**Methanophenazin: Strukturaufklärung und
Totalsynthese eines neuartigen Cofaktors aus
methanogenen Archaea**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Mario Tietze
aus Kyllburg

Göttingen 2000

D7

Referent:	Priv.-Doz. Dr. U. Beifuss
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. h.c. L. F. Tietze
Tag der mündlichen Prüfung:	02. 11. 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1997 bis Mai 2000 am Institut für Organische Chemie der Georg-August-Universität in Göttingen angefertigt.

Besonders herzlich danke ich
Herrn Priv.-Doz. Dr. Uwe Beifuss für die
interessante Themenstellung, die vielen
Anregungen in zahlreichen Diskussionen und die
Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

I Allgemeiner Teil

1	Einleitung	1
2	Methanogenese	11
2.1	Methanogene Organismen	11
2.2	Der Energiestoffwechsel methanogener Archaea	13
2.3	Untersuchungen an <i>Methanosarcina mazei</i> Gö1	17
3	Zielsetzung und Planung der Arbeit	19
3.1	Strukturaufklärung von Methanophenazin (1)	20
3.2	Synthese von Methanophenazin (1)	20
3.3	Retrosynthese von Methanophenazin (1)	21
4	Strukturaufklärung von Methanophenazin (1)	24
4.1	Fermentation	24
4.2	Isolierung	24
4.3	Reinigung	25
4.4	Strukturaufklärung	31
4.5	Zusammenfassung	42
5	Vorkommen und Biosynthese von Phenazinen	44
5.1	Vorkommen von Phenazinen	44
5.2	Biosynthese von Phenazinen	48
6	Synthese von 2-Hydroxyphenazin (2)	53
6.1	Wege zu Phenazinen	53
6.2	Synthese von 2-Hydroxyphenazin (2) nach <i>Kehrmann</i> und <i>Cherpillod</i>	56
6.3	Synthese von 2-Hydroxyphenazin (2) nach <i>Ott</i>	58
6.4	Diskussion der spektroskopischen Daten von 2-Hydroxyphenazin (2)	59

7	Synthese des Phenazinethers <i>rac</i>-51	62
7.1	Optimierung der Versuchsbedingungen	62
7.2	Diskussion der spektroskopischen Daten von <i>rac</i> -51	64
8	Synthese der C₆-Bausteine <i>rac</i>-6 und (<i>R</i>)-6	66
8.1	Synthese von <i>rac</i> -6	66
8.2	Synthese von (<i>R</i>)-6	67
8.2.1	Synthese der Lactone (<i>R</i>)-12 und (<i>S</i>)-12	69
8.2.2	Öffnung des Lactons (<i>R</i>)-12 zum Amid (<i>R</i>)-56	71
8.2.3	Diskussion der spektroskopischen Daten von (<i>R</i>)-56	71
8.2.4	Reduktion des Piperidids (<i>R</i>)-56 und Synthese von (<i>R</i>)-6	73
8.2.5	Diskussion der spektroskopischen Daten von (<i>R</i>)-6	75
8.3	Bestimmung der optischen Reinheit des C ₆ -Bausteins (<i>R</i>)-6	76
8.4	Zusammenfassung	79
9	Synthese des diastereomerenreinen C₁₉-Bausteins 7	80
9.1	Synthese des terminalen Alkins 9	80
9.2	Diskussion der spektroskopischen Daten von 9	82
9.3	Synthese des Vinyljodids 7	84
9.4	Diskussion der spektroskopischen Daten von 7	86
9.5	Zusammenfassung	88
10	Synthese von Methanophenazin (1)	89
10.1	Palladium-katalysierte Kreuzkupplung von (<i>R</i>)-6 mit 7	89
10.2	Desilylieren der Seitenkette von (<i>S</i>)-76	91
10.3	Bestimmung der Enantiomerenreinheit von (<i>S</i>)-78	92
10.4	Diskussion der spektroskopischen Daten von (<i>S</i>)-78	95
10.5	Darstellung von (<i>S</i>)-Methanophenazin [(<i>S</i>)-1]	98
10.6	Darstellung von racemischem Methanophenazin <i>rac</i> -1	99
10.7	Diskussion der spektroskopischen Daten von (<i>S</i>)-Methanophenazin [(<i>S</i>)-1]	99
10.8	Zusammenfassung	103

11	Versuche zur Ermittlung der absoluten Konfiguration von Methanophenazin (1)	104
11.1	Untersuchungen mit chromatographischen Methoden	104
11.2	Untersuchungen mit chiroptischen Methoden	105
11.3	Versuche zur Aufklärung der absoluten Konfiguration durch chemischen Abbau	106
11.4	Zusammenfassung	107
12	Die biologische Funktion von Methanophenazin (1)	108
12.1	Untersuchungen zum membrangebundenen Elektronentransfer in <i>Methanosarcina mazei</i> Gö1	110
12.2	Zusammenfassung	113
13	Zusammenfassung und Ausblick	114
II	Experimenteller Teil	
1	Allgemeine Verfahren	125
1.1	Allgemeine Arbeitstechniken	125
1.2	Verwendete Geräte	125
1.3	Chromatographische Methoden	126
1.4	Software	127
2	Synthese von 2-Hydroxyphenazin (2)	128
2.1	1,2,4-Triacetoxybenzol (44)	128
2.2	1,2,4-Trihydroxybenzol (45)	129
2.3	2-Hydroxyphenazin (2) nach <i>Kehrmann</i> und <i>Cherpillod</i>	130
2.4	2-Hydroxyphenazin (2) nach <i>Ott</i>	131

3	Synthese des Phenazinethers <i>rac</i>-51	133
3.1	(3 <i>RS</i>)-(±)-8-Methylsulfonyl-2,6-dimethyl-non-2-en (<i>rac</i> -49)	133
3.2	(3 <i>RS</i>)-(±)-8-Toluolsulfonyl-2,6-dimethylnon-2-en (<i>rac</i> -48)	134
3.3	(3 <i>RS</i>)-(±)-8-Brom-2,6-dimethyl-2-hepten (<i>rac</i> -50)	135
3.4	(3' <i>RS</i>)-(±)-2-(3,7-Dimethyl-oct-6-enyloxy)-phenazin (<i>rac</i> -51)	136
4	Synthese des C₆-Bausteins <i>rac</i>-6	138
4.1	(3 <i>RS</i>)-(±)-5- <i>tert.</i> -Butylsilyloxy-3-methyl-pentan-1-ol (<i>rac</i> -52)	138
4.2	(3 <i>RS</i>)-(±)-5-Iodo-3-methyl-pentoxy-isopropyl- dimethyl-silan (<i>rac</i> -6)	139
4.3	(3 <i>RS</i>)-(±)-5-Bromo-3-methyl-pentoxy-isopropyl- dimethyl-silan (<i>rac</i> -53)	140
5	Synthese der C₆-Bausteine (<i>R</i>)-6 und (<i>S</i>)-12	142
5.1	(4 <i>R</i>)-(+)-4-Methyl-tetrahydro-2-pyran-2-on [(<i>R</i>)-12]	142
5.2	(3 <i>R</i>)-(+)-5-Hydroxy-3-methyl-1-piperidin- 1-yl-pentan-1-on [(<i>R</i>)-56]	143
5.3	(3 <i>R</i>)-(-)-5- <i>tert.</i> -Butyldimethylsilyloxy-3-methyl- 1-yl-pentan-1-on [(<i>R</i>)-57]	144
5.4	(3 <i>S</i>)-(+)-5- <i>tert.</i> -Butylsilyloxy-3-methyl-pentan-1-ol [(<i>R</i>)-52]	145
5.5	(3 <i>R</i>)-(-)-5-Iodo-3-methyl-pentoxy-isopropyl- dimethyl-silan [(<i>R</i>)-6]	147
5.6	Synthese des Lactons (4 <i>S</i>)-(-)-4-Methyl-tetrahydro- pyran-2-on [(<i>S</i>)-12]	148
6	Synthese des diastereomerenreinen Vinyliodids 7	149
6.1	(5 <i>E</i> ,9 <i>E</i>)-6,10,14-Trimethyl-pentadeca-5,9,13-trien-1-in (9)	149
6.2	(1 <i>E</i> ,5 <i>E</i> ,9 <i>E</i>)-1-Iodo-2,6,10,14-tetramethyl-pentadeca- 1,5,9,13-tetraen (7)	151

7	Synthese von racemischen Methanophenazin (<i>rac</i>-1)	153
7.1	(6 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>E</i>)-(3 <i>RS</i>)-(±)- <i>tert.</i> -Butyloxysilyl-3,7,11,15,19-pentamethyl-eicosa-6,10,14,18-tetraen (<i>rac</i> -76)	153
7.2	(6 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>E</i>)-(3 <i>RS</i>)-(±)-3,7,11,15,19-Pentamethyl-eicosa-6,10,14,18-tetraen-1-ol (<i>rac</i> -78)	155
7.3	(<i>E</i> 6', <i>E</i> 10', <i>E</i> 14')-(3' <i>RS</i>)-(±)-2(3,7,11,15,19-Pentamethyl-eicosa-6,10,14,18-tetraenyloxy)-phenazin (<i>rac</i> -1)	156
8	Synthese von (<i>S</i>)-Methanophenazin [(<i>S</i>)-1]	159
8.1	(6 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>E</i>)-(3 <i>S</i>)-(–)-3,7,11,15,19-Pentamethyl-eicosa-6,10,14,18-tetraen-1-ol [(<i>S</i>)-78]	159
8.2	(<i>E</i> 6', <i>E</i> 10', <i>E</i> 14')-(3' <i>S</i>)-(–)-2(3,7,11,15,19-Pentamethyl-eicosa-6,10,14,18-tetraenyloxy)-phenazin [(<i>S</i>)-1]	160
9	Synthese der Mosher-Ester <i>rac</i>-63, (<i>S,S</i>)-63, <i>rac</i> 79 und (<i>S,S</i>)-79	162
9.1	(2 <i>S</i> ,3' <i>RS</i>)-3,3,3-Trifluoro-2-methoxy-2-phenyl-propansäure-5'- <i>tert.</i> -butyldimethylsilyl-pentylester (<i>rac</i> -63)	162
9.2	(2 <i>S</i> ,3' <i>S</i>)-3,3,3-Trifluoro-2-methoxy-2-phenyl-propansäure-5'- <i>tert.</i> -butyldimethylsilyl-pentylester [(<i>S</i>)-63]	163
9.3	(2 <i>S</i> ,3' <i>RS</i> ,6' <i>E</i> ,10' <i>E</i> ,14' <i>E</i> ,18' <i>E</i>)-3,3,3-Trifluoro-2-methoxy-2-phenyl-propan-säure-3',7',11',15',19'-pentamethyl-eicosa-tetraenyl-ester (<i>rac</i> -79)	164
9.4	(2 <i>S</i> ,3' <i>S</i> ,6' <i>E</i> ,10' <i>E</i> ,14' <i>E</i> ,18' <i>E</i>)-3,3,3-Trifluoro-2-methoxy-2-phenyl-propan-säure-3',7',11',15',19'-pentamethyl-eicosa-tetraenyl-ester [(<i>S,S</i>)-79]	165
10	Charakterisierung von Methanophenazin (1)	167
III	Anhang	
1	Abkürzungsverzeichnis	169
2	Literaturverzeichnis und Anmerkungen	170

I Allgemeiner Teil

1 Einleitung

Die physikalische Grundeinheit aller Organismen ist die Zelle. Sie ist die kleinste lebensfähige Einheit und setzt sich im wesentlichen aus den Bestandteilen Desoxyribonucleinsäure (DNA), Ribonucleinsäure (RNA), Proteinen, Lipiden und Phospholipiden zusammen. Jede vegetative Zelle hat eine definierte Struktur und Größe und stellt ein mikroskopisch und makroskopisch hochgeordnetes System dar, dessen Struktur die Grundlage des Lebens ist. Die Zelle ist ein offenes System, das nach Art eines Fließgleichgewichts kontinuierlich Material aufnimmt, transformiert und ausscheidet. Durch den hohen Organisationsgrad befinden sich lebende Organismen nicht im Gleichgewicht mit ihrer Umgebung, die dem dritten Hauptsatz der Thermodynamik folgend, auf Maximierung der Entropie des Universums ausgerichtet ist. Um einen Ordnungszustand aufzubauen und zu erhalten, muß Energie aufgewendet werden, weshalb vegetative Zellen sowohl während des Wachstums als auch in Ruhe auf dauernde Energiezufuhr angewiesen sind.^[1,2]

Die zur Erhaltung des Lebens sowie zur Neusynthese von Zellbestandteilen und Reduplikation der Zelle notwendige Energie gewinnt der Organismus im Stoffwechsel. Hierbei werden Nährstoffe aus der Umgebung aufgenommen und mit Hilfe von Enzymen umgesetzt. Man unterscheidet den Katabolismus, bei dem durch den Abbau von organischen Substanzen niedermolekulare Verbindungen gebildet und biochemisch nutzbare Energie freigesetzt wird, vom Anabolismus, bei dem aus niedermolekularen Verbindungen durch biologische Synthese monomere und polymere Zellbestandteile aufgebaut werden.

Abb. 1: Umwandlung von ATP in ADP und Phosphat

Das Coenzym Adenosin-5'-triphosphat (ATP) stellt die wichtigste Speicherform biologisch nutzbarer Energie dar und ist der universelle Überträger zwischen energiefreisetzenden und energieaufwendigen Reaktionen. Beinahe alle energieaufwendigen Prozesse in lebenden Zellen sind mit der Umwandlung von ATP zu Adenosin-5'-diphosphat (ADP) gekoppelt (Abbildung 1).^[3]

Die Hydrolyse von ATP führt unter Abspaltung eines Phosphatrestes PO_4^{3-} zu ADP und ist stark exergon. Die dabei freigesetzte chemische Energie dient dazu, durch energetische Kopplung endergone Vorgänge wie Biosynthesen, Bewegungs- und Transportprozesse zu ermöglichen.

Im Laufe der Evolution haben sich zwei grundlegende Mechanismen der ATP-Synthese herausgebildet, die in ähnlicher Weise in allen Zellen stattfinden. Unter der Elektronentransportphosphorylierung versteht man einen Prozess, bei dem Elektronen von einem Donor mit negativem Redoxpotential auf einen Akzeptor mit stärker positivem Redoxpotential übertragen werden. Diese Redoxreaktionen verlaufen immer an Membranen, wobei die freiwerdende Energie zum Aufbau eines transmembranen elektrochemischen Gradienten genutzt wird. Wie in einem Kondensator findet an der Membran eine Trennung der Ladungen statt, die der Speicherung von Energie dient. Wichtig für die zelluläre ATP-Synthese sind Protonengradienten. Der Energiegehalt ΔG eines solchen Gradienten ist die Summe aus der pH-Differenz ΔpH und des elektrischen Membranpotentials $\Delta \Psi$ zwischen der inneren und äußeren Seite der Membran. Das Membranpotential $\Delta \Psi$ ist direkt abhängig von der Differenz der Redoxpotentiale von Elektronendonator und Elektronenakzeptor. Aus den beiden Größen ΔpH und $\Delta \Psi$ ergibt sich die protonenmotorische Kraft ΔP als Maß für die chemische Arbeit ΔG , die der Gradient zu leisten vermag.^[4]

H^+ -transportierende, membrangebundene ATP-Synthasen nutzen den aufgebauten Protonengradienten und dessen Energie zur ATP-Synthese. Elektronentransportphosphorylierung findet in der Atmungskette und im Photosyntheseapparat statt.

Der zweite Mechanismus der ATP-Bildung wird als Substraphosphorylierung bezeichnet. Er beruht auf der Kopplung der ATP-Synthese an die Hydrolyse energiereicher Stoffwechselmetabolite, die beim Abbau von organischen Substraten in kleiner Zahl gebildet werden. Solche Verbindungen wie beispielsweise Phosphoenolpyruvat, Acetylphosphat und 1,3-Bisphosphoglycerat enthalten energiereiche Phosphatbindungen (Abbildung 2).

Abb. 2: Strukturen von 1,3 Bisphosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat und Acetylphosphat

Im Verlauf des Stoffwechsels ermöglichen Enzyme den Transfer der energiereichen Phosphatgruppen vom Substrat auf ADP. Beispielweise katalysiert das Enzym Pyruvat-Kinase die Übertragung einer Phosphatgruppe von Phosphoenolpyruvat auf ADP. Bei dieser Reaktion entstehen Pyruvat und ATP (Abbildung 3).

Abb. 3: Umwandlung von Phosphoenolpyruvat in Pyruvat und ATP

Es hat sich als nützlich erwiesen, die Organismen nach der Art der Energiequellen einzuteilen, die sie nutzen, um nach den genannten Mechanismen ATP zu regenerieren.

Demnach unterscheidet man die phototrophen von den chemotrophen Organismen. Diejenigen Organismen, welche als Energiequelle das Licht nutzen, werden als phototroph bezeichnet. Chemotrophe Lebewesen hingegen gewinnen ihre Energie zur ATP-Regeneration aus Redox-Reaktionen an den als Nährstoffe dienenden Substraten (Abbildung 4).^[3]

Weitere Kriterien zur Einteilung der Lebewesen berücksichtigen neben der Energiequelle die Kohlenstoffquelle und den Wasserstoff-Donor des Organismus. Mit Blick auf den Ursprung des Zellkohlenstoffs unterscheidet man zwischen heterotrophen und autotrophen Lebewesen. Die Erstgenannten nutzen organische Verbindungen, letztgenannte nutzen Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle zum Zellaufbau. Alle Organismen, die organische Verbindungen als Wasserstoff-Donor benutzen, werden als organotroph bezeichnet. Der Begriff lithotroph kennzeichnet die Fähigkeit, den Wasserstoff aus anorganischen Donoren wie elementarem Wasserstoff (H_2), Ammoniak (NH_3), Schwefelwasserstoff (H_2S) u. a. verwerten zu können. Phototrophe Pflanzen und Cyanobakterien, die den anorganischen Elektronendonator Wasser (H_2O) zur Reduktion von Kohlendioxid verwenden, werden demnach als photolithoautotroph bezeichnet. Organismen, die im Licht mit organischen Substraten wachsen, werden photorganoheterotroph genannt. Dementsprechend bezeichnet man chemotrophe Bakterien, die organisches Material benutzen, als chemorganoheterotroph. Zu dieser Gruppe gehören anaerobe und aerobe Bakterien. Die Anaeroben nutzen entweder Nitrat (NO_3^-), Sulfat (SO_4^{2-}) oder organische Verbindungen als Elektronenakzeptor. Chemolithoautotrophe Bakterien bedienen sich anorganischer Elektronendonoren wie Wasserstoff (H_2), Ammoniak (NH_3), Schwefelwasserstoff (H_2S) u. a. und oxidieren diese mit Luftsauerstoff zu Wasser, Sulfat

(SO_4^{2-}) und Nitrit (NO_2^-). Diese exergonische Reaktion wird mit der Bildung von ATP aus ADP und Phosphat gekoppelt.^[1]

Abb. 4: Schema zur Einteilung der Lebewesen nach der Energie- und Kohlenstoffquelle die sie zum Leben nutzen^[5]

Die Methanogenen unterscheiden sich deutlich von allen anderen chemolithoautotrophen Bakterien, weil sie im Gegensatz zu diesen strikt anaerobe Organismen sind. Sie gewinnen ATP durch Reduktion von Kohlendioxid zu Methan mit molekularem Wasserstoff. Da sie keine organischen Verbindungen, sondern nur anorganische Substrate zur Energiegewinnung einsetzen und ihre einzige Kohlenstoffquelle aus Kohlendioxid besteht, sind sie ihrer Lebensweise entsprechend in die Gruppe chemolithoautotropher Archaea einzuordnen.

Kohlenhydrate sind die mengenmäßig vorherrschenden Produkte pflanzlicher Photosynthese und zugleich die allgemeinen Nahrungsstoffe für die überwiegende Zahl von Mikroorganismen. Die meisten chemorganotrophen Bakterien und alle höheren Organismen nutzen sie als Kohlenstoff- und Energiequelle. Unter aeroben Bedingungen wird ein Teil des Substrats unter Energiegewinn zu Kohlendioxid und Wasser transformiert. Sauerstoff bildet dabei den terminalen Elektronenakzeptor. Die freigesetzte Energie dient der Synthese von monomeren und polymeren Zellbestandteilen.

Der am weitesten verbreitete Abbauweg verläuft über Fructose-1,6-bisphosphat als Zwischenverbindung. Wichtige alternative Abbauwege sind der Pentosephosphat-Weg, auf dem Glucose zu Ribulose-5-phosphat umgesetzt wird und der 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Weg, der die gleichnamige Zwischenverbindung zu Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat spaltet (Abbildung 5).

Abb. 5: Strukturen von Ribulose-5-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat

Beim Transport in die Zelle wird Glucose in Glucose-6-phosphat, ihre stoffwechselaktive Form, übergeführt. Sie ist der Ausgangspunkt der drei oben genannten Abbauwege (Abbildung 6). Durch den auch als Glycolyse bekannten Fructose-1,6-bisphosphat-Weg wird Glucose-6-phosphat zu zwei Molekülen Pyruvat abgebaut. Neben vier Reduktionsäquivalenten (Protonen und Elektronen), die auf NAD^+ übertragen NADH ergeben, werden im Sinne einer Substratphosphorylierung noch zwei Moleküle ATP gebildet. Die Verwertung der C_3 -Bausteine Pyruvat erfolgt durch einen Multienzymkomplex, der als Pyruvat-Dehydrogenase bezeichnet wird. Unter oxidativer Decarboxylierung entsteht als wichtiges Endprodukt Acetyl-CoA. Es fallen weitere vier Reduktionsäquivalente an, die auf NAD^+ übertragen werden. Der Tricarbonsäure-Cyclus (TCC) bewirkt unter Abspaltung des Wasserstoffs die vollständige Oxidation von Acetat zu Kohlendioxid. Von den 16 Reduktionsäquivalenten werden 12 auf NAD^+ und zwei auf das Coenzym FAD übertragen. Es entstehen zwei Moleküle ATP durch Substratphosphorylierung. Der Tricarbonsäure-Cyclus hat nicht nur die Funktion der terminalen Oxidation der Nahrungsstoffe, sondern stellt auch zahlreiche Vorstufen für die Biosynthese zur Verfügung. Auffüllungsreaktionen, sogenannte anaplerotische Sequenzen, gleichen einen Verbrauch von Intermediaten des Tricarbonsäure-Cyclus aus.^[1] Die Bilanz der Oxidation von Glucose lautet:^[6]

Abb. 6: Schema zum Abbau von Glucose auf dem Fructose-1,6-bisphosphat-Weg^[1]

Die von der Oxidation der organischen Substrate stammenden Reduktionsäquivalente werden von Coenzymen, meist NAD^+ als NADH , aufgenommen und in die Elektronentransportkette der aeroben Organismen eingeschleust. Bei Prokaryonten trägt die Cytoplasmamembran die Atmungskette, bei Eukaryonten die innere Mitochondrienmembran. Die Atmungskette umfaßt drei Proteinkomplexe (Komplexe *I*, *III* und *IV*), die in die Membran eingebaut sind.^[2] Alle Komplexe der Elektronentransportkette sind aus zahlreichen Polypeptid-Untereinheiten aufgebaut und enthalten proteingebunden eine Reihe verschiedener Redox-Coenzyme wie Flavine (FMN oder FAD), Eisen-Schwefelzentren (Fe/S) und Häm-Gruppen. Bei der Oxidation von NADH durch Komplex *I* gelangen die Elektronen über FMN und Fe/S-Zentren zum Ubichinon. Es wird dadurch zum Hydrochinon reduziert (Abbildung 7).

Abb. 7: oxidierte und reduzierte Form von Ubichinon, $n = 6 - 10$

Durch seine unpolare isoprenoide Seitenkette kann sich das Hydrochinon (QH₂) in der Membran bewegen und gelangt so zu Komplex *III*, wo es zu Ubichinon (Q) oxidiert wird. Seiner Natur gemäß wird Ubichinon als membrangebundener Elektronen-Carrier bezeichnet.

Abb. 8: Vereinfachtes Modell der Atmungskette in Eukaryonten und Prokaryonten^[2]

Über das Häm-Protein Cytochrom-c gelangen die Elektronen von Komplex *III* zu Komplex *IV*, der sie auf Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor überträgt. In der Atmungskette vollzieht sich die „biologische Knallgasreaktion“ (Abbildung 8).

Die Elektronen werden in der Weise durch die Membran geleitet, daß es zur Protonen-Translokation und zum Aufbau eines transmembranen elektrochemischen Gradienten kommt, mit einem positiven Potential auf der Außenseite und einem negativen Potential auf der Innenseite der Membran. Katalysiert durch die ATP-Synthase wird die protonenmotorische Kraft von der Zelle zur ATP-Regeneration eingesetzt. Die Energiebilanz der Glucose-Veratmung lautet:^[6]

Zusammen mit den vier Äquivalenten ATP durch Substratphosphorylierung aus der Glycolyse und dem Tricarbonsäure-Cyclus ergeben sich 38 ATP für den Gesamtprozeß aus Glucose-Oxidation und Veratmung. Es wird deutlich, daß die Elektronentransport-Kette zusammen mit der APT-Synthase den wirksamsten Apparat zur ATP-Regeneration darstellt.

Überall dort in der Natur, wo organische Verbindungen vorliegen, es aber an Sauerstoff fehlt, wie beispielsweise in den Sedimenten von Flüssen und Seen oder im Verdauungssystem von Wiederkäuern, setzen sich anaerobe Mikroorganismen durch. Das Fehlen von Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor hat entscheidende Auswirkungen auf den Elektronenfluß und die Energiekonservierung. Bei den Gärungen wird kein externer Elektronenakzeptor genutzt. Stattdessen dient das organische Substrat als Wasserstoff-Donor und Wasserstoff-Akzeptor zugleich. Außerdem wird es als Baustoff für die Biosynthese genutzt. Gärprozesse bewirken eine Disproportionierung des Substrats.^[6]

Durch oxidativen Abbau organischer Substrate, vorwiegend über den Fructose-1,6-bisphosphat-Weg, entsteht unter ATP-Bildung zunächst Pyruvat als wichtigste Zwischenverbindung. Als Akzeptoren des in Form von NADH vorliegenden Wasserstoffs dienen Zwischenprodukte des Substratabbaus. Bei der Regeneration von NAD^+ werden diese reduziert und die Reduktionsprodukte aus den Zellen ins Medium ausgeschieden. So werden beispielweise bei der homofermentativen Milchsäure-Gärung aus einem Mol Glucose zwei Mol Milchsäure und zwei Mol ATP gebildet.

Abb. 9: Übersicht über Verlauf und Produkte der wichtigsten Gärungen^[6]

Die Energiekonservierung erfolgt bei Gärungen ausschließlich durch Substratphosphorylierung. Im Vergleich mit der aeroben Atmung bleiben ATP-Ausbeute und Wachstumsertrag bei den Gärern gering. Die Zellen setzen große Mengen an Substrat um, bevor sie sich teilen können. Bei der Vergärung von Kohlenhydraten und einigen anderen Substraten treten u. a. Ethanol, Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Propansäure, Buttersäure, Wasserstoff und Kohlendioxid als Produkte auf (Abbildung 9).

Die Gärer haben am Stoffwechselkreislauf in der Natur einen wesentlichen Anteil, denn sie leiten die anaerobe Nahrungskette ein. Die vergorenen organischen Biomonomere und Biopolymere liefern fast immer Wasserstoff, der im Mittelpunkt der anaeroben Nahrungskette steht und den methanbildenden und sulfatreduzierenden Bakterien als Substrat dient, das sie zur Generierung von Methan und Schwefelwasserstoff benötigen.

Unter anaeroben Bedingungen kommt es neben der Gärung häufig zur Entwicklung von Bakterien, die ihre Stoffwechselenergie durch „anaerobe Atmung“ gewinnen. Als Kohlenstoffquellen und Wasserstoff-Donatoren verwerten sie die Stoffwechselprodukte der gärenden Bakterien. Die anaeroben Atmer stehen am Ende der anaeroben Atmungskette und sind für den Prozeß der Mineralisation von entscheidender Bedeutung. Als Wasserstoff-Akzeptoren vermögen sie Nitrat (NO_3^-), Sulfat (SO_4^{2-}), Carbonat (CO_3^{2-}), Kohlendioxid (CO_2) und andere Verbindungen zu verwerten (Tabelle 1).^[1]

Tabelle 1: Anaerobe Atmungsprozesse

$10 [\text{H}] + 2 \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$	Denitrifikation	Nitrat-Atmung
$8 [\text{H}] + \text{SO}_4^{2-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 4 \text{H}_2\text{O}$	Sulfat-Reduktion	Sulfat-Atmung
$2 [\text{H}] + \text{S} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$	Schwefel-Reduktion	Schwefel-Atmung
$8 [\text{H}] + 2 \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O}$	CO_2 -Reduktion zu Acetat	Carbonat-Atmung
$8 [\text{H}] + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	CO_2 -Reduktion zu Methan	Carbonat-Atmung
$[\text{H}] + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+$	Eisen-Reduktion	Eisen-Atmung

Die wichtigste Carbonat-Atmung ist die Methanogenese. Hierbei wird Kohlendioxid vollständig zu Methan reduziert. Die Methanogenese wird ausschließlich von Archaea geleistet und soll im nachfolgenden Kapitel ausführlich dargestellt werden.

2 Methanogenese

2.1 Methanogene Organismen

Die Bildung von Methan ist einer der bedeutendsten biologischen Prozesse im Zuge des Abbaus von organischem Material unter anaeroben Bedingungen.^[7] Die Hydrolyse polymerer organischer Materie zu Monomeren und deren fermentative Umsetzung durch gärende Organismen liefert einfache Verbindungen wie Wasserstoff, Kohlendioxid, Ameisensäure, Essigsäure, Methanol und Methylamine als Substrat für methanogene Archaea. Sie stehen am Ende der anaeroben Atmungskette und transformieren die genannten Substrate zu Methan und Kohlendioxid, die als gasförmige Produkte dem Kohlenstoffkreislauf wieder zugeführt werden. Der Gehalt an Methan in der Atmosphäre beträgt etwa 1.8 ppm. Nach Schätzungen werden rund 70 % davon durch biologische Methanogenese-Prozesse gebildet.^[8]

Methanogene Organismen zählen zu den Archaea, einem Organismenreich, das sich aus den extrem thermophilen und thermoaciden Archaea (*Crenarchaeota*) sowie den extrem halophilen und methanogenen Archaea (*Euryarchaeota*) zusammensetzt. Das Reich der Archaea bildet eine eigenständige Evolutionslinie im phylogenetischen Stammbaum (Abbildung 10). Diese besondere Stellung wird aus 16S-rRNA-Analysen deutlich, anhand derer der Unterschied zu den Eukaryonten und Bakteria sichtbar wird. Im Gegensatz zu den Bacteria besteht die archaeelle Zellwand nicht aus einer Mureinschicht, sondern aus Pseudomurein, Heteropolysacchariden und Proteinen.^[9] Die Cytoplasmamembran von Archaea enthält anstelle von Fettsäureglycerinestern eine Reihe von C₂₀-Diphytanyl- und C₄₀-Biphytanyl-Glycerinethern.^[10] Die Komponenten, die an der Proteinbiosynthese von Archaeobakterien beteiligt sind, zeigen evolutionäre Nähe zu den Eukarya.^[11] Betrachtungen des Zellstoffwechsels und die Art und Weise der Energiegewinnung lassen Übereinstimmungen mit den Bacteria erkennen.

Für die strikt anaeroben methanogenen Archaea bilden Sumpf- und Tundragebiete, Sedimente von Seen und Flüssen sowie Wiederkäuerpansen und die Faultürme von Kläranlagen den natürlichen Lebensraum.

2.2 Der Energiestoffwechsel methanogener Archaea

Die Gruppe der Methanogenen umfasst zahlreiche, morphologisch uneinheitliche Organismen, die alle ausschließlich Methanogenese zur Energiegewinnung betreiben. Hydrogenotrophe Methanogene sind in der Lage Wasserstoff zu aktivieren und Kohlendioxid zu fixieren. Im Zuge der Energiegewinnung wird Wasserstoff oxidiert und Kohlendioxid zu Methan reduziert. Ihre Lebensweise wird als chemolithoautotroph bezeichnet, da sie Kohlendioxid als einzige Kohlenstoffquelle zum Aufbau von Zellsubstanz nutzen. Andere Vertreter dieser Gruppe, die methylotrophen Methanogenen, verwerten einfache C₁-Verbindungen wie Ameisensäure, Methanol und Methylamin zur Energiegewinnung. Das Substratspektrum acetogenotropher Methanogener beschränkt sich auf Essigsäure, die zu Methan und Wasserstoff transformiert wird.^[13]

Methanogene Archaea der Gattung *Methanosarcina* sind in der Lage, Wasserstoff und Kohlendioxid gemäß nachfolgender Gleichung zu Methan umzusetzen.

Wie Studien an den Cytoplasmamembranen von *Methanosarcina mazei* und *Methanosarcina barkeri* ergaben, werden die hierbei ablaufenden Redox-Reaktionen von membrangebundenen Proteinkomplexen katalysiert.^[14] Neben diesen spezifischen Enzymsystemen sind in die Kohlendioxid-Reduktion auch einige ungewöhnliche Cofaktoren involviert (Abbildung 13).^[15]

Die Methanogenese wird durch die Aktivität des Formylmethanofuran-Dehydrogenase-Systems eingeleitet (Abbildung 11). Dabei wird Kohlendioxid zunächst von Methanofuran (MF) fixiert und dann reduktiv als Formyl-Methanofuran (Formyl-MF) gebunden. Eine anschließende Formylgruppenübertragung auf Tetrahydromethanopterin (H₄MPT) ergibt 5-Formyl-H₄MPT. Die Formylgruppe bleibt im weiteren Verlauf an H₄MPT gebunden und wird schrittweise bis zum Methylrest reduziert. Als Reduktionsmittel fungiert das Coenzym F₄₂₀H₂, das durch die F₄₂₀-abhängige Dehydrogenase bereitgestellt wird. Die Methylgruppe von Methyl-H₄MPT wird auf HS-CoM übertragen, bevor die Methyl-Co-M-Reduktase die HS-CoB-abhängige Reduktion des zuvor gebildeten Methyl-S-Co-M zum Methan katalysiert. Bei dieser reduktiven Demethylierung von Methyl-S-CoM fällt das gemischte Disulfid CoM-S-S-CoB als Reaktionsprodukt an.^[16] Es dient der membrangebundenen H₂:CoB-S-S-CoM-Oxidoreduktase als terminaler Elektronenakzeptor. Die beiden an der Reaktion beteiligten Cofaktoren werden dabei durch die Tätigkeit der Heterodisulfidreduktase regeneriert.

Abb. 11: Modell des Energiestoffwechsels und des Elektronentransfers bei hydrogenotrophen Methanogenen nach Deppenmeier und Gottschalk^[17,22]

Die $\text{H}_2\text{:CoB-S-S-CoM}$ -Oxidoreduktase-Reaktion ist mit dem Aufbau eines transmembranen Protonengradienten verbunden.^[18] Er wird durch die Aktivität einer ATP-Synthase zur ATP-Synthese genutzt.

Bei der Methanogenese aus Methanol (Abbildung 12) handelt es sich um eine Disproportionierung von Methanol, gemäß nachfolgender Reaktionsgleichung.

Der erste Schritt bei dieser Umsetzung ist eine durch Methyltransferasen (MT1, MT2) katalysierte Übertragung der Methylgruppe von Methanol auf das Coenzym HS-CoM wobei sich Methyl-CoM bildet.^[19] An dieser Stelle spaltet sich der Stoffwechsel in einen reduktiven und einen oxidativen Zweig auf. Im reduktiven Abschnitt wird Methyl-S-CoM analog dem Vorgang beim hydrogenotrophen Stoffwechsel, mit Hilfe der Methyl-CoM-Reduktase, in Gegenwart von HS-CoB zu Methan und CoB-S-S-CoM transformiert. Die Reduktion des Heterodisulfids erfolgt wiederum durch die Heterodisulfid-Reduktase.^[20]

Der zweite Abschnitt beschreibt die Oxidation der Methylgruppe zum Kohlendioxid und beginnt mit dem Methyltransfer auf Tetrahydromethanopterin (H_4MPT) durch die membranintegrale Methyl- $\text{H}_4\text{MPT:CoM}$ -Methyltransferase. Nach dem Methyltransfer erfolgt die sukzessive Oxidation von Methyl- H_4MPT in entgegengesetzter Richtung zum hydrogenotrophen Stoffwechsel. Abschließend ermöglicht die Formylmethanofuran-Dehydrogenase die Oxidation von Formyl-Methanofuran zu Kohlendioxid. Die bei der Oxidation des Methylrestes anfallenden Reduktionsäquivalente werden auf das Coenzym F_{420} übertragen. Die Oxidation von F_{420}H_2 ist mit der Reduktion des Heterodisulfids CoM-S-S-CoM gekoppelt.^[21] Diese exergone Reaktion ist mit dem Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten verbunden, der zur ATP-Synthese genutzt wird.

Abb. 12: Modell des Energiestoffwechsels und des Elektronentransfers bei methylo trophen Methanogenen nach Deppenmeier und Gottschalk^[17,22]

2.3 Untersuchungen an *Methanosarcina mazei* Gö1

Der Stamm *Methanosarcina mazei* Gö1 verfügt über eine reichhaltige Enzymausstattung und vermag Wasserstoff und Kohlendioxid, sowie Methanol, Methylamine und Essigsäure als Substrat zu nutzen. Die Untersuchungen an diesem Organismus konzentrierten sich in den letzten Jahren auf die beiden protonentranslozierenden Elektronentransportsysteme.^[23] Die $F_{420}H_2$:Heterodisulfid-Oxidoreduktase steht hierbei an zentraler Stelle bei den hydrogenotrophen Methanogenen. Sie ist aus zwei Komponenten, der F_{420} -Dehydrogenase und der Heterodisulfid-Reduktase zusammengesetzt.

Abb. 13: Strukturformeln der an der Methanogenese beteiligten Coenzyme^[16,120]

Kürzlich gelang die Isolierung und Reinigung der F_{420} -Dehydrogenase aus *Ms. Mazei*.^[24,25] Das Protein besitzt eine Masse von 400 kDa, ist aus 13 Untereinheiten aufgebaut und enthält neben Eisen-Schwefel-Clustern auch FAD. Bei der zweiten Komponente dieses Systems handelt es sich um die Heterodisulfid-Reduktase, deren Charakterisierung zeigt, daß sie aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist.^[26] Bei der kleinen Untereinheit handelt es sich um ein b-Typ-Cytochrom.

Das H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System aus *Ms. mazei* übernimmt eine Schlüssel-funktion im Elektronentransport und ist aus zwei membrangebundenen Proteinen konstruiert. Eine Hydrogenase, die Eisen-Schwefel-Cluster enthält und eine Cytochrom-b Untereinheit trägt, repräsentiert eine Komponente des Systems.^[27] Der zweite Teil des Elektronentransportsystems besteht aus der bereits oben angeführten Heterodisulfid-Reduktase.

Der Cofaktor F_{420} ist der zentrale Elektronenüberträger im Stoffwechsel der Methanogenen und in seiner Funktion vergleichbar mit dem Coenzym NAD^+ bzw. $NADP^+$ in Eubakterien und Eukaryonten. F_{420} dient unter anderem als Cofaktor der F_{420} abhängigen Hydrogenase, der Methylen- H_4 MPT-Dehydrogenase sowie der Methylen- H_4 MPT-Reduktase und tritt in reduzierter Form als $F_{420}H_2$ direkt mit der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase in Kontakt.

Im Gegensatz dazu war die Natur des membrangebundenen Elektronenüberträgers, der den Transport der Elektronen zwischen der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase bzw. Hydrogenase und der Heterodisulfid-Reduktase vermittelt, lange Zeit unbekannt. Während in Eubakterien diese Aufgabe von Chinonen wahrgenommen wird, findet man bei methanogenen Organismen nur Tocopherolchinone, die nicht am Elektronentransport beteiligt sind.

Die vorliegende Arbeit berichtet über die Entdeckung eines Phenazin-Derivates als neuartigem, membranintegralelem Cofaktor aus *Methanosarcina mazei* Gö1. Auf die Reinigung, Strukturaufklärung, Synthese und biologische Funktion des als Methanophenazin (**1**) bezeichneten Naturstoffs wird in den nachfolgenden Kapiteln ausführlich eingegangen.

3 Zielsetzung und Planung der Arbeit

Wie im vorangehenden Abschnitt ausführlich erläutert, setzt sich das $F_{420}H_2$ -abhängige Heterodisulfid-Reduktasesystem von *Methanosarcina mazei* aus der F_{420} -abhängigen Hydrogenase und einer Heterodisulfid-Reduktase zusammen. Das System ermöglicht die Energiekonservierung beim Leben auf einfachen Substraten wie Methanol oder Methylamin. Des weiteren besitzt der Organismus das H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System, wodurch Wasserstoff und Kohlendioxid zur Energiekonservierung verfügbar gemacht werden. Es ist aus einer Hydrogenase und der Heterodisulfid-Reduktase aufgebaut. In beiden Systemen reduziert die Heterodisulfid-Reduktase das gemischte Disulfid CoB-S-S-CoM, das bei der Methanerzeugung im Organismus anfällt. Diese Reduktion ist mit einer Protonentranslokation und dem Aufbau eines transmembranen Protonengradienten verknüpft, der von einer ATP-Synthase zur ATP-Regeneration genutzt wird (Abbildung 14).

Abb. 14: Vereinfachtes Schema der Methanogenese in *Methanosarcina mazei* Gö1

3.1 Strukturaufklärung von Methanophenazin (1)

Auf der Suche nach einem unbekannten, membranintegralen Elektronenüberträger, der für die Übertragung der Elektronen von der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase bzw. der Hydrogenase auf die Heterodisulfid-Reduktase verantwortlich ist, extrahierte *Abk* die Cytoplasmamembranen von *Ms. mazei* Gö1 mit Isooctan.^[24]

Eine Analyse des Rohextrakts, die Separation der Bestandteile aus der Etherlipid-Matrix und die Reinigung der abgetrennten Bestandteile sowie deren Strukturaufklärung definierten ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit.

Mit der Isolierung geringer Mengen des als Methanophenazin (1) bezeichneten, redoxaktiven Naturstoffs **1** und der Aufklärung seiner Konstitution durch massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Methoden, wurde der erste Abschnitt der Arbeit erfolgreich abgeschlossen.

Es handelt sich bei Methanophenazin (1) nicht nur um das erste Phenazin-Derivat das jemals aus Archaea isoliert wurde, sondern auch um das erste Phenazin-Derivat überhaupt, dem eine Funktion am Elektronentransport in einer Atmungskette nachgewiesen wurde.^[28,29]

3.2 Synthese von Methanophenazin (1)

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration des natürlichen Methanophenazins (1) sowie zur Untersuchung seiner Rolle im membrangebundenen Elektronentransport von *Ms. mazei* waren größere Mengen des Naturstoffs erforderlich. Die durch Extraktion aus Cytoplasmamembranen erhältlichen Mengen an Methanophenazin (1) sind zu gering und der Aufwand ihrer Isolierung und Reinigung zu groß, als daß sich der Bedarf an **1** aus dieser natürlichen Quelle decken ließe. Eine Synthese des Naturstoffs war also unabdingbar.

Ein Problem bei der Strukturaufklärung der Seitenkette betrifft das Auftreten eines stereogenen Zentrums in Position C-3'. Die Ermittlung seiner absoluten Konfiguration erfordert die Synthese des Naturstoffs **1** in racemischer und enantiomerenreiner Form. Nur ein Vergleich der synthetischen Verbindung bekannter Konfiguration mit dem natürlich

vorkommenden Material ermöglicht eine eindeutige Zuordnung und die Aufklärung des Stereozentrums.

Zur Lösung der angegebenen Probleme war es also nötig, eine Synthesestrategie zu entwickeln, die sowohl die Synthese von racemischen Methanophenazin (*rac*-**1**) als auch die von enantiomerenreinem (*R*)- und (*S*)-**1** gestattet.

