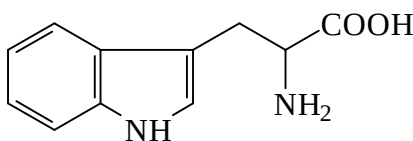


Burkhardt Müller aus Halle a. d. Saale



**Synthese, Analytik und Bildungsbedingungen von
Kontaminanten in biotechnologisch hergestelltem
Tryptophan**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg
Abteilung für Lebensmittelchemie

Hamburg 1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1996 bis Januar 1999 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. Hans Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie – Abteilung Lebensmittelchemie - angefertigt.

- | | |
|---------------|-----------------------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr Dr. Hans Steinhart |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr fil. Volker Kasche |

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 5. Mai 1999

Danksagung

Für die umfangreiche wissenschaftliche, praktische und seelische Unterstützung, die mir während meiner Promotionszeit zuteil wurde, bedanke ich mich ganz herzlich bei:

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart für die Überlassung des Themas und den großzügigen Handlungsspielraum als Mitarbeiter in seinem Arbeitskreis.

Herrn Prof. Dr. fil. Volker Kasche (Technische Universität Hamburg-Harburg) für das engagierte Verfechten der Idee eines interdisziplinären Forschens im Rahmen des „Graduiertenkollegs Biotechnologie“.

Herrn Dr. Thomas Simat, mit seinen wertvollen Hinweisen und seiner großen Erfahrung auf dem Gebiet Tryptophan.

Frau Meike Schüpphaus, Frau Claudia Pacholski und Herrn Arne Sierts für ihre hervorragende Unterstützung, ohne die das vorliegende Werk nicht in diesem Umfang hätte realisiert werden können.

Herrn Klaus Eulitz, Frau Barbara van Wickern, Frau Kim Karen Kleeberg und Frau Kathrin Hönicke für die stets hilfsbereite und kollegiale Zusammenarbeit, ohne die das Team Tryptophan nicht zu solchen wissenschaftlichen Leistungen fähig wäre.

Oliver Bolender und Andreas Schäfer, die mir aus manchen schwierigen synthetischen Problemen mit Leihgaben aus ihrem Arbeitskreis weitergeholfen haben. Desweiteren war die intensive Diskussion während der Mittagsstunde stets eine Bereicherung für mich.

Der DFG für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Meinen Eltern die immer daran geglaubt haben, daß in ihrem Sohn ein Chemiker steckt.

Meiner Sabine, die mich immer auf den Teppich der Realität zurückgeholt hat.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Lebensmittelchemie, bei denen ich mich freundschaftlich aufgehoben fühlte.

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin
d	Dublett
dd	Dublett eines Dubletts
DC	Dünnschichtchromatographie
dest.	destilliertes Wasser
DHETHCC	1-(1',2'-Dihydroxyethyl)-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure
dhPIT	2-[2'',3''-Dihydroxy-1''-(3'-indolyl)-propyl]-tryptophan
DMF	N,N-Dimethylformamid
EBT	1,1'-Ethylidenbistryptophan
EMS	Eosinophilie-Myalgie-Syndrom
FAB	Fast Atom Bombardment
HIT	2-(2'-Hydroxyindolin)-tryptophan
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAC	3-Indolylacetaldehyd
IG	3-Indolylglycerin
IM	3-Indolylmethanol
IMK	3-Indolylmethyl-Kation
IMT	2-(3'-Indolylmethyl-tryptophan
IMTHCC	1-(3'-Indolylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure
m	Multipllett
MTHCC	1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure
IR	Infrarot
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OH-Trp	Hydroxytryptophan
PAA	3-Phenylaminoalanin
PIC	3a-Hydroxy-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolindol-2-carbonsäure
PP	Pyrophosphat
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SD	Showa Denko K.K.
t	Triplett
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THCC	1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure
Trp	L-Tryptophan
UV	Ultraviolett

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Tryptophan	1
Abb. 2:	Die Trp-Biosynthese	4
Abb. 3:	Der Trp-Metabolismus	5
Abb. 4:	MANNICH-Reaktion am Indol.....	7
Abb. 5:	Trp-Synthese aus Gramin und Formamidomalonester.....	8
Abb. 6:	Fermentative de novo Synthese (B. amyloliquefaciens, Strain V)	10
Abb. 7:	technologischer Ablauf des SD-Verfahrens	11
Abb. 8:	Trp-Synthase Reaktion.....	12
Abb. 9:	technologischer Ablauf des Amino GmbH-Verfahrens.....	14
Abb. 10:	EMS-assoziierte Kontaminanten im SD-Trp	17
Abb. 11:	EMS-assoziierte SD-Trp-Charge	17
Abb. 12:	Trp-Metaboliten in SD-Trp-Chargen	18
Abb. 13:	Trp-Oxidationsprodukte in SD-Trp-Chargen	19
Abb. 14:	Trp-Carbonylkondensationsprodukte in SD-Trp-Chargen.....	19
Abb. 15:	EBT in SD-Trp-Chargen	20
Abb. 16:	PAA in SD-Trp-Chargen.....	20
Abb. 17:	2-substituierte Trp-Derivate in SD-Trp-Chargen	21
Abb. 18:	Indol.....	22
Abb. 19:	Resonanzstrukturen des Indols.....	23
Abb. 20:	FISCHER-Indolsynthese	24
Abb. 21:	modifizierte REISSERT-Indolsynthese	25
Abb. 22:	MADLUNG-Indolsynthese.....	25
Abb. 23:	2-substituierte Indole über Lithiierung	26
Abb. 24:	Trp-Synthese über Dehydroalanin-Derivate.....	26
Abb. 25:	Trp-Synthese über Aziridin-Derivate.....	27
Abb. 27:	Syntheschema zur Darstellung der Hydroxytryptophane	30
Abb. 28:	Darstellung von Benzyloxynitrotoluol.....	30
Abb. 29:	Darstellung von (E)-Benzyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren	31
Abb. 30:	Darstellung von Benzyloxyindol	32
Abb. 31:	Darstellung von Benzyloxygramin	32
Abb. 32:	Darstellung von Benzyloxyskatylformamidomalonester	33
Abb. 33:	Darstellung von Benzyloxytryptophan	34
Abb. 34:	Darstellung von Hydroxytryptophan.....	34
Abb. 35:	Syntheschema zur Darstellung von IMT.....	37
Abb. 36:	Darstellung von 2-Nitrobenzyltriphenylphosphoniumchlorid	38
Abb. 37:	Darstellung von 2-Aminobenzyltriphenylphosphoniumchlorid Hydrochlorid	38
Abb. 38:	Darstellung von 3-Indolylacetylchlorid	39

Abb. 39:	Darstellung von 2-(3'-Indolylacetamido)-benzyltriphenylphosphoniumchlorid	40
Abb. 40:	Darstellung von 2-(3'-Indolylmethyl)-indol.....	40
Abb. 41:	Darstellung von 3-Brom-2-hydroxyiminopropansäureethylester.....	41
Abb. 42:	Darstellung von 2''-(Hydroxyimino)-3-[2-(3'-indolylmethyl)-indolyl]-propansäureethylester.....	42
Abb. 43:	Darstellung von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophanethylester.....	42
Abb. 44:	Darstellung von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan.....	43
Abb. 45:	Resonanz im 3-Indolylmethylkation	43
Abb. 46:	Bildung des 3-Indolylmethyl-Kations	44
Abb. 47:	saure und basische IMK-Bildung	44
Abb. 48:	Potentielle IMK-Bildner	45
Abb. 49:	IMK-Bildung und Folgereaktionen aus IAc	46
Abb. 50:	Abhängigkeit der IMT-Bildung vom pH-Wert	47
Abb. 51:	Abhängigkeit der IMT-Bildung vom molaren Verhältnis zwischen Trp und IM	48
Abb. 52:	Zeitabhängigkeit der IMT-Bildung	48
Abb. 53:	Reaktion der IMT-Schnellsynthese	49
Abb. 54:	Reaktionsansatz der IMT-Schnellsynthese.....	50
Abb. 55:	Faktorieller Versuchsplan der IMT-Schnellsynthese.....	52
Abb. 56:	Planmatrix der IMT-Versuchsplanung	52
Abb. 57:	IMT-Monitoring.....	53
Abb. 58:	Monitoring der UV-aktiven Nebenprodukte.....	53
Abb. 59:	Paretdiagramm der IMT-Ausbeute	54
Abb. 60:	Paretdiagramm für die UV-aktiven Nebenprodukte	55
Abb. 61:	IMT-Ausbeuten-Flächenplot des experimentellen Raumes	55
Abb. 62:	Flächenplot der UV-aktiven Verunreinigungen im exp. Raum	56
Abb. 63:	IMT-Schnellsynthese: Reaktionsansatz nach flüssig-flüssig Extraktion	58
Abb. 64:	IMT-Lyophilisat nach Säulenchromatographie und Aktivkohlebehandlung	59
Abb. 65:	Retrosynthese von dhPIT.....	60
Abb. 66:	dhPIT-Vollsynthesekonzept	62
Abb. 67:	dhPIT-Bildung aus Trp und IG.....	63
Abb. 68:	3-Indolylglycerin-Synthese nach LINGENS und LANGE (1970)	64
Abb. 69:	3-Indolylglycerin aus R-(-)-2,2-Dimethyl-4-hydroxymethyl-1,3-dioxolan	64
Abb. 70:	dhPIT-Bildung aus IG (in situ) und Trp	66
Abb. 71:	dhPIT-Reaktionsansatz, pH=0.5.....	67
Abb. 72:	Bildungsmechanismus der 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäuren nach PICTET-SPENGLER.....	68

Abb. 73:	Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure-Derivate aus unterschiedlichen Aldehyden	69
Abb. 74:	IAC-Synthese nach SWERN	70
Abb. 75:	IAC-Synthese nach DARBRE	71
Abb. 76:	IAC-Stabilisierung nach GRAY	71
Abb. 77:	Zeitabhängigkeit der IMTHCC-Bildung	72
Abb. 78:	pH-Abhängigkeit der IMTHCC-Bildung	73
Abb. 78:	pH-Abhängigkeit der IMTHCC-Bildung	73

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen	3
2.1. Der Tryptophanstoffwechsel	3
2.1.1. Die Tryptophan-Biosynthese	3
2.1.2. Der Tryptophan-Metabolismus	5
2.2. Herstellung von Tryptophan	6
2.2.1. Chemische Synthesen	6
2.2.2. Fermentative de novo Darstellung (Showa Denko K.K.)	9
2.2.3. Biotransformationsverfahren (AMINO GmbH)	12
2.3. Eosinophilie-Myalgie-Syndrom (EMS)	15
2.3.1. EMS-Ursachenforschung	16
2.3.2. Kontaminanten im Showa Denko-Trp	17
2.3.3. Gesetzliche Bestimmungen für die Qualität von Trp in pharmazeutischen Applikationen	21
2.4. Grundlegende Aspekte zur Indol- bzw. Tryptophanchemie	22
2.4.1. Synthesestrategien substituierter Indole	24
2.4.2. Tryptophan-Synthesen durch Anfügen der Alaninkette an Indolderivate	26
3. Problemstellung	28
4. Ergebnisse	29
4.1. Hydroxytryptophane	29
4.1.1. Synthese der Hydroxytryptophane	29
4.1.1.1. Darstellung von Benzyloxynitrotoluol	30
4.1.1.2. Darstellung von (E)-Benzyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren	31
4.1.1.3. Darstellung von Benzyloxyindol	32
4.1.1.4. Darstellung von Benzyloxygramin	32
4.1.1.5. Darstellung von Benzyloxyskatylformamidomalonester	33
4.1.1.6. Darstellung von Benzyloxytryptophan	33
4.1.1.7. Darstellung von Hydroxytryptophan	34
4.2. 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan (IMT)	36
4.2.1. Synthese von IMT	36
4.2.1.1. Darstellung von 2-Nitrobenzyltriphenylphosphoniumchlorid	38
4.2.1.2. Darstellung von 2-Aminobenzyltriphenylphosphoniumchlorid Hydrochlorid	38
4.2.1.3. Darstellung von 3-Indolylacetylchlorid	39
4.2.1.4. Darstellung von 2-(3'-Indolylacetamido)-benzyltriphenylphosphoniumchlorid	39
4.2.1.5. Darstellung von 2-(3'-Indolylmethyl)-indol	40
4.2.1.6. Darstellung von 3-Brom-2-hydroxyiminopropansäureethylester	41

4.2.1.7. Darstellung von 2''-(Hydroxyimino)-3-[2-(3'-indolylmethyl)-indolyl]-propansäureethylester	41
4.2.1.8. Darstellung von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophanethylester	42
4.2.1.9. Darstellung von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan	43
4.2.2. Bildungsbedingungen von IMT	43
4.2.2.1. Untersuchung von verschiedenen potentiellen IMK-Bildnern	46
4.2.2.2. Abhängigkeit der IMT-Bildung vom pH-Wert	47
4.2.2.3. Abhängigkeit der IMT-Bildung vom molaren Verhältnis zwischen Trp und IM	47
4.2.2.4. Abhängigkeit der IMT-Bildung von der Zeit	48
4.2.3. Entwicklung einer IMT-Schnellsynthese	49
4.2.3.1. Faktorenanalyse der IMT-Schnellsynthese	50
4.2.3.2. Meßergebnisse des Versuchsplans	53
4.2.3.3. Statistica-Auswertung der Meßergebnisse	54
4.2.3.4. Optimierung der Reaktionsbedingungen bezüglich der IMT-Bildung	56
4.2.3.5. Entwicklung eines Clean up Verfahrens der IMT-Schnellsynthese	57
4.3. 2-[2'',3''-Dihydroxy-1''-(3'-indolyl)-propyl]-tryptophan (dhPIT)	60
4.3.1. De novo Synthese von dhPIT	60
4.3.2. dhPIT-Synthese über 3-Indolylglycerin	63
4.3.3. dhPIT-Bildung aus in situ hergestelltem IG	65
4.4. 1-(3'-Indolylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolin-3-carbonsäure (IMTHCC)	68
4.4.1. Tetrahydro-β-carbolincarbonsäure-Derivate aus unterschiedlichen Aldehyden	68
4.4.2. Synthese von IAc	69
4.4.2.1. IAc-Darstellung nach SWERN	70
4.4.2.2. IAc-Darstellung nach DARBRE	70
4.4.2.3. Stabilisierung von IAc nach Gray	71
4.4.3. Bildungsbedingungen von IMTHCC	72
4.4.3.1. Abhängigkeit der IMTHCC-Bildung von der Zeit	72
4.4.3.2. Abhängigkeit der IMTHCC-Bildung vom pH-Wert	72
4.4.4. Synthese von IMTHCC	73
4.4.4.1. Optimierung der IMTHCC-Synthese	74
5. Diskussion	75
5.1. Kontaminanten in biotechnologisch hergestelltem Trp	75
5.1.1. Hydroxytryptophane	76
5.1.1.1. Synthese der Hydroxytryptophane	76
5.1.2. IMT	77
5.1.2.1. Synthese von IMT	77
5.1.2.2. Untersuchung der Bildungsbedingungen von IMT	78
5.1.2.3. IMT-Schnellsynthese	80

5.1.3. dhPIT	81
5.1.3.1. dhPIT-Bildung	81
5.1.4. IMTHCC	82
5.1.4.1. Synthese von IMTHCC	82
5.1.4.2. Bildungsbedingungen von IMTHCC	83
5.2. Fazit	83
6. Zusammenfassung	84
7. Anhang	87
7.1. Chemikalien und Geräte	87
7.1.1. Chemikalien	87
7.1.2. Geräte	89
7.1.3. Säulenmaterialien und Methoden	90
7.2. HPLC-Bedingungen	91
7.2.1. Reaktionsmonitoring der Hydroxytryptophan-Synthesen	91
7.2.2. Synthesen und Bildungsbedingungen von IMT, dhPIT und IMTHCC	91
7.3. Synthese von 4-, 6- und 7-Hydroxytryptophan	92
7.3.1. Synthese von 6-Benzoyloxy-2-nitrotoluol (4-OH-Trp)	92
7.3.2. Synthese von 4-Benzoyloxy-2-nitrotoluol (6-OH-Trp)	93
7.3.3. Synthese von 3-Benzoyloxy-2-nitrotoluol (7-OH-Trp)	94
7.3.4. Synthese von (E)-6-Benzoyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren (4-OH-Trp)	95
7.3.5. Synthese von (E)-4-Benzoyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren (6-OH-Trp)	96
7.3.6. Synthese von (E)-3-Benzoyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren (7-OH-Trp)	97
7.3.7. Synthese von 4-Benzoyloxyindol (4-OH-Trp)	98
7.3.8. Synthese von 6-Benzoyloxyindol (6-OH-Trp)	99
7.3.9. Synthese von 7-Benzoyloxyindol (7-OH-Trp)	100
7.3.10. Synthese von 4-Benzoyloxygramin	101
7.3.11. Synthese von 6-Benzoyloxygramin	102
7.3.12. Synthese von 7-Benzoyloxygramin	103
7.3.13. Synthese von 4-Benzoyloxyskatylformamidomalonester	104
7.3.14. Synthese von 6-Benzoyloxyskatylformamidomalonester	105
7.3.15. Synthese von 7-Benzoyloxyskatylformamidomalonester	106
7.3.16. Synthese von 4-Benzoyloxytryptophan	107
7.3.17. Synthese von 6-Benzoyloxytryptophan	108
7.3.18. Synthese von 7-Benzoyloxytryptophan	109
7.3.19. Synthese von 4-Hydroxytryptophan	110
7.3.20. Synthese von 6-Hydroxytryptophan	111
7.3.21. Synthese von 7-Hydroxytryptophan	112

7.4. IMT	113
7.4.1. Synthese von IMT	113
7.4.1.1. Synthese von 2-Nitrobenzyltriphenylphosphoniumchlorid	113
7.4.1.2. Synthese von 2-Aminobenzyltriphenylphosphoniumchlorid Hydrochlorid	114
7.4.1.3. Synthese von 3-Brom-2-hydroxyiminopropansäureethylester	115
7.4.1.4. Synthese von 3-Indolylacetylchlorid	116
7.4.1.5. Synthese von 2-(3'-Indolylacetamido)-benzyltriphenylphosphoniumchlorid	117
7.4.1.6. Synthese von 2-(3'-Indolylmethyl)-indol	118
7.4.1.7. Synthese von 2''-(Hydroxyimino)-3-[2-(3'-indolylmethyl)indolyl]- propansäure-ethylester	119
7.4.1.8. Synthese von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophanethylester	120
7.4.1.9. Synthese von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan	121
7.4.2. Bildungsbedingungen von IMT	123
7.4.2.1. Verwendete Puffer- und StammLösungen	123
7.4.2.2. IMT-Kalibrierung	125
7.4.2.3. 3-Indolylmethylderivate, Indol und Formaldehyd	125
7.4.2.4. pH-Abhängigkeit der IMT-Bildung	126
7.4.2.5. Abhängigkeit der IMT-Bildung vom molaren Verhältnis zwischen Trp und IM	127
7.4.2.6. Abhängigkeit der IMT-Bildung von der Zeit	127
7.4.3. Entwicklung einer Schnellsynthese von 2-(3'-Indolylmethyl)tryptophan	127
7.4.3.1. Verwendete Trp-StammLösungen	127
7.4.3.2. Optimierung der IMT-Bildung mittels Faktorenanalyse	127
7.4.3.3. Schnellsynthese von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan	129
7.5. IMTHCC	130
7.5.1. Bildungsbedingungen von IMTHCC	130
7.5.1.1. Verwendete Puffer- und StammLösungen	130
7.5.1.2. pH-Abhängigkeit der IMTHCC-Bildung	130
7.5.1.3. Abhängigkeit der IMTHCC-Bildung von der Zeit	131
7.5.2. Synthese von IMTHCC	131
7.5.2.1. Synthese von 3-Indolylacetaldehyd	131
7.5.2.2. Synthese von IMTHCC	132
7.6. Bildung von dhPIT	134
7.6.1. dhPIT-Nachweis aus in situ gebildetem 3-Indolylglycerin	134
8. Literatur	135

1. Einleitung

Die essentielle, aromatische Aminosäure L-Tryptophan (Trp) gehört zu den 20 proteinogenen Aminosäuren. Sie besteht aus einem Indolring und einer mit C-3 des Indols verbundenen Alaninkette (**Abb. 1**). Da Trp vom menschlichen Organismus nicht synthetisiert werden kann, muß sie mit der Nahrung aufgenommen werden. Trp gehört zu den weniger häufigen Aminosäuren, da der Gehalt in Proteinen nur ca. 1% beträgt. Der tägliche Mindestbedarf wird mit 160 mg für

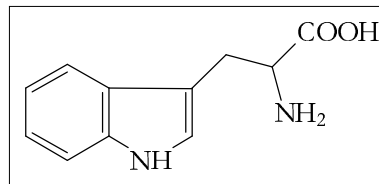


Abb. 1 Tryptophan

Frauen und 250 mg für Männer angegeben (FAO/WHO/UNO, 1985). Ein Teil des Trp's wird im menschlichen Organismus über Chinolinsäure zu Nicotinsäureamid metabolisiert, weshalb Nicotinsäure-Mangelerscheinungen nur bei gleichzeitiger Trp-armer Ernährung oder eines gestörten Trp-Stoffwechsels auftreten kann. Die als Pellagra bezeichnete schwere Hautkrankheit tritt in Ländern auf, in denen sich überwiegend von Trp-armen Nahrungsmitteln (Mais) ernährt wird. Niedrige Serumkonzentrationen an Trp können über einen Mangel an Serotonin zu Depressionen führen. 1989 kam es im Zusammenhang mit der oralen Einnahme von Trp-haltigen Produkten zum Auftreten des Eosinophilie-Myalgie-Syndroms (EMS), einer in Einzelfällen auch tödlichen verlaufenden Krankheit, charakterisiert durch erhöhte Eosinophilen-Zahl in Verbindung mit Muskelschmerzen und einer Vielzahl anderer unspezifischer Symptome. Allerdings scheint es, daß Verunreinigungen im Trp für den Ausbruch dieser Krankheit verantwortlich sind. Trp kann im Organismus auf verschiedenen Wegen metabolisiert werden. Der dominierende Abbauweg ist mit über 90% der oxidative Kynurenin-Metabolismus zu Kohlendioxid und Ammoniak. Dabei werden wichtige Stoffwechselprodukte wie Kynurensäure, Chinolinsäure und Niacin (Vitamin B₂) gebildet. Dagegen werden 1-2% des Trp zu dem biogenen Amin 5-Hydroxytryptamin (5-HT) umgesetzt. Dieser Neurotransmitter, auch Serotonin genannt, wird als Vorstufe zur Synthese des Epiphysenhormons Melatonin (5-Methoxy-N-acetyl-tryptamin) verwendet, welches bei der Chronobiologie von Wirbeltieren eine wichtige Regulationsfunktion besitzt (BROWN, 1994; SAINIO et al., 1996). Die Vielzahl der physiologischen Wirkungen gaben Trp auch ein wirtschaftliches Interesse. Heute findet Trp folgende Verwendung:

- Pharmazeutischer Rohstoff in der parenteralen Ernährung (Infusionslösungen)
- Pharmazeutischer Wirkstoff in Sedativa, Neuroleptika und Antidepressiva
- Essentielle Aminosäure in oral einzunehmenden Arzneimitteln
- Essentielle Aminosäure in diätetischen Lebensmitteln
- Futtermittelzusatz
- Mikrobiologie

Der therapeutische Stellenwert des Trp's als Schlafmittel und Antidepressivum ist bis heute nicht ganz geklärt. Gesichert ist, daß die pharmazeutische Wirkung auf den 5-HT-Stoffwechsel zurückzuführen ist. Trp besitzt im Gegensatz zu 5-HT die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und wird daher als Precursor für 5-HT eingesetzt, um die oben erwähnten pharmazeutischen Indikationen zu erzielen (erste Publikation: LAUER et al., 1958). Als Antidepressivum wird eine Dosierung von 1.5-3.0 g/d, als Sedativum 0.5-1.0 g/d (vor dem Schlafengehen) empfohlen (FRESENIUS, 1984).

Trp wurde erst relativ spät von Hopkins und Cole im Jahre 1902 bei der Spaltung von Casein mit Trypsin entdeckt (zum Vergleich: Glycin 1819 und Tyrosin 1846). Da im 19. Jahrhundert Proteine ausschließlich unter drastischen Bedingungen hydrolysiert wurden und Trp bei diesen Bedingungen zerstört wurde, konnte diese Aminosäure erst bei Anwendung schonenderer, enzymatischer Methoden gefunden werden. Der Name Tryptophan wurde aufgrund der späten Entdeckung gegeben. Trp bedeutet etwa: „DAS SICH ERST JETZT OFFENBARTE“ (griechisch: phaneros = offenbar). Nach seiner Entdeckung sind in den Jahren 1940-1970 eine Anzahl von chemischen Synthesen für Trp und seine Derivate entwickelt worden, die besonders auf der Weiterentwicklung der Indolchemie beruhen. Synthetisch erhielt man DL-Tryptophan, aus dem durch enzymatische Racematspaltung die natürliche L-Form gewonnen wurde. Die große Gruppe der pharmakologisch wirksamen und therapeutisch genutzten pflanzlichen Indolalkaloide werden sämtlich über den Indolring-Donator Trp gebildet. Das große wissenschaftliche Interesse an dieser Substanzklasse, führte zur Weiterentwicklung der präparativen, organischen Synthese und leistete einen großen Beitrag zur Strukturaufklärung dieser Verbindungen. In den 80-iger Jahren verdrängten biotechnologische Verfahren die chemischen Synthesen weitestgehend. Diese wesentlich kostengünstigere Herstellung von Trp führte zum umfangreichen Einsatz dieser Aminosäure in den oben erwähnten Anwendungsgebieten. Allein in den USA wurden 1989 50-100 t Trp in Futtermitteln eingesetzt, 80% davon in der Schweinemast. Die größten Trp-Hersteller waren im Jahre 1989 (GREER et al., 1991):

• Mitsui Toatsu Chemical Industry	200 t
• Ajinomoto Co.	150 t
• Showa Denko K.K.	150 t
• Kyowa Hakko Kogyo Co.	40 t
• Seiyaku Co.	30 t

Trp-Rohwaren werden grundsätzlich in zwei Reinheitsstufen unterteilt. Dabei handelt es sich um **feed grade**- und **pharma grade**-Qualitäten. Die Reinheitsstufen werden unter anderem aufgrund der UV-aktiven Inhaltsstoffe, sowie Farbe und Begleitstoffe der Trp-Rohwaren festgelegt. Der Weltmarktpreis von Trp (pharma grade) betrug 1998 ca. 160 DM/kg; damit ist Trp die teuerste Aminosäure (zum Vergleich L-Serin 100 DM/kg).

2. Grundlagen

2.1. Der Tryptophanstoffwechsel

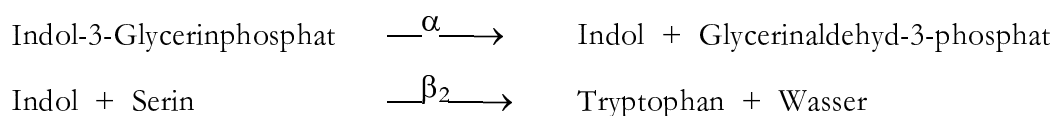
2.1.1. Die Tryptophan-Biosynthese

Die fünf Enzyme der vom Chorismat ausgehenden Trp-Biosynthese sind auf dem trp-Operon codiert. Dieses Operon wurde schon sehr früh entdeckt und an ihm Regulations-Mechanismen der Proteinexpression auf molekularer Ebene studiert. Diese fünf Enzyme werden nacheinander in koordinierter Weise und in äquimolaren Mengen synthetisiert.

Ausgangspunkt für die Biosynthese von Trp ist die Kondensation von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat. Über 5-Dehydrochinat, 5-Dehydroshikimat und Shikimat entsteht Chorismat. Chorismat stellt den Verzweigungspunkt für die Biosynthesen von Trp, Tyrosin und Phenylalanin dar. Zur Bildung von Anthranilat wird eine Aminogruppe der Glutaminseitenkette auf Chorismat übertragen. Ab dem Chorismat sind vier Enzymsysteme beteiligt:

- Anthranilatphosphoribosyl-Transferase
- Anthranilatphosphoribosyl-Isomerase
- Indol-3-glycerinphosphat-Synthase
- Trp-Synthase

Anthranilat kondensiert mit Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP), einer aktivierten Form von Ribosephosphat. In einer durch Hydrolyse von Pyrophosphat (PP) angetriebenen Reaktion wird eine Bindung zwischen C-1 des Ribose-5-phosphats und dem Stickstoff des Anthranilats geknüpft. Anschließend Ringöffnung und Isomerisierung des Ribose-5-phosphates führt zu 1-(*o*-Carboxyphenylamino)-1'-desoxyribose-5'-phosphat. Dehydratisierung und Decarboxylierung dieses Zwischenproduktes führen zu Indol-3-glycerinphosphat, das schließlich mit L-Serin unter Bildung von Trp reagiert. Die Glycerinphosphat-Seitenkette wird dabei durch eine, von L-Serin stammende, Alaninkette ersetzt (**Abb. 2**). Diese Reaktion wird von der Trp-Synthase katalysiert, dem zentralen Enzym der Trp-Biosynthese. Das Enzym Trp-Synthase besitzt die Untereinheitenstruktur $\alpha_2\beta_2$ und kann in zwei α und eine β_2 -Untereinheit dissoziieren. Die isolierten Untereinheiten katalysieren Teilreaktionen, die zusammen zur Trp-Synthase führen:



Jedes aktive Zentrum der β_2 -Untereinheit enthält Pyridoxalphosphat als prosthetische Gruppe.

Die katalytischen Eigenschaften der isolierten Untereinheiten ändern sich merklich bei der Ausbildung des $\alpha_2\beta_2$ -Komplexes; so verzehnfacht sich die Reaktionsgeschwindigkeit der Teilreaktio-

nen. Ferner synthetisiert der $\alpha_2\beta_2$ -Komplex Trp in einem kooperativen Mechanismus. Das Indol aus der ersten Partialreaktion reagiert sofort mit Serin, so daß es gar nicht aus dem $\alpha_2\beta_2$ -Komplex freigesetzt, sondern innerhalb des Enzyms von einer katalytischen Untereinheit zur anderen kanalisiert wird (ANDERSON et al., 1995; HYDE et al., 1988).

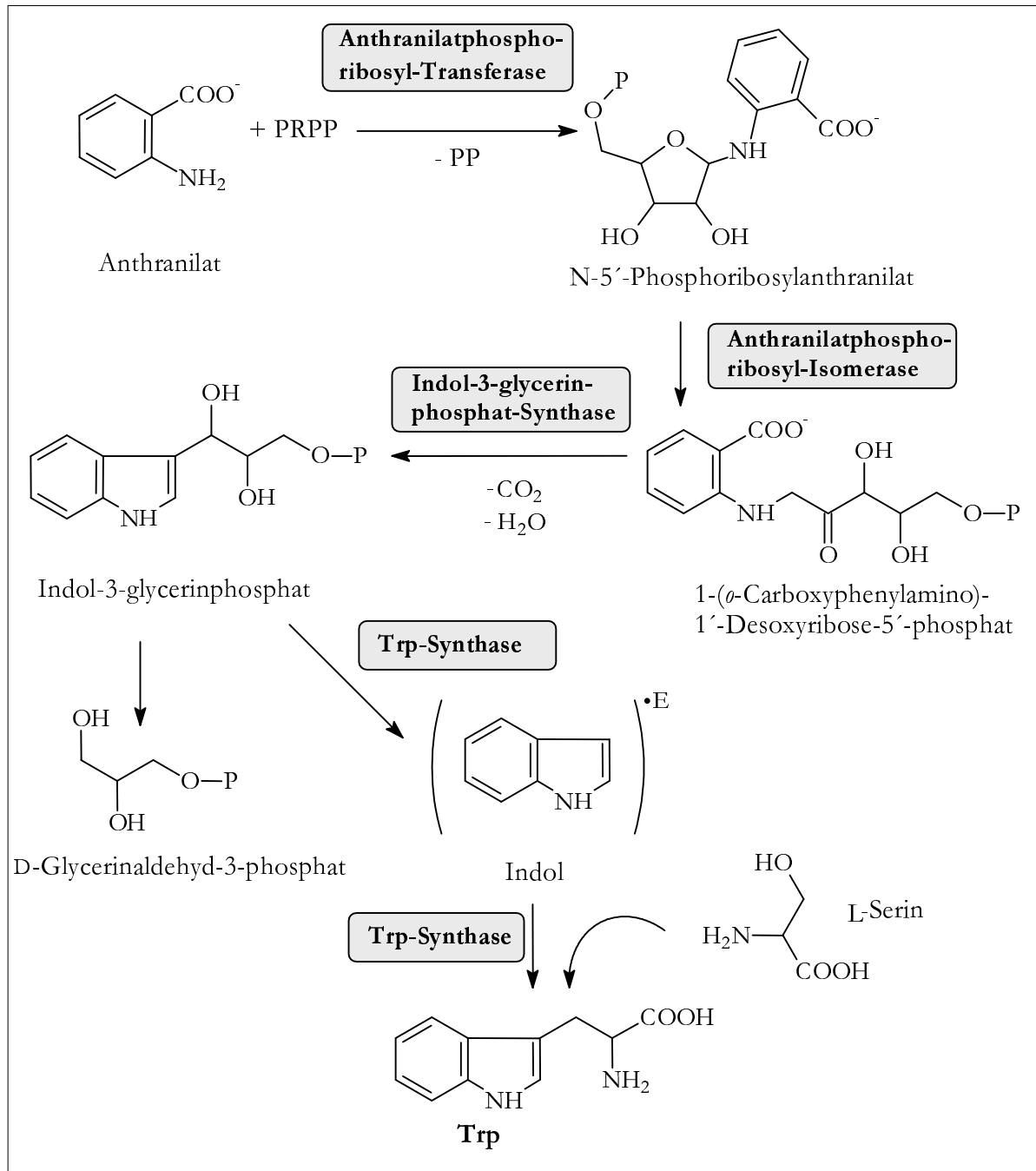


Abb. 2 Die Trp-Biosynthese

2.1.2. Der Tryptophan-Metabolismus

Das Ziel des Aminosäureabbaus ist es, wichtige Stoffwechselprodukte zu bilden, die in Glucose umgewandelt oder im Citratzyklus oxidiert werden können. Sämtliche Kohlenstoffgerüste der 20 verschiedenen Aminosäuren gehen in nur sieben Moleküle über. Trp ist sowohl glucogen als auch ketogen, d.h. das Kohlenstoffgerüst des Trp's wird sowohl zu Acetyl-CoA bzw. Acetoacetyl-CoA als auch zu Pyruvat abgebaut und dient zur Energiegewinnung des Organismus.

Trp wird zu über 90% über den Kynurenin-Abbauweg metabolisiert, wobei es schließlich zu Kohlendioxid und Ammoniak abgebaut wird. Es werden auf diesem Weg jedoch wichtige Stoffwechselprodukte wie Kynurensäure, Chinolensäure und Niacin (Vitamin B₂) gebildet. Etwa 2% des Trp's werden zum Neurotransmitter Serotonin über den sogenannten 5-HT-Abbauweg verstoffwechselt. Serotonin stellt den Precursor des Hormons Melatonin dar, dem eine entscheidende Bedeutung in der Schlaf-Wach-Regulation zukommen soll (BROWN, 1994). In dieser physiologischen Funktion liegt ein pharmazeutisches Einsatzgebiet von Trp-Produkten. Ferner wird Trp im Organismus zum Teil über Desaminierung und Decarboxylierung über die Zwischenstufen Tryptamin und 3-Indolylacetaldehyd (IAC) zum Indolacetat abgebaut. Außerdem wird Trp durch oxidative Desaminierung zu Indolpyruvat metabolisiert, das seinerseits durch Decarboxylierung zu IAC bzw. durch Reduktion der Carbonylfunktion zum Indollactat umgewandelt wird. In **Abb. 3** ist die Komplexität des Trp-Metabolismus und die Vielfältigkeit der während der biotechnologischen Herstellung von Trp möglichen Trp-Metaboliten ersichtlich.

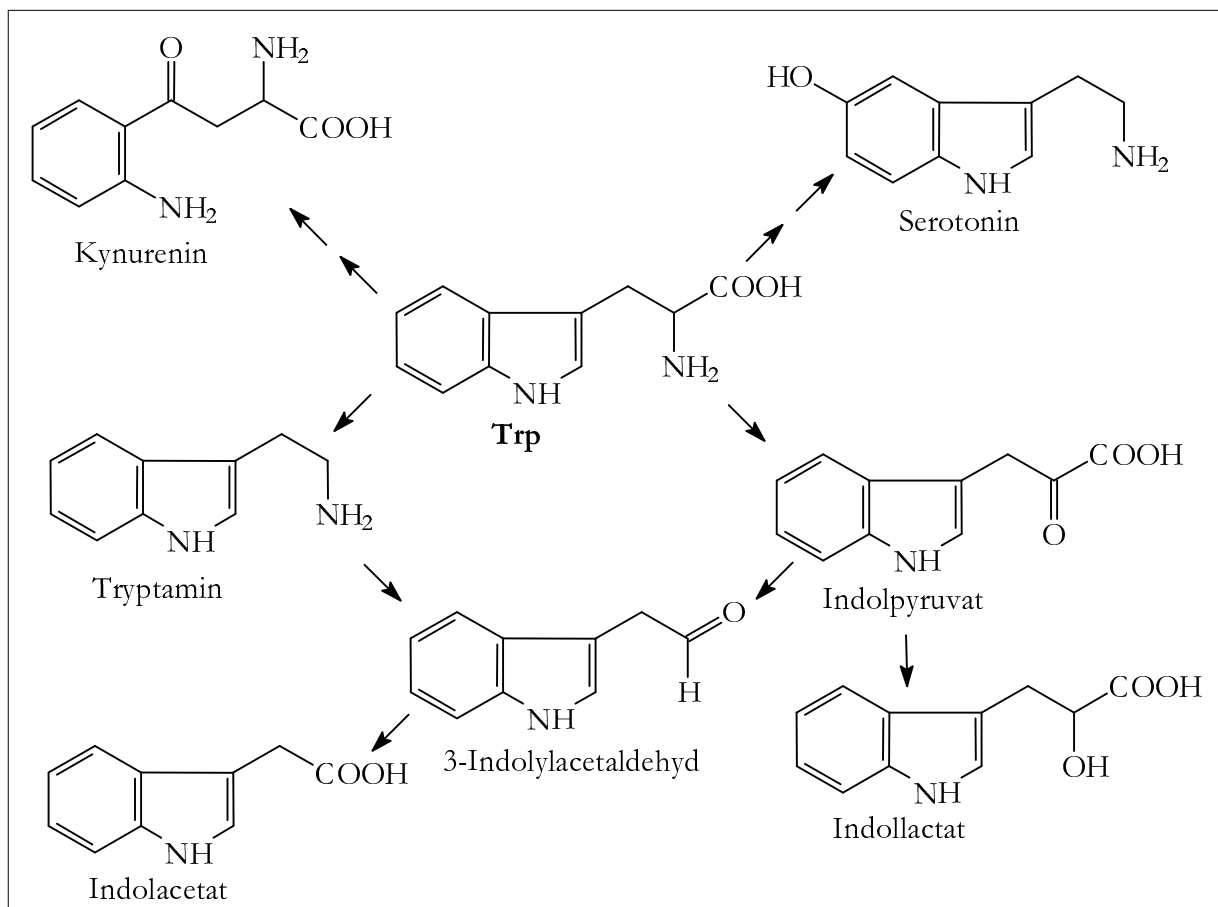


Abb. 3 Der Trp-Metabolismus

2.2. Herstellung von Tryptophan

Es werden drei Arten für die Darstellung von Trp unterschieden. Auf **chemisch-präparativem Wege** wurden eine Vielzahl von Synthesen entwickelt, die neben Trp auch ein breites Spektrum an Trp-Derivaten zugänglich machten. In der Regel erhält man ein racemisches DL-Trp, aus dem durch enzymatische Racematspaltung die natürliche L-Form gewonnen werden kann.

Die seit den 80-iger Jahren zur großtechnischen Darstellung von Trp verwendeten biotechnologischen Verfahren verfolgen zwei grundlegende Strategien. Bei der **fermentativen de novo Darstellung** von Trp werden Mikroorganismen eingesetzt, die im Gegensatz zu Wirbeltieren eine Trp-Biosynthese durchführen können. Damit Mikroorganismen wirtschaftlich zur Biosynthese von Trp eingesetzt werden können, muß die Biosynthese von Trp so modifiziert werden, daß es zu einer Überproduktion kommt.

Bei dem als **Biotransformation** bezeichnetem Verfahren ist die Biokatalyse im wesentlichen auf die β_2 -Untereinheit der Trp-Synthase des Mikroorganismus beschränkt. Üblicherweise werden bei der Produktion immobilisierte Bakterien eingesetzt, die die Enzyme überexprimieren (BANG et al., 1983a; PLISCHKE und STEINMETZER, 1988; HATAKEYAMA et al., 1996a, 1996b). Pyruvat und Ammonium können unter Ausnutzung der Umkehrreaktion der Tryptophanase ebenfalls als Substrat eingesetzt werden (TOMITA et al., 1996; MASATO et al., 1990).

2.2.1. Chemische Synthesen

Seitdem die Bedeutung von Trp für die tierische Ernährung um die Jahrhundertwende bekannt wurde, bemühte man sich, die Aminosäure synthetisch herzustellen, um die aufwendige Isolierung aus natürlichem Material zu umgehen. Es dauerte allerdings bis in die vierziger Jahre, bis alle Schwierigkeiten beseitigt waren und eine effiziente Trp-Synthese gefunden war. Es werden Indole oder Indolderivate als Edukte benutzt und die Alaninkette anschließend aufgebaut. Eine andere Möglichkeit besteht im Aufbau des Indolringes während der Trp-Synthese. Ein Beispiel dafür ist die Synthese nach WARNER und MOE (1948), die Trp aus Acrolein und Phenylhydrazin synthetisierten. In der großtechnischen Herstellung von Trp haben bis zur Ablösung durch biotechnologische Verfahren, vor allem modifizierte WARNER-MOE-Synthesen (DEGUSSA, 1978) Anwendung gefunden (KLEEMAN et al., 1985). Die hier vorgestellten Trp-Synthesen geben einen kurzen historischen Überblick einiger Darstellungsmöglichkeiten.

Synthese durch Kondensation von β -Indolylaldehyd mit Hippursäure bzw. Hydantoin:

Nach dem Prinzip der KNOEVENAGEL-Kondensation können Aldehyde und Hippursäure (N-Benzoylglycin) oder deren Azlacton umgesetzt werden. Reduktion und Hydrolyse führen zu α -Aminocarbonsäuren. HOPKINS und COLE (1902) erhielten nach Behandlung von Trp mit Eisen(III)-chlorid eine Verbindung, die durch ELLINGER (1906) als β -Indolylaldehyd identifiziert wurde. Die Anwendung der Azlacton-Methode mit β -Indolylaldehyd führte in Anlehnung an die Phenylalaninsynthese zur ersten Trp-Synthese (ELLINGER und FLAMAND, 1908). Die Gesamtausbeute betrug allerdings nur 3.5%, was auf die schlechte Ausbeute bei der Aldehydsynthese und

die sich anschließende, äußerst aufwendige Reinigung zurückzuführen ist. Durch diese Synthese wurde die Konstitution des Trp's als β -Indolylaminopropionsäure erkannt. Alternativ kann anstelle von Hippursäure, Hydantoin mit β -Indolylaldehyd kondensiert werden. Nach anschließender Reduktion mit Natriumamalgam und Hydrolyse wurde durch WHEELER und HOFFMANN (1911) Trp erhalten. Aber auch hier lag die Gesamtausbeute bei nur 6,5%.

Synthesen durch Kondensation von Gramin mit Acylaminocarbonsäureestern:

Indole tragen an der C-3 Position einen aktiven Wasserstoff. Die als MANNICH-Reaktion bezeichnete Umsetzung von Dimethylamin, Formaldehyd und einer CH-aciden Verbindung führt zu tertiären Basen. Benutzt man Indol als Reaktionspartner, so wird das Alkaloid Gramin (Dimethylaminomethylindol) erhalten (**Abb. 4**), (KÜHN und STEIN, 1937).

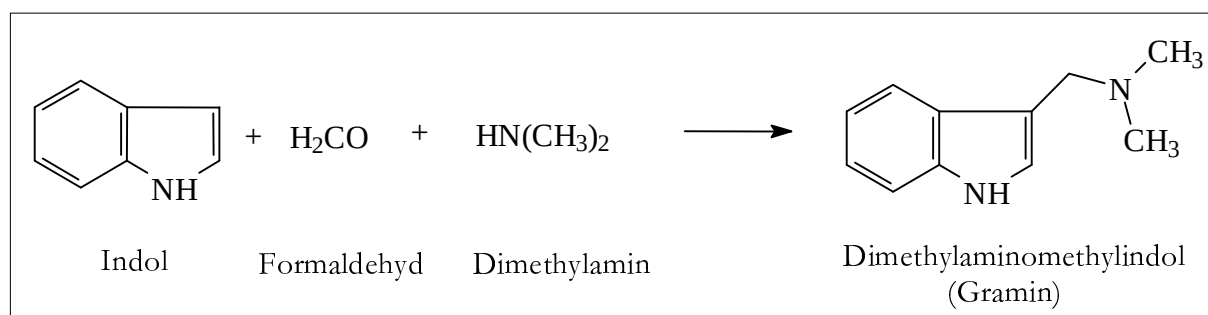


Abb. 4 MANNICH-Reaktion am Indol

MANNICH et al. (1937) entdeckten die Kondensationsfähigkeit gewisser tertiärer Basen. Sie fanden, daß 1-(Dimethylaminomethyl)-cyclohexanon mit Malonester und wenig Natrium-alkoholat unter Abspaltung von Dimethylamin und Knüpfung einer C-C Bindung reagiert. Ein großer Fortschritt für eine Trp-Synthese bestand in der Entdeckung des Gramins als Alkylierungsmittel für Acylaminomalonsäureester. Diese Entdeckung führte zu einer ausgezeichneten Trp-Synthese, deren Ausbeute bis heute nicht mehr gesteigert werden konnte. SNYDER und SMITH (1944) führten die erste Fassung einer derartigen Synthese zur Trp-Darstellung durch. Sie setzten das quartäre Salz Graminiodid mit der Natriumverbindung des Acetamidomalonesters zum Skatylacetamidomalonester um, der bei der alkalischen Verseifung die Skatylamidomalonsäure lieferte. Nach Eliminierung einer Carboxylgruppe ergab eine nochmalige alkalische Hydrolyse Trp. Die Gesamtausbeute betrug 45% bezogen auf Indol. SNYDER et al. (1945) fanden, daß die Bildung des quartären Ammoniumsalzes für die Alkylierung überflüssig ist, denn das freie Gramin bildet mit Acetamidomalonsäure in Gegenwart von gepulvertem Natriumhydroxid hervorragende Ausbeuten an Skatylacetamidomalonester. Neben dem Acetamidomalonester wurde von HELLMANN (1949) der Formamidomalonester für die SNYDERSCHE-Trp-Synthese verwendet. Dieser Ester spaltet unter den Bedingungen der basischen Esterhydrolyse die Formylgruppe ab. Dadurch wird gegenüber der Trp-Synthese mit Acetamidomalonester ein Reaktionsschritt gespart (**Abb. 5**). Desweiteren erfolgt die Alkylierung des Formamidomalonesters durch das Gramin wesentlich leichter. Die Synthese von Trp gelingt in 1-2 Tagen mit nahezu 90%-iger Ausbeute bezogen auf Indol.

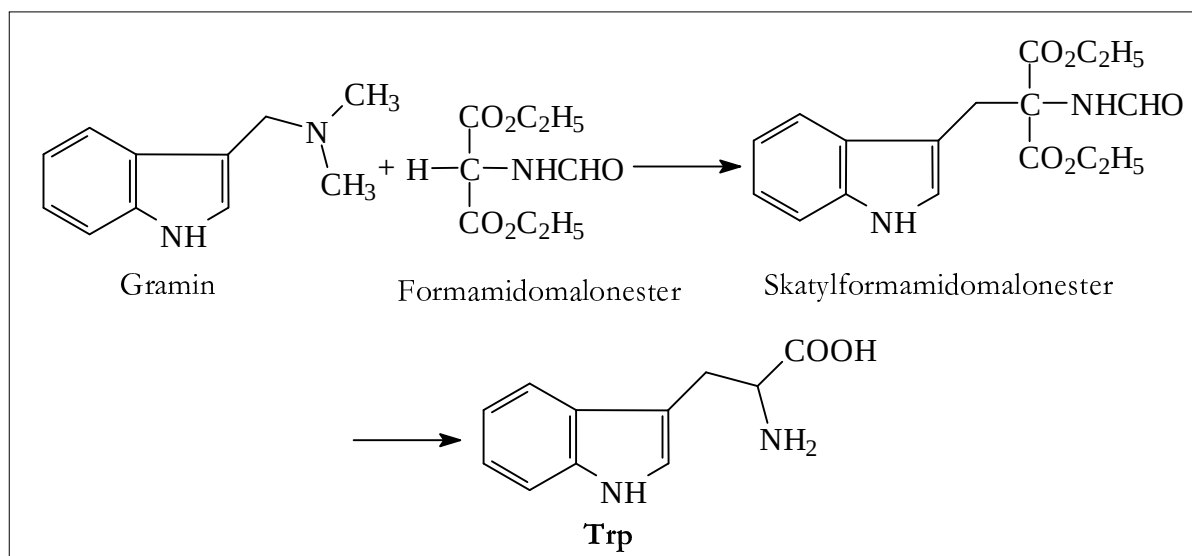


Abb. 5 Trp-Synthese aus Gramin und Formamidomalonester

Synthese durch Kondensation von Indol mit tertiären Mannichbasen:

Die bisher dargelegten Synthesen gehen von einem Indolderivat aus, das in 3-Stellung bereits das β -Kohlenstoffatom der Alaninseitenkette trägt. Dieses Kohlenstoffatom stammte entweder aus einer Aldehydfunktion des β -Indolylaldehydes oder aus der Dimethylaminomethylgruppe des Gramins. BUTENANDT et al. (1949) fanden in bestimmten tertiären Mannichbasen kondensationsfähige Stoffe, die mit unsubstituiertem Indol zu Produkten reagieren können, die mit denjenigen aus Gramin und Acylaminoestern identisch sind. Die tertiären Mannichbasen sind durch MANNICH-Reaktion leicht herstellbar. Der Formamidomalonester bildet zum Beispiel mit Formaldehyd und Piperidin innerhalb einer Minute bei Raumtemperatur (RT) einen Piperidylmethylformamidomalonester, der mit Indol bei Gegenwart von wenig Natriumhydroxid sehr leicht zum erwähnten Skatylformamidomalonester unter Freisetzung von Piperidin kondensiert. Trp konnte auf diesem Wege in 71%-iger Ausbeute bezogen auf Indol erhalten werden (BUTENANDT et al., 1949).

2.2.2. Fermentative de novo Darstellung (Showa Denko K.K.)

Durch die rasante Entwicklung der Biochemie war es Anfang der 80-iger Jahre möglich, die kostenintensiven chemischen Synthesen durch biotechnologische Verfahren zu ersetzen. Um die Überexpression einer Zielsubstanz in einem Mikroorganismus zu verwirklichen, muß er im Idealfall folgende Kriterien hinsichtlich seiner Stoffwechseltätigkeit erfüllen:

- Keine Produkthemmung der Enzymsynthese der am Trp-Anabolismus beteiligten Enzyme
- Keine Aktivitätshemmung der am Syntheseweg beteiligten Enzyme
- Sehr geringe Enzymaktivität des Trp-Abbaus
- Geringe abbauende Aktivität gegenüber dem einzusetzenden Substrat (z.B. Anthranilsäure)

Zur Gewinnung von Mikroorganismen mit diesen Eigenschaften wurden in der Vergangenheit im wesentlichen zwei Strategien angewandt:

- Ungerichtete Mutagenese mit anschließender Selektion auf modifizierte Eigenschaften in der Regulation der Trp-Biosynthese und Kombination verschiedener Eigenschaften durch Kreuzung
- Gezielte gentechnische Veränderung

Durch obenstehende Methoden ist es gelungen, eine Vielzahl an Mikroorganismen für die Produktion von Trp zu modifizieren, von denen nachstehend eine Auswahl aufgeführt wird.

<i>Art</i>	<i>Name</i>	<i>Literatur</i>
Bakterien	<i>Escherichia coli</i>	BANG und LANG et al., 1983; BANG und BEHRENDT et al., 1983; MATEUS et al., 1996; KUNG, 1988; MALIN, 1960, 1961
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	SHOWA DENKO K.K., 1984
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	KATSUMATA et al., 1995
	<i>Aeromonas spec.</i>	ASAI et al. 1982
	<i>Klebsiella spec.</i>	
	<i>Bacillus subtilis</i>	AIDA et al. 1986
	<i>Brevibacterium spec.</i>	
Pilze	<i>Torulopsis utilis</i>	REHM, 1967
	<i>Saccharomyces willianus</i>	
	<i>Fusarium roseum</i>	

Die japanische Firma Showa Denko K.K. (SD) führte bis 1989 eine effiziente, fermentative Trp-Herstellung durch. Um diesen Prozeß wirtschaftlich zu gestalten, mußte die Wahl des Substrates nach kostengünstigen und realisierbaren Faktoren erfolgen. Aus diesem Grunde wurde Anthranilsäure als C-Quelle zur Darstellung des Indolringes gewählt. Als Substrat für die L-Serin Biosynthese wurde Glucose verwendet (**Abb. 6**).

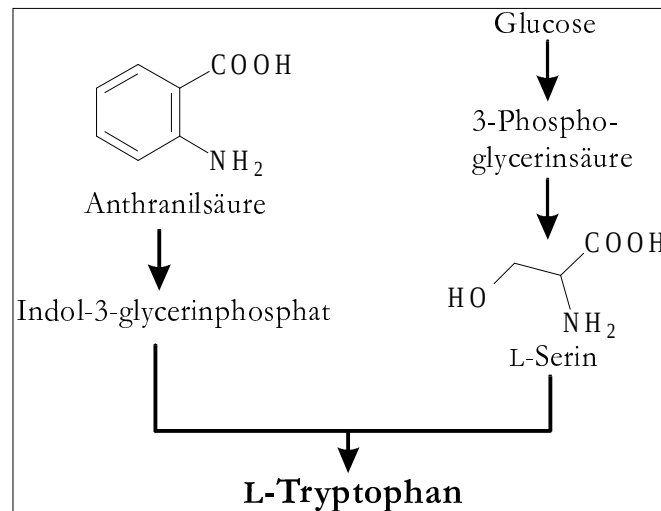


Abb. 6 Fermentative de novo Synthese (*B. amyloliquefaciens*, Strain V)

Ausgehend von Anthranilsäure sind vier Enzyme erforderlich, um Trp herstellen zu können. SD verwendete ausschließlich gentechnisch modifizierte 5-Fluoro-Trp-resistente Mutanten des *Bacillus amyloliquefaciens*. Nach Duplizierung des trp-Operons (Strain II) und Integration eines effizienten Promotors wurde ein Stamm erhalten (Strain III), der bis Dezember 1988 zur Produktion genutzt wurde. Nach dieser Zeit wurden neue, weitergehend veränderte Stämme mit einer Vervielfachung des serA-Gens (Strain IV) und Integration eines prs-Gens (Strain V) zur Produktion verwendet (FUSHO et al., 1986; TAKINISHI et al., 1988; SAKIMOTO et al., 1989; MAYENO und GLEICH, 1994). Zur Gewinnung des Trp's wurde nach Fermentation und Zentrifugation eine Reinigung über einen Anionen- und Kationenaustauscher angewandt. Anschließend erfolgte eine Aktivkohlebehandlung, Filtration und Auskristallisation des Produktes (**Abb.7**) (SAKIMOTO und TORIGOE, 1994).

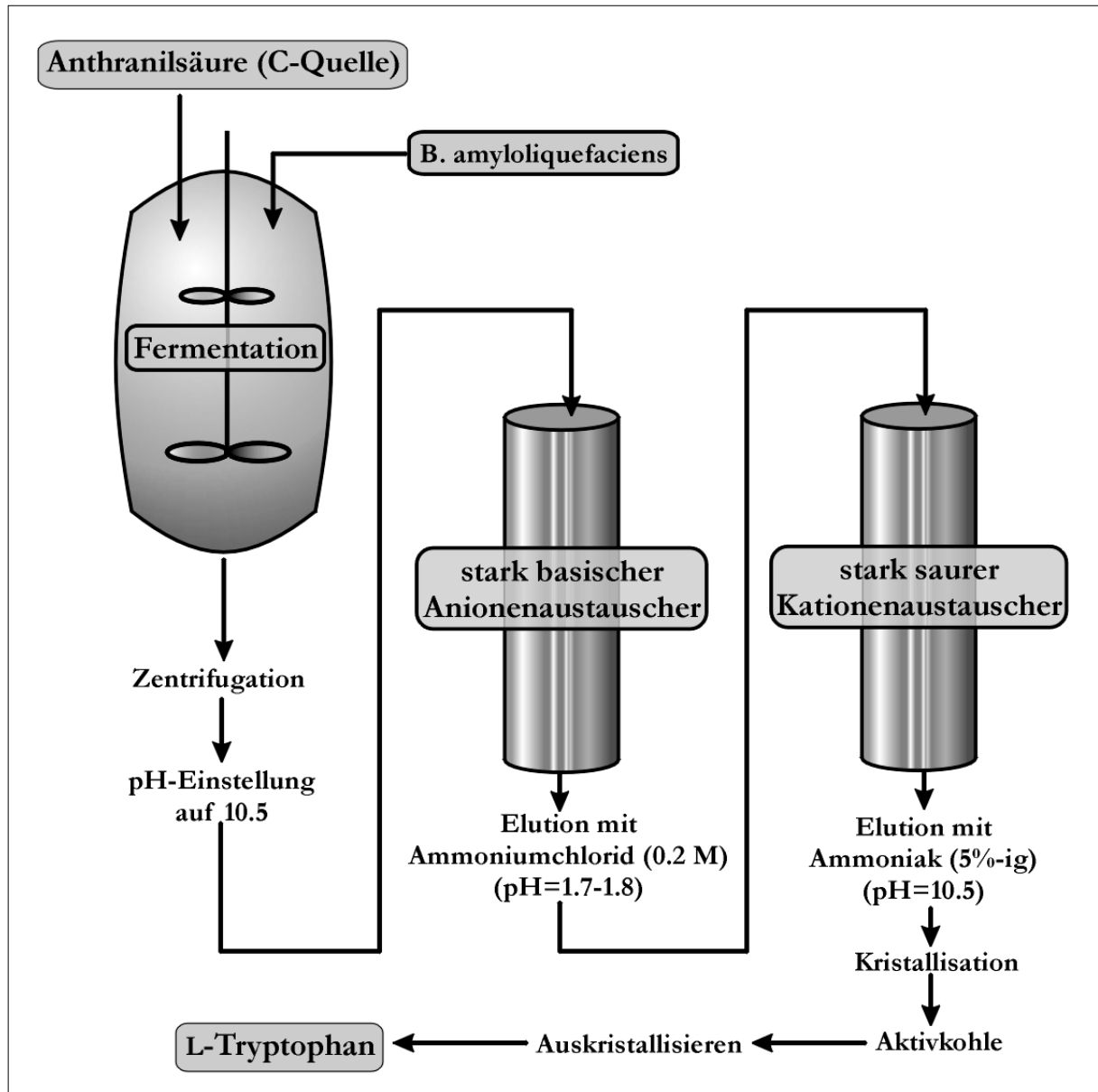


Abb. 7 technologischer Ablauf des SD-Verfahrens

2.2.3. Biotransformationsverfahren (AMINO GmbH)

Trp wird bei der AMINO GmbH (Frellstedt, Deutschland) über biokatalytische Kondensation von L-Serin und Indol hergestellt (**Abb. 8**). Die AMINO GmbH ist eine Tochterfirma der Norddeut-

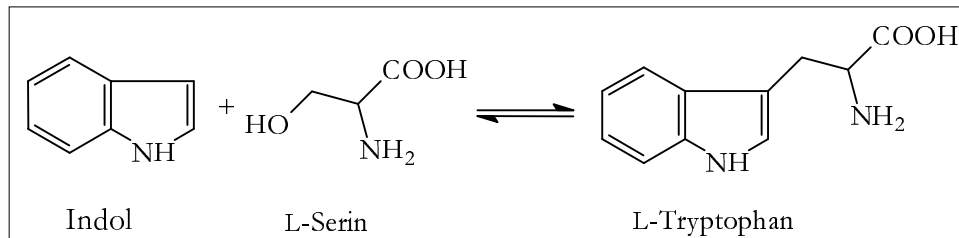


Abb. 8 Trp-Synthase Reaktion

schen Zuckerraffinerie. Die bei der Verarbeitung von Zuckerrüben anfallende Melasse enthält neben einem hohen Anteil an Saccharose eine Vielzahl von Aminosäuren und anderen Naturstoffen. Neben der Abtrennung von Saccharose (Herstellung von Invertzucker-Sirup) werden Aminosäuren, Betain und Uredin isoliert und kommerziell vertrieben. Eine der isolierten Aminosäuren ist L-Serin. Nachfolgend soll das Herstellungsverfahren näher beschrieben werden (FAURIE and FRIES, 1998; Faurie, persönliche Mitteilung), (**Abb. 9**).

Die bei der Zuckerherstellung anfallende Melasse wird mit Wasser verdünnt, um sie durch eine Kationenaustauschersäule fördern zu können. Einen guten Überblick über die Bestandteile der Melasse und dessen Weiterverarbeitung gibt STEINMETZER, 1991. Während des Chromatographieprozesses werden die Ascheanteile (anorganische Salze) der Melasse mittels Ionenausschlußchromatographie von den übrigen Bestandteilen getrennt und verlassen sehr schnell die Kolonne. Die übrigen Bestandteile (Saccharin, Betain und Aminosäuren) werden ihrer Größe nach aufgetrennt. Dadurch ist es prozeßtechnisch möglich, genaue Schnitte zu legen, um einzelne Fraktionen mit hoher Produktreinheit zu gewinnen. Mischfraktionen werden gesammelt und der Säule erneut zur Trennung zugeführt. Die L-Serin-Fraktion besitzt eine so große Reinheit, daß keine weitere Reinigung erfolgen muß. Ein Teil des L-Serins wird durch pH-Anhebung racemisiert, umkristallisiert und als DL-Serin verkauft. Das verbliebene L-Serin wird einer weiteren Ionenaustauschchromatographie zugeführt, um Reste von Zuckern und anderer Aminosäuren vollständig abzutrennen. Die erhaltene hochreine L-Serin-Fraktion kann gelagert werden und bei Bedarf zur Biotransformation von Trp verwendet werden. Das für die Umsetzung erforderliche, durch Rektifikation von Steinkohlenteer gewonnene Indol wird käuflich erworben. Trp wird durch Biokatalyse mit dem aus Mutation hervorgegangenen *Escherichia coli* Stamm B 10 (BANG et al., 1980) gewonnen. Die Tryptophanase Aktivität ist reduziert. Das Bakterium besitzt aufgrund einer Deletion der Gensequenzen des Trp-Repressors, des Attenuationssignals sowie Teilen des trp-Operons (trp E und trp D) eine Überexpression der Gene trp A und trp B des trp-Operons und damit eine permanente Überexpression der α - und β -Untereinheiten des Trp-Synthase-Komplexes. Infolge des Fehlens der Gene trp E und trp D ist der Organismus nicht in der Lage, Trp durch eigene Biosynthese herzustellen und ist daher Trp-auxotroph.

