

Untersuchungen zur Charakterisierung ausgewählter pflanzlicher Inhaltsstoffe aus Pflanzen der Gattung *Allium*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

von Magister für Chemie und Physik Nadya Radeva Dimitrova
geb. am 12.03.1975 in Sliven, Bulgarien

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Promotionskommission: Prof. Dr. Helmut Weiß (Vorsitz)
 Prof. Dr. Dieter Schinzer (Gutachter)
 Prof. Dr. Martin E. Maier (Gutachter)
 Jun.-Prof. Dr. Edgar Haak (Gutachter)

eingereicht am: 04.03.2013
Promotionskolloquium am: 29.05.2013

Für meine Eltern.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des Verbundprojekts InnoRegio-Projekt REPHYNA Sachsen-Anhalt „Untersuchungen zur Entwicklung neuer hochwertiger pflanzlicher Inhaltsstoffe als Rohstoffe für Nahrungsergänzungsmittel, Functional Food sowie Pflegekosmetika“, das die Zielstellung hat, die einheimischen Heil- und Gewürzpflanzen (Gattung *Allium*) als Grundlage für die Herstellung innovativer Produkten zu benutzen.

Der erste Teil der Arbeit befasste sich mit der Isolierung und Strukturaufklärung von biologisch wirksamen Inhaltsstoffen aus frischem Schalottenextrakt (*Allium cepa* var. *Aggregatum*), die nach enzymatischen Reaktionen beim Zerschneiden oder Zerdrücken der Zwiebeln entstehen. Die Isolierung instabiler Primär- und Sekundärmetabolite erfolgte über eine Kombination aus Radial- und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. Die ausgearbeiteten chromatographischen Bedingungen bestätigten die universelle Einsetzbarkeit und die Reproduzierbarkeit der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methoden. Die Strukturaufklärung der Komponenten erfolgte anhand verzahnter Anwendung von NMR, HPLC-MS und HR-MS. Die erhaltenen Ergebnisse beweisen, dass neben *cis*- **33** bzw. *trans*-Zwiebelan **34** ebenfalls Cepaene **27** und **30** als Sekundärmetabolite im frischen Extrakt aus der Sorte *Bonilla* entstanden.

Der zweite Teil stellte die Synthese ausgewählter Thiosulfinate, die als Primärmetabolite in der Literatur beschrieben sind, dar. Die symmetrischen bzw. asymmetrischen gesättigten und α -ungesättigten Thiosulfinate **12**, **13**, [*E*]-, [*Z*]-**14**, [*E*]-, [*Z*]-**16** und **17** wurden nach leicht modifizierten Literaturvorschriften synthetisiert und als Referenzsubstanzen bei der analytischen HPLC verwendet. Die Co-Chromatographie der Naturstoffe mit den Naturstoffanaloga und HPLC-MS beschrieben die Zuordnung der Peaks zu den Thiosulfinaten. Ausgehend von der Komplexität des Extraktes trug die Strukturaufklärung isolierter Inhaltsstoffe aus den einzelnen Extraktfraktionen bzw. der Referenzsubstanzen auch dazu bei.

Die biologisch wirksamen Komponenten wurden qualitativ und quantitativ bestimmt.

Im weiteren wurden Dimethyl- **12** und Dipropylthiosulfinat **13** bezüglich ihrer immunmodulatorischen Potenz untersucht.

Der dritte Teil beschäftigte sich mit dem Versuch, einen effizienten Zugang zu 2,3-substituierten 1,4-bis-Acylsilanen **62a** und **64a** zu erarbeiten. Die Dethioketalisierung, Silylierung und direkte Thionierung von 2,3-substituierten Bernsteinsäure-Derivaten verliefen mit Schwierigkeiten. Acylsilan **66** isomerisierte ungewöhnlich zu seinem Diastereomer **72** bei Thionierung unter milden Bedingungen. Die Thionierung von Diweinrebamid **67** mit HMDST lieferte Thioamid **68**. Diese Studien können als grundlegende Vorversuche zur Synthese der biologisch wirksamen

Naturstoffe *cis*- und *trans*-Zwiebelan, welche die Thromboxan-B₂-Biosynthese im humanen plättchenreichen Plasma hemmen, sein.

Schlagwörter: Schalotten (*Allium cepa* var. *Aggregatum*); Cypaene; Zwiebelane; Thiosulfinate; Radialchromatographie; präparative HPLC; HPLC-MS; NMR; Acylsilane; Thionierung; HMDST

Abstract

The present work was part of the InnoRegio joint project REPHYNA Saxony-Anhalt "Studies on the development of new high quality herbal ingredients as raw materials for dietary supplements, functional foods and care cosmetics". The objective of the project was to use the native medicinal and spice plants (genus *Allium*) as basis for the manufacture of innovative products.

The first part of this thesis was focused on an isolation and a structure elucidation of biologically active ingredients from fresh shallots extract (*Allium cepa* var. *Aggregatum*). These flavour ingredients are formed by enzymatic reactions upon cutting or crushing the onions. The isolation of unstable primary and secondary metabolites was carried out by a combination of radial and high performance liquid chromatography. Elaborated chromatographic conditions confirmed the universal applicability and reproducibility of the methods, which were developed and validated in the present work. The structure elucidation of natural compounds was obtained using the spectroscopic methods such as NMR, HPLC-MS and HR-MS. Cepaenes **27** and **30** as secondary metabolites were isolated from shallots extract (variety *Bonilla*). *Cis*-**33** and *trans*-Zwiebelane **34** were identified as well.

In the second part the syntheses of selected thiosulfinates were described, which are known as primary metabolites. The symmetrical and asymmetrical saturated and α -unsaturated thiosulfinates **12**, **13**, [*E*]-, [*Z*]-**14**, [*E*]-, [*Z*]-**16** and **17** were synthesized applying slightly modified literature procedures and used as reference compounds in analytical HPLC.

Identification of the thiosulfinates from *Bonilla* extract was achieved by comparison with synthetic standards. Because of the complexity of the extract it was additionally verified by structure elucidation of the individual isolated natural compounds and the reference substances. Biologically active ingredients were determined qualitatively and quantitatively.

In addition, the immunomodulatory potency of dimethyl-**12** and dipropylthiosulfinate **13** was investigated.

Finally, the elaboration of an efficient access to 2,3- substituted 1,4-bis(acylsilanes) **62a** and **64a** using dethioetalisation, silylation and direct thionation of 2,3-substituted succinic acid derivatives was proceeded with difficulties. An unusual isomerisation of acylsilan **66** into his diastereomer **72** was observed under mild thionation conditions. Thioamid **68** was synthesized by the thionation of bis(weinrebamide) **67** with HMDST under the catalytic activity of $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. These studies can be used as preliminary synthesis of the biologically active natural products *cis*- and *trans*-Zwiebelane, which inhibit the thromboxane- B_2 biosynthesis in human platelet rich plasma.

Keywords: shallots (*Allium cepa* var. *Aggregatum*); cepaenes; zwibelanes; thiosulfinates; radial chromatography; preparative HPLC; HPLC-MS; NMR; acylsilanes; thionation; HMDST

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 2003 bis 2008 während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Chemischen Institut der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. D. Schinzer danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Möglichkeit zur selbstständigen wissenschaftlichen Arbeit und die jederzeit freundliche Unterstützung bei deren Durchführung.

Zu großem Dank bin ich den Kooperationspartnern LUS GmbH und IMTM GmbH innerhalb des Verbundprojekts InnoRegio-Projekt REPHYNA verpflichtet, insbesondere Herrn Dr. L. Lücke, Frau Dr. A.-M. Lücke für die Bereitstellung der *Allium*-Extrakte und ihre Diskussionsbereitschaft. Frau Dr. E. Tennert danke ich für die biologische Evaluierung der synthetischen Naturstoffanaloga.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Schinzer danke ich für die herzliche Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt Olga Krug, Muharram, Andrew Goss, Martin Cordes, Dagmar Franke, Friedrich Stuhlmann, Jörg Moritz, Stefanie Berger, Edgar Haak, Meta Adityawarman, Zahid Iqbal, Kumeneger Belayneh, Lars Michaelis und Elvira Vorster.

Für die Ermittlung der spektroskopischen und analytischen Daten möchte ich mich bei Frau Dr. L. Hilfert (NMR), Frau I. Sauer (NMR, IR, UV/Vis), Frau A. Gädicke (NMR), Frau Dr. S. Busse (MS, HRMS), Frau S. Preiß (MS, HRMS, Elementanalyse), Frau U. Gutknecht (IR, UV/Vis) und Frau C. Jäger (Elementanalyse) bedanken. Außerdem danke ich Frau Ch. Knoche sowie Herrn J. Krüger (Chemikalienlager) und Herrn B. Köwel (glastechnische Werkstatt).

Allen Mitarbeitern des Chemischen Instituts der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg danke ich für die freundliche Aufnahme und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft.

Bei Oliver Böhm, Jörg Moritz, Mandy Merker und Anja Nussner möchte ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Allen meinen Freunden danke ich, dass sie immer für mich da waren.

Dem BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung), dem Bundesland Sachsen-Anhalt und dem DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Mein herzlicher Dank gilt Teo, meiner Familie, meinem Bruder und meiner Großeltern für die grenzenlose und vielfältige Unterstützung.

Abkürzungsverzeichnis

α	Trennfaktor
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
c	Konzentration
CAN	Cer(IV)-ammoniumnitrat
CO ₂ -SFE	überkritische Kohlenstoffdioxid-Extraktion
COSY	Correlation Spectroscopy
CS	Cysteinsulfoxid
Δ	Wärmezufuhr
d	Tag
DC	Dünnschichtchromatographie
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMP	Dess-Martin-Periodinan
DMPU	N,N-Dimethyl-N,N-trimethylenharnstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EI	Elektronenstoßionisation
eq	stöchiometrisches Äquivalent
Et	Ethyl
EtOAc	Ethylacetat
ES-API	Elektrospray-Ionisation bei Atmosphärendruck
F	Fraktion
g	Gramm
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMDST	Hexamethyldisilathian
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz

IBX	2-Iodoxybenzoesäure
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IgE	Immunglobulin Klasse E
IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante
kDa	Kilodalton
Ko	Kontrolle
L	Liter
LAH	Lithiumaluminiumhydrid
LC	Flüssigkeitschromatographie
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
Li	Lithium
LR	Lawesson-Reagenz
M	Mol, Molar
M ⁺	Molekülion
<i>m</i> CPBA	meta-Chlorperbenzoesäure
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Milimeter
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrum
MsCl	Methansulfonsäurechlorid
MW	Mittelwert
μl	Mikroliter
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
<i>n</i> -BuLi	Butyllithium
NBS	N-Bromsuccinimid
NMR	Kernmagnetische Resonanz
NOE	Kern-Overhauser-Effekt
NOESY	zweidimensionale homonukleare Kern-Overhauser-Spektren
NP	Normalphase

Abkürzungsverzeichnis

p	Signifikanz
PC	Personal Computer
Ph	Phenyl
PTFE	Polytetrafluoroethylen
Py	Pyridin
R _f	Retentionsfaktor
Reflux	unter Refluxieren erhitzen
RP	Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
Si	Silicium
Smp	Schmelzpunkt
TEA	Triethylamin
Tf	Trifluormethansulfonat
THF	Tetrahydrofuran
TMEDA	Tetramethylethyldiamin
TMS	Trimethylsilyl
<i>t_R</i>	Retentionszeit
UV	Ultraviolett-Spektroskopie
UV/VIS	Ultraviolett-Visible-Spektroskopie

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Gattung <i>Allium</i> L.....	1
1.2	<i>Allium cepa</i> var. <i>Aggregatum</i> , eine Untergruppe der <i>Allium cepa</i> L.....	2
1.3	Pharmazeutische Bedeutung der Gattung <i>Allium</i> L.....	2
1.3.1	Heilpflanzen aus der uralten Volksmedizin.....	2
1.3.2	<i>Allium</i> -Arten als Phytopharmaka	3
1.4	Nebenwirkungen der <i>Allium</i> -Gewächse.....	4
1.5	Abweisung von Tieren und Insekten durch <i>Allium</i> -Pflanzen und schwefelhaltigen Verbindungen	4
1.6	Schwefelhaltige Inhaltsstoffe in Pflanzen der Gattung <i>Allium</i> L.....	5
1.6.1	Cysteinsulfoxide.....	5
1.6.2	Die Alliinase-Reaktion.....	6
1.6.3	Enzym Tränenfaktor-Synthase	8
1.6.4	Primäre Aromakomponenten.....	9
1.6.4.1	Primäre Aromakomponenten im Schalottenextrakt nach Block.....	12
1.6.5	Der tränenreizende Faktor	13
1.6.6	Sekundäre Aromakomponenten	15
1.6.6.1	Isolierung und Bildungsmechanismus der Cepaene.....	15
1.6.6.2	Erste Diskussionen über Identifizierung von <i>cis-/trans</i> -Cepaen 27	20
1.6.6.3	Synthese von [<i>E</i>]-1-Propenyl-1-(propylsulfinyl)propyldisulfid nach Block	21
1.6.6.4	Zwiebelane.....	21
1.6.6.5	Synthese der Zwiebelane nach Block.....	24
1.6.6.6	Das Bissulfin: (<i>Z,Z</i>)-(±)-2,3-Dimethylbutandithial S,S'-Dioxid	26
1.6.6.7	Die Deoxycepaene.....	26
1.7	γ -Glutamyl-Cysteinsulfoxide	27
1.8	Selenverbindungen.....	27
1.9	Weitere wirksame Inhaltsstoffe der Arten der Gattung <i>Allium</i> L.	28
1.9.1	Phenole und Flavonoide	28
1.9.2	Neuartige Proteine	29
1.9.3	Fruktane.....	29
1.9.4	Steroidsaponine	30
1.9.5	Vitamine, Mineralstoffe und biologische Elektrolyte	30
1.9.6	Wasser.....	30
1.10	Einsatz chromatographischer Trennverfahren bei der Isolierung von Naturstoffen.....	31
1.11	Flüssigkeitschromatographie	31