3.3 Retrosynthese von Methanophenazin (**1**)

Eine retrosynthetische Analyse von *rac*-**1** führt zu 2-Hydroxyphenazin (**2**) und der terpenoiden Einheit *rac*-**3**, welche durch Etherbildung miteinander verknüpft werden können (Abbildung 15). Der Baustein *rac*-**3** lässt sich in das Alkyljodid *rac*-**6** und das (*E*)-Vinyljodid **7** zerlegen. Eine Pd(0) katalysierte sp^3 - sp^2 Kupplungsreaktion soll die Verknüpfung von *rac*-**6** mit **7** gewährleisten und die (*Z*)-Geometrie der C-6', C-7'-Doppelbindung sicherstellen. Das (*E*)-Vinyljodid (**7**) kann mit der von *Negishi* und seinen Mitarbeitern erarbeiteten Methode zur Carboaluminierung aus dem Alkin **9** zugänglich gemacht werden, das sich auf (*E,E*)-Farnesylaceton (**10**) zurückführen lässt.^[30] Die Synthese von 2-Hydroxyphenazin (**2**) sollte nach der Methode von *Kehrmann* und *Cherpillod* durch Umsetzung von 2-Hydroxychinon (**4**) mit *o*-Phenylendiamin (**5**) hergestellt werden.^[31]

Abb. 15: Retrosyntheseschema von Methanophenazin (*rac-1*)

Fragment *rac-6* sollte sich in wenigen Stufen aus 3-Methylpentan-1,5-diol (**8**) durch selektive Funktionalisierung der beiden Hydroxylgruppen aufbauen lassen. Der Vorteil eines solchen symmetrischen C₆-Bausteins besteht in der Möglichkeit, durch Differenzierung seiner

enantiotopen Gruppen die beiden Enantiomere (*R*)-**6** und (*S*)-**6** zugänglich zu machen (Abbildung 16). Ein geeigneter Vorläufer zur Verwirklichung dieser stereodivergenten Synthesestrategie stellt der in hoher optischer Reinheit ($ee > 95\%$) erhältliche (*R*)-3-Methylglutarsäurehalbester [(*R*)-**11**] dar. (*R*)-**11** lässt sich nach bekannten Verfahren in die chiralen Lactone (*R*)-**12** und (*S*)-**12** umwandeln. Aus ihnen sind dann die beiden Bausteine (*R*)-**6** und (*S*)-**6** zugänglich. Sie bilden die Grundlage für den Zugang zu den beiden Antipoden von Methanophenazin (**1**).

Abb. 16: Retrosyntheseschema der chiralen Iodide (*R*)-**6** und (*S*)-**6**

4 Strukturaufklärung von Methanophenazin (1)

4.1 Fermentation^[24]

Die Anzucht von *Methanosarcina mazei* Gö1 im 100 l bzw. 300 l Fermenter wurde in einem für die Bedürfnisse methanogener Organismen optimierten Medium bei einem pH Wert von 6.9 bis 7.3 durchgeführt. Nach der Inoculation wurde der strikt anaerobe Organismus in einer N₂/CO₂ = 4 : 1 Atmosphäre mit Methanol (150 mM) als Substrat inkubiert. Eine Überprüfung des Substratverbrauchs durch gaschromatographische Untersuchungen des Mediums und Messungen der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) zeigten das Ende der Inkubationszeit nach 2 bis 3 Tagen bei 37 °C an.

Das Abtrennen der Zellen von der Kulturbrühe geschah in einer Durchlaufzentrifuge. Das Zellpellet wurde im unmittelbaren Anschluß an die Zentrifugation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

4.2 Isolierung^[24]

Zur Isolierung der redoxaktiven Komponente aus Membranen von *Methanosarcina mazei* Gö1 wurden 100 g Zellen aus der Lagerung bei -70 °C durch Auftauen in einem Morpholinopropansulfonsäure-Puffer (MOPS-Puffer) unter anaeroben Bedingungen aufgeschlossen. Die Zugabe des Enzyms DNase zum reduzierenden Medium gewährleistete die vollständige Zerkleinerung der polymeren DNA. Im ersten Schritt wurden durch niedertourige Zentrifugation (8000 x g) die noch intakten Zellen und Zellbruchstücke entfernt. Der Überstand wurde einer Ultrazentrifugation (120000 x g) unterzogen, um das Cytoplasma im Überstand von dem Membranpellet abzutrennen. Das Membranpellet wurde noch zweimal mit organischem MOPS-Puffer gewaschen und erneut ultrazentrifugiert. Die gewaschenen Membranen wurden in MOPS-Puffer suspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht durch Gefriertrocknung vom Wasser befreit. Anschließend wurden die Membranen viermal mit je 30 ml Isooctan (Merck, p.a. Qualität) extrahiert. Dazu wurden sie in Isooctan aufgenommen, mechanisch homogenisiert und der Überstand nach dem Sedimentieren der Membranen dekantiert. Die vereinigten Isooctanextrakte wurden abschließend zur Abtrennung der verbliebenen Membranen zentrifugiert und das Solvens unter den Bedingungen der Gefriertrocknung entfernt. Der erhaltene braun-gelbe Rohextrakt

wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Aus 100 g Zellen wurden auf diesem Weg etwa 30 mg Rohmaterial gewonnen. Insgesamt erhielt man aus 5 x 100 g Zellen 137 mg Rohextrakt.

4.3 Reinigung

137 mg Rohmaterial wurden in 10 ml Isooctan gelöst und über einen Filter mit der Porengröße $0.45\text{ }\mu\text{m}$ (Sartorius, Membranfilter RC 15) filtriert. Ein Dünnschichtchromatogramm (Hexan/Ethylacetat = 10 : 1) des Filtrats zeigte bei Tageslicht neben einem Startfleck den Spot des Phenazinethers **1** bei einem R_f -Wert von 0.51. Untersuchte man das Chromatogramm im UV-Licht bei $\lambda = 254\text{ nm}$, so detektierte man zusätzlich einige geringe Verunreinigungen im Bereich von $R_f = 0.05$ bis 0.1 und einen UV-löschenden Fleck bei $R_f = 0.65$. Dieser konnte Dioctylphthalat (**13**) zugeordnet werden.

Abb. 17: Ausschnitt aus dem ^1H NMR-Spektrum eines Rohextrakts aus Membranen von *Ms. mazei* Gö1, abgebildet ist nur der Aromatenbereich (500 MHz, C_6D_6)

Die in Abbildung 17 dargestellte Ausschnittsvergrößerung des ^1H NMR-Spektrums des Rohextrakts zeigt neben den charakteristischen Resonanzen der Aromatenprotonen des Phenazinethers **1** bei $\delta = 7.20$ bis 7.30 , 7.55 , 8.04 und 8.23 ppm , weitere Signale bei $\delta = 6.85$

und 7.59 ppm. Sie werden durch die aromatischen Protonen des Phthalsäureesters **13** hervorgerufen und sind anthropogenen Ursprungs.

Die als Weichmacher in Polymeren zum Einsatz kommenden langkettigen Phthalsäureester sind ubiquitär verbreitet und finden sich regelmäßig bei der Analyse unpolarer Rückstände unterschiedlichster Herkunft.^[32] Der aromatische Kern ermöglicht eine Detektion im UV-Licht bei $\lambda = 260$ nm. Nach der Abtrennung vom Substanzgemisch durch HPLC wurde die Struktur des Phthalsäureesters **13** durch massenspektrometrische Untersuchungen, ^1H NMR-Spektroskopie und Spektrenvergleich mit Literaturdaten ermittelt.^[33]

Abb. 18: ^1H NMR-Spektrum eines Rohextrakts aus Membranen von *Methanosarcina mazei* Gö1, (500 MHz, C_6D_6)

Die Cytoplasmamembran von Archaeobakterien unterscheidet sich wesentlich von der aller anderen Bakterien. Sie besitzt anstatt der bei Eubakterien vorkommenden Glycerinester Glycerinether mit isoprenoiden C₂₀- und C₄₀-Alkylketten. Daneben enthält sie auch freie isoprenoide C₁₅- und C₃₀-Kohlenwasserstoffe als neutrale Lipide.^[10] Die beschriebene Extraktionsmethode mit Isooctan als Extraktionsmittel ist unselektiv und löste alle unpolaren Komponenten aus der Cytoplasmamembran. Das in Abbildung 18 dargestellte ¹H NMR-Spektrum des Rohmaterials zeigt im Bereich von $\delta = 0.80$ bis 1.80 ppm starke Resonanz von Protonen, die große Mengen gesättigter Alkylverbindungen anzeigen. Ihre chromatographische Abtrennung von **1** bereitete erhebliche Schwierigkeiten, weil isoprenoide Alkylketten und Glycerinether sich hierbei ähnlich unpolar wie der Phenazinether **1** selbst verhielten. So werden bei der chromatographischen Aufreinigung des Rohextraktes durch HPLC-Techniken unter UV-Detektion Verunreinigungen wie beispielsweise Kohlenwasserstoffe, die über keinen Chromophor verfügen, nicht detektiert. Sie absorbieren im Bereich $\lambda \leq 190$ nm und fallen in den „cut off“-Bereich des Eluenten, werden also von dessen Absorption überlagert und können weder detektiert noch gezielt abgetrennt werden.

Um eine gute Auftrennung der Komponenten zu erreichen, wurden erste Versuche mit einer „reversed phase“-HPLC-Säule (LiChrospher RP 18, 4 x 125 mm, Merck) durchgeführt. Bei diesem Typ von stationärer Phase wird die Kieselgeloberfläche mit Alkylketten unterschiedlicher Länge (C₈ - C₁₈) modifiziert, wodurch sich ihre Polarität umkehrt. Unpolare Substanzgemische treten nun in starke Wechselwirkung mit der unpolaren stationären Phase. Dies bewirkt eine, im Vergleich mit der reinen Kieselgelphase, verbesserte Trennleistung der stationären Phase und führt zu einer besseren Separation der einzelnen Komponenten des Gemischs. Bei dieser Art von Säulenmaterial haben sich Methanol und Acetonitril, oft in Verbindung mit unterschiedlichen Anteilen Wasser, als Eluenten bewährt.^[34]

Die Ergebnisse, die bei Anwendung dieser Trennmethode zur Aufreinigung des Rohextrakts aus Membranen von *Ms. mazei* Gö1 erzielt wurden, waren nicht zufriedenstellend. Zwar gelang es, nahezu alle Verunreinigungen abzutrennen, dennoch enthielten alle ¹H NMR-Spektren neben den Resonanzen des Phenazinethers **1** noch Signale einer Verunreinigung im Bereich zwischen $\delta = 1.0$ bis 1.6 ppm, die sich durch eine breite unaufgelöste Bande zu erkennen gab, und die auch durch mehrmaliges Chromatographieren derselben Substanzprobe nicht abzutrennen war. Massenspektrometrische Untersuchungen der Substanzprobe und die Durchführung von Blindversuchen mit anschließender Analyse der dabei angefallenen Rückstände führten zur Identifikation der Kontamination als Bestandteil der RP-Phase (C₁₈),

die aus der HPLC-Säule durch den Eluenten Methanol herausgelöst worden war. Da es sich bei dem isolierten Methanophenazin (**1**) in der Regel um weniger als 1 mg an aufgereinigter Substanz handelte, führten auch geringe Verunreinigung an RP-Material (≤ 0.1 mg) zu störenden Signalen in den ^1H NMR-Spektren, so daß auf eine weitere Chromatographie an dieser Art von stationärer Phase verzichtet wurde.

Da der Bereich von $\delta = 1.0$ bis 1.6 ppm des ^1H NMR-Spektrums von entscheidender Bedeutung zur Aufklärung der Struktur der Seitenkette von **1** war, wurden andere Trennbedingungen zur Aufreinigung des Rohmaterials ausgearbeitet (Abbildung 19).

Abb. 19: Analytisches HPLC-Chromatogramm des Rohextrakts aus Membranen von *Ms. mazei* Gö1 (Kieselgelsäule: LiChrospher Si 60, 4 x 125 mm, Merck; Flußrate: 1.0 ml/min; UV-Detektion: $\lambda = 260$ nm; Eluent A: Cyclohexan, Eluent B: Ethylacetat; Eluentengradient: 0 bis 15 min 3 % B; 15 bis 25 min stufenloser Gradient bis 100 % B; 25 bis 30 min 100 % B, 30 bis 35 min 3 % B)

Eine Separation des Naturstoffs von Verunreinigungen gelang durch Chromatographie an einer analytischen Kieselgelsäule (LiChrospher Si 60, 4 x 125 mm, Merck). Sie ergab das in Abbildung 19 dargestellte Chromatogramm. Es zeigt neben einigen Verunreinigungen während der ersten beiden und nach 15 min den Hauptpeak, der durch die Absorption von **1** nach einer Retentionszeit von 9.54 min erzeugt wurde. Der Anteil an Essigsäureethylester (Eluent B) im Laufmittel wurde nach 15 min kontinuierlich von 3 auf 100 % gesteigert. Dies hat einen Anstieg der Grundlinie nach ca. 17.5 min, hervorgerufen durch die Absorption dieses Eluenten, zur Folge. Eine Verminderung des Anteils Ethylacetat am Eluentengemisch läßt die Grundlinie wieder auf ihren ursprünglichen Wert fallen, was bei einer Retentionszeit von ca. 32 min zu erkennen ist.

Die Isolierung des Naturstoffs **1** wurde durch halbpräparative HPLC unter folgenden Bedingungen durchgeführt: semipräparative Kieselgelsäule (Si 60, 10 x 250 mm, Kontron); Flußrate: 4.0 ml/min; Detektion: $\lambda = 260$ nm; Eluent A: Cyclohexan; Eluent B: Ethylacetat; Eluentengradient: 0 bis 15 min 5 % B, 15 bis 22 min 30 % B, 22 bis 28 min stufenloser Gradient bis 100 % B, 28 bis 35 min 5 % B. Dabei wurden pro Lauf etwa 10 mg Substanzgemisch in 200 μ l Isooctan auf die Säule aufgetragen.

Nach der chromatographischen Reinigung von 137 mg Rohextrakt aus Cytoplasmamembranen von 5 x 100 g Zellen von *Methanosarcina mazei* Gö1, wurden 1.2 mg reines Methanophenazin (**1**) als gelbes Öl isoliert (Abbildung 20).

Anzucht von *Ms. mazei* Gö1 im 100 l Fermenter:
 150 mM Methanol, pH 6.9 -7.3, anaerobe
 Bedingungen in N₂/CO₂-Atmosphäre, 2-3 d, 37 °C

⇒ Zellmasse: ≈ 100 g

Membranpräparation: Abtrennen der Cytoplasmamembranen von Zellwand, DNA und anderen Zellbestandteilen durch Zentrifugation; Isooctanextraktion der Cytoplasmamembranen

⇒ Rohextrakt: ≈ 30 mg

HPLC-Reinigung des Rohextrakts:
 SiO₂-Säule; Gradient: Cyclohexan/Essigester, Detektion: λ = 260 nm

⇒ Reinsubstanz: ≈ 0.3 mg

Strukturaufklärung:
 Massenspektrometrie, ¹H- und ¹³C NMR-Spektroskopie,
 zweidimensionale NMR-Korrelationsexperimente

Methanophenazin (1)

das erste Phenazinderivat aus Archaea

Abb. 20: Schema zur Isolierung, Reinigung und Strukturaufklärung von Methanophenazin (1) aus Cytoplasmamembranen von *Methanosarcina mazei* Gö1

4.4 Strukturaufklärung

Die Summenformel des Naturstoffs **1**, von dem insgesamt nur 1.2 mg zur Verfügung standen, wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt. Seine Konstitution und die Struktur der Seitenkette wurde durch ein- und zweidimensionale ^1H - und ^{13}C -Kernresonanzexperimente (HMQC, H,H COSY, HMBC) ermittelt.

Abb. 21: EI (70 eV) Massenspektrum von Methanophenazin (**1**)

Das EI Massenspektrum präsentiert das Molekülion bei $m/z = 538$ als Basispeak (Abbildung 21). Das Zerfallsmuster zeigt Fragmente mit geringer Intensität ($< 4\%$) bei $m/z = 470$, 402 , 334 und 265 . Die Differenzen zu M^+ und untereinander betragen $m/z = 68$ bzw. 69 Masseneinheiten und entsprechen dem sukzessiven Verlust von C_5H_8 bzw. C_5H_9 durch Allylsplaltung. Dieses Verhalten unter Elektronenbeschuss ist charakteristisch für Verbindungen mit linearen, isoprenoiden Ketten und wird beispielsweise bei Geranylgeranylbenzochinonen beobachtet.^[35] Eine Hochauflösung des Molekülions (EI-HRMS, ber.: 538.3923 , gef.: 538.3930) zur Bestimmung der Elementarzusammensetzung ergab für **1** $\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}$ als Summenformel. Hieraus läßt sich aufgrund der Valenzen der einzelnen Elemente die Gesamtzahl der Ringe und Doppelbindungen einer Verbindung bestimmen. Für Molekülionen mit ungerader Elektronenzahl und der Summenformel $\text{C}_x\text{H}_y\text{N}_z\text{O}_n$ beträgt sie $x - (y/2) + (z/2)$

+ 1. Die Elementarzusammensetzung von Methanophenazin (1) $C_{37}H_{50}N_2O$ deutet demnach auf 14 Doppelbindungsäquivalente hin.^[36]

Abb. 22: 1H NMR-Spektrum von natürlichem Methanophenazin (1) (500 MHz, C_6D_6)

Das 1H NMR-Spektrum von **1** in Deuterobenzol lassen sich bei $\delta = 7.30, 8.12, 8.30$ und 8.31 ppm die Resonanzen von sieben aromatischen Protonen erkennen (Abbildung 22). Die Signale bei $\delta = 5.25$ bis 5.38 ppm werden vier olefinischen Protonen zugeordnet, während die Resonanz einer Methylengruppe bei $\delta = 3.80$ ppm durch die unmittelbare Nähe eines Sauerstoffatoms charakteristisch zu tiefem Feld verschoben wird. Die verbleibenden 37 Protonen resonieren im aliphatischen Bereich zwischen $\delta = 0.85$ bis 2.20 ppm und komplizieren die Analyse des Spektrums durch zahlreiche sich überlagernde Signale. Beispielsweise zeigen 14 allylische Protonen bei $\delta = 1.97$ bis 2.27 ppm ein nicht aufgelöstes Multipllett, hingegen lassen sich 15 an Doppelbindungen fixierte Methylprotonen in Gestalt von fünf Singulettis bei $\delta = 1.56$ bis 1.68 ppm deutlich erkennen. Sie überlagern hier ein Methinproton, das durch die genaue Auswertung des Integrals über diesen Bereich nachgewiesen wurde. Gut zu analysieren ist das Dublett einer Methylgruppe bei $\delta = 0.83$ ppm, was auf ein tertiäres C-Atom in α -Position deutet und ein stereogenes Zentrum anzeigt.

Der Bereich von $\delta = 1.14$ bis 1.44 ppm beherbergt noch vier aliphatische Protonen, die der gesättigten Teilstruktur des Naturstoffs zugeordnet werden. Die ^1H NMR-Daten von **1** in Deuterobenzol sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2: ^1H NMR-Daten von Methanophenazin (**1**) (500MHz, C_6D_6)

Protonen	$\delta_{\text{C}_6\text{D}_6}$ [ppm]	Multiplizität, J in [Hz]	Anzahl der Protonen
1-H	7.48	d (2.7)	1H
3-H, 7-H, 8-H	7.22 - 7.33	m	3H
4-H	8.06	d (9.4)	1H
6-H oder 9-H	8.24	dd (8.8, 1.2)	1H
9-H oder 6-H	8.245	dd (8.8, 1.2)	1H
1'-H ₂	3.76	m _C	2H
2'-H _A	1.69	m _C	1H
2'-H _B , 4'-H _A	1.30 - 1.44	m	2H
3'-H	1.54 - 1.63	m	1H
3'-CH ₃	0.81	d (6.6)	3H
4'-H _B	1.17	m _C	1H
5'-H ₂ , 8'-H ₂ , 9'-H ₂ , 12'-H ₂ , 13'-H ₂ , 16'-H ₂ , 17'-H ₂ ,	1.94 - 2.23	m	14H
6'-H, 10'-H, 14'-H	5.22 - 5.32	m	3H
18'-H	5.20	t br (6.9)	1H
7-CH ₃ , 11'-CH ₃ , 15'-CH ₃	1.58, 1.59, 1.60	3 s	je 3H
19'-CH ₃	1.53	s	3H
20'-H ₃	1.63	d (1.0)	3H

Abb. 23: ^1H NMR-Spektrum von natürlichem Methanophenazin (**1**) (500 MHz, CD_3OD)

Eine Aufnahme in Deuteriomethanol (Abbildung 23) hat im aliphatischen und allylischen Bereich des Protonenspektrums nur wenig Einfluß auf die Signallage und Multiplizität. Im Bereich des Aromaten hingegen löst sich das Multipllett von 3 Protonen bei $\delta_{\text{C}_6\text{D}_6} = 7.30$ ppm auf, und die Signale erscheinen separiert bei $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}} = 7.55$, 7.83 und 7.89 ppm (Abbildung 25). Das Dublett vom Dublett von zwei Protonen bei $\delta_{\text{C}_6\text{D}_6} = 8.31$ ppm wird zu zwei Dubletts vom Dublett bei $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}} = 8.13$ und 8.17 ppm aufgelöst. Insgesamt können die sieben aromatischen Protonen nun sieben separaten Resonanzen zugeordnet werden. Eine detaillierte Analyse der Kopplungsmuster und Kopplungskonstanten dieser Signale führt zu zwei aromatischen Teilstrukturen mit unterschiedlichen Substitutionsmustern. Eine Teilstruktur mit den drei Protonen 1-H, 3-H und 4-H bei $\delta = 7.38$, 7.55 und 8.07 ppm bildet ein ABC Spinsystem aus. Die andere Teilstruktur mit den vier Protonen 6-H, 7-H, 8-H und 9-H bei $\delta = 7.83$, 7.89, 8.13 und 8.17 ppm erzeugt ein ABCD Spinsystem (Abbildung 24).

Abb. 24: Spinsysteme und Kopplungskonstanten des Aromatenbereichs von Methanophenazin (1) (500 MHz, CH_3OD)

Wechselwirkungen der Spinsysteme untereinander, über die Stickstoffatome hinweg, werden nicht beobachtet. Die deutliche Verschiebung der aromatischen Protonen 4-H, 6-H und 9-H mit $\delta = 8.07$, 8.13 und 8.17 ppm zu tiefem Feld zeigt den negativen induktiven Effekt der benachbarten Stickstoffatome an. Die 1H NMR-Daten von 1 in Deuteromethanol sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Abb. 25: 1H NMR-Spektrum des Aromatenbereichs von Methanophenazin (1) (500 MHz, CD_3OD)

Tabelle 3: ^1H NMR-Daten von Methanophenazin (1) (500 MHz, CD_3OD)

Protonen	$\delta_{\text{CD}_3\text{OD}}$ [ppm]	Multiplizität, J in [Hz]	Anzahl der Protonen
1-H	7.42	d (2.4)	1H
3-H	7.58	dd (9.4, 2.5)	1H
4-H	8.09	d (9.4)	1H
6-H oder 9-H	8.19	ddd (8.5, 1.4, 0.6)	1H
7-H oder 8-H	7.85	ddd (8.4, 6.7, 1.4)	1H
8-H oder 7-H	7.91	ddd (8.4, 6.7, 1.5)	1H
9-H oder 6-H	8.15	ddd (8.8, 0.8, 0.6)	1H
1'-H ₂	4.29	m _C	2H
2'-H _A	1.79 - 1.86	m	1H
2'-H _B	1.70 - 1.79	m	1H
3'-H	1.46 - 1.53	m	1H
3'-CH ₃	1.04	d (6.6)	3H
4'-H ₂	1.27 - 1.37	m	2H
5'-H ₂ , 8'-H ₂ , 9'-H ₂ , 12'-H ₂ , 13'-H ₂ , 16'-H ₂ , 17'-H ₂ ,	1.87 - 2.17	m	14H
6'-H	5.08	t br (7.9)	1H
10'-H, 14'-H,	4.99 - 5.06	m	2H
18'-H	5.15	t br (7.0)	1H
7'-CH ₃	1.62	s	3H
11'-CH ₃ , 15'-CH ₃ , 19'-CH ₃	1.54, 1.55, 1.56,	3s	je 3H
20'-H ₃	1.63	d (1.0)	3H

Die ^{13}C NMR- und ^{13}C APT-Spektren enthüllen neun quartäre C-Atome (Abbildung 26). Das C-2-Atom erfährt durch die direkte Verknüpfung mit dem Sauerstoff den größten Tieffeldshift und resoniert bei $\delta = 160.78$ ppm. Die Signale der vier quartären aromatischen Kohlenstoff-atome C-4a, C-5a, C-9a und C-10a finden sich im Bereich von $\delta = 140$ bis 145 ppm. Drei olefinische quartäre C-Atome (C-7', C-11' und C-15') zeigen, ihrer ähnlichen chemischen Umgebung entsprechend, mit $\delta = 135.09$, 135.04 und 134.99 nahezu identische chemische Verschiebungen. Das C-19' erfährt einen für quartäre, terminale Kohlenstoffe

isoprenoider Natur charakteristischen leichten Hochfeldshift und resoniert bei $\delta = 131.07$. Die ^{13}C NMR-Daten von Methanophenazin (1) sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: ^{13}C NMR-Daten von Methanophenazin (1) (125 MHz, APT: '–' = CH_2 , C_{quart} und '+' = CH_3 , CH)

Kohlenstoffatome	$\delta_{\text{C}_6\text{D}_6}$ [ppm]	$\delta_{\text{CD}_3\text{OD}}$ [ppm]	APT
C-1	105.80	105.41	'+'
C-2	160.78	162.61	'–'
C-3	126.53	128.35	'+'
C-4	131.29	131.31	'+'
C-4a	145.87	146.23	'–'
C-5a oder C-9a	144.12	144.21	'–'
C-6 oder C-9	130.26	129.31	'+'
C-7 oder C-8	129.56	132.19	'+'
C-8 oder C-7	128.78	130.66	'+'
C-9 oder C-6	130.17	130.22	'+'
C-9a oder C-5a	142.63	142.77	'–'
C-10a	141.36	141.78	'–'
C-1'	66.91	68.36	'–'
C-2'	36.01	36.96	'–'
C-3'	29.80	30.58	'+'
3'- CH_3	19.56	20.05	'+'
C-4'	37.45	38.19	'–'
C-5'	25.83	26.31	'–'
C-6', C-10', C-14'	124.77, 124.93, 124.73	125.43, 125.45	'+'
C-7', C-11', C-15'	135.09, 135.04, 134.99	135.87, 135.79	'–'
7'- CH_3 , 11'- CH_3 , 15'- CH_3	16.12, 16.13, 16.15	16.10, 16.13	'+'
C-8', C-12', C-16'	40.23, 40.20	40.81	'–'
C-9', C-13', C-17'	27.23, 27.12, 27.11	27.78, 27.43, 27.58	'–'
C-18'	125.04	125.91	'+'
C-19'	131.07	131.99	'–'
19'- CH_3	17.73	17.75	'+'
C-20'	25.78	25.89	'+'

Abb. 26: ^{13}C APT NMR-Spektrum von natürlichem Methanophenazin (1) (125 MHz, C_6D_6)

Von den 11 Signalen tertiärer Kohlenstoffatome werden vier Resonanzen bei $\delta = 124.73$, 124.77 , 124.93 und 125.04 ppm durch die olefinischen Atome C-6', C-10', C-14' und C-18' im Spektrum hervorgerufen. Die verbleibenden sieben Signale erscheinen im Aromatenbereich und werden dementsprechend zugeordnet. Eine auffallende Hochfeldverschiebung zu $\delta = 105.80$ ppm erfährt das C-1 Atom. Hier wirkt sich der positive mesomere Effekt des an C-2 gebundenen Sauerstoffatoms aus. Die Atome C-3 und C-4 mit Signalen bei $\delta = 126.53$ und 131.29 ppm können mit Hilfe eines zweidimensionalen $^1J(\text{C},\text{H})$ Korrelationsspektrums (HMQC, Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) eindeutig zugeordnet werden. Die chemischen Verschiebungen der verbleibenden vier tertiären Atome C-6, C-7, C-8 und C-9 werden den Signalen bei $\delta = 130.26$, 130.17 ppm (für C-6/C-9) und $\delta = 129.56$, 128.78 ppm (für C-7/C-8) zugeordnet. Eine eindeutige Bestimmung hätte die Korrelation zwischen einem zugeordneten Atom, beispielsweise C-1/1-H oder C-4/4-H, mit mindestens einem der vier unbestimmten C- bzw. H-Atome erfordert. Dies ist jedoch nicht möglich, denn die vier tertiären C-Atome bilden eine, durch die beiden Stickstoffatome isolierte Teilstruktur, die von den H,H COSY- und HMBC-Korrelationsmethoden (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) nicht erreicht wird.

Die Resonanzen von 10 Methylengruppen werden durch die sekundären C-Atome in der Seitenkette hervorgerufen. Dabei besetzen sieben CH_2 -Gruppen die Allylpositionen der Doppelbindungen. Die Kohlenstoffatome C-8', C-12' und C-16' befinden sich am Kopfende des jeweiligen ungesättigten isoprenoiden Bausteins (Abbildung 27). Diese drei Atome zeigen zwei Signale bei $\delta = 40.23$ und 40.20 ppm. Die Resonanzen bei $\delta = 25.83$, 27.23 , 27.12 und

27.11 ppm werden C-5', C-9', C-13' und C-17' zugeordnet. Sie besetzen die Allylstellungen am Schwanzende der jeweiligen isoprenoiden Teilstrukturen.^[37]

Abb. 27: ^{13}C NMR-Verschiebungen der Allylkohlenstoffatome einer Isopreneinheit

Durch die direkte Verbindung mit einem Sauerstoffatom findet sich das Signal für C-1' bei einer für Ether typischen Verschiebung von $\delta = 66.91$ ppm. Zwei weitere sekundäre Kohlenstoffatome (C-2' und C-4') resonieren bei $\delta = 36.01$ und 37.45 ppm. Zusammen mit der Resonanz des tertiären C-Atoms C-3' bei $\delta = 29.80$ ppm und der Resonanz des primären C-Atoms der Methylgruppe 3'-CH₃ bei $\delta = 19.56$ ppm, läßt sich ein gesättigter isoprenoider C₅H₁₀-Baustein als weitere Teilstruktur erkennen. Die Zuordnung insbesondere der diastereotopen Protonen 2'-H_A, 2'-H_B sowie 4'-H_A und 4'-H_B zu den Atomen C-2' und C-4' wird durch die Auswertung eines HMQC-Spektrums ermöglicht. Die Verknüpfung der Kohlenstoffatome C-1', C-2', C-3', 3'-CH₃ und C-4' wird durch H,H-Korrelationsspektroskopie der zugehörigen H-Atome sichergestellt (Abbildung 28).

Abb. 28: H,H-Korrelationen im gesättigten Teil der Seitenkette von **1**

Neben der oben genannten Methylgruppe an C-3 findet man noch drei weitere Resonanzen dieser Art bei $\delta = 16.12$, 16.13 und 16.15 ppm. Sie werden den 7'-CH₃, 11'-CH₃ und 15'-CH₃ zugeordnet. Die Signale bei $\delta = 17.73$ und 25.78 ppm charakterisieren die Kohlenstoffatome 19'-CH₃ und C-20' und markieren das Ende einer ungesättigten Terpeneinheit. Dabei resoniert die (*E*)-ständige Methylgruppe (C-20') im Vergleich mit der (*Z*)-ständigen (19'-CH₃) bei tieferem Feld. Durch Analyse des HMQC-Spektrums ordnet man ihnen die im ^1H

NMR-Spektrum bei $\delta = 1.58$ (Z) und 1.69 ppm (E) in Erscheinung tretenden Resonanzen zu. Die H,H COSY- und die HMBC- Daten von **1** sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Die Verknüpfung der nun vorliegenden Teilstrukturen, einer gesättigten und vier ungesättigten Isopreneinheiten untereinander sowie ihre Verbindung mit dem Heteroaromaten, wurde durch die Auswertung eines zweidimensionalen $^3J(\text{C,H})$ Korrelationsspektrums (HMBC) ermittelt. Die Frage, ob die C₅H₈-Strukturteile in Kopf-Schwanz-, Schwanz-Schwanz- oder Kopf-Kopf-Manier untereinander verknüpft sind, war von besonderem Interesse.

Tabelle 5: H,H COSY- und HMBC-Daten von Methanophenazin (**1**) (500 MHz, C₆D₆)

Position	δ_{H} [ppm]	H,H COSY	HMBC
1	7.53	3-H	C-2, 4a, 10a
3	7.32	1-H, 4-H	C-1, 4, 4a
4	8.12	3-H	C-2, 4a
6	8.31	7-H, 8-H	C-5a, 7, 8, 9a,
7	7.29 oder 7.35	6-H, 8-H, 9-H	C-5a, 6, 8, 9
8	7.35 oder 7.29	6-H, 7-H, 9-H	C-6, 7, 9, 9a
9	8.31	8-H, 7-H	C-4a, 5a, 7, 8
1'-A	3.79	1'-H _B , 2'-H _{A,B}	C-2, 2', 3'
1'-B	3.77	1'-H _A , 2'-H _{A,B}	C-2, 2', 3'
2'-A	1.44	2-H _B , 1'-H _{A,B}	C-1', 3', 4', 3'-CH ₃
2'-B	1.72	2-H _A , 1'-H _{A,B} , 3'-H	C-1', 3', 4', 3'-CH ₃
3'	1.60 - 1.65	2-H _{A,B} , 3'-CH ₃ , 4'-H _B	C-2', 4'
3'-CH ₃	0.86	3'-H	C-3', 4'
4'-A	1.18 - 1.27	3'-H _B , 5-H ₂	C-3', 5', 3'-CH ₃
4'-B	1.32 - 1.39	3'-H, 4'-H _B , 5-H ₂	C-3', 5', 3'-CH ₃
5'	2.00 - 2.30	4'-H _{A,B} , 6'-H	C-3', 4', 6', 7'
6'		5'-H ₂ , 7'-CH ₃ , 8-H ₂	C-5', 8', 7'-CH ₃
10'	5.27 - 5.38	9'-H ₂ , 11'-CH ₃ , 12-H ₂	C-9', 12', 11'-CH ₃
14'		13'-H ₂ , 15'-H ₂ , 16-H ₂	C-13', 16', 15'-CH ₃ ,

Tabelle 5: Fortsetzung

Position	δ_H [ppm]	H,H COSY	HMBC
7'-CH ₃		6'-H	C-6', 7', 8'
11'-CH ₃	1.63, 1.64, 1.65	10'-H	C-10', 11', 12'
15'-CH ₃		15'-H	C-14', 15', 16'
8',		6'-H, 9'-H	C-6', 7', 9', 7'-CH ₃
12',	2.00 - 2.30	10'-H, 13'-H	C-10', 11', 13', 11'-CH ₃
16'		14'-H, 17'-H	C-14', 15', 17', 15'-CH ₃
9'		8'-H ₂ , 10'-H	C-8', 10', 11'
13'	2.00 - 2.30	12'-H ₂ , 14'-H ₂	C-12', 14', 15'
17'		16'-H ₂ , 18'-H ₂	C-16', 18', 19'
18'	5.25	17'-H ₂ , 19'-H ₂ , 20'-H ₃	19'-CH ₃ , C-20'
19'-CH ₃	1.58	18'-H	C-19', 18'
20'	1.69	18'-H	C-19', 18', 19'-CH ₃

An zentraler Stelle der Untersuchung des HMBC-Spektrums stehen die Signale der 1'-H₂ Protonen. Sie lassen sich mit den Kohlenstoffatomen C-2 und C-3' korrelieren und bestätigen die Annahme einer Etherbrücke als Bindeglied zwischen dem Heteroaromaten und der Seitenkette. Zusätzlich wird klar, daß der aromatische Kern mit dem Schwanzende der gesättigten C₅H₁₀-Teilstruktur verknüpft ist (Abbildung 30).

Abb. 30: Ausgewählte 2J und 3J (C,H)-Korrelationen in Methanophenazin (1)

Eine weitere wichtige Korrelation besteht zwischen C-5' und den Protonen 4'-H₂ und 6'-H, denn sie belegt die Verbindung des Kopfs der gesättigten mit dem Schwanz der ersten ungesättigten Isopreneinheit. Dieses Kopf-Schwanz-Verknüpfungsmuster gilt auch für den Rest der Seitenkette, wie die Wechselwirkungen zwischen 9'-H₂ und C-8', 13'-H₂ und C-12' und

17'-H₂ sowie C-16' zeigen. Am Ende der Seitenkette befinden sich die beiden Methylgruppen 19'-CH₃ und 20'-H₃. Deren Protonen korrelieren mit dem charakteristisch zu $\delta = 131.07$ ppm verschobenen quartären Kohlenstoffatom C-19', welches seinerseits zusätzlich mit den 17'-H₂ Protonen in Kontakt steht. Die Wechselwirkung des vinylichen Protons 18'-H mit dem C-Atom 19'-CH₃ bestimmt dessen Position am Ende der terpenoiden Kette.

Ein Vergleich der Daten ¹³C NMR-chemischer Verschiebungen von Dolicholen – das sind polyisoprenoide Alkohole mit unterschiedlicher Anzahl nicht konjugierter, Kopf-Schwanz verknüpfter (*E*)- und (*Z*)-konfigurierter Doppelbindungen – mit den eigenen experimentell ermittelten Werten zeigt, daß die chemischen Verschiebungen der Methylengruppen des Kopfes der Isopreneinheiten am stärksten von der Konfiguration der Doppelbindung beeinflusst werden.^[38] Ist diese Methylengruppe Teil einer (*E*)-Doppelbindung, so resoniert sie bei $\delta \approx 40$ ppm. Im Falle einer (*Z*)-Doppelbindung erwartet man das Signal bei $\delta \approx 32$ ppm (Abbildung 31).

Abb. 31: Chemische Verschiebungen der Methylengruppen am Kopfende von (*E*)- und (*Z*)-konfigurierten Isopreneinheiten^[38]

Im Experiment wurden für die chemischen Verschiebungen der entsprechenden Atome C-8', C-12' und C-16' Werte von $\delta = 40.23$ und 40.20 ppm gefunden. Daraus folgt, daß Methanophenazin (1) über eine all-(*E*)-konfigurierte isoprenoide Seitenkette verfügt.

4.5 Zusammenfassung

Der durch Extraktion von Cytoplasmamembranen des Archaeabakteriums *Methanosarcina mazei* GöI isolierte Naturstoff Methanophenazin (1) wurde chromatographisch unter Anwendung von HPLC-Techniken gereinigt. Seine Summenformel wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt. Die Struktur des neuen Naturstoffs wurde durch ein- und zweidimensionale Kernresonanzexperimente (HMQC, H,H COSY, HMBC) ermittelt.

Methanophenazin (**1**) ist ein Sesterterpenether des 2-Hydroxyphenazins (**2**). Die Seitenkette besteht aus einem gesättigten und vier ungesättigten isoprenoiden Bausteinen, die regelmäßig in Kopf-Schwanz-Manier miteinander verknüpft und einheitlich (*E*)-konfiguriert sind. Am Schwanzende der gesättigten C₅H₁₀-Einheit befindet sich die Etherfunktionalität, die den terpenoiden Rest mit C-2 des Phenazins verknüpft. Der in kleinen Mengen gewonnene empfindliche Naturstoff ist das erste aus Archaea isolierte Phenazinderivat.

5 Vorkommen und Biosynthese von Phenazinen

5.1 Vorkommen von Phenazinen^[39]

Während Methanophenazin (**1**) das erste Phenazinderivat ist, das aus Archaea isoliert wurde, sind Phenazine aus Bakterien schon seit längerem bekannt. Dazu zählen die extracellulären Pigmente Pyocyanin (**14**), Iodinin (**15**) und Chlororaphin (**16**), die an ihren Farben erkannt und aus *Pseudomonas*-Stämmen bzw. aus *Brevibacterium iodinum* isoliert wurden.^[40,41,42]

Man hat bis heute etwa 75 weitere natürlich vorkommende Phenazin-Derivate gefunden, die ausschließlich von Eubakterien produziert werden.^[43] Ihnen allen gemeinsam ist der aromatische Phenazin-Grundkörper (Abbildung 32). Sie unterscheiden sich in der Art der Substituenten und im Substitutionsmuster voneinander.

Phenazin

Abb. 32: Struktur von Phenazin

Hierbei werden bevorzugt die Positionen 1, 2, 4, 6 und 9 durch Carboxyl- und Hydroxylgruppen substituiert. Bekannt sind aber auch 2, 3, 7-trisubstituierte Verbindungen. Meistens

werden nur zwei bis vier, selten sechs oder mehr Substituenten am Ring vorgefunden. Ein häufig auftretendes und vielfältig variiertes Motiv ist das des 1,6-disubstituierten Phenazingrundgerüsts. In Abbildung 33 sind einige Beispiele natürlich vorkommender Phenazine dargestellt.

2-Hydroxyphenazin-
1-carbonsäure

6-Hydroxyphenazin-
1-carbonsäure

2,3,4 -Trihydroxyphenazin-
1-carbonsäure

2,3,7-Trihydroxyphenazin-
1,6-dicarbonsäure

Abb. 33: Strukturen einiger natürlich vorkommender Phenazin-Derivate

Aus den Gattungen *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Microbispora* und *Sporangium* sind eine Vielzahl phenazinproduzierender Mikroorganismen bekannt. Mehr als die Hälfte der bekannten Phenazine werden von *Pseudomonaden* produziert. So wurden in den zurückliegenden Jahrzehnten allein aus dem Stamm *Pseudomonas aureofaciens* 14 Verbindungen wie beispielsweise Phenazin-1-carbonsäure (**17**), 2-Hydroxyphenazin (**2**), 2,3-Dihydroxyphenazin (**18**), Phenazin-1,6-dicarbonsäure (**19**), u. a. isoliert.^[44]

An zweiter Stelle in Bezug auf die Produktion von Phenazinderivaten rangiert nach den *Pseudomonaden* die Gattung *Streptomyces*. Die aus Kulturen verschiedener Streptomyceten isolierten Metabolite sind teilweise identisch mit denen aus *Pseudomonaden*, teilweise unterscheiden sie sich nur geringfügig am Substitutionsmuster. Da Streptomyceten als Quelle vieler physiologisch aktiver Substanzen bekannt sind, wurden die meisten der aus ihnen gewonnenen Verbindungen auf ihre biologische Aktivität überprüft. Viele der oben genannten Phenazine zeigen antibiotische Wirkung. Modelluntersuchungen an Pyocyanin (**14**), Iodinin (**15**), Phenazin-1,6-dicarbonsäure (**19**) u. a. schreiben die antibiotische Aktivität der planaren aromatischen Phenazinstruktur, ihrer Fähigkeit zur Einlagerung in die DNA und der damit einhergehenden Inhibierung der DNA-abhängigen RNA-Synthese zu.^[45] Besonders erwähnenswert sind die Verbindungen 1,2,6-Trimethoxyphenazin (Mycomethoxin A) und 6-Methoxyphenazin-1-carbonsäuremethylester (Mycomethoxin B), die aus *Streptomyces luteoreticuli* isoliert wurden (Abbildung 34).^[46] Sie wirken gegen pathogene Mycobakterien, einschließlich der Stämme, die sich als resistent gegenüber den gebräuchlichen Wirkstoffen Streptomycin und Isoniazid zeigen. Auf der Suche nach einem Antibiotikum gegen *Mycobakterium tuberculosis* fand man in *Streptomyces misakiensis* einen Produzenten der tuberkulostatisch wirkenden Phenazin-1-carbonsäure (**17**) (Tubermycin B). Die aus einer *Sorangium*-Spezies isolierte Verbindung Myxin wird als Breitspektrum-Antibiotikum eingesetzt.^[47]

Abb. 34: Strukturen von Mycomethoxin A, Mycomethoxin B und Myxin

Im Unterschied zu den Pseudomonaden sind Streptomyceten in der Lage, neben den oben erwähnten einfachen Phenazinen auch komplexere Phenazin-Derivate mit ungewöhnlichen Seitenketten aufzubauen. Als Beispiele mögen die aus *Streptomyces endus sub. sp. aureus* isolierten Substanzen Sendomycin A und Sendomycin B dienen (Abbildung 35). Sie zeigen neben einer breiten antibiotischen Aktivität auch karzinostatische Wirkung.^[48]

Abb. 35: Strukturen von Sendomycin A und Sendomycin B

Entdeckungen der jüngeren Zeit sind die gegen Bakterien und Tumoren wirksamen dimeren Phenazinderivate Esmeraldin A, Esmeraldin B sowie Saphenamycin, welche aus *Streptomyces antibioticus* Tü 2706 isoliert wurden (Abbildung 36).^[49]

Abb. 36: Strukturen von Esmeraldin A, Esmeraldin B und Saphenamycin

5.2 Biosynthese von Phenazinen

Die Biogenese phenazinhaltiger Verbindungen in Archaea ist noch ungeklärt. Modellvorstellungen hierzu orientieren sich an der Biosynthese von Phenazinen in Eubakterien, auf deren Aufklärung einige Mühe verwandt worden ist.^[50]

Die Entstehung von Phenazinen verläuft zunächst nach dem bekannten Shikimisäure-Weg der Biosynthese von aromatischen Aminosäuren (Abbildung 37). Der erste Schritt dieser Sequenz ist eine intermolekulare Aldolreaktion zwischen Phosphoenolpyruvat (**A**) und D-Erythrose-4-phosphat (**B**) zu 3-Desoxy-D-arabinoseheptulosonsäure-7-phosphat (**C**). Daran anschließend erfolgt der Ringschluß zu Dehydrochininsäure (**D**). Dies geschieht nach der Eliminierung des Phosphatrestes in **C** durch eine intramolekulare Aldolreaktion. Die Eliminierung von Wasser aus **D** führt zu 5-Dehydroshikimisäure (**E**). Die nachfolgende Reduktion ihrer Carbonylgruppe in 3-Position mit Hilfe von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ergibt Shikimisäure (**F**). Sie kondensiert nach Phosphorylierung der 3-OH-Funktionalität durch ATP mit einem Molekül Phosphoenolpyruvat (**A**) zum 3-Enolpyruvyl-Zwischenprodukt (**H**), welches abschließend durch eine Eliminierung von Phosphorsäure in Chorisminsäure (**I**) transformiert wird. Sie ist die gemeinsame Vorstufe aller drei aromatischen Aminosäuren Tryptophan (**L**), Phenylalanin (**M**) und Tyrosin (**N**).

