

Ringöffnungsreaktionen an bioreaktiven Lactamsystemen

Ring Opening Reactions of Bioreactive Lactam Systems

Hermann Frister und Eckhard Schlimme

Institut für Chemie und Physik, Bundesanstalt für Milchforschung, Hermann-Weigmann-Straße 1, D-2300 Kiel, und Laboratorium für Biologische Chemie, Universität-GH-Paderborn, Warburger Straße 100, D-4790 Paderborn, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **42c**, 603–612 (1987); received December 15, 1986/February 11, 1987

Lactam Systems, Silylation, Ribosylation, Ribonucleosides, Bioselectivity

1- β -D-Ribofuranosylpyrrolidin-2,5-dione (**9**) was synthesized by ribosylation of N-silylated succinimide (**7**) with 1,2,3,5-tetra-O-acetyl- β -D-ribofuranose in acetonitrile in the presence of tin tetrachloride. The compounds **9**, 1- β -D-ribofuranosyl-1-H-pyrrol-2,5-dione (**5**) and N-methylmaleimide (**2**) were converted with ammonia to the ring-opened components **16**, **14** and **15**. The bioreactivity of the N-maleimide derivatives **2** and **5** with respect to addition and ring-opening reactions with amino acid side chains containing either thiol or amino groups was shown in model reactions with glutathione (compds. **17**, **18**) and lysine (compds. **19**, **20**). The ring opening reaction of 3-methyl-3-phenyl-1- β -D-ribofuranosylpyrrolidin-2,5-dione (**11**) with lysine yields **21**, thus demonstrating the possibility of glycosuccinylation of amino groups in proteins.

Einleitung

N-Ethylmaleimimid (NEM) (**3**) ist ein für die Bestimmung von Thiolgruppen in Funktions- und Strukturproteinen vielfach verwendetes Reagenz [1–3]. Neben dieser auf der Doppelbindung beruhenden Spezifität für Thiolgruppen wurden weitere Umsetzungen von **3** mit Aminogruppen der Aminosäureseitenketten beobachtet [4, 5].

In diesem Zusammenhang ist die antibiotische und cytostatische [6, 7] Wirkung des von Streptomyceten gebildeten seltenen Nucleosids Showdomycin (**4**) interessant, das Maleinsäureimid (**1**) als Aglycon enthält. Durch **4** werden beispielsweise die Enzyme Uridin-5'-monophosphokinase und Uridinphosphorylase irreversibel im Sinne eines Suizidsubstrates gehemmt [8]. Dabei kommt es durch Alkylierung von im Bindungszentrum angeordneten funktionellen Thiolgruppen zu einem irreversiblen Ausfall der biologischen Funktion dieser alkylierten Rezeptorproteine. Offenbar übt die in **4** glycosidisch gebundene Ribose einen dirigierenden Effekt aus, wodurch

ein Transport zu Nucleosid-affinen Rezeptormolekülen erreicht wird. Das strukturisomere, synthetisch zugängliche Isoshowdomycin (**5**) ist ebenfalls ein SH-aktives Nucleosid [9], das im Gegensatz zu **4** eine β -N-ribosidische Bindung besitzt und wegen des Glycons ebenfalls bevorzugt Nucleosid-spezifische Rezeptorbindungen eingehen sollte.

Da die vorstehend genannten Verbindungen **3**, **4** und **5** Lactamsysteme enthalten, war die Glycosylierung ähnlich ungewöhnlicher fünfgliedriger gesättigter bzw. partiell ungesättigter Dicarbonsäureimide wie Succinimid (**6**) und 3-Methyl-3-phenyl-pyrrolidin-2,5-dion (**10**) von chemischem und biologischem Interesse. Wegen der erwähnten Nebenreaktionen von **3** mit Aminosäureseitenketten sollte die chemische Reaktivität der glycosylierten Lactamverbindungen **5**, 1- β -D-Ribofuranosyl-pyrrolidin-2,5-dion (**9**) und 3-Methyl-3-phenyl-1- β -D-ribofuranosylpyrrolidin-2,5-dion (**11**) gegenüber N-Methylmaleimid (**2**) bezüglich ihrer selektiven Umsetzung mit Thiol- bzw. Aminoverbindungen verglichen werden. Für diese Modelluntersuchungen boten sich Glutathion, das neben der α -Aminogruppe noch eine weitere Thiolgruppe besitzt, sowie Lysin an, das neben der α - eine weitere ϵ -terminale Aminogruppe enthält.

Als Ribosylierungsmethode wurde die von Vorbrüggen modifizierte Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion [10–16] gewählt, wobei in der vorliegenden Arbeit zunächst über die Silylierung des Succinimids (**6**) und anschließend über die Glycosylierung des Silylderivates **7** berichtet wird.

Abkürzungen: HMDS, Hexamethyldisilazan; GSH, Glutathion, red. Form; NMM, N-Methylmaleimid (1-Methyl-1H-pyrrol-2,5-dion); NEM, N-Ethylmaleimid (1-Ethyl-1H-pyrrol-2,5-dion).

Sonderdruckanforderungen an Dr. H. Frister und Prof. Dr. E. Schlimme, Institut für Chemie und Physik, Bundesanstalt für Milchforschung, Postfach 6069, D-2300 Kiel 14, Bundesrepublik Deutschland.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen 0341-0382/87/0500-0603 \$ 01.30/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Experimentelles

Material und Methoden

UV-Spektren: Shimadzu-UV-200-Spektrometer. ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und ^{29}Si -NMR-Spektren: Bruker-Gerät WM 250 F8; δ -Werte relativ zu Tetramethylsilan (TMS). Die Zahl der Protonen wurde durch Off-resonance-Entkopplung ermittelt. Massenspektren: Varian-MAT-331-A-Spektrometer. IR-Spektren: Perkin-Elmer-Grating Infrared Spektrumphotometer. Schmelzpunkte (nicht korrigiert): Büchi-SMP-20-Schmelzpunktgerät. Elementaranalysen: Mikroanalytisches Labor Beller, Göttingen. Dünnschichtchromatographie (DC): (a) Silicagel-Platten F 254 (Woelm, Eschwege); (b) Aluminiumfolie mit Kieselgel 60 F 254 (Merck, Darmstadt); (c) DC-Fertigfolien F 1440 LS 254 Cellulose (Schleicher & Schüll, Dassel). Als Chromatographiesysteme dienten: Methylenechlorid/Methanol I (95:5, v/v); II (1:1, v/v); III (9:1, v/v); *n*-Butanol/Eisessig/Wasser IV (4:1:4, v/v/v) mit anschließender Ninhydrinbehandlung. Säulenchromatographie wurde an Kieselgel 60 (230–400 mesh ASTM; Merck) durchgeführt. Das verwendete Acetonitril wurde über CaH_2 getrocknet. Die Feinchemikalien wurden von EGA-Chemie (Steinheim), Merck (Darmstadt), Sigma-Chemie (München) und Ventron-Chemie (Karlsruhe) bezogen.