Der Mikroorganismus wird schrittweise mittels Fed-Batch-Fermentation (30 L-, 300 L- und 3000 L-Fermenter) in einer sterilen Fermentationskaskade angezüchtet, die Zellen durch Zentrifugation gewonnen und gemeinsam mit den Substraten L-Serin und Indol inkubiert. Dabei wird der Suspension aus L-Serin und den Zellen genau dosiert Indol zugeführt, um die Konzentration an Indol im Reaktor stets konstant zu halten. Die Umsetzung wird mittels HPLC online verfolgt und aus den erhaltenen Daten der Prozeß gesteuert. Die Verweilzeit im Bioreaktor beträgt 6 h, wobei die Ausbeute an Trp mit 75 g/l/day angegeben wird. Die Enzymaktivität wird mit 250 U/L und der Enzymverbrauch mit 4500 U/kg beziffert. Während Indol zu 99% in Trp umgesetzt wird, ist der Bedarf an L-Serin deutlich höher. Ursache ist vermutlich eine Metabolisierung des L-Serins. Dabei ist die Hauptkomponente, neben anderen katabolischen Reaktionswegen, vermutlich die in den Mikroorganismen vorhandene Serin-Dehydratase Aktivität. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von Serin zu Pyruvat und Ammonium und ist Teil des Aminosäureabbaus. Nach erfolgter Umsetzung werden die Zellen bei 70°C abgetötet und durch Zentrifugation entfernt. Die zellfreie Biotransformationslösung wird auf einen pH-Wert von ca. 5.5 eingestellt und mit Aktivkohle gemischt. Nach Abtrennung der Aktivkohle wird Trp durch Eindampfen der Biotransformationslösung auskristallisiert. Der Rückstand wird erneut in Wasser gelöst und noch zweimal umkristallisiert. Das Trp der letzten Reinigungsstufe besitzt Pharmaqualität und wird abschließend durch Mikrofiltration pyrogenfrei gemacht. Die bei dem Prozeß anfallenden Reststoffe (Zuckerrübenschnitzel, Zellen, Aktivkohle) werden als Futtermittel, Dünger oder Baustoffe verwendet.

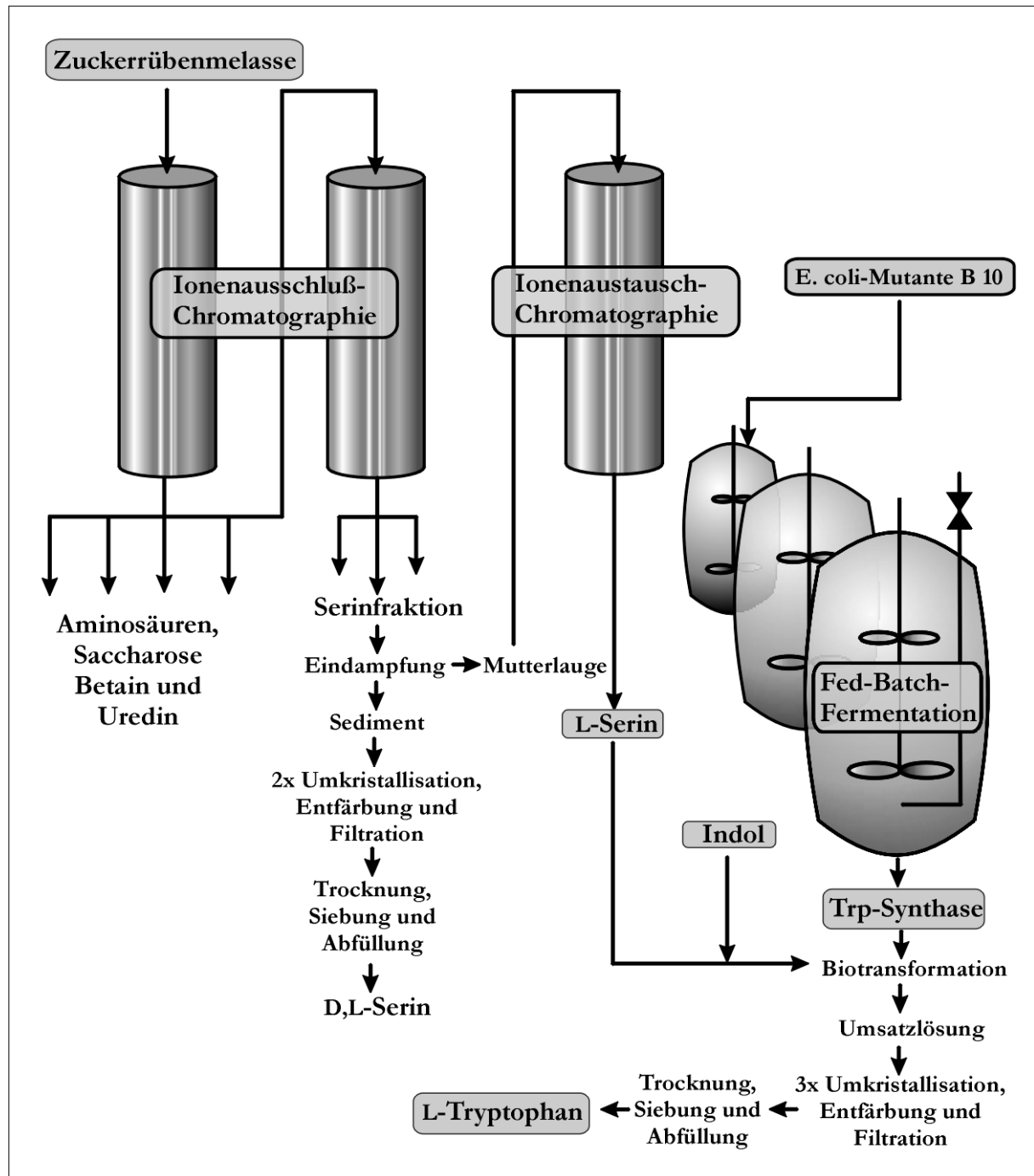


Abb. 9 technologischer Ablauf des Amino GmbH-Verfahrens

2.3. Eosinophilie-Myalgie-Syndrom (EMS)

Im Jahre 1989 wurde in den USA der epidemische Ausbruch einer bis dahin unbekannten Krankheit registriert. Es handelt sich dabei um eine Krankheit, die mit dem Anstieg der eosinophilen Granulozyten auf über 1000/ μ L Blut und dem Auftreten schwerer Myalgien, die bis zur Bewegungsunfähigkeit führen können, verbunden ist (CDC, 1989a). Die Symptomatik von EMS ist allerdings wesentlich vielschichtiger. Es wird auch von Müdigkeit, Gelenkschmerzen, Fieber, Atembeschwerden, Mißempfindungen (Neuropathie), dermatologische Manifestationen (Ödeme, Sklerodermie, Indurationen, Fehlpigmentierung) und Pruritus berichtet (SZEIMIES und MEURER, 1993).

Von der äußerlichen Symptomatik ähnelt es damit dem 1981 in Spanien aufgetretenen Toxic-Oil-Syndrom, einer bis dahin nicht aufgeklärten Erkrankung, die im Zusammenhang mit dem Verzehr von mit Anilin vergälltem Rapsöl steht (TABUENCA, 1981).

Auf Grundlage des oben genannten Symptomkomplexes wurden in den USA bis September 1992 1511 EMS-Fälle registriert, von denen 38 tödlich verliefen (KILBOURNE, 1992). In Deutschland erfüllten 105 Patienten die Kriterien der CDC (1989a) für die EMS-Indikation (CARR et al., 1994). Es gilt als äußerst wahrscheinlich, daß die Dunkelziffer der EMS-Fälle weit- aus höher liegt, da positive Fälle einerseits nicht als EMS diagnostiziert wurden oder andererseits die Falldefinition für die Eosinophilie nicht erfüllt wurde (KAMB et al., 1992). Unmittelbar nach dem Auftreten von EMS konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Applikation von Trp und dem Ausbruch von EMS aufgedeckt werden (CDC, 1989b). Die Akzeptanz und weite Verbreitung von Trp als Arzneimittel wurde durch das physiologische Vorkommen von Trp und dem damit verbundenen natürlichen Charakter bedingt. Trp schloß eine Lücke zwischen den umstrittenen Psychopharmaka und der ebenfalls nur bedingt akzeptierten Naturheilkunde. Die Verwendung von Trp als wirksames und als besonders nebenwirkungsarm geltendes Schlafmittel und Antidepressivum bedingte die große Verbreitung von EMS, die noch zusätzlich durch den freien Verkauf von Trp als Nahrungsergänzungsmittel in den USA gefördert wurde.

BELONGIA et al. (1990) und SLUTSKER et al. (1990) konnten zeigen, daß fast alle EMS-Fälle auf die Einnahme von Trp eines Rohstoffherstellers, Showa Denko K.K. in Japan, zurückzuführen waren. Durch das Ruhen der Zulassung für Trp-haltige, oral einzunehmende Arzneimittel (BGA, 1989a; 1989b; 1990) konnten weitere Neuerkrankungen verhindert werden. In Deutschland waren ab 1990 nur Arzneimittel zur intravenösen Anwendung (Infusionslösungen) und diätische Lebensmittel (bilanzierte Diäten) nicht von dem vorläufigen Vertriebsstop für Trp-haltige Zubereitungen betroffen. Seit dem 1.1.1996 ist Trp mit erhöhten Reinheitsanforderungen wieder für Oraltherapeutika zugelassen, allerdings gelingt die Wiedereinführung auf dem Pharmamarkt nur schleppend. Zu viele Fragen sind noch offen, die mit der Ursache dieser Krankheit in Verbindung stehen. Bis heute ist keine Heilung von EMS realisiert. Es sind lediglich Symptomlinderungen möglich. Bis heute werden Gerichtsprozesse durchgeführt, bei denen es um Entschädigungsforderungen von EMS-Kranken an Trp-Hersteller und Vertreiber in Millionenhöhe geht.

2.3.1. EMS-Ursachenforschung

Das weltweite epidemische Auftreten von EMS im Jahre 1989 und sein vollständiges Verschwinden nach dem Rückruf oral einzunehmender Trp-haltiger Präparate legt bis heute die Hypothese nahe, daß die Ursachen für EMS in Verunreinigungen einzelner Chargen der Firma SD liegen (Kontaminanten-Hypothese). Diese Kontaminanten-Hypothese wird durch HILL et al. (1993) bestätigt, der durch RP-HPLC-UV-Analyse bei 220 nm 63 Substanzen im SD-Trp detektierte. Radiochemische und mikrobiologische Untersuchungen des SD-Trp's wiesen ebenso wie die Untersuchung auf 32 anorganische Elemente keine besonderen Kontaminationen nach (HERTZMANN et al., 1991).

Der erste mit EMS assoziierte Peak (BELONGIA et al., 1990) wurde strukturell als 1,1'-Ethylidenbistryptophan (EBT) aufgeklärt (MAYENO et al., 1990; Smith et al., 1991). In weiteren Untersuchungen fanden TOYO'OKA et al. (1991) einen vor Trp eluierenden EMS-assoziierten Substanzpeak, der als 3-Phenylaminoalanin (PAA) aufgeklärt wurde (GODA et al., 1992). HILL et al. (1993) fand eine Korrelation von 2-(3'-Indolylmethyl-tryptophan (IMT) mit EMS-SD-Trp-Chargen, dessen Struktur von MÜLLER et al. (1991) aufgeklärt worden war. Die Identifizierung der durch oxidative Umsetzung von Trp entstandene 3a-Hydroxy-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolindol-2-carbonsäure (PIC) gelang durch SIMAT et al. (1996). Diese in der Literatur als Peak C bezeichnete Verbindung wurde ebenfalls von HILL et al. (1993) mit EMS assoziiert. Die zuletzt identifizierte Substanz konnte über LC-MS-MS als 2-(2'-Hydroxyindolin)-tryptophan (HIT) von NAYLOR et al. (1999, im Druck) strukturell aufgeklärt werden und stellt den EMS-assoziierten Peak FF dar (HILL et al., 1993), (**Abb. 10**). Trotz des Fehlens eines geeigneten Tierversuchmodells zur Erzeugung von EMS in vivo besteht die Möglichkeit diese Verbindungen als Markersubstanzen für potentiell EMS-auslösende Trp-Chargen zu verwenden, ohne daß sie selbst Auslöser dieser Krankheit sind (HILL et al., 1993).

Bei der Ursachenforschung von EMS wurde die Aufmerksamkeit auf Veränderungen im Produktionsprozeß der Firma SD gelegt. BELONGIA et al. (1990) erkannten einen Zusammenhang zwischen EMS-auslösender SD-Trp-Chargen und der Reduzierung der Aktivkohlemenge ($p=0.014$) im Reinigungsverfahren (siehe **Kap. 2.2.2.**). Die Umgehung eines Umkehrosmosefilters (Ausschlußgrenze 1000 Da) in einem begrenzten Zeitraum konnte dagegen nicht mit den EMS-positiven Chargen korreliert werden ($p=0.067$). Der Reinigungsprozeß über einen Anionentauscher und einen Kationentauscher blieb dagegen unverändert. BELONGIA et al. (1990) und HILL et al. (1993) assoziierten die Verwendung eines neuen, weiter gentechnisch veränderten *Bacillus amyloliquefaciens* (Strain V) mit EMS ($p=0.04$), wobei die Ergebnisse von HILL et al. (1993) darauf hinwiesen, daß bereits der zuvor eingesetzte, ebenfalls gentechnisch modifizierte Stamm (Strain IV2) eng mit dem Auftreten von EMS korreliert ist. Die Fragestellung im Zusammenhang mit dem Auftreten von EMS besteht darin, ob ein gentechnisch veränderter Mikroorganismus oder Kontaminanten in der Trp-Rohware für den Ausbruch dieser Krankheit verantwortlich sind.

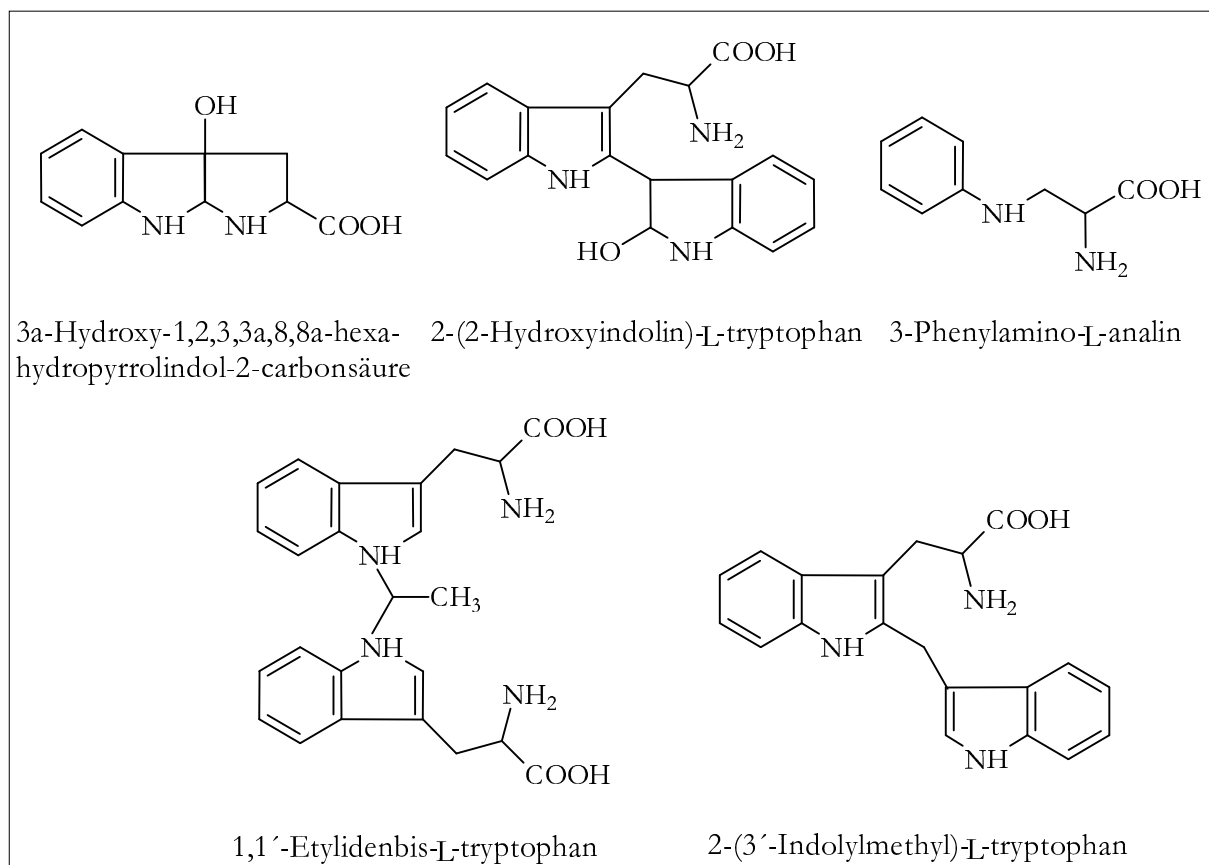


Abb. 10 EMS-assozierte Kontaminanten im SD-Trp

2.3.2. Kontaminanten im Showa Denko-Trp

Abb. 11 zeigt das Chromatogramm einer EMS auslösenden SD-Trp-Charge. Die Kontaminanten lassen sich aufgrund der bis heute strukturell aufgeklärten Verunreinigungen grob in folgende Gruppen unterteilen: physiologische Trp-Metaboliten, aphysiologische Oxidationsprodukte, Carbonylkondensationsprodukte, PAA sowie 1- und 2-substituierte Trp-Derivate.

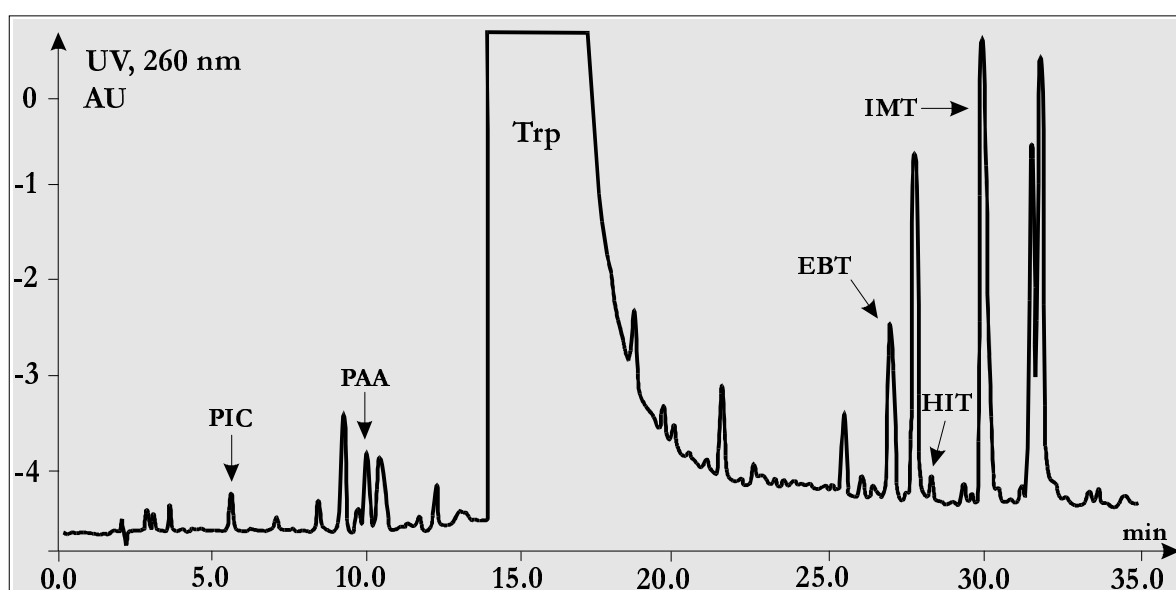


Abb. 11 EMS-assozierte SD-Trp-Charge

Trp-Metaboliten

In der Trp-Rohware sind Metaboliten aus allen Trp-Abbauwegen zu finden. 5-Hydroxytryptophan (5-OH-Trp) ist der im Endprodukt in den größten Mengen auftretende Metabolit. Daneben wurden N-Formylkynurenin, Kynurenin, Anthranilsäure, Tryptamin, IAc und Indolesigsäure nachgewiesen (siehe **Kap. 2.1.2.**), (**Abb. 12**).

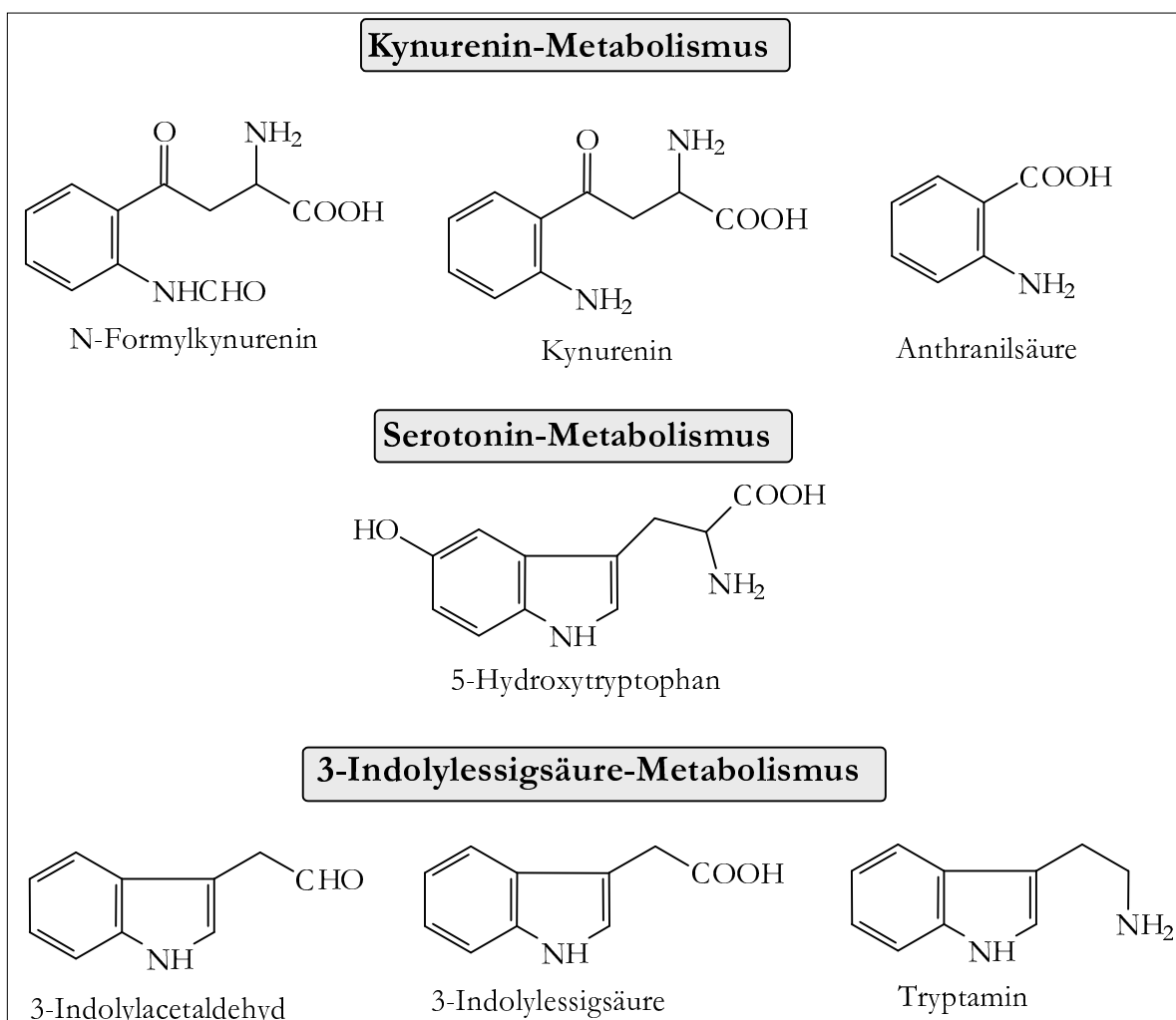


Abb. 12 Trp-Metaboliten in SD-Trp-Chargen

Trp-Oxidationsprodukte

Durch aphysiologische Oxidation entstehen PIC, Dioxindolylalanin, Oxindolylalanin und 4-, 6- und 7-Hydroxy-L-tryptophan (4-, 6- und 7-OH-Trp), (**Abb. 13**). Diese Substanzen lassen auf eine ungerichtete Oxidation des Trp's während der Herstellung oder des Reinigungsverfahrens schließen.

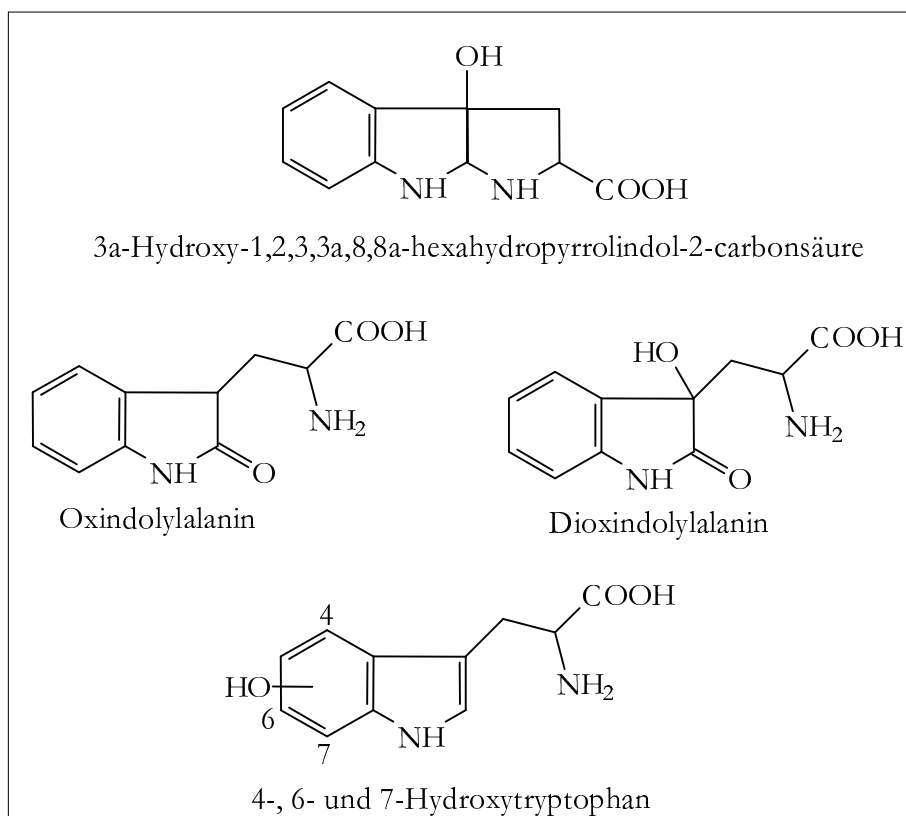


Abb. 13 Trp-Oxidationsprodukte in SD-Trp-Chargen

Carbonylkondensationsprodukte (Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäuren)

Die Kondensationsprodukte aus Trp und der sich bei der Fermentation gebildeten Aldehyde (Formaldehyd, Acetaldehyd, D-Glycerinaldehyd und der Trp-Metaboliten IAc) werden über eine PICTET-SPENGLER-Reaktion gebildet und zu der Substanzklasse der Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäuren zusammengefaßt (Abb. 14).

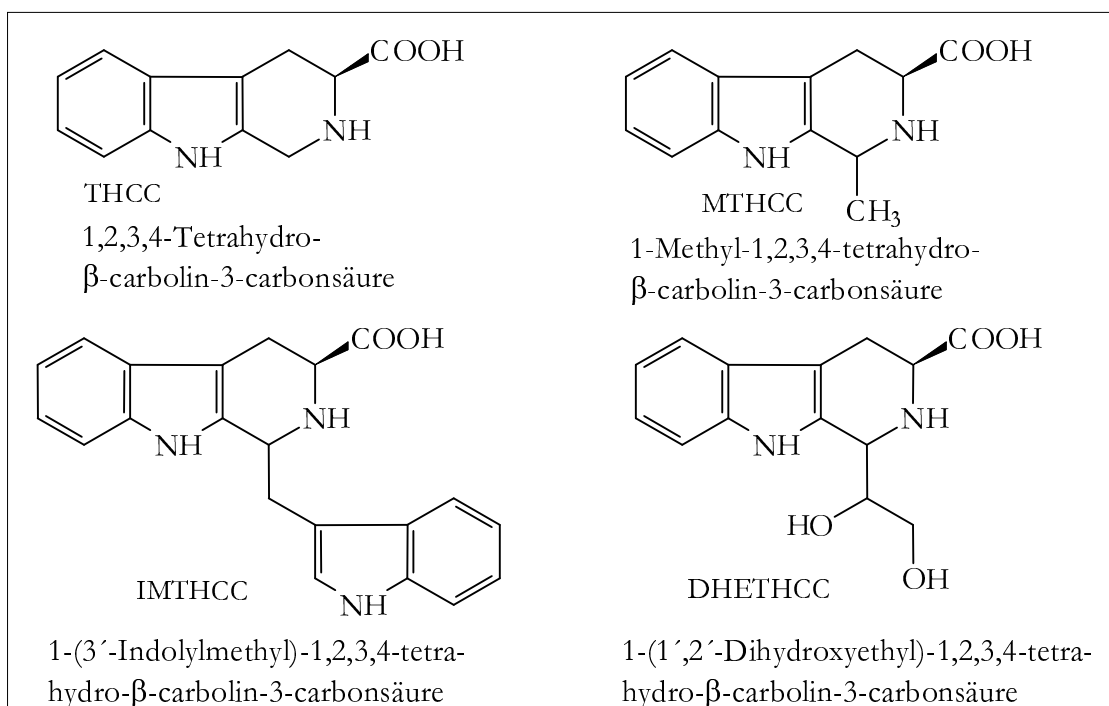


Abb. 14 Trp-Carbonylkondensationsprodukte in SD-Trp-Chargen

1-substituierte Trp-Derivate

Die in der Literatur ursprünglich als Peak E bezeichnete Substanz EBT wurde zuerst mit EMS in Verbindung gebracht. Es handelt sich um ein Trp-Dimer, das über die Indolstickstoffe durch eine Acetaldehyd-Brücke verknüpft ist (**Abb. 15**).

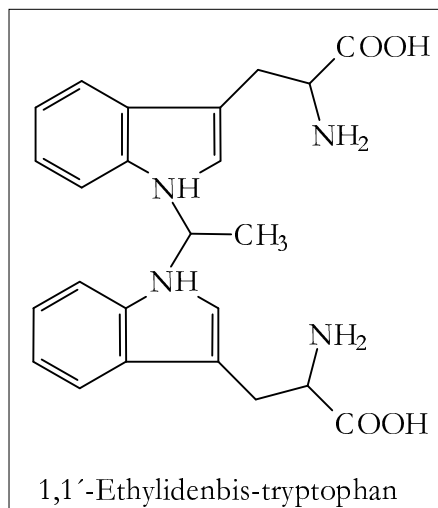


Abb. 15 EBT in SD-Trp-Chargen

3-Phenylamino-L-alanin

Das EMS-assoziierte PAA wurde vor seiner Strukturaufklärung als Peak UV-5 bezeichnet (**Abb. 16**). Die Detektion von PAA im SD-Trp stellt eine Verbindung zum Toxic-Oil-Syndrom dar, bei dem ebenfalls Anilinderivate für die Erkrankung verantwortlich gewesen sein sollen. Bei PAA ist ein direkter struktureller Zusammenhang zu Trp nicht sofort ersichtlich. Die Frage, ob sich PAA bei der biotechnologischen Trp-Synthese bilden kann, muß noch geklärt werden.

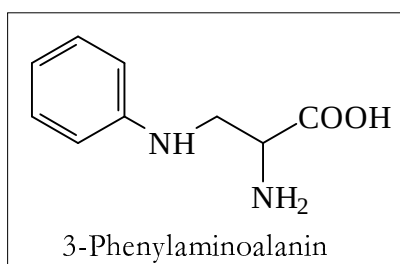


Abb. 16 PAA in SD-Trp-Chargen

2-substituierte Trp-Derivate

Diese Substanzklasse ist in EMS-assoziierten SD-Trp-Chargen mit einer Vielzahl von Verbindungen vertreten (**Abb. 17**). Trp ist an Position C-2 des Indolringes mit verschiedenen Alkylresten substituiert. Die Alkylreste tragen sämtlich ein Indol- oder Indolin-Fragment und stammen aller Wahrscheinlichkeit nach vom Trp. Zwei Verbindungen dieser Substanzklasse sind EMS-

assoziiert: IMT und HIT. IMT stellt neben IMTHCC eine Hauptkontaminante in EMS-korrelierten SD-Trp-Chargen dar.

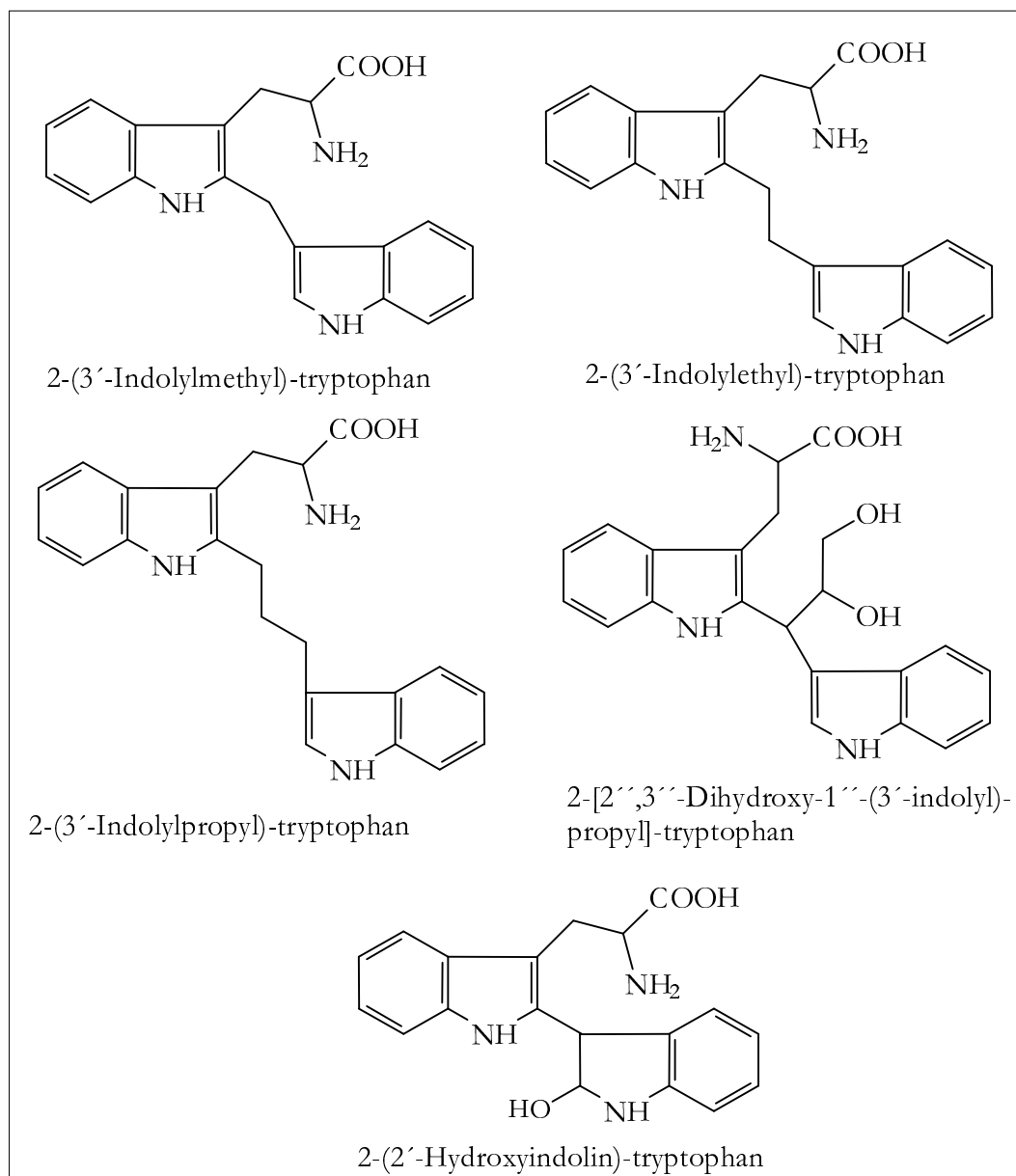


Abb. 17 2-substituierte Trp-Derivate in SD-Trp-Chargen

2.3.3. Gesetzliche Bestimmungen für die Qualität von Trp in pharmazeutischen Applikationen

Die Qualität des für pharmazeutische Zwecke in den Verkehr gebrachten Trp's wurde in dem Deutschen Arzneibuch (DAB) in einer Monographie definiert (DAB 9, 1989). Neben Prüfungsvorschriften für die Identität waren dort auch eine Gehaltsbestimmung mit Perchlorsäure und Reinheitsanforderungen für anorganische und färbende oder Trübungen verursachende Bestandteile enthalten. Die Untersuchung auf verwandte Substanzen beschränkte sich auf eine dünnschichtchromatographische Methode mit Ninhydrindetektion (Anforderung: Ninhydrin-

detektierbare Substanzen $<1\%$ (<10000 mg/kg Trp)). Nach Auftreten des EMS und Identifizierung möglicherweise EMS-auslösender Kontaminanten in einem Konzentrationsbereich von etwa 100 mg/kg wurde die Trp-Monographie 1994 durch eine HPLC-Methode ergänzt (FEIDEN, 1994), die auf die Erfahrungen eines Ringversuches deutscher Arzneimittelhersteller (KÖRNER und MALINKA, 1992) zurückgreift. Für die mit dieser Methode in Trp-Rohware bestimmbaren Kontaminanten (Summenparameter) wurde ein Grenzwert von 400 mg/kg Trp verfügt, für EBT einer von 8 mg/kg Trp. Mit Wirkung vom 1. Januar 1996 wurden die Zulassungen für oral einzunehmende Trp-haltige Arzneimittel geändert (BfArM, 1995). Es wurde angeordnet, daß die oben genannten Grenzwerte für Kontaminanten auch in Fertigarzneimitteln nicht überschritten werden dürfen und daß beim Herstellungsprozeß des Fertigarzneimittels PAA und EBT nachweislich nicht entstehen. Seit Januar 1996 dürfen oral einzunehmende Trp-haltige Arzneimittel unter diesen Zulassungsvoraussetzungen und den neuen Reinheitsanforderungen der Trp-Monographie wieder in den Verkehr gebracht werden. Seit 1997 wurden die DAB-Reinheitsanforderungen an Trp in das Europäische Arzneimittelbuch übernommen.

2.4. Grundlegende Aspekte zur Indol- bzw. Tryptophanchemie

Bei der Entwicklung von Strategien zur Synthese von Trp und Trp-Derivaten werden der Indolkörper und die Alaninkette prinzipiell getrennt betrachtet. So wird in den überwiegenden Fällen das Indolderivat hergestellt und die Aminosäurefunktion nachfolgend synthetisiert. Dabei ist eine genaue Kenntnis der Reaktivität von Indol und seinen Derivaten unerlässlich. Im Folgenden sollen die wichtigsten Eigenschaften sowie Synthesemöglichkeiten von unterschiedlich substituierten Indolen aufgezeigt werden. Desweiteren werden ausgehend von Indolderivaten verschiedene Möglichkeiten der Trp-Synthesen betrachtet.

Grenzstrukturen: Resonanz und Tautomerie des Indolkörpers

Das bedeutendste benzolannelierte Derivat der 1-Hetero-2,2-cyclopentadiene ist zweifellos das Indol, welches in vielen Naturstoffen enthalten ist. Indol steht in derselben Beziehung zu Pyrrol wie Naphthalin zu Benzol. Die Struktur von Indol und die nach IUPAC festgelegte Zählweise der Atome ist in **Abb. 18** ersichtlich. Sein elektronischer Aufbau läßt sich an der Fülle von möglichen Resonanzstrukturen erkennen (siehe **Abb. 19**). Für die neutrale Grenzstruktur I ist die integrierte Enamin-Struktur kennzeichnend. Die Ladungsverteilung kann durch die dipolare benzoide Grenzstruktur II veranschaulicht werden. Obwohl die Resonanzstrukturen III bis V, bei denen das cyclische 6 π -Elektronensystem des annilierten Benzolrings gestört ist, von geringerer Bedeutung sind, zeigen sie den elektronenliefernden Effekt des Heteroatoms.

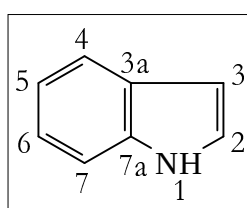


Abb. 18 Indol

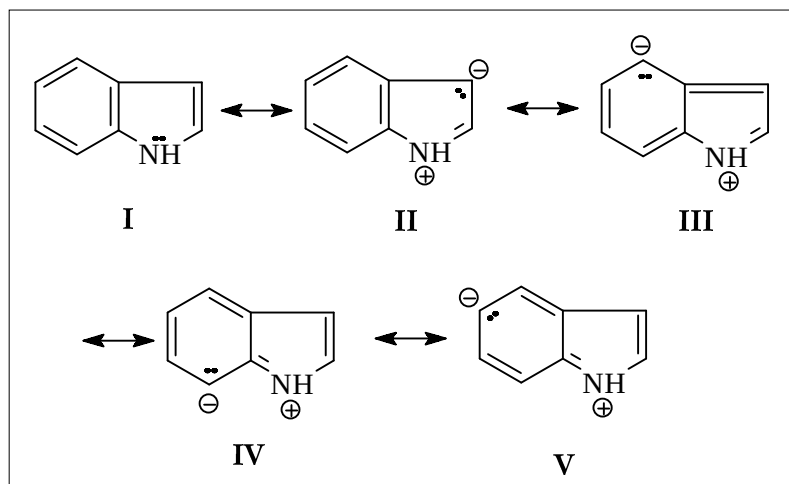


Abb. 19 Resonanzstrukturen des Indols

Chemische Eigenschaften des Indolkörpers

Die chemischen Eigenschaften des Indolkörpers werden stark durch den Pyrrolring geprägt. Das Indol und einfach substituierte Indole sind sowohl säure- als auch basenlabil und im allgemeinen leicht oxidierbar. Indol ist thermisch bemerkenswert stabil. Indol weist einen aciden Charakter auf ($pK_s=16.97$), die Acidität wird durch den σ -Akzeptor-Effekt des Stickstoffatoms und die Delokalisierung der anionischen Ladung bedingt. Indole sind aufgrund der aciden Eigenschaften der NH-Gruppe mit geeigneten Reagenzien (z.B. Metall-Salze, metallorganische Verbindungen) deprotonierbar bzw. metallierbar. Indol ist eine schwache Base ($pK_b=-3.63$), da das freie Elektronenpaar des Stickstoffatoms in das konjugierte π -Elektronensystem einbezogen ist. In saurer Lösung wird Indol in Position C-3 protoniert.

Reaktivität von Indolen

Indole sind für S_E -Reaktionen prästrukturiert. Es dominiert der Angriff von Elektrophilen mit moderater Reaktivität in C-3-Stellung und nicht, wie bei Pyrrol, in C-2-Stellung. Dies ist durch die sehr hohe Elektronendichte am C-3 erklärbar und kann anhand der Formulierung der „Enamin“-Grenzstruktur über die Stabilisierung der negativen Partialladung an C-3 veranschaulicht werden. Indole reagieren mit Elektrophilen somit bevorzugt an β -Position zum Stickstoffatom. Ist die C-3-Position des Indols bereits besetzt, erfolgt die elektrophile Substitution an Position C-2. In vielen Fällen werden die 2-substituierten Produkte über einen primären Angriff des Elektrophils an C-3 gebildet, dem sich eine 1,2-Verschiebung im intermediären Kation anschließt (JACKSON und SMITH, 1968). Der Benzolkern ist wesentlich reaktionsträger als der Pyrrolkern. Die Prognosen über die Reaktivität der Positionen des sechsgliedrigen Carbocyclus differieren, die Ringpositionen C-4 und C-7 haben eine Präferenz bei S_E -Reaktionen. Ein weiteres Angriffszentrum für elektrophile Reagenzien neben den Ringpositionen ist die NH-Gruppe. Die nucleophile Reaktivität des Heteroatoms wird zwangsläufig durch Deprotonierung bzw. Metallierung erhöht. Die Metallsalze werden durch Umsetzung mit starken Basen wie Kalium-*tert*-butanolat, Natriumhy-

drid, Grignardreagenz oder n-Butyllithium erhalten. Die N-metallierten Indole sind ambidente Nucleophile, die Substitution in N-1 oder C-3 ist abhängig vom gewählten elektrophilen Reagenz und den Reaktionsparametern. So ist die Substitution am Stickstoff mit harten Elektrophilen (Natrium- und Kaliumsalze) in dipolaren, aprotischen Lösungsmitteln bevorzugt. Bei S_E -Reaktionen an Indolen sind saure Reaktionsbedingungen zu vermeiden, da die C-3-Position protoniert wird und das entstandene Produkt polymerisieren kann. Aufgrund der leichten Oxidierbarkeit der Indole und der Gefahr oxidativer Umwandlungen, vor allem durch Öffnung des Pyrrolrings, ist synthetisches Arbeiten unter Schutzgasatmosphäre zwingend erforderlich.

2.4.1. Synthesestrategien substituierter Indole

Unterschiedliche Substitutionsstellen im Indol erfordern gezielte Synthesestrategien. Einfache 3-substituierte Indole werden in der Regel durch Substitutionsreaktionen am vorhandenen Indolsystem synthetisiert, für Indole mit anderen Substitutionspositionen ist es jedoch häufig notwendig, das Ringsystem aufzubauen. Alle wichtigen Methoden dafür sind Cyclisierungsreaktionen. Wie bei anderen benzoanellierten Heterocyclen gibt es zwei Synthesestrategien; ein Weg geht von einer benzoiden Vorstufe mit einem Substituenten (Stickstoff) und einer freien *ortho*-Position aus, der andere von einer Vorstufe mit benachbarten Kohlenstoff- und Stickstoffsubstituenten. Zu den Indolringsynthesen des zweiten Types gehören intramolekulare Cyclisierungen, palladium-katalysierte Cyclisierungen, Isonitril-Cyclisierungen und Nitren-Cyclisierungen. Die am häufigsten angewandten Indol-Synthesen gehören jedoch zum ersten Typ, bei dem der Ring durch Angriff der Seitenkette eines stickstoffsubstituierten Benzolderivates in einer freien *ortho*-Position geschlossen wird. Die Fischer-Indolsynthese, erstmalig vor mehr als hundert Jahren beschrieben, ist weiterhin die wichtigste und vielseitigste Methode dieses Typs.

Fischer-Indolsynthese

Bei dieser Synthese werden Arylhydrazone durch Erhitzen in der Regel in Gegenwart eines Säure- oder Lewis-Säure-Katalysators cyclisiert. Es ist jedoch auch möglich, diese Reaktion mit substituierten Phenylhydrazonen und mit Arylhydrazonen von Aldehyden, Ketosäuren, Ketoestern und Diketonen durchzuführen. Ein Nachteil dieser Methode ist, daß unsymmetrische Ketone eine Mischung von Indolen ergeben können. Die Synthese ist einfach und zweckmäßig, der Mechanismus ist jedoch nicht klar erkennbar, da eines der beiden Stickstoffatome des Hydrazons verloren geht. In der Regel werden mit dieser Methode 2- oder 2,3-substituierte Indole hergestellt (Abb. 20).

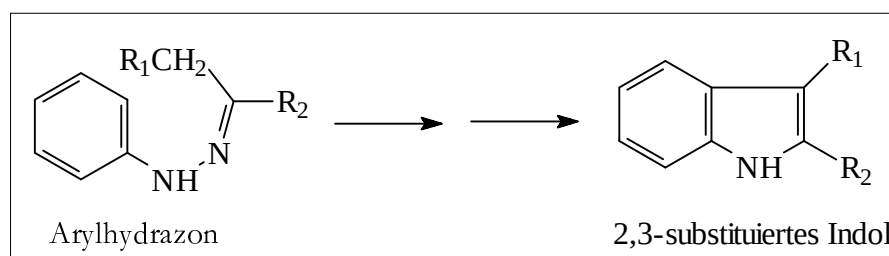


Abb. 20 FISCHER-Indolsynthese

Reissert-Indolsynthese

Mit der REISSERT-Indolsynthese ist es möglich, Indole mit Substituenten am Benzolring darzustellen. Der Pyrrolring des Indolkörpers wird nicht substituiert. Als Ausgangsverbindungen werden substituierte *ortho*-Nitrotoluole verwendet, die eine aktivierte Methylgruppe besitzen. Während ursprünglich eine Kondensation mit Oxalsäuredieethylester mit anschließender Reduktion und Cyclisierung erfolgte, wird heute eine modifizierte Synthese durchgeführt. Die aktivierte Methylgruppe kondensiert mit Amidacetalen unter Bildung von Enaminen. Die sich anschließende Reduktion und Cyclisierung liefert das entsprechende 4-, 5-, 6- oder 7-substituierte Indol am Carbocyclus (**Abb. 21**).

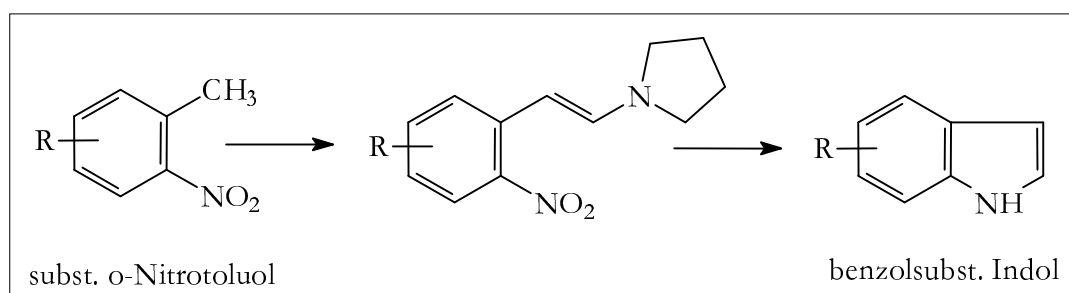


Abb. 21 modifizierte REISSERT-Indolsynthese

Madelung-Indolsynthese

Die MADELUNG-Synthese ist die Cyclisierung von 2-(Acylamino)-toluolen durch starke Basen unter Ausschluß von Luft. Eine moderne Variante wird bei RT mit Butyllithium als Base durchgeführt (**Abb. 22**). Dadurch sind 2-substituierte Indole mit verschiedenen Gruppen zugänglich.

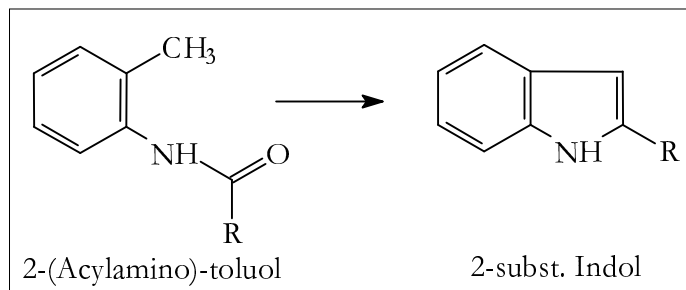


Abb. 22 MADELUNG-Indolsynthese

2-substituierte Indole durch Lithiierung

Einfache N-substituierte Indole, wie 1-Methylindol, werden selektiv am C-2 lithiiert. Dies geschieht auch bei 1-Arensulfonylindolen, die durch *n*-Butyllithium in die lithiierten Derivate überführt werden. Da die Arensulfonylgruppe anschließend wieder entfernt werden kann, sind diese Verbindungen, über eine Reaktion mit Elektrophilen, wertvolle Edukte für die Synthese von 2-substituierten Indolen. Auch ein 1-CH₂N(CH₃)₂-Substituent dirigiert die Lithiierung in die 2-Position, und die Indole werden leicht durch Reaktion mit *n*-Butyllithium dargestellt. Der 1-Isogramin-Substituent kann anschließend leicht durch Reaktion mit Natriumborhydrid entfernt werden (**Abb. 23**).

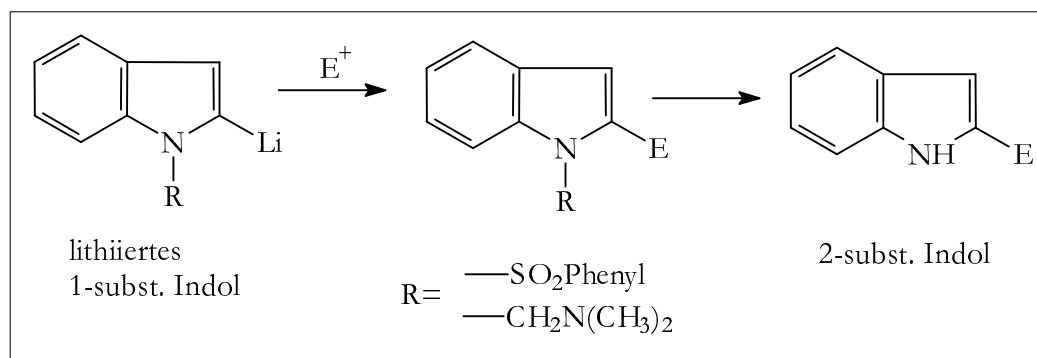


Abb. 23 2-substituierte Indole über Lithierung

2.4.2. Tryptophan-Synthesen durch Anfügen der Alaninkette an Indolderivate

Bei den folgenden Ausführungen wird sich auf Trp-Synthesen beschränkt, die von Indol oder einem Indolderivat ausgehen. Die reaktivste Position für einen elektrophilen Angriff an Indol ist die Position C-3. Es gibt eine Vielzahl von Synthesen, die über einen elektrophilen Angriff an C-3 die Alaninfunktion einführen. Da bei chemischen Synthesen in der Regel ein Racemat aus R- und S-Trp entsteht, versuchte man in den letzten Jahren enantiomerenreine Produkte zu erhalten. Für die Verwendung von Trp oder Trp-Derivaten mit einem chiralen C-Atom in der HPLC-Analytik spielt es keine Rolle, stereochemisch reine Verbindungen zu erhalten. Jedoch ist es bei Indolderivaten mit bereits vorhandenen chiralen C-Atomen für eine anschließende Trp-Synthese wichtig, die Stereochemie der Alaninfunktion zu berücksichtigen.

Tryptophan-Synthese über Gramin

Die seit den vierziger Jahren durchgeführte Graminmethode liefert ein Trp-Racemat. Eine ausführliche Beschreibung dieses Syntheseweges ist im **Kap. 2.2.1.** zu finden.

Tryptophan-Synthese über α,β -Dehydroalanin-Derivate

Ausgehend von Serin wird über Wasser-Eliminierung α,β -Dehydroalanin gebildet. Die Carboxylgruppe ist als Ester geschützt, wogegen die Aminogruppe mit verschiedensten Schutzgruppen versehen sein kann, die einerseits eine Aktivierung der Doppelbindung bewirken soll und andererseits leicht abspaltbar sein muß. Die Verknüpfung mit dem Indolkörper erfolgt über eine MICHAEL-Addition oder über eine Lewissäure katalysierte Addition. Dadurch ist es möglich, das Alaningerüst in einem Schritt einzuführen (HORIKAWA et al., 1983), (**Abb. 24**).

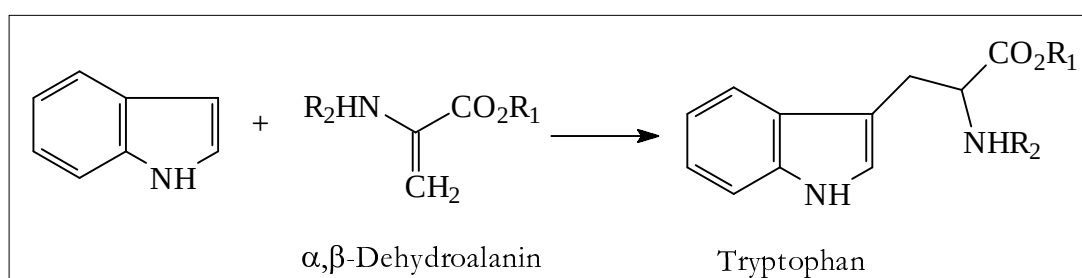


Abb. 24 Trp-Synthese über Dehydroalanin-Derivate

Synthese optisch aktiver Tryptophan-Derivate über Aziridine

Eine Möglichkeit, optisch aktives Trp herzustellen, besteht in der Umsetzung von Indol mit Aziridin-Derivaten in Gegenwart von starken Lewissäuren wie Zinktriflat. Bei der Umsetzung wird der Aziridinring stereospezifisch geöffnet und liefert das optisch aktive Produkt (FUKAMI et al., 1996). Der Aminstickstoff ist über eine Z-Gruppe geschützt, wogegen die Carboxylgruppe als Ester vorliegt (Abb. 25).

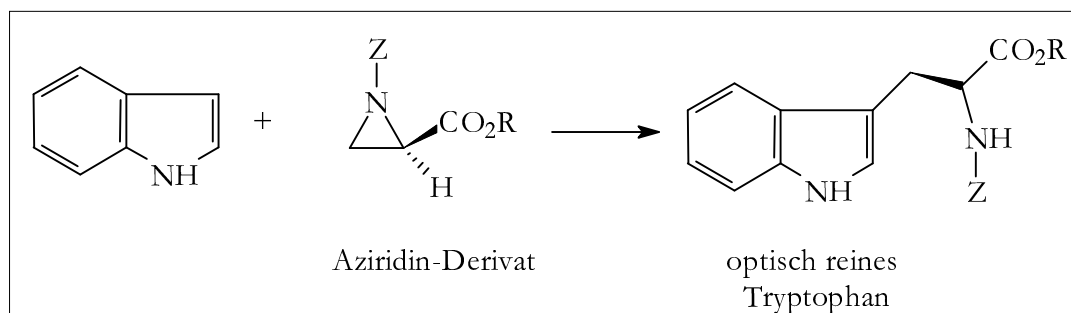


Abb. 25 Trp-Synthese über Aziridin-Derivate

Tryptophan-Synthese über Cycloaddition von 2-substituierten Indolen und Nitrosoalkenen

Diese Trp-Synthese ist auf 2-substituierte Indole beschränkt. Eine DIELS-ALDER-Cycloaddition zwischen einem 2-substituiertem Indol und Ethyl- α -nitrosoacrylat, gefolgt von einer Reduktion, liefert 2-substituierte Trp-Methylester. Das Ethyl- α -nitrosoacrylat wird in situ aus Ethyl-3-bromo-2-hydroxyiminopropanoat hergestellt (GILCHRIST et al., 1979), (Abb. 26).

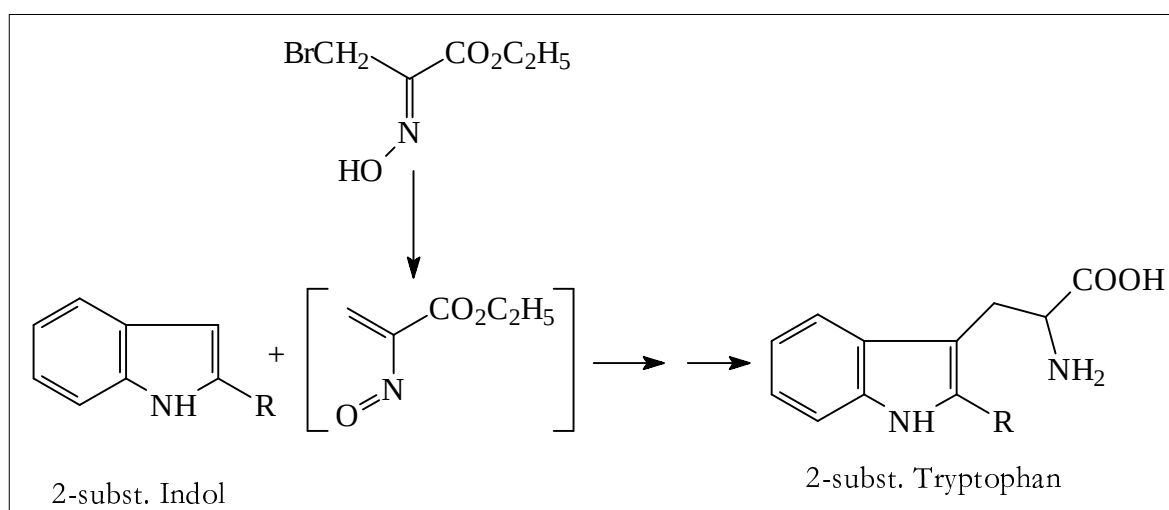


Abb. 26 Trp-Synthese über Cycloaddition

3. Problemstellung

Als Ursache für den epidemischen Ausbruch des EMS im Jahre 1989 werden Verunreinigungen in bestimmten Trp-Chargen eines japanischen Herstellers angesehen. Allerdings ist bis heute nicht geklärt, ob sich die Kontaminanten beim Fermentationsprozeß oder beim Reinigungsverfahren über Ionenaustauscher gebildet haben. Vor diesem Hintergrund sollten folgende Aufgaben bearbeitet werden:

- Die Synthese von 4-, 6- und 7-Hydroxytryptophan, die bei der ungerichteten Oxidation von Trp entstehen und im Gegensatz zu 5-OH-Trp nicht physiologisch sind. Die Hydroxytryptophane standen längere Zeit selbst in Verdacht, EMS-assoziiert zu sein. Alle aphysiologischen Hydroxytryptophane werden in EMS-assoziierten SD-Trp-Chargen gefunden. Diese als Referenzsubstanzen für die HPLC-Analytik herzustellenden Verbindungen eignen sich weiterhin als Markersubstanzen für einen Bestrahlungsnachweis von proteinreichen Lebensmitteln und würden damit einen anderen Trp-Forschungsbereich erschließen.
- Die Synthese der Hauptkontaminanten im EMS-assoziierten SD-Trp sollte realisiert werden. Dazu gehören neben dem EMS-korrelierten 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan (IMT), 2-[2'',3''-Dihydroxy-1''-(3'-indolyl)-propyl]-tryptophan (dhPIT) und 1-(3'-Indolylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure (IMTHCC). Diese drei Hauptverunreinigungen sollten als Referenzsubstanzen für die HPLC-Analytik zur Verfügung gestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten weiterhin Untersuchungen bezüglich der Bildungsbedingungen dieser Verunreinigungen durchgeführt werden, um Rückschlüsse auf die beteiligten Edukte und den Ort der Entstehung zu ziehen. Diese Untersuchungen sollten Hinweise geben, ob sich die Kontaminanten bei der Fermentation mit gentechnisch modifizierten Mikroorganismen oder beim Reinigungsprozeß über Ionenaustauscher gebildet haben.

4. Ergebnisse

4.1. Hydroxytryptophane

4.1.1. Synthese der Hydroxytryptophane

Zur Darstellung der Hydroxytryptophane (4-, 6- und 7-OH-Trp) wurde eine „de novo“-Synthese durchgeführt, die eine Kombination der Methoden von EK und WITKOP (1954) und FLEMING et al. (1985) darstellt. Die REISSERT-Indolsynthese ermöglicht die gezielte Darstellung von Indolen mit Substitution am Benzolkern (siehe **Kap. 2.4.1.**). Ausgehend von einem *ortho*-Nitrotoluol-Derivat wird der Indolring durch Kondensation mit N,N-Dimethylformamiddimethylacetal und anschließender reduktiver Cyclisierung erhalten. Durch die gezielte Wahl der Edukte sollten isomerenreine Produkte hergestellt werden. FLEMING et al. (1985) stellten aus Methylnitrophenolen in drei Synthesestufen 4- und 6-Benzyl oxyindol her. Als Ausgangsverbindungen wurden entsprechende Methylnitrophenole verwendet, wobei die Methyl- und Nitrogruppe in *ortho*-Position zueinander stehen müssen. Die Phenolgruppe im Edukt determiniert die Position der Hydroxylgruppe im OH-Trp. Die phenolische Gruppe wird zu Beginn der Synthese als Benzylether geschützt, um sie inert gegenüber drastischen Bedingungen, wie starke pH-Wert-Schwankungen und oxidative Bedingungen im Verlauf der Synthese zu gestalten. Die Entfernung der Benzylgruppe am Ende der Synthese durch Hydrierung verläuft problemlos bei schonenden Bedingungen (DOBSON et al., 1991; BRENNEISEN und BORNER, 1988; EK und WITKOP, 1954). Das benzylgeschützte Methylnitrophenol-Derivat wird mit N,N-Dimethylformamiddimethylacetal umgesetzt. Dadurch wird eine C-C-Bindung geknüpft und die Anzahl der C-Atome im Indolring komplettiert. Danach erfolgt eine katalytische, reduktive Cyclisierung mit Raney-Nickel und Hydrazin unter Bildung der entsprechenden Benzyl oxyindol-Isomere. Aus den hergestellten Benzyl oxyindolen wurden nach dem Synthesekonzept von EK und WITKOP (1954) die entsprechenden OH-Trp-Isomere hergestellt. Die Synthese wurde ursprünglich für die Darstellung von 5- und 7-OH-Trp entwickelt. Ausgehend von den geschützten Hydroxyindolen wurde die Alaninfunktion über die „Gramin-Methode“ eingeführt (siehe **Kap. 2.2.1.**) Über eine MANNICH-Reaktion wird das entsprechende Benzyl oxygramin gebildet. Die nachfolgende Umsetzung mit Diethylformamidomalonalat und anschließender basischer Verseifung liefert die freien Benzyl oxyalonsäure-Isomere, die bei saurem pH-Wert spontan zu den Benzyl oxytryptophan-Isomeren decarboxylieren. Zum Schluß werden die OH-Trp-Isomere durch Hydrierung der Benzyl oxy-Gruppe erhalten.