Abb. 37: Schema zum Shikimisäure-Weg der Biosynthese aromatischer Aminosäuren

Die Aminierung von Chorisminsäure (**I**) führt über Anthranilsäure (**J**) zu Tryptophan (**L**). Dagegen verläuft die Bildung von Phenylalanin (**M**) und Tyrosin (**N**) über Prephensäure (**K**) als Zwischenverbindung, die nach Art einer Claisen-Umlagerung aus Chorisminsäure (**I**) entsteht. Der in die aromatischen Aminosäuren eingebaute Stickstoff entstammt der Aminosäure L-Glutamin, die in vielen Biosynthesereaktionen als Aminogruppendonor dient (Abbildung 38).

Abb. 38: Struktur von L-Glutamin

Alle in Abbildung 37 dargestellten Umwandlungen, wie etwa die Aldolreaktionen, die Reduktion, die Eliminierungen und die Umlagerung, verlaufen stereospezifisch. Die Mechanismen sind gut untersucht und der stereochemische Verlauf dieser Sequenz ist durch zahlreiche Experimente belegt.^[51]

Der auf den ersten Blick plausible Weg zu Phenazinen durch Kondensation von zwei Molekülen Anthranilsäure (**J**) fand bislang keine experimentelle Bestätigung. Ausführliche Fütterungsexperimente mit ¹⁴C markierter Anthranilsäure (**J**) und ¹⁴C/³H markierter Shikimisäure (**F**) bei der Biosynthese von Pyocyanin (**14**) durch *Pseudomonas aeruginosa* bzw. bei der Biosynthese von Iodinin (**15**) durch *Brevibacterium iodinum* zeigten, daß zwei Moleküle Shikimisäure (**F**) als biogenetische Vorstufe zu deren Aufbau dienen.^[52]

Diese Abzweigung vom Shikimisäure-Weg zum Phenazin-Biosyntheseweg, ohne Beteiligung von Anthranilsäure (**J**), wurde durch Versuche mit Mutanten von *Pseudomonas aeruginosa* bestätigt. Sie produzierten Pyocyanin (**14**), obwohl sie weder in der Lage waren, Shikimisäure (**F**) abzubauen, noch die Fähigkeit zur Synthese von Aminosäuren besaßen.^[53]

Grundlegende Untersuchungen der Stickstoffquelle wurden von R. B. Herbert und A. Römer und seinen Mitarbeitern an *Brevibacterium iodinum* und *Pseudomonas aureofaciens* unternommen.^[54] Sie fanden durch Einbauversuche mit ¹⁵N markiertem L-Glutamin heraus, daß der Amid-Stickstoff von L-Glutamin als Stickstoffquelle beim biologischen Aufbau von Phenazinen dient. Die Suche nach einer intermediär aus Shikimisäure (**F**) durch Transaminierung gebildeten Zwischenverbindung, die dann in einen aromatischen Phenazin-Tricyclus übergeführt wird, blieb bislang ohne Erfolg.

Als allgemeiner Vorläufer der Biogenese von Phenazinen wird Phenazin-1,6-dicarbonsäure (**19**) angenommen, die als Primärprodukt aus Shikimisäure (**20**) aufgebaut wird. Häufig vorkommende Reaktionen am aromatischen Ring sind Hydroxylierungen. Zur Einführung des Sauerstoffs wird die entsprechende Stelle des Aromaten zunächst epoxidiert und das Epoxid dann selektiv geöffnet. Dieser Schritt wird oft von einer Decarboxylierung begleitet. Die Biogenese von 2-Hydroxyphenazin (**2**) in *Pseudomonas aureofaciens* folgt vermutlich diesem Prinzip. Am Beginn der Synthese steht Phenazin-1,6-dicarbonsäure (**19**). Durch Decarboxylierung entsteht Phenazin-1-carbonsäure (**17**), die zur Einführung der Hydroxylgruppe in 2-Stellung zunächst in das entsprechende Epoxid **21** übergeführt wird. Die Epoxidöffnung verläuft unter Verlust der Carboxylgruppe als Kohlendioxid und bildet 2-Hydroxyphenazin (**2**).^[55]

Die meisten Studien hierzu wurden an *Brevibacterium iodinum* und an verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen durchgeführt. Wie Untersuchungen gezeigt haben, lassen sich die hierbei gefundenen Prinzipien auch auf Stämme der Gattung *Streptomyces* übertragen.^[56]

Die Entdeckung der ungewöhnlichen Phenazine Esmeraldin A und B in *Streptomyces antibioticus* Tü 2706 wirkte stimulierend auf Untersuchungen zur Biogenese dieser Strukturen.^[43]

Die Bedeutung der Phenazinderivate für ihre Produzenten ist ungeklärt. Es ist bezeichnend für eine Vielzahl von Mikroorganismen unterschiedlicher Gattungen, daß die von ihnen produzierten Sekundärmetabolite keine offensichtliche physiologische Funktion übernehmen.^[57]

Das Ausscheiden von antibiotisch wirksamen Sekundärmetaboliten interpretiert man daher als Maßnahme zu Schaffung eines Standortvorteils für den Produzenten, und zwar durch Inhibieren oder Abtöten von Nahrungskonkurrenten.^[58]

Obwohl manche Phenazine an Redoxprozessen beteiligt sind, gab es vor dem Auffinden von Methanophenazin (**1**) keinen Anhaltspunkt für eine physiologische Funktion eines Phenazin-Derivates in einer Atmungskette.^[59]

6 Synthese von 2-Hydroxyphenazin (2)

6.1 Wege zu Phenazinen^[60]

Bei den meisten Synthesen von Phenazinderivaten ist der Aufbau des zentralen heterocyclischen Rings der kritische Schritt der Synthesesequenz. Weil der desaktivierte Phenazin-Grundkörper elektrophile aromatische Substitutionsreaktionen nur schwer eingeht, werden Derivate oft durch die Fusion entsprechend substituierter Vorläufer synthetisiert.

Einen direkten Zugang zu Phenazinen ermöglicht z. B. die intermolekulare Kondensation von *o*-Phenylendiamin (**5**) mit *o*-Benzochinonen bzw. 1,2-Naphtochinonen.^[61] Die benötigten *o*-Chinone **22** werden dabei *in situ* aus den entsprechenden Catecholen durch Oxidation mit Cer(IV)sulfat oder Mangandioxid hergestellt und dann mit *o*-Phenylendiamin (**5**) abgefangen.

Nach diesem Syntheseprinzip, jedoch unter Umgehung der Probleme, die aus der Herstellung der *o*-Chinone resultieren, synthetisierte *Ris* Phenazin (**26**) durch Erhitzen einer Mischung aus **5** und Catechol (**24**) im verschlossenem Rohr bei 220-240 °C.^[62] Das als Primärprodukt entstehende 5,10-Dihydrophenazin (**25**) wird an der Luft zu Phenazin (**26**) oxidiert.

Ein alternativer Weg zum Aufbau der Phenazinstruktur ist die intramolekulare Cyclisierung von *ortho*-substituierten Diphenylaminderivaten unter reduktiven oder oxidativen Bedingungen. Das in die angelsächsische Literatur auch als *Vivian-Methode*^[63] eingegangene Verfahren wurde bereits viel früher von *Nietzki* und *Ernst*^[64] zur Phenazin-Synthese durch Cyclisierung von 2-Aminodiphenylamin (**30**) eingesetzt. Die durch *ipso*-Substitution des reaktiven

Chloratoms in *o*-Nitrochlorbenzol (**27**) durch Anilin (**28**) und anschließender Reduktion der Nitrogruppe erhaltene Verbindung **30** cyclisiert in Gegenwart von Braunstein und Eisen-
spänen zu Phenazin (**26**).

Vivian, Hartwell und Waterman^[65] nutzten diese Methode zur Darstellung von 2-Chlorphenazin (**33**), das sie dann in 2-Hydroxyphenazin (**2**) umwandeln konnten. Die Substitution des Chloratoms in **33** durch eine Hydroxylgruppe gelingt allerdings erst nach Umwandlung der beiden zentralen Stickstoffatome in die entsprechenden Oxide. Die *N*-Oxide können abschließend mit alkalischer Natriumhydrogensulfidlösung desoxygeniert werden.

Eine weitere, interessante Methode zur Synthese zahlreicher Phenazinderivate ist die *Beirut-Reaktion*.^[66] Bei dieser Reaktion kondensiert man Benzofuroxan (**36**) mit einer Reihe unterschiedlicher Substrate unter Bildung der korrespondierenden Phenazin-*N*-oxide. So reagiert **36** bereitwillig mit 1,2-Cyclohexandion (**37**) in Gegenwart sekundärer und tertiärer Amine zu einer Mischung aus 1-Hydroxyphenazinmono-(**38**) und di-*N*-oxid (**39**). Nach Zugabe einer Persäure zur Reaktionsmischung erhält man ausschließlich 1-Hydroxyphenazin-5,10-dioxid (**38**) als Produkt.

Bemerkenswert ist die Reaktion von Benzofuroxan (**36**) mit den Phenolat-Anionen von Phenol, Resorcin und Hydrochinon, aber auch mit Benzochinon, weil hierbei 2-Hydroxyphenazin-5,10-dioxid (**42**) in allen Fällen als einziges Produkt gebildet wird. Es kann dann mit Natriumdithionit zu 2-Hydroxyphenazin (**2**) reduziert werden.^[65] Ley und seine Mitarbeiter^[67] nutzten Hydrochinon (**41**) zur Gewinnung von **42**.

Die in der Regel bei dieser Reaktion in guten Ausbeuten erhaltenen *N*-Oxide können mit einer Reihe von Reduktionsmitteln, wie beispielsweise Natriumdithionit, Phosphorylchlorid oder Pd/C-Wasserstoff zu den entsprechenden Phenazinen desoxygeniert werden.

Das zur Synthese von **1** benötigte 2-Hydroxyphenazin (**2**) wurde auf direktem Wege nach der Vorschrift von *Kehrmann* und *Cherpillod*^[68] bzw. der Vorschrift von *Ott*^[69] hergestellt. Diese Methoden versprachen gute Ausbeuten und gingen von einfachen, im Handel günstig erhältlichen Substanzen aus.

6.2 Synthese von 2-Hydroxyphenazin (**2**) nach *Kehrmann* und *Cherpillod*^[68]

Ausgangspunkt dieser Synthese ist *p*-Benzochinon (**43**), das mit Essigsäureanhydrid im Sauren zu 1,2,4-Triacetoxybenzol (**44**) umgesetzt wird.^[70] Eine anschließende saure Verseifung der drei Estergruppen mit konzentrierter Salzsäure in Methanol ergibt 1,2,4-Trihydroxybenzol (**45**) in guter Ausbeute.^[70] Das graue Rohprodukt läßt sich durch Sublimation im Vakuum bei 10^{-2} torr reinigen. Man erhält so **45** als weiße analysenreine Substanz.

Das zur Kondensation mit *o*-Phenylendiamin (**5**) erforderliche 2-Hydroxybenzochinon (**46**), wird nach einer Vorschrift von *Willstätter* und *Müller*^[71] aus 1,2,4-Trihydroxybenzol (**45**) durch Oxidation mit Silber(I)oxid gewonnen. Das empfindliche gelbe Chinon **46**, das an Luft zur Zersetzung neigt, wird am besten ohne weitere Aufreinigung mit *o*-Phenylendiamin (**5**) zu Reaktion gebracht. Nach *Kehrmann* und *Cherpillod*^[68] suspendiert man das Chinon **46** in konzentrierter Essigsäure und gibt *o*-Phenylendiamin (**5**) innerhalb weniger Minuten hinzu. Im weiteren Verlauf scheiden sich aus der zunächst blutroten und danach gelb gefärbten

Lösung Kristalle von 2-Hydroxyphenazin (**2**) ab, die durch Zugabe von „reichlich“ Wasser vervollständigt wird. Nach Aufarbeitung und Reinigung beträgt die Ausbeute an **2** laut Literatur 87 %.^[68]

Bei eigenen Versuchen konnte nach Zugabe von **5** zur essigsauen Chinon-Suspension ebenfalls eine dunkle Rotfärbung der Reaktionsmischung beobachtet werden. Hierauf trat, im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur, keine Gelbfärbung, sondern eine Schwarzfärbung des Ansatzes ein. Auf dem Boden des Glaskolbens ließ sich bei Betrachtung im Gegenlicht schemenhaft ein schwarzer Niederschlag erkennen, auf den die Zugabe von Wasser wenig Einfluß hatte. Filtration, Reinigung durch Umfällen, Entfernen des Kristallwassers bei 150 °C und Chromatographie an SiO_2 ergaben das Produkt mit Ausbeuten zwischen 10 und 18 %. Untersuchungen des Filtrats durch dünnschichtchromatographische Analyse zeigten neben einem schwarzen Startfleck noch überschüssiges *o*-Phenylendiamin (**5**) und sehr wenig weiteres 2-Hydroxyphenazin (**2**), das aber nicht isoliert wurde.

Kehrmann und *Cherpillod*^[68] führen die anfänglich auftretende intensive rote Färbung der Reaktionsmischung auf ein offenes Anilid als Zwischenprodukt zurück, das dann durch Ringschluß zum Phenazin abreagiert. Um eine Verbesserung der Ausbeuten zu erzielen, wurden neben Variationen der Stöchiometrie der Reaktionspartner auch die Reaktionsführung geändert. So versuchte man beispielsweise durch Erhitzen der dunkelroten Suspension aus **46** und **5** die Phenazinbildung zu verbessern. Dies gelang jedoch nicht.

Die unbefriedigenden Ausbeuten bei dieser Reaktion gaben Anlaß zur Suche nach einer alternativen Synthesemethode.

6.3 Synthese von 2-Hydroxyphenazin (2) nach Ott^[69]

Bei seinen Untersuchungen über Chinone fand R. Ott, daß die Kondensation von *p*-Benzoquinon (43) mit *o*-Phenylendiamin (5) in alkoholischer Lösung direkt zu 2-Hydroxyphenazin (2) führt. Diese Methode besteht nicht nur durch die Verwendung leicht zugänglicher Substrate und der Einfachheit in der Durchführung, sondern auch durch ihre hohe Ausbeute, die von Ott^[69] mit „etwa 90 %“ angegeben wurde.

Eigene Versuche unter Anwendung der Ott'schen Versuchsvorschrift ergaben bei der Umsetzung von 43 mit 5 zwar das angestrebte Produkt 2, doch blieben die Ausbeuten mit 6 bzw. 10 % deutlich hinter der Erwartung zurück. Angesichts der mageren Ergebnisse wurden keine weiteren Anstrengungen zur Optimierung dieses Verfahrens unternommen.

Wie die genannten Versuche zeigen, ist der Zugang zu 2-Hydroxyphenazin (2) auf direktem Wege, also durch intermolekulare Kondensation von 2-Hydroxybenzochinon (46) bzw. *o*-Benzochinon (43) mit *o*-Phenylendiamin (5) möglich. Hierbei gute Ausbeuten zu erzielen ist hingegen problematisch. Die Anwendung einer mehrstufigen Synthese, beispielweise der *Beirut-Reaktion*,^[66] erscheint unter diesen Bedingungen erfolgversprechender, wurde aber nicht durchgeführt.

6.4 Diskussion der spektroskopischen Daten von 2-Hydroxyphenazin (2)

Reines 2-Hydroxyphenazin (2) ist ein gelber Feststoff, der im UV-Spektrum bei $\lambda = 216, 253, 355$ und 391 nm Absorptionsmaxima aufweist. Sein IR-Spektrum verrät die Hydroxylfunktion durch eine breite Bande im Bereich von $\tilde{\nu} = 3420 - 2595$ cm^{-1} . Die C-H-Streckschwingungen werden durch die ausgeprägten Absorptionen der Wasserstoffbrückenbindungen der OH-Gruppe überlagert. Zahlreiche Absorptionen, beispielsweise bei $\tilde{\nu} = 1632, 1602, 1476$ und 1452 cm^{-1} , werden durch Streckschwingungen der aromatischen C=C-Doppelbindungen hervorgerufen.

Im ^1H NMR-Spektrum (Abbildung 39) erkennt man das breite mit D_2O austauschbare Signal des sauren Hydroxylprotons bei $\delta = 10.85$ ppm. Alle anderen Signale liegen im aromatischen Bereich und sind durch die Gegenwart der elektronegativen Stickstoffatome zu tiefem Feld verschoben. Am stärksten wirkt sich das auf die Protonen in Position 4, 6 und 9 aus, die mit Verschiebungen zu $\delta = 8.10, 8.11$ und 8.15 ppm bei tiefstem Feld resonieren. Die Hydroxylgruppe hat den stärksten Einfluß auf das Proton in 1-Position. Es erfährt einen charakteristischen Hochfeldshift und resoniert bei $\delta = 7.34$ ppm. Sein Signal wird durch eine 4J -Kopplung mit dem Proton an C-4 zum Dublett aufgespalten.

Abb. 39: ^1H NMR-Spektrum von 2-Hydroxyphenazin (2) (300 MHz, $\text{DMSO}[D_6]$)

Die Analyse des ^{13}C NMR APT-Spektrums (Abbildung 40) zeigt erwartungsgemäß fünf quartäre und sieben tertiäre Kohlenstoffatome. Bemerkenswert hierbei sind die Verschiebungen der Atome C-1 und C-2. Analog den Verhältnissen im Protonen-Spektrum, erfährt das Kohlenstoffatom C-1 einen Hochfeldshift durch den positiven mesomeren Effekt des indirekt benachbarten Sauerstoffatoms. Sein Signal erscheint bei $\delta = 107.07$ ppm. Das Atom C-2 als Träger der Hydroxylgruppe wird durch dessen negativen induktiven Effekt am stärksten zu tiefem Feld verschoben. Es resoniert bei $\delta = 159.60$ ppm.

Das Signal des Kohlenstoffatoms C-3 erscheint bei $\delta = 126.39$ ppm und unterscheidet sich damit kaum von den anderen tertiären Kohlenstoffatomen C-4, C-6, C-7, C-8 und C-9, die alle im Bereich zwischen $\delta = 128.48$ und 130.70 ppm resonieren. Für die vier quartären Kohlenstoffatome C-4a, C-5a, C-9a und C-10a finden sich Signale im Bereich von $\delta = 139.47$ bis 144.75 ppm.

Abb. 40: ^{13}C NMR APT-Spektrum von 2-Hydroxyphenazin (2) (50 MHz, $\text{DMSO}[D_6]$)

Im Massenspektrum erscheint das Molekülion mit $m/z = 196$ als intensivstes Signal. Weitere charakteristische Signale zeigen die Fragmentationen $[M^+ - 2N]$ bei $m/z = 168$ und $[168 - \text{CO}]$ bei $m/z = 140$. Sie deuten auf die Extrusion der beiden Stickstoffatome und den anschließenden Verlust einer CO-Gruppe hin.^[72]

7 Synthese des Phenazinethers *rac-51*

7.1 Optimierung der Versuchsbedingungen

Aus dem Retrosyntheschema in Abbildung 15 ist zu ersehen, daß als letzte Stufe der Totalsynthese von Methanophenazin (**1**) eine Veretherung der isoprenoiden Seitenkette **3** mit 2-Hydroxyphenazin (**2**) geplant ist. Um zu prüfen, ob sich dieser Schritt verwirklichen läßt, wurden vorab einige Versuche zur Ethersynthese zwischen 2-Hydroxyphenazin (**2**) und Citronellol (*rac-47*) als Modellverbindung durchgeführt. Das Ziel dieses Unterfangens war es, die optimalen Reaktionsbedingungen zur Durchführung der Transformation zu erarbeiten. Dabei galt es die beste Abgangsgruppe sowie die besten Reaktionsbedingungen (Base, Lösungsmittel, Temperatur) herauszufinden. Die Überführung der Alkoholfunktion von *rac-47* in das entsprechende Mesylat *rac-49* bzw. das Tosylat *rac-48* wurde durch die Anwendung von Standardmethoden in guten Ausbeuten erreicht.

Die Synthese des entsprechenden Bromids *rac-50* gelang nach einer Vorschrift von Kocienski und seinen Mitarbeitern mit 86 % Ausbeute.^[73]

Erste Versuche mit Natriumhydrid als Base in Tetrahydrofuran ergaben bei langen Reaktionszeiten (> 12 h) nur unvollständigen Umsatz und entsprechend niedrige Ausbeuten im Bereich von 40 bis 50 %. Hierbei war das Mesylat dem Tosylat als Abgangsgruppe gegenüber im Vor-teil. Die besten Ergebnisse erzielte man mit trockenem, feingemörsertem Kaliumcarbonat als Base in Dimethylformamid unter Einsatz des Mesylats *rac-49* bei 100 °C. Versuche mit dem Bromid *rac-50* ergaben keine besseren Ausbeuten an *rac-51*.

Eine Übertragung der Bedingungen zur Etherbildung dieser Modellexperimente auf die Natur-stoffsynthese verlief mit enttäuschendem Ergebnis (64 % Ausbeute), so daß eine andere Syn-thesemethode ausgearbeitet wurde. Eine Abwandlung der Vorschrift von *Loupy* und seinen Mitarbeitern^[74] brachte schließlich die angestrebte hohe Ausbeute. Mit gemörsertem Kalium-hydroxid als Base und unter Zusatz des Phasentransferkatalysators Aliquat 336 wurde *rac-51* in einer Ausbeute von 96 % isoliert. Während *Loupy* die Ethersynthese gänzlich ohne Solvens durchführte, bewährte sich beim eigenen Vorgehen Tetrahydrofuran als Lösungsmittel.

Vermutlich ist der Phasentransferkatalysator in der Lage, im heterogenen Reaktionsgemisch die Nucleophilie des Phenolat-Anions zu steigern, was sich günstig auf die Etherbildung auswirkt. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn man Aliquat 336 über das katalytische Maß hinaus, in Mengen bis zu 30 Gewichtsprozent bezogen auf **2**, einsetzt.

7.2 Diskussion der spektroskopischen Daten von *rac-51*

Der Phenazincitronellylether *rac-51* ist ein gelbes Öl, das seine Absorptionsmaxima im UV-Spektrum bei $\lambda = 216, 256, 359$ und 391 nm hat. Im IR-Spektrum finden sich Signale bei $\tilde{\nu} = 3060$ und 3028 cm^{-1} , die durch aromatische C-H-Streckschwingungen hervorgerufen werden. Die entsprechenden aliphatischen C-H-Streckschwingungen führen zu Absorptionsbanden bei $\tilde{\nu} = 2959$ bis 2855 cm^{-1} . Ähnlich wie bei 2-Hydroxyphenazin (**2**) zeugen die Banden bei $\tilde{\nu} = 1632$ und 1605 cm^{-1} von den Streckschwingungen der C=C-Doppelbindungen des aromatischen Phenazingerüsts. Die Aryl-Alkylethergruppe zeigt die Absorption ihrer C-O-Streckschwingung bei $\tilde{\nu} = 1281$ und 1197 cm^{-1} .

Im ^1H NMR-Spektrum finden sich neben den Signalen der Protonen des Heteroaromaten, die bei der Interpretation des Spektrums von 2-Hydroxyphenazin (**2**) im vorangegangenen Kapitel ausführlich erörtert wurden, weitere Resonanzen, die Strukturelemente der ungesättigten Seitenkette anzeigen. Ein Resonanzsignal bei $\delta = 1.00$ ppm zeugt von einer Methylgruppe,

die mit einem tertiären Kohlenstoffatom direkt verbunden ist und durch eine 3J -Kopplung mit dessen Proton charakteristisch zum Dublett aufspaltet. Die terminalen olefinischen Methylgruppen sind verantwortlich für zwei Singulets bei $\delta = 1.61$ und 1.68 ppm. Die Resonanz des olefinischen Protons 6'-H erscheint bei $\delta = 5.11$ ppm. Die direkte Nähe des Sauerstoffatoms entschirmt die 1'-H₂ Protonen und verursacht die Tieffeldverschiebung ihrer Signale zu $\delta = 4.21$ ppm. Die chemische Verschiebung und die Multiplizität der aromatischen Protonen wird durch die Veretherung der Hydroxylgruppe nur wenig beeinflusst. Sie zeigen sich im Vergleich mit 2-Hydroxyphenazin (**2**) nur geringfügig verändert. Gleiches gilt auch für die Resonanzen der Kohlenstoffatome im ^{13}C NMR-Spektrum. Hier treten, zusätzlich zu den von **2** her bekannten Signalen der 12 aromatischen Kohlenstoffatome, noch zwei weitere Resonanzen bei $\delta = 124.46$ und 131.32 ppm in Erscheinung. Zusammen mit den beiden Resonanzsignalen bei $\delta = 17.65$ und 25.69 ppm markieren sie das Ende der ungesättigten Seitenkette und werden den Atomen C-6', C-7', 7'-CH₃ und C-8' zugeordnet. Die für das direkt mit dem Sauerstoff verbundene Atom C-1' typische Resonanz findet sich bei $\delta = 67.04$ ppm.

8 Synthese der C₆-Bausteine *rac*-6 und (*R*)-6

8.1 Synthese von *rac*-6

Der für die Synthese von *rac*-1 benötigte Baustein *rac*-6 wurde ausgehend von 3-Methylpentan-1,5-diol (**8**) in wenigen Schritten hergestellt. Bei der Funktionalisierung dieses bifunktionellen Substrats **8**, das über zwei äquivalente funktionelle Gruppen in gleicher chemischer Umgebung verfügt, gilt es zu beachten, daß der selektive Schutz von nur einer der beiden Alkoholfunktionen erschwert ist. Werden solche Substrate mit äquimolaren Mengen eines Silylierungsreagenzes unter Standardbedingungen zur Reaktion gebracht, resultieren häufig Gemische aus monofunktionalisiertem und bisfunktionalisiertem Produkt, sowie unverbrauchtem Substrat. Ist dieses Substrat gut verfügbar und leicht aus dem Reaktionsgemisch abzutrennen, setzt man es in großem Überschuß ein, um eine gleichzeitige Funktionalisierung beider reaktiven Positionen zu unterdrücken. Ist das Material jedoch wertvoll, dann ist es sinnvoll, eine Synthesemethode zur selektiven Monofunktionalisierung zu entwickeln. Von der Arbeitsgruppe um *McDougal*^[75] wurde eine solche Vorschrift zum selektiven Schutz symmetrischer Diole als *tert*.-Butyldimethylsilylether erarbeitet. Dabei setzt man äquimolare Mengen des entsprechenden Diols mit *tert*.-Butyldimethylsilylchlorid als Silylierungsreagenz um. Der Schlüssel für den Erfolg liegt in der Wahl der richtigen Base. Während Standardmethoden zum Silylieren von Alkoholen mit Triethylamin oder Pyridin als Base arbeiten, fanden *McDougal* und seine Mitarbeiter Natriumhydrid als geeignet, eine Monofunktionalisierung von bisfunktionellen Diolen zu erzielen. Im Falle von Ethan-1,2-, Propan-1,3-, Butan-1,4- und Pentan-1,5-diol liegen die Ausbeuten an einfach geschützten Produkten zwischen 85 und 95 %.^[75]

Die Anwendung dieser Vorschrift auf das Diol **8** ergibt den monosilylierten Alkohol *rac*-52 mit einer Ausbeute von 83 %. Die bissilylierte Verbindung wurde nicht gebildet.

Die Transformation des geschützten Alkohols ins Iodid *rac*-6 gelingt in sehr guten Ausbeuten auf etabliertem Weg durch Mesylierung der Alkoholfunktion und Verdrängung der guten Abgangsgruppe mit Lithiumiodid in siedendem Aceton oder Tetrahydrofuran.

Dem Solvens Tetrahydrofuran ist dabei der Vorzug zu geben, denn Versuche mit Natriumiodid unterschiedlicher Qualität führten unter den oben angegebenen Bedingungen mit Aceton als Lösungsmittel wiederholt zur Spaltung des Silylethers. Die Umsetzung derselben Reaktionspartner in siedendem, trockenem Tetrahydrofuran verlief dagegen problemlos und ebenfalls mit sehr guter Ausbeute.

Versuche zur Synthese des entsprechenden Bromids *rac*-**53** durch den Umsatz von *rac*-**52** mit Lithiumbromid in siedendem Tetrahydrofuran ergaben deutlich schlechtere Ergebnisse. Stets entstand entschütztes Nebenprodukt, was auf die Lewis-Säure-Aktivität von Lithiumbromid zurückzuführen ist.

Mit der dreistufigen Synthese von *rac*-**6** in 77 % Gesamtausbeute stand einer der für die Synthese von *rac*-**1** benötigten Vorläufer zur Verfügung.

8.2 Synthese von (*R*)-**6**

Der in hoher optischer Reinheit (ee > 95%) im Handel erhältliche (*R*)-3-Methylglutarsäuremonoethylester [(*R*)-**11**] sollte durch die Anwendung einer stereodivergenten Synthesestrategie als Substrat sowohl für die Synthese von (*R*)-**6** als auch für die des Enantiomers (*S*)-**6** eingesetzt werden können.

Demnach müßte es möglich sein, ausgehend von (*R*)-**11** beide Antipoden des Naturstoffs Methanophenazin (*S*)-**1** und (*R*)-**1**, aufzubauen.

Eine gesättigte C₅-Kette, die an C-3 ein Stereozentrum mit einer Methylgruppe trägt, ist Strukturelement vieler Pheromone^[76] Terpene^[77] und anderer natürlich vorkommender Verbindungen. Damit sind chirale Substanzen wie (*R*)-**11** begehrte Bausteine für die Synthese von Verbindungen wie α -Tocopherol^[78] oder Verrucarinsäure.^[79]

Die Gewinnung des mittlerweile im Handel erhältlichen (*R*)-**11** erfolgt auf zwei prinzipiell unterschiedliche Art und Weisen. Bei der klassischen Methode der Racematspaltung durch Kristallisation diastereomerer Salze verwendet man das enantiomerenreine Alkaloid Cinchonidin als Base und setzt es mit racemischen Glutarsäureethylester (*rac*-**54**) zum entsprechenden Salz um. Kristallisation und die Freisetzung des Alkaloids in saurem Medium ergibt die chirale Verbindung (*R*)-**11**.^[80]

Ein eleganter Ansatz zur Gewinnung chiraler Verbindungen aus prochiralen Vorläufern nutzt die Fähigkeit von Enzymen wie α -Chymotrypsin,^[81] Schweineleber-Esterase^[82] und Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase,^[83] enantiotopdifferenzierende Reaktionen zu katalysieren. So wird der prochirale Diester **55** durch das Enzym Schweineleber-Esterase in sehr guten Enantiomerenüberschüssen in (*R*)-**11** übergeführt. Das Enzym stellt in dieser Reaktion einen biologischen Katalysator dar, der in der Lage ist, die beiden enantiotopen Liganden des Prochiralitätszentrums zu differenzieren und damit selektiv die Hydrolyse des *pro-R* Ethylesters von **55** zu ermöglichen.

Diese Methode hat gegenüber der o. g. klassischen Racematspaltung den Vorteil, daß das gesamte Substrat in ein einziges Enantiomer umgewandelt werden kann.

Die ersten Schritte der Synthese des Iodids (R)-6 sahen vor, (R)-11 durch chemoselektive Reduktion die Carboxylgruppe in den entsprechenden Alkohol überzuführen und zu silylieren.^[84]

Bei dem Versuch diese Transformationen durchzuführen, stellten sich gleich zu Beginn Schwierigkeiten ein. Während die Reduktion der Carboxylgruppe durch Diboran (BH₃·SMe₂) problemlos gelang,^[85] bereitete der Schutz des gebildeten Alkohols als Silylether Probleme. Im basischen Medium konkurriert die Silylierung mit der gleichzeitig ablaufenden Lactonisierung. Dabei ist der intramolekulare Prozeß gegenüber dem intermolekularen im Vorteil, so daß überwiegend oder ausschließlich das Lacton entsteht.^[86] Der Versuch, die Lactonbildung durch den Einsatz von drei Äquivalenten *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid zu verhindern, war erfolglos. Der cyclische Ester blieb Hauptprodukt der Umsetzung. Um dieses Problem zu lösen, versuchte man zunächst das Lacton (R)-12 zu synthetisieren und dieses dann in das Iodid (R)-6 zu überführen.

8.2.1 Synthese der Lactone (R)-12 und (S)-12

Carbonsäuren und Carbonsäureester werden mit komplexen Metallhydriden üblicherweise zu Alkoholen reduziert. Die selektive Reduktion einer Carbonsäuregruppe in Gegenwart eines Esters gestattet das Reagenz Diboran (B₂H₆). In Form seines Dimethylsulfidkomplexes BH₃·SMe₂ ist es in seiner Reaktivität genügend abgeschwächt und kann auch im Überschuß eingesetzt werden, ohne das man Gefahr läuft, neben der Carboxylgruppe die Estergruppe zu reduzieren.^[87] Das Substrat darf jedoch keine Doppel- oder Dreifachbindungen enthalten, da diese durch BH₃·SMe₂ hydroboriert werden können.

Die Reduktion der Carboxylgruppe wird nach der Zugabe von BH₃·SMe₂ zum Substrat (R)-11 bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktionsmischung wird am Ende mit Wasser behandelt, um den entstandenen Borsäureester zu hydrolysieren. Um eine quantitative

Cyclisierung des intermediär entstehenden 5-Hydroxycarbonsäureesters zum Lacton (R)-**12** zu erreichen, erhitzt man das Rohprodukt, in Gegenwart von *p*-Toluolsulfonsäure, mehrere Stunden mit Benzol am Wasserabscheider.^[88] Eine Alternative zur sauer katalysierten Cyclisierung bietet die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte basische Cyclisierung des Rohprodukts mit wäßriger Kaliumhydroxidlösung. Um gute Ausbeuten an (R)-**12** zu erzielen, ist es wichtig, die aus zwei Phasen bestehende Mischung aus Rohprodukt und wäßriger Kaliumhydroxidlösung durch die Zugabe von Methanol zu homogenisieren. Vorteil des hier vorgestellten Verfahrens ist die hohe Ausbeute des benötigten Lactons (R)-**12**.

Der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{20} = +27.0^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl_3) von (R)-**12** entspricht auf Basis der Ergebnisse von Rossi^[88] {Lit. $[\alpha]_D^{27} = 27.61^\circ$ ($c = 5.716$ in CHCl_3)} einem Enantiomerenüberschuß von $ee = 98\%$.

Die chemoselektive Reduktion der Esterfunktion in (R)-**11** gelingt nach einer Vorschrift von Dugar und seinen Mitarbeitern,^[90] mit Natriumborhydrid und Methanol in siedendem Dimethoxyethan. Die anschließende Lactonisierung mit wäßriger Kaliumhydroxidlösung liefert das Lacton (S)-**12** mit 84 % Ausbeute.

Der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -24.0^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl_3) von Lacton (S)-**12** entspricht, verglichen mit den Werten von Nohira^[91] {Lit. $[\alpha]_D^{20} = -27.0^\circ$ ($c = 1$ in CHCl_3)}, einem Enantiomerenüberschuß von $ee = 89\%$. Die hier vorgestellten Resultate sind das Ergebnis erster orientierender Versuche. Um bessere Ergebnisse zu erzielen und das Potential der Methode auszuschöpfen, sind weitere Versuche zur Optimierung der Reaktionsbedingungen erforderlich. Für die weitere Synthese wurde das Lacton (R)-**12** als Startmaterial eingesetzt.

8.2.2 Öffnung des Lactons (R)-12 zum Amid (R)-56

Die ersten Untersuchungen zur Öffnung von (R)-12 wurden mit 60 proz. und 80 proz. wässriger Dimethylaminlösung bei Temperaturen von 100 bis 120 °C im Druckkolben durchgeführt.^[91] Neben dem entsprechenden Amid wurden nach 48 h im ¹H- und ¹³C NMR-Spektrum noch etwa 10 bis 20 % (R)-12 detektiert. Versuche bei höheren Temperaturen als 120 °C führten zur Zersetzung des Substrats (R)-12. Die angestrebte Bildung eines Hydroxycarbonsäureamids wurde schließlich durch zwölfstündiges Erhitzen des Lactons (R)-12 mit Piperidin bei 70 °C erreicht. Das stabile Piperidid (R)-56 entsteht dabei mit 98 % Ausbeute nahezu quantitativ.

8.2.3 Diskussion der spektroskopischen Daten von (R)-56

Im IR-Spektrum von (R)-56 zeugt eine breite Bande bei $\tilde{\nu} = 3406 \text{ cm}^{-1}$ von Wasserstoffbrückenbindungen, deren Ursache die primäre Alkoholgruppe des Moleküls ist. Neben den symmetrischen und asymmetrischen Streckschwingungen der aliphatischen CH₂-Gruppen mit Absorptionsbanden bei $\tilde{\nu} = 2933$ und 2857 cm^{-1} ist die Carbonylschwingungsbande der Amidgruppe bei $\tilde{\nu} = 1620 \text{ cm}^{-1}$ gut zu identifizieren.

Im ¹H NMR-Spektrum erscheint das Signal der Methylgruppe durch eine ³J-Kopplung mit dem 3-H Methin-Proton als Dublett bei $\delta = 0.95$ ppm. Das Hydroxylproton resoniert in Form eines breiten Singulets bei $\delta = 3.16$ ppm. Die unmittelbare Nähe des elektronegativen Stickstoffs entschirmt die Methylenprotonen der Kohlenstoffatome C-1' und C-5' und verschiebt ihre Resonanzen zu $\delta = 3.37$ und 3.51 ppm. Am stärksten zu tiefem Feld verschoben sind die Resonanzen der diastereotopen 5-H₂ Protonen. Das ihnen zugeordnete Signal erscheint bei $\delta = 3.57$ ppm.

Abb. 41: ¹³C APT NMR-Spektrum von (R)-**56** (50 MHz, CDCl₃)

Im ¹³C NMR-Spektrum (Abbildung 41) resoniert die Methylgruppe bei $\delta = 21.04$ ppm. Eng beieinander und im einzelnen nicht genau zuzuordnen sind die Signale der Atome C-2', C-3' und C-4', die im Bereich von $\delta = 24.43$ bis 26.44 ppm in Erscheinung treten. Die C–N-Bindung besitzt aus Mesomeriegründen einen hohen Doppelbindungsanteil. Als Folge der eingeschränkten Drehbarkeit um diese Bindung befinden sich die Kohlenstoffatome des Piperidinrings C-1' und C-5' relativ zum Carbonylsauerstoff (*E*)- bzw. (*Z*)-angeordnet. Im ¹³C NMR-Spektrum beobachtet man für diese Positionen unterschiedliche chemische Verschiebungen. Das zum Carbonylsauerstoff (*Z*)-angeordnete α -Kohlenstoffatom des tertiären Amid-Stickstoffs resoniert bei höherem, das (*E*)-angeordnete C-Atom resoniert bei tieferem Feld. Deshalb wird das Signal bei $\delta = 42.82$ ppm dem Atom C-1', das Signal bei $\delta =$

46.75 ppm dem Kohlenstoffatom C-5' zugeordnet. Die Resonanzen der C-Atome der Hydroxylgruppe und der Amidgruppe finden sich bei $\delta = 60.13$ bzw. 171.16 ppm.

8.2.4 Reduktion des Piperidids (R)-56 und Synthese von (R)-6

Das Hydroxyamid (R)-56 kann durch Silylierung der Hydroxylgruppe mittels *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid und Triethylamin mit 98 % Ausbeute in Verbindung (R)-57 übergeführt werden.

Die einstufige Reduktion von tertiären Amiden zu den korrespondierenden primären Alkoholen ist ein Spezialfall der selektiven Reduktion von Amiden. Die Addition eines Hydrid-Anions an die Carbonylgruppe eines tertiären Amids **58** führt im ersten Schritt zunächst zum Tetraeder-Intermediat **59**, das dann durch Spaltung der C-N-Bindung zum primären Alkohol **60**, bzw. durch Spaltung der C-O-Bindung zum tertiären Amin **61** zerfallen kann (Abbildung 42).^[89]

Abb. 42: Schema zur Reduktion von tertiären Amiden mit Metallhydriden (M–H)

Typische Metallhydride, wie Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH₄) und Di-*iso*-butylaluminiumhydrid (DIBAL), reagieren bevorzugt unter Bildung der Amine. Wichtige Ausnahmen bilden das von *H. C. Brown* und seinen Mitarbeitern^[92] entwickelte Lithiumtriethylborhydrid

(LiEt₃BH; Superhydride[®]), sowie das von *B. Singaram* und Mitarbeitern^[93] eingeführte Lithiumpyrrolidin-Boran-Reagenz [Li(CH₂)₄NBH₃; LPT]. Neben diesen Verbindungen, entwickelten *A. G. Myers* und seine Mitarbeiter^[94] Lithiumamidotrihydroborat (LiH₂NBH₃; LAB) als Reagenz zur selektiven Reduktion von Pseudoephedrinamiden zu primären Alkoholen.

Das prominenteste der oben aufgeführten Reduktionsmittel ist Lithiumtriethylborhydrid. Es wird in der Regel zur Reduktion von *N,N*-Dimethylamiden eingesetzt und hat sich dort erfolgreich bewährt. Die Ausbeuten dieser Reaktion liegen meistens im Bereich zwischen 90 und 100 %. Untersuchungen an höher substituierten Amiden, wie beispielsweise an Propansäurediethylamid und an Propansäurepyrrolidid zeigen eine deutliche Abnahme der Ausbeuten mit zunehmender Komplexität der Amide.^[92] Im Fall der Reduktion des Propansäurepyrrolidids wurde der entsprechende Alkohol, das 1-Propanol, mit nur 50 % Ausbeute erhalten.

Über die einstufige Reduktion eines Piperidids zu einem Alkohol wurden in der Literatur keine Informationen gefunden. Es war deshalb umso erfreulicher, daß die Umwandlung von (*R*)-57 zum Alkohol (*S*)-52 mit LiEt₃BH als Reduktionsmittel problemlos verlief. Die rasch und unter milden Bedingungen verlaufende Reaktion und ergab das Produkt (*S*)-52 in 92 % Ausbeute.

Die abschließende Transformation des Silyloxyalkohols (*S*)-52 in den chiralen C₆-Baustein (*R*)-6 wurde analog zur Synthese von *rac*-6 (Kapitel 8.1), durch Aktivieren der Hydroxylgruppe als Mesylat und deren Substitution durch Iodid in siedendem Tetrahydrofuran erfolgreich durchgeführt.

8.2.5 Diskussion der spektroskopischen Daten von (R)-6

Im IR-Spektrum prägen mehrere Absorptionsbanden der C-H-Streckschwingungen den Bereich von $\tilde{\nu} = 2955$ bis 2857 cm^{-1} . Hinweise auf den Silylether geben die Absorptionsbanden bei $\tilde{\nu} = 1098$ und 836 cm^{-1} .

Das ^1H NMR-Spektrum enthüllt durch charakteristische Resonanzsignale bei $\delta = 0.03$ und 0.87 ppm die Anwesenheit einer *tert.*-Butyldimethylsilyl-Gruppe. Sie überlagern das Dublett bei $\delta = 0.87\text{ ppm}$, das durch die Methylgruppe am Stereozentrum hervorgerufen wird. Die diastereotopen 2-H₂-, 3-H- und 4-H₂-Protonen führen zu komplexen Resonanzen im Bereich von $\delta = 1.34$ bis 1.97 ppm und lassen sich nur im Einzelnen schwer zuordnen. Der negative induktive Effekt von Sauerstoff- und Iodatome lassen die Signale der Protonen 1-H₂ und 5-H₂ bei $\delta = 3.15$ und 3.23 , bzw. bei 3.60 und 3.65 ppm in Erscheinung treten.

Abb. 43: ^{13}C APT NMR-Spektrum von (R)-6 (50 MHz, C₆D₆)

Im ^{13}C NMR-Spektrum (Abbildung 43) erkennt man die Resonanzen der Kohlenstoffatome, die direkt mit dem Silicium- bzw. mit dem Iodatome verbunden sind, an ihrer charakteristischen Hochfeldverschiebung. Sie resonieren bei $\delta = -5.29$ sowie -5.26

[(SiCH₃)₂] und 4.91 (C-1) ppm. Das Signal des quartären Kohlenstoffatoms der *tert*.-Butylgruppe bei $\delta = 18.42$ ppm lässt sich im ¹³C APT NMR-Spektrum durch seine entgegengesetzte Orientierung gut vom Signal der Methylgruppe am stereogenen Zentrum bei $\delta = 18.54$ ppm unterscheiden. Das stärkste Signal erzeugen die drei Methylgruppen der *tert*.-Butylgruppe bei $\delta = 26.13$ ppm. Das stereogene Atom C-3 resoniert bei $\delta = 30.35$ ppm und die Signale der Atome C-2 und C-4 erscheinen bei $\delta = 39.18$ und 41.07 ppm. Bedingt durch den elektronegativen Sauerstoff resoniert das Kohlenstoffatom C-5 bei $\delta = 60.88$ ppm.

