

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOGENESE

DES

PROTOANEMONINS

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Hohen Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu

Bonn

vorgelegt von

Wolfgang Wirth

aus

Unkel/Rhein

1980

Angefertigt mit Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Bonn

Referent: Professor Dr. R. Tschesche  
Korreferent: Professor Dr. E. Breitmaier

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1977 bis Dezember 1979 im Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Professor Dr. R. Tschesche durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. Rudolf Tschesche

danke ich für seine freundliche Unterstützung und sein stetes Interesse an dieser Arbeit.

Desgleichen danke ich Herrn Prof. Dr. Breitmaier für die Übernahme des Zweitreferates.

## INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	3
3.	THEORETISCHER TEIL	5
3.1.	Protoanemonin/Anemonin	5
3.1.1.	Vorkommen	5
3.1.2.	Strukturaufklärung	5
3.1.3.	Synthese	8
3.1.4.	Wirksamkeit und Bedeutung	9
3.2.	Glucosidische Vorstufen	11
3.3.	Frühere Arbeiten zur Biogenese	19
3.3.1.	Protoanemoninbiogenese	19
3.3.2.	Metabolismus der 5-Hydroxylävulinsäure	21
3.3.3.	Metabolismus der 4,5-Dioxovaleriansäure	26
3.4.	Zielsetzung der eigenen Experimente	28
3.4.1.	Biogenetische Priorität der 5-Hydroxy- lävulinsäure	28
3.4.2.	Stütze für ein genuines Hydroxylglucosid	30
3.4.3.	Biogenese der 5-Hydroxylävulinsäure in höheren Pflanzen	30
3.5.	Protoanemoninabbau	32
3.6.	Synthesen	34
3.7.	Methoden	40
3.7.1.	Allgemeines	40
3.7.2.	Tracertechnik	41
3.7.3.	Anwendungsmöglichkeiten	43
3.7.4.	Fehlerbetrachtung, Meßzeitoptimierung	44
4.	EXPERIMENTELLER TEIL	48
4.1.	Allgemeine Angaben	48
4.2.	Synthetische Arbeiten	51

4.2.1.	Synthesen von Ausgangs- und Vergleichs- substanzen	51
4.2.2.	5-Hydroxy [1- <sup>14</sup> C]lävulinsäure	57
4.2.2.1.	α-Benzyl oxyessigsäureethylester	57
4.2.2.2.	4-Benzyl oxyacetessigsäureethylester	57
4.2.2.3.	4-Benzyl oxyacetessigsäureethylester- ethylenacetal	58
4.2.2.4.	1-Benzyl oxy-4-hydroxy-2-butanon- ethylenacetal	59
4.2.2.5.	1-Benzyl oxy-4-(p-toluolsulfonyl)-2-butanon- ethylenacetal	59
4.2.2.6.	1-Benzyl oxy-4-brom-2-butanon-ethylenacetal	60
4.2.2.7.	5-Benzyl oxy [1- <sup>14</sup> C]lävulinsäure-ethylenacetal	61
4.2.2.8.	5-Benzyl oxy [1- <sup>14</sup> C]lävulinsäure	63
4.2.2.9.	5-Hydroxy [1- <sup>14</sup> C]lävulinsäure	64
4.2.3.	5-Hydroxy [4- <sup>14</sup> C]lävulinsäure	65
4.2.4.	4,5-Dioxo [1- <sup>14</sup> C]lävulinsäure	66
4.3.	Einbauversuche	67
4.3.1.	Pflanzenexperimente	67
4.3.2.	Aufarbeitungen	68
4.3.2.1.	Anemonin, Ranuncosid, Ranunculosid	68
4.3.2.2.	Ranunculin, Isoranunculin	69
4.3.2.3.	Protoanemonin	70
4.3.3.	Abbau des Silbervalerats	72
4.3.3.1.	C-1 bis C-3 des Silbervalerats	72
4.3.3.2.	C-4 und C-5 des Silbervalerats	74
4.3.3.3.	Bestimmung von <sup>14</sup> C in Bariumcarbonat	75
4.3.4.	Ergebnisse der Applikationen	76
4.3.4.1.	Applikation von 5-Hydroxy [1- <sup>14</sup> C]lävulinsäure, Zielprodukte: Ranuncosid, Ranunculosid, Ranuncosidhydrolyse	76
4.3.4.2.	Applikation von 5-Hydroxy [1- <sup>14</sup> C]lävulinsäure, Zielprodukte: Ranunculin, Isoranunculin	77
4.3.4.3.	Applikation von 5-Hydroxy [1- <sup>14</sup> C]lävulinsäure, Zielprodukt: Anemonin	78

4.3.4.4.	Applikation von 5-Hydroxy[1- <sup>14</sup> C]lävulinsäure, Zielprodukt: Protoanemonin	79
4.3.4.5.	Applikation von 5-Hydroxy[4- <sup>14</sup> C]lävulinsäure, Zielprodukt: Protoanemonin	79
4.3.4.6.	Applikation von 5-Benzyloxy[1- <sup>14</sup> C]lävulinat, Natriumsalz, Zielprodukt: Protoanemonin	80
4.3.4.7.	Applikation von Natrium[2- <sup>14</sup> C]glyoxylat, Zielprodukt: Protoanemonin	81
4.3.4.8.	Applikation von Natrium[1- <sup>14</sup> C]glyoxylat, Zielprodukt: Protoanemonin	81
4.3.4.9.	Applikation von Natrium- $\alpha$ -keto[5- <sup>14</sup> C]glutarat, Zielprodukt: Protoanemonin	82
4.3.4.10.	Applikation von [1,5- <sup>14</sup> C]Citronensäuremono- hydrat, Zielprodukt: Protoanemonin	83
4.3.4.11.	Applikation von 5-Amino[4- <sup>14</sup> C]lävulinsäure- hydrochlorid, Zielprodukt: Protoanemonin	83
4.3.4.12.	Applikation von 4,5-Dioxo[1- <sup>14</sup> C]valeriansäure, Zielprodukt: Protoanemonin	84
4.4.	Diskussion der Ergebnisse	86
4.4.1.	Einbauversuche in die glucosidischen Vorstufen	86
4.4.2.	Einbauversuch mit Natrium-5-benzyloxy[1- <sup>14</sup> C]- lävulinat	89
4.4.3.	Einbauversuche zur Biosynthese der 5-Hydroxy- lävulinsäure in höheren Pflanzen	90
5.	LITERATURVERZEICHNIS	95
6.	LEBENS LAUF	103

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Meine Untersuchungen zur Biosynthese des Protoanemonins und seiner glucosidischen Vorstufen mit Hilfe  $^{14}\text{C}$ -markierter Precursor erstreckten sich auf

- 1) den experimentellen Beweis für die biogenetische Priorität der 5-Hydroxylävulinsäure,
- 2) die Stützung der Annahme, daß ein Hydroxyglucosid der Säure durchlaufen wird,
- 3) die Entstehung der 5-Hydroxylävulinsäure in höheren Pflanzen.

zu 1) Es wurde 5-Hydroxy[1- $^{14}\text{C}$ ]- und [4- $^{14}\text{C}$ ]lävulinsäure synthetisiert und an Helleborus foetidus-Pflanzen appliziert. Durch Wasserdampfdestillation oder Gefriertrocknung gewonnenes Protoanemonin war radioaktiv. Der vollständige Abbau des Antibiotikums ergab die in 1- und 4-Stellung erwartete Markierung. Die Säure wurde außerdem von allen angebotenen Precursoren am besten verwertet.

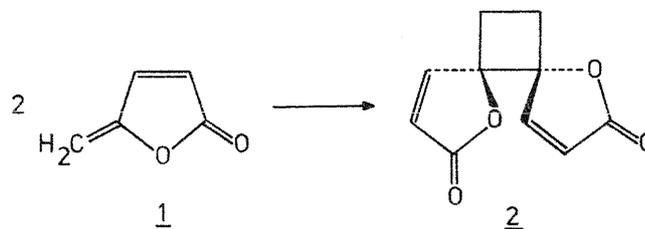
Die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials mit verdünnter Salzsäure ergab radioaktives Ranunculin und Isoranunculin, die Extraktion mit wässrigem Aceton lieferte markiertes Ranuncosid und Ranunculosid, wenn 5-Hydroxy[1- $^{14}\text{C}$ ]lävulinsäure appliziert wurde.

Die saure Ranuncosidhydrolyse zu D-Glucose und 5-Hydroxylävulinsäure zeigte, daß fast die gesamte inkorporierte Markierung im Aglykon des Inhaltsstoffes vorhanden war. Ein Katabolismus der 5-Hydroxylävulinsäure kann demzufolge in höheren Pflanzen nur untergeordnete Bedeutung haben.

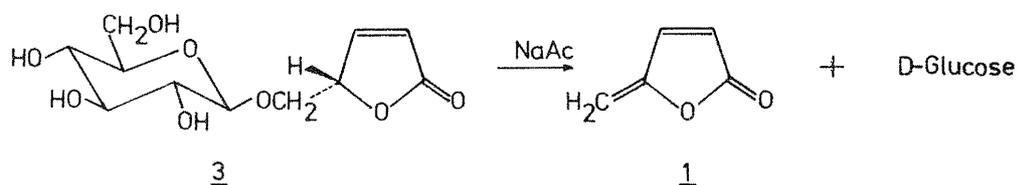
- zu 2) Der Einbauversuch mit 5-Benzoyloxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinat ergab eine verglichen mit der Verbindung mit freier Hydroxylfunktion geringere Einbaurate für Protoanemonin. Es ist daher wahrscheinlich, daß ein 5-Hydroxylglucosid der 5-Hydroxylävulinsäure durchlaufen wird. Dies wird indirekt auch durch die Struktur der vier Glucoside deutlich, deren Bildung nur ausgehend von einem 5-Hydroxylglucosid (Ranunculin, Ranuncosid, Ranunculosid) bzw. einem 4-Hydroxylglucosid (Isoranunculin) formuliert werden kann.
- zu 3) Einbauversuche mit verschiedenen <sup>14</sup>C-markierten Primärmetaboliten, wie [1-<sup>14</sup>C]Glyoxylat, [2-<sup>14</sup>C]Glyoxylat, [5-<sup>14</sup>C]α-Ketoglutarat, [1,5-<sup>14</sup>C]Citrat, 5-Amino[4-<sup>14</sup>C]lävulinsäure und 4,5-Dioxo[1-<sup>14</sup>C]valeriansäure (durch Oxidation von 5-Hydroxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure synthetisiert) legen nahe, daß die 5-Hydroxylävulinsäure in höheren Pflanzen durch eine neue, einstufige Reduktion des C-Atoms 1 des α-Ketoglutarats entsteht. Andere, aus der Literatur bekannte Biosynthesemöglichkeiten wurden ausführlich diskutiert und experimentell überprüft, sie kommen aufgrund der Applikationsergebnisse aber nicht in Betracht.

## 2. EINLEITUNG

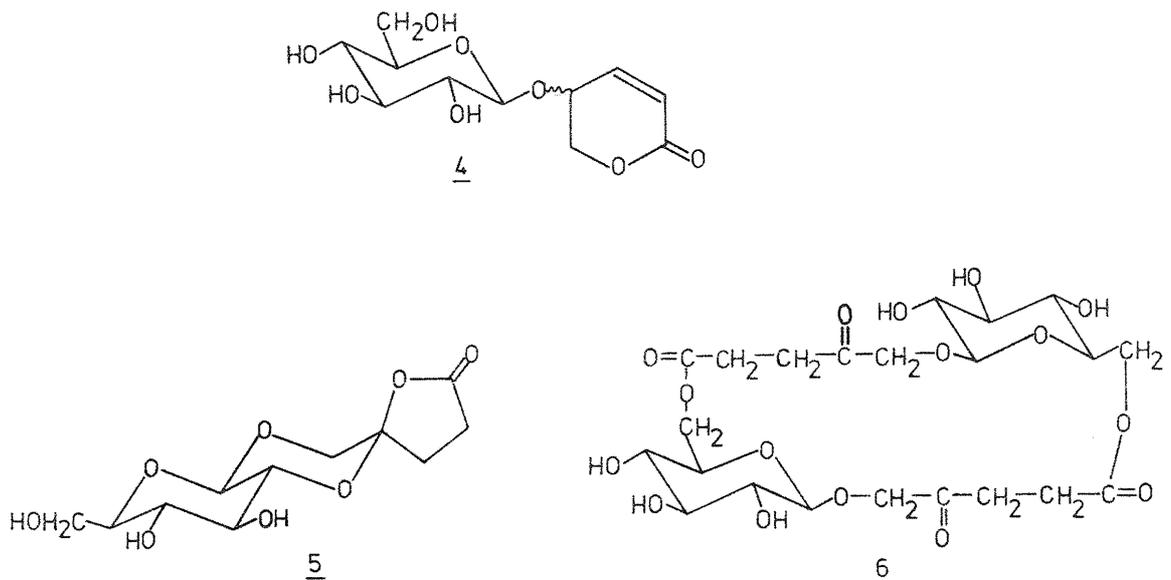
Protoanemonin (1) ist ein leicht flüchtiger, pflanzlicher Scharfstoff, der bei der normalen Transpiration, besonders aber bei der Verletzung des Gewebes von Vertretern der Hahnenfußgewächse (Ranunculaceae) abgegeben wird. In Wasserdampf- oder Gefriertrocknungsdestillaten des frischen Pflanzenmaterials wird es in größerer Menge vorgefunden. Läßt man die Destillate einige Zeit stehen, so scheiden sich Festkörper aus. Nähere Untersuchungen ergaben<sup>1,2,3,4)</sup>, daß es sich hierbei neben polymerem hauptsächlich um dimeres Protoanemonin handelte. Heyer, der die Verbindung erstmals 1780 aus *Anemone pulsatilla* (Kuh- oder Küchenschelle) erhalten hatte, gab ihr den Namen Anemonin (2)<sup>5)</sup>:



Die Frage, in welcher stabilen und unschädlichen Form der Hemmstoff 1, der neben haut- und augenreizenden Wirkungen vor allem antibiotische Aktivität gegenüber grampositiven wie gramnegativen Mikroorganismen besitzt, in den Pflanzenzellen vorliegt, interessierte Hill und van Heyningen<sup>6)</sup>. Nach Enzyminaktivierung mit Mineralsäure gelang es ihnen, kristallines Ranunculin (3) zu isolieren. Weiterhin stellten sie fest, daß das Glucosid 3 bei Wasserdampfdestillation oder bei Behandlung mit Basen in D-Glucose und das aktive Prinzip (1) zerfällt:



Im Rahmen der in unserem Institut durchgeführten Neuuntersuchung von Glykosiden mit lacton-bildendem Aglykon wurde nach der von Hill et al. beschriebenen Aufarbeitung neben Ranunculin (3) das strukturisomere Sechsringlacton Isoranunculin (4) isoliert. Eine schonende Extraktion der Blüten von *Helleborus foetidus* L. (Stinkende Nieswurz) mit wässrigem Aceton ergab schließlich zwei neuartige Glucoside, die Ranuncosid (5) und Ranunculosid (6) benannt wurden<sup>7)</sup>:



Die vier antibiotisch unwirksamen Glucoside 3-6 weisen als gemeinsames Strukturelement im Aglykon ein C<sub>5</sub>-Carbonsäure auf, die am C-4 und C-5 funktionalisiert ist. Im cyclischen Dimeren Ranunculosid (6) erweist sich die Säure als 5-Hydroxylävulinsäure (5-Hydroxy-4-ketovaleriansäure, Abk.: HKV), aber auch die Bildung der übrigen drei Glucoside kann man ausgehend von einer glucosylierten HKV formulieren<sup>8,9)</sup>. In der vorliegenden Arbeit soll daher mit Hilfe der Tracertechnik untersucht werden, ob der 5-Hydroxylävulinsäure eine Schlüsselstellung bei der Protoanemoninbiogenese zukommt und wie sie gegebenenfalls in höheren Pflanzen entsteht<sup>10)</sup>.

### 3. THEORETISCHER TEIL

#### 3.1. Protoanemonin/Anemonin

##### 3.1.1. Vorkommen

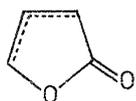
Protoanemonin bzw. protoanemoninliefernde Verbindungen wurden bisher in etwa 65 Arten der in den nördlichen, extratropischen Gebieten weit verbreiteten Familie der Hahnenfußgewächse (Ranunculaceae) nachgewiesen<sup>10,11)</sup>. Diese verteilen sich besonders auf die Gattungen Anemone, Clematis, Ranunculus und Helleborus. Einzelne Helleborus-Arten enthalten während der Blüte extrem viel Ranunculin.

Hier sei erwähnt, daß Helleborus-Pflanzen bereits im alten Griechenland ("Elleboros melas") therapeutisch angewendet wurden. Es wurden sogar Helleboruskuren durchgeführt; ein Mensch, der sich närrisch benahm, wurde "Helleborus" genannt<sup>12)</sup>. Im Mittelalter verwendete Paracelsus die getrockneten Blätter der Christrose (Helleborus niger L.) als Geriatrikum<sup>13)</sup>. Die Wirkung der Nieswurzelarten als Heilpflanzen ist jedoch sicher nicht auf den Gehalt an protoanemoninliefernden Verbindungen, sondern auf die herzwirksamen Steroidglykoside Hellebrin, Strophantin u.a. zurückzuführen.

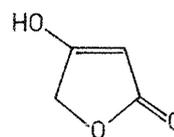
##### 3.1.2. Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung des öligen Scharfstoffs 1 und seines gut kristallisierenden Dimeren Anemonin 2 wurde von Beckurts<sup>2)</sup>, Meyer<sup>3)</sup> und Asahina<sup>4,14)</sup>, der eine Vielzahl von Reaktionen mit dem Lacton sowie zwei Darstellungsmethoden durchführte, beschrieben. Moriarty et al. konnten mittels Röntgenstrukturanalyse<sup>15)</sup> und <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum<sup>16)</sup> zeigen, daß sich die Lactonringe am Cyclobutanring in 1,1,2,2-trans-Stellung befinden und daß der Vierring selbst eine gebogene Konformation besitzt.

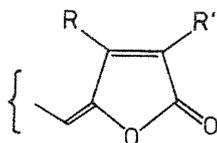
Das Protoanemonin ist demnach der einfachste Vertreter der Gruppe natürlich vorkommender 4-Ylidenbutenolide (2-Keto-4-yliden-dihydrofurane). Befindet sich in 3-Stellung eine Hydroxylgruppe, so handelt es sich um eine 4-Ylidentetronsäure, deren Abkömmlinge aus Flechten und Penicillium-Arten isoliert worden sind.



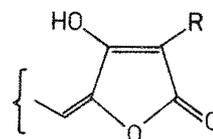
Butenolid



Tetronsäure



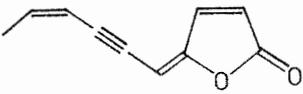
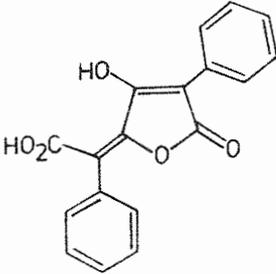
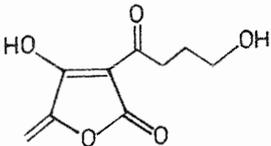
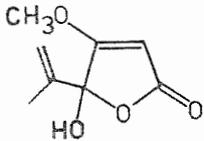
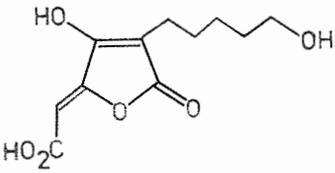
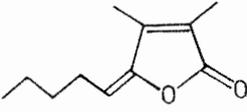
4-Ylidenbutenolid



4-Ylidentetronsäure

Eine ausführliche Behandlung beider Gruppen ist vor kurzem von Pattenden<sup>17)</sup> und früher bereits von Haynes<sup>18)</sup> und Dean<sup>19)</sup> vorgenommen worden. Einige Vertreter seien nachfolgend aufgeführt; sie wurden so ausgewählt, daß die Vielfalt der biogenetischen Möglichkeiten für die Entstehung desselben Strukturelementes deutlich wird:

	Vorkommen	biogenetische Intermediärverbindungen
 Patulin	Penicillium-Arten (P.patulum)	Acetat, Malonat, Polyketid, 6-Methylsalicylsäure, m-Kresol, m-Hydroxybenzylalkohol, m-Hydroxybenzaldehyd, Gentisaldehyd

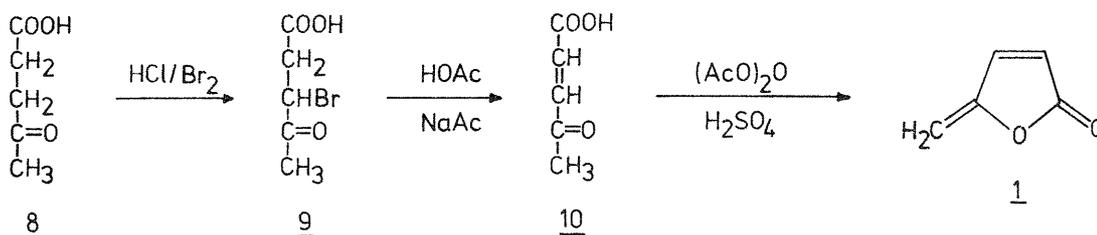
	Vorkommen	biogenetische Intermediärverbindungen
 <p>Matricarialacton</p>	<p>höhere Pflanzen, Fam. Asteraceae, Matricaria (Kamille)</p>	<p>Ölsäure, Linolensäure, Crepenensäure, Dehydromatricariaester</p>
 <p>Pulvinsäure</p>	<p>Flechten, Pilze</p>	<p>Phenylalanin, Phenylpyruvat, Polyporsäure</p>
 <p>Dehydrocarolsäure</p>	<p>Penicillium- Arten (P.charlesii)</p>	<p>Malat u. Malonat, Butyrat, Carolsäure</p>
 <p>Penicillsäure</p>	<p>Penicillium- Arten</p>	<p>Acetat, Polyketid, Orsellinsäure</p>
 <p>Multicolsäure</p>	<p>Penicillium- Arten (P.multicolor)</p>	<p>Acetat, Polyketid, 2,4-Dihydroxy-6-n- butylbenzoesäure</p>
 <p>Bovolid</p>	<p>Butter</p>	<p>nicht untersucht</p>

Zu erwähnen ist auch, daß die große Gruppe der Cardenolide als charakteristisches Strukturelement einen Butenolidring enthält. Die herzaktive Wirksamkeit dieser Inhibitoren hängt u.a. vom Vorhandensein eines fünf- oder sechsgliedrigen ungesättigten Lactonringes in  $\beta$ -Konfiguration am C-17 ab<sup>20)</sup>.

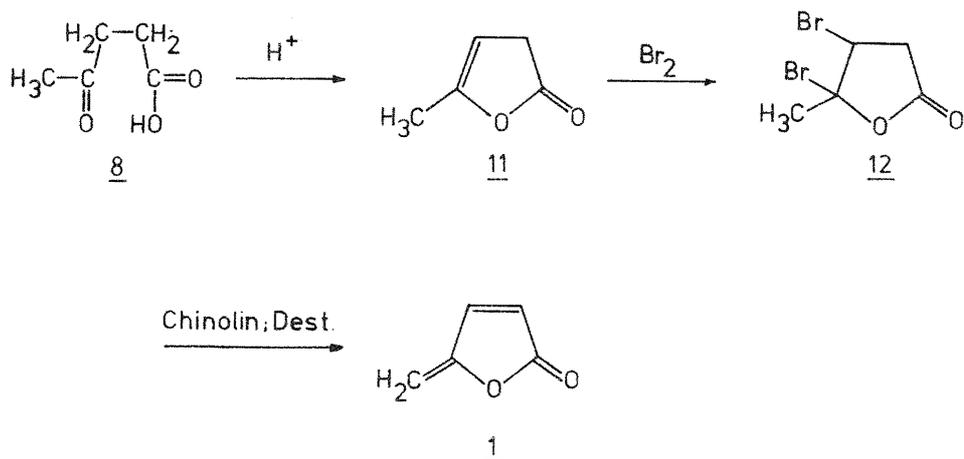
### 3.1.3. Synthese

Synthetisch wurde das Protoanemonin in geringer Ausbeute 1922 von Asahina und Fujita auf zwei verschiedenen Wegen erhalten<sup>14)</sup>. Beide Darstellungsmöglichkeiten wurden später von Shaw<sup>21)</sup>, Grundmann et al.<sup>22)</sup> und Osipenko et al.<sup>23)</sup> optimiert.

Ausgangsprodukt war in beiden Fällen Lävulinsäure (8). Zum einen wurde die Säure über  $\beta$ -Bromlävulinsäure (9) zur  $\beta$ -Acetylacrylsäure (10), dem Hydrolyseprodukt des Protoanemonins, umgesetzt. Ringschluß und Dehydratisierung mit Acetanhydrid/Schwefelsäure lieferte den Scharfstoff 1 in 30%iger Ausbeute:



Im zweiten Fall wurde Lävulinsäure zu  $\alpha$ -Angelikalacton (11) cyclisiert und nach Bromierung (12) mit einer Base zweifach dehydrobromiert. Bei Verwendung von Chinolin in Benzol erzielten Grundmann et al. eine Ausbeute von 90% bezogen auf  $\alpha$ -Angelikalacton:



Muskat et al. gingen von der Vinylacrylsäure aus. Bromierung ergab das 4,5-Dibromderivat, welches beim Destillieren direkt das Antibiotikum lieferte<sup>24)</sup>. Weitere Synthesen von Walton<sup>25)</sup> und Lardelli<sup>26)</sup> führten ebenfalls zu Protoanemoninabkömmlingen.

#### 3.1.4. Wirksamkeit und Bedeutung

Pharmakologische Untersuchungen mit Anemonin wurden bereits 1898 von Noël<sup>27)</sup> und später von Raymond-Hamet<sup>28)</sup> angestellt. Demzufolge lähmte die intravenöse Injektion von 20 mg Anemonin/kg Körpergewicht die Atmungs- und Herztätigkeit eines Hundes. Boas et al. untersuchten die Wirkung des Anemonins auf Mikroorganismen<sup>29)</sup>. Für *Aspergillus niger* erhielten sie Grenzverdünnungswerte bis zu 1:70000. Im Gegensatz hierzu stellten Baer et al.<sup>30)</sup> nur sehr geringe antibiotische Aktivität des Dimeren fest.

Beim Vergleich der Wirksamkeit von natürlichem und synthetischem Protoanemonin hingegen konnte bei allen untersuchten Mikroorganismen eine gleich große Wachstumshemmung beobachtet werden. Winter et al.<sup>31)</sup> bestätigten die Werte für die minimale Hemmkonzentration und vermuteten, daß das Protoanemonin wegen seiner generell toxischen Wirkung nicht in dieser Form im Gewebe vorliegt.

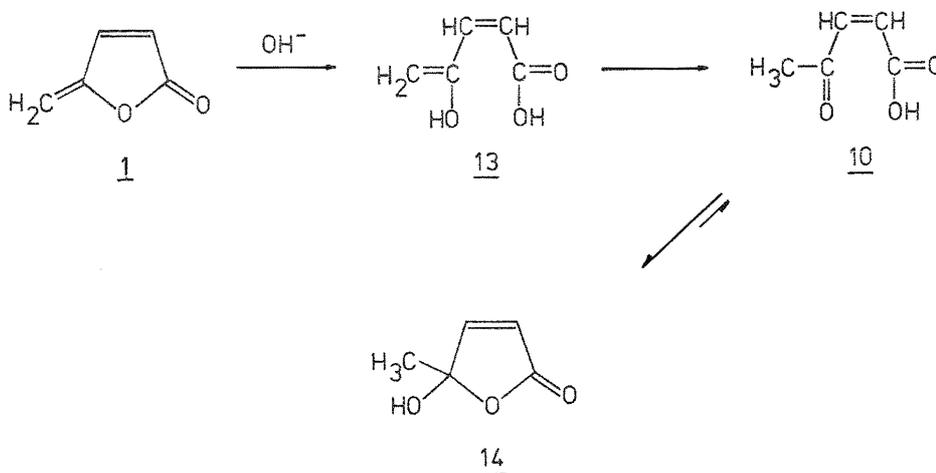
Über den Wirkungsmechanismus des Lactons ist wenig bekannt. Cavallito et al.<sup>32)</sup> vermuteten, daß sich das hochreaktive Doppelbindungssystem an die Enzymsulfhydrylgruppen von Cysteinresten anlagert. Andere Autoren<sup>33,34)</sup> führten die Wirksamkeit auf eine Blockierung des Zellcyclus bei der Inter- oder Prophase zurück.

Die Hauptaufgabe des Scharfstoffs liegt sicher im Schutz höherer Pflanzen, in Analogie zum Immunsystem der Säuger, gegenüber anderen Lebewesen, besonders Pilzen und Bakterien. Als präinfektionelles Phytoalexin<sup>35)</sup> ist er in Form der unwirksamen Glucoside permanent vorhanden und wird wie bereits erwähnt bei Verletzung des Gewebes verstärkt abgegeben. Auf grund des bitteren Geschmacks werden ranunculinhaltige Pflanzen vom weidendem Vieh gemieden<sup>36)</sup>. Das Abwehrverhalten der Pflanzen ist bekanntlich sehr vielseitig und im Detail oft ungeklärt. Der physikalischen Verteidigung, z.B. das bei Berührung hervorgerufene "Un-sichtbarwerden" der Sinnpflanze (*Mimosa pudica*), das durch Bewegungsstoffe (leaf movement factors, LMF) ausgelöst wird<sup>37)</sup>, steht die rein chemische Abwehr gegenüber. Eine Vielzahl chemisch unterschiedlicher Substanzen wie proteolytische Enzyme (Papain), biogene Amine, Alkaloide, Häutungs- und Juvenilhormone, Phytoalexine und allgemein Antibiotika werden hierzu von Pflanzen innerhalb des Sekundärstoffwechsels synthetisiert<sup>33)</sup>. Auch die gegenseitige Beeinflussung der Pflanzen untereinander (Allelopathie) ist hier zu erwähnen.

Die glucosidischen Vorstufen könnten neben der Transportfunktion noch eine weitere Bedeutung für die Pflanze haben: bei jeder Abgabe des Wirkstoffs entsteht Glucose, die zur Energiegewinnung und zur Synthese von Zellbestandteilen verwendet werden könnte.

### 3.2. Glucosidische Vorstufen

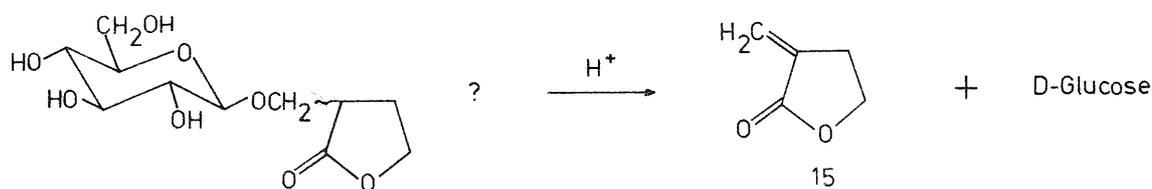
Das erstmals 1951 von Hill et al.<sup>6)</sup> isolierte Ranunculin (3), dessen Konfiguration am C-Atom 4 von Benn und Yelland als S bestimmt wurde<sup>38)</sup>, besitzt die für Glykoside ungewöhnliche Eigenschaft, im sauren Bereich relativ stabil zu sein. In Gegenwart basischer Verbindungen, besonders Natriumacetat, tritt jedoch rasch der Zerfall in Glucose und das Anhydroaglykon Protoanemonin ein (s.S. 3). Je nach Reaktionsführung wird dieses über  $\gamma$ -Hydroxy-vinylacrylsäure (13) mehr oder weniger zur tautomeren  $\beta$ -Acetylacrylsäure (10) hydrolisiert<sup>21)</sup>. In wässriger Lösung liegt diese in Analogie zur Penicillinsäure (s.S. 7) überwiegend in der "pseudosauren" Lactolform 14 vor:



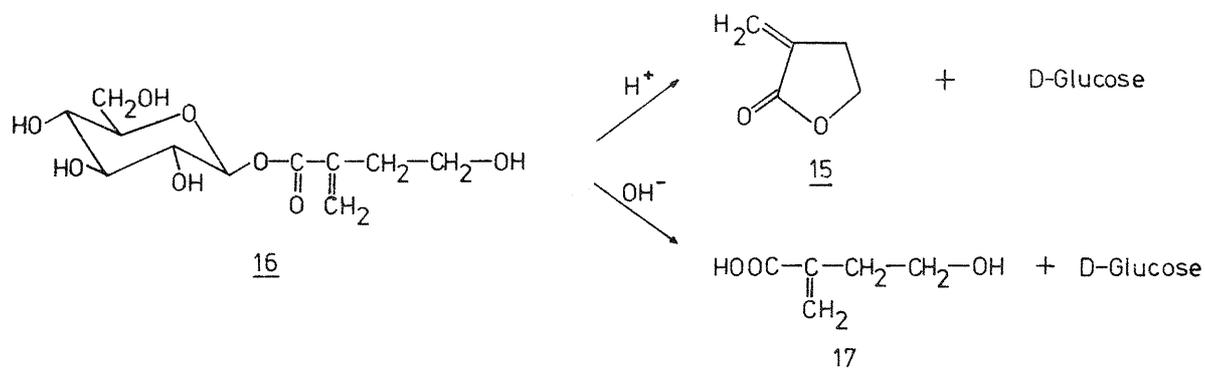
Im pflanzlichen Gewebe soll der Scharfstoff enzymatisch durch eine  $\beta$ -Glucosidase, die sog. "Ranunculase"<sup>10)</sup>, freigesetzt werden.

