

# Identifizierung und Synthese flüchtiger Verbindungen aus Vertebraten

Dissertation

Zur Erlangung des Naturwissenschaftlichen Doktorgrades

Vorgelegt dem Department Chemie  
der Universität Hamburg

von

**Gunnar Weibchen**

Hamburg 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. W. Schultze

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 05. März 2010 (Disputation)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2003 bis Juli 2003 am Department of Chemistry & Polymer Science an der Universität Stellenbosch in Südafrika und von August 2003 bis September 2006 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg in Zusammenarbeit mit dem Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW) in Berlin durchgeführt.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke, danke ich für die Überlassung des Themas, die wertvollen Diskussionen und Anregungen, die Betreuung während dieser Arbeit, seine große Geduld und die Zeit in seiner Arbeitsgruppe.

Ich danke des Weiteren den ehemaligen Angehörigen des Arbeitskreises: Susanne Sölter, Matthias Rietdorf, Till Tolasch, Robert Twele, Jenny Haftmann, Jochen Titze, Carolin Kellersmann, Stephanie Nagorny, Melanie Mosler, Gaby Graack, Sven Possner, Nicolas Heinzl und Armin Tröger. Mein besonderer Dank gilt Karsten Fehler und Matthias Fritzsche für das Lesen der Korrektur dieser Arbeit und die unzähligen gemeinsamen Waldläufe.

Herrn Dr. Volker Sinnwell und seinem Team danke ich für die Aufnahme der zahlreichen NMR-Spektren und den fruchtbaren Diskussionen zu den Ergebnissen der Diterpenlactone.

Herrn Dr. Stephan Franke danke ich für die Diskussionen zu massenspektrometrischen Fragestellungen und im Besonderen für die Durchführung gaschromatographischer Trennungen an chiralen Phasen und hochauflösender massenspektrometrischer Experimente.

Meinen Kooperationspartnern Prof. Ben V. Burger (Universität Stellenbosch), Dr. Martin Dehnhard (IZW Berlin) und Prof. Benoist Schaal (Centre Europeen des Sciences du Goût Dijon) danke ich für die Bereitstellung der verschiedenen Naturproben.

Meinen Arbeitskollegen Dr. Manfred Bergmann und Dr. Susanne Sölter danke ich für den fortwährenden Ansporn zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben, mich finanziell lange Zeit unterstützten und mir damit den Rücken freigehalten haben.

Bei meiner Frau Julia Carstensen und meinen Kindern Johanna-Marie und Lennart Gunnar Friedrich Carstensen möchte ich mich für die Zeit, die sie mir zur Anfertigung dieser Arbeit gewährt haben, ganz herzlich bedanken.



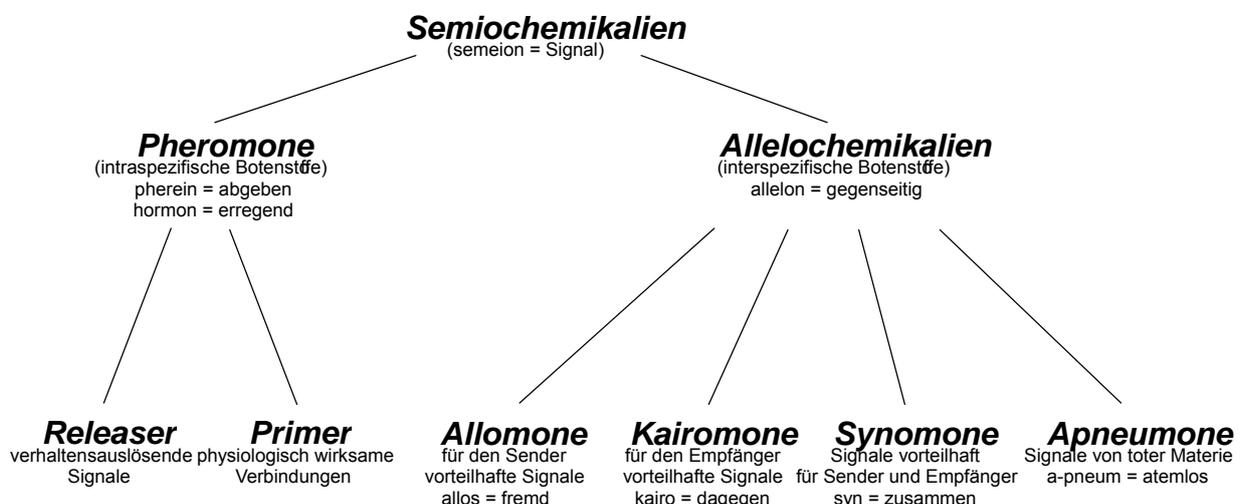
# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
Signalstoffe bei Wirbeltieren .....	7
Chemische Signalstoffe in Säugetieren .....	9
Chemische Signalstoffe beim Menschen .....	12
<b>AUFGABENSTELLUNG</b> .....	<b>17</b>
<b>ASIATISCHER ELEFANT</b> .....	<b>20</b>
Themenstellung .....	20
Reproduktionsanzeigende Signalstoffe .....	23
Identifizierung flüchtiger Substanzen im Elefantenkuh-Urin .....	26
Identifizierung flüchtiger Steroide im Elefantenkuh-Urin .....	37
Identifizierung unbekannter Zielsubstanzen .....	42
Massenspektren der Zielsubstanzen: .....	42
Bestimmung der atomaren Zusammensetzungen: .....	46
Isolierung der Zielsubstanzen .....	48
Strukturaufklärung von Diterpenen mit Pimaran- und Abietanskelett .....	56
Strukturvorschläge für die Spurenkomponenten E175, E178, E179 und E184 .....	94
Biosynthese von Diterpenen aus der Gruppe der Harzsäuren .....	108
2-Hydroxyditerpensäurelactone in biologischen Zusammenhängen .....	111
Synthesestrategie zur Darstellung von 2-Hydroxyditerpenlactonen .....	112
Ergebnisse und Diskussion .....	119
<b>BUNTBOCK</b> .....	<b>123</b>
Allgemeines zum Buntbock .....	123
Zielsetzung .....	130
Synthesen .....	132
Darstellung von racemischem (6Z)-Dodec-6-en-4-olid (18) .....	132
Erste Strategie zur enantioselektiven Synthese .....	135
Zweite Strategie zur enantioselektiven Synthese .....	136
Bestimmung der absoluten Konfiguration des Deer-Lactons im Buntbock .....	137
Biosynthese .....	139
Ergebnisse und Diskussion .....	140
<b>FISCHFAKTOR</b> .....	<b>141</b>
Biologisch aktive Substanzen in limnischen Systemen .....	141
Flüchtige organische Verbindungen im „Fischwasser“ .....	143
Zielsetzung .....	149
Syntheseplanung .....	151
Synthesen .....	158
Interpretation der massenspektrometrischen Fragmentierung von B88, F56 und F59 .....	160

Enantioselektive Gaschromatographie .....	163
Biosynthese .....	165
Ergebnisse und Diskussion.....	166
<b>DIE MUTTER-KIND-ERKENNUNG .....</b>	<b>167</b>
Die Mutter-Kind-Erkennung bei Säugetieren .....	167
Die Mutter-Kind-Erkennung beim Menschen.....	169
Aufgabenstellung .....	172
Analytische Durchführung .....	172
Identifizierung flüchtiger Verbindungen aus Kolostrum und SAG .....	174
Diskussion der Methoden und Ergebnisse .....	184
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>188</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>190</b>
<b>EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>192</b>
Allgemeiner Teil .....	192
Allgemeine chromatographische Methoden: .....	192
Gaschromatographie (GC) .....	193
APCI-Massenspektrometrie; LC/MS .....	196
Spektroskopie:.....	197
Probenvorbereitung und Derivatisierungen .....	198
Enzymatische Hydrolyse.....	201
Festphasenmikroextraktion (SPME) aus der Gasphase .....	202
Reaktionen mit hydrolyse- / luftempfindlichen Substanzen .....	202
Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel.....	202
Spezieller Teil - Asiatischer Elefant.....	203
NMR-Daten der identifizierten 2-Hydroxyharzsäurelactone.....	203
Synthesen .....	206
Spezieller Teil - Buntbock.....	210
Spezieller Teil - Fischfaktor .....	226
Spektrenanhang .....	240
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>245</b>
<b>SICHERHEIT UND ENTSORGUNG .....</b>	<b>250</b>
Verwendete Chemikalien .....	250
Sicherheitshinweise R- und S-Sätze.....	254
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>262</b>

## Einleitung

Das Forschungsgebiet der Chemischen Ökologie liegt an der Schnittstelle zwischen den Disziplinen Biologie und Chemie. Es umfasst neben der Identifizierung und Synthese chemischer Signalstoffe vor allem auch deren Zuordnung zu biologischen Phänomenen in einer Biozönose, um die Mechanismen der Interaktion zwischen einem Organismus und seiner Umwelt durch die chemischen Signalstoffe aufzuklären. Neben den akustischen, taktilen und visuellen Formen der Kommunikation besitzt das komplexe System chemischer Signalstoffe bei vielen Tieren eine wichtige Funktion und ist bei Pflanzen alleiniges Kommunikationsmittel. Während Hormone physiologische Prozesse innerhalb eines Organismus steuern, dienen chemische Signalstoffe der intra- und interspezifischen Verständigung zwischen einem Sender und Empfänger. In einer frühen Terminologie wurden die Signalstoffe im Sinne der chemischen Ökologie daher als Ektohormone (griech.: ekto „ausen“, hormon "erregend") definiert<sup>1</sup> und damit von den dahin als Hormone bezeichneten Stoffen, die nach dieser Definition nun unter dem Begriff Endohormone (griech.: endo „innen“) geführt werden sollten, abgegrenzt. Gegenwärtig hat sich der Begriff Semiochemikalien<sup>2</sup> (griech.: semeion „Signal“), nicht zuletzt wegen seiner besseren begrifflichen Abgrenzung zu den Hormonen, für diese Naturstoffe durchgesetzt. Semiochemikalien werden je nach Zielorganismus in Pheromone (griech.: pherein "überbringen, übermitteln") und Allelochemikalien (allelon, griech.: „gegenseitig“) unterteilt (Abbildung 1). Peter Karlson und Adolf Butenandt prägten 1959 den Begriff Pheromon<sup>3</sup>, und im gleichen Jahr wurde die neue Definition für chemische Signalstoffe von Peter Karlson und Martin Lüscher aufgestellt<sup>4</sup>.



**Abbildung 1:** Einteilung chemischer Signalstoffe<sup>5</sup>

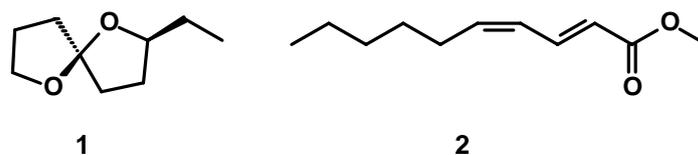
Pheromone dienen der intraspezifischen Kommunikation und werden anhand ihres Wirkungsmechanismus in zwei Untergruppen unterteilt: Primerpheromone lösen durch Beeinflussung des endokrinen Systems physiologische Veränderungen beim Empfänger aus, während Releaserpheromone verhaltensmodifizierend auf den Empfänger wirken<sup>6,7</sup>. Zusätzlich werden sie aufgrund ihrer funktionellen Klassifikation beispielsweise als Aggregations-, Alarm-, Markierungs-, Schwarm-, Sexual- und Spurpheromon bezeichnet<sup>8</sup>. Ein bekanntes Beispiel eines Primerpheromons liegt in den Staaten der westlichen Honigbiene *Apis mellifera* vor. Ein aus den Mandibeldrüsen der Königin freigesetztes Pheromon, die so genannte Königinnensubstanz, unterdrückt die Ovarienausbildung der Arbeiterinnen<sup>9</sup>. Ein interessantes biologisches Phänomen der mehrfachen Funktion einer Semiochemikalie tritt bei der australischen Rollwespe *Neozeleboria cryptoides* auf: Das flügellose Weibchen lockt das flugfähige Männchen mittels eines Sexualpheromons und somit mittels eines Releasers zur Kopulation an. Die gleiche Substanz wird auch von den Blüten der Orchidee *Chiloglottis trapeziformis* verströmt. Dabei tritt die Blüte als sogenannter Sexualtäuscher in Konkurrenz zu den Weibchen und lockt die Rollwespenmännchen mit nachgeahmtem Aussehen und identischen Signalstoff zur Pseudokopulation an. Hierbei fungiert der Signalstoff als Allomon und triggert die Bestäubung der Blüten<sup>10</sup>.

Die Allelochemikalien, die der interspezifischen Kommunikation dienen, werden in die Gruppen Kairomone, Allomone und Synomone eingeteilt. Synomone bringen Vorteile sowohl für den Sender als auch für den Empfänger des chemischen Signalstoffes. Die Kairomone nutzen nur dem Empfänger, und bei einem Allomon profitiert der Sender.

Zusätzlich zu den beschriebenen Signalen, deren Quelle ein lebender Organismus ist, werden mitunter auch sogenannte Apneumone als weitere Untergruppe der Allelochemikalien geführt. Apneumone ermöglichen Lebewesen die chemische Ortung toter Materie<sup>11</sup>. Die parasitäre Wespenart *Venturia canescens* wird von Geruchbestandteilen frischen Mehls angelockt und legt ihre Eier in die Raupen verschiedener vorratschädlicher Mehlmottenarten, die daraufhin von innen aufgefrassen werden<sup>12</sup>.

Wehrchemikalien oder Schreckstoffe gegen Fraßfeinde sind typische Allomone, während die Lokalisierung der Beute durch den Räuber oder das Bemerkten der Anwesenheit eines Räubers durch die Beute Beispiele für Kairomone sind<sup>13</sup>. Unterliegen bestimmte Pflanzen einem Schädlingsbefall durch Insekten, so können diese durch das Emittieren chemischer Signale parasitäre oder räuberische Insekten anlocken, die wiederum den Fraßfeind der Pflanzen befallen oder fressen. Bei diesem komplexen Dreiecksmodell, bei dem Pflanzen mit Hilfe einer Infochemikalie den Feind ihres Feindes zur Unterstützung anlocken, liegt für Pflanze und Parasit ein Synomon vor.

Senden Pflanzen unabhängig vom Befall Infochemikalien aus und Pflanzenschädlinge sowie deren Parasiten werden durch das identische chemische Signal angelockt, so liegt für Pflanze und Parasit weiterhin ein Synomon und für den Pflanzenschädling ergänzend ein Kairomon vor. Durch diese genannten Beispiele wird ersichtlich, dass die begriffliche Zuordnung für eine Semiochemikalie bei mehreren interagierenden Spezies empfängerbezogen betrachtet werden muss und dabei unterschiedliche Ergebnisse liefern kann. Die Signalwirkung der Semiochemikalien kann auf einem einzelnen chemischen Signalstoff beruhen oder durch ein komplexes Bukett verschiedener Substanzen in definiertem Verhältnis zustande kommen. Häufig ist letzteres der Fall, und die Einzelsubstanzen sind nur schwach oder gar nicht biologisch aktiv, während das Bukett der Komponenten äußerst wirkungsvoll ist. Oftmals ist dabei die Wirkung des Substanzgemisches deutlich höher als die Summe der biologischen Aktivität der Einzelsubstanzen, so dass ein synergistischer Effekt auftritt.

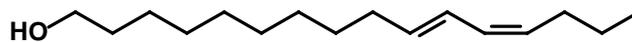


**Abbildung 2:** (2*S*,5*R*)-2-Ethyl-1,6-dioxaspiro[4.4]nonan (**1**) und (2*E*,4*Z*)-2,4-Decadiensäuremethylester (**2**) aktive Bestandteile des Aggregationspheromons vom Borkenkäfer *Pityogenes chalcographus*

Das Aggregationspheromon des Borkenkäfers *Pityogenes chalcographus* besteht aus (2*S*,5*R*)-2-Ethyl-1,6-dioxaspiro[4.4]nonan (**1**) und (2*E*,4*Z*)-2,4-Decadiensäuremethylester (**2**) in einem Verhältnis von 95:5<sup>14,15</sup>. Das Spiroacetal **1** erzeugt in isolierter Form nur eine schwache Reaktion bei den Käfern, während das Gemisch von Spiroacetal **1** und Ester **2** im natürlich auftretenden Verhältnis hoch wirksam ist.

Generell sind die unterschiedlichsten Verbindungen verschiedener Substanzklassen geeignet, die Funktion als chemische Signalstoffe zu erfüllen, wenn dafür einschränkende Voraussetzungen erfüllt sind. Eine hinreichende Flüchtigkeit wird für eine gewünschte räumliche Ausbreitung der Signalstoffe benötigt, damit ein entfernter Empfänger das Signal detektieren kann. Bei Markierungs- und Spurpheromonen jedoch ist beispielsweise erhöhte Flüchtigkeit nur begrenzt erforderlich und wenn der Empfänger das Signal in seinen Mund-Rachen-Raum aufnehmen wird oder es sich um ein aquatisches Umfeld handelt, sind auch schwer- und nichtflüchtige Verbindungen geeignet. Verhaltensmodifizierende Signalstoffe sollen zudem oft eine momentane Wirkung haben. Eine zu hohe Stabilität und Persistenz des Signals wäre bei dynamischen Lebensvorgängen ungeeignet. So soll das Auffinden eines Sexualpartners durch ein Pheromon nicht durch „alte“ Signale von Plätzen, an denen sich der Emittent nicht mehr befindet, erschwert werden. Zusätzlich müssen sich die Semiochemikalien von dem durch „allgemeine“ Duftstoffe hervorgerufenem Hintergrund ohne Signalfunktion unterscheiden, was häufig durch spezielle Molekülstrukturen oder Buketts von Verbindungen mit spezifischen Verhältnissen gewährleistet wird. Somit können gewisse Einschränkungen an die chemische Struktur der Infochemikalie aufgrund ihrer Funktion und ihres ökologischen Umfeldes gemacht werden.

Die Strukturaufklärung des ersten Sexualpheromons gelang Butenandt 1959, der das „Bombykol“ Hexadecadi-10,12-enol (**3**) als aktive Verbindung des weiblichen Seidenspinners *Bombyx mori* identifizierte<sup>16</sup>.



**3**

**Abbildung 3:** Das Sexualpheromon Bombykol (**3**) des Seidenspinners *Bombyx mori*

Seit der Entdeckung des Bombykols wurden bei Insekten zahllose weitere Strukturen von Pheromonen und Pheromongemischen beschrieben. Die Tiergruppe der Insekten ist hinsichtlich der chemischen Kommunikation weit stärker untersucht worden als alle anderen Tierarten<sup>5</sup>. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang das Verfahren der Aufnahme von Elektroantennogrammen (EAG). Hierbei wird die Antenne des untersuchten Insekts präpariert und über einen Verstärker an ein Signalaufnahmegerät angeschlossen. Die spezifischen Rezeptoren, die auf der Antenne beherbergt sind, geben bei Kontakt mit biologisch aktiven Zielmolekülen ein elektrophysiologisches Signal.

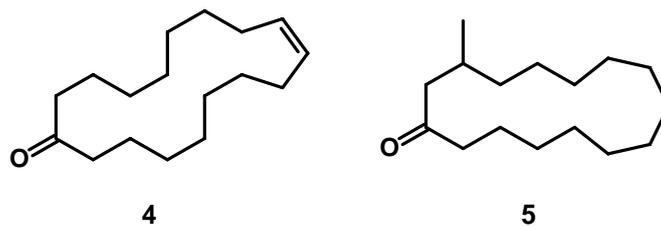
Durch zeitlich aufgelöste Kopplung dieser Detektion mit gaschromatographischen Techniken und simultane oder nachfolgende Detektion mit FID unter identischen Bedingungen können die biologisch aktiven Komponenten eines Insekts in komplexen Gemischen aufgezeichnet und dargestellt werden. Diese Vorauswahl einzelner oder weniger aktiver Verbindungen aus komplexen Multikomponentengemischen ist von zentraler Bedeutung bei der Zuordnung und Strukturaufklärung von Semiochemikalien, die bislang nur bei Insekten zum Einsatz kommt.

## **Signalstoffe bei Wirbeltieren**

Im Gegensatz zum Bereich der Insekten, in dem die Chemische Ökologie bereits ein etabliertes Forschungsgebiet darstellt und eine große Anzahl an Semiochemikalien bekannt ist, wurden bei Wirbeltieren bislang nur wenige Strukturen einer biologischen Aktivität zugeordnet. Dies liegt an vielfältigen Schwierigkeiten, da beispielsweise eine Technik zur Identifizierung biologisch aktiver Verbindungen, ähnlich der Detektion mittels EAG bei Insekten, bei Vertebraten bislang unbekannt ist. Signalstoffe werden bei Wirbeltieren oft über Drüsensekret oder Urin abgegeben und die Identifizierung von potentiell biologisch aktiven Komponenten in diesen komplexen Multikomponentengemischen aus Stoffwechselmetaboliten und Bestandteilen des Drüsensekrets mit vielfältigen biologischen Funktionen, entspricht der sprichwörtlichen Suche nach der Nadel im Heuhaufen. Weiterhin ist nicht immer klar, ob die Substanzen im Drüsensekret von dem Tier selbst oder durch mikrobiellen Abbau von Primär- und Sekundärmetaboliten von dort ansässigen Mikroorganismen produziert werden. Probennahme und Biotest stoßen zusätzlich aufgrund geringer Individuenzahlen und tierschutzrechtlicher Bestimmungen schnell an die Grenzen der Durchführbarkeit. Bei höheren Tieren sind neben genetisch verankerten Reaktionen auf äußerliche Reize und verändertem Verhalten unter den artifiziellen Bedingungen einer Haltung zusätzlich noch angelesene Verhaltensmuster und assoziative Lernfähigkeit zu berücksichtigen, die einen Biotest erheblich erschweren können.

Primer- und Releaserpheromone werden als Ursache vieler biologischer Phänomene bei Wirbeltieren angenommen. Oft kann auch die biologische Aktivität von Sekreten oder Extrakten in Biotests reproduziert werden. Allerdings sind in den meisten Fällen die Zusammensetzung der Gemische und chemischen Strukturen nicht identifiziert. Einige Autoren sprechen aufgrund der kognitiven Fähigkeiten höherer Tiere und deren besser entwickelten Sinnesorgane für visuelle und akustische Signale auch nicht von Pheromonen analog zu den Insekten, sondern benennen aktive Verbindungen als „Attractant“.

Ziel einiger früher Untersuchungen zu Pheromonen bei Wirbeltieren waren oft die Sekrete von Markierungsdrüsen mit für menschliche Nasen deutlich wahrnehmbarem Geruch. So wurden die wirtschaftlich bedeutenden Parfumbestandteile Zibeton (**4**) der Zibetkatze *Viverra civetta* und Muscon (**5**) des Moschushirschen *Moschus moschiferus* schon vor über 80 Jahren von Ruzicka identifiziert<sup>17-19</sup>, wobei biologische Aktivität dieser Substanzen bislang in keinem Feldtest nachgewiesen wurde<sup>20</sup>.

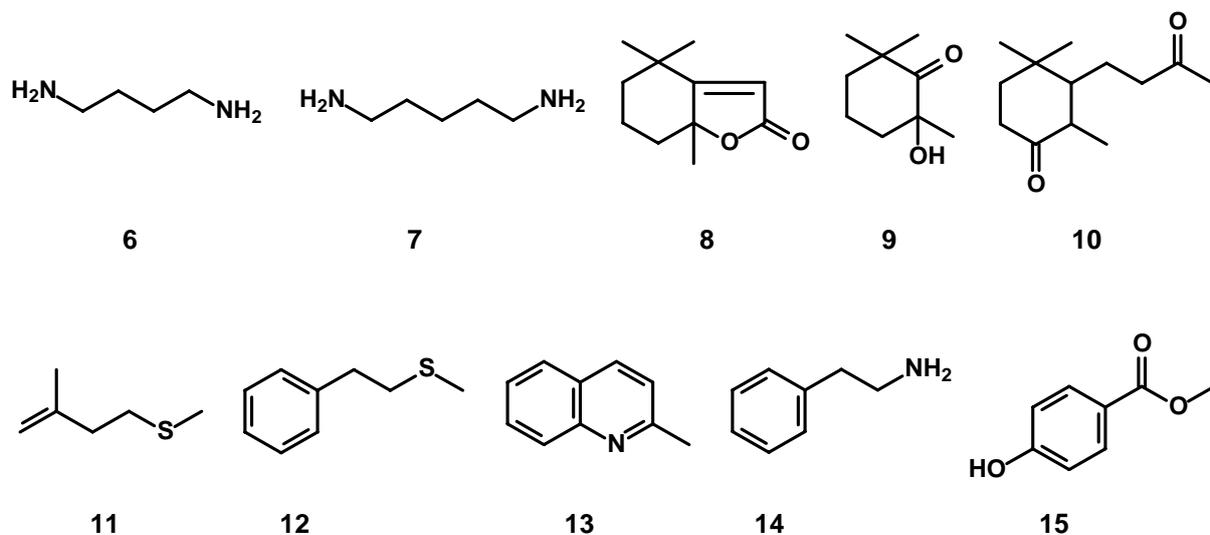


**Abbildung 4:** Zibeton (**4**) und Muscon (**5**)

Für Reptilien wurden bei der Rotseitigen Strumpfbandnatter *Thamnophis sirtalis parietalis*<sup>21</sup> und der Eidechse *Eumeces laticeps*<sup>22</sup> verhaltensmodifizierende Pheromone beschrieben. Bei der Rotseitigen Strumpfbandnatter gelang mit Strukturaufklärung, Synthese und Biotest von gesättigten und ungesättigten langkettigen Methylketonen erstmalig die vollständige Charakterisierung eines Pheromons bei einer Reptilienart<sup>23,24</sup>. Ein Beispiel eines Allomons liefert die Gewöhnliche Moschusschildkröte *Sternotherus odoratus*, deren umgangssprachliche englische Bezeichnung „Stinkpot“ lautet. Zur Abschreckung von Fraßfeinden gibt sie ein stark riechendes Sekret aus ihrer Moschusdrüse ab, dessen abstoßender Geruch von  $\omega$ -Phenylalkansäuren herrührt<sup>25</sup>.

## Chemische Signalstoffe in Säugetieren

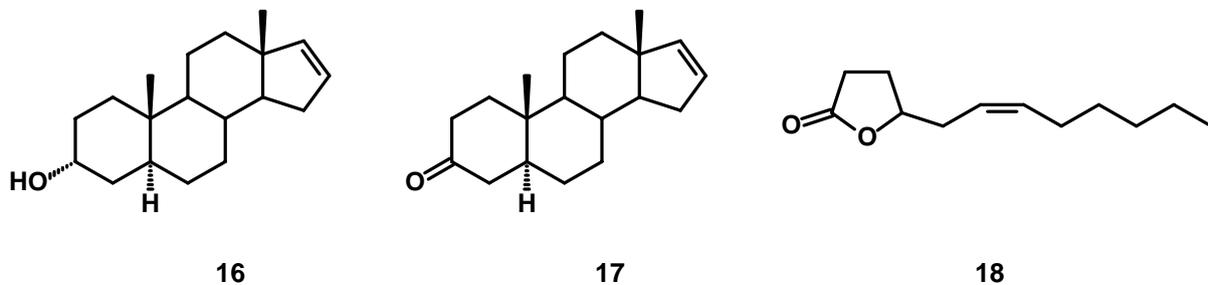
Viele Raubtiere sondern Sekrete direkt aus dem Analsack oder über den Urin als Markierungsflüssigkeit zur Abgrenzung ihrer Territorien ab. Das Pheromonbukett des Rotfuchses *Vulpes vulpes* beinhaltet neben aliphatischen Säuren,  $\omega$ -Phenyl- und  $\omega$ -(4-Hydroxy)-phenylalkansäuren auch die Stoffe Putrescin (1,4-Diaminobutan, **6**) und Cadaverin (1,5-Diaminopentan, **7**) aus der Analdrüse<sup>26</sup>, während bei Untersuchungen der Violdrüse (engl. supracaudal gland) die Verbindungen Dihydroactinidiolid (**8**), 6-Hydroxy-2,2,6-trimethylcyclohexanon (**9**) und *trans*-4-Keto- $\beta$ -ionon (**10**) identifiziert wurden<sup>27,28</sup>. Im Urin des Rotfuchses wurden unter anderem Isopentenylmethylsulfid (**11**), 2-Phenylethylmethylsulfid (**12**) und spezifisch für männliche Tiere 2-Methylchinolin (**13**) gefunden<sup>29</sup>. Putrescin (**6**) und Cadaverin (**7**) konnten ebenso in der Analdrüse des Löwen *Panthera leo* nachgewiesen werden<sup>26</sup>. Bei dem Tiger *Panthera tigris* wurde Phenylethylamin (**14**) als Bestandteil seiner Markierungsflüssigkeit beschrieben<sup>30-33</sup>.



**Abbildung 5:** Identifizierte Verbindungen im biologisch aktiven Urin und Drüsensekret von Raubtieren

Beim weiblichen Haushund *Canis lupus familiaris* waren flüchtige Dialkylsulfide im Urin Ziel von Untersuchungen, wobei allerdings keine eindeutigen zyklischen Konzentrationsschwankungen während des Östrus festgestellt werden konnten<sup>34</sup>. Als Sexualpheromon im Vaginalsekret des Hundes wurde *p*-Hydroxymethylbenzoat (**15**) postuliert<sup>35</sup>. Für diese identifizierten Bestandteile des biologisch aktiven Drüsensekrets oder Urins von Raubtieren konnte bislang kein Biotest die biologische Aktivität absichern. Beim Hund konnte die Aktivität von **15** in späteren Versuchen nicht bestätigt werden<sup>36</sup>.

Die Struktur von Androstenol ( $5\alpha$ -Androst-16-en-3 $\alpha$ -ol, **16**), dem bekanntesten Vertreter von Sexualpheromonen bei Säugetieren, wurde 1968 von Patterson beim Hausschwein *Sus scrofa domestica* identifiziert<sup>37</sup>. Die Steroide Androstenol und das korrespondierende Androstenon ( $5\alpha$ -Androst-16-en-3-on, **17**) werden beim Eber in den Hoden gebildet und gelangen über das Blut in die Speicheldrüsen<sup>38</sup>. Während des präkopulatorischen Verhaltens führt der Eber ruckartige Kaubewegungen durch, die seinen Speichelfluss steigern und den pheromonhaltigen Speichel schaumig schlagen. Die erhöhte Aufnahme flüchtiger Steroide führt bei der rauschenden Sau zum so genannten „Duldungsreflex“ während der Kopulation<sup>39,40</sup>. Mit diesen synthetischen Steroiden in Sprühflaschen wird die einzig bislang bekannte kommerzielle Anwendung von Säugetierpheromonen bei künstlichen Besamungen in der Tierzucht angewandt (sogenannter Dosen Eber).

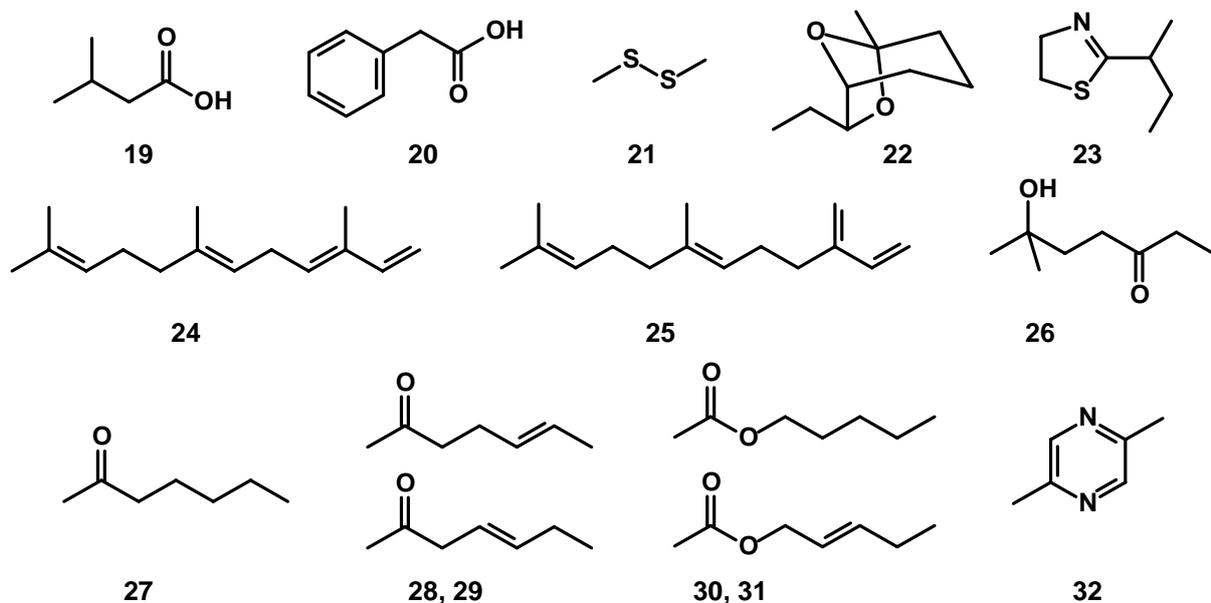


**Abbildung 6:** In Biotest aktive Säugetierpheromone I

Das „Deer Lactone“ ( $6Z$ )-Dodec-6-en-4-olid (**18**) kann aus dem Urin und der Fußwurzeldrüse des Schwarzwedelhirsches *Odocoileus hemionus columbianus* isoliert werden und fungiert als Markierungssubstanz und Bedrohungssignal<sup>41-46</sup>. Männchen des Gabelbocks *Antilocapra americana* (engl. Pronghorn) nutzen Isovaleriansäure (**19**) zur Markierung ihres Territoriums und zum Anlocken weiblicher Tiere<sup>47</sup>. Die Männchen und Weibchen der Mongolischen Wüstenrennmaus *Meriones unguiculatus* markieren ihr Revier mit einem Sekret der Ventraldrüse, in dem Phenylelessigsäure (**20**) die aktive Komponente darstellt<sup>48,49</sup>. Der weibliche Hamster *Mesocricetus auratus* nutzt Dimethyldisulfid (**21**) und weitere Substanzen im Vaginalsekret als „Attractant“-Pheromon zur Anzeige des Östrus<sup>50,51</sup>.

Bei der Hausmaus *Mus musculus* wurden vermutlich die weitestgehenden Untersuchungen zu Pheromonen im Urin unternommen. Bislang konnte eine Reihe von Verbindungen bekannten biologischen Aktivitäten zugeordnet werden<sup>52,53</sup>. In ihrer Namensgebung weisen diese Effekte zumeist auf ihren Entdecker hin.

Bei männlichen Artgenossen rufen 3,4-Dehydro-*exo*-brevicomine (22) und 2-*sec*-Butyl-4,5-dihydrothiazol (23) aggressives Verhalten untereinander hervor<sup>54,55</sup>, während die gleichen Substanzen auf weibliche Tiere anziehend wirken und die Synchronisation des Östrus hervorrufen (Whitten-Effekt<sup>56-58</sup>)<sup>59,60</sup>. Bei dominanten männlichen Mäusen werden aus einer Drüse erhöhte Konzentrationen an (*E,E*)- $\alpha$ -Farnesen (24) und (*E*)- $\beta$ -Farnesen (25) über den Urin abgegeben<sup>61,62</sup>. Diese Terpene spielen ebenfalls eine Rolle bei der Einleitung und folglich Synchronisation des Östrus weiblicher Tiere<sup>63</sup>. Das Zusammenspiel der Substanzen 3,4-Dihydro-*exo*-brevicomine (22) und 2-*sec*-Butyl-4,5-dihydrothiazol (23) mit (*E,E*)- $\alpha$ -Farnesen (24), (*E*)- $\beta$ -Farnesen (25) und 6-Hydroxy-6-methyl-3-heptanon (26) im männlichen Urin bewirkt eine schnellere Geschlechtsreife junger Weibchen (Vandenbergh-Effekt<sup>64-66</sup>)<sup>67,68</sup>.



**Abbildung 7:** In Biotest aktive Säugetierpheromone II

Die Verbindungen 2-Heptanon (27), (*E*)-5-Hepten-2-on (28), (*E*)-4-Hepten-2-on (29), Pentylacetat (30), (*Z*)-2-Pentenylacetat (31) und 2,5-Dimethylpyrazin (32) treten im Urin weiblicher Mäuse auf und lösen den umgekehrten Effekt der verzögerten sexuellen Reife aus (Puperty delay-Effekt<sup>69</sup>), wobei nach neueren Untersuchungen speziell 2,5-Dimethylpyrazin (32) für die biologische Aktivität bei den Weibchen ausschlaggebend ist und vermutlich auch ein chemisches Signal für die Männchen darstellt<sup>68-72</sup>. Das Beispiel der chemischen Kommunikation bei der Hausmaus zeigt anschaulich die synergistischen Effekte der Substanzen und die variantenreiche Wirkungsweise als Primer und Releaser in Abhängigkeit des Empfängergeschlechts.

## Chemische Signalstoffe beim Menschen

Bei Menschen wird Kommunikation von visuellen und akustischen Signalen dominiert. Chemische Strukturen menschlicher Pheromone sind bislang gänzlich unbekannt. Allerdings gibt es Hinweise für die Existenz von Primerpheromonen, während eine biologische Funktion der Releaserpheromone sehr umstritten ist. Shorey beschrieb den Geruchssinn der Primaten als schwach entwickelt, wobei die entsprechenden Organe und Drüsen des olfaktorischen Kanals, die als evolutionäres Überbleibsel eingestuft wurden und möglicherweise zu einem pheromonalen System gehören, auch beim Menschen vorliegen. Aus apokrinen Hautdrüsen, die nicht der Schweißproduktion dienen, könnten die potentiellen Pheromone abgegeben werden<sup>73</sup>. Besonders die hohe Dichte an apokrinen Drüsen in den menschlichen Achselhöhlen<sup>74</sup>, mit geschlechtsspezifisch unterschiedlicher Struktur und Bakterienflora bei Männern und Frauen<sup>75</sup> und die Tatsache, dass eine Aktivität erst mit der Pubertät einhergeht<sup>76</sup>, machten das Drüsensekret zum Ziel wissenschaftlicher Studien. Aber auch Urin und Vaginalsekrete wurden als vermutlicher Träger chemischer Signalstoffe in zahlreichen Arbeiten untersucht.

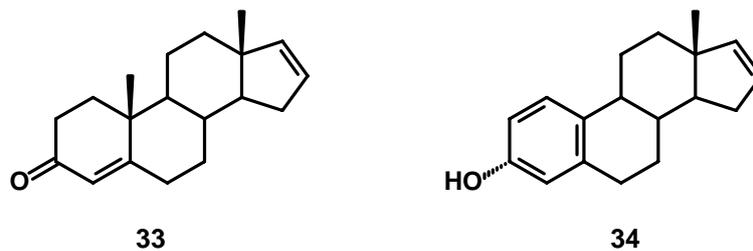
Das Auftreten einer Synchronisation des Menstruationszyklus bei Frauen, die in enger Gemeinschaft und bei gleichzeitiger Abwesenheit von Männern leben, war Inhalt einer Anzahl von Untersuchungen, worin dieser sogenannte McClintock-Effekt (Äquivalent zum Whitten-Effekt bei Mäusen) Pheromonen zugeschrieben wurde<sup>77-79</sup>. Weiterführende Studien zur Synchronisation der Zyklen, unter anderem bei Müttern und Töchtern sowie bei Frauen in Wohngemeinschaften, weisen jedoch darauf hin, dass eine zusätzliche Beeinflussung durch Umweltfaktoren eine Rolle spielen könnte<sup>80</sup>. Eine neuere Studie mit Drüsensekreten aus der Achselhöhle unterstützt hingegen die Theorie des McClintock Effektes, wobei in Abhängigkeit der Zyklusphase der Signalsenderin bei der Signalempfängerin entweder eine Verlängerung oder Verkürzung der Follikelphase eintrat, die durch korrespondierende Wechselwirkungen zur Synchronisation des Zyklus in der Gruppe führt<sup>81</sup>. Die Aussagekraft dieser Studie unterliegt hinsichtlich der statistischen Daten einer wissenschaftlichen Diskussion<sup>82,83</sup>.

Als Quelle potentieller Signalstoffe, die den Menstruationszyklus beeinflussen, wurde die Zusammensetzung des Schweißes aus Achseldrüsen und Armbeugen analysiert. Im Sekret der Achseldrüsen wurden neben kurzkettigen Fettsäuren auch Steroide und Steroidkonjugate mit signifikanten Unterschieden zwischen Männern und Frauen gefunden<sup>84,85</sup>.

Die Anwesenheit von Androstenol (**16**) und Androstenon (**17**) in diesem Sekret löste aufgrund dessen Aktivität als Releaser beim Hausschwein vielfältige Spekulationen aus und führte zu kommerziellen Offerten dieser Steroide, obwohl eine biologische Aktivität als Releaser bei Menschen nicht bewiesen ist. Die mögliche Existenz von Releaser-Pheromonen beim Menschen ist Inhalt kontroverser Diskussionen. Durch das Auftreten verhaltensmodifizierender Signalstoffe bei verschiedenen Primaten, zu denen in der biologischen Systematik letztendlich auch der Mensch gehört, wurde das Interesse an der Untersuchung dieser Fragestellung verstärkt.

Die Männchen der Rhesusaffen *Macaca mulatta* zeigen innerhalb der Horde eine sexuelle Bevorzugung für weibliche Tiere mit Signalstoffen in deren Vaginalsekret, die als „Copuline“ bezeichnet werden. Sie setzen sich aus den kurzkettigen Carbonsäuren Essig-, Propion-, Isobutter-, Butter-, Isovalerian- und Isocaprinsäure zusammen und treten in Abhängigkeit des Östrogenstoffwechsels auf<sup>86-89</sup>. Vergleichbare Substanzen wurden bei weiblichen Schimpansen *Pan troglodytes* gefunden<sup>90</sup>, und sowohl die Männchen der Buschbabys *Otolemur crassicaudatus* als auch des Braunen Maki *Lemur fulvus* können anhand von Signalstoffen zwischen dem Duft männlicher und weiblicher Tiere unterscheiden<sup>91,92</sup>. Männer emittieren Androstenon (**17**), eines von zehn im menschlichen Achselschweiß gefundenen Steroiden<sup>93</sup>, in höheren Konzentrationen als Frauen über die Schweißdrüsen auf die Körperoberfläche. **17** wurde zusammen mit dem korrespondierenden Androstenol (**16**) schon früh als menschliches Sexualpheromon diskutiert<sup>20,94-96</sup>. Interessant ist in diesem Zusammenhang, neben der generell höheren Empfindlichkeit der weiblichen Nase gegenüber Gerüchen, die deutlich bessere Wahrnehmung des süßlich moschus- bis urinartigen Geruchs der genannten Steroide durch geschlechtsreife Frauen<sup>97</sup>. Versuchsreihen haben gezeigt, dass in Maßen dosiertes Androstenol (**16**) die Bewertung der Attraktivität leicht verbessert<sup>98</sup> und es gibt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Fähigkeit der sensorischen Wahrnehmung von **16** und der Synchronisation des Menstruationszyklus<sup>99-102</sup>. Unterstützt wurde dieser Befund in einer weiteren Untersuchung, in der männliches Achseldrüsensekret durch endokrinologische Beeinflussung bei weiblichen Versuchspersonen die Zykluslänge verändert und bei diesen eine entspannte Stimmung bewirkt<sup>103</sup>.

Später wurden noch dem Androstadienon (Androsta-4,16-dien-3-on, **33**) im Achselschweiß und dem Estratetraenol (Estra-1,3,5(10),16-tetraen-3-ol, **34**) im Urin schwangerer Frauen biologische Aktivität hinsichtlich physiologischer Wirkungen und psychologischer Beeinflussung zugeschrieben<sup>104</sup>. Die Aufnahme von **33** soll beispielsweise bei Frauen die Aktivität des limbischen Systems erhöhen<sup>105</sup> und bei beiden Geschlechtern eine Änderung von Hauttemperatur und Leitfähigkeit bewirken<sup>106</sup> sowie den Gemütszustand beziehungsweise die Stimmung beeinflussen<sup>107</sup>.



**Abbildung 8:** Postulierte menschliche Pheromone Androstadienon (**33**) und Estratetraenol (**34**)

Vielfach unterliegen diese Studien jedoch der wissenschaftlichen Diskussion und sind nicht eindeutig belegbar, da die Reaktionen der Versuchspersonen in erneuten Test teilweise unterschiedlich und nicht eindeutig reproduzierbar sind (Übersichtsartikel<sup>108-112</sup>).

Hinreichend belegt ist hingegen die Fähigkeit des Menschen, feine Geruchsvarianzen wahrzunehmen und verschiedene Individuen anhand ihres Geruchs zu erkennen<sup>113</sup>. So können Familienmitglieder von nicht verwandten Personen anhand olfaktorischer Signale unterschieden werden. Schon im 19. Jahrhundert beschrieb Darwin das Schürzen der Lippen und die Ausrichtung des Blickes von Säuglingen als Reaktion auf die Wahrnehmung der Mutter(-brust) und erwähnte in diesem Zusammenhang den Geruch als mögliche Ursache dieses Effektes<sup>114</sup>. Frühe Studien zur menschlichen Kommunikation anhand olfaktorischer Signale zeigten, dass Studenten anhand des Geruchs sowohl zwischen eigenen und fremden getragenen T-Shirts als auch zwischen weiblichen und männlichen Trägern der fremden T-Shirts unterscheiden können. Neugeborene können ihre stillende Mutter zwischen anderen Frauen anhand des Geruchs erkennen. Ebenso können die Mütter wiederum ihr Neugeborenes am Geruch identifizieren<sup>115</sup>. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass Neugeborene diese Fähigkeit zur Erkennung ihrer Mutter während ihrer ersten sechs Lebenswochen erlangen, während Neugeborene nach zwei Lebenstagen noch keine Differenzierung in ihrem Verhalten auf unterschiedliche Mütter zeigen und die Interaktion zwischen Mutter und Kind während des Stillens Auslöser der Mutter-Kind-Erkennung ist<sup>116,117</sup>.

Weiterhin können Mütter schon wenige Stunden nach der Geburt die getragene Babykleidung ihres Kindes von derer anderer Kinder über den Geruch erkennen<sup>118</sup>. Als potentielle Quelle charakteristischer Gerüche innerhalb einer Familie gelten genetische Übereinstimmungen. So wird die getragene Babykleidung des verwandten Kindes zwischen der Kleidung anderer Kinder auch von Vätern, Tanten und Großmüttern erkannt, und länger getrennt lebende Geschwister können das getragene T-Shirt ihres Bruders oder ihrer Schwester richtig zuordnen<sup>119</sup>. Zusätzlich zu dieser genetischen Präferenz besteht die Möglichkeit einer schnellen Erlernung charakteristischer Gerüche durch den Säugling. Bei einem Experiment, in dem stillende Mütter ein zusätzliches Parfum auftragen, reagieren die Säuglinge auf diesen „künstlichen“ Geruch ebenfalls mit einer charakteristischen Kopfbewegung zur Geruchsquelle<sup>120</sup>.

Es gibt zudem auch Hinweise auf eine genetische Bevorzugung anhand des Geruchs bei der Partnerwahl von Frauen in Abhängigkeit ihres endokrinologischen Profils. Die Frauen sollten in diesem Experiment die Körpergerüche ihnen unbekannter Männer bewerten. Dazu wurden getragene T-Shirts männlicher Probanden eingesetzt. Die Frauen wurden anhand ihrer oralen Aufnahme von Kontrazeptiva in zwei Gruppen differenziert, da die Steroide der Verhütungsmittel dem Körper eine Schwangerschaft simulieren, wodurch die Geruchswahrnehmung beeinflusst wird. Frauen ohne Einnahme der Pille bewerteten T-Shirt-Gerüche positiv, wenn das Immunsystem des Trägers genetisch möglichst unterschiedlich zum eigenen war, während Frauen mit Einnahme steroidhaltiger Verhütungsmittel Gerüche von Trägern mit genetisch ähnlichem Immunsystem bevorzugten. Dieser Befund wird als hormonell abhängige Präferenz von Geruchsprofilen, die eine Aussage über die genetische Information des Emittenten wiedergeben, folgendermaßen interpretiert: Bei der Partnerwahl werden genetische Unterschiede von Frauen bevorzugt, wodurch ein biologischer Vorteil hinsichtlich des Immunsystems für eventuelle zukünftige Nachkommen resultiert, während hingegen innerhalb einer Schwangerschaft größere genetische Übereinstimmungen vorgezogen werden, die ihren Ursprung in der familiären Umgebung haben könnten<sup>121-123</sup>.

Im letzten Jahrzehnt wurden wegweisende Arbeiten zur Signaltransduktion von Gerüchen und chemischen Signalstoffen durchgeführt, für die 2004 der Nobelpreis für Medizin und Physiologie gemeinsam an Richard Axel und Linda B. Buck vergeben wurde. In diesen Arbeiten wurden zwei Varianten der Signalaufnahme und Weitergabe chemischer Signalstoffe beim Menschen beschrieben: Das sind zum einen die Riechschleimhaut an der oberen Nasenhöhle mit dem Riechkolben *Bulbus olfactoris*, an dem die Glomeruli Informationen des Geruchs an die Neuronen übertragen, und des weiteren das Jacobson'sche beziehungsweise Vomeronasale Organ (VNO)<sup>124,125</sup>. Die Rolle und Funktion des VNO beim Menschen ist allerdings noch nicht abschließend untersucht<sup>126</sup>.

## Aufgabenstellung

Im Fokus der Forschung zu chemischen Signalstoffen bei Vertebraten stehen heutzutage biologische und veterinärmedizinische Betrachtungen zur verhaltensmodifizierenden Wirkung von Substanzen, wohingegen die Untersuchungen zur Aufklärung der chemischen Strukturen erst am Anfang stehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden Identifizierung und Synthese von Naturstoffen beschrieben, die als potentielle Kandidatverbindungen bei einer olfaktorischen Signalübertragung zwischen Wirbeltieren von Bedeutung sein könnten:

- Der weibliche asiatische Elefant weist in seinem Urin eine Gruppe von zyklisch wiederkehrenden unbekanntem Substanzen auf, deren Auftreten mit dem Menstruationszyklus zu korrelieren scheint. Eine Identifizierung dieser potentiellen Signalstoffe wird angestrebt, da diese Substanzen als Sexualpheromon dem Elefantenbullen den Östrus anzeigen könnten. Kenntnisse über den endokrinologischen Zustand des asiatischen Elefanten mittels nicht-invasiver Methoden würde eine wertvolle Hilfe zur Arterhaltung dieser bedrohten Spezies in Gefangenschaft darstellen.
- In limnischen Systemen vollziehen verschiedene Wasserfloharten aus der Gattung *Daphnia* eine tagesperiodische Vertikalwanderung in Abhängigkeit von einem räuberischen Fischbesatz des Gewässers. Damit die Wahrscheinlichkeit sinkt, zur Beute der visuell jagenden Räuber zu werden, nehmen sie kältere Wasserschichten mit geringerem Nahrungsangebot in Kauf. Ursache dieses komplexen Räuber-Beute-Verhältnisses ist ein von Fischen freigesetztes Kairomon, welches als „Fischfaktor“ bezeichnet wird. Im Hälterungswasser von Fischen sollen geeignete Kandidatverbindungen des Kairomons identifiziert und deren Struktur durch (stereoselektive) Synthese aufgeklärt werden.
- Der zu den Kuhantilopen gehörende Buntbock markiert seinen Lebensraum mittels eines Interdigitaldrüsensekrets und zeigt ausgeprägtes Revierverhalten, dessen Ursache vermutlich ein Markierungspheromon ist. Diese bedrohte Tierart besiedelte einst weite Gebiete im südlichen Afrika und ist durch Bejagung nahezu ausgerottet worden. Neben dem generellen wissenschaftlichen Interesse an Säugetierpheromonen könnte die Strukturaufklärung mit exakter stereochemischer Zuordnung des Pheromons helfen, diese Tierart aus erholten Beständen der Schutzgebiete und Nationalparks wieder in den ehemaligen Siedlungsgebieten anzusiedeln.

- Wenige Tage nach der Geburt reagieren Säuglinge auf das Herannahen der Mutterbrust mit einer zur Brust hin orientierten Kopfbewegung. Diese Mutter-Kind-Erkennung basiert auf olfaktorischen Signalen. Zwei potentielle Quellen dieser Substanzen sollen hinsichtlich ihrer flüchtigen Inhaltsstoffe untersucht werden: Die frühe Muttermilch, auch Kolostralmilch oder Kolostrum genannt, und das apokrine Sekret, welches nach der Geburt und beim Stillen des Kindes aus den um die Brustwarze verteilten Montgomery-Drüsen (*Glandulae areolares*) austritt.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, neue Methoden zur Aufarbeitung des komplexen Probenmaterials und Gewinnung von Proben aus Drüsensekreten, Fischwasser und Urin zu erarbeiten, um potentielle Zielverbindungen der Analytik durch Abtrennen unerwünschter Bestandteile zugänglich zu machen. Mit Hilfe modernster Verfahren der organischen Spurenanalytik wie Gaschromatographie und Flüssigchromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie sollen die Inhaltsstoffe erstmalig oder auch zur Vervollständigung bestehender Ergebnisse analysiert werden. In den meisten Fällen lag nicht ausreichend Probenmaterial zur Isolierung vor, um eine Strukturzuordnung mittels NMR-Spektroskopie durchführen zu können. Daher müssen bestimmte Verbindungen durch Synthese von Referenzverbindungen mittels eines indirekten Strukturbeweises verifiziert werden. Dabei sollen die Referenzverbindung und die Substanz in der Naturprobe bei gleicher gaschromatographischer Retention identische Massenspektren aufweisen.

Durch die Bestimmung der absoluten Konfiguration der Kandidatverbindungen in den Naturproben soll die Herstellung von Probenmaterial mit eindeutig definierter stereochemischer Zusammensetzung als naturidentische Kopie ermöglicht werden.

Die vorliegende Arbeit erfolgte in interdisziplinärer Zusammenarbeit mit biologisch orientierten Kooperationspartnern aus dem In- und Ausland. Diese sollten das zu untersuchende Probenmaterial zur Verfügung stellen, vornehmlich von Tieren, bei denen relevante biologische Phänomene beobachtet wurden. Die Untersuchungen der gegebenenfalls synthetisierten Verbindungen in Verhaltenstest auf eine mögliche biologische Aktivität hin, werden von den Kooperationspartnern durchgeführt.

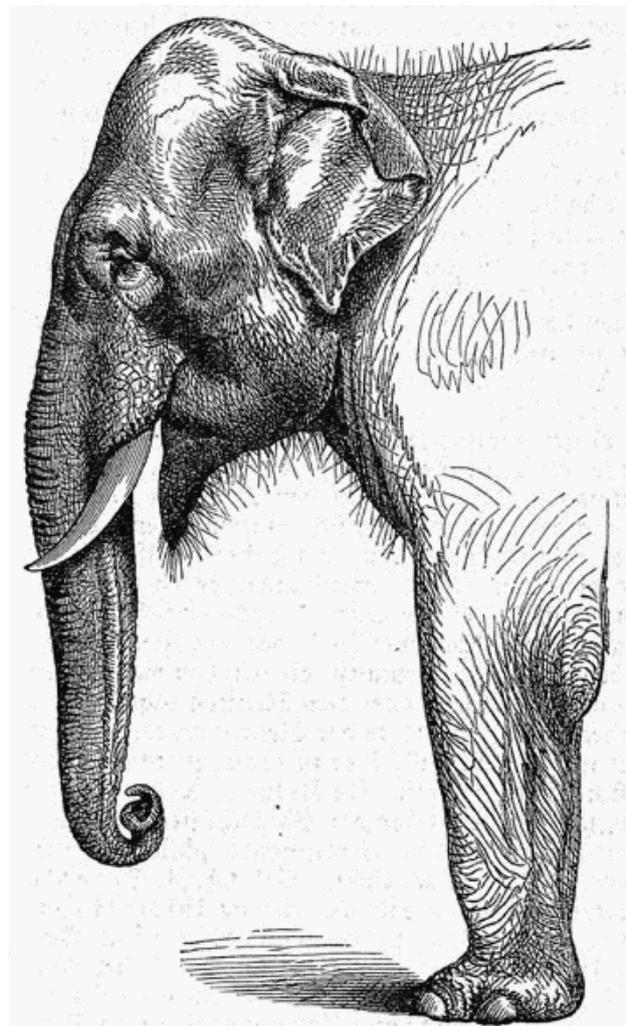


# Asiatischer Elefant

## Themenstellung

Der asiatische Elefant *Elephas maximus* (Linné, 1758), oft auch unter dem Namen Indischer Elefant bekannt, ist neben dem Waldelefanten (*Loxodonta cyclotis*) und dem afrikanischen Elefanten (*Loxodonta africana*) die einzig noch lebende Art in der Familie der Elefanten (Elephantidae).

Der asiatische Elefant unterscheidet sich von dem afrikanischen unter anderem durch die wesentlich kleineren Ohren, vier statt drei Zehen an den Hinterbeinen und nur einer statt zweier fingerartigen Rüsselspitzen. Der asiatische Elefant hat eine Schulterhöhe von 3 Metern und ist kleiner als der afrikanische. Das Gewicht einer Kuh liegt bei 2700 kg, und bei Bullen können 5000 kg überschritten werden. Stoßzähne sind oft nur bei Bullen präsent, können aber selbst bei diesen fehlen. Der Lebensraum des asiatischen Elefanten war einst sowohl tropischer Regenwald als auch offenes Grasland. Heute leben wilde Elefanten nur noch innerhalb dichter Wälder. Stark fragmentierte Habitate finden sich in Indien, Sri Lanka, Nepal, Bhutan, Vietnam, Indonesien, China, Bangladesh, Myanmar, Thailand, Malaysia, Kambodscha und Laos<sup>127</sup>.



**Abbildung 9:** Illustration des asiatischen Elefanten

Die Populationen des asiatischen Elefanten in Zoos und Tierparks schrumpfen. Dies bedeutet, dass durch zu geringe Nachzuchtquoten der Bestand der Tiere überaltert ist. Der Grund liegt neben der zu geringen Geburtenrate in einer zu hohen Sterblichkeit der Jungtiere innerhalb des ersten Lebensjahres, in dem zum Beispiel in Nordamerika ungefähr ein Drittel der Kälber verstirbt<sup>128-130</sup>.

Nach der Prognose von Olson und Wilson<sup>130</sup> wird es innerhalb der nächsten 50 Jahre keine Populationen des asiatischen Elefanten in nordamerikanischen Tierparks mehr geben. Der asiatische Elefant gehört zu den bedrohten Tierarten und ist in der Roten Liste gefährdeter Tier- und Pflanzenarten der Weltnaturschutzunion IUCN ( International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) als bedrohte Tierart geführt<sup>131</sup>. Der Handel mit dieser Tierart wurde in der Konferenz zum Washingtoner Artenschutzübereinkommen durch Nennung in CITES: Anhang I untersagt (CITES - Convention on International Trade in Endangered Species / Konvention über den internationalen Handel mit gefährdeten Tier- und Pflanzenarten).



**Abbildung 10:** Wilder asiatischer Elefant im Corbett National Park, Indien

Damit der asiatische Elefant nicht als Sympathieträger und Botschafter des Artenschutzes aus den Tierparks verschwindet, muss die Reproduktionsrate hoch genug sein, um eine autarke Bestandserhaltung zu gewährleisten. Die wildlebenden Elefanten sind durch zunehmende Zersiedelung ihres Lebensraumes und fortschreitende Industrialisierung ihrer Herkunftsländer in ihrem Fortbestehen gefährdet. Zusätzlich werden alle existierenden Elefantenarten bis heute wegen ihrer aus Elfenbein bestehenden Stoßzähne gejagt und gewildert.

Die Haltung der Elefantenbullen, die in ihren natürlichen Habitaten solitär leben, ist in Gefangenschaft wegen ihres aggressiven Verhaltens und ihrer daraus resultierenden Gefährlichkeit ein Problem und wird nur von wenigen Zoos und Tierparks betrieben. Die wenigen verfügbaren Bullen müssen daher in Zuchtprogrammen besonders effektiv eingesetzt werden.

In diesem Zusammenhang wären Kenntnisse über die Detektion des Zyklusstandes, die Mechanismen der sozialen Interaktion und eine potentielle Kommunikation durch Signalstoffe bei Kühen innerhalb der Herde Voraussetzung für potentielle Zuchtprogramme. Die Hypothese, dass über Pheromone im Urin oder Drüsensekrete der Östrusverlauf anderen Tieren signalisiert, die Ovulation induziert oder zyklische Ovaraktivität synchronisiert wird, wäre Grundlage, um mit dieser Information im Zusammenhang mit Parametern über den endokrinologischen Verlauf ein Modell der nicht-invasiven Ovulationsprognose zu entwickeln. Beim invasiven Monitoring (Entnahme einer Blutprobe beispielsweise zur Hormonanalytik) besteht das Risiko von Störung und Beeinflussung der Tiere. Außerdem ist unter Umständen eine Immobilisierung der Tiere durch Anästhetika nötig. Abgesehen vom Aufwand des Verfahrens ist dies aus Gründen des damit verbundenen Risikos der Verletzung nicht praktikabel.

Das Modell des nicht-invasiven Monitorings könnte Anwendung bei künstlichen Besamungen oder dem Zusammenführen der Kühe mit potentiellen Deckbullen zum Zeitpunkt der Ovulation finden und sollte zudem zeitlich präziser als die Verfolgung des Verlaufs von Hormonkonzentrationen sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Kooperation mit dem Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW) in Berlin zyklusabhängig gebildete potentielle Signalstoffe im Urin isoliert und identifiziert.

## Reproduktionsanzeigende Signalstoffe

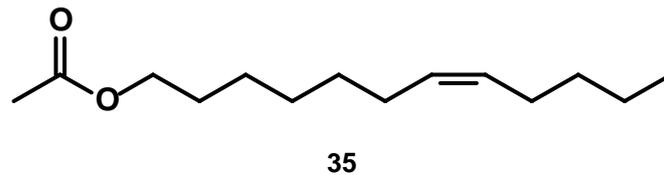
Viele Säugetiere teilen Artgenossen ihren Reproduktionsstatus durch Pheromone mit. Bei verschiedenen Spezies konnten Verhaltensveränderungen durch Östrus-abhängige Pheromone, wie Anziehung (attraction), olfaktorische Bevorzugung oder Flehmenreaktion männlicher Tiere auf Urin oder Vaginalsekret weiblicher Tiere beobachtet werden. So wurden zum Beispiel bereits für Ratte<sup>132</sup>, Maus<sup>133-135</sup>, Hamster<sup>136</sup>, Schaf<sup>137</sup>, Rind<sup>138</sup>, afrikanischen<sup>139</sup> und asiatischen Elefanten<sup>140</sup> reproduktionsanzeigende Signalstoffe publiziert. Allerdings ist die chemische Struktur dieser Pheromone im Allgemeinen unbekannt.

Freilandbeobachtungen beim asiatischen Elefanten zeigten, dass solitär lebende Elefantenbullen den herannahenden Östrus einer Elefantenkuh wahrnehmen und den richtigen Zeitpunkt der Paarung detektieren<sup>141</sup>, wobei eine erste Kontaktaufnahme bereits 6 Wochen vor der Ovulation erfolgt. Weitergehende Untersuchungen mit Elefantenkühen in Gefangenschaft ergaben, dass zuvor erfolgreich deckende Elefantenbullen zum Ende der Follikelphase, also kurz vor der Ovulation, sexuelles Interesse an der Kuh zeigten<sup>142</sup>, während bei unerfahrenen Bullen dies bereits drei Wochen vor und zum Zeitpunkt der Ovulation der Fall ist. Die früher vermutete Zyklusdauer von 22 Tagen beim asiatischen Elefanten (tatsächliche Zyklusdauer etwa 15 Wochen<sup>143</sup>) resultierte aus der Beobachtung, dass eine männlich-weibliche Interaktion im Abstand von 22 Tagen registriert wurde<sup>144</sup>.

Bei allen weiblichen Tieren innerhalb der Klasse der Säugetiere (Mammalia) steuert das luteinisierende Hormon (LH) den Eisprung und die Gelbkörperbildung. Kurz vor dem Eisprung ist ein steiler Anstieg der LH-Konzentration im Blut nachweisbar, der danach schnell wieder abklingt. Diese plötzliche Konzentrationserhöhung des LH wird ovulatorischer Peak genannt. Bei weiblichen asiatischen Elefanten wird als Besonderheit innerhalb der Säugetiere inmitten der Follikelphase ein zusätzlicher, plötzlicher anovulatorischer Anstieg der Konzentration des luteinisierenden Hormons (LH) detektiert, dem nach 21 Tagen zum Zeitpunkt des Eisprungs der ovulatorische Anstieg folgt<sup>145,146</sup>.

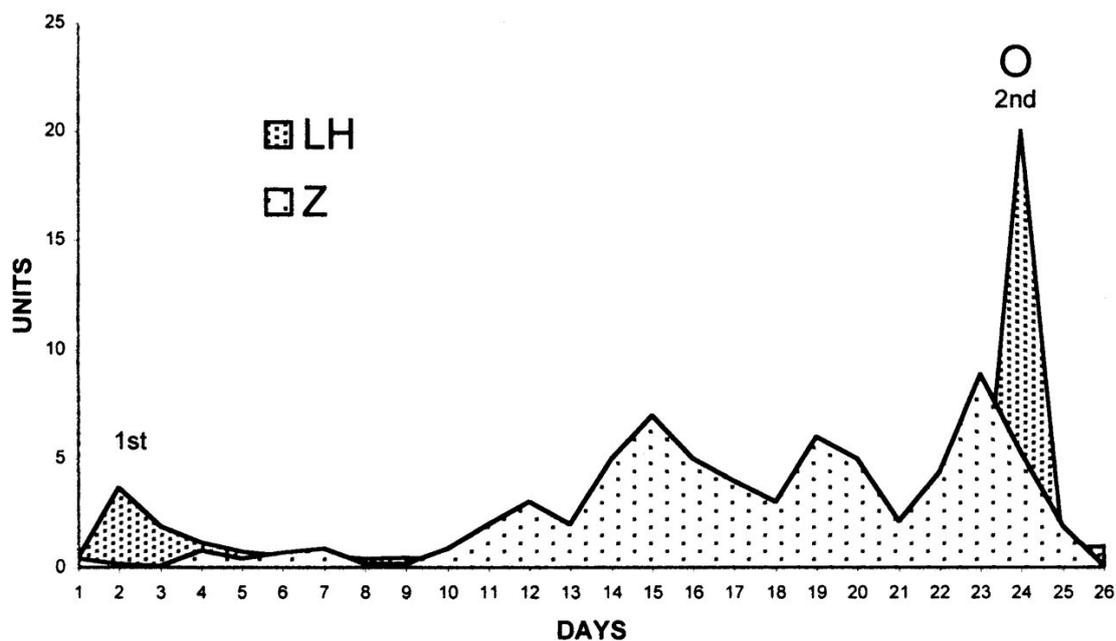
Diese Befunde könnten bedeuten, dass bereits zu Anfang der Follikelphase, also 6 Wochen vor der Ovulation, Pheromone den Bullen über den herannahenden Östrus informieren und somit im Sinne eines „Attractants“ wirken. Außerdem sind zur zeitgerechten Erkennung des Östrus wahrscheinlich weitere Signalstoffe der Kuh beteiligt, die 3 Wochen vor und während der Ovulation synchron mit einem LH-Anstieg auftreten.

Der asiatische Elefant ist eines der wenigen Wirbeltiere, bei dem ein vom Östrus abhängiges Pheromon identifiziert wurde. In der Follikelphase wird von Elefantenkühen mit dem Urin das Sexpheromon (7Z)-Dodecenylnacetat (**35**) (in der Literatur oft als Z abgekürzt; Abbildung 11), das bei vielen Insekten bereits als Pheromon bekannt ist<sup>147</sup>, ausgeschieden. Kurz vor der Ovulation erreicht **35** die höchste Konzentration im Urin der Elefantenkühe, worauf die Elefantenbullen mit Flehmen reagieren<sup>140</sup>.



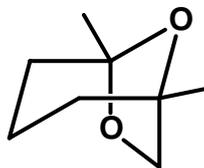
**Abbildung 11:** (7Z)-Dodecenylnacetat (**35**)

In einer neueren Publikation wurde allerdings dargelegt, dass kein synchrones Auftreten zwischen dem (7Z)-Dodecenylnacetat (**35**) und den beiden LH-Peaks besteht. Stattdessen konnte lediglich eine schwankend ansteigende Konzentration des (7Z)-Dodecenylnacetats (**35**) in der präovulatorischen Phase zwischen dem ersten und zweiten LH-Peak gemessen werden<sup>148</sup> (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Konzentrationsverlauf des lutenisierenden Hormons (LH) und (7Z)-Dodecenylnacetat (**35**, Z). 24 Tage vor Ovulation (O) wurden der erste (1st) und am Tage der Ovulation der zweite (2nd) LH-Peak gemessen. (LH in ng/ml und (Z, **35**) in  $10^{-1}$  mM). Abbildung nach Rasmussen<sup>148</sup>.

Diese Substanz könnte somit ein so genanntes „Attractant“ oder Bestandteil eines solchen sein. Räumlich von der Herde getrennt lebende Elefantenbullen würden so die bevorstehende Ovulation der Elefantenkuh wahrnehmen und zum richtigen Zeitpunkt Kontakt zur Herde aufnehmen. Der biologische Nutzen läge in dem höheren Reproduktionserfolg, da lange Menstruationszyklen und ein unregelmäßiger Östrus bei Elefantenkühen vorliegen. Neben dem „Attractant“ (7Z)-Dodecenylacetat (**35**), welches eine Rolle bei der Interaktion von Elefantenkuh und Bullen spielt, wurde ein weiterer verhaltensmodifizierender Signalstoff identifiziert, der das Sozialverhalten männlicher Tiere zueinander beeinflusst. Männliche Tiere scheiden während sich jährlich wiederholender Phasen erhöhter Aggression und sexueller Aktivität (engl. Musth) durch Drüsen an der Schläfe ein Sekret aus. Während Elefanten, die anatomisch gesehen erwachsen, aber sozial gesehen noch jugendlich sind, kurze Phasen der Brunft (Musth) haben, verlängert sich diese bei vollständig erwachsenen Tieren. Zusätzlich variiert auch die chemische Zusammensetzung dieses Drüsensekrets<sup>149</sup>. Als Inhaltsstoff konnte das bicyclische Acetal (**36**; 1,5-Dimethyl-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octan) identifiziert werden. Frontalin (**36**) konnte nur bei erwachsenen Tieren detektiert werden und fehlt bei jugendlichen Tieren.



**36**

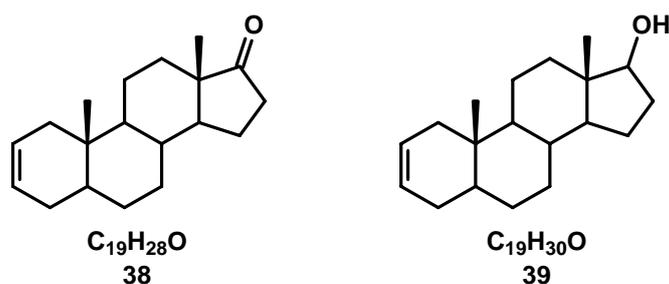
**Abbildung 13:** Frontalin (**36**)

Durch Verhaltenstests konnte gezeigt werden, dass jugendliche Bullen auf Sekret mit Frontalin (**36**) als Inhaltsstoff mit Zurückweichen oder Distanzwahrung reagieren, ältere Bullen jedoch nicht eindeutig reagieren<sup>150</sup>. Neuere Studien mit wildlebenden Elefanten zeigen ein komplexeres Bild der chemosensorischen Mechanismen<sup>151</sup>, in denen auch noch die Stereochemie des Frontalins eine Rolle spielt<sup>152</sup>. Ein präkopulatorisches Pheromon, das zur Detektion des Paarungszeitpunkts dient und einen synchronen Verlauf zu den LH-Peaks haben sollte, konnte allerdings bislang nicht identifiziert werden. Weiterhin sind die Ovarialzyklen von Elefantenkühen einer Herde im hohen Grade synchronisiert<sup>153,154</sup>. Dies ist zusätzlich ein Hinweis auf das Vorhandensein von unbekanntem Signalen, welche sowohl den Bullen den Reproduktionsstatus einer Kuh als auch den weiblichen Herdenmitgliedern den Zyklusstand anzeigen.

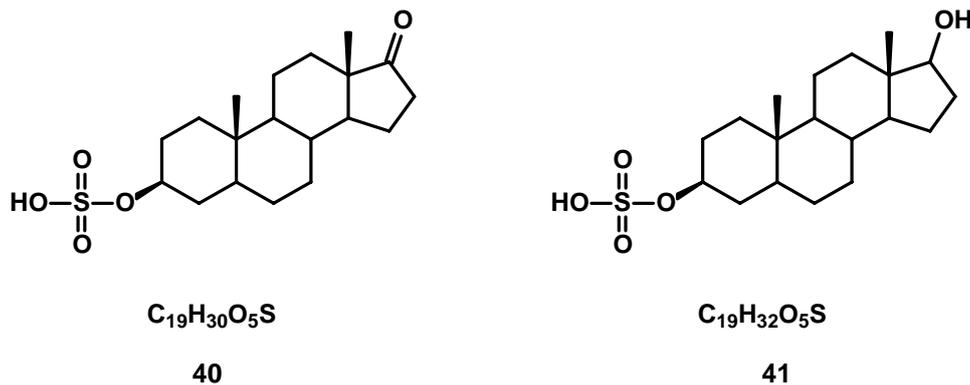
## Identifizierung flüchtiger Substanzen im Elefantenkuh-Urin

Erste Untersuchungen, deren Ergebnisse Ausgangspunkt dieser Arbeit waren, wurden am Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW) in Berlin mittels Festphasenmikroextraktion (Solid Phase Microextraction, SPME)<sup>155</sup> im Gasraum (Headspace, HS) über erhitzten Proben durchgeführt<sup>156</sup>. Dabei kam eine mit Polyacrylat-Polymer beschichtete Faser zum Einsatz. Bei diesen Untersuchungen handelte es sich um ein systematisches Non-Target-Screening auf flüchtige Substanzen im Urin von Elefantenkühen. Ziel dieser Untersuchungen war der Nachweis einzelner Substanzen oder Substanzgruppen, deren Konzentration vom Stand des Ovarialzyklus der jeweiligen Elefantenkuh abhängig ist. Der Stand des Zyklus und weibliche Reproduktionsstatus wurde durch die nicht-invasive Messung von 5 $\beta$ -Pregnantriol (**37**) im Urin kontrolliert. Dazu wurde ein auf Enzymmarkierungen basierender Assay (Enzyme-linked Immunosorbent Assays, ELISA) genutzt<sup>157</sup>.

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten mittels GC/MS-Analysen zwei flüchtige Steroide, 5 $\alpha$ -Androst-2-en-17-on (**38**) und 5 $\alpha$ -Androst-2-en-17 $\beta$ -ol (**39**), identifiziert werden<sup>158</sup>. Es wurde ferner erkannt, dass diese flüchtigen Steroide während des Erhitzens des Urins durch thermische Eliminierung aus den Vorstufen 5 $\alpha$ -Androstan-17-on-3 $\beta$ -sulfat (**40**) und 5 $\alpha$ -Androstan-17 $\beta$ -ol-3 $\beta$ -sulfat (**41**) entstehen<sup>159</sup> (Diskussion des Mechanismus siehe Abbildung 20)



**Abbildung 14:** 5 $\alpha$ -Androst-2-en-17-on (**38**) und 5 $\alpha$ -Androst-2-en-17 $\beta$ -ol (**39**)

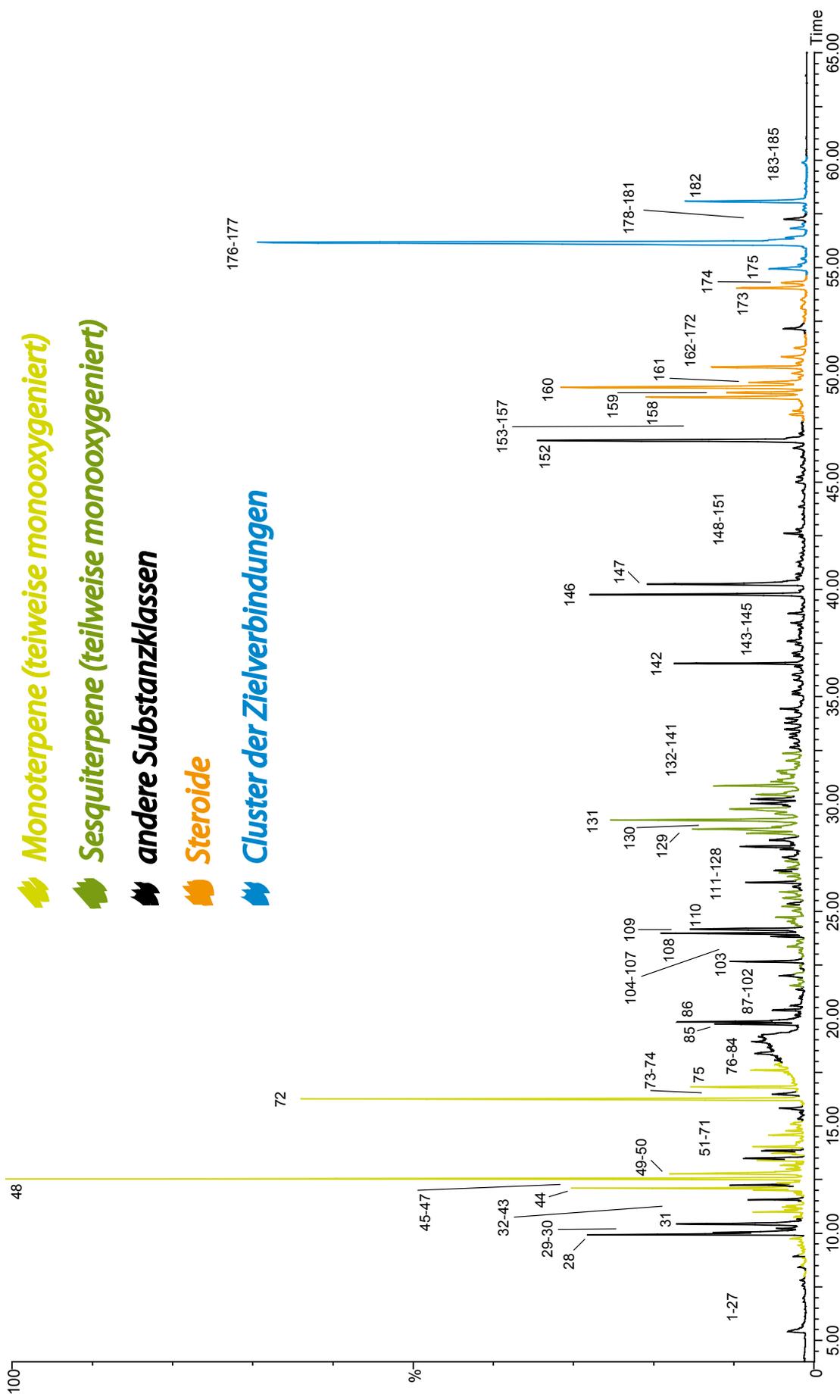


**Abbildung 15:** 5 $\alpha$ -Androstan-17-on-3 $\beta$ -sulfat (**40**) und 5 $\alpha$ -Androstan-17 $\beta$ -ol-3 $\beta$ -sulfat (**41**)

In den Totalionenstromchromatogrammen der Proben wurde weiterhin ein unbekannter Substanzcluster detektiert, deren Hauptkomponenten die Molekulargewichte 298, 300 und 302 g/mol aufwiesen. Hieraus ergab sich als Arbeitshypothese, dass es sich bei diesen Substanzen, analog zu den erwähnten C<sub>19</sub>-Steroiden des Androstangerüsts, um C<sub>21</sub>-Steroide des Pregnangerüsts handeln könnte, die ebenfalls aus sulfatierten Vorläufern gebildet würden. Dieser unbekannte Substanzcluster trat synchron bei allen Elefantenkühen einer Herde des Tierparks auf, wobei die Maximalkonzentrationen im Urin unterschiedlicher Kühe voneinander abwichen. Ferner wurde festgestellt, dass dieser Konzentrationsanstieg zeitlich synchron zu den Follikelphasen auftrat.

Von den Tierpflegern wurde zusätzlich in einigen Phasen erhöhter urinärer Konzentrationen dieser Substanzen eine aggressive Interaktion zwischen den Elefantenkühen beobachtet. Da die Maximalkonzentrationen dieses Substanzclusters mit der größten Häufigkeit 6 Wochen vor der Ovulation messbar war, aber auch mit gehäuftem Auftreten 9 und 3 Wochen bzw. unmittelbar vor der Ovulation, wurde ein endogener 3-Wochen-Rhythmus vermutet. Aufgrund der nicht zufälligen Verteilung der Substanzen wurde ein ernährungsphysiologisches Phänomen ausgeschlossen.

Diese beschriebenen orientierenden Vorarbeiten wurden am IZW in Berlin durchgeführt. Zu Beginn der eigenen Untersuchungen wurde als Referenz zunächst ein HS-SPME-Experiment über mit Kochsalz gesättigtem und gepuffertem Urin durchgeführt.



**Abbildung 16:** HS-SPME Totalionenstromchromatogramm von Elefantenuh-Urin (Säule: 30 m DB-5ms; Temperaturprogramm: 50 °C, 5 min isotherm, 10 °C/min auf 100 °C, 3 °C/min auf 300 °C, 10 min isotherm; Injektion: 2 min sl).

Wie das Gaschromatogramm in Abbildung 16 zeigt, findet man im Dampfraum über dem erhitzten Urin (Elefantenkuh Kewa, Tierpark Berlin-Freidrichsfelde) ein komplexes Gemisch flüchtiger Verbindungen. Bei der überwiegenden Anzahl der Komponenten dieses Gemisches handelt es sich um Monoterpen- und Sesquiterpenkohlenwasserstoffe, sowie mono-oxygenierte Monoterpene und Sesquiterpene. Zusätzlich finden sich überwiegend Nor-Terpenoide, Steroide, Lactone, Alkaloide und Aromaten.

Abgesehen von den Steroiden und dem Substanzcluster der Zielmoleküle, auf dem der Fokus der Untersuchungen lag, wurden die übrigen Komponenten dieses Chromatogramms ausschließlich durch GC/MS untersucht. Für die meisten Substanzen wurden anhand ihrer Massenspektren und Retentionszeiten Strukturvorschläge gemacht.

Die Massenspektren einiger Sesquiterpene und monooxygenierter Sesquiterpene können allerdings nur einen geringen Beitrag zu ihrer Strukturaufklärung liefern, da man in vielen Spektren übereinstimmende typische Fragmentationen findet, die aus dem Zerfall der unterschiedlichen Isoprenoid-Skelette hervorgehen. Aufgrund dieser sehr ähnlichen Massenspektren und der häufigen Koelution verschiedener Komponenten konnten keine eindeutigen Strukturvorschläge und Aussagen zur absoluten Konfiguration gemacht werden.

Nr.	Verbindung	Int	Nr.	Verbindung	Int
E1	Pipicolin	s	E56	Safranal	++
E2	4-Heptanon	s	E57	<i>n</i> -Decanal	+
E3	Santen	+	E58	Terpenalkohol M=152 C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>1</sub>	+
E4	2-Heptanon (27)	s	E59	3-Methylnon-2-en-4-on	++
E5	Butyrolacton	s	E60	4-Ethenylphenol	++
E6	$\alpha$ -Pinen	s	E61	Carveol	+
E7	Camphen	s	E62	Eucarvon	s
E8	Verbenen	s	E63	Carvon	+
E9	6-Methylheptan-3-on	s	E64	unbekannt	s
E10	Benzaldehyd	+	E65	Piperiton	+
E11	Dimethyltrisulfid	s	E66	<i>m</i> -Propylphenol	+
E12	<i>p</i> -Cymol	s	E67	2-Amino- <i>p</i> -cymol	+
E13	Phenol	s	E68	Trimethylphenol (K)	s
E14	3-Octanon	+	E69	<i>n</i> -Decanol	+
E15	2-Pentylfuran	s	E70	Tetramethylphenol (K)	s
E16	2-Octanon	s	E71	M=194 aromatisch	+
E17	1,3,8-Menthatrien	s	E72	Indol +Thymol	+++
E18	$\alpha$ -Phellandren	s	E73	Cavacrol	+
E19	Diethylenglycolmonoethylether (K)	+	E74	2-Aminoacetophenon	+
E20	$\alpha$ -Terpinen	s	E75	4-Ethenyl-2-methoxyphenol	+++
E21	<i>m</i> -Cymol	s	E76	Undec-2-en-4-on	s
E22	<i>o</i> -Cymol	s	E77	unbekannt	++
E23	2-Ethylhexanol (K)	s	E78	Piperitenon	+
E24	$\beta$ -Phellandren	s	E79	2-Allyl-4-methylphenol	+
E25	4-Ethyl-2-methyl-(1 <i>H</i> )-pyrrol	+	E80	1-(2-Hydroxy-1-methylethyl)-2,2-dimethylpropyl-2-methylpropanoat	+
E26	$\gamma$ -Terpinen	+	E81	5-Hydroxy-8a-methyloctahydro-1(2 <i>H</i> )-naphthalenon	+
E27	2-Methyl-6-propylpyridin	s	E82	3-Hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl-2-methylpropanoat	+
E28	2-Methyl-6-propylpiperidin	+++	E83	$\beta$ -Damascenon	+
E29	Acetophenon	+	E84	Tromethamin	+
E30	unbekannt	+	E85	1-(3,6,6-Trimethyl-1,6,7,7a-tetrahydrocyclopenta-[c]pyran-1-yl)ethanon	+++
E31	<i>p</i> -Cresol	+++	E86	unbekannt	+++
E32	Methylcatechol	+	E87	2,2-Dimethylchroman	+
E33	<i>p</i> -Cymenen	+	E88	$\beta$ -Damascon	+
E34	Rosenfuran	+	E89	Dodecanal	+
E35	Campholenaldehyd	s	E90	unbekannt	+
E36	2-Hydroxy-6-methylenbicyclo[2.2.2]octan	++	E91	6-Methyl-6-(5-methylfuran-2-yl)-heptan-2-on	+
E37	Nonanal	+	E92	unbekannt	+
E38	bicyclischer Terpenalkohol M=152	+	E93	2,6-bis- <i>tert.</i> Butylphenol (K)	s
E39	Terpen	+	E94	1-Benzopyran-2-on	s
E40	Isophoron	++	E95	6-Methyl-6-(5-methylfuran-2-yl)-hept-3-en-2-on	+
E41	<i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	++	E96	Sesquiterpen KW, zweifach ungesättigt, M=204	+
E42	(3 <i>E</i> )-Non-3-en-2-on	+	E97	Sesquiterpen KW, zweifach ungesättigt, M=204	s
E43	Terpenalkohol M=154 C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>1</sub>	+	E98	unbekannt	s
E44	<i>trans</i> -Verbenol	+++	E99	2,6-bis- <i>tert.</i> -Butyl-4-methylphenol (K)	+
E45	Coumaran	++	E100	<i>Ep</i> i-bicyclo-sesquiphellandren, M=204	+
E46	Camphenilol	+	E101	<i>N</i> -Alkyl-Morpholin	s
E47	2-Hydroxyacetophenon	+	E102	Sesquiterpen KW, zweifach ungesättigt, M=204	s
E48	$\alpha$ -Phellandren-8-ol	+++	E103	4-(2,6,6-Trimethylcyclohexa-1,3-dienyl)-but-3-en-2-on	++
E49	$\beta$ -Phellandren-8-ol	+++	E104	Bicyclosesquiphellandren, M=204	+
E50	Borneol	+++	E105	$\gamma$ -Muurolen	+
E51	Cymen-8-ol + Terpinen-4-ol	+	E106	$\alpha$ -Muurolen	+
E52	Myrtanal + 3-Methylacetophenon	+	E107	2,4-bis- <i>tert.</i> -Butylphenol (K)	+
E53	<i>p</i> -Cymen-8-ol	+	E108	Dihydrobovid	++
E54	Undecan-2-on	+	E109	Sesquiterpen KW, zweifach ungesättigt, M=204	+
E55	$\alpha$ -Terpineol	++	E110	Bovolid	++

Nr.	Verbindung	Int	Nr.	Verbindung	Int
E111	$\delta$ -Cadinen	++	E148	Hexadecansäureisopropylester	s
E112	Sesquiterpen KW, zweifach ungesättigt, M=204	+	E149	Diterpen C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	+
E113	unbekannt	+	E150	Hexadecanol	s
E114	Sesquiterpen KW, zweifach ungesättigt, M=204	+	E151	1,5-Diphenylpent-1-en-3-on	+
E115	$\beta$ -Calacoren	+	E152	unbekannt	+++
E116	unbekannt	+	E153	<i>n</i> -Butylhexadecanoat	+
E117	Megastigmatrienon	++	E154	unbekanntes Isomer vom Androstenol	s
E118	Terpen	+	E155	unbekanntes Isomer vom Androstenol	+
E119	2,2,4-Trimethylpentan-1,3-dioldiisobutyrat	+	E156	unbekannt	+
E120	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O / Sesquiterpen, monooxygeniert, M=218	+	E157	unbekannt	+
E121	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O / Sesquiterpen, monooxygeniert, M=218	+	E158	5 $\alpha$ -Androst-2-en-17-on (38)	+++
E122	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O / Sesquiterpen, monooxygeniert, M=220	s	E159	5 $\alpha$ -Androst-3-en-17-on	+++
E123	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O / Sesquiterpen, monooxygeniert, M=220	+	E160	5 $\alpha$ -Androst-2-en-17 $\beta$ -ol (39)	+++
E124	Megastigmatrienon II	+	E161	5 $\alpha$ -Androst-3-en-17 $\beta$ -ol	++
E125	unbekannt	s	E162	5 $\alpha$ -Androst-11/12-en-3 $\beta$ -ol	+
E126	Megastigmatrienon III	+	E163	5 $\alpha$ -Androst-16-en-3-ol (17)	++
E127	2-Hydroxymethylnaphthalin	+	E164	5 $\alpha$ -Androst-16-en-3-on (16)	+
E128	monooxygenierte Sesquiterpene,	++	E165	vermutlich ein Diterpen	+++
	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O / C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O, M = 218 / 220	+	E166	vermutlich ein Diterpen	+
E129	$\tau$ -Muurolol, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O, M=222	+++	E167	unbekanntes Isomer vom Androstenon	s
E130	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O / Sesquiterpen, monooxygeniert, M=222	+	E168	9-Octadecenamid	+
E131	$\alpha$ -Cadinol, C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O, M=222	+++	E169	Pregnenon	s
E132	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O / Sesquiterpen, monooxygeniert, M=220	+	E170	Diocyladipat (K)	s
E133	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O / Sesquiterpen, monooxygeniert, M=220	+	E171	Pregna-2,16-dien-20-on	s
E134	3,5-Bis( <i>tert.</i> butyl)-4-hydroxypropiophenon (K)	+	E172	unbekannt	s
E135	unbekannt	++	E173	5 $\alpha$ -Pregn-2-en-20-on	+++
E136	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O / Sesquiterpen, monooxygeniert, M=220	++	E174	5 $\alpha$ -Pregn-3-en-20-on	+
E137	unbekannt M=224	+++	E175	unbekannte Substanz Masse = 300	+
E138	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O / Sesquiterpen, monooxygeniert, M=220	+	E176	unbekannte Substanz Masse = 300	+++
E139	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O / Sesquiterpen, monooxygeniert, M=220	+	E177	unbekannte Substanz Masse = 302	+++
E140	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O / Sesquiterpen, monooxygeniert, M=220	+	E178	unbekannte Substanz Masse = 300	+
E141	3,5-Di- <i>tert.</i> butyl-4-hydroxybenzaldehyd (K)	s	E179	unbekannte Substanz Masse = 300	+
E142	Di- <i>tert.</i> butylphthalat (K)	s	E180	Di-(2-ethylhexyl)-phthalat (K)	+
E143	Hexadecanol	+	E181	unbekannte Substanz Masse = 298	+
E144	4-Acetyl-2,2,6-trimethylindanon	+	E182	unbekannte Substanz Masse = 300	+++
E145	unbekannt	+	E183	unbekannte Substanz Masse = 300	s
E146	Dibutylphthalat (K)	+	E184	unbekannte Substanz Masse = 300	s
E147	18-Norisopimara-4(19)-7,15-trien	+	E185	Squalen	s

**Tabelle 1:** Strukturvorschläge zu Komponenten des Chromatogramms in **Abbildung 16**.

Den Nummern der Komponenten im HS-SPME Totalionenstromchromatogramm des Elefantenkuh-Urins ist jeweils ein E vorangestellt, um die Unterscheidung von den im Text genannten Verbindungen zu erleichtern. Für die Quantifizierung wurden folgende relative Abschätzungen vorgenommen: +++ Komponente mit mehr als 10 % Peakhöhe im Vergleich zum intensivsten Peak im Totalionenstromchromatogramms , ++ 5 – 10 %, + 1 – 5 % und s für Spurenkomponenten unter 1 % Intensität. Verbindungen, die offensichtlich durch eine Kontamination der Probe aus Probennahme und Aufbewahrung herrühren, wurden mit K gekennzeichnet.

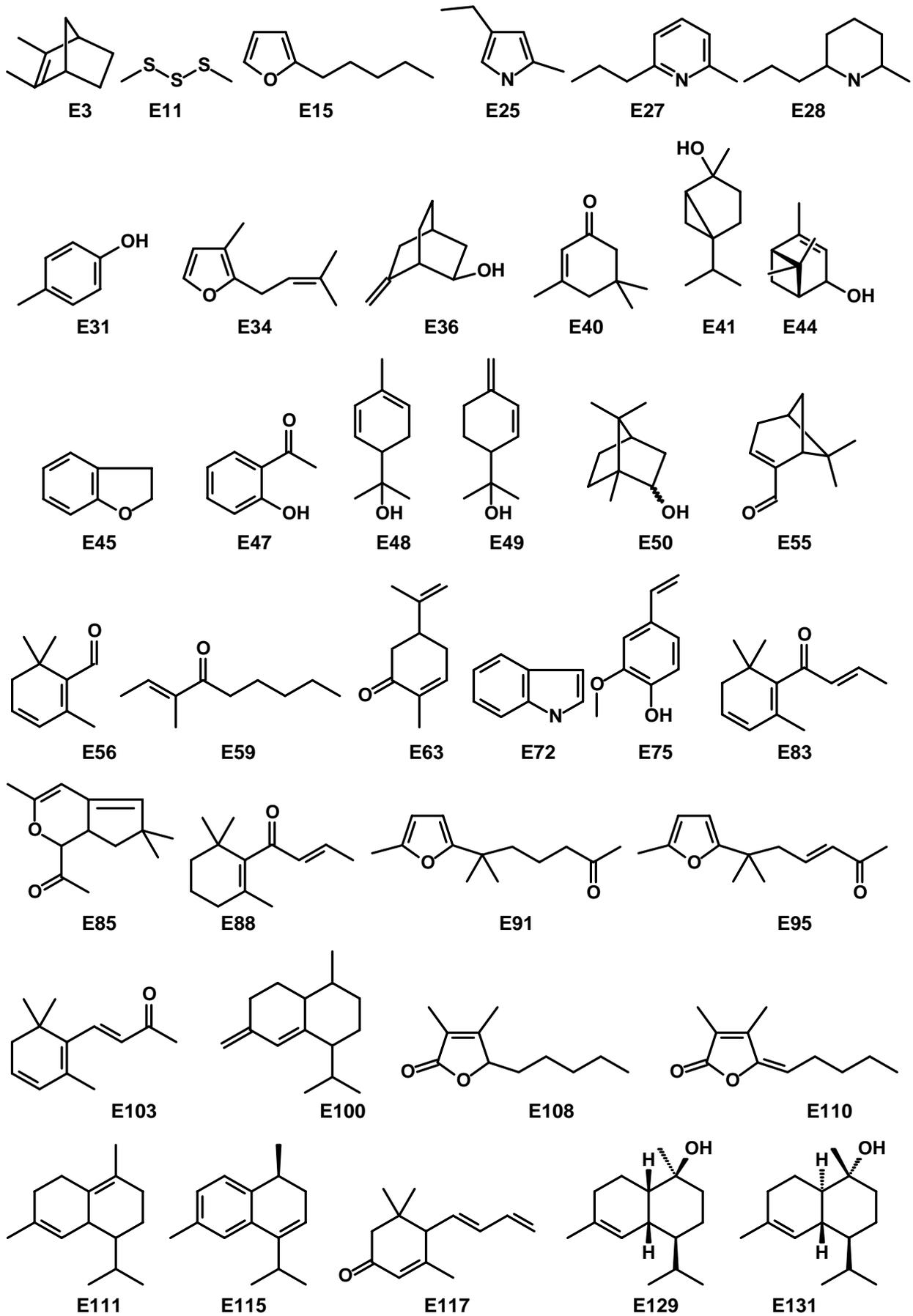


Abbildung 17: Strukturvorschläge für einige Hauptkomponenten und ausgewählter Verbindungen

Die Hauptkomponenten im leichtflüchtigen Bereich dieses Chromatogramms sind überwiegend Terpen- und Sesquiterpenkohlenwasserstoffe sowie monoxygenierte Terpene und Sesquiterpene, wovon hier folgende abgebildet sind:

3-Methyl-2-(3-methyl-2-butenyl)-furan (Rosenfuran) **E34**

*p*-Menth-2-en-1-ol (Sabinenhydrat) **E41**

4,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol (*trans*-Verbenol) **E44**

*p*-Mentha-1,5-dien-8-ol ( $\alpha$ -Phellandren-8-ol) **E48**

*p*-Mentha-1(7),2-dien-8-ol ( $\beta$ -Phellandren-8-ol) **E49**

1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol (Borneol) **E50**

6,6-Dimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-en-2-carbaldehyd (Myrtenal) **E55**

2-Methyl-5-(1-methylethenyl)-2-cyclohexen-1-on (Carvon) **E63**

4-Ethenyl-2-methoxyphenol (*p*-Vinylguaiaicol) **E75**

*Epi*-bicyclosesquiphellandren **E100**,  $\delta$ -Cadinen **E111**

$\beta$ -Calacoren **E115**,

$\tau$ -Muurolol **E129**

$\alpha$ -Cadinol **E131**

Vertreter der Norterpene sind

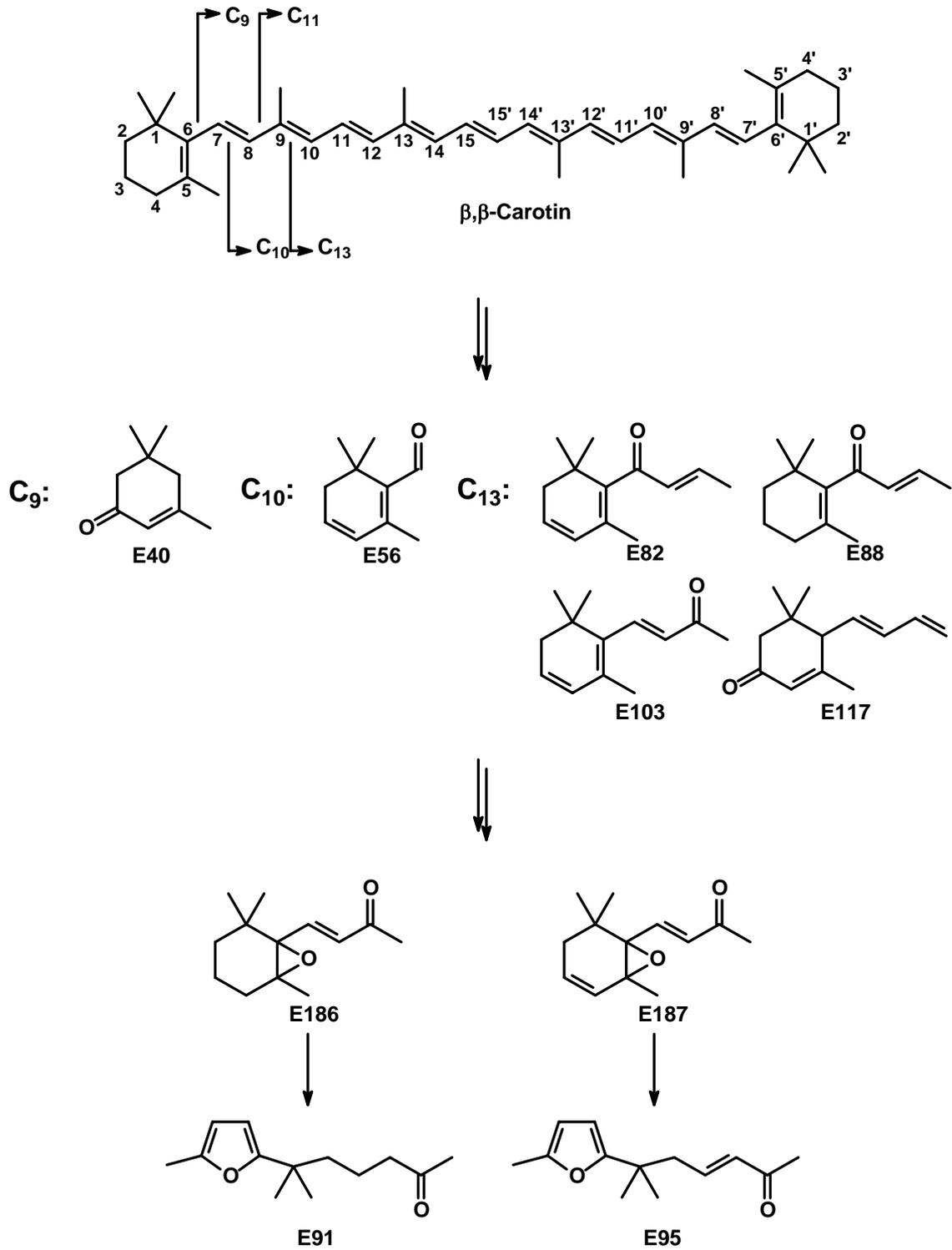
2,3-Dimethyl-bicyclo[2.2.1]hept-2-en (Santen) **E3** und

2-Hydroxy-6-methylenbicyclo[2.2.2]octan **E36**.

Weiterhin wurde eine Vielzahl an Abbauprodukten der Carotinoide gefunden<sup>160</sup>. Unklar ist, ob der Abbau dieser Tetraterpene zu den hier auftretenden flüchtigen Nor-Isoprenoiden mit 9-13 Kohlenstoffatomen durch enzymatische Spaltung oder durch Autoxidation mit Singulett-Sauerstoff verläuft. Weiterhin wurde nicht untersucht, ob es sich bezüglich der Herkunft dieser Verbindungen um Inhaltsstoffe der Nahrung oder um Stoffwechselmetaboliten handelt. Nor-Isoprenoide sind in der Natur weit verbreitet und sind bedeutende Geruch- und Aromastoffe vieler Pflanzenöle.

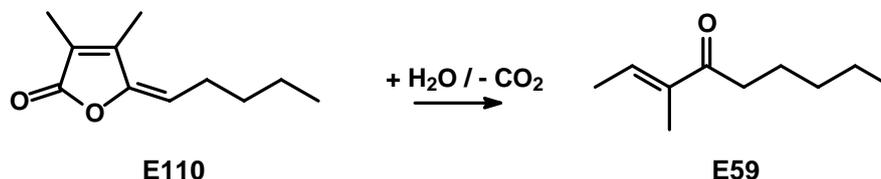
Der vermutliche Abbau zu den im Elefantenerin identifizierten Nor-Isoprenoiden ist ausgehend vom  $\beta,\beta$ -Carotin in Abbildung 18 kurz skizziert. Der Einfachheit halber wurde der Mechanismus nur für die detektierten Verbindungen dargestellt. Durch Spaltung zwischen C6 und C7 des Carotinoids entsteht 3,5,5-Trimethylcyclohex-2-en-1-on (Isophoron) (**E40**) mit einem C-9-Skelett, und Spaltung zwischen C7 und C8 ergibt 2,6,6-Trimethyl-1,3-cyclohexadien-1-carboxaldehyd (Safranal) (**E56**).

Zu den C-13-nor-Isoprenoiden mit Megastigmangerüst, die aus dem Bruch zwischen C9 und C10 resultieren, gehören 4-(2,6,6-Trimethyl-1,3-cyclohexadien-1-yl)-2-buten-1-on ( $\beta$ -Damascenon) (**E83**), 4-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2-buten-1-on ( $\beta$ -Damascon) (**E88**), 6-Methyl-6-(5-methylfuran-2-yl)-heptan-2-on (**E91**), 6-Methyl-6-(5-methylfuran-2-yl)-hept-3-en-2-on (**E95**), 4-(2,6,6-Trimethylcyclohexa-1,3-dienyl)-but-3-en-2-on (**E103**) sowie die Isomere der Megastigmatrienone, von denen hier das 4-[(1*E*)-1,3-Butadienyl]-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one (Megastigmatrienon I) (**E117**) dargestellt ist. Die Verbindungen **E88** und **E95** entstehen durch Umlagerung aus den Epoxiden des  $\beta$ -Ionons (**E186**) und des Dehydroionons (**E187**)<sup>161</sup>, welche jedoch selbst nicht im Urin detektiert werden konnten. Diese Umlagerungsprodukte konnten bei Photoreaktionen der entsprechenden 5,6-Epoxyionone isoliert werden<sup>162,163</sup>.