8.3 Bestimmung der optischen Reinheit des C₆-Bausteins (*R*)-**6**

Neben den spezifischen Drehwerten, deren Bestimmung mit einem relativ großen Fehler behaftet ist und über die in der Literatur oft uneinheitliche Angaben gemacht werden, wurden noch andere, voneinander unabhängige Methoden zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses angewendet. Eine praktikable Vorgehensweise ist die gaschromatographische Separation der Enantiomeren an chiraler Phase. Versuche, die Verbindungen *rac*-**52** und *rac*-**6** an der chiralen stationären Phase Heptakis-(2,6-O-methyl-3-O-pentyl)- β -cyclodextrin in ihre Spiegelbildisomeren aufzutrennen, waren erfolglos.

Eine andere, ebenfalls häufig angewandte Methode zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses, ist die Umsetzung der Probensubstanz mit einem chiralen Derivatisierungsreagenz. Zur Derivatisierung von primären und sekundären Alkoholen ist die (nach seinem Erfinder) als *Mosher-Reagenz* bekannte α -Methoxy- α -(trifluormethyl)phenyllessigsäure (**62**) das Mittel der Wahl.^[95] Sie ist sowohl als (*S*)- als auch als (*R*)-Enantiomer kommerziell erhältlich.

Die diastereomere Zusammensetzung der Probensubstanz wird nach ihrer Derivatisierung in der Regel durch eine Analyse der ¹⁹F NMR-Spektren bestimmt. Dies hat den Vorteil, daß die charakteristischen Signale der Fluoratome zur Diastereomerenbestimmung nicht durch

Abb. 44: ¹H NMR-Spektrum der diastereomeren Mosher-Ester (*S,S*)-**63** und (*R,S*)-**63** (500 MHz, C₆D₆); Diastereomerenverhältnis = 1 : 1

Resonanzen anderer Atome überlagert sind. Die Untersuchung der NMR-Spektren des durch Umsetzung von Verbindung *rac*-**52** mit (*S*)-**62** erhaltenen Diastereomerengemisches der Mosher-Ester (*S,S*)-**63** und (*R,S*)-**63** ergaben allerdings weder im ¹⁹F- noch im ¹³C NMR-Spektrum Signale, die sich zur Bestimmung des Diastereomerenverhältnisses eigneten.

Dagegen zeigt die Aufnahme eines ¹H NMR-Spektrums der beiden Diastereomere (*S,S*)-**63** und (*R,S*)-**63** in Deuterobenzol (Abbildung 44) eine ausreichend große Differenz in der chemischen Verschiebung der direkt am Stereozentrum befindlichen Methylgruppe ($\delta = 0.705$ und 0.710 ppm). Sie kann deshalb zur Bestimmung des Diastereomeren- und damit des Enantiomerenverhältnisses herangezogen werden.

Abb. 45: ¹H NMR-Spektrum des Mosher-Esters (*S,S*)-**63** (500 MHz, C₆D₆)

Das ¹H NMR-Spektrum des Produkts der Umsetzung von (S)-**52** mit (S)-**62** ist in Abbildung 45 dargestellt. Wie dem Spektrum zu entnehmen ist, läßt sich nur das (S,S)-**63** Diastereomer nachweisen, da sich nur die Resonanz des Dubletts der Methylgruppe von (S,S)-**63** bei $\delta = 0.745$ ppm findet. Der Enantiomerenüberschuß des Alkohols (S)-**52** ist damit größer als 95 %.^[107]

8.4 Zusammenfassung

Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen, nahezu enantiomerenreinen chiralen (R)-3-Methylglutarsäureethylester (R)-**11** (ee > 95 %) ist es möglich, durch chemoselektive Reduktion der Carbonsäure- bzw. der Esterfunktionalität die beiden enantiomeren Lactone (S)-**12** und (R)-**12** zu synthetisieren. (R)-**12** erhielt man dabei mit einer Ausbeute von 92 % und einem Enantiomerenüberschuß von 98 %. Die Öffnung des Lactons (R)-**12** mit Piperidin zum entsprechenden Hydroxyamid (R)-**56** ergibt nach dem Silylieren der Hydroxylgruppe (R)-**57**. Die einstufige Reduktion des tertiären Amids (R)-**57** zum primären Alkohol (S)-**52**, dessen Mesylierung und Umsetzung mit Kaliumiodid ergibt das benötigte Iodid (R)-**6**.

Im Ergebnis gelingt die Synthese des enantiomerenreinen C₆-Bausteins (R)-**6** in Grammengen aus (R)-**11** mit einer Gesamtausbeute von 76 % über fünf Stufen. Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses auf der Stufe des Silyloxyalkohols (S)-**52** nach der Mosher-Methode zeigt, daß die Integrität des Stereozentrums im Verlauf der Synthesesequenz unangetastet bleibt.

9 Synthese des diastereomerenreinen C₁₉-Bausteins 7

Im vorhergehenden Kapitel wurde die Synthese der gesättigten C₆-Bausteine *rac*-**6** und (*R*)-**6** ausführlich beschrieben. Zum Aufbau der kompletten Seitenkette von Methanophenazin (**1**) sah der Syntheseplan vor, *rac*-**6** bzw. (*R*)-**6** mit dem diastereomerenreinen Vinyljodid **7** zu verknüpfen (Abbildung 15). Es war geplant, diesen C₁₉-Baustein durch eine Zirkonium-katalysierte Carbometallierung eines entsprechenden terminalen Alkins **9** herzustellen.^[96] Als Startmaterial für die Synthese von **9** war das im Handel erhältliche, diastereomerenreine (*E,E*)-Farnesylaceton (**10**) vorgesehen.^[97]

9.1 Synthese des terminalen Alkins 9

Systematische Untersuchungen zur Chemie von Organozirkonium-Verbindungen durch *Negishi* und seine Mitarbeiter, führten zur Methode der Zirkonium-katalysierten Carboaluminierung terminaler Alkine.^[96] Damit ist es möglich, eine endständige Dreifachbindung wie in **64** regio- und stereoselektiv in die entsprechende (*E*)-2-Methyl-1-alkenylaluminium-Verbindung **65** überzuführen. Ausgehend von **65** eröffnen sich eine Reihe von Reaktionsmöglichkeiten, wie etwa die Alkylierung, die Acylierung, die Transmetallierung oder auch die konjugierte Addition, die unter Substitution des Aluminiumatoms und Retention der Konfiguration der Doppelbindung verlaufen.^[98]

Die Methode eignet sich besonders gut zum Aufbau trisubstituierter-(*E*)-Olefine des Typs **66**, einem bei Terpenen häufig auftretenden Strukturelement. Ihr Erfolg hängt entscheidend von einem effizienten Zugang zu dem entsprechenden terminalen Alkin ab. Erneut waren es *Negishi* und seine Mitarbeiter,^[96,99,100] die 1980 über eine breit anwendbare Methode zur Umwandlung von Methylketonen in endständige Dreifachbindungen berichteten.

Der erste Schritt dieser Transformation besteht in der Generierung des kinetischen Enolats durch Deprotonierung des Methylketons **67** bei -78 °C mit einer sperrigen Base wie Lithiumdi-*iso*-propylamid (LDA) oder Lithium-2,2,6,6-tetramethylpiperidid (LiTMP) und dessen Abfangen mit Diethylchlorophosphat [ClPO(OEt)₂] als Phosphoenolether **68**. Erneutes

Deprotonieren mit 2 Äquivalenten LDA bzw. LiTMP in der Kälte führt zur β -Eliminierung von Diethylphosphat und ergibt das entsprechende Acetylid, welches bei der Aufarbeitung mit wässriger Säure zum terminalen Alkin **69** protoniert wird.

Die Reaktion wird in der Regel im Stile einer „Eintopf-Reaktion“ ohne Isolierung des Phosphonoethers durchgeführt und ergibt die Alkine, je nach Substrat, mit Ausbeuten zwischen 61 und 85 %.^[100]

Durch die erfolgreiche Anwendung dieser Synthesemethode konnte (*E,E*)-Farnesylacetone (**10**) mit 75 % Ausbeute in das terminale Alkin **9** umgewandelt werden.

9.2 Diskussion der spektroskopischen Daten von 9

Das UV-Spektrum von **9** zeigt im Wellenlängenbereich $\lambda = 190$ bis 400 nm keine Absorptionbanden, da die Doppelbindungen dieses Kohlenwasserstoffs untereinander nicht in Konjugation stehen.

Charakteristische Absorptionsbanden der terminalen Dreifachbindung treten im IR-Spektrum bei $\tilde{\nu} = 3311$ cm⁻¹ für die $\equiv\text{C-H}$ - und bei $\tilde{\nu} = 2119$ cm⁻¹ für die $\text{C}\equiv\text{C}$ -Streckschwingungen auf. Im Bereich von $\tilde{\nu} = 2966$ bis 2854 cm⁻¹ überlagern sich olefinische und aliphatische C-H-Schwingungsbanden. Die Absorption bei $\tilde{\nu} = 1667$ cm⁻¹ wird einer olefinischen C=C-Streckschwingung zugeordnet.

Abb. 46: ¹H NMR-Spektrum von Verbindung **9** (300 MHz, C₆D₆)

Aufgrund sich wiederholender isoprenoider Strukturelemente im Molekül beobachtet man im ¹H NMR-Spektrum (Abbildung 46) zahlreiche sich überlagernde Signale. Dennoch gut zu identifizieren sind die vier olefinischen Methylgruppen bei $\delta = 1.48, 1.55, 1.57$ und 1.66 ppm. Das Signal des acetylenischen Protons 1-H erscheint durch eine ⁴J-Kopplung mit den 3-H₂-Protonen als Triplet bei $\delta = 1.77$ ppm. Alle Methylenprotonen treten als breites, schwach aufgelöstes Signal zwischen $\delta = 1.96$ und 2.22 ppm in Erscheinung. Die vinyllischen Protonen 5-H, 9-H, 13-H zeigen ein Multiplett zwischen $\delta = 5.16$ und 5.28 ppm.

Abb. 47: ¹³C APT NMR-Spektrum von Verbindung 9 (50 MHz, C₆D₆)

Im ¹³C NMR-Spektrum erscheinen die charakteristischen Signale der Kohlenstoffatome der Methylgruppen der Isopropylidengruppe von Verbindung 9 bei $\delta = 17.72$ (14-CH₃) und 25.48 (C-15) ppm (Abbildung 47). Neben den Resonanzen der Atome C-6 und C-10 bei $\delta = 135.01$ und 136.49 ppm tritt das Signal von C-14 bei $\delta = 131.09$ ppm in Erscheinung. Mit $\delta = 68.81$ und 84.27 ppm liegen die Resonanzsignale der Kohlenstoffatome C-1 bzw. C-2 in einem für endständige Alkine typischen Bereich des ¹³C NMR-Spektrums. Die vinyllischen Atome C-5, C-9 und C-13 resonieren bei $\delta = 123.09, 124.63$ und 124.91 ppm.

9.3 Synthese des Vinylidids 7

Wie bereits in Abschnitt 9.1 dargestellt, ergibt die Reaktion eines terminalen Alkins **64** mit Trimethylaluminium (**70**) in Gegenwart von Zirkonocendichlorid (**71**) das entsprechende *syn*-Additionsprodukt **65** mit einer Selektivität größer 95 %. Die AlMe₂-Gruppe wird bei diesem Prozeß mit einer Regioselektivität von 95 % auf das endständige Kohlenstoffatom von **64** übertragen, während die Methylgruppe an C-2 addiert. Die Ausbeuten für die anschließende Umsetzung der Alkenyl-Aluminium-Spezies **65** mit I₂ zum Vinylidid liegen im Bereich von 70 bis 85 %.^[101] Der genaue Mechanismus und die Gründe für den im hohen Maße regio- und stereoselektiv ablaufenden Vorgang sind in großen Teilen noch unverstanden. Man vermutet als Folge eines raschen Methyl-Chlor-Austauschs zwischen Zirkonocendichlorid (**71**) und Trimethylaluminium (**70**) die Bildung des Zirkon-Aluminium Komplexes **72**, der mit der endständigen Dreifachbindung von **64** koordiniert (Abbildung 48). Den zentralen Schritt bildet die Addition der koordinativ ungesättigten Zirkon-Aluminium-Spezies **73** an die terminale Dreifachbindung von **64**.^[102] Nach einem erneuten Methyl-Chlor-Austausch dissoziiert Zirkonocendichlorid **71** unter Freisetzung der 2-Methyl-1-alkenylaluminium Verbindung **65** aus dem Komplex **74** ab.

Abb. 48: Schema zum Mechanismus der Zirkonium-katalysierten Carboaluminierung terminaler Alkine

Aus der Reaktion geht Zirkonocendichlorid (**71**) unverändert hervor und kann weitere Carboaluminierungs-Cyclen durchlaufen. Um gute Ausbeuten zu erzielen, verlangen die als „katalytisch“ bezeichneten Varianten dieser Synthesemethode in der Regel 20 bis 30 Molprozent Zirkonocendichlorid (**71**) sowie überstöchiometrische Mengen an Trimethylaluminium. Die Methode ist mit einigen funktionellen Gruppen, wie etwa der Hydroxylgruppe und den Halogenatomen Chlor, Brom und Iod sowie mit Silylschutzgruppen kompatibel und wurde in zahlreichen Naturstoffsynthesen eingesetzt.^[98]

Zur Herstellung des Vinyliodids **7** wurden einer Vorschrift von Ley^[103] folgend 0.25 Äquivalente Zirkonocendichlorid (**71**) und drei Äquivalente Trimethylaluminium (**70**) zur Carboaluminierung des diastereomerenreinen Alkins **9** eingesetzt. Die intermediär entstehende Alkenyl-Metall-Spezies wird durch Zugabe von elementarem Iod in Tetrahydrofuran zur Reaktionsmischung in **7** übergeführt. Die Ausbeuten der Reaktion liegen zwischen 68 und 74 %. Der Einsatz von 0.5 Äquivalenten Zirkonocendichlorid (**71**) brachte in diesem Punkte keine Verbesserung.

Die Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel gestaltete sich aufwendig, da zur Abtrennung der unpolaren Nebenprodukte viel Adsorbens (Rohprodukt / Adsorbens = 1 : 500) und meist zweimaliges Chromatographieren erforderlich war. Das auf diesem Wege erhaltene Produkt **7** war diastereomerenrein, wie die Analyse des ¹³C NMR-Spektrums und zusätzliche GC/MS-Untersuchungen bewiesen.

9.4 Diskussion der spektroskopischen Daten von **7**

Ebenso wie bei Alkin **9** treten auch bei Verbindung **7** im UV-Spektrum zwischen $\lambda = 190$ und 400 nm keine Absorptionsbanden auf, da die im Molekül vorhandenen Doppelbindungen untereinander nicht in Konjugation stehen.

Das IR-Spektrum zeigt die Absorptionsbanden der olefinischen C-H-Streckschwingungen bei $\tilde{\nu} = 3054 \text{ cm}^{-1}$ und die Absorptionen der aliphatischen C-H-Schwingungen im Bereich von 2966 bis 2854 cm^{-1} . Einige für die Streckschwingungen der C=C-Doppelbindungen charakteristischen Absorptionen treten bei $\tilde{\nu} = 1714, 1666, 1618 \text{ cm}^{-1}$ in Erscheinung.

Abb. 49: ¹H NMR-Spektrum von Verbindung **7** (200 MHz, C₆D₆)

Vergleicht man die ¹H NMR-Spektren der Verbindungen **7** und **9**, so läßt sich die erfolgreiche Umwandlung des terminalen Alkins in die entsprechende trisubstituierte Doppelbindung am Signal der neuen Methylgruppe bei $\delta = 1.66 \text{ ppm}$ erkennen (Abbildung 49). Das

entsprechende olefinische Proton 2-H resoniert, bedingt durch die Nachbarschaft des Iodatoms, bei $\delta = 5.71$ ppm.

Abb. 50: ¹³C APT NMR-Spektrum von Verbindung 7 (50 MHz, C₆D₆)

Im ¹³C NMR-Spektrum zeigt sich der Einfluß des Iodatoms am deutlichsten (Abbildung 50). Das mit dem Halogenatom direkt verbundene Atom C-1 erfährt die bei Iodaten charakteristische Hochfeldverschiebung und resoniert bei $\delta = 75.39$ ppm. Der Einfluß auf das Atom C-2 führt erwartungsgemäß zu einer Tieffeldverschiebung (β -Effekt) und läßt das entsprechende Signal bei $\delta = 147.61$ ppm in Erscheinung treten. Von diesem β -Effekt erfährt auch die Methylgruppe 2-CH₃, was dazu führt, daß ihr Signal bei $\delta = 23.92$ ppm zu sehen ist. Das quartäre Kohlenstoffatom der Isopropylidengruppe präsentiert sein Signal bei $\delta = 131.13$ ppm, während die endständigen olefinisch gebundenen Methylgruppen ebenfalls charakteristisch bei $\delta = 17.80$ (14-CH₃) und 25.90 (C-15) ppm resonieren.

Im Massenspektrum erscheint der Molpeak bei $m/z = 386$ mit geringer Intensität. Das durch den Verlust des Iodatoms entstehende Fragmention $[M^+ - I]$ tritt bei $m/z = 259$ in Erscheinung. Den Basispeak des Massenspektrums bildet das Fragmention $[C_5H_9^+]$ mit $m/z = 69$, was die zahlreichen Möglichkeiten zur Allylsplattung der isoprenoiden Verbindung 7 zum Ausdruck bringt.

9.5 Zusammenfassung

Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen, diastereomerenreinen (*E,E*)-Farnesylaceton **10**^[97] gelang die Synthese des diastereomerenreinen Vinyljodids **7** in wenigen Syntheseschritten. Nach einer Methode von *Negishi* und Mitarbeitern^[99,100] wurde (*E,E*)-Farnesylaceton (**10**) zunächst mit einer Ausbeute von 75 % in das entsprechende terminale Alkin **9** übergeführt, das die Ausgangsbasis für die sich anschließende Carboaluminierung^[96,101] bildete. Diese ergab das angestrebte diastereomerenreine Vinyljodid **7** mit einer Ausbeute von 74 %.

Die zu Beginn durchgeführten Versuche verliefen mit lediglich 40-45 % Ausbeute an (S)-76. Als Nebenprodukt der Reaktion konnte das Homokupplungsprodukt **77** isoliert und anhand seines ^1H NMR- und Massenspektrums identifiziert werden.

Eine Ausbeuteverbesserung wurde durch Erhöhung der Menge an $\text{Pd(PPh}_3)_4$ von drei auf neun Molprozent erzielt. Günstig wirkte sich auch aus, wenn die Vereinigung des Zink-Organyls (R)-75 mit der ungesättigten Verbindung **7** nicht tropfenweise, sondern schnell und ohne Unterbrechung durchgeführt wurde. Vermutlich wird durch den so erzeugten Überschuß an Metallorganyl (R)-75 die Homokupplungsreaktion von zwei Molekülen **7** etwas zurückgedrängt. Die Ausbeute der Reaktion konnte im Verlauf mehrerer Versuche auf 65 % gesteigert werden. Neben $\text{Pd(PPh}_3)_4$ kamen auch die Katalysatoren $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ und $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_4$ zum Einsatz. Mit Ausbeuten zwischen 30 und 40 % ließ sich aber so keine Verbesserung erreichen.

Die übergangsmetallkatalysierte C-C-Kupplung verläuft wie erwartet unter vollständiger Retention der Konfiguration des Vinyljodids **7**. Das wird durch die Analyse des ^{13}C NMR-Spektrums und durch GC-MS Untersuchungen des Kupplungsprodukts bestätigt.

Die mechanistischen Vorstellungen^[106] über den Ablauf Palladium-katalysierter Kreuzkupplungen gehen davon aus, daß sich im ersten Schritt Pd(0) durch oxidative Addition in die C(sp²)-I Bindung des Vinylhalogenids einschleibt, wobei Pd(0) zu Pd(+II) oxidiert wird. Im nächsten Schritt kommt es dann zu einer Ummetallierung der Alkyl-Zink-Verbindung, wobei ein Alkylrest auf das Palladium übertragen wird und so eine Alkyl-Palladium-Verbindung entsteht. Die abschließende reduktive Eliminierung verläuft schneller als die mit ihr konkurrierende β -Hydrid-Eliminierung. Dabei entsteht unter Retention der Konfiguration des sp²-C-Atoms das sp²-sp³-Kupplungsprodukt und die niedervalente katalytisch aktive Pd(0)-Spezies wird regeneriert.

10.2 Desilylieren der Seitenkette (*S*)-**76**

Die flouridinduzierte Abspaltung der Schutzgruppe gelingt mühelos und nahezu quantitativ, durch kurzzeitiges Erwärmen des Kupplungsproduktes (*S*)-**76** mit Tetrabutylammonium-fluorid in Tetrahydrofuran.

Im Verlauf der Synthese von (*S*)-**78** hat sich herausgestellt, daß die Reinigung des geschützten Kupplungsprodukts (*S*)-**76** nicht in jedem Fall notwendig ist. Am einfachsten ist es, das rohe Kupplungsprodukt (*S*)-**76** ohne weitere Aufreinigung in den entsprechenden Alkohol (*S*)-**78** überzuführen. Die Isolierung des chiralen Alkohols (*S*)-**78** gelingt dann durch einfache Chromatographie an Kieselgel. Die Verwendung des rohen (*S*)-**76** mindert nicht die Ausbeute an (*S*)-**78**.

10.3 Bestimmung der Enantiomerenreinheit von (S)-78

Wie bereits in Kapitel 8.3 berichtet, ist zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von primären Alkoholen die in beiden Enantiomeren verfügbare α -Methoxy- α -(trifluormethyl)phenyllessigsäure (**62**) das Reagenz der Wahl.

Nach der Veresterung von *rac*-78 mit *S*(-)- α -Methoxy- α -(trifluormethyl)phenyllessigsäure [(S)-62] und Analyse der ¹⁹F-, ¹H- und ¹³C NMR-Spektren der diastereomeren Produkte (R,S)-79 und (S,S)-79 wies nur das ¹³C NMR-Spektrum Signale auf, die zur Bestimmung der optischen Reinheit des Alkohols (S)-78 geeignet waren. (Abbildung 51). Es sind die Signale der Kohlenstoffatome C-1', C-2', C-4' und 3'-CH₃ der beiden Diastereomere (R,S)-79 und (S,S)-79, die unterschiedliche chemische Verschiebungen zeigen und so zur Enantiomerenanalytik herangezogen wurden.

Abb. 51: ^{13}C NMR-Spektrum der Mosher-Ester (*R,S*)-**79** und (*S,S*)-**79** mit Dehnungen der Signale, die zur Bestimmung des Diastereomerenverhältnis herangezogen wurden (125 MHz, C_6D_6 , Diastereomerenverhältnis = 1 : 1)

Die Reaktion der chiralen Seitenkette (*S*)-**78** mit der enantiomerenreinen Carbonsäure (*S*)-**62** ergibt den Ester (*S,S*)-**79** mit 83 % Ausbeute. Die Analyse des ^{13}C NMR-Spektrums läßt nur den Signalsatz des (*S,S*)-**79** Diastereomers erkennen (Abbildungen 52 und 53). Der Alkohol (*S*)-**78** liegt demnach mit einem Enantiomerenüberschuß von wenigstens > 95 % vor.^[107] Die Behandlung des nahezu enantiomerenreinen (ee > 95 %) Alkyljodids (*R*)-**6** mit ZnCl_2 und *tert.* Butyllithium, sowie die anschließende Palladium-katalysierte Kupplung mit **7** führt also nicht zur Racemisierung am stereogenen Zentrum des C_6 -Bausteins (*R*)-**6**.

Abb. 52: ^{13}C NMR-Spektrum des Mosher-Esters (*S,S*)-**79** (125 MHz, C_6D_6)

Abb. 53: Dehnungen der Signale, die zur Bestimmung des Diastereomerenverhältnis herangezogen wurden

10.4 Diskussion der spektroskopischen Daten von (*S*)-**78**

Die Verbindung (*S*)-**78** ist ihrer Natur nach ein farbloses Öl, das im UV-Spektrum zwischen $\lambda = 190$ und 400 nm erwartungsgemäß keine Absorptionsbanden zeigt. Der spezifische Drehwert beträgt $[\alpha]_D^{20} = -2.6^\circ$. Im IR-Spektrum ist die breite Bande bei $\tilde{\nu} = 3331 \text{ cm}^{-1}$ ein Beleg für die freie Hydroxylgruppe im Molekül. Die C-O-Streckschwingung absorbiert bei $\tilde{\nu} = 1057 \text{ cm}^{-1}$. Die aliphatischen C-H-Streckschwingungen der zahlreichen Methylen- und Methylgruppen absorbieren bei $\tilde{\nu} = 2960, 2924$ und 2854 cm^{-1} . Die Bande bei $\tilde{\nu} = 1666 \text{ cm}^{-1}$ wird der C=C-Streckschwingung einer trisubstituierten Doppelbindung zugeordnet.

Abb. 54: ^1H NMR-Spektrum von Verbindung (*S*)-**78** (500 MHz, C_6D_6)

Das ^1H NMR-Spektrum (Abbildung 54) präsentiert die Methylgruppe am stereogenen Zentrum bei $\delta = 0.83$ ppm als ein durch die 3J -Kopplung zum benachbarten Methinproton zum Dublett aufgespaltenes Signal. Vier starke Singulets der Methylgruppen 7- CH_3 , 11- CH_3 , 15- CH_3 und 19- CH_3 dominieren das Spektrum im Bereich von $\delta = 1.56$ bis 1.61 ppm. Sie werden eingerahmt durch die Signale der 20- H_3 Protonen bei $\delta = 1.67$ ppm, die als Dublett erscheinen, sowie dem mit Deuterium austauschbaren Hydroxylproton bei $\delta = 1.54$ ppm. Die Methylenprotonen 2- H_2 , 3- H und 4- H_2 resonieren im Bereich von $\delta = 1.10$ bis 1.53 ppm, während die allylischen Methylengruppen in einem schwach aufgelösten Resonanzsignal den Bereich von $\delta = 1.94$ bis 2.25 ppm des Spektrums belegen. Durch die unmittelbare Nähe des Sauerstoffatoms zu tiefem Feld verschoben, resonieren die diastereotopen 1- H_2 Protonen bei $\delta = 3.39$ und 3.41 ppm. Bei tiefstem Feld treten erwartungsgemäß die vier olefinischen Protonen 6- H , 10- H , 14- H und 18- H als Multipllett von $\delta = 5.21$ bis 5.35 ppm in Erscheinung.

Abb. 55: ^{13}C APT NMR-Spektrum von Verbindung (*S*)-**78** (50 MHz, C_6D_6)

Von der gelungenen Kreuzkupplung der beiden Fragmente (*R*)-**6** mit **7** sowie der anschließenden Desilylierung zeugen im ^{13}C NMR-Spektrum (Abbildung 55) u. a. die Resonanzen der tertiären C-Atome des olefinischen Teils von (*S*)-**78** bei $\delta = 124.80$ (C-10, C-14), 124.93 (C-6) und 125.27 (C-18) ppm sowie das stereogene Kohlenstoffatom C-3 des aliphatischen Teils von (*S*)-**78** bei $\delta = 29.49$ ppm. Die dazugehörigen quartären Kohlenstoffatome C-7, C-11 und C-15 präsentieren ihre Signale im Bereich von bei $\delta = 134.78$ bis 134.99 ppm. Eine Ausnahme bildet das quartäre Atom C-19. Es resoniert bei $\delta = 131.10$ ppm. Zusammen mit den daran gebundenen Methylgruppen $19'\text{-CH}_3$ und 20-H_3 bei $\delta = 17.75$ und 25.86 ppm markieren sie eine Isopropylidengruppe und unterscheiden sich damit charakteristisch von den entsprechenden Kohlenstoffatomen inmitten der Kette. Neben den bereits erwähnten Signalen der beiden terminalen Methylgruppen finden sich Resonanzen der Atome 7-CH_3 , 11-CH_3 und 15-CH_3 im Bereich von $\delta = 16.09$ bis 16.15 ppm. Das Signal der Methylgruppe am Stereozentrum tritt bei $\delta = 19.71$ ppm in Erscheinung. Bedingt durch die Bindung zum Sauerstoffatom wird das Atom C-1 entschirmt und sein Resonanzsignal erfährt eine Tieffeldverschiebung zu $\delta = 60.83$ ppm.

10.5 Darstellung von (S)-Methanophenazin [(S)-**1**]

Nachdem nun **2** und (S)-**78** vorlagen, war zum erfolgreichen Abschluß der Synthese von (S)-Methanophenazin [(S)-**1**] nur noch die Verknüpfung dieser beiden Bausteine durch eine Veretherung erforderlich. Wie in Kapitel 7.1 dargelegt, ergaben Modellversuche mit 2-Hydroxyphenazin (**2**) und Citronellol (*rac*-**47**) gute Ausbeuten an Ether, wenn *rac*-**47** in Form seines Mesylats mit **2** in Gegenwart von Kaliumhydroxid in Tetrahydrofuran unter Phasentransferkatalyse zur Reaktion gebracht wurden. Unter den gleichen Bedingungen entsteht Methanophenazin [(S)-**1**] aus dem Mesylat von (S)-**78** und 2-Hydroxyphenazin (**2**) in 80 % Ausbeute. Die Bildung eines nicht identifizierten Nebenproduktes kann durch Steigerung der Reaktionstemperatur, Verkürzung der Reaktionszeit und Verwendung von Toluol als Lösungsmittel vermindert werden. Der Einsatz eines Überschusses an 2-Hydroxyphenazin (**2**) (1.2 Äquivalente) ist notwendig, um den vollständigen Umsatz des Mesylats von (S)-**78** zu gewährleisten. Dies ist notwendig, da sich nicht umgesetztes Mesylat (S)-**3** und das Reaktionsprodukt (S)-**1** bei der chromatographischen Reinigung nur schwer voneinander trennen lassen. Unter den optimierten Reaktionsbedingungen liegt die Ausbeute an (S)-**1** bei 90 %.

Damit war die Synthese von (S)-Methanophenazin [(S)-**1**] abgeschlossen. Sie verlief ausgehend von (*E,E*)-Farnesylaceton (**10**) in 6 Schritten und lieferte die Verbindung (S)-**1** in enantiomerenreiner Form mit einer Gesamtausbeute von 32 %.

10.6 Darstellung von racemischen Methanophenazin *rac*-**1**

Die Synthese des racemischen Naturstoffs *rac*-**1** geht von dem in Kapitel 8.1 beschriebenen Alkyljodid *rac*-**6** aus. Seine Verknüpfung mit dem ungesättigten C₁₉-Baustein **7** verläuft nach derselben Methode, nach der auch (*S*)-**1** synthetisiert wird, also durch eine Palladium-katalysierte Kreuzkupplung der beiden Bausteine *rac*-**6** und **7** zu *rac*-**76**. Nach Entschützen und Aktivieren von *rac*-**76** wird die abschließende Veretherung mit 2-Hydroxyphenazin (**2**) zu *rac*-**1** in der oben beschriebenen Art und Weise durchgeführt.

10.7 Diskussion der spektroskopischen Daten von (*S*)-Methanophenazin [(*S*)-**1**]

(*S*)-Methanophenazin [(*S*)-**1**] ist ein gelbes Öl, das im UV-Spektrum Absorptionsmaxima bei $\lambda = 256, 354, \text{ und } 388 \text{ nm}$ aufweist. Das Stereozentrum an C-3' ist verantwortlich für die Drehung linear polarisierten Lichtes. Der höchste Drehwert $[\alpha]_{546}^{20} = -4.6^\circ$ wurde am Polarimeter bei Untersuchungen mit einer Wellenlänge von $\lambda = 546 \text{ nm}$ gemessen. Im IR - Spektrum finden sich die Signale der aromatischen bzw. olefinischen C-H-Valenz-

schwingungen bei $\tilde{\nu} = 3059 \text{ cm}^{-1}$. Die entsprechenden Schwingungsbanden der Methylen- und Methylgruppen präsentieren sich im Bereich von $\tilde{\nu} = 2954$ bis 2853 cm^{-1} . Absorptionsbanden bei $\tilde{\nu} = 1632$ und 1605 cm^{-1} deuten auf olefinische-, solche bei $\tilde{\nu} = 1560$ und 1518 cm^{-1} auf aromatische C=C-Valenzschwingungen hin. Mittelstarke Absorptionsbanden von CH₂- und CH₃-Deformationsschwingungen treten im Bereich von $\tilde{\nu} = 1483$ bis 1360 cm^{-1} in Erscheinung. Eine Absorption bei $\tilde{\nu} = 1196 \text{ cm}^{-1}$ wird einer C-O-Valenzschwingung der Ethergruppe zugeordnet.

Abb. 56: ¹H NMR-Spektrum von natürlichem Methanophenazin (**1**) (500 MHz, C₆D₆)

Im ¹H NMR-Spektrum zählt man die Resonanzsignale von sieben aromatischen, vier olefinischen und 39 aliphatischen Protonen (Abbildungen 56 und 57). Der aliphatische Bereich wird dominiert von den Resonanzen der fünf an Doppelbindungen gebundenen olefinischen Methylgruppen bei $\delta = 1.56 \text{ ppm}$ (19'-CH₃), $\delta = 1.61$ bis 1.64 ppm (7'-CH₃, 11'-CH₃, 15'-CH₃), sowie bei $\delta = 1.68 \text{ ppm}$ (20'-H₃). Sie überlagern das Signal des 3'-H bei $\delta = 1.60$ bis 1.65 ppm . Das Signal der Methylgruppe 3'-CH₃ am stereogenen Zentrum erscheint bei $\delta = 0.83 \text{ ppm}$ und wird durch die ³J-Kopplung mit dem benachbarten 3'-H Proton charakteristisch zum Dublett aufgespalten. Die diastereotopen Protonen 2'-H₂ und 4'-H₂ treten als Multiplett zwischen $\delta = 1.14$ und 1.44 ppm in Erscheinung. Alle allylischen

Methylenprotonen resonieren als wenig aufgelöstes Multipllett bei $\delta = 1.97$ bis 2.27 ppm. Der negative induktive Effekt des Sauerstoffatoms entschirmt die $1'-H_2$ Protonen und das Spektrum zeigt ihre Signale bei $\delta = 3.80$ ppm.

Abb. 57: 1H NMR-Spektrum von synthetischem Methanophenazin [(S)-**1**] (500 MHz, C_6D_6)

Die vier olefinischen Protonen $6'-H$, $10'-H$, $14'-H$ und $18'-H$ erscheinen als Multipllett bei $\delta = 5.21$ bis 5.48 ppm. Die Gegenwart der beiden Stickstoffatome hat den größten Einfluß auf die aromatischen Protonen $4-H$, $6-H$ und $9-H$. Ihre Signale sind daher zu tiefem Feld verschoben und finden sich bei $\delta = 8.12$ ($4-H$) und 8.30 ($6-H$ und $9-H$) ppm. Das Sauerstoffatom hat den stärksten Einfluß auf das $1-H$ Proton. Es erfährt eine Hochfeldverschiebung und sein Signal tritt bei $\delta = 7.53$ ppm, aufgespalten durch die *meta*-Kopplung mit dem $3-H$ Proton, als Dublett in Erscheinung. Die Protonen $3-H$, $7-H$ und $8-H$ zeigen ein Multipllett bei $\delta = 7.32$ bis 7.35 ppm.

Abb. 58: ^{13}C NMR-Spektrum von natürlichem Methanophenazin (**1**) (125 MHz, C_6D_6)

Abb. 59: ^{13}C NMR-Spektrum von synthetischem Methanophenazin [(S)-**1**] (125 MHz, C_6D_6)

Das ^{13}C NMR-Spektrum von (*S*)-**1** präsentiert die Signale der olefinischen Methylgruppen 7'-CH₃, 11'-CH₃, und 15'-CH₃ bei $\delta = 16.12$, 16.13 und 16.15 ppm (vergleiche Abbildungen 58 und 59). Die Atome 19'-CH₃ und C-20' resonieren bei $\delta = 17.73$ und 25.78 ppm und markieren zusammen mit der Resonanz des quartären Atoms C-19' bei $\delta = 131.07$ das Ende der ungesättigten Seitenkette. Das Signal bei $\delta = 19.56$ ppm wird der direkt mit dem stereogenen Zentrum verbundenen Methylgruppe 3'-CH₃ zugeordnet. Durch die Nähe des Sauerstoffatoms auffallend zu tiefem Feld verschoben, erscheinen die Resonanzsignale der Atome C-1' und C-2 bei $\delta = 66.91$ bzw. 160.78 ppm. Ein positiver mesomerer Effekt, hervorgerufen durch das Sauerstoffatom, führt zur Hochfeldverschiebung des Signals von C-1 zu $\delta = 105.80$ ppm. Die quartären aromatischen Atome C-4a, C-5a, C-9a und C-10a stehen in direktem Kontakt mit den beiden elektronegativen Stickstoffatomen und resonieren tieffeldverschoben im Bereich von $\delta = 141.36$ bis 145.87 ppm. Dadurch lassen sie sich gut von den quartären olefinischen Atomen C-7', C-11' und C-15', deren Signale bei $\delta = 134.99$ bis 135.09 ppm erscheinen, unterscheiden.

Im Massenspektrum bildet der Basispeak gleichzeitig das Molekülion und ist bei $m/z = 538$ zu erkennen. Charakteristische Fragmentationen bei $m/z = 470$, 402, 334 und 265 entstehen durch die sukzessive Abspaltung von C₅H₈- bzw. C₅H₉-Einheiten durch Allylsplaltung aus der Seitenkette.

Insgesamt bleibt festzuhalten, daß die spektroskopischen Daten von synthetischem Methanophenazin *rac*-**1** und (*S*)-**1** mit denen des natürlichen Methanophenazins (**1**) hervorragend übereinstimmen. Damit ist das Ergebnis der Strukturaufklärung von Methanophenazin (**1**) durch Totalsynthese bestätigt worden.

10.8 Zusammenfassung

Ein Schlüsselschritt zur Synthese von (*S*)-Methanophenazin [(*S*)-**1**] ist die zum Aufbau der Seitenkette erforderliche Verknüpfung des gesättigten C₆-Bausteines (*R*)-**6** mit dem ungesättigten C₁₉-Baustein **7**. Dies gelingt durch die Überführung des Alkyljodids (*R*)-**6** in das entsprechende Zink-Organyl und seine anschließende Palladium-katalysierte Kreuzkupplung mit dem Vinyljodid **7**. Desilylieren des Kupplungsprodukts zum Alkohol (*S*)-**78** und Verethern mit 2-Hydroxyphenazin (**2**) führt zum angestrebten Zielmolekül (*S*)-**1**. Unter Verwendung von *rac*-**6** wurde Methanophenazin (*rac*-**1**) auch in seiner racemischen Form synthetisiert.

11 Versuche zur Ermittlung der absoluten Konfiguration von Methanophenazin (1)

Die einzige ungeklärte Frage im Zusammenhang mit der Strukturaufklärung von natürlichem Methanophenazin (1) ist die nach der absoluten Konfiguration des Naturstoffs. Ihre Klärung wird vor allem durch die geringen zur Verfügung stehenden Mengen des Naturstoffs erschwert.

11.1 Untersuchungen mit chromatographischen Methoden

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration eines stereogenen Zentrums bedient man sich häufig der Chromatographie an chiraler Phase.^[118] Neben der Verbindung, deren absolute Konfiguration aufgeklärt werden soll, benötigt man dazu am besten das racemische Gemisch und ein Enantiomer mit bekannter absoluter Konfiguration. Dabei etabliert man zunächst mit dem racemischen Gemisch die Bedingungen zur Separation der Enantiomeren. Anschließend vergleicht man die Retentionszeit der Substanz unbekannter Konfiguration mit den Retentionszeiten der Enantiomere bekannter Konfiguration. Die dabei erhaltenen Ergebnisse lassen einen eindeutigen Rückschluß auf die absolute Konfiguration des fraglichen Stereozentrums zu. Durch abschließende Co-Chromatographie der drei Substanzproben überprüft man die erzielten Resultate. Der große Vorteil der chromatographischen Methoden liegt im geringen Substanzbedarf.

Zunächst war geplant, die Konfiguration des stereogenen Zentrums von Methanophenazin (1) durch Gaschromatographie an chiraler Phase zu ermitteln. Bei den Versuchen, die Parameter zur Auftrennung der Enantiomeren von *rac*-1 zu bestimmen, stellte man schnell die Zersetzung von *rac*-1 im Injektor des Gaschromatographen fest. Eine Variation der Injektortemperatur im Bereich von 150 bis 250 °C brachte keinen Fortschritt, da unter keinen Bedingungen aussagekräftige, reproduzierbare Signale detektiert werden konnten.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie war die zweite Methode, die Anwendung fand.^[119] An einer speziell für unpolare, chirale Substanzen ausgelegten Säule (Chiralcel OD, Fa. Diacell) wurde versucht, die Trennbedingungen für Methanophenazin (*rac*-1) zu ermitteln. Dabei wurden die folgenden Bedingungen gewählt Flußrate: 0.5 ml/min; Laufmittel: Hexan/Isopropanol mit wechselnden Anteilen von Isopropanol zwischen 1 und 20 %; UV-Detektion bei 255 nm. Alle Bemühungen zur Auftrennung von *rac*-1 in die beiden

Enantiomeren waren ohne Erfolg. Künftige Untersuchungen werden sich jetzt auf den Einsatz weiterer chiraler Phasen konzentrieren.

11.2 Untersuchung mit chiroptischen Methoden

Bei den chiroptischen Meßmethoden handelt es sich um eine Form der Absorptionsspektroskopie, die auf der Chiralität der untersuchten Stoffe basiert. Voraussetzung dafür ist das Vorliegen von optischer Aktivität.^[108] Ein Stoff ist optisch aktiv, wenn er die Ebene des linear polarisierten Lichtes dreht. Messungen von (*S*)-Methanophenazin [(*S*)-**1**] im Polarimeter ergaben einen spezifischen Drehwert von $[\alpha]_{546}^{20} = -4.6^\circ$ ($c = 1$, C_6H_6). Damit erfüllt die Verbindung (*S*)-**1** das Kriterium der optischen Aktivität.

Der spezifische Drehwert von natürlichem Methanophenazin (**1**) wurde nicht bestimmt, weil mit 0.7 mg an **1** zuwenig Substanz vorlag, um eine ausreichend genaue, aussagekräftige Messung durchzuführen. Ein einfacher Vergleich der Drehwerte von natürlichem Methanophenazin (**1**) mit synthetischem (*S*)-Methanophenazin [(*S*)-**1**] zur Bestimmung der absoluten Konfiguration war deshalb nicht möglich.

Die Verbindung (*S*)-**1** verfügt über verschiedene Absorptionsmaxima im UV-Spektrum bei $\lambda = 256$ nm, 354 und 388 nm. Bei geeigneten optisch aktiven Verbindungen werden innerhalb von Absorptionsbanden links und rechts *zirkular* polarisierte Lichtstrahlen unterschiedlich stark absorbiert. Diese Differenz in der Absorption nennt man Zirkulardichroismus (CD). Er wird mit Hilfe von CD-Spektrometern quantitativ bestimmt.^[108] Die zirkulardichroitischen Untersuchungen von (*S*)-**1** an einem Jasco J 715 CD-Spektrometer über einen Wellenlängenbereich von 500 bis 200 nm wiesen keinen CD-Effekt auf. Die hervorgerufenen Effekte sind offensichtlich zu gering, um einen Unterschied in der Absorption entgegengesetzt zirkular polarisierten Lichtes zu bewirken. Diese Methode eignet sich daher nicht zur Bestimmung der absoluten Konfiguration des Stereozentrums von natürlichem Methanophenazin (**1**).

11.3 Versuche zur Aufklärung der absoluten Konfiguration durch chemischen Abbau

Ein anderer Weg zur Aufklärung der absoluten Konfiguration von **1** ist der chemische Abbau und die Bestimmung der absoluten Konfiguration des Abbauprodukts. Eine Möglichkeit zur Derivatisierung von **1** besteht im ozonolytischen Abbau aller Doppelbindungen der Seitenkette. Durch anschließende reduktive Aufarbeitung der Reaktionsmischung sollte es möglich sein, **1** in den Alkohol **80** überzuführen (Abbildung 60), der dann weiter derivatisiert werden kann.

