



Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Biologisch-Pharmazeutische Fakultät  
Max-Planck-Institut für  
Chemische Ökologie



---

seit 1558

Eine  $^{18}\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}$  markierte Modellverbindung für  
biosynthetische  $^{31}\text{P}$ -NMR Untersuchungen

Bachelorarbeit

zur Erlangung des Grades eines

Bachelor of Science

vorgelegt von

David Szamosvari

aus Budapest

Jena, 27.09.2012

Gutachter:

Prof. Dr. Christian Hertweck

Dr. Bernd Schneider

## Inhaltsverzeichnis

1. <u>Einleitung</u> .....	1
1.1. Phenolische Sekundärmetabolite in Pflanzen.....	1
1.2. Der indirekte Nachweis von isotopischem Sauerstoff.....	2
1.3. Der <sup>31</sup> P-Kern.....	3
1.4. Die Entwicklung der <sup>31</sup> P-NMR-Spektroskopie.....	4
1.5. Der kinetische Isotopeneffekt.....	5
1.6. Die <sup>18</sup> O-markierte Modellverbindungen.....	7
2. <u>Zielstellung</u> .....	7
3. <u>Die Synthesen</u> .....	8
3.1. Phosphinylierung von Phenol mit DPPC.....	8
3.1.1. Synthese , Extraktion und Aufreinigung.....	8
3.1.2. Analytische Daten des Phenol-DPPC.....	8
3.2. Phosphinylierung von Brenzkatechin mit DPPC.....	9
3.2.1. Synthese , Extraktion und Aufreinigung.....	9
3.2.2. Analytische Daten des Brenzkatechin-DPPC.....	9
3.3. Phosphinylierung von DPA mit DPPC.....	10
3.3.1. Synthese und Aufarbeitung.....	10
3.3.2. Analytische Daten von DPA.....	11
3.4. Methylierung von DPA .....	11
3.4.1. Synthese , Extraktion und Aufreinigung.....	11
3.4.2. Analytische Daten von Met-DPA.....	12
3.5. Phosphinylierung von Met-DPA mit DPPC.....	13
3.5.1. Synthese , Extraktion und Aufreinigung.....	13
3.5.2. Analytische Daten von Met-DPA-DPPC.....	13
3.6. Methylierung und Phosphinylierung des DPA( <sup>18</sup> O).....	14
3.6.1. Synthese , Extraktion und Aufreinigung.....	14
3.6.2. Analytische Daten des DPA( <sup>18</sup> O).....	15
3.6.3. Analytische Daten des Met-DPA( <sup>18</sup> O).....	16
3.6.4. Analytische Daten des Met- DPA( <sup>18</sup> O)-DPPC.....	16
3.7. Phosphinylierung von (-)-Epicatechin.....	17
3.7.1. Synthese , Extraktion und Aufreinigung.....	17
3.7.2. Analytische Daten des (-)-Epicatechin-DPPC (4-fach- phosphinyliert).....	18

3.8.	Phosphinylierung von Anigorufon.....	18
3.8.1.	Synthese , Extraktion und Aufreinigung.....	19
3.8.2.	Analytische Daten des Anigorufon-DPPC.....	19
4.	<u>Ergebnisse und Diskussion</u> .....	20
4.1.	Phosphorreagenz und Reaktionsbedingungen.....	20
4.2.	Synthese und Strukturanalyse von Phenol- und Brenzkatechin-DPPC.....	21
4.3.	Strukturanalyse der 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure.....	23
4.4.	Der Syntheseversuch von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure mit DPPC.....	24
4.5.	Synthese und Identifizierung des 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure- methylesters.....	25
4.6.	Synthese und Strukturanalyse von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure- methylester-DPPC.....	26
4.7.	Zuordnungen und Interpretation der Signale der markierten 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure.....	28
4.8.	Synthese und Nachweis des markierten 3,4-Dihydroxyphenyl- essigsäuremethylesters.....	30
4.9.	Synthese und Signalzuordnung des markierten 3,4-Dihydroxy- phenylelessigsäuremethylester-DPPC.....	31
4.10.	Vergleich und Auswertung der <sup>31</sup> P-Signale zwischen Met-DPA-DPPC und Met- DPA( <sup>18</sup> O)-DPPC.....	32
4.11.	Synthese und Strukturanalyse von (-)-Epicatechin-DPPC.....	34
4.12.	Synthese und Strukturanalyse von Anigorufon-DPPC.....	37
5.	<u>Zusammenfassung</u> .....	38
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	
7.	<u>Anhang</u>	

## Abkürzungsverzeichnis

amu	atomic mass unit
COSY	correlation spectroscopy
DC	Dünnschichtchromatografie
DPA	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
DPA( <sup>18</sup> O)	4`- <sup>18</sup> O, Ring- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> markierte 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
DPPC	Diphenylphosphinsäurechlorid
ESIMS	electrospray ionization mass spectrometry
HEE 1:1	n-Hexan/Essigester 1:1
HMBC	heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HOESY	heteronuclear overhauser effect spectroscopy
HPLC	high performance liquid chromatography
HSQC	heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
LC-MS	liquid chromatography–mass spectrometry
Met-DPA	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäuremethylester
Met-DPA( <sup>18</sup> O)	4`- <sup>18</sup> O, Ring- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> markierter 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäuremethylester
Met-DPA-DPPC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäuremethylester-Diphenylphosphinsäurechlorid
Met-DPA-DPPC( <sup>18</sup> O)	4`- <sup>18</sup> O, Ring- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> markiertes 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäuremethylester-Diphenylphosphinsäurechlorid
NMR	nuclear magnetic resonance
OCC	open column chromatography
TEA	Triethylamin
TEA-HCl	Triethylammoniumchlorid
TMDP	2-Chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholan

## 1. Einleitung

### 1.1. Phenolische Sekundärmetabolite in Pflanzen

Der pflanzliche Stoffwechsel kann allgemein in zwei Bereiche eingeteilt werden. In den Bereich des primären Stoffwechsels, der alle lebensnotwendigen Stoffe bereitstellt, wie Zucker, Aminosäuren, Nukleinsäuren, Lipide und Chlorophyll, und in den Bereich des sekundären Stoffwechsels. Dieser variiert stark zwischen den unterschiedlichen Pflanzenarten und umfasst eine weitaus größere Anzahl an strukturell und funktionell unterschiedlichsten Metaboliten, die jedoch nicht direkt am Energiestoffwechsel oder an anabolen bzw. katabolen Prozessen der Pflanze beteiligt sind. Der Sekundärstoffwechsel beinhaltet die Stoffklassen Alkaloide, Isoprenoide, Polyketide, Phenylpropanoide und nicht-proteinogene Aminosäuren. Eine strikte Abgrenzung der beiden Bereiche des pflanzlichen Stoffwechsels kann jedoch nicht getroffen werden, da Produkte des primären Stoffwechsels als Ausgangsverbindungen der Sekundärmetaboliten dienen. Es konnte gezeigt werden, dass diese auch in einem „turnover“ in Intermediate des primären Stoffwechsels umgebaut werden und somit Speicherstoffe darstellen<sup>40</sup>.

Eine für die Forschung interessante Gruppe von Sekundärmetaboliten bilden phenolische Verbindungen, die vor allem unter den Polyketiden und Phenylpropanoiden zu finden sind. Sie zeichnen sich durch das Vorhandensein mindestens einer an einem aromatischen Ring befindlichen Hydroxylgruppe aus. Der Sauerstoff dieser phenolischen Hydroxylgruppe kann generell zwei Ursprünge haben. Eine Möglichkeit ist, dass er von einer Malonsäure- bzw. Malonyl-CoA-Einheit stammt, die während der Biosynthese als Ketofunktion im Grundgerüst vorliegt und durch Keto-Reduktasen zur Hydroxylgruppe reduziert wird. Die zweite Möglichkeit ist, dass er aus molekularem Sauerstoff stammt, der durch Mono- oder Dioxygenasen in den aromatischen Ring eingefügt wird, wie man es z.B. bei der *para*-Hydroxylierung der Zimtsäure zu *p*-Cumarsäure durch Zimtsäure-4-Hydroxylase im Phenylpropanoidweg findet.

## 1.2. Der indirekte Nachweis von isotopischem Sauerstoff

Der Nachweis und die Bestimmung der Positionen von Hydroxylgruppen in einer Molekülstruktur kann einfach durch NMR-Untersuchungen durchgeführt werden. Die Aufklärung der Biosyntheseschritte bzw. der Zeitpunkte, in denen die Hydroxylgruppen eingebaut werden, ist jedoch oft nicht einfach nachzuvollziehen. Einen Hinweis auf eine neu eingeführte Hydroxylgruppe kann eine massenspektrometrische Analyse der Substanz zusammen mit einem Vergleich der molekularen Masse der Vorstufe liefern. Die Bestimmung der Position der Hydroxylgruppe kann allerdings nur durch Strukturanalysen, wie z.B. durch NMR-Spektroskopie erfolgen. Unglücklicherweise hat das mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,762%<sup>1</sup> am häufigsten vorkommende Sauerstoffisotop <sup>16</sup>O durch seine Kernstruktur einen Kernspin von 0 (gg-Kern) und kann deshalb nicht mittels NMR-Spektroskopie gemessen werden. <sup>17</sup>O ist mit einem Kernspin von 5/2 zwar mit NMR messbar, eignet sich durch seine geringe Häufigkeit von 0,038%<sup>1</sup>, seiner geringen magnetischen Suszeptibilität (negatives gyromagnetisches Verhältnis) und durch die Erzeugung von Quadrupoleffekten nur bedingt für NMR-Untersuchungen. Das einzige verbleibende, stabile Sauerstoffisotop ist <sup>18</sup>O. Wie <sup>16</sup>O besitzt es keinen Kernspin und kann nicht direkt mit NMR gemessen werden. Der Unterschied, der <sup>18</sup>O im Gegensatz zu <sup>16</sup>O für die NMR-Spektroskopie nützlich macht, ist seine um 2 amu größere Masse. Die dadurch entstehenden Veränderungen äußern sich in, für die Synthesechemie und die NMR-Spektroskopie relevanten, kinetischen Isotopeneffekten. Da sich <sup>18</sup>O nur mit einer natürlichen Häufigkeit von 0,200%<sup>1</sup> in den Molekülen befindet, ist eine künstliche Anreicherung nötig, damit sich der Isotopeneffekt stark genug ausprägen kann. In der NMR-Spektroskopie äußert sich das Vorhandensein eines <sup>18</sup>O-Kerns in einem Molekül durch Signalverschiebungen der Bindungspartner weshalb die Stärke des verschobenen Signals auch von Art und Häufigkeit des gemessenen Kerns des Bindungspartners abhängt. Obwohl sie eine sehr hohe Häufigkeit und das größte gyromagnetische Verhältnis aller Kerne aufweisen, eignet sich die Messung von Protonen zur Messung der Isotopenverschiebung insbesondere für phenolische Hydroxylgruppen nicht, da sie acid sind und in einigen protischen Lösungsmittel wie z.B. D<sub>2</sub>O oder MeOD im NMR-Spektrum nicht detektiert werden. In nicht-protischen Lösungsmitteln können sehr breite und überlappende Signale entstehen aus denen keine Strukturinformationen gewonnen werden können. Besser für die Messung der Isotopenverschiebung geeignet sind <sup>13</sup>C-Kerne an denen die phenolische Hydroxylgruppe gebunden ist. Nachteil des <sup>13</sup>C-Kerns ist sein geringes



gyromagnetisches Verhältnis und die Häufigkeit von 1,109%<sup>1</sup> weshalb <sup>13</sup>C-Spektren, besonders bei geringen Substanzmengen, lange Messzeiten benötigen. Um die Nachteile des <sup>13</sup>C-Kerns für den Nachweis und die Messung von <sup>18</sup>O verursachten Isotopenverschiebungen bei phenolischen Hydroxylgruppen auszugleichen, kann die kritische Position des <sup>13</sup>C-Kohlenstoffs künstlich durch Fütterungsexperimente erhöht werden<sup>2</sup>. Eine andere Methode, um den Anteil an <sup>13</sup>C an dem Hydroxylsauerstoff zu erhöhen, ist die Methylierung der Hydroxylgruppe (z.B. mit <sup>13</sup>C-markiertem Diazomethan) zur Methoxygruppe<sup>2</sup>. Die Reaktion mit Diazomethan hat die Vorteile, dass sie sehr schnell und sauber (entstehendes N<sub>2</sub> entweicht) ist und in hohen Ausbeuten stattfindet. Allerdings ist Diazomethan eine hoch toxische, krebserregende Verbindung und <sup>13</sup>C markiertes Diazomethan muss selbst hergestellt werden, was zusätzlichen Aufwand mit sich bringt. Eine günstige Alternative, die <sup>18</sup>O Isotopenverschiebung zu detektieren, ist der Einsatz von <sup>31</sup>P durch Derivatisierung der Hydroxylfunktionen mit einem entsprechenden Phosphorreagenz.

### 1.3. Der <sup>31</sup>P-Kern

Phosphor bietet sich für diese Art der Isotopenuntersuchung an, da der <sup>31</sup>P-Kern viele für die NMR-Spektroskopie nützliche Eigenschaften besitzt. <sup>31</sup>P besitzt einen NMR-messbaren Kernspin von 1/2 und ist das einzige stabile Phosphorisotop wodurch es mit einer natürlichen Häufigkeit von 100 % vorkommt. Des Weiteren besitzt <sup>31</sup>P, nach <sup>1</sup>H und <sup>19</sup>F, das drittgrößte gyromagnetische Verhältnis von allen Kernen was auch bei geringen Substanzmengen kurze Messzeiten erlaubt. Weiterhin zeichnet sich <sup>31</sup>P durch einen großen Signalbereich von -488 ppm für weißen Phosphor bis +1362 ppm für  $[\text{Cr}(\text{CO})_5]_2(\mu\text{-P-tert-Bu})$ <sup>3</sup> aus, wobei 85%ige Phosphorsäure als Standard ( $\delta = 0$  ppm) verwendet wird. Dies hat zur Folge, dass chemisch ähnliche <sup>31</sup>P-Signale im Spektrum gut separiert werden. Der Verschiebungsbereich eines <sup>31</sup>P-Signals hängt dabei vor allem von der Oxidationsstufe des Phosphors bzw. von der Art der Substituenten und der damit entstehenden elektronischen Umgebung ab. Weitere Faktoren sind die Bindungswinkel und die Art der Bindung ( $\sigma$ - oder  $\pi$ -Bindung). Eine weitere nützliche Eigenschaft des Phosphorkerns ist, dass er über bis zu vier Bindungen mit anderen Kernen koppelt. Anhand der Kopplungskonstanten können die Entfernungen von <sup>1</sup>H- oder <sup>13</sup>C-Kernen vom <sup>31</sup>P-Kern ermittelt werden, was zur Strukturaufklärung genutzt werden kann. Dabei nimmt der Betrag der Kopplungskonstanten allgemein mit Verringerung der Elektronendichte am Phosphorkern zu. Gleiches gilt beim Verlust von

ungebundenen Elektronenpaaren. Eine Besonderheit ist, dass dabei die  $^3J_{PC}$  Kopplungskonstanten größer werden als die  $^2J_{PC}$  Kopplungskonstanten.

#### 1.4. Die Entwicklung der $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie

Die Eignung des Phosphorkerns für die NMR-Spektroskopie ist schon zeitig erkannt und seit 1951, als die ersten P-NMR-Spektren entstanden, intensiv untersucht worden<sup>4</sup>. Wo am Anfang noch grundlegende Studien von  $^{31}\text{P}$ -NMR mit anorganischen und kleinen organischen Phosphorverbindungen gemacht worden<sup>5,6</sup>, entstanden später durch die Einführung der Fourier-Transformation, supraleitenden Magnetsystemen und die Verfügbarkeit von stabilen Isotopen, neue Anwendungsgebiete. Neben den andauernden Untersuchungen der Stereochemie von Phosphorverbindungen<sup>7</sup> und der Phosphorkopplungen<sup>8</sup> wurden, in den Jahren nach 1970 bis in die frühen 90er Jahren, nun vermehrt biochemische und medizinische Themen mithilfe von  $^{31}\text{P}$ -NMR untersucht. Beschäftigt wurde sich v.a. mit Proteinen (Enzyme, Phosphoproteine)<sup>9</sup>, Nukleinsäuren (DNA- und RNA-Konformation<sup>10</sup>, t-RNAs<sup>11</sup>, Protein-DNA-Interaktion<sup>12</sup>) und Phospholipide<sup>13</sup>. Hervorzuheben ist dabei die Arbeit von Mildred Cohn die mit Hilfe von  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie Phosphormetaboliten wie ATP und deren Rolle in enzymatischen Reaktionsmechanismen untersuchte. Dabei beinhalteten ihre Arbeiten bereits schon damals  $^{31}\text{P}$ -Isotopologstudien mit  $^{17}\text{O}$  und  $^{18}\text{O}$ <sup>14,15</sup>. In den Jahren darauf fand die  $^{31}\text{P}$ -NMR in vielen weiteren Bereichen Anwendung in denen sie häufig zum Nachweis von bestimmten Phosphorverbindungen oder Substanzklassen genutzt wurde wie z.B. bei der Analyse von labilen Wasserstoffverbindungen in Kohle<sup>16</sup>, als Marker für chemische Kampfstoffe<sup>17</sup> oder der Untersuchung von Ligninen<sup>18</sup>. Großes Interesse besteht seit einigen Jahren darin,  $^{31}\text{P}$ -NMR zur Qualitäts- und Herkunftskontrolle von Lebensmitteln wie Ölen oder Wein zu nutzen, indem bestimmte Moleküle wie Wasser, Glycerol oder phenolischen Verbindungen mit Phosphorreagenzien derivatisiert werden<sup>19,20,21</sup>.

## 1.5. Der kinetische Isotopeneffekt

Ein kinetischer Isotopeneffekt kann immer dann beobachtet werden, wenn in einer chemischen Bindung ein Bindungspartner durch ein Isotop ausgetauscht wird. Der entstehende Effekt, der sich u.a. in einer Verringerung der Reaktivität äußert, ist umso größer, je größer die Massendifferenz der ausgetauschten Atome ist<sup>22</sup>. Ein starker Isotopeneffekt ist daher z.B. beim Austausch von Wasserstoff mit Deuterium zu beobachten, da Deuterium eine fast doppelt so große Masse wie Wasserstoff besitzt. Die Ursache für die verringerte Reaktivität ergibt sich aus einer Erniedrigung der Nullpunktschwingungsenergie der Bindung welche durch Gl.1<sup>22</sup> beschrieben wird, wobei  $v$  das Schwingungsniveau beschreibt und für den Grundzustand gleich 0 gesetzt wird.

$$E_v = (v + \frac{1}{2})\hbar\omega \quad (\text{Gl.1}) \quad \hbar = \text{reduziertes Plancksches Wirkungsquantum}$$

Da die Schwingungsfrequenz  $\omega$  abhängig ist von der effektiven Masse  $m_{\text{eff}}$  (Gl.2)<sup>22</sup>, welche wiederum abhängig ist von den Atommassen der Bindungspartner (Gl.3)<sup>22</sup>, wird die Schwingungsenergie, bei erhöhter reduzierter Masse und bei gleichbleibend betrachteter Federkonstante  $k$  geringer.

$$\omega = \left(\frac{k}{m_{\text{eff}}}\right)^{1/2} \quad (2)$$

$$m_{\text{eff}} = \frac{m_1 \times m_2}{m_1 + m_2} \quad (3)$$

Aus der verringerten Nullpunktschwingungsenergie folgt eine kürzere Bindungslänge zwischen den Bindungspartnern. Am Beispiel von leichtem und schwerem Wasser, ist die OH-Bindungslänge im H<sub>2</sub>O Molekül mit 1,01 Å ca. 3% länger als die OD-Bindung in D<sub>2</sub>O mit 0,98 Å<sup>23</sup>. Diese Bindungslängenverkürzung verursacht eine niedrigere Reaktivität durch eine Erhöhung der Aktivierungsenergie und eine Veränderung der chemischen Umgebung der benachbarten Atomkerne durch eine Zunahme der Elektronendichte<sup>22</sup>. Dieser Effekt kann in der NMR-Spektroskopie als eine Hochfeldverschiebung des Signals des Bindungspartners wahrgenommen werden. Diese Wanderung zu niedrigeren Frequenzen bzw. ppm-Werten im Spektrum wird als Isotopenverschiebung bezeichnet und ermöglicht den indirekten Nachweis von Isotopen durch die Differenz der chemischen Verschiebungen des Bindungspartnersignals gegenüber einer Referenzverbindung ohne Isotopen. Die Isotopenverschiebung kommt zustande, indem die höhere Elektronendichte, die den Atomkern des Bindungspartners umgibt, die Abschirmungskonstante  $\sigma$  des Kerns erhöht, wodurch nach Gl.4<sup>24</sup> das

lokale Magnetfeld  $B_{\text{lokal}}$  verringert wird. Durch das kleinere lokale Magnetfeld sinkt die Larmor-Frequenz  $\nu_L$  mit der die magnetischen Momente der Kerne um das angelegte Magnetfeld  $B_0$  präzedieren (Gl.5)<sup>24</sup>.

$$B_{\text{lokal}} = (1 - \sigma)B_0 \quad (4)$$

$$\nu_L = \frac{\gamma B_{\text{lokal}}}{2\pi} \quad (5) \quad \gamma = \text{gyromagnetisches Verhältnis}$$

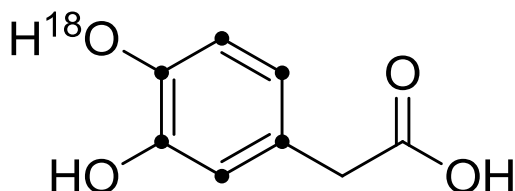
Die chemische Verschiebung  $\delta$  nimmt somit bei kleinerer Larmor-Frequenz (Gl.6) bzw. größerer Abschirmung des Kerns (Gl.7) ab<sup>24</sup>.

$$\delta = \frac{\nu - \nu^\circ}{\nu^\circ} \times 10^6 \quad (6) \quad \nu^\circ = \text{Larmor-Frequenz des Referenzkerns}$$

$$\delta = \frac{\sigma^\circ - \sigma}{1 - \sigma^\circ} \times 10^6 \quad (7) \quad \sigma^\circ = \text{Abschirmungskonstante des Referenzkerns}$$

Die Stärke der Abschirmungskonstanten und damit auch der messbaren Isotopenverschiebung ist jedoch nicht nur von der Art des Isotops abhängig, sondern auch von den benachbarten funktionellen Gruppen, der Temperatur oder dem Lösungsmittel. Da sich die Massen von Wasserstoff und Deuterium um fast 100% unterscheiden ist es nicht verwunderlich, dass die entstehende Isotopenverschiebung durch Deuterium sehr groß ist. Die Differenz der chemischen Verschiebungen der <sup>13</sup>C-Signale von CHCl<sub>3</sub> und CDCl<sub>3</sub> beträgt hier ca. 200 ppb (Anhang, S. LXI) Der Isotopeneffekt und die dadurch entstehenden Isotopenverschiebungen, die durch den Austausch von <sup>16</sup>O gegen <sup>18</sup>O entstehen, sind durch ihre geringe Massendifferenz von 6,23 % wesentlich geringer. Die durch den <sup>18</sup>O verursachte <sup>13</sup>C-Kohlenstoffverschiebung einer <sup>18</sup>O-<sup>13</sup>C- Bindung liegt für verschiedene funktionelle Gruppen im Bereich von 16 – 54 ppb<sup>25,26</sup> und für verschiedene Phenylether bei 26 ppb (Methylether)<sup>2</sup>, 25 ppb (Ethylether)<sup>26</sup> und 18 ppb (Vinylether)<sup>26</sup>. Die <sup>31</sup>P-Verschiebung einer <sup>18</sup>O-<sup>31</sup>P-Bindung wurde bereits intensiv für Moleküle wie ATP und verschiedene Zucker bestimmt und liegt im Bereich von 14-43 ppb<sup>15</sup>. Die <sup>31</sup>P-Verschiebung einer <sup>18</sup>O markierten phenolischen Hydroxylgruppe liegt im Bereich von 15- 21 ppb<sup>27, 28</sup>.

## 1.6. Die $^{18}\text{O}$ -markierte Modellverbindungen



Die einzige kommerziell erhältliche Verbindung mit einer  $^{18}\text{O}$  enthaltenden, phenolischen Hydroxylgruppe ist die 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (Ring  $^{13}\text{C}_6$ , 99%; 4-Hydroxy- $^{18}\text{O}$ , 95%). Zur erfolgreichen Derivatisierung der markierten Dihydroxyphenylacetic acid musste zunächst untersucht werden wie sich phenolische Hydroxylgruppen allgemein am besten mit einem Phosphorreagenz derivatisieren lassen, ob die 3,4-Dihydroxyposition eine Derivatisierung durch sterische Behinderung der Phosphorsubstituenten untereinander erschweren oder sogar verhindern könnte und welchen Einfluss die Carboxylgruppe auf die Reaktion hat. Da uns von der markierten Dihydroxyphenylacetic acid lediglich nur 10 mg zu Verfügung standen, musste während aller angesprochenen Untersuchungen zusätzlich immer darauf hingearbeitet werden, dass man am Ende die markierte Substanz im Mikromaßstab derivatisieren und aufreinigen musste.

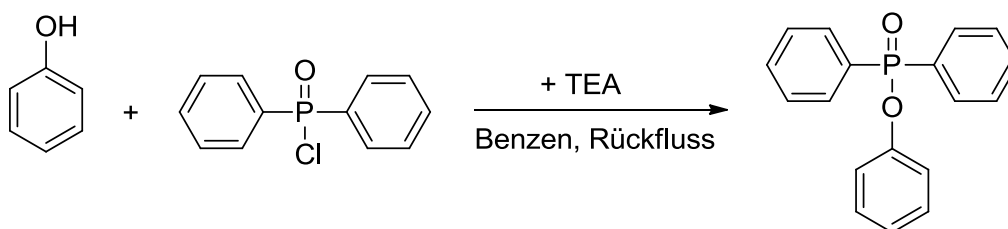
### 2. Zielstellung

Durch die Derivatisierung einer phenolischen  $^{18}\text{O}$ -markierten Hydroxylgruppe einer Modellverbindung sollte die  $^{18}\text{O}$ -verursachte  $^{31}\text{P}$ -Isotopenverschiebung beobachtet werden. Dazu muss ein geeignetes Phosphorreagenz sowie die notwendigen Reaktionsbedingungen und Aufreinigungsverfahren ermittelt werden, um im Mikromaßstab die Modellverbindungen effektiv zu derivatisieren und in hohen Ausbeuten zu erhalten. Zusätzlich sollten zwei ausgewählte Naturstoffe derivatisiert werden, um die Anwendungsmöglichkeiten der Methode für Verbindungen mit strukturellen Besonderheiten zu untersuchen.

### 3. Die Synthesen

(Anhang, S. LXII, Übersicht der Synthesen)

#### 3.1. Phosphinylierung von Phenol mit DPPC



##### 3.1.1. Synthese, Extraktion und Aufreinigung

109,34 mg Phenol ( $1,16 \times 10^{-3}$  mol) wurden in einem sekurierten Rundkolben in 50 ml Benzen gelöst. Unter Röhren wurden zu der Lösung 533  $\mu$ l DPPC (2,4 eq.) und 643  $\mu$ l TEA (4 eq.) tropfenweise pipettiert. Der Ansatz wurde für zwei Stunden unter Röhren und Rückfluss erhitzt. Während der Reaktion fiel in der ansonsten klaren Lösung TEA-HCl als ein weißer, kristalliner Niederschlag aus. Nach der Reaktionszeit wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgeköhlt und 75 ml destilliertes Wasser zugegeben. Die Wasserphase wurde mit konz. HCl auf pH 2 angesäuert und die organische Phase separiert. Die organische Phase wurde dreimal mit 100 ml destilliertem Wasser gewaschen, mit  $Mg_2SO_4$  getrocknet und nach Filtration im Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde durch OCC mit Kieselgel und HEE 1:1 aufgereinigt. Die Masse des weißen, kristallinen Produktes betrug 296,5 mg ( $1,00 \times 10^{-3}$  mol) was einer Ausbeute von 86,7% entspricht.

##### 3.1.2. Analytische Daten des Phenol-DPPC

(Anhang, S. I-IV)

DC  $R_f$  = 0,33 (n-Hexan/Essigester 1:1)

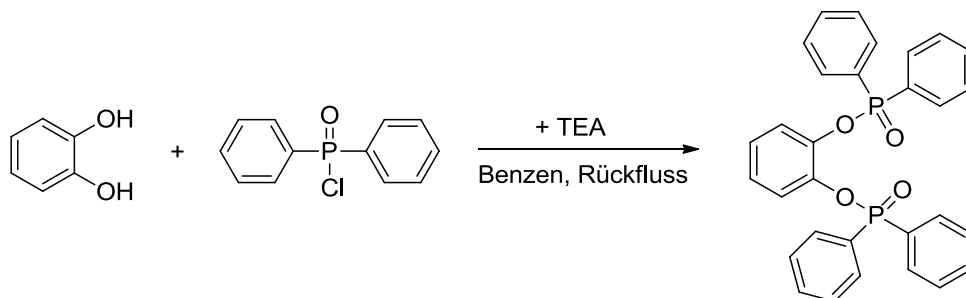
ESIMS,  $m/z$  317  $[M+Na]^+$ , 295  $[M+H]^+$

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  6,98 (t, 1H,  $^3J_{HH} = 7,0$  Hz, H-4), 7,16 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 8,1$  Hz, H-3/5), 7,20 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 8,1$  Hz, H-2/6), 7,37 (m, 4H, H-3`/5`), 7,42 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 7,1$  Hz,  $^5J_{PH} = 1,3$  Hz, H-4`), 7,88 (dd, 4H,  $^3J_{HH} = 7,7$  Hz,  $^3J_{PH} = 13$  Hz, H-2`/6`)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  120,5 (d, 2C,  $^3J_{\text{PC}} = 4,5$  Hz, C-2/6), 124,4 (s, 1C, C-4), 128,4 (d, 4C,  $^3J_{\text{PC}} = 13,6$  Hz, C-3`/5`), 129,4 (s, 2C, C-3/5), 130,7 (d, 2C,  $^1J_{\text{PC}} = 138$  Hz, Überlagerung mit C-2`/6`-Signal, C-1`), 131,6 (d, 4C,  $^2J_{\text{PC}} = 10,3$  Hz, C-2`/6`), 132,3 (d, 2C,  $^4J_{\text{PC}} = 2,6$  Hz, C-4`), 150,8 (d, 1C,  $^2J_{\text{PC}} = 8,2$  Hz, C-1)

$^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  30,73 (s)

### 3.2. Phosphinylierung von Brenzkatechin mit DPPC



#### 3.2.1. Synthese, Extraktion und Aufreinigung

49,84 mg Brenzkatechin ( $4,53 \times 10^{-4}$  mol) wurden in einem sekurierten Rundkolben in 50 ml Benzen mit Hilfe von Ultraschall gelöst. Unter Rühren wurden zu der Lösung 415  $\mu\text{l}$  DPPC (4,8 eq. bzw. 2,4 eq. pro Hydroxylgruppe) und 502  $\mu\text{l}$  TEA (8 eq. bzw. 4 eq. pro Hydroxylgruppe) tropfenweise pipettiert. Der Ansatz wurde für zwei Stunden unter Rühren und Rückfluss erhitzt. In der klaren Lösung viel TEA-HCl aus. Nach der Reaktionszeit wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und 75 ml destilliertes Wasser zugegeben. Die Wasserphase wurde mit konz. HCl auf pH 2 angesäuert und die organische Phase separiert. Die organische Phase wurde anschließend dreimal mit 100 ml destilliertem Wasser gewaschen, mit  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  getrocknet und nach Filtration im Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde durch OCC mit Kieselgel und HEE 1:1 aufgereinigt. Die Masse des flüssigen, farblosen Produktes betrug 207,5 mg ( $4,07 \times 10^{-4}$  mol) was einer Ausbeute von 89,8% entspricht.

#### 3.2.2. Analytische Daten des Brenzkatechin-DPPC

(Anhang, S.V-IX)

DC  $R_f = 0,20$  (n-Hexan/Essigester 1:1)

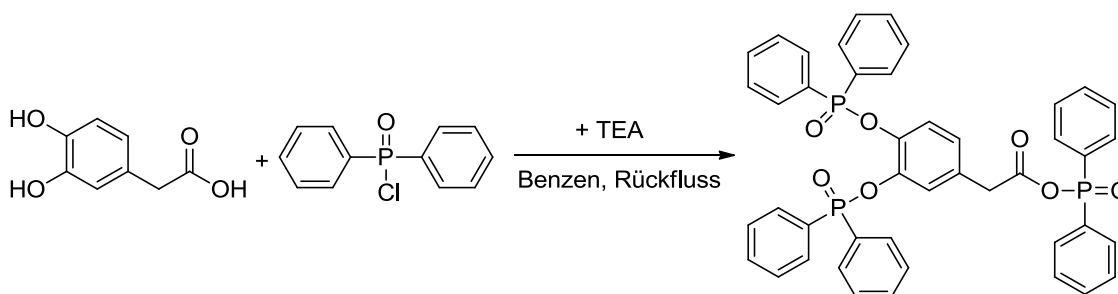
ESIMS,  $m/z$  533  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 511  $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,83 (m, 2H, H-4/5), 7,34 (2H, Überlagerung mit Signalen von H-3 $\prime$ /5 $\prime$ , H-3/6), 7,37 (t, 8H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,6$  Hz,  $^4J_{\text{PH}} = 3,7$  Hz, H-3 $\prime$ /5 $\prime$ ), 7,51 (t, 4H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,4$  Hz,  $^5J_{\text{PH}} = 1,3$  Hz, H-4 $\prime$ ), 7,87 (d, 8H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,4$  Hz,  $^3J_{\text{PH}} = 13$  Hz, H-2 $\prime$ /6 $\prime$ )

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  121,6 (d, 2C,  $^3J_{\text{PC}} = 4,1$  Hz, C-3/6), 124,9 (s, 2C, C-4/5), 128,6 (d, 8C,  $^3J_{\text{PC}} = 13,2$  Hz, C-3 $\prime$ /5 $\prime$ ), 130,6 (d, 4C,  $^1J_{\text{PC}} = 138$  Hz, C-1 $\prime$ ), 131,7 (d, 8C,  $^2J_{\text{PC}} = 10,9$  Hz, C-2 $\prime$ /6 $\prime$ ), 132,5 (d, 4C,  $^4J_{\text{PC}} = 2,8$  Hz, C-4 $\prime$ ), 141,8 (dd, 2C,  $^2J_{\text{PC}} = 8,2$  Hz,  $^3J_{\text{PC}} = 6,5$  Hz, C-1/2)

$^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  32,17 (s)

### 3.3. Phosphinylierung von 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure mit DPPC



#### 3.3.1. Synthese und Aufarbeitung

50,20 mg des violetten, festen DPA ( $2,98 \times 10^{-4}$  mol) wurden in einem sekurierten Rundkolben in 50 ml Benzen suspendiert und unter Rühren 410  $\mu\text{l}$  DPPC (7,2 eq. bzw. 2,4 eq. pro Hydroxyl- und Carboxylgruppe) und 496  $\mu\text{l}$  TEA (12 eq. bzw. 4 eq. pro Hydroxyl- und Carboxylgruppe) zugegeben. Der Ansatz wurde für zwei Stunden unter Rühren und Rückfluss erhitzt. Die Bildung von TEA-HCl konnte beobachtet werden. Im Gegensatz zu den vorherigen Beobachtungen blieb die Lösung jedoch nicht klar sondern verfärbte sich während der Reaktion Orange (Anhang, S. XII, 4.2). Vom Ansatz wurden 100  $\mu\text{l}$  entnommen und für eine LC-MS-Messung verwendet. Die Auswertung der LC-MS-Analyse zeigte, dass sich eine Vielzahl von unterschiedlichen Produkten gebildet hat, die nicht durch LC separiert werden konnten. DC-Versuche mit verschiedenen Laufmittelkombinationen zeigten das gleiche Ergebnis (Anhang, S.XII, 4.1) wodurch es nicht möglich war die Produkte durch OCC aufzutrennen.



### 3.3.2. Analytische Daten von 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure

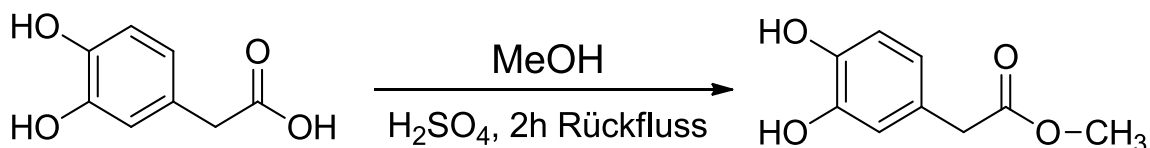
(Anhang, S.IX-XII)

DC  $R_f$  = 0,42 (Essigester)

$^1\text{H-NMR}$  (MeOD)  $\delta$  3,42 (s, 2H, H-2), 6,58 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,08$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1,8$  Hz, H-6'), 6,70 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,08$  Hz, H-5'), 6,73 (d, 1H,  $^4J_{\text{HH}} = 1,8$  Hz, H-2')

$^{13}\text{C-NMR}$  (MeOD)  $\delta$  41,36 (s, C-2), 116,39 (s, C-5'), 117,50 (s, C-2'), 121,87 (s, C-6'), 127,44 (s, C-1'), 145,24 (s, C-4'), 146,14 (s, C-3'), 176,49 (s, C-1)

### 3.4. Methylierung von 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure



#### 3.4.1. Synthese, Extraktion und Aufreinigung

Die Methylierung wurde nach Gambacorta et. al.<sup>34</sup> durchgeführt. Dazu wurden 99,5 mg DPA ( $5,917 \times 10^{-4}$  mol) in 20 ml trockenem Methanol in einem sekurierten Rundkolben gelöst. Da in der Vorschrift keine genauen Angaben über die Menge an konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gemacht wurden, wurde ein Überschuss von 1 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in die rührende DPA-Lösung pipettiert und der Ansatz für zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde der Ansatz im Rotationsverdampfer eingedampft was eine blau-schwarze Flüssigkeit ergab. Die Flüssigkeit wurde in 20 ml Essigester aufgenommen und anschließend im Scheidetrichter schrittweise mit insgesamt 40 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung auf pH 8-9 gebracht. Die Phasen wurden getrennt und die Wasserphase dreimal mit 20 ml Essigester rückextrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden zweimal mit 40 ml Brine (gesättigte Kochsalzlösung) gewaschen und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde danach mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingedampft was eine gelbe Flüssigkeit hinterließ. Die Ausbeute betrug 100,8 mg (93,5 %). NMR-Untersuchungen zeigten, dass das Produkt noch Verunreinigungen enthielt. Da in der Vorschrift das Produkt als sauber genug bewertet und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet wurde lagen keine Informationen zur Aufreinigung vor. Wir versuchten daher zunächst das Verfahren auf einen 5 mg Ansatz zu übertragen.

5,18 mg DPA ( $3,08 \times 10^{-5}$  mol) wurden in einem sekurierten Rundkolben mit 5 ml trockenem Methanol gelöst und 100 µl konz.  $H_2SO_4$  zupipettiert. Nach der Reaktionszeit wurde der Ansatz eingedampft und der Rest in 1 ml Essigester gelöst. Schrittweise wurden 3,5 ml gesättigte  $NaHCO_3$ -Lösung zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phasen wurde dreimal mit 2 ml Essigester rückextrahiert und die vereinigten organischen Phasen zweimal mit 3 ml Brine gewaschen. Nach der Phasentrennung wurden die gesammelten Brine-Phasen zweimal mit 2 ml Essigester rückextrahiert und die gesammelten organischen Phasen zur Trocknung durch eine 1 ml Phasentrennsäule mit ca. 2 g  $Na_2SO_4$  geleitet. Die getrocknete Essigester-Phase wurde eingedampft und getrocknet was eine gelbe Flüssigkeit hinterließ. Die Ausbeute betrug 6,04 mg (107,7 %). Das Produkt wurde anschließend mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die gesammelten Methanol-Wasser-Fractionen wurden mittels Vakuumzentrifuge vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand war eine braune Flüssigkeit mit einer Masse von 4,26 mg (76%).

#### **3.4.2. Analytische Daten von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäuremethylester (Anhang, S.XII-XV)**

DC  $R_f$  = 0,63 (Essigester)

3,4-Dihydroxyphenylelessigsäuremethylester (Referenz)

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  3,45 (s, 2H, H-2), 3,64 (s, 3H, H-OMe), 6,57 (dd, 1H,  $^3J_{HH} = 8,10$  Hz,  $^4J_{HH} = 1,70$  Hz, H-6'), 6,69 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 8,10$  Hz, H-5'), 6,71 (d, 1H,  $^4J_{HH} = 1,7$  Hz, H-2')

$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  40,47 (s, C-2), 52,27 (s, C-OMe), 115,74 (s, C-5'), 116,64 (s, C-2'), 121,77 (s, C-6'), 126,05 (s, C-1'), 143,23 (s, C-4'), 143,98 (s, C-3'), 174,29 (s, C-1)

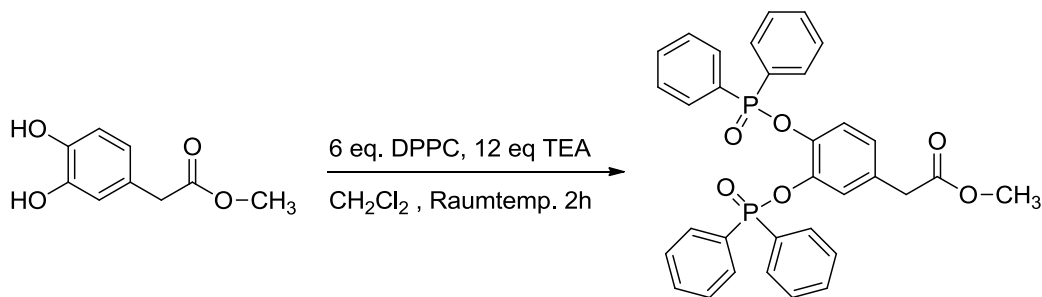
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäuremethylester (aus der Methylierung von DPA)

ESIMS,  $m/z$  181  $[M-H]^-$

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  3,51 (s, 2H, H-2), 3,70 (s, 3H, H-OMe), 6,67 (dd, 1H,  $^3J_{HH} = 8,20$  Hz,  $^4J_{HH} = 1,50$  Hz, H-6'), 6,77 (d, 1H, verdeckt von H-2', H-5'), 6,78 (s, 1H, H-2')

$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  40,46 (s, C-2), 52,22 (s, C-OMe), 115,44 (s, C-5'), 116,33 (s, C-2'), 121,85 (s, C-6'), 126,47 (s, C-1'), 142,94 (s, C-4'), 143,66 (s, C-3'), 172,95 (s, C-1)

### 3.5. Phosphinylierung von 3,4-Dihydroxyphenylessigsäuremethylester mit DPPC



#### 3.5.1. Synthese, Extraktion und Aufreinigung

Bei der Phosphinylierung wurde sich an Liu et al.<sup>30</sup> orientiert. 1,25 Met-DPA ( $6,86 \times 10^{-6}$  mol) wurden in einem 4 ml Vial abgewogen und in 500  $\mu$ l trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Zu der Lösung wurden 7,9  $\mu$ l DPPC (6 eq. bzw. 3 eq. pro Hydroxylgruppe) und anschließend 11,5  $\mu$ l TEA (12 eq. bzw. 6 eq. pro Hydroxylgruppe) zugegeben. Bei der Zugabe des TEA erwärmte sich der Ansatz und es bildete sich weißer Nebel der nach wenigen Minuten jedoch wieder verschwand. Der Ansatz wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur belassen und anschließend, bis auf wenige Mikroliter eingedampft. Der Rest wurde auf DC-Alufolien aufgetragen und mit HEE 1:1 als Eluent aufgetrennt. Die Produktbanden wurden ausgeschnitten und mit Acetonitril von den DC-Alufolien eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden eingedampft und erneut in 1-2 ml Acetonitril aufgenommen. Das gelöste Produkt wurde mithilfe einer Filtereinheit (0,45  $\mu$ m Porengröße) und einer 1 ml Spritze vom Kieselgel getrennt. Das Filtrat wurde erneut eingedampft und getrocknet. Zurück blieb eine klare, farblose Flüssigkeit mit einer Masse von 3,9 mg (97,6 %).

#### 3.5.2. Analytische Daten von 3,4-Dihydroxyphenylessigsäuremethylester-DPPC (Anhang, S. XVI-XXIV)

DC  $R_f$  = 0,48 (Essigester)

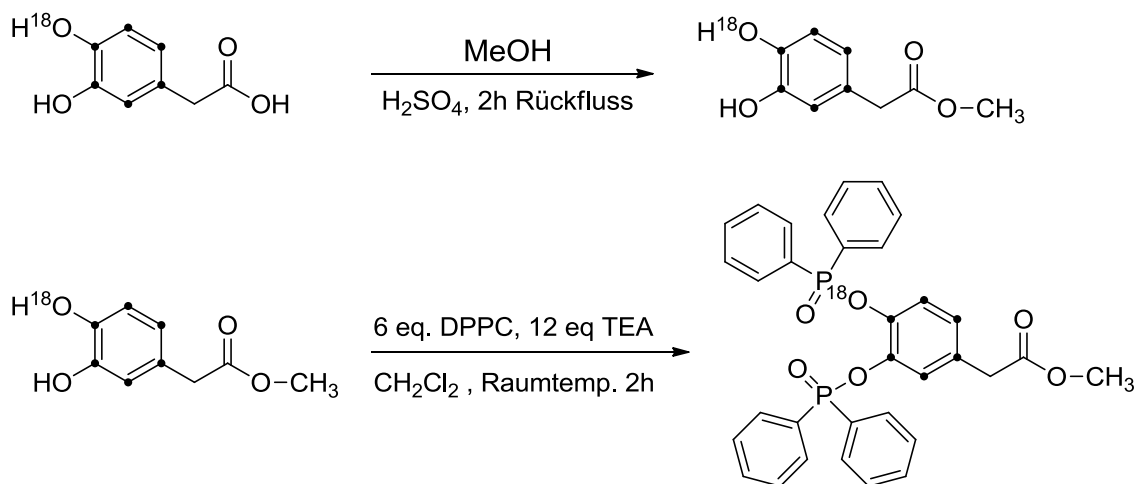
ESIMS,  $m/z$  1187 [2M+Na]<sup>+</sup>, 605 [M+Na]<sup>+</sup>, 583 [M+H]<sup>+</sup>, 581 [M-H]<sup>-</sup>, 381 [M-(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)P(O)]<sup>-</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3,36 (s, 2H, H-2), 3,56 (s, 3H, H-OMe), 6,81 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,5 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2,0 Hz, H-6<sup>^</sup>), 7,27 (verdeckt von H-2<sup>^</sup>, 1H, H-5<sup>^</sup>), 7,29 (verdeckt von H-5<sup>^</sup>, 1H, H-2<sup>^</sup>), 7,38 (dd, 8H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>PH</sub> = 3,8 Hz, H-3/5 $\alpha$  und H-3/5 $\beta$ ), 7,52 (dd, 4H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,6 Hz, <sup>5</sup>J<sub>PH</sub> = 1,0 Hz, H-4 $\alpha$  und H-4 $\beta$ ), 7,86 (dd, 8H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,2 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1,2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>PH</sub> = 12,8 Hz, H-2/6 $\alpha$  und H-2/6 $\beta$ )

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  40,38 (s, C-2), 52,12 (s, C-OMe), 121,54 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 4,0$  Hz, C-5'), 122,78 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 4,0$  Hz, C-2'), 125,91 (s, C-6'), 128,71 und 128,85 (d, 8C,  $^3J_{\text{PC}} = 13,8$  Hz, C-3/5 $\alpha$  und C-3/5 $\beta$ ), 130,67 und 130,76 (d, 4C,  $^1J_{\text{PC}} = 138,1$  Hz, C-1 $\alpha$  und C-1 $\beta$ ), 131,01 (s, C-1'), 131,96 und 131,98 (d, 8C,  $^2J_{\text{PC}} = 10,6$  Hz, C-2/6 $\alpha$  und C-2/6 $\beta$ ), 132,72 und 132,73 (d, 4C,  $^4J_{\text{PC}} = 2,8$  Hz, C-4 $\alpha$  und C-4 $\beta$ ), 141,07 (dd,  $^2J_{\text{PC}} = 7,5$  Hz,  $^3J_{\text{PC}} = 6,0$  Hz, C-4'), 141,81 (dd,  $^2J_{\text{PC}} = 7,5$  Hz,  $^3J_{\text{PC}} = 6,0$  Hz, C-3'), 171,31 (s, C-1)

$^{31}\text{P}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  32,30 (s, P- $\beta$ ), 32,43 (s, P- $\alpha$ )

### 3.6. Methylierung und anschließende Phosphinylierung der markierten 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure



#### 3.6.1. Synthese, Extraktion und Aufreinigung

Für die Methylierung wurden die vorhandenen 10 mg des DPA( $^{18}\text{O}$ ) in einem 4 ml Vial mit 1 ml trockenem Methanol gelöst und 500  $\mu\text{l}$  in einen mit 4,5 ml trockenem Methanol befüllten Rundkolben überführt. Auffällig war, dass im Gegensatz zum violetten DPA, das DPA( $^{18}\text{O}$ ) dunkelbraun war. Die Lösung wurde mit 100  $\mu\text{l}$  konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt und für zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel verdampft was eine dunkelblaue Flüssigkeit hinterließ. Der Rückstand wurde in 1 ml Essigester gelöst und mit 3,5 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung versetzt. Danach wurden die Phasen getrennt, die wässrige Phase dreimal mit Essigester extrahiert und die gesammelten organischen Phasen zweimal mit 3 ml Brine gewaschen. Die Brine-Phasen wurden zweimal mit 2 ml Essigester rückextrahiert und die vereinigten organischen Phasen durch eine, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  befüllte, 1 ml Phasentrennsäule getrocknet.

Die gesammelten Fraktionen aus der Säule wurden eingedampft und getrocknet was eine braune Flüssigkeit hinterließ. Das Produkt wurde anschließend mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die gesammelten Methanol-Wasser-Fractionen wurden mittels Vakuumentrifuge vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand war eine dunkelbraune Flüssigkeit mit einer Masse von 4,08 mg ( $2,147 \times 10^{-5}$  mol). Davon ausgehend, dass vom DPA( $^{18}\text{O}$ ) 5 mg ( $2,84 \times 10^{-5}$  mol) benutzt worden sind, entspricht die erhaltene Produktmasse einer Ausbeute von 75,6 %.

Die 4,08 mg Met-DPA( $^{18}\text{O}$ ) wurden in 400  $\mu\text{l}$  trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst, 100  $\mu\text{l}$  entnommen und in ein 4 ml Vial pipettiert. Nach der Trocknung konnte die Masse an Met-DPA( $^{18}\text{O}$ ) im Vial auf 1,00 mg ( $5,26 \times 10^{-6}$  mol) bestimmt werden. Das Met-DPA( $^{18}\text{O}$ ) wurde in 500  $\mu\text{l}$  trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und mit 6  $\mu\text{l}$  DPPC (6 eq. bzw. 3 eq. pro Hydroxylgruppe) und 8,75  $\mu\text{l}$  TEA (12 eq. bzw. 6 eq. pro Hydroxylgruppe) versetzt wobei es wieder zur Wärmeentwicklung und der Bildung eines weißen Nebels kam. Der Ansatz wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur belassen und anschließend, bis auf wenige Mikroliter eingengt. Der Rückstand wurde auf DC-Alufolien aufgetragen und mit HEE 1:1 aufgetrennt. Nach dem Ausschneiden und Eluieren der Produktbanden wurde das Produkt vom Kieselgel getrennt und getrocknet. Zurück blieb eine klare, farblose Flüssigkeit mit einer Masse von 2,4 mg ( $4,07 \times 10^{-6}$  mol), was einer Ausbeute von 77,4 % entspricht.