Zur Gruppe der Inhaltsstoffe, die direkt ein Anhydrogenin liefern, zählt ebenfalls ein aus *Erythronium americanum*<sup>39)</sup> und aus der Tulpe<sup>40,41)</sup> isoliertes Glucosid. Es wird mittels Säure in D-Glucose und in das strukturell dem Protoanemonin ähnlichen, ebenfalls antibiotisch wirksame  $\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -butyrolacton (15) gespalten. Cavallito et al.

schlugen auf grund dieser Eigenschaft für das Glucosid eine ranunculinaloge Struktur vor:



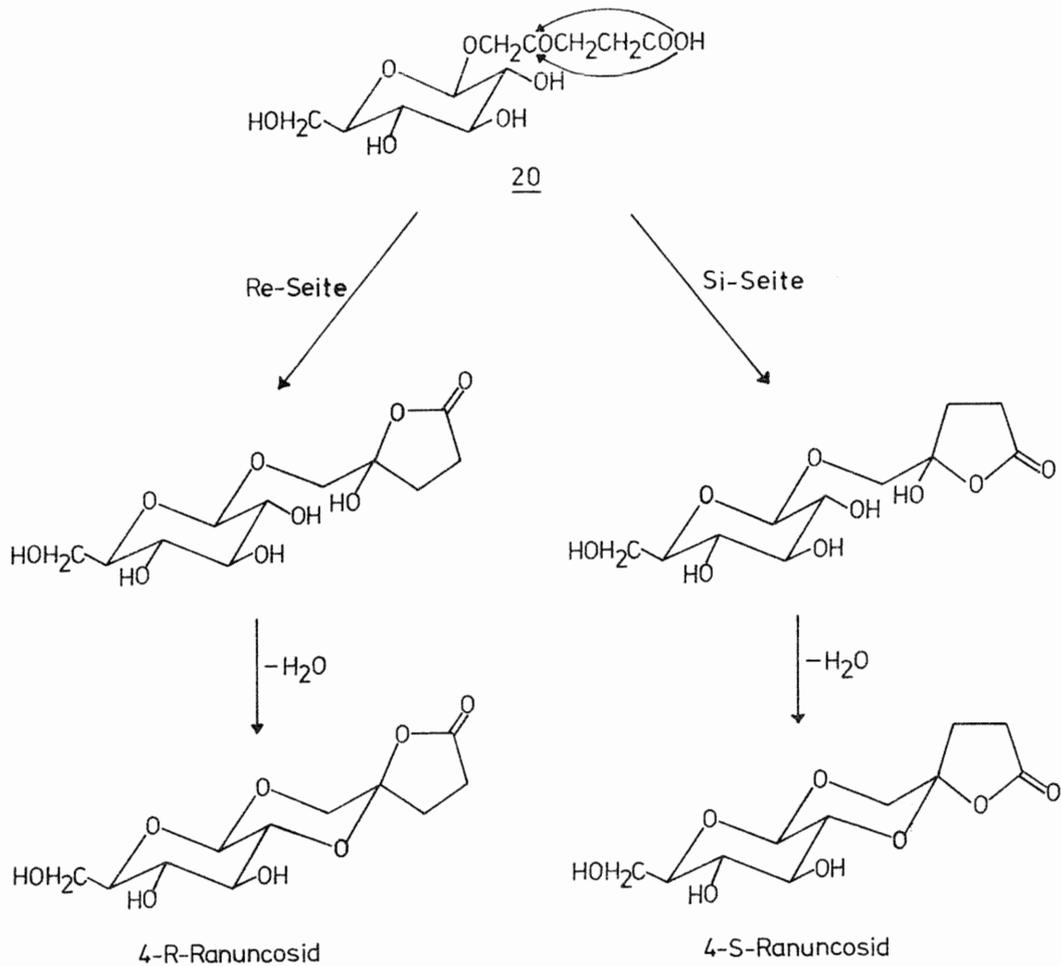
Tschesche et al.<sup>42,43)</sup> stellten jedoch fest, daß es sich bei dem Glucosid um ein 1-Acylglucosid (Acylosid) einer  $\alpha, \beta'$ -ungesättigten  $\gamma$ -Hydroxycarbonsäure handelte. Die Verbindung 16 (1-Tuliposid A) besaß antibiotische, vor allem fungizide Wirksamkeit und stellte einen neuartigen Wirkstofftyp dar. Beim Aufbewahren nahm die antibiotische Aktivität nach einiger Zeit aber stark ab. Der Grund hierfür war die leicht eintretende Acylwanderung zum C-6' des Zuckers unter Bildung des unwirksamen 6-Tuliposids A. Dieselben Verhältnisse wurden für das  $\beta$ -Hydroxyderivat (1-Tuliposid B, 6-Tuliposid B) vorgefunden. Im alkalischen trat im Gegensatz zum Ranunculin Hydrolyse zur entsprechenden offenkettigen Carbonsäure (17) ein:



Aufgrund dieser Ergebnisse war ein Acylglucosid der 5-Hydroxylävulinsäure (18 oder 19) als genuiner Vorläufer für Protoanemonin in Erwägung zu ziehen. Möglicherweise führte eine Umlagerung zum Hydroxylglucosid (20),

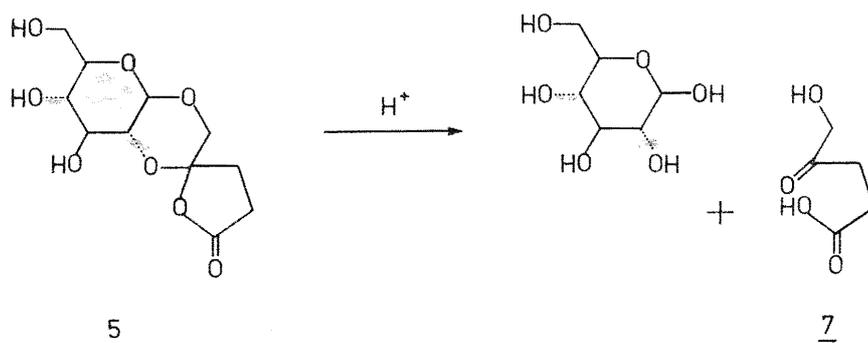


des Zuckers ein 1,4-Dioxanring gebildet wird. Eine von Mariezcurrena et al. durchgeführte Röntgenstrukturuntersuchung<sup>45)</sup> bestätigte die von Tschesche et al.<sup>7)</sup> mit Hilfe der <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie aufgestellte Strukturformel und ergab für das chirale C-Atom 4 eine 4-R-Konfiguration. Neuerdings wurde von Delhvi<sup>46)</sup> ein Glucosid isoliert, das zwar fast die gleichen spektroskopischen Daten, jedoch einen anderen R<sub>F</sub>-Wert als eine authentische Ranuncosidprobe besaß. Möglicherweise handelte es sich hierbei um das in bezug auf C-Atom 4 konfigurationsisomere 4-S-Ranuncosid. Festgelegt wird die Konfiguration am C-4 durch den Angriff der Carboxylgruppe (Re- oder Si-Seite). Die darauffolgende Kondensation ist aus sterischen Gründen nur mit dem C-2' des Zuckers möglich:



Ein solcher nicht stereospezifischer Verlauf könnte darauf hindeuten, daß Ranuncosid spontan bei der Aufarbeitung und nicht enzymatisch kontrolliert gebildet wird.

Beim Erwärmen mit verdünnter Säure zerfällt die Verbindung 5 entsprechend ihrer Diacetalstruktur vollständig in D-Glucose und 5-Hydroxylävulinsäure (7)<sup>45,47,48</sup>:

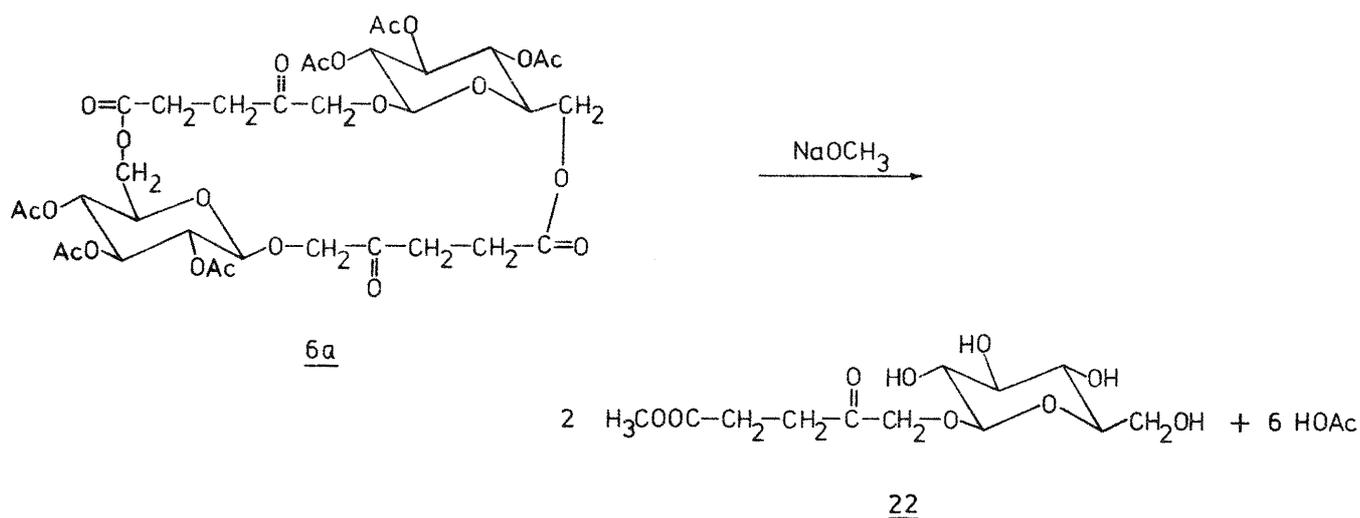


Aufgrund dieser Reaktion konnte untersucht werden, ob bei Applikation der radioaktiv markierten 5-Hydroxylävulinsäure ein Teil der Markierung im Zucker wiederzufinden war. Das Ausmaß, wie stark die Säure im Organismus katabolischen Reaktionen unterliegt und in Form unbekannter Abbauprodukte in den Zucker eingebaut wird, konnte so abgeschätzt werden.

Die Isolierung und Strukturaufklärung des Ranunculosids (6)<sup>7)</sup> zeigte, daß innerhalb des 22-gliedrigen Ringes sowohl zwei den 6-Tuliposiden entsprechende acylglucosidische, als auch zwei hydroxylglucosidische Bindungen zur 5-Hydroxylävulinsäure vorliegen. Die Entstehung von 6 kann so gedeutet werden, daß entweder eine Dimerisierung von zwei Hydroxylglucosiden (20) oder von zwei 6'-Acylglucosiden (19) stattgefunden hat. Die gemischte Kondensation von einem Hydroxyl- und einem Acylglucosid führt nicht zum Makrolid 6. Offen bleibt auch hier die Frage, ob es sich bei der Dimerisierung um einen spontanen oder enzymatischen

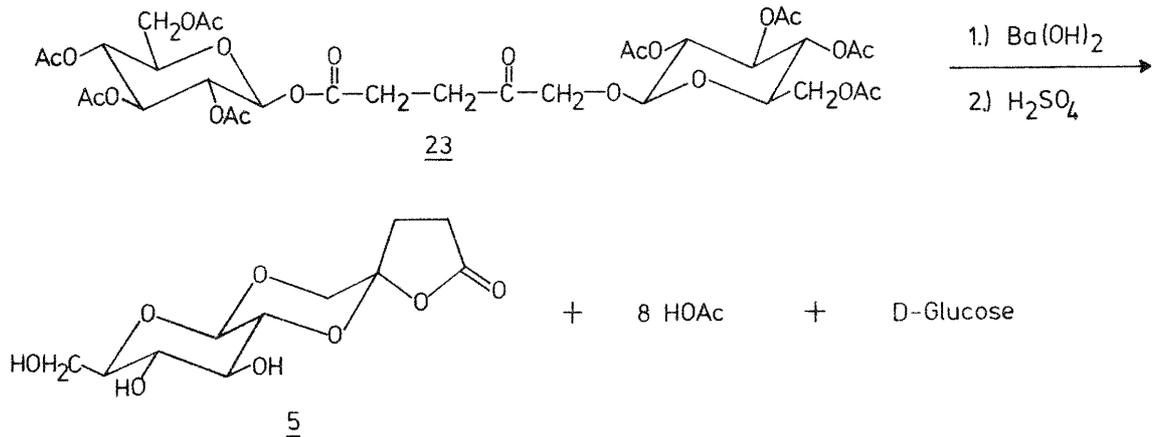
Prozeß handelt. In jedem Fall ist eine sterisch günstige Anordnung sowie die Anhäufung des Monomeren an einem bestimmten Ort erforderlich.

Bei der Zemplén-Hydrolyse des acetylgeschützten Ranunculosids (6a) wurde erwartungsgemäß der 5-β-D-Glucopyranosyloxylävulinsäuremethylester (22) gebildet:



Ein monomeres offenkettiges Glucosid der 5-Hydroxylävulinsäure in Analogie zu den Tuliposiden war aus den Pflanzen nicht isolierbar.

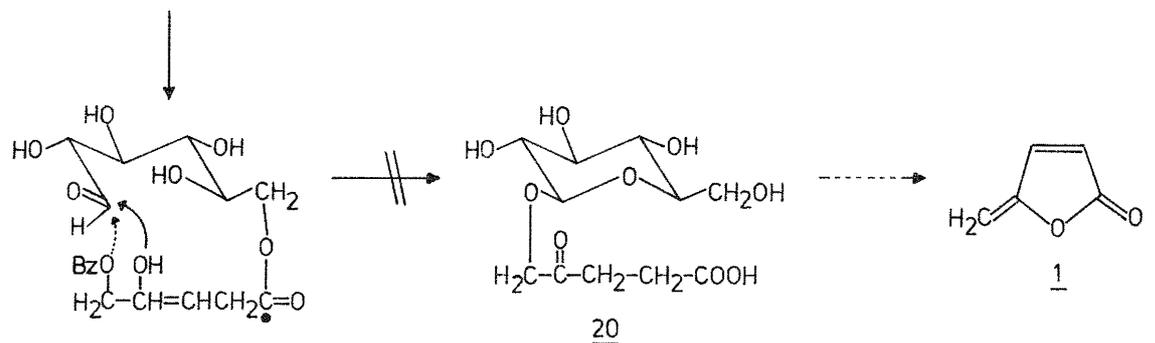
Daher wurde versucht, das Problem synthetisch zu lösen. Skötsch<sup>49)</sup> erhielt aus Silber-5-hydroxylävulinat und Acetobromglucose das in Form des Peracetylderivates isolierbare Diglucosid 23. Methanolyse der Verbindung lieferte den Methylester 22, vorsichtige Hydrolyse mit einem Unterschluß an Bariumhydroxidlösung und anschließendes Ansäuern ergab neben anderen Substanzen Ranuncosid (5):



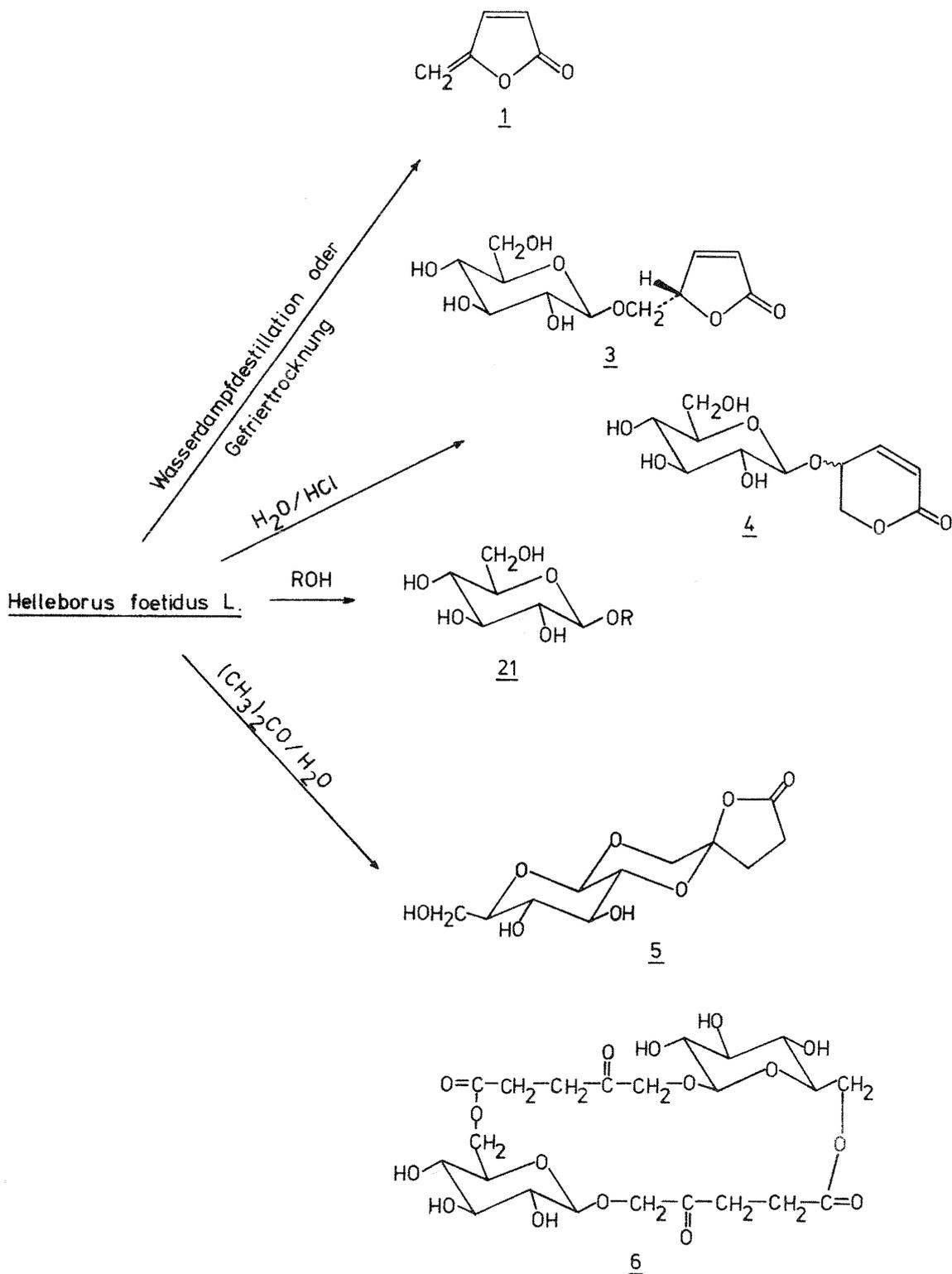
Welmar gelang es inzwischen, das Hydroxyglucosid (20) der 5-Hydroxylävulinsäure ausgehend vom Ranunculosid zu erhalten und mit ihm Ringschlußreaktionen durchzuführen<sup>50)</sup>.

Zu der Problematik wurden folgende Tracerexperimente durchgeführt: Vergleich der Einbaurrate von 5-Hydroxy[1-<sup>14</sup>C]-lävulinsäure mit derjenigen von 5-Benzyloxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure. Die Blockierung der Hydroxyfunktion sollte, unter der Voraussetzung, daß die Pflanze nicht in der Lage ist, den Benzylether zu spalten, einen Nichteinbau in Protonemonein bewirken. Der eigentliche Wert des Versuches ist darin zu sehen, daß besonders die Einbauraten der ebenfalls angebotenen Precursor aus dem Primärstoffwechsel durch den Vergleich mit dem Nichteinbau relativiert und somit nicht überbewertet werden.

Glucose-6-phosphat + 5-Benzyloxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure



Im Rahmen der Untersuchungen über Glykoside mit lacton-bildendem Aglykon sind zusammenfassend die folgenden Substanzen aus *Helleborus foetidus*-Pflanzen isoliert worden:



### 3.3. Frühere Arbeiten zur Biogenese

#### 3.3.1. Protoanemoninbiogenese

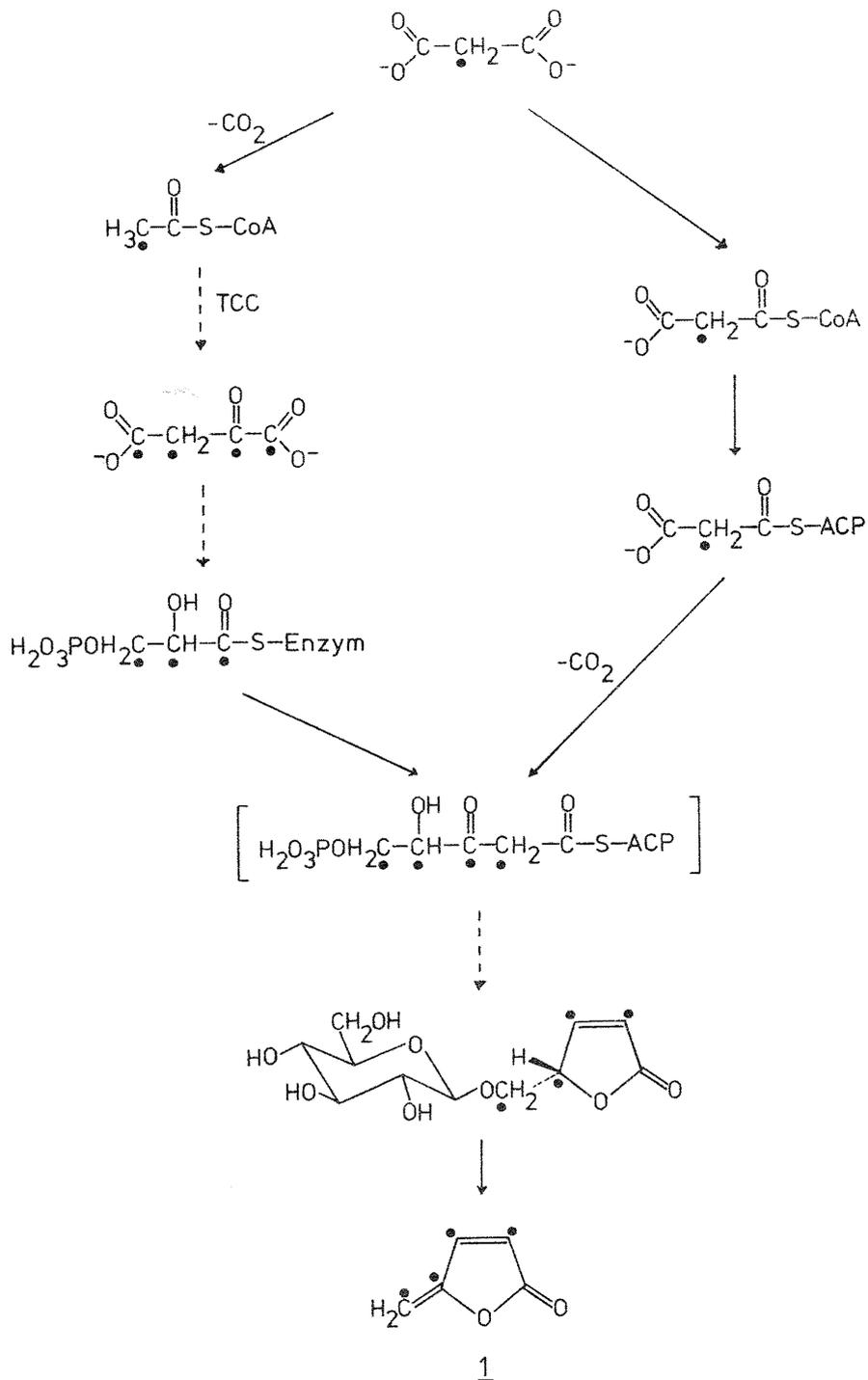
Trotz der weiten Verbreitung der Ranunculaceen und der einfachen Struktur des Wirkstoffs 1 sind erst 1973/74 zwei Arbeiten japanischer Autoren zur Protoanemoninbiogenese erschienen<sup>51,52</sup>). Die erste Arbeit beinhaltet den Vorschlag, daß eine enzymatisch katalysierte, decarboxylierende Kondensation von Malonyl-ACP mit 3-Phosphoglycerat einen C<sub>5</sub>-Körper liefert, der nach weiteren enzymatischen Schritten (Lactonisierung, Reduktion, Dehydratisierung und Glucosylierung) in Ranunculin umgewandelt werden soll (s.S. 20).

Als Stütze für diesen Mechanismus wurde der Einbau von [2-<sup>14</sup>C]Malonat und [U-<sup>14</sup>C]D-Glucose angeführt. Malonat wurde am besten metabolisiert. Ein Abbau des Wirkstoffs zeigte, daß das C-Atom 1 kaum markiert war. C-Atom 2 besaß 60%, die übrigen C-Atome je 12% der Gesamtaktivität von 1.

Ein Teil des [2-<sup>14</sup>C]Malonyl-ACP sollte demzufolge über Acetat in den Tricarbonsäurecyclus eingeschleust werden und als Oxalacetat im Sinne der Gluconeogenese zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt werden. Hiermit würde eine Verschmierung der Aktivität einhergehen (C-3, C-4, C-5 des Protoanemonins), wohingegen ein anderer Teil des Precursors direkt unter Abgabe von inaktivem Kohlendioxid zum C<sub>5</sub>-Zwischenprodukt kondensieren und somit die beobachtete verstärkte Markierung am C-Atom 2 des Scharfstoffs hervorrufen würde. Als weitere Stütze für das intermediär auftretende 3-Phosphoglycerat führten die Autoren den Einbau der [U-<sup>14</sup>C]D-Glucose an, die ja während der Glykolyse 3-Phosphoglycerat liefert.

Leider ist diese Formulierung der Protoanemoninbiogenese, die von den Autoren in der darauffolgenden Publikation

revidiert wurde, auch in den Übersichtsartikel von Patten-  
den<sup>17)</sup> übernommen worden:



Aufgrund vier weiterer Tracerexperimente mit *Ranunculus*  
*glaber* kommen Suga et al. in der zweiten Arbeit zu dem

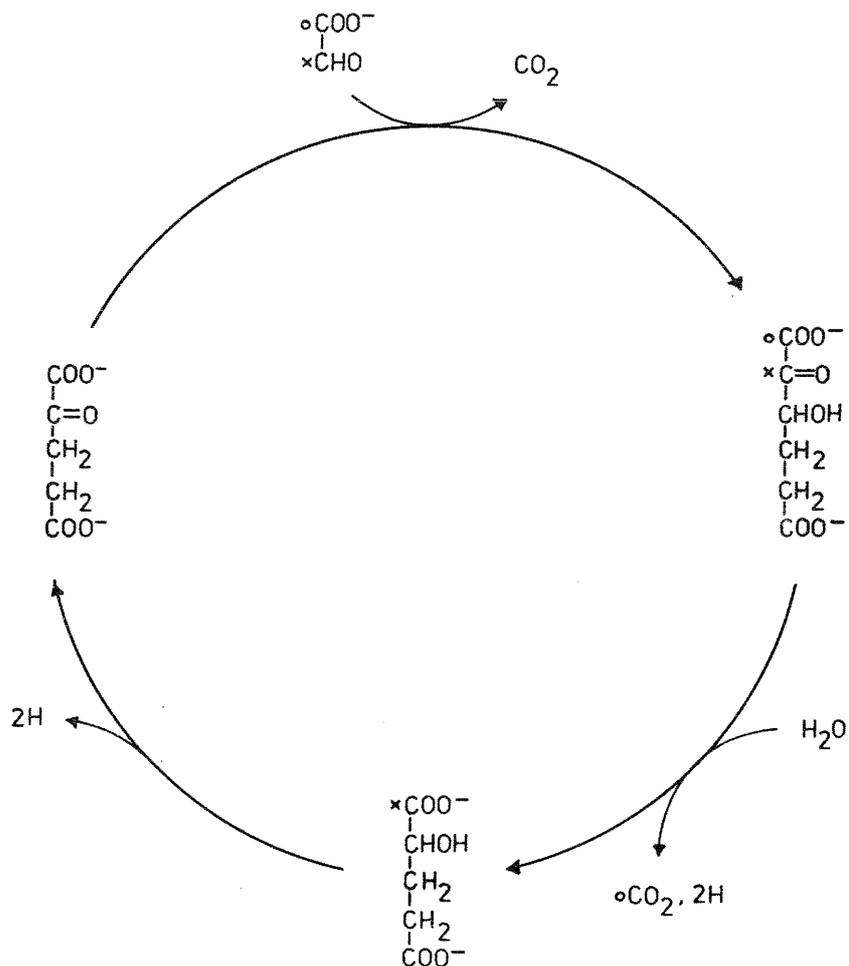
Schluß, daß das Protoanemonin durch eine direkte Lactonisierung der 5-Carboxylgruppe mit der Enolform der Ketogruppe des  $\alpha$ -Ketoglutarats gebildet wird. [5- $^{14}\text{C}$ ] $\alpha$ -Ketoglutarat ergab nach Applikation (Aufsaugen) beim Abbau des Wirkstoffs eine selektive Markierung des C-Atoms 1. In die gleiche Position gelangte die Markierung von [1- $^{14}\text{C}$ ]Acetat; [2,3- $^{14}\text{C}$ ]Succinat verteilte sich auf die Positionen C-3, C-4 und C-5. Alle Ergebnisse sprachen dafür, daß  $\alpha$ -Ketoglutarat nach der Bildung aus den entsprechenden Vorstufen des Tricarbonsäurecyclus zur Synthese aus dem Cyclus abgezogen wurde. In beiden Arbeiten wurde eine intermediär auftretende glucosylierte 5-Hydroxylävulinsäure nicht berücksichtigt.

### 3.3.2. Metabolismus der 5-Hydroxylävulinsäure

Die Frage, auf welchem biogenetischen Weg die 5-Hydroxylävulinsäure in der Pflanze gebildet wird, stellte sich nach einem erfolgten Einbau in die Glucoside 3-6 und den Scharfstoff 1. Es konnte sich hierbei nicht um einen unbedeutenden Nebenweg handeln, da die Säure in Form der Glucoside immerhin etwa 1,3% des Trockengewichts bei *Helleborus foetidus* ausmacht.

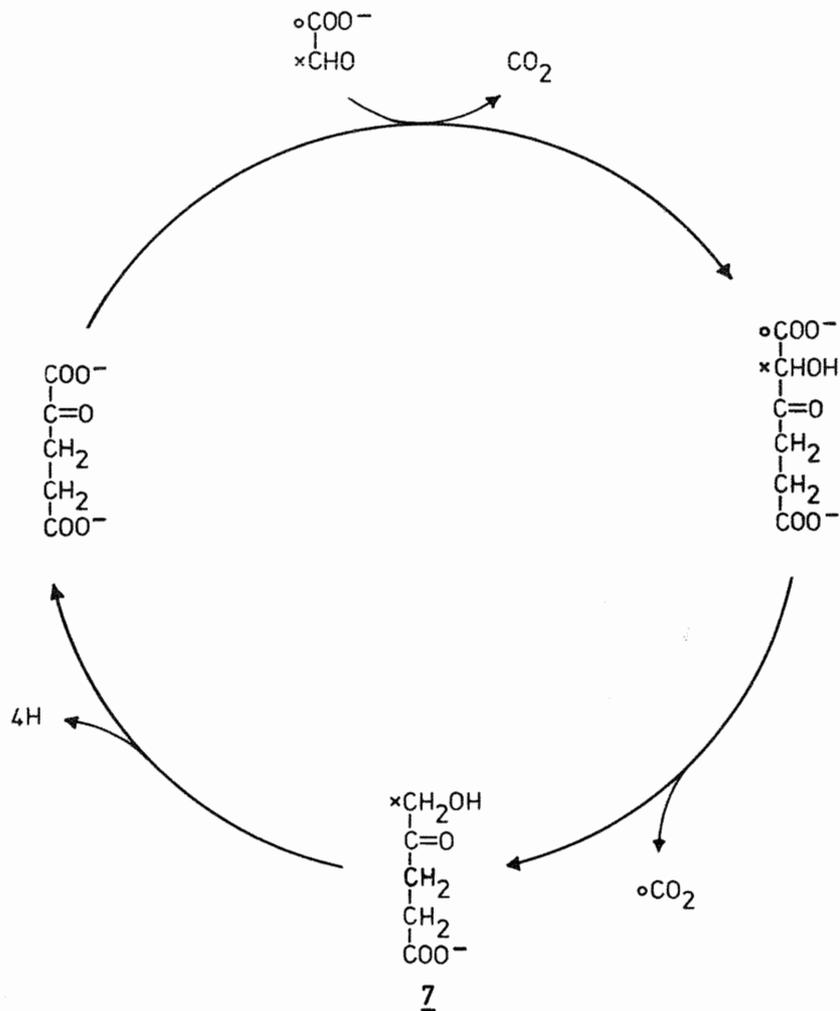
Eine Literaturrecherche ergab, daß in mehreren Publikationen über die 5-Hydroxylävulinsäure im Zusammenhang mit dem weit verzweigten Glyoxylsäuremetabolismus berichtet worden war. Besondere Bedeutung besitzt die Glyoxylsäure u.a. dadurch, daß sie in einem Transaminasegleichgewicht mit Glycin steht und bei Mikroorganismen, die nur mit Acetat als Kohlenstoffquelle wachsen, innerhalb des anaplerotischen Glyoxylatcyclus (Krebs-Kornberg-Cyclus) für die Bereitstellung von  $\text{C}_4$ -Carbonsäuren sorgt. Läßt man bestimmte Bakterien nur mit Glyoxylat als Substrat wachsen, so wird dieses nach einer Induktionsperiode über den Dicarbonsäurecyclus abgebaut. Die Nachlieferung von Zwischenprodukten wird hierbei durch die Glyceratbahn besorgt<sup>53)</sup>.