**Abbildung 18:** Abbauweg der Carotinoide zu den identifizierten C-9, C-10 und C-13 Nor-Isoprenoiden

(3*E*)-Methylnon-2-en-4-on (**E59**) ist trotz seines C<sub>10</sub>-Körpers nicht terpenoiden Ursprungs. Es entsteht nach vorheriger Hydratisierung aus 3,4-Dimethyl-5-pentyliden-2(5*H*)-furanon (2,3-Dimethylnona-2,4-dien-4-olid / Bovolid) (**E110**) durch Decarboxylierung<sup>164,165</sup>.



**Abbildung 19:** Hydrolyse und Decarboxylierung von Bovolid (**E110**) zu (3*E*)-Methylnon-2-en-4-on (**E59**)

Verbindung **E110** soll genauso wie 3,4-Dimethyl-5-pentyl-2(5*H*)-furanone (**E108**) (2,3-Dimethylnon-2-en-4-olid / Dihydrobovolid) durch Photooxidation von Fettsäuren<sup>166</sup> oder Furanfettsäuren<sup>167,168</sup> entstehen und wurde erstmals als Spurenkomponente im Butterfett von Rindern nachgewiesen, woher sich der Name ableitet<sup>169</sup>. Das aufgenommene Massenspektrum stimmt exzellent mit dem Referenzmassenspektrum aus der Literatur überein<sup>170</sup>.

Das Alkaloid 2-Methyl-6-propylpiperidin (Epidihydropinidin) (**E28**) ist als Bestandteil des Extrakts von Fichtennadeln (*Picea*) bekannt<sup>171</sup>. Das oxidierte Analogon 2-Methyl-6-propylpyridin (**E27**) wurde allerdings nicht in diesem Zusammenhang als Naturstoff beschrieben. Das in allen Proben ubiquitär auftretende *p*-Cresol (**E31**) wurde auch bei Wiederkäuern als dominierende neutrale Urinkomponente gefunden. Die Aminosäure Phenylalanin wird über Tyrosin als Zwischenstufe zu *p*-Cresol metabolisiert<sup>172,173</sup>.

Weitere Komponenten sind neben Dimethyltrisulfid (**E11**) die Aromaten und Heterozyklen 2-Pentylfuran (**E15**), 4-Ethyl-2-methyl-(1*H*)-pyrrol (**E25**), Dihydrobenzofuran (**E45**), 2-Hydroxyacetophenon (**E47**), Indol (**E72**) und 1-(3,6,6-Trimethyl-1,6,7,7a-tetrahydro-cyclopenta[*c*]pyran-1-yl)-ethanon (**E85**).

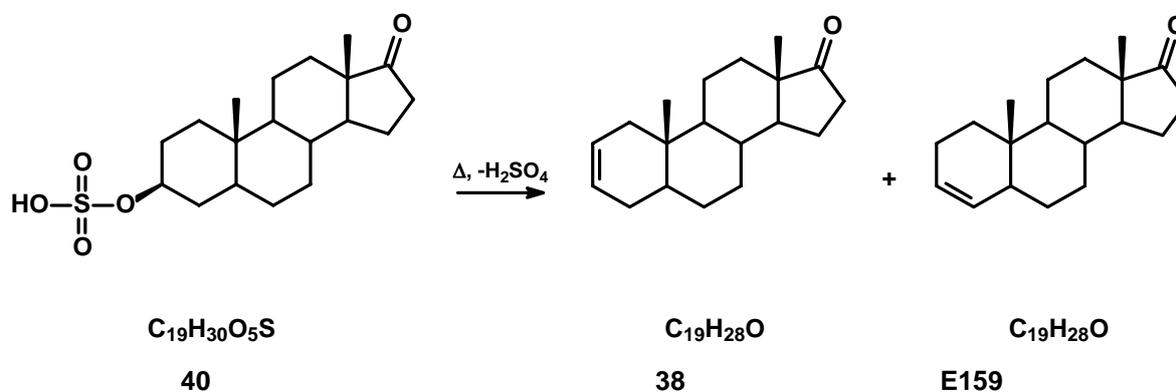
## Identifizierung flüchtiger Steroide im Elefantenkuh-Urin

In der weiteren Arbeit richtete sich das Hauptaugenmerk auf den Bereich der schwerflüchtigen Komponenten dieses Chromatogramms, da dort die Steroide und zyklisch auftretenden unbekanntem Verbindungen detektiert wurden. In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass die Steroide  $5\alpha$ -Androst-2-en-17-on (**38**),  $5\alpha$ -Androst-3-en-17-on (**E159**),  $5\alpha$ -Androst-2-en-17 $\beta$ -ol (**39**),  $5\alpha$ -Androst-3-en-17 $\beta$ -ol (**E161**),  $5\alpha$ -Pregn-2-en-20-on (**E173**) und  $5\alpha$ -Pregn-3-en-20-on (**E174**) vor dem unbekanntem Substanzcluster eluieren. Die Steroide liegen jeweils paarweise als Stellungsisomere mit Doppelbindungen an Position 2 beziehungsweise 3 vor (Tabelle 2).

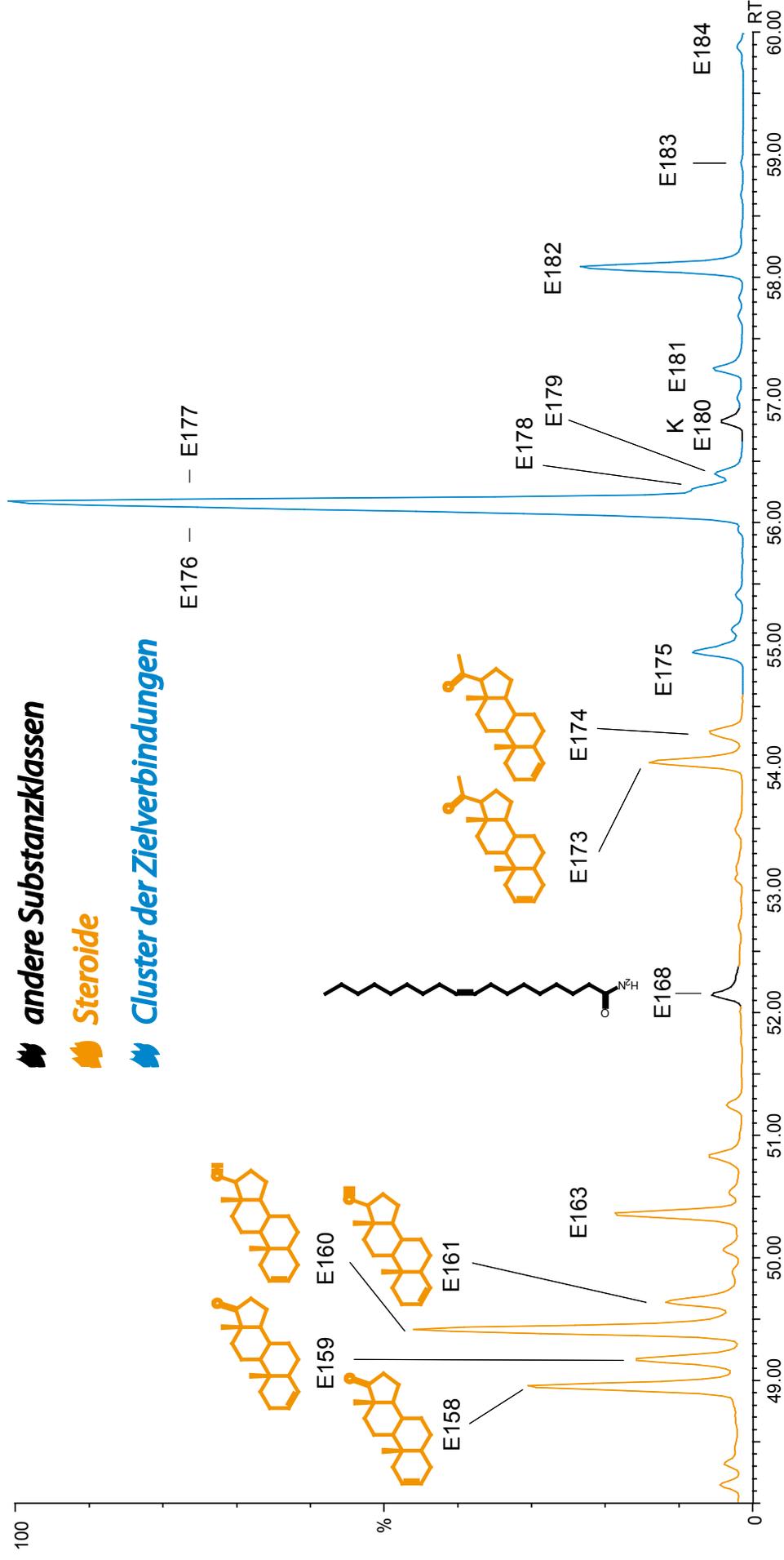
<b>38 / E158</b>	$5\alpha$ -Androst-2-en-17-on
<b>E159</b>	$5\alpha$ -Androst-3-en-17-on
<b>39 / E160</b>	$5\alpha$ -Androst-2-en-17 $\beta$ -ol
<b>E161</b>	$5\alpha$ -Androst-3-en-17 $\beta$ -ol
<b>E173</b>	$5\alpha$ -Pregn-2-en-20-on
<b>E174</b>	$5\alpha$ -Pregn-3-en-20-on

**Tabelle 2:** Übersicht über Substanzen im Retentionsbereich der unbekanntem Inhaltsstoffe

Die Massenspektren der Verbindungen wurden unter der Berücksichtigung ausgewertet, dass die nachgewiesenen Steroide durch thermische Prozesse entstehen und somit jeweils zwei isomere Steroide aus einer gemeinsamen Sulfat-Vorstufe entstanden sein könnten:



**Abbildung 20:** Möglicher thermischer Prozess zur Bildung flüchtiger  $5\alpha$ -Androsten-17-one (**38** und **E159**) aus  $5\alpha$ -Androstan-17-on-3 $\beta$ -sulfat (**40**) unter Bedingungen der HS-SPME.



**Abbildung 21:** Ausschnitt des Chromatogramms von 48-61 min (TIC) HS-SPME (Polyacrylatfaser) Elefantenkuh-Urin. (Säule: 30 m DB-5ms; Temperaturprogramm: 50 °C, 5 min isotherm, 10 °C/min auf 100 °C, 3 °C/min auf 300°C, 10 min isotherm; Injektion. 2 min sl).

Das Massenspektrum von  $5\alpha$ -Androst-2-en-17-on (**38**) mit der Unsattigung an Position C-2 in Abbildung 22 zeigte als Basispeak ein Signal bei  $m/z = M^+ - 54$ , was einer Abspaltung von Butadien als Folge einer Retro-Diels-Alder Spaltung (RDA-Spaltung) im Ring A entspricht. Daraus entsteht unter Eliminierung von Kohlenmonoxid das Signal bei  $m/z$  190.

Die Fragmentierungen können auch in umgekehrter Reihenfolge unter Eliminierung von Kohlenmonoxid aus dem Molekülion zum Signal bei  $m/z$  244 und anschließender RDA-Spaltung zum Signal bei  $m/z$  190 verlaufen. Der Verlust einer Methylgruppe aus dem Molekülion führt zum Signal bei  $m/z$  257

Das isomere Steroid  $5\alpha$ -Androst-3-en-17-on (**E159**) mit gleicher Molekülmasse von 272 g/mol und der Unsattigung an Position 3 zeigt als Basispeak das Molekülion. Dies fragmentiert weniger signifikant unter Abspaltung einer Methylgruppe zum Signal bei  $m/z$  257. Die abgespaltene Methylgruppe liegt vermutlich benachbart zur Carbonylgruppe, da das entstehende Kation mesomeriestabilisiert ist. Nachfolgende Eliminierung von Kohlenmonoxid führt zum Signal bei  $m/z$  229 (Abbildung 23). Auch hier ist zusätzlich die umgekehrte Reihenfolge der Fragmentierung zu erkennen. Eliminierung von Kohlenmonoxid aus dem Molekülion führt zum Signal bei  $m/z$  244 und nachfolgender Verlust einer Methylgruppe zum Signal bei  $m/z$  229.

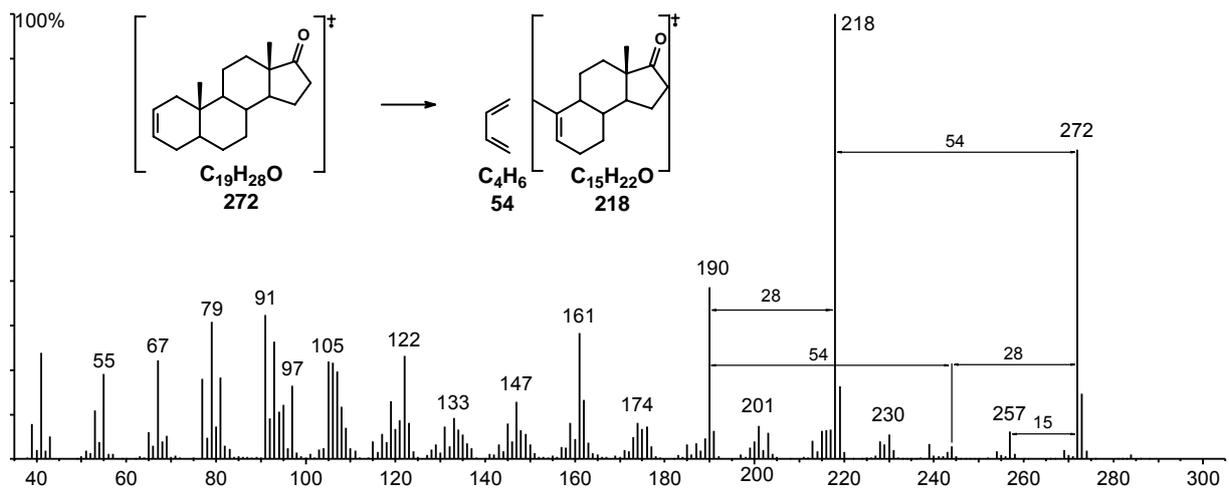


Abbildung 22: Massenspektrum von 5α-Androst-2-en-17-on (38)

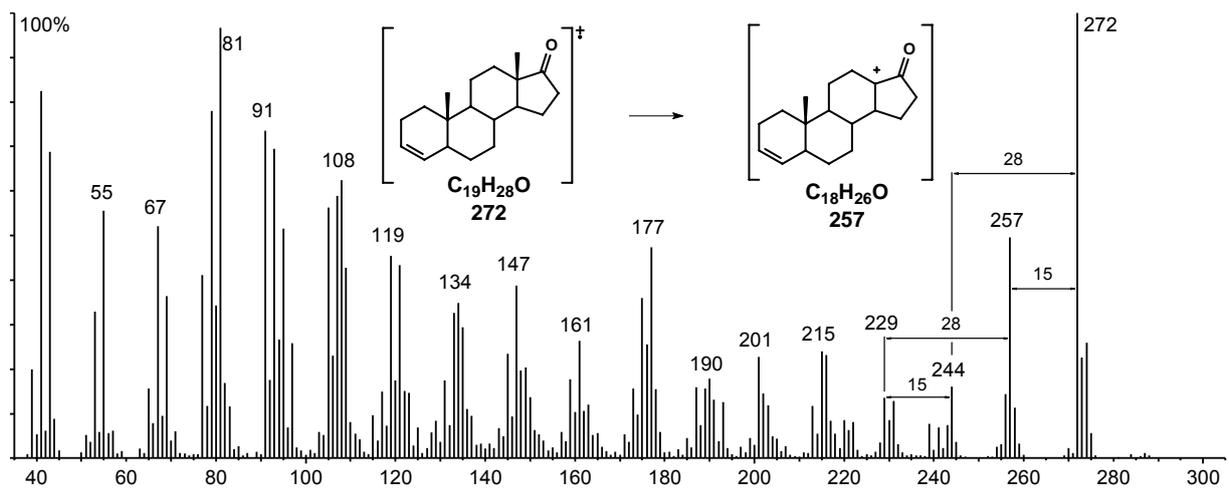
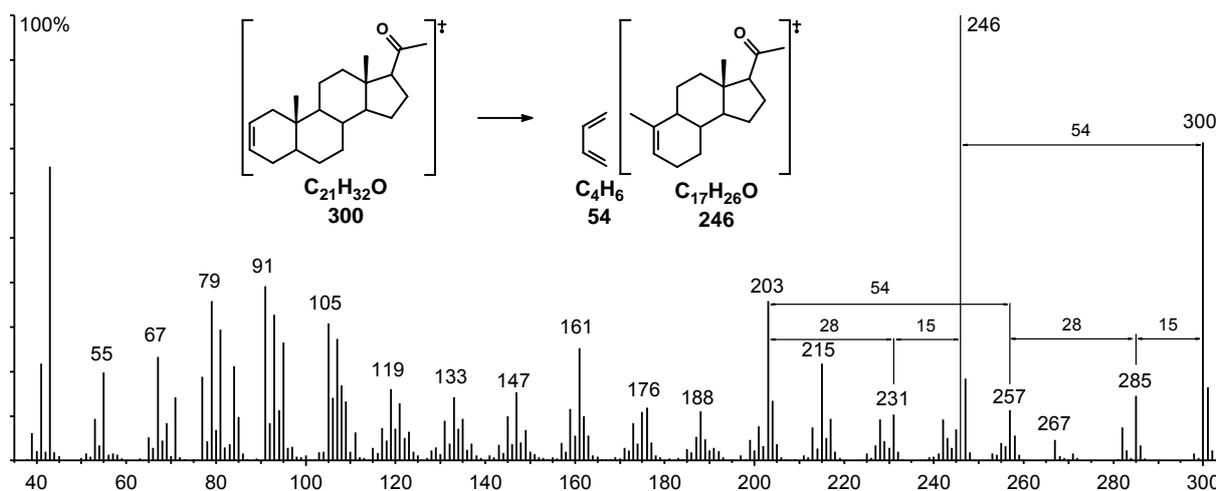
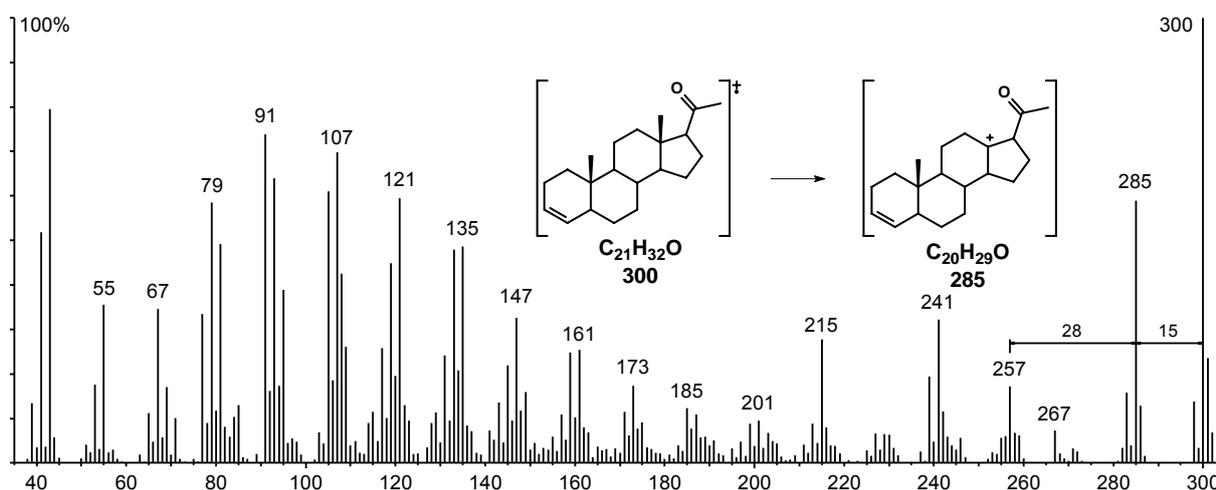


Abbildung 23: Massenspektrum von 5α-Androst-3-en-17-on (E159)



**Abbildung 24:** Massenspektrum von 5α-Pregn-2-en-20-on (E173)



**Abbildung 25:** Massenspektrum von 5α-Pregn-3-en-20-on (E174)

Bei den detektierten Steroiden des Pregnantyps wurde ein vergleichbares Fragmentierungsverhalten gefunden. Wie in obigen Abbildungen ersichtlich, ist die Hauptfragmentierungsreaktion bei Unsättigung an Position 2 ebenfalls die RDA-Reaktion zum geradzahigen Fragment mit der Masse  $m/z$  246, während bei Unsättigung an Position 3 ebenfalls eine weniger charakteristische Fragmentierung vorherrscht, die mit Eliminierung von Kohlenmonoxid oder Abspaltung einer Methylgruppe beginnt.

Dieses Fragmentierungsmuster ist analog auch für die anderen identifizierten  $\Delta^2$ - und  $\Delta^3$ -Steroide mit der Hydroxylgruppe an Stelle der Carbonylgruppe gültig.

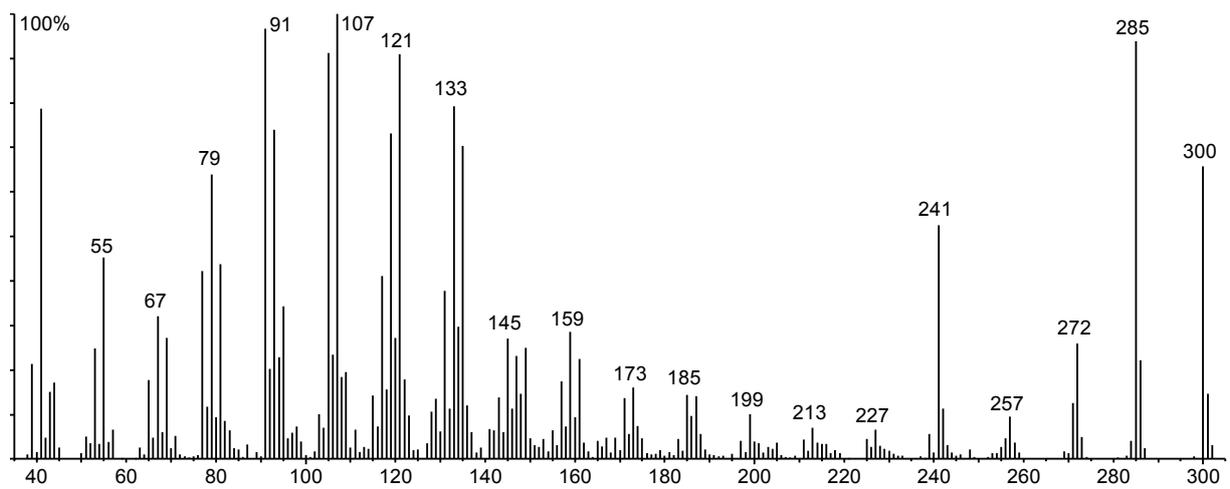
## Identifizierung unbekannter Zielsubstanzen

### Massenspektren der Zielsubstanzen:

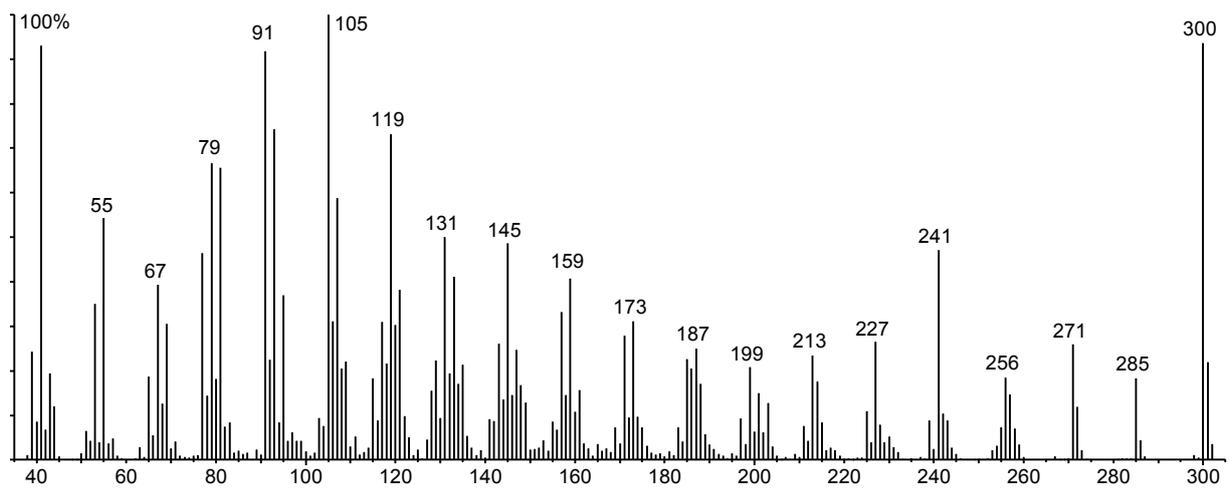
Der oben erwähnte Cluster unbekannter Verbindungen mit Massenspektren, die an Steroide erinnern, besteht aus mindestens acht Substanzen, die in Tabelle 3 aufgeführt sind. Unter den gewählten Meßbedingungen koeluiieren die unbekannt Hauptkomponenten **E176** und **E177** teilweise. Die Massenspektren der Verbindungen sind auf den folgenden Seiten abgebildet und werden anschließend diskutiert.

<b>E175</b>	unbekannte Substanz m/z 300
<b>E176</b>	unbekannte Substanz m/z 300
<b>E177</b>	unbekannte Substanz m/z 302
<b>E178</b>	unbekannte Substanz m/z 300
<b>E179</b>	unbekannte Substanz m/z 300
<b>E181</b>	unbekannte Substanz m/z 298
<b>E182</b>	unbekannte Substanz m/z 300
<b>E184</b>	unbekannte Substanz m/z 300

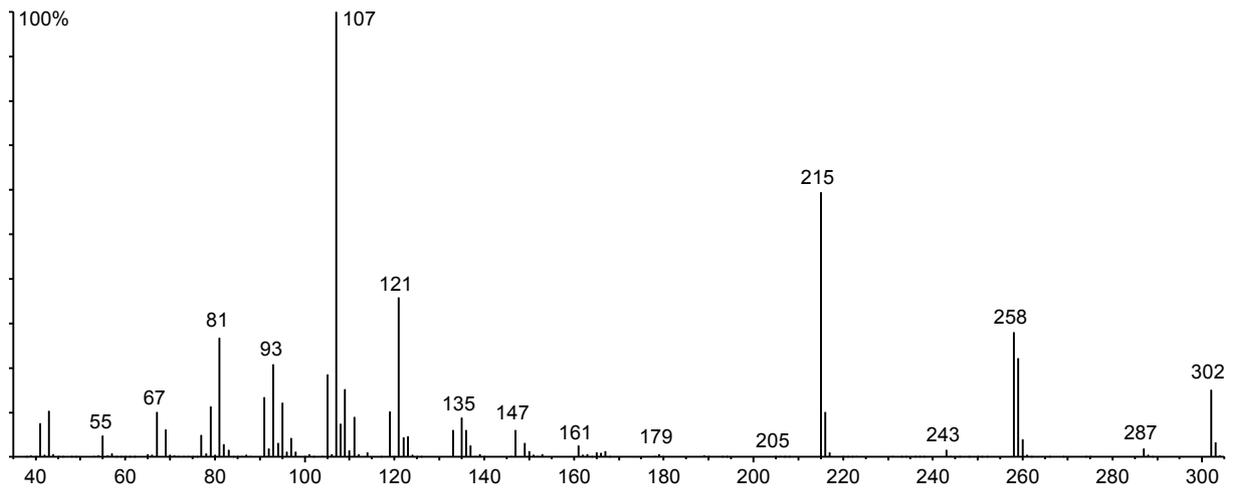
**Tabelle 3:** Übersicht über die unbekannt Inhaltsstoffe des Substanzclusters



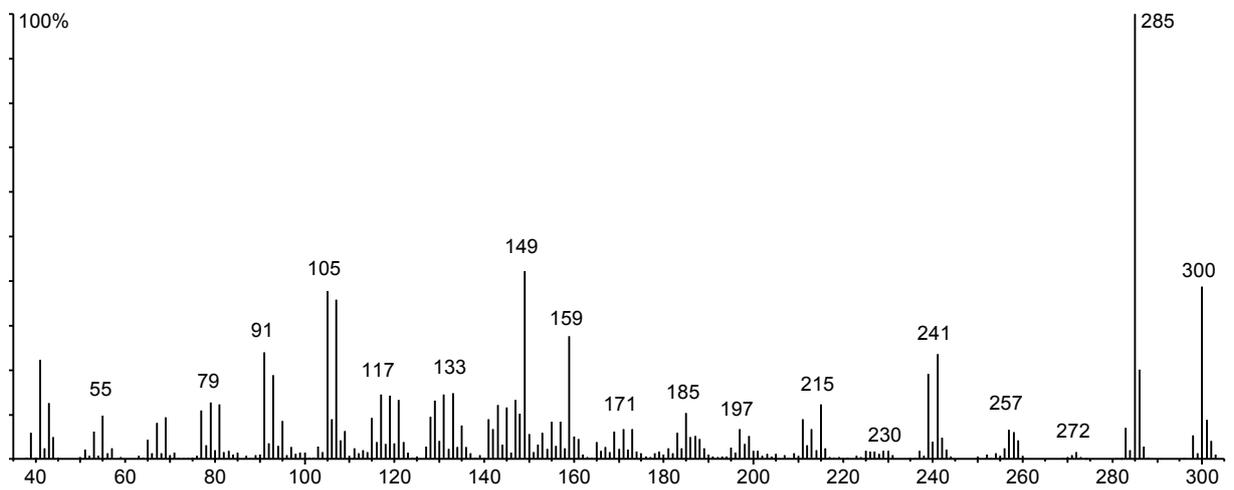
**Abbildung 26:** Massenspektrum der unbekanntes Substanz **E175**



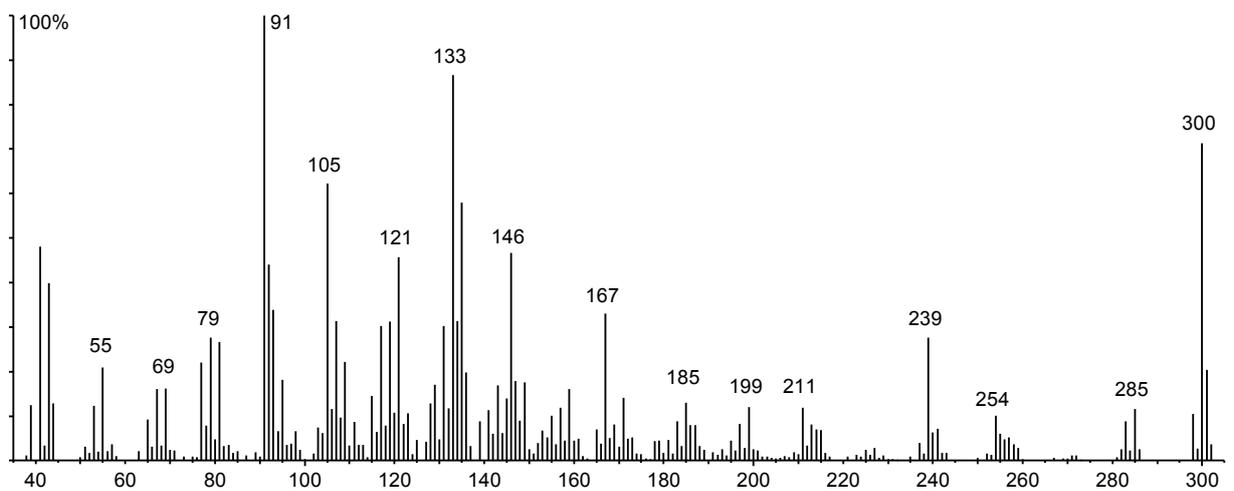
**Abbildung 27:** Massenspektrum der unbekanntes Substanz **E176**



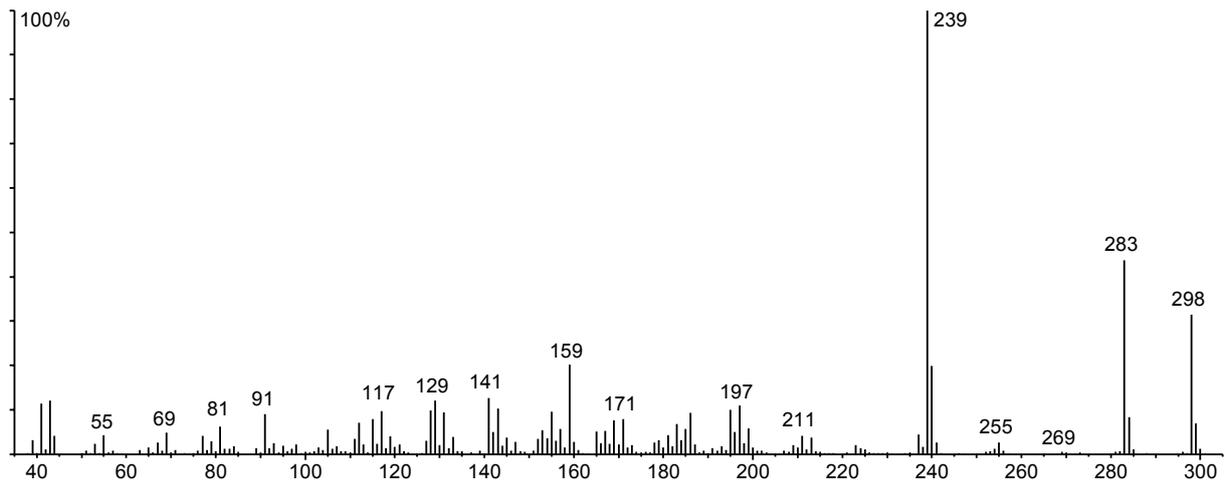
**Abbildung 28:** Massenspektrum der unbekanntes Substanz **E177**



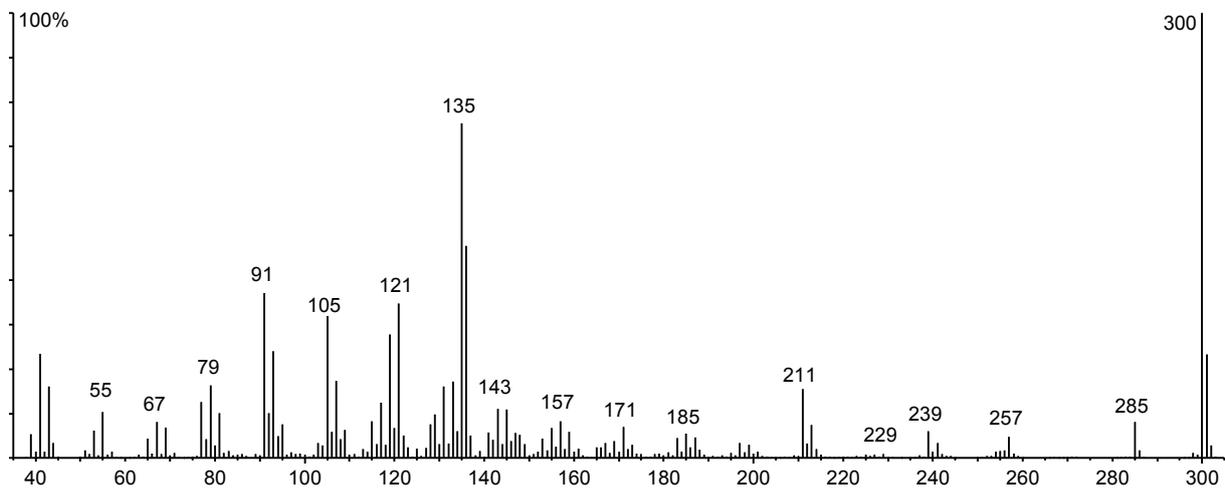
**Abbildung 29:** Massenspektrum der unbekanntes Substanz **E178**



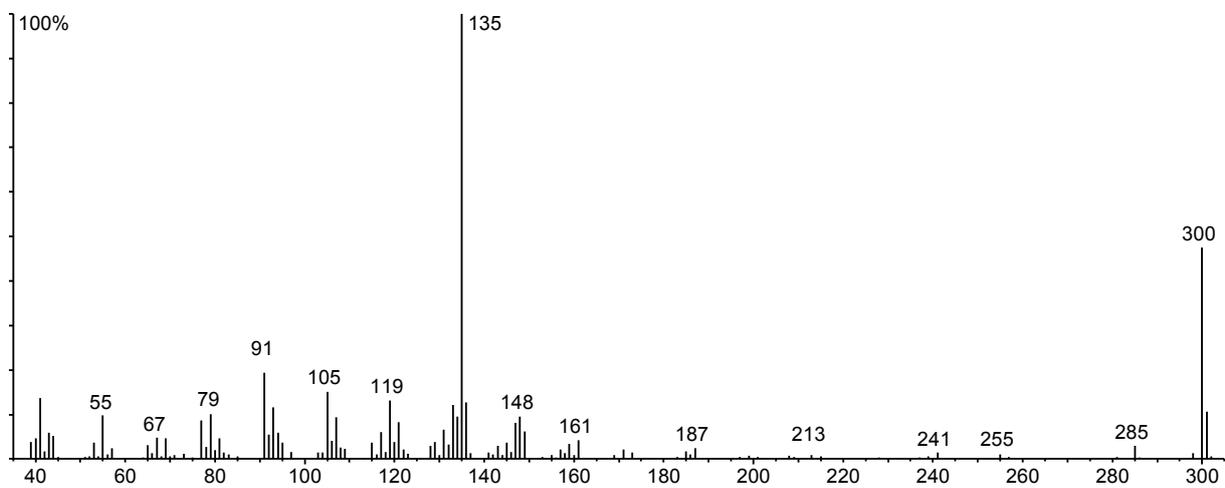
**Abbildung 30:** Massenspektrum der unbekanntes Substanz **E179**



**Abbildung 31:** Massenspektrum der unbekanntes Substanz **E181**



**Abbildung 32:** Massenspektrum der unbekanntes Substanz **E182**



**Abbildung 33:** Massenspektrum der unbekanntes Substanz **E184**

### **Bestimmung der atomaren Zusammensetzungen:**

Die unbekannt Substanzen **E175-E179** sowie **E181**, **E182** und **E184** zeigten ein von den Steroiden abweichendes Fragmentierungsmuster. Wichtige Fragmentierungsreaktionen des Molekülions beinhalten die Abspaltung von Fragmenten der Massen  $m/z$  44 und 15 sowie 43 oder 28. Es ist jedoch keine RDA-Abspaltung von Butadien ( $M^+-54$ ) zu erkennen. Daher wurde angenommen, dass es sich vermutlich nicht um strukturanaloge Steroide handelt. Von den Verbindungen **E176**, **E177**, **E181**, **E182** und  $5\alpha$ -Androst-2-en-17-on (**38**) konnte mit Hilfe hochauflösender Massenspektrometrie die atomare Zusammensetzung der Molekülionen und intensivsten Fragmente bestimmt werden (Tabelle 4). Androstenon (**38**) diente bei diesem Experiment als Referenz.

Die Unterschiede im Fragmentierungsverhalten von den Steroiden und unbekannt Verbindungen erzeugte erste Zweifel an der Arbeitshypothese, dass die Verbindungen des Substanzclusters Steroide seien. Die Daten der atomaren Zusammensetzung verstärkten diese Bedenken, da natürlich auftretende Steroide dieser Molekülmassen Gerüste mit 19 oder 21 Kohlenstoffatomen haben und in der durchgeführten Bestimmung der atomaren Zusammensetzung eine gerade Kohlenstoffanzahl ermittelt wurde.

Summenformel	Gefundene Masse	Berechnete Masse	Abweichung mDa	Abweichung ppm	DBE <sup>i</sup>
<b>5<math>\alpha</math>-Androst-2-en-17-on (38)</b>					
C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O	272,2150	272,2140	-1,00	3,67	6
C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> O	257,1923	257,1905	-1,78	6,90	6,5
C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218,1685	218,1670	-1,52	6,99	5
C <sub>14</sub> H <sub>22</sub>	190,1730	190,1721	-0,88	4,60	4
C <sub>12</sub> H <sub>17</sub>	161,1323	161,1330	0,73	-4,50	4,5
<b>Unbekannte Substanz E176</b>					
C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	300,2111	300,2089	-2,20	7,33	7
C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub>	285,1853	285,1854	0,10	-0,35	7,5
C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> O <sub>2</sub>	271,1704	271,1698	-0,57	2,12	7,5
C <sub>19</sub> H <sub>28</sub>	256,2180	256,2191	1,15	-4,49	6
C <sub>18</sub> H <sub>25</sub>	241,1968	241,1956	-1,20	4,98	6,5
C <sub>17</sub> H <sub>23</sub>	227,1804	227,1799	-0,50	2,20	6,5
C <sub>16</sub> H <sub>21</sub>	213,1653	213,1643	-1,02	4,81	6,5
<b>Unbekannte Substanz E177</b>					
C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	302,2252	302,2247	-0,53	1,76	6
C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> O <sub>2</sub>	287,2001	287,2012	1,07	-3,71	6,5
C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> O <sub>2</sub>	259,1718	259,1698	-1,95	7,52	6,5
C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	258,1624	258,1619	-0,47	1,84	7
C <sub>19</sub> H <sub>30</sub>	258,2306	258,2347	4,10	-15,88	5
C <sub>18</sub> H <sub>27</sub>	243,2141	243,2112	-2,90	11,92	5,5
C <sub>16</sub> H <sub>23</sub>	215,1812	215,1799	-1,32	6,16	5,5
C <sub>12</sub> H <sub>17</sub>	161,1317	161,1330	1,33	-8,22	4,5
<b>Unbekannte Substanz E181</b>					
C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	298,1968	298,1932	-3,60	12,07	8
C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> O <sub>2</sub>	283,1725	283,1698	-2,70	9,53	8,5
C <sub>18</sub> H <sub>23</sub>	239,1787	239,1799	1,20	-5,02	7,5
<b>Unbekannte Substanz E182</b>					
C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	300,2086	300,2089	0,30	-1,00	7
C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub>	285,1849	285,1854	0,50	-1,75	7,5
C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> O <sub>2</sub>	257,1521	257,1541	2,00	-7,78	7,5
C <sub>18</sub> H <sub>23</sub>	239,1773	239,1799	2,65	-11,08	7,5
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,1228	136,1252	2,40	-17,63	3
C <sub>10</sub> H <sub>15</sub>	135,1157	135,1173	1,60	-11,84	3,5

**Tabelle 4:** Atomare Zusammensetzungen der intensivsten Fragment- und Molekülionen von Androstenon (**38**) und den unbekanntem Verbindungen **E176**, **E177**, **E181** und **E182**, bestimmt durch hochauflösende Massenspektrometrie

<sup>i</sup> In einem vollständig gesättigten Molekül, welches nur Kohlenstoff und Wasserstoff enthält, berechnet sich die Anzahl der Wasserstoffatome aus der Anzahl der Kohlenstoffatome nach folgender Formel:

$$\text{Anzahl H} = 2 \times \text{Anzahl C} + 2$$

Die Anzahl der Doppelbindungsäquivalente (DBE) lässt sich somit wie folgt berechnen:

$$\text{Doppelbindungsäquivalente (Ringe + Doppelbindungen)} = \frac{(2 \times \text{Anzahl C} + 2) - \text{Anzahl H}}{2}$$

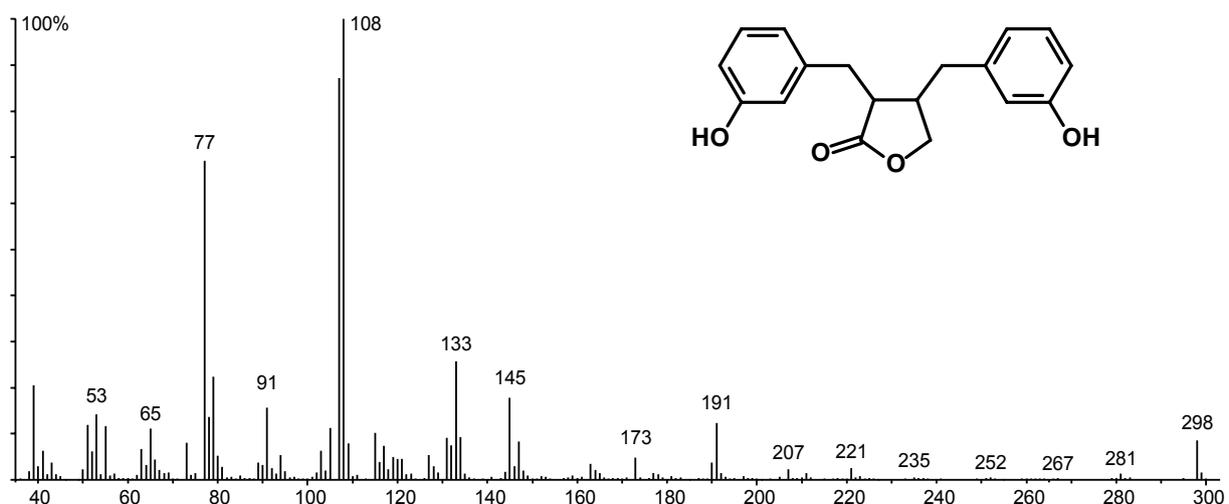
## Isolierung der Zielsubstanzen

### Extraktion des Elefantenkuh-Urins

SPME-Experimente mit Polydimethylsiloxan-, Carboxen/Polydimethylsiloxan- und mit Carbowax/Divinylbenzol-Phasen zeigten eine deutlich verminderte Adsorption der Zielsubstanzen im Vergleich zur Polyacrylat-Phase (PA). Die Zielsubstanzen konnten nur noch anhand ihrer charakteristischen Ionenspuren im GC/MS-Chromatogramm und nicht mehr als Hauptkomponenten detektiert werden. Aufgrund dieser unterschiedlichen Affinität der Phasen zu bestimmten Substanzklassen konnte die Quantität der Zielsubstanzen im Urin nicht abgeschätzt werden. Um eine Strukturaufklärung erfolgreich durchführen zu können, war die Isolierung der Zielsubstanzen für Derivatisierungsreaktionen und NMR-Experimente erforderlich.

Dazu erfolgte eine mehrmalige Extraktion des Urins mit Dichlormethan. Die Zielverbindungen konnten in diesem tiefbraunen Dichlormethanextrakt jedoch nicht nachgewiesen werden. Dieser Extrakt enthielt überwiegend Cresol sowie einige terpenoide, leichtflüchtige Verbindungen, die das Chromatogramm beherrschten.

Im Retentionszeitbereich der Zielsubstanzen konnte lediglich das Enterolacton (**42**) (Abbildung 34), welches im Verdauungstrakt bei Säugetieren durch bakterielle Metabolisierung von Lignan aus pflanzlicher Ernährung gebildet wird<sup>174</sup>, nachgewiesen werden.



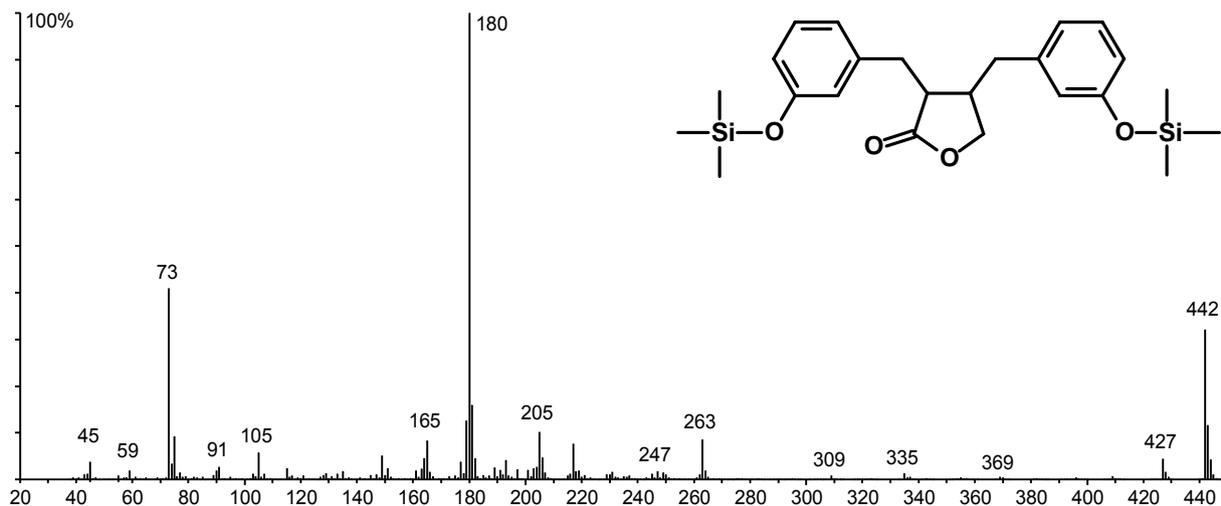
**Abbildung 34:** Massenspektrum und Struktur von Enterolacton (**42**)

Daher wurde eine Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) des Urins durchgeführt<sup>175</sup>, bei der Umkehrphasen (reversed phase) SPE Kartuschen mit polymergebundenen Octyl- und Octadecylketten unter verschiedenen Bedingungen zum Einsatz kamen.

Die C18-Phase hielt die gewünschten Zielverbindungen quantitativ zurück. Eluieren mit Methanol ergab einen mit den Zielverbindungen angereicherten Extrakt. Die Kontrolle erfolgte durch Einengen des Extrakts, Zugabe von gesättigter Kochsalzlösung und Puffer durch Anreicherung über HS-SPME (Polyacrylat-Phase) und Detektion mittels GC/MS. Da der Organismus Steroide als Sulfate und Glucuronide über den Urin ausscheidet, erfolgten verschiedene Versuche, diese Konjugate zu hydrolysieren. Dazu wurden wiederholt enzymatische Methoden<sup>176,177</sup> mit  $\beta$ -Glucuronidasen und Sulfatasen angewandt sowie eine alkalische Hydrolyse<sup>178</sup> durchgeführt. Derivatisierungsreaktionen<sup>179,180,181</sup> des hydrolysierten Ansatzes erfolgten mit Methoxylaminhydrochlorid und *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid. Da keine derivatisierten Steroide durch GC/MS detektiert werden konnten, wurden die Experimente mit käuflichen Steroidkonjugaten wiederholt (Natriumsalz des Dehydroisoandrosteron-3-sulfats, Natriumsalz des Pregnenolonsulfats, beides Sigma, sowie Natriumsalz des 20-Oxo-5- $\beta$ -pregnan-3- $\alpha$ -yl- $\beta$ -D-glucuronids, Aldrich). Dabei zeigten sich die prinzipielle Durchführbarkeit und Validität der angewandten Methoden.

Daraus konnte geschlossen werden, dass es sich bei den unbekanntem Zielsubstanzen nicht um Steroide oder deren Derivate handelte.

Daraufhin wurden Derivatisierungsexperimente, sowohl des Rohextrakts der C18-Umkehrphasen Anreicherung, als auch des hydrolysierten Extrakts mit Diazomethan in Pentan, Acetanhydrid und Trifluoracetanhydrid durchgeführt. Dabei konnten jedoch keine acetylierten, trifluoracetylierten oder methylierten Derivate der Zielverbindungen nachgewiesen werden. Als schwerflüchtige Hauptkomponente der Silylierung konnte das zweifach silylierte Derivat des Enterolactons (**42**) durch GC/MS detektiert werden.

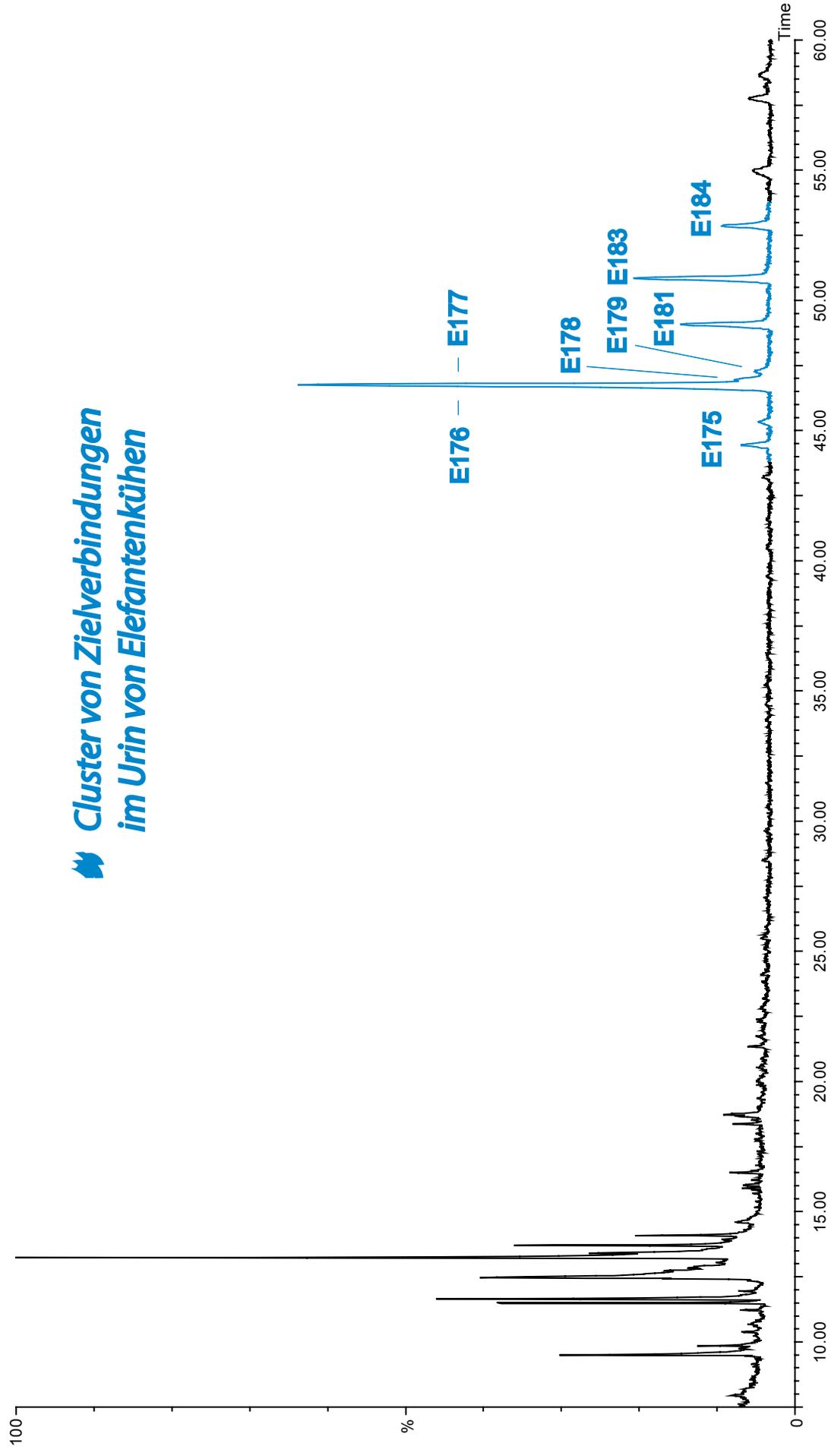


**Abbildung 35:** Massenspektrum und Struktur von 2,3-Bis-(3'-trimethylsilyloxybenzyl)butyrolacton (**43**)

Löslichkeitsversuche mit dem methanolischen Festphasenextrakt nach Einengen im Stickstoffstrom ergaben eine nur geringe Löslichkeit des Rückstandes in Pentan und Ethylacetat. Die Analyse des Ethylacetatüberstands per GC/MS zeigte die angereicherten underivatisierten Zielverbindungen als Hauptkomponenten.

Daher wurden 25 ml frischer Elefantenkuh-Urin mittels C18-SPE extrahiert. Die Kartuschen wurden mit Methanol eluiert und das Methanol im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wurde im Ultraschallbad dreimal mit je 20 ml Pentan / Ethylacetat 1:1 extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden eingengt und in 500 µl Ethylacetat aufgenommen. Von diesem Extrakt wurde 1 µl per GC/MS untersucht (Abbildung 36).

**Cluster von Zielverbindungen  
im Urin von Elefantenkühen**



**Abbildung 36:** Chromatogramm (TIC) Extraktion des methanolischen Eluats der Festphasenextraktion (SPE C-18) mit Ethylacetat (Säule CP8944 VF-5ms 30m fused silica-Kapillare; Temperaturprogramm: 50°C, 3 min isotherm, 10 °C/min auf 200 °C, 1 °C/min auf 300 °C, 10 min isotherm, Inj. 2 min sl).

Aus Abbildung 36 wird ersichtlich, dass die Zielverbindungen zu Hauptkomponenten angereichert wurden und bis auf einige leichtflüchtige Verbindungen gut von den restlichen Verbindungen abgetrennt wurden. Steroide konnten nicht nachgewiesen werden. Diese Methode erwies sich somit als brauchbar zur Anreicherung der nur in geringen Mengen vorkommenden Zielsubstanzen. Allerdings war die quantitative Zusammensetzung der Verbindungen **E175-E179** sowie **E181**, **E183** und **E184** verglichen mit dem SPME-Experiment verändert. Von den unter diesen Bedingungen koeluierenden Verbindungen **E176** und **E177** lag die Verbindung **E177** in deutlich größerer Konzentration vor.

Die Zugänglichkeit der zu Hauptinhaltsstoffen angereicherten Zielsubstanzen im methanolischen Extrakt der SPE machte eine weitere Untersuchung mittels hochauflösender Massenspektrometrie nach chemischer Ionisierung bei atmosphärischem Druck möglich (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI).

Die Analyten in methanolischer Lösung wurden direkt mittels Spritzenpumpe ohne chromatographische Trennung in die Ionenquelle überführt und nach Ionisierung im positiven Modus konnte die atomare Zusammensetzung der protonierten Pseudomolekülonen bestimmt werden. In Tabelle 5 ist zu beachten, dass der Masse  $M = 300$  g/mol der Inhaltsstoffe **E175**, **E176**, **E178**, **E179**, **E182** und **E184** aus den massenspektrometrischen Experimenten mit Einheitsmassenauflösung (LR) die genaue und hochaufgelöste Masse  $M = 301,2162$  g/mol und damit verbundene identische atomare Zusammensetzung zugeordnet wurde. Es konnte kein weiteres hochaufgelöstes Massensignal bei der Masse  $m/z$  301 mit diesem Experiment der Direktinjektion detektiert werden

Verbindung	Summenformel	Gefundene Masse	Berechnete Masse	Abweichung mDa	Abweichung ppm	DBE
<b>E177</b>	$C_{20}H_{31}O_2$	303,2332	303,2324	-0,80	2,64	5,5
<b>E175, E176, E178</b>						
<b>E179, E182, E184</b>	$C_{20}H_{29}O_2$	301,2162	301,2167	0,50	-1,66	6,5
<b>E181</b>	$C_{20}H_{27}O_2$	-	299,2011	-	-	-
<b>E42</b>	$C_{18}H_{19}O_4$	299,1281	299,1283	0,20	-0,67	9,5

**Tabelle 5:** Atomare Zusammensetzung der intensivsten Pseudomolekülonen bestimmt durch hochauflösende Massenspektrometrie (APCI, positiv)

Obwohl statt der protonierten Zielsubstanz **E181** mit der erwarteten atomaren Zusammensetzung  $C_{20}H_{27}O_2$  vermutlich das Pseudomolekülion des Enterolactons (**42**) mit der Summenformel  $C_{18}H_{19}O_4$  gefunden wurde, entsprechen die übrigen gefundenen atomaren Zusammensetzungen denen der Pseudomolekülionen der Zielverbindungen. Das Massensignal des Pseudomolekülions von **E181** wurde vermutlich von dem sehr intensiven Signal des Enterolactons überlagert.

Damit konnte davon ausgegangen werden, dass die Zielsubstanzen keine Artefakte von thermolabilen Precursoren sind, die sich unter den Bedingungen der Gaschromatographie bei hohen Injektor- und Chromatographietemperaturen bilden.

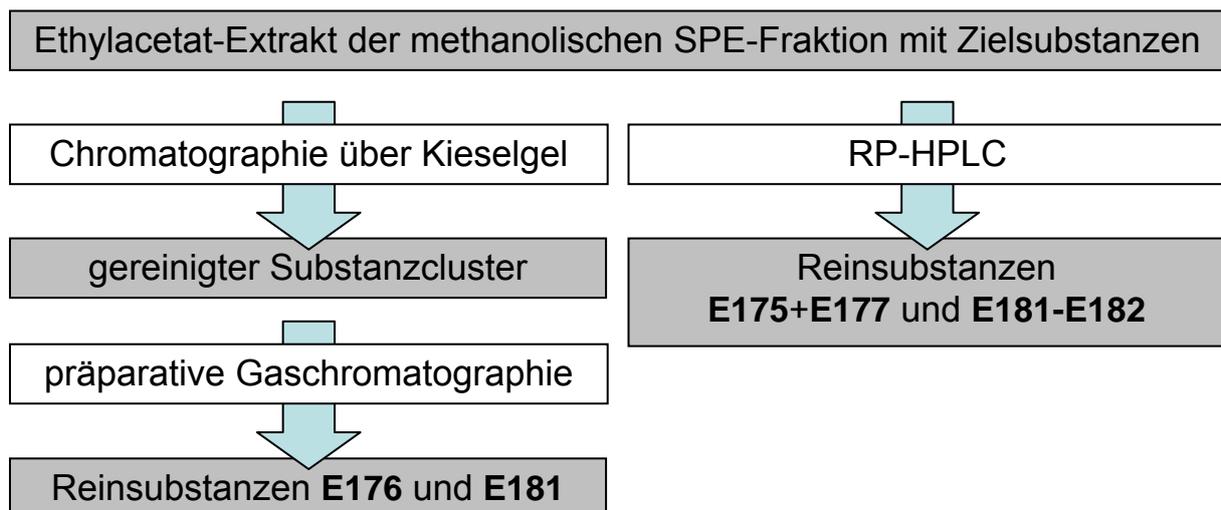
Zur Strukturaufklärung der unbekannt Substanzen wurden größere Mengen Elefantenkuh-Urin benötigt. Daher wurden vom IZW Berlin weitere 10 L, die vorab auf Anwesenheit der Zielsubstanzen überprüft wurden, bereitgestellt. Aus diesen 10 L konnte in 10 Extraktions-Durchgängen mittels RP18-Festphasenextraktion eine methanolische Fraktion erhalten werden, in der die Zielanalyten angereichert waren. Einengen dieser Fraktion unter Stickstoffstrom und Extraktion des festen Rückstands mit Pentan und Ethylacetat ergaben eine weitergehende Anreicherung.

## Chromatographische Trennung

Zur Strukturaufklärung der unbekannt Substanzen im Urin der Elefanten wurde zunächst die Isolierung der einzelnen Verbindungen angestrebt.

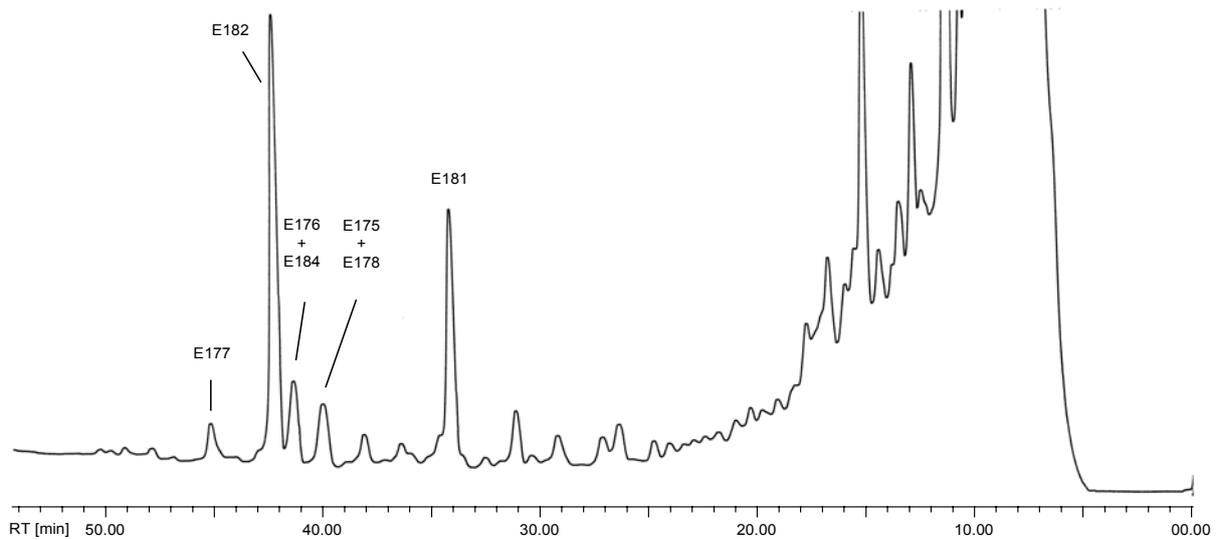
Die Trennung der vereinigten Pentan- und Ethylacetatextrakte durch Säulenchromatographie an Normalphasenkieselgel (ICN) mit einem Laufmittelgradienten von Pentan zu Ethylacetat gelang nicht. Dabei zeigte sich zwar, dass die unbekannt Zielsubstanzen von polaren Begleitkomponenten abgetrennt wurden, doch eluierte der Cluster annähernd ungetrennt. Die Trennung an Kieselgel erwies sich somit als ungeeignet.

Die gute gaschromatographische Trennung des Substanzclusters an einer mittelpolaren GC-Phase (OV-1701) legte nahe, die an Kieselgel vorgereinigten Verbindungen mittels präparativer Gaschromatographie rein zu gewinnen. Nach Einengen im Wasserbad bei 50 °C und Stickstoffgegenstrom wurde der an Zielkomponenten angereicherte Extrakt in Portionen von wenigen Mikrolitern sukzessive im Gaschromatographen getrennt. Hierfür wurde die im experimentellen Teil beschriebene Gerätekonfiguration eingesetzt. Es konnten jedoch nur zwei Verbindungen in ausreichender Menge zur vollständigen NMR-Charakterisierung rein gewonnen werden. Hier erschwerten die geringen Substanzmengen, Kontamination der Fraktionen durch Säulenbluten bei hohen Elutionstemperaturen sowie die unvollständige Trennung des komplexen Gemisches mit sehr ähnlichen Retentionszeiten an verschiedenen GC-Phasen die Isolierung weiterer Komponenten.



**Abbildung 37:** Extraktions- und Aufarbeitungsschema nach Festphasenextraktion (SPE)

Schließlich gelang eine weit reichende Auftrennung des Gemisches mittels Reversed-Phase-HPLC. Dazu konnten die methanolischen Eluate der Festphasenextraktion ohne weitere Reinigung eingesetzt werden. Dafür wurde der Extrakt zur Trockene eingengt, in Methanol/Wasser 80:20 aufgenommen und anschließend über eine präparative Umkehrphasen-Säule mit einem Methanol/Wasser Gradienten getrennt. Die Peakerkennung erfolgte mittels UV-Detektion bei 185 nm.



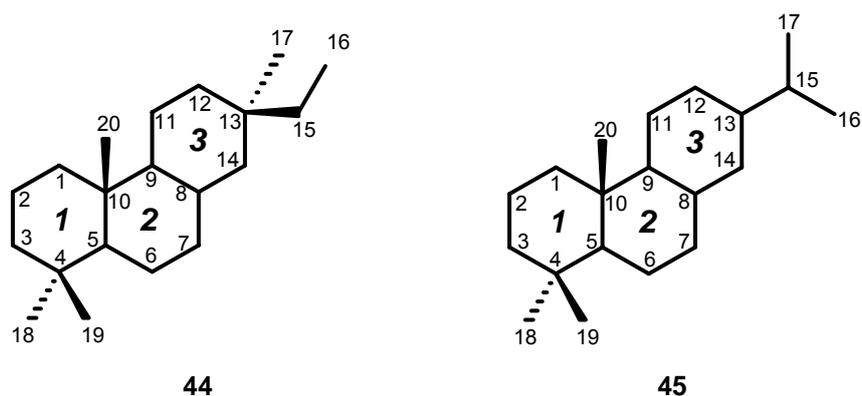
**Abbildung 38:** Präparative HPLC Trennung des Ethylacetatextraktes der Festphasenextraktion (0-15 min MeOH/H<sub>2</sub>O 85:15, 15-50 min Gradient, 50-60 min 100% MeOH, Flow = 6 ml/min, UV bei 185 nm).

Die Intensitäten der einzelnen Peaks im Chromatogramm sind aufgrund der unterschiedlichen chromophoren Eigenschaften und damit unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten der jeweiligen Verbindungen nicht proportional zu deren Konzentration in der Probe (vgl. Gaschromatogramm Abbildung 36).

## Strukturaufklärung von Diterpenen mit Pimaran- und Abietanskelett

### Diterpene

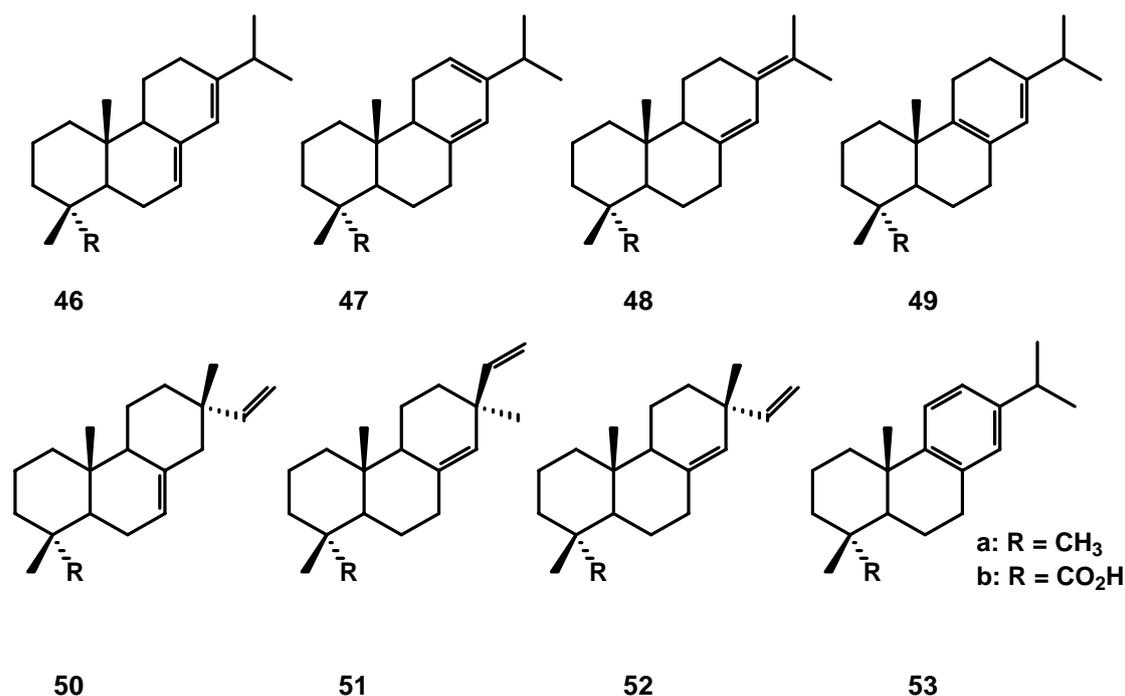
Im folgenden Kapitel wird die Strukturaufklärung der unbekanntenen Zielverbindungen mit Hilfe NMR-spektroskopischer Methoden diskutiert. Dabei stellte sich heraus, dass diese Naturstoffe zu einer Gruppe neuer Diterpenlactone mit Skeletten des Pimaran- und Abietantyps gehören. Die Bezeichnung der Gerüste und die Nummerierung der Positionen erfolgt analog dieser Diterpenskelette und ist in Abbildung 39 dargestellt.



**Abbildung 39:** Pimaran- (**44**) und Abietanskelett (**45**) mit Ringbezeichnungen und Nummerierung

Beide Strukturen besitzen eine tricyclische Perhydrophenanthrenstruktur, deren IUPAC-Namen 7-Ethyltetradecahydro-1,1,4a,7-tetramethyl-phenanthren (**44**) (Pimaran-Skelett) und Tetradecahydro-1,1,4a-trimethyl-7-(1-methylethyl)-phenanthren (**45**) (Abietanskelett) lauten. Basierend auf diesen Gerüsten treten isomere Diterpenkohlenwasserstoffe in der Natur auf. Die korrespondierenden Diterpencarbonsäuren entstehen durch selektive Oxidation der Methylgruppe an der Position C-18.

Abietin- (**46**), Levopimar- (**47**), Neoabietin- (**48**), Palustrin- (**49**), Isopimar- (**50**), Pimar- (**51**), und Sandaracopimarsäure (**52**) sind im Harz von Pinusarten enthalten und werden daher auch Harzsäuren (engl. resin acids) genannt<sup>182,183</sup>. Aus den Säuren des Abietantyps (**45**) entsteht durch Oxidation schnell die Dehydroabietinsäure (**53**), die zusätzlich zu den eigentlichen Harzsäuren auftritt (Abbildung 40, **b**).



**Abbildung 40:** Strukturen der Diterpenkohlenwasserstoffe vom Abietan- und Pimarantyp (a) und deren korrespondierende Harzsäuren (b). Gerüste der Abietangruppe (als Säuren, b): Abietin- (**46**), Levopimar- (**47**), Neoabietin- (**48**) und Palustrinsäure (**49**). Gerüste der Pimarangruppe (als Säuren, b): Isopimar- (**50**), Pimar- (**51**) und Sandaracopimarsäure (**52**). Dehydroabietinsäure (**53**) ist ein Oxidationsprodukt der Säuren aus der Abietangruppe

Allerdings liegen trotz der anellierten Sechsringe keine klassischen axialen und äquatorialen Positionen vor, da die identifizierten Strukturen durch bicyclische Überbrückung des Ring 1 und unterschiedlich starke Unsättigungen der Ringe 2 und 3 keine typischen Sessel- und Wannenkongformationen ausbilden können. Die energetisch günstigste Konformation der einzelnen Moleküle, welche durch einfache Molecular Modelling-Berechnungen erhalten wurde, dient im Folgenden als räumliche Darstellung zur Veranschaulichung dieser Problematik<sup>a</sup>.

Zum besseren Verständnis der Zuordnung der NMR-Signale werden die diastereotopen Methylenprotonen, soweit diese eine ausreichende Auflösung im Spektrum besitzen, durch die Indizes ax für axiale und eq für äquatoriale Orientierung unterschieden. Liegen Kopplungen mit Kopplungskonstanten unter 0.5 Hz vor, so kann unter diesen Messbedingungen die Kopplung nicht aufgelöst und erkannt werden. Schwache Kopplungen werden in den Tabellen durch *w* gekennzeichnet.

<sup>a</sup> Durchgeführt mit dem Programm *Chem3D Ultra 9.0*, Molecular Modeling and Analysis, CambridgeSoft Corp., USA, 2004

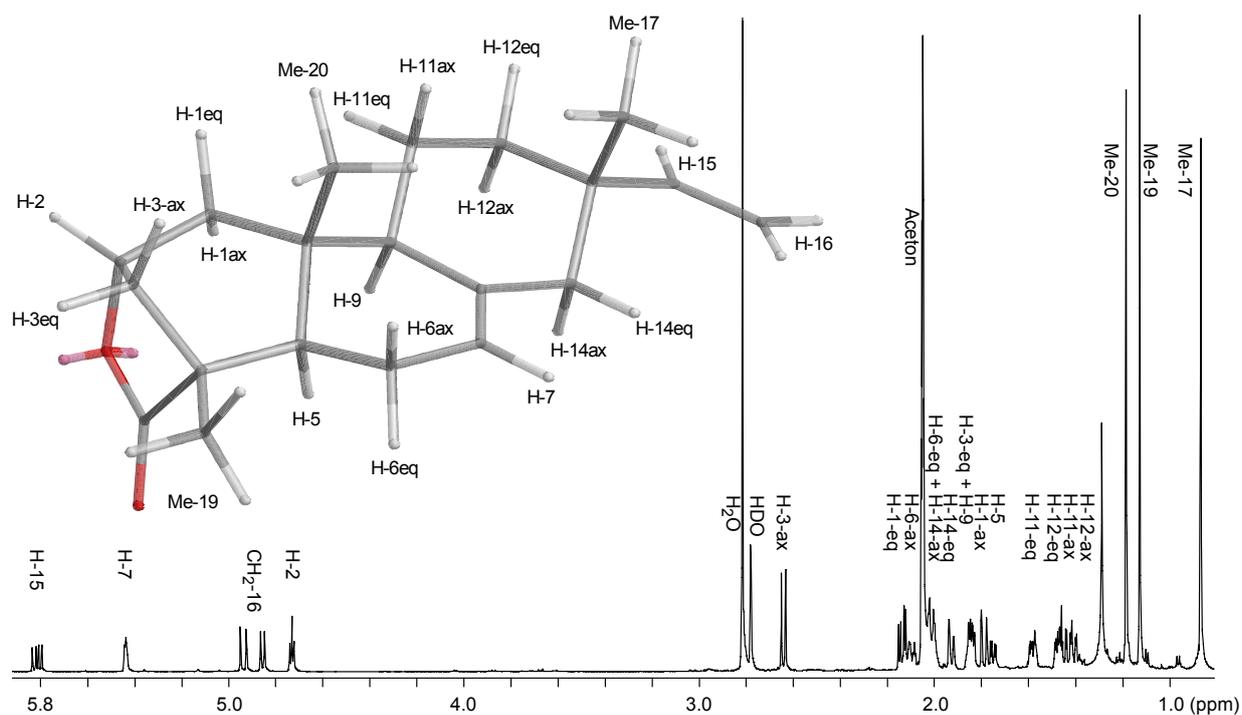
## Strukturaufklärung von Substanz **E176** durch NMR-Spektroskopie

Die Hauptkomponente **E176** konnte durch präparative Gaschromatographie des an Kieselgel vorgereinigten Substanzclusters abgetrennt werden. Aufgrund der großen Anzahl diastereotoper Protonensignale und der kleinen Substanzmenge gelang die Strukturaufklärung von **E176** nur mit Hilfe eines Avance DRX 700 Spektrometers.

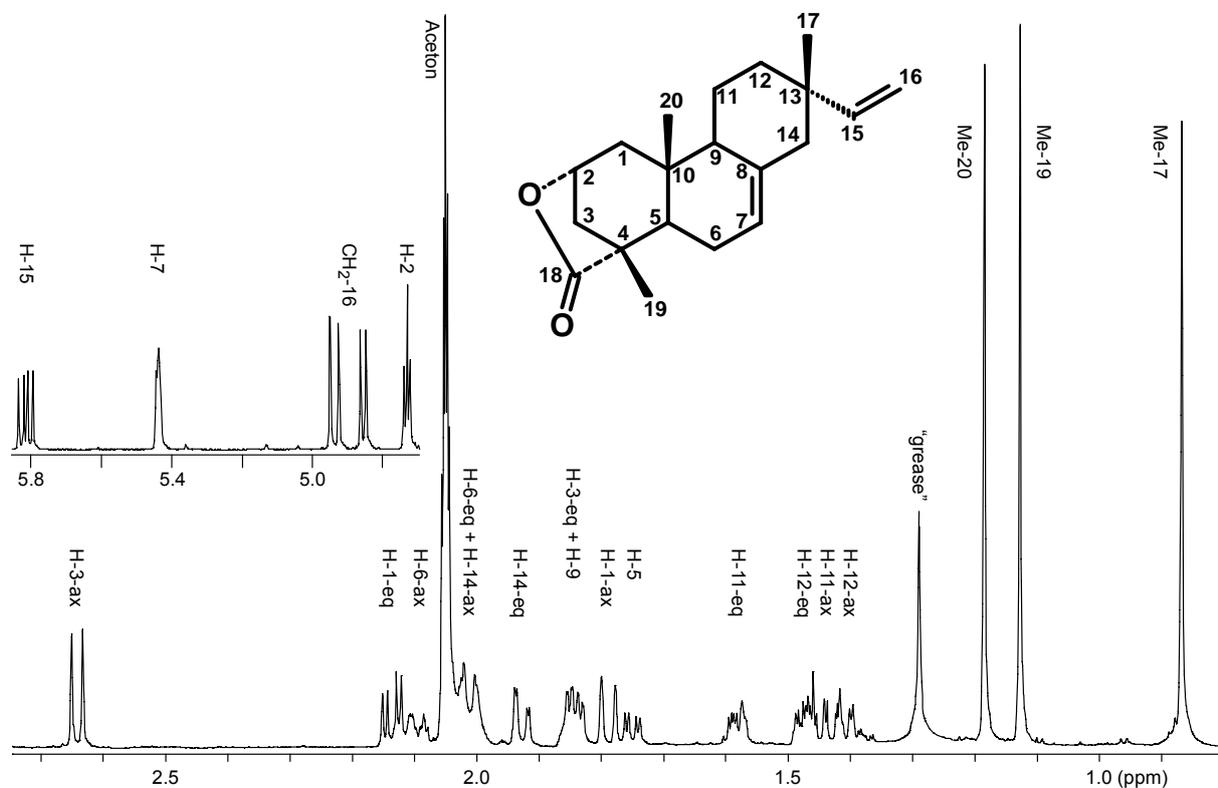
Von **E176** konnten ein  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum sowie die zweidimensionalen Spektren HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -COSY), HMBC, COSY90 ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY) und NOESY aufgenommen werden. Durch die hier diskutierte Analyse der NMR-Daten konnte **E176** eindeutig als der neue Naturstoff 2-Hydroxyisopimarsäurelacton identifiziert werden. 2-Hydroxyisopimarsäurelacton (**E176**) besitzt die Summenformel  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$  mit der Masse 300 g/mol und verfügt über 6 stereogene Zentren an den Positionen 2, 4, 5, 9, 10 und 13, wodurch die Protonen der Methylengruppen an den Positionen 1, 3, 6, 11, 12 und 14 eine diastereotope Aufspaltung zeigen.

Der Tieffeldbereich des  $^1\text{H}$ -NMR von **E176** zeigt drei olefinische Protonen, die mit Hilfe der HMQC-Untersuchungen ihren Kohlenstoffatomen zugeordnet werden konnten [ $\delta_{\text{H}}; \delta_{\text{C}}$  = 5.81;150.87 (Pos. 15), 5.44;123.37 (Pos. 7) und 4.89;109.88 ppm (Pos. 16)]. Das Signal von H-15 bei  $\delta_{\text{H}}$  = 5.81 ppm stellt ein Dublett eines Dubletts dar, in dem die Kopplungskonstanten von 10.8 Hz für die *cis*- und 17.5 Hz für die *trans*-Kopplung mit den terminalen Methylenprotonen an H-16 enthalten sind. Die Kopplungskonstante von 10.8 Hz findet man bei  $\delta_{\text{H}}$  = 4.85 ppm wieder. Dieses Dublett der *cis*-Kopplung mit dem zum Molekülrest (*E*)-ständigen terminalen Methylenproton ist zusätzlich noch aufgrund einer geminalen Kopplung mit 1.4 Hz aufgespalten. Das andere terminale Methylenproton H-16 in *trans*-Position zu H-15 und (*Z*)-ständig zum tetrazyklischen Molekülgerüst liegt bei  $\delta_{\text{H}}$  = 4.94 ppm und die Kopplungskonstanten von 17.5 und 1.4 Hz werden hier ebenfalls wiedergefunden. Somit ist das Strukturelement einer Ethenylgruppe an einem quartären Kohlenstoff einwandfrei zugeordnet. Für das olefinische Proton bei  $\delta_{\text{H}}$  = 5.44 ppm kann anhand des Protonenspektrums keine Aussage zu Kopplungspartnern gemacht werden, da die Kopplungskonstanten zu klein sind und es somit als nicht aufgelöstes breites Singulett erscheint.

Das Proton an einem eine Acyloxyfunktion tragenden Kohlenstoff an H-2 bei  $\delta_{\text{H}}$  = 4.73 ppm zeigt ein Pseudotriplett mit der Kopplungskonstante 5.7 Hz und resultiert aus der Superposition zweier Dubletts mit beinahe gleichgroßer Kopplungskonstante aus Kopplungen zu den Protonen an H-1 und H-3.



**Abbildung 41:** 700 MHz- $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von 2-Hydroxyisopimarsäurelacton (**E176**) in Aceton- $d_6$  mit räumlicher Darstellung und hier angewandter Nummerierung.

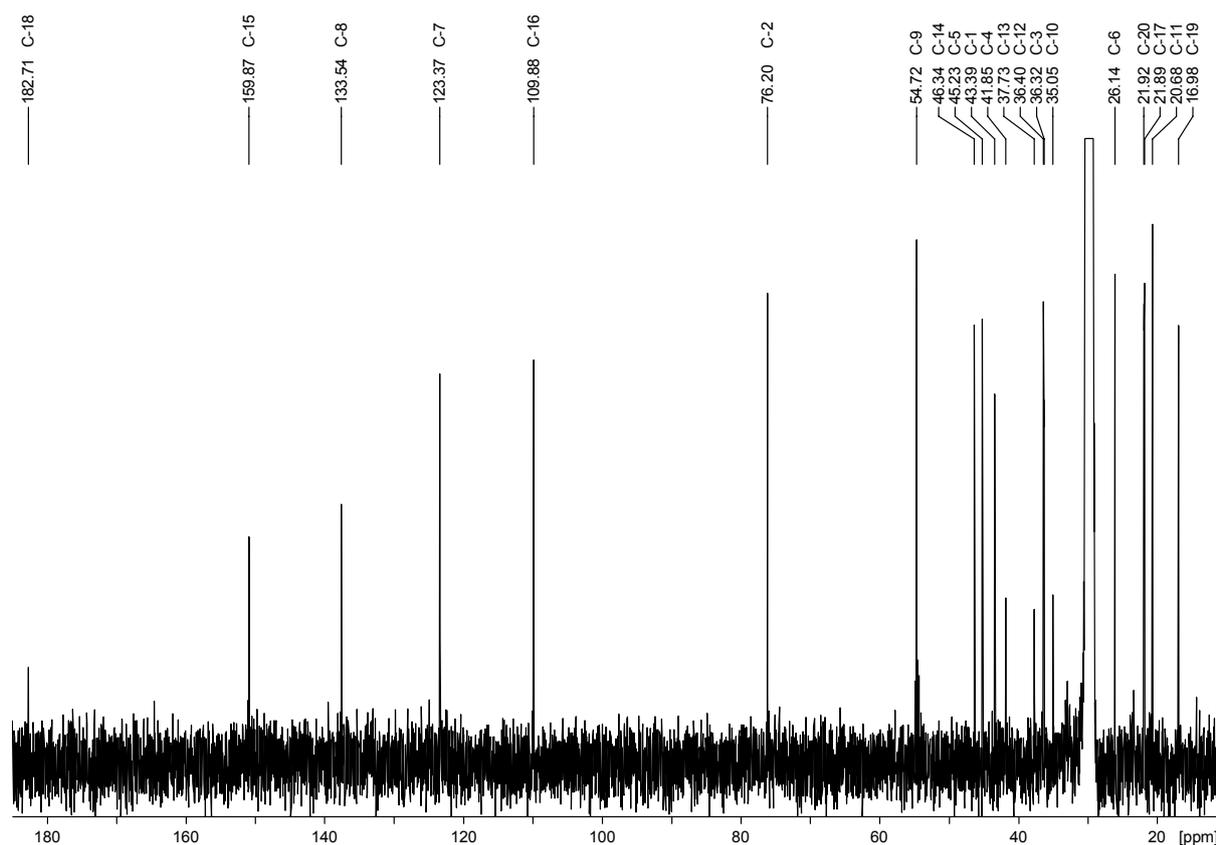


**Abbildung 42:** Ausschnitte des 700 MHz- $^1\text{H}$ -NMR Spektrums der Komponente (**E176**) in Aceton- $d_6$  und deren Strukturformel mit hier angewandter Nummerierung.

Im Hochfeldbereich des  $^1\text{H}$ -Spektrums sind annähernd alle Signale in Aceton- $d_6$  bei 700 MHz separiert. Wichtige Strukturinformationen ergeben die drei Methylgruppensignale, deren fehlende Aufspaltung aus einer Substitution an quartären Kohlenstoffatomen resultiert ( $\delta_{\text{H}}, \delta_{\text{C}}$  [ppm] = Me-17: 0.87, 21.89; Me-19: 1.13, 16.98; und Me-20: 1.18, 21.92). Zusätzlich ist das Kopplungsmuster der Protonen an Position 1 und 3 separiert und aufgelöst. Das Signal bei  $\delta_{\text{H}} = 2.13$  ppm entspricht dem Dublett eines Dubletts für das äquatoriale Proton der Position 1. Die Kopplungskonstanten sind 15.6 Hz für die geminale und 5.9 Hz für die  $^3J$ -Kopplung zum Proton H-2. Bei  $\delta_{\text{H}} = 1.79$  ppm liegt als Signal des axialen Protons ein Dublett mit der Kopplungskonstante von 15.6 Hz. Diese resultiert aus der  $^2J$  Kopplung zum äquatorialen Proton. Die  $^3J$ -Kopplung dieses Protons ist aufgrund der geometrischen Anordnung der Protonen zu gering, um beobachtet zu werden.

Ähnlich verhält es sich mit den Protonen an Position 3. Das äquatoriale Proton H-3<sub>eq</sub> ist durch den Anisotropiekegel der Carbonylgruppe stark zu tieferem Feld verschoben ( $\delta_{\text{H}} = 2.64$  ppm), und es wird ausschließlich die geminale  $^2J$ -Kopplung zu H-3<sub>ax</sub> bei  $\delta_{\text{H}} = 1.84$  ppm, die zu einem Dublett mit der Kopplungskonstanten von 12.4 Hz führt, beobachtet. Das Proton H-3<sub>eq</sub> weist neben der geminalen Kopplung zu H-3<sub>ax</sub> mit 12.4 Hz noch die vicinale Kopplung zu H-2 mit einer Kopplungskonstanten von 5.6 Hz und eine Fernkopplung mit 1.4 Hz auf. Ein Kopplungspartner der Fernkopplung mit gleicher Kopplungskonstante kann nicht bestimmt werden, da die Signale potentieller Kopplungspartner nicht aufgelöst sind.

Durch vier Methylengruppen mit diastereotopen Protonen an den Positionen 6, 11, 12 und 14 sowie Allyl- und Homoallylkopplungen ist die Multiplizität der verbleibenden Protonen der Ringe 2 und 3 zu komplex und nicht ausreichend aufgelöst, um durch Auswertung der Kopplungskonstanten weitere Strukturinformationen zu erhalten. Die Reihenfolge der Protonensignale einzelner Spinsysteme erfolgte durch Auswertung des COSY90-Spektrums.



**Abbildung 43:**  $^{13}\text{C}$ -Spektrum von 2-Hydroxyisopimarsärelacton (**E176**), 100.6 MHz, Aceton- $d_6$

Die chemischen Verschiebungen aller 20 Kohlenstoffe konnten anhand der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie ermittelt werden. Besonders signifikante Signale sind das Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe des Lactonringes mit einer chemischen Verschiebung von  $\delta_{\text{C}} = 182.71$  ppm, vier olefinische Kohlenstoffatome mit  $\delta_{\text{C}} = 159.87$ , 133.54, 123.37 und 109.88 ppm sowie das Kohlenstoffatom mit  $\delta_{\text{C}} = 76.20$  ppm, das die Acyloxyfunktion trägt. Die ermittelten Daten stimmen gut mit Literaturdaten von Isopimarsäure (**50**) überein<sup>184</sup>. Lediglich der Kohlenstoff an Position 2 von **E176** weist aufgrund seiner Acyloxygruppe eine deutlich unterschiedliche chemische Verschiebung zu den Literaturwerten von **50** auf. Die Kohlenstoffatome der Positionen 1, 4 und 20 von **E176** zeigen kleine Abweichungen der chemischen Verschiebungen im Vergleich zu **50** aufgrund unterschiedlicher chemischer Umgebung und veränderter Konformation des Ringes 1 durch den Lactonring. Die zu den Protonensignalen gehörenden Kohlenstoffatome konnten mit Hilfe des HMQC-Spektrums identifiziert werden und durch  $(^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H})\text{-long range}$  Korrelationen (aus HMBC-Spektren) wurde die Verknüpfungsreihenfolge der unterschiedlichen Spinsysteme über die quartären Kohlenstoffe bestätigt. In Tabelle 6 sind alle COSY90-, HMBC- und NOESY-Kreuzsignale aufgeführt, mit denen die Struktur des neuen tetrazyklischen Diterpenlactons **E176** bewiesen wurde.

Pos	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	COSY90	HMBC	NOESY
1	43.39	1.79-ax d 2.13-eq dd	H-1-eq, H-2 w, Me-20 w H-1-ax, H-2	C-2, C-3, C-9, C-10, Me-20 C-5, C-10, Me-20	H-1-eq, H-2 w, H-11-eq w, H-1-ax, H-2, H-3-ax w, H-11-eq w, Me-20
2	76.20	4.73 dd	H-1-ax w, H-1-eq, H-3- eq, H-3-ax w	C-4, C-10, C-18	H-1-eq, H-1-ax, H-3-eq, H-3-ax
3	36.32	1.84-eq <sup>a</sup> dd 2.64-ax d	H-2, H-3-ax H-2 w, H-3-eq	C-1, C-2, C-4, C-5, C-18 w, C-19 C-2 w, C-4, C-5, C-18	H-2 w, H-3-ax, Me-19 H-1-eq w, H-2 w, H-3eq, Me-19 w, Me-20
4	41.85	-	-	-	-
5	45.23	1.75 dd	H-6-ax, H-6-eq	C-3 w, C-6, C-9, C-18, C-20	Me-19 w, H-9, H-6-eq
6	26.14	2.01-eq <sup>b</sup> 2.09-ax m	H-5, H-6-ax, H-7, H-14-eq H-5 w, H-6-eq, H-7	C-7, C-8 C-5, C-10, Me-20	H-5 w, H-6-ax, H-7, Me-19 H-6-eq, H-7 w, Me-19, Me-20
7	123.37	5.44 m	H-6-ax, H-6-eq, H-9, H-14-eq, H-14-ax	C-6, C-9, C-14	H-6-ax, H-6-eq, H-14-eq, H-14-ax
8	137.54	-	-	-	-
9	54.72	1.84 <sup>a</sup> m	H-7, H-11-eq, H-11-ax	C-1	H-1-ax, H-11-eq, H-12-ax
10	33.05	-	-	-	-
11*	20.68	1.45-ax m 1.58-eq m	H-9, H-11-eq, H-12-ax, H-12-eq H-9, H-11-ax, H-12-eq, H12-ax	C-9, C-12, C-13 w C-8, C-9, C-12, C-13	H-11-eq, H-12, Me-17, Me-20 H-1-ax, H-1-eq, H-9, H-11-ax, H-12
12*	36.40	1.41-ax m 1.48-eq m	H-11-ax, H-11-eq, H-12-eq H-11-ax, H-11-eq, H-12-ax	C-9, C-11, C-13 C-9, C-11, C-13, C-14	H-9, H-11-eq, H-12-eq, H-14-ax, H-11-eq, H-11-ax, H-12-ax, Me-17
13	37.73	-	-	-	-
14	46.34	1.93-eq m 2.01-ax <sup>b</sup>	H-7 w, H-12-eq w, H-14-ax H-6-eq, H-7, H-14-eq	C-7, C-8, C-9, C-12, Me-17 w C-7, C-8, Me-17	H-7, H-14-ax, Me-17 H-7, H-9 w, H-12-ax w, H-14-eq
15	150.87	5.81 dd	H-16	C-12, C-13, C-14, Me-17	H-12-ax w, H-14-ax, H-16, Me-17
16	109.88	4.85 dd ( <i>E</i> ) 4.94 dd ( <i>Z</i> )	H-15	C-13, C15	H-12-ax w, H-14-ax, H-15, Me-17
17	21.89	0.87 s	-	C-12, C-13, C-14, C15, C-16 w	H-11-ax, H-12-eq, H-14-eq
18	182.71	-	-	-	-
19	16.98	1.13 s	-	C-3, C-4, C-5, C-18	H-3-ax w, H-6-ax, H-6-eq,
20	21.92	1.18 s	-	C-1, C-5, C-6 w, C-9, C-10	H-1-eq, H-3-ax, H-3-eq, H-6-ax, H-11-ax,

**Tabelle 6:** NMR-Daten von 2-Hydroxyisopimarsäurelacton (**E176**). (Aceton- $d_6$ ,  $^1\text{H}$ : 700 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100.6 MHz,  $\delta$  in ppm relativ zu  $\delta_{\text{H}}(\text{Aceton}) = 2.05$  ppm,  $\delta_{\text{C}}(\text{Aceton}) = 29.84$  ppm, ax =axial, eq = äquatorial)

<sup>a</sup> H-3-eq und H-9 teilweise überlagert

<sup>b</sup> H-14-ax und H-6-eq teilweise überlagert

Anhand der NOESY-Kreuzsignale konnte die relative Konfiguration bestätigt werden. Wichtige dipolare Kopplungen sind in Abbildung 44 hervorgehoben. Die dipolaren Kopplungen der axialen Substituenten an den verbrückenden Positionen H-5, H-9, Me-17 und Me-20 wurden zusätzlich rot für oberhalb und blau für unterhalb der Papierebene gekennzeichnet. Aufgrund der räumlichen Nähe der 1,3 diaxialen Substituenten ergeben diese zumeist guten Kopplungssignale die relative Konfiguration der anellierten Ringe.

Das axiale H-5 koppelt unter anderem mit dem ebenfalls axialen H-9, das eine Schlüsselposition bei der Aufklärung der relativen Konfiguration einnimmt. H-9 koppelt weiterhin mit den axialen Substituenten an den Positionen H-1<sub>ax</sub>, H-12<sub>ax</sub> und H-14<sub>ax</sub>. Aus den Kopplungen zwischen H-12<sub>ax</sub> mit H-15 und der Kopplung H-14<sub>ax</sub> mit H-15 kann auf die äquatoriale Position des Ethenylsubstituenten geschlossen werden. Im Umkehrschluss ergibt sich die axiale, aus der Darstellungsebene herausragende Position von Me-17, was der Konfiguration der natürlich vorkommenden Isopimarsäure entspricht.

Hervorzuheben ist auch die dipolare Kopplung zwischen H-3<sub>ax</sub> und der Methylgruppe Me-20, die belegt, dass die Methylengruppe der Position 3 aus der Bildebene heraus orientiert ist. Demzufolge muss der Lactonring in die Bildebene hinein ragen. Dieser Befund entspricht der Orientierung der Carboxylgruppe in natürlich vorkommender Isopimarsäure (**50**). Die absolute Konfiguration wurde nicht bestimmt, jedoch ist die dargestellte Konfiguration aufgrund der Biosynthese dieser Diterpenskelette wahrscheinlich.

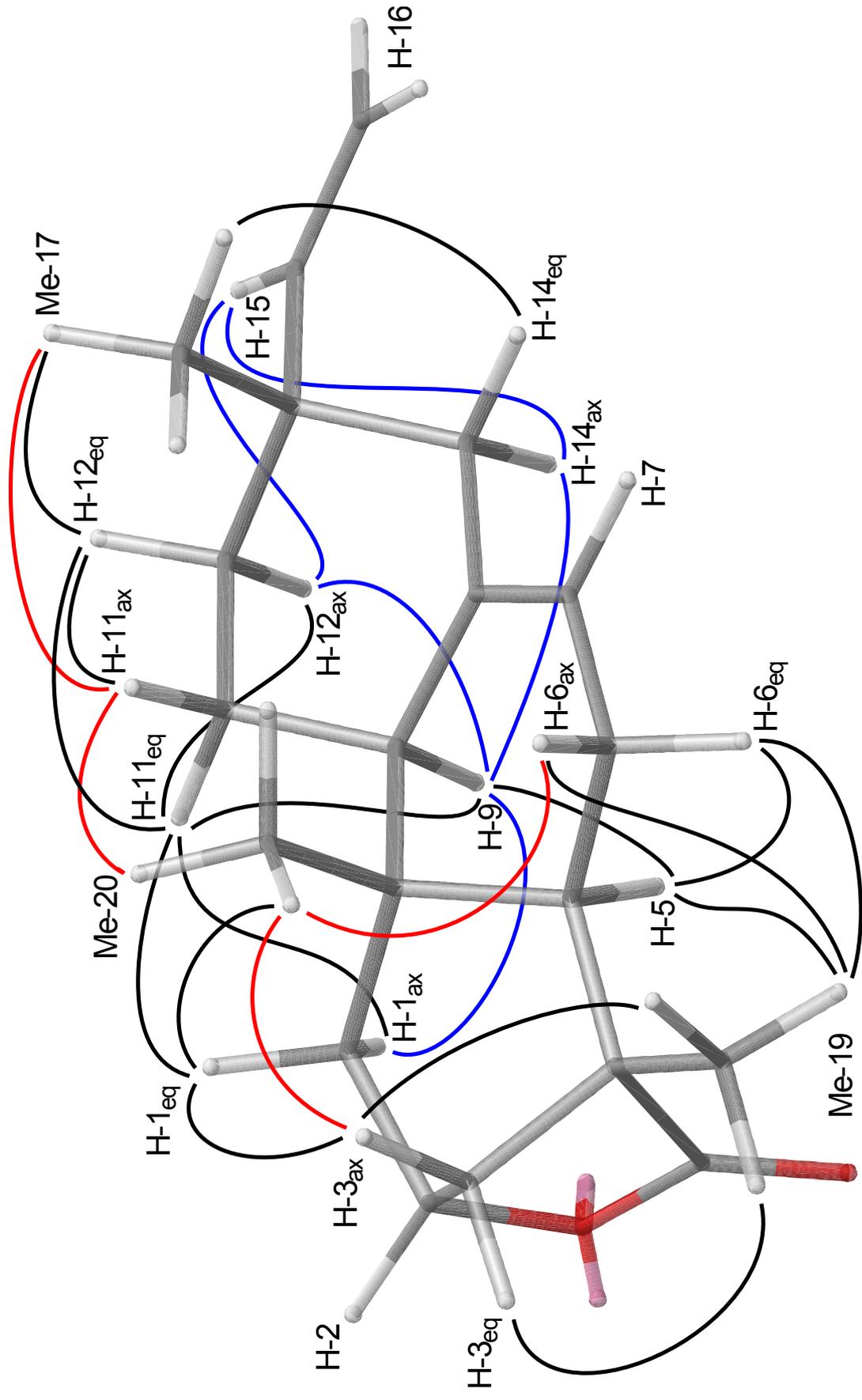


Abbildung 44: Struktur von **E176** mit Hervorhebung ausgewählter NOE-Kopplungen, die zur Klärung der relativen Konfiguration beitragen

## Massenspektrometrische Fragmentierung von E176

Anhand der aufgeklärten Struktur und den Daten der Hochauflösungsmessung können die wichtigsten Fragmentierungsreaktionen von 2-Hydroxyisopimarsäurelacton (E176) erklärt werden. Die Bestimmung der atomaren Zusammensetzung ergab, dass die Fragmentionen  $m/z$  271, 285 sowie das Molekülion  $m/z$  300 zwei Sauerstoffatome besitzen. Die übrigen Fragmentionen  $\leq m/z$  241 enthalten nur Kohlenstoff- und Wasserstoffatome.

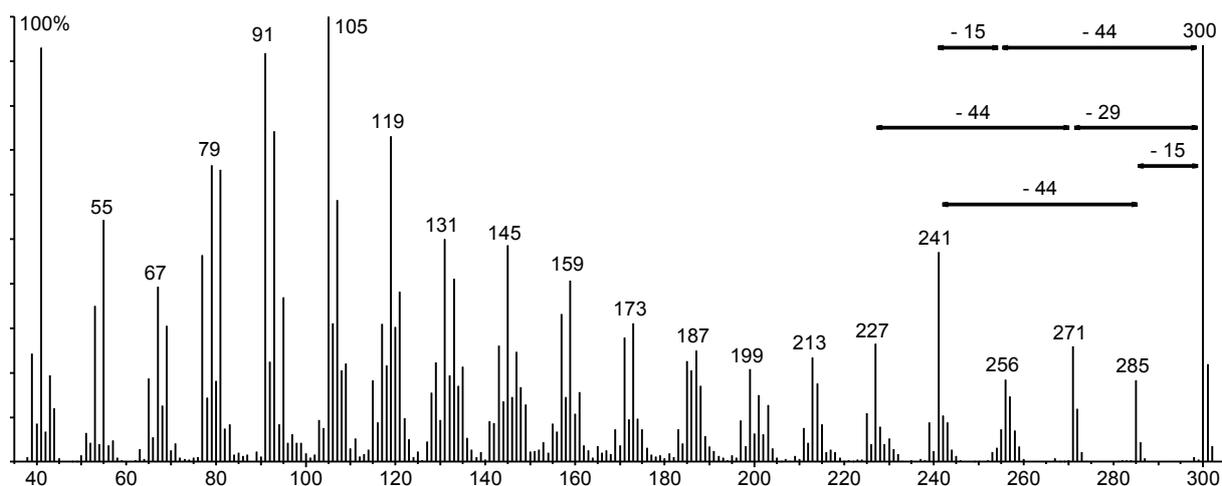


Abbildung 45: Massenspektrum von E176 mit Angabe wichtiger Fragmentierungsmuster

Daraus kann auf das folgende Fragmentierungsschema geschlossen werden. Das Molekülion  $m/z$  300 fragmentiert unter Verlust von Kohlendioxid aus dem Lactonring zu  $m/z$  256 und spaltet anschließend eine der drei Methylgruppe als Methylradikal zu  $m/z$  241 ab. Energetisch günstig ist die Abspaltung der Methylgruppe Nummer 17, da die Lokalisierung der positiven Ladung an der allylischen Position 13 bevorzugt ist.