### 3.6.2. Analytische Daten der markierten 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure (Anhang, S. XXV-XXIX)

DC  $R_f = 0,37$  (Essigester)

ESIMS,  $m/z$  131  $[\text{M}-\text{COOH}]^-$

$^1\text{H-NMR}$  (MeOD)  $\delta$  3,42 (q, 2H,  $^2J_{\text{CH}} = 5,7$  Hz,  $^3J_{\text{CH}} = 5,3$  Hz, H-2), 6,57 (ddt, 1H,  $^1J_{\text{CH}} = 158$  Hz,  $^2J_{\text{CH}} = 8,0$  Hz  $^3J_{\text{HH}} = 8,2$  Hz, H-6'), 6,70 (m, 1H,  $^1J_{\text{CH}} = 158$  Hz, H-5' und H-2')

$^{13}\text{C-NMR}$  (MeOD)  $\delta$  41,41 (m,  $^1J_{\text{CC}} = 45$  Hz, C-2), 115,6 bis 118,1 (m, 2C, C-2' und C-5'), 121,68 (dt,  $^1J_{\text{CC}} = 59$  Hz,  $^2J_{\text{CC}} = 6,1$  Hz, C-6'), 127,44 (dt,  $^1J_{\text{CC}} = 59$  Hz,  $^2J_{\text{CC}} = 6,1$  Hz, C-1'), 144,5 bis 147,0 (m, 2C, C-3' und C-4') 176,25 (s, C-1)

**3.6.3. Analytische Daten des markierten 3,4-Dihydroxyphenylessigsäuremethylester**  
(Anhang, S. XXX)

DC  $R_f$  = 0,63 (Essigester)

ESIMS,  $m/z$  189 [M-H]<sup>-</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 3,51 (dt, 2H, <sup>2</sup>J<sub>CH</sub> = 5,7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>CH</sub> = 5,3 Hz, H-2), 3,70 (s, 3H, H-OMe), 6,67 (m, 1H, <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 159 Hz, H-6'), 6,78 (m, 1H, <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 158 Hz, H-5', H-2')

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 40,45 (m, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 45 Hz, C-2), 114,6 bis 117,1 (m, 2C, C-2' und C-5'), 121,82 (dt, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 59 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CC</sub> = 6,0 Hz, C-6'), 126,48 (dt, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 59 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CC</sub> = 6,0 Hz, C-1'), 141,9 bis 144,6 (m, 2C, C-3' und C-4') 172,92 (s, C-1)

**3.6.4. Analytische Daten des markierten 3,4-Dihydroxyphenylessigsäuremethylester-DPPC**  
(Anhang, S. 29, XXXI-XXXVI)

DC  $R_f$  = 0,48 (Essigester)

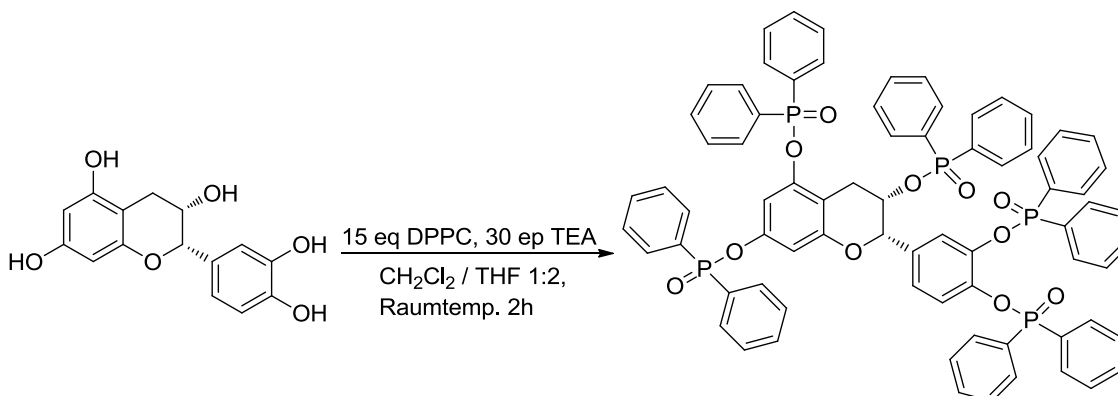
ESIMS,  $m/z$  613 [M+Na]<sup>+</sup>, 591 [2M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 3,40 (dt, 2H, <sup>2</sup>J<sub>CH</sub> = 6,0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>CH</sub> = 5,2 Hz, H-2), 3,57 (s, 3H, H-OMe), 6,80 (m, 1H, <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 160 Hz, H-6'), 7,27 (m, 2-H, Überlagerungen zwischen H-2' und H-5', <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 160 Hz, H-2' und H-5'), 7,38 (m, 8H, H-3/5α und H-3/5β), 7,52 (m, 4H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,5 Hz, J = 1,5 Hz, <sup>5</sup>J<sub>PH</sub> = 1 Hz, H-4α und H-4β), 7,86 (dd, 8H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,2 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1,2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>PH</sub> = 12,8 Hz, H-2/6α und H-2/6β)

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 52,22 (s, C-OMe), 120,8 bis 123,7 (m, 2C, C-5' und C-2'), 125,96 (dt, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 59 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CC</sub> = 6,0 Hz, C-6'), 128,85 und 128,88 (d, 8C, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 14,0 Hz, C-3/5α und C-3/5β), 131,08 (dt, <sup>1</sup>J<sub>CC</sub> = 59 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CC</sub> = 6,0 Hz, C-1'), 132,11 und 132,09 (d, 8C, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 11,0 Hz, C-2/6α und C-2/6β), 132,79 (m, 4C, C-4α und C-4β), 140,0 bis 143,0 (m, 2C, C-4' und C-3')

<sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 32,28 (s, P-β), 32,43 (s, P-α)

### 3.7. Phosphinylierung von (-)-Epicatechin



#### 3.7.1. Synthese, Extraktion und Aufreinigung

2,66 mg ( $9,16 \times 10^{-6}$  mol) (-)-Epicatechin wurden in einem 4 ml Vial in einem Gemisch aus 500  $\mu$ l trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 1 ml trockenem THF gelöst. Unter leichtem Rühren wurden 27  $\mu$ l DPPC (15 eq. bzw 3 eq. pro Hydroxylgruppe) und 38  $\mu$ l TEA (30 eq. bzw 6 eq. pro Hydroxylgruppe) zugegeben. Neben der Entstehung von Wärme und weißem Nebel konnte zusätzlich das Ausfallen des TEA-HCl als weißer Niederschlag bemerkt werden. Nach zwei Stunden Reaktionszeit wurden 125  $\mu$ l des Ansatzes entnommen und für eine LC-MS Analyse verwendet. Die Messungen zeigten, dass ein Hauptprodukt entstanden ist, dessen Masse dem vierfach phosphinylierten Epicatechins entsprach. Anschließend wurde der restliche Ansatz eingedampft, in 1 ml trockenem THF aufgenommen, das TEA-HCl abzentrifugiert und das Salz dreimal mit 1 ml trockenem THF gewaschen. Die gesammelten THF-Phasen wurden bis auf wenige Mikroliter eingedampft und durch präparative DC mit Aceton als Eluent aufgetrennt. Die Elution der ausgeschnittenen Produktbanden erfolgte mit Aceton. Nach der Vereinigung der Acetonfraktionen und Filtration wurde das Filtrat eingedampft und im Exikator getrocknet. NMR-Messungen zeigten, dass das Produkt noch nicht sauber war. Da die Verunreinigungen per DC nicht mit Aceton als Fließmittel vom Produkt zu trennen waren, wurde für die nächste Trennung Essigester verwendet. Da das Produkt auch nach diesem Schritt noch nicht komplett sauber war, wurde es ein drittes Mal aufgearbeitet. Diesmal wurden dieselben DC-Alufolien mit dem Produkt viermal in Essigester laufen gelassen. Das danach erhaltene Produkt hatte eine Masse von 5,58 mg. Unter Berücksichtigung der Entnahme der 125  $\mu$ l für die LC-MS-Analyse entspricht diese Masse einer Ausbeute von 61%.

### 3.7.2. Analytische Daten des (-)-Epicatechin-DPPC (4-fach-phosphinyliert)

(Anhang, S. XXXIX-LII)

DC  $R_f = 0,18$  (Essigester)

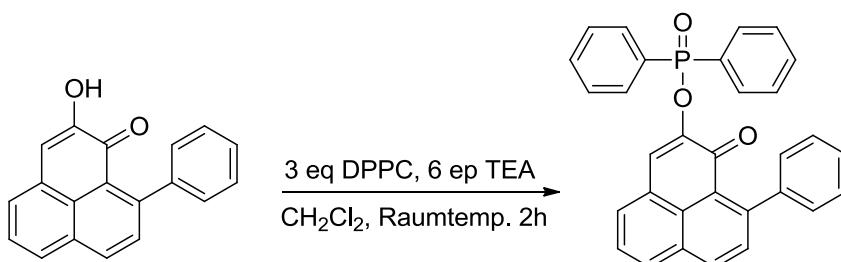
ESIMS,  $m/z$  1113  $[M+Na]^+$ , 913  $[M+Na - (C_6H_5)_2P(O)]^+$ , 713  $[M+Na - 2(C_6H_5)_2P(O)]^+$ , 1135  $[M+CHOOH - H]^-$ , 1089  $[M - H]^-$ , 889  $[M - (C_6H_5)_2P(O) - H]^-$ , 689  $[M - 2(C_6H_5)_2P(O) - H]^-$

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  2,83 (dd, 1H,  $^2J_{HH} = 17,3$  Hz,  $^3J_{HH} = 4,2$  Hz, H-4<sub>a</sub> oder H<sub>b</sub>-4), 2,90 (dd, 1H,  $^2J_{HH} = 17,3$  Hz,  $^3J_{HH} = 2,0$  Hz, H<sub>a</sub>-4 oder H<sub>b</sub>-4), 4,03 (m, 1H, H-3), 4,69 (s, 1H, H-2), 6,66 (d, 1H,  $^4J_{HH} = 2,4$  Hz, H-8), 6,79 (d, 1H,  $^4J_{HH} = 2,4$  Hz, H-6), 6,97 (dd, 1H,  $^3J_{HH} = 8,6$  Hz,  $^4J_{HH} = 2,0$  Hz, H-6'), 7,29 (d, 1H,  $^4J_{HH} = 1,7$  Hz, H-2'), 7,34 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 8,6$  Hz, H-5'), 7,39 (t, 4H,  $^3J_{HH} = 7,67$  Hz, H-3/5 $\delta$ ), 7,40 (t, 4H,  $^3J_{HH} = 7,67$  Hz, H-3/5 $\gamma$ ), 7,43 (t, 4H,  $^3J_{HH} = 7,67$  Hz, H-3/5 $\alpha$ ), 7,45 (t, 4H,  $^3J_{HH} = 7,67$  Hz, H-3/5 $\beta$ ), 7,52 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 7,3$  Hz, H-4 $\alpha$ ), 7,525 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 7,3$  Hz, H-4 $\delta$ ), 7,537 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 7,3$  Hz, H-4 $\gamma$ ), 7,55 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 7,3$  Hz, H-4 $\beta$ ), 7,79 (dd, 4H,  $^3J_{HH} = 7,3$  Hz, H-2/6 $\alpha$  und H-2/6 $\beta$ ), 7,86 (d, 4H,  $^3J_{HH} = 7,3$  Hz, H-2/6 $\delta$ ), 7,89 (d, 4H,  $^3J_{HH} = 7,3$  Hz, H-2/6 $\gamma$ )

$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  28,92 (s, C-4), 29,91 (s, C-2), 65,50 (s, C-3), 106,07 (d,  $^3J_{PC} = 4,0$  Hz, C-8), 106,83 (dd,  $^3J_{PC} = 6,0$  Hz  $^3J_{PC} = 4,0$  Hz, C-6), 108,33 (d,  $^3J_{PC} = 6,0$  Hz, C-10), 119,96 (d,  $^3J_{PC} = 4,0$  Hz, C-2'), 121,83 (d,  $^3J_{PC} = 3,7$  Hz, C-5'), 122,94 (s, C-6'), 128,7 bis 129,1 (d, 16C,  $^3J_{PC} = 13,3$  Hz, C-3/5 $\alpha$ - $\delta$ ), 129,8 bis 131,7 (d, 8C,  $^1J_{PC} = 137$  bis 139 Hz, C-1 $\alpha$ - $\delta$ ), 131,7 bis 132,2 (d, 16C,  $^2J_{PC} = 10,0$  Hz, C-2/6 $\alpha$ - $\delta$ ), 132,6 bis 133,0 (d, 8C,  $^4J_{PC} = 3$  bis 4 Hz, C-4 $\alpha$ - $\delta$ ), 134,70 (s, C-1'), 141,90 (dd,  $^2J_{PC} = 7,8$  Hz,  $^3J_{PC} = 6,0$  Hz, C-4'), 142,02 (dd,  $^2J_{PC} = 7,8$  Hz,  $^3J_{PC} = 6,0$  Hz, C-3'), 150,07 (d,  $^2J_{PC} = 8,0$  Hz, C-7), 150,40 (d,  $^2J_{PC} = 8,0$  Hz, C-5), 155,21 (s, C-9)

$^{31}P$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  31,18 (s, P- $\alpha$ ), 31,81 (s, P- $\beta$ ), 32,49 (s, P- $\gamma$ ), 32,83 (s, P- $\delta$ )

### 3.8. Phosphinylierung von Anigorufon





### 3.8.1. Synthese, Extraktion und Aufreinigung

1,22 mg ( $4,485 \times 10^{-6}$  mol) Anigorufon wurden in einem 4 ml Vial in 500  $\mu$ l trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und unter Rühren 2,6  $\mu$ l DPPC (3 eq.) und 3,7  $\mu$ l TEA (6 eq.) nacheinander zupipettiert. Schon kurz nach Zugabe des TEA färbte sich die Lösung von einem anfänglich intensiven dunkelgelb in ein hellgelb, es kam zur Wärmeentwicklung und Bildung von weißem Nebel. Nach zwei Stunden Reaktionszeit wurde der Ansatz bis auf wenige Mikroliter eingedampft und auf DC-Alufolien aufgetragen. An dieser Stelle wurde durch Unachtsamkeit eine geringe Menge des Reaktionsgemisches verschüttet. Um das Produkt aufzureinigen wurden die DC-Alufolien dreimal hintereinander in HEE 1:1 laufen gelassen und die ausgeschnittenen Banden anschließend mit Aceton von den DC-Alufolien eluiert. Danach wurden die gesammelten Acetonphasen eingedampft, mit Acetonitril aufgenommen, filtriert und das Produkt getrocknet. Zurück blieben 1,73 mg ( $3,66 \times 10^{-6}$  mol) einer hellgelben Flüssigkeit, was einer Ausbeute von 81,7 % entspricht.

### 3.8.2. Analytische Daten des Anigorufon-DPPC

(Anhang, S. LIII-LXI)

DC  $R_f$  = 0,45 (Essigester)

ESIMS,  $m/z$  967  $[2M+Na]^+$ , 495  $[M+Na]^+$ , 473  $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,30 (m, 2H, H-2/6'), 7,41 (m, 4H,  $^4J_{\text{PH}} = 3,7$  Hz, H-3/5 $\alpha$ ), 7,44 bis 7,52 (m, 5H, H-3/5', H-4' und H-4 $\alpha$ ), 7,54 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,2$  Hz, H-8), 7,57 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 8,2$  Hz, H-5), 7,75 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,2$  Hz, H-4), 7,95 (d, 1H, Überlagerung mit H-3 Signal, H-6), 7,97 (s, 1H, H-3), 7,99 (dd, 4H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,8$  Hz,  $^3J_{\text{PH}} = 12,5$  Hz, H-2/6 $\alpha$ ), 8,14 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,2$  Hz, H-7)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  126,14 (s, C-9b), 126,44 (s, C-3), 126,48 (s, C-9a), 126,74 (s, C-5), 127,37 (s, C-3a), 127,44 (s, C-4'), 127,97 (s, 2C, C-2/6'), 128,38 (s, 2C, C-3/5'), 128,53 (d, 4C,  $^3J_{\text{PC}} = 13,2$  Hz, C-3/5 $\alpha$ ), 130,64 (d, 2C,  $^1J_{\text{PC}} = 139$  Hz, C-1 $\alpha$ ), 131,07 (s, C-6), 131,53 (s, C-6a), 131,74 (s, C-8), 131,96 (s, C-4), 132,11 (d, 4C,  $^2J_{\text{PC}} = 10,3$  Hz, C-2/6 $\alpha$ ), 132,52 (d, 2C,  $^4J_{\text{PC}} = 3,0$  Hz, C-4 $\alpha$ ), 134,36 (s, C-7), 142,64 (s, C-1'), 145,67 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 9,5$  Hz, C-2), 148,24 (s, C-9), 178,56 ( aus HMBC entnommen, C-1)

$^{31}\text{P NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  33,06 (s)

## **4. Ergebnisse und Diskussion**

### **4.1. Phosphorreagenz und Reaktionsbedingungen**

Um DPA(<sup>18</sup>O) erfolgreich zu derivatisieren musste zunächst untersucht werden, unter welchen Bedingungen sich phenolische Hydroxylgruppen generell mit einem Phosphorreagenz derivatisieren lassen und ob die 3,4-Dihydroxyposition problematisch sein könnte. Dazu wurden Phenol und Brenzkatechin als Testverbindung ausgesucht. Da wir zuvor keinerlei Erfahrung mit den Vor- und Nachteilen der unterschiedlichen, erhältlichen Phosphorreagenzien hatten, wurden am Anfang Versuche mit zwei verschiedenen Reagenzien durchgeführt. Ein in der Literatur häufig erwähntes und in vielen verschiedenen Bereichen genutztes Reagenz ist 2-Chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholan (TMDP)<sup>19,20,35,36</sup>. Allerdings konnten keine Vorschriften zur Extraktion und Aufreinigung der derivatisierten Produkte mit TMDP gefunden werden. Ein anderes, im Vergleich zum TMDP strukturell deutlich unterschiedlicheres Phosphorreagenz ist Diphenylphosphinylchlorid (DPPC) für welches eine Vorschrift zur Phenolderivatisierung, Extraktion und Aufreinigung vorlag<sup>29</sup>. Im ersten Schritt wurde daher versucht, unter den beschriebenen Bedingungen die Phenolderivatisierung mit DPPC zu wiederholen und untersucht, ob sich TMDP bei gleichen Bedingungen zur Derivatisierung von Phenol eignet. Obwohl in der Vorschrift die Verwendung von Pyridin und TEA als gleichwertig beschrieben wurde, haben wir die stärkere Base TEA verwendet, welche als geeigneter nachgewiesen wurde<sup>30</sup> und anstatt equimolare Mengen an Base und Phosphorreagenz zu verwenden, wurde mit 2,4 eq. Phosphorreagenz und 4 eq. TEA pro Hydroxylgruppe des Substrats gearbeitet um sicherzustellen, dass die Derivatisierung möglichst vollständig abläuft. Aus den Versuchen mit TMDP und DPPC ging hervor, dass das Phenol-TMDP an der Luft nicht stabil war und sich in seine Ausgangsverbindungen zersetzte. Wir vermuten, dass der Grund dafür mit der Oxidationsstufe des Phosphors in Verbindung steht. Im Gegensatz zum TMDP liegt der Phosphor im DPPC nicht in der Oxidationsstufe +3, sondern +5 vor. Das ungebundene Elektronenpaar im Phosphor +3 könnte eine erhöhte Reaktivität und damit eine hohe Hydrolyseempfindlichkeit der TMDP-Produkte zur Folge haben, wodurch die Phosphoresterbindung zwischen TMDP und dem Phenol durch Wasser in der Luft oder in Lösungsmitteln gespalten werden konnte. Da das DPPC-Phenol jedoch stabil war und in hoher Ausbeute hergestellt werden konnte wurde DPPC als Phosphorreagenz und die beschriebene Methode zur Derivatisierung von Brenzkatechin verwendet.

## 4.2. Synthese und Strukturanalyse von Phenol- und Brenzkatechin-DPPC

Anhand der DC-Versuche (Anhang, S. I, 1.1 und S. V, 2.1), lies sich schon erkennen, dass die Reaktion des DPPC mit Phenol und Brenzkatechin effektiv, wenn nicht sogar quantitativ, nach 30 Minuten Reaktionszeit abgelaufen war. In beiden Fällen nimmt der Retentionsfaktor der Produkte im Vergleich zu den Ausgangsverbindungen ab was, beim Fließmittel HEE 1:1, für eine Erhöhung der Polarität spricht. Die Ausbeute des Phenol-DPPC war mit 86,7% noch höher als in der Literatur<sup>29</sup> beschrieben (76%) was höchstwahrscheinlich auf den Überschuss an Base und Phosphorreagenz zurück zu führen ist. Eine noch höhere Ausbeute von 89,8% konnte für Brenzkatechin-DPPC erzielt werden. Die ESIMS-Analyse der Produkte zeigte die erwarteten Massen bei positiver Ionisation jeweils als Addukt mit  $H^+$  und  $Na^+$  (Anhang, S. I, 1.2 und S. V, 2.2). Die Auswertung der NMR-Spektren zur Strukturanalyse von Phenol- und Brenzkatechin-DPPC war durch Vergleiche der Spektren möglich. Durch die große Ähnlichkeit der beiden Strukturen konnten einige Ergebnisse von einer Substanz auf die andere übertragen werden. In beiden Protonenspektren stimmen die Integrale der Signale mit der erwarteten Anzahl der Protonen überein (Anhang, S. II, 1.3 und S. VI, 2.3). Anhand dieser Protonenspektren konnte die wichtige Identifizierung der Protonensignale der DPPC-Phenylreste gut erfolgen da nur wenige Protonensignale vorhanden sind die nicht zum DPPC gehören. Schon die Werte der Integrale und das Finden von drei gleichen Strukturen mit den gleichen Aufspaltungsmustern im Protonenspektrum beider Substanzen lies eine Schlussfolgerung über die Zugehörigkeit zu. Anhand des COSY-Spektrums von Brenzkatechin-DPPC konnte dann gezeigt werden, dass nur eines der Protonensignale vom DPPC mit beiden anderen korreliert (Anhang, S.VIII, 2.5). Dieses Proton konnte dadurch als H-3/5` identifiziert werden. Die Zuordnung der anderen beiden Protonensignale kann schon anhand der  $J_{PH}$  gemacht werden. Am Beispiel von Brenzkatechin-DPPC ist  $J_{PH}$  der beiden zuzuordnenden Signal 13 Hz (bei 7,87 ppm) und 1,3 Hz (bei 7,51 ppm). Da die Stärke der Kopplungen und damit auch die Größe der Kopplungskonstanten mit der Entfernung der Kopplungspartner abnimmt, konnte H-2/6` bei 7,87 ppm und H-4` bei 7,51 ppm zugeordnet werden.  $J_{PH}$  von H-3/5` passt mit 3,7 Hz ebenfalls ins Bild. Diese Zuordnung kann durch die Ergebnisse des HSQC-Spektrums von Phenol-DPPC bestätigt werden (Anhang, S. IV, 1.5). Durch eine  $^{31}P$ -Entkopplung sind Messungen der  $J_{HH}$  möglich und das Aufspaltungsmuster der Signale in Dublett (H-2/6`), Triplett (H-4`), Triplett (H-3/5`) belegt die Zuordnung (Anhang, S. VI, 2.3).

Die Zuordnung der übrigen Protonen von beiden Verbindungen geschah aus den Integralen bzw. für H-2/6 und H-3/5 von Phenol-DPPC durch das HSQC-Spektrum nach Aufklärung der  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffsignale.

Auch in den  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffspektren beider Verbindungen können gleiche Signale mit gleichen Aufspaltungen erkannt werden (Anhang, S. III, S. VII). Die vier Signale die zu den  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffen des DPPC-Phenylrestes gehören, erkennt man an ihren charakteristischen  $^{31}\text{P}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungskonstanten, die aus einer Besonderheit des Phosphorkerns entstehen. Durch den Verlust des ungebundenen Elektronenpaars, wie es bei dem Phosphorkern im DPPC der Fall ist, erhöht sich einerseits  $^1J_{\text{PC}}$  und andererseits wird  $^2J_{\text{PC}}$  kleiner als  $^3J_{\text{PC}}$ <sup>37</sup>. Im Fall von Phenol-DPPC konnten die Kopplungskonstanten auf  $^1J_{\text{PC}} = 138 \text{ Hz (C-1)}$ ;  $^2J_{\text{PC}} = 10,3 \text{ Hz (C-2/6)}$ ;  $^3J_{\text{PC}} = 13,6 \text{ Hz (C-3/5)}$  und  $^4J_{\text{PC}} = 2,6 \text{ Hz (C-4)}$  bestimmt werden. Diese, oder nur leicht abweichende Werte, lassen sich sowohl in Brenzkatechin-DPPC als auch in allen weiteren DPPC-derivatisierten Verbindungen für die  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffe der DPPC-Substituenten wiederfinden und sind dadurch leicht zu erkennen. Wie das HSQC-Spektrum des Phenol-DPPC zeigt, kann die Zugehörigkeit der Protonen zu den entsprechenden  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffen belegt werden (Anhang, S. IV, 1.5). Eine Kopplung des Phosphorkerns zum  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff nach der Phosphoresterbindung bzw. durch den Sauerstoff lässt sich auch erkennen. Beim Phenol-DPPC spalten die C-1 und C-2/6 Signale zum Dublett mit  $^2J_{\text{PC}} = 8,2 \text{ Hz}$  und  $^3J_{\text{PC}} = 4,5 \text{ Hz}$  auf, was zur Identifikation der Signale herangezogen werden kann. Eine  $^{31}\text{P}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplung zum C-3/5 ist nicht beobachtet worden. Durch den Vergleich der  $^{31}\text{P}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungskonstanten mit und ohne Sauerstoff zwischen den Kopplungspartnern zeigt sich, dass durch den Sauerstoff die Kopplung über zwei und drei Bindungen abgeschwächt wird bis sie für  $^4J_{\text{PC}}$  nicht mehr sichtbar ist. Bei den C-1/2 und C-3/6  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffsignalen des Brenzkatechin-DPPC kann man ähnliches erkennen. Das C-4/5 Signal ist nicht aufgespalten und C-3/6 zeigt eine  $^3J_{\text{PC}}$  von 4,1 Hz. Für das C-1/2 Signal konnte ein Doppeldublett mit  $^2J_{\text{PC}} = 8,2 \text{ Hz}$  und  $^3J_{\text{PC}} = 6,5 \text{ Hz}$  beobachtet werden da beide Phosphorkerne das Signal aufspalten. Das von uns beobachtete  $^{31}\text{P}$ -NMR Signal für Phenol-DPPC von 30,73 ppm weicht von dem Literaturwert von 30,4 ppm<sup>32</sup> geringfügig ab, wobei in der Quelle keine Angaben über die Messbedingungen zu finden sind (Anhang, S. IV, 1.6). Da es keine Hinweise darauf gibt, dass Brenzkatechin-DPPC bereits zuvor hergestellt wurden ist, fehlen für unser beobachtetes  $^{31}\text{P}$ -Signal bei 32,17 ppm direkte Vergleichswerte (Anhang, S. IX, 2.6). Ähnliche Struktur zeigten Phosphorsignale bei 32,53 ppm

(2,3,6,7,10,11Hexa(diphenylphosphinat)triphenylen)<sup>33</sup> und 32,76 ppm (1,2-Di((bis-dimethoxyphenyl)phosphinat)-benzen)<sup>33</sup>. Das beim Brenzkatechin-DPPC nur ein Phosphorsignal zu sehen ist, liegt an der Symmetrie der Verbindung.

Mit der erfolgreichen Derivatisierung von Phenol und Brenzkatechin, mit dem Phosphorreagenz DPPC, konnte gezeigt werden, dass unter den von uns angewandten Reaktions-, Extraktions- und Aufreinigungsbedingungen eine Derivatisierung von phenolischen Hydroxylgruppen bei großen Ansatzmengen in hohen Ausbeuten möglich ist und dass eine Derivatisierung einer 3,4-Dihydroxyfunktion trotz der Größe der DPPC-Phenylreste ohne sterische Hinderungen gelingt. Des Weiteren konnten die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Signale der DPPC-Phenylreste identifiziert und die J<sub>PH</sub> sowie J<sub>PC</sub> ermittelt werden was sich bei späteren Strukturanalysen von komplizierteren Verbindungen als äußerst hilfreich erwies.

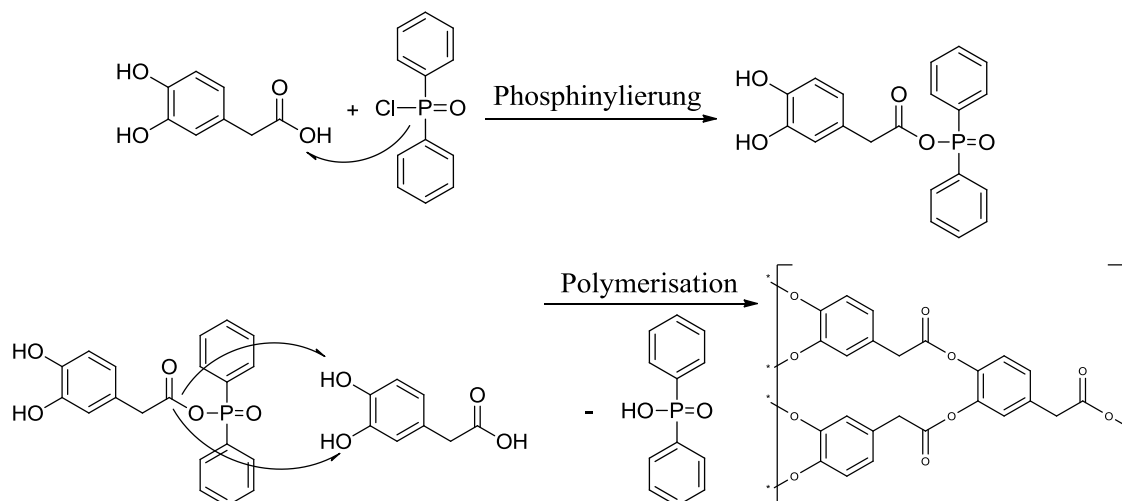
#### 4.3. Strukturanalyse der 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure

Im Protonenspektrum (Anhang, S. X) des DPA stimmen die Integrale der Signale mit der erwarteten Anzahl an Protonen überein. Die Protonen der Methylengruppe an Position 2 stellen sich als Singulett dar, weil sich kein Proton in unmittelbarer Nähe befindet, um mit ihnen zu koppeln. Die Protonen am aromatischen Ring lassen sich schon anhand ihrer charakteristischen Aufspaltungen zuordnen. Das Doppeldublett von H-6` bildet sich, indem das Signal sowohl durch das H-5` über drei Bindungen mit einer Kopplungskonstanten <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,08 Hz (zum Dublett), als auch von H-2` über vier Bindungen mit <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1,8 Hz (zum Doppeldublett) aufgespalten wird. So wie H-2` und H-5` in Abhängigkeit ihrer Entfernung das Signal von H-6` aufspalten, spaltet H-6` die beiden anderen Protonensignale mit den jeweils gleichen Kopplungskonstanten auf. H-5` ist zum Dublett mit <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,08 Hz und H-2` zum Dublett mit <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1,8 Hz aufgespalten worden, wodurch sie sich leicht zuordnen lassen. Das <sup>13</sup>C-Spektrum (Anhang, S. XI) zeigt die acht Signale der <sup>13</sup>C-Kohlenstoffe als Singuletts, da in einem normalen <sup>13</sup>C-Spektrum die Kopplung der Protonen unterdrückt wird. Allein anhand des <sup>13</sup>C-Spektrums lassen sich bestimmte <sup>13</sup>C-Kohlenstoffe ihren Positionen zuordnen, indem man die verschiedenen elektronischen Umgebungen der einzelnen <sup>13</sup>C-Kohlenstoffe berücksichtigt. Aus der Struktur des Moleküls geht hervor, dass der <sup>13</sup>C-Kohlenstoff der Carboxylgruppe (C-1) durch die Bindung an zwei Sauerstoffe am weitesten in Richtung Tieffeld bzw. höhere ppm- oder Hz-Werte verschoben sein muss

und die beiden  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffe an den Hydroxylgruppen mit jeweils einem Sauerstoff als Bindungspartner (C-3` und C-4`) darauffolgend und mit kurzem Abstand zueinander zu sehen sein müssten. Das aliphatische C-2 der Methylengruppe sollte bei niedrigen ppm-Werten erscheinen. Da sich die chemischen Umgebungen von C-2` und C-5` sehr ähnlich sind, sollten sie mit kurzem Abstand aufeinander folgen. Das gemessene  $^{13}\text{C}$ -Spektrum zeigt die Signale in erwarteter Reihenfolge. Die eindeutige Zuordnung der Signale des aromatischen Ringes gelang durch ein HMBC-Spektrum (nicht gezeigt), welches für diese Positionen gleiche Ergebnisse lieferte wie die HMBC-Spektren von Met-DPA und Met-DPA-DPPC (Anhang, S. XXI und XXVI).

#### **4.4. Der Syntheseversuch von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure mit DPPC**

Im nächsten Schritt sollte DPA ein einem großen Ansatz mit DPPC phosphinyliert werden, um den Einfluss der Carboxylgruppe zu untersuchen und im gleichen Zug bei erfolgreicher Synthese die unmarkierte Vergleichsverbindung zum DPA( $^{18}\text{O}$ )-DPPC zu erhalten. Wie bereits im entsprechendem Syntheseteil beschrieben, zeigte sich, dass kein alleiniges Reaktionsprodukt, wie in den Reaktionen von Phenol und Brenzkatechin entstanden ist, sondern ein Produktgemisch, welches sich per DC nicht trennen lies, (Anhang, S. XII, 4.1). Wie schon in den beiden vorherigen Reaktionen, entstand auch hier TEA-HCl, was bedeutet, dass eine Reaktion des DPPC mit den Hydroxyl- und/oder der Carboxylgruppe des DPA stattgefunden haben muss. Durch gezielte Literaturrecherche konnten wir herausfinden, dass DPPC ein Aktivierungsreagenz für Carboxylgruppen ist welches in der Proteinsynthese verwendet wurde<sup>31</sup>. Anhand der beobachteten Orangefärbung (Anhang, S.XII, 4.2) des Reaktionsansatzes, der schlechten Separation der Reaktionsprodukte durch DC und LC und dem Wissen über die Fähigkeit Carboxylgruppen zu aktivieren vermuten wir, dass es bei der Reaktion zu einer Polymerisation kam die viele Produkte mit ähnlichen Eigenschaften erzeugte (siehe Reaktionsschema 1). Die direkte Phosphinylierung von DPA wurde daher nicht weiter verfolgt.



Reaktionsschema 1. Aktivierung des Carboxylkohlenstoffs durch Phosphinylierung der Säurefunktion mit DPPC und anschließende Polymerisation durch Reaktion mit den phenolischen Hydroxylgruppen.

#### 4.5. Synthese und Identifizierung des 3,4-Dihydroxyphenylethylsäuremethylesters

Zur Lösung des Problems wurde versucht die Carboxylgruppe zu methylieren. Die Methylgruppe sollte dann später bei der folgenden Phosphinylierung als Schutzgruppe dienen und die Aktivierung verhindern. Um die Veresterung schnell und in hohen Ausbeuten stattfinden zu lassen kann eine Säurekatalyse durch konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> genutzt werden. Die Schwefelsäure wird beim Erwärmen in Methanol zum (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> methyliert und wirkt dadurch als starkes Methylierungsreagenz auf die Carboxylfunktion des DPA. In der von uns verwendeten Vorschrift<sup>34</sup> wurde das Produkt nach der Extraktion als rein genug betrachtet um es weiterzuverarbeiten. Obwohl auch für uns die Möglichkeit bestand, das Produkt ohne Reinigung direkt für die Phosphinylierung zu verwenden, entschlossen wir uns für eine Aufreinigung durch präparative HPLC, um Verunreinigungen, die in der folgenden Phosphinylierung die Reaktion oder die Aufreinigung erschweren könnten, auszuschließen. Met-DPA konnte für einen 5 mg Ansatz mit einer Ausbeute von 76% gewonnen werden. In der ESIMS-Analyse konnte die molekulare Masse vom Met-DPA bei negativer Ionisation gemessen werden (Anhang, S. XIII). Im Vergleich zu den <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Spektren des DPA unterscheiden sich die Spektren des Met-DPA nur in den Signalen der Methylgruppe bei 3,70 ppm (H-OMe) und 52,22 ppm (C-OMe) (Anhang, S. XIV-XV). Der R<sub>f</sub>-Wert und die NMR-Signale stimmen ebenfalls mit denen der Referenzsubstanz überein.

#### **4.6. Synthese und Strukturanalyse von 3,4-Dihydroxyphenylessigsäuremethylester-DPPC**

In Hinsicht darauf, dass wir später mit möglichst geringen Mengen an markiertem Methylester und Naturstoffen arbeiten müssten, wurde die Phosphinylierungs- und Aufarbeitungsmethodik, wie wir sie bei der Derivatisierung von Phenol und Brenzkatechin erfolgreich verwendeten, als nicht geeignet betrachtet, um sie in den Mikromaßstab zu übertragen. Nach einer Vorschrift in der Phosphinylierungen von verschiedenen Alkoholen mit einem, DPPC sehr ähnlichem, Phosphorreagenz (Diphenylphosphorsäurechlorid) bei Katalysatorstudien durchgeführt wurden, konnte die Phosphinylierung auch unter Raumbedingungen in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ablaufen. Durch das fehlende Erhitzen der Ansätze war es nun möglich in kleinen Vials mit beliebig geringen Lösungsmittelvolumina zu arbeiten. Obwohl Extraktions- und Aufreinigungsmethodik in dieser Vorschrift beschrieben waren, entschieden wir uns für eine Aufreinigung durch präparative DC. Dazu wurden jedoch nicht, wie üblich, große DC-Glasplatten mit Kieselgel benutzt sondern mit dünnen DC-Aluminiumfolien mit Kieselgel gearbeitet. Mit diesem Verfahren fielen die zusätzlichen Arbeitsschritte einer Extraktion weg, was eine große Zeitersparnis bedeutete. Die Elution des Produktes von den DC-Alufolien erfolgte am Anfang mit Acetonitril, da sich in Vorversuchen zeigte, dass es kein Kieselgel löst. Dass die Elution von Produkten von den DC-Alufolien quantitativ erfolgt, lässt sich leicht daran erkennen, dass unter UV-Licht die Fluoreszenzlösung der Produkte während der Elution immer schwächer wird bis nur noch das grüne Fluoreszenzlicht der DC-Alufolie zu sehen ist. Die vollständige Elution von den DC-Alufolien zeigte schon, dass die Hydroxylgruppen der Verbindung, die an der Luft leicht mit den Hydroxylgruppen des Kieselgels Bindungen eingehen und so nur schwer oder gar nicht eluiert werden können, durch die Phosphinylierung besetzt worden sind. Ein weiterer Hinweis darauf war, dass sich der Substanzfleck nicht, wie bei DPA und Met-DPA, auf der DC-Alufolie an der Luft durch Oxidations- und Polymerisationsreaktionen braun verfärbte. Da bei der Elution immer lockeres Kieselgel, von den geschnittenen Kanten der DC-Alufolien, mit in das Eluat eingespült wurde, musste das Eluat zunächst wieder eingedampft werden um es danach in geringerem Volumen filtrieren zu können. Später erfolgte dann die DC-Elution mit Aceton welches die Produkte schneller eluiert. Dass die Reaktion und unsere Aufreinigungsmethode erfolgreich waren, zeigte sich in einer sehr hohen Met-DPA-DPPC Ausbeute von 97,5% für einen 1,25 mg Met-DPA Ansatz. Die erwartete Masse



des Produktes konnte per ESIMS-Analyse eindeutig nachgewiesen werden (Anhang, S. XVI, 6.2 und S. XVII). Dass es sich bei dem Produkt um das Met-DPA-DPPC handelt konnte ebenfalls durch NMR-Experimente gezeigt werden. Im Protonenspektrum stimmen die Integrale der Signale mit der erwarteten Anzahl an Protonen überein (Anhang, S. XVIII). Gut wiederzuerkennen sind die typischen Signale der Protonen der DPPC-Phenylreste, deren chemische Verschiebungen fast exakt mit denen der entsprechenden Protonen des Brenzkatechin-DPPC übereinstimmen. Die  $J_{PH}$  und  $J_{PC}$  für die DPPC-Protonen konnten durch  $^{31}P$ -Entkopplung sehr genau gemessen werden und liegen im erwarteten Bereich (Anhang, S. XIX). Für alle anderen  $^1H$ -Signale ist im Vergleich zum Met-DPA eine Tieffeldverschiebung zu erkennen, die mit der Entfernung der Protonen vom DPPC-Rest abnimmt. Auffällig ist die starke Verschiebung der Protonen H-2' und H-5' im Met-DPA-DPPC um ca. 0,5 ppm im Vergleich zum Met-DPA. In diesem Zusammenhang konnte durch ein  $^{31}P$ -HOESY-Experiment gezeigt werden, dass (nur) auf H-2', H-5' und den am stärksten tieffeldverschobenen H-2/6 $\alpha,\beta$ -Signalen Beeinflussungen durch die Phosphorkerne wirken (Anhang, S. XXIV). Die Zuordnung der H-2' und H-5' Signale ist dadurch erschwert worden, dass das H-2' Signal nicht mehr als Dublett zu erkennen war und durch das H-5' Signal eine unsymmetrische Form annahm. Da sich die Hälfte des H-5' Signals unter dem H-2' Signal verbirgt, lässt sich deutlich anhand der Integrale der beiden Signale im Protonenspektrum feststellen. Eine bessere Zuordnung konnte durch die Korrelationen mit bestimmten  $^{13}C$ -Kohlenstoffsignalen gemacht werden. Das schwache Signal zwischen H-2' und H-5' stammt von  $CHCl_3$ -Resten im  $CDCl_3$ . Dieselben Verschiebungsmuster wie für die Protonensignale lassen sich auch im  $^{13}C$ -Spektrum wiederfinden (Anhang, S. XX). Während die Verschiebungen und  $^{31}P$ - $^{13}C$ -Kopplungskonstanten der  $^{13}C$ -Kohlenstoffsignale der DPPC-Phenylreste im Vergleich zum Brenzkatechin-DPPC nahezu gleich geblieben sind fand eine deutliche Tieffeldverschiebung für C-2' und C-5' von rund 6 ppm und für C-6' bzw. C-1' von 4 ppm bzw. 4,5 ppm statt. Unerwartet war hingegen die Differenz der chemischen Verschiebungen für C-3' und C-4'. Obwohl sie am nächsten zum Phosphorkern liegen konnte für diese beiden  $^{13}C$ -Kohlenstoffe eine Hochfeldverschiebung von 1,85 und 1,87 ppm gemessen werden, was für eine Erhöhung der Elektronendichte spricht. Dies zeigt, dass die Substitution mit DPPC eine starke Veränderung der Polarität des gesamten Moleküls zur Folge hatte. Zu erkennen ist auch die zweifache Aufspaltung der  $^{13}C$ -Signale von C-3' und C-4' zum jeweiligen Doppeldublett mit  $^2J_{PC} = 7,5$  Hz und  $^3J_{PC} = 6,0$  Hz sowie die einfache Aufspaltung der

$^{13}\text{C}$ -Signale von C-2' und C-5' zum jeweiligen Dublett mit  $^3J_{\text{PC}} = 4,0$  Hz. Die Methylen- und Methylgruppe von C-2 und C-OMe blieben annähernd gleich. Die Zuordnung der ähnlichen C-3' und C-4'-Signale konnte im HMBC-Spektrum durch die Kopplungen mit H-2', H-5' und H-6' erfolgen (Anhang, S. XXI-XXII). Beim Vergleich des HMBC-Signals von H-5' und C-1' ist zu erkennen, dass das Signal aus einem intensiven mittleren und zwei seitlichen, schwächeren Signalen besteht. Das Signal von H-2' und C-6' besteht aus vier annähernd gleich intensiven Signalen. Durch die Nähe der Signale von C-3' und C-4' überlagern die beiden Signalmuster, was die Zuordnung erschwert aber trotzdem die Korrelationen zwischen H-5'/C-3' und H-2'/C-4' erkennen lässt. Eine eindeutige Bestimmung der Position von C-4' kann durch die Korrelation mit H-6' gemacht werden. Die Korrelation zwischen H-2' und C-2 konnte ebenfalls beobachtet werden (nicht gezeigt). Im  $^{31}\text{P}$ -Spektrum konnten die erwarteten zwei Phosphorsignale gemessen werden (Anhang, S. XXIII). Die Zuordnung der Signale erfolgte nachträglich aus den Ergebnissen der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messung der markierten, phosphinylierten Modellverbindung. An diesem  $^{31}\text{P}$ -Spektrum zeigt sich, dass sich auch  $^{31}\text{P}$ -Signale von chemisch sehr ähnlichen Phosphorkernen separieren lassen wohingegen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren keine Unterschiede der chemisch nicht äquivalenten DPPC-Phenylreste sichtbar machten.

#### **4.7. Zuordnungen und Interpretation der Signale der markierten 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure**

Die Molekülmasse des Isotopenangereicherten  $\text{DPA}(^{18}\text{O})$ , welche sich von der Masse des DPA um 8 amu unterscheidet, konnte durch ESIMS-Messungen, für das decarboxylierte  $\text{DPA}(^{18}\text{O})$ , nachgewiesen werden (Anhang, S. XXV, 7.2). Der Rf-Wert von  $\text{DPA}(^{18}\text{O})$  stimmt nicht mit dem von DPA überein. Grund dafür ist, dass in reinem Essigester, ohne Zusatz einer Säure, sowohl DPA als auch  $\text{DPA}(^{18}\text{O})$  durch ihre deprotonierte Carboxylgruppe stark mit dem Kieselgel interagieren und das Laufverhalten sehr stark Konzentrationsabhängig ist. Die Rf-Werte aller weiteren markierten Substanzen (Met-DPA( $^{18}\text{O}$ )) und Met-DPA( $^{18}\text{O}$ )-DPPC) stimmen mit den unmarkierten Referenzsubstanzen exakt überein (Anhang, S. XXV, 7.1). Das Protonenspektrum von  $\text{DPA}(^{18}\text{O})$  sieht deutlich anders aus, als das von DPA (Anhang, S. XXVI-XXVII). Grund dafür sind die Kopplungen der  $^{13}\text{C}$ -Kerne mit den Protonen. Zwar muss es auch im DPA koppelnde  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffe geben, weshalb ein  $^{13}\text{C}$ -Spektrum

aufgenommen werden konnte, allerdings ist der Anteil an  $^{13}\text{C}$  in DPA mit natürlichen 1,1% so gering, dass man die daraus folgenden Aufspaltungen der  $^1\text{H}$ -Signale, sogenannter Satelliten, nicht sehen kann, weil sie eine zu geringe Intensität haben. Im DPA( $^{18}\text{O}$ ) hingegen ist der aromatische Ring durchgehend zu 99% mit  $^{13}\text{C}$  besetzt. Dadurch ist der Anteil durch  $^{13}\text{C}$  aufgespaltener Protonensignale so hoch, dass nur noch die Satelliten und nicht das ursprüngliche Signal zu sehen sind. Beim direkten Vergleich der Protonensignale von DPA und DPA( $^{18}\text{O}$ ) wird dies für die Protonen des aromatischen Rings sehr deutlich. Aus dem ehemaligen Doppeldublett für H-6` sind nun zwei Multipletts entstanden, die als Doppeltriplett interpretiert werden können, womit das gesamte H-6`-Signal als Doppel-Doppeltriplett bezeichnet werden kann. Das H-6` Signal hat sich durch die  $^1\text{J}_{\text{CH}}$  von 158 Hz in zwei Signale mit einem jeweiligen Integralwert von 0,5 aufgespalten. Die Triplettbildung kann durch die zweifache Aufspaltung mit gleichen Kopplungskonstanten durch C-1` und C-5` über zwei Bindungen mit  $^2\text{J}_{\text{CH}} = 8,0$  Hz erklärt werden. Die zweite Dublettbildung, die das Triplet aufspaltet, entsteht durch die bekannte Proton-Proton-Kopplung mit H-5` über drei Bindungen mit  $^3\text{J}_{\text{HH}} = 8,2$  Hz. Die  $^4\text{J}_{\text{HH}}$  Kopplung zu H-2` ist nicht mehr erkennbar. Durch die letzte Aufspaltung überlagern die beiden Doppeltripletts, sodass das Multiplett den Anschein eines Quartetts hat. Die einzelnen Integrale der vier Signalspitzen weisen jedoch nicht das typische Verhältnis für ein Quartett von 1:3:3:1 auf sondern haben ein Verhältnis von 1:2,5:2,5:1. Dieses Verhältnis und die sehr ähnlichen Kopplungskonstanten  $^2\text{J}_{\text{CH}}$  und  $^3\text{J}_{\text{HH}}$  haben widerlegt, dass es sich hierbei um ein klassisches Quartett bzw. Doppelquartett handeln kann. Die Signale von H-2` und H-5` der markierten Substanz sind zu einem Multiplett zusammengefallen, dessen Aufspaltungen, abgesehen von  $^1\text{J}_{\text{CH}} = 158$  Hz, nicht nachvollzogen werden können. Die Integrale der beiden Multipletts mit einer Wertigkeit von zwei bestätigen jedoch zusätzlich, dass es sich bei diesen Signalen um H-2` und H-5` handelt. Die Aufspaltung des H-2 zum Quartett kann gut nachvollzogen werden, da hier alle Kopplungen durch  $^{13}\text{C}$  entstanden sein mussten. Das H-2 ist einmal durch die  $^2\text{J}_{\text{CH}}$  Kopplung von C-1` mit 5,7 Hz zum Dublett, und dann noch zweimal mit den gleichen  $^3\text{J}_{\text{CH}}$  durch C-2` und C-6` mit 5,3 Hz zum Quartett aufgespalten worden. Beim H-2 handelt es sich somit um ein echtes Quartett, was auch die Integralwertigkeiten der einzelnen Signalspitzen mit einem Verhältnis von 1:3:3:1 bestätigen. Die  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffsignale des DPA( $^{18}\text{O}$ ) lassen sich wie die Protonensignale gut anhand des Vergleiches mit dem DPA identifizieren (Anhang, S. XXVIII-XXIX). C-1 und C-2 sind im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum nur schwach zu erkennen, da sie im DPA( $^{18}\text{O}$ ) als nicht  $^{13}\text{C}$ -angereicherte

Kohlenstoffpositionen nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,1% als  $^{13}\text{C}$  vorkommen. Während das C-1 Signal auch hier als Singulett vorliegt, weist das C-2 Signal eine Aufspaltung von 45 Hz auf, was durch die C-C-Kopplung über eine Bindung zum C-1` zurückzuführen ist. Die anderen sechs Signale des vollständig markierten aromatischen Rings zeigen alle C-C-Kopplungen über mindestens zwei Bindungen. Während C-1` und C-6` noch als einzelne Signale gesehen werden können, überlagern sich die nah beieinander liegenden Signalpaare C-2`/C-5` und C-3`/C-4` zu hoch komplexen Multipletts, deren Aufspaltungsmuster, sowie die Zugehörigkeit einzelner Signalspitzen zu einem  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffsignal, nicht nachvollzogen werden kann. C-1` und C-6` weisen beide das gleiche Aufspaltungsmuster auf, welches aber ebenfalls nicht vollständig nachvollzogen werden kann. Sicher festgestellt werden kann, dass die Triplet-ähnliche Form der Signale durch eine zweimalige Aufspaltung durch zwei  $^{13}\text{C}$ -Kerne über eine Bindung mit jeweils 59 Hz stattgefunden haben muss. Diese Tripletstruktur wurde dann nochmals mit einer Kopplungskonstante von 6,0 Hz zum Doppeltriplett aufgespalten. Da diese Kopplung nur durch ein  $^{13}\text{C}$  über zwei Bindungen stattgefunden haben kann, ist fraglich, wieso nur eine Aufspaltung über zwei Bindungen zu sehen ist, obwohl ein zweites  $^{13}\text{C}$  über zwei Bindungen zum Koppeln vorhanden wäre. Obwohl dies für  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffsignale nicht zulässig ist, soll an dieser Stelle trotzdem erwähnt werden, dass die Integration der einzelnen Signalspitzen von C-1` und C-6`, die, wie bereits erwähnt, die gleichen Aufspaltungsmuster und Kopplungskonstanten haben, unterschiedliche Ergebnisse liefert. Während sich das Verhältnis der Intergrale vom C-6` Signal wie ein Triplet mit 1:2:1 darstellt, sind die Verhältnisse vom C-1` Signal mit 0,5:1,5:1 deutlich schwieriger zu interpretieren. Zusammenhängend kann gesagt werden, dass sich sowohl das Protonen- als auch das  $^{13}\text{C}$ -Spektrum durch den  $^{13}\text{C}$  markierten Ring deutlich verkompliziert haben; es stellt mithin ein  $^{13}\text{C}$ -Spektrum höherer Ordnung dar. Eine Zuordnung der Signale durch Vergleiche mit dem DPA war jedoch möglich. Da das Multiplett der Signale von C-3` und C-4` leider nicht aufgeklärt werden kann, ist es auch nicht möglich, die  $^{18}\text{O}$ -induzierte  $^{13}\text{C}$ -Isotopenverschiebung vom C-4` zu messen oder zu erkennen.

#### **4.8. Synthese und Nachweis des markierten 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäuremethylesters**

Das Met-DPA( $^{18}\text{O}$ ) konnte mit einer Ausbeute von 75,6% hergestellt werden. Da wir Überführungsverluste des DPA( $^{18}\text{O}$ ) verhindern wollten, entnahmen wir die Hälfte der

zuvor gelösten Ausgangssubstanz und pipettierten sie direkt in das Lösungsmittel. Da die entnommene Masse der Ausgangsverbindung nicht gewogen wurde, kann die Ausbeute nicht exakt angegeben werden. Da die Ausbeuten von Met-DPA(<sup>18</sup>O) und Met-DPA (76%) jedoch nur geringfügig voneinander abweichen, kann davon ausgegangen werden, dass eine sehr ähnliche Menge verwendet wurde und das Ergebnis der Methylierung der DPA wiederholt werden konnte. Wie bereits beim DPA unterscheiden sich die Spektren des DPA(<sup>18</sup>O) von denen des erzeugten Met-DPA(<sup>18</sup>O) nur durch die Signale der Methylgruppe. Daher wurde auf die Abbildung der Spektren im Anhang verzichtet. Das Vorhandensein der Methylgruppe kann aber auch in den Spektren des Met-DPA(<sup>18</sup>O)-DPPC eindeutig wiedergefunden werden. Durch ESIMS ließ sich die Masse des Met-DPA(<sup>18</sup>O) bei positiver Ionisation nachweisen (Anhang, S. XXX).

#### **4.9. Synthese und Signalzuordnung des markierten 3,4-Dihydroxyphenyl-essigsäuremethylester-DPPC**

Im Gegensatz zur sehr hohen Ausbeute von 97,5% des Met-DPA-DPPC, erhielten wir für das Met-DPA(<sup>18</sup>O)-DPPC eine Ausbeute von 77,4%. Der wahrscheinlichste Grund für die geringere Ausbeute ist der in der Einleitung erwähnte Isotopeneffekt. Dieser entsteht in diesem Molekül nicht nur durch das <sup>18</sup>O, welches am Brechen einer alten und Bilden einer neuen Bindung direkt an der Phosphinylierungsreaktion teilnimmt (primärer Isotopeneffekt), und dadurch den größten Einfluss auf den Isotopeneffekt ausübt, sondern auch durch die sechs <sup>13</sup>C im aromatischen Ring, die, obwohl sie nicht direkt an der Reaktion teilnehmen, die Reaktivität beider Hydroxylgruppen negativ beeinflussen können (sekundärer Isotopeneffekt). Eine höhere Ausbeute wäre wahrscheinlich durch eine längere Reaktionszeit möglich gewesen. Wir verzichteten allerdings darauf, um die Ausbeuten vergleichbar zu machen. Zu erwähnen ist an dieser Stelle, dass der Reaktionsverlauf der Phosphinylierung mittels DC-Analyse verfolgt wurde, und nach zwei Stunden Reaktionszeit kein Hinweis darauf vorlag, dass noch unreaktiertes Met-DPA(<sup>18</sup>O) vorhanden war. Möglich wäre, dass die Hydroxylgruppe der 3`-Position trotz <sup>13</sup>C-Ringes eine ähnlich hohe Reaktivität wie die analoge im Met-DPA besitzt. Die Phosphinylierung an der 3`-Position würde somit schneller ablaufen als an der 4`-Position mit <sup>18</sup>O. Durch das Fehlen des Substanzflecks könnte bei der Betrachtung der DC der Eindruck entstanden sein, dass sich das Met-DPA(<sup>18</sup>O) komplett zum zweifach phosphinylierten Produkt umgesetzt hat obwohl noch das einfach substituierte

Derivat vorhanden war. Die Zuordnung der Protonen- und  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffsignale kann mit Hilfe der Vergleichsspektren des Met-DPA-DPPC eindeutig getroffen werden (Anhang, S.XXXII-XXXV). Im Protonenspektrum lassen sich wieder die typischen Protonensignale der DPPC-Phenylreste erkennen, die nicht durch die Isotopen beeinflusst wurden, und unter denen man keine Trennung der  $\alpha$ -DPPC und  $\beta$ -DPPC Substituenten feststellen kann. Die Position H-2 zeigt das charakteristische Quartett, welches schon in der DPA( $^{18}\text{O}$ ) besprochen wurde. Das Singulett der Methylgruppe blieb unverändert. Die Signale der Protonen am aromatischen Ring zeigen die erwartete Aufspaltung von 58-60 Hz durch die C-H-Kopplung über eine Bindung, sind aber ansonsten nicht weiter analysierbar, da sie nur noch als breite, diffuse Signale ohne nachvollziehbare Multiplizität zu erkennen sind, die keine klare Abgrenzung zum Grundlinienrauschen zeigen. Im  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffspektrum sind die Signale C-2, C-1 und C-1 $\alpha$ /C-1 $\beta$  nicht mehr erkennbar. Die übrigen Signale der DPPC-Phenylreste zeigen die erwartete Position und Aufspaltung. Die  $^{13}\text{C}$ -Signale des aromatischen Rings sind, wie beim DPA( $^{18}\text{O}$ ) schon beschrieben, durch die  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungen stark aufgespalten. C-1' und C-6' zeigen die gleichen Aufspaltungsmuster wie im DPA( $^{18}\text{O}$ ) was wiederum zeigt, dass die Phosphorkopplung nicht bis zu diesen  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffen reicht. Hingegen ist eine Veränderung der Multipletts von C-3'/C-4' und C-2'/C-5' durch den Einfluss des Phosphors klar erkennbar. Die Signale von C-3'/C-4' scheinen durch die  $^{31}\text{P}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplung enger zusammengefallen zu sein, wobei sich seitliche, breite Signale noch schwach vom Grundlinienrauschen abheben und dazugehören scheinen. Wo für das Multiplett der C-2'/C-5' Signale in dem DPA( $^{18}\text{O}$ ) noch eine gewisse Symmetrie erkennbar war, ist diese in dem Multiplett des Met-DPA( $^{18}\text{O}$ )-DPPC nicht mehr zu erkennen. Die Molekülmasse konnte durch ESIMS, bei positiver Ionisation, für die Addukte mit  $\text{H}^+$  und  $\text{Na}^+$  nachgewiesen werden (Anhang, S.35).