1.11.1	Prinzip der linearen Adsorptionschromatographie	32
1.11.2	Phasensystem in der Adsorptionschromatographie	35
1.11.3	Lösungsmittelgradienten.....	36
1.11.4	Kalibrierung des UV-Detektors	37
1.11.5	Präparative (nichtlineare) Chromatographie.....	38
1.12	Die Radialchromatographie	40
2	Thematik und Aufgabenstellung	41
2.1	Thematik.....	41
2.2	Untersuchungen der biologischen Aktivität von <i>Allium cepa</i> var. <i>Aggregatum</i>	41
2.3	Aufgabenstellung.....	42
3	Theoretischer Teil.....	44
3.1	Isolierung und Strukturaufklärung von Aromakomponenten aus Schalotten (<i>Allium cepa</i> var. <i>Aggregatum</i>).....	44
3.1.1	Gesättigte und ungesättigte Thiosulfinate	44
3.1.2	Zwiebelane	44
3.1.3	Cepaene	45
3.1.3.1	<i>trans, trans</i> -1-(1-Propenyldisulfanylpropan-1-sulfinyl)propen 30.....	45
3.1.3.1.1	MS-Fragmentierung.....	46
3.1.3.1.2	Strukturaufklärung mittels NMR.....	46
3.1.3.2	<i>cis</i> -1-[1-(Propan-1-sulfinyl)propyl]disulfanyl]propen 27, ein neu isolierter Naturstoff der Cepaen-Familie	48
3.1.3.2.1	MS-Fragmentierung.....	49
3.1.3.2.2	Strukturaufklärung mittels NMR.....	49
3.2	Quantitative Bestimmung des frischen Schalottenextraktes.....	52
3.3	Qualitative Bestimmung eines Extraktes aus Bärlauch (<i>Allium ursinum</i> L.)	53
3.4	Synthese von Referenzsubstanzen.....	55
3.4.1	Monooxidation von symmetrischen Disulfiden.....	55
3.4.2	Symmetrische und asymmetrische Thiosulfonsäure-S-alkylester	56
3.4.2.1	Darstellung von Dimethylthiosulfonat.....	57
3.4.2.2	Darstellung von S-Propylmethanthiosulfonat.....	58
3.4.3	Ausgewählte α -ungesättigte Thiosulfinate.....	58
3.4.3.1	Darstellung von S-[<i>E</i>]- und S-[<i>Z</i>]-1-Propenylpropylsulfid	58
3.4.3.2	Darstellung von S-[<i>E</i>]- und S-[<i>Z</i>]-1-Propenylmethylthiosulfinat, S-[<i>E</i>]- und S-[<i>Z</i>]- 1-Propenylpropylthiosulfinat und S-Propyl-1-Propenylthiosulfinat.....	59
3.5	Retrosynthetische Analyse des <i>trans</i> -Zwiebelans.....	61
3.6	Synthese von 1,4-bis-Acylsilane nach Saleur.....	62

3.7	Strategien zur Synthese des 1,4-bis-Acylsilans 62a und 64a.....	63
3.8	Synthese des 1,4-bis-Acylsilans 62a und 64a.....	64
3.8.1	Dethioketalisierung von bis-Dithian 62	64
3.8.2	Silylierung von bis-Morpholinamid 64	68
3.8.3	Silylierung von bis-Weinrebamid 67	71
3.9	Thionierung von 1,4-Dicarbonylverbindungen	72
3.9.1	Reaktion mit Lawesson-Reagenz	75
3.9.2	Reaktion mit Hexamethyldisilathian	76
3.9.2.1	Synthese von Thioamid 68	76
3.9.2.2	Darstellung der Reaktion mit bis-Morpholinamid 64	78
3.9.2.3	Isomerisierung von Acylsilan 66	78
4	Zusammenfassung, Ausblick und biologische Evaluierung.....	80
4.1	Zusammenfassung	80
4.2	Ausblick	82
4.3	Biologische Evaluierung	83
4.3.1	Proliferationsgrad.....	83
4.3.2	Histaminrelease	85
4.3.3	Aktivierungsgrad basophiler Granulozyten	86
5	Experimenteller Teil.....	87
5.1	Chromatographisches System.....	87
5.1.1	Analytisches HPLC-Anlage.....	87
5.1.2	Präparative HPLC-Anlage	88
5.1.3	Das Chromatotron	89
5.2	Allgemeine Arbeitstechniken	91
5.3	Extraktauftrennung des frischen Schalottenextraktes	94
5.3.1	Fraktionierung mittels Chromatotron	94
5.3.2	Normalphasen- und Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie	94
5.3.3	Qualitative Analyse	95
5.3.4	Kalibrierung des UV-Detektors mit einem Benzylalkohol-Standard.....	96
5.3.5	Qualitative Bestimmung der synthetischen Substanzen.....	97
5.3.6	Präparative Trennung	98
5.3.7	Semipräparative Aufreinigung	99
5.3.8	HPLC-MS-Einstellungen für die Analyse von Cepaenen.....	100
5.4	Physikalische Daten der isolierten Verbindungen .. Fehler! Textmarke nicht definiert.	
5.4.1	Cepaene	101

5.4.2	Zwiebelane	104
5.5	Beschreibung der Versuche	105
5.5.1	Versuche zu Kapitel 3.3.1	105
5.5.2	Versuche zu Kapitel 3.3.2	107
5.5.3	Versuche zu Kapitel 3.7.1	119
5.5.4	Versuche zu Kapitel 3.7.2	121
5.5.5	Versuche zu Kapitel 3.8.2	128
6	Literaturverzeichnis	131

Anhang

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Allium* L.

Die Gattung *Allium* L. umfasst derzeit etwa 850 Arten^[1, 3] und zählt zu einer der größten Gruppen der einkeimblättrigen Pflanzen. Die Spezies sind meistens anspruchslose krautige Pflanzen, die nicht nur in der gesamten nördlichen Hemisphäre, sondern auch in trockenen Gebieten, beheimatet sind. Wirtschaftlich gehören zu der Gattung sehr wichtige Gewürz- und Gemüsepflanzen (Zwiebel, Schalotten- *Allium cepa* L., Knoblauch- *Allium sativum* L., Winterzwiebel- *Allium fistulosum* L., Schnittlauch- *Allium schoenoprasum* L., Porree- *Allium porrum* L., Chinesischer Schnittlauch- *Allium tuberosum* L.), die auch in subtropischen Klimazonen zu den bedeutendsten Feld- und Gartenkulturen zählen. Weitere Arten mit ihrem sehr auffallenden Habitus, großen Blättern und Blütenständen werden bereits seit Jahren als Zierpflanzen in europäischen und nordamerikanischen Ziergärten genutzt.^[2]

Im Laufe der Jahre wurde die natürliche Verwandtschaft vieler *Allium*-Arten aufgeklärt, wobei verschiedene Klassifikationen der gesamten Gattung veröffentlicht wurden. Die aktuelle Einteilung der Arten in 15 Untergattungen und 72 Sektionen von Friesen *et al.*^[3] basiert auf phylogenetischen Untersuchungen, durch Sequenzierung des *internal transcribed spacer* (ITS) der nuklearen ribosomalen Desoxyribonukleinsäure (DNS). Die phylogenetische Systematik der Gattung *Allium* ist in Abbildung 1 wiedergegeben.^[1, 2, 5, 7]

1. Klasse *Liliopsida*.
2. Unterklasse *Lilidae*.
3. Superordnung *Lilianaes*.
4. Ordnung *Asparagales*.
5. Familie *Amaryllidaceae*.
6. Unterfamilie *Allioideae*.
7. Tribus *Allieae*.
8. Gattung *Allium*.

Abbildung 1: Phylogenetische Systematik der Gattung *Allium* L.^[1, 2, 5, 6]

Nach Block *et al.*^[4] könnte der botanische Name *Allium* von dem keltischen Wort „*all*“ abgeleitet werden, das „stechend, scharf“ bedeutet.

Zwiebeln (*Allium cepa* L.) und Knoblauch (*Allium sativum* L.) gehören zu den ältesten Kulturpflanzen der Amaryllidaceae. Ihren Ursprung^[4] haben sie in den Wüstengebieten Zentralasiens.

1.2 *Allium cepa* var. *Aggregatum*, eine Untergruppe der *Allium cepa* L.

Lange Zeit wurden die Schalotten als eigenständige Pflanzenart mit dem botanischen Namen *Allium ascalonicum* L. angesehen. Derzeit werden sie nur noch als Teil der "*Allium cepa* *Aggregatum*"-Gruppe zugeführt.^[3]

Schalotten (*Allium cepa* var. *Aggregatum*) sind aus den Zwiebeln kultiviert und weltweit verbreitet. Aufgrund ihres besonderen Aromas sind sie in Europa und in den Vereinigten Staaten sehr beliebt.^[6] Wegen ihrer vegetativen Vermehrung und kurzen Wachstumsphase werden sie als Ersatz den Zwiebeln in tropischen Gebieten eingesetzt.^[6, 8] Schalotten sind birnenförmigen Zwiebeln mit goldbrauner bis rosaroter Färbung. Die Schalottenpflanzen unterscheiden sich von Zwiebelpflanzen durch ihre schmalen Blätter und kurzen Blütenstandstiele.^[6]

Schalotten, der *Aggregatum* Typ der *Allium cepa* L., wurden in dieser Arbeit untersucht. Aufgrund ihrer genetischen Ähnlichkeit mit den Zwiebeln wurde die Chemie der natürlich vorkommenden Organoschwefelverbindungen, die in *Allium cepa* L. bereits nachgewiesen werden konnten, hauptsächlich diskutiert. Die nicht-schwefelhaltigen Inhaltsstoffe wurden als weitere wirksame Komponenten kurz dargestellt.

1.3 Pharmazeutische Bedeutung der Gattung *Allium* L.

1.3.1 Heilpflanzen aus der uralten Volksmedizin

Seit Jahrtausenden finden Zwiebeln (*Allium cepa* L.) und Knoblauch (*Allium sativum* L.) eine enorme Anwendung nicht nur als Gewürz und Nahrungsmittel, sondern auch als Bestandteil der Volksmedizin. Im „Papyrus Ebers“ aus der Zeit um 1550 vor Christus sind über 800 Rezepturen gegen eine Vielzahl an Erkrankungen wie Herzprobleme, Kopfschmerzen, Insektenstiche, Schwellungen und Würmer dokumentiert, wobei der Knoblauch als ein wirkungsvolles Mittel beschrieben wurde.^[4]

Nicht nur der medizinische Papyrus aus dem alten Ägypten beschreibt die Heilwirkung der Pflanzen, sondern auch der römische Naturphilosoph Plinius der Ältere, therapeutische Anwendungen für Knoblauch und Zwiebeln einführte. Auch Aristoteles, Hippokrates und Aristophanes empfahlen den Knoblauch mit seiner heilkräftigen Wirkung. Während der ersten Olympiade in Griechenland nahmen die Athleten Knoblauch als Anregungsmittel. In Indien benutzte man eine antiseptische Schüttelmischung aus Knoblauch für Heilung von Wunden und Schwellungen, und von der traditionellen chinesischen Medizin wurde Zwiebel-Tee seit alters her gegen Fieber, Kopfschmerzen, Cholera und bakterielle Infektion des Dickdarmes empfohlen.^[4]

1.3.2 *Allium*-Arten als Phytopharmaka

Über ein Jahrhundert lang haben die Forscher die Wirksamkeit der Extrakte und Öle aus *Allium*-Pflanzen untersucht und herausgefunden, dass Flavonoide, Steroidsaponine, Proteine, verschiedenste Vitamine und vor allem auch die niedermolekularen Organoschwefelverbindungen für die vielfältigen pharmazeutischen Eigenschaften der Gattung *Allium* verantwortlich sind.^[4, 9-11] Besonders hervorzuheben sind die Thiosulfinate, α -Sulfinyldisulfide, zyklische Disulfidverbindungen, sowie Di- und Polysulfide.

Die breite biologische Aktivität der Zwiebel- und Knoblauchextrakte ist bereits in zahlreichen Studien beschrieben. Sie umfasst u.a. die Behandlung von kardiovaskulären, bronchialen und diabetischen Erkrankungen. Die Extrakte wirken antimikrobiell, antioxidativ, antikarzinogen, antimutagen und immunmodulatorisch. Einige Pflanzen verfügen über Antiangiogenese-Eigenschaften.^[12, 13]

In den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden die asthmaprotektiven und entzündungshemmenden Wirkungen der frischen Zwiebelextrakte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Diese Wirkungen wurden den Thiosulfinaten **13**, **14** bzw. **16** und Cepaenen **13** - **21** zugeschrieben^[14, 15], wobei die Zwiebelane **33/34** die Thromboxan-B₂-Biosynthese im humanen plättchenreichen Plasma^[14] hemmten. Für die thrombozytenaggregationshemmenden Eigenschaften der Zwiebel- und Knoblauchextrakte wurden neben Adenosin auch die Thiosulfinate und Diallyldisulfide verantwortlich gemacht.^[16] Die lipidsenkenden und fibrinolytischen Effekte konnten für Knoblauch in zahlreichen Studien bewiesen werden. Allicin **60**, die instabile Substanz des Knoblauchs, wirkt antibiotisch, fungizid, insektizid und antiparasitär.^[17, 18] Ajoen, das stabile Umwandlungsprodukt des Allicins, zeigt auch eine breitere biologische Aktivität und besitzt u.a. antithrombotische, antifungale, antibakterielle; und eine

Antikrebs-Wirkung.^[19] Schalottenextrakte hemmen die Freisetzung von Histamin und reduzieren die allergische Reaktion bei Insektenstichen.^[20]

Die tumorprotektive Wirkung der *Allium*-Arten wurde immer mehr diskutiert, wobei für die Diallyldisulfide eine Wirkung auf Phase-II-Enzyme und eine antigenotoxische Aktivität in HepG2 Zellen nachgewiesen werden konnte.^[21]

Zwiebel- und Knoblauchpräparate haben heute einen hohen Stellenwert als Arzneipflanzen am gesamten phytopharmazeutischen und homöopathischen Markt. Mit Zwiebelsalben und -cremes (Gele) können u.a. Hautverletzungen und Narben in leichten Fällen behandelt werden. Als Nahrungsergänzungsmittel können die Zwiebelpräparate gegen Appetitlosigkeit verwendet werden. Knoblauchdragées und Knoblauch-Kapseln unterstützen diabetische Maßnahmen bei erhöhten Blutfettwerten und beugen der altersbedingten Blutgefäß-Veränderungen sowie der allgemeinen Blutgefäßverkalkung vor.