Chemische Synthesen*

1- β -D-Ribofuranosyl-1-H-pyrrol-2,5-dion (5)

	R ₁	R ₂
0		
1	H	H
2	CH ₃	H
3	CH ₂ CH ₃	H
4	H	
5		H

Die Darstellung des Isoshowdomycins (5) erfolgte gemäß [9].

1- β -D-Ribofuranosylpyrrolidin-2,5-dion (9)

	R ₁	R ₂
6	H	H
7		H
8		H
9		H

6 wurde in HMDS zur N-silylierten Verbindung 7 umgesetzt, was durch die Lage des ^{29}Si -Signals bei $\delta = 13,70$, die äquivalente Lage der ^{13}C -Signale der C-2- und C-5-Carbonylkohlenstoffe bei 182,09 ppm und das Fehlen des in 6 bei $\delta = 11,04$ im ^1H -NMR auftretenden NH-Signals bewiesen wird. Die Darstellung von 9, die bisher nur durch Reduktion aus 5 zugänglich war, erfolgte erstmals durch Zinntetrachlorid-katalysierte Ribosylierung von 7 mit 1,2,3,5-Tetraacetyl- β -D-ribofuranose in Acetonitril bei Raumtemperatur. Die NMR-spektroskopischen Befunde sprechen zweifelsfrei für eine β -N-Ribosylierung, d. h. das zunächst aus der N-Silylverbindung 7 gebildete O-Ribosid wurde durch Transribosylierung, die bei überäquivalentem Einsatz von peracyliertem Zucker auftreten kann [17], in das β -N-ribosidierte Produkt 8 übergeführt. Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte mit methanolischer Salzsäure, um eine Ringöffnungsreaktion im basischen Milieu auszuschließen. Das 1'-H-Proton liegt in 9 bei $\delta = 5,31$; der entsprechende C-1'-Kohlenstoff tritt im ^{13}C -NMR-Spektrum als Dublett bei $\delta = 86,90$ auf. Die Symmetrie des Aglycons in 9 wird durch das Singulett für die C-2- und C-5-Carbonylkohlenstoffe bei $\delta = 179,10$ und das Triplett für die C-3- und C-4-Methylkohlenstoffe bei $\delta = 28,98$ bewiesen.

Darstellung von 1-(Trimethylsilyl)-pyrrolidin-2,5-dion (7): 4 g (40,4 mmol) Succinimid (6) wurden un-

* Bei den ringgeschlossenen Dicarbonsäureimiden sowie deren Derivaten beginnt die Zählweise beim Stickstoffatom gegen den Uhrzeigersinn. Bei den ringoffenen Verbindungen verläuft die Zählweise beim glycosidisch gebundenen Stickstoff beginnend zum Kettenden hin.

ter Argon in 60 ml HMDS gelöst, mit 380 mg Ammoniumsulfat versetzt, 8 h unter Rückfluß gekocht und der Reaktionsansatz im Hochvakuum eingedampft. Ausbeute: 7,2 g Rohprodukt **7** (90% spektroskopisch rein).

²⁹Si-NMR (CDCl₃): δ = 13,70 (s, =N-Si(CH₃)₃).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 182,09 (s, C-2, C-5), 29,97 (t, C-3, C-4), 1,26 (q, Trimethylsilyl).

¹H- und ¹³C-NMR-Daten von **6** [18]: ¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 11,04 (s, 1H, N-H), 2,56 (s, 4H, 3-H, 4-H).

¹³C-NMR (CD₃OD): δ = 181,40 (s, C-2, C-5), 30,60 (t, C-3, C-4).

Darstellung von 1-(2',3',5'-Tri-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-pyrrolidin-2,5-dion (**8**): 2,3 g (12,3 mmol) **7** wurden unter Argon in 30 ml Acetonitril gelöst und mit 5,18 g (16,3 mmol) 1,2,3,5-Tetra-O-acetyl- β -D-ribofuranose sowie einer Lösung aus 5,5 ml (46,8 mmol) Zinntrichlorid in 30 ml Acetonitril versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Zum Reaktionsansatz wurden anschließend 60 ml Eiswasser gegeben und 15 min weitergerührt. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert und die vereinigten Chloroformextrakte nacheinander mit gesättigter NaCl-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und nochmals mit gesättigter NaCl-Lösung geschüttelt. Nach Trocknung der organischen Phase über MgSO₄ und Abziehen des Lösungsmittels wurden 4,8 g eines schaumigen, chromatographisch nicht einheitlichen Rückstandes isoliert. Die Aufreinigung erfolgte über Kieselgel mit Methylenchlorid/Methanol (98:2). Ausbeute: 4,2 g (86%) weißer, schaumiger Feststoff **8**.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 5,61–5,65 (m, 1H, 2'-H, $J_{2',1'} = 3,5$ Hz), 5,53 (d, 1H, 1'-H, $J_{1',2'} = 3,5$ Hz), 5,38–5,43 (m, 1H, 3'-H), 4,29–4,34 (m, 1H, 4'-H), 4,01–4,15 (m, 2H, 5'-H), 2,63 (s, 4H, 3-H, 4-H), 1,97 (s, 9H, Acetylprotonen).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 175,48 (s, C-2, C-5), 170,22 (s, C-5'-Acetyl), 169,28 (s, C-2'-Acetyl), 169,08 (s, C-3'-Acetyl), 83,38 (d, C-1'), 79,27 (d, C-4'), 71,45 (d, C-3'), 70,51 (d, C-2'), 62,88 (t, C-5'), 27,89 (t, C-3, C-4), 20,34 (q, C-5'-Acetyl), 20,09 (q, C-2'-Acetyl, C-3'-Acetyl).

MS (EI): m/e = 357 (M⁺), 259 (M⁺ – Aglycon), 99 (Aglycon + H), 98 (Aglycon), 43 (Acetyl).

DC (System I; a): R_F = 0,63.