#### **4.10. Vergleich und Auswertung der $^{31}\text{P}$ -Signale zwischen Met-DPA-DPPC und Met-DPA( $^{18}\text{O}$ )-DPPC**

Das  $^{31}\text{P}$ -Spektrum zeigt die beiden Phosphorsignale bei 32,28 und 32,43 ppm für Met-DPA( $^{18}\text{O}$ )-DPPC und für Met-DPA-DPPC bei 32,30 und 32,43 ppm (Anhang, S.XXIII und XXXVII). Aus den Differenzen der Verschiebungen lässt sich für eines der beiden Signale eine Differenz von 0,02 ppm errechnen. Bei der Überlagerung der Phosphorstandardsignale der Spektren wird die  $^{18}\text{O}$  verursachte Verschiebung eines der beiden Phosphorsignale sichtbar (Anhang, S.XXXVII, 9.8). Das andere Signal verändert

seine Position erwartungsgemäß nicht. Dadurch konnte P $\alpha$  der 3'-Position und P $\beta$  der 4'-Position zugeordnet werden. Der Abstand zwischen den geschätzten Signalspitzen von P $\beta$  (Met-DPA-DPPC) und P $\beta$  (Met-DPA( $^{18}\text{O}$ )-DPPC) konnte auf 0,02 ppm/3,45 Hz bestimmt werden (Anhang, S. XXXVII, 9.9). Die genaue Messung der  $^{18}\text{O}$  verursachten  $^{31}\text{P}$ -Signalverschiebung lässt sich jedoch nicht durchführen, da die  $^{31}\text{P}$ -Signale des Met-DPA( $^{18}\text{O}$ )-DPPC mit einer Signalhalbwertsbreite von 14,5 Hz mehr als doppelt so breit sind, wie die des Met-DPA-DPPC mit 6,4 Hz, wodurch die Spitze des Signals nicht genau erkennbar ist. Die große Breite der  $^{31}\text{P}$ -Signale entsteht durch  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$ -Kopplungen aus dem  $^{13}\text{C}$  markierten, aromatischen Ring, die das Signal aufspalten. Dass das breite Phosphorsignal aus mehreren Signalen besteht wird bei einer Auflösung des Spektrums mit kleinerer Linienbreite sichtbar (Anhang, S. XXXVIII). Das Problem der großen Signalbreite lässt sich aber auch schon bei den Phosphorsignalen des Met-DPA-DPPC oder beim Phosphorstandard wiederfinden. Es ist eine Veröffentlichung bekannt, in der Phosphorsignale mit einer Signalbreite von schätzungsweise 1,5 Hz, ebenfalls mit einem 400 MHz Spektrometer, gemessen wurden<sup>39</sup>. Auch mit angepassten Parametern (Spektrenbreite, Scan-Anzahl, gezieltes Shimmen auf  $^{31}\text{P}$ , Pulsverzögerung, Pulsbreite), wie sie in der Veröffentlichung genutzt worden sind, wurde unser Ergebnis nicht verbessert, was darauf schließen lässt, dass mit 6-7 Hz die bestmögliche Signalbreite für ein Phosphorsignal mit dem von uns genutzten Spektrometer erreicht ist. Um eine genauere Messung der Isotopenverschiebung zu ermöglichen, könnte ein  $^{13}\text{C}$ -entkoppeltes  $^{31}\text{P}$ -Spektrum gemessen werden. Dieses NMR-Experiment kann aber nur mit einem Probenkopf durchgeführt werden, der zwei Breitbandkanäle besitzt. Ein derartiger Probenkopf stand uns jedoch nicht zur Verfügung.

Trotz der großen Breite der Phosphorsignale kann die  $^{18}\text{O}$  verursachten  $^{31}\text{P}$  Isotopenverschiebung jedoch deutlich erkannt werden. Die Größe der Verschiebung liegt im Bereich des erwarteten Wertes, wobei es keine genauen Vergleichswerte gibt, da uns kein Nachweis darüber vorliegt, dass eine  $^{18}\text{O}$  verursachte Isotopenverschiebung des  $^{31}\text{P}$ -Kerns vom DPPC an einer Substanz schon jemals veröffentlicht wurde.

#### 4.11. Synthese und Strukturanalyse von (-)-Epicatechin-DPPC

Durch die Phosphonylierung von Epicatechin sollte untersucht werden, wie gut die Separation von mehreren, chemisch ähnlichen Phosphorsignalen in einem Molekül ist. Epicatechin eignete sich dafür gut, da es fünf Hydroxylfunktionen besitzt, von denen vier phenolisch sind, und eine als sekundärer Alkohol vorliegt. Durch die vielen polaren Hydroxylfunktionen war die Löslichkeit des Epicatechins in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  nicht möglich, weshalb eine Mischung aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und THF im Verhältnis 1:2 verwendet wurde. Durch den Einsatz von THF fiel während der Reaktion TEA-HCl aus, welches unlöslich in THF ist. Dieses Ausfallen konnte bei den vorherigen Phosphinylierungsreaktion im Mikromaßstab nicht beobachtet werden, da sich die geringen Mengen an entstandenem TEA-HCl im  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  lösten. Anhand der DC konnte man erkennen, dass die Reaktion nach zwei Stunden komplett abgelaufen sein musste (Anhang, S. XXXIX, 10.1). Da durch LC-MS-Analyse gezeigt wurde, dass nach der Reaktionszeit ein vierfach phosphinyliertes Produkt entstanden ist, und wir aus den vorherigen Reaktionen wussten, dass phenolische Hydroxylgruppen problemlos reagieren, war schon sicher, dass nur die Hydroxylfunktion des sekundären Alkohols nicht derivatisiert wurde. Dass die phenolischen Hydroxylfunktionen besetzt wurden, kann auch deutlich am Bild 10.2 (Anhang, S. XXXIX) gesehen werden. Während sich eine farblose  $\text{CDCl}_3$ -Lösung von Epicatechin nach fünf Tagen durch Oxidation (Licht/Luft) und Polymerisation gelb färbte, blieb die  $\text{CDCl}_3$ -Lösung mit dem Epicatechin-DPPC auch nach fünf Tagen farblos. Da die Vorschrift<sup>30</sup>, die wir verwendeten, sich mit der Katalysatorentwicklung für Phosphinylierungsreaktionen beschäftigte, entschieden wir uns für einen zweiten Versuch zur vollständigen Epicatechin-Phosphinylierung mit dem Katalysator Molybdän(VI)-tetrachloridoxid ( $\text{MoOCl}_4$ ) durchzuführen. Den bisherigen Einsatz des Katalysators haben wir vermieden, um Probleme bei der Aufreinigung zu vermeiden. Aber auch dieser Versuch, Epicatechin fünffach zu derivatisieren, führte nur zum vierfach substituierten DPPC-Produkt. Durch diese Versuche konnte eine hohe Selektivität der Phosphinylierung für phenolische Hydroxylgruppen gezeigt werden. Die erhaltene Ausbeute von 61% ist zwar deutlich geringer als erwartet, ist allerdings durch die drei Aufreinigungsschritte zu erklären. Auf eine erneute Synthese zur Ausbeutesteigerung wurde verzichtet. Sowohl bei positiver als auch bei negativer Ionisation ist die Masse des vierfach phosphinylierten Epicatechins sichtbar (Anhang, S. XL). Das Fragmentierungsmuster, was durch die Abspaltung einer oder zweier



DPPC-Reste entsteht, ist leicht durch die Massendifferenz von 200 bzw. 400 m/z zu erkennen. Im Protonenspektrum stimmt die Summe der Integrale der Signale mit der Anzahl an Protonen im Molekül überein (Anhang, S.XLI-XLII). Die Protonensignale der DPPC-Phenylreste zeigen nicht das erwartete Bild. Die Signale H-2 $\alpha$ - $\delta$  bilden zwei getrennte Multipletts zwischen 7,76 und 7,93 ppm, H-4 $\alpha$ - $\delta$  bilden ein Multiplett zwischen 7,48 und 7,58 ppm und H-3 $\alpha$ - $\delta$  ein Multiplett zwischen 7,36 und 7,48 ppm. Dass sich die einzelnen Multiplettsignale auch zu den Gruppen H-2 $\alpha$ - $\delta$ , H-4 $\alpha$ - $\delta$  und H-3 $\alpha$ - $\delta$  zuordnen lassen, beweist das COSY-Spektrum in diesem Bereich (Anhang, S.XLIII). Hier ist zu erkennen, dass die H-3 $\alpha$ - $\delta$  mit beiden anderen Gruppen korrelieren, während H-2 $\alpha$ - $\delta$  und H-4 $\alpha$ - $\delta$  keine Korrelationen zeigen. Daran lässt sich erkennen, dass die vier DPPC-Phenylreste in diesem Molekül nicht äquivalent sind und deshalb unterschiedliche chemische Verschiebungen haben, was zu einer Überlagerung der Signale führt. Die übrigen Protonensignale lassen sich an ihren charakteristischen Aufspaltungsmustern erkennen (Anhang, S. XLIV). H-6 und H-8 koppeln miteinander über vier Bindungen und spalten beide zu einem Dublett auf. H-2', H-5' und H-6' zeigen die gleichen Aufspaltungen wie sie bereits in der 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure zu sehen waren und besprochen wurden. Die Signale der Protonen H-2, H-3 und H<sub>a</sub>-4/H<sub>b</sub>-4 zeigten interessante und nicht zu erwartende Aufspaltungen. Obwohl H-2 über drei Bindungen mit H-3 koppeln und zu einem Dublett aufspalten sollte, ist im Protonenspektrum nur ein Singulett zu sehen. Dass H-2 und H-3 tatsächlich miteinander korrelieren ist im stark vergrößerten COSY-Spektrum (long-range-Korrelationen) zu sehen (Anhang, S. XLV). Die ungewöhnlich schwache Wechselwirkung der beiden Protonen kann durch die Stereochemie des (-)-Epicatechins an diesen Stellen und der Karplus-Beziehung erklärt werden. Im (-)-Epicatechin, wie auch im (-)-Epicatechin-DPPC, liegen die beiden Protonen über der Strukturebene in cis-Stellung. Nach der Karplus-Beziehung ist die Größe der Kopplungskonstanten zweier Protonen über drei Bindungen bei einem Diederwinkel von 90° am geringsten und steigt nach 0° und 180° wieder an. Daher kann vermutet werden, dass die beiden Protonen sich in einem Winkel gegenüberstehen, der nahe 90° ist und keine starke Kopplung zulässt, wodurch die Aufspaltung von H-2 nicht beobachtet werden konnte. Die Zuordnung von H-2 konnte auch durch die long-range Korrelationen im COSY-Spektrum zu H-2' und H-6' bestätigt werden. H-3 erscheint im Protonenspektrum als breites Singulett. Aus Messungen des (-)-Epicatechins und aus den COSY-Spektrum mit long-range-Korrelationen des (-)-Epicatechin-DPPC zeigt sich, dass H-3 mit H-2 und H<sub>a</sub>-4/H<sub>b</sub>-4 zu einem Doppel-Doppel-Dublett aufspaltet, welches

durch die kleinen Kopplungskonstanten jedoch als breites Singulett erscheint. Eine Interpretation der  $H_{a-4}/H_{b-4}$ -Signale ist nur schwer möglich. Durch die unterschiedliche Aufspaltung der einen Signalhälfte lässt sich jedoch sagen, dass die geminalen Protonen an dieser Stelle chemisch nicht äquivalent sind und mit H-3 und H-2 unterschiedlich stark korrelieren. Eine Bestimmung der chemischen Verschiebungen der beiden Protonen konnte durch das HMBC-Spektrum erfolgen, in welchem man sehen kann, dass die Korrelationssignale mit den gleichen  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffen an unterschiedlichen Stellen zu sehen sind (Anhang, S. XLVIII). Nach der Aufklärung der Protonensignale konnte die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffe durch HSQC-/HMBC-Experimente durchgeführt werden (Anhang, S. XLVI-XLIX). Die  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffsignale der DPPC-Phenylreste waren, auch im Falle des Epicatechin-DPPC, leicht an ihren Positionen und Aufspaltungsmustern im 1D- $^{13}\text{C}$ -Spektrum erkennbar. Wie schon anhand der Protonensignale dieser Reste erkannt wurde, sind die DPPC-Phenylreste nicht äquivalent und zeigen daher Signale an unterschiedlichen Positionen, wodurch sie sich überlagern. Ein gutes Beispiel dafür, dass nicht nur die vier DPPC-Substituenten sondern auch die gleichen Positionen innerhalb eines DPPC-Substituenten nicht äquivalent sind, zeigen die C-1 $\alpha$ - $\delta$  Signalpaare, die leicht an ihren großen Kopplungskonstanten von 137-139 Hz erkennbar sind. Insgesamt sind von den acht möglichen C-1 Signalen sechs sichtbar (Anhang, S. XLVII, jeweilige Signalpaare sind rot nummeriert). In den Fällen von C-2 $\alpha$ - $\delta$  sind vier verschiedene Signalpaare sichtbar, wobei ein Paar eine deutlich größere Intensität hat als die beiden anderen, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass es aus mehreren Signalen besteht. Bei den Signalen von C-3 $\alpha$ - $\delta$  und C-4 $\alpha$ - $\delta$  ist auch zu erkennen, dass mehrere Signalpaare vorliegen. Die genaue Anzahl kann jedoch auch hier nicht bestimmt werden. Das  $^{31}\text{P}$ -Spektrum zeigte die vier Signale der chemisch ähnlichen Phosphorkerne mit einer guten Separation (Anhang, S. LII). Die Frage, welches der vier  $^{31}\text{P}$ -Signale an welcher Position sitzt, konnte durch ein  $^{31}\text{P}$ -HMBC-Experiment beantwortet werden (Anhang, S. L). Das Spektrum zeigt, dass die  $^{31}\text{P}$ -Signale bei 31,18 und 31,81 ppm eindeutig zu der ehemaligen 1,3-Dihydroxybenzol-Funktion im Epicatechin gehören und die anderen beiden Signale bei 32,49 und 32,83 ppm durch die Phosphorkerne der 1,2-Dihydroxybenzol-Funktion entstehen. Eine weitere Aufteilung der beiden Signalgruppen konnte nun durch die spezifischen Korrelationen von H-8 mit P $\alpha$  und H-6' mit P $\delta$  erfolgen. Mithilfe des  $^{31}\text{P}$ -HMBC-Experimentes konnten dann sogar die chemischen Verschiebungen der einzelnen Protonensignale der DPPC-Reste bis auf H-2 $\alpha$  und H-2 $\beta$  für alle anderen Protonen

zugeordnet werden (Anhang, S. LI). Mit der Phosphinylierung von (-)-Epicatechin konnte somit gezeigt werden dass, die Reaktion spezifisch für phenolische Hydroxylgruppen ist, chemisch ähnliche Phosphorkerne im  $^{31}\text{P}$ -Spektrum gut separierte Signale geben, und eine Zuordnung der  $^{31}\text{P}$ -Signale durch ein  $^{31}\text{P}$ -HMBC möglich ist.

#### 4.12. Synthese und Strukturanalyse von Anigorufon-DPPC

Mit der Phosphinylierung von Anigorufon sollte herausgefunden werden, ob bzw. wie gut sich dessen  $\alpha$ -Hydroxyketogruppe mit Phosphor derivatisieren lässt.

Die Synthese verlief problemlos und das Produkt konnte, obwohl etwas vom Rohansatz verschüttet wurde, mit einer guten Ausbeute von 81,7% isoliert werden.

Die Signale im Massenspektrum zeigen eindeutig das Produkt als  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]$  und  $[\text{2M}+\text{Na}]^+$  (Anhang, S. LIII).

Die Strukturaufklärung erfolgte mithilfe der NMR-Daten von Anigorufon<sup>39</sup>. Bei der Betrachtung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffspektren ergaben sich unerwartete Probleme (Anhang, S. LIV-LVI). Die Summe der Signalintegrale der Protonen (19H) stimmte nicht mit der theoretischen Anzahl der Protonen (21) überein. Des Weiteren gab es im Bereich des H-4 $\alpha$  Signales Signalüberlagerungen, und das einzige Singulett im Protonenspektrum (H-3) kann im Bereich der beschriebenen Verschiebung bei 7,18 ppm nicht entdeckt werden. Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum konnte das vormals im Bereich von 180 ppm befindliche und am weitesten in Tieffeldrichtung verschobene C-1 Signal nicht beobachtet werden. Gleiches gilt für das am weitesten in Hochfeldrichtung verschobene C-3 Signal (vormals im Bereich von 113 ppm). Ausgehend vom H-5, welches durch das typische, in diesem Molekül einzigartige Doppeldublettmuster gut zu identifizieren war, erfolgte die Strukturaufklärung zunächst durch Zuordnung der Protonensignale von H-4 bis H-8 durch deren Korrelationen im COSY-Spektrum (Anhang, S. LVII). Durch das HSQC-Spektrum wurden die zugehörigen  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffe C-4 bis C-8 zugeordnet (Anhang, S. LVIII). Aus dem HSQC konnte außerdem entnommen werden, dass es, entsprechend der Anzahl an chemisch verschiedenen Protonen im Molekül, 12 H-C-Korrelationen über eine Bindung gab. Dabei fiel das intensive Signal bei 7,97 auf, dessen Größe durch Überlagerung des H-6 Signals mit dem H-2 $\alpha$  Signal stammt. Durch das HSQC zeigte sich, dass es sich jedoch um ein weiteres Signal eines Protons handelt, welches keine Korrelation zu einem anderen Proton im COSY zeigt. Da dies strukturbedingt nur auf ein Proton im Molekül zutreffen konnte, wurden so H-3 und C-3 identifiziert. Beide Signale zeigen eine starke Tieffeldverschiebung im Vergleich zum

normalen Anigorufon von 0,8 ppm im  $^1\text{H}$ - bzw. 13,3 ppm im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum. Mit dem HSQC zeigt sich, dass das Multiplett im Protonenspektrum zwischen 7,44 und 7,52 ppm aus drei Protonensignalen besteht, welche H-4 $\alpha$  und zwei der drei Protonen des Phenylrestes des Anigorufon-Grundgerüsts zuzuordnen sind. Eines der drei Protonen musste das Signal bei 7,3 ppm erzeugen. Die Zuordnung von H-2', H-3' und H-4' konnte durch das HMBC-Spektrum geklärt werden, da H-2' zu C-9 und H-3' zu C-1' eine Korrelation zeigten (Anhang, S. LIX-LX). Im HMBC konnte die im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum nicht erkennbare Position von C-1 durch dessen starke Korrelation mit H-3 und durch die schwache Korrelation mit H-8 bestimmt werden. Durch die HMBC-Korrelationen zu weiteren kritischen Stellen wie C-2, C-1', C-9 und C-9b konnte die Protonenzuordnung bestätigt und die Kohlstoffsignale zugeordnet werden. Das  $^{31}\text{P}$ -Spektrum zeigte ein Signal bei 33,06 ppm (Anhang, S. XLI, 11.8).

## **5. Zusammenfassung**

Durch die erfolgreiche Ausarbeitung notwendiger Reaktionsbedingungen und Aufreinigungsverfahren konnte eine isotopenmarkierte Modellverbindung, welche eine phenolische  $^{18}\text{O}$ -Hydroxylgruppe besitzt, mit dem Phosphorreagenz Diphenylphosphinsäurechlorid (DPPC) im Mikromaßstab effektiv derivatisiert und in guter Ausbeute dargestellt werden. Die  $^{18}\text{O}$ -verursachte Isotopenverschiebung des  $^{31}\text{P}$ -Signals konnte anschließend durch einen Vergleich mit der selbst hergestellten, unmarkierten Referenzsubstanz zweifelsfrei festgestellt werden, wodurch die Zielstellung dieser Arbeit erfüllt wurde.

Die zusätzliche erfolgreiche Phosphinylierung von (-)-Epicatechin und Anigorufon zeigte, dass die Derivatisierung mit DPPC unter den gewählten Reaktionsbedingungen spezifisch für phenolische Hydroxylgruppen ist,  $^{31}\text{P}$ -Signale von chemisch sehr ähnlichen Phosphorkernen im  $^{31}\text{P}$ -Spektrum gut separiert werden, und dass  $\alpha$ -Hydroxyketo-Positionen derivatisiert werden können. Während der Untersuchungen konnten fünf noch nicht beschriebene Verbindungen erzeugt werden. Von diesen, sowie von zwei weiteren von uns synthetisierten, bekannten Verbindungen, konnte die Molekülmasse durch ESIMS nachgewiesen und die Struktur durch NMR-Spektroskopie bestätigt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Firestone, Richard B.; Baglin, Coral M.; Chu, S.Y.Frank. (1998), Table of Isotopes eighth Edition 1998 Update, John Wiley & Sons Inc., S. 52
2. Munde, Tobias; Maddula, Ravi K.; Svatos, Ales; Schneider, Bernd. (2011), The biosynthetic origin of oxygen functions in phenylphenalenones of *Anigozanthos preissii* inferred from NMR- and HRMS-based isotopologue analysis, *Phytochemistry* (Elsevier), 72(1), 49-58
3. Kühl, Olaf. (2008), Phosphorus-31 NMR Spectroscopy, Springer-Verlag, S.9
4. Gutowsky, H. S.; McCall, D. W.; Slichter, C. P. (1951), Coupling among nuclear magnetic dipoles in molecules, *Physical Review*, 84, 589-90.
5. Muller, Norbert; Lauterbur, Paul C.; Goldenson, Jerome. (1956), Nuclear magnetic resonance spectra of phosphorous compounds, *Journal of the American Chemical Society*, 78, 3557-61.
6. Van Wazer, John R.; Callis, Clayton F.; Shoolery, James N.; Jones, Robert C. (1956), Principles of phosphorus chemistry. II. Nuclear magnetic resonance measurements, *Journal of the American Chemical Society*, 78, 5715-26
7. Gorenstein, David G.; Rowell, Robert. (1980), Isotopic oxygen-18 shifts in phosphorus-31 NMR as a probe of stereochemistry of hydrolysis in phosphate triesters, *Journal of the American Chemical Society*, 102(19), 6165-6
8. Mavel, G. (1973), Annual Reports on NMR Spectroscopy, Vol. 5B: NMR Studies of Phosphorus Compounds (1965-1969), 441 pp..
9. Nageswara Rao B D; Kayne F J; Cohn M. (1979), <sup>31</sup>P NMR studies of enzyme-bound substrates of rabbit muscle pyruvate kinase. Equilibrium constants, exchange rates, and NMR parameters, *The Journal of biological chemistry*, 254(8), 2689-96.
10. Gorenstein David G., Wyrwicz Alice M., Bode Jurgen. (1976), Interaction of uridine and cytidine monophosphates with ribonuclease A. IV. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies, *J. Am. Chem. Soc.*, 98 (8), pp 2308–2314
11. Gueron, M.; Shulman, R. G. Phosphorus-31 magnetic resonance of tRNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1975), 72(9), 3482-5

12. Patel, Dinshaw J. Peptide antibiotic-oligonucleotide interactions. Nuclear magnetic resonance investigations of complex formation between actinomycin D and d-ApTpGpCpApT in aqueous solution, *Biochemistry* (1974), 13(11), 2396-402
13. London, Erwin; Feigenson, Gerald W. Phosphorus NMR analysis of phospholipids in detergents, *Journal of Lipid Research* (1979), 20(3), 408-12
14. Cohn, Mildred; Hu, Angela. Isotopic (oxygen-18) shift in phosphorus-31 nuclear magnetic resonance applied to a study of enzyme-catalyzed phosphate-phosphate exchange and phosphate (oxygen)-water exchange reactions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1978), 75(1), 200-3
15. Cohn, Mildred. Oxygen-18 and oxygen-17 effects on phosphorus-31 NMR as probes of enzymic reactions of phosphate compounds, *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* (1982), 11, 23-42
16. Lensink, C.; Verkade, J. G. Identification of labile-hydrogen functionalities in coal-derived liquids by phosphorus-31 NMR spectroscopy, *Preprints of Papers - American Chemical Society, Division of Fuel Chemistry* (1988), 33(4), 906-12
17. Koskela, Harri; Grigoriu, Nicoleta; Vanninen, Paula. Screening and Identification of Organophosphorus Compounds Related to the Chemical Weapons Convention with 1D and 2D NMR Spectroscopy, *Analytical Chemistry* (2006), 78(11), 3715-3722
18. Jiang, Zhi-Hua; Argyropoulos, Dimitris S.; Granata, Alessandro. Correlation analysis of <sup>31</sup>P NMR chemical shifts with substituent effects of phenols, *Magnetic Resonance in Chemistry* (1995), 33(5), 375-82
19. Hatzakis, Emmanuel; Dais, Photis. Determination of Water Content in Olive Oil by <sup>31</sup>P NMR Spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2008), 56(6), 1866-1872.
20. Hatzakis, Emanuel; Archavlis, Eleftherios; Dais, Photis. Determination of glycerol in wines using <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy, *Journal of the American Oil Chemists' Society* (2007), 84(7), 615-619.
21. Dais, Photis; Spyros, Apostolos. <sup>31</sup>P NMR spectroscopy in the quality control and authentication of extra-virgin olive oil: a review of recent progress, *Magnetic Resonance in Chemistry* (2007), 45(5), 367-377.
22. Atkins, Peter W.; de Paula, Julio. (2006), *Physikalische Chemie* 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, S. 506-508, 903-904
23. Soper, A. K.; Benmore, C. J. (2008), Quantum differences between heavy and light water, *Physical Review Letters*, 101(6), 065502/1-065502/4.

24. Atkins, Peter W.; de Paula, Julio. (2006), *Physikalische Chemie* 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, S. 578-580
25. Diakur, James; Nakashima, Thomas T.; Vederas, John C. (1980), Magnitudes of oxygen-18 isotope shifts in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of ketones and alcohols, *Canadian Journal of Chemistry*, 58(13), 1311-15.
26. Risley, John M.; Van Etten, Robert L. (1979), Oxygen-18 isotope effect in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. 2. The effect of structure, *Journal of the American Chemical Society*, 102(14), 4609-14.
27. Stowell, Kerensa S.; Hengge, Alvan C. (2005), Probing Potential Medium Effects on Phosphorus Ester Bonds Using  $^{18}\text{O}$  Isotope Shifts on  $^{31}\text{P}$  NMR, *J. Org. Chem.*, 70, 8303-8308
28. Stowell, Kerensa S.; Hengge, Alvan C. (2005), Examination of P-OR Bridging Bond Orders in Phosphorus Monoesters using  $^{18}\text{O}$  Isotope shifts in  $^{31}\text{P}$  NMR, *J. Org. Chem.*, 70, 4805-4809
29. Beznosko, B. K.; Usanova, B. M.; Zhuravleva, L. V.; Baulin, V. E.; Yarkevich, A. N.; Syundyukova, V. Kh.; Tsvetkov, E. N. (1997), Synthesis and antiphlogistic and analgesic activities of some phosphinic acid esters, *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, 31(12), 12-14
30. Cheng-Yuan Liu et al.(2010), Substitution- and Elimination –Free Phosphorylation of Functionalized Alcohols Catalyzed by Oxidomolybdenum Tetrachloride, *Adv. Synth. Catal.*, 352, 188-194
31. Pearson, A.J.; Roush, W.R. (2001), *Handbook of Reagents for Organic Synthesis Activating Agents and Protecting Groups*, John Wiley & Sons, LTD, S. 166-168
32. Peng, Weimin; Shreeve, Jean'ne M. (2005), Rapid and high yield oxidation of phosphine, phosphite and phosphinite compounds to phosphine oxides, phosphates and phosphinates using hypofluorous acid-acetonitrile complex, *Journal of Fluorine Chemistry*, 126(7), 1054-1056
33. Givélet, Cecile; Tinant, Bernard; Van Meervelt, Luc; Buffeteau, Thierry; Marchand-Geneste, Nathalie; Bibal, Brigitte. (2009), Polyphosphorylated Triphenylenes: Synthesis, Crystal Structure, and Selective Catechol Recognition, *Journal of Organic Chemistry* (2009), 74(2), 652-659
34. Gambacorta, Augusto; Tofani, Daniela; Bernini, Roberta; Migliorini, Antonella, (2007), High-yielding preparation of a stable precursor of hydroxytyrosol by total

- synthesis and from the natural glycoside oleuropein, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), 3386-3391
35. Wroblewski, A. E.; Lensink, C.; Markuszewski, R.; Verkade, John G. (1988), Phosphorus-31 NMR spectroscopic analysis of coal pyrolysis condensates and extracts for heteroatom functionalities possessing labile hydrogen, *Energy & Fuels*, 2(6), 765-74
  36. Mazumder, Avik; Kumar, Ajeet; Purohit, Ajay K.; Dubey, Devendra K. (2012), A high-resolution phosphorus-31 nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic method for the non-phosphorus markers of chemical warfare agents, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(4), 1643-1652.
  37. Kühl, Olaf. (2008), *Phosphorus-31 NMR Spectroscopy*, Springer-Verlag, S.19
  38. Sorensen-Stowell, Kerensa; Hengge, Alvan C. (2005), Examination of P-OR Bridging Bond Orders in Phosphate Monoesters using <sup>18</sup>O Isotope Shifts in <sup>31</sup>P NMR, *Journal of Organic Chemistry*, 70(12), 4805-4809
  39. Hölscher, Dirk; Schneider, Bernd. (1997), Phenylphenalenones from root cultures of *Anigozanthos preissii*, *Phytochemistry*, 45(1), 87-91.
  40. Adewusi, Steve R. A. (1990), Turnover of dhurrin in green sorghum seedlings, *Plant Physiology*, 94(3), 1219-24



## Anhang

### Instrumentierung und Lösungsmittel

NMR-Spektrometer: Bruker Avance 400 (400,13 MHz ( $^1\text{H}$ ), 100,62 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 161,99 MHz ( $^{31}\text{P}$ ), Probenkopf: Bruker BBO 400 MHz 5mm with Z-gradient, NMR-Röhrchen: 5 mm Norell 502, Steuerungssoftware: Bruker Topspin 2.1pl5, Aufnahme der  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  Spektren von DPA, DPA( $^{18}\text{O}$ ) und DPE in MeOD 99,8% mit 0,03% TMS als int. Standard (Deutero GmbH). Aufnahme der  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ , COSY, HSQC, HMBC,  $^{31}\text{P}$ -HMBC Spektren aller anderen Verbindungen wurden in  $\text{CDCl}_3$  99,8% mit 0,03% TMS als int. Standard (Carl Roth GmbH) bzw. bei für  $^{31}\text{P}$  und  $^{31}\text{P}$ -HMBC Spektren zusätzlich mit einem 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ext. Standard gemessen. Massenspektrometer: Bruker Daltonics esquire 3000, Prozessierungssoftware: Bruker Daltonics Data Analysis. Dünnschichtchromatografie: DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck.

### Gliederung

<u>1. Phenol-DPPC</u> .....	I
1.1. DC.....	I
1.2. Massenspektrum Phenol-DPPC.....	I
1.3. $^1\text{H}$ -Spektrum ( $^{31}\text{P}$ gekoppelt) Phenol-DPPC.....	II
1.4. $^{13}\text{C}$ -Spektrum ( $^{31}\text{P}$ gekoppelt) Phenol-DPPC.....	III
1.5. Ausschnitt aus HSQC-Spektrum Phenol-DPPC.....	IV
1.6. $^{31}\text{P}$ -Spektrum Phenol-DPPC.....	IV
<u>2. Brenzkatechin-DPPC</u> .....	V
2.1. DC.....	V
2.2. Massenspektrum Brenzkatechin-DPPC.....	V
2.3. $^1\text{H}$ -Spektrum ( $^{31}\text{P}$ -entkoppelt) Brenzkatechin-DPPC.....	VI
2.4. $^{13}\text{C}$ -Spektrum ( $^{31}\text{P}$ gekoppelt ) Brenzkatechin-DPPC.....	VII
2.5. Ausschnitt aus COSY-Spektrum ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) Brenzkatechin-DPPC.....	VIII
2.6. $^{31}\text{P}$ -Spektrum Brenzkatechin-DPPC.....	IX

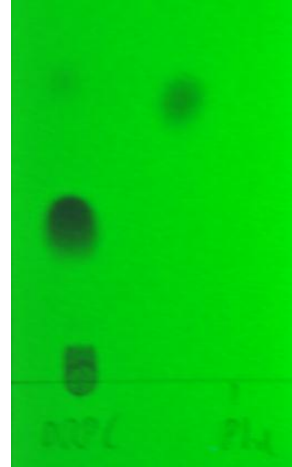
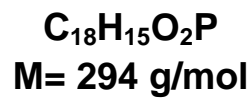
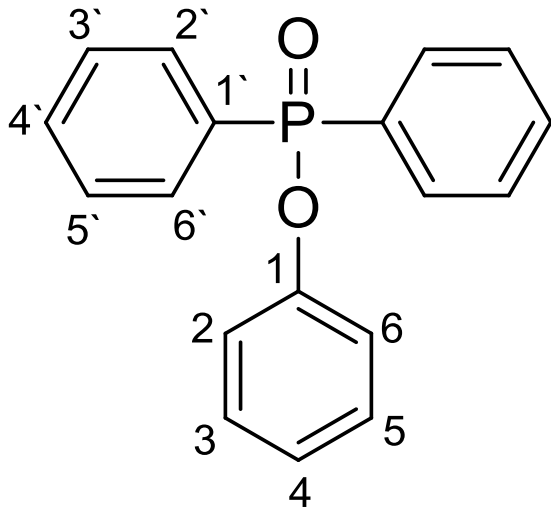
<u>3. unmarkierte 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DPA)</u> .....	IX
3.1. <sup>1</sup> H-Spektrum DPA.....	X
3.2. <sup>13</sup> C-Spektrum DPA.....	XI
<u>4. Reaktion von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure mit DPPC</u> .....	XII
4.1. DC.....	XII
4.2. Bild.....	XII
<u>5. 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäuremethylester (Met-DPA)</u> .....	XII
5.1. DC.....	XII
5.2. Massenspektrum Met-DPA.....	XIII
5.3. <sup>1</sup> H-Spektrum Met-DPA.....	XIV
5.4. <sup>13</sup> C-Spektrum Met-DPA.....	XV
<u>6. 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäuremethylester-DPPC (Met-DPA-DPPC)</u> .....	XVI
6.1. DC.....	XVI
6.2. Massenspektrum Met-DPA-DPPC (positiv).....	XVI
6.3. Massenspektrum Met-DPA-DPPC (negativ).....	XVII
6.4. <sup>1</sup> H-Spektrum ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) Met-DPA-DPPC.....	XVIII
6.5. Vergleich der <sup>1</sup> H-Signale von H-2 bis H-4α/β von Met-DPA-DPPC <sup>31</sup> P-gekoppelt und <sup>31</sup> P-entkoppelt.....	XIX
6.6. <sup>13</sup> C-Spektrum ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) Met-DPA-DPPC.....	XX
6.7. Ausschnitt vom <sup>13</sup> C-Spektrum ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) Met-DPA-DPPC.....	XX
6.8. Ausschnitte aus HMBC-Spektrum ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) Met-DPA-DPPC....	XXI
6.9. <sup>31</sup> P-Spektrum Met-DPA-DPPC.....	XXIII
6.10. Detailansicht der <sup>31</sup> P-Signale Met-DPA-DPPC.....	XXIII
6.11. Ausschnitt aus dem <sup>31</sup> P-HOESY-Spektrum Met-DPA-DPPC.....	XXIV

<u>7. markierte 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure (DPA(<sup>18</sup>O))</u> .....	XXV
7.1. DC.....	XXV
7.2. Massenspektrum DPA( <sup>18</sup> O).....	XXV
7.3. <sup>1</sup> H-Spektrum DPA( <sup>18</sup> O).....	XXVI
7.4. Vergleich der <sup>1</sup> H-Signale von DPA( <sup>18</sup> O) und DPA.....	XXVII
7.5. <sup>13</sup> C-Spektrum DPA( <sup>18</sup> O).....	XXVIII
7.6. Vergleich der <sup>13</sup> C-Signale 1` bis 6` von DPA( <sup>18</sup> O) und DPA.....	XXIX
<u>8. markierter 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäuremethylester (Met-DPA(<sup>18</sup>O))</u> .....	XXX
8.1. Massenspektrum Met-DPA( <sup>18</sup> O).....	XXX
<u>9. markierter 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäuremethylester-DPPC (Met-DPA(<sup>18</sup>O)-DPPC)</u> .....	XXXI
9.1. Massenspektrum Met-DPA( <sup>18</sup> O)-DPPC.....	XXXI
9.2. <sup>1</sup> H-Spektrum ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) Met-DPA( <sup>18</sup> O)-DPPC.....	XXXII
9.3. Vergleich der <sup>1</sup> H-Signale ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) von Met-DPA( <sup>18</sup> O)-DPPC und Met-DPA-DPPC.....	XXXIII
9.4. <sup>13</sup> C-Spektrum ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) Met-DPA( <sup>18</sup> O)-DPPC.....	XXXIV
9.5. Vergleich der <sup>13</sup> C-Signale ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) von 1` bis 6` und 1 bis 6α/β von Met-DPA( <sup>18</sup> O)-DPPC und Met-DPA-DPPC.....	XXXV
9.6. <sup>31</sup> P-Spektrum Met-DPA( <sup>18</sup> O)-DPPC.....	XXXVI
9.7. Detailansicht der <sup>31</sup> P-Signale Met-DPA( <sup>18</sup> O)-DPPC.....	XXXVI
9.8. Überlagerte <sup>31</sup> P-Spektren von Met-DPA( <sup>18</sup> O)-DPPC und Met-DPA-DPPC.....	XXXVII
9.9. Gemessener Abstand zwischen den <sup>31</sup> P-Signale (Pβ) von Met-DPA( <sup>18</sup> O)-DPPC und Met-DPA-DPPC.....	XXXVII
9.10. Überlagerte <sup>31</sup> P-Spektren von Met-DPA( <sup>18</sup> O)-DPPC (schwarz, lb 5; blau, lb 1).....	XXXVIII

<u>10. (-)-Epicatechin-DPPC</u> .....	XXXIX
10.1. DC.....	XXXIX
10.2. Bild.....	XXXIX
10.3. Massenspektrum (-)-Epicatechin-DPPC.....	XL
10.4.1. <sup>1</sup> H-Spektrum Nr.1 ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) (-)-Epicatechin-DPPC.....	XLI
10.4.2. <sup>1</sup> H-Spektrum Nr.2 ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) (-)-Epicatechin-DPPC.....	XLII
10.5.1. Ausschnitt COSY-Spektrum Nr.1 ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) von (-)-Epicatechin-DPPC.....	XLIII
10.5.2. Ausschnitt COSY-Spektrum Nr.2 ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) von (-)-Epicatechin-DPPC.....	XLIV
10.5.3. Ausschnitt COSY-Spektrum Nr.3 ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) mit long-range-Korrelationen von (-)-Epicatechin-DPPC.....	XLV
10.6.1. <sup>13</sup> C-Spektrum Nr.1 ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) (-)-Epicatechin-DPPC.....	XLVI
10.6.2. <sup>13</sup> C-Spektrum Nr.2 ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) (-)-Epicatechin-DPPC .....	XLVII
10.7.1. Ausschnitt A: HMBC-Spektrums ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) (-)-Epicatechin-DPPC.....	XLVIII
10.7.2. Ausschnitt B: HMBC-Spektrums ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) (-)-Epicatechin-DPPC.....	XLIX
10.8.1. Ausschnitte A: <sup>31</sup> P-HMBC ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) von (-)-Epicatechin-DPPC.....	L
10.8.2. Ausschnitte B: <sup>31</sup> P-HMBC ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) von (-)-Epicatechin-DPPC .....	LI
10.9. <sup>31</sup> P-Spektrum (-)-Epicatechin-DPPC.....	LII
10.10. Detailansicht der <sup>31</sup> P-Signale (-)-Epicatechin-DPPC.....	LII
<u>11. Anigorufon-DPPC</u> .....	LIII
11.1. DC.....	LIII
11.2. Massenspektrum Anigorufon-DPPC.....	LIII
11.3. <sup>1</sup> H-Spektrum ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) Anigorufon-DPPC.....	LIV
11.4.1. <sup>13</sup> C-Spektrum Nr.1 ( <sup>31</sup> P-gekoppelt) Anigorufon-DPPC.....	LV

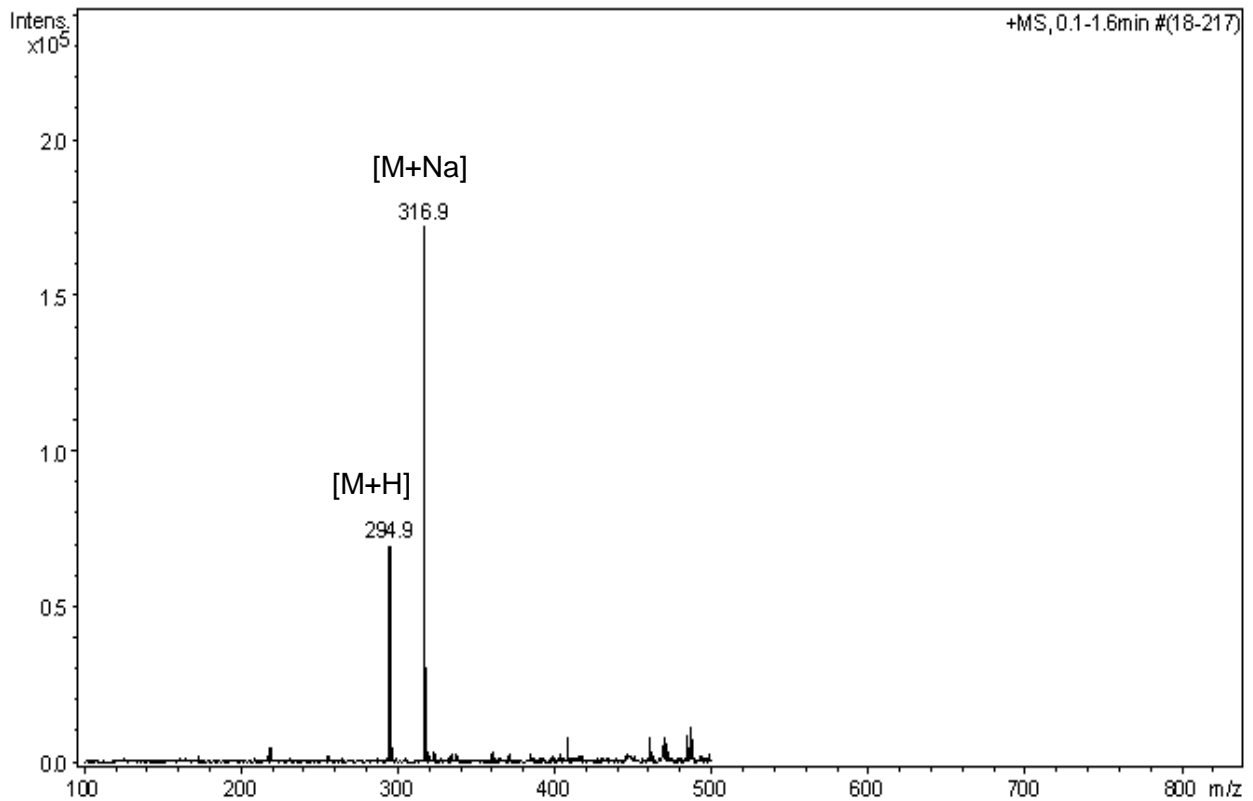
11.4.2. $^{13}\text{C}$ -Spektrum Nr.2 ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) Anigorufon-DPPC.....	LVI
11.5. Ausschnitt aus COSY-Spektrum ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) von Anigorufon-DPPC.....	LVII
11.6. Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) von Anigorufon-DPPC.....	LVIII
11.7.1. Ausschnitte A: HMBC-Spektrum ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) von Anigorufon-DPPC.....	LIX
11.7.2. Ausschnitte B: HMBC-Spektrum ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) von Anigorufon-DPPC.....	LX
11.8. $^{31}\text{P}$ -Spektrum Anigorufon-DPPC.....	LXI
<u>12. D-verursachte <math>^{13}\text{C}</math>-Isotopenverschiebung von <math>\text{CDCl}_3</math>.....</u>	<u>LXI</u>
<u>13. Übersicht der Synthesen.....</u>	<u>LXII</u>

## 1. Phenol-DPPC

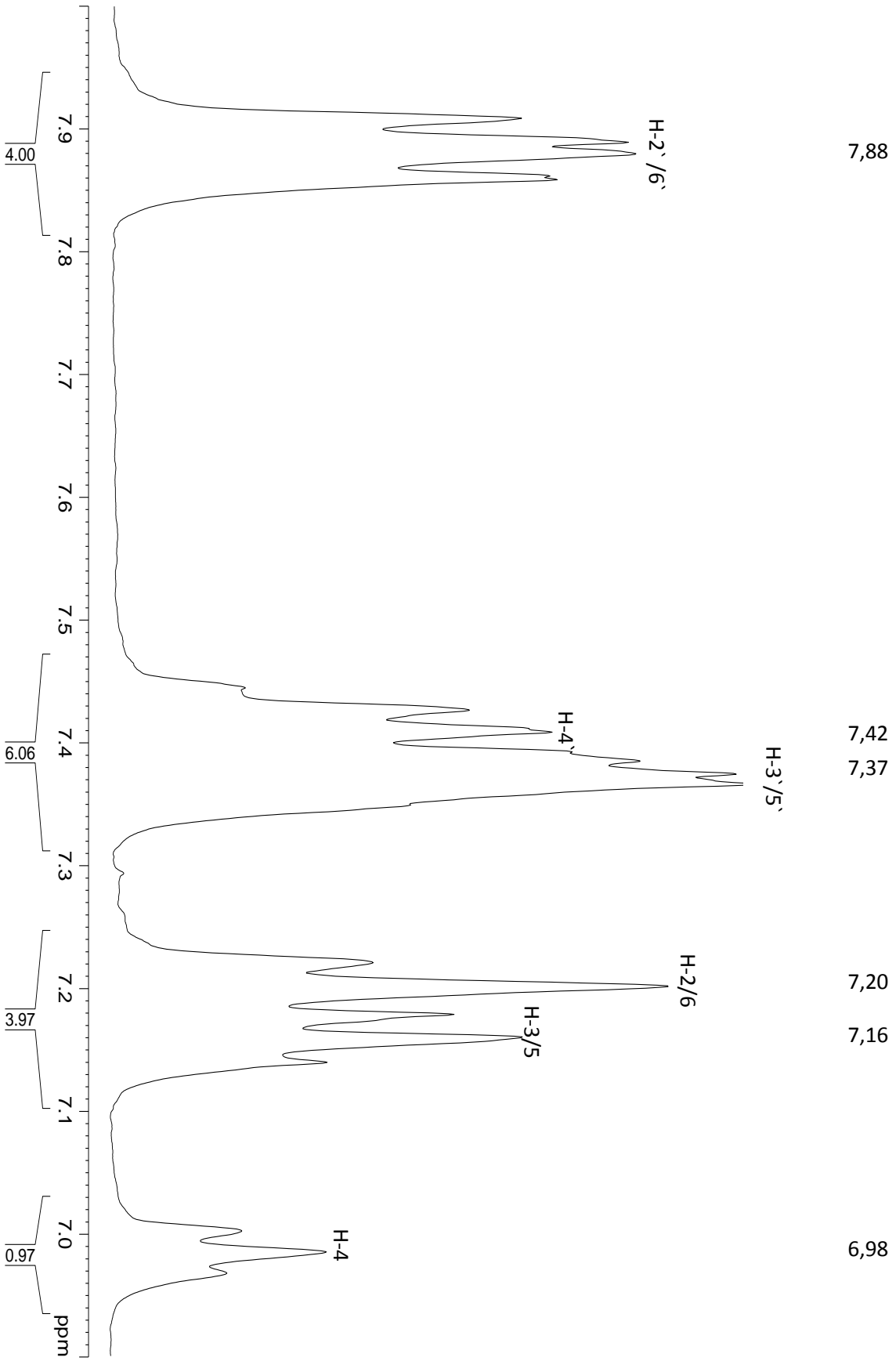


**1.1. DC:** Fließmittel: n-Hexan/Essigester 1:1,  
Links: Reaktion 6.1 nach 30 min mit Phenol (R<sub>f</sub> = 0,53), Produkt (R<sub>f</sub> = 0,33) und DPPC (R<sub>f</sub> = 0), Rechts: Phenol

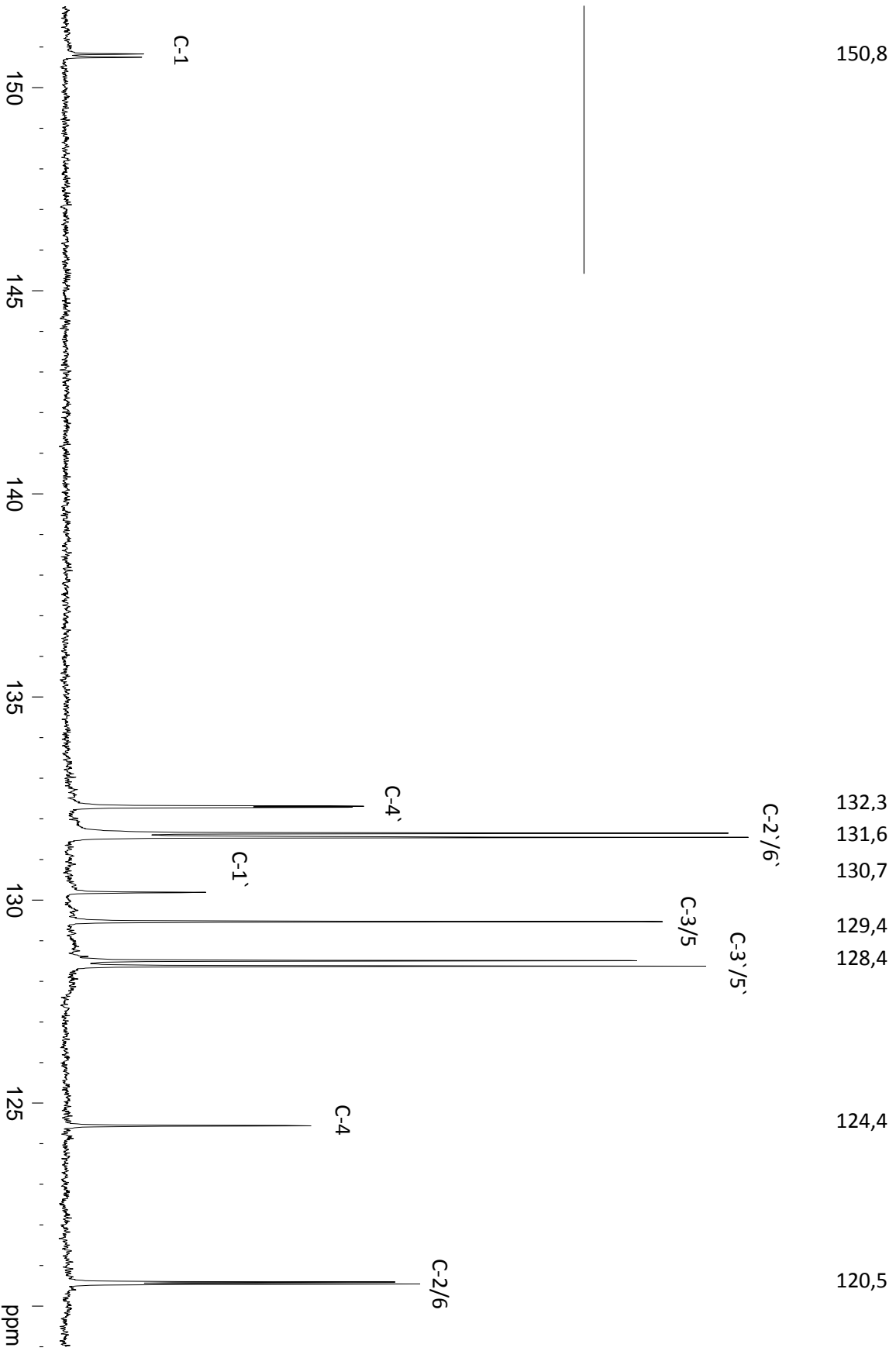
## 1.2. Massenspektrum Phenol-DPPC (positiv)