Ebenso wird die umgekehrte Reihenfolge der Abspaltungen aus dem Molekülion beobachtet: Abspaltung des Methylradikals ergibt  $m/z$  285 und der folgende Verlust von Kohlendioxid führt gleichfalls zum Ion  $m/z$  241. Teilweise fragmentiert das Molekülion auch unter Verlust des Alkylradikals  $m/z$  29 zu  $m/z$  271 mit anschließendem Verlust von Kohlendioxid zu  $m/z$  227. Die weiteren Fragmentierungen aus den Kohlenwasserstoffgerüsten nach Abspaltung des Kohlendioxids verlaufen unspezifisch unter Verlust von Alkylgruppen.

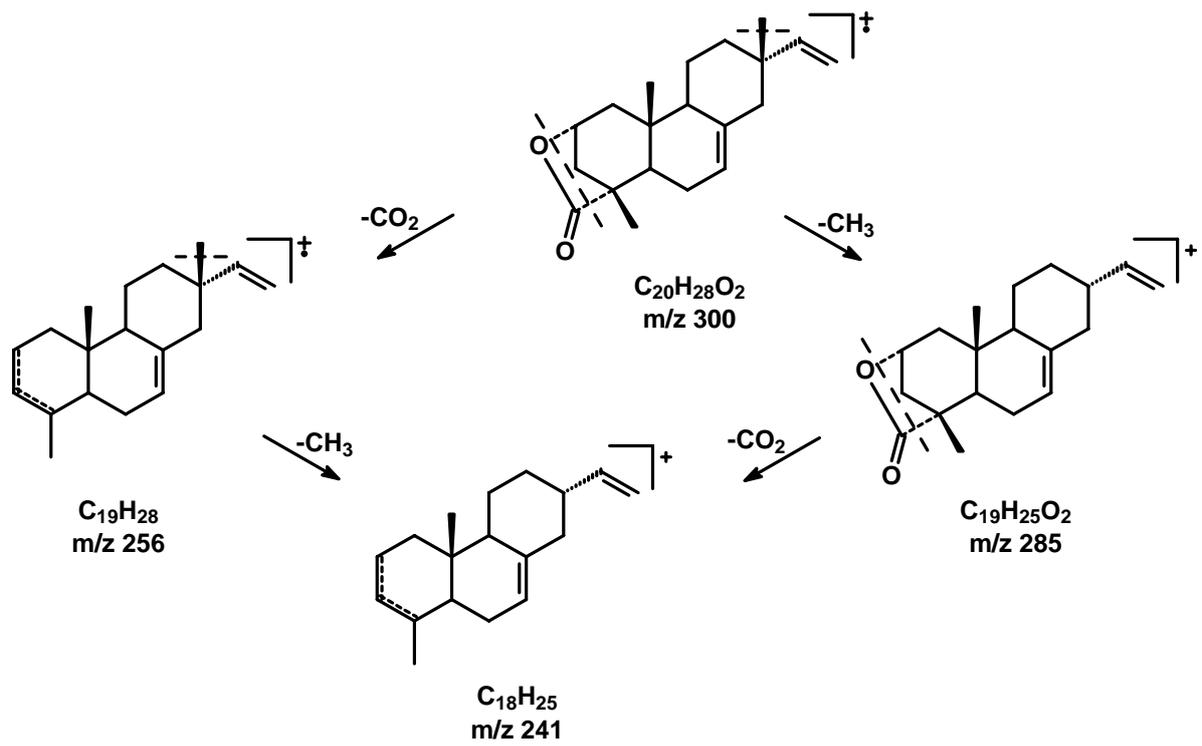


Abbildung 46: Vermutliches Fragmentierungsschema von E176

## Strukturaufklärung von Substanz **E182** durch NMR-Spektroskopie

Die Isolierung der Substanz **E182** erfolgte mittels Umkehrphasen-HPLC an einer C18-Phase. Es wurden ausreichende Substanzmengen von **E182** gewonnen, um eindimensionale  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren sowie die zweidimensionalen HMQC-, HMBC-, COSY90- und NOESY-Spektren aufzunehmen. Durch Interpretation dieser NMR-Daten konnte **E182** eindeutig als 2-Hydroxyabietinsäurelacton (**E182**) identifiziert werden.

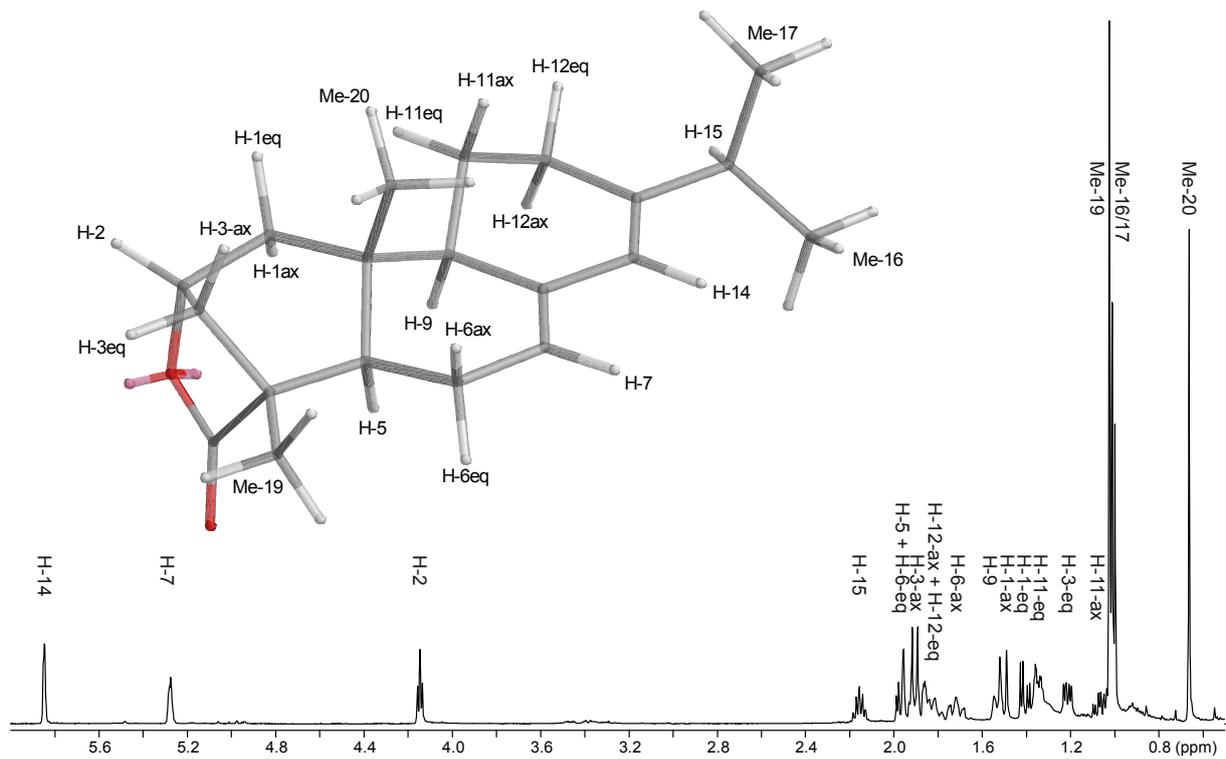
Auch dieses  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt bereits bei 500 MHz in Benzol eine ausreichende Signaltrennung. Da alle Methylengruppen diastereotope Protonen aufweisen, und zusätzlich noch Allyl- und Homoallyl-Fernkopplungen in den Ringen 2 und 3 vorliegen, konnten in diesem Spinsystem wenig relevante Strukturinformationen aus den Kopplungskonstanten erhalten werden. Im Bereich des tiefen Feldes sind die Signale der olefinischen Protonen H-14 bei  $\delta_{\text{H}}=5.85$  und H-7 bei  $\delta_{\text{H}}=5.28$  ppm zu erkennen. Die Kopplungskonstanten sind von zu geringer Größe, um mit dieser Messmethodik bestimmbar zu sein.

Aus dem Spinsystem der Kohlenstoffe 1 - 3, welches in allen identifizierten Strukturen mit nur geringen Änderungen der chemischen Verschiebungen vorliegt, konnten die gleichen Strukturinformationen, wie bei **E176**, aus den Kopplungskonstanten abgeleitet werden. Das Proton an H-2 bei  $\delta_{\text{H}}=4.15$  ppm weist analog zu **E176** eine Pseudotriplettstruktur auf und die gemittelte Kopplungskonstante beträgt  $^3J = 5.5$  Hz. Diese setzt sich aus den vicinalen Kopplungen zu den äquatorialen Protonen H-1 bei  $\delta_{\text{H}}=1.41$  ppm ( $^3J = 5.7$  Hz) und H-3 bei  $\delta_{\text{H}}=1.21$  ppm ( $^3J = 5.4$  Hz) zusammen.

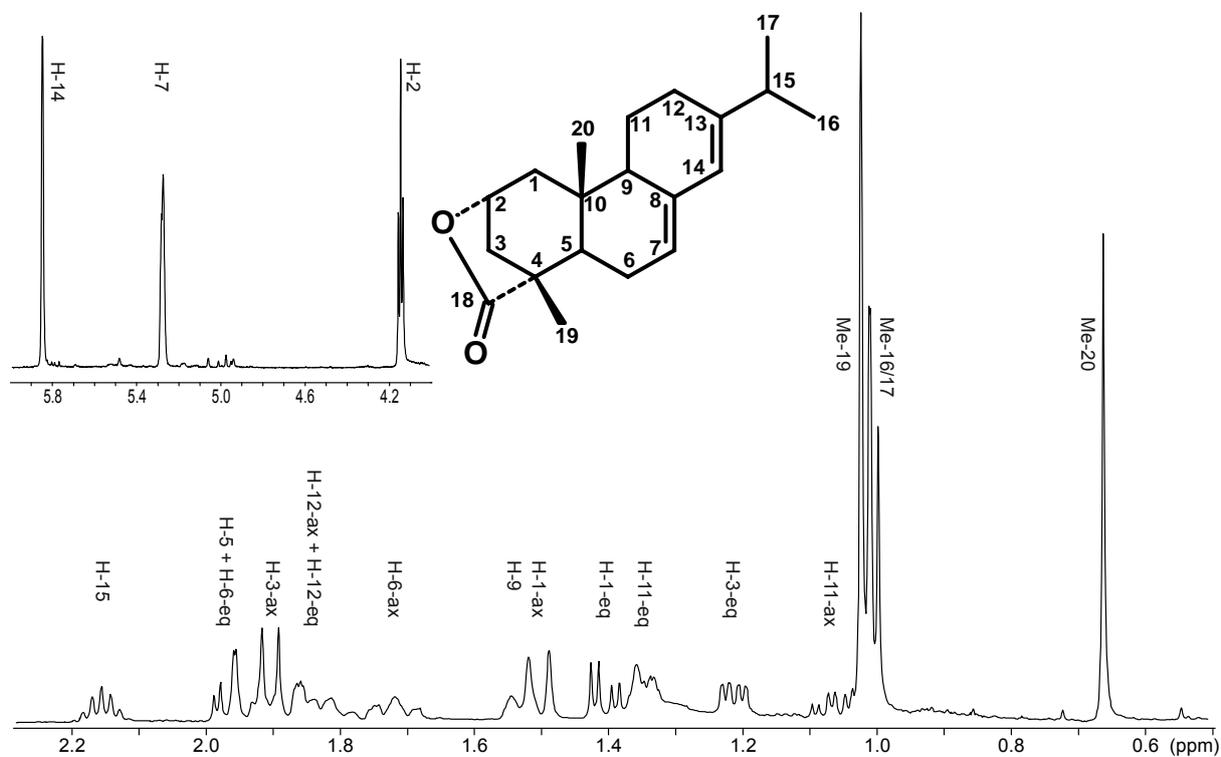
Die Methylenprotonen an Position 1 zeigen ein Dublett bei  $\delta_{\text{H}}=1.51$  ppm für das axiale und ein Quartett bei  $\delta_{\text{H}}=1.41$  ppm für das äquatoriale Proton. Dieses Muster resultiert aus der geminalen Kopplung mit einer Kopplungskonstanten von  $^2J = 15.1$  Hz und der zusätzlichen Kopplung des äquatorialen Protons mit einer Kopplungskonstanten von  $^2J = 5.7$  Hz zum Proton an H-2. Analog verhalten sich die Methylenprotonen an Position 3 bei  $\delta_{\text{H}}=1.90$  (ax) und  $\delta_{\text{H}}=1.21$  (eq) ppm, deren geminale Kopplungskonstante  $^2J = 12.3$  Hz beträgt. Das äquatoriale Proton koppelt zu H-2 mit  $^2J = 5.4$  Hz und ist weiterhin durch eine Fernkopplung zu einem unbekanntem Partner aufgespalten (1 Hz).

Desweiteren findet sich bei  $\delta_{\text{H}}=2.16$  ppm erneut das charakteristische Septett eines Methinprotons mit der Kopplungskonstante  $^2J = 6.8$  Hz. Das Dublett der zwei äquivalenten Methylgruppen mit gleicher Kopplungskonstante kann bei  $\delta_{\text{H}}=1.01$  ppm als Kopplungspartner identifiziert werden. Wiederum resultiert daraus das Strukturelement einer Isopropylgruppe an einem quartären Kohlenstoff.

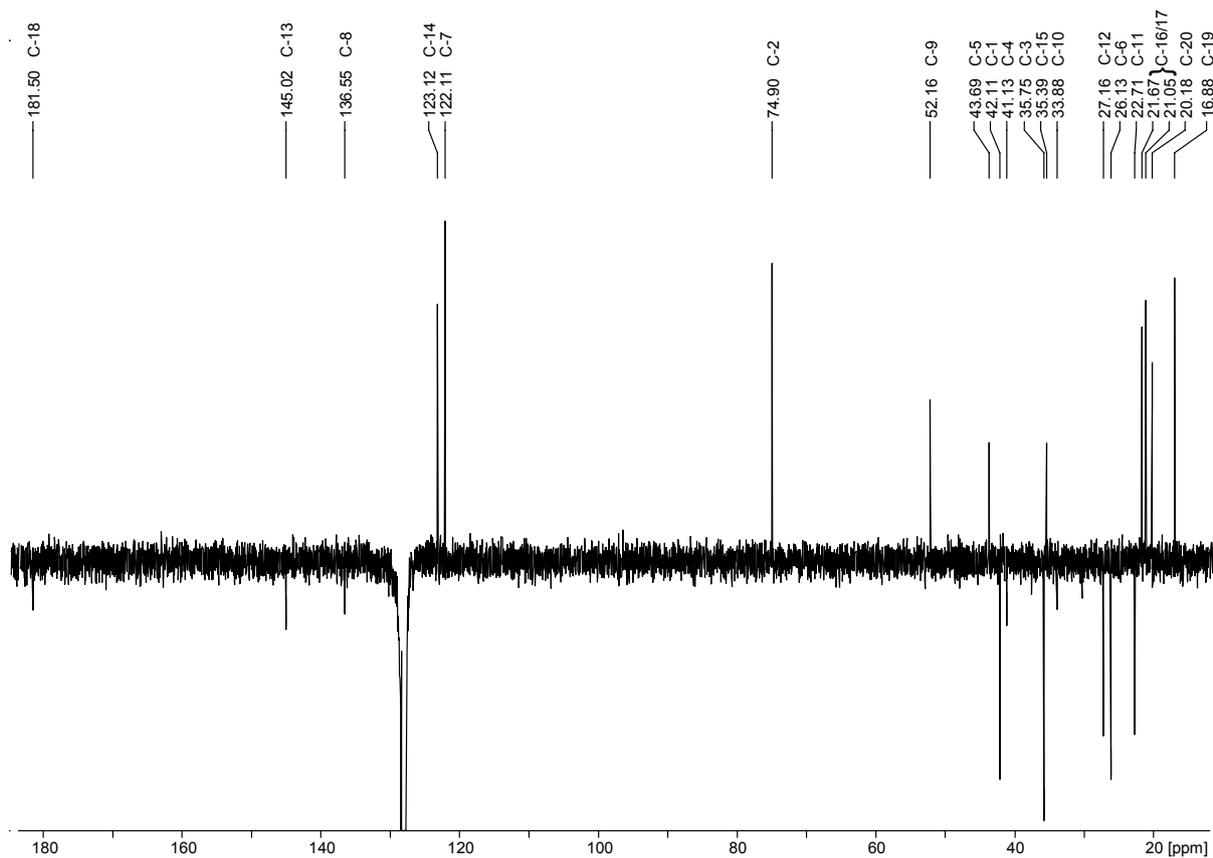
Die chemischen Verschiebungen des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums stimmen gut mit den Literaturwerten von Abietinsäure (**46**) überein<sup>185</sup>. Erwartungsgemäß weisen die Protonen am Ring A Abweichungen der chemischen Verschiebungen auf, da der Ring 1 eine unterschiedliche chemische Umgebung bei der Abietinsäure(**46**) und **E182** aufweist. Die komplette Struktur von **E182** konnte durch Auswertung der ein- und vor allem zweidimensionalen NMR-Spektren bewiesen werden. In Tabelle 7 sind alle COSY90-, HMBC- und NOESY-Kreuzsignale aufgeführt, welche die Struktur des neuen Naturstoffs **E182** belegen.



**Abbildung 47:** 500 MHz- $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des 2-Hydroxyabietinsäurelactons (**E182**) in Benzol- $d_6$  mit räumlicher Darstellung und hier angewandter Nummerierung



**Abbildung 48:** Vergrößerte Ausschnitte des 500 MHz- $^1\text{H}$ -NMR Spektrums von **E182** in Benzol- $d_6$  und Strukturformel mit angewandter Nummerierung



**Abbildung 49:** Pendant  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von 2-Hydroxyabietinsäurelacton (**E182**), (100.6 MHz, Benzol- $d_6$ ).  $\text{CH}_3$ - und  $\text{CH}$ -Gruppen geben positive,  $\text{CH}_2$ - und quartäre C-Atome negative Signale.

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Pendant-Experiment schlüsselt alle 20 Kohlenstoffatome der Struktur **E182** anhand ihrer Multiplizität auf. Bei 181.50 ppm liegt das quartäre Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe aus dem Lactonring. Zu höherem Feld liegen als nächstes die olefinischen quartären Kohlenstoffe bei 145.02 und 136.55 ppm. Die positiven Signale bei 123.12 und 122.11 ppm entsprechen den tertiären olefinischen Kohlenstoffen. Das positive Signal bei 74.90 ppm entspricht dem tertiären Kohlenstoff, der die Acyloxyfunktion trägt. Die chemischen Verschiebungen des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experiments liegen in guter Übereinstimmung mit publizierten Daten für die Abietinsäure(**46**)<sup>186</sup>. Lediglich das Kohlenstoffatom an Position 2, das die Acyloxygruppe trägt, zeigt eine deutlich andere chemische Verschiebung.

Die Multiplizität der weiteren Signale im tiefen Feld wurde zunächst aus obigem Spektrum ermittelt und mit Hilfe des HMQC-Spektrums ihren entsprechenden Protonensignalen zugeordnet. Durch das HMBC-Experiment konnten über ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ )-Fernkopplungen die durch quartäre Kohlenstoffe getrennten Spinsysteme miteinander verknüpft werden. Die Tabelle 7 enthält alle bestimmten COSY90-, HMBC- und NOESY-Korrelation, welche die Struktur **E182** belegen.

Pos	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	COSY90	HMBC	NOESY
1	42.11	1,41-eq dd	H-2, H-1-ax	C-2 w, C-5, C-10, Me-20	H-1-gem, H-2, Me-20
		1.51-ax d	H-1-eq	C-2, C-3, C-9, C-10, Me-20	H-1-ax
2	74.90	4.15 dd	H-1-eq, H-3-eq,	C-3, C-4, C-10, C-18	H-1-eq, H-1-ax w, H-3-eq, H-3-ax w
3	35.75	1.21-eq ddd 1.90-ax d	H-2; H-3-ax H-3-eq,	C-1, C-2, C-4, C-5, C-18 w, C-19 C-2, C-4, C-5, C-18	H-3-ax, H-2 w
4	41.13	-	-	-	-
5	43.69	1.97 <sup>a</sup> m	H-6-ax, H-6-eq	C-3 w, C-4, C-6, C-7, C-9, C-10, C-18, C-20	H-9
6	26.14	1.72-ax m	H-5, H-6-eq, H-7 w	C-5 w, C-7 w, C-8 w	H-7, Me-19, Me-20
		1.96-eq <sup>a</sup> m	H-6-ax H-7	C-5 w, C-7, C-8, C-10 w	H-6-ax, H-7, Me-19
7	122.11	5.28 m	H-6-ax w, H-6-eq, H-9 w	C-5, C-6, C-9, C-14	H-6-eq, H-6-eq, H-14
8	136.55	-	-	-	-
9	52.16	1.53 m	H-6-ax w H-7 w H-11-ax w	C-8 w	
10	33.88	-	-	-	-
11	22.71	1.34-eq m	H-11-ax, H-12	C-8, C-9, C-12, C-13	H-11-eq, H-12
		1.05-ax m	H-9, H-11-eq, H-12	C-8, C-9, C-12	H-11-ax, H-12 w, H-20
12	27.16	1.86 m	H-11ax, H-11-eq	C-9 w, C-11, C-13, C-14	H-11-eq, H-11-ax w, Me-16/17
13	145.02	-	-	-	-
14	123.12	5.85 s	H-12 w	C-7, C-8, C-9, C-12, C-15	H-7, H-12 w, H-15, Me-16/17
15	35.39	2.16 sept	H-14, Me-16/17	C-12, C-13, C-14, C-16, C-17	H-12 w, H-14, Me-16/17
16	21.67	1.01 d	H-15	C-13, C15, C-17	H-12, H-14, H-15
17	21.05	1.01 d	H-15	C-13, C15, C-16	H-12, H-14, H-15
18	181.50	-	-	-	-
19	16.88	1.02 s	-	C-3, C-4, C-5, C-18	H-3-ax H-6-ax,
20	20.18	0.66 s	-	C-1, C-5, C-6 w, C-9, C-10	H-1-eq, H-3-ax, H-6-ax, H-11-ax

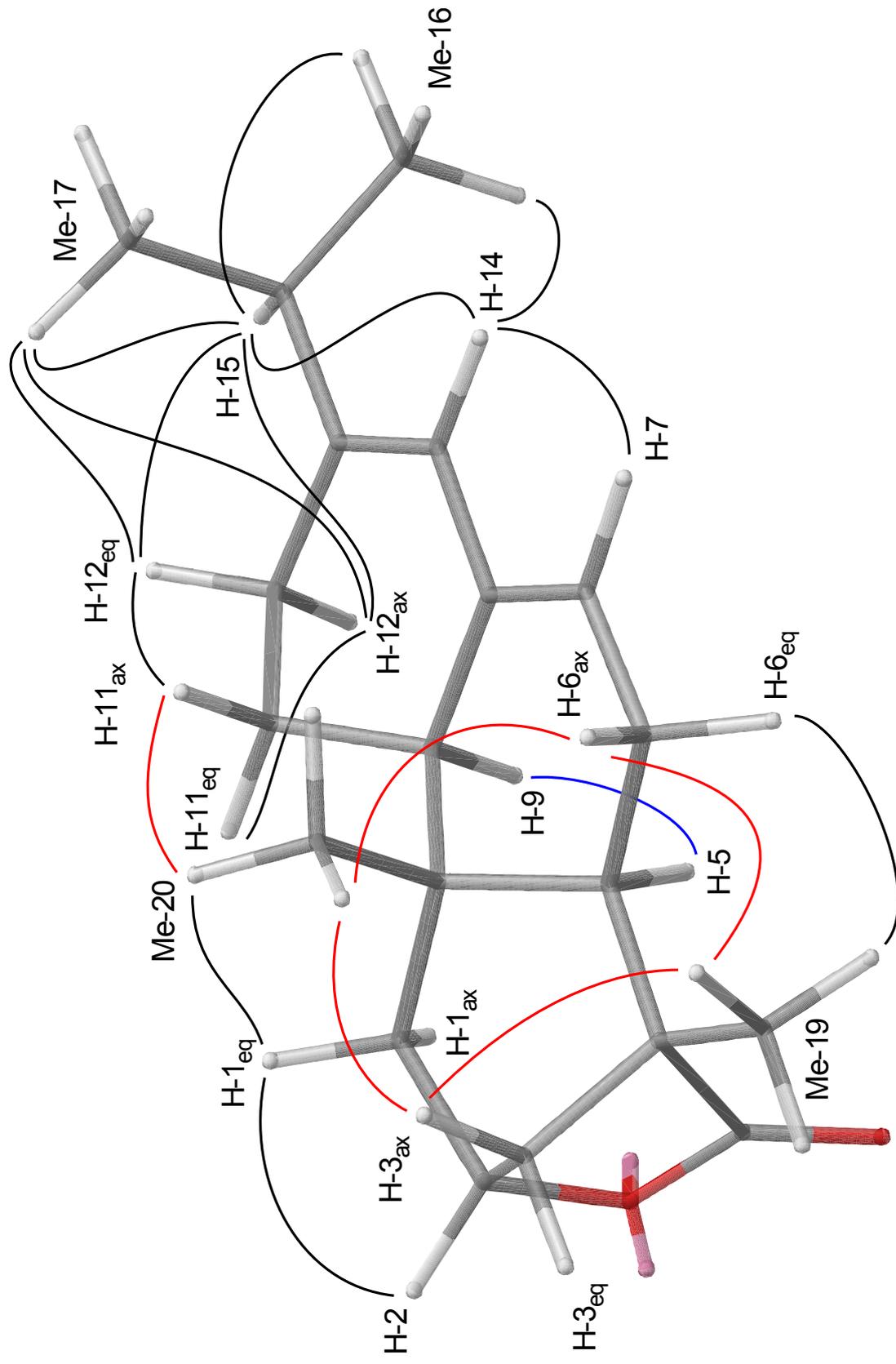
**Tabelle 7:** NMR-Daten von 2-Hydroxyabietinsäurelacton (**E182**). (Benzol- $d_6$ ,  $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100.6 MHz,  $\delta$  in ppm relativ zu  $\delta_{\text{H}}(\text{Benzol}) = 7.16$  ppm,  $\delta_{\text{C}}(\text{Benzol}) = 128.06$  ppm, ax =axial, eq = äquatorial)

<sup>a</sup> H-5 und H-6-eq überlagert

Durch Auswertung der Korrelationen aus den NOE-Experimenten konnte die relative Konfiguration analog zu den Darstellungen in Abbildung 47 und Abbildung 48 abgesichert werden. Ausgewählte NOE-Kopplungen sind in Abbildung 50 gekennzeichnet. Wichtige Kopplungen oberhalb der Papierebene wurden rot und die Kopplung zwischen H-5 und H-9 unterhalb der Papierebene blau gekennzeichnet.

Die axiale Methylgruppe Me-20 zeigt wichtige Signale dipolarer Kopplungen zu H-3<sub>ax</sub> und H-6<sub>ax</sub>. Die Kopplung zu H-3<sub>ax</sub> belegt die Orientierung der Ringe im Bicyclus mit in die Papierebene hineinragendem Lactonring. Dieser Befund wird zusätzlich noch durch die dipolaren Kopplungen der Methylgruppe Me-19 mit H-6<sub>ax</sub> und H-3<sub>ax</sub> abgesichert. Die Signale der Kopplungen zwischen den axialen Protonen H-9 und H-5 sowie die Kopplung zwischen H-5 und H-6<sub>eq</sub> beweisen die in die Ebene gerichtete Stellung dieser Substituenten. Analog zu dem Diterpenlacton **E176** liegt die relative Konfiguration in Übereinstimmung mit der natürlichen Abietinsäure (**46**) vor.

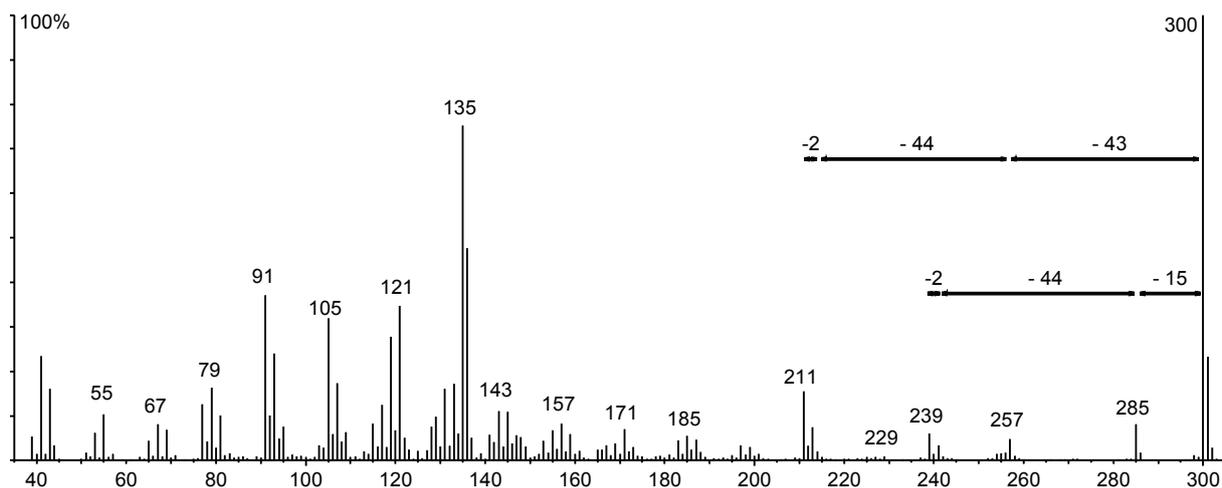
Die absolute Konfiguration der Substanz wurde nicht ermittelt, doch die hier abgebildete Konfiguration ist aufgrund der enantioselektiven Biosynthese der Diterpengerüste plausibel.



**Abbildung 50:** Struktur von **E182** mit Hervorhebung ausgewählter NOE-Kopplungen, die zur Klärung der relativen Konfiguration beitragen

## Massenspektrometrische Fragmentierung von **E182**

Abgesehen vom Molekülradikalkation zeigt das Massenspektrum von **E182** keine besonders intensiven Ionen im höheren Massenbereich. Dennoch kann auch hier mit den Daten der Hochauflösungsmessung und anhand der ermittelten Struktur die prinzipielle massenspektrometrische Fragmentierung interpretiert werden.



**Abbildung 51:** Massenspektrum von **E182** mit Angabe wichtiger Fragmentierungsmuster

Das Molekülion fragmentiert auf zwei unabhängigen Wegen.

Eine Abspaltung der Isopropylgruppe ergäbe das Ion  $m/z$  257. Dieser Fragmentierungsschritt ist nur wahrscheinlich, wenn gleichzeitig eine Umlagerung der konjugierten Doppelbindungen [Positionen 13 und 15(8)] stattfindet, da die Lokalisierung der positiven Ladung im Fragmention in Allylposition energetisch vorteilhaft ist, während ein vinylicsches Kation energetisch sehr ungünstig ist. Nachfolgende Eliminierung des Neutralteilchens Kohlendioxid aus dem Lactonring führt zu  $m/z$  213. Erneute Isomerisierung am Ring 3 mit Dehydrierung könnte das Ion  $m/z$  211 mit aromatischer Substruktur im Ring 3 ergeben.

Ein alternativer Weg ist der Verlust einer Methylgruppe aus dem Molekülion zu  $m/z$  285 und weitere Fragmentierung unter Verlust von Kohlendioxid zu  $m/z$  241. Auch hier tritt vermutlich Isomerisierung und Verlust von molekularem Wasserstoff auf. Das Ion  $m/z$  239 hat ein Octahydrophenanthrenskelett und entsteht vermutlich ebenfalls mit aromatischer Substruktur im Ring 3. Die weitere Fragmentierung nach Abspaltung von Kohlendioxid und Isomerisierung verläuft unter Verlust von Alkylresten wenig spezifisch.

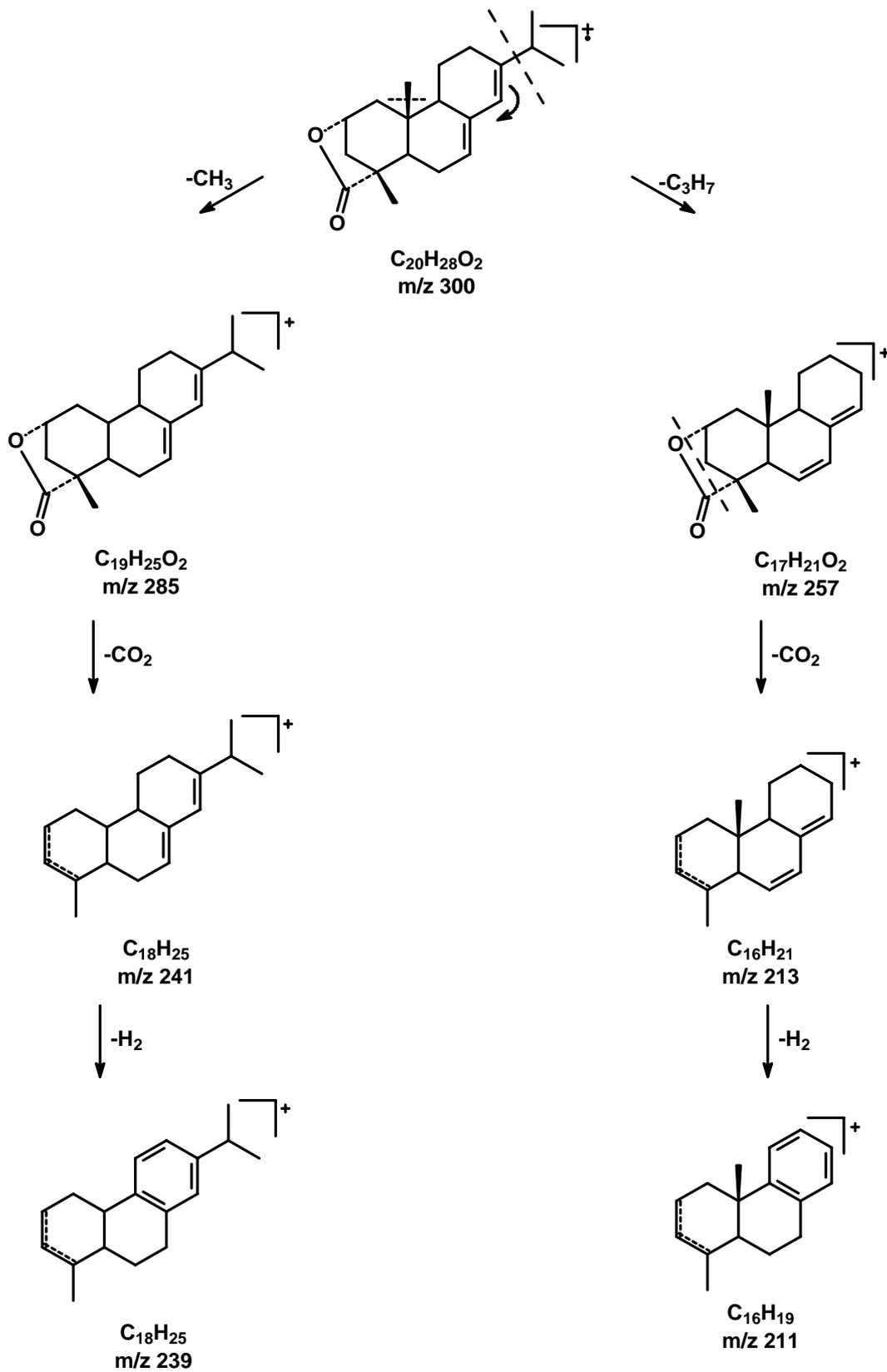


Abbildung 52: Vermutliches Fragmentierungsschema von E182

## Strukturaufklärung von Substanz **E181** durch NMR-Spektroskopie

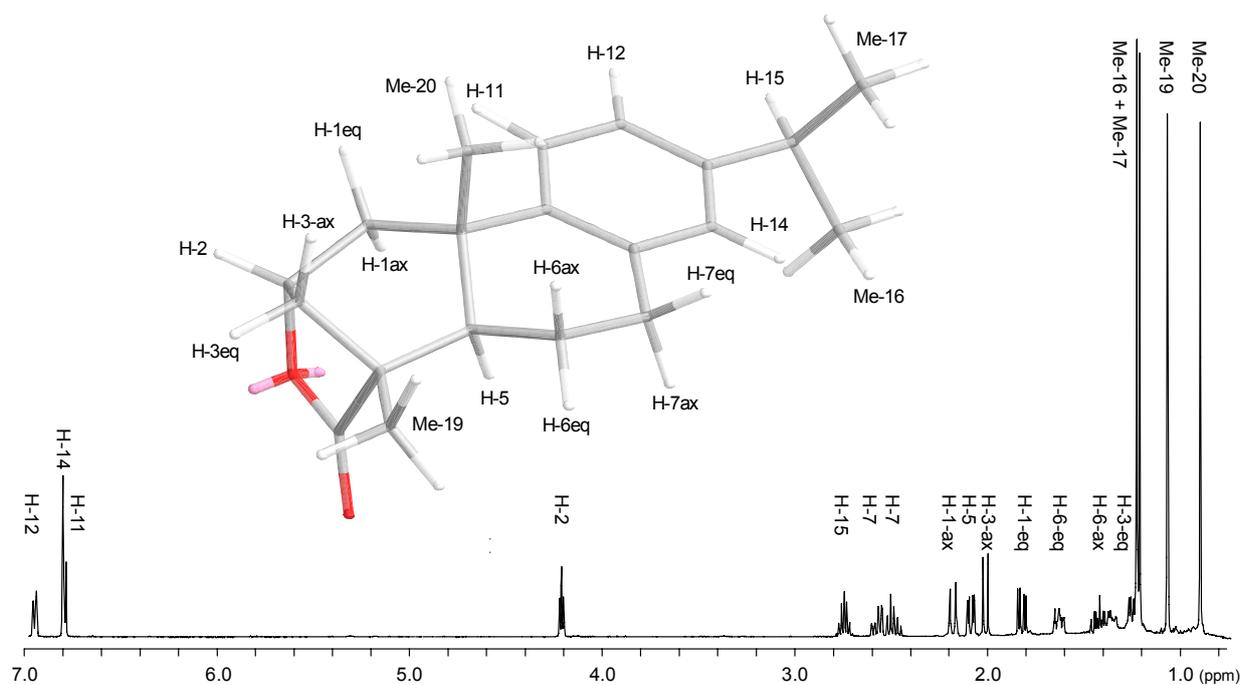
Die Komponente **E181** wurde ebenfalls mittels präparativer Gaschromatographie isoliert. Nach Auswertung der ein- und zweidimensionalen NMR-Experimente konnte der Verbindung **E181** die Struktur von 2-Hydroxydehydroabietinsäurelacton zugeordnet werden. Es zeigte sich, dass der neue Naturstoff **E181** in Analogie zu **E182** ebenfalls ein Skelett des Abietantyps besitzt. Da die Substanz ein aromatisches Ringsystem als Teilstruktur aufweist, treten im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum starke Unterschiede im Vergleich zu der Struktur von Substanz **E182** auf. Bei Substanz **E181** führte die Aufnahme des NMR-Spektrensatzes in Benzol- $d_6$  bei 500 MHz Messfrequenz zu exzellenter Signaltrennung, und die Signale im  $^1\text{H}$ -Spektrum wurden aufgrund geringerer Anzahl diastereotoper Protonen mit Ausnahme der aromatischen Protonen H-11 und H-14 komplett separiert.

Im Tieffeldbereich des Spektrums sind insgesamt drei aromatische Protonensignale ersichtlich, von denen das Dublett bei  $\delta_{\text{H}} = 6.79$  und das Singulett bei  $\delta_{\text{H}} = 6.80$  ppm teilweise überlagert sind. Die Dublettstruktur der Protonen bei  $\delta_{\text{H}} = 6.94$  und  $\delta_{\text{H}} = 6.79$  ppm wird durch deren vicinale Kopplung mit einer Kopplungskonstante von 7.9 Hz hervorgerufen. Die drei aromatischen Protonensignale sind ferner durch nicht aufgelöste Fernkopplungen verbreitert. Aus diesem Kopplungsmuster kann auf eine 1,3,4-trisubstituierte aromatische Ringstruktur geschlossen werden.

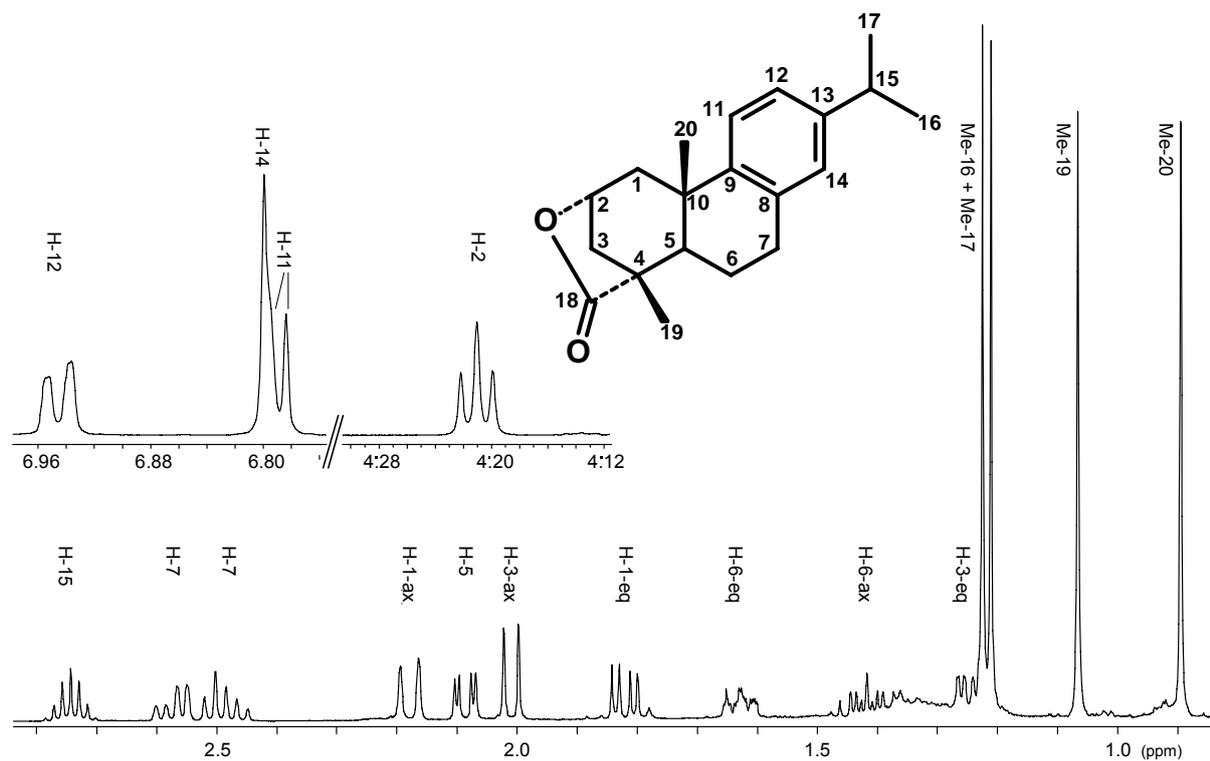
Ebenso wie bei den Strukturen **E176** und **E182** ist das Proton an einem Kohlenstoff, das eine Acyloxyfunktion trägt, bei  $\delta_{\text{H}} = 4.21$  ppm mit Pseudotriplettstruktur vorhanden. Auch hier resultiert das Pseudotriplett aus zwei  $^3J$ -Kopplungen zu Kopplungspartnern an Position 1 und 3 mit sehr ähnlicher Kopplungskonstante (gemittelt 5.7 Hz). Die Protonen an den Positionen 1, 2 und 3 bilden zusammen ein abgeschlossenes Spinsystem.

Im Bereich des höheren Feldes liegen die gut separierten Signale der Methylengruppe der Position 1 mit den chemischen Verschiebungen von  $\delta_{\text{H}} = 2.18$  ppm für das axiale Proton und  $\delta_{\text{H}} = 1.82$  ppm für das äquatoriale Proton. Diese für aliphatische Protonen ungewöhnliche Verschiebung wird durch den Anisotropiekegel der Carbonylgruppe hervorgerufen, der besonders das axiale Proton beeinflusst.

Während aus dem Dublett des axialen Protons nur die Kopplungskonstante der geminalen Kopplung mit dem äquatorialen Proton abgelesen werden konnte ( $^2J = 15.4$  Hz), ist die Kopplungskonstante aus der Kopplung des äquatorialen Protons mit dem Proton am Kohlenstoff an Position 2 groß genug, um zusätzlich zugeordnet zu werden ( $^3J = 6.0$  Hz).



**Abbildung 53:** 500 MHz- $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des 2-Hydroxydehydroabietinsäurelactons (**181**) in Benzol- $d_6$  mit räumlicher Darstellung und hier angewandter Nummerierung von **E181**



**Abbildung 54:** Vergrößerte Ausschnitte des 500 MHz- $^1\text{H}$ -NMR Spektrums von **E181** in Benzol- $d_6$  und Strukturformel mit hier angewandter Nummerierung

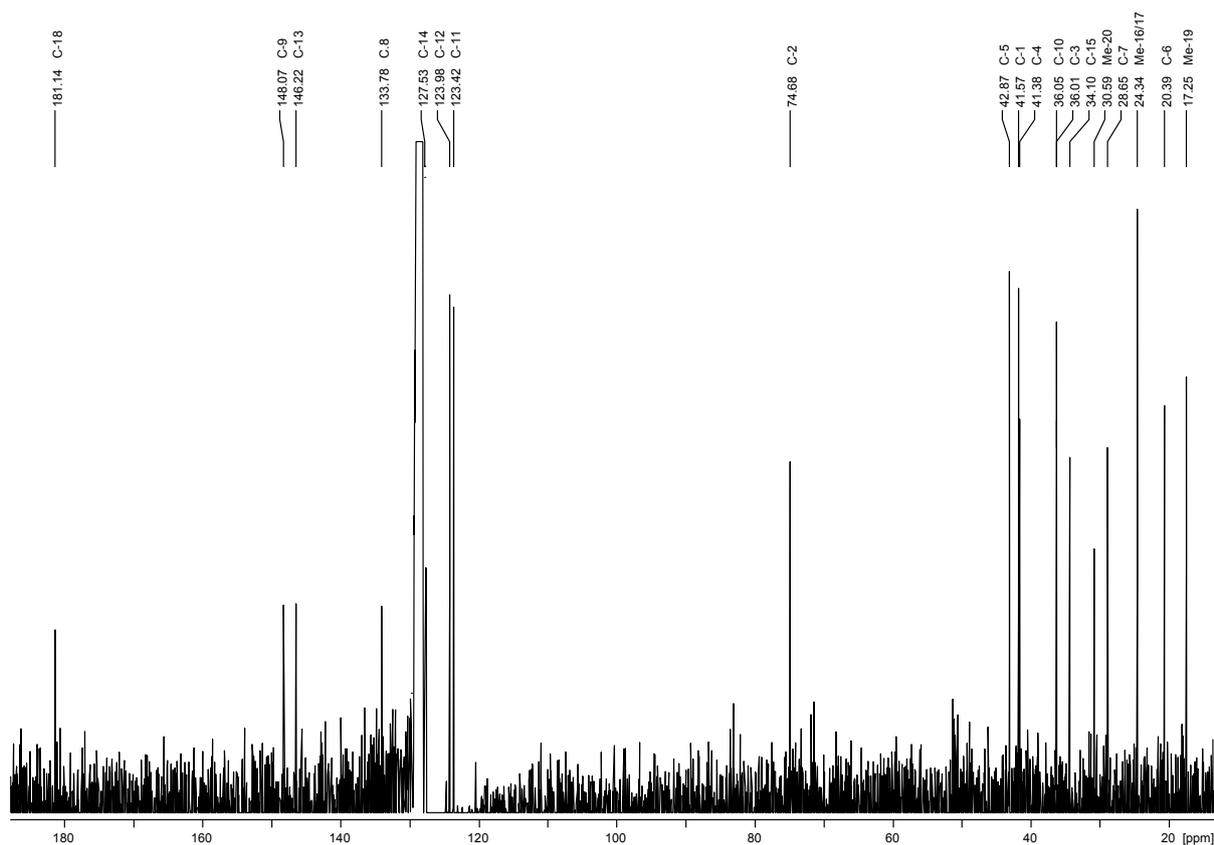
Die Methylengruppe an Position 3 zeigt ein vergleichbares Bild: Das Dublett des axialen Protons bei  $\delta_{\text{H}} = 2.01$  ppm resultiert aus der Kopplungskonstanten der geminalen Kopplung mit 12.3 Hz, und die vicinale Kopplungskonstante ist wiederum zu klein, um aufgelöst zu werden. Das äquatoriale Proton weist neben der Kopplungskonstanten der geminalen Kopplung noch die der vicinalen mit dem Proton an Position 2 auf ( ${}^3J = 5.1$  Hz). Das Signal ist in Form des Dubletts eines Dubletts zu erkennen.

Das Methinproton der Position 5 zeigt bei  $\delta_{\text{H}} = 2.09$  ppm ebenfalls ein Dublett eines Dubletts mit den Kopplungskonstanten 13.6 und 3.6 Hz. Allerdings können diese Kopplungskonstanten bei der Methylengruppe an Position 6 mit den chemischen Verschiebungen von  $\delta_{\text{H}} = 1.42$  ppm für das axiale und  $\delta_{\text{H}} = 1.63$  ppm für das äquatoriale Proton nicht wieder gefunden werden, da eine komplexe, nicht aufgelöste Multipletstruktur vorliegt. Die Methylengruppe an Position 7 weist bei den chemischen Verschiebungen  $\delta_{\text{H}} = 2.49$  und  $\delta_{\text{H}} = 2.57$  ppm ebenfalls Multipletstruktur auf.

Als wichtigen Unterschied zu Struktur **E182** sieht man im Spektrum noch das Dublett zweier Methylgruppen bei  $\delta_{\text{H}} = 1.22$  ppm und ein Septett eines Methinprotons bei  $\delta_{\text{H}} = 2.74$  ppm. Beide Signale besitzen eine Kopplungskonstante von  $J = 6.94$  Hz. Daraus kann auf eine Isopropylgruppe an einem quartären Kohlenstoff geschlossen werden. Die Singulett bei  $\delta_{\text{H}} = 1.07$  und  $\delta_{\text{H}} = 0.89$  ppm stehen für zwei Methylgruppen an quartären Kohlenstoffen.

Die chemischen Verschiebungen der Protonen im  ${}^1\text{H}$ -NMR Spektrum von **E181** besitzen eine recht gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten von Dehydroabietinsäure (**53**)<sup>187</sup>. Die Protonen am Ring 1 besitzen jedoch aufgrund der unterschiedlichen chemischen Umgebungen der jeweiligen Strukturen teilweise andere chemischen Verschiebungen.

Weitere Strukturinformationen konnten nur durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie erhalten werden, da aus den übrigen Signalen keine Kopplungskonstanten bestimmt werden konnten.



**Abbildung 55:** DEPT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von 2-Hydroxydehydroabietinsäurelacton (**E181**), (100.6 MHz, Benzol- $d_6$ )

Die chemischen Verschiebungen aller 20 Kohlenstoffatome konnten anhand des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experiments ermittelt werden. Besonders charakteristisch sind die Signale im Tieffeldbereich. Dort findet sich bei 181.14 ppm das Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe. Bei  $\delta_{\text{C}} = 148.07$ , 146.22 und 133.78 ppm liegen die quartären Kohlenstoffe und bei 127.53 (vom Lösungsmittelsignal nur knapp separiert), 123.98 und 123.42 ppm die tertiären Kohlenstoffe des aromatischen Ringes. Weiterhin ist noch das Signal bei  $\delta_{\text{C}} = 74.68$  ppm eindeutig dem Kohlenstoff an Position 2 zuzuordnen, der die Acyloxygruppe trägt. Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experiment besitzen eine sehr gute Übereinstimmung mit Literaturwerten von Dehydroabietinsäure (**53**)<sup>187,188</sup>. Lediglich das Kohlenstoffatom der Position 2 von **E181** besitzt aufgrund der Acyloxygruppe eine deutlich abweichende chemische Verschiebung im Vergleich zu **53**.

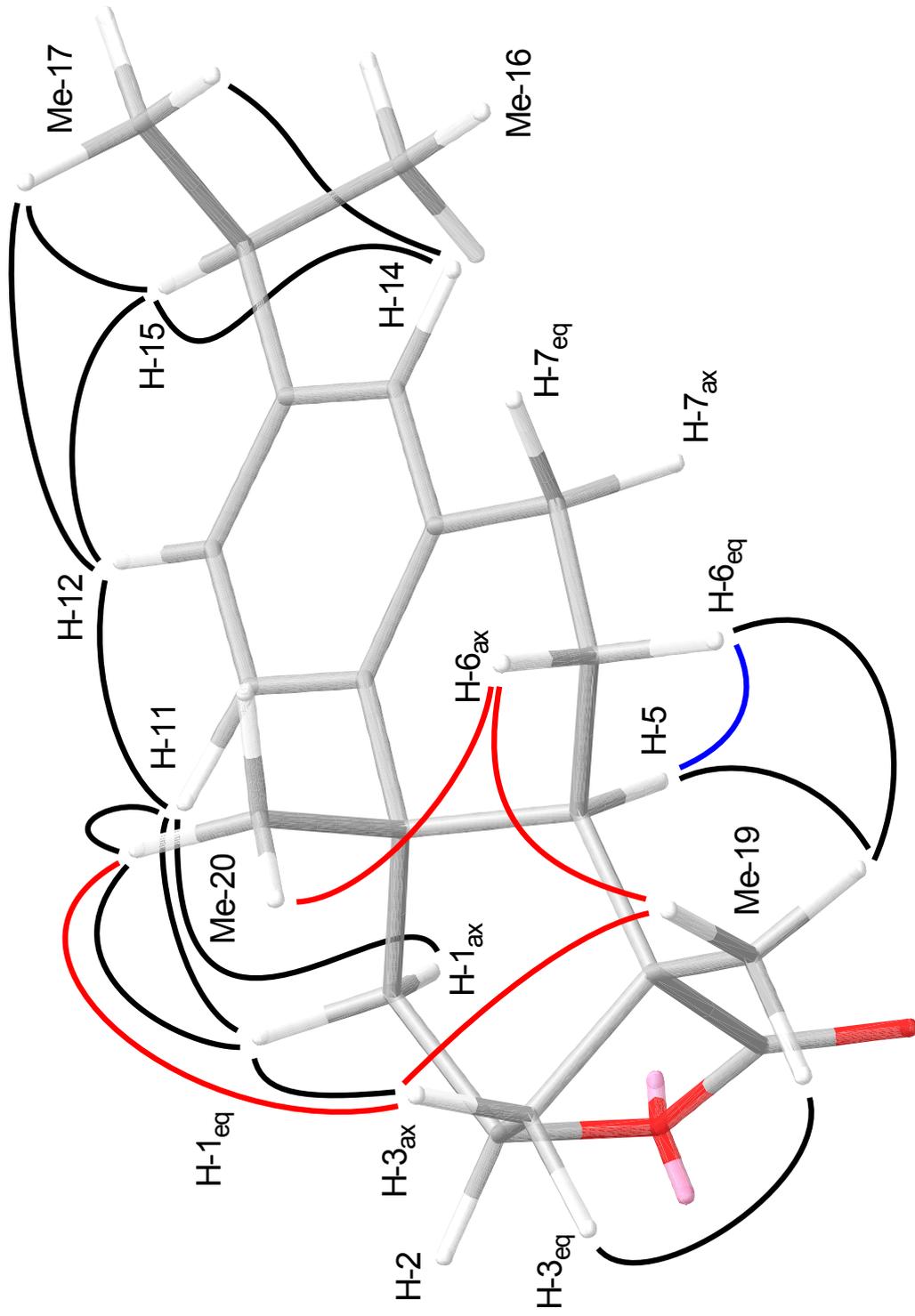
Die weiteren Signale konnten anhand von Pendant-Messungen der Multiplizität ihrer Protonen zugeordnet werden. Mit einem HMQC-Experiment wurden die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoff-atome ihren jeweiligen Protonensignalen zugeordnet. Durch die  $^2J$ - und  $^3J$ -*long range*-( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ )-Kopplungen, die mittels HMBC-Experiment ermittelt wurden, konnte die Verknüpfungsreihenfolge der Methin-, Methylen- und Methylprotonen aller Spinsysteme bestätigt werden. Die HMQC-, COSY90-, HMBC- und NOESY-Kreuzsignale beweisen somit Struktur **E181** eindeutig.

Pos	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	COSY90	HMBC	NOESY
1	41.57	1.82-eq dd	H-1-eq, H-2 w, H-5 w,	C-3, C-5, C-10, Me-20	H-1-ax, H-2, H-11, Me-20
		2.18-ax d	H-1-ax, H-2 w, H-3-eq, Me-20 w	C-2, C-3, C-9, C-10, Me-20	H-1-eq, H-2, H-11
2	74.68	4.21 dd	H-1-ax w, H-1-eq, H-3-eq, H-3-ax w, Me-19 w	C-4, C-10, C-18	H-1-eq, H-1-ax, H-3-eq, H-3-ax
3	36.01	1.25-eq dd	H-1-ax w, H-2, H-3-ax	C-1, C-2, C-4, C-5, C-19 w	H-2, H-3-ax, Me-19 w
		2.01-ax d	H-2 w, H-3-eq, Me-19 w	C-1, C-2, C-4, C-5, C-18	H-1-eq w, H-2 w, H-3-eq, Me-19 w, Me-20
4	41.38	-	-	-	-
5	42.87	2.09 dd	H-1-eq w, H-3-ax w, H-6-ax, H-6-eq, Me-19 w	C-1, C-3, C-4, C-6 w, C-7 w, C-9, C-10, C-18, Me-20 w	H-6-eq, H-7, Me-19 w
6	20.39	1.42-ax m	H-5, H-6-eq, H-7	C-4 w, C-5, C-7, C-10	H-6-ax, H-7, Me-19, Me-20
		1.63-eq m	H-5 w, H-6-ax H-7	C-5, C-7 w, C-8 w	H-6-eq, H-7, Me-19
7	28.65	2.49 m 2.57 m	H-6-ax, H-6-eq, H-14	C-5 w, C-6, C-8, C-9, C-14	H-6-eq, H-6-eq, H-14
8	133.78	-	-	-	-
9	148.07	-	-	-	-
10	36.05	-	-	-	-
11	123.42	6.79 d	H12	C-8, C-10, C-12, C-13	H-1-ax, H-1-eq, H-12, Me-20
12	123.98	6.94 d	H-11	C-9, C-14, C-15 w	H-11, H-15, Me-16/17
13	146.22	-	-	-	-
14	127.53	6.80 s	H-7 w	C-7, C-9, C-12, C-15 w	H-7, H-15, Me-16/17
15	34.10	2.74 sept	Me-16/17	C-12, C-13, C-14, Me-16/17	H-12, H-14, Me-16/17
16	24.34	1.22 d	H-15	C-13, C15, C-17	H-12, H-14, H-15, Me-17
17	24.34	1.22 d	H-15	C-13, C15, C-16	H-12, H-14, H-15, Me-16
18	181.14	-	-	-	-
19	17.25	1.07 s	-	C-3, C-4, C-5, C-18	H-3-ax, H-3-eq, H-5, H-6-ax, H-6-eq
20	30.59	0.89 s	-	C-1, C-5, C-9, C-10	H-1-eq, H-3-ax, H-6-ax, H-11

**Tabelle 8:** NMR-Daten von 2-Hydroxydehydroabietinsäurelacton (**E181**). (Benzol- $d_6$ ,  $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100.6 MHz,  $\delta$  in ppm relativ zu  $\delta_{\text{H}}(\text{Benzol}) = 7.16$  ppm,  $\delta_{\text{C}}(\text{Benzol}) = 128.06$  ppm, ax =axial, eq = äquatorial)

Die relative Konfiguration von 2-Hydroxydehydroabietinsäurelacton (**E181**) konnte durch die dipolaren Kopplungen der NOESY-Kreuzsignale verifiziert werden. Wichtige Kopplungen sind in Abbildung 56 dargelegt. Kopplungen der axialen Substituenten H-3<sub>ax</sub>, H-6<sub>ax</sub> und Me-20 oberhalb der Papierebene sind zusätzlich rot dargestellt, und die Kopplung des axialen Protons an H-5 unterhalb der Papierebene ist blau gekennzeichnet. Die axiale Methylgruppe Me-20 weist eine dipolare Kopplung zu H-3<sub>ax</sub> auf und beweist so die Orientierung der Methylengruppe an Position 3 zum Betrachter. Somit liegt bei **E181** die Carboxylgruppe analog zur Konfiguration von 2-Hydroxyabietinsäurelacton (**E182**) vor. Eine weitere Kopplung wird zwischen den 1,3- diaxialen Substituenten Me-20 und H-6<sub>ax</sub> beobachtet. Das Proton H-6<sub>ax</sub> koppelt unter anderem mit Me-19, welches über eine weitere Kopplung mit H-3<sub>ax</sub> verknüpft ist. Dadurch wird die axiale Ausrichtung dieser vier Substituenten belegt. Das in die Ebene orientierte Proton an Position 5 zeigt ein Signal mit H-6<sub>eq</sub>, so dass auch diese relative Konfiguration klar ist. Die relative Konfiguration steht somit in Analogie zu den bereits bestimmten Strukturen von **E176** und **E182**.

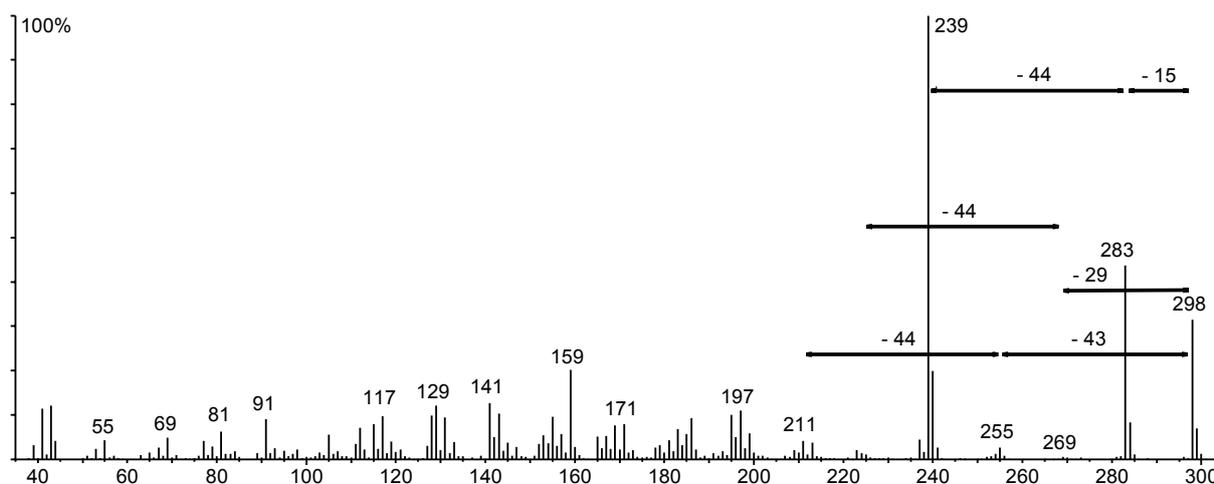
Die absolute Konfiguration wurde nicht bestimmt, jedoch ist die in Abbildung 56 abgebildete Konfiguration aus Überlegungen zur Biosynthese wahrscheinlich.



**Abbildung 56:** Struktur von **E181** mit Hervorhebung ausgewählter NOE-Kopplungen, die zur Klärung der relativen Konfiguration beitragen

## Massenspektrometrische Fragmentierung von **E181**

Auf Basis der aufgeklärten Struktur von **E181** und den Daten der Hochauflösungsmessungen können die intensivsten Fragmentationen interpretiert werden. Das Molekülion bei  $m/z$  298 spaltet vermutlich zunächst eine Methylgruppe in  $\alpha$ -Stellung zum aromatischen Ring ab, die zu einem energetisch günstigen benzylicischen Radikalkation bei  $m/z$  283 führt. Die anschließende Abspaltung von Kohlendioxid führt zum charakteristischen Basepeak bei  $m/z$  239.



**Abbildung 57:** Massenspektrum von **E181** mit Angabe wichtiger Fragmentierungsmuster

Zusätzlich ist noch schwach der Verlust von  $m/z$  29 zum Signal bei  $m/z$  269 und Verlust einer Isopropylgruppe zum Signal bei  $m/z$  255 aus dem Molekülion zu erkennen. Anschließende Eliminierung von Kohlendioxid aus dem Ion bei  $m/z$  255 führt zum Ion  $m/z$  211.

Die weitere Fragmentierung des sauerstofffreien Kohlenwasserstoffgerüsts ist wenig spezifisch, jedoch scheint auch der partielle Verlust von molekularem Wasserstoff aus dem Ion  $m/z$  197 zu  $m/z$  195 statt zu finden. Dieses könnte durch die energetisch begünstigte Ausbildung einer zum aromatischen Ring konjugierten Doppelbindung hervorgerufen werden, wodurch sich die weiteren Fragmentierungswege aufteilen. Ein Indiz für das Auftreten des Effektes der teilweisen Dehydrierung der Ionen im Massenspektrometer sind die mit der Massendifferenz 2u auftretenden weiteren Fragmentationenpaare, wie zum Beispiel  $m/z$  211 + 213,  $m/z$  169 + 171 und  $m/z$  141 + 143. Diese Ionen entstehen durch wenig charakteristische Fragmentierung aus dem verbliebenen Kohlenwasserstoffgerüst.

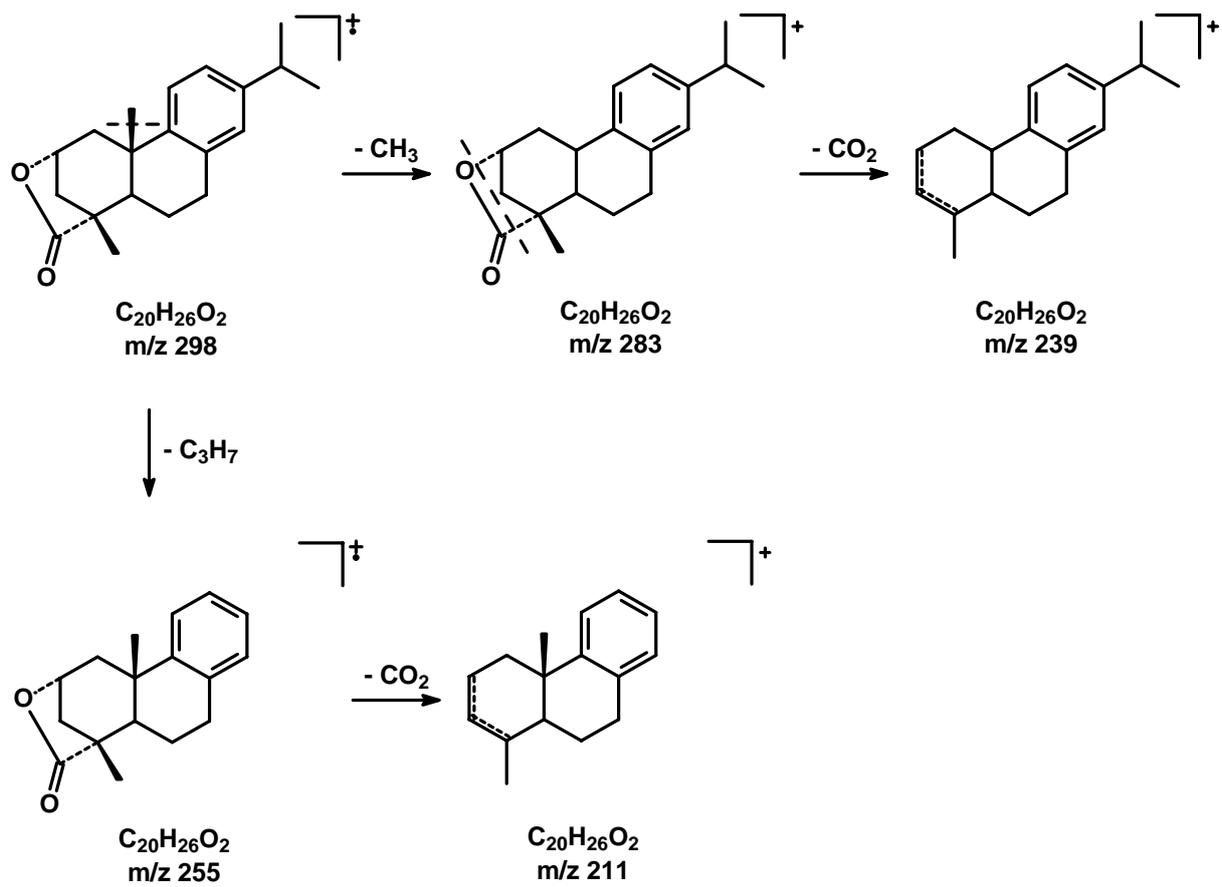


Abbildung 58: Vermutliches Fragmentierungsschema von **E181**

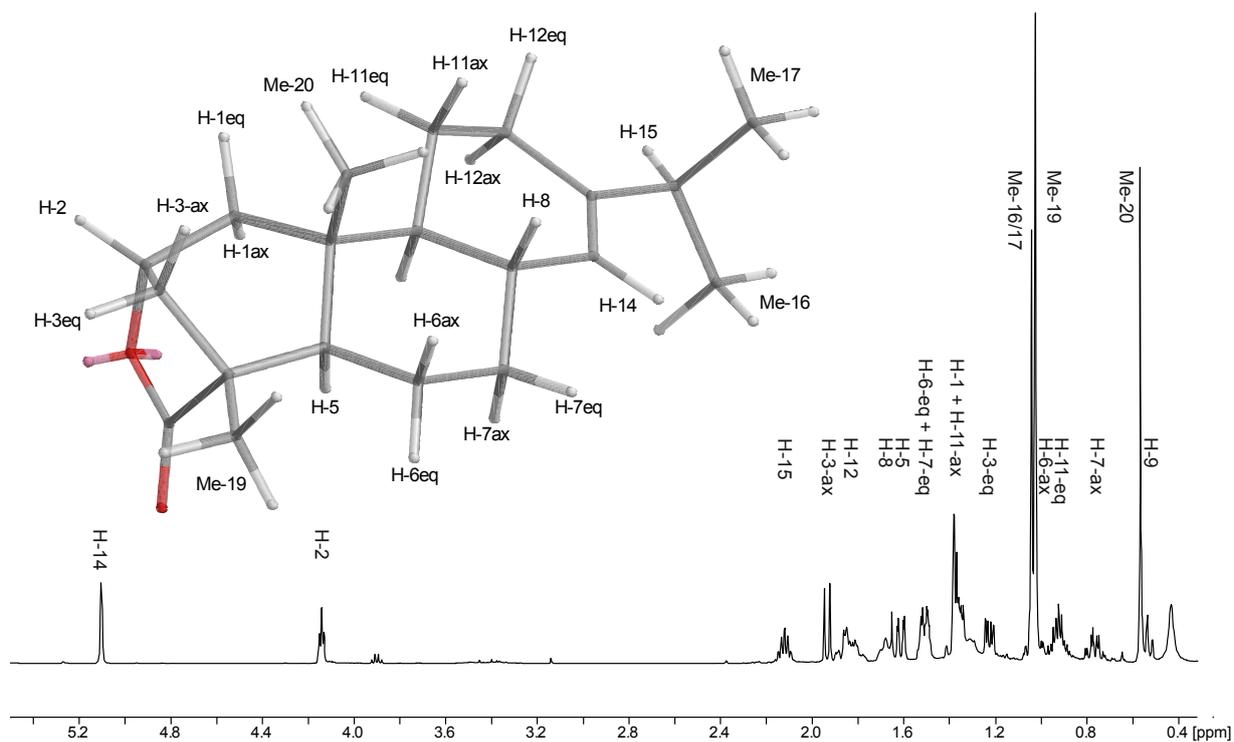
## Strukturaufklärung von Substanz **E177** durch NMR-Spektroskopie

Verbindung **E177** wurde mittels Umkehrphasen-HPLC isoliert. Die Struktur der Verbindung konnte durch ein- und zweidimensionale NMR-Experimente (500 MHz, Benzol-*d*<sub>6</sub>) als das zu **E182** strukturanaloge Diterpenlacton 2-Hydroxy-7,8-dihydroabietinsäurelacton (**E177**) aufgeklärt werden. Diese Struktur unterscheidet sich von **E182** nur durch zusätzliche Sättigung der Doppelbindung an den Positionen 7 und 8.

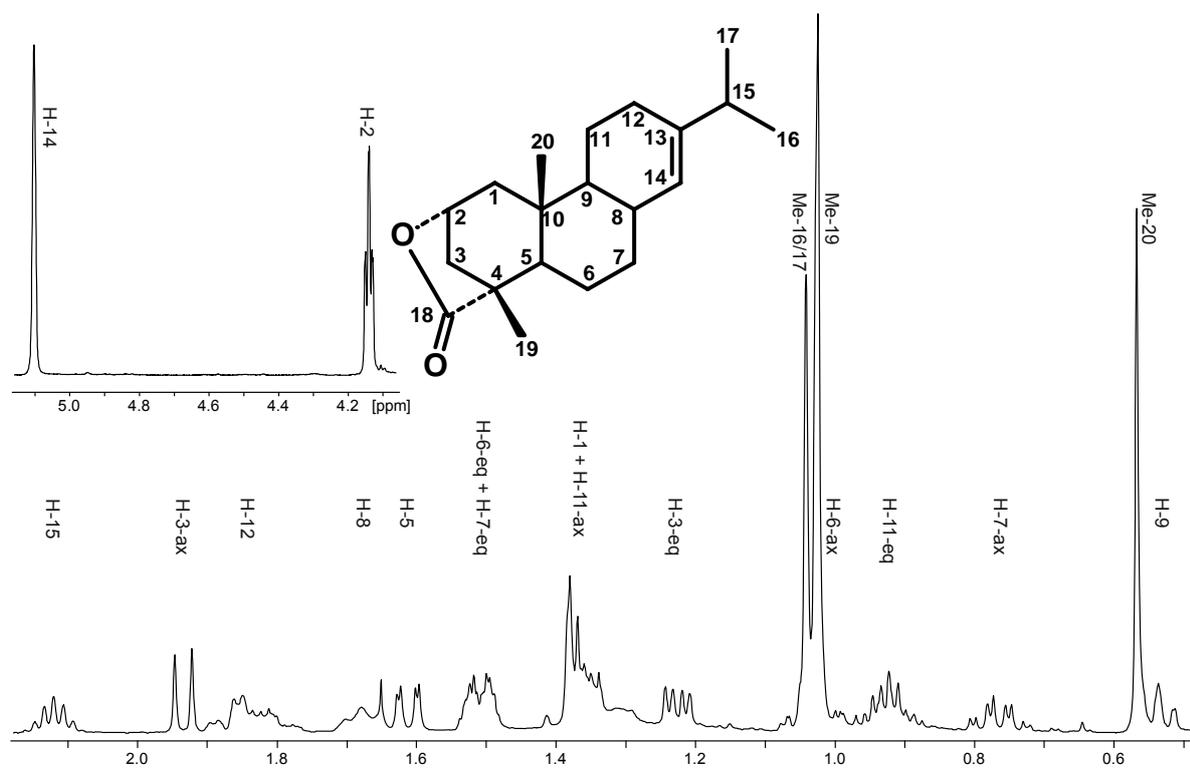
Das <sup>1</sup>H-NMR Spektrum der Substanz **E177** in Benzol (Abbildung 59) zeigt, trotz nur geringer Unterschiede der Strukturformeln zwischen **E177** und **E182**, wesentliche Unterschiede zum Spektrum der Substanz **E182**. Durch die Sättigung der Doppelbindung zwischen den Positionen 7 und 8 werden die ehemaligen vinyllischen und allyllischen Protonen H-6, H-7 und besonders stark H-9 jetzt zu höherem Feld verschoben. Zusätzlich liegt nun eine weitere diastereotope Methylengruppe an Position 7 und ein stereogenes Methinproton an Position 8 vor, wodurch das Spinsystem signifikant verändert ist.

Im Tieffeldbereich des Spektrums ist nur ein olefinisches Proton bei  $\delta_{\text{H}}=5.10$  ppm zu erkennen, wodurch eine trisubstituierte Doppelbindung nachgewiesen wird. Weiterhin zeigt das Spektrum ein Proton an einem eine Acyloxyfunktion tragendem Kohlenstoff bei  $\delta_{\text{H}}=4.14$  ppm. Das olefinische Proton zeigt nur ein breites Singulett, da das Kopplungsmuster aufgrund zu geringer Kopplungskonstanten nicht ausreichend aufgelöst werden konnte. Das Proton am Kohlenstoff, der die Acyloxygruppe trägt, erscheint als Pseudotriplett aus zwei Kopplungen mit sehr ähnlichen Kopplungskonstanten ( $^3J = 5.46$  Hz). Dieses Strukturelement ist analog zu den vorherigen Spektren der Strukturen **E177**, **E181** und **E182** mit vergleichbaren Kopplungsmustern und wurde dort hinreichend diskutiert.

Besonders signifikant im Hochfeldbereich sind die Signale von vier Methylgruppen. Zwei von ihnen ( $\delta_{\text{H}}=0.57$  und  $1.02$  ppm) sind aufgrund ihrer Singulettstruktur an quartären Kohlenstoffatomen gebunden. Die beiden anderen Methylgruppen ( $\delta_{\text{H}}=1.03$  ppm) weisen durch ihre Dublett-Struktur auf die Nachbarschaft zu einem Methinproton hin. Dabei überlagert sich das Singulett bei  $\delta_{\text{H}}=1.02$  ppm mit der rechten Flanke des Dubletts bei  $\delta_{\text{H}}=1.03$  ppm, so dass in diesem Fall die Kopplungskonstante des Dubletts nicht exakt bestimmt werden kann. Aus dem Septett des Methinprotons bei  $\delta_{\text{H}}=2.12$  ppm kann die Kopplungskonstante von  $J = 6.8$  Hz bestimmt werden, so dass als Strukturelement eine an einen quartären Kohlenstoff gebundene Isopropylgruppe bewiesen ist.



**Abbildung 59:** 500 MHz- $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des 2-Hydroxy-7,8-dihydroabietinsäurelactons (**E177**) in Benzol- $d_6$  mit räumlicher Darstellung und hier angewandter Nummerierung



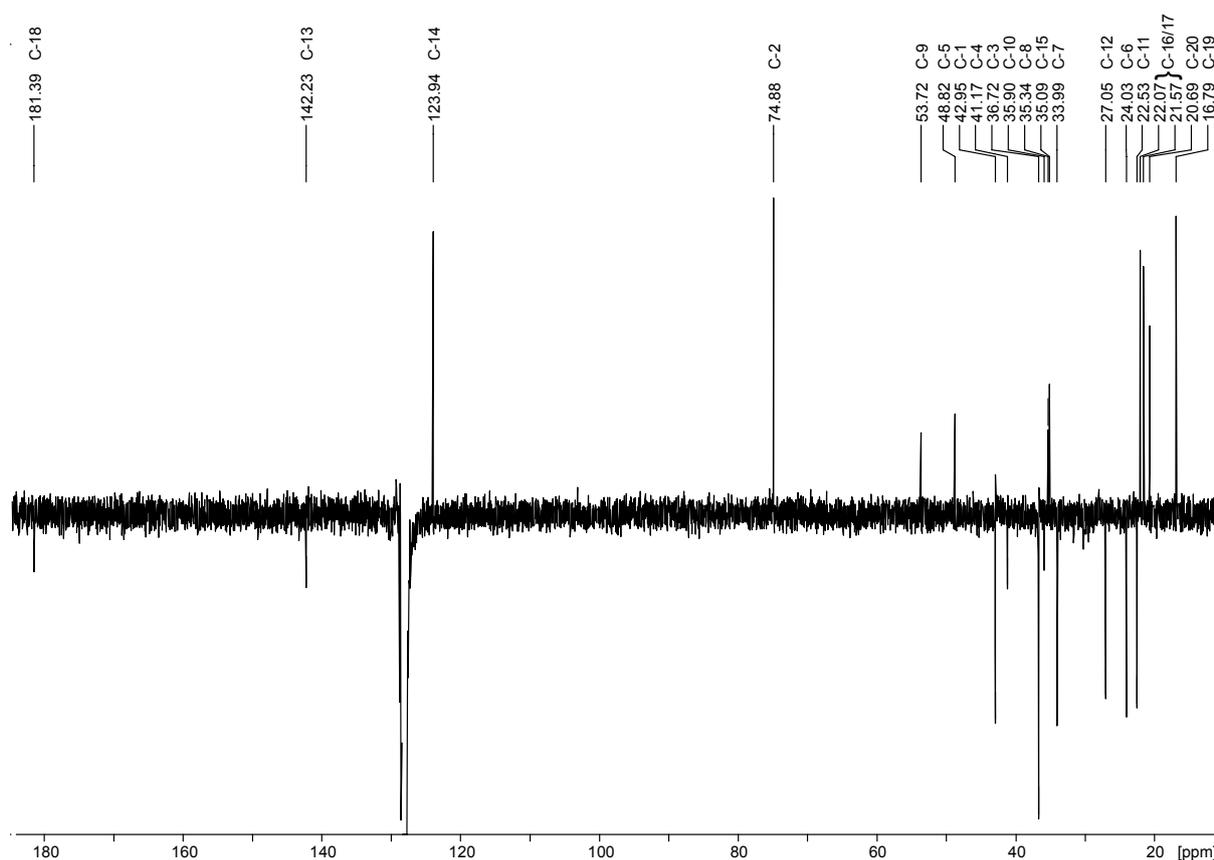
**Abbildung 60:** Vergrößerte Ausschnitte des 500 MHz- $^1\text{H}$ -NMR Spektrums von **E177** in Benzol- $d_6$  und Strukturformel mit angewandter Nummerierung

Aufgrund von Überlagerungen zwischen H-1 und H-11<sub>ax</sub> im Bereich  $\delta_{\text{H}} = 1.35\text{-}1.38$  ppm können aus dem Spinsystem der Positionen 1 - 3 nur die Kopplungskonstanten der Kopplung zwischen H-2 und H-3 bestimmt werden. Das Proton H-3<sub>ax</sub> liegt bei  $\delta_{\text{H}} = 1.93$  ppm und zeigt ein Dublett, das aus der geminalen Kopplung mit der Kopplungskonstanten  ${}^2J = 12.0$  Hz herrührt. Das äquatoriale Proton bei  $\delta_{\text{H}} = 1.23$  ppm ist durch die zusätzliche Kopplung mit dem Proton H-2 zu einem Dublett eines Dubletts aufgespalten ( ${}^3J = 5.4$  Hz,  ${}^2J = 12.0$  Hz). Die weiteren Signale liegen als Multiplett vor, so dass durch Analyse der Kopplungskonstanten keine weiteren Strukturinformationen zu erhalten sind.

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR Pendant-Experiment des 2-Hydroxy-7,8-dihydroabietinsäurelactons (**E177**) zeigt die Signale aller 20 Kohlenstoffe. Das Carboxylkohlenstoffatom aus dem Lactonring weist eine chemische Verschiebung von 181.39 ppm auf. Bei 142.23 ppm liegt das quartäre olefinische Kohlenstoffatom. Der tertiäre olefinische Kohlenstoff ist bei 123.94 ersichtlich. Schließlich weist die chemische Verschiebung von 74.88 ppm auf das tertiäre Kohlenstoffatom an Position 2 hin, der die Acyloxygruppe trägt.

Alle Signale des Protonenspektrums konnten durch Auswertung des HMQC-Spektrums ihren korrespondierenden Signalen im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zugeordnet werden.

Die Verknüpfungsreihenfolge der Signale konnte anhand der zweidimensionalen COSY90- und HMBC-Spektren identifiziert werden. Ihre Zuordnung, sowie die Korrelationen, welche die Konstitution von **E177** beweisen, sind in Tabelle 9 wiedergegeben.



**Abbildung 61:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von 2-Hydroxy-7,8-dihydroabietinsäurelacton (**E177**), (100.6 MHz, Benzol- $d_6$ )

Pos	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	COSY90	HMBC	NOESY
1	42.95	1.38 m <sup>a</sup>	H-2	C-2, C-5, C-9, C-10, Me-20	H-1-gem, H-2, Me-20
2	74.88	4.14 dd	H-1, H-3-eq, H-3-ax	C-4, C-10, C-18	H-1, H-3-eq, H-3-ax w
3	36.72	1.23-eq dd	H-2, H-3-ax	C-1, C-2, C-4, C-5, C-18, C-19	H-2 w, H-3-ax,
		1.93- ax d	H-2 w, H-3-eq	C-2, C-4, C-5, C-18	H-2 w, H-3eq, Me-19 w, Me-20
4	41.17	-	-	-	-
5	48.82	1.61 dd	H-6-ax, H-6-eq	C-1 w, C-3 w, C-4, C-6, C-7, C-9, C-10 w, C-18, C-20	H-6-eq, H-7-ax, H-9, Me-19 w
6	24.03	1.50-eq m <sup>b</sup> 1.01-ax m	H-6-ax, H-7-ax H-5-ax, H-6-eq H-7-ax	C-4, C-5, C-8, C-10 C-4, C-5, C-10	H-7-eq, Me-19 H-6-eq, H-7-eq
7	33.99	0.76-ax m 1.51-eq m <sup>b</sup>	H-6-ax, H-7-eq, H-8 H-7-ax, H-8 w	C-5, C-6, C-8, C-9, C-14 C-5, C-6, C-8, C-9, C-14	H-5-ax w, H-6-eq, H-7-eq H-7-ax, H-14 w
8	35.34	1.68 m	H-7-ax, H-7-eq, H-9, H-12 w, H-14	-	H-20
9	53.72	0.54 m	H-8, H-11-eq, H-11-ax,	C-1 w, C-5, C-8 w, C- 10, C11 w, C-12, C-20	H-1, H-5, H-7-ax w, H-11-eq w H-12 w
10	35.90	-	-	-	-
11	22.53	1.35-ax <sup>a</sup> m 0.92-eq m	H-9, H-11eq, H-12	C-10, C-13 C-8, C-9, C-12	H-11-eq, H-12 w H-9 w, H-11-ax, H-12 w
12	27.05	1.83 m	H-9, H-11ax, H-12-gem	C-9, C-11, C-13, C-14	H-11-eq, H-12-gem, Me-16/17 w
13	142.23	-	-	-	-
14	123.94	5.10 s (br)	H-8, H-12, H-15	C-7 w, C-9, C-12, C-15	H-7-eq, H-7-ax w, H-8, H-12 w, H-15, Me-16/17
15	35.09	2.12 sept	H-14, Me-16/17	C-12, C-13, C-14, C-16, C-17	H-14, Me-16/17
16	22.07	1.03 d	H-15	C-13, C15, C-17	H-12, H-14, H-15
17	21.57	1.03 d	H-15	C-13, C15, C-16	H-12, H-14, H-15
18	181.39	-	-	-	-
19	16.79	1.02 s	-	C-3, C-4, C-5, C-18	H-3-eq, H-3-ax w, H-5-eq, Me-20 w
20	20.69	0.57 s	-	C-1, C-5, C-9, C-10	H-1, H-3-ax, H-8, H-11-eq, H-11-ax, Me-19

**Tabelle 9:** NMR-Daten von 2-Hydroxy-7,8-dihydroabietinsäurelacton (**E177**). (Benzol-*d*<sub>6</sub>, <sup>1</sup>H: 500 MHz, <sup>13</sup>C: 100.6 MHz,  $\delta$  in ppm relativ zu  $\delta_{\text{H}}(\text{Benzol}) = 7.16$  ppm,  $\delta_{\text{C}}(\text{Benzol}) = 128.06$  ppm, ax =axial, eq = äquatorial)

<sup>a</sup> H-1 und H-11-ax teilweise überlagert

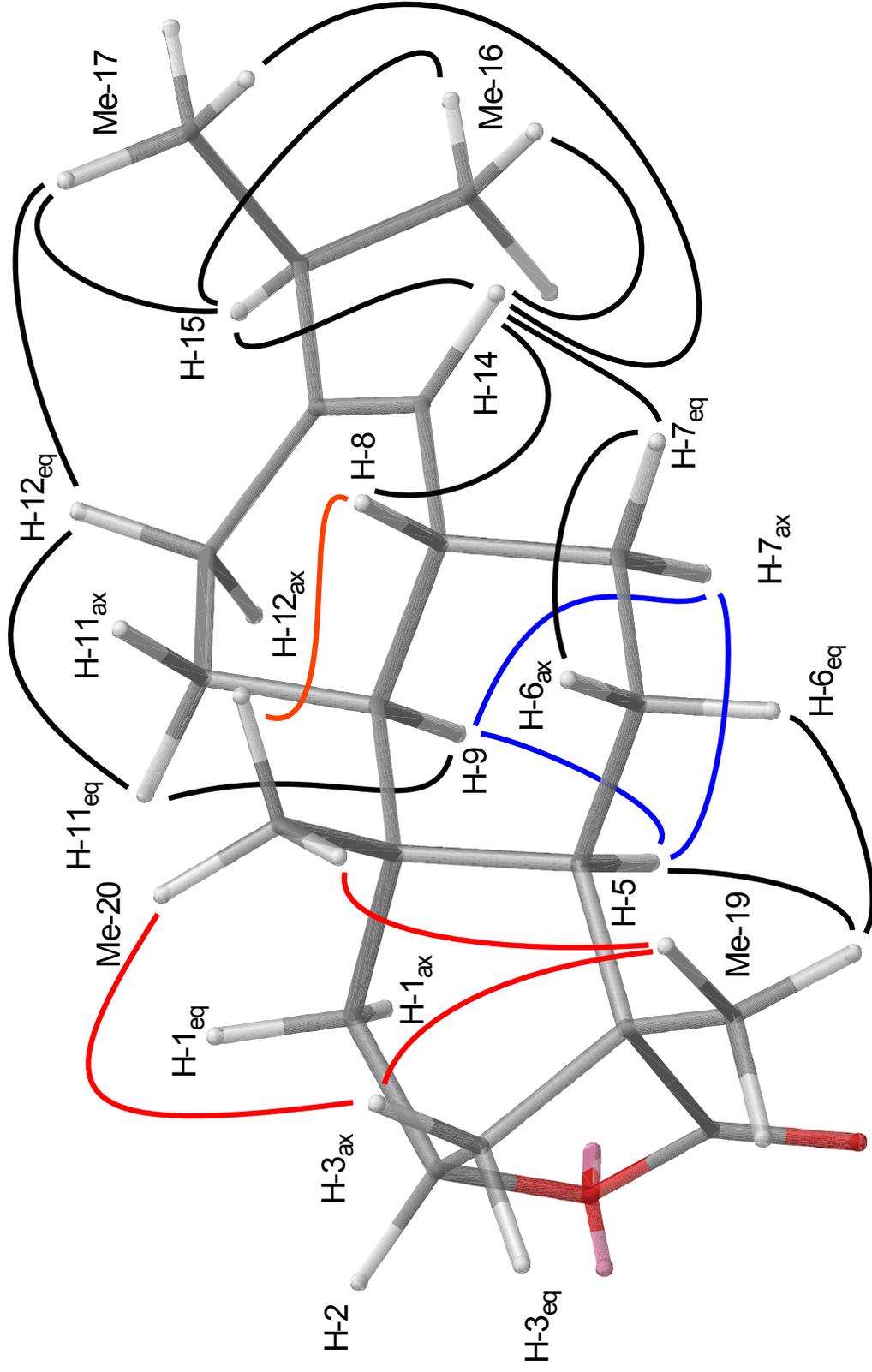
<sup>b</sup> H-6-eq und H-7-eq teilweise überlagert

Durch die Auswertung der Daten aus dem NOE-Experiment konnte die relative Konfiguration analog zu den Darstellungen in Abbildung 59 und Abbildung 60 abgesichert werden. Ausgewählte dipolare Kopplungen sind zusätzlich in Abbildung 62 gekennzeichnet, wobei auch hier wichtige Kopplungen oberhalb der Papierebene rot und die Kopplungen unterhalb der Papierebene blau gekennzeichnet wurden.

Die relative Konfiguration in den Ringen 1 und 2 kann durch zwei Gruppen von Substituenten mit unabhängigen dipolaren Kopplungen bestimmt werden. In der ersten Gruppe der Substituenten mit Orientierung aus der Papierebene hinaus werden Kopplungen der axialen Methylgruppe Me-20 mit H-3<sub>ax</sub> und Me-19, die auch jeweils untereinander Kopplungen aufweisen, beobachtet. Dadurch kann die Konfiguration des überbrückten Ringes A verifiziert werden. Zusätzlich ist noch das Signal einer Kopplung der Methylgruppe Me-20 mit dem axialen H-8 zu beobachten, wodurch eine *cis*-Verknüpfung der Ringe 2 und 3 belegt ist. Die in die Ebene hineingerichteten axialen Substituenten H-5, H-7<sub>ax</sub> und H-9 weisen jeweils Kopplungen untereinander auf, die komplementär zu obigen Kopplungen sind und die dargestellte Konfiguration absichern.

Wie bei den Diterpenlactonen **E177**, **E181** und **E182** stimmt die ermittelte relative Konfiguration der Struktur **E176** mit der von natürlicher Abietinsäure überein. Allerdings ist eine 7,8-Dihydroform der Abietinsäure (**46**) nicht aus der Biosynthese des Abietangerüsts bekannt. Über Zeitpunkt und Art der Reduktion der Doppelbindung zwischen Position 7 und 8 kann keine Aussage getroffen werden. Da das NOESY die relative Konfiguration belegt, muß die Hydrierung enantioselektiv erfolgen.

Die absolute Konfiguration wurde nicht ermittelt. Die abgebildete Konfiguration ist aufgrund der Herkunft des Precursor Abietinsäure (**46**) aus der enantioselektiven Biosynthese der Diterpengerüste wahrscheinlich.



**Abbildung 62:** Struktur von **E177** mit Hervorhebung ausgewählter NOE-Kopplungen, die zur Klärung der relativen Konfiguration beitragen

## Massenspektrometrische Fragmentierung von E177

Die Fragmentierung von 2-Hydroxy-7,8-dihydroabietinsäurelacton (E177) kann folgendermaßen erklärt werden. Neben der untergeordneten Abspaltung einer Methylgruppe zu  $m/z$  287 werden aus dem Molekülion zunächst das Neutralteilchen Kohlendioxid zu  $m/z$  258 eliminiert und dann die Isopropylgruppe zum Ion  $m/z$  215 abgespalten. Eine geringfügige Fragmentierungstendenz des Ions  $m/z$  258 zu  $m/z$  243 durch Verlust einer Methylgruppe aus dem Radikalkation ist ebenfalls ersichtlich. Der aufeinander folgende Verlust von Kohlendioxid und Isopropylgruppe aus dem Molekülion läuft auch in umgekehrter Reihenfolge über das Tochterion  $m/z$  259 zu  $m/z$  215 ab. Bei Abspaltung der Isopropylgruppe bildet sich unter Umlagerung der Doppelbindung im Ring 3 vermutlich das energetisch günstige Allylkation.

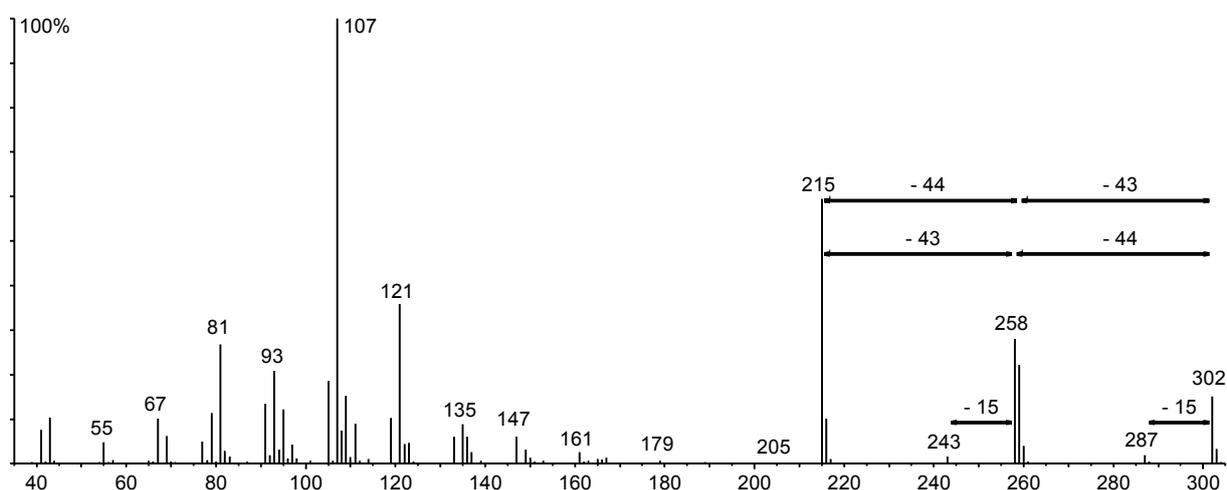
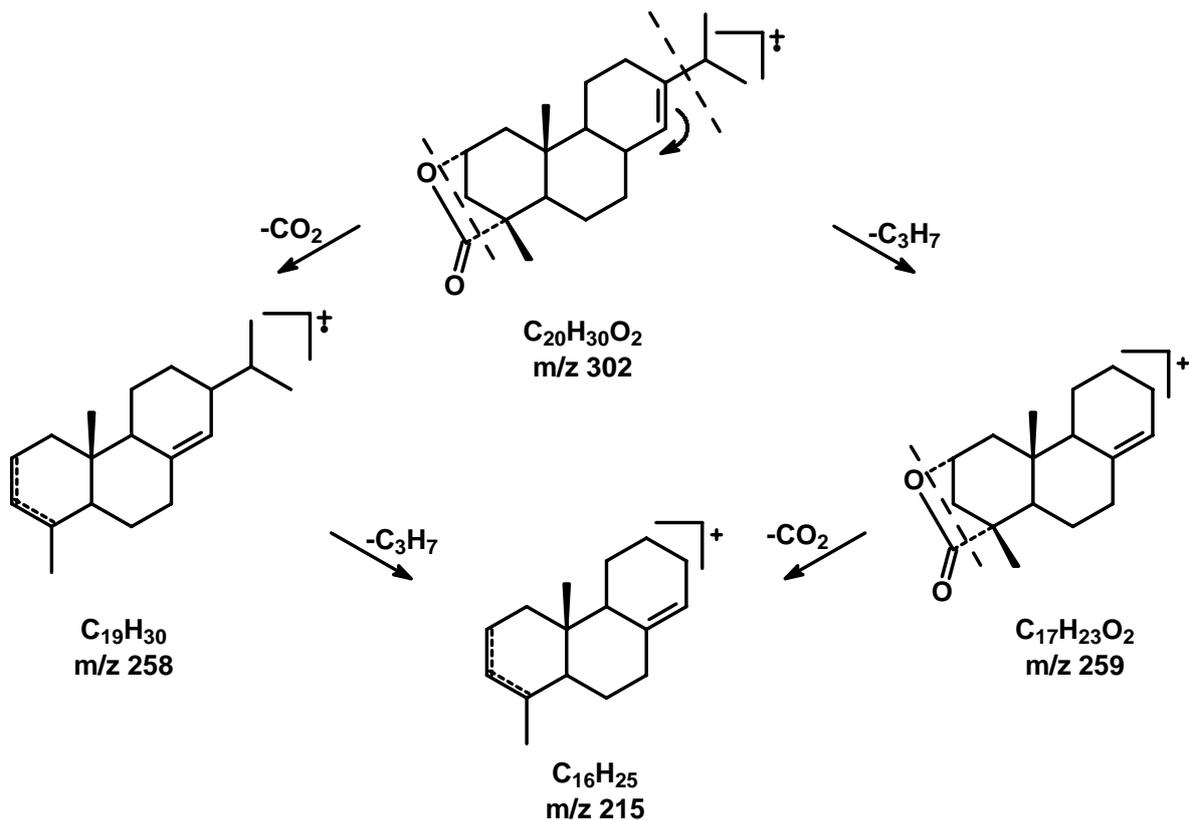


Abbildung 63: Massenspektrum von E177 mit Angabe wichtiger Fragmentierungsmuster

Interessanterweise ergab die Bestimmung der atomaren Zusammensetzung für das Radikalkation  $m/z$  258 zwei Ergebnisse. Das Signal wird von den Ionen mit der Zusammensetzung  $C_{17}H_{22}O_2$  und  $C_{19}H_{30}$  (siehe Tabelle 4) hervorgerufen. Somit scheint auch teilweise die ungewöhnliche Abspaltung von Propan aus dem Molekülion vorzuliegen. Die weitere Fragmentierung des Fragmentions  $m/z$  215, welches ein reines Kohlenwasserstoffgerüst besitzt, wurde nicht untersucht.



**Abbildung 64:** Vermutliches Fragmentierungsschema von **E177**

Signifikant ist die Abweichung des Fragmentierungsmusters im Massenbereich um  $m/z$  100. Die bislang untersuchten Diterpenlactone **E176**, **E181** und **E182** fragmentieren zu Ionen, die vermutlich einen aromatischen Ring beinhalten ( $m/z$  91 für Tropylium- / Benzylion und  $m/z$  105 für das Methyltropylium- / Methylbenzylion).

2-Hydroxy-7,8-dihydroabietinsäurelacton (**E177**), mit nur einer Unsatigung im Molekülgerüst, zeigt als Basispeak im Massenspektrum das Ion  $m/z$  107. Hierbei dürfte es sich um ein Dimethylcyclohexadienradikal handeln, das unter Verlust einer Methylgruppe zu einem Methylcyclohexadienradikal mit  $m/z$  93 fragmentieren kann.

### **Strukturvorschläge für die Spurenkomponenten E175, E178, E179 und E184**

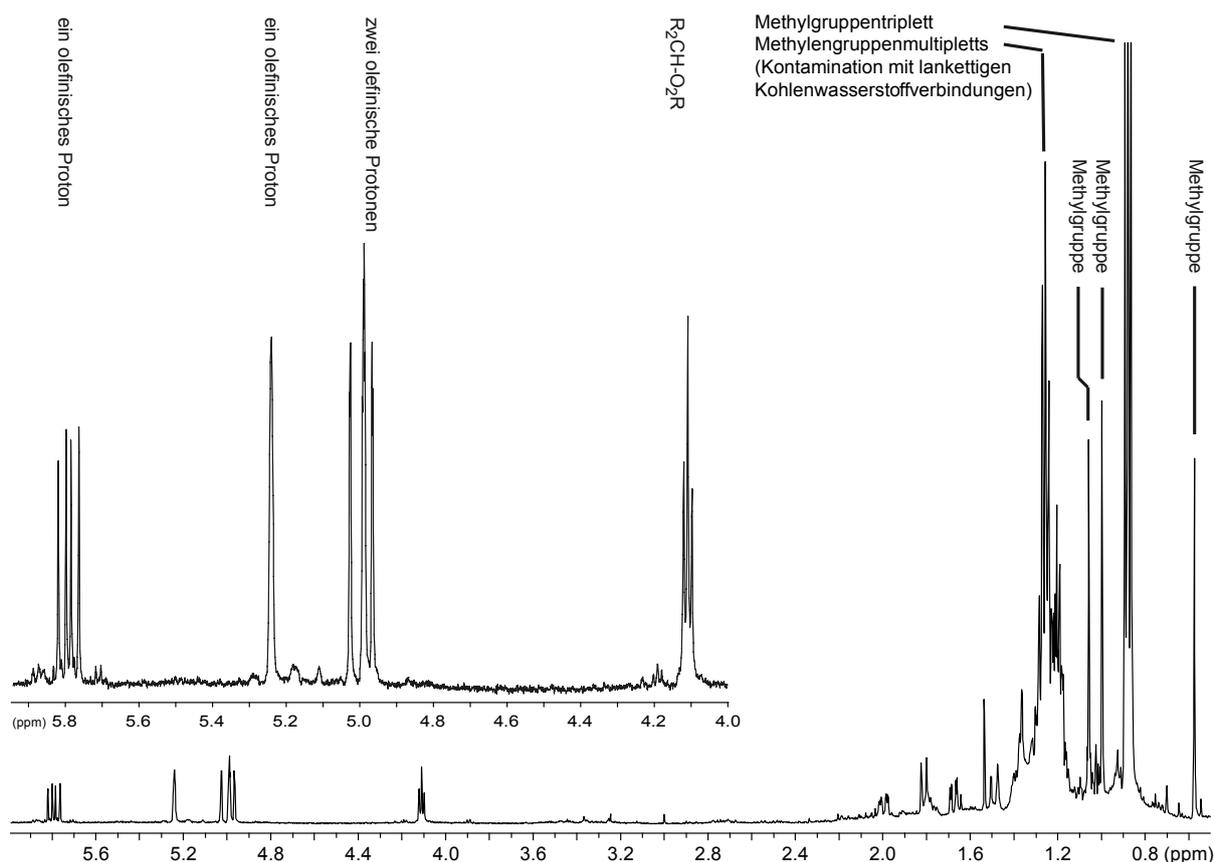
Die Verbindungen **E175**, **E178**, **E179** und **E184** konnten aufgrund ihrer zu geringen Konzentration im Elefantenerin nicht in ausreichender Menge abgetrennt werden. Für die Verbindung **E175** liegen NMR-Daten vor, jedoch reichte die isolierte Substanzmenge nicht für eine ausreichende NMR-Charakterisierung.

Alle Verbindungen dieses Substanzclusters zeigen sowohl an polaren und unpolaren Kapillarsäulen bei der Gaschromatographie als auch an Umkehrphasen bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ähnliche Retentionszeiten. Diese Substanzen haben daher vergleichbare Polaritäten sowie Siedepunkte und sind daher vermutlich strukturverwandte Diterpenlactone.