Anlaß für die verstärkte Erforschung der enzymatischen Umsetzungen der Glyoxylsäure, eine Übersicht wird in der Einleitung eines Artikels von Okuyama et al.<sup>54)</sup> gegeben, war der Befund, daß die Oxidation der Glyoxylsäure zu Kohlendioxid durch die Zugabe von L-Glutamat<sup>55,56)</sup> bzw. von  $\alpha$ -Ketoglutarat<sup>57,58,59)</sup> wesentlich verstärkt wurde. Die Ergebnisse resultierten sowohl aus Untersuchungen mit Organen von Säugern (Rattenlebermitochondrien, Rinderherzhomogenate) als auch mit Mikroorganismen (*Aspergillus niger*, *Rhodopseudomonas spheroides* u.a.). Mit Pflanzenzellen wurden hingegen keine Untersuchungen angestellt. Okuyama deutete die Ergebnisse versuchsweise mit dem Vorhandensein eines cyclischen Mechanismus für die Glyoxylatoxidation:

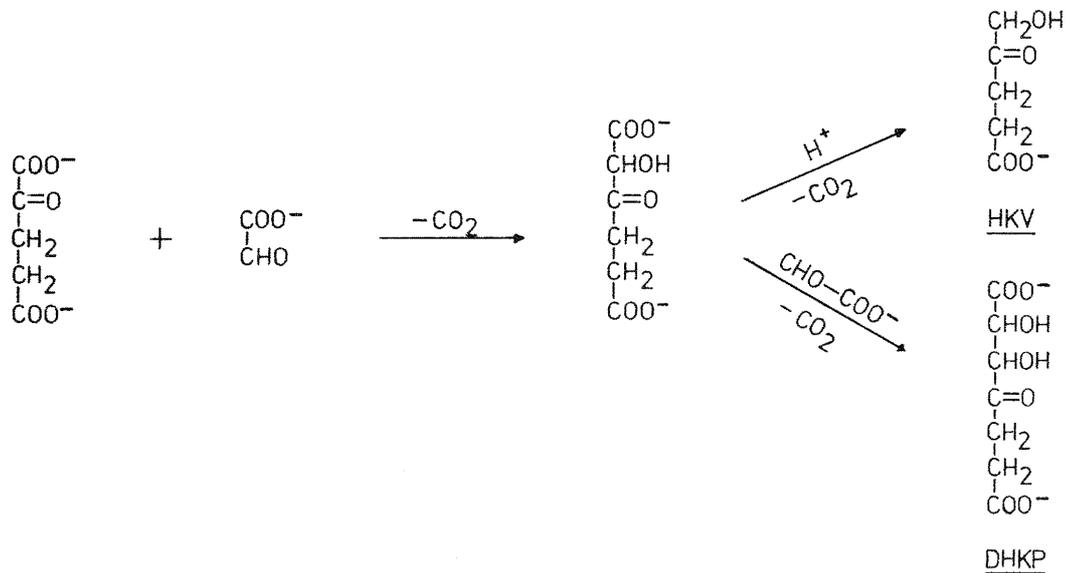


Es wurde weiterhin gefunden, daß Pyruvat an Stelle von  $\alpha$ -Ketoglutarat die gleiche katalytische Wirkung für die Glyoxylatoxidation besaß<sup>60,61)</sup>. Hierbei wurden jedoch neben dem Pyruvat als Zwischenprodukte  $\gamma$ -Hydroxy- $\alpha$ -ketoglutarat und Malat gefunden.

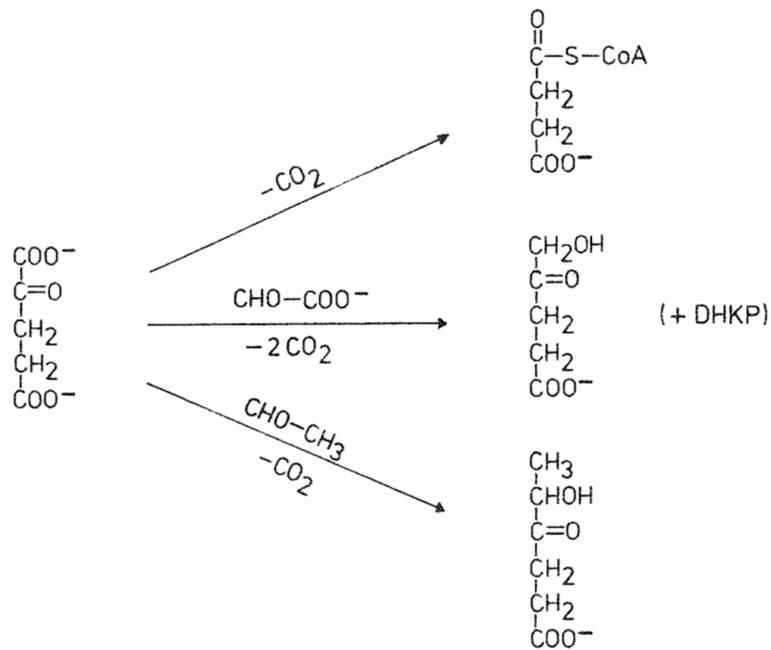
Die unter  $\text{CO}_2$ -Abspaltung verlaufende Kondensation zwischen dem  $\alpha$ -Ketoglutarat und dem Glyoxylat kann jedoch auch anders formuliert werden: an Stelle eines  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -keto-adipinsäure, die als  $\beta$ -Ketosäure nichtenzymatisch (bei in vitro-Versuchen z.B. mittels Trichloressigsäure oder 4-Aminoantipyrin<sup>62)</sup>) zum 5-Hydroxylävulinat (7) decarboxyliert. Oxidation von 7 zu  $\alpha$ -Ketoglutarat könnte den Cyclus schließen<sup>63)</sup>:



Die neue Möglichkeit der Verknüpfung von  $\alpha$ -Ketoglutarat und Glyoxylat mit 5-Hydroxylävulinsäure als Folgeprodukt wurde 1966 von Moriyama et al.<sup>64)</sup> und Koch et al.<sup>65)</sup> unabhängig voneinander gefunden. Bestätigt wurde sie später von Westerfeld und seinen Mitarbeitern<sup>66)</sup>, die die Säure 7 enzymatisch in größerer Menge darstellten und die Struktur durch Derivatisierung sowie Synthese (Desaminierung von 5-Aminolävulinsäure) absicherten. Als Nebenprodukt der Carboligase-Reaktion fanden sie 2,3-Dihydroxy-4-ketopimelinsäure (DHKP)<sup>67)</sup>, die durch Kondensation der  $\alpha$ -Hydroxy- $\beta$ -keto adipinsäure mit einem zweiten Glyoxylat gebildet wird. Die Reaktion ist vom Standpunkt der Substratspezifität des Enzyms von Interesse:



Verantwortlich für die  $\alpha$ -Ketoglutarat:Glyoxylat-Carboligase-Reaktion ist die Thiaminpyrophosphat-abhängige Komponente A ( $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase) des  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (EC 1.2.4.2). Während der 100-fachen Reinigung behielt sie die folgenden drei Aktivitäten bei:



Analoge Verhältnisse wurden für die Pyruvat-Dehydrogenase gefunden<sup>68)</sup>.

Die biologische Bedeutung der Carboligase-Reaktion ist noch unklar. Yamasaki et al. konnten mit zellfreien Extrakten von *Mycobacterium phlei* zeigen, daß 5-Hydroxylävulinsäure ein stärkerer kompetitiver Inhibitor der 5-Aminolävulinatdehydratase ist als Lävulinsäure<sup>69)</sup>. Die Porphyrinbiosynthese wurde zu 84% gehemmt, so daß die 5-Hydroxylävulinsäure hier eine regulatorische Aufgabe besitzen könnte<sup>\*)</sup>.

Am C-Atom 1 bzw. C-Atom 5 <sup>14</sup>C-markierte 5-Hydroxylävulinsäure erhielten Wang et al.<sup>63)</sup> durch die α-Ketoglutarat: Glyoxylat-Carboligase-Reaktion beim Einsatz entsprechend

\*) Es soll hier angemerkt werden, daß nur bei Applikation der markierten HKV an Helleborus-Pflanzen tatsächlich beobachtet werden konnte, daß die grüne Farbe der Kronblätter auffällig verblich.



anemonin. Die Reduktion des C-Atoms 1 des  $\alpha$ -Ketoglutarats entspräche der Rückreaktion der von Wang et al.<sup>63)</sup> in Rattenlebermitochondrien gefundenen Oxidation des 5-Hydroxylävulinats (s.o.). Bei diesem Biogeneseverlauf konnte ein Einbau von <sup>14</sup>C-markierter 4,5-Dioxovaleriansäure (DOVA) in Protoanemonin erwartet werden.

Die Säure ist besonders durch die Arbeiten von Shemin et al.<sup>70)</sup> über den Succinat-Glycin-Cyclus im Rahmen der Porphyrinbiosynthese in den Vordergrund getreten. Die Autoren wiesen eine Spaltung des 4,5-Dioxovalerats ( $\alpha$ -Ketoglutaratsemialdehyd) in Succinat, welches den Cyclus schließt und ein C<sub>1</sub>-Bruchstück nach. Es wird innerhalb des C<sub>1</sub>-Stoffwechsels in Ameisensäure übergeführt oder in die Ureidogruppe der Harnsäure (C-4, C-5) bei der Purinbiosynthese eingebaut. Den Nachweis der 4,5-Dioxovaleriansäure in biologischem Material erbrachten Kissel und Heilmeyer<sup>71,72)</sup>. Jerzykowski et al.<sup>73)</sup> untersuchten die Eignung der Säure für das Glyoxalase-Enzym-System, das die Umsetzung zum D- $\alpha$ -Hydroxyglutarat katalysierte. Sie schlagen einen Cyclus mit 4,5-Dioxovalerat als Zwischenprodukt vor, der die Oxidation von Glycin bewirken soll.

Bei Applikation von markierter 5-Aminolävulinsäure an Helleborus-Pflanzen sollte bei einem Verlauf der Protoanemoninbiogenese über die 4,5-Dioxovaleriansäure das Ausmaß der Transaminaserückreaktion beurteilt werden können (s.S. 26).

Neuere Untersuchungen zur Biosynthese der 5-Aminolävulinsäure in grünen Pflanzen haben gezeigt, daß die Säure direkt aus  $\alpha$ -Ketoglutarat oder Glutamat und nicht über den Succinat-Glycin-Cyclus entsteht<sup>74,75)</sup>.

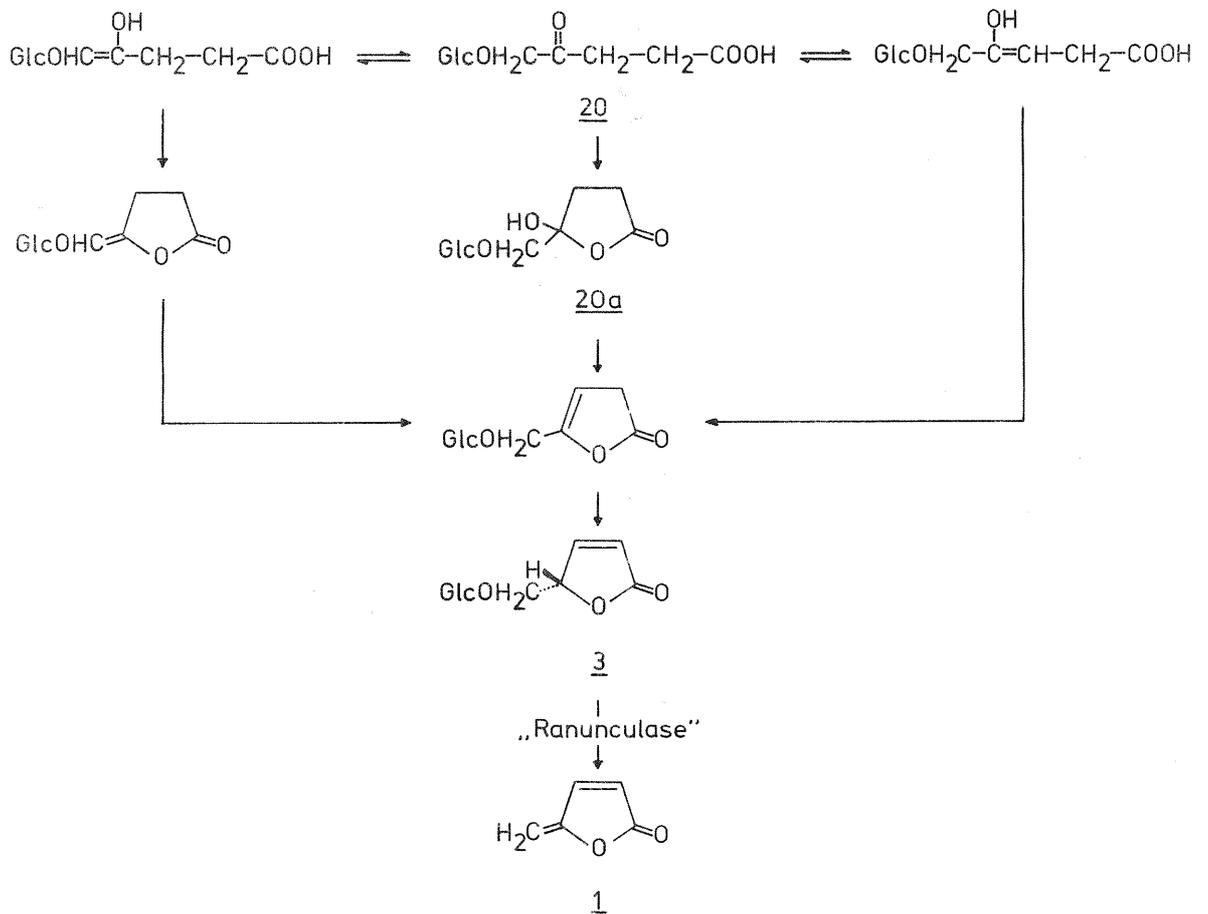
Die nicht-enzymatische Transaminierung von 4,5-Dioxovaleriansäure zu 5-Aminolävulinsäure mit Alanin<sup>76)</sup> oder anderen Aminodonatoren, vor allem Glycin<sup>77)</sup>, wurde ebenfalls in jüngster Zeit entdeckt.

### 3.4. Zielsetzung der eigenen Experimente

#### 3.4.1. Biogenetische Priorität der 5-Hydroxylävulinsäure

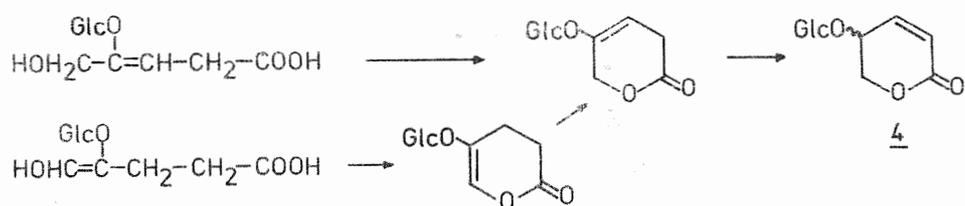
Ist die 5-Hydroxylävulinsäure, die in freier Form bei keiner Aufarbeitungsmethode im Pflanzenextrakt nachgewiesen werden konnte, der biogenetische Vorläufer des Protoanemonins (1) sowie der Aglykone seiner glucosidischen Vorstufen Ranunculin (3), Isoranunculin (4), Ranuncosid (5) und Ranunculosid (6)?

Die enzymatische Ranunculin- bzw. Protoanemoninbildung kann theoretisch mit allen drei tautomeren Formen des HKV-Hydroxyglucosids (20) erfolgen. Der Weg über die Lactolform 20a (vgl. S. 87) erscheint jedoch am wahrscheinlichsten:



Daß die Glucosylierung auf der offenkettigen Stufe der 5-Hydroxylävulinsäure eintritt, wird durch die Struktur des Ranunculosids (6) nahegelegt.

Die Entstehung des Isoranunculins (4) kann als Lactonisierung eines 4-Hydroxyglucosids (Enol- oder Endiolform der 5-Hydroxylävulinsäure) formuliert werden:



Ein möglicher, zum Ranuncosid führender Mechanismus wurde bereits auf Seite 14 abgebildet, die Dimerisierung zum Ranunculosid wurde auf Seite 15 diskutiert.

Eine zu synthetisierende 5-Hydroxy[1-<sup>14</sup>C]ävulinsäure sollte demnach in Protoanemonin bzw. Anemonin und die vier Glucoside eingebaut werden. Da die Säure möglicherweise im Primärstoffwechsel liegt, war mit einem Abbau zu rechnen. Die Aktivität konnte in Form unbekannter Abbauprodukte in die isolierten Inhaltsstoffe gelangt sein und eine falsche Interpretation der Ergebnisse bedingen. Um dem vorzubeugen, wurde

- a) eine Hydrolyse des aktiven Ranuncosids in D-Glucose und 5-Hydroxylävulinsäure durchgeführt. Nur ein unbedeutender Teil der Ranuncosidgesamtaktivität sollte im Zucker anzutreffen sein. Zur weiteren Absicherung wurden die Spaltprodukte in Form der  $\beta$ -D-Pentaacetylglucose und des 5-Hydroxylävulinsäure-p-bromphenacylesters derivatisiert und bis zur konstanten spezifischen Aktivität kokristallisiert,
- b) ein Abbau des aktiven Protoanemonins durchgeführt. Applikation von 5-Hydroxy[1-<sup>14</sup>C]ävulinsäure sollte C-1-markiertes Protoanemonin liefern ,

c) 5-Hydroxy[4-<sup>14</sup>C]lävulinsäure synthetisiert und appliziert. Der Versuch sollte zeigen, daß das intakte C<sub>5</sub>-Gerüst der Säure zur Protoanemoninbiogenese benutzt wird. Der Protoanemoninabbau sollte die Markierung am C-Atom 4 lokalisieren.

### 3.4.2. Stütze für ein genuines Hydroxylglucosid

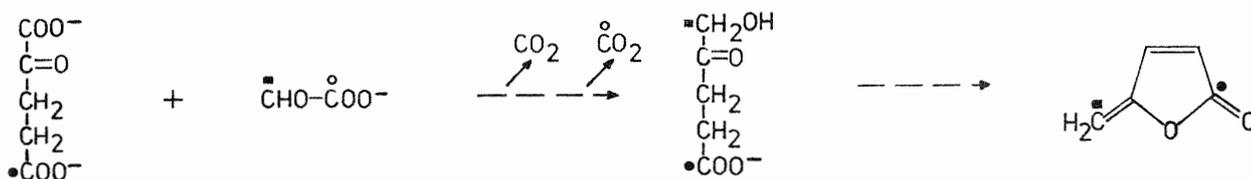
Handelt es sich bei dem genuinen Glucosid um die 5-β-D-Glucopyranosyloxylävulinsäure?

Eine Blockierung der Hydroxylfunktion würde die Glucosylierung verhindern und damit die Protoanemoninentstehung verhindern. Die Applikation der zu synthetisierenden 5-Benzoyloxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure sollte einen Nichteinbau in Protoanemonin ergeben (s.S. 17).

### 3.4.3. Biogenese der 5-Hydroxylävulinsäure in höheren Pflanzen

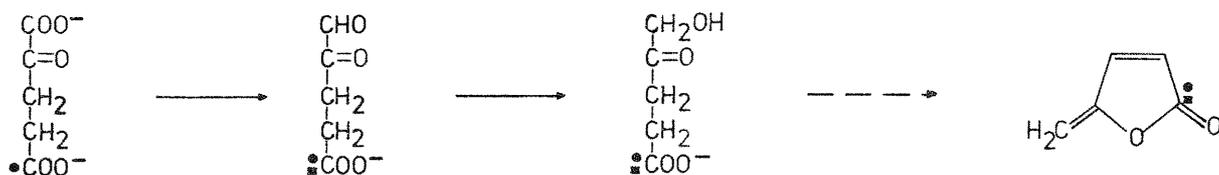
Wie wird die 5-Hydroxylävulinsäure in höheren Pflanzen gebildet?

Hypothese 1: Die 5-Hydroxylävulinsäure wird durch eine α-Ketoglutarat:Glyoxylat-Carboligase-Reaktion gebildet.



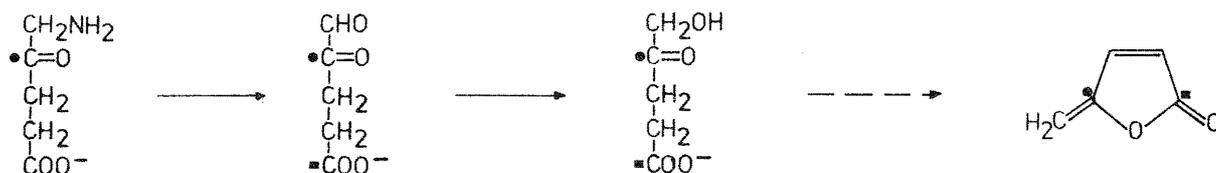
[5-<sup>14</sup>C]α-Ketoglutarat ergibt C-1-markiertes Protoanemonin. [1-<sup>14</sup>C]Glyoxylat sollte keinen Einbau oder höchstens eine Verschmierung der Aktivität im Wirkstoff hervorrufen. [2-<sup>14</sup>C]Glyoxylat muß C-5-markiertes Protoanemonin bilden.

Hypothese 2: Die 5-Hydroxylävulinsäure entsteht durch Reduktion von α-Ketoglutarat über 4,5-Dioxovalerat als



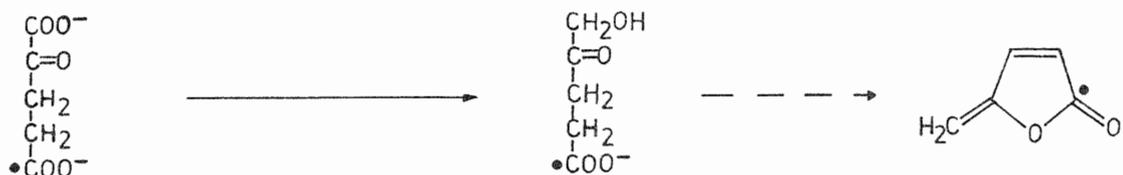
Diese Möglichkeit käme nach einem negativen Resultat der Glyoxylat-Applikationen in Betracht. Die Applikation von  $[5-^{14}\text{C}]\alpha$ -Ketoglutarat erlaubt es nicht, auf grund des Markierungsmusters im Wirkstoff zwischen Hypothese 1 und Hypothese 2 zu unterscheiden. Eine zu synthetisierende 4,5-Dioxo $[1-^{14}\text{C}]$ valeriansäure sollte die Position 1 des Protoanemonins markieren.

Hypothese 3: Die 5-Hydroxylävulinsäure entsteht durch oxidative Transaminierung von 5-Aminolävulinsäure zu 4,5-Dioxovaleriansäure und anschließende Reduktion.



5-Amino $[4-^{14}\text{C}]$ lävulinsäure muß das C-Atom 4 des Protoanemonins markieren. Besteht in der Pflanze ein reversibles Gleichgewicht zwischen der 5-Aminolävulinsäure und dem  $\alpha$ -Ketoglutarat, so ist dieser Reaktionsmechanismus praktisch identisch mit Hypothese 2 (Verzweigung des Biosyntheseweges). Markierte 4,5-Dioxovaleriansäure sollte wie dort eingebaut werden. Bei einer Biogenese der 5-Aminolävulinsäure über den Succinat-Glycin-Cyclus sollte nur das  $\alpha$ -Aminoketon einen deutlichen Einbau ergeben.

Hypothese 4: Die 5-Hydroxylävulinsäure entsteht durch eine direkte, einstufige Reduktion des  $\alpha$ -Ketoglutarats.



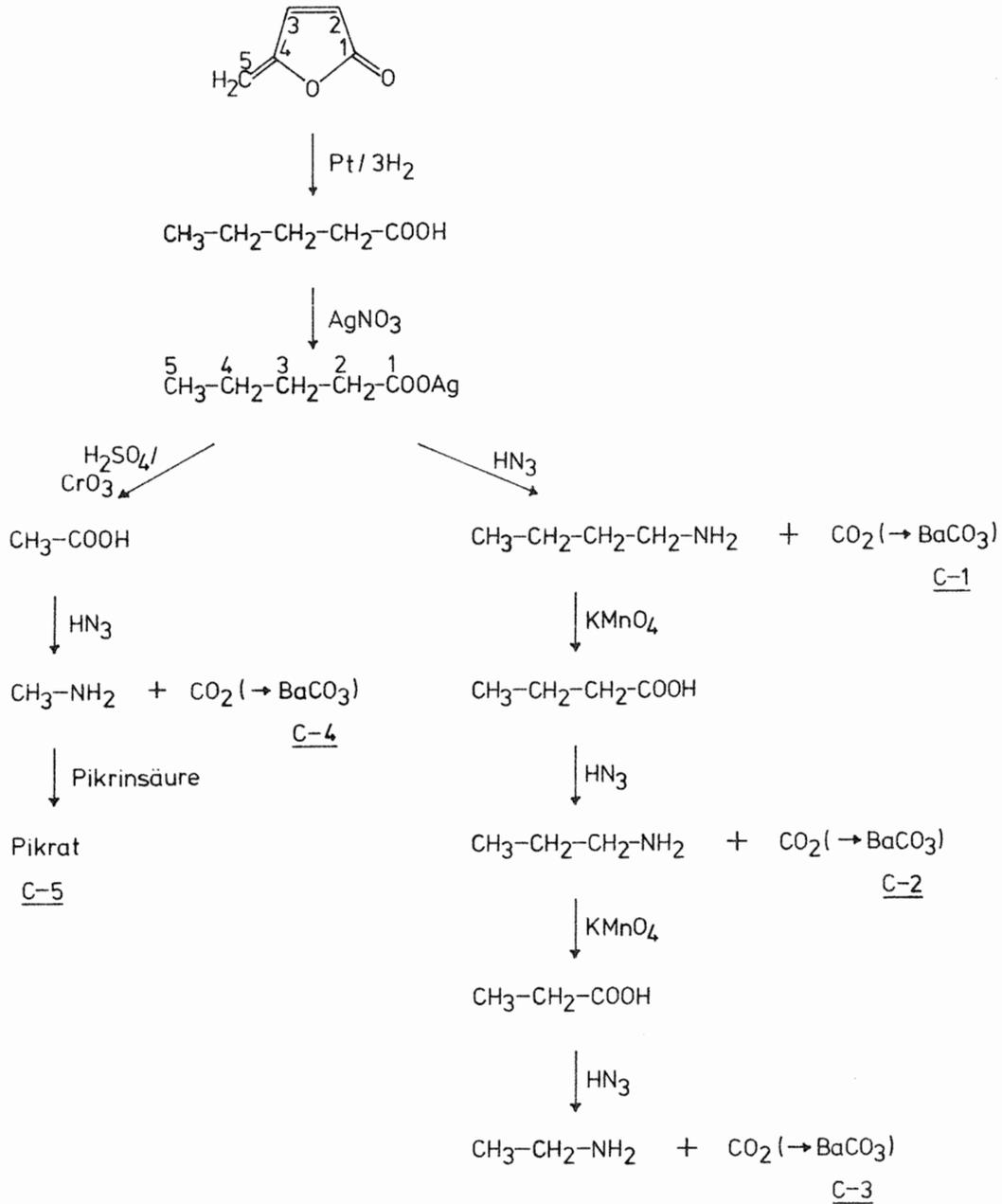
Die Möglichkeit käme in Betracht, wenn zwar [5-<sup>14</sup>C] $\alpha$ -Ketoglutarat eingebaut würde, die Applikation von 4,5-Dioxo-[1-<sup>14</sup>C]valeriansäure und von 5-Amino[4-<sup>14</sup>C]lävulinsäure jedoch einen Nichteinbau ergäbe. Die 4,5-Dioxovaleriansäure würde in diesem Fall durch eine enzymgebundene Zwischenstufe mit entsprechender Oxidationsstufe ersetzt.

Da das Protoanemonin keinen Verzweigungskohlenstoff besitzt, ist es im Gegensatz zum  $\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -butyrolacton (15) nicht als Hemiterpen im Sinne der Isoprenregel von Ruzicka aufzufassen. Entsprechende biologische Vorstufen (z.B. Mevalonat) wurden den Pflanzen daher nicht angeboten.

### 3.5. Protoanemoninabbau

Das aus der Pflanze erhaltene Protoanemonin mußte wegen seiner unangenehmen Eigenschaften direkt nach der Isolierung in eine reaktionsträge Form übergeführt werden. Hierfür bot sich die von Kipping<sup>78)</sup> beschriebene katalytische Hydrierung mit Platindioxid (Adams Katalysator) an. Im Verlauf der Reaktion wurden drei Mole Wasserstoff unter Bildung von n-Valeriansäure aufgenommen.  $\gamma$ -Valerolacton entstand nur in geringen Mengen als Nebenprodukt. Die Säure wurde als Silbersalz ausgefällt und bis zur konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert. Ein Teil hiervon wurde dem Schmidt-Abbau unterworfen. Oxidation des entstandenen Amins mit Kaliumpermanganat zur Säure

und erneuter Schmidt-Abbau lieferte C-Atom 2 usw. bis C-Atom 3 des Antibiotikums in Form von Bariumcarbonat:



Es mußte aber beachtet werden, daß infolge einer Überoxidation der Amine unter Umständen kürzere Bruchstücke entstehen konnten<sup>79,80,81</sup>). Zur Überprüfung wurde daher jeweils ein kleiner Teil der Säure in den p-Bromphenacyl-ester übergeführt und mit Vergleichssubstanz chromato-

graphiert. Bei Anwesenheit mehrerer Oxidationsprodukte wurde eine Trennung an angefeuchtetem Kieselgel durchgeführt. Der andere Teil des Silbersalzes wurde mit dem Säuregemisch nach Kuhn-Roth bis zur Essigsäure durchoxidiert und diese dann dem Schmidt-Abbau unterworfen. Das entstandene Methylamin wurde in eine Pikrinsäurelösung geleitet und in Form des Pikrates auf seine Radioaktivität hin untersucht. Die Auszählung der Barium[ $^{14}\text{C}$ ]carbonat-Präparate erfolgte nach der von Frohofer<sup>82)</sup> entwickelten Methode. Sie ergab gute Zählausbeuten.