1.3. <sup>1</sup>H-Spektrum (<sup>31</sup>P gekoppelt) Phenol-DPPC

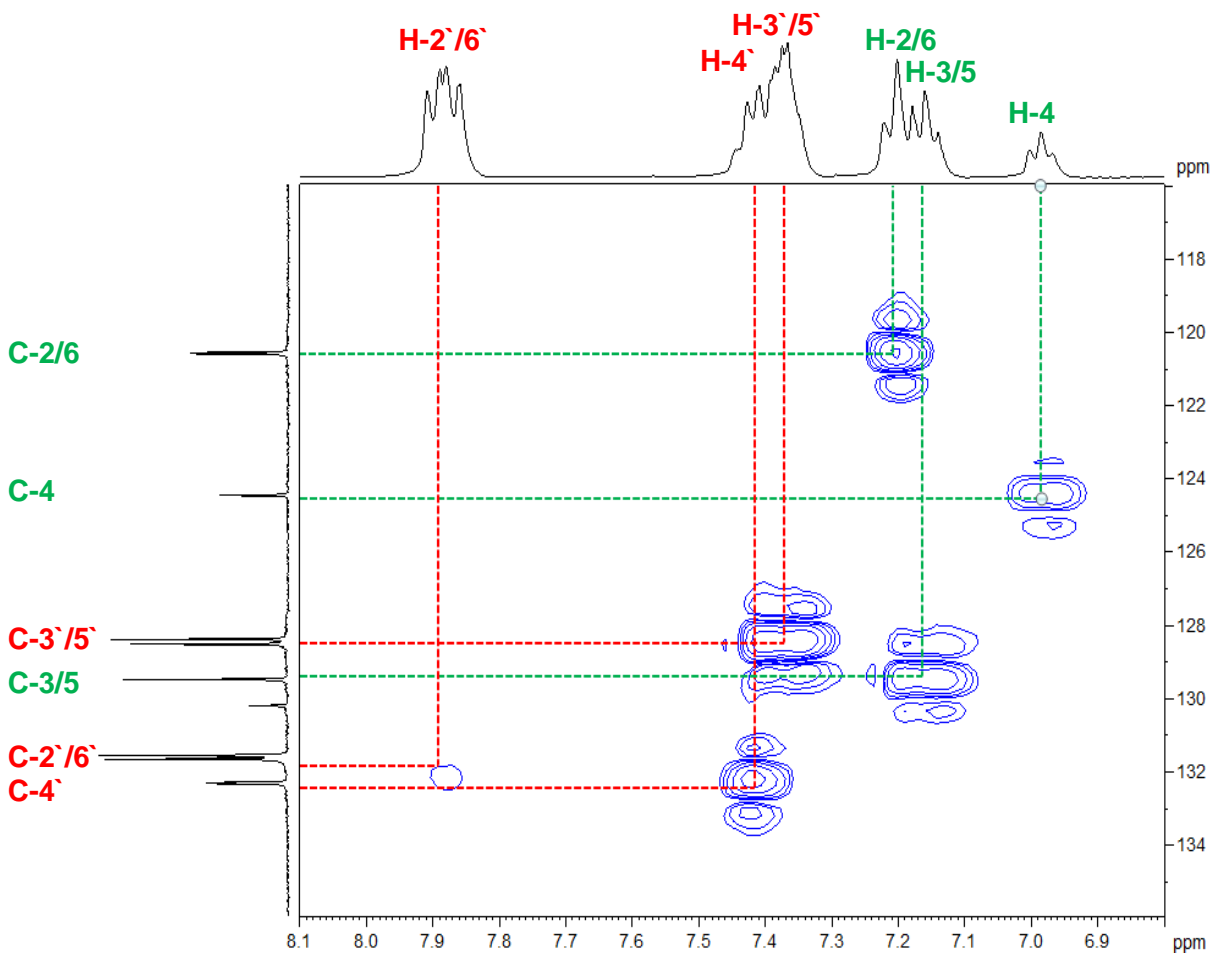


1.4. <sup>13</sup>C-Spektrum (<sup>31</sup>P gekoppelt) Phenol-DPPC

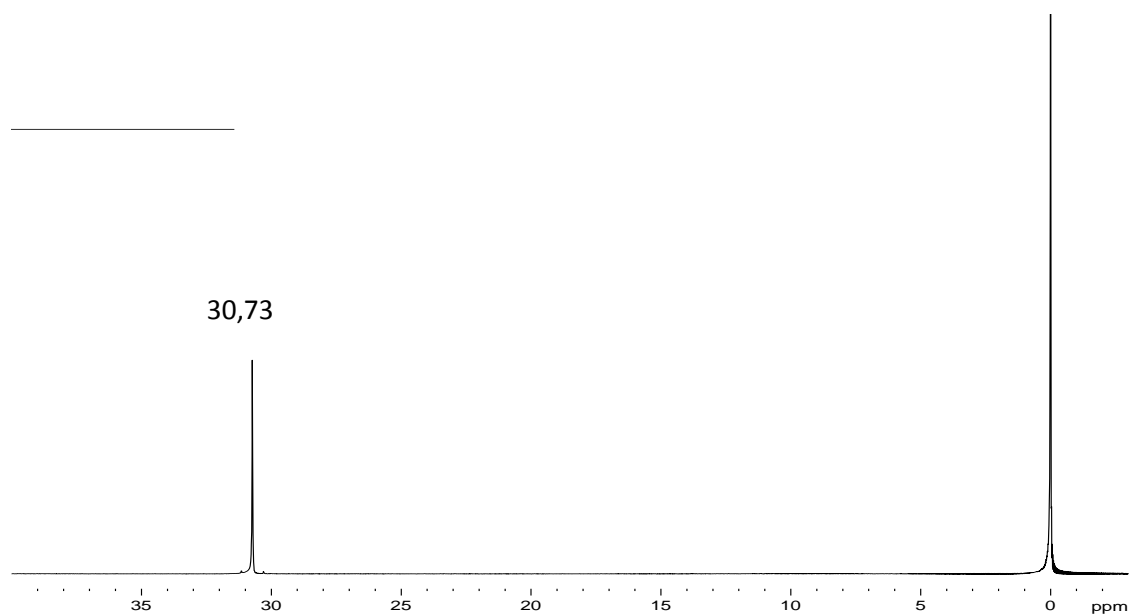




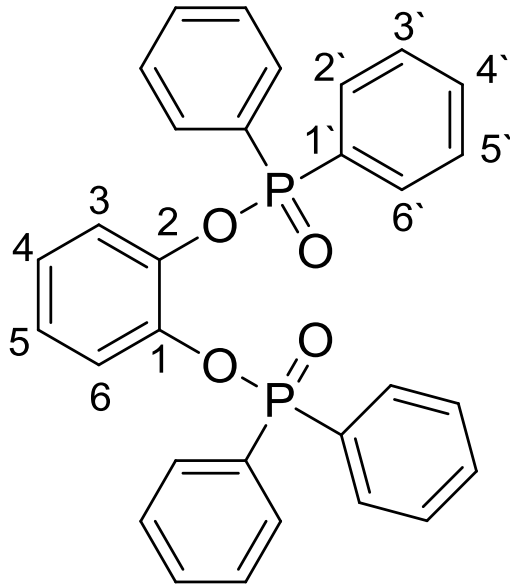
### 1.5. Ausschnitt aus HSQC-Spektrum Phenol-DPPC



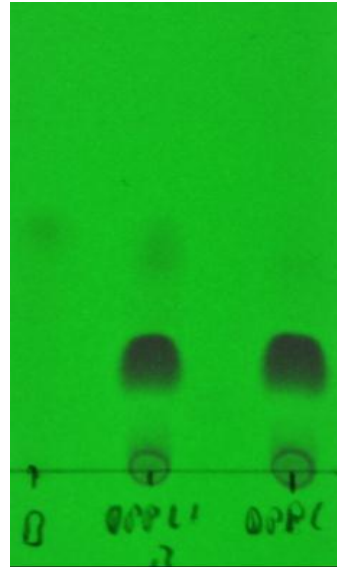
### 1.6. $^{31}\text{P}$ -Spektrum Phenol-DPPC



## 2. Brenzkatechin-DPPC

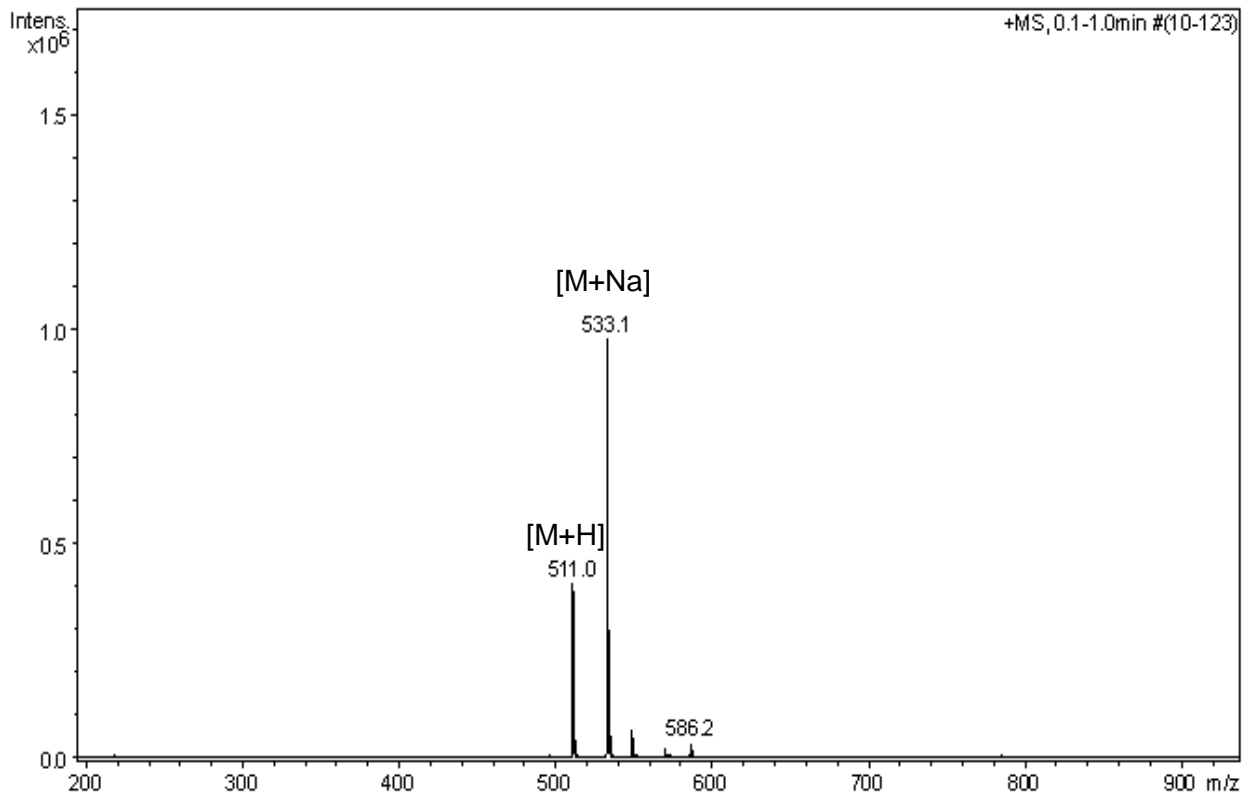


$C_{30}H_{24}O_4P_2$   
 $M = 510 \text{ g/mol}$

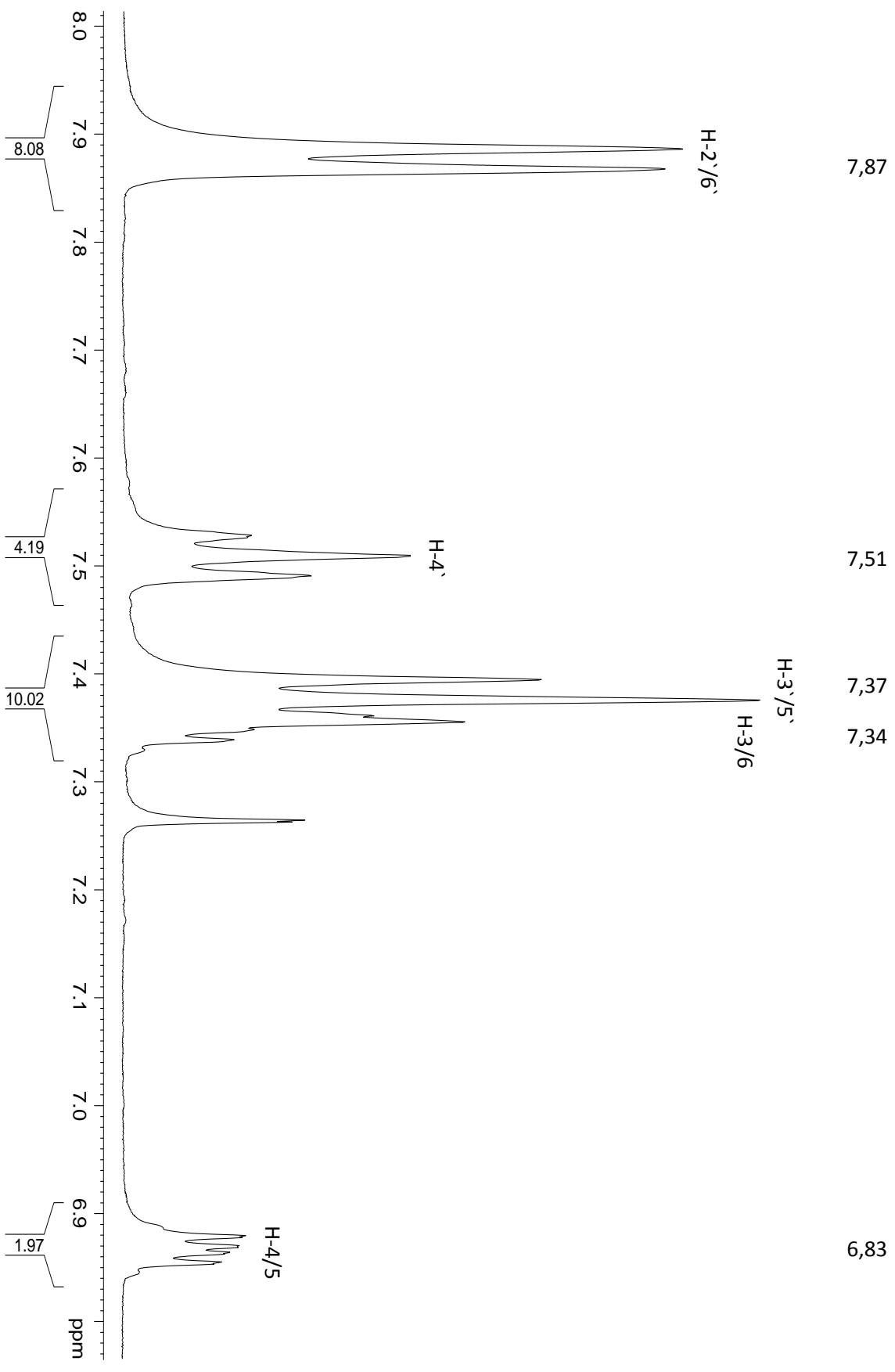


2.1. DC: Fließmittel: n-Hexan/Essigester 1:1, Links: Brenzkatechin ( $R_f = 0,43$ ), Rechts: Reaktionsansatz nach 30 min mit Produkt ( $R_f = 0,2$ ) und DPPC ( $R_f = 0$ ), Mitte: Gemisch aus Reaktionsansatz und Brenzkatechin

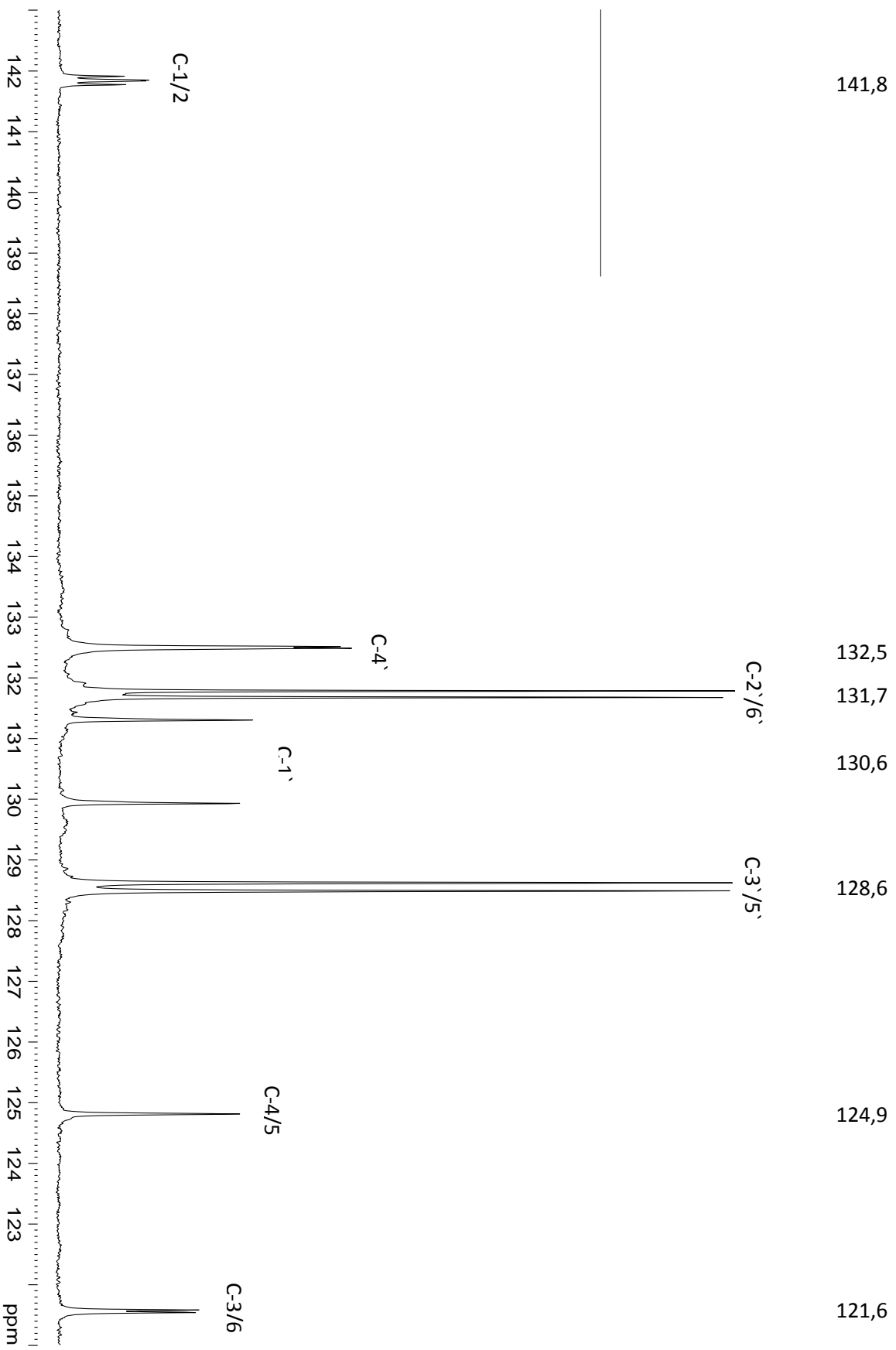
## 2.2. Massenspektrum Brenzkatechin-DPPC (positiv)



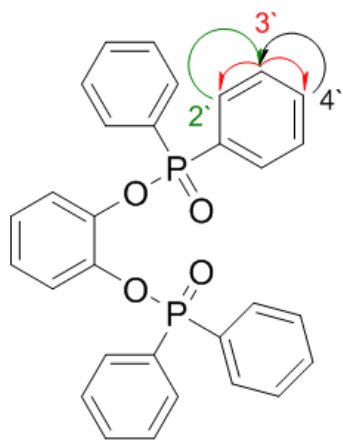
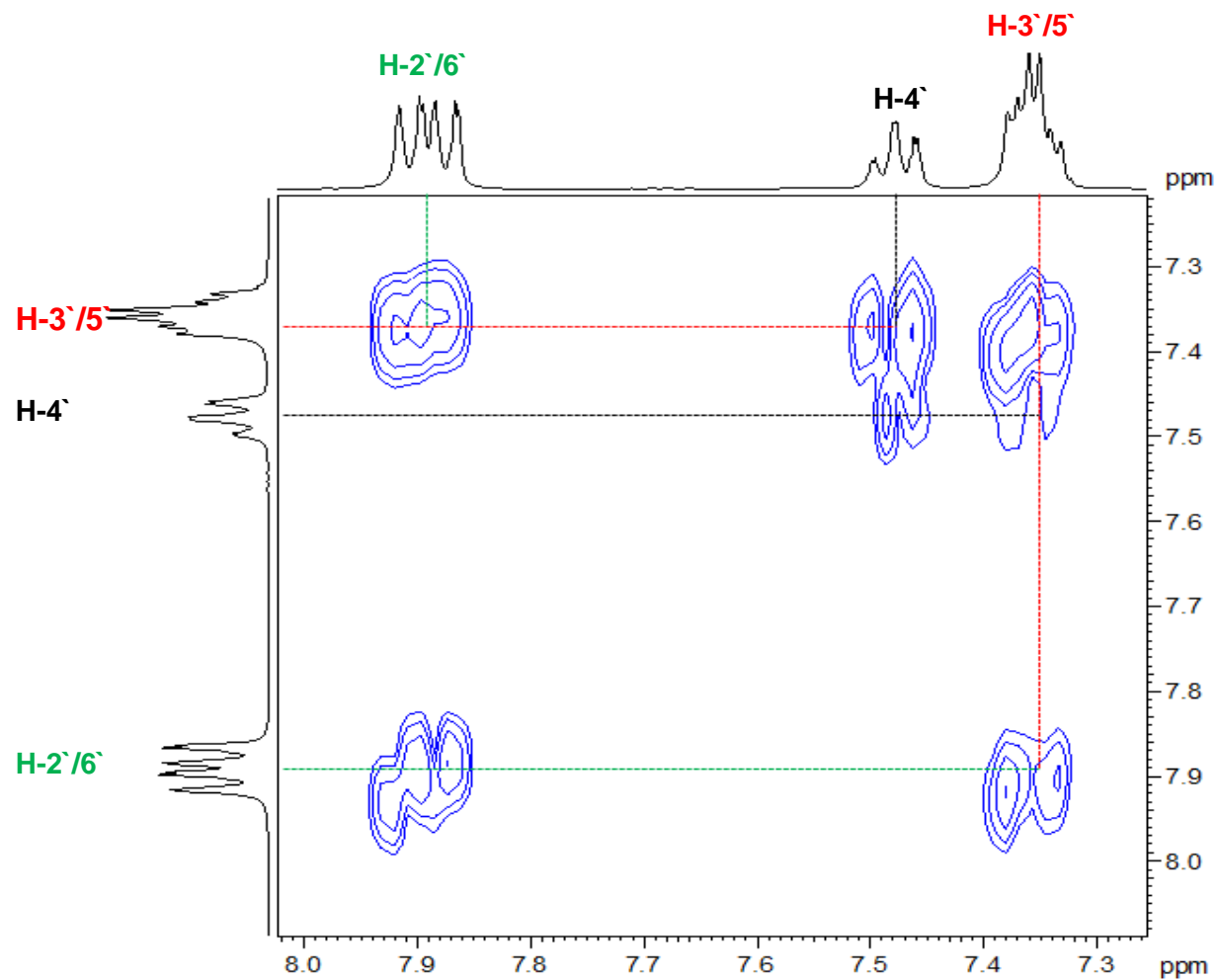
### 2.3. <sup>1</sup>H-Spektrum (<sup>31</sup>P-entkoppelt) Brenzkatechin-DPPC



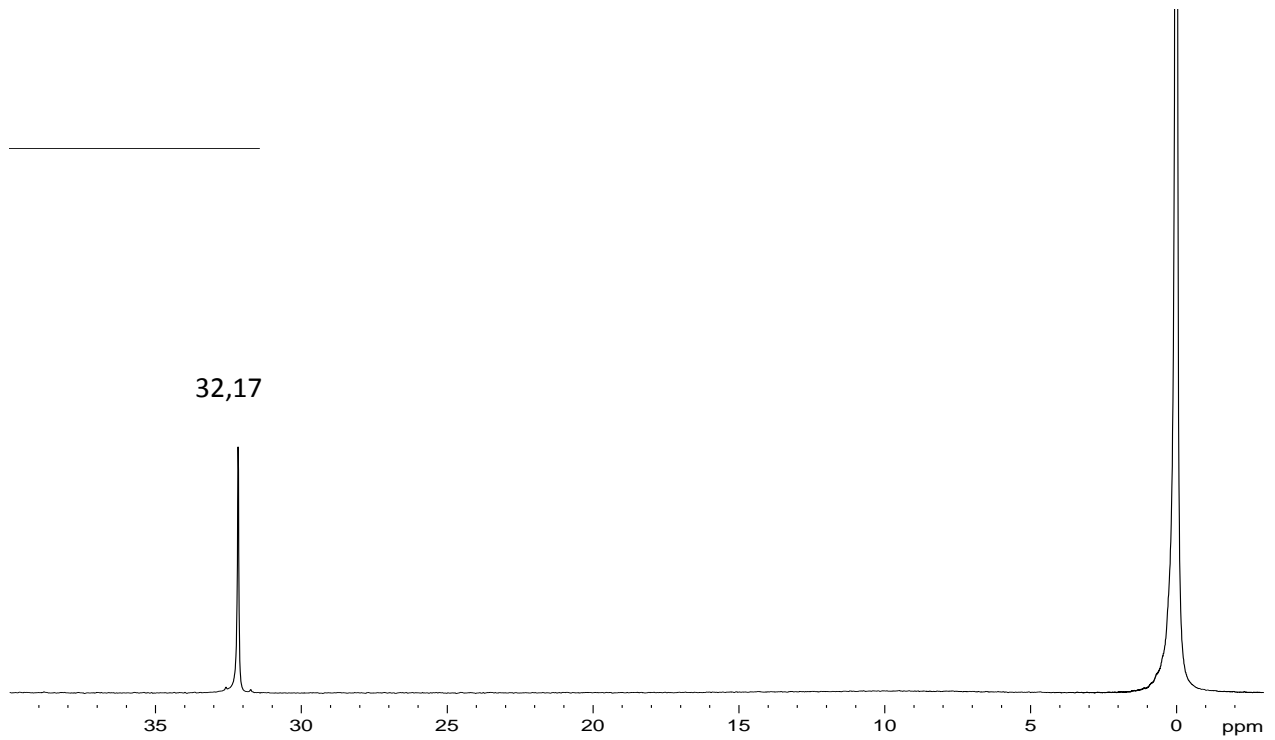
## 2.4. <sup>13</sup>C-Spektrum ( <sup>31</sup>P gekoppelt ) Brenzkatechin-DPPC



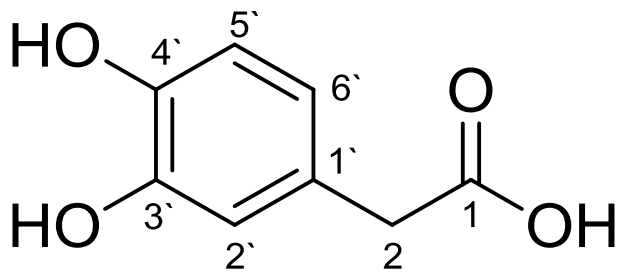
## 2.5. Ausschnitt aus COSY-Spektrum (31P-gekoppelt) Brenzkatechin-DPPC



## 2.6. $^{31}\text{P}$ -Spektrum Brenzkatechin-DPPC

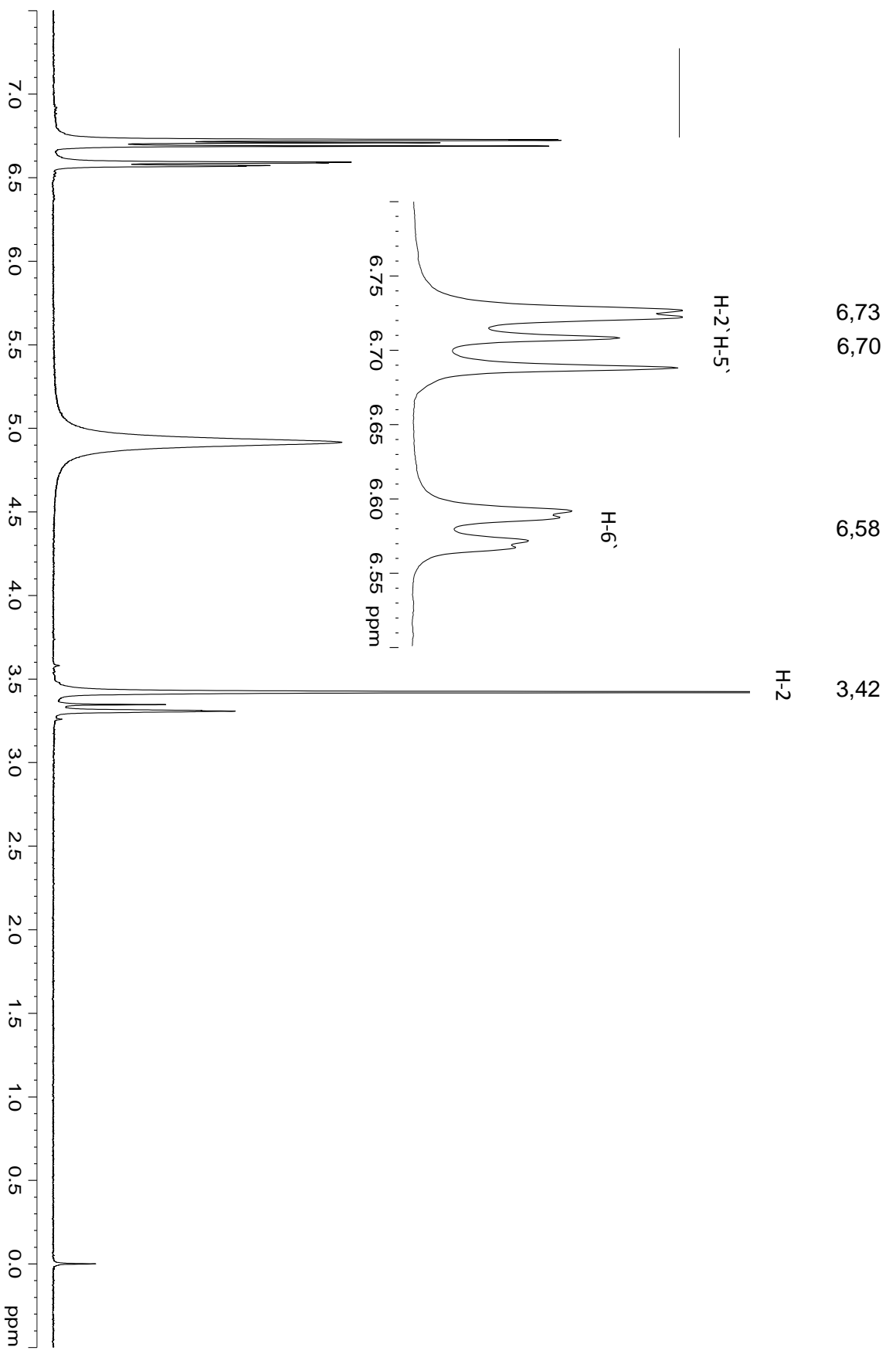


## 3. unmarkierte 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DPA)

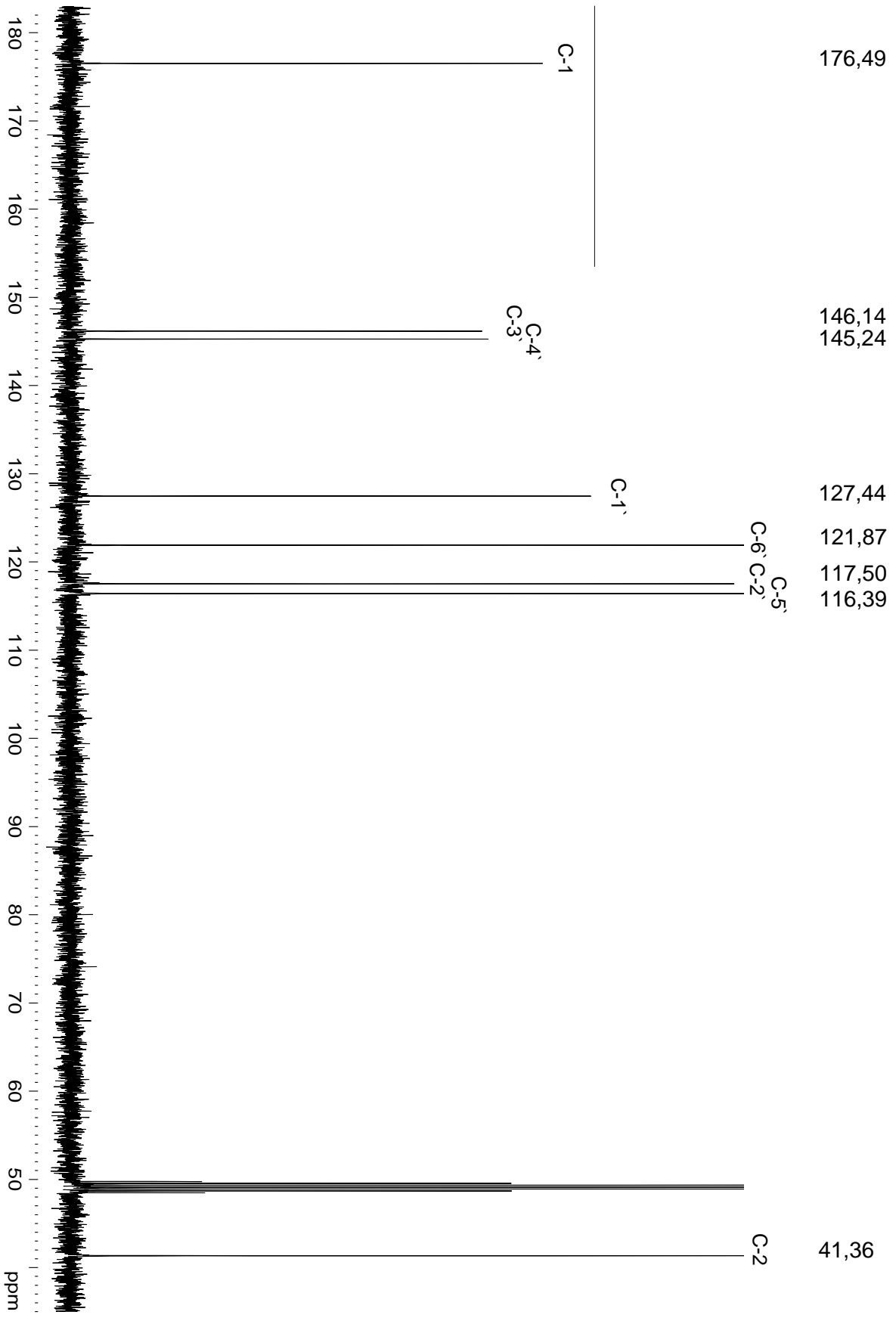


$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$   
 $M = 168 \text{ g/mol}$

### 3.1. <sup>1</sup>H-Spektrum DPA

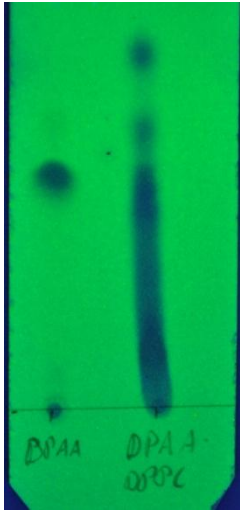


3.2. <sup>13</sup>C-Spektrum DPA





#### 4. Reaktion von 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure mit DPPC

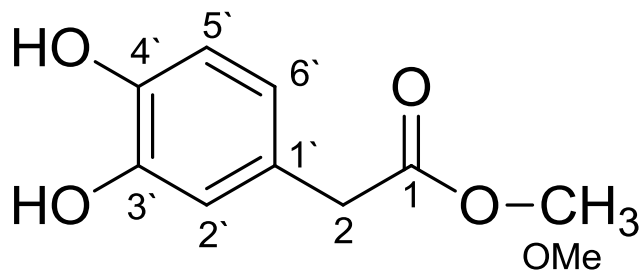


**4.1. DC:** Fließmittel: Essigester + 1% Essigsäure, Links: DPA ( $R_f = 0,5$ ), Rechts: Reaktion von DPA mit DPPC

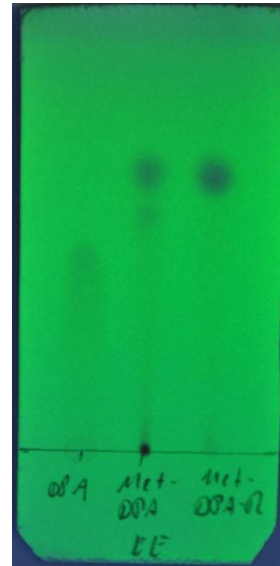


**4.2. Bild:** Reaktionsansatzes DPA mit DPPC, oranger Überstand: Benzenphase, weißer Niederschlag: TEA- HCl

#### 5. 3,4-Dihydroxyphenylessigsäuremethylester (Met-DPA)

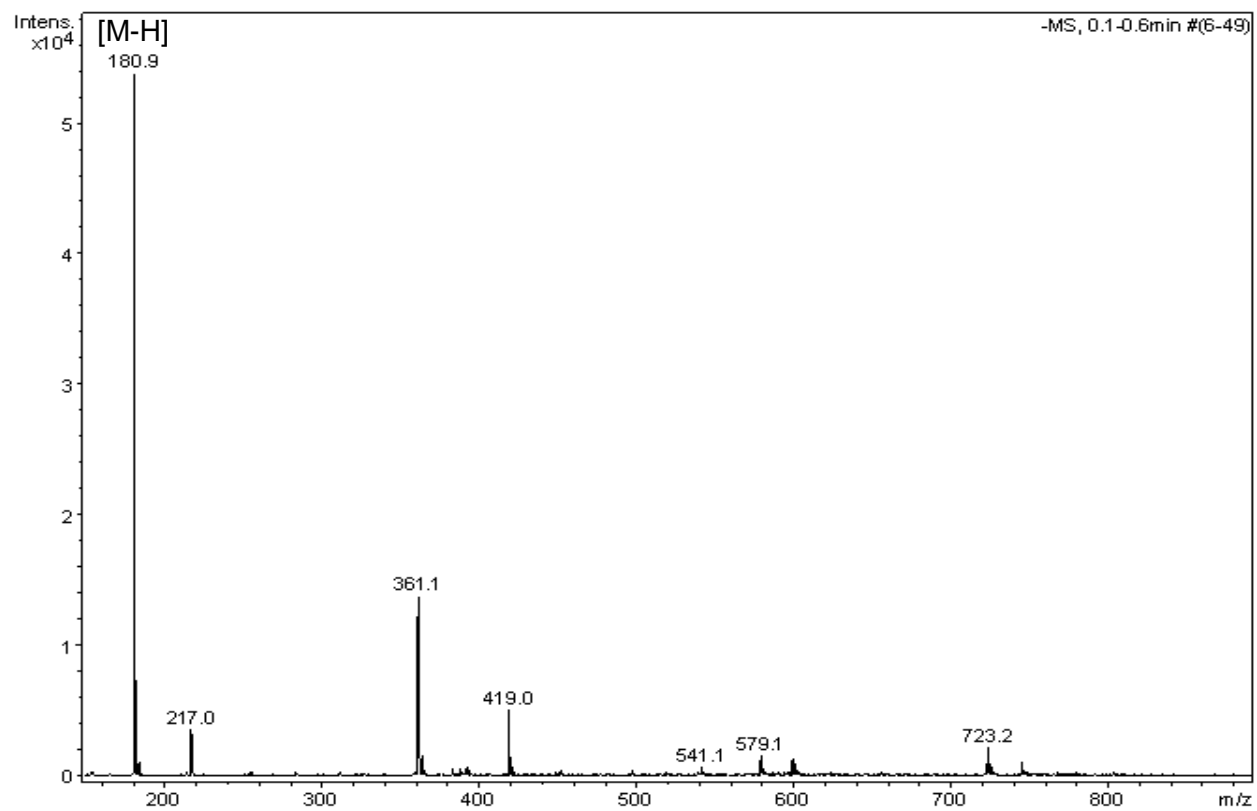


$C_9H_{10}O_4$   
 $M = 182 \text{ g/mol}$



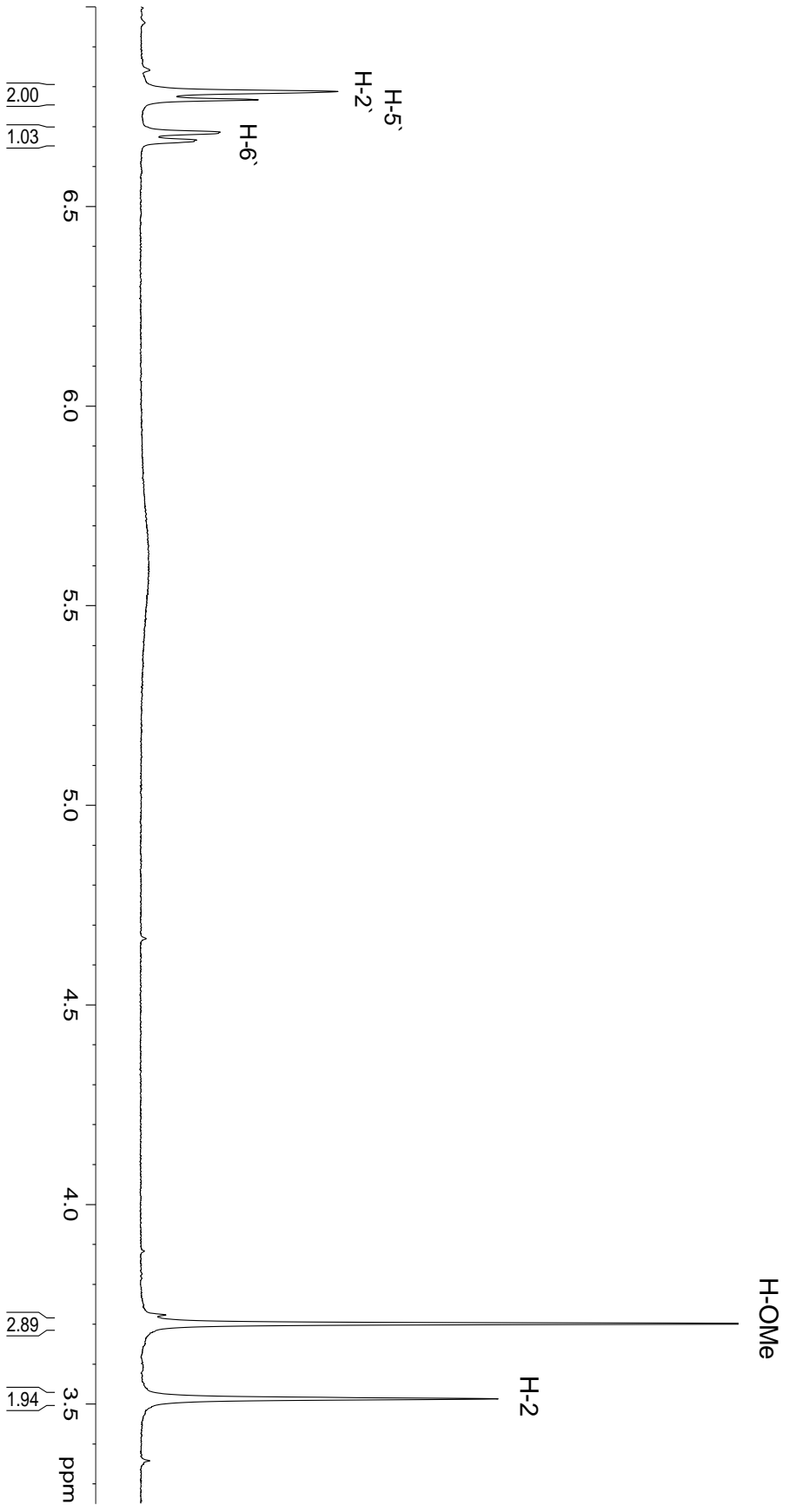
**5.1. DC:** Fließmittel: Essigester, Links: DPA ( $R_f = 0,42$ ), Mitte: Met-DPA ( $R_f = 0,63$ ), Rechts: Met-DPA Referenz ( $R_f = 0,63$ )

## 5.2. Massenspektrum Met-DPA (negativ)

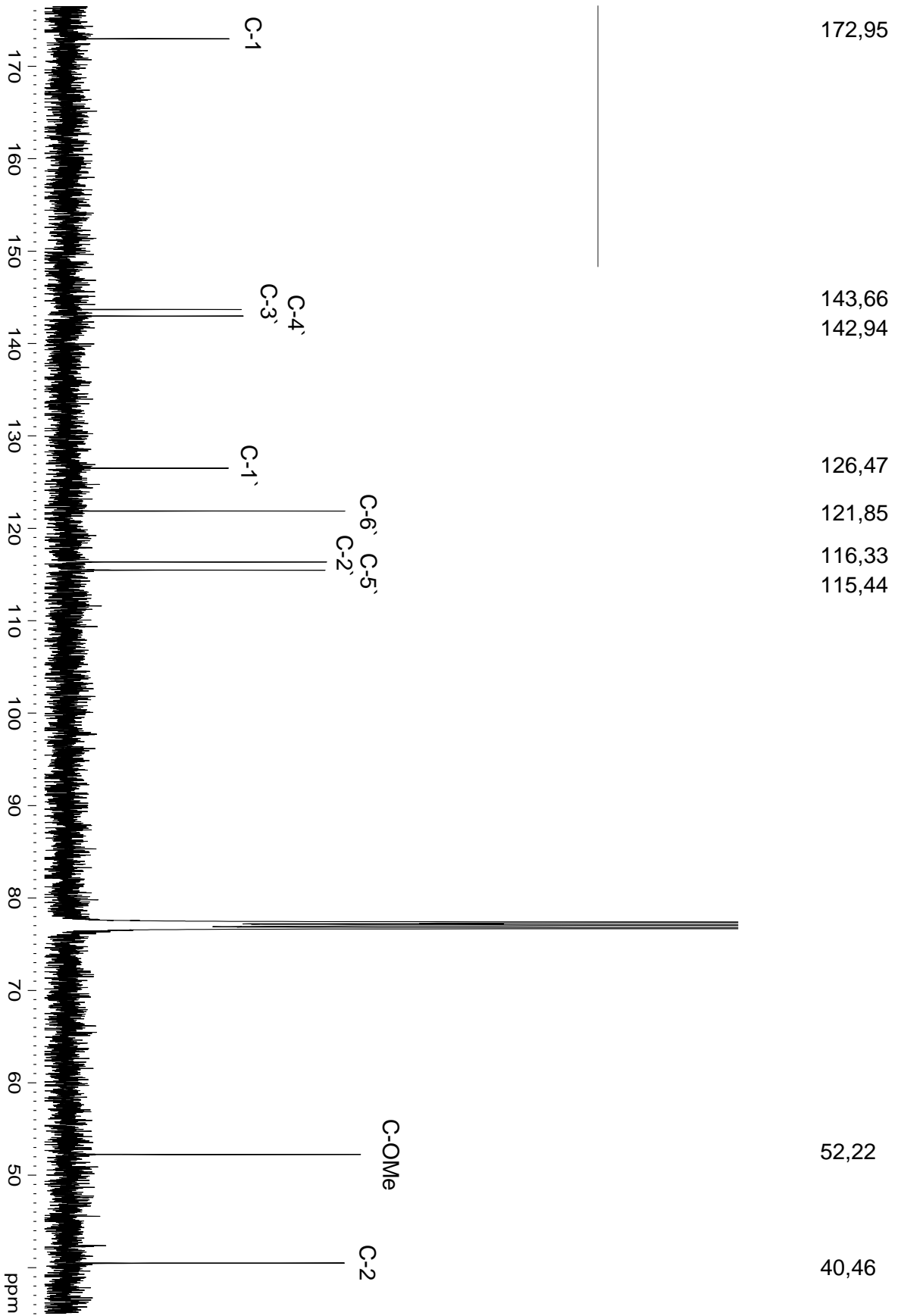


5.3. <sup>1</sup>H-Spektrum Met-DPA

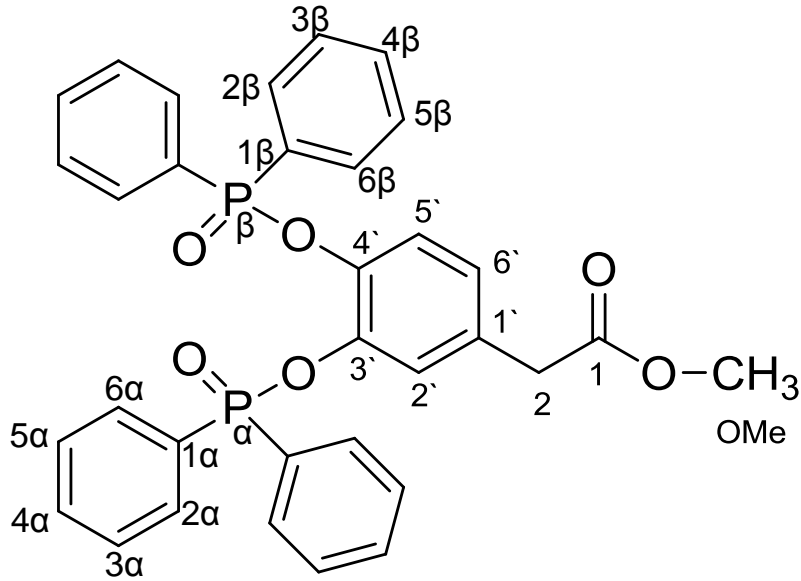
6,78  
6,77  
6,67



5.4. <sup>13</sup>C-Spektrum Met-DPA



### 6. 3,4-Dihydroxyphenylessigsäuremethylester-DPPC (Met-DPA-DPPC)

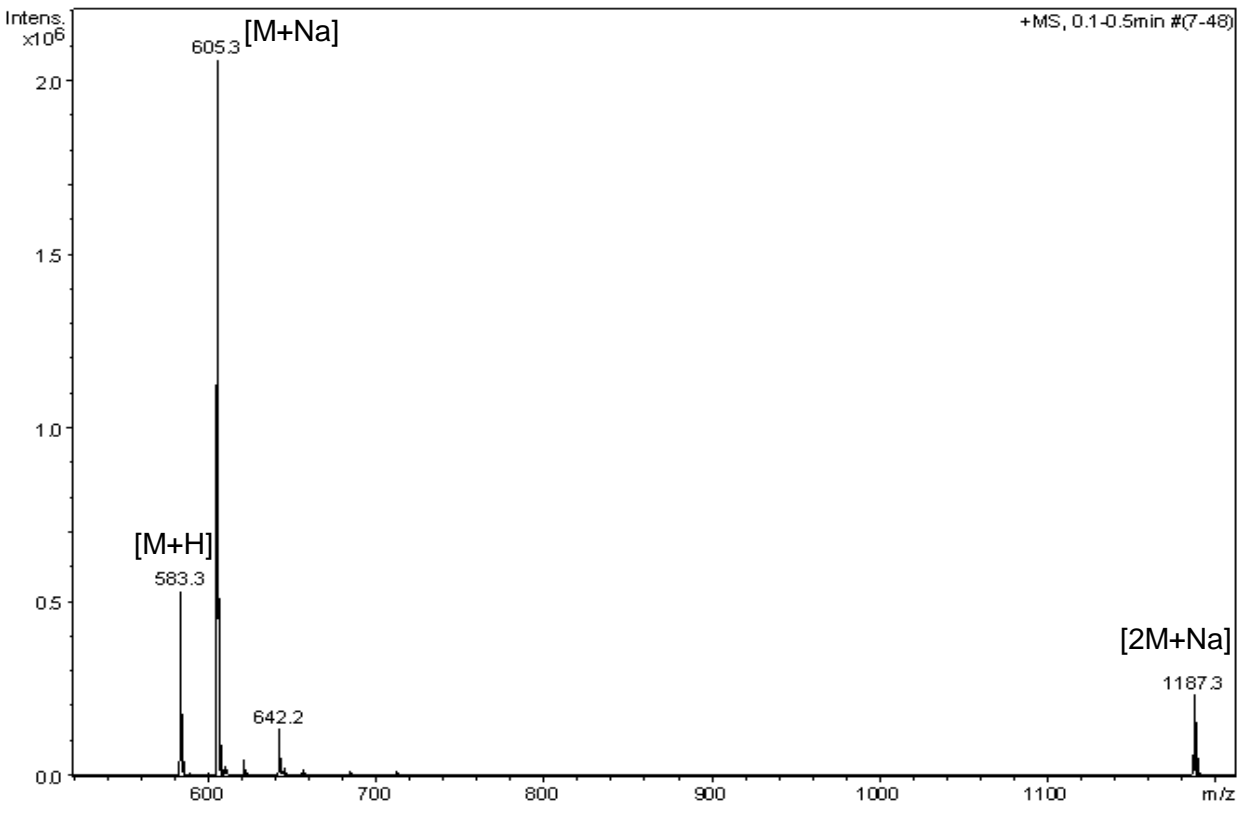


**C<sub>33</sub>H<sub>28</sub>O<sub>6</sub>P<sub>2</sub>**  
**M = 582 g/mol**

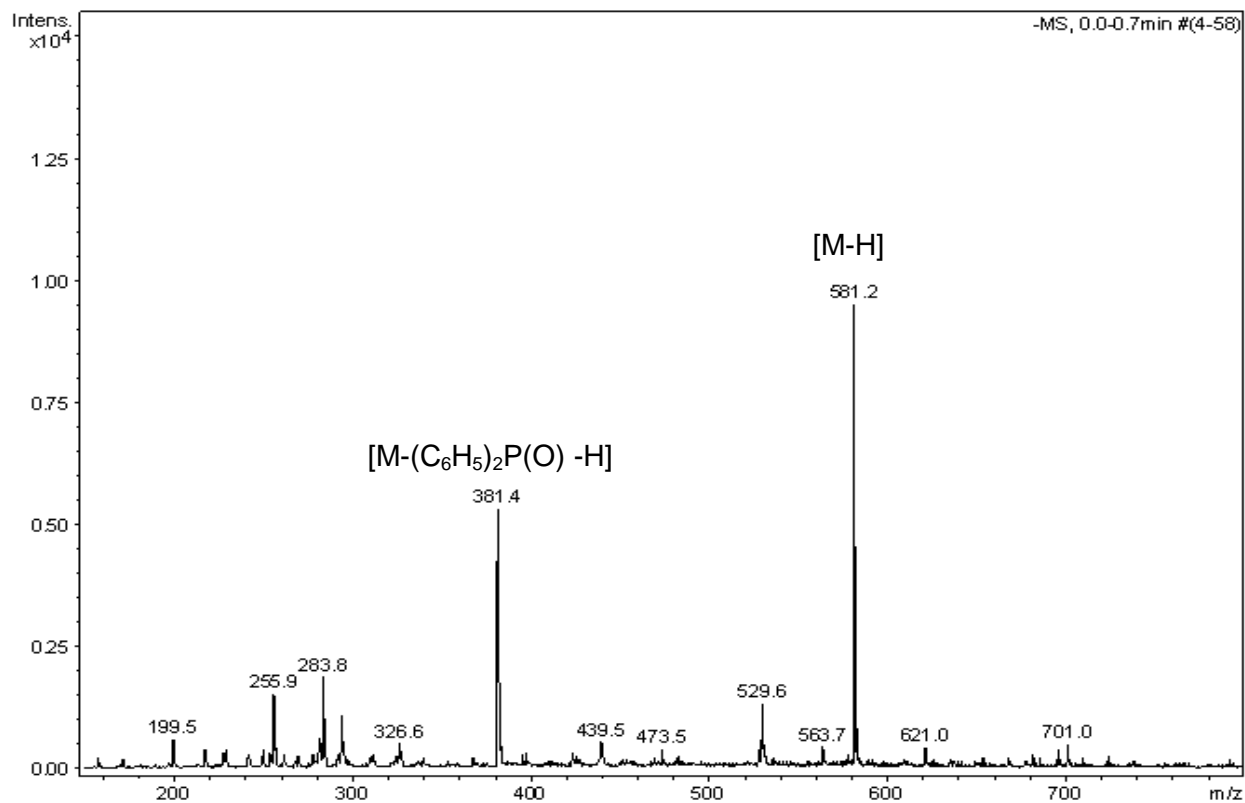


**6.1.DC:** Fließmittel: Essigester,  
Met-DPA-DPPC (R<sub>f</sub> = 0,48)

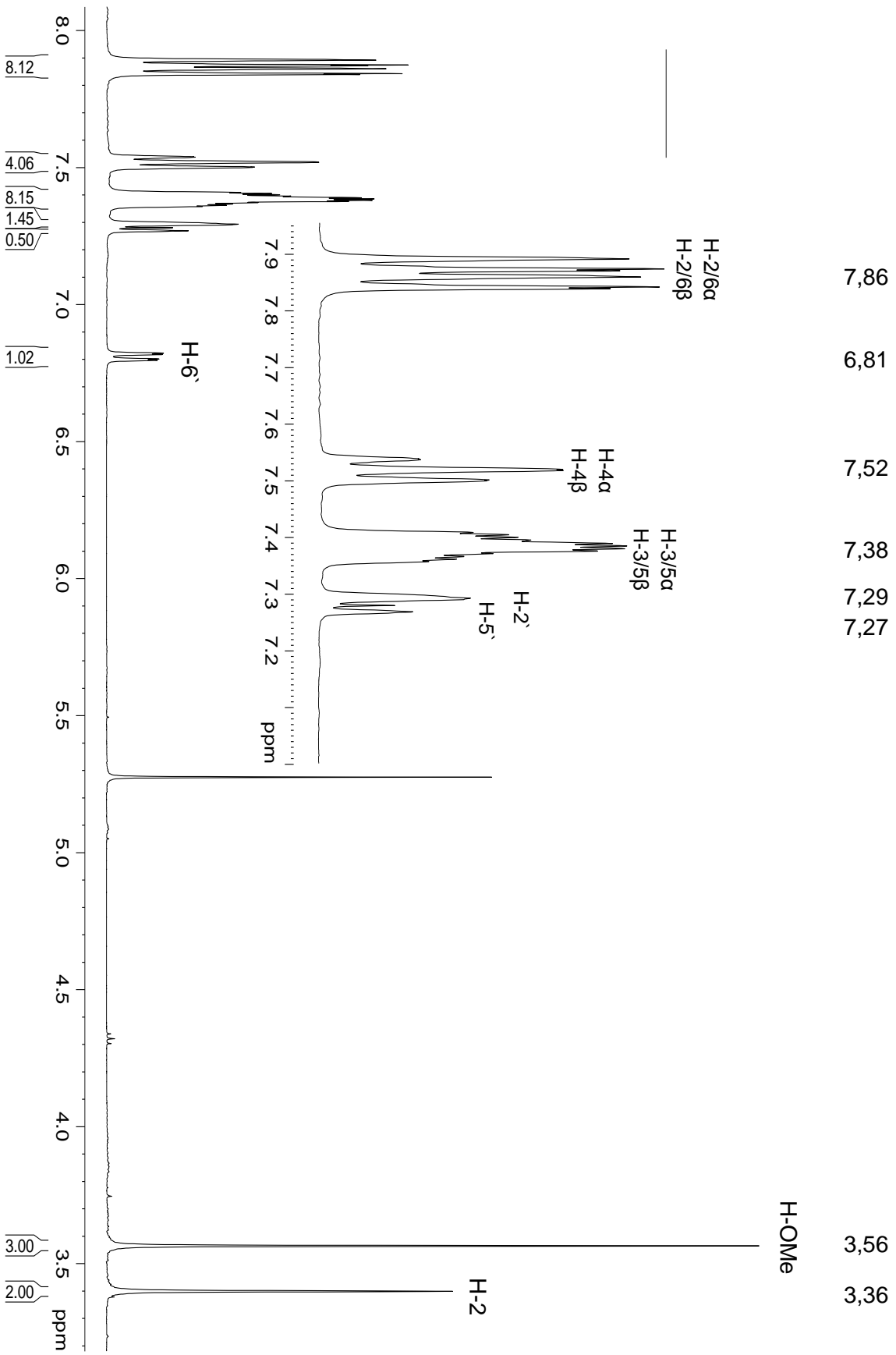
### 6.2. Massenspektrum Met-DPA-DPPC (positiv)



