>2</sub> ), 5.46 (t, $J$ = 3.0 Hz, 1 H, CH), 7.21 (dd, $J$ = 8.3 Hz, $J$ = 8.0 Hz, 1 H, CH), 7.32 (dd, $J$ = 8.3 Hz, $J$ = 1.2 Hz, 1 H, CH), 7.43 (dd, $J$ = 8.0 Hz, $J$ = 1.2 Hz, 1 H, CH).			
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ [ppm] = 11.7 (CH <sub>3</sub> ), 18.6 (CH <sub>2</sub> ), 25.0 (CH <sub>2</sub> ), 30.2 (CH <sub>2</sub> ), 62.0 (CH <sub>2</sub> ), 96.7 (CH), 116.7 (CH), 118.1 (CH), 122.5 (C <sub>q</sub> ), 126.6 (CH), 151.0 (C <sub>q</sub> ), 155.8 (C <sub>q</sub> ).			
GC/EI-MS	$m/z$ [%] = 237 [[M] <sup>+</sup> , 1], 85 [100].			
EA	ber. [%]:	C 60.75	H 6.37	N 5.90
	gef. [%]:	C 60.86	H 6.44	N 5.81
Summenformel	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> (M = 237.25 g/mol)			

**8.6.6.2 4-( $\alpha$ -Tetrahydropyranyloxy)indol (217)<sup>[158]</sup>**

1.66 g (7.00 mmol) 2-Methyl-3-nitro-1-( $\alpha$ -tetrahydropyranyloxy)benzol (**215**), 1.67 g (14.0 mmol, 1.87 ml) *N,N*-Dimethylformamidmethylacetal (**188**) und 108 mg (0.70 mmol, 106  $\mu$ l) DBU werden in 20.0 ml abs. DMF gelöst und für 24 Stunden bei 130 °C gerührt. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das resultierende tiefrote Öl wird in 25.0 ml Essigsäureethylester aufgenommen, mit 200 mg Pd/C (10-proz.) versetzt und drei Stunden bei einem Wasserstoffdruck von 3.5 bar bei Raumtemperatur hydriert. Man filtriert das Reaktionsgemisch durch Celite<sup>®</sup> und engt das Filtrat bis zur Trockene ein. Der Rückstand wird flash-chromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 3/1 gereinigt. Man erhält einen leicht rosafarbenen Feststoff.

Ausbeute	910 mg (60 %, Lit. <sup>[158]</sup> 60 %) rosafarbener Feststoff
Schmp.	128–130 °C (Lit. <sup>[158]</sup> 128–131 °C)
$R_f$ -Wert	0.55 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 3/1)
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ [ppm] = 1.58–2.18 (m, 6 H, 3 $\times$ CH <sub>2</sub> ), 3.58–3.65 (m, 1 H, CH <sub>2</sub> ), 3.96–4.04 (m, 1 H, CH <sub>2</sub> ), 5.62 (t, $J$ = 3.2 Hz, 1 H, CH), 6.67 (m, 1 H, CH), 6.79 (dd, $J$ = 7.5 Hz, $J$ = 1.0 Hz, 1 H, CH), 7.02 (dt, $J$ = 8.2 Hz, $J$ = 1.0 Hz, 1 H, CH), 7.09 (m, 2 H, 2 $\times$ CH), 8.15 (s, br, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ [ppm] = 18.9 (CH <sub>2</sub> ), 25.3 (CH <sub>2</sub> ), 30.5 (CH <sub>2</sub> ), 62.0 (CH <sub>2</sub> ), 96.4 (CH), 99.8 (CH), 104.1 (CH), 105.1 (CH), 119.5 (C <sub>q</sub> ), 122.7 (2 $\times$ CH), 137.5 (C <sub>q</sub> ), 150.4 (C <sub>q</sub> ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 217 [[M] <sup>+</sup> , 3], 133 [100].
Summenformel	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub> (M = 217.26 g/mol)

**8.6.6.3 (4-Hydroxyindol-3-yl)glyoxylchlorid (218)**

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von (Indol-3-yl)glyoxylchloriden

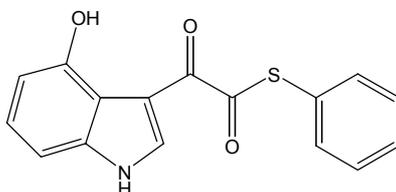
218 mg (1.00 mmol) 4-( $\alpha$ -Tetrahydropyranyloxy)indol (**217**) in 5.00 ml abs. Diethylether

178 mg (1.40 mmol, 119  $\mu$ l) Oxalylchlorid (**155**)

Reaktionsdauer 1.5 h

Ausbeute 184 mg (82 %) tiefrotes Pulver

Summenformel  $C_{10}H_6ClNO_3$  (M = 223.61 g/mol)

**8.6.6.4 (4-Hydroxy-1H-indol-3-yl)-oxo-thioessigsäure-S-phenylester (219)**

31.0 mg (0.14 mmol) (4-Hydroxyindol-3-yl)glyoxylchlorid (**218**) und 26.0 mg (0.15 mmol) Kupferthiophenolat (**210**) werden in 5.00 ml abs. Acetonitril suspendiert und zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 1/2 gereinigt. Man erhält ein rotes, kristallines Produkt.

Ausbeute 27.0 mg (66 %) roter Feststoff

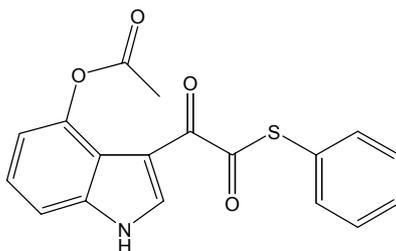
Schmp. Zersetzung > 200 °C

$R_f$ -Wert 0.71 (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Essigsäureethylester 1/2)

UV (CH<sub>3</sub>OH):  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) = 204 nm (4.60), 209 nm (sh, 4.59), 246 nm (4.13), 271 nm (4.08), 382 nm (3.77).

IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3395 (m), 3282 (s), 3155 (m), 3076 (m), 1741 (m), 1693 (s), 1682 (s), 1654 (m), 1634 (m), 1595 (s), 1577 (s), 1508 (m), 1497 (m), 1479 (m), 1434 (s), 1404 (m), 1366 (m), 1330 (s), 1312 (s), 1257 (m), 1222 (w), 1166 (m), 1136 (s), 1069 (w), 1057 (w), 1038 (w), 1024 (m), 1005 (s), 939 (w), 884 (w), 869 (w), 845 (m), 783 (m), 768 (s), 752 (s), 731 (m), 691 (m), 670 (m), 645 (w), 623 (m), 614 (m), 590 (m), 534 (m), 490 (w), 478 (m), 435 (m), 413 (w).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 6.62 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 0.4$ Hz, 1 H, CH), 6.99 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 0.4$ Hz, 1 H, CH), 7.18 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 7.9$ Hz, 1H, CH), 7.52 (m, 5 H, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ), 8.63 (s, 1 H, CH), 10.62 (s, 1 H, OH), 12.88 (s, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 104.6 (CH), 108.9 (CH), 111.0 (C <sub>q</sub> ), 114.7 (C <sub>q</sub> ), 127.1 (CH), 127.4 (C <sub>q</sub> ), 129.7 (2 × CH), 130.1 (CH), 134.8 (2 × CH), 139.3 (C <sub>q</sub> ), 141.5 (CH), 151.6 (C <sub>q</sub> ), 178.9 (C <sub>q</sub> ), 190.8 (C=O).
EI-MS	$m/z$ [%] = 297 [[M] <sup>+</sup> , 2], 159 [94], 131 [52], 110 [100], 76 [19], 66 [29].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 297.0460, gef.: 297.0448.
Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> S (M = 297.33 g/mol)

#### 8.6.6.5 (4-Acetoxy-1*H*-indol-3-yl)-oxo-thioessigsäure-*S*-phenylester (220)

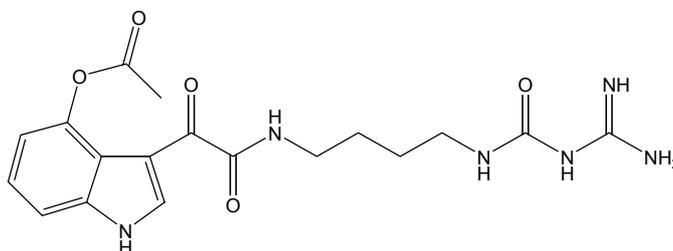


24.0 mg (0.08 mmol) **219** werden in 10.0 ml abs. Diethylether suspensiert. Man gibt 1.00 ml Acetanhydrid und eine Spatelspitze DMAP hinzu und lässt 12 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktionslösung wird je dreimal mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Brine gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand flash-chromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 1/1 gereinigt. Man erhält ein gelbes, kristallines Produkt.

Ausbeute 20.0 mg (74 %) gelber Feststoff

Schmp.	173–174 °C
$R_f$ -Wert	0.57 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/1)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 209 nm (4.64), 266 nm (4.09), 274 nm (sh, 4.02), 341 nm (3.96).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3315 (s), 3148 (m), 3060 (m), 3020 (w), 1765 (s), 1734 (s), 1691 (s), 1659 (m), 1645 (s), 1628 (s), 1580 (m), 1505 (s), 1478 (m), 1456 (m), 1441 (m), 1424 (s), 1368 (m), 1311 (s), 1256 (m), 1210 (s), 1164 (m), 1138 (m), 1064 (m), 1042 (m), 1025 (m), 1008 (s), 1001 (s), 954 (w), 905 (m), 867 (w), 846 (m), 792 (s), 777 (s), 746 (s), 704 (w), 688 (m), 642 (m), 615 (w), 600 (m), 586 (m), 525 (m), 492 (w), 452 (w), 424 (m).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 2.38 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 6.95 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 7.32 (dd, $J$ = 8.1 Hz, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 7.47 (d, $J$ = 8.1 Hz, 1H, CH), 7.52 (m, 5 H, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ), 8.58 (s, 1 H, CH), 12.74 (s, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 21.4 (CH <sub>3</sub> ), 109.6 (C <sub>q</sub> ), 111.1 (CH), 116.7 (CH), 119.2 (C <sub>q</sub> ), 125.0 (CH), 127.3 (C <sub>q</sub> ), 129.6 (2 × CH), 129.9 (CH), 134.8 (2 × CH), 139.3 (C <sub>q</sub> ), 140.7 (CH), 144.4 (C <sub>q</sub> ), 169.5 (COCH <sub>3</sub> ), 177.7 (C <sub>q</sub> ), 191.9 (C=O).
(+)-FAB-MS	$m/z$ [%] = 340 [[M+H] <sup>+</sup> , 28].
HR-FAB-MS	für [M+H] <sup>+</sup> ber.: 340.0644, gef.: 340.0681.
Summenformel	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S (M = 339.37 g/mol)

#### 8.6.6.6 *N*-[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(4-acetoxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-acetamid (221)

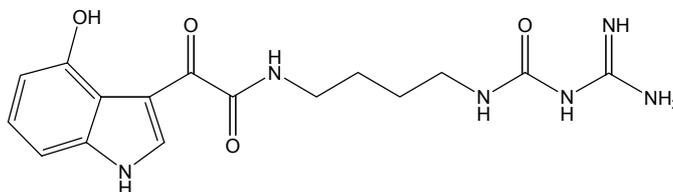


Eine Suspension aus 21.0 mg (0.10 mmol) **204** in 2.00 ml abs. DMF und 10.0 mg (0.10 mmol, 14.0  $\mu$ l) NEt<sub>3</sub> wird bei Raumtemperatur 15 Minuten gerührt. Anschließend gibt man 34.0 mg (0.10 mmol) **220** in 2.00 ml abs. DMF hinzu und erwärmt für drei Stunden unter Rühren auf 40 °C. Dabei beobachtet man, dass sich der Feststoff auflöst. Das Lösungsmittel wird im

Vakuum entfernt und das Produkt mittels präparativer HPLC an RP-18 mit Methanol als Laufmittel gereinigt (System 6). Man erhält einen blaßgelben Feststoff.

Ausbeute	27.0 mg (67 %) blaßgelber Feststoff
Schmp.	66–68 °C
$R_f$ -Wert	0.82 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA) 0.04 (SiO <sub>2</sub> , Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3)
$R_f$ -Wert	(HPLC): 14.9 min (System 3)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 210 nm (4.42), 256 nm (4.04), 271 nm (sh, 3.94), 319 nm (3.87).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3370 (m), 2943 (m), 2868 (w), 1729 (m), 1695 (s), 1646 (s), 1578 (m), 1542 (m), 1501 (m), 1457 (m), 1422 (m), 1369 (m), 1343 (w), 1312 (m), 1236 (m), 1205 (s), 1140 (m), 1043 (m), 1004 (w), 914 (w), 840 (m), 797 (m), 743 (m), 722 (m), 652 (m), 605 (m).
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.46 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 1.51 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 2.36 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 3.12 (q, $J$ = 6.1 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.20 (q, $J$ = 6.1 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 6.88 (d, $J$ = 7.6 Hz, 1 H, CH), 7.26 (dd, $J$ = 8.0 Hz, $J$ = 7.6 Hz, 1 H, CH), 7.43 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1 H, CH), 7.53 (t, $J$ = 6.1 Hz, 1 H, NH), 8.14 (s, breit, 3 H, NH + NH <sub>2</sub> ), 8.61 (d, $J$ = 2.9 Hz, 1 H, CH), 8.65 (t, $J$ = 6.1 Hz, 1 H, NH), 10.01 (s, 1 H, NH), 12.44 (d, $J$ = 2.9 Hz, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(151 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 21.5 (CH <sub>3</sub> ), 26.4 (CH <sub>2</sub> ), 26.7 (CH <sub>2</sub> ), 38.4 (CH <sub>2</sub> ), 39.1 (CH <sub>2</sub> ), 110.8 (CH), 112.4 (C <sub>q</sub> ), 116.0 (CH), 119.1 (C <sub>q</sub> ), 124.2 (CH), 139.1 (C <sub>q</sub> ), 140.0 (CH), 144.4 (C <sub>q</sub> ), 153.5 (C <sub>q</sub> ), 155.5 (C <sub>q</sub> ), 164.7 (C=O), 169.5 (C <sub>q</sub> ), 182.2 (C=O).
(+)-ESI-MS	$m/z$ [%] = 805 [[2M+H] <sup>+</sup> , 12], 403 [[M+H] <sup>+</sup> , 100].
HR-ESI-MS	für [M+H] <sup>+</sup> ber.: 403.1730, gef.: 403.1738.
Summenformel	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> (M = 402.41 g/mol)

### 8.6.6.7 *N*-[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(4-hydroxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamid (**222**)



Methode A: Man löst 20.0 mg (0.05 mmol) **221** in 5.00 ml Methanol und 2.00 ml Wasser und gibt eine Spatelspitze Lithiumhydroxid hinzu. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur zeigt das analytische HPL-Chromatogramm (System 3) vollständigen Umsatz. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Produkt flash-chromatographisch an RP-18 mit Methanol als Laufmittel gereinigt.

Ausbeute 12.0 mg (67 %) gelber Feststoff

Methode B: Eine Suspension aus 25.0 mg (0.12 mmol) **204** in 2.00 ml abs. DMF und 12.0 mg (0.12 mmol, 17.0  $\mu$ l)  $\text{NEt}_3$  wird bei Raumtemperatur 15 Minuten gerührt. Anschließend gibt man 36.0 mg (0.12 mmol) **219** in 2.00 ml abs. DMF hinzu und erwärmt für drei Stunden unter Rühren auf 40 °C. Dabei geht der Feststoff vollständig in Lösung und die Farbe verändert sich von rot nach gelb. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und reinigt das Produkt mit Hilfe der präparativen HPLC an RP-18 (System 6).

Ausbeute 17.0 mg (39 %) gelber Feststoff

Schmp. 103–105 °C

$R_f$ -Wert 0.75 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)

0.09 ( $\text{SiO}_2$ , Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3)

$R_t$ -Wert (HPLC): 16.3 min (System 3)

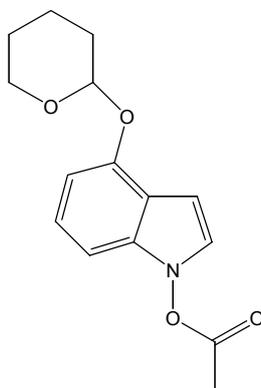
UV ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ) = 211 nm (4.42), 252 nm (4.04), 265 nm (sh, 3.98), 380 nm (3.65).

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3391 (s), 2929 (m), 2857 (m), 1729 (m), 1695 (s), 1678 (s), 1631 (m), 1596 (s), 1540 (m), 1498 (m), 1433 (m), 1329 (m), 1316 (m), 1259 (m), 1204 (s), 1158 (m), 1133 (s), 1046 (m), 1025 (m), 1004 (m), 920 (w), 838 (m), 800 (m), 781 (m), 761 (m), 722 (m), 690 (m), 653 (m), 628 (m), 601 (m), 526 (m), 517 (w), 487 (w).

$^1\text{H-NMR}$	(600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ): $\delta$ [ppm] = 1.47 (m, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 1.52 (m, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 3.12 (q, $J = 6.1$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 3.23 (q, $J = 6.1$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 6.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, CH), 6.96 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, CH), 7.13 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1 H, CH), 7.53 (t, $J = 6.1$ Hz, 1 H, NH), 8.15 (s, breit, 3 H, NH + $\text{NH}_2$ ), 8.75 (d, $J = 3.2$ Hz, 1 H, CH), 8.90 (t, $J = 6.1$ Hz, 1 H, NH), 10.19 (s, breit, 1 H, NH), 11.03 (s, 1 H, OH), 12.58 (s, breit, 1 H, NH). (600.1 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ): $\delta$ [ppm] = 1.68 (m, 4 H, $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.30 (t, $J = 6.7$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 3.42 (t, $J = 6.7$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 6.63 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, CH), 6.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, CH), 7.19 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1 H, CH), 8.86 (s, 1 H, CH).
$^{13}\text{C-NMR}$	(151 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ): $\delta$ [ppm] = 26.3 ( $\text{CH}_2$ ), 26.6 ( $\text{CH}_2$ ), 38.5 ( $\text{CH}_2$ ), 39.1 ( $\text{CH}_2$ ), 104.1 (CH), 108.0 (CH), 113.5 ( $\text{C}_q$ ), 114.9 ( $\text{C}_q$ ), 126.4 (CH), 138.9 ( $\text{C}_q$ ), 140.9 (CH), 151.6 ( $\text{C}_q$ ), 153.5 ( $\text{C}_q$ ), 155.5 ( $\text{C}_q$ ), 163.3 (C=O), 184.1 (C=O).
(+)-ESI-MS	$m/z$ [%] = 721 $[[2\text{M}+\text{H}]^+, 1]$ , 383 $[[\text{M}+\text{Na}]^+, 5]$ , 361 $[[\text{M}+\text{H}]^+, 100]$ .
HR-ESI-MS	für $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber.: 361.1624, gef.: 361.1647.
Summenformel	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_4$ ( $M = 360.37$ g/mol)

## 8.6.7 Experimentelle Daten zur Synthese von *N*-[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(1,4-dihydroxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-acetamid (**229**)

### 8.6.7.1 1-Acetoxy-4-( $\alpha$ -tetrahydropyranyloxy)indol (**224**)



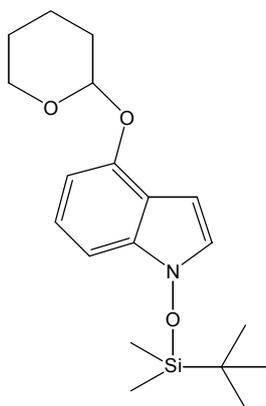
Eine Lösung aus 1.68 g (7.08 mmol) 2-Methyl-3-nitro-1-( $\alpha$ -tetrahydropyranyloxy)benzol (**215**), 1.69 g (14.2 mmol, 1.89 ml) *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal (**188**) und 108 mg

(0.70 mmol, 106  $\mu$ l) DBU in 21.0 ml abs. DMF wird für 24 Stunden refluxiert. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und erhält das Enamin **216** in Form eines tiefroten Öls, welches in 75.0 ml Diethylether aufgenommen und ohne weitere Reinigung sofort weiter umgesetzt wird. Nach Zugabe von 1.39 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in 10.0 ml Wasser zur etherischen Lösung von **216** kühlt man auf 0 °C und gibt portionsweise 4.37 g Zink-Pulver unter Rühren dazu. Anschließend wird noch drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann über Kieselgel abfiltriert. Das Filtrat wird mit wäßriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und dann im Vakuum etwas eingeeengt. Zu der etherischen Lösung gibt man dann eine Spatelspitze DMAP und 1.08 g (10.6 mmol, 1.00 ml) Essigsäureanhydrid und rührt 12 Stunden bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wird zuerst mit wäßriger  $\text{NaHCO}_3$ - und dann mit  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und reinigt den Rückstand flash-chromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 3/1 als Laufmittel. Das erhaltene Öl ist zuerst nahezu farblos, färbt sich dann aber schnell rot, wobei im NMR-Spektrum keine Veränderungen zu beobachten sind. Das Produkt wird bei -20 °C gelagert.