Abb. 60: geplante Abbaureaktion zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von Methanophenazin (**1**)

Wie in Kapitel 7 dargestellt, wurde der Phenazinether *rac*-**51** durch Veretherung von 2-Hydroxyphenazin (**2**) mit Citronellol (*rac*-**47**) synthetisiert. Von M. Dehler^[109] durchgeführte Versuche haben gezeigt, daß der Alkohol *rac*-**80** durch ozonolytische Spaltung der terminalen Doppelbindung von *rac*-**51** und anschließende reduktive Aufarbeitung mit Natriumborhydrid in guten Ausbeuten zugänglich ist (Abbildung 61).

Abb. 61: Ozonolyse von *rac*-**51**

Demnach sind auf diesem Weg, ausgehend von 2-Hydroxyphenazin (**2**) und enantiomerenreinem Citronellol (*R*)-**47** bzw. (*S*)-**47**, die zur Aufklärung der absoluten Konfiguration von **1** erforderlichen Vergleichssubstanzen (*R*)-**80** bzw. (*S*)-**80** leicht zugänglich (Abbildung 62).

Abb. 62: Synthese und Ozonolyse von (*S*)-**51**

Neben den oben genannten Techniken zur Bestimmung der Konfiguration durch chromatographische und chiroptische Methoden bietet die primäre Hydroxylgruppe im Abbauprodukt **80** die Möglichkeit der Derivatisierung mit chiralen Reagenzien und eröffnet somit einen weiteren Weg zur Konfigurationsermittlung durch Kernresonanzspektroskopie.

11.4 Zusammenfassung

Versuche zur Bestimmung der absoluten Konfiguration des Naturstoffs Methanophenazin (**1**) mit chromatographischen und chiroptischen Methoden blieben bislang ohne Erfolg. Eine andere Möglichkeit zur Lösung dieses Problems liegt im chemischen Abbau von **1** durch Ozonolyse der Seitenkette und anschließender Bestimmung der absoluten Konfiguration des Abbauprodukts **80**. Die dazu erforderlichen Modellsubstanzen sind aus 2-Hydroxyphenazin (**2**) und enantiomerenreinem Citronellol (*S*)-**47** bzw. (*R*)-**47** zugänglich.

12 Die biologische Funktion von Methanophenazin (1)

Methanogene Organismen spielen eine zentrale Rolle im Prozeß der Mineralisation organischer Verbindungen (siehe Kapitel 2). *Methanosarcina mazei* Gö1 ist dabei in der Lage, Abbauprodukte der natürlichen Biopolymere, wie Wasserstoff/Kohlendioxid, Ameisensäure, Methanol und Methylamine in Methan umzuwandeln.^[13] Katalysiert wird dieser Vorgang durch die Methyl-Co-M-Reduktase (siehe die Abbildungen 11 und 12 in Kapitel 2.2), wobei Methyl-S-CoM reaktiv zu Methan demethyliert wird. Die dazu erforderlichen Elektronen stammen von HS-CoB. Neben Methan bildet sich dabei das Heterodisulfid CoM-S-S-CoB. Die Reduktion dieses Heterodisulfids ist ein energiekonservierender Schritt im Stoffwechsel methylotropher und hydrogenotropher Methanogener, weil er mit einer Protonentranslokation verbunden ist, die einen transmembranen Protonengradienten aufbaut, der von einer APTase zur ATP-Synthese genutzt wird.^[17,18] Verantwortlich für die Regeneration der Coenzyme M (CoM-SH) und B (CoB-SH) in *Ms. mazei* Gö1 sind zwei membrangebundene Enzymsysteme. Beim Wachstum auf Methanol ist das $F_{420}H_2$:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System aktiv. Dabei wird der Elektronentransport von $F_{420}H_2$ zu CoB-S-S-CoM durch eine $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase vermittelt, die die Elektronen mit Hilfe von Elektronenüberträgern auf die Heterodisulfid-Reduktase überträgt.^[26] Nutzt der Organismus Wasserstoff und Kohlendioxid, bedient er sich des H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems zum Elektronentransport. Eine membranständige Hydrogenase macht den elementaren Wasserstoff verfügbar und überträgt die zur Heterodisulfid-Reduktion notwendigen Elektronen auf Elektronen-Carrier, die sie zur Heterodisulfid-Reduktase transportieren.^[28] Die Frage nach der Natur des Elektronenüberträgers führte zur Extraktion von Cytoplasmamembranen aus *Ms. mazei* Gö1. Aus dem Rohextrakt wurde Methanophenazin (1) als potentieller Elektronenüberträger isoliert, seine Struktur aufgeklärt und die Verbindung synthetisiert.

Abb. 63: Modell des membrangebundenen Elektronentransfers von *Methanosarcina mazei* Gö1 nach Deppenmeier.^[29] CoM-SH = Coenzym M; CoB-SH = Coenzym B, F₄₂₀ = Coenzym F₄₂₀; F₄₂₀H₂ = reduzierte Form des Coenzym F₄₂₀; MP = Methanophenazin; Dihydro-MP = reduzierte Form von Methanophenazin^[22]

12.1 Untersuchungen zum membrangebunden Elektronentransfer in *Ms. mazei* Gö1

Die ersten Untersuchungen zur biologischen Funktion wurden von *S. Bäumer*^[28] mit der gut zugänglichen Modellverbindung 2-Hydroxyphenazin (**2**) durchgeführt. Sie stellt ein um die sesterterpenoide Seitenkette verkürztes Derivat von Methanophenazin (**1**) dar.

Bei den Versuchen wurden in gepuffertem Medium, in einer Stickstoff-Atmosphäre, $F_{420}H_2$ und gewaschene Cytoplasmamembranen von *Ms. mazei* Gö1 vorgelegt. Nach der Zugabe von 2-Hydroxyphenazin (**2**) wurde die Reaktion spektralphotometrisch verfolgt. Bei einer Wellenlänge von $\lambda = 420$ nm beobachtete man eine Zunahme der Absorption, die durch Oxidation von $F_{420}H_2$ zu F_{420} hervorgerufen wurde. Gleichzeitig mit der Zunahme der F_{420} -Absorption beobachtete man eine Abnahme der Phenazin-Absorption bei $\lambda = 365$ nm, die durch Reduktion von 2-Hydroxyphenazin (**2**) zu Dehydro-2-hydroxyphenazin (Dehydro-**2**) hervorgerufen wird. Offensichtlich ist **2** in der Lage, der $F_{420}H_2$ -abhängigen Dehydrogenase als Elektronenakzeptor zu dienen.

Wurden gewaschene Membranen in einer Wasserstoff-Atmosphäre mit 2-Hydroxyphenazin (**2**) versetzt, so beobachtete man im Photometer eine Abnahme der Absorption als Folge der Reduktion von **2** zu Dehydro-**2**. Ebenso wie die F_{420} -Dehydrogenase ist es also auch der membranständigen Hydrogenase möglich, Elektronen auf **2** zu übertragen.^[28]

Zur Überprüfung der Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität reduzierte man **2** mit Pt/H_2 , filtrierte vom Katalysator ab und mischte das erhaltene Dihydro-**2** unter Sauerstoffausschluß mit gewaschenen Cytoplasmamembranen. Nach der Zugabe von CoM-S-S-CoB, beobachtete man im Photometer eine Zunahme der Absorption durch die fortlaufende Oxidation von Dihydro-**2** zu 2-Hydroxyphenazin (**2**).

Die in den beiden Elektronentransport-Systemen abgelaufenen Redoxprozesse lassen sich durch die nachfolgend aufgeführten Teilreaktionen beschreiben:

$F_{420}H_2$:Heterodisulfid-Oxidoreduktase

H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase

Bei der Wiederholung der genannten Versuche mit gereinigten Enzymen anstelle der gewaschenen Cytoplasmamembranen gelang es, das $F_{420}H_2$:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System funktionell zu rekonstituieren.^[110] Das heißt, die beiden Teilreaktionen dieses Elektronentransport-Systems wurden erfolgreich miteinander gekoppelt und sind im selben Reaktionsgefäß im Sinne einer Konsekutivreaktion nacheinander abgelaufen. Der künstliche Elektronenüberträger **2** wird dabei zunächst von der gereinigten $F_{420}H_2$ -abhängigen Dehydrogenase zu Dehydro-**2** reduziert und im gleichen Gefäß nach Zugabe von CoB-S-S-CoM, unter Katalyse der gereinigten Heterodisulfid-Reduktase, in seine oxidierte Form **2** zurückverwandelt. Versuche zur Rekonstitution des H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems mit der gereinigten Hydrogenase aus *Ms. mazei* Gö1 schlugen fehl. Untersuchungen dazu ergaben, daß bei der Aufreinigung dieses Enzyms einige für seine Funktion wichtige Untereinheiten abgetrennt wurden, so daß die Übertragung der Elektronen auf **2** nicht stattfinden konnte.

Nach Abschluß der Totalsynthese von Methanophenazin (*rac*-**1**) wurden die mit 2-Hydroxyphenazin (**2**) und gewaschenen Cytoplasmamembranen durchgeführten Versuche von *S. Bäumer* mit *rac*-**1** wiederholt.

Die Ergebnisse der mit **2** und *rac*-**1** durchgeführten Versuche sind in Tabelle 6 in übersichtlicher Form zusammengefaßt. Wie daraus zu ersehen ist, reagieren die Schlüsselenzyme beider Elektronentransportsysteme mit beinahe der gleichen spezifischen Aktivität mit den Elektronenüberträgern **2** und *rac*-**1**. Das zeigt an, daß für den Redoxprozeß allein das heteroaromatische Phenazinsystem verantwortlich ist und die terpenoide Seitenkette in *rac*-**1** vermutlich nur zur Verankerung des Elektronenüberträgers in der Membran dient.

Die Ergebnisse zeigen, daß auch Methanophenazin (*rac*-**1**) sowohl der F_{420} -abhängigen Dehydrogenase als auch der membrangebunden Hydrogenase als Elektronenakzeptor dient. Außerdem nutzt die Heterodisulfid-Reduktase die reduzierte Form von Methanophenazin (Dihydro-*rac*-**1**) als Elektronendonator für die Reduktion von CoB-S-S-CoM (Abbildung 63).

Tabelle 6: Reaktivität von 2-Hydroxyphenazin (**2**) und Methanophenazin (*rac-1*) mit den Komponenten der Elektronentransportsysteme von *Methanosarcina mazei* Gö1

Enzym	Elektronendonor	Elektronenakzeptor	Spez. Aktivität [U/mg Protein ⁻¹]
F ₄₂₀ H ₂ - Dehydrogenase	F ₄₂₀	2	0.2
F ₄₂₀ H ₂ - Dehydrogenase	F ₄₂₀	<i>rac-1</i>	0.15
Membrangebundene Hydrogenase	H ₂	2	3.2
Membrangebundene Hydrogenase	H ₂	<i>rac-1</i>	2.3
Heterodisulfid- Reduktase	Dihydro- 2	CoB-S-S-CoM	2.3
Heterodisulfid- Reduktase	Dihydro- <i>rac-1</i>	CoB-S-S-CoM	2.3

Methanophenazin (**1**) ist also in der Lage, den Elektronentransport zwischen den membran- gebundenen Enzymen zu vermitteln. Die mit *rac-1* als Elektronenüberträger in den Elektronentransport-Systemen ablaufenden Redoxreaktionen lauten dementsprechend:

F₄₂₀H₂:Heterodisulfid-Oxidoreduktase

H₂:Heterodisulfid-Oxidoreduktase

Damit ist Methanophenazin (**1**) das erste Phenazin, für das eine Beteiligung am Elektronentransport in biologischen Systemen nachgewiesen wurde. Nach den hier vorgestellten Ergebnissen entspricht die Rolle von Methanophenazin (**1**) im Energiestoffwechsel methanogener Organismen der des Ubichinons in Mitochondrien und Bakterien.

12.2 Zusammenfassung

Untersuchungen zur biologischen Funktion von 2-Hydroxyphenazin (**2**) und Methanophenazin (*rac-1*) sowie ihrer reduzierten Formen ergaben, daß diese Verbindungen in der Lage sind, als zentrale redoxaktive Elektronenüberträger in der Cytoplasmamembran von *Methanosarcina mazei* Gö1 zu fungieren und den Elektronentransport zwischen den Schlüsselenzymen zu vermitteln. Dabei dienen **2** und *rac-1* der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase und der membranständigen Hydrogenase als Elektronenakzeptoren. Gegenüber der Heterodisulfid-Reduktase treten die reduzierten Formen Dihydro-**2** bzw. Dihydro-*rac-1* als Elektronendonoren auf und werden dabei oxidiert. Die Elektronen werden zur Regeneration der Coenzyme M und B durch Reduktion des Heterodisulfids CoM-S-S-CoB genutzt. Methanophenazin (**1**) ist damit das erste Phenazin, für das eine Beteiligung am Elektronentransport in biologischen Systemen nachgewiesen wurde.

Die erzielten Ergebnisse legen nahe, daß die Aufgabe von Methanophenazin (**1**) im Energiestoffwechsel der Methanogenen der des Ubichinons in Mitochondrien und Bakterien entspricht.

13 Zusammenfassung und Ausblick

Methanogene Organismen gehören zum Reich der Archaea und unterscheiden sich deutlich von den Eukarya und Bakteria. Die ubiquitär verbreiteten methanogenen Archaea sind strikt anaerobe Organismen, die bevorzugt in Sedimenten von Gewässern sowie im Pansen von Wiederkäuern vorkommen. Sie stehen am Ende der anaeroben Nahrungskette und wandeln einfache Substrate wie Wasserstoff/Kohlendioxid, Ameisensäure, Methanol, Methylamine und Essigsäure in Methan um, das anschließend unter aeroben Bedingungen oxidiert werden kann und damit dem Kohlenstoffkreislauf wieder zugeführt wird.

Abb. 64: Vereinfachtes Schema der Methanogenese in *Methanosarcina mazei* Gö1

An der Bildung des Methans sind zahlreiche außergewöhnliche Enzyme und ungewöhnliche Cofaktoren beteiligt. Wie in Abbildung 64 dargestellt, ist Methyl-S-CoM die zentrale Zwischenstufe aller methanogenen Stoffwechselwege. Sie wird unter dem katalytischen Einfluß der Methyl-CoM-Reduktase reaktiv zu Methan demethyliert. Die hierfür benötigten Elektronen entstammen CoB-SH und führen zur Bildung eines Heterodisulfids (CoB-S-S-CoM) aus CoB-SH und CoM-SH. Ein energiekonservierender Schritt im Stoffwechsel methylotropher und hydrogenotropher Methanogener ist die Reduktion von CoB-S-S-CoM. Am membrangebundenen Elektronentransfer von *Methanosarcina mazei* Gö1 sind zwei vor kurzem entdeckte, protonentranslozierende Enzymsysteme beteiligt: die H₂:Heterodisulfid-Oxidoreduktase und die F₄₂₀H₂:Heterodisulfid-Oxidoreduktase. Der Elektronentransport von F₄₂₀H₂ zu CoB-S-S-CoM wird durch eine F₄₂₀H₂-Dehydrogenase vermittelt, die die Elektronen mit Hilfe von membrangebundenen Elektronenüberträgern auf die Heterodisulfid-Reduktase überträgt. Liegt molekularer Wasserstoff vor, fungiert eine membrangebundene Hydrogenase als elektroneneinspeisende Komponente für die Heterodisulfid-Reduktase.

Die Struktur des Elektronenüberträgers war zunächst unbekannt. Auf der Suche danach führte die Extraktion der Cytoplasmamembranen von *Methanosarcina mazei* Gö1 mit Isooctan und die anschließende Aufreinigung des Rohextrakts mittels HPLC zur Isolierung einer redoxaktiven Verbindung, bei der es sich um einen Phenazinether handelte (Abbildung 65). Die detaillierte NMR-Analyse des nur in geringen Mengen (1.2 mg aus 5 × 100 l Kultur) erhältlichen, empfindlichen Naturstoffs ergab, daß seine lipophile Seitenkette aus fünf in Kopf-Schwanz-Manier verknüpften isoprenoiden Einheiten besteht. Während die direkt über die Etherbrücke mit dem 2-Phenazinylrest verknüpfte C₅-Einheit gesättigt ist, sind die vier weiteren ungesättigt. Drei davon weisen (*E*)-konfigurierte Doppelbindungen auf. Bei dem als Methanophenazin (**1**) bezeichneten, redoxaktiven Naturstoff handelt es sich um das erste aus Archaea isolierte Phenazin überhaupt.

Methanophenazin (**1**)

Anzucht von *Ms. mazei* Gö1 im 100 l Fermenter:
 150 mM Methanol, pH 6.9 -7.3, anaerobe
 Bedingungen in N₂/CO₂-Atmosphäre, 2-3 d, 37 °C

⇒ Zellmasse: ≈ 100 g

Membranpräparation: Abtrennen der Cytoplasmamembranen von Zellwand, DNA und anderen Zellbestandteilen durch Zentrifugation; Isooctanextraktion der Cytoplasmamembranen

⇒ Rohextrakt: ≈ 30 mg

HPLC-Reinigung des Rohextrakts:
 SiO₂-Säule; Gradient: Cyclohexan/Essigester, Detektion: λ = 260 nm

⇒ Reinsubstanz: ≈ 0.3 mg

Strukturaufklärung:

Massenspektrometrie, ¹H- und ¹³C NMR-Spektroskopie,
 zweidimensionale NMR-Korrelationsexperimente

Methanophenazin (1)

das erste Phenazinderivat aus Archaea

Abb. 65: Schema zur Isolierung, Reinigung und Strukturaufklärung von Methanophenazin (1) aus Cytoplasmamembranen von *Methanosarcina mazei* Gö1

Da Methanogene keine herkömmlichen Chinone besitzen, wurde vermutet, daß **1** als Elektronenüberträger in der Cytoplasmamembran fungiert und eine Rolle im energie-konservierenden Elektronentransport übernimmt.

Zum Zwecke einer Prüfung der biologischen Funktion von **1** und dem genauen Studium seiner Rolle im membrangebundenen Elektronentransport von *Ms. mazei* sowie zur Aufklärung der absoluten Konfiguration an C-3' waren größere Mengen des Naturstoffs erforderlich. Die durch Extraktion aus Cytoplasmamembranen verfügbaren Mengen an Methanophenazin (**1**) sind zu gering und der Aufwand ihrer Isolierung ist zu groß, als daß sich der Bedarf an **1** aus dieser natürlichen Quelle decken ließe. Eine Synthese des Naturstoffs war also unumgänglich.

Abb. 66: Zur Retrosynthese von Methanophenazin (*rac*-1)

Wie in Abbildung 66 dargestellt, führt die retrosynthetische Analyse des racemischen Methanophenazins (*rac*-**1**) zu den drei Bausteinen **2**, *rac*-**6** und **7**. Das 2-Hydroxyphenazin (**2**) soll durch Umsetzung von **4** mit **5** hergestellt werden. Der ungesättigte Teil der Seitenkette von **1** soll durch das Vinyljodid (**7**) eingeführt werden, das sich auf das bekannte (*E,E*)-Farnesylaceton (**10**) zurückführen läßt. Das mittlere Fragment *rac*-**6** kann aus 3-Methylpentan-1,5-diol (**8**) durch selektive Funktionalisierung der beiden Hydroxylgruppen zugänglich gemacht werden. Der Vorteil eines solchen symmetrischen C₆-Bausteins besteht in der Möglichkeit, durch Differenzierung seiner enantiotopen Liganden beide Enantiomeren verfügbar zu machen. So ist der kommerziell in hoher optischer Reinheit (ee > 95%) erhältliche (*R*)-3-Methylglutarsäureester [(*R*)-**11**] ein geeigneter Vorläufer zum Aufbau der chiralen Lactone (*R*)-**12** und (*S*)-**12**. Aus ihnen sollten die beiden Bausteine (*R*)-**6** und (*S*)-**6** zugänglich sein, die die Grundlage für den Aufbau der beiden Antipoden (*S*)-**1** und (*R*)-**1** bilden (Abbildung 67).

Abb. 67: Zur Retrosynthese der enantiomeren Iodalkohole (*R*)-**6** und (*S*)-**6** aus (*R*)-**11**

Als Schlüsselschritte der Synthese racemischen Methanophenazins (*rac*-**1**) gelten der diastereoselektive Aufbau des isoprenoiden Vinyljodids (**7**) und dessen Verknüpfung mit *rac*-**6** zur vollständigen Seitenkette *rac*-**3**. Im letzten Schritt sollen *rac*-**3** und 2-Hydroxyphenazin (**2**) durch Veretherung ins Zielmolekül *rac*-**1** übergeführt werden.

Abb. 68: Zur Synthese von racemischen Methanophenazin (*rac-1*)

2-Hydroxyphenazin (**2**) wurde nach einer Vorschrift von *Kehrmann* und *Cherpillod* durch die Kondensation von 1,2,4-Trihydroxybenzol (**45**) mit *o*-Phenylendiamin (**5**) synthetisiert.

Zur Herstellung von **7** wurde (*E,E*)-Farnesylaceton (**10**) zunächst in das terminale Alkin **9** transformiert und dann durch eine Zirkonium-katalysierte Carboaluminierung mit Trimethylaluminium und Abfangen mit Iod in das diastereomerenreine (*E*)-Vinyljodid (**7**) mit 74 % Ausbeute übergeführt (Abbildung 68).

Das zur Verknüpfung mit **7** erforderliche Alkyljodid *rac*-**6** konnte durch selektive Monofunktionalisierung von 3-Methyl-pentan-1,5-diol (**8**) in wenigen Schritten zugänglich gemacht werden. Die Umwandlung von *rac*-**6** in die entsprechende Organozinkverbindung durch Behandeln mit trockenem Zinkchlorid und *tert.*-Butyllithium ermöglichte die Palladium-katalysierte sp²-sp³-Kreuzkupplung mit dem Vinyljodid **7** zu *rac*-**76**. Diese C-C-Kupplung verlief unter Retention der Konfiguration am sp²-Zentrum und gestattet den (*E*)-selektiven Aufbau der C-6', C7'-Doppelbindung der Seitenkette *rac*-**76** mit 65 % Ausbeute. Fluoridinduzierte Silyletherspaltung und die Aktivierung der so gebildeten Hydroxylgruppe durch Methansulfonsäurechlorid ergab das Mesylat, das mit 2-Hydroxyphenazin (**2**) zu *rac*-**1** verethert wurde.

Durch die konvergente Synthesestrategie gelang es, Methanophenazin (*rac*-**1**) in racemischer Form ausgehend von (*E,E*)-Farnesylaceton (**10**) in 6 Schritten mit einer Gesamtausbeute von 32 % zu synthetisieren.

Für die Synthese von (*S*)- bzw. (*R*)-Methanophenazin [(*R*)- bzw. (*S*)-**1**] wurde eine stereo-divergente Synthesestrategie, die auf der bekannten Umwandlung von (*R*)-**11** in die Lactone (*R*)-**12** und (*S*)-**12** beruhte, ausgearbeitet.

Wie in Abbildung 69 dargestellt, ließen sich ausgehend von (*R*)-3-Methylglutarsäureethylester [(*R*)-**11**] (ee > 95%) durch chemoselektive Reduktion der Carbonsäure- bzw. der Ester-funktionalität die beiden enantiomeren Lactone (*S*)-**12** und (*R*)-**12** synthetisieren. Letztere Verbindung erhielt man dabei mit einer Ausbeute von 92 % und

einem Enantiomeren-überschuß von 98 %. Die Öffnung des Lactons (*R*)-**12** mit Piperidin zum entsprechenden Amidalkohol und dessen Silylierung ergaben nahezu quantitativ das Amid (*R*)-**57**. Die einstufige Reduktion des tertiären Amids (*R*)-**57** zum primären Alkohol (*S*)-**52** gelang mit Lithiumtriethylborhydrid in einer Ausbeute von 92 %.

Abb. 69: Zur Synthese von (*R*)-**6** und (*S*)-**12**

Aktivieren der Hydroxylfunktion mit Methansulfonsäurechlorid und Reaktion mit Lithiumiodid lieferte den C_6 -Baustein (*R*)-**6**. Im Ergebnis gelang die Synthese des Alkyliodids (*R*)-**6** aus (*R*)-**11** in fünf Schritten mit einer Gesamtausbeute von 76 %. Die Integrität des stereogenen Zentrums bleibt dabei unangetastet.

In Analogie zur Synthese von racemischem Methanophenazin (*rac*-**1**) wurde durch eine Palladium-katalysierte C-C-Kreuzkupplung des enantiomerenreinen Bausteins (*R*)-**6** mit (*E*)-Vinyljodid **7** und anschließender Desilylierung des Kupplungsproduktes der Alkohol (*S*)-**78** hergestellt (Abbildung 70). Die abschließende Veretherung mit 2-Hydroxyphenazin (**2**) ergab (*S*)-Methanophenazin [(*S*)-**1**] mit 90 % Ausbeute.

Da sich (*S*)-**12** leicht durch chemoselektive Reduktion der Esterfunktionalität von (*R*)-**11** und anschließende Cyclisierung darstellen lässt, ist mit der hier vorgestellten Strategie auch die Grundlage für die Synthese von (*R*)-Methanophenazin [(*R*)-**1**] gelegt worden.

Abb. 70: Zur Synthese von (*S*)-Methanophenazin [(*S*)-**1**]

Ausgehend von den leicht zugänglichen Substraten 2-Hydroxyphenazin (**2**), 3-Methyl-1,5-pentandiol (**8**) und (*E,E*)-Farnesylaceton (**7**), stellt die vorliegende Synthese einen effizienten und konvergenten Zugang zu Methanophenazin (**1**) dar. Die Möglichkeit der gezielten Manipulation der drei Bausteine, eröffnet auch einen einfachen Weg zur Darstellung von Derivaten von **1**. Unter Verwendung des enantiomerenreinen Alkyljodids (*R*)-**6**, das sich aus

(*R*)-3-Methylglutarsäureethylester [(*R*)-**11**] (ee > 95%) aufbauen läßt, wurde die Synthese von (*S*)-Methanophenazin [(*S*)-**1**] verwirklicht. Der Antipode (*R*)-Methanophenazin [(*R*)-**1**] wird sich nach derselben Strategie synthetisieren lassen, da sich (*R*)-**11** auch in das Lacton (*S*)-**12** umwandeln läßt, das eine Vorstufe für das Iodid (*S*)-**6** darstellt.

Zukünftige Untersuchungen werden sich auf die Bestimmung der absoluten Konfiguration des natürlichen Methanophenazins (**1**) konzentrieren. Nach chiroptischen und chromatographischen Verfahren werden dabei chemische Abbaureaktionen im Mittelpunkt stehen, die bereits an Modellverbindungen erfolgreich durchgeführt worden sind.

Die ersten Experimente zur biologischen Funktion von Phenazinen bei der Methanogenese von Archaea wurden mit 2-Hydroxyphenazin (**2**) und seiner reduzierten Form (Dihydro-**2**) durchgeführt (AK U. Deppenmeier). Sie zeigten, daß die in den Elektronentransport involvierten Enzyme des $F_{420}H_2$:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems und des H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems mit dem künstlichen Elektronenüberträger reagieren. Entsprechende Untersuchungen mit synthetischem Methanophenazin (*rac*-**1**) wurden an gewaschenen Cytoplasmamembranen von *Methanosarcina mazei* Gö1 durchgeführt. Die photometrische Bestimmung der Enzymaktivitäten ergab, daß die membrangebundene Hydrogenase in Gegenwart von Wasserstoff, bzw. die F_{420} -Dehydrogenase in Gegenwart von $F_{420}H_2$ in der Lage ist, Elektronen auf *rac*-**1** zu übertragen. Im weiteren Verlauf fungiert die reduzierte Form von *rac*-**1** (Dihydro-*rac*-**1**) als Elektronendonator für die Heterodisulfid-Reduktase und ermöglicht die Heterodisulfid-Reduktion. Demnach ist *rac*-**1** in der Lage, den Elektronentransport zwischen den membrangebunden Enzymen zu vermitteln. Die dabei ablaufenden Redoxprozesse lassen sich in zwei Teilreaktionen beschreiben.

$F_{420}H_2$:Heterodisulfid-Oxidoreduktase

H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase

Methanophenazin (**1**), über dessen Isolierung, Strukturaufklärung und Totalsynthese in dieser Arbeit berichtet wird, ist das erste Phenazin aus methanogenen Archaea. Es stellt gleichzeitig das erste am Elektronentransport in biologischen Systemen beteiligte Phenazin-Derivat dar. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß die Funktion von **1** im Energiestoffwechsel der Methanogenen mit der des Ubichinons in Mitochondrien und Bakterien vergleichbar ist. Weitere Arbeiten werden sich mit dem Mechanismus der Elektronentransferreaktion von Phenazinen in natürlichen Systemen, aber auch in Modellen beschäftigen.

II Experimenteller Teil

1 Allgemeine Verfahren

1.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Alle sauerstoff- und feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden unter einem leichten Überdruck von Argon in ausgeheizten, trockenen Glasapparaturen unter Anwendung von Spritzen- und Septentechniken durchgeführt. Die hierbei verwendeten Lösungsmittel wurden zuvor destilliert und entsprechend den üblichen Laboratoriumsmethoden absolutiert.^[111] Käufliche Substanzen wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

1.2 Verwendete Geräte

Infrarotspektren: Verwendet wurden ein FT-IR Spektrometer IFS 25 der Firma *Bruker*. Kristalline Substanzen wurden als KBr-Preßlinge, flüssige Proben als Film zwischen NaCl-Platten gemessen. Zur Eichung diente eine Polystyrolbande bei 1601 cm^{-1} .

UV/VIS-Spektren: Verwendet wurden die Spektrometer Cary 219 der Firma *Varian* und die Modelle Lambda 2 bzw. Lambda 9 der Firma *Perkin-Elmer*.

^1H NMR-Spektren: Die ^1H NMR-Spektren wurden an den Modellen XL-200 (200 MHz), VXR (200 MHz) und VXR-500 S (500 MHz) der Firma *Varian* sowie dem Modell AMX-300 (300 MHz) der Firma *Bruker* aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ -Skala angegeben. Tetramethylsilan ($\delta_{\text{TMS}} = 0.00\text{ ppm}$), Chloroform ($\delta_{\text{CHCl}_3} = 7.24\text{ ppm}$) und Benzol ($\delta_{\text{C}_6\text{H}_6} = 7.26\text{ ppm}$) dienten als interne Standards. Zur Kennzeichnung der Multiplizität der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, sept = Septett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, m = Multiplett, weiterhin m_{C} für das Zentrum eines symmetrischen Multipletts und br für breite Signale. Die Spektren wurden den Regeln erster Ordnung entsprechend interpretiert. Die Kopplungskonstanten $^nJ_{\text{X-H}, \text{Y-H}}$ sind in Hertz (Hz) angegeben. Der Index n gibt die Art der Kopplung an: 2J entspricht einer geminalen Kopplung, 3J einer vicinalen Kopplung. Bei $n > 3$ handelt es sich um eine Fernkopplung. X und Y geben die C-Atome an, deren Protonen miteinander koppeln.

^{13}C NMR-Spektren: Verwendet wurden die Modelle XL-200 (50.3 MHz), VXR-200 (50.3 MHz) und VXL-500 S (125.7 MHz) der Firma *Varian* sowie das Modell AMX-300 (75.4 MHz) der Firma *Bruker*. Tetramethylsilan ($\delta_{\text{TMS}} = 0.00$ ppm), Chloroform ($\delta_{\text{CHCl}_3} = 7.24$ ppm) und Benzol ($\delta_{\text{C}_6\text{H}_6} = 7.26$ ppm) dienten als interne Standards. Die chemischen Verschiebungen sind ^1H -breitband-entkoppelten Spektren entnommen. Die '+'/'-' Zeichen vor den Werten der chemischen Verschiebung geben die Orientierung der Signale in den ^{13}C NMR APT-Spektren an. Ein '+' Zeichen repräsentiert dabei das Signal einer CH- oder CH_3 -Resonanz, ein '-' Zeichen steht für das Signal einer CH_2 - oder C_{quart} -Resonanz.

Massenspektren: Es wurden die Modelle MAT 311A (niederaufgelöste Spektren) und MAT 731 (hochaufgelöste Spektren) der Firma *Varian* eingesetzt. Die in Klammern gesetzten Prozentzahlen geben die Intensitäten der Peaks bezogen auf den Basispeak ($I = 100\%$) an.

Die zur GC-MS Kopplung notwendigen gaschromatographischen Trennungen wurden an einer DB-5 Kapillarsäule (20 m, 0.25 mm) mit einem GC Modell 3400 der Firma *Varian* durchgeführt.

Drehwerte: Die Drehwerte wurden mit einem Polarimeter 241 der Firma *Perkin-Elmer* (Standardküvette, 1 dm) bestimmt. Die Werte für die *spezifische Drehung* $[\alpha]_D^{25}$ sind in der Einheit $[\text{grad cm}^3 \text{ dm}^{-1} \text{ g}^{-1}]$ angegeben.

Elementaranalysen: Das Mikroanalytische Laboratorium des Instituts für Organische Chemie der Universität Göttingen führte die Elementaranalysen durch.

1.3 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie: Es wurden DC-Fertigfolien Alugram SIL G/UV₂₅₄ der Firma *Macherey & Nagel* (Schichtdicke 0.25 mm) verwendet. Angegeben sind die R_F -Werte (Laufhöhe relativ zur Laufmittelfront) sowie die verwendeten Laufmittelgemische. Als Abkürzungen für verwendete Lösungsmittel werden benutzt: EE (Essigsäureethylester), PE (Petrolether des Siedebereichs 35 bis 60 °C), Et_2O (Diethylether), CH_2Cl_2 (Dichlormethan). Zur Detektion wurden neben UV-Licht der Wellenlänge 254 nm Anfärbereagenzien wie eine 1 proz. wässrige Kaliumpermanganatlösung oder ein Gemisch aus 0.5 g Vanillin, 3 ml konzentrierter Schwefelsäure, 10 ml konzentrierter Essigsäure in 85 ml Methanol verwendet.

Säulenchromatographie: Für chromatographische Reinigungen unter normalem Druck wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* mit einer Korngröße von 0.05 - 0.20 mm eingesetzt. Arbeiten unter 1.0 - 1.5 bar Druck (Flash-Chromatographie)^[112] wurden an Kieselgel 60 der Firma *Merck* mit einer Korngröße von 0.040 - 0.063 mm durchgeführt. Wenn in den Arbeitsvorschriften nicht anders angegeben, wurden für präparative Trennungen Substanz: Adsorbensverhältnisse zwischen 1 : 100 und 1 : 200 gewählt. Für Säulenfiltrationen wurden Verhältnisse von 1 : 10 bis 1 : 20 eingestellt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie: Zur analytischen und präparativen Untersuchung und Aufreinigung von Substanzproben kam eine HPLC-Anlage der Firma *Kontron* mit Lösungsmittelpumpe 422, Mischkammer 425, UV-Detektor 322 und einem Probensammler Advantec SF-2120 der Firma *Advantec* zum Einsatz. Die Software zur Datenaufnahme und Datenauswertung DS450-MT2 stammt ebenfalls von der Firma *Kontron*. Analytische Untersuchungen wurden an einer LiChrospher Si 60 (4 x 125 mm) bzw. LiChrospher 100 RP-18 (4 x 125 mm) HPLC-Säule der Firma *Merck*, präparative Trennungen an einer Kontosorb 10 SIL (10 x 250 mm) Säule der Firma *Kontron* durchgeführt. Es wurden Eluenten in HPLC-Qualität der Firmen *Merck* und *Acros* und bidestilliertes Wasser eingesetzt. Sowohl die Laufmittel als auch die zu analysierenden Proben wurden vor Gebrauch membranfiltriert (0.2 µm).

Gaschromatographie: Gaschromatographische Untersuchungen wurden an einem GC Modell 3400 der Firma *Varian* oder einem GC Modell HRGC 5300 der Firma *Carlo Erba* durchgeführt. Die Bestimmung von Enantiomerenüberschüssen geschah an einer Kapillarsäule OV 1701 (25 m, 0.25 mm), die mit 20 % Heptakis-(2,6-O-methyl-3-O-pentyl)- β -cyclodextrin in Polysiloxan als chiraler stationärer Phase beladen war. Bei gewöhnlichen Untersuchungen gelangte eine SE 30 Säule (25 m, 0.32 mm) der Firma *Chrompack* zum Einsatz.

1.4 Software

Die Textverarbeitung erfolgte mit dem Programm Word für Windows 95 der Firma *Microsoft*. Die chemischen Formelbilder wurden mit dem Zeichenprogramm ChemDraw Ultra 5.0 der Firma *CambridgeSoft* erstellt.

2 Synthese von 2-Hydroxyphenazin (2)

2.1 1,2,4-Triacetoxybenzol (44)^[70]

In einer Argon-Atmosphäre wurden zu einer Lösung von 110 ml (119 g, 1.16 mol, 3.7 Äquiv.) frisch destillierten Essigsäureanhydrids und 3.0 ml (5.52 g, 56 mmol, 0.18 Äquiv.) konz. Schwefelsäure, 34.0 g (0.32 mol, 1.0 Äquiv.) 1,4-Benzochinon (**43**) so zugefügt, daß die Temperatur im Reaktionsgefäß zwischen 40 und 50 °C lag. Nach dem Ende der Wärmeentwicklung wurde die Reaktionslösung in 200 ml Wasser eingetragen und ca. 10 min. unter Eiskühlung gerührt, bis das Produkt auskristallisierte. Man saugte ab, wusch mit 30 ml Wasser und kristallisierte aus Methanol um. Es wurden 45.9 g 1,2,4-Triacetoxybenzol (**44**) (58 % Ausbeute, Lit.^[70] 80 %) erhalten.

$R_f = 0.37$ (Et₂O/PE = 5 : 1).

Schmp.: 97 °C (Lit.^[70] 96.5 - 97 °C).

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3054 \text{ cm}^{-1}$ (=C-H), 1780, 1762, (C=O), 1608 (C=C), 1498, 1428, 1374 (CH₃), 1210, 1190, 1170 (=C-H), 840 (C=C).

UV (CH₃CN): λ_{max} (lg ϵ) = 200 nm (4.20), 264 (2.83).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 2.26$ (s, 9H, 3 x CH₃), 6.98 (dd, $^3J_{5\text{H},6\text{H}} = 9.0 \text{ Hz}$, $^4J_{5\text{H},3\text{H}} = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), teilweise überlagert von 7.01 (d, $^4J_{3\text{H},5\text{H}} = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 7.15 (d, $^3J_{6\text{H},5\text{H}} = 9.0 \text{ Hz}$, 1H, 6-H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): $\delta =$ '+' 20.50 (2 x CH₃), '+' 20.95 (CH₃), '+' 116.98, '+' 119.37, '+' 123.45 (C-3, C-5, C-6), '-' 139.50, '-' 142.12, '-' 148.00 (C-1, C-2, C-4), '-' 167.69, '-' 168.02, '-' 168.71 (3 x C=O).

MS (70 eV): m/z (%) = 252 (8) [M⁺], 210 (17) [M⁺-C₂H₂O], 168 (36) [210⁺-C₂H₂O], 126 (100) [168⁺-C₂H₂O], 43 (14) [C₂H₃O⁺].

C₁₂H₁₂O₆ (252.22) Ber.: C 57.13 H 4.80 Gef.: C 57.08 H 4.93

2.2 1,2,4-Trihydroxybenzol (45)^[70]

45.9 g (0.18 mol, 1.0 Äquiv.) 1,2,4-Triacetoxybenzol (**44**) wurden in einer Lösung von 10 ml (11.8 g, 0.12 mol, 0.67 Äquiv.) konz. Salzsäure in 100 ml Methanol während 1 h unter Sieden am Rückfluß zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde die Reaktionsmischung i. Vak. am Rotationsverdampfer ohne Erhitzen bis zur Trockene eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung für nachfolgende Reaktionen eingesetzt. Es entstanden 20.1 g des gewünschten Produkts. Die Ausbeute betrug 87 % (Lit.^[70] > 80 %). Analysenreines 1,2,4-Trihydroxybenzol (**45**) ließ sich durch Sublimation bei 0.01 Torr und 120 °C gewinnen.

$R_f = 0.23$ (EE/PE = 4 : 1).

Schmp.: 140 °C (Lit.^[70] 137 -138 °C).

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3202 \text{ cm}^{-1}$ (OH--O), 3044 (=C-H), 1626 (C=C), 1554, 1518 (C-C), 1394, 1300 (=C-O), 1216, 1198, 1178, 1154 (=C-H), 840, 790 (C=C).

UV (CH₃CN): λ_{max} (lg ϵ) = 195 nm (4.46), 290 (3.52).

¹H NMR (300 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 6.02$ (dd, $^3J_{5\text{H},6\text{H}} = 8.5 \text{ Hz}$, $^4J_{5\text{H},3\text{H}} = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 5-H), 6.23 (d, $^4J_{3\text{H},5\text{H}} = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 6.51 (d, $^3J_{6\text{H},5\text{H}} = 8.5 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 7.96 (s, 1H, OH [D₂O]), 8.44 (s, 1H, OH, [D₂O]), 8.60 (s, 1H, OH [D₂O]).

¹³C NMR (50 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = \text{'+' } 103.50$ (C-5 oder C-6), $\text{'+' } 105.16$ (C-6 oder C-5), $\text{'+' } 115.84$ (C-3), $\text{'-' } 137.51$ (C-4), $\text{'-' } 145.58$ (C-1 oder C-2), $\text{'-' } 150.16$ (C-2 oder C-1).

MS (70 eV): m/z (%) = 126 (100) [M^+], 108 (3) [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$], 97 (16) [$\text{M}^+ - \text{CHO}$], 80 (36) [$\text{M}^+ - \text{CO}$], 52 (92) [C_4H_4^+], 42 (8) [C_3H_6^+].

C₆H₆O₃ (126.11)

Ber.: C 57.13 H 4.80

Gef.: C 57.39 H 4.90

2.3 2-Hydroxyphenazin (2) nach Kehrmann und Cherpillod ^[68,71]

50.0 g (0.35 mol, 4.28 Äquiv.) Natriumsulfat, für 12 h bei 150 °C getrocknet, wurden in 250 ml trockenem Diethylether suspendiert. Anschließend wurden 10.0 g (80.0 mmol, 1.0 Äquiv.) 1,2,4-Trihydroxybenzol (**45**) in der Suspension gelöst und noch 40.4 g (170 mmol, 2.1 Äquiv.) Silber-(I)-oxid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, der graue Feststoff abfiltriert und mit 140 ml Diethylether gewaschen. Das lichtempfindliche, gelbe Filtrat wurde in einem mit Aluminiumfolie verkleideten Rundkolben, i. Vak. am Rotationsverdampfer, ohne Erwärmen bis zur Trockene eingedampft. Das entstandene 2-Hydroxy-1,4-benzochinon wurde in 150 ml Eisessig suspendiert (Ultraschall). In die Suspension wurden innerhalb von 10 min 10.0 g (92.5 mmol, 1.15 Äquiv.) *o*-Phenyldiamin (**5**) eingetragen und 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem sich schwarze Kristalle gebildet hatten, fügte man noch 250 ml Wasser zu und ließ die Reaktionsmischung 8 h bei 4 °C im Kühlschrank stehen. Dann wurde der Niederschlag abfiltriert, in 10 proz. Natriumhydroxidlösung gelöst und erneut filtriert. Das Filtrat wurde mit konz. Essigsäure auf pH ≤ 5 angesäuert. Nach einer Stunde Kühlen mit Eiswasser wurde der entstandene Niederschlag über eine Nutsche filtriert und 5 h im Trockenschrank bei 150 °C getrocknet. Die erhaltenen 3.04 g Rohprodukt wurden auf 30 g Kieselgel aufgezogen und unter Druck an 250 g Kieselgel chromatographiert (Et₂O/PE = 3 : 1 → Et₂O). Es wurden 2.86 g (Ausbeute = 18 %; Lit.^[68] 87 %) des gewünschten Produkts (**2**) als hellgelber Feststoff erhalten.

2.4 2-Hydroxyphenazin (2) nach Ott^[69]

500 mg (4.6 mmol, 1.0 Äquiv.) 1,4-Benzochinon (**43**) wurden in 5 ml trockenem Ethanol (Na) gelöst, indem die Suspension mit einem Fön leicht erhitzt wurde. Nach dem Abkühlen gab man 500 mg (4.6 mmol, 1.0 Äquiv.) *o*-Phenylendiamin (**5**) zu. Die Lösung färbte sich dunkelrot und schwarze Kristalle schieden sich ab. Nach einer Stunde Stehen bei Raumtemperatur erhitzte man die Reaktionsmischung unter Rühren noch ca. 30 min bei 75 °C, fügte nach dem Abkühlen ca. 1 ml Wasser zu und stellte sie mehrere Stunden bei 4 °C in den Kühlschrank. Die kalte Reaktionsmischung wurde über eine Nutsche filtriert und die auf dem Filter verbliebenen braunschwarzen Kristalle in 0.5 *M* Natronlauge gelöst. Dann filtrierte man vom Unlöslichen ab und säuerte das Filtrat mit konz. Essigsäure an, wobei ein brauner Feststoff ausfiel. Dieser wurde filtriert, i. Vak. getrocknet und zur Aufreinigung an 50 g Kieselgel chromatographiert (Et₂O/PE = 3 : 1 → Et₂O). Es wurden 100 mg (10 % Ausbeute Lit.^[69] „etwa 90 %“) 2-Hydroxyphenazin (**2**) als hellgelber Feststoff isoliert.