1.4 Nebenwirkungen der *Allium*-Gewächse

Der Verzehr von frischen *Allium*-Pflanzen verursacht den charakteristischen Mund- und Schweißgeruch bei Menschen. Beim Zerschneiden, Zerdrücken oder Konsumieren von rohen Zwiebeln tritt seine unerwünschte tränenreizende Wirkung auf. Das Essen der rohen Zwiebel kann zum Effekt des Magensäure-Rücklaufs^[22], dem so genannten "Sodbrennen", führen. Einige Individuen können allergisch mit Dermatitis und Asthma auf Knoblauch, Knoblauch-Pollen und Zwiebel reagieren.^[23]

1.5 Abweisung von Tieren und Insekten durch *Allium*-Pflanzen und schwefelhaltigen Verbindungen

Die *Allium*-Gewächse schützen andere Kulturpflanzen gegen Krankheiten und Schädlinge.^[24, 25] Di- und Trisulfide, die aus dem Knoblauch stammen, wirken in geringen Konzentrationen toxisch gegen Mücken und Insektenlarven, sowie abwehrend auf Zecken.^[9] Nach Brewster *et al.* spielen die schwefelhaltigen Verbindungen eine Rolle als Schutzmittel gegen Weidetiere, einige Pilze und Bakterien.^[26] Amin *et al.* konnte die antifungale und antimikrobielle Wirksamkeit von Schalottenextrakten nachweisen. Gegen *Aureobasidium pullulans* und *Microsporium gypseum* haben die Schalotten eine minimale inhibitorische Konzentration (MIC) von 0.15 mg/ml. Eine inhibitorische Wirkung^[27] gegen *Bacillus cereus* konnte mit einer MIC von 5 mg/ml gezeigt werden.

1.6 Schwefelhaltige Inhaltsstoffe in Pflanzen der Gattung *Allium* L.

Die Pflanzen der Gattung *Allium* sind reich an bioaktiven Inhaltsstoffen wie Cysteinsulfoxide, Thiosulfinate und strukturell verwandte Verbindungen, daneben kommen noch Fruktane^[28], Saponine^[29], Flavonoide^[30], Proteine^[31, 32], Vitamine und Mineralien^[18, 30, 33] sowie beachtliche Mengen Organoselenverbindungen^[9, 34] vor.

Die schwefelhaltigen Verbindungen sind von besonderer Bedeutung für die Gattung *Allium*. Der einzigartige Geruch und Geschmack und die pharmazeutische Wirkung der einzelnen Arten beruhen auf den Primär- und Sekundärmetaboliten. Diese können durch Alliinase-Reaktion bzw. das Enzym Tränenfaktor-Synthase aus den Cysteinsulfoxiden und den korrespondierenden γ -Glutamylpeptiden biosynthetisiert werden.

Die *Allium*-Pflanzen bestehen zu 1-5% ihres Trockengewichts aus Sekundärmetaboliten der nicht-proteinogenen schwefelhaltigen Aminosäuren.^[9]

Die Zusammensetzung und die Konzentration der bioaktiven Inhaltsstoffe hängen von dem genetischen Faktor und Umweltbedingungen, wie Temperatur^[35], Schwefel-, Stickstoff- und Selengehalt in den Böden^[34, 36], Bewässerung der Gewächse während der Vegetationsphase^[37], ab. Viele biochemische und physikalische Veränderungen der intakten Pflanzen, die unter Lagerbedingungen nach der Ernte auftreten, bestimmen zusätzlich die gesundheitsfördernden Eigenschaften dieser Gattung.^[8]

1.6.1 Cysteinsulfoxide

Die Cysteinsulfoxide, die sich von der Aminosäure Cystein ableiten, sind die wichtigsten Vertreter der schwefelhaltigen Verbindungen in den Pflanzen der Gattung *Allium*. Diese Aminosäuren unterscheiden sich in der Art der Alk(en)ylketten, die über ein oxidiertes Schwefelatom mit einem α -Aminosäurerest verbunden sind. Die Isolierung des ersten Cysteinsulfoxid Alliin **4**^[10] aus den *Allium*-Gewächsen gelang Stoll und Seebeck in den vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts. Alliin **4** ist die stabile Vorstufe von Cavallitos^[11] antibakteriellem Inhaltsstoff des Knoblauchs, dem Allicin **10**.

Alk(en)ylcysteinsulfoxide sind die Geruchs- und Geschmacksvorstufen in den enzymatischen Reaktionen. Ihre Zusammensetzung sowie Konzentration im Cytoplasma der intakten Zellen bestimmen die sensorischen Eigenschaften der einzelnen *Allium*-Arten.

Vier *L*-Cysteinsulfoxide kommen am häufigsten in den *Allium*-Pflanzen vor: (+)-*S*-Methyl-*L*-Cysteinsulfoxid (Methiin) **1**, (+)-*S*-Propyl-*L*-Cysteinsulfoxid (Propiin) **2**, (+)-*S*-(1-Propenyl)-*L*-Cysteinsulfoxid (Isoalliin) **3** und (+)-*S*-(2-Propenyl)-*L*-Cysteinsulfoxid (Alliin) **4**.^[8, 38] In Abbildung 2 sind die Strukturen von Methiin, Propiin, Isoalliin und Alliin wiedergegeben.

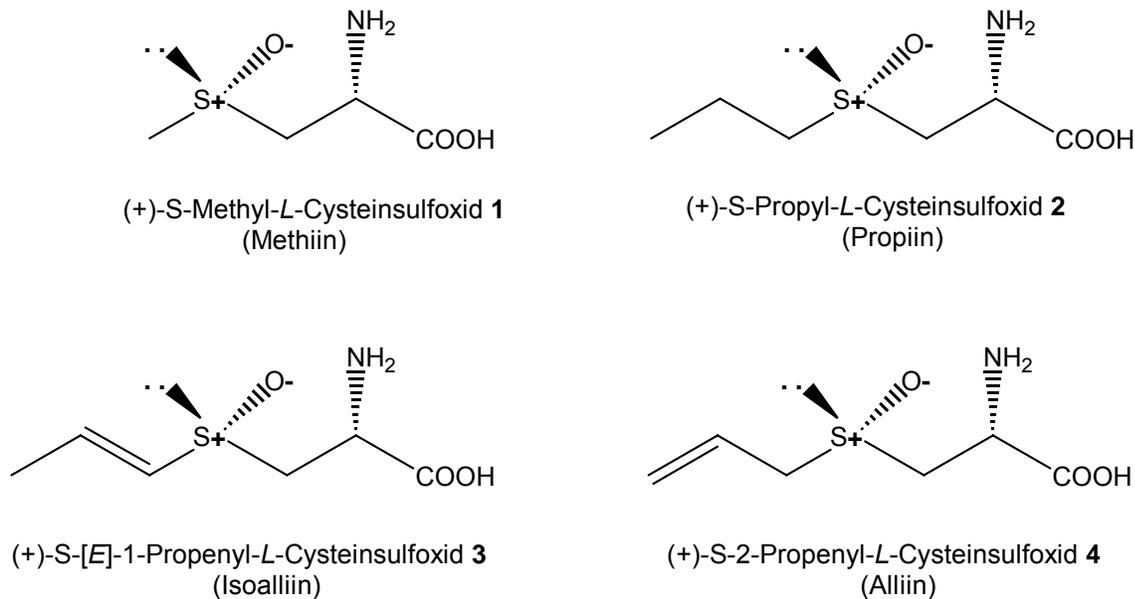


Abbildung 2: Nachgewiesene Cysteinsulfoxide in Pflanzen der Gattung *Allium*.

Methiin konnte aus Zwiebeln, Porree, Schalotten und Knoblauch isoliert werden.^[18] Isoalliin kommt vorwiegend in Zwiebeln und Schalotten vor, wobei Alliin hauptsächlich in Knoblauch zu finden ist. Der Propiin-Gehalt in Schalotten beträgt über 10%. Im Vergleich mit anderen *Allium*-Arten haben die Schalotten niedrige Konzentrationen an Isoalliin. Allgemein konnten in Schalotten und Porree nur geringe Mengen an Cysteinsulfoxiden nachgewiesen werden.^[8]

In den letzten 15 Jahren konnten weitere Cysteinsulfoxide in *Allium*-Arten in sehr niedrigen Konzentrationen isoliert werden. So gelang der Arbeitsgruppe um Kubec^[39] die Struktur- aufklärung von Ethiin, Butiin, Marasmin und Petiveriin.

1.6.2 Die Alliinase-Reaktion

Das Enzym Alliinase ist das wichtigste und am meisten untersuchte Enzym der Gattung *Allium*. Alliinase wurde zuerst von Stoll und Seebeck^[10] 1949 aus *Allium sativum* L. isoliert. Nach

Lancaster *et al.*^[40] ist es vermutlich in allen *Allium*-Pflanzen enthalten. Alliinase [EC 4.4.1.4] gehört zur Familie der CS-Lyasen.^[41] Nach Kuettnner *et al.*^[42] handelt es sich um ein homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 103 kDa. Jede Untereinheit ist aus 448 Aminosäuren aufgebaut und mit einem Coenzym Pyridoxal-5'-Phosphat nicht-kovalent gebunden. Das Enzym weist eine maximale Aktivität im neutralen pH-Bereich (pH 7 - pH 7.5) mit dem Temperaturoptimum oberhalb von 36 °C auf. Die höchste Substratspezifität besteht für Alliin **4** und Isoalliin **3**.^[43, 7]

Allium-Alliinase katalysiert die Umwandlung verschiedener Cysteinsulfoxide zu hochreaktiven Organoschwefelverbindungen, die für das typische *Allium*-Aroma verantwortlich sind.

In den intakten Zellen befinden sich die (+)-S-Alk(en)yl-L-Cysteinsulfoxide **1** - **4** im Cytoplasma.^[44] Beim Zerschneiden bzw. Zerdrücken oder bei der Beschädigung der Pflanzen durch Bakterien und Pilze wird die Alliinase aus den Vakuolen freigesetzt.^[45] Nach einer α,β -Eliminierung werden die Cysteinsulfoxide von der Alliinase zu instabilen Alk(en)ylsulfensäuren **5** - **8**, Brenztraubensäure und Ammoniak hydrolysiert. Die instabilen Alk(en)ylsulfensäuren reagieren spontan zu primären Aromakomponenten wie Alk(en)ylthiosulfinaten und dem tränenreizenden Faktor **9**.^[9, 46, 47]

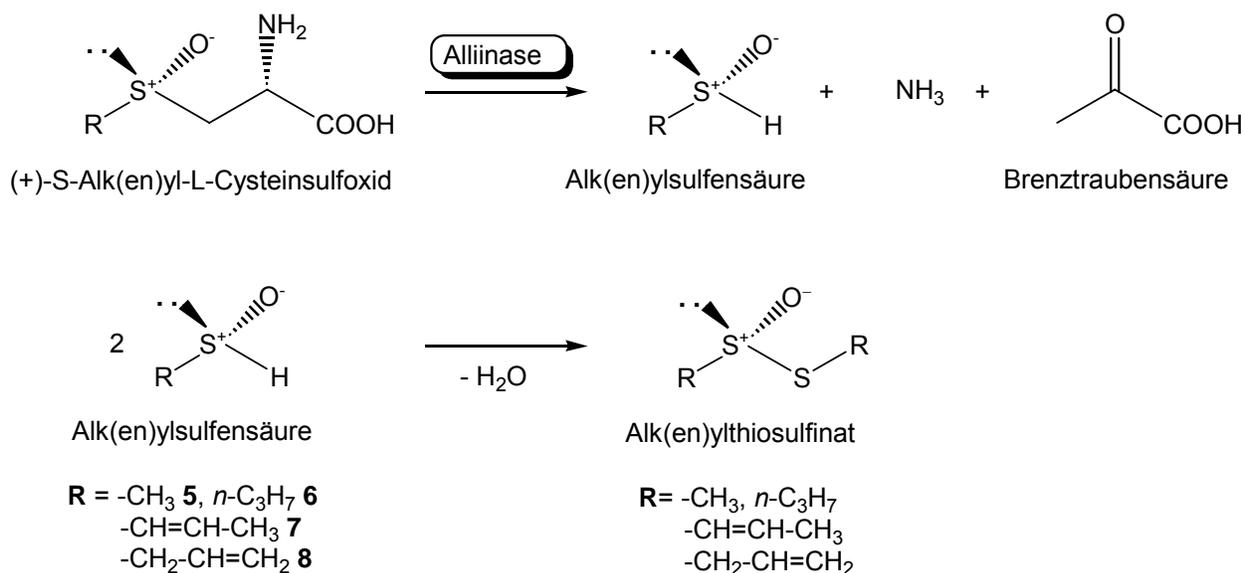


Abbildung 3: Alliinase-katalysierte Reaktion von Cysteinsulfoxiden zur Bildung von Thiosulfinaten, Brenztraubensäure und Ammoniak nach Krest *et al.*^[46]

Bedeutet „R“ die Allylgruppe (-CH₂CH=CH₂), dann liegt das instabile und antibakterielle Allicin **10** vor, jene Verbindung, die dem Knoblauch den typischen Geruch und Geschmack verleiht. Für den Fall, dass „R“ der 1-Propenylgruppe (-CH=CHCH₃) entspricht, läuft neben der Biosynthese den Thiosulfonaten eine Konkurrenzreaktion ab, eine [1,4]-sigmatrope Umlagerung, die zu der Bildung des tränenreizenden Faktors **9** ([Z]-Propanthial-S-Oxid, lachrymatory factor, LF) führt (Abbildung 4). Der tränenreizende Faktor verursacht die Tränenbildung beim Zerschneiden oder Zerdrücken den Zwiebeln und ist für das Zwiebelaroma verantwortlich.