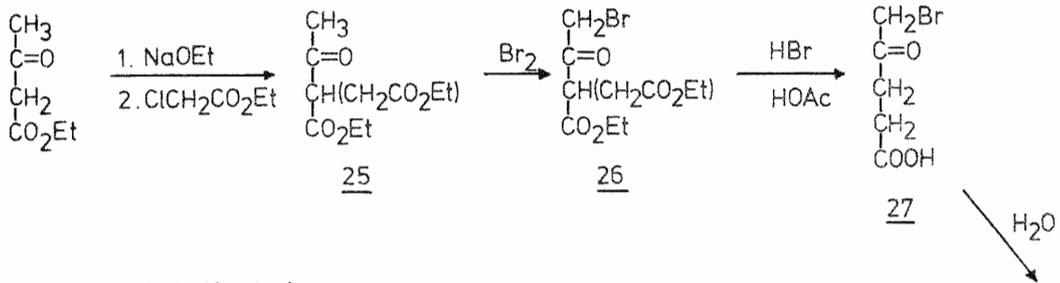
### 3.6. Synthesen

Von den insgesamt neun angebotenen Precursoren wurden vier<sup>\*)</sup> synthetisiert; die übrigen wurden von The Radiochemical Centre, Amersham Buchler, käuflich erworben:

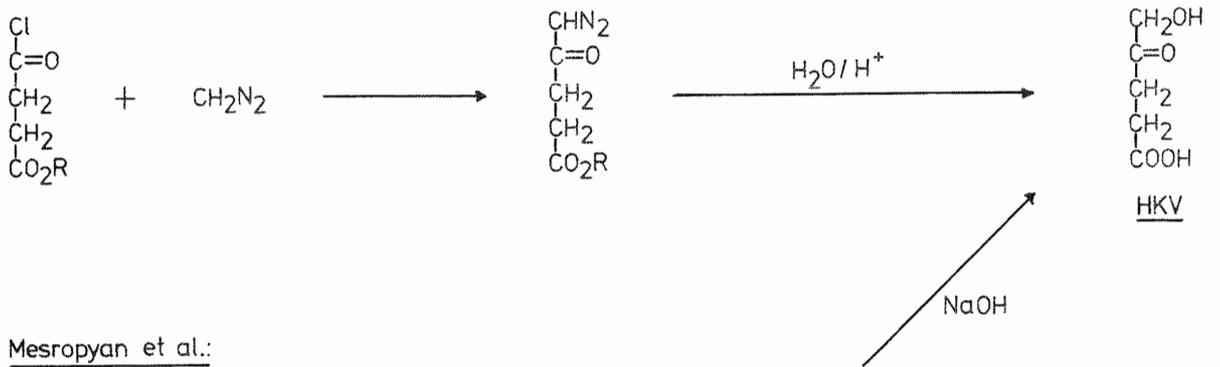
1. 5-Amino[4- $^{14}\text{C}$ ]lävulinsäurehydrochlorid, 58 mCi/mmol
2. Natrium-5-benzyloxy[1- $^{14}\text{C}$ ]lävulinat<sup>\*)</sup>, 4.85 mCi/mmol
3. [1,5- $^{14}\text{C}$ ]Citronensäuremonohydrat, 20 mCi/mmol
4. 4,5-Dioxo[1- $^{14}\text{C}$ ]valeriansäure<sup>\*)</sup>, 3.9 mCi/mmol
5. Natrium[1- $^{14}\text{C}$ ]glyoxylat, 10.9 mCi/mmol
6. Natrium[2- $^{14}\text{C}$ ]glyoxylat, 2.5 mCi/mmol
7. 5-Hydroxy[1- $^{14}\text{C}$ ]lävulinsäure<sup>\*)</sup>, 4.2 mCi/mmol
8. 5-Hydroxy[4- $^{14}\text{C}$ ]lävulinsäure<sup>\*)</sup>, 5.3 mCi/mmol
9. Natrium- $\alpha$ -keto[5- $^{14}\text{C}$ ]glutarat, 20.2 mCi/mmol.

Obgleich in der Literatur mehrere Darstellungsmöglichkeiten für die 5-Hydroxylävulinsäure beschrieben worden sind, eignet sich kaum eine von ihnen für eine Markierungssynthese. Entweder hätten nach Lartillot<sup>83)</sup> mit dem aktiven Material Reaktionsschritte geringer Ausbeute durchgeführt werden müssen oder die Synthese startete mit einem komplizierten  $\text{C}_5$ -Gerüst (Mesropyan et al.<sup>84)</sup>). Eine Markierung mit radioaktivem Diazomethan (Rappe<sup>85)</sup>, Auterhoff et al.<sup>86)</sup>) kam wegen der Instabilität der Substanz nicht in Betracht:

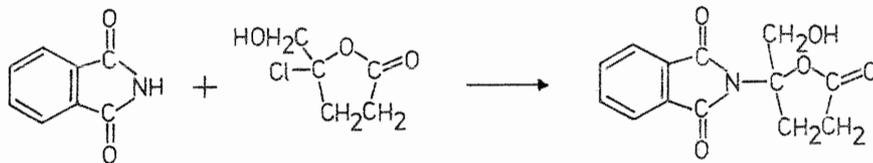
Lartillot et al.:



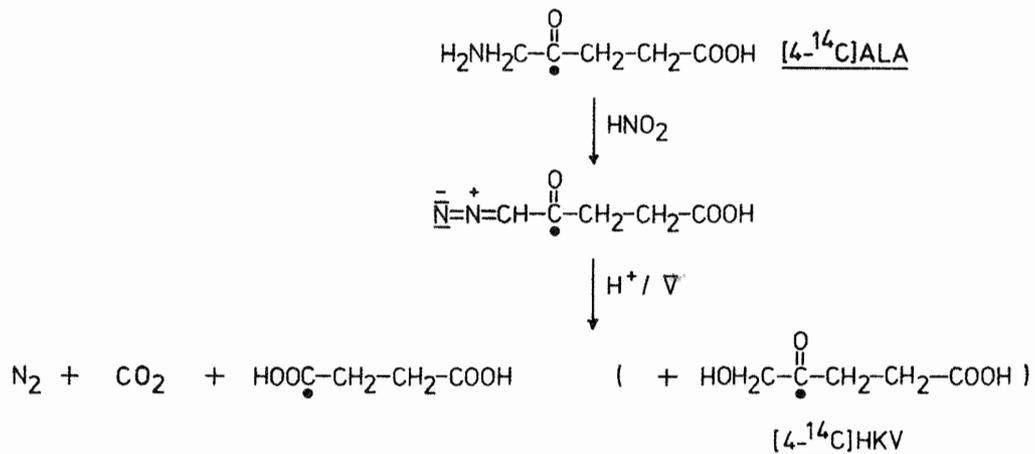
Rappe, Auterhoff et al.:



Mesropyan et al.:

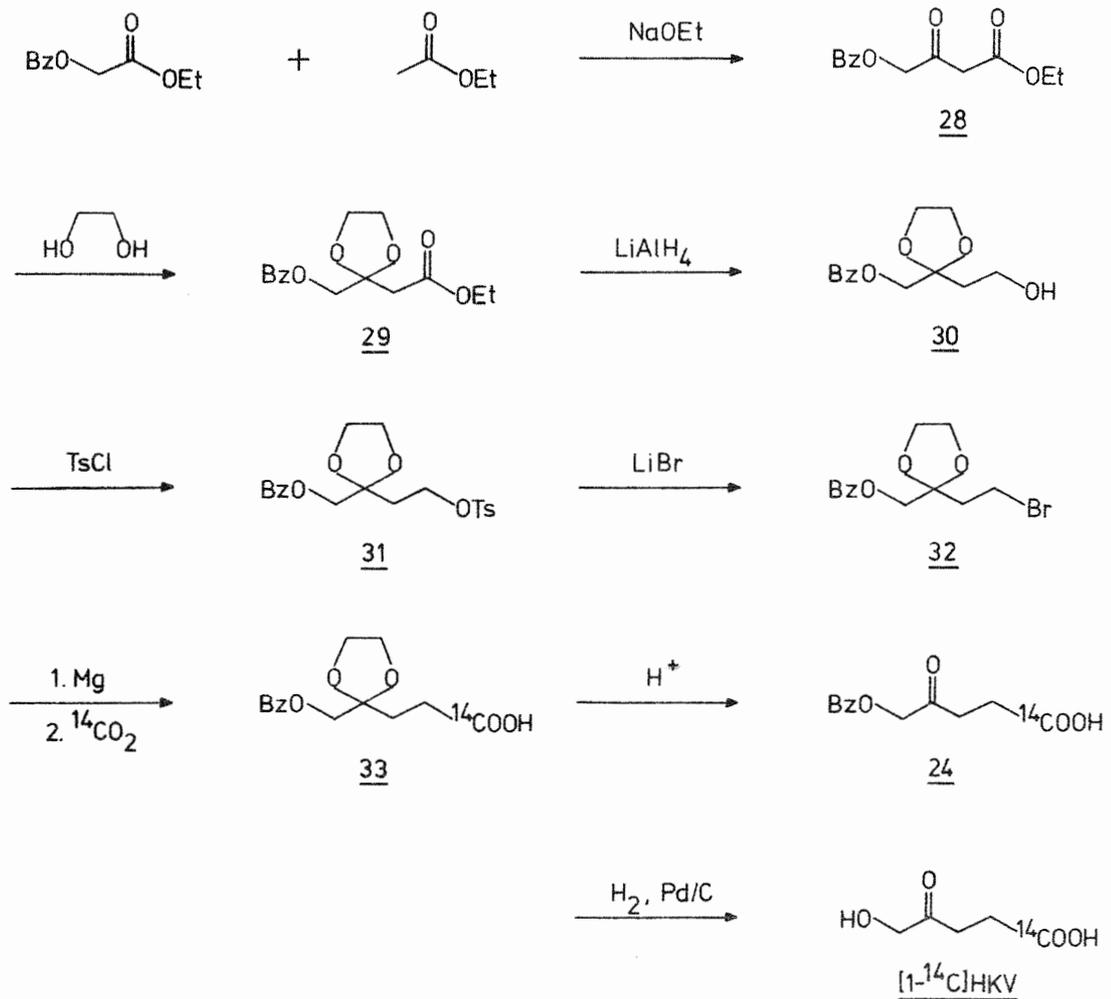


Im Rahmen der Untersuchungen zur  $\alpha$ -Ketoglutarat:Glyoxylat-Carboligase-Reaktion synthetisierten Schlossberg et al.<sup>66)</sup> die Säure durch Diazotierung von 5-Aminolävulinsäure und Hydrolyse des entstandenen Diazoketons:





Die nachstehende Abbildung zeigt, über welchen Syntheseweg das für die Grignard-Reaktion geeignete, noch nicht beschriebene 1-Benzyloxy-4-brom-2-butanon-ethylenacetal (32) erhalten wurde:



Der Aufbau des C<sub>4</sub>-Grundkörpers mit benzylgeschützter α-Ketolgruppe erfolgte durch eine gemischte Esterkondensation. Bei geeigneten Reaktionsbedingungen<sup>89)</sup> betrug die Ausbeute an 4-Benzyloxyacetessigester (28) etwa 45%. Die nachfolgenden Umsetzungen (Acetalisierung, Reduktion, Tosylierung, Finkel'stejn-Austausch) wurden nach den üblichen Methoden durchgeführt. Das 4-Benzyloxyacetessigester-ethylenacetal (29) wurde wie auch 28 destillativ gereinigt, wohingegen die Verbindungen 30 und 31 als

Rohprodukte weiterverwendet wurden. Die Gesamtausbeute von 32 bezogen auf den  $\beta$ -Ketoester 28 lag bei 34%. Versuche, das Bromid 32 durch fraktionierte Destillation im Hochvakuum rein zu erhalten, waren nicht erfolgreich, da ein Teil der Verunreinigungen azeotrop mit 32 überdestillierte. Die Substanz wurde daher vor jedem Einsatz in der Grignard-Reaktion mittels präparativer Schichtchromatographie gesäubert. Das  $\alpha$ -Benzyloxy-ethylenacetal (33) erwies sich als relativ stabil; erst durch einstündiges Refluxieren mit Dioxan/verd. Salzsäure wurde die Schutzgruppe abgespalten. Ein Teil der entstandenen 5-Benzyloxy [ $1-^{14}\text{C}$ ]lävulinsäure (24) wurde in Form des wasserlöslichen Natriumsalzes appliziert, der andere Teil lieferte nach hydrolytischer Debenzylierung die gewünschte 5-Hydroxy [ $1-^{14}\text{C}$ ]lävulinsäure in einer radiochemischen Gesamtausbeute von etwa 10% bezogen auf Barium [ $^{14}\text{C}$ ]carbonat.

Die Derivatisierung der [ $1-^{14}\text{C}$ ]HKV wie auch der [ $4-^{14}\text{C}$ ]HKV erfolgte als p-Bromphenacylester. Beide Substanzen ergaben beim gleichen  $R_F$ -Wert einen Peak im Radiochromatogramm.

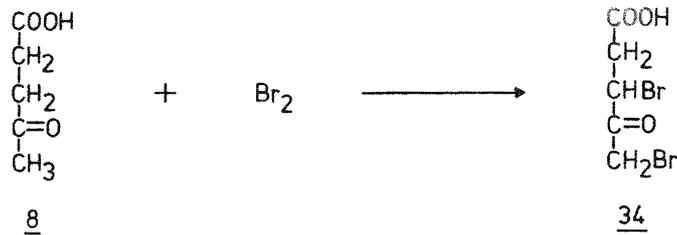
Die bisher in der Literatur beschriebenen Synthesen von 4,5-Dioxovaleriansäure (s.S. 39) waren ebenfalls für eine  $^{14}\text{C}$ -Markierung weniger geeignet. In zwei Fällen wäre zuerst eine Markierung der Lävulinsäure (8) erforderlich gewesen. Nach Wolff<sup>90,91</sup>) hätte diese dann am C-Atom 5 in etwas unübersichtlicher Weise funktionalisiert werden müssen (bei der Reaktion entsteht auch viel Diacetyl). Bei inaktiven Vorversuchen gestaltete sich die Aufarbeitung des über die 3,5-Dibromlävulinsäure (34) erhaltenen Produktes als problematisch.

Die Einführung der Aldehydfunktion im Sinne der Kröhnke-Reaktion über das Nitron 36, wie sie von Heilmeyer<sup>71</sup>) und

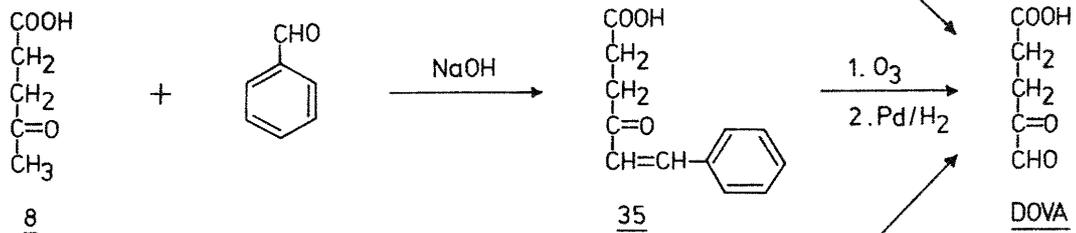
Beale et al.<sup>77)</sup> durchgeführt worden ist, hätte <sup>14</sup>C-markierte 5-Bromlävulinsäure (27) erfordert. Diese ist jedoch, wie bereits bei der Diskussion der HKV-Synthesen dargelegt (s.S. 35), nach der Methode von Lartillot et al.<sup>83)</sup> nur in mäßigen Ausbeuten erhältlich.

Die schonende Synthese nach Kissel et al.<sup>72)</sup> über 5-Benzylidenlävulinsäure (35) als Zwischenprodukt hätte beim Einsatz markierter Lävulinsäure zur Darstellung der markierten DOVA dienen können:

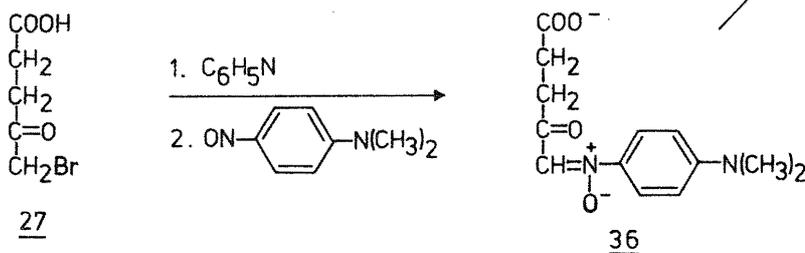
Wolff :



Kissel u. Heilmeyer :

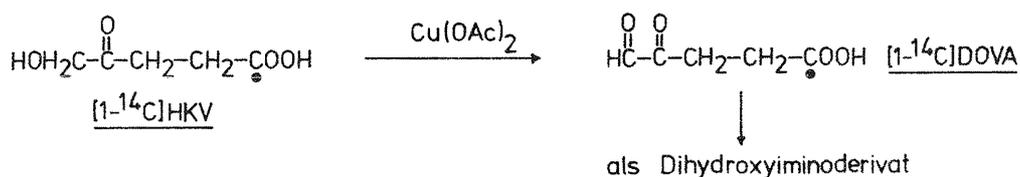


Heilmeyer , Beale et al. :



Da aber genügend 5-Hydroxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure von der auf Seite 37 beschriebenen Synthese vorhanden war, wurde zunächst

mit inaktiver Substanz versucht, durch vorsichtige Oxidation die  $\alpha$ -Keto-Gruppe in eine Glyoxalgruppe zu überführen. Dies gelang nach der Zinckeschen Methode<sup>92,93,94)</sup> mit gepulvertem Kupfer-II-acetat in einer Schutzgasatmosphäre. Die nicht kristallisierende, im tiefgefrorenen Zustand glasartige 4,5-Dioxovaleriansäure wurde als 4,5-Dihydroxyiminovaleriansäure<sup>71)</sup> derivatisiert:



Wegen ihrer großen Reaktivität mußte die Säure direkt nach der chromatographischen Reindarstellung der entsprechenden Verwendung zugeführt werden. Radiodünnschichtscanning des aktiven Materials zeigte, daß sich die Verbindung vor allem in wässriger Lösung schnell zersetzte.

### 3.7. Methoden

#### 3.7.1. Allgemeines

Zur vollständigen Aufklärung eines Biosyntheseweges sind bekanntlich viele aufeinander aufbauende Untersuchungen erforderlich. Ein wichtiger erster Schritt, um einen Einblick in natürliche Prozesse zu erhalten, ist die chemische Analyse. Sie erlaubt es, auf Grund der Isolierung strukturverwandter Inhaltsstoffe aus der gleichen Spezies oft erste Hinweise auf bestehende Zusammenhänge zu bekommen<sup>95)</sup>. Da höhere Pflanzen im Vergleich zu Mikroorganismen z.B. relativ langsam wachsen, ist es hier auch möglich, die während einzelner Entwicklungsstadien auftretenden Substanzen zu untersuchen ("sequential analysis")<sup>96)</sup>.

Fast alle Isolierungsmethoden stellen, besonders natürlich

wenn aggressive Chemikalien verwendet werden, starke Eingriffe dar, so daß mit der Bildung von Artefakten gerechnet werden muß. Eine weitere Begrenzung tritt dadurch auf, daß viele in Fließgleichgewichten vorkommende Intermediärverbindungen wegen ihrer zu geringen Konzentration nicht nachweisbar sind. Bei den Precursor-Isolierungsmethoden ("isotope trapping") wird versucht, durch Zugabe von isotopenmarkiertem Substrat und unmarkiertem Produkt das Gleichgewicht so zu beeinflussen, daß sich die vermutete Intermediärverbindung anhäuft und auf grund der Markierung nachweisbar wird. Nachteilig an der Methode ist, daß mit ihr nur langsame Reaktionen untersucht werden können, auf Substanzen des Primärstoffwechsels ist sie nicht anwendbar, und daß durch die hohe Produktkonzentration kompetitive oder feedback-Hemmung eintreten kann.

### 3.7.2. Tracertechnik

Die Umgehung der genannten Schwierigkeiten wird mit der Tracertechnik erreicht. Sie erlaubt es, den intakten Organismus "in vivo" zu untersuchen, ohne gleichzeitig eine zu große Beeinflussung auf ihn auszuüben. Eine isotopenmarkierte Intermediärverbindung (Precursor) hinterläßt im Organismus eine Spur ("trace"), die mit chemischen und physikalischen Methoden analysiert wird. Voraussetzung hierfür ist die Annahme, daß markierte und nicht markierte Substanz für den Organismus ununterscheidbar sind. Sowohl radioaktive als auch stabile Isotope finden Anwendung in der Tracertechnik. Einige für biochemische Untersuchungen wichtige Nuklide sind:

radioaktive Isotope (Halbwertszeit):  $^3\text{H}$  (12.34 a),  $^{14}\text{C}$  (5736 a),  $^{13}\text{N}$  (9.96 m),  $^{32}\text{P}$  (14.3 d),  $^{35}\text{S}$  (87.5 d),

stabile Isotope (Kernspin):  $^2\text{H}$  (1),  $^{12}\text{C}$  (0),  $^{13}\text{C}$  (1/2),  $^{15}\text{N}$  (1/2),  $^{17}\text{O}$  (5/2),  $^{31}\text{P}$  (1/2),  $^{33}\text{S}$  (3/2).

Während bei den Radioisotopen ohne größeren Aufwand nur die Einbaurate bzw. die Isotopenverdünnung festgestellt werden kann, erlaubt es die NMR-Spektroskopie, ohne destruktive Methoden direkt die Konzentrationen und die Lokalisierung der markierten Atome oder Atomgruppen im Endprodukt zu bestimmen. Dies ist besonders bei nicht abbaubaren Verbindungen von Bedeutung.

Wurden anfänglich  $^{13}\text{C}$ -angereicherte Precursor nur durch die Intensitätssteigerung der  $^{13}\text{C}$ -H-Satelliten im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Metaboliten nachgewiesen (nur C-Atome, an die ein H-Atom gebunden war, konnten untersucht werden), so erreichte die Methode der  $^{13}\text{C}$ -Markierung ihren Durchbruch mit der Entwicklung des Puls-Fourier-Transformations-Verfahrens (PFT-NMR). Der hiermit verbundene Empfindlichkeitsgewinn<sup>97)</sup> erlaubt eine routinemäßige Aufnahme von  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren. Eine breite Anwendung fand die Methode seither besonders bei Biogeneseuntersuchungen mit Mikroorganismen<sup>98)</sup>, die im Gegensatz zu höheren Pflanzen oft hohe Inkorporationsraten ergeben. Durch kombinierte Anwendung von  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -angereicherten Kohlenstoffquellen soll es möglich sein, Isotopenverdünnungen bis zu 1:1000 zu erfassen<sup>99)</sup>.

Bei den in Pflanzen meist auftretenden geringen Einbau-raten (und geringen Substanzmengen) werden die Radioisotope bevorzugt eingesetzt, auch wenn hier, um eine Lokalisierung der Markierung festzulegen, oft viel Zeit für einen Abbau aufgewendet werden muß. Bei Biosyntheseuntersuchungen komplizierterer sekundärer Metabolite, wie z.B. Steroiden ist kaum mit einem vollständigen Abbau im Organismus zu rechnen<sup>100)</sup>, so daß durch Normierung der Einbau-raten (Koapplikationen) auch ohne Abbau des Metaboliten verlässliche Aussagen zu einer biogenetischen Reihenfolge gemacht werden können.

### 3.7.3. Anwendungsmöglichkeiten

Die Zugabe eines Precursors zu einem Enzymsystem kann

- a) am intakten Organismus, Organ oder Gewebeteil (in vivo)
  - b) an Zellkulturen
  - c) an zellfreien Extrakten (in vitro)
- erfolgen.

Die in vivo-Methode besitzt nach wie vor große Aussagekraft, auch wenn sie durch Permeabilitäts- und Transportprobleme limitiert ist. Das Substrat wird meist in wässriger Lösung in bestimmte Pflanzenorgane injiziert oder gelangt durch die Wurzeln oder den geschnittenen Stengel (Aufsaugmethode) in den Saftstrom<sup>101,102</sup>). Es kann auch mittels eines durchgezogenen Baumwolldochtes hierhin gelangen (Dochtmethode). Die Absorption aufgesprühter, wasserunlöslicher Tracerlösungen durch die Blätter ist ebenfalls mit Erfolg angewendet worden<sup>103</sup>).

Die Zellkulturtechnik macht von der Möglichkeit Gebrauch, daß das Pflanzengewebe unter günstigen Bedingungen wie Mikroorganismen in Kultur zu bringen ist<sup>104</sup>). Jede einzelne Zelle besitzt ähnlich einer befruchteten Eizelle die Fähigkeit, einen differenzierten Organismus zu bilden (Totipotenz). Als Vorteile einer Zellsuspensionskultur sind u.a. die höhere Stoffwechselaktivität, das einheitliche Entwicklungsstadium der Zellen sowie die Möglichkeit, auxotrophe Mutanten erzeugen zu können, anzuführen. Nachteilig ist jedoch, daß Ergebnisse von Experimenten mit Zellkulturen z.T. im Widerspruch zu denen der in vivo-Methoden stehen<sup>105</sup>).

Bei den in letzter Zeit häufig benutzten zellfreien Extrakten entfallen Permeabilitätsbarrieren. Ein ungelöstes Problem ist hier aber die Enzyminaktivierung durch Komplexierung mit im Extrakt enthaltenen Chinonen<sup>95</sup>).

Am Schluß der vollständigen Aufklärung eines Biosyntheseweges steht die Reinigung der beteiligten Enzyme und die detaillierte Studie des Reaktionsmechanismus mit Hilfe spezifisch markierter Substrate.

Grundsätzlich muß bei den Precursor-Applikationsmethoden beachtet werden, daß durch die Veränderung der natürlichen Konzentration eines Metaboliten unnatürliche Biosynthesewege entstehen können (kompetitive Hemmung, feedback-Hemmung). Robinson<sup>106)</sup> wies darauf hin, daß das einzige echte kohlenstoffhaltige Substrat der grünen Pflanzen Kohlendioxid zu 0.03% ist.

Sind die beteiligten Enzyme eher funktions- und weniger substratspezifisch, so können Applikationsergebnisse falsch interpretiert werden<sup>107)</sup>. Mikroorganismen, die auf der Pflanze leben und mit ihr um ein Substrat konkurrieren, können ebenfalls falsche Stoffwechselwege vortäuschen.

Trotz der geschilderten Einschränkungen ist die Tracertechnik für die Aufklärung von Biosynthesewegen von größter Bedeutung, was die mit ihr erzielten Erfolge zeigen.

#### 3.7.4. Fehlerbetrachtung, Meßzeitoptimierung

Die in der vorliegenden Arbeit ausgezählten <sup>14</sup>C-β-Aktivitäten wurden mit einem Flüssig-Szintillations-Zähler (FSZ) ermittelt<sup>108)</sup>. Die Hochrechnung der gemessenen Impulsrate cpm (counts per minute) auf die tatsächliche Impulsrate dpm (decays per minute) erfolgte mit Hilfe von Quenchkorrekturkurven, die nach der ESKV-Methode (Extern-Standard-Kanalverhältnis-Methode) aufgenommen wurden. Sie geben in spezifischer Weise die Abhängigkeit der Zählausbeute vom ESKV wieder und wurden mit Proben bekannter Aktivität

aufgestellt. Bei Konstanthaltung gewisser Faktoren (Nuklid, Szintillatorlösung, -volumen, Material des Zählfläschchens) kann der Verlauf einer Quenchkorrekturkurve für eine längere Zeitspanne (Gerätedrift) als konstant angesehen werden und zur Ermittlung der tatsächlichen Impulsrate unbekannter Proben herangezogen werden. Da z.T. kleine Impulsraten erhalten wurden, mußte, um den Meßfehler möglichst klein zu halten, eine gewisse Mindestzählzeit eingehalten werden.

Die den radioaktiven Zerfall begleitenden Impulse bzw. Lichtblitze treten sowohl zeitlich als auch örtlich völlig unregelmäßig auf. Sie unterliegen statistischen Schwankungen, die den Gesetzen der Wahrscheinlichkeitsrechnung gehorchen.

Stellt man mittels vieler Einzelmessungen die Anzahl der Fälle (Häufigkeit), in denen eine bestimmte Impulszahl  $x$  während eines Zeitintervalls beobachtet werden, fest und trägt die Werte in ein Diagramm ein (Abszisse: Impulszahl, Ordinate: Häufigkeit), so erhält man eine Kurve, die sich durch folgende Formel darstellen läßt:

$$P(x) = \frac{m^x}{x!} e^{-m} \quad (\text{Poisson'sche Gleichung})$$

$$\begin{aligned} P(x) &= \text{Häufigkeit einer Impulszahl } x \\ m &= \text{Mittelwert der hinreichend oft in dem} \\ &\quad \text{Zeitintervall gezählten Impulse} \\ x &= \text{Impulszahl} \end{aligned}$$

Die Beziehung gilt besonders für kleine  $m$ -Werte, z.B. Nulleffektmessungen. Je größer aber die durchschnittliche Impulszahl  $m$  ist, um so mehr nähert sich die Poisson-Verteilung einer speziellen Normalverteilung (Gauss'sche Glockenkurve). Sie ist durch zwei Parameter gegeben: den Mittelwert  $m$  und die Varianz  $\sigma^2$ .

$$dP = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-(x-m)^2/2\sigma^2} dx$$

Der Wert  $\sigma$  gibt die Standardabweichung (mittlere statistische Schwankung) an, die die Breite der Verteilungsfunktion beschreibt und somit ein Maß für die Genauigkeit des Meßverfahrens darstellt. Aus der Wahrscheinlichkeitsrechnung ergibt sich, daß mit 68.3%iger Wahrscheinlichkeit der beobachtete Meßwert im Intervall  $(m-1.00\sigma, m+1.00\sigma)$ , mit 95.45% im Intervall  $(m-2.00\sigma, m+2.00\sigma)$  und mit 99.7% im Intervall  $(m-3.00\sigma, m+3.00\sigma)$  zu finden ist.

Die einfache Standardabweichung der Nettozählrate  $\sigma_{\text{rel},N}$  hängt folgendermaßen von der Gesamtzählrate  $G$ , dem Nulleffekt  $B$  und den dazugehörigen Meßzeiten  $t_G$  und  $t_B$  ab:

$$\sigma_{\text{rel},N} = \frac{\sqrt{\frac{G}{t_G} + \frac{B}{t_B}}}{G - B}$$

Durch Multiplikation von  $\sigma_{\text{rel},N}$  mit 2 erhält man die  $2\sigma$ -Standardabweichung (ein zusätzlicher Faktor 100 ergibt die Standardabweichung in Prozent). Dies stellt einen Vertrauensbereich, das sog. Konfidenzintervall ("confidence level"), von 95.45% dar, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 4.55%.

Durch entsprechendes Umformen<sup>108)</sup> obiger Gleichung ergibt sich für die Gesamtmeßzeit  $T = t_G + t_B$ :

$$T = \frac{(G + B)^2}{(\sigma_{\text{rel},N})^2 \cdot (G - B)^2}$$

Die optimale Aufteilung der Gesamtmeßzeit auf Proben- und

Nulleffektmeßzeit wird erreicht, wenn folgendes Verhältnis beachtet wird:

$$\frac{t_G}{t_B} = \sqrt{\frac{G}{B}} \quad t_G = \frac{T}{1 + \sqrt{\frac{B}{G}}} \quad \text{bzw.} \quad t_B = \frac{T}{1 + \sqrt{\frac{G}{B}}} .$$

Bei tiefaktiven Proben, z.B.  $G=100$  dpm und  $B=20$  dpm wird eine Gesamtmeßzeit  $T$  von 81.81 Minuten benötigt, wenn der Meßfehler innerhalb der  $2\sigma$ -Standardabweichung ( $\sigma_{\text{rel},N} = 0.02$ ) liegen soll. Optimal aufgeteilt ist die Zeit, wenn  $t_G = 56.53$  und  $t_B = 25.28$  Minuten beträgt.

Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Impulsraten wurden mit dem 95.45%-Konfidenzintervall angegeben.

#### 4. EXPERIMENTELLER TEIL

##### 4.1. Allgemeine Angaben

Schmelzpunktbestimmung:	Mikroskop-Heiztisch nach Weygand, Firma Leitz und Heizbank nach Kofler
IR-Spektren:	Perkin-Elmer-Spektrometer 157 G
$^1\text{H}$ -NMR-Spektren:	Varian EM 360 (60 MHz) Bruker WH 90 (90 MHz)
$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren:	Bruker WH 90 (22.63 MHz)
Massenspektren:	MS 9 und MS 30 der A.E.I. (70 eV)
Elementaranalysen:	Perkin-Elmer-Elemental Analyser 240, im mikroanalytischen Labor
Aktivitätsmessung:	Flüssigszintillationszähler BF 8000 der Firma Berthold mit Tischrechner HP 9815 A der Firma Hewlett-Packard
Szintillationslösung:	a) 10 g PPO (2,5-Diphenyloxazol, Merck 2946), 0.5 g POPOP (1,4-bis- 2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol, Merck 7249) und 50 g Naphthalin in einem Gemisch von 830 ml Dioxan und 170 ml Ethylenglykolmonomethyl- ether b) Aqua-Luma der Firma Baker Volumina der Probenlösungen: 4 ml (mini vials), außer bei den $\text{CO}_2$ -Bestimmungen nach Frohofer <sup>82)</sup> (15 ml) und bei farbigen Proben (10 ml)
Radiogramme:	Dünnschichtscanner LB 2720 der Firma Berthold in Kombination mit dem Methandurchflußzähler FH 524 der Firma Frieseke&Höpfner, sowie

DC-Scanner LB 2723 und LB 2760  
mit angeschlossener Amplifier-High-  
Voltage-Einheit BF 2301 und  
Ratemeter-Integrator BF 2305 der  
Firma Berthold.