$R_f = 0.66$ (EE/PE = 3 : 1).

Schmp.: 250 °C, Zers. (Lit.^[69] 253-254, Zers.).

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3420 - 2595 \text{ cm}^{-1}$ (OH, =C-H), 1632, 1602, 1476, 1452, 1420 (C=C), 1282 (O-H), 1222, 1200 (C-O).

UV (CH₃CN): λ_{max} (lg ϵ) = 216 nm (4.36), 253 (4.87), 355 (3.94), 391 (3.83).

¹H NMR (300 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 7.34$ (d, $^4J_{1\text{H},3\text{H}} = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 1-H), 7.57 (dd, $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 9.5 \text{ Hz}$, $^4J_{3\text{H},1\text{H}} = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 7.80 (ddd, $^3J_{7\text{H},6\text{H}} = 8.5 \text{ Hz}$, $^3J_{7\text{H},8\text{H}} = 6.5 \text{ Hz}$, $^4J_{7\text{H},9\text{H}} = 1.5 \text{ Hz}$ bzw. $^3J_{8\text{H},9\text{H}} = 8.5 \text{ Hz}$, $^3J_{8\text{H},7\text{H}} = 6.5 \text{ Hz}$, $^4J_{8\text{H},6\text{H}} = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, 7-H oder 8-H), teilweise überlagert von 7.87 (ddd, $^3J_{8\text{H},9\text{H}} = 8.5 \text{ Hz}$, $^3J_{8\text{H},7\text{H}} = 6.5 \text{ Hz}$, $^4J_{8\text{H},6\text{H}} = 1.5 \text{ Hz}$ bzw. $^3J_{7\text{H},6\text{H}} = 8.5 \text{ Hz}$, $^3J_{7\text{H},8\text{H}} = 6.5 \text{ Hz}$, $^4J_{7\text{H},9\text{H}} = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, 8-H oder 7-H), 8.10 (d, $^3J_{4\text{H},3\text{H}} = 9.5 \text{ Hz}$, 1H, 4-H), überlagert von 8.11 (dd, $^3J_{6\text{H},7\text{H}} = 8.5 \text{ Hz}$, $^4J_{6\text{H},8\text{H}} = 1.5 \text{ Hz}$ bzw. $^3J_{9\text{H},8\text{H}} = 8.5 \text{ Hz}$, $^4J_{9\text{H},7\text{H}} = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, 6-H oder 9-H), überlagert von 8.15 (dd, $^3J_{9\text{H},8\text{H}} = 8.5 \text{ Hz}$, $^4J_{9\text{H},7\text{H}} = 1.5 \text{ Hz}$, bzw. $^3J_{6\text{H},7\text{H}} = 8.5 \text{ Hz}$, $^4J_{6\text{H},8\text{H}} = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, 9-H oder 6-H), 10.85 (s br, 1H, OH [D₂O]).

^{13}C NMR (50 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta =$ '+' 107.01 (C-1), '+' 126.39 (C-3), '+' 128.47, '+' 128.72, '+' 129.27, '+' 130.45, '+' 130.70 (C-4, C-6, C-7, C-8, C-9), '-' 139.47, '-' 140.90, '-' 142.87, '-' 144.75 (C-4a, C-5a, C-9a, C-10a), '-' 159.50 (C-2).

MS (70 eV): m/z (%) = 196 (100) $[\text{M}^+]$, 168 (5) $[\text{M}^+-2\text{N}]$, 140 (3) $[\text{168}^+-\text{CO}]$, 114 (2), 102 (2), 98 (4), 76 (3), 64 (4), 50 (4).

$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$ (196.21)

Ber.: C 73.45

H 4.11

Gef.: C 73.38

H 4.06

3 Synthese von Phenazinether *rac*-51

3.1 (3*RS*)-(±)-1-Methylsulfonyl-3,7-dimethyl-non-6-en (*rac*-49)^[121]

Es wurden bei 0 °C 156 mg (1.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Citronellol (*rac*-47) in 3 ml trockenem Dichlormethan (P₄O₁₀) gelöst. Nacheinander wurden 111 mg (1.1 mmol, 1.1 Äquiv.) Triethylamin und 126 mg (1.1 mmol, 1.1 Äquiv.) Methansulfonsäurechlorid zugespritzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und nach ca. 15 min. Rühren war alles Substrat umgesetzt (DC Kontrolle: Et₂O/PE = 1 : 3). Man überführte den Ansatz mit 5 ml Dichlormethan in einen Scheidetrichter und extrahierte zweimal mit je 5 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit 5 ml gesättigter Natriumchloridlösung. Man trocknete über Natriumsulfat, filtrierte und entfernte das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i. Vak. Der verbliebene Rückstand wurde an 15 g Kieselgel unter Druck chromatographiert (Et₂O/PE = 1 : 1). Es wurden 210 mg (92 % Ausbeute) des Produkts *rac*-49 als Öl isoliert.

$R_f = 0.47$ (Et₂O/PE = 1 : 1).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 0.92 (d, ³J_{CH₃,3H} = 6.5 Hz, 3H, 3-CH₃), 1.08 - 1.46 (m, 3H, 3-H, 4-H₂), 1.47 - 1.88 (m, 2H, 2-H₂) überlagert von 1.59 (s, 3H, 7-CH₃) und 1.67 (s, 3H, 8-H₃), 1.89 - 2.10 (m 2H, 5-H₂), 2.97 (s, 3H, OSO₂CH₃), 4.26 (t, ³J_{1H₂,2H₂} = 6.5 Hz, 2H, 1-H₂), 5.07 (m, 1H, 6-H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = '+' 17.60 (7-CH₃), '+' 19.10 (3-CH₃), '-' 25.22 (C-5), '+' 25.65 (C-8), '+' 28.91 (C-3), '-' 35.86 (C-4 oder C-2), '-' 36.74 (C-2 oder C-4), '+' 37.26 (OSO₂CH₃), '-' 68.55 (C-1), '+' 124.22 (C-6), '-' 131.48 (C-7).

MS (70 eV): m/z (%) = 234 (4) [M⁺], 138 (42) [M⁺-HOSO₂CH₃], 123 (16) [138⁺-CH₃], 109 (16) [138⁺-C₂H₅], 95 (46) [OSO₂CH₃⁺], 81 (67) [138⁺-C₄H₉], 69 (75) [C₅H₉⁺].

C₁₁H₂₂SO₃ (234.13)

3.2 (3*RS*)-(±)-1-Toluolsulfonyl-3,7-dimethyl-non-6-en (*rac*-48)^[122]

In 5 ml frisch destilliertem Pyridin (KOH) wurden bei 0 °C 312 mg (2.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Citronellol (*rac*-47) gelöst und anschließend 572 mg (3.0 mmol, 1.5 Äquiv.) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid zugegeben. Nach ca. 8 h bei 0 °C wurden 3 ml Wasser zugegeben, einige Minuten gerührt und in 10 ml Dichlormethan aufgenommen. Nach dem Abtrennen der wäßrigen Phase wurde die organische Phase zweimal mit je 5 ml 2 *M* Salzsäure und je einmal mit 5 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und 5 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und dem Evaporieren des Solvens erhielt man ein Öl, das an 20 g Kieselgel aufgereinigt wurde (Eluent: Et₂O/PE = 1 : 10). Es wurden 504 mg (85 % Ausbeute) des Tosylats *rac*-48 erhalten.

$R_f = 0.63$ (Et₂O/PE = 1 : 2).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 0.82 (d, ³J_{CH₃,3H} = 6.5 Hz, 3H, 3-CH₃), 1.00 - 1.80 (m, 5H, 2-H₂, 3-H, 4-H₂) überlagert von 1.57 (s, 3H, 7-CH₃) und 1.68 (s, 3H, 8-H₃), 1.77 - 2.08 (m, 2H, 5-H₂), 2.44 (s, 3H, 4'-CH₃), 4.06 (t, ³J_{1H₂,2H₂} = 6.0 Hz, 2H, 1-H₂), 5.02 (m_C, 1H, 6-H), 7.34 (d, ³J_{3'H,2'H} = ³J_{5'H,6'H} = 8.0 Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.79 (d, ³J_{2'H,3'H} = ³J_{6'H,5'H} = 8.0 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = '+' 17.56 (7-CH₃), '+' 18.97 (3-CH₃), '+' 21.57 (4'-CH₃), '-' 25.20 (C-5), '+' 25.64 (C-8), '+' 28.79 (C-3), '-' 35.59 (C-4 oder C-2), '-' 36.64 (C-2 oder C-4), '-' 69.00 (C-1), '+' 124.25 (C-6), '+' 127.81 (C-3', C-5'), '+' 129.75 (C-2', C-6'), '-' 131.48 (C-7), '-' 133.15 (C-4'), '-' 144.59 (C-1').

MS (200 eV, DCI/NH₃): *m/z* (%) = 638 (30) [2M + NH₄⁺], 328 (100) [M + NH₄⁺].

C₁₇H₂₆SO₃ (310.45)

Ber.: C 65.77 H 8.44

Gef.: C 65.74 H 8.38

3.3 (3*RS*)-(±) 1-Brom-3,7-dimethyl-6-hepten (*rac-50*)^[73]

Zu einer gerührten Lösung von 8.81 g (50.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Citronellol (*rac-47*) und 20.75 g (62.5 mmol, 1.25 Äquiv.) Tetrabromkohlenstoff in 80 ml trockenem Dichlormethan (P_4O_{10}) wurden bei 0 °C 19.6 g (75 mmol, 1.50 Äquiv.) Triphenylphosphin während 5 min hinzugefügt. Nach 15 min war die Reaktion laut dünnschichtchromatographischer Analyse der Reaktionsmischung beendet ($\text{Et}_2\text{O/PE} = 1 : 1$). Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i. Vak. entfernt und der Rückstand in 70 ml Diethylether aufgenommen und filtriert. Der Feststoff wurde dann dreimal mit je 50 ml Ether gewaschen, die organischen Phasen vereinigt und das Solvens i. Vak. entfernt. Der ölige Rückstand wurde im Kugelrohrföfen (10^{-2} Torr/100 °C) destilliert. Man erhielt 9.38 g (86 % Ausbeute) der Titelverbindung *rac-50* als klares Öl.

$R_f = 0.43$ ($\text{Et}_2\text{O/PE} = 1 : 2$).

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.88$ (d, $^3J_{\text{CH}_3,3\text{H}} = 6.5$ Hz, 3H, 3- CH_3), 1.05 - 1.45 (m, 3H, 3-H, 4- H_2), 1.59 (s, 3H, 7- CH_3) und 1.67 (s, 3H, 8- H_3) überlagert von 1.55 - 2.05 (m, 4H, 2- H_2 , 5- H_2), 3.39 (ddd, $^2J_{1\text{H}_\text{B},1\text{H}_\text{A}} = 15.0$ Hz, $^3J_{1\text{H}_\text{B},2\text{H}_\text{A}} = 10.0$ Hz, $^3J_{1\text{H}_\text{B},2\text{H}_\text{B}} = 7.0$ Hz, 1H, 1- H_B) teilweise überlagert von 3.43 (ddd, $^2J_{1\text{H}_\text{A},1\text{H}_\text{B}} = 15.0$ Hz, $^3J_{1\text{H}_\text{A},2\text{H}_\text{A}} = 9.5$ Hz, $^3J_{1\text{H}_\text{A},2\text{H}_\text{B}} = 5.0$ Hz, 1H, 1- H_A), 5.07 (m, 1H, 6-H).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): $\delta =$ '+' 17.65 (7- CH_3), '+' 18.84 (3- CH_3), '-' 25.32 (C-5), '+' 25.69 (C-8), '+' 31.36 (C-3), '-' 32.06 (C-4 oder C-2), '-' 36.55 (C-2 oder C-4), '-' 39.99 (C-1), '+' 124.42 (C-6), '-' 131.46 (C-7).

$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{Br}$ (219.60)

3.4 (3'*RS*)-(±) 2-(3,7-Dimethyl-oct-6-enyloxy)-phenazin (*rac-51*)

Variante A

Es wurden 196 mg (1.0 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-Hydroxyphenazin (**2**) bei Raumtemperatur in 5 ml trockenem Dimethylformamid (CaH₂) gelöst und mit 691 mg (5.0 mmol, 5.0 Äquiv.) wasserfreiem, fein gemörsertem Kaliumcarbonat versetzt und gerührt. Nach ca. 10 min spritzte man 220 mg (0.94 mmol, 0.94 Äquiv.) des Mesylats *rac-49* zu und erhitzte die Mischung auf 100 °C bis zur Beendigung des Umsatzes (DC-Kontrolle: Et₂O/PE = 1 : 1). Nach dem Abkühlen verdünnte man mit 20 ml Dichlormethan und schüttelte einmal mit 10 ml Wasser aus. Die wässrige Phase wurde abgetrennt, mit Natriumchlorid gesättigt und zweimal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert. Abschließend wurden die organischen Phasen vereinigt und zweimal mit je 10 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Entfernen des Solvens am Rotationsverdampfer i. Vak. ergab das Rohprodukt, das an 40 g Kieselgel unter Druck chromatographiert wurde. Es wurden 284 mg (85 % Ausbeute) Produkt *rac-51* als gelbes Öl isoliert.

Variante B

Man mischte 19.6 mg (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-Hydroxyphenazin (**2**) mit 5.6 mg (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) fein gemörsertem Kaliumhydroxid und 6 mg Aliquat 336. Nach 10 min Rühren

bei Raumtemperatur fügte man 23.4 mg Mesylat *rac*-**49** als Lösung in 2 ml Tetrahydrofuran hinzu und erhitzte unter Sieden am Rückfluß. Nach etwa 10 h war die Reaktion beendet (DC Kontrolle: Et₂O/PE = 1 : 1), die Reaktionsmischung wurde in 10 ml Diethylether aufgenommen und zweimal mit je 5 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Solvens entfernt. Das Rohprodukt wurde auf 200 mg Kieselgel aufgezogen und an 4 g Kieselgel chromatographisch gereinigt (Et₂O/PE = 1 : 3). Es wurden 32 mg des Produkts *rac*-**51** (96 % Ausbeute) als gelbes Öl isoliert.

R_f = 0.45 (Et₂O/PE = 1 : 2).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3060, 3028 cm⁻¹ (=C-H), 2959, 2925, 2872, 2855 (CH₂, CH₃), 1632, 1605, 1560, 1518 (C=C), 1483, 1473, 1445, 1390, 1380, (CH₂, CH₃), 1289, 1197 (C-O), 828, 757 (C=C, arom.).

UV (MeOH): $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) 216 nm = (3.40), 256 (3.91), 359 (2.97), 391 (2.90).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 1.00 (d, ³J_{CH₃,3H} = 6.0 Hz, 3H, 3'-CH₃), 1.15 - 1.55 (m, 3H, 3'-H, 4'-H₂), 1.61 (s, 3H, 7'-CH₃) und 1.68 (s, 3H, 8'-H₃) überlagert von 1.56 - 2.15 (m, 4H, 2'-H₂, 5'-H₂), 4.21 (t, ³J_{1'H₂,2'H_A} = ³J_{1'H₂,2'H_B} = 6.0 Hz, 2H, 1'-H₂), 5.11 (t, ³J_{6'H,5'H_A} = ³J_{6'H,5'H_B} = 7.0 Hz, 1H, 6'-H), 7.40 (d, ⁴J_{1H,3H} = 3.0 Hz, 1H, 1-H), 7.49 (dd, ³J_{3H,4H} = 10.0 Hz, ⁴J_{3H,1H} = 3.0 Hz, 1H, 3-H), 7.78 (m_C, 2H, 7-H, 8-H), 8.09 (d, ³J_{4H,3H} = 10.0 Hz, 1H, 4-H), 8.16 - 8.30 (m, 2H, 6-H, 9-H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = '+' 17.65 (7'-CH₃), '+' 19.49 (3'-CH₃), '-' 25.38 (C-5'), '+' 25.69 (C-8'), '+' 29.56 (C-3'), '-' 35.66 (C-4' oder C-2'), '-' 37.03 (C-2' oder C-4'), '-' 67.04 (C-1'), '+' 104.82 (C-1), '+' 124.46 (C-6'), '+' 126.67 (C-3), '+' 128.75, '+' 128.81, '+' 129.53, '+' 130.26 (C-6, C-7, C-8, C-9), '+' 130.38 (C-4), '-' 131.32 (C-7'), '-' 140.60, '-' 141.73, '-' 143.19, '-' 145.03 (C-4a, C-5a, C-9a, C-10a), '-' 160.63 (C-2).

MS (70 eV): m/z (%) = 334 (86) [M⁺], 265 (5) [M⁺-C₅H₉], 251 (5) [M⁺-C₆H₁₁], 209 (8) [C₁₃H₉N₂O⁺], 196 (100) [C₁₂H₈N₂O⁺], 168 (5) [196-CO], 69 (24) [C₅H₉⁺].

C₂₂H₂₆N₂O (334.21)

Ber.: C 78.99 H 7.84

Gef.: C 79.19 H 8.03

4 Synthese des C₆-Bausteins *rac*-6

4.1 (3*RS*)-($\pm$)-5-*tert*.-Butyldimethylsilyloxy-3-methyl-pentan-1-ol (*rac*-52)^[75]

Durch Waschen mit Hexan wurden 3.35 g 60 proz. Natriumhydrid (2.02 g, 84 mmol, 1.0 Äquiv.) vom Mineralöl befreit und in 110 ml Tetrahydrofuran (K) suspendiert. Durch ein Septum wurden 10.20 ml (9.93 g, 84 mmol, 1.0 Äquiv.) 3-Methyl-1,5-pentandiol (**8**) zugespritzt und 60 min bei Raumtemperatur gerührt, währenddessen sich große Mengen eines weißen Niederschlags bildeten. Nun gab man 12.66 g (84 mmol, 1.0 Äquiv.) *tert.*-Butyldimethylchlorsilan zur Reaktionsmischung und rührte kräftig für weitere 60 min bei Raumtemperatur. Der Ansatz wurde anschließend in 300 ml Diethylether aufgenommen und je einmal mit 300 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 200 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. am Rotationsverdampfer entfernt. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt an 500 g Kieselgel chromatographiert (Et₂O/PE = 1 : 10 → 1 : 2). Es wurden 16.20 g (83 % Ausbeute) der Titelverbindung *rac*-**52** als klares Öl isoliert.

$$R_f = 0.79 \text{ (Et}_2\text{O/PE} = 1 : 1).$$

¹H NMR (200 MHz, C₆D₆): δ = 0.17 [s, 6H, Si(CH₃)₂], 0.93 (d, ³J_{CH₃,CH} = 6.5 Hz, 3H, CH₃), 0.97 (s br, 1H, OH), 1.08 [s, 9H, SiC(CH₃)₃], 1.18 - 1.95 (m, 5H, 2-H₂, 3-H, 4 H₂), 3.42 (m_C, 2H, 1-H₂) 3.57 (m_C, 2H, 5-H₂).

¹³C NMR (50 MHz, C₆D₆): δ = '+' -5.17 und '+' -5.14 [Si(CH₃)₃], '-' 18.51 [Si-C(CH₃)₃], '+' 19.99 (CH₃), '+' 26.17 [Si-C(CH₃)₃], '+' 26.67 (CH), '-' 40.22 (C-2 und C-4), '-' 60.73 (C-5), '-' 61.42 (C-1).

MS (200 eV, DCI/NH₃): m/z (%) = 250 (100) [M + NH₄⁺], 233 (92) [M + H⁺].

C₁₂H₂₈SiO₂ (232.44)

4.2 (3*RS*)-(±)-*tert*.-Butyl-(5-iodo-3-methyl-pentyloxy)-dimethylsilan (*rac*-6)

Man löste in 25 ml Dichlormethan 1.16 g (5 mmol, 1.0 Äquiv.) des Alkohols *rac*-**52** sowie 5 ml (3.36 g, 36 mmol, 7.2 Äquiv.) frisch destilliertes Triethylamin und kühlte auf 0 °C ab. Nach Zugabe von 630 mg (5.5 mmol, 1.1 Äquiv.) Methansulfonsäurechlorid rührte man noch ca. 2 h bei 0 °C, bis das Substrat vollständig umgesetzt war (DC Kontrolle: Et₂O/PE = 2 : 1). Zur Aufarbeitung gab man die Reaktionsmischung in 25 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung, trennte die organische Phase ab und extrahierte die wäßrige Phase noch dreimal mit je 20 ml Dichlormethan. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Solvens i. Vak. entfernt. Das rohe Mesylat wurde in 40 ml Aceton (K₂CO₃) gelöst, dann fügte man 1.05 g (7.0 mmol, 1.4 Äquiv.) Natriumiodid zu und erhitzte unter Sieden zum Rückfluß. Nach etwa 4 h war die Reaktion beendet (DC Kontrolle: Et₂O/PE = 1 : 2) und die abgekühlte Lösung wurde in 30 ml Wasser aufgenommen. Die Reaktionsmischung wurde nun viermal mit je 30 ml Diethylether extrahiert und die vereinigen organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Abfiltrieren vom Trockenmittel und Evaporieren des Lösungsmittels i. Vak. ergaben das Rohprodukt, das an 150 g Kieselgel chromatographisch gereinigt wurde (Et₂O/PE = 1 : 5). Es wurden 1.60 g des Iodids *rac*-**6** (93 % Ausbeute) als klares Öl isoliert.

$R_f = 0.66$ (Et₂O/PE = 1 : 2).

IR (Film): $\tilde{\nu} = 2955, 2928, 2885, 2857\text{ cm}^{-1}$ (C-H), 1471, 1462, (CH₂, CH₃), 1255 (C-OSi), 1098, 836 (Si-OC), 775 (OSi-CH₃), 740 (C-SiCH₃).

UV (CH₃CN): λ_{max} (lg ϵ) = 193 nm (3.84), 253 (2.72).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.03$ [s, 6H, Si(CH₃)₂], 0.87 [s, 9H, SiC(CH₃)₃], überlagert von 0.87 (d, ³J_{CH₃,3H} = 6.0 Hz, 3H, CH₃), 1.34 (m_C, 1H, CH), 1.46 - 1.60 (m, 1H, 2-H_A bzw. 4-H_A), 1.60 - 1.66 (m, 2H, 2-H_B, 4-H_B), 1.80 - 1.97 (m, 1H, 4-H_A bzw. 2-H_A), 3.09 - 3.28 (m, 2H, 1-H₂), 3.63 (m_C, 2H, 5-H₂).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = '+' -5.29 und '+' -5.26 (Si(CH₃)₂), '-' 4.91 (C-5), '-' 18.30 (Si-C(CH₃)₃), '+' 18.75 (CH₃), '+' 25.95 (Si-C(CH₃)₃), '+' 30.83 (CH), '-' 39.06 (C-4 oder C-2), '-' 41.03 (C-2 oder C-4), '-' 60.92 (C-1).

MS (200 eV, DCI/NH₃): *m/z* (%) = 377 (12) [M + NH₃ + NH₄⁺], 360 (100) [M + NH₄⁺], 343 (18) [M + H⁺].

C₁₂H₂₇SiOI (342.09)

Ber.: C 42.09 H 7.95

Gef.: C 42.38 H 7.76

4.3 (3*RS*)-(±)-(5-Bromo-3-methyl-pentyloxy)-*tert*.-butyl-dimethylsilan (*rac*-53)

Man löste in 5 ml Dichlormethan 232 mg (1.0 mmol, 1.0 Äquiv.) des Alkohols *rac*-52, sowie 1.0 ml (672 mg, 6.2 mmol, 6.2 Äquiv.) frisch destilliertes Triethylamin und kühlte auf 0 °C ab. Nach Zugabe von 126 mg (1.1 mmol, 1.1 Äquiv.) Methansulfonsäurechlorid rührte man noch etwa 1 h bei 0 °C, bis das Substrat vollständig umgesetzt war (DC Kontrolle: Et₂O/PE = 2 : 1). Zur Aufarbeitung gab man die Reaktionsmischung in 5 ml Wasser, trennte die organische Phase ab und extrahierte die wäßrige Phase noch dreimal mit je 5 ml Dichlormethan. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Solvens i. Vak. am Rotationsverdampfer entfernt. Das rohe Mesylat wurde dann in 10 ml Tetrahydrofuran (K) gelöst, mit 120 mg (1.38 mmol, 1.38 Äquiv.) Lithiumbromid versetzt und unter Sieden am Rückfluß zur Reaktion gebracht. Nach ca. 6 h war das Mesylat umgesetzt (DC Kontrolle: Et₂O/PE = 1 : 2) und die abgekühlte Lösung wurde in 5 ml Wasser aufgenommen. Die Reaktionsmischung wurde nun viermal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Abfiltrieren vom Trockenmittel und Evaporieren des Lösungsmittels i. Vak. ergaben das Rohprodukt, das an 30 g Kieselgel unter Druck chromatographisch gereinigt wurde (Et₂O/PE = 1 : 5). Es wurden 208 mg des Bromids *rac*-53 (65 % Ausbeute) als klares Öl isoliert.

R_f = 0.78 (Et₂O/PE = 1 : 2).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ = 2956, 2929, 2895, 2857 cm⁻¹ (C-H), 1471, 1463, (CH₂, CH₃), 1255 (C-OSi), 1098, 836 (Si-OC), 775 (OSi-CH₃), 740 (C-SiCH₃), 647 (C-Br).

UV (CH₃CN): Die Verbindung *rac*-**53** zeigt im Wellenlängenbereich λ = 195 bis 400 nm keine UV-Absorption.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.03 [s, 6H, Si(CH₃)₂], 0.87 [s, 9H, SiC(CH₃)₃], überlagert von 0.89 (d, ³J_{CH₃,3H} = 6.5 Hz, 3H, CH₃), 1.20 -2.00 (m, 5H, 2-H₂, 3-H, 4-H₂), 3.42 (m_C, 2H, 5-H₂), 3.63 (m_C, 2H, 1-H₂).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = '+' -5.30 und '+' -5.27 [Si(CH₃)₂], '-' 18.31 [Si-C(CH₃)₃], '+' 19.01 (CH₃), '+' 25.96 [Si-C(CH₃)₃], '+' 28.63 (CH), '-' 31.90 (C-5), '-' 39.29 (C-4 oder C-2), '-' 40.10 (C-2 oder C-4), '-' 60.95 (C-1).

MS (70 eV): m/z (%) = 295 (22) [M⁺], 239 (2) [M⁺ - C₄H₈], 167 (10) [C₆H₁₄Br⁺], 139 (22) [C₄H₁₀Br⁺], 115 (10) [C₆H₁₅Si], 73 (56) [C₄H₉O⁺], 55 (100) [C₄H₇⁺], 41 (32) [C₃H₅⁺].

C₁₂H₂₇SiOBr (295.34)

Ber.: C 48.96 H 9.25

Gef.: C 48.68 H 9.02

5 Synthese der C₆-Bausteine (R)-6 und (S)-12

5.1 (4R)-(+)-4-Methyl-tetrahydro-pyran-2-on [(R)-12]^[88]

5.23 g Halbester (R)-11 (30.0 mmol, 1.0 Äquiv.) wurden in 40 ml trockenem Tetrahydrofuran (K) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nun wurden vorsichtig 21 ml einer Lösung von 2 M Boran Dimethylsulfid-Komplex in Tetrahydrofuran (42.0 mmol, 1.4 Äquiv.) zugetropft. Anschließend wurde 30 min bei 0 °C und danach 36 h bei Raumtemperatur gerührt. Nun wurden unter Eiskühlung 15 ml Wasser zugegeben und ca. 20 min gerührt, bis die Wasserstoffentwicklung abgeklungen war. Die Reaktionsmischung wurde am Rotationsverdampfer i. Vak. von Flüchtigem befreit und der verbliebene weiße Rückstand mit 20 ml einer 2 M wässrigen Kaliumhydroxidlösung versetzt. Durch Zufügen von 5 - 10 ml Methanol homogenisierte man die Reaktionsmischung und rührte sie 12 h bei Raumtemperatur. Zum Abschluß säuerte man den Ansatz mit 10 ml einer 6 M Salzsäurelösung an, sättigte die wässrige Phase mit Natriumchlorid und extrahierte viermal mit je 70 ml Diethylether. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i. Vak. entfernt. Das verbliebene Rohprodukt wurde bei 70 °C im Kugelrohrföfen (10⁻² Torr) destilliert. Es wurden 3.15 g (92 % Ausbeute) des Lactons (R)-12 als klares Öl isoliert. Der spezifische Drehwinkel von $[\alpha]_D^{20} = 27.0^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl₃) entspricht, verglichen mit den Werten von Rossi^[88], einem Enantiomerenüberschuß von ee = 98 % {Lit. $[\alpha]_D^{27} = 27.61^\circ$ ($c = 5.716$ in CHCl₃)}.

$[\alpha]_D^{20} = 27.0^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl₃), {Lit.^[88] $[\alpha]_D^{27} = 27.61^\circ$ ($c = 5.716$ in CHCl₃)}.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) : $\delta = 1.04$ (d, ³J_{CH₃,CH} = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.50 (m_C, 1H, CH), 1.81 - 2.22 (m, 3H, 3-H_A, 5-H₂), 2.65 (ddd, ²J_{3H_B,3H_A} = 21.0 Hz, ³J_{3H_B,4H} = 10.5 Hz, ⁴J_{3H_B,5H_A} bzw. ⁴J_{3H_B,5H_B} = 2.0 Hz, 1H, 3-H_B), 4.23 (dt, ²J_{6H_A,6H_B} = ³J_{6H_A,5H_A} = 11.0 Hz, ³J_{6H_A,5H_B} = 3.5 Hz, 1H, 6-H_A), 4.40 (ddd, ²J_{6H_B,6H_A} = 11.0 Hz, ³J_{6H_B,5H_A} = 5.0 Hz, ³J_{6H_B,5H_B} = 3.5 Hz, 1H, 6-H_B).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) : δ = '+' 21.68 (4-CH₃), '+' 26.78 (C-4), '-' 30.84 (C-5), '-' 38.45 (C-3), '-' 68.84 (C-6), '-' 171.52 (C=O).

MS (70 eV): *m/z* (%) = 114 (35) [M⁺], 84 (4) [M⁺ - CH₂O], 70 (30) [M⁺ - CO₂], 69 (13) [C₄H₅O⁺], 55 (100) [C₃H₃O⁺], 43 (10) [C₃H₇⁺], 42 (73) [C₂H₂O⁺].

C₆H₁₀O₄ (114.14)

5.2 (3R)-(+)-5-Hydroxy-3-methyl-1-piperidin-1-yl-pentan-1-on [(R)-56]

2.8 g Lacton (25.0 mmol, 1.0 Äquiv.) (R)-12 wurden mit 17 g (200 mmol, 8.0 Äquiv.) frisch destilliertem Piperidin (CaH₂) versetzt und in einem Druckkolben unter Rühren für 12 h auf 70°C erhitzt. Abschließend ließ man abkühlen und entfernte das überschüssige Piperidin i. Vak. am Rotationsverdampfer. Das erhaltene Rohprodukt konnte ohne weitere Aufreinigung für die nächste Syntheseoperation eingesetzt werden. Analysenreine Substanz erhielt man durch Chromatographie des rohen Piperidids an Kieselgel mit Aceton als Laufmittel. Geringe Mengen dabei sich lösenden Kieselgels ließen sich durch abschließende Filtration über Celite einfach entfernen. Nach der Aufreinigung des Rohprodukts erhielt man 4.79 g (98 % Ausbeute) Piperidid (R)-56 als farbloses Öl.

R_f = 0.2 (EE/PE = 20 : 1).

[α]_D²⁰ = 9.4° (*c* = 0.8 in CHCl₃), {Lit.^[115] **[α]_D²⁰** = 7.9° (*c* = 3 in CHCl₃)}.

IR (Film): $\tilde{\nu}$ = 3406 cm⁻¹ (O-H), 2933, 2857 (C-H), 1620 (Amid), 1444, 1369, (CH₂, CH₃), 1059, 1020 (C-O).

UV (CH₃CN): λ_{max} (lg ε) = 205 nm (3.92).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 0.95 (d, ³J_{CH₃,CH} = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.32 - 1.70 (m, 8H, 2'-H₂, 3'-H₂, 4'-H₂, 3-H, 4-H_B), 2.07 - 2.39 (m, 3H, 2-H₂, 4-H_A), 3.16 (s br, 1H, OH); 3.37 (t br, ³J_{1'-H₂,2'-H₂} = 5.1 Hz, 2H, 1'-H₂ bzw. 5'-H₂), 3.51 (t br, ³J_{5'-H₂,4'-H₂} = 5.0 Hz, 2H, 5'-H₂ bzw. 1'-H₂), 3.57 (t, ³J_{5H₂,4H₂} = 6.0 Hz, 2H, 5-H₂).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = '+' 21.04 (CH₃), '-' 24.43, '-' 25.54, '-' 26.44 (C-2', C-3', C-4'), '+' 26.48 (CH), '-' 40.06 (C-2 und C-4), '-' 42.82 (C-1'), '-' 46,75 (C-5'), '-' 60.13 (C-5), '-' 171.16 (C-1).

MS (70 eV): *m/z* (%) = 199 (15) [M⁺], 181 (17) [M⁺ – H₂O], 168 (10) [M⁺ – CH₃O], 154 (42) [M⁺ – C₂H₅O], 127 (100) [C₇H₁₃NO⁺], 112 (68) [C₆H₁₀NO⁺], 99 (6) [127 – CO], 84 (56) [C₅H₁₀N⁺], 71 (6) [C₄H₇O⁺], 69 (30) [C₅H₉⁺], 56 (10) [C₃H₆N⁺], 41 (23) [C₃H₅⁺].

C₁₁H₂₁NO₂ (199.29)	Ber.: C 66.29	H 10.62
	Gef.: C 66.47	H 10.87

5.3 (3R)-(-)-5-*tert*.-Butyldimethylsilyloxy-3-methyl-1-piperidin-yl-pentan-1-on [(R)-57]

Es wurden 4.50 g (22.5 mmol, 1.0 Äquiv.) des Piperidids (R)-56 in 40 ml Dichlormethan gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur fügte man zunächst 3.73 g (24.8 mmol, 1.1 Äquiv.) *tert*.-Butyldimethylchlorsilan und dann tropfenweise 4.05 ml (2.96 g, 29.3 mmol, 1.5 Äquiv.) frisch destilliertes Triethylamin zu. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und der Fortgang der Reaktion mittels dünnschichtchromatographischer Analyse verfolgt (EE/PE = 5 : 1). Nach annähernd 4 h war das Substrat vollständig verbraucht. Zur Aufarbeitung verdünnte man den Ansatz mit 50 ml Dichlormethan, wusch einmal mit 20 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und trocknete die organische Phase über Natriumsulfat. Abfiltrieren des Trockenmittels und Entfernen des Solvens i. Vak. ergaben 7.58 g Rohprodukt, das an 450 g Kieselgel chromatographiert wurde (Et₂O/PE = 1 : 5 → Et₂O). Man isolierte 6.95 g (98 % Ausbeute) der gewünschten Verbindung (R)-57 als klares Öl.

R_f = 0.60 (EE/PE = 5 : 1).

$[\alpha]_D^{20} = -1.5^\circ$ (*c* = 1.0 in CHCl₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ = 2931 cm⁻¹, 2856 (CH₂,CH₃), 1646 (Amid), 1462, 1433 (CH₂, CH₃), 1254, 1095 (C-O).

UV (CH₃CN): $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) = 205 nm (3.91).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 0.00 [s, 6H, Si(CH₃)₂], 0.85 [s, 9H, SiC(CH₃)₃], 0.93 (d, ³J_{CH₃,CH} = 6.5 Hz, 3H, CH₃), 1.29 - 1.70 (m, 8H, 2'-H₂, 3'-H₂, 4'-H₂, 3-H, 4-H_B), 2.08 (dt, ²J_{4H_A,4H_B} = 13.0 Hz, ³J_{4H_A,5H_A} = ³J_{4H_A,5H_B} = 6.0 Hz, 1H, 4-H_A) überlagert von 2.08 (dd, ²J_{2H_A,2H_B} = 17.5 Hz, ³J_{2H_A,3H} = 9.0 Hz, 1H, 2-H_A), 2.37 (dd, ²J_{2H_B,2H_A} = 17.5 Hz, ³J_{2H_B,3H} = 9.0 Hz, 1H, 2-H_B), 3.36 (t br, ³J_{1'-H₂,2'-H₂} = 5.0 Hz, 2H, 1'-H₂ bzw. 5'-H₂), 3.51 (t br, ³J_{5'-H₂,4'-H₂} = 5.0 Hz, 2H, 5'-H₂ bzw. 1'-H₂), 3.63 (t, ³J_{5H_B,4H_A} = ³J_{5H_B,4H_B} = 6.0 Hz, 1H, 5-H_B), 3.64 (t, ³J_{5H_A,4H_A} = ³J_{5H_A,4H_B} = 6.0 Hz, 1H, 5-H_A).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = '+' -5.35 [Si(CH₃)₂], '-' 18.25 [SiC(CH₃)₃], '+' 19.93 (CH₃), '-' 24.85, '-' 25.65, '-' 26.62 (C-2', C-3', C-4'), '+' 25.91 [SiC(CH₃)₃], '+' 27.39 (CH), '-' 39.83 (C-2 oder C-4), '-' 40.88 (C-4 oder C-2), '-' 42.57 (C-1'), '-' 46.90 (C-5'), '-' 61.12 (C-5), '-' 170.68 (C-1).

MS (70 eV): m/z (%) = 313 (26) [M⁺], 298 (3) [M⁺-CH₃], 256 (100) [M⁺-*tert*-Butyl], 182 (4) [M⁺-TBDMSO], 154 (3) [C₉H₁₆NO⁺], 142 (4) [256-C₅H₁₀SiO], 127 (3) [C₇H₁₃NO⁺], 112 (2) [C₆H₁₀NO⁺], 84 (4) [C₅H₁₀N⁺], 73 (7) [C₂H₅SiO⁺], 41 (6) [C₃H₅⁺].

C₁₇H₃₅NO₂Si (313.56)

Ber.: C 65.12 H 11.25

Gef.: C 65.27 H 11.18

5.4 (3S)-(+)-5-*tert*-Butyldimethylsilyoxy-3-methyl-pentan-1-ol [(S)-52]

In einem Dreihalskolben wurden 46.5 ml (46.5 mmol, 2.5 Äquiv.) einer 1 M Lösung von LiBH(C₂H₅)₃ (Superhydride[®]) auf 0 °C abgekühlt. Dann wurden 5.86 g (18.7 mmol, 1.0 Äquiv.) des Substrats (R)-57 in 30 ml Tetrahydrofuran (K) unter kräftigem Rühren, mit Hilfe eines Tropftrichters eingetropft. Nach 1 h bei 0 °C ließ man die Reaktionsmischung auf

Raumtemperatur auftauen und rührte etwa 1 h, bis laut dünnschichtchromatographischer Analyse (EE/PE = 1 : 3) das Amid vollständig reduziert war. Dann wurde bei 0 °C die Reaktion durch Zugabe von 30 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung gequenchet und die Reaktionsmischung anschließend mit 100 ml Dichlormethan in einen Scheidetrichter übergeführt. Nach dem Abtrennen der organischen Phase sättigte man die wässrige Phase mit Natriumsulfat und extrahiert diese noch dreimal mit je 100 ml Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer i. Vak. eingeeengt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch Chromatographie an 500 g Kieselgel. Als Laufmittel diente ein Gemisch von Et₂O/PE = 1 : 3. Es wurden 4.00 g (92 % Ausbeute) der gewünschten Verbindung (S)-52 erhalten.

$R_f = 0.43$ (EE/PE = 1 : 3).

$[\alpha]_D^{20} = 2.3^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl₃).

IR (Film): $\tilde{\nu} = 3353$ cm⁻¹ (OH), 2955, 2929, 2885, 2858 (CH₂, CH₃), 1471, 1462 (CH₂, CH₃), 1255 (C-OSi), 1096 (C-O), 836 (Si-OC), 775 (C-SiCH₃).

UV (CH₃CN): Die Verbindung (S)-52 zeigt im Wellenlängenbereich von 195 bis 400 nm keine UV-Absorption.

¹H NMR (300 MHz, C₆D₆): $\delta = 0.17$ [s, 6H, Si(CH₃)₂], 0.93 (s br, 1H, OH), teilweise überlagert von 0.94 (d, $^3J_{\text{CH}_3, \text{CH}} = 6.5$ Hz, 3H, CH₃), 1.09 [s, 9H, SiC(CH₃)], 1.26 - 1.47 (m, 2H, 3-H, 2-H_B), 1.55 (dq, $^2J_{4\text{H}_B, 4\text{H}_A} = 14.0$ Hz, $^3J_{4\text{H}_B, 3\text{H}} = ^3J_{4\text{H}_B, 5\text{H}_2} = 7.0$ Hz, 1H, 4-H_B), 1.65 (dtd, $^2J_{4\text{H}_A, 4\text{H}_B} = 14.0$ Hz, $^3J_{4\text{H}_A, 3\text{H}} = ^3J_{4\text{H}_A, 5\text{H}_A} = 7.0$ Hz, $^3J_{4\text{H}_A, 5\text{H}_B} = 6.0$ Hz bzw. $^2J_{4\text{H}_A, 4\text{H}_B} = 14.0$ Hz, $^3J_{4\text{H}_A, 5\text{H}_2} = 7.0$ Hz, $^3J_{4\text{H}_A, 3\text{H}} = 6.0$ Hz, 1H, 4-H_A), 1.84 (ddt, $^2J_{2\text{H}_A, 2\text{H}_B} = 20.5$ Hz, $^3J_{2\text{H}_A, 1\text{H}_A} = 14.0$ Hz, $^3J_{2\text{H}_A, 1\text{H}_B} = 6.5$ Hz, 1H, 2-H_A), 3.45 - 3.60 (m schwach aufgelöst, 2H, 1-H₂ bzw. 5-H₂), 3.68 (m_C, 2H, 5-H₂ bzw. 1-H₂).

¹³C NMR (50 MHz, C₆D₆): $\delta = \text{'+' } -5.51$ und $\text{'+' } -5.49$ [Si(CH₃)₂], $\text{'-' } 18.16$ [SiC(CH₃)₃], $\text{'+' } 19.65$ (CH₃), $\text{'+' } 25.84$ [SiC(CH₃)₃], $\text{'+' } 26.34$ (CH), $\text{'-' } 39.90$ (C-2 und C-4), $\text{'-' } 60.40$ (C-1), $\text{'-' } 61.09$ (C-5).

MS (200 eV, DCI/NH₃): m/z (%) = 482 (5) [2M + NH₄⁺], 250 (100) [M + NH₄⁺], 233 (40) [M+H⁺].

C₁₂H₂₈SiO₂ (232.44)

5.5 (3R)-(-)-tert.-Butyl-(5-iodo-3-methyl-pentyloxy)-dimethyl-silan [(R)-6]

Es wurden 232 mg (1.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Alkohol (S)-52 in 5 ml trockenem Tetrahydrofuran (K) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Dann versetzte man die kalte Lösung mit 126 mg (1.1 mmol, 1.1 Äquiv.) Methansulfonsäurechlorid und 194 µl (142 mg, 1.3 mmol, 1.3 Äquiv.) frisch destilliertem Triethylamin. Nach 15 min bei 0 °C war die Reaktion beendet (DC Kontrolle: Et₂O/PE = 1 : 2). Man nahm die Reaktionsmischung in 10 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf und extrahierte viermal mit je 10 ml Diethylether. Die getrockneten organischen Phasen wurden filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. am Rotationsverdampfer entfernt. Das rohe Mesylat wurde ohne Aufreinigung in 20 ml Tetrahydrofuran gelöst, auf 0 °C abgekühlt, mit 161 mg (1.2 mmol, 1.2 Äquiv.) wasserfreiem Lithiumiodid versetzt und unter Sieden am Rückfluß erhitzt. Nach ca. 2 h hatte das Mesylat vollständig abgereagert (DC Kontrolle: Et₂O/PE = 1 : 2). Die erkaltete Reaktionslösung wurde in 20 ml Wasser aufgenommen und viermal mit je 20 ml Diethylether extrahiert und die organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und i. Vak. am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Zur Reinigung wurde das rohe Iodid an 20 g Kieselgel chromatographiert (Et₂O/PE = 1 : 100). Es wurden 318 mg der Titelverbindung (R)-6 als Öl isoliert. Die Ausbeute betrug 93 %.

$[\alpha]_D^{20} = -11.0^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl₃).