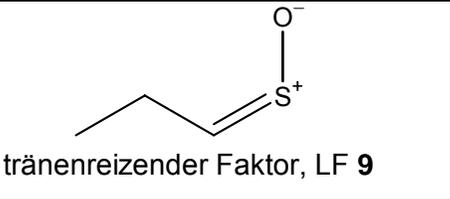
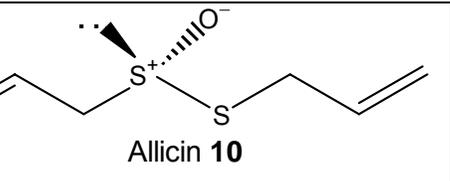
Zwiebel	 <p>tränenreizender Faktor, LF 9</p>	verursacht Tränen
Knoblauch	 <p>Allicin 10</p>	verleiht typischen Geruch und Geschmack

Abbildung 4: Der natürlich vorkommende tränenreizende Faktor **9** und Allicin **10**.

Cysteinsulfoxide, die mit γ -Glutamylpeptiden verknüpft sind, können von dem Enzym Alliinase nicht abgebaut werden und spielen damit keine Rolle bei der Geruchs- und Geschmacksstoffbildung.^[7, 48]

1.6.3 Enzym Tränenfaktor-Synthase

Imai *et al.*^[49] publizierte 2002, dass für das Entstehen des sogenannten tränenreizenden Faktors **9** ein bis dato unentdecktes Enzym verantwortlich ist. Das Enzym besteht aus 169 Aminosäuren und wurde Tränenfaktor-Synthase (Lachrymatory Factor-Synthase, LFS) genannt. Vor der Isolierung des Enzyms wurde lange angenommen, dass die Bildung von **9** durch die Alliinase-Reaktion^[7] spontan stattfindet. Die Tränenfaktor-Synthase katalysiert nur die [1,4]-sigmatrope Umlagerung der instabilen 1-Propenesulfensäure **7** zu dem [Z]-Propanthial-S-oxid **9** (Abbildung 8).^[49]

Im Jahr 2008 gelang Eady *et al.*^[50] das Gen der LF-Synthase mittels Gen RNAi-Silencing aktiv abzuschalten. Hierdurch entstanden genetisch modifizierte Zwiebeln mit einem veränderten Aroma, welches dem süßen Aroma der gekochten Zwiebel ähnelt. Die Hemmung der LF-Synthase verursachte eine starke Veränderung in der Zusammensetzung der

schwefelhaltigen Verbindungen und führte überwiegend zur Bildung von 1-Dipropenylthiosulfonaten, die u.a. zu "Zwiebelan-Isomeren", Disulfiden und Dihydrothiophenen weiter reagieren können.^[49, 50]

Erst vor kurzem gelang Aoyagi *et al.*^[51] die Isolierung und Strukturaufklärung von bereits berichteten von Eady *et al.* "Zwiebelan-Isomere". Hierbei handelt es sich um Stereoisomerenverbindungen S-3,4-Dimethyl-5-hydroxythiolane-2-yl-1-propenethiosulfonate, die aus einem Thiolan- und einem Thiosulfonat-Gerüst aufgebaut sind (Abbildung 5). Die isolierte Verbindung mit einer (2*R*, 3*R*, 4*R*, 5*R*)-Stereokonfiguration wurde Cepathiolan A **11** genannt.

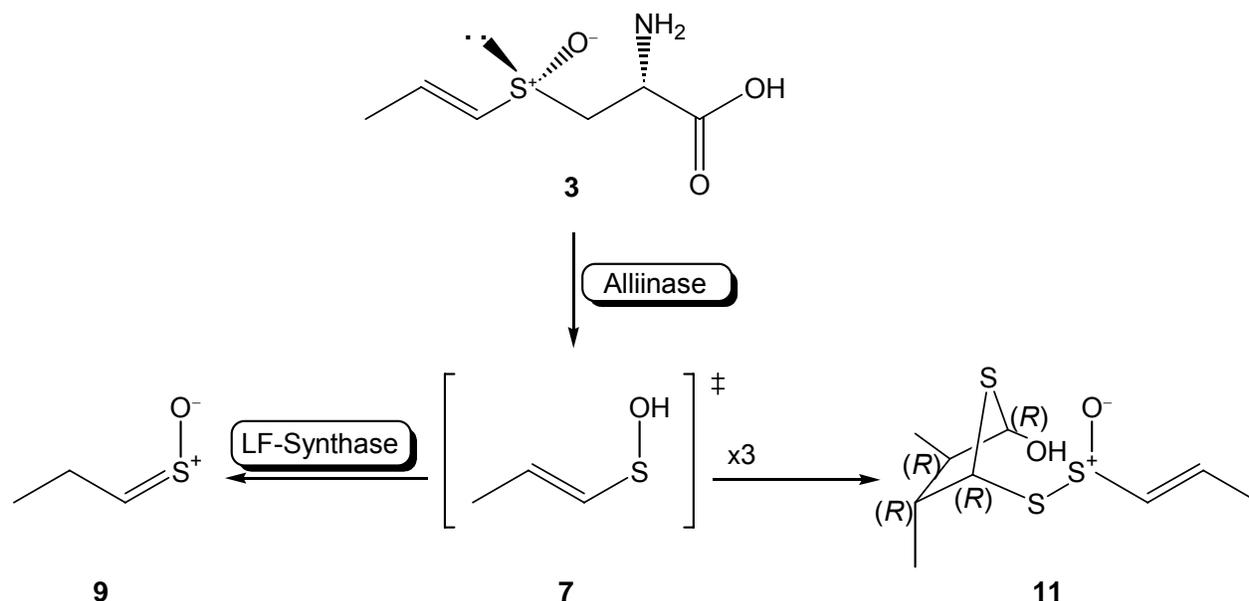


Abbildung 5: Mechanismus zur Bildung von Cepathiolan A **11** nach Aoyagi *et al.*^[51]

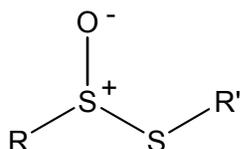
In vitro zeigen die Cepathiolane thrombozytenaggregationshemmende und blutzuckersenkende Wirkungen.

Um die enzymatischen Reaktionen reproduzierbar ablaufen lassen zu können, spielen u.a. die Temperatur, Zeit und der pH-Wert eine entscheidende Rolle. Die Komplexität der Biosynthese der niedermolekularen schwefelhaltigen Verbindungen ist nicht nur von diesen Reaktionen abhängig, sondern auch von der Zusammensetzung der Cysteinsulfoxide.

1.6.4 Primäre Aromakomponenten

Nach der enzymatischen Spaltung der (+)-S-Alk(en)yl-L-Cysteinsulfoxide **1 - 4** werden flüchtige, sehr reaktive Alk(en)ylsulfensäuren **5 - 8** freigesetzt. Diese sehr reaktiven Komponenten können

über verschiedene Wege, abhängig von den Eigenschaften der organischen Reste R, R' (-CH₃, n-C₃H₇, [E]- und [Z]-CH=CHCH₃, -CH₂CH=CH₂) und physikalisch-chemischen Bedingungen, sofort miteinander zu den primären Aromakomponenten wie Thiosulfinaten und dem LF **9** reagieren (Abbildung 6, Abbildung 8).^[9, 52]



Alk(en)ylthiosulfinate

Abbildung 6: Nachgewiesene Alk(en)ylthiosulfinate RSS(O)R' in frischen *Allium*-Extrakten, wobei R, R' = -CH₃, n-C₃H₇, -CH=CHCH₃, -CH₂CH=CH₂, und R=R'.

Laut Ferary *et al.*^[52] sind 25 chemische Strukturen, die über eine Sulfoxidgruppe (S⁺-O⁻) verfügen, möglich. Alle von frischen *Allium*-Extrakten gewonnenen Thiosulfinate lassen sich in vier Typen unterteilen: Gesättigte vom Typ RS(O)SR', wobei R, R' = -CH₃ oder n-C₃H₇; mono- oder bis-β,γ-ungesättigte Thiosulfinate CH₂=CHCH₂S(O)SCH₃, CH₂=CHCH₂SS(O)CH₃ oder CH₂=CHCH₂S(O)SCH₂CH=CH₂; mono-α,β-ungesättigte von Typ [E]-CH₃CH=CHS(O)SR oder [E]-, [Z]-CH₃CH=CHSS(O)R, R = -CH₃ oder -C₃H₇ und gemischte α,β- und β,γ-ungesättigte Thiosulfinate von Typ [E]-CH₃CH=CHS(O)SR oder [E]-, [Z]-CH₃CH=CHSS(O)R, R = -CH₂CH=CH₂.^[9]

Allicin **10** wurde als das erste bis-β,γ-ungesättigte Thiosulfinat aus dem Knoblauch von Cavallito *et al.*^[11] 1949 isoliert. Etwa 20 Jahre später berichtete Matikkala *et al.* über die Entdeckung von Dimethyl- **12** und Dipropylthiosulfinat **13**, die nach einer enzymatischen Zersetzung aus (+)-S-Methyl- **1** (Metthiin) und (+)-S-Propyl-L-Cysteinsulfoxid **2** (Propiin) in der Zwiebel entstanden sein konnten.^[24]

Während gesättigte aliphatischen und allylischen Thiosulfinate längst isoliert werden konnten, hat man mono-α,β-ungesättigte Thiosulfinate erst später entdeckt, obwohl diese Substanzen neben **9**, **12** und **13** in frischen Zwiebel- und Knoblauchextrakten vorkommen. Im Jahr 1988 gelang Th. Bayer^[14] die Isolierung von [E]-, [Z]-Methyl-1-Popenylthiosulfinat **14** und [E]-, [Z]-Propyl-1-Propenylthiosulfinat **16** aus dem lipophilen Extrakt der gelben Zwiebel durch Flüssigkeitschromatographie (Abbildung 7).

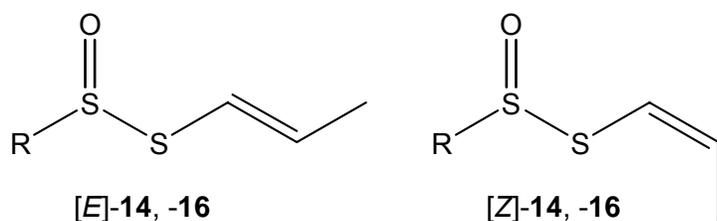


Abbildung 7: Mono- α,β -ungesättigten Thiosulfinate aus der gelben Zwiebel nach Bayer *et al.*, R= $-\text{CH}_3$ (**14**) und $n\text{-C}_3\text{H}_7$ (**16**).

Die asymmetrisch substituierten Thiosulfinatsäureester **14**, **16** wiesen auf die Anwesenheit der Sulfoxidgruppe mit einer charakteristischen IR-Absorptionsbande bei 1088 cm^{-1} hin. Im magnetischen Feld koppeln die olefinischen Protonen am C1- und C2-Atom in *cis*-Konfiguration (*Z*-Konfiguration) mit 8,9 Hz, wobei zwischen den Methylprotonen am C3-Atom und dem olefinischen Proton eine *long range*-Kopplung von 1.5 Hz beobachtet wird. Bei der *trans*-Konfiguration (*E*-Konfiguration) überlagern sich die Signale beider Protonen an der Doppelbindung zu einem System höherer Ordnung. Die Forschergruppe wies auch die schnelle *cis/trans*-Isomerisierung dieser Substanzen bei Raumtemperatur nach.^[14]

Zwei Jahre später konnten **14** und **16** von Lawson *et al.* auch in Schalotten, Winterzwiebel, Porree und Knoblauch nachgewiesen werden. Dorsch *et al.* zeigte 1989 die asthmaprotektiven und entzündungshemmenden Eigenschaften der Zwiebelextrakte, wobei die Asthmaschutzwirkung wesentlich vom Gehalt an Thiosulfinaten abhängig ist. Da jedes Thiosulfinat sein eigenes Wirkprofil besitzt, konnte die Forschergruppe den Wirkstoff mit der höchsten biologischen Aktivität nicht benennen.^[14, 15, 53]

Eine Zuordnung der *Allium*-Pflanzen^[9, 54] nach der Art der Alkyl- ($-\text{CH}_3$ und $n\text{-C}_3\text{H}_7$) bzw. Alkenylgruppen (*[E]*-, *[Z]*- $\text{CH}=\text{CHCH}_3$ und $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) in den Thiosulfinaten $\text{RSS(O)R}'$ ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Thiosulfinate mit Propylgruppen sind in Schnittlauch, Winterzwiebeln, Schalotten, Porree und Zwiebeln nachgewiesen worden. Obwohl die *[E]*- und *[Z]*-1-Propenylgruppen in allen *Allium*-Pflanzen vorkommen, sind sie die vorherrschenden Alkylgruppen in Zwiebeln und Schalotten. Von allen untersuchten Gewächsen enthält der Chinesische Schnittlauch überwiegend primäre Aromakomponenten mit Methylgruppen. Thiosulfinate mit Allylgruppen als Hauptkomponente sind beim Knoblauch, Elefantknoblauch sowie Bärlauch anzutreffen.

Alk(en)ylgruppe	<i>Allium</i> -Spezies
-CH ₃	Chinesischer Schnittlauch, Bärlauch, Zwiebel, Elefantknoblauch, Porree, Frühlingszwiebel, Schalotten, Schnittlauch, Knoblauch
<i>n</i> -C ₃ H ₇	Schnittlauch, Frühlingszwiebel, Schalotten, Porree, Zwiebel
[<i>E</i>]-, [<i>Z</i>]-CH=CHCH ₃	Zwiebel, Schalotte, Porree, Frühlingszwiebel, Schnittlauch, Chinesischer Schnittlauch, Elefantknoblauch, Bärlauch
-CH ₂ CH=CH ₂	Knoblauch, Elefantknoblauch, Bärlauch, chinesischer Schnittlauch

Tabelle 1: Alkyl- bzw. Alkenylgruppen in den Thiosulfinaten in *Allium* Pflanzen, nachgewiesen durch HPLC, NMR, GC-MS nach Block *et al.*^[54].