Ausbeute	870 mg (45 %) rotes Öl
$R_f$ -Wert	0.69 ( $\text{SiO}_2$ , Petrolether/Essigsäureethylester 2/1)
UV	( $\text{CH}_3\text{OH}$ ): $\lambda_{\text{max}}$ ( $\log \epsilon$ ) = 217 nm (4.38), 258 nm (3.76), 265 nm (sh, 3.76), 287 nm (3.59), 294 nm (sh, 3.58).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2945 (s), 2873 (m), 2852 (m), 1808 (s), 1746 (m), 1615 (m), 1587 (s), 1533 (m), 1508 (s), 1485 (s), 1469 (m), 1455 (m), 1441 (m), 1389 (m), 1356 (s), 1340 (s), 1245 (s), 1203 (s), 1171 (s), 1122 (s), 1141 (m), 1110 (s), 1076 (s), 1035 (s), 1021 (s), 991 (s), 949 (m), 907 (s), 872 (m), 820 (m), 737 (s), 704 (m), 667 (m), 646 (w), 618 (m), 587 (m), 576 (m), 546 (w), 535 (w), 480 (w), 435 (w).
$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ [ppm] = 1.59–2.16 (m, 6 H, 3 $\times$ $\text{CH}_2$ ), 2.37 (s, 3 H, $\text{CH}_3$ ), 3.58–3.65 (m, 1 H, $\text{CH}_2$ ), 3.93–4.01 (m, 1 H, $\text{CH}_2$ ), 5.59 (t, $J$ = 3.0 Hz, 1 H, CH), 6.61 (dd, $J$ = 3.5 Hz, $J$ = 0.9 Hz, 1 H, CH), 6.83 (m, 2 H, 2 $\times$ CH), 7.05 (d, $J$ = 3.5 Hz, 1 H, CH), 7.14 (dd, $J$ = 8.1 Hz, $J$ = 8.1 Hz, 1 H, CH).
$^{13}\text{C-NMR}$	(75.5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ [ppm] = 18.1 ( $\text{CH}_3$ ), 18.7 ( $\text{CH}_2$ ), 25.3 ( $\text{CH}_2$ ), 30.4 ( $\text{CH}_2$ ), 61.9 ( $\text{CH}_2$ ), 96.4 (CH), 97.1 (CH), 102.0 (CH), 105.0 (CH), 115.9 ( $\text{C}_q$ ), 123.6 (CH), 124.0 (CH), 135.2 ( $\text{C}_q$ ), 150.6 ( $\text{C}_q$ ), 168.5 (C=O).

EI-MS	$m/z$ [%] = 275 $[[M]^+$ , 3], 191 [65], 149 [67], 133 [100], 104 [9], 85 [26], 67 [7], 55 [9].			
HR-EI-MS	für $[M]^+$ ber.: 275.1158, gef.: 275.1150.			
EA	ber. [%]:	C 65.44	H 6.22	N 5.09
	gef. [%]:	C 65.02	H 6.40	N 4.95
Summenformel	$C_{15}H_{17}NO_4$ (M = 275.30 g/mol)			

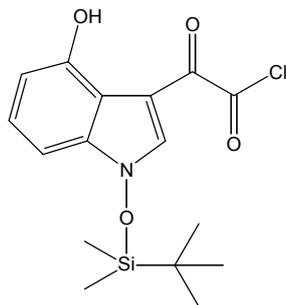
### 8.6.7.2 *N*-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-4-( $\alpha$ -tetrahydropyranyloxy)indol (**226**)



Man löst 2.36 g (9.95 mmol) **215** in 30.0 ml abs. DMF und gibt 2.37 g (19.9 mmol, 2.65 ml) *N,N*-Dimethylformamid-dimethylacetal (**188**) und 151 mg (0.99 mmol, 149  $\mu$ l) DBU hinzu. Die Lösung wird für 24 Stunden auf 135 °C gehalten und anschließend vom Lösungsmittel befreit. Das resultierende, tiefrote Enamin **216** wird sofort ohne weitere Reinigung umgesetzt. Dazu nimmt man **216** in 63.0 ml Diethylether auf, versetzt mit 1.97 g  $NH_4Cl$  in 14.0 ml Wasser und kühlt im Eisbad auf 0 °C. Unter Rühren werden 6.21 g Zn-Pulver in kleinen Portionen zugegeben und anschließend drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man filtriert über Kieselgel ab und wäscht das Filtrat mit wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung, trocknet über Magnesiumsulfat und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das Produkt wird an der Vakuumpumpe zwei Stunden getrocknet und dann in 30.0 ml abs. Dichlormethan aufgenommen. Man kühlt die Lösung im Eisbad auf 0 °C, versetzt mit 677 mg (9.95 mmol) Imidazol und gibt dann portionsweise 1.50 g (9.95 mmol)  $TBDMSCl$  (**225**) hinzu. Es wird weitere 30 Minuten bei 0 °C und anschließend 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen. Man wäscht nacheinander mit wässrigen  $NH_4Cl$ -,  $NaHCO_3$ - und  $NaCl$ -Lösungen und trocknet die organische Phase über Magnesiumsulfat. Nachdem Entfernen des

Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das Produkt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 100/1 isoliert. Man erhält ein schwachgelbes Öl, das sich schnell rot färbt, aber im NMR keine Veränderungen zeigt.

Ausbeute	650 mg (19 % über drei Stufen) rotes Öl
$R_f$ -Wert	0.74 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 6/1)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 206 nm (sh, 4.26), 221 nm (4.37), 263 nm (3.60), 269 nm (3.61), 291 nm (3.64), 301 nm (3.62).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 2933 (s), 2884 (m), 2860 (m), 1614 (m), 1584 (m), 1506 (m), 1484 (m), 1472 (m), 1463 (m), 1441 (m), 1390 (m), 1354 (m), 1340 (m), 1281 (m), 1248 (s), 1203 (m), 1183 (m), 1165 (w), 1146 (m), 1124 (m), 1112 (m), 1077 (m), 1036 (m), 1021 (m), 996 (s), 954 (m), 950 (m), 908 (m), 862 (m), 836 (s), 818 (m), 788 (m), 734 (s), 694 (m), 649 (w), 619 (m), 580 (w), 544 (w), 526 (w), 480 (w), 434 (w).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ [ppm] = 0.23 (s, 6 H, 2 × CH <sub>3</sub> ), 1.11 (s, 9 H, 3 × CH <sub>3</sub> ), 1.59–2.17 (m, 6 H, 3 × CH <sub>2</sub> ), 3.61–3.68 (m, 1 H, CH <sub>2</sub> ), 3.98–4.06 (m, 1 H, CH <sub>2</sub> ), 5.61 (t, $J$ = 3.1 Hz, 1 H, CH), 6.48 (dd, $J$ = 3.4 Hz, $J$ = 0.8 Hz, 1 H, CH), 6.76 (dd, $J$ = 7.7 Hz, $J$ = 0.8 Hz, 1 H, CH), 7.00 (dt, $J$ = 8.1 Hz, $J$ = 0.8 Hz, 1 H, CH), 7.05 (d, $J$ = 3.4 Hz, 1 H, CH), 7.11 (dd, $J$ = 7.7 Hz, $J$ = 8.1 Hz, 1 H, CH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ [ppm] = -4.9 (2 × CH <sub>3</sub> ), 17.9 (C <sub>q</sub> ), 18.8 (CH <sub>2</sub> ), 25.3 (CH <sub>2</sub> ), 25.7 (3 × CH <sub>3</sub> ), 30.5 (CH <sub>2</sub> ), 62.0 (CH <sub>2</sub> ), 94.3 (CH), 96.4 (CH), 102.9 (CH), 103.6 (CH), 115.4 (C <sub>q</sub> ), 122.7 (CH), 123.7 (CH), 135.2 (C <sub>q</sub> ), 150.3 (C <sub>q</sub> ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 347 [[M] <sup>+</sup> , 2], 263 [100], 207 [27], 174 [11], 133 [24], 85 [14], 75 [25].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 347.1917, gef.: 347.1901.
EA	ber. [%]: C 65.67 H 8.41 N 4.03 gef. [%]: C 65.41 H 8.43 N 3.99
Summenformel	C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub> Si (M = 347.53 g/mol)

**8.6.7.3** [N-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-4-hydroxyindol-3-yl]glyoxylchlorid (**227**)

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von (Indol-3-yl)glyoxylchloriden

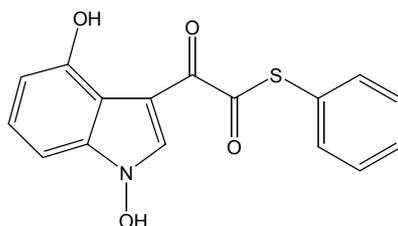
70.0 mg (0.20 mmol) *N*-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-4-( $\alpha$ -tetrahydropyranyloxy)indol (**226**) in 1.00 ml abs. Diethylether

36.0 mg (0.28 mmol, 24.0  $\mu$ l) Oxalylchlorid (**155**)

Reaktionsdauer 2 h

Ausbeute 49.0 mg (68 %) roter Feststoff

Summenformel C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>4</sub> (M = 353.87 g/mol)

**8.6.7.4** (1,4-Dihydroxy-1*H*-indol-3-yl)-oxo-thioessigsäure-*S*-phenylester (**228**)

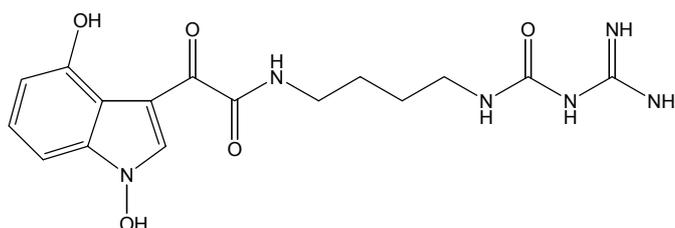
49.0 mg (0.14 mmol) [N-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-4-hydroxyindol-3-yl]glyoxylchlorid (**227**) werden in 5.00 ml abs. Acetonitril gelöst. Man gibt unter Schutzgas 26.0 mg (0.15 mmol) Kupferthiophenolat (**210**) hinzu und lässt 1.5 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Die Farbe der Lösung verändert sich von rot nach orange. Man zieht das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer ab und reinigt das Produkt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 1/2. Man erhält einen roten Feststoff.

Ausbeute 30.0 mg (69 %) roter Feststoff

Schmp. 135–137 °C

$R_f$ -Wert	0.38 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/2)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 203 nm (4.53), 216 nm (4.45), 282 nm (3.98), 427 nm (3.77).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3153 (m), 2921 (m), 1682 (s), 1592 (s), 1556 (m), 1441 (s), 1362 (m), 1314 (s), 1252 (m), 1162 (m), 1134 (m), 1061 (m), 1016 (m), 947 (m), 878 (w), 849 (w), 778 (m), 742 (s), 686 (m), 607 (w), 515 (w), 468 (w).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 6.68 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 7.02 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1 H, CH), 7.27 (dd, $J$ = 7.8 Hz, $J$ = 8.0 Hz, 1H, CH), 7.52 (m, 5 H, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ), 8.64 (s, 1 H, CH), 10.83 (s, 1 H, OH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 101.7 (CH), 105.1 (C <sub>q</sub> ), 109.8 (CH), 112.5 (C <sub>q</sub> ), 126.9 (C <sub>q</sub> ), 127.4 (CH), 129.7 (2 × CH), 130.1 (CH), 134.8 (2 × CH), 136.8 (C <sub>q</sub> ), 137.1 (CH), 151.6 (C <sub>q</sub> ), 177.5 (C <sub>q</sub> ), 190.7 (C=O).
EI-MS	$m/z$ [%] = 313 [[M] <sup>+</sup> , 2], 218 [48], 176 [25], 160 [100], 131 [23], 110 [58], 77 [18], 65 [21].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 313.0409, gef.: 313.0416.
Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub> S (M = 313.33 g/mol)

#### 8.6.7.5 *N*-[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(1,4-dihydroxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamid (**229**)



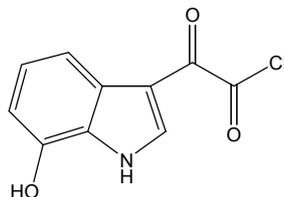
Man suspendiert 17.0 mg (0.08 mmol) **204** in 1.50 ml abs. DMF, versetzt mit 8.00 mg (11.0  $\mu$ l) NEt<sub>3</sub> und rührt zehn Minuten bei Raumtemperatur. 25 mg (0.08 mmol) (1,4-Dihydroxy-1*H*-indol-3-yl)-oxo-thioessigsäure-*S*-phenylester (**228**) werden in 1.50 ml abs. DMF gelöst und zur Suspension gegeben. Man lässt vier Stunden bei 40 °C rühren, wobei sich die Farbe von rot nach gelb ändert und eine klare Lösung entsteht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand an RP-18 mittels präparativer HPLC (System 7) aufgetrennt. Man erhält das Produkt als gelben Feststoff.

---

Ausbeute	16.0 mg (53 %) gelber Feststoff
Schmp.	149–151 °C
$R_f$ -Wert	0.84 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)
$R_t$ -Wert	(HPLC): 27.7 min (System 7)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 210 nm (4.48), 260 nm (3.99), 274 nm (4.00), 406 nm (3.96).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3385 (m), 3319 (m), 3171 (m), 2940 (m), 2868 (w), 1693 (s), 1587 (m), 1536 (m), 1488 (m), 1469 (m), 1441 (m), 1415 (w), 1362 (m), 1316 (m), 1283 (w), 1250 (m), 1204 (m), 1158 (m), 1140 (m), 972 (w), 843 (w), 800 (w), 777 (w), 758 (m), 724 (m), 698 (w), 646 (w), 610 (w), 574 (w).
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.47 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 1.51 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.11 (q, $J$ = 6.1 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.22 (q, $J$ = 6.1 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 6.61 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 6.98 (d, $J$ = 8.0 Hz, 1 H, CH), 7.22 (dd, $J$ = 7.8 Hz, $J$ = 8.0 Hz, 1 H, CH), 7.52 (t, breit, 1 H, NH), 8.11 (breit, 3 H, NH+NH <sub>2</sub> ), 8.79 (s, 1 H, CH), 8.93 (t, $J$ = 6.1 Hz, 1 H, NH), 9.91 (s, 1 H, NH), 11.22 (s, 1 H, OH), 12.79 (s, 1 H, OH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 26.2 (CH <sub>2</sub> ), 26.6 (CH <sub>2</sub> ), 38.5 (CH <sub>2</sub> ), 39.1 (CH <sub>2</sub> ), 101.2 (CH), 107.6 (C <sub>q</sub> ), 108.8 (CH), 112.5 (C <sub>q</sub> ), 126.8 (CH), 136.4 (C <sub>q</sub> ), 137.0 (CH), 151.6 (C <sub>q</sub> ), 153.4 (C <sub>q</sub> ), 155.4 (C <sub>q</sub> ), 162.9 (C=O), 182.4 (C=O).
FAB-MS	$m/z$ [%] = 377 [[M+H] <sup>+</sup> , 15].
HR-FAB-MS	für [M+H] <sup>+</sup> ber.: 377.1573, gef.: 377.1581.
Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> (M = 376.37 g/mol)

## 8.6.8 Experimentelle Daten zur Synthese von *N*-[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(7-hydroxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-acetamid (**233**)

### 8.6.8.1 (7-Hydroxyindol-3-yl)glyoxylchlorid (**231**)



Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von (Indol-3-yl)glyoxylchloriden

266 mg (2.00 mmol) 7-Hydroxyindol (**230**) in 3.00 ml abs. Diethylether

355 mg (2.80 mmol, 237  $\mu$ l) Oxalylchlorid (**155**)

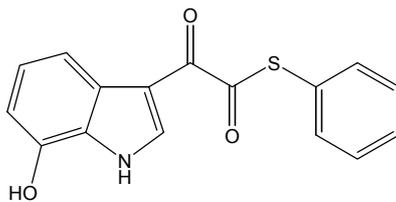
Reaktionsdauer 2 h

Die Umsetzung wird zusätzlich unter Lichtschutz durchgeführt.

Ausbeute 363 mg (81 %) orange-roter Feststoff

Summenformel  $C_{10}H_6ClNO_3$  (M = 223.61 g/mol)

### 8.6.8.2 (7-Hydroxy-1*H*-indol-3-yl)-oxo-thioessigsäure-*S*-phenylester (**232**)

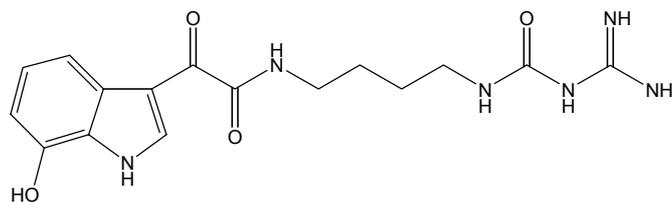


Unter Stickstoffatmosphäre und Lichtschutz werden 112 mg (0.50 mmol) (7-Hydroxyindol-3-yl)glyoxylchlorid (**231**) in 10.0 ml abs. Acetonitril gelöst. Man gibt 95.0 mg (0.55 mmol) Kupferthiophenolat (**210**) hinzu und rührt zwei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt flash-chromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 1/1 gereinigt. Man erhält einen roten kristallinen Feststoff.

Ausbeute 124 mg (83 %) roter Feststoff

Schmp.	229–231 °C
$R_f$ -Wert	0.44 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/1)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 205 nm (4.61), 254 nm (4.08), 371 nm (3.90).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3392 (m), 3270 (m), 1691 (m), 1622 (m), 1594 (m), 1516 (m), 1498 (m), 1477 (m), 1440 (s), 1379 (m), 1361 (m), 1322 (m), 1294 (m), 1238 (s), 1175 (m), 1146 (m), 1047 (m), 1024 (w), 999 (w), 956 (w), 862 (w), 828 (w), 772 (m), 748 (m), 730 (m), 708 (m), 689 (m), 652 (m), 614 (m), 568 (w), 543 (w), 531 (w), 462 (w), 422 (w).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 6.74 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 7.11 (dd, $J$ = 7.8 Hz, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 7.51 (m, 5 H, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ), 7.68 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 8.39 (d, $J$ = 3.1 Hz, 1 H, CH), 10.12 (s, 1 H, OH), 12.50 (d, $J$ = 3.1 Hz, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 109.1 (CH), 110.3 (C <sub>q</sub> ), 112.5 (CH), 124.5 (CH), 126.6 (C <sub>q</sub> ), 127.6 (C <sub>q</sub> ), 128.3 (C <sub>q</sub> ), 129.6 (2 × CH), 129.8 (CH), 134.8 (2 × CH), 137.8 (CH), 144.6 (C <sub>q</sub> ), 177.6 (C <sub>q</sub> ), 191.8 (C=O).
EI-MS	$m/z$ [%] = 297 [[M] <sup>+</sup> , 0.5], 160 [100], 110 [57], 77 [16], 66 [19].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 297.0460, gef.: 297.0442.
Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> S (M = 297.33 g/mol)

### 8.6.8.3 *N*-[4-(3-Amidinoureido)butyl]-2-(7-hydroxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamid (233)



59.0 mg (0.28 mmol) **204** werden in 3.00 ml abs. DMF suspensiert und 28.0 mg (0.28 mmol, 39.0  $\mu$ l) NEt<sub>3</sub> unter Rühren hinzugegeben. Nach 15 Minuten versetzt man die Suspension mit einer Lösung aus 83.0 mg (0.28 mmol) **232** und erwärmt für sechs Stunden auf 40 °C, wobei sich allmählich eine klare Lösung bildet und die Farbe von rot nach gelb wechselt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC an RP-18 (System 6) gereinigt. Man erhält einen gelben Feststoff.

---

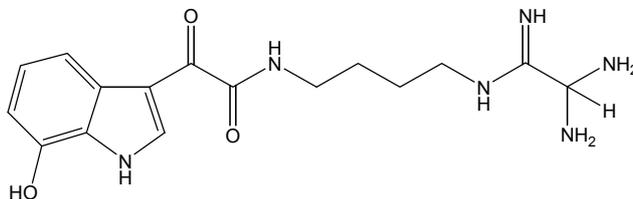
Ausbeute	44.0 mg (44 %) gelber Feststoff
Schmp.	108–110 °C
$R_f$ -Wert	0.84 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)
$R_t$ -Wert	(HPLC): 14.7 min (System 3)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 211 nm (4.51), 248 nm (4.07), 253 nm (4.07), 274 nm (sh, 3.83), 349 nm (3.79).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3392 (s), 2931 (w), 1693 (s), 1628 (s), 1544 (m), 1512 (m), 1436 (m), 1366 (w), 1331 (w), 1286 (m), 1241 (m), 1204 (m), 1152 (m), 1137 (m), 1074 (w), 1049 (w), 838 (w), 788 (w), 738 (w), 723 (m), 630 (w), 601 (w).
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.47 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 1.50 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.11 (q, $J$ = 5.7 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.21 (q, $J$ = 6.0 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 6.67 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 7.03 (dd, $J$ = 7.8 Hz, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 7.53 (t, $J$ = 5.7 Hz, 1 H, NH), 7.66 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 8.19 (s, 3 H, NH + NH <sub>2</sub> ), 8.58 (d, $J$ = 3.0 Hz, 1 H, CH), 8.69 (t, $J$ = 6.0 Hz, 1 H, NH), 10.03 (s, breit, 1 H, OH), 10.18 (s, 1 H, NH), 12.16 (d, $J$ = 3.0 Hz, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(151 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 26.4 (CH <sub>2</sub> ), 26.7 (CH <sub>2</sub> ), 38.3 (CH <sub>2</sub> ), 39.1 (CH <sub>2</sub> ), 108.4 (CH), 112.4 (CH), 112.9 (C <sub>q</sub> ), 123.7 (CH), 126.2 (C <sub>q</sub> ), 128.4 (C <sub>q</sub> ), 137.6 (CH), 144.3 (C <sub>q</sub> ), 153.5 (C <sub>q</sub> ), 155.6 (C <sub>q</sub> ), 163.9 (C=O), 182.3 (C=O).
(+)-FAB-MS	$m/z$ [%] = 361 [[M+H] <sup>+</sup> , 16].
HR-FAB-MS	für [M+H] <sup>+</sup> ber.: 361.1624, gef.: 361.1603.
Summenformel	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> (M = 360.37 g/mol)

## 8.6.9 Experimentelle Daten zur Reduktion von Birnbaumin B (282)

### 8.6.9.1 Arbeitsvorschrift

Man löst 5.00 mg Birnbaumin B (**282**) (0.01 mmol) in 5.00 ml Methanol, gibt vier Tropfen Eisessig und eine Spatelspitze Zinkpulver hinzu und lässt zwei Stunden bei Raumtemperatur rühren. Anschließend entfernt man die Zinkreste durch Festphasenextraktion an RP-18-Kartuschen (Chromabond, 100 mg, Macherey & Nagel) mit Methanol. Durch präparative HPL-Chromatographie an RP-18 mit Wasser/Acetonitril und 0.25%iger TFA (System 8) gelingt die Isolierung eines gelben Feststoffes **234**.