Das vollständige Syntheschema ist in **Abb. 27** dargestellt.

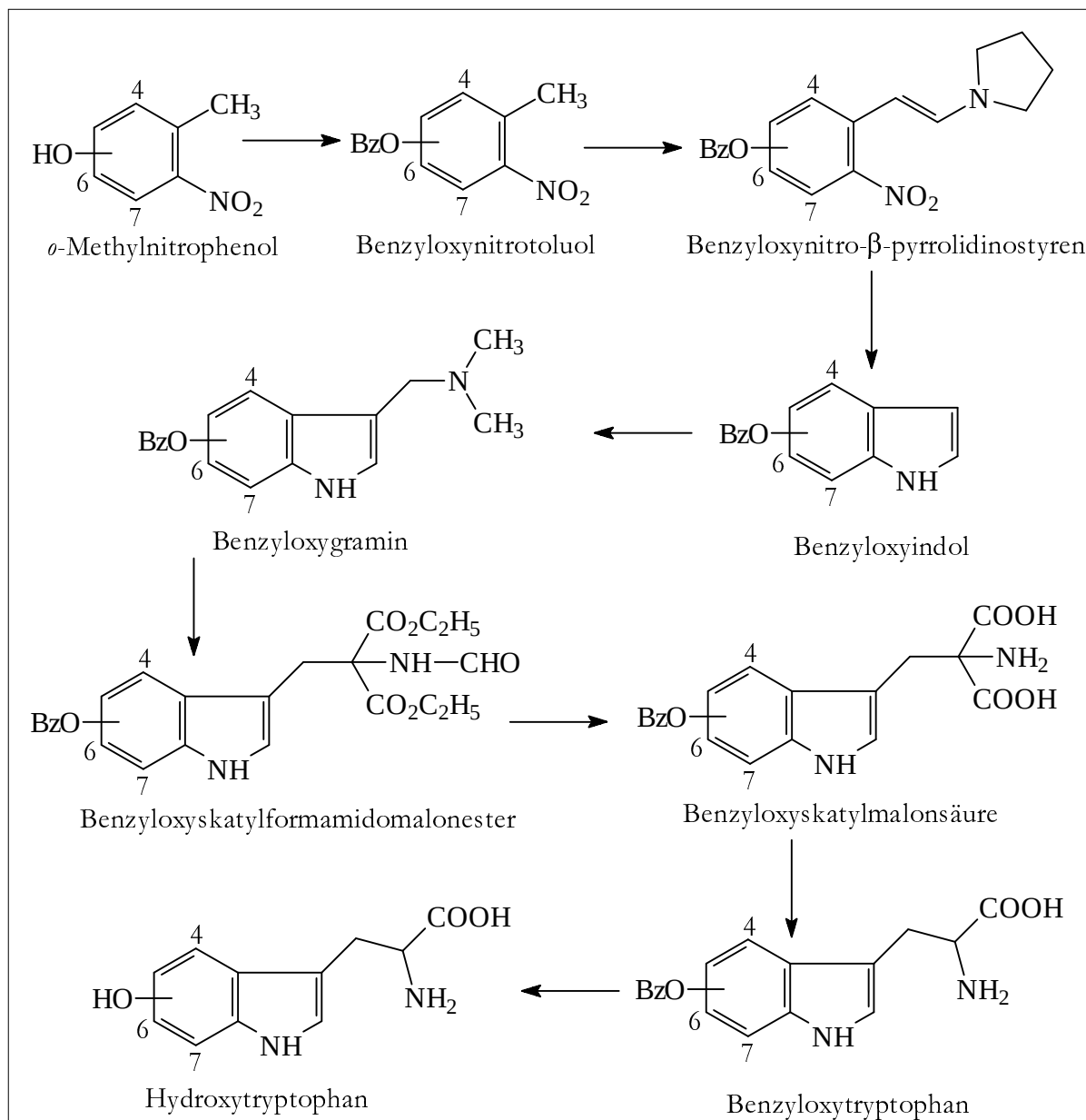


Abb. 27 Syntheschema zur Darstellung der Hydroxytryptophane

4.1.1.1. Darstellung von Benzyloxynitrotoluol

Die Umsetzung vom entsprechenden *ortho*-Methylnitrophenol zum Benzyloxynitrotoluol-Derivat erfolgt durch eine alkalische Veretherung nach WILLIAMS. Durch Kaliumcarbonat bildet sich das stark nucleophile Phenolat-Anion, das sich mit Benzylchlorid zum Benzylether umsetzt (Abb. 28).

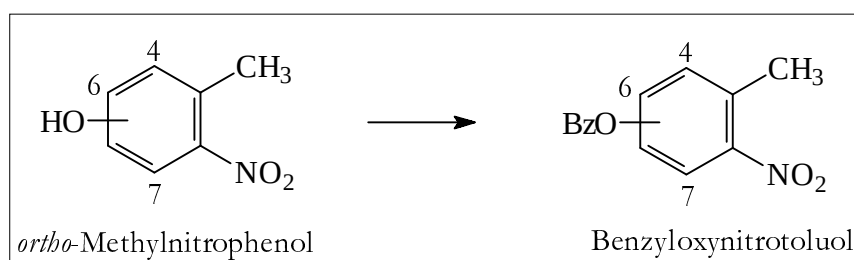


Abb. 28 Darstellung von Benzyloxynitrotoluol (die Zahlen geben die Positionen der Substituenten am entsprechenden Indolderivat wieder)

Eine Mischung aus dem jeweiligen *ortho*-Methylnitrophenol, Benzylchlorid und wasserfreiem Kaliumcarbonat in DMF wurde ca. 2 h bei 90°C erhitzt. Die Lösung wurde eingeeengt, mit 1 M NaOH-Lösung versetzt und anschließend 30 min bei RT gerührt. Nach anschließender Extraktion mit Diethylether und Entfernung des Lösungsmittels wurde das Produkt als gelber Feststoff erhalten. Die Ausbeuten betrugen: 6-Benzylxy-2-nitrotoluol 78%, 3-Benzylxy-2-nitrotoluol 73% und 4-Benzylxy-2-nitrotoluol 68%. Die Substanzen wurden mittels ^1H -, ^{13}C -NMR, Elementaranalyse, sowie IR- und Massenspektroskopie identifiziert. (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.3.1.**, **7.3.2.** und **7.3.3.**)

4.1.1.2. Darstellung von (E)-Benzylxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren

Durch den starken –M und –I-Effekt der Nitrogruppe wird besonders die in *ortho*-Position stehende Methylgruppe aktiviert. Dies ermöglicht den Angriff des nucleophilen N,N-Dimethylformamiddimethylacetals. In Gegenwart von Pyrrolidin findet eine vorgeschaltete Austauschreaktion zwischen N,N-Dimethylformamiddimethylacetal und Pyrrolidin unter Bildung einer Mischung aus Formylpyrrolidinacetal und Pyrrolidindimethylaminacetal statt. Diese Mischung ergibt wesentlich höhere Ausbeuten an Kondensationsprodukten, die Pyrrolidinenamin-Derivate liefern. Der Reaktionsmechanismus für die Darstellung von (E)-Benzylxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren ist noch nicht völlig aufgeklärt (FLEMING et al., 1985). Durch diese Reaktion wird das Kohlenstoffgerüst des potentiellen Indolringes vervollständigt, die Doppelbindung des Pyrrolringes eingeführt und durch die Substituenten ein reduktiver Ringschluß zum Indol vorbereitet (**Abb. 29**).

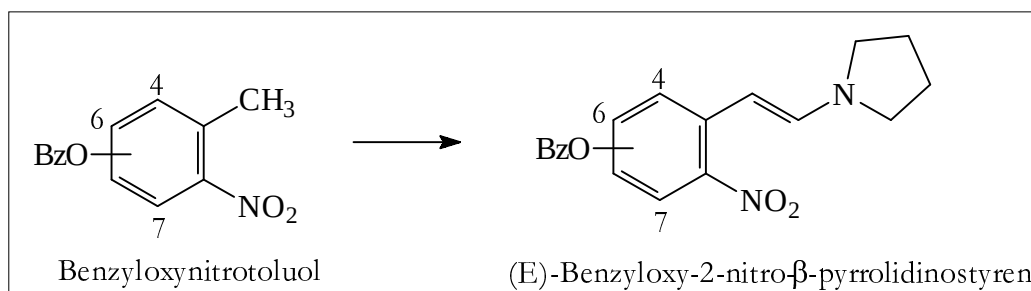


Abb. 29 Darstellung von (E)-Benzyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren

Eine Mischung aus dem entsprechenden Benzyloxy-2-nitrotoluol, N,N-Dimethylformamiddimethylacetal und Pyrrolidin in DMF wurde ca 8 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der ölige Rückstand mit Methanol und Dichlormethan versetzt. Ein Teil des Lösungsmittelgemisches wurde entfernt, wobei das Produkt bei den 4- und 6-Isomeren als roter Feststoff ausfiel. Die Ausbeuten betrugen 97% bzw. 88%. Die Produkte wurden mittels ^1H -, ^{13}C -NMR, Elementaranalyse, sowie IR- und Massenspektroskopie identifiziert. (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.3.4.**, **7.3.5.** und **7.3.6.**). Das 7-Isomer konnte nicht kristallisiert und gereinigt werden und wurde direkt zur Umsetzung zum Indol eingesetzt.

4.1.1.3. Darstellung von Benzyloxyindol

Die Ausbildung des Indolringes erfolgt unter reduktiven Bedingungen. Dabei wird die Nitrogruppe selektiv mittels Hydrazin und Raney-Nickel-Katalysator zur Amin-Funktion reduziert. Anschließend erfolgt eine spontane Indolbildung unter Freisetzung von Pyrrolidin. Triebkraft der Reaktion ist die Ausbildung eines aromatischen Systems (**Abb. 30**).

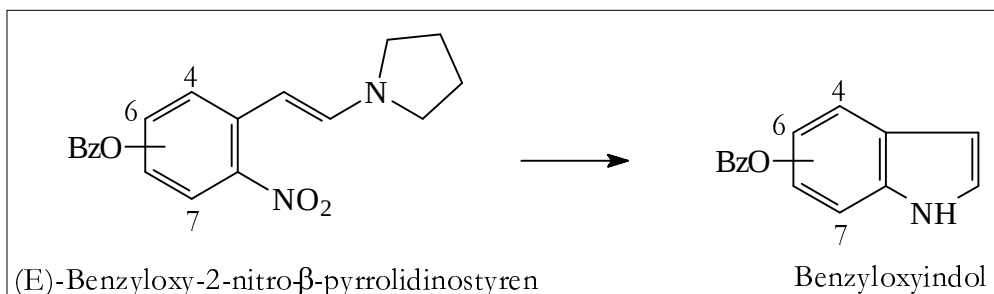


Abb. 30 Darstellung von Benzyloxyindol

(E)-Benzyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren wurde in einer Mischung aus THF und Methanol gelöst und mit Raney Nickel versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 30°C erwärmt und im Abstand von jeweils 30 min dreimal Hydrazinhydroxid-Lösung zugegeben und anschließend weitere 2 h gerührt. Der Katalysator wurde entfernt und aus dem Filtrat mittels azeotroper Destillation das Wasser entzogen. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (Toluol/Cyclohexan auf Kieselgel) gereinigt. Das Lösungsmittelgemisch wurde entfernt und der erhaltene Feststoff umkristallisiert. Die drei Isomere lagen in folgenden Ausbeuten vor: 4-Benzyloxyindol 72%, 6-Benzyloxyindol 64% und 7-Benzyloxyindol 59 %. Die Stoffe wurden mittels ^1H , ^{13}C -NMR, Elementaranalyse, IR- und Massenspektroskopie identifiziert. (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.3.7.**, **7.3.8.** und **7.3.9**)

4.1.1.4. Darstellung von Benzyloxygramin

Die Darstellung von 4-, 6- und 7-Benzyloxygramin erfolgte über eine MANNICH-Reaktion. Die jeweiligen Benzyloxyindole wurden mit Formaldehyd und Dimethylamin umgesetzt. Aus Dimethylamin und Formaldehyd bildete sich eine elektrophile Zwischenstufe, die Indol selektiv an Position C-3 alkyliert (**Abb. 31**).

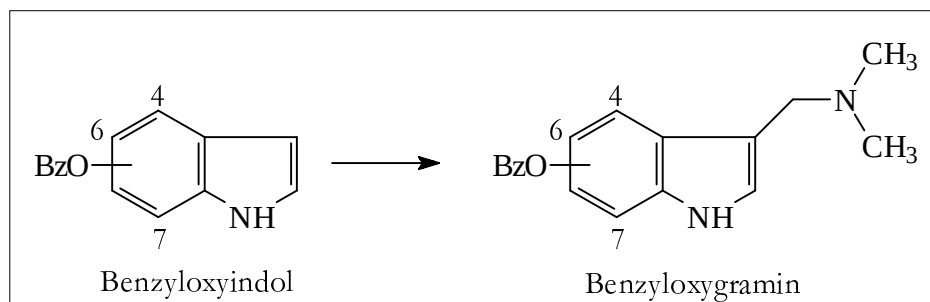


Abb. 31 Darstellung von Benzyloxygramin

Die Umsetzung der Benzyloxyindole erfolgte zunächst unter Eiskühlung und anschließend bei RT in einer Mischung aus Dioxan, Eisessig, Formaldehyd und Dimethylamin. Nach Abschluß

der Reaktion wurde mit Wasser verdünnt und mit 2 M NH_3 -Lösung auf $\text{pH}=9$ eingestellt, wobei das Gramin als weißer Feststoff ausfiel. Das Gramin wurde abgesaugt und getrocknet. Die Ausbeuten lagen bei 4- und 6-Benzyl oxygramin bei 100%, wogegen 7-Benzyl oxygramin mit 88%-iger Ausbeute erhalten wurde. Die Stoffe wurden mittels ^1H , ^{13}C -NMR, Elementaranalyse, IR- und Massenspektroskopie identifiziert. (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.3.10.**, **7.3.11.** und **7.3.12.**)

4.1.1.5. Darstellung von Benzyl oxykatylformamidomalonestern

Malonsäurederivate sind CH-acide Verbindungen, bei denen durch eine Base ein Wasserstoffatom abstrahiert werden kann. Das resultierende Carbanion greift den positivierten Methylenkohlenstoff des Gramins nucleophil an. Dadurch wird Dimethylamin abgespalten, das durch einen starken Stickstoffstrom dem Gleichgewicht entzogen wird (**Abb. 32**).

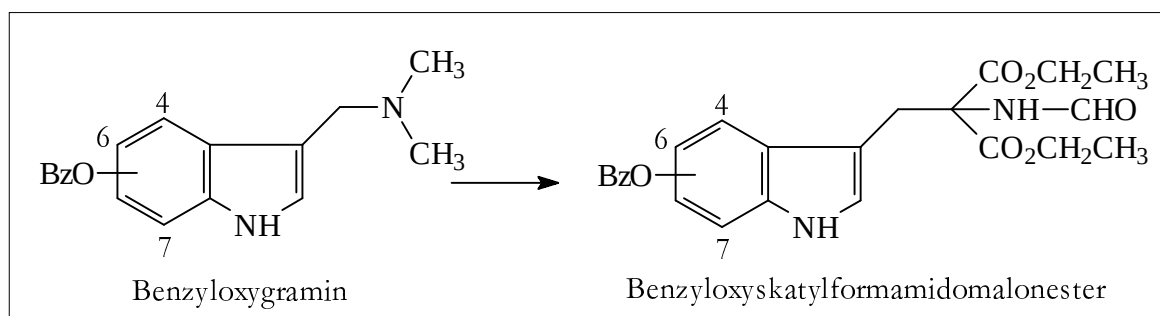


Abb. 32 Darstellung von Benzyl oxykatylformamidomalonestern

Eine Suspension aus dem jeweiligen Benzyl oxygramin, Diethylformamidomalonat und gepulvertem NaOH in Toluol wurde unter Durchleiten eines starken Stickstoffstroms 24 h unter Rückfluß erhitzt. Das Ende der Reaktion war erreicht, als kein Dimethylamin mehr freigesetzt wurde. Die Lösung wurde heiß filtriert und nach Abkühlen mit dest. Wasser, 1 M HCl-Lösung und 1 M NaOH-Lösung gewaschen. Bei Zugabe der NaOH-Lösung fiel das 6-Isomer als weißer Niederschlag aus. Der Feststoff wurde isoliert und getrocknet. Die Ausbeute betrug 61%. Das Produkt wurde mittels ^1H , ^{13}C -NMR, Elementaranalyse, IR- und Massenspektroskopie identifiziert. Beim 4- und 7-Isomer wurde nach der Extraktion das Lösungsmittel entfernt. Bei beiden Isomeren verblieb ein hellgelbes Öl, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte, so daß auf eine Charakterisierung verzichtet wurde (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.3.13.**, **7.3.14.** und **7.3.15.**).

4.1.1.6. Darstellung von Benzyl oxytryptophan

Die Bildung der Benzyl oxytryptophane aus den Benzyl oxykatylformamidomalonestern erfolgt in zwei Teilschritten. Zunächst werden unter basischen Bedingungen die Estergruppen und die Formylgruppe verseift. Das Aminomalonat wird durch Ansäuern in die freie Aminomalonsäure überführt, die beim Erhitzen spontan unter Bildung der Benzyl oxytryptophane decarboxyliert (**Abb. 33**).

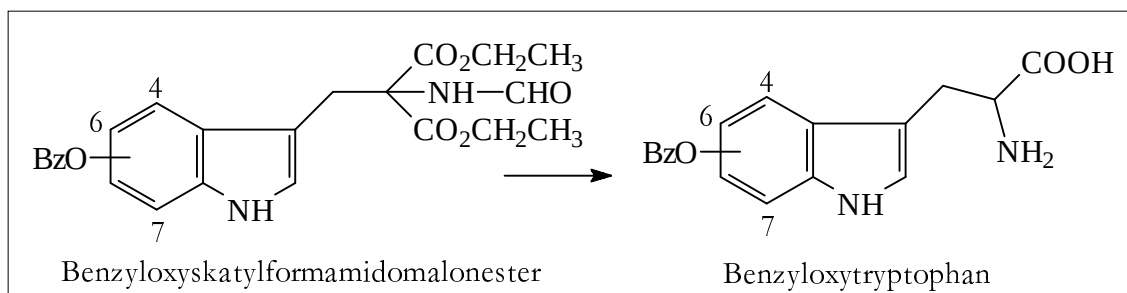


Abb. 33 Darstellung von Benzyloxytryptophan

Eine Suspension aus dem Benzyloxyskatylformamidomalonester, NaOH und Wasser wurde unter Rückfluß erhitzt, wobei der Ester aufgrund der Verseifung langsam in Lösung ging. Nach vollständigem Auflösen des Benzyloxyskatylformamidomalonesters wurde die Lösung mit Phosphorsäure auf pH=2 angesäuert. Die freie Aminomalonsäure fiel dabei aus. Durch Erhitzen der Suspension setzte die Benzyloxytryptophan-Bildung ein. Benzyloxytryptophan besitzt eine schlechte Löslichkeit in Wasser und liegt zum Teil ebenfalls ungelöst im Reaktionsgemisch vor. Deshalb wurde ein HPLC-Monitoring der Synthese durchgeführt. Die Reaktionslösung wurde mit 2 M NH_3 -Lösung auf den isoelektrischen Punkt von Trp ($p_1=5.9$) eingestellt, wobei weiterer Feststoff ausfiel. Der gesamte Feststoff wurde abgesaugt und getrocknet. Die Ausbeute betrug bei 4-Benzyloxy-tryptophan 36%, bei 6-Benzyloxytryptophan 85% und bei 7-Benzyloxytryptophan 71%. Die Stoffe wurden mittels ^1H , ^{13}C -NMR, Elementaranalyse, IR- und Massenspektroskopie (FAB) identifiziert. (Durchführung und Daten: siehe Kap. 7.3.16., 7.3.17. und 7.3.18.)

4.1.1.7. Darstellung von Hydroxytryptophan

Zur Bildung der Hydroxytryptophane wird die Benzylgruppe durch Hydrierung, unter Verwendung eines Palladium/Aktivkohle-Katalysators, entfernt. Dabei wird Toluol freigesetzt (Abb. 34).

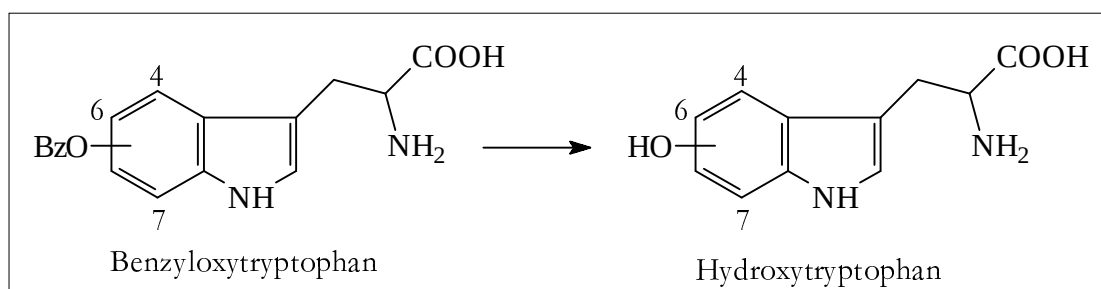


Abb. 34 Darstellung von Hydroxytryptophan

Die jeweiligen Benzyloxytryptophane wurden in einem Gemisch aus Wasser und Ethanol suspendiert. Anschließend wurde der Katalysator zugesetzt und Wasserstoff bis zur Sättigung eingeleitet. Um die Bildung der Hydroxytryptophane zu verfolgen, wurde ein HPLC-Monitoring durchgeführt. Nach erfolgter Umsetzung wurde der Katalysator abfiltriert und das Ethanol weitestgehend im Vakuum entfernt. Die wäßrige Lösung wurde unter Lichtausschluß lyophilisiert.

Die Ausbeuten betrugen: 4-Hydroxytryptophan 85%, 6-Hydroxytryptophan 89% und 7-Hydroxytryptophan 75%. Die Zielverbindungen wurden mittels ^1H , ^{13}C -NMR, Elementaranalyse, IR- und Massenspektroskopie (FAB) identifiziert (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.3.19.**, **7.3.20.** und **7.3.21.**).

4.2. 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan (IMT)

4.2.1. Synthese von IMT

IMT ist ein Trp-Derivat, welches an Position C-2 des Indolringes mit einer 3-Methylenindol-Gruppe substituiert ist. In der Literatur sind nur eine geringe Anzahl von 2-substituierten Trp-Synthesen beschrieben, wobei dieser Substituent noch nicht eingeführt wurde. Die Substituenten variieren und lassen sich in folgende Gruppen unterteilen:

- Alkylsubstituenten (Methyl- und *tert*-Butyl-)
- Arylsubstituenten (Phenyl-)
- Carboxylsubstituenten
- Hydroxylsubstituenten
- Thiol- und Halogensubstituenten

Bei der Syntheseplanung eines 2-substituierten Trp-Derivates wird in der Regel zuerst das 2-substituierte Indolderivat hergestellt und anschließend die Alaninfunktion mit den unter **Kap. 2.4.2.** vorgestellten Alternativen synthetisiert. Da die Synthese der Aminosäurefunktion leicht zu realisieren ist, mußte eine geeignete Darstellung für das 2-substituierte Indolderivat 2-(3'-Indolylmethyl)-indol gefunden werden. Die direkte Einführung einer Methylenindolgruppe, z.B. über Bromskatol an Position C-2 des Indols, ist nur unter Verwendung starker Basen möglich (SUNDBERG et al., 1973). Das wiederum erfordert eine Schutzgruppe für den Indolstickstoff und führt zu zusätzlichen Reaktionsschritten und Ausbeuteverlusten. Außerdem ist die Reaktivität der Methylengruppe aufgrund des starken +M-Effektes des Indolringes stark herabgesetzt, so daß eine elektrophile Substitution mittels Lithiierung (siehe **Kap. 2.4.1.**) fraglich erschien. Auch die MADELUNG-Synthese findet unter Beteiligung starker Basen (*n*-Butyllithium) statt und ist aus den gleichen Gründen nicht realisierbar (HOULIHAN et al., 1981).

2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan wurde über eine Ringschlußreaktion nach LE CORRE (1981) hergestellt. Ausgangspunkt der Synthese ist 2-Nitrobenzylchlorid, das mit Triphenylphosphin zum 2-Nitrobenzyltriphenylphosphoniumchlorid umgesetzt wurde (ARDAKANI et al., 1978). Diese Verbindung wurde durch Zink/Essigsäure zur Aminoverbindung reduziert (LI et al., 1988) und anschließend mit 3-Indolylacetylchlorid acyliert. Das Acylierungsmittel wurde nach RAUCHER et al. (1987) aus Indolessigsäure und Phosphorpentachlorid hergestellt. Das resultierende 2-(3'-Indolylacetamido)-benzyltriphenylphosphoniumchlorid cyclisierte über eine WITTIG-Reaktion durch Behandlung mit Kalium-*tert*-butanolat zu 2-(3'-Indolylmethyl)indol (LE CORRE et al., 1981). Die Aminosäurefunktion wurde über 3-Brom-2-hydroxyiminopropansäureethylester eingeführt (GILCHRIST et al., 1979) und anschließend mit Zink/Essigsäure zum Amin reduziert (siehe **Kap. 2.4.2.**). Zum Schluß wurde der Ester basisch verseift. Das vollständige Syntheschema ist in **Abb. 35** dargestellt.

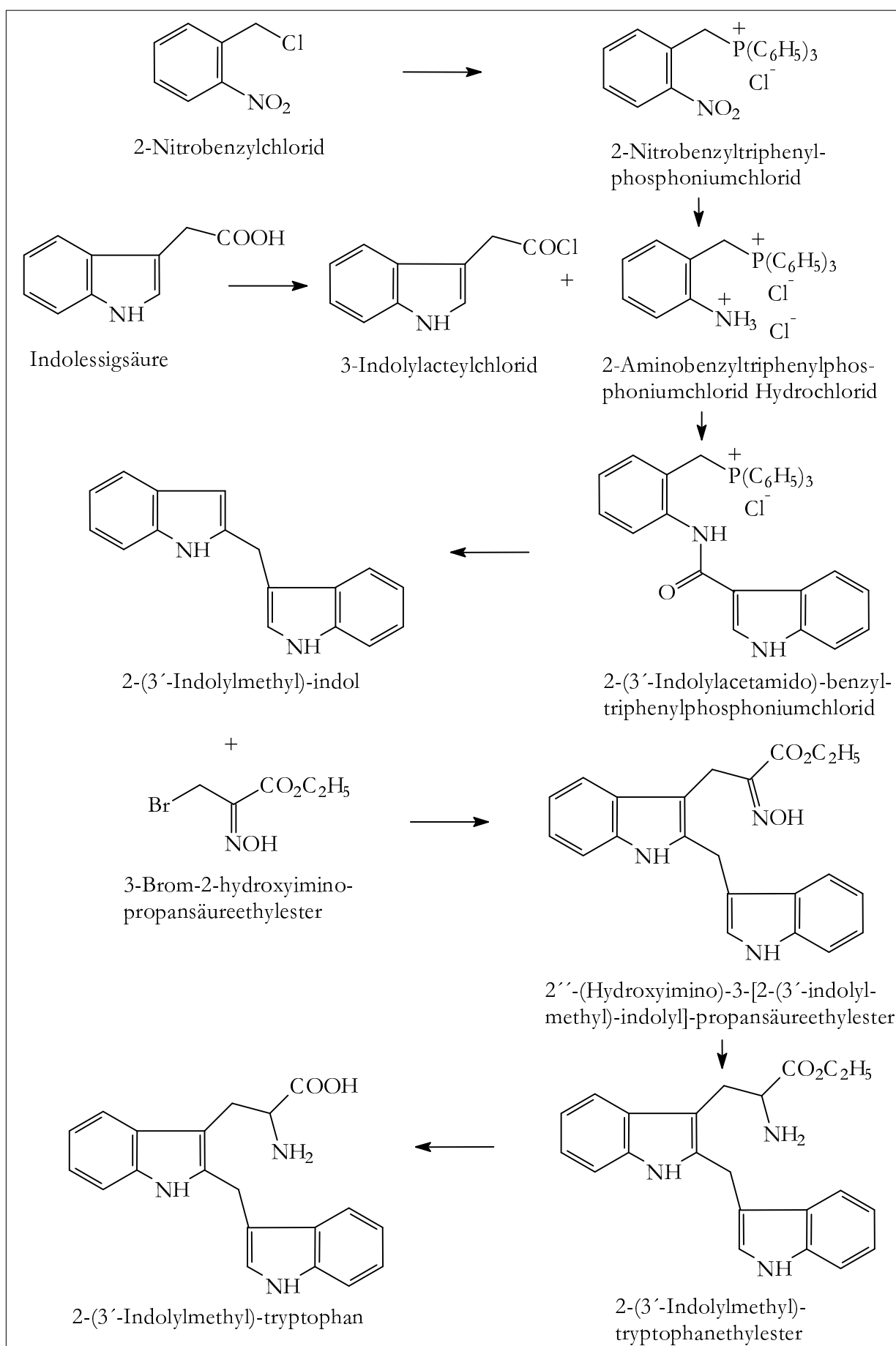


Abb. 35 Syntheschema zur Darstellung von IMT

4.2.1.1. Darstellung von 2-Nitrobenzyltriphenylphosphoniumchlorid

In einer nucleophilen Substitutionsreaktion ersetzt Triphenylphosphin das benzyliche Chlorid von 2-Nitrobenzylchlorid unter Bildung des Phosphoniumsalzes (**Abb. 36**).

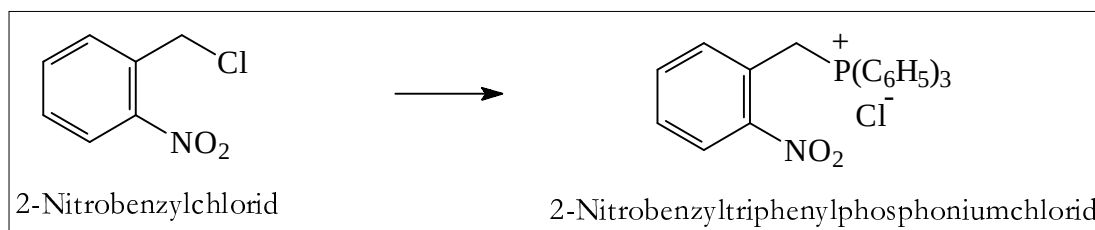


Abb. 36 Darstellung von 2-Nitrobenzyltriphenylphosphoniumchlorid

Triphenylphosphin und 2-Nitrobenzylchlorid wurden in Chloroform gelöst und 72 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Diethylether trübte die Lösung ein und nach weiterem Rühren für 48 h fiel ein Feststoff aus. Zur Vervollständigung der Kristallisation wurde die Suspension 3 h bei -18°C gelagert. Anschließend wurde das Produkt abgesaugt, mit Diethylether gewaschen und aus Isopropanol/Diethylether umkristallisiert. Es wurden weiße Kristalle erhalten. Die Ausbeute betrug 72%. Die Identifizierung erfolgte mittels ¹H-, ¹³C-NMR, Elementaranalyse, IR- und Massenspektroskopie (Durchführung und Daten: siehe **Kap.7.4.1.1.**).

4.2.1.2. Darstellung von 2-Aminobenzyltriphenylphosphoniumchlorid Hydrochlorid

Die Nitrogruppe von 2-Nitrobenzyltriphenylphosphoniumchlorid wird mit Zink/Essigsäure zur Aminogruppe reduziert. Zink wird dabei zu Zinkacetat oxidiert und fällt als weißer Niederschlag aus (**Abb. 37**).

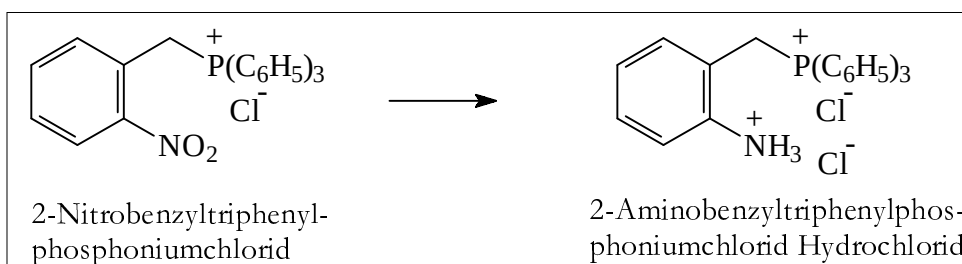


Abb. 37 Darstellung von 2-Aminobenzyltriphenylphosphoniumchlorid Hydrochlorid

2-Nitrobenzylphosphoniumchlorid wurde unter Stickstoff in Eisessig gelöst und langsam mit Zinkpulver versetzt. Während der Zugabe erwärmte sich die Lösung, jedoch wurde der Ansatz nicht gekühlt. Die Suspension wurde über Nacht gerührt, wobei weißes Zinkacetat ausfiel. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit Aktivkohle versetzt und über Celite membranfiltriert, um farbige Nebenprodukte sowie Zinkacetat und nicht umgesetztes Zink abzutrennen. Die Essigsäure wurde entfernt und der verbleibende ölige Rückstand in *n*-Butanol gelöst. Die organische Phase wurde mit ges. Na₂CO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung neutral gewaschen und getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde das freie Amin mit 1 M HCl-Lösung in das Hydro-

chlorid überführt. Es wurden weiße Kristalle erhalten. Die Ausbeute betrug 66%. Die Identifizierung erfolgte mittels ^1H -, ^{13}C -NMR, Elementaranalyse, IR- und Massenspektroskopie (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.4.1.2.**).

4.2.1.3. Darstellung von 3-Indolylacetylchlorid

Durch das starke Chlorierungsmittel Phosphorpentachlorid wird Indolessigsäure in das Säurechlorid überführt (**Abb. 38**).

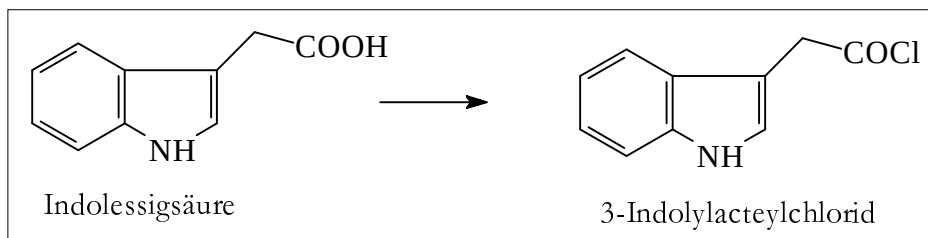


Abb. 38 Darstellung von 3-Indolylacetylchlorid

3-Indolylacetic acid was dissolved in diethyl ether and slowly added under ice cooling to finely powdered phosphorus pentachloride. The solution turned red. After 30 minutes of reaction time, the solvent was removed at 0°C to 75%. The residue was treated with ice-cooled hexane and the solution was filtered to separate the starting material and by-products. The clear filtrate was cooled to -78°C (acetone/dry ice). After 1 h, the crystallized product was filtered and dried. For the described synthesis, all apparatus and reagents must be dried, as the product is hydrolysis sensitive. The reaction and workup were carried out under nitrogen. White crystals were obtained. The yield was 92%. Identification was carried out by ^1H -NMR. Due to the hydrolysis sensitivity of 3-indolylacetyl chloride, further characterization was waived (conducting and data: see **Kap. 7.4.1.4.**).

4.2.1.4. Darstellung von 2-(3'-Indolylacetamido)-benzyltriphenylphosphoniumchlorid

The acylation of 2-aminobenzyltriphenylphosphoniumchloride hydrochloride with 3-indolylacetyl chloride leads to the formation of an amide bond. Through the activation of the carboxylic acid via the acid chloride, the reaction proceeds nearly quantitatively (**Abb. 39**).

2-Aminobenzyltriphenylphosphoniumchloride hydrochloride was treated with DMF and pyridine. By addition of the base, the free amine was obtained, which, due to its changed properties, dissolved, while pyridinium hydrochloride precipitated. To the ice-cooled suspension, a solution of 3-indolylacetyl chloride in DMF was added dropwise. The resulting orange-colored solution was stirred overnight at room temperature. Subsequently, the solvent was removed and the remaining residue was taken up in chloroform and 1 M HCl solution. A white precipitate was formed, which was recrystallized in 2-propanol.

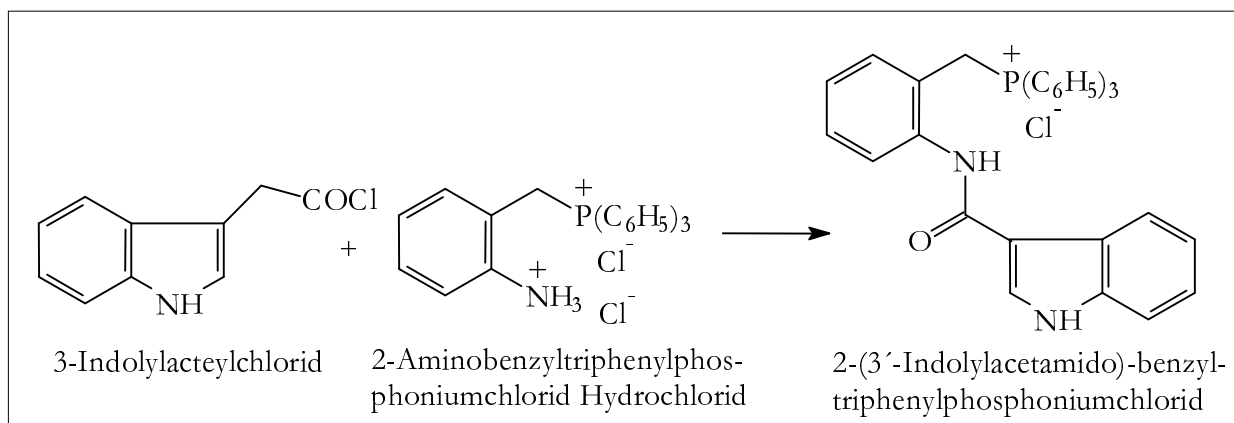


Abb. 39 Darstellung von 2-(3'-Indolylacetamido)-benzyltriphenylphosphoniumchlorid

Es wurden weiße Kristalle erhalten. Die Ausbeute betrug 87%. Die Identifizierung erfolgte mittels ^1H -, ^{13}C -NMR, Elementaranalyse, IR- und Massenspektroskopie (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.4.1.5.**).

4.2.1.5. Darstellung von 2-(3'-Indolylmethyl)-indol

2-(3'-Indolylacetamido)-benzyltriphenylphosphoniumchlorid cyclisiert in einer WITTIG-Reaktion zu 2-(3'-Indolylmethyl)-indol. Das Alkyltriphenylphosphoniumsalz wird durch Kalium-*tert*-butanolat deprotoniert. Das resultierende Phosphoniumylid befindet sich aufgrund der Möglichkeit der Oktetaufweitung des Phosphors mit der „Ylen“-Form im Gleichgewicht. Das Phosphonium-ylen addiert an die Carbonylgruppe und bildet dadurch den Ring aus. Im letzten Schritt wird Triphenylphosphinoxid eliminiert (**Abb. 40**).

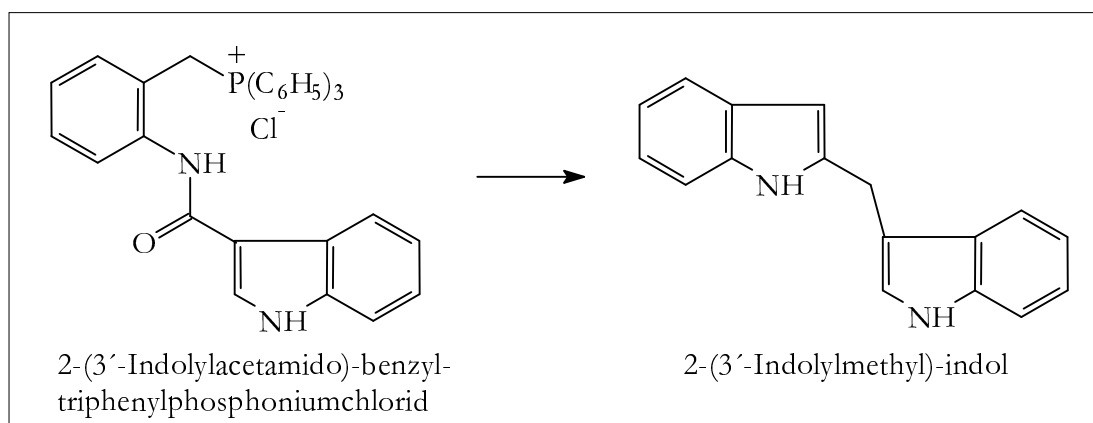


Abb. 40 Darstellung von 2-(3'-Indolylmethyl)-indol

Eine Suspension aus 2-(3'-Indolylacetamido)-benzyltriphenylphosphoniumchlorid und Toluol wurde unter Schutzgas und Rückfluß auf 80°C erhitzt. Der Reaktionsansatz wurde innerhalb von 10 min mit Kalium-*tert*-butanolat in kleinen Portionen versetzt. Dabei färbte sich die resultierende Lösung dunkelrot. Nach 5-minütigem Erhitzen unter Rückfluß wurde heiß filtriert und der

Filtrationsrückstand mit Diethylether gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden eingengt und durch Säulenfiltration über Kieselgel mit Toluol als Eluent gereinigt. Das Rohprodukt wurde aus Hexan/Toluol umkristallisiert. Es wurden farblose Blättchen erhalten. Die Ausbeute betrug 52%. Die Identifizierung erfolgte mittels ^1H -, ^{13}C -NMR, Elementaranalyse, IR- und Massenspektroskopie (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.4.1.6.**).

4.2.1.6. Darstellung von 3-Brom-2-hydroxyiminopropansäureethylester

Hydroxylaminsulfat kondensiert mit Ethylbromopyruvat zu 3-Brom-2-hydroxyiminopropansäureethylester (**Abb. 41**).

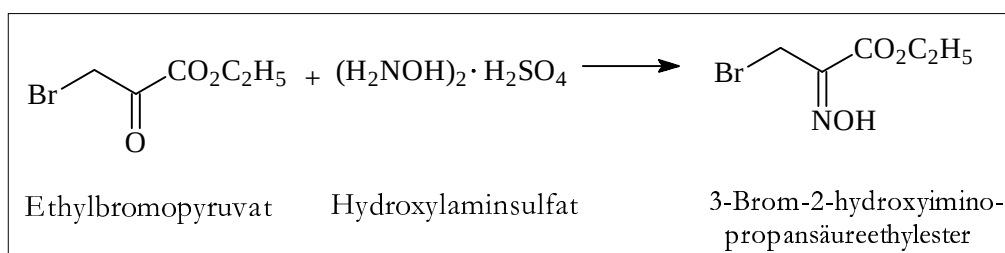


Abb. 41 Darstellung von 3-Brom-2-hydroxyiminopropansäureethylester

Ethylbromopyruvat wurde in Chloroform gelöst und tropfenweise mit einer Lösung aus Hydroxylaminsulfat in Wasser versetzt. Das Zweiphasensystem wurde 22 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Chloroformphase abgetrennt und die wässrige Phase mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels kristallisierte das Produkt aus. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten. Die Ausbeute betrug 82%. Die Identifizierung erfolgte mittels ^1H -, ^{13}C -NMR, Elementaranalyse, IR- und Massenspektroskopie (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.4.1.3.**).

4.2.1.7. Darstellung von 2''-(Hydroxyimino)-3-[2-(3'-indolylmethyl)-indolyl]-propansäureethylester

3-Brom-2-hydroxyiminopropansäureethylester steht mit der Nitrosoverbindung im tautomeren Gleichgewicht. Diese wird durch Natriumcarbonat deprotoniert und eliminiert HBr unter Bildung eines Nitrosoalkens. Die 2,3-Doppelbindung des 2-(3'-Indolylmethyl)-indols reagiert mit dem Olefin in einer DIELS-ALDER-Reaktion. Das Additionsprodukt rearomatisiert anschließend zur Hydroxyiminoverbindung (**Abb. 42**).

Natriumcarbonat und 2-(3'-Indolylmethyl)-indol wurden in Dichlormethan suspendiert und unter Schutzgas tropfenweise mit einer Lösung aus 3-Brom-2-hydroxyiminopropansäureethylester in Dichlormethan versetzt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei RT gerührt, wobei sich das Produkt als Feststoff absetzte. Anschließend wurde die Suspension filtriert. Der erhaltene Feststoff enthielt ausgefallenes Natriumbromid und nicht umgesetztes Natriumcarbonat. Das Produkt wurde mit Methanol extrahiert. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

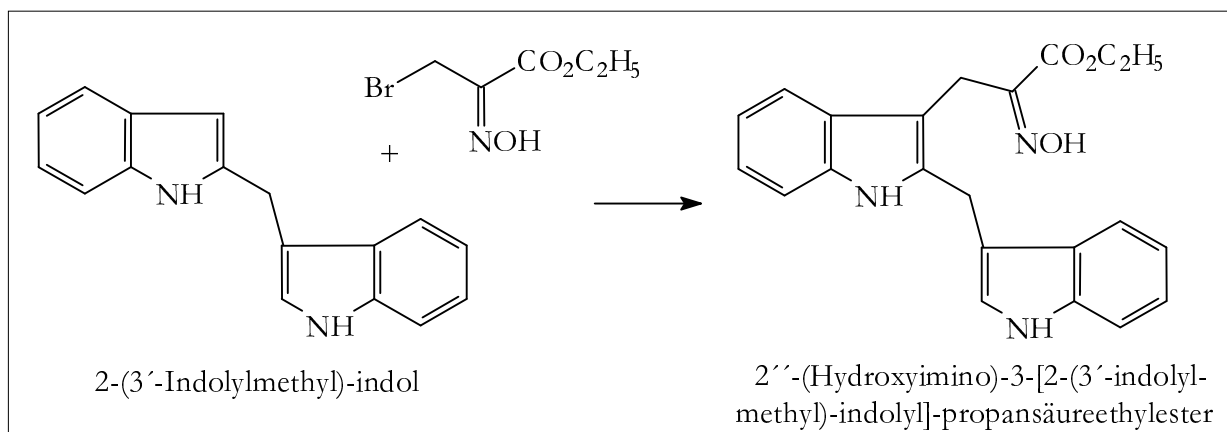


Abb. 42 Darstellung von 2''-(Hydroxyimino)-3-[2-(3'-indolylmethyl)-indolyl]-propansäureethylester

Die Ausbeute betrug 86%. Die Identifizierung erfolgte mittels ^1H -, ^{13}C -NMR, Elementaranalyse, IR- und Massenspektroskopie (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.4.1.7.**).

4.2.1.8. Darstellung von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophanethylester

Die Oximgruppe des 2''-(Hydroxyimino)-3-[2-(3'-indolylmethyl)-indolyl]-propansäureethylesters wird durch Zink/Essigsäure zur Aminogruppe reduziert (Abb. 43).

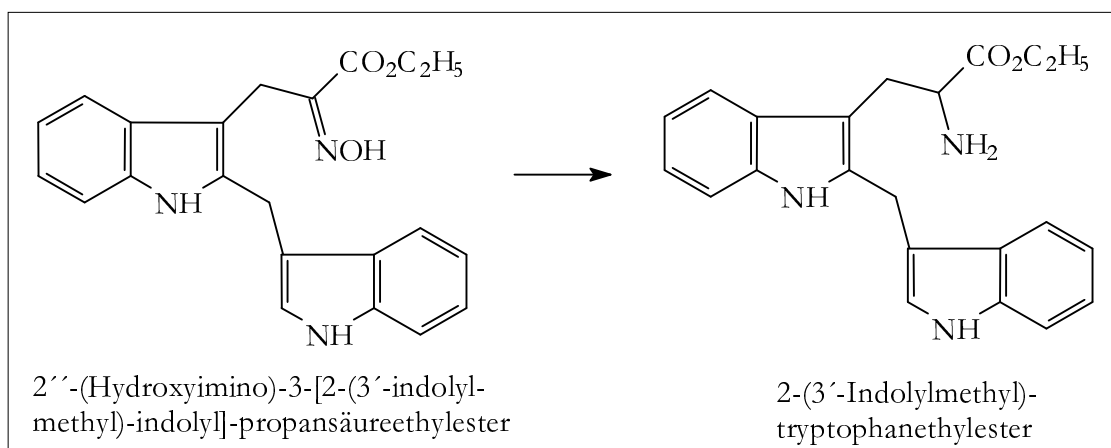


Abb. 43 Darstellung von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophanethylester

2''-(Hydroxyimino)-3-[2-(3'-indolylmethyl)indolyl]-propansäureethylester und Zinkpulver wurden unter Schutzgas in Eisessig suspendiert und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz filtriert und das Filtrat eingedunstet. Das verbliebene braune Öl wurde in 2 M methanolischer Essigsäure-Lösung aufgenommen und über einen Kationenaustauscher gereinigt. Die Elution erfolgte fraktioniert mit 0,05 M methanolischer Ammoniak-Lösung. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit dest. Wasser versetzt und lyophilisiert. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten. Die Ausbeute betrug 80%. Das Produkt wurde umgehend zur nächsten Reaktion eingesetzt, so daß eine Charakterisierung nicht durchgeführt wurde (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.4.1.8.**).

4.2.1.9. Darstellung von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan

Der 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophanethylester wird basisch hydrolysiert (**Abb. 44**).

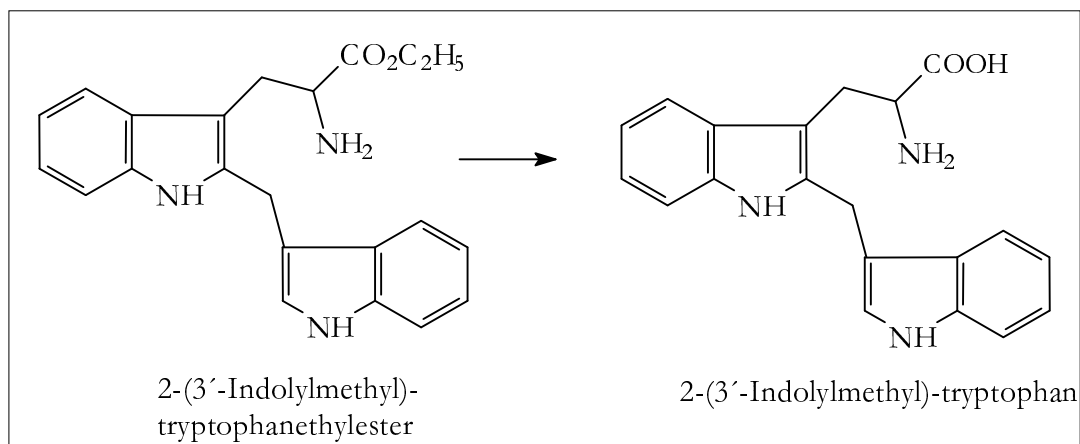


Abb. 44 Darstellung von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan

Der 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophanethylester wurde in Methanol gelöst und unter Schutzgas mit 1 M NaOH-Lösung auf pH=12 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde 16 h bei RT gerührt. Das Rohprodukt wurde über einen Anionenaustauscher gereinigt. Die Elution erfolgte fraktioniert mit 2 M methanolischer Essigsäure-Lösung. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit dest. Wasser versetzt und lyophilisiert. Es wurde ein rosa-weißliches Lyophilisat erhalten. Die Ausbeute betrug 77%. Die Identifizierung erfolgte mittels ^1H -, ^{13}C -NMR, Elementaranalyse, IR- und Massenspektroskopie (Durchführung und Daten: siehe **Kap.7.4.1.9.**).

4.2.2. Bildungsbedingungen von IMT

IMT ist ein 2-substituiertes Trp-Derivat. Die Substitution an Position C-2 ist nur über einen elektrophilen Angriff möglich. Da die reaktivste Stelle für einen elektrophilen Angriff im Trp-Molekül die Position C-2 des Indolringes ist, überrascht die Tatsache des Auftretens einer Vielzahl von 2-substituierten Trp-Derivaten im SD-Trp nicht (SIMAT et al. 1996; NAYLOR et al., 1999, in Druck). Das für die IMT-Bildung erforderliche 3-Indolylmethyl-Kation (IMK) stellt ein besonders stabiles Elektrophil dar, da die positive Ladung über das aromatische System delokalisiert werden kann (**Abb. 45**). Analog zum Benzylkation besitzt das IMK eine wesentlich längere Lebensdauer als primäre Kationen, die sich sofort über Umlagerungen oder Eliminierungen stabilisieren.

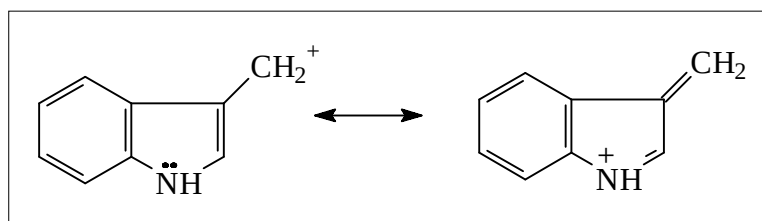


Abb. 45 Resonanz im 3-Indolylmethylkation

Potentiell können alle Verbindungen, die ein 3-Indolylmethyl-Fragment beinhalten, unter bestimmten Bedingungen ein IMK bilden. Bei der Betrachtung des Anabolismus und Katabolismus von Trp sind viele Trp-Derivate mit diesem Fragment ausgestattet, wie z.B. Indolessigsäure, Indolpyruvat, IAc und Trp selbst. Die Bildung eines IMK aus den entsprechenden Verbindungen liegt im elektronenspendenden Charakter des Indolkerns begründet, der die Eigenschaften von Substituenten, besonders an der Position C-3 des Pyrrolringes, beeinflusst. Der Austritt einer Abgangsgruppe am Kohlenstoffatom in α -Stellung zum Ring wird erheblich erleichtert (**Abb. 46**). Dieses Phänomen wird z.B. bei der Trp-Herstellung aus Gramin ausgenutzt.

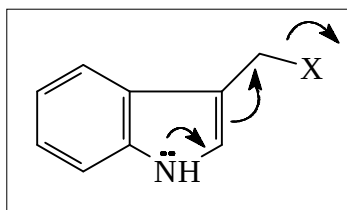


Abb. 46 Bildung des 3-Indolylmethyl-Kations

Die Entstehung des IMK's und damit die Bildung von IMT beim Herstellungsprozeß der Firma SD könnte durch die Einwirkung von Säuren und Laugen auf die Fermentationslösung, wie sie bei der Reinigung über Ionenaustauscherharze auftreten, erklärt werden. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse von AMAT-GUERRI et. al. (1984) gestützt. Sie wiesen die Bildung von 2,3'-Methylendiindolderivaten durch Kondensation von 3-Hydroxymethylindolen mit 3-substituierten Indolen bei verschiedenen sauren pH-Werten nach. Die Reaktion verlief dabei über die Dehydratisierung von 3-Indolylmethanol (IM) zum IMK, das 3-substituierte Indole in Position C-2 elektrophil angreift. LEETE (1959) zeigte, daß sich im basischen Milieu ebenfalls IMK bilden können. Die Base deprotoniert die NH-Gruppe des 3-Hydroxymethylindols. Anschließend erfolgt die Abspaltung der Hydroxyl-Gruppe zur exocyclischen Methylenverbindung. Nach Reprotonierung liegt das reaktive IMK vor (**Abb. 47**).

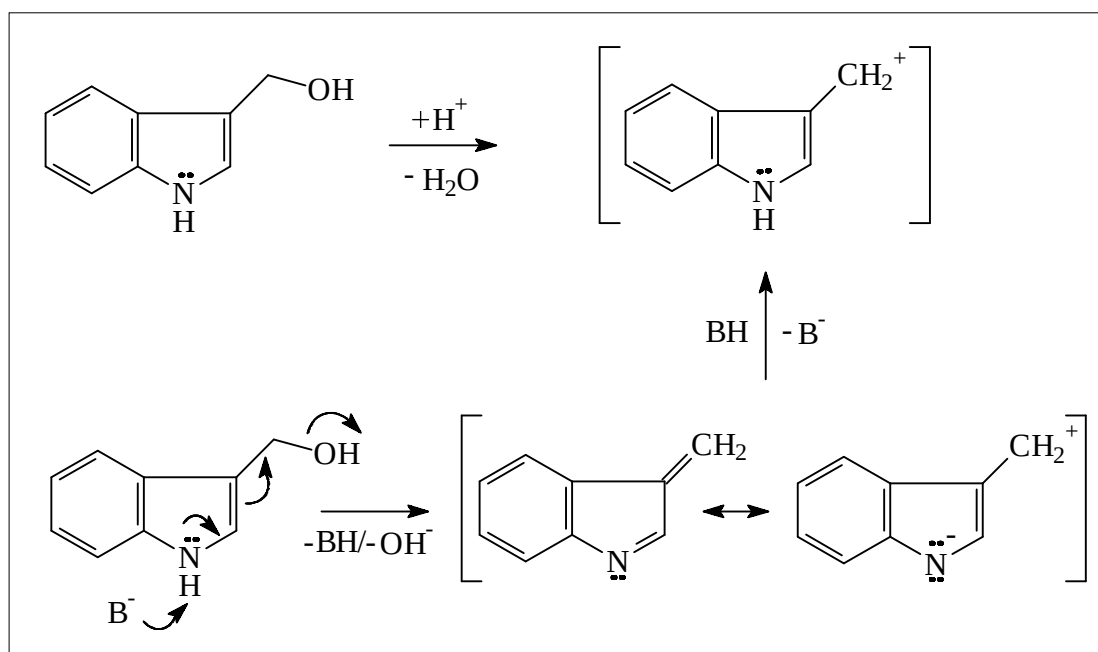


Abb. 47 saure und basische IMK-Bildung

Die Entstehung von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan könnte folglich durch Reaktion zwischen Trp und einem 3-Indolylmethyl-Derivat erfolgen. Neben dem von AMAT-GUERRI et al. (1984) untersuchtem IM sollten auch Stoffwechselprodukte des Trp's mit der entsprechenden Struktur als potentielle IMK-Bildner, wie Indolessigsäure, IAc, Indolpyruvat und Trp selbst, eingesetzt werden (**Abb. 48**). Bis auf IM sind alle Verbindungen in der Fermentationslösung enthalten, wogegen IM bisher darin nicht nachgewiesen werden konnte. Die Reaktion zwischen Formaldehyd und Indol unter basischen Bedingungen führt zu IM (RUNTI, 1951). Aus diesem Grund sollte auch die Umsetzung von Trp mit Formaldehyd und Indol untersucht werden.

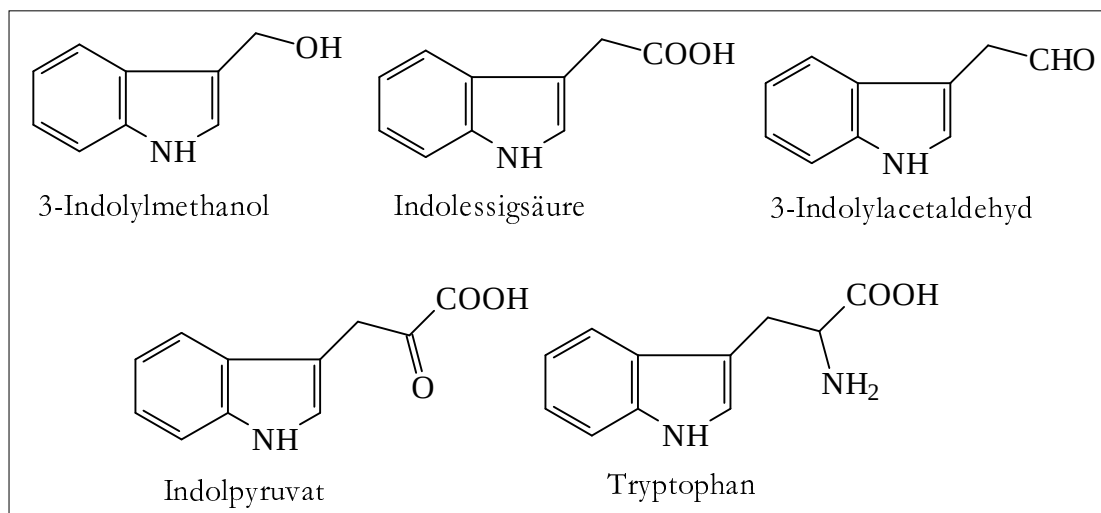


Abb. 48 Potentielle IMK-Bildner

IM wurde aufgrund seiner besonders reaktiven Eigenschaften und seiner hohen physiologischen Aktivität als Modellschubstanz für IMK-Bildner ausgewählt, um weitergehende Studien zur IMT-Bildung durchzuführen (CHEN et al., 1996). Es sollten die pH-Abhängigkeit die Kinetik und das Verhältnis der Reaktanden hinsichtlich einer IMT-Bildung, untersucht werden.

Abhängigkeit vom pH-Wert

Im Herstellungsprozeß der Firma SD wurde die zentrifugierte Fermentationslösung vor der Aufgabe auf die Ionenaustauscher sowohl auf pH=10.5 (pH-Wert bei der Aufgabe auf den Anionenaustauscher) als auch auf pH=1.7 (pH-Wert bei der Aufgabe auf den Kationenaustauscher) eingestellt. Hat diese pH-Wert Änderung direkt Einfluß auf die Bildung von IMT?

Abhängigkeit vom molaren Verhältnis der Edukte

In der Fermentationslösung von SD ist ein großer Überschuß an Tryptophan gegenüber den Metaboliten vorhanden. Fördert dieser die Bildung von IMT oder hemmt er unerwünschte Nebenreaktionen?

Abhängigkeit von der Zeit

Hätte die Verkürzung des Reinigungsprozesses eine positive Wirkung auf die Verringerung der EMS-assoziierten Verbindung ?

4.2.2.1. Untersuchung von verschiedenen potentiellen IMK-Bildnern

Die Umsetzung von Trp mit Indolessigsäure, Indolpyruvat, IAc und IM bei pH=3 und pH=9 führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während IM sowohl im sauren als auch im basischen Milieu mit Trp zu IMT reagierte, war keine Bildung von IMT aus Trp und den anderen beiden 3-Indolylmethyl-Derivaten zu beobachten. Indolessigsäure zeigte bei diesen pH-Werten keine Reaktivität und setzte sich auch nicht zu anderen Produkten um. Mit Indolpyruvat entstand ein unbekanntes Produkt, das nicht identifiziert werden konnte. Eine IMT-Bildung konnte bei der Reaktion von IAc mit Trp bei pH=3 mittels RP-HPLC-UV-Analyse nachgewiesen werden. Als zusätzliche Produkte wurden 1-(3'-Indolylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure (IMTHCC) und 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure (THCC) detektiert. Offensichtlich treten unter diesen Bedingungen zwei konkurrierende Reaktionen auf. Einerseits bildet sich das Carbolin aus IAc und Trp als Produkt der PICTET-SPENGLER-Reaktion und andererseits zerfällt IAc in ein IMK und Formaldehyd. Aus dem IMK wird mit Trp IMT gebildet, wogegen Formaldehyd in der Lage ist mit Trp ein weiteres Carbolin (THCC) zu bilden. Der Bildungsmechanismus läuft vermutlich über das mesomeriestabilisierte IMK, welches aus IAc durch Abspaltung eines Formaldehydmoleküls entstehen könnte. Der analytische Nachweis dieses Mechanismus wurde durch den positiven HPLC-Nachweis von THCC im selben Reaktionsansatz erbracht (Abb. 49).

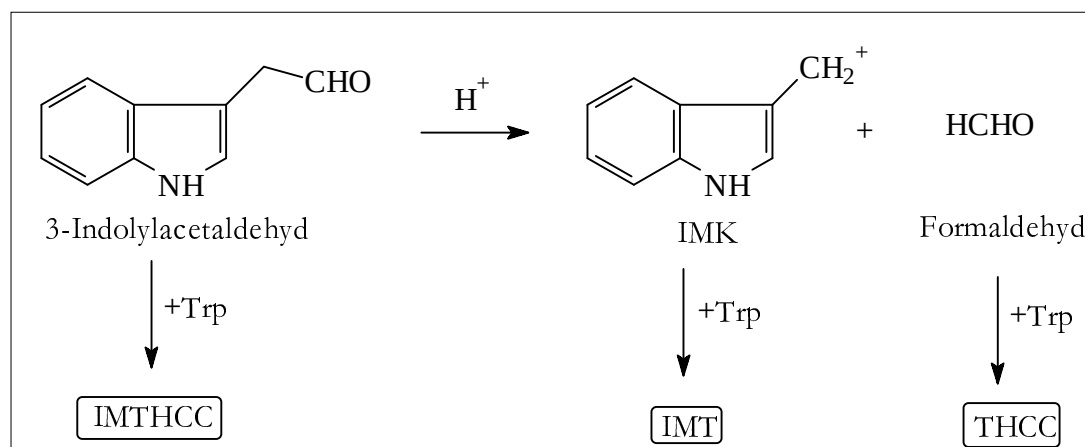


Abb. 49 IMK-Bildung und Folgereaktionen aus IAc

Somit konnte eine IMT-Bildung aus einem bei der Fermentation entstehenden Trp-Metaboliten bei sauren Bedingungen nachgewiesen werden.