Chromatographie:

a) Die Dünnschichtchromatographie wurde nach Tschesche<sup>109)</sup> oder mit DC-Plastikfolien 0.2 mm Kieselgel der Firma Schleicher&Schüll, Laufstrecke 10 cm, durchgeführt. Die angegebenen  $R_F$ -Werte beziehen sich auf letztere. Für die Aufnahme von Radiogrammen wurden die Plastikfolien mit Tesafilm auf Glasplatten befestigt und in der Regel mit 60 mm/h (Dämpfung 50 s), Schlitzbreite 1 x 20 mm, vermessen. Die Lokalisierung erfolgte außerdem mit authentischer Vergleichssubstanz im UV-Licht oder durch Ansprühen mit konz. Schwefelsäure und anschließendes Erhitzen auf 140°C. Hiermit nicht anfärbbare Carbonsäuren, z.B. Bernsteinsäure, wurden durch Besprühen mit 0.04%iger ethanolischer Bromphenolblaulösung (pH 8)<sup>73)</sup> und Erhitzen oder durch Stehenlassen in der Jodkammer sichtbar gemacht.

b) Zur präparativen Schichtchromatographie wurden 100 g Kieselgel 60 PF<sub>254</sub> oder 60 PF<sub>254+366</sub> (Merck) in 280 ml destilliertem Wasser aufgeschlämmt und auf vier Glasplatten der Größe 20 x 20 cm gleichmäßig verteilt. Nach Trocknen an der Luft (ca. 2 Tage) wurde mit Methanol entwickelt und eine Stunde bei 120°C aktiviert. Sichtbarmachung wurde meist durch UV-Beleuchtung erreicht, bei aktiven Substanzen durch DC-Scanning. Die radioaktiven Zonen wurden mittels eines speziellen Laborstaubsaugers direkt in die Extraktionshülse befördert. Die Isolierung erfolgte durch Elution mit ca. 500 ml eines geeigneten Lösungsmittels (i.a. Methylenchlorid, System J<sub>2</sub> oder Methanol) und mehrfache Filtration durch Watte/Kieselgur.

c) Als Trägermaterialien für die Säulenchromatographie wurde Munktell's Cellulose Pulver, Kieselgel der Firma Woelm (Korngröße 0.063-0.1 mm), Sephadex G 10 der Firma Pharmacia und das Anionenaustauscherharz Dowex 1 X 1 (50-100 mesh) der Firma Roth verwendet.

Laufmittelsysteme:

System A :	Butanol/Eisessig/Wasser (12:3:5)
System B :	Cyclohexan/Essigester (1:1)
System C :	Cyclohexan/Essigester (2:3)
System D :	Cyclohexan/Essigester (85:15)
System E :	Benzol/Dioxan/Eisessig (90:25:4)
System F :	Chloroform/Ethanol (93:7)
System G :	Methylenchlorid/Aceton (100:1)
System H :	Benzol/Aceton (8:2)
System J <sub>1</sub> :	Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:10) (untere Phase)
System J <sub>2</sub> :	Chloroform/Methanol/Wasser (65:35:10) (untere Phase)
System K :	Chloroform/Aceton (8:2)
System L :	Essigester/Pyridin/Wasser (360:100:115) (obere Phase)
System P :	Petrolether/Methylenchlorid/i-Propanol (90:5:5)

Abkürzungen:

DC	:	Dünnschichtchromatographie
ER	:	Einbaurate
Frgw.	:	Frischgewicht
Glc	:	Glucose
PSC	:	präparative Schichtchromatographie
SC	:	Säulenchromatographie
Rot.V.	:	Rotationsverdampfer
RT	:	Raumtemperatur

## 4.2. Synthetische Arbeiten

### 4.2.1. Synthesen von Ausgangs- und Vergleichssubstanzen

In der Literatur nicht beschriebene physikalische oder spektroskopische Daten werden bei der jeweiligen Verbindung angeführt.

#### 5-Hydroxylävulinsäure (HKV, 7)

a) Synthese nach Lartillot und Baron<sup>83)</sup>, Formelschema S. 35

2-Acetylbernsteinsäurediethylester (25)<sup>110)</sup>

durch Kondensation von Acetessigsäureethylester und Chloressigsäureethylester mit Natriummethylat

$\beta$ -Bromacetylbernsteinsäurediethylester, Rohprodukt (26)<sup>111)</sup>  
durch Bromierung von 25

5-Bromlävulinsäure (27)<sup>83)</sup>

durch Stehenlassen von 26 mit einem 1/1-Gemisch von Bromwasserstoffsäure/Eisessig

5-Hydroxylävulinsäure (7)<sup>85,112)</sup>

durch Erhitzen von 27 mit Wasser

b) Synthese nach Schlossberg et al.<sup>66)</sup>, Formelschema S. 35

5-Hydroxylävulinsäure (7)

durch Diazotierung von 5-Aminolävulinsäure (ALA) und Ver-  
kochen des entstandenen Diazoketons mit Wasser

Daten der 5-Hydroxylävulinsäure (7):

Fp.: 101°C; R<sub>F</sub>-Werte (J<sub>1</sub>): 0.25 und (A): 0.67

IR (KBr): 3430, 3380 (s,  $\nu_{\text{OH}}$ ); 3020 (m, breit,  $\nu_{\text{OH-intram.}}$ );  
2930 (m,  $\nu_{\text{CH}}$ ); 1725, 1690 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1450, 1430 (m,  $\delta_{\text{CH}}$ );  
1405 (s,  $\delta_{\text{OH}}$ ); 1315 (s,  $\nu_{\text{C-OH}}$ ); 1225, 1210 (m); 1155 (w);  
1125 (m); 1090 (s); 1010 (s); 930 (m); 740 (w); 640 (s) cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (90 MHz, [D<sub>6</sub>]Aceton/TMS):  $\delta$ =2.70 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-2,3),  
4.28 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-5), 5-7 (breit, 2H, OH und COOH).

$^{13}\text{C}$ -NMR (22.63 MHz,  $^{12}\text{CD}_3\text{OD}$  mit wenig  $\text{D}_2\text{O}/\text{TMS}$ ):  $\delta=212.0$  (C-4), 177.15 (C-1), 68.4 (C-5), 33.7 (C-2), 28.4 (C-3).

5-Hydroxylävulinsäure-p-bromphenacylester<sup>nach 113)</sup>

durch Reaktion von Natrium-5-hydroxylävulinat mit p-Bromphenacylbromid

Fp.:  $102^\circ\text{C}$ ,  $R_F$ -Werte (C): 0.35 und (K): 0.42

IR (KBr): 3480 (m,  $\nu_{\text{OH}}$ ); 3000, 2960, 2930 (w,  $\nu_{\text{CH}}$ ); 1735 (m,  $\nu_{\text{C=O, Ester}}$ ); 1700 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1580, 1570 (m,  $\nu_{\text{C=C}}$ ); 1425 (m,  $\delta_{\text{CH}_2}$ ); 1370, 1320 (m,  $\delta_{\text{OH}}$ ); 1280 (w); 1240, 1230 (m); 1190, 1180 (s); 1130 (w); 1100, 1070, 1010 (m); 820 (m,  $\chi_{\text{CH-p-disubst.}}$ ); 755, 725, 650 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$ -NMR (90 MHz,  $[\text{D}_6]\text{Aceton}/\text{TMS}$ ):  $\delta=2.80$  (m, 4H,  $\text{CH}_2$ -2,3), 4.24 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 5.19 (s, 2H, Ester- $\text{CH}_2$ ), 7.76 ("d", 2H, m-Protonen), 7.94 ("d", 2H, o-Protonen) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (22.63 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):  $\delta=207.9$  (C-4), 191.1 (C-1'), 171.8 (C-1), aromatische C-Atome: 132.8 (C-1), 132.4 (2 C-3), 129.3 (2 C-2 und C-4), aliphatische C-Atome: 68.2 (C-5), 66.1 (Ester-C), 39.9 (C-2), 27.5 (C-3).

5-Hydroxylävulinsäure-2,4-dinitrophenylosazon<sup>66)</sup>

durch Reaktion von 7 mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

5-Benzyloxylävulinsäure (24)<sup>88)</sup>, Formelschema S. 36

durch Reaktion von 27 mit Natriumbenzylat

Fp.:  $75^\circ\text{C}$ ,  $R_F$ -Werte (P): 0.26 und ( $J_1$ ): 0.71

IR (KBr): 3000 (m, breit,  $\nu_{\text{OH}}$ ); 3070, 3040, 3030 (m,  $\nu_{\text{Aryl-CH}}$ ); 2930, 2880 (m,  $\nu_{\text{CH}}$ ); 1730, 1710 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1500 (w,  $\nu_{\text{C=C}}$ ); 1470, 1450 (w); 1420 (m,  $\delta_{\text{CH}_2}$ ); 1390, 1355 (w); 1310 (s,  $\delta_{\text{OH}}$ ); 1220 (m,  $\nu_{\text{CO}}$ ); 1150, 1135 (m); 1100 (s); 990, 965 (w); 920 (m); 750, 740 (m,  $\chi_{\text{CH-monosubst.}}$ ); 645 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$ -NMR (90 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):  $\delta=2.75$  (m, 4H,  $\text{CH}_2$ -2,3), 4.15 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 4.65 (s, 2H, Benzyl- $\text{CH}_2$ ), 7.45 (s, 5H, arom. Protonen), 10.9 (s, 1H, COOH).

Protoanemonin (1), Anemonin (2)

Synthese nach Grundmann<sup>22)</sup>, Formelschema S. 9

$\alpha$ -Angelikalacton (11)<sup>114)</sup>

durch Lactonisierung und Dehydratisierung von Lävulin-  
säure (8) mit Phosphorsäure

3,4-Dibrom- $\gamma$ -valerolacton (12)<sup>21)</sup> (Rohprodukt)

durch Bromierung von 11

Protoanemonin (1)<sup>22)</sup>

durch zweifache Dehydrobromierung von 12 mit Chinolin

Anemonin (2)

durch Stehenlassen des Protoanemonins (1) und Ausfällen des  
Dimeren (2) mit Ethanol und Herauslösen mit heißem Methylen-  
chlorid

Fp.: 151°C, R<sub>F</sub>-Werte (B): 0.43 und (K): 0.72

Eine HPLC-Analyse zeigte, daß es sich bei der Substanz  
um eine einheitliche Verbindung (1,2-trans-Isomeres) handelte.  
Moriarty et al.<sup>15)</sup> führten als Erklärung für die Stereo-  
selektivität der thermischen Cyclodimerisierung die Stabi-  
lisierung des im Übergangszustand auftretenden Diradikals  
(bessere Elektronendelokalisierung) und geringere destabi-  
lisierende Dipol-Dipol-Wechselwirkungen an.

IR (KBr): 3510, 3190 (w); 3110, 3090 (m,  $\nu_{\text{CH}}$ ); 3020, 2980 (w);  
1770 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1600 (m,  $\nu_{\text{C=C}}$ ); 1440, 1335 (w); 1250, 1230  
(m); 1180, 1150 (m); 1140, 1120 (s); 940 (m); 905 (s);  
890, 835, 825 (m); 815 (s); 740 (w); 705 (m) cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (90 MHz, [D<sub>6</sub>]Aceton/TMS):  $\delta$ =2.50 (m, 20 Linien, 4H,  
Cyclobutanringprotonen), 6.19 (d, J=6 Hz, 2H,  $\alpha$ -Protonen),  
8.12 (d, J=6 Hz, 2H,  $\beta$ -Protonen).

<sup>13</sup>C-NMR (22.63 MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$ =171.0 (Lacton-C), 153.5  
( $\beta$ -C), 121.15 ( $\alpha$ -C), 90.4 (substituierte Cyclobutan-C),  
23.9 (Cyclobutan-CH<sub>2</sub>).

4,5-Dioxovaleriansäure (DOVA)

a) Synthese nach Wolff<sup>91)</sup>, Formelschema S. 39

3,5-Dibromlävulinsäure (34)<sup>90)</sup>

durch Bromierung von Lävulinsäure (8)

4,5-Dioxovaleriansäure

durch Reaktion von 34 mit Wasser

b) Synthese nach Heilmeyer<sup>71,72)</sup>, Formelschema S. 39

5-Benzylidenlävulinsäure (35)<sup>115)</sup>

durch basenkatalysierte Reaktion von Lävulinsäure (8)  
mit Benzaldehyd

4,5-Dioxovaleriansäure<sup>71,72)</sup>

durch Ozonisierung von 35 und reduktive Spaltung des  
Ozonids mit Pd/CaCO<sub>3</sub>/Wasserstoff

c) durch Oxidation der 5-Hydroxylävulinsäure (7) mit  
Kupfer(II)acetat nach Zincke<sup>92, 93, 94)</sup>

Die Säure (DOVA) ist bei Raumtemperatur hellgelb und hoch-  
viskos, bei -20°C glasartig. Sie wurde durch zweifaches  
Auftrennen an Kieselgel mit dem System A gereinigt:

R<sub>F</sub>-Werte (J<sub>1</sub>): 0.32 und (A): 0.86. Die spektroskopischen  
Daten waren in Übereinstimmung mit denen von Heilmeyer<sup>71)</sup>.

4,5-Dihydroxyiminovaleriansäure<sup>71)</sup>

durch Reaktion der 4,5-Dioxovaleriansäure mit Hydroxyl-  
aminhydrochlorid

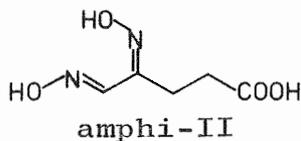
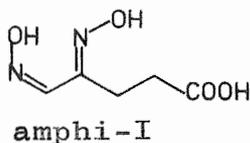
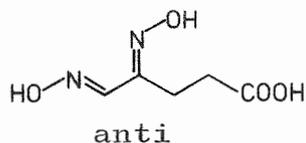
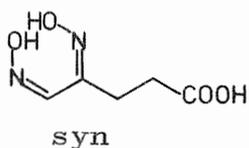
Fp.: 127°C, R<sub>F</sub>-Werte (E): 0.46 und (J<sub>2</sub>): 0.61.

IR (KBr): 3400 (s, breit, ν<sub>OH</sub>); 2940 (s, ν<sub>CH</sub>); 1700 (s, ν<sub>CO</sub>);  
1500 (w); 1440, 1410 (s); 1350, 1310 (w); 1250, C-O);  
1170, 1045, 1025 (w); 950 (s); 855, 810 (w); 740 (m);  
650 (w) cm<sup>-1</sup>.

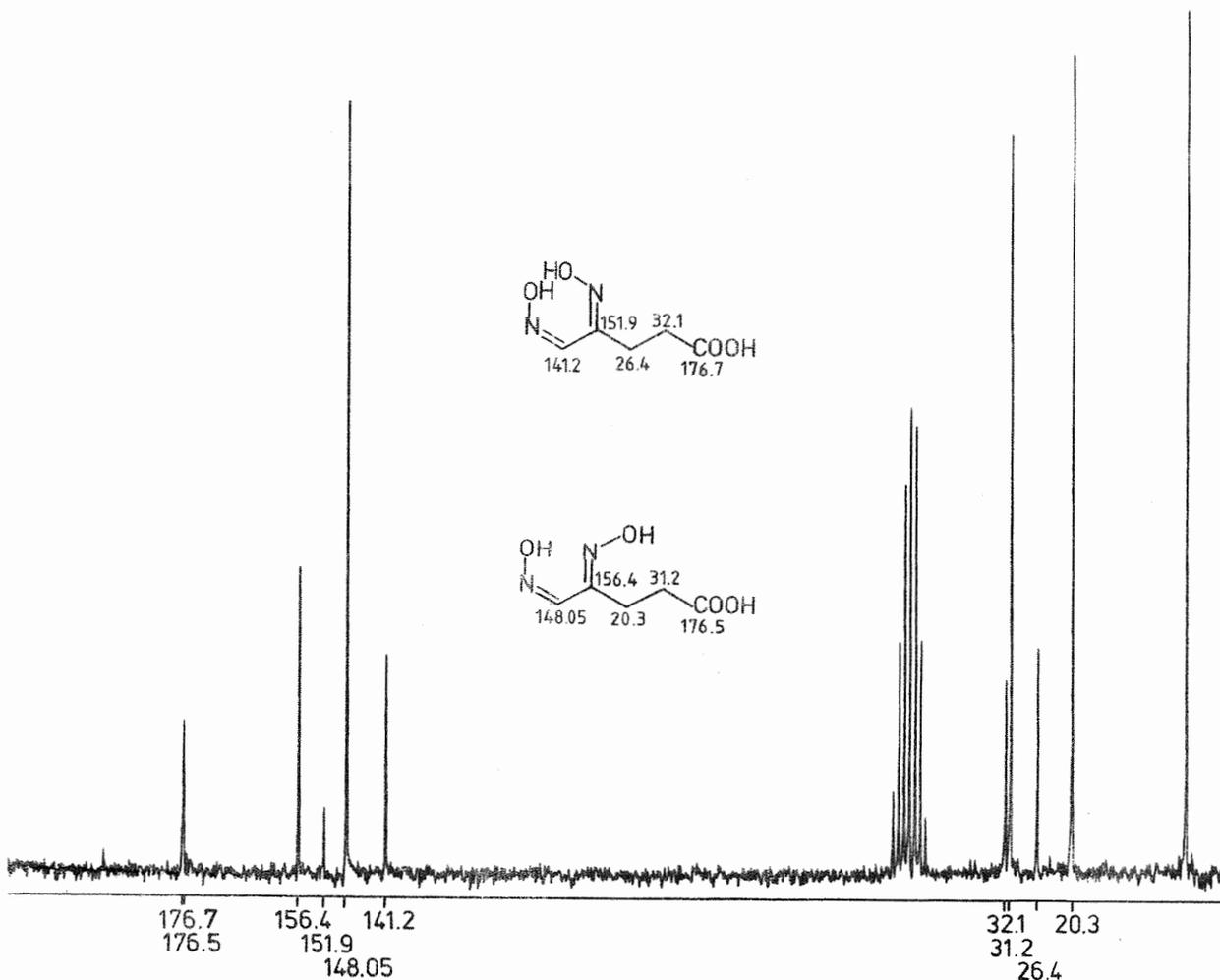
<sup>1</sup>H-NMR (90 MHz, [D<sub>6</sub>]Aceton/TMS): δ=2.71 (m, 31 Linien, 4H,  
CH<sub>2</sub>-2,3), 7.67 (s, CH-5), 8.44 (s, CH-5), 10.58 (s, breit,  
3H, COOH- und NOH-Protonen). Die Signale für das H-5 haben  
ein Intensitätsverhältnis von 4 (7.67):1.

Isomere der 4,5-Dihydroxyiminovaleriansäure

Bereits das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum deutete darauf hin, daß es sich bei dem DOVA-Derivat um ein Gemisch zweier Isomere handelte (zwei Signale für H-5). Bei dem unsymmetrischen Dioxim sind theoretisch vier verschiedene Isomere denkbar:



Die Aufnahme des  $^1\text{H}$ -breitbandenkoppelten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums ergab 10 Signale für die 5 C-Atome mit den Intensitätsverhältnissen 4.39, 4.64, 4.77, 4.50 und 3.15 (überlappend):



Für die Resonanzen bei 141.2 ppm und 148.05 ppm wurden im  $^1\text{H}$ -Off-Resonance-Spektrum Dubletts erhalten, so daß sie den C-Atomen 5 der beiden Isomere zugeordnet werden konnten\*). Die Signale bei 20.3, 26.4, 31.2 und 32.1 ppm ergaben Off-Resonance-Multipletts, die übrigen zeigten keine Aufspaltung. Eine Inkrementabschätzung<sup>116)</sup> für die  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -Gruppierung mit der Ethanverschiebung (5.7 ppm) als Basiswert ergab die beste Übereinstimmung mit den gemessenen Wertepaaren, wenn man das *amphi-I*- und das *syn*-Isomere zugrundelegte und wenn man die Carboxylatinkremente verwendete (die COOH-Inkremente ergaben Verschiebungsdifferenzen  $\delta_{\text{C-2}} - \delta_{\text{C-3}}$ , die um den Wert 2.9 ppm kleiner waren):

	<i>amphi-I</i>		<i>syn</i>		
Ethan	5.7	5.7	5.7	5.7	
$Z_{\text{COO}^-}$	3.5	24.5	3.5	24.5	
$Z_{\text{C-4-N=OH}}$	11.7	0.6	16.1	4.3	
$Z_{\text{C-5-N=OH}}$	0.6	-1.8	0.6	-1.8	
$\delta_{\text{berechnet}}$	21.5	29.0	25.9	32.7	ppm
$\delta_{\text{gemessen}}$	20.3	31.2	26.4	32.1	ppm
					(in $^{12}\text{CD}_3\text{OD}$ )

Unter der Voraussetzung, daß die Additivitätsbeziehung Gültigkeit besaß, handelte es sich demnach um ein ~4.5:1-Gemisch von *amphi-I*- und *syn*-Isomerem, das sich chromatographisch nicht auftrennen ließ (eine von Heilmeyer<sup>71)</sup> durchgeführte Hochspannungselektrophorese ergab ebenfalls nur eine Bande).

#### $\beta$ -Pentaacetylglucose<sup>117)</sup>

durch Reaktion von D-Glucose mit Natriumacetat/Acetanhydrid

#### Essigsäure-, Propionsäure-, Buttersäure-, n-Valeriansäure-p-bromphenacyl-ester<sup>113)</sup>

aus dem Natriumslz der Carbonsäure und p-Bromphenacylbromid

#### Silbervalerat<sup>118)</sup>

aus Natriumvalerat und Silbernitratlösung

\*) Eine Oxim-Nitroso-Tautomerie war daher auszuschließen.

4.2.2. 5-Hydroxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure<sup>88)</sup>

Formelschema s.S. 37

4.2.2.1.  $\alpha$ -Benzyloxyessigsäureethylester<sup>119)</sup>

In einem 1-l-Dreihalskolben mit KPG-Rührer, Tropftrichter und Rückflußkühler werden 1000 g (9.25 Mol) Benzylalkohol vorgelegt und bei RT 66 g (2.87 Tom) Natrium in kleinen Stücken unter kräftigem Rühren hinzugefügt. Der Kolbeninhalt erwärmt sich dabei stark, so daß sich das entstehende Natriumbenzylat im Benzylalkohol löst. Nachdem alles Natrium zugegeben ist, läßt man abkühlen und tropft 246 g (2.01 Mol) Chloressigsäureethylester zu. Die Mischung verfärbt sich unter starker Erwärmung. Anschließend rührt man 20 Stunden bei 90°C. Nach dem Abkühlen fügt man etwa 1 l Ether hinzu, filtriert vom Natriumchlorid-Niederschlag ab und wäscht ihn mehrere Male mit Ether. Die vereinigten Ether/Benzylalkohol-Phasen werden vier Mal mit 100 ml-Portionen Wasser extrahiert. Der Ether wird abrotiert und der Rückstand wird im Wasserstrahlvakuum über eine 20-cm-Vigreux-Kolonnen destilliert. Nach einem Vorlauf (Benzylalkohol,  $Kp_{10}$ : 91.5°C) geht der  $\alpha$ -Benzyloxyessigsäureethylester bei  $Kp_{10}$ : 139°-142°C über. Durch Umesterung gebildeter  $\alpha$ -Benzyl-oxyessigsäurebenzylester folgt bei  $Kp$ : 210°-213°C.

Ausbeute: 100.5 g

entspricht 26% bezogen auf Chloressigester.

4.2.2.2. 4-Benzyloxyacetessigsäureethylester (28)

In einem 2-l-Dreihalskolben mit KPG-Rührer, Rückflußkühler und Tropftrichter wird eine Natriumsuspension in der üblichen Weise aus 500 ml absolutem Toluol und 23 g (1 Tom) Natrium hergestellt. Nachdem 46 g (1 Mol) trockenes Ethanol zuge-  
tropft worden ist, wird der Rückflußkühler gegen eine Des-  
tillationsbrücke ausgetauscht. Ein Gemisch von 100.5 g  
(0.52 Mol)  $\alpha$ -Benzyloxyessigester und 133 g (1.51 Mol)  
Essigester wird nun über eine Stunde zugefügt, wobei der  
Kolbeninhalt langsam auf 100°C aufgeheizt wird. Während

einer 5-stündigen Reaktionszeit destillieren ca. 100 g eines Ethanol/Essigester-Gemisches ab. Nach dem Abkühlen säuert man mit 2 n Salzsäure an, trennt die Phasen, ethert aus, wäscht mit 5%iger Natriumcarbonatlösung und Wasser und trocknet über Natriumsulfat. Durch fraktionierte Destillation im Hochvakuum werden nach einem Vorlauf von Acetessigester ( $Kp_{0.3}$ :  $30^{\circ}\text{C}$ ) 56 g (0.237 Mol) des bei  $Kp_{0.3}$ :  $135^{\circ}\text{C}$  siedenden 4-Benzyloxyacetessigesters (28) erhalten. Dies entspricht 46% bezogen auf eingesetzten  $\alpha$ -Benzyloxyessigester.

4.2.2.3. 4-Benzyloxyacetessigsäureethylester-ethylenacetal (29)  
56 g (0.237 Mol) 4-Benzyloxyacetessigsäureethylester (28) werden in 100 ml Benzol mit 50 mg p-Toluolsulfonsäure und 30 g (0.48 Mol) Ethylenglykol in einem 250-ml-Kolben mit Wasserabscheider erhitzt. Nach 20 Stunden hatten sich 5 ml (0.28 Mol) Wasser gebildet. Zu der abgekühlten Reaktionsmischung gibt man 40 mg kristallines Natriumcarbonat und rührt noch eine Stunde bei RT. Das Benzol wird am Rot.V. abgezogen und der Rückstand in eine Mikrodestille übergeführt. Die fraktionierte Destillation im Ölvakuum ergibt nach einem Vorlauf von Glykol ( $Kp_{0.2}$ :  $50^{\circ}\text{C}$ ) das bei  $Kp_{0.3}$ :  $130^{\circ}\text{C}$  siedende Acetal 29 als nur wenig verunreinigtes Öl ( $^1\text{H-NMR}$ ). Zur spektroskopischen Untersuchung werden 300 mg über PSC mit System G aufgetrennt und ergeben 220 mg reines 29.

Ausbeute 37.7 g (0.13 Mol) Acetal 29 entsprechend 55% bezogen auf eingesetztes 28.

IR ( $\text{CCl}_4$ ): 3070, 3030 (w,  $\nu_{\text{Aryl-CH}}$ ); 2980, 2900 (m,  $\nu_{\text{CH}}$ ); 1800 (m); 1740 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1450 (m,  $\delta_{\text{CH}_2}$ ); 1370, 1350, 1330, 1200 (m); 1110, 1040 (s); 950 (m); 695 (m,  $\gamma_{\text{CH}}$ , monosubst.)  $\text{cm}^{-1}$ .  
 $^1\text{H-NMR}$  (60 MHz,  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ):  $\delta=1.23$  (t,  $J=7\text{Hz}$ , 3H, Ester- $\text{CH}_3$ ), 2.68 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -2), 3.53 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 3.98 (s, 4H, Acetalprotonen), 4.11 (q,  $J=7\text{Hz}$ , 2H, Ester- $\text{CH}_2$ ), 4.60 (s, 2H, Benzyl- $\text{CH}_2$ ), 7.38 (s, 5H, arom. Protonen).

4.2.2.4. 1-Benzylloxy-4-hydroxy-2-butanon-ethylenacetal (30)

In einem 500-ml-Zweihalskolben mit Magnetrührer, Tropftichter und Rückflußkühler mit Trockenrohr werden 5.7 g (0.15 Mol) Lithiumaluminiumhydrid in 100 ml Ether vorgelegt und eine Lösung von 37.7 g (0.13 Mol) 29 in Ether so zugetropft, daß das Lösungsmittel mäßig siedet. Anschließend refluxiert man noch 4 Stunden und zersetzt überschüssiges Reduktionsmittel vorsichtig und unter Kühlung mit nassem Ether und Eiswasser. Das Neutralisieren erfolgt mit 10%iger Schwefelsäure bis pH 7.5. Schwierigkeiten bei der Phasentrennung, hervorgerufen durch voluminöses Aluminiumhydroxid, können durch Natriumchlorid- und Etherzugabe sowie längeres Stehenlassen der Suspension im Scheidetrichter aufgehoben werden. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Ethers und Ethanols bleiben 31.1 g roher Alkohol 30 zurück. Das Produkt wird zur Tosylierung ohne weitere Reinigung eingesetzt. Zwecks spektroskopischer Untersuchung wurde eine Auftrennung des Gemisches über PSC mit dem System B durchgeführt.

Ausbeute (Rohprodukt): 31.1 g (0.31 Mol) entsprechend 97%.

IR ( $\text{CCl}_4$ ): 3570 (m, scharf,  $\nu_{\text{OH-frei}}$ ); 3070, 3030 (w,  $\nu_{\text{Aryl-CH}}$ ); 2960, 2940, 2890 (s,  $\nu_{\text{CH}}$ ); 1760 (w); 1490 (w); 1450 (m,  $\delta_{\text{CH}_2}$ ); 1400, 1360, 1340 (m); 1280, 1250, 1090 (m); 1100, 1075, 1040 (s,  $\nu_{\text{C-O}}$ ); 945 (m); 695 (s,  $\gamma_{\text{CH-monosubst}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-NMR}$  (60 MHz,  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ):  $\delta=1.92$  (t,  $J=6\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2-3$ ), 2.59 (s, 1H, OH), 3.42 (s, 2H,  $\text{CH}_2-1$ ), 3.67 (t,  $J=6\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2-4$ ), 4.02 (s, 4H, Acetalprotonen), 4.60 (s, 2H, Benzyl- $\text{CH}_2$ ), 7.39 (s, 5H, arom. Protonen).

4.2.2.5. 1-Benzylloxy-4-(p-toluolsulfonyl)-2-butanon-ethylenacetal (31)

31.1 g (0.13 Mol) 30 werden in etwa 150 ml Pyridin p.A. gelöst und mit Trockeneis/Aceton auf  $-35^\circ\text{C}$  heruntergekühlt und mit einem leichten Überschuß von 27 g (0.14 Mol) p-Toluolsulfonsäurechlorid behandelt. Die portionsweise

Zugabe des Säurechlorids erfolgt so, daß die Temperatur zwischen  $-30^{\circ}\text{C}$  und  $-35^{\circ}\text{C}$  bleibt. Über einen Zeitraum von 3 Stunden läßt man bis auf  $0^{\circ}\text{C}$  erwärmen. Ausgefallenes Pyridinhydrochlorid wird durch Zugabe von etwa 80 ml Eiswasser wieder aufgelöst. Das Pyridin/Wasser-Gemisch wird fünf Mal mit 100-ml Portionen Chloroform extrahiert und die vereinigten Phasen am Rot.V. eingeengt. Mehrfaches azeotropes Abrotieren mit Benzol entfernt Pyridinreste aus dem Rohprodukt, das direkt zur Finkel'stejn-Reaktion mit Lithiumbromid verwendet wird. Reines Produkt 31 wird über PSC mit dem System G als farbloses, nicht kristallisierbares Öl erhalten.

Ausbeute (Rohprodukt): 48.61 g (0.124 Mol) entsprechend 91%.

IR ( $\text{CCl}_4$ ): 3070, 3030 (w,  $\nu_{\text{Aryl-CH}}$ ); 2960, 2890 (m,  $\nu_{\text{CH}}$ ); 1735 (w); 1595, 1490 (w,  $\nu_{\text{C=C}}$ ); 1450 (m); 1370 (s,  $\nu_{\text{SO}_2\text{O}}$ ); 1300, 1290 (w); 1190, 1180 (s); 1100 (s); 1040, 965, 945 (m); 900, 840 (w); 695, 660 (s,  $\gamma_{\text{CH}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H-NMR}$  (60 MHz,  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ):  $\delta = 2.04$  (t,  $J=7\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2-4$ ), 2.41 (s, 3H,  $\text{Toluol-CH}_3$ ), 3.30 (s, 2H,  $\text{CH}_2-1$ ), 3.87 (s, 4H, Acetalprotonen), 4.11 (t,  $J=7\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2-4$ ), 4.50 (s, 2H,  $\text{Benzyl-CH}_2$ ), 7.34 ("d",  $J=8\text{Hz}$ , 2H, m-Protonen der Tosylgruppe), 7.37 (s, 5H, arom. Protonen der Benzylgruppe), 7.82 ("d",  $J=8\text{Hz}$ , 2H, o-Protonen der Tosylgruppe).

#### 4.2.2.6. 1-Benzylloxy-4-brom-2-butanon-ethylenacetal (32)

13.8 g (0.16 Mol) wasserfreies Lithiumbromid wird in 200 ml trockenem Aceton gelöst und mit 48.61 g (0.124 Mol) 31 sowie 0.5 ml Triethylamin versetzt. Nach etwa 30-minütigem Refluxieren springt die Reaktion unter Abscheidung von Lithiumtosylat an. Um Siedeverzüge zu verhindern, wird hin und wieder abfiltriert; der Umsatz ist nach 4 Stunden beendet. Nach dem Abdestillieren des Acetons fällt weiteres Salz aus, insgesamt 17.43 g (0.12 Mol) Lithiumtosylat. Das rohe Bromid 32 wiegt 33.55 g. Ein Destillationsversuch in der Mikrodestille war nicht erfolgreich (Verunreini-

gungen wurden mit dem Produkt überdestilliert), so daß die Substanz vor dem Einsatz in der Grignard-Reaktion durch PSC mit dem System G gereinigt wurde. Hieraus errechnet sich die Ausbeute des letzten Schrittes zu 23.5 g (0.08 Mol) entsprechend 63%.