Die enzymatische Entstehung der primären Aromakomponenten hängt von der Konzentration und der Zusammensetzung der Alk(en)ylsulfensäuren, dem pH Wert, der Temperatur, der Polarität des Extraktionslösungsmittels sowie von den Verfahren der Extrakt-Gewinnung ab.

1.6.4.1 Primäre Aromakomponenten im Schalottenextrakt nach Block

Die nachgewiesenen primären Aromakomponenten und deren relative Konzentrationen im frischen Schalottenextrakt sind nach Literaturangaben von Block *et al.*^[54] in der Tabelle 2 zusammengefasst. Aufgrund der schnellen stereochemischen Isomerisierung von mono- α,β -ungesättigten Thiosulfinaten (**14**, **16**) sind deren Mengen als Summe von [*E*]- und [*Z*]-Isomeren angegeben. **14** und **16** konnten mit einem typischen [*E*]:[*Z*]-Verhältnis 2-3:1 als Mittelwert aus Extrakt isoliert werden. Die Konzentration von Bisulfin **20** ist als prozentualer Anteil aller Thiosulfinaten (**TS**) dargestellt. Der flüchtige LF **9** konnte aufgrund unterschiedlicher Verluste bei der Aufarbeitung des Extraktes (u.a. seiner spontanen Zersetzung) nicht quantifiziert^[9] werden. Seine Konzentration ist in geringen Mengen (<<<1%) angegeben.

Substanz	Relative Konzentration, Massenprozent
CH ₃ S(S)OCH ₃ 12	9%
CH ₃ CH ₂ CH ₂ S(S)OCH ₂ CH ₂ CH ₃ 13	26%
[E]-, [Z]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₃ 14	15%
[E]-CH ₃ CH=CH(S)OSCH ₃ 15	9%
[E]-, [Z]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₂ CH ₂ CH ₃ 16	22%
[E]-CH ₃ CH=CH(S)OSCH ₂ CH ₂ CH ₃ 17	14%
CH ₃ CH ₂ CH ₂ S(S)OCH ₃ 18	1.2%
CH ₃ CH ₂ CH ₂ (S)OSCH ₃ 19	2.8%
CH ₃ CH ₂ CH=S ⁺ -O ⁻ 9	<<<1%
⁻ O-S=CHCH(CH ₃)CH(CH ₃)CH=S ⁺ -O ⁻ 20	0.2% TS

Tabelle 2: Relative Konzentrationen nachgewiesener primärer Aromakomponenten im frischen Schalottenextrakt (in Mol-% bezogen auf gesamte Menge **TS**).^[9, 54]

1.6.5 Der tränenreizende Faktor

Die tränenreizende Wirkung, die beim Zerschneiden oder Zerdrücken der Zwiebel (*Allium cepa* L.) auftritt, wurde schon mit der ersten Verwendung dieser Pflanzen festgestellt. Nach einer Isolierung der tränenreizenden Vorläufer Isoalliin **3** und 1-Propenylsulfensäure **7** von Späure und Virtanen^[55] konnte 1965 dieses Phänomen chemisch aufgeklärt werden. Der tränenreizende Faktor ist instabil und hydrolysiert zu Schwefelwasserstoff, freiem Schwefel und Propionaldehyd, der spontan zu 2-Methyl-2-pental unter einer Retro-Aldolrkondensation reagiert.^[9] Diese Carbonylverbindungen weisen eine augenreizende Wirkung auf. Nach Strukturaufklärung vom tränenreizenden Faktor durch Virtanen *et al.* und Brodniz *et al.* publizierte Block *et al.* 1992 einen denkbaren Weg für seine Bildung aus der Vorstufe **3**.^[9, 56] Zuerst bildet sich die Schiff'sche Base **21** aus dem geruchlosen Isoalliin **3** mit dem Pyridoxal-5'-Phosphat, wobei diese in der katalytischen Tasche des Enzyms reversibel gebunden ist.^[9] Dort erfolgt die β -Eliminierung^[33], die die C-S-Bindung spaltet. Die Tränenfaktor-Synthese ermöglicht anschließend der Zugang zu **9** (Abbildung 8) über eine katalysierte [1,4]-sigmatrope Umlagerung^[49] der 1-Propenylsulfensäure **7**. Das flüchtige LF geht in einer weiteren Reihe von Rreaktionen zur Bildung von sekundären Aromakomponenten u.a Cepaene ein und konnte lange Zeit nicht isoliert werden.

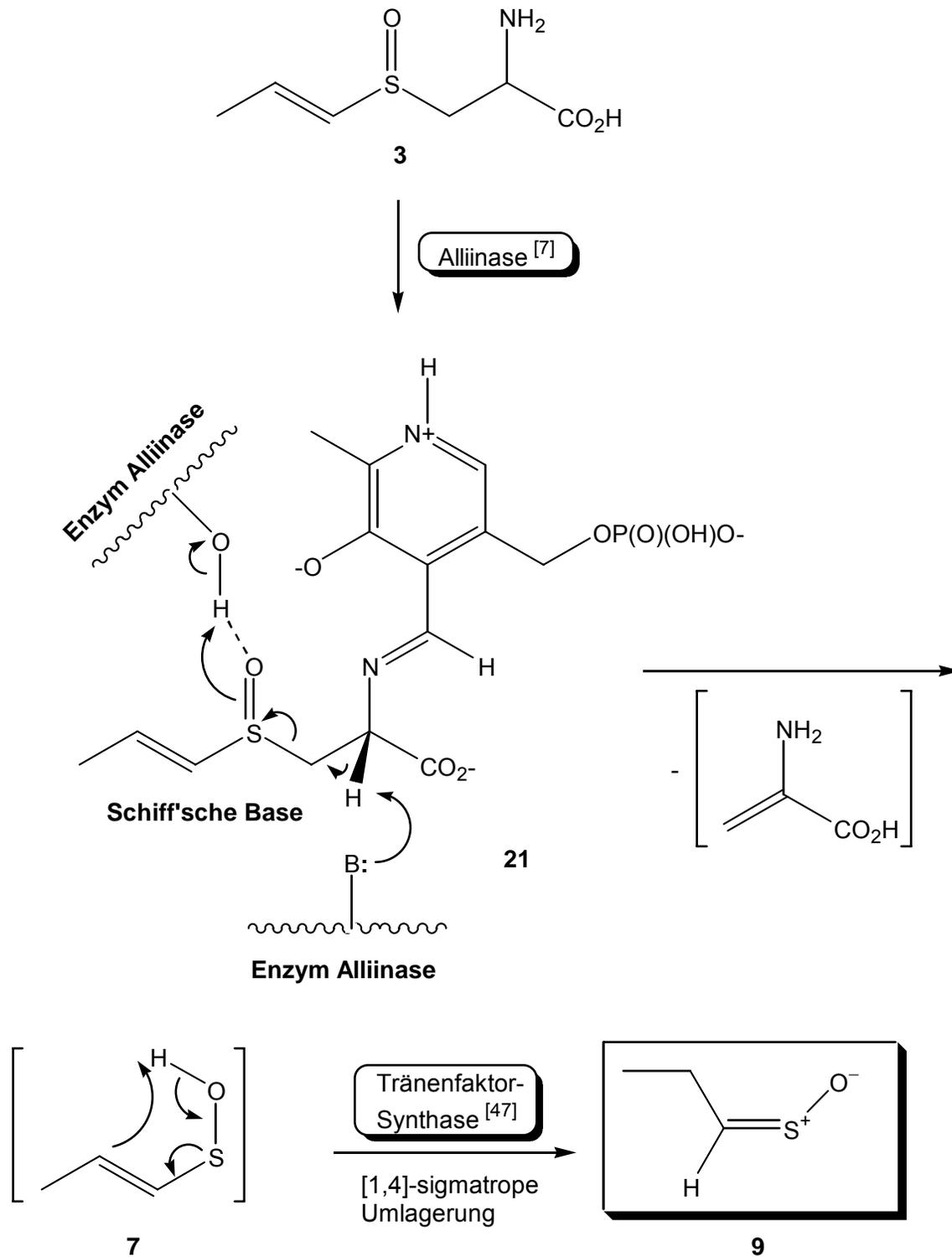


Abbildung 8: Mechanismus der Alliinase- und anschließenden Tränenfaktor-Synthese-katalysierten Umwandlung von **3** in LF **9** nach Block *et al.*^[9] und Imai *et al.*^[49]

Dieser Mechanismus ist allgemein anwendbar und beschreibt nicht nur die enzymatische Zersetzung des Isoalliins **3** zu **7** und **9**, sondern auch die Zersetzung von Methiin **1**, Propiin **2** und Alliin **4** zu den entsprechenden Alk(en)ylsulfensäuren **4**, **6** und **8** und deren Kondensation unter Wasserabspaltung zu Thiosulfinaten (**12**, **13**, [E]-, [Z]-**14**, [E]-, [Z]-**16** und **17**).

1.6.6 Sekundäre Aromakomponenten

Als Primärprodukte konnten neben dem tränenreizenden Faktor **9** hauptsächlich Thiosulfinate nachgewiesen werden. Diese Organoschwefelverbindungen sind sehr reaktiv und reagieren innerhalb weniger Stunden miteinander zu einer Vielzahl stark riechender schwefelhaltiger Sekundärmetaboliten. Aus bis-1-Propenylthiosulfinat entstehen die zyklischen Disulfidverbindungen Zwiebelane **33** und **34**. In Gegenwart von den entsprechenden Thiosulfinaten können 1-Propenyl- **7** und Allylsulfensäure **8** zu α -Sulfinyldisulfiden wie Cepaene und Cepaen-Homologe **22** - **30** sowie Ajoene reagieren.^[14, 52, 56] Daneben entstehen noch Di-, Polysulfide und Vinylidithiine.^[9, 57]

Zusammen mit den primären Aromakomponenten bestimmen die Sekundärenmetabolite den Geschmack und den Geruch frisch zerschnittener *Allium*-Pflanzen. Anhand zahlreicher HPLC-, LC/MS- und NMR-Untersuchungen von Bayer *et al.*^[14], Morimitsu *et al.*^[58, 59], Block *et al.*^[9, 56] und Calvey *et al.*^[60] sind die natürlich vorkommenden sekundären Aromakomponenten, die in Zwiebelextrakten nach der Alliinase-Reaktion isoliert werden konnten, in Abbildung 11 und Abbildung 14 wiedergegeben.

Die primären und sekundären Aromakomponenten reagieren in der flüssigen Phase zu stabilen symmetrisch und asymmetrisch substituierten Di-, Polysulfiden und Thiosulfonaten mit Methyl-, Propyl-, Propenyl- und Allylgruppen weiter.^[52, 61] Diese Verbindungen^[9] konnten in den frischen *Allium*-Extrakten nicht nachgewiesen werden.

1.6.6.1 Isolierung und Bildungsmechanismus der Cepaene

Eine Volksweisheit besagt, dass eine rohe Zwiebel (*Allium cepa* L.) den Schmerz und die Entzündung lindert, wobei der Hustensaft, der aus der zerhackten Zwiebel gepresst wird, Asthmasymptome reduziert und vielen anderen respiratorischen Krankheiten vorbeugt.^[56]

Bei den Untersuchungen der Asthmaschutzwirkung von Zwiebelextrakten konnten von Th. Bayer^[14] 1988 außergewöhnliche Organoschwefelverbindungen entdeckt werden. Diese Inhaltsstoffe wurden aus der mehr hydrophilen Unterfraktion des Chloroform-Extraktes isoliert und "Cepaene" genannt. Die Arbeitsgruppe um Wagner leitete den Namen "Cepaen" aus dem

Artnamen „*cepa*“ ab.^[59, 62] Hierbei handelt es sich um drei Diastereisomerenpaare **29**, [*E*]-**30** und [*Z*]-**30**, die über eine ähnliche Struktur der α -Sulfinyldisulfide verfügen (Abbildung 9, Abbildung 12).

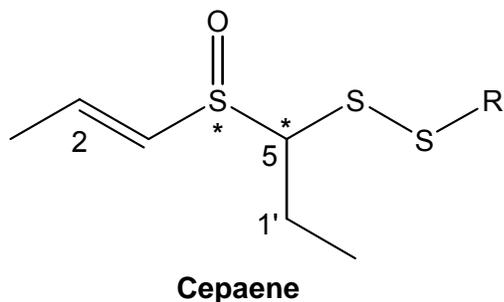


Abbildung 9: Cypaene in Zwiebelextrakten nach Bayer *et al.*: **29**, R= *n*-C₃H₇; [*E*]-**30**, R= [*E*]-CH=CHCH₃; [*Z*]-**30**, R= [*Z*]-CH=CHCH₃.

Die Moleküle der Cypaene **29**, **30** enthalten am Schwefelatom bei der Sulfoxidgruppe und am Kohlenstoffatom in Stellung 5C zwei Stereozentren, wobei die Doppelbindung am C2-Atom nach der Kopplungskonstante der olefinischen Protonen von 15.1 Hz *trans*-Konfiguration aufweist (Abbildung 9, Abbildung 11). Die Diastereomerenpaare [*E*]-**30** und [*Z*]-**30** unterscheiden sich auch in der geometrischen Konfiguration der Doppelbindung am C8-Atom (Abbildung 11). Über die Zuordnung zu einer stereochemischen Reihe (dd oder ll bzw. dl oder ld) konnte die Forschergruppe anhand der chemischen Verschiebung der Protonen an dem C2, C3, C5 und C1'-Atom keine Aussage treffen.^[14, 15, 62] Sie vermuten auch, dass die Cypaene aus einem ähnlichen Mechanismus, wie die Bildung von Ajoene aus Allicin im Knoblauch, entstehen könnten.