### 8.6.9.2 Reduktionsprodukt: *N*-{4-[(2,2-Diaminoacetimidoyl)amino]butyl}-2-(7-hydroxy-1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-acetamid (234)

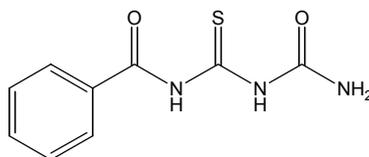


Ausbeute	2.00 mg (43 %) gelber Feststoff
Schmp.	39–41 °C
$R_f$ -Wert	0.61 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)
$R_t$ -Wert	(HPLC): 14.8 min (System 8)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 211 nm (4.05), 247 nm (3.59), 265 nm (sh, 3.28), 322 nm (3.32).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3430 (s), 2925 (m), 2855 (m), 1678 (s), 1527 (w), 1497 (w), 1441 (m), 1399 (w), 1382 (w), 1293 (m), 1241 (m), 1206 (s), 1137 (s), 1049 (w), 1026 (w), 1004 (w), 912 (w), 841 (m), 801 (m), 724 (m), 518 (w).
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.39 (m, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.04 (q, $J$ = 5.8 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.09 (q, $J$ = 5.8 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 5.27 (br, 1 H, CH), 6.68 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 7.03 (dd, $J$ = 7.8 Hz, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 7.58 (t, br, 1 H, NH), 7.58 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 8.56 (s, 3 H, NH + NH <sub>2</sub> ), 8.59 (d, $J$ = 2.9 Hz, 1 H, CH), 8.75 (t, $J$ = 5.8 Hz, 1 H, NH), 10.14 (s, breit, 1 H, OH), 12.40 (d, $J$ = 2.9 Hz, 1 H, NH). (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 1.47 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 1.55 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.21 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.40 (CH <sub>2</sub> , teilweise unter Methanol-Signal), 6.74 (d, $J$ = 7.9 Hz, 1 H, CH), 7.11 (dd, $J$ = 7.9 Hz, $J$ = 7.9 Hz, 1 H, CH), 7.73 (d, $J$ = 7.9 Hz, 1 H, CH), 8.48 (s, 1 H, CH).
<sup>13</sup> C-NMR	(151 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 25.9 (CH <sub>2</sub> ), 26.0 (CH <sub>2</sub> ), 38.9 (CH <sub>2</sub> ), 40.4 (CH <sub>2</sub> ), 58.0 (CH), 108.4 (CH), 112.2 (CH), 113.4 (C <sub>q</sub> ), 123.8 (CH), 126.8 (C <sub>q</sub> ), 127.6 (C <sub>q</sub> ), 135.3 (CH), 144.3 (C <sub>q</sub> ), 156.9 (C <sub>q</sub> ), 163.7 (C <sub>q</sub> ), 182.5 (C <sub>q</sub> ).
(+)-ESI-MS	$m/z$ [%] = 347 [[M+H] <sup>+</sup> , 100].
HR-(+)-ESI-MS	für [M+H] <sup>+</sup> ber.: 347.1832, gef.: 347.1845.

Summenformel  $C_{16}H_{22}N_6O_3$  ( $M = 346.38$  g/mol)

### 8.6.10 Experimentelle Daten zur Synthese von *N*-[4-(3-Carbamoylguanidino)-butyl]-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-acetamid (**245**)

#### 8.6.10.1 1-Benzoyl-2-thiobiuret (**241**)<sup>[166]</sup>



11.7 g (0.12 mol) Kaliumthiocyanat (**238**) werden in 70.0 ml warmen Aceton gelöst. Unter Rühren tropft man 14.0 g (0.10 mol, 11.6 ml) Benzoylchlorid (**239**) zu und erwärmt anschließend für drei Stunden auf 50 °C. Das entstandene Kaliumchlorid wird aus dem erkalteten Reaktionsgemisch abgesaugt, das orangefarbene Filtrat mit 6.01 g (0.10 mol) Harnstoff (**240**) versetzt und anschließend für vier Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach 12stündigem Auskristallisieren bei –20 °C wird der gelbe Feststoff abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute 11.7 g (53 %, Lit.<sup>[166]</sup> 30 %) gelber Feststoff

Schmp. 173–174 °C (Lit.<sup>[165]</sup> 173–175 °C)

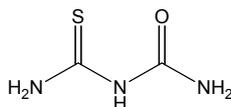
$R_f$ -Wert 0.62 (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Essigsäureethylester 1/3)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  [ppm] = 5.42 (s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 7.55 (m, 2 H, 2 × CH), 7.66 (m, 1 H, CH), 7.88 (m, 2 H, 2 × CH), 11.12 (s, breit, 1 H, NH), 13.43 (s, breit, 1 H, NH).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  [ppm] = 128.0 (CH), 129.1 (2 × CH), 133.2 (C<sub>q</sub>), 133.5 (2 × CH), 154.7 (C<sub>q</sub>), 159.8 (C<sub>q</sub>), 179.4 (C<sub>q</sub>).

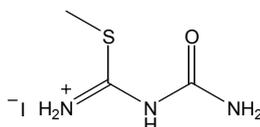
EI-MS  $m/z$  [%] = 223 [[M]<sup>+</sup>, 13], 180 [33], 105 [100], 77 [57], 51 [14].

Summenformel  $C_9H_9N_3O_2S$  ( $M = 223.25$  g/mol)

**8.6.10.2 Thiobiuret (242)<sup>[166]</sup>**

Eine Lösung aus 4.47 g (20.0 mmol) **241** in 80.0 ml Methanol und 4 Tropfen konz. HCl wird für 48 Stunden am Rückfluß erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Feststoff mehrmals in *n*-Hexan suspendiert, um das entstandene Benzoat zu entfernen. Nach Umkristallisation aus Wasser erhält man ein farbloses, kristallines Produkt.

Ausbeute	2.30 g (96 %, Lit. <sup>[166]</sup> 75 %) farbloser Feststoff
Schmp.	185–186 °C (Lit. <sup>[165]</sup> 189–193 °C)
$R_f$ -Wert	0.88 (RP-18, Methanol)
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 157.3 (C=O), 184.3 (C=S).
EI-MS	$m/z$ [%] = 119 [[M] <sup>+</sup> , 39], 76 [100], 60 [37], 43 [95].
Summenformel	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> OS (M = 119.15 g/mol)

**8.6.10.3 2-Methylthiopseudobiuret-Hydroiodid (236)<sup>[165]</sup>**

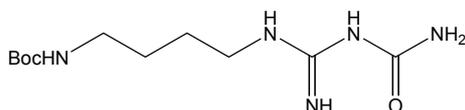
Zu einer Suspension aus 2.30 g (19.3 mmol) **242** in 30.0 ml Acetonitril gibt man 3.29 g (23.2 mmol, 1.45 ml) Methyljodid (**243**) und erhitzt für 30 Minuten unter Rückfluß. Das farblose Produkt wird aus dem erkalteten Reaktionsgemisch abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute	3.52 g (70 %, Lit. <sup>[165]</sup> 87 %) farbloser Feststoff
Schmp.	181–183 °C (Lit. <sup>[165]</sup> 181–183 °C)
$R_f$ -Wert	0.80 (RP-18, Methanol)
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 2.66 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 10.63 (br, 3 H, NH + NH <sub>2</sub> ).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 13.8 (CH <sub>3</sub> ), 153.6 (C <sub>q</sub> ), 171.6 (C <sub>q</sub> ).
(+)-ESI-MS	$m/z$ [%] = 134 [[C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub> OS] <sup>+</sup> , 100].

(-)-ESI-MS  $m/z$  [%] = 127 [ $I^-$ , 100].

Summenformel  $C_3H_7N_3OS \times HI$  ( $M = 261.09$  g/mol)

#### 8.6.10.4 *N*-(*N*'-Boc-4-aminobutyl)-*N*'-carbamoylguanidin (**372**)



Eine Suspension aus 94.0 mg (0.50 mmol) *N*-Boc-1,4-diaminobutan (**168**), 131 mg (0.50 mmol) **236** und 41.0 mg (0.50 mmol) Natriumacetat in 5.00 ml *i*-Propanol wird 24 Stunden refluxiert. Die noch heiße Reaktionslösung wird filtriert und das Filtrat im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wird zwischen Essigsäureethylester und ges.  $NaHCO_3$ -Lösung verteilt. Man trocknet die organische Phase über Magnesiumsulfat, entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und erhält ein farbloses Öl, das langsam fest wird.

Ausbeute 73.0 mg (53 %) farbloser Feststoff

Schmp. 78–80 °C

$R_f$ -Wert 0.75 (RP-18, Methanol)

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 3417 (m), 3372 (m), 3322 (m), 2980 (m), 2937 (m), 2876 (w), 1689 (s), 1657 (m), 1612 (m), 1525 (m), 1482 (m), 1456 (m), 1392 (m), 1366 (m), 1317 (m), 1282 (m), 1253 (m), 1172 (m), 1110 (m), 1043 (w), 1014 (m), 869 (w), 781 (m), 747 (w), 602 (m).

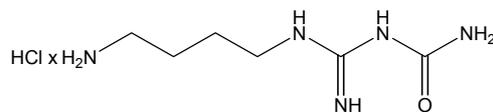
$^1H$ -NMR (300 MHz,  $[D_6]DMSO$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.32 (s, breit, 4 H,  $2 \times CH_2$ ), 1.36 (s, 9 H,  $3 \times CH_3$ ), 2.90 (m, 4 H,  $2 \times CH_2$ ), 5.35 (s, 1 H, NH), 5.91 (t,  $J = 5.0$  Hz, 1 H, NH), 6.74 (t,  $J = 5.0$  Hz, 1 H, NH).

$^{13}C$ -NMR (75.5 MHz,  $[D_6]DMSO$ ):  $\delta$  [ppm] = 27.2 ( $CH_2$ ), 27.6 ( $CH_2$ ), 28.5 ( $3 \times CH_3$ ), 39.1 ( $CH_2$ ), 39.9 ( $CH_2$ ), 77.6 ( $C_q$ ), 155.8 ( $C_q$ ), 158.9 ( $2 \times C_q$ ).

FAB-MS  $m/z$  [%] = 274 [ $[M+H]^+$ , 75].

HR-FAB-MS für  $[M+H]^+$  ber.: 274.1879, gef.: 274.1874

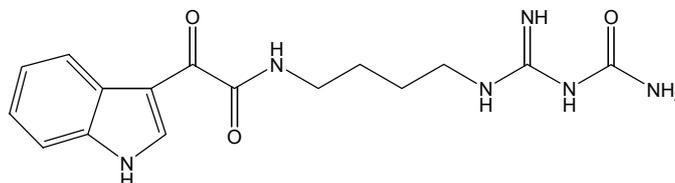
Summenformel  $C_{11}H_{23}N_5O_3$  ( $M = 273.33$  g/mol)

**8.6.10.5 1-(3-Carbamoylguanidino)-4-aminobutan-Hydrochlorid (244)**

73.0 mg (0.27 mmol) **372** werden in 1.00 ml Methanol gelöst. Man gibt 2.00 ml einer 5N HCl/*iso*-Propanol-Lösung hinzu und rührt eine Stunde bei Raumtemperatur, wobei ein farbloser Niederschlag ausfällt. Das Lösungsmittel wird anschließend im Vakuum entfernt und das farblose Produkt getrocknet.

Ausbeute	45.0 mg (80 %) farbloser Feststoff
Schmp.	179–181 °C
$R_f$ -Wert	0.77 (RP-18, Methanol)
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3418 (m), 3315 (m), 2980 (m), 2900 (m), 2029 (w), 1735 (w), 1638 (m), 1648 (s), 1610 (m), 1578 (m), 1564 (m), 1478 (m), 1449 (m), 1393 (w), 1362 (w), 1320 (w), 1286 (w), 1247 (m), 1167 (m), 1118 (m), 1036 (w), 997 (w), 942 (w), 922 (w), 892 (w), 873 (w), 560 (m), 500 (w), 480 (w).
$^1\text{H-NMR}$	(600 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.41 (m, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 1.53 (m, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 2.74 (breit, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 2.97 (t, $J = 6.7$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 6.15 (br, 2 H, $\text{NH}_2$ ), 8.11 (br, 2 H, $\text{NH}_2$ ), 8.18 (br, 3 H, $3 \times \text{NH}$ ).
$^{13}\text{C-NMR}$	(75.5 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): $\delta$ [ppm] = 24.3 ( $\text{CH}_2$ ), 24.7 ( $\text{CH}_2$ ), 38.3 ( $\text{CH}_2$ ), 38.8 ( $\text{CH}_2$ ), 159.4 ( $2 \times \text{C}_q$ ).
(+)-FAB-MS	$m/z$ [%] = 174 $[[\text{M}+\text{H}]^+, 4]$ .
Summenformel	$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O} \times \text{HCl}$ ( $M = 209.68$ g/mol)

### 8.6.10.6 *N*-[4-(3-Carbamoylguanidino)butyl]-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-acetamid (245)



Man suspendiert 45.0 mg (0.21 mmol) **244** und 21.0 mg (29.0  $\mu$ l)  $\text{NEt}_3$  in 1.50 ml abs. DMF. Nach 10minütigem Rühren bei Raumtemperatur wird eine Lösung aus 59.0 mg (0.21 mmol) (1*H*-Indol-3-yl)-oxo-thioessigsäure-*S*-phenylester (**211**) in 1.50 ml abs. DMF hinzugegeben. Man erwärmt die Suspension für vier Stunden unter Rühren auf 40 °C, wobei sich eine klare Lösung bildet und die gelbe Farbe von **211** allmählich verblasst. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand durch HPL-Chromatographie an RP-18 (System 6) aufgetrennt. Man erhält das Produkt als farblosen Feststoff.

Ausbeute	44 mg (61 %) farbloser Feststoff
Schmp.	Zersetzung > 260 °C
$R_f$ -Wert	0.82 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)
$R_f$ -Wert	(HPLC): 15.9 min (System 3)
UV	( $\text{CH}_3\text{OH}$ ): $\lambda_{\text{max}}$ ( $\log \epsilon$ ) = 210 nm (4.32), 255 nm (4.04), 266 nm (3.98), 273 nm (sh, 3.93), 325 nm (3.97).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3384 (m), 3348 (m), 2935 (w), 2868 (w), 1658 (s), 1622 (s), 1564 (m), 1538 (m), 1505 (m), 1459 (m), 1433 (m), 1376 (w), 1357 (w), 1340 (w), 1314 (w), 1281 (w), 1239 (m), 1204 (m), 1180 (w), 1157 (m), 1131 (m), 1099 (w), 1011 (w), 834 (w), 803 (w), 773 (w), 750 (m), 722 (w), 651 (w), 599 (w), 427 (w).
$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, [ $\text{D}_6$ ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.38 (m, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 1.49 (m, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 2.97 (t, $J = 6.8$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 3.20 (q, $J = 6.1$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2$ ), 5.31 (s, breit, 1 H, NH), 5.97 (s, breit, 4 H, $2 \times \text{NH} + \text{NH}_2$ ), 7.25 (m, 2 H, $2 \times \text{CH}$ ), 7.52 (d, $J = 7.2$ Hz, 1 H, CH), 8.22 (d, $J = 6.9$ Hz, 1 H, CH), 8.71 (t, $J = 6.1$ Hz, 1 H, NH), 8.73 (d, $J = 3.0$ Hz, 1 H, CH), 12.20 (s, breit, 1 H, NH).
$^{13}\text{C-NMR}$	(75.5 MHz, [ $\text{D}_6$ ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 26.6 ( $\text{CH}_2$ ), 27.7 ( $\text{CH}_2$ ), 38.5 ( $\text{CH}_2$ ), 39.2 ( $\text{CH}_2$ ), 112.4 ( $\text{C}_q$ ), 112.7 (CH), 121.4 (CH), 122.7 (CH), 123.6 (CH),

126.4 (C<sub>q</sub>), 136.4 (C<sub>q</sub>), 138.6 (CH), 159.9 (2 × C<sub>q</sub>), 163.8 (C=O), 182.6 (C=O).

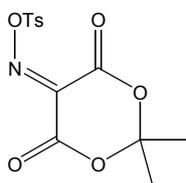
(+)-FAB-MS  $m/z$  [%] = 345 [[M+H]<sup>+</sup>, 5].

HR-FAB-MS für [M+H]<sup>+</sup> ber.: 345.1675, gef.: 345.1637.

Summenformel C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (M = 344.37 g/mol)

## 8.6.11 Experimentelle Daten zur Synthese der Modellverbindungen 262, 263, 265 und 266

### 8.6.11.1 5-Tosyloxyimino-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (257)<sup>[173]</sup>



Zu einer Lösung aus 6.00 g (41.6 mmol) 2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (Meldrums Säure, **254**) in 60.0 ml Methanol gibt man langsam 2.87 g (41.6 mmol) Natriumnitrit in 10.0 ml Wasser hinzu und lässt zwei Stunden bei Raumtemperatur rühren. Dann wird das Lösungsmittel im Vakuum bei Raumtemperatur entfernt und der Rückstand in 160 ml Aceton aufgenommen. Man versetzt die Suspension mit 7.93 g (41.6 mmol) Tosylchlorid (**256**) und rührt bei Raumtemperatur für fünf Stunden. Anschließend wird das Reaktionsgemisch filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum vom Filtrat entfernt. Der resultierende Feststoff wird aus Chloroform/Hexan 1/1 umkristallisiert. Man erhält ein farbloses, kristallines Produkt.

Ausbeute 6.55 g (48 %, Lit.<sup>[173]</sup> 79 %) farbloser Feststoff

Schmp. 153–154 °C (Lit.<sup>[175]</sup> 155–156 °C)

R<sub>F</sub>-Wert Zersetzung auf SiO<sub>2</sub>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.80 (s, 6 H, 2 × CH<sub>3</sub>), 2.48 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 7.41 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 0.7 Hz, 2 H, 2 × CH), 7.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, 2 × CH).

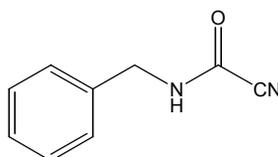
<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 21.8 (CH<sub>3</sub>), 28.2 (2 × CH<sub>3</sub>), 106.8 (C<sub>q</sub>), 129.6 (2 × CH), 130.1 (C<sub>q</sub>), 130.2 (2 × CH), 138.8 (C<sub>q</sub>), 147.1 (C<sub>q</sub>), 149.6 (C<sub>q</sub>), 154.7 (C<sub>q</sub>).

EI-MS  $m/z$  [%] = 327 [[M]<sup>+</sup>, 0.03], 155 [80], 91 [100].

HR-EI-MS für [M]<sup>+</sup> ber.: 327.0413, gef.: 327.0424

Summenformel C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>7</sub>S (M = 327.31 g/mol)

### 8.6.11.2 *N*-Benzyl-2-nitriloacetamid (260)<sup>[173]</sup>



327 mg (1.00 mmol) 5-Tosyloxyimino-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**257**) werden in 4.00 ml THF gelöst. Unter Eiskühlung gibt man eine Lösung aus 108 mg (1.01 mmol) Benzylamin (**259**) und 101 mg (1.00 mmol) NEt<sub>3</sub> in 1.00 ml THF hinzu und rührt 30 Minuten bei 0 °C. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand flash-chromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 2/1 gereinigt. Man erhält ein farbloses, festes Produkt.

Ausbeute 98.0 mg (61 %, Lit.<sup>[173]</sup> 68 %) farbloser Feststoff

Schmp. 60–61 °C (Lit.<sup>[173]</sup> 72 °C)

*R*<sub>F</sub>-Wert 0.67 (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Essigsäureethylester 2/1)

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3276 (s), 3064 (m), 3035 (m), 2932 (w), 2791 (w), 2241 (w), 1662 (s), 1554 (s), 1498 (m), 1453 (m), 1360 (m), 1322 (m), 1261 (m), 1226 (m), 1214 (w), 1158 (w), 1080 (m), 1050 (m), 1030 (m), 980 (w), 914 (w), 842 (w), 815 (w), 804 (w), 753 (m), 696 (s), 662 (m), 612 (m), 574 (w), 540 (m), 462 (w).

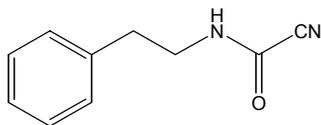
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 4.47 (d, *J* = 6.0 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 6.79 (s, br, 1 H, NH), 7.26 (m, 2 H, 2 × CH), 7.36 (m, 3 H, 3 × CH).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 44.4 (CH<sub>2</sub>), 111.4 (C<sub>q</sub>), 128.0 (2 × CH), 128.5 (CH), 129.1 (2 × CH), 135.1 (C<sub>q</sub>), 143.0 (C<sub>q</sub>).

GC/EI-MS  $m/z$  [%] = 160 [[M]<sup>+</sup>, 100], 91 [27], 79 [34], 51 [24].

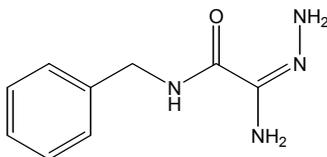
HR-EI-MS für [M]<sup>+</sup> ber.: 160.0637, gef.: 160.0632.

Summenformel C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O (M = 160.17 g/mol)

**8.6.11.3 2-Nitrilo-*N*-phenylethylacetamid (261)**

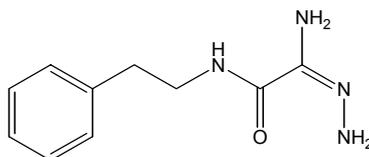
Eine Lösung aus 327 mg (1.00 mmol) 5-Tosyloxyimino-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**257**) in 4.00 ml THF wird auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren fügt man 122 mg (1.01 mmol) Phenylethylamin (**157**) und 101 mg (1.00 mmol) NEt<sub>3</sub> in 1.00 ml THF hinzu. Nach weiterem 30minütigem Rühren entfernt man das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 2/1 gereinigt. Man erhält einen farblosen Feststoff.