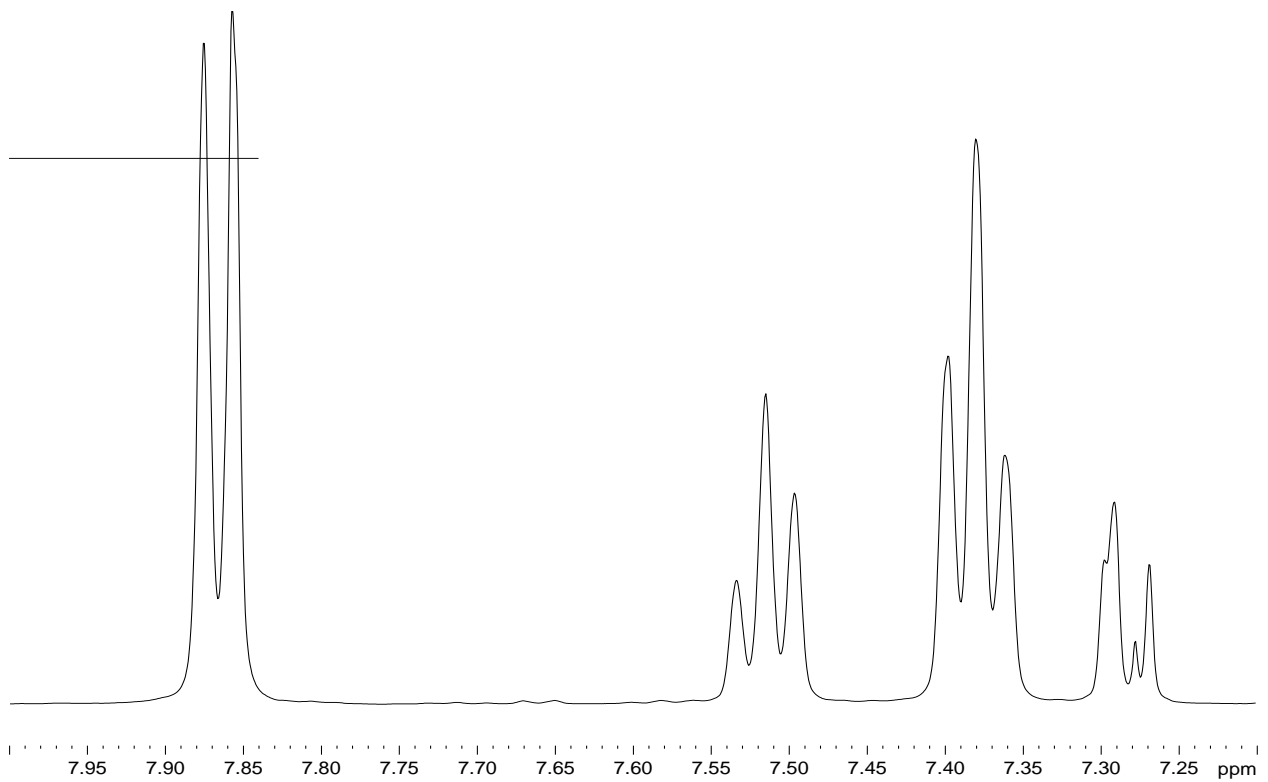
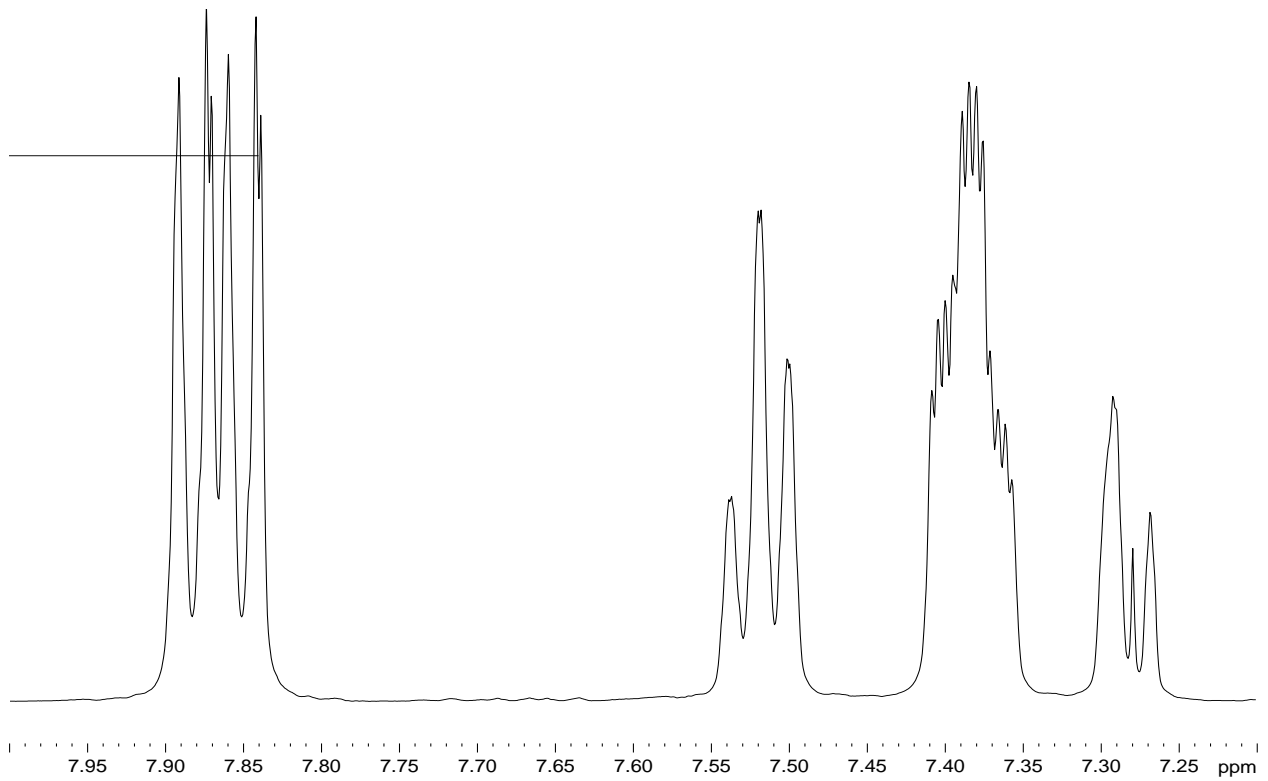
### 6.3. Massenspektrum Met-DPA-DPPC (negativ)



6.4.  $^1\text{H}$ -Spektrum ( $^3\text{P}$ -gekoppelt) Met-DPA-DPPC

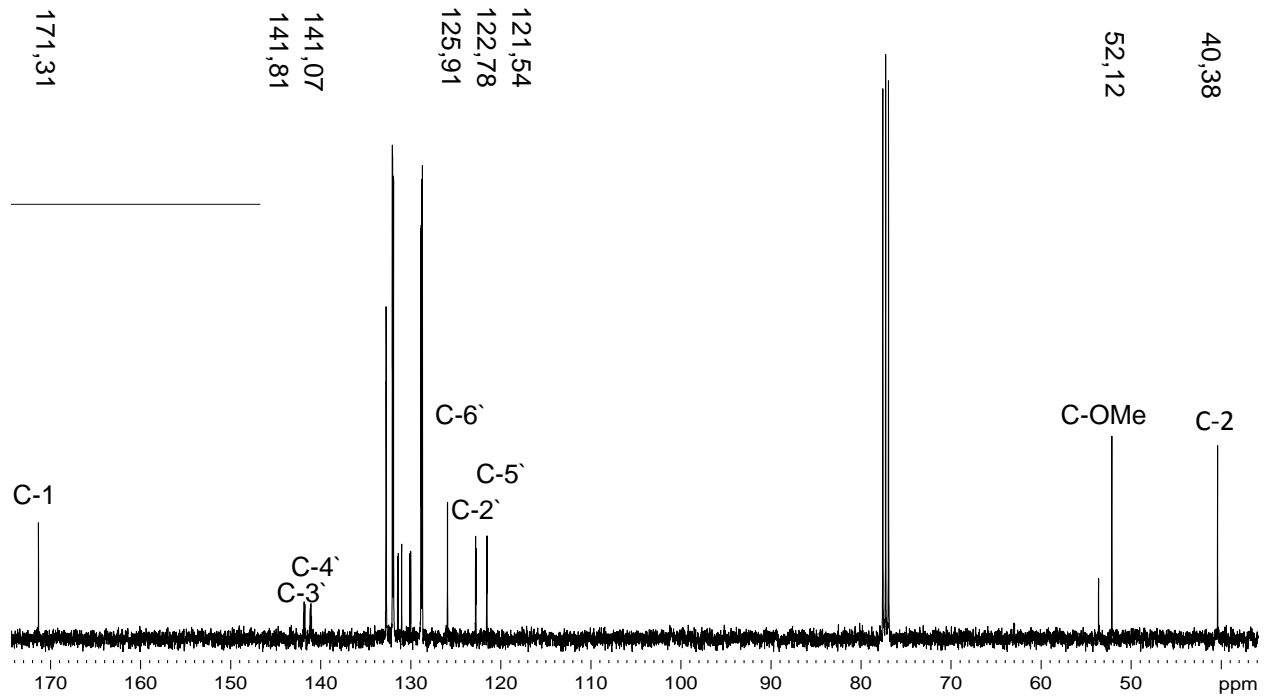


**6.5. Vergleich der  $^1\text{H}$ -Signale von H-2 bis H-4 $\alpha/\beta$  von Met-DPA-DPPC  $^{31}\text{P}$ -gekoppelt (oben) und  $^{31}\text{P}$ -entkoppelt (unten)**

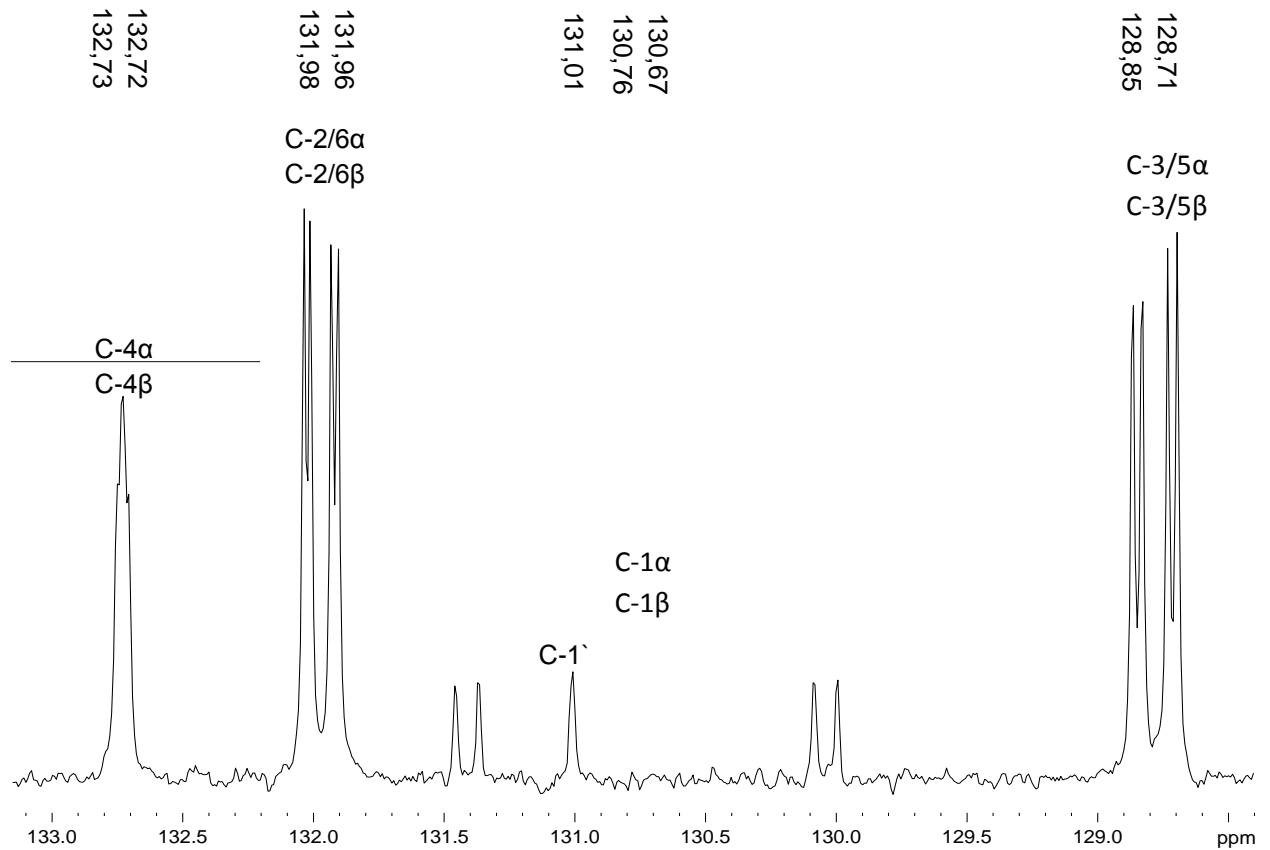




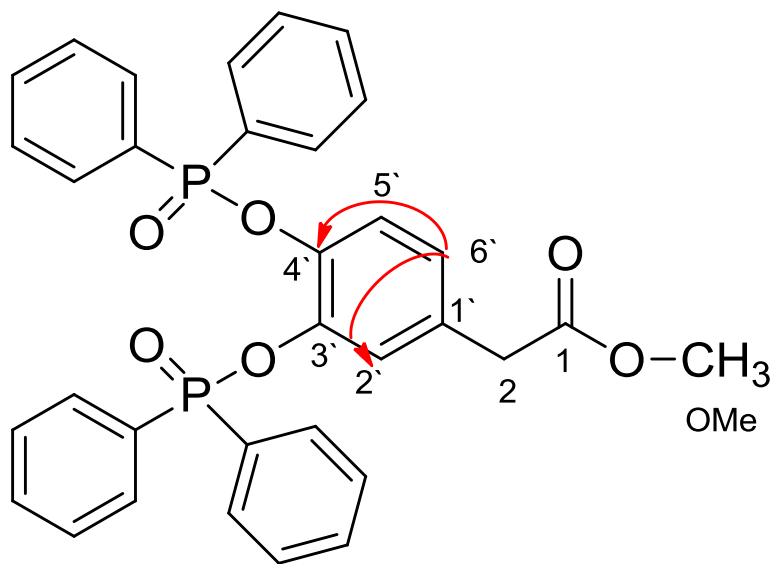
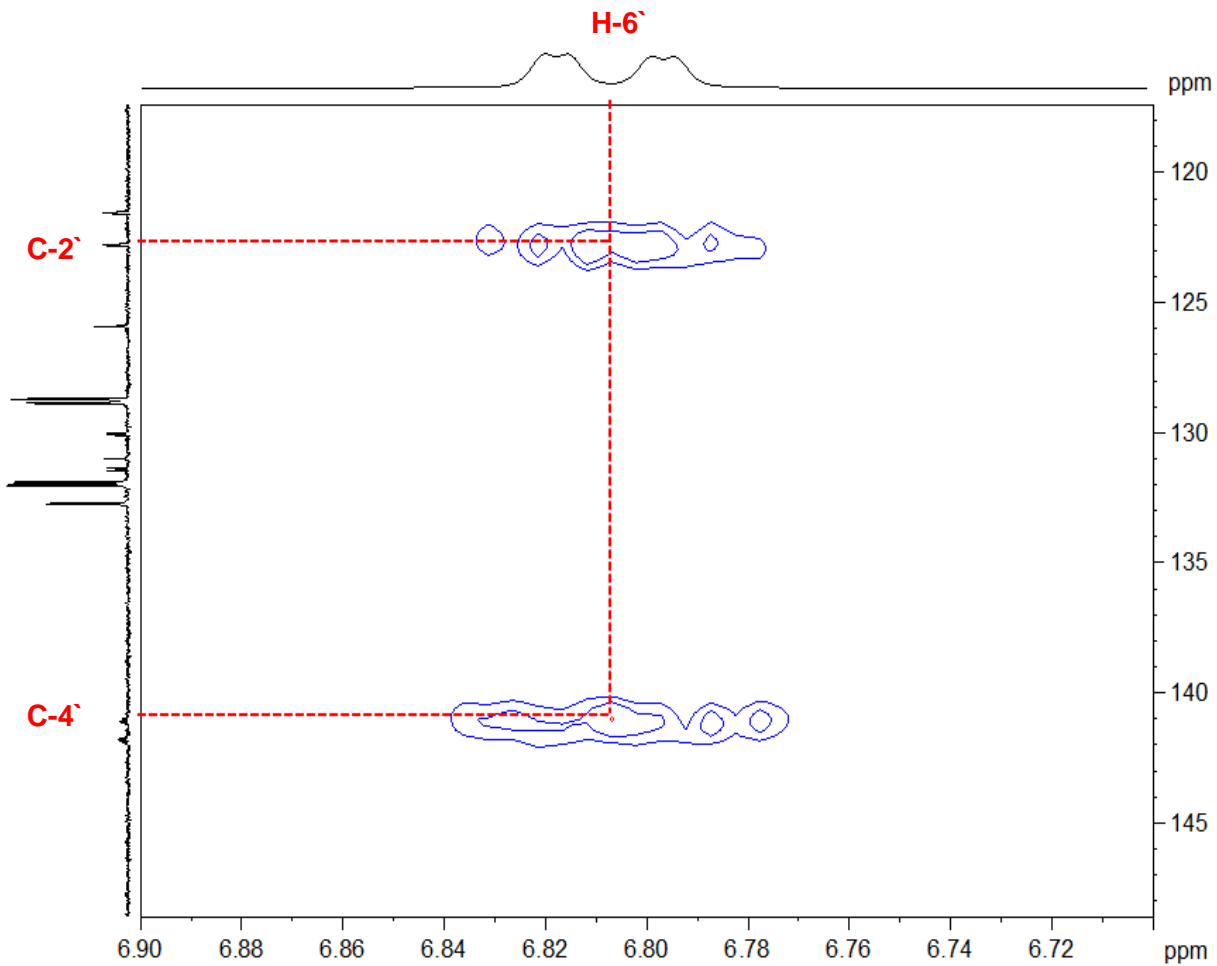
6.6.  $^{13}\text{C}$ -Spektrum ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) Met-DPA-DPPC

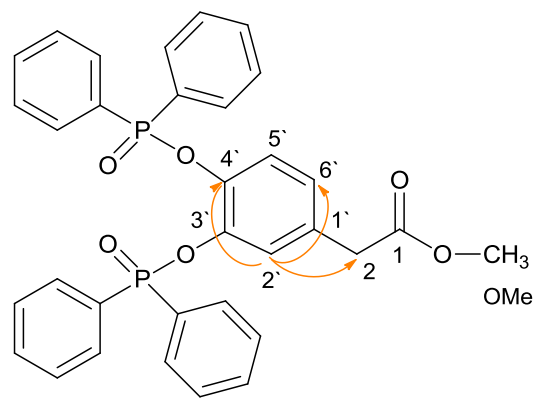
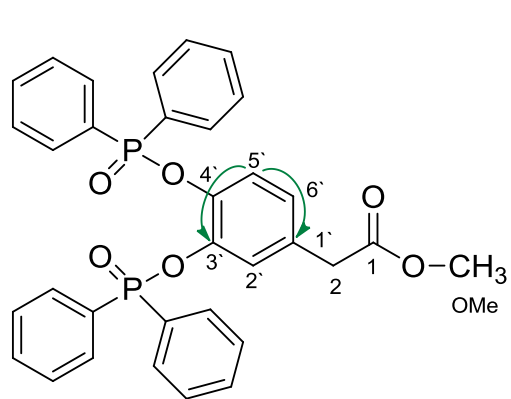
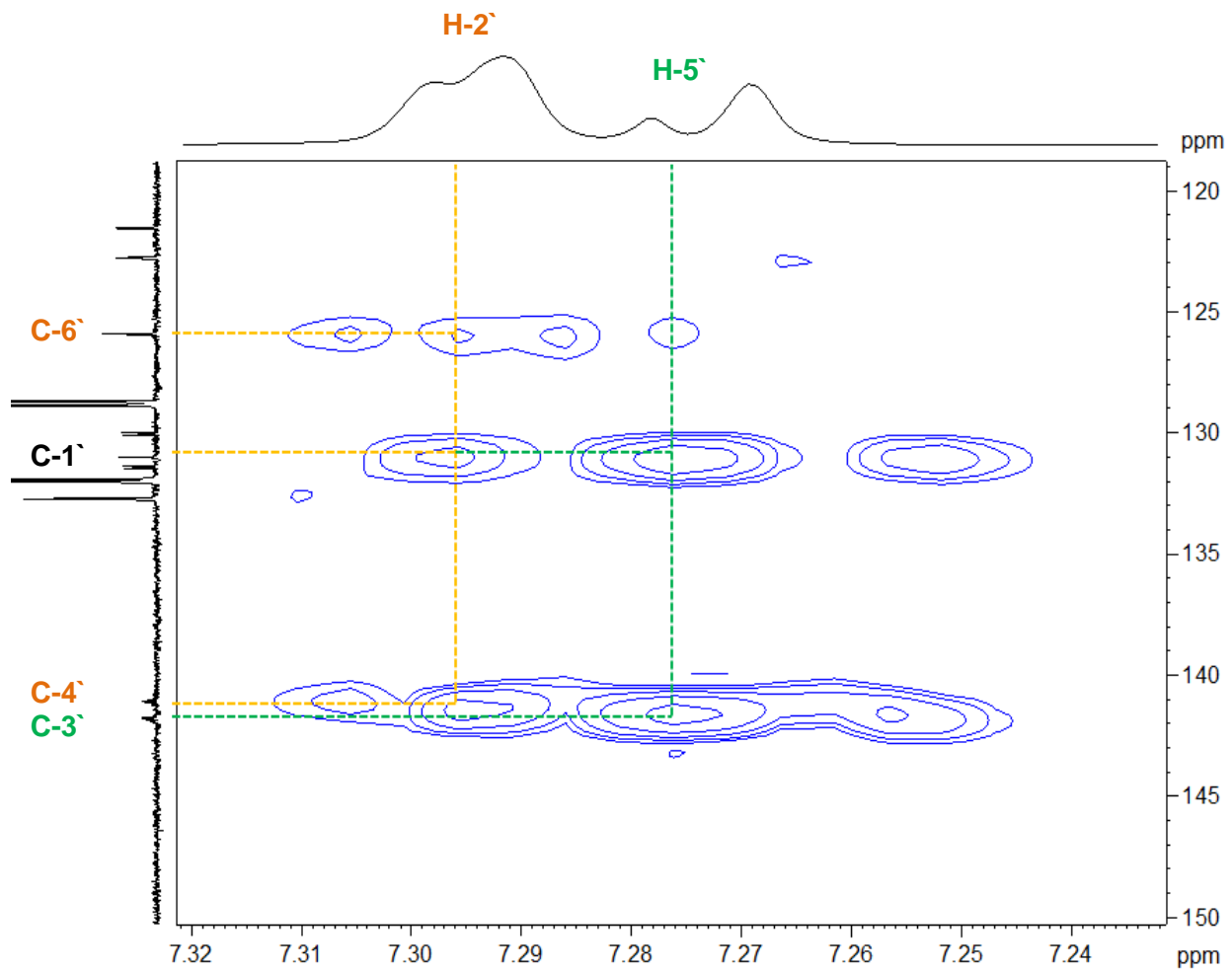


6.7. Ausschnitt vom  $^{13}\text{C}$ -Spektrum ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) Met-DPA-DPPC

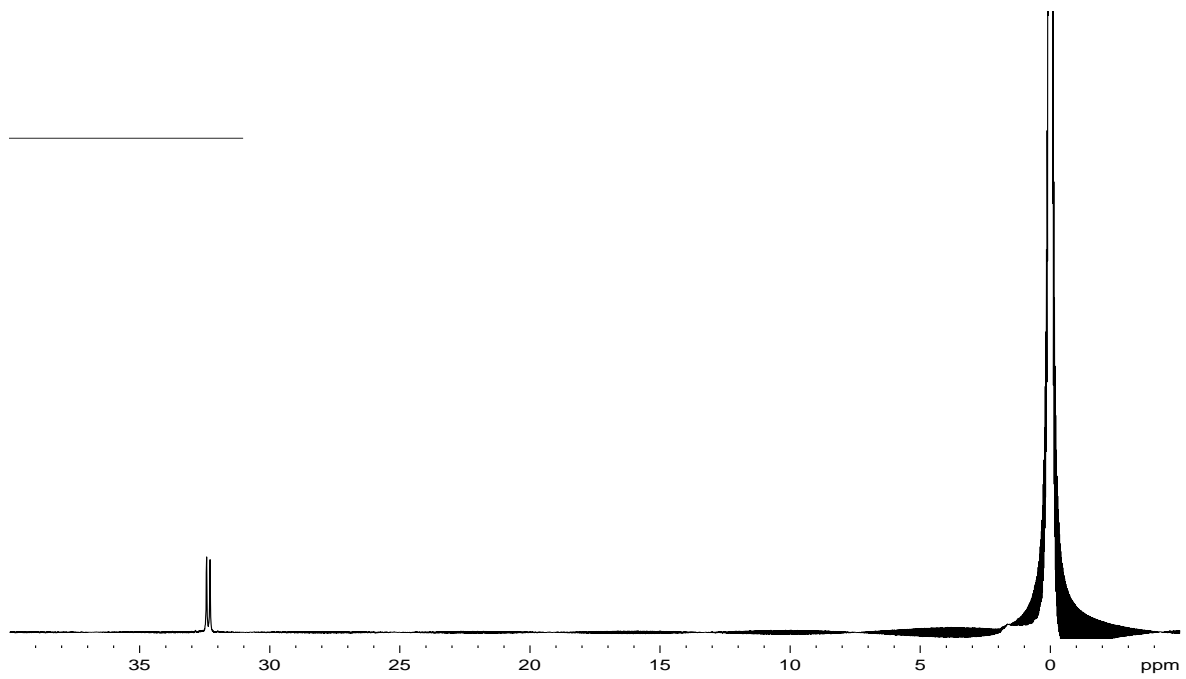


### 6.8. Ausschnitte aus HMBC-Spektrum ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) Met-DPA-DPPC

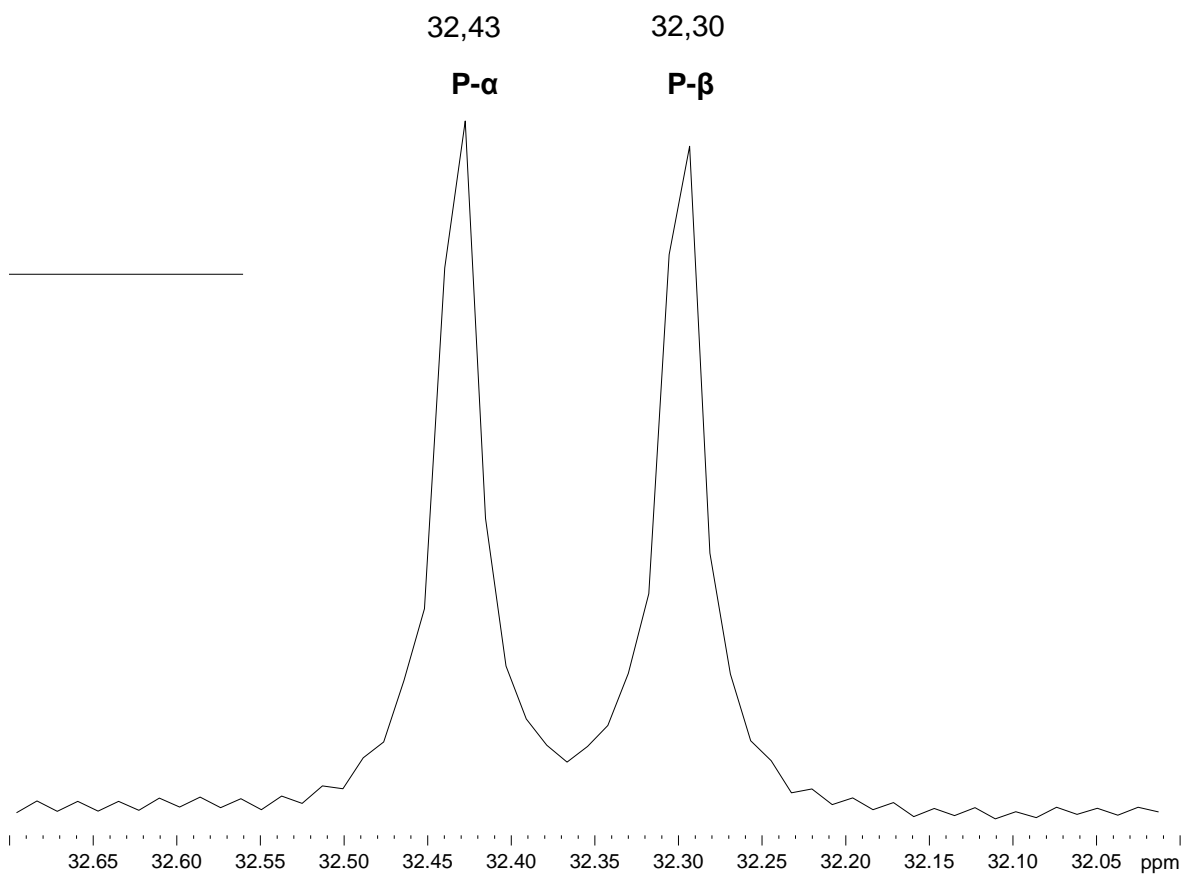




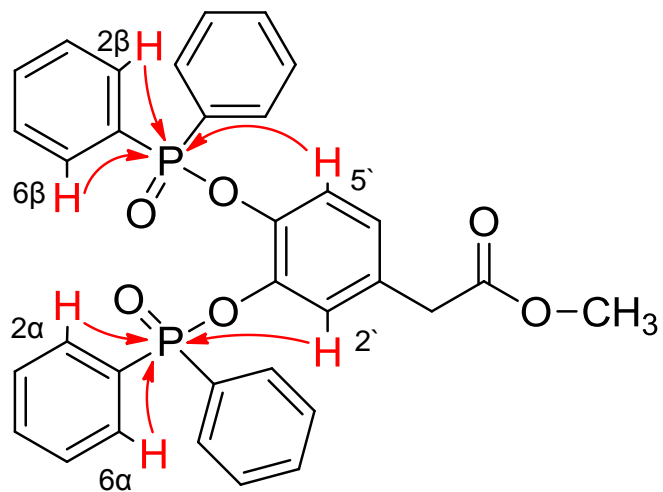
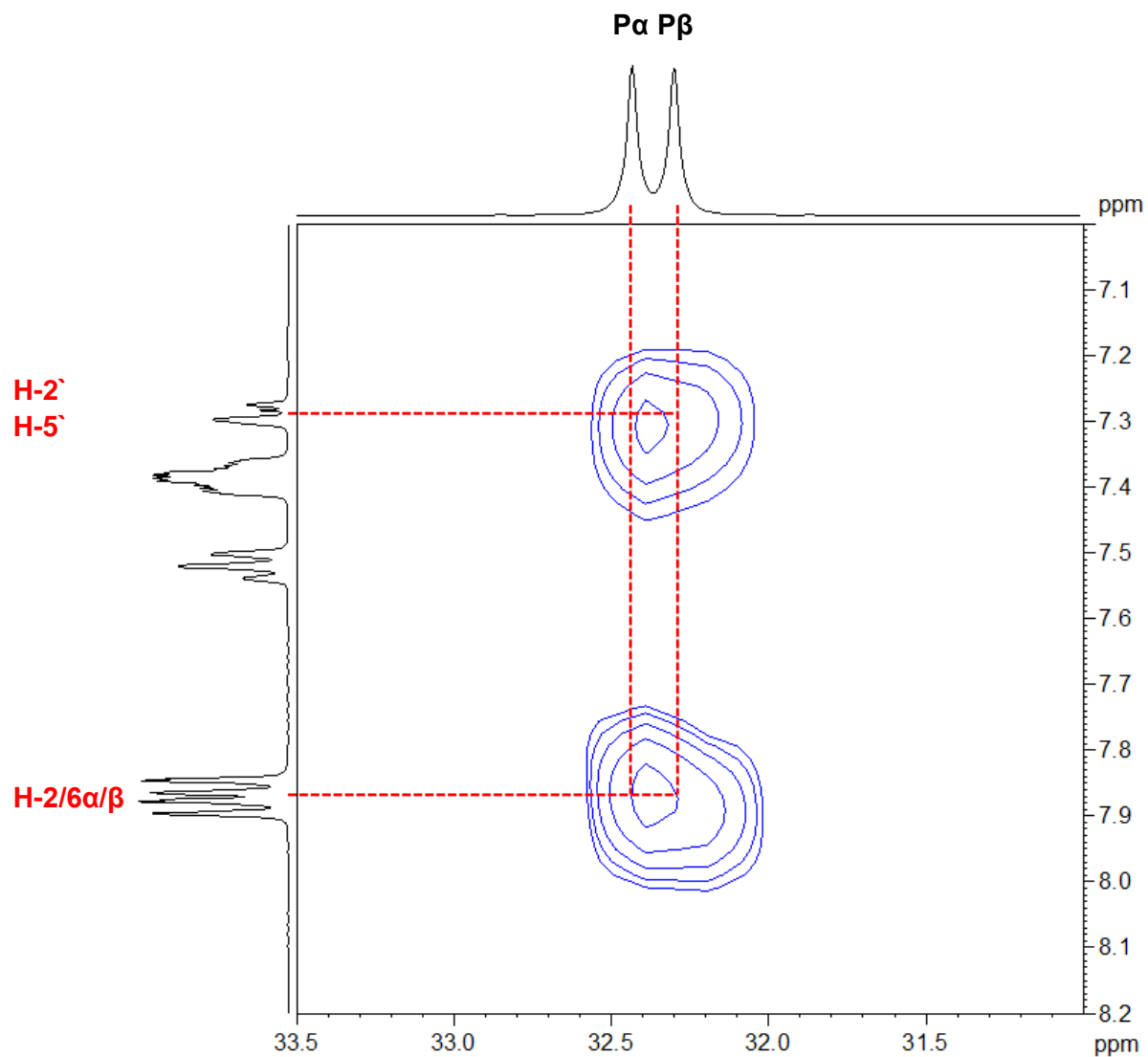
### 6.9. $^{31}\text{P}$ -Spektrum Met-DPA-DPPC



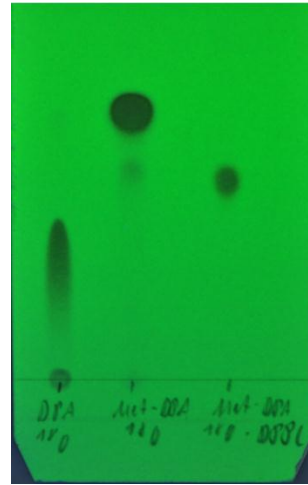
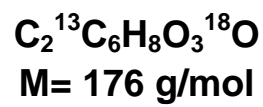
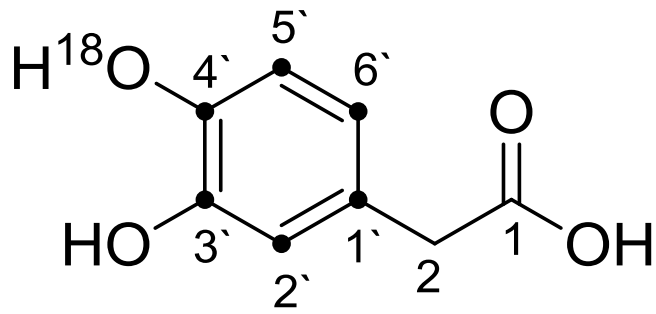
### 6.10. Detailansicht der $^{31}\text{P}$ -Signale Met-DPA-DPPC



6.11. Ausschnitt aus dem  $^{31}\text{P}$ - HOESY-Spektrum Met-DPA-DPPC

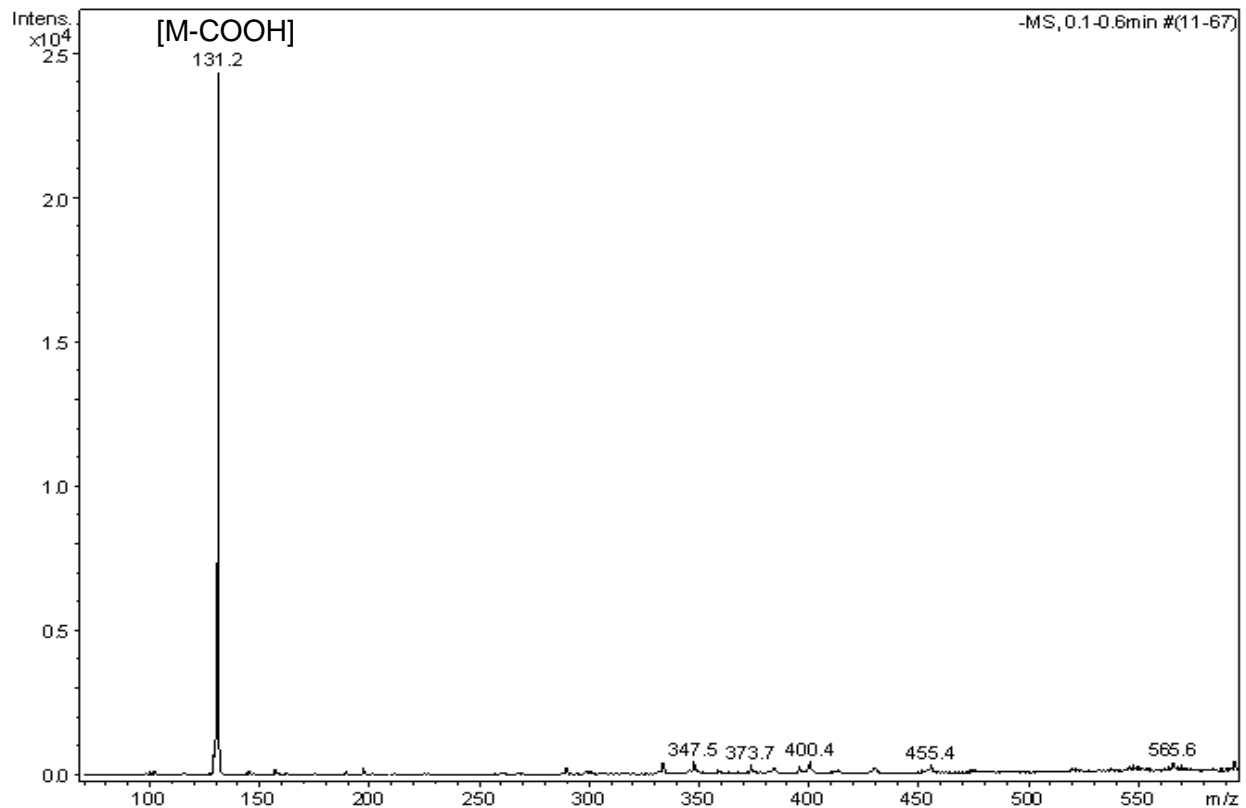


## 7. markierte 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure (DPA(<sup>18</sup>O))



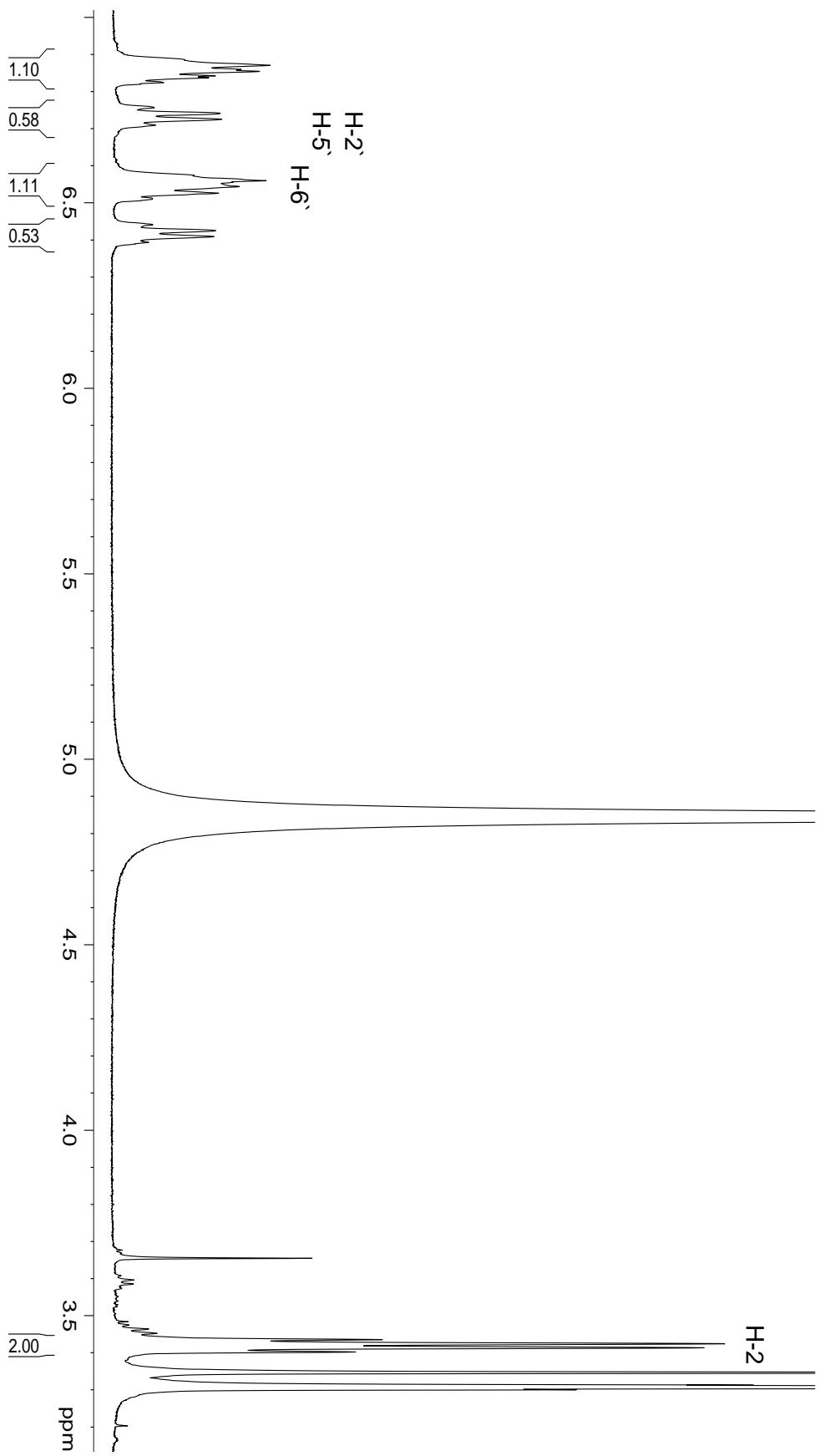
7.1. DC: Fließmittel: Essigester, Links DPA(<sup>18</sup>O) (R<sub>f</sub> = 0,37), Mitte: Met-DPA(<sup>18</sup>O) (R<sub>f</sub> = 0,63), Rechts: Met-DPA(<sup>18</sup>O)-DPPC (R<sub>f</sub> = 0,48)

## 7.2. Massenspektrum DPA(<sup>18</sup>O) (negative)

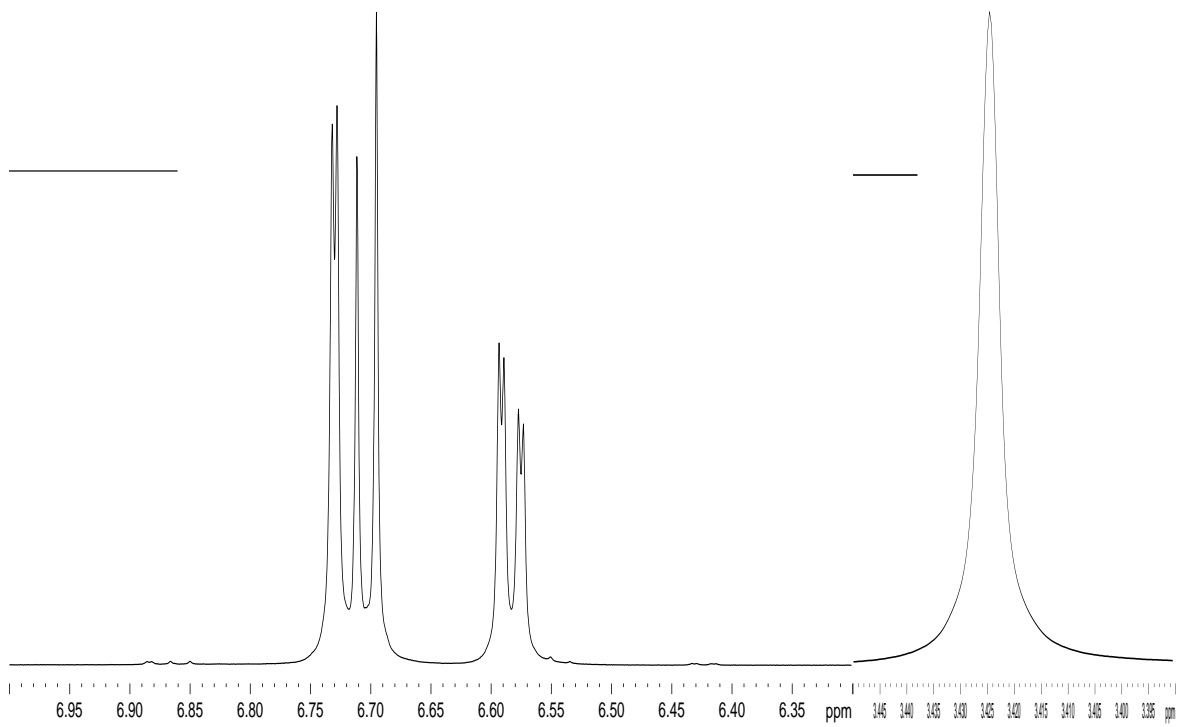
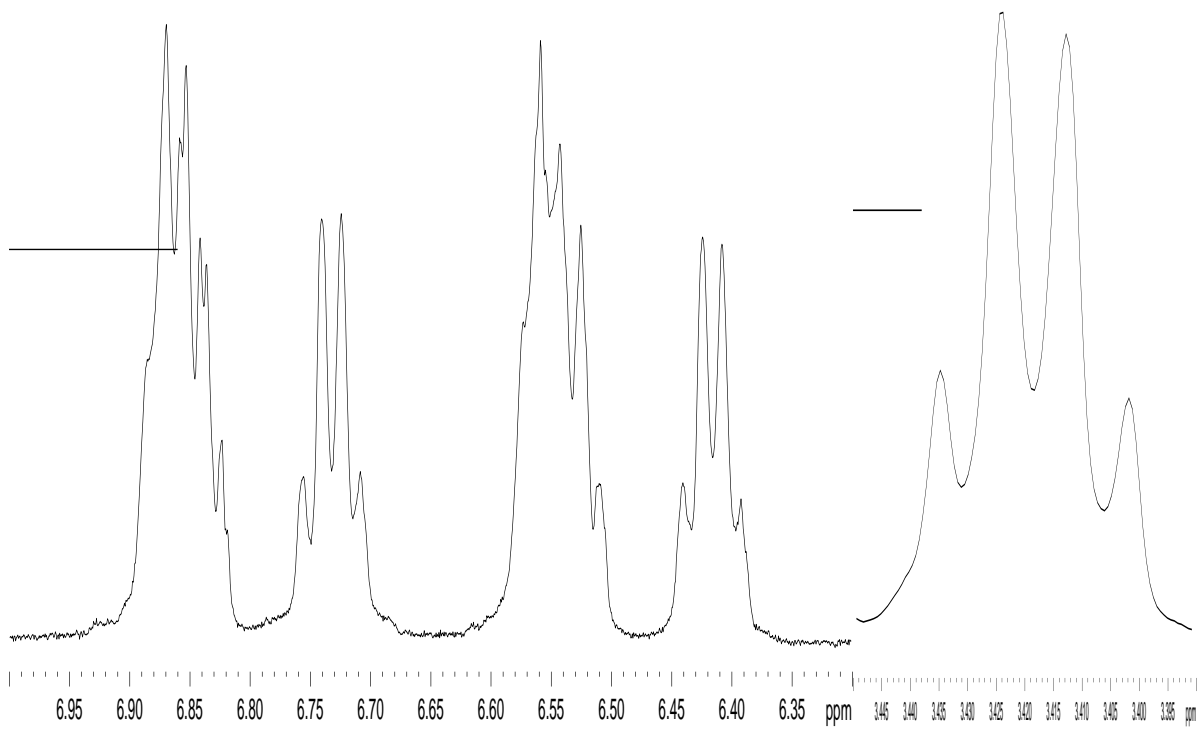


7.3. <sup>1</sup>H-Spektrum DPA(<sup>18</sup>O)