Unabhängig von Th. Bayer aus der Arbeitsgruppe um Wagner beschrieben S. Kawakishi und Y. Morimitsu einige Wochen später die Identifizierung des Methyl-1-(methylsulfinyl)-propylsulfids **22** im frischen Zwiebelextrakt als Inhibitor der Blutplättchen-Aggregation (Abbildung 10).^[58] Durch Mischen vom frischen Zwiebelsaft mit S-Alk(en)ylcysteinsulfoxiden **1** - **4** aus anderen *Allium*-Spezies (u.a. Knoblauchsaff) konnte die Forschergruppe verschiedenartige Cypaene, auch solche mit Allylgruppen, synthetisieren (Abbildung 12). Es wurde vorgeschlagen, dass die Bildung von **22** über eine Interaktion zwischen [*Z*]-Thiopropional-S-oxid **9** und Methansulfensäure **5** ablaufen kann.^[58]

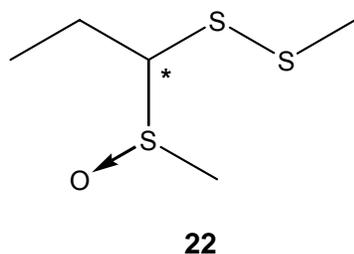


Abbildung 10: Cypaene **22** im Zwiebelextrakt nach Kawakishi *et al.*.

Im Jahr 1997 konnten von Calvey *et al.* mittels CO₂ Supercritical Fluid Extraction (SFE) Cypaene im Extrakt einer zerkleinerten Zwiebel identifiziert werden. Aufgrund der Chiralität am Schwefel- und Kohlenstoffatom ist jedes Cypaen als Gemisch aus zwei Diastereomerenpaaren vorhanden. Durch die LC/MS- Untersuchungen ordnete Calvey *et al.* die Massen [MH⁺] *m/z* 185, 211, 237 und 238 den Diastereomerenpaaren **22**, **24/28**, **27/29**, **30** zu.^[60]

Die schnelle Cypaen-Bildung in den Zwiebel-Homogenaten während der CO₂-SF Extraktion trägt zu der Aufklärung ihrer enzymatischen Entstehung bei. Laut Block *et al.* läuft die Bildung der Cypaene in Zwiebelsaft unter einer carbophilen Addition von LF **9** an entsprechenden Alk(en)ylsulfensäuren **5 - 8** ab (Abbildung 11), wobei intermolekular-wasserstoffgebundenen α -Sulfensäuren **31** entstehen.^[9, 63] Es ist bekannt, dass die intramolekulare Wasserstoff-Sauerstoffbindung die Sulfensäuren stabilisiert. Eine weitere Umsetzung von **32** mit Alk(en)ylthiosulfonaten führt zu den Cypaenen **22 - 30**.

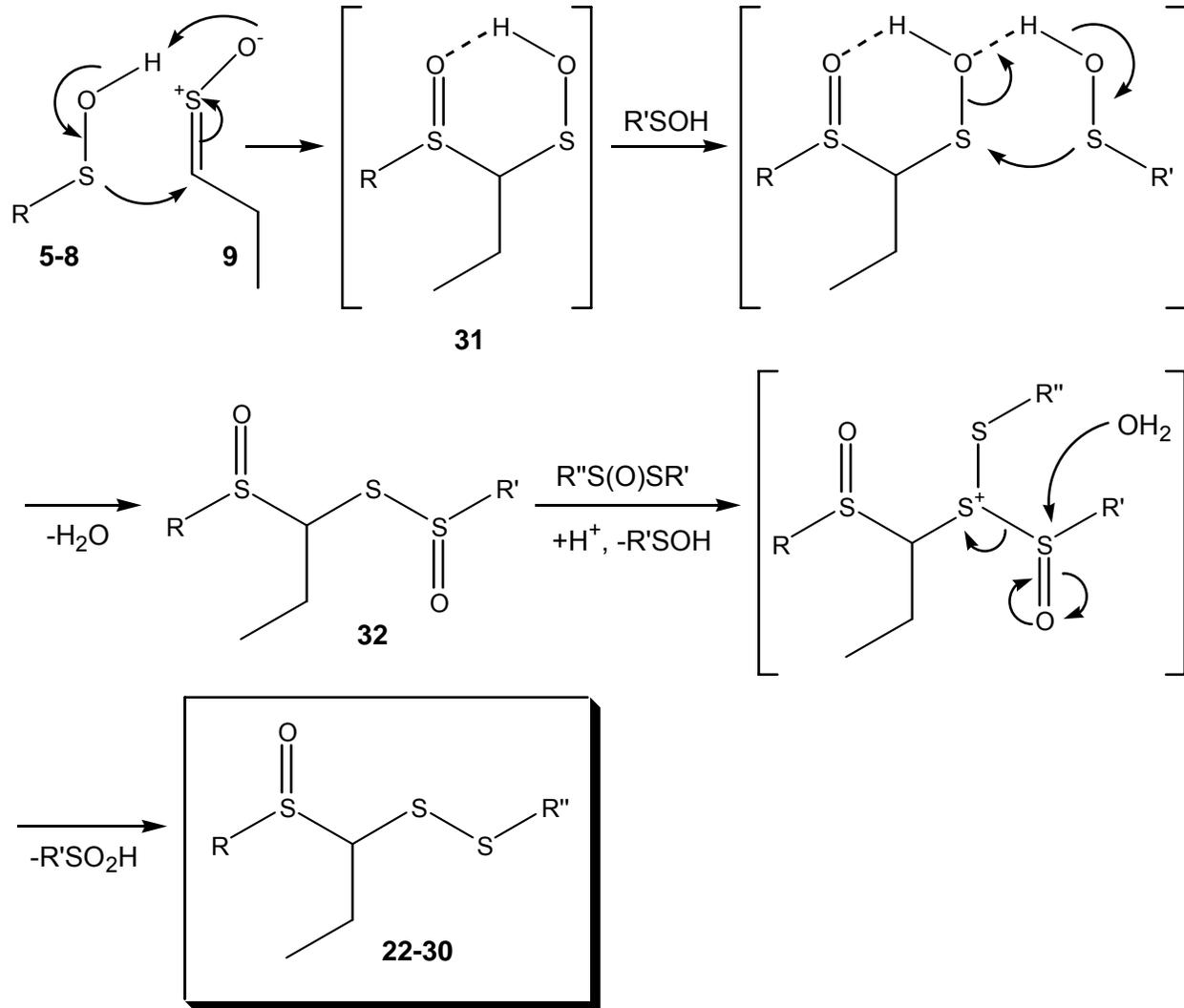


Abbildung 11: Enzymatische Entstehung von Cepaenen in Zwiebelsaft nach Block *et al.*. R, R', R'' = -CH₃, n-C₃H₇, [E]-, [Z]-CH=CHCH₃ sowie R'=R''.

Die Entstehung von 16 Cepaenen sowie deren geometrischen Isomeren und Diastereomeren ist möglich^[56], aber nur die Cepaene, die aus den 5 - 8 stammen, konnten in frischen Zwiebelextrakten nachgewiesen werden. Die synthetischen Cepaene, nach Block *et al.* sind in Abbildung 12 wiedergegeben.^[56] Die Cepaene 22 - 27 konnten durch Mischen von Zwiebel- und Knoblauchsafte hergestellt werden.^[58, 59, 64] Mittels HPLC, LC-MS und CO₂-SF Extraktion konnten Cepaene 22, 24, 26 - 30 in frischen Extrakten isoliert werden.

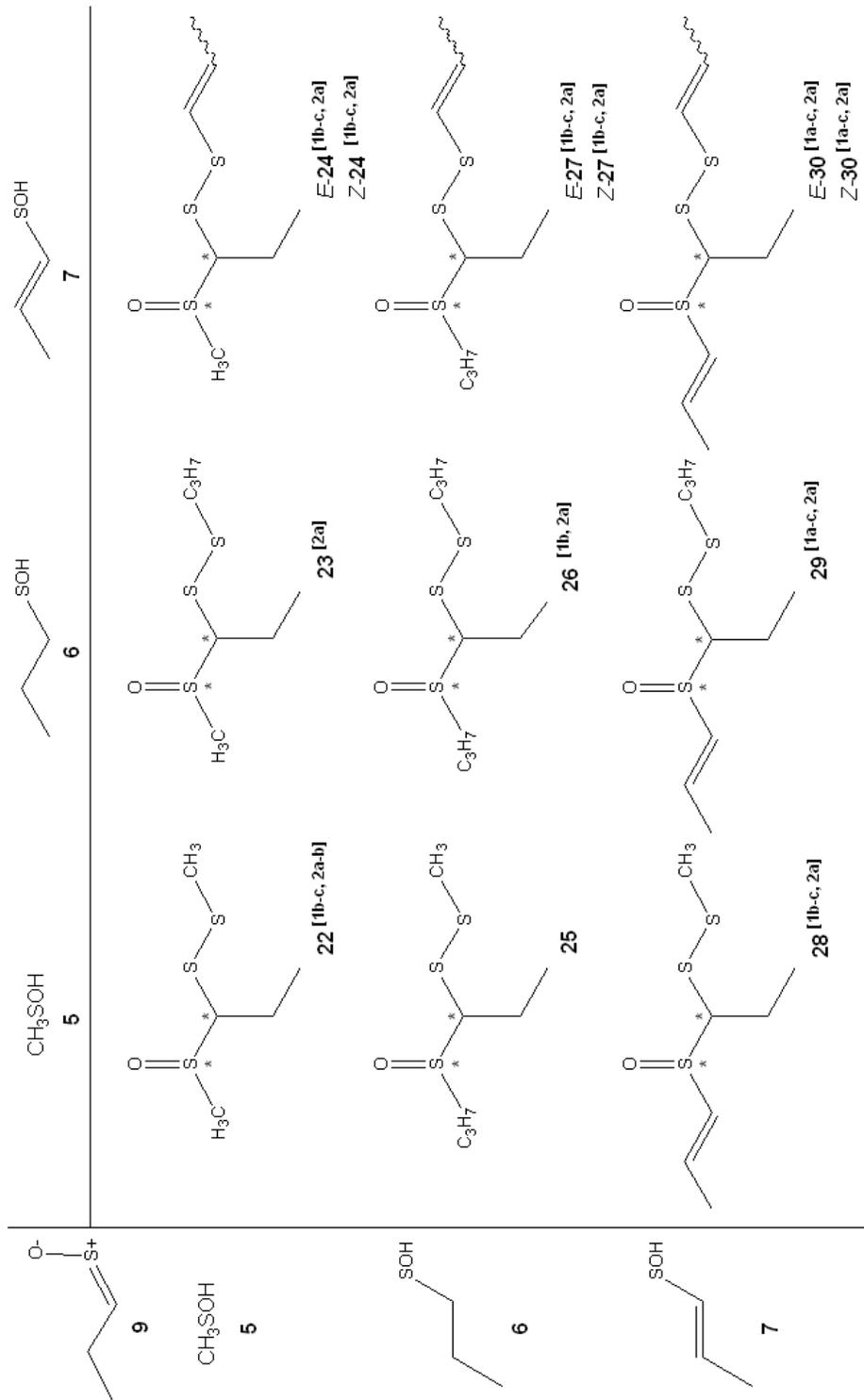


Abbildung 12: Synthetische Cepaene **22 - 30** nach Block *et al.*^[56], die im Zwiebelextrakt (*Allium cepa* L.) nachgewiesen werden konnten. **Isoliert:** Bayer *et al.*^{[14], [1a]} (HPLC), Morimitsu *et al.*^{[58], [1b]} (HPLC), Calvey *et al.*^{[60], [1c]} (CO_2 -SFE); **Synthetisiert:** Block *et al.*^{[56], [2a]}, Morimitsu *et al.*^{[58], [2b]} (*Allium cepa* L. und S-alk(en)yl-L-cysteinsulfoxid aus *Allium sativum* L. sowie *Allium chinense*).

Abbildung 12: Synthetische Cepaene **22 - 30** nach Block *et al.*^[58], die im Zwiebelextrakt (*Allium cepa* L.) nachgewiesen werden konnten. **Isoliert:** Bayer *et al.*^[1a] (HPLC), Morimitsu *et al.*^[1b] (HPLC), Calvey *et al.*^[1c] (CO₂-SFE); **Synthetisiert:** Block *et al.*^[2a], Morimi

1.6.6.2 Erste Diskussionen über Identifizierung von *cis*-/*trans*-Cepaen **27**

Mit der ersten Isolierung und MS-Fragmentierung von *cis*- und *trans*-6-Ethyl-4,5,7-trithia-2-decen-7-S-oxid **27** befasste sich Morimitsu *et al.*^[58] am Ende des 20. Jahrhunderts.

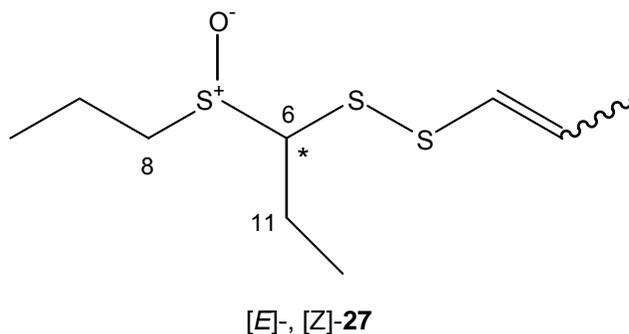


Abbildung 13: Struktur der natürlich vorkommenden Cepaene [*E*]- und [*Z*]-**27** nach Morimitsu *et al.*

Die Forschungsgruppe konnte beim Mischen vom Zwiebelextrakt mit S-Propyl-*L*-Cystein-Sulfoxid das Stereoisomergemisch **27** synthetisieren. Die Verbindung *cis*- und *trans*-**27** wurden an einer Normalphasen-HPLC bei Detektion von 270 nm in geringer Menge isoliert, wobei über eine einzelne Auftrennung der Stereoisomere nicht berichtet wurde. Durch EI-MS-Untersuchungen diskutierten die Forscher teilweise die Fragmentierung des Gemisches und ordneten 1992 den Molekülpeak [M⁺, 1.8] mit *m/z* 238 den Cepaenen **27** zu (Abbildung 13).