Indol, Formaldehyd und Trp reagierten bei pH=0 und pH=1 zu IMT. Bei allen anderen höher liegenden pH-Werten war keine IMT-Bildung zu beobachten. Stattdessen entstand bevorzugt ein anderes Produkt, das als THCC identifiziert wurde. Unter stark sauren Reaktionsbedingungen (pH=0) war keine THCC-Bildung mehr zu erkennen. Außerdem wurde die Entstehung weiterer UV-aktiver Substanzen beobachtet, deren Strukturen nicht aufgeklärt werden konnten. Bei reinen Trp-Lösungen wurden keine Produkte nachgewiesen (Durchführung und Daten: siehe Kap.7.4.2.2.).

4.2.2.2. Abhängigkeit der IMT-Bildung vom pH-Wert

Für die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der IMT-Bildung wurden Trp und IM im molaren Verhältnis von 5:1 zusammengegeben, über Nacht gerührt und anschließend mittels HPLC und UV-Detektion bei 220 nm analysiert. In **Abb. 50** ist die pH-Abhängigkeit der IMT-Bildung aus Trp und IM graphisch dargestellt. Auf der Abzisse sind die pH-Werte und auf der Ordinate die relativen Flächenprozentage des IMT's zu Trp aufgetragen. Die Entstehung von IMT besitzt im sauren bei pH=3 und im basischen Milieu bei pH=9 ein Maximum. Im neutralen pH-Bereich und bei stark alkalischen Bedingungen (pH>11) erreichen die IMT-Ausbeuten minimale Werte. Im allgemeinen liegen die IMT-Ausbeuten bei sauren Bedingungen höher als bei basischen pH-Werten. (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.4.2.3.**)

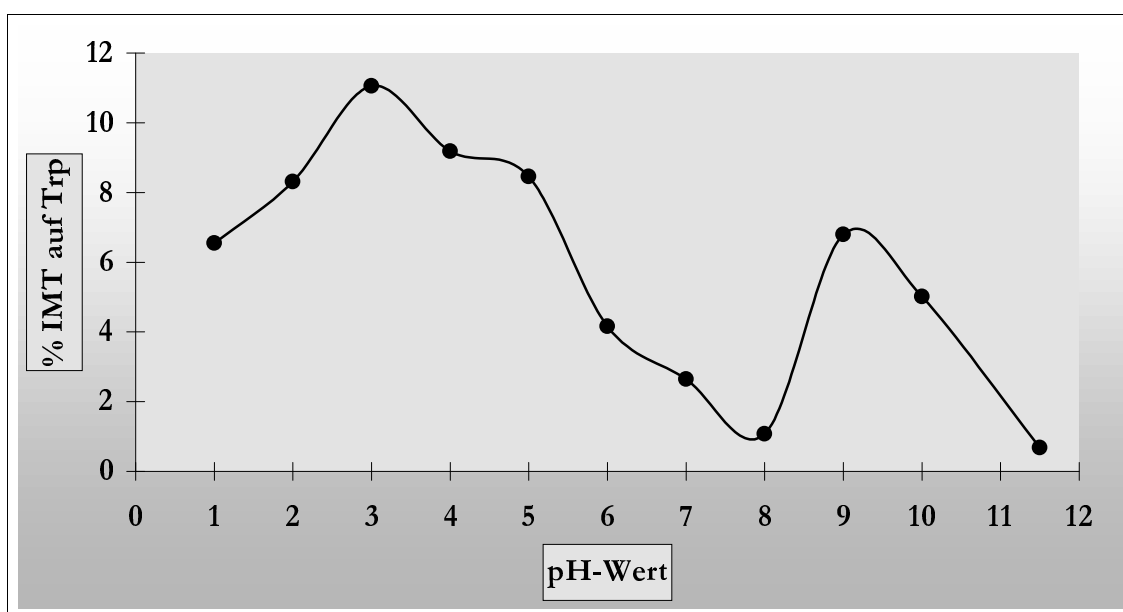


Abb. 50 Abhängigkeit der IMT-Bildung vom pH-Wert

4.2.2.3. Abhängigkeit der IMT-Bildung vom molaren Verhältnis zwischen Trp und IM

Für die Untersuchung der Abhängigkeit der IMT-Bildung vom molaren Verhältnis zwischen Trp und IM wurden die Edukte bei pH=3 zusammengegeben, über Nacht gerührt und anschließend mittels HPLC und UV-Detektion bei 220 nm analysiert. In **Abb. 51** ist die Abhängigkeit der IMT-Bildung vom molaren Verhältnis zwischen der eingesetzten Menge Trp und IM dargestellt. Auf der Ordinate sind die IMT-Ausbeuten in Prozent, bezogen auf die eingesetzte Menge IM und auf der Abzisse der molare Überschuss an Trp aufgetragen. Während bei einem molaren Verhältnis von 1:1 zwischen IM und Trp nur geringe Ausbeuten von ca. 12% an IMT erhalten werden, erfolgt bei Verhältnissen von 1:50 und höher eine quantitative Umsetzung (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.4.2.4.**).

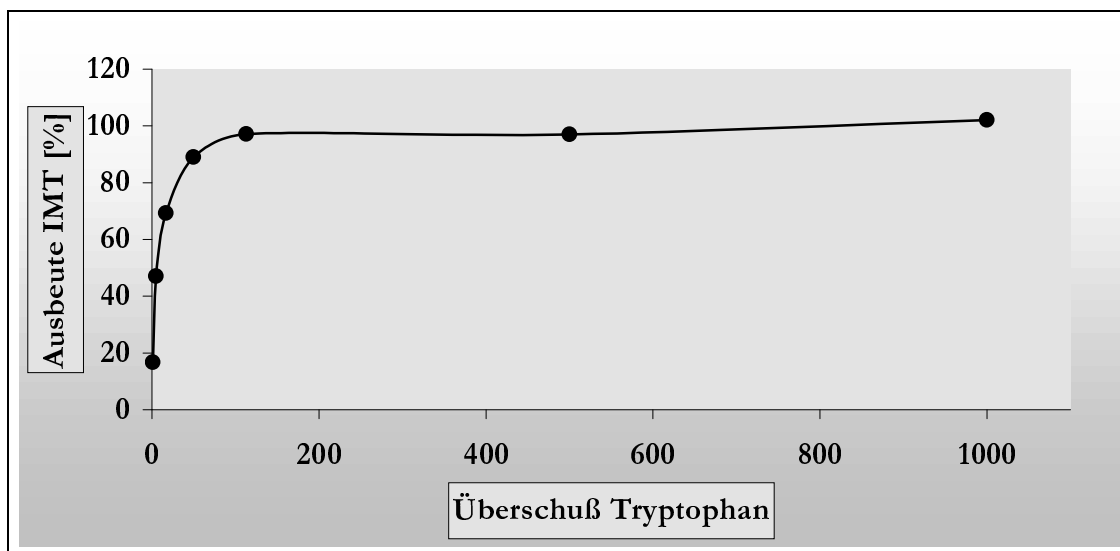


Abb. 51 Abhängigkeit der IMT-Bildung vom molaren Verhältnis zwischen Trp und IM

4.2.2.4. Abhängigkeit der IMT-Bildung von der Zeit

Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der IMT-Bildung wurden Trp und IM im molaren Verhältnis von 5:1 bei pH=3 zusammengegeben, gerührt und mittels HPLC und UV-Detektion bei 220 nm analysiert. Die Abhängigkeit der IMT-Bildung von der Zeit ist in **Abb. 52** graphisch dargestellt. Auf der Ordinate ist die Peakfläche von IMT und auf der Abzisse die Zeit aufgetragen. Die Entstehung von IMT aus Trp und IM verläuft schnell. Bereits nach 1 h ist eine quantitative Umsetzung erreicht. (Durchführung und Daten: siehe **Kap. 7.4.2.5.**)

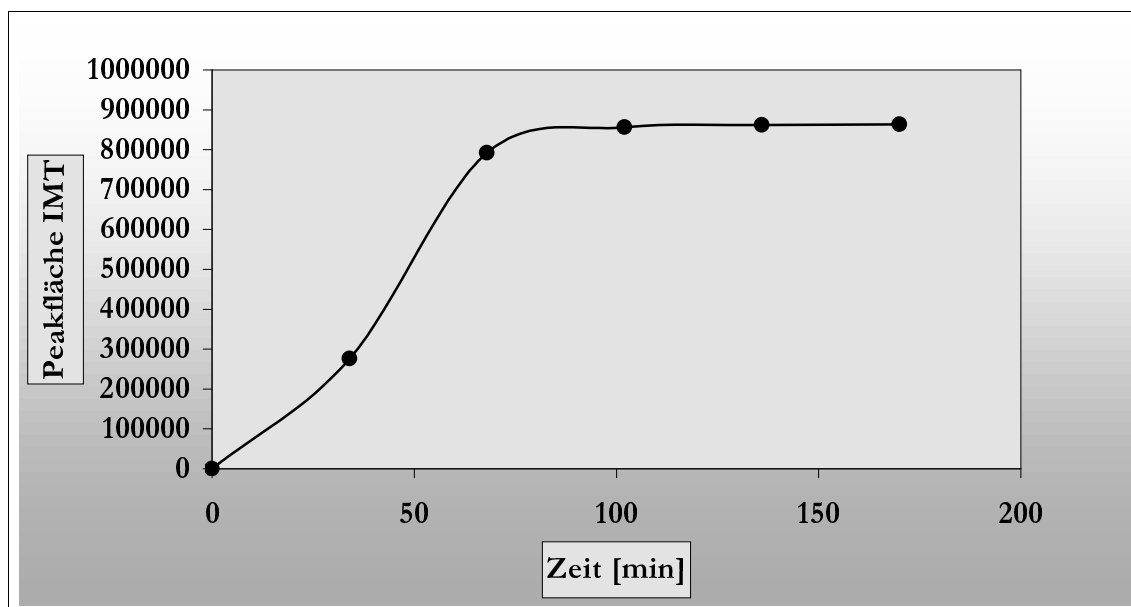


Abb. 52 Zeitabhängigkeit der IMT-Bildung

4.2.3. Entwicklung einer IMT-Schnellsynthese

Aufgrund der bei der Untersuchung der IMT-Bildungsbedingungen erzielten Ergebnisse besteht offenbar die Möglichkeit, IMT in einem einzigen Reaktionsschritt darzustellen. Dadurch würde gegenüber der aufwendigen chemischen de novo Synthese eine erhebliche Kosten- und Zeiterparnis erzielt. IM reagiert bei einem sauren pH-Wert unter Wasserabspaltung zum IMK, welches Trp an Position C-2 elektrophil angreift (**Abb. 53**).

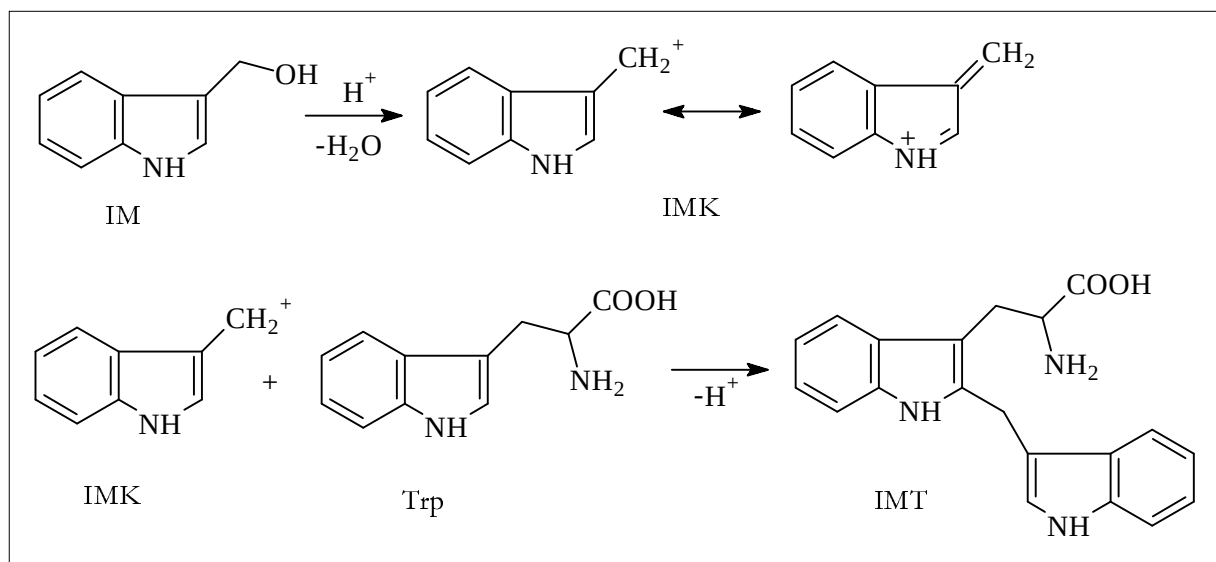


Abb. 53 Reaktion der IMT-Schnellsynthese

Aus den Ergebnissen, die bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit, der Zeitabhängigkeit und des molaren Verhältnis der Reaktanden IM und Trp erhalten wurde (siehe **Kap. 4.2.2.2.**, **4.2.2.3.** und **4.2.2.4.**), ergaben sich die empirisch ermittelten Bedingungen für eine IMT-Schnellsynthese wie folgt:

- pH-Wert 3
- Reaktionsdauer 60 min
- molares Verhältnis Trp : IM 2 : 1

Das HPLC-Chromatogramm einer nach diesen Bedingungen durchgeführten Reaktion ist in **Abb. 54** dargestellt. In diesem Chromatogramm sind vier Verunreinigungen erkennbar. Die drei nach IMT eluierenden Substanzen werden als Oligomerisationsprodukte der Reaktion interpretiert, die vor dem IMT-Peak eluierende Substanz stellt Trp dar. Über die Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen sollte die IMT-Ausbeute maximiert und die Konkurrenzreaktionen durch Polymerisation von IM minimiert werden. Diese Optimierung sollte über eine entsprechende Faktorenanalyse erreicht werden. Durch die Entwicklung eines Clean up-Verfahrens sollte eine Reinheit des IMT's gewährleistet werden, die den Einsatz als HPLC-Referenzsubstanz zulässt.

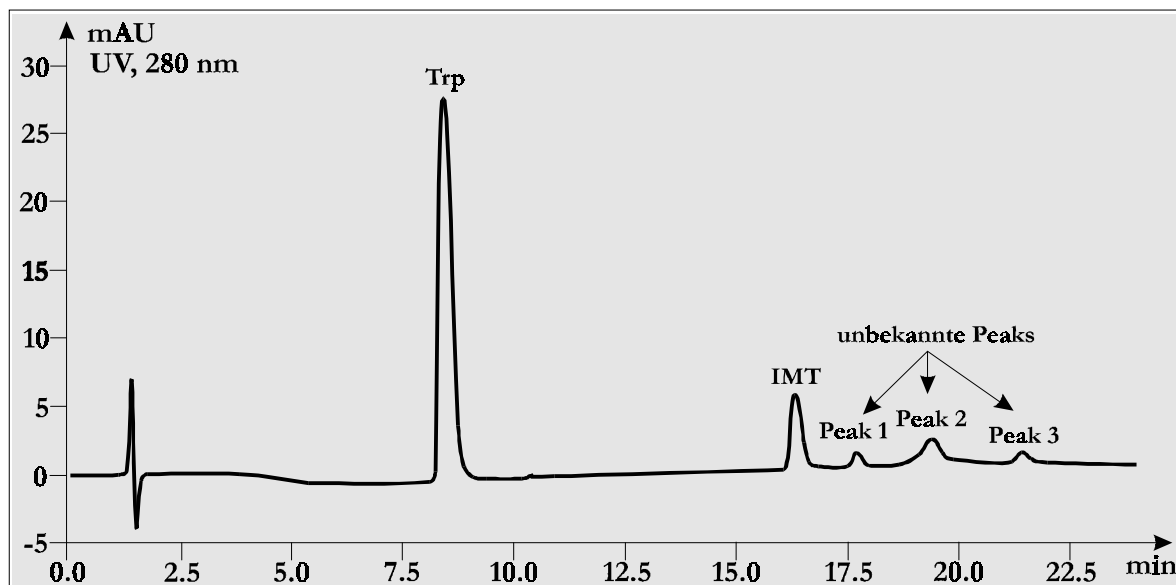


Abb. 54 Reaktionsansatz der IMT-Schnellsynthese

4.2.3.1. Faktorenanalyse der IMT-Schnellsynthese

Experimentelle Methoden sind sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der angewandten Forschung der Industrie weit verbreitet, wenn sie auch zuweilen sehr unterschiedliche Zielsetzungen besitzen. Methoden der Versuchsplanung werden zunehmend eingesetzt, um Fertigungsprozesse zu optimieren. Das Ziel besteht insbesondere darin, die optimalen Einstellungen für die verschiedenen Faktoren, die den Fertigungsprozeß beeinflussen, zu finden (STATSOFT, 1995). Führt man die Versuchsplanung auf Basis chemometrischer Prinzipien durch, so können aus den Daten einer geringen Anzahl von Experimenten durch Anwendung statistischer Methoden deutlich mehr Informationen über die Zusammenhänge komplexer Reaktionen gewonnen werden. Moderne Statistikprogramme erleichtern dabei die Anwendung soweit, daß keine außergewöhnlichen Statistikkenntnisse erforderlich sind (PREU und PETZ, 1998).

In diesem Fall bestand das Hauptziel darin, anhand statistischer Methodik die Haupteffekte ausgewählter Reaktionsparameter auf die Zielgrößen der IMT-Bildung und der Bildung UV-aktiver Verunreinigungen zu überprüfen. Es sollten so die idealen Reaktionsparameter ermittelt werden, die eine maximale IMT-Ausbeute bei minimaler Bildung von Polymerisationsprodukten erlauben. Bei der Durchführung einer Faktorenanalyse treten im allgemeinen zwei Grundprobleme auf:

- Wie plant man einen Versuch in optimaler Weise?
- Wie analysiert man die Ergebnisse eines solchen Versuches?

In der Literatur werden drei unterschiedliche Methoden in diesem Zusammenhang beschrieben:

- OVAT-Methode
- Sequentielle Optimierung
- Simultane Optimierung

Bei der sogenannten **OVAT-Methode** (**O**ne-**V**ariable-**A**t-a-**T**ime) werden alle Parameter schrittweise nacheinander optimiert. Dies hat den Nachteil, daß Wechselwirkungen zwischen den Parametern nicht erkannt und berücksichtigt werden können. Da außerdem nur ein sehr enger Ausschnitt aller möglichen Wertekombinationen untersucht wird, ist das gefundene Optimum in vielen Fällen nicht das tatsächliche Optimum.

Bei der **sequentiellen Optimierung** wird systematisch nach einer Art „Suchverfahren“ (Simplex-Verfahren) nach dem Optimum gesucht. Die Ergebnisse der ersten Versuche werden verwendet, um die Parametereinstellung der nächsten Versuche festzulegen und so fort (OTTO, 1997). Nachteilig ist hierbei, daß nur systematisch nach einem Optimum gesucht wird, während Zusammenhänge zwischen den Zielgrößen und Einflußparametern nicht näher untersucht werden. Zum anderen können lokale Suboptima und globale Optima nicht unterschieden werden, so daß das tatsächliche Optimum nicht immer sicher gefunden wird.

Bei der **simultanen Optimierung** werden die Zusammenhänge zwischen Zielgröße und Versuchsparametern genau untersucht und mathematisch modelliert (ESBENSEN et al., 1996; OTTO, 1997). Hierzu wird zunächst eine Reihe von Experimenten durchgeführt, die einen bestimmten experimentellen Raum abdecken. Aus den Ergebnissen dieser Experimente wird ein mathematisches Modell errechnet, mit welchem man die Zielgrößenwerte an allen Stellen des Raumes vorhersagen kann. Das so ermittelte Optimum stellt das tatsächliche Optimum des experimentellen Raumes dar.

Die statistische Untersuchung der IMT-Schnellsynthese wurde anhand des Prinzips einer simultanen Optimierung durchgeführt. Konkrete Hinweise auf den auszuwählenden experimentellen Raum ergeben sich aus den Untersuchungen bezüglich der IMT-Bildungsbedingungen. Das Statistica-Software-Paket bietet bezüglich der Auswertung und der Erstellung eines Versuchsplanes verschiedene Betrachtungen und Lösungsvorschläge an, deren detaillierte Erläuterung jedoch den Rahmen dieser Arbeit übersteigen würde. Die ideale Lösung der beschriebenen Probleme konnte mit Hilfe eines sogenannten zweistufigen 3-faktoriellen Versuchsplanes gefunden werden. In diesem Fall opfert man im Interesse einer geringen Anzahl von Versuchen intuitiv diejenigen Faktoren, deren Einflußgrößen auf das System aufgrund der bisher erlangten Erfahrungen der IMT-Schnellsynthese gering ausfallen. Die Möglichkeit eines vollständigen faktoriellen Versuchsplanes, d.h. das Austesten aller möglichen Kombinationen von Einstellungen hätte ein exponentielles Anwachsen der dazu notwendigen Versuche zur Folge, was mit einem unvertretbaren zeitlichen Aufwand verbunden wäre. Die ausgewählten Faktoren werden im nächsten Schritt zwei Stufen zugeordnet, im weiteren als +1 und -1 beschrieben. Sie stellen eine Erhöhung bzw. eine Erniedrigung einer vorher gewählten Standardgröße des entsprechenden Einflußfaktors dar. (Beispiel: Einflußfaktor Reaktionsdauer: gewählte Standardgröße=60 min; Stufe +1=90 min; Stufe -1 = 30 min). Der unter diesen Voraussetzungen erhaltene faktorielle Versuchsplan und die daraus resultierende Planmatrix sind in den **Abb. 55** und **56** dargestellt.

variable Einflußfaktoren	Einheit	Standardgröße	Stufe +1	Stufe -1
1. Molratio (Trp : IM)		2 : 1	1 : 1	4 : 1
2. pH-Wert	pH	3	4	2
3. Reaktionsdauer	min	60	90	30

konstante Einflußfaktoren	Einheit	Standardgröße	Stufe +1	Stufe -1
Temperatur	°C	20	20	20
Trp-Konzentration	g/l	0,11	0,11	0,11

Zielgrößen	Einheit
max. IMT Ausbeute	mg/l
min. Nebenprodukte	mg/l

Abb. 55 Faktorieller Versuchsplan der IMT-Schnellsynthese

Die Auswertung der Zielgrößenkonzentrationen wurde über eine externe IMT-Kalibrierung mittels RP-HPLC-UV (siehe **Kap. 7.2.2.**) durchgeführt (IMT-Kalibrierung: siehe **Kap. 7.4.2.2.**).

Versuch	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Molratio (Trp : IM)	pH	min
1	-1	-1	-1	4 : 1	2	30
2	+1	-1	-1	1 : 1	2	30
3	-1	+1	-1	4 : 1	4	30
4	+1	+1	-1	1 : 1	4	30
5	-1	-1	+1	4 : 1	2	90
6	+1	-1	+1	1 : 1	2	90
7	-1	+1	+1	4 : 1	4	90
8	+1	+1	+1	1 : 1	4	90
9,10,11	0	0	0	2 : 1	3	60

Abb. 56 Planmatrix der IMT-Versuchsplanung

Die Versuche 9-11 stellen den Mittelpunkt des Versuchsplanes dar. Pläne mit Faktoren, die nur auf zwei Stufen eingestellt werden, setzen implizit voraus, daß der Effekt der Faktoren auf die interessierenden Zielgrößen linearer Natur ist. Will man testen, ob Beziehungen zwischen den Faktoren und den Zielgrößen nichtlinearer Natur bestehen, dann sollten ein oder mehrere Versuche zusätzlich in den Plan aufgenommen werden, in denen alle stetigen Faktoren auf ihre Mittelpunkte gesetzt werden; sie werden Runs durch den Nullpunkt genannt, da die Punkte in gewissem Sinn im Nullpunkt (Zentrum) des Plans liegen (STATSOFT, 1995).

4.2.3.2. Meßergebnisse des Versuchsplans

Die in der Planmatrix dokumentierte Nummerierung der Versuche wurde bei der Auswertung der IMT-Konzentrationen und der UV-aktiven Nebenprodukte beibehalten. Die **Abb. 57** und **58** müssen zur Ermittlung der idealen Versuchsparameter (höchste IMT-Ausbeute bei minimaler Bildung von Nebenprodukten) direkt miteinander verglichen werden.

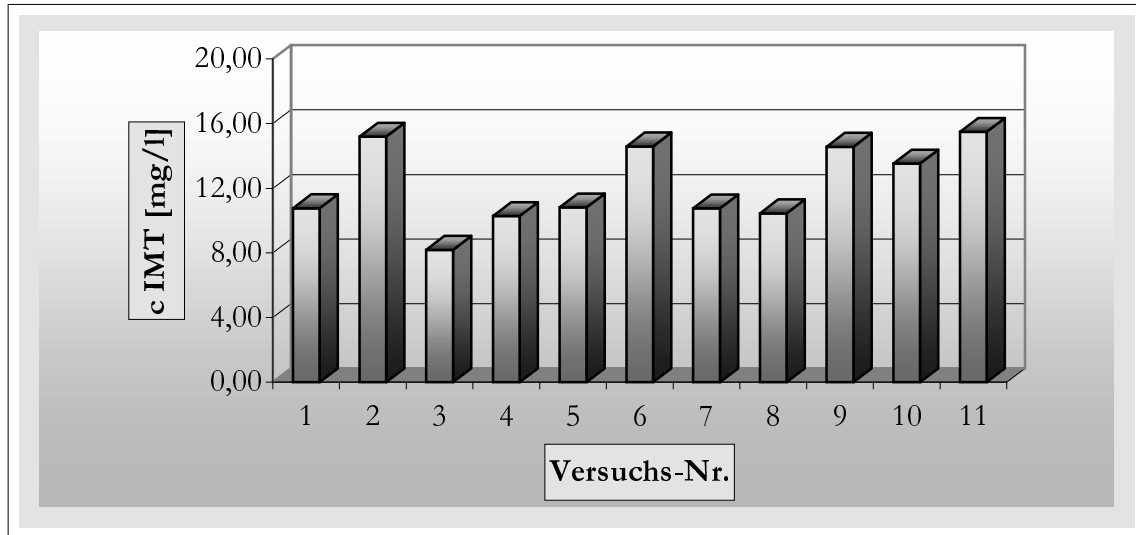


Abb. 57 IMT-Monitoring

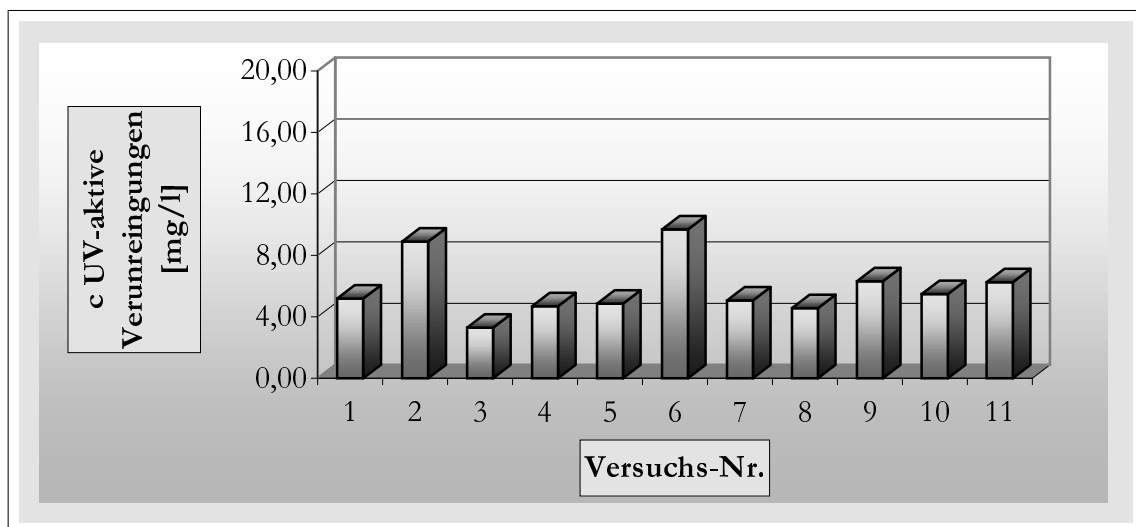


Abb. 58 Monitoring der UV-aktiven Nebenprodukte

Durch Interpretation der **Abb. 57** können neben den Versuchen 2 und 6 die sogenannten Nullpunkte des Versuchsplans, die Versuche 9-11, als Reaktionsansätze mit der höchsten IMT-Ausbeute betrachtet werden. Vergleicht man nun diese Versuche mit deren Konzentration an UV-aktiven Nebenprodukten, so weisen die Versuche 2 und 6 die mit Abstand höchsten Gehalte an Polymerisationsprodukten auf. Die Nullpunkte 9-11 liegen hingegen nur schwach oberhalb der übrigen Ansätze, von denen Versuch 3 den geringsten Anteil an detektierbaren Verunreinigungen aufweist (Meßdaten und Auswertung: siehe **Kap. 7.4.3.2.**).

4.2.3.3. Statistica-Auswertung der Meßergebnisse

Anhand der statistischen Auswertung der Meßdaten des Versuchsplanes über das simultane Optimierungsprinzip können signifikante Zusammenhänge zwischen den Versuchsparametern und den Zielgrößen ermittelt werden. Eine gut zu dokumentierende und aussagekräftige Darstellung konnte über die sogenannten Paretdiagramme wie in den **Abb. 59** und **60** ersichtlich erreicht werden. Bezüglich der IMT-Ausbeute weist keiner der drei untersuchten Reaktionsparameter Molratio (1), pH-Wert (2) und Reaktionszeit (3) einen signifikanten Einfluß auf die IMT-Bildung im gewählten experimentellen Raum auf, was ebenfalls für die berechneten Interaktionen der Parameter untereinander gilt (1*2, 2*3 und 1*3). Allerdings können pH und Molratio als Parameter mit dem höchsten, unsignifikanten Einfluß interpretiert werden, wobei der pH-Wert einen negativen (Stufe -1 bevorzugt, d.h. je geringer der pH-Wert, desto höher die zu erwartende IMT-Ausbeute) und das Molratio einen positiven Effekt (Stufe +1 bevorzugt, d.h. je höhermolar der IM-Anteil, desto höher die zu erwartende IMT-Ausbeute) besitzen.

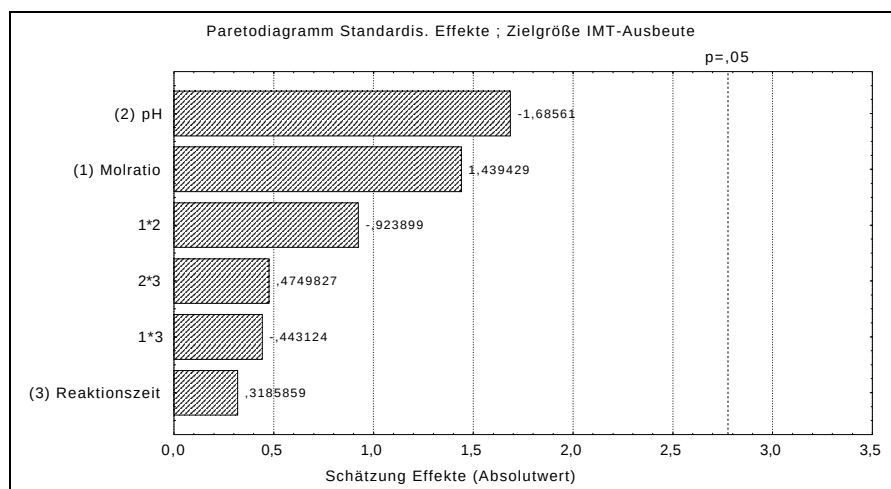


Abb. 59 Paretdiagramm der IMT-Ausbeute

Für die Untersuchung der Polymerisationsprodukte hingegen ergab die Statistica-Auswertung mehrere signifikante Effekte, die in Reihe ihrer Signifikanz als pH (2), Molratio (1) und Interaktion beider zueinander (1*2) gedeutet werden. Aus beiden Paretdiagrammen wird ersichtlich, daß hauptsächlich die Faktoren pH und Molratio die Bildung der untersuchten Zielgrößen beeinflusst. Über den aus diesen Faktoren modellierten Flächenplot (siehe **Abb. 61** und **62**), der die wahrscheinlichen Ausbeuten im gesamten experimentellen Raum mathematisch berechnet, sollten die optimalen Einstellungen ermittelt werden, bei denen die höchste IMT-Ausbeute bei geringstem Verunreinigungsgrad gewährleistet werden. Wie jedoch aus den entsprechenden Abbildungen erkennbar, werden die positiven Effekte auf die IMT-Ausbeute durch den niedrigen pH=2 und der hohen Molratio (1:1) von der noch stärker steigenden Bildung von Polymerisationsprodukten begleitet. Dieser Zusammenhang ist auch aus den Paretdiagrammen ersichtlich, da die Signifikanz der Einflußfaktoren bei der Bildung der Verunreinigungen wesentlich höher als bei der IMT-Bildung ist.

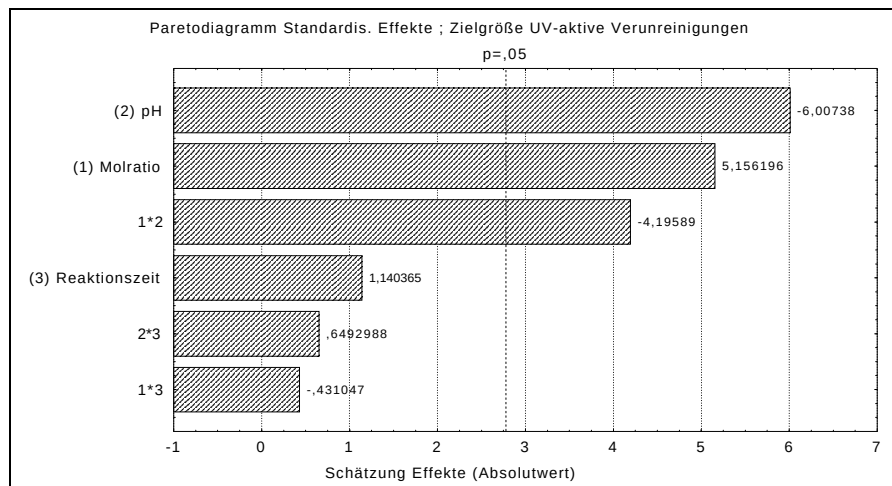


Abb. 60 Paretrodiagramm für die UV-aktiven Nebenprodukte

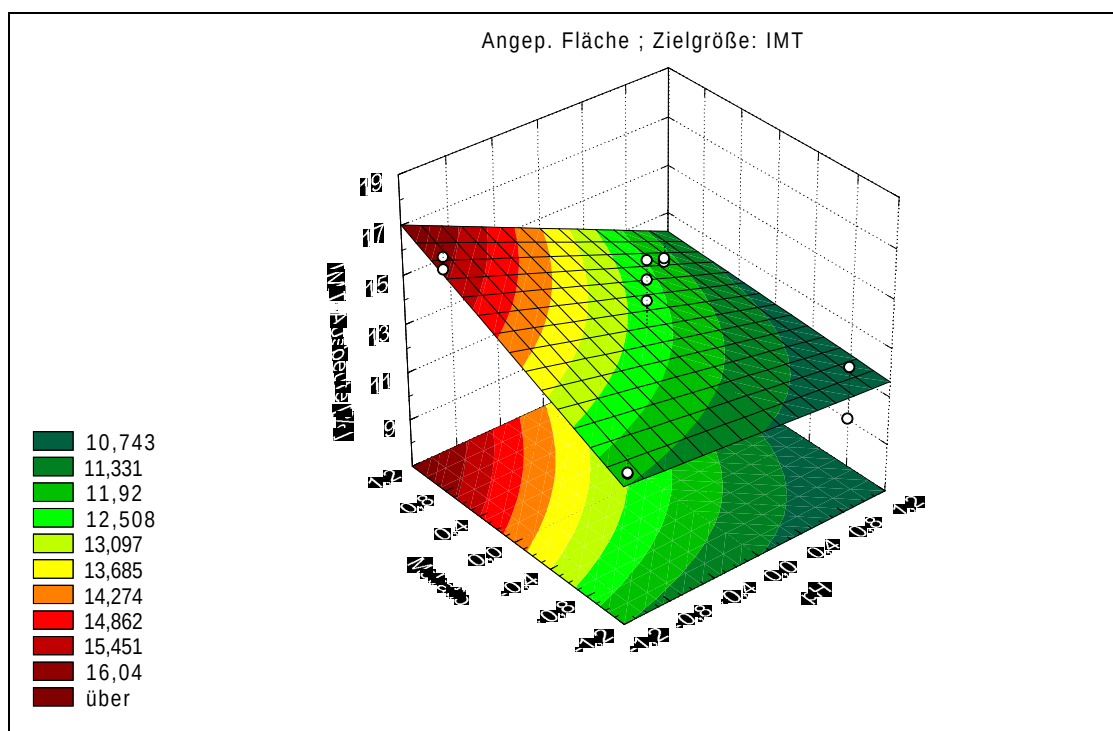


Abb. 61 IMT-Ausbeuten-Flächenplot des experimentellen Raumes

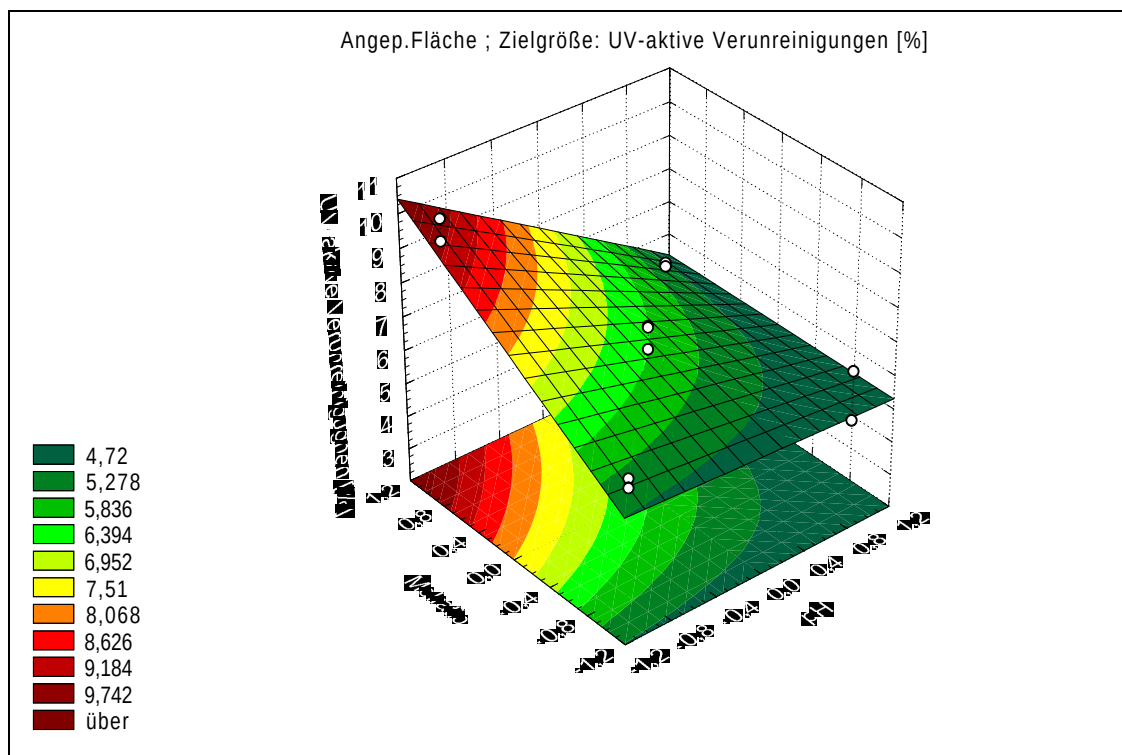


Abb. 62 Flächenplot der UV-aktiven Verunreinigungen im exp. Raum

4.2.3.4. Optimierung der Reaktionsbedingungen bezüglich der IMT-Bildung

Nach statistischer Auswertung ist die Bildung UV-aktiver Nebenprodukte signifikant abhängig vom Molratio und dem pH-Wert, welche ebenfalls die höchsten, nichtsignifikanten Effekte der max. IMT-Ausbeute darstellen. Hierbei wiegt der negative Effekt der vermehrten Polymerisationsbildung bei einem Molratio von 1:1 den positiven Effekt der IMT-Mehrbildung auf. Bei einem Molratio von 4:1 wird die geringste Bildung an Polymerisationsprodukten beobachtet. Die IMT-Ausbeute der Standard-Einstellung wird jedoch nicht erreicht, womit das Molratio von 2:1 für die optimalste Reaktionsbedingung steht. Der pH-Wert im untersuchten Bereich weist keinen signifikanten Einfluß auf die IMT-Bildung, jedoch einen stark signifikanten Einfluß auf die Bildung der Verunreinigungen auf. Der Einfluß der Reaktionsdauer ist nahezu ohne Einfluß auf die IMT-Bildung. Sowohl nach Auswertung der Meßergebnisse und Interpretation der Statistica-Auswertung weisen die Standard-Einstellungen des Versuchsplans, ausgenommen der Reaktionsdauer, die günstigsten Versuchsparameter aus. Die optimalen Reaktionsbedingungen, die nach Auswertung des IMT-Monitorings und nach Faktorenanalyse der IMT-Schnellsynthese ermittelt wurden, lauten:

- molares Verhältnis Trp : IM 2 : 1
- pH-Wert 3.0
- Reaktionsdauer 30 min

4.2.3.5. Entwicklung eines Clean up Verfahrens der IMT-Schnellsynthese

Das HPLC-Chromatogramm der Reaktionslösung, das unter den optimierten Bedingungen erhalten wurde, unterscheidet sich kaum zu dem auf **Abb. 54**. Das Edukt Trp ist der Hauptpeak, da es im Überschuß zugesetzt wurde, gefolgt von IMT. Nur ca. 13% der Fläche in diesem HPLC-Chromatogramm wird durch IMT repräsentiert. Die drei unbekannten Peaks stellen Oligomerisationsprodukte aus IM und Trp dar. Nicht in diesem Chromatogramm zu sehen sind die Polymerisationsprodukte, die als milchig-weißer Niederschlag ausfallen und durch Filtration abgetrennt werden können. Daher war es notwendig, ein Reinigungsverfahren zu entwickeln, das sämtliche Verunreinigungen (Peak 1-3 und Polymerisationsprodukte) sowie das Edukt Trp abtrennt und IMT in einer Reinheit von >96% ergibt. Nur diese hohe Reinheit läßt eine Verwendung als HPLC-Referenzsubstanz zu. Aufgrund unterschiedlicher physikalischer und chemischer Eigenschaften der Verunreinigungen und des IMT's könnte eine Abtrennung der störenden Verbindungen über flüssig-flüssig Extraktion, Sorption oder Filtration erreicht werden.

- **Filtration:** Es soll der Einfluß auf das Verunreinigungsmuster durch den Einsatz eines Membranfilters untersucht werden (HPLC-Kontrolle; siehe **Kap. 7.2.2.**).
- **Extraktion:** Es sollte eine flüssig-flüssig-Extraktion durchgeführt werden, um eine Anreicherung von IMT zu erzielen. Dabei sollte die erhöhte Lipophilie von IMT im Vergleich zu Trp zu einer groben Abtrennung von Trp ausgenutzt werden. Zu diesem Zweck wurden aliquote Teile eines IMT-Reaktionsansatzes mit Wasser unmischarbaren Lösungsmitteln extrahiert. Die Ermittlung der Extraktionseigenschaften der verschiedenen Extraktionsmittel (bezüglich Trp, IMT und Peak 1-3) erfolgt über HPLC-Kontrolle (siehe **Kap. 7.2.2.**).
- **Sorption:** Es wurden Untersuchungen an unterschiedlichen Sorptionsmitteln durchgeführt. So sollten die Eigenschaften von Aktivkohle und Celiten getestet werden. Der Einsatz von Kieselgel für eine säulenchromatographische Abtrennung der Verunreinigungen wurde überprüft, ferner sollten die Sorptionseigenschaften von XAD-2 Adsorberharzen (siehe **Kap. 7.1.3.**) analog Eulitz (1996) getestet werden (HPLC-Kontrolle; siehe **Kap. 7.2.2.**).

Peak 2 wurde durch Celitefiltration des Reaktionsansatzes und anschließender Membranfiltration (0,45 µm RC) abgetrennt. Der Einsatz von XAD-2 Kunsthharzen war nicht erfolgreich, da sowohl Trp und IMT als auch die Peaks 1-3 auf der XAD-2-Säule nicht retardiert wurden und sich ausschließlich im wässrigen Wascheulat wiederfanden. Es wurden folgende Extraktionsmittel für eine flüssig-flüssig Extraktion des Reaktionsansatzes getestet: Ethylacetat, Hexan, Diisopropylether, Chloroform, Dichlormethan, 1-Butanol, Toluol, Diethylether. Eine Lösungsmittelkombination aus 1-Butanol und Ethylacetat (1:1, v:v) erwies sich als geeignetes IMT-Extraktionsmittel. Trp als Hauptverunreinigung konnte zu ca. 70% abgetrennt werden. Die nach IMT eluierenden Substanzen wiesen im gewählten Extraktionsmittel nahezu gleiches Extraktionsverhalten wie IMT auf; sie konnten nicht vollständig abgetrennt werden (siehe **Abb. 63**). Die nahezu quantitative Abtrennung von Trp und der Verunreinigung Peak 3 wurde über Säulenchromatographie an Kieselgel erreicht. Peak 1 konnte allerdings nicht in ausreichendem Maße von der Zielsubstanz abgetrennt werden. Der verwendete Eluent setzt sich aus Ethylacetat, Methanol, Essigsäure und

Wasser zusammen. Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich der Wassergehalt des Eluenten als ausschlaggebender Parameter zur Einstellung der Elutionskraft des Eluenten dar. Als auf den Wasserzusatz verzichtet wurde, konnte die Zielsubstanz nicht mit ausreichender Trennschärfe eluiert werden; bei zu hohem Wasseranteil befand sich die Zielsubstanz zum Teil im Vorlauf und wurde nicht von den Störsubstanzen abgetrennt. Das optimale Elutionsgemisch setzte sich aus Ethylacetat/1 M Essigsäure-Lösung (4:1, v:v) zusammen. Zum Ansetzen der 1 M Essigsäure-Lösung wurde eine 2 M wässrige Essigsäure-Lösung mit Methanol 1:1 verdünnt.

Aktivkohle erwies sich als starkes Adsorptionsmittel, sowohl Trp, IMT als auch die Verunreinigungen wurden adsorbiert. Die eingesetzte Menge stellte einen entscheidenden Faktor auf die IMT-Ausbeute der Synthese dar. Durch vermehrte Aktivkohlezugabe wurden die Verunreinigungen vollständig entfernt, jedoch auch ein Großteil des IMT. Der Einsatz von Aktivkohle mußte aus diesem Grunde in ausgewogenem Maße zum Verunreinigungsgrad und zur gebildeten IMT-Menge stehen und sollte eine 1-2%-ige Zugabe bezogen auf IMT nicht überschreiten. Nur mittels Aktivkohlezugabe war es möglich, Peak 1 größtenteils zu entfernen (siehe **Abb. 64**). Dies führte jedoch auch zu unvermeidbaren IMT-Verlusten.

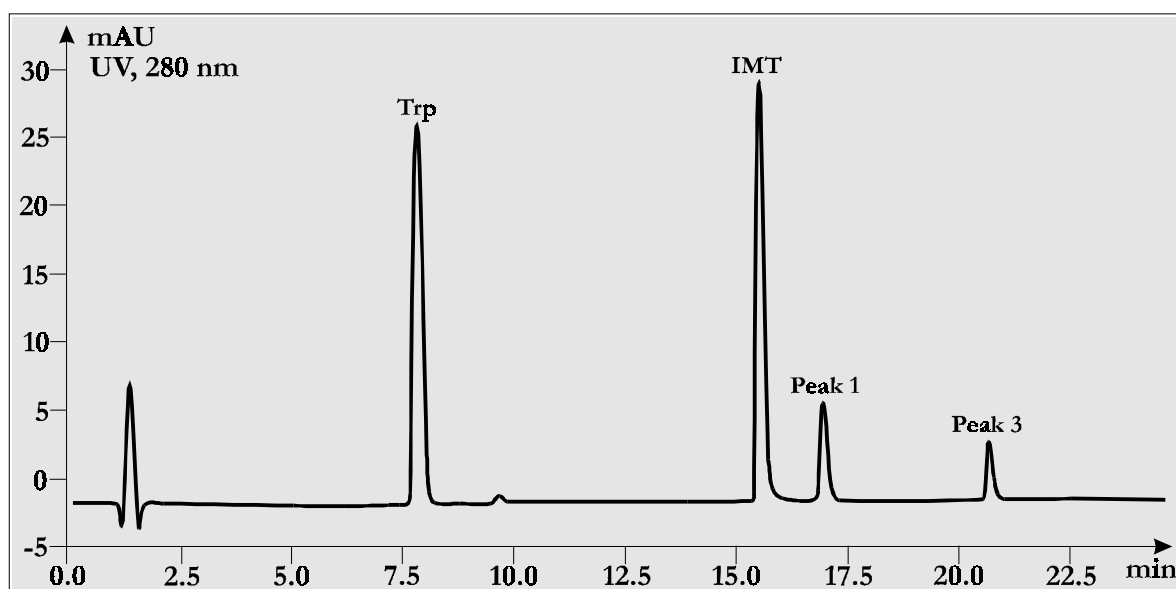


Abb. 63 IMT-Schnellsynthese: Reaktionsansatz nach flüssig-flüssig Extraktion

Das optimierte Clean-up-Verfahren der IMT-Schnellsynthese wurde wie folgt durchgeführt:

- Der Reaktionsansatz wurde über Celite filtriert und anschließend membranfiltriert.
- Das Filtrat wurde mit 1-Butanol/Ethylacetat (1:1) extrahiert. Das Extraktionsmittel wurde vollständig entfernt und der Rückstand zur Säulenchromatographie eingesetzt.
- Säulenchromatographie
- Die organischen Lösungsmittel des IMT-haltigen Eluates wurden entfernt.
- Nach Wasserzugabe erfolgte die Aktivkohle-Reinigung. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert und das Filtrat lyophilisiert.
- Der weiße, kristalline Feststoff wies eine Reinheit von $\geq 96\%$ /RP-HPLC_{UV 280 nm}) auf.

Das entwickelte Clean-up-Verfahren lieferte IMT in hinreichend hoher Reinheit, die den Einsatz als HPLC-Referenzsubstanz zuläßt (Durchführung und Analytik: siehe **Kap. 7.4.3.3.**).

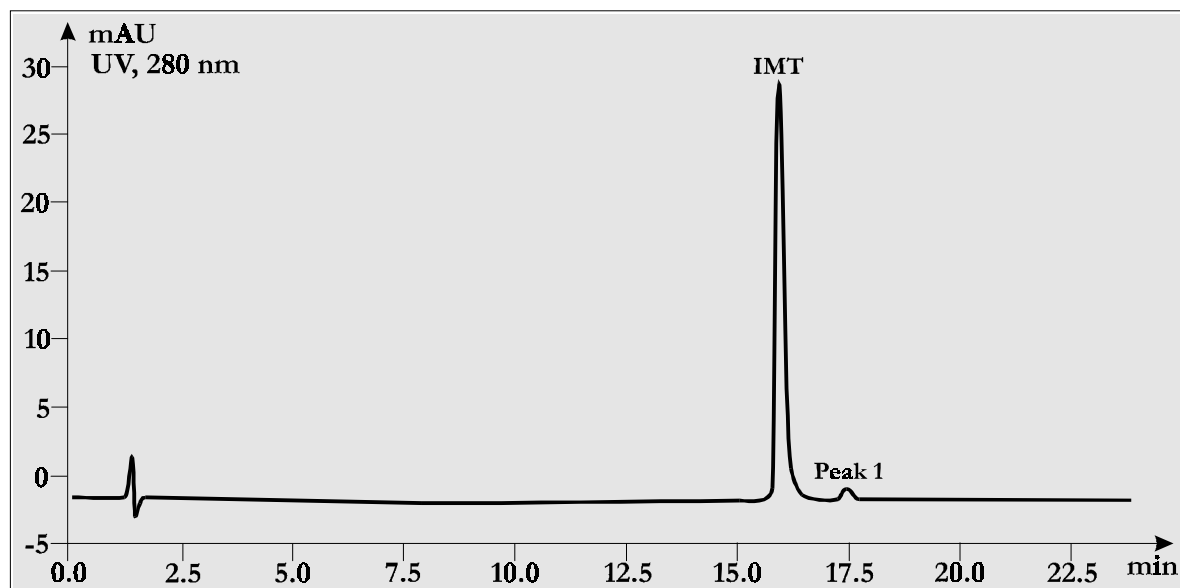


Abb. 64 IMT-Lyophilisat nach Säulenchromatographie und Aktivkohlebehandlung

4.3. 2-[2'',3''-Dihydroxy-1''-(3'-indolyl)-propyl]-tryptophan (dhPIT)

4.3.1. De novo Synthese von dhPIT

Die Entwicklung einer Strategie zur dhPIT-Vollsynthese erfolgte mittels retrosynthetischer Analyse der Zielverbindung (siehe **Abb. 65**). Dabei wird das Molekül Schritt für Schritt an geeigneten Bindungen in einfache Fragmente zerlegt. Ziel dieses Vorgehens ist der Aufbau des Zielmoleküls aus kommerziell erhältlichen Substanzen. Weiterhin verfügt man über eine Kontrollfunktion, für den gerichteten Aufbau komplizierter Verbindungen. Bei der retrosynthetischen Herangehensweise müssen genaue Studien über die Durchführbarkeit der einzelnen Schritte erfolgen sowie Nebenreaktionen und Rangfolgen einzelner Teilschritte berücksichtigt werden. Auf diesem Wege wurde ein Synthesekonzept erstellt, das eine Vollsynthese von dhPIT potentiell möglich machte. Allerdings war von Beginn an klar, daß bei erfolgreicher Synthese ein Diastereomeren-Gemisch von vier Verbindungen erhalten werden würde. Darin liegt der entscheidende Nachteil einer chemischen de novo Synthese für eine Verbindung, die als HPLC-Referenzsubstanz verwendet werden sollte. Eine optisch-reine Synthese wäre vom Aufwand her nicht vertretbar gewesen.

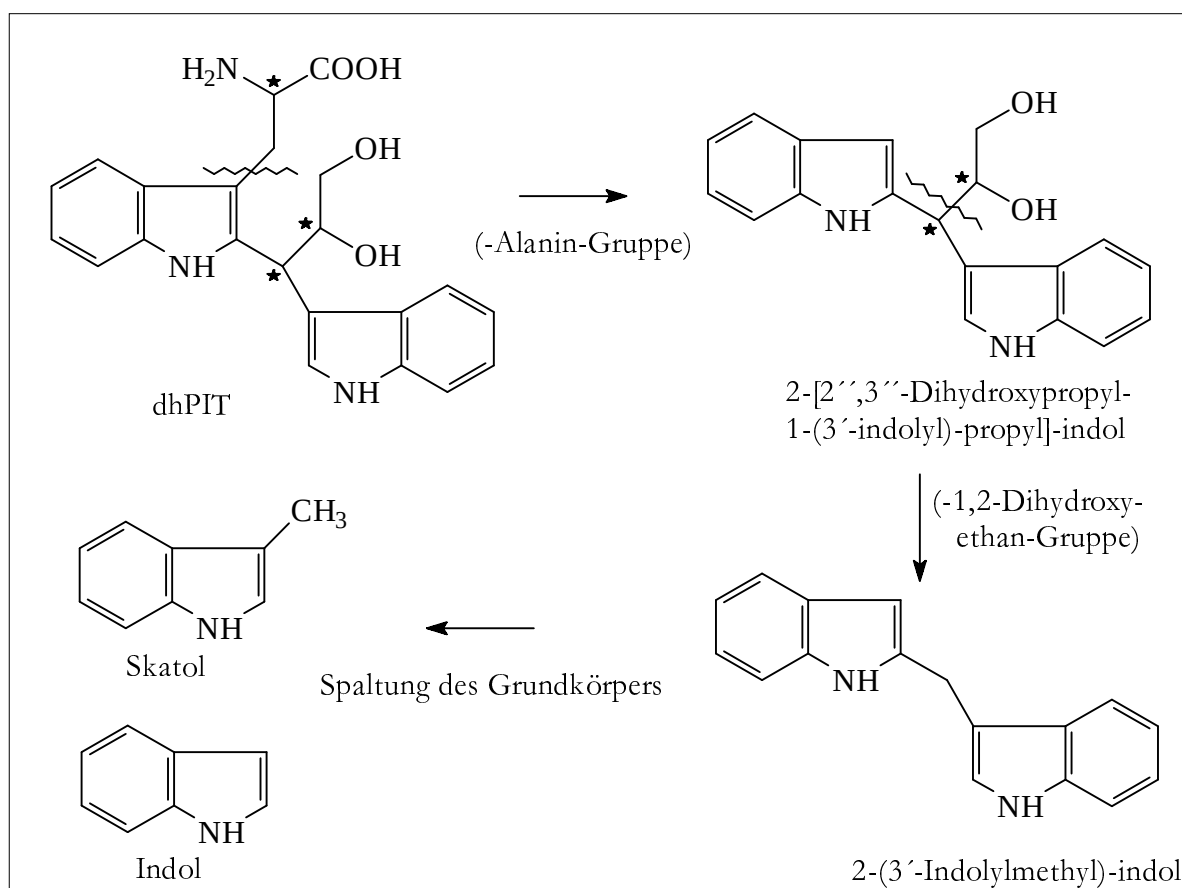


Abb. 65 Retrosynthese von dhPIT

Das Syntheschema ist in **Abb. 66** dargestellt. Ausgangspunkt der Synthese sind Indol und 3-Methylindol (Skatol). Die Stickstoffatome des Indols (acide) beider Edukte mußten durch Benzolsulfonylchlorid unter Einführung der Benzolsulfongruppe geschützt werden (1) (COOK et al.,

1992). Die Einführung einer Schutzgruppe an der Position N-1 war aufgrund der aciden Eigenschaften der NH-Gruppe notwendig, da bei der Knüpfung des dhPIT-Grundkörpers aus Indol und Skatol die eingesetzte starke Base *n*-Butyllithium ebenfalls die NH-Gruppe deprotonieren würde und ein selektiver Umsatz der Edukte nicht stattfände. In der zweiten Stufe wird Skatol selektiv an der Methylgruppe (Allyl-Stellung) radikalisch mittels N-Bromsuccinimid bromiert (2) (Cook et al., 1995). Die C-C-Knüpfung erfolgt über elektrophile Substitution, indem zuerst Indol (geschützt) mit *n*-Butyllithium umgesetzt und an C-2 lithiert wird. Nach Zusatz des bromierten Elektrophils (Skatol) bildet sich unter Abspaltung von Lithiumbromid die neue C-C-Bindung aus (3) (SUNDBERG und RUSSEL, 1973). Nach selektiver radikalischer Bromierung der doppelt allylischen Methylengruppe (4) sollte über elektrophile Substitution (GRINGARD-Reaktion) Oxalsäurediethylester in das Molekül eingeführt werden (5), welches die 1,2-Dihydroxyethan-Gruppe determiniert. Die resultierende Zwischenstufe weist ein Chiralitätszentrum auf; es liegen zwei Enantiomere vor. Über die anschließende Reduktion (6) der Carbonylgruppen des Oxalsäurediethyl-esters mit Natriumborhydrid entsteht die 2,3-Dihydroxyethyl-Gruppe, welche ein weiteres chirales C-Atom aufweist. Dadurch werden vier Enantiomere (ein Paar Diastereomere) erhalten. Nach Einführung der entsprechenden Hydroxyl-Schutzgruppe über Benzylchlorid (7) sollte die Abspaltung der Schutzgruppen am Indolring (8) erfolgen; sie sind in den folgenden Synthesestufen bedeutungslos, da die gewählten Reaktionsbedingungen kein Reaktionspotential bezüglich der NH-Gruppe mehr aufweisen. Die Schützungen der Hydroxyl-Gruppen wäre erforderlich, da im Verlauf der Synthese starke pH-Schwankungen auftreten, die Eliminierungen und Umlagerungen zur Folge haben. Die Aminosäureseitenkette sollte über die mehrstufige Graminmethode eingeführt werden (9) (SNYDER und SMITH, 1944). Durch die Einführung der Aminosäurefunktion entsteht ein weiteres, drittes Chiralitätszentrum. Nach abschließender Abspaltung der Benzylgruppen (10) wird die Zielsubstanz dhPIT erhalten. Der entscheidende Nachteil der *de novo*-Synthese besteht neben den hohen synthetischen Anforderungen in der Ausbildung von drei Chiralitätszentren. Es entstehen acht Enantiomere, von denen vier Diastereoisomere darstellen. Somit wäre nach der dhPIT-Vollsynthese eine abschließende, komplizierte Diastereoisomeren-Trennung notwendig.