6,70  
6,57

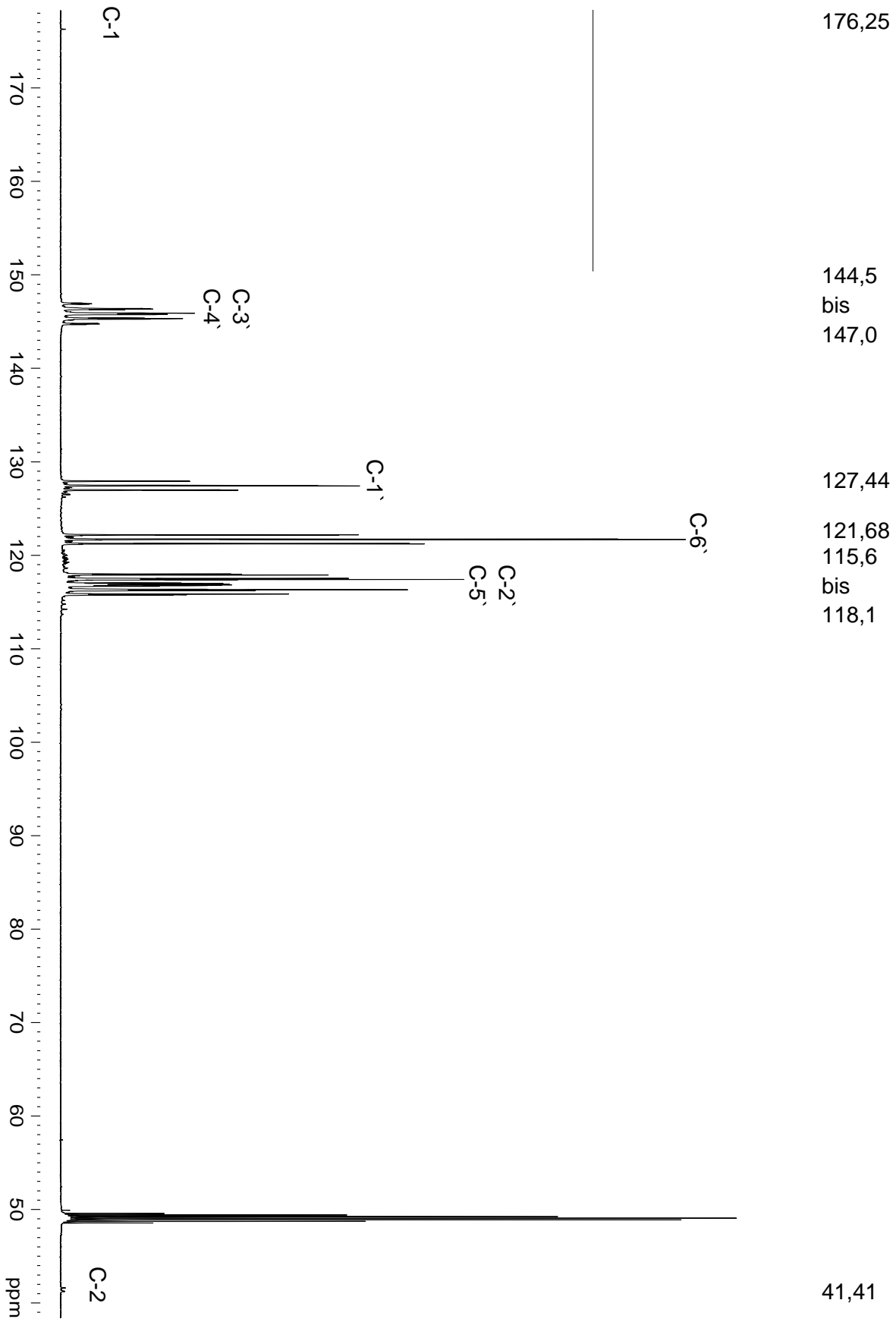


#### 7.4. Vergleich der $^1\text{H}$ -Signale von DPA( $^{18}\text{O}$ ) (oben) und DPA (unten)

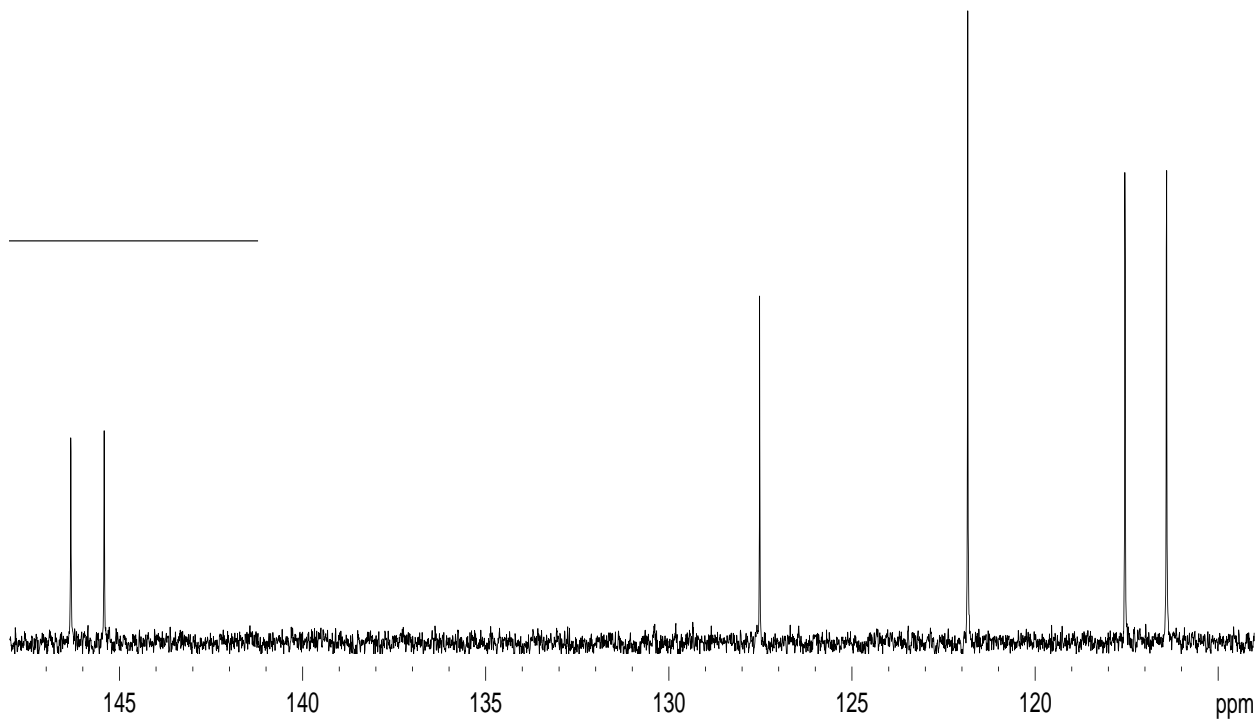
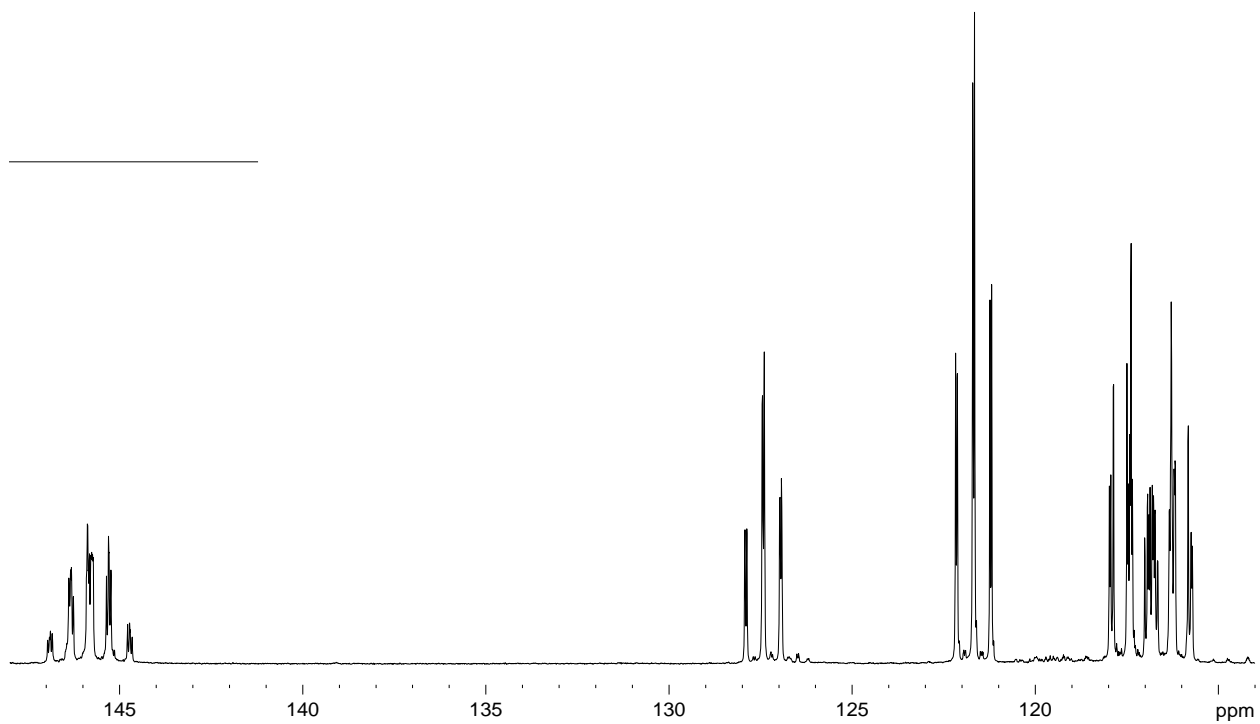




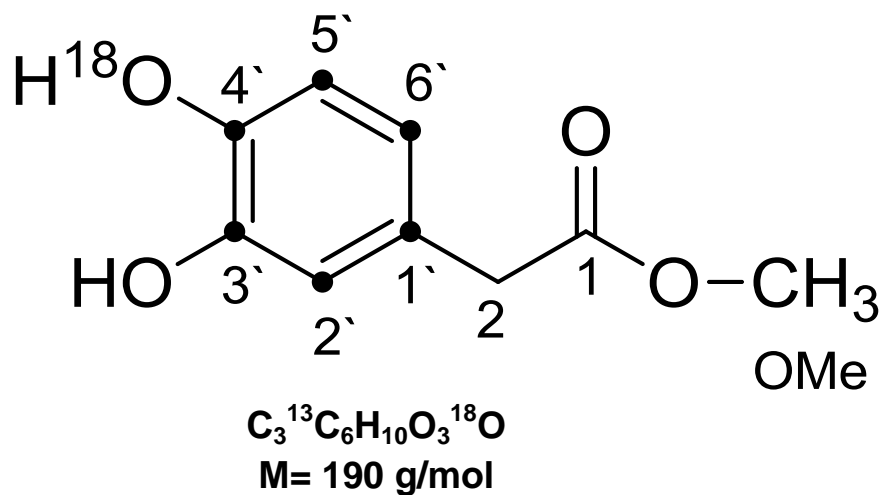
7.5. <sup>13</sup>C-Spektrum DPA(<sup>18</sup>O)



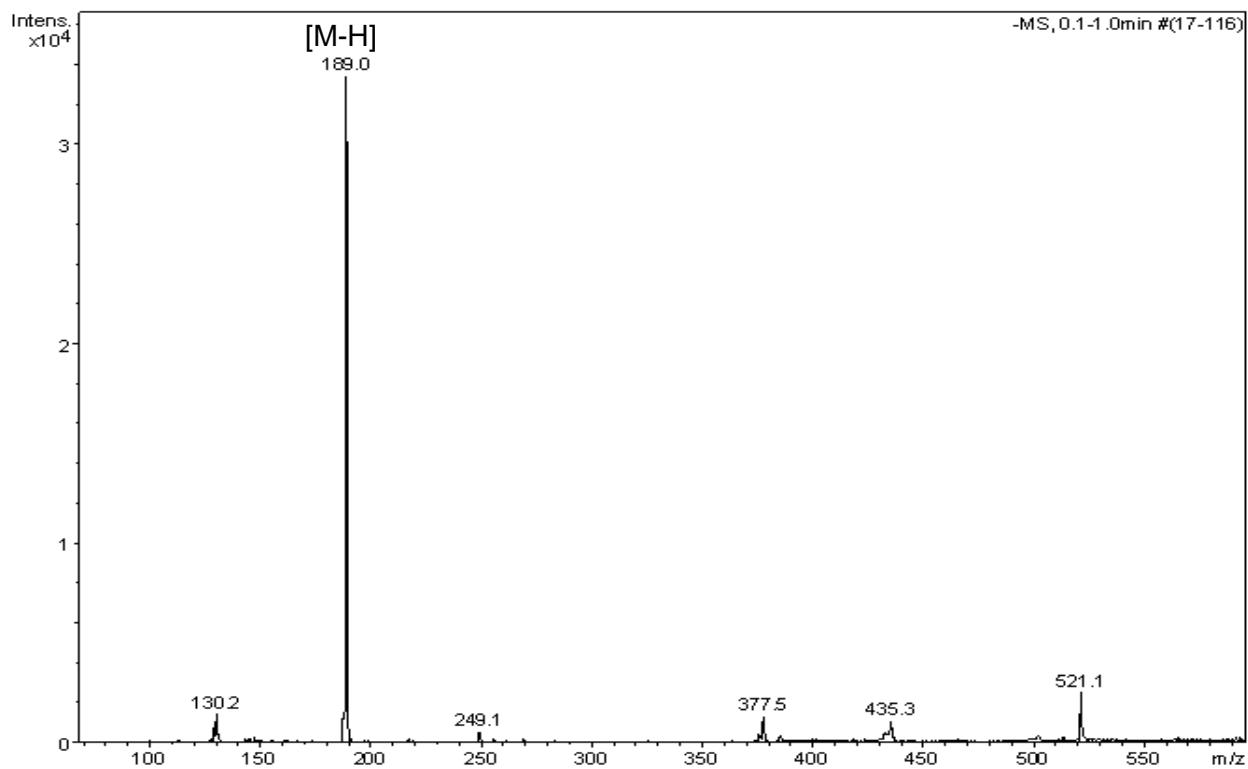
7.6. Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -Signale 1` bis 6` von DPA( $^{18}\text{O}$ ) (oben) und DPA (unten)



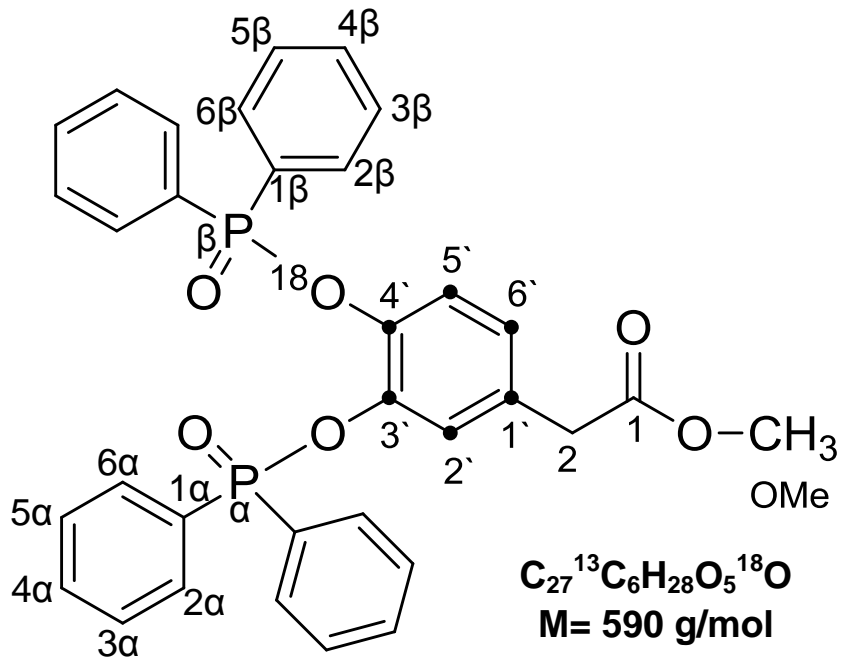
## 8. markierte 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäuremethylester (Met-DPA(<sup>18</sup>O))



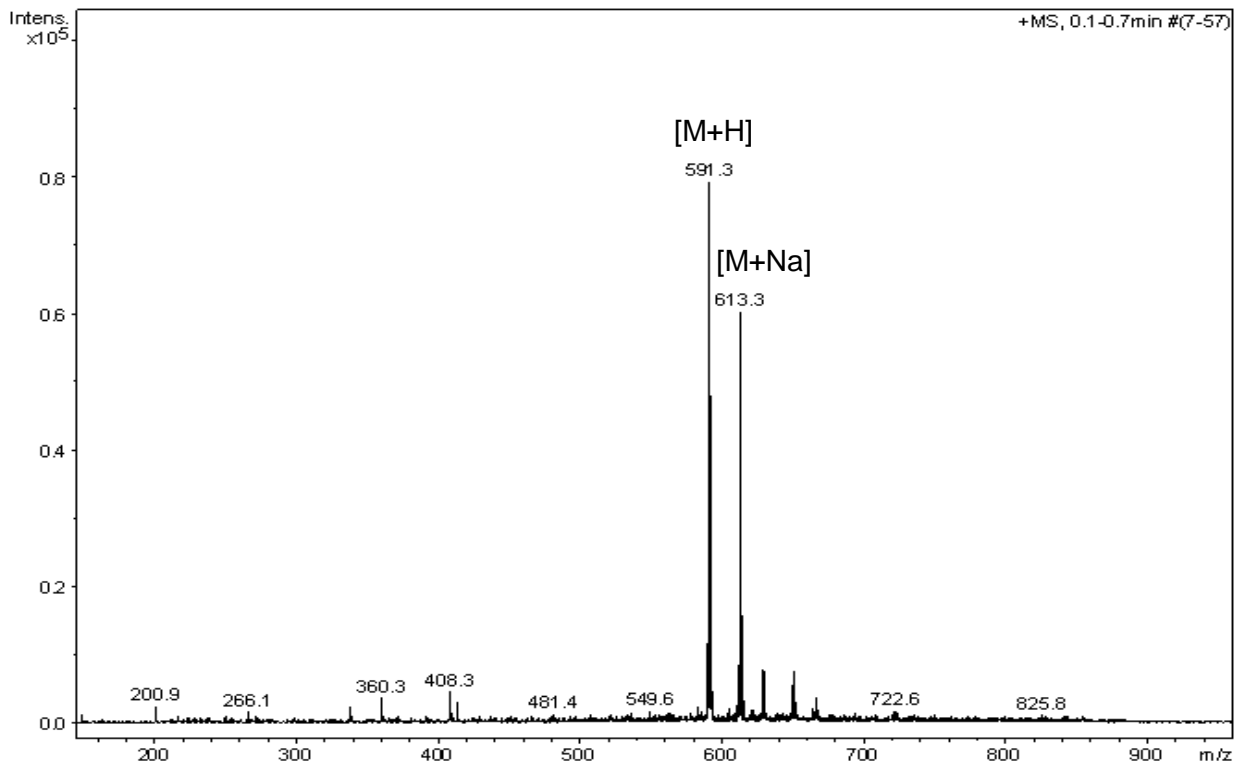
### 8.1. Massenspektrum Met-DPA(<sup>18</sup>O) (negativ)



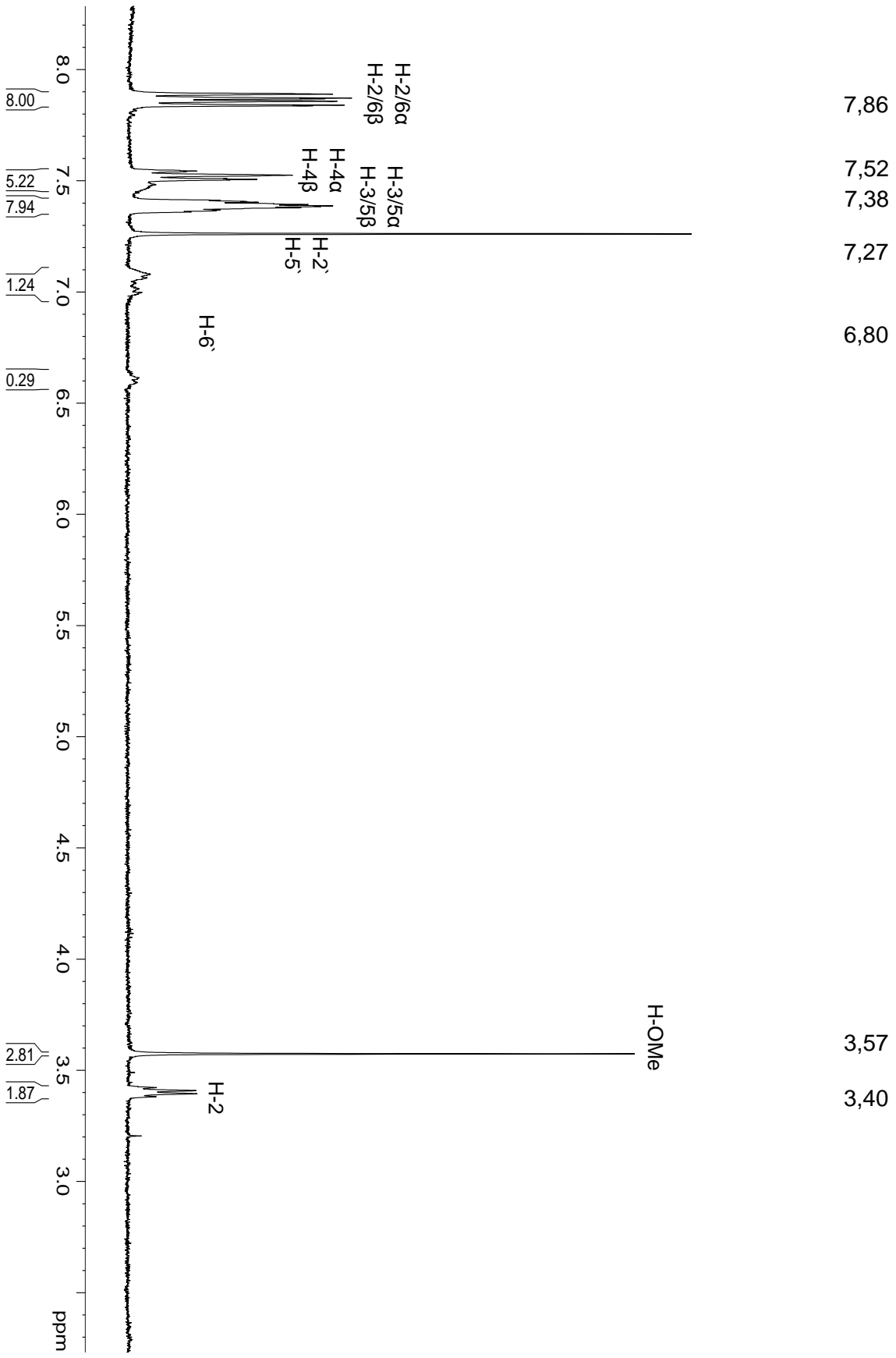
## 9. markierte 3,4-Dihydroxyphenylessigsäuremethylester-DPPC (Met-DPA(<sup>18</sup>O)-DPPC)



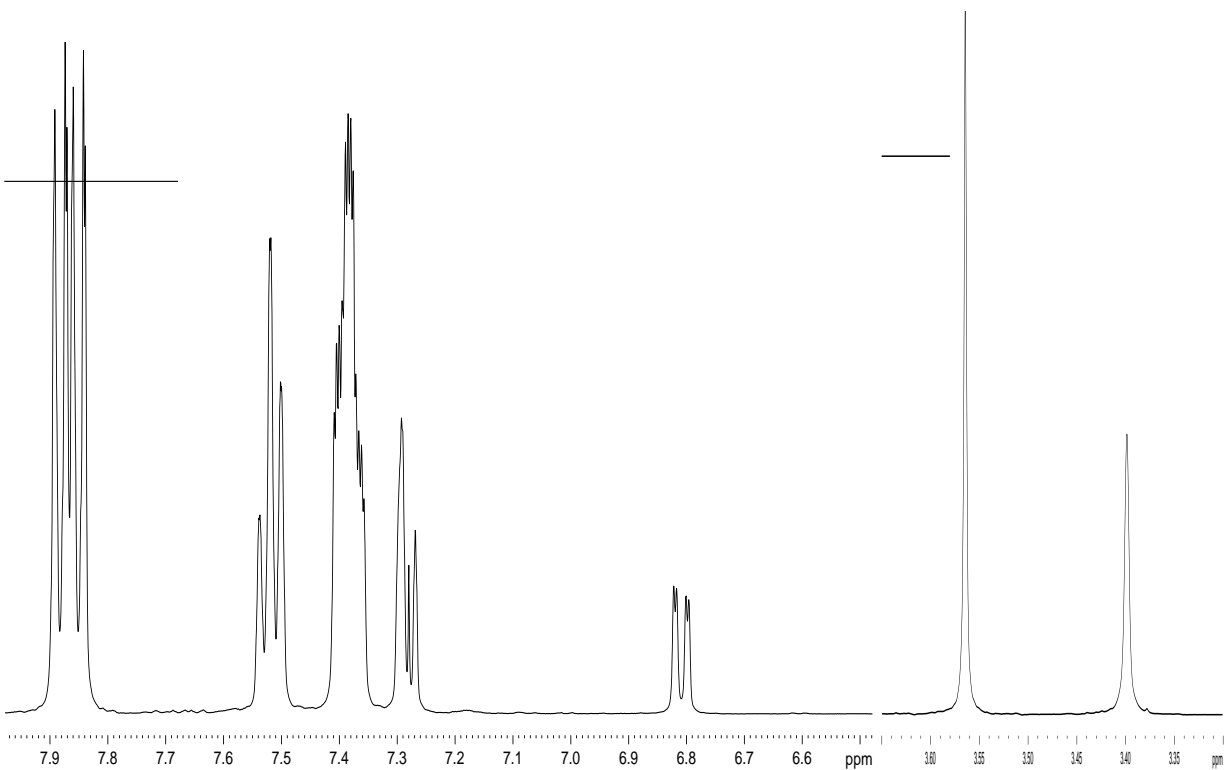
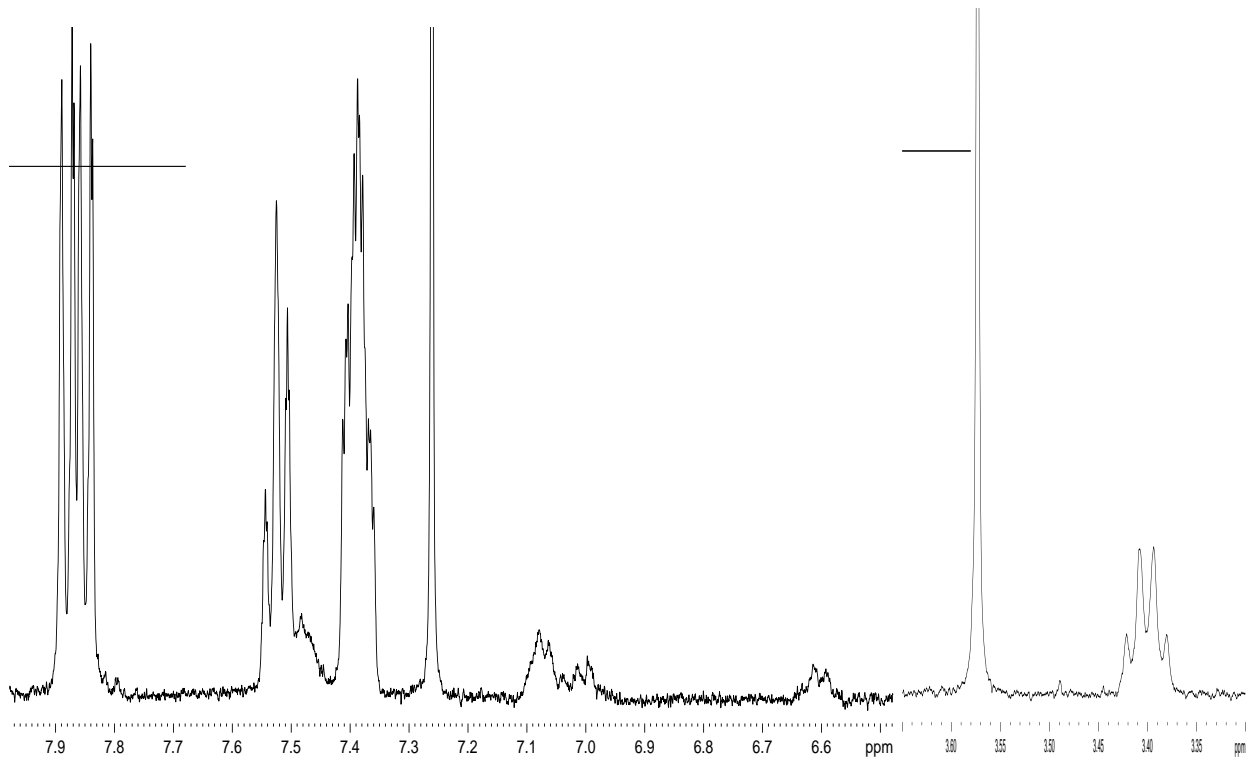
### 9.1. Massenspektrum Met-DPA(<sup>18</sup>O)-DPPC (positiv)



9.2. <sup>1</sup>H-Spektrum (<sup>31</sup>P-gekoppelt) Met-DPA(<sup>18</sup>O)-DPPC

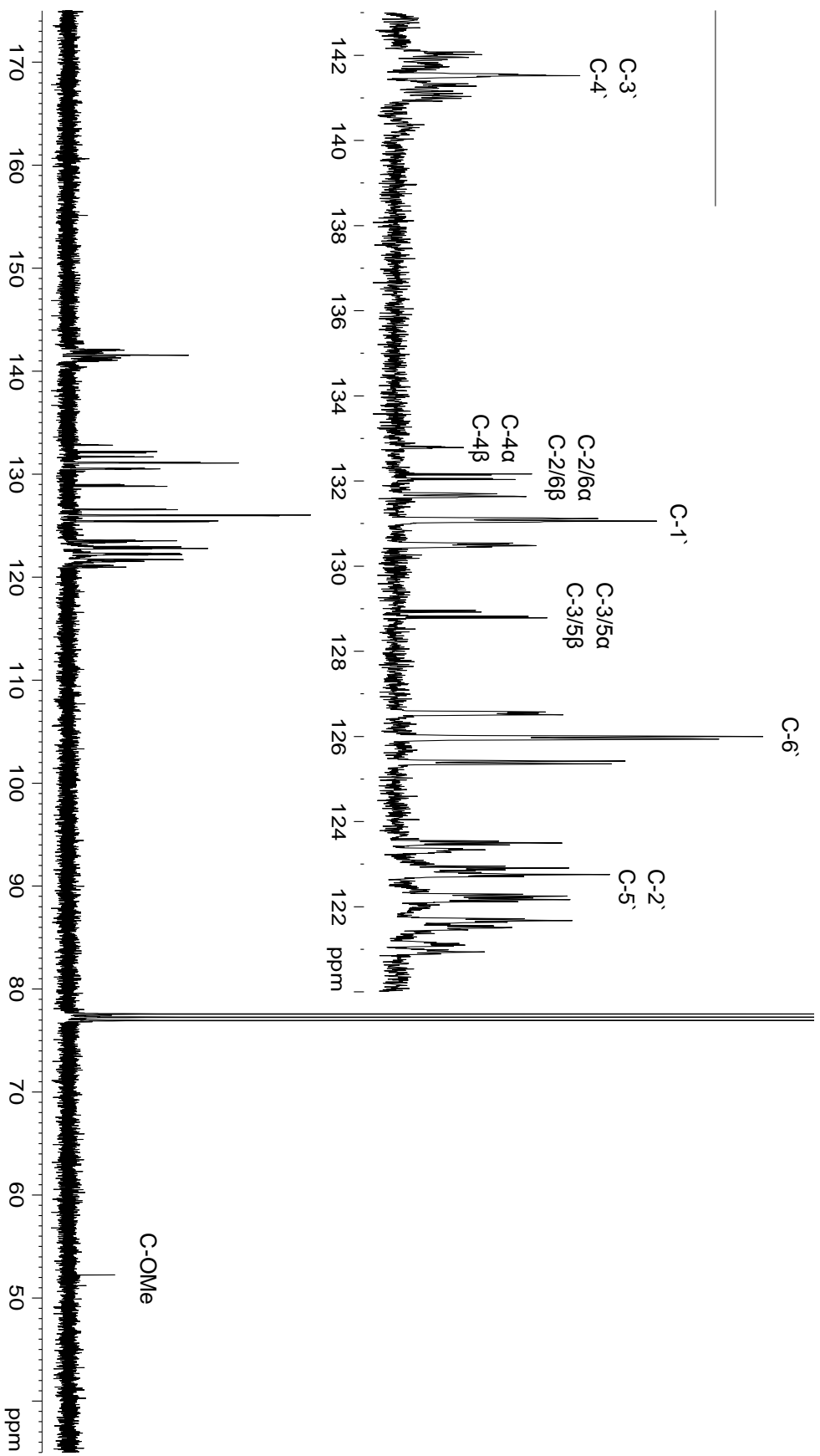


9.3. Vergleich der  $^1\text{H}$ -Signale ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) von Met-DPA( $^{18}\text{O}$ )-DPPC (oben) und Met-DPA-DPPC (unten)

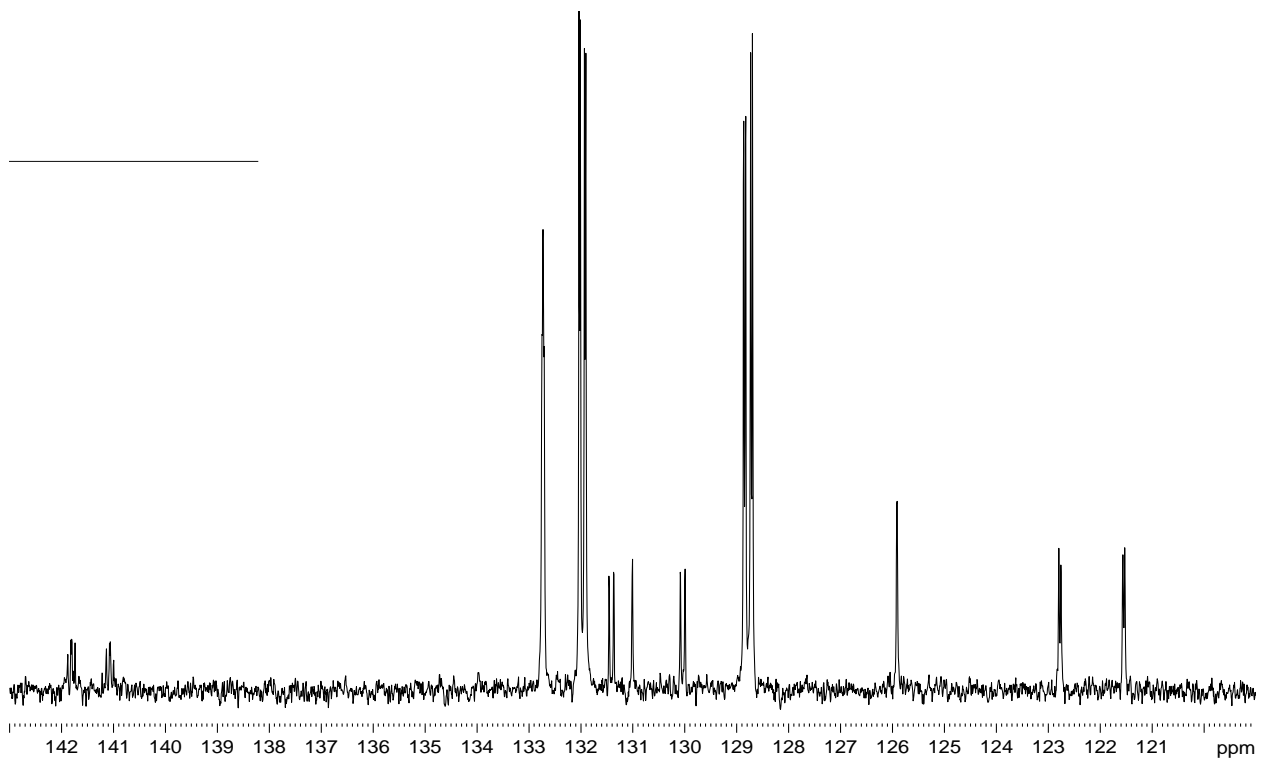
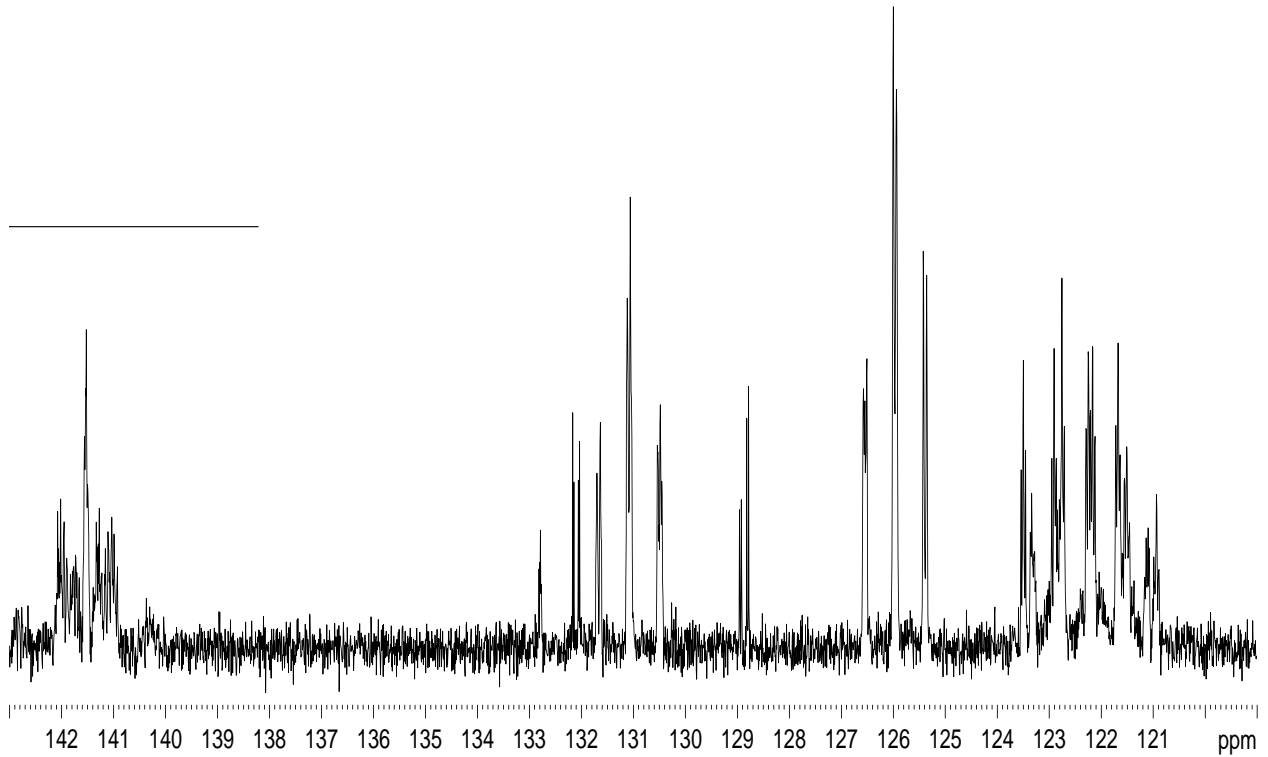


9.4. <sup>13</sup>C-Spektrum (<sup>31</sup>P-gekoppelt) Met-DPA(<sup>18</sup>O)-DPPC

140,0	
bis	
143,0	
132,79	
132,11	
132,09	
131,08	
128,88	
128,85	
125,96	
120,8	
bis	
123,7	
52,22	



9.5. Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -Signale ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) von 1' bis 6' und 1 bis 6 $\alpha/\beta$  von Met-DPA( $^{18}\text{O}$ )-DPPC (oben) und Met-DPA-DPPC (unten)

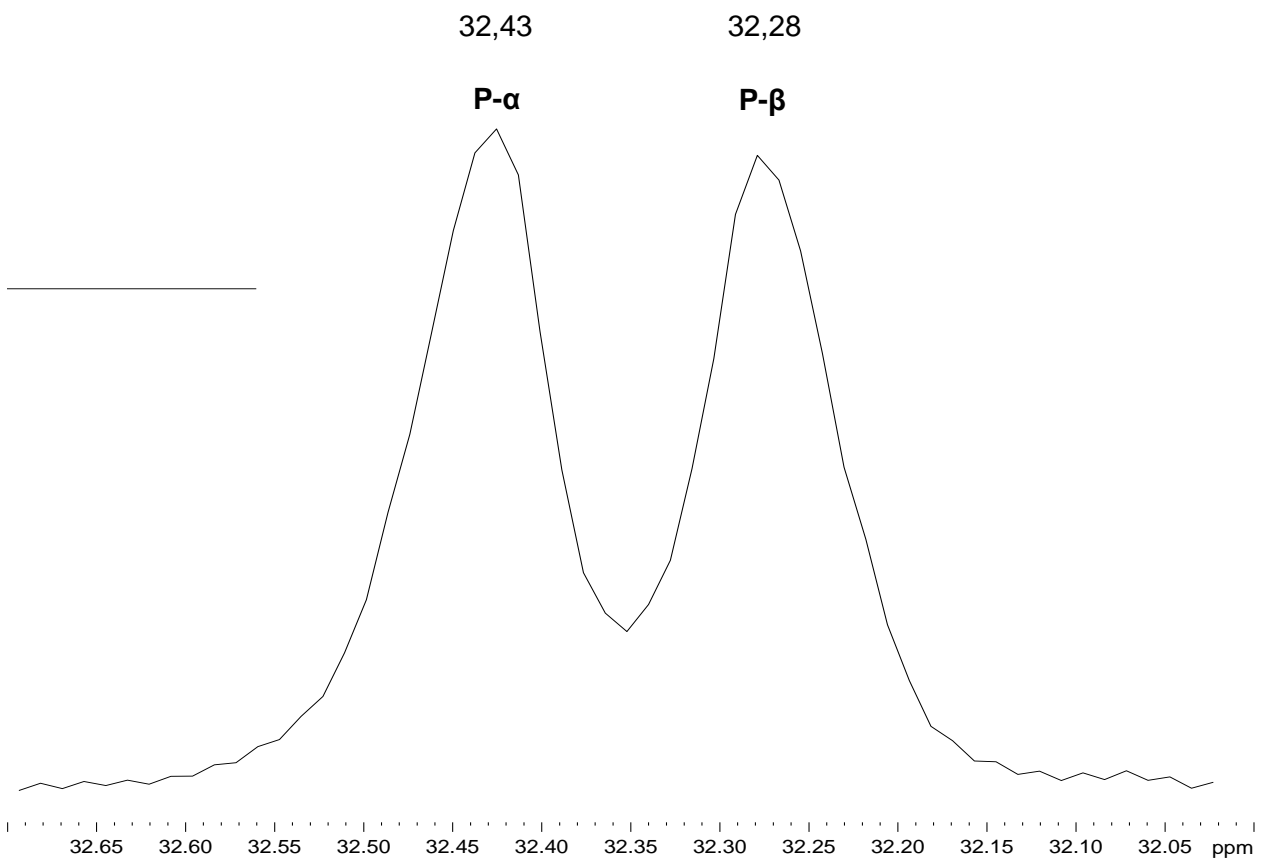




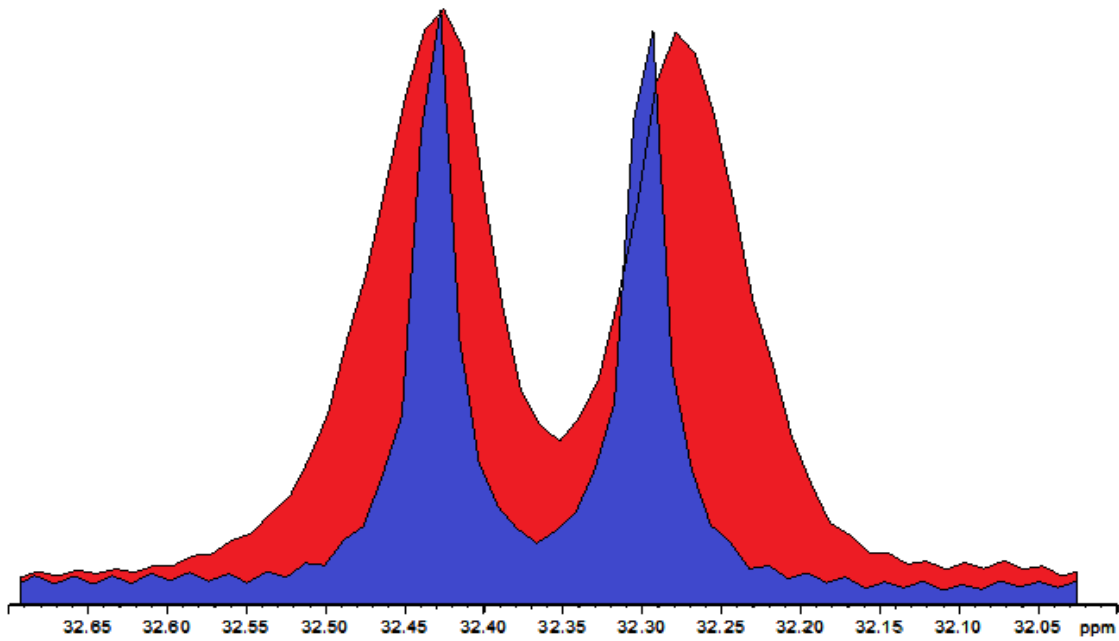
### 9.6. $^{31}\text{P}$ -Spektrum Met-DPA( $^{18}\text{O}$ )-DPPC



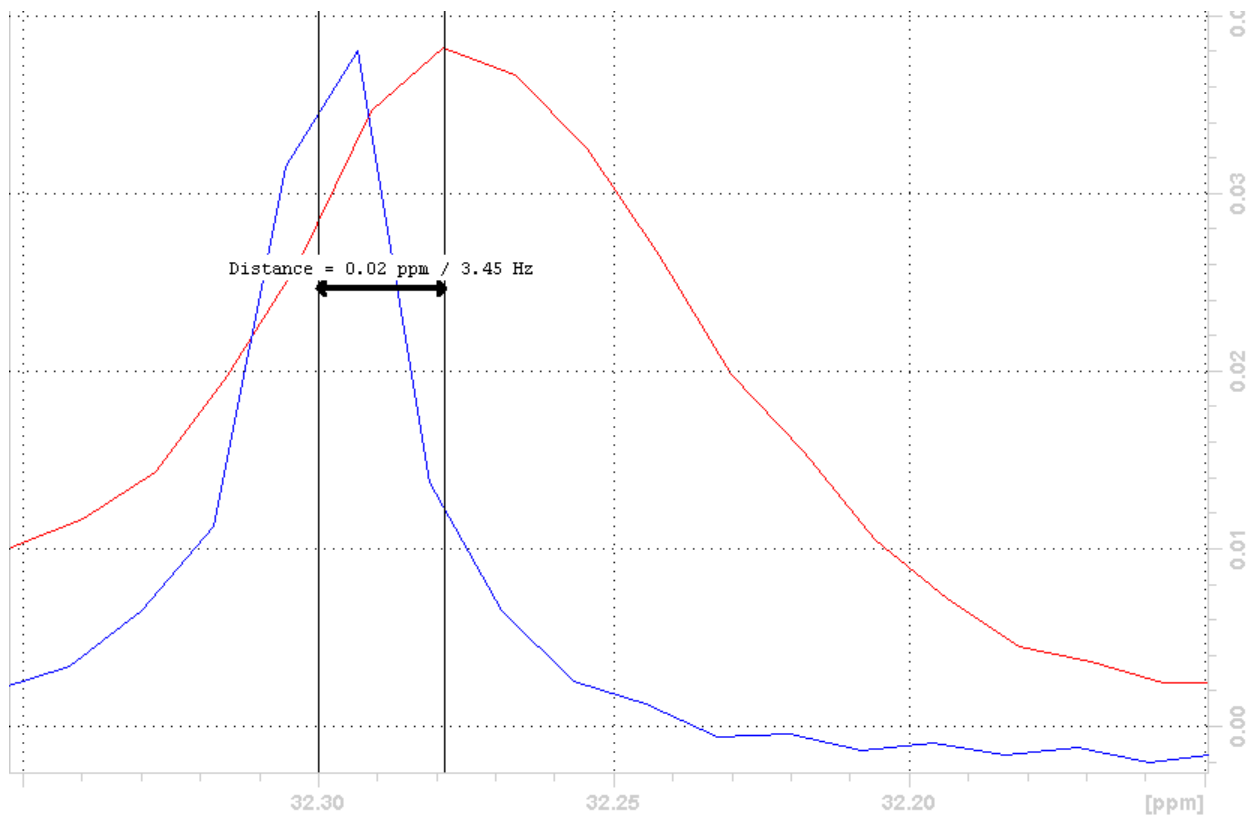
### 9.7. Detailansicht der $^{31}\text{P}$ -Signale Met-DPA( $^{18}\text{O}$ )-DPPC



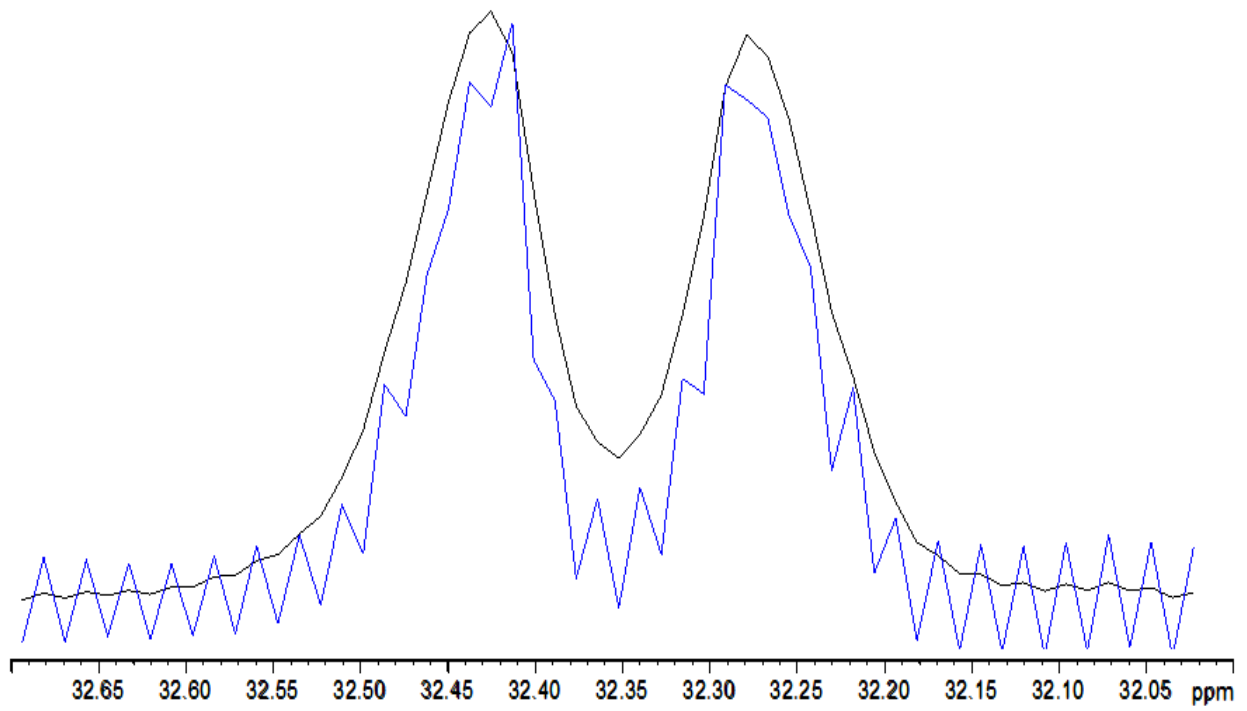
9.8. Überlagerte  $^{31}\text{P}$ -Spektren von Met-DPA( $^{18}\text{O}$ )-DPPC (rot) und Met-DPA-DPPC (blau)



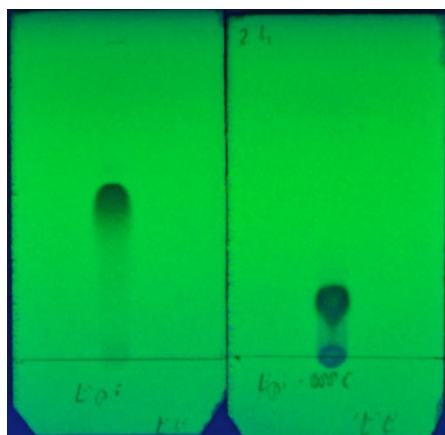
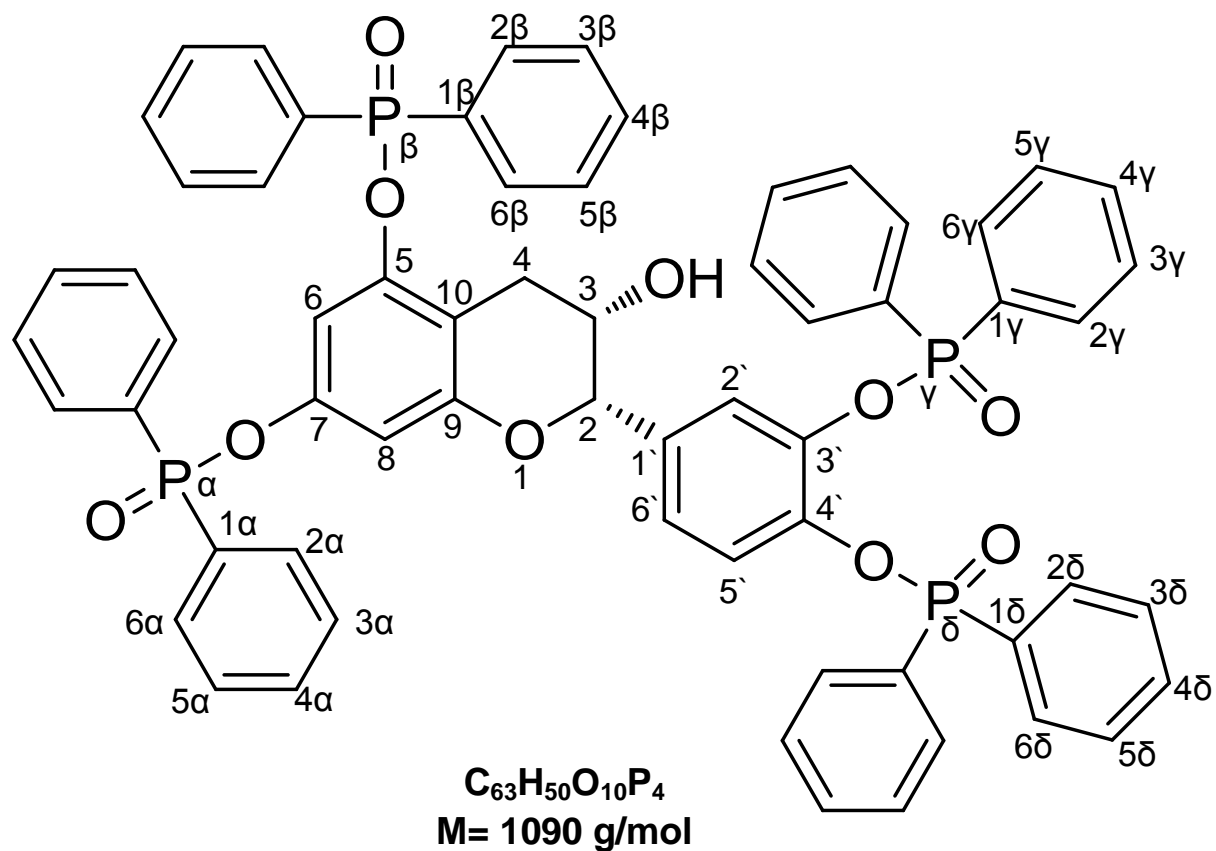
9.9. Gemessener Abstand zwischen den  $^{31}\text{P}$ -Signalen ( $\text{P}\beta$ ) von Met-DPA( $^{18}\text{O}$ )-DPPC (rot) und Met-DPA-DPPC (blau)