Für Verbindung **E175** werden im Folgenden die Ergebnisse NMR-spektroskopischer Untersuchungen diskutiert. Unter zusätzlicher Berücksichtigung der massenspektrometrischen Daten wird ein Strukturvorschlag erstellt. Weiterhin werden Strukturvorschläge für die Komponenten **E178**, **E179** und **E184** anhand ihrer Massenspektren diskutiert.

## Diskussion eines Strukturvorschlags für die Verbindung **E175**

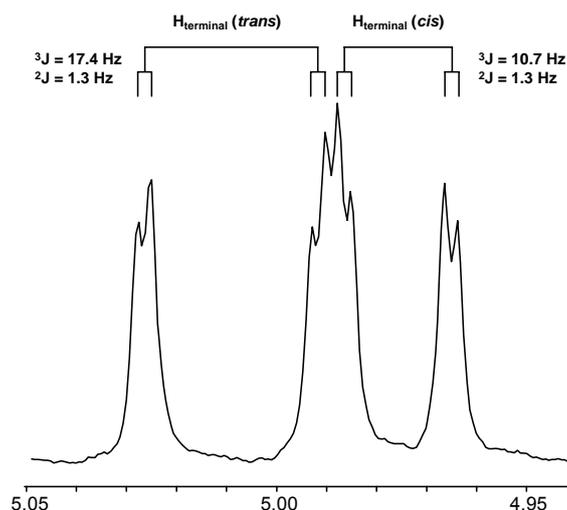
Verbindung **E175** konnte durch präparative HPLC aus dem Extrakt abgetrennt werden. Diese Fraktion wurde trotz ihrer geringen Menge mit kernmagnetischer Resonanz untersucht. Das 500 MHz- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Komponente **E175** zeigt im Tieffeldbereich vier sauber aufgelöste und separierte Signale, deren Integrale vom tiefen Feld aus gesehen ein Verhältnis von 1:1:2:1 besitzen.



**Abbildung 65:** 500 MHz- $^1\text{H}$ -NMR Spektrum der Komponente **E175** in Benzol- $d_6$

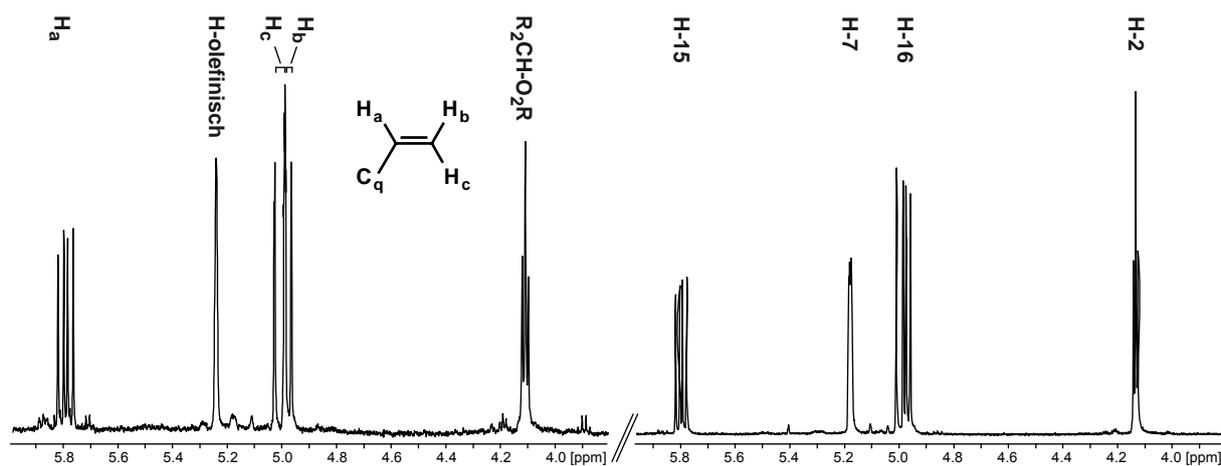
Anhand der chemischen Verschiebungen kann auf vier olefinische Protonen in den Signalen bei 5.79, 5.24 und 4.99 ppm geschlossen werden. Bei 4.11 ppm liegt ein Proton an einem eine Acyloxyfunktion tragendem Kohlenstoff. Daher liegen in diesem Molekül mindestens zwei Doppelbindungen vor. Das Signal des olefinischen Protons bei 5.79 ppm ist ein Dublett eines Dubletts, dessen Kopplungskonstanten  $^3J = 17.4$  und  $^3J = 10.7$  Hz lauten.

Bei detaillierter Interpretation des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums zeigt sich, dass das Signal bei 4.99 ppm aus zwei Dubletts hervorgeht, deren Signalmitte bei 5.01 und 4.98 ppm liegt. Obwohl sich die jeweils inneren Arme der Dubletts überlagern, können die Kopplungskonstanten mit  $^3J = 17.4$  Hz und  $^3J = 10.7$  Hz identisch zum Signal bei 5.79 ppm bestimmt werden. Eine weitere feine Aufspaltung tritt durch eine Kopplung mit einer Kopplungskonstanten von  $^2J = 1.3$  Hz auf.



**Abbildung 66:** Kopplungskonstanten der terminalen olefinischen Protonen von **E175** im  $^1\text{H}$ -NMR

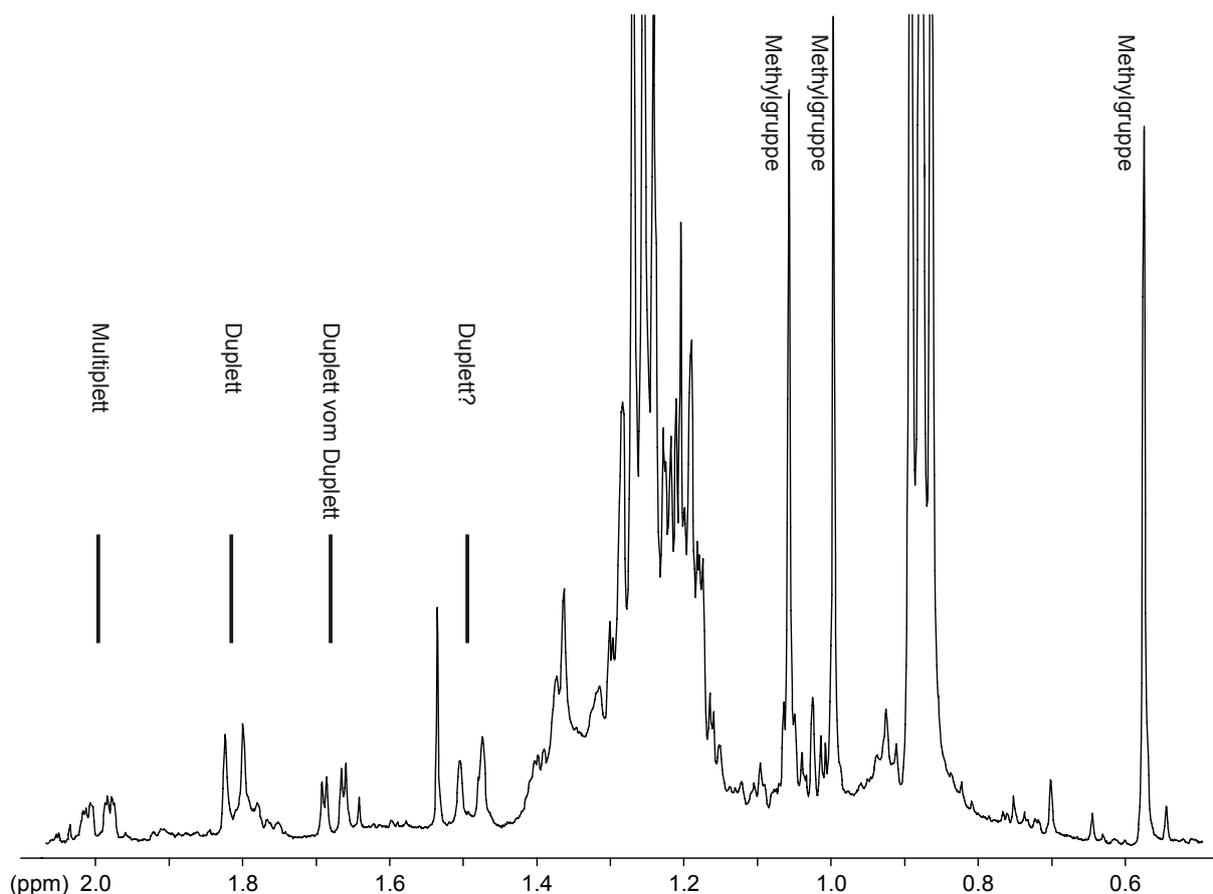
Das Auftreten der gleichen Kopplungskonstanten in den separierten Signalen bei 5.79, 5.01 und 4.98 ppm weist diese als Kopplungspartner aus. Da keine weiteren Kopplungen zu beobachten sind, handelt es sich um ein abgeschlossenes Spinsystem. Die größere Kopplungskonstante ( $^3J = 17.4$  Hz) ist typisch für eine *trans*-Kopplung und die kleinere ( $^3J = 10.7$  Hz) für eine *cis*-Kopplung in einem Olefin. Daraus ergeben sich für das Proton bei 5.01 ppm (Kopplungskonstante  $^3J = 17.4$  Hz) die *trans*- und für das Signal bei 4.98 ppm (Kopplungskonstante  $^3J = 10.7$  Hz) die *cis*-Anordnung zum Proton bei 5.79 ppm. Die kleine Aufspaltung der Signale 5.01 und 4.98 ppm von  $^2J = 1.3$  Hz wird durch deren geminale Kopplung hervorgerufen und ist zusätzlich charakteristisch für eine olefinische Methylengruppe. Es kann somit, wie bei dem bereits identifizierten 2-Hydroxyisopimarsäurelacton (**E176**), von einem Strukturelement eines Ethenylsubstituenten an einem quartären Kohlenstoffatom ausgegangen werden.



**Abbildung 67:** Gegenüberstellung der  $^1\text{H}$ -NMR-Tieffeldbereiche von unbekannter Struktur **E175** und 2-Hydroxyisopimarsäurelacton (**E176**)

Substanz **E175** und 2-Hydroxyisopimarsäurelacton (**E176**) weisen in den Tieffeldbereichen der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren sehr ähnliche Signalintegrale und Multiplizitäten bei leicht veränderten chemischen Verschiebungen in Benzol- $d_6$  auf. So liegen in den Spektren von **E175** und **E176**, zusätzlich zu den Protonen der Ethenylgruppe, noch ein olefinisches Proton mit nicht aufgelösten Kopplungen bei 5.24 ppm (5.18 ppm bei **E176**) und das Pseudotriplett eines Protons bei 4.11 ppm (4.13 ppm bei **E176**) mit einer gemittelten Kopplungskonstanten von 5.7 Hz (5.5 Hz bei **E176**) vor. Das Proton bei 4.11 ppm könnte analog zu **E176** an einem eine Acyloxygruppe tragenden Kohlenstoff hängen

Die Signale im Hochfeldbereich des  $^1\text{H}$ -Spektrums werden von einem Triplett bei 0.88 ppm und einem Multiplett bei 1.26 ppm dominiert und überlagert (Abbildung 68), die aus einer Verunreinigung der Probe resultieren dürften. Solche chemischen Verschiebungen treten bei langkettigen linearen Kohlenwasserstoffen auf. Dennoch konnten im Hochfeldbereich drei Methylgruppen bei 0.57, 1.00 und 1.06 ppm erkannt werden, die zu der Zielsubstanz gehören. Aus deren Singulettstruktur kann auf eine Substitution an quartären Kohlenstoffatomen geschlossen werden. Weiterhin sind ein Multiplett bei 2 ppm (möglicherweise auch ein ddd-System mit  $J_1 = 14.6$  Hz,  $J_2 = 4.6$  Hz und  $J_3 = 1.9$  Hz), ein Dublett bei 1.81 ppm ( $J = 12$  Hz), ein Dublett eines Dubletts bei 1.68 ppm ( $J_1 = 12$  Hz und  $J_2 = 3.2$  Hz) und ein weiteres mögliches Dublett bei 1.49 ppm ( $J = 5.5$  Hz) zu erkennen. Weitere strukturelle Informationen lassen sich aus dem  $^1\text{H}$ -Spektrum nicht ablesen.



**Abbildung 68:** Hochfeldbereich des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **E175** mit Überlagerung durch eine aliphatische Verunreinigung

Zweidimensionale NMR-Spektroskopie erbrachte wichtige zusätzliche Informationen. Im  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY konnte das Spinsystem der Ethenylgruppe am quartären Kohlenstoff abgesichert werden. Die olefinischen Protonen der chemischen Verschiebungen 4.98, 5.01 und 5.79 ppm koppeln ausschließlich miteinander.

Das olefinische Proton bei 5.24 ppm koppelt hingegen zu einem Dublett bei 1.8 ppm und zu Signalen bei 1.37 und 1.24 ppm, die nicht zuzuordnen sind.

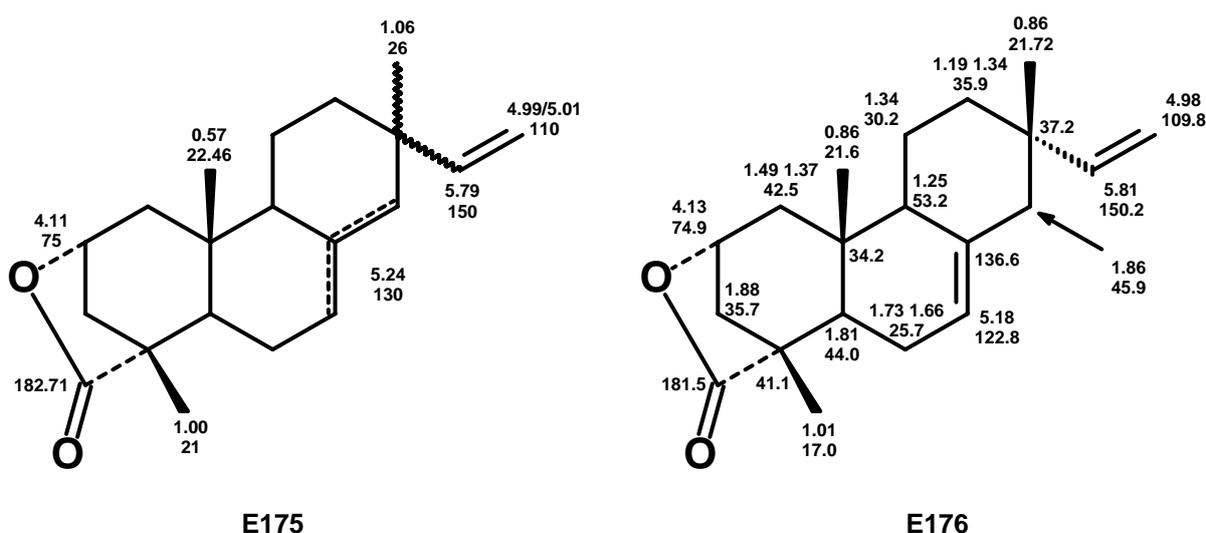
Das Proton am Kohlenstoff, der die Acyloxyfunktion trägt, koppelt zu Signalen bei 1.25-1.30 ppm und 1.15-1.20 ppm, die jedoch durch die Kontamination ebenfalls überlagert sind. Das HMQC kann einige Protonensignale den chemischen Verschiebungen im  $^{13}\text{C}$ -NMR zuordnen. Diese Korrelationen sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Protonen der Methylgruppe bei 1.00 ppm korrelieren im HMBC-Spektrum mit einem Kohlenstoff der chemischen Verschiebung von 182 ppm. Dadurch wird das quartäre Kohlenstoffatom einer Carboxylgruppe indirekt nachgewiesen.

Weitere Kreuzsignale sind für die Methylgruppenprotonen bei 1.06 ppm mit 150 und 130 sowie schwächer mit 110 ppm zu erkennen. Zusätzlich kann eine Korrelation zwischen dem Proton eines Kohlenstoffs, der eine Acyloxyfunktion trägt, und dem (vermutlichen) Carboxylkohlenstoff bei 181 beobachtet werden.

$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$J$ [Hz]
0.57 s	22.46	-
1.00 s	21	-
1.06 s	26	-
1.68	47.6	12 / 3.2
1.81 d	36.3	12
2.00 ddd	35.2	14.6 / 4.6 / 1.9
4.11 dd	75	5.7
4.99 dd ( <i>E</i> )	110	10.7 / 1.3
5.01 dd ( <i>Z</i> )		17.4 / 1.3
5.24 m	130	-
5.79 dd	150	17.4 / 10.7
-	182.71	

**Tabelle 10:** Vermutliche NMR-Korrelationen der Substanz **E175**

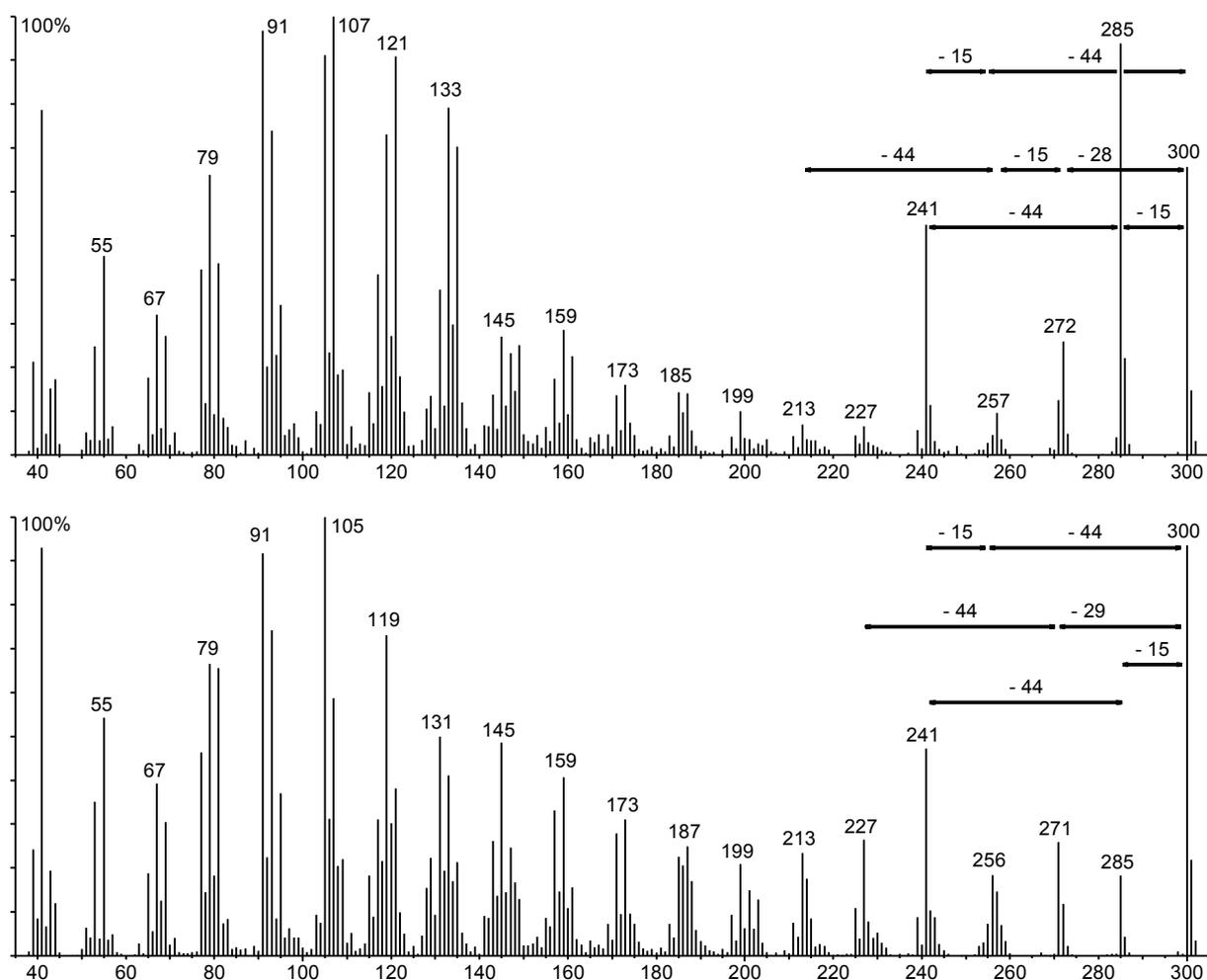
Diese Daten stützen den Vorschlag, dass es sich bei der unbekanntten Verbindung **E175** um ein Isomer des 2-Hydroxyisopimarsäurelactons (**E176**) handelt. Als Strukturvorschlag für **E175** wird somit ein 2-Hydroxypimarsäurelacton mit unbekannter Lage einer Doppelbindung im Ringsystem und unbekannter Konfiguration an C-13 formuliert:



**Abbildung 69:** Unbekannte Verbindung **E175** mit unbekannter Lage einer Doppelbindung im Ringsystem und unbekannter Konfiguration an C-13 im Vergleich mit 2-Hydroxyisopimarsäurelacton (**E176**)

Auch der Vergleich der Massenspektren zeigt sehr ähnliche Fragmentierungen. Lediglich im höheren Massenbereich weichen die Intensitäten der Fragmentionen und teilweise auch einzelne Masse / Ladung-Verhältnisse ( $m/z$ ) ab.

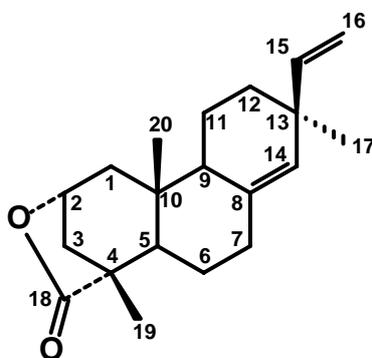
Vermutlich ist Substanz **E175** ein Epimer von **E176**, mit inverser Stereochemie am Kohlenstoff 13 und spaltet bevorzugt eine Methylgruppe zu  $m/z$  285, gefolgt von Kohlendioxid zu  $m/z$  241 ab. Die vorliegende Eliminierung von Ethen aus dem Molekulation zu  $m/z$  272 wird nur bei **E175** beobachtet. Aus der weiteren Fragmentierung dieses Radikalkations kann auch das Fragmentation  $m/z$  257 erklärt werden. Die veränderte Konfiguration an C-13 von **E175** kann der Grund für die beobachtete Eliminierung von Ethen aus dem Molekulation sein, da die axiale Konfiguration der Ethenylgruppe energetisch ungünstig ist und der Verlust des Neutralteilchen in einer Umlagerungsreaktion durch räumliche Nähe zum Ringsystem ermöglicht werden könnte.



**Abbildung 70:** Vergleich der massenspektrometrischen Fragmentierung:

Oben: Unbekanntes 2-Hydroxyharzsäurelacton (**E175**) / Unten: 2-Hydroxyisopimarsäurelacton (**E176**)

Aufgrund der chromatographischen, kernmagnetischen und massenspektrometrischen Daten in Kombination mit der natürlichen Verfügbarkeit der Pimarsäure als Precursor kann als Strukturvorschlag 2-Hydroxypimarsäurelacton als das Lacton der an Position 2 hydroxylierten Pimarsäure (**51**) für die Verbindung **E175** postuliert werden ( $C_{20}H_{28}O_2$ ,  $M = 300$  g/mol).



**E175**

**Abbildung 71:** 2-Hydroxypimarsäurelacton als Strukturvorschlag für die Verbindung **E175**

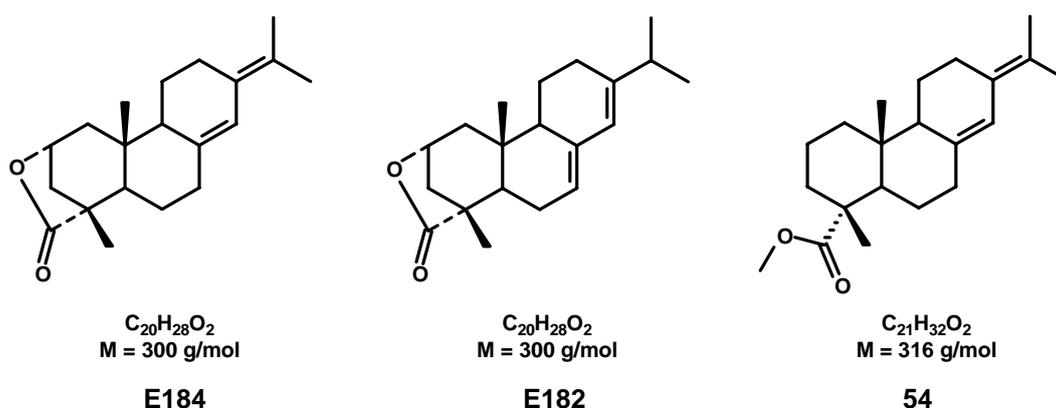
## Diskussion eines Strukturvorschlags für die Verbindung **E184**

Von der Verbindung **E184** konnten keine NMR-spektroskopischen Daten aufgenommen werden, da die Isolierung mittels chromatographischer Methoden aufgrund der geringen Konzentrationen in der Probe nur unzureichende Mengen ergab. Es dürfte sich aber bei dieser Substanz ebenfalls um ein Diterpenlacton handeln.

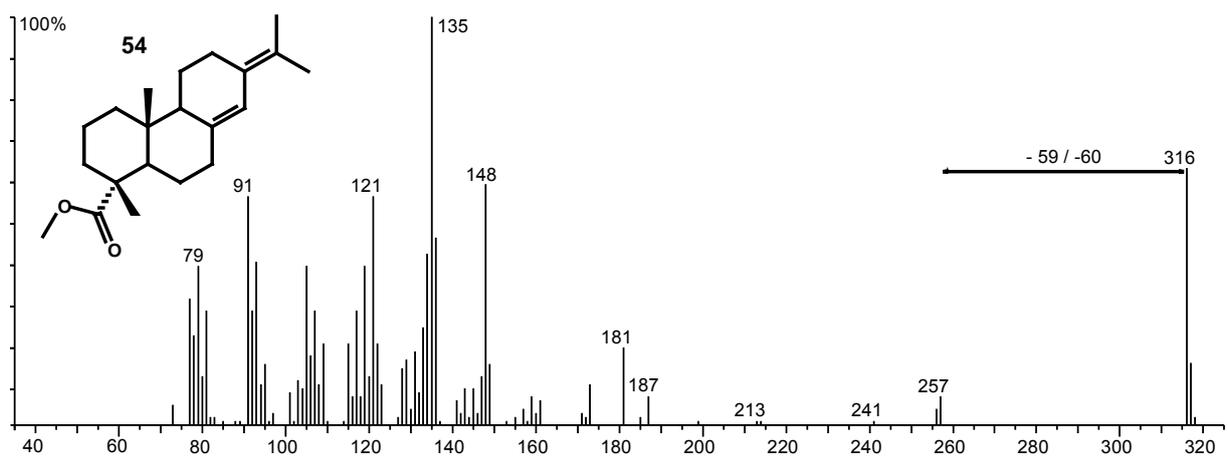
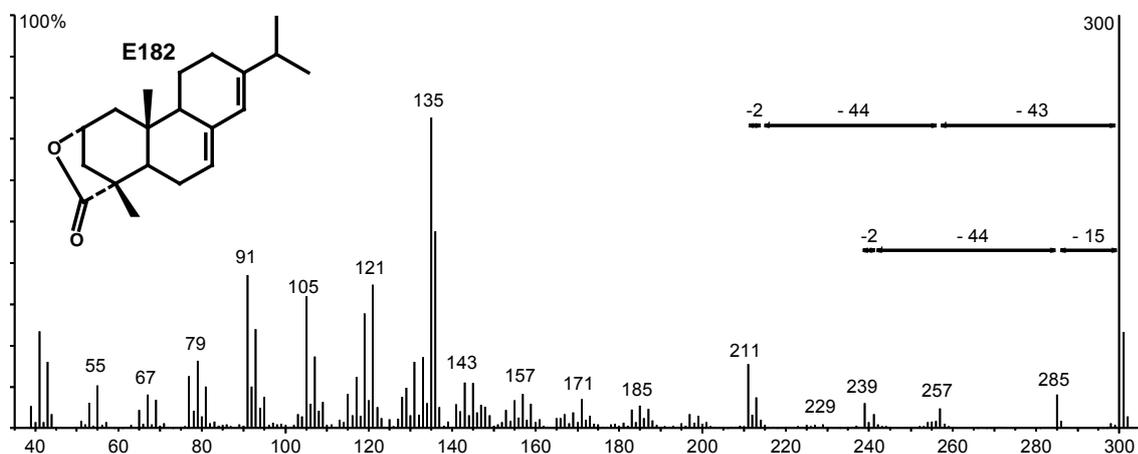
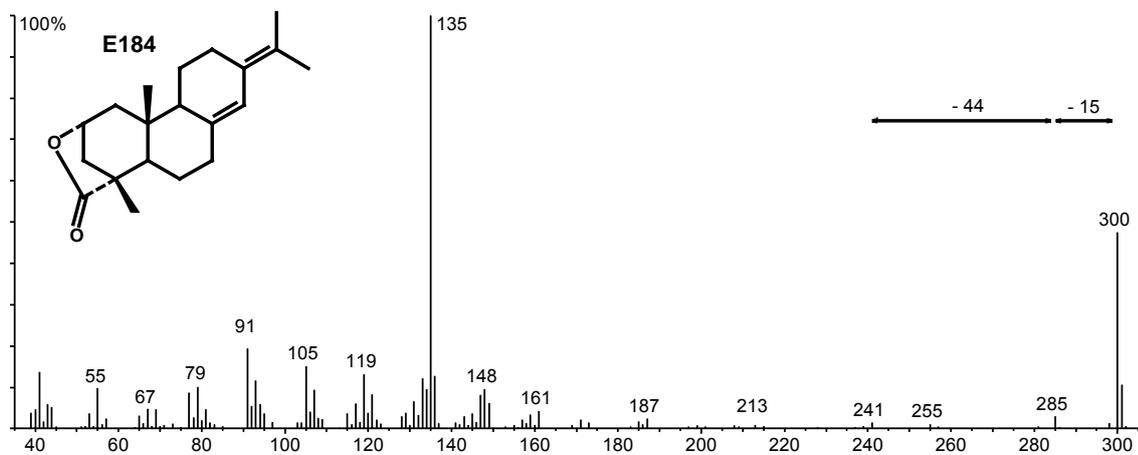
Die Retentionszeit von Verbindung **E184** auf unpolaren und mittelpolaren gaschromatographischen Kapillarsäulen (Phasen mit 5% Phenyl- und 95% Polydimethylsiloxan sowie 7% Phenyl-, 7% Cyanopropyl- und 86% Polydimethylsiloxan) und auf Umkehrphasen der Hochleistungsflüssigchromatographie HPLC (RP-8 sowie RP-18) ist ähnlich wie die der bereits identifizierten Diterpenlactone.

Neben den vergleichbaren chromatographischen Eigenschaften von Verbindung **E184** kann die strukturelle Ähnlichkeit zu den identifizierten Diterpenlactonen mit deren massenspektrometrischen Daten begründet werden.

Die Verbindung **E184** zeigt ebenso wie **E175**, **E176**, **E178**, **E179** und **E182** aus dem Substanzcluster ein Molekülion der Masse  $m/z$  300. Typischen Fragmentierungen, die bei den vorherigen Substanzen und speziell bei **E182** beobachtet wurden, sind auch hier zu sehen. Das Fragmention  $m/z$  285 resultiert aus der Abspaltung einer Methylgruppe, und das Fragmention  $m/z$  256 entsteht bei einer Eliminierung von Kohlendioxid ( $M^+ - 44$ ) aus dem Lactonring. Das Fragmention  $m/z$  241 sollte ein Tochterion von  $m/z$  256 sein, aus dem wiederum eine Methylgruppe abgespalten wurde. Hervorzuheben ist die hohe Ähnlichkeit des Massenspektrums der Substanz **E184** mit den Spektren von 2-Hydroxyabietinsäurelacton (**E182**) und Neoabietinsäuremethylester (**54**).



**Abbildung 72:** 2-Hydroxyneoabietinsäurelacton als Strukturvorschlag für **E184**, 2-Hydroxyabietinsäurelacton (**E182**) und Neoabietinsäuremethylester (**54**)



**Abbildung 73:** Vergleich der Massenspektren der unbekannt Substanz **E184** (2-Hydroxyneoabietinsäurelacton als Strukturvorschlag für **E184**, oben) mit den Massenspektren der Substanz **E182** (mitte) und dem Bibliotheksspektrum des Neoabietinsäuremethylesters (**54**) (unten)

Vergleichbare Fragmentationen sind speziell im Spektrum von **E184** und dem Bibliotheksspektrum des Neoabietinsäuremethylesters (**54**) zu erkennen. Der Verlust von  $m/z$  59, bzw.  $m/z$  60 aus dem Molekölion von Neoabietinsäuremethylester, welcher aus Abspaltung der Methylcarboxylgruppe resultiert, führt zu dem Fragment  $m/z$  257. Die weiteren Fragmentationen oberhalb von  $m/z$  148 sind zwar nur von geringer Intensität, jedoch treten die Ionen  $m/z$  241, 213, 187, 161 und 159 analog zu **E184** auf, und speziell das Fragmentation  $m/z$  148 ist hier charakteristisch. Daher wird 2-Hydroxyneoabietinsäurelacton als Strukturvorschlag für **E184** postuliert.

Zusätzlich kann unterstützend berücksichtigt werden, dass die Neoabietinsäure als potentieller Precursor dieser Struktur mit den anderen Harzsäuren, der vermutlichen Edukte der bereits eindeutig identifizierten Strukturen **E176**, **E177**, **E181** und **E182** vergesellschaftet vorliegt.

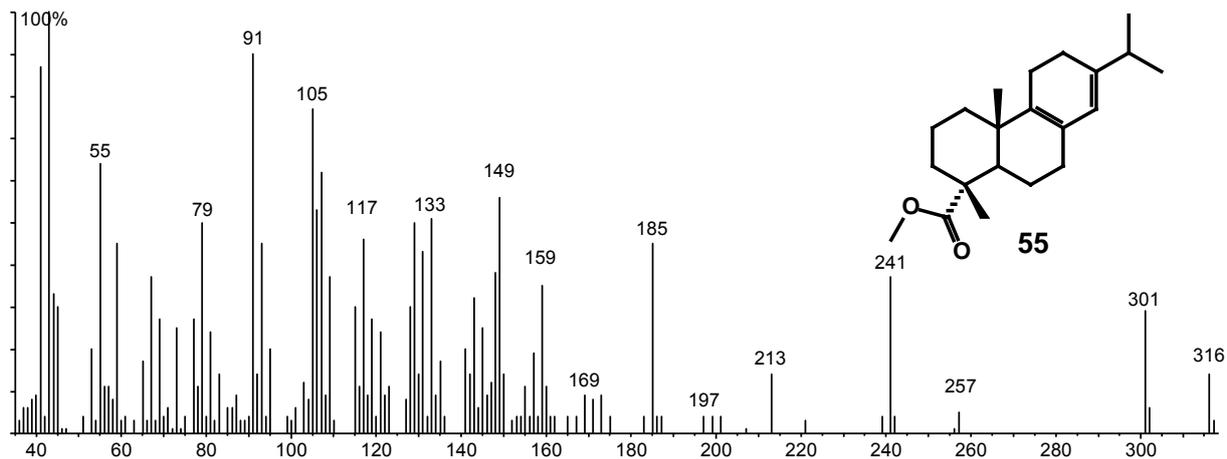
## Diskussion der Strukturvorschläge für die Verbindungen **E178** und **E179**

Die Verbindungen **E178** und **E179** besitzen ähnliche physikalische Eigenschaften wie die Verbindungen **E175-E177**, **E181**, **E182** und **E184**. Dieses zeigt sich im sehr ähnlichen Retentionsverhalten in der GC und HPLC auf den verwendeten unterschiedlich polaren Phasen. Die Konzentrationen in der Probe reichten nicht zur Isolierung aus, und es liegen nur die mit Elektronenstoßionisierung aufgenommenen Massenspektren vor.

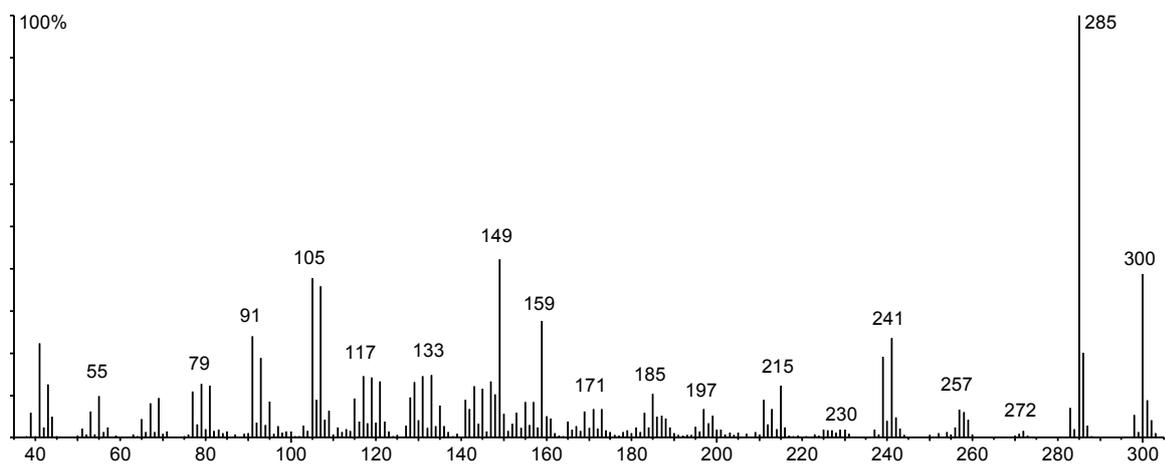
Aus der Gruppe der natürlich auftretenden Harzsäuren konnten bislang die 2-Hydroxylactone der Isopimar- (**50**) und Abietinsäure (**46**) sowie der Dihydro- und Dehydroabietinsäure (**53**) identifiziert werden. Zusätzlich erfolgte die Zuordnung von Strukturvorschlägen für die 2-Hydroxylactone der Neoabietin- (**48**) und Pimarsäure (**51**). Bislang konnte den Strukturen der Levopimar- (**47**) und Palustrinsäure (**49**) vom Abietantyp sowie der Sandaracopimarsäure (**52**) vom Pimarantyp noch keine der im Elefantenerin gefundenen 2-Hydroxylactone als Strukturvorschlag zugeordnet werden.

Durch den Vergleich mit Bibliotheksmassenspektren der korrespondierenden Methylester der verbleibenden Harzsäuren soll eine Zuordnung wahrscheinlich gemacht werden. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass in den kommerziell verfügbaren Bibliotheken (NIST05), sowohl für Palustrinsäuremethylester (**55**) als auch für Levopimarsäuremethylester (**46**) nur jeweils ein Eintrag vorhanden ist. Ob die Aufnahme- und Korrekturbedingungen zu Abweichungen im Massenspektrum führen, ist nicht bekannt. Bei den Spektren des Palustrin- (**55**) und Levopimarsäuremethylesters (**56**) aus der Bibliothek liegen im höheren Massenbereich zunächst Signale aus Abspaltungen einer Methyl- und Methylcarboxylgruppe mit  $m/z$  15 beziehungsweise  $m/z$  59 aus dem Molekülion  $m/z$  316 vor. Die Fragmentierung beginnt aufgrund der methylierten Carboxylgruppe anders als es bei den entsprechenden 2-Hydroxylactonen der Fall wäre. Dafür weist der mittlere Massenbereich von  $m/z$  69 bis  $m/z$  200 mit den Fragmentierungen des polyzyklischen Gerüsts charakteristische intensive Fragmentationen auf.

Der Palustrinsäuremethylester (**55**) in Abbildung 74 weist die besonders charakteristischen Fragmentationen  $m/z$  149 und  $m/z$  159 auf, die bei den anderen Harzsäuremethylestern nicht in vergleichbarer Intensität beobachtet werden. Bei der unbekannt Substanz **E178** (Abbildung 75) treten diese identischen Fragmentationen auf. Das Muster der Fragmentationen im Bereich zwischen  $m/z$  79 und  $m/z$  197 weist zusätzlich eine Vielzahl von Parallelen auf.



**Abbildung 74:** Bibliotheksspektrum Palustrinsäuremethylester (**55**)



**Abbildung 75:** Massenspektrum der unbekanntes Substanz **E178**

Im Bibliotheksspektrum des Levopimarsäuremethylesters (**56**) in Abbildung 76 liegt das charakteristische Fragmentationsmuster mit  $m/z$  91, 105, 121, 133 und speziell das geradzahlige Fragment  $m/z$  146 vor. Diese Fragmentationen finden sich ebenso im Massenspektrum der unbekanntes Substanz **E179** (Abbildung 77) wieder, wie weitere signifikante Übereinstimmungen im mittleren Massenbereich des Bibliotheksspektrums.

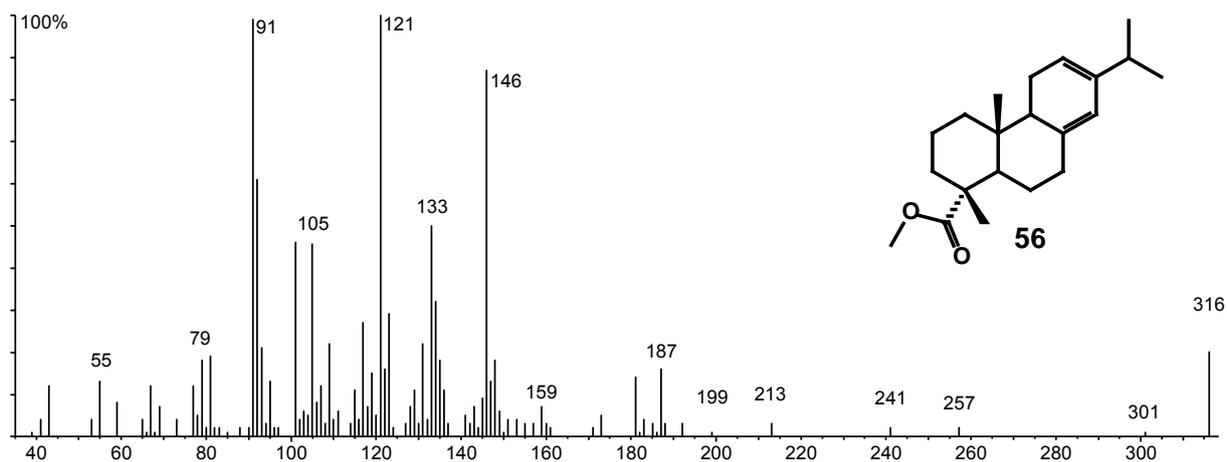


Abbildung 76: Bibliotheksspektrum Levopimarsäuremethylester (**56**)

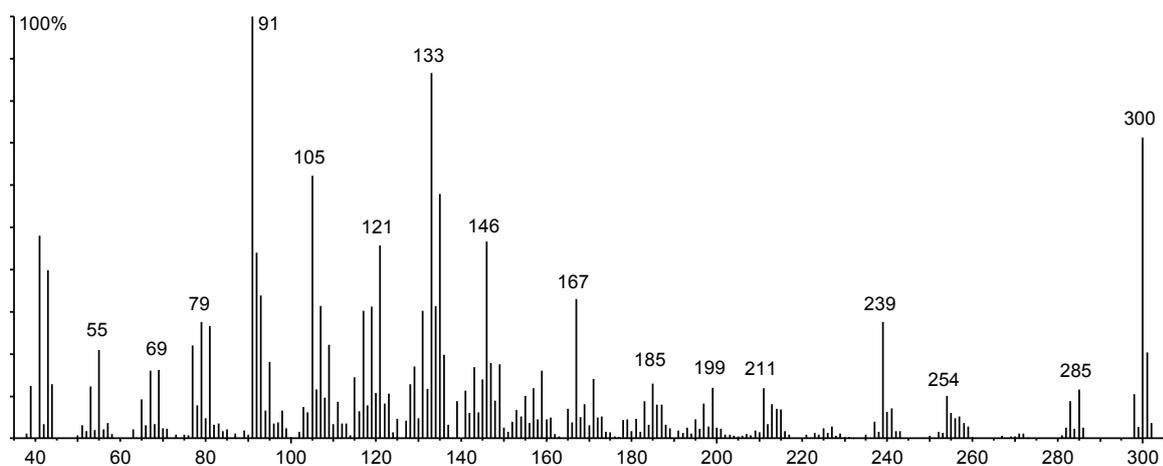


Abbildung 77: Massenspektrum der unbekanntes Substanz **E179**

Anhand dieser Übereinstimmungen und in Zusammenhang mit den bereits identifizierten 2-Hydroxyharzsäurelactonen des Substanzclusters kann für Verbindung **E178** die Struktur von 2-Hydroxypalustrinsäurelacton und für Verbindung **E179** die Struktur von 2-Hydroxy-levopimarsäurelacton als sehr wahrscheinlich angesehen werden.

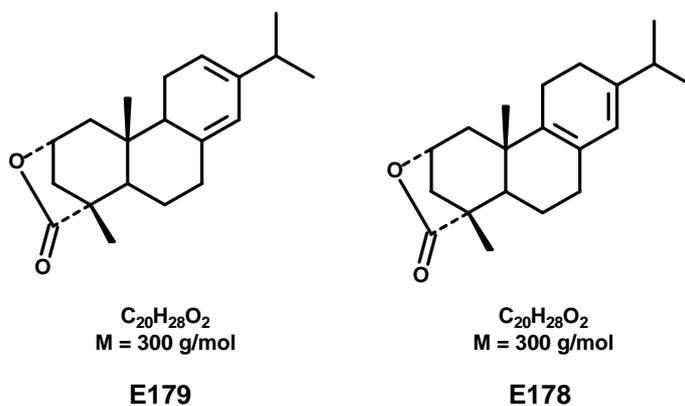
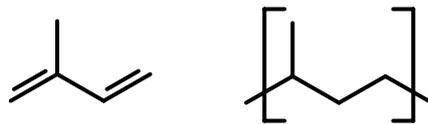


Abbildung 78: 2-Hydroxylevopimarsäurelacton und 2-Hydroxypalustrinsäurelacton als Strukturvorschläge für die unbekanntes Verbindungen **E179** und **E178**

## Biosynthese von Diterpenen aus der Gruppe der Harzsäuren

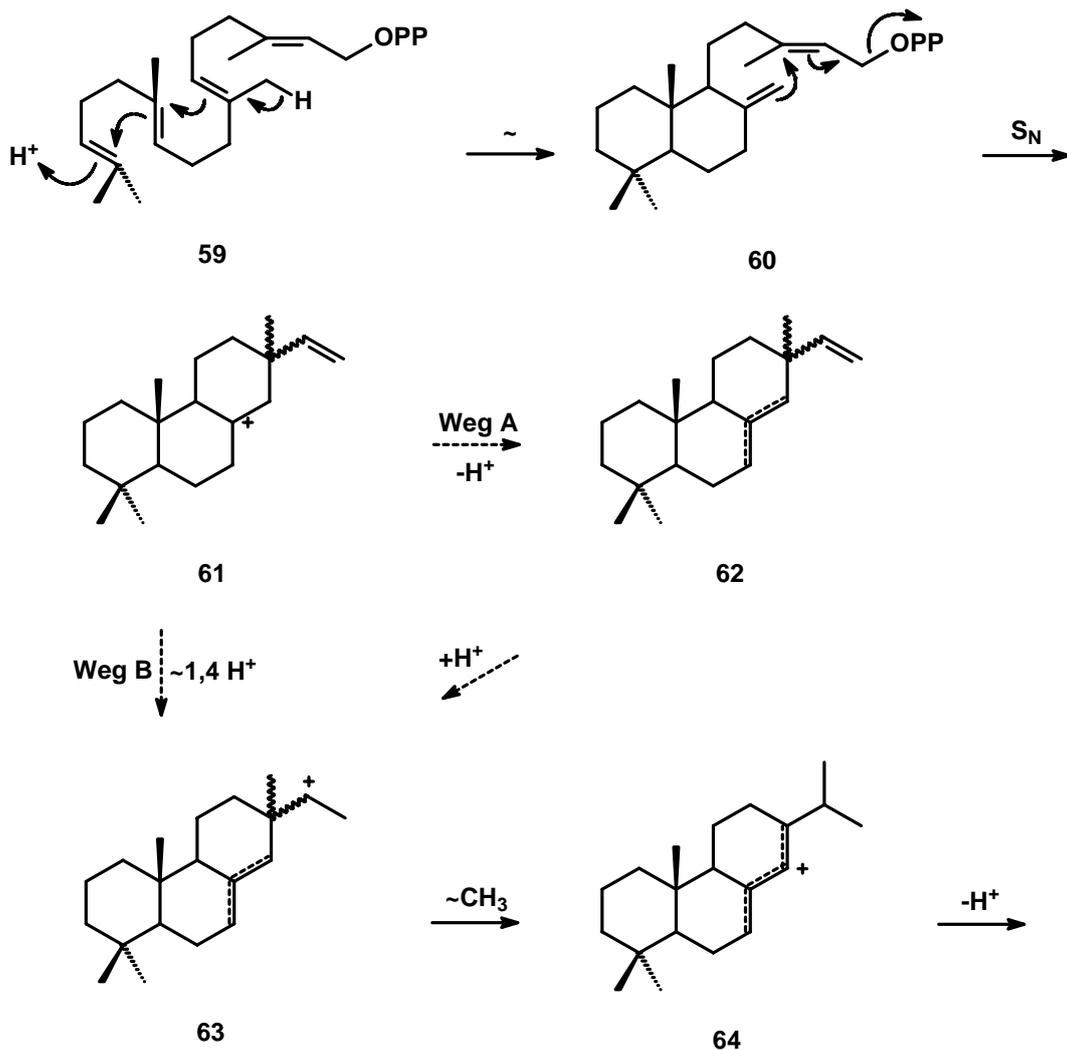
Die Diterpenlactone können, wie alle Terpene, prinzipiell als Oligomere des Isoprens (2-Methyl-1,3-butadien, **57**) aufgefasst werden und lassen sich biosynthetisch aus C<sub>5</sub>-Isopentyleinheiten ableiten (**58**) (Isoprenoide)<sup>189,190</sup>.



**Abbildung 79:** Isopren (**57**), Isopentyleneinheit (**58**)

Die Terpene zeichnen sich durch einen gemeinsamen Biogeneseweg aus. Bis kurz vor der Jahrtausendwende galt die Biosynthese über den Mevalonatweg ausgehend von aktivierter Essigsäure (Acetyl-CoA) als die einzig bekannte Terpenbiosynthese<sup>191,192</sup>. In den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde bei <sup>13</sup>C-Markeirungsexperimenten ein vom Mevalonat unabhängiger Biosyntheseweg, der „Non-Mevalonate Pathway“ oder auch 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Weg, entdeckt<sup>193-197</sup>.

Die Biosynthese führt in beiden Fällen zu den gleichen Vorstufen der unterschiedlichen Terpene. Da die isolierten Harzsäuren Diterpenoide sind, wird deren weitere Biogenese ausgehend vom (*E,E,E*)-Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) (**59**) erläutert. Die Biosynthese wurde beispielhaft anhand des bifunktionalen Enzyms *Abietadien Synthase* bei der Riesentanne (grand fir, *Abies grandis*) untersucht<sup>198-201</sup>. *Abietadien Synthase* setzt sauer induziert (*E,E,E*)-GGPP (**59**) in einer Kaskadenreaktion um.

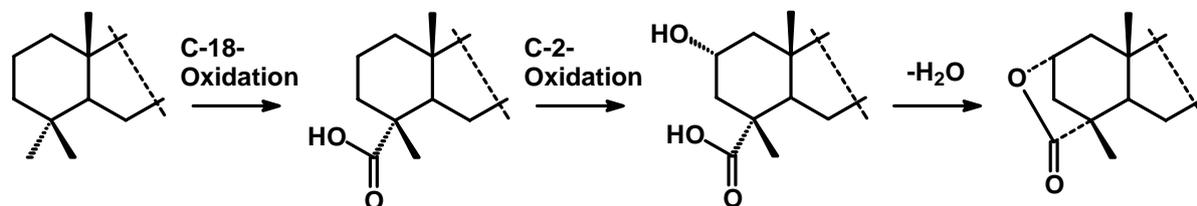


**Abbildung 80:** Biosynthese der Tricyclyphytane der Abietadien- und Pimaradiengruppe

Im ersten Schritt dieser Polyencyclisierung wird das GGPP (**59**) durch Protonierung an Position 14 und Deprotonierung an Position 19 zum stabilen bicyclischen Intermediat (+)-Copalyl diphosphat (**60**) umgelagert. In der folgenden intramolekularen nucleophilen Substitution bildet sich unter Ringschluß das Pimarenylkation (**61**).

Dieses stellt den zentralen Precursor der Biosynthesen von Harzsäuren dar. Die Deprotonierung des Pimarenylkation (**61**) auf dem Weg A ergibt die Pimaradiene (**62**). Weg B führt unter 1,4-Protonenumlagerung zum Zwischenprodukt (**63**). Zusätzlich können auch die Pimaradiene (**62**) protoneninduziert in das Intermediat **63** überführt werden. Aus **63** entsteht unter 1,2-Wagner-Meerwein-Umlagerung der Methylgruppe von C-13 zu C-15 und anschließender Isomerisierung der Doppelbindung das Abietenylkation (**64**). Aus **64** entstehen bei Deprotonierung die Abietadiene.

Die Stereochemie der Ringverknüpfung verläuft entsprechend der Storck-Eschenmoser-Hypothese<sup>202,203</sup>, die besagt, dass Kaskadenreaktionen von (*E*)-konfigurierten Polyenen in Isoprenoidbiosynthesen aufgrund der Vermeidung von 1,3-diaxialen Wechselwirkungen im Übergangszustand zu einem *trans* verknüpften Ringsystem führen.



**Abbildung 81:** Vermutliche Biogenese der Diterpenlactone vom Pimaradien- und Abietadientyp

Durch die nicht festgelegte Stereochemie am C-13 bei den Pimaradienen und die variable Lage der Doppelbindungen in den Ringen B und C bei Pimaradienen und Abietadienen entstehen die verschiedenen Harzsäuren nach Oxidation der Methylgruppe an Position 18 (siehe Abbildung 40). Die Hydroxylgruppe wird vermutlich enantioselektiv durch enzymatische Hydroxylierung der Position 2 eingeführt. Abschliessende Lactonisierung ergibt die 2-Hydroxyharzsäurelactone.

## 2-Hydroxyditerpensäurelactone in biologischen Zusammenhängen

Die selektive Hydroxylierung der Position C-2 und somit auch die Lactonisierung wurden bislang nicht bei tierischen Organismen beschrieben. Wegen ihrer Toxizität wurde der Metabolismus von Abietin- (**46**) und Dehydroabietinsäure (**53**) sowie anderer Terpenoide an Kaninchen untersucht<sup>204</sup>. Dabei wurden den Kaninchen wässrige Lösungen der Harzsäuren oral appliziert und die Urinmetabolite nach Extraktion und Derivatisierung per GC/MS untersucht. Es wurde festgestellt, dass Oxidation fast ausschließlich unselektiv an den Positionen 15, 16 und 17 der Isopropylgruppen stattfindet. Eine Methylengruppe in einem der Ringe wurde nur in Spuren bei Dehydroabietinsäure (**53**) an Position 7 zum Keton oxidiert. In weiterführenden Studien zur Biotransformation dieser Substanzen wurden nach oraler Gabe von Dehydroabietinsäure (**53**) verschiedene Metabolite aus dem Urin der Kaninchen durch Flüssigchromatographie getrennt und mittels NMR-Spektroskopie identifiziert. Hier wurde ebenfalls beobachtet, dass eine Oxidation unselektiv an der Isopropylgruppe stattfindet<sup>205</sup>. Die Abwässer von Zellstofffabriken enthalten die Diterpensäuren als unerwünschte Substanzen, da diese fischgiftig sind. Daher wurden etliche Versuche unternommen, mit Mikroorganismen einen biologischen Abbau zu weniger giftigen Metaboliten zu erreichen. Eine kanadische Arbeitsgruppe unternahm dazu Versuche mit einer großen Anzahl von Pilzen und Bakterien<sup>206-214</sup>.

Von den untersuchten Mikroorganismen oxidierte nur der Pilz *Mortierella isabellina* Dehydroabietinsäure (**53**), Isopimarsäure (**50**) und Abietinsäure (**46**) sowie chlorierte Dehydroabietinsäuren an der Position 2. Allerdings erfolgte schnell eine Weiteroxidation an der Isopropyl- bzw. Ethenylgruppe. Kleine Mengen dieser 2-Hydroxyditerpensäuren konnten als Zwischenprodukte isoliert werden. Eine präparative Darstellung gelang bislang nur ausgehend von den hydroxylierten Harzsäuren der Isopimarsäure (**50**) und Dehydroabietinsäure (**53**) zu den entsprechenden Lactonen (**E175**) und (**E181**)<sup>206,207</sup>. Die publizierten spektroskopischen Daten sind allerdings unzureichend. Eine Darstellung von 2-Hydroxyabietinsäurelacton (**182**) zur Reinsubstanz gelang nicht, da ein Produktgemisch entstand<sup>208</sup>. Ein neueres japanisches Patent beschreibt die selektive mikrobielle Oxidation an Position 2 von Dehydroabietinsäure (**53**) und Abietinsäure (**46**) mit einem Pilz der Mucorgruppe<sup>215</sup>. Weitere Oxidationsreaktionen der 2-Hydroxyditerpensäuren finden nicht statt. Eine Lactonisierung wurde weder beobachtet noch präparativ durchgeführt.

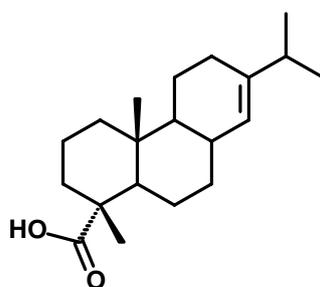
## Synthesestrategie zur Darstellung von 2-Hydroxyditerpenlactonen

Die Identifizierung unbekannter Strukturen in einer komplexen Matrix ist ein aufwändiger Prozess. Liegen unvollständige analytische Daten vor, wie bei dem Fehlen von zweidimensionalen NMR-Spektren, so muss die aus den zur Verfügung stehenden Daten postulierte Struktur mit Hilfe einer authentischen Referenzsubstanz verifiziert werden. Dabei werden die analytischen Daten der Synthesesubstanz mit denen der natürlichen Zielsubstanz verglichen und die Substanz gilt als identifiziert, wenn alle analytischen Daten einer synthetischen Verbindung mit dem Strukturvorschlag der natürlichen Zielverbindung übereinstimmen. Die postulierten Strukturen der Nebenkomponenten **E175**, **E178**, **E179** und **E184** können zweifelsfrei nur durch unabhängige Synthese bestätigt werden. Für potentielle zukünftige Biotests der neuen Verbindungen würden ebenfalls Substanzmengen benötigt, die im präparativen Maßstab liegen, da diese biologischen Tests mehrfach und reproduzierbar durchgeführt werden müssen. Dabei müssen die Substanzen in den natürlich auftretenden Mengen und Konzentrationen eingesetzt werden.

Bislang sind jedoch weder für die Diterpenlactone der Harzsäuren noch für die potentiellen Vorstufen, die korrespondierenden 2-Hydroxyditerpensäuren, Synthesen in der Literatur bekannt. Die Erstellung einer Synthesestrategie ist somit erforderlich.

Die Carboxylgruppe ist die einzige funktionelle Gruppe im Gerüst der Diterpensäuren. Die Einführung einer zusätzlichen Hydroxylgruppe mit organisch-chemischer Synthesetechnik ist sehr kompliziert. Bislang sind nur Oxidationen in Allylstellung der Doppelbindungen der Abietinsäure (**46**) beschrieben. Bei diesen Oxidationen mit Bleitetraacetat oder Selendioxid wird jedoch neben der Einführung einer Hydroxylgruppe an Position 9, auch Aromatisierung des Rings 3 mit und ohne Einführung einer Hydroxylgruppe an 7 beobachtet<sup>216</sup>. Daher ist der Ansatz, eine klassische organisch-chemische Synthese zu den 2-Hydroxyditerpenlactonen zu entwickeln, ebenso wie eine Totalsynthese der tetrazyklischen Strukturen mit bis zu sechs stereogenen Zentren, wenig Erfolg versprechend.

Die Darstellung der 2-Hydroxyditerpensäuren als Vorstufen der 2-Hydroxyditerpenlactone könnte vielmehr mit den erwähnten mikrobiologischen Umsetzungen aus den Diterpensäuren erfolgen<sup>206-208,215</sup>. Als Edukte der präparativen Darstellung werden neben den klassischen Harzsäuren noch die Dehydroabietinsäure (**53**) und 7,8-Dihydroabietinsäure (**65**), die als Referenzsubstanz nicht verfügbar ist, benötigt.

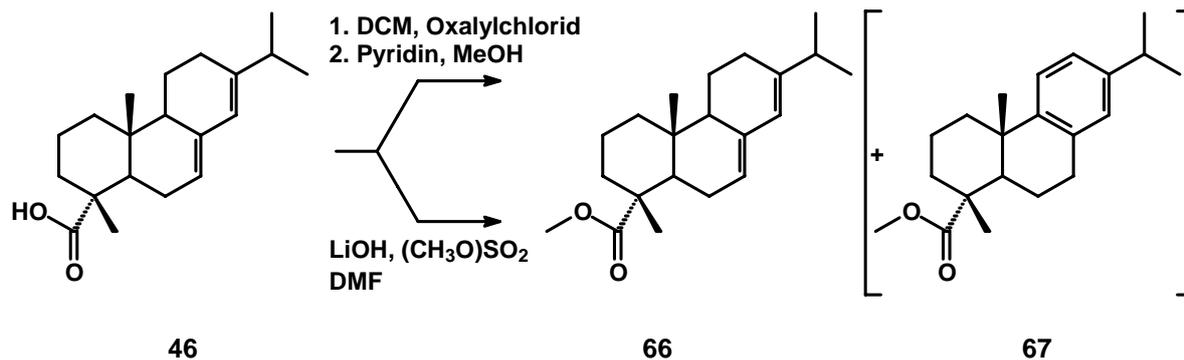


**65**

**Abbildung 82:** Kommerziell nicht erhältliche 7,8-Dihydroabietinsäure (**65**)

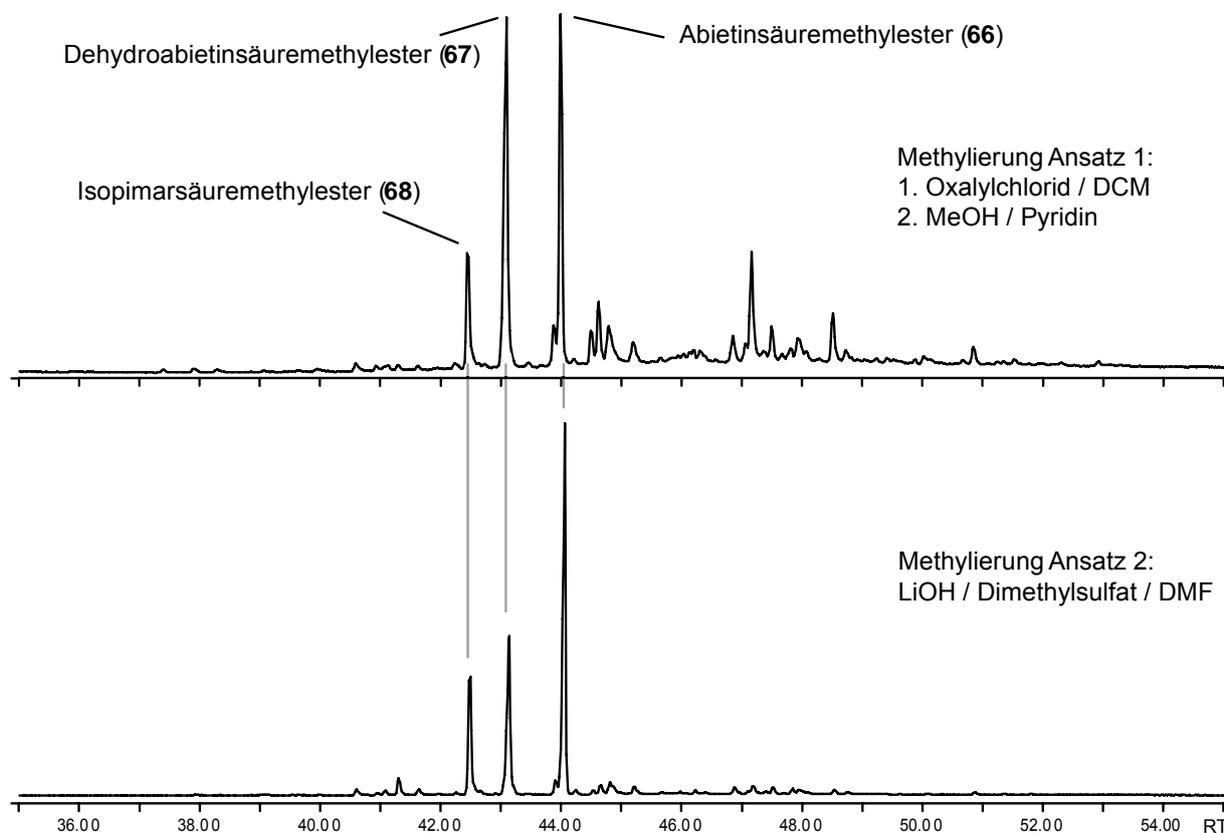
Von den Harzsäuren sind Abietinsäure (**46**), Neoabietinsäure (**48**), Isopimarsäure (**50**), Pimarsäure (**51**) und Dehydroabietinsäure (**53**) kommerziell erhältlich<sup>217</sup>. In der Naturprobe wurde von den möglichen Doppelbindungsisomeren einzig das 2-Hydroxy-7,8-dihydroabietinsäurelacton (**E177**) nachgewiesen. Die Reduktion von Abietinsäure (**46**) mit Lithium in flüssigem Ammoniak ergibt jedoch ein Gemisch an Reduktionsprodukten<sup>218</sup>, so dass die Darstellung der Dihydroabietinsäure (**65**) aus Abietinsäure (**46**) durch Disproportionierung erfolgen soll. Dieses milde Verfahren ergibt neben einer höheren Selektivität der Reduktion die Dehydroabietinsäure (**53**) als zusätzliches Produkt. Dazu wurden folgende Erfolg versprechende Voruntersuchungen unternommen.

Abietinsäure (**46**) ist oxidationsempfindlich gegenüber Licht, Säuren und Wärme<sup>219,220</sup>. Für eine schnelle Reaktionskontrolle der Disproportionierungsansätze durch GC/MS mit hoher Trennschärfe wurde **46** durch Veresterung zum Methylester in ein leichter flüchtiges Derivat umgewandelt. Dazu war die durch Mineralsäuren katalysierte Methylierung mit MeOH aus Gründen der Eduktlabilität ungeeignet. Eine beschriebene Methylierung mit Diazomethan<sup>221</sup> wurde für den gewünschten präparativen Maßstab ebenfalls verworfen.



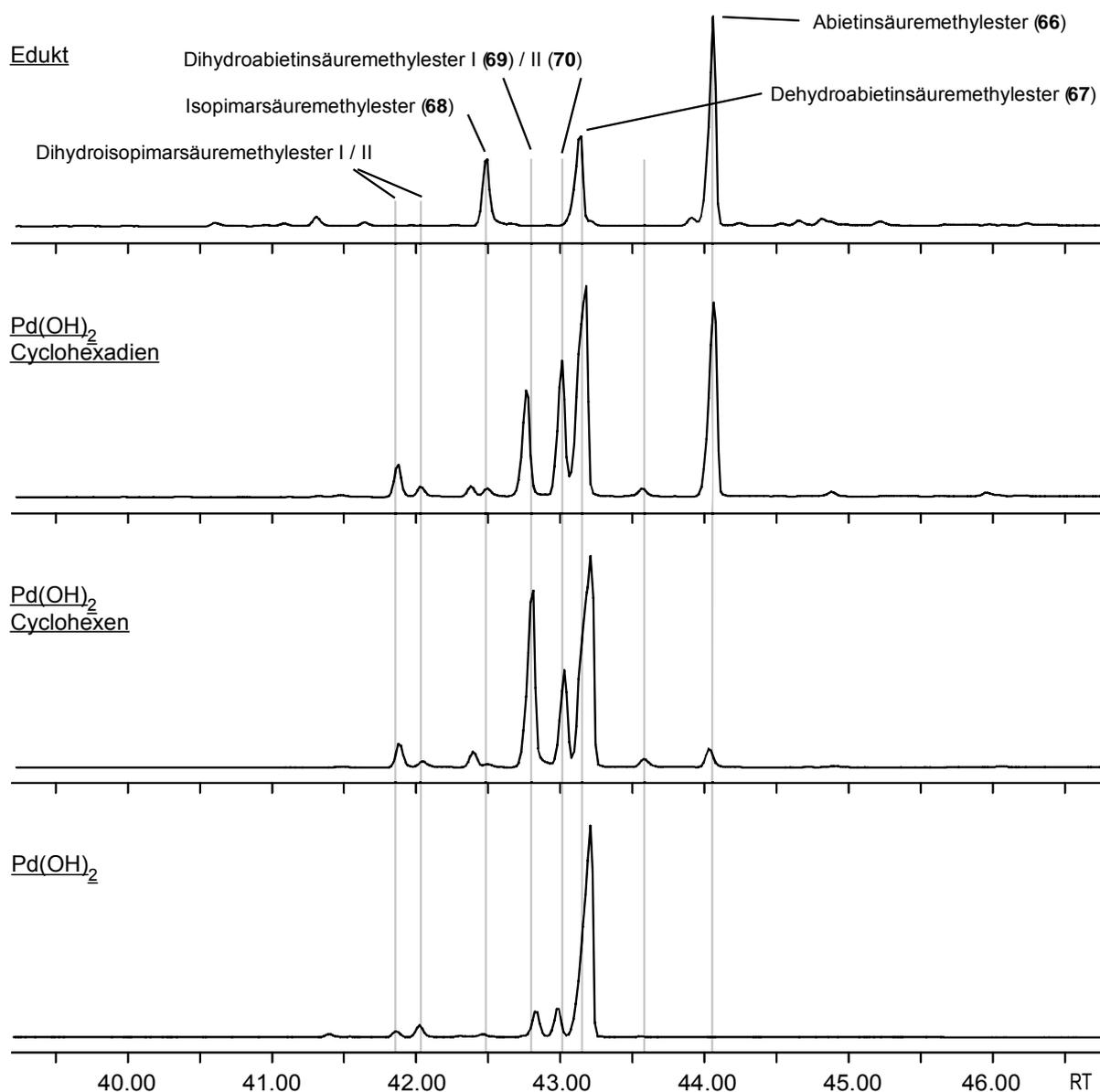
**Abbildung 83:** Darstellung von Abietinsäuremethylester (**66**)

Der erste Ansatz der Methylierung von **46** durch Umwandlung in das Säurechlorid mittels Oxalylchlorid und anschließender Hydrolyse mit MeOH ergab zwar den gewünschten Abietinsäuremethylester (**66**), aber als Hauptprodukt entstand Dehydroabietinsäuremethylester (**67**). Ein besseres Produktverhältnis zu Gunsten von **66** gelang durch die sanfte Methylierung von **46** im Alkalischen bei Raumtemperatur nach dem HSAB-Prinzip mit LiOH und Dimethylsulfat in Dimethylformamid<sup>222</sup>.



**Abbildung 84:** Vergleich Chromatogramme (TIC) der Methylierungen von Abietinsäure (**46**) (Säule: 30 m VF-5ms, 0.25 mm ID, 0.25 µm FD Temperaturprogramm: 60°C, 5min isotherm, 5°C/min auf 300°C, 10 min isotherm; Injektion: 10 s sl)

Neben der besseren relativen Ausbeute an Abietinsäuremethylester (**66**) zeigt der Vergleich der Analysen beider Methylierungsreaktionen neben Dehydroabietinsäuremethylester (**67**) noch als weiteres intensives Signal Isopimarsäuremethylester (**68**) (Abbildung 84). Kommerziell verfügbare Abietinsäure (**46**) hat lediglich einen Reinheitsgehalt von 75%, und als Verunreinigungen können aufgrund der Gewinnung aus Koniferenharz andere Harzsäuren enthalten sein. Mit Dimethylsulfat gelang die präparative Darstellung trotz der Nebenreaktion und Verunreinigung des Edukts zufrieden stellend. Das Rohprodukt der Reaktion wurde zur Methodenentwicklung der Disproportionierung eingesetzt. Versuche zur Disproportionierung von Abietinsäuremethylester (**66**) wurden sowohl mit Palladium auf Kohle als auch mit Palladiumhydroxid auf Kohle getestet. Die Disproportionierung mit Palladiumhydroxid wurde sowohl ohne als auch mit Cyclohexen und Cyclohexadien als zusätzlichen Wasserstoffüberträger getestet<sup>223</sup>. Bei dem Einsatz von Pd/C war weder bei Raumtemperatur noch beim Sieden unter Rückfluß in Benzol eine nennenswerte Reaktion zu beobachten.



**Abbildung 85:** Gaschromatogramme der Disproportionierungsreaktionen von technischer Abietinsäure (**46**) (Säule: 30 m VF-5ms, 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m FD Temperaturprogramm: 60°C, 5min isotherm, 5°C/min auf 300°C, 10 min isotherm; Injektion: 10 s sl)

Die Ansätze von Pd(OH)<sub>2</sub> mit Cyclohexen und Cyclohexadien lieferten die gewünschten Dihydroabietinsäuremethylester nach dem Hauptprodukt **66** als zweitstärkste Produkte. Durch Abgleich mit Bibliotheksspektren konnte Dihydroabietinsäuremethylester I der Struktur 7,8-Dihydroabietinsäuremethylester (**69**) und Dihydroabietinsäuremethylester II der Struktur 8(14)-Abietensäuremethylester (**70**) zugeordnet werden. Die Massenspektren in Abbildung 86 bis Abbildung 88 wurden für einen verlässlichen Vergleich der Fragmentierungen unter den gleichen massenspektrometrischen Bedingungen aufgenommen.

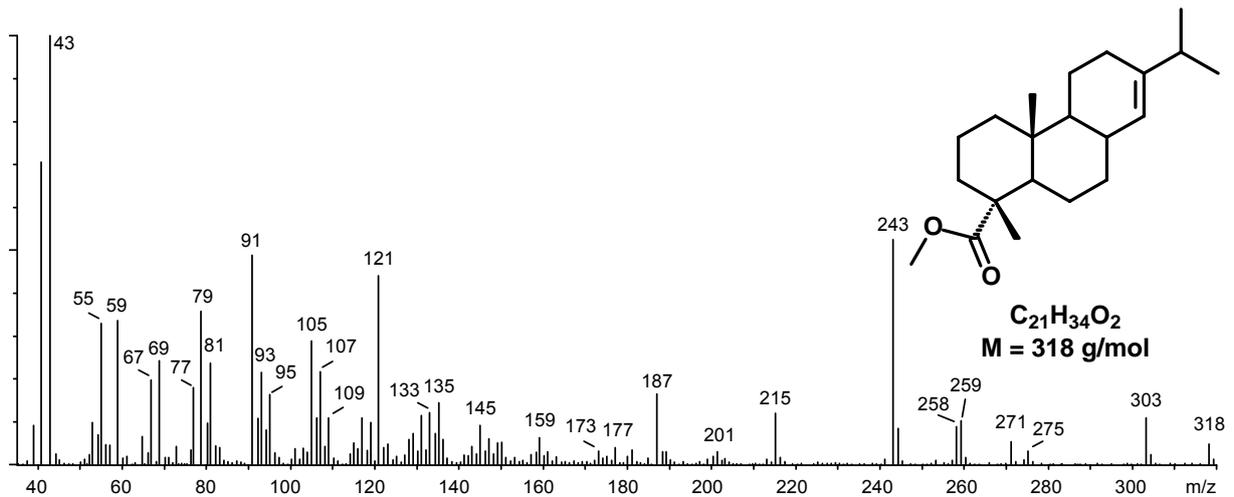


Abbildung 86: Massenspektrum von 7,8-Dihydroabietinsäuremethylester (69)

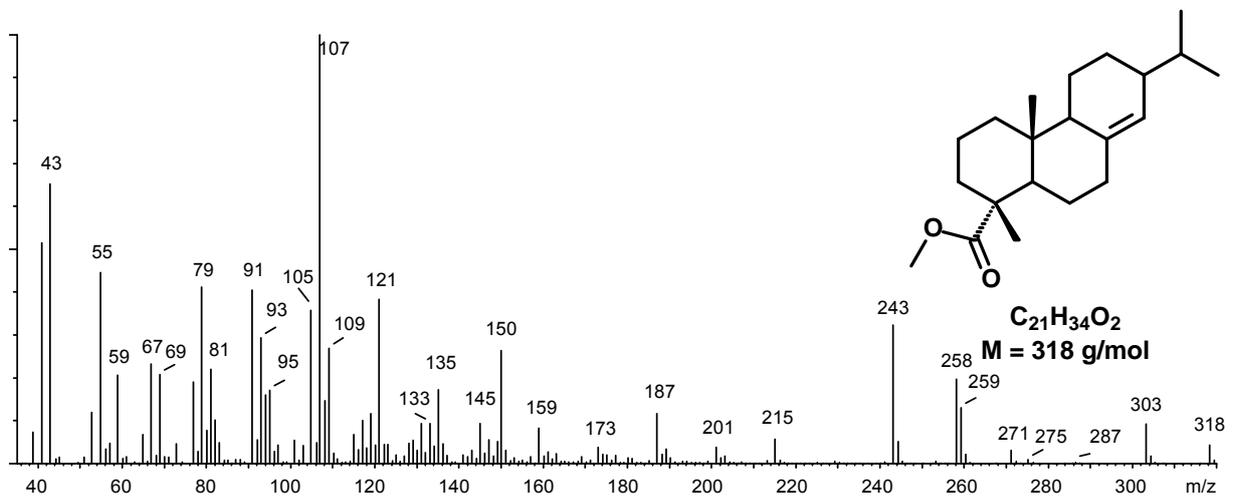


Abbildung 87: Massenspektrum von 8(14)-Abietensäuremethylester (70)

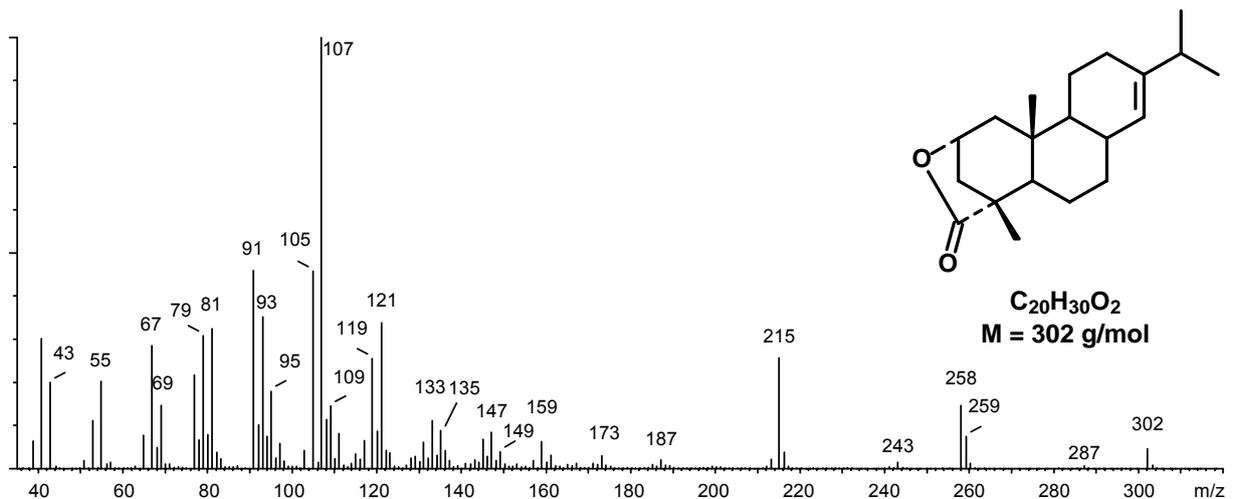


Abbildung 88: Massenspektrum von 2-Hydroxy-7,8-dihydroabietinsäurelacton (E177)

Die präparative Auftrennung der Produkte aus der Methylierungsreaktion gelang mit Hilfe präparativer HPLC analog der Methode für die 2-Hydroxyditerpensäurelactone bei erhöhten Retentionszeiten. Somit können alle erforderlichen Edukte für eine mikrobielle Umsetzung dargestellt und auch im präparativen Maßstab isoliert werden.

Die Isolierung der hydroxylierten Diterpensäuren aus dem wässrigen Kulturmedium der mikrobiellen Hydroxylierung kann entweder mittels Flüssig-flüssig Extraktion oder durch Festphasenextraktion analog zur Isolierung der Substanzen aus dem Urin und folgender Reinigung der Extrakte mit präparativer HPLC durchgeführt werden.

Die gereinigten 2-Hydroxyditerpensäuren sollten unter Bildung der  $\gamma$ -Lactone zu den Zielverbindungen umgesetzt werden können. Die Bildung von  $\gamma$ -Lactonen aus 4-Hydroxysäuren ist entropisch begünstigt<sup>224</sup> und sollte unter mildsaurer Katalyse mit *p*-Toluolsulfonsäure in Toluol gelingen. Falls Isomerisierung der Doppelbindungen auftritt, kann alternativ die Aktivierung der Carboxylgruppe unter neutralen Bedingungen durch Umwandlung in gemischte Anhydride mit Carbonyldiimidazol oder Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) erfolgen<sup>225</sup>. Das Mukaiyama-Verfahren mit  $\alpha$ -chloriertem *N*-Methylpyridiniumiodid<sup>226,227</sup> und der Steglich-Katalysator Dimethylaminopyridin<sup>228</sup> wären weitere Optionen zur Aktivierung. Für den letzten Schritt der Darstellung von synthetischen Referenzverbindungen durch Lactonisierung der hydroxylierten Vorstufen stehen daher erprobte und Erfolg versprechende Methoden zur Verfügung.

## Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine Vielzahl flüchtiger Verbindungen mit Hilfe der HS-SPME im Urin der Elefantenkühe identifiziert. Darunter finden sich die Vertreter unterschiedlichster Substanzklassen, wie zum Beispiel Terpene, Terpenoide, oxygenierte Aliphaten, Alkaloide und Steroide. Die biologische Herkunft und Funktion der Mehrheit dieser Substanzen ist bislang im Zusammenhang mit der Anwesenheit im Elefantenurin unklar.

Die Anwesenheit der an Position 2 ungesättigten Steroide  $5\alpha$ -Androst-2-en-17-on (**38**) und  $5\alpha$ -Androst-2-en-17 $\beta$ -ol (**39**) wurde im Elefantenurin eindeutig bewiesen. Zusätzlich wurden korrespondierende Steroide mit der Unsatigung an Position 3,  $5\alpha$ -Androst-3-en-17-on (**E159**) und  $5\alpha$ -Androst-3-en-17 $\beta$ -ol (**161**) identifiziert und bestätigen so deren Entstehung aus den Vorstufen  $5\alpha$ -Androstan-17-on-3 $\beta$ -sulfat (**40**) und  $5\alpha$ -Androstan-17 $\beta$ -ol-3 $\beta$ -sulfat (**41**). Eine analoge Entstehung kann für die nachgewiesenen Steroide  $5\alpha$ -Pregn-2-en-20-on (**E173**),  $5\alpha$ -Pregn-3-en-20-on (**E174**) und weitere vorhergesagt werden.

Für die Verbindungen des Substanzclusters, der synchron und zyklisch mit einem Konzentrationsanstieg während der Follikelphase in der Elefantenherde auftrat, wurden anfänglich ebenfalls Strukturen der Steroide bzw. Steroidmetaboliten angenommen. Diese zyklisch wiederkehrenden Substanzen konnten isoliert und identifiziert werden. Dazu wurde eine Aufarbeitungsmethode unter Nutzung von Festphasenextraktion, fest-flüssig-Extraktion und präparativer HPLC entwickelt. Im Rahmen dieser Methodenentwicklung wurde klar, dass die isolierten Hauptkomponenten des Substanzclusters im Elefantenkuh-Urin lediglich im ppb-Bereich vorlagen, da die NMR-spektroskopischen Experimente mit einer maximalen Substanzmenge in der Größenordnung eines Milligramms erfolgten.

Bei der Aufklärung der Strukturen stellte sich heraus, dass es sich nicht, wie ursprünglich vermutet, um Steroide mit einem Gonangerüst (**71**) handelt, sondern um tricyclische Diterpene mit Abietan- (**45**) und Pimarangerüst (**44**).

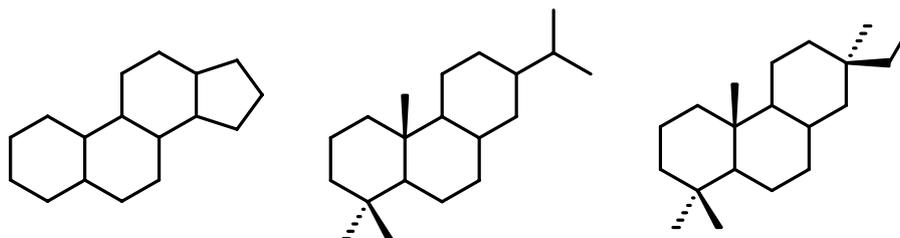


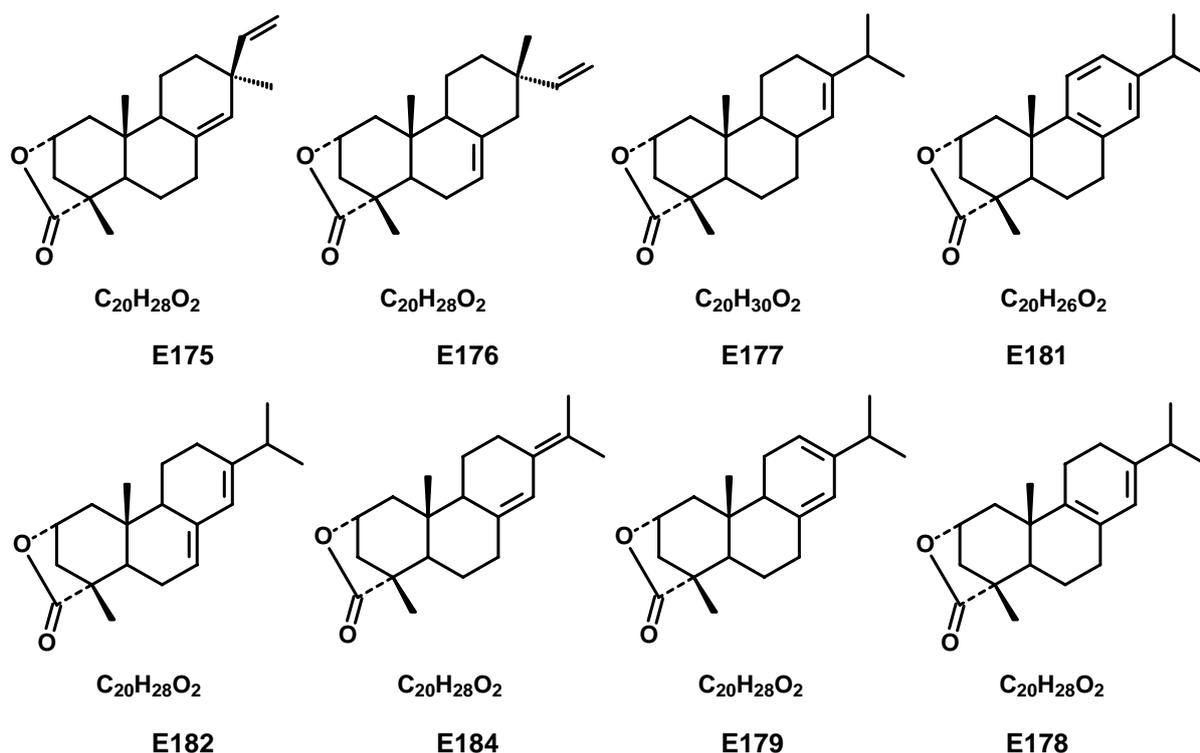
Abbildung 89: Gonan- (**71**)

Abietan-(**45**)

Pimarangerüst (**44**)

Bei den eindeutig durch NMR Spektroskopie identifizierten Verbindungen handelt es sich um 2-Hydroxyisopimarsäurelacton (**E176**), 2-Hydroxy-7,8-dihydroabietinsäurelacton (**E177**), 2-Hydroxydehydroabietinsäurelacton (**E181**) und 2-Hydroxyabietinsäurelacton (**E182**). Für die Nebenkompente **E175** konnte anhand der erlangten Daten, insbesondere durch die in NMR-Experimenten zugeordneten Partialstrukturen, das 2-Hydroxy-pimarsäurelacton (**E175**) als Strukturvorschlag postuliert werden.

Zusätzlich können den Verbindungen **E178**, **E179** und **E184** unter Berücksichtigung der massenspektrometrischen Fragmentierungsreaktionen und Vergleich mit strukturverwandten Verbindungen die Strukturvorschläge 2-Hydroxyneoabietinsäurelacton (**E184**), 2-Hydroxypalustrinsäurelacton (**E178**) und 2-Hydroxylevopimarsäurelacton (**E179**) zugeordnet werden. Dabei wurde berücksichtigt, dass die natürlich vorkommenden Harzsäuren prinzipiell die Vorstufen, analog zu den identifizierten Verbindungen, der noch nicht vollständig identifizierten Verbindungen **E175**, **E178**, **E179** und **E184** darstellen. Daher basieren die entsprechenden Strukturvorschläge auf den bekannten Grundgerüsten der Harzsäuren. Die vermutliche absolute Konfiguration der Lactone **E175-E179** und **E181-E184** entspricht den Beschreibungen der Stereochemie in den Kapiteln. Diese Annahme ist plausibel, da die Biosynthese solcher Verbindungen mit definierter Stereochemie abläuft (Storck Eschenmoser Hypothese<sup>190</sup>).



**Abbildung 90:** 2-Hydroxypimarsäurelacton (**E175**), 2-Hydroxyisopimarsäurelacton (**E176**), 2-Hydroxy-7,8-dihydroabietinsäurelacton (**E177**), 2-Hydroxydehydroabietinsäurelacton (**E181**), 2-Hydroxyabietinsäurelacton (**E182**), 2-Hydroxyneoabietinsäurelacton (**E184**), 2-Hydroxylevopimarsäurelacton (**E179**) und 2-Hydroxypalustrinsäurelacton (**E178**)

Die identifizierten Verbindungen sind als Naturstoffe neu. Nur 2-Hydroxyisopimarsäurelacton (**E177**) und 2-Hydroxydehydroabietinsäurelacton (**E181**) sind in der Literatur beschrieben. Allerdings nicht als natürlich auftretende Substanzen, sondern als Produkte einer synthetischen Lactonisierung<sup>207,208</sup>. Die biologische Aktivität und biogenetische Herkunft dieser Diterpenlactone **E175-E179** sowie **E181**, **E182** und **E184** ist gegenwärtig unklar und muss Inhalt weiterer Untersuchungen sein.

Zur präparativen Darstellung aus kommerziell erhältlichen Diterpenen der Harzsäuren wurde ein Weg skizziert. In ausführlichen Voruntersuchungen gelang sowohl die Darstellung der kommerziell nicht erhältlichen Isomere der Dihydroabietinsäuren als auch die präparative Trennung der Harzsäuren als Edukte einer mikrobiellen Umsetzung zu den identifizierten Verbindungen. Die letztlich noch fehlende mikrobielle Umsetzung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da dies nur in Kooperation mit einem mikrobiologischen Labor erfolgen kann.

Zukünftige Versuche zur biologischen Aktivität benötigen diese Darstellung zur Gewinnung authentischer Referenzverbindungen. Durch Isolierung anhand des dargestellten Weges bei der Anreicherung aus dem Urin, gefolgt von präparativer HPLC, können die Verbindungen einzeln und in natürlicher Zusammensetzung auf ihre Aktivität und synergistische Effekte hin getestet werden. Weiterhin würde die Darstellung der bislang postulierten Strukturen der NebenkompONENTEN **E175**, **E178**, **E179** und **E184** den indirekten Strukturbeweis ermöglichen. Durch Übereinstimmung beim Vergleich der analytischen Daten (Retentionszeit und Massenspektrum) der Zielsubstanz mit denen der Referenzsubstanz könnten die Strukturvorschläge verifiziert werden.

# Buntbock

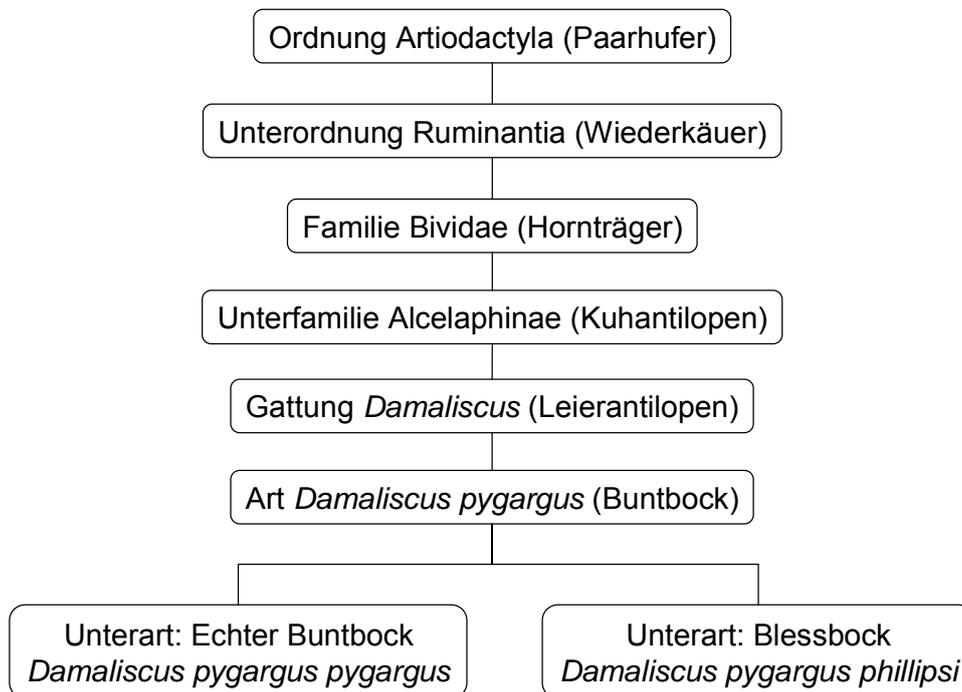
## Allgemeines zum Buntbock

Der Buntbock (Afrikaans/Englisch: Bontebok, *Damaliscus pygargus* (Pallas, 1767)) ist eine im südlichen Afrika endemisch vorkommende Kuhantilope, welche in die zwei Unterarten Echter Buntbock (*Damaliscus pygargus pygargus*) und Blessbock (*Damaliscus pygargus phillipsi*) unterteilt ist (Abbildung 92). Buntböcke haben ein kräftig rotbraunes Haarkleid mit dunkleren Flanken und Läufen, von denen sich die Bauchpartie, die unteren Extremitäten und der Spiegel weiß absetzen (Abbildung 91). Die besonders charakteristische Blesse am Kopf verläuft vom Hornansatz bis zum Maul und ist nur auf Augenhöhe dünn unterbrochen. Beim Blessbock ist dieser Streifen der Blesse etwas schmaler. Als zusätzliche Unterscheidung ist die weiße Färbung des Spiegels und der Hinterläufe beim Echten Buntbock ausgeprägter. Geringelte schwarze Hörner werden von beiden Unterarten und Geschlechtern getragen. Ausgewachsene Buntböcke haben eine Schulterhöhe von 85-100 cm, Geißen wiegen etwa 60 kg und Böcke 70 kg, können aber gelegentlich bis zu 100 kg erreichen.



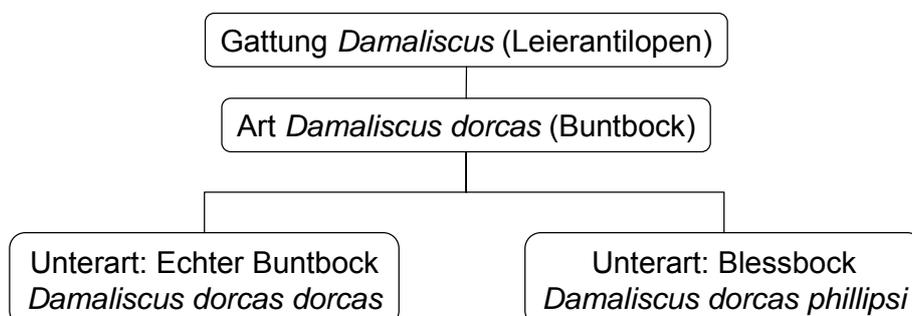
Abbildung 91: Zeichnung des Buntbocks

Die Unterarten lassen sich nur schwer von einander abgrenzen. Eine strikte taxonomische Trennung ist zusätzlich erschwert, da sich die Unterarten kreuzen und die aus Paarungen entstandenen Hybride ihr Erbgut ebenfalls weitergeben<sup>229</sup>.



**Abbildung 92:** Auszug aus der gültigen phylogenetischen Systematik der Paarhufer

Die phylogenetische Systematik in Abbildung 92 folgt der Auffassung von Wilson und Reeder<sup>230</sup>, welche die frühere Einteilung des Buntbocks in die Art *Damaliscus dorcas* mit den Unterarten *Damaliscus dorcas dorcas* für den Echten Buntbuck und *Damaliscus philippsi* für den Blesbuck ersetzt hat. Diese ältere Einteilung in Abbildung 93 ist jedoch noch immer weit verbreitet und führt durch den geläufigen Gebrauch nicht nur in älterer Literatur gelegentlich zu taxonomischen Verwechslungen.



**Abbildung 93:** Ältere, revidierte Einteilung der Gattung *Damaliscus*

Durch das Entstehen eines sehr trockenen Landstreifens, der heutigen Halbwüste Karoo, entstanden vor tausenden von Jahren die beiden endemischen Unterarten aus einem gemeinsamen Vorfahren. Die Karoo trennte den Fynbos, eine von mediterranem Klima geprägte Vegetation der Küstensteifen im südwestlichen Südafrika, von den trockeneren Ebenen im Landesinneren. Der Echte Buntbock entwickelte sich in den Ebenen des Küstenstreifens, während die Population des Blesbocks eine der häufigsten Antilopenarten im zentralen Flachland Südafrikas war.

Geschlechtsreife männliche Buntböcke leben als Einzelgänger und zeigen ein sehr ausgeprägtes Territorialverhalten. Eine Umsiedlung oder Vertreibung aus ihrem angestammten Lebensraum, den sie meist das ganze Jahr über nicht verlassen, in eine ungewohnte Umgebung, ist praktisch unmöglich. Weibliche Buntböcke dagegen leben in kleinen Gruppen mit den Jungen des Vorjahres und durchziehen in der Paarungszeit verschiedene Reviere erwachsener Männchen.

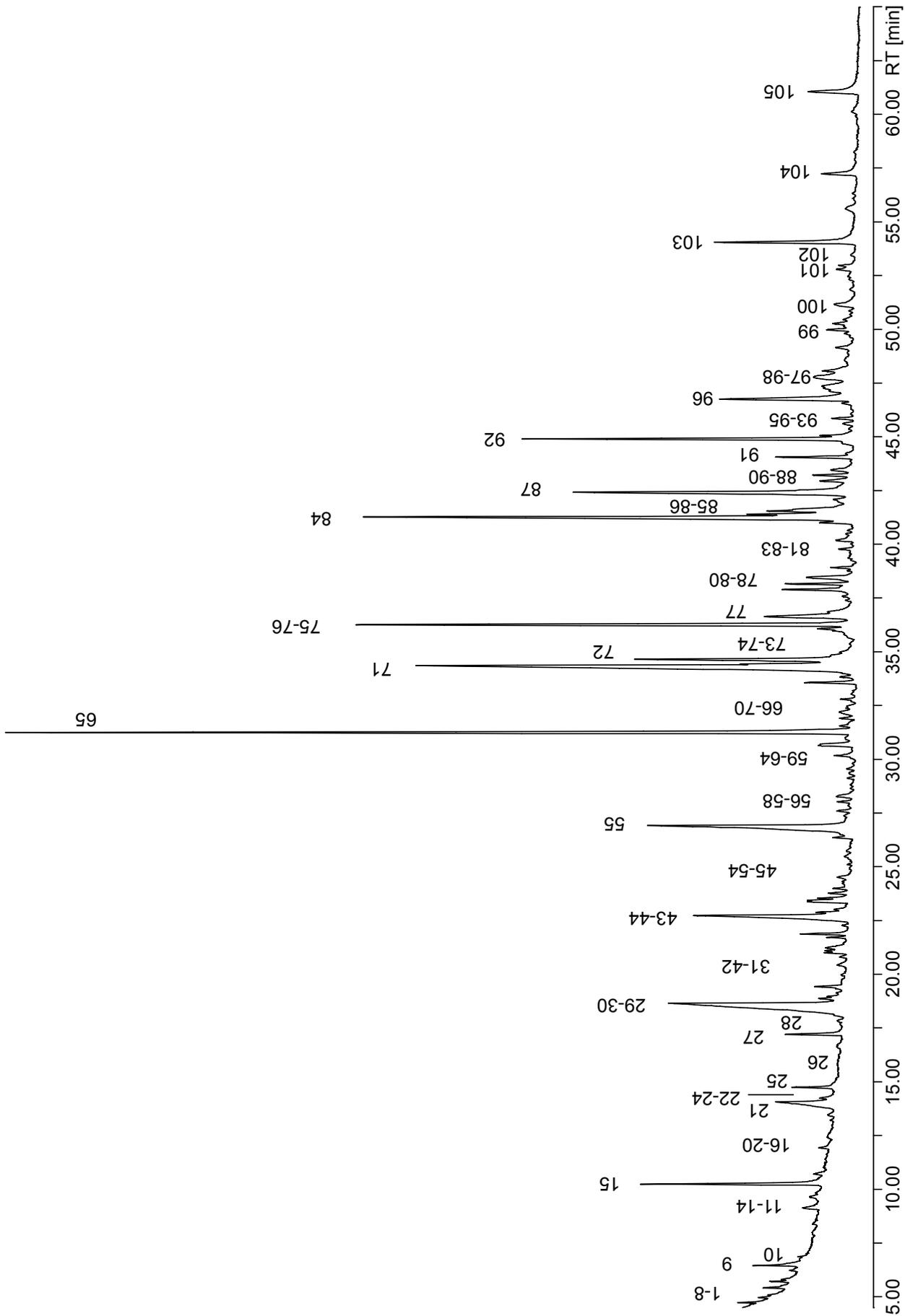
Die Mehrzahl flüchtender Buntböcke hält unter Jagddruck die Köpfe nach unten gerichtet, als ob Informationen am Boden für sie von größerer Bedeutung sind als die Quelle der Bedrohung. Dieses ist auch der Grund dafür, dass besonders der Echte Buntbock in Freiheit schon seit der Jagd durch die ersten Siedler Südafrikas am Rande der Ausrottung stand und es 1926 gerade noch 17 Tiere in freier Wildbahn gab<sup>231</sup>. Obwohl der Bestand durch die Hege in Schutzgebieten wieder deutlich ansteigen konnte, gilt die Tierart immer noch als potentiell gefährdet und wird in der Roten Liste Südafrikas aufgeführt<sup>232,233</sup>. Auch die Blesbockbestände waren erheblich reduziert, konnten sich aber durch Nachzucht auf Farmen und in Schutzgebieten erholen (Bestand 240.000 Tiere, steigend)<sup>234</sup>.

Wie bei allen Paarhufern liegt die Mittelachse des Beins zwischen dritter und vierter Zehe, welche vergrößert sind und als einzige den Boden berühren. Die erste Zehe fehlt gänzlich während die zweite und vierte aufgrund ihrer Verkümmerng den Boden nicht berühren. Zwischen dritter und vierter Zehe liegen die Interdigitaldrüsen. Sowohl die ausgeprägte Reviertreue als auch das ungewöhnliche Fluchtverhalten des Buntbocks wird mit den Markierungen durch das Sekret der Interdigitaldrüsen in Verbindung gebracht.

Der chemische Charakter des Düsensekrets weist auf eine langfristige Funktion zur Markierung des Habitats hin, da die menschliche Nase den typischen Geruch auch noch nach Monaten und Jahren an Geräten im Labor, die mit Sekret in Kontakt gekommenen waren, wahrnehmen kann.

Nachdem in einer ersten Untersuchung des Interdigitaldrüsensekrets in den Jahren 1976-77 neun Verbindungen identifiziert wurden<sup>235,236</sup>, konnten bei einer erneuten weiterführenden Untersuchung zusätzlich 76 Komponenten aufgeklärt werden<sup>237</sup>. Bei diesen insgesamt 85 Verbindungen konnte weder eine qualitative Unterscheidung zwischen den beiden Unterarten Echter Buntbock und Blessbock noch zwischen Geschlechtern frei lebender Tiere in verschiedenartigen Habitaten gefunden werden. Kleinere quantitative Differenzen deuten wahrscheinlich nicht auf eine unterschiedliche semiochemische Information hin. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Probe enthielt Interdigitaldrüsensekrete von verschiedenen Tieren beiderlei Geschlechts.