¹H NMR (200 MHz, C₆D₆): $\delta = 0.15$, [s, 6H, Si(CH₃)₂], 0.73 (d, ³J_{CH₃,3H} = 6.5 Hz, 3H, 3-CH₃), 1.08 [s, 9H, SiC(CH₃)₃], 1.10 - 1.35 (m, 1H, CH), 1.35 - 1.55 (m, 2H, 2-H₂ oder 4-H₂), 1.55 - 1.85 (m, 2H, 4-H₂ oder 2-H₂), 2.83 ddd, ²J_{5H_B,5H_A} = 15.0 Hz, ³J_{5H_B,5H_A} = 9.5 Hz, ³J_{5H_B,5H_A} = 7.0 Hz, 1H, 5-H_B) überlagert von 2.91 (ddd, ²J_{5H_B,5H_A} = 15.0 Hz, ³J_{5H_B,5H_A} = 9.0 Hz, ³J_{5H_B,5H_A} = 5.5 Hz, 1H, 5-H_B), 3.57 (t, ³J_{1H₂,2H₂} = 6.5 Hz, 2H, 1-H₂).

¹³C NMR (50 MHz, C₆D₆): $\delta =$ '+' -5.24 und '+' -5.20 (Si(CH₃)₂), '-' 4.61 (C-5), '-' 18.42 (SiC(CH₃)₃), '+' 18.54 (CH₃), '+' 26.13 (SiC(CH₃)₃), '+' 30.35 (CH), '-' 39.18 (C-2 oder C-4), '-' 41.07 (C-4 oder C-2), '-' 60.88 (C-1).

C₁₂H₂₇SiOI (342.09)

5.6 Synthese des Lactons (4S)-(-)-4-Methyl-tetrahydro-pyran-2-on [(S)-12]^[90]

In 2 ml trockenem 1,2-Dimethoxyethan (Na) wurden 34 mg (1.5 mmol, 1.5 Äquiv.) 95 proz. Lithiumborhydrid suspendiert. Dazu spritzte man vorsichtig eine Lösung aus 61 µl (48 mg, 1.5 mol, 1.5 Äquiv.) trockenem Methanol (Na) und 174 mg (1.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Halbester (R)-11 in 2 ml 1,2-Dimethoxyethan. Die Lösung wurde 3 h unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, dann auf 0 °C abgekühlt und mit 0.2 ml einer 1 M Salzsäurelösung gequenchet. Die Reaktionsmischung wurde anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt und der Rückstand in 1.0 ml einer 2 M Natriumhydroxidlösung aufgenommen. Nach 8 h Rühren bei Raumtemperatur säuerte man mit 0.4 ml einer 6 M Salzsäurelösung an und extrahierte viermal mit je 10 ml Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Solvens i. Vak. am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde bei 70 °C im Kugelrohrföfen (10⁻² Torr) destilliert. So erhielt man 96 mg (84 % Ausbeute) des Lactons (S)-12 als klares Öl. Der spezifische Drehwinkel von $[\alpha]_D^{20} = -24.0^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl₃) entspricht, verglichen mit den Werten von Nohira,^[91] einem Enantiomerenüberschuß von $ee = 89\%$ {Lit. $[\alpha]_D^{20} = -27.0^\circ$ ($c = 1$ in CHCl₃)}.

$[\alpha]_D^{20} = -24.0^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl₃), {Lit.^[91] $[\alpha]_D^{20} = -27.0^\circ$ ($c = 1$ in CHCl₃)}.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.00$ (d, ³J_{CH₃,CH} = 6.5 Hz, 3H, CH₃), 1.32 - 1.57 (m, 1H, CH), 1.75 - 2.18 (m, 3H, 3-H_B, 5-H₂), 2.61 (ddd, ²J_{3H_A,3H_A} = 21.0 Hz, ³J_{3H_A,3H} = 10.5 Hz, ⁴J_{3H_A,4H_A} bzw. ⁴J_{3H_A,4H_B} = 2.0 Hz, 1H, 3-H_A), 4.20 (dt, ²J_{6H_B,6H_A} = ³J_{6H_B,5H_A} = 11.5 Hz, ³J_{6H_B,5H_B} = 4.0 Hz, 1H, 6-H_B), 4.36 (ddd, ²J_{6H_A,6H_B} = 11.5 Hz, ³J_{6H_A,5H_A} = 5.0 Hz, ³J_{6H_A,5H_B} = 4.0 Hz, 1H, 6-H_A).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): $\delta =$ '+' 21.32 (CH₃), '+' 26.42 (C-4), '-' 30.48 (C-5), '-' 38.09 (C-3), '-' 68.49 (C-6), '-' 171.19 (C=O).

C₆H₁₀O₂ (114.15)

6. Synthese des diastereomerenreinen Vinyliodids 7

6.1 (5*E*,9*E*)-6,10,14-Trimethyl-pentadeca-5,9,13-trien-1-in (9)^[99,100]

In einem ausgeheizten 250 ml Dreihalskolben mit Innenthermometer, 50 ml Tropftrichter und Magnetührkern wurden in einer Argon-Atmosphäre 2.97 g (21.0 mmol, 1.05 Äquiv.) 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin in 20 ml Tetrahydrofuran (K) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Mit einer Spritze fügte man langsam 15.44 ml (21.0 mmol, 1.05 Äquiv.) einer 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan^[113] zu, rührte 30 min bei 0 °C und kühlte dann mit einem Aceton/Trockeneis-Bad auf –78 °C ab. Aus dem Tropftrichter ließ man eine Lösung von 5.25 g (20.0 mmol, 1.0 Äquiv.) (*E,E*)-Farnesylacetone (**10**) in 15 ml Tetrahydrofuran (K) zur Reaktionsmischung tropfen und rührte 1 h bei –78 °C. Dann spritzte man 3.62 g (21.0 mmol, 1.05 Äquiv.) Diethylchlorophosphat zu, entfernte das Kühlbad, ließ den Ansatz auf Raumtemperatur auftauen und rührte bei dieser Temperatur weitere 3 h (Mischung A).

In einem separaten, trockenen 250 ml Dreihalskolben mit Innenthermometer, 100 ml Tropftrichter und Magnetührkern wurden in einer Argon-Atmosphäre 6.36 g (45 mmol, 2.25 Äquiv.) 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin unter Rühren in 30 ml Tetrahydrofuran (K) gelöst, durch Zufügen von 33.10 ml (45 mmol, 2.25 Äquiv.) einer 1.6 M *n*-Butyllithium Lösung in Hexan bei 0 °C deprotoniert und anschließend auf –78 °C abgekühlt (Mischung B).

Zur Vereinigung beider Reaktionsmischungen wurde zunächst Reaktionsmischung A unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit mit Hilfe einer an beiden Enden spitzen Kanüle durch leichten Argon-Überdruck in den 100 ml Tropftrichter von Reaktionsmischung B übergeführt. Dann tropfte man Mischung A während 45 min langsam unter Rühren in die –78 °C kalte Mischung B, entfernte das Kühlbad, ließ den Ansatz auf Raumtemperatur auftauen und 2 - 3 h rühren. Zum Schluß kühlte man auf 0 °C ab und quenchte die Reaktion durch Zugabe von 30 ml Wasser.

Zur Aufarbeitung wurde die organische Phase abgetrennt, die wässrige Phase mit Natriumchlorid gesättigt und dreimal mit je 50 ml Pentan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und je einmal mit 20 ml eiskalter 1 M Salzsäure, 20 ml Wasser und 20 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen ($\text{pH} > 8$). Hierbei entstand nach der Extraktion mit Salzsäure, beim Zufügen von Wasser zur organischen Phase eine Emulsion, die sich jedoch nach Zugabe der gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung auflöste und zwei gut trennbare Phasen ergab. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. am Rotationsverdampfer evaporiert. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt an 400 g Kieselgel chromatographiert ($\text{PE}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 100 : 1$). Es wurden 3.67 g (75 % Ausbeute) des Alkins (**9**) als klares Öl isoliert.

$R_f = 0.31$ ($\text{PE}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 100 : 1$).

IR (Film): $\tilde{\nu} = 3311 \text{ cm}^{-1}$ ($\equiv\text{C-H}$), 2966, 2921, 2854 (CH_2 , CH_3), 2119 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1667 ($\text{C}=\text{C}$), 1445, 1382 (CH_2 , CH_3), 836 ($=\text{C-H}$), 630 ($\equiv\text{C-H}$).

UV (CH_3CN): Die Verbindung **9** zeigt im Wellenlängenbereich von $\lambda = 190 - 400 \text{ nm}$ keine UV-Absorption.

^1H NMR (300 MHz, C_6D_6): $\delta = 1.48$ (s, 3H, 14- CH_3), 1.55 (s, 3H, 6- CH_3 bzw. 10- CH_3), 1.57 (s, 3H, 10- CH_3 bzw. 6- CH_3), 1.66 (d, $^4J_{15\text{H},13\text{H}} = 1.0 \text{ Hz}$, 3H, 15- H_3), 1.77 (t, $^4J_{1\text{H},3\text{H}_\text{A}} = ^4J_{1\text{H},3\text{H}_\text{B}} = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 1-H), 1.96 - 2.22 (m, 12H, 3- H_2 , 4- H_2 , 7- H_2 , 8- H_2 , 11- H_2 , 12- H_2), 5.16 - 5.28 (m, 3H, 5-H, 9-H, 13-H).

^{13}C NMR (50 MHz, C_6D_6): $\delta =$ '+' 16.08 (6- CH_3 und 10- CH_3), '+' 17.72 (14- CH_3), '-' 19.17 (C-3), '+' 25.84 (C-15), '-' 26.90 (C-4), '-' 27.20 (C-8 oder C-12), '-' 27.51 (C-12 oder C-8), '-' 40.00 (C-7 oder C-11), '-' 40.16 (C-11 oder C-7), '+' 68.81 (C-1), '-' 84.27 (C-2), '+' 123.09 (C-5), '+' 124.63 (C-9 oder C-13), '+' 124.91 (C-13 oder C-9), '-' 131.09 (C-14), '-' 135.01 (C-6 oder C-10), '-' 136.49 (C-10 oder C-6).

MS (200 eV, DCI/ NH_3): m/z (%) = 262 (100) [$\text{M} + \text{NH}_4^+$], 245 (18) [$\text{M} + \text{H}^+$].

$\text{C}_{18}\text{H}_{28}$ (244.22)

Ber.: C 88.20 H 11.48

Gef.: C 88.45 H 11.55

6.2 (1E,5E,9E)-1-Iodo-2,6,10,14-tetramethyl-pentadeca-1,5,9,13-tetraen (7)^[96,103]

In einem 250 ml Zweihalskolben mit Tieftemperaturthermometer löste man 290 mg (1.0 mmol, 0.25 Äquiv.) Dichlorobis[η^5 -cyclopentadienyl]zirconium in 30 ml trockenem 1,2-Dichlorethan (P₄O₁₀), tropfte bei Raumtemperatur 6.0 ml (12.0 mmol, 3.0 Äquiv.) einer 2 M Lösung von Trimethylaluminium in Heptan zu und rührte 15 min. Dann kühlte man auf 0 °C ab, spritzte eine Lösung von 980 mg (4.0 mmol, 1.0 Äquiv.) des Alkins **9** in 6 ml 1,2-Dichlorethan (P₄O₁₀) hinzu und rührte noch 30 min in der Kälte, ehe die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Der Reaktionskolben wurde mit Aluminiumfolie verkleidet und 20 h bei Raumtemperatur gerührt, dann auf –40 bis –30 °C abgekühlt und mit einer Lösung von 1.22 g (4.8 mmol, 1.2 Äquiv.) Iod in Tetrahydrofuran gequencht. Nach 20 min erwärmte man mit einer Eis/Kochsalz-Kältemischung die Reaktionsmischung auf –10 °C und spritzte 2 ml einer gesättigten Kaliumcarbonatlösung so zu, daß die Temperatur im Kolbeninneren nicht über 5 °C stieg. Nach 15 min wurden 8 g einer Mischung aus gleichen Anteilen Magnesiumsulfat und Natriumsulfat in das Reaktionsgefäß gegeben und 1 h bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Zum Abtrennen der festen Bestandteile filtrierte man über eine dünne Schicht aus 3 g Celite und spülte mit genügend Diethylether nach. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer i. Vak. entfernt und das rohe Vinyliodid an 500 g Kieselgel mit reinem Petrolether als Laufmittel chromatographiert. Es wurden 1.14 g (74 % Ausbeute) des Vinyliodids **7** als klares Öl isoliert.

$R_f = 0.35$ (PE).

IR (Film): $\tilde{\nu} = 3054\text{ cm}^{-1}$ (=C-H), 2966, 2923, 2854 (CH₂, CH₃), 1714, 1666, 1618 (C=C), 1446, 1378, (CH₂, CH₃), 1368 (CH₃).

UV (CH₃CN): Die Verbindung **7** zeigt im Wellenlängenbereich $\lambda = 190$ bis 400 nm keine UV-Absorption.

^1H NMR (300 MHz, C_6D_6): $\delta = 1.49$ (s, 3H, 6- CH_3 bzw. 10- CH_3), 1.56 (s, 3H, 14- CH_3), 1.60 (s, 3H, 10- CH_3 bzw. 6- CH_3), 1.66 (s, 3H, 2- CH_3), 1.67 (s, 3H, 15- H_3), 1.92 (m_{C} , 4H, 3- H_2 , 4- H_2), 2.00 - 2.22 (m, 8H, 7- H_2 , 8- H_2 , 11- H_2 , 12- H_2), 5.04 (m_{C} , 1H, 13-H), 5.22 - 5.27 (m, 2H, 5-H, 9-H), 5.71 (d, $^4J = 0.7$ Hz, 1H, 1-H).

^{13}C NMR (50 MHz, C_6D_6): $\delta =$ '+' 16.08 (6- CH_3 oder 10- CH_3), 16.19 (10- CH_3 oder 6- CH_3), '+' 17.80 (14- CH_3), '+' 23.92 (2- CH_3), '+' 25.90 (C-15), '-' 26.54 (C-4), '-' 27.09 (C-8 oder C-12), '-' 27.27 (C-12 oder C-8), '-' 39.54 (C-3), '-' 40.10 (C-7 oder C-11), '-' 40.24 (C-11 oder C-7), '+' 75.39 (C-1), '+' 123.52 (C-5), '+' 124.64 (C-9 oder C-13), '+' 124.90 (C-13 oder C-9), '-' 131.13 (C-14), '-' 135.09 (C-6 oder C-10), '-' 135.92 (C-10 oder C-6), '-' 147.61 (C-2).

MS (70 eV): m/z (%) = 386 (6) [M^+], 259 (11) [$\text{M}^+ - \text{I}$], 191 (5) [$259 - \text{C}_5\text{H}_8$], 136 (36) [$\text{C}_{10}\text{H}_{16}^+$], 121 (24) [$\text{C}_9\text{H}_{13}^+$], 69 (100) [C_5H_9^+], 41 (20) [C_3H_5^+].

$\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{I}$ (386.15)

Ber.: C 59.04 H 8.09

Gef.: C 58.77 H 7.90

7 Synthese von racemischem Methanophenazin (*rac-1*)

7.1 (6*E*,10*E*,14*E*)-(3*RS*)-(±)-1-*tert*-Butyldimethylsilyloxy-(3,7,11,15,19-pentamethyleicosa-6,10,14,18-tetraenyl)-silan (*rac-76*)^[105]

Es wurden 204 mg (1.5 mmol, 1.5 Äquiv.) Zinkchlorid mit einer Heißluftpistole i. Vak. geschmolzen und in einer Argon-Atmosphäre abgekühlt. Anschließend versetzt man das trockene Zinkchlorid mit einer Lösung aus 513 mg (1.5 mmol, 1.5 Äquiv.) des Alkyljodids *rac-6* in 12 ml Diethylether (Na) und rührt bei Raumtemperatur ca. 1 h bis sich das Zinkchlorid vollständig gelöst hatte. Eine Kältemischung, bestehend aus Petrolether/Isopropanol/Aceton im Verhältnis 4 : 1 : 1, wurde mit flüssigem Stickstoff auf $-100\text{ }^\circ\text{C}$ gebracht und die Reaktionsmischung darin abgekühlt. Bei dieser Temperatur tropfte man 3 ml (4.5 mmol, 4.5 Äquiv.) einer 1.5 M Lösung von *tert*-Butyllithium in Pentan aus einer Spritze langsam zu, rührte noch 30 min in der Kälte, entfernte dann das Kältebad und ließ die Reaktionsmischung auftauen. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde der Ansatz unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit, durch eine an beiden Seiten spitze Kanüle, unter einem leichten Überdruck von Argon in einen separaten Kolben übergeführt, der 386 mg (1.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Vinyljodid **7** und 60 mg (0.09 mmol, 0.09 Äquiv.) Tetrakis(triphenylphosphin)palladium enthielt. Nach 10 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung zur Aufarbeitung in 30 ml Diethylether aufgenommen, zweimal mit je 15 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, und das Solvens am Rotationsverdampfer i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde an 50 g Kieselgel (PE/Et₂O = 100 : 1) chromatographiert. Es wurden 307 mg (65 % Ausbeute bezogen auf das Vinyljodid **7**) der Titelverbindung *rac-76* als klares farbloses Öl isoliert.

R_f = 0.47 (Et₂O/PE = 1 : 100).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ = 2956, 2927, 2856 cm⁻¹ (CH₂, CH₃), 1665, 1618 (C=C), 1471, 1461, 1449, 1383, (CH₂, CH₃), 1254 (C-OSi), 1096, 836 (Si-OC), 775 (C-SiCH₃).

UV (CH₃CN): $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) = 248 (2.41).

¹H NMR (500 MHz, C₆D₆): δ = 0.09 [s, 6H, Si(CH₃)₂], 0.92 [d, ³*J*_{3CH₃,3H} = 6.8 Hz, 3H, 3-CH₃], 1.00 [s, 9H, SiC(CH₃)₃], 1.23 (m_C, 1H, 4-H_B), 1.32 - 1.48 (m, 2H, 2-H_A, 4-H_A), 1.57 (s, 3H, 19-CH₃), 1.63 - 1.69 (m, 1H, 3-H) überlagert von 1.62 (s, 6H, 7-CH₃, 11-CH₃) und 1.64 (s, 3H, 15-CH₃), 1.69 (d, ⁴*J*_{20H,18H} = 1.0 Hz, 3H, 20-H₃), 2.01 - 2.26 (m, 15H, 2-H_B, 5-H₂, 8-H₂, 9-H₂, 12-H₂, 13-H₂, 16-H₂, 17-H₂), 3.64 (m_C, 2H, 1-H₂), 5.25 (t br, ³*J*_{18H,17H₂} = 7.0 Hz, aufgespalten durch Fernkopplungen ⁴*J* $\approx$ 1.2 Hz, 1H, 18-H), 5.27 - 5.35 (m, 3H, 6-H, 10-H, 14-H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = '+' -5.23 [Si(CH₃)₂], '+' 15.99 und '+' 16.03 (7-CH₃, 11-CH₃, 15-CH₃), '+' 17.70 (19-CH₃), '-' 18.35 [SiC(CH₃)₃], '+' 19.66 (3-CH₃), '-' 25.41 (C-5), '+' 25.72 (C-20), '+' 25.99 [SiC(CH₃)₃] '-' 26.68 und '-' 26.78 (C-9, C-13, C-17), '+' 29.22 (C-3), '-' 37.25 (C-2 und C-4), '-' 39.73 und '-' 39.94 (C-8, C-12, C-16), '-' 61.48 (C-1), '+' 124.26, '+' 124.39, '+' 124.71, (C-6, C-10, C-14, C-18), '-' 131.21 (C-19), '-' 134.68, '-' 134.86 (C-7, C-11, C-15).

MS (70 eV): *m/z* (%) = 474 (18) [M⁺], 417 (16) [M⁺-C₄H₉], 405 (10) [M⁺-C₅H₉], 335 (4) [405-C₅H₁₀], 204 (28) [C₁₅H₂₄⁺], 123 (23) [204-C₅H₈], 81 (64) [C₆H₉⁺], 69 (100) [C₅H₉⁺], 41 (14) [C₃H₅⁺].

MS (200 eV, DCI/NH₃): *m/z* (%) = 492 (100) [M + NH₄⁺].

HR-MS: ber. für C₃₁H₅₈SiO: 474.4247; gef.: 474.4256.

C₃₁H₅₈SiO (474.43)

7.2 (6*E*,10*E*,14*E*)-(3*RS*)-3,7,11,15,19-Pentamethyl-eicosa-6,10,14,18-tetraen-1-ol (*rac-78*)

236.5 mg (0.5 mmol, 1.0 Äquiv.) des Silylethers *rac-76* wurden in 4 ml einer 0.5 M Lösung von Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat (2 mmol Fluorid, 4.0 Äquiv.) in Tetrahydrofuran gelöst und zum Sieden erhitzt. Nach ca. 30 min war das Substrat laut dünnschichtchromatographischer Analyse der Reaktionsmischung vollständig desilyliert (Et₂O/Pentan = 1 : 1). Zur Reaktionsmischung wurde 1 g Kieselgel zugegeben und das Solvens am Rotationsverdampfer i. Vak. entfernt. Das so auf Kieselgel aufgezogene Rohprodukt wurde zur Reinigung an 25 g Kieselgel chromatographiert (Et₂O/Pentan = 1 : 10 → 1 : 1). Es wurden 176 mg (98 % Ausbeute) des Alkohols *rac-78* als klares Öl isoliert.

$R_f = 0.47$ (Et₂O/Pentan = 1 : 1).

IR (Film): $\tilde{\nu} = 3331 \text{ cm}^{-1}$ (OH), 2960, 2924, 2854 (CH₂,CH₃), 1666, (C=C), 1450, 1379 (CH₂, CH₃), 1057 (C-O).

UV (CH₃CN): Die Verbindung *rac-78* zeigt im Wellenlängenbereich von $\lambda = 190 - 400 \text{ nm}$ keine UV-Absorption.

¹H NMR (300 MHz, C₆D₆): $\delta = 0.83$ (d, $^3J_{\text{CH}_3,3\text{H}} = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, 3-CH₃), 1.10 - 1.28 (m, 2H, 4-H₂), 1.30 - 1.40 (m, 2-H_B), 1.41 - 1.50 (m, 1H, 2-H_A), 1.50 - 1.58 (m, 1H, 3-H), 1.54 (s, 1H, OH), 1.56 (s, 3H, 7-CH₃), 1.61 (s, 9H, 11-CH₃, 15-CH₃, 19-CH₃), 1.67 (d, $^4J_{20\text{H}_3,18\text{H}} = 0.7 \text{ Hz}$, 3H, 20-H₃), 1.95 - 2.25 (m, 14H, 5-H₂, 9-H₂, 8-H₂, 12-H₂, 13-H₂, 16-H₂, 17-H₂), 3.40 (m, 2H, 1-H₂), 5.19 - 5.28 (m, 2H, 10-H, 14-H), 5.28 (t br, 2H, 6-H, 18-H).

¹³C NMR (50 MHz, C₆D₆): $\delta = \text{'+' } 16.09$ und $\text{'+' } 16.13$ (7-CH₃, 11-CH₃, 15-CH₃), $\text{'+' } 17.74$ (19-CH₃), $\text{'+' } 19.70$ (3-CH₃), $\text{'-' } 25.85$ (C-5), $\text{'+' } 25.88$ (C-20), $\text{'-' } 25.90$ (C-2), $\text{'-' } 27.10$ und $\text{'-' } 27.23$ (C-9, C-13, C-17), $\text{'+' } 29.49$ (C-3), $\text{'-' } 37.63$ (C-4), $\text{'-' } 40.20$ (C-8, C-12, C-16), $\text{'-' } 60.83$ (C-1), $\text{'+' } 124.80$ (C-10 und C-14), $\text{'+' } 124.93$ (C-6), $\text{'+' } 125.26$ (C-18), $\text{'-' } 131.09$ (C-19), $\text{'-' } 134.78$, $\text{'-' } 134.97$, $\text{'-' } 134.99$ (C-7, C-11, C-15).

MS (200 eV, DCI/NH₃): m/z (%) = 492 (100) [M + NH₄⁺].

C₂₅H₄₄O (360.34)

Ber.: C 83.25 H 12.30

Gef.: C 83.55 H 12.34

7.3 (E6',E10',E14')-(3'RS)-(±)-2-(3,7,11,15,19-Pentamethyl-eicosa-6,10,14,18-tetraenyloxy)-phenazin (*rac-1*)

Es wurden bei 0 °C 90 mg (0.25 mmol, 1.0 Äquiv.) Alkohol *rac-78* in 3 ml trockenem Dichlormethan (P₄O₁₀) gelöst, mit 55 µl (40 mg, 0.37 mmol, 1.47 Äquiv.) frisch destilliertem Triethylamin und mit 32 mg (0.28 mmol, 1.1 Äquiv.) Methansulfonsäurechlorid versetzt. Nach ca. 30 min war das Substrat vollständig umgesetzt (DC-Kontrolle: Et₂O/PE = 1 : 2). Der Ansatz wurde in 3 ml ges. Natriumhydrogencarbonatlösung aufgenommen und viermal mit je 10 ml Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das rohe Mesylat wurde anschließend in 5 ml trockenem Dimethylformamid (CaH₂) gelöst, mit 172 mg (1.25 mmol, 5.0 Äquiv.) wasserfreiem, fein gemörsertem Kaliumcarbonat und 55 mg (0.28 mmol, 1.1 Äquiv.) 2-Hydroxyphenazin (**2**) versetzt. Diese Reaktionsmischung wurde für 10 h auf 100 °C erhitzt (DC Kontrolle: CH₂Cl₂/PE = 100 : 1) und nach dem Abkühlen mit 5 ml Wasser verdünnt. Nun extrahierte man die Reaktionsmischung einmal mit 10 ml Diethylether, trennte die wäßrige Phase ab, sättigte sie mit Natriumchlorid und extrahierte erneut dreimal mit je 5 ml Diethylether. Die organischen Phasen wurden vereinigt und einmal mit 10 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und i. Vak. das Solvens am Rotationsverdampfer entfernt. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt an 20 g

Kieselgel unter Druck chromatographiert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{PE} = 100 : 1$). Es wurden 86 mg (64 % Ausbeute bezogen auf den Alkohol *rac-78*) des Naturstoffs *rac-1* als gelbes Öl isoliert.

$R_f = 0.51$ (Diethylether/Hexan = 1:1).

IR (Film): $\tilde{\nu} = 3059 \text{ cm}^{-1}$ (=C-H), 2954, 2924, 2853 (CH_2 , CH_3), 1632, 1605, 1560, 1518 (C=C), 1483, 1445 1380, 1360 (CH_2 , CH_3), 1196 (C-O-C), 828, 757 (C=C, arom.).

UV (CH_3CN): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 388 (3.72), 355 (3.78), 256 nm (4.71).

^1H NMR (200 MHz, C_6D_6): $\delta = 0.89$ (d, $^3J_{3'\text{CH}_3,\text{CH}} = 6.5 \text{ Hz}$, 3H, 3'- CH_3), 1.12 - 1.58 (m, 4H, 4'- H_2 , 2'- H_2), 1.61 (s, 3H, 19'- H_3), 1.70-1.80 (m, 1H, 3'-H) überlagert von 1.64 - 1.71 (3 s, je 3H, 7'- CH_3 , 11'- CH_3 , 15'- CH_3) und 1.73 (s, 3H, 20'- H_3), 2.02 - 2.29 (m, 14 H, 5'- H_2 , 8'- H_2 , 9'- H_2 , 12'- H_2 , 13'- H_2 , 16'- H_2 , 17'- H_2), 3.83 (t, $^3J_{1'\text{H}_2,2'\text{H}_2} = 6.5$, 2H, 1'- H_2), 5.21 - 5.48 (m, 4H, 6'-H, 10'-H, 14'-H, 18'-H), 7.27 - 7.47 (m, 3H, 3-H, 7-H, 8-H), 7.56 (d, $^4J_{1\text{H},3\text{H}} = 3.0 \text{ Hz}$, 1H, 1-H), 8.15 (d, $^3J_{4\text{H},3\text{H}} = 9.6 \text{ Hz}$, 1H, 4-H), 8.34 (dd, $^3J_{6\text{H},7\text{H}} = 7.0 \text{ Hz}$, $^4J_{6\text{H},8\text{H}} = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 6-H und dd, $^3J_{9\text{H},8\text{H}} = 7.0 \text{ Hz}$, $^4J_{9\text{H},7\text{H}} = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 9-H).

^1H NMR (500 MHz, C_6D_6): $\delta = 0.81$ (d, $^3J_{3'\text{CH}_3,3'\text{H}} = 6.6 \text{ Hz}$, 3H, 3'- CH_3), 1.17 (m_C, 1H, 4'- H_B), 1.30 - 1.44 (m, 2H, 2'- H_B , 4'- H_A), 1.53 (s, 3H, 19'- CH_3), 1.54 - 1.63 (m, 1H, 3'-H) überlagert von 1.58, 1.59, 1.60 (3s, je 3H, 7'- CH_3 , 11'- CH_3 , 15'- CH_3), 1.63 (d, $^4J_{20'\text{H}_3,18'\text{H}} = 1.0 \text{ Hz}$, 3H, 20'- H_3), 1.69 (m_C, 1H, 2'- H_A), 1.94 - 2.23 (m, 14H, 5'- H_2 , 8'- H_2 , 9'- H_2 , 12'- H_2 , 13'- H_2 , 16'- H_2 , 17'- H_2), 3.76 (m_C, 2H, 1'- H_2), 5.20 (t br, $^3J_{18'\text{H},17'\text{H}_2} = 6.9 \text{ Hz}$, aufgespalten durch Fernkopplungen $^4J \approx 1.4 \text{ Hz}$, 1H, 18'-H), 5.22 - 5.32 (m, 3H, 6'-H, 10'-H, 14'-H), 7.22 - 7.35 (m, 3H, 3-H, 7-H, 8-H), 7.48 (d, $^4J_{1\text{H},3\text{H}} = 2.7 \text{ Hz}$, 1H, 1-H), 8.06 (d, $^3J_{4\text{H},3\text{H}} = 9.4 \text{ Hz}$, 1H, 4-H), 8.24 (dd, $^3J_{6\text{H},7\text{H}} = 8.8 \text{ Hz}$, $^4J_{6\text{H},8\text{H}} = 1.2 \text{ Hz}$, 1H, 6-H oder 9-H), 8.245 (dd, $^3J_{9\text{H},7\text{H}} = 8.8 \text{ Hz}$, $^4J_{9\text{H},7\text{H}} = 1.2 \text{ Hz}$, 1H, 6-H oder 9-H).

^{13}C NMR (50 MHz, C_6D_6): $\delta = \text{'+' } 16.12$ (7'- CH_3 , 11'- CH_3 , 15'- CH_3), $\text{'+' } 17.72$ (19'- CH_3), $\text{'+' } 19.56$ (3'- CH_3), $\text{'+' } 25.76$ (C-20'), $\text{'-' } 25.84$ (C-5'), $\text{'-' } 27.10$ und $\text{'-' } 27.21$ (C-9', C-13', C-17'), $\text{'+' } 29.76$ (C-3'), $\text{'-' } 35.99$ (C-2'), $\text{'-' } 37.43$ (C-4'), $\text{'-' } 40.19$ und $\text{'-' } 40.22$ (C-8', C-12', C-16'), $\text{'-' } 66.86$ (C-1'), $\text{'+' } 105.80$ (C-1), $\text{'+' } 124.72$, $\text{'+' } 124.75$, $\text{'+' } 124.91$, (C-10', C-14', C-18'), $\text{'+' } 125.03$ (C-6'), $\text{'+' } 126.51$ (C-3), $\text{'+' } 128.77$ (C-7 oder C-8), $\text{'+' } 129.58$ (C-8 oder C-7), $\text{'+' } 130.15$ (C-6 oder C-9), $\text{'+' } 130.27$ (C-9 oder C-6), $\text{'-' } 131.08$ (C-19'), $\text{'+' } 131.30$ (C-4), $\text{'-' } 134.98$, $\text{'-' } 135.01$, $\text{'-' } 135.07$ (C-7', C-11', C-15'), $\text{'-' } 141.36$ (C-4a), $\text{'-' } 142.64$ (C-5a oder C-9a), $\text{'-' } 144.14$ (C-9a oder C-5a), $\text{'-' } 145.89$ (C-10a), $\text{'-' } 160.74$ (C-2).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 1.04 (d, $^3J_{3'\text{CH}_3,3'\text{H}}$ = 6.6 Hz, 3H, 3'-CH₃), 1.27 - 1.37 (m, 2H, 4'-H₂), 1.46 - 1.53 (m, 1H, 3'-H), 1.54, 1.55, 1.56 (3s, je 3H, 11'-CH₃, 15'-CH₃, 19'-CH₃), 1.62 (s, 3H, 7'-CH₃), 1.63 (d, $^4J_{20'\text{H}_3,18'\text{H}}$ = 1.0 Hz, 3H, 20'-H₃), 1.70 - 1.79 (m, 1H, 2'-H_B) 1.79 - 1.86 (m, 1H, 2'-H_A), 1.87 - 2.17 (m, 14H, 5'-H₂, 8'-H₂, 9'-H₂, 12'-H₂, 13'-H₂, 16'-H₂, 17'-H₂), 4.29 (m_C, 2H, 1'-H₂), 4.99 - 5.06 (m, 2H, 10'-H, 14'-H), 5.08 (t br, $^3J_{6'\text{H},5'\text{H}_2}$ = 7.9 Hz, aufgespalten durch Fernkopplungen $^4J \approx 1.1$ Hz, 1H, 6'-H), 5.15 (t br, $^3J_{18'\text{H},17'\text{H}_2}$ = 7.0 Hz, aufgespalten durch Fernkopplungen $^4J \approx 1.2$ Hz, 1H, 18'-H), 7.42 (d, $^4J_{1\text{H},3\text{H}}$ = 2.4 Hz, 1H, 1-H), 7.58 (dd, $^3J_{3\text{H},4\text{H}}$ = 9.4 Hz, $^4J_{4\text{H},1\text{H}}$ = 2.5 Hz, 1H, 3-H) 7.85 (ddd, $^3J_{7\text{H},6\text{H}}$ = 8.4 Hz, $^3J_{7\text{H},8\text{H}}$ = 6.7 Hz, $^4J_{7\text{H},9\text{H}}$ = 1.4 Hz, 1H, 7-H oder 8-H), 7.91 (ddd, $^3J_{8\text{H},9\text{H}}$ = 8.5 Hz, $^4J_{8\text{H},7\text{H}}$ = 6.7 Hz, $^4J_{8\text{H},6\text{H}}$ = 1.5 Hz, 1H, 8-H oder 7-H), 8.09 (d, $^3J_{4\text{H},3\text{H}}$ = 9.4 Hz, 1H, 4-H), 8.15 (ddd, $^3J_{6\text{H},7\text{H}}$ = 8.8 Hz, $^4J_{6\text{H},8\text{H}}$ = 0.8 Hz, $^5J_{6\text{H},9\text{H}}$ = 0.6 Hz, 1H, 6-H oder 9-H), 8.19 (ddd, $^3J_{9\text{H},7\text{H}}$ = 8.5 Hz, $^4J_{9\text{H},7\text{H}}$ = 1.4 Hz, $^5J_{9\text{H},6\text{H}}$ = 0.6 Hz, 1H, 9-H oder 6-H).

MS (70 eV): m/z (%) = 538 (100) [M⁺], 470 (6) [M⁺-C₅H₈], 402 (8) [470-C₅H₈], 334 (20) [402-C₅H₈], 265 (4) [334-C₅H₉], 196 (82) [C₁₂H₈N₂O⁺], 168 (7) [196-CO].

HR-MS: ber. für C₃₇H₅₀N₂O: 538.3923; gef.: 538.3923.

C₃₇H₅₀N₂O (538.39)

8 Synthese von (S)-Methanophenazin [(S)-1]

8.1 (6E,10E,14E)-(3S)-(-)-3,7,11,15,19-Pentamethyl-eicosa-6,10,14,18-tetraen-1-ol [(S)-78]

Es wurden 102 mg (0.78 mmol, 1.5 Äquiv.) Zinkchlorid i. Vak. mit einer Heißluftpistole geschmolzen und in einer Argon-Atmosphäre auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend versetzt man das trockene Zinkchlorid mit einer Lösung aus 268 mg (0.78 mmol, mmol, 1.5 Äquiv.) des chiralen Alkyljodids (R)-6 in 10 ml Diethylether und rührte bei Raumtemperatur etwa 1 h, bis sich das Zinkchlorid vollständig gelöst hatte. Eine Kältemischung, bestehend aus Petrolether/Isopropanol/Aceton im Verhältnis 4 : 1 : 1, wurde mit flüssigem Stickstoff auf -100 °C gebracht und die Reaktionsmischung darin abgekühlt. Bei dieser Temperatur tropfte man 1.5 ml (2.25 mmol, 4.5 Äquiv.) einer 1.5 M Lösung von *tert.*-Butyllithium in Pentan mit einer Spritze langsam zu, rührte noch 1 h in der Kälte, entfernte dann das Kältebad und ließ die Reaktionsmischung auftauen. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde der Ansatz unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit durch eine an beiden Seiten spitze Kanüle unter einem leichten Überdruck von Argon in einen separaten Kolben übergeführt, der 193 mg (0.5 mmol, 1.0 Äquiv.) Vinyljodid 7 und 30 mg (0.043 mmol, 0.09 Äquiv.) Tetrakis(triphenylphosphin)palladium enthielt. Nach 6 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung zur Aufarbeitung in 20 ml Diethylether aufgenommen, zweimal mit je 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Solvens am Rotationsverdampfer i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde über 5 g Kieselgel (PE/Et₂O = 50 : 1) filtriert und dann in 4.5 ml (1.5 mmol Fluorid, 3.0 Äquiv.) einer 0.33 M Lösung aus Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat in Tetrahydrofuran aufgenommen. Nach 1 h Erhitzen auf 70 °C Ölbadtemperatur (DC Kontrolle: Et₂O/PE = 1 : 1) ließ man den Ansatz auf Raumtemperatur abkühlen und entfernte das Solvens i. Vak. am Rotationsverdampfer. Den Rückstand zog man auf ca. 500 mg Kieselgel auf und chromatographierte an 6 g Kieselgel

(Et₂O/PE = 1 : 50 → 1 : 1). Es wurden 115 mg (64 % Ausbeute bezogen auf das Vinyljodid **7**) der Titelverbindung (*S*)-**78** als klares Öl isoliert.

$R_f = 0.47$ (Et₂O/PE = 1 : 1).

$[\alpha]_D^{20} = -2.6^\circ$ ($c = 1$ in CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, C₆D₆): $\delta = 0.90$ (d, $^3J_{3CH_3,3H} = 6.0$ Hz, 3H, 3-CH₃), 1.10 - 1.51 (m, 5H, 2-H₂, 4-H₂, OH), 1.53 - 1.85 (m, 1H, 3-H) überlagert von 1.66 (s, 3H, 19-CH₃), 1.71 (s, 9H, 7-CH₃, 11-CH₃, 15-CH₃), 1.78 (s, 3H, 20-H₃), 2.05 - 2.43 (m, 14H, 5-H₂, 8-H₂, 9-H₂, 12-H₂, 13-H₂, 16-H₂, 17-H₂), 3.55 (m_C, 2H, 1-H₂), 5.21 - 5.50 (m, 4H, 6-H, 10-H, 14-H, 18-H).

¹³C NMR (50 MHz, C₆D₆): $\delta =$ '+' 16.09, '+' 16.12, '+' 16.15 (7-CH₃, 11-CH₃, 15-CH₃), '+' 17.75 (19-CH₃), '+' 19.71 (3-CH₃), '-' 25.84 (C-5), '+' 25.86 (C-20), '-' 25.88 (C-2), '-' 27.11 und '-' 27.23 (C-9, C-13, C-17), '+' 29.49 (C-3), '-' 37.64 (C-4), '-' 40.21 (C-8, C-12, C-16), '-' 60.83 (C-1), '+' 124.80 (C-10 und C-14), '+' 124.93 (C-6), '+' 125.27 (C-18), '-' 131.10 (C-19), '-' 134.78, '-' 134.96, '-' 134.99 (C-7, C-11, C-15).

C₂₅H₄₄O (360.34)

8.2 (E6',E10',E14')-(3'S)-(-)-2-(3,7,11,15,19-Pentamethyl-eicosa-6,10,14,18-tetraenyloxy)-phenazin [(*S*)-1]

Man löste in 2 ml trockenem Tetrahydrofuran (K) 54 mg (0.15 mmol, 1.0 Äquiv.) des enantiomerenreinen Alkohols (*S*)-**78** und brachte ihn bei 0 °C mit 30 μ l (21.8 mg, 0.20 mmol, 1.3 Äquiv.) frisch destilliertem Triethylamin und 19 mg (0.165 mmol, 1.1 Äquiv.) Methansulfonsäurechlorid zur Reaktion. Nach etwa 15 min war der Alkohol (*S*)-**78** quantitativ umgesetzt (DC Kontrolle: Et₂O/PE = 1 : 3). Der Ansatz wurde in 5 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben und viermal mit je 5 ml Diethylether ausgeschüttelt, über

Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i. Vak. evaporiert. In einem separaten Reaktionskolben suspendierte man 35 mg (0.18 mmol, 1.2 Äquiv.) 2-Hydroxyphenazin (**2**), 10 mg wasserfreies, fein gemörstertes Kaliumhydroxid und ca. 20 mg [ca. 30 Gew.% bezogen auf den Alkohol (S)-**78**] Aliquat 336 in 5 ml Toluol und rührte 30 min bei Raumtemperatur. Zu dieser roten Suspension fügte man dann das rohe Mesylat als Lösung in 2 ml Toluol und erhitzte unter kräftigem Rühren für 3 h unter Sieden am Rückfluß (DC Kontrolle: PE/CH₂Cl₂ = 1 : 100). Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz in 5 ml Wasser aufgenommen und viermal mit je 5 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet, filtriert und das Solvens i. Vak. entfernt. Das verbliebene Rohprodukt wurde auf 1 g Kieselgel aufgezogen und an 35 g Kieselgel chromatographiert (Eluent: PE/CH₂Cl₂ = 1 : 100). Es wurden 72.5 mg (90 % Ausbeute) der Titelverbindung (S)-**1** als gelbes Öl isoliert.

R_f = 0.27 (PE/CH₂Cl₂ = 1 : 100).

UV (CH₃CN): $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) = 256 nm (4.89), 354 (3.95), 388 (3.89).

[α]_D²⁰ = -3.7° (*c* = 1 in C₆H₆); **[α]₅₇₈²⁰** = -4.0° (*c* = 1 in C₆H₆); **[α]₅₄₆²⁰** = -4.6° (*c* = 1 in C₆H₆).

¹H NMR (200 MHz, C₆D₆): δ = 0.89 (d, ³*J*_{3'-CH₃,CH} = 6.5 Hz, 3H, 3'-CH₃), 1.12 - 1.58 (m, 4H, 4'-H₂, 2'-H₂), 1.61 (s, 3H, 19'-H₃), 1.70-1.80 (m, 1H, 3'-H) überlagert von 1.64 - 1.71 (3 s, je 3H, 7'-CH₃, 11'-CH₃, 15'-CH₃) und 1.73 (s, 3H, 20'-H₃), 2.02 - 2.29 (m, 14 H, 5'-H₂, 8'-H₂, 9'-H₂, 12'-H₂, 13'-H₂, 16'-H₂, 17'-H₂), 3.83 (t, ³*J*_{1'-H₂,2'-H₂} = 6.5, 2H, 1'-H₂), 5.21 - 5.48 (m, 4H, 6'-H, 10'-H, 14'-H, 18'-H), 7.27 - 7.47 (m, 3H, 3-H, 7-H, 8-H), 7.56 (d, ⁴*J*_{1H,3H} = 3.0 Hz, 1H, 1-H), 8.15 (d, ³*J*_{4H,3H} = 9.6 Hz, 1H, 4-H), 8.34 (dd, ³*J*_{6H,7H} = 7.0 Hz, ⁴*J*_{6H,8H} = 2.5 Hz, 1H, 6-H und dd, ³*J*_{9H,8H} = 7.0 Hz, ⁴*J*_{9H,7H} = 2.5 Hz, 1H, 9-H).

¹³C NMR (50 MHz, C₆D₆): δ = '+' 16.12 (7'-CH₃, 11'-CH₃, 15'-CH₃), '+' 17.73 (19'-CH₃), '+' 19.57 (3'-CH₃), '+' 25.76 (C-20'), '-' 25.85 (C-5'), '-' 27.10 und '-' 27.20 (C-9', C-13', C-17'), '+' 29.76 (C-3'), '-' 35.99 (C-2'), '-' 37.43 (C-4'), '-' 40.19 und '-' 40.22 (C-8', C-12', C-16'), '-' 66.86 (C-1'), '+' 105.78 (C-1), '+' 124.72, '+' 124.75, '+' 124.91, (C-10', C-14', C-18'), '+' 125.02 (C-6'), '+' 126.51 (C-3), '+' 128.76 (C-7 oder C-8), '+' 129.58 (C-8 oder C-7), '+' 130.14 (C-6 oder C-9), '+' 130.27 (C-9 oder C-6), '-' 131.07 (C-19'), '+' 131.28 (C-4), '-' 134.98, '-' 135.01, '-' 135.07 (C-7', C-11', C-15'), '-' 141.34 (C-4a), '-' 142.61 (C-5a oder C-9a), '-' 144.11 (C-9a oder C-5a), '-' 145.87 (C-10a), '-' 160.73 (C-2).