Ausbeute	111 mg (64 %) farbloser Feststoff
Schmp.	89–91 °C
R <sub>F</sub> -Wert	0.65 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 2/1)
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3275 (s), 3084 (m), 3028 (m), 2944 (m), 2866 (m), 2239 (m), 1681 (s), 1602 (m), 1554 (s), 1498 (m), 1455 (m), 1435 (m), 1366 (m), 1333 (m), 1274 (s), 1202 (m), 1160 (m), 1089 (w), 1052 (m), 1028 (m), 970 (w), 914 (w), 892 (m), 814 (w), 756 (m), 702 (s), 679 (m), 620 (m), 551 (w), 524 (m), 501 (m).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ [ppm] = 2.87 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.61 (q, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 6.40 (s, br, 1 H, NH), 7.18 (m, 2 H, 2 × CH), 7.30 (m, 3 H, 3 × CH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): $\delta$ [ppm] = 34.7 (CH <sub>2</sub> ), 41.5 (CH <sub>2</sub> ), 111.4 (C <sub>q</sub> ), 127.1 (CH), 128.6 (2 × CH), 128.9 (2 × CH), 137.2 (C <sub>q</sub> ), 143.1 (C <sub>q</sub> ).
GC/EI-MS	<i>m/z</i> [%] = 174 [[M] <sup>+</sup> , 1], 104 [100], 91 [8].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 174.0793, gef.: 174.0802.
Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O (M = 174.20 g/mol)

**8.6.11.4 2-Amino-N-benzyl-2-hydrazonoacetamid (262)**

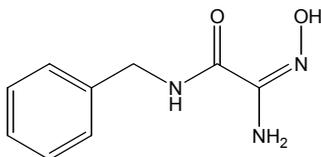
74.0 mg (0.46 mmol) **260** und 23.0 mg (0.46 mmol) Hydrazin-Monohydrat (**250**) werden in 1.00 ml Ethanol gelöst und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Reaktionslösung wird 1.00 ml Wasser hinzugegeben, woraufhin ein Feststoff ausfällt, der abgesaugt und mit Wasser gewaschen wird. Man erhält einen farblosen Feststoff.

Ausbeute	38.0 mg (43 %) farbloser Feststoff
Schmp.	104–105 °C
$R_f$ -Wert	0.13 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/1)
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3306 (s), 3179 (m), 3036 (m), 2931 (m), 1674 (m), 1617 (s), 1529 (s), 1496 (m), 1455 (m), 1432 (m), 1379 (m), 1356 (m), 1330 (m), 1311 (m), 1278 (m), 1258 (m), 1232 (m), 1162 (w), 1119 (w), 1083 (w), 1028 (w), 1016 (w), 985 (w), 739 (m), 695 (m), 611 (m), 591 (m), 555 (m), 500 (m), 444 (w), 408 (w).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]Aceton): $\delta$ [ppm] = 4.55 (d, $J$ = 6.6 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 6.11 (s, br, 2 H, NH <sub>2</sub> ), 7.26–7.37 (m, 5 H, 5 × CH), 8.48 (s, br, 1 H, NH). (600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 4.37 (d, $J$ = 6.0 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 6.19 (s, br, 2 H, NH <sub>2</sub> ), 7.21–7.32 (m, 5 H, 5 × CH), 8.76 (t, $J$ = 6.0 Hz, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]Aceton): $\delta$ [ppm] = 42.9 (CH <sub>2</sub> ), 127.3 (CH), 127.8 (2 × CH), 128.7 (2 × CH), 139.7 (C <sub>q</sub> ), 149.0 (C <sub>q</sub> ), 162.2 (C <sub>q</sub> ). (151 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 42.4 (CH <sub>2</sub> ), 126.9 (CH), 127.4 (2 × CH), 128.4 (2 × CH), 139.5 (C <sub>q</sub> ), 148.2 (C <sub>q</sub> ), 161.9 (C <sub>q</sub> ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 192 [[M] <sup>+</sup> , 2], 176 [20], 106 [100], 91 [75].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 192.1011, gef.: 192.1020.
Summenformel	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O (M = 192.22 g/mol)

**8.6.11.5 2-Amino-2-hydrazono-*N*-phenylethylacetamid (263)**

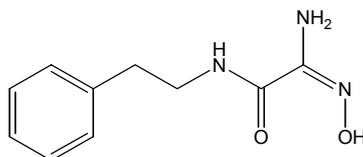
Zu einer Lösung aus 101 mg (0.58 mmol) **261** in 1.00 ml Ethanol gibt man 29.0 mg (0.58 mmol) Hydrazin-Monohydrat (**250**) und rührt zwei Stunden bei Raumtemperatur. Man versetzt die Reaktionslösung mit Wasser und extrahiert mit Essigsäureethylester. Die EE-Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält ein festes, farbloses Produkt.

Ausbeute	100 mg (84 %) farbloser Feststoff
Schmp.	89–90 °C
$R_f$ -Wert	0.12 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/1)
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3339 (m), 3302 (m), 3025 (m), 2933 (m), 2862 (m), 1677 (m), 1619 (s), 1535 (s), 1498 (m), 1456 (m), 1434 (m), 1380 (m), 1280 (m), 1234 (m), 1190 (m), 1160 (w), 1119 (w), 1088 (w), 1030 (m), 989 (w), 906 (w), 753 (m), 700 (m), 573 (m), 543 (m), 500 (w), 472 (w).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]Aceton): $\delta$ [ppm] = 2.86 (t, $J$ = 7.3 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.53 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 6.00 (s, br, 2 H, NH <sub>2</sub> ), 7.17–7.32 (m, 5 H, 5 × CH), 7.94 (s, br, 1 H, NH). (600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 2.78 (t, $J$ = 7.3 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.40 (q, $J$ = 6.2 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 6.15 (s, br, 2 H, NH <sub>2</sub> ), 7.21 (m, 3 H, 3 × CH), 7.28 (m, 2 H, 2 × CH), 8.19 (t, $J$ = 6.2 Hz, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]Aceton): $\delta$ [ppm] = 35.8 (CH <sub>2</sub> ), 40.8 (CH <sub>2</sub> ), 126.6 (CH), 128.8 (2 × CH), 129.1 (2 × CH), 139.7 (C <sub>q</sub> ), 148.9 (C <sub>q</sub> ), 161.8 (C <sub>q</sub> ). (151 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 35.1 (CH <sub>2</sub> ), 40.4 (CH <sub>2</sub> ), 126.3 (CH), 128.5 (2 × CH), 128.8 (2 × CH), 139.4 (C <sub>q</sub> ), 148.1 (C <sub>q</sub> ), 161.6 (C <sub>q</sub> ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 206 [[M] <sup>+</sup> , 12], 175 [64], 155 [62], 115 [81], 91 [100].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 206.1168, gef.: 206.1174.
Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O (M = 206.24 g/mol)

**8.6.11.6 2-Amino-*N*-benzyl-2-hydroxyiminoacetamid (265)**

98.0 mg (0.61 mmol) **260**, 83.0 mg (1.22 mmol) Natriumethanolat und 85.0 mg (1.22 mmol) Hydroxylamin-Hydrochlorid (**264**) werden in 8.00 ml abs. Ethanol gelöst und drei Stunden refluxiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand flash-chromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 1/1 gereinigt. Man erhält ein farbloses Produkt.

Ausbeute	75.0 mg (64 %) farbloser Feststoff
Schmp.	113–114 °C
$R_f$ -Wert	0.62 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/1)
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3465 (s), 3354 (s), 3306 (s), 2928 (m), 1686 (m), 1660 (s), 1549 (s), 1494 (m), 1454 (m), 1436 (m), 1425 (m), 1393 (m), 1359 (m), 1254 (m), 1080 (m), 1060 (w), 1027 (m), 945 (m), 861 (w), 755 (m), 718 (m), 698 (m), 623 (m), 512 (m), 461 (m).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 4.32 (d, $J$ = 6.4 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 5.63 (s, 2 H, NH <sub>2</sub> ), 7.21–7.33 (m, 5 H, 5 × CH), 8.39 (t, $J$ = 6.4 Hz, 1 H, NH), 9.86 (s, 1 H, OH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 42.2 (CH <sub>2</sub> ), 126.9 (CH), 127.3 (2 × CH), 128.4 (2 × CH), 139.6 (C <sub>q</sub> ), 146.0 (C <sub>q</sub> ), 161.1 (C <sub>q</sub> ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 194 [[M+H] <sup>+</sup> , 2], 176 [32], 150 [12], 106 [72], 91 [100], 77 [28], 65 [29], 51 [22].
HR-EI-MS	für [M+H] <sup>+</sup> ber.: 194.0930, gef.: 194.0914.
EA	ber. [%]: C 55.95      H 5.74      N 21.75 gef. [%]: C 56.20      H 5.72      N 21.61
Summenformel	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> (M = 193.20 g/mol)

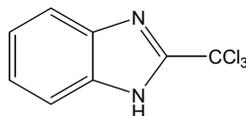
**8.6.11.7 2-Amino-2-hydroxyimino-*N*-phenylethylacetamid (266)**

Man löst 106 mg (0.61 mmol) **261**, 83.0 mg (1.22 mmol) Natriumethanolat und 85.0 mg (1.22 mmol) Hydroxylamin-Hydrochlorid (**264**) in 8.00 ml abs. Ethanol und erhitzt für drei Stunden unter Rückfluß. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 1/1 gereinigt. Das resultierende Produkt ist ein farbloser Feststoff.

Ausbeute	91.0 mg (72 %) farbloser Feststoff
Schmp.	98–99 °C
$R_f$ -Wert	0.59 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/1)
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3462 (s), 3335 (s), 3029 (m), 2937 (m), 2869 (m), 1643 (s), 1545 (s), 1498 (m), 1456 (m), 1383 (m), 1332 (m), 1284 (m), 1242 (m), 1194 (m), 1088 (w), 1062 (m), 1030 (m), 970 (m), 941 (m), 779 (m), 752 (m), 700 (m), 601 (m), 502 (m), 419 (m).
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 2.75 (t, $J$ = 7.1 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.38 (q, $J$ = 6.3 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 5.59 (s, 2 H, NH <sub>2</sub> ), 7.19 (m, 3 H, 3 × CH), 7.27 (m, 2 H, 2 × CH), 7.82 (t, $J$ = 6.3 Hz, 1 H, NH), 9.80 (s, 1 H, OH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 35.1 (CH <sub>2</sub> ), 40.2 (CH <sub>2</sub> ), 126.3 (CH), 128.5 (2 × CH), 128.7 (2 × CH), 139.4 (C <sub>q</sub> ), 145.9 (C <sub>q</sub> ), 160.9 (C <sub>q</sub> ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 208 [[M+H] <sup>+</sup> , 1], 184 [8], 147 [9], 104 [29], 91 [100], 77 [11], 65 [28], 51 [12].
HR-EI-MS	für [M+H] <sup>+</sup> ber.: 208.1086, gef.: 208.1070.
EA	ber. [%]: C 57.96 H 6.32 N 20.28 gef. [%]: C 57.67 H 6.27 N 19.88
Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> (M = 207.23 g/mol)

## 8.6.12 Experimentelle Daten zur Synthese von Benzimidazol-2-carboxamidoxim (271)

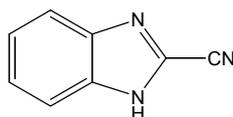
### 8.6.12.1 2-Trichloromethylbenzimidazol (269)<sup>[177]</sup>



Zu einer Suspension aus 10.8 g (0.10 mol) *o*-Phenylendiamin (**267**) in 150 ml Essigsäure tropft man unter Eiskühlung langsam 17.6 g (0.10 mol) 2,2,2-Trichloroacetimidomethylester (**268**). Nach Abklingen der exothermen Reaktion lässt man noch zwei Stunden bei Raumtemperatur rühren. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt aus Essigsäure umkristallisiert. Man erhält einen farblosen Feststoff.

Ausbeute	10.02 g (43 %, Lit. <sup>[177]</sup> 85 %) farbloser Feststoff
Schmp.	> 360 °C (Lit. <sup>[289]</sup> > 360 °C)
$R_f$ -Wert	0.83 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/3)
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 7.30 (m, 2 H, 2 $\times$ CH), 7.65 (m, 2 H, 2 $\times$ CH), 12.72 (s, br, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 89.1 (CCl <sub>3</sub> ), 114.6 (CH), 116.6 (CH), 124.0 (2 $\times$ CH), 138.5 (2 $\times$ C <sub>q</sub> ), 150.8 (C <sub>q</sub> ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 235 [[M] <sup>+</sup> , 11], 234 [13], 200 [64], 199 [100], 163 [27], 102 [41].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 233.9518, gef.: 233.9518.
Summenformel	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub> (M = 235.50 g/mol)

### 8.6.12.2 Benzimidazol-2-carbonitril (270)<sup>[179]</sup>

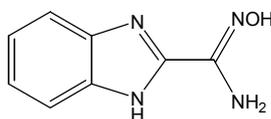


4.95 g (21.0 mmol) 2-Trichloromethylbenzimidazol (**269**) werden bei -78 °C portionsweise zu 100 ml flüssigen Ammoniak gegeben. Das Reaktionsgemisch wird fünf Minuten bei -78 °C gerührt. Anschließend entfernt man das Kältebad und lässt das Reaktionsgemisch auf

Raumtemperatur kommen. Nachdem der Ammoniak verdampft ist, wird der Rückstand dreimal mit 200 ml siedendem Essigsäureethylester extrahiert. Man engt die EE-Lösung im Vakuum auf 60.0 ml ein und saugt den ausfallenden Feststoff ab. Man erhält ein farbloses Produkt.

Ausbeute	1.66 g (55 %, Lit. <sup>[179]</sup> 66 %) farbloser Feststoff
Schmp.	> 250 °C (Lit. <sup>[179]</sup> > 250 °C)
$R_f$ -Wert	0.81 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/3)
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 7.40 (m, 2 H, 2 $\times$ CH), 7.72 (m, 2 H, 2 $\times$ CH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 112.8 (C <sub>q</sub> ), 116.7 (2 $\times$ CH), 125.1 (2 $\times$ CH), 138.1 (2 $\times$ C <sub>q</sub> ), 142.1 (C <sub>q</sub> ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 143 [[M] <sup>+</sup> , 100], 116 [18], 91 [10], 63 [14].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 143.0483, gef.: 143.0479.
Summenformel	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> (M = 143.15 g/mol)

### 8.6.12.3 Benzimidazol-2-carboxamidoxim (271)<sup>[179]</sup>



Man löst 1.66 g (11.6 mmol) Benzimidazol-2-carbonitril (**270**), 1.61 g (23.2 mmol) Hydroxylamin-Hydrochlorid (**264**) und 1.58 g (23.2 mmol) Natriumethanolat in 70.0 ml abs. Ethanol und lässt die Lösung für drei Stunden refluxieren. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand dreimal mit je 100 ml heißem Methanol aufgeschlämmt und filtriert. Man engt das Filtrat bis auf 30.0 ml ein und kühlt auf 0 °C. Der ausfallende Feststoff wird abgesaugt. Man erhält ein farbloses, festes Produkt.

Ausbeute	1.85 g (91 %, Lit. <sup>[179]</sup> 88 %) farbloser Feststoff
Schmp.	200–202 °C (Lit. <sup>[178]</sup> 225 °C)
$R_f$ -Wert	0.27 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/3)

---

<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO, 290 K): δ [ppm] = 5.87 (s, 2 H, NH <sub>2</sub> ), 7.18 (d, <i>J</i> = 4.1 Hz, 2 H, 2 × CH), 7.53 (br, 2 H, 2 × CH), 10.09 (s, 1 H, OH), 12.57 (s, 1 H, NH). (400.1 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO, CD <sub>3</sub> OD, 243 K): δ [ppm] = 7.15 (m, 2 H, 2 × CH), 7.41 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1 H, CH), 7.57 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1 H, CH).
<sup>13</sup> C-NMR	(100.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO, CD <sub>3</sub> OD, 243 K): δ [ppm] = 112.8 (CH), 119.8 (CH), 122.9 (CH), 124.5 (CH), 135.2 (C <sub>q</sub> ), 143.3 (C <sub>q</sub> ), 145.4 (C <sub>q</sub> ), 146.8 (C <sub>q</sub> ).
EI-MS	<i>m/z</i> [%] = 176 [[M] <sup>+</sup> , 67], 146 [100], 119 [86], 91 [32], 63 [24].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 176.0698, gef.: 176.0711.
Summenformel	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O (M = 176.18 g/mol)

### 8.6.13 Experimentelle Daten zu Derivatisierungen von Birnbaumin A (281) und B (282)

#### 8.6.13.1 Methylierung von Birnbaumin A (281)

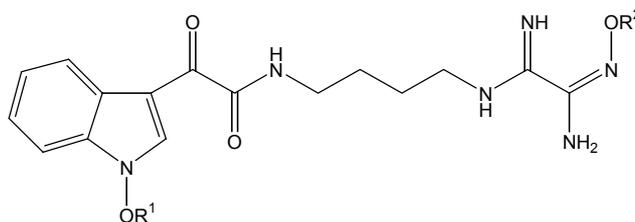
##### 8.6.13.1.1 Arbeitsvorschrift

Man löst 10.0 mg (0.03 mmol) Birnbaumin A (281) in 5.00 ml Methanol und kühlt im Eisbad auf 0 °C. Dann gibt man unter Rühren solange etherische Diazomethanlösung hinzu, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Man rührt anschließend noch 30 Minuten bei 0 °C, entfernt die Kühlung, zerstört das überschüssige Diazomethan mit Eisessig und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird mit Hilfe der präparativen HPLC an RP-18 mit Wasser/Acetonitril und 0.25 % TFA-Zusatz aufgetrennt (System 6). Man erhält drei Fraktionen.

##### 8.6.13.1.2 1. Fraktion

Ausbeute	< 1.00 mg blassgelber Feststoff
R <sub>T</sub> -Wert	(HPLC): 30.4 min (System 6)
(+)-ESI-MS	<i>m/z</i> [%] = 359 [[M+H] <sup>+</sup> , 51].
HR-(+)-ESI-MS	für [M+H] <sup>+</sup> ber.: 359.1832, gef.: 359.1865.
Summenformel	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> (M = 358.40 g/mol)

## 8.6.13.1.3 2. Fraktion

R<sup>1</sup>=CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup>=H: **278**R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=CH<sub>3</sub>: **279**

Ausbeute 2.00 mg Gemisch aus zwei gelben Feststoffen

*R<sub>T</sub>*-Wert (HPLC): 30.8 min (System 6)

<sup>1</sup>H-NMR (**278**) (600 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): δ [ppm] = 1.49 (s, br, 4 H, 2 × CH<sub>2</sub>), 3.12 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.20 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.18 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 7.29 (m, 1 H, CH), 7.36 (m, 1 H, CH), 7.52 (br, 1 H, NH), 7.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, CH), 8.25 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, CH), 8.40 (t, *J* = 5.3 Hz, 1 H, NH), 8.54 (s, 1 H, CH), 12.01 (s, 1 H, OH).

<sup>13</sup>C-NMR (**278**) (151 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): δ [ppm] = 25.9 (CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>), 38.3 (CH<sub>2</sub>), 40.5 (CH<sub>2</sub>), 67.3 (CH<sub>3</sub>), 108.9 (C<sub>q</sub>), 109.2 (CH), 121.4 (C<sub>q</sub>), 121.9 (CH), 123.4 (CH), 124.3 (CH), 131.6 (C<sub>q</sub>), 132.7 (CH), 151.4 (C<sub>q</sub>), 156.8 (C<sub>q</sub>), 161.5 (C<sub>q</sub>), 181.5 (C<sub>q</sub>).

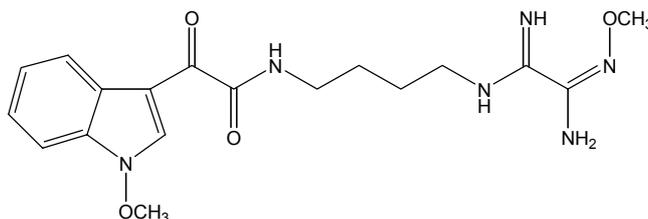
<sup>1</sup>H-NMR (**279**) (600 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): δ [ppm] = 1.48 (s, br, 4 H, 2 × CH<sub>2</sub>), 3.11 (q, *J* = 5.8 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.18 (q, *J* = 5.8 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.87 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 7.29 (m, 1 H, CH), 7.36 (m, 1 H, CH), 7.52 (br, 1 H, NH), 7.53 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H, CH), 8.09 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, CH), 8.12 (s, 1 H, CH), 8.45 (t, *J* = 5.8 Hz, 1 H, NH), 12.32 (s, br, 1 H, OH).

<sup>13</sup>C-NMR (**279**) (151 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): δ [ppm] = 26.2 (CH<sub>2</sub>), 26.3 (CH<sub>2</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>), 40.6 (CH<sub>2</sub>), 62.9 (CH<sub>3</sub>), 109.6 (C<sub>q</sub>), 109.9 (CH), 121.0 (CH), 121.6 (C<sub>q</sub>), 123.3 (CH), 124.0 (CH), 134.2 (CH), 134.4 (C<sub>q</sub>), 151.8 (C<sub>q</sub>), 156.8 (C<sub>q</sub>), 160.8 (C<sub>q</sub>), 182.4 (C<sub>q</sub>).

(+)-ESI-MS *m/z* [%] = 749 [[2M+H]<sup>+</sup>, 4], 375 [[M+H]<sup>+</sup>, 100].

HR-(+)-ESI-MS für [M+H]<sup>+</sup> ber.: 375.1781, gef.: 375.1836.