C₁₅H₁₉NO₉ (357,32) Ber. C 50,42 H 5,36 N 3,92
Gef. C 50,33 H 5,44 N 3,87

Darstellung von 1- β -D-Ribofuranosylpyrrolidin-2,5-dion (**9**): Zu einer Lösung aus 2,3 g (6,44 mmol) **8** und 65 ml Methanol wurden unter Rühren 6,5 ml 6 mol/l wässrige HCl-Lösung hinzugefügt und bei 45 °C 5 h lang gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels und Trocknung im Hochvakuum konnten 1,5 g eines schwarzen, schaumigen, chromatographisch nicht einheitlichen Rückstandes isoliert werden, dessen Reinigung über Kieselgel mit einem Methylenchlorid/Methanol-Gradienten (99:1 → 95:5) erfolgte. Ausbeute: 900 mg (66%) weißer, schaumiger Feststoff **9**.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 5,31 (d, 1H, 1'-H, $J_{1',2'} = 4,5$ Hz), 5,11 (d, 1H, 2'-OH, $J = 5,4$ Hz), 4,98 (d, 1H, 3'-OH, $J = 5,7$ Hz), 4,59 (t, 1H, 5'-OH, $J = 5,7$ Hz), 4,47–4,53 (m, 1H, 2'-H), 4,00–4,07 (m, 1H, 3'-H), 3,68–3,75 (m, 1H, 4'-H), 3,29–3,68 (m, 2H, 5'-H), 2,64 (s, 4H, 3-H, 4-H).

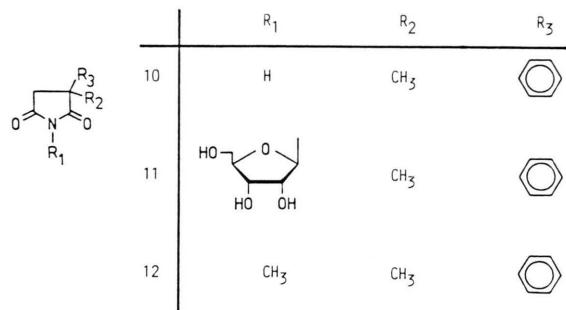
¹³C-NMR (CD₃OD): δ = 179,10 (s, C-2, C-5), 86,90 (d, C-1'), 86,09 (d, C-4'), 72,34 (d, C-3'), 72,23 (d, C-2'), 63,69 (t, C-5'), 28,98 (t, C-3, C-4).

MS (EI): m/e = 231 (M⁺), 132 (Ribose – H), 131 (Ribose – 2H), 99 (Aglycon + H), 98 (Aglycon).

DC (System III; b): R_F = 0,34.

C₉H₁₃NO₆ (231,21) Ber. C 46,75 H 5,67 N 6,06
Gef. C 46,91 H 5,83 N 6,01

3-Methyl-3-phenyl-1- β -D-ribofuranosylpyrrolidin-2,5-dion (**11**)



Die Darstellung des ribosidierten Analogon **11** von Mesuximid (**12**) wurde von uns in einer früheren Arbeit [19b] beschrieben.

Ringöffnungsreaktionen am Aglycon

Bildung von N- β -D-Ribofuranosylmaleinsäuremonoamidomonomethylester (**13**): Bei längerer NMR-spektroskopischer Untersuchung (ca. 1 h) in

Deuteromethanol konnte eine Veränderung der Signallage der Verbindung **5** im ¹H-NMR-Spektrum wie im ¹³C-NMR-Spektrum beobachtet werden, die eine Aufhebung der Äquivalenz des 3-H- und 4-H-Protons anzeigen.

¹H-NMR (CD₃OD): δ = 6,88 (s, 3-H, 4-H) (**5**), 6,21–6,43 (m, 3-H, 4-H, $[\delta_{3\text{H}} = 6,41, \delta_{4\text{H}} = 6,23]$, $J_{3,4\text{ cis}} = 11,9$ Hz) (**13**), 5,49 (d, 1'-H, $J_{1',2'} = 4,8$ Hz) (**5**), 5,44 (d, 1'-H, $J_{1',2'} = 3,8$ Hz) (**13**), 4,64–4,68 (m, 4'-H) (**5**), 4,24–4,29 (m, 3'-H) (**5**), 4,06–4,11 (m, 4'-H) (**13**), 3,97–4,00 (m, 3'-H) (**13**), 3,85–3,92 (m, 2'-H) (**5**), 3,75 (s, Methylprotonen) (**13**), 3,57–3,77 (m, 5'-H) (**5**), 2'-H, 5'-H (**13**)).

¹³C-NMR (CD₃OD): δ = 171,66 (s, C-2, C-5) (**5**), 167,76 (s, C-5) (**13**), 167,32 (s, C-2) (**13**), 135,90 (d, C-3, C-4) (**5**), 135,02 (d, C-3) (**13**), 128,28 (d, C-4) (**13**), 86,40 (d, C-1') (**13**), 85,93 (d, C-1') (**5**), 85,80 (d, C-4') (**5**), 84,97 (d, C-4') (**13**), 75,97 (d, C-3') (**13**), 72,55 (d, C-3') (**5**), 71,93 (d, C-2') (**5**), 71,71 (d, C-2') (**13**), 63,60 (t, C-5') (**5**), 63,05 (t, C-5') (**13**), 49,86 (q, Methyl) (**13**).

Darstellung von N-β-D-Ribofuranosylmaleinsäurediamid (**14**): 220 mg (0,62 mmol) tri-O-acetyliertes **5** wurden in 5 ml Methanol gelöst, mit 10 ml wässriger 33prozentiger Ammoniaklösung versetzt und eine $\frac{1}{4}$ h bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde im Hochvakuum eingedampft und der verbleibende Rückstand über Kieselgel mit einem Methylenchlorid/Methanol-Gradienten (95:5 \rightarrow 60:40) aufgetrennt. Ausbeute: 100 mg (65,6%) weißer, schaumiger Feststoff **14**.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 9,59 (d, 1H, N-H, $J_{\text{NH},1'} = 8,8$ Hz), 8,25 (s, 1H, Amidproton), 7,46 (s, 1H, Amidproton), 6,06–6,20 (m, 2H, 3-H, 4-H [$\delta = 6,16, \delta = 6,01$], $J_{3,4\text{ cis}} = 12,9$ Hz), 5,21–5,26 (dd, 1H, 1'-H, $J_{1',\text{NH}} = 8,8$ Hz), 4,69–5,09 (m, 3H, 2'-OH, 3'-OH, 5'-OH), 3,38–3,87 (m, 5H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H).

MS (EI): m/e = 248 (M⁺ + 2H), 202 (M⁺ – O=C–NH₂), 133 (Ribose), 115 (Agllycon + 2H), 113 (Agllycon), 69 (Agllycon – O=C–NH₂), 44 (O=C–NH₂).

DC (System III; b): R_F = 0,72.