Die dhPIT-Vollsynthese wurde bis zur zweiten Stufe reproduzierbar durchgeführt. Die Schützungen von Indol und Skatol zu den entsprechenden Benzolsulfon-Derivaten verlief problemlos. Auch die Bromierung von Skatol zu Bromskatol bereitete keine Schwierigkeiten. Die C-C-Knüpfung von Indol und Bromskatol über elektrophile Substitution mißlang, da eine Vielzahl von Produkten entstand. Das Synthesekonzept konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Aufgrund der entscheidenden Nachteile dieses Syntheseweges wurden hinsichtlich der vollsynthetischen dhPIT-Darstellung keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

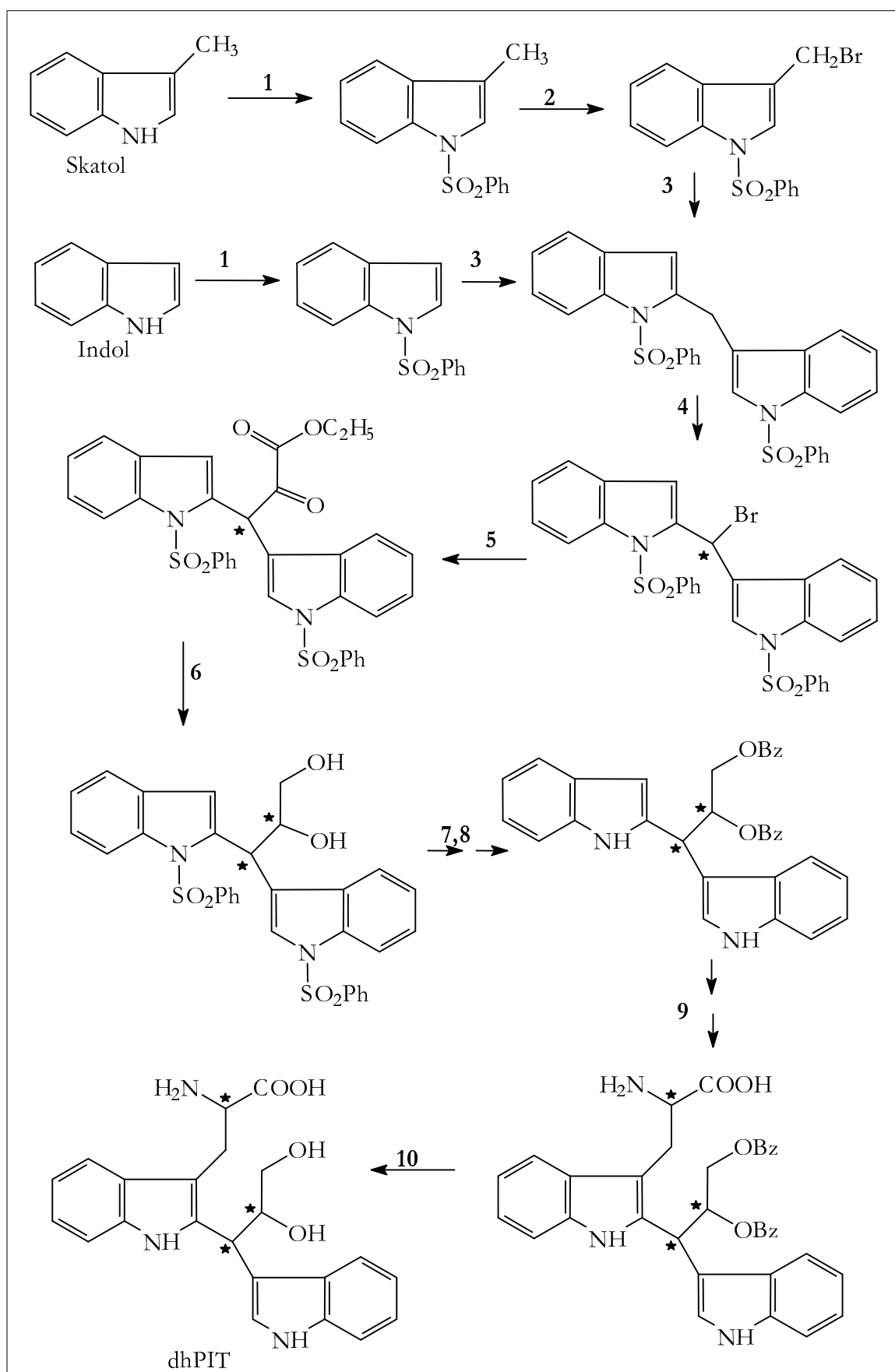


Abb. 66 dhPIT-Vollsynthesekonzept

4.3.2. dhPIT-Synthese über 3-Indolylglycerin

Das zweite Synthesekonzept basiert auf der Hypothese, daß dhPIT aus Trp und 3-Indolylglycerin (IG) gebildet wird. IG ist ein Anabolit der biotechnologischen Trp-Herstellung und ist unter sauren Bedingungen analog zum IM (siehe **Kap. 4.2.2.**) in der Lage, Wasser abzuspalten. Wie aus **Abb. 67** ersichtlich, stellt dieses Synthesekonzept eine elektrophile Substitutionsreaktion dar. Die Hydroxylgruppe in α -Position zum Pyrrolring kann im sauren Milieu Wasser unter Ausbildung eines resonanzstabilisierten Carbenium-Ions abspalten. Zwar können auch die Hydroxylgruppen an β - und γ -Position Wasser eliminieren, jedoch besitzt nur das α -Carbeniumion aufgrund von stabilisierenden Mesomerieeffekten des aromatischen Systems eine längere Lebensdauer. Erst dadurch kann es von Trp unter dhPIT-Bildung abgefangen werden. Die entsprechenden β - und γ -Carbeniumionen besitzen nicht die Möglichkeit der Mesomerie und stabilisieren sich über Eliminierung und Umlagerung. Da das Reaktionsedukt IG nicht über den Handel bezogen werden konnte, mußte eine IG-Synthese entwickelt werden. Die Stereochemie spielt eine entscheidende Rolle bei der Wahl der IG-Synthese. Wie in **Abb. 67** erkennbar, weist dhPIT drei mögliche Chiralitätszentren (*) auf, von denen zwei aus IG resultieren. Im Idealfall sollten durch geeignete Wahl der Reaktionsparameter beide Chiralitätszentren festgelegt werden. Die Bildung des dhPIT sollte in Anlehnung an den Reinigungsprozeß von SD nachgestellt werden, indem bei einem pH von 1.7-2.0 der Umsatz mit Trp erfolgen sollte (pH der SD-Kationenaustauscher-Reinigung).

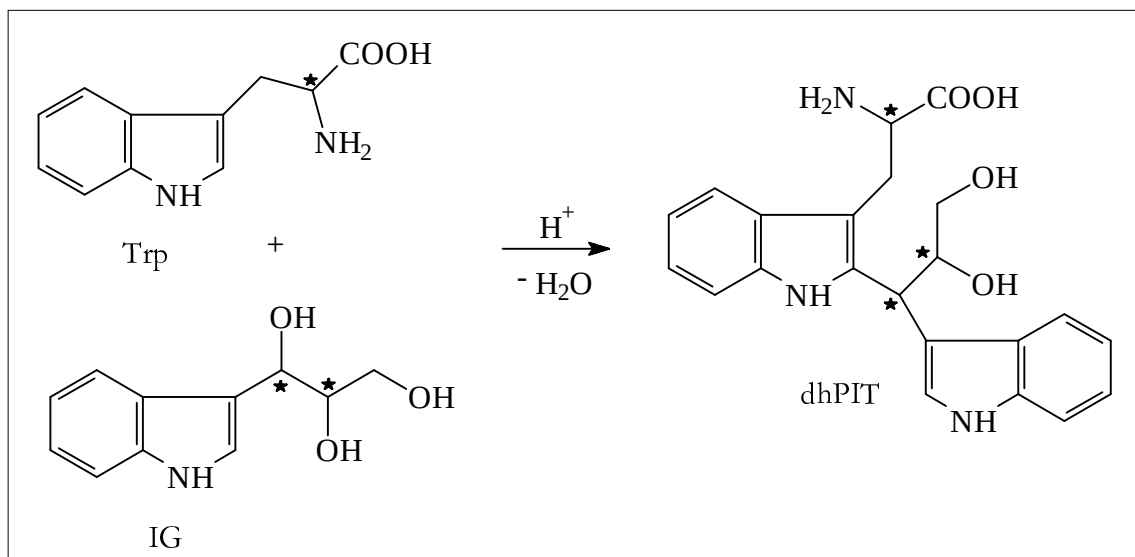


Abb. 67 dhPIT-Bildung aus Trp und IG

IG läßt sich durch Umsetzung von 3-Indolglyoxylsäurechlorid mit Diazomethan zum 3-Indolglyoxalyldiazomethan synthetisieren. Dessen Spaltung mit starker Mineralsäure zum 3-Indolglyoxalylmethanol und anschließender Reduktion des Ketols mit Natriumborhydrid liefert die Zielsubstanz. Das 3-Indolglyoxylsäurechlorid wird durch Umsetzung von Indol mit Oxalylchlorid dargestellt (LINGENS und LANGE, 1970). Der in **Abb. 68** beschriebene Syntheseweg lie-

fert 3-Indolylglycerin in 35%-iger Ausbeute bezogen auf Indol bei einer Synthesedauer von etwa drei Tagen. Es liegen im IG nach LINGENS zwei chirale Kohlenstoffatome vor. Daraus resultieren zwei Enantiomerenpaare bzw. Diastereoisomere. Diese IG-Synthese nach LINGENS wurde aufgrund der Bildung von Diastereoisomeren nicht durchgeführt.

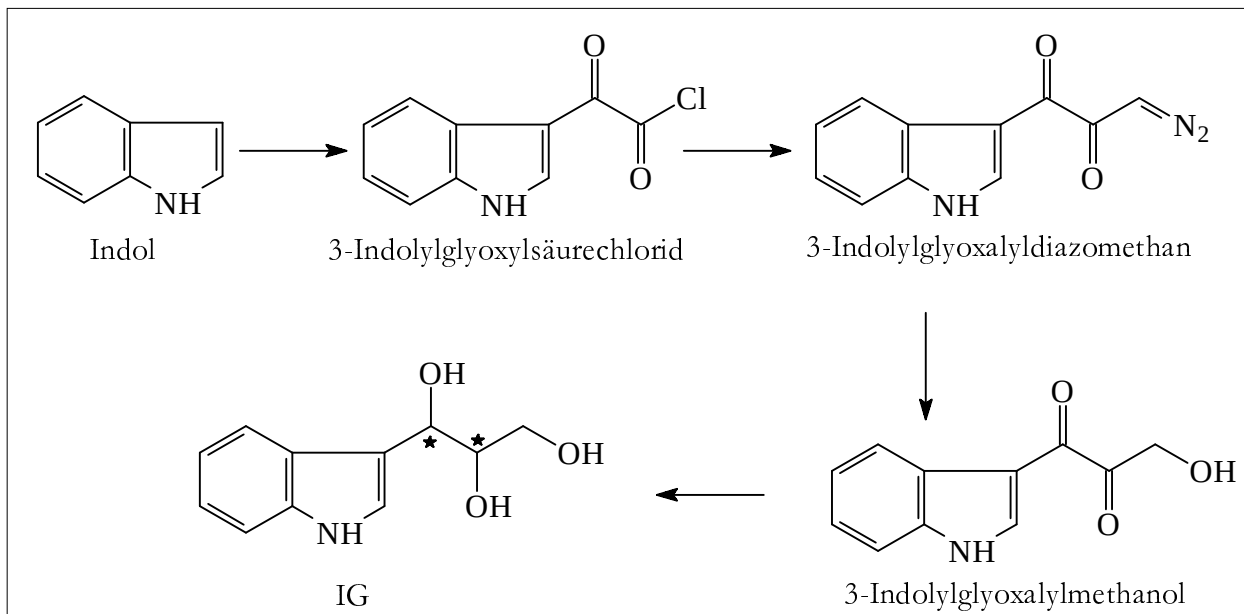


Abb. 68 3-Indolylglycerin-Synthese nach LINGENS und LANGE (1970)

Es konnte eine Alternativmethode gefunden werden, die in mehreren Bereichen analog der Synthese nach LINGENS aufgebaut war. Der wesentliche Unterschied besteht darin, daß durch den Einsatz einer optisch aktiven Verbindung mit festgelegter Stereochemie, R-(-)-2,2-Dimethyl-4-hydroxymethyl-1,3-dioxolan, und dessen Umwandlung in das entsprechende Säurechlorid, ein geeignetes Reagenz zur IG-Synthese hergestellt werden konnte (siehe Abb. 69).

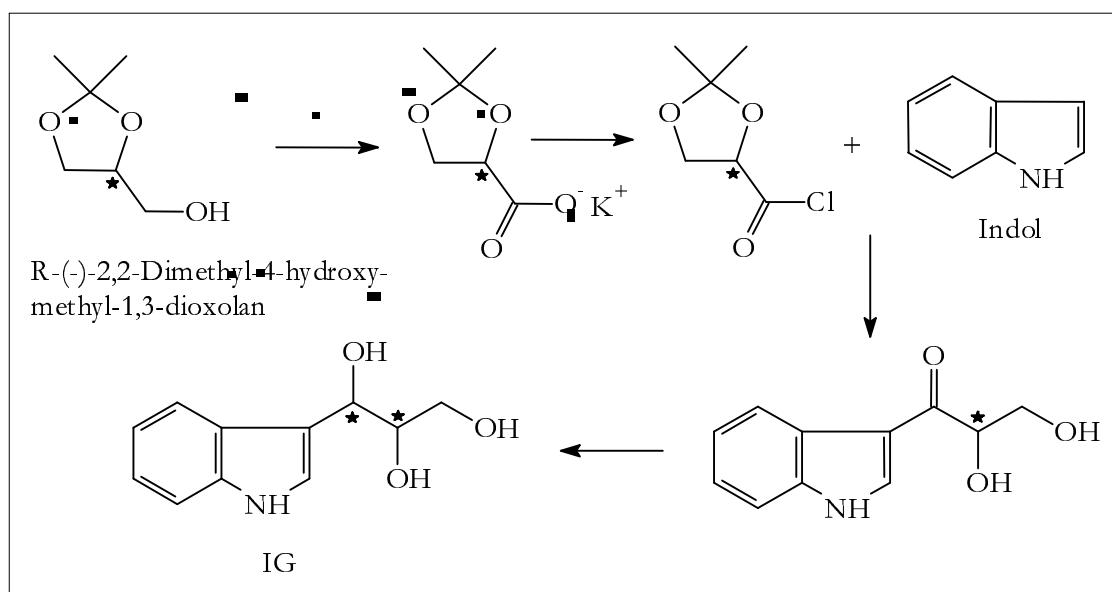


Abb. 69 3-Indolylglycerin aus R-(-)-2,2-Dimethyl-4-hydroxymethyl-1,3-dioxolan

Das Edukt wurde mittels alkalischer Kaliumpermanganatlösung schonend in das Kaliumsalz der Carbonsäure (R-(-)-2,2-Dimethyl-4-Kaliumformiat-1,3-dioxolan) oxidiert (TANKAKA und YAMASHITA, 1980). Die Überführung in das entsprechende Säurechlorid gelang mit Oxalylchlorid in hoher Ausbeute (EARLE et al., 1996). Die Darstellung von IG kann durch Umsetzung mit Indol über eine GRINGARD-Reaktion erfolgen (PREOBRAZHenskAYA et al., 1965). Nach abschließender Reduktion mit Natriumborhydrid wird die Zielsubstanz kristallin isoliert (LINGENS und LANGE, 1970). Die Oxidation des Reaktionseduktes in das Kaliumsalz der Carbonsäure und die darauf folgende Überführung in das Säurechlorid verliefen problemlos und in guter Ausbeute. Beim Umsatz des Säurechlorides mit Indol nach GRINGARD konnte über dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung die Entstehung mehrerer schwacher Produktspecks neben einem Hauptprodukt beobachtet werden, was auf teilweise unkontrollierte Umsetzung des Säurechlorides schließen läßt. Nach Aufarbeitung des Reaktionsansatzes wurde nach Reduktion eine kristalline Substanz isoliert, die innerhalb weniger Minuten zu einer schmutzig-schwarzen, sirup-ähnlichen Flüssigkeit zerfiel. Aufgrund der extremen Reaktivität und Labilität der isolierten Substanz war es nicht möglich, den analytischen Identifikationsnachweis als IG über $^1\text{H-NMR}$ zu erbringen. Diese erfolgsversprechende Synthese eines stereochemisch größtenteils festgelegten IG's wurde nicht erreicht und ist nur unter Schutzgasatmosphäre realisierbar.

4.3.3. dhPIT-Bildung aus in situ hergestelltem IG

Aufgrund des Scheiterns einer chemischen de novo-Synthese von dhPIT und einer chemischen Synthese von IG sollte der Nachweis der dhPIT-Bildung über in situ gebildetes IG und nachfolgenden Umsatz mit Trp im sauren pH-Wert erbracht werden. Dies wurde durch die Reaktion von Indol, D-(R)-Glycerinaldehyd und Trp erreicht. Im sauren Milieu wird die Carbonylfunktion des Aldehydes protoniert. Über eine BLANC-Reaktion wird Indol an Position C-3 elektrophil substituiert. Das gebildete intermediäre IG eliminiert Wasser unter Bildung des resonanzstabilisierten Carbenium-Ions und wird von Trp durch eine elektrophile Substitution an Position C-2 abgefangen. Es resultiert dhPIT (siehe **Abb. 70**). Die Bestätigung des hypothetischen Bildungsmechanismus wurde über RP-HPLC-UV-Analyse (siehe **Kap. 7.2.2.**) durch Dotierung mit einer EMS assoziierten SD-Trp-Charge, die dhPIT als eine Hauptkontaminante enthält, erbracht (Durchführung: siehe **Kap. 7.6.1.**). Indol wurde in Methanol gelöst und mit D-(R)-Glycerinaldehyd versetzt. Nach Zusatz von Trp wurde dest. Wasser zugesetzt und der pH-Wert mit einer 0.5 M H_2SO_4 -Lösung auf 2.0 eingestellt. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT in einem Braunglaskolben unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Trp wurde in zehnfachem molaren Überschuß zugesetzt, um das in situ gebildete IG sofort nach dessen Bildung abzufangen. Das nach RP-HPLC-Analyse bei UV-Detektion (280 nm) (siehe **Kap. 7.2.2.**) erhaltene Chromatogramm des Reaktionsansatzes weist neben den Edukten Indol und Trp die Bildung mehrerer, unbekannter Peaks auf. Die gewählten Reaktionsparameter und die Anwesenheit eines Aldehydes neben Trp unter sauren Bedingungen stellen ideale Voraussetzungen für die Bildung eines Carbolins dar. EULITZ (1996) be-

schreibt die Bildung von 1-(1,2-Dihydroxyethyl)-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure (DHETHCC) aus Trp und D-(R)-Glycerinaldehyd. Der Beweis, daß es sich um DHETHCC handelt, wurde mit dem von EULITZ (1996) synthetisierten DHETHCC erbracht. Weitere Peaks wurden nicht identifiziert.

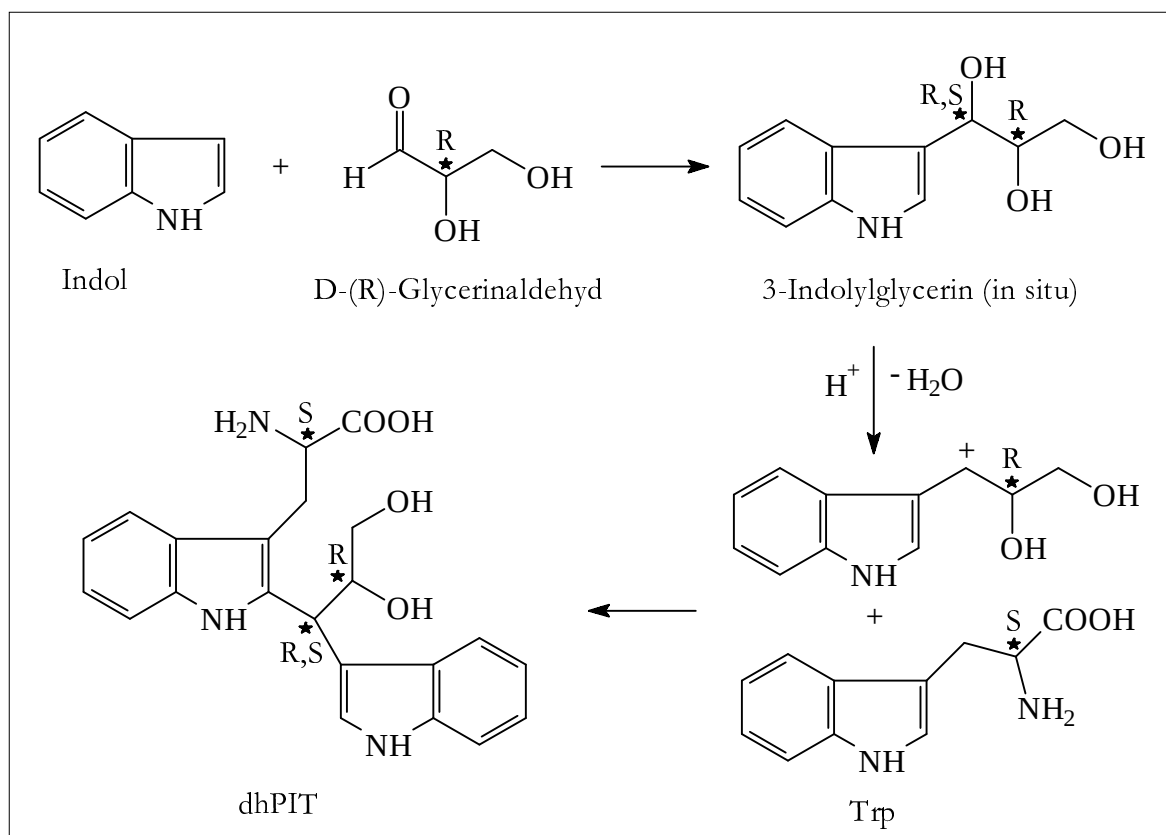


Abb. 70 dhPIT-Bildung aus IG (in situ) und Trp

Der Versuch wurde unter stark sauren Bedingungen bei pH=0.5 wiederholt. Es sollte durch vollständige Protonierung der Amino-Funktion des Trp's die Bildung der für die Darstellung des Carbolinkörpers notwendigen Schiff'schen Base unterdrückt werden. Die vollständige Unterdrückung der DHETHCC-Bildung wurde nicht erreicht. Allerdings bildete sich unter diesen Bedingungen dhPIT als Doppelpeak bei 14 min (siehe **Abb. 71**). Die dem dhPIT-Bildungsmechanismus zu Grunde liegende elektrophile Substitution des Carbenium-Ions an Trp liefert zwei mögliche Produkte (S, R, R- und S, R, S-Diastereoisomere), deren Bildung im Chromatogramm (**Abb. 71**) anhand der entstandenen dhPIT-Doppelpeaks bewiesen wurde. Die Diastereoisomere lagen jedoch nicht äquimolar vor; das Verhältnis des Gemisches betrug ca. 3:1. Die Bildung eines Diastereoisomers war begünstigt, was über einen sterisch behinderten Angriff des IG (Carbenium-Ion) an Trp erklärt werden kann. Im SD-Trp ist jedoch nur ein dhPIT-Peak detektierbar. Es ist möglich, daß ein Isomer eine besonders gute Wasserlöslichkeit besitzt und daher nicht bei der Kristallisation von Trp ausfiel. Die theoretische Betrachtung ergibt zwei Diastereomere, die mit diesem Versuch nachgewiesen werden konnten. Der qualitative Nachweis der dhPIT-Bildung wurde über Dotierung mittels einer dhPIT-haltigen SD-Trp-Charge erbracht. Durch den Vergleich der Chromatogramme wurde dhPIT über die identische Retentionszeit sowie über zwei

unterschiedliche Detektionsverfahren (UV- und Fluoreszenz-Detektion) nachgewiesen. Die Berechnung der angegebenen Faktoren erfolgte über den Peakflächenvergleich der entsprechenden Chromatogramme (Durchführung siehe **Kap. 7.6.1.**).

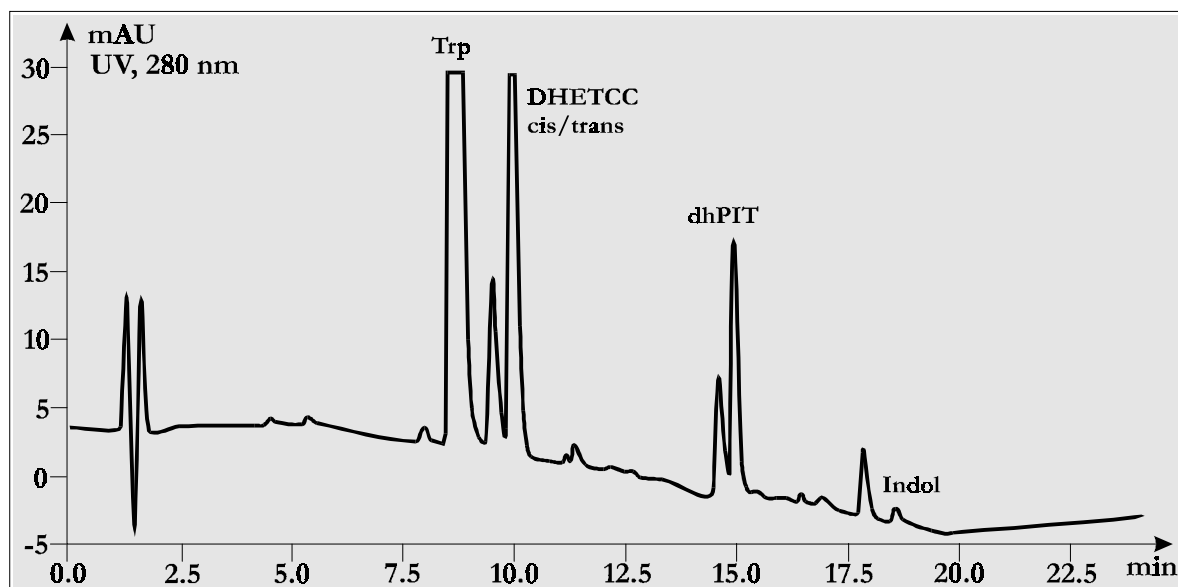


Abb. 71 dhPIT-Reaktionsansatz, pH=0.5

4.4. 1-(3'-Indolylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure (IMTHCC)

Die Bildung der 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäuren kann anhand des PICTET-SPENGLER-Mechanismus erläutert werden (BROSSI et al., 1973; PICTET und SPENGLER, 1911). Trp kondensiert mit einem Aldehyden unter Wasserabspaltung zu einer Schiffschen Base. JACKSON und SMITH (1968) postulierten eine elektrophile Substitution der Schiffschen Base an Position C-3 des Trp. Über eine 3-2-WAGNER-MEERWEIN Umlagerung bildet das intermediäre Zwischenprodukt den Carbolingrundkörper wie in **Abb. 72** dargestellt.

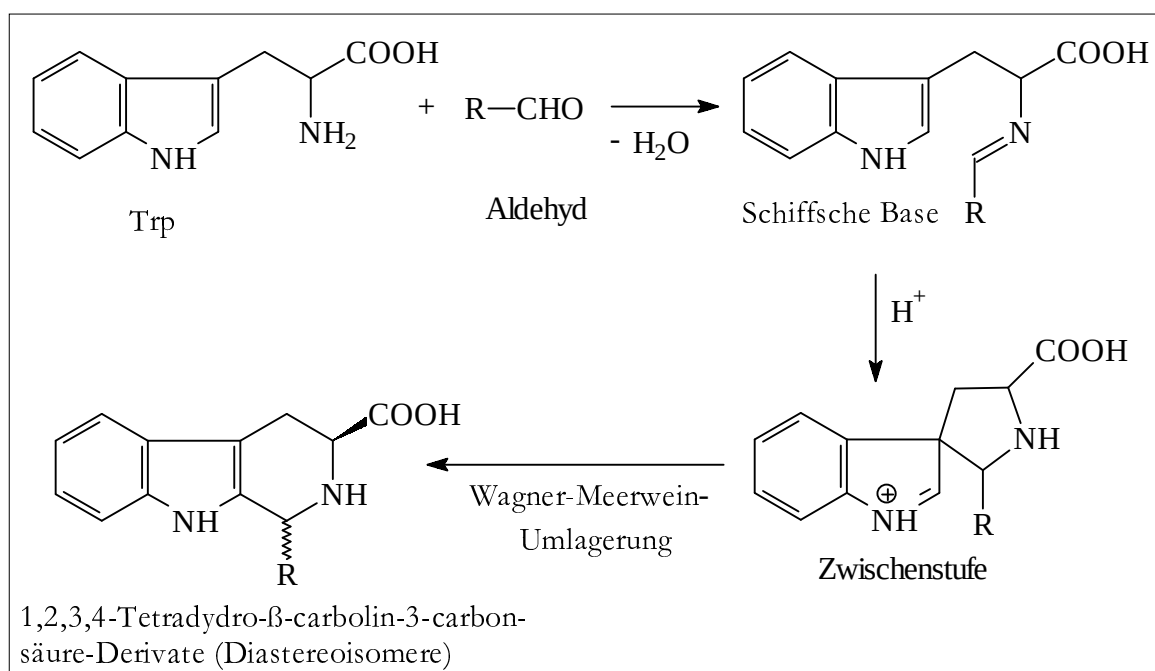


Abb. 72 Bildungsmechanismus der 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäuren nach PICTET-SPENGLER

Bei der Bildung der 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäuren entsteht ein neues, zweites Chiralitätszentrum. Das erste Chiralitätszentrum der Aminosäureseitenkette ist durch den Einsatz von Trp festgelegt. Bei cyclischen Verbindungen, wie die 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäuren, unterscheidet man die Diastereoisomere in cis- und trans. Im Gegensatz zu Enantiomeren sind Diastereomere Moleküle mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften und werden im HPLC-Chromatogramm mit unterschiedliche Retentionszeiten detektiert.

4.4.1. Tetrahydro- β -carbolincarbonsäure-Derivate aus unterschiedlichen Aldehyden

Man unterscheidet die 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäuren anhand des an der PICTET-SPENGLER-Kondensation beteiligten Aldehyden. Als Reaktionspartner sind zweifellos alle bekannten Aldehyde denkbar. Es sollen jedoch nur die jeweiligen Carboline des Formaldehydes, Acetaldehydes, IAc und D-(R)-Glycerinaldehydes betrachtet werden, da sie in direkter Beziehung zu den Hauptkontaminanten des SD-Trp's stehen (SIMAT et al., 1996). Die entsprechenden

1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäuren und die neu entstandenen Chiralitätszentren (*) sind in **Abb. 73** dargestellt. Die 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure aus Formaldehyd und Trp (THCC) bildet bei der Kondensation kein weiteres Stereozentrum aus, so daß keine Diastereomere entstehen.

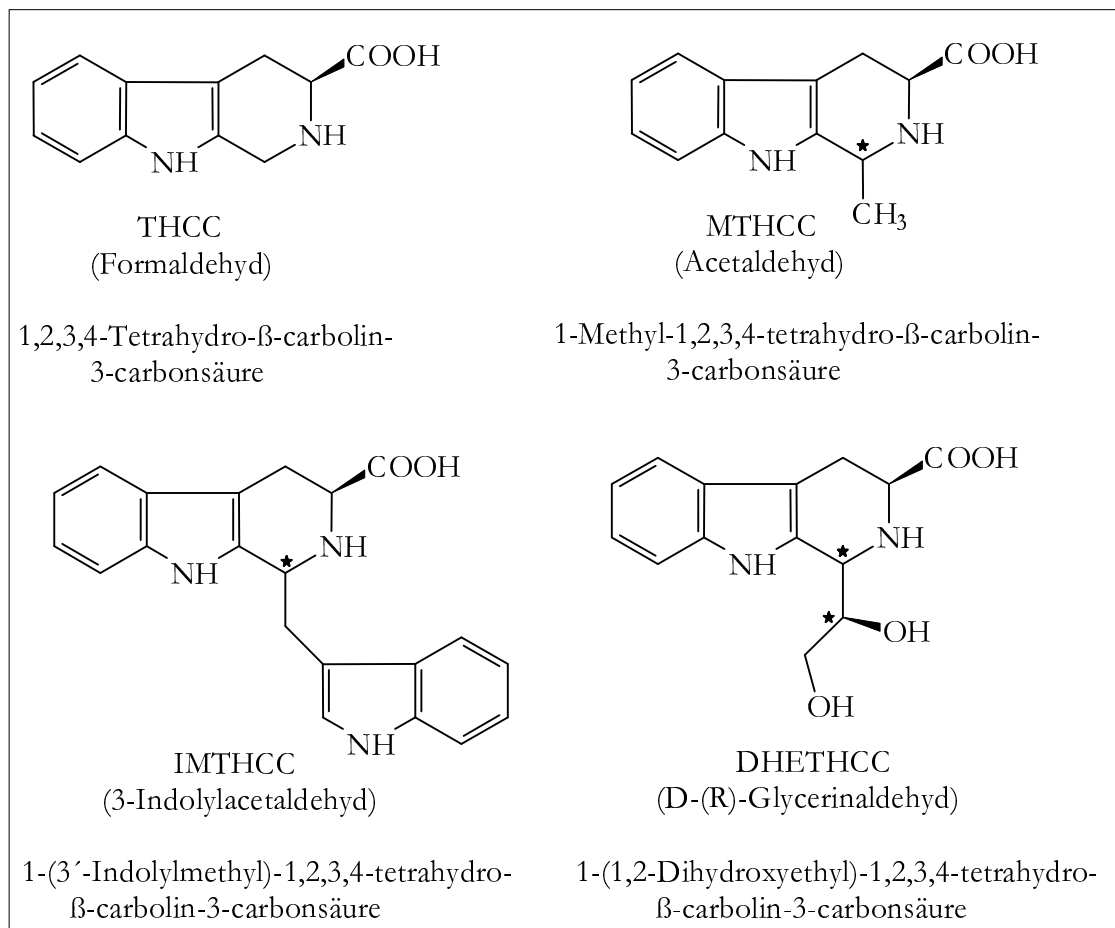


Abb. 73 Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure-Derivate aus unterschiedlichen Aldehyden

Durch Decarboxylierung entstehen die 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carboline, die man auch als Reaktionsprodukte aus Tryptamin und Aldehyden erhält. Durch nachfolgende Dehydrierung erhält man die aromatischen β -Carboline, die als potente Monoaminoxidase-A-Inhibitoren (ROMMELSBACHER et al., 1994) und Mutagene (GROSS und GRÜTER, 1992) wirken sowie Halluzinationen, Tumore und Krämpfe hervorrufen können (BUCKHOLTZ, 1980; CAIN et al., 1982).

4.4.2. Synthese von IAc

IMTHCC ist eine Hauptkontaminante im SD-Trp. Es bildet sich aus dem Metaboliten IAc und Trp im sauren Milieu. Da IAc aufgrund zu hoher Kosten nicht über den Handel erworben werden konnte, mußte eine IAc-Synthese entwickelt werden. Grundsätzlich sind zwei unterschiedliche Synthesestrategien zur Darstellung von Aldehyden möglich:

- Oxidation eines Alkohols
- Reduktion einer funktionellen Gruppe höherer Oxidationszahl (Carbonsäure, Carbonsäureester, Carbonsäureamid, Carbonsäurenitril)

Beide Strategien weisen jedoch die Schwierigkeit auf, da sowohl die Oxidation als auch die Reduktion mit entsprechenden Oxidations- bzw. Reduktionsmitteln nicht zwangsläufig auf der Stufe der Aldehydfunktion endet. Nur der Einsatz spezifischer Oxidations- bzw. Reduktionsreagenzien erlaubt erfolgsversprechende Aldehyd-Synthesen.

4.4.2.1. IAc-Darstellung nach SWERN

Es wurde versucht, IAc über die SWERN-Oxidation aus 3-Indolyethanol (Tryptophol) zu synthetisieren, da sie eine schonende selektive Oxidation eines primären Alkohols zur Aldehydfunktion darstellt (siehe **Abb. 74**).

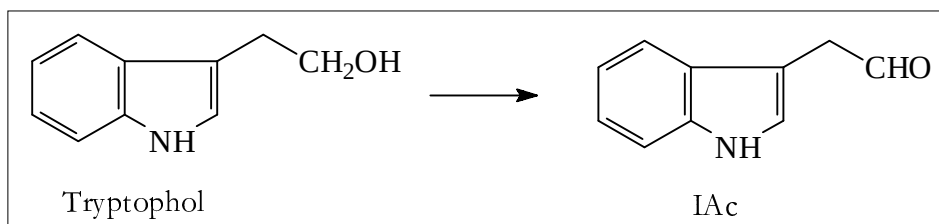


Abb. 74 IAc-Synthese nach SWERN

Oxalylchlorid reagiert bei RT unkontrollierbar exotherm mit Dimethylsulfoxid, so daß es notwendig ist, bei niedriger Temperatur gewöhnlich -60°C das für die Swern-Oxidation benötigte aktivierte Oxidationsreagenz zu bilden. Dies entsteht durch Addition des Oxalylchlorids an DMSO unter spontanem Verlust von je einem Molekül Kohlenmonoxid und Kohlendioxid. Bietet man dem Oxidationsreagenz ein Nucleophil (Tryptophol) als Reaktionspartner an, so entsteht nach basischer Aufarbeitung mit Triethylamin die entsprechende Carbonylverbindung (MANCUSO und SWERN, 1981).

Oxalylchlorid wurde in Dichlormethan auf -60°C abgekühlt. Nach Zugabe von DMSO wurde kurz gerührt und Tryptophol, gelöst in Dichlormethan, innerhalb von 5 min zugetropft. Nach weiteren 15 min unter Rühren wurde Triethylamin zugegeben und weitere 5 min gerührt. Nach langsamer Erwärmung auf RT erfolgte die DC-Kontrolle. Die dünnschichtchromatographische Überprüfung ergab ein Produktgemisch von acht UV-aktiven Stoffen. Die SWERN-Oxidation von Tryptophol zum IAc mißlang. Auf die Reinigung des Reaktionsansatzes wurde verzichtet.

4.4.2.2. IAc-Darstellung nach DARBRE

Da die SWERN-Oxidation von Tryptophol nicht realisiert werden konnte, wurde als zweite Möglichkeit die Reduktion eines Carbonsäurederivates durchgeführt. Denkbare Reaktionsedukte identischer Oxidationsstufen stellen die entsprechenden Säure-, Ester-, Amid- oder Nitril-Funktionen dar. Die Löslichkeit einer Carbonsäure in organischen Lösungsmitteln ist oft ungenügend und muß durch das Überführen in den entsprechenden Ester erhöht werden. Dies stellt den Nachteil der Carboxylgruppe gegenüber der Amid- oder Nitrilgruppe dar, da durch die Umwandlung in den Ester eine weitere Synthesestufe erforderlich ist. Für die Reduktion einer Amidverbindung zum Aldehyden wurde keine geeignete Synthese in der Literatur gefunden. Eine Möglichkeit der IAc-Darstellung stellt die Reduktion von 3-Indolylacetonitril zur entsprechenden

Iminverbindung mittels Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAH) dar. Nach Hydrolyse mit gesättigter Weinsäurelösung entsteht IAc (DARBRE et al., 1984), (siehe **Abb. 75**).

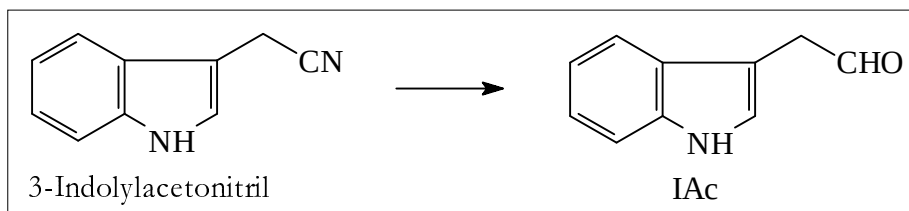


Abb. 75 IAc-Synthese nach DARBRE

DIBAH stellt ein schonendes Reduktionsmittel für die Nitrilgruppe dar. 3-Indolylacetonitril wird mit DIBAH in absolutem Benzol bei 0°C umgesetzt. Der Ansatz mußte gekühlt werden, um die Reaktivität von DIBAH herabzusetzen. Die Synthese fand unter Stickstoff-Atmosphäre statt. Durch Hydrolyse der gebildeten Schiff'schen Base entsteht ein Halbaminal. Durch Protonierung des Stickstoffes bildet sich ein intermediäres Iminium-Ion aus. Erst durch die Abspaltung des Diisobutylaluminiumamins wird das Gleichgewicht in Richtung IAc verschoben. Dieser Effekt wird vermutlich durch die komplexierenden Eigenschaften der Weinsäure begünstigt.

3-Indolylacetonitril wurde in absolutem Benzol gelöst und bei 0°C mit DIBAH innerhalb von 10 min versetzt und eine Stunde bei 0°C gerührt. Der Reaktionsansatz wurde in gesättigte Weinsäurelösung überführt und stark gerührt. Das nach Extraktion mit Diethylether erhaltene Rohprodukt wurde durch Aktivkohlebehandlung und Celitefiltration gereinigt (DARBRE et al., 1984). Nach ersten Untersuchungen zeigte sich, daß IAc eine sehr labile Verbindung ist, die sich sowohl im sauren als auch im basischen Milieu unter Lichteinwirkung innerhalb von 5-15 min irreversibel zersetzt. Dies stellt den Hauptgrund dafür dar, daß IAc nicht als Reinsubstanz synthetisiert werden kann (GRAY, 1959). Auch nach Sauerstoff- und Lichteinwirkung zersetzte sich die Verbindung, so daß eine Stabilisierung der Aldehydfunktion notwendig wurde.

4.4.2.3. Stabilisierung von IAc nach Gray

IAc wurde durch Natriumhydrogensulfit stabilisiert. Durch einstündiges Rühren in 39%-iger Natriumhydrogensulfit-Lösung bei 0°C wurde IAc nahezu quantitativ in das Natriumhydrogensulfit-Addukt überführt (GRAY, 1959), (siehe **Abb. 76**).

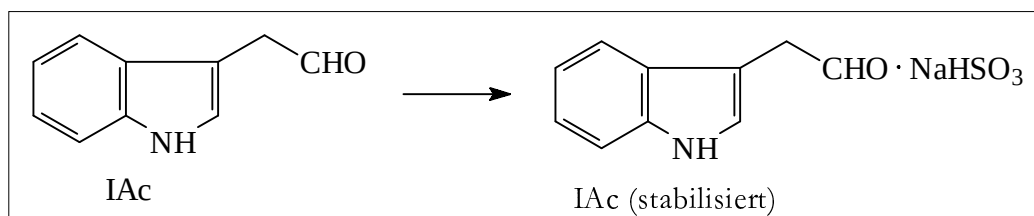


Abb. 76 IAc-Stabilisierung nach GRAY

Es wurde ein weiß-grauer, kristalliner Feststoff erhalten. Das Produkt wurde abfiltriert und mit 95%-igem Ethanol, Ethanol/Diethylether (1:1) und Diethylether gewaschen. Die Ausbeute an IAc-Natriumhydrogensulfit betrug 65%, bezogen auf 3-Indolylacetonitril (Durchführung: siehe **Kap. 7.5.2.1.**). Die Verbindung muß kühl und dunkel gelagert werden.

4.4.3. Bildungsbedingungen von IMTHCC

4.4.3.1. Abhängigkeit der IMTHCC-Bildung von der Zeit

Für die Untersuchungen der Zeitabhängigkeit der IMTHCC-Bildung wurden Trp und frisch entschützter IAc im molaren Verhältnis von 10:1 bei pH=2 zusammengegeben (EULITZ, 1996), gerührt und mittels RP-HPLC und UV-Detektion bei 280 nm analysiert (siehe **Kap. 7.2.2.**). Das IAc-Addukt wurde analog GRAY (1959) entschützt. Um den freien Aldehyden zu erhalten, wurde das Addukt in Wasser gelöst und mit ges. Natriumcarbonat-Lösung bis zur leichten Trübung versetzt. Nach 5 min wurde der freie Aldehyd mit Diethylether extrahiert und das Extraktionsmittel schonend bei RT und unter leichtem Vakuum entfernt. IAc wurde als farblose, sirupöse Flüssigkeit erhalten, die sofort umgesetzt wurde. Die Zeitabhängigkeit ist in **Abb. 77** graphisch dargestellt. Auf der Abzisse ist die Reaktionszeit in min aufgetragen, auf der Ordinate die entsprechenden Flächenprozentage der Analyten. Sie wurden durch Division der IMTHCC-Peakflächen (cis/trans) bzw. der IAc-Peakfläche durch die Trp-Peakfläche (bei $t=0$) und anschließender Multiplikation mit Faktor 100 erhalten. Es wurden die prozentualen Veränderungen der Flächengehalte von IAc, cis-IMTHCC und trans-IMTHCC dargestellt, um einerseits die Abnahme des Reaktionseduktes IAc zu überprüfen und andererseits die Bildung der Reaktionsprodukte cis- und trans-IMTHCC nachzuweisen (Durchführung und Auswertung: siehe **Kap. 7.5.1.**).

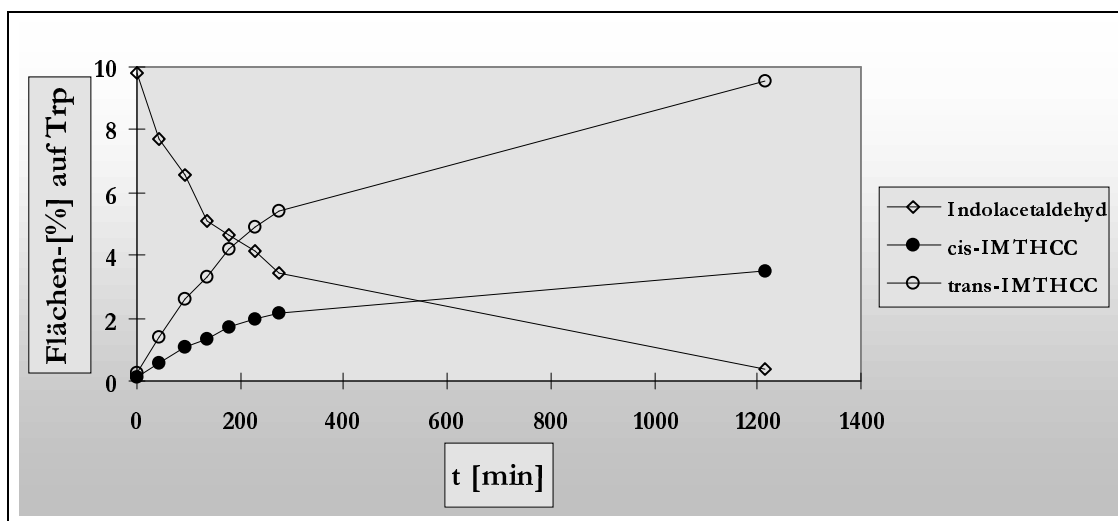


Abb. 77 Zeitabhängigkeit der IMTHCC-Bildung

Die Reaktionsgeschwindigkeit der IMTHCC-Bildung ist gering. Erst nach einer Reaktionsdauer von 24 h (letzter Meßpunkt) kann anhand der nahezu vollständigen Abnahme des IAc die quantitative Umsetzung in die IMTHCC-Diastereoisomere nachgewiesen werden. Das Verhältnis trans-IMTHCC zu cis-IMTHCC beträgt bei diesen Reaktionsbedingungen ca. 2:1.

4.4.3.2. Abhängigkeit der IMTHCC-Bildung vom pH-Wert

Für die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der IMTHCC-Bildung wurden Trp und frisch entschützter IAc im molaren Verhältnis von 5:1 zusammengegeben, über Nacht gerührt und an-

schließlich über RP-HPLC und UV-Detektion bei 280 nm analysiert (siehe **Kap. 7.2.2.**). In **Abb. 78** ist die pH-Abhängigkeit der IMTHCC-Bildung aus Trp und IAc graphisch dargestellt. Auf der Abzisse sind die pH-Werte und auf der Ordinate die IMTHCC-Flächenprozentage summerisch aufgetragen. Sie wurden durch Division der IMTHCC-Peakflächen durch die Trp-Peakfläche (bei $t=0$) und anschließender Multiplikation mit Faktor 100 erhalten. Die Untersuchung beschränkte sich auf die pH-Werte im sauren Bereich, da sich die Tetrahydro- β -carbolinsäure-Derivate im basischen Milieu zersetzen und unter neutralen Bedingungen keine Bildung der Carboline stattfindet (EULITZ, 1996).

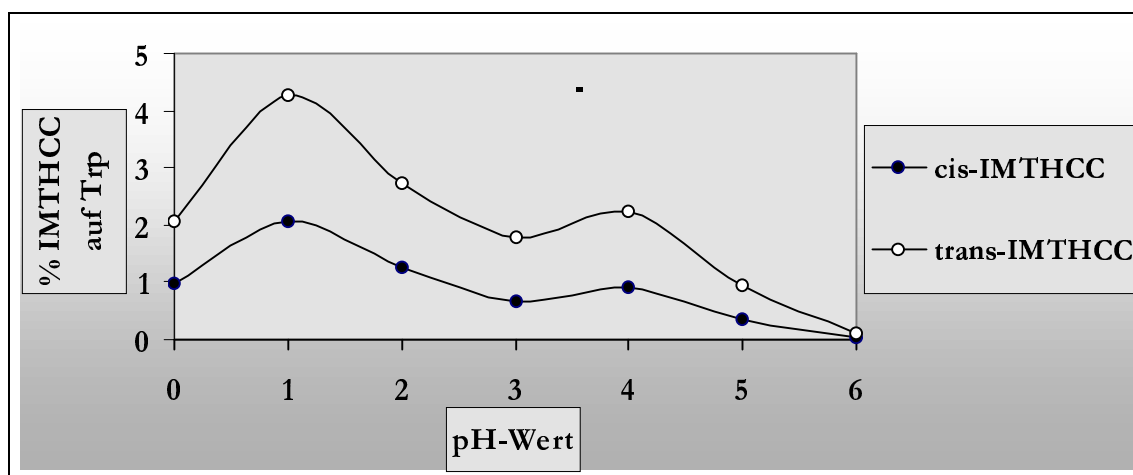


Abb. 78 pH-Abhängigkeit der IMTHCC-Bildung

Die IMTHCC-Bildung besitzt bei pH=1 ein absolutes und bei pH=4 ein stationäres Maximum. Es ist zu erkennen, daß die IMTHCC-Bildung durch Erhöhung des pH-Wertes kontinuierlich abnimmt um bei einem pH=6 das absolute Minimum zu erreichen. Das Verhältnis von trans-IMTHCC zu cis-IMTHCC beträgt bei den gewählten Reaktionsbedingungen ca. 2:1 (Durchführung und Auswertung: siehe **Kap. 7.5.1.**).

4.4.4. Synthese von IMTHCC

Basierend auf den Erkenntnissen der Untersuchungen der IMTHCC-Bildungsbedingungen wurde eine IMTHCC-Synthese entwickelt. Das molare Verhältnis der Reaktionsedukte Trp und IAc wurde mit 1:1.5 gewählt, um bei stattfindenden Nebenreaktionen von IAc stets das Vorhandensein einer äquimolaren Menge IAc zu gewährleisten. Der frisch entschützte Aldehyd mußte rechnerisch in einem geringen Überschuß zugesetzt werden, um eine maximale Umsetzung zu erreichen. Ferner sollte Trp nicht im Überschuß zugegeben werden, um dessen Abtrennung bei der Reinigung zu vereinfachen. Da der freie IAc nicht definiert eingewogen und zugegeben werden konnte, war eine genaue Aussage bezüglich des tatsächlichen Molverhältnisses von IAc zu Trp nicht möglich. Als Maßnahme gegen die Bildung lichtinduzierter Nebenprodukte und Photolyse des Aldehyden wurde die Reaktion lichtgeschützt durchgeführt. Die Reaktionslösung wurde mit 0.5 M H_2SO_4 -Lösung auf pH=1 eingestellt, da man bei diesem Wert die höchste Ausbeute an

IMTHCC erhält (siehe **Abb. 78**). Als Reaktionsdauer wurden 48 h gewählt, da in diesem Zeitraum die quantitative Umsetzung der Reaktionsedukte sichergestellt werden konnte (siehe **Abb. 77**). Der Reaktionsverlauf wurde zur Kontrolle alle 24 h mittels RP-HPLC und UV-Detektion bei 280 nm analysiert (siehe **Kap. 7.2.2.**). Es schloß sich eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel an. Das IMTHCC-haltige Eluat wurde lyophilisiert (Durchführung und Analytik: siehe **Kap. 7.5.2.2.**).

4.4.4.1. Optimierung der IMTHCC-Synthese

Im HPLC-Chromatogramm der unter **Kap. 4.4.4.** beschriebenen Synthese war neben der erwarteten Bildung der IMTHCC-Diastereoisomere die Entstehung unbekannter Verunreinigungen zu beobachten. Es handelt sich dabei um Halbaminale, die bei einer 1-Substitution von Trp durch den Aldehyden entstehen (EULITZ, 1996). Eine nähere Identifikation und Charakterisierung wurde nicht durchgeführt. Durch Vergleich der HPLC-Analyse mehrerer Vergleichssubstanzen (Trp-Methylester, THCC, MTHCC, IMT) mit dem Reaktionsansatz konnten zwei unbekannte Peaks als Trp-Methylester und IMT identifiziert werden. Der positive Befund des Trp-Methylesters ist auf die Anwesenheit von Methanol als Modifier zurückzuführen. Es sollte durch den Austausch des Methanols die Bildung der Nebenprodukte unterdrückt werden. Dies konnte durch den Einsatz von Tetrahydrofuran (THF) erreicht werden. Die Bildung der EMS-assoziierten Verbindung IMT wurde im **Kap. 4.2.2.1.** erläutert und durch Dotierung mit einem externen IMT-Standard bestätigt. Die quantitative Unterdrückung der IMT-Bildung wurde durch THF nicht erreicht. Da die Bildung jedoch vernachlässigbar gering und die säulenchromatographische Abtrennung des IMT keine Probleme darstellte, wurden keine weiteren Untersuchungen bezüglich einer Abtrennung durchgeführt. Dies gilt ebenso für die gebildeten Halbaminale. Die Veränderungen in der Durchführung der optimierten IMTHCC-Synthese beruhen somit auf dem Austausch des Lösungsvermittlers. Durch den Einsatz des aprotischen Tetrahydrofurans konnte die Bildung der Verunreinigungen in befriedigendem Ausmaß unterdrückt werden. Das Verhältnis der Diastereoisomere veränderte sich insofern, daß cis- und trans-IMTHCC nun äquimolar vorlagen. Die Reinigung des Reaktionsansatzes erfolgte analog dem unter **Kap. 4.4.4.** beschriebenen Verfahren. Es wurden 200 mg einer grau-weißlichen, kristallinen Substanz isoliert. Die Substanz wies eine Reinheit $\geq 99\%$ (RP-HPLC, UV_{280nm}) auf (Durchführung und Analytik: siehe **Kap. 7.5.2.2.**).

5. Diskussion

5.1. Kontaminanten in biotechnologisch hergestelltem Trp

Mit dem Auftreten von EMS in Verbindung mit gentechnisch hergestelltem L-Tryptophan im Jahre 1989 wurde die Debatte um den umstrittenen Einsatz von gentechnisch veränderten Mikroorganismen zur Herstellung von Pharmaprodukten neu entfacht. Den Gentechnikgegnern diente der „Fall Tryptophan“ fortan als erstes Beispiel für die Schädigung von Menschen durch den Einsatz dieser neuen Technologie (DER SPIEGEL, 1990). Die tragischen Folgen für Personen, die durch die Einnahme von Trp-Produkten stark geschädigt wurden und sogar teilweise verstarben sind bis heute, 10 Jahre nach Ausbruch der Epidemie, noch deutlich spürbar. Dabei geht es überwiegend um Entschädigungsforderungen von Betroffenen an verschiedene Pharmafirmen, die EMS-assoziiertes Trp der Firma SD für die Produktion ihrer Trp-haltigen Produkte verwendeten. Da die eigentliche Ursache von EMS nicht bekannt ist und die Symptomatik dieser Krankheit sehr komplexer Natur ist, besteht auch heute noch intensiver, fachübergreifender Forschungsbedarf. Als gesichert gilt die Tatsache, daß das Auftreten von EMS mit der Einnahme von bestimmten Trp-Chargen des japanischen Herstellers SD korreliert ist (CDC, 1989b; BELONGIA et al., 1990 und SLUTSKER et al., 1990). Als eigentliche Ursache werden Kontaminanten im SD-Trp angesehen (Kontaminanten-Hypothese). RP-HPLC-Untersuchungen von EMS-assoziierten SD-Trp-Chargen ergaben über 60 Verbindungen, deren Untersuchung mittels statistischer Methoden eine Fokussierung auf 6 Substanzen ermöglichte, die mit dem Auftreten von EMS korreliert wurden (BELONGIA et al., 1990; HILL et al., 1993). Nach der Korrelation von bestimmten Substanzen mit EMS erfolgte die Strukturaufklärung von einigen Verbindungen. Da die Kontaminanten nur im Spurenbereich vorlagen, war es sehr aufwendig, die für eine eindeutige Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie benötigte Substanzmenge von mindestens 1 mg zu isolieren. MÜLLER et al. (1991) isolierten sieben Kontaminanten, darunter die drei Hauptverunreinigungen in EMS-assoziierten SD-Trp, durch Anwendung einer präparativen HPLC und identifizierten diese mit ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und Massenspektroskopie (siehe **Kap. 2.3.1.**). Bisher konnte in keinem Tierversuchsmodell EMS-Symptome nachgestellt werden. Das liegt zum einen an der fehlenden Verfügbarkeit von EMS-assoziierten Verbindungen, da bisherige Studien nur mit einer EMS-assoziierten Substanz (EBT) durchgeführt wurden (SATO et al., 1995). Desweiteren ist unklar, ob die entscheidende Verbindung überhaupt detektiert wurde. Bisher wurden alle Untersuchungen mit RP(C_{18})-HPLC, saurer Gradientenelution und UV-Detektion durchgeführt. Durch SIMAT et al. (1995) konnte gezeigt werden, daß bei einem enzymatischen Trp-Abbau bisher unbekannte Peaks (Kryptopeaks) detektiert werden konnten.

Um eine Aussage über die toxikologische Relevanz der statistisch ermittelten EMS-assoziierten Kontaminanten machen zu können, ist es erforderlich, diese Substanzen zu synthetisieren und durch toxikologische oder immunologische Tests auf ihr Potential hinsichtlich der Krankheit EMS zu überprüfen.

5.1.1. Hydroxytryptophane

5.1.1.1. Synthese der Hydroxytryptophane

Durch HILL et al. (1993) und NAYLOR (1999, im Druck) konnte der Verdacht, daß Hydroxytryptophane EMS-assoziiert sind, widerlegt werden, da die EMS-korrelierte Substanz PIC die identische Summenformel der Hydroxytryptophan-Isomere besitzt. In der Literatur werden verschiedene Ansätze zur Darstellung von Hydroxytryptophanen beschrieben. Die direkte Einführung der Hydroxylgruppe durch radikalische Substitution am Trp wurde aufgrund der schlechten Ausbeuten und der hohen Anforderungen an die Reinigung der Reaktionsprodukte nicht in Betracht gezogen (KLEEBERG, 1995). Durch die geringe Selektivität der Reaktion entsteht eine Vielzahl von Produkten, die nur mittels DC in unbefriedigender Reinheit getrennt werden konnten (EICH und ROCHELMAYER, 1966). Daher wurde eine de novo Synthese für die Darstellung von 4-, 6- und 7-Hydroxytryptophan durchgeführt. Zuerst mußte eine geeignete Indolsynthese gefunden werden, um die entsprechenden Hydroxyindol-Derivate herzustellen. Da die Hydroxyl-Gruppe innerhalb der Synthese nicht frei vorliegen darf, mußte eine Schutzgruppe gefunden werden, die sich inert gegenüber starken pH-Wert-Schwankungen und thermischer Beanspruchung verhält. Eine geeignete Schutzgruppe für aromatische Hydroxyl-Gruppen ist die Benzylgruppe, die schon von EK und WITKOP (1954) verwendet wurde. Mit der Weiterentwicklung der Indolchemie wurde von REISSERT eine Indolsynthese entdeckt, die es erlaubt, Substituenten am Benzolkern des Indolrings selektiv einzuführen (siehe **Kap. 2.4.1.**). Durch Modifikationen dieser Synthese und Verwendung neuer Verbindungen, wie z.B. Formamidacetale, konnten die Ausbeuten der Indolsynthesen drastisch erhöht werden. FLEMING et al. (1985) synthetisierten nach diesem Verfahren 4-, 5- und 6-Benzyl oxyindol in guten Ausbeuten. Die Übertragung dieser Synthese auf die Darstellung von 7-Benzyl oxyindol gelang problemlos, jedoch wirkte sich der elektronenliefernde Benzyl oxy substituent in *ortho*-Position zur Nitro-Gruppe reaktionshemmend aus. Ursache dafür ist die Herabsetzung des –M und –I-Effektes der Nitrogruppe durch die Benzyl oxy-Funktion, der wiederum die Reaktivität der Methylgruppe herabsetzt. Die Ausbeute des 7-Benzyl oxyindols lag mit 59% niedriger als die der beiden anderen Isomere. Nach dieser Strategie wurden alle benzylgeschützten, aphysiologischen Hydroxyindole in guten Ausbeuten im Grammaßstab synthetisiert. Die hier erreichten Ausbeuten für 4- und 6-Benzyl oxyindol lagen in den gleichen Größenordnungen wie die von FLEMING et al. (1985) erreichten (4-Benzyl oxyindol: 70% und 6-Benzyl oxyindol 75%). Ein weiterer Vorteil dieses Weges ist der Einsatz von preiswerten Methyl nitrophenol-Derivaten. Zum anschließenden Aufbau der Alaninfunktion wurde der effiziente Weg von SNYDER und SMITH (1944) angewendet. Aufgrund der hohen Ausbeuten und der nach diesem Weg beschriebenen Darstellung von 5- und 7-Hydroxytryptophan durch EK und WITKOP (1954) wurde dieser Syntheseweg favorisiert. In der Literatur ist bisher noch keine Synthese der aphysiologischen Hydroxytryptophane innerhalb eines Syntheseweges beschrieben worden. Mit der Kombination der modifizierten REISSERT-Indolsynthese nach Fleming et al. (1985) und der Graminmethode zur Darstellung der Tryptophane (EK und WITKOP, 1954) konnten alle drei aphysiologischen Hydroxytryptophan-Isomere in guten Ausbeuten hergestellt

werden. Die Synthese ist im Grammaßstab durchführbar und liefert die Hydroxytryptophane in hoher Reinheit, so daß sie als Referenzsubstanzen für die HPLC-Analytik einsetzbar sind.

5.1.2. IMT

5.1.2.1. Synthese von IMT

Die Untersuchung der EMS-assoziierten Substanz IMT hinsichtlich seines potentiellen EMS-auslösenden Charakters ist bis heute in der Literatur nicht beschrieben worden, obwohl sie eine Hauptkontaminante im SD-Trp darstellt. Grund dafür ist die mangelnde Verfügbarkeit dieser Substanz. IMT besteht aus einem Trp-Molekül mit einem an Position C-2 des Indolringes substituierten 3-Indolylmethyl-Fragment. In der Literatur ist keine Synthese von IMT beschrieben. Da es in der Regel ohne Probleme gelingt die Alaninfunktion an einen Indolkörper an Position C-3 zu knüpfen, reduzierte sich das Syntheseproblem auf die Darstellung von 2-(3'-Indolylmethyl)-indol. Die Darstellung 2-substituierter Indole kann allgemein durch Ringschlußreaktionen unter Aufbau des fünfgliedrigen Heterocyclus oder unter Verwendung des Indoles und seiner Derivate als Edukte erfolgen (siehe **Kap. 2.4.1.**). Die wichtigste Cyclisierungsreaktion ist die FISCHER-Indolsynthese. Bei dieser Synthese werden Arylhydrazone durch Erhitzen in Gegenwart von Säuren oder Lewis-Säure-Katalysatoren umgesetzt (FISCHER und JOURDAN, 1883). Um einheitliche Produkte zu erhalten, müssen bei dieser Darstellungsart symmetrische Ketone verwendet werden. Zur IMT-Darstellung wäre jedoch ein unsymmetrisches Keton erforderlich, so daß von dieser Methode abgesehen wurde.

Eine andere Möglichkeit zur Darstellung von IMT stellt die modifizierte MADELUNG-Synthese nach HOULIHAN et al. (1981) dar. Dabei erfolgt der Ringschluß von 2-(Acylamino)-toluolen bei RT unter Zusatz von *n*-Butyllithium (siehe **Kap. 2.4.1.**). Eine Cyclisierung konnte nach einigen Vorversuchen nicht erreicht werden, da im Edukt vor der Cyclisierung bereits ein Indolring vorhanden war und dieser durch die Base am Stickstoff deprotoniert wurde. Es erfolgte Zersetzung des Eduktes. Eine Umgehung dieses Problems würde durch Verwendung von Schutzgruppen am Indolstickstoff erreicht werden, jedoch beinhalten diese Schritte zwei zusätzliche Reaktionen und Ausbeuteverluste.

Ein ähnliches Problem würde bei der Darstellung des IMT-Grundkörpers mittels Lithiierung auftreten (siehe **Kap. 2.4.1.**). Dabei müßten sowohl Indol als auch das zu substituierende 3-Indolylmethylbromid durch Einführung von speziellen Gruppen vor Zersetzung und Umlagerung geschützt werden (SUNDBERG et al., 1973).

Es wurde eine Synthese zur Darstellung von IMT entwickelt, die analog zur Herstellung von 2-substituierten Indolen nach LE CORRE et al. (1981) durchgeführt wurde. Die Cyclisierung zum 2-(3'-Indolylmethyl)-indol fand über eine WITTIG-Reaktion statt und wurde mit der moderat-reaktiven Base Kalium-*tert*-butanolat durchgeführt. Ausgangspunkt der Synthese war 2-Nitrobenzylchlorid, das mit Triphenylphosphin zum 2-Nitrobenzyltriphenylphosphoniumchlorid umgesetzt wurde. (LI et al., 1988). Durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt, der eine Umkristallisation aus Isopropanol/Diethylether beinhaltete, lag die Ausbeute mit 72% unter der durch LI et

al. (1988) erzielten von 85%. Die von ARDAKANI (1978) beschriebene Umkristallisation aus Ethanol konnte nicht nachvollzogen werden. Das Triphenylphosphoniumsalz wurde durch Zink/Essigsäure zur Aminoverbindung reduziert (LI et al., 1988) und anschließend mit 3-Indolylacetylchlorid acyliert. Die Ausbeute der Acylierung lag im Bereich der von LI et al. (1988) erzielten Ergebnisse. 3-Indolylacetylchlorid wurde nach RAUCHER et al. (1987) aus Indolessigsäure und Phosphorpentachlorid erfolgreich synthetisiert. Die Herstellung des 3-Indolylacetyl bromides als reaktiverer Verbindung nach APPEL (1975) gelang nicht. Das resultierende 2-(3'-Indolylacetamido)-benzyltriphenylphosphoniumchlorid cyclisierte durch Behandlung mit Kalium-*tert*-butanolat zu 2-(3'-Indolylmethyl)-indol (LE CORRE et al., 1981). Die von LE CORRE et al. (1981) beschriebene Umsetzung führte zu unbefriedigenden Ausbeuten von 2-(3'-Indolylmethyl)-indol (15%). Obwohl die Base Kalium-*tert*-butanolat im Vergleich zu *n*-Butyllithium weniger reaktiv ist, zersetzte sie den Indolkörper zu unerwünschten Nebenprodukten. Durch Verkürzung der Reaktionszeit auf 5 min und die Zugabe der Base bei 80 °C konnte die Ausbeute in den Bereich, der von LI et al. (1988) für die Darstellung ähnlicher Verbindungen angegebenen Ergebnisse, gebracht werden (52%). Die Aminosäurefunktion wurde über drei Synthesestufen nach GILCHRIST et al. (1979) eingeführt. Nach Reaktion von Ethylbromopyruvat mit 2-(3'-Indolylmethyl)-indol wurde das resultierende Oxim zum Amin reduziert und der Ester basisch hydrolysiert. Um das Endprodukt in Referenzqualität zu erhalten, wurde eine Reinigung über Ionenaustauscher entwickelt. Das so erhaltene IMT besitzt eine Reinheit von >96% und ist für den Einsatz als Referenzsubstanz geeignet. Die Gesamtausbeute über alle Synthesestufen betrug 13%. Als entscheidende Nachteile der de novo Synthese von IMT sind die lange Durchführungszeit von ca. 2 Wochen und die hohen Kosten dieser Synthese zu nennen. Allerdings besteht außer auf dem chemisch-synthetischen Wege keine andere Möglichkeit, diese Verbindung gezielt aufzubauen und jeden Schritt der Synthese analytisch zu kontrollieren.