CH-Analyse (%)  $C_{13}H_{17}BrO_3$  (301.19):

Ber. C 51.84 H 5.69 Gef. C 52.03 H 5.79

$R_F$ -Werte (G): 0.77 und (D): 0.55

IR ( $CCl_4$ ): 3060, 3030 (w,  $\nu_{\text{Aryl-CH}}$ ); 2960, 2920, 2880, 2860 (s,  $\nu_{\text{CH}}$ ); 1725 (w); 1490 (w); 1450 (m); 1340, 1320, 1290, 1260, 1220, 1170 (m); 1090 (s,  $\nu_{\text{C-O}}$ ); 1050, 940, 865 (m); 695 (s,  $\gamma_{\text{CH-monosubst.}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .

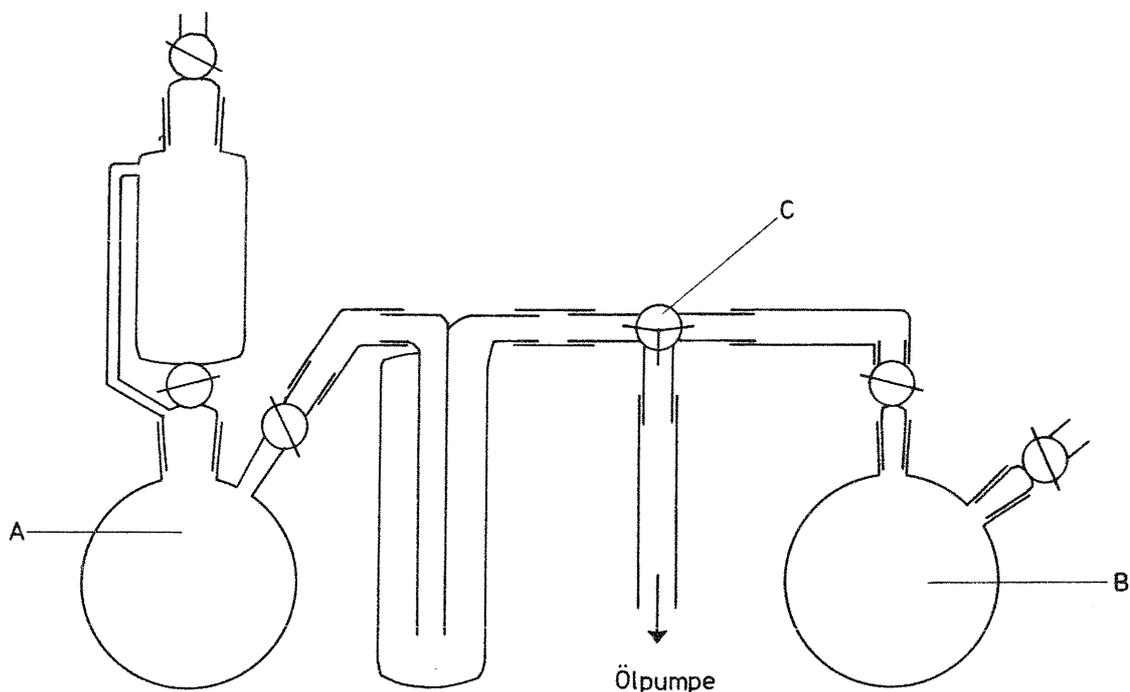
$^1\text{H-NMR}$  (60 MHz,  $CCl_4/\text{TMS}$ ):  $\delta=2.29$  (t,  $J=7\text{Hz}$  m. Feinaufspaltung, 2H,  $\text{CH}_2-3$ ), 3.38 (s, 2H,  $\text{CH}_2-1$ ), 3.39 (t,  $J=7\text{Hz}$  m. Feinaufspaltung, 2H,  $\text{CH}_2-4$ ), 3.98 (s, 4H, Acetalprotonen), 4.60 (s, 2H, Benzyl- $\text{CH}_2$ ), 7.39 (s, 5H, arom. Protonen).

MS (70 eV,  $180^\circ\text{C}$ ): 193 (25%)  $\text{M}^+-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ , 180/182 (28%), 179/181 (100%)  $\text{M}^+-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ , 135/137 (42%)  $\text{M}^+-\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_2$ , 107/109 (50%)  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}^+$ , 99 (38%)  $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2$ , 91 (68%) Tropyliumkation, 80/82 (7%)  $\text{HBr}^+$ , 79/81 (3%)  $\text{Br}^+$ , 65 (25%), 55 (25%), 51 (22%), 41, 42, 43 (23%).

#### 4.2.2.7. 5-Benzylloxy[1- $^{14}\text{C}$ ]lävulinsäure-ethylenacetal (33)

In einem mit Rückflußkühler, Tropftrichter und Magnetührer versehenen 100-ml-Rundkolben werden 1.57 g (5.21 mmol) 32, die zuvor längere Zeit im Ölvakuum getrocknet worden waren, in 17.5 ml absolutem, frisch destilliertem Tetrahydrofuran gelöst und mit 194.4 mg (8 mmol) Magnesiumspänen unter Argon zur Reaktion gebracht. Zum Anspringen der Reaktion, wie auch zur Erhöhung der Ausbeute an Grignard-Reagens wird die Lösung unter Rückfluß gekocht. Bevor der Reaktionskolben B an die nachfolgend abgebildete Apparatur angeschlossen wird, wird mittels DC kontrolliert, ob sich alles Bromid umgesetzt hat. In diesem Fall erscheint der

rote Fleck (konz. Schwefelsäure) des durch Hydrolyse entstandenen, polareren 1-Benzyl-2-butanon-ethylenacetals (CH-Analyse, IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $R_F$  (G): 0.46 und (D): 0.46).



Im Kolben A der Apparatur zur Erzeugung von  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid<sup>120)</sup> befinden sich 47 mg (5.0 mCi) Barium[ $^{14}\text{C}$ ]carbonat (Amersham Buchler) (20.9 mCi/mmol), das, um einem Zerstäuben beim Zutropfen der Säure vorzubeugen, mit Glasperlen überschichtet worden ist. Der Tropftrichter enthält 10 ml konzentrierte Schwefelsäure. Nachdem die Grignard-Lösung (Kolben B) auf  $-192^\circ\text{C}$  gekühlt worden ist, wird das ganze System mit einer Ölpumpe auf 0.01 Torr evakuiert, das  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid freigesetzt und durch die auf  $-78^\circ\text{C}$  gekühlte Trockenfalle in den Kolben B einkondensiert. Man läßt auf RT erwärmen, absorbiert nach Druckausgleich Restaktivitäten mit einer  $\text{Ba}(\text{OH})_2/\text{BaCl}_2$ -Lösung (s.S. 72 u.) und hydrolysiert mit 10 ml einer gesättigten Ammoniumchloridlösung. Nach Filtration und Phasentrennung wird mehrfach mit Tetrahydrofuran extrahiert. In der organischen

Phase befinden sich 4.51 mCi, in der wässrigen 0.232 mCi. Eine Auftrennung des Gemisches durch PSC mit System B ergibt 1.415 mCi radiochemisch reines (System G, P) 5-Benzyloxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure-ethylenacetal (33). Die Substanz läßt sich in Methylenchlorid bei -20°C für eine lange Zeit unzersetzt aufbewahren. Die physikalischen und spektroskopischen Daten wurden mit der aus inaktiven Vorversuchen stammenden Säure 33 erhalten.

CH-Analyse (%) C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub> (266.28):

Ber. C 63.15 H 6.81 Gef. C 63.40 H 6.80

Fp.: 62.5°C (n-Hexan), die Nadeln zerfließen beim Aufbewahren bei RT.

R<sub>F</sub>-Werte (P): 0.31 und (J<sub>1</sub>): 0.71

IR (KBr): 3000 (m, breit, ν<sub>OH</sub>); 2970, 2900, 2860, 2800 (s, ν<sub>CH</sub>); 1705 (s, ν<sub>C=O</sub>); 1600, 1580 (w, ν<sub>C=C</sub>); 1495, 1470, 1450, 1410 (m, δ<sub>CH<sub>2</sub></sub>); 1360, 1350 (m); 1270 (s); 1240, 1225, 1180, 1130 (m); 1105 (s); 1090, 1075 (m); 1100, 1090 (s, δ<sub>C-O</sub>); 950 (s); 930 (w); 880 (s); 820, 830 (w); 750 (s), 700 (s, γ<sub>CH-monosubst.</sub>); 680, 625 (m) cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (60 MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS): δ=2.27 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-2,3), 3.40 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-5), 3.96 (s, 4H, Acetalprotonen), 4.60 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 7.37 (s, 5H, arom. Protonen), 10.1 (s, 1H, Säureproton).

#### 4.2.2.8. 5-Benzyloxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure (24)

Zur Acetalspaltung werden die 1.415 mCi 33 in einem Gemisch von 15 ml Dioxan und 10 ml Wasser gelöst, mit 0.5 ml konzentrierter Salzsäure versetzt und eine Stunde refluxiert. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel bei niedriger Temperatur abgezogen und zur Entfernung der Salzsäure fünf Mal mit 20 ml Wasser eingeeengt. Der Rückstand wird in wenig Ethanol aufgenommen und durch PSC mit dem System P aufgetrennt (acetalisierte (33) und nicht acetalisierte Verbindung (24) lassen sich mit diesem Laufmittel an

20 x 20 cm-Fertigplatten voneinander trennen). Es werden 39.8 mg (0.87 mCi) 5-Benzyloxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure (4.5 mCi/mmol, ermittelt durch Titration, radiochemische Reinheit 96%) isoliert. Die physikalischen Daten der aus inaktiven Vorversuchen erhaltenen Verbindung 24 sind identisch mit der aus 5-Bromlävulinsäure (27) synthetisierten Substanz (s.S. 52 u.).

71.77 µCi 5-Benzyloxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure werden mit 0.32 ml einer 0.05 n Natriumhydroxidlösung gegen Phenolphthalein titriert. Dies entspricht 3.55 mg Säure 24 mit der oben angegebenen spezifischen Aktivität. 62.84 µCi des wasserlöslichen Natriumsalzes werden für die Applikation 4.3.4.6. verwendet.

#### 4.2.2.9. 5-Hydroxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure ([1-<sup>14</sup>C]HKV)

In einem 100-ml-Kolben mit Magnetrührer werden 797.28 µCi 5-Benzyloxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure in 4 ml Essigester gelöst, mit 40 mg Palladium/Aktivkohle (10%) versetzt und an die Hydrierapparatur angeschlossen. Nach 8 Stunden (Verbrauch 45 ml Wasserstoff bei nicht vorhydriertem Palladium) wird durch Radiodünnschichtscanning (System J<sub>1</sub>) festgestellt, daß 96% der aufgetragenen Aktivität beim R<sub>F</sub>-Wert des polaren Produktes 7 lokalisiert sind. Die Entfernung der 4% Ausgangssubstanz erfolgt durch PSC mit dem System J<sub>1</sub>. Nach Elution der Kieselgelzone mit 600 ml Lösungsmittelgemisch J<sub>2</sub> und Filtration durch Watte/Kieselgur werden 433 µCi 5-Hydroxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure (4.2 mCi/mmol, radiochemische Reinheit (J<sub>2</sub>, A) 99%) isoliert. Dies entspricht einer radiochemischen Gesamtausbeute von 8.66% bezogen auf eingesetztes Barium[<sup>14</sup>C]carbonat. Dieser Wert kann sicherlich als untere Grenze angesehen werden. Optimierungsreserven müßten in der rein technischen Durchführung der Reaktion mit dem <sup>14</sup>C-Kohlendioxid und in den einzelnen Trennverfahren liegen.

Zur Derivatisierung werden 1.12  $\mu\text{Ci}$  neutralisiert und mit einer Spatelspitze p-Bromphenacylbromid 1 Stunde in wässrigem Ethanol refluxiert. Radiodünnschichtscanning zeigte neben dem Ausgangsprodukt 5-Hydroxy[1- $^{14}\text{C}$ ]lävulinsäure-p-bromphenacylester ( $R_F$ -Werte (C): 0.35 und (K): 0.42.

4.2.3. 5-Hydroxy[4- $^{14}\text{C}$ ]lävulinsäure ([4- $^{14}\text{C}$ ]HKV)<sup>66</sup>,  
Formelschema S. 35

250  $\mu\text{Ci}$  5-Amino[4- $^{14}\text{C}$ ]lävulinsäurehydrochlorid (Amersham Buchler) (58 mCi/mmol) werden mit 5.7 mg inaktivem Hydrochlorid verdünnt, so daß eine spezifische Aktivität von 6.5 mCi/mmol resultiert. Die in der Ampulle befindlichen Substanzen werden durch Zugabe von 0.250 ml 1 n Schwefelsäure gelöst und in Eis gestellt. Unter Stickstoff erfolgt nun die tropfenweise Zugabe von 25 mg (0.36 mmol) Natriumnitrit in 0.5 ml Wasser. Es tritt Gasentwicklung und Färbung der Lösung ein. Man läßt über 25 Minuten auf RT erwärmen und erhitzt noch 5 Minuten auf 100°C. Nach dem Abkühlen pipettiert man die jetzt wieder farblose Lösung in einen 50-ml-Spitzkolben, der etwa 10 ml dest. Wasser enthält, engt auf 2 ml ein, gibt erneut 30 ml Wasser hinzu und titriert mit 0.05 n Natriumhydroxidlösung mit einem pH-Meter (Glaselektrode) auf pH 7.0. Die Auftrennung des Reaktionsgemisches erfolgt an einer Dowex 1X1-Säule (15 x 1 cm) in der Formiat-Form (Übergießen der vom Hersteller gelieferten Chlorid-Form mit einer 1-molaren Natriumformiatlösung, bis im Filtrat mit  $\text{AgNO}_3$  kein Silberchlorid mehr ausfällt<sup>121</sup>). Nachdem die neutralisierte Lösung auf die Säule gegeben worden ist, eluiert man zuerst mit 50 ml Wasser (Entsalzung) und anschließend mit einem Ameisensäure/Wasser-Gradienten (1:9, 2:8 usw.). Von den 46 aufgefangenen 3-ml-Fractionen wird die Aktivität bestimmt. Die eingesetzten 250  $\mu\text{Ci}$  werden 100%ig zurückerhalten und verteilen sich auf zwei Peaks mit 92.78 und 158  $\mu\text{Ci}$ . Die 92.78  $\mu\text{Ci}$  werden erneut aufgetrennt und ergeben einen

scharfen Peak von 38.59  $\mu\text{Ci}$  (radiochemische Ausbeute 15.4%):

Die Identifizierung der 5-Hydroxy[4- $^{14}\text{C}$ ]lävulinsäure erfolgt mittels DC mit der [1- $^{14}\text{C}$ ]HKV als Vergleich sowie durch Derivatisierung als p-Bromphenacyl-ester (wie beschrieben unter 4.2.2.9.) mit jeweils zwei Laufmittelsystemen. Bei den 158  $\mu\text{Ci}$  handelt es sich hauptsächlich um [1- $^{14}\text{C}$ ]-Bernsteinsäure (Schmelzpunkt, IR,  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der bei inaktiven Kontrollversuchen erhaltenen Substanz, Derivatisierung als Bernsteinsäureanhydrid mittels Thionylchlorid), wie auch Martinek<sup>48)</sup> feststellte.

4.2.4. 4,5-Dioxo[1- $^{14}\text{C}$ ]valeriansäure, [1- $^{14}\text{C}$ ]DOVA, s.S. 40  
100  $\mu\text{Ci}$  5-Hydroxy[1- $^{14}\text{C}$ ]lävulinsäure (s. 4.2.2.9.) werden in einem 50-ml-Kolben mit Magnetprüher in 1 ml dest. Wasser gelöst. Hierzu gibt man unter Argon 137.82 mg (0.69 mmol) pulverisiertes Kupfer-II-acetat-monohydrat, so daß die Lösung an Kupfer-II übersättigt ist. Man verschließt den Kolben und rührt 4 Tage unter Argon bei RT. Ein Radiogramm der mit System A entwickelten DC-Folie zeigt, daß die 5-Hydroxy[1- $^{14}\text{C}$ ]lävulinsäure praktisch vollständig zugunsten des unpolaren 4,5-Dioxoderivates verschwunden ist. Die Reinsolierung erfolgt durch PSC mit System A, Extraktion des Kieselgels mit Methanol liefert 58.72  $\mu\text{Ci}$  (58.7%) radiochemischer reiner (99%) 4,5-Dioxo[1- $^{14}\text{C}$ ]valeriansäure.

Die Identifizierung erfolgt durch chromatographischen Vergleich sowie durch Derivatisierung als 4,5-Dihydroxyimino[1- $^{14}\text{C}$ ]valeriansäure<sup>71)</sup>: ein kleiner Teil der Aktivität in 1 ml Wasser wird in eine 12-ml-Schliffampulle (NS 14.5) gegeben und eine Lösung von Hydroxylammoniumchlorid (Überschuß) in Wasser hinzugegeben. Mit 10%iger Natriumbicarbonatlösung wird ein pH von 4.0 eingestellt (Glaselektrode). Man läßt noch zwei Stunden bei RT stehen und extrahiert dann fünf Mal mit je 5 ml Ether. Der chromatographische

Vergleich bestätigte die Identität der Verbindung ( $R_F$ -Werte S. 54). Unter denselben Bedingungen gebildetes 5-Hydroxy-[1- $^{14}C$ ]älvulinsäureoxim ist polarer ( $R_F$ -Wert ( $J_1$ ): 0.53) und in Ether weniger gut löslich.

In jedem Fall muß die [1- $^{14}C$ ]DOVA wegen ihrer leichten Zersetzlichkeit<sup>71)</sup> möglichst bald nach der Reinisolierung appliziert werden.

#### 4.3. Einbauversuche

##### 4.3.1. Pflanzenexperimente

Alle Einbauversuche wurden mit der zur Familie der Hahnenfußgewächse (Ranunculaceae) gehörenden Stinkenden Nieswurz (*Helleborus foetidus* L.) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine perennierende Staude, die vor allem in Mittel- und Süddeutschland verbreitet ist. Sie wächst in Bergwäldern auf steinigen, kalkhaltigen Triften und blüht, abhängig von der Strenge des Winters, zwischen Februar und April<sup>122)</sup>. Ihre kräftig grünen Blätter heben sich in dieser Jahreszeit vom eintönigen Braun des laubbedeckten Waldbodens ab und sind daher leicht zu finden.

Die für die vorliegende Arbeit benötigten Pflanzen stammen aus dem Brohltal (Kreis Ahrweiler, Rheinl.-Pf.). Für Einbauversuche, bei denen Ranuncosid (5) und Ranunculoid (6) isoliert werden sollten, wurden blühende Pflanzen mit Wurzeln und umgebenden Erdreich ausgegraben und in Tontöpfe gepflanzt. Die Haltung im Labor war sehr zufriedenstellend. Zur Applikation wurde jeweils 1  $\mu$ l der hochaktiven Precursorlösung unterhalb der Blüten in die Blütenstiele injiziert.

Sollte die Metabolisierung der Precursor zu Ranunculin (3), Isorranunculin (4) und Protoanemonin (1) untersucht werden, so wurde die weniger aufwendige Aufsaugmethode angewendet. Hierzu wurden die Pflanzenstengel (meist junge, nicht blühende Triebe) schräg abgeschnitten und zur Vermeidung einer Luftembolie direkt in Wasser oder die precursorhaltige, wässrige Lösung gestellt. Ein Vorteil der Methode liegt darin, daß Aktivitäten, die nicht vom Saftstrom aufgenommen werden, im Gegensatz zur Injektionsmethode gemessen werden können ( $A_{\text{Rest}}$ ) und somit nicht in die Berechnung der Einbaurate eingehen.

#### 4.3.2. Aufarbeitungen

4.3.2.1. Anemonin (2), Ranuncosid (5), Ranunculosid (6)  
Nach der Injektion des Precursors mit einer Mikroliterspritze (1  $\mu\text{l}$  pro Blüte) wird die Restaktivität ( $A_{\text{Rest}}$ ) im Spitzkolben gemessen und von der Gesamtaktivität subtrahiert ( $A_{\text{ges}} - A_{\text{Rest}} = A_{\text{appl}}$ ). Nach einer Inkubationszeit von 8 Tagen werden die Blüten von fünf Pflanzen abgeschnitten, ausgewogen (Frgw. z.B. 120 g = 250 Blüten) und in flüssigen Stickstoff gelegt. Das nun spröde gewordene Pflanzenmaterial wird in kleineren Portionen in einen Mörser übergeführt, unter flüssigem Stickstoff zerrieben und anschließend lyophilisiert.

Das aufgefangene Gefriertrocknungsdestillat wird auf seine Radioaktivität hin untersucht und zur Isolierung von Anemonin benutzt (Experiment 4.4.3.3.): hierzu sättigt man es mit Natriumsulfat, extrahiert mehrere Male mit Ether, läßt zur Dimerisierung einige Tage im verschlossenen Kolben stehen und kristallisiert aus heißem Methylenchlorid um. Radiodünnschichtscanning mit System G und System K beweist durch Vergleich und Kokristallisation mit authentischer Substanz die Identität der Verbindung 2.

Zur Isolierung der Glucoside 5 und 6 werden die gefriergetrockneten Blüten (40 g = 33% des Frischgewichtes) drei Mal mit je 330 ml Aceton/Wasser (1:1) extrahiert, die Aktivität  $A_{\text{extr}}$  gemessen und nach Acetonentfernung durch Lyophilisation eingeengt. Man löst jetzt in Aceton (mit wenig Wasser), versetzt mit 15 g Munktell's Cellulose Pulver, rotiert ein und gibt die aufgezugene Substanz auf eine 400-g-Cellulose-Säule. Die Elution erfolgt mit dem von Colombo et al.<sup>123)</sup> beschriebenen Lösungsmittelgemisch L. Nach einem Vorlauf von etwa 1.5 l werden 20-ml-Fractionen aufgefangen, die mittels DC und durch Radioaktivitätsmessung untersucht werden. Zuerst erscheint Chlorophyll (0-470 ml), danach nur wenig verunreinigtes Ranuncosid (475-1380 ml,  $R_F$ -Wert ( $J_2$ ): 0.66) und zuletzt Ranunculosid (2400-3000 ml,  $R_F$ -Wert ( $J_2$ ): 0.43). Wichtig ist eine schnelle Durchführung der säulenchromatographischen Grobtrennung, da sonst Zersetzung des Ranunculosids eintreten kann. Ranuncosid kristallisierte durch Acetonzugabe zu den entsprechenden Fractionen aus. Ranunculosid wurde durch 3-fache Chromatographie an Sephadex G 10 gereinigt.

#### 4.3.2.2. Ranunculin (3), Isoranunculin (4)

Die Pflanzen werden nach der Inkubationszeit von 84 Stunden (Aufsaugen) in einer Mischung von 90 ml Wasser und 3 ml konzentrierter Salzsäure (pro 100 g Frischgewicht) in einem Becherglas mit einem Ultraturrax bei kleiner Drehzahl zerkleinert. Man saugt durch Kieselgur, trennt kleinere Partikel durch Zentrifugation ab und untersucht den klaren, rotbraunen Rohextrakt auf seine Aktivität ( $A_{\text{extr}}$ ). Zur Entfernung der Farbstoffe versetzt man mit 2.5 g Aktivkohle, läßt 20 Minuten bei RT stehen und filtriert durch Kieselgur. Die Glucoside werden durch Zugabe weiterer 12 g Aktivkohle absorbiert. Nach einer Stunde filtriert man ab, wäscht zur Entfernung der Salzsäure gründlich mit Wasser und eluiert dann mit 500 ml eines Ethanol/Wasser-Gemisches (1:1). Nach dem Einengen wird ein Öl erhalten, das durch

Chromatographie an Sephadex G 10 gereinigt wird. Es wird eine Substanz erhalten, die praktisch den gleichen  $R_F$ -Wert wie Ranuncosid besitzt ( $J_2$ ): 0.65. Zum Beweis, daß es sich um das Ranunculin/Isoranunculin-Gemisch handelt, wird in der üblichen Weise (Pyridin/Acetanhydrid) acetyliert und durch DC mit System H (dreifache Entwicklung) eine Auftrennung der beiden Acetyl-derivate erreicht.

Isoranunculintetraacetat,  $R_F$  (H, dreifache E.): 0.42 und Ranunculintetraacetat,  $R_F$  (H, dreifache E.): 0.46.

#### 4.3.2.3. Protoanemonin (1)

Die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials erfolgt in diesem Fall nach der von Asahina<sup>4)</sup> beschriebenen Methode. Die applizierte Aktivität  $A_{\text{appl}}$  erhält man wieder durch Subtraktion der nach einer Inkubationszeit von 84 Stunden nicht aufgesaugten Aktivität  $A_{\text{Rest}}$  von der eingesetzten Gesamtaktivität  $A_{\text{ges}}$ .

Nach der Applikation werden die jungen Helleborus foetidus-Triebe (Frgw. 170-350 g) grob zerkleinert und zur Auflockerung und als Schutz vor Verkohlung der Pflanzenteile im Kolbenboden mit 20-30 g Strohschnitzeln in einen 2-l-Einhalskolben eingewogen (auf keinen Fall darf zu Beginn der Destillation in den Kolben Wasser gegeben werden). Nach Aufsetzen einer Destillationsbrücke mit Dampfeinleitung stellt man die Badtemperatur und die Dampfkanne so ein, daß nach vier Stunden ca. 1 l eines farblosen Destillates übergegangen ist. Dieses sättigt man unter Rühren mit ca. 250 g Natriumsulfat, extrahiert fünf Mal mit je 300 ml Ether und trocknet über Natriumsulfat. Nach dem Abziehen des Ethers bleibt Protoanemonin als hellgelbes Öl mit den bereits beschriebenen unangenehmen Eigenschaften zurück. Es wird in 2 ml Ethanol gelöst und zu 30 mg vorhydrierten, frisch hergestellten<sup>124)</sup> Platindioxid in 2 ml Ethanol gegeben. Einen kleinen Rest behält man im Spitzkolben zurück und läßt ihn zur Derivatisierung des Protoanemonins als

Anemonin einige Tage stehen. Nach ca. 6 Stunden ist die Wasserstoffaufnahme beendet. Aus dem Verbrauch berechnet man die isolierte Protoanemoninmenge: sie betrug bei neun Versuchen (Experimente 4.3.4.4. - 4.3.4.12.)  $0.11 \pm 0.01\%$  bezogen auf das Frischgewicht. Man filtriert vom Platin ab, wäscht drei Mal mit Ethanol und bestimmt die Aktivität  $A_{\text{EtOH}}$ . Die noch Verunreinigungen enthaltende ethanolische n-Valeriansäurelösung wird mit 1 n Natriumhydroxidlösung neutralisiert (Phenolphthalein), eingeeengt, in 10 ml Wasser/Ethanol (1:2) aufgenommen und mit der äquimolaren Menge Silbernitrat in Wasser/Ethanol (7:3) tropfenweise unter Rühren versetzt<sup>125)</sup>. Der grauschwarze, voluminöse Silbervalerat-Niederschlag wird abfiltriert und nacheinander mit Wasser, wenig Aceton und Ether gewaschen. Das erste Umkristallisieren ließ sich am besten mit siedendem Wasser/Aceton-Gemisch (8:2), dem bis zur Auflösung des Silbersalzes Pyridin zugesetzt wurde, erreichen (Silbervalerat ist leicht löslich in Pyridin; zur Aktivitätsmessung wurde der Szintillationslösung daher 1 Tropfen Pyridin als Lösungsvermittler zugesetzt). Die weitere Reinigung erfolgte ohne Pyridinzusatz bis zur konstanten, spezifischen Aktivität des weißen, relativ wenig lichtempfindlichen Silbervalerats, dessen IR-Spektrum mit dem eines synthetischen Präparates verglichen wurde. Da auf grund der Reinigungsoperationen z.T. unterschiedliche Ausbeuten erhalten wurden (entsprechend  $0.11 \pm 0.03\%$  Protoanemonin bezogen auf das Frischgewicht), wurden die Einbauten auf einen Gehalt von 0.11% berechnet. Zum Vergleich sind in der folgenden Tabelle einige in der Literatur beschriebene Gehalte an Protoanemonin bzw. seinen glucosidischen Vorstufen zusammengestellt:

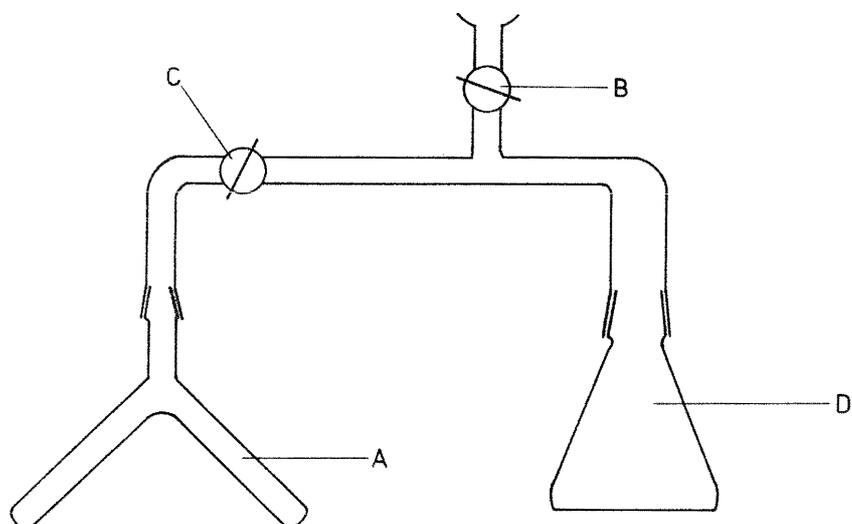
Autor	Pflanze	Gehalt (%)	Verbindung
Ruijgrok <sup>11,126)</sup>	H.foetidus	1.4	Ranunculin
Asahina <sup>4)</sup>	R.japonicus	0.1	Protoanemonin
Kipping <sup>78)</sup>	R.bulbosus	0.18	Protoanemonin
Hill et al. <sup>6)</sup>	R.bulbosus	0.33-0.97	Ranunculin
Tschesche et al. <sup>7)</sup>	H.foetidus	0.05 0.02	Ranunculin Isoranunculin

#### 4.3.3. Abbau des Silbervalerats

Um bei positivem Einbau die Aktivität der einzelnen C-Atome des Protoanemonins in Form des Silbervalerats bestimmen zu können, wurde der auf Seite 33 abgebildete Abbau durchgeführt.

##### 4.3.3.1. C-1 bis C-3 des Silbervalerats

Ein Teil des bis zur konstanten spezifischen Aktivität umkristallisierten Silbervalerats (ca. 40 mg) wird in die Doppelschenkelampulle A gegeben und die 1.4-molare Menge an Natriumazid<sup>127)</sup> hinzugefügt. In den Hals der Ampulle gibt man ca. 700 mg Polyphosphorsäure und schließt nun an die nachfolgend abgebildete Apparatur<sup>127)</sup> an:



Man evakuiert das ganze System über Hahn B mit der Wasserstrahlpumpe und läßt nach Schließen der Hähne B und C die Polyphosphorsäure durch Drehen der Apparatur und leichtes Erwärmen mit fächernder Flamme zu den Salzen fließen. Unter gelegentlichem Umschütteln erwärmt man eine Stunde bei 80°C und gibt in die Vorlage D 15 ml einer Lösung von Bariumhydroxid und Bariumchlorid in Wasser (1 l einer filtrierten, gesättigten Bariumhydroxidlösung gemischt mit 200 ml einer 10.75%igen Bariumchloridlösung). Nach dem Evakuieren wird Hahn B wieder geschlossen und das beim Schmidt-Abbau ent-

standene Kohlendioxid (C-1) durch Hahn C in die Vorlage D geleitet. Nach einer Stunde bei RT wird das ausgefallene Bariumcarbonat abzentrifugiert, fünf Mal mit heißem, bidestilliertem Wasser und je zwei Mal mit Methanol und Ether gewaschen und sechs Stunden bei 60°C/0.01 Torr getrocknet (Ausbeute ca. 80%).

In den freien Schenkel der Doppelschenkelampulle gibt man bezüglich der Polyphosphorsäure einen großen Überschuß an 30%iger Natronlauge und schließt an eine Destillationsbrücke mit Hülsenschliff an, läßt die Lauge vorsichtig zur polyphosphorsauren Lösung fließen (Erwärmung) und destilliert das n-Butylamin/Wasser-Gemisch in eine Vorlage, die 0.5 n Schwefelsäure als Sperrflüssigkeit enthält. Die Butylaminsulfatlösung gibt man in 10 ml einer 5%igen Kaliumpermanganatlösung, stellt mit Natriumhydroxidlösung einen pH von 12 ein und erhitzt eine Stunde auf 100°C<sup>79,80</sup>). Nach dem Abkühlen wird mit verd. Schwefelsäure wieder angesäuert, wasserdampfdestilliert bis ca. 50 ml Destillat entstanden sind (tropfenweise Wasserzugabe während der Destillation) und mit 0.05 n Natriumhydroxidlösung gegen Phenolphthalein titriert (85% bezogen auf eingesetztes Silbervalerat). Ein Aliquot der Natriumbutyralösung wird mit p-Bromphenacylbromid zur Reaktion gebracht. Chromatographie des Esters mit Benzol und authentischen Vergleichssubstanzen zeigt, ob durch Überoxidation Propionsäure oder Essigsäure entstanden ist. Die p-Bromphenacyl-ester der C<sub>1</sub>- bis C<sub>5</sub>-Carbonsäuren lassen sich mit Benzol als Laufmittel voneinander trennen<sup>113</sup>):

Ameisensäure-p-bromphenacylester	R <sub>F</sub> (Benzol): 0.26
Essigsäure-p-bromphenacylester	R <sub>F</sub> (Benzol): 0.20
Propionsäure-p-bromphenacylester	R <sub>F</sub> (Benzol): 0.28
Buttersäure-p-bromphenacylester	R <sub>F</sub> (Benzol): 0.39
Valeriansäure-p-bromphenacylester	R <sub>F</sub> (Benzol): 0.48.