Darstellung von N-Methylmaleinsäurediamid (**15**): 1,0 g (9 mmol) NMM (**2**) in 20 ml Methanol wurden mit 40 ml 33prozentiger wässriger Ammoniaklösung versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Eindampfen im Hochvakuum erfolgte die Aufreinigung über Kieselgel mit einem Methylenchlorid/Methanol-Gradienten (95:5 \rightarrow

90:10) als Elutionsmittel. Ausbeute: 530 mg (46.0%) weißer, pulvriger Feststoff **15**.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 8,94 (s, breit, 1H, N-H), 8,55 (s, 1H, Amidproton), 7,38 (s, 1H, Amidproton), 6,02–6,14 (m, 2H, 3-H, 4-H [$\delta = 6,06, \delta = 6,10$], $J_{3,4\text{ cis}} = 13$ Hz), 2,65 (d, 3H, Methylprotonen, $J_{\text{CH}_3,\text{NH}} = 4,7$ Hz).

¹³C-NMR (CD₃OD): δ 169,48 (s, C-5), 167,78 (s, C-2), 133,13 (d, C-3), 132,34 (d, C-4), 26,70 (q, Methylgruppe).

IR (KBr): 3420 cm⁻¹ (O=C–NH), 3320 cm⁻¹, 3240 cm⁻¹ (O=C–NH₂), 2980 cm⁻¹ (–CH₂–CH₃), 1700 cm⁻¹ (O=C–NH), 1650 cm⁻¹ (HC=CH), *cis*, st; 1630 cm⁻¹ (O=C–NH₂), 1430 cm⁻¹ (CH₂–CH₃), 710 cm⁻¹ (HC=CH, *cis*, oop).

MS (EI): m/e = 128 (M⁺), 112 (M⁺ – NH₂), 99 (M⁺ – HN–CH₃), 84 (M⁺ – O=C–NH₂), 44 (O=C–NH₂).

C₅H₈N₂O₂ (128,13) Ber. C 46,87 H 6,29 N 21,89
Gef. C 46,72 H 6,34 N 21,96

¹³C-NMR-Daten (CDCl₃) von **2**: δ = 170,60 (s, C-2, C-5), 134,11 (d, C-3, C-4), 23,45 (q, Methylgruppe).

Darstellung von N-β-D-Ribofuranosylbernsteinsäurediamid (**16**): 2,4 g (6,72 mmol) **8** wurden in 30 ml Methanol gelöst, mit 20 ml 33prozentiger wässriger Ammoniaklösung versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Eindampfen des Reaktionsansatzes erfolgte die Aufreinigung über Kieselgel mit einem Methylenchlorid/Methanol-Gradienten (92:8 \rightarrow 80:20). Ausbeute: 1,1 g (66%) weißer, schaumiger Feststoff **16**.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 8,27 (d, 1H, N-H, $J_{\text{NH},1'} = 9$ Hz), 7,28 (s, 1H, Amidproton), 6,72 (s, 1H, Amidproton), 5,15–5,21 (dd, 1H, 1'-H, $J_{1',\text{NH}} = 9$ Hz, $J_{1',2'} = 5$ Hz), 4,93 (d, 1H, 2'-OH, $J = 5,8$ Hz), 4,85 (d, 1H, 3'-OH, $J = 5,5$ Hz), 4,68 (t, 1H, 5'-OH, $J = 5,8$ Hz), 3,78–3,84 (m, 1H, 2'-H), 3,64–3,72 (m, 1H, 3'-H), 3,58–3,63 (m, 1H, 4'-H), 3,32–3,47 (m, 2H, 5'-H), 2,27–2,30 (m, 4H, 3-H, 4-H).

¹³C-NMR ([D₆]DMSO): δ = 173,47 (s, C-2), 171,94 (s, C-5), 83,75 (d, C-1'), 83,31 (d, C-4'), 73,82 (d, C-3'), 70,23 (d, C-2'), 62,10 (t, C-5'), 30,75 (t, C-3), 30,03 (t, C-4).

MS (EI): m/e = 248 (M⁺), 232 (M⁺ – NH₂), 133 (Ribose), 115 (Agllycon), 99 (Agllycon – NH₂).

DC (System II; b): R_F = 0,39.

C₉H₁₆N₂O₆ (248,23) Ber. C 43,55 H 6,50 N 11,28
Gef. C 43,58 H 6,40 N 11,09

Bioanaloge Modellreaktionen

Umsetzung von N-Methylmaleinimid (**2**) mit Glutathion zu **17**: 556 mg (5 mmol) NMM (**2**) wurden in 20 ml H₂O gelöst und unter Röhren mit 1,537 g (5 mmol) GSH versetzt und bei pH = 4 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz am Hochvakuum eingedampft und aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 1,2 g (57,3%) weißer, pulvriger Feststoff **17**.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 8,42–8,52 (m, 2H, O=C–NH–CH₂, CH–NH–C=O), 6,35–6,79 (s, breit, 2H, –NH₂), 4,42–4,51 (m, 1H, O=C–CH–NH–C=O), 3,96–4,06 (m, 1H, NH₂–CH–COOH), 3,68–3,72 (m, 2H, –CH₂–COOH), 2,83–3,37 (m, 3H, 3-H, 4-H), 2,83 (s, 3H, Methylprotonen), 1,63–2,38 (m, 6H, Methylenprotonen).

¹³C-NMR (D₂O/CD₃OD) (Breitband entkoppelt): δ = 178,87 (s, C-2), 177,56 (s, C-5), 174,20 (s, NH₂–CH–COOH), 172,75 (s, amidische Carbonyle), 175,58 (s, CH₂–COOH), 23,33–55,27 (m, aliphatische C-Atome).

MS (EI): *m/e* = 274 (GSH – SH), 144 (NMM + SH), 112 (NMM + H), 97 (NMM + H – CH₃).

DC (System IV; c): *R_F* = 0,26 (*R_F* (GSH) = 0,30).

C₁₅H₂₂N₄O₈S (418,42)

Ber. C 43,04 H 5,30 N 13,39 S 7,66

Gef. C 43,26 H 5,33 N 13,36 S 7,75

Umsetzung von Isoshowdomycin (**5**) mit Glutathion zu **18**: 25 mg (0,11 mmol) **5** wurden in 2 ml Wasser gelöst und unter Röhren mit 34 mg (0,11 mmol) GSH versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei pH 4 gerührt, im Hochvakuum eingedampft und lyophilisiert. Ausbeute: 55 mg weißer, pulvriger Feststoff **18**.

F.p.: Zersetzung ~ 240 °C.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 8,58 (t, 1H, HN–CH₂, *J* = 5,2 Hz), 8,43–8,46 (m, 1H, HN–CH), 5,31 (d, 1H, 1'-H, *J*_{1',2'} = 4,4 Hz), 4,38–4,51 (m, 2H, 5'-OH, O=C–CH–NH–C=O), 4,01–4,09 (m, 2H, 2'-OH, 3'-OH), 3,71–3,73 (m, 1H, CH(NH₂)COOH), 3,35–3,58 (m, 5H, Riboseprotonen), 2,78–3,29 (m, 3H, 3-H, 4-H), 1,90–2,33 (m, 4H, Methylenprotonen).