Mit Aufklärung der chemischen Zusammensetzung des Interdigitaldrüsensekretes sollen Kandidatverbindungen eines potentiellen Markierungsspheromons identifiziert werden, um dieses zur Untersuchung des Territorialverhaltens der Antilope zu nutzen. Tiere aus erholten Beständen in Zuchten und Reservaten könnten schonend in neu eingerichtete Habitate verbracht werden, um auf diesem Wege ehemaligen Lebensraum zurück zu gewinnen.



**Abbildung 94:** Gaschromatogramm des Interdigitaldrüsensekrets Bontebok

[Säule 50 m PS-089 (äquivalent zu SE-52), 0.30 mm ID, 0.25 µm FD, Temperaturprogramm: 40 °C, 4 °C/min auf 250 °C, 30 min isotherm]

B1	But-2-enal	B54	2-Nonenal <sup>a</sup>
B2	Butanal	B55	Octansäure <sup>a</sup>
B3	2-Methylbut-3-en-2-ol	B56	<i>p</i> -Cymen-8-ol
B4	Tetrahydrofuran	B57	$\alpha$ -Terpineol <sup>a</sup>
B5	2-Methylbutan-2-ol	B58	2-Octensäure
B6	3-Methylbutan-2-on <sup>a</sup>	B59	2,4-Nonadienal
B7	3-Methyl-3-buten-2-on	B60	dioxygeniertes Terpen SV
B8	(3 <i>Z</i> )-Penten-2-ol <sup>a</sup>	B61	4-Non-2-enolid
B9	Pentanal <sup>a</sup>	B62	2-Decenal
B10	Heptan	B63	Nonansäure
B11	1-Pentanol	B64	Geranial
B12	3-Methyl-2-butenal	B65	(5 <i>Z</i> )-Undecen-2-on <sup>a</sup>
B13	Butansäure	B66	2-Undecanon <sup>a</sup>
B14	2-Hexanon <sup>a</sup>	B67	2,5-Decandion <sup>a</sup>
B15	Hexanal <sup>a</sup>	B68	2,4-Decadienal <sup>a</sup>
B16	Octan <sup>a</sup>	B69	unbekannt mit Basepeak 84
B17	Valeriansäuremethylester	B70	(5 <i>Z</i> )-Nonen-4-olid
B18	3,3-Dimethyl-2-acetyloxiran	B71	3-Decensäure
B19	Ethylbenzol	B72	Decansäure <sup>a</sup>
B20	1-Hexanol	B73	3-Hydroxyacetophenon
B21	Valeriansäure	B74	2-[(4 <i>E</i> )-Hepten-1-yl]pyridin <sup>a</sup>
B23	2-Heptanon (27) <sup>a</sup>	B75	2-(Hept-1-yl-)pyridin <sup>a</sup>
B24	Dimethylsulfon <sup>a</sup>	B76	2,5-Undecandion <sup>a</sup>
B25	Heptanal <sup>a</sup>	B77	unbekannt
B26	5,5-Dimethyl-2(5 <i>H</i> )-furanon	B78	Dodecadienol SV
B27	(2 <i>Z</i> )-Heptenal <sup>a</sup>	B79	(5 <i>Z</i> )-Decen-4-olid
B28	?-Octanon	B80	3-Dodecen-2-on SV
B29	Phenol <sup>a</sup>	B81	4-Undecanolid
B30	Hexansäure <sup>a</sup>	B82	Tridecanal
B31	2-Octanon <sup>a</sup>	B83	2-Heptanoylpyridin <sup>a</sup>
B32	2-Pentylfuran (E15)	B84	12-Dodecanolid
B33	Octanal <sup>a</sup>	B85	Dodecadienol SV
B34	2,4-Heptadienal <sup>a</sup>	B86	Dodecansäure
B35	Decan	B87	unbekannt
B36	4-Hex-2-enolid	B88	5-Hydroxy-4-decanolid
B37	3,5-Octadien-2-ol <sup>a</sup>	B89	2,4,4-Trimethyl-1,3-pentandioldiisobutyrat
B38	Tetrahydro-(2 <i>H</i> )-pyran-2-on	B90	5-Hydroxy-4-decanolid Diastereomer
B39	4-Hexanolid	B91	unbekannt, Basepeak 69, Masse 194
B40	2,6-Dimethyl-1,3,7-octatrien	B92	(6 <i>Z</i> )-Dodec-6-en-4-olid (18) <sup>a</sup>
B41	2-Octenal <sup>a</sup>	B93	4,6-Dimethoxy-2-hydroxyacetophenon
B42	4-Nonanon <sup>a</sup>	B94	unbekannt, Basepeak 41, Masse 196
B43	<i>m</i> -Cresol <sup>a</sup>	B95	Dodecan-5-olid <sup>a</sup>
B44	Heptansäure <sup>a</sup>	B96	unbekannt
B45	Linalooloxid (Furanoid)	B97	unbekannt Basepeak 85
B46	$\beta$ -Terpineol	B98	Tetradecansäure <sup>a</sup>
B47	2-Nonanon <sup>a</sup>	B99	Hexadecanal
B48	Linalooloxid (Pyranoid)	B100	Pentadecansäure <sup>a</sup>
B49	Nonanal	B101	Heptadecanal
B50	Linalool <sup>a</sup>	B102	(9 <i>Z</i> )-Hexadecensäure <sup>a</sup>
B51	$\gamma$ -Terpineol	B103	Hexadecansäure <sup>a</sup>
B52	3-Nonen-2-on	B104	Heptadecansäure <sup>a</sup>
B53	4-Heptanolid	B105	Octadecansäure <sup>a</sup>

**Tabelle 11:** Substanzliste des Totalionenstromchromatogramms des Buntbockinterdigitaldrüsensekrets

<sup>a</sup> Verbindungen ebenfalls in vorherigen Untersuchungen aufgeklärt<sup>235,236,237</sup>.

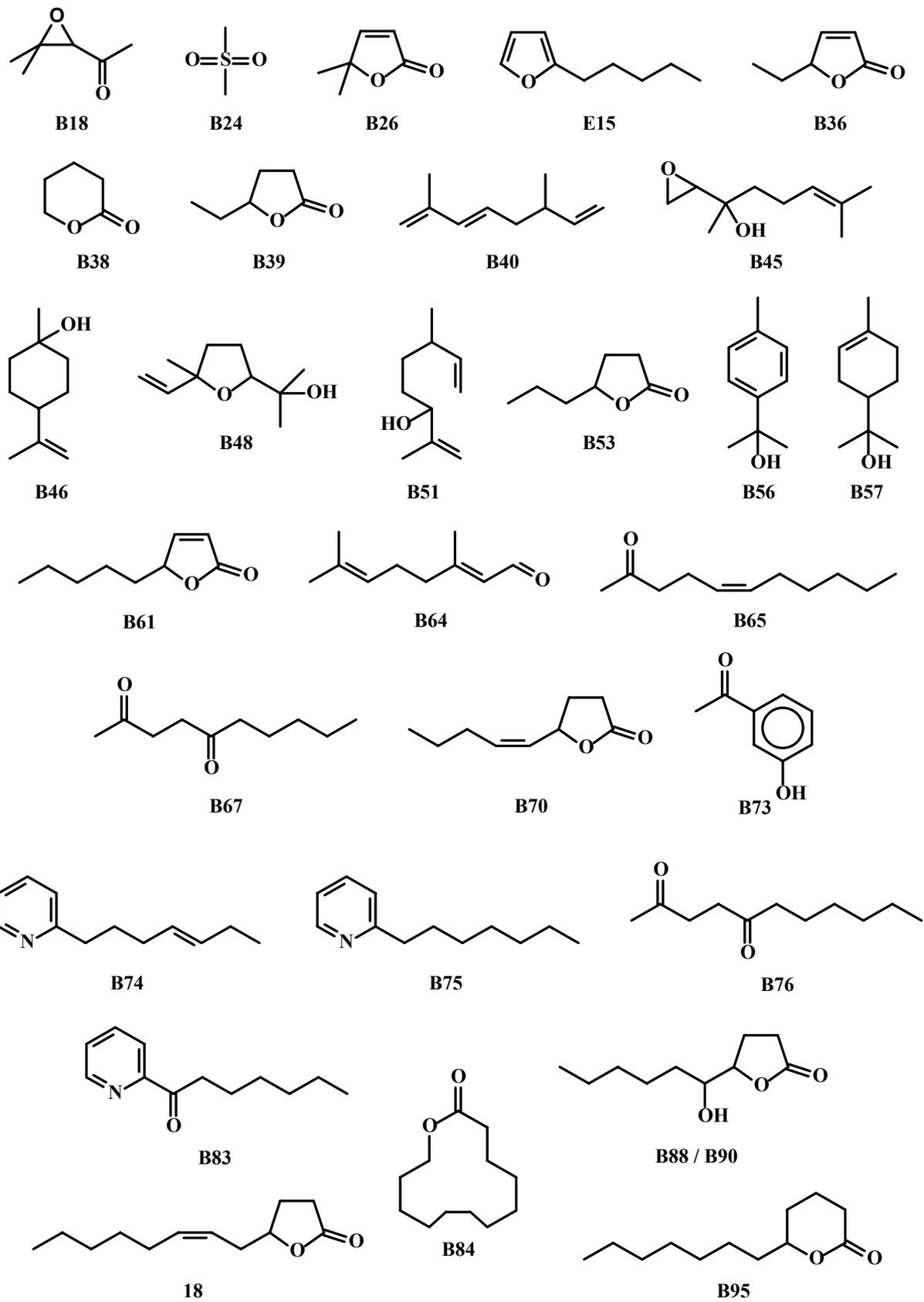
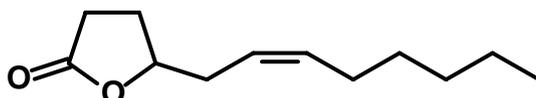


Abbildung 95: Strukturvorschläge einiger Hauptkomponenten und ausgewählter Verbindungen

## Zielsetzung

Als eine der Hauptkomponenten des Interdigitaldrüsensekrets des Buntbocks wurde (6Z)-Dodec-6-en-4-olid<sup>h</sup> (**18**) aufgeklärt (Abbildung 96). Die Substanz hat für menschliche Nasen einen deutlich wahrnehmbaren Geruch und ist unter anderem ein Duftbestandteil von Pfirsichsaft<sup>238</sup> und Weißwein<sup>239</sup>. Sie wurde als Aromabestandteil in Milch von Rindern<sup>240</sup> und damit in weiteren Milchprodukten (Butterfett<sup>241</sup>, Cheddar Cheese<sup>242</sup>, Emmentaler<sup>243</sup>, Camembert<sup>244</sup>) sowie im subkutanen Fettgewebe von Lämmern<sup>245</sup> nachgewiesen und führt zu dem süßlichen Geschmack des gekochten Lammfleisches. Außerdem wird sie unter anderem von dem Schimmelpilz *Fusarium poae*<sup>246</sup> und dem marinen Bakterium DFL-27 [aus Zellen der Algen (Dinoflagellaten) *Alexandrium ostenfeldii*] produziert<sup>247</sup>.



**Abbildung 96:** (6Z)-Dodec-6-en-4-olid (**18**)

Weiterhin wurde diese Verbindung bereits als Pheromon des nordamerikanischen Schwarzwedelhirsches *Odocoileus hemionus columbianus*, der ebenfalls in die Ordnung der Paarhufer (Artiodactyla) gehört, identifiziert und wird daher auch als „Deer Lactone“ (Hirsch Lacton) bezeichnet<sup>42</sup>. Der Schwarzwedelhirsch reichert diese Verbindung mit Hilfe von Haarbüscheln der Fußwurzeldrüse aus seinem Urin an<sup>248</sup>. Das „Deer Lactone“ **18** liegt in der Z-Konfiguration der Doppelbindung<sup>45</sup> und einem enantiomeren Verhältnis 89% (*R*) und 11% (*S*) vor<sup>46</sup>. Es weist eine semiochemische Funktion bei Tieren jeden Alters und beiderlei Geschlechts auf. Kitze nutzen es zum Anzeigen einer Notsituation, während erwachsene Tiere damit auf eine Bedrohung hinweisen<sup>249</sup>.

Das Lacton **18** gilt auch im Kontext mit dem Buntbock als potentielle Kandidatverbindung für einen verhaltensmodifizierenden Wirkstoffs oder Bestandteil eines solchen Buketts. Für eine mögliche biologische Aktivität ist, zumindest im Bereich der Insektenpheromone, oft neben der naturgetreuen quantitativen Zusammensetzung der Substanzen ebenso das exakte stereochemische Verhältnis von entscheidender Bedeutung.

<sup>h</sup> IUPAC Name: 5-Oct-2-enyldihydrofuran-2-on

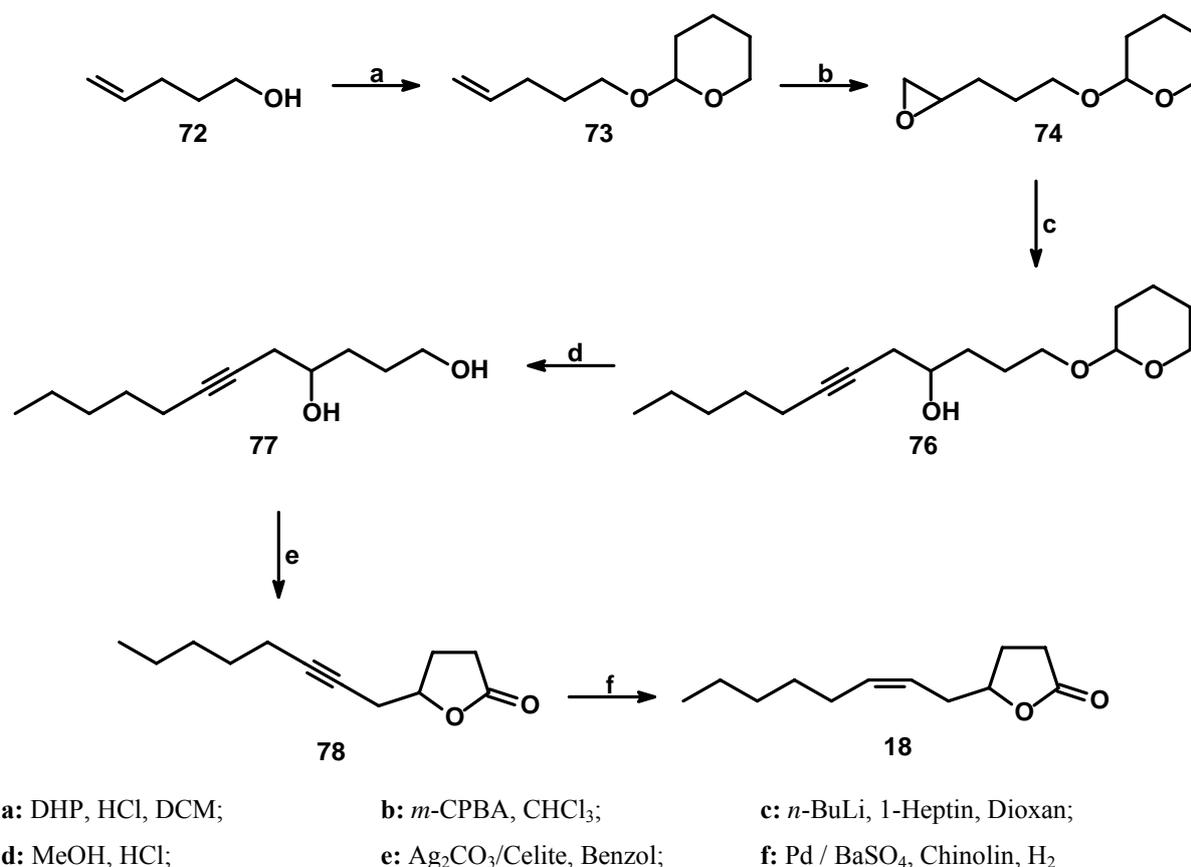
Die Bestimmung der Zusammensetzung der Enantiomere im Interdigitaldrüsensekret des Buntbocks soll nach asymmetrischer Synthese der Enantiomere des Lactons **18** durch enantioselektive Gaschromatographie erfolgen. In Feldtests soll die biologische Aktivität des Lactons in natürlicher Zusammensetzung der Enantiomere, der enantiomerenreinen Verbindungen und des Racemats getestet werden. Ein potentieller Unterschied der biologischen Aktivität zwischen dem natürlichen Enantiomerengemisch und den optischen Antipoden soll hiermit untersucht werden.

Für umfangreiche Freilandtests sollen jeweils etwa 3-5 g der optisch reinen Verbindungen und des Racemats zur Verfügung gestellt werden. Weiterhin sollen für bislang unbekannte Inhaltsstoffe Strukturvorschläge gemacht werden.

## Synthesen

### Darstellung von racemischem (6Z)-Dodec-6-en-4-olid (18)

Zunächst wurde die Synthese des racemischen (6Z)-Dodec-6-en-4-olids (**18**) durchgeführt, da die enantioselective Synthese präparativ aufwändiger und kostenintensiver ist und für Feldtests zur biologischen Aktivität größere Mengen des Racemats nötig sind. Von Burger *et al.* wurde die Darstellung des racemischen Lactons nach folgender Methode beschrieben<sup>235</sup>:

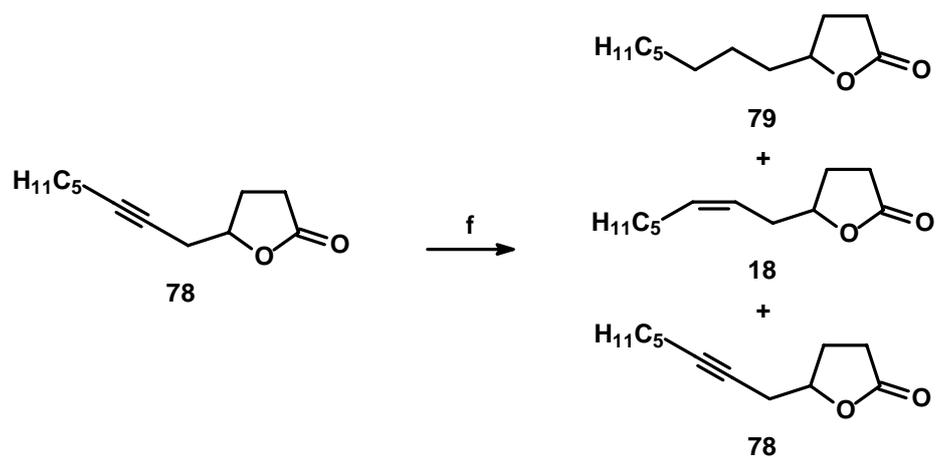


**Abbildung 97:** Synthese des racemischen (6Z)-Dodec-6-en-4-olid (**18**) nach Burger

Hierbei wurde zunächst die Hydroxyfunktion von Pent-4-en-1-ol (**72**) unter salzsaurer Katalyse mit Dihydropyran blockiert (**a**) und anschließend die Doppelbindung von **73** durch *meta*-Chlorperbenzoesäure in Chloroform in das Epoxid **74** umgewandelt (**b**).

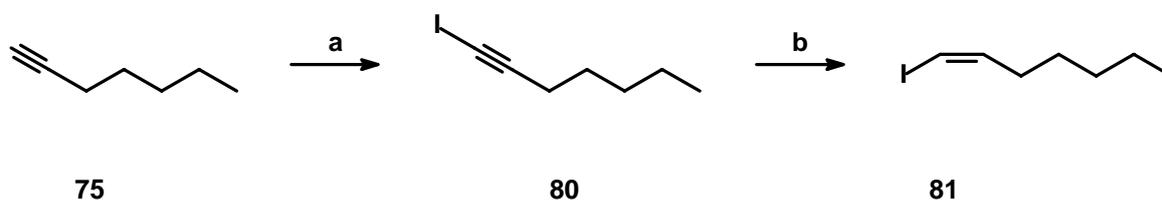
Öffnung des Epoxids durch das Anion von 1-Heptin (**75**) führte zu **76** (**c**). Dieses wurde säurekatalysiert zum Alkindiol **77** deblockiert (**d**).

Selektive Oxidation der primären Alkoholfunktion mit Silbercarbonat auf Celite nach der Methode von Fetizon führte zum Dodec-6-en-4-olid (**78**) (**e**)<sup>250</sup>.



**Abbildung 98:** Produktgemisch der unselektiv verlaufenden Hydrierung von **78** mit Lindlarkatalysator

Die partielle Hydrierung der Dreifachbindung an mit Chinolin vergiftetem Lindlarkatalysator ergab (6Z)-Dodec-6-en-4-olid (**18**) (**f**). Da sich diese Hydrierung (Schritt **f**) in der Vergangenheit präparativ nicht quantitativ zum Alken durchführen ließ und ein Produktgemisch aus Alkanolid **79**, Alkenolid **18** und Alkinolid **78** entstand (Abbildung 98)<sup>251</sup>, welches sich chromatographisch schwer im präparativen Maßstab trennen lässt, wurde der Synthesepfad abgewandelt. Die C-C-Verknüpfung sollte statt mit deprotoniertem 1-Heptin (**75**) (Schritt **c**) mit dem *in situ* erzeugten Cuprat aus (1Z)-1-Heptenyliodid (**81**) durchgeführt werden. Ein chromatographisches Trennproblem zwischen (6Z)-Dodec-6-en-4-olid (**18**) und Dodec-6-in-4-olid (**78**) kann so vermieden werden. Das dafür benötigte (1Z)-1-Heptenyliodid (**81**) wurde zuvor über 1-Iod-1-heptin (**80**) als Zwischenstufe aus **75** dargestellt:

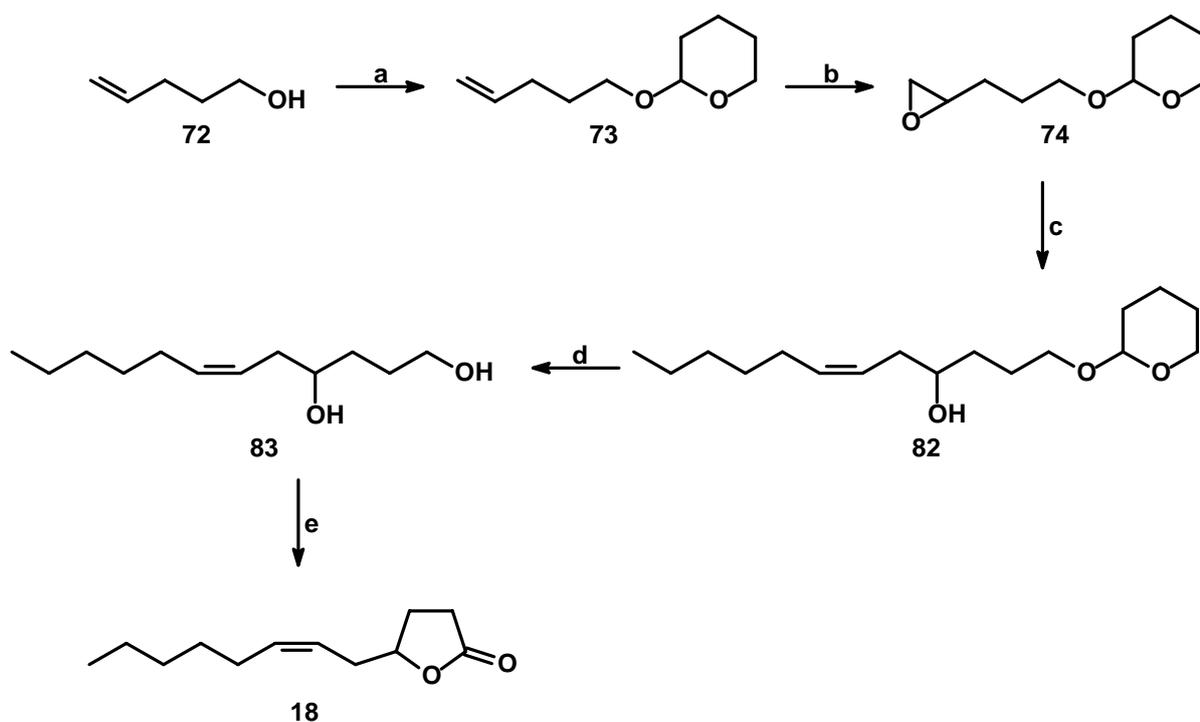


**a:** n-BuLi, Iod, Et<sub>2</sub>O;

**b:** BH<sub>3</sub>·S(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Cyclohexen, Et<sub>2</sub>O

**Abbildung 99:** Synthese von (1Z)-1-Heptenyliodid (**81**)

Deprotonierung von Heptin (**75**) durch *n*-Butyllithium in Diethylether und Umsetzung des Carbanions mit elementarem Iod ergab 1-Iod-1-heptin (**80**) (Abbildung 99, Schritt **a**). Stereoselektive Reduktion mit *in situ* erzeugtem Dicyclohexylboran (Abbildung 99, Schritt **b**) führte nach Hydrolyse zu (1*Z*)-Heptenyliodid (**81**). Die entsprechend abgeänderte Synthese wurde auf dem in Abbildung 100 dargestellten Weg durchgeführt:



**a:** DHP, TsOH, DCM;

**b:** *m*-CPBA, DCM;

**c:** (1*Z*)-1-Heptenyliodid (**81**), *n*-BuLi, CuI, Et<sub>2</sub>O;

**d:** MeOH, TsOH;

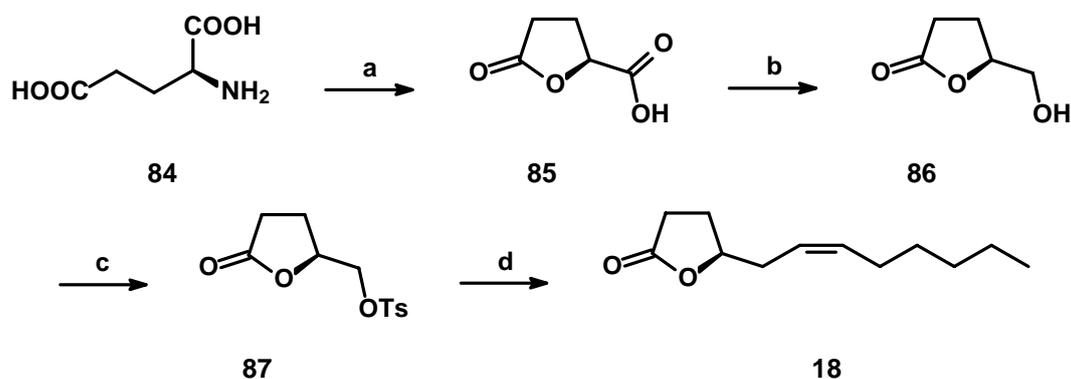
**e:** Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/Celite, Toluol

**Abbildung 100:** Verbesserte Synthese von racemischen (6*Z*)-Dodec-6-en-4-olid (**18**)

Ausgehend von Pent-4-en-1-ol (**72**) wurde (6*Z*)-Dodec-6-en-4-olid (**18**) erhalten. **72** wurde unter Katalyse durch *p*-Toluolsulfonsäure in Dichlormethan mit Dihydropyran blockiert<sup>252,253</sup>. Die Epoxidierung von **73** erfolgte mit *m*-CPBA in Dichlormethan zu **74**. Das Cuprat höherer Ordnung aus (1*Z*)-Heptenyl-1-iodid (**81**) in Diethylether öffnete das Epoxid zu **82**. Deblockieren mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in Methanol führte zum Alkendiol (**83**). Die primäre Hydroxylgruppe wurde selektiv nach der Methode von Fetizon zur Carboxylgruppe oxidiert. Durch anschließende *in situ* Zyklisierung bildete sich (6*Z*)-Dodec-6-en-4-olid (**18**).

## Erste Strategie zur enantioselektiven Synthese

Die Darstellung von enantiomerenreinem (6*Z*)-Dodec-6-en-4-olid (**18**) gelang Ravid *et al.* mittels einer klassischen Chiral-Pool-Synthese, welche von den Enantiomeren der Glutaminsäure (**84**) ausging<sup>254</sup>:



**a:** NaNO<sub>2</sub>, HCl, H<sub>2</sub>O;    **b:** BH<sub>3</sub>•S(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, THF;    **c:** TsCl, Pyridin;  
**d:** *n*-BuLi, (1*Z*)-1-Heptenyljodid (**81**), CuI, Et<sub>2</sub>O

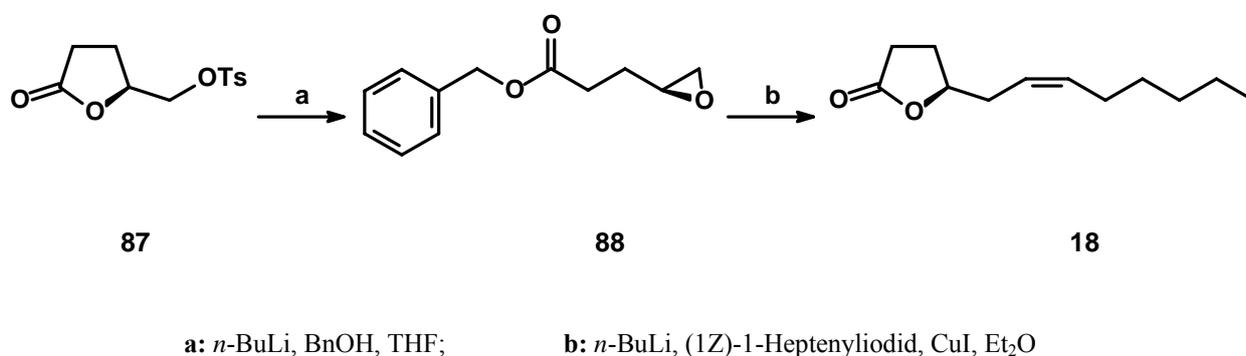
**Abbildung 101:** Enantioselektive Synthese von (6*Z*)-Dodec-6-en-4-olid (**18**) nach Ravid *et al.*<sup>254</sup>

Als Ausgangsverbindungen dieser Synthese wurden die kommerziell erhältlichen optisch reinen Enantiomere der Glutaminsäure (**84**) genutzt. Im Schritt **a** (dargestellt ist die Variante mit *L*-Glutaminsäure) konnte durch Diazotierung mit salpetriger Säure unter Retention der Konfiguration (*S*)-(+)-γ-Carboxy-γ-butyrolacton (**85**) dargestellt werden. Selektive Reduktion der freien Carboxylgruppe in Anwesenheit der Lactonfunktion mit Boran-Dimethylsulfid-Komplex ergab (*S*)-(+)-γ-Hydroxymethyl-γ-butyrolacton (**86**), dessen Hydroxylgruppe mit TsCl in das entsprechende Tosylat (**87**) überführt wurde. Dieses diente als Abgangsgruppe bei der anschließenden Umsetzung mit Dihept-1-enylcuprat, welches aus (1*Z*)-Heptenyl-1-iodid (**81**) *in situ* dargestellt wurde. Produkt dieser Cupratkopplung ist (6*Z*)-Dodec-6-en-4-olid (**18**). Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit gelang in einer ersten, leicht abgeänderten Synthese die Darstellung von (6*Z*)-Dodec-6-en-4-olid (**18**) anhand des obigen Synthesepfades. Der Diazotierungsschritt (**a**) konnte übersprungen werden, da beide optisch reinen Enantiomere des γ-Carboxy-γ-butyrolactons (**85**) kommerziell erhältlich sind. Die Umsetzung im letzten Syntheseschritt (**d**) gelang nur in sehr unbefriedigenden Ausbeuten [(*S*)-(**18**) 11%, (*R*)-(**18**) 13 %].

Der Austausch des Tosylats gegen Iodid<sup>255</sup> mittels Finkelstein Reaktion erbrachte keine Ausbeuteverbesserung in der Cupratkopplung. Für die Aufklärung der absoluten Konfiguration des Naturprodukts konnten ausreichende Mengen dargestellt werden. Da jedoch für Biotests mindestens 3 g der reinen Enantiomere dargestellt werden sollten, wurde ein neuer Syntheseweg mit besseren Ausbeuten ausgearbeitet.

### Zweite Strategie zur enantioselektiven Synthese

Da sich die bereits beschriebene enantioselektive Synthese aufgrund unzureichender Ausbeuten als ungeeignet erwiesen hatte, wurde folgender alternativer Synthesepfad erarbeitet: Bei der Umwandlung von (*S*)-Glutaminsäure (**84**) in das (*R*)-Enantiomer beschrieben Tanaka *et al.*<sup>256</sup> (*4S*)-Benzyl 4,5-epoxypentanoat (**88**) als Intermediat. Das Epoxid **88** entsteht beim nucleophilen Angriff des Benzylalkoholatanions auf die Carboxylgruppe von **87** in einer Kaskadenreaktion. Das intermediär gebildete Oxyanion am stereogenen Zentrum greift unter Erhalt der Stereochemie den Kohlenstoff des Tosylesters an, und unter Austritt des Tosylatanions entsteht das chirale Epoxid (*S*)-**88** (Abbildung 102).

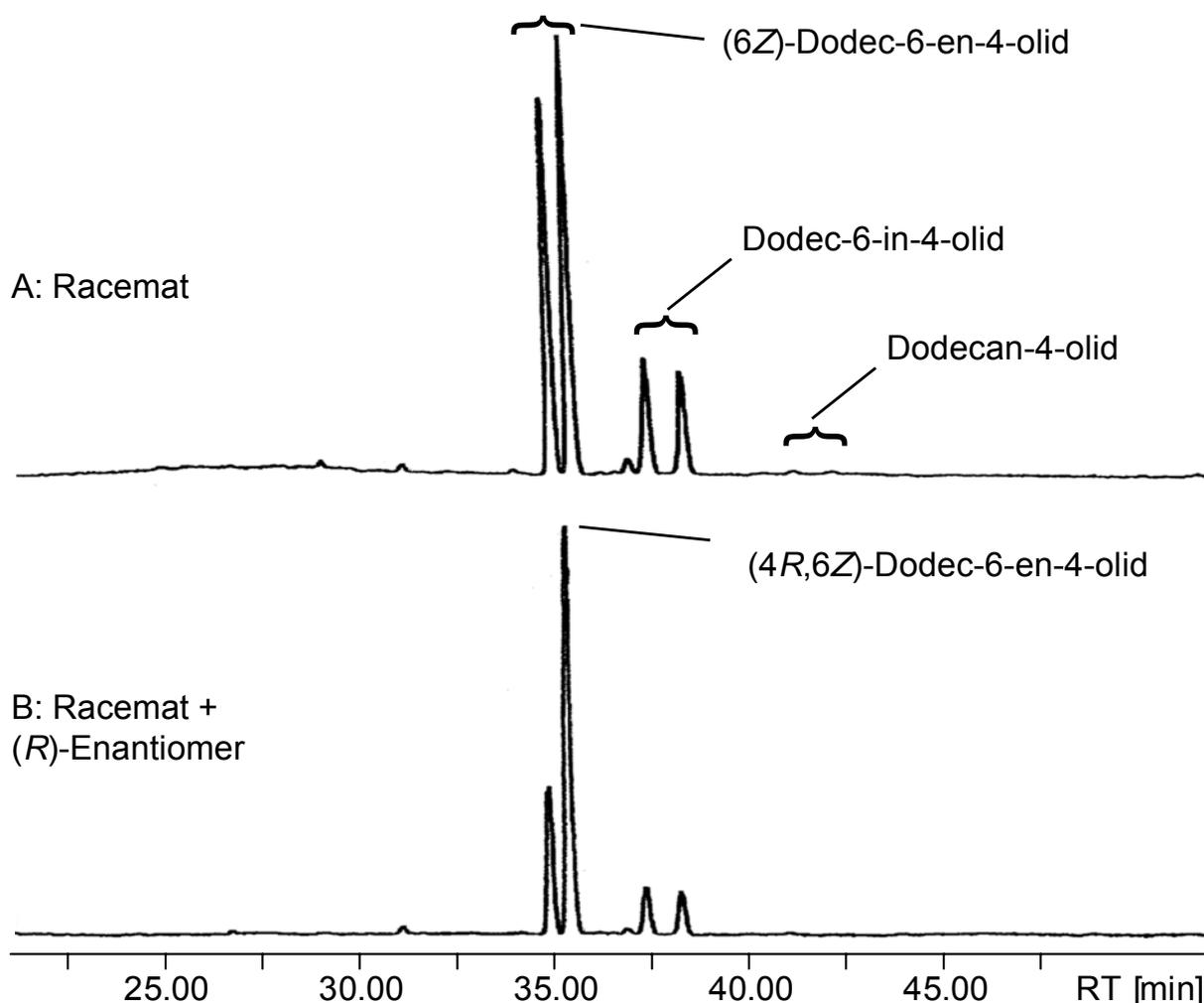


**Abbildung 102:** Enantioselektive optimierte Synthese von (6*Z*)-Dodec-6-en-4-olid (**18**)

Das Epoxid **88** konnte durch Öffnung mit dem Cuprat höherer Ordnung aus (1*Z*)-1-Heptynylid (**81**) zu dem gewünschten Lacton (**18**) umgesetzt werden<sup>257</sup>. Die Umsetzung in das Epoxid **88** gelang mit Ausbeuten von 60-70% und die Darstellung des Lactons **18** in Ausbeuten bis zu 60%. Somit konnte trotz längeren Synthesewegs eine wesentlich bessere Ausbeute über alle Synthesestufen erzielt werden.

## Bestimmung der absoluten Konfiguration des Deer-Lactons im Buntbock

Die Bestimmung der Zusammensetzung der Enantiomere von (6Z)-Dodec-6-en-4-olid (**18**) im Buntbock gelang durch enantioselektive Gaschromatographie. Zunächst wurden die Trennleistung und die Elutionsreihenfolge der optisch reinen Verbindungen an optisch aktiven stationären Phasen bestimmt. Dazu wurde das synthetische Racemat, in Coinjektion das Racemat mit dem (*R*)-Enantiomer und letztlich das reine (*R*)-Enantiomer injiziert. Es konnte gezeigt werden, dass das (*S*)-Enantiomer unter diesen Bedingungen zuerst eluiert. Da das Racemat analog dem Synthesepfad nach Burger in Abbildung 97 hergestellt wurde, sind die später eluierenden Enantiomere des Dodec-6-in-4-olids (**78**) und in Spuren des Dodecan-4-olids (**79**) als Verunreinigungen enthalten.

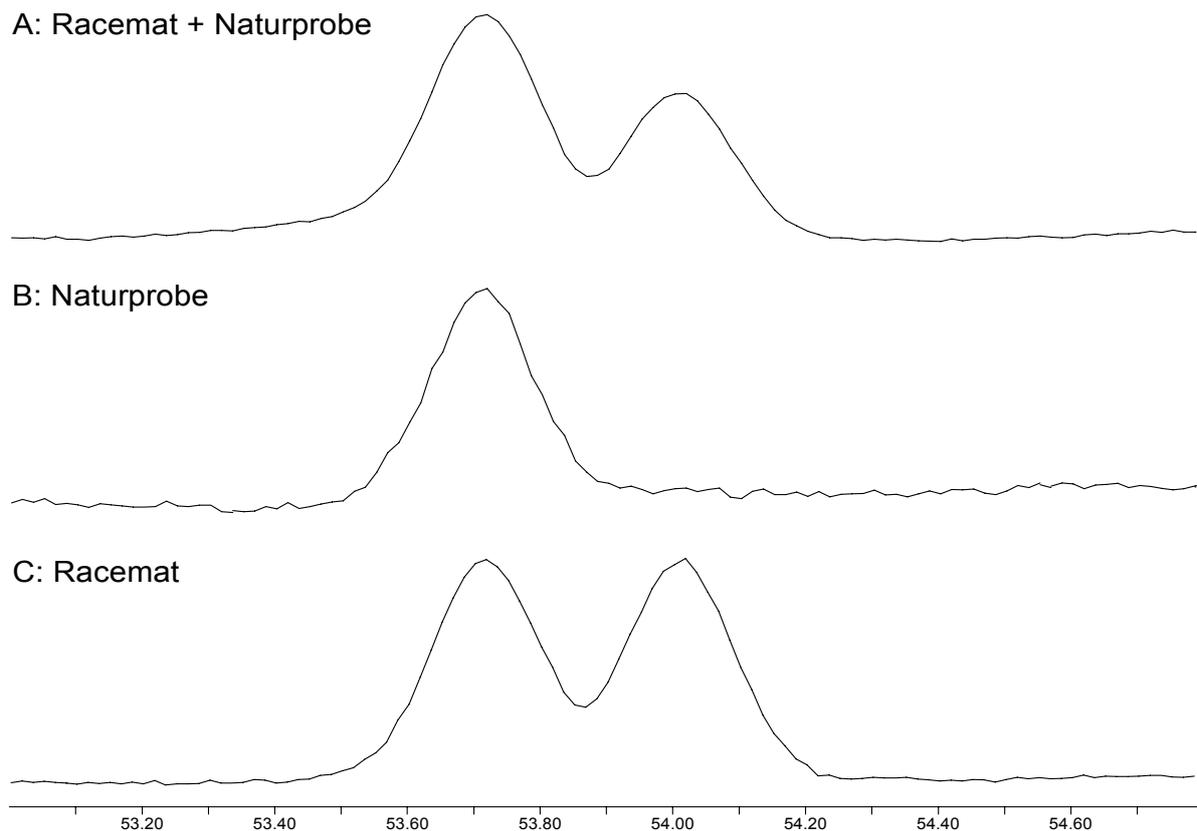


**Abbildung 103:** Ausschnitte der FID-Chromatogramme der enantioselektiven Gaschromatographie

A: Racemat und B: Coinjektion von synthetisiertem Racemat und (*R*)-Enantiomer von **18**

[30 m 0.2mm ID 13% Heptakis(2,3-di-O-methyl-6-O-tert-butylidimethylsilyl)- $\beta$ -cyclodextrin gelöst in OV-1701-OH (eigene Herstellung<sup>258</sup>) 0.25  $\mu$ m FT; Temperaturprogramm 120  $^{\circ}$ C, 2  $^{\circ}$ C/min auf-170, 30 min isotherm]

Um eine eindeutige Zuordnung der Enantiomere im komplexen Gemisch der Naturprobe zu gewährleisten, wurde erneut an der gleichen Cyclodextrin-Phase getrennt, wobei die Detektion mit Hilfe eines Massenspektrometers erfolgte (TIC). Durch Coinjektion der einzelnen Enantiomere mit der Naturprobe und Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren konnte gezeigt werden, dass ausschließlich das (*S*)-Enantiomer von **18** im Drüsensekret des Buntbocks vorkommt.



**Abbildung 104:** Ausschnitte der Totalionenstromchromatogramme der enantioselektiven Gaschromatographie  
A: Coinjektion Racemat von **18** und Naturprobe, B: Naturprobe und C: Racemat von **18**

[30 m 0.2mm ID 13% Heptakis(2,3-di-O-methyl-6-O-tert-butyldimethylsilyl)- $\beta$ -cyclodextrin gelöst in OV-1701-OH, 0.25  $\mu$ m FT; Temperaturprogramm 40 °C, 4 °C/min auf 160 °C, 1 °C/min auf 180 °C, 10 min isotherm]

## Biosynthese

In den Interdigitaldrüsen des Buntbocks konnten unabhängig von Unterart, Geschlecht und Habitat nur zwei Bakterienstämme *Bacillus brevis* und *Planococcus citreus* durch Arbeiten von Burger *et al.* isoliert werden<sup>237</sup>. Die Metaboliten der kultivierten Bakterienstämme wurden analysiert. Dabei konnte *in vitro* (6Z)-Dodec-6-en-4-olid (**18**) als eines der Hauptprodukte von *P. citreus* gefunden werden. Allerdings wurde über mögliche Biosynthesewege in den Drüsen des Buntbocks nichts berichtet. Unabhängig von dieser speziellen Problemstellung beim Buntbock, wurden mikrobielle Abbauwege von Fettsäuren durch mehrere Arbeitsgruppen eingehend untersucht und publiziert.

(6Z)-Dodec-6-en-4-olid (**18**) wurde als Metabolit bei der Umsetzung von Fettsäuren durch Mikroorganismen identifiziert<sup>245,259-262</sup>. Abhängig von der Art der Mikroorganismen konnte von **18** sowohl das (*S*)- als auch das (*R*)-Produkt in hohen Enantiomerenüberschüssen isoliert werden. Es wird daher angenommen, dass der mikrobielle Abbau von Fettsäuren durch verschiedene Mikroorganismen über unterschiedliche Wege zu entgegengesetzten Stereoisomeren ablaufen kann. Die Biogenese des Lactons **18** ist bislang unbekannt und muss Inhalt weiterer Untersuchungen sein.

## Ergebnisse und Diskussion

Bei den gaschromatographisch-massenspektrometrischen Untersuchungen des Sekrets der Interdigitaldrüsen vom Buntbock konnten über hundert Substanzen identifiziert werden. Etliche in vorherigen Arbeiten bestimmte Verbindungen wurden bestätigt. Zusätzlich konnte eine Vielzahl neuer Strukturvorschläge für bislang in diesem Zusammenhang unbekannte Verbindungen gemacht werden.

Eine der Hauptkomponenten war auch in diesen Proben das (6Z)-Dodec-6-en-4-olid (**18**), welches schon in anderen Zusammenhängen eine biologische Aktivität aufwies und demzufolge als Kandidatverbindung für biologische Aktivität beim Buntbock dargestellt wurde. Auf den in Abbildung 101 und Abbildung 102 vorgestellten Wegen gelang die enantioselektive Synthese des (6Z)-Dodec-6-en-4-olids (**18**), wobei die erste Synthese aufgrund unbefriedigender Ausbeuten in der letzten Stufe für die Darstellung von in Biotests geforderten Substanzmengen unzureichend war. Durch die Entwicklung der Synthese in Abbildung 102 gelang dieses unter Nutzung bekannter Synthesestrategien.

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration in der Naturprobe des Interdigitaldrüsensekrets vom Buntbock erfolgte mittels enantioselektiver Gaschromatographie. Die Zuordnung wurde durch Vergleich der Retentionszeiten zwischen Synthesesubstanzen und Naturprobe getroffen: Im Interdigitaldrüsensekret fand sich ausschließlich das (*S*)-Enantiomer von **18**.

Das untersuchte Probenmaterial stammte von mehreren Tieren beiderlei Geschlechts. Das Lacton **18** wird vermutlich durch Mikroorganismen in den Interdigitaldrüsen und nicht vom Buntbock selbst gebildet<sup>237</sup>. Eine geschlechtsspezifische Enantiomerenzusammensetzung kann daher ausgeschlossen werden, zumal hier ausschließlich das (*S*)-Enantiomer gefunden wurde.

Biologische Feldtests konnten bislang noch nicht durchgeführt werden, so dass eine Aussage zur biologischen Aktivität einzelner Enantiomere oder des Racemats nicht gemacht werden kann.

# Fischfaktor

## Biologisch aktive Substanzen in limnischen Systemen

Die Übertragung von Signalen zwischen Organismen durch biologisch aktive Substanzen, den Semiochemikalien, spielt auch in aquatischen Lebensräumen eine bedeutende Rolle. In limnischen Systemen wurden durch Kairomone induzierte Beziehungen zwischen Räubern und ihren potentiellen Beutetieren beobachtet. Die Anwesenheit der Räuber kann bei Beutetieren ein Abwehr- oder Ausweichverhalten hervorrufen.

Das Abwehrverhalten äußert sich in morphologischen Veränderungen, die ein Ergreifen des Beutetieres durch den Räuber erschweren. Analog zur Terminologie der Pheromone wird aufgrund der Auslösung einer physiologischen Reaktion als Antwort auf das vom Räuber freigesetzte Kairomon von einem Primerkairomon (primer kairomone) gesprochen<sup>263</sup>.

Im Zooplankton wurde bei Anwesenheit von räuberischen Rädertieren (Rotatoria) der Art *Asplanchna* eine Dornenbildung bei den anderen Rädertierenarten *Brachionus calyciflorus* sowie *Keratella cochlearis* beschrieben<sup>264,265</sup>. Ebenso wurden bei verschiedenen Arten der Gattung *Daphnia* morphologische Änderungen beobachtet, die durch Kairomone ausgelöst wurden. Daphnien gehören zu den Blattfußkrebse, die in Mitteleuropa mit etwa 90 Arten vertreten sind und nahezu alle Formen der Wasseransammlungen, von tiefen Seen bis hin zu Pfützen, besiedeln. Die millimetergroßen Krebstierchen weiden an Wasserpflanzen und sind als Bestandteil des Zooplanktons wichtige Nahrungsquelle von Fischen und somit ein unverzichtbares Glied in der Nahrungskette von Süßwassersystemen.

*Daphnia carinata* bildet unter Einfluß des Rückenschwimmers *Anisops calcaratus* im Kopfbereich einen Dorn aus, wodurch das Tier größer erscheint. Die räuberische Larve der Büschelmücke *Chaoborus* ruft über ein Kairomon eine ähnliche Wirkung bei *D. pulex* und bei *D. hyalina* hervor<sup>266-269</sup>. Bei *D. cucullata* wird unter Einwirkung von *Chaoborus* eine typische Helmbildung beobachtet<sup>270-273</sup>. Diese morphologischen Änderungen treten nur in Gewässern mit „Feinddruck“, also bei Anwesenheit des potentiellen Räubers, auf. Durch die phänotypische Plastizität wird dem Räuber das Erfassen seiner Beute erschwert.

Neben den Kairomonen von räuberischen Insekten und ihren Larven detektieren Daphnien auch ein von Fischen freigesetztes Kairomon, welches als „Fischfaktor“ bezeichnet wurde<sup>274,275</sup>. Dabei erfolgt eine unmittelbare Verhaltensänderung der Daphnien. Das Kairomon wird daher als Releaserkairomon (releaser kairomones) bezeichnet<sup>263</sup>. In tiefen Gewässern mit Besatz zooplanktonfressender Fische reagieren die Daphnien auf den „Fischfaktor“ mit einer tagesperiodischen Vertikalwanderung [engl.: Diel Vertical Migration (DVM)]<sup>276,277</sup>. Die Wasserflöhe halten sich tagsüber im kalten Tiefenwasser der Seen auf, um visuell jagenden räuberischen Fischen zu entgehen, und steigen nachts an die Wasseroberfläche, um die tiefen Wasserschichten mit kälterer Temperatur und geringen Konzentrationen an Phytoplankton zu verlassen. Diese Wanderungsbewegung findet in direkter Abhängigkeit von der Fischpopulationsdichte und somit der Kairomonkonzentration statt. Weiterhin ist für das Auftreten der DVM eine tagesperiodische Änderung der Lichtintensität erforderlich. Daphnien befolgen die DVM überwiegend im Sommer, und in einem dauerhaft abgedunkelten Biotest findet ohne Lichtzyklus keine DVM statt<sup>278,279</sup>. Die DVM stellt für Daphnia einen Kosten-Nutzen-Kompromiss dar: Die Migration in tiefere und dunklere Wasserschichten senkt das Risiko zum Opfer visuell jagender planktivorer Fische zu werden. Dafür werden jedoch hohe demographische Kosten in Kauf genommen, da die Reproduktionsrate und das Wachstum durch die Fluchtbewegung in Zonen geringen Nahrungsangebots und kalter Temperaturen reduziert sind<sup>280-282</sup>. Bei Abwesenheit des Kairomons, also in Gewässern ohne Fischbesatz, findet daher keine DVM der Daphnien statt. Bislang sind die chemischen Zusammensetzungen der biologisch aktiven Substanzen in limnischen Systemen nicht bekannt. Die chemische Struktur des „Fischfaktors“ konnte somit trotz intensiver Bemühungen bisher nicht aufgeklärt werden. Für den „Fischfaktor“ wurde ein nicht-olefinisches, mittelpolares Molekül geringen Molekulargewichts, welches mindestens eine Hydroxyfunktion und keine Aminogruppe enthält, postuliert<sup>283</sup>. Trimethylamin wurde zwischenzeitlich als ein aktiver Bestandteil einer Substanzgruppe, welche gemeinsam als Bukett den Fischfaktor bildet, vorgeschlagen<sup>284</sup>, doch konnte biologische Aktivität des Trimethylamins jedoch in weiterführenden Biotests nicht nachgewiesen werden<sup>285</sup>.

## Flüchtige organische Verbindungen im „Fischwasser“

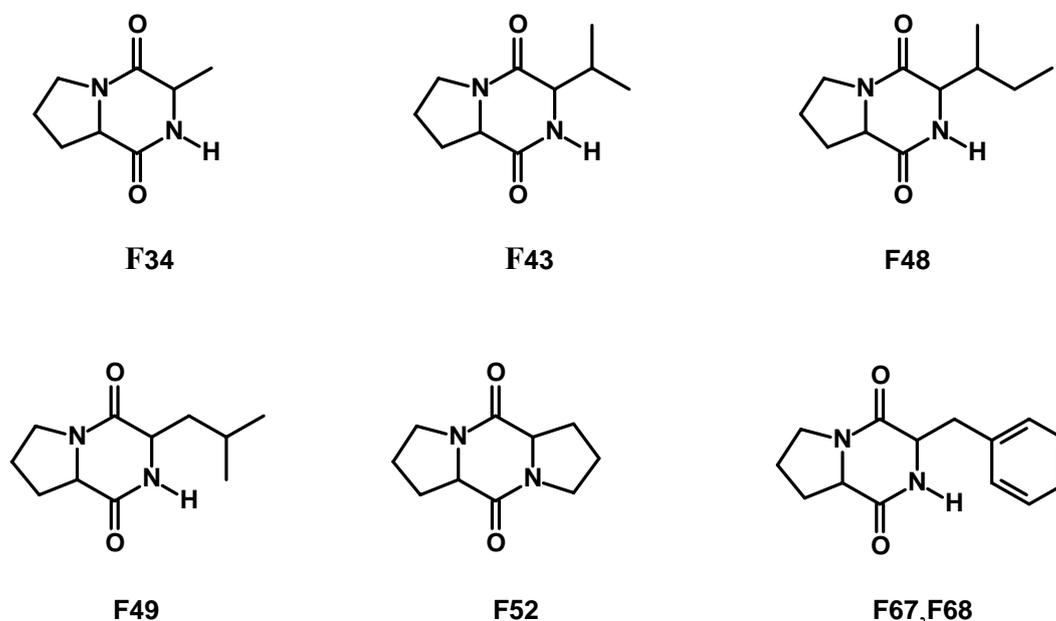
Wässriges Probenmaterial wurde durch zwei unabhängige Haltungen von Flußbarschen (*Perca fluviatilis*) am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg und von Karauschen (*Carassius carassius*) am Max-Planck-Institut für Limnologie in Plön gewonnen. Das Hälterungswasser wurde entnommen, in verschiedenen Extraktionsverfahren angereichert und fraktioniert (Methode siehe SNIFFS-Report<sup>286</sup>). Die einzelnen Fraktionen des angereicherten Probenmaterials wurden hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität getestet, wobei sich zeigte, dass das methanolische Eluat der Festphasenextraktion mit Umkehrphasensäulen (C18 SPE) Aktivität im Biotest aufwies. Durch den Vergleich mit Kontrollproben ohne Fischbesatz (blanks) und zusätzlichen Fütterungsexperimenten bei Nahrungsmangel und -überschuß konnten aussagekräftige Unterschiede der detektierten Substanzen festgestellt werden. Diese Fraktionen wurden zur Trockene eingengt, in 50 µl Methanol aufgenommen und direkt mittels GC/MS untersucht. Ein typisches Totalionenstromchromatogramm eines methanolischen SPE Eluates bei Fischbesatz und Nahrungsüberschuß ist in Abbildung 105 gezeigt. Die detektierten Substanzen werden in Tabelle 12 aufgeführt. Durch die hohe Anreicherung der organischen Spurenkomponenten bei der Festphasenextraktion um einen Faktor von  $10^6$  liegen neben den zahlreichen und teilweise koeludierenden Verbindungen verschiedener Substanzklassen auch einige offensichtliche Kontaminanten aus Hälterung und Probenvorbereitung vor. Dabei handelt es sich beispielsweise um Weichmacher und UV-Stabilisatoren, die in Kunststoffmaterialien zu finden sind (Bezeichnung K in der Tabelle 12). Mehrere Diketopiperazine (Abbildung 106) sowie  $\alpha$ -Hydroxyalkyllactone (Abbildung 107), deren Strukturen zunächst nur anhand der massenspektrometrischen Daten postuliert werden konnten, wurden neben überwiegend oxygenierten aliphatischen Substanzen erstmalig im Hälterungswasser von Fischen nachgewiesen. Für einige Verbindungen konnte trotz Interpretation der Massenspektren und Abgleich mit Spektrenbibliotheken kein sicherer Strukturvorschlag gemacht werden. Diese Verbindungen sind im abgebildetem Chromatogramm in der Abbildung 105 mit dem Sternsymbol „\*“ gekennzeichnet. Weiterhin liegen zwei unbekannte Substanzgruppen in geringer Intensität vor. Die erste Gruppe (**F53-F55** und **F57**) zeigt ein vermutliches Molekülion bei  $m/z$  272 und intensive Signale bei entweder  $m/z$  179 und 139 oder  $m/z$  129 und 100. Die zweite Gruppe (**F62-F63**) wird durch einen intensiven Basispeak bei  $m/z$  137 charakterisiert. Die Massenspektren der unbekanntenen Verbindungen sind im Anhang abgebildet.



F1	Benzaldehyd	F37	<i>Tris</i> -(2-Chlorethyl)phosphorsäureester K
F2	2-Phenylacetaldehyd	F38	Aliphatisches Dienol / Enal SV
F3	2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexen-1,4-dion	F39	6-Tridecanolid SV
F4	2-Phenylpropenal	F40	6-Hydroxy-5-dodec-2-enolid
F5	2-Phenylelessigsäuremethylester	F41	1,2-Diphenylethandion K
F6	2,6,6-Trimethylcyclohexa-1,4-dion	F42	6-Hydroxy-5-dodecanolid
F7	2-(2-Butoxyethoxy)-ethanol K	F43	3-Isopropylhexahydropyrrolo[1,2a]- pyrazin-1,4-dion (cycloProVal)
F8	Decanal	F44	Diisobutylphthalat K
F9	3-Ethyl-4-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2,5-dion	F45	6-Hydroxy-5-alkanolid / bp=100 SV
F10	3-Methyl-4-vinyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2,5-dion	F46	Methylhexadecanoat
F11	2-Undecanon	F47	Alkantriol SV
F12	Indol	F48	3-(1-Methylpropyl)-hexahydropyrrolo[1,2a]- pyrazin-1,4-dion (cycloProlle)
F13	3-Nonen-5-on	F49	3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2a]- pyrazin-1,4-dion (cycloProLeu)
F14	4-(2,3-Dimethyl-2-cyclopenten-1-yl)- 4-methylpentanal	F50	M=272 bp 179,139
F15	2-Dodecanon	F51	2-Octadecanon
F16	5-Dodecenal	F52	5 <i>H</i> ,10 <i>H</i> -Octahydrodipyrrolo[1,2a:1',2'd]- pyrazin-5,10-dion (cycloProPro)
F17	Dodecyloxiran	F53	M=272 bp 179, 139
F18	4-Dodecenal	F54	M=272 bp 179, 139
F19	Methyl-4- <i>tert.</i> -butylbenzoat K	F55	M=272 bp 129, 100
F20	2-Dodecenal	F56	6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid
F21	$\alpha, \alpha, \alpha', \alpha'$ -Tetramethyl-1,4- benzendimethanol K	F57	M=272 bp 179, 139
F22	4-Undecanolid	F58	6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid Diastereomer
F23	4-(1-Hydroxy-1-methylethyl)-acetophenon K	F59	6-Hydroxy-5-tetradecanolid
F24	Dodecyloxiran	F60	6-Hydroxy-5-tetradecanolid Diastereomer
F25	4- <i>tert.</i> -Butylbenzoesäure K	F61	Methyloctadecanoat
F26	$\alpha, \beta$ -ungesättigtes Keton SV	F62	bp 137
F27	ungesättigter Ester SV	F63	bp 137
F28	Naphthylamin	F64	Tributylacetylcitrat K
F29	Tetradecenal / Tetradecadien-1-ol SV	F65	Octadecanal
F30	Tetradecenal / Tetradecadien-1-ol SV	F66	4-Octadecanolid
F31	5-Hydroxy-4-decanolid ( <b>B88</b> )	F67	3-Phenylmethylhexahydropyrrolo[1,2a]- pyrazin-1,4-dion ( <i>trans</i> -cycloProPhe)
F32	5-Hydroxy-4-decanolid Diastereomer ( <b>B90</b> )	F68	3-Phenylmethylhexahydropyrrolo[1,2a]- pyrazin-1,4-dion ( <i>cis</i> -cycloProPhe)
F33	4-Dodec-2-enolid und	F69	<i>Bis</i> -(2-Ethylhexyl)-phthalat K
F34	3-Methylhexahydropyrrolo[1,2a]- pyrazin-1,4-dion (cycloProAla)		
F35	4-Dodecanolid		
F36	<i>N</i> -Acetylnaphthylamin		

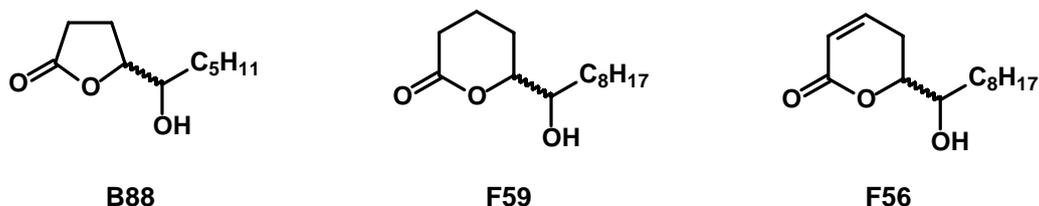
**Tabelle 12:** Substanzliste des Totalionenstromchromatogramms der Fischwasserprobe (Methanoleluat C18 SPE)  
Massenspektren der unbekanntenen Substanzen sind im Anhang abgebildet.

Die Diketopiperazine 3-Methylhexahydropyrrolo[1,2a]pyrazin-1,4-dion (cycloProAla) (**F34**), 3-Isopropylhexahydropyrrolo[1,2a]pyrazin-1,4-dion (cycloProVal) (**F43**), 3-(1-Methylpropyl)-hexahydropyrrolo[1,2a]pyrazin-1,4-dion (cycloProIle) (**F48**), 3-Isobutylhexahydropyrrolo-[1,2a]pyrazin-1,4-dion (cycloProLeu) (**F49**), 5*H*,10*H*-Octahydrodipyrrolo-[1,2a:1',2'd]pyrazin-5,10-dion (cycloProPro) (**F52**) und 3-Phenylmethylhexahydropyrrolo-[1,2a]pyrazin-1,4-dion (cycloProPhe) (**F67,F68**) bilden eine Substanzklasse (Abbildung 106). Diese Diketopiperazine sind Cyclisierungsprodukte, welche unter zweimaliger Eliminierung von Wasser aus zwei Aminosäuren entstehen. Diketopiperazine ohne Beteiligung des Prolins konnten nicht detektiert werden. In einem Biotest zur Induktion der DVM wurden zunächst die Diketopiperazine **F52**, **F67** und **F68** untersucht. Biologische Aktivität konnte allerdings nicht bestätigt werden.

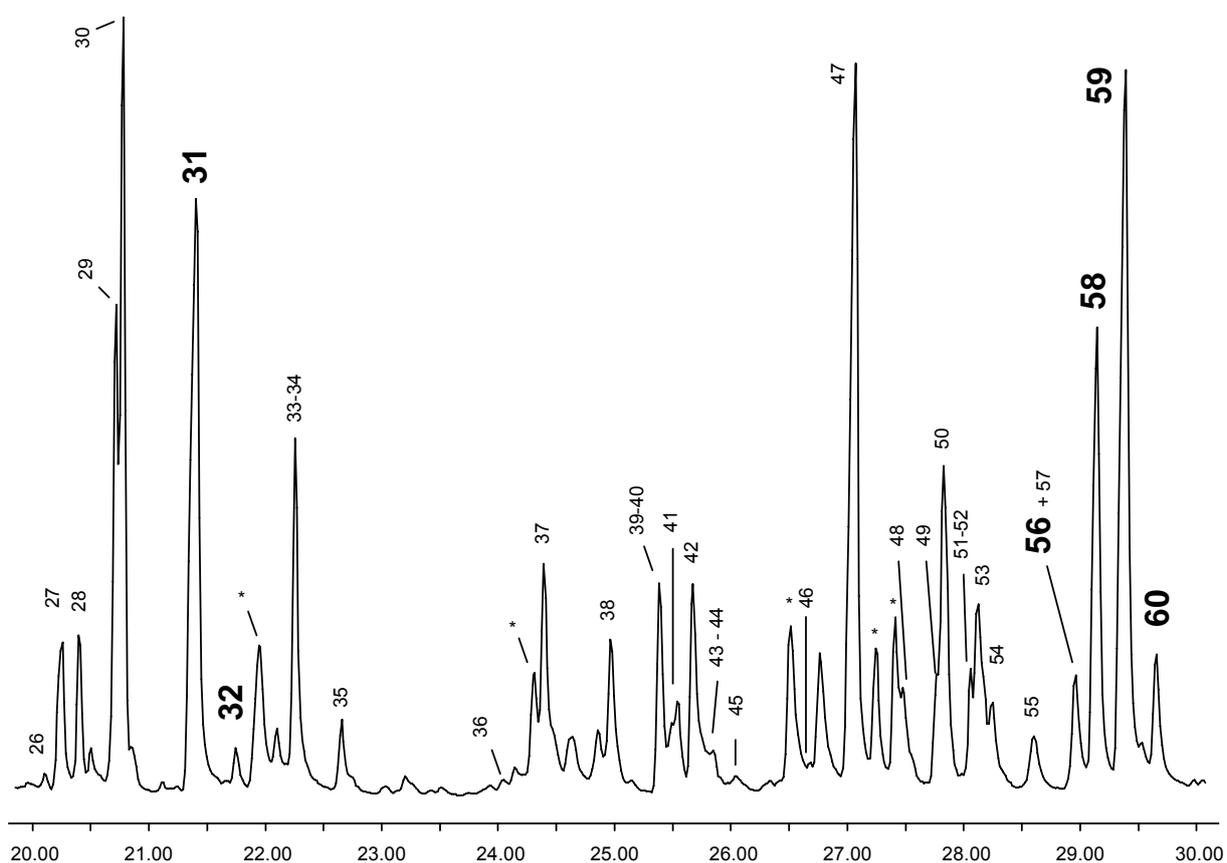


**Abbildung 106:** Diketopiperazine im Fischwasser

Die Diastereomere der Hydroxylactone 5-Hydroxy-4-decanolid (**B88**, **B90**), 6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (**F56**, **F58**) und 6-Hydroxy-5-tetradecanolid (**F59**, **F60**)<sup>a</sup> (Abbildung 107) sind in der relativen Zusammensetzung der flüchtigen organischen Verbindungen im Fischwasser wesentliche Mengenbestandteile (Abbildung 108). Im folgenden Text werden diese Substanzen mit der Nummer des zuerst eluierenden Diastereomers bezeichnet.



**Abbildung 107:** Hydroxylactone im Fischwasser



**Abbildung 108:** Ausschnitt aus dem Gaschromatogramm des Methanoleluates (C18 SPE) einer Fischwasserprobe mit Hervorhebung der Signale der Hydroxylactone

<sup>a</sup> Nomenklatur nach IUPAC:

5-Hydroxy-4-decanolid:

5-(1-Hydroxyhexyl)-dihydrofuran-2(3*H*)-on

6-Hydroxy-5-tetradecanolid:

6-(1-Hydroxynonyl)-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-on

6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid:

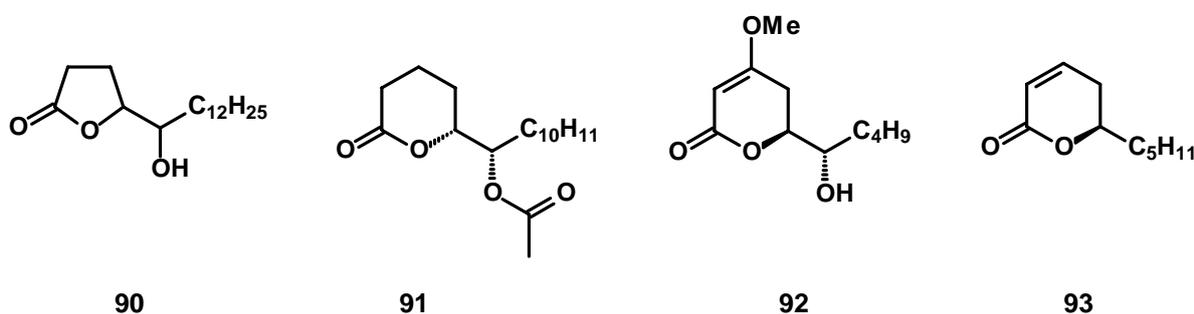
6-(1-Hydroxynonyl)-tetrahydro-2*H*-pyran-2-on

Der Struktur von **F56** konnte vor Beginn der vorliegenden Untersuchungen nicht durch unabhängige Synthese bewiesen werden. Weiterhin waren die stereochemische Zusammensetzungen der Hydroxylactone mit ihren zwei chiralen Zentren und den jeweils vier resultierenden möglichen Stereoisomeren in der Naturprobe des Fischwassers noch nicht aufgeklärt. Dies ist jedoch die Voraussetzung für nachfolgende Tests hinsichtlich einer biologischen Aktivität dieser Kandidatverbindungen, da die exakte Stereochemie in Zusammenhängen der chemischen Ökologie häufig für die Signalerkennung essentiell ist.

## Zielsetzung

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der gefundenen  $\alpha$ -Hydroxyalkyllactone als wesentliche Bestandteile der flüchtigen organischen Verbindungen in der Naturprobe sind gut mit den von Elert & Pohnert erarbeiteten Erkenntnissen über den Fischfaktor vereinbar. Zusammengefasst schlussfolgerten Elert & Pohnert, dass es sich bei dieser Infochemikalie um ein „non-olefinic low-molecular-weight anion of intermediate lipophilicity“ mit mindestens einer für biologische Aktivität essentiellen Hydroxylgruppe handelt<sup>282</sup>.

Lactone aus unverzweigten Hydroxycarbonsäuren mit zum Ring  $\alpha$ -ständiger Hydroxyalkylgruppe sind bereits als Naturstoffe, teilweise mit biologischer Aktivität, bekannt. 5-Hydroxy-4-decanolid (**B88**) wurde in Kulturen von *Streptomyces griseus* als Autoregulator der Leukaemomycin Biosynthese postuliert und als sogenannter L-Faktor bezeichnet<sup>287,288</sup>. Das Stereoisomer (4*R*,5*R*)-**B88** wurde bei der mikrobiellen Umsetzung von Vernolsäure (**89**) (12,13-Epoxy-(*Z*)-9-octadecensäure) mit der Hefe *Sporobolomyces odorus* isoliert<sup>289</sup>. **B88** wurde als Fehlgeschmack im Bier nach der Gärung durch *S. cerevisiae* nachgewiesen<sup>290</sup>. Vor kurzem wurden das Diastereomergemisch aus (4*R*,5*R*)- und (4*R*,5*S*)-**B88** als männliches Sexualpheromon der parasitären Wespe *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) identifiziert<sup>291</sup>. Eine Funktion von **B88** als Spurpheromon bei Ameisen wurde ebenfalls postuliert, wobei jedoch Ergebnisse entsprechender Verhaltensversuche nicht publiziert wurden<sup>292</sup>. Das zu **B88** homologe 5-Hydroxy-4-heptadecanolid (**90**), bekannt unter der Bezeichnung Muricatacin (Abbildung 109), zeigt in Zellversuchen hohe Cytotoxizität gegenüber humanen Karzinomzelllinien<sup>293</sup>.



**Abbildung 109:** 5-Hydroxy-4-heptadecanolid (**90**), (5*R*,6*S*)-6-Acetoxy-5-hexadecanolid (**91**), (-)-Pestalotin (**92**) und Massoialactone (**93**)

Bislang ist 6-Hydroxy-5-tetradecanolid (**F56**) nicht als Naturstoff bekannt. Das zu **F56** homologe und an Position 6 acetylierte *erythro*-(5*R*,6*S*)-6-Acetoxy-5-hexadecanolid (**91**) ist die Hauptkomponente des Eiablagekairomons bei der Mücke *Culex pipiens fatigans*<sup>294-296</sup>. Auch 6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (**F56**) oder ein homologes 6-Hydroxy-5-alk-2-enolid wurden bislang nicht als Naturstoffe veröffentlicht. Biologische Aktivität als Gibberellin Synergist besitzt jedoch das strukturverwandte (6*S*,1'*S*)-6-(1'-Hydroxypentyl)-4-methoxy-5,6-dihydro-2-pyron (**92**), mit der Bezeichnung (-)-Pestalotin, welches aus dem phytopathogenen Pilz *Pestalotia cryptomeriaecola* von Kimuro *et al.* und aus einem unbekanntem Stamm des *Penicillium* von Ellestad *et al.* isoliert wurde<sup>297,298</sup>.

Das ebenfalls strukturverwandte 5-Hydroxy-2-decensäurelacton (**93**) mit der Bezeichnung Massoialacton wurde in dem Öl der Rinde von *Cryptocarya massoia*, welches in der traditionellen Medizin in Neu Guinea genutzt wird, identifiziert und ist bei zwei Arten von Ameisen der Gattung *Camponotus* Bestandteil ihres Verteidigungssekrets<sup>299</sup>.

Die Strukturen von 5-Hydroxy-4-decanolid (**B88**) und 6-Hydroxy-5-tetradecanolid (**F59**) wurden bereits in einer vorherigen Arbeit durch unabhängige asymmetrische Synthese eindeutig bewiesen<sup>300</sup>. Die alkylierte Dihydropyranonstruktur von **F56** konnte aufgrund der erhaltenen Massenspektren bislang lediglich postuliert werden.

Daher ist es Ziel dieser Arbeit, die Struktur des 6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolids (**F56**) durch asymmetrische Synthese eindeutig zu beweisen und mit Hilfe der synthetisierten enantiomerenreinen Hydroxylactone **B88**, **F56** und **F59** die Bestimmung der stereochemischen Zusammensetzung in der Naturprobe des Fischwassers durch enantioselektive Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion aufzuklären.

## Syntheseplanung

Die Darstellung der Stereoisomere des 6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolids (**F56**) sollte in Anlehnung zur beschriebenen Synthese der Stereoisomere des 6-Hydroxy-5-tetradecanolids (**F59**) durchgeführt werden<sup>301</sup>. Kern dieser Synthesestrategie ist die Einführung der Chiralitätszentren in das Molekül durch asymmetrische Dihydroxylierung (AD) nach Sharpless. In dieser Reaktion werden prochirale Olefine in Anwesenheit eines chiralen Alkaloids, eines Oxidationsmittels und Osmiumtetroxid mit sehr guten Enantiomerenüberschüssen zu optisch aktiven Diolen umgesetzt. Die chirale Induktion in der Reaktionsführung liefert entweder Dihydrochinin (DHQD) (**94**) oder Dihydrochinidin (DHQ) (**95**), die durch Disubstitution an einem Spacermolekül den eigentlichen Liganden des enantioselektiven Katalysators bilden.

In den kommerziell vorgefertigten Mischungen für die AD liegen diese als 1,4-Bis-(9-O-dihydrochinidin)-phthalazine (**96**) (AD-mix  $\beta$ ) beziehungsweise 1,4-Bis-(9-O-dihydrochinin)-phthalazine (AD-mix  $\alpha$ ) vor<sup>302</sup>.

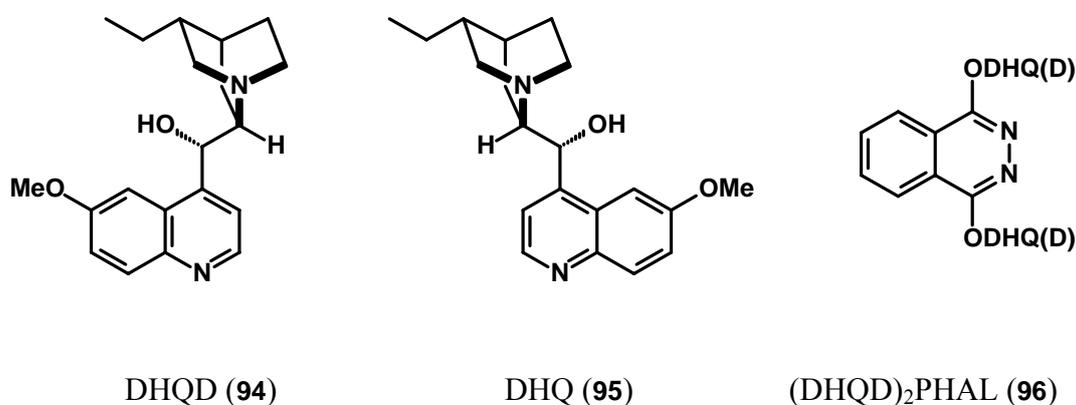
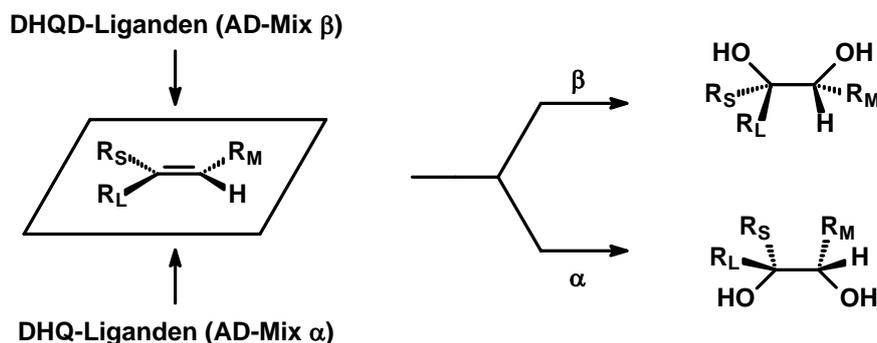


Abbildung 110: Liganden der AD nach Sharpless

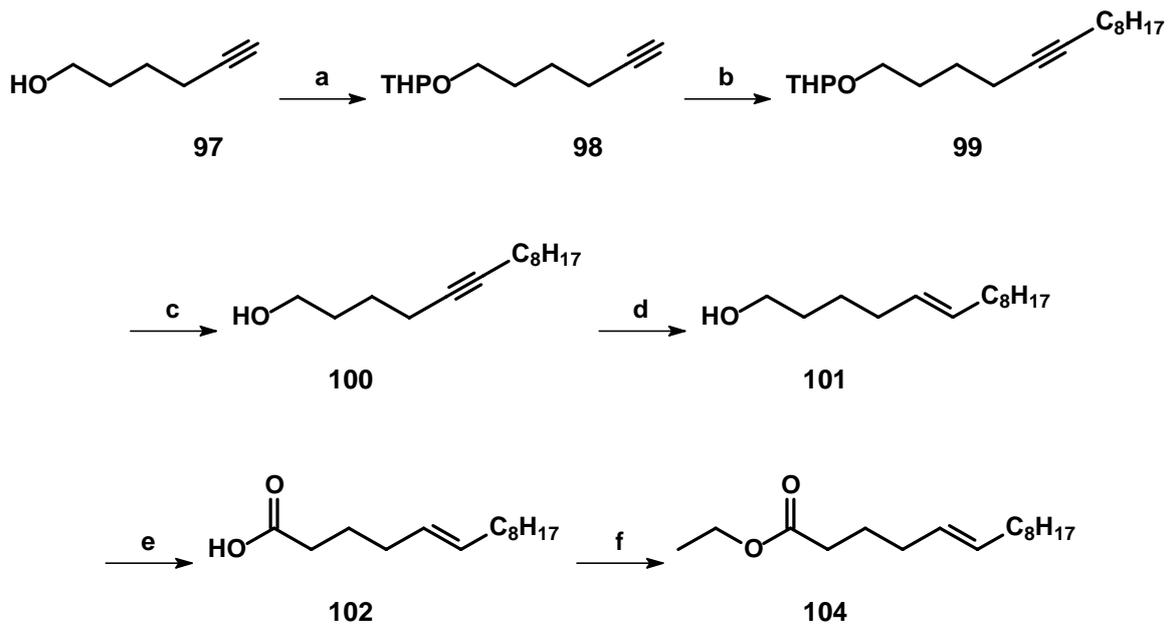
Die Seitendifferenzierung der Angriffsrichtung und die daraus resultierenden Enantiomerenüberschüsse (*ee*) hängen bei Olefinen von den Substituenten ab, wobei eine *trans*-Konfiguration der Doppelbindung bei Kohlenwasserstoffen für hohe Enantiomerenüberschüsse besonders begünstigt ist.



**Abbildung 111:** Modell der Seitendifferenzierung durch die Substituenten bei der AD

In Abbildung 111 ist eine günstige Konfiguration mit einer *trans*-Orientierung des größten (L) zum mittleren Substituenten (M) dargestellt. Die weiteren beiden Positionen an der Doppelbindung sind idealerweise von Wasserstoffatomen oder kleinen Substituenten (S) belegt. Je nach Art des chiralen Liganden (hier AD-mix  $\alpha$  beziehungsweise  $\beta$ ) erfolgt die Dihydroxylierung von der Unterseite ( $\alpha$ ) oder Oberseite ( $\beta$ ) der in der dargestellten planaren Projektion der Doppelbindung.

In der erfolgreich durchgeführten enantioselektiven Darstellung von 6-Hydroxy-5-tetradecanolid (**F59**) wurde zunächst das passende Edukt für die Schlüsselreaktion der AD synthetisiert (Abbildung 112)<sup>301</sup>. Dies erfolgte durch Blockieren von 5-Hexin-1-ol (**97**) mit DHP (**a**) zu 2-(Hex-5'-inyloxy)-tetrahydropyran (**98**), das durch *n*-BuLi deprotoniert und mit Octyliodid zu 2-(Tetradec-5'-inyloxy)-tetrahydropyran (**99**) gekoppelt wurde (**b**). Durch Umacetalisierung in Methanol wurde das Intermediat zu Tetradec-5-in-1-ol (**100**) deblockiert (**c**). Selektive Reduktion der Dreifachbindung von **100** zum (*E*)-Tetradec-5-en-1-ol (**101**) erfolgte mit Lithiumalanat (**d**). Die folgende Oxidation von **101** mit Jones-Reagenz ergab quantitativ (*E*)-Tetradec-5-ensäure (**102**) (**e**). **102** wurde zunächst mit Oxalylchlorid in das Säurechlorid (**103**) umgewandelt und *in situ* mit Ethanol zum Tetradec-5-ensäureethylester (**104**) umgesetzt, welches ein geeignetes Edukt der asymmetrischen Dihydroxylierung nach Sharpless ist. Ausgehend von **104** gelang die enantioselektive Darstellung der Hydroxylactone **F59** durch AD über die Zwischenstufen der Dihydroxytetradecansäureethylester (**105**) zu (*S,S*)-**F59** (AD-Mix- $\alpha$ ) und (*R,R*)-**F59** (AD-Mix- $\beta$ ). Schließlich konnte das stereogene Zentrum an Position 6 mittels Mitsunobu-Reaktion zu (*S,R*)-**F59** oder (*R,S*)-**F59** invertiert werden (Abbildung 113).



**a:** DHP (1.2 Äquiv.), PTSA (kat.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> **b:** *n*-BuLi (1.1 Äquiv.), Octyliodid (1.2 Äquiv.), THF  
**c:** MeOH, PTSA (kat.) **d:** LiAlH<sub>4</sub> (4 Äquiv.), Diglyme **e:** CrO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (aq.), Aceton  
**f:** 1) (COCl)<sub>2</sub>, (1.04 Äquiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2) EtOH (1.1 Äquiv.), Pyridin

Abbildung 112: Synthese von 5-Tetradecensäureethylester (104) als Edukt der AD

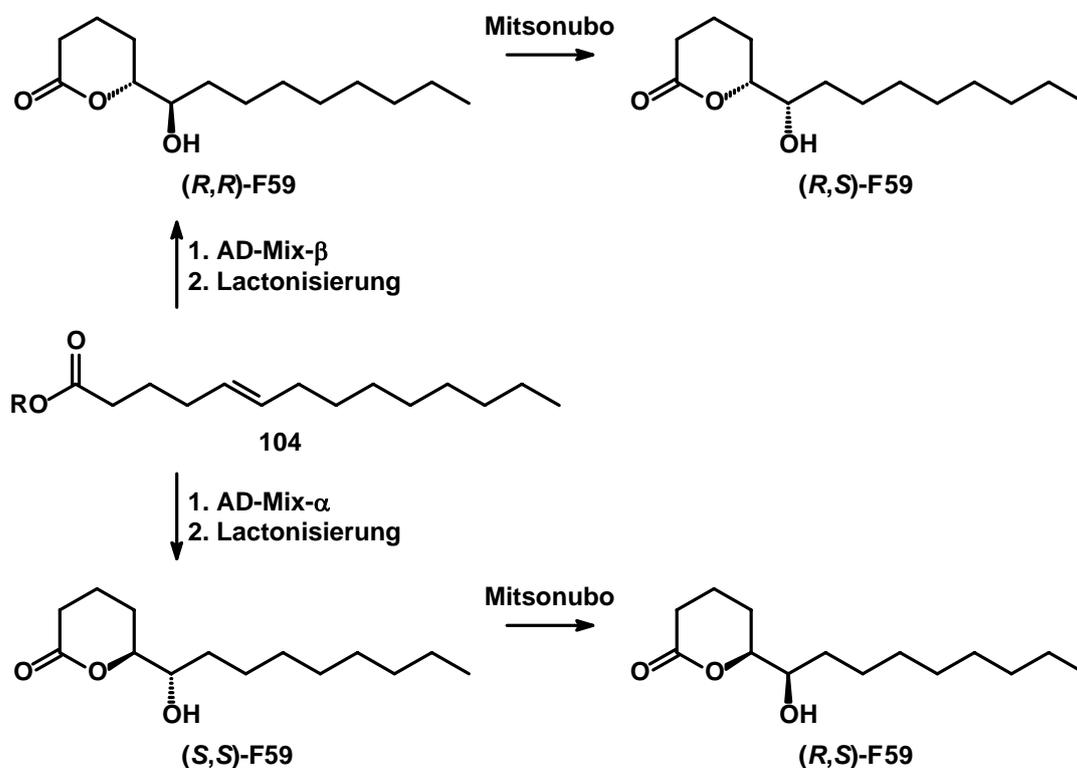
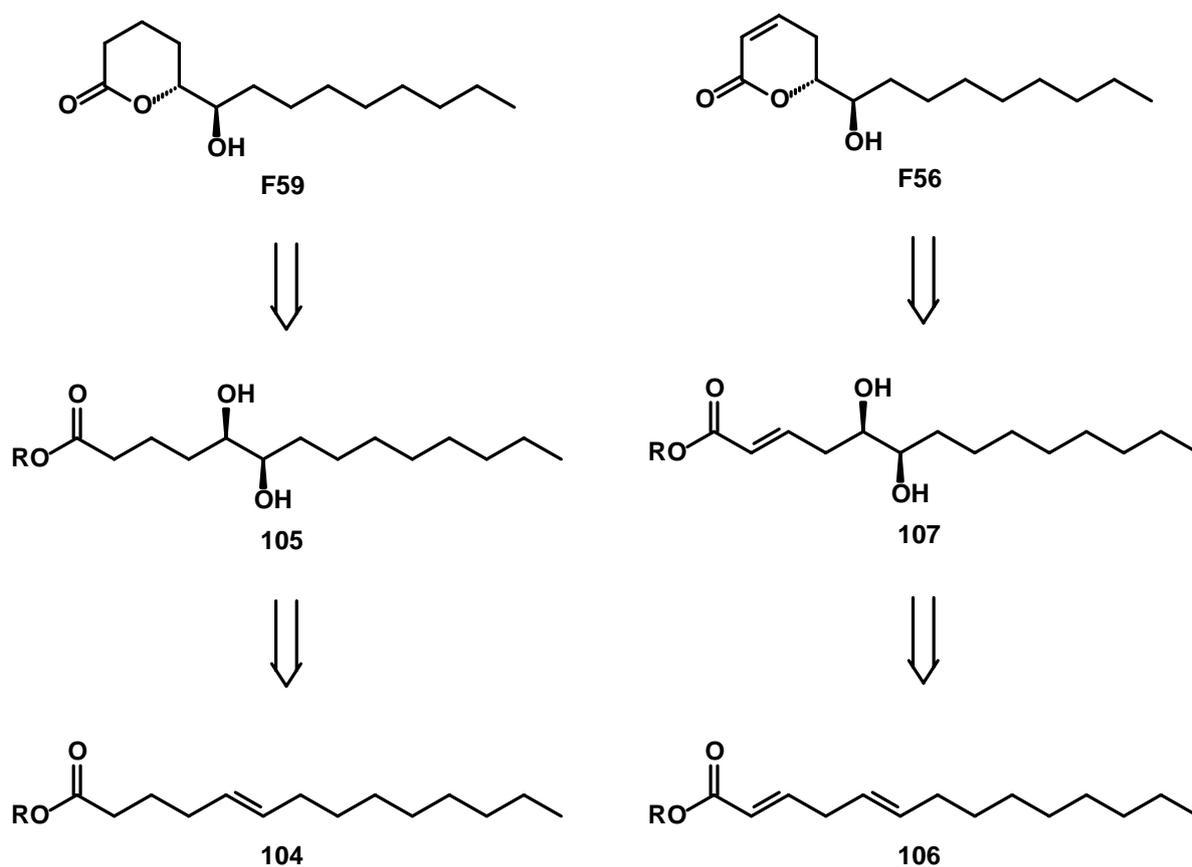


Abbildung 113: Synthese der Stereoisomere von F59 durch AD nach Sharpless als Schlüsselreaktion

Beim 6-Hydroxy-5-tetradecanolid (**F59**) liegt das Molekül ohne Un sättigung vor, während beim 6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (**F56**) eine Doppelbindung an der Position 2 verbleibt. Daher ist entweder eine selektive Dihydroxylierung von 2,5-Tetradecadiensäureethylester (**106**) zu 5,6-Dihydroxytetradec-2-ensäureethylester (**107**) oder eine stufenweise Einführung der Funktionalitäten während der Synthese erforderlich (Abbildung 114).



**Abbildung 114:** Unterschiede der retrosynthetischen Konzepte in Bezug auf den Schlüsselschritt der AD. Linker Ast: Bereits beschriebener Synthesep lan zu **F59**. Rechter Ast: Analoge Strategie zu **F56**.

Führt die Synthesestrategie zu einer Dihydroxycarbonsäure, so kann die Lactonisierung spontan erfolgen. Im Falle eines Dihydroxycarbonsäureesters könnte die Lactonisierung unter Umesterung gegebenenfalls durch Erwärmen, saure Katalyse (PTSA) oder unter neutralen Bedingungen mit geeigneten Reagenzien, wie beispielsweise Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder Dimethylaminopyridin, erfolgen.

Diese Strategie ist in dem linken Ast der Abbildung 115 dargelegt. Das 6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (**F56**) wird sich aus dem 5,6-Dihydroxytetradec-2-ensäurealkylester (**107**) durch Umesterung unter Freisetzung eines Alkanols bilden. Im Schritt zuvor kann **107** durch selektive Reduktion der Dreifachbindung des 5,6-Dihydroxytetradec-2-ensäurealkylesters (**108**) zum Alken dargestellt werden. Das Edukt der Dihydroxylierung ist ein Tetradec-5-en-2-ensäurealkylester (**109**) mit (*E*)-Konfiguration der Doppelbindung, welcher wiederum durch Kopplung eines Propionsäurealkylesters (**110**) mit einem funktionalisierten Allylundecan (**111**) dargestellt werden sollte. **111** ist aus dem entsprechenden allylischen Alkohol (**112**) zugänglich.

Der rechte Ast beschreibt eine alternativ mögliche Route, worin als letzter Schritt die selektive Oxidation der primären Alkoholfunktion von **113** zum Lacton **F56** vorläge. Zuvor müßte das Alkenetriol **113** durch selektive Reduktion aus dem Alkintriol **114** dargestellt werden. Das Alkintriol **114** würde mittels AD aus **115** gewonnen, welches zuvor durch Deblockierung aus 2-(Tetradec-5'-en-2'-inyloxy)-tetrahydropyran (**116**) entstehen soll. Die Kopplung des C-H-aciden **117** mit einem funktionalisierten Allylundecan (**111**) ergäbe **116**.

Diese zweite Retrosynthese geht somit vom gleichen Edukt **111** aus und führt die Umwandlung der funktionalen Gruppen des C<sub>14</sub>-Gerüsts zum Zielmolekül über andersartig funktionalisierte Zwischenprodukte durch.

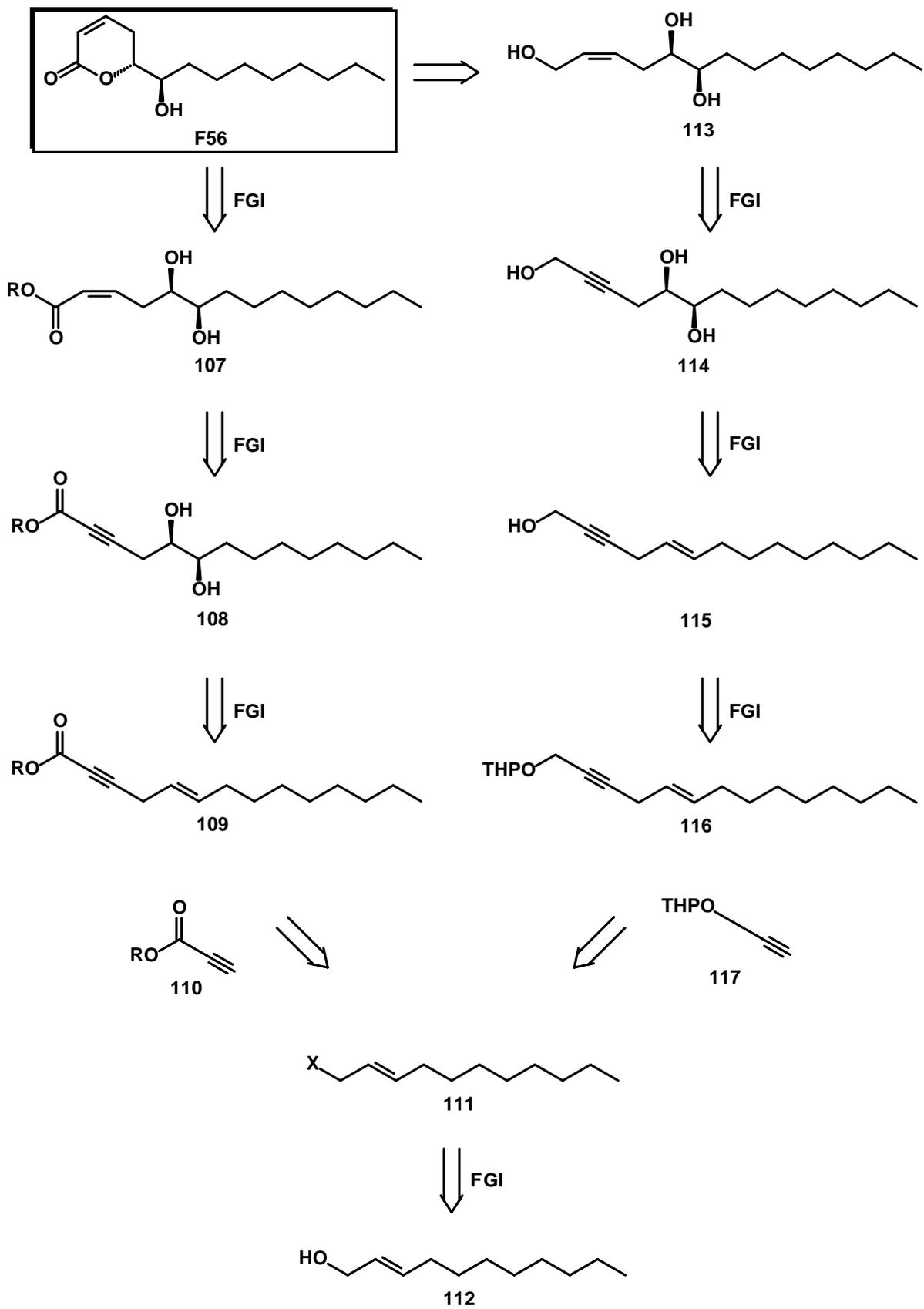
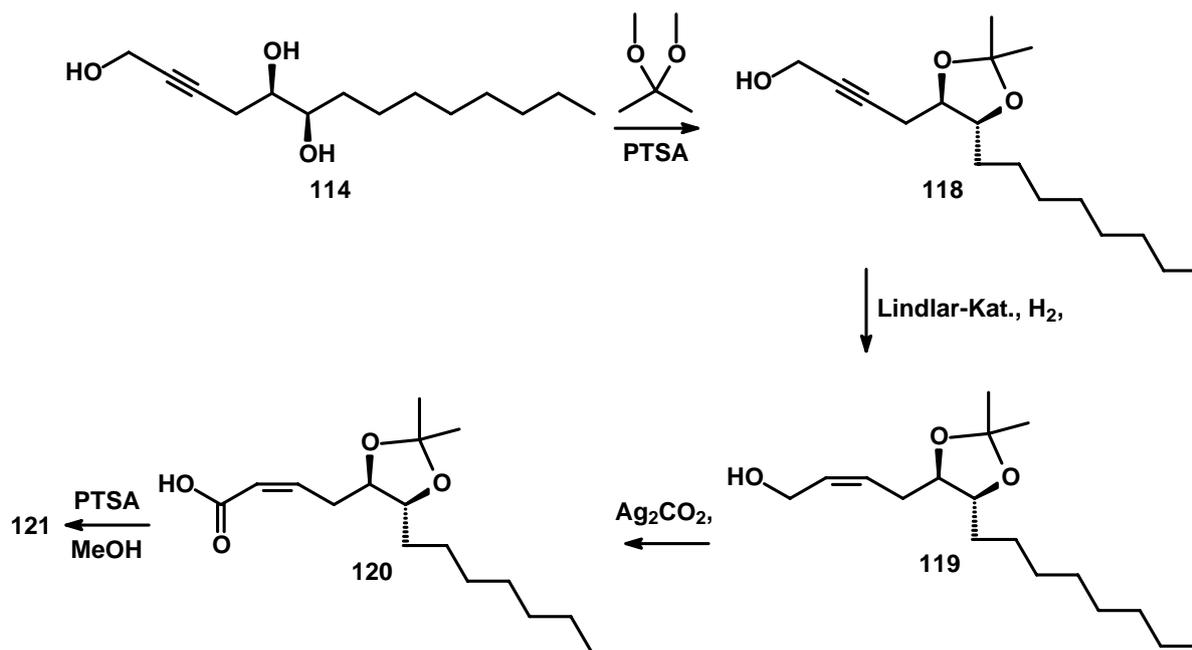


Abbildung 115: Retrosynthesewege zu den Stereoisomeren des 6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolids (F56)

Als weitere Variante können noch die sekundären Hydroxylgruppen des Triols **114** vor der Oxidation der primären Hydroxylgruppe zur Carboxylgruppe durch Umsetzung mit Dimethoxypropan zum Acetonid **118** blockiert werden. Anschließend selektive Reduktion der Dreifachbindung von **118** zur Doppelbindung ergibt das Acetonid **119**. Dieses ist das Edukt bei der Oxidation der primären Hydroxylgruppe zu **120**. Bei der Deblockierung von **120** entsteht 5,6-Dihydroxytetradec-2-ensäure (**121**), welche spontan zu **F56** lactonisiert.



**Abbildung 116:** Alternative Syntheseroute unter Blockierung der benachbarten Hydroxylgruppen als Acetonid

## Synthesen

Beide Retrosynthesestrategien wurden in parallelen Ansätzen durchgeführt (Abbildung 117). Die asymmetrische Dihydroxylierung wurde mit beiden chiralen Katalysatoren (AD-Mix  $\alpha/\beta$ ) zu den jeweiligen Enantiomeren vorgenommen, auch wenn in den Abbildungen der Übersicht halber nur jeweils ein Enantiomer dargestellt ist. Als Voraussetzung wurde Undec-2-en-1-ol (**112**) durch Mukaiyama-Reaktion zu Undec-2-enylbromid (**111**) als gemeinsames Edukt beider Synthesewege umgesetzt.

In dem ersten Syntheseweg (linker Ast Abbildung 117) wurde **111** mit Propiolsäureethylester (**110**) in einer milden Variante der Alkinkopplung<sup>303-305</sup> zum Tetradec-2-in-5-ensäureethylester (**109**) verknüpft. Asymmetrische Dihydroxylierung nach Sharpless ergab 5,6-Dihydroxytetradec-2-ensäureethylester (**108**), der in nachfolgender Reduktion mittels Lindlar-Katalysator selektiv zum 5,6-Dihydroxytetradec-2-ensäureethylester (**107**) hydriert wurde. Ausgehend von diesem Ester erfolgte durch Umesterung spontan der Ringschluß zum 6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (**F56**) in Ausbeuten von knapp 90 %.

In dem alternativen zweiten Syntheseweg (rechter Ast in Abbildung 117) wurde das Bromid **111** in einer Alkinkopplung mit dem als Acetal blockierten 2-(2'-Propinyloxy)-tetrahydropyran (**117**) zu **116** verknüpft. Deblockieren von **116** unter Umacetalisierung mit Methanol ergab Tetradec-5-en-2-in-1-ol (**115**), welches asymmetrisch nach Sharpless zum Tetradec-2-in-1,5,6-triol (**114**) dihydroxyliert wurde. Selektive Hydrierung der Dreifachbindung mit Lindlar-Katalysator ergab Tetradec-2-en-1,5,6-triol (**113**). Milde Oxidation der primären allylischen Hydroxylgruppe nach Fétizon<sup>250</sup> mit Silbercarbonat auf Celite führte zu 5,6-Dihydroxytetradec-2-ensäure (**121**), welche unter den Reaktionsbedingungen zum 6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (**F56**) cyclisierte.

Die Ausbeuten der einzelnen Stufen beider Synthesewege sind vergleichbar gut und liegen im Mittel bei 80 %. Allerdings gelang die letzte Stufe im zweiten Syntheseweg (rechter Ast in Abbildung 117) nur mit moderaten Ausbeuten von 28 % beziehungsweise 51%. Daher scheint der erste Syntheseweg (linker Ast Abbildung 117) präparativ günstiger, da die Einzelreaktionen durchweg mit guten Ausbeuten durchführbar sind und der Weg zusätzlich noch um zwei Synthesestufen kürzer ist. Das Schützen der Glycolgruppe von **114** mit Dimethoxypropan zum Acetonid **118** und anschließende Reduktion der Dreifachbindung von **118** zum Acetonid **119** gelang präparativ zwar unklompliziert, wurde jedoch nicht weiter verfolgt, da der erste Syntheseweg mit weniger Stufen und guten Ausbeuten vorteilhafter war.

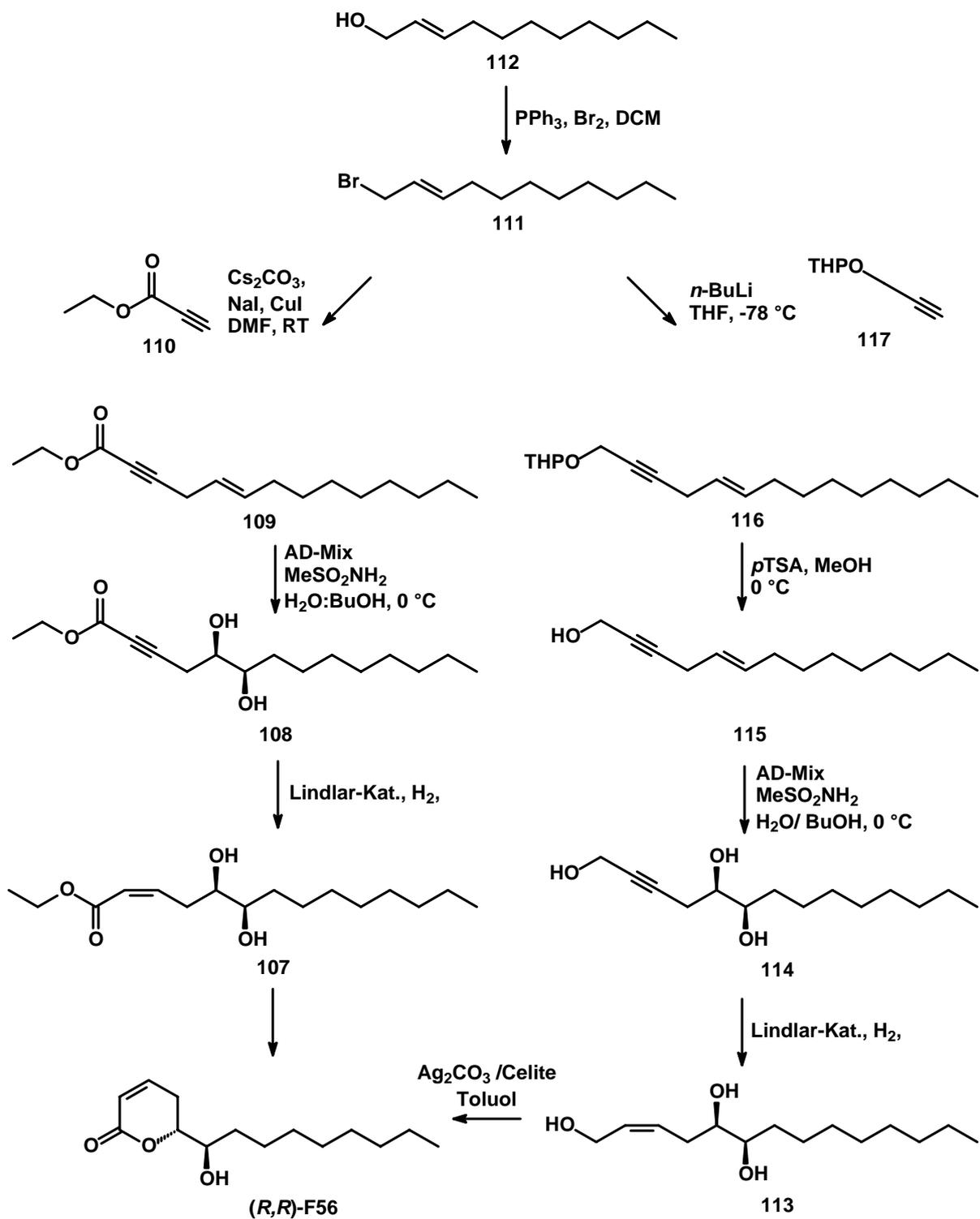


Abbildung 117: Synthesewege zum 6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (F56)

## Interpretation der massenspektrometrischen Fragmentierung von B88, F56 und F59

In den aufgenommenen Massenspektren besitzen die Ionen mit der höchsten Signalintensität ein geradzahliges Masse/Ladungs-Verhältnis, welches durch eine charakteristische Umlagerungsreaktion zustande kommt. Eine vergleichbare Umlagerungsreaktion wurde bereits bei der Zuordnung der Struktur des 6-Acetoxy-5-hexadecanolids (**91**) für das Eiablagepheromon bei *Culex pipiens fatigans* von Laurence und Pickett beschrieben (Abbildung 118)<sup>294</sup>.