Es wurde hierbei festgestellt, daß neben der Buttersäure Spuren von Propionsäure, z.T. aber bis zu 15% Essigsäure

entstanden waren. Die Auftrennung der freien Carbonsäuren wird an angefeuchtetem Kieselgel (15 g Kieselgel werden in einem Mörser mit 0.9 ml 0.5 n Schwefelsäure verrieben) durchgeführt<sup>81)</sup>. Die Elution erfolgt mit einem Chloroform/Butanol-Gradienten, wobei das Chloroform zuvor mit 0.5 n Schwefelsäure ausgeschüttelt worden ist. Lokalisiert werden die Säuren durch Titration der Fraktionen und Derivatisierung eines Aliquots.

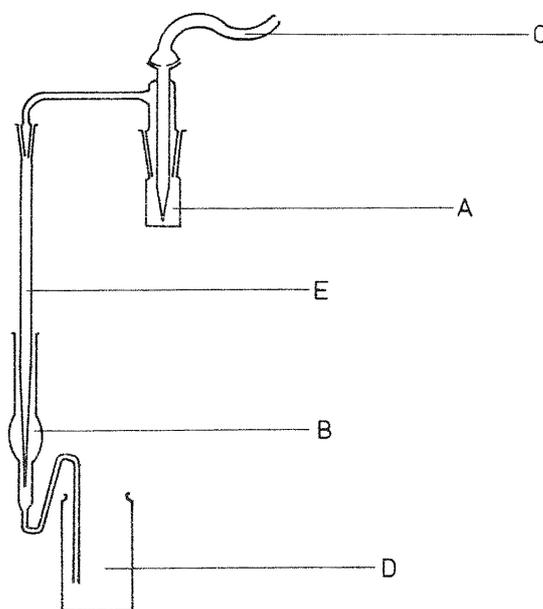
Die Natriumbutyratlösung wird nach dem Einengen in die Doppelschenkelampulle gegeben und bis zur Trockne eingedampft. Der folgende Schmidt-Abbau wird wie beschrieben durchgeführt und liefert C-Atom 2 und nach Oxidation und Abbau C-3 des Protoanemonins in Form von Bariumcarbonat.

#### 4.3.3.2. C-4 und C-5 des Silbervalerats

Der andere Teil des Silbervalerats (ca. 30 mg) wird in einen 100-ml-Kolben gegeben und mit einem Gemisch von 20 ml 5 n Chromsäure und 5 ml konz. Schwefelsäure nach Kuhn-Roth eineinhalb Stunden refluxiert<sup>128)</sup>. Die entstandene Essigsäure wird unter tropfenweiser Wasserzugabe so destilliert, daß die Flüssigkeit im Destillationskolben nicht weniger als 15 ml ausmacht. Nach ca. 50 ml Destillat wird abgebrochen und gegen Phenolphthalein titriert und als p-Bromphenacylester derivatisiert. Der Schmidt-Abbau liefert das C-Atom 4. Das entstandene Methylamin (C-5) wird nicht nach Slyke-Folch naß oxidiert, sondern nach Zugabe eines Überschusses an 30%iger Natronlauge in einen 1.4-molaren Überschuß einer ethanolschen Pikrinsäurelösung geleitet. Nach dem Abziehen des Ethanol wird mit 60°C heißem Benzol digeriert (Herauslösen überschüssiger Pikrinsäure), aus Ethanol umkristallisiert und unter Lichtausschluß im Hochvakuum getrocknet. Zur Aktivitätsmessung werden Mengen bis zu 1 mg Methylammoniumpikrat (Farbquenching) in 20 ml Szintillationslösung eingewogen.

#### 4.3.3.3. Bestimmung von $^{14}\text{C}$ in Bariumcarbonat

Zur Auszählung der durch den Abbau erhaltenen Bariumcarbonatpräparate wurde die von Frohofer<sup>82)</sup> entworfene Apparatur verwendet:



Ca. 1-5 mg des Bariumcarbonats werden in das kleine Reaktionsgefäß A eingewogen und mit der Apparatur verbunden. In das Syphongefäß B legt man 1.5 ml der Kohlendioxidabsorptionslösung (Ethanolamin/Methanol 1:14) vor. In den Knick des oberen Einleitungsrohres C mit Kugelschliff gibt man 0.7 ml konz. Schwefelsäure, läßt diese durch Drehen von C hinunterfließen und stellt eine Verbindung zum Stickstoffstrom (ca. 8 ml/min) her. Nach 10 Minuten entleert man den Syphoninhalt in das Zählfläschchen D und spült das Einleitungsrohr E und den Syphon B mit 3.5 ml Methanol und 10 ml Dioxan-Cocktail. Die Quenchkorrektur erfolgt mit einer Standardkurve, die durch Zusatz steigender Mengen an Ethanolamin/Methanol-Gemisch im interessierenden Konzentrationsbereich erhalten wurde.

4.3.4. Ergebnisse der Applikationen

4.3.4.1. Applikation von 5-Hydroxy [1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure, [1-<sup>14</sup>C]HKV  
(Injektion)

Zielprodukte: Ranuncosid (5), Ranunculosid (6)

Aufarbeitung: 4.3.2.1., 125 g Frgw.

Aktivitätsverteilung (dpm):

$A_{ges}^{*)}$	$A_{Rest}$	$A_{appl}$	$A_{extr}$
$1.008 \cdot 10^8$	$5.039 \cdot 10^6$	$9.576 \cdot 10^7$	$3.066 \cdot 10^7$

Nach der säulenchromatographischen Trennung mit System L wurden 302.8 mg (0.24%) aktives Ranuncosid (5) erhalten. Hiervon wurden 49.4 mg mit 45.5 mg inaktiver Substanz aus Aceton/Wasser- und Ethanol/Wasser-Gemischen kokristallisiert. Es ergab sich eine spezifische Aktivität von 3266 dpm/mg entsprechend 6391 dpm/mg für das nicht verdünnte Glucosid 5.

$$ER = \frac{6391 \cdot 302.8 \cdot 100}{9.576 \cdot 10^7} = 2.02 \%$$

Nach zwei Trennungen an Sephadex G 10 wurden außerdem 59.7 mg (0.05%) aktives Ranunculosid (6) erhalten. Wegen zu geringer Menge an inaktivem Material wurde nur umkristallisiert. Die spezifische Aktivität betrug 3297 dpm/mg.

$$ER = \frac{3297 \cdot 59.7 \cdot 100}{9.576 \cdot 10^7} = 0.21 \%$$

Ranuncosidhydrolyse, Formelschema S. 15

155.6 mg (0.53 mmol,  $9.944 \cdot 10^5$  dpm) Ranuncosid (5) wurden zwei Stunden mit 10 ml 2 n Salzsäure auf 90°C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 500 mg Munktell's Cellulose-Pulver aufgezogen und an 8 g mit dem System L aufgetrennt.

\*) Die spezifischen Aktivitäten der Precursor entnehme man S. 34.

Es wurden 58.2 mg (83%) aktive 5-Hydroxylävulinsäure (7) isoliert. Diese wurden mit 89.76 mg inaktivem Material bis zur konstanten spezifischen Aktivität von 4110 dpm/mg (Gesamtaktivität  $6.082 \cdot 10^5$  dpm) kokristallisiert (Aceton/Chloroform, Essigester/Ethanol, Aceton).

Außerdem wurden 65 mg nicht kristalline D-Glucose mit einer Gesamtaktivität von  $7.571 \cdot 10^4$  dpm eluiert. Die zurückerhaltene Gesamtaktivität von  $6.839 \cdot 10^5$  dpm (69%, radioaktive Nebenprodukte wurden nicht erhalten) verteilte sich also zu 88.93% auf die kristallisierte 5-Hydroxylävulinsäure und zu 11.07% auf die rohe D-Glucose.

Zur Derivatisierung wurde eine Aliquot der Säure mit p-Bromphenacylbromid umgesetzt und umkristallisiert. Von der eingesetzten Gesamtaktivität von  $1.968 \cdot 10^5$  dpm wurden im Ester  $1.832 \cdot 10^5$  dpm (93%) wiedergefunden.

Die D-Glucose wurde nach Koenigs-Knorr<sup>117)</sup> mit wasserfreiem Natriumacetat und Acetanhydrid zum Pentaacetylderivat umgesetzt und mit inaktiver Substanz kokristallisiert. Von den eingesetzten  $7.571 \cdot 10^4$  dpm wurden  $6.372 \cdot 10^4$  dpm (84%) in Form der  $\beta$ -D-Pentaacetylglucose zurückgewonnen. Auf grund der Derivatisierung wurde die ursprüngliche Aktivitätsverteilung nur geringfügig zugunsten der 5-Hydroxylävulinsäure verschoben:

5-Hydroxylävulinsäure : 89.88%  
D-Glucose : 10.12%.

4.3.4.2. Applikation von 5-Hydroxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure, [1-<sup>14</sup>C]HKV (Injektion)

Zielprodukte: Ranunculin (3), Isoranunculin (4)

Aufarbeitung: 4.3.2.2., 397 g Frgw.

Aktivitätsverteilung (dpm):

$A_{ges}$	$A_{Rest}$	$A_{appl}$	$A_{extr}$
$5.337 \cdot 10^7$	$4.684 \cdot 10^6$	$4.868 \cdot 10^7$	$4.946 \cdot 10^6$

Nach der chromatographischen Trennung an Kieselgel mit dem System J<sub>2</sub> wurden 102.5 mg (0.03) des nicht kristallisierenden Ranunculin/Isoranunculin-Gemisches erhalten. Es besaß eine Gesamtaktivität von  $7.297 \cdot 10^4$  dpm. Zur Trennung wurde acetyliert und mit System H chromatographiert (dreifache Entwicklung). Die Aktivität verteilte sich zu 17% =  $1.114 \cdot 10^4$  dpm Isoranunculintetraacetat (18.3 mg) und zu 83% =  $5.428 \cdot 10^4$  dpm auf Ranunculintetraacetat (75 mg).

$$ER = \frac{11141 \cdot 100}{4.868 \cdot 10^7} = 0.02 \%$$

$$ER = \frac{54279 \cdot 100}{4.868 \cdot 10^7} = 0.11 \%$$

Diese Einbauraten beziehen sich auf einen Glucosidgehalt von 93.3 mg = 0.023%. Bei den Protoanemoninaufarbeitungen (Experimente 4.3.4.4. - 4.3.4.12.) wurde ein mittlerer Gehalt von 0.11% gefunden. Bezieht man hierauf, so erhielte man für das Glucosidgemisch eine Einbaurate von 0.62%.

4.3.4.3. Applikation von 5-Hydroxy [1-<sup>14</sup>C]ävalinsäure, [1-<sup>14</sup>C]HKV (Injektion)

Zielprodukt: Anemonin (2)

Aufarbeitung: Gefriertrocknung s. 4.3.2.1., 115 g Frgw.

Aktivitätsverteilung (dpm):

$A_{\text{ges}}$	$A_{\text{Rest}}$	$A_{\text{appl}}$	$A_{\text{Dest}}$
$2.779 \cdot 10^8$	$8.125 \cdot 10^6$	$2.698 \cdot 10^8$	$2.491 \cdot 10^7$ (9.23%)

Neben unlöslichem polymerem Protoanemonin wurden 22.5 mg (0.02%) Anemonin (2) isoliert. Diese wurden mit 238.4 mg inaktiver Substanz bis zur konstanten spezifischen Aktivität von 6839 dpm/mg entsprechend einer Aktivität von 79083 dpm/mg für das unverdünnte Dimere 2 kokristallisiert.

$$ER = \frac{6839 \cdot 261.0 \cdot 100}{2.698 \cdot 10^8} = 0.66 \%$$

4.3.4.4. Applikation von 5-Hydroxy [1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure, [1-<sup>14</sup>C]HKV  
(Aufsaugen)

Zielprodukt: Protoanemonin (1)

Aufarbeitung: 4.3.2.3., 228 g Frgw.

Aktivitätsverteilung (dpm):

$A_{ges}$	$A_{Rest}$	$A_{appl}$	$A_{EtOH}$
$1.625 \cdot 10^8$	$6.949 \cdot 10^6$	$1.556 \cdot 10^8$	$9.724 \cdot 10^6$ (6.25%)

546.0 mg Silbervalerat besaßen eine konstante spezifische Aktivität von 8070 dpm/mg ( $1.686 \cdot 10^6$  dpm/mmol).

$$ER = \frac{8070 \cdot 546.0 \cdot 100}{1.556 \cdot 10^8} = 2.83 \%$$

Der Abbau des Silbersalzes wurde wie unter 4.3.3. beschrieben durchgeführt.

Verteilung der Radioaktivität im Protoanemonin (1):

C-Atom	spez. Radioaktivität des BaCO <sub>3</sub> (dpm/mg)	Verteilung (%)
C-1	4718 (3)*)	97.92
C-2	62 (5)	1.29
C-3	3 (5)	0.06
C-4	13 (5)	0.27
C-5	22 (5)	0.46

4.3.4.5. Applikation von 5-Hydroxy [4-<sup>14</sup>C]lävulinsäure, [4-<sup>14</sup>C]HKV  
(Aufsaugen)

Zielprodukt: Protoanemonin (1)

\*) Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der Messungen an.

Aufarbeitung: 4.3.2.3., 315 g Frwg.

Aktivitätsverteilung (dpm):

$A_{\text{ges}}$	$A_{\text{Rest}}$	$A_{\text{appl}}$	$A_{\text{EtOH}}$
$8.567 \cdot 10^7$	$1.288 \cdot 10^7$	$7.279 \cdot 10^7$	$5.664 \cdot 10^5$ (0.78%)

754.3 mg Silbervalerat besaßen eine konstante spezifische Aktivität von 542 dpm/mg ( $1.132 \cdot 10^5$  dpm/mmol).

$$ER = \frac{542 \cdot 754.3 \cdot 100}{7.279 \cdot 10^7} = 0.56 \%$$

Verteilung der Radioaktivität im Protoanemonin (1):

C-Atom	spez. Radioaktivität des $\text{BaCO}_3$ (dpm/mg)	Verteilung (%)
C-1	4 (3)	0.80
C-2	83 (3)	16.60
C-3	28 (3)	5.60
C-4	381 (3)	76.20
C-5	4 (3)	0.80

4.3.4.6. Applikation von 5-Benzylloxy[1- $^{14}\text{C}$ ]älvulinat,  
Natriumsalz, [1- $^{14}\text{C}$ ]BzOKV  
(Aufsaugen)

Zielprodukt: Protoanemonin (1)

Aufarbeitung: 4.3.2.3., 278 g Frwg.

Aktivitätsverteilung (dpm):

$A_{\text{ges}}$	$A_{\text{Rest}}$	$A_{\text{appl}}$	$A_{\text{EtOH}}$
$1.395 \cdot 10^8$	$5.179 \cdot 10^7$	$8.771 \cdot 10^7$	$1.234 \cdot 10^5$ (0.14%)

665.8 mg Silbervalerat besaßen eine konstante spezifische Aktivität von 133 dpm/mg ( $2.779 \cdot 10^4$  dpm/mmol).

$$ER = \frac{133 \cdot 665.8 \cdot 100}{8.771 \cdot 10^7} = 0.10 \%$$

Verteilung der Radioaktivität im Protoanemonin (1):

C-Atom	spez. Radioaktivität des BaCO <sub>3</sub> (dpm/mg)	Verteilung (%)
C-1	83 (5)	93.26
C-2	1 (5)	1.12
C-3	1 (5)	1.12
C-4	2 (5)	2.25
C-5	2 (5)	2.25

4.3.4.7. Applikation von Natrium[2-<sup>14</sup>C]glyoxylat  
(Aufsaugen)

Zielprodukt: Protoanemonin (1)

Aufarbeitung: 4.3.2.3., 210 g Frgw.

Aktivitätsverteilung (dpm):

A <sub>ges</sub>	A <sub>Rest</sub>	A <sub>appl</sub>	A <sub>EtOH</sub>
1.110 · 10 <sup>8</sup>	5.528 · 10 <sup>6</sup>	1.055 · 10 <sup>8</sup>	1.429 · 10 <sup>5</sup> (0.14%)

502.9 mg Silbervalerat besaßen eine konstante spezifische Aktivität von 87 dpm/mg (1.818 · 10<sup>4</sup> dpm/mmol).

$$ER = \frac{87 \cdot 502.9 \cdot 100}{1.055 \cdot 10^8} = 0.0415 \%$$

4.3.4.8. Applikation von Natrium[1-<sup>14</sup>C]glyoxylat  
(Aufsaugen)

Zielprodukt: Protoanemonin (1)

Aufarbeitung: 4.3.2.3., 177 g Frgw.

Aktivitätsverteilung (dpm):

A <sub>ges</sub>	A <sub>Rest</sub>	A <sub>appl</sub>	A <sub>EtOH</sub>
1.110 · 10 <sup>8</sup>	4.751 · 10 <sup>6</sup>	1.062 · 10 <sup>8</sup>	1.542 · 10 <sup>5</sup> (0.15%)

423.8 mg Silbervalerat besaßen eine konstante spezifische Aktivität von 274 dpm/mg ( $5.723 \cdot 10^4$  dpm/mmol).

$$ER = \frac{274 \cdot 423.8 \cdot 100}{1.062 \cdot 10^8} = 0.1094 \%$$

Verteilung der Radioaktivität im Protoanemonin (1):

C-Atom	spez. Radioaktivität des BaCO <sub>3</sub> (dpm/mg)	Verteilung (%)
C-1	31 (9)	18
C-2	23 (6)	14
C-3	19 (3)	11
C-4	27 (6)	16
C-5	52 (12)	41

4.3.4.9. Applikation von Natrium[5-<sup>14</sup>C]α-Ketogluarat,  
[5-<sup>14</sup>C]α-KG  
(Aufsaugen)

Zielprodukt: Protoanemonin (1)

Aufarbeitung: 4.3.2.3., 385 g Frgw.

Der Precursor wurde in einem Fall nicht zu Protoanemonin metabolisiert (spez. Aktivität des Silbervalerats: 15 dpm/mg, entsprechend einer Einbaurrate von 0.0082%), so daß das Experiment wiederholt wurde.

Aktivitätsverteilung (dpm):

A <sub>ges</sub>	A <sub>Rest</sub>	A <sub>appl</sub>	A <sub>EtOH</sub>
$1.110 \cdot 10^8$	$2.575 \cdot 10^6$	$1.084 \cdot 10^8$	$2.442 \cdot 10^5$ (0.23%)

921.9 mg Silbervalerat besaßen eine konstante spezifische Aktivität von 201 dpm/mg ( $4.200 \cdot 10^4$  dpm/mmol).

$$ER = \frac{201 \cdot 921.9 \cdot 100}{1.084 \cdot 10^8} = 0.171 \%$$

Verteilung der Radioaktivität im Protoanemonin (1):

C-Atom	spez. Radioaktivität des BaCO <sub>3</sub> (dpm/mg)	Verteilung (%)
C-1	155 (3)	86.59
C-2	13 (3)	7.26
C-3	2 (3)	1.12
C-4	4 (3)	2.79
C-5	5 (3)	2.23

4.3.4.10. Applikation von [1,5-<sup>14</sup>C]Citronensäuremonohydrat,  
[1,5-<sup>14</sup>C]Citrat  
(Aufsaugen)  
Zielprodukt: Protoanemonin (1)  
Aufarbeitung: 4.3.2.3., 250 g Frgw.

Aktivitätsverteilung (dpm):

A <sub>ges</sub>	A <sub>Rest</sub>	A <sub>appl</sub>	A <sub>EtOH</sub>
1.110 · 10 <sup>8</sup>	1.094 · 10 <sup>7</sup>	1.001 · 10 <sup>8</sup>	1.294 · 10 <sup>5</sup> (0.13%)

598.6 mg Silbervalerat besaßen eine konstante spezifische Aktivität von 52 dpm/mg (1.086 · 10<sup>4</sup> dpm/mmol).

$$ER = \frac{52 \cdot 598.6 \cdot 100}{1.001 \cdot 10^8} = 0.0311 \%$$

4.3.4.11. Applikation von 5-Amino[4-<sup>14</sup>C]lävulinsäure-  
hydrochlorid, [4-<sup>14</sup>C]ALA  
(Aufsaugen)  
Zielprodukt: Protoanemonin (1)  
Aufarbeitung: 4.3.2.3., 276 g Frgw.

Aktivitätsverteilung (dpm):

A <sub>ges</sub>	A <sub>Rest</sub>	A <sub>appl</sub>	A <sub>EtOH</sub>
1.110 · 10 <sup>8</sup>	2.198 · 10 <sup>7</sup>	8.902 · 10 <sup>7</sup>	1.757 · 10 <sup>5</sup> (0.20%)

660 mg Silbervalerat besaßen eine konstante spezifische Aktivität von 111 dpm/mg ( $2.319 \cdot 10^4$  dpm/mmol).

$$ER = \frac{111 \cdot 660 \cdot 100}{8.902 \cdot 10^7} = 0.0824 \%$$

4.3.4.12. Applikation von 4,5-Dioxo[1-<sup>14</sup>C]valeriansäure, [1-<sup>14</sup>C]DOVA

(Aufsaugen)

Zielprodukt: Protoanemonin (1)

Aufarbeitung: 4.3.2.3., 300 g Frgw.

Aktivitätsverteilung (dpm):

$A_{ges}$	$A_{Rest}$	$A_{appl}$	$A_{EtOH}$
$1.110 \cdot 10^8$	$1.265 \cdot 10^6$	$1.097 \cdot 10^8$	$2.886 \cdot 10^5$ (0.26%)

718 mg Silbervalerat besaßen eine konstante spezifische Aktivität von 90 dpm/mg ( $1.880 \cdot 10^4$  dpm/mmol).

$$ER = \frac{90 \cdot 718 \cdot 100}{1.097 \cdot 10^8} = 0.0589 \%$$

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der Einbauversuche zusammengestellt. Bei den Experimenten 4.3.4.1. - 4.3.4.3. wurde der Precursor in die Blütenstiele injiziert, die übrigen Applikationen erfolgten durch Aufsaugen des Precursors durch den geschnittenen Stengel.

Einbauversuche in die glucosidischen Vorstufen und Anemonin:

Exp. Nr.	Precursor	Metabolit	Einbaurate (%)
4.3.4.1.	[1- <sup>14</sup> C]HKV	Ranuncosid	2.02
		Ranunculosid	0.21
4.3.4.2.	[1- <sup>14</sup> C]HKV	Ranunculin	0.11
		Isoranunculin	0.02
4.3.4.3.	[1- <sup>14</sup> C]HKV	Anemonin	0.66

Einbauversuche in Protoanemonin:

Exp. Nr.	Precursor	Silbervalerat (dpm/mmol)	Einbaurate (%)	Abbauer- gebnis
4.3.4.4.	[1- <sup>14</sup> C]HKV	1.686 · 10 <sup>6</sup>	2.83	C-1, 98%
4.3.4.5.	[4- <sup>14</sup> C]HKV	1.132 · 10 <sup>5</sup>	0.56	C-4, 76%
4.3.4.6.	[1- <sup>14</sup> C]BzOKV	2.779 · 10 <sup>4</sup>	0.101	C-1, 93%
4.3.4.7.	[2- <sup>14</sup> C]Glyoxylat	1.818 · 10 <sup>4</sup>	0.0415	-
4.3.4.8.	[1- <sup>14</sup> C]Glyoxylat	5.723 · 10 <sup>4</sup>	0.1094	verteilt
4.3.4.9.	[5- <sup>14</sup> C]α-KG	4.200 · 10 <sup>4</sup>	0.171	C-1, 87%
4.3.4.10.	[1,5- <sup>14</sup> C]Citrat	1.086 · 10 <sup>4</sup>	0.0311	-
4.3.4.11.	[4- <sup>14</sup> C]ALA	2.319 · 10 <sup>4</sup>	0.0824	-
4.3.4.12.	[1- <sup>14</sup> C]DOVA	1.880 · 10 <sup>4</sup>	0.0589	-

#### 4.4. Diskussion der Ergebnisse

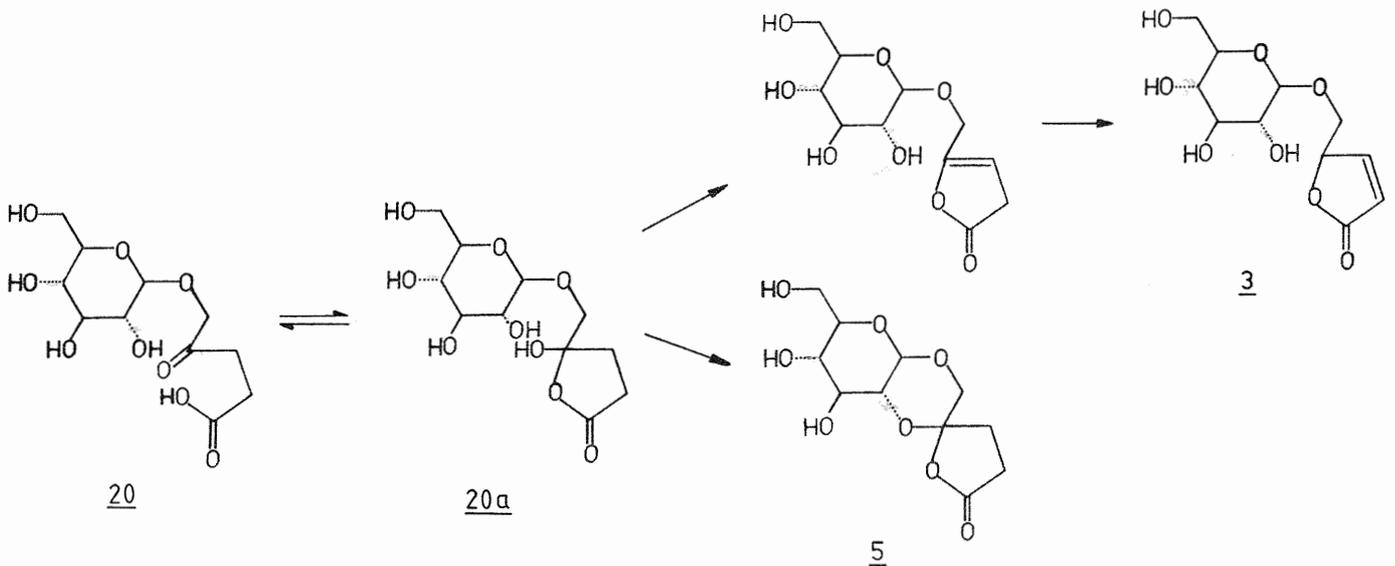
Die mit dem gleichen Precursor erhaltenen unterschiedlichen Einbauraten zeigen, daß ihrem Absolutwert keine allzu große Bedeutung beigemessen werden sollte. Auch bei scheinbar identischen äußeren Bedingungen (Applikationsmethode, Applikationszeit, Aufarbeitungsmethode) werden größere Abweichungen der Einbauraten beobachtet. Dies spiegeln auch die Experimente der japanischen Autoren wieder. Die Einbauversuche gestatten daher in erster Linie qualitative Aussagen. Eine quantitative Auswertung, wie sie z.B. bei der Untersuchung einer biogenetischen Reihenfolge von sekundären Naturstoffen mit Hilfe von Koapplikationen und Doppelmarkierungen angestrebt wird, kann und soll im vorliegenden Fall nicht gemacht werden. Eine deutlich meßbare, vor allem aber spezifische, d.h. durch Abbaureaktionen lokalisierte  $^{14}\text{C}$ -Markierung des Metaboliten spricht für die Verwertung des Precursors und damit indirekt für einen bestimmten Biogenesemechanismus. Die bei Precursoren des Primärstoffwechsels in vielen Fällen isolierten tiefaktiven Silbervalerat-Proben ( $\sim 100$  dpm/mg) werden durch die Gesamtheit der zwölf Experimente, besonders durch die Applikation des "unphysiologischen" Natrium-5-benzyloxy[1- $^{14}\text{C}$ ]lävulinats relativiert.

##### 4.4.1. Einbauversuche in die glucosidischen Vorstufen (s. 3.4.1.)

Durch die Einbauversuche mit  $^{14}\text{C}$ -markierter 5-Hydroxylävulininsäure wird erstmals experimentell gezeigt, daß die Säure eine direkte Protoanemonin-Vorstufe darstellt. Dieses Ergebnis steht im Einklang damit, daß die radioaktive Markierung auch in den bei verschiedenen Aufarbeitungsmethoden erhaltenen vier glucosidischen Vorstufen Ranunculin (3), Isoranunculin (4), Ranuncosid (5) und Ranunculosid (6) auftritt. Daraus ist zu folgern, daß in der Pflanze eine 5-Hydroxylävulinat-glucosyltransferase vor-

handen ist, die die Säure in 5-Stellung glucosyliert. Die sich anschließenden Prozesse (Cyclisierung, Dehydratisierung und Doppelbindungsverschiebung, s.S. 28) liegen sicher im Grenzgebiet enzymatisch katalysierter und spontan ablaufender Reaktionen. Bemerkenswert ist auch die außerordentlich leicht verlaufende Freisetzung des Protoanemonins, die mit dem Austrocknen des Pflanzenmaterials z.B. bei der Lyophilisation einhergeht.

Die nur im sauren Bereich stattfindende Isoranunculin-Bildung (Glucosylierung in 4-Stellung, s.S. 29) ist vermutlich als Nebenweg (Artefaktbildung) aufzufassen, dem in vivo keine Bedeutung zukommt. Es ist unwahrscheinlich, daß die Pflanze Enzymsysteme besitzt, die die Rückreaktion des Isoranunculins (4) oder auch des Ranuncosids (5) in Richtung des offenkettigen HKV-Hydroxylglucosids (20) katalysieren. Für Ranuncosid (5) und Ranunculin (3) kann als gemeinsamer Ursprung die Lactolform 20a des HKV-Hydroxylglucosids (20) angesehen werden:



Welcher der beiden Wege, Dehydratisierung oder Kondensation mit dem C-2' des Zuckers, eingeschlagen wird, hängt offenbar

von der Zusammensetzung des Extraktionsmittels und vom pH-Wert ab. Es erscheint möglich, daß bei der schonenden Extraktion mit Aceton/Wasser das HKV-Hydroxylglucosid (20) aus der enzymatischen Umgebung, die seine Weiterreaktion zum Ranunculin/Protoanemonin katalysiert, herausgelöst wird und über die im Gleichgewicht vorliegende Lactolform eine spontane Kondensation mit dem C-2' des Zuckers an Stelle einer energiereicheren Eliminierung zum Ranunculin (3) eingeht.

5-Hydroxylävulinsäure (7) wurde von allen angebotenen Precursoren am besten metabolisiert und erwies sich für *Helleborus foetidus* als biologisch aktiv. Besonders die durch Lyophilisation erhaltenen Anemoninpräparate besaßen eine hohe spezifische Aktivität ( $7.9 \cdot 10^4$  dpm/mg). Durch die deutliche Inkorporation wurde ein vollständiger Abbau des Wirkstoffs 1 ermöglicht. Dies war wegen der "Nähe" der 5-Hydroxylävulinsäure zum Primärstoffwechsel ( $\alpha$ -Ketoglutarat, Tricarbonsäurecyclus) erforderlich. Die radioaktive Markierung im Wirkstoff 1 konnte an den erwarteten Stellen (C-1 bei  $[1-^{14}\text{C}]$ HKV und C-4 bei  $[4-^{14}\text{C}]$ HKV) lokalisiert werden und schloß damit eine "Kontamination" durch eventuelle HKV-Abbauprodukte weitgehend aus. Die Hydrolyse des radioaktiven Ranuncosids (5) (s.S. 15) mit verdünnter Salzsäure zu D-Glucose und HKV (7) zeigte ebenfalls, daß rund 90% der Ranuncosidgesamtaktivität nach der Metabolisierung in der Säure erhalten geblieben war. Diese Ergebnisse können so gedeutet werden, daß die 5-Hydroxylävulinsäure trotz ihrer einfachen Struktur außerhalb des Intermediärstoffwechsels angesiedelt ist und nicht mehr zu katabolischen Reaktionen herangezogen wird. Regulatorische Bedeutung für die Protoanemoninbiogenese kommt daher sicher solchen Schritten zu, die zur Bildung der 5-Hydroxylävulinsäure führen.