9.10. Überlagerte  $^{31}\text{P}$ -Spektren von Met-DPA( $^{18}\text{O}$ )-DPPC (schwarz, Ib 5; blau, Ib 1)



## 10. (-)-Epicatechin-DPPC

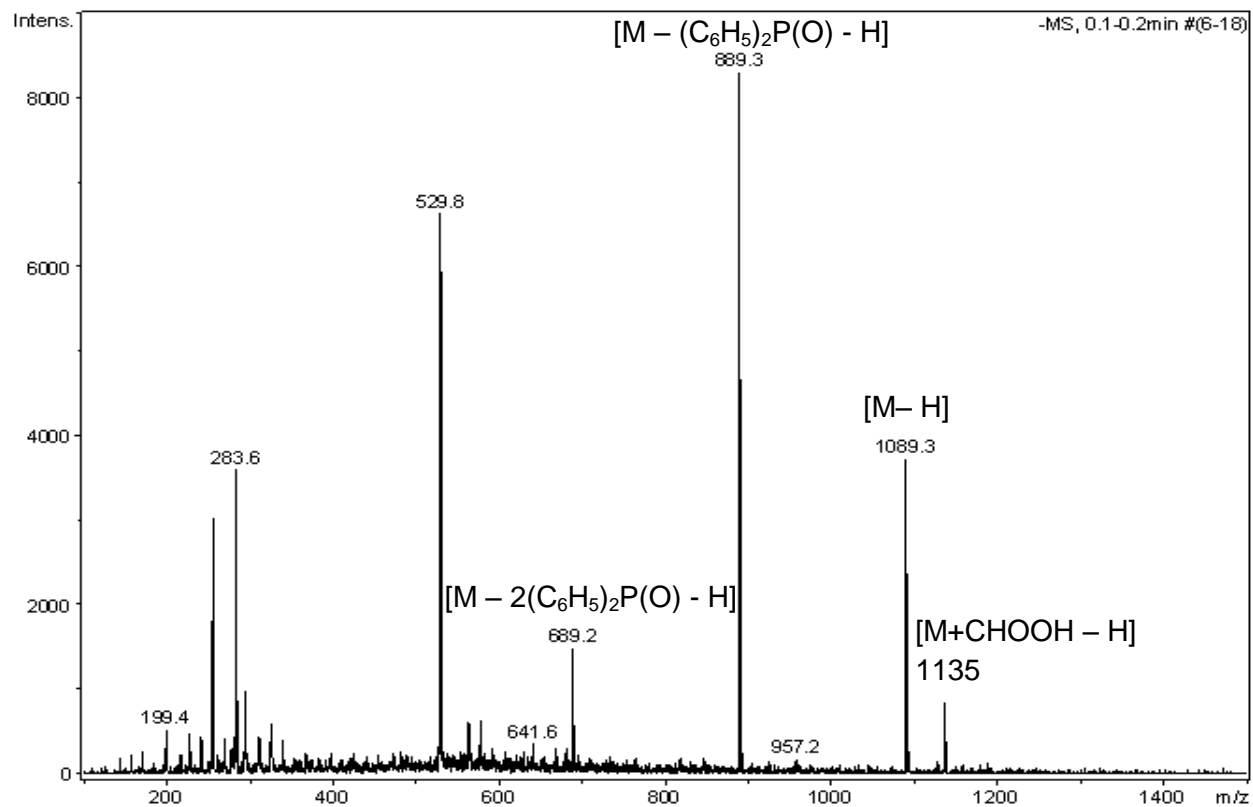
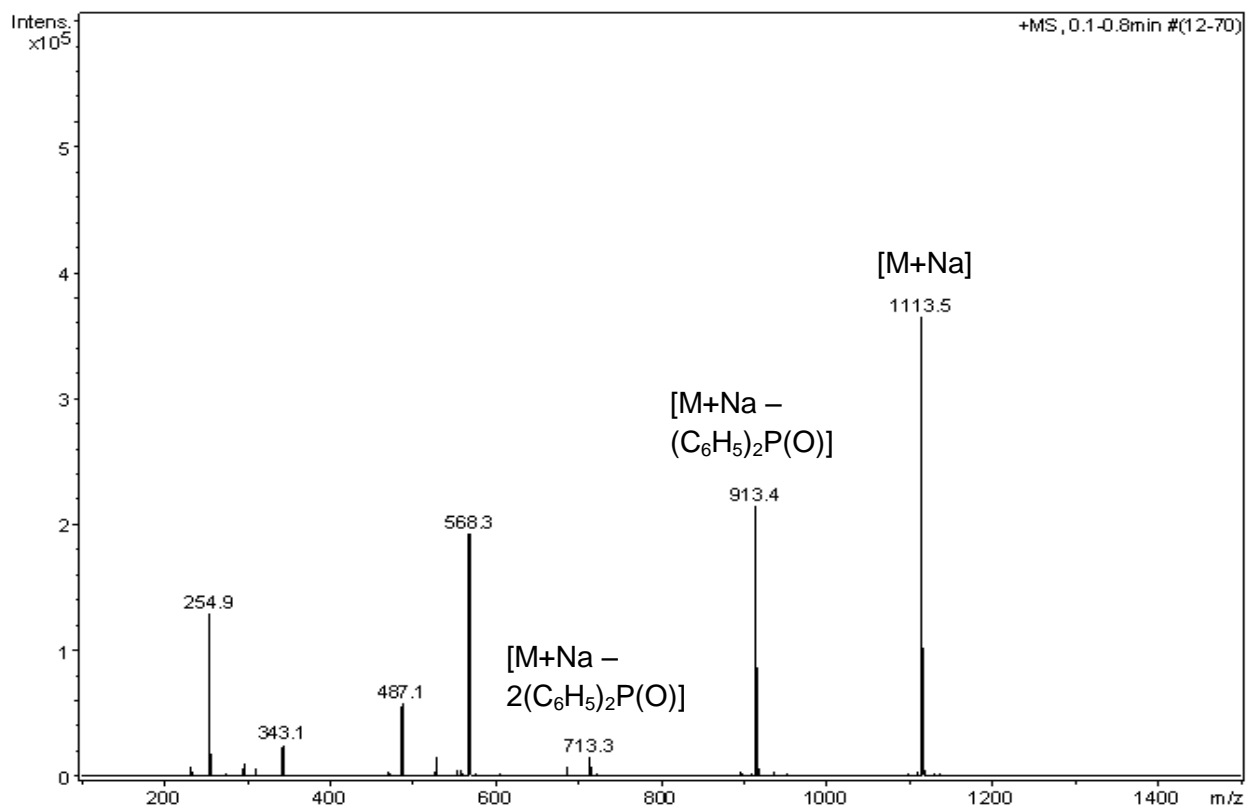


**10.1. DC:** Fließmittel: Essigester,  
 Links: (-)-Epicatechin ( $R_f = 0,48$ ),  
 Rechts: (-)-Epicatechin-DPPC  
 Ansatz nach 2h Reaktionszeit:  
 Produkt ( $R_f = 0,18$ ), DPPC ( $R_f = 0$ )

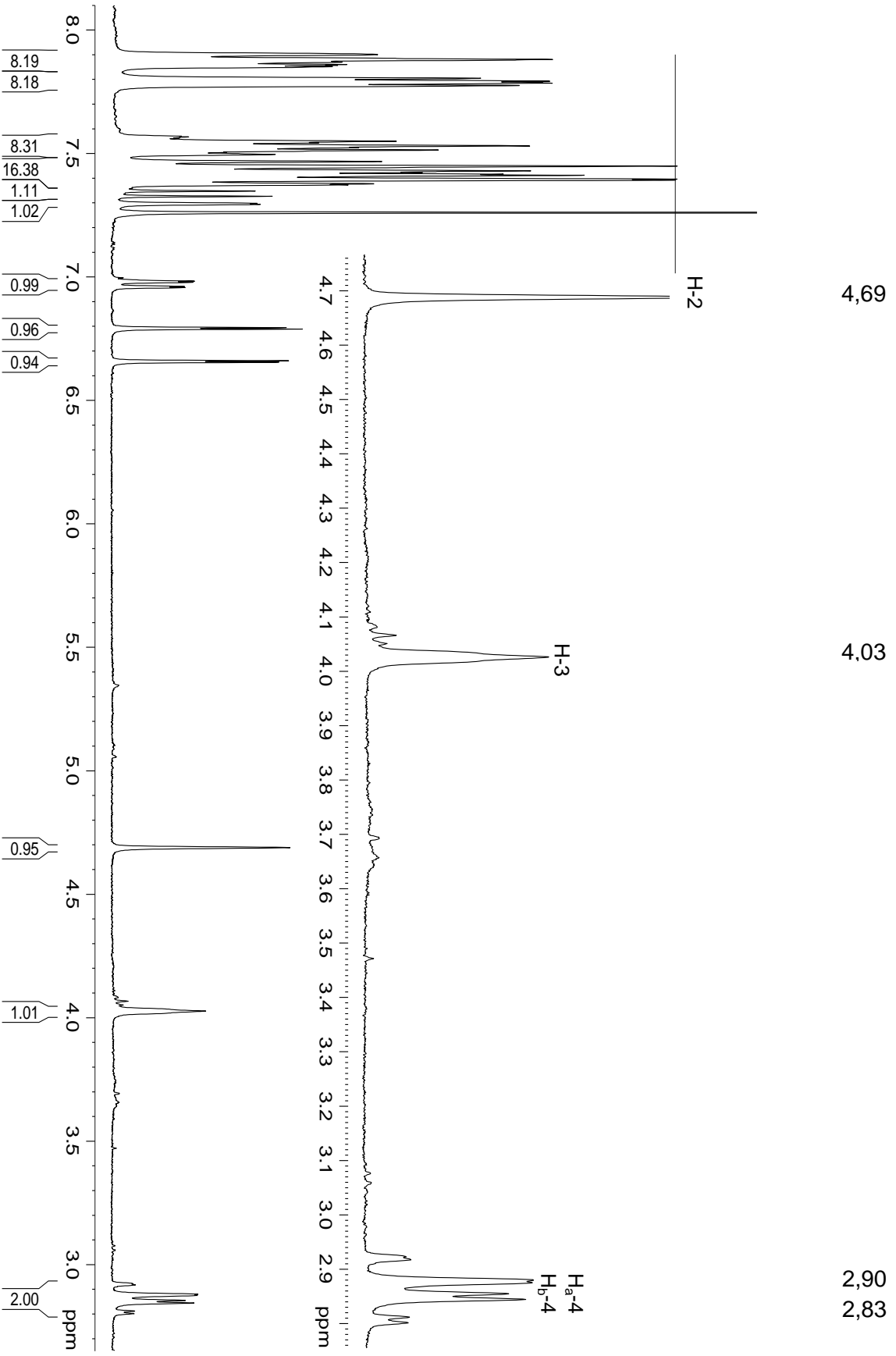


**10.2. Bild:** Links: (-)-Epicatechin in  $CDCl_3$   
 nach 5 d, Rechts: (-)-Epicatechin-DPPC in  
 $CDCl_3$  nach 5 d (mit  $^{31}P$ -Standard)

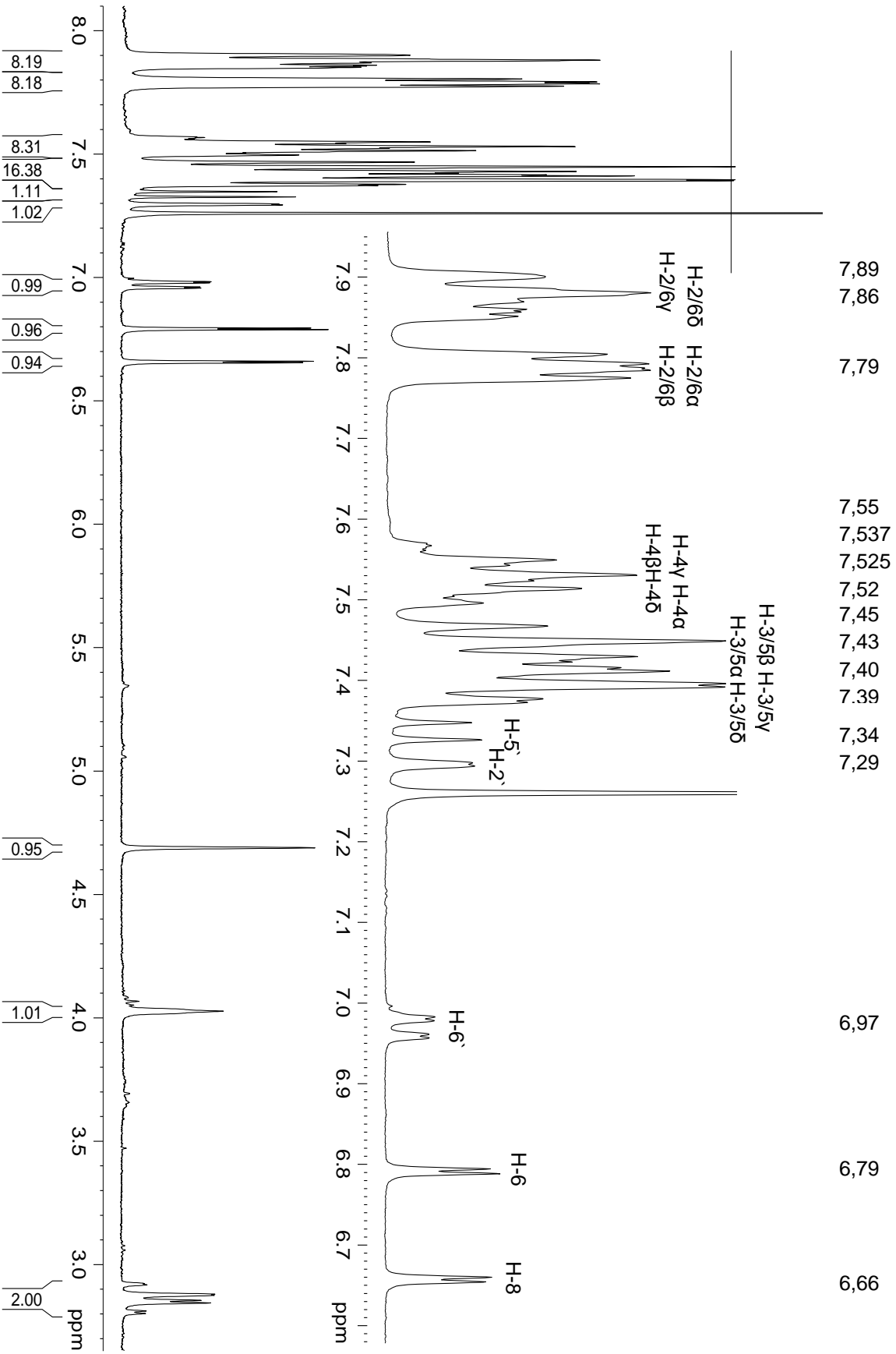
### 10.3. Massenspektrum (-)-Epicatechin-DPPC (positiv oben und negativ unten)



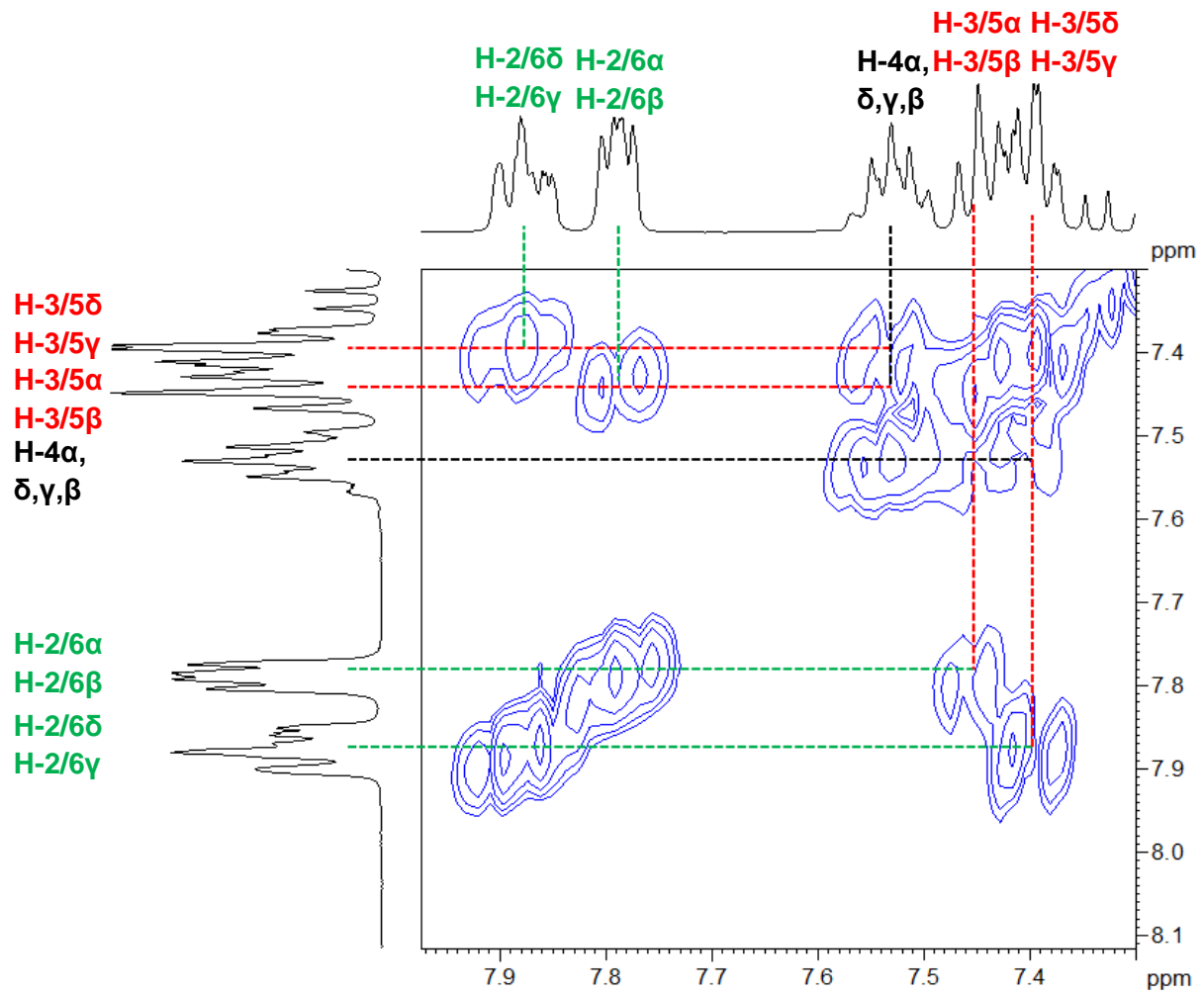
10.4.1. <sup>1</sup>H-Spektrum Nr.1 (<sup>31</sup>P-gekoppelt) (-)-Epicatechin-DPPC



10.4.2. <sup>1</sup>H-Spektrum Nr.2 (<sup>31</sup>P-gekoppelt) (-)-Epicatechin-DPPC

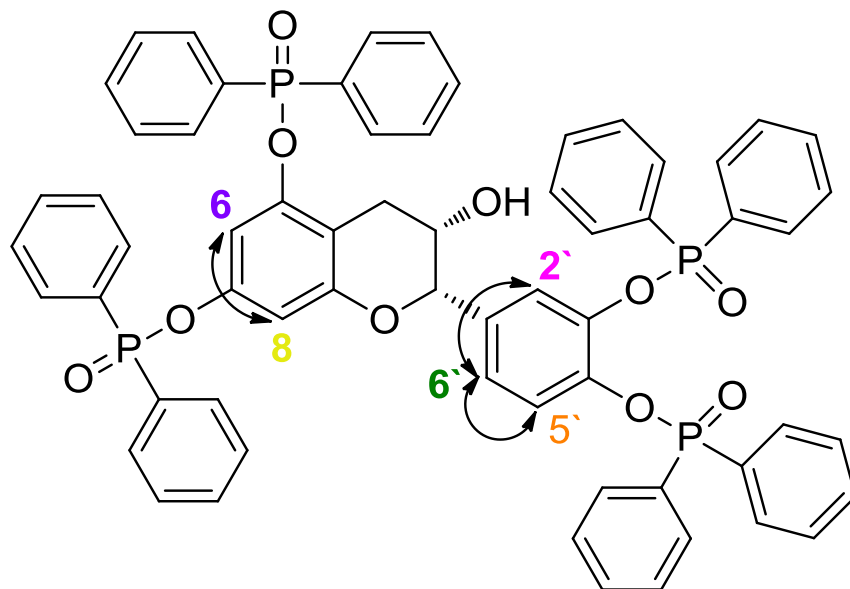
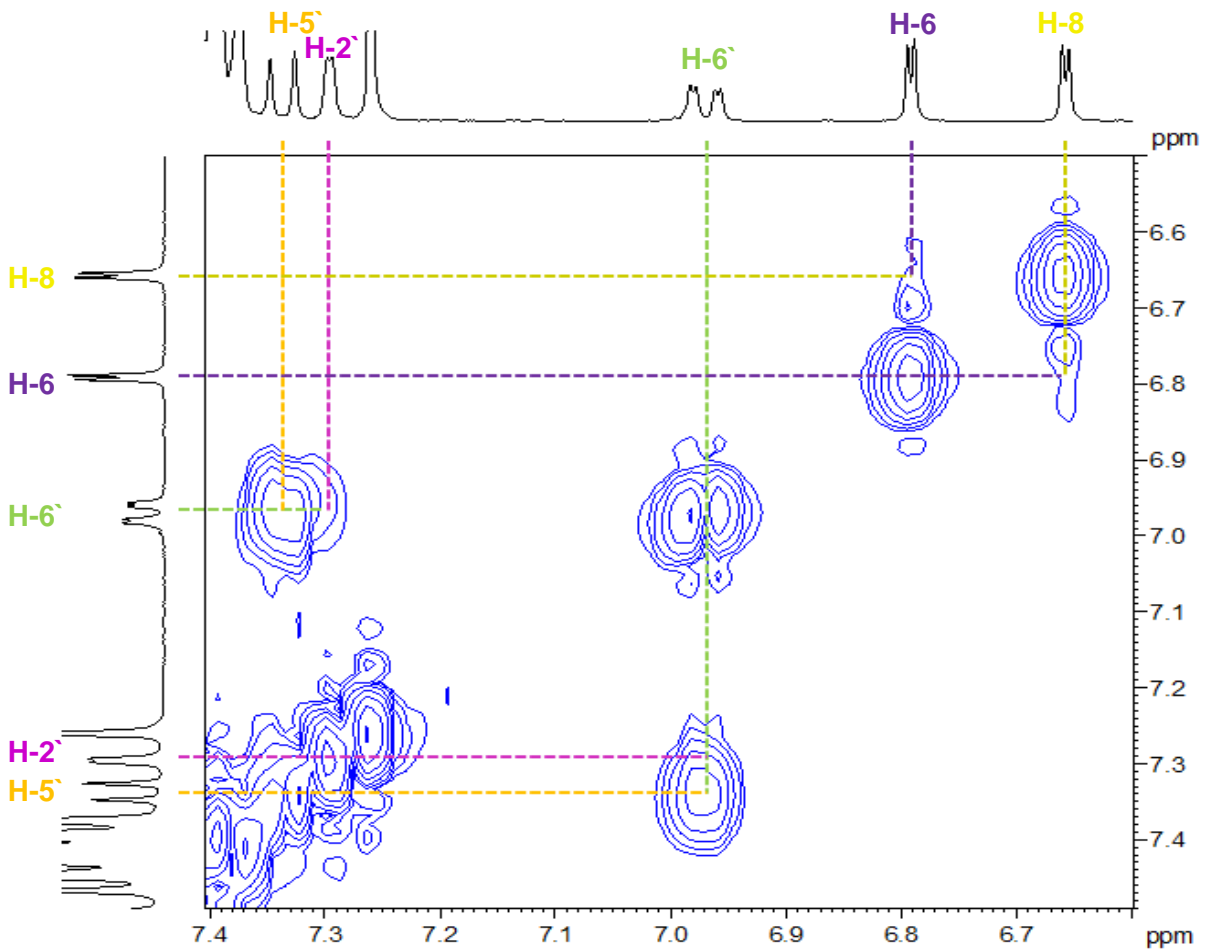


10.5.1. Ausschnitt A: COSY-Spektrums ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) von (-)-Epicatechin-DPPC

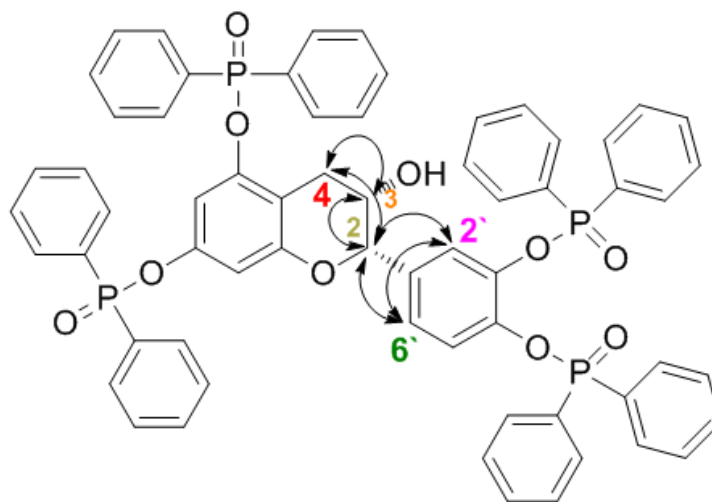
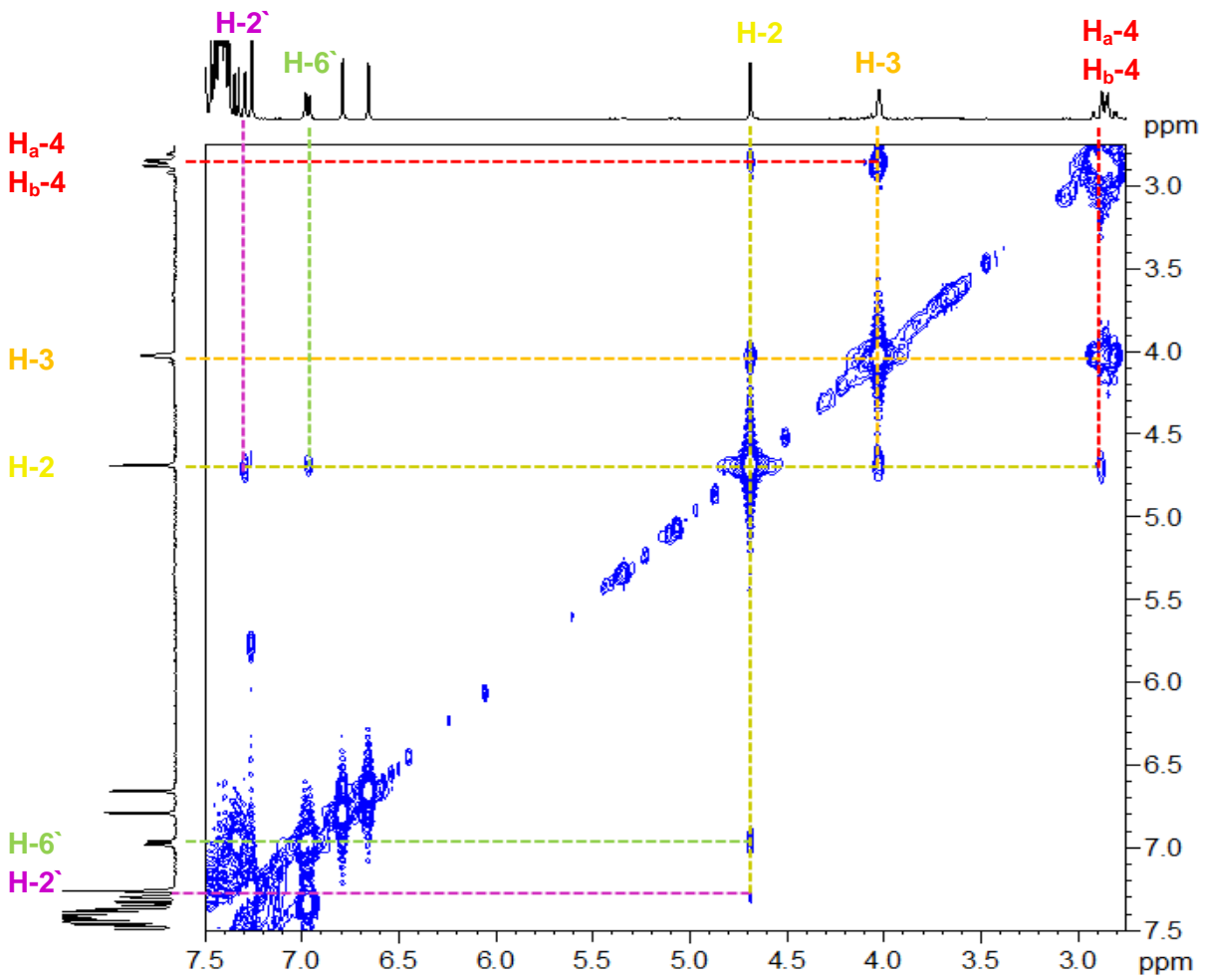




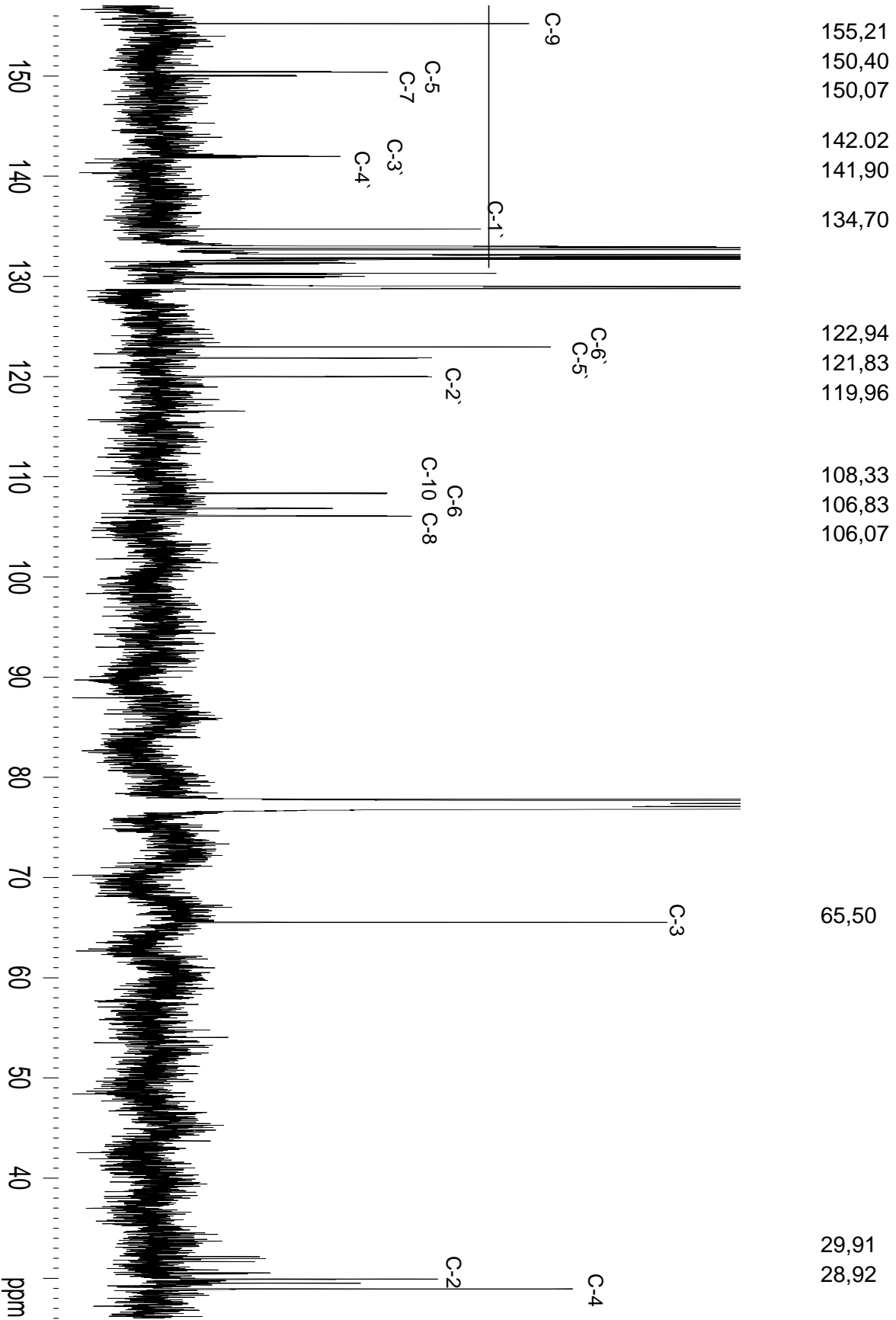
10.5.2. Ausschnitt B: COSY-Spektrums ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) von (-)-Epicatechin-DPPC



10.5.3. Ausschnitt C:COSEY-Spektrums ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) mit long-range-Korrelationen von (-)-Epicatechin-DPPC



10.6.1. <sup>13</sup>C-Spektrum Nr. 1 (<sup>31</sup>P-gekoppelt) (-)-Epicatechin-DPPC



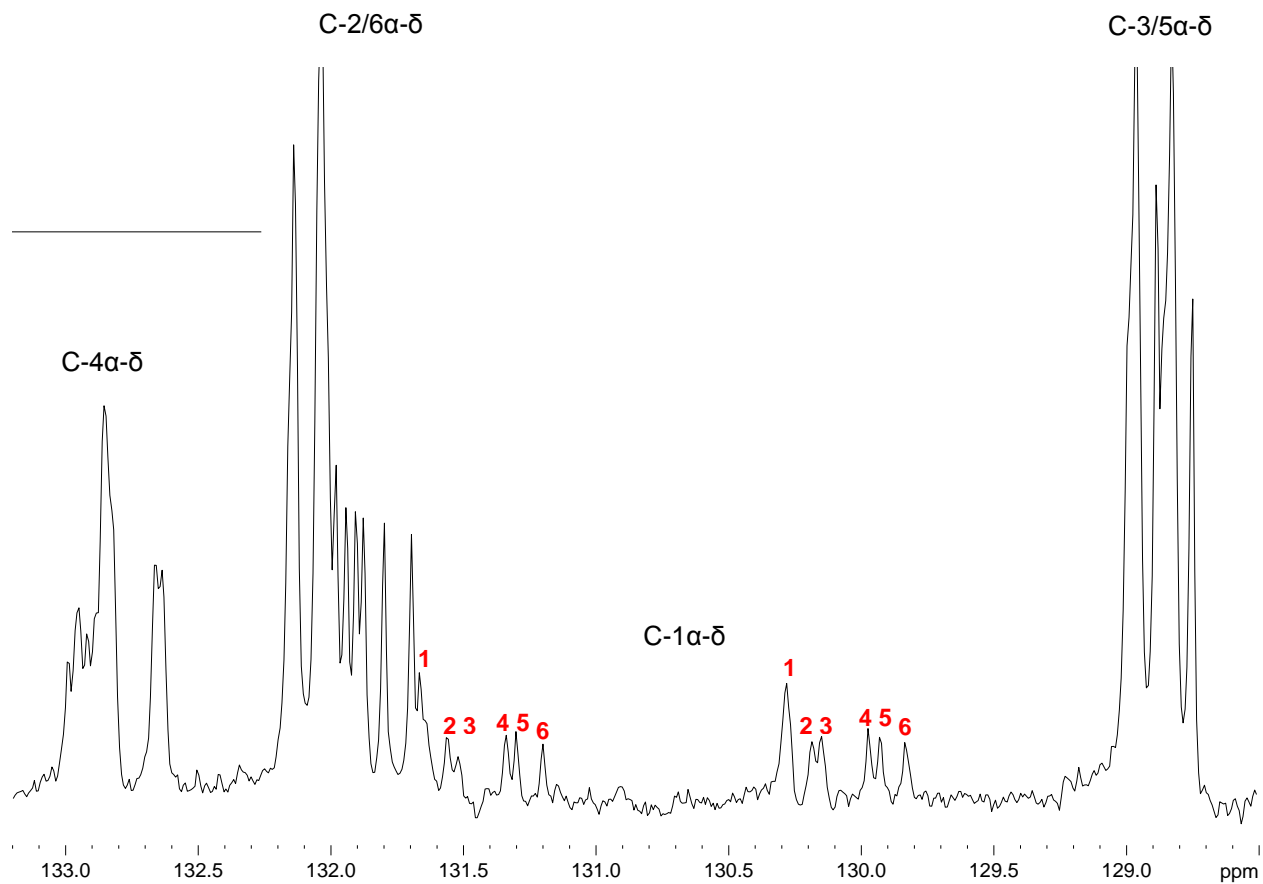
### 10.6.2. $^{13}\text{C}$ -Spektrum Nr.2 ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) (-)-Epicatechin-DPPC

132,6 bis 133,0

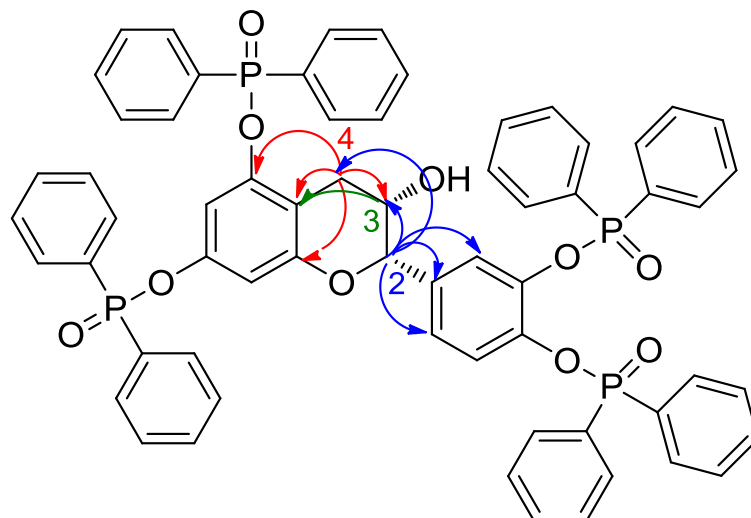
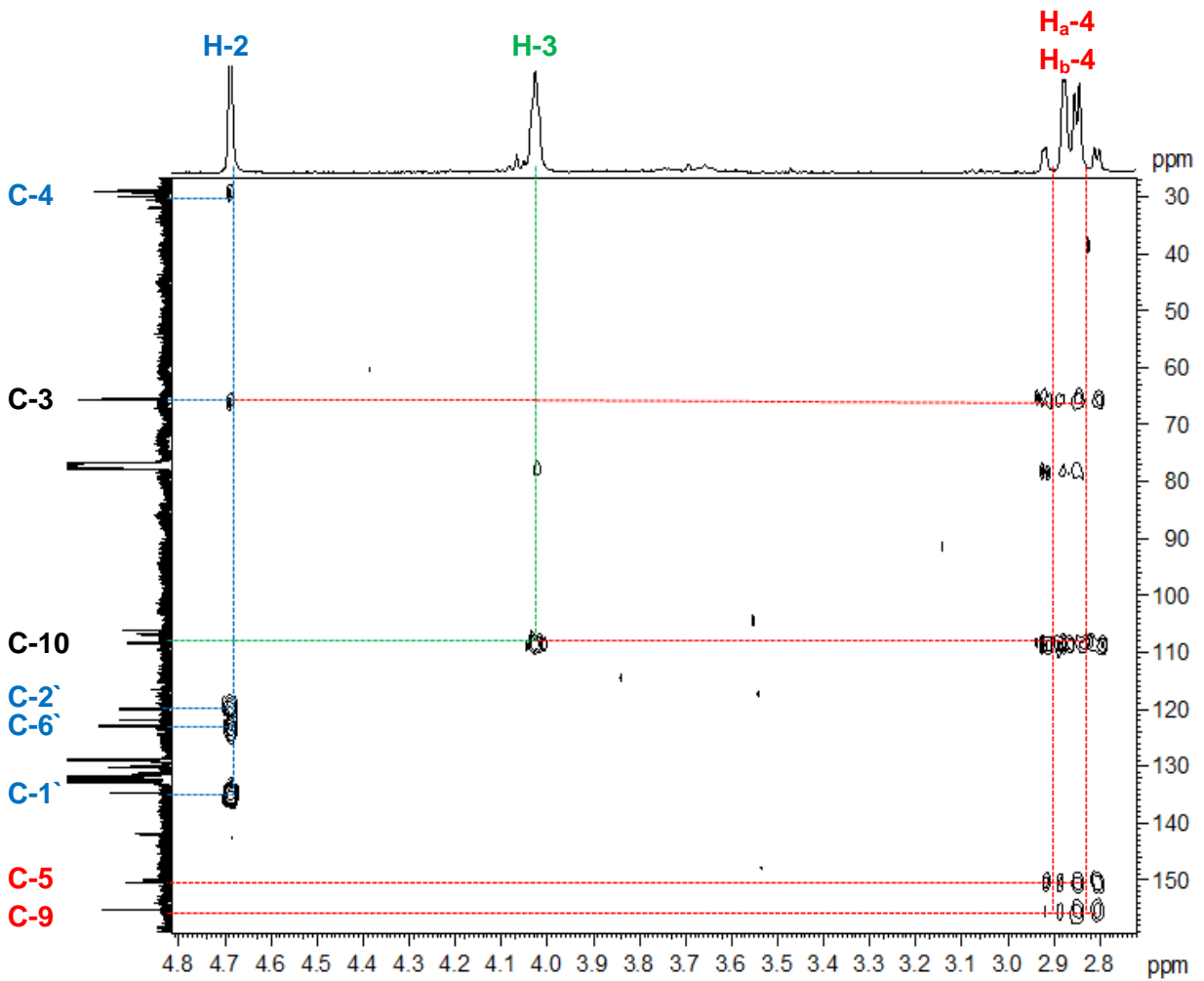
131,7 bis 132,2

129,8 bis 131,7

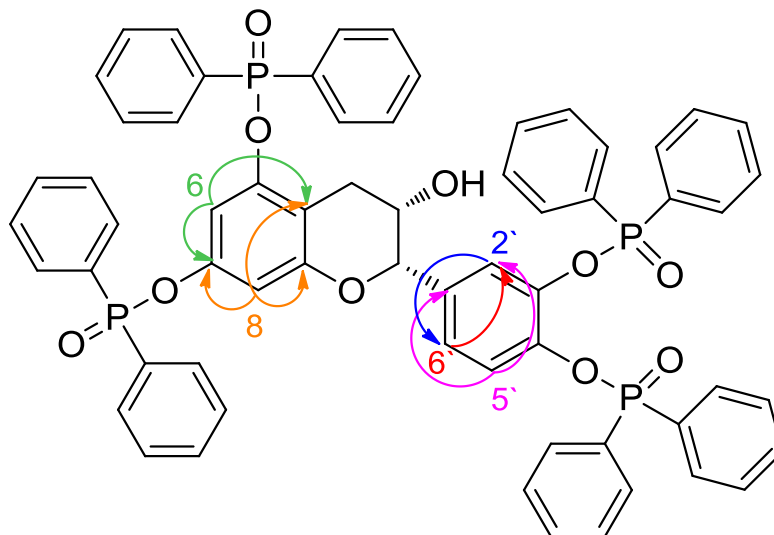
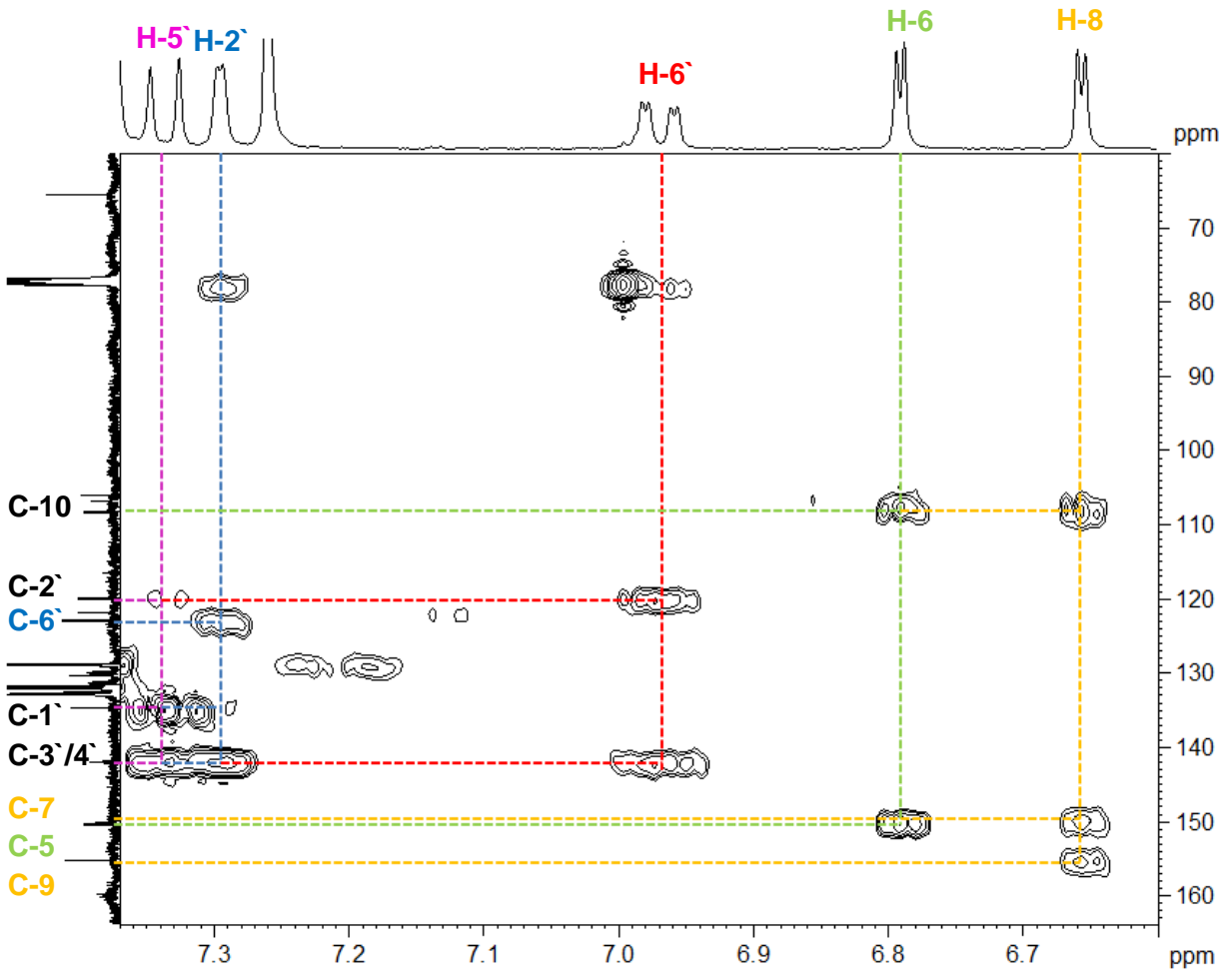
128,7 bis 129,1



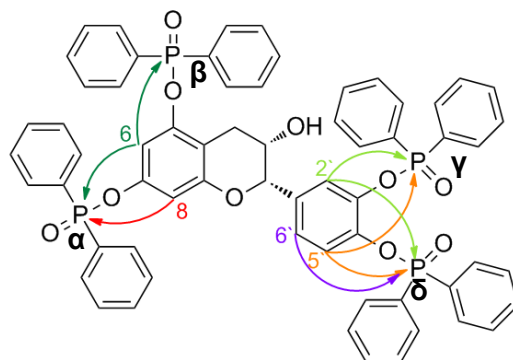
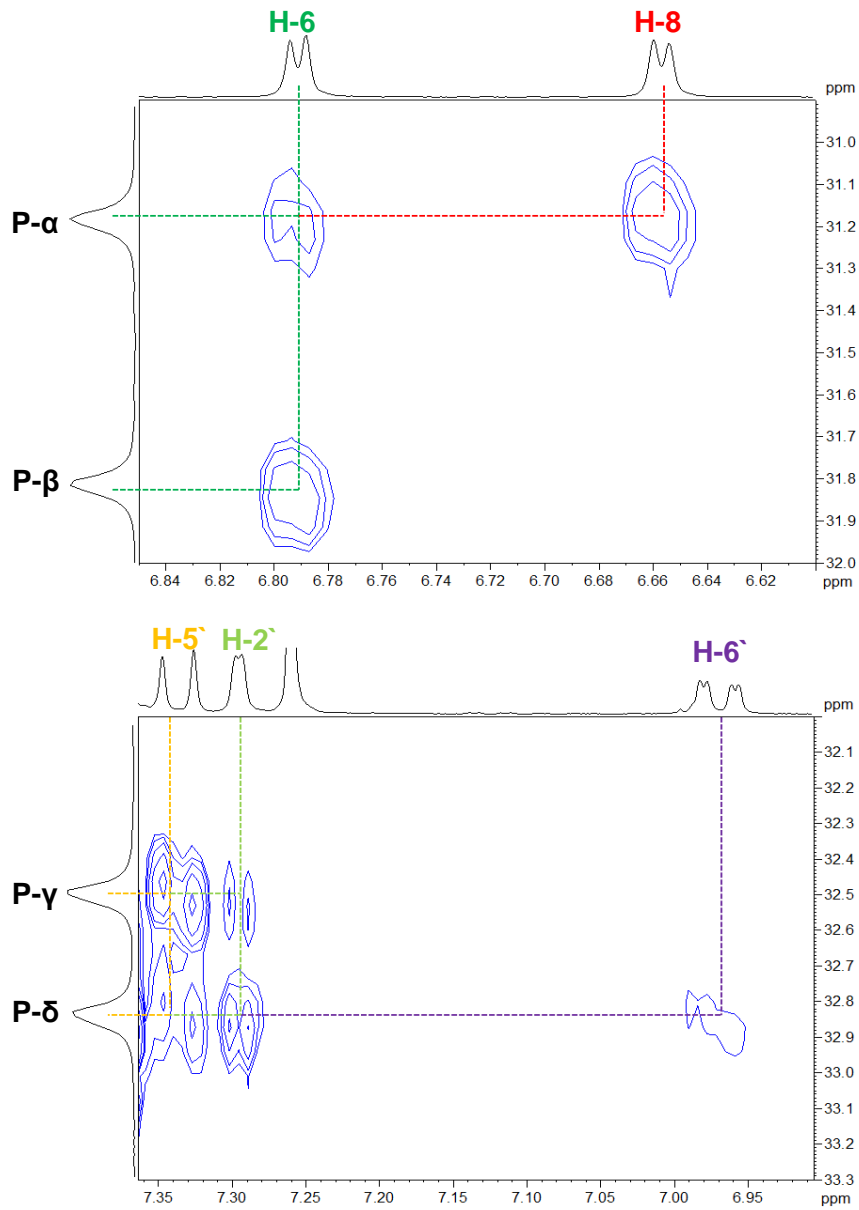
10.7.1. Ausschnitt A: HMBC-Spektrums ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) (-)-Epicatechin-DPPC



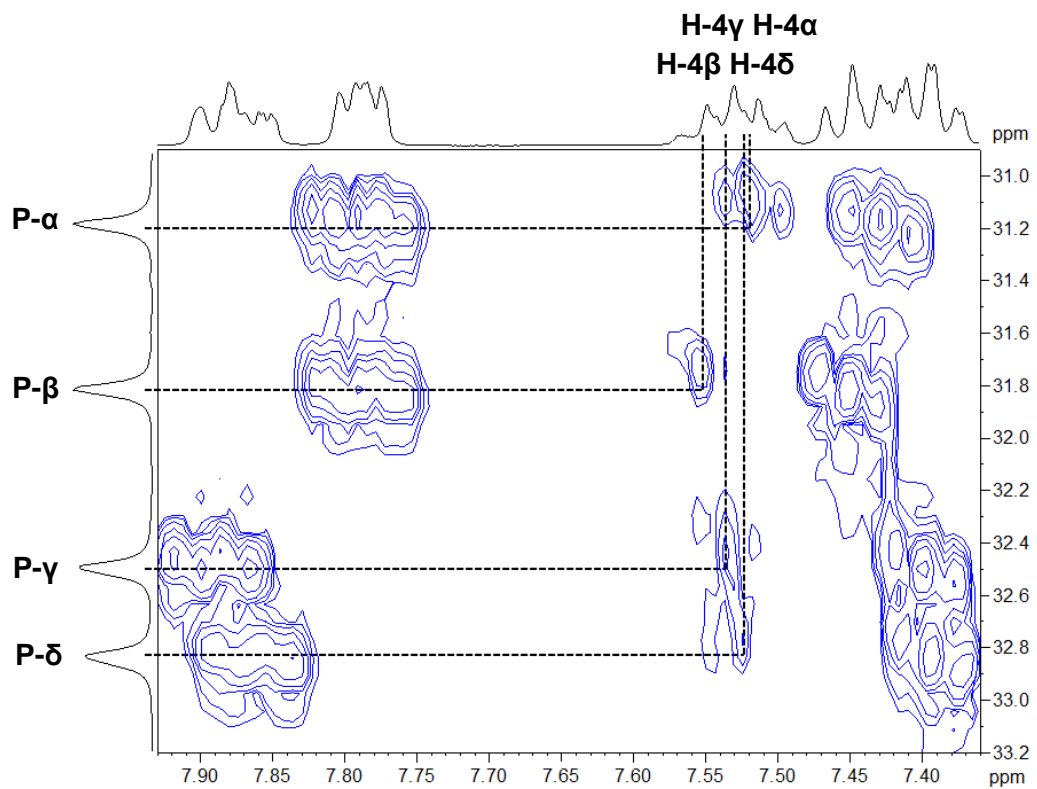
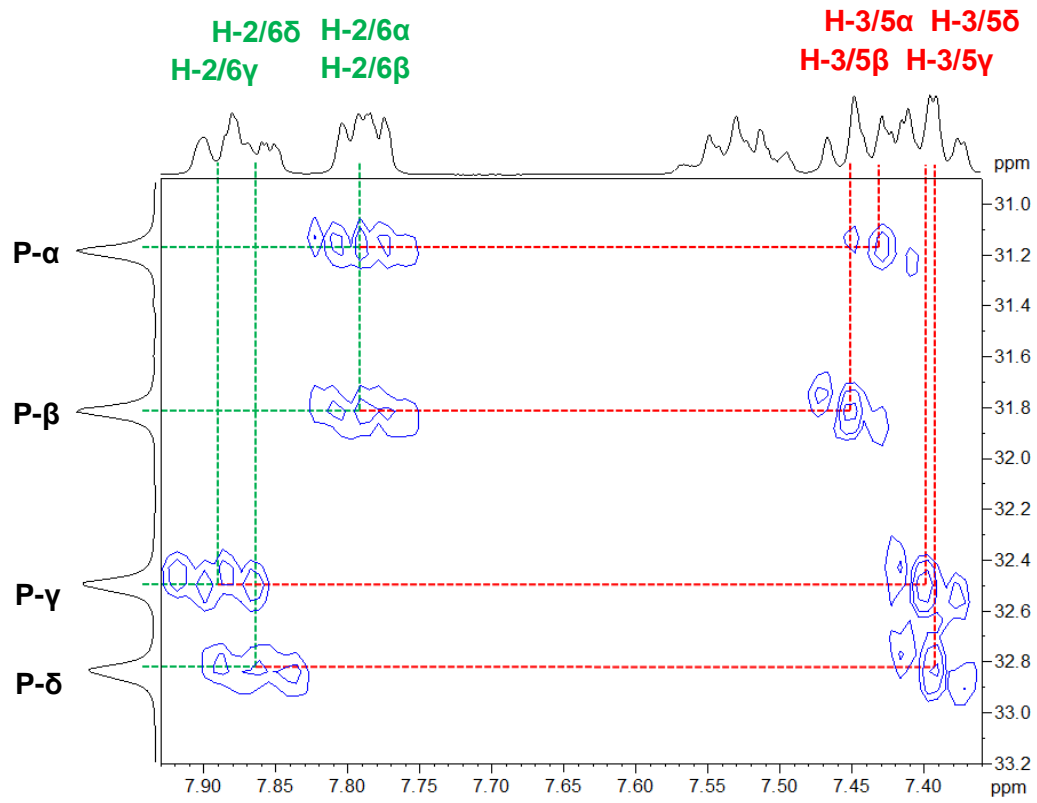
10.7.2. Ausschnitt B: HMBC-Spektrums ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) (-)-Epicatechin-DPPC