MS (EI): *m/e* = 536 (M⁺), 306 (GSH – H), 230 (M⁺ – GSH – H), 131 (Ribose – 2H).

DC (System IV; c): *R_F* = 0,17 (*R_F* (GSH) = 0,30).

Umsetzung von N-Methylmaleinimid (**2**) mit *S*- α , ϵ -Diaminocapronsäure (*L*-Lysin) zu **19**: 1 g (9,0

mmol) NMM (**2**) wurden in 20 ml H₂O gelöst und unter Röhren 1,2 g (8,22 mmol) Lysin hinzugefügt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Dabei fiel der pH-Wert der Lösung von 10 auf 7,5 ab. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz im Hochvakuum eingedampft und mehrmals aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 1,3 g weißer, pulvriger Feststoff **19**.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 8,60–9,50 (m, 2H, NH), 5,83–6,26 (m, 2H, 3-H, 4-H), 4,50–5,50 (s, breit, NH₂), 3,46–3,80 (m, 1H, H₂N–CH–COOH), 2,79 (s, 3H, Methylprotonen), 1,29–1,73 (m, 8H, Methylenprotonen).

¹³C-NMR (D₂O/CD₃OD): δ = 173,98–180,69 (m, Carbonylkohlenstoffatome), 135,74 (d, C-3), 124,84 (d, C-4), 20,12–55,93 (m, aliphatische Kohlenstoffatome).

MS (EI): *m/e* = 198 (M⁺ – COOH – NH₂), 145 (Lysin – H), 112 (M⁺ – HN–(CH₂)₄CH(NH₂)COOH), 84 (CH₃–NH–CO–CH=CH).

DC (System IV; c): *R_F* = 0,33 + 0,16 (Lysin).

Umsetzung von Isoshowdomycin (**5**) mit *S*- α , ϵ -Diaminocapronsäure (*L*-Lysin) zu **20**: 33 mg (0,14 mmol) **5** wurden in 2 ml Wasser gelöst und unter Röhren mit 21 mg (0,14 mmol) Lysin versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt, im Hochvakuum eingedampft und lyophilisiert. Ausbeute: 49 mg weißer, pulvriger Feststoff **20**.

F.p.: Zersetzung ~ 150 °C.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 12,34 (s, breit, 1H, Carbonsäureproton), 9,62 (d, 1H, 1-NH, *J*_{NH,1'} = 8,4 Hz), 9,10 (t, 1H, O=C–NH–CH₂, *J* = 5,1 Hz), 5,54–6,12 (m, 2H, 3-H, 4-H [*δ*_{3H} = 6,09, *δ*_{4H} = 5,57], *J*_{3,4,cis} = 13,3 Hz), 5,29–5,31 (m, 1H, 1'-H), 5,20–5,21 (m, 1H, 5'-OH), 4,46–5,00 (m, 1H, 3'-OH), 4,01–4,05 (m, 1H, 2'-OH), 3,11–3,84 (m, 6H, Riboseprotonen, CH–(NH₂)–COOH), 1,37–1,67 (m, 8H, Methylenprotonen).

MS (EI): *m/e* = 375 (M⁺), 374 (M⁺ – H), 242 (Agllycon), 230 (M⁺ – Lysin), 229 (M⁺ – Lysin – H), 145 (Lysin – H), 82 (O=C–CH=CH–C=O).

DC (System IV; c): *R_F* = 0,25 (*R_F* (Lysin) = 0,14).

Umsetzung von 3-Methyl-3-phenyl-1- β -D-ribofuranosylpyrrolidin-2,5-dion (**11**) mit *S*- α , ϵ -Diaminocapronsäure (*L*-Lysin) zu **21**: 30 mg (0,09 mmol) (**11**) wurden in 2 ml H₂O gelöst und unter Röhren mit 13 mg (0,09 mmol) Lysin versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend auf 37 °C erwärmt und nochmals 4 mg

Lysin zugesetzt, wodurch sich in der Lösung ein pH-Wert von 8 einstellte. Die Reaktion wurde nach 7 h beendet, der Reaktionsansatz im Hochvakuum eingedampft und lyophilisiert. Ausbeute: 41 mg **21** weißer Feststoff.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): $\delta = 8,93\text{--}8,96$ (m, 1H, NH), 8,78–8,82 (m, 1H, NH), 7,11–7,36 (m, 5H, Phenylprotonen), 5,15–5,38 (m, 4H, 1'-H, 5'-OH, 3'-OH, 2'-OH), 3,32–3,80 (m, 6H, Riboseprotonen, CH(NH₂)COOH, 2,67 (m, 2H, 3-H), 1,62 (s, 3H, Methylprotonen), 1,36–1,43 (m, 8H, Methylenprotonen).

MS (EI, „Flash“-Verdampfung bei 300 °C): *m/e* = 467 (M⁺), 322 (M⁺ – Lysin – H), 145 (Lysin – H), 133 (Ribose), 112 (Aglycon – Lysin – Phenyl – H), 77 (Phenyl).

DC (System IV; *c*): *R_F* = 0,25 + 0,14 (Lysin).

Kinetische Untersuchung zur Aminolyse von **2** und **5**

Die Untersuchung erfolgte gemäß [19a], wobei die gemessenen *t*₁₀-Werte gegen den pH-Wert der Reaktionslösung bei *t* = 0 halblogarithmisch aufgetragen wurden (Abb. 1).

Ergebnisse und Diskussion

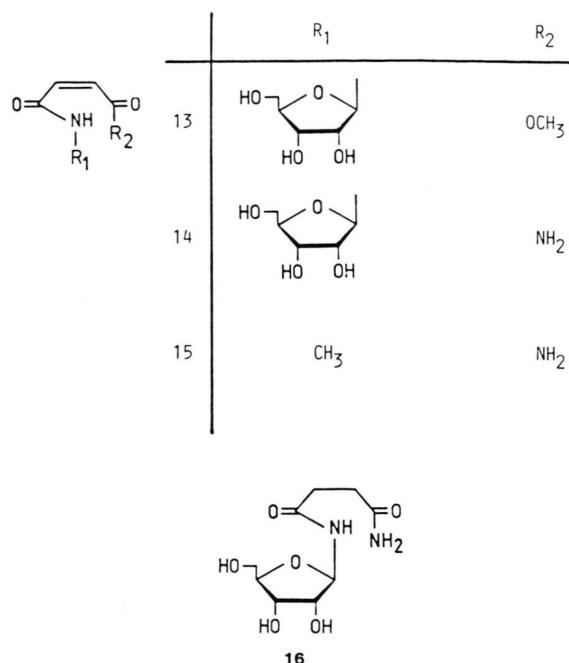
Ringöffnungsreaktionen am Aglycon

Bei Maleinsäureimiden wurden neben der Addition von Thiolgruppen an die Doppelbindung [1–3, 20–24] Reaktionen mit Aminogruppen beobachtet [4, 5, 25, 26]. Es handelt sich dabei um Ringöffnungen, die – wie die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Beispiele der Dicarbonsäureimid-Derivate **13**–**16** zeigen – sowohl ammonolytisch als auch alkoholytisch ablaufen können.