Summenformel C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (M = 374.40 g/mol)

**8.6.13.1.4 3. Fraktion: Dimethylbirnbaum A (277)**

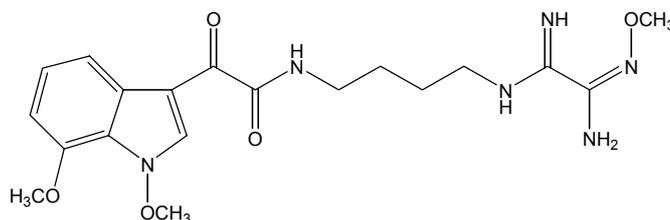
Ausbeute	3.00 mg (28 %) hellgelber Feststoff
Schmp.	48–50 °C
$R_f$ -Wert	0.70 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)
$R_f$ -Wert	(HPLC): 35.5 min (System 6)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 212 nm (4.70), 246 nm (4.47), 314 nm (4.33).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3369 (s), 3199 (m), 2945 (m), 2874 (m), 1652 (s), 1538 (m), 1512 (m), 1487 (m), 1455 (m), 1443 (m), 1373 (m), 1340 (m), 1326 (m), 1251 (m), 1203 (s), 1180 (s), 1133 (s), 1063 (m), 1034 (m), 954 (m), 893 (m), 837 (m), 802 (m), 749 (m), 722 (m), 694 (m), 598 (m).
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.49 (s, br, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.11 (q, $J$ = 6.1 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.18 (q, $J$ = 6.1 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.89 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 4.17 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 7.33 (dd, $J$ = 7.8 Hz, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 7.39 (dd, $J$ = 8.1 Hz, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 7.56 (br, 1 H, NH), 7.61 (d, $J$ = 8.1 Hz, 1 H, CH), 8.12 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH), 8.46 (t, br, 1 H, NH), 8.47 (s, 1 H, CH).
<sup>13</sup> C-NMR	(151 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 26.2 (CH <sub>2</sub> ), 26.3 (CH <sub>2</sub> ), 38.5 (CH <sub>2</sub> ), 40.6 (CH <sub>2</sub> ), 63.1 (CH <sub>3</sub> ), 67.3 (CH <sub>3</sub> ), 109.5 (CH), 110.6 (C <sub>q</sub> ), 121.2 (CH), 121.4 (C <sub>q</sub> ), 123.7 (CH), 124.6 (CH), 132.3 (C <sub>q</sub> ), 133.3 (CH), 151.5 (C <sub>q</sub> ), 156.9 (C <sub>q</sub> ), 160.7 (C <sub>q</sub> ), 183.0 (C <sub>q</sub> ).
(+)-ESI-MS	$m/z$ [%] = 777 [[2M+H] <sup>+</sup> , 5], 389 [[M+H] <sup>+</sup> , 100].
HR-(+)-ESI-MS	für [M+H] <sup>+</sup> ber.: 389.1937, gef.: 389.2015.
Summenformel	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> (M = 388.42 g/mol)

### 8.6.13.2 Methylierung von Birnbaumin B (282)

#### 8.6.13.2.1 Arbeitsvorschrift

Eine Lösung aus 12.0 mg (0.03 mmol) Birnbaumin B (**282**) in 5.00 ml Methanol wird mit einer Spatelspitze Kieselgel versetzt und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren gibt man so lange etherische Diazomethanlösung hinzu, bis man keine Gasentwicklung mehr beobachtet. Anschließend rührt man noch eine Stunde unter Eiskühlung, lässt die Reaktionslösung dann auf Raumtemperatur kommen, zerstört das überschüssige Diazomethan mit Eisessig und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird mittels präparativer HPL-Chromatographie an RP-18 mit Wasser/Acetonitril und Zusatz von 0.25 % TFA als Laufmittel aufgetrennt (System 6). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man einen gelben Feststoff **280** als Hauptprodukt.

#### 8.6.13.2.2 Trimethylbirnbaumin B (280)



Ausbeute	4.00 mg (30 %) gelber Feststoff
Schmp.	43–45 °C
$R_f$ -Wert	0.70 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)
$R_t$ -Wert	(HPLC): 18.5 min (Trennsystem 3)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 214 nm (4.39), 239 nm (4.06), 266 nm (sh, 3.74), 327 nm (3.78).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3401 (s), 2928 (m), 2852 (m), 1674 (s), 1521 (m), 1496 (m), 1460 (m), 1438 (m), 1372 (m), 1351 (m), 1306 (m), 1268 (m), 1205 (m), 1180 (m), 1133 (m), 1052 (m), 1033 (m), 957 (m), 937 (m), 859 (w), 836 (m), 802 (m), 783 (m), 722 (m), 680 (m).
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 1.49 (s, br, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 3.10 (q, $J$ = 5.7 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.17 (q, $J$ = 6.1 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 3.88 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 3.94 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 4.11 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 6.95 (d, $J$ = 8.1 Hz, 1 H, CH), 7.23 (dd, $J$

= 8.1 Hz,  $J = 8.0$  Hz, 1 H, CH), 7.49 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1 H, NH), 7.70 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1 H, CH), 8.28 (s, 1 H, CH), 8.45 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1 H, NH).

$^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ):  $\delta$  [ppm] = 26.2 (CH<sub>2</sub>), 26.3 (CH<sub>2</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>), 40.6 (CH<sub>2</sub>), 56.2 (CH<sub>3</sub>), 63.0 (CH<sub>3</sub>), 68.1 (CH<sub>3</sub>), 106.2 (CH), 110.4 (C<sub>q</sub>), 113.4 (CH), 122.3 (C<sub>q</sub>), 123.9 (C<sub>q</sub>), 124.7 (CH), 133.8 (CH), 146.1 (C<sub>q</sub>), 151.5 (C<sub>q</sub>), 156.8 (C<sub>q</sub>), 160.7 (C<sub>q</sub>), 183.0 (C<sub>q</sub>).

(+)-ESI-MS  $m/z$  [%] = 837 [[2M+H]<sup>+</sup>, 1], 419 [[M+H]<sup>+</sup>, 100].

HR-(+)-ESI-MS für [M+H]<sup>+</sup> ber.: 419.2043, gef.: 419.2070.

Summenformel C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> (M = 418.45 g/mol)

## 9 Experimentelle Daten zu *M. furfur*

### 9.1 Kultivierung

Die Stammhaltung des ausschließlich verwendeten *M. furfur*-Referenzstammes CBS 1878 erfolgt nach einer Methode von Guého et al.<sup>[268]</sup> auf Dixon-Agar mit Modifikationen nach Mayer.<sup>[261]</sup> Das Medium zur Pigmentinduktion besteht aus einer Mischung aus 30.0 ml Tween<sup>®</sup> 80 ultra der Firma Sigma, 970 ml Wasser bidest. und 20.0 g Agar der Firma Merck bei einem pH = 5.5. Nach Autoklavieren und Abkühlen auf 50 °C werden 3.00 g L-Tryptophan (**18**, Firma Merck) zum Kulturmedium hinzugegeben. Man gießt das Medium in sterile Petrischalen mit einem Durchmesser von 10.0 cm (je 10.0 ml) und streicht den Referenzstamm CBS 1878 mit einem sterilen Tupfer auf das Agarmedium.<sup>[261]</sup> Anschließend wird 14 Tage bei 30 °C inkubiert.

### 9.2 Aufarbeitung und Isolierung

Nach Beendigung der Inkubationszeit wird der Inhalt der Petrischalen zerkleinert und mit Essigsäureethylester über 12 Stunden extrahiert. Der Extrakt wird über Glaswolle abfiltriert, mit dem gleichen Volumen Wasser gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die anschließende Vorreinigung erfolgt durch Mitteldruck-Gelpermeationschromatographie (Säulenlänge ca. 525 mm) an Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (Firma Merck) mit Methanol als Eluent. Dabei beträgt der Fluß ca. 20 ml/min und die Detektion erfolgt unter UV-Licht bei 254 nm.

Die so erhaltenen Fraktionen werden auf Kieselgel 60 (Firma Merck) mit Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10/5/3 als Laufmittel dünnschichtchromatographisch weiter aufgetrennt. Für die standardisierte und rationelle Probenaufgabe sowohl bei der analytischen als auch bei der präparativen Dünnschichtchromatographie steht ein Camag-Linnomat IV zur Verfügung. Die detektierten Banden werden von den Platten abgekratzt und mit Essigsäureethylester und Wasser im Verhältnis 1/1 extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, abzentrifugiert, unter einem Stickstoffstrom getrocknet und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die weitere Auftrennung erfolgt durch analytische und präparative HPLC.

### 9.2.1 Analytische HPLC

Man bestimmt die Zusammensetzung der einzelnen Banden durch analytische HPLC an RP-8 bzw. RP-18 (Säulendimension  $4 \times 250\text{ mm}$ ) isokratisch oder mittels Niederdruck-Gradienten mit Wasser/Acetonitril-Gemischen als mobile Phase. Hinsichtlich der Übertragbarkeit auf die präparative Trennung wird der Zusatz von Puffersubstanzen möglichst vermieden. Die Detektion erfolgt meistens bei  $220\text{ nm}$ , kann bei Bedarf jedoch an den Einzelfall angepasst werden. Für die analytische HPLC steht eine Merck-Hitachi-Anlage mit L-6200A Pumpe, L-3000 Multi Channel Photodetektor (DAD), Fluoreszenzdetektor (Fluoromonitor III, LDC-Milton-Roy) und C-R5A Intergrator (Shimadzu) zur Verfügung.

System 9:	Laufmittel A:	Wasser
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 100 % A, 0 % B, 100 min: 0 % A, 100 % B
	Flußrate:	1 ml/min

### 9.2.2 Präparative HPLC

Die an der analytischen HPLC optimierten Trennbedingungen werden auf die präparative HPLC übertragen. Die dafür zur Verfügung stehende Anlage ist aus einer 302 Pumpe (Gilson), UV-Detektor (Holochrome, Gilson) und einem Schreiber (LKB, Gilson) aufgebaut. Die noch recht komplexen Fraktionen (durchschnittlich 5–10 Komponenten) können durch HPL-Chromatographie an einer LiChrospher-RP-18 Säule ( $30 \times 250\text{ mm}$ ) mit LiChrosorb-RP-18 Vorsäule durch folgenden Gradienten weiter aufgetrennt werden:

---

System 10:	Laufmittel A:	Wasser
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 100 % A, 0 % B, 100 min: 0 % A, 100 % B
	Flußrate:	5 ml/min

Die Detektion erfolgt nach visuellen Kriterien wie Farbe, Fluoreszenz bei 340 nm und Absorption im UV. Die eluierenden Verbindungen werden mit Hilfe eines Fraktionensammlers (Super Frac, Pharmacia Biotech) aufgefangen und lyophilisiert (Lyovac GT2). Anschließend wird mit einem zweiten Gradienten weiter aufgetrennt, wobei folgende Systeme verwendet werden:

System 11:	Laufmittel A:	Wasser
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 50 % A, 50 % B, 180 min: 30 % A, 70 % B
	Flußrate:	5 ml/min

System 12:	Laufmittel A:	Wasser
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 50 % A, 50 % B, 180 min: 15 % A, 85 % B
	Flußrate:	5 ml/min

System 13:	Laufmittel A:	Wasser
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 85 % A, 15 % B, 180 min: 60 % A, 40 % B
	Flußrate:	5 ml/min

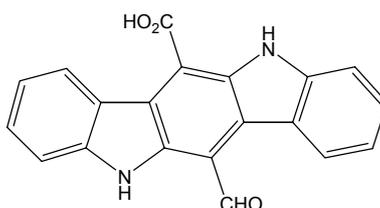
System 14:	Laufmittel A:	Wasser
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 100 % A, 0 % B, 180 min: 70 % A, 30 % B
	Flußrate:	5 ml/min

Die erhaltenen Komponenten werden mit Hilfe der analytischen HPLC auf ihre Reinheit überprüft und gegebenenfalls erneut mit einem der oben aufgeführten Trennsysteme weiter gereinigt.

Die lyophilisierten Reinsubstanzen werden dann unter Stickstoffatmosphäre auf Trockeneis zur Strukturaufklärung nach München geschickt.

### 9.3 Charakterisierung der isolierten Inhaltsstoffe aus *M. furfur*

#### 9.3.1 Malasseziacarbazol C (344)



Malasseziacarbazol C (**344**) wird aus der DC-Bande mit  $R_f$ -Wert von 0.53 ( $\text{SiO}_2$ , Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3) isoliert und mit den Systemen 10 und 11 weiter aufgereinigt. Die isolierte Menge stammt aus 1159 Platten.

Ausbeute	1.69 mg orangefarbener Feststoff
Schmp.	Zersetzung > 300 °C
$R_f$ -Wert	0.53 ( $\text{SiO}_2$ , Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3)
$R_f$ -Wert	(HPLC): 40.6 min (System 9)
UV	( $\text{CH}_3\text{OH}$ ): $\lambda_{\text{max}}$ ( $\log \epsilon$ ) = 214 nm (3.76), 226 nm (sh, 3.71), 247nm (3.66), 268 nm (3.51), 308 nm (3.23), 391 nm (3.19), 462 nm (2.95).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3430 (m), 2926 (m), 2855 (w), 1682 (s), 1617 (m), 1515 (w), 1460 (m), 1439 (w), 1385 (m), 1322 (m), 1296 (w), 1259 (w), 1211 (m), 1183 (m), 1134 (m), 1024 (w), 964 (w), 895 (w), 841 (w), 804 (m), 747 (w), 725 (m), 700 (w), 518 (w).
$^1\text{H-NMR}$	(600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ): $\delta$ [ppm] = 7.23 (m, 1 H, CH), 7.26 (m, 1 H, CH), 7.45 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 7.4$ Hz, 1 H, CH), 7.50 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 7.4$ Hz, 1 H, CH), 7.64 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, CH), 7.66 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, CH), 8.43 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, CH), 8.69 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, CH), 11.44 (s, 1 H, CHO). Die Signale bei $\delta_{\text{H}}$ 7.23 und 7.26 fallen zusammen. Daher können die Kopplungskonstanten nicht bestimmt werden.

(600 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  [ppm] = 7.13 (m, 2 H, 2  $\times$  CH), 7.37 (dd,  $J$  = 8.0 Hz,  $J$  = 7.5 Hz, 1 H, CH), 7.42 (dd,  $J$  = 8.0 Hz,  $J$  = 7.5 Hz, 1 H, CH), 7.71 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2 H, 2  $\times$  CH), 8.50 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1 H, CH), 8.91 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1 H, CH), 11.32 (s, 1 H, CHO), 11.35 (s, 1 H, NH), 11.66 (s, 1 H, NH).

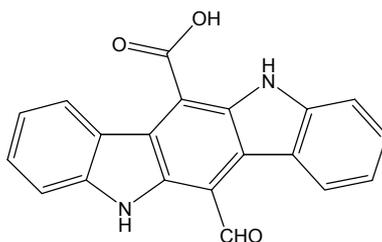
<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] = 112.3 (CH), 113.0 (CH), 113.5 (C<sub>q</sub>), 120.5 (CH), 120.7 (CH), 121.2 (C<sub>q</sub>), 122.9 (C<sub>q</sub>), 123.1 (C<sub>q</sub>), 124.5 (C<sub>q</sub>), 125.0 (CH), 125.3 (CH), 126.6 (C<sub>q</sub>), 127.5 (CH), 127.9 (CH), 134.2 (C<sub>q</sub>), 138.4 (C<sub>q</sub>), 143.4 (C<sub>q</sub>), 143.5 (C<sub>q</sub>), 174.7 (C<sub>q</sub>), 191.8 (CHO).

(-)-ESI-MS  $m/z$  [%] = 327 [[M-H]<sup>-</sup>, 28].

HR-(-)-FAB-MS für [M-H]<sup>-</sup> ber.: 327.0770, gef.: 327.0737.

Summenformel C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M = 328.32 g/mol)

### 9.3.2 Malasseziacarbazol D (346)

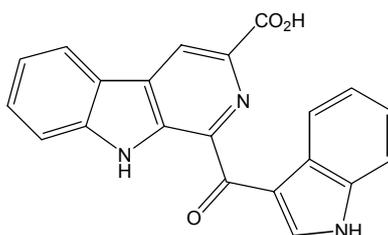


Die rote Verbindung **346** mit dem  $R_f$ -Wert von 0.38 wird mittels präparativer HPLC (Systeme 10 und 11) gereinigt. Die angegebene Menge stammt aus 427 Platten.

Ausbeute 0.97 mg eines roten Feststoffes  
 Schmp. Zersetzung > 300 °C  
 $R_f$ -Wert 0.38 (SiO<sub>2</sub>, Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3)  
 $R_f$ -Wert (HPLC): 35.3 min (System 9)  
 UV (CH<sub>3</sub>OH):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) = 209 nm (4.39), 230 nm (sh, 4.15), 242 nm (sh, 4.05), 275 nm (sh, 3.70), 306 nm (3.55), 409 nm (3.33), 482 nm (3.16).  
 IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3434 (m), 3384 (m), 2925 (m), 2854 (m), 1662 (m), 1634 (s), 1614 (m), 1515 (m), 1462 (m), 1384 (m), 1343 (m), 1321 (m), 1298 (m), 1225 (m), 1207 (m), 1169 (m), 1127 (m), 1102 (m), 1026 (m), 1001 (m), 945 (w), 920 (w), 829 (w), 803 (m), 764 (m), 743 (m), 723 (m), 703 (m), 685 (m), 641 (m), 623 (m), 552 (m), 492 (w).

$^1\text{H-NMR}$	(600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ): $\delta$ [ppm] = 7.23 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 7.5$ Hz, 1 H, CH), 7.30 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 7.5$ Hz, 1 H, CH), 7.49 (dd, $J = 7.5$ Hz, $J = 7.5$ Hz, 1 H, CH), 7.54 (dd, $J = 7.5$ Hz, $J = 7.5$ Hz, 1 H, CH), 7.67 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, CH), 7.68 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, CH), 8.44 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, CH), 8.48 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, CH), 11.55 (s, 1 H, CHO).
$^{13}\text{C-NMR}$	(151 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ): $\delta$ [ppm] = 112.6 ( $\text{C}_q$ ), 112.7 (CH), 113.1 (CH), 116.0 ( $\text{C}_q$ ), 120.8 (CH), 121.1 (CH), 122.4 ( $\text{C}_q$ ), 122.5 ( $\text{C}_q$ ), 122.8 ( $\text{C}_q$ ), 125.1 ( $\text{C}_q$ ), 125.2 (CH), 125.6 (CH), 128.2 (CH), 128.5 (CH), 135.6 ( $\text{C}_q$ ), 137.1 ( $\text{C}_q$ ), 143.7 ( $2 \times \text{C}_q$ ), 172.6 ( $\text{C}_q$ ), 192.3 (CHO), 198.6 ( $\text{C}_q$ ).
(-)-ESI-MS	$m/z$ [%] = 355 [[ $\text{M-H}$ ] $^-$ ], 100].
HR(-)-ESI-MS	für [ $\text{M-H}$ ] $^-$ ber.: 355.0719, gef.: 355.0707.
Summenformel	$\text{C}_{21}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ ( $M = 356.33$ g/mol)

### 9.3.3 Pityriacitrin B (356)



Der gelbe Feststoff **356** wird aus der Bande mit dem  $R_f$ -Wert 0.44 isoliert und mit Hilfe der präparativen HPLC (Systeme 10 und 12) gereinigt. Die angegebene Menge stammt aus 251 Platten.

Ausbeute	1.71 mg eines gelben Feststoffes
Schmp.	Zersetzung $> 300$ °C
$R_f$ -Wert	0.44 ( $\text{SiO}_2$ , Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3) 0.53 (RP-18, Methanol + 2 Tropfen TFA)
$R_t$ -Wert	(HPLC): 55.2 min (System 9)
UV	( $\text{CH}_3\text{OH}$ ): $\lambda_{\text{max}}$ ( $\log \epsilon$ ) = 214 nm (4.49), 266 nm (4.18), 280 nm (4.17), 289 nm (4.17), 391 nm (3.74).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3414 (m), 3059 (m), 2925 (m), 2854 (m), 1707 (m), 1603 (s), 1513 (m), 1494 (m), 1458 (m), 1430 (m), 1384 (m), 1323 (w), 1306 (m),

1277 (m), 1239 (m), 1165 (m), 1150 (w), 1129 (m), 1099 (m), 1063 (w), 1025 (m), 1011 (m), 953 (m), 906 (w), 842 (w), 808 (m), 781 (m), 746 (m), 724 (m), 638 (m), 621 (w), 598 (w), 428 (w).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] = 7.27 (s, breit, 2 H, 2  $\times$  CH), 7.36 (dd,  $J = 7.2$  Hz,  $J = 7.2$  Hz, 1 H, CH), 7.51 (s, breit, 1 H, CH), 7.62 (dd,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 6.9$  Hz, 1 H, CH), 7.74 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1 H, CH), 8.29 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1 H, CH), 8.61 (s, breit, 1H, CH), 8.99 (s, breit, 1H, CH), 9.60 (s, breit, 1H, CH).

(600 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO):  $\delta$  [ppm] = 7.29 (m, 2 H, 2  $\times$  CH<sub>2</sub>), 7.35 (dd,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 7.4$  Hz, 1 H, CH), 7.55 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1 H, CH), 7.63 (dd,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 7.8$  Hz, 1 H, CH), 7.89 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, CH), 8.45 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1 H, CH), 8.59 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H, CH), 9.13 (s, 1H, CH), 9.72 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, CH), 12.26 (s, 1 H, NH), 12.38 (s, 1 H, NH), 13.10 (s, breit, 1 H, OH).

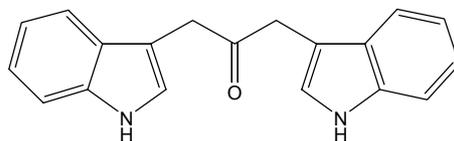
<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  [ppm] = 113.0 (CH), 113.8 (CH), 116.6 (C<sub>q</sub>), 118.4 (C<sub>q</sub>), 119.6 (CH), 121.7 (CH), 122.9 (CH), 123.4 (CH), 123.7 (CH), 124.3 (CH), 129.3 (C<sub>q</sub>), 130.2 (CH), 133.3 (C<sub>q</sub>), 137.8 (C<sub>q</sub>), 138.0 (CH), 139.0 (C<sub>q</sub>), 141.0 (C<sub>q</sub>), 143.7 (C<sub>q</sub>), 144.7 (C<sub>q</sub>), 174.6 (C<sub>q</sub>), 190.1 (C<sub>q</sub>).