5.1.2.2. Untersuchung der Bildungsbedingungen von IMT

Bei der Untersuchung der Bildungsbedingungen von IMT wurde der Fokus auf die mögliche Bildung dieser Verbindung beim Ionentauscher-Reinigungsverfahren von SD gelegt. Bei diesem Clean-up-Prozeß wurde ein pH-Bereich von 1-12 durchlaufen (SAKIMOTO und TORIGOE, 1994). Dieser breite pH-Range ist gerade für labile Verbindungen wie Trp und seine Derivate kritisch zu betrachten (EULITZ, 1996; SIMAT, 1997). Die Analyse einer SD-Trp-Charge nach FEIDEN (1994) ergab einen IMT-Gehalt von 660 mg/kg bei einer Gesamtkontamination des SD-Trp von 2600 mg/kg UV-aktiver Verunreinigungen. IMT stellt die Hauptkontaminante des SD-Trp mit ca. 25% der Gesamtkontamination dar, wobei an diesem Punkt die hohe Reinheit des SD-Trp von 99.75% erwähnt werden muß. Dies soll verdeutlichen, in welchem Bereich die Analytik der Verunreinigungshypothese stattfindet und weiterhin veranschaulichen, daß 1989 eine hochreine SD-Trp-Ware (Reinheit von 99.75%) als potentiell EMS-auslösend eingestuft wurde (BGA, 1989). Um die Frage nach der Bildungsmöglichkeit für IMT während der Trp-Synthese zu beantworten wurden Indol-Derivate untersucht, die potentiell in der Lage sind, ein IMK zu bilden, welches mit Trp unter IMT-Bildung reagiert. Während Indolessigsäure und Indolpyruvat keine IMT-Bildung ergaben, entstand aus Trp und IM IMT. Dieses Ergebnis war aufgrund der Untersu-

chungen von AMAT-GUERRI et al. (1984), die die Entstehung von 2,3'-Methylen-diindolen durch Kondensation von 3-Hydroxymethylindolen und 3-substituierten Indolen nachweisen konnten, zu erwarten. Als Nebenprodukte traten stets Polymerisationsverbindungen auf. Die niedrige Reaktivität der Indoleessigsäure könnte durch Oxidation zur Indolyl-3-glycolsäure (VON DOBENECK et al., 1968) oder durch Decarboxylierung (AMAT-GUERRI et al., 1983) erhöht werden. Die Bildung einer 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure aus Indolpyruvat und Trp wird von SNYDER et al. (1948) beschrieben und erklärt bei diesem Versuch die Abwesenheit von IMT. Eine IMT-Bildung wurde bei der Reaktion aus IAc und Trp beobachtet. IAc spaltet unter Ausbildung des IMK Formaldehyd ab und bildet neben IMT die Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure aus Trp und Formaldehyd. Durch den Nachweis von THCC konnte ein Bildungsmechanismus postuliert werden. IAc liegt als Trp-Metabolit während des Fermentationsprozesses vor. Die Studien von SAKIMOTO und TORIGOE (1994) beweisen, daß Aldehyde (hier IAc) während des SD-Trp Reinigungsverfahrens auf dem Anionenaustauscher angereichert und nicht wie erwartet, als neutrale Verbindung den Anionenaustauscher ohne Wechselwirkung verlassen würden. Mit der anschließenden Elution wurde auch IAc auf den Kationenaustauscher gebracht, das mit Trp im sauren pH-Wert zu IMT reagierte. Der hier vorgestellte Zusammenhang, daß IAc als direkter Trp-Metabolit in der SD-Fermentationslösung vorliegt und im nachgestellten Versuch mit Trp zum IMT neben einer Carbolin-Konkurrenzreaktion abreagiert, spricht für die wahrscheinliche Ursache der IMT-Kontamination des SD-Trp's über IAc auf dem SD-Kationenaustauscher. Dies wird durch die Tatsache bekräftigt, daß hohe Gehalte an IAc in der SD-Fermentationslösung vorgelegen haben, da das aus Trp und IAc gebildete Carbolin (IMTHCC) als eine Hauptkontaminante im HPLC-Chromatogramm des SD-Trp (siehe **Abb. 11**) detektiert wurde.

Für die Untersuchung der IMT-Bildungsbedingungen wurde ein Modellsystem aus IM und Trp verwendet. IM stellt eine reaktive Verbindung dar, die bei unterschiedlichen pH-Werten Wasser eliminieren kann und ein IMK ausbildet. Die IMT-Bildung ist stark pH-abhängig. Sie besitzt im sauren bei pH=3 und im basischen Milieu bei pH=9 ein Maximum. Die unterschiedlichen Ausbeuten von IMT unter sauren und basischen Bedingungen könnten durch die verschiedenen Reaktionswege zum IMK erklärt werden (AMAT-GUERRI et al., 1984; LEETE, 1959). Durch einen hohen Trp-Überschuß wird eine quantitative Bildung von IMT begünstigt und Polymerisationsprodukte zurückgedrängt. Bei einem molaren Verhältnis zwischen Trp und IM von 50:1 und höher erfolgt eine quantitative Umsetzung zu IMT. Diese ist bereits nach 1 h abgeschlossen. Da IM in den Fermentationslösungen bisher nicht nachgewiesen wurde, war dessen Entstehung ebenfalls zu untersuchen. Die Synthese von IM aus Indol und Formaldehyd in Methanol unter basischen Reaktionsbedingungen wurde bereits von RUNTI (1951) beschrieben. Bei der Reaktion zwischen Trp, Indol und Formaldehyd ist jedoch die Bildung von THCC über einen weiten pH-Bereich bevorzugt. Erst im stark sauren (pH=0 bzw. pH=1) wird die PICTET-SPENGLER-Reaktion durch die Protonierung der Aminosäurefunktion des Trp's soweit gehemmt, daß Indol und Formaldehyd zu IM reagieren und nachfolgend mit Trp IMT entsteht. Allerdings dürfte in der Fermentationslösung der Firma SD kein freies Indol vorhanden sein, weil dieser Herstellungsprozeß von Anthranilsäure und Ammoniumsalzen ausgeht und die Bildung des Trp's aus

IG im Enzym Tryptophan-Synthase stattfindet. Das dabei im ersten Schritt aus IG freigesetzte Indol verläßt das Enzym nicht, sondern wird durch Substratkanalisierung von einem katalytischen Zentrum zum nächsten transportiert, ohne in das umgebende Medium abgegeben zu werden. Nur der Verzicht auf starke pH-Wert-Änderungen und Ionenaustauscher verspricht eine Reduktion der IMT-Konzentration in den Produkten. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit ist die EMS-auslösende Wirkung von IMT kritisch zu betrachten, weil IM auch in Lebensmitteln, wie Blumenkohl (CHEN et al., 1996) vorkommt und IMT folglich auch im Magen gebildet werden könnte. Aufgrund der hohen Reaktivität von IM ist die Verwendung dieser Substanz als Arzneimittel (GRUBBS et al., 1995), die zur Zeit kontrovers diskutiert wird, erneut zu überdenken.

5.1.2.3. IMT-Schnellsynthese

Die Möglichkeiten der statistischen Versuchsplanung und deren Aussagekraft bezüglich der wahrscheinlichen Ausbeuten-Maxima an IMT und maximale Reduktion an Polymerisationsprodukten im gewählten experimentellen Raum, sowie der Erhalt konkreter Erkenntnisse über die Zusammenhänge der Versuchsparameter und der Zielgrößen bildete die Basis, auf der eine Optimierung der IMT-Synthese aus IM und Trp ermittelt werden sollte. Die Ergebnisse, welche schnell und einfach ohne spezielle Statistikkenntnisse auswertbar waren, bestätigen die durch PREU und PETZ (1998) beschriebene Durchführung entsprechender Untersuchungen. Allerdings sollte man sich nicht ausnahmslos auf die Ergebnisse der Statistica-Software verlassen: Die Erkenntnisse, die aus den Erfahrungen herkömmlicher Auswertungsmethodik erlangt werden, müssen stets in die Auswertung mit einbezogen werden. Anderenfalls wäre der Einfluß der Reaktionszeit, in diesem Fall durch verstärkte Polymerisation und leichte IMT-Verluste nachweisbar, nicht erkennbar. Der von AMAT-GUERRI et al. (1948) beschriebene Effekt der Polymerisation des IM's im sauren Medium wurde durch die durchgeführten Studien bestätigt. Bei der Auswahl der Versuchsparameter wurde auf die Untersuchung der Reaktionstemperatur als Einflußfaktor auf die IMT-Schnellsynthese verzichtet, da keine positiven Effekte auf die IMT-Ausbeute vermutet wurden. Ein entsprechend gekühlter Versuchsansatz wies keine vermehrte IMT-Bildung auf; die Erwärmung könnte zu verstärkter Polymerisation führen. Der auf der Basis optimierter Reaktionsparameter erhaltene IMT-Reaktionsansatz wurde über ein entwickeltes, effizientes Clean-up Verfahren gereinigt. Das resultierende IMT-Lyophilisat kann aufgrund seiner Reinheit als Referenzsubstanz zur RP-HPLC-Analytik eingesetzt werden. Anhand der durchgeführten flüssig-flüssig-Extraktion des Reaktionsansatzes mit 1-Butanol/Ethylacetat (1:1) und einer Aktivkohlebehandlung wurde der zeitliche Aufwand des Clean-up Verfahrens und die Abtrennung der Verunreinigungen entscheidend verbessert; der dadurch resultierende IMT-Verlust war unvermeidbar. Die IMT-Ausbeute war mit ca. 15% aufgrund der Konkurrenzreaktion der Polymerisation von IM gering. Die Lagerung des IMT's muß unter Licht- und Sauerstoffausschluß bei -18°C erfolgen, da IMT photolytisch und oxidativ angegriffen wird. Die effiziente Aufreinigung und rasche Durchführbarkeit (1-2 Tage) der Schnellsynthese ermöglicht jedoch das stetige Synthetisieren benötigter IMT-Mengen.

5.1.3. dhPIT

5.1.3.1. dhPIT-Bildung

Der entscheidende Vorteil der dhPIT-Bildung aus in situ hergestelltem IG im Gegensatz zu den chemischen Vollsynthesen liegt im Einsatz der sterisch festgelegten Reaktionsedukte L-(S)-Trp und D-(R)-Glycerinaldehyd. Das im SD-Trp enthaltene dhPIT weist nach RP-HPLC-Analyse nur einen Peak auf, wodurch die Entstehung von Diastereoisomeren während der dhPIT-Bildung theoretisch ausgeschlossen werden müßte. Allerdings wäre es möglich, daß die dhPIT-Bildung in der SD-Trp-Fermentationslösung hinsichtlich eines Diastereoisomers so stark begünstigt wurde, daß das zweite Diastereoisomer als Minor Komponente nicht mehr detektiert werden konnte. Über einen diesbezüglichen Einfluß der Fermentationslösung können nur Vermutungen angestellt werden. In der komplexen Zusammensetzung der Lösung und den daraus nicht nachvollziehbaren Solvationseigenschaften bezüglich der reaktiven Zwischenstufe (Carbenium-Ion) könnte jedoch die Ursache für die begünstigte Bildung des im SD-Trp enthaltenen dhPIT-Diastereoisomers liegen. Für einen weiteren Erklärungsansatz dient die von EULITZ (1996) durchgeführte Untersuchung der MTHCC-Diastereoisomeren-Trennung aufgrund unterschiedlicher Lösungsmitelegenschaften des trans-MTHCC (wasserlöslich) zum cis-MTHCC (nahezu wasserunlöslich). Dieser Effekt könnte ebenso für die dhPIT-Diastereoisomere gelten, so daß ein Diastereoisomer bei der Auskristallisation der SD-Rohware aus der Mutterlauge in Lösung verblieb und das zweite neben Trp auskristallisierte. Das in **Abb. 70** dargestellte dhPIT weist ein nicht eindeutig festgelegtes Chiralitätszentrum (R,S) auf, so daß theoretisch ein Paar Diastereoisomere gebildet werden müßte. Diese Vorhersage konnte durch das in situ hergestellte dhPIT bewiesen werden (siehe **Abb. 71**). Die sterisch bedingten Einflüsse sind demnach nicht so stark selektivierend, daß aufgrund der „raumfüllenden“ Indolgruppen von Trp und IG nur eine einseitige elektrophile Substitution möglich ist. So bildeten sich die dhPIT-Diastereoisomere im Verhältnis von 60:30 aus. Das Ziel, dhPIT als HPLC-Referenzsubstanz zu synthetisieren, konnte aufgrund nichtpraktikabler Synthesen und der extremen Labilität von IG innerhalb dieser Arbeit nicht erreicht werden. Die Isolierung des dhPIT aus dem Reaktionsansatz über in situ hergestelltes IG sollte jedoch über die erlangten Erfahrungen während der Reinigung des IMT-Reaktionsansatzes in der Zukunft möglich sein. Die dhPIT-Bildung aus Indol, D-(R)-Glycerinaldehyd und Trp kann nicht direkt auf den Bildungsmechanismus im SD-Trp übertragen werden, da in der SD-Fermentationslösung kein freies Indol vorliegt. Allerdings ist durch die Realisierung des gesamten Trp-Stoffwechsels bei der fermentativen de novo Herstellung die Anwesenheit aller Trp-Anaboliten und -Metaboliten zu erwarten. IG, eine Trp-Vorstufe bei der biotechnologischen SD-Trp-Herstellung, liegt direkt in der SD-Fermentationslösung vor und reagiert unter sauren Bedingungen (SD-Kationenaustauscher) mit dem im hochmolaren Überschuß vorhandenen Trp zum dhPIT analog **Abb. 70**. In den dokumentierten dhPIT-Untersuchungen wurde dieser Zusammenhang ausgenutzt, weil aus Indol und D-(R)-Glycerinaldehyd die natürliche Rückreaktion zu IG (in situ) erfolgreich nachgestellt wurde. Eine mögliche dhPIT-Bildung im basischen Milieu (SD-Anionenaustauscher) wurde nicht untersucht.

Untersuchungen bezüglich der IMT-Bildung im sauren und basischen Milieu aus IM und Trp ergaben ein stationäres IMT-Bildungsmaximum bei pH=9. DhPIT könnte über einen Bildungsmechanismus einer reaktiven Zwischenstufe analog dem IMK unter basischen Bedingungen, aus IG und Trp im SD-Trp, entstanden sein. Weiterführende Untersuchungen der dhPIT-Bildungsbedingungen und Nachstellung der möglichen Bildung auf dem SD-Kationenaustauscher (und eventuell dem SD-Anionenaustauscher) müßten zur Absicherung der aufgestellten Zusammenhänge der Entstehung von dhPIT-Kontaminationen in Fermentationslösungen folgen. Die dhPIT-Bildung hätte vorraussichtlich unter Verzicht einer Ionenaustauscher-Reinigung im SD-Trp vermieden bzw. unterdrückt werden können.

5.1.4. IMTHCC

5.1.4.1. Synthese von IMTHCC

Der Carbolinbildungsmechanismus nach PICTET-SPENGLER wurde durch den Einsatz des Aldehyden IAc erfolgreich auf die IMTHCC-Synthese übertragen (BROSSI et al., 1973; PICTET und SPENGLER, 1911). Die Schwierigkeit in dieser Synthese bestand in der Entwicklung einer geeigneten IAc-Synthese. Durch Reduktion von 3-Indolylacetonitril und entsprechender hydrolytischer Aufarbeitung mußte die Aldehydfunktion aufgrund ihres hohen Reaktions-, Oxidations- und Photolysepotentials stabilisiert werden. Die von GRAY (1959) entwickelte IAc-Stabilisierung über Natriumdihydrogensulfit wurde erfolgreich in vergleichbarer Ausbeute nachgestellt. Die Aktivierung des Adduktes unter Freisetzung zum IAc nach GRAY (1959) stellte keine Probleme dar. Über die Ermittlung der optimalen IMTHCC-Bildungsbedingungen (pH-Wert, Reaktionszeit) wurde eine erfolgreiche IMTHCC-Synthese entwickelt. Nach entsprechender Reinigung wurde IMTHCC in HPLC-Referenzqualität mit 99%-iger Reinheit synthetisiert. Das Diastereoisomerenverhältnis cis/trans-IMTHCC ist abhängig von dem zur Synthese eingesetzten Modifier. So liegen cis/trans-IMTHCC bei Einsatz des polaren, protischen Methanols im Verhältnis 1:2 ; bei Einsatz des polaren, aprotischen THF jedoch im äquimolaren Verhältnis vor. Dieser Zusammenhang kann über den Einfluß des Lösungsmittels bei elektrophilen Substitutionsreaktionen erklärt werden. So beeinträchtigt normalerweise die Solvation der reaktiven Zwischenstufen durch polare, protische Lösungsmittel deren Nucleophilie. Die Reaktionsgeschwindigkeit in aprotischen, polaren Lösungsmitteln dagegen ist stark erhöht, da in diesem Fall keine Wasserstoffbrückenbindungen die reaktive Zwischenstufe solvatisieren, wodurch diese quasi „nackt“ vorliegt. Durch die Solvation über Methanol wird das Angriffszentrum vermutlich sterisch so eingegrenzt, daß der theoretisch zu erwartende Rück- und Vorderseitenangriff des Trp's, wie er bei dem THF-Reaktionsansatz zu beobachten ist (cis zu trans 1:1), nicht gleichmäßig erfolgt. Das im SD-Trp vorliegende IMTHCC weist dasselbe Diastereoisomerenverhältnis cis zu trans (1:2) wie bei Einsatz eines protischen, polaren Lösungsmittels auf, wodurch man einen ersten Hinweis auf die voraussichtliche IMTHCC-Bildung (protisches Lösungsmittel - in diesem Fall wäßrige Fermentationslösung) im SD-Trp erhält.

5.1.4.2. Bildungsbedingungen von IMTHCC

Im neutralen Medium wurde keine IMTHCC-Bildung nachgewiesen, die 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure-Bildung im basischen Milieu findet laut EULITZ (1996) nicht statt und wurde deshalb nicht untersucht. Die IMTHCC-Bildung aus IAc und Trp kann auf einen möglichen Bildungsmechanismus im SD-Trp übertragen werden, da der Trp-Metabolit IAc in der SD-Fermentationslösung vorliegt. Anhand der Untersuchung der IMTHCC-Bildungsbedingungen, die ein pH-Optimum bei stark sauren Bedingungen (pH=1) aufweist, jedoch auch noch bei dem in der SD-Kationentauscher-Reinigung vorliegenden pH von 1.7 qualitativ gebildet wurde, liegt die vermutliche Ursache der IMTHCC-Kontamination des SD-Trp in der SD-Ionentauscher-Reinigung. Die Tatsache, daß IAc in den Untersuchungen von SAKIMOTO und TORIGOE (1994) in der Aufgabelösung des SD-Kationenaustauschers nachgewiesen wurde, bekräftigt die aufgestellten Zusammenhänge. Zur Überprüfung dieser These müßte die Nachstellung der IMTHCC-Synthese an dem originalen SD-Kationentauscher erfolgen. Die Bildung des IMTHCC hätte durch Verzicht der SD-Ionentauscheraufreinigung voraussichtlich unterdrückt bzw. vermieden werden können.

5.2. Fazit

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hauptkontaminanten im EMS-assoziierten SD-Trp werden aufgrund der erhaltenen Ergebnisse überwiegend im sauren pH-Wert aus Anaboliten (IG) und Kataboliten (IAc) gebildet. Bei einem neutralen pH-Wert findet keine oder nur minimale Kontaminanten-Bildung statt. Trp ist ein säure- und basenlabiles Molekül. Drastische pH-Wert-Schwankungen, wie im Falle der Ionentauscher-Reinigung der Firma SD, begünstigen Reaktionen des Trp's in vielfältiger Hinsicht. Die Abspaltung eines IMK aus verschiedenen Indolderivaten ist eine drastische Umwandlung unter C-C-Bindungsbruch. Resonanzstabilisierte Carbenium-Ionen fungieren als starke Elektrophile und vermögen das im riesigen Überschuß vorliegende Trp zu substituieren. Vermutlich wurden neben den 2-substituierten auch 1-substituierte Trp-Derivate gebildet. Die PICTET-SPENGLER-Reaktion findet in Anwesenheit eines Aldehyden und Trp statt. Da eine Vielzahl von Aldehyden natürliche Produkte der Fermentation sind, werden bei einem pH<6 auch verschiedene 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäuren gebildet. Nur durch Vermeidung von pH-Wert-Schwankungen während des Trp-Clean-up-Prozesses kann eine Kontaminanten-Bildung verhindert werden.

6. Zusammenfassung

Seit dem epidemischen Auftreten des Eosinophilie-Myalgie Syndroms (EMS) im Jahre 1989, das mit der oralen Einnahme von Trp-haltigen Produkten in Verbindung gebracht wurde, ist das wissenschaftliche Interesse auf die Ursache dieser Krankheit gerichtet. Die bis heute vertretene Hypothese macht Kontaminanten in der Trp-Rohware des japanischen Herstellers Showa Denko K.K. (SD) für den Ausbruch dieser Krankheit verantwortlich. Aus den über 60 detektierten Verunreinigungen wurde über statistische Verfahren eine Klassifizierung in EMS-assoziierte und nicht EMS-assoziierte Verbindungen vorgenommen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Synthesen von den drei aphysiologischen Hydroxytryptophanen (4-, 6- und 7-OH-Trp) und den drei Hauptkontaminanten im SD-Trp durchgeführt werden. Bei diesen Hauptverunreinigungen handelt es sich um das EMS-assoziierte 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan (IMT) und den nicht EMS-assoziierten Substanzen 2-[2'',3''-Dihydroxy-1''-(3'-indolyl)-propyl]-tryptophan (dhPIT) und 1-(3'-Indolylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure (IMTHCC). Weiterhin sollten Untersuchungen hinsichtlich der Bildungsbedingungen dieser drei Hauptverunreinigungen durchgeführt werden.

Für die Synthese der OH-Trp-Isomere wurde ein effizienter Weg entwickelt, der es ermöglichte, alle drei OH-Trp-Isomere nach diesem Schema herzustellen. Er stellt eine Kombination aus einer REISSERT-Indolsynthese und der Graminmethode zur Darstellung von Trp dar. Durch gezielte Wahl der Edukte konnte eine isomerenreine Synthese erfolgen. Durch die Wahl, die aromatische und reaktive Hydroxylgruppe durch Umwandlung in einen Benzylether zu schützen, konnte die Synthese problemlos bis zum Endprodukt durchgeführt werden. Aufgrund der Instabilität der OH-Trp-Isomere müssen diese als Benzyloxytryptophan-Isomere gelagert werden. Die Abspaltung der Benzylgruppe erfolgt leicht mittels Hydrierung. Die entsprechenden Benzyloxy-Trp-Isomere wurden alle im Gramm-Maßstab hergestellt und können je nach Bedarf in die OH-Trp-Isomere umgewandelt werden. Da die Reinheit dieser Verbindungen >99% beträgt, sind sie für die Verwendung als HPLC-Referenzsubstanzen geeignet.

Die Darstellung von IMT wurde in einer siebenstufigen Synthese erreicht. Ausgehend von 2-Nitrobenzylchlorid wurde in vier Schritten der 2-(3'-Indolylmethyl)-indol-Grundkörper erhalten. Dieses gelang durch eine WITTIG-Ringschluß-Reaktion. An das 2-substituierte Indolderivat wurde über eine Cycloaddition mit 3-Brom-2-hydroxyiminopropansäureethylester die Aminosäurefunktion eingeführt. Nach Reduktion und basischer Verseifung wurde IMT in 11%-iger Gesamtausbeute in Referenzqualität erhalten. Bei der IMT-Bildung spielt das 3-Indolylmethyl-Kation eine wesentliche Rolle, da es resonanzstabilisiert ist und folglich eine längere Lebensdauer besitzt, als nichtstabilisierte Carbenium-Ionen. Durch diese Eigenschaft kann dieses Elektrophil Substitutionsreaktionen eingehen. Trp lag in der Fermentationslösung von SD als Hauptprodukt vor und fungierte als Abfänger dieses reaktiven Intermediates. Zur Untersuchung der IMT-Bildungsbedingungen wurden verschiedene 3-Indolylmethyl-Derivate, sowie Indol und Formal-

dehyd bei sauren und basischen pH-Werten untersucht. Bei Indolessigsäure und Indolpyruvat konnte keine IMT-Bildung nachgewiesen werden. 3-Indolylacetaldehyd (IAc) dagegen reagierte bei sauren pH-Werten unter IMT-Bildung. Der postulierte Mechanismus, daß IAc ein 3-Indolylmethyl-Kation unter Abspaltung von Formaldehyd ausbildet, konnte durch die Detektion von 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure aus Trp und Formaldehyd bewiesen werden. Die Umsetzung von 3-Indolylmethanol (IM) ergab sowohl unter sauren als auch basischen Bedingungen IMT. Indol und Formaldehyd reagierten intermediär zu IM und ergaben mit Trp ebenfalls IMT. Aufgrund der hohen Reaktivität von IM wurde diese Substanz für Modellversuche verwendet. Bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der IMT-Bildung wurden maximale Bildungs-raten bei pH=3 im sauren und bei pH=9 im basischen Milieu beobachtet. Bei einem mola-ren Verhältnis von 50:1 und höher zwischen Trp und IM erfolgte eine quantitative Umsetzung von IM zu IMT. Die Reaktion verläuft schnell und ist nach ca. 30 min abgeschlossen. Aufgrund der Ergebnisse, die aus der Untersuchung der Bildungsbedingungen von IMT aus IM und Trp erhalten wurden, wurde eine IMT-Schnellsynthese entwickelt, die eine Darstellung dieser Verbin-dung in einer einstufigen Synthese in zwei Tagen ermöglicht. Die über statistische Versuchspla-nung erhaltenen Zusammenhänge zwischen den Reaktionsparametern (pH-Wert, molares Ver-hältnis und Reaktionsdauer) und den Zielgrößen (IMT-Ausbeute und Bildung von Verunreini-gungen) wurden zu einer gezielten Optimierung der IMT-Schnellsynthese genutzt. Das so opti-mierte Verfahren ermöglichte die nahezu quantitative Abtrennung der Kontaminanten. Dadurch konnte die zeitaufwendige chemische de novo Synthese von IMT ersetzt werden und IMT schnell und effizient in 96%-iger Reinheit und Referenzqualität hergestellt werden.

Eine chemische Synthese von dhPIT wurde nach verschiedenen Synthesekonzepten versucht. Weder die Komplettsynthese noch die Darstellung aus 3-Indolylglycerin (IG) und Trp gelangen. Allerdings konnte dhPIT in situ aus D-(R)-Glycerinaldehyd, Indol und Trp synthetisiert werden. Damit wurde die Hypothese der Bildung von dhPIT aus dem Anaboliten IG und Trp bewiesen.

Das Carbolinsäure-Derivat IMTHCC wurde in einer zweistufigen Synthese in 99%-iger Reinheit dargestellt. Das dafür benötigte IAc wurde über Reduktion von 3-Indolylacetonitril erhalten. Der hochreaktive IAc mußte über das Natriumhydrogensulfit-Addukt stabilisiert werden. Über eine PICTET-SPENGLER-Reaktion unter sauren Bedingungen wurde das Diastereomeren-Gemisch aus cis- und trans-IMTHCC isoliert. Eine IMTHCC-Bildung wurde nur bei einem sauren pH-Wert nachgewiesen, da der Aldehyd basisch zerstört wird. IAc reagiert zwar bevorzugt zu IMTHCC, jedoch konnte auch IMT detektiert werden. Somit konnte die IMT-Bildung aus einem Trp-Metaboliten nachgewiesen werden.

Summary

The essential aromatic amino acid Trp is mainly produced by biotechnological processes. The epidemic outbreak in 1989 of an unknown disease, called the eosinophilia-myalgia syndrome (EMS), was traced back to the intake of contaminated Trp of certain lots from a single Japanese manufacturer, Showa Denko KK (SD). SD-Trp was manufactured by fermentation with genetically modified strains of *Bacillus amyloliquefaciens*. The producer purified and isolated Trp from the fermentation broth by using ion exchange resins followed by treatment with activated carbon and crystallisation of the product. It was found, that 6 of the 60 examined contaminants peaks to be associated with EMS. The topic of the present scientific research was the synthesis of the three aphysiologically hydroxytryptophanes (4-, 6- and 7-OH-Trp), the EMS-associated major contaminant 2-(3'-indolylmethyl)-tryptophan (IMT) and the non EMS-associated contaminants 2-[2'',3''-dihydroxy-1''-(3'-indolyl)-propyl]-tryptophan (dhPIT) and 1-(3'-indolylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (IMTHCC). Further, the formation conditions of the contaminants should be investigated.

The synthesis of the OH-Trp-isomers were achieved with a combination of the modified REISSERT-indole-synthesis to get the substituted indole-derivates and the gramis-method to obtain the appropriate tryptophan-derivates. A chemical synthesis for IMT was developed. Starting with o-nitrobenzylchloride the 2-substituted indole, 2-(3-indolylmethyl)-indole, was formed in a four step synthesis. Diels-Alder type cycloaddition between 2-substituted indole and 3-bromo-2-hydroxyiminopropanoate followed by reduction and ester hydrolysis affords IMT in good purity. A appropriate model system to investigate the IMT formation was created with IM and Trp. IM, a metabolite of Trp with physiological properties, is an excellent 3-indolylmethyl cation (IMC) former due to its high ability to eliminate water at different pH-values. Potential IMC-formers like IM, 3-indolylacetaldehyde (IAC) or indole and formaldehyde are able to react with Trp to form IMT at different pH-values. No IMT was detected under neutral conditions and moderate acidic and alkaline conditions, that is why a chemical formation of IMT during the fermentation process of SD is improbable. A high Trp level dominates in the fermentation broth during the purification over ion exchange resins. As a result of this, Trp is able to react with IMC to form IMT. Furthermore, a wide range of pH values (1-11) occurs during the ion exchange purification. Under such drastic conditions a chemical formation of IMT during the down stream process, after the fermentation can be expected.

A chemical synthesis of dhPIT failed, but it was possible to form dhPIT in situ from D-(R)-glyceraldehyde, indole and Trp at acidic pH-values <2. The probably formation during the purification process resulted from 3-indolylglycerine (an anabolite of Trp) and Trp under acidic conditions.

The β -carboline-3-carboxylic acid from Trp and IAC IMTHCC was synthesized in a two step procedure with a purity of 99%. IAC was obtained by reduction of 3-indolylacetonitrile and following stabilization in the corresponding sodiumhydrogensulfite-addukt. IMTHCC-formation was detected at acidic conditions. IAC is also able to form a IMC. Thus a competition reaction of IAC to form either IMTHCC or IMT and THCC is observed.

7. Anhang

7.1. Chemikalien und Geräte

7.1.1. Chemikalien

Trp wurde von den Firmen Ajinomoto (Japan) und der Amino GmbH (Deutschland) zur Verfügung gestellt. Sämtliche Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Aldrich und Sigma in Analysen- bzw. Synthesequalität erworben. Liste der verwendeten Gefahrstoffe:

Gefahrstoff		R-Sätze	S-Sätze
Acetonitril	T, F	11-23/24/25	16-27-45
Ammoniaklösung (25 %-ig)	Xi	36/37/38	2-26
Ammoniumchlorid	Xn	22-36	22
Benzol	T, F	45-11-E48/23/24/25	53-45
Benzylchlorid	T	22-23-37/38-40-41	36/37-38-45
1-Butanol	Xn	10-20	16
n-Butyllithium (1.6 M in n-Hexan)	F, C, Xn	11-14/15-17-34-48/20	6.1-7/9-26-33- 36/37/39-45
Chlorameisensäurebenzylester	T, C	34-37	26-45
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Chloroform-d ₁ (CDCl ₃)	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
DIBAH (1 M in Toluol)	F, C	11-23/24/25-34-14/15	16-45-26-36/37/39
Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat	F, Xi	11-14-36/37/38	26-28-43.12
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Diethylether	F⁺	12-19	9-16-29-33
Diisopropylether	F	11-19	9-16-33
Dimethylamin (40 %-ig)	F, Xi	11-36/37	26-29
Dimethylformamid	T	61-E20/21-36	53-45
N,N-Dimethylformamid- dimethylacetal	F	11	7-16-24/25
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Dioxan	Xn, F	11-36/37-40	16-36/37
Essigsäure (100%-ig)	C	10-35	2-23.2-26
Ethanol	F	11	7-16
Ethylacetat	F	11	16-23.2-29-33
Ethylbromopyruvat	Xi	36/37/38	
Formaldehyd (37%-ig)	T	23/24/25-34-40-43	26-36/37-44-51

Gefahrstoff		R-Sätze	S-Sätze
n-Hexan	F, Xn	11-48/20	9-16-24/25-29-51
Hydraziniumhydroxid (80%-ig)	T	45-23/24/25-34-43	53-26-36/37/39-45
Hydroxylaminsulfat	C	34-20/21/22	22-26-28-36/37/39
Indol	Xn	21/22	36/37
3-Indolylacetaldehyd	Xn	36/37/38	26-36
3-Indolylacetoneitril	Xn	20/21/22	36
Kaliumcarbonat	Xn	22-36	22-26
Kaliumhydroxid	C	35	26-37/39-45
Kalium- <i>tert</i> -butylat	F, C	11-14-34	8-16-26-36/37/39-43.6-45
Methanol	F, T	11-23/25	7-16-24-45
2-Methyl-3-nitrophenol	C	20/21/22-33-34	26-36/37/39-45
3-Methyl-2-nitrophenol	C	20/21/22-33-34	26-36/37/39-45
4-Methyl-3-nitrophenol	C	20/21/22-33-34	26-36/37/39-45
Natriumcarbonat	Xi	36	22-26
Natriumhydrogensulfid-Lsg. (39%-ig in Wasser)	Xn	22-36/37/38	
Natriumhydroxid	C	35	2-26-37/39
2-Nitrobenzylchlorid	Xi	36/37/38	
Petrolether, 50/70	F	11	9-16-29-33
Phosphorpentachlorid	C, Xi	34-37	7/8-26-45
2-Propanol	F	11	7-16
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
Pyrrolidin	F, C	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45
Raney-Nickel	Xn	40-43	22-36/37
Salzsäure (35 %ig)	C	34-37	2-26
Schwefelsäure (96%-ig)	C	35	26-30-45
Tetrahydrofuran	F, Xi	11-19-36/37	16-29-33
o-Toluidin	T	45-E23/25-36	53-45
Toluol	Xn, F	11-20-47	16-25-29-33-53
Triethylamin	F, Xi	11-36/37	16-26-29
Trifluoressigsäure	C	20-35	9-26-27-28.1-45
Triphenylphosphin	Xn, U	43-48/20/22-50-53	22-24-37
Weinsäure	Xi	36	24/25
Zink	F	15-17	7/8-43.3

7.1.2. Geräte

Kernresonanzspektrometer: Sämtliche ^1H -(400 MHz) und ^{13}C -(100.67 MHz)NMR Spektren wurden mit einem Bruker AMX 400 aufgenommen. Als interner Standard wurde CDCl_3 , DMSO oder TMS verwendet. Die Zuordnung der Signale erfolgte z.T. mittels Inkrementberechnungen und ^1H - ^1H -COSY- bzw. ^1H - ^{13}C -COSY Experimenten. Zur Auswertung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurde die WIN-NMR Software der Firma Bruker verwendet.

Massenspektrometer: Varian 311 A (70 eV)

IR-Spektrometer: ATI Mattson Genesis Series FTIRTM

Schmelzpunktbestimmung: Polarisationsmikroskop Olympus BH-2
Meller Heiztisch FP 800

UV-Detektion der DC: Hanau Fluotest (254 nm)

UV-Photometrie: Lambda 2 UV/VIS Spectrophotometer, Perkin Elmer

Gefriertrocknungsanlage: Christ LOC-2 Beta 1-16

Ethanol-Kältebad: Christ FOC-1 K 40

pH-Meter: pH Digi 520, WTW, Weilheim

HPLC-Anlage:

HPLC-Pumpe: Merck L-5000 LC Controller, Merck Hitachi 655A-12 Liquid Chromatograph

Aufgabensystem: Rheodyne-Ventil mit 20 μl Probenschleife

Detektor: LDC, Milton Roy, Spectro MonitorTM D
655 A Variable Wavelength UV Monitor, Merck Hitachi
F-1080 Fluorescence Detektor, Merck Hitachi

Auswertung: Chromstar Software Ver. 4.05, SCPA GmbH

7.1.3. Säulenmaterialien und Methoden

Adsorberharze: XAD-2, Fa. Sigma Chemicals

Ionenaustauscher

Kationenaustauscher: Typ: DOWEX-50 W (Sigma)
Matrix: Gel
Vernetzung 2%
Mesh: 200-400
Ionen-Form: H^+
Kapazität 0.6 meq./mL
pH-Bereich 0-14

Konditionierung:

1. Ionenaustauscher im dest. Wasser quellen.
2. in eine Säule füllen und dort weiter konditionieren
3. mit 1 M NaOH-Lösung waschen (entladen und mit Na^+ -beladen)
4. mit 1 M HCl-Lösung waschen (H^+ -beladen)
5. mit Wasser waschen bis pH neutral

Anionenaustauscher: Typ: DOWEX-1 (Sigma)
Matrix: Gel
Vernetzung 2%
Mesh: 200-400
Ionen-Form: Cl^-
Kapazität 0.6 meq./mL
pH-Bereich 0-14

Konditionierung:

1. Ionenaustauscher im dest. Wasser quellen.
2. in eine Säule füllen und dort weiter konditionieren
3. mit 2 M HCl-Lösung waschen (entladen und mit Cl^- -beladen)
4. mit 1 M NaOH-Lösung waschen (OH^- -beladen)
5. mit Wasser waschen bis pH neutral
6. mit 2 M Essigsäure-Lösung waschen (Acetat-beladen)
7. mit Wasser demin. Waschen bis neutral

Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (Korngröße 70-230 mesh), Merck

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel-Fertigfolien (Kieselgel 60, F₂₅₄), Merck

7.2. HPLC-Bedingungen

7.2.1. Reaktionsmonitoring der Hydroxytryptophan-Synthesen

Säule: Nucleosil 120-3 RP 18, 125x4 mm
mit 20x2 mm Vorsäule

Detektion: UV bei 280 nm

Flow: 1 mL/min

Temperatur: 25°C (RT)

Eluent: A: 0.1% TFA in bidest. Wasser
B: Acetonitril

min	A (%)	B (%)
0	90	10
15	60	40
17	60	40
18	90	10
23	90	10

7.2.2. Synthesen und Bildungsbedingungen von IMT, dhPIT und IMTHCC

Säule: Nucleosil 120-3 RP 18, 125x4 mm
mit 20x2 mm Vorsäule

Detektion: UV bei 220 nm oder 280 nm

Flow: 1 mL/min

Temperatur: 25°C (RT)

Eluent: A: 0.1% TFA in bidest. Wasser
B: Acetonitril

min	A (%)	B (%)
0	90	10
20	50	50
25	50	50
26	90	10
34	90	10

7.3. Synthese von 4-, 6- und 7-Hydroxytryptophan

7.3.1. Synthese von 6-Benzyloxy-2-nitrotoluol (4-OH-Trp)

Durchführung:

Eine Mischung aus 14,5 g (95 mmol) 2-Methyl-3-nitrophenol, 13 g (105 mmol) Benzylchlorid, 13 g (95 mmol) wasserfreies Kaliumcarbonat und 95 mL DMF wurde 1,5 h bei 90°C erhitzt. Das DMF wurde am Vakuumrotationsverdampfer entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt mit 46 mL 1 M NaOH-Lösung versetzt und die Suspension 30 min bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 95 mL Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter Vakuum bis zur Trockne eingengt. Nach dem Erkalten bildete sich ein gelber Feststoff. Das Rohprodukt wurde in 30 mL Methanol umkristallisiert. Der gelbe Feststoff wurde abgesaugt, mit kaltem Methanol gewaschen und getrocknet.

Reaktionsverfolgung:

DC

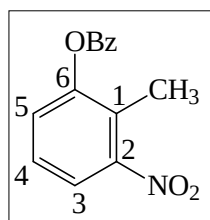
mobile Phase: n-Hexan/Dichlormethan
(1:1; V:V)

R_F-Wert: 0.60

Ausbeute:

18,1 g (74 mmol) 6-Benzyloxy-2-nitrotoluol (78%, bezogen auf 2-Methyl-3-nitrophenol).

Charakterisierung:



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=2.40 (s, 3H, CH₃), 5.12 (s, 2H, CH₂), 7.08 (d, 1H, H-5), 7.12 (dd, 1H, H-4), 7.30-7.44 (m, 6H, H-3 und H_{phenyl}) ppm.

Kopplungskonstanten:

³J_{H-3,H-4}=7.8, ³J_{H-4,H-5}=8.1 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ=11.8 (CH₃), 70.9 (CH₂), 115.4 (C-3), 116.1 (C-5), 122.5 (C-1), 126.7 (C-4), 127.2-136.3 (5C, C_{phenyl}), 148.9 (C-2), 157.5 (C-6) ppm.

MS (70 eV, EI): 243 (27, M⁺), 227 (4), 165 (3), 153 (5), 152 (10), 121 (3), 105 (52), 92 (8), 91 (100, C₇H₇), 89 (1), 77 (1), 65 (9), 52 (2).

IR (KBr): 657 (w), 703 (s), 735 (m), 756 (m), 783 (m), 794 (m), 836 (m), 993 (m), 1004 (m), 1021 (m), 1053 (s, Ether), 1176 (m), 1191 (m), 1212 (m), 1264 (s, Ether), 1305 (w), 1363 (s, NO₂), 1461 (m), 1453 (m), 1499 (m), 1523 (s, NO₂), 1534 (s), 1606 (m), 2881 (m), 2935 (w), 2985 (w), 3096 (w).

Schmelzpunkt: 62°C

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	69.1	5.3	5.8
gefunden [%]	69.2	5.4	5.9

7.3.2. Synthese von 4-Benzyloxy-2-nitrotoluol (6-OH-Trp)**Durchführung:**

Eine Mischung aus 10 g (65 mmol) 4-Methyl-3-nitrophenol, 9.1 g (80 mmol) Benzylchlorid, 9 g (65 mmol) wasserfreies Kaliumcarbonat und 65 mL DMF wurde 1.5 h bei 90°C erhitzt. Das DMF wurde am Vakuumrotationsverdampfer entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt mit 32 mL 1 M NaOH-Lösung versetzt und die Suspension 30 min bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 65 mL Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter Vakuum bis zur Trockne eingengt. Nach dem Erkalten bildet sich ein gelber Feststoff. Das Rohprodukt wurde in 20 mL Methanol umkristallisiert. Der gelbe Feststoff wurde abgesaugt, mit kaltem Methanol gewaschen und getrocknet.

Reaktionsverfolgung:**DC**

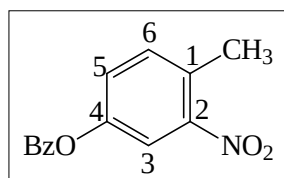
mobile Phase: n-Hexan/Dichlormethan

(1:1; V:V)

R_F-Wert: 0.55

Ausbeute:

10.6 g (44 mmol) 4-Benzyloxy-2-nitrotoluol (68%, bezogen auf 4-Methyl-3-nitrophenol).

Charakterisierung:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=2.62 (s, 3H, CH₃), 5.29 (s, 2H, CH₂), 7.47-7.72 (m, 8H, H-3, H-5, H-6 und H_{phenyl}.) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ=18.3 (CH₃), 70.6 (CH₂), 110.4 (C-3), 120.4 (C-5), 125.5 (C-1), 127.7-128.6 (5C, C_{phenyl}), 133.6 (C-6), 136.9 (C_{phenyl}), 150.0 (C-2), 157.7 (C-6) ppm.

MS (70 eV, EI): 243 (5, M⁺), 92 (8), 91 (100, C₇H₇), 89 (1), 65 (7).

IR (KBr): 697 (m), 747 (m), 813 (m), 837 (w), 847 (w), 863 (w), 1014 (s, Ether), 1079 (w), 1154 (w), 1199 (w), 1232 (s, Ether), 1282 (m), 1307 (m), 1344 (s, NO₂), 1382 (m), 1407 (w), 1452 (m), 1465 (w), 1508 (m), 1518 (s, NO₂), 1569 (w), 2853 (w), 2935 (w), 2935 (w), 3031 (w), 3094 (w).

Schmelzpunkt: 50°C

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	69.1	5.3	5.8
gefunden [%]	69.1	5.4	5.8

7.3.3. Synthese von 3-Benzyloxy-2-nitrotoluol (7-OH-Trp)

Durchführung:

Eine Mischung aus 11.7 g (76 mmol) 3-Methyl-2-nitrophenol, 10.6 g (84 mmol) Benzylchlorid, 11 g (76 mmol) wasserfreies Kaliumcarbonat und 75 mL DMF wurde 1.5 h bei 90°C erhitzt. Das DMF wurde am Vakuumrotationsverdampfer entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt mit 37 mL 1 M NaOH-Lösung versetzt und die Suspension 30 min bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 75 mL Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der verbleibende braun-ölige Rückstand wurde in 20 mL Methanol umkristallisiert. Der gelbe Feststoff wurde abgesaugt, mit kaltem Methanol gewaschen und getrocknet.

Reaktionsverfolgung:

DC

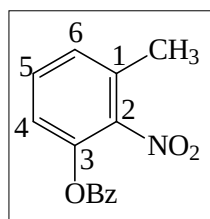
mobile Phase: n-Hexan/Dichlormethan
(1:1; V:V)

R_F-Wert: 0.53

Ausbeute:

13.6 g (55 mmol) 3-Benzyloxy-2-nitrotoluol (73%, bezogen auf 3-Methyl-2-nitrophenol).

Charakterisierung:



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=2.30 (s, 3H, CH₃), 5.14 (s, 2H, CH₂), 6.82-7.35 (m, 8H, H-4, H-5, H-6 und H_{phenyl}.) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ=16.9 (CH₃), 70.9 (CH₂), 111.6 (C-4), 122.9 (C-6), 127.0-128.7 (5C, C_{phenyl}), 130.5 (C-1 und C-2), 131.1 (C-5), 135.7 (C_{phenyl}), 149.8 (C-3) ppm.

MS (70 eV, EI): 243 (10, M⁺), 137 (9), 92 (9), 91 (100, C₇H₇⁺), 89 (1), 77 (1), 66 (1), 65 (9), 51 (1).

IR (KBr): 658 (m), 698 (m), 742 (m), 756 (m), 775 (m), 850 (m), 910 (w), 1000 (w), 1002 (w), 1028 (w), 1064 (m, Ether), 1085 (m), 1220 (w), 1251 (m), 1273 (s, Ether), 1370 (m), 1449 (m), 1463 (m), 1477 (m), 1499 (m), 1531 (s, NO₂), 1582 (m), 1615 (m), 1722 (m), 2873 (w), 2962 (w), 3037 (w), 3065 (w), 3370 (w), 3425 (m).

Schmelzpunkt: 36°C

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	69.1	5.3	5.8
gefunden [%]	69.2	5.4	5.7

7.3.4. Synthese von (E)-6-Benzoyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren (4-OH-Trp)

Durchführung:

Zu einer Lösung aus 17.5 g (72 mmol) 6-Benzoyloxy-2-nitrotoluol in 40 mL DMF wurden 10.2 g (84 mmol) N,N-Dimethylformamid-dimethylacetal und 5.9 g (84 mmol) Pyrrolidin gegeben. Die Lösung wurde unter Schutzgas 3 h zum Sieden erhitzt. Die flüchtigen Bestandteile wurden am Rotationsverdampfer entfernt und der blutrote Rückstand in 20 mL Dichlormethan und 160 mL Methanol gelöst. Die Lösung wurde auf ein Volumen von 140 mL unter Vakuum eingeeengt und dann auf 5°C abgekühlt, wobei ein roter Feststoff auskristallisiert. Dieser wurde abgesaugt und mit kaltem Methanol gewaschen. Die Mutterlauge wurde verdampft und der rote Rückstand in Methanol umkristallisiert, abgesaugt und gewaschen. Es wurden rot-glänzende Blättchen erhalten.

Reaktionsverfolgung:

DC

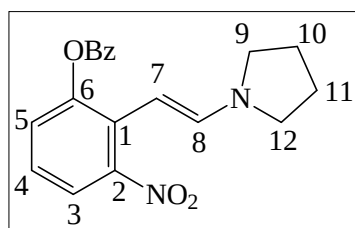
mobile Phase: Diethylether/Petrolether
(1:1; V:V)

R_F-Wert: 0.52

Ausbeute:

22.7 g (70 mmol) (E)-6-Benzoyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren (97%, bezogen 6-Benzoyloxy-2-nitrotoluol).

Charakterisierung:



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ =1.88 (m, 4H, H-10 und H-11), 3.17 (m, 4H, H-9 und H-12), 5.12 (s, 2H, CH₂), 5.30 (d, 1H, H-8), 6.86 (dd, H-4), 6.98 (d, H-5), 7.26 (d, H-3) 7.33-7.48 (m, 5H, H_{phenyl}), 7.78 (d, 1H, H-7) ppm.

Kopplungskonstanten:

³J_{H-3,H-4}=7.9, ³J_{H-4,H-5}=8.0, ³J_{H-7,H-8}=16.2 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ =25.2 (C-10 und C-11), 48.6 (C-9 und C-12), 71.3 (CH₂), 86.4 (C-8), 114.9 (C-3), 117.4 (C-5), 121.0 (C-4), 124.6 (C-1), 127.7-128.6 (5C, C_{phenyl}), 136.5 (C-2), 143.5 (C-7), 147.8 (C_{phenyl}), 155.5 (C-6) ppm.

MS (70 eV, EI): 324 (28, M⁺), 308 (2), 307 (10), 234 (13), 233 (79, C₇H₇⁺), 216 (23), 187 (10), 186 (24), 173 (10), 148 (9), 118 (27), 112 (14), 98 (40), 91 (100, C₇H₇⁺), 84 (12), 71 (11), 70 (42), 65 (11), 56 (23), 55 (71).

IR (KBr): 703 (m), 753 (m), 775 (w), 845 (w), 948 (w), 1036 (m, Ether), 1098 (w), 1147 (m), 1167 (w), 1181 (w), 1209 (m), 1224 (m), 1239 (m), 1260 (s, Ether), 1293 (m), 1314 (m), 1360 (m), 1392 (s), 1457 (m), 1480 (m), 1511 (s, NO₂), 1584 (s), 1617 (s), 2853 (m), 2919 (w), 2951 (w), 2963 (w).

Schmelzpunkt: 92°C

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	70.7	6.2	8.6
gefunden [%]	70.4	6.2	8.6

7.3.5. Synthese von (E)-4-Benzoyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren (6-OH-Trp)

Durchführung:

Zu einer Lösung aus 8 g (33 mmol) 4-Benzoyloxy-2-nitrotoluol in 18 mL DMF wurden 4.7 g (38 mmol) N,N-Dimethylformamiddimethylacetal und 2.9 g (38 mmol) Pyrrolidin gegeben. Die Lösung wurde unter Schutzgas 5.5 h zum Sieden erhitzt. Die flüchtigen Bestandteile wurden am Rotationsverdampfer entfernt und der blutrote Rückstand in 9 mL Dichlormethan und 72 mL Methanol gelöst. Die Lösung wurde auf ein Volumen von 63 mL unter Vakuum eingeeengt und dann auf 5°C abgekühlt, wobei ein roter Feststoff auskristallisiert. Dieser wurde abgesaugt und mit kaltem Methanol gewaschen. Die Mutterlauge wurde verdampft und der rote Rückstand in Methanol umkristallisiert, abgesaugt und gewaschen. Es wurden rot-glänzende Blättchen erhalten.

Reaktionsverfolgung:

DC

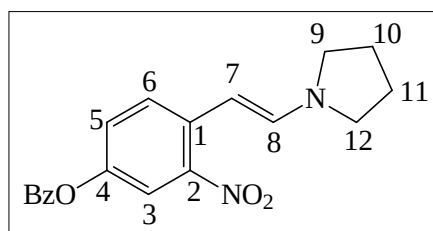
mobile Phase: Diethylether/Petrolether
(1:1; V:V)

R_F-Wert: 0.25

Ausbeute:

9.5 g (29 mmol) (E)-4-Benzoyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren (88%, bezogen 4-Benzoyloxy-2-nitrotoluol).

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ =1.94 (m, 4H, H-10 und H-11), 3.29 (m, 4H, H-9 und H-12), 5.05 (s, 2H, CH_2), 5.85 (d, 1H, H-8), 7.05 (d, 1H, H-5), 7.10 (d, 1H, H-7) 7.30-7.45 (m, 6H, H-6 und H_{phenyl}), 7.50 (s, 1H, H-3) ppm.

Kopplungskonstanten:

$^3J_{\text{H-5,H-6}}$ =7.9, $^3J_{\text{H-7,H-8}}$ =16.3 Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ =25.3 (C-10 und C-11), 49.1 (C-9 und C-12), 70.5 (CH_2), 91.6 (C-8), 109.5 (C-3), 122.2 (C-5), 125.7 (C-6), 127.6-128.7 (5C, C_{phenyl}), 130.0 (C-1), 136.7 (C_{phenyl}), 139.5 (C-7), 154.1 (C-4) ppm.

MS (70 eV, EI): 324 (21, M^+), 307 (4), 233 (100, C_7H_7), 226 (5), 216 (4), 187 (5), 186 (15), 163 (3), 159 (20), 132 (3), 131 (10), 112 (8), 99 (3), 92 (7), 91 (80, C_7H_7), 90 (3), 71 (9), 70 (16), 65 (6).

IR (KBr): 705 (m), 759 (m), 823 (m), 938 (m), 1008 (s, Ether), 1109 (m), 1141 (s), 1176 (m), 1198 (m), 1220 (m), 1275 (s, Ether), 1332 (m), 1346 (m), 1369 (m), 1395 (s), 1449 (m), 1509 (s, NO_2), 1554 (m), 1607 (s), 2842 (w), 2971 (w).

Schmelzpunkt: 110.5°C

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	70.7	6.2	8.6
gefunden [%]	70.1	6.3	8.6

7.3.6. Synthese von (E)-3-Benzoyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren (7-OH-Trp)

Durchführung:

Zu einer Lösung aus 13 g (53 mmol) 3-Benzoyloxy-2-nitrotoluol in 30 mL DMF wurden 7.8 g (64 mmol) N,N-Dimethylformamiddimethylacetal und 4.5 g (64 mmol) Pyrrolidin gegeben. Die Lösung wurde unter Schutzgas 3 h zum Sieden erhitzt. Die flüchtigen Bestandteile wurden am Rotationsverdampfer entfernt und der blutrote Rückstand in 15 mL Dichlormethan und 123 mL Methanol gelöst. Die Lösung wurde auf ein Volumen von 100 mL unter Vakuum eingeeengt und dann auf 5°C abgekühlt. Das Produkt kristallisiert nicht aus und wurde nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer direkt weiter umgesetzt.

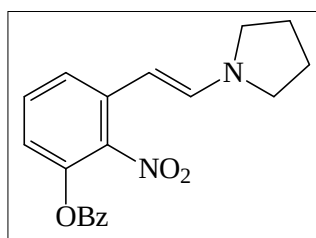
Reaktionsverfolgung:

DC

mobile Phase: Diethylether/Petrolether
(1:1; V:V)

R_fWert: 0.15

Charakterisierung:



Das Produkt wurde ohne Charakterisierung für die nächste Reaktionsstufe eingesetzt.

7.3.7. Synthese von 4-Benzoyloxyindol (4-OH-Trp)

Durchführung:

Zu einer Lösung aus 22.2 g (68 mmol) (E)-6-Benzoyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren in 140 mL THF und 140 mL Methanol wurden bei 30°C unter Schutzgas nacheinander 1.4 mL Raney Nickel und 6.0 mL (103 mmol) Hydrazinhydroxid (85 %) gegeben. Eine kräftige Gasentwicklung wurde beobachtet. Die zuerst rote Lösung verfärbte sich dunkelbraun wobei die Reaktionstemperatur auf 46°C ansteigt. Im Abstand von 30 min wurden noch zweimal weitere 6.0 mL Hydrazinhydroxid (85 %) zugegeben. Die Temperatur wurde für 2 h nach der letzten Zugabe zwischen 45-50°C gehalten. Anschließend wurde der Katalysator mittels Filtration durch ein Bett aus Celiten entfernt und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde bis zur Trockne eingedunstet und Wasserreste mit Toluol azeotrop entfernt. Das Rohprodukt wurde in wenig Toluol/Cyclohexan (1:1) gelöst und durch Säulenchromatographie über Kieselgel mit Toluol/Cyclohexan (1:1) als Eluent gereinigt. Das Eluat wurde unter Vakuum eingedunstet und die resultierenden weißen Kristalle aus einer Mischung aus Toluol/Cyclohexan (1:4; V:V) umkristallisiert.

Reaktionsverfolgung:

DC

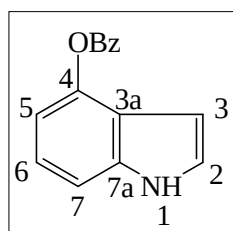
mobile Phase: Diethylether/Petrolether
(1:2; V:V)

R_f Wert: 0.33

Ausbeute:

11.2 g (50 mmol) 4-Benzoyloxyindol (74%, bezogen (E)-6-Benzoyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren).

Charakterisierung:



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ =5.22 (s, 2H, CH₂), 6.57 (d, 1H, H-5), 6.72 (d, 1H, H-3), 7.03 (d, 1H, H-7), 7.06 (dd, 1H, H-6), 7.11 (d, 1H, H-2), 7.22-7.50 (m, 5H, H_{phenyl}), 8.09 (s, 1H, NH) ppm.

Kopplungskonstanten:

³J_{H-2,H-3}=2.9, ³J_{H-5,H-6}=7.6, ³J_{H-6,H-7}=7.8 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ =69.9 (CH₂), 100.1 (C-3), 101.1 (C-5), 104.6 (C-7), 118.9 (C-3a), 122.6 (C-6), 122.7 (C-2), 127.3-128.5 (5C, C_{phenyl}), 137.3 (C-7a), 137.6 (C_{phenyl}), 152.6 (C-4) ppm.

MS (70 eV, EI): 223 (40, M⁺), 132 (50, C₇H₇), 104 (23), 91 (100, C₇H₇), 77 (1), 65 (4).

IR (KBr): 505 (s), 522 (m), 692 (s), 724 (s), 728 (m), 750 (s), 851 (m), 914 (m), 963 (m), 1012 (s), 1048 (s, Ether), 1079 (s), 1122 (m), 1171 (m), 1207 (m), 1241 (s, Ether), 1280 (s), 1360 (s), 1381 (m), 1413 (s), 1439 (m), 1453 (m), 1468 (m), 1501 (s), 1586 (s), 1611 (m), 2885 (m), 2940 (m), 3030 (m), 3064 (m), 3110 (m), 3132 (m), 3433 (s, NH).

Schmelzpunkt: 61°C

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	80.6	5.8	6.3
gefunden [%]	80.6	5.9	6.3

7.3.8. Synthese von 6-Benzoyloxyindol (6-OH-Trp)

Durchführung:

Zu einer Lösung aus 9.2 g (28 mmol) (E)-4-Benzoyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren in 60 mL THF und 60 mL Methanol wurden bei 30°C unter Schutzgas nacheinander 0.6 mL Raney Nickel und 2.5 mL (42 mmol) Hydrazinhydroxid (85 %) gegeben. Eine kräftige Gasentwicklung wurde beobachtet. Die zuerst rote Lösung verfärbte sich dunkelbraun wobei die Reaktionstemperatur auf 46°C ansteigt. Im Abstand von 30 min wurden noch zweimal weitere 2.5 mL Hydrazinhydroxid (85%) zugegeben. Die Temperatur wurde für 2 h nach der letzten Zugabe zwischen 45-50°C gehalten. Anschließend wurde der Katalysator mittels Filtration durch ein Bett aus Celiten entfernt und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde bis zur Trockne eingedunstet und Wasserreste mit Toluol azeotrop entfernt. Das Rohprodukt wurde in wenig Toluol/Cyclohexan (1:1) gelöst und durch Säulenchromatographie über Kieselgel mit Toluol/Cyclohexan (1:1) als Eluent gereinigt. Das Eluat wurde unter Vakuum eingedunstet und die resultierenden weißen Kristalle aus einer Mischung aus Toluol/Cyclohexan (1:3; V:V) umkristallisiert.

Reaktionsverfolgung:

DC

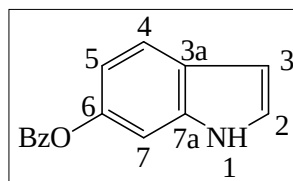
mobile Phase: Diethylether/Petrolether
(1:2; V:V)

R_f Wert: 0.32

Ausbeute:

4.06 g (18 mmol) 6-Benzoyloxyindol (64%, bezogen (E)-4-Benzoyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren).

Charakterisierung:



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ =5.10 (s, 2H, CH₂), 6.47 (d, 1H, H-3), 6.88 (d, 1H, H-5), 6.91 (d, 1H, H-7), 7.07 (d, 1H, H-2), 7.29-7.44 (m, 5H, H_{phenyl}), 7.52 (d, 1H, H-4), 7.96 (s, 1H, NH) ppm.

Kopplungskonstanten:

³J_{H-2,H-3}=3.2, ³J_{H-4,H-5}=8.2 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ =70.7 (CH₂), 96.0 (C-7), 102.5 (C-5), 110.7 (C-3), 121.2 (C-4), 122.4 (C-3a), 123.1 (C-2), 127.5-128.5 (5C, C_{phenyl}), 136.4 (C-7a), 137.6 (C_{phenyl}), 155.6 (C-6) ppm.

MS (70 eV, EI): 233 (36, M⁺), 133 (10), 132 (100, C₇H₇), 104 (21), 103 (1), 92 (7), 91 (91, C₇H₇), 89 (3), 78 (3), 77 (9), 76 (2), 65 (13), 63 (2), 52 (1), 51 (5).

IR (KBr): 518 (m), 536 (m), 626 (s), 698 (s), 721 (s), 744 (s), 763 (s), 815 (s), 825 (s), 848 (m), 898 (m), 916 (m), 939 (m), 958 (s), 996 (s), 1063 (m), 1091 (s, Ether), 1124 (s), 1175 (s), 1219 (s), 1253 (s, Ether), 1292 (s), 1325 (m), 1343 (s), 1378 (m), 1405 (s), 1456 (s), 1496 (m), 1508 (m), 1579 (m), 1623 (s), 1886 (m), 2873 (m), 2917 (m), 2931 (m), 2946 (m), 3008 (m), 3029 (m), 3064 (m), 3100 (m), 3365 (s)-3388 (s) (NH).