Aufgrund dieser Ergebnisse und in der Literatur beschriebener Befunde [4, 5, 25, 27] wurde das Reaktionsverhalten von N-Methylmaleimid (**2**) und 1-β-D-Ribofuranosyl-1-H-pyrrol-2,5-dion (**5**), die beide als Strukturanaloga von **3** anzusehen sind, gegenüber Amminosäureseitenketten modellmäßig mit den natürlichen Aminosäuren Glutathion und Lysin geprüft.

Bioselektive Modellreaktionen

Diese Modellversuche sollten klären, ob eine Addition an die Doppelbindung und/oder eine Öffnung des Imidringes bei den N-funktionalisierten Maleimididen **2** und **5** auftreten. Zusätzlich bot sich die Um-

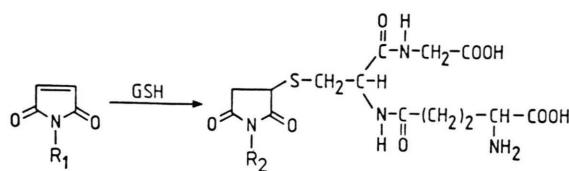


setzung von 3-Methyl-3-phenyl-1-β-D-ribofuranosyl-pyrrolidin-2,5-dion (**11**) mit Lysin an. **11** ist ein Strukturanalogen des Antiepileptikums Methsuximid [28, 29] bzw. dessen N-methylierten Derivates Mesuximid (Petinutin®) [30]. Aus Untersuchungen mit [¹⁴C]Methsuximid ist bekannt, daß eine Metabolisierung dieses Pharmakons über eine Ringöffnung eingeleitet wird [29].

Reaktionen mit Glutathion

Die SH-aktiven Maleimidide **2** und **5** wurden mit GSH unter Beibehaltung der Lactamstruktur zu 1-Methylpyrrolidin-2,5-dion-3-yl-glutathion (**17**) bzw. 1-β-D-Ribofuranosylpyrrolidin-2,5-dion-3-yl-glutathion (**18**) reduziert.

Im ¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung **17** konnte das in **2** aufgetretene Dublett der C-3- und C-4-Atome bei 134,11 ppm nicht mehr beobachtet werden. Gleichzeitig war festzustellen, daß die in **2** als Singulett bei 170,60 ppm auftretenden C-2- und C-5-Carbonylkohlenstoffatome bei **17** nun als zwei Singulets (178,87 und 177,56 ppm) vorlagen, d. h. durch Addition der Thiolgruppe des GSH an die Doppelbindung nicht mehr strukturäquivalent waren. Entsprechend dazu trat im ¹H-NMR-Spektrum bei 2,83–3,37 ppm ein Multiplett für die 3-H- bzw. 4-H-Protonen auf. Die aus der Addition resultierenden



	R ₁	R ₂
2	CH ₃	17
5		18

Methin- bzw. Methylen-(C-3- bzw. C-4)-Kohlenstoffatome lagen neben den Signalen der aliphatischen Kohlenstoffe des Glutathionrestes im ¹³C-NMR-Spektrum als Multiplett bei 23,33–55,27 ppm vor.

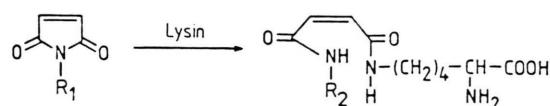
Ebenfalls ergab die ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung des Nucleosids **18** keinen Hinweis auf das bei **5** zu beobachtende Singulett für die olefinischen 3-H- bzw. 4-H-Protonen. Dafür trat in **18** ein Multiplett bei 2,78–3,29 ppm für die 3-H- bzw. 4-H-Protonen auf, das wie bei **17** einen additiven Angriff auf die Doppelbindung des Nucleosids **5** anzeigen. **5** stellt mithin neben NEM (**3**) und NMM (**2**) ein weiteres SH-aktives Reagenz dar. Eine Ringöffnung war bei beiden Umsetzungen nicht zu beobachten, da neben den Signalen für die zwei sekundären amidischen Protonen des Glutathionrestes (Triplet bei 8,58 ppm sowie Multiplett bei 8,43–8,46 ppm) keine weiteren NH-Signale zu beobachten waren. Auch trat das Signal des 1'-H-Protons bei 5,31 ppm mit *J*_{1',2'} = 4,4 Hz als Dublett auf, was ebenfalls die Erhaltung des Lactamsystems bestätigte (Die Zuordnung von *R,S*-Isomeren war aufgrund der dafür nicht ausreichenden spektroskopischen Auflösung im aliphatischen Bereich nicht möglich).

Eine Ringöffnung durch nucleophilen Angriff auf ein Carbonylkohlenstoffatom war bei den Umsetzungen nicht eingetreten. Die für einen nucleophilen Angriff in Frage kommende α -Aminogruppe des GSH war im ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **17** weiterhin als ein breites Singulett bei 6,35–6,79 ppm (Integral entsprach 2 Protonen) zu beobachten. Für

die Erhaltung der α -Aminocarbonsäurefunktion des GSH sprach ebenfalls die positive Ninhydrinreaktion, derzu folge eine Addition der Aminogruppe an die Doppelbindung auszuschließen war.