EI-MS  $m/z$  [%] = 355 [[M]<sup>+</sup>, 75], 338 [51], 311 [35], 294 [63], 144 [100], 116 [55], 89 [42], 44 [62].

HR-EI-MS für [M]<sup>+</sup> ber.: 355.0957, gef.: 355.0955.

Summenformel C<sub>21</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (M = 355.35 g/mol)

### 9.3.4 Malasseziaketon (358)



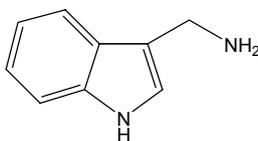
Malasseziaketon (**358**) erhält man bei der weiteren Auftrennung der Bande mit dem  $R_f$ -Wert 0.41 mittels präparativer HPLC (Systeme 10 und 13). Die angegebene Menge stammt aus 427 Platten.

Ausbeute 1.54 mg eines farbloses Feststoffes

---

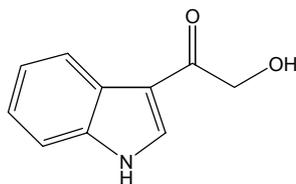
Schmp.	Zersetzung > 150 °C
$R_f$ -Wert	0.41 (SiO <sub>2</sub> , Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3) 0.41 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 1/3)
$R_t$ -Wert	(HPLC): 25.3 min (System 9)
UV	(CH <sub>3</sub> OH): $\lambda_{\max}$ (log $\epsilon$ ) = 207 nm (3.04), 216 nm (sh, 3.01), 266 nm (2.57), 280 nm (2.56), 289 nm (sh, 2.54).
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3421 (s), 2925 (m), 2854 (m), 1583 (s), 1458 (m), 1420 (m), 1399 (m), 1385 (m), 1354 (w), 1340 (w), 1276 (w), 1226 (m), 1206 (w), 1180 (w), 1124 (w), 1024 (w), 1010 (w), 800 (w), 786 (w), 743 (m), 426 (w).
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 3.67 (s, br, 4 H, 2 × CH <sub>2</sub> ), 7.00 (dd, $J$ = 7.7 Hz, $J$ = 7.5 Hz, 2 H, 2 × CH), 7.09 (dd, $J$ = 8.1 Hz, $J$ = 7.5 Hz, 2 H, 2 × CH), 7.16 (s, 2 H, 2 × CH), 7.33 (d, $J$ = 8.1 Hz, 2 H, 2 × CH), 7.63 (d, $J$ = 7.7 Hz, 2 H, 2 × CH).  (600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 3.36 (br, 2 × CH <sub>2</sub> , teilweise verdeckt durch H <sub>2</sub> O-Signal), 6.89 (dd, $J$ = 7.8 Hz, $J$ = 7.4 Hz, 2 H, 2 × CH), 6.99 (dd, $J$ = 8.1 Hz, $J$ = 7.4 Hz, 2 H, 2 × CH), 7.14 (s, 2 H, 2 × CH), 7.27 (d, $J$ = 8.1 Hz, 2 H, 2 × CH), 7.51 (d, $J$ = 7.8 Hz, 2 H, 2 × CH), 10.66 (s, 2 H, 2 × NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(151 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 35.9 (br, 2 × CH <sub>2</sub> ), 112.2 (2 × CH), 112.3 (2 × C <sub>q</sub> ), 119.7 (2 × CH), 120.1 (2 × CH), 122.3 (2 × CH), 124.4 (2 × CH), 129.5 (2 × C <sub>q</sub> ), 138.3 (2 × C <sub>q</sub> ).  Das <sup>13</sup> C-Signal für die Carbonylgruppe kann nicht detektiert werden.
EI-MS	$m/z$ [%] = 288 [[M] <sup>+</sup> , 4], 175 [18], 144 [6], 130 [100], 117 [39], 89 [14], 77 [19], 63 [10].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 288.1263, gef.: 288.1282.
Summenformel	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O (M = 288.34 g/mol)

### 9.3.5 Vergleichsverbindung für Malasseziaketon (358): 3-Aminomethylindol (359)<sup>[275]</sup>



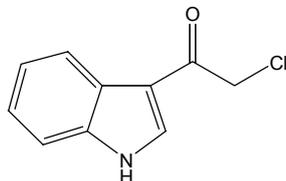
Man löst 68.0 mg (0.39 mmol) Gramin in 4.00 ml abs. THF, gibt 593 mg (4.18 mmol, 0.26 ml) Methyljodid (**243**) hinzu und rührt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 12.0 ml konz. Ammoniak versetzt. Man lässt zwei Stunden bei Raumtemperatur rühren, verdünnt mit gesättigter NaCl-Lösung und extrahiert mit Chloroform/Methanol 95/5. Die organische Phase wird mit Brine gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Man reinigt das Rohprodukt durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Ammoniak 46/5/0.5. Es wird ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute	10.0 mg (18 %, Lit. <sup>[275]</sup> 60 %) farbloser Feststoff
Schmp.	96–98 °C (Lit. <sup>[275]</sup> 98–101 °C)
$R_f$ -Wert	0.06 (SiO <sub>2</sub> , Chloroform/Methanol/Ammoniak 46/5/0.5)
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 4.07 (s, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 7.08 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 7.5$ Hz, 1 H, CH), 7.15 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 7.5$ Hz, 1 H, CH), 7.26 (s, 1 H, CH), 7.39 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, CH), 7.65 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, CH).
<sup>13</sup> C-NMR	(151 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 37.5 (CH <sub>2</sub> ), 112.7 (CH), 115.9 (C <sub>q</sub> ), 119.4 (CH), 120.3 (CH), 122.9 (CH), 124.3 (CH), 128.1 (C <sub>q</sub> ), 138.6 (C <sub>q</sub> ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 146 [[M] <sup>+</sup> , 62], 130 [100], 118 [33], 102 [15], 89 [10], 77 [11], 63 [6].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 146.0844, gef.: 146.0830.
Summenformel	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> (M = 146.19 g/mol)

**9.3.6 3-(Hydroxyacetyl)indol (360) aus *M. furfur***

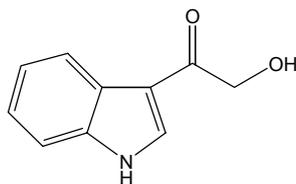
Die farblose Verbindung wird aus der DC-Bande mit dem  $R_f$ -Wert 0.14 isoliert und an der präparativen HPLC (Systeme 10 und 14) gereinigt. Die angegebene Menge stammt aus 120 Platten.

Ausbeute	2.10 mg
Schmp.	173–174 °C (Lit. <sup>[283]</sup> 173–174 °C)
$R_f$ -Wert	0.29 (SiO <sub>2</sub> , Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3) 0.72 (RP-18, Methanol/Wasser 3/1)
$R_t$ -Wert	(HPLC): 12.0 min (System 4)
UV	Lit. <sup>[276]</sup>
IR	Lit. <sup>[276]</sup>
<sup>1</sup> H-NMR	(600 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 4.78 (s, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 7.27 (m, 2 H, 2 $\times$ CH), 7.50 (d, $J$ = 8.3 Hz, 1 H, CH), 8.24 (s, 1 H, CH), 8.27 (d, $J$ = 7.8 Hz, 1 H, CH). (600 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 4.56 (s, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 4.89 (s, 1 H, OH), 7.19 (m, 2 H, 2 $\times$ CH), 7.47 (dd, $J$ = 1 Hz, $J$ = 7.1 Hz, 1 H, CH), 8.16 (dd, $J$ = 1 Hz, $J$ = 6.9 Hz, 1 H, CH), 8.33 (s, 1 H, CH), 12.00 (s, br, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(151 MHz, CD <sub>3</sub> OD): $\delta$ [ppm] = 66.6 (CH <sub>2</sub> ), 113.2 (CH), 115.2 (C <sub>q</sub> ), 123.0 (CH), 123.6 (CH), 124.7 (CH), 127.2 (C <sub>q</sub> ), 134.3 (CH), 138.5 (C <sub>q</sub> ), 196.3 (C <sub>q</sub> ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 175 [[M] <sup>+</sup> , 5], 159 [5], 144 [100], 130 [7], 116 [19], 89 [13].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 175.0633, gef.: 175.0621.
Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> (M = 175.19 g/mol)

**9.3.7 Experimentelle Daten zur Synthese von 3-(Hydroxyacetyl)indol (360)****9.3.7.1 3-(Chloroacetyl)indol (362)<sup>[282]</sup>**

Zu einer Lösung aus 2.34 g (20.0 mmol) Indol (**16**) und 1.58 g (20.0 mmol, 1.61 ml) Pyridin in 50.0 ml Toluol werden bei 55 °C unter Rühren 2.26 g (20.0 mmol, 1.59 ml) Chloracetylchlorid (**361**) während einer Stunde zugetropft. Man rührt weitere 60 Minuten bei 55 °C und gibt anschließend 60.0 ml Wasser und 10.0 ml Methanol zum Reaktionsgemisch hinzu. Der erhaltene braune Feststoff wird abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute	1.00 g (26 %, Lit. <sup>[282]</sup> 48 %) beigefarbener Feststoff				
Schmp.	230–232 °C (Lit. <sup>[282]</sup> 230–232 °C)				
$R_f$ -Wert	0.64 (SiO <sub>2</sub> Petrolether/Essigsäureethylester 1/2)				
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 4.87 (s, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 7.22 (m, 2 H, 2 × CH), 7.50 (m, 1 H, CH), 8.17 (m, 1 H, CH), 8.43 (d, $J$ = 3.3 Hz, 1 H, CH), 12.13 (s, br, 1 H, NH).				
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]DMSO): $\delta$ [ppm] = 46.6 (CH <sub>2</sub> ), 112.5 (CH), 113.8 (C <sub>q</sub> ), 121.3 (CH), 122.3 (CH), 123.4 (CH), 125.6 (C <sub>q</sub> ), 134.9 (CH), 136.8 (C <sub>q</sub> ), 186.3 (C <sub>q</sub> ).				
EI-MS	$m/z$ [%] = 193 [[M] <sup>+</sup> , 16], 144 [100], 130 [8], 116 [21], 89 [24].				
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 193.0294, gef.: 193.0292.				
EA	ber. [%]:	C 62.03	H 4.16	N 7.23	Cl 18.31
	gef. [%]:	C 62.14	H 3.79	N 7.18	Cl 17.90
Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> ClNO (M = 193.63 g/mol)				

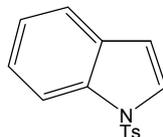
**9.3.7.2 Synthese von 3-(Hydroxyacetyl)indol (360)<sup>[283]</sup>**

500 mg (2.58 mmol) 3-(Chloroacetyl)indol (**362**) werden in 50.0 ml Formamid/Wasser (10/1) suspendiert und unter Rühren für 3.5 Stunden auf 110 °C erwärmt. Anschließend gibt man 200 ml halbkonzentrierten Ammoniak (14%ig) zur Reaktionslösung und extrahiert mit Chloroform. Die organische Phase wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält ein Öl, aus dem langsam ein farbloser Feststoff auskristallisiert. Die Reinigung erfolgt flash-chromatographisch an RP-18 mit Methanol/Wasser (3/1) als Laufmittel.

Ausbeute	283 mg (63 %, Lit. <sup>[283]</sup> 97 %) farbloser Feststoff
Schmp.	173–174 °C (Lit. <sup>[283]</sup> 173–174 °C)
R <sub>F</sub> -Wert	0.29 (SiO <sub>2</sub> , Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3) 0.72 (RP-18, Methanol/Wasser 3/1)
R <sub>T</sub> -Wert	(HPLC): 12.0 min (System 4)
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CD <sub>3</sub> OD): δ [ppm] = 4.78 (s, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 7.27 (m, 2 H, 2 × CH), 7.50 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1 H, CH), 8.24 (s, 1 H, CH), 8.27 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1 H, CH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, CD <sub>3</sub> OD): δ [ppm] = 66.6 (CH <sub>2</sub> ), 113.2 (CH), 115.2 (C <sub>q</sub> ), 123.0 (CH), 123.6 (CH), 124.7 (CH), 127.2 (C <sub>q</sub> ), 134.3 (CH), 138.5 (C <sub>q</sub> ), 196.3 (C <sub>q</sub> ).
EI-MS	<i>m/z</i> [%] = 175 [[M] <sup>+</sup> , 10], 159 [1], 144 [100], 130 [2], 116 [31], 89 [33].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 175.0633, gef.: 175.0633.
Summenformel	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> (M = 175.19 g/mol)

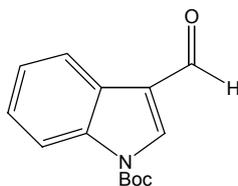
## 9.4 Experimentelle Daten zur Synthese von Malassezin (326)

### 9.4.1 *N*-(Toluol-4-sulfonyl)indol (368)<sup>[263]</sup>



Zu einer Lösung aus 5.85 g (0.05 mol) Indol (**16**) in 50.0 ml abs. THF werden bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  21.0 ml einer 2.5M *n*-BuLi-Lösung in Hexan (3.36 g, 52.5 mmol, 1.05 eq) innerhalb von 15 Minuten zugetropft. Man rührt 20 Minuten bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  und entfernt dann die Kühlung für 45 Minuten. Nach erneutem Abkühlen auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gibt man 10.5 g (55.1 mmol, 1.1 eq), Toluol-4-sulfonylchlorid (**256**) in 15.0 ml abs. THF hinzu und lässt unter Rühren über Nacht auftauen. Die Reaktionslösung wird bei  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorsichtig mit 80.0 ml Eiswasser versetzt und zweimal mit Diethylether extrahiert. Man wäscht mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und Brine, trocknet die organische Phase über Magnesiumsulfat und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das Rohprodukt wird aus Methanol umkristallisiert. Man erhält einen farblosen Feststoff.

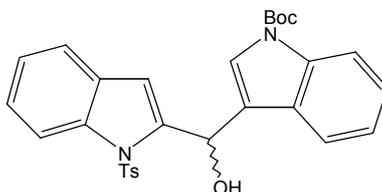
Ausbeute	9.62 g (71 %, Lit. <sup>[263]</sup> 85 %) farbloser Feststoff
Schmp.	83–84 $^{\circ}\text{C}$ (Lit. <sup>[290]</sup> 86 $^{\circ}\text{C}$ )
$R_f$ -Wert	0.72 ( $\text{SiO}_2$ , Petrolether/Essigsäureethylester 3/1)
$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ [ppm] = 2.32 (s, 3 H, $\text{CH}_3$ ), 6.64 (dd, $J = 3.7\text{ Hz}$ , $J = 0.8\text{ Hz}$ , 1 H, CH), 7.18–7.32 (m, 4 H, $4 \times \text{CH}$ ), 7.51 (dt, $J = 7.7\text{ Hz}$ , $J = 1.0\text{ Hz}$ , 1 H, CH), 7.56 (d, $J = 3.7\text{ Hz}$ , 1 H, CH), 7.75 (m, 2 H, $2 \times \text{CH}$ ), 7.99 (dd, $J = 8.3\text{ Hz}$ , $J = 0.9\text{ Hz}$ , 1 H, CH).
$^{13}\text{C-NMR}$	(75.5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ [ppm] = 21.5 ( $\text{CH}_3$ ), 109.0 (CH), 113.5 (CH), 121.3 (CH), 123.2 (CH), 124.5 (CH), 126.3 (CH), 126.8 ( $2 \times \text{CH}$ ), 129.8 ( $2 \times \text{CH}$ ), 130.7 ( $\text{C}_q$ ), 134.8 ( $\text{C}_q$ ), 135.3 ( $\text{C}_q$ ), 144.9 ( $\text{C}_q$ ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 271 [ $[\text{M}]^+$ , 94], 155 [73], 116 [70], 91 [100], 65 [14].
HR-EI-MS	für $[\text{M}]^+$ ber.: 271.0667, gef.: 271.0703.
Summenformel	$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$ ( $M = 271.34\text{ g/mol}$ )

**9.4.2** *N*-Boc-indol-3-carbaldehyd (335)<sup>[263]</sup>

7.00 g (48.2 mmol) Indol-3-carbaldehyd werden in 100 ml abs. THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Man gibt eine Spatelspitze DMAP und 11.6 g (53.1 mmol, 1.1 eq) (Boc)<sub>2</sub>O hinzu und lässt eine Stunde bei 0 °C rühren. Die Lösung wird eingengt und der Feststoff aus Methanol umkristallisiert. Man erhält ein farbloses Produkt.

Ausbeute	9.80 g (83 %, Lit. <sup>[263]</sup> 90 %) farbloser Feststoff
Schmp.	124–126 °C (Lit. <sup>[291]</sup> 124–126 °C)
<i>R<sub>f</sub></i> -Wert	0.68 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 3/1)
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ [ppm] = 1.71 (s, 9 H, 3 × CH <sub>3</sub> ), 7.34–7.44 (m, 2 H, 2 × CH), 8.15 (dd, <i>J</i> = 7.2 Hz, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1 H, CH), 8.23 (s, 1 H, CH), 8.29 (m, 1 H, CH), 10.10 (s, 1 H, CH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ [ppm] = 28.1 (3 × CH <sub>3</sub> ), 85.6 (C <sub>q</sub> ), 115.1 (CH), 121.6 (C <sub>q</sub> ), 122.1 (CH), 124.6 (CH), 126.0 (CH), 126.1 (C <sub>q</sub> ), 136.0 (C <sub>q</sub> ), 136.4 (CH), 148.8 (C <sub>q</sub> ), 185.7 (CH).
EI-MS	<i>m/z</i> [%] = 245 [[M] <sup>+</sup> , 1], 189 [8], 144 [46], 116 [17], 89 [17], 57 [100].
HR-EI-MS	für [M] <sup>+</sup> ber.: 245.1052, gef.: 245.1036.
Summenformel	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub> (M = 245.27 g/mol)

**9.4.3 3-{Hydroxy-[1-(toluol-4-sulfonyl)-1*H*-indol-2-yl]methyl}indol-1-carbonsäure-*tert*-butylester (371)<sup>[263]</sup>**

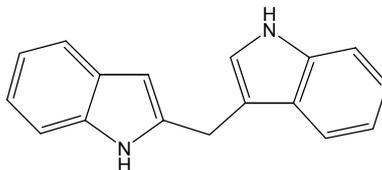


Zu einer Lösung aus 2.70 g (9.95 mmol) *N*-(Toluol-4-sulfonyl)indol (**368**) in 40.0 ml abs. THF tropft man bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Schutzgasatmosphäre 7.30 ml (11.0 mmol, 1.1 eq) einer 1.5N *tert*-BuLi-Lösung zu und lässt 30 Minuten rühren. Anschließend gibt man zu der orangefarbenen Lösung 2.44 g (9.95 mmol) *N*-Boc-indol-3-carbaldehyd (**335**) in einer Portion hinzu und rührt eine weitere Stunde bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Man lässt auf Raumtemperatur kommen, quencht vorsichtig mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung und extrahiert die wässrige Phase dreimal mit Essigsäureethylester. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man reinigt das resultierende Öl flashchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 3/1 und erhält einen hellgelben Feststoff.

Ausbeute	4.46 g (87 %, Lit. <sup>[263]</sup> 74 %) hellgelber Feststoff
Schmp.	83–85 °C (Lit. <sup>[263]</sup> 151 °C)
$R_f$ -Wert	0.51 ( $\text{SiO}_2$ , Petrolether/Essigsäureethylester 3/1)
$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ [ppm] = 1.67 (s, 9 H, 3 $\times$ $\text{CH}_3$ ), 2.34 (s, 3 H, $\text{CH}_3$ ), 3.81 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H, OH), 6.36 (s, 1 H, CH), 6.58 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H, CH), 6.94 (d, $J = 7.7$ Hz, 1 H, CH), 7.03 (dd, $J = 7.7$ Hz, $J = 7.1$ Hz, 1 H, CH), 7.18 (m, 3 H, 3 $\times$ CH), 7.24–7.34 (m, 3 H, 3 $\times$ CH), 7.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, 2 $\times$ CH), 7.72 (s, 1 H, CH), 8.16 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, 2 $\times$ CH).
$^{13}\text{C-NMR}$	(75.5 MHz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ [ppm] = 21.5 ( $\text{CH}_3$ ), 28.1 (3 $\times$ $\text{CH}_3$ ), 63.4 (CH), 83.8 ( $\text{C}_q$ ), 111.9 (CH), 114.6 (CH), 115.2 (CH), 119.7 (CH), 120.7 ( $\text{C}_q$ ), 121.3 (CH), 122.4 (CH), 123.7 (CH), 124.1 (CH), 124.4 (CH), 125.1 (CH), 126.2 (2 $\times$ CH), 128.4 ( $\text{C}_q$ ), 128.8 ( $\text{C}_q$ ), 129.8 (2 $\times$ CH), 135.6 ( $\text{C}_q$ ), 135.8 ( $\text{C}_q$ ), 137.5 ( $\text{C}_q$ ), 142.0 ( $\text{C}_q$ ), 145.1 ( $\text{C}_q$ ), 149.5 ( $\text{C}_q$ ).
EI-MS	$m/z$ [%] = 516 [ $[\text{M}]^+$ , 40], 460 [29], 304 [41], 260 [36], 144 [100], 117 [31], 91 [16], 57 [42].
HR-EI-MS	für $[\text{M}]^+$ ber.: 516.6091, gef.: 516.1716.

Summenformel  $C_{29}H_{28}N_2O_5S$  ( $M = 516.61$  g/mol)

#### 9.4.4 2,3'-Methylenbisindol (370)



Man suspendiert 228 mg (6.01 mmol) Lithiumaluminiumhydrid unter Stickstoffatmosphäre in 10.0 ml abs. THF und tropft 517 mg (1.00 mmol) **371** in 5.00 ml abs. THF zu. Die rote Suspension wird für 18 Stunden unter Stickstoff und Lichtschutz refluxiert, wobei eine Farbänderung nach gelb zu beobachten ist. Anschließend quencht man unter Eiskühlung vorsichtig mit Natrium-Kalium-Tartrat-Lösung und filtert das Reaktionsgemisch durch Celite<sup>®</sup>. Der Filterkuchen wird ausgiebig mit THF und Dichlormethan gewaschen, das Filtrat zweimal gegen Wasser und einmal gegen gesättigte NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Man trocknet die organische Phase über Magnesiumsulfat und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Man erhält ein gelbes Öl, das sich schnell rot färbt und durch Flashchromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester 3/1 gereinigt wird. Das resultierende Produkt ist ein blassrosafarbener Feststoff, der bei  $-20$  °C unter Lichtausschluss gelagert werden muss.