Schmelzpunkt: 117°C

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	80.6	5.8	6.3
gefunden [%]	80.3	5.8	6.2

7.3.9. Synthese von 7-Benzoyloxyindol (7-OH-Trp)

Durchführung:

Zu einer Lösung aus 10 g (31 mmol) (E)-3-Benzoyloxy-2-nitro- β -pyrrolidinostyren in 60 mL THF und 60 mL Methanol wurden bei 30°C unter Schutzgas nacheinander 0.63 mL Raney Nickel und 2.7 mL (46 mmol) Hydrazinhydroxid (85 %) gegeben. Eine kräftige Gasentwicklung wurde beobachtet. Die zuerst rote Lösung verfärbte sich dunkelbraun wobei die Reaktionstemperatur auf 46°C ansteigt. Im Abstand von 30 min wurden noch zweimal weitere 2.7 mL Hydrazinhydroxid (85%) zugegeben. Die Temperatur wurde für 2 h nach der letzten Zugabe zwischen 45-50°C gehalten. Anschließend wurde der Katalysator mittels Filtration durch ein Bett aus Celiten entfernt und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde bis zur Trockne eingedunstet und Wasserreste mit Toluol azeotrop entfernt. Das Rohprodukt wurde in wenig Toluol/Cyclohexan (1:1) gelöst und durch Säulenchromatographie über Kieselgel mit Toluol/Cyclohexan (1:1) als Eluent gereinigt. Das Eluat wurde unter Vakuum eingedunstet und die resultierenden weißen Kristalle aus einer Mischung aus Toluol/Cyclohexan (1:3; V:V) umkristallisiert.

Reaktionsverfolgung:

DC

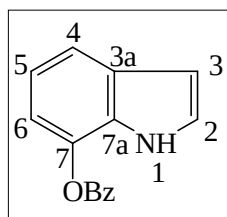
mobile Phase: Diethylether/Petrolether
(1:2; V:V)

R_f Wert: 0.68

Ausbeute:

6.91 g (31 mmol) 7-Benzoyloxyindol (58%, bezogen 3-Benzoyloxy-2-nitrotoluol).

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ =5.18 (s, 2H, CH_2), 6.52 (d, 1H, H-3), 6.70 (dd, 1H, H-5), 7.02 (d, 1H, H-6), 7.12 (d, 1H, H-2), 7.26 (d, 1H, H-4), 7.32-7.48 (m, 5H, H_{phenyl}), 8.36 (s, 1H, NH) ppm.

Kopplungskonstanten:

$^3J_{\text{H-2,H-3}}$ =3.2, $^3J_{\text{H-4,H-5}}$ =8.2, $^3J_{\text{H-5,H-6}}$ =7.6 Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ =70.2 (CH_2), 102.8 (C-6), 103.0 (C-5), 113.7 (C-3), 120.1 (C-4), 123.7 (C-2), 126.6 (C-3a), 127.8-128.6 (5C, C_{phenyl}), 129.3 (C-7a), 137.1 (C_{phenyl}), 145.4 (C-7) ppm.

MS (70 eV, EI): 223 (27, M^+), 132 (9), 105 (1), 104 (15), 92 (8), 91 (100, C_7H_7), 89 (2), 78 (2), 77 (5), 76 (1), 65 (9), 63 (1), 51 (3).

IR (KBr): 532 (w), 696 (m), 719 (s), 730 (s), 755 (m), 784 (s), 969 (m), 1026 (w), 1070 (s, Ether), 1109 (m), 1174 (w), 1213 (w), 1255 (s, Ether), 1290 (m), 1338 (m), 1363 (w), 1379 (m), 1419 (m), 1440 (m), 1490 (m), 1577 (s), 1627 (w), 2861 (w), 3370 (s, NH), 3401 (m).

Schmelzpunkt: 74°C

Elementaranalyse:

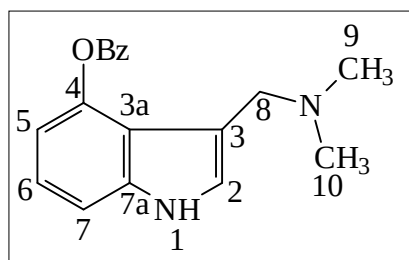
Element	C	H	N
berechnet [%]	80.6	5.8	6.3
gefunden [%]	80.9	6.0	6.3

7.3.10. Synthese von 4-Benzoyloxygramin**Durchführung:**

Unter Eiskühlung wurden 36 mL Dioxan, 36 mL Eisessig, 2.9 mL 37%ige Formaldehydlösung und 8 mL 40%ige Dimethylaminlösung gerührt. Eine Lösung aus 8 g (36 mmol) 4-Benzoyloxyindol, gelöst in 36 mL Dioxan, wurde innerhalb von 20 min zu der eiskühlten Lösung getropft. Die Lösung wurde 2 h unter Eiskühlung und anschließend 24 h bei RT gerührt. Danach wurden 260 mL Wasser hinzugegeben und das Gramin mit 1 M NH_3 -Lösung ausgefällt. Der weiße Feststoff wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Ausbeute:

10.5 g (36 mmol) 4-Benzoyloxygramin (100%, bezogen auf 4-Benzoyloxyindol).

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ =2.08 (s, 3H, H-9), 2.10 (s, 3H, H-10), 3.64 (s, 2H, H-8), 5.14 (s, 2H, CH_2), 6.49 (dd, 1H, H-6), 6.94 (d, 1H, H-5), 6.98 (d, 1H, H-7), 7.03 (s, 1H, H-2), 7.5-7.57 (m, 5H, H_{phenyl}) ppm.

Kopplungskonstanten:

$^3J_{\text{H-5,H-6}}$ =7.2, $^3J_{\text{H-6,H-7}}$ =8.1 Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO): δ = 45.4 (C-9 und C-10), 55.7 (C-8), 69.9 (CH_2), 101.1 (C-7), 105.9 (C-5), 112.4 (C-3), 118.2 (C-3a), 122.5 (C-6), 124.3 (C-2), 128.4-129.2 (5C, C_{phenyl}), 137.8 (C_{phenyl}), 138.5 (C-7a), 154.0 (C-4) ppm.

MS (70 eV, EI): 280 (M^+), 277 (1), 237 (1), 236 (7), 235 (30), 234 (3), 208 (5), 189 (2), 146 (6), 145 (3), 117 (4), 92 (9), 91 (100, C_7H_7), 89 (6), 77 (1), 65 (11), 63 (6), 51 (2).

IR (KBr): 692 (m), 712 (m), 726 (s), 755 (s), 782 (m), 820 (m), 833 (m), 848 (m), 969 (m), 1000 (m), 1079 (s, Ether), 1174 (m), 1247 (s, Ether), 1260 (s), 1284 (m), 1352 (m), 1363 (m), 1378 (m), 1439 (m), 1453 (s), 1513 (s), 1542 (m), 1586 (m), 2701 (m), 2711 (m), 2749 (m), 2770 (s), 2979 (m), 3003 (m), 3033-3138 (m, NH).

Schmelzpunkt: 168°C

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	77.1	7.1	10.0
gefunden [%]	77.2	7.3	9.9

7.3.11. Synthese von 6-Benzoyloxygramin

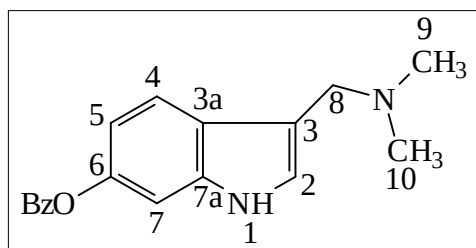
Durchführung:

Unter Eiskühlung wurden 18 mL Dioxan, 18 mL Eisessig, 1.47 mL 37%-ige Formaldehydlösung und 4 mL 40%-ige Dimethylaminlösung gerührt. Eine Lösung aus 4 g (18 mmol) 6-Benzoyloxyindol, gelöst in 18 mL Dioxan, wurde innerhalb von 20 min zu der eisgekühlten Lösung getropft. Die Lösung wurde 2 h unter Eiskühlung und anschließend 24 h bei RT gerührt. Danach wurden 130 mL Wasser hinzugegeben und das Gramin mit 1 M NH_3 -Lösung ausgefällt. Der weiße Feststoff wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Ausbeute:

5 g (18 mmol) 6-Benzoyloxygramin (100%, bezogen auf 6-Benzoyloxyindol).

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ =2.24 (s, 3H, H-9), 2.28 (s, 3H, H-10), 3.23 (s, 2H, H-8), 4.88 (s, 2H, CH_2), 6.48 (d, 1H, H-5), 6.70 (s, 1H, H-7), 6.81 (s, 1H, H-2), 7.07-7.19 (m, 5H, H_{phenyl}), 7.24 (d, 1H, H-4), ppm.

Kopplungskonstanten:

$^3J_{\text{H-4,H-5}}$ =8.6 Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO): δ = 40.2 (C-9), 41.0 (C-10), 55.4 (C-8), 70.3 (CH_2), 96.7 (C-7), 110.0 (C-5), 112.6 (C-3), 120.6 (C-4), 123.0 (C-3a), 124.0 (C-2), 128.4-129.2 (5C, C_{phenyl}), 137.8 (C_{phenyl}), 138.5 (C-7a), 155.3 (C-6) ppm.

MS (70 eV, EI): 282 (8, M^+), 280 (11), 237 (2), 236 (8), 235 (13), 146 (5), 145 (4), 118 (5), 117 (3), 92 (8), 91 (100, C_7H_7^+), 89 (4), 77 (1), 65 (11), 63 (3), 51 (1), 45 (14).

IR (KBr): 590 (m), 696 (m), 736 (s), 801 (s), 817 (s), 844 (m), 1001 (s, Ether), 1024 (m), 1112 (m), 1126 (m), 1146 (m), 1170 (s), 1242 (m), 1262 (m, Ether), 1277 (m), 1309 (m), 1341 (m), 1460 (s), 1544 (m), 2620 (m), 2678 (m), 2713 (m), 2777 (s), 2817 (s), 2848 (m), 2861 (m), 2881 (m), 2933 (m), 2959 (m), 2990 (m), 3019 (m)-3081 (m) (NH).

Schmelzpunkt: 136°C

Elementaranalyse:

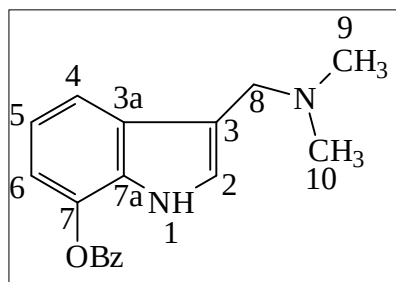
Element	C	H	N
berechnet [%]	77.1	7.1	10.0
gefunden [%]	76.9	7.3	9.9

7.3.12. Synthese von 7-Benzoyloxygramin**Durchführung:**

Unter Eiskühlung wurden 30 mL Dioxan, 30 mL Eisessig, 2.4 mL 37%-ige Formaldehydlösung und 6.7 mL 40%-ige Dimethylaminlösung gerührt. Eine Lösung aus 6.6 g (30 mmol) 7-Benzoyloxy-indol, gelöst in 30 mL Dioxan, wurde innerhalb von 20 min zu der eiskühlten Lösung getropft. Die Lösung wurde 2 h unter Eiskühlung und anschließend 24 h bei RT gerührt. Danach wurden 220 mL Wasser hinzugegeben und das Gramin mit 1 M NH_3 -Lösung ausgefällt. Der weiße Feststoff wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Ausbeute:

7.42 g (26 mmol) 7-Benzoyloxygramin (87%, bezogen auf 7-Benzoyloxyindol).

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ =2.24 (s, 3H, H-9), 2.28 (s, 3H, H-10), 3.64 (s, 2H, H-8), 5.38 (s, 2H, CH_2), 6.85 (dd, 1H, H-5), 7.03 (d, 1H, H-6), 7.26 (s, 1H, H-2), 7.33 (d, 1H, H-4), 7.42-7.71 (m, 5H, H_{phenyl}) ppm.

Kopplungskonstanten:

$^3J_{\text{H-4,H-5}}$ =8.3, $^3J_{\text{H-6,H-6}}$ =7.6 Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO): δ = 39.8 (C-9), 41.0 (C-10), 55.3 (C-8), 70.0 (CH_2), 103.7 (C-5), 112.4 (C-3), 113.0 (C-6), 119.7 (C-4), 125.0 (C-2), 127.4 (C-3a), 128.4-129.2 (5C, C_{phenyl}), 130.1 (C-7a), 138.3 (C_{phenyl}), 138.5 (C-7a), 145.9 (C-7) ppm.

MS (70 eV, EI): 280 (5, M^+), 236 (12), 235 (20), 234 (13), 129 (6), 92 (5), 91 (100, C_7H_7), 65 (12), 45 (11).

IR (KBr): 697 (w), 719 (m), 729 (m), 754 (w), 811 (w), 1006 (s, Ether), 1039 (s), 1065 (m), 1124 (w), 1240 (s, Ether), 1261 (s), 1344 (m), 1380 (m), 1434 (w), 1459 (m), 1499 (m), 1562 (w), 1577 (m), 1655 (w), 1720 (w), 1729 (w), 2106 (w), 2172 (w), 2197 (w), 2222 (w), 2252 (m), 2281 (m), 2345 (m), 2769 (m), 2788 (w), 2819 (m), 2859 (w), 2935 (w), 2985 (w).

Schmelzpunkt: 142°C

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	77.1	7.1	10.0
gefunden [%]	77.2	7.3	9.9

7.3.13. Synthese von 4-Benzoyloxyskatylformamidomalonester

Durchführung:

Eine Mischung aus 5 g (18 mmol) 4-Benzoyloxygramin, 6 g (30 mmol) Formamidomalonat, 0.5 g NaOH und 75 mL Toluol wurde 24 h bei 120°C unter Rückfluß und Durchleiten eines starken Stickstoffstromes gerührt. Die Freisetzung von Dimethylamin wurde bis zum Ende der Reaktion mit einem feuchten pH-Papier im Gasraum des Reaktionansatzes nachgewiesen. Die Lösung wurde heiß filtriert und je zweimal mit Wasser, 1 M HCl-Lösung, 1 M NaOH-Lösung und wieder mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das erhaltene farblose Öl wurde direkt weiter eingesetzt.

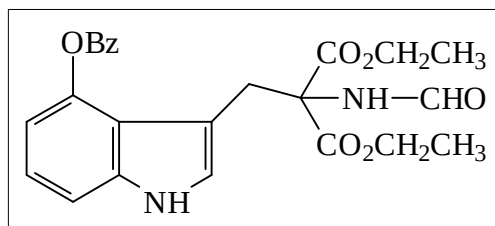
Reaktionsverfolgung:

DC

mobile Phase: Ethylacetat/Hexan/Eisessig
(3:1:1; V:V:V)

R_f-Wert: 0.63

Charakterisierung:



Das Produkt wurde ohne Charakterisierung für die nächste Reaktionsstufe eingesetzt.

7.3.14. Synthese von 6-Benzoyloxyskatylformamidomalonester**Durchführung:**

Eine Mischung aus 5 g (18 mmol) 6-Benzoyloxygramin, 6 g (30 mmol) Formamidomalonat, 0,5 g NaOH und 75 mL Toluol wurde 60 h bei 120°C unter Rückfluß und Durchleiten eines starken Stickstoffstromes gerührt. Die Freisetzung von Dimethylamin wurde bis zum Ende der Reaktion mit einem feuchten pH-Papier im Gasraum des Reaktionansatzes nachgewiesen. Die Lösung wurde heiß filtriert und je zweimal mit Wasser, 1 M HCl-Lösung, 1 M NaOH-Lösung und wieder mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der erhaltene weiße Feststoff wurde in 96%-igem Ethanol umkristallisiert.

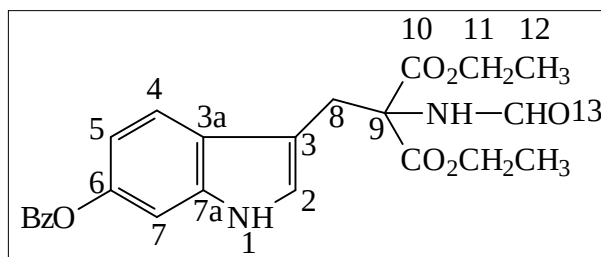
Reaktionsverfolgung:**DC**

mobile Phase: Ethylacetat/Hexan/Eisessig
(3:1:1; V:V:V)

R_F-Wert: 0,73

Ausbeute:

4,9 g (11 mmol) 6-Benzoyloxyskatylformamidomalonester (61%, bezogen auf 6-Benzoyloxygramin).

Charakterisierung:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=1.27 (t, 6H, H-12), 3.82 (s, 2H, H-8), 4.22 (q, 4H, H-11), 5.08 (s, 2H, CH₂), 6.81-6.88 (m, 3H, H-2, H-5 und H-7), 7.30-7.44 (m, 5H, H_{phenyl}), 7.46 (d, 1H, H-4), 8.00 (bs, 1H, NH), 8.15 (s, 1H, H-13) ppm.

Kopplungskonstanten:

³J_{H-4,H-5}=8.3 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO): δ=14.0 (C-12), 28.3 (C-11), 62.8 (C-8), 66.8 (C-9), 70.6 (CH₂), 96.0 (C-7), 108.9 (C-3), 110.4 (C-5), 119.5 (C-4), 122.2 (C-2), 122.6 (C-3a), 127.5-128.6 (5C, C_{phenyl}), 136.4 (C-7a), 155.7 (C-6), 160.0 (C-13), 167.4 (C-10) ppm.

MS (70 eV, EI): 280 (5, M⁺), 236 (12), 235 (20), 234 (13), 129 (6), 92 (5), 91 (100, C₇H₇), 65 (12), 45 (11).

IR (KBr): 438 (8, M⁺), 348 (1), 347 (8), 302 (4), 275 (2), 237 (9), 236 (43), 235 (8), 158 (4), 146 (23), 130 (24), 117 (5), 102 (13), 91 (100, C₇H₇), 85 (43), 74 (CO₂C₂H₅), 65 (10), 46 (17, NHCHO).

Schmelzpunkt: 130°C

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	65.7	6.0	6.4
gefunden [%]	65.3	5.9	6.3

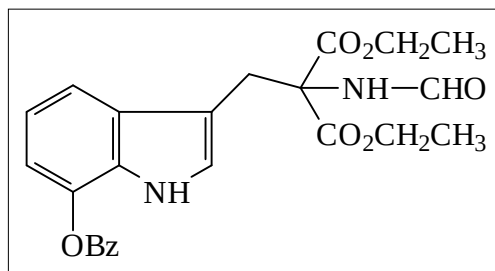
7.3.15. Synthese von 7-Benzoyloxyskatylformamidomalonester**Durchführung:**

Eine Mischung aus 2.5 g (9 mmol) 7-Benzoyloxygramin, 3 g (15 mmol) Formamidomalonat, 0.25 g NaOH und 38 mL Toluol wurde 24 h bei 120°C unter Rückfluß und Durchleiten eines starken Stickstoffstromes gerührt. Die Freisetzung von Dimethylamin wurde bis zum Ende der Reaktion mit einem feuchten pH-Papier im Gasraum des Reaktionansatzes nachgewiesen. Die Lösung wurde heiß filtriert und je zweimal mit Wasser, 1 M HCl-Lösung, 1 M NaOH-Lösung und wieder mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das erhaltene farblose Öl wurde direkt weiter eingesetzt.

Reaktionsverfolgung:**DC**

mobile Phase: Ethylacetat/Hexan/Eisessig
(3:1:1; V:V:V)

R_f-Wert: 0.90

Charakterisierung:

Das Produkt wurde ohne Charakterisierung für die nächste Reaktionsstufe eingesetzt.

7.3.16. Synthese von 4-Benzoyloxytryptophan

Durchführung:

Aus 6.0 g (14 mmol) 4-Benzoyloxytryptophan, 9 g NaOH und 345 mL Wasser wurde eine Suspension hergestellt und unter Rückfluß bei 108°C 24 h erhitzt. Die rot-orange Lösung wurde heiß filtriert und mit 84%-iger *o*-Phosphorsäure auf pH=2 eingestellt, wobei die freie Malonsäure ausfiel. Die Lösung wurde anschließend unter Rückfluß 30 min erhitzt. CO₂-Bildung zeigte den Zerfall der Malonsäure zu Tryptophan an. Die Reaktion wurde mittels HPLC-Monitoring verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung heiß filtriert und mit 25%-igem Ammoniak auf pH=5.9 eingestellt. Das gebildete 4-Benzoyloxytryptophan wurde abfiltriert und getrocknet.

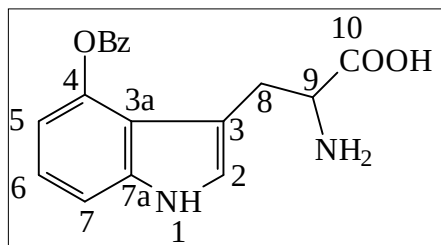
Reaktionsverfolgung:

HPLC-Bedingungen: siehe Kap. 7.2.1.

Ausbeute:

1.53 g (11 mmol) 4-Benzoyloxytryptophan (28%, bezogen auf 4-Benzoyloxygramin).

Charakterisierung:



¹H-NMR (400 MHz, D₂O+NaOH):

δ =3.03 (dd, 1H, H-8_α), 3.21 (dd, 1H, H-8_β), 3.56 (dd, 1H, H-9), 5.25 (d, 2H, CH₂), 6.67 (dd, 1H, H-6), 7.05 (d, 1H, H-7), 7.09 (d, 1H, H-5), 7.37-7.49 (m, 5H, H_{phenyl}), 7.55 (s, 1H, H-2) ppm.

Kopplungskonstanten:

²J_{H-8α,H-8β}=14.6, ³J_{H-8α,H-9}=4.8, ³J_{H-8β,H-9}=8.1, ³J_{H-5,H-6}=8.2, ³J_{H-6,H-7}=7.7 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O+NaOH):

32.5 (C-8), 58.2 (C-9), 70.5 (CH₂), 101.7 (C-7), 105.9 (C-5), 107.9 (C-3), 122.8 (C-6), 123.0 (C-2), 127.6 (C-3a), 128.3-129.2 (5C, C_{phenyl}), 137.5 (C-7a), 153.0 (C-4), 183.0 (C-10) ppm.

MS (FAB): 311 (86, M⁺+H), 236 (32).

IR (KBr): 437 (m), 728 (m), 971 (m), 1073 (s, Ether), 1086 (s), 1167 (m), 1203 (m), 1236 (m), 1268 (m, Ether), 1355 (m), 1405 (m), 1441 (m), 1453 (m), 1506 (s), 1586 (s), 1619 (s), 1652 (s, NH₂), 2933 (m, COOH), 3036 (s), 3125 (m) (NH₃⁺), 3214 (s) 3374 (m) (NH).

Schmelzpunkt: 230°C (Zersetzung)

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	69.7	5.9	9.0
gefunden [%]	69.4	5.7	8.8

7.3.17. Synthese von 6-Benzoyloxytryptophan**Durchführung:**

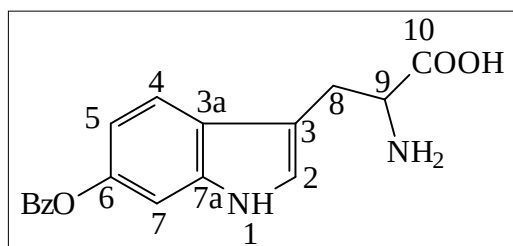
Aus 2 g (4.7 mmol) 6-Benzoyloxyskatylformamidomalonat, 3 g NaOH und 115 mL Wasser wurde eine Suspension hergestellt und unter Rückfluß bei 108°C 24 h erhitzt. Die rot-orange Lösung wurde heiß filtriert und mit 84%-iger *o*-Phosphorsäure auf pH=2 eingestellt, wobei die freie Malonsäure ausfiel. Die Lösung wurde anschließend unter Rückfluß 6 h erhitzt. CO₂-Bildung zeigte den Zerfall der Malonsäure zu Tryptophan an. Die Reaktion wurde mittels HPLC-Monitoring verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion, wurde die Lösung heiß filtriert und mit 25%-igem Ammoniak auf pH=5.9 eingestellt. Das gebildete 6-Benzoyloxytryptophan wurde abfiltriert und getrocknet.

Reaktionsverfolgung:

HPLC-Bedingungen: siehe Kap. 7.2.1.

Ausbeute:

1.1 g (4 mmol) 6-Benzoyloxytryptophan (85%, bezogen auf 6-Benzoyloxyformamidomalonester).

Charakterisierung:**¹H-NMR (400 MHz, D₂O+NaOH):**

δ =3.14 (dd, 1H, H-8 α), 3.22 (dd, 1H, H-8 β), 3.63 (dd, 1H, H-9), 5.17 (d, 2H, CH₂), 6.93 (d, 1H, H-5), 7.14 (s, 1H, H-7), 7.19 (s, 1H, H-2), 7.45-7.55 (m, 5H, H_{phenyl}), 7.68 (d, 1H, H-4) ppm.

Kopplungskonstanten:

$^2J_{H-8\alpha, H-8\beta}$ =14.3, $^3J_{H-8\alpha, H-9}$ =5.1, $^3J_{H-8\beta, H-9}$ =7.6, $^3J_{H-4, H-5}$ =8.4 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O+NaOH):

33.2 (C-8), 58.5 (C-9), 71.2 (CH₂), 101.2 (C-7), 106.3 (C-5), 107.7 (C-3), 123.4 (C-2), 127.6 (C-3a), 127.8-129.5 (5C, C_{phenyl}), 137.5 (C-7a), 152.5 (C-4), 155.3 (C-6), 183.0 (C-10) ppm.

MS (FAB): 311 (M⁺+H, 100), 294 (32, -NH₃⁺), 236 (84).

IR (KBr): 501 (m), 536 (m), 696 (m), 757 (m), 800 (m), 812 (m), 1027 (m), 1037 (m, Ether), 1131 (w), 1172 (s), 1265 (m, Ether), 1307 (m), 1312 (m), 1346 (m), 1382 (m), 1405 (m), 1417 (m), 1452 (s), 1498 (m), 1561 (m), 1584 (s), 1621 (s), 1662 (s, NH₂), 2745 (w) 2964 (m) (COOH), 3035 (s) - 3088 (m) (NH₃⁺), 3402 (s, NH).

Schmelzpunkt: 230°C (Zersetzung)

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	69.7	5.9	9.0
gefunden [%]	69.4	5.8	8.8

7.3.18. Synthese von 7-Benzoyloxytryptophan**Durchführung:**

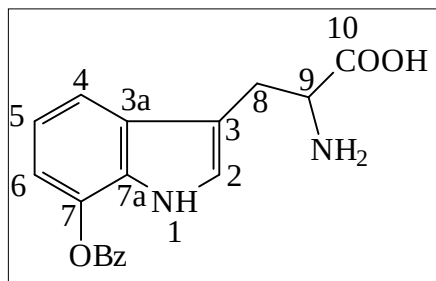
Aus 3.0 g (7 mmol) 7-Benzoyloxyskatylformamidomalonat, 4.5 g NaOH und 173 mL Wasser wurde eine Suspension hergestellt und unter Rückfluß bei 108°C 24 h erhitzt. Die rot-orange Lösung wurde heiß filtriert und mit 84%-iger *o*-Phosphorsäure auf pH=2 eingestellt, wobei die freie Malonsäure ausfiel. Die Lösung wurde anschließend unter Rückfluß 30 min erhitzt. CO₂-Bildung zeigte den Zerfall der Malonsäure zu Tryptophan an. Die Reaktion wurde mittels HPLC-Monitoring verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion, wurde die Lösung heiß filtriert und mit 25%-igem Ammoniak auf pH=5.9 eingestellt. Das gebildete 7-Benzoyloxytryptophan wurde abfiltriert und getrocknet.

Reaktionsverfolgung:

HPLC-Bedingungen: siehe Kap. 7.2.1.

Ausbeute:

1.7 g (5 mmol) 7-Benzoyloxytryptophan (56%, bezogen auf 7-Benzoyloxygramin).

Charakterisierung:**¹H-NMR (400 MHz, D₂O+NaOH):**

δ =3.14 (dd, 1H, H-8_α), 3.22 (dd, 1H, H-8_β), 3.63 (dd, 1H, H-9), 5.17 (d, 2H, CH₂), 6.85 (dd, 1H, H-5), 7.03 (d, 1H, H-6), 7.26 (s, 1H, H-2), 7.33 (d, 1H, H-4), 7.42-7.71 (m, 5H, H_{phenyl}) ppm.

Kopplungskonstanten:

²J_{H-8α,H-8β}=15.1, ³J_{H-8α,H-9}=4.9, ³J_{H-8β,H-9}=7.8, ³J_{H-4,H-5}=8.6, ³J_{H-5,H-6}=7.3 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O+NaOH):

32.4 (C-8), 58.2 (C-9), 70.3 (CH₂), 106.3 (C-5), 107.9 (C-3), 110.1 (C-6), 120.1 (C-4), 124.7 (C-2), 126.2 (C-3a), 128.1-129.2 (5C, C_{phenyl}), 135.5 (C-7a), 142.0 (C-7), 182.9 (C-10) ppm.

MS (FAB): 311 (100, M⁺+H), 294 (32), 236 (84).

IR (KBr): 437 (m), 728 (m), 971 (m), 1073 (s, Ether), 1086 (s), 1167 (m), 1203 (m), 1236 (m), 1268 (m, Ether), 1355 (m), 1405 (m), 1441 (m), 1453 (m), 1506 (s), 1586 (s), 1619 (s), 1652 (s, NH₂), 2933 (m, COOH), 3036 (s), 3125 (m) (NH₃⁺), 3214 (s) 3374 (m) (NH).

Schmelzpunkt: 235°C (Zersetzung)

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	69.7	5.9	9.0
gefunden [%]	69.4	5.8	8.8

7.3.19. Synthese von 4-Hydroxytryptophan**Durchführung:**

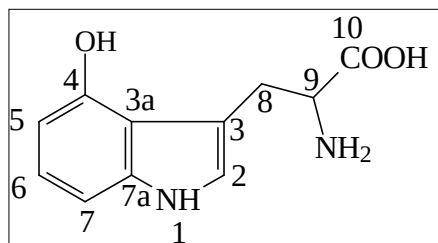
Ein Gemisch aus 20 mL Ethanol und 20 mL Wasser wurde mit Stickstoff entgast. Anschließend wurden 277 mg Katalysator (Palladium/Aktivkohle) und 273 mg (0.88 mmol) 4-Benzoyloxytryptophan in dem Lösungsmittelgemisch suspendiert. Die Suspension wurde mit Wasserstoff gesättigt und unter Durchleiten eines schwachen Wasserstoffstroms 1.5 h gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Katalysator durch Filtration entfernt und mit Wasser gewaschen. Das Ethanol wurde unter Vakuum entfernt und die wässrige Lösung gefriergetrocknet.

Reaktionsverfolgung:

HPLC-Bedingungen: siehe Kap. 7.2.1.

Ausbeute:

164 mg (75 μ mol) 4-Hydroxytryptophan (85%, bezogen auf 4-Benzoyloxytryptophan).

Charakterisierung:

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ =3.25 (dd, 1H, H-8 α), 3.64 (dd, 1H, H-8 β), 4.13 (dd, 1H, H-9), 6.55 (dd, 1H, H-6), 7.07 (d, 1H, H-7), 7.08 (dd, 1H, H-5), 7.14 (s, 1H, H-2) ppm.

Kopplungskonstanten:

$^2J_{H-8\alpha, H-8\beta}$ =14.8, $^3J_{H-8\alpha, H-9}$ =4.6, $^3J_{H-8\beta, H-9}$ =8.1, $^3J_{H-5, H-6}$ =8.3, $^3J_{H-6, H-7}$ =7.9 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): 28.4 (C-8), 57.2 (C-9), 104.6 (C-7), 105.4 (C-5), 107.9 (C-3), 122.8 (C-6), 124.7 (C-2), 126.2 (C-3a), 139.5 (C-7a), 150.6 (C-4), 175.4 (C-10) ppm.

MS (FAB): 221 (100, M⁺+H), 204 (20).

IR (KBr): 511 (m), 529 (m), 954 (w), 1047 (m), 1089 (w), 1104 (w), 1263 (m), 1409 (m), 1421 (m), 1443 (m), 1459 (m), 1474 (m), 1491 (m), 1500 (m), 1507 (m), 1539 (m), 1578 (m), 1627 (s, NH₂), 1774 (w), 2344 (w), 2374 (w), 2864 (m)-2991 (m) (COOH), 3066 (m)-3246 (s) (NH₃⁺), 3399 (s)-3422 (s) (NH), 3568 (m), 3588 (w).

Schmelzpunkt: 290°C (Zersetzung)

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	60.3	5.1	12.8
gefunden [%]	60.1	4.9	12.5

7.3.20. Synthese von 6-Hydroxytryptophan**Durchführung:**

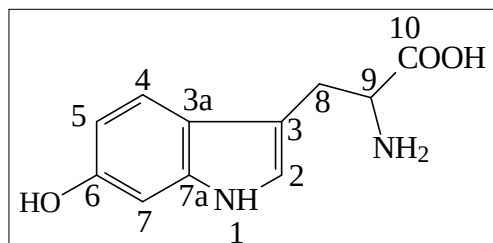
Ein Gemisch aus 20 mL Ethanol und 20 mL Wasser wurde mit Stickstoff entgast. Anschließend wurden 200 mg Katalysator (Palladium/Aktivkohle) und 312 mg (1 mmol) 6-Benzoyloxytryptophan in dem Lösungsmittelgemisch suspendiert. Die Suspension wurde mit Wasserstoff gesättigt und unter Durchleiten eines schwachen Wasserstoffstroms 1.5 h gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Katalysator durch Filtration entfernt und mit Wasser gewaschen. Das Ethanol wurde unter Vakuum entfernt und die wässrige Lösung gefriergetrocknet.

Reaktionsverfolgung:

HPLC-Bedingungen: siehe Kap. 7.2.1.

Ausbeute:

195 mg (89 μ mol) 6-Hydroxytryptophan (89%, bezogen auf 6-Benzoyloxytryptophan).

Charakterisierung:

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ =3.34 (dd, 1H, H-8 α), 3.42 (dd, 1H, H-8 β), 4.02 (dd, 1H, H-9), 6.77 (d, 1H, H-5), 6.96 (s, 1H, H-7), 7.15 (s, 1H, H-2), 7.56 (d, 1H, H-4) ppm.

Kopplungskonstanten:

$^2J_{\text{H-8}\alpha,\text{H-8}\beta}$ =15.3, $^3J_{\text{H-8}\alpha,\text{H-9}}$ =4.5, $^3J_{\text{H-8}\beta,\text{H-9}}$ =8.2, $^3J_{\text{H-4},\text{H-5}}$ =8.1 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): 29.5 (C-8), 58.2 (C-9), 101.2 (C-7), 106.4 (C-5), 108.9 (C-3), 118.4 (C-4), 124.7 (C-2), 126.4 (C-3a), 139.5 (C-7a), 155.3 (C-6), 179.3 (C-10) ppm.

MS (FAB): 221 (100, M⁺+H), 204 (42).

IR (KBr): 489 (w), 518 (m), 544 (m), 601 (m), 807 (m), 823 (m), 1165 (m), 1326 (m), 1395 (m), 1418 (m), 1437 (m), 1458 (m), 1509 (m), 1525 (m), 1577 (m), 1629 (s, NH₂), 2929 (m, COOH), 3031 (m), 3269 (m) (NH₃⁺), 3440 (s) (NH).

Schmelzpunkt: 291°C (Zersetzung)

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	60.3	5.1	12.8
gefunden [%]	59.8	5.3	12.3

7.3.21. Synthese von 7-Hydroxytryptophan**Durchführung:**

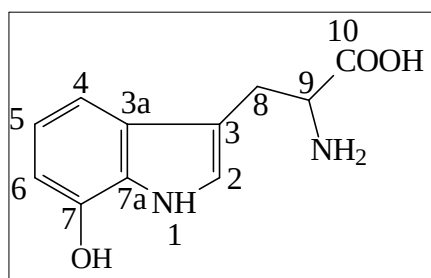
Ein Gemisch aus 22 mL Ethanol und 22 mL Wasser wurde mit Stickstoff entgast. Anschließend wurden 200 mg Katalysator (Palladium/Aktivkohle) und 312 mg (1 mmol) 7-Benzoyloxytryptophan in dem Lösungsmittelgemisch suspendiert. Die Suspension wurde mit Wasserstoff gesättigt und unter Durchleiten eines schwachen Wasserstoffstroms 1.5 h gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Katalysator durch Filtration entfernt und mit Wasser gewaschen. Das Ethanol wurde unter Vakuum entfernt und die wäßrige Lösung gefriergetrocknet.

Reaktionsverfolgung:

HPLC-Bedingungen: siehe Kap. 7.2.1.

Ausbeute:

165 mg (75 μ mol) 7-Hydroxytryptophan (75%, bezogen auf 7-Benzoyloxytryptophan).

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ =3.25 (dd, 1H, H-8 α), 3.45 (dd, 1H, H-8 β), 4.04 (dd, 1H, H-9), 6.75 (dd, 1H, H-5), 7.05 (d, 1H, H-6), 7.07 (s, 1H, H-2), 7.02 (d, 1H, H-4) ppm.

Kopplungskonstanten:

$^2J_{\text{H-8}\alpha,\text{H-8}\beta}$ =15.4, $^3J_{\text{H-8}\alpha,\text{H-9}}$ =4.6, $^3J_{\text{H-8}\beta,\text{H-9}}$ =8.1, $^3J_{\text{H-4},\text{H-5}}$ =8.1, $^3J_{\text{H-5},\text{H-6}}$ =7.8 Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): 26.2 (C-8), 54.8 (C-9), 106.4 (C-5), 107.9 (C-3), 110.5 (C-6), 120.1 (C-4), 124.7 (C-2), 126.2 (C-3a), 128.7 (C-7a), 141.8 (C-7), 174.2 (C-10) ppm.

MS (FAB): 221 (100, $M^+ + H$), 204 (40).

IR (KBr): 542 (m), 1405 (m), 1438 (m), 1498 (m), 1584 (m), 1627 (s, NH_2), 2930 (m) -2971 (m) (COOH), 3077 (m)-3265 (s) (NH_3^+), 3411 (s)-3436 (s) (NH), 3567 (m), 3588 (m).

Schmelzpunkt: 300°C (Zersetzung)

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	60.3	5.1	12.8
gefunden [%]	59.5	4.9	12.4

7.4. IMT

7.4.1. Synthese von IMT

7.4.1.1. Synthese von 2-Nitrobenzyltriphenylphosphoniumchlorid

Durchführung:

10 g (58.3 mmol) 2-Nitrobenzylchlorid und 25.3 g (58.3 mmol) Triphenylphosphin wurden in 120 mL Chloroform gelöst und 72 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 120 mL Diethylether versetzt. Der Ansatz trübt sich ein und nach weiterem 48-stündigem Rühren fiel ein Feststoff aus. Zur Vervollständigung der Kristallisation wurde die Suspension für 3 h bei 18°C gelagert. Anschließend wurde das Produkt abgesaugt und mit Diethylether gewaschen. Der Feststoff wurde aus Isopropanol/Diethylether umkristallisiert. Es wurde ein weißer, kristalliner Feststoff erhalten.

Reaktionsverfolgung:

DC

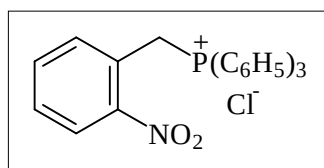
mobile Phase: n-Butanol/Eisessig/Wasser
(4:1:1; V:V:V)

R_f-Wert: 0.58

Ausbeute:

18.3 g (42.2 mmol) 2-Nitrobenzyltriphenylphosphoniumchlorid (72%, bezogen auf 2-Nitrobenzylchlorid).

Charakterisierung:



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=6.20 (d, 2H, CH₂), 7.40-8.20 (m, 19H, H_{phenyl}) ppm.

Kopplungskonstanten:

³J_{H,P}=14.8 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ=28.4 (CH₂), 117.4-148.4 (24C, C_{phenyl}) ppm.

MS (70 eV, EI): 398 (6, M⁺), 349 (6), 332 (6), 316 (10), 305 (4), 277 (48), 262 (100, P⁺(C₆H₅)₃), 185 (10, P⁺(C₆H₅)₂), 183 (50), 152 (9), 119 (5), 108 (20, P⁺C₆H₅), 107 (8), 77 (9, C₆H₅⁺), 52 (5, C₄H₄⁺).

IR (KBr): 496 (m), 471 (s), 536 (w), 589 (m), 687 (s), 721 (m), 751 (s), 798 (m), 834 (m), 997 (w), 1109 (s), 1126 (m), 1315 (m), 1342 (s, -NO), 1408 (m), 1438 (s, P-Phenyl), 1483 (m), 1524 (s, -NO), 1575 (w), 1586 (m), 1608 (m), 1615 (m), 2796 (w), 2860 (w), 2884 (m), 2991 (w), 3008 (w), 3045 (w), 3057 (w), 3067 (m), 3079 (w), 3104 (w), 3272 (w), 3332 (m), 3371 (s), 3445 (s), 3567 (w).

Schmelzpunkt: 252°C

Elementaranalyse:

Element	C	H	N	Cl	P
<i>berechnet</i> [%]	69.2	4.9	3.2	8.2	7.1
<i>gefunden</i> [%]	66.0	5.0	3.0	7.8	7.3

7.4.1.2. Synthese von 2-Aminobenzyltriphenylphosphoniumchlorid Hydrochlorid

Durchführung:

10.2 g (23.6 mmol) 2-Nitrobenzyltriphenylphosphoniumchlorid wurden in 100 mL Eisessig gelöst und unter Schutzgas innerhalb von 15 min mit 9.2 g (140.7 mmol) Zink versetzt. Die Suspension wurde über Nacht gerührt, mit Aktivkohle versetzt und über Celite filtriert. Anschließend wurde die Essigsäure abdestilliert und der verbleibende ölige Rückstand in ca. 100 mL *n*-Butanol gelöst. Die organische Phase wurde mit ges. Natriumcarbonatlösung (3x 50 mL) und ges. Natriumchloridlösung (100 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde ein Feststoff erhalten, der in 1 M HCl-Lösung gelöst wurde. Nach erneutem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Hydrochlorid erhalten. Das Rohprodukt wurde mit 30 mL Chloroform versetzt und gerührt. Dabei setzte sich ein Feststoff ab, der aus Chloroform umkristallisiert wurde. Es wurden weiße Kristalle erhalten.

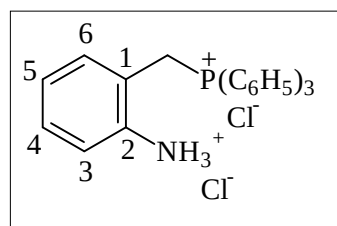
Reaktionsverfolgung:**DC**

mobile Phase: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser
(4:1:1; V:V:V)

R_F-Wert: 0.72

Ausbeute:

6.8 g (15.4 mmol) 2-Aminobenzyltriphenylphosphoniumchlorid Hydrochlorid (66%, bezogen auf 2-Nitrobenzyltriphenylphosphoniumchlorid).

Charakterisierung:

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ=5.12 (d, 2H, CH₂), 6.53 (d, 1H, H-3), 6.65 (dd, 1H, H-5), 6.80 (d, 1H, H-6), 7.10 (dd, 1H, H-4), 7.64-7.95 (m, 15H, H_{phenyl.}), 8.34 (bs, NH₃⁺) ppm.

Kopplungskonstanten:

³J_{H,P}=14.8, ³J_{H-3,H-4}=7.8, ³J_{H-4,H-5}=8.1,
³J_{H-5,H-6}=7.9 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO): δ=24.8 (CH₂), 117.8-135.4 (24C, C_{phenyl}) ppm.

MS (70 eV, EI): 420 (4), 408 (2), 327 (12), 314 (14), 304 (18), 303 (35), 302 (14), 263 (22), 262 (100, P⁺(C₆H₅)₃), 261 (20), 183 (88), 157 (6), 152 (12), 109 (4), 108 (5, P⁺C₆H₅), 107 (21), 93 (4), 77 (9, C₆H₅⁺), 52 (14, C₄H₄⁺).

IR (KBr): 486 (w), 512 (m), 533 (m), 688 (m), 717 (m), 748 (s), 833 (w), 1110 (m), 1438 (m, P-Phenyl), 1492 (w), 2572 (w), 2609 (w), 2696 (w), 2842 (m), 2853 (m), 2925 (w), 3620 (w), 3630 (w), 3651 (w), 3677 (w), 3690 (w), 3752 (w), 3770 (w), 3822 (w), 3841 (w), 3871 (w), 3875 (w).

Schmelzpunkt: 248°C (Zersetzung)

Elementaranalyse:

Element	C	H	N	Cl	P
berechnet [%]	68.2	5.5	3.2	16.1	7.0
gefunden [%]	67.9	5.6	3.2	16.5	6.8

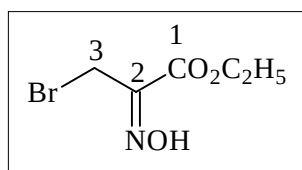
7.4.1.3. Synthese von 3-Brom-2-hydroxyiminopropansäureethylester

Durchführung:

1,2 g (6 mmol) Ethylbromopyruvat wurden in 5 mL Chloroform gelöst und tropfenweise mit einer Lösung aus 1 g (6 mmol) Hydroxylaminsulfat in 10 mL Wasser versetzt. Das Zweiphasensystem wurde 22 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die organische Phase abgetrennt und die wäßrige Phase mit Chloroform (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der verbliebene hellgelbe Rückstand kristallisierte beim Abkühlen aus. Der Feststoff wurde aus Hexan umkristallisiert. Es wurden weiße Kristalle erhalten.

Ausbeute:

1,0 g (4,9 mmol) 3-Brom-2-hydroxyiminopropansäureethylester (82%, bezogen auf Ethylbromopyruvat).

Charakterisierung:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=1.39 (t, 3H, CH₃), 4.27 (s, 2H, H-3), 4.38 (q, 2H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO): δ=14.1 (CH₃), 15.2 (CH₂), 62.5 (C-3), 148.1 (C-2), 161.8 (C-1) ppm.

MS (70 eV, EI): 211 (4, M⁺), 209 (4, M⁺), 183 (16), 181 (16), 165 (9), 130 (10), 129 (52), 120 (11), 103 (8), 102 (12), 101 (100), 95 (6, CH₂Br⁺), 85 (12), 84 (64), 82 (76, HBr⁺), 80 (80, HBr⁺), 79 (31, Br⁺), 59 (10), 58 (46), 55 (65), 54 (22), 45 (30, C₂H₅O⁺).

IR (KBr): 721 (w), 782 (w), 857 (w), 1027 (s), 1116 (w), 1191 (m), 1225 (m), 1325 (m), 1374 (w), 1421 (w), 1443 (m), 1458 (w), 1473 (w), 1723 (s, COOC₂H₅), 3056 (w), 3227 (w), 3280 (w).

Schmelzpunkt: 80°C

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
berechnet [%]	28.6	3.9	6.7
gefunden [%]	28.3	4.0	6.7

7.4.1.4. Synthese von 3-Indolylacetylchlorid

Durchführung:

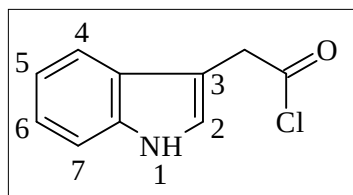
Unter Eiskühlung und Schutzgas wurden 3.9 g (22.5 mmol) 3-Indolyllessigsäure in 90 mL Diethylether gelöst und mit 5.6 g (27.0 mmol) Phosphorpentachlorid portionsweise versetzt. Während der Zugabe verfärbte sich die Lösung langsam rot. Nach 30 min Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel um ca. 75% bei 0°C unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit 200 mL eiskühlem Hexan versetzt. Die Lösung wurde anschließend unter Schutzgas membranfiltriert und das helle Filtrat auf -78°C (Aceton/Trockeneis) gekühlt. Nach 1 h kristallisierte das Produkt aus. Der Feststoff wurde unter Schutzgas abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Das Säurechlorid wurde aufgrund seiner Licht- und Hydrolyseempfindlichkeit unter Schutzgas gelagert und sofort weiter verwendet.

Ausbeute:

4.0 g (20.7 mmol) 3-Indolylacetylchlorid
(92 %, bezogen auf 3-Indolyllessigsäure).

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ =4.30 (s, 2H, CH_2), 7.18 (dd, 1H, H-5), 7.19 (s, 1H, H-2), 7.24 (dd, 1H, H-6), 7.38 (d, 1H, H-7), 7.56 (d, 1H, H-4), 8.14 (bs, NH) ppm.

Kopplungskonstanten:

$^3J_{\text{H-4,H-5}}$ =7.8, $^3J_{\text{H-5,H-6}}$ =7.3, $^3J_{\text{H-6,H-7}}$ =8.1 Hz.

Aufgrund der Instabilität von 3-Indolylacetylchlorid wurde auf eine weitere Charakterisierung verzichtet.

7.4.1.5. Synthese von 2-(3'-Indolylacetamido)-benzyltriphenylphosphoniumchlorid

Durchführung:

1,2 g (2,7 mmol) 2-Aminobenzyltriphenylphosphoniumchlorid Hydrochlorid wurden in 3 mL DMF und 0,6 mL Pyridin gelöst. Nach kurzer Zeit fiel Pyridiniumhydrochlorid als weißer Feststoff aus. Zu der auf 0°C gekühlten Suspension wurden anschließend eine Lösung aus 600 mg (3,1 mmol) 3-Indolylacetylchlorid, gelöst in 2 mL DMF, getropft. Die orange Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Lösungsmittel wurden unter Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand mit Chloroform und 1 M HCl-Lösung versetzt. Dabei fiel ein Niederschlag aus. Nach Umkristallisation aus 2-Propanol wurden weiße Kristalle erhalten.

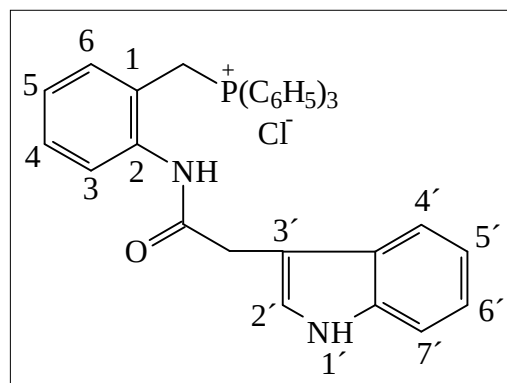
Reaktionsverfolgung:**DC**

mobile Phase: n-Butanol/Eisessig/Wasser
(4:1:1; V:V:V)

R_F-Wert: 0,66

Ausbeute:

1,3 g (2,3 mmol) 2-(3'-Indolylacetamido)-benzyltriphenylphosphoniumchlorid (87%, bezogen auf 2-Aminobenzyltriphenylphosphoniumchlorid Hydrochlorid).

Charakterisierung:

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ=3,50 (s, 2H, CH₂), 5,29 (d, 2H, CH₂-P), 6,91 (dd, 1H, H-5'), 6,94 (m, 2H, H-3, H-5), 7,05 (dd, 1H, H-6'), 7,16 (s, 1H, H-2'), 7,25 (dd, 1H, H-4), 7,33 (d, 1H, H-7'), 7,48 (d, 1H, H-6), 7,50-7,53 (m, 6H, H_{phenyl}), 7,55 (d, 1H, H-4'), 7,59-7,66 (m, 6H, H_{phenyl}), 7,79-7,85 (3H, H_{phenyl}), 10,12 (s, 1H, NH), 10,90 (s, 1H, NH_{arom.}) ppm.

Kopplungskonstanten:

³J_{H,P}=15,3, ³J_{H-3,H-4}=7,7, ³J_{H-4,H-5}=8,1,
³J_{H-5,H-6}=8,2, ³J_{H-3',H-4'}=7,8, ³J_{H-4',H-5'}=8,1,
³J_{H-5',H-6'}=7,9 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO): δ=25,4 (CH₂), 33,2 (CH₂-P), 111,7-135,3 (24-C_{phenyl}), 168,5 (C=O) ppm.

MS (70 eV, EI): 396 (14, M⁺), 278 (48), 277 (100), 262 (94, P⁺(C₆H₅)₃), 290 (70), 218 (16), 199 (23), 185 (20, P⁺(C₆H₅)₂), 183 (92), 152 (24), 130 (97, C₉H₈N⁺), 118 (22), 108 (43, P⁺C₆H₅), 107 (18), 77 (49, C₆H₅⁺), 52 (34, C₄H₄⁺).

IR (KBr): 491 (w), 510 (m), 692 (m), 721 (m), 748 (s), 779 (w), 1112 (s), 1166 (w), 1339 (w), 1421 (w), 1438 (s, P-Phenyl), 1489 (m), 1527 (m), 1586 (m), 1667 (m), 1696 (m, -C=O), 2905 (w), 2940 (w), 3057 (w), 3106 (w), 3135 (w), 3174 (m), 3192 (m), 3220 (m), 3351 (w), 3375 (w), 3394 (w), 3405 (w), 3422 (w), 3430 (w), 3447 (w), 3459 (w), 3476 (w), 3855 (w).

Schmelzpunkt: 261°C (Zersetzung)

Elementaranalyse:

Element	C	H	N	Cl	P
berechnet [%]	74,9	5,4	5,0	6,3	5,5
gefunden [%]	73,6	5,0	4,7	6,8	5,4

7.4.1.6. Synthese von 2-(3'-Indolylmethyl)-indol

Durchführung:

1,0 g (1,8 mmol) 2-(3'-Indolylacetamido)-benzyltriphenylphosphoniumchlorid wurden in 30 mL Toluol suspendiert und unter Schutzgas auf 80°C erhitzt. Innerhalb von 10 min wurde der Reaktionsansatz mit 0,2 g (1,8 mmol) Kalium-*tert.*-butylat in kleinen Portionen versetzt und anschließend 5 min unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Die heiße dunkelrote Lösung wurde filtriert und der Filtrationsrückstand mit 20 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden am Vakuumrotationsverdampfer auf ca. 1 mL eingengt. Das Rohprodukt wurde in 1 mL Toluol gelöst und durch Säulenfiltration über Kieselgel mit Toluol als Eluent gereinigt. Die resultierende Substanz wurde aus Hexan/Toluol umkristallisiert. Es wurden rötlich-kristalline Blättchen erhalten.

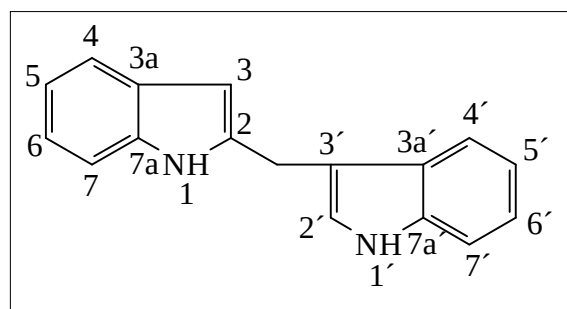
Reaktionsverfolgung:**DC**

mobile Phase: Toluol

R_F Wert: 0.30

Ausbeute:

230 mg (934 µmol) 2-(3'-Indolylmethyl)indol (52%, bezogen auf 2-(3'-Indolylacetamido)benzyltriphenylphosphoniumchlorid).

Charakterisierung:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=4.29 (s, 2H, CH₂), 6.39 (dd, 1H, H-3), 7.05 (dd, 1H, H-5), 7.07 (dd, 1H, H-6), 7.09 (s, 1H, H-2'), 7.11 (dd, 1H, H-5'), 7.14 (dd, 1H, H-6'), 7.22 (d, 1H, H-7), 7.38 (d, 1H, H-7'), 7.52 (d, 1H, H-4), 7.54 (d, 1H, H-4') ppm.

Kopplungskonstanten:

³J_{H-1,H-3}=2.1, ³J_{H-3,H-7}=0.8, ³J_{H-4,H-5}=7.9

³J_{H-5,H-6}=8.2, ³J_{H-6,H-7}=8.1 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ=24.5 (CH₂), 100.1 (C-3), 110.5 (C-7), 111.2 (C-7'), 112.9 (C-3'), 119.0 (C-4'), 119.6 (C-5'), 119.8 (C-4), 119.9 (C-5), 121.0 (C-6), 122.4 (C-6'), 122.6 (C-2'), 127.3 (C-3a'), 128.9 (C-3a), 136.0 (C-7a), 136.4 (C-7a'), 138.3 (C-2) ppm.

MS (70 eV, EI): 247 (18), 246 (100, M⁺), 245 (74), 243 (16), 218 (7), 217 (12), 189 (4), 165 (3), 151 (4), 137 (4), 130 (32, C₉H₈N⁺), 123 (19), 117 (20), 109 (7), 97 (10), 91 (5), 83 (9), 71 (6), 69 (11), 56 (14)

IR (KBr): 431 (m), 505 (m), 578 (w), 595 (w), 626 (w), 734 (s), 773 (w), 787 (w), 1008 (w), 1100 (w, CN), 1231 (w), 1291 (w, CN), 1339 (w), 1408 (w), 1419 (w), 1456 (m), 1538 (w), 1654 (w), 3395 (s, NH), 3822 (w), 3846 (w), 3854 (w)

Schmelzpunkt: 141°C

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
Berechnet [%]	82.9	5.7	11.4
Gefunden [%]	81.8	5.7	11.3

7.4.1.7. Synthese von 2''-(Hydroxyimino)-3-[2-(3'-indolylmethyl)indolyl]-propansäureethylester

Durchführung:

465 mg (1.9 mmol) 2-(3'-Indolylmethyl)-indol und 131 mg (1.9 mmol) Natriumcarbonat wurden in 4 mL Dichlormethan suspendiert und unter Schutzgas tropfenweise mit einer Lösung aus 257 mg (1.3 mmol) 3-Brom-2-hydroxyiminopropansäureethylester in 4 mL Dichlormethan versetzt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei RT unter Schutzgas gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert und der Filtrationsrückstand mit Dichlormethan gewaschen. Der Rückstand wurde in 10 mL Methanol suspendiert und nach 10 min Rühren erneut abgesaugt. Das Filtrat wurde unter Vakuum eingedunstet und ein weißer Feststoff erhalten.

Reaktionsverfolgung:

DC

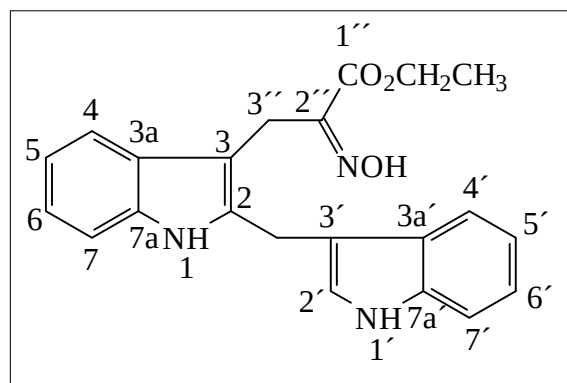
mobile Phase: Chloroform/Aceton
(98:2; V:V)

R_f Wert: 0.42

Ausbeute:

423 mg (1.1 mmol) 2''-(Hydroxyimino)-3-[2-(3'-indolylmethyl)indolyl]-propansäureethylester (86%, bezogen auf 3-Brom-2-hydroxyiminopropansäureethylester).

Charakterisierung:



¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ=1.12 (t, 3H, CH₂-CH₃), 3.99 (s, 2H, CH₂), 4.06 (q, 2H, CH₂-CH₃), 4.23 (s, 2H, H-3'), 6.88 (dd, 1H, 5-H), 6.92 (dd, 1H, 5-H'), 6.94 (dd, 1H, 6-H), 7.04 (dd, 1H, 6-H'), 7.10 (s, 1H, H-2'), 7.19 (d, 1H, H-7), 7.33 (d, 1H, H-7'), 7.45 (d, 1H, H-4'), 7.50 (d, 1H, H-4), 10.59 (bs, 1H, H-1'), 10.85 (bs, 1H, H-1) ppm.

Kopplungskonstanten:

³J_{H-4,H-5}=7.9 ³J_{H-5,H-6}=8.2, ³J_{H-6,H-7}=8.1 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO): δ=14.2 (CH₃-CH₂), 19.6 (CH₃-CH₂), 22.2 (CH₂), 61.0 (C-3'), 104.4 (C-3), 111.0 (C-7), 111.7 (C-7'), 112.3 (C-3'), 118.4 (C-4'), 118.5 (C-5'), 118.6 (C-4), 118.8 (C-5), 120.4 (C-6), 121.3 (C-6'), 123.7 (C-2'), 127.3 (C-3a'), 128.4 (C-3a), 135.6 (C-2), 136.7 (C-7a' und C-7a), 150.6 (C=NOH), 164.4 (C=O) ppm.

MS (70 eV, EI): 375 (17, M⁺), 368 (8), 284 (22), 281 (34), 257 (100), 256 (94), 245 (70), 243 (18), 168 (40), 130 (50, C₈H₉N⁺), 128 (46), 117 (36), 114 (18), 95 (14), 71 (16), 69 (24), 58 (33, C₃H₈N⁺), 55 (33), 45 (44, C₂H₅O⁺).

IR (KBr): 739 (m), 751 (m), 1010 (m), 1022 (m), 1138 (w), 1214 (m, CN), 1318 (w), 1382 (w), 1421 (m), 1439 (w), 1457 (m), 1490 (w), 1560 (w), 1619 (w), 1637 (w), 1654 (w), 1686 (w), 1716 (s, COOC₂H₅), 3273 (w), 3286 (w), 3296 (w), 3354 (m), 3403 (s, NH), 3650 (w), 3822 (w), 3841 (w), 3854 (w).

Schmelzpunkt: 194°C (Zersetzung)

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
Berechnet [%]	70.4	5.6	11.2
Gefunden [%]	69.8	5.4	10.9

7.4.1.8. Synthese von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophanethylester

Durchführung:

373 mg (1.0 mmol) 2-(Hydroxyimino)-3-[2-(3'-indolylmethyl) indolyl]-propansäureethylester und 255 mg (3.9 mmol) Zink wurden in 10 mL Eisessig suspendiert und über Nacht unter Schutzgas bei RT gerührt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz filtriert und das Filtrat unter Vakuum eingengt. Es wurde ein braunes Öl erhalten. Das Rohprodukt wurde in 3 mL 2 M methanolischer Essigsäure-Lösung gelöst und mittels Kationenaustauscher gereinigt. 7 mL des gequollenen Kationenaustauschers (H^+ -Form) wurden in eine Säule überführt, mit 50 mL destilliertem Wasser gespült und langsam mit Methanol/Wasser (1:1; V:V; entgast) konditioniert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch aufgetragen und mit Methanol/Wasser (1:1; V:V, entgast) gewaschen, bis der Eluent neutral austrat. Die Elution erfolgt in Fraktionen mit 0.05 M methanolischer Ammoniak-Lösung (pH=8). Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und das Lösungsmittel weitestgehend unter Vakuum entfernt. Die Lösung wurde mit 50 mL destilliertem Wasser verdünnt und lyophilisiert. Es wurde ein weißes Lyophilisat erhalten.

Reaktionsverfolgung:

DC

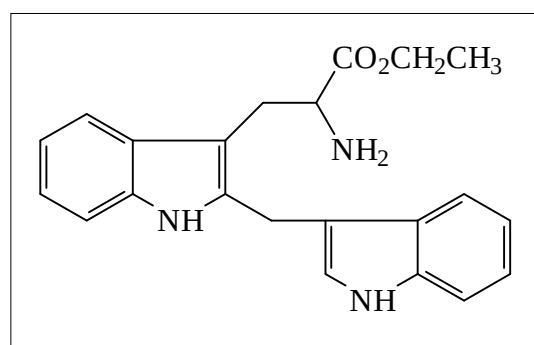
mobile Phase: Ethylacetat/Eisessig/ Wasser
(4:1:1; V:V:V)

R_f Wert: 0.81

Ausbeute:

280 mg (774 μ mol) 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophanethylester (80%, bezogen auf 2''-(Hydroxyimino)-3-[2-(3'-indolylmethyl)-indolyl]-propansäureethylester.

Charakterisierung:



Das Produkt wurde ohne Charakterisierung für die nächste Reaktionsstufe eingesetzt.

7.4.1.9. Synthese von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan

Durchführung:

280 mg (775 μmol) 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophanethylester wurden in 10 mL Methanol gelöst und unter Schutzgas mit 1 M NaOH-Lösung auf einen pH-Wert ≥ 12 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde 16 h bei RT gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels Anionenaustauscher gereinigt. 4 mL des gequollenen Anionenaustauschers (OH-Form) wurden in eine Säule überführt, mit 50 mL destilliertem Wasser gespült und dabei langsam mit Methanol/Wasser (1:1; V:V; entgast) konditioniert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch aufgetragen und mit Methanol/Wasser (1:1; V:V, entgast) gewaschen, bis der Eluent neutral austrat. Die Elution erfolgt in Fraktionen mit 2 M methanolischer Essigsäure-Lösung und wurde mittels DC kontrolliert. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und das Lösungsmittel weitestgehend unter Vakuum entfernt. Die Lösung wurde mit 50 mL destilliertem Wasser verdünnt und lyophilisiert. Es wurde ein rosa-weißliches Lyophilisat erhalten.