Im Jahr 1997 berichtete Calvey *et al.*^[60] über die Isolierung des Gemisches von geometrischen Isomeren *n*-C₃H₇S(O)CH(CH₂CH₃)SSCH=CHCH₃ **27** mittels überkritischer Kohlenstoffdioxid-Extraktion (SFE) aus dem Zwiebelextrakt. Die MS-Messungen im positiven Ionisationsmodus zeigten das Fragment *m/z* 239 [M+H]⁺ mit einer relativen Intensität von 4%. Durch Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) konnte die Forschungsgruppe das Ion [M+H]⁺ mit *m/z* 147

($\text{MeCH=CHS}_2\text{CHC}_2\text{H}_5^+$) und $[\text{M}+\text{H}]^+$ mit m/z 105 (MeCH=CHS_2^+) dem **27** zuordnen. Durch eine enge Kooperation mit Block *et al.* wurden diese MS-Messungen mit den MS-Untersuchungen der synthetischen Standards anschließend abgeglichen. Eine weitere Auftrennung des Gemisches **27** bzw. eine Strukturaufklärung der einzelnen Naturstoffe anhand anderer spektroskopischer Methode wurde nicht beschrieben.

1.6.6.3 Synthese von [*E*]-1-Propenyl-1-(propylsulfinyl)propyldisulfid nach Block

Die publizierte Synthese und begleitende Analytik von Block *et al.*^[56] trugen 1997 zur Strukturaufklärung von [*E*]-**27** bei. Die Forscher chromatographierten mittels HPLC das Reaktionsgemisch und bestimmten sein Isomerenverhältnis von 1:2. Durch NMR-Untersuchungen wurde die *trans*-Konfiguration an den Doppelbindungen beider Verbindungen bewiesen, da die olefinischen Protonen mit 14.5 Hz bzw. 14 Hz koppelten. Die ^1H -NMR Daten zeigten unterschiedliche chemische Verschiebungen der einzelnen Methylenprotonen am C8- und C11-Atom, da die beiden Atome sich in Nachbarschaft zweier Stereozentren befanden. Das Vorhandensein der $>\text{S}=\text{O}$ Gruppe ($\nu=1049\text{ cm}^{-1}$) in der chemischen Struktur wurde mittels IR-Absorption nachgewiesen.

Nebenbei berichtete Block *et al.* über die chemische Verschiebung der Methylenprotonen am C6-Atom der Diastereomere [*Z*]-**27** [^1H : $\delta=3.64\text{ ppm}$ (dd, 10.7 Hz, 4.1 Hz) und ^{13}C : $\delta=73\text{ ppm}$ bzw. ^1H : $\delta=3.50\text{ ppm}$ (dd, 11 Hz, 3.7 Hz) und ^{13}C : $\delta=72.23\text{ ppm}$] kurz. Eine weitere Strukturbeschreibung wurde nicht veröffentlicht.

Obwohl Morimitsu *et al.* und Calvey *et al.* die Cepaene **27** im Zwiebelextrakt nachweisen konnten, wurden bis heute keine vollständigen ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten und einzelne MS-Fragmentierung vom Naturstoff bzw. vom Naturstoffanalogon [*Z*]-**27** publiziert. Eine Identifizierung dieser Cepaen-Art aus anderen *Allium*-Spezies außer der *Allium cepa* L. (Zwiebel) wurde in der Literatur jedoch nicht beschrieben.

1.6.6.4 Zwiebelane

Aus zerkleinerten *Allium*-Gewächsen konnten lange Zeit keine bis- α,β -ungesättigten Thiosulfinate isoliert werden, obwohl das bis- β,γ -ungesättigte Thiosulfinat Allicin **10** im Knoblauch längst bekannt und seine Biosynthese von unterschiedlichen Gruppen umfangreich

beschrieben wurde.^[10, 11, 47] Der Grund dafür ist die schnelle Umwandlung der sehr reaktiven bis- α,β -ungesättigten Vorläufer unter Bildung von Zwiebelanen **33** und **34**.^[9]

Neben der Untersuchung von antiasthmatischer Wirkung der Zwiebelextrakte wurden von Th. Bayer^[14] 1988 zwei biologisch aktive Bicycloverbindungen als farblose Öle isoliert. Das Stereoisomeregemisch **33/34** zeigte im humanen plättchenreichen Plasma (PRP) bei Konzentrationen von 0.1-1.0 mg/mL eine 65-90%ige Inhibierung der thrombininduzierten Thromboxan-B₂-Biosynthese (TXB₂-Biosynthese).^[14, 65]

Diese Organoschwefelverbindungen wurden nach dem deutschen Wort „Zwiebel“ genannt und erhielten die entsprechenden Trivialnamen *cis*- und *trans*-Zwiebelan.^[14]

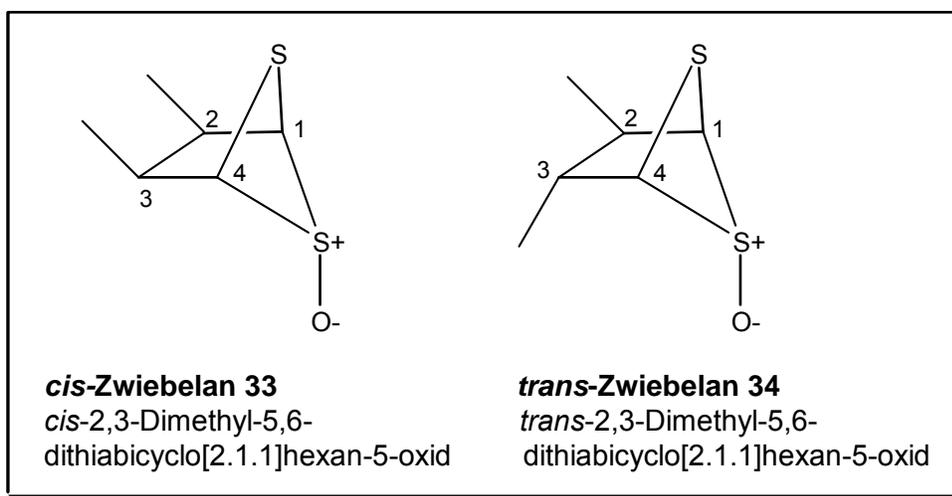


Abbildung 14: Aus *Allium cepa*-Extrakten isolierte Zwiebelane.^[9]

Vier Isomere von **33** und zwei von **34** sind möglich. Aufgrund der Kernspinresonanzspektroskopie-Studien mit "shift reagent" Eu(fod)₃ und aromatischen Lösungsmittel (C₆D₆) wurden von Th. Bayer et al.^[65] die Strukturen der beiden Stereoisomeren (1 α , 2 α , 3 α , 4 α , 5 β)- und (\pm)-(1 α , 2 α , 3 β , 4 α , 5 β)-2,3-Dimethyl-5,6-dithiabicyclo[2.1.1]hexan-5-oxid entsprechend für *cis*- und *trans*-Zwiebelan vorgeschlagen.

Aufgrund der Zusammenarbeit zwischen Block et al.^[9] und der Arbeitsgruppe um Wagner et al.^[65] wurde parallel mit den stereoselektiven Synthesen vom [*E*, *E*]-, [*Z*, *Z*]- und [*E*, *Z*]-1-Propenyl-1-propylthiosulfinat **36** auch der vermutliche Mechanismus für die Bildung der Zwiebelane, die beim Zerschneiden von Zwiebeln entstehen können, dargelegt (Abbildung 15). Dies entspricht der Allicin-Bildung im Knoblauch, wobei die Thiosulfinat **36** aus Isoallin **3** enzymatisch entstehen. Der Thiosulfinat **36** reagiert ungewöhnlich leicht unter einer [3,3]-sigmatropen

Umlagerung zu der Schlüsselverbindung Butandithial-S-Oxid **37** weiter. Diese Reaktion verläuft analog zu der Thio-Claisen-Umlagerung. Aufgrund der schwachen S-S-Bindung läuft sie leicht ab und über eine intramolekulare [2+2]-Cycloaddition des Oxids **37** ist der Zugang zu *cis*- und *trans*-Zwiebelan ermöglicht. Eine intramolekulare 1,3-Dipolarcycloaddition des Butandithial-S-oxides **37** führt schließlich zum Dithia-3-oxobicyclo[2.2.1]heptan **38**, wobei sich die Thial-S-Oxid-Gruppe ($C=S^+-O^-$) als 1,3-Dipol und die Thial-Funktion ($C=S$) als 1,3-Dipolarophil beteiligen. Eine weitere heterolytische oder wenig denkbarer homolytische Umlagerung des **38** über den Übergangszustand **39** erlaubt den Zugang zur Verbindung **33** und **34**.

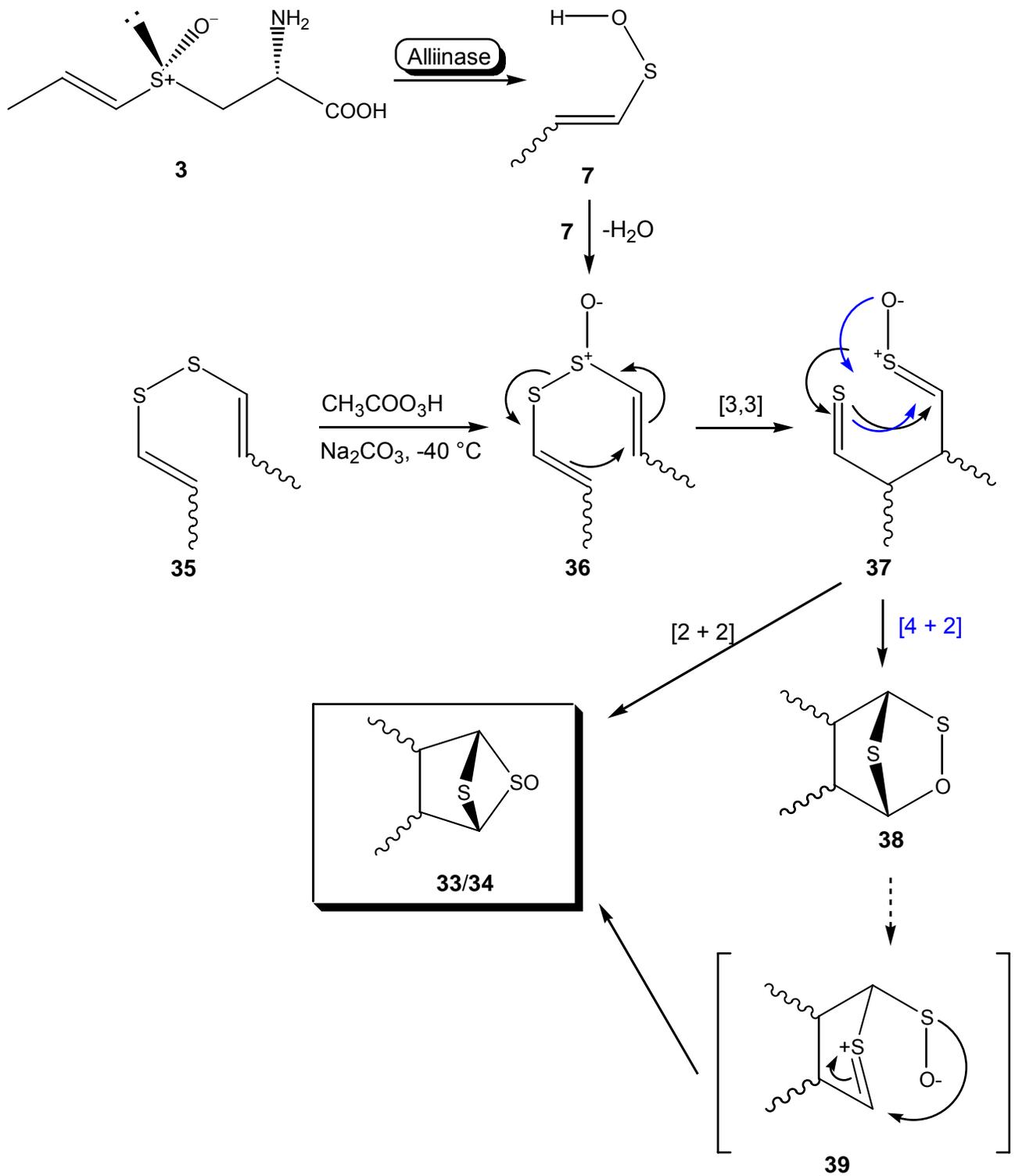


Abbildung 15: Vermutlicher Mechanismus der Bildung der Zwiebelane **33/34** über eine intramolekulare [2+2]-Cycloaddition nach Block *et al.*^[9] und Wagner *et al.*^[65]

1.6.6.5 Synthese der Zwiebelane nach Block

Im Jahr 1996 beschrieb Block *et al.*^[66] die stereospezifische Synthese von den Bis-(1-Propenyl)-disulfiden **35**. Während [*E*, *E*]- und [*Z*, *Z*]-**35** bei der direkten Oxidation von Lithium-1-propen-thiolat ([*E*]-**40**, [*Z*]-**40**) synthetisiert wurden, erfolgte der Zugang zu [*E*, *Z*]-**35** über eine indirekte Route.

Nach Addition von Methansulfonsäurechlorid zu [*E*]-**40** bzw. [*Z*]-**40** in Diethylether bei -78 °C, und rasche Erwärmung auf 5 °C und Aufarbeitung der Reaktion konnten [*E*, *E*]- und [*Z*, *Z*]-**35** in einer 82%igen bzw. 72%igen Ausbeute isoliert werden. Hierbei lag die Stereoisomerenreinheit bei >95% (Abbildung 16).