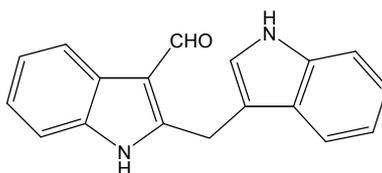
Ausbeute	195 mg (79 %) blassrosafarbener Feststoff
Schmp.	137–138 °C (Lit. <sup>[292]</sup> 141–142 °C)
$R_f$ -Wert	0.38 (SiO <sub>2</sub> , Petrolether/Essigsäureethylester 3/1)
<sup>1</sup> H-NMR	(300 MHz, [D <sub>6</sub> ]Aceton): $\delta$ [ppm] = 4.27 (s, 2 H, CH <sub>2</sub> ), 6.26 (q, $J = 1.0$ Hz, 1 H, CH), 6.90–7.00 (m, 3 H, 3 $\times$ CH), 7.08 (ddd, $J = 8.1$ Hz, $J = 7.1$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1 H, CH), 7.21 (m, 1 H, CH), 7.25 (dt, $J = 6.9$ Hz, $J = 0.9$ Hz, 1 H, CH), 7.38 (dt, $J = 8.1$ Hz, $J = 0.9$ Hz, 1 H, CH), 7.42 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1 H, CH), 7.50 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1 H, CH), 9.90 (s, br, 1 H, NH), 10.03 (s, br, 1 H, NH).
<sup>13</sup> C-NMR	(75.5 MHz, [D <sub>6</sub> ]Aceton): $\delta$ [ppm] = 25.1 (CH <sub>2</sub> ), 100.2 (CH), 111.4 (CH), 112.1 (CH), 113.3 (C <sub>q</sub> ), 119.4 (CH), 119.5 (CH), 119.6 (CH), 120.2 (CH), 121.1 (CH), 122.1 (CH), 124.0 (CH), 128.4 (C <sub>q</sub> ), 129.9 (C <sub>q</sub> ), 137.5 (C <sub>q</sub> ), 137.8 (C <sub>q</sub> ), 140.2 (C <sub>q</sub> ).

GC/EI-MS  $m/z$  [%] = 246 [[M]<sup>+</sup>, 100], 217 [11], 130 [20], 117 [12].

HR-EI-MS für [M]<sup>+</sup> ber.: 246.1157, gef.: 246.1166.

Summenformel C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub> (M = 246.31 g/mol)

#### 9.4.5 (2,3'-Methylenbisindol-3-yl)carbaldehyd (Malassezin, 326)<sup>[263]</sup>



2.00 ml abs. DMF werden auf 0 °C gekühlt und unter Schutzgas mit 113 mg (0.74 mmol, 0.067 ml, 1.1 eq) POCl<sub>3</sub> versetzt. Nach 20minütigem Rühren unter Eiskühlung lässt man weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur rühren. Anschließend kühlt man erneut auf 0 °C, gibt 164 mg (0.67 mmol) 2,3'-Methylenbisindol (**370**) hinzu und erwärmt nach 20 Minuten für zwei Stunden auf 40 °C. Die abgekühlte Reaktionslösung wird in 15.0 ml wässrige Natriumcarbonat-Lösung gegossen und dreimal mit Chloroform extrahiert. Man wäscht die organische Phase nacheinander mit 1N Natronlauge, Wasser und NaCl-Lösung und trocknet sie über Magnesiumsulfat. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester (5/1 → 2/1) gereinigt. Man erhält einen farblosen Feststoff.

Ausbeute 137 mg (75 %, Lit.<sup>[263]</sup> 74 %) farbloser Feststoff

Schmp. Zersetzung > 240 °C (Lit.<sup>[263]</sup> 240 °C)

R<sub>f</sub>-Wert 0.53 (SiO<sub>2</sub>, Petrolether/Essigsäureethylester 1/1)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): δ [ppm] = 4.55 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 6.94 (dd, *J* = 7.7 Hz, = 7.2 Hz, 1 H, CH), 7.05 (dd, *J* = 8.0 Hz, = 7.2 Hz, 1 H, CH), 7.14 (m, 2 H, 2 × CH), 7.26 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, CH), 7.36 (m, 2 H, 2 × CH), 7.49 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, CH), 8.05 (m, 1 H, CH), 10.26 (s, 1 H, CH), 10.97 (s, 1 H, NH), 11.91 (s, br, 1 H, NH).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): δ [ppm] = 22.2 (CH<sub>2</sub>), 111.0 (C<sub>q</sub>), 111.7 (CH), 111.9 (CH), 113.2 (C<sub>q</sub>), 118.4 (CH), 118.7 (CH), 120.4 (CH), 121.4 (CH), 122.1 (CH), 122.8 (CH), 123.9 (CH), 125.7 (C<sub>q</sub>), 126.8 (C<sub>q</sub>), 135.6 (C<sub>q</sub>), 136.4 (C<sub>q</sub>), 151.5 (C<sub>q</sub>), 184.8 (CH).

---

EI-MS  $m/z$  [%] = 274 [[M]<sup>+</sup>, 31], 257 [26], 157 [17], 43 [100].

HR-EI-MS für [M]<sup>+</sup> ber.: 274.1106, gef.: 274.1124.

Summenformel C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O (M = 274.32 g/mol)

## V Abkürzungsverzeichnis

<i>A.</i>	<i>Austroboletus</i>
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetyl
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
AHR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AHT	Amidinoharnstoff-Terminus
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B.</i>	<i>Boletus</i>
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
(Boc) <sub>2</sub> O	Di- <i>tert</i> -butyl-dicarbonat
br	verbreitert
CI	Chemische Ionisation
CoA	Coenzym A
COSY	correlation spectroscopy
<i>D.</i>	<i>Daldinia</i>
DAHP	3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat
DBU	1,5-Diazabicyclo[5.4.0]undecen-5
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
det.	determinavit
DMAP	4-( <i>N,N</i> -Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMFDMA	<i>N,N</i> -Dimethylformamiddimethylacetal
DMSO	Dimethylsulfoxid
Δ	Erhitzen
EA	Elementaranalyse
EI	Elektronenstoßionisation
eq.	Äquivalent(e)

---

EPSP	5-Enolpyruvyl-shikimat-3-phosphat
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	et alii
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
Fa.	Firma
FAB	fast atom bombardment
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
GC	Gaschromatographie
gef.	gefunden
h	Stunde(n)
HMBC	heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	high performance liquid chromatography
HR-MS	High Resolution Mass Spectrometry
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IGP	3'-Indolylglycerin-3-phosphat
IR	Infrarotspektroskopie
konz.	konzentriert
Koppl.	Kopplungen
<i>L.</i>	<i>Leucocoprinus</i>
leg.	legit
Lit.	Literatur
<i>M.</i>	<i>Malassezia</i>
M	Multiplizität
M	molar
[M] <sup>+</sup>	Molekülion
Me	Methyl
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoroacetamid
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
N	normal
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte/reduzierte Form)
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte/reduzierte Form)

---

NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PCC	Pyridiniumchlorochromat
Pd/C	Palladium auf Kohle
PEP	Phosphoenolpyruvat
Ph	Phenyl
PLP	Pyridoxalphosphat
PPA	Polyphosphorsäure
quant.	quantitativ
$R_f$	Ratio of fronts
$R_t$	Retentionszeit
RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur
Schmp.	Schmelzpunkt
sh	Schulter
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDMSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyranyl
TMS	Tetramethylsilan
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
Ts	<i>para</i> -Tosyl
UV	Ultraviolett
Vis	visible

## VI Literaturverzeichnis

- [1] F. Lingens, *Angew. Chem.* **1968**, *80*, 384–394.
- [2] B. Ganem, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 3353–3383.
- [3] J. F. Eykmann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1891**, *24*, 1278–1303.
- [4] P. R. Srinivasan, M. Katagiri, D. B. Sprinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4943–4944.
- [5] P. R. Srinivasan, D. B. Sprinson, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 716–722.
- [6] P. A. Bartlett, K. L. McLaren, M. A. Marx, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2082–2085.
- [7] T. Widlanski, S. L. Bender, J. R. Knowles, *Biochemistry* **1989**, *28*, 7572–7282.
- [8] M. J. Turner, B. W. Smith, E. Haslam, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1975**, 52–55.
- [9] H. Yaniv, C. Gilvarg, *J. Biol. Chem.* **1955**, *213*, 787–795.
- [10] A. Rivera Jr., P. R. Srinivasan, *Biochemistry* **1963**, *2*, 1063–1069.
- [11] H. Morell, M. J. Clark, P. F. Knowles, D. B. Sprinson, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 82–90.
- [12] Y. Asano, J. J. Lee, T. L. Shieh, F. Spreafico, C. Kowal, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4314–4320.
- [13] S. Bornemann, D. J. Lowe, R. N. F. Thorneley, *Biochemistry* **1996**, *35*, 9907–9916.
- [14] P. R. Srinivasan, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 1772–1773.
- [15] P. R. Srinivasan, A. Rivera Jr., *Biochemistry* **1963**, *2*, 1059–1062.
- [16] P. R. Srinivasan, *Biochemistry* **1965**, *4*, 2860–2865.
- [17] P. P. Policastro, K. G. Au, C. T. Walsh, G. A. Berchtold, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2443–2444.
- [18] C.-Y. P. Teng, B. Ganem, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2463–2464.
- [19] F. Lingens, H. J. Burkhardt, H. Hellmann, *Z. Naturforsch.* **1957**, *12 b*, 493–497.
- [20] C. H. Doy, F. Gibson, *Biochem. J.* **1959**, *72*, 586–597.
- [21] J. Wegman, J. A. DeMoss, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 3781–3788.
- [22] U. Hommel, M. Eberhard, K. Kirschner, *Biochemistry* **1995**, *34*, 5429–5439.
- [23] I. P. Crawford, C. Yanofski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 1161–1170.
- [24] K. S. Anderson, E. W. Miles, K. A. Johnson, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 8020–8033.
- [25] K. S. Anderson, A. Y. Kim, J. M. Quillen, E. Sayers, X.-J. Yang, E. W. Miles, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 29936–29944.

- [26] G. J. W. Euverink, D. J. Wolters, L. Dijkhuizen, *Biochem. J.* **1995**, *308*, 313–320.
- [27] M. Iwasaki, H. Hayashi, H. Kagamiyama, *J. Biochem.* **1994**, *115*, 156–161.
- [28] E. L. Camm, G. H. N. Towers, *Phytochemistry* **1973**, *12*, 961–973.
- [29] M. Gill, W. Steglich, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Vol. 51*, Springer Verlag, Wien, New York, **1987**.
- [30] F. Lynen, M. Tada, *Angew. Chem.* **1961**, *73*, 513–519.
- [31] F. Lynen, E. Reichert, L. Rueff, *Liebigs Ann.* **1951**, *574*, 1–32.
- [32] J. Mann, *Secondary Metabolism*, 2nd ed., Oxford University Press, New York, **1987**.
- [33] B. Shen, *Topics Curr. Chem.* **2000**, *209*, 1–51.
- [34] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Lehrbuch der Biochemie*, WILEY-VCH, Weinheim, **2002**.
- [35] C. B. J. Wolfe, *Austroboletus and Tylopilus subgenus Porphyrellus with emphasis on North American taxa*, J. Cramer Verlag, Vaduz, **1979**.
- [36] R. Phillips, *Mushrooms of North America*, Little, Brown and Company, Boston, Toronto, London, **1991**.
- [37] E. Bessette, A. R. Bessette, D. W. Fischer, *Mushrooms of Northeastern North America*, Syracuse University Press, Syracuse, New York, **1997**.
- [38] W. Steglich, H. Huppertz, B. Steffan, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 716–717, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, *24*, 711–712.
- [39] B. Steffan, *Dissertation*, Universität Bonn, **1981**.
- [40] B. Steffan, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 435–437, *Angew. Chem, Int. Ed.* **1984**, *23*, 445–447.
- [41] D. C. Aumann, G. Clooth, B. Steffan, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 495–496, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 453–454.
- [42] R. Marumoto, C. Kilpert, W. Steglich, *Z. Naturforsch.* **1986**, *41 c*, 363–365.
- [43] H. Schmidt, *Dissertation*, Universität Bonn, **1990**.
- [44] W. Steglich, W. Furtner, A. Prox, *Z. Naturforsch.* **1968**, *23 b*, 1044–1050.
- [45] M. Winner, *Dissertation*, Universität München, **2003**.
- [46] O. Sterner, B. Steffan, W. Steglich, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1075–1082.
- [47] P. Spitteller, *Dissertation*, Universität München, **2001**.
- [48] J. Dasenbrock, *Dissertation*, Universität Bonn, **1994**.
- [49] V. Hellwig, *Dissertation*, Universität München, **1998**.

- [50] V. Hellwig, J. Dasenbrock, C. Gräf, L. Kahner, S. Schumann, W. Steglich, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2895–2904.
- [51] L. Kahner, *Dissertation*, Universität München, **2001**.
- [52] R. Hermann, *Dissertation*, Universität Bonn, **1980**.
- [53] J. Klamann, *Dissertation*, Universität Bonn, **1988**.
- [54] K. Justus, *Dissertation*, Universität Bonn, **1993**.
- [55] G. Gruber, *Dissertation*, Universität München, **2002**.
- [56] C. B. de Koning, A. L. Rosseau, W. A. L. van Otterlo, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7–36.
- [57] P. Nebois, H. Fillion, *Heterocycles* **1999**, *50*, 1137–1156.
- [58] S. Danishefsky, T. Kitahara, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 7807–7808.
- [59] J. Banville, P. Brassard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1976**, 1852–1856.
- [60] G. Bringmann, R. Götz, P. A. Keller, R. Walter, M. R. Boyd, F. Lang, A. Garcia, J. Walsh, I. Tellitu, K. V. Bhaskar, T. R. Kelly, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1090–1097.
- [61] W. Oppolzer, *Synthesis* **1978**, 793–802.
- [62] J. L. Charlton, M. M. Alauddin, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 2873–2889.
- [63] N. G. Andersen, S. P. Maddaford, B. A. Keay, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2885–2887.
- [64] M. J. Haddadin, *Heterocycles* **1978**, *9*, 865–901.
- [65] W. Friedrichsen, *Adv. Heterocycl. Chem.* **1980**, *26*, 135–241.
- [66] K. H. Dötz, *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 672–673, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1975**, *14*, 644–645.
- [67] K. H. Dötz, P. Tomuschat, *Chem. Soc. Rev.* **1999**, *28*, 187–198.
- [68] X. Xie, M. C. Kozlowski, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2661–2663.
- [69] R. C. Larock, Q. Tian, A. A. Pletnev, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3238–3239.
- [70] M. Rucker, R. Brückner, *Synlett* **1997**, 1187–1189.
- [71] A. Martínez, J. C. Estévez, R. J. Estévez, L. Castedo, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2365–2367.
- [72] A. Piettre, E. Chevenier, C. Massardier, Y. Gimbert, A. E. Greene, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3139–3142.
- [73] M. A. Rizzacasa, M. V. Sargent, *Aust. J. Chem.* **1987**, *40*, 1737–1743.
- [74] B. K. Mehta, S. Nandi, H. Ila, H. Junjappa, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 12843–12852.
- [75] J. M. Mellor, A. H. El-Sagheer, E. E.-D. M. Salem, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7383–7386.
- [76] P. A. Ganeshpure, R. Stevenson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1981**, 1681–1684.

- [77] H. R. Snyder, F. X. Weber, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 2965–2967.
- [78] J. Koo, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 1891–1894.
- [79] R. J. Ferrier, J. M. Tedder, *J. Chem. Soc.* **1957**, 1435–1437.
- [80] W. Borsche, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1936**, 526, 1–22.
- [81] J. F. McOmie, D. E. West, *Org. Synth., Coll. Vol. V* **1973**, 412–414.
- [82] E. H. Vickery, L. F. Pahler, E. J. Eisenbraun, *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 4444–4446.
- [83] D. C. Allport, J. D. Bu'Lock, *J. Chem. Soc.* **1958**, 4090–4094.
- [84] D. C. Allport, J. D. Bu'Lock, *J. Chem. Soc.* **1960**, 654–662.
- [85] R. L. Edwards, H. J. Lockett, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1976**, 2149–2155.
- [86] B. Bodo, R. G. Tih, D. Davoust, H. Jacquemin, *Phytochemistry* **1983**, 22, 2579–2581.
- [87] R. L. Edwards, V. Fawcett, D. J. Maitland, R. Nettleton, L. Shields, A. J. S. Whalley, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1991**, 15, 1009–1010.
- [88] M. Semar, H. Anke, W.-R. Arendholz, R. Velten, W. Steglich, *Z. Naturforsch.* **1996**, 51 c, 500–512.
- [89] M. Rischmann, R. Mues, H. Geiger, H. J. Laas, T. Eicher, *Phytochemistry* **1989**, 28, 867–869.
- [90] H. Tazaki, K.-P. Adam, H. Becker, *Phytochemistry* **1995**, 40, 1671–1675.
- [91] F. Cullmann, K.-P. Adam, H. Becker, *Phytochemistry* **1993**, 34, 831–834.
- [92] R. Mues, S. Huneck, J. D. Connolly, D. S. Rycroft, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 6793–6796.
- [93] S. Ryman, I. Holmåsen, *Pilze*, Bernhard Thalacker Verlag GmbH & Co. KG, Braunschweig, **1992**.
- [94] R. M. Dähncke, *1200 Pilze*, Weltbild Verlag GmbH, Augsburg, **2001**.
- [95] T. Regnery, *Persönliche Fotografie*, **2001**.
- [96] M. Bross, *Dissertation*, Universität Bonn, **1990**.
- [97] A. Hofmann, R. Heim, A. Brack, H. Kobel, A. Frey, H. Ott, T. Petrzilka, F. Troxler, *Helv. Chim. Acta* **1959**, 42, 1557–1572.
- [98] J. Picker, R. W. Rickards, *Aust. J. Chem.* **1970**, 23, 853–855.
- [99] C. O. Miles, S. C. Munday, A. L. Wilkins, *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 2458–2460.
- [100] H. Wieland, G. Oertel, *Ann.* **1929**, 469, 193–215.
- [101] F. D. Monache, A. G. De Brovetto, E. Cor, G. B. Marini-Bettòlo, *J. Chromatog.* **1968**, 32, 178–179.

- [102] N. G. Bisset, A. K. Choudhury, *Phytochemistry* **1974**, *13*, 265–269.
- [103] T. Ohmoto, K. Koike, *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 1204–1209.
- [104] T. Ohmoto, K. Koike, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3579–3583.
- [105] T. Ohmoto, K. Koike, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 3847–3851.
- [106] Y.-I. Sung, K. Koike, T. Nikaido, T. Ohmoto, U. Sankawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 1872–1877.
- [107] G. Gould Jr., W. A. Jacobs, *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 2890–2895.
- [108] B. Riegel, G. R. Lappin, B. H. Adelson, R. I. Jackson, C. J. Albisetti Jr., R. M. Dodson, R. H. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 1264–1266.
- [109] R. H. Mizzoni, F. Goble, E. Konopka, J. Gelzer, J. Szanto, D. C. Maplesden, J. E. Brown, J. Boxer, G. Zaunius, J. B. Ziegler, G. de Stevens, *J. Med. Chem.* **1970**, *13*, 870–878.
- [110] T. Kametani, K. Kigasawa, M. Hiiragi, K. Wakisaka, O. Kusama, H. Sugi, K. Kawasaki, *J. Heterocyclic Chem.* **1977**, *14*, 1175–1182.
- [111] H. Link, K. Bernauer, G. Englert, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 2645–2667.
- [112] D. G. Markees, L. S. Schwab, *Helv. Chim. Acta* **1972**, *55*, 1319–1326.
- [113] B. Witkop, *Ann.* **1944**, *556*, 103–114.
- [114] B. Witkop, H. Fiedler, *Ann.* **1947**, *558*, 91–98.
- [115] M. d'Ischia, G. Prota, *Gazz. Chim. Ital.* **1986**, *116*, 407–410.
- [116] L. J. Dolby, D. L. Booth, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1049–1051.
- [117] A. de la Cruz, J. Elguero, P. Goya, A. Martínez, W. Pfeleiderer, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 6135–6150.
- [118] G. Häfelinger, M. Nimtz, V. Horstmann, T. Benz, *Z. Naturforsch.* **1999**, *54 b*, 397–414.
- [119] T. Kawate, M. Yamanaka, M. Nakagawa, *Heterocycles* **1999**, *50*, 1033–1039.
- [120] A. M. Bianucci, A. Da Settimo, F. Da Settimo, G. Primofiore, C. Martini, G. Giannaccini, A. Lucacchini, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2214–2220.
- [121] M. J. McKay, A. R. Carroll, R. J. Quinn, J. N. A. Hooper, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 595–597.
- [122] N. Lindquist, W. Fenical, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2521–2524.
- [123] K. Ito, Y. Hashimoto, *Nature* **1966**, *211*, 417.
- [124] M. V. Laycock, J. S. Craigie, *Can. J. Biochem.* **1977**, *55*, 27–30.