C₃₇H₅₀N₂O (538.39)

9 Synthese der Mosher-Ester *rac*-**63**, (*S,S*)-**63**, *rac*-**79** und (*S,S*)-**79**

9.1 (2*S*,3'*RS*)-3,3,3-Trifluoro-2-methoxy-2-phenyl-propansäure-5'-(*tert.*-butyl-dimethyl-silanyloxy)-3-methyl-pentylester (*rac*-**63**)

Es wurden 13 mg (0.055 mmol, 1.1 Äquiv.) der enantiomerenreinen (*S*)-(-)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenylelessigsäure [(*S*)-**62**] in 0.5 ml trockenem Dichlormethan gelöst, mit 11.3 mg (0.055 mmol, 1.1 Äquiv.) Dicyclohexylcarbodiimid, 0.8 mg (0.007 mmol, 0.013 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Dann spritzte man 11.5 mg (0.05 mmol, 1.0 Äquiv.) des racemischen Alkohols *rac*-**52** zu und rührte weitere 12 h. Zur Aufarbeitung gab man 200 mg Kieselgel zur Reaktionsmischung und evaporierte das Solvens am Rotationsverdampfer i. Vak. Das so auf Kieselgel aufgezogene Rohprodukt wurde an 5 g Kieselgel chromatographisch gereinigt (Et₂O/PE = 1 : 10). Es wurden 16.2 mg (73 % Ausbeute) der Titelverbindung *rac*-**63** als ein Gemisch von zwei Diastereomeren im Verhältnis 1 : 1 isoliert.

R_f = 0.68 (Et₂O/PE = 1 : 2).

¹³C NMR (50 MHz, C₆D₆, Diastereomergemisch): δ = '+' -5.31, '+' -5.88 [Si(CH₃)₂], '-' 18.40 [SiC(CH₃)₃], '+' 19.17 (3'-CH₃), '+' 26.08 [SiC(CH₃)₃], '+' 26.72/'+' 26.78 (C-3'), '-' 35.42/'-' 35.46 (C-4'), '-' 39.71/'-' 39.75 (C-2'), '+' 55.29/'+' 55.31 (OCH₃), '-' 60.95 (C-5'), '-' 64.64/'-' 64.70 (C-1'), '-' 85.11 (d, ²*J*_{C1,F3} = 28 Hz, C-2), '-' 126.30 (q, ¹*J*_{CF3} = 288 Hz, CF₃), '+' 127.52 (C-3'' und C-5''), '+' 128.57 (C-2'' und C-6''), '+' 129.65 (C-4''), '-' 133.14 (C-1'').

¹H NMR (500 MHz, C₆D₆): δ = 0.05 [s, 12 H, Si(CH₃)₂], 0.705 (d, ³*J*_{3'CH3,3'H} = 7.0 Hz, 3H, 3'-CH₃, Diastereomer A) teilweise überlagert von 0.710 (d, ³*J*_{3'CH3,3'H} = 7.0 Hz, 3H, 3'-CH₃, Diastereomer B), 0.98 [s, 9H, SiC(CH₃)₃, Diastereomer A] teilweise überlagert von 0.985 [s, 9H, SiC(CH₃)₃, Diastereomer B], 1.13 - 1.28 (m, 4H, 4'-H₂), 1.35 - 1.63 (m, 6H, 2'-H₂, 3'-

H), 3.43 - 3.53 (m, 4H, 5'-H₂) überlagert von 3.45 (d, $^5J_{\text{CF}_3, \text{OCH}_3} = 1.3$ Hz, 6H, OCH₃), 4.07 - 4.17 (m, 4H, 1'-H₂), 7.06 (tt, $^3J_{4'', \text{H}, 3'', \text{H}} = ^3J_{4'', \text{H}, 5'', \text{H}} = 7.8$ Hz, $^4J_{4'', \text{H}, 2'', \text{H}} = ^4J_{4'', \text{H}, 6'', \text{H}} = 2.0$ Hz, 2H, 4''-H), 7.12 (tdd, $^3J_{3'', \text{H}, 2'', \text{H}} = ^3J_{3'', \text{H}, 4'', \text{H}} = 7.5$ Hz, $^4J_{3'', \text{H}, 5'', \text{H}} = 2.0$ Hz, $^4J_{3'', \text{H}, 6'', \text{H}} = 1.5$ Hz, 4H, 3''-H und 5''-H), 7.71 (d, $^3J_{2'', \text{H}, 3'', \text{H}} = ^3J_{6'', \text{H}, 5'', \text{H}} = 7.8$ Hz, 4H, 2''-H und 6''-H); Diastereomerenverhältnis = 1 : 1 (bestimmt durch Vergleich der Signalintensitäten von 3'-CH₃ bei $\delta = 0.705/0.710$ ppm).

¹⁹F NMR (470 MHz, C₆D₆): $\delta = -72.144$ (CF₃, Diastereomer A) überlagert von -72.156 (CF₃, Diastereomer B); Diastereomerenverhältnis = 1 : 1

C₂₂H₃₅F₃SiO₄ (448.60)

9.2 (2*S*,3'*S*)-3,3,3-Trifluoro-2-methoxy-2-phenyl-propansäure-5'-(*tert*-butyldimethyl-silanyloxy)-3-methyl-pentylester [(*S,S*)-**63**]

Es wurden 10 mg (0.042 mmol, 1.1 Äquiv.) der enantiomerenreinen (*S*)-(-)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenylacessigsäure [(*S*)-**62**] in 0.5 ml trockenem Dichlormethan gelöst, mit 8.8 mg (0.042 mmol, 1.1 Äquiv.) Dicyclohexylcarbodiimid, 0.5 mg (0.004 mmol, 0.01 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Dann spritzte man 8.9 mg (0.038 mmol, 1.0 Äquiv.) des enantiomerenreinen Alkohols (*S*)-**52** zu und rührte weitere 12 h. Zur Aufarbeitung gab man 200 mg Kieselgel zur Reaktionsmischung und evaporierte das Solvens am Rotationsverdampfer i. Vak. Das so auf Kieselgel aufgezugene Rohprodukt wurde an 5 g Kieselgel chromatographiert (Et₂O/PE = 1 : 10). Es wurden 13.9 mg des diastereomerenreinen Mosher-Esters (*S,S*)-**63** (81 % Ausbeute) isoliert.

$R_f = 0.68$ (Et₂O/PE = 1 : 2).

¹H NMR (500 MHz, C₆D₆, Diastereomer A): δ = 0.09 [s, 6 H, Si(CH₃)₂], 0.745 (d, ³J_{3'CH₃,3'H} = 7.0 Hz, 3H, 3'-CH₃), 1.02 [s, 9H, SiC(CH₃)₃], 1.17 - 1.31 (m, 2H, 4'-H₂), 1.31 - 1.66 (m, 3H, 4-H₂, 3'-H), 3.47 - 3.59 (m, 2H, 5'-H₂) überlagert von 3.49 (d, ⁵J_{CF₃,OCH₃} = 1.3 Hz, 3H, OCH₃), 4.16 (m_C, 2H, 1'-H₂), 7.10 (tt, ³J_{4''H,3''H} = ³J_{4''H,5''H} = 7.5 Hz, ⁴J_{4''H,2''H} = ⁴J_{4''H,6''H} = 2.0 Hz, 1H, 4''-H), 7.16 (tdd, ³J_{3''H,2''H} = ³J_{3''H,4''H} = 7.5 Hz, ⁴J_{3''H,5''H} = 3.0 Hz, ⁴J_{3''H,6''H} = 2.0 Hz, 2H, 3''-H und 5''-H), 7.74 (d, ³J_{2''H,3''H} = ³J_{6''H,5''H} = 7.5 Hz, 4H, 2''-H und 6''-H).

C₂₂H₃₅F₃SiO₄ (448.60)

9.3 (2*S*,3'*RS*,6'*E*,10'*E*,14'*E*,18'*E*)-3,3,3-Trifluoro-2-methoxy-2-phenyl-propansäure-3',7',11',15',19'-pentamethyl-eicosa-6',10',14',18'-tetraenyl-ester (*rac*-**79**)

Es wurden 7.7 mg (0.033 mmol 1.1 Äquiv.) der enantiomerenreinen (*S*)-(-)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenylacessigsäure [(*S*)-**62**] in 0.5 ml trockenem Dichlormethan gelöst und 6.8 mg (0.033 mmol, 1.1 Äquiv.) Dicyclohexylcarbodiimid sowie 0.5 mg (0.004 mmol, 0.12 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin zugegeben. Nach 10 min versetzte man mit 10.8 mg (0.03 mmol, 1.0 Äquiv.) des racemischen Alkohols *rac*-**78** und rührte 10 h bei Raumtemperatur. Abschließend fügte man 200 mg Kieselgel zur Reaktionsmischung, entfernte alles Flüchtige i. Vak. am Rotationsverdampfer und reinigte den Rückstand an 2 g Kieselgel (Et₂O/ PE = 1 : 100). Es wurden 11.8 mg (70 % Ausbeute) der Titelverbindung *rac*-**79** als Gemisch von zwei Diastereomeren im Verhältnis 1 : 1 isoliert.

$R_f = 0.76$ (Et₂O/PE = 1 : 3).

¹³C NMR (125 MHz, C₆D₆): $\delta = +'$ 16.04, $'$ 16.10, $'$ 16.12 (7'-CH₃, 11'-CH₃, 15'-CH₃), $'$ 17.73 (18'-CH₃), $'$ 19.12/ $'$ 19.15 (3'-CH₃), $'$ 25.61 (C-5'), $'$ 25.84 (C-20'), $'$ 27.10, $'$ 27.11, $'$ 27.22 (C-9', C-13', C-17'), $'$ 35.35/ $'$ 35.38 (C-4'), $'$ 37.05/ $'$ 37.08 (C-2'), $'$ 40.20 (C-8', C-12', C-16'), $'$ 55.29 (OCH₃), $'$ 64.69/ $'$ 64.72 (C-1'), $'$ 88.11 (d, $^2J_{\text{Cl},\text{F}_3} = 28$ Hz, C-2), $'$ 124.26 (q, $^1J_{\text{CF}_3} = 288$ Hz, CF₃), $'$ 124.74, $'$ 124.77, $'$ 124.80/ $'$ 124.82, $'$ 124.92 (C-6', C-10', C-16, C-18'), $'$ 127.77 (C-3'' und C-5''), $'$ 128.58 (C-2'' und C-6''), $'$ 129.67 (C-4''), $'$ 131.11 (C-19'), $'$ 133.16 (C-1''), $'$ 135.01, $'$ 135.06, $'$ 135.09 (C-7', C-11', C-15'), $'$ 166.60 (C=O); Diastereomerenverhältnis = 1 : 1 (bestimmt durch Vergleich der Signalintensitäten von C-1' bei $\delta = 64.69/64.72$ ppm, C-2' bei $\delta = 37.05/37.08$ ppm, C-4' bei $\delta = 35.35/35.38$ ppm sowie 3'-CH₃ bei $\delta = 19.12/19.15$ ppm).

¹H NMR (300 MHz, C₆D₆, Diastereomeregemisch): $\delta = 0.79$ (d, $^3J_{3'\text{-CH}_3,3'\text{-H}} = 6.5$ Hz, 6H, 3'-CH₃), 1.06 - 1.39 (m, 8 H, 2'-H₂, 4'-H₂), 1.39 - 1.65 (m, 2H, 3'-H), 1.67 (s, 6H, 19'-CH₃), überlagert von 1.68 (s, 6H, 7'-CH₃), 1.72 (2 s br, je 6H, 11'-CH₃ und 15'-CH₃), 1.78 (d, $^4J_{20'\text{-H},18'\text{-H}} = 1.0$ Hz, 6H, 20'-H₃), 2.02 (m_C, 4H, 5'-H₂), 2.15 - 2.38 (m, 24 H, 8'-H₂, 9'-H₂, 12'-H₂, 14'-H₂, 16'-H₂, 17'-H₂), 3.53 (d, $^5J_{\text{CF}_3,\text{OCH}_3} = 1.5$ Hz, 3H, OCH₃), 4.11 - 4.29 (m, 4H, 1'-H₂), 5.28 (t br, $^3J_{18'\text{-H},17'\text{-H}} = 7.0$ Hz, 2H, 20'-H), 5.31 - 5.46 (m, 6H, 6'-H, 10'-H, 14'-H), 7.11 - 7.20 (m, 6H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 7.80 (d, $^3J_{2''\text{-H},3''\text{-H}} = ^3J_{6''\text{-H},5''\text{-H}} = 8.0$ Hz, 4H, 2''-H, 6''-H).

¹⁹F NMR (470 MHz, C₆D₆): $\delta = -71.68$ (CF₃).

C₃₅H₅₁F₃O₃ (576.78)

9.4 (2*S*,3'*S*,6'*E*,10'*E*,14'*E*,18'*E*)-3,3,3-Trifluoro-2-methoxy-2-phenyl-propansäure-3',7',11',15',19'-pentamethyl-eicosa-6',10',14',18'-tetraenyl-ester [(*S*)-79**]**

Es wurden 7.1 mg (0.031 mmol, 1.1 Äquiv.) der enantiomerenreinen (*S*)-(-)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenylelessigsäure [(*S*)-**62**], 6.3 mg (0.031 mmol, 1.1 Äquiv.) Dicyclohexylcarbodiimid und 0.5 mg (0.004 mmol, 0.12 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin mit 10.0 mg (0.028 mmol, 1.0 Äquiv.) des enantiomerenreinen Alkohols (*S*)-**78** zur Reaktion gebracht. Zur Aufarbeitung fügte man 200 mg Kieselgel zur Reaktionsmischung, entfernte alles Flüchtige i. Vak. am Rotationsverdampfer und reinigte den Rückstand an 2 g Kieselgel (Eluent: Et₂O/ PE = 1 : 100). Es wurden 12.9 mg (83 % Ausbeute) der diastereomerenreinen Titelverbindung (*S,S*)-**79** isoliert.

$R_f = 0.76$ (Et₂O/PE = 1 : 3).

¹³C NMR (125 MHz, C₆D₆, Diastereomer A): $\delta =$ '+' 16.04, '+' 16.10, '+' 16.12 (7'-CH₃, 11'-CH₃, 15'-CH₃), '+' 17.73 (18'-CH₃), '+' 19.12 (3'-CH₃), '-' 25.61 (C-5'), '+' 25.84 (C-20'), '-' 27.10, '-' 27.11, '-' 27.22 (C-9', C-13', C-17'), '-' 35.34 (C-4'), '-' 37.08 (C-2'), '-' 40.20 (C-8', C-12', C-16'), '+' 55.29 (OCH₃), '-' 64.71 (C-1'), '-' 88.11 (d, ²*J*_{Cl,F₃} = 28 Hz, C-2), '-' 124.26 (q, ¹*J*_{CF₃} = 288 Hz, CF₃), '+' 124.74, '+' 124.77, '+' 124.81, '+' 124.92 (C-6', C-10', C-14', C-18'), '+' 127.76 (C-3'' und C-5''), '+' 128.58 (C-2'' und C-6''), '+' 129.67 (C-4''), '-' 131.11 (C-19'), '-' 133.16 (C-1''), '-' 135.01, '-' 135.06, '-' 135.09 (C-7', C-11', C-15'), '-' 166.60 (C=O).

C₃₅H₅₁F₃O₃ (576.78)

10 Charakterisierung von Methanophenazin (1)

Stamm: *Ms. mazei* Gö1; DSM-Stamm-Nr.: 3647; Methanophenazin (1)

Kultivierung:^[24] modifiziertes Methanogenen-Medium DSM-Nr.141, 150 mM Methanol, pH 6.9-7.3, strikt anaerobe Bedingungen in N₂/CO₂-Atmosphäre, 37 °C (siehe Kapitel 4 und Abbildung 20).

Aufarbeitung:^[24] Membranpräparation: Abtrennen der Cytoplasmamembranen durch Zentrifugation, Isooctanextraktion der Cytoplasmamembranen.

Reinigung: HPLC: semipräparative Kieselgelsäule (Si 60, 10 x 250 mm, Kontron); Flußrate: 4.0 ml/min; Detektion: $\lambda = 260$ nm; Eluent A: Cyclohexan; Eluent B: Ethylacetat; Eluentengradient: 0 bis 15 min 5 % B, 15 bis 22 min 30 % B, 22 bis 28 min stufenloser Gradient bis 100 % B, 28 bis 35 min 5 % B. Dabei wurden pro Lauf etwa 10 mg Substanzgemisch in 200 μ l Isooctan auf die Säule aufgetragen.

Ausbeute: aus 5 x 100 g Zellen wurden 1.2 mg **1** als gelbes Öl isoliert.

$R_f = 0.51$ (Diethylether/Hexan = 1:1).

Detektion: UV-löschend bei 254 nm, entfärbt KMnO₄-Lösung.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): $\delta = 1.04$ (d, $^3J_{3'\text{CH}_3,3'\text{H}} = 6.6$ Hz, 3H, 3'-CH₃), 1.27 - 1.37 (m, 2H, 4'-H₂), 1.46 - 1.53 (m, 1H, 3'-H), 1.54, 1.55, 1.56 (3s, je 3H, 11'-CH₃, 15'-CH₃, 19'-CH₃), 1.62 (s, 3H, 7'-CH₃), 1.63 (d, $^4J_{20'\text{H}_3,18'\text{H}} = 1.0$ Hz, 3H, 20'-H₃), 1.70 - 1.79 (m, 1H, 2'-H_B) 1.79 - 1.86 (m, 1H, 2'-H_A), 1.87 - 2.17 (m, 14H, 5'-H₂, 8'-H₂, 9'-H₂, 12'-H₂, 13'-H₂, 16'-H₂, 17'-H₂), 4.29 (m_C, 2H, 1'-H₂), 4.99 - 5.06 (m, 2H, 10'-H, 14'-H), 5.08 (t br, $^3J_{6'\text{H},5'\text{H}_2} = 7.9$ Hz, aufgespalten durch Fernkopplungen $^4J \approx 1.1$ Hz, 1H, 6'-H), 5.15 (t br, $^3J_{18'\text{H},17'\text{H}_2} = 7.0$ Hz, aufgespalten durch Fernkopplungen $^4J \approx 1.2$ Hz, 1H, 18'-H), 7.42 (d, $^4J_{1\text{H},3\text{H}} = 2.4$ Hz, 1H, 1-H), 7.58 (dd, $^3J_{3\text{H},4\text{H}} = 9.4$ Hz, $^4J_{4\text{H},1\text{H}} = 2.5$ Hz, 1H, 3-H) 7.85 (ddd, $^3J_{7\text{H},6\text{H}} = 8.4$ Hz,

$^3J_{7H,8H} = 6.7$ Hz, $^4J_{7H,9H} = 1.4$ Hz, 1H, 7-H oder 8-H), 7.91 (ddd, $^3J_{8H,9H} = 8.5$ Hz, $^4J_{8H,7H} = 6.7$ Hz, $^4J_{8H,6H} = 1.5$ Hz, 1H, 8-H oder 7-H), 8.09 (d, $^3J_{4H,3H} = 9.4$ Hz, 1H, 4-H), 8.15 (ddd, $^3J_{6H,7H} = 8.8$ Hz, $^4J_{6H,8H} = 0.8$ Hz, $^5J_{6H,9H} = 0.6$ Hz, 1H, 6-H oder 9-H), 8.19 (dd, $^3J_{9H,7H} = 8.5$ Hz, $^4J_{9H,7H} = 1.4$ Hz, $^5J_{9H,6H} = 0.6$ Hz, 1H, 9-H oder 6-H).

^{13}C NMR (125 MHz, C_6D_6): $\delta =$ '+' 16.12, '+' 16.13, '+' 16.15 (7'-CH₃, 11'-CH₃, 15'-CH₃), '+' 17.73 (19'-CH₃), '+' 19.56 (3'-CH₃), '+' 25.78 (C-20'), '-' 25.83 (C-5'), '-' 27.11, '-' 27.12, '-' 27.21 (C-9', C-13', C-17'), '+' 29.80 (C-3'), '-' 36.31 (C-2'), '-' 37.45 (C-4'), '-' 40.20 und '-' 40.23 (C-8', C-12', C-16'), '-' 66.91 (C-1'), '+' 105.80 (C-1), '+' 124.73, '+' 124.77, '+' 124.93, (C-6', C-10', C-14'), '+' 125.04 (C-18'), '+' 126.53 (C-3), '+' 128.78 (C-7 oder C-8), '+' 129.56 (C-8 oder C-7), '+' 130.17 (C-6 oder C-9), '+' 130.26 (C-9 oder C-6), '-' 131.07 (C-19'), '+' 131.29 (C-4), '-' 134.99, '-' 135.04, '-' 135.09 (C-7', C-11', C-15'), '-' 141.36 (C-10a), '-' 142.63 (C-5a oder C-9a), '-' 144.12 (C-9a oder C-5a), '-' 145.87 (C-4a), '-' 160.78 (C-2).

MS (70 eV): m/z (%) = 538 (100) [M^+], 470 (6) [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8$], 402 (8) [$470 - \text{C}_5\text{H}_8$], 334 (20) [$402 - \text{C}_5\text{H}_8$], 265 (4) [$334 - \text{C}_5\text{H}_9$], 196 (82) [$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}^+$], 168 (7) [$196 - \text{CO}$].

HR-MS: ber. für $\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}$: 538.3923; gef.: 538.3923.

$\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}$ (538.39)

III Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

APT	attached proton test
Äquiv.	Moläquivalente
ber.	berechnet
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	Direct Chemical Ionisation
DME	Dimethoxyethan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DIBAH	Diisobutylaluminiumhydrid
EI	Elektronenstoßionisation
Et	Ethyl
gef.	gefunden
h	Stunde(n)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LiTMP	Lithium-2,2,6,6-tetramethylpiperidid
Me	Methyl
min	Minuten
MS	Massenspektrum
NMR	Nuclear Magnetic Resonanz
<i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -	<i>ortho</i> -, <i>meta</i> -, <i>para</i> -
PE	Petrolether
Ph	Phenyl
Schmp	Schmelzpunkt
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> .-Butyldimethylsilyl
Temp.	Temperatur
THF	Tetrahydrofuran
<i>tert</i> .-	<i>tertiär</i>

2 Literaturverzeichnis

- [1] H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. überarb. Aufl., Thieme, Stuttgart, **1992**.
- [2] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie* (Hrsg.: A. Maelike, W. Müller-Esterl), VCH, Weinheim, **1992**.
- [3] G. Gottschalk, *Bacterial metabolism*, 2nd ed., Springer, New York, **1986**.
- [4] J. Koolmann, K.-H. Röhm, *Taschenatlas der Biochemie*, Thieme, Stuttgart, **1994**.
- [5] T. D. Brock, M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker, *Biology of Microorganisms*, Prentice-Hall International, London, **1994**.
- [6] H. Cypionka, *Grundlagen der Mikrobiologie*, Springer, Berlin, **1999**.
- [7] S. H. Zinder in *Methanogenesis* (Hrsg.: J. G. Ferry), Chapman & Hall, New York, **1993**, S. 128.
- [8] R. Cammak, *Nature* **1997**, 443.
- [9] O. Kandler, H. König, *Arch. Microbiol.* **1978**, 118, 141.
- [10] T. G. Tornabene, T. A. Langworthy, *Science* **1987**, 203, 51.
- [11] W. Zillig, K. O. Stetter, R. Schnabel, J. Madou, A. Gierl, *Zbl. Bakt. Hyg. 1 Abt. Orig. C3* **1982**, 218.
- [12] H. Cypionka, *Grundlagen der Mikrobiologie*, Springer, Berlin, **1999**, S. 76.
- [13] D. R. Boone, W. B. Whitman, P. E. Rouviere in *Methanogenesis* (Hrsg.: J. G. Ferry), Chapman & Hall, New York, **1993**, S. 35.
- [14] U. Deppenmeier, A. Blaut, G. Gottschalk, *Eur. J. Biochem.* **1989**, 186, 317.
- [15] J. Escalante-Semerenda, K. L. Rinehart, R. S. Wolfe, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 9447.
- [16] R. K. Thauer, *Microbiology* **1998**, 144, 2377.
- [17] U. Deppenmeier, T. Lienhard, G. Gottschalk, *FEBS Lett.* **1999**, 457, 291.
- [18] U. Deppenmeier, M. Blaut, G. Gottschalk, *Arch. Microbiol.* **1991**, 155, 272.
- [19] U. Harms, R. K. Thauer, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 235, 653.
- [20] A. Mahlmann, U. Deppenmeier, G. Gottschalk, *FEMS Microbiol. Lett.* **1989**, 61, 149; U. Harms, R. K. Thauer, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 241, 149.

- [21] K. Ma, R. K. Thauer, *FEMS Microbiol. Lett.* **1990**, *70*, 119; B. W. J. Te Broemmelstroet, W. J. Geerts, J. T. Keltjens, C. van der Drift, G. D. Vogels, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1079*, 293.
- [22] Für die Abbildung danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. U. Deppenmeier.
- [23] U. Deppenmeier, T. Lienhard, G. Gottschalk, *FEBS Lett.* **1999**, *457*, 291.
- [24] H. J. Abken, Dissertation, Universität Göttingen, **1997**.
- [25] H. J. Abken, U. Deppenmeier, *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, *154*, 231.
- [26] S. Bäumer, T. Ide, C. Jacobi, A. Johann, G. Gottschalk, U. Deppenmeier, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17968.
- [27] U. Deppenmeier, M. Blaut, B. Schmitt, G. Gottschalk, *Arch. Microbiol.* **1992**, *157*, 505.
- [28] H. J. Abken, M. Tietze, J. Brodersen, S. Bäumer, U. Beifuss, U. Deppenmeier, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 2027.
- [29] U. Beifuss, M. Tietze, S. Bäumer, U. Deppenmeier, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2583; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2470.
- [30] E. Negishi, D. E. Van Horn, A. O. King, N. Okukado, *Synthesis* **1979**, 501; D. E. Van Horn, E. Negishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2252.
- [31] F. Kehrman, F. Cherpillod, *Helv. Chim. Acta* **1924**, *7*, 973.
- [32] persönliche Mitteilung Dr. G. Remberg, Universität Göttingen, **1998**.
- [33] *The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR-Spectra* **1993**, *2*, 1276.
- [34] W. Gottwald, *RP-HPLC für Anwender*, VCH, Weinheim, **1993**.
- [35] R. H. Thomson in *Naturally Occuring Quinones III*, Chapman & Hall, London, **1987**, S. 55.
- [36] F. W. McLafferty, F. Turecek, *Interpretation von Massenspektren*, Spektrum, Heidelberg, **1995**, S. 27.
- [37] H. O. Kalinowski, S. Berger, S. Braun, *^{13}C -NMR-Spektroskopie*, Thieme, Stuttgart, **1984**, S. 117.
- [38] L. Jaenicke, H.-U. Sigmund, *Chemistry and Physics of Lipids* **1989**, *51*, 159; Y. Tanaka, H. Sato, A. Kageyu, T. Tomita, *Biochem. J* **1987**, *243*, 481; Y. Tanaka, H. Sato, A. Kageyu, *Polymer* **1982**, *23*, 1087; D. Grassi, V. Lippuner, J. Brunner, A. Vasella, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10992.
- [39] eine gute Übersicht zu diesem Thema geben J. M. Turner, A. J. Messenger, *Adv. Microb. Physiol* **1986**, *27*, 211.

- [40] J. Fordos, *Recueil des Travaux de la Societe d'Emulation pour les Sciences Pharmaceutiques* **1859**, 3, 30; F. Wrede, E. Starck, *Z. Physiol. Chem.* **1929**, 181, 58.
- [41] L. Guignard, M. Sauvageau, *Compte Rendu des Siences de la Societe de Biologie* **1894**, 46, 841.
- [42] J. R. Clemo, H. McIlwain, *J. Chem. Soc.* **1938**, 479; J. R. Clemo, H. McIlwain, *J. Chem. Soc.* **1950**, 1481.
- [43] M. McDonald, B. Wilkinson, C. W. Van't Land, U. Mocek, S. Lee, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5619.
- [44] A. Römer, H. Budzikiewicz, H. Korth, G. Pulverer, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 509; A. Römer, H. Scholl, H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch. B: Chem. Sci* **1981**, 36, 1037; M. E. Levich, P. Reitz, *Biochemistry* **1966**, 5, 689.
- [45] U. Hollstein, R. J. Van Gemert, *Biochemistry* **1971**, 10, 497; U. Hollstein, P. I. Butler, *Biochemistry* **1972**, 11, 1345; H. M. Hassan, I. Friedovich, *J. Bacteriol.* **1980**, 141, 156.
- [46] S. Yamanaka, *Chiba Igakkai Zasshi* **1972**, 48, 63 (*Chem. Abstr.* **1972**, 77, 162986).
- [47] U. Gräfe, *Biochemie der Antibiotika*, Spektrum, Heidelberg, **1992**, S. 65.
- [48] Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. 1982, japanisches Patent 82-04, 975 (*Chem. Abstr.* **1982**, 96, 197887f).
- [49] W. Keller-Schierlein, A. Geiger, H. Zähler, M. Brandl, *Helv. Chim. Acta* **1988**, 71, 2058; A. Geiger, W. Keller-Schierlein, M. Brandl, H. Zähler, *J. Antibiot.* **1988**, 41, 1542.
- [50] R. B. Herbert, F. G. Holliman, P. N. Ibberson, J. B. Sheridan, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1979**, 2411; T. E. Etherington, R. B. Herbert, F. G. Holliman, J. B. Sheridan, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1979**, 2416; U. Hollstein, L. G. Marshall, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3510.
- [51] A. M. Helbing, M. Viscontini, *Helv. Chim. Acta* **1976**, 59, 2284; A. G. McInnes, D. G. Smith, J. A. Walter, *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 3200; J. L. C. Wright, L. C. Vining, A. G. McInnes, *Can. J. Biochem.* **1977**, 55, 678; E. Leete, N. Kowanko, R. A. Newmark, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 4103; M. Tanabe, S. Urano, *Tetrahedron* **1983**, 39, 3569.

- [52] M. Podojil, N. N. Gerber, *Biochemistry* **1967**, 6, 2701; M. Podojil, N. N. Gerber, *Biochemistry* **1970**, 9, 4616; R. B. Herbert, F. G. Holliman, P. N. Ibberson, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 151; R. B. Herbert, F. G. Holliman, G. B. Sheridan, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 4201; R. B. Herbert, F. G. Holliman, G. B. Ibberson, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 639; U. Hollstein, D. I. Mock, R. R. Sibbit, U. Roitch, F. Lingens, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 2987.
- [53] D. H. Calhoun, M. Carson, R. A. Jensen, *J. Gen. Microbiol.* **1972**, 72, 581; R. P. Longley, J. E. Haliwell, J. J. R. Campell, W. M. Ingelsdew, *Can. J. Microbiol.* **1972**, 18, 1357.
- [54] A. Römer, R. B. Herbert, *Z. Naturforsch., C: Biosci.* **1982**, 37, 1070; R. B. Herbert, J. Mann, A. Römer, *Z. Naturforsch., C: Biosci.* **1982**, 37, 159.
- [55] A. J. M. Messenger, J. M. Turner, *FEMS Microbiol. Lett.* **1983**, 18, 65; A. Römer, E. Lange, *Z. Naturforsch., C: Biosci.* **1983**, 38, 539; U. Hollstein, G. E. Krisov, D. L. Mock, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 3267; P. R. Buckland, R. B. Herbert, F. G. Holliman, *J. of Chem. Res., Synop.* **1981**, 362.
- [56] A. J. M. Messenger, J. M. Turner, *Biochem. Soc. Trans.* **1978**, 6, 1326; S. P. Gulliford, R. B. Herbert, F. G. Holliman, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 2, 195.
- [57] E. D. Weinberg, *Adv. Microbiol. Physiol.* **1970**, 4, 1; E. D. Weinberg, *Perspectives in Biology and Medicine* **1971**, 14, 565.
- [58] J. F. Martin, A. I. Demain, *Microbiol. Rev.* **1980**, 44, 230.
- [59] J. M. Turner, A. J. Messenger, *Adv. Microbiol. Physiol.* **1986**, 27, 218.
- [60] U. Orleb, *Methoden Org. Chemie (Houben-Weyl)*, 4. Aufl., Bd. E9b/2, **1998**, S. 266; N. Hughes in *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds* (Hrsg.: S. Coffey, M. F. Ansell), 2nd ed., Vol. IV, Part I J, Elsevier, Amsterdam, **1989**, S 403.
- [61] F. Kehrman, F. Cherpillod, *Helv. Chem. Acta* **1924**, 7, 973; F. Kehrman, C. Mermod, *Helv. Chim. Acta* **1927**, 10, 62; C. Liebermann, O. N. Witt, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, 20, 2442; T. G. H. Jones, R. Robinson, *J. Chem. Soc.* **1917**, 111, 927.
- [62] C. Ris, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1886**, 19, 2206.
- [63] D. L. Vivian, H. C. Waterman, *J. Org. Chem.* **1949**, 14, 289.
- [64] R. Nietzky, O. Ernst, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1890**, 23, 1852.

- [65] D. L. Vivian, J. L. Hartwell, H. C. Waterman, *J. Org. Chem.* **1953**, *19*, 1136;
D. L. Vivian, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 457.
- [66] Übersicht über die Reaktionen von Benzofuroxan: A. Gasco, A. J. Boulton, *Adv. Heterocycl. Chem.* **1981**, *29*, 251 und K. Ley, F. Seng, *Synthesis* **1975**, 415.
- [67] K. Ley, F. Seng, U. Eholzer, R. Nast, R. Schubert, *Angew. Chem.* **1969**, *81*, 569;
Angew. Chem. Int. Ed. **1969**, *8*, 596.
- [68] F. Kehrman, F. Cherpillod, *Helv. Chim. Acta* **1924**, *7*, 973.
- [69] R. Ott, *Monatsh. Chem.* **1959**, *90*, 827.
- [70] J. Thiele, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1898**, *1*, 1247.
- [71] R. Willstätter, F. Müller, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1911**, *44*, 2180.
- [72] Y. Morita, *Chem. Pharm. Bull.* **1966**, *14*(4), 426.
- [73] P. J. Kocienski, G. Cernigliaro, G. Feldstein, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 353.
- [74] A. Loupy, J. Sansoulet, F. Vaziri-Zand, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1987**, 1027.
- [75] P. G. McDougal, J. G. Rico, Y.-I. Oh, B. D. Condon, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3388.
- [76] U. Jensen-Korte, H.-J. Schäfer, *Liebigs Ann. Chem.* **1982**, 1532; R. Rossi, A. Carpita, M. Chini, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 627; K. Mori, S. Masuda, T. Suguro, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 1329.
- [77] D. B. Collum, J. H. McDonald III, W.C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2120.
- [78] H. G. W. Leuenberger, W. Boguth, R. Barner, M. Schmid R. Zell, *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*, 455.
- [79] P. Mohr, M. Tori, P. Grossen, P. Herold, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 1412;
P. Herold, P. Mohr, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 744.
- [80] S. Stållberg-Stenhagen, *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* **1947**, *25A*, No. 10, 1.
- [81] R. Chenevert, M. Desjardins, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4249.
- [82] L. K. P. Lam, R. A. H. F. Hui, J. B. Jones, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2047.
- [83] A. J. Irvin, J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 556.
- [84] P. Herold, P. Mohr, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 744.
- [85] N. M. Yoon, C. S. Pak, H. C. Brown, S. Krishnamurthy, T. P. Stocky, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2786.
- [86] C. Tamm weist in seiner Publikation [84] auf dieses Problem hin.
- [87] C. F. Lane, *Aldrichimica Acta*, **1975**, *8*, 20.

- [88] R. Rossi, A. Carpita, M. Chini, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 627; C. P. D. Theisen, C. H. Heathcock, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 142.
- [89] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, 1. Aufl., Spektrum, Heidelberg, **1996**, S. 525.
- [90] L.-Y. Chen, A. Zaks, S. Chackalamannil, S. Dugar, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8341.
- [91] D. Terunuma, M. Motegi, M. Tsuada, T. Sawada, H. Nozawa, H. Nohira, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1630.
- [92] H. C. Brown, S. C. Kim, *Synthesis* **1977**, 635.
- [93] G. B. Fisher, J. C. Fuller, J. Harrison, S. G. Alvarez, E. R. Burkhardt, C. T. Golarski, B. Singaram, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6378.
- [94] A. G. Myers, B. H. Yang, H. Chen, L. McKinstry, D. J. Kopecky, J. L. Gleason, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6496.
- [95] J. A. Dale, D. L. Dull, H. S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 2543; J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512.
- [96] D. E. Van Horn, E. Negishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2252.
- [97] Dr. J. Paust und Dr. H. Jaedicke (BASF AG, Ludwigshafen) sowie Dr. R. K. Müller (Hoffmann-La Roche Ltd., Basel) danke ich für die großzügigen Spenden von (*E,E*)-Farnesylaceton.
- [98] ausführliche Übersichten zur Organozirkonium-Chemie: E. Negishi, T. Takahashi, *Synthesis* **1988**, 1; E. Negishi, T. Takahashi, *Aldrichim. Acta* **1985**, *18*, 31; E. Negishi, *Pure Appl. Chem.* **1981**, *53*, 2333.
- [99] E. Negishi, A. O. King, W. L. Klima, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 2526.
- [100] *Org. Synth.* **1985**, *64*, 44.
- [101] E. Negishi, D. E. Van Horn, A. O. King, N. Okukado, *Synthesis* **1979**, 501.
- [102] T. Yoshida, E. Negishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1276; T. Yoshida, E. Negishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4958.
- [103] S. V. Ley, A. Armstrong, D. Diez-Martin, M. J. Ford, P. Grice, J. G. Knight, H. C. Kolb, A. Madin, C. A. Marby, S. Mukherjee, A. N. Shaw, A. M. Z. Slawin, S. Vile, A. D. White, D. J. Williams, M. Woods, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, 667.
- [104] K. Mori, N. Murata, *Liebigs Ann.* **1995**, *12*, 2089.
- [105] A. B. Smith III, Y. Qiu, D. R. Jones, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12011.

- [106] L. S. Hegedus, *Organische Synthese mit Übergangsmetallen*, VCH, Weinheim, **1995**, S. 73.
- [107] Wenn sich nur ein Isomer nachweisen läßt, wird eine Reinheit von > 95 % angegeben.
- [108] G. Snatzke, *ChiuZ* **1981**, 15, 78.
- [109] Für die Durchführung dieser Arbeiten danke ich Herrn Michael Dehler; M. Dehler, Staatsexamensarbeit, Universität Bayreuth, **1998**.
- [110] S. Bäumer, E. Murakami, J. Brodersen, G. Gottschalk, S. W. Ragsdale, U. Deppenmeier, *FEBS Lett.* **1998**, 428, 295.
- [111] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed., Pergamon, Oxford, **1988**.
- [112] W. C. Still, M. Kahn, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923.
- [113] Die genaue Konzentration der verwendeten *n*-Buthyllithium Lösung wurde durch direkte Titration einer Lösung von *N*-Pivaloyl-*o*-toluidin in THF bestimmt, siehe dazu J. Suffert, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 509.
- [114] Übersicht: E. Negishi, F. Liu in *Metal-catalysed Cross-coupling Reactions* (Hrsg.: F. Diederich, P. J. Stang), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 1.
- [115] D. Terunuma, M. Motegi, M. Tsuda, T. Sawada, H. Nozawa, H. Nohira, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 1630.
- [116] R. W. Hoffmann, B. Landmann, *Chem. Ber.* **1986**, 119, 1039.
- [117] T. H. Chan, K. Koumaglo, *J. Organomet. Chem.* **1985**, 285, 109.
- [118] *Chromatographic Chiral Separations* (Hrsg.: M. Zief, L. J. Crane), Marcel Dekker, New York, **1988**.
- [119] *Chiral Liquid Chromatography* (Hrsg.: W. J. Lough), Chapman & Hall, New York, **1996**.
- [120] A. A. DiMarco, T. A. Bobik, R. S. Wolfe, *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, 59, 355; L. D. Eirich, G. D. Vogels, R. S. Wolfe, *Biochemistry* **1978**, 17, 4583; L. G. M. Gorris, C. van der Drift, *BioFactors* **1994**, 4, 139; P. J. Keller, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 344; D. W. Sullins, T. A. Bobik, R. S. Wolfe, K. L. Rinehart, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6646.
- [121] D. E. Cane, G. Young, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 5794.
- [122] D. Raederstorff, A. Y. L. Shu, E. J. Thompson, G. Djerassi, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 2337.

Meine akademischen Lehrer waren u. a. die Herren Professoren und Dozenten

U. Beifuss, R. Brückner, U. Deppenmeier, G. Gottschalk, K. Hafner, H. Hippler,
K. H. Hoyer mann, G. F. Kahl, W. Kne pel, H. Laatsch, F. W. Lichtenthaler, A. de Meijere,
H. W. Roesky, C. Schneider, L. F. Tietze, H. G. Wagner, K. G. Weil, A. Zeeck.

Danksagung

Der NMR-Abteilung des Hauses danke ich für die Aufnahme zahlreicher Protonen- und Kohlenstoff-Spektren. Mein besonderer Dank gilt Frau C. Zolke für die Durchführung der Sondermessungen, ihre lebenswürdige Art, eilige Aufträge auf dem „kleinen Dienstweg“ zu erledigen und ihr großes Herz für kleine Substanzmengen. Herrn Dipl.-Chem. R. Machinek danke ich für seine Bereitschaft zur ausführlichen Diskussion von Kernresonanz-Problemen. Mein Dank gebührt Frau G. Udvarnoki und Herrn Dr. G. Remberg für die Aufnahme der Massenspektren. Herrn Dr. G. Remberg danke ich zudem für viele wertvolle Tips beim Einrichten und Betreiben eines Gaschromatographen, sowie für die „Dauerleihgabe“ einer Chrompak SE 30 Kapillarsäule. Frau E. Pfeil verdanke ich die Aufnahmen der UV- und IR-Spektren und die Messung der Drehwerte.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Deppenmeier, den Damen Katja Weiß, Claudia Hemmerling, Vera Allerheiligen, Anja Claus, Tina Ide und Sabine Lentjes, sowie den Herren Hans-Jörg Abken, Sebastian Bäumer, Jens Brodersen und Frank Falinski danke ich für die wohlwollende Aufnahme und die erfolgreiche interdisziplinäre Zusammenarbeit. Herrn Priv.-Doz. Dr. Uwe Deppenmeier danke ich für das geduldige Beantworten vieler Fragen und für meine Aufnahme in den Stand eines „assoziierten Arbeitskreis-Mitglieds“.

Meinen Laborkollegen Olaf Kunz, Gerald Feder, Frank Döring, Heiko Leutbecher und Dietmar Schmidt danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen konstruktiven Gespräche, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Uwe Beifuss für seine Unterstützung und Förderung während meiner gesamten Promotionszeit.

Bei meinen Freunden Dirk und Markus bedanke ich mich für ihren selbstlosen Einsatz beim Beheben rechnergestützter Schwierigkeiten und für das allzeit „freie Sofa“.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Mario Tietze
geboren am 7. Juni 1966 als Sohn des Heizungsbauers
Manfred Tietze und seiner Frau Helga Tietze geb. Arend
in Kyllburg

Schul Ausbildung:

1972 bis 1976	Besuch der St. Maximin-Grundschule in Kyllburg
1976 bis 1985	Besuch des St. Matthias-Gymnasiums in Gerolstein
22. Juni 1985	Abiturprüfung

Wehrdienst:

1985 bis 1986	Wehrdienst im FschJgBtl 261 in Lebach
---------------	---------------------------------------

Berufsausbildung:

1986 bis 1989	Ausbildung zum Chemielaboranten bei der Hoechst AG in Frankfurt/M
13. Juni 1989	Ablegen der Prüfung vor der Industrie- und Handelskammer in Frankfurt/M

Hochschulausbildung:

SS 1989 bis SS 1991	Chemiestudium an der Technischen Hochschule in Darmstadt
30. September 1991	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
WS 1991 bis WS 1995	Fortsetzung des Chemiestudiums an der Georg-August- Universität in Göttingen
Aug. 94 bis Mrz. 95	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Göttingen unter der Leitung von Dr. U. Beifuss unter der Schirmherrschaft von Prof. Dr. Dr. h.c. L.- F. Tietze zum Thema „Ausgewählte Transformationen mit 4-Silyloxy- 1-benzothiopyrylium-Salzen“
3. November 1995	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
Jan. 96 bis Okt. 97	Untersuchungen zur biologischen Oxidation durch membran- gebundene Dehydrogenasen des Essigsäurebakteriums <i>Gluconobacter oxydans</i>
Okt. 97 bis Mai 00	Dissertation im Arbeitskreis von Priv.-Doz. Dr. U. Beifuss zum Thema „Methanophenazin: Strukturaufklärung und Totalsynthese eines neuartigen Cofaktors aus methanogenen Archaea“
2. November 2000	mündliche Promotionsprüfung