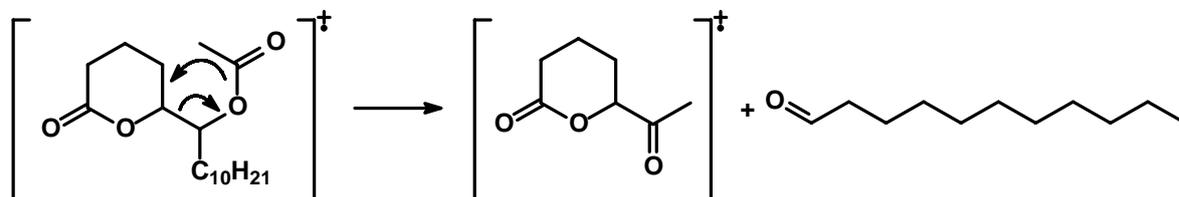
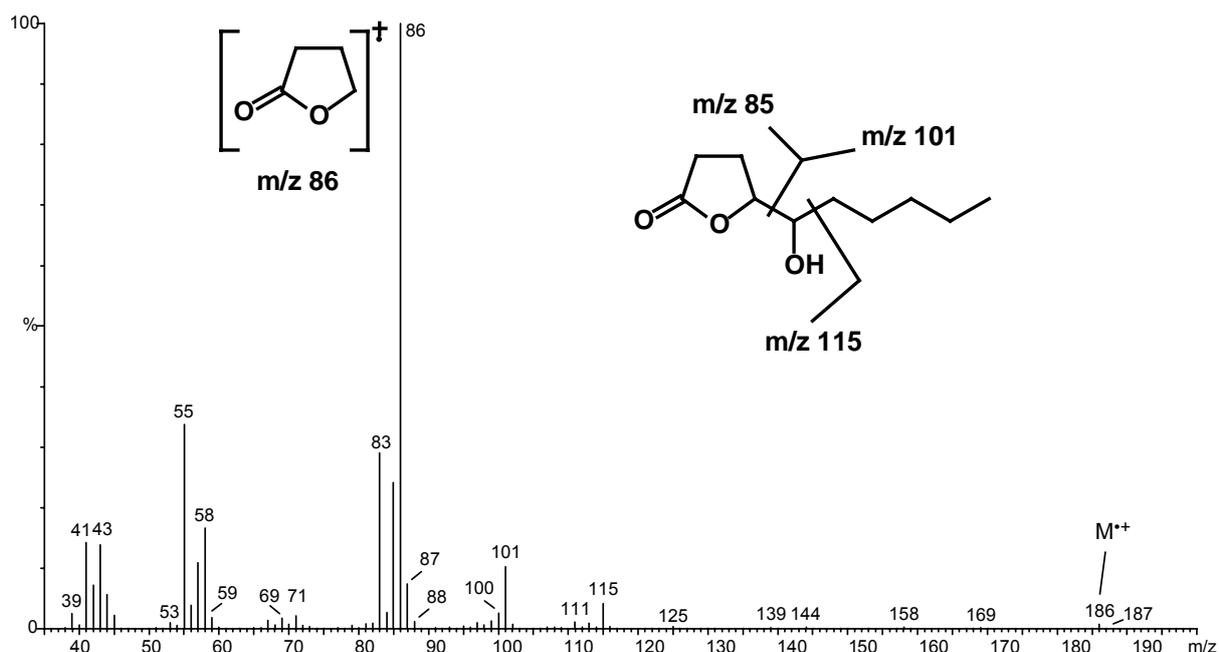


Abbildung 118: Massenspektrometrische Fragmentierung von 6-Acetoxy-5-hexadecanolid (**91**)

Dabei lagert sich das Molekülion unter Verschiebung zweier Elektronenpaare in das Radikalkation mit der atomaren Zusammensetzung  $C_7H_{10}O_3$  ( $m/z$  142) und der vermutlichen Struktur von 6-Oxo-5-heptanolid um, wobei Undecanal als Neutralteilchen aus dem Molekülion gespalten wird.

Diese ungewöhnliche Fragmentierung wird auch im Falle der Hydroxylactone **B88**, **F56** und **F59** beobachtet. Beim 5-Hydroxy-4-decanolid (**B88**) ergibt die Umlagerung unter Verschiebung des Wasserstoffs der Hydroxylgruppe das Kation  $m/z$  86, welches auch den Basepeak im Massenspektrum liefert (Abbildung 119). Durch Eliminierung von Kohlenmonoxid aus dem Ion  $m/z$  86 könnte das Signal bei  $m/z$  58 entstehen. Weiterhin werden als relevante Fragmentierungen  $\alpha$ -Spaltungen zur Hydroxylgruppe beobachtet, so dass sich die Fragmentionen  $m/z$  115,  $m/z$  101 und  $m/z$  85 erklären lassen. Das Molekülion tritt im Spektrum nur in geringer Intensität auf. Weitere, wenig intensive Fragmentierungen sind der Verlust von Kohlenmonoxid mit Masse 28 g/mol zu  $m/z$  158 und Verlust von Keten zum Signal bei  $m/z$  144 aus dem Molekülion.



**Abbildung 119:** Fragmentierungsreaktionen von 5-Hydroxy-4-decanolid (**B88**)

Eine analoge Umlagerungsreaktion führt bei 6-Hydroxy-5-tetradecanolid (**F59**) zum Basepeak  $m/z$  100 (Abbildung 120). Das Molekülion ( $m/z$  242) tritt nur mit schwacher Intensität auf. Signifikante Fragmentierungen sind auch hier die  $\alpha$ -Spaltungen zur Hydroxylgruppe, welche die Signale  $m/z$  99,  $m/z$  143 und  $m/z$  129 liefern. Durch Eliminierung von Kohlenmonoxid aus dem Ion  $m/z$  100 könnte das Signal bei  $m/z$  72 entstehen. Die weiteren Signale sind von geringer Intensität und wenig spezifisch.

Durch die Unstättigung im Ring führt eine vergleichbare Umlagerung des 6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (**F56**) zum Signal  $m/z$  98 (Abbildung 121). Das Molekülion bei  $m/z$  240 ist kaum nachweisbar. Aus den  $\alpha$ -Spaltungen zur Hydroxylgruppe sind die Ionen  $m/z$  97 und  $m/z$  127 ersichtlich. Zusätzlich treten noch Signale von Fragmentationen des Pyranrings mit längerer Alkylkette bei  $m/z$  141 und  $m/z$  155 auf. Durch Eliminierung von Kohlenmonoxid aus dem Ion  $m/z$  98 könnte das Ion  $m/z$  70 entstehen. Die weiteren Ionen im Massenspektrum sind auch hier von geringer Intensität und wenig spezifisch.

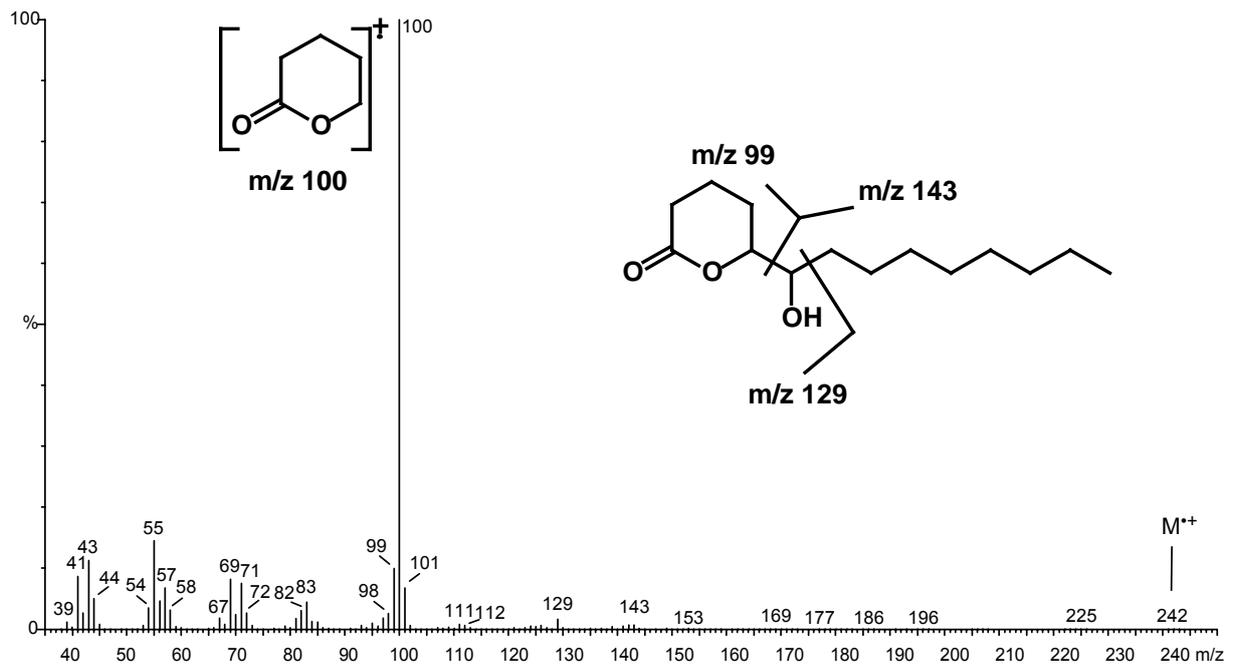


Abbildung 120: Fragmentierungsreaktionen von 6-Hydroxy-5-tetradecanolid (F59)

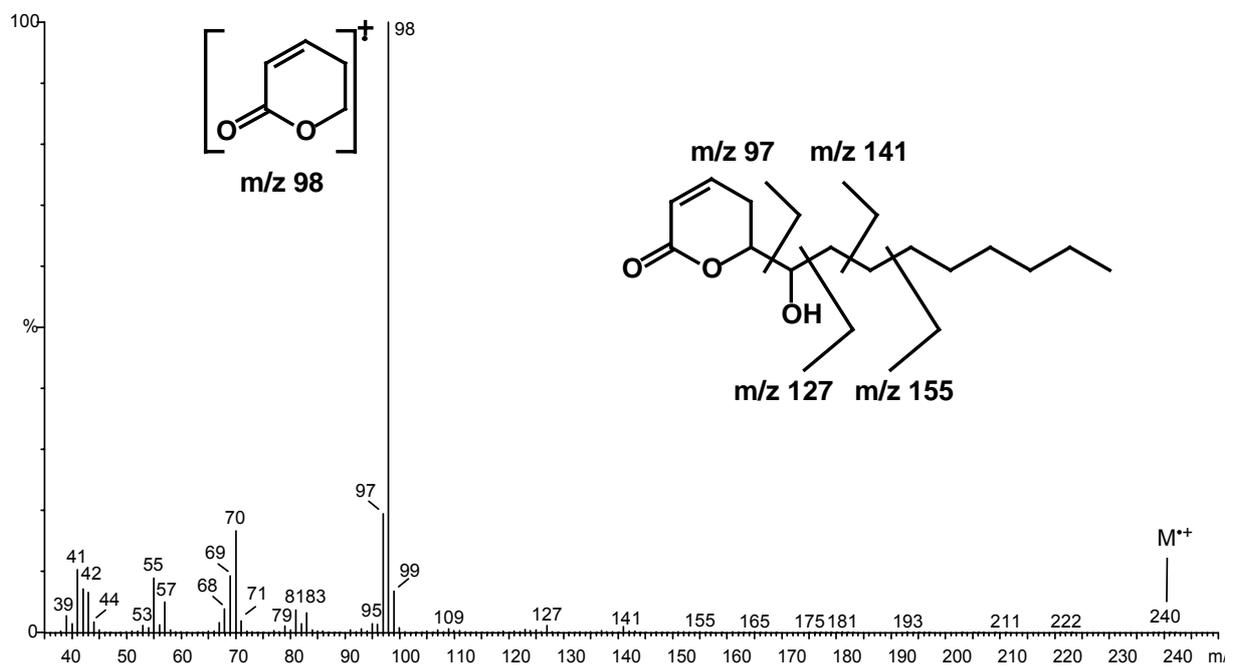


Abbildung 121: Fragmentierungsreaktionen von 6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (F56)

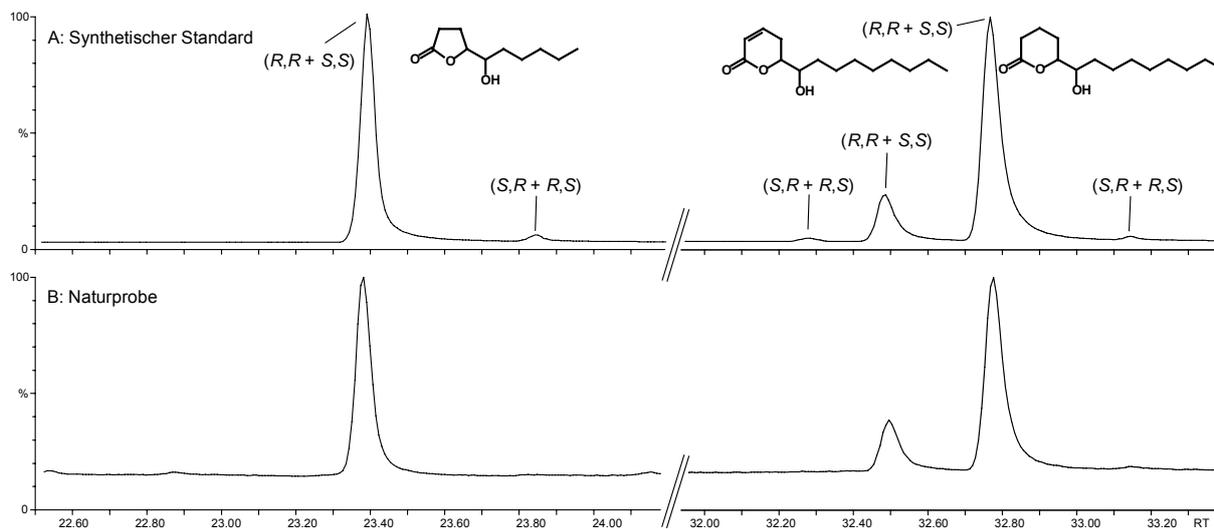
## Enantioselektive Gaschromatographie

Durch die stereoselektive Synthese der Hydroxylactone wurde erstmals authentisches Referenzmaterial im präparativen Maßstab zugänglich. Das 5-Hydroxy-4-decanolid (**B88**) ist zwar bereits als Naturstoff beschrieben, jedoch gab es weder für dieses noch für die neu identifizierten Lactone 6-Hydroxytetradecan-5-olid (**F59**) und 6-Hydroxytetradec-2-en-5-olid (**F56**) verfügbare Standards. Die Bestimmung der enantiomeren Zusammensetzung in der Naturprobe konnte unter Nutzung enantioselektiver Gaschromatographie durchgeführt werden. Für eine eindeutige und empfindliche Detektion wurde die Messung von charakteristischen Ionen der Verbindungen mittels Hochauflösung (HR) im sogenannten Selected Ion Monitoring (SIM) durchgeführt, da nur noch geringste Mengen einer gealterten Naturprobe vorlagen. Als charakteristische Ionen wurden die jeweiligen Basepeaks der charakteristischen Umlagerungen aus dem Full-Scan-Massenspektrum sowie das Ion  $m/z$  115 als zusätzliche Kontrollmasse ausgewählt. Dadurch wird neben erhöhter Sensitivität auch große Selektivität gewährleistet. Ein ein falsch positiver Nachweis der SIM-Messung durch Matrixeinflüsse in der Naturprobe kann durch diese Messtechnik ausgeschlossen werden. Die genauen Massen für das HR-SIM-Experiment wurden gemäß Tabelle 13 berechnet und gemessen:

Substanz	elementare Zusammensetzung	berechnete Masse	gemessene Masse
5-Hydroxy-4-decanolid ( <b>B88</b> )	$C_{10}H_{18}O_2$	86.03678	86.0368
6-Hydroxy-5-tetradecanolid ( <b>F59</b> )	$C_{14}H_{26}O_2$	100.05243	100.0524
6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid ( <b>F56</b> )	$C_{14}H_{24}O_2$	98.03678	98.0368
Kontrollmasse	$C_5H_7O_3$	115.03951	115.0395

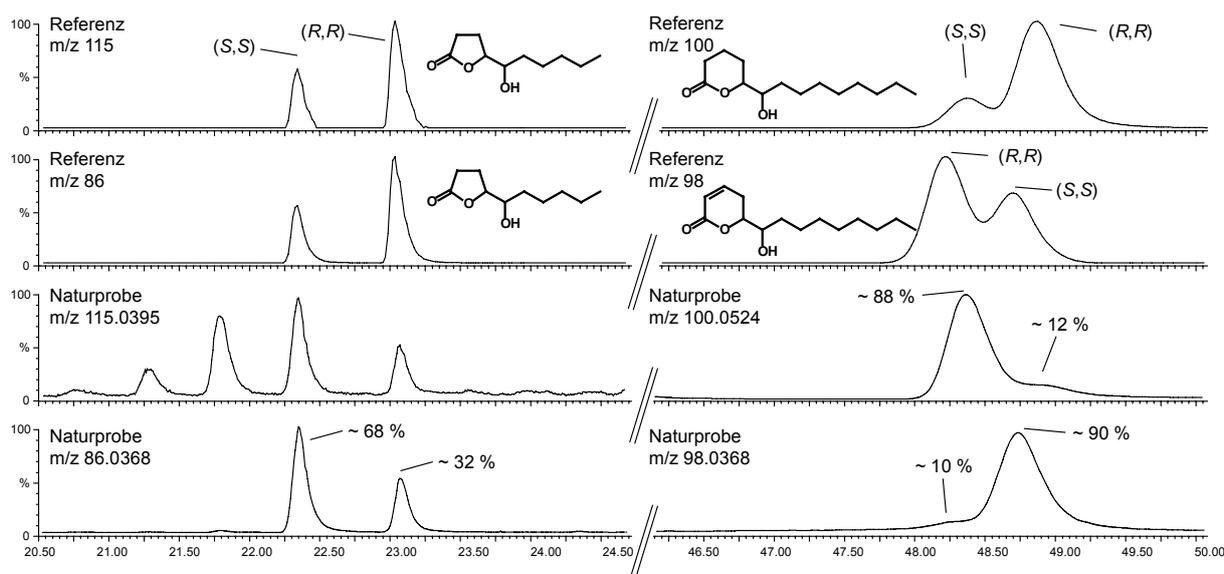
**Tabelle 13:** Berechnete und gemessene Massen der charakteristischen Fragmentionen

Bei der Trennung mittels enantioselektiver Gaschromatographie koeluierten die Stereoisomere von **F56** teilweise mit denen von **F59**. Daher wurde zur eindeutigen Bestimmung zunächst mit konventioneller, nicht enantioselektiver Gaschromatographie bestimmt, welche Diastereomerenpaare für die chirale Trennung von Relevanz sind.



**Abbildung 122:** Gaschromatographische Trennung der Diastereomere der Hydroxylactone. Hochauflösende SIM-Detektion der Ionen  $m/z$  86.0368, 115.0395, 100.0524 und 98.0368. (BPX 5 30m; T-Prog.: 60°C, 3 min isotherm, 5°C/min auf 280°C, 30 min isotherm, Inj. 1min sl)

In der Naturprobe sind lediglich die Enantiomere der Hydroxylactone mit  $(R,R)$ - und  $(S,S)$ -Konfiguration nachweisbar (Abbildung 122). Die synthetisierten Referenzsubstanzen zeigen keine vollständige Diastereomerenreinheit, und Spuren der  $(R,S)$ - und  $(S,R)$ -Stereoisomere sind zusätzlich im Chromatogramm des Referenzstandards sichtbar. Daher werden zur Bestimmung der absoluten Konfiguration in dieser Naturprobe nur die  $(R,R)$ - und  $(S,S)$ -Stereoisomere benötigt. Die Elutionsreihenfolge der Enantiomere wurde an einer Cyclodextrinsäule bestimmt. An dieser Phase eluierten vom 5-Hydroxy-4-decanolid (**B88**) und 6-Hydroxytetradecan-5-olid (**F59**) jeweils das  $(S,S)$ - vor dem  $(R,R)$ -Enantiomer. Beim 6-Hydroxytetradec-2-en-5-olid (**F56**) wurde die umgekehrte Reihenfolge beobachtet (Abbildung 123).



**Abbildung 123:** Enantioselektive gaschromatographische Trennung der Enantiomere der Hydroxylactone. Synthetische Referenzsubstanz mit den Ionenspiuren  $m/z$  115, 86, 100 und 98 in den oberen zwei Chromatogrammen. Naturprobe mit hochauflösender SIM-Detektion der Ionen  $m/z$  115.0395,  $m/z$  86.0368, 100,0524 und 98.0368 in den unteren zwei Chromatogrammen. (Hydrodex- $\beta$ -6-TBDM®; T-Prog.: 140°C, 2°C/min auf 190°C, 60 min isotherm, Inj. 1 min sl))

Die stereochemische Zusammensetzung der Hydroxylactone in der Naturprobe wurde durch Integration der Signalfächen der Masse/Ladungsverhältnisse  $m/z$  86.0368, 100.0524 und 98.0368 bestimmt. Das 5-Hydroxy-4-decanolid (**B88**) liegt zu 68 % als (*S,S*)- und zu 32 % als (*R,R*)-Enantiomer vor. Das 6-Hydroxytetradecan-5-olid (**F59**) setzt sich zu 88 % aus dem (*S,S*)- und zu 12 % aus dem (*R,R*)-Enantiomer und das 6-Hydroxytetradec-2-en-5-olid (**F56**) zu 90 % aus dem (*S,S*)- und zu 10 % aus dem (*R,R*)-Enantiomer zusammen. Somit liegt in der Naturprobe neben eindeutigem Überschuß der *threo*-Stereoisomere eine Bevorzugung der (*S,S*)-Enantiomere vor.

## Biosynthese

Die untersuchten Hydroxyalkyllactone sind acetogenine Sekundärmetabolite, deren mögliche Biosynthese für das 5-Hydroxy-4-decanolid (**B88**) und für das 6-Hydroxy-5-tetradecanolid (**F56**) ausgehend von Fettsäuren bereits beschrieben sind<sup>289,301</sup>. Die mikrobielle Umsetzung von Fettsäuren zu **B88** ergab hohe Enantiomerenüberschüsse<sup>306</sup>. Die Biosynthese von **F59** verläuft vermutlich ähnlich wie die bereits beschriebene Biosynthese von **F56**, deren Schlüsselschritt eine Epoxydierung ist, die mit stereoselektiver Präferenz verläuft<sup>307,308</sup>.

## Ergebnisse und Diskussion

In der komplexen Mischung der Vielzahl organischer Verbindungen im Fischwasser konnten die Hydroxylactone 5-Hydroxy-4-decanolid (**B88**), 6-Hydroxytetradecan-5-olid (**F59**) und 6-Hydroxytetradec-2-en-5-olid (**F56**) identifiziert werden. In dieser Arbeit wird erstmalig die Struktur des Lactons **F56** als Naturstoff und die stereochemische Zusammensetzung des Lactonbuketts von **B88**, **F56** und **F59** aufgezeigt.

Die enantioselektive Synthese von **F56** machte die Stereoisomere aller drei Lactone für die enantioselektive Gaschromatographie und Biotests verfügbar. In der enantioselektiven Gaschromatographie wurden die Elutionsreihenfolgen der Stereoisomere und ihre stereochemische Zusammensetzung bei hochauflösender Detektion des jeweiligen intensivsten Basisions (Bp) wie folgt bestimmt:

5-Hydroxy-4-decanolid ( <b>B88</b> )	68 % ( <i>S,S</i> )-	32 % ( <i>R,R</i> )-Enantiomer
6-Hydroxytetradecan-5-olid ( <b>F59</b> )	88 % ( <i>S,S</i> )-	12 % ( <i>R,R</i> )-Enantiomer
6-Hydroxytetradec-2-en-5-olid ( <b>F56</b> )	90 % ( <i>S,S</i> )-	10 % ( <i>R,R</i> )-Enantiomer

In den gaschromatographisch-massenspektrometrischen Daten, die zu Beginn des Projektes auf einer achiralen Säule aufgenommen wurden, lag neben den Signalen der (*R,R*)- und (*S,S*)-Stereoisomere der Hydroxyalkyllactone zusätzlich noch in deutlich geringerer Konzentration jeweils ein weiteres Signal mit identischem Massenspektrum vor. Daher kann die Annahme gemacht werden, dass in der Naturprobe bei Projektstart auch ein Anteil der (*R,S*)- und (*S,R*)-Stereoisomere enthalten war. In der später analysierten Probe, die zur Bestimmung der stereochemischen Zusammensetzung untersucht wurde, konnten keine Anteile der (*R,S*)- und (*S,R*)-Stereoisomere mehr detektiert werden. Dieser Befund ist nicht eindeutig interpretierbar. Neben der Alterung des Probenmaterials ist auch dessen Gewinnung aus unterschiedlichen Hälterungsversuchen verschiedener Fischarten in zwei Laboratorien als Ursache denkbar. Als Nebenprodukt der hochauflösenden Detektion wurde die elementare Zusammensetzung der charakteristischen Basispeakionen in den Massenspektren abgesichert und ihre postulierte Struktur, die aus einer ungewöhnlichen Fragmentierung stammt, untermauert.

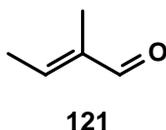
Die Kenntnis der enantiomeren Zusammensetzung ermöglicht nun als nächsten Schritt biologische Versuche an *Daphnia* Populationen. Im Biotest können sowohl die Racemate und reinen Enantiomere als auch vor allem Mischungen dieser in ihrem bestimmten natürlichen Verhältnis verwendet werden. Ergebnisse eines Biotests liegen noch nicht vor.

# Die Mutter-Kind-Erkennung

## Die Mutter-Kind-Erkennung bei Säugetieren

Die Mutter-Kind-Erkennung ist bei Säugetieren ein schon länger bekanntes Phänomen. Verhaltensrelevante Beobachtungen unterstützen als Ursache der Mutter-Kind-Erkennung die These, dass diese auf chemischer Kommunikation basiert. Muttertiere sind bei einer Reihe von Tierarten in der Lage, ihre eigenen Neugeborenen von anderen Jungtieren anhand olfaktorischer Informationen zu unterscheiden. Beobachtungen bei Nagetieren, wie dem Meerschweinchen *Cavia porcellus*, der Mongolischen Wüstenrennmaus *Meriones unguiculatus* und dem Wildkaninchen *Oryctolagus cuniculis*, zeigten, dass die Jungtiere nach ihrer Geburt von der Mutter mit Drüsensekret markiert werden. Das Entfernen dieser Duftmarkierung durch Abwaschen oder das Aufbringen fremder Gerüche verhindert die Mutter-Kind-Erkennung und kann sogar zu feindlichem Verhalten bis hin zum Kannibalismus führen<sup>309-313</sup>. Die gewöhnliche Stachelmaus *Acomys cahirinus* nutzt zur Markierung der Nachkommen ihren Urin. Aufgrund von Präferenzen bei der Nahrungsaufnahme entsteht ein individuell spezifischer Geruch des Urins. Wird die Nahrung für die Versuchstiere vereinheitlicht, können die Muttertiere ihre eigenen Nachkommen nicht mehr von fremden Jungtieren unterscheiden<sup>314,315</sup>. Bei Herdentieren spielt die Mutter-Kind-Erkennung anhand des Geruchs eine besonders wichtige Rolle, da sich die Jungtiere nach der Geburt im Herdenverband frei bewegen können und nicht wie die Nagetiere innerhalb eines Nestes heranwachsen. Eigene Nachkommen, beispielsweise bei Ziegen *Capra hircus*, Schafen *Ovis aries*, Rindern *Bos primigenius taurus* und Schweinen *Sus domesticus*, werden vom Muttertier behütet, und das Säugen wird ihnen gestattet, während fremde Jungtiere abgewiesen werden<sup>316-323</sup>. Als Quelle der spezifischen olfaktorischen Signale wurde bei Ziegen eine Übertragung vom Muttertier auf den Nachwuchs durch Lecken oder über das Säugen der Milch angenommen<sup>324</sup>. Ebenso spielt die Erkennung des Muttertiers durch den Nachwuchs anhand von spezifischen flüchtigen Substanzen eine wichtige Rolle und wurde unter anderem bei Hamstern, Hauskatzen, Haus-, Stachel- und Wüstenrennmäusen, Ratten sowie Wildkaninchen untersucht<sup>325</sup>.

Besonders die Interaktion zwischen Kaninchennachwuchs und ihrer Mutter wurde intensiv untersucht, da die Jungen taub und mit verschlossenen Augen geboren werden und nur einmal am Tag für wenige Minuten gesäugt werden<sup>326</sup>. Die Wahrnehmung der säugenden Mutter während ihres Besuchs im Bau ist für die blinden Kaninchenjungen daher überlebenswichtig. Die Jungtiere reagieren innerhalb von Sekunden mit einer typischen suchenden Kopfbewegung und Ausrichtung zu den Zitzen am Mutterbauch auf die Anwesenheit der Mutter<sup>327</sup>. Diese Reaktion wird durch ein semiochemisches Signal, das zunächst als „nipple-search pheromone“ und später als „mammary pheromone“ (MP) bezeichnet wurde, ausgelöst<sup>328,329</sup>. Als biologisch aktive Komponente konnte 2-Methyl-2-butenal (**129**) in der Kaninchenmilch identifiziert werden<sup>330,331</sup>.



**Abbildung 124:** 2-Methyl-2-butenal (**121**) als Releaserpheromon in der Muttermilch von Kaninchen

## Die Mutter-Kind-Erkennung beim Menschen

Darwin berichtete schon 1877, dass menschliche Neugeborene auf das Herannahen der Mutterbrust mit einer Kopfbewegung reagieren<sup>114</sup>. Annähernd ein Jahrhundert später konnten flüchtige Substanzen als Ursache nachgewiesen werden<sup>332,333</sup>. Das Sammeln individueller Gerüche von der Mutterbrust auf Wattebäusche ermöglichte Versuche mit Säuglingen, die eindeutige Reaktionen auf die Wattebäusche zeigten und sogar in der Lage waren, zwischen dem Geruch ihrer Mutter und fremden Müttern zu unterscheiden. Die Erkennung der leiblichen Mutter durch Gerüche erleichtert dem Neugeborenen das Finden der Mutterbrust und unterstützt somit das lebensnotwendige Säugen<sup>334</sup>. Schon wenige Stunden nach ihrer Geburt präferieren die Neugeborenen eine Mutterbrust mit ihrem natürlichen Geruch vor einer frisch gewaschenen Brust mit vermindertem Eigengeruch. Zwei Wochen nach ihrer Geburt sind auch Neugeborene, die mittels Flaschennahrung gestillt wurden, zur eindeutigen Diskriminierung anhand von Gerüchen in der Lage. Sie zeigen auf die Brustgerüche nicht verwandter stillender Mütter eine positivere Reaktion als auf die Achselgerüche fremder Mütter und der eigenen Familie<sup>335,336</sup>. Bei Abwesenheit ihrer Mutter und ohne visuelle, taktile und audielle Beeinflussung durch diese bewiesen Neugeborene, dass ausschließlich die Brustgerüche auf Wattebäuschen eine Bewegung zur Geruchsquelle auslösten<sup>337</sup>. Der Geruch von Fruchtwasser begünstigt zusätzlich die Wahl einer Mutterbrust in den ersten Stunden nach der Geburt. Eine pränatale Vorprägung wird als Ursache postuliert<sup>338,339</sup>. In wenigen Tagen nach der Geburt ändert sich die Geruchspräferenz des Neugeborenen von Fruchtwasser über Erstmilch, auch Kolostrum oder Kolostralmilch genannt, zu Gunsten „normaler“ Muttermilch, wobei der Geruch der eigenen Mutter dem Geruch fremder Mütter vorgezogen wird<sup>340-343</sup>.

Neben der Präferenz des Neugeborenen für die natürlichen Gerüche von Fruchtwasser, Kolostrum und Milch, wird der Fötus im Uterus schon durch die Essgewohnheiten der Mutter an weitere Gerüche gewöhnt. Diese pränatale Prägung resultiert in einer postnatalen Bevorzugung der gewohnten Gerüche und zeigt die ausgeprägte sensorische Fähigkeit des menschlichen Fötus sowohl vor als auch nach der Geburt<sup>344</sup>. Besonders in der ersten Stunde nach der Geburt nimmt der Säugling unbekannte neue Gerüche wahr und erlernt diese, so dass eine schnelle Eingewöhnung an die Gerüche der neuen Umgebung und speziell an die der Mutter erfolgen kann<sup>345</sup>.

Außer der Brustdrüse (lat. *Glandula mammaria*) als Quelle der Erstmilch und späteren Muttermilch befinden sich auf dem die Brustdrüse umgebenden Warzenhof (lat. *Areola*) zahlreiche weitere Drüsen. Auf der pigmentierten Haut der *Areola* liegen neben ekkrinen Schweißdrüsen<sup>a</sup> und vergrößerten Talgdrüsen (lat. *Glandula sebacea*) noch ursprünglich als Erhebungen „Follikel“ beziehungsweise Vorsprünge „Tubercula“<sup>346</sup> oder Erhöhungen „Protuberances“<sup>347</sup> bezeichnete Drüsen vor. Montgomery beschrieb die Drüsen genauer und beobachtete deren Schwellung während der Schwangerschafts- und Stillzeit. Seither werden sie als Montgomery-Drüsen oder Tubercula (*Glandulae areolares*) bezeichnet<sup>348</sup>. Durch ihre mehrfache Funktion als apokrine Schweißdrüse<sup>b</sup>, als Talgdrüse und zusätzlich als milchführende Drüse ist die histologische Einordnung umstritten. In der vorliegenden Arbeit werden diese Drüsen im Folgenden unabhängig von ihrer Histologie als *Areola Glands* (AG) bezeichnet und ihr Sekret im analytischen Teil als Sekret der *Areola Glands* (SAG). Diese Drüsen weisen eine erhöhte Sekretion während der späten Phase der Schwangerschaft und während der Stillzeit auf. Das Sekret soll die Brust vor Entzündungen und trockener Haut ebenso schützen wie vor dem aggressiven Speichel und den Saugbemühungen des Neugeborenen. Außerdem fungiert das Drüsensekret zusammen mit dem Speichel des Säuglings als effiziente Versiegelung zwischen den Säuglingslippen und der Haut der *Areola*, wodurch das Saugen des Kindes erleichtert wird<sup>349</sup>. Eine zusätzliche olfaktorische Funktion der Drüsensekrete der *Areola* wurde schon mehrfach postuliert, wobei bislang Substanzen der gesamten Mutterbrust, gesammelt auf Wattebäuschen, untersucht wurden, die jedoch eine Unterteilung nach ihrem Ursprung unmöglich machte<sup>337-340</sup>.

---

<sup>a</sup> Ekkrine (oder merokrine) Schweißdrüse: Das Sekret reguliert den Wärmehaushalt des Lebewesens und der niedrige pH-Wert bewirkt den Säureschutzmantel der Haut. Der Mensch besitzt 2-4 Millionen ekkrine Schweißdrüsen mit einem Durchmesser von 0.4 mm. Sie sind bis auf wenige Ausnahmen über die gesamte Körperoberfläche verteilt.

<sup>b</sup> Apokrine Schweißdrüse, auch Duftdrüse genannt: Die apokrinen Schweißdrüsen werden erst in der Pubertät gebildet und die Sekretion ist abhängig vom emotionalen und hormonellen Zustand. Apokrine Schweißdrüsen geben Duftstoffe ab, welche zusammen mit dem Sekret der Talgdrüsen für den Körpergeruch verantwortlich sind. Der Drüsenkörper hat einen Durchmesser von 3-5 mm. Sie finden sich nur in bestimmten Körperregionen (Achselhöhle, Brustwarze, Genital- und Perinatalgegend).

Erst 2007 wurden die Drüsensekrete der *Areola* in morphologisch differenzierten Versuchen auf ihre Aktivität bei Neugeborenen untersucht<sup>350</sup>. Dabei wurden bestimmte Hautregionen auf der Brust mit ihren jeweiligen Drüsen nacheinander selektiv mit luftundurchlässigen Folien abgedeckt, damit sie als Quelle olfaktorischer Substanzen bei folgenden Untersuchungen ausgeschlossen werden konnten. Dabei zeigten Säuglinge drei Tage nach ihrer Geburt ein identisches Verhalten auf Gerüche der gesamten Mutterbrust, wie sie schon in früheren Experimenten beschrieben wurden. Entscheidender waren die Tests zur Reaktion auf die isolierten Gerüche von den Drüsensekreten der *Areola*, der *Mammalia* und der Muttermilch im Vergleich zum kombinierten Geruch der gesamten Brust. Die Neugeborenen zeigten auf die isoliert dargebotenen Gerüche vergleichbar positive Reaktionen, wie auf den Geruch der gesamten Mutterbrust. Die stärkste Reaktion zeigten Neugeborene nach vorläufigen Ergebnissen weiterführender Untersuchungen auf das Drüsensekret der *Areola*<sup>351,352</sup>.

Der Geruchssinn des Neugeborenen spielt somit schon von Geburt an eine wichtige Rolle bei der Mutter-Kind-Interaktion. Die erste Prägung der Säuglinge tritt schon im Uterus auf und zeigt sich in der Attraktivität des Fruchtwassers, das einen zusätzlichen individuellen Geruch resultierend aus der Nahrung und vermutlich genetischen Information der Mutter besitzt. Direkt nach der Geburt lernt das Neugeborene schnell die neuen Gerüche der Umgebung sowie den spezifischen Geruch von Brust, Kolostrum und Muttermilch, den es mit der Mutter verbindet. Unter dem Einfluß dieser Gerüche beruhigen sich Neugeborene schneller und weinen weniger. Der biologische Vorteil aus diesen olfaktorischen Fähigkeiten liegt im schnellen Finden der Mutterbrust und der raschen Aufnahme von Kolostrum. Neben der Nahrungsaufnahme und Aktivierung der körpereigenen Verdauung ist dieses für das noch nicht ausgeprägte Immunsystem des Kindes essentiell<sup>352</sup>. Zusätzlich wird durch das frühe Stillen die Produktion der Muttermilch erst angeregt. Das Stillen führt bei der Mutter zur günstigen Änderung hormoneller Werte und erzeugt eine physiologische Wirkung im Uterus<sup>353,354</sup>.

## Aufgabenstellung

Untersuchungen zu den flüchtigen Inhaltsstoffen der Muttermilch sind in der Literatur nur selten beschrieben<sup>355-357</sup>. Die flüchtigen Bestandteile des Kolostrums waren bislang nur in einer zu dieser Dissertation vorangegangenen Arbeit das Ziel von Untersuchungen<sup>358</sup>, und das Montgomery-Drüsensekret wurde bislang nur in Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit untersucht<sup>352</sup>. Ziel dieser Untersuchung ist daher die Bestimmung der chemischen Zusammensetzung der flüchtigen Inhaltsstoffe von Kolostrum und Montgomery-Drüsensekret. Erst durch die Kenntnis der flüchtigen Inhaltsstoffe von Kolostrum und dem milchartigen Sekret der Montgomery-Drüsen können Aussagen über deren chemische Übereinstimmungen gemacht werden. So können diese Ergebnisse helfen, die histologisch schwer einzuordnenden Drüsen der *Areola* zumindest chemisch besser zu klassifizieren. Zusätzlich zu der vergleichenden Analytik hinsichtlich der Inhaltsstoffe beider Proben ist die Identifizierung potentiell biologisch aktiver Substanzen von Interesse, vergleichbar zu 2-Methyl-2-butenal (**121**) bei den Kaninchen. Diese Arbeit soll somit die Grundlage für weitere Untersuchungen zur chemischen Ökologie flüchtiger Verbindungen im Sekret der Montgomery-Drüsen und des Kolostrums liefern.

## Analytische Durchführung

Bedingt durch die sehr geringe verfügbare Probenmenge von wenigen Mikrolitern ist eine Probenaufarbeitung oder chromatographische Fraktionierung sehr schwierig. In ersten Untersuchungen mit größeren Probenvolumina wurde noch eine Fraktionierung an Florisil durchgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der Probenmenge nicht durchgeführt werden konnte<sup>358,352</sup>. Als neue Proben stehen jeweils die Sekrete der Montgomery-Drüsen und Kolostrum von drei verschiedenen Frauen zur Verfügung. In den bislang durchgeführten GC/MS-Analysen des Kolostrums zeigte sich eine nicht optimale Chromatographie der oft polaren Inhaltsstoffe auf unpolaren Phasen (VF-5ms: 95% PDMS/5% Phenyl). Daher sollte die chromatographische Trennung sowohl an polaren Phasen für eine gute Chromatographie und Trennung der Analyten als auch zusätzlich an unpolaren Phasen zur Bestimmung der schwerflüchtigen Inhaltsstoffe durchgeführt werden.

Dazu wurden folgende Phasen mit möglichst unterschiedlicher Polarität und Selektivität ausgewählt<sup>a</sup>:

VF-5ms	0.25 µm FD	unpolare Säule	normale Filmdicke
VF-624ms	1.40 µm FD	mittelpolare Säule	große Filmdicke
VF-WAXms	0.25 µm FD	sehr polare Säule	normale Filmdicke

Unter den gleichen chromatographischen Bedingungen wurde jeweils ein Alkanraster mit den Alkanen von Octan bis Triacontan vor Analyse der Proben als externe Referenz zur Bestimmung des linearen Retentionsindex gemessen.

Zur weiteren Absicherung der Strukturvorschläge wurden zusätzliche Analysen mit Chemischer Ionisierung (CI) durchgeführt. Eine sehr weiche und somit fragmentierungsarme Chemische Ionisierung gelingt besonders gut mit flüssigen Reaktanden bei der internen Ionisierung in Ionenfallen. Dazu wurde bei den Ionenfallen-Massenspektrometern 220-MS mit der Säule VF-624-ms und 240-MS mit der Säule VF-WAXms Methanol genutzt, um über das Pseudomolekülion ( $M+H^+$ ) das Molekulargewicht zusätzlich abzusichern.

Das Probenmaterial wurde von Dr. Benoist Schaal vom Centre Européen des Sciences du Goût zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden direkt nach ihrer Abnahme bei -18 °C tiefgefroren und erst kurz vor den Analysen aufgetaut. Bei beiden Probenarten von Kolostrum und SAG handelte es sich um inhomogene milchige Lösungen.

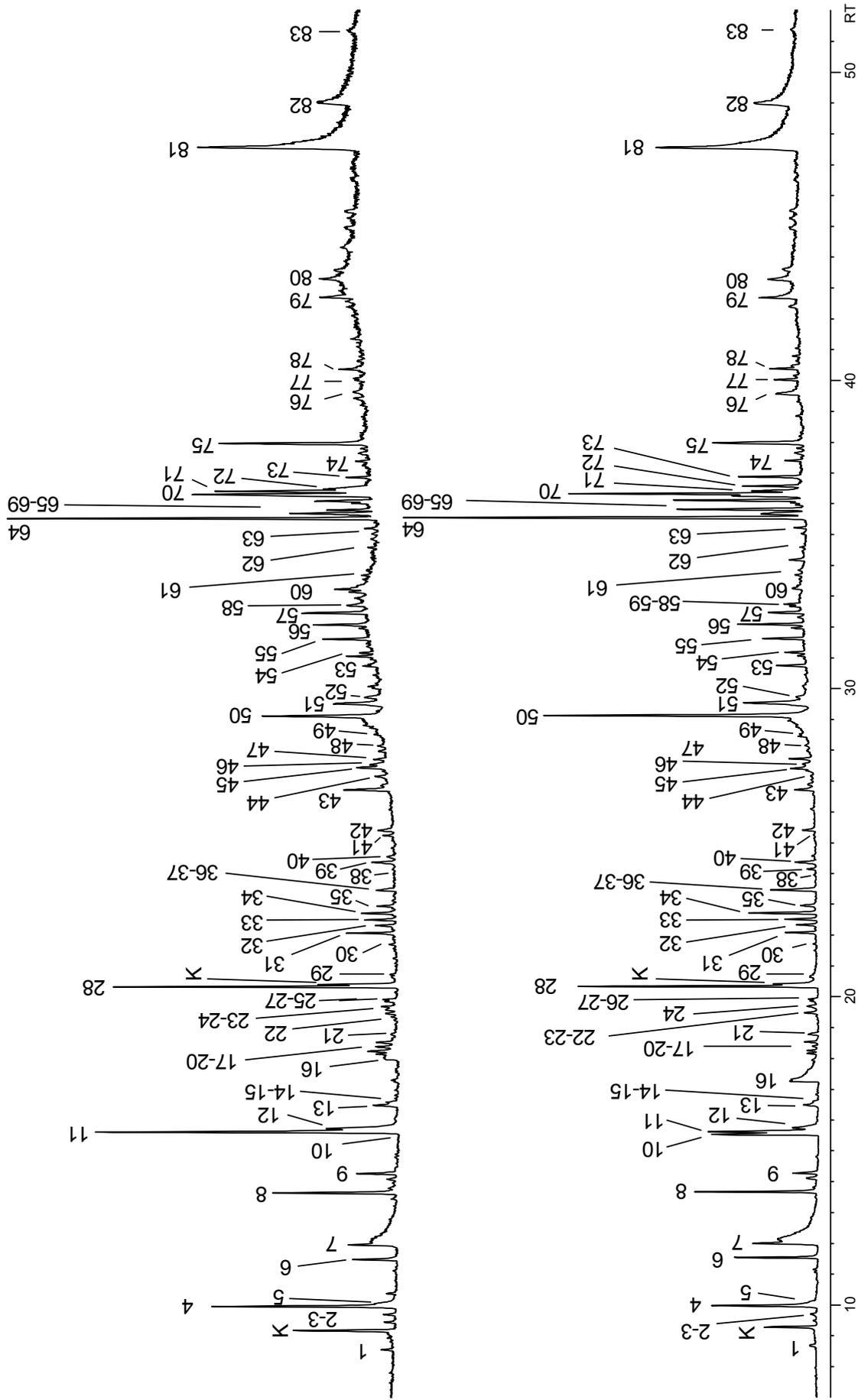
Von den Suspensionen der Kolostrumproben wurde jeweils 1 µL entnommen und mit Methanol um den Faktor 1:20 verdünnt. Analog dazu wurde von den Suspensionen der SAG-Proben 1 µL entnommen und mit Methanol um den Faktor 1:10 verdünnt. Zur gaschromatographisch-massenspektrometrischen Untersuchung wurde von den verdünnten Proben ohne weitere Aufarbeitung jeweils 1 µL injiziert.

---

<sup>a</sup> Vollständige Informationen zu den analytischen Bedingungen im Experimentellen Teil

## **Identifizierung flüchtiger Verbindungen aus Kolostrum und SAG**

Im Zentrum der Untersuchungen stand die Identifizierung flüchtiger Verbindungen, die mit Hilfe der Kopplung aus Gaschromatographie und Massenspektrometrie untersucht wurden. Durch die Bestimmung der linearen Retentionsindices soll die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit mit zukünftigen Messungen vereinfacht werden. Der folgende Abschnitt stellt die Ergebnisse der chemischen Analysen von Kolostrum (K) und SAG dar. Trotz der geringen Probenmenge wurden einige Experimente wiederholt durchgeführt. Dabei zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit in den Messungen. Es wurden die gleichen Analyten in allen Proben nachgewiesen, wodurch die Zuverlässigkeit der Analytik unterstützt wird. Zusätzlich zeigten die Proben gleicher Drüsen von verschiedener Frauen ein nahezu identisches qualitatives Bild. Daher wird im Folgenden nur jeweils ein Chromatogramm pro Probentyp (SAG oder K) und chromatographischer Trennsäule exemplarisch abgebildet. In der kompletten Liste der Inhaltsstoffe werden die unter den jeweiligen chromatographischen Bedingungen identifizierten Verbindungen durch Angabe ihrer linearen Retentionsindices (RI) angezeigt. Nicht alle Verbindungen konnten unter den unterschiedlichen chromatographischen Bedingungen stets wiedergefunden werden. Sehr leichtflüchtige Verbindungen konnten auf unpolaren Säulen teilweise nicht ausreichend vom Lösungsmittel getrennt werden, während schwerflüchtige Verbindungen nicht immer innerhalb der Analysenzeit bei den niedrigeren Endwerten der Ofentemperaturprogramme auf den polaren Säulen eluierten. Bei der hohen Anzahl an Analyten traten zudem gelegentlich Koelutionen auf, wodurch Komponenten mit wenig intensiven Signalen unter starken Signalen gleicher Retentionszeit möglicherweise nicht detektiert werden konnten. Durch die unterschiedlichen Phaseneigenschaften bei der Chromatographie konnte jedoch eine weitestgehend vollständige Analyse der flüchtigen Verbindungen gewährleistet werden. Auf den folgenden Seiten sind die Chromatogramme und Tabellen mit den jeweils identifizierten Analyten einzeln aufgeführt.

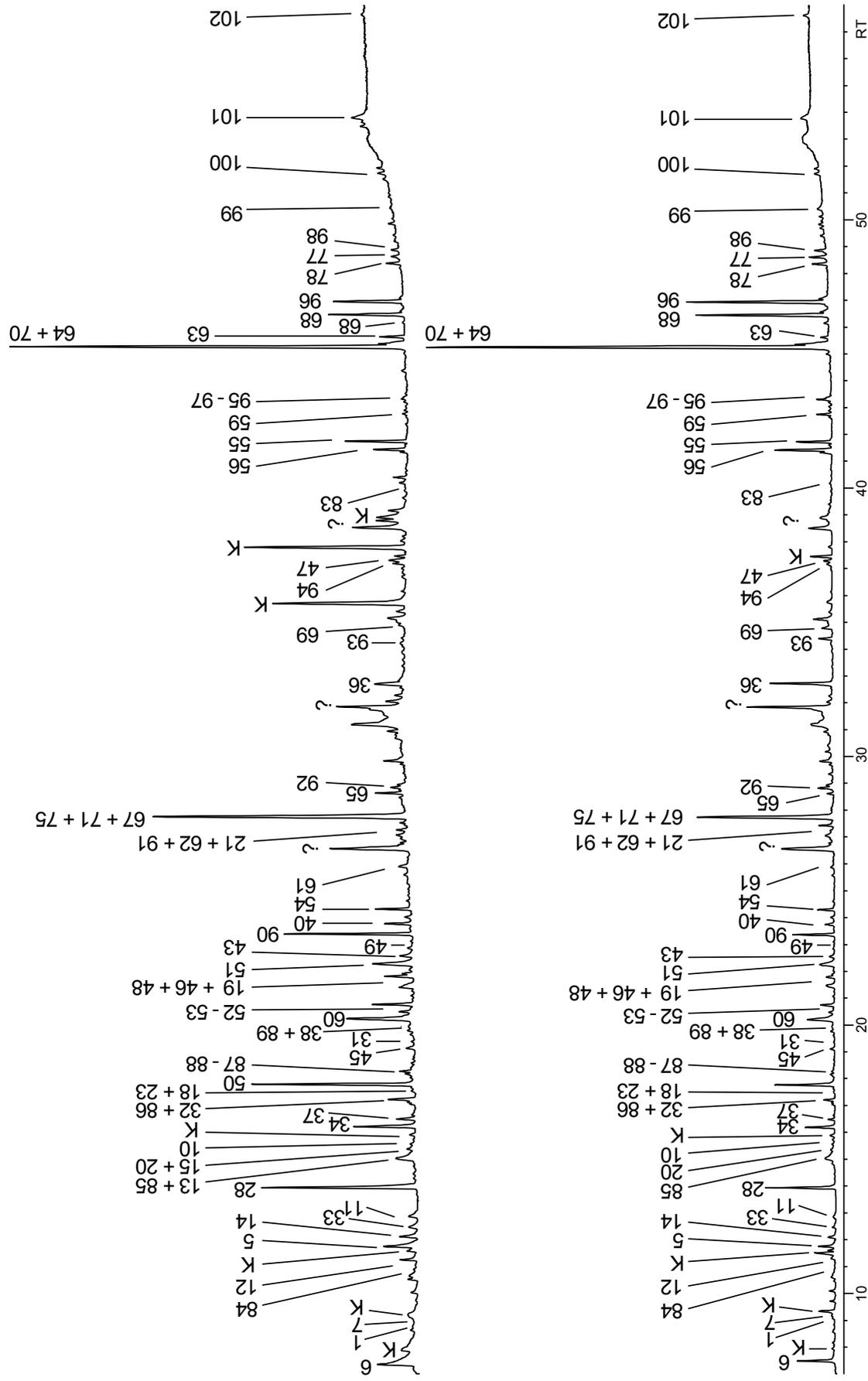


**Abbildung 125:** Gegenüberstellung der Gaschromatogramme von Kolostrum (oberes Chromatogramm) und SAG (unteres Chromatogramm)  
 [Säule VF-WAXms, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm ID, Temperaturprogramm: 35 °C, 1 min isotherm, mit 5 °C/min auf 240 °C, 15 min isotherm]

Nr.	Name	Formel	RI	RT K	RT SAG
M1	Pyridin	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sup>Cl</sup>	1189 <sup>RT</sup>	8,55	8,70
K	K	-	1214	9,17	9,27
M2	2-Methylfuran	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sup>Cl</sup>	1224	9,44	9,49
M3	5,5-Dimethyl-2(5H)-furanon	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1234	9,69	9,70
M4	Furfurylmethylether	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1244	9,95	9,98
M5	Methyl 2-oxopropanoat	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1247 <sup>RT</sup>	10,03	10,05
M6	1-Hydroxyaceton	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1302 <sup>RT</sup>	11,47	11,54
M7	Methyl 2-hydroxypropanoat	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1321 <sup>RT</sup>	11,95	12,00
M8	Methyl hydroxyacetat? Cl m/z 90/91	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ?	1385 <sup>RT</sup>	13,63	13,67
M9	Dimethyloxalat	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> <sup>Cl</sup>	1410	14,26	14,29
M10	Essigsäure	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1462 <sup>RT</sup>	15,59	15,54
M11	2-Furfural	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1463 <sup>RT</sup>	15,62	15,63
M12	2-Methyl-2-butenal	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sup>Cl</sup>	1468	15,73	15,75
M13	Furfurylformiat	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1497	16,48	16,50
M14	3-Furfurylalkohol	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1500	16,55	16,55
M15	2-Acetylfuran	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1501 <sup>RT</sup>	16,58	16,61
M16	Ameisensäure	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1540	17,95	17,26
M17	Methyl 4-oxopentanoat / Methyl levulat	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1566	18,14	18,17
M18	5-Methyl-2-furfural	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1570 <sup>RT</sup>	18,23	18,26
M19	Methyl furoat	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1576 <sup>RT</sup>	18,38	18,40
M20	Protoanemonin / 3-Hydroxypenta-2,4-dienolid	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1582 <sup>RT</sup>	18,53	18,54
M21	Methyl decanoat	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1592 <sup>RT</sup>	18,77	18,79
M20	Methyl benzoat	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1617 <sup>RT</sup>	19,35	19,38
M23	Isomaltol / 1-(3-Hydroxy-2-furanyl)-ethanon	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1627	19,58	19,49
M24	Methyl carbamat	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1631	19,68	19,70
M25	Buttersäure	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1635 <sup>RT</sup>	19,78	n.n.
M26	Methyl 4-hydroxy-3-methylpent-2-enoat	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	1638	19,85	19,86
M27	Methyl 4-hydroxy-3-methylpent-2-enoat Isomer	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	1641	19,91	19,92
M28	2-Furfurylalkohol	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1659 <sup>RT</sup>	20,32	20,34
K	K, Methylmethanesulfonat	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S <sup>Cl</sup>	1662	20,40	20,42
M29	2-Butendisäuredimethylester? Cl m/z 145	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ?	1676	20,71	20,74
M30	5-Methyl-2-furfurylalkohol	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1719 <sup>RT</sup>	21,69	21,72
M31	1,3-Glycerindiacetat Cl m/z 177/163/117	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	1736	22,08	22,08
M32	2-Buten-4-olid	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1747 <sup>RT</sup>	22,30	22,34
M30	Acetamid	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sup>Cl</sup>	1756	22,50	22,52
M34	2-Hydroxy-2-cyclopenten-1-on	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1765 <sup>RT</sup>	22,71	22,72
M35	unbekannt, Cl m/z 102	-	1776	22,94	22,97
M36	Methyl dodecanoat	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	1799 <sup>RT</sup>	23,45	23,47
M37	MS wie 3-Furfurylalkohol? Cl m/z 99	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ?	1801	23,49	23,52
M38	2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-on / Cycloten	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1822 <sup>RT</sup>	23,93	23,95
M39	1-Amino-2,6-dimethylpiperidin? Cl m/z 129	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> ?	1842	24,37	24,35
M40	2,3-Dihydro-5-hydroxy-6-methyl-(4H)-pyran-4-on	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1852	24,56	24,58
M41	Methyl 2,4-heptadienoat? Cl m/z 141	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> ?	1884	25,23	25,26
M42	Dimethyl tartronat / Dimethyl 2-hydroxypropandioat	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub> <sup>Cl</sup>	1892	25,39	25,41
M43	Maltol / 3-Hydroxy-2-methyl-4-pyranon	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1957 <sup>RT</sup>	26,71	26,72
M44	Levoglucosenon	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1979	27,16	27,17
M45	2H-Pyran-2,6(5H)-dion / Glutaconsäureanhydrid	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1993	27,43	27,41
M46	MS ähnlich Maltol, Isomer? Cl m/z 127	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ?	1998	27,53	27,55
M47	Methyl tetradecanoat	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2007 <sup>RT</sup>	27,71	27,73
M48	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon / Furaneol	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	2030 <sup>RT</sup>	28,14	28,15
M49	Methyl pyrrole-2-carboxylat	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2049 <sup>RT</sup>	28,52	28,53

Nr.	Name	Formel	RI	RT K	RT SAG
M50	Glycerindehyd	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	2080 <sup>RT</sup>	29,11	29,13
M51	unbekannt CI m/z 117	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ?	2103	29,54	29,53
M52	4-Hydroxy-5-methyl-3(2 <i>H</i> )-furanon / Norfuranol	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	2113 <sup>RT</sup>	29,72	29,72
M53	3-Hydroxydihydro-2(3 <i>H</i> )-furanon	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	2167	30,73	30,75
M54	Dimethyl 2-hydroxy-2-methylbutan-1,4-dioat	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	2193	31,16	31,18
M55	Methyl hexadecanoat	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2212	31,61	31,62
M56	Methyl 9-hexadecenoat	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2241 <sup>RT</sup>	32,08	32,09
M57	3,5-Dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-(4 <i>H</i> )-pyran-4-on	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> <sup>Cl</sup>	2262 <sup>RT</sup>	32,46	32,47
M58	Decansäure	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2276 <sup>RT</sup>	32,71	32,67
M59	Ethyl 9-hexadecenoat	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2278	32,74	32,74
M60	Glycerin	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	2305 <sup>RT</sup>	33,22	33,27
M61	2-Acetyl-2-hydroxy-4-butanolid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> <sup>Cl</sup>	2332	33,67	33,69
M62	Picolinamid / 2-Pyridinecarboxamid	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sup>Cl</sup>	2384	34,58	34,59
M63	Methyl octadecanoat	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2421 <sup>RT</sup>	35,21	35,22
M64	Methyl 9-octadecenoat	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2441 <sup>RT</sup>	35,52	35,54
M65	3-Acetamidofuran	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2451	35,69	35,70
M66	Isopropyl 9-octadecenoat	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2458	35,80	35,79
M67	5-Hydroxymethyldihydrofuran-2-on	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	2471	36,01	36,03
M68	Ethyl 9-octadecenoat	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2475 <sup>RT</sup>	36,09	36,12
M69	Dodecansäure	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2486 <sup>RT</sup>	36,26	36,26
M70	Methyl 9,12-octadecadienoat	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2488 <sup>RT</sup>	36,30	36,32
M71	5-(Hydroxymethyl)-2-furfural	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	2494 <sup>RT</sup>	36,40	36,42
M72	Isopropyl 9,12-octadecadienoat	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2505	36,56	36,57
M73	Ethyl 9,12-octadecadienoat	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2525 <sup>RT</sup>	36,86	36,88
M74	2,5-Dihydroxymethylfuran CI m/z 111 (-H <sub>2</sub> O)	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	2577 <sup>RT</sup>	37,63	37,65
M75	4-Hydroxydihydro-2(3 <i>H</i> )-furanon	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	2600 <sup>RT</sup>	37,96	37,99
M76	Tetradecansäure	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	2697	39,56	39,55
M77	Methyl 8,11,14-eicosatrienoat	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2729	40,03	40,37
M78	Methyl 5,8,11,14-eicosatetraenoat	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2750	40,36	40,37
M79	Hexadecansäure	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2881 <sup>RT</sup>	42,70	42,70
M80	9-Hexadecensäure	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	2916	43,30	43,30
M81	9-Octadecensäure	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	3193 <sup>RT</sup>	47,57	47,55
M82	9-Octadecensäure Isomer	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	3279	49,04	49,02
M83	3-Acetamido-5-acetylfuran	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	3415	51,36	51,39

**Tabelle 14:** Strukturvorschläge zu den Inhaltsstoffen von Kolostrum und SAG. Trennung an polarer Waxphase VF-WAXms. Der hochgestellte Index <sup>Cl</sup> bei den Summenformeln in den Tabellen bedeutet, dass das Pseudomolekülion der Verbindung mit CI abgesichert wurde. Eine auftretende Abspaltung von Wasser aus dem Molekülion unter den Bedingungen der CI ist gekennzeichnet. Der hochgestellte Index <sup>RT</sup> bedeutet, dass diese Verbindung auf ähnlichen chromatographischen Phasen einen vergleichbaren linearen Retentionsindex besitzt<sup>359</sup>. Die Kennzeichnung eines Signals mit „K“ steht für eine Kontaminante, die bei der Probenvorbereitung oder der Aufbewahrung in die Probe gelangte, wie zum Beispiel Weichmacher und Stabilisatoren von Kunststoffen. Zusätzlich liegen in dem Lösungsmittel Methanol noch leichtflüchtige Acetale und Ester vor, die durch eine Blindwertmessung des Lösungsmittels zugeordnet wurden.



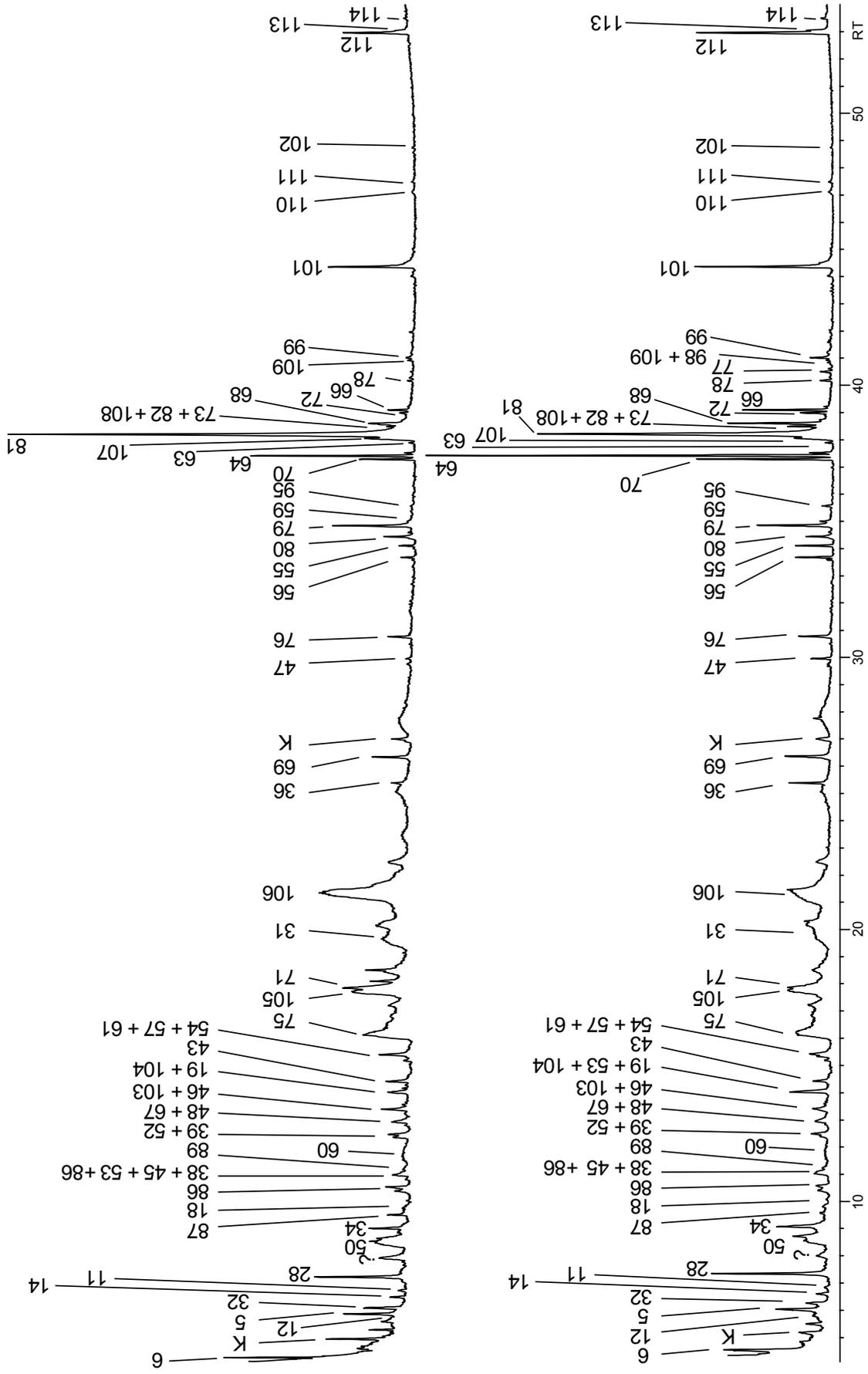
**Abbildung 126:** Gegenüberstellung der Gaschromatogramme von Kolostrum (oberes Chromatogramm) und SAG (unteres Chromatogramm)

[Säule VF-624ms, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm FD, Temperaturprogramm: 40 °C, 1 min isotherm, mit 5 °C/min auf 300 °C, 5 min isotherm]

Nr.	Name	Formel	RI	RT K	RT SAG
M6	1-Hydroxyacetone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	735	7,35	7,48
K	K, 2,2-Dimethoxybutan	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	771	8,59	8,57
M1	Pyridin	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sup>Cl</sup>	783	9,00	9,06
M7	Methyl 2-hydroxypropanoat	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	786	9,12	9,18
K	K, Propylacetat	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	791	9,29	9,36
M84	3-Methyl-2-butenal	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sup>Cl</sup>	828	10,55	10,60
M12	2-Methyl-2-butenal	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sup>Cl</sup>	841	11,02	11,04
K	K, Siloxan	-	855	11,44	11,50
M5	Methyl 2-oxopropanoat	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	862	11,73	11,76
M14	3-Furfurylalkohol	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	873	12,10	12,09
M33	Acetamid	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sup>Cl</sup>	882	12,43	12,46
M11	2-Furfural	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	895	12,86	12,85
M28	2-Furfurylalkohol	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	926	13,90	13,93
M13	Furfurylformiat	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	949	14,75	14,78
M85	Dihydroxyacetone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	957	14,99	15,02
M20	Protoanemonin / 3-Hydroxypenta-2,4-dienolid	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	967	15,36	15,35
M15	2-Acetylfuran	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	970	15,47	15,47
M10	Essigsäure	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	978	15,73	15,72
K	K, Siloxan	-	983	15,90	15,88
M34	2-Hydroxy-2-cyclopenten-1-on	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	991	16,19	16,19
M37	MS wie 3-Furfurylalkohol, Cl m/z 99	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ?	1000	16,48	16,48
M86	2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-on	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> <sup>Cl</sup>	1017	17,03	17,04
M32	2-Buten-4-olid	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1022	17,21	17,20
M23	Isomaltol / 1-(3-Hydroxy-2-furanyl)-ethanon	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1030	17,51	17,50
M18	5-Methyl-2-furfural / 5-Methyl-2-furancarboxaldehyd	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1031	17,54	17,54
M50	Glycerindehyd	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1038	17,76	17,77
M87	3-Methyl-2,5-furandion	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1050	18,16	18,16
M88	5-Acetyldihydro-2(3H)-furanon	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	1053	18,23	18,26
M45	2H-Pyran-2,6(5H)-dion / Glutaconsäureanhydrid	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1079	19,12	19,12
M31	1,3-Glycerindiacetat	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	1087	19,37	19,37
M38	2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-on / Cycloten	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1091	19,64	19,62
M89	Pyrrrol-2,5-dion	C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1099	19,78	19,78
M60	Glycerin	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1111	20,18	20,21
M52	4-Hydroxy-5-methyl-3-(2H)-furanon / Norfuraneol	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1121	20,49	20,47
M53	3-Hydroxydihydro-2(3H)-furanon	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1129	20,76	20,74
M48	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon / Furaneol	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1150	21,44	21,47
M46	MS ähnlich Maltol, Isomer? Cl m/z 127	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ?	1162	21,82	21,79
M19	Methyl furoat	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1166	21,93	21,89
M51	unbekannt Cl m/z 117	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ?	1177	22,29	22,27
M43	Maltol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1186	22,59	22,57
M49	Methyl pyrrol-2-carboxylat	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1202	23,04	22,98
M90	unbekannt Cl m/z 117	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ?	1214	23,41	23,36
M57	3,5-Dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-(4H)-pyran-4-on	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> <sup>Cl</sup>	1227	23,79	23,75
M54	Dimethyl 2-hydroxy-2-methylbutan-1,4-dioat	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> <sup>Cl</sup>	1245	24,34	24,29
M61	2-Acetyl-2-hydroxy-4-butanolid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> <sup>Cl</sup>	1299	25,95	25,88
?	unbekannt	-	1321	26,56	26,54
M21	Methyl decanoat	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1355	27,49	27,43
M91	5-Hydroxymethyl-2(5H)-furanon	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1357	27,57	27,51
M62	Picolinamid / 2-Pyridinecarboxamid	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sup>Cl</sup>	1360	27,63	27,58
M67	5-Hydroxymethyldihydrofuran-2-on	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1365	27,78	27,74
M75	4-Hydroxydihydro-2(3H)-furanon	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1366	27,80	27,78
M71	5-(Hydroxymethyl)-2-furfural	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> <sup>Cl</sup>	1368	27,86	27,82
M65	3-Acetamidofuran	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1397	28,68	28,62
M92	1,2,3-Glycerintriacetat	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	1404	28,88	28,83
M36	Methyl dodecanoat	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> <sup>Cl</sup>	1554	32,78	32,72

Nr.	Name	Formel	RI	RT K	RT SAG
M93	Ethyl dodecanoat	$C_{14}H_{28}O_2^{Cl}$	1622	34,46	34,39
M69	Dodecansäure	$C_{12}H_{24}O_2$	1629	n.n.	34,78
K	K, Diethyl phthalat	$C_{12}H_{14}O_4$	1679	35,80	35,74
M94	Methyl tetradecanoat	$C_{15}H_{28}O_2^{Cl}$	1748	241	37,36
M47	Methyl tetradecanoat	$C_{15}H_{30}O_2^{Cl}$	1755	37,51	37,45
K	K, 1,1,3-Trimethyl-3-phenylindan	$C_{18}H_{20}$	1771	37,88	37,81
M83	3-Acetamido-5-acetylfuran	$C_8H_9NO_3^{Cl}$	1880	40,25	40,18
M56	Methyl 9-hexadecenoat Isomer	$C_{17}H_{32}O_2^{Cl}$	1936	41,39	41,32
M56	Methyl 9-hexadecenoat	$C_{17}H_{32}O_3^{Cl}$	1941	41,49	41,42
M55	Methyl hexadecanoat	$C_{17}H_{34}O_2^{Cl}$	1956	41,79	41,72
M59	Ethyl 9-hexadecenoat	$C_{18}H_{34}O_2^{Cl}$	2007	42,82	42,75
M95	Isopropyl 9-hexadecenoat	$C_{19}H_{36}O_2^{Cl}$	2035	43,38	43,30
M96	Methyl heptadecenoat	$C_{18}H_{34}O_2^{Cl}$	2039	43,44	43,38
M97	Methyl heptadecanoat	$C_{18}H_{36}O_2^{Cl}$	2056	43,78	43,71
M70	Methyl 9,12-octadecadienoat	$C_{19}H_{34}O_2^{Cl}$	2117	45,20	45,20
M64	Methyl 9-octadecenoat	$C_{19}H_{36}O_2^{Cl}$	2138	45,32	45,25
M64	Methyl 9-octadecenoat Isomer	$C_{19}H_{36}O_2^{Cl}$	2143	45,42	45,35
M63	Methyl octadecanoat	$C_{19}H_{38}O_2^{Cl}$	2157	45,68	45,62
M68	Ethyl 9-octadecenoat	$C_{20}H_{38}O_2^{Cl}$	2202	46,52	46,44
M66	Isopropyl 9-octadecenoat	$C_{21}H_{38}O_2^{Cl}$	2212	47,01	46,93
M78	Methyl 5,8,11,14-eicosatetraenoat	$C_{21}H_{34}O_2^{Cl}$	2306	48,43	48,35
M77	Methyl- 8,11,14-eicosatrienoat	$C_{21}H_{36}O_2^{Cl}$	2322	48,68	48,61
M98	Methyl eicosadienoat	$C_{21}H_{38}O_2$	2337	48,94	48,85
M99	Tetradecansäure-2,3-dihydroxypropylester	$C_{17}H_{34}O_4$	2412	50,41	50,41
M100	Methyl docosatetraenoat	$C_{23}H_{38}O_2^{Cl}$	2513	51,79	51,71
M101	Hexadecansäure-2,3-dihydroxypropylester	$C_{19}H_{38}O_4$	2642	53,86	53,78
M102	Squalen	$C_{30}H_{50}$	2835	57,71	57,60

**Tabelle 15:** Strukturvorschläge zu den Inhaltsstoffen von Kolostrum und SAG. Trennung an unpolare Phase mit großer Filmdicke VF-624ms. Der hochgestellte Index <sup>Cl</sup> bei den Summenformeln in den Tabellen bedeutet, dass das Pseudomolekül der Verbindung mit Cl abgesichert wurde. Die Kennzeichnung eines Signals mit „K“ steht für eine Kontaminante, die bei der Probenvorbereitung oder der Aufbewahrung in die Probe gelangte, wie zum Beispiel Weichmacher und Stabilisatoren von Kunststoffen. Zusätzlich liegen in dem Lösungsmittel Methanol noch leichtflüchtige Acetale und Ester vor, die durch eine Blindwertmessung des Lösungsmittels zugeordnet wurden.



**Abbildung 127:** Gegenüberstellung der Gaschromatogramme von Kolostrum (oberes Chromatogramm) und SAG (unteres Chromatogramm) [Säule VF-5ms, 30 m und 10 m Retention Gap Vorsäule, 0.25 mm ID, 0.25 µm ID, 1 min isotherm, mit 5 °C/min auf 320 °C, 5 min isotherm]

Nr.	Name	Formel	RI	RT K	RT SAG
M6	1-Hydroxyaceton	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	-	4,27	4,55
K	K, Propylacetat	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	779 <sup>RT</sup>	4,95	5,19
M12	2-Methyl-2-butenal	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O	800	5,48	5,68
M5	Methyl 2-oxopropanoat	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	816	5,86	6,05
M32	2-Buten-4-olid	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	825 <sup>RT</sup>	6,09	6,26
M14	3-Furfurylalkohol	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	840	6,48	6,60
M11	2-Furfural	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	850 <sup>RT</sup>	6,72	6,84
M28	2-Furfurylalkohol	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	870 <sup>RT</sup>	7,22	7,35
?	unbekannt	-	898	7,91	8,01
M50	Glycerindehyd	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	919 <sup>RT</sup>	8,53	8,61
M34	2-Hydroxy-2-cyclopenten-1-on	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	935	9,01	9,09
M87	3-Methyl-2,5-furandion	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	952 <sup>RT</sup>	9,50	9,57
M18	5-Methyl-2-furfural	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	970 <sup>RT</sup>	10,02	10,09
M23	Isomaltol / 1-(3-Hydroxy-2-furanyl)-ethanon	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	986 <sup>RT</sup>	10,49	10,54
M86	2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-on	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	987 <sup>RT</sup>	10,53	10,58
M38	2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-on / Cycloten	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	1003 <sup>RT</sup>	10,98	10,96
M45	2H-Pyran-2,6(5H)-dion / Glutaconsäureanhydrid	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	1002	10,95	11,01
M89	Pyrrol-2,5-dion	C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	1010	11,20	11,14
M60	Glycerin	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	1029	11,77	11,77
M52	4-Hydroxy-5-methyl-3-(2H)-furanon / Norfuraneol	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1048 <sup>RT</sup>	12,35	12,40
M39	1-Amino-2,6-dimethylpiperidin	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	1052	12,46	12,49
M48	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon / Furaneol	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	1063 <sup>RT</sup>	12,80	12,84
M67	5-Hydroxymethyldihydrofuran-2-on	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	1067	12,93	12,94
M103	2-Carboxyfuran	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	1079 <sup>RT</sup>	13,28	13,30
M46	MS ähnlich Maltol, Isomer?	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ?	1082	13,38	13,41
M19	Methyl furoat	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1088 <sup>RT</sup>	13,56	13,60
M53	3-Hydroxydihydro-2(3H)-furanon	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1103	14,01	14,03
M104	Nonanal	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	1108 <sup>RT</sup>	14,16	14,16
M43	Maltol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1117 <sup>RT</sup>	14,41	14,42
M61	2-Acetyl-2-hydroxy-4-butanolid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	1143	15,18	15,19
M54	Dimethyl 2-Hydroxy-2-methylbutan-1,4-dioat	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	1147 <sup>RT</sup>	15,30	15,34
M57	3,5-Dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-(4H)-pyran-4-on	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	1150 <sup>RT</sup>	15,39	15,42
M75	4-Hydroxydihydro-2(3H)-furanon	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1175	16,13	16,20
M105	5-Oxotetrahydrofuran-2-carbonsäure	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	1229 <sup>RT</sup>	17,71	17,74
M71	5-(Hydroxymethyl)-2-furfural	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1236 <sup>RT</sup>	17,85	17,92
M31	1,3-Glycerindiacetat	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	1257	18,46	18,51
M106	2-Hydroxy-2-methylbutandisäure	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	1364	21,34	21,41
M36	Methyl dodecanoat	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	1525 <sup>RT</sup>	25,08	25,39
M69	Dodecansäure	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	1565 <sup>RT</sup>	26,35	26,40
M47	Methyl tetradecanoat	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	1725 <sup>RT</sup>	29,95	29,96
M76	Tetradecansäure	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	1763 <sup>RT</sup>	30,76	30,78
M56	Methyl 9-hexadecenoat isomer	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1899 <sup>RT</sup>	33,58	33,59
M56	Methyl 9-hexadecenoat	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1904 <sup>RT</sup>	33,68	33,69
M55	Methyl hexadecanoat	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	1921 <sup>RT</sup>	34,11	34,11
M80	9-Hexadecensäure	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	1941 <sup>RT</sup>	34,44	34,45
M79	Hexadecensäure	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1965	34,85	34,86
M59	Ethyl 9-hexadecenoat	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	1972	35,00	35,01
M95	Isopropyl 9-hexadecenoat	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	2001 <sup>RT</sup>	35,56	35,57
M79	Methyl 9,12-octadecadienoat	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	2094 <sup>RT</sup>	37,29	37,30
M64	Methyl 9-octadecenoat	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	2101	37,41	37,42
M64	Methyl 9-octadecenoat Isomer	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	2107 <sup>RT</sup>	37,52	37,52
M63	Methyl octadecanoat	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	2128 <sup>RT</sup>	37,89	37,90
M107	9,12-Octadecadiensäure	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	2137	38,05	38,06
M81	9-Octadecensäure	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	2145 <sup>RT</sup>	38,21	38,22
M82	9-Octadecensäure Isomer	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	2161	38,49	38,49

Nr.	Name	Formel	RI	RT K	RT SAG
M73	Ethyl 9,12-octadecadienoat	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	2162	38,51	38,52
M108	Octadecansäure	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	2165 <sup>RT</sup>	38,56	38,57
M68	Ethyl 9-octadecenoat	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	2167 <sup>RT</sup>	38,60	38,61
M72	Isopropyl 9,12-octadecadienoat	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	2188	38,98	38,98
M66	Isopropyl 9-octadecenoat	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	2195	39,09	39,10
M78	Methyl 5,8,11,14-eicosatetraenoat	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	2258	40,18	40,18
M77	Methyl 8,11,14-eicosatrienoat	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	2277	n.n.	40,50
M98	Methyl eicosadienoat	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	2296	n.n.	40,84
M109	Methyl eicosenoat	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	2301	40,93	40,92
M99	Tetradecansäure-2,3-dihydroxypropylester	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	2307	41,01	41,02
M101	Hexadecansäure-2,3-dihydroxypropylester	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	2514	44,36	44,37
M110	9-Octadecensäure-2,3-dihydroxypropylester	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	2713 <sup>RT</sup>	47,10	47,11
M111	Octadecansäure-2,3-dihydroxypropylester	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	2723	47,48	47,48
M102	Squalen	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	2811 <sup>RT</sup>	48,74	48,75
M112	Cholesterol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	3120	52,97	52,96
M113	α-Tocopherol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	3126	53,05	53,05
M114	Desmosterol	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O	3158	53,50	53,50

**Tabelle 16:** Strukturvorschläge zu den Inhaltsstoffen von Kolostrum und SAG. Trennung an unpolarer Phase VF-5ms. Der hochgestellte Index <sup>RT</sup> bedeutet, dass diese Verbindung auf ähnlichen chromatographischen Phasen einen vergleichbaren linearen Retentionsindex besitzt<sup>359</sup>. Die Kennzeichnung eines Signals mit „K“ steht für eine Kontaminate, die bei der Probenvorbereitung oder der Aufbewahrung in die Probe gelangte, wie zum Beispiel Weichmacher und Stabilisatoren von Kunststoffen. Zusätzlich liegen in dem Lösungsmittel Methanol noch leichtflüchtige Acetale und Ester vor, die durch eine Blindwertmessung des Lösungsmittels zugeordnet wurden.

## Diskussion der Methoden und Ergebnisse

Die hohe Zahl an flüchtigen polaren Inhaltstoffen in Kolostrum und SAG ließ sich chromatographisch am besten an der polaren Waxphase mit guter Peakform auftrennen. Unter diesen Bedingungen konnten die meisten Verbindungen bis in den Spurenbereich detektiert werden. Bei Trennung an der unpolare VF-5-Phase zeigten polarer Verbindungen hingegen oft eine schlechte Peakform durch starkes Peaktailing oder Fronting. Dafür konnten wiederum an dieser unpolaren Standardphase VF-5 die Fraktionen der hochsiedenden Fettsäureester, freie Fettsäuren und Monoacylglyceride am besten bestimmt werden. Die unpolare Phase VF-624 mit dickem Film zeigte eine deutlich verbesserte Selektivität für die leichtflüchtigen Inhaltsstoffe als die VF-5 Phase, wodurch mehr Verbindungen als an der VF-5 Phase aufgetrennt und detektiert werden konnten. Die Chromatographie und Peakform kann allerdings nicht mit der Waxphase mithalten. Für eine möglichst umfassende Analytik dieser Probenart hinsichtlich leichtflüchtiger und polarer Verbindungen bis zu unpolaren Hochsiedern ist somit eine Waxphase in Verbindung mit einer unpolaren Standardphase VF-5 eine geeignete Kombination.

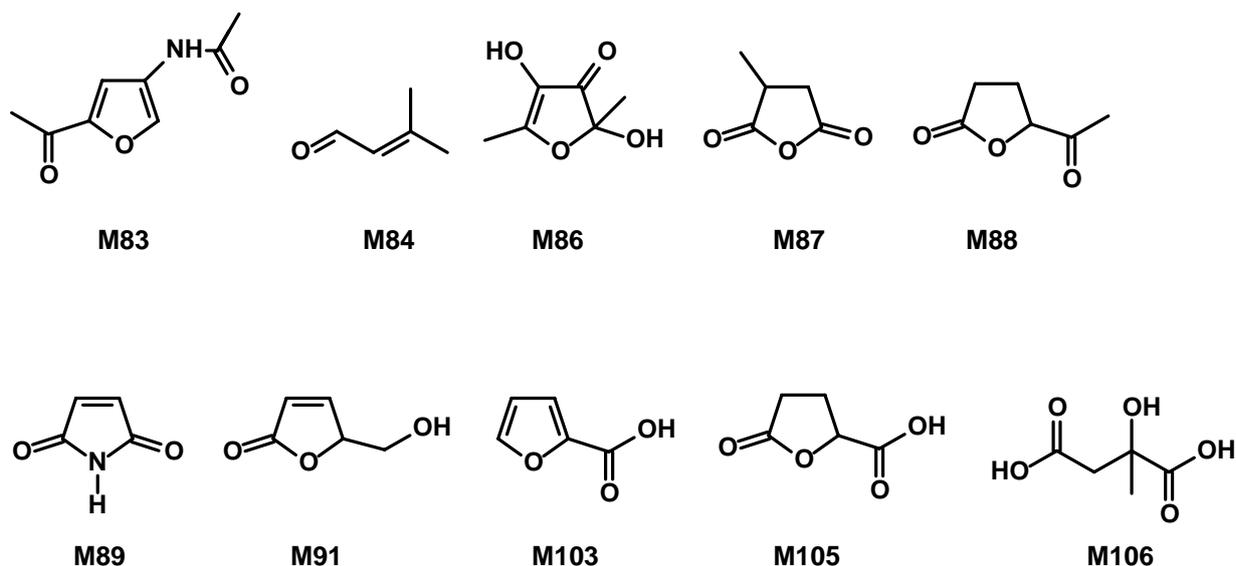
Die Molekulargewichte der überwiegenden Anzahl der Strukturvorschläge konnte mit Hilfe von Chemischer Ionisierung (CI) abgesichert werden. Durch den zusätzlichen Vergleich der bestimmten Retentionsindices mit Referenzdaten, die zu Waxphasen und Phasen mit 5 % Diphenyl- und 95 % Dimethylpolysiloxan vorliegen, konnten die aufgestellten Strukturvorschläge zusätzlich bestätigt werden<sup>359</sup>.

Das Auftreten von Methylestern in den Analysen kann durch das Verdünnen der Proben mit Methanol als Lösungsmittel erklärt werden, da möglicherweise freie Fettsäuren in die korrespondierenden Methylester umgewandelt wurden, Die Ethyl- und Isopropylester der Fettsäuren hingegen können nicht aus der Probenvorbereitung stammen.



Bei der Zusammensetzung der flüchtigen Inhaltsstoffe hinsichtlich ihrer Probenherkunft kann aus den bislang erzielten Ergebnissen kein Unterschied der Verbindungen zwischen Kolostrum und SAG festgestellt werden. Die Proben weisen vielmehr eine qualitativ identische Zusammensetzung auf. Bei einer Abschätzung zur Quantität der flüchtigen Verbindungen ist zu berücksichtigen, dass die Proben des Kolostrums mit der doppelten Lösungsmittelmenge verdünnt waren. Bei vergleichbarer Signalintensität der Totalionenstromchromatogramme ergibt sich daraus, dass die Kolostrumproben einen höheren Anteil an flüchtigen Verbindungen aufweisen. Speziell die leichtflüchtigen und polaren Verbindungen der Kolostrum-Proben zeigen trotz der höheren Verdünnung intensivere Signale als bei den SAG-Proben. Hingegen sind die Signale von Fettsäuren und Fettsäureestern in den Proben der SAG intensiver. Aus diesen Ergebnissen kann als vorläufige Schlussfolgerung gezogen werden, dass die unterschiedlichen Drüsen anhand der Zusammensetzung ihrer flüchtigen Verbindungen eine ähnliche Funktion aufweisen und die AG sowohl als Milch- als auch als Talgdrüse fungieren könnten.

Unter den auf der Waxphase identifizierten flüchtigen Verbindungen finden sich eine Anzahl an polaren Furan und Pyron-Derivaten, die in Abbildung 128 dargestellt sind. Durch veränderte chromatographische Bedingungen konnten auf den Kapillarsäulen VF-624ms und VF-5ms noch einige weitere Verbindungen detektiert werden.



**Abbildung 129:** Strukturvorschläge für weitere charakteristische Heterozyklen und für eine Auswahl der oxygenierten aliphatischen Verbindungen, die mittels chromatographischer Auftrennung an den Säulen VF-5ms und VF-624ms in den Proben von Kolostrum und SAG detektiert werden konnten.

In früheren Untersuchungen konnten nach Fraktionierung einer Kolostrumprobe bereits eine Anzahl dieser Heterocyclen und flüchtigen Verbindungen identifiziert werden. So sind Furfurylmethylether (**M4**), Methyl-2-hydroxypropanoat (**M7**), 2-Furfural (**M7**), 2-Acetylfuran (**M15**), 5-Methyl-2-furfural (**M18**), Methylfuroat (**M19**), Isomaltol (**M23**), 2-Furfurylalkohol (**M28**), 5-Methyl-2-furfurylalkohol (**M30**), 2-Buten-4-olide (**M32**), Acetamid (**M33**), Maltol (**M43**), Furaneol (**M48**), 3,5-Dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-on (**M57**), 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural (**M71**), 2,5-Dihydroxymethylfuran (**M74**) und 2-Carboxyfuran (**M103**) bereits als flüchtige Inhaltsstoffe des Kolostrums beschrieben und mit authentischem Referenzmaterial größtenteils verifiziert<sup>358</sup>. Die identifizierten Fettsäuremethylester **M21**, **M36**, **M47**, **M55**, **M56**, **M63**, **M64**, **M70**, **M78**, **M94**, **M97** und die Monoacylglyceride **M99**, **M101**, **M110** und **M112** wurden in der gleichen Arbeit bereits identifiziert. Die Massenspektren der Monoacylglyceride und der Heterocyclen **M48**, **M57**, **M71** und **M74** sind darin ebenfalls interpretiert. Die vorliegenden Ergebnisse früherer Arbeiten konnten folglich mit dieser Untersuchung bestätigt werden und zusätzlich wurden für eine Vielzahl weiterer Verbindungen Strukturvorschläge gemacht.

Somit liegt eine umfassende Untersuchung der flüchtigen Verbindungen der Drüsensekrete Kolostrum aus der Milchdrüse und dem Sekret der AG vor. Diese Untersuchung kann als Grundlage für Test zu einer möglichen biologischen Aktivität dienen. Die Spurenkomponente 2-Methyl-2-butenal (**M12 = 121**) könnte hierbei von besonderem Interesse sein, da diese eine biologische Aktivität in Zusammenhang mit der Mutter-Kind-Beziehung bei Kaninchen aufweist.

## Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Strukturaufklärung und Synthese von Signalstoffen, die Wirbeltiere zur intra- und interspezifischen Kommunikation nutzen. Die Arbeit ist in vier Kapitel unterteilt, die jeweils mögliche Signalsubstanzen einer anderen Wirbeltierart behandeln. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Untersuchung flüchtiger Substanzen im Urin weiblicher Asiatischer Elefanten (*Elephas maximus*), die als östrusanzeigende Indikatoren eine Rolle bei der Partnerfindung spielen könnten. Es wurde eine Methode zur Anreicherung und Isolierung eines bis dahin unbekanntes Substanzclusters im Urin der Elefanten entwickelt, der in Korrelation zum Östruszyklus auftritt. Kenntnis der chemischen Struktur dieser Substanzen könnte für das Verständnis des Paarungsverhaltens hilfreich sein und die Bestimmung des Zeitpunktes der Ovulation ermöglichen, wodurch Nachzuchten in Gefangenschaft erleichtert würden. Die Untersuchungen wurden mit HS-SPME und mit gekoppelter Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS) durchgeführt. Insgesamt wurden in der komplexen Mischung über 180 Verbindungen, zumeist Terpene und Terpenoide, identifiziert. Die unbekanntes Substanzen eluierten zwischen den Steroiden  $5\alpha$ -Androst-2-en-17-on (**38**),  $5\alpha$ -Androst-3-en-17-on (**E159**),  $5\alpha$ -Androst-2-en-17 $\beta$ -ol (**39**),  $5\alpha$ -Androst-3-en-17 $\beta$ -ol (**E161**),  $5\alpha$ -Pregn-2-en-20-on (**E173**) und  $5\alpha$ -Pregn-3-en-20-on (**E174**). Zunächst wurden daher Steroidstrukturen für die unbekanntes Substanzen angenommen. Mittels präparativer Gaschromatographie und HPLC konnten die unbekanntes Hauptbestandteile in Mengen von weniger als 1 mg isoliert werden. Die Strukturen erwiesen sich als oxygenierten Diterpene. Die Strukturen von 2-Hydroxyisopimarsäurelacton (**E176**), 2-Hydroxy-7,8-dihydro-abietinsäurelacton (**E177**), 2-Hydroxydehydroabietinsäurelacton (**E181**) und 2-Hydroxy-abietinsäurelacton (**E182**) konnten mittels NMR-Spektroskopie bewiesen werden. Zusätzlich wurde der Verbindung **E175** die Struktur von 2-Hydroxypimarsäurelacton anhand der partiellen NMR Daten und Interpretation des Massenspektrums zugewiesen. Die Strukturen von 2-Hydroxyneoabietinsäurelacton (**E184**), 2-Hydroxypalustrinsäurelacton (**E178**) und 2-Hydroxylevopimarsäurelacton (**E179**) wurden anhand Interpretation ihrer Massenspektren postuliert. Diese Substanzen werden das erste Mal im Urin des Asiatischen Elefanten beschrieben und stellen neue bislang unbekanntes Naturstoffe dar. Nur **E177** und **E181** wurden als Produkte einer Synthese bereits in der Literatur beschrieben.

Der zweite Teil behandelt die Analyse des Interdigitaldrüsensekrets des Buntbocks (*Damaliscus pygargus pygargus*) und die stereoselektive Synthese von (6Z)-Dodec-6-en-4-olid (**18**), dem Hauptbestandteil von ungefähr 100 in dieser Arbeit identifizierten flüchtigen Verbindungen im Interdigitaldrüsensekret des Buntbocks. Die stereoselektive Synthese der Verbindung wurde dahingehend optimiert, dass nicht nur genügend Referenzmaterial zur Bestimmung der absoluten Konfiguration erhalten wurde, sondern auch um ausreichend Material für biologische Feldtests in den Halbwüsten Südafrikas zu gewinnen. Die absolute Konfiguration wurde mit Hilfe enantioselektiver Gaschromatographie bestimmt. Das natürliche Sekret enthält einzig das (*S*)-Enantiomer von **18**. Das dritte Kapitel beschreibt die Identifizierung flüchtiger Verbindungen, die von planktonfressenden Fischen abgegeben werden. Ein unbekanntes Kairomon, Fischfaktor genannt, induziert bei Populationen von *Daphnia* im Süßwasser eine tagesperiodische Vertikalwanderung. Die Untersuchungen erfolgten mit Hilfe von GC/MS nach Anreicherung der organischen Verbindungen des Hälterungswassers von Barschen mittels Festphasenextraktion. Der Extrakt enthält als Hauptkomponenten Diketopiperazine und die strukturverwandten  $\alpha$ -Hydroxyalkyllactone 5-Hydroxy-4-decanolid (**B88**), 6-Hydroxy-tetradecan-5-olid (**F59**) und 6-Hydroxy-tetradec-2-en-5-olid (**F56**). **F56** wurde enantioselektiv durch asymmetrische Dihydroxylierung (AD) nach Sharpless dargestellt. **B88** und **F59** wurden bereits in einer früheren Arbeit stereoselektiv synthetisiert. Die absolute Konfiguration der Naturstoffe **F56**, **B88** und **F59** wurde durch enantioselektive Gaschromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie unter Verwendung der synthetisierten Referenzverbindungen aufgeklärt. Die Naturprobe enthielt folgende Enantiomerenzusammensetzung: 68 % (*S,S*) / 32 % (*R,R*)- **B88**, 88 % (*S,S*) / 12 % (*R,R*)- **F59** and 90 % (*S,S*) / 10 % (*R,R*)- **F56**. Das Lacton **F56** ist ein neuer Naturstoff. Der vierte Teil beschreibt die Untersuchung der flüchtigen Verbindungen im menschlichen Kolostrum und im Drüsensekret der *Areola*, welche möglicherweise eine Rolle bei der Mutter-Kind-Beziehung spielen. Mit Hilfe von GC/MS und unterschiedlichen stationären Phasen wurden diese Extrakte untersucht und miteinander verglichen. Beide Sekrete enthielten eine komplexe Mischung von über 100 Verbindungen ohne erkennbare qualitative Unterschiede. Resultate früherer Untersuchungen menschlichen Kolostrums wurden bestätigt und mehr als 70 zusätzliche Verbindungen durch Vergleich ihrer Massenspektren, Retentionsindices und Absicherung des Molekulargewichts durch chemische Ionisierung identifiziert. Dieser Datensatz soll als Grundlage für weitere Untersuchungen zur biologischen Aktivität einzelner Verbindungen in der Beziehung von Neugeborenen zu ihren Müttern dienen.

## Summary

This thesis deals with structure elucidation and synthesis of possible semiochemicals that various vertebrate species may use for intra- and interspecific communication. The study is structured into four parts. The first part covers analytical investigations on volatile substances in the urine of female Asian elephants (*Elephas maximus*), which may signalize the state of the oestrous cycle and play a role in mate choice. Subject of the second part is the analysis of the interdigital secretion of the bontebok (*Damaliscus pygargus pygargus*) and the stereoselective synthesis of an unsaturated lactone as a main component of the secretion. Content of the third part is the identification of volatiles released by freshwater fish and the stereoselective synthesis of  $\alpha$ -Hydroxyalkyllactones, with a potential kairomonal function in the predator-prey relationship between planktivorous fish and zooplankton (*Daphnia*). Finally, the thesis describes the identification of volatile compounds in human colostrum and in secretions of *areola* glands that have a possible biological activity in human mother-offspring interactions.

In the first part of the present investigations a method for the enrichment and isolation of an unknown substance cluster in the urine of female Asian Elephants was developed. The occurrence of this substance cluster is linked to the oestrous cycle, and the structure elucidation could be helpful to understand the mate choice in Asian elephants and to detect the time of ovulation for captive breeding activities. The investigation of the compounds in urine was carried out using HS-SPME for sample preparation followed by coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). A total number of more than 180 compounds have been identified in this complex mixture, mostly terpenes and terpenoids. The unknown substance cluster eluted at retention times between the steroids  $5\alpha$ -androst-2-en-17-one (**38**),  $5\alpha$ -androst-3-en-17-one (**E159**),  $5\alpha$ -androst-2-en-17 $\beta$ -ol (**39**),  $5\alpha$ -androst-3-en-17 $\beta$ -ol (**E161**),  $5\alpha$ -pregn-2-en-20-one (**E173**) and  $5\alpha$ -pregn-3-en-20-one (**E174**) which initially led to the hypothesis that the unknowns were steroids. Approximately less than 1 mg of the main components of the substance cluster were isolated by preparative gas chromatography and HPLC and proved to be oxygenated diterpenes. 2-hydroxyisopimaric acid lactone (**E176**), 2-hydroxy-7,8-dihydroabietic acid lactone (**E177**), 2-hydroxydehydroabietic acid lactone (**E181**) and 2-hydroxyabietic acid lactone (**E182**) were verified by NMR spectroscopy. In addition, 2-hydroxypimaric acid lactone (**E175**) was proposed on the basis of partial NMR data and mass spectral data.

The structures of 2-hydroxyneoabietic acid lactone (**E184**), 2-hydroxypalustric acid lactone (**E178**) and 2-hydroxylevopimaric acid lactone (**E179**) were deduced from mass spectral data. It is the first time that these structures are reported in the urine of Asian elephants, and they represent new natural products.

The second part of this thesis deals with the stereoselective synthesis of the lactone (6*Z*)-dodec-6-en-4-olide (**18**), which is a major constituent among the approximately 100 identified volatiles of the Bontebok's interdigital secretion. The stereoselective synthesis was optimized to not only obtain reference material for the determination of the absolute configuration but also to gain enough material for field testings in the semi-deserts of South Africa. The natural product was shown to exclusively keep (*S*)-configuration.

The third chapter describes the identification of volatiles released by planktivorous fish. Unknown chemical cues called "Fischfaktor" induce a diel vertical migration (DVM) on *Daphnia* populations in freshwater. The investigation of possible kairomones was carried out by GC/MS after sample preparation with solid phase extraction (SPE) of water from perch cultivations. The extract consists mainly of diketopiperazines and the new  $\alpha$ -hydroxy-alkyllactones 5-hydroxy-4-decanolide (**B88**), 6-hydroxytetradecan-5-olide (**F59**) and 6-hydroxytetradec-2-en-5-olide (**F56**). **F56** was synthesized enantioselectively by Sharpless asymmetric dihydroxylation (AD). **B88** and **F59** were already synthesized enantioselectively in an earlier study. The absolute configuration of the natural compounds **F56**, **B88** and **F59** were elucidated using enantioselective gas chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry and the synthetic reference material. The natural products were found to consist of the following enantiomeric ratios: 68 % (*S,S*) / 32 % (*R,R*)- **B88**, 88 % (*S,S*) / 12 % (*R,R*)- **F59** and 90 % (*S,S*) / 10 % (*R,R*)- **F56**. **F56** is a new natural product.

Finally, volatiles of human colostrum and the secretions of *areola* glands (SAG) were compared upon analysis by GC/MS on different stationary phases. Both secretions contained a complex mixture of more than 100 compounds with no obvious qualitative differences. Results from earlier studies of human colostrum could be confirmed and more than 70 additional volatiles were identified by comparison of mass spectral data and retention indices. This data set serve as a base for further investigations of biologically active compounds in this secretions and biological tests with neonates.

# Experimenteller Teil

## Allgemeiner Teil

### Allgemeine chromatographische Methoden:

#### Dünnschichtchromatographie

Für dünn-schichtchromatographische Untersuchungen wurden Kieselgelfolien Typ 60 F254 (Merck) mit Fluoreszenz-Indikator verwendet. Detektion erfolgte unter UV-Licht. Die nicht durch UV-Licht detektierbaren Substanzen wurden mit Iod oder verschiedenen Sprüh- oder Tauchreagenzien (Molybdäthosphorsäure (1 % in Ethanol) und Anisaldehyd (2 % Anisaldehyd, 2 % Schwefelsäure, 2 % Essigsäure in Ethanol)) nach Erhitzen mittels Heißluftföhn sichtbar gemacht.

#### Niederdruck-Säulenchromatographie

Flüssigchromatographische Trennungen wurden an Kieselgel (Partikelgröße: 32-63  $\mu\text{m}$ , Porengröße: 60  $\text{\AA}$ ) der Firmen MP Eco Chrom und ICN durchgeführt. Die verwendeten Eluenten sind den Versuchsvorschriften zu entnehmen. Es wurde bei einem Überdruck von 0.2 bis 0.5 bar gearbeitet.