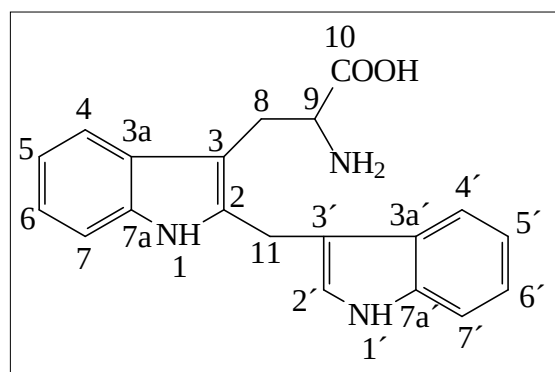
Reaktionsverfolgung:**DC**

mobile Phase: Ethylacetat/Eisessig/ Wasser
(4:1:1; V:V:V)

R_F Wert: 0.71

Ausbeute:

198 mg (594 μmol) 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan (77%, bezogen auf 2-(3'-Indolylmethyl)tryptophanethylester.

Charakterisierung:

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ =3.00 (dd, 1H, H-8 α), 3.39 (dd, 1H, H-8 β), 3.55 (dd, 1H, H-9 α), 4.10 (d, 1H, H-11), 4.29 (d, 1H, H-9 β), 6.91 (dd, 1H, 5-H), 6.93 (dd, 1H, 5-H'), 6.94 (dd, 1H, H-6), 7.03 (dd, 1H,

H'-6), 7.13 (d, 1H, H-2'), 7.23 (d, 1H, H-7), 7.32 (d, 1H, H-7'), 7.49 (d, 1H, H-4'), 7.53 (d, 1H, H-4), 10.68 (bs, 1H, H-1'), 10.86 (bs, 1H, H-1) ppm.

Kopplungskonstanten:

$^2J_{\text{H-8}\alpha,\text{H-8}\beta}$ =14.8, $^3J_{\text{H-8}\alpha,\text{H-9}}$ =9.2, $^3J_{\text{H-8}\beta,\text{H-9}}$ =4.6, $^2J_{\text{H-11}\alpha,\text{H-11}\beta}$ =16.3, $^3J_{\text{H-4},\text{H-5}}$ =7.8, $^3J_{\text{H-5},\text{H-6}}$ =8.3, $^3J_{\text{H-6},\text{H-7}}$ =8.2, $^3J_{\text{H-1},\text{H-2}}$ = 2.0 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO): δ =21.5 (C-9), 22.2 (C-8), 27.1 (C-11); 105.4 (C-3), 111.1 (C-7), 111.7 (C-7'), 112.5 (C-3'), 118.1 (C-4'), 118.6 (C-5'und C-4), 118.8 (C-5), 120.5 (C-6), 121.3 (C-6'), 123.6 (C-2'), 127.3 (C-3a'), 128.5 (C-3a), 135.9 (C-2), 136.6 (C-7a') 137.3 (C-7a), 170.9 (C-10) ppm.

MS (70 eV, EI): 333 (45, M⁺), 315 (14), 302 (6), 289 (12), 260 (40), 259 (100), 257 (28), 256 (15), 144 (6), 142 (12, C₉H₆NCH₂⁺), 130 (24, C₈H₉N⁺), 115 (16, CH₂CHNH₂CO₂C₂H₅⁺), 103 (7, C₈H₇⁺), 90 (6), 77 (10, C₆H₅⁺), 58 (3, C₃H₈N⁺).

IR (KBr): 748 (m), 1331 (w), 1399 (m), 1421 (m), 1438 (m), 1459 (m), 1474 (w), 1490 (m), 1498 (m), 1508 (m), 1523 (m), 1542 (m), 1560 (m), 1578 (m), 1619 (s), 1625 (s), 1637 (s), 1654 (m), 1672 (m), 1686 (m), 1695 (m), 1717 (m, COOH), 3296 (w), 3477 (s, NH), 3413 (s, NH₂), 3422 (s), 3504 (m), 3528 (m), 3546 (m), 3568 (m), 3588 (m), 3596 (w), 3610 (w), 3619 (w), 3629 (w), 3649 (w), 3678 (w), 3691 (w), 3752 (w), 3806 (w), 3854 (w).

Schmelzpunkt: 202°C (Zersetzung)

Elementaranalyse:

<i>Element</i>	<i>C</i>	<i>H</i>	<i>N</i>
Berechnet [%]	72.1	5.7	12.6
Gefunden [%]	71.9	5.7	12.4

Reinheit: >98% (HPLC-Bedingungen: siehe Kap. 7.2.2.)

7.4.2. Bildungsbedingungen von IMT

7.4.2.1. Verwendete Puffer- und StammLösungen

Alle Pufferlösungen wurden mit Hilfe einer pH-Elektrode auf den genauen pH-Wert eingestellt.

Trp-Lösung, pH=2 bzw. pH=3

Zur Herstellung der 25 mM Trp-Lösung (pH=2 bzw. pH=3) wurden 250.6 mg Trp in ein 100 mL Becherglas eingewogen und mit 40 mL dest. Wasser versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl (0.1 M) auf pH=2.00 bzw. pH=3.00 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 50 mL Meßkolben überführt und mit dest. Wasser aufgefüllt.

Phosphatpuffer, pH=3

Zur Herstellung des 0.1 M Phosphatpuffers (pH=3) wurden 17.84 g *di*-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat in ein 800 mL Becherglas eingewogen und mit 750 mL dest. Wasser versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl (0.1 M) auf pH=3.00 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 1000 mL Meßkolben überführt und mit dest. Wasser aufgefüllt.

Acetatpuffer, pH=4 bzw. pH=5

Zur Herstellung des 1 M Acetatpuffers (pH=4 bzw. 5) wurden 7.71 g Ammoniumacetat in ein 150 mL Becherglas eingewogen und mit 75 mL dest. Wasser versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl (0.1 M) auf pH=4.00 bzw. pH=5.00 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 mL Meßkolben überführt und mit dest. Wasser aufgefüllt.

Phosphatpuffer, pH=6 bzw. pH=7

Zur Herstellung des 0.1 M Phosphatpuffers (pH=6 bzw. 7) wurden 1.78 g *di*-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat in ein 150 mL Becherglas eingewogen und mit 75 mL dest. Wasser versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl (0.1 M) auf pH=6.00 bzw. pH=7.00 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 mL-Meßkolben überführt und mit dest. Wasser aufgefüllt.

Ammoniumpuffer, pH=8

Zur Herstellung des 1 M Ammoniumpuffers (pH=8.00) wurden 7.71 g Ammoniumacetat in ein 150 mL Becherglas eingewogen und mit 75 mL dest. Wasser versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit NaOH (0.1 M) auf pH=8.00 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 mL Meßkolben überführt und mit dest. Wasser aufgefüllt.

Trp-Lösung, pH=9 bzw. pH=10

Zur Herstellung der 25 mM Tryptophanlösung (pH=9 bzw. pH=10) wurden 250.6 mg Trp in ein 100 mL Becherglas eingewogen und mit 40 mL dest. Wasser versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit NaOH (0.1 M) auf pH=9.00 bzw. pH=10 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 50 mL-Meßkolben überführt und mit dest. Wasser aufgefüllt.

Phosphatpuffer, pH=11.5

Zur Herstellung des 0.1 M Phosphatpuffers (pH=11.5) wurden 1.79 g *di*-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat in ein 150 mL Becherglas eingewogen und mit 75 mL dest. Wasser versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit NaOH auf pH=11.50 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 mL-Meßkolben überführt und mit dest. Wasser aufgefüllt.

Trp-StammLösung (25.0 mmol/l)

255.0 mg Trp wurden in einen 50 mL Meßkolben eingewogen und mit dest. Wasser aufgefüllt.

Trp-StammLösung pH=2 (100.0 mmol/l)

511.0 mg Trp wurden in einen 25 mL Meßkolben eingewogen und mit 15 mL dest. Wasser suspendiert. Die Suspension wurde mit 1 M HCl auf pH=2.0 eingestellt und mit dest. Wasser aufgefüllt.

Trp-StammLösung pH=3 (25.0 mmol/l)

255.0 mg Trp wurden in einen 50 mL Meßkolben eingewogen und mit 0.1 M Phosphatpuffer (pH=3) aufgefüllt.

Trp-Lösung pH=3 (2.5 mmol/l)

10 mL der Trp-StammLösung (25.0 mmol/l) wurden in einen 100 mL Meßkolben mit 0.1 M Phosphatpuffer (pH=3) aufgefüllt.

3-Indolylacetaldehyd-StammLösung (50.0 mmol/l)

26.0 mg (0.1 mmol) des IAc-Natriumhydrogensulfitadduktes wurden entsprechend **Kap. hh** geschützt. Der Rückstand der Diethylether-Extraktion wurde in 1 mL Methanol aufgenommen und quantitativ in einen 2 mL-Meßkolben überführt und mit 0.1%-iger TFA aufgefüllt.

3-Indolylmethanol-StammLösung (25.0 mmol/l)

371.59 mg 3-Indolylmethanol wurden in einen 100 mL Meßkolben eingewogen und mit Acetonitril aufgefüllt. Diese Lösung wurde vor Gebrauch immer frisch angesetzt.

3-Indolylmethanol-Lösung (2.5 mmol/l)

1 mL der 3-Indolylmethanol-StammLösung (25.0 mmol/l) wurden in einem 10 mL Meßkolben mit Acetonitril aufgefüllt.

3-Indolylpyruvat-StammLösung (25.0 mmol/l)

10.14 mg 3-Indolylpyruvat wurden in einen 2 mL Meßkolben eingewogen und mit Acetonitril aufgefüllt. Diese Lösung wurde vor Gebrauch immer frisch angesetzt.

3-Indolylessigsäure-StammLösung (25.0 mmol/l)

45.44 mg 3-Indolylessigsäure wurden in einen 10 mL Meßkolben eingewogen und mit Acetonitril aufgefüllt.

Indol-StammLösung (25.0 mmol/l)

29.58 mg Indol wurden in einen 10 mL Meßkolben eingewogen und mit Acetonitril aufgefüllt.

Formaldehyd-StammLösung (25.0 mmol/l)

25.7 µl 37 %-ige Formaldehydlösung wurden in einen 100 mL Meßkolben pipettiert und mit dest. Wasser aufgefüllt.

IMT-StammLösung (100 mg/l)

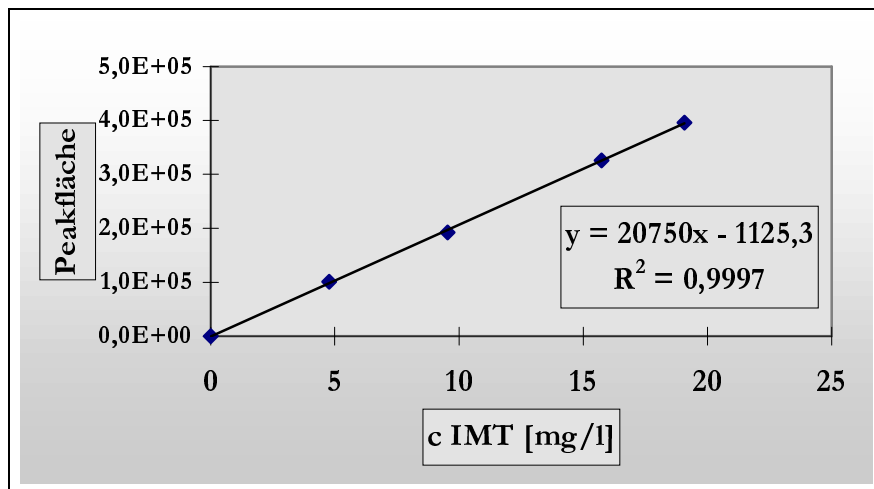
10.16 mg 2-(3'-Indolylmethyl)tryptophan wurden in einen 100 mL Meßkolben eingewogen und mit dest. Wasser aufgefüllt.

IMT-Standardlösungen (1, 5, 10, 20, 25 mg/l)

Jeweils 1, 5, 10, 20 und 25 mL der StammLösung (100 mg/l) wurden in 100 mL Meßkolben pipettiert und mit dest. Wasser aufgefüllt.

7.4.2.2. IMT-Kalibrierung

Aus den fünf IMT-Standardlösungen (1, 5, 10, 20 und 25 mg/l wurde eine Kalibriergerade mittels HPLC aufgenommen (siehe **Kap. 7.4.2.1.**).



7.4.2.3. 3-Indolylmethylderivate, Indol und Formaldehyd

Das molare Verhältnis von Trp und dem verwendeten 3-Indolylmethylderivat betrug immer 5:1. Die Lösungen wurden nach folgender Tabelle in 4 mL Braunglasvials pipettiert:

Reaktionsansatz	3-Indolylmethylderivat (µl) (c=25 mmol/l)	Trp-Lösung (µl) (c=25 mmol/l)
3-Indolylacetaldehyd, pH=2	800 (c=50 mmol/l)	2000 (pH=2) (c=100 mmol/l)
3-Indolylmethanol, pH=3	200	1000 (pH=3)
3-Indolylmethanol, pH=9	200	1000 (pH=9)
3-Indolylpyruvat, pH=3	200	1000 (pH=3)
3-Indolylpyruvat, pH=9	200	1000 (pH=9)
3-Indolyllessigsäure, pH=3	200	1000 (pH=3)
3-Indolyllessigsäure, pH=9	200	1000 (pH=9)

Reaktionsansatz	Trp-Lsg. (µl) [c=25 mmol/l]	Indol-Lsg. (µl) [c=25 mmol/l]	Formaldehyd-Lsg. (µl) [c=25 mmol/l]	Puffer-Lsg. (µl)
pH=2	1000 (pH=2)	100	100	-
pH=3	1000 (pH=3)	100	100	-
pH=4	500 (pH=3)	100	100	600 (pH=4)
pH=7	500 (in H ₂ O)	100	100	600 (pH=7)
pH=8	500 (in H ₂ O)	100	100	600 (pH=8)
pH=9	1000 (pH=9)	100	100	-
pH=10	1000 (pH=10)	100	100	-
pH=11.5	500 (pH=10)	100	100	600 (pH=11.5)

Reaktions- ansatz	Trp-Lsg. (μl) [c=25 mmol/l]	Indol-Lsg. (μl) [c=25 mmol/l]	Formaldehyd-Lsg. (μl) [c=25 mmol/l]	HCl (μl)
pH = 0	500 (in H ₂ O)	100	100	600 (2 M)
pH = 1	500 (in H ₂ O)	100	100	600 (0.2 M)

Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei RT gerührt und anschließend mittels HPLC und UV-Detektion bei 280 nm auf gebildetes IMT untersucht (siehe **Kap. 7.2.2.**). Dafür wurden die Lösungen 1:50 bzw. 1:100 verdünnt und gegebenenfalls mit 1 M Essigsäure-Lösung angesäuert. Die Auswertung erfolgt über externe Standardkalibrierung (siehe **Kap. 7.4.2.2.**) durch Vergleich der Retentionszeiten und durch Dotierung.

7.4.2.4. pH-Abhängigkeit der IMT-Bildung

Das molare Verhältnis von Trp und IM betrug immer 5:1. Die Lösungen wurden nach folgender Tabelle in 4 mL Braunglasvials pipettiert:

Reaktions- ansatz	Trp-Lsg. (μl) (c=25 mmol/l)	IM-Lsg. (μl) (c=25 mmol/l)	Puffer-Lsg. (μl)
pH=1	500 (pH=3)	100	600 HCl (0.2M)
pH=2	1000 (pH=2)	200	-
pH=3	1000 (pH=3)	200	-
pH=4	500 (in H ₂ O)	100	600 (pH=4)
pH=5	500 (in H ₂ O)	100	600 (pH=5)
pH=6	500 (in H ₂ O)	100	600 (pH=6)
pH=7	500 (in H ₂ O)	100	600 (pH=7)
pH=8	500 (in H ₂ O)	100	600 (pH=8)
pH=9	1000 (pH=9)	200	-
pH=10	1000 (pH=10)	200	-
pH=11.5	500 (pH=10)	100	600 (pH=11.5)

Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei RT gerührt und anschließend mittels HPLC und UV-Detektion bei 280 nm auf gebildetes IMT untersucht (siehe **Kap. 7.2.2.**). Dafür wurden die Lösungen 1:100 verdünnt und gegebenenfalls mit 1 M Essigsäure-Lösung angesäuert. Die Auswertung erfolgte über externe Standardkalibrierung (siehe **Kap. 7.4.2.2.**) durch Vergleich der Retentionszeiten und anschließender Berechnung des prozentualen Anteiles der Peakfläche von IMT zur Peakfläche des Trp's.

7.4.2.5. Abhängigkeit der IMT-Bildung vom molaren Verhältnis zwischen Trp und IM

Die Lösungen wurden nach folgender Tabelle in 4 mL Braunglasvials, bzw. 20 mL Meßkolben pipettiert :

Verhältnis IM:Trp	Trp-Lsg. (µl)	IM-Lsg. (µl) (c=2.5 mmol/l)	Phosphatpuffer (µl) (pH=3, c=0.1 M)
1:1	100 (c=2.5 mmol/l)	100	1800
1:5	500 (c=2.5 mmol/l)	100	1400
1:10	1000 (c=2.5 mmol/l)	100	900
1:50	500 (c=25 mmol/l)	100	1400
1:100	1000 (c=25 mmol/l)	100	900
1:500	5000 (c=25 mmol/l)	100	14100
1:1000	10000 (c=25 mmol/l)	100	9900

Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei RT gerührt und anschließend mittels HPLC und UV-Detektion bei 220 nm auf die Menge des gebildeten IMT untersucht (siehe Kap. 7.2.2.). Die Auswertung erfolgte über externe Standardkalibrierung (siehe Kap. 7.4.2.2.). Der Gehalt an IMT wurde in den Reaktionsansätzen berechnet und auf die eingesetzte Menge IM bezogen.

7.4.2.6. Abhängigkeit der IMT-Bildung von der Zeit

Es wurden 5 mL 25 mmol/l Trp-Lsg., 100 µl 2.5 mmol/l IM-Lsg. und 14.1 mL 0.1 M Phosphatpuffer (pH=3) in einen 20 mL Meßkolben pipettiert und bei RT gerührt. Die Lösung wurde in 30 min Abständen auf die Menge des gebildeten IMT mittels HPLC und UV-Detektion bei 280 nm untersucht (siehe Kap. 7.2.2.). Die Auswertung erfolgte über externe Standardkalibrierung (siehe Kap. 7.4.2.2.).

7.4.3. Entwicklung einer Schnellsynthese von 2-(3'-Indolylmethyl)tryptophan

7.4.3.1. Verwendete Trp-StammLösungen

Alle StammLösungen wurden mit Hilfe einer pH-Elektrode auf den genauen pH-Wert eingestellt.

Trp-StammLösungen, pH=2, pH=3 und pH=4

Zur Herstellung der 27 mM Trp-StammLösungen (pH=2, pH=3 und pH=4) wurden 550 mg Trp in ein 100 mL Becherglas eingewogen und in 50 mL dest. Wasser suspendiert. Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl (0.5 M) auf pH=2.00, pH=3.00 und pH=4.00 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in einen 100 mL Meßkolben überführt und mit dest. Wasser aufgefüllt. Es wurden je 10 mL der Trp-StammLösungen verwendet.

7.4.3.2. Optimierung der IMT-Bildung mittels Faktorenanalyse

Zu je 10 mL der Trp-StammLösungen wurden die entsprechenden molaren Mengen an IM, die aus der Planmatrix hervorgehen, zugesetzt. Das IM wurde in je 1 mL Methanol vorgelöst und in-

nerhalb von ca. 20 Sekunden über eine Spritze der Trp-Lösung zugetropft und der Ansatz bei RT gerührt. Die Reaktionszeit für die Versuche 1-4 betrug 30 min; für die Versuche 5-8 90 min. Die Nullpunkte des Versuchplans, die Ansätze 9-11, wurden 60 Minuten gerührt. Die genaue Zusammensetzung der Versuchslösungen und deren Auswertung über die durch lineare Regression erhaltene Geradengleichung ($y=20750x-1125.3$) der IMT-Kalibrierung (siehe **Kap. 7.4.2.2.**) ist in nachfolgender Tabelle dokumentiert.

Versuch	Trp-Lösung je 10 mL (pH)	IM (mg)	IMT (mg/l)	UV-aktive Kontaminanten (mg/l)
1	2	10.1	10.77	5.18
2	2	39.9	15.18	8.91
3	4	10.2	8.20	3.30
4	4	40.3	10.29	4.69
5	2	10.2	10.83	4.85
6	2	40.0	14.58	9.69
7	4	10.1	10.77	5.07
8	4	40.1	10.46	4.56
9	3	20.0	14.57	6.31
10	3	20.0	13.54	5.49
11	3	20.2	15.48	6.26

Nach einer Membranfiltration wurden die Lösungen 1:100 mit 0.1%-iger TFA verdünnt und über RP-HPLC-UV bei 280 nm analysiert (siehe **Kap. 7.2.2.**).

7.4.3.3. Schnellsynthese von 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan

Durchführung:

Eine Suspension aus 1.1 g (5.4 mmol) Trp und 100 mL dest. Wasser wurde mit 0.5 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Dabei löste sich das Trp vollständig. Unter Rühren wurden 400 mg (2.7 mmol) IM, gelöst in 3 mL eiskaltem Methanol, innerhalb von 2 min mittels Spritze zugetropft und die milchige Suspension 1 h bei RT gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch zuerst über Celite filtriert und anschließend membranfiltriert (0.45 µm RC). Das Filtrat wurde dreimal mit je 30 mL *n*-Butanol/Ethylacetat (1:1) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittelgemisch bei max. 40°C am Vakuumrotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene weiße Feststoff wurde in 10 mL Methanol in der Siedehitze gelöst, die Lösung am Vakuumrotationsverdampfer auf 4 mL eingengt und das ausfallende Tryptophan abfiltriert. Das Filtrat wurde mit einem Eluenten aus Ethylacetat/1 M Essigsäure (4:1), (Ansetzen der Essigsäure: 2 M wäßrige Essigsäure mit Methanol 1:1 verdünnen) säulenchromatographisch gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und die organischen Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Dabei wurde häufiger für das verdampfte Lösungsmittel Wasser zugegeben. Zu der verbliebenen wäßrigen Lösung wurde eine Spatelspitze Aktivkohle gegeben und bei RT für 15 min gerührt. Dabei wurde mittels HPLC (siehe **Kap. 7.2.2.**) die Reinheit des Produktes und die Menge an noch zuzugebener Aktivkohle überprüft. Nach Membranfiltration wurde die klare Lösung unter Lichtausschluß lyophilisiert.

Reaktionsverfolgung:

HPLC

HPLC-Bedingungen: siehe Kap.7.2.2.

DC

mobile Phase: Ethylacetat/1 M Essigsäure
(4:1; V:V)

R_f Wert: Trp 0.09
IMT 0.24

Ausbeute:

90 mg (271 µmol) 2-(3'-Indolylmethyl)-tryptophan (14%, bezogen auf 3-Indolylmethanol.

Charakterisierung:

siehe **Kap. 7.2.1.9.**

Reinheit: >96% (HPLC-Bedingungen: siehe Kap. 7.2.2.)

7.5. IMTHCC

7.5.1. Bildungsbedingungen von IMTHCC

7.5.1.1. Verwendete Puffer- und Stammlösungen

Alle Pufferlösungen wurden mit Hilfe einer pH-Elektrode auf den genauen pH-Wert eingestellt.

Trp-Lösung, pH=2 bzw. pH=3

siehe Kap.7.4.2.1.

Acetatpuffer, pH=4 bzw. pH=5

siehe Kap.7.4.2.1.

Phosphatpuffer, pH=6

siehe Kap.7.4.2.1.

Trp-Lösung (25.0 mmol/l)

siehe Kap.7.4.2.1.

IAC-Lösung (ca. 25 mmol/l)

Es wurden 200 mg des Natriumhydrogensulfit-Adduktes analog Gray entschützt: Die Substanz wurde in 8 mL dest. Wasser gelöst und mit ges. Natriumcarbonatlösung tropfenweise auf pH=10 eingestellt, wobei eine Trübung der Lösung zu beobachten war. Nach 5 min wurde dreimal mit je 5 mL Diethylether extrahiert und die organische Phase am Vakuumrotationsverdampfer bei leichtem Vakuum (900 mbar) und unter RT vollständig entfernt. Es wurden 80 mg (0.5 mmol) IAC unter der Annahme der vollständigen Freisetzung des Aldehyden erhalten, in 10 mL Methanol aufgenommen und nach Überführung in einen 20 mL Meßkolben bis zur Marke mit dest. Wasser aufgefüllt.

7.5.1.2. pH-Abhängigkeit der IMTHCC-Bildung

Das molare Verhältnis von Trp und IAC betrug immer 5:1. Die Lösungen wurden nach folgender Tabelle in 4 mL Braunglasvials pipettiert:

Reaktions- ansatz	Trp-Lsg. (µl) (c=25 mmol/l)	IAC-Lsg. (µl) (c=25 mmol/l)	Puffer-Lsg. (µl)
pH=0	500 (pH=2)	100	600 HCl (1 M)
pH=1	500 (pH=3)	100	600 HCl (0.1 M)
pH=2	1000 (pH=2)	200	-
pH=3	1000 (pH=3)	200	-
pH=4	500 (in H ₂ O)	100	600 (pH=4)
pH=5	500 (in H ₂ O)	100	600 (pH=5)
pH=6	500 (in H ₂ O)	100	600 (pH=6)

Die Reaktionsansätze wurden über 48 h bei RT unter Lichtausschluß gerührt und mittels RP-HPLC-UV (siehe **Kap. 7.2.2.**) auf gebildete IMTHCC-Diastereoisomere untersucht. Die Lösungen wurden zur HPLC-Analyse 1:100 verdünnt. Zur Auswertung der prozentualen IMTHCC-Gehalte wurden die entsprechenden Peakflächen durch die Trp-Peakfläche dividiert und mit dem Faktor 100 multipliziert.

7.5.1.3. Abhängigkeit der IMTHCC-Bildung von der Zeit

Es wurden 10 mL der 25 mM Trp-Lösung mit 1 mL der ca. 25 mM IAc-Lösung versetzt und mit 1 M HCl auf pH=2 eingestellt. Die Lösung wurde unter Lichtausschluß bei RT gerührt und in ca. 45 minütigen Abständen über RP-HPLC-UV bei 280 nm vermessen (siehe **Kap. 7.2.2.**).

7.5.2. Synthese von IMTHCC

7.5.2.1. Synthese von 3-Indolylacetaldehyd

Durchführung:

Eine Lösung aus 3.12 g (20 mmol) 3-Indolylacetonitril und 40 mL abs. Benzol wurden mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 22 mL einer 1 M DIBAH-Lösung (in Toluol) innerhalb von 10 min zugetropft. Die resultierende gelblich-bräunliche Lösung wurde 1 h bei 0°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter starkem Rühren in 200 mL ges. Weinsäurelösung getropft. Die heterogene Mischung wurde viermal mit je 200 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, mit 100 mg Aktivkohle versetzt und über Celite abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde bei 20°C unter Vakuum entfernt. Die verbleibende Lösung wurde mit 40 mL Natriumhydrogensulfit-Lösung versetzt und 1 h bei 0°C kräftig gerührt. Die sich bildenden weißen Kristalle wurden abgesaugt und unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute:

3.4 g (13 mmol) 3-Indolylacetaldehyd-NaHSO₃ (66 %, bezogen auf 3-Indolylacetonitril).

Charakterisierung:

Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit wurde auf eine komplette Strukturaufklärung verzichtet.

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
Berechnet [%]	75.4	5.7	8.8
Gefunden [%]	75.1	5.7	8.7

7.5.2.2. Synthese von IMTHCC

Durchführung:

1,0g (3.8 mmol) Indolacetaldehyd- NaHSO_3 Addukt wurden in 40 mL dest. Wasser gelöst und die resultierende Lösung tropfenweise mit einer ges. Natriumcarbonat-Lösung auf $\text{pH}=10$ eingestellt. Nach 5 min wurde die wäßrige Phase dreimal mit je 30 mL Diethylether extrahiert, die organische Phase getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der entschützte 3-Indolylacetaldehyd wurde in 20 mL THF aufgenommen und zu einer Lösung aus 500 mg (2.4 mmol) Tryptophan, 10 mL dest. Wasser und 2 mL 0.5 M Schwefelsäure-Lösung in einem Braunglaskolben getropft. Der pH -Wert der resultierenden Mischung wurde mit 0.5 M Schwefelsäure-Lösung auf $\text{pH}=1$ eingestellt. Nach 48 h Rühren bei RT wurde die Reaktion abgebrochen. Die Lösungsmittel wurden unter Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand in 3 mL Eluent (Etylacetat/1 M Essigsäure-Lösung, 4:1; Ansetzen der 1 M Essigsäure-Lösung: 2 M wäßrige Essigsäure-Lösung mit Methanol 1:1 verdünnen) gelöst und säulenchromatographisch gereinigt. Die Produktfraktionen wurden gesammelt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisation aus 2-Propanol/Hexan gereinigt. Dabei erfolgt auch die Trennung der Diastereoisomere.

Reaktionsverfolgung:

HPLC: siehe HPLC-Bedingungen++

DC

mobile Phase: Etylacetat/1N Essigsäure
(4:1; V:V)

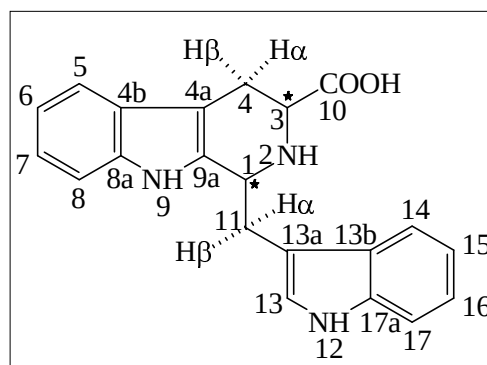
R_f-Wert: IMTHCC: 0.28
Tryptophan 0.08

Ausbeute:

200 mg (0.58 mmol) eines Gemisches aus 50% cis- und 50% trans-Isomer von 2-(3'-Indolylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure (24 %, bezogen auf Tryptophan).

Charakterisierung:

Zur kompletten Strukturaufklärung wurde nur das cis-Isomer herangezogen



¹H-NMR (400 MHz, DMSO): $\delta=2.71$ (dd, 1H, H-11 β), 3.05 (dd, 1H, H-11 α), 3.13 (dd, 1H, H-4 β), 3.49 (dd, 1H, H-1), 3.79 (dd, 1H, H-4 α), 4.68 (dd, 1H, H-3), 6.96 (dd, 1H, H-6), 6.98 (dd, 1H, H-16), 7.05 (dd, 1H, H-7), 7.08 (dd, 1H, H-15), 7.23 (s, 1H, H-13), 7.38 (dd, 1H, H-17), 7.40 (dd, 1H, H-8), 7.41 (dd, 1H, H-14), 11.02 (s, 2H, NH) ppm.

Kopplungskonstanten:

$^3J_{H-1,H-11\alpha}=11.7$, $^3J_{H-1,H-11\beta}=4.1$,
 $^2J_{H-11\alpha,H-11\beta}=16.1$, $^3J_{H-3,H-4\alpha}=11.3$,
 $^3J_{H-3,H-4\beta}=4.9$, $^2J_{H-4\alpha,H-4\beta}=16.1$, $^3J_{H-5,H-6}=7.6$,
 $^4J_{H-5,H-7}=1.2$, $^3J_{H-6,H-7}=8.1$, $^4J_{H-6,H-8}=1.3$,
 $^3J_{H-7,H-8}=8.1$, $^3J_{H-12,H-13}=2.0$, $^3J_{H-14,H-15}=7.7$,
 $^4J_{H-14,H-16}=1.2$, $^3J_{H-15,H-16}=8.1$, $^4J_{H-15,H-17}=1.2$,
 $^3J_{H-16,H-17}=8.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO): $\delta=23.8$
 (C-11), 29.6 (C-4), 51.2 (C-3), 57.5 (C-1),
 106.7 (C-4a), 109.4 (C-13a), 111.5 (C-13),
 111.8 (C-8 und C-17), 118.9 (C-14), 119.0
 (C-5), 121.3 (C-15), 121.4 (C-6), 124.5
 (C-16), 124.6 (C-7), 126.8 (C-9a), 127.6
 (C-13b), 127.9 (C-4b), 136.6 (C-17a), 136.7
 (C-8a), 168.5 (C-10) ppm.

MS (70 eV, EI): 345 (8, M^+), 297 (10), 272
 (18), 271 (17), 215 (12), 172 (7), 171 (40),
 168 (18), 145 (12), 130 (100, $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}^+$), 117
 (21), 103 (7), 90 (10), 77 (14), 63 (8), 52 (6).

IR (KBr): 426 (w), 591 (w), 712 (w), 743 (s),
 1221 (w), 1340 (m), 1400 (s), 1438 (m), 1455
 (m), 1627 (s), 2733 (w), 2759 (w), 2778 (w),
 2790 (w), 2852 (w), 2927 (m), 2965 (m),
 3056 (m), 3117 (m), 3222 (s), 3239 (m), 3283
 (m), 3306 (s), 3318 (m), 3328 (m), 3307 (s),
 3528 (w).

Schmelzpunkt: 201°C (Zersetzung)

Elementaranalyse:

Element	C	H	N
Berechnet [%]	73.0	5.5	12.2
Gefunden [%]	72.6	5.3	12.0

Reinheit: >99% (HPLC-Bedingungen+++)

7.6. Bildung von dhPIT

7.6.1. dhPIT-Nachweis aus in situ gebildetem 3-Indolylglycerin

Das molare Verhältnis von Trp, Indol und D-(R)-Glycerinaldehyd betrug 10:1:1. Es wurden 800 mg Trp (4.0mmol), 45 mg Indol (0.4 mmol), gelöst in 1 mL THF, und 35 mg D-(R)-Glycerinaldehyd (0.4 mmol) in ca. 30 mL dest. Wasser suspendiert. Nach Einstellung des Reaktionsansatzes mit 2 M HCl-Lösung auf pH=2.0 wurde die klare Lösung auf ca. 50 mL mit dest. Wasser aufgefüllt und in einen 50 mL Braunglas-Rundkolben überführt. Bei der Wiederholung des Versuches wurde die Lösung mit 2 M HCl-Lösung auf pH=0.5 eingestellt und analog zum ersten Versuchsansatz verfahren. Die Analyse der Lösung erfolgte über RP-HPLC-UV (siehe **Kap. 7.2.2.**) und über Fluoreszenzdetektion. Der qualitative dhPIT-Nachweis wurde über die Dotierung einer dhPIT-haltigen SD-Trp-Charge erbracht. Hierzu wurden 1 mL einer SD-Trp-StammLösung (5 mg/mL) und 200 µl des Reaktionsansatzes (1:100) in ein 2 mL HPLC-Vial pipettiert und vermessen (siehe **Kap. 7.2.2.**). Über die Berechnung der anteiligen dhPIT-Flächen des SD-Trp und des Versuchsansatzes erfolgte die Auswertung durch Vergleich des zu erwartenden dhPIT-Soll-Wertes mit dem analysierten Ist-Wert.

dhPIT	Ansatz	1/6·Ansatz	SD-Trp	5/6·SD-Trp	Dotierung (Ist-Wert)	Dotierung (Soll-Wert)
UV	178444	29741	36377	30314	57362	60055
Fluoreszens	2625244	437541	545672	454727	871382	892268

8. Literatur

AIDA, K., CHIBATA, I., NAKAYAMA, K., TAKINAMI, K., YAMADA, H., Biotechnology of Amino Acid Production: Elsevier, Amsterdam, **1986**, 231-236.

AMAT-GUERRI, F., LOPEZ-GONZALEZ, M.M.C., MARTINEZ-UTRILLA, R., Dye-Sensitized Photooxidation of 1-Methylindolyl-3-acetic Acid: *Tetrahedron*, **1983**, 24, 3749-3752.

AMAT-GUERRI, F., MARTINEZ-UTRILLA, R., PASCUAL, C., Condensation of 3-Hydroxymethylindoles with 3-Substituted Indoles. Formation of 2,3'-Methylenediindole Derivates: *J. Chem. Research (S)*, **1984**, 160-161.

ANDERSON, K.S., KIM, A.Y., QUILLEN, J.M., SAYERS, E., YANG, X.J., MILES, E.W., Kinetic Characterization of Channel Impaired Mutants of Tryptophan Synthase: *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 29936-29944.

APPEL, R., Tertiäres Phosphan/Tetrachlormethan, ein vielseitiges Reagens zur Chlorierung, Dehydratisierung und PN-Verknüpfung: *Angew. Chem.*, **1975**, 87, 863-880.

ARDAKANI, A. A., MALEKI, N., SAADEIN, M. R., 1,2-Diphenyl-3-azanaphtho[b]cyclobutadiene: *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 4128-4131.

ASAI, G., Process for Preparation of L-Tryptophan by Enzyme. US Patent No. 4335209, **1982**.

BANG, W.-G., BEHRENDT, U., LANG, S., WAGNER, F., Continuous Production of SCL-Tryptophan from Indole and SCL-Serine by Immobilized Escherichia Coli Cells: *Biotechnol. Bioeng.*, **1983a**, 25, 1013-1025.

BANG, W.-G., LANG, S., SAHM, H., WAGNER, F., Production of L-Tryptophan by Escherichia Coli Cells: *Biotechnol. Bioeng.*, **1983b**, 25, 999-1011.

BELONGIA, E.A., HEDBERG, C.W., GLEICH, G.J., WHITE, K.E., MAYENO, A.N., LOEGERING, D.A., DUNNETTE, S.L., PIRIE, P.L., MACDONALD, K.L., OSTERHOLM, M.T., An Investigation of the Cause of the Eosinophilia-Myalgia Syndrome Associated with Tryptophan Use: *N. Engl. J. Med.*, **1990**, 322, 357-365.

BfArM (BUNDESINSTITUT FÜR ARZNEIMITTEL UND MEDIZINPRODUKTE), Abwehr von Arzneimittelrisiken-L-Tryptophan-haltige Arzneimittel, Berlin, Bescheid vom 13.12.1995, **1995**.

BGA (Bundesgesundheitsamt), BGA veranlaßt Einschränkungen bei L-Tryptophan-haltigen Arzneimitteln: BGA-8963, *bga-pressedienst*, 12.12.1989, **1989a**.

BGA (Bundesgesundheitsamt), BGA ordnet vorläufigen Vertriebsstop für L-Tryptophan-haltige Schlafmittel an: BGA-8966, *bga-pressedienst*, 28.12.1989, **1989b**.

BGA (Bundesgesundheitsamt), BGA ordnet vorläufigen Vertriebsstop für niedrig dosierte L-Tryptophan-haltige Arzneimittel an: BGA-9041, *bga-pressedienst*, 28.09.1990, **1990**.

BRENNEISEN, R.; BORNER, S., Synthesis of Baeocystin, a Natural Psilocybin Analogue: *Arch. Pharm.*, **1988**, 8, 487-489.

BROSSI, A., FOCELLA, A., TEITEL, S., Alkaloids in Mammalian Tissues-Condensation of L-Tryptophan and L-Hydroxytryptophan with Formaldehyde and Acetaldehyde: *J. Med. Chem.*, **1973**, 16, 418-420.

BROWN, R.R., Tryptophan Metabolism: A Review. In: KOCHEN, W., STEINHART, H., L-Tryptophan-Current Prospects in Medicine and Drug Safety: Walter de Gruyter, Berlin, New York, **1994**, 17-30.

BUCKHOLTZ, N.S., Neurobiology of Tetrahydro- β -carbolines: *Life Sci.*, **1980**, 27, 893-903.

BUTENANDT, A.M., HELLMANN, H., RENZ, E., Über tertiäre Esterbasen als Zwischenprodukte bei der Synthese von Aminosäuren: *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.*, **1949**, 284, 168-175.

CAIN, M., WEBER, R.W., GUZMAN, F., COOK, J.M., BARKER, S.A., RICE, K.C., CRAWLEY, J.N., PAUL, S.M., SKOLNICK, P., β -Carbolines: Synthesis and Neurochemical and Pharmacological Actions on Brain Benzodiazepine Receptors: *J. Med. Chem.*, **1982**, 25, 1081-1091.

CARR, L., RUTHER, E., BERG, P.A., LEHNERT, H., Eosinophilia-Myalgia Syndrome in Germany-An Epidemiologic Review: *Mayo Clin. Proc.*, **1994**, 69, 620-625.

CDC (CENTERS OF DISEASE CONTROL), Eosinophilia-Myalgia Syndrome-New Mexico: *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **1989a**, 38, 765-767.

CDC (CENTERS OF DISEASE CONTROL), Eosiniphilia-Myalgia Syndrome and L-Tryptophan Containing Products-New Mexico, Minnesota, Oregon und New York: *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **1989b**, 38, 785-788.

CHEN, I., SAFE, S., BJELDANES, L., Indole-3-carbinol and Diindolylmethane as Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists and Antagonist in T47D Human Breast Cancer Cells: *Biochem. Pharmacol.*, **1996**, 51, 1069-1076.

COOK, J.M., ALLEN, M.S., HAMAKER, L.K., LA LOGGIA, A.J., Entry into 6-Methoxy-D(+)-tryptophans. Stereospecific Synthesis of 1-Benzenesulfonyl-6-methoxy-D-(+)-tryptophan-ethyl ester: *Synth. Commun.*, **1992**, 22, 2077-2102.

COOK, J.M., ZHANG, P., LIU, R., Regiospecific Bromination of 3-Methylindoles with N-Bromosuccinimide: *Tetrahedron*, **1995**, 36, 3103-3106.

DAB 9 (Deutsches Arzneibuch, 9. Ausgabe, 1. Nachtrag)-Tryptophan: Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, **1989**.

DARBRE, T., NUSSBAUMER, C., BORSCHBERG, H.-J., Synthesis of (-)-Hobartine and Related Indole Alkaloids: *Helv. Chem. Acta.*, **1984**, 67, 1038-1051.

DEGUSSA, Dt. Patent, De 2647255 (H. Offermanns, H. Weigel), **1978**.

DER SPIEGEL, Schlaflose Nächte-Die schweren Nebenwirkungen des Schlafmittels L-Tryptophan sind womöglich auf Fehler bei der gentechnischen Produktion zurückzuführen: **1990**, 41, 268-274.

DOBSON, D.; TODD, A.; GILMORE, J., The Synthesis of 7-Alkoxyindoles: *Synth. Commun.*, **1991**, 21, 611-617.

EARLE, M.J., ABDUR-RASHID, A., PRIESTLEY, N.D., Large Scale Synthesis of Cyclodiphospho-D-glycerate: *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 5697-5700.

EICH, E., ROCHELMMEYER, H., Über die präparative Anwendung der radikalischen Hydroxylierung von Indol: *Pharm. Acta Helv.*, **1966**, 41, 109-123.

EK, A.; WITKOP, B., The Synthesis of Labile Hydroxytryptophan Metabolites: *J. Amer. Chem. Soc.*, **1954**, 76, 5579-5588.

ELLINGER, A., Oxidation des Tryptophans zu β -Indolylaldehyd: *Ber.*, **1906**, 39.3, 2515-2522.

ELLINGER, A., FLAMAND, C., Über synthetisch gewonnenes Tryptophan und einiger seiner Derivate: *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.*, **1908**, 55, 8-24.

ESBENSEN, K., SCHONKOPF, S., MIDTGAARD, T., Multivariant Analysis in Practice: CAMO ASA, Trondheim, **1996**.

EULITZ, K.D., Synthese und Bestimmung von Aldehyd-Kondensationsprodukten des Tryptophans: Universität Hamburg, Abteilung Chemie, Dissertation, **1996**.

FAO/WHO/UNO, Expert Consultation, Energy and Protein Requirements: *WFO Techn. Rep. Ser.* **724**, Genf, **1985**.

FAURIE, R., FRIES, G., From Sugar Beet Molasses to Lyphan[®]-Integrated Quality Management from the Raw Material to the Drug: Plenum Verlag; New York, Tagungsband ISTRY'98, **1999** (im Druck).

FEIDEN, K., Monographie Tryptophan: *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **1994**, **134**, 3361-3362.

FISCHER, E., JOURDAN, F., Über die Hydrazine der Brenztraubensäure: *Ber.*, **1883**, **16**, 2241-2245.

FLEMING, I.; HEATHCOCK, C.; KENDE, A.S.; NOYORI, R., SEMMELHACK, M.F., SHARPLESS, K.B.; SMART, B.E.; VEDJES, E.J.; WHITE, J.D., Indoles from 2-Methylnitrobenzenes by Condensation with Formamide Acetals followed by Reduction: 4-Benzylxyindole: *Org. Syn.*, **1985**, **63**, 214-225.

FRESENIUS AG, Kalma[®] L-Tryptophan, die natürliche Aminosäure: Fresenius AG, Oberursel **1984**.

FUKAMI, T., YAMAKAWA, T., NIYAMA, K., KOJIMA, H., AMANO, Y., KANDA, F., OZAKI, S., FUKURODA, T., IHARA, M., YANO, M., ISHIKAWA, K., Synthesis and Structure-Activity Relationships of 2-Substituted D-Tryptophan-Containing Peptidic Endothelin Receptor Antagonists: Importance of the C-2 Substituted of the D-Tryptophan Residue for Endothelin A and B Receptor Subtype Selectivity: *J. Med. Chem.*, **1996**, **39**, 2313-2330.

FUSHO, Y., NAKAYAMA, A., YAMASHITA, A., MURATA, Y. (Showa Denko K.K.), Selection of Microbial Mutants Producing Amino Acids and Other Compounds. Jpn. Patent JP 61, 152, 277 [86, 152, 277] (1986) in: *Chem. Abstr.*, **1986**, **105**, 207593c.

GILCHRIST, T. L., LINGHAM, D. A., ROBERTS, T. G., Ethyl-3-Bromo-2-hydroxyiminopropanoate, a Reagent for the Preparation of Ethyl Esters of α -Amino Acids: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1979**, 1089-1090.

GODA, Y., SUZUKI, J., MAITANI, T., YOSHIHARA, K., TAKEDA, M., UCHIYAMA, M., 3-Anilino-L-alanine, Structural Determination of UV-5, a Contaminant in EMS-Assoziated L-Tryptophan Samples: *CHEM. PHARM. BULL.*, **1992**, 40, 2236-2238.

GRAY, R.A., Preparation and Properties of 3-Indolacetaldehyd: *Arch. Biochem Biophy.*, **1959**, 81, 480-488.

GREER, J.D., PETERS, M.K., JANSHEKAR, H., TAKEI, N, CEH-*Chemical Economics Handbook.-Marketing Research Report-Amino Acids*, SRI-International **1991**.

GROSS, G.A., GRÜTER, A., Quantitation of Mutagenic/Carcinogenic Heterocyclic Aromatic Amines in Food Products: *J. Chromatogr.*, **1992**, 592, 271-278.

GRUBBS, C. J., STEELE, V. E., CASEBOLT, T., JULIANA, M. M., ETO, I., WHITAKER, L. M., DRAGNEV, K. H., KELLOFF, G. J., LUBEZ, R. L., Chemoprevention of Chemically-Induced Mammary Carcinogenesis by Indole-3-carbinol: *Anticancer Res.*, **1995**, 15, 709-716.

HATAKEYAMA, K., KOBAYASHI, M., TERASAWA, M., YUGAWA, H. (Mitsubishi Chem. Corp., Jap.), Fermentative or Enzymic Manufacture of L-Tryptophan from Indole and L-Serine. Jpn. Patent JP 08, 103, 283 [96, 103, 283] (1996) in: *Chem. Abstr.*, **1996a**, 125, 84822f.

HATAKEYAMA, K., KOBAYASHI, M., TERASAWA, M., YUGAWA, H. (Mitsubishi Chem. Corp., Jap.), Fermentative or Enzymic Manufacture of L-Tryptophan from Indole and L-Serine. Jpn. Patent JP 08, 103, 284 [96, 103, 284] (1996) in: *Chem. Abstr.*, **1996b**, 125, 84823f.

HELLMANN, H., Über eine verbesserte Synthese von D,L-Tryptophan: *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.*, **1949**, 284, 163-167.

HERTZMANN, P.A., FALK, H., KILBOURNE, E.M., PAGE, S., SHULMAN, L.E., The Eosinophilia-Myalgia Syndrome-The Los Alamos Conference: *J. Rheumatol.*, **1991**, 18, 867-873.

HILL, R.H., CAUDILL, S.P., PHILEN, R.M., BAILEY, S.L., FLANDERS, W.D., DRISKELL, W.J., KAMB, M.L., NEEDHAM, L.L., SAMPSON, E.J., Contaminants in L-Tryptophan Associated with Eosiniphilia-Myalgia Syndrome: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **1993**, 25, 134-142.

HOPKINS, F.G., COLE, S.W., On the Proteid Reaction of Adamkiewicz, with Contribution to the Chemistry of Glyoxylic Acid: *Proc. R. Soc.*, **1902**, 68, 21-33.

HORIKAWA, H., NISHITANI, T., IWASAKI, T., INOUE, I., A Synthesis of Geminally Functionalized Heterocyclic Aminocarboxylic Acids by Cycloaddition of Ethyl N-Acetyl- α,β -Dehydroalaninate with 1,3-Dipoles: *Tetrahedron*, **1983**, 24, 2193-2194.

HOULIHAN, W. J., PARRINO, V. A., UIKE, Y., Lithiation of N-(2-Alkylphenyl)-alkanamides and Related Compounds. A Modified Madelung Indole Synthesis: *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 4511-4515.

HYDE, C.C., AHMED, S.A., PADLAN, E.A., MILES, E.W., DAVIES, D.R., Three-Dimensional Structure of the Tryptophan Synthase $\alpha_2\beta_2$ -Multienzym Complex from Salmonella Typhimurium: *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 17857-17863.

JACKSON, A.H., SMITH, P., Electrophilic Substitution in Indoles-III-Rearrangement of 3,3-Dialkylindolines: *Tetrahedron*, **1968**, 24, 2227-2239.

KAMB, M.L., MURPHY, J.J., JONES, J.L., CASTON, J.C., NEDERLOF, K., HORNEY, L.F., SWYGERT, L.A., FALK, H., KILBOURNE, E.M., Eosinophilia-Myalgia Syndrome in L-Tryptophan-Exposed Patients: *J. Am. Med. Assoc.*, **1992**, 267, 77-82.

KATSUMATA, I.L., RYOICHI, Y.L., IKEDA, K.O., MASATO, T.O., Tryptophan Production by Transport Mutants of Corynebacterium Glutamicum: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1995**, 59, 1600-1602.

KILBOURNE, E.M., Eosinophilia-Myalgia Syndrome-Coming to Grips with a New Illness: *Epidemiol. Rev.*, **1992**, 14, 16-36.

KLEEBOERG, K.K., Identifizierung und Quantifizierung ausgewählter Radiolyseprodukte in g-bestrahlten Tryptophanlösungen: Diplomarbeit Universität Hamburg, Abteilung für Lebensmittelchemie, **1995**.

KLEEMANN, A., LEUCHTENBERGER, W., HOPPE, B., TANNER, H., Amino Acids. In: Gerhartz, W. Ullmann's Enzyklopädie of Industrial Chemistry: VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1985**, 57-97.

KÖRNER, A., MALINKA, J., L-Tryptophan. Eine Retrospektive und ihre Konsequenzen für die Rohstoff-Analytik: *Pharm. Ztg. Wiss.*, **1992**, 137, 45-51.

KÜHN, H., STEIN, O., Über Kondensation von Indolen mit Aldehyden und sekundären Aminen: *Ber.*, **1937**, 70, 567-569.

KUNG, W.-J., E Patent No. 293207, **1988**.

LAUER, J.W., INSKIP, W.M., BERNSOHN, J., ZELLER, E.A., Observations on Schizophrenic Patients after Iproniazid and Tryptophan: *A.M.A. Arch. Neurol. Psychiatr.*, **1958**, 80, 122-130.

LE CORRE, M., HERCOUET, A., LE BARON, H., New Synthesis of Indoles from o-Acylaminobenzyltriphenylphosphonium Salts: *J.Chem.Soc. Chem. Comm.*, **1981**, 14-15.

LEETE, E., 3-Hydroxymethylindoles: *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 6023-6025.

LI, J. P., NEWLANDER, K. A., YELLIN, T. O., A Facile and Versatile Synthesis of 2-Substituted Tryptophans as N^α-*tert*-Butyloxycarbonyl Derivates: *Synthesis (1)*, **1988**, 73-76.

LINGENS, F., LANGE, J., Synthese von 3-[Indolyl-(3)]-glycerin und 3-[N-Methyl-indolyl-(3)]-glycerin: *Liebigs Ann Chem.*, **1970**, 738, 46-53.

MALIN, T., UK Patent No. 846521, **1960**; US Patent No. 2999051, **1961**..

MANNICH, C., KOCH, W., BORKOWSKY, F., Über den Aufbau von β-Dekalon aus Cyclohexanon: *Ber.*, **1937**, 70.1, 355-359.

MANCUSO, A.J., SWERN, D., Activated Dimethyl Sulfoxid: Useful Reagents for Synthesis-Reviews: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1981**.

MASATO, T., MAKIKO, F., YASUROU, K., HIDEAKI, Y., SCL-Tryptophan Production by the Application of High Expressed Tryptophanase in Escherichia Coli: *Process. Biochem. Inter.*, **1990**, 25, 172-175.

MATEUS, D.M.R., ALVES, S.S., FONSECA, M.M.R., Model for the Production of L-Tryptophan from L-Serine and Indole by Immobilized Cells in a Three-Phase Liquid-Impelled Loop Reactor: *Bioprocess Eng.*, **1996**, 14, 151-158.

MAYENO, A.N., GLEICH, G.J., Eosinophilia-Myalgia Syndrome and Tryptophan Production-A Cautionary Tale: *Trends Biotechnol.*, **1994**, 12, 346-352.

MAYENO, A.N., LIN, F., FOOTE, C.S., LOEGERING, D.A., AMES, M.M., HEDBERG, C.W., GLEICH, G.J., Characterization of „Peak E“, a Novel Amino Acid associated with Eosinophilia-Myalgia Syndrome: *Science*, **1990**, 250, 1707-1708.

MÜLLER, A., BUSKER, E., GÜNTHER, K., HOPPE, B., Characterization of Byproducts in L-Tryptophan: *Bioforum*, **1991**, 14, 350-354.

NAYLOR, S., WILLIAMSON, B.L., JOHNSON, K.L., GLEICH, G.J., Structural Characterization of Case-Associated Contaminants PEAK C and FF in L-Tryptophan Implicated in Eosinophilia-Myalgia Syndrome: Plenum Verlag, New York, Tagungsband ISTRY'98, **1999**, (im Druck).

OTTO, M., Chemometrie: Statistik und Computereinsatz in der Analytik: VCH Weinheim, Weinheim, **1997**.

PICTET, A., SPENGLER, T., Über die Bildung von Isochinolin-Derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyläthylamin, Phenylalanin und Tyrosin: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1911**, 44, 2030-2036.

PLISCHKE, H., STEINMETZER, W. (Amino GmbH), Recovery of DL-Serine from Serine-Containing Liquids by Ion-Exchange Chromatography and Use of the Serine to Prepare Tryptophan: Deutsches Patentamt, DE 3630878 (1988) in: *Chem. Abstr.*, **1988**, 109, 188 845a.

PREOBRAZHenskAYA, M.N., KHOLODKOVSKAYA, K.B., SUVOROV, N.N., Sintez Prirodn. Soedin., ikh Analogov i Fragmentov, Akad. Nauk SSSR: *Otd. Obsch. i. Tekhn. Khim. J.*, **1965**, 233, 125-129.

PREU, M., PETZ, M., Experimental Design zur Optimierung chemischer Derivatisierungsreaktionen-Prinzip und Anwendungsbeispiele: Paper zum Deutschen Lebensmittelchemikertag München, **1998**.

RAUCHER, S., BRAY, B. L., LAWRENCE, R. F., Synthesis of ($\pm$)-Catharanthine, (+)-Anhydrovinblastine, and (-)-Anhydrovincovoline: *J. Amer. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 442-446.

REHM, H.J., Industrielle Mikrobiologie: Springer, Berlin, **1967**, 125-128.

ROMMELSBACHER, H., MAY, T., SALEWSKI, B., Harman (1-Methyl- β -carbolin) is a Natural Inhibitor of Monoamine Oxidase Type A in Rats: *Eur. J. Pharmacol.*, **1994**, 252, 51-59.

RUNTI, C., Sull'ossimetilazione Diretta Dell'Indolo: Reattività Nucleofila Del β -Indolilcarbinolo: *Gazz. Chim. Ital.*, **1951**, 81, 613-620.

SAINIO, E.-L., PULKKI, K., YOUNG, S.N., L-Tryptophan: Biochemical, Nutritional and Pharmacological Aspects (Review): *Amino Acids*, **1996**, 10, 21-47.

SAKIMOTO, K., TARUSAWA, N., KONDO, T., MIYAO, K., ICHINORI, A. (Showa Denko K.K.), Tryptophan Manufacture with Recombinant Bacillus Containing the Gene for 3-

Phosphopolyacrylate Dehydrogenase: Jpn. Patent JP 01 67, 179, [89, 67, 179] (1989) in: *Chem. Abstr.*, **1989**, 111, 168688q.

SAKIMOTO, K., TORIGOE, Y., Study of Mechanism of Peak E Substance Formation in Process for Manufacture of L-Tryptophan. In: Kochen, W., Steinhart, H., L-Tryptophan-Current Prospects in Medicine and Drug Safety: Walter de Gruyter, Berlin, New York, **1994**, 295-311.

SATO, F., HAGIWARA, Y., KAWASE, Y., Subchronic Toxicity of 3-Phenylaminoalanine, an Impurity in L-Tryptophan Reported to be Associated with Eosinophilic-Myalgia Syndrome: *Arch. Toxicol.*, **1995**, 69, 444-449.

SHOWA DENKO K.K., Production of L-Tryptophan by Anthranilic acid resistant microbe: Jpn Patent JP 59,130,180 [84,130,181] (1984), *Chem. Abstr.*, **1984**, 101, 169088z.

SIMAT, T., STEINHART, H., Use of Tryptophanase in the detection of Contaminants in EMS Related L-Tryptophan: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1997**, 16, 167-173.

SIMAT, T.J., EULITZ, K.D., STEINHART, H., Unerwünschte Nebenprodukte in biotechnologisch hergestelltem L-Tryptophan: *GIT*, Fachzeitschrift für das Laboratorium, **1996**, 40, 339-344.

SLUTSKER, L., HOELSLEY, F.C., MILLER, L., WILLIAMS, P., WATSON, J.C., FLEMING, D.W., Eosinophilia-Myalgia Syndrome Associated with Exposure to Tryptophan from a Single Manufacturer: *J. Am. Med. Assoc.*, **1990**, 264, 213-217.

SMITH, M.J., MAZZOLA, E.P., FARRELL, T.J., SPHON, J.A., PAGE, S.W., ASHLEY, D., SIRIMANNE, S.R., KILL, R.H., NEEDHAM, L.L., 1,1'-Ethylidene-bis-(L-tryptophan), Structure Determination of Contaminant „97“-Implicated in the Eosiniphilia-Myalgia Syndrome (EMS): *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 991-994.

SNYDER, H.R., HANSCH, C.H., KATZ, L., PARMETER, S.M., SPAETH, E.C., The Synthesis of Derivates of b-Carboline. II. Synthesis from D,L-Tryptophan and Aldehydes: *J. Am. Chem. Soc.*, **1948**, 70, 219-221.

SNYDER, H.R., SMITH, C.W., A Convenient Synthesis of D,L-Tryptophan: *J. Amer. Chem. Soc.*, **1944**, 66, 350-351.

SNYDER, H.R., HOWE, E.E., ZAMBITO, A.J., TISHLER, M., The Application of a New Alkylation Reaction to the Synthesis of Tryptophan: *J. Amer. Chem. Soc.*, **1945**, 67, 38-39.

STATISTICA for Windows (Volume IV), Industrial Statistics-Chapter 3: Experimental Design: StatSoft, Inc., Tulsa, **1995**.

STEINMETZER, W., Die Verwendung der Nichtzuckerstoffe der Zuckerrübenmelasse: *Zucker Industrie*, **1991**, 116, 30-39.

SUNDBERG, R.J., RUSSELL, H.F., Synthesis with N-Protected 2-Lithioindoles: *J. Org. Chem.*, **1973**, 38, 3324-3330.

SZEIMIES, R.M., MEURER, M., Tryptophan-Assoziiertes Eosinophilie-Myalgie-Syndrom-Klinische Verlaufsbeobachtung bei acht Patienten: *Dtsch. Med. Wschr.*, **1993**, 118, 213-220.

TABUENCA, J.M., Toxic-Allergic Syndrome Caused by Ingestion of Rapeseed Oil Denatured with Aniline: *Lancet II*, **1981**, 567-568.

TAKINISHI, E., SAKIMOTO, K., TAKAMATSU, H., YAJIMA, Y. (Showa Denko K.K.), Genetically Engineered Microorganisms and the Manufacture of L-Tryptophan Using Them: Jpn. Patent JP 62, 195, 280 [87, 195, 280] (1987) in: *Chem. Abstr.*, **1988**, 108, 54453s.

TANKAKA, A.K., YAMASHITA, K., Synthesis of (S)-(+)-Methyl-dihydroxy-methylenebutyrate and (S)-(-)-Tulipalin B: *Agric. Biol. Chem.*, **1980**, 44, 199-202.

TOMITA, F., KAWASAKI, K., YOKATA, A., L-Tryptophan Production by a Pyruvic Acid-Producing Escherichia Coli Strain Carrying the Enterobacter Aerogenes Tryptophanase Gene: *J. Ferment. Bioeng.*, **1996**, 82, 604-606.

TOYO'OKA, T., YAMAZAKI, T., TANIMOTO, T., SATO, K., SATO, M., TOYODA, M., ISHIBASHI, M., YOSHIHARA, K., UCHIYAMA, M., Characterization of Contaminants in EMS-Associated L-Tryptophan Samples by High-Performance-Liquid-Chromatography: *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, 39, 820-822.

VON DOBENECK, H., WOLKENSTEIN, D., BLANKENSTEIN, G., α,β' -Diindolylmethane und -methene. Der Urorosein-Chromophor: *Chem. Ber.*, **1969**, 102, 1347-1356.

WARNER, D.T., MOE, O.A., Amino Acids. I. New Synthesis of D,L-Tryptophan, D,L-Ornithine and D,L-Glutamic Acid: *J. Amer. Chem. Soc.*, **1948**, 70, 2765-2767.

WHEELER, B., HOFFMANN, T., The Synthesis of D,L-Tryptophan Using Hydantoine and β -Indolylaldehyde: *J. Amer. Chem. Soc.*, **1911**, 45, 368-371.

Publikationen

B. van Wickern, B. Müller, T. Simat, H. Steinhart, Determination of γ -radiation induced products in aqueous solutions of tryptophan and synthesis of 4-, 6- and 7-hydroxytryptophan, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 57-65.

T. Simat, B. Müller, B. van Wickern, M. Schüpphaus, Hydroxytryptophanisomere-Referenzsubstanzen für einen Bestrahlungsnachweis in Lebensmitteln und für die Qualitätssicherung pharmazeutischer Produkte, *Lebensmittelchemie* 51, **1997**, 62.

B. Müller, C. Pacholski, T. Simat, H. Steinhart, Synthesis and formation of an EMS correlated contaminant in biotechnologically manufactured L-tryptophan. In: Tryptophan-Basic Aspects and Practical Applications: Eds.: Huether, G., Kochen, W., Simat, T., Steinhart, H., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **accepted**.

T. Simat, B. Müller, K.K. Kleeberg, A. Sierts, C. Pacholsky, H. Steinhart, Synthesis, formation and occurrence of contaminants in biotechnologically manufactured L-tryptophan. In: Tryptophan-Basic Aspects and Practical Applications: Eds.: Huether, G., Kochen, W., Simat, T., Steinhart, H., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **accepted**.

Poster

B. van Wickern, B. Müller, T. Simat, H. Steinhart:
Hydroxytryptophanisomere als Leitsubstanzen für den Nachweis einer γ -Bestrahlung
Analytika, München, **1996**.

B. Müller, C. Pacholski, T. Simat, H. Steinhart:
Synthesis and formation of an EMS correlated contaminant in biotechnologically manufactured L-tryptophan
International Congress of ISTRY, Hamburg, **1998**.

B. Müller, C. Pacholski, T. Simat, H. Steinhart:
Synthese und Bildungsbedingungen einer EMS-assozierten Kontaminante in biotechnologisch hergestelltem L-Tryptophan
Lebensmittelchemiker-Tag, München, **1998**.