4.4.2. Einbauversuch mit Natrium-5-benzyloxy [1-<sup>14</sup>C]lävulinat (s. 3.4.2.)

Der Einbauversuch mit 5-Benzyloxy [1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure (Exp. Nr. 4.3.4.6.) ergab eine verglichen mit der freien Säure viel geringere Inkorporation in Protoanemonin (1). Hierdurch wurden die übrigen Applikationen, wie bereits erwähnt, in gewissem Maße normiert. Das Ergebnis zeigt, daß die spezifische Aktivität von nur 133 dpm/mg Silbervalerat einem Nichteinbau gleichkommt, da durch die Wasserdampfdestillation bei jeder Aufarbeitung ca.  $1.2-3.0 \cdot 10^5$  dpm im Etherextrakt des Destillates wiedergefunden wurden ( $A_{\text{EtOH}}$ ). Es war deshalb damit zu rechnen, daß trotz mehrfachen Umkristallisierens besonders fest haftende oder kokristallisierende Verunreinigungen eine höhere Aktivität des Silbersalzes vortäuschten. Dennoch wurde durch den Abbau festgestellt, daß die schwache Markierung des Hemmstoffs 1 vollständig am C-Atom 1 vorhanden war. Als Erklärung kann möglicherweise angeführt werden, daß sich ein kleiner Teil des  $\alpha$ -Ketolbenzylethers in der Applikationslösung zersetzt hat und von der Pflanze verwertet wurde.

Der insgesamt schwache Einbau der an der Hydroxylfunktion blockierten Säure zeigt ebenso wie die mechanistischen Betrachtungen zur Bildung der Glucoside 3 bis 6, daß eine freie, glucosylierbare Hydroxylfunktion vorhanden sein muß. Die Aussagekraft des Experimentes wird dadurch stark eingeschränkt, daß selbst bei einem Protoanemoninbiogeneseverlauf über ein Acylglucosid keine Markierung im Wirkstoff 1 beobachtet werden sollte. Die Prozesse der Glucosylierung, Cyclisierung, Dehydratisierung und Doppelbindungsverschiebung wären zwar prinzipiell denkbar, eine Freisetzung des Wirkstoffs 1, die mit der Spaltung des Benzylethers gekoppelt wäre, sollte für die Pflanze jedoch nicht möglich sein. Der Sinn der Glucosylierung bei einem Verlauf über ein Acylglucosid bestünde lediglich in einer Aktivierung der Carboxylfunktion, mit der Struktur der isolierten

Glucoside ist sie, wie unter 3.2. dargelegt, unvereinbar. Ob das HKV-Hydroxylglucosid (20) durch Umlagerung eines primär gebildeten HKV-Acylglucosids (18) entsteht, ist mit in vivo-Tracerexperimenten nicht zu entscheiden. Derartige mechanistische Untersuchungen zur Glucoseaktivierung müßten mit gereinigten Enzympräparaten untersucht werden. Da aber bisher keine glucosidische Vorstufe mit einem 1'-HKV-Acylglucosidstrukturelement isoliert werden konnte (im Gegensatz zu den Tuliposiden), ist es unwahrscheinlich, daß dieses tatsächlich durchlaufen werden soll.

Für die Entstehung der im Ranunculosid (6) vorgefundenen 6'-HKV-Acylglucosidbindung wird daher angenommen, daß sie durch Kondensation zweier enzymatisch aktivierter Hydroxylglucoside (20) gebildet wird. Die mit der Gefriertrocknung einhergehende Konzentrierung der in den Zellen gelösten Stoffe könnte der eigentliche Anlaß für eine derartige Kondensation sein.

Die Bildung der  $\beta$ -D-Glucopyranoside (21) bei der Aufarbeitung mit Alkoholen ist möglicherweise der Transglucosidaseaktivität der Ranunculase zuzuschreiben. Anstelle einer Hydrolyse (Übertragung des Zuckerrestes auf Wasser) kann hierbei wegen der hohen Alkoholkonzentrationen eine Glucosidierung erfolgen.

#### 4.4.3. Einbauversuche zur Biosynthese der 5-Hydroxylävulinsäure in höheren Pflanzen (s. 3.4.3.)

Die zur Biosynthese der 5-Hydroxylävulinsäure in Helleborus foetidus-Pflanzen gemachten Experimente (4.3.4.7. - 4.3.4.12.) ergaben erwartungsgemäß geringe Einbauraten, so daß es schwierig war, den einen oder anderen Precursor vollends auszuschließen.

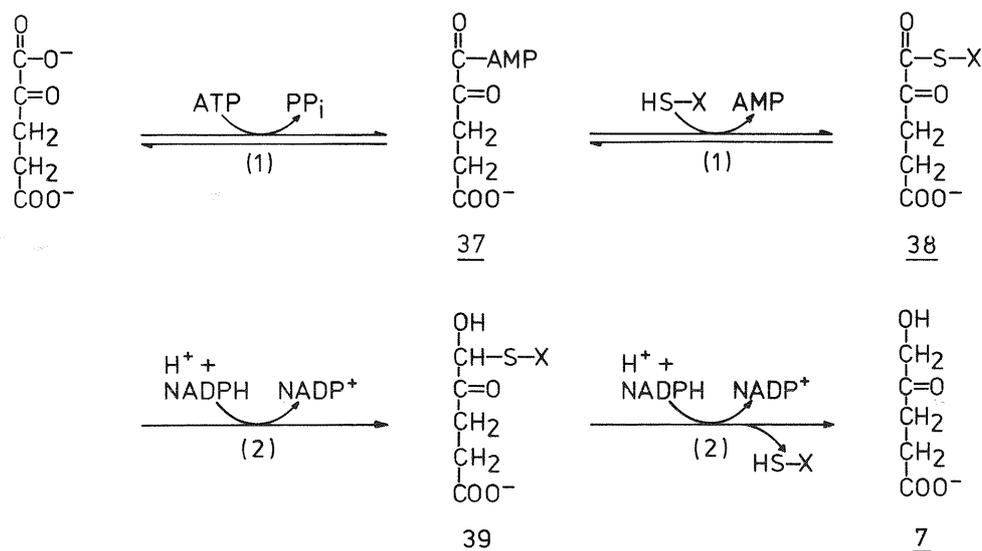
Da aus der Literatur bekannt war, daß die HKV in Mikroorganismen durch die  $\alpha$ -Ketoglutarat:Glyoxylat-Carboligase-

Reaktion gebildet wird, wurde zunächst diese Biosynthesemöglichkeit durch Applikation von  $[1-^{14}\text{C}]$ Glyoxylat und  $[2-^{14}\text{C}]$ Glyoxylat überprüft (Hypothese 1). Im Gegensatz zu dieser Vermutung wurde jedoch festgestellt, daß die  $[1-^{14}\text{C}]$ -Säure besser eingebaut wurde als die  $[2-^{14}\text{C}]$ Säure. Der Protoanemoninabbau des Versuchs mit dem  $[1-^{14}\text{C}]$ Glyoxylat ergab, daß die Radioaktivität unspezifisch über das Molekül verschmiert war. Der Einbau der  $[2-^{14}\text{C}]$ Säure war so gering (87 dpm/mg Silbervalerat), daß ein Abbau nicht unternommen wurde. Hypothese 1 kam daher mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit nicht in Betracht.

Die Applikation des  $\alpha$ -Keto $[5-^{14}\text{C}]$ glutarats zeigte dann aber in Übereinstimmung mit den Ergebnissen japanischer Forscher, daß es verwertet wurde und das C-Atom 1 des Wirkstoffs markierte, auch wenn eine Unterstützung des Einbaus durch Applikation des  $[1,5-^{14}\text{C}]$ Citrats (biologische Vorstufe) nicht erfolgreich war. Der spezifische  $\alpha$ -Keto-glutarat-Einbau zeigt, daß die 5-Hydroxylävlinsäure durch eine bisher noch nicht beschriebene Reduktion des  $\alpha$ -Keto-glutarats entsteht. Die Annahme, daß die HKV über eine Zwei-Stufen-vier-Elektronen-Reduktion mit einem  $\alpha$ -Ketoaldehyd (DOVA) als Intermediärprodukt gebildet würde (Hypothese 2), war naheliegend; sie konnte durch Einbauversuche aber nicht untermauert werden.

DOVA wie auch die mit ihr im Transaminasegleichgewicht stehende ALA ergaben sehr niedrige Einbauraten (man sollte hier besser von einem Nichteinbau sprechen). Der Nichteinbau der  $[1-^{14}\text{C}]$ DOVA wäre für sich allein wenig aussagekräftig gewesen, da auf grund der Reaktivität der Substanz damit gerechnet werden mußte, daß sie den Biosyntheseort in veränderter, nicht mehr verwertbarer Form erreichen würde. Durch den Nichteinbau der  $[4-^{14}\text{C}]$ ALA wurde daher zusätzlich bewiesen, daß die Wirkstoff- und die Porphyrinbiosynthese getrennt voneinander ablaufen und daß das ALA/DOVA-Paar nur für letztere utilized wird.

Somit müssen die Einbauversuche dahingehend gedeutet werden, daß die 5-Hydroxylävulinsäure durch eine direkte, einstufige  $\alpha$ -Ketoglutarat-Reduktion gebildet wird (Hypothese 4), bei der die freie Aldehydstufe (DOVA) z.B. durch ein enzymgebundenes  $\alpha$ -Ketoglutaraldehydthiohalbacetal (39) ersetzt wird, wie es analog bei der Reduktion des 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoAs (HMG-CoA) zum Mevalonat im Rahmen der Cholesterinbiosynthese postuliert wird. Auch hier wurde seinerzeit gefunden, daß der Mevalonsäuresemialdehyd von einer gereinigten Reduktase nicht verwertet wurde und daß die Zugabe von Aldehyd abfangendem Semicarbazid keinen Einfluß auf die Reaktion hatte<sup>129,130</sup>). In Analogie zur HMG-CoA-Reduktion, zur Fettsäure- und Aminosäureaktivierung wird daher folgender Weg des  $\alpha$ -Ketoglutarats zum 5-Hydroxylävulinat (7) vorgeschlagen:



X = CoA, Reduktase

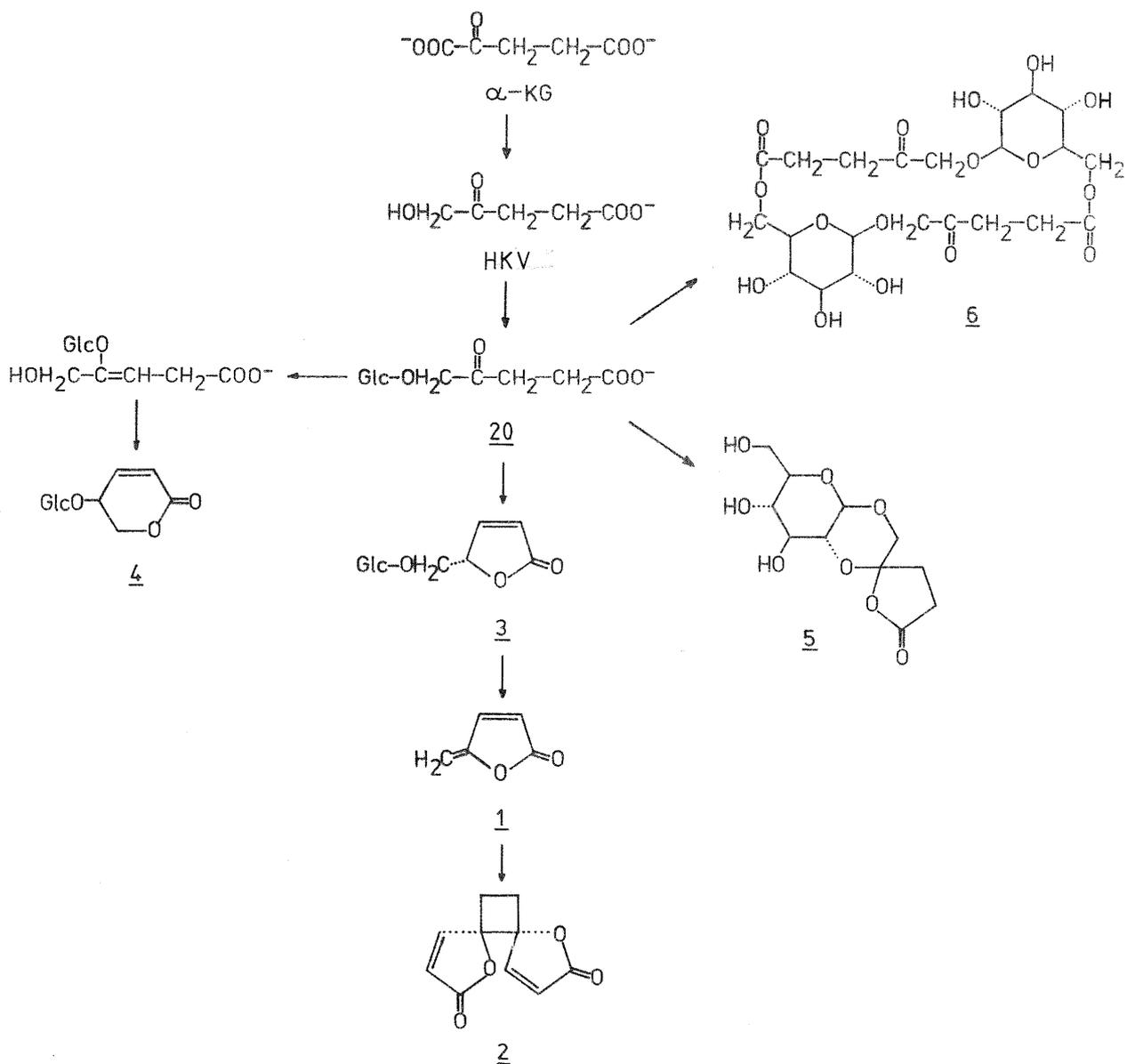
In einer vom regulatorischen Standpunkt aus gesehen wichtigen, vermutlich hochspezifischen Aktivierung des  $\alpha$ -Ketoglutarats durch eine  $\alpha$ -Ketoglutarat-CoA-Synthetase (1) wird die Dicarbonsäure aus dem Tricarbonsäurecyclus herausgeschleust und unter Verbrauch von einem ATP zum  $\alpha$ -Keto-

glutaryladenylat (37) umgesetzt. Der Befund, daß  $\alpha$ -Ketoglutarat im Vergleich zur 5-Hydroxylävulinsäure deutlich schwächer eingebaut wurde, kann so interpretiert werden, daß nur ein kleiner Teil des  $\alpha$ -Ketoglutarat-Pools der Aktivierung zugeführt wird, der Rest hingegen für katabolische oder andere Reaktionen des Amphibolismus herangezogen wird. Durch hydrolytische Spaltung des entstandenen Pyrophosphats mittels einer Phosphorylase kann das Gleichgewicht nach rechts verschoben werden. Es könnte jetzt eine Übertragung des Adenylats 37 zum Coenzym A (oder direkt zu einer SH-Gruppe der Reduktase) unter Bildung des  $\alpha$ -Ketoglutaryl-CoAs stattfinden. Die darauffolgende Reduktion benötigt zwei NADPH und könnte von einer  $\alpha$ -Ketoglutaryl-CoA-Reduktase (2) bewerkstelligt werden. Als nicht-isolierbares Zwischenprodukt der Reaktion wäre das bereits erwähnte Thiohalbacetal (39) zu formulieren. Möglicherweise ist die Abspaltung des Coenzym A (oder der Reduktase) mit einer  $\beta$ -Glucosylierung gekoppelt, da die freie Säure in den Extrakten in makroskopischer Menge nicht nachgewiesen werden konnte.

Die aus den Experimenten zu folgernde Analogie zur Mevalonatbildung bekommt auch dadurch einen interessanten Aspekt, daß aus der Mispel (*Mespilus germanica* L.) ein Glucosid des (-)(R)-Mevalonsäurelactons, das Mevalosid, isoliert werden konnte<sup>131</sup>). Da die Ranunculaceen ebenfalls Isoprenoide synthetisieren, könnte man annehmen, daß bei nicht zu großer Spezifität der HMG-CoA-Reduktase auch eine Reduktion des  $\alpha$ -Ketoglutaryl-CoAs und die darauffolgende Glucosylierung möglich sein sollte.

Abschließend seien die Applikationsergebnisse in einem Schema für die Biogenese des Protoanemonins und seiner glucosidischen Vorstufen zusammengefaßt:

Biogenese des Protoanemonins (1) und seiner glucosidischen Vorstufen Ranunculin (3), Isoranunculin (4), Ranunculosid (6) und Ranuncosid (5). Die Dimerisierung zum Anemonin (2) erfolgt spontan bei Konzentrierung von 1.



5. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) J. Müller  
Arch. Pharm. 113, 1 (1850)
- 2) H. Beckurts  
Arch. Pharm. 230, 182 (1892)
- 3) H. Meyer  
Monatsh. Chem. 17, 283 (1896)  
Monatsh. Chem. 20, 634 (1899)
- 4) Y. Asahina  
Ber. 47, 914 (1914)
- 5) M. Heyer  
Chemisch Journ. V. Crell 2, 102 (1792)  
A. D. Wurtz, "Dictionnaire de Chemie", Vol I,  
Librairie Hackette et C, Paris, 1870, S. 299
- 6) R. Hill und R. van Heyningen  
Biochem. J. 49, 332 (1951)
- 7) R. Tschesche, K. Welmar, G. Wulff und G. Snatzke  
Chem. Ber. 105, 290 (1972)
- 8) K. Welmar  
Dissertation, Univ. Bonn 1970
- 9) R. Tschesche  
Landesamt f. Forschung, Nordrh.-Westf.,  
Jahrb. 1971/72, S. 275
- 10) R. Hegnauer  
Chemotaxonomie der Pflanzen VI,  
Verlag Birkhäuser, Basel, 1964, S. 17 ff. und S. 712
- 11) H. W. L. Ruijgrok  
Naturwiss. 50, 620 (1963)
- 12) W. Karrer  
Helv. Chim. Acta 26(2), 1353 (1943)
- 13) Schuller  
Prophylaxe 6, 92 (1967)
- 14) Y. Asahina und A. Fujita  
Chem. Zentralbl. 3, 712 (1922)
- 15) R. M. Moriarty, C. R. Romain, J. L. Karle und J. Karle  
J. Am. Chem. Soc. 87, 3251 (1965)
- 16) E. Lustig und R. M. Moriarty  
J. Am. Chem. Soc. 87, 3252 (1965)
- 17) G. Pattenden  
in "Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe",  
Bd. 35, S. 133 ff., Springer Verlag, Wien 1978

- 18) L. J. Haynes  
Quart. Rev. (Chem. Soc. London) 2, 46 (1948)
- 19) F. M. Dean  
Naturally Occurring Oxygen Ring Compounds,  
Butterworths 1963, Kapitel 3, S. 53 ff.
- 20) L. Stryer  
Biochemie, Verlag Friedr. Vieweg & Sohn,  
Braunschweig/Wiesbaden, 1979, S. 514
- 21) E. Shaw  
J. Am. Chem. Soc. 68, 2150 (1946)
- 22) C. Grundmann und E. Kober  
J. Am. Chem. Soc. 77, 2332 (1955)
- 23) J. F. Osipenko und M. M. Doroshkevich  
Vestsi Akad. Navuk Belarusk. SSR,  
Ser. Fiz.-Tekhn. Navuk 1963(4), 71 (1963)  
ref. C. A. 60, 10628d (1964)
- 24) I. E. Muskat, B. C. Becker und J. S. Lowenstein  
J. Am. Chem. Soc. 52, 326 (1930)
- 25) H. M. Walton  
J. Org. Chem. 22(1), 312 (1957)  
J. Org. Chem. 22(1), 315 (1957)
- 26) G. Lardelli, G. Dijkstra, P. D. Harkes und J. Boldingh  
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 85, 43 (1966)
- 27) Noël und Lamert  
Arch. internat. de Pharmacodynamie 4, 173 (1898)
- 28) Raymond-Hamet  
Chem. Zentralbl. II,1, S. 121 (1927)
- 29) F. Boas und R. Steude  
Biochem. Z. 279, 417 (1935)
- 30) H. Baer, M. Holden und B. C. Seegal  
J. Biol. Chem. 162, 65 (1946)
- 31) A. G. Winter und L. Willeke  
Naturwiss. 38, 457 (1951)
- 32) C. J. Cavallito und T. H. Haskell  
J. Am. Chem. Soc. 67, 1991 (1945)
- 33) T. Reynolds  
Chem. and Industry 1975, 603 (1975)
- 34) S. Garb  
Bot. Rev. 27, 422 (1961)
- 35) D. Gross  
in "Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe",  
Bd. 34, S. 187 ff., Springer Verlag, Wien 1977
- 36) H. Metzner  
Biochemie der Pflanzen  
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1973

- 37) H. Schildknecht  
Nachr. Chem. Tech. Lab. 26(5), 282
- 38) M. H. Benn und L. J. Yelland  
Canad. J. Chem. 46, 729 (1968)
- 39) C. J. Cavallito und T. H. Haskell  
J. Am. Chem. Soc. 68, 2332 (1946)
- 40) B. H. H. Bergman, J. C. M. Beijersbergen,  
J. C. Overeem und A. K. Sijpesteijn  
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 86, 709 (1967)
- 41) U. W. Brongersma-Oosterhoff  
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 86, 705 (1967)
- 42) R. Tschesche, F.-J. Kämmerer und G. Wulff  
Tetrahedron Letters 1968, 701 (1968)
- 43) R. Tschesche, F.-J. Kämmerer und G. Wulff  
Chem. Ber. 102, 2057 (1969)
- 44) G. Wulff und R. Tschesche  
Tetrahedron 25, 415 (1969)
- 45) R. A. Mariezcurrena, S. E. Rasmussen, J. Lam  
und E. Wollenweber  
Tetrahedron Letters 1972, 3091 (1972)
- 46) S. Delhvi  
unveröffentlichte Ergebnisse
- 47) A. Martinek  
Planta Med. 24, 73 (1973)
- 48) A. Martinek  
Planta Med. 26, 218 (1974)
- 49) C. Skötsch  
Diplomarbeit, Univ. Bonn 1976
- 50) K. Welmar  
private Mitteilung
- 51) T. Suga und T. Hirata  
Chemistry Letters (Chem. Soc. Japan) 1973, 637 (1973)
- 52) T. Suga, T. Hirata, T. Horikawa und N. Waki  
Chemistry Letters (Chem. Soc. Japan) 1974, 1201 (1974)
- 53) H. G. Schlegel  
Allgemeine Mikrobiologie  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1976, S. 223 ff.
- 54) M. Okuyama, S. Tsuiki und G. Kikuchi  
Biochim. Biophys. Acta 110, 66 (1965)
- 55) H. J. Nakada und S. Weinhouse  
Arch. Biochem. Biophys. 42, 257 (1953)
- 56) H. J. Nakada und L. P. Sund  
J. Biol. Chem. 233, 8 (1958)

- 57) W. Franke und G. Jilge  
Arch. Mikrobiol. 39, 88 (1961)
- 58) J. C. Crawhall und R. W. E. Watts  
Biochem. J. 85, 163 (1962)
- 59) H. Kawasaki, M. Okuyama und G. Kikuchi  
J. Biochem. (Tokyo) 59, 419 (1966)
- 60) B. Payes und G. G. Laties  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 13, 179 (1966)
- 61) K. Kobayashi, K. Kuratomi und T. Sekine  
Seikagaku 35, 623 (1963)
- 62) D. L. McDonald und R. Y. Stanier  
in Colowick, Kaplan:  
Methods in Enzymology III, S. 614 (1951)
- 63) F. K. Wang, J. Koch und E. L. R. Stokstad  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 576 (1970)
- 64) T. Moriyama und G. Yui  
Biken J. 9(4), 263 (1966)
- 65) J. Koch und E. L. R. Stokstad  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 585 (1966)
- 66) M. A. Schlossberg, D. A. Richert, R. J. Bloom  
und W. W. Westerfeld  
Biochemistry 7, 333 (1968)
- 67) M. A. Schlossberg, R. J. Bloom, D. A. Richert  
und W. W. Westerfeld  
Biochemistry 9, 1148 (1970)
- 68) N. P. Kubasik, D. A. Richert, R. J. Bloom, R. Y. Hsu  
und W. W. Westerfeld  
Biochemistry 11, 2225 (1972)
- 69) H. Yamasaki und T. Moriyama  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 638 (1970)
- 70) D. Shemin, C. S. Russell und T. Abramsky  
J. Biol. Chem. 215, 613 (1955)
- 71) L. Heilmeyer  
Dissertation, Univ. Freiburg 1965
- 72) H. J. Kissel und L. Heilmeyer jr.  
Biochim. Biophys. Acta 177, 78 (1969)
- 73) T. Jerzykowski, R. Winter und W. Matuszewski  
Biochem. J. 135, 713 (1973)
- 74) E. Meller, S. Belkin und E. Harel  
Phytochemistry 14, 2399 (1975)
- 75) E. Harel, E. Meller und M. Rosenberg  
Phytochemistry 17, 1277 (1978)
- 76) H.-U. Meisch, H. Hoffmann und W. Reinle  
Z. Naturforsch. 33c, 623 (1978)

- 77) S. I. Beale, M. H. Gold und S. Granick  
Phytochemistry 18, 441 (1979)
- 78) F. B. Kipping  
J. Chem. Soc. (London) 1935, 1145 (1935)
- 79) E. F. Phares  
Arch. Biochem. 33, 173 (1951)
- 80) E. H. Mosbach, E. F. Phares und S. F. Carson  
Arch. Biochem. 33, 179 (1951)
- 81) C. S. Marvel und R. D. Rands jr.  
J. Am. Chem. Soc. 72, 2642 (1950)
- 82) H. Frohofer  
Z. Anal. Chem. 253, 97 (1971)
- 83) S. Lartillot und Ch. Baron  
Bull. Soc. Chim. France 12, 3798 (1966)
- 84) E. G. Mesropyan, E. N. Dzhandzhapanyan und M. T. Dangyan  
Khim. Geterotsikl. Soedin. 1968(6), 963 (1968)  
ref. C. A. 70, 57082c (1969)
- 85) Ch. Rappe  
Arkiv Kemi 14, 467 (1959)
- 86) H. Auterhoff und H. J. Flach  
Arch. Pharm. 295, 460 (1966)
- 87) R. J. Bloom und W. W. Westerfeld  
Biochemistry 5, 3204 (1966)
- 88) W. Wirth  
Diplomarbeit, Univ. Bonn 1977
- 89) T. B. Johnson und L. A. Mikeska  
J. Am. Chem. Soc. 41, 812 (1919)
- 90) L. Wolff  
Ann. Chem. 229, 266 (1885)
- 91) L. Wolff  
Ann. Chem. 260, 79 (1890)
- 92) K. Breuer und Th. Zincke  
Ber. 13, 636 (1880)
- 93) K. Breuer und Th. Zincke  
Ann. Chem. 216, 313 (1883)
- 94) Houben-Weyl 7(1), S. 190  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1954
- 95) S. A. Brown  
in "A Specialist Periodical Reports, Biosynthesis",  
Vol. 1, S. 1,  
The Chemical Society, Burlington House, London, 1972
- 96) R. Robinson  
Structural Relations of Natural Products  
Oxford University Press, Oxford, 1955

- 97) E. Breitmaier, G. Jung und W. Voelter  
Angew. Chem. 83, 659 (1971)
- 98) F. W. Wehrli und T. Nishida  
in "Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe",  
Bd. 36, S. 1 ff., Springer Verlag, Wien, 1979
- 99) A. G. McInnes und J. L. C. Wright  
Acc. Chem. Res. 8, 313 (1975)
- 100) R. Tschesche  
in "Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe",  
Bd. 12, S. 131 ff., Springer Verlag, Wien, 1955
- 101) T. A. Wheaton und I. Stewart  
Phytochemistry 8, 85 (1969)
- 102) S. A. Brown und L. R. Wetter  
Progr. Phytochem. 3, 1 (1972)
- 103) R. D. Bennett und E. Heftmann  
Phytochemistry 4, 475 (1965)
- 104) M. H. Zenk  
Veröffentlichungen der Rhein.-Westf. Akad. d. Wiss.  
N 257 (1976)
- 105) D. Vágújfalvi, M. Maróti und P. Tétéuyi  
Phytochemistry 13, 823 (1974)
- 106) T. Robinson  
Science 184, 430 (1974)
- 107) D. H. R. Barton und D. A. Widdowson  
EuChem Conference on Chemistry and Biosynthesis of  
Steroids and Terpenoids, La Laguna (1974)
- 108) H. Simon und P. Rauschenbach  
in "Anwendung von Isotopen in der Organischen Chemie  
und Biochemie", Bd. II,  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1974, S. 54 f.
- 109) R. Tschesche, W. Freytag und G. Snatzke  
Chem. Ber. 92, 3053 (1959)
- 110) H. Adkins, N. Isbell und B. Wojcik  
in "Organic Syntheses", Coll. Vol. 2, S. 262  
John Wiley & Sons, Inc., New York, 1950
- 111) A. K. Macbeth und D. Traill  
J. Chem. Soc. 127, 1121 (1925)
- 112) Ch. Rappe  
Arkiv Kemi 13, 425 (1959)
- 113) A. R. Battersby, R. Binks, W. Lawrie, G. V. Parry  
und B. R. Webster  
J. Chem. Soc. (London) 1965, bes. S. 7468 (1965)
- 114) J. H. Helberger, S. Ulubay und H. Civelekoglu  
Ann. Chem. 561, 215 (1949)

- 115) E. Erlenmeyer  
Ber. 23(1), 74 (1890)
- 116) E. Breitmaier und G. Bauer  
<sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie  
Eine Arbeitsanleitung mit Übungen  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1977, S. 52
- 117) W. Koenigs und E. Knorr  
Ber. 34, 974 (1901)
- 118) G. Wulff, W. Krüger und G. Röhle  
Chem. Ber. 104, 1387 (1971)
- 119) H. Gault und A. Viout  
Bull. Soc. Chim. France 1951, 713 (1951)
- 120) M. G. Peter  
private Mitteilung
- 121) H. Busch, R. B. Hurlbert und V. R. Potter  
J. Biol. Chem. 196, 717 (1952)
- 122) Schmeil-Fitschen  
Flora von Deutschland und seinen angrenzenden Gebieten  
Verlag Quelle & Meyer, Heidelberg, 1968, S. 116
- 123) P. Colombo, D. Corbetta, A. Pirotta, G. Ruffini  
und A. Sartori  
J. Chromatogr. 3, 343 (1960)
- 124) F. Zymalkowski  
Katalytische Hydrierungen  
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1965, S. 24
- 125) R. Adams und R. L. Shriner  
J. Am. Chem. Soc. 45, 2171 (1923)
- 126) H. W. L. Ruijgrok  
Planta Medica 11, 338 (1963)
- 127) M. G. Peter  
Dissertation, Univ. Zürich 1973
- 128) H. Simon und H. G. Floss  
Bestimmung der Isotopenverteilung in markierten  
Verbindungen, Bd. I, S. 13,  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967
- 129) J. Knappe, E. Ringelmann und F. Lynen  
Biochem. Z. 332, 195 (1959)
- 130) I. F. Durr und H. Rudney  
J. Biol. Chem. 235, 2572 (1960)
- 131) R. Tschesche, K. Struckmeyer und G. Wulff  
Chem. Ber. 104, 3567 (1971)

DANK

Zum Abschluß der Arbeit möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Gewährung von Sach- und Personalbeihilfen zur Durchführung des Forschungsvorhabens danken.

Ich möchte außerdem allen danken, die durch Ihre Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, besonders

Frau Dr. Welmar für die Überlassung je einer Substanzprobe von Ranunculin- und Isoranunculintetraacetat sowie von Ranuncosid und Ranunculosid,

Herrn Dr. Peter für Ratschläge bei der Durchführung der Grignard-Reaktion mit  $^{14}\text{CO}_2$  und beim Abbau des Silbervalerats,

Herrn Schmidt für die Messung von  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren,

meiner Frau, die mir mit Rat und Tat bei den Pflanzenversuchen zur Seite stand.

6. LEBENSLAUF

Am 26. 2. 1951 wurde ich als erstes von zwei Kindern des Verwaltungsjuristen Werner Wirth und seiner Ehefrau Erika, geb. Hovenbitzer, in Unkel am Rhein geboren.

Dezember 1953 zogen wir von Erpel nach Köln-Lindenthal, wo ich von Ostern 1957 bis Oktober 1960 die Kath. Volksschule besuchte.

1962 trat ich in das damalige Städtische Neusprachliche Gymnasium Bensberg ein, wo wir seit 1960 wohnten. Dort legte ich 1970 die Reifeprüfung ab.

Zum Wintersemester 1970/71 immatrikulierte ich mich an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn im Fach Chemie. 1973 legte ich das Diplomchemiker-Vorexamen ab. Im Juli 1976 folgte das Hauptexamen.

Am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn fertigte ich dann bei Herrn Prof. Dr. Rudolf Tschesche meine Diplomarbeit über die inaktive Synthese von 5-Hydroxy[1-<sup>14</sup>C]lävulinsäure an.

Mit der vorliegenden Dissertation begann ich im Oktober 1977. Sie stand ebenfalls unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rudolf Tschesche.

Seit September 1977 bin ich mit der Studienrätin Hedi Weber verheiratet und wohne in Hennef a. d. Sieg.