#### HPLC

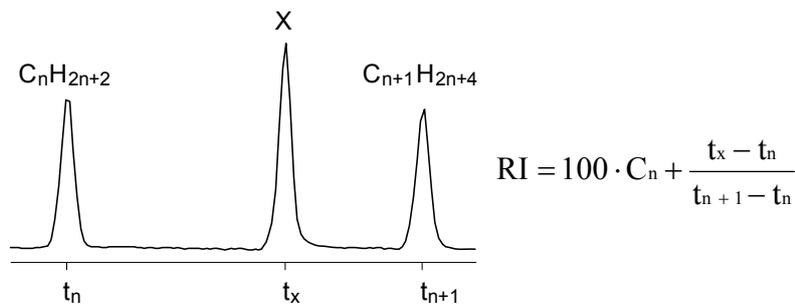
Analytische HPLC Untersuchungen wurden mit einer Merck Hitachi L-6200 Intelligent Pump und einem L-4500 Diode Array Detector (DAD, max. Messbereich 190-800 nm) durchgeführt. Für präparative Trennungen stand eine L-7150 Intelligent Pump sowie ein L-4000 UV-Detektor zur Verfügung. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 185 nm. Folgende Säulen und Laufmittel wurden eingesetzt:

- *LiChrospher*<sup>®</sup> 100 RP18 endcapped (5  $\mu\text{m}$  Korngröße), Länge 250 mm, 4 mm ID, Merck, mobile Phase Methanol / Wasser Gemische, Flussraten 1-1.5 mL/min
- *Kromasil*<sup>®</sup> RP18 (5  $\mu\text{m}$  Korngröße, 100 $\text{\AA}$ ), Länge 250, 21.2 mm ID, Eka Chemicals, mobile Phase Methanol / Wasser Gemische, Flussraten 6-12 mL/min

## Gaschromatographie (GC)

### Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion (GC-FID)

GC-FID Messungen wurden mit Hilfe eines HP6890 Gas-Chromatographen mit Split/Splitless-Injektor der Firma Agilent durchgeführt. Zur Bestimmung der linearen Retentionsindices (RI) wurde der Extrakt mit einem internen Standard aus n-Alkanen koinjiziert und die Indices anschließend nach der unten abgebildeten Formel berechnet ( $C_n$  Anzahl der Kohlenstoffatome des Alkans mit der Retentionszeit  $t_n$ , das vor der unbekanntem Substanz eluiert,  $t_{n+1}$  Retentionszeit des folgenden Alkans  $C_{n+1}H_{2n+4}$  und  $t_x$  Retentionszeit der unbekanntem Substanz).



Folgende Kapillarsäulen wurden verwendet:

- 30 m DB5 MS, ID 0.25 mm, FD 0.25  $\mu$ m der Firma J&W Scientific
- 60 m Optima-5 MS, ID 0.32 mm, FD 0.25  $\mu$ m der Firma Macherey & Nagel
- 60 m DB1 MS, ID 0.25 mm, FD 0.25  $\mu$ m der Firma J&W Scientific
- 60 m CPSil 8 LowBleed/MS, ID 0.25 mm, FD 0.25  $\mu$ m der Firma Varian
- 30 m VF-5ms, ID 0.25 mm, FD 0.25  $\mu$ m der Firma Varian
- 30 m VF-5ms mit 10 m unbelegter Vorsäule (EZ-Guard™ Retention Gap)  
ID 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m FD der Firma Varian
- 30 m VF-624ms, ID 0.25 mm, 1.40  $\mu$ m FD der Firma Varian
- 30 m VF-WAXms, ID 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m FD der Firma Varian

## Präparative Gaschromatographie

Zur präparativen gaschromatographischen Trennung diente ein Gaschromatograph HP 5890 Series II GC der Firma Hewlett & Packard (Agilent) mit Split/Splitless-Injektor und Flammenionisationsdetektor (FID). Probenaufgabe erfolgte mit einem Autoinjektor HP 7673 (Hewlett-Packard).

Folgende Megabore-Dickfilmsäule wurde zur Trennung der Diterpenlactone verwendet:

- Optima-1701 fused Silica, 30 m-Säule, (0.53 mm ID, 2 µm FD) der Firma Macherey&Nagel

Die Fraktionierungen der flüchtigen Komponenten erfolgte mit Hilfe eines Fraktionssammlers (Preparative Fraction Collector, PFC) der Firma Gerstel mit 6 Fallengefäßen (Volumen: 1 µL) und einer Nullfalle. Die Kühlung der Fallen wurde mit einem Umwälzkühler Thermo Haake K20 und einem Ethylenglycol/Wasser-Gemisch bei - 2 bis - 5 °C durchgeführt. Die isolierten Reinsubstanzen wurden für NMR-Messungen direkt mit NMR-Lösungsmitteln aus den Fallengefäßen gespült.

## Gaschromatographie an optisch aktiven Phasen

Gaschromatographische Trennungen wurde mit einem Carlo Erba GC6000 VegaSeries 2 Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor (FID) durchgeführt. Als Trägergas wurde Wasserstoff bei einem konstanten Vordruck von 55kPa verwendet. Folgende optisch aktive Trennflüssigkeiten kamen zum Einsatz:

- Hydrodex-β-6-TBDM<sup>®</sup> (Machery & Nagel), H-CD, 25 m, 0,25 mm ID mit folgender Phase: [Heptakis-(2,3-di-O-methyl-6-O-t-butyldimethylsilyl)]-β-cyclodextrin
- FS Lipodex G<sup>®</sup> (Machery & Nagel), L-CD, 25 m, 0,25 mm ID mit folgender Phase: [Octakis-(2,3-di-O-pentyl-6-O-methyl)]-γ-cyclodextrin

Im Falle des (6Z)-Dodec-6-en-4-olids ergab sich die beste Trennung der Enantiomere bei 150 °C isotherm unter Verwendung der Hydrodex-β-6-TBDM<sup>®</sup>-Phase (Das S-Enantiomer eluierte nach 42 und das R-Enantiomer nach 45 min;  $\alpha = 45:42 = 1.072$ ).

## Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)

Massenspektren flüchtiger Verbindungen wurden mittels GC/MS-Kopplungen bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV aufgenommen. Als Trägergas diente Helium. Folgende Gerätekombinationen kamen hierbei zum Einsatz:

- Quadrupol-Massenspektrometer MD800 in Kopplung mit einem GC8060 mit Split-Splitless-Injektor (beides Firma FISIONS)
  - Quadrupol-Massenspektrometer QMD 1000 in Kopplung mit einem Carlo Erba HRGC Gaschromatograph mit Split-Splitless-Injektor (beides Firma Carlo Erba)
  - VG 70-250 SE Sektorfeld-Massenspektrometer der Firma VG Analytical in Kopplung mit einem HP6890 Gaschromatograph der Firma Hewlett Packard (Agilent)
- Hochaufgelöste Massenspektren wurden mit diesem Sektorfeldgerät und Perfluorkerosen (PFK500HR) als Referenzsystem aufgenommen.

Alle Analysen von Kolostrum und SAG erfolgten bei einer Injektortemperatur von 250 °C mit zwei Minuten splitloser Injektion und 1.2 mL konstantem Gasfluss. Es wurden folgende Gerätekombinationen eingesetzt:

- Varian 320-MS Triplequadrupol-Massenspektrometer im Scan Modus m/z 29-450 mit Säule VF-5ms, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm FD + 10 m EZ Guard Retention Gap.  
Ofen: 35 °C, 1 min isotherm, mit 5 °C/min auf 320 °C, 5 min isotherm, Gesamtdauer 63 min
- Varian 220-MS Ionenfallen-Massenspektrometer im EI-Scan Modus m/z 35-399 und CI-Scan Modus m/z 55-399 unter Nutzung von Methanol als CI-Reaktandgas mit VF-624ms, 30 m, 0.25 mm ID, 1.40 µm FD.  
Ofen: 40 °C, 1 min isotherm, mit 5 °C/min auf 300 °C, 5 min isotherm, Gesamtdauer 58 min
- Varian 240-MS Ionenfallen-Massenspektrometer im internen EI-Scan Modus m/z 29-399 und CI-Scan Modus m/z 50-450 unter Nutzung von Methanol als CI-Reaktandgas mit VF-WAXms, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm FD.  
Ofen: 35 °C, 1 min isotherm, mit 5 °C/min auf 240 °C, 15 min isotherm, Gesamtdauer 57 min

In den Massenspektren wird das Masse-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) mit der relativen Intensität (in Klammern dahinter) bezogen auf das stärkste Signal (Basispeak) angegeben. Alle Peaks, die eine geringere Intensität als 2 % (bezogen auf den Basispeak) besitzen, wurden nur in Ausnahmefällen berücksichtigt.

Strukturvorschläge wurden durch Interpretation der Massenspektren und Vergleich mit Bibliotheksspektren unter Nutzung der Programme Mass-Lib<sup>360</sup>) beziehungsweise NIST MS Search Program v2.0<sup>361</sup> für die Analytik des Kolostrums und der SAG erstellt.

### **APCI-Massenspektrometrie; LC/MS**

Zur Aufnahme der APCI-Massenspektren von Lösungen diente die Sektorfeldgerät-Ionenfallenkopplung MAT 95 XL der Firma ThermoQuest. Die Ionisation erfolgte durch chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) im Negativ- oder Positiv-Modus. Die Zuführung des Analyten in Lösung erfolgte durch eine Spritzenpumpe mit Flussraten zwischen 10 und 25 mL/min. Als Lösungsmittel dienten Methanol/Wasser-Gemische. Die Hochauflösung der Molekülonen erfolgte bei einer Auflösung von  $\geq 5000$  mittels PEG300 als Referenzstandard.

## Spektroskopie:

### NMR-Spektroskopie

Mit Hilfe der Geräte AMX-400 (400 MHz für  $^1\text{H}$ ; 101 MHz für  $^{13}\text{C}$ ), DRX500 (500 MHz für  $^1\text{H}$ ; 126 MHz für  $^{13}\text{C}$ ) und Avance 700 (mit Cryo-Probenkopf) (700 MHz für  $^1\text{H}$ , und 176 MHz für  $^{13}\text{C}$ ) wurden die NMR-Spektren aufgenommen.

Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (300 K). Die chemische Verschiebung  $\delta$  wird im ppm angegeben. Als interner Standard wurde Tetramethylsilan verwendet (TMS,  $\delta = 0$  ppm). In Ausnahmefällen wurde kein TMS verwendet und das Spektrum auf die chemische Verschiebung des betreffenden Lösungsmittel kalibriert ( $\text{CHCl}_3$  in  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta = 7.26$  ppm,  $\text{CDHCl}_2$  in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ :  $\delta = 5.32$  ppm,  $\text{C}_6\text{D}_5\text{H}$  in  $\text{C}_6\text{D}_6$ :  $\delta = 7.16$  ppm,  $\text{C}_2\text{D}_5\text{HCO}$  in  $\text{C}_2\text{D}_6\text{O}$   $\delta = 2.05$  ppm und  $\text{CD}_3\text{OH}$  in  $\text{CD}_3\text{OD}$ :  $\delta = 3.31$  ppm).

Die  $^{13}\text{C}$ -Signale wurden über PENDANT-Experimente zugeordnet. Die zweidimensionalen NMR-Experimente ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY, HMQC bzw. HSQC, HMBC und NOESY) wurden mit Hilfe der NMR-Spektrometer DRX500 und Avance 700 durchgeführt.

Es wurden folgende Pulsprogramme verwendet:

zg30 ( $^1\text{H}$  - NMR)

zgbg90, dept45, pendant.amx ( $^{13}\text{C}$  - NMR)

inviedetgs (HMQC)

cosy90 (HH - COSY)

hxcobicp (CH - COSY)

inv4gslplrnd (HMBC)

noesygptp (NOESY)

### Drehwertbestimmung

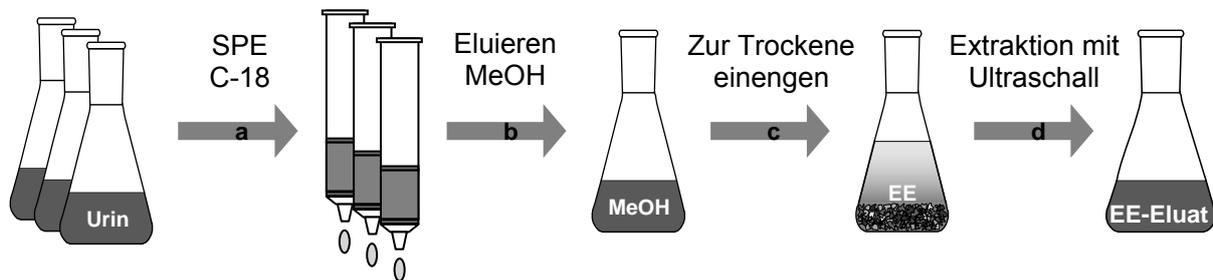
Die Drehwerte optisch aktiver Substanzen wurden mit dem Polarimeter 341 (Firma Perkin-Elmer) in 10 cm Küvetten bei einer Wellenlänge von 589 nm bestimmt.

## Probenvorbereitung und Derivatisierungen

### Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE)

Hierbei kamen 6 mL Bakerbond SPE Säulen Octyl C8 und Octadecyl C18 mit 500 mg Adsorbens zum Einsatz (Firma J. T. Baker). Als Lösungsmittel gelangten nur hochreine Lösungsmittel zum Einsatz (HPLC grade).

Nach vorheriger Konditionierung mit 5 mL Methanol und 10 mL Wasser wurden 20 mL zentrifugierter Urin über die Säule gegeben (a). Die SPE-Kartusche wurde mit 5 mL Wasser und 5 mL 20%igem Methanol gewaschen und dann die Zielfraktion mit 5 mL 100 %igem Methanol eluiert (b). Kontrolle der einzelnen Eluate durch HS-SPME ergab die Anwesenheit der Zielanalyten ausschließlich in den 100%igen Methanoleluaten. Die Fraktionen der Methanoleluate wurden im Stickstoffstrom eingengt und im Vakuum bei 15-20 mTorr getrocknet (c). Durch Extraktion des festen Rückstands mit Pentan und Ethylacetat im Ultraschallbad wurde die mit Zielanalyten angereicherte Fraktion gewonnen (d).



**Abbildung 130:** Anreicherung der Zielsubstanzen mittels SPE

## Derivatisierungsreaktionen

Alle Derivatisierungsreaktionen wurden mit sehr geringen, nicht bestimmbar Mengen durchgeführt. Dazu wurde der durch Festphasenextraktion (SPE) erhaltene Extrakt zunächst im Stickstoffgegenstrom eingeeengt, darauffolgend unter Hochvakuum getrocknet und für die Derivatisierung eingesetzt. Dieser besaß ein Trockengewicht von 5-8 mg. Anhand der Signalintensitäten der im Anschluss durchgeführten Analysen (GC-FID, GC/MS) lassen sich die Ansatzgrößen auf wenige Mikrogramm schätzen. Alle Reagenzien wurden daher in nicht-stöchiometrischen Mengen eingesetzt.

### Silylierung

Ein SPE-Extrakt wurde mit 100 µL N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA / Iodtrimethylsilan (Kat.) 1000: 2; Fluka) versetzt und nach einer Reaktionsdauer von 60 Minuten bei 55 °C vorsichtig im Wasserbad vollständig eingeeengt. Der Rückstand wurde für weitere analytische Zwecke in Dichlormethan aufgenommen.

### Trifluoracetylierung

Ein SPE-Extrakt wurde mit einer Spatelspitze Dimethylaminopyridin und 100 µL Trifluoressigsäureanhydrid (Fluka) versetzt. Nach einer Reaktionsdauer von 60 Minuten bei 60 °C wurde der Ansatz im Wasserbad vollständig eingeeengt. Der Rückstand wird für weitere analytische Zwecke in Dichlormethan aufgenommen.

### Acetylierung

Ein SPE-Extrakt wurde mit 100 µL abs. Pyridin und 100 µL Essigsäureanhydrid versetzt und eine Stunde lang auf 60 °C erhitzt. Anschließend wurden zur Neutralisation Natriumhydrogencarbonat und etwas Wasser gegeben. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und für weitere Analysen eingeeengt.

## Methylierung

Darstellung von *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff<sup>362,363</sup>:

Zur Darstellung von *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff wurden 20.1 g (0.3 mol) Methylaminhydrochlorid und 60 g (1 mol) Harnstoff in 150 mL Wasser gelöst und 3 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurden 22.1 g (0.32 mol) Natriumnitrit hinzugegeben und auf - 10 °C gekühlt. Die erkaltete Reaktionslösung wurde auf ein Gemisch aus 600 g Eis / 100 g konz. Schwefelsäure gegossen. Dabei fiel das Produkt als weiß-gelber Niederschlag aus, der abgesaugt und aus Methanol umkristallisiert wurde.

## Darstellung von Diazomethan

In einer kommerziell für die Darstellung von Diazomethan erhältlichen schliffreien Apparatur (MNNG: diazomethane-generation apparatus, Aldrich) wurden einige Spatelspitzen *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff mit wenigen Tropfen 40%iger Kaliumhydroxid-Lösung versetzt. Das als gelbes Gas gewonnene Diazomethan wurde bis zum Stillstand der Gasentwicklung in *n*-Pentan (SupraSolv<sup>®</sup>) als Lösungsmittelvorlage unter Kühlung einkondensiert. Einige Tropfen dieser Lösung wurden anschließend zu einen SPE-Extrakt gegeben, nach Abreagieren des Diazomethans wurde erneut vollständig eingeeengt, in Dichlormethan (SupraSolv<sup>®</sup>) aufgenommen und gaschromatographisch-massenspektrometrisch untersucht.

## Hydrierung

Die Hydrierungen der SPE-Extrakte erfolgte unter Rühren im Autoklaven in hochreinem Lösungsmittel (Methanol) bei 5-50 bar Wasserstoffdruck in Gegenwart geringer Mengen eines Katalysators (Pd/C - Palladium auf Aktivkohle; Platin auf Aktivkohle).

## Enzymatische Hydrolyse

### Glucuronidase

Zu einem SPE-Extrakt wurden 7.5 mg  $\beta$ -Glucuronidase aus *Helix Pomatia* Typ H-1 ( $\geq 300,000$  units/g; Sigma) und 10 mL 0.5 M Natriumacetatpuffer (Merck) gegeben und 24 h bei 55 °C thermostatisiert.

Nach analogem Vorgehen kam ebenso  $\beta$ -Glucuronidase aus *Escherichia coli* Type VIII-A (5.000000-20.000000 units/g protein, Sigma) zum Einsatz.

### Sulfatase

Zu einem SPE-Extrakt wurden 200  $\mu$ L Sulfatase aus *Helix Pomatia* H-2 ( $\geq 2,000$  units / mL, Sigma) und 5 mL 0.5 M Natriumacetatpuffer (Merck) gegeben und über Nacht bei 55 °C thermostatisiert.

### Aufarbeitung

Variante 1: Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die enzymatischen Hydrolyseansätze mit festem Kaliumcarbonat auf pH 10-11 eingestellt und dreimal mit 20 mL Dichlormethan extrahiert.

Variante 2: Der wässrige Ansatz der enzymatischen Hydrolyse wurde einer Festphasenextraktion nach obigem Muster unterworfen, der methanolische Extrakt im Stickstoffstrom eingengt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen.

## **Festphasenmikroextraktion (SPME) aus der Gasphase**

Die qualitativen Analysen durch HS-SPME-Experimente wurden manuell mit dem entsprechenden Faserhalter durchgeführt. Dazu wurden 20 mL Headspace Probengläser mit 3-5 mL Urin befüllt, die wässrige Phase mit 3.0 g festem Kochsalz gesättigt und in einem Sandbad unter Kontrolle eines Kontaktthermometers temperiert. Die Faser wurde nach Erreichen der Zieltemperatur durch das Septum eingestochen und im Gasraum über der Flüssigkeit mindestens 30 min lang exponiert. Anschließende Desorption der Analyten erfolgte im heißen Injektor des Gaschromatographen bei 250 °C unter splitlosen Bedingungen. Folgende kommerziell verfügbare Fasern von Supelco®<sup>364</sup> wurden erprobt:

- Polydimethylsiloxan 100 µm Filmdicke (Supelco Kodierung: rot)
- Carboxen Polydimethylsiloxan 75 µm Filmdicke (Supelco Kodierung: schwarz)
- Polyacrylat 85 µm Filmdicke (Supelco Kodierung: weiß)

Letztere zeigte die beste Affinität für die Targetanalyten.

## **Reaktionen mit hydrolyse- / luftempfindlichen Substanzen**

Reaktionen, die wasser- und sauerstofffreie Bedingungen erforderten, wurden unter Stickstoff- oder Argonatmosphäre mit wasserfreien Lösungsmitteln durchgeführt.

## **Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel**

Die für Synthesen eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen Acros, Aldrich, Bachem, Fluka, ICN, Lancaster und Merck bezogen und wenn nicht anders angegeben, ohne vorherige Reinigung für die Synthesen verwendet. Für die hochdruck-flüssigchromatographischen Methoden (HPLC) wurden Lösungsmittel der Firma Merck in den Reinheitsgraden SupraSolv® bzw. LichroSolv® und Acros (HPLC-Grade) verwendet. Wasserfreie Lösungsmittel wurden ebenfalls bei den Firmen Acros, Aldrich, Fluka, und Merck bezogen oder nach den gängigen Vorschriften absolutiert.

## Spezieller Teil - Asiatischer Elefant

### NMR-Daten der identifizierten 2-Hydroxyharzsäurelactone

#### Partielle NMR Daten von Hydroxypimarsäurelacton (E175)

<sup>1</sup>H-NMR [700 MHz, Benzol-*d*<sub>6</sub>] δ[ppm]: 0.57(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.06 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.49 (d?, J<sub>1</sub> = 5.5 Hz), 1.68 (dd, J<sub>2</sub> = 12 Hz, J<sub>3</sub> = 3.2 Hz), 1.81 (d, J<sub>1</sub> = 12 Hz), 2.0 (ddd, J<sub>1</sub> = 14.6 Hz, J<sub>2</sub> = 4.6 Hz, J<sub>3</sub> = 1.9 Hz), 4.11 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, C2-CHO), 4.98 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 10.7 Hz (Z), <sup>2</sup>J = 1.3 Hz (gem), C16-CH<sub>2</sub> (E)), 5.01 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 17.4 Hz (E), <sup>2</sup>J = 1.3 Hz (gem), C16-CH<sub>2</sub> (Z)), 5.24 (m, 1H, C7-CH), 5.79 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 10.7 Hz (Z), <sup>3</sup>J = 17.4 Hz (E), C15-CH)

<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, Benzol-*d*<sub>6</sub>] δ[ppm]: 21, 22.46, 26, 35.2, 36.3, 47.6, 75, 110, 130, 150, 182.7

#### 2-Hydroxyisopimarsäurelacton (E176)

<sup>1</sup>H-NMR [700 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>] δ[ppm]: 0.87 (s, 3H, C17-CH<sub>3</sub>), 1.13 (s, 3H, C19-CH<sub>3</sub>), 1.18 (s, 3H, C20-CH<sub>3</sub>), 1.41 (m, 1H, C12-CH<sub>2a</sub>), 1.45 (m, 1H, C11-CH<sub>2a</sub>), 1.48 (m, 1H, C12-CH<sub>2b</sub>), 1.58 (m, 1H, C11-CH<sub>2b</sub>), 1.75 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 4.4 Hz, <sup>3</sup>J = 12.3 Hz, C5-CH), 1.79 (d, 1H, J = 15.6 Hz, C1-CH<sub>2a</sub>), 1.84 (m, 1H, C9-CH), 1.84 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J = 1.4 Hz, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, J = 12.4 Hz, C3-CH<sub>2a</sub>), 1.93 (dd, 1H, C14-CH<sub>2a</sub>), 2.01 (m, 1H, C14-CH<sub>2b</sub>), 2.01 (m, 1H, C6-CH<sub>2a</sub>), 2.09 (m, 1H, C6-CH<sub>2b</sub>), 2.13 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 5.9 Hz, J = 15.6 Hz, C1-CH<sub>2b</sub>), 2.64 (d, 1H, J = 12.4 Hz, C3-CH<sub>2b</sub>), 4.73 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, <sup>3</sup>J = 5.9 Hz, C2-CH), 4.85 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 10.8 Hz (Z), <sup>2</sup>J = 1.4 Hz (gem), C16-CH<sub>2</sub> (E)), 4.94 (dd, 2H, <sup>3</sup>J = 17.5 Hz (E), <sup>2</sup>J = 1.4 Hz (gem), C16-CH<sub>2</sub> (Z)), 5.44 (m, 1H, C7-CH), 5.81 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 10.8 Hz (Z), <sup>3</sup>J = 17.5 Hz (E), C15-CH)

<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>] δ[ppm]: 16.98 (q, C-19), 20.68 (t, C-11), 21.89 (q, C-17), 21.92 (q, C-20), 26.14 (t, C-6), 35.05 (s, C-10), 36.32 (t, C-3), 36.40 (t, C-12), 37.73 (s, C-13), 41.85 (s, C-4), 43.39 (t, C-1), 45.23 (d, C-5), 46.34 (t, C-14), 54.72 (d, C-9), 76.20 (d, C-2), 109.88 (t, C-16), 123.37 (d, C-7), 137.54 (s, C-8), 150.87 (d, C-15), 182.71 (s, C-18)

## 2-Hydroxy-7,8-dihydroabietinsäurelacton (E177)

**<sup>1</sup>H-NMR [700 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>] δ[ppm]:** 0.54 (m, 1H, C9-CH), 0.57 (s, 3H, C20-CH<sub>3</sub>), 0.76 (m, 1H, C7-CH<sub>2a</sub>), 0.92 (m, 1H, C11-CH<sub>2a</sub>), 1.01 (m, 1H, C6-CH<sub>2a</sub>), 1.02 (s, 3H, C19-CH<sub>3</sub>), 1.03 (d, 6H, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, C16-CH<sub>3</sub>, C17-CH<sub>3</sub>), 1.23 (dd, 1H, <sup>2</sup>J = 12.0 Hz, <sup>3</sup>J = 5.3 Hz, C3-CH<sub>2a</sub>), 1.35 (m, 1H, C11-CH<sub>2b</sub>), 1.38 (dd, 2H, <sup>2</sup>J = 11.6 Hz, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, C1-CH<sub>2</sub>), 1.50 (m, 1H, C6-CH<sub>2b</sub>), 1.51 (m, 1H, C7-CH<sub>2b</sub>), 1.61 (dd, 1H, J = 2.7 Hz, <sup>3</sup>J = 12.9 Hz, C5-CH), 1.68 (m, 1H, C8-CH), 1.83 (m, 2H, <sup>2</sup>J = 11.6 Hz, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, C12-CH), 1.93 (d, 1H, <sup>2</sup>J = 12.2 Hz, C3-CH<sub>2b</sub>), 2.12 (septett, 1H, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, C15-CH), 4.14 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, <sup>3</sup>J = 5.3 Hz, C2-CH), 5.10 (s, 1H, C14-CH)

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>] δ[ppm]:** 16.79 (q, C-19), 20.69 (q, C-20), 21.57 (q, C-17), 22.07 (q, C-16), 22.53 (t, C-11), 24.03 (t, C-6), 27.05 (t, C-12), 33.99 (t, C-7), 35.09 (d, C-15), 35.34 (d, C-8), 36.72 (t, C-3), 35.90 (s, C-10), 41.17 (s, C-4), 42.95 (t, C-1), 48.82 (d, C-5), 53.72 (d, C-9), 74.88 (d, C-2), 123.94 (d, C-14), 142.23 (s, C-13), 181.39 (s, C-18)

## 2-Hydroxydehydroabietinsäurelacton (E181)

**<sup>1</sup>H-NMR [500 MHz, Benzol-*d*<sub>6</sub>] δ[ppm]:** 0.89 (s, 3H, C20-CH<sub>3</sub>), 1.07 (s, 3H, C19-CH<sub>3</sub>), 1.22 (d, 6H, <sup>3</sup>J = 6.94 Hz, C16-CH<sub>3</sub>, C17-CH<sub>3</sub>), 1.25 (dd, 1H, <sup>2</sup>J = 12.3 Hz, <sup>3</sup>J = 5.1 Hz, C3-CH<sub>2a</sub>), 1.42 (m, 1H, C6-CH<sub>2a</sub>), 1.63 (m, 1H, C6-CH<sub>2b</sub>), 1.82 (dd, 1H, <sup>2</sup>J = 15.4 Hz, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, C1-CH<sub>2a</sub>), 2.01 (d, 1H, <sup>2</sup>J = 12.3 Hz, C3-CH<sub>2b</sub>), 2.09 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 3.6 Hz, <sup>3</sup>J = 13.6 Hz, C5-CH), 2.18 (d, 1H, <sup>2</sup>J = 15.4 Hz, C1-CH<sub>2b</sub>), 2.49 (m, 1H, C7-CH<sub>2a</sub>), 2.57 (m, 1H, C7-CH<sub>2b</sub>), 2.74 septett, 1H, <sup>3</sup>J = 6.94 Hz, C15-CH), 4.21 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 5.1 Hz, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, C2-CH), 6.79 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, C11-CH), 6.80 (s, 1H, C14-CH), 6.94 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, C12-CH)

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, Benzol-*d*<sub>6</sub>] δ[ppm]:** 17.25 (q, C-19), 20.39 (t, C-6), 24.34 (q, C-16, C-17), 28.65 (t, C-7), 30.59 (q, C-20), 34.10 (d, C-15), 36.01 (t, C-3), 36.05 (s, C-10), 41.38 (s, C-4), 41.57 (t, C-1), 42.87 (d, C-5), 74.68 (d, C-2), 123.42 (d, C-11), 123.98 (d, C-12), 127.53 (d, C-14), 133.78 (s, C-8), 146.22 (s, C-13), 148.07 (s, C-9), 181.14 (s, C-18)

## 2-Hydroxyabietinsäurelacton (E182)

**<sup>1</sup>H-NMR [700 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>] δ[ppm]:** 0.66 (s, 3H, C20-CH<sub>3</sub>), 1.01 (d, 6H, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, C16-CH<sub>3</sub>, C17-CH<sub>3</sub>), 1.02 (s, 3H, C19-CH<sub>3</sub>), 1.05 (m, 1H, C11-CH<sub>2a</sub>), 1.21 (ddd, 1H, J = 1 Hz, <sup>2</sup>J = 12.3 Hz, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, C3-CH<sub>2a</sub>), 1.34 (m, 1H, C11-CH<sub>2b</sub>), 1.41 (dd, 1H, <sup>2</sup>J = 15.1 Hz, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, C1-CH<sub>2a</sub>), 1.51 (d, 1H, <sup>2</sup>J = 15.1 Hz, C1-CH<sub>2b</sub>), 1.53 (m, 1H, C9-CH), 1.72 (m, 1H, C6-CH<sub>2a</sub>), 1.86 (m, 2H, C12-CH), 1.90 (d, 1H, <sup>2</sup>J = 12.3 Hz, C3-CH<sub>2b</sub>), 1.96 (m, 1H, C6-CH<sub>2b</sub>), 1.97 (m, 1H, C5-CH), 2.16 (septett, 1H, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, C15-CH), 4.15 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, C2-CH), 5.28 (m, 1H, C7-CH), 5.85 (s, 1H, C14-CH)

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>] δ[ppm]:** 16.88 (q, C-19), 20.18 (q, C-20), 21.05 (q, C-17), 21.67 (q, C-16), 22.71 (t, C-11), 26.13 (t, C-6), 27.16 (t, C-12), 33.88 (s, C-10), 35.39 (d, C-15), 35.75 (t, C-3), 41.13 (s, C-4), 42.11 (t, C-1), 43.69 (d, C-5), 52.16 (d, C-9), 74.90 (d, C-2), 122.11 (d, C-7), 123.12 (d, C-14), 136.55 (s, C-8), 145.02 (s, C-13), 181.50 (s, C-18)

## Synthesen

### **Darstellung von Abietinsäuremethylester (66) mit Oxalylchlorid und Methanol**

Unter Argonstrom wurde 2.98 g (7.5 mmol) Abietinsäure (**46**) in 50 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurden 1.3 mL (7.2 mmol) Oxalylchlorid über einen Zeitraum von zehn Minuten hinzugegeben, und die Lösung verfärbte sich unter Gasentwicklung braun. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur 2 h lang gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum abgezogen und das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung weiter eingesetzt. Unter Argon und bei 0 °C wurde zu 4.8 mL (118.4 mmol) absolutem Methanol in 20 mL absolutem Pyridin das Säurechlorid in 20 mL Dichlormethan getropft. Die Suspension wurde nach 2.5 h auf Raumtemperatur erwärmt und 17 h lang gerührt. Nach Zugabe von 100 mL Petrolether und 100 mL Wasser wurde die organische Phase abgetrennt, die wässrige dreimal mit jeweils 20 mL Petrolether extrahiert und die organische Phase jeweils zweimal mit je 60 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die Lösung wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel ( $R_f = 0.45$ , Laufmittel: Petrolether / Ethylacetat 20:1) gereinigt. Es wurde ein bräunliches Öl erhalten. Die Ausbeute betrug 0.71 g (2.2 mmol, 30 %) an einem Gemisch von Diterpensäuremethylestern.

### **Darstellung von Abietinsäuremethylester (66) mit Dimethylsulfat**

Eine Lösung aus 3.00 g (7.5 mmol) Abietinsäure (**46**) und 0.48 g (20.0 mmol) Lithiumhydroxid in 12 mL Dimethylformamid wurde 4 h lang bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Es wurden 2.8 mL (29.5 mmol) Dimethylsulfat zugegeben und die Lösung weitere 15 min gerührt. Anschließend wurden 25 mL Wasser hinzugegeben, viermal mit jeweils 50 mL n-Hexan extrahiert, die organische Phase mit insgesamt 150 mL 5 %iger Salzsäure und 100 mL 10 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel ( $R_F = 0.49$ , Laufmittel: Petrolether / Ethylacetat 20/1) gereinigt. Es wurde ein bräunliches Öl mit einer Ausbeute von 0.77 g (2.5 mmol, 34 %) als Gemisch von Diterpensäuremethylestern erhalten.

## **Disproportionierung von Abietinsäuremethylester (66)**

Die jeweiligen Ansätze wurden gaschromatographisch-massenspektrometrisch untersucht, Strukturvorschläge anhand von Bibliotheksabgleich erstellt und die Rohprodukte zur Methodenentwicklung in der HPLC genutzt.

### **Ansatz: Pd/C**

100 mg (0.31 mmol) **66** wurden in 5 mL Benzol gelöst. Nach Zugabe von 20 mg Pd/C wurde die Lösung 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösemittel im Stickstoff-Gegenstrom verdampft.

Die Gaschromatographische Auswertung zeigte, dass kein gewünschtes reduziertes oder disproportioniertes Produkt detektiert werden konnte. Es fand lediglich partielle Oxidation von **66** zum Dehydroabietinsäuremethylester (**67**) statt.

### **Ansatz: Pd/C unter Rückfluß**

100 mg (0.31 mmol) **66** wurden in 5 mL Benzol gelöst. Nach Zugabe von 20 mg Pd/C wurde die Lösung 3 Tage unter Rückfluß gerührt, anschließend wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösemittel im Stickstoff-Gegenstrom verdampft.

Die Gaschromatographische Auswertung zeigte, dass auch hier kein gewünschtes reduziertes oder disproportioniertes Produkt detektiert werden konnte. Wiederum fand lediglich partielle Oxidation von **66** zum Dehydroabietinsäuremethylester (**67**) statt.

### **Ansatz: Pd(OH)<sub>2</sub>/C**

97 mg (0.31 mmol) **66** wurden in 5 mL Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 28 mg Pd(OH)<sub>2</sub>/C wurde die Lösung zwei Tage unter Rückfluß gerührt, anschließend wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösemittel im Stickstoff-Gegenstrom verdampft.

Die gaschromatographische Auswertung zeigte, dass auch hier kein gewünschtes reduziertes oder disproportioniertes Produkt von **66** detektiert werden konnte. Neben dem Oxidationsprodukt Dehydroabietinsäuremethylester (**67**), konnten ein vollständig gesättigter Isopimarsäuremethylester (**68**) und ein Isopimarsäuremethylester detektiert werden. Dies bestätigt die prinzipielle Durchführbarkeit der Reaktion.

**Ansatz: Pd(OH)<sub>2</sub>/C und Cyclohexen,**

100 mg (0.31 mmol) **66** wurden in 5 mL Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 31 mg Pd(OH)<sub>2</sub>/C und 1.19 g Cyclohexen wurde die Lösung einen Tag unter Rückfluss gerührt, anschließend wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösemittel im Stickstoff-Gegenstrom verdampft. Das Gaschromatogramm ergab neben Dehydroabietinsäuremethylester (**67**) und sehr geringen Eduktresten zwei Isopimarensäuremethylester sowie 8(14)-Abietensäuremethylester (**70**) und 7,8-Dihydroabietinsäuremethylester (**69**) als Hauptprodukte.

**Ansatz: Pd(OH)<sub>2</sub>/C und 1,3-Cyclohexadien**

101 mg (0.32 mmol) **66** wurden in 5 mL Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 25 mg Pd(OH)<sub>2</sub>/C und 1.21 g 1,3-Cyclohexadien wurde die Lösung einen Tag unter Rückfluss gerührt, anschließend wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösemittel im Stickstoff-Gegenstrom verdampft.

Das Gaschromatogramm ergab neben Dehydroabietinsäuremethylester (**67**) und nicht umgesetztem Edukt (**66**) ebenfalls zwei Isopimarensäuremethylester sowie als Hauptprodukte 8(14)-Abietensäuremethylester (**70**) und 7,8-Dihydroabietinsäuremethylester (**69**).

## Massenspektrometrische Daten der Disproportionierungsprodukte:

### 8(14)-Abietaensäuremethylester (70):

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (7), 41 (51), 43 (65), 53 (12), 55 (45), 56 (3), 57 (5), 59 (21), 65 (7), 67 (23), 69 (21), 73 (5), 77 (19), 78 (3), 79 (41), 80 (8), 81 (22), 82 (10), 83 (5), 91 (40), 92 (6), 93 (29), 94 (16), 95 (17), 96 (3), 97 (4), 101 (5), 103 (4), 105 (36), 106 (5), 107 (100), 108 (15), 109 (27), 110 (2), 115 (7), 116 (3), 117 (10), 118 (4), 119 (12), 120 (4), 121 (38), 122 (4), 123 (4), 125 (2), 128 (5), 129 (5), 130 (3), 131 (9), 132 (3), 133 (9), 134 (4), 135 (17), 136 (5), 141 (2), 143 (3), 145 (9), 146 (2), 147 (6), 149 (5), 150 (26), 151 (3), 159 (8), 161 (3), 163 (2), 173 (4), 174 (2), 187 (12), 188 (2), 189 (3), 201 (4), 215 (6), 243 (32), 244 (5), 258 (20), 259 (13), 260 (2), 271 (3), 303 (9), 318 (4)

### 7,8-Dihydroabietinsäuremethylester (69):

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (9), 41 (71), 43 (100), 44 (2), 52 (2), 53 (10), 54 (7), 55 (33), 56 (5), 57 (5), 59 (34), 65 (7), 66 (3), 67 (20), 69 (24), 73 (4), 76 (3), 77 (18), 79 (36), 80 (10), 81 (24), 82 (4), 83 (4), 91 (49), 92 (11), 93 (22), 94 (8), 95 (16), 96 (3), 101 (4), 103 (4), 104 (3), 105 (29), 106 (11), 107 (22), 108 (4), 109 (11), 114 (2), 115 (5), 116 (4), 117 (11), 118 (3), 119 (10), 121 (44), 122 (4), 123 (5), 127 (2), 128 (6), 129 (7), 130 (3), 131 (11), 132 (3), 133 (12), 134 (7), 135 (14), 136 (6), 141 (2), 142 (2), 143 (4), 144 (2), 145 (9), 146 (3), 147 (6), 148 (2), 149 (5), 150 (5), 157 (2), 158 (3), 159 (6), 160 (2), 161 (3), 173 (3), 177 (4), 181 (3), 187 (16), 188 (3), 189 (3), 201 (3), 215 (12), 243 (52), 244 (8), 258 (9), 259 (10), 271 (5), 275 (3), 303 (11), 304 (2), 318 (5)

## Spezieller Teil - Buntbock

### 1-Iod-1-heptin (80)

Zu 11.3 g (118 mmol) 1-Heptin (**75**) wurden in einem Dreihalskolben unter Argonatmosphäre langsam bei 60 °C 100 mL (160 mmol) 1.6 M *n*-BuLi in *n*-Hexan getropft. Nach 60 min wurde auf -78 °C abgekühlt und 33.0 g (130 mmol) Iod in 600 mL abs. Diethylether langsam zugetropft. Die Lösung wurde 3 Stunden lang zwischen -60 und -80 °C gerührt und dann auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionsmischung wurde einmal mit 100 mL gesättigter Natriumdisulfit-Lösung sowie zweimal mit 100 mL Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Einengen im Vakuum wurde das Rohprodukt bei 60 °C und 7 Torr destilliert. Es wurden 21.7 g (97.7 mmol, 83 %) einer farblosen Flüssigkeit als Produkt **80** erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 0.90 (t, 3H, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, H-7), 1.25-1.40 (m, 4H, H-5, H-6), 1.51 (q, 2H, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H-4), 2.35 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H-3)

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** -7.61 (s, C-1), 14.08 (q, C-7), 20.94 (t, C-3), 22.30 (t, C-5), 28.35 (t, C-4), 31.09 (t, C-6), 94.98 (s, C-2)

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 37 (15), 38 (35), 39 (88), 41 (100), 42 (13), 43 (10), 49 (3), 50 (21), 51 (26), 52 (14), 53 (26), 55 (65), 56 (5), 57 (6), 62 (4), 63 (6), 64 (2), 65 (14), 66 (23), 67 (69), 68 (4), 77 (9), 79 (10), 80 (7), 91 (5), 93 (9), 95 (48), 96 (3), 127 (19), 164 (2), 165 (19), 166 (5), 180 (2), 222 (6)

### **(1Z)-1-Heptenyliodid (81)**

Unter Argonatmosphäre wurden 16.6 mL (166 mmol) Boran-Dimethylsulfid-Komplex in einem Dreihalskolben in 200 mL abs. Diethylether vorgelegt. Unter Eiskühlung und Rühren wurden 33.5 mL (332 mmol) Cyclohexen innerhalb von 30 min zugetropft. Es entstand eine weiße Suspension. Nach Entfernung des Eisbads wurde weitere 2 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Danach wurden unter Eiskühlung 37.0 g (166 mmol) 1-Iod-1-heptin (**80**) langsam zugetropft. Die Lösung wurde 1 h bei 0 °C und weitere 2 h bei 20 °C gerührt. Daraufhin wurden unter erneuter Eiskühlung 85 mL Eisessig innerhalb von 20 min zugetropft und bei 20 °C weitere 90 min gerührt. Es wurden 180 mL Diethylether zugegeben und die organische Phase abgetrennt. Diese wurde dreimal mit je 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung und einmal mit gesättigter Natriumdisulfit-Lösung gewaschen und nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde bei 65 °C und 6 Torr destilliert. Es wurden 30.8 g (138 mmol, 83 %) einer farblosen Flüssigkeit als Produkt **81** erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 0.90 (t, 3H, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, H-7), 1.28-1.37 (m, 4H, H-5, H-6), 1.44 (quin, 2H, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, H-4), 2.10-2.17 (m, 2H, H-3), 6.16-6.20 (m, 2H, H-1, H-2)

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 14.21 (q, C-7), 22.75 (t, C-5), 27.93 (t, C-4), 31.60 (t, C-6), 34.97 (t, C-3), 82.79 (d, C-1), 142.33 (d, C-2)

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (34), 40 (7), 41 (43), 42 (8), 43 (9), 50 (2), 51 (4), 52 (2), 53 (10), 55 (100), 56 (7), 57 (12), 65 (2), 67 (5), 69 (8), 70 (6), 97 (13), 127 (4), 154 (24), 167 (12), 168 (5), 183 (2), 224 (31), 225 (2)

## Synthese von racemischen (6Z)-Dodec-6-en-4-olid (18)

### 2-(Pent-4'-en-1'-yloxy)-tetrahydropyran (73)

Zu 11.5 g (134 mmol) 4-Penten-1-ol (72) wurden bei 0 °C in 100 mL abs. Dichlormethan ca. 200 mg *p*-Toluolsulfonsäure gegeben. Unter Rühren wurden langsam innerhalb von 60 min 13.5 g (160 mmol) Dihydropyran in 50 mL Dichlormethan zugetropft. Die Lösung wurde bei 0 °C weitere 5 h lang gerührt. Nach Zugabe einiger Spatel Natriumhydrogencarbonat, gefolgt von 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat Lösung, wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittel Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis 15:1 gereinigt. Es wurden 23.1 g (132 mmol, 99 %) farbloses Öl als Produkt 73 erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 1.48-1.64 (m, 4H, H-3a, H-4a, H-5), 1.65-1.76 (m, 3H, H-2', H-3b), 1.78-1.90 (m, 1H, H-4b), 2.09-2.19 (m, 2H, H-3'), 3.39 (dt, 1H, <sup>2</sup>J = 9.7 Hz, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, H-1'a), 3.46-3.53 (m, 1H, H-6a), 3.75 (dt, 1H, <sup>2</sup>J = 9.7 Hz, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, H-1'b), 3.83-3.90 (m, 1H, H-6b), 4.57 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 2.8 Hz, <sup>3</sup>J = 4.3 Hz, H-2), 4.96 (m, 1H, H-5'a), 5.03 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J = 17 Hz, <sup>2</sup>J = 1.6 Hz, <sup>4</sup>J = 3.5 Hz, H-5'b), 5.83 (m, 1H, H-4')

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 19.78 (t, C-4), 25.65 (t, C-5), 29,11 (t, C-2'), 30.56 (t, C-3'), 30,90 (t, C-3), 62.42 (t, C-6), 67.08 (t, C-1'), 98.99 (d, C-2), 114.80 (t, C-5'), 138.51 (d, C-4')

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (23), 40 (5), 41 (73), 42 (7), 43 (14), 44 (3), 53 (7), 54 (3), 55 (17), 56 (20), 57 (14), 67 (29), 68 (18), 69 (34), 70 (3), 83 (4), 84 (19), 85 (100), 86 (8), 98 (4), 101 (7), 169 (0.3)

### **2-(4',5'-Epoxy-pentan-1'-yloxy)-tetrahydropyran (74)**

Es wurden 22.5 g (132 mmol) **73** in 250 mL Dichlormethan auf 0 °C gekühlt. Dazu wurden 30.0 g *m*-CPBA (77% Gehalt an *m*-CPBA; entspricht 23,1 g, 134 mmol) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 4 h lang bei 0 °C und dann bei 20 °C über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 250 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittel Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis 6:1 gereinigt. Es wurden 21.8 g (117 mmol, 89 %) farbloses Öl als Produkt **74** erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 1.46-1.85 (m, 10H, H-2', H-3, H-3', H-4, H-5), 2.48 (m, 1H, H-5a'), 2.75 (m, 1H, H-5'b), 2.93-2.97 (m, 1H, H-4'), 3.40-3.45 (m, 1H, H-1'a), 3.45-3.52 (m, 1H, H-6a), 3.74-3.81 (m, 1H, H-1'b), 3.82-3.88 (m, 1H, H-6b), 4.58 (m, 1H, H-2)

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 19.78 (t, C-4), 25.58 (t, C-5), 26.28 + 29.52 (t, C-2' / t, C-3'), 30.84 (t, C-3), 47.26 (t, C-5'), 52.25 (d, C-4'), 62.44 (t, C-6), 67.11 (t, C-1'), 99.01 (d, C-2)

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (44), 40 (8), 41 (92), 42 (15), 43 (46), 44 (6), 45 (4), 51 (2), 53 (9), 54 (6), 55 (45), 56 (15), 57 (39), 58 (3), 67 (36), 68 (3), 69 (5), 71 (10), 83 (4), 84 (9), 85 (100), 86 (6), 101 (17)

**(6'Z)-2-(4'-Hydroxydodec-6'-en-1'-yloxy)-tetrahydropyran (82)**

Es wurden 16.8 g (75.0 mmol) (1Z)-1-Heptynyliodid (**81**) in 160 mL trockenem Diethylether auf -78 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden langsam 7.5 mL (75 mmol) 10 M *n*-BuLi in *n*-Hexan getropft und 30 min lang gerührt. In einem weiteren Kolben wurden 7.05 g (37.0 mmol) CuI, welches zuvor in einer Trockenpistole getrocknet wurden war, in ca. 300 mL trockenem Diethylether suspendiert und ebenfalls auf -78 °C gekühlt. Das entstandene (1Z)-1-Lithium-1-hepten wurde langsam bei -78 °C in die CuI-Suspension gegeben. Es wurde 1 h gerührt, wobei die Temperatur ständig unter -40 °C gehalten wurde. Schließlich wurde eine Lösung aus 7.00 g (37.0 mmol) 2-(4',5'-Epoxyptan-1'-yloxy)-tetrahydropyran (**74**) in ca. 200 mL trockenem Diethylether langsam zugetropft und anschließend 4 h bei unter -40 °C gerührt, bis eine schwarz-braune Suspension entstanden war. Diese wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Nach der Zugabe von ca. 200 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung wurde die Suspension filtriert, die wässrige Phase dreimal mit ca. 50 mL Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen zweimal mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittel Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis 3:1 gereinigt. Es wurden 8.3 g (29.0 mmol, 79 %) farblose Flüssigkeit als Produkt **76** erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 0.85 (t, 3H, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, H-12'), 1.19-1.37 (m, 6H, H-9', H-10', H-11'), 1.40-1.90 (m, 10H, H-2', H-3, H-3', H-4, H-5), 2.15 (q, 2H, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H-8'), 2.11-2.26 (m, 2H, H-5'), 2.40 (s, 1H, OH), 3.35-3.43 (m, 1H, H-1'a), 3.44-3.51 (m, 1H, H-6a), 3.58-3.66 (m, 1H, H-4'), 3.72-3.78 (m, 1H, H-1'b), 3.79-3.86 (m, 1H, H-6b), 4.57 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 3.8 Hz, <sup>3</sup>J = 3.0 Hz, H-2), 5.33-5.42 (m, 1H, H-7'), 5.63-5.55 (m, 1H, H-6')

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 14.11 (q, C-12'), 19.61 (t, C-4), 22.61 (t, C-11'), 25.50 (t, C-5), 26.28 (t, C-2'), 27.45 (t, C-8), 29.40 (t, C-10), 30.70 (t, C-3), 31.58 (t, C-10'), 34.06 (t, C-3'), 35.41 (t, C-5'), 62.32 (t, C-6), 67.78 (t, C-1'), 71.38 (d, C-4'), 98.90 (d, C-2), 125.36 (d, C-6'), 133.12 (d, C-7')

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (9), 41 (34), 42 (5), 43 (17), 44 (4), 53 (3), 54 (4), 55 (14), 56 (6), 57 (11), 67 (11), 69 (5), 71 (24), 81 (3), 83 (3), 85 (100), 86 (5), 95 (3), 101 (2), 109 (2), 155 (3), 182 (1), 183 (1), 283 (0.2 M-1)

**(6Z)-Dodec-6-en-1,4-diol (83)**

Es wurden 8.3 g (29.0 mmol) (6'Z)-2-(4'-Hydroxydodec-6'-en-1'-yloxy)-tetrahydropyran (**82**) in ca. 300 mL Methanol vorgelegt. Nach der Zugabe von 0.8 g (4.0 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure unter Eiskühlung wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden einige Spatel Natriumhydrogencarbonat zugegeben, die Reaktionslösung im Vakuum auf 50 mL eingengt und mit jeweils 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Ethylacetat versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittel Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis 1:1 gereinigt. Es wurden 5.33 g (26.7 mmol, 92 %) eines leicht gelblichen Öls als Produkt **83** erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 0.87 (t, 3H, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, H-12), 1.20-1.40 (m, 6H, H-9, H-10, H-11), 1.42-1.56 (m, 1H, H-3a), 1.62-1.75 (m, 3H, H-2, H-3b), 2.03 (q, 2H, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, H-8), 2.16-2.29 (m, 2H, H-5), 2.68 (s, 2H, OH), 3.60-3.72 (m, 2H, H-4, H-1), 5.36 (m, 1H, H-6), 5.55 (m, 1H, H-7)

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 14.42 (q, C-12), 23.02 (t, C-11), 27.77 (t, C-8), 29.54 (t, C-2), 29.70 (t, C-9), 31.89 (t, C-10), 34.22 (t, C-3), 35.87 (t, C-5), 63.25 (t, C-1), 71.87 (t, C-4), 125.36 (d, C-6), 133.63 (d, C-7)

**MS (EI, 70 eV ) [m/z]:** 39 (25), 41 (70), 42 (14), 43 (60), 44 (5), 45 (2), 53 (9), 54 (9), 55 (18), 56 (9), 57 (12), 67 (7), 68 (3), 69 (8), 70 (5), 71 (100), 72 (4), 79 (3), 81 (3), 82 (2), 83 (7), 84 (4), 89 (23), 112 (2)

### **Darstellung des Oxidationsmittels Silbercarbonat auf Celite**

Handelsübliches Celite wurde zunächst intensiv mit 10 %iger HCl in Methanol gerührt, abfiltriert und bis zur Neutralität mit destilliertem Wasser gewaschen. Es wurden 30 g der gereinigten Celite 24 h lang bei 100 °C getrocknet und in eine Lösung aus 34.0 g (200 mmol) AgNO<sub>3</sub> in 200 mL destilliertem Wasser gegeben. Zu dieser Suspension wurde langsam eine Lösung aus 30.0 g (105 mmol) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> • 10 H<sub>2</sub>O in 300 mL destilliertem Wasser gegeben. Die Suspension wurde 30 min gerührt und die gelbliche feste Phase abfiltriert. Restliches Wasser wurde durch azeotrope Destillation mit Toluol am Wasserabscheider entfernt. Das Oxidationsmittel enthielt 1 mmol Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf 0.57 g Celite.

### **(6Z)-Dodec-6-en-4-olid (18)**

Zu einer Suspension aus 38.00 g (66.75 mmol) Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf Celite in ca. 400 mL Toluol wurden 5.33 g (26.7 mmol) (6Z)-Dodec-6-en-1,4-diol (**83**) gegeben und 5 h am Wasserabscheider erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch überprüft. Der feste Rückstand wurde vom Reaktionsgemisch abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittel Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis 3:1 gereinigt. Es wurden 2.72 g (13.9 mmol, 53 %) leicht gelbliches Öl als Produkt **18** erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 0.89 (t, 3H, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, H-12), 1.23-1.40 (m, 6H, H-9, H-10, H-11), 1.85-1.95 (m, 1H, H-3a), 2.03 (q, 2H, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, H-8), 2.25-2.34 (m, 1H, H-3b), 2.36-2.44 (m, 1H, H-5a), 2.46-2.52 (m, 1H, H-5b), 2.50-2.57 (m, 2H, H-2), 4.52 (quin, 1H, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, H-4), 5.31-5.38 (m, 1H, H-6), 5.54-5.61 (m, 1H, H-7)

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 14.45 (C-12) 22.94 (C-10), 27.57 (C-3), 27.85 (C-8), 29.14 (C-2), 29.55 (C-9), 31.89 (C-11), 33.31 (C-5), 80.70 (C-4), 122.57 (C-6), 134.66 (C-7), 177.26 (C-1)

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (21), 41 (34), 42 (4), 43 (4), 53 (6), 54 (9), 55 (10), 56 (4), 57 (10), 65 (2), 67 (6), 69 (3), 77 (2), 79 (4), 80 (3), 81 (4), 85 (100), 86 (4), 96 (6), 136 (2), 196 (1)

## Erste enantioselective Synthese von (6Z)-Dodec-6-en-4-olid (18)

### (S)-(+)- $\gamma$ -Hydroxymethyl- $\gamma$ -butyrolacton (86)

17.9 g (138 mmol) (S)-(+)- $\gamma$ -Carboxyl- $\gamma$ -butyrolacton (**85**) wurden in einem Dreihalskolben unter Argonatmosphäre in 100 mL abs. THF gelöst. Innerhalb von 3 h wurden 15.8 mL (158 mmol, 12.6 g) einer 95%igen Boran-Dimethylsulfid-Komplex Lösung zugetropft und über Nacht gerührt. Es wurden vorsichtig 260 mL Methanol hinzu gegossen und danach das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde bei 110 °C und 1 Torr destilliert. Es wurden 14.3 g (123 mmol, 89 %) Produkt erhalten.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +50.1^\circ$  (c = 1.03, CHCl<sub>3</sub>)

**<sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$ [ppm]:** 2.09-2.20 (m, 1H, H-3a), 2.21-2.32 (m, 1H, H-3a), 2.48-2.67 (m, 2H, H-2), 3.64 (dd, 1H, <sup>2</sup>J = 4.7 Hz, <sup>3</sup>J = 12.5 Hz, H-5a), 3.89 (dd, 1H, <sup>2</sup>J = 2.8 Hz, <sup>3</sup>J = 12.5 Hz, H-5b), 4.62 (m, 1H, H-4)

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$ [ppm]:** 23.58 (t, C-3), 29.09 (t, C-2), 64.54 (t, C-5), 81.21 (d, C-4)

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (8), 41 (5), 42 (8), 43 (6), 44 (4), 55 (5), 56 (5), 57 (15), 85 (100), 86 (11), 98 (1), 116 (1, M<sup>+</sup>)

### (S)-(+)- $\gamma$ -Tosyloxymethyl- $\gamma$ -butyrolacton (87)

14.3 g (123 mmol) (S)-(+)- $\gamma$ -Hydroxymethyl- $\gamma$ -butyrolacton (**86**) wurden bei 0 °C in 130 mL abs. Pyridin gelöst. Dazu wurden bei 0 °C 35 g (183 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid gegeben und über Nacht gerührt. Der Ansatz wurde in 200 mL eisgekühlte gesättigte Natriumhydrogencarbonat gegossen, die organische Phase in 200 mL Ethylacetat aufgenommen und abgetrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit je 50 mL einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat und einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt war ohne weitere Aufarbeitung rein. Es wurden 30.0 g (111 mmol, 90 %) Produkt erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 2.09-2.19 (m, 1H, H-3a), 2.30-2.40 (m, 1H, H-3b), 2.46 (s, 3H, Me-Ar), 2.47-2.65 (m, 2H, H-2), 4.16 (dd, 2H, <sup>2</sup>J = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J = 11 Hz, H-5), 4.68 (m, 1H, H-4), 7.37 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, H-3-Ar), 7.79 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, H-2-Ar)

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 21.83 (d, Me-Ar), 23.72 (t, C-3), 28.01 (t, C-2), 70.04 (t, C-5), 76.52 (d, C-4), 128.12 (d, H-2-Ar), 130.20 (d, H-3-Ar), 132.5 (s, C-1-Ar), 145.61 (s, C-4-Ar), 177.11 (s, C-1)

**Drehwert :**  $[\alpha]_D^{20} = +45.2^\circ$  (c = 1.13, CHCl<sub>3</sub>)

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (10), 41 (5), 43 (4), 51 (2), 55 (3), 56 (2), 57 (5), 63 (4), 65 (17), 77 (2), 85 (100), 86 (4), 89 (5), 91 (36), 92 (4), 98 (2), 99 (10), 107 (8), 155 (10), 206 (16), 207 (2), 270 (3, M<sup>+</sup>)

**(S)-(+)-(Z)-6-Dodec-6-en-4-olid (18)**

2.84 g (12.6 mmol) (1Z)-1-Heptenyliodid (**81**) in 25 mL abs. Diethylether wurden in einem Dreihalskolben unter Argon-Schutzgasatmosphäre auf -78 °C abgekühlt. Es wurden 8.0 mL 1.6 M *n*-BuLi (12.8 mmol) in *n*-Hexan tropfenweise zu der Lösung gegeben und die Lösung wurde 45 min zwischen -70 °C und -80 °C gerührt. Diese Lösung wurde zu einer Suspension aus 1,70 g (8.27 mmol) Kupfer(I)iodid in 120 mL abs. Diethylether gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 60 min lang zwischen -30 °C und -60 °C gerührt und dann auf -70 °C abgekühlt. Anschließend wurden 1.63 g (6.03 mmol) (S)-(+)- $\gamma$ -Tosyloxymethyl- $\gamma$ -butyrolacton (**87**) in 120 mL abs. Dichlormethan tropfenweise mit Hilfe einer Spritze zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde weitere 8 h zwischen -30 °C und -50 °C gerührt und dann in 200 mL einer eiskalten gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung gegossen. Nach Filtration über Celite wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase viermal mit 50 mL Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 100 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 100 mL Ethylacetat aufgenommen, fünfmal mit je 40 mL 10 M NaOH extrahiert und die wässrige alkalische Phase mit verd. HCl (2.5 mol/l) auf pH 4 angesäuert. Die saure, wässrige Phase wurde fünfmal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurden 130 mg (0.663 mmol, 11 %) Produkt erhalten.

NMR-spektroskopische Daten entsprechen denen des Racemats.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +14.8^\circ$  (c = 1.1, MeOH)

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (10), 41 (18), 42 (2), 43 (3), 53 (4), 54 (7), 55 (10), 56 (3), 57 (9), 67 (7), 68 (2), 69 (4), 77 (2), 79 (5), 80 (4), 81 (7), 82 (3), 85 (100), 86 (7), 93 (3), 94 (2), 95 (3), 96 (12), 136 (4), 196 (3)

### **(R)-(-)- $\gamma$ -Hydroxymethyl- $\gamma$ -butyrolacton (86)**

18.7 g (144 mmol) (*R*)-(-)- $\gamma$ -Carboxyl- $\gamma$ -butyrolacton (**85**) wurden in einem Dreihalskolben unter Argonatmosphäre in 150 mL abs. THF gelöst. Innerhalb von 3 h wurden 16.5 mL (165 mmol, 13.2 g) einer 95%iger Boran-Dimethylsulfid-Komplex Lösung zugetropft und über Nacht gerührt. Es wurden vorsichtig 260 mL Methanol hinzu gegossen und daraufhin das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde bei 112 °C und 1 Torr destilliert. Es wurden 15.1 g (130 mmol, 91 %) Produkt erhalten.

NMR-spektroskopische Daten entsprechen denen des (*S*)-Enantiomers.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -52.0^\circ$  (c = 1.22, CHCl<sub>3</sub>)

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (10), 41 (5), 42 (9), 43 (7), 44 (5), 55 (5), 56 (5), 57 (14), 85 (100), 86 (10), 98 (1), 116 (1, M<sup>+</sup>)

### **(R)-(-)- $\gamma$ -Tosyloxymethyl- $\gamma$ -butyrolacton (87)**

15.0 g (130 mmol) (*R*)-(-)- $\gamma$ -Hydroxymethyl- $\gamma$ -butyrolacton (**86**) wurden bei 0 °C in 120 mL abs. Pyridin gelöst. Dazu wurden 35 g (183 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid gegeben und bei 0 °C über Nacht gerührt. Der Ansatz wurde in 200 mL eiskalte gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegossen, die organische Phase in 200 mL Ethylacetat aufgenommen und abgetrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit je 50 mL einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach dem Trocken über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt war ohne weitere Aufarbeitung rein. Es wurden 35.0 g (129 mmol, 99 %) Produkt erhalten.

NMR-spektroskopische Daten entsprechen denen des (*S*)-Enantiomers.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -44.1^\circ$  (c = 1.31, CHCl<sub>3</sub>)

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (16), 41 (9), 42 (3), 43 (6), 50 (3), 51 (4), 54 (2), 55 (4), 56 (3), 57 (7), 63 (8), 65 (28), 71 (2), 77 (4), 85 (100), 86 (4), 89 (9), 91 (41), 92 (4), 98 (2), 99 (6), 107 (7), 155 (10), 206 (21), 207 (2), 270 (4, M<sup>+</sup>)

**(R)-(-)-(Z)-6-Dodec-6-en-4-olid (18)**

2.82 g (12.6 mmol) (1Z)-1-Heptenyliodid (**81**) in 25 mL abs. Diethylether wurden in einem Dreihalskolben unter Stickstoff auf -78 °C abgekühlt. Dazu wurden 7.9 mL 1.6 M *n*-BuLi in *n*-Hexan (12.6 mmol) tropfenweise gegeben. Die Lösung wurde 60 min lang zwischen -60 °C und -80 °C gerührt. Diese Lösung wurde zu einer Suspension aus 1,49 g (7.82 mmol) Kupfer(I)iodid in 160 mL abs. Diethylether gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 60 min lang zwischen -30 °C und -50 °C gerührt und dann auf -70 °C abgekühlt. Es wurden 1.6 g (5.93 mmol) (*R*)-(-)- $\gamma$ -Tosyloxymethyl- $\gamma$ -butyrolacton (**87**) in 100 mL abs. Dichlormethan tropfenweise mit Hilfe einer Spritze zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde weitere 8 h zwischen -40 °C und -60 °C gerührt und dann in 200 mL einer eiskalten gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung gegossen. Nach Filtration über Celite wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit 100 mL Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 100 mL einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 100 mL Petrolether aufgenommen, fünfmal mit je 30 mL 10 M NaOH extrahiert und die wässrige alkalische Phase mit verd. HCl (ca. 2.5 mol/l) auf pH 4 angesäuert. Die saure, wässrige Phase wurde fünfmal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurden 150 mg (0.764 mmol, 13 %) Produkt erhalten.

NMR-spektroskopische Daten entsprechen denen des Racemats.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -15.3^\circ$  (c = 0.9, MeOH)

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (12), 41 (24), 42 (3), 43 (4), 53 (5), 54 (10), 55 (16), 56 (5), 57 (15), 67 (8), 68 (3), 69 (5), 79 (5), 80 (5), 81 (8), 82 (3), 85 (100), 86 (9), 93 (4), 94 (3), 95 (4), 96 (16), 109 (2), 136 (5), 196 (2)

## Zweite enantioselective Synthese von (6Z)-Dodec-6-en-4-olid

### (4S)-Benzyl 4,5-epoxypentanoat (88)

Unter Argonatmosphäre wurden 3.99 g (14.8 mmol) (S)-(+)- $\gamma$ -Tosyloxymethyl- $\gamma$ -butyrolacton (87) in 300 mL THF gelöst und mit 1.6 mL (1.6 g, 14.8 mmol) Benzylalkohol versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf -78 °C gekühlt und tropfenweise mit 9.6 mL (14.8 mmol) 1.6 M *n*-BuLi in *n*-Hexan versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 min lang bei dieser Temperatur gerührt, dann über einen Zeitraum von 3 h langsam auf 0 °C erwärmt und weitere 20 min bei dieser Temperatur gerührt. Es wurden 250 mL einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung zugegeben und auf Raumtemperatur erwärmt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Petrolether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils zweimal mit Wasser, einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Laufmittelgradienten aus Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis von 8:1 zu 6:1 gereinigt. Es wurden 1.88 g (9.12 mmol, 62 %) eines farblosen Öls als Produkt erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$ [ppm]: 1.75-1.86 (m, 1 H, H-3a), 1.94-2.04 (m, 1H, H-3b), 2.47-2.55 (m, 3H, H-2, H-5a), 2.74 (dd, 1H, J = 4.1Hz, J =4.5 Hz, H-5b), 2.95 -3.01 (m, 1H, H-4), 5.13 (s, 2H, H-benzyl), 7.28-7.42 (m, 5H, H-arom.)

<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$ [ppm]: 27.74 (t, C-3), 30.57 (t, C-2), 47.18 (t, C-5), 51.32 (d, C-4), 66.56 (t, Bn-H), 128.39 + 128.72 (d, 4 Ar-H), 135.97 (s, Ar-q), 172.78 (s, C-1)

Drehwert:  $[\alpha]_D^{20} = -7.84^\circ$  (c = 2.8, CHCl<sub>3</sub>)

MS (EI, 70 eV) [m/z]: 39 (25), 40 (4), 41 (24), 42 (10), 43 (22), 44 (6), 50 (3), 51 (10), 52 (3), 53 (2), 54 (12), 55 (30), 56 (8), 57 (10), 58 (8), 63 (6), 65 (26), 71 (5), 72 (3), 77 (13), 78 (3), 79 (15), 82 (6), 85 (33), 89 (8), 90 (9), 91 (100), 92 (9), 99 (3), 100 (31), 101 (3), 105 (21), 106 (5), 107 (40), 108 (10), 206 (1, M<sup>+</sup>)

**(4R)-Benzyl 4,5-epoxypentanoat (88)**

Es wurden 2.70 g (10.0 mmol) (*R*)-(-)- $\gamma$ -Tosyloxymethyl- $\gamma$ -butyrolacton (**87**) unter Argonatmosphäre in ca. 250 mL trockenem THF gelöst. Nach der Zugabe von 1.10 g (10.2 mmol) Benzylalkohol wurden unter Rühren bei -78 °C langsam 6.5 mL einer 1.6 M Lösung aus *n*-BuLi in Hexan zugetropft. Die Reaktionslösung wurde weitere 3 h lang gerührt und langsam auf 0 °C erwärmt. Es wurden 250 mL einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung zugegeben und auf Raumtemperatur erwärmt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen zweimal mit je 50 mL einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung und einmal mit 50 mL einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Das Rohprodukt wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittel Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis 8:1 gereinigt. Es wurden 1.43 g (6.94 mmol, 69.4 %) eines farblosen Öls als Produkt erhalten.

NMR-spektroskopische Daten entsprechen denen des (*S*)-Enantiomers.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +9.95^\circ$  (c = 2.1, CHCl<sub>3</sub>)

**MS (EI, 70 eV)[m/z]:** 39 (43), 40 (6), 41 (18), 42 (8), 43 (10), 44 (2), 50 (5), 51 (12), 52 (3), 53 (3), 54 (6), 55 (17), 56 (4), 57 (6), 58 (3), 63 (8), 65 (29), 71 (6), 77 (21), 78 (4), 79 (13), 82 (5), 85 (22), 89 (10), 91 (100), 92 (6), 100 (16), 105 (14), 107 (21), 108 (3), 206 (1, M<sup>+</sup>)

**(S)-(+)-(6Z)-Dodec-6-en-4-olid (18)**

Eine Lösung von 3.12 g (13.9 mmol) (1Z)-1-Heptynyliodid (**81**) in 150 mL trockenem Diethylether wurde auf -78 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden langsam 8.2 mL (13 mmol) 1.6 M *n*-BuLi in *n*-Hexan getropft und 30 min. lang gerührt. In einem weiteren Kolben wurden 1.05 g (5.51 mmol) trockenes CuI in ca. 300 mL trockenem Diethylether vorgelegt und ebenfalls auf -78 °C gekühlt. Das intermediär entstandene (1Z)-1-Lithium-1-hepten wurde langsam bei -78 °C in die CuI-Suspension gegeben. Es wurde 1 h lang gerührt, wobei die Temperatur unter -40 °C gehalten wurde. Schließlich wurden 1.14 g (5.51 mmol) (4S)-Benzyl 4,5-epoxypentanoat (**88**) in 50 mL abs. Et<sub>2</sub>O langsam zugetropft und anschließend 4 h bei unter -40 °C gerührt, bis eine schwarz-braune Suspension entstanden war. Es wurde bis auf Raumtemperatur erwärmt. Nach der Zugabe von ca. 200 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung wurde die Suspension filtriert, die wässrige Phase dreimal mit 50 mL Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen zweimal mit einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittel Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis 9:1 gereinigt. Es wurden 615 mg (3.13 mmol, 56.8 %) Produkt als gelblich ölige Flüssigkeit erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 0.88 (t, 3H, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, H-12), 1.22-1.39 (m, 6H, H-9, H-10, H-11), 1.84-1.94 (m, 1H, H-3a), 2.02 (q, 2H, J=7.2 Hz, H-8), 2.25-2.32 (m, 1H, H-3b), 2.35-2.42 (m, 1H, H-5a), 2.45-2.54 (m, 3H, H-2, H-5b), 4.51 (quin, 1H, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, H-4), 5.31-5.37 (m, 1H, H-6), 5.53-5.59 (m, 1H, H-6)

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 14.13 (C-12), 22.61 (C-10), 27.23 (C-3), 27.51 (C-8), 28.84 (C-2), 29.22 (C-9), 31.56 (C-11), 32.98 (C-5), 80.37 (C-4), 122.27 (C-6), 134.29 (C-7), 177.22 (C-1)

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +16.5^\circ$  (c = 1.3, MeOH)

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (26), 41 (49), 42 (7), 43 (7), 51 (2), 53 (8), 54 (11), 55 (11), 56 (7), 57 (12), 65 (2), 67 (7), 68 (3), 69 (3), 77 (3), 79 (5), 81 (6), 85 (100), 86 (4), 93 (3), 96 (6), 196 (1), 197 (1)

**(R)-(-)-(6Z)-Dodec-6-en-4-olid (18)**

Zu einer Lösung aus 2.1 g (9 mmol) (1Z)-1-Heptenyliodid (**81**) in 30 mL Diethylether wurden bei -78 °C 6 mL (9 mmol) einer 15 %igen Lösung von *n*-BuLi in *n*-Hexan langsam getropft und die gelbe Reaktionslösung 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Die Lösung wurde zu einer braunen Suspension von 0.9 g (4.8 mmol) CuI in 90 mL Diethylether bei -78 °C gegeben und 30 min lang bei dieser Temperatur gerührt. Zu dem Reaktionsgemisch wurde über einen Tropftrichter eine Lösung von 0.89 g (4.32 mmol) (4*R*)-Benzyl 4,5-epoxypentanoat (**88**) in 25 mL Diethylether bei -78 °C langsam getropft und anschließend über 90 min auf -20 °C erwärmt. Zu dem dunkelbraunen Reaktionsgemisch wurden 200 mL gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung gegeben und über Nacht hydrolysiert. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Petrolether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je dreimal mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Laufmittelgradienten Petrolether/Ethylacetat von 8:1 zu 6:1 gereinigt. Es wurden 370 mg (1.88 mmol, 42 %) Produkt als stark riechendes Öl erhalten.

NMR-spektroskopische Daten entsprechen denen des (*S*)-Enantiomers.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -16.8^\circ$  (c = 1.2, MeOH)

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (13), 41(22), 42 (3), 53 (5), 54 (9), 55 (11), 56 (3), 57 (11), 67 (6), 69 (3), 79 (4), 80 (3), 81 (5), 85 (100), 86 (4), 96 (7), 136 (3), 196 (2)

## Spezieller Teil - Fischfaktor

### Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV1):

#### Asymmetrische Dihydroxylierung nach Sharpless

Das Alken wird in Wasser und *tert*-Butanol im Verhältnis 1:1 suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Der AD-Mix- $\alpha$  bzw  $\beta$  und Methansulfonsäureamid wird unter Eiskühlung zugesetzt. Dabei entsprechen 1.4 g AD-Mix einem mmol Alken als Edukt der Dihydroxylierung. Der Reaktionsmischung wird nach 72 Stunden Reaktionsdauer bei 0 - 4 °C Natriumpyrosulfit zugesetzt und daraufhin eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit Ethylacetat versetzt, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase fünfmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert.

### Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV2):

#### Hydrierung mit Lindlar Katalysator

Chinolin wird bei 110 °C im Wasserstrahlvakuum (~15-20 mbar) frisch destilliert. 2-3 Tropfen des frisch destillierten Chinolins und eine Spatelspitze Lindlarkatalysator werden zu dem in Ethanol gelösten Dihydroxyalkin zugesetzt. Die Atmosphäre des Reaktionsansatzes wird dreimal mit Wasserstoff gespült, mit Wasserstoff gesättigt und es wird unter Normaldruck bei Raumtemperatur hydriert. Nach abgeschlossener Reduktion wird der Katalysator durch Säulenfiltration an Kieselgel abgetrennt.

#### Darstellung des Oxidationsmittels $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ auf Celite

Es wurden 15 g Celite mit salzsaurem Methanol (10 Vol. % konz. HCl) gewaschen, filtriert und anschließend erneut mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Das Celite wurde anschließend 6 Stunden bei 120 °C getrocknet, zu einer Lösung aus 17 g  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  in 100 mL Wasser gegeben und 10 Minuten gerührt. Die Suspension verfärbte sich gelbgrün. Nach Filtration unter vermindertem Druck wurde der Rückstand 5 Stunden im Vakuum getrocknet. Vor dem Einsatz als Oxidationsmittel wurde ein Teil des Reagenz entnommen und Wasserreste mit Toluol am Wasserabscheider entfernt. Von dem fertigen Reagenz entsprechen 0.57 g 1 mmol  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ .

### 1-Undec-2-enylbromid (111)

In 100 mL abs. DCM wurden unter Argonatmosphäre 7.05 g (25 mmol) Triphenylphosphin gelöst und 1.33 mL (4.16 g, 26.0 mmol) Brom zugetropft. Es bildete sich eine orangefarbene Suspension mit einem weißen Feststoff. Zu dieser Suspension wurde solange Triphenylphosphin zugegeben, bis ein Farbumschlag von orange nach gelbweiß beobachtet wurde. Langsam wurden zu der Suspension 5.0 mL (4.25 g, 25.0 mmol) *E*-2-Undecen-1-ol (112) hinzugegeben. Es konnte eine Klärung der Suspension beobachtet werden, und es bildete sich eine gelbe Lösung. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionslösung wurde 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es bildete sich eine schwarz-braune Lösung. Zu der Lösung wurden 50 mL einer gesättigten Natriumcarbonatlösung und 50 mL Petrolether gegeben. Die Phasen wurden getrennt, es wurde dreimal mit 50 mL Petrolether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Laufmittel Petrolether gereinigt. Es wurden 5.71 g (24.6 mmol, 98 % Ausbeute bezogen auf 115) 1-Undec-2-enylbromid (114) als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0.60$  (Petrolether)

$^1\text{H-NMR}$  [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ [ppm]: 0.88 (t, 3H,  $^3J = 7.3$  Hz, H-11); 1.21-1.45 (m, 10H, H-6-H-10); 1.50-1.60 (m, 2H, H-5); 2.01-2.09 (m, 2H, H-4); 3.95 (d, 2H,  $^3J = 7.3$  Hz, H-1); 5.64-5.72 (m, 1H, H-3); 5.74-5.81 (m, 1H, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$  [101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ [ppm]: 14.46 (q, C-11); 22.81 (t, C-10); 28.95, 29.26, 29.39, 29.55, (t, 4C, C-5, C-6, C-7, C-8); 32.22 (t, C-9); 32.01 (t, C-4); 33.86 (t, C-1); 126.36 (d; C-2); 136.98 (d; C-3).

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 38 (2), 39 (45), 40 (9), 41 (99), 42 (14), 43 (60), 51 (5), 52 (4), 53 (36), 54 (48), 55 (96), 56 (11), 57 (32), 65 (6), 66 (3), 67 (32), 68 (9), 69 (77), 70 (9), 71 (19), 77 (4), 79 (8), 81 (12), 82 (5), 83 (97), 84 (7), 85 (5), 95 (6), 96 (2), 97 (100), 98 (8), 109 (2), 111 (24), 112 (2), 133 (2), 135 (3), 153 (1), 232 (1), 234 (1).

### **Tetradec-2-in-5-ensäureethylester (109)**

Es wurden 16.8 g (51.6 mmol) Cäsiumcarbonat, 8.16 g (49.2 mmol) Kaliumiodid und 5.15 g (27.1 mmol) Kupferiodid in 150 mL *N,N*-Dimethylformamid suspendiert. Zu dieser Suspension wurden 2.52 mL (2.44 g, 24.8 mmol) Propiolsäureethylester (**110**) und 5.71 g (24.5 mmol) 1-Undec-2-enylbromid (**111**) unter Eiskühlung langsam zugegeben. Dabei verfärbte sich die Suspension von gelb zu braunorange. Das Reaktionsgemisch wurde weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 150 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung sowie 150 mL Petrolether / Ethylacetat 15:1 versetzt. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase fünf Mal mit jeweils 100 mL Petrolether/Ethylacetat 15:1 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 150 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Laufmittelgradienten Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis von 40:1 zu 15:1 gereinigt. Es wurden 5.15 g **109** als gelbes Öl erhalten (20.6 mmol, 83 % Ausbeute bezogen auf **111**).

$R_f = 0.18$  (Petrolether/Ethylacetat 4:1);  $0.30$  (Petrolether: Ethylacetat 20:1)

**$^1\text{H-NMR}$  [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ [ppm]:** 0.88 (t, 3H,  $^3J = 6.9$  Hz, H-14); 1.24-1.33 (m, 13H, H-8-H-13,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O-}$ ); 1.99-2.02 (m, 2H, H-7); 3.03-3.06 (m, 2H, H-4); 4.20-4.25 (t, 2H,  $^3J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O-}$ ); 5.31-5.40 (m, 1H, H-5); 5.63-5.75 (m, 1H, H-6).

**$^{13}\text{C-NMR}$  [101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ [ppm]:** 14.24 (q, C-14); 14.35 (q,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O-}$ ); 22.05 (t, C-4); 22.81, 29.23, 29.32, 29.40, 29.58, 32.03 (t, C-8-C-13); 32.44 (t, C-7); 61.97 (t,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O-}$ ); 74.47 (s, C-2); 87.00 (s, C-3); 121.18 (d, C-5); 134.41 (d, C-6); 171 (s, C-1) (aus HMBC).

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 38 (3), 39 (30), 40 (6), 41 (95), 42 (15), 43 (80), 44 (3), 45 (5), 50 (3), 51 (13), 52 (11), 53 (20), 54 (11), 55 (65), 56 (17), 57 (36), 63 (5), 64 (3), 65 (29), 66 (21), 67 (35), 68 (7), 69 (26), 70 (10), 71 (5), 76 (2), 77 (57), 78 (30), 79 (91), 80 (15), 81 (27), 82 (7), 83 (16), 84 (18), 85 (3), 86 (3), 90 (3), 91 (47), 92 (13), 93 (33), 94 (10), 95 (23), 96 (6), 97 (27), 98 (4), 103 (3), 105 (29), 106 (17), 107 (24), 108 (6), 109 (7), 110 (7), 111 (26), 112 (14), 114 (2), 117 (2), 119 (26), 120 (10), 121 (12), 122 (4), 123 (30), 124 (41), 125 (19), 126 (4), 133 (15), 134 (5), 135 (7), 136 (2), 137 (13), 138 (10), 139 (16), 140 (3), 147 (9), 148 (3), 149 (2), 151 (10), 152 (100), 153 (26), 154 (3), 161 (7), 162 (2), 165 (10), 166 (5), 175 (5), 177 (2), 179 (5), 193 (3), 205 (37), 206 (6), 221 (2), 250 (0.3), 251 (0.4)

### **(S,S)-5,6-Dihydroxytetradec-2-insäureethylester (108)**

Die Durchführung erfolgte nach der AAV1: Es wurden 1.00 g (4.00 mmol) Tetradec-2-in-5-ensäureethylester (**109**), 5.59 g AD-Mix- $\alpha$ , und 379 mg (4 mmol) Methansulfonsäureamid in 25 mL Wasser und *tert*-Butanol eingesetzt. Nach 72 Stunden wurden 5.21 g Natriumpyrosulfit zugegeben und eine Stunde gerührt. Zur Reaktionsmischung wurden 10 mL Ethylacetat gegeben, die organische Phase abgetrennt und die wässrige fünf Mal mit jeweils 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Laufmittelgradienten Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis von 3:1 zu 1:1 gereinigt. Es wurden 448 mg 5,6-Dihydroxytetradec-2-in-säureethylester (**111**) (1.59 mmol, 40 % Ausbeute bezogen auf **112**) als farbloser Feststoff erhalten

**Schmelzpunkt:** 69 °C.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +14.5^\circ$  (c = 0.005, CHCl<sub>3</sub>)

$R_f = 0.15$  (Petrolether/Ethylacetat 1:2)

**<sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$ [ppm]:** 0.88 (t, 3H, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, H-14); 1.02-1.72 (m, 17H, H-7-H-13, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O-); 1.97-2.41 (m, 2H, H-4); 3.52-3.64 (m, 1H, H-6); 3.64-3.76 (m, 1H, H-5); 4.07-4.28 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O-).

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$ [ppm]:** 14.17 (q, C-14); 14.22 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O); 24.56 (t, C-13), 25.70 (t, C-4); 29.24, 29.38, 29.65, 29.71, 32.00, 33.80 (t, C-7-C-12); 62.14 (t, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O); 71.85 (d, C-5), 73.18 (d, C-6), 74.24 (s, C-2); 85.46 (s, C-3); 154 (s, C-1) (aus HMBC).

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 38 (4), 39 (31), 40 (10), 41 (77), 42 (22), 43 (66), 44 (14), 45 (12), 47 (2), 51 (3), 52 (3), 53 (10), 54 (5), 55 (62), 56 (12), 57 (37), 58 (5), 59 (23), 60 (8), 65 (3), 66 (22), 67 (42), 68 (92), 69 (74), 70 (29), 71 (16), 72 (11), 73 (8), 77 (3), 79 (10), 80 (4), 81 (18), 82 (4), 83 (19), 84 (42), 85 (23), 86 (100), 87 (7), 91 (3), 93 (4), 94 (5), 95 (44), 96 (23), 97 (30), 98 (9), 99 (32), 100 (3), 107 (4), 109 (3), 111 (21), 112 (72), 113 (49), 114 (19), 115 (4), 121 (5), 123 (4), 125 (14), 126 (3), 130 (3), 135 (2), 137 (2), 139 (3), 141 (10), 142 (20), 143 (5), 155 (6), 167 (2), 173 (5), 193 (3), 239 (2), 266 (1.0), 284 (0.3)

**(R,R)-5,6-Dihydroxytetradec-2-ensäureethylester (108)**

Die Durchführung erfolgte nach der AAV 1: Es wurden 1.50 g (7.20 mmol) Tetradec-2-in-5-ensäureethylester (**109**), 10.08 g AD-Mix- $\beta$  und 684 mg (0.68 mmol) Methansulfonsäureamid in jeweils 40 mL Wasser und *tert*-Butanol eingesetzt. Nach 48 Stunden wurden 10.0 g Natriumpyrosulfit zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 mL Ethylacetat versetzt, die organische Phase abgetrennt und fünf Mal mit jeweils 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittel Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis 2:1 gereinigt. Es wurden 1.33 g (*R,R*)-5,6-Dihydroxytetradec-2-ensäureethylester (**108**) (5.49 mmol, 76 % Ausbeute bezogen auf **109**) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmelzpunkt:** 72 °C

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -16.8^\circ$  (c = 0.01, CHCl<sub>3</sub>)

$R_f = 0.15$  (Petrolether/Ethylacetat 1:2)

NMR-spektroskopische und massenspektrometrische Daten entsprechen denen des (*S*)-Enantiomers.

**(S,S)-6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (F56)**

Die Durchführung erfolgte nach der AAV 2: Es wurden 60,4 mg (24,8  $\mu$ mol) 5,6-Dihydroxytetradec-2-ensäureethylester (**108**) eingesetzt und 12 Stunden lang bei Raumtemperatur hydriert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Laufmittelgradienten Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis von 4:1 zu 1:1 gereinigt. Es wurden 52,26 mg (21,77  $\mu$ mol, 88 %) eines farblosen Öls erhalten.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +15.5^\circ$  (c = 0.0094, CHCl<sub>3</sub>)

$R_f = 0.33$  (Petrolether/Ethylacetat 1:1)

**<sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 0.88 (t, 3H, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, H-14); 1.53-1.63 (m, 12H, H-8-H-13); 1.63-1.73 (m, 2H, H-7); 1.75 (s, br., 1H, -OH); 2.25-2.33 (m, 1H, H-4a); 2.57-2.66 (m, 1H, H-4b); 3.62-3.66 (m, 1H, H-6); 4.31-4.37 (m, 1H, H-5); 6.01-6.04 (m, 1H, H-2); 6.90-6.92 (m, 2H, H-3).

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 14.22 (q, C-14); 22.79, 29.38, 29.63, 29.67, 32.00 (t, C-9-C-13); 25.60 (t, C-8); 26.17 (t, C-4); 32.80 (t, C-7); 72.75 (d, C-6); 80.61 (d, C-5); 121.24 (d, C-2); 145.50 (d, C-3); 163.86 (s, C-1).

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (9), 40 (4), 41 (24), 42 (10), 43 (10), 44 (4), 53 (3), 55 (12), 57 (7), 67 (2), 68 (6), 69 (13), 70 (16), 81 (4), 83 (3), 97 (34), 98 (100), 99 (7), 109 (0.9), 127 (1.1), 141 (0.6), 240 (0.1), 241 (0.1)

#### **(R,R)-6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (F56)**

Die Durchführung erfolgte nach der AAV 2: Es wurden 100 mg (35,2 μmol) 5,6-Dihydroxytetradec-2-insäureethylester (**108**) eingesetzt und 15 Stunden bei Raumtemperatur hydriert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Laufmittelgradienten Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis von 4:1 zu 3:1 gereinigt. Es wurden 73 mg (30,4 μmol, 86 %) eines farblosen Öls erhalten.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -17.5^\circ$  (c = 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

**R<sub>f</sub>** = 0.08 (Petrolether/Ethylacetat 2:1)

NMR-spektroskopische und massenspektrometrische Daten entsprechen denen des (S,S)-Enantiomers.

## 2-(Tetradec-5'-en-2'-inyloxy)-tetrahydropyran (**116**)

2.04 g (14.6 mmol, 1.1 eq) 2-(Prop-2'-inyloxy)tetrahydropyran (**117**) wurden unter Rühren in abs. Tetrahydrofuran (25 mL) gelöst und auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Es wurden 9.1 mL (14.6 mmol, 1.1 eq) einer 1.6 M Butyllithiumlösung in Hexan zugegeben und die Reaktionslösung unter Rühren langsam von  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurden 3.08 g (13.2 mmol) Undec-2-enylbromid (**111**) hinzugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung verfärbte sich beim Erwärmen auf  $50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$  über zwei Stunden von gelb- nach orangefarben. Es wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und 30 mL einer gesättigten Ammoniumchloridlösung unter Bildung eines weißen Niederschlags zugegeben. Es wurde gesättigte Natriumchlorid-Lösung zugegeben bis sich der weiße Niederschlag vollständig gelöst hatte und sich die Phasen trennten. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 50 mL Ethylacetat und einmal mit 50 mL Petrolether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Laufmittelgradienten Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis von 6:1 zu 4:1 gereinigt. Es wurden 3.07g (10.5 mmol, 79 %) eines gelblichen Öls an **116** erhalten. Weiterhin wurden 560 mg (2.40 mmol, 18 %) **111** zurück gewonnen.

$R_f = 0.45$  (Petrolether/Ethylacetat 4:1)

$^1\text{H-NMR}$  [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ [ppm]: 0.88 (t, 3H,  $^3J_{\text{H}14'-\text{H}13'} = 6.9\text{ Hz}$ , H-14'); 1.21-1.31 (m, 10H, H-9', H-10', H-11', H-12', H-13'); 1.31-1.40 (m, 2H, H-8'); 1.47-1.66 (m, 6H, H-3-H-5); 1.97-2.03 (m, 2H, H-7'); 2.92-2.96 (m, 2H, H-4'); 3.88-3.81 (m, 1H, H-6a); 3.50-3.56 (m, 1H, H-6b); 4.23 (m, 1H, H-1a'); 4.32 (m, 1H, H-1b'); 4.82 (dd, 1H,  $^3J_{\text{H}2-\text{H}3} = 3.2\text{ Hz}$ , H-2); 5.38 (ttd, 1H,  $^4J_{\text{H}5'-\text{H}7'} = 1.3\text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H}5'-\text{H}4'} = 5.6\text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H}5'-\text{H}6'} = 15.1\text{ Hz}$ , H-5'); 5.66 (ttd, 1H,  $^4J_{\text{H}6'-\text{H}4'} = 1.6\text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H}6'-\text{H}7'} = 6.8\text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H}6'-\text{H}5'} = 15.1\text{ Hz}$ , H-6').

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 14.26 (q, 1C, C-14'); 19.27 (t, 1C, C-4); 22.24 (t, 1C, C-4'); 25.54 (t, 1C, C-5); 32.04, 29.45, 29.41, 29.36, 22.83 (t, 5C, C-9', 10', 11', 12', 13'); 29.62 (t, 1C, C-8'); 30.44 (t, 1C, C-3); 32.43 (t, 1C, C-7'); 54.81 (t, 1C, C-1'); 62.14 (t, 1C, C-6); 77.51 (s, 1C, C-2'); 84.34 (s, 1C, C-3'); 96.87 (d, 1C, C-2); 123.73 (d, 1C, C-5'); 132.68 (d, 1C, C-6').

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (13), 41 (42), 42 (6), 43 (29), 51 (4), 52 (5), 53 (8), 54 (3), 55 (46), 56 (12), 57 (24), 65 (13), 66 (4), 67 (38), 68 (5), 69 (19), 70 (3), 71 (3), 77 (31), 78 (18), 79 (73), 80 (19), 81 (29), 82 (6), 83 (13), 85 (100), 86 (4), 91 (66), 92 (22), 93 (68), 94 (16), 95 (21), 96 (6), 97 (4), 101 (10), 103 (8), 105 (19), 106 (12), 107 (28), 108 (5), 109 (10), 110 (4), 119 (10), 120 (3), 121 (14), 122 (2), 123 (4), 133 (6), 135 (6), 147 (4), 190 (9), 292 (0.03 M+).

#### **Tetradec-5-en-2-in-ol (115)**

3.07 g (10.5 mmol) 2-(Tetradec-5'-en-2'-inyloxy)-tetrahydropyran (**116**) wurden in 100 mL Methanol gelöst und eine Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt. Anschließend wurden drei Spatelspitzen Natriumcarbonat zugegeben und das Lösungsmittel bis auf ca. 50 mL am Rotationsverdampfer eingengt. Zu der Reaktionslösung wurden 100 mL Wasser und 100 mL Ethylacetat:Petrolether 1:1 gegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase viermal mit je 100 mL Ethylacetat/Petrolether 1:1 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 100 mL Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 100 mL Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittel Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis 4:1 gereinigt. Es wurden 1.96 g (9.40 mmol, 90 %) eines gelblichen Öles erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 0.88 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>H14-H13</sub> = 6.9 Hz, H-14); 1.20-1.34 (m, 10H, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13); 1.34–1.40 (m, 2H, H-8); 1.55 (br, 1H, -OH); 2.01 (tdd, 2H, <sup>4</sup>J<sub>H5-H7</sub> = 1.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H6-H7</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H7-H8</sub> = 6.8 Hz, H-7); 2.92-2.96 (m, 2H, H-4); 4.28 (t, 2H, <sup>5</sup>J<sub>H1-H4</sub> = 2.0 Hz, H-1); 5.38 (ttd, 1H, <sup>4</sup>J<sub>H5-H7</sub> = 1.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5-H4</sub> = 5.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5-H6</sub> = 15.2 Hz, H-5); 5.66 (ttd, 1H, <sup>4</sup>J<sub>H6-H4</sub> = 1.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H6-H7</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H6-H5</sub> = 15.2 Hz, H-6).

<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]: 14.10 (q, 1C, C-14); 22.00 (t, 1C, C-4); 29.36 (t, 1C, C-8); 22.82, 29.40, 29.42, 29.61, 32.04, (t, 5C, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13); 32.44 (t, 1C, C-7); 51.60 (t, 1C, C-1); 79.97 (s, 1C, C-2); 84.34 (s, 1C, C-3); 123.61 (d, 1C, C-5); 132.81 (d, 1C, C-6).

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (40), 40 (8), 41 (100), 42 (14), 43 (69), 44 (3), 50 (3), 51 (10), 52 (7), 53 (26), 54 (22), 55 (75), 56 (18), 57 (40), 63 (3), 65 (22), 66 (19), 67 (54), 68 (15), 69 (34), 70 (14), 71 (8), 77 (41), 78 (25), 79 (81), 80 (22), 81 (81), 82 (20), 83 (30), 84 (7), 85 (2), 91 (85), 92 (23), 93 (39), 94 (14), 95 (57), 96 (17), 97 (11), 98 (3), 103 (3), 105 (34), 106 (14), 107 (19), 108 (6), 109 (28), 110 (10), 111 (2), 117 (2), 119 (24), 120 (6), 121 (12), 122 (2), 123 (9), 124 (3), 133 (20), 134 (4), 135 (5), 137 (4), 147 (14), 148 (2), 161 (5), 177 (2), 190 (0.9), 208 (0.1).

#### **(S,S)-Tetradec-2-in-1,5,6-triol (114)**

Durchführung nach AAV1: 21,1 g (15.1 mmol) AD-Mix-α wurden in 120 mL Wasser / *tert*-Butanol (1:1) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Daraufhin wurden 1.43 g (15.1 mmol) Methansulfonsäureamid, sowie 2.90 g (13.9 mmol) Tetradec-5-en-2-in-1-ol (**115**) zugegeben und bei 0 °C 72 Stunden gerührt. Anschließend wurden unter Eiskühlung vorsichtig 13.2 g (69,3 mmol) Natriumpyrosulfit zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde fünfmal mit jeweils 120 mL Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittel Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis 2:1 gereinigt. Es wurden 2.70 g (11.2 mmol, 80 % Ausbeute bezogen auf **115**) Tetradec-2-in-1,5,6-triol (**114**) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmelzpunkt:** 72 °C

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +41^\circ$  (c = 0.1, EtOH)

**R<sub>f</sub>** = 0.08 (Petrolether/Ethylacetat 1:1)

**<sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 0.88 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>H14-H13</sub> = 6.9 Hz, H-14); 1.22-1.40 (m, 10H, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13); 1.41-1.55 (m, 5H, H-7, H-8, -OH, primär); 2.48-2.55 (m, 2H, H4); 3.57-3.64 (m, 2H, H-5, H-6); 4.25 (s, 1H, H-1).

**<sup>13</sup>C-NMR [101 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ[ppm]:** 14.23 (q, 1C, C-14); 24.55 (t, 1C, C-4); 25.71 (t, 1C, C-8); 22.81, 29.41, 29.68, 29.77, 32.02 (t, 5C, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13); 33.73 (t, 1C, C-7); 51.41 (t, 1C, C-1); 72.39 (d, 1C, C-6); 73.40 (d, 1C, C-5); 81.08 (s, 1C, C-2); 82.53 (s, 1C, C-3).

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (19), 40 (4), 41 (46), 42 (8), 43 (34), 44 (7), 45 (3), 51 (4), 52 (35), 53 (27), 54 (34), 55 (54), 56 (6), 57 (35), 58 (3), 65 (3), 67 (10), 68 (5), 69 (100), 70 (9), 71 (9), 77 (2), 79 (4), 80 (3), 81 (68), 82 (42), 83 (56), 84 (5), 85 (2), 93 (4), 95 (11), 96 (3), 97 (8), 98 (3), 107 (4), 109 (2), 111 (10), 112 (6), 124 (2), 125 (4), 141 (2), 142 (3), 143 (10), 173 (7), 195 (0.7), 206 (0.2), 207 (0.3), 224 (0.1 M<sup>+</sup>).

#### **(R,R)-Tetradec-2-in-1,5,6-triol (114)**

Durchführung nach AAV1: 7.12 g (5.05 mmol) AD-Mix-β wurden in 40 mL Wasser / *tert*-Butanol (1:1) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Daraufhin wurden 480 mg (5.05 mmol) Methansulfonsäureamid, sowie 1.00 g (4.81 mmol) Tetradec-5-en-2-in-1-ol (**115**) zugegeben und bei 0 °C 71 Stunden lang gerührt. Anschließend wurden unter Eiskühlung vorsichtig 4.40 g (23,2 mmol) Natriumpyrosulfid zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde fünfmal mit jeweils 40 mL Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittel Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis 3:1 gereinigt. Es wurden 1.00 g (4.13 mmol, 86 % Ausbeute bezogen auf **115**) an **114** als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmelzpunkt:** 75 °C

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -36^\circ$  (c = 0.1, EtOH)

**R<sub>f</sub>** = 0.08 (Petrolether/Ethylacetat 1:1)

NMR-spektroskopische und massenspektrometrische Daten entsprechen denen des (*S,S*)-Enantiomers.

**(S,S)-Tetradec-2-en-1,5,6-triol (113)**

Durchführung nach AAV 2: Es wurden 2.70 g (11,17 mmol) Tetradec-2-en-1,5,6-triol (114) zwei Stunden hydriert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Laufmittelgradienten Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis von 3:1 zu 1:1 gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff quantitativ erhalten.

**Schmelzpunkt:** 53 °C

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +44^\circ$  (c = 0.1, MeOH)

$R_f = 0.02$  (Petrolether/Ethylacetat 1:1)

**$^1\text{H-NMR}$  [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ [ppm]:** 0.87 (t, 3H,  $^3J_{\text{H14-H13}} = 6.9$  Hz, H-14); 1.15-1.59 (m, 15H, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, -OH, primär); 2.31-2.47 (m, 2H, H-4); 3.42-3.55 (m, 2H, H-5, H-6); 4.00 (s, br., 2H, -OH, sekundär); 4.04-4.23 (s, 1H, H-1); 5.76-5.62 (m, 1H, H-3); 5.76-5.93 (m, 1H, H-2).

**$^{13}\text{C-NMR}$  [101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ [ppm]:** 14.46 (q, 1C, C-14); 21.41, 23.03, 29.40, 29.64, 30.01, 30.05, 32.06, 32.20 (t, 8C, C-4, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13); 60.79 (t, 1C, C-1); 73.80 (d, 1C, C-6); 74.12 (d, 1C, C-5); 130.03 (d, 1C, C-2); 131.44 (d, 1C, C-3).

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (11), 40 (3), 41 (38), 42 (8), 43 (36), 44 (8), 45 (2), 53 (8), 54 (61), 55 (82), 56 (23), 57 (33), 58 (3), 60 (2), 66 (9), 67 (13), 68 (5), 69 (67), 70 (12), 71 (8), 73 (2), 79 (3), 81 (13), 82 (8), 83 (100), 84 (42), 85 (6), 95 (12), 96 (3), 97 (7), 101 (10), 113 (3), 125 (2), 141 (7), 143 (13), 173 (2), 208 (0.3), 226 (0.4), 229 (1.0), 244 (0.1)

**(R,R)-Tetradec-2-en-1,5,6-triol (113)**

Durchführung nach AAV 2: Es wurden 896 mg (3.70 mmol) Tetradec-2-in-1,5,6-triol (**114**) 15 Stunden bei Raumtemperatur hydriert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittel Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis von 1:7 gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff quantitativ erhalten.

**Schmelzpunkt:** 54 °C

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -48^\circ$  (c = 1, CHCl<sub>3</sub>)

**R<sub>f</sub>** = 0.02 (Petrolether/Ethylacetat 2:1)

NMR-spektroskopische und massenspektrometrische Daten entsprechen denen des (S,S)-Enantiomers.

**(S,S)-6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (F56) durch Oxidation**

Es wurden 300 mg (1.23 mmol) (S,S)-Tetradec-2-in-1,5,6-triol (**114**) in 100 mL Toluol mit 700 mg (1.23 mmol) Silbercarbonat versetzt und 13 Stunden unter Rückfluss gerührt. Es wurden 154 mg (0.641 mmol, 51 %) (S,S)-6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (**F56**) erhalten.

**(R,R)-6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (F56) durch Oxidation**

Es wurden 300 mg (1.23 mmol) (R,R)-Tetradec-2-in-1,5,6-triol (**114**) in 100 mL Toluol mit 700 mg (1.23 mmol) Silbercarbonat versetzt und 13 Stunden unter Rückfluss gerührt. Es wurden 88 mg (0.34 mmol, 28 %) (R,R)-6-Hydroxy-5-tetradec-2-enolid (**F56**) erhalten.

### 5,6-Di-O-isopropylidentetradec-2-in-1-ol (118)

Es wurden 215 mg (0.89 mmol) Tetradec-2-in-1,5,6-triol (114) mit 15 mL 2,2-Dimethoxypropan und einer katalytischen Menge PTSA versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde drei Stunden bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit einem Spatel Natriumcarbonat versetzt und im Vakuum auf das halbe Volumen eingengt. Es wurden 20 mL gesättigte Natriumchloridlösung zugegeben, filtriert und das Filtrat mit 20 mL Ethylacetat versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase fünf Mal mit jeweils 20 mL Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittel Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis 1:1 gereinigt. Es wurden 136 mg (0.48 mmol, 54 %) orangefarbiges Öl erhalten.

$R_f = 0.5$  (Petrolether/Ethylacetat 1:1)

**$^1\text{H-NMR}$  [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ [ppm]:** 0.90 (t, 3H,  $^3J_{\text{H14-H13}} = 6.9$  Hz, H-14); 1.20-1.38 (m, 12H, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13); 1.38 (s, 6H,  $-\text{CH}_3$ , isopropyliden); 1.43-1.55 (m, 2H, H-7); 2.52-2.60 (m, 2H, H-4); 3.63-3.78 (m, 2H, H-5); 3.80-3.88 (m, 2H, H-6); 4.29 (s, 1H, H-1).

**$^{13}\text{C-NMR}$  [101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$ [ppm]:** 14.46 (q, 1C, C-14); 23.37 (t, 1C, C-4); 27.41, 27.48 (q, 2C,  $-\text{CH}_3$  isopropyliden); 25.97, 29.91, 30.00, 30.08, 32.94, 33.35 (t, 6C, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13); 51.64 (t, 1C, C-1); 73.47 (s, 1C, C-2); 74.47 (d, 1C, C-3); 80.89 (d, 1C, C-5); 82.73 (s, 1C, C-6); 110.54 (s, 1C,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ , isopropyliden).

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (15), 40 (4), 41 (51), 42 (11), 43 (100), 44 (4), 51 (3), 52 (5), 53 (12), 54 (5), 55 (57), 56 (8), 57 (37), 58 (4), 59 (74), 60 (3), 65 (9), 66 (4), 67 (33), 68 (7), 69 (34), 70 (6), 71 (13), 73 (3), 77 (8), 78 (2), 79 (26), 80 (5), 81 (71), 82 (7), 83 (17), 84 (3), 85 (9), 91 (22), 92 (3), 93 (18), 94 (4), 95 (48), 96 (5), 97 (8), 99 (3), 105 (13), 107 (11), 108 (4), 109 (66), 110 (6), 111 (5), 113 (3), 119 (9), 121 (5), 123 (4), 133 (6), 137 (5), 147 (2), 155 (6), 169 (3), 189 (2), 207 (5), 213 (38), 214 (5), 267 (66), 268 (11), 282 (0.1).

### **5,6-Di-O-isopropylidentetradec-2-en-1-ol (119)**

Die Durchführung erfolgte nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 2: Eine Spatelspitze 5,6-Di-O-isopropylidentetradec-2-en-1-ol (**118**) wurde in diesem Testansatz in 5 mL Ethanol vier Stunden hydriert. Der Umsatz war quantitativ. Das Rohprodukt wurde ausschließlich gaschromatographisch-massenspektrometrisch untersucht.