- [125] T. Wakamiya, Y. Kobayashi, T. Shiba, K. Setogawa, H. Matsutani, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 235–240.
- [126] K. Ito, Y. Hashimoto, *Agric. Biol. Chem.* **1965**, *29*, 832–835.
- [127] R. Chillemi, R. Morrone, A. Patti, M. Piattelli, S. Sciuto, *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1220–1224.
- [128] J. N. Kim, K. Y. Lee, H. S. Kim, T. Y. Kim, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 343–345.
- [129] T. Kawasaki, A. Kodama, T. Nishida, K. Shimizu, M. Somei, *Heterocycles* **1991**, *32*, 221–227.
- [130] T. Henmi, T. Sakamoto, Y. Kikugawa, *Heterocycles* **1997**, *44*, 157–163.
- [131] J.-F. Pons, J.-L. Fauchère, F. Lamaty, A. Molla, R. Lazaro, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 853–859.
- [132] J. Söll, A. Stutzer, *Chem. Ber.* **1909**, *42*, 4532–4541.
- [133] T. Urbański, B. Skowrońska-Serafin, H. Dabrowska, J. Jankowska, *Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. III* **1953**, *1*, 74–76.
- [134] T. Urbański, B. Skowrońska-Serafin, H. Dabrowska, *Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. III* **1954**, *2*, 453–454.
- [135] T. Urbański, B. Skowrońska-Serafin, *Tetrahedron* **1960**, *10*, 12–25.
- [136] P. A. Boivin, W. Bridgeo, J. L. Boivin, *Can. J. Chem.* **1954**, *32*, 242–248.
- [137] J. Thiele, E. Uhlfelder, *Ann.* **1898**, *303*, 107–114.
- [138] M. Frankel, T. Sheradsky, *J. Chem. Soc. (C)* **1967**, *24*, 2698–2699.
- [139] R. M. Acheson, P. G. Hunt, D. M. Littlewood, B. A. Murrer, H. E. Rosenberg, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1978**, *10*, 1117–1125.
- [140] M. Somei, T. Kawasaki, *Heterocycles* **1989**, *29*, 1251–1254.
- [141] M. Somei, K. Yamada, M. Hasegawa, M. Tabata, Y. Nagahama, H. Morikawa, F. Yamada, *Heterocycles* **1996**, *43*, 1855–1858.
- [142] M. Somei, *Heterocycles* **1999**, *50*, 1157–1211.
- [143] M. Somei, K. Kobayashi, K. Tanii, T. Mochizuki, Y. Kawada, Y. Fukui, *Heterocycles* **1995**, *40*, 119–122.
- [144] S. A. Lakatosh, J. Balzarini, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, M. N. Preobrazhenskaya, *J. Antibiotics* **2002**, *55*, 768–773.
- [145] M. Somei, T. Shoda, *Heterocycles* **1981**, *16*, 1523–1525.
- [146] M. Somei, H. Ohnishi, Y. Shoken, *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 677–681.

- [147] M. Somei, S. Inoue, S. Tokutake, F. Yamada, C. Kaneko, *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 726–738.
- [148] R. D. Clark, D. B. Repke, *J. Heterocyclic Chem.* **1985**, *22*, 121–125.
- [149] R. M. Acheson, *Adv. Heterocycl. Chem.* **1990**, *51*, 105–175.
- [150] F. Yamada, K. Yamada, H. Takeda, M. Somei, *Heterocycles* **2001**, *55*, 2361–2368.
- [151] M. Adamczyk, J. Grote, *Org. Prep. Proced. Int.* **1995**, *27*, 239–242.
- [152] F. Weygand, W. Steglich, *Chem. Ber.* **1960**, *93*, 2983–3005.
- [153] N. Kihara, C. Ollivier, P. Renaud, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1419–1422.
- [154] H.-U. Reißig, B. Scherer, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 4259–4262.
- [155] M. R. Detty, G. P. Wood, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 80–89.
- [156] R. D. Clark, D. B. Repke, *Heterocycles* **1984**, *22*, 195–221.
- [157] H. N. Grant, V. Prelog, R. P. A. Sneed, *Helv. Chim. Acta* **1961**, *46*, 415–421.
- [158] M. Brenner, G. Mayer, A. Terpin, W. Steglich, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 70–74.
- [159] M. Somei, *Adv. Heterocycl. Chem.* **2002**, *82*, 101–155.
- [160] M. Somei, K. Aoki, Y. Nagahama, K. Nakagawa, *Heterocycles* **1995**, *41*, 5–8.
- [161] C. Hinze, *Diplomarbeit*, Universität Bonn, **1990**.
- [162] A. Foucaud, C. Razorilalana-Rabearivony, E. Loukakou, H. Person, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3639–3644.
- [163] M. Somei, Y. Saida, N. Komura, *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 4116–4125.
- [164] V. V. Sokolov, S. I. Kozhushkov, S. Nikolskaya, V. N. Belov, M. Es-Sayed, A. de Meijere, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 777–783.
- [165] D. L. Klayman, R. J. Shine, J. D. Bower, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 1532–1537.
- [166] C. Párkányi, H. L. Yuan, N. S. Cho, J.-H. J. Jaw, *J. Heterocyclic Chem.* **1989**, *26*, 1331–1334.
- [167] L. A. Reiter, K. E. Brighty, R. A. Bryant, M. E. Goldsmith, *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 1423–1429.
- [168] P. Schmidt, J. Druey, *Helv. Chim. Acta* **1955**, *38*, 1560–1564.
- [169] S. P. Stanforth, B. Tarbit, M. D. Watson, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 693–694.
- [170] D. G. Neilson, R. Roger, J. W. M. Heatlie, L. R. Newlands, *Chem. Rev.* **1970**, *70*, 151–170.
- [171] R. Rätz, H. Schroeder, *J. Org. Chem.* **1958**, *23*, 1931–1934.
- [172] F. H. Case, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 931–933.

- [173] N. Katagiri, M. Ishikura, Y. Morishita, M. Yamaguchi, *Heterocycles* **2000**, *52*, 283–289.
- [174] B. Eistert, F. Geiss, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 929–947.
- [175] A. R. Renslo, R. L. Danheiser, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7840–7850.
- [176] E. W. Berndt, H. A. Fratzke, B. G. Held, *J. Heterocyclic Chem.* **1972**, *9*, 137–140.
- [177] G. Crank, A. Mursyidi, *Aust. J. Chem.* **1982**, *35*, 775–784.
- [178] G. Holan, E. L. Samuel, *J. Chem. Soc. (C)* **1967**, 25–29.
- [179] D. J. Cundy, G. W. Simpson, *Aust. J. Chem.* **1996**, *49*, 199–203.
- [180] B. Clement, T. Kämpchen, *Chem. Ber.* **1985**, *118*, 3481–3491.
- [181] U. Girreser, M. König, B. Clement, *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, 202–206.
- [182] G. E. Martin, C. E. Hadden, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 543–585.
- [183] G. C. Levy, R. L. Lichter, *Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, John Wiley & Sons, New York, **1979**.
- [184] M. Witanowski, L. Stefaniak, G. A. Webb, *Annual Reports on NMR Spectroscopy, Vol. 18* (Ed.: G. A. Webb), Academic Press, London, **1986**.
- [185] M. Witanowski, L. Stefaniak, G. A. Webb, *Annual Reports on NMR Spectroscopy, Vol. 7* (Ed.: G. A. Webb), Academic Press, London, **1977**.
- [186] G. J. Martin, M. L. Martin, J.-P. Gouesnard, *15N-NMR Spectroscopy*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1981**.
- [187] V. C. Emery, M. Akhtar, *Enzyme Mechanisms* (Eds.: M. I. Page, A. Williams), The Royal Society of Chemistry, London, **1987**.
- [188] C. Keller-Juslem, M. Kuhn, H. D. King, US 4 478 831, **1984**.
- [189] J. E. Leet, H. A. Ax, D. R. Gustavson, L. Turner, K. Brown, W. Li, K. S. Lam, US 6 218 398, **2001**.
- [190] J. E. Leet, W. Li, H. A. Ax, J. A. Matson, S. Huang, R. Huang, J. L. Cantone, D. Drexler, R. A. Dalterio, K. S. Lam, *J. Antibiotics* **2003**, *56*, 232–242.
- [191] T. Sasaki, T. Otani, H. Matsumoto, N. Unemi, M. Hamada, T. Takeuchi, M. Hori, *J. Antibiotics* **1998**, *51*, 715–721.
- [192] W. Steglich, B. Steffan, T. Eizenhöfer, B. Fugmann, R. Herrmann, J.-D. Klamann, *Bioactive compounds from plants*, J. Wiley & Sons, Chichester, **1990**.
- [193] H. Morimoto, H. Oshio, *Ann.* **1965**, *682*, 212–218.
- [194] S. R. Johns, J. A. Lamberton, J. L. Occolowitz, *Aust. J. Chem.* **1967**, *20*, 1737–1742.
- [195] T. Kinoshita, S. Tatara, U. Sankawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 1770–1773.

- [196] T. Kinoshita, S. Tataru, F.-C. Ho, U. Sankawa, *Phytochemistry* **1989**, *28*, 147–151.
- [197] C. A. Bradfield, L. F. Bjeldanes, *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 896–900.
- [198] K. Monde, M. Takasugi, A. Shirata, *Phytochemistry* **1995**, *39*, 581–586.
- [199] M. Nomoto, S. Tamura, *Agric. Biol. Chem.* **1970**, *34*, 1590–1592.
- [200] R. Gmelin, A. I. Virtanen, *Acta Chem. Scand.* **1962**, *16*, 1378–1384.
- [201] A. Belkhir, G. B. Lockwood, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1315–1316.
- [202] N. Agerbirk, L. B. Peterson, C. E. Olsen, B. A. Halkier, J. K. Nielsen, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1502–1507.
- [203] M. Soledade, C. Pedras, K. C. Smith, *Phytochemistry* **1997**, *46*, 833–837.
- [204] M. Soledade, C. Pedras, J. L. Sorensen, *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1959–1965.
- [205] M. Takasugi, N. Katsui, A. Shirata, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1986**, 1077–1078.
- [206] M. Takasugi, K. Monde, N. Katsui, A. Shirata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 285–289.
- [207] K. Monde, K. Sasaki, A. Shirata, M. Takasugi, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1499–1500.
- [208] K. Monde, K. Sasaki, A. Shirata, M. Takasugi, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3921–3922.
- [209] M. Soledade, C. Pedras, I. L. Zaharia, *Phytochemistry* **2000**, *55*, 213–216.
- [210] M. Soledade, C. Pedras, F. I. Okanga, I. L. Zaharia, A. Q. Khan, *Phytochemistry* **2000**, *53*, 161–176.
- [211] S. B. Singh, D. L. Zink, J. D. Polishook, A. W. Dombrowski, S. J. Darkin-Rattray, D. M. Schmatz, M. A. Goetz, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8077–8080.
- [212] S. B. Singh, D. L. Zink, J. M. Liesch, A. W. Dombrowski, S. J. Darkin-Rattray, D. M. Schmatz, M. A. Goetz, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2815–2818.
- [213] S. B. Singh, D. L. Zink, J. M. Liesch, R. T. Mosley, A. W. Dombrowski, G. F. Bills, S. J. Darkin-Rattray, D. M. Schmatz, M. A. Goetz, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 815–825.
- [214] D. L. Boger, H. Keim, B. Oberhauser, E. P. Schreiner, C. A. Foster, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6197–6205.
- [215] R. Padmanabha, Y.-Z. Shu, L. S. Cook, J. A. Veitch, M. Donovan, S. Lowe, S. Huang, D. Pirnik, S. P. Manly, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 569–574.
- [216] P. Clivio, B. Richard, M. Zeches, L. L. Men-Olivier, S. H. Goh, B. David, T. Sevenet, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2693–2696.
- [217] H. Wagner, T. Nestler, A. Neszmelyi, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *31*, 2777–2778.
- [218] T. Ohmoto, K. Koike, *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 3198–3204.
- [219] C. Ito, T.-S. Wu, H. Furukawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 2377–2380.

- [220] C. Ito, N. Okahana, T.-S. Wu, M.-L. Wang, J.-S. Lai, C.-S. Kuoh, H. Furukawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 230–232.
- [221] K. J. Kwong-Chung, J. E. Bennett, *Medical Mycology*, Lea & Febiger, Philadelphia, London, **1992**.
- [222] E. Ingham, A. C. Cunningham, *J. Med. Vet. Mycol.* **1993**, *31*, 265–288.
- [223] A. N. Hagler, D. G. Ahearn, *Int. Syst. Bacteriol.* **1981**, *31*, 204–208.
- [224] R. B. Simmons, D. G. Ahearn, *Mycologia* **1987**, *79*, 38–43.
- [225] N. J. van Abbe, *J. Soc. Cosm. Chemists* **1964**, *15*, 609–630.
- [226] J. N. Labows, K. J. McGinley, J. J. Leyden, *Appl. Environm. Microbiol.* **1975**, *38*, 412–415.
- [227] W. C. Sloof, *The Yeast-A taxonomic study*, Hrsg.: J. Lodder, 2end ed., North Holland Publishing Company, Amsterdam, **1970**.
- [228] R. B. Simmons, E. Guého, *Mycol. Res.* **1990**, *94*, 1146–1149.
- [229] D. Yarrow, D. G. Ahearn, *The Yeast-A taxonomic study*, 3rd ed., North Holland Publishing Company, Amsterdam, **1984**.
- [230] J. Guillot, E. Guého, *Antonie van Leeuwenhoek* **1995**, *67*, 297–314.
- [231] H. Mittag, *Mycoses* **1994**, *37*, 393–399.
- [232] H. Mittag, *Mycoses* **1995**, *38*, 13–21.
- [233] E. Thompson, J. R. Colvin, *Can. J. Microbiol.* **1970**, *16*, 263–265.
- [234] J. Brotherton, *J. Gen. Microbiol.* **1967**, *49*, 393–400.
- [235] M. J. Marples, *The Ecology of the Human Skin*, C. C. Thomas, Springfield, **1965**.
- [236] W. C. Noble, *Microbiology of Human Skin*, Lloyd-Duke, London, **1981**.
- [237] R. J. Hay, S. O. Roberts, D. W. R. Mackenzie, *Textbook of Dermatology*, 5th ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1992**.
- [238] D. Borelli, P. H. Jacobs, L. Nall, *J. Am. Acad. Dermatol.* **1991**, *25*, 300–305.
- [239] M. J. Pontasch, M. E. Kyanko, R. T. Brodell, *Cutis* **1989**, *43*, 81–84.
- [240] L. Bélec, J. Testa, P. Bouree, *J. Med. Vet. Mycol.* **1991**, *29*, 323–329.
- [241] L. Terragni, A. Lasagni, A. Oriani, *Mycoses* **1991**, *34*, 345–347.
- [242] L. Balus, D. Grigoriu, *Pityriasis versicolor*, Cilag GmbH, Alsbach, **1982**.
- [243] E. M. A. Razack, *Sabouraudia* **1977**, *15*, 305–311.
- [244] S. O. B. Roberts, *Br. J. Derm.* **1969**, *81*, 315–326.
- [245] H. B. Allen, C. R. Charles, B. L. Johnson, *Arch. Derm.* **1972**, *112*, 1110–1112.
- [246] W. I. Dotz, *J. Med. Acad. Derm.* **1985**, *12*, 37–44.

- [247] A. Castellani, A. Chalmers, *Manual of tropical medicine*, 2nd ed., Baillière Tindall & Cox, London, **1913**.
- [248] A. B. Ackermann, *Histologic diagnosis of inflammatory skin disease*, Bd. 2nd ed., Williams and Wilkins, Baltimore, **1997**.
- [249] L. Wertheim, *Derm. Zeitschr.* **1928**, 38, 343–354.
- [250] H. Blumenthal, *Arch. Derm.* **1971**, 103, 461–462.
- [251] D. B. Jeliffe, F. W. Jacobsen, *J. Trop. Med. Hyg.* **1954**, 57, 290–293.
- [252] A. S. Breathnach, M. Nazzaro-Porro, B. Martin, *Giorn. Ital. Derm.* **1975**, 110, 457–469.
- [253] M. Oguchi, *Acta Derm. (Kyoto)* **1982**, 77, 187–192.
- [254] A. E. Ruete, *Derm. Wochenschr.* **1933**, 96, 333–336.
- [255] Z. El-Gothamy, A. Abdel-Fattah, *Int. J. Derm.* **1975**, 14, 510–515.
- [256] E. G. Jung, E. Bohnert, *Derm. Res.* **1976**, 256, 333–334.
- [257] M. Nazzaro-Porro, S. Passi, *J. Invest. Derm.* **1978**, 71, 205–208.
- [258] E. J. Robins, A. S. Breathnach, D. Bennet, M. Picardo, S. Passi, M. Nazzaro-Porro, *Br. J. Derm.* **1985**, 113, 687–697.
- [259] A. S. Breathnach, M. Nazzaro-Porro, S. Passi, *Br. J. Derm.* **1984**, 111, 115–120.
- [260] E. Guého, T. Boeckhout, H. R. Ashbee, J. Guillot, A. van Belkum, J. Faergemann, *Medical Mycology* **1998**, 36, 220–229.
- [261] P. Mayser, A. Imkampe, M. Winkeler, C. Papavassilis, *Arch. Dermatol. Res.* **1998**, 290, 277–282.
- [262] P. Mayser, G. Wille, A. Imkampe, W. Thoma, N. Arnold, T. Monsees, *Mycoses* **1998**, 41, 265–272.
- [263] G. Wille, *Dissertation*, Universität München, **2000**.
- [264] G. Wille, P. Mayser, W. Thoma, T. Monsees, H.-J. Schmitz, D. Schrenk, K. Zeitler, W. Steglich, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 955–960.
- [265] B. Irlinger, *Dissertation*, Universität München, **2002**.
- [266] P. Mayser, U. Schäfer, H.-J. Krämer, B. Irlinger, W. Steglich, *Arch. Dermatol. Res.* **2002**, 294, 131–134.
- [267] J. R. Wikler, N. Janssen, D. P. Bruynzeel, C. Nieboer, *Acta Derm. Venereol (Stockholm)* **1990**, 70, 69–71.
- [268] E. Guého, G. Midgley, J. Guillot, *Antonie van Leeuwenhoek* **1996**, 69, 337–355.

- [269] H.-O. Kalinowski, S. Berger, S. Braun, *<sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1984**.
- [270] C.-S. Kwon, K. R. Grose, J. Riby, Y.-H. Chen, L. F. Bjeldanes, *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2536–2540.
- [271] J. Tholander, J. Bergman, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1619–1622.
- [272] J. Tholander, J. Bergman, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6243–6260.
- [273] J. Tholander, J. Bergman, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 12577–12594.
- [274] M. Salmoun, C. Devijver, D. Dalozé, J.-C. Braekman, R. W. M. van Soest, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1173–1176.
- [275] F. Yamada, K. Kobayashi, A. Shimizu, N. Aoki, M. Somei, *Heterocycles* **1993**, *36*, 2783–2804.
- [276] M. Bernart, W. H. Gerwick, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3697–3698.
- [277] W. A. Ayer, L. S. Trifonov, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 839–841.
- [278] R. L. Dillman, J. H. Cardellina II, *J. Nat. Prod. (Lloydia)* **1991**, *54*, 1056–1061.
- [279] B. Böhlendorf, E. Forche, N. Bedorf, K. Gerth, H. Irschik, R. Jansen, B. Kunze, W. Trowitzsch-Kienast, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann.* **1996**, 49–53.
- [280] S.-W. Yang, G. A. Cordell, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 44–48.
- [281] M. D. Mashkovskii, N. N. Suvorov, M. N. Preobrazhenskaya, S. S. Liberman, L. M. Orlova, I. Gurovich, G. Avrutskii, L. A. Nikitina, E. G. Balashova, Soviet Union Patent No. 1 164 218, **1967**.
- [282] J. Bergman, J.-E. Bäckvall, J.-O. Lindström, *Tetrahedron* **1973**, *29*, 971–976.
- [283] S. Tsujii, K. L. Rinehart, S. P. Gunasekera, Y. Kashman, S. S. Cross, M. S. Lui, S. A. Pomponi, M. C. Diaz, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5446–5453.
- [284] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 4., überarbeitete Auflage ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1991**.
- [285] C. P. Berg, *J. Biol. Chem.* **1933**, *100*, 79–83.
- [286] H. Yukimasa, H. Sawai, T. Takizawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, *27*, 551–553.
- [287] G. R. Proctor, W. I. Ross, A. Tapia, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1972**, 1803–1806.
- [288] L. Zalibera, V. Milata, D. Ilavský, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 681–684.
- [289] G. Holan, E. L. Samuel, B. C. Ennis, R. W. Hinde, *J. Chem. Soc. (C)* **1967**, 20–25.
- [290] V. O. Illi, *Synthesis* **1979**, 136.
- [291] S. Cassel, B. Casenave, G. Déléris, L. Latxague, P. Rollin, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8515–8524.

- 
- [292] A. H. Jackson, N. Prasitpan, P. V. R. Shannon, A. C. Tinker, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1987**, 2543–2551.

## Curriculum vitae

**Name** Andrea Bartsch, geb. Schultz  
**Geburtstag** 07.07.1975  
**Geburtsort** Stralsund  
**Familienstand** verheiratet mit Sören Bartsch, Dipl.-Ingenieur (FH) Maschinenbau  
**Eltern** Eckhard und Heidemarie Schultz, geb. Stiboy

### Schulbildung

09/1982 bis 08/1990 Allgemeinbildende Oberschule Stralsund  
09/1990 bis 07/1994 Herdergymnasium Stralsund  
07/1994 Abitur

### Studium

10/1994 bis 08/1999 Studium der Chemie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
08/1996 Diplomvorprüfung  
01/1997 bis 04/1997 Auslandssemester an University of Aberdeen, Schottland  
09/1998 Diplomhauptprüfung  
11/1998 bis 07/1999 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der LMU München im Arbeitskreis von Prof. Dr. W. Steglich:  
"Untersuchungen über Inhaltsstoffe aus Höheren Pilzen"

### Dissertation

09/1999-04/2003 Experimentelle Arbeiten zur Dissertation am Department Chemie der LMU München im Arbeitskreis von Prof. Dr. W. Steglich:  
"Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese von Sekundärmetaboliten aus den Höheren Pilzen *Austroboletus gracilis* und *Leucocoprinus birnbaumii* sowie der lipophilen Hefe *Malassezia furfur*"

### Tätigkeiten

ab 09/1999 Wissenschaftliche Angestellte am Department Chemie der LMU München