Reaktionen mit Lysin

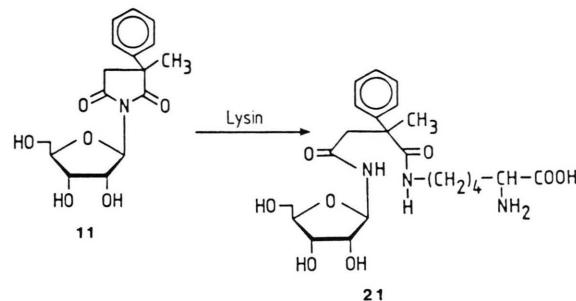
Die Verbindungen **14**, **15** und **16** waren durch Ringöffnungsreaktionen mit Ammoniak zugänglich. In einer analog geführten Reaktion wurde **2** mit Lysin, das sich wegen seiner ϵ -terminalen Aminofunktion als Modellverbindung anbot, umgesetzt. Die stark ausgeprägte Nucleophilie der ϵ -Aminogruppe führt bei **2** ebenfalls zu einer Ringöffnung unter Beibehaltung der Doppelbindung. Im Reaktionsprodukt **19** war NMR-spektroskopisch die eingetretene Ringöffnung eindeutig nachzuweisen. Im ¹³C-NMR-Spektrum von **19** traten zwei Doublets mit unterschiedlicher Lage bei 135,74 ppm und 124,84 ppm für die C-3- bzw. C-4-Atome auf (**2**: 134,11 ppm), die für eine Aufhebung der bei **2** festgestellten Strukturäquivalenz sprachen. Entsprechend dazu lagen im ¹H-NMR-Spektrum die Signale der olefinischen 3-H- bzw. 4-H-Protonen nicht mehr als Singulett vor, sondern als Multiplett bei 5,83–6,26 ppm. Die für das ringoffene **19** typischen zwei NH-Protonen der neu entstandenen sekundären Amidfunktionen wurden als Multiplett bei 8,60–9,50 ppm beobachtet.



	R ₁	R ₂
2	CH ₃	19
5		20

Die Umsetzung von **5** zu **20** erfolgte analog. Im ¹H-NMR-Spektrum des Nucleosids **20** traten die olefinischen 3-H- bzw. 4-H-Protonen ebenfalls wie bei **19** nicht als Singulett, sondern als Quartett eines Zweispinsystems des Typs AB bei 5,54–6,12 ppm

mit einer Kopplungskonstante $J_{3,4} = 13,3$ Hz auf, die eine *cis*-Konfiguration anzeigen. Die durch Ringöffnung bewirkte Ausbildung von zwei sekundären Amidfunktionen wurde durch Vorliegen eines Triplets bei 9,10 ppm ($J_{\text{NH},\text{CH}_2} = 5,1$ Hz) sowie eines Doublets bei 9,62 ppm ($J_{\text{NH},1'} = 8,4$ Hz) für die entsprechenden NH-Protonen bewiesen. Ein nucleophiler Angriff der α -Aminogruppe konnte ausgeschlossen werden, da andernfalls die sekundären Amidfunktionen mit zwei Doublets für die NH-Protonen hätten auftreten müssen. Für die unveränderte α -Aminocarbonsäuregruppe in **19** und **20** sprach außerdem der positive Ninhydrin-nachweis.



11 wurde mit 1,3 Äquivalenten Lysin zum ringoffenen Nucleosid **21** umgesetzt. Im ^1H -NMR-Spektrum von **21** waren die NH-Protonen der beiden sekundären Amidfunktionen als Multipletts bei

8,93–8,96 ppm sowie 8,78–8,82 ppm zu beobachten. Die chemische Verschiebung des Singulets der 3-H-Methylenprotonen trat wegen der Ringöffnung um ca. 0,35 ppm hochfeldverschoben gegenüber der Ausgangsverbindung **11** bei 2,67 ppm auf. Aufgrund des $+M$ -Effekts der Phenyl- bzw. des $+I$ -Effekts der Methylgruppe ist ein nucleophiler Angriff der ϵ -terminalen Aminogruppe des Lysins auf das elektrophilere C-2-Carbonylkohlenstoffatom der Ausgangsverbindung **11** verständlich. Die positive Ninhydrinreaktion schließt eine Beteiligung der α -Aminogruppe des Lysins an der Umsetzung aus.

Kinetische Untersuchung zur Aminolyse von N-Methylmaleinimid (**2**) und Isoshedomycin (**5**) durch Lysin

Die durch Lysin bewirkte aminolytische Ringöffnung bei den Verbindungen **2** und **5** wurde UV-spektroskopisch verfolgt. Der Umsatz beider Maleinimidderivate wurde mit abnehmendem pH-Wert exponentiell kleiner, wobei das ribosidische Strukturanalogen **5** bei gleichen pH-Werten schneller abgebaut wurde. Bei pH 8,5 wurde der t_{10} -Wert graphisch für **2** mit 3 min und für **5** mit 1,7 min ermittelt (Abb. 1). Dieses Reaktionsverhalten steht im Einklang mit Ergebnissen, die bei der Umsetzung von **3** mit verschiedenen Aminen bzw. Aminosäuren (außer Lysin) gemessen wurden. Bei den verschiede-

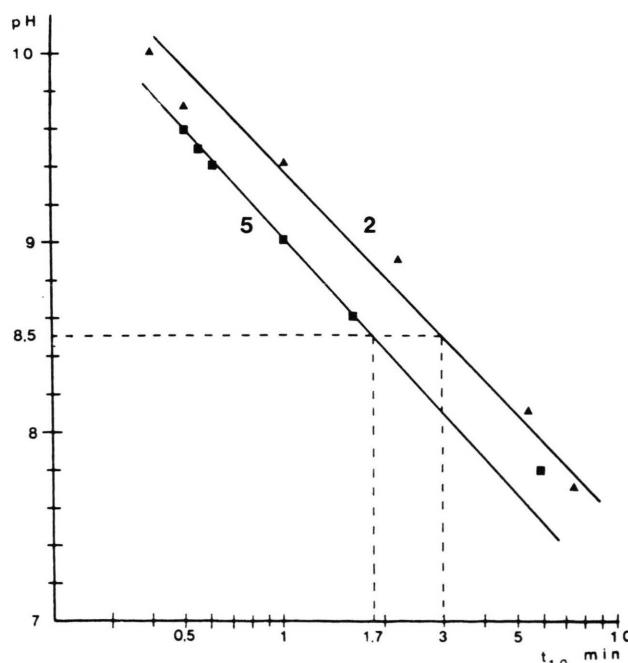


Abb. 1. pH-Wert ($t=0$)-Zeit (t_{10})-Diagramm der durch Lysin bedingten Aminolyse von **2** und **5**. Dazu wurden jeweils 1 μmol von **2** und **5** in 3 ml Wasser gelöst und mit 50 μl einer 2,5 mikromolaren Lysinlösung versetzt, deren pH-Wert vorher durch Zugabe von 6 mol/l HCl eingestellt wurde. Die Messung der für einen 10prozentigen Reaktionsumsatz t_{10} benötigten Zeit erfolgte über die Extinktionsabnahme bei Raumtemperatur in einer Quarzküvette bei $\lambda = 313$ nm. Zur Bestimmung des pH-Wertes bei $t=0$ wurde jeweils ein Parallelansatz vermessen.

nen Aminokomponenten, die im zehnfachen Überschuß zugesetzt wurden, lagen die t_{10} -Werte für NEM 3 bei 1,3–100 min [27].