$R_f = 0.5$  (Petrolether/Ethylacetat 1:1)

**MS (EI, 70 eV) [m/z]:** 39 (16), 40 (5), 41 (68), 42 (15), 43 (100), 44 (5), 53 (9), 54 (14), 55 (58), 56 (14), 57 (41), 58 (7), 59 (96), 60 (3), 65 (4), 66 (5), 67 (40), 68 (9), 69 (43), 70 (19), 71 (21), 77 (5), 79 (20), 80 (4), 81 (52), 82 (10), 83 (42), 84 (20), 85 (17), 91 (6), 93 (21), 94 (6), 95 (58), 96 (10), 97 (14), 98 (5), 99 (7), 107 (11), 109 (12), 110 (3), 111 (9), 113 (7), 121 (9), 123 (4), 124 (3), 125 (2), 127 (2), 135 (5), 137 (11), 141 (11), 155 (29), 156 (4), 169 (3), 191 (2), 209 (3), 213 (97), 214 (14), 269 (45), 270 (8), 284 (5)

# Spektrenanhang

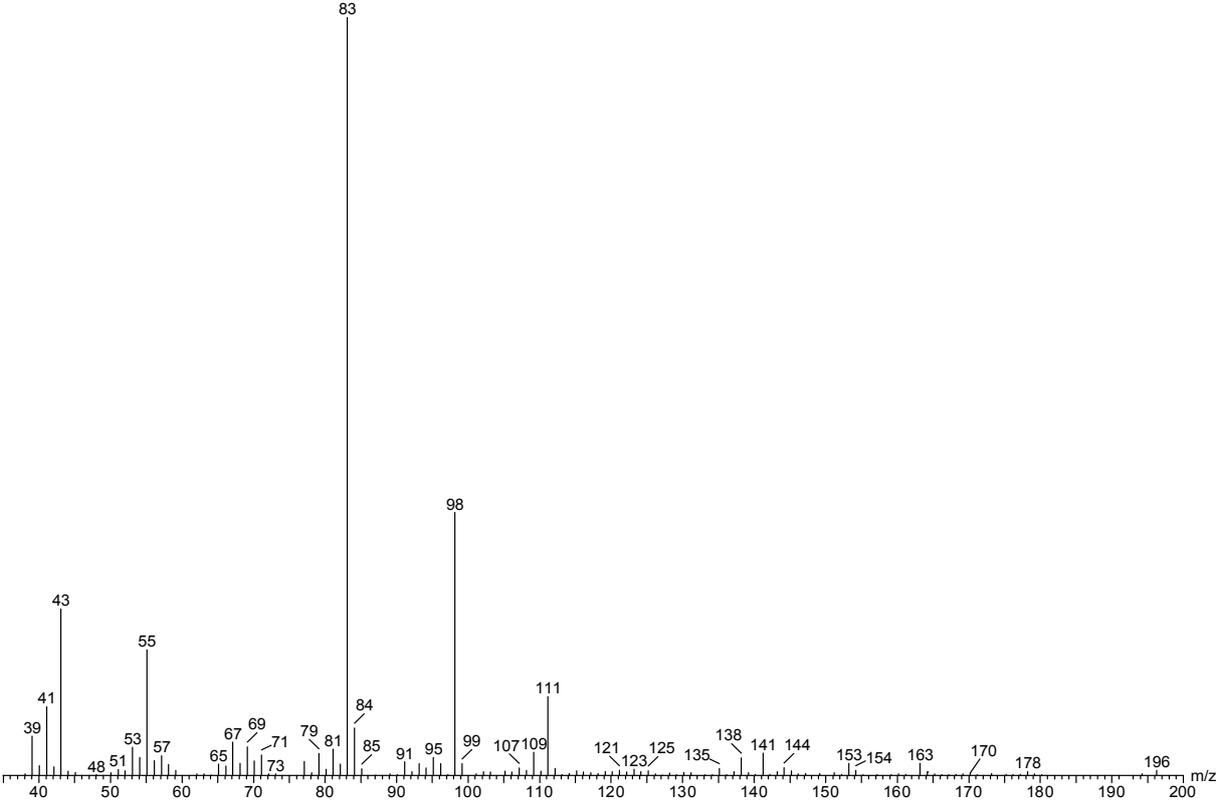


Abbildung 131: Massenspektrum der Substanz F26

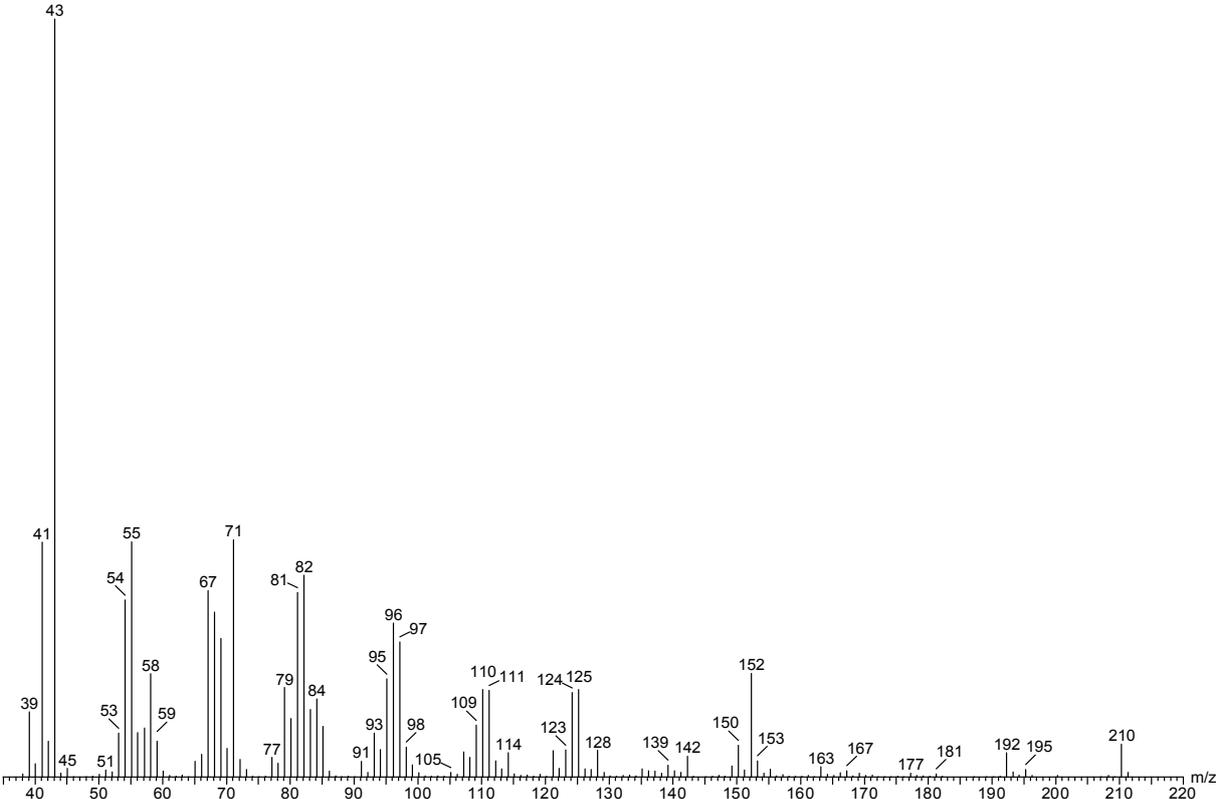


Abbildung 132: Massenspektrum der Substanz F27

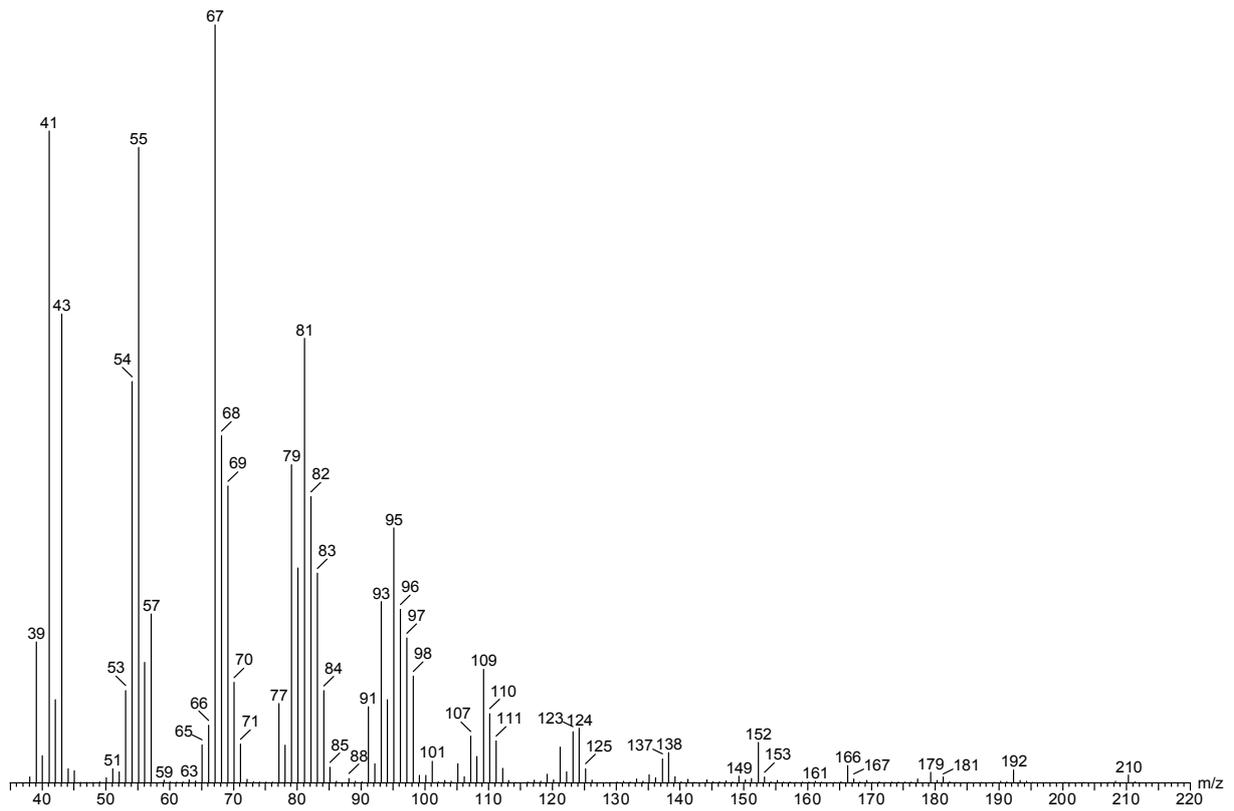


Abbildung 133: Massenspektrum der Substanz F29

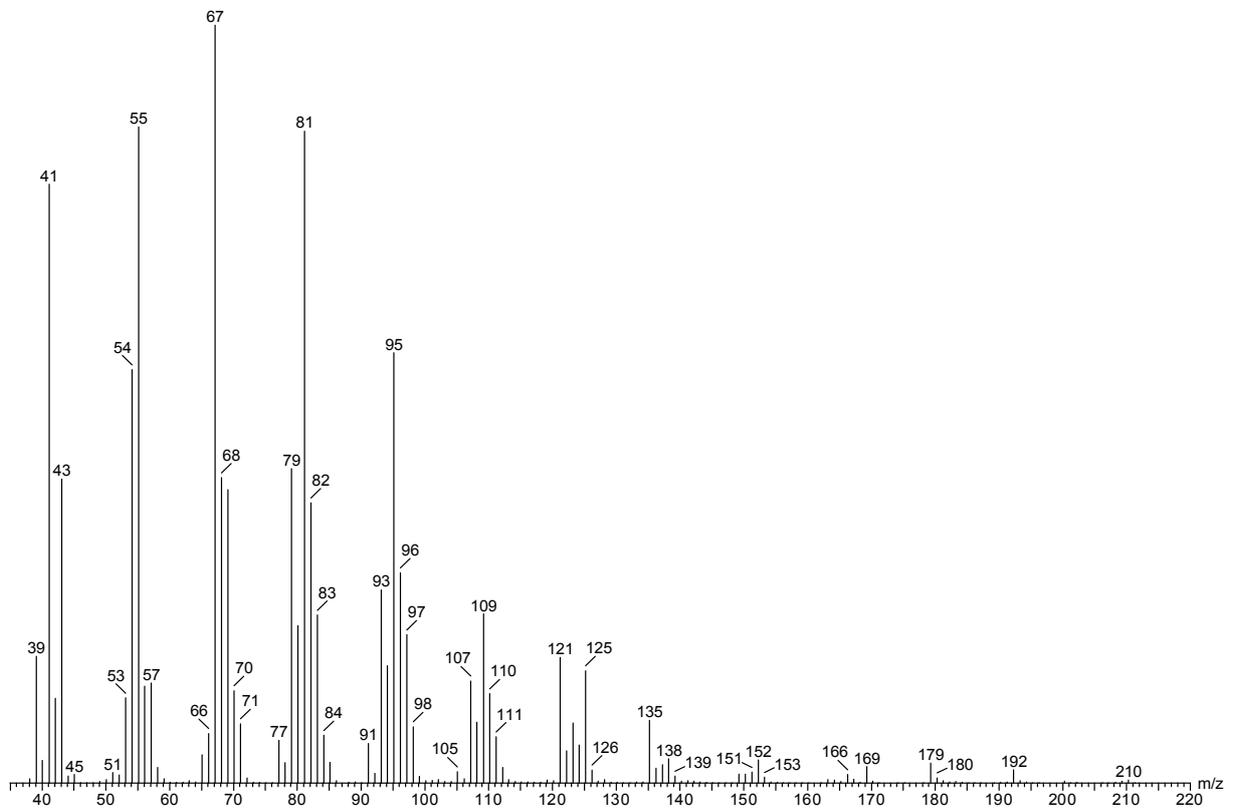


Abbildung 134: Massenspektrum der Substanz F30

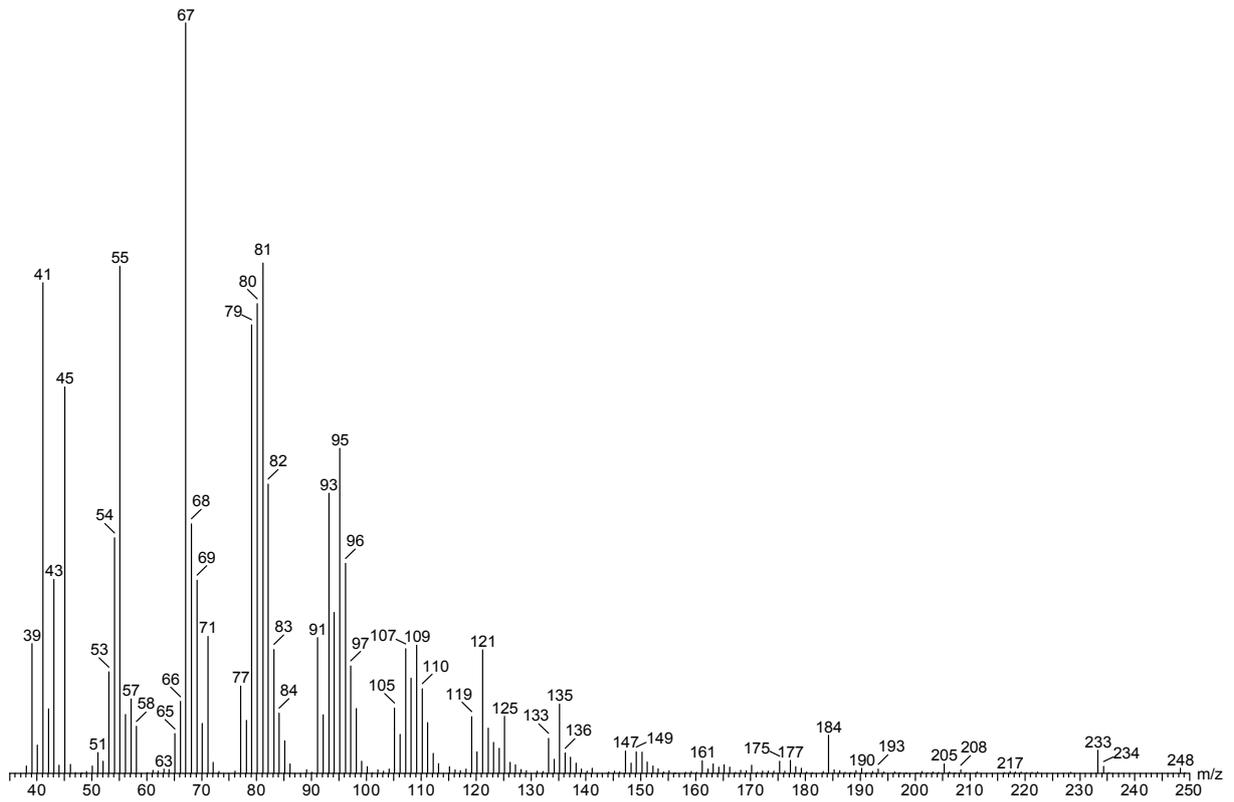


Abbildung 135: Massenspektrum der Substanz **F38**

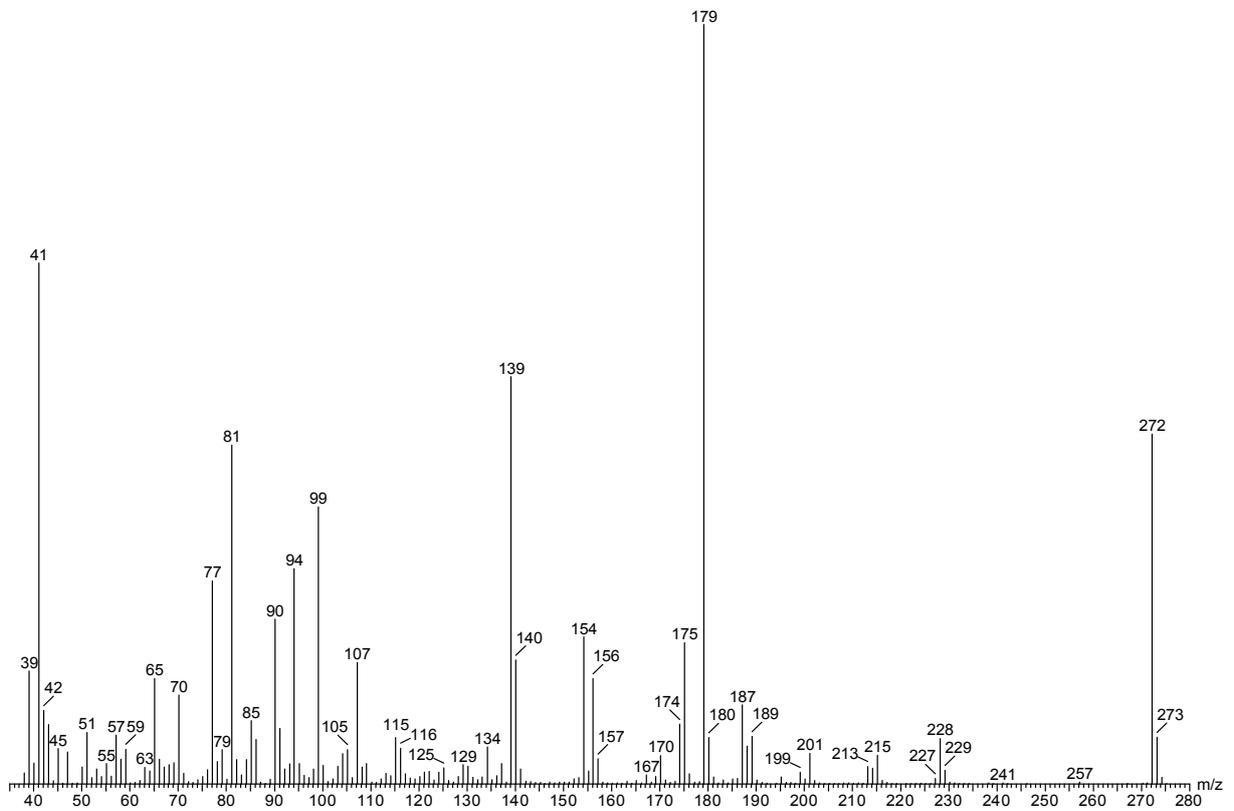


Abbildung 136: Massenspektrum der Substanz **F50**

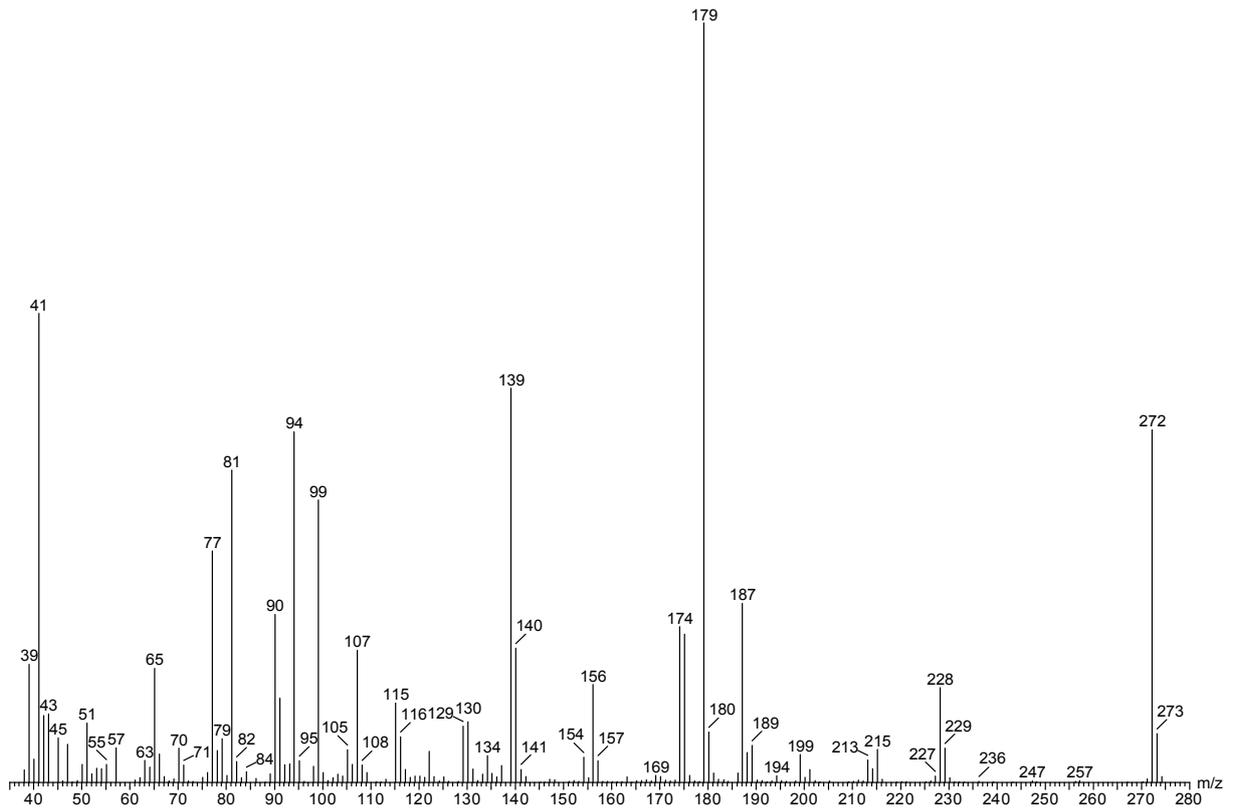


Abbildung 137: Massenspektrum der Substanz **F54**

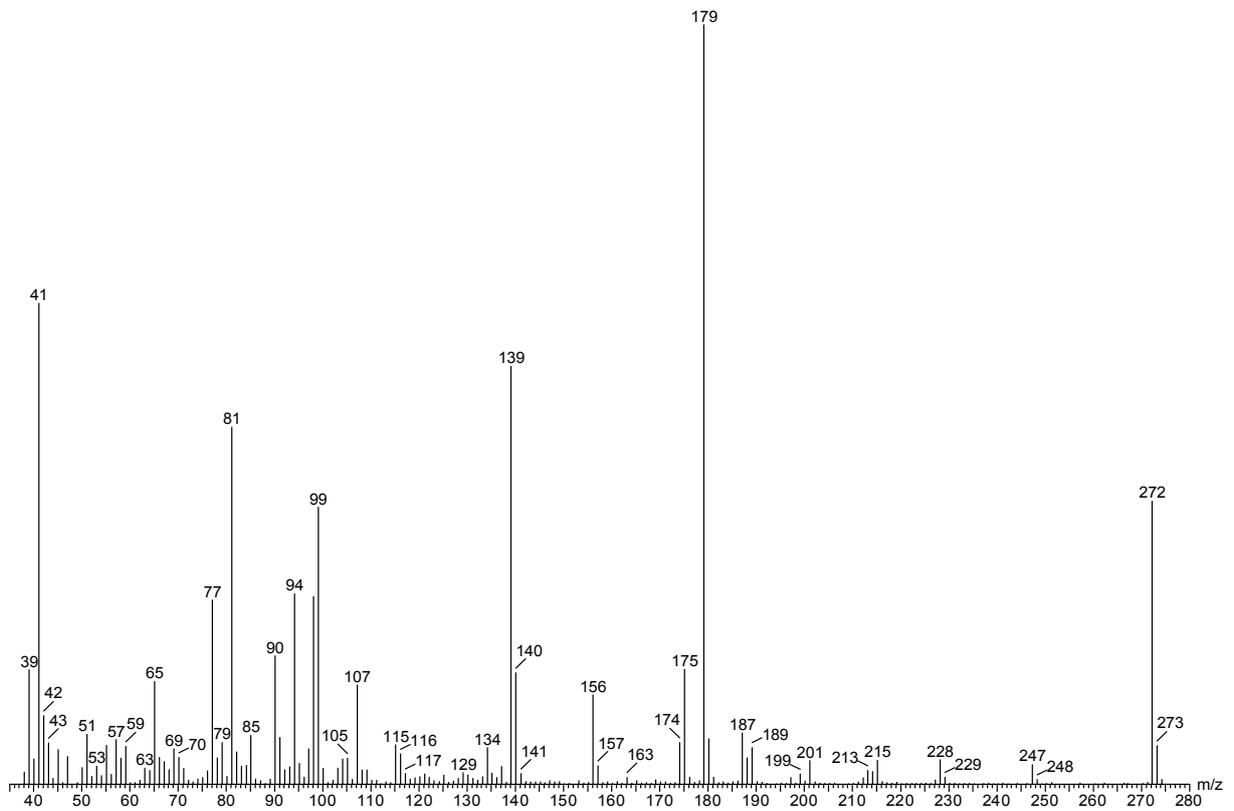


Abbildung 138: Massenspektrum der Substanz **F57**

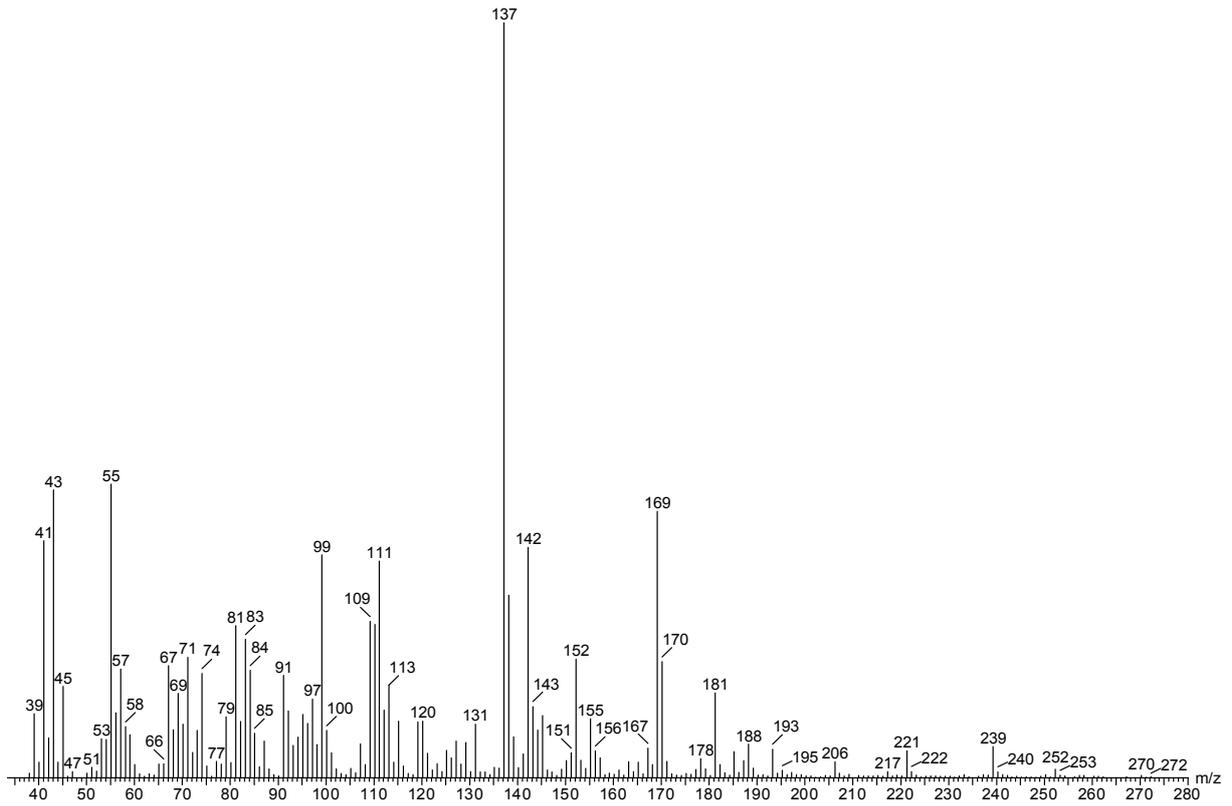


Abbildung 139: Massenspektrum der Substanz **F62**

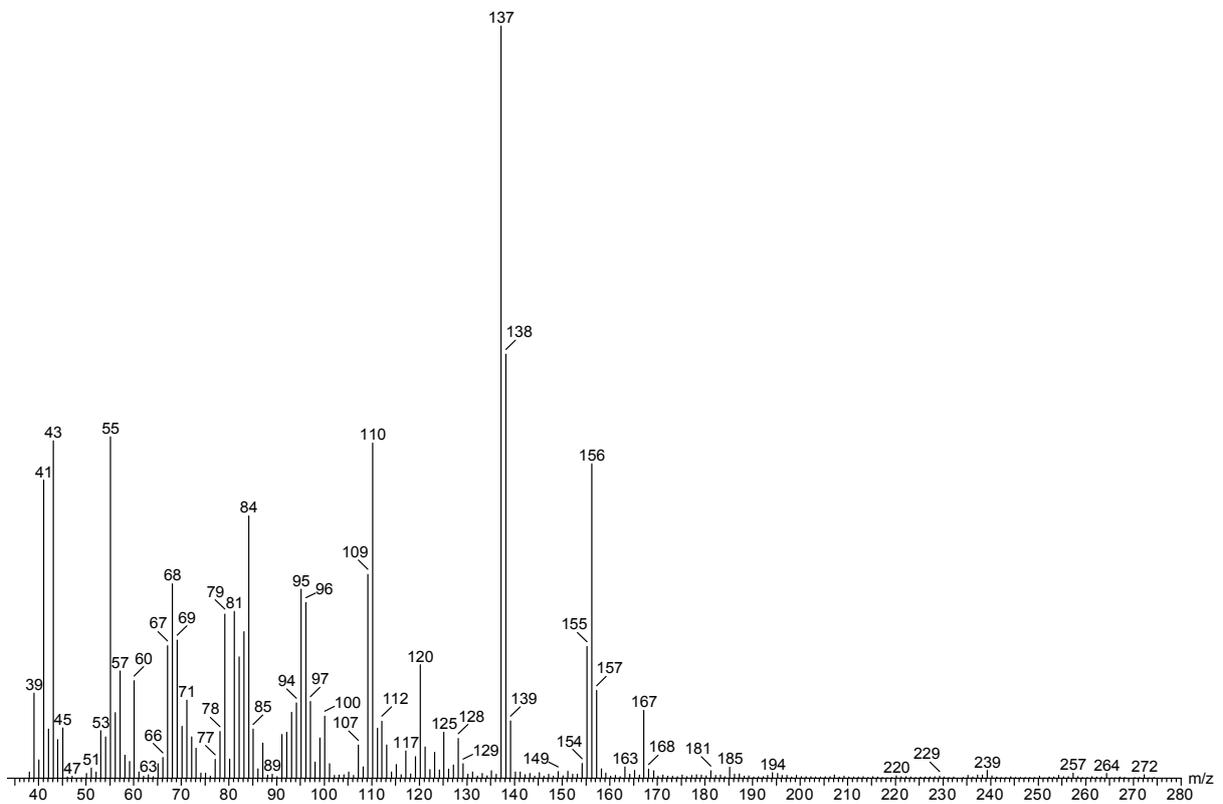


Abbildung 140: Massenspektrum der Substanz **F63**

## Abkürzungsverzeichnis

$[\alpha]_D$	spezifischer Drehwert
°	Grad
μL	Mikroliter
Abb.	Abbildung
abs.	absolut (wasserfrei)
AD	asymmetrische Dihydroxylierung (nach Sharpless)
AG	<i>Areola</i> Gland, Drüsen auf der <i>Areola</i> , Montgomery Drüsen
amu	atomare Masseneinheit (atomic mass unit)
APCI	atmospheric pressure chemical ionisation
arom.	aromatisch
br.	breit
BSTFA	<i>N,O</i> -bis-Trimethylsilyltrifluoracetamid
c	Konzentration
C	Celsius
ca.	circa
CI	Chemische Ionisation
CI-MS	Chemische Ionisation-Massenspektrometrie
CNRS	Centre Européen des Sciences du Goût, Dijon
COSY	correlated spectroscopy
d	Dublett
DB5-MS	unpolare stationäre Phase von Trennsäulen für die Gaschromatographie: 5% Phenyl-, 95% Dimethyl-polysiloxan
DC	Dünnschichtchromatogramm; Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dest.	destilliert
DHP	2,3-Dihydropyran
DMAPP	3,3-Dimethylallylpyrophosphat
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DVM	Diel Vertical Migration
<i>E</i>	entgegen

EAG	Elektroantennogramm
ee	Enantiomerenüberschuß
EE	Essigsäureethylester
EI	Electron Impact
eq	Äquivalent(e)
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	( <i>lat.</i> ) und weitere
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
<i>etc.</i>	( <i>lat.</i> ) et cetera
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FD	Filmdicke (engl. FT film thickness)
FGI	(engl. functional group interconversion) Umwandlung einer funktionellen Gruppe
FFAP	Free fatty acid phase - polare stationäre Phase von Trennsäulen für die Gaschromatographie: Polyethylenglykol-2-nitroterephthalsäureester
FID	Flammenionisationsdetektor
fl.	flüssig
FPP	Farnesylpyrophosphat
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
g	Gramm
GC	Gaschromatographie; Gaschromatogramm
GC/MS	Gaschromatograph gekoppelt mit Massenspektrometer
ges.	gesättigt
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	high performance liquid chromatography
HR-MS	high resolution mass spectrometry (hochaufgelöste Massenspektrometrie)
HR-SIM	high resolution selected ion monitoring
HS	Headspace / Dampfraum oberhalb einer flüssigen Probe
HSQC	heteronuclear single quantum correlation

Hz	Hertz
ID	Innendurchmesser (engl.: internal diameter)
INADEQUATE	incredible natural abundance double quantum transfer experiment
Inj.	Injektion
Int.	Intensität
IPP	3-Isopentenylpyrophosphat
IR	Infrarot
IZW	Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Kontaminante
KW	Kohlenwasserstoff
LH	Lutenisierendes Hormon
LRI	Linearer Retentionsindex
Lsg.	Lösung
m	Multipllett
M	Molar ( $c = 1 \text{ mol / L}$ )
m/z	Masse/Ladungsverhältnis (in der Massenspektrometrie)
$M^+$	Molekülion
mBar	Millibar
<i>m</i> -CPBA	meta-Chlorperbenzoesäure
Me	Methylgruppe
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
mL	Milliliter
mmol	Millimol
MS	Massenspektrum; Massenspektrometer
Mult.	Multiplizität (von NMR-Signalen)
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Buthyllithium
NMR	Nuclear Magnetic Resonance / Kernresonanzspektroskopie
NOE	nuclear Overhauser enhancement
NOESY	nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy
NPP	Nerylpyrophosphat
Optima-1701	Trennsäule für die Gaschromatographie, Phase: 14% Cyanopropylphenyl-/ 86% Dimethylpolysiloxan

Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PDC	Pyridiniumdichromat
PDMS	Polydimethylsiloxan, unpolare Phase in der Gaschromatographie
PE	Petrolether
PENDANT	polarization enhancement during attached nucleus testing
Ph	Phenyl
Pos.	Position
ppm	parts per million
PTSA	<i>para</i> -Toluensulfonsäure
q	Quartett
quin	Quintett
R	Rest
RDA	Retro-Diels-Alder (Reaktion)
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RI	Retentionsindex
RIC	reconstructed ion chromatogramm
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	retention time, Retentionszeit
s	Singulett
SAG	Sekret der <i>Areola</i> Glands / Montgomery Drüsen
sext.	Sextett
sl	Splitlose (Injektion)
SPE	Solid phase extraction / Festphasenextraktion
SPME	Solid phase micro extraction / Festphasenmikroextraktion
SV	Strukturvoschlag
t	Triplett
<i>tert.</i>	tertiär(es)
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran(yl)-
TIC	total ion current; Totalionenstromchromatogramm
TMS	Tetramethylsilan, interner Standard für die NMR-Spektroskopie
Ts	Tosylat

U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VF5-MS	siehe DB5-MS
vis	Visuell
w	weak, schwach
Z	zusammen
z.B.	zum Beispiel
$\Delta$	Wärme
$\delta$	chemische Verschiebung

## Sicherheit und Entsorgung

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Chemikalien sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet. Die verwendeten Gefahrstoffe sind, soweit bei diesen eine Einstufung vorliegt, mit den jeweiligen Gefahrensymbolen und zugehörigen R- und S-Sätzen versehen worden. Die Erläuterung der R- und S-Sätze sowie die Bedeutung der Gefahrensymbole sind im Anschluss an die Tabelle aufgelistet.

Noch nicht eingestufte Verbindungen wurden als Gefahrstoffe behandelt. Diese Verbindungen sind in der Tabelle nicht gelistet.

### Verwendete Chemikalien

Substanzname	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
2,2-Dimethoxypropan	F, Xi	11-36-66	9-16-26
2,3-Dimethylbut-2-en	F	11	26
3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -pyran	F, Xn	11-19-36/38-20	9-16-29-43.3
Abietinsäure:	Xi	36/37/38-51/53	26-36
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-40
Aceton	F, Xn	11-36-66-67	9-16-26
Acetonitril	F, Xn	11-20/21/22-36	16-36/37
AD-mix- $\alpha/\beta$	Xn	20/21/22	26-36/37/39-22
Ammoniumchlorid	Xn	22-36	22
Benzol:	F, T	45-11-48/23/24/25	53-45
Benzol-d <sub>6</sub>	F, T	45-11-48/23/24/25	53.1-45
Benzylalkohol	Xn	20/22	26
Benzylbromid	Xi	36/37/38	39
Bromwasserstoffsäure 48 %	C	35-37	26-45-7/9
Boran-Dimethylsulfid-Komplex	C, Xn	11-14-41-37/38	16-26-36
Boran-THF-Komplex	F, Xn	11-14/15-19-22-36/37/38	16-26-33-36
Bortrifluorid Et <sub>2</sub> O-Komplex	T <sup>+</sup> , F, C	10-15-22-23-34	26-36/37/39-43-45
Brom	T <sup>+</sup> , C, N	26-35-50	7/9-26-45-61
Butan-1-ol	Xn	10-22-37/38-41-67	13-26-37/39-46-7/9

Calciumhydrid	F	15	7/8-24/25-43.6
Cäsiumcarbonat	Xi	36/37/38	22-26
Chinolin	Xn	21/22	24/25-36/37
Chlor	T, N	23-36/37/38-50	1/2-9-45-61
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Cyclohexen	F, Xn	11-21/22	16-23.2-33-36/37
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Diethylenglycol- dimethylether	T, Repr. Cat.	60-61-10-19	53.1-45
Diethylether	F <sup>+</sup> , Xn	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Dimethylformamid	T	61-E20/21-36	53-45
Dimethylsulfat	T <sup>+</sup>	45-E25-E26-34-43- 68	53-45
Dimethylsulfoxid-d6 (DMSO-d6)	Xn	20/21/22-38	
Essigsäure 100%	C	10-35	23.2-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethylacetat	F, Xi	11-36-66-67	16-26-33
Ethylacetylen-carboxylat	Xi	10-36/37/38	24-26
Hept-1-in	F	11	
Imidazol	C	22-34	26-36/37/39-45
Iod	Xn, N	20/21-50	23.2-25-61
Kaliumbromid	Xn	36/37/38	26-36
Kieselgel60	Xi	40-37	22-24/25
Kupfer(I)-iodid	N	50/53	22-61
Kupfer-(II)-sulfat	Xn, N	22-36/38-50/53	22-60-61
Lindlar-Katalysator	Xn	20/22-33	22-36/37/39
Lithiumaluminiumhydrid	F	15	24/25-43.12-7/8
Lithiumhydroxid	C	35	26-36/37/39-45
Magnesium	F	11-15	7/8-43.6
Magnesiumsulfat Hydrat			22-24/25
<i>m</i> -Chlorperbenzoesäure	O, Xn	5-8-36/37/38	17-26-36
Methanol	F, T	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45

Methansulfonsäure-amid	Xi	36/38	22
Molekularsieb	Xn	36/37	26
<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin	T <sup>+</sup>	25-27-34	26-28.2-36/37/39-45
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	F, Repr. Cat.	61-20/21-36	53.1-45
Natriumcarbonat	Xn	36	22-26
Natriumchlorid	-	-	-
Natriumchlorit	Xn	22-32-41	14-26-36/37/39
Natriumhydrogencarbonat	-	-	-
Natriumhydroxid, 36 %	C	35	26-37/39-45
Lösung			
Natriumiodid	Xn	36/38	26
Natriumpyrosulfit	Xn	22-31-41	26-39-46
<i>n</i> -Butyllithium 1.6 M Lsg. in Hexan	F, C, N	14/15-17-34-48/20-51/53-62	6.1-26-33-36/37/39-45-61-62
<i>n</i> -Hexan	F, Xn, N, Repr. Cat. 3	11-38-48/20-51/53-62-65-67	9-16-29-33-36/37-61-62
<i>n</i> -Pentan	F <sup>+</sup> , Xn, N	12-51/53-65-66-67	9-16-29-33-61-62
Oxalylchlorid:	T	14-23-34-37	26-36/37/39-45
Palladium/Aktivkohle	F	10	14-16-22
Petrolether 50-70	F, Xn, N	11-38-48/20-51/53-62-65-67	16-23.2-24-33-36/37-61-62
Phosphormolybdänsäure 20 % Lösung in Ethanol	F, C	11-34	26-36/37/39-45
Propiolsäureethylester			
<i>p</i> -Toluolsulfonsäure	Xi	36/37/38	26-37
<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid	C	34	26-36/37/39-45
Pyridin:	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
Salzsäure, 5M	Xi	Xi	Xi
Salzsäure, 0,1M	-	-	-
Salzsäure	C	34/37	26-36/37/39-45
Schwefel	F	11	16-26
Schwefelsäure 10M	C	35	26-30-45
Selen	T	23/25-33-53	20/21-28-45-61

Silbernitrat	C, N	34-50/53	26-45-60-61
<i>tert.</i> -Butanol	F, Xn	11-20	9-16
Tetrachlorkohlenstoff	T, N	23/24/25-40-48/23- 52/53-59	23-36/37-45-59-61
Tetrahydrofuran	F, Xn	11-19-36/37	16-29-33
Toluol	F, Xn	11-20	16-25-29-33
Triethylamin	F, Xi	11-20/21/22-35	3-16-26-29- 36/37/39-45
Trifluoacetanhydrid	C	14-20-35-52/53	9-26-36/39-61
Triphenylphosphin	Xn, N	43-48/20/22-50/53	22-24-37
Triphenylphosphinoxid	Xn	22-36/37/38	-
Wasserstoff	F <sup>+</sup>	12	9-16-33
Wasserstoffperoxid 35%	C	34	28.1-36/39-45

### **Bedeutung der Gefahrensymbole:**

E	Explosionsgefährlich
O	Brandfördernd
C	Ätzend
F	Leichtentzündlich
F <sup>+</sup>	Hochentzündlich
T	Giftig
T <sup>+</sup>	Sehr giftig
Xn	Gesundheitsschädlich
Xi	Reizend
N	Umweltgefährlich

## Sicherheitshinweise R- und S-Sätze

### R-Sätze: Hinweis auf besondere Gefahren

- R 1 Im trockenen Zustand explosionsgefährlich
- R 2 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen explosionsgefährlich
- R 3 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen besonders explosionsgefährlich
- R 4 Bildet hochempfindliche explosionsgefährliche Metallverbindungen
- R 5 Beim Erwärmen explosionsfähig
- R 6 Mit und ohne Luft explosionsfähig
- R 7 Kann Brand verursachen
- R 8 Feuergefahr bei Berührung mit brennenden Stoffen
- R 9 Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen
- R 10 Entzündlich
- R 11 Leichtentzündlich
- R 12 Hochentzündlich
- R 13 Hochentzündliches Flüssiggas
- R 14 Reagiert heftig mit Wasser
- R 15 Reagiert mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase
- R 16 Explosionsgefährlich in Mischung mit brandfördernden Stoffen
- R 17 Selbstentzündlich an der Luft
- R 18 Bei Gebrauch Bildung explosionsfähiger / leichtentzündlicher Dampf-Luftgemische möglich
- R 19 Kann explosionsfähige Peroxide bilden
- R 20 Gesundheitsschädlich beim Einatmen
- R 21 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut
- R 22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
- R 23 Giftig beim Einatmen
- R 24 Giftig bei Berührung mit der Haut
- R 25 Giftig beim Verschlucken
- R 26 Sehr giftig beim Einatmen
- R 27 Sehr giftig Berührung mit der Haut
- R 28 Sehr giftig beim Verschlucken
- R 29 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase
- R 30 Kann bei Gebrauch leicht entzündlich werden

- R 31 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase
- R 32 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
- R 33 Gefahr kumulativer Wirkungen
- R 34 Verursacht Verätzungen
- R 35 Verursacht schwere Verätzungen
- R 36 Reizt die Augen
- R 37 Reizt die Atmungsorgane
- R 38 Reizt die Haut
- R 39 Ernste Gefahr irreversiblen Schadens
- R 40 Irreversibler Schaden möglich
- R 41 Gefahr ernster Augenschäden
- R 42 Sensibilisierung durch Einatmung möglich
- R 43 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
- R 44 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss
- R 45 Kann Krebs erzeugen
- R 46 Kann vererbare Schäden verursachen
- R 47 Kann Missbildungen verursachen
- R 48 Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition.
- R 49 Kann Krebs erzeugen beim Einatmen
- R 50 Sehr giftig für Wasserorganismen
- R 51 Giftig für Wasserorganismen
- R 52 Schädlich für Wasserorganismen
- R 53 Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
- R 54 Giftig für Pflanzen
- R 55 Giftig für Tiere
- R 56 Giftig für Bodenorganismen
- R 57 Giftig für Bienen
- R 58 Kann längerfristig schädliche Wirkungen auf die Umwelt haben
- R 59 Gefährlich für die Ozonschicht
- R 60 Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
- R 61 Kann das Kind im Mutterleib schädigen
- R 62 Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
- R 63 Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen
- R 64 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen

### **Kombinationen der R-Sätze**

- R 14/15 Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase
- R 15/29 Reagiert mit Wasser unter Bildung giftiger und hochentzündlicher Gase
- R 20/21 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 21/22 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
- R 20/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken
- R 20/21/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
- R 23/24 Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 24/25 Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
- R 23/25 Giftig beim Einatmen und Verschlucken
- R 23/24/25 Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
- R 26/27 Sehr giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 27/28 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
- R 26/28 Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken
- R 26/27/28 Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
- R 36/37 Reizt die Augen und die Atmungsorgane
- R 37/38 Reizt die Atmungsorgane und die Haut
- R 36/38 Reizt die Augen und die Haut
- R 36/37/38 Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut
- R 39/23 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen
- R 39/23/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 39/23/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 39/23/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken
- R 39/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut
- R 39/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 39/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken
- R 39/26 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen
- R 39/26/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut

- R 39/26/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 39/26/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und Verschlucken
- R 39/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut
- R 39/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 39/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken
- R 40/20 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen
- R 40/20/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 40/20/21/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 40/20/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken
- R 40/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut
- R 40/21/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 40/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Verschlucken
- R 42/43 Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich
- R 48/20 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen
- R 48/20/21 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Berührung mit der Haut
- R 48/20/21/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 48/20/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken
- R 48/21 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut
- R 48/21/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

- R 48/22      Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken
- R 48/23      Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen
- R 48/23/24    Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Berührung mit der Haut
- R 48/23/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 48/23/25    Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken
- R 48/24      Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut
- R 48/24/25    Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 48/25      Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken
- R 50/53      Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
- R 51/53      Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
- R 52/53      Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

## **S-Sätze: Sicherheitsratschläge**

- S 1 Unter Verschluss aufbewahren
- S 2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen
- S 3 Kühl aufbewahren
- S 4 Von Wohnplätzen fernhalten
- S 5 Unter ... aufbewahren (Geeignete Flüssigkeit vom Hersteller anzugeben)
- S 6 Unter ... aufbewahren (inertes Gas vom Hersteller anzugeben)
- S 7 Behälter dicht geschlossen halten
- S 8 Behälter trocken halten
- S 9 Behälter an einem gut belüfteten Ort aufbewahren
- S 12 Behälter nicht gasdicht verschließen
- S 13 Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten
- S 14 Von ... fernhalten (inkompatible Substanzen vom Hersteller anzugeben)
- S 15 Vor Hitze schützen
- S 16 Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen
- S 17 Von brennbaren Stoffen fernhalten
- S 18 Behälter unter Vorsicht öffnen und handhaben
- S 20 Bei der Arbeit nicht essen und trinken
- S 21 Bei der Arbeit nicht rauchen
- S 22 Staub nicht einatmen
- S 23 Gas / Rauch / Dampf / Aerosol nicht einatmen
- S 24 Berührung mit der Haut vermeiden
- S 25 Berührung mit den Augen vermeiden
- S 26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und den Arzt konsultieren
- S 27 Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen
- S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (vom Hersteller angeben)
- S 29 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen
- S 30 Niemals Wasser hinzugießen
- S 33 Maßnahmen gegen elektromagnetische Aufladungen treffen
- S 34 Schlag und Reibung vermeiden
- S 35 Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden
- S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen

- S 37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen
- S 38 Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen
- S 39 Schutzbrille / Gesichtsschutz tragen
- S 40 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit ... reinigen (vom Hersteller anzugeben)
- S 41 Explosions- und Brandgase nicht einatmen
- S 42 Beim Räuchern/Versprühen geeignetes Atemschutzgerät anlegen (geeignete Bezeichnung[en] vom Hersteller anzugeben)
- S 43 Zum Löschen verwenden ... (vom Hersteller anzugeben) (wenn Wasser die Gefahr erhöht, einfügen: Kein Wasser verwenden)
- S 44 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen
- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen)
- S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen
- S 47 Nicht aufbewahren bei Temperaturen über ... °C (vom Hersteller anzugeben)
- S 48 Feucht halten mit ... (geeignetes Mittel vom Hersteller anzugeben)
- S 49 Nur im Originalbehälter aufbewahren
- S 50 Nicht mischen mit ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 51 Nur in gut belüfteten Bereichen verwenden
- S 52 Nicht großflächig für Wohn und Aufenthaltsräume zu verwenden
- S 53 Explosion vermeiden - vor Gebrauch besondere Einweisungen einholen
- S 54 Vor Ableitung in Kläranlagen Einwilligung der zuständigen Behörden einholen
- S 55 Vor Ableitung in die Kanalisation oder in Gewässer nach dem Stand der Technik behandeln
- S 56 Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen
- S 57 Zur Vermeidung einer Kontamination der Umwelt geeigneten Behälter verwenden
- S 58 Als gefährlichen Abfall entsorgen
- S 59 Informationen zur Wiederverwendung/Wiederverwertung beim Hersteller / Lieferanten erfragen
- S 60 Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen

- S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen  
/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen
- S 62 Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen  
und Verpackung oder dieses Etikett vorzeigen

### **Kombination der S-Sätze**

- S 1/2 Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren
- S 3/7 Behälter dicht geschlossen halten und an einem kühlen Ort aufbewahren
- S 3/7/9 Behälter dicht geschlossen halten und an einem kühlen, gut gelüfteten Ort  
aufbewahren
- S 3/9 Behälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort aufbewahren
- S 3/14 An einem kühlen Ort, entfernt von ... aufbewahren (die Stoffe, mit denen  
Kontakt vermieden werden muss, sind vom Hersteller anzugeben)
- S 3/9/14 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ... aufbewahren (die Stoffe,  
mit denen Kontakt vermieden werden muss, sind vom Hersteller anzugeben)
- S 3/9/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut belüfteten Ort aufbewahren
- S 3/9/14/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ...  
aufbewahren (die Stoffe, mit denen Kontakt vermieden werden muss, sind vom  
Hersteller anzugeben)
- S 7/8 Behälter trocken und dicht geschlossen halten
- S 7/9 Behälter dicht geschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren
- S 7/47 Behälter dicht geschlossen und nicht bei Temperaturen über ... °C aufbewahren
- S 20/21 Bei der Arbeit nicht essen, trinken, rauchen
- S 24/25 Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden
- S 29/56 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen
- S 36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
- S 36/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille /  
Gesichtsschutz tragen
- S 37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille /  
Gesichtsschutz tragen
- S 36/37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille  
/ Gesichtsschutz tragen
- S 47/49 Nur im Originalbehälter bei einer Temperatur von nicht über ... °C (vom  
Hersteller anzugeben) aufbewahren

## Literaturverzeichnis

---

- 1 A. Bethe, *Naturwissenschaften*, **1932**, 20, 177-81
- 2 F. E. Regnier, *Biol. Reprod.*, **1971**, 4, 309-26
- 3 P. Karlson, A. Butenandt, *Annu. Rev. Entomol.*, **1959**, 4, 49-58
- 4 P. Karlson, M. Lüscher, *Nature*, **1959**, 183, 55-6
- 5 W. Francke, S. Schulz, „Pheromones“, in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, D. Barton, K. Nakanishi (eds.), Elsevier Science, Oxford, **1999**, 8, 197ff., K. Mori (Vol. Ed.)
- 6 E. O. Wilson, W. H. Bossert, *Recent Prog. Horm. Res.*, **1963**, 19, 673-716
- 7 E. O. Wilson, *Science*, **1965**, 149, 1064-71
- 8 D. A. Nordlund, W. J. Lewis, *J. Chem. Ecol.*, **1976**, 2, 211-20
- 9 C. G. Butler, *Trans. R. Entomol. Soc. London*, **1954**, 105, 11-29
- 10 F. P. Schiestl, R. Peakall, J. G. Mant, F. Ibarra, C. Schulz, S. Franke, W. Francke, *Science*, **2003**, 302, 437-8
- 11 D. A. Nordlund, in „*Semiochemicals: Their Role in Pest Control*“, D. A. Nordlund, R. L. Jones, W. J. Lewis (eds.), Wiley, New York, **1981**, 13-28
- 12 W. H. Thorpe, F. G. W. Jones, *Proc. R. Soc. London, Ser. B*, **1937**, 124, 56-81
- 13 W. L. Brown, T. Eisner, R. H. Whittaker, *BioScience*, **1970**, 20, 21-8
- 14 W. Francke, V. Heemann, B. Gerken, J. A. A. Renwick, J. P. Vite, *Naturwissenschaften*, **1977**, 64, 590-1
- 15 J. A. Byers, G. Birgersson, J. Löfqvist, G. Bergström, *Naturwissenschaften*, **1988**, 75, 153
- 16 A. Butenandt, R. Beckmann, D. Stamm, E. Hecker, *Z. Naturforsch.*, **1959**, 14b, 283-4
- 17 L. Ruzicka, *Helv. Chim. Acta*, **1926**, 9, 230-48
- 18 L. Ruzicka, *Helv. Chim. Acta*, **1926**, 9, 715-29
- 19 L. Ruzicka, *Helv. Chim. Acta*, **1926**, 9, 1008-17
- 20 E. O. Wilson, *Sci. Amer.*, **1963**, 208, 100-14
- 21 W. R. Garstka, D. Crews, *Science*, **1981**, 214, 681-3
- 22 W. Cooper, L. J. Vitt, *Anim. Behav.*, **1986**, 34, 367-76
- 23 R. T. Mason, H. M. Fales, T. H. Jones, L. K. Pannell, J. W. Chinn, D. Crews, *Science*, **1989**, 245, 290-3
- 24 R. T. Mason, T. H. Jones, H. M. Fales, L. K. Pannell, D. Crews, *J. Chem. Ecol.*, **1990**, 16, 2353-69
- 25 T. Eisner, W. E. Conner, K. Hicks, K. R. Dodge, H. I. Rosenberg, T. H. Jones, M. Cohan, J. Meinwald, *Science*, **1977**, 196, 1347-9
- 26 E. S. Albone, G. Eglinton, *Life Sci.*, **1974**, 14, 387-400
- 27 E. S. Albone, G. C. Perry, *J. Chem. Ecol.*, **1975**, 2, 101-11
- 28 E. S. Albone, *Nature*, **1975**, 256, 575
- 29 J. W. Jorgenson, M. Novotny, M. Carmack, G. B. Copland, S. R. Wilson, *Science*, **1978**, 199, 796-8
- 30 R. L. Brahmachary, J. Dutta, *Z. Naturforsch.*, **1979**, 34c, 632-3
- 31 R. L. Brahmachary, J. Dutta, *Amer. Nat.*, **1981**, 118, 561-7
- 32 R. L. Brahmachary, *Endeavour*, **1986**, 10, 65-8

- 
- 33 B. V. Burger, M. Z. Viviers, J. P. I. Bekker, M. le Roux, N. Fish, W. B. Fourie, G. Weibchen,  
*J. Chem. Ecol.*, **2008**, *34*, 659-71
- 34 T. H. Schultz, S. M. Kruse, R. A. Flath, *J. Chem. Ecol.*, **1985**, *11*, 169-75
- 35 M. Goodwin, K. M. Gooding, F. Regnier, *Science*, **1979**, *203*, 559-61
- 36 S. M. Kruse, W. E. Howard, *J. Chem. Ecol.*, **1983**, *9*, 1503-10
- 37 R. L. S. Patterson, *J. Sci. Food Agric.*, **1968**, *19*, 434-8
- 38 R. L. S. Patterson, *J. Sci. Food Agric.*, **1968**, *19*, 31-7
- 39 E. S. E. Hafez, J. P. Signoret, The behaviour of swine. In: E. S. E. Hafez (Ed.) Behaviour of domestic  
animals, Bailliere, Tindall & Cassell, London, United Kingdom, **1969**, 349-90
- 40 J. P. Signoret, B. A. Baldwin, D. Fraser, E. S. E. Hafez, The behaviour of swine. In: E. S. E. Hafez (Ed.)  
Behaviour of domestic animals, Bailliere, Tindall & Cassell, London, United Kingdom, **1975**, 295-329
- 41 R. G. Brownlee, R. M. Silverstein, D. Müller-Schwarze, A. G. Singer, *Nature*, **1969**, *221*, 284-5
- 42 D. Müller-Schwarze, *Anim. Behav.*, **1971**, *19*, 141-52
- 43 D. Müller-Schwarze, C. Müller-Schwarze, *J. Chem. Ecol.*, **1975**, *1*, 125-31
- 44 D. Müller-Schwarze, R.M. Silverstein, C. Müller-Schwarze, A.G. Singer, N.J. Volkman, *J. Chem.*  
*Ecol.*, **1976**, *2*, 389-98
- 45 D. Müller-Schwarze U. Ravid, A. Claesson, A. G. Singer, R. M. Silverstein, C. Müller-Schwarze, N. J.  
Volkman, K. F Zemanek, L. G. Butler, *J. Chem. Ecol.*, **1978**, *4*, 247-56
- 46 D. Müller-Schwarze, R. Altieri, N. Porter, *J. Chem. Ecol.*, **1984**, *10*, 1707-29
- 47 D. Müller-Schwarze, C. Müller-Schwarze, A. G. Singer, R. M. Silverstein, *Science*, **1974**, *183*, 860-2
- 48 D. D. Thiessen, G. Limdzey, J. Nyby, *Horm. Behav.*, **1970**, *1*, 315-25
- 49 D. D. Thiessen, F. E. Regnier, M. Rice, M. Goodwin, N. Isaacks, N. Lawson, *Science*, **1974**, *184*, 83-5
- 50 A. G. Singer, W. Agosta, R. J. O'Connell, C. Pfaffman, D. V. Boven, F. H. Field, *Science*, **1976**, *191*,  
948-50
- 51 R. J. O'Connell, A. G. Singer, C. Pfaffman, W. C. Agosta, *J. Chem. Ecol.*, **1979**, *5*, 575-85
- 52 J. G. Vandenbergh, Pheromonal Regulation of Puberty, in: Pheromones and Reproduction in Mammals,  
J. G. Vandenbergh (ed.), Academic Press, **1983**, 95-110
- 53 F. J. Schwende, D. Wiesler, J. W. Jorgenson, M. Carmack, M. Novotny, *J. Chem. Ecol.*, **1986**, *12*, 277-  
96
- 54 M. Novotny, F. J. Schwende, D. Wiesler, J. W. Jorgenson, M. Carmack, *Experientia*, **1984**, *40*, 217-9
- 55 M. Novotny, S. Harvey, B. Jemiolo, J. Alberts, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1985**, *82*, 2059-61
- 56 W. K. Whitten, *Nature*, **1957**, *180*, 1436
- 57 W. K. Whitten, *J. Endocrinol.*, **1956**, *13*, 399-404
- 58 W. K. Whitten, *J. Endocrinol.*, **1956**, *14*, 160-3
- 59 B. Jemiolo, J. Alberts, S. Sochinski-Wiggins, S. Harvey, M. Novotny, *Anim. Behav.*, **1985**, *33*, 1114-8
- 60 B. Jemiolo, S. Harvey, M. Novotny, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1986**, *83*, 4576-9
- 61 M. Novotny, S. Harvey, B. Jemiolo, *Experientia*, **1990**, *46*, 109-13
- 62 B. Jemiolo, T.-M. Xie, M. Novotny, *Physiol. Behav.*, **1991**, *50*, 1119-22
- 63 W. Ma, Z. Miao, M. Novotny, *Chem. Senses*, **1999**, *24*, 289-93
- 64 J. G. Vandenbergh, *Endocrinology*, **1967**, *81*, 345-9

- 
- 65 J. G. Vandenberg, *Endocrinology*, **1969**, *84*, 658-60
- 66 J. G. Vandenberg (ed.). 1983. Pheromones and Mammalian Reproduction. Academic Press, New York
- 67 M.V. Novotny, B. Jemiolo, D. Wiesler, W. Ma, S. Harvey, F. Xu, T.-M. Xie, M. Carmack, *Chem. Biol.*,  
**1999**, *6*, 377-83
- M. V. Novotny, W. Ma, L. Zidek, E. Daev, Recent biochemical insights into puberty acceleration,  
estrus induction, and puberty delay in the house mouse. In: R. E Johnston, D. Müller-Schwarze,  
P. W. Sorensen (eds) *Advances in chemical signals in vertebrates VIII*. Plenum Publishers, New York,  
**1999**, 99-116
- 69 L. C. Drickamer, *J. Reprod. Fertil.*, **1977**, *51*, 77-81
- 70 M. Novotny, B. Jemiolo, S. Harvey, D. Wiesler, A. Marchlewska-Koj, *Science*, **1986**, *231*, 722-5
- 71 B. Jemiolo, M. Novotny, *Biol. Reprod.*, **1993**, *48*, 926-9
- 72 B. Jemiolo, M. Novotny, *Physiol. Behav.*, **1994**, *55*, 519-22
- 73 H. H. Shorey, *Animal Communication by Pheromones*, Academic Press, New York,  
San Francisco, London, **1976**
- 74 W. Montagna, *J. Invest Dermatol.*, **1964**, *42*, 119-29
- 75 B. Brody, *Psychiatry*, **1975**, *38*, 278-89
- 76 R. L. Doty, M. M. Orndorff, J. Leyden, A. Kligman, *Behav. Biol.*, **1978**, *23*, 373-80
- 77 M. K. McClintock, *Nature*, **1971**, *229*, 244-5
- 78 M. J. Russell, G. M. Switz, K. Thompson, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **1980**, *13*, 737-8
- 79 R. L. Doty, P. J. Snyder, G. R. Huggins, L. D. Lowry, *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **1981**, *95*, 45-60
- 80 A. Weller, L. Weller, *Physiol. Behav.*, **1993**, *53*, 943-9
- 81 K. Stern, M. K. McClintock, *Nature*, **1998**, *392*, 177-9
- 82 W. Whitten, *Nature*, **1999**, *401*, 232
- 83 M. K. McClintock, *Nature*, **1999**, *401*, 232-3
- 84 G. Preti, W. B. Cutler, C. M. Christensen, H. Lawley, G. R. Huggins, C.-R. Garcia, *J. Chem. Ecol.*, **1987**,  
*13*, 717
- 85 D. B. Gower, S. Bird, P. Sharma, F. R. House, *Experientia*, **1985**, *41*, 1134-6
- 86 R. P. Michael, E. B. Keverne, *Nature*, **1968**, *218*, 746-9
- 87 R. P. Michael, E. B. Keverne, R. W. Bonsall, *Science*, **1971**, *172*, 964-6
- 88 R. P. Michael, R. W. Bonsall, M. Kutner, *Chemical Signals and Primate Behavior*. In: D. Müller-  
Schwarze, M. M. Mozell (eds.) *Chemical Signals in Vertebrates*, New York: Plenum Press, **1977**,  
251-71
- 89 R. P. Michael, D. Zumpe, *J. Endocr.*, **1982**, *95*, 189-205
- 90 G. J. Fox, *Folia Primol.*, **1982**, *37*, 255-66
- 91 J. E. Herrington, *Anim. Behav.*, **1976**, *24*, 207-12
- 92 J. E. Herrington, *Anim. Behav.*, **1977**, *25*, 147-51
- 93 J. N. Labows: Odor detection, generation, and etiology in the axilla. In: K. Laden and C.B. Felger eds.  
*Cosmetic Science and Technology Series, Vol. 7: Antiperspirants and Deodorants*, Marcel Dekker,  
New York, **1988**, 321-43

- 94 R. Claus, W. Alsing, Occurrence of 5alpha-androst-16en-3-one, a boar pheromone, in man and its  
relationship to testosterone, *J. Endocrinol.*, **1976**, 68, 483-4
- 95 A. Comfort, *Nature*, **1971**, 230, 432-3
- 96 R. L. Doty, *Chem. Senses*, **1981**, 6, 351-71
- 97 H. S. Koelega, E. P. Köster, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1974**, 237, 234-46
- 98 D. B. Gower, B. A. Ruparelia, *J. Endocrinol.*, **1993**, 137, 167-87
- 99 G. Preti, W. B. Cutler, G. R. Huggins, C. R. Garcia, H. J. Lawley, *Horm. Behav.*, **1986**, 20, 474-82
- 100 W. B. Cutler, G. Preti, A. M Krieger, G. R. Huggins, C. R. Garcia, H. J. Lawley, *Horm. Behav.*, **1986**,  
20, 463-73
- 101 K. Shinohara, M. Morofushi, T. Funabashi, D. Mitsushima, F. Kimura, *Chem. Senses*, **2000**, 25, 407-11
- 102 K. Shinohara, M. Morofushi, T. Funabashi, D. Mitsushima, F. Kimura, *Chem. Senses*, **2000**, 25, 465-67
- 103 G. Preti, C. J. Wysocki, K. T. Barnhart, S. J. Sondheimer, J. J. Leyden, *Biol. Reprod.*, **2003**, 68, 2107-13
- 104 S. Jacob, M. K. McClintock, *Horm. Behav.*, **2000**, 37, 57-78
- 105 S. Jacob, L. H. Kinnunen, J. Metz, M. Cooper, M. K. McClintock, *NeuroReport*, **2001**, 12, 2391-4
- 106 S. Jacob, D. J. Hayreh, M. K. McClintock, *Physiol. Behav.*, **2001**, 74, 15-27
- 107 S. Jacob, S. Garcia, D. Hayreh, M. K. McClintock, *Horm. Behav.*, **2002**, 42, 274-83
- 108 A. Comfort: The Likelihood of Human Pheromones. In: M. C. Birch ed. Pheromones,  
Amsterdam: North Holland/Elsevier, **1974**, 386-96
- 109 A. Weller, *Nature*, **1998**, 392, 126-7
- 110 J. V. Kohl, M. Atzmüller, B. Fink, K. Grammer, *Neuroendocrinol. Lett.*, **2001**, 22, 309-21
- 111 W. S. T. Hays, *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **2003**, 54, 89-97
- 112 C. J. Wysocki, G. Preti, *Anat. Rec.*, **2004**, 281a, 1201-11
- 113 P. Wallace, *Physiol. Behav.*, **1977**, 19, 577-59
- 114 C. Darwin, *Mind*, **1877**, 2, 285-94
- 115 A.-S. Cismaresco, F. Bonnin, *J. Psychosom. Obstet. Gynaecol.*, **1993**, 14, 65-70
- 116 M. J. Russell, *Nature*, **1976**, 260, 520-2
- 117 R. H. Porter, *Genetica*, **1999**, 104, 259-63
- 118 R. H. Porter, J. M. Cernoch, F. J. McLaughlin, *Physiol Behav.*, **1983**, 30, 151-4
- 119 R. H. Porter, R. D. Balogh, J. M. Cernoch, C. Franchi, *Chem. Senses*, **1986**, 11, 389-95
- 120 M. Schleidt, C. Genzel, *Ethol. Sociobiol.*, **1990**, 11, 145-54
- 121 C. Wedekind, T. Seebeck, F. Bettens, A. J. Paepke, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **1995**, 260, 245-9
- 122 C. Wedekind, S. Furi, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **1997**, 264, 1471-9
- 123 C. Wedekind, D. Penn, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **2000**, 15, 1269-71
- 124 R. Axel, Die Entschlüsselung des Riechens, *Spektr. Wiss.*, **1995**, 2, 72-8
- 125 L. Buck, R. and Axel, *Cell*, **1991**, 65, 175-87
- 126 M. Meredith, *Chem. Senses*, **2001**, 26, 433-45
- 127 Artikel *Asiatischer Elefant*. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 24. Juli 2006,  
14:03 UTC. URL: [http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Asiatischer\\_Elefant&oldid=19343272](http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Asiatischer_Elefant&oldid=19343272)  
(Abgerufen: 31. Juli 2006, 09:32 UTC)
- 128 D. Olson, R. J. Wiese, *Zoo Biol.*, **2000**, 19, 311-20

- 129 R. J. Wiese, *Zoo Biol.*, **2000**, *19*, 299-309
- 130 A. Hauffellner, J. Schilfarth, G. Schweiger, **1997**, Elefanten in Zoo und Circus, München, Germany:  
European Elephant Group, 288
- 131 <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/7140/summ> ; Asian Elephant Specialist Group **1996**.  
Elephas maximus. In: IUCN 2006. 2006 IUCN Red List of Threatened Species. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.  
Downloaded on 30 July 2006
- 132 W. J. Carr; L. S. Loeb; N. R. Wylie, *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **1966**, *62*, 336-8
- 133 F. J. Schwende, D. Wiesler, M. Novotny, *Experientia*, **1984**, *40*, 213-5
- 134 M. Kavaliers, J. P. Wiebe, L. A. M. Galea, *Brain Research*, **1994**, *646*, 140-4
- 135 M. Kavaliers, D. M. Kinsella, *Brain Research*, **1995**, *682*, 222-6
- 136 A. G. Singer, W. C. Agosta, R. J. O'Connell, C. Pfaffmann, D. V. Bowen, F. H. Field, *Science*, **1976**,  
*191*, 948-50
- 137 M. J. Blissitt, K. P. Bland, D. F. Cottrell, *J. Reprod. Fertil.*, **1994**, *101*, 189-91
- 138 M. Dehnhard, R. Claus, S. Pfeiffer, D. Schopper, *Theriogenology*, **1991**, *35*, 645-52
- 139 K. R. Bagley, T. E. Goodwin, L.E.L. Rasmussen, B. A. Schulte, *Anim. Behav.*, **2006**, *71*, 1439-45
- 140 L. E. L. Rasmussen, T. D. Lee, A. Zhang, W. L. Roelofs, G. D. Daves Jr., *Chem. Senses*, **1997**, *22*,  
417-37
- 141 J. F. Eisenberg, G. M. McKay, M. R. Jainudeen, *Behaviour*, **1971**, *38*, 193-225
- 142 E. C. Ramsey, B. L. Lasley, G. H. Stabenfeldt, *Am. J. Vet. Res.*, **1980**, *42*, 256-60
- 143 E. D. Plotka, U. S. Seal, F. R. Zarembka, L. G. Simmons, A. Teare, L. G. Phillips, K. C. Hinshaw, D. G.  
Wood, *Biol. Reprod.*, **1988**, *38*, 309-14
- 144 M. R. Jainudeen, J. F. Eisenberg, N. Tilekeratne, *J. Reprod. Fert.*, **1983**, *67*, 121-7
- 145 J. K. Hodges, *Anim. Reprod. Sci.*, **1998**, *53*, 3-8
- 146 J. L. Brown, D. L. Schmitt, A. Bellem, L. H. Graham, J. Lehnhardt, *Biol. Reprod.*, **1999**, *61*, 1294-9
- 147 L. E. L. Rasmussen, T. D. Lee, W. L. Roelofs, A. Zhang, G. D. Daves Jr., *Nature*, **1996**, *379*, 684
- 148 L. E. L. Rasmussen, *Chem. Senses*, **2001**, *26*, 611-23
- 149 L. E. L. Rasmussen, H. Riddle, V. Krishnamurthy, *Nature*, **2002**, *415*, 975-6
- 150 L. E. L. Rasmussen, D. R. Greenwood, *Chem. Senses*, **2003**, *28*, 433-46
- 151 L. E. L. Rasmussen, V. Krishnamurthy, R. Sukumar, *Behaviour*, **2005**, *142*, 351-96
- 152 D. R. Greenwood, D. Comeskey, M. B. Hunt, L. E. L. Rasmussen, *Nature*, **2005**, *438*, 1097-8
- 153 A.-K. Oerke, M. Heistermann, K. Hodges, *EEP Research Group Newsletter*, **1999**, 68
- 154 E. Pieler, Fortpflanzungsbiologie, in: Elefant in Menschenhand, F. Kurt (Hrsg.), Filander Verlag, Fürth,  
**2001**, 131-44
- 155 C. L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, **1990**, *62*, 2145-8
- 156 Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, **1993**, *65*, 1843-52.
- 157 C. A. Niemüller, H. J. Shaw, J. K. Hodges, *J. Reprod. Fertil.*, **1993**, *99*, 617-25
- 158 M. Dehnhard, M. Heistermann, F. Göritz, R. Hermes, T. Hildebrandt, H. Haber, *Reproduction*, **2001**,  
*121*, 475-84
- 159 M. Dehnhard, J.-M. Hatt, K. Eulenberger, A. Ochs, G. Strauss, *J. Steroid Biochem.*, **2003**, *84*, 383-91
- 160 C. Enzell, *Pure & Appl. Chem.*, **1985**, *57*, 693-700

- 161 R. Näf, A. Jaquier, A. Velluz, *Flavour Fragr. J.*, **1997**, *12*, 377-80
- 162 W. Skorianetz, G. Ohloff, *Helv. Chim. Acta*, **1978**, *61*, 2151-66
- 163 K. Murato, H. R. Wolf, O. Jeger, *Helv. Chim. Acta*, **1981**, *64*, 215-23
- 164 E. Demole, P. Enggist, *Helv. Chim. Acta*, **1973**, *56*, 2318-27
- 165 R. Näf, A. Velluz, *Flavour Fragr. J.*, **2000**, *15*, 329-34
- 166 M. Kawakami, *Foods & Food Ingred. J. Jpn.*, **2002**, *197*, 13-27
- 167 J. A. Sarelse, K. B. de Roos, C. B. Kanner, P. C. Burgers, J. Kloosterman, The precursors of bovolides and its homologues, in: Trends in Flavour Research, H. Maarse, D. G. van der Heij (Hrsg.), Elsevier Science, Amsterdam, **1994**, 373-7
- 168 R. Pompizzi, G. G. G. Manzardo, R. Amadò, Photo- and autoxidation of a dimethyl furan fatty acid - identification of flavour compounds, in: P. Schieberle, K. H. Engel (Hrsg.), Frontiers of Flavour Science, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, **2000**, 557-60
- 169 J. Boldingh, R. J. Taylor, *Nature*, **1962**, *194*, 909-13
- 170 G. MacLeod, *Food Chem.*, **1991**, *40*, 113-7
- 171 M. J. Schneider, J. A. Montali, D. Hazen, C. E. Stanton, *J. Nat. Prod.*, **1991**, *54*, 905-9
- 172 R. Suemitsu, S. Fujita, Y. Mishima, M. Yoshimura, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **1968**, *41*, 1381-5
- 173 A. K. Martin, *Br. J. Nutr.*, **1982**, *48*, 497-507
- 174 <http://en.wikipedia.org/wiki/Lignan>, Downloaded 17.10.2007
- 175 C. H. L. Shackleton, *Clin. Chim Acta*, **1980**, *107*, 231-43
- 176 C. H. L. Shackleton, *J. Chromatogr.*, **1986**, *379*, 91-156
- 177 G. P. Cartoni, M. Ciardi, A. Giarrusso, F. Rosati, *J. Chromatogr.*, **1983**, *279*, 515-22
- 178 S. Burstein, S. Liebermann, *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 5235-40
- 179 W. Schänzer, M. Donike, *Anal. Chim. Acta*, **1993**, *275*, 23-48
- 180 D. Goudreault, R. Massé, *J. Steroid Biochem. Molec Biol.*, **1990**, *37*, 137-54
- 181 E. Haber, J. A. Muñoz-Guerra, C. Soriano, D. Carreras, C. Rodriguez, F. A. Rodriguez, *J Chromatogr. B*, **2001**, *755*, 17-26
- 182 H.M. Rauen (Hrsg), Biochemisches Taschenbuch, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 2. Auflage **1964**
- 183 C. Funk, R. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1994**, *308*, 258-66
- 184 E. Wenkert, B. L. Buckwalter, *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 4367-66
- 185 H. J. Lee, M. M. Ravn, R. M. Coates, *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 6155-67
- 186 W. B. Smith, *Org. Magn. Reson.*, **1978**, *11*, 427-8
- 187 B. Gigante, L. Santos, M. J. Marcelo-Curto, *Magn. Reson. Chem.*, **1995**, *33*, 318-21
- 188 J. M. M. del Corral, M. Gordaliza, M. A. Salinero, A. San Feliciano, *Magn. Reson. Chem.*, **1994**, *32*, 774-81
- 189 O. Wallach, Terpene und Campher: Zusammenfassung eigener Untersuchungen auf dem Gebiet der alicyclischen Verbindungen, *Veit und Comp.*, **1909**, Leipzig
- 190 L. Ruzicka, A. Eschenmoser, H. Heusser, *Experientia*, **1953**, *9*, 357-67
- 191 K. Bloch, *Steroids*, **1992**, *57*, 378-82
- 192 E. Breitmaier, Terpene, Teubner Verlag, Stuttgart, Leipzig **1999**

- 193 M. K. Schwarz, Terpen-Biosynthese in Ginkgo biloba: Eine überraschende Geschichte, Dissertation  
(Thesis Nr. 10951) **1994**, ETH Zürich, Schweiz.
- 194 M. Rohmer, M. Seemann, S. Horbach, S. Bringer-Meyer, H. Sahm, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**,  
118, 2564-6
- 195 D. Arigoni, S. Sagner, C. Latzel, W. Eisenreich, A. Bacher, M. H. Zenk, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1997**,  
94, 10600-5
- 196 D. Arigoni, W. Eisenreich, C. Latzel, S. Sagner, T. Radykewicz, M. H. Zenk, A. Bacher, *Proc. Natl.*  
*Acad. Sci.*, **1999**, 96, 1309-14
- 197 M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.*, **1999**, 16, 565-74
- 198 B. Stofer Voger, M. Wildung, G. Vogel, R. Croteau, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 23262-8
- 199 R. J. Peters, M. M. Ravn, R. M. Coates, R. Croteau, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 8974-8
- 200 M. M. Ravn, R. J. Peters, R. M. Coates, R. Croteau, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 6998-7006
- 201 R. J. Peters, O. A. Carter, Y. Zhang, B. W. Matthews, R. Croteau, *Biochem.*, **2003**, 42, 2700-7
- 202 G. Stork, A. W. J. Burgstahler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 5068-77
- 203 A. Eschenmoser, L. Ruzicka, O. Jeger, D. Arigoni, *Helv. Chim. Acta*, **1955**, 38, 1890-4
- 204 Y Asakawa, T. Ishida, M. Toyota, T. Takemoto, *Xenobiotica*, **1986**, 16, 753-67
- 205 T. Matsumoto, N. Hayashi, T. Ishida, Y Asakawa, *J. Pharm. Sci.*, **1990**, 79, 540-7
- 206 J. P. Kutney, M. Singh, G. M. Hewitt, P. J. Salisbury, B. R. Worth, J. A. Servizi, D. W. Martens, R. W.  
Gordon, *Can. J. Chem.*, **1981**, 59, 2334-41
- 207 J. P. Kutney, E. Dimitriadis, G. M. Hewitt, P. J. Salisbury, M. Singh, B. R. Worth, J. A. Servizi, D. W.  
Martens, R. W. Gordon, *Can. J. Chem.*, **1981**, 59, 3350-5
- 208 J. P. Kutney, E. Dimitriadis, G. M. Hewitt, M. Singh, B. R. Worth, *Helv. Chim. Acta*, **1982**, 65, 661-70
- 209 J. P. Kutney, E. Dimitriadis, G. M. Hewitt, P. J. Salisbury, M. Singh, J. A. Servizi, D. W. Martens, R.  
W. Gordon, *Helv. Chim. Acta*, **1982**, 65, 1343-50
- 210 J. P. Kutney, E. Dimitriadis, *Helv. Chim. Acta*, **1982**, 65, 1351-58
- 211 J. P. Kutney, E. Dimitriadis, G. M. Hewitt, P. J. Salisbury, M. Singh, J. A. Servizi, D. W. Martens, R.  
W. Gordon, *Helv. Chim. Acta*, **1983**, 66, 921-8
- 212 J. P. Kutney, G. M. Hewitt, P. J. Salisbury, M. Singh, J. A. Servizi, D. W. Martens, R. W. Gordon,  
*Helv. Chim. Acta*, **1983**, 66, 2191-7
- 213 J. P. Kutney, S. L. C. Lewis, G. M. Hewitt, P. J. Salisbury, M. Singh, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1985**,  
49, 96-100
- 214 J. P. Kutney, J.-D. Berset, G. M. Hewitt, M. Singh, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1988**, 54, 1015-22
- 215 T. Nagasawa, K. Mitsukura (Kanegafuchi Chemical Industry Co., Ltd., Japan), Microbial manufacture  
of abietic acid derivatives with Mucor, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, **2004**. JP 2004081008
- 216 S. N. Suryawanshi, A. Rani, T. S. Dhama, D. S. Bhakuni, *Synth. Commun.*, **1989**, 19, 2927-37
- 217 Isopimarsäure, Neoabietinsäure und Abietinsäure bei Sigma Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com>);  
Pimarsäure bei MP Biomedicals (<http://www.mpbio.com/index.php>); Dehydroabietinsäure bei Wako  
Chemicals GmbH (<http://www.wako-chemicals.de/>)
- 218 A. W. Burgstahler, J. N. Marx, D. F. Zinkel, *J. Org. Chem.*, **1969**, 34, 1550-61

- 219 K. B. Anderson, R. M. Ede, R. A. Franich, H. W. Kroese, J. A. Lloyd, R. Meder, *Synth. Commun.*,  
1998, 28, 1375-80
- 220 S. Prinz, U. Müllner, J. Heilmann, K. Winkelmann, O. Sticher, E. Haslinger, A. Hüfner, *J. Nat. Prod.*,  
2002, 65, 1530-4,
- 221 F. H. M. Nestler, D. F. Zinkel, *Anal. Chem.*, 1967, 39, 1118-24
- 222 A. Abad, M. Arno, L. R. Domingo, R. J. Zaragoza, *Tetrahedron*, 1985, 41, 4937-40
- 223 S. Hanessian, T. J. Liak, B. Vanasse, *Synthesis*, 1981, 81, 396
- 224 R. Brückner, Reaktionsmechanismen, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin,  
2003, 294-5
- 225 J. Mulzer, Synthesis of Esters, Activated Esters and Lactones, In: Comprehensive Organic Synthesis,  
B.M. Trost, I. Fleming, (Eds.), Bd 6, Pergamon Press, Oxford, 1991, 323-80
- 226 T. Mukaiyama, M. Usui, E. Shimada, K. Saigo, *Chem Lett.*, 1975:1045-8
- 227 K. Saigo, M. Usui, K. Kikuchi, E. Shimada, T. Mukaiyama, *Bull Chem Soc Jpn.*, 1977, 50, 1863-6
- 228 G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, *Angew. Chem.*, 1978, 90, 602-15
- 229 C. Fabricius, H. J. van Hensbergen, W. Zucchini, *S. Afr. J Wildl. Res.*, 1989 19, 61-6
- 230 D. E Wilson., D. M. Reeder (Eds), Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic  
Reference. Second edition. Smithsonian Institution Press, Washington D.C., 1993
- 231 R. Bigalke, The bontebok, *Damaliscus pygargus* (Pall) with special reference to its history and  
preservation, *Fauna Flora*, 1955, 6, 95-116
- 232 R. H. N. Smithers, South africa red data book - terrestrial mammals. South african national scientific  
programmes report 125. Council for scientific and industrial research, 1986, Pretoria, South Africa
- 233 Antelope Specialist Group 1996. *Damaliscus pygargus*. In: IUCN 2006. 2006 IUCN Red List of  
*Threatened Species*. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 14 August 2006
- 234 <http://de.wikipedia.org/wiki/Buntbock>. Downloaded on 03 November 2007
- 235 B. V. Burger, M. le Roux, C. F. Garbers, H. S. Spies, R. C. Bigalke, K.G. Pachler, P. L. Wessels, V.  
Christ, K. H. Maurer, *Z. Naturforsch. [C]*, 1976, 31, 21-8
- 236 B. V. Burger, M. le Roux, C. F. Garbers, H. S. Spies, R. C. Bigalke, K.G. Pachler, P. L. Wessels, V.  
Christ, K. H. Maurer, *Z. Naturforsch.*, 1977, 32, 49-56
- 237 B. V. Burger, A. E. Nell, H. S. C. Spies, M. le Roux, R. C. Bigalke and P. A. J. Brand, *J. Chem. Ecol.*,  
1999, 25, 2057-84
- 238 C. Derail, T. Hofmann, P. Schieberle, *J. Agr. Food Chem.*, 1999, 47, 4742-5
- 239 H. Guth, *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, 3022-26
- 240 J. G. Bendall, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 4825-32
- 241 W. Stark, G. Urbach, *Chemistry & Industry*, 1974, 10, 413-4
- 242 M. E. C. Whetstone, K. R. Cadwallader, M. Drake, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 3126-32
- 243 M. Preininger, M. Rychlik, W. Grosch, *Developments in Food Science*, 1994 35 267-70.
- 244 J. Kubickova, W. Grosch, *International Dairy Journal*, 1997, 7, 65-70
- 245 R. J. Park, A. L Ford, D. Ratcliff, *J. Food Sci.*, 1978, 43, 1363-7
- 246 J. Sarris, A. Latrasse, *Agric. Biol. Chem.*, 1985, 49, 3227-30
- 247 J. S. Dickschat, I. Wagner-Döbler, S. Schulz, *J. Chem. Ecol.*, 2005, 31, 925-47

- 
- 248 D. Müller-Schwarze, N. J. Volkman, K. F. Zemanek, *J. Ultrastruct. Res.*, **1977**, *59*, 223-30
- 249 A. E. Anderson, O. C. Wallmo, *Odocoileus hemionus*. Mammalian Species, 219, American Society of  
Mammalogists, New York, **1984**, 1-9
- 250 V. Balogh, M. Fetizon, M. Golfier, *J. Org. Chem.*, **1979**, *10*, 1339-41
- 251 B.V. Burger, mündliche Mitteilung
- 252 W. E. Parham, E. L. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1948**, *70*, 4187-9
- 253 J. H. Van Boom, J. D. M. Herscheid, C. B. Reese, *Synthesis*, **1973**, *3*, 169-70
- 254 U. Ravid, R. M. Silverstein, L. R. Smith, *Tetrahedron*, **1978**, *34*, 1449-52
- 255 K. Mori, *Tetrahedron*, **1975**, *31*, 3011-2
- 256 M. Tanaka, K. Tomioka, K. Koga, *Heterocycles*, **1985**, *23*, 2347-50
- 257 D. Shin, P. Yadagiri, J. R. Falk, J. L. Masferrer, M. L. Schwartzman, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*,  
3923-6
- 258 B. Burger, eigene Synthese des Cyclodextrins und Belegung der Säule, persönliche Mitteilung
- 259 T. Haffner, R. Tressl, *J. Agr. Food Chem.*, **1996**, *44*, 1218-23
- 260 P. Chalier, J. Crouzet, *Chirality*, **1998**, *10*, 786-90
- 261 A. Latrasse, E. Guichard, C. Piffaut, N. Fournier, L. Dufosse, *Chirality*, **1993**, *5*, 379-84
- 262 B. Ercoli, C. Fuganti, P. Grasselli, S. Servi, G. Allegrone, M. Barbeni, A. Pisciotta, *Biotechn. Lett.*,  
**1992**, *14*, 665-8
- 263 J. Ruther, T. Meiners, J. L. M. Steidle, *Chemoecology*, **2002**, *12*, 161-7
- 264 J. J. Gilbert, J. K. Waage, *Ecology*, **1967**, *48*, 1027-31
- 265 R. S. Stemberger, J. J. Gilbert, *Freshwat. Biol.*, **1984**, *14*, 639-47
- 266 R. Tollrian, *J. Plankton Res.*, **1993**, *15*, 1309-18
- 267 R. Tollrian, E. von Elert, *Limnol. Oceanogr.*, **1994**, *39*, 788-96
- 268 R. Tollrian, *Ecology*, **1995**, *76*, 1691-1705
- 269 J. M. Jeschke, R. Tollrian, *Oecologia*, **2000**, *123*, 391-6
- 270 S. I. Dodson, *Limnol. Oceanogr.*, **1974**, *19*, 721-29
- 271 D. A. Krueger, S. I. Dodson, *Limnol. Oceanogr.*, **1981**, *26*, 219-23
- 272 S. I. Dodson, *Limnol. Oceanogr.*, **1988**, *33*, 1431-9
- 273 S. I. Dodson, *Oecologia*, **1989**, *78*, 361-7
- 274 W. E. Neill, *Nature*, **1990**, *345*, 524-6
- 275 C. J. Loose, E. von Elert, P. Dawidowicz, *Arch. Hydrobiologie*, **1993**, *126*, 329-37
- 276 T. M. Zaret, J. S. Suffern, *Limnol. Oceanogr.*, **1976**, *21*, 804-13
- 277 H. B. Stich, W. Lambert, *Nature*, **1981**, *293*, 396-8
- 278 C. J. Loose, *Limnol. Oceanogr.*, **1993**, *38*, 1837-41
- 279 E. van Gool, J. Ringelberg, *J. Plankton Res.*, **2002**, *24*, 713-21
- 280 C. J. Loose, *Arch. Hydrobiol./ Beih. Ergebn. Limnol*, **1993**, *39*, 29-36
- 281 C. J. Loose, P. Dawidowicz, *Ecology*, **1994**, *75*, 2255-63
- 282 E. von Elert, G. Pohnert, *OIKOS*, **2000**, *88*, 119-28
- 283 E. von Elert, C. J. Loose, *J. Chem. Ecol.*, **1996**, *22*, 885-95
- 284 H. Boriss, M. Boersma, K. H. Wiltshire, *Nature*, **1999**, *398*, 382

- 285 G. Pohnert, E. von Elert, *Limnol. Oceanogr.*, **2000**, *45*, 1153-6
- 286 W. Francke, A. Frias, R. Gatermann, „Isolation and Identification of infochemicals“, in „*SNIFFS Second Annual Report: Steering role of infochemicals for food chain function and structure*“, J. Vijverberg (ed.), Maarssen, **2000**, 33ff
- 287 U. Gräfe, G. Reinhardt, W. Schade, D. Krebs, I. Eritt, W. F. Fleck, E. Heinrich, L. Radies, *J. Antibiotics*, **1982**, *35*, 609-14
- 288 U. Gräfe, I. Eritt, *J. Antibiotics*, **1983**, *36*, 1592-3
- 289 W. Albrecht, R. Tressl, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1993, *4*, 1391-6
- 290 R. Tressl, Projekt AIF 11890 N "Vorhersage der Geschmacksstabilität des Bieres durch Messung von alpha-Ketolen und Di- sowie Trihydroxysäuren als Vorstufen geschmacksaktiver Carbonyle", Forschungsinstitut für Technologie der Brauerei und Mälzerei (FBM), **2001**
- 291 J. Ruther, L. M. Stahl, S. Steiner, L. A. Garbe, T. Tolasch, *J. Exp. Biol.*, **2007**, *210*, 2163-9
- 292 P. Selzer, *Dissertation*, Erlangen-Nürnberg, **1998**
- 293 M. J. Rieser, J. F. Kozlowski, K. V. Wood, J. L. McLaughlin, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 1137-40
- 294 B. R. Laurence, J. A. Pickett, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1982**, 59-60
- 295 K. Mori, T. Otsuka, *Tetrahedron*, **1983**, *39*, 3267-9
- 296 B. R. Laurence, K. Mori, T. Otsuka, J. A. Pickett, L. J. Wadhams, *J. Chem. Ecol.*, **1985**, *11*, 643-8
- 297 K. Mori, T. Otsuka, M. Oda, *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 2929-34
- 298 Z.-M. Wang, M. Shen, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 3393-6
- 299 K. Mori, *Agr. Biol. Chem.*, **1976**, *40*, 1617-9
- 300 W. Francke, U. Fittschen, S. Franke, R. Gatermann, „Isolation and Identification of infochemicals“, in „*SNIFFS Final Report: Steering role of infochemicals for food chain function and structure*“, J. Vijverberg (ed.), Maarssen, **2001**, 32-3 und 47
- 301 G. Weibchen, Diplomarbeit, **2002**, Universität Hamburg
- 302 Kommerziell erhältlich unter der Marke Aldrich von Sigma-Aldrich
- 303 M. Lapitskaya, L. L. Vasiljeva, K. K. Pivnisky, *Synthesis*, **1993**, 65-6
- 304 A. Spinella, T. Caruso, M. Martino, C. Sessa, *Synlett.*, **2001**, *12*, 1971-3
- 305 A. Spinella, T. Caruso, C. Sessa, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 1681-3
- 306 L. A. Garbe, R. Tressl, *Helv. Chim. Acta*, **2003**, *86*, 2349-54
- 307 T. Haffner, R. Tressl, *Lipids*, **1998**, *33*, 47-58
- 308 F. Pinot, I. Benveniste, J.-P. Salaün, O. Loreau, J.-P. Noël, L. Schreiber, F. Durst, *Biochem. J.*, **1999**, *342*, 27-32
- 309 R. Mykytowycz, *Sci. Am.*, **1968**, *218*, 116-26
- 310 R. Mykytowycz, M. L. Dudzinski, *Behaviour*, **1973**, *43*, 96-120
- 311 R. Mykytowycz, Odour signals in the life of the wild rabbit, *Austral Sci Mag.*, **1985**, *1*, 44-50
- 312 R. H. Porter, C. Fullerton, J. C. Berryman, *Z. Tierpsychol.*, **1973**, *32*, 489-95
- 313 P. Wallace, K. Owen, D. D. Thiessen, *Physiol. Behav.*, **1973**, *10*, 463-6
- 314 R. H. Porter, S. A. Cavallaro, J. D. Moore, *Z. Tierpsychol.*, **1980**, *53*, 153-170
- 315 H. M. Doane, R. H. Porter, *Dev. Psychobiol.*, **1978**, *11*, 271-7
- 316 B. A. Baldwin, E. E. Shillito, *Anim. Behav.*, **1974**, *22*, 220-3

- 
- 317 P. H. Klopfer, J. Gamble, *Z. Tierpsychol.*, **1966**, 23, 588-92
- 318 B. Tschanz, *Experientia*, **1962**, 18, 187-90
- 319 L. Hersher, J. B. Richmond, A. U. Moore, Maternal behaviour in sheep and goats. In: H. Rheingold  
(ed), Maternal behaviour in mammals, John Wiley and Sons, London, **1963**, 203-32
- 320 S. J. Hudson, M.M. Mullord, *Anim. Ethol.*, **1977**, 3, 271-6
- 321 G. B. Meese, D. J. Conner, B. A. Baldwin, *Physiol. Behav.*, **1975**, 15, 121-5
- 322 B. A. Baldwin, G. B. Meese, *Physiol. Behav.*, **1977**, 18, 803-8
- 323 P. Poindrón, P. Le Neindre, Endocrine and Sensory Regulation of Maternal Behaviour in the Ewe.  
In: J. S. Rosenblatt, R. A. Hinde, C. Beer (Eds.), Advances in the Study of Behaviour, Vol 11.  
Academic Press, New York, **1980**, 75-119
- 324 D. J. Gubernick, *Anim. Behav.*, **1980**, 28, 124-9
- 325 Z. T. Halpin, *Adv. Study Behav.*, **1986**, 16, 39-70
- 326 R. Hudson, H. Distel, *Behaviour*, **1982**, 79, 255-71
- 327 R. Hudson, H. Distel, *Behaviour*, **1983**, 82, 260-75
- 328 G. Coureaud, B. Schaal. *Dev. Psychobiol.*, **2000**, 36, 271-81
- 329 G. Coureaud, B. Schaal, D. Langlois, G. Perrier, *Anim. Behav.*, **2001**, 61, 153-62
- 330 B. Schaal, G. Coureaud, D. Langlois, C. Ginies, E. Semon, G. Perrier, *Nature*, **2003**, 424, 68-72
- 331 G. Coureaud, D. Langlois, G. Sicard, B. Schaal, *Chem. Senses*, **2004**, 29, 341-50
- 332 A. MacFarlane, Olfaction in the Development of Social Preferences in the Human Neonate. Ciba  
Found. Symp., **1975**, 33, 103-17
- 333 B. Schaal, H. Montagner, E. Hertling, D. Bolzoni, A. Moyse, R. Quichon, *Reprod. Nutr. Develop.*,  
**1980**, 20, 843-58
- 334 H. Varendi, R. H. Porter, J. Winberg, *Lancet*, **1994**, 344, 989-90
- 335 J. W. Makin, R. H. Porter, *Child Dev.*, **1989**, 60, 803-10
- 336 R. H. Porter, J. W. Makin, L. B. Davis, K. M. Christensen, *Physiol. Behav.*, **1991**, 50, 907-11
- 337 H. Varendi, R. H. Porter, *Acta Paediatr.*, **2001**, 90, 372-5
- 338 B. Schaal, L. Marlier, R. Soussignan, *Biol. Neonate*, **1995**, 67, 397-406
- 339 H. Varendi, R. H. Porter, J. Winberg, *Acta Paediatr.*, **1996**, 85, 1223-7
- 340 H. Varendi, R. H. Porter, J. Winberg, *Acta Paediatr.*, **1997**, 86, 985-90
- 341 L. Marlier, B. Schaal, R. Soussignan, *C. R. Acad. Sci. III*, **1997**, 320, 999-1005
- 342 R. Soussignan, B. Schaal, L. Marlier, T. Jiang, *Physiol. Behav.*, **1997**, 62, 745-58
- 343 L. Marlier, B. Schaal, R. Soussignan, *Child Dev.*, **1998**, 69, 611-23
- 344 B. Schaal, L. Marlier, R. Soussignan, *Chem. Senses*, **2000**, 25, 729-37
- 345 O. Romantshik, R. H. Porter, V. Tillmann, H. Varendi, *Acta Paediatr.*, **2007**, 96, 372-6
- 346 G. B. Morgagni, *Adversaria Anatomica Omnia*, Padua, **1719**, 10pp
- 347 X. Roederer, *Elementa Artis Obstetriciae in Usum Praelectionum Academicarum*, Göttingen, **1753**
- 348 W. F. Montgomery, *An Exposition of the Signs and Symptoms of Pregnancy, the Period of Human  
Gestation, and Signs of Delivery*, Verlag Sherwood, Gilbert and Piper, London, **1837**, 38-50
- 349 J. L. Burton, S. Shuster, M. Cartledge, L. J. Libman, U. Martell, *Nature*, **1973**, 243, 349-50
- 350 S. Doucet, R. Soussignan, P. Sagot, B. Schaal, *Dev. Psychobiol.*, **2007**, 49, 129-38c

- 351 S. Doucet, R. Soussignan, P. Sagot, B. Schaal, *PLoS ONE*, **2007**, *4(10)*, published online
- 352 B. Schaal, S. Doucet, R. Soussignan, M. Rietdorf, G. Weibchen, W. Francke. The Human Breast as a Scent Organ: Exocrine structures, Secretions, Volatile Components, and Possible Functions in Breastfeeding Interactions. In: J. L. Hurst, R. J. Beynon, S. C. Roberts, T. D. Wyatt (eds.), *Chemical Signals in Vertebrates 11*. Springer, New York, **2008**, 325-35
- 353 J. Winberg, R. H. Porter, *Acta Paediatr.*, **1998**, *87*, 6-10
- 354 R. H. Porter, *Acta Paediatr.*, **2004**, *93*, 1560-62
- 355 M. Stafford, M. G. Horning, A. Zlatkis, *J. Chromatogr. B*, **1976**, *126*, 495-502
- 356 E. D. Pellizari, T. D. Hartwell, B. S. H. Harris III, R. D. Waddell, D. A. Whitaker, M. D. Erickson, *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **1982**, *28*, 322-8
- 357 P. M. Bingham, D. Sreven-Tuttle, E. Lavin, T. Acree, *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, **2003**, *157*, 1031
- 358 M. Rietdorf, Dissertation, **2002**, Universität Hamburg
- 359 Quellen zu Retentionsindices wurden entnommen aus:
- Flavornet: <http://www.flavornet.org/flavornet.html> Downloaded on 12 September 2009-09-12
  - The Pherobase: <http://www.pherobase.net/> Downloaded on 12 September 2009-09-12
  - NIST08 Datenbank
- 360 MassLib-Software [MSP Kofel MassLib V8.7E (Copyright 1996-2005, MPI für Kohlenforschung)] mit den MS-Datenbanken:
- NIST 02, Copyright NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, US Dept. of Commerce
  - Wiley Registry of Mass Spectral Data, 7<sup>th</sup> Ed., Copyright John Wiley & Sons Inc
  - Chemical Concepts Mass Spectral Data Base, 4<sup>th</sup> Ed., Copyright Chemical Concepts
  - Mass Spectra of Geochemicals, Petrochemicals and Biomarkers, 1<sup>st</sup> Ed., Copyright Chemical Concepts
  - MCR Collection 1<sup>st</sup> Ed., Copyright Chemical Concepts
  - Mass Spectra of Volatiles in Food, 1<sup>st</sup> Ed., Copyright TNO Zeist
  - K. Pflieger, H. H. Maurer, A. Weber, Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pharmaceuticals and their Metabolites, 2<sup>nd</sup> Ed., VCH Weinheim, 1992, 2000
  - Mass Spectra of Androstanes, Oestrogens and other Steroids, 1<sup>st</sup> Ed. Edition, Copyright Chemical Concepts
  - Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, W. A. König, D. Joulain, D. H. Hochmuth
- 361 NIST MS Search Software Version 2.0 mit den MS-Datenbanken:
- NIST 08, Copyright NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, US Dept. of Commerce, 2008
  - H. H. Maurer, K. Pflieger, A. Weber, Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites, 3<sup>rd</sup> Ed., VCH Weinheim, 1992, 2007
  - Wiley Registry of Mass Spectral Data, 8<sup>th</sup> Ed., Copyright John Wiley & Sons Inc, 2008
  - AAFS Drug Library, American Academy of Forensic Sciences, Toxicology Section, 2006
- 362 K. Blau, A. Darbre, Handbook of Derivatives for Chromatography, (Hrsg. K. Blau, J. M. Halket), John Wiley & Sons, New York, **1993**, 11-28
- 363 Autorenkollektiv, Organikum, 16. Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, **1986**
- 364 Weltweit alleiniger Lizenznehmer für Festphasenmikroextraktion-Technologie ist Supelco® (U.S. Patent 5,691,206; Europäisches Patent EP523092)

### **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, Gunnar Weibchen, dass vorher keine weiteren Promotionsversuche unternommen worden sind, oder an einer anderen Stelle vorgelegt wurden.

Hamburg, den 14. Januar 2010

### **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und allein von mir unter den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde.

Hamburg, den 14. Januar 2010