10.8.1. Ausschnitte A:  $^{31}\text{P}$ -HMBC ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) von (-)-Epicatechin-DPPC

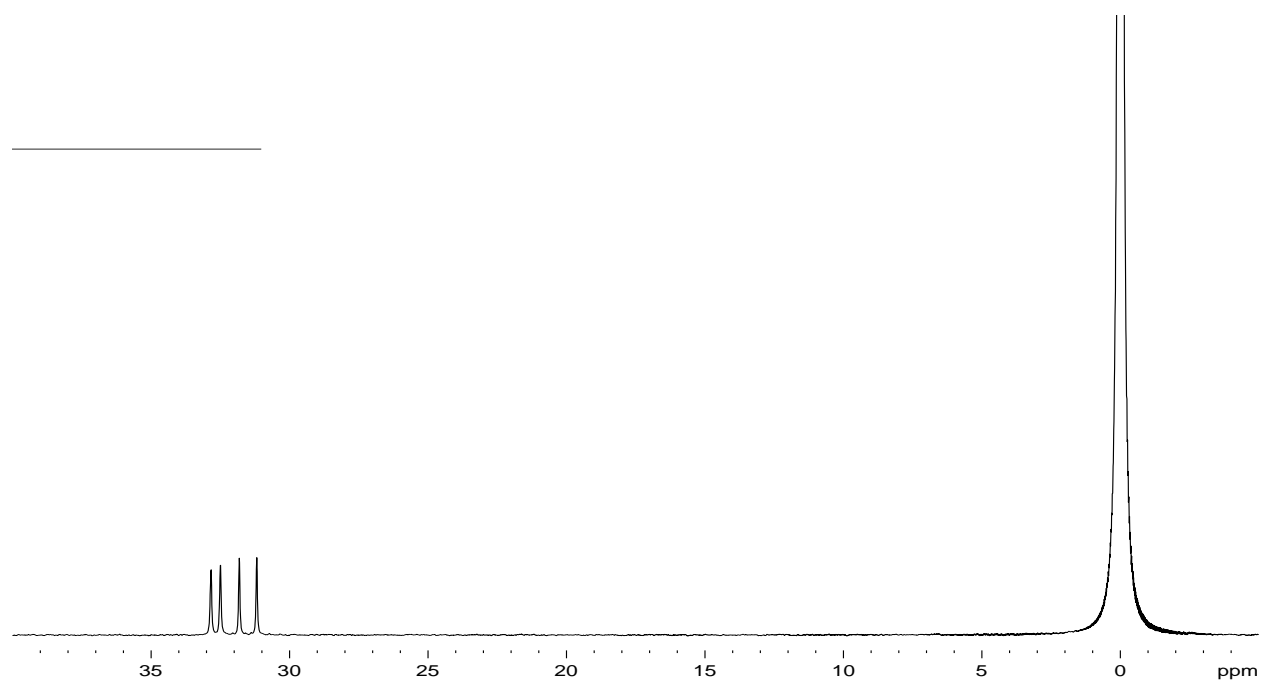


10.8.2. Ausschnitte B:  $^{31}\text{P}$ -HMBC ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) von (-)-Epicatechin-DPPC

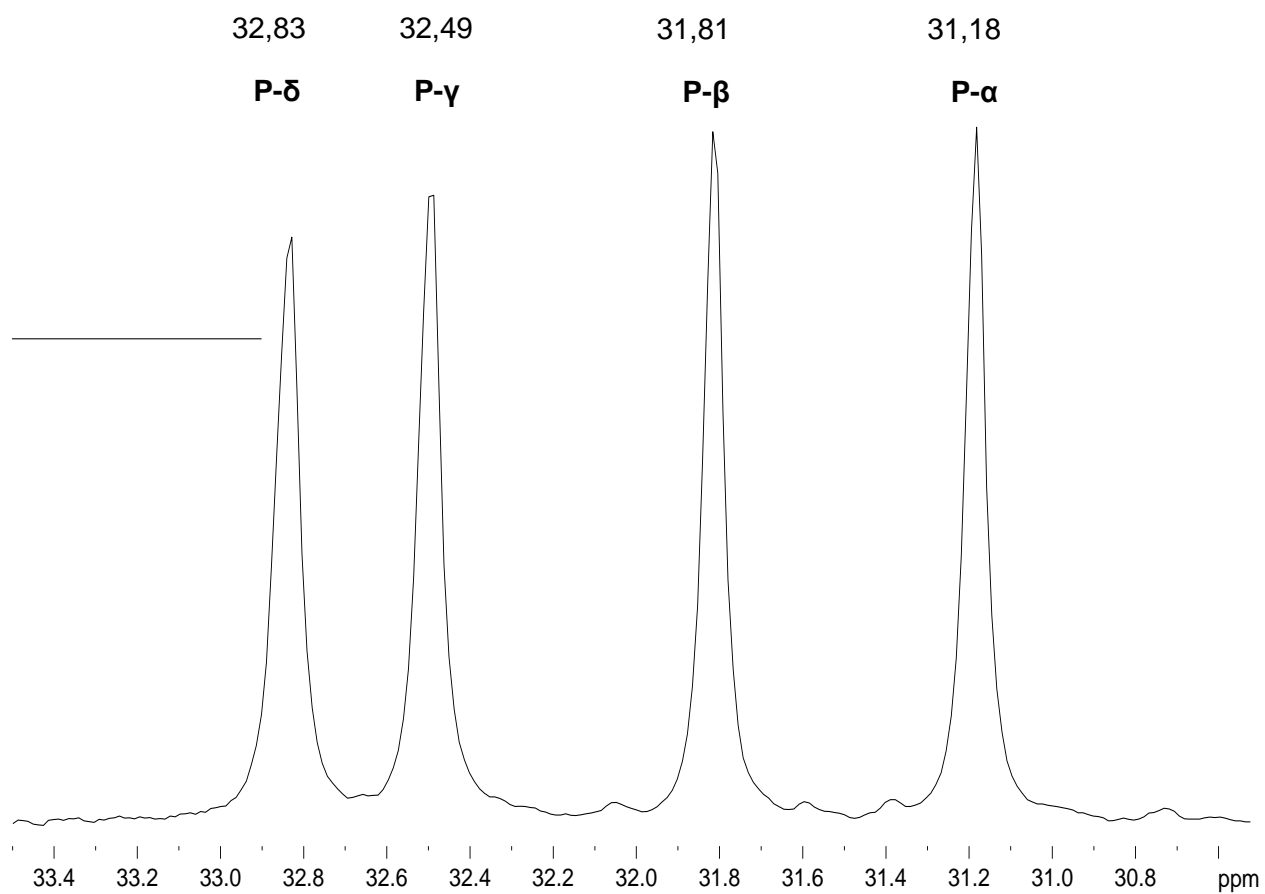




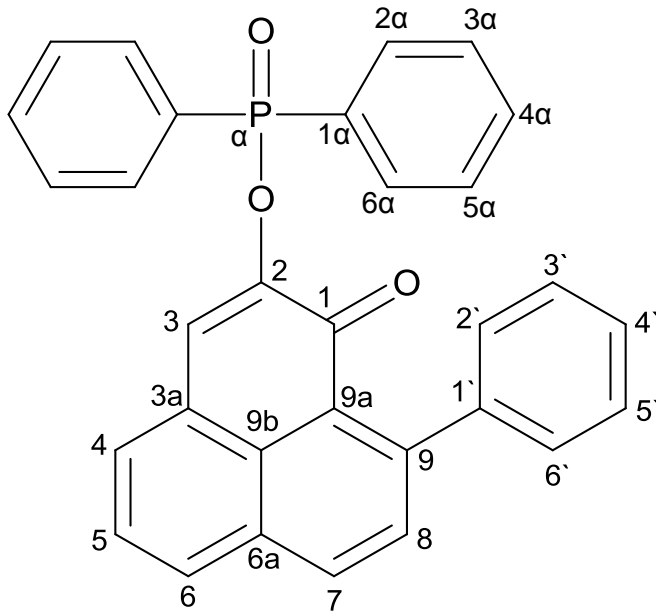
### 10.9. $^{31}\text{P}$ -Spektrum (-)-Epicatechin-DPPC



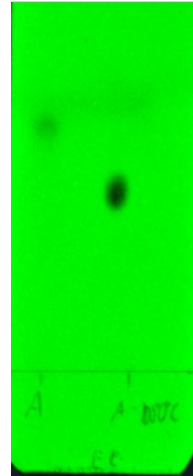
### 10.10. Detailansicht der $^{31}\text{P}$ -Signale (-)-Epicatechin-DPPC



## 11. Anigorufon-DPPC

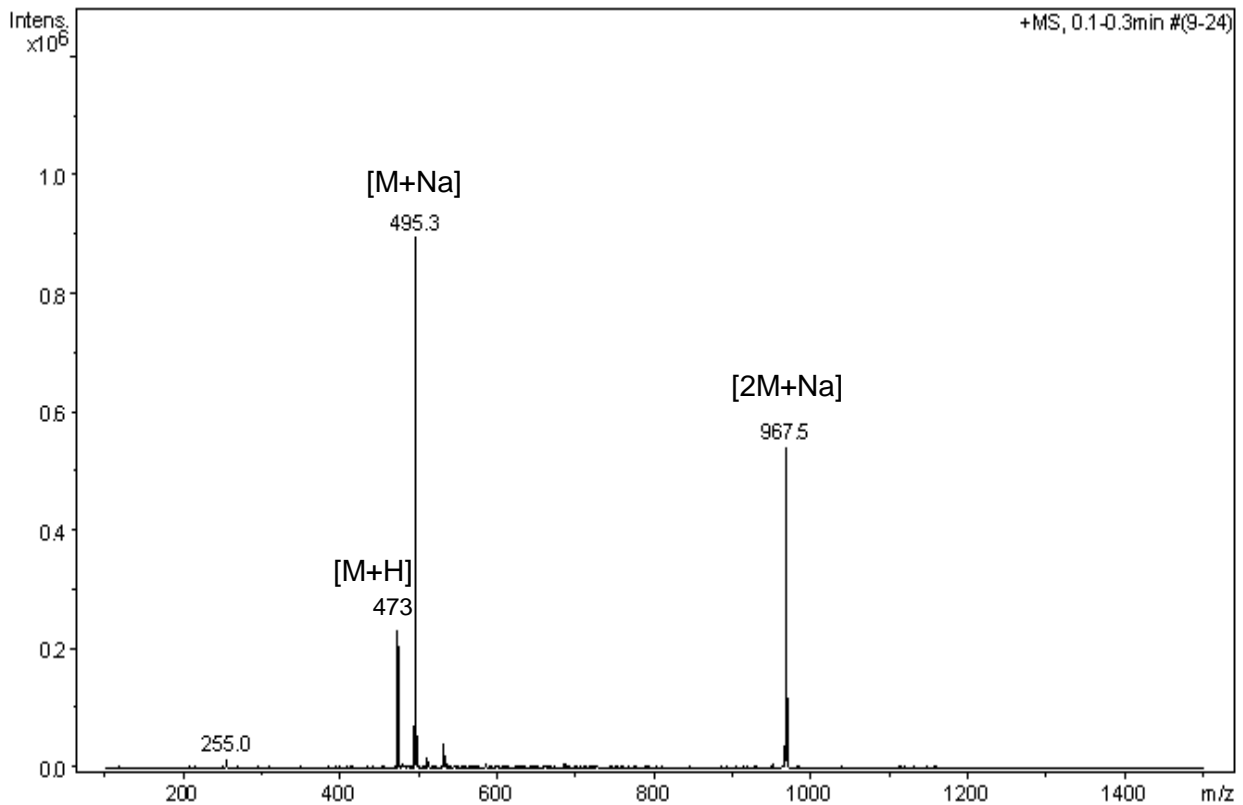


**C<sub>31</sub>H<sub>21</sub>O<sub>3</sub>P**  
**M= 472 g/mol**

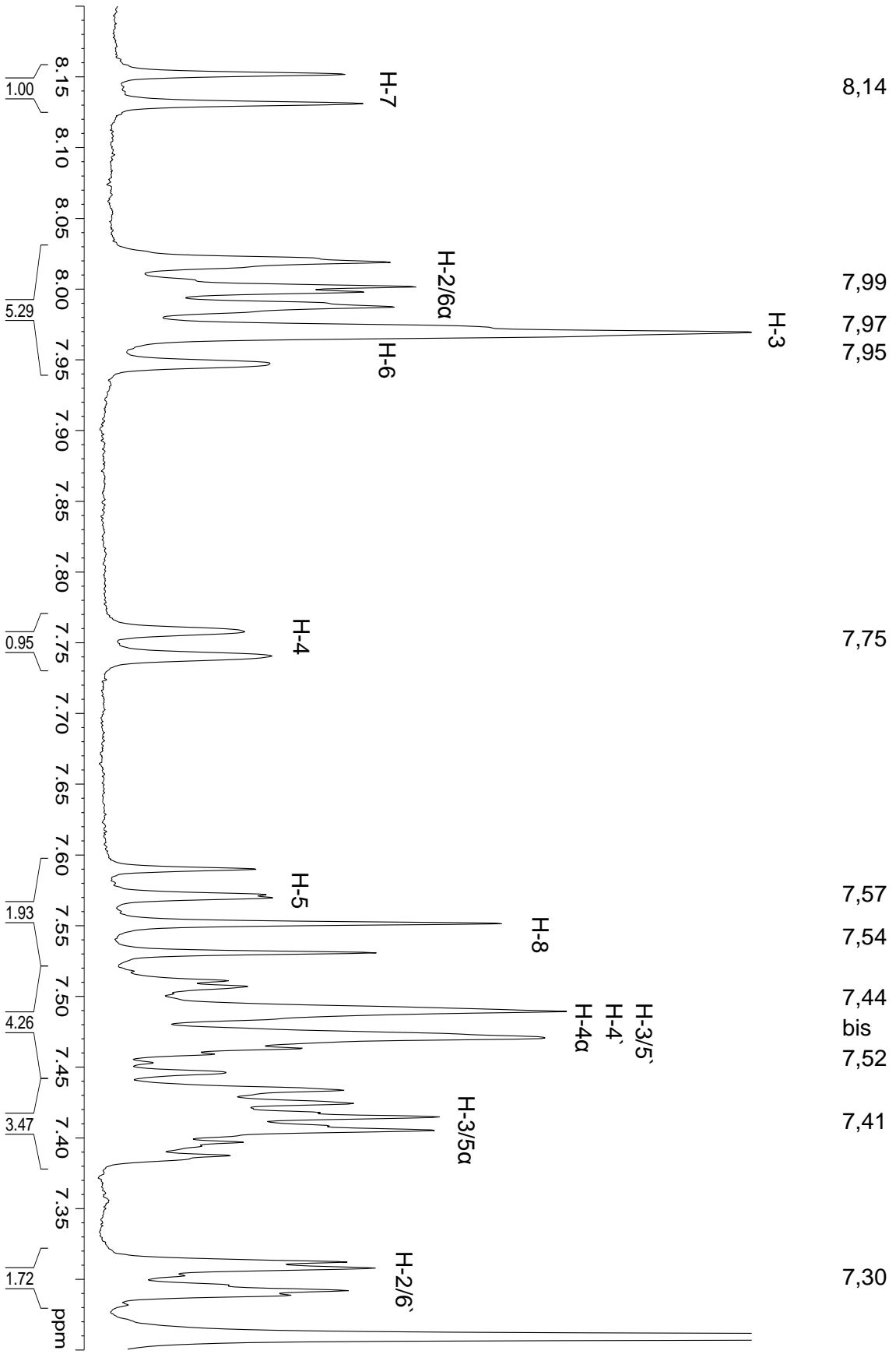


**11.1.DC:** Fließmittel: Essigester,  
Links: Anigorufon (R<sub>f</sub> = 0,63),  
Rechts: Anigorufon-DPPC (R<sub>f</sub> = 0,45)

## 11.2. Massenspektrum Anigorufon-DPPC (positiv)

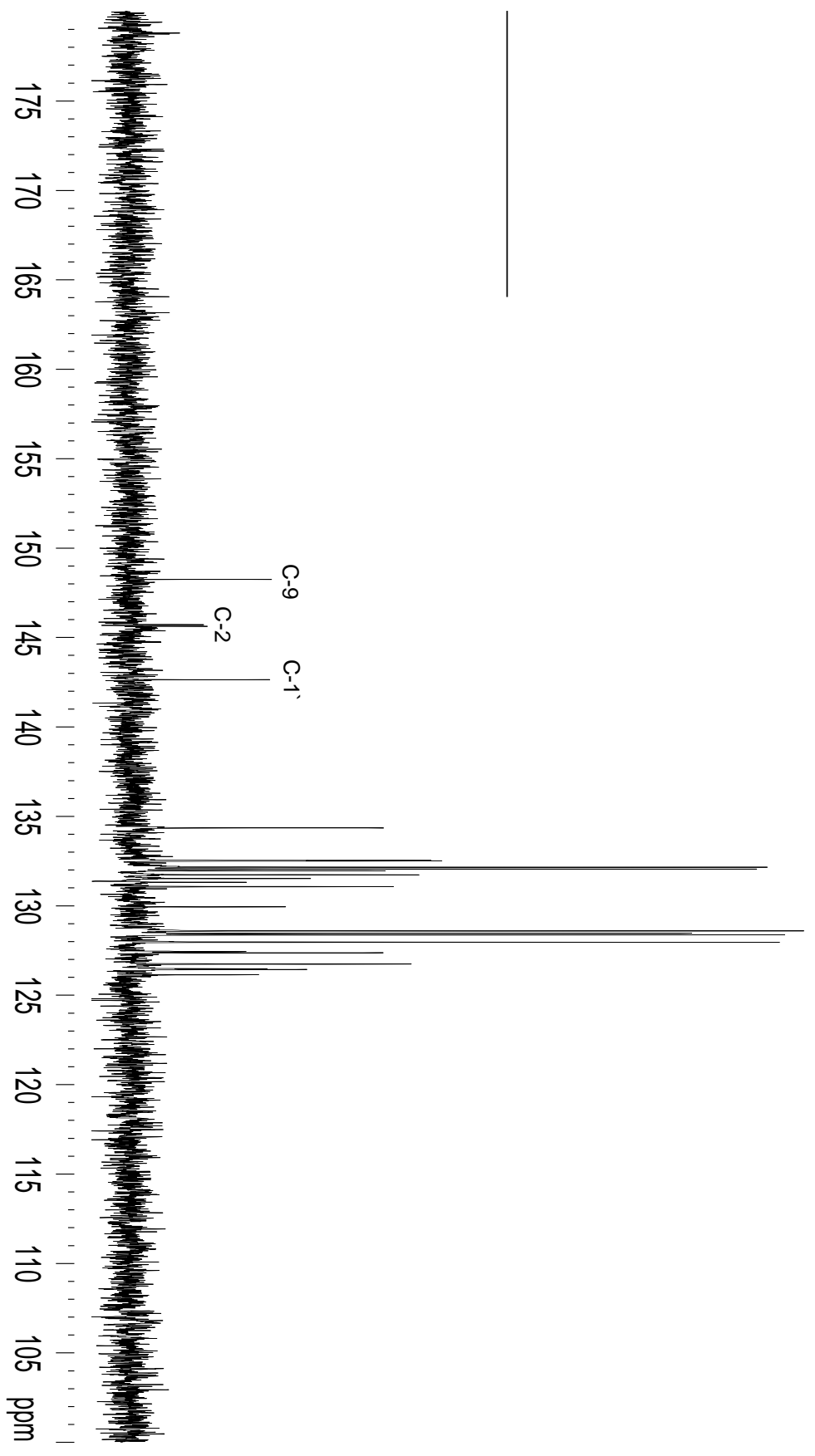


11.3. <sup>1</sup>H-Spektrum (<sup>31</sup>P-gekoppelt) Anigorufon-DPPC

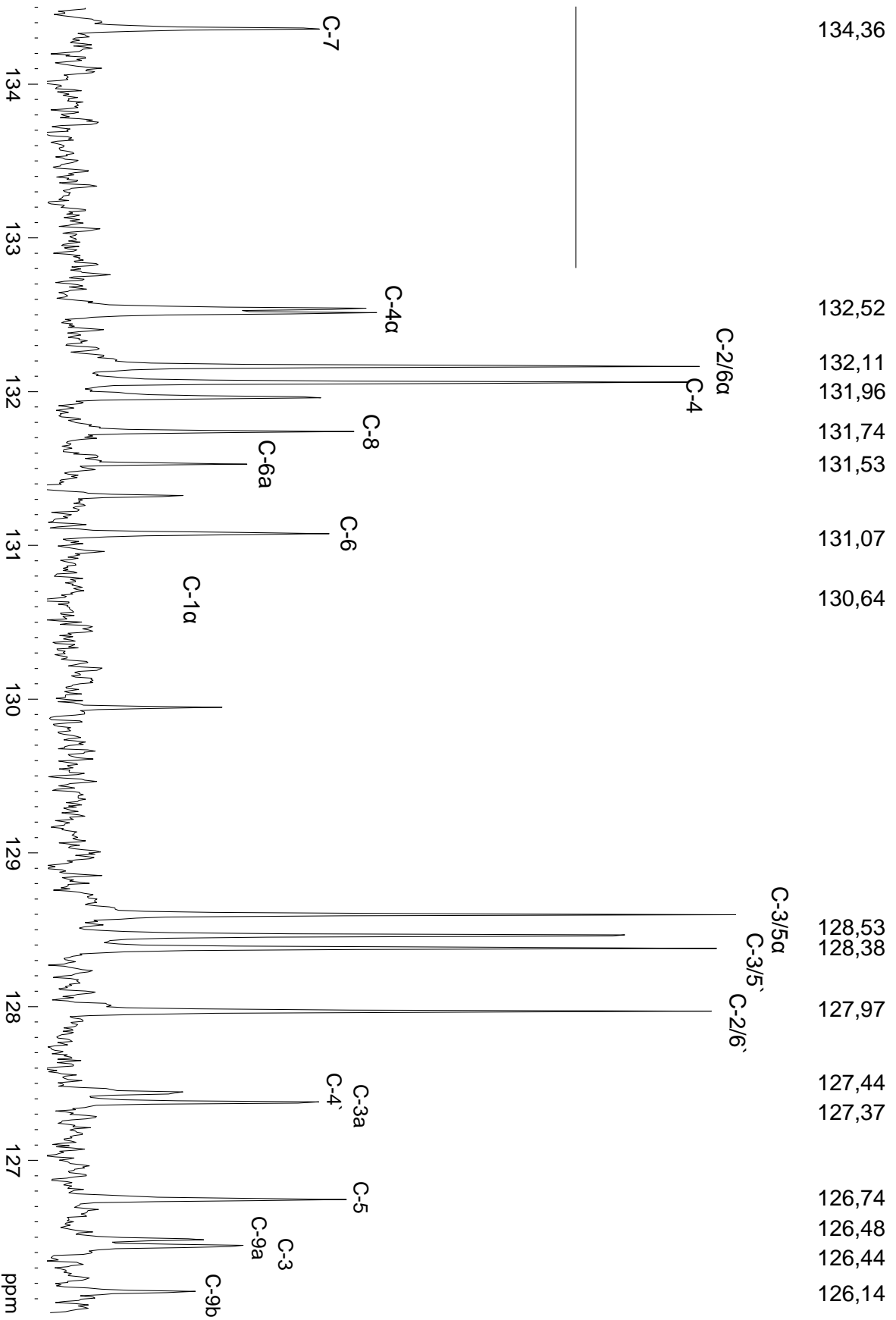


11.4.1. <sup>13</sup>C-Spektrum Nr. 1 (<sup>31</sup>P-gekoppelt) Anigorufon-DPPC

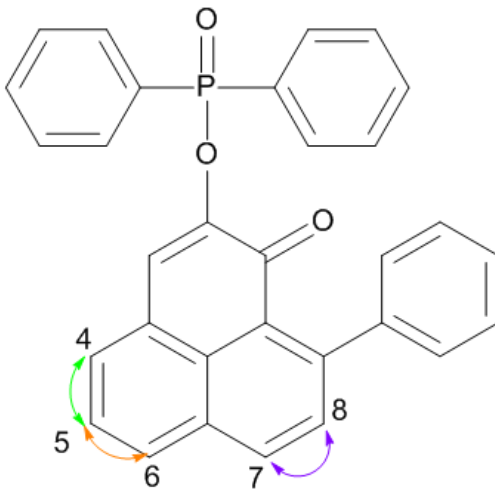
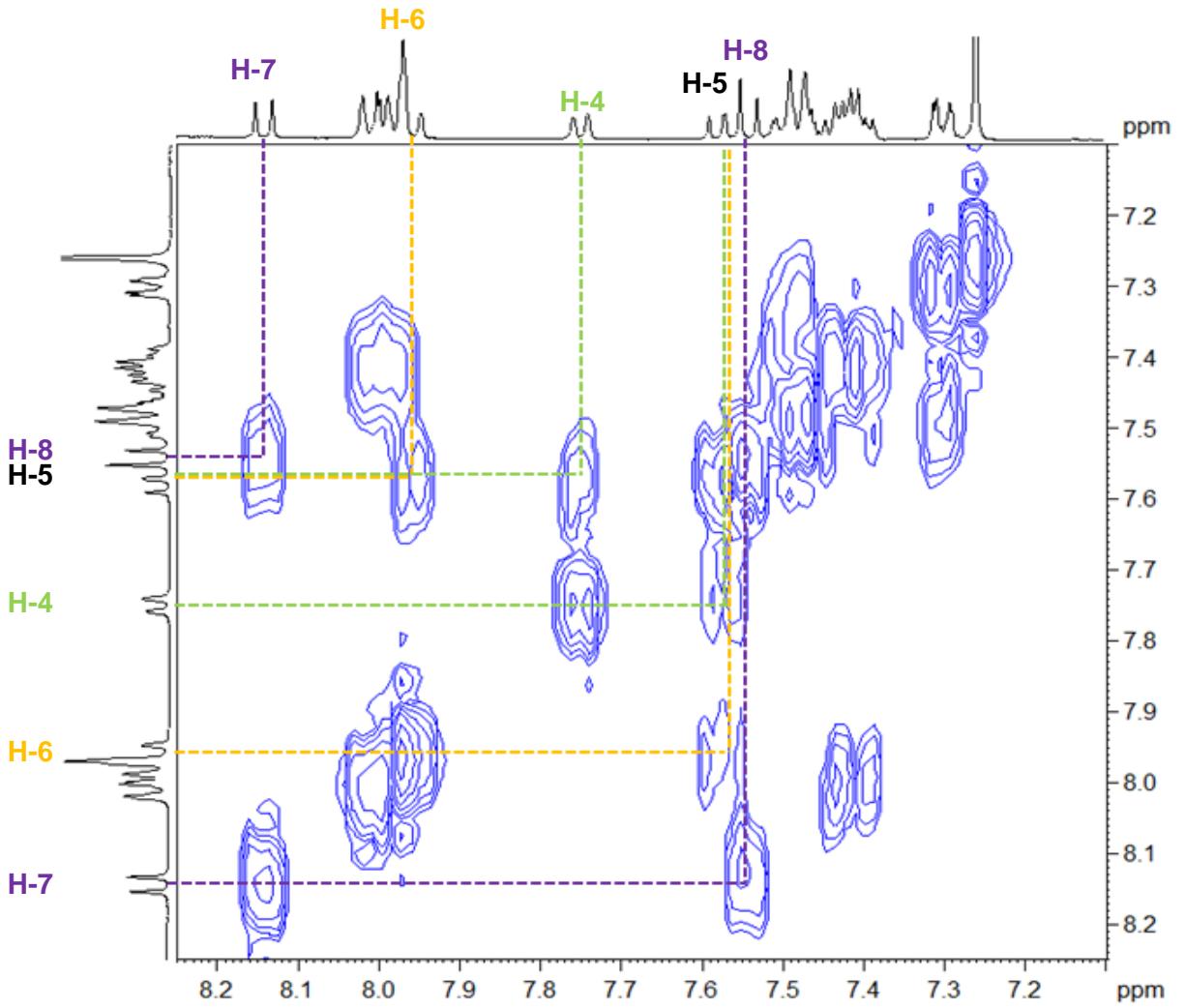
148,24  
145,67  
142,64



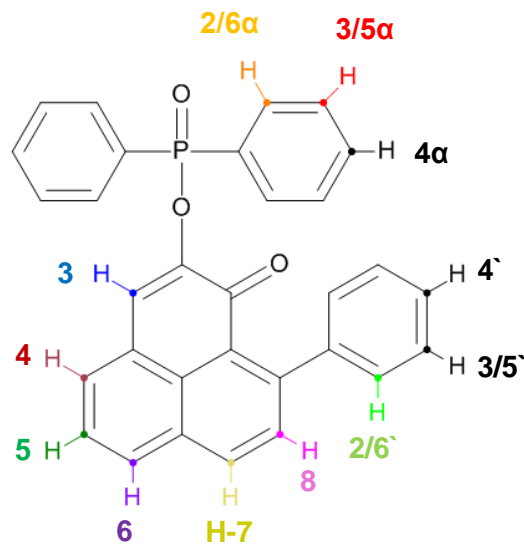
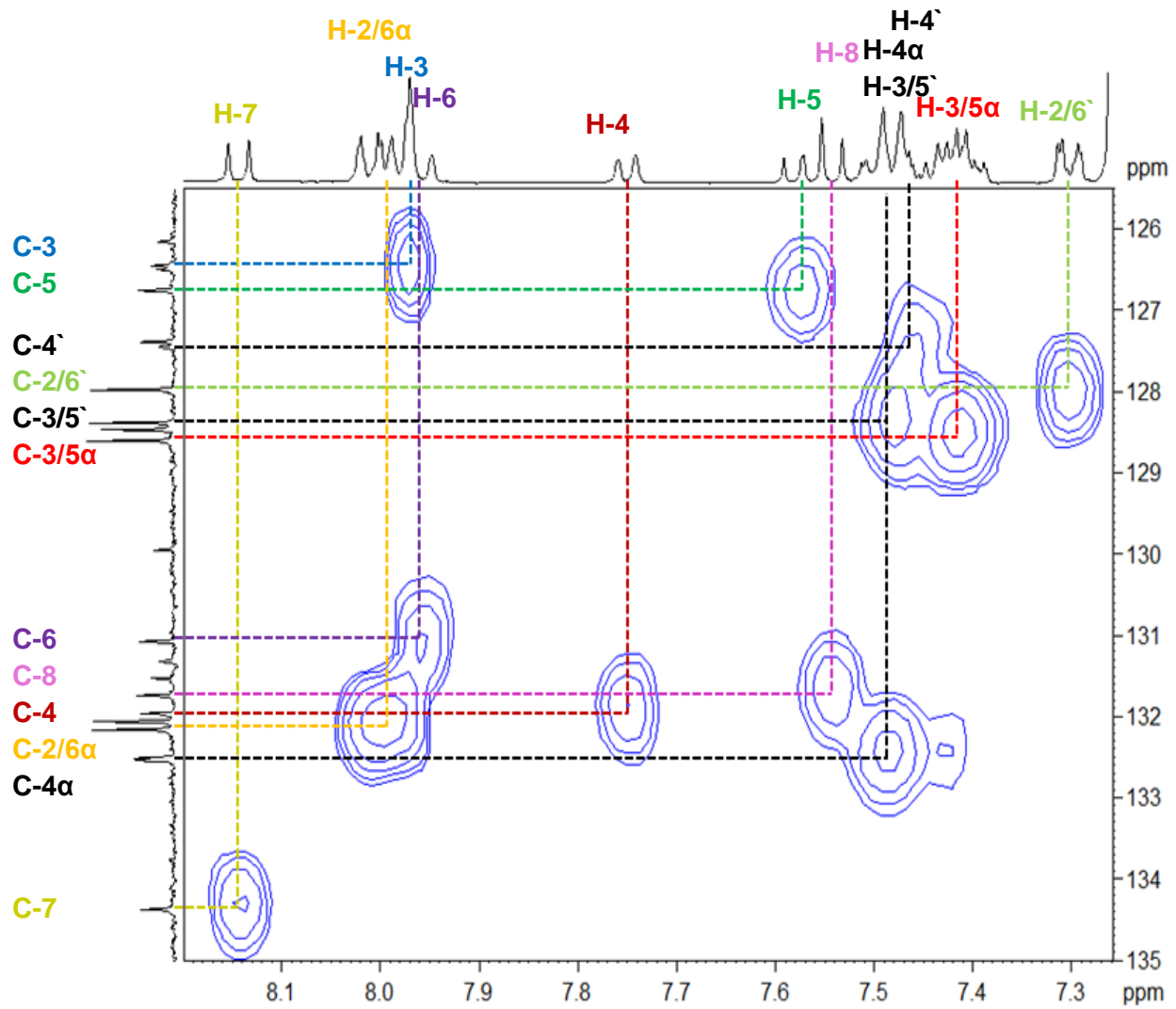
11.4.2. <sup>13</sup>C-Spektrum Nr.2 (<sup>31</sup>P-gekoppelt) Anigorufon-DPPC



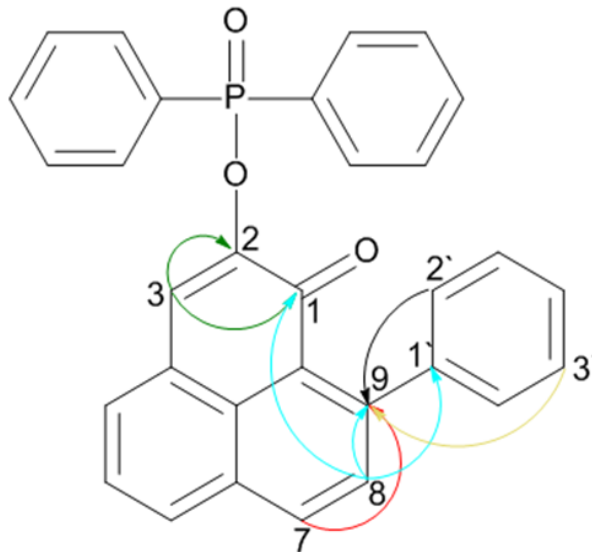
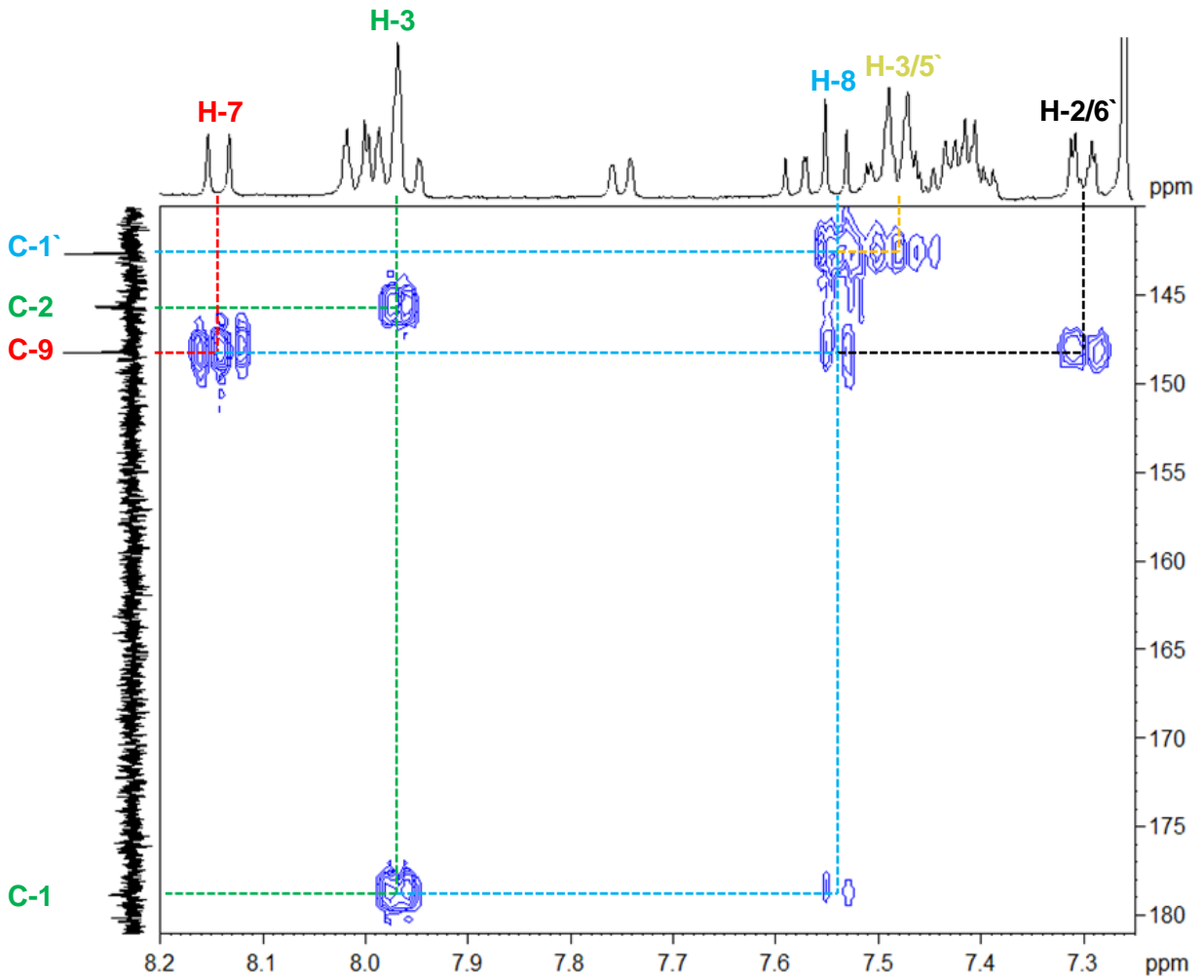
11.5. Ausschnitt aus COSY-Spektrum ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) von Anigorufon-DPPC



11.6. Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) von Anigorufon-DPPC

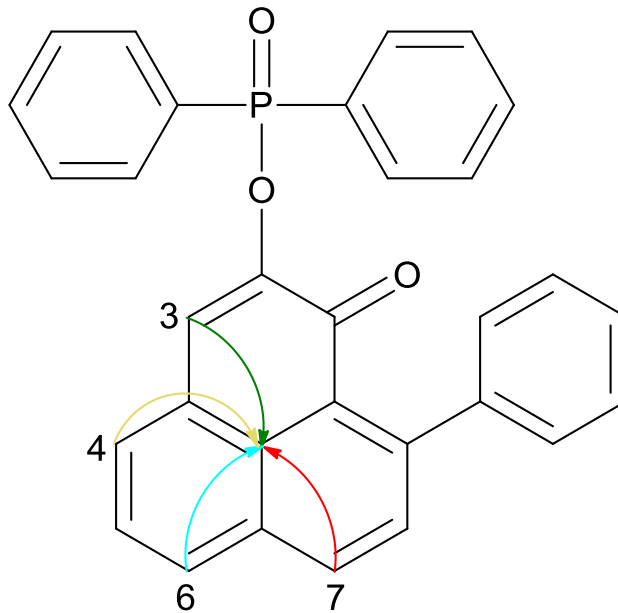
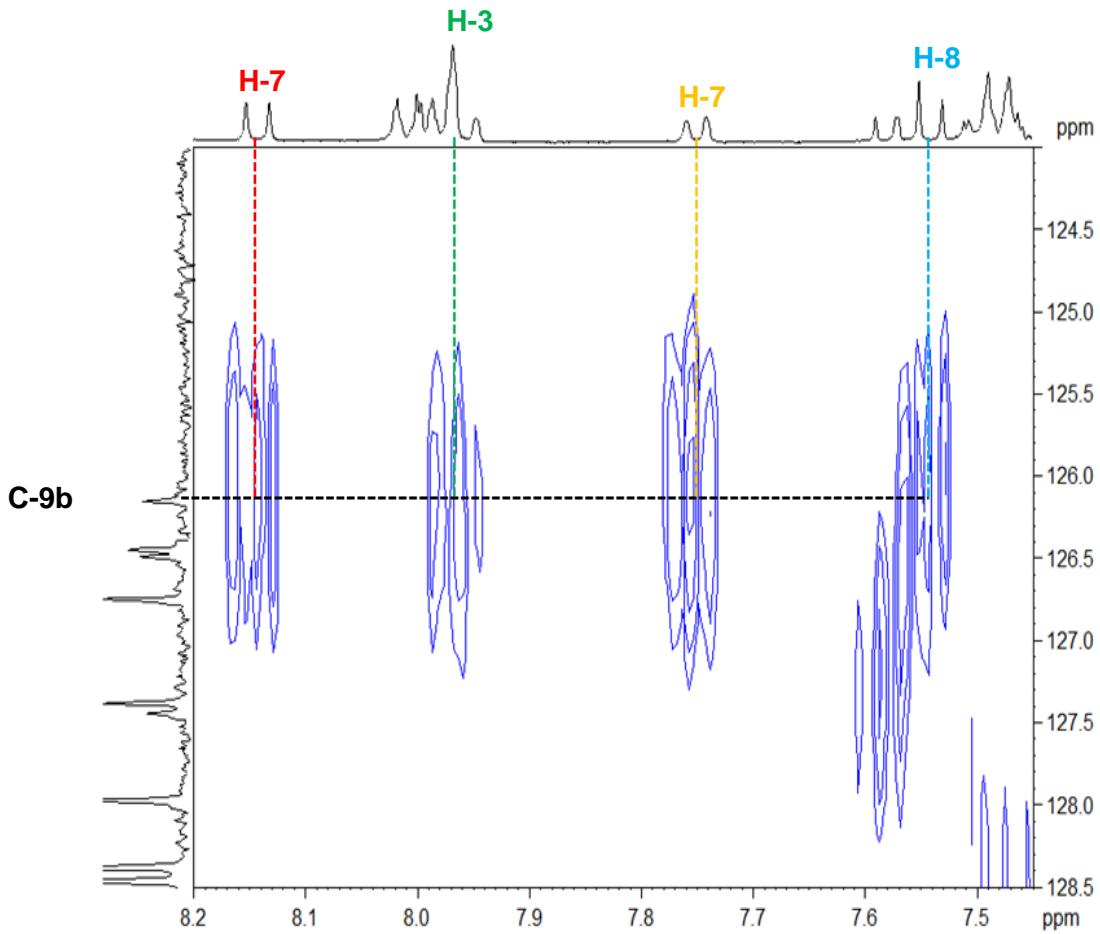


11.7.1. Ausschnitte A: HMBC-Spektrum ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) von Anigorufon-DPPC

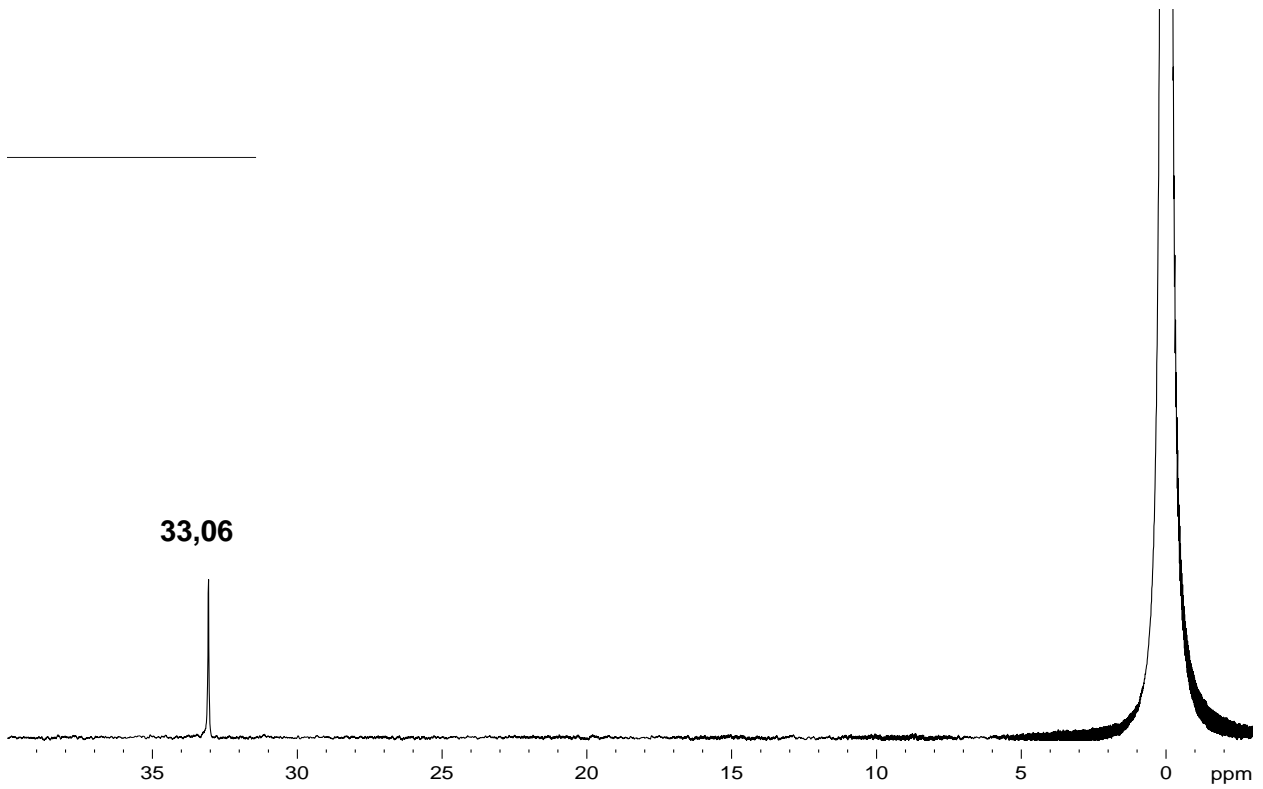




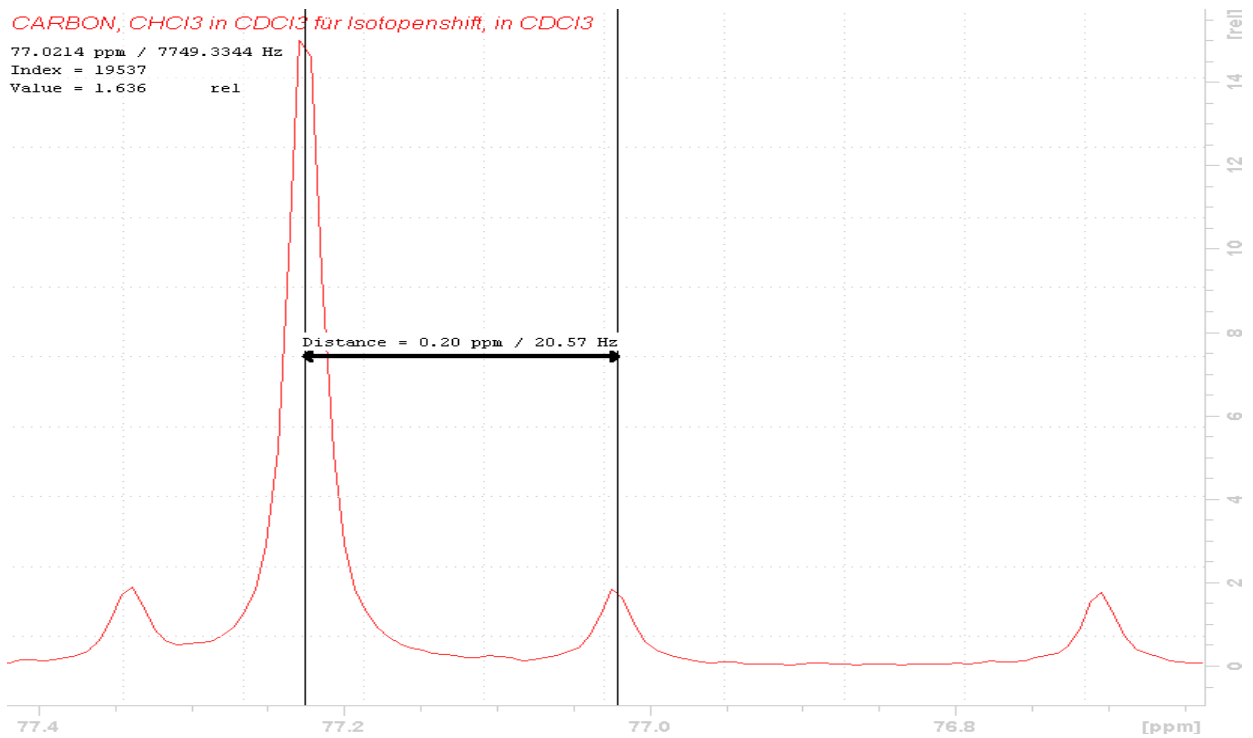
11.7.2. Ausschnitte B: HMBC-Spektrum ( $^{31}\text{P}$ -gekoppelt) von Anigorufon-DPPC



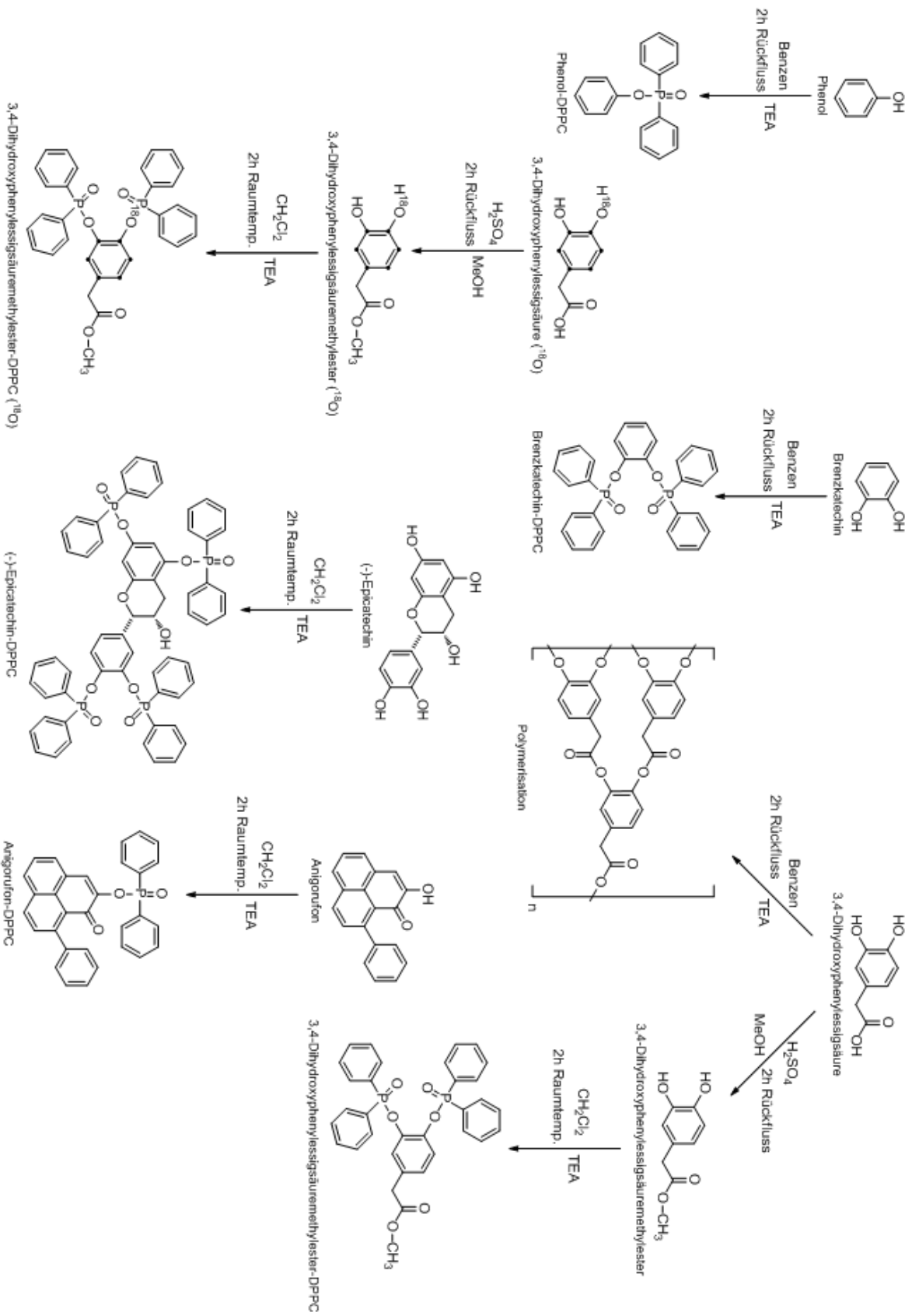
## 11.8. $^{31}\text{P}$ -Spektrum Anigorufon-DPPC



## 12. D-verursachte $^{13}\text{C}$ -Isotopenverschiebung von $\text{CDCl}_3$



### 13. Überblick der Synthesen



## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind kenntlich gemacht. Die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Fassung war noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung.

Datum und Unterschrift