Der im Vergleich zu 2 um etwa 1,8fache schnellere Abbau von 5 zeigt deutlich, daß die Substitution der Methylgruppe in 2 durch Ribose zu einer höheren aminolytischen Labilität des Lactamringes führt. Eine Ringöffnung durch hydrolytische Nebenreaktionen ist aufgrund der Ausbeute bei der präparativen Umsetzung von 2 und 5 mit Lysin unter den gewählten Reaktionsbedingungen zu vernachlässigen. Die größere Labilität von 5 gegenüber 2 zeigte sich auch bei der hydrolytisch bedingten Ringöffnung im schwach sauren Milieu. Die t_{10} -Werte lagen für 5 mit etwa 10 h und für 2 mit etwa 20 h im Vergleich zur Aminolyse sehr hoch [19a].

Die Modellreaktionen mit GSH und Lysin zeigen insgesamt, daß N-substituierte Maleinimide über zwei bioselektive Molekülzentren verfügen:

- (1) Die Doppelbindung als Ort für die Addition von Thiolgruppen und
- (2) die Lactambindung als Ort für nucleophile Ringöffnungsreaktionen.

Dieses unterschiedliche Reaktionsverhalten gegenüber verschiedenen funktionellen Gruppen kann zu Wechselwirkungen mit spezifischen Aminosäuren bzw. Aminosäureseitenketten in Peptiden und Proteinen genutzt werden. Die größere Labilität des Lactamringes nach Substitution des N-Methylrestes durch Ribose zeigt beispielhaft, daß die Reaktivität N-substituierter Maleinimide gegenüber aminolytischen Umsetzungen modulierbar ist. Darüber hinaus ist durch Einführung eines physiologischen N-Substituenten eine höhere Rezeptoraffinität induzierbar.

Diese durch die vorstehenden Modelluntersuchungen gestützten bioselektiven Eigenschaften erklären die Beobachtungen einer irreversiblen Hemmung von Enzymen des Nucleotidstoffwechsels [8], wobei sowohl eine Thioladdition als auch eine durch nucleophilen Angriff bedingte Ringöffnung des Isoshowdomycin (5) die Ursache sein kann. Entsprechende Untersuchungen mit N-substituierten Succinimiden (9, 11), die im Gegensatz zu den N-Maleinimiden nur noch eine aminolytisch bedingte Ringöffnungsreaktion zeigen, könnten klären, wodurch letztlich die in der Literatur [8] beschriebene irreversible Enzymhemmung besteht. Die von Nicholls und Orton berichteten Arbeiten über die durch Ringöffnung eingeleitete Metabolisierung des Antiepileptikums Methylsuximid [29] stehen in Einklang mit den Ergebnissen unserer Modelluntersuchungen mit den N-substituierten Succinimiden 9 und 11.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen dieser Arbeit, daß vor allem N-substituierte Succinimide als potentielle Reagenzien zur Succinylierung bzw. Glycosuccinylierung von Lysinseitenketten angesehen und durch Variation der Substituenten auf bestimmte Proteinmodifizierungen zugeschnitten werden können.

Dank

Frau Rita Wissmann, Paderborn, danken wir für die Aufnahme der NMR- und Herrn E. Jonk, Paderborn, für die der Massenspektren sowie dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

- [1] A. Witter und H. Tuppy, *Biophys. Biochim. Acta* **45**, 429 (1960).
- [2] T. Miyadera und E. M. Kosower, *J. Med. Chem.* **15**, 534 (1972).
- [3] *Aldrichimica Acta* **4**, 33 (1971).
- [4] G. Guidotti und W. Konigsberg, *J. Biol. Chem.* **239**, 1474 (1964).
- [5] D. G. Smyth, O. O. Blumenfeld und W. Konigsberg, *Biochem. J.* **91**, 589 (1964).
- [6] H. Nishimura, M. Mayama, Y. Komatsu, H. Kato, N. Shimaoka und Y. Tanaka, *J. Antibiotics (Tokyo)* **17A**, 148 (1964).
- [7] S. Matsuura, O. Shiratori und K. Katagiri, *J. Antibiotics (Tokyo)* **17A**, 234 (1964).
- [8] S. Roy-Burman, P. Roy-Burman und D. W. Visser, *Cancer Res.* **28**, 1605 (1968).
- [9] N. Numao, H. Hemmi, S. A. Naujokaitis, M. Rabinovitz und J. A. Beisler, *J. Med. Chem.* **24**, 515 (1981).
- [10] U. Niedballa und H. Vorbrüggen, *Angew. Chemie* **82**, 449 (1970).
- [11] U. Niedballa und H. Vorbrüggen, *J. Org. Chem.* **39**, 3654 (1974).
- [12] H. Vorbrüggen, K. Krolkiewicz und B. Bennua, *Chem. Ber.* **114**, 1234 (1981).
- [13] E. Schlimme, *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 1903.
- [14] H. Vorbrüggen und G. Höfle, *Chem. Ber.* **114**, 1256 (1981).
- [15] G. E. Hilbert und T. B. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **52**, 2001 (1930).
- [16] G. E. Hilbert und T. B. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **52**, 4489 (1930).
- [17] F. W. Lichtenthaler, P. Voss und A. Heerd, *Tetrahedron Lett.* **24**, 2141 (1974).
- [18] H. Frister, Diplomarbeit, Universität-GH-Paderborn (1981).
- [19] a. H. Frister, Dissertation, Universität-GH-Paderborn (1985).
b. H. Frister und E. Schlimme, *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 1704.
- [20] D. H. Marrian, *J. Chem. Soc.* **1949**, 1515.
- [21] E. Roberts und G. Rouser, *Anal. Chem.* **30**, 1291 (1958).
- [22] N. M. Alexander, *Anal. Chem.* **30**, 1292 (1958).
- [23] J. D. Gregory, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 3922 (1955).
- [24] C. C. Lee und E. R. Samuels, *Can. J. Chem.* **42**, 168 (1964).
- [25] D. G. Smyth, A. Nagamatsu und J. S. Fruton, *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 4600 (1960).
- [26] D. G. Smyth und H. Tuppy, *Biochim. Biophys. Acta* **168**, 173 (1968).
- [27] N. E. Sharpless und M. Flavin, *Biochemistry* **5**, 2963 (1966).
- [28] C. A. Miller und L. M. Long, *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 4895 (1951).
- [29] P. J. Nicholls und T. C. Orton, *Br. J. Pharmac.* **45**, 48 (1972).
- [30] Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e. V., Rote Liste 1982.