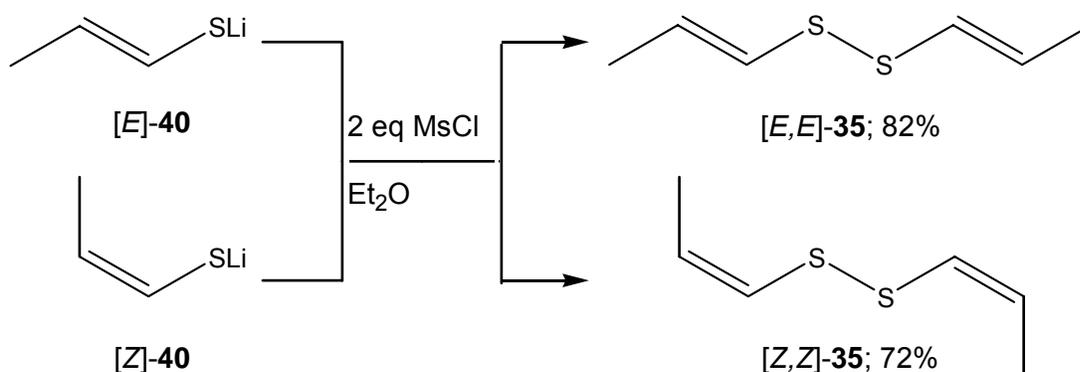


Abbildung 16: Stereospezifische Synthese von [*E*, *E*]- und [*Z*, *Z*]-Bis-(1-Propenyl)-disulfid **35** nach Block *et al.*

Die Reaktion zwischen Kaliumsalz von Lithium-[*E*]-1-Propen-thiolat **41** und [*Z*]-1-Propenylmethanthiosulfonat **42** führte zu [*E*, *Z*]-**35** mit einer Ausbeute von 60% (Abbildung 17).^[66]

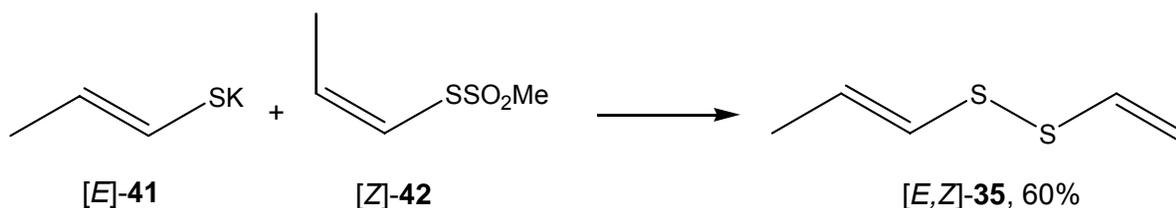


Abbildung 17: Stereospezifische Synthese von [*E*, *Z*]-Bis-(1-Propenyl)-disulfid **35** nach Block *et al.*

Diese Syntheserouten beschreiben die Simplizität und die Stereospezifikaion der Reaktion bei der Herstellung von α , β -ungesättigten Disulfid-Derivaten.

Die $[E, Z]$ -, $[E, E]$ - und $[Z, Z]$ -Bis-(1-Propenyl)-disulfide **35** sind die Schlüsselverbindungen der Zwiebelan-Synthese. Während $[E, E]$ -**35** und $[Z, Z]$ -**35** bei RT relativ stabil sind, isomerisiert $[E, Z]$ -**35** spontan zu einem Gemisch aus allen drei Isomeren. Die Isomere lassen sich über Flüssigkeitschromatographie trennen. Die Monooxidation von Bis-(1-Propenyl)-disulfid **35** mit Peroxyessigsäure bei niedriger Temperatur ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) und die anschließende Erwärmung auf $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ und schnelle Aufarbeitung des Reaktionsgemisches liefern das *cis*- und *trans*-Zwiebelan **33/34** in einer Gesamtausbeute von 20% und einer Selektivität von $Z/E\ 2/3$ (Abbildung 15).^[65] Block *et al.* zeigte, dass aus $[E, E]$ - und $[Z, Z]$ -Bis-(1-Propenyl)-disulfid das *trans*-Zwiebelan **34** und aus $[E, Z]$ -Bis-(1-Propenyl)-disulfid das *cis*-Zwiebelan **33** synthetisiert werden konnte. Bei der niedrig-temperierten Sulfoxid-Thio-Claisen-Umlagerung des Thiosulfinats **37** können neben den Zwiebelanen, Verbindungen mit einem Heterobicyclo[2.2.1]heptan-Gerüst **38** entstehen. Bei der Oxidation von $[E, Z]$ -**35** kann der Thiosulfinat-Sauerstoff im Übergangszustand entweder pseudoaxial oder pseudoäquatorial schließlich ausgerichtet sein. Daraus folgt die Bildung in etwa gleichen Mengen von **33** und **38**. Die schwache S-S-Bindung begünstigt die Umlagerung des Übergangszustandes bei der Monooxidation von $[E, E]$ -**35**. Die anschließende Cyclisierung durch die hohe Reaktivität der Thialgruppe als 1,3-Dipolarophyl erleichtert den Zugang, bevorzugterweise, zu Heterobicyclo[2.2.1]heptan **38**. Bei der analogen Oxidation von $[Z, Z]$ -**35** führt dagegen die *cis*-Doppelbindung zu einem Übergangszustand, bei dem der Thiosulfinat-Sauerstoff pseudoäquatorial ausgerichtet ist. Durch die $[E]$ -Geometrie der $\text{C}=\text{S}^+-\text{O}^-$ -Gruppe wird die intramolekulare [2+2]-Cycloaddition, die zu **34** führt, begünstigt.^[9, 66]

Bei der Monooxidation von $[E, Z]$ -, $[E, E]$ - und $[Z, Z]$ -Bis-(1-Propenyl)-disulfid **35** wird die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung in allen drei Fällen völlig stereoselektiv geknüpft, wobei die Reaktion zu verschiedenen Ringsystemen, wie Heterobicyclo[2.2.1]hexan-System (**33**, **34**) sowie zu Heterobicyclo[2.2.1]heptan-System **38** führt.^[9]

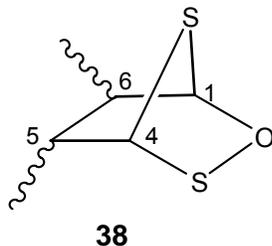


Abbildung 18: Heterobicyclo[2.2.1]heptan-System **38**.

1.6.6.6 Das Bissulfin: (Z,Z)-(\pm)-2,3-Dimethylbutandithial S,S'-Dioxid

Über den ersten Bis(thial-S-Oxid) wurde von E. Block und Th. Bayer im Jahr 1990 berichtet. Das zweite natürlich vorkommende Dimer **20** konnte als farbloser Feststoff aus dem Zwiebelextrakt durch Säulenchromatographie isoliert und mit Hilfe seiner spektroskopischen Eigenschaften sowie seiner Synthese identifiziert werden.^[54, 67, 68] Das Bissulfin wurde durch Normalphasen LC/UV von Block *et al.*^[54] quantitativ bestimmt. Im Jahr 1997 berichtete Calvey *et al.*^[60], dass das Bissulfin **20** mit einer Masse $[MH^+]$ von 179 auch im CO₂-SFE-Extrakt mittels LC-APCI-MS gefunden werden konnte.

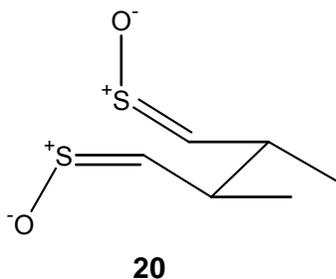


Abbildung 19: (Z,Z)-(\pm)-2,3-Dimethylbutandithial S,S'-Dioxid **20**.

1.6.6.7 Die Deoxycepaene

In destillierten Ölen von Schalotten und Winterzwiebeln konnten α -Sulfinyldisulfide **43** nachgewiesen werden.^[56, 69]

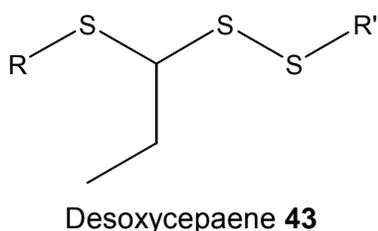


Abbildung 20: „Deoxycepaene“ in Ölen von Zwiebeln nach Block *et al.*^[9] R, R' = -CH₃, -C₂H₅ und -CH=CHCH₃).

Die sauerstofffreien Analogverbindungen der Cepaene, Alk(en)yl-1-[alk(en)ylthio]propyldisulfide, wurden von Block *et al.*^[9] als „Deoxycepane“ benannt. Es ist unbekannt, ob diese Verbindungen durch Deoxygenierung von Cepaenen oder auf völlig andere Art und Weise gebildet werden.

1.7 γ -Glutamyl-Cysteinsulfoxide

Bis heute sind mehr als 20 schwefel- und selenhaltigen γ -Glutamylpeptide der Gattung *Allium* identifiziert worden.^[34, 70] Sie werden als Speicherform von Stickstoff, Schwefel und Selen in den Pflanzen, aber auch als Zwischenprodukt bei der Biosynthese von S-Alk(en)yl-Cysteinsulfoxiden bzw. Se-Methyl-Selenocystein angesehen.^[34, 71] Die bedeutendsten Vertreter von γ -Glutamylpeptiden sind in Abbildung 21 wiedergegeben.^[72]

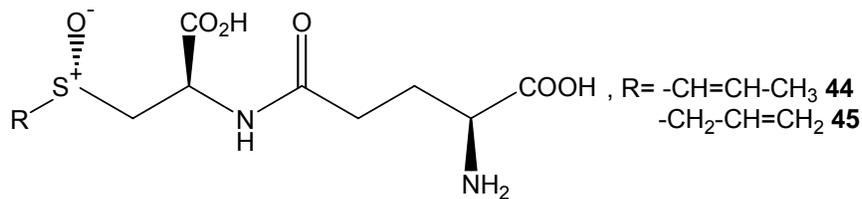


Abbildung 21: γ -Glutamyl-*trans*-S-1-Propenylcysteinsulfoxid **44** in Zwiebel und γ -Glutamyl-S-2-Propenylcysteinsulfoxid **45** in Knoblauch.

Die Hemmung der Resorption der Knochensubstanz von **44** wurde bereits von Herbert *et al.* untersucht. γ -Glutamylpeptid **45** zeigte eine cholesterinsenkende Wirkung.^[73]

Das Enzym γ -Glutamyl-Transpeptidase transferiert die γ -Glutamyl-Gruppe von γ -Glutamylpeptiden zu den Aminosäuren oder den anderen Peptidvorstufen, wobei als Produkte dieser Biosynthesewege die S-Alk(en)yl-Cysteinsulfoxide gespalten werden können.^[70]

1.8 Selenverbindungen

Allium Spezies können eine beachtliche Menge Selen aus dem Erdboden aufnehmen und speichern. Selen wird als Alternative zu Schwefel in Aminosäuren eingebaut, die zu Selenocystein-Derivaten weiter reagieren können.^[34, 74]

Durch die Anreicherung von Selen in Pflanzen aus den Se-reichen Böden nimmt signifikant die Wirkung von Zwiebel- und Knoblauchextrakten bei der Prävention und der Hemmung von Krebserkrankungen zu. Im Jahr 2004 berichtete Auger *et al.*^[34] über die Isolierung von Selenomethionin, Selenosystein und Se-Methyl-L-Selenocystein **46** aus Zwiebel und Knoblauch, wobei das Se-Methyl-L-Selenocystein **46** und das γ -Glutamyl-Se-Methyl-L-Selenocystein **47** über eine höhere Anti-Krebs-Aktivität im Vergleich zu den Schwefel-Analoga verfügen

(Abbildung 22). El-Bayoumy *et al.*^[75] beschrieb 2006 *in vivo* die starke chemopräventive Wirkung der synthetischen Diallylselenide gegen Brustkrebs bei Mäusen und Ratten.

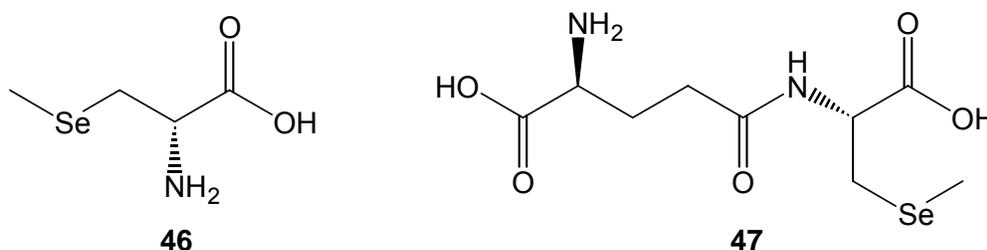


Abbildung 22: Das natürlich vorkommende Se-Methyl-L-Selenocystein **46** und γ -Glutamyl-Se-Methyl-L-Selenocystein **47**.

1.9 Weitere wirksame Inhaltsstoffe der Arten der Gattung *Allium* L.

1.9.1 Phenole und Flavonoide

Die entdeckten antioxidativen Eigenschaften der *Allium*-Pflanzen lassen sich nicht nur durch die schwefelhaltigen Verbindungen erklären. Mit ihrer Polyphenolstrukturen spielen auch Flavonoide, Hydroxyzimtsäure- und Phenolsäure-Derivate bei diesen Eigenschaften eine entscheidende Rolle.^[76] Einige Flavonoide aus der Gruppe der Chalkone, Flavonole und Anthocyane wurden aus den Zwiebeln der Gattung *Allium* isoliert.^[77, 78]

Schalotten sind die einzigen *Allium*-Arten, die das Chalkon Isoliquiritigenin **48** enthalten. Isoliquiritigenin hat eine starke Antioxidationswirkung und hemmt die Zellproliferation in menschlichen Leber- und Lungenkrebszellen.^[79] In der Zwiebel kommen überwiegend die Flavonole Quercetin **49** und seine Glykosid-Derivate, Rutin, Kaempferol und Isorhamnetin sowie die Anthocyanidin-Derivate vor.^[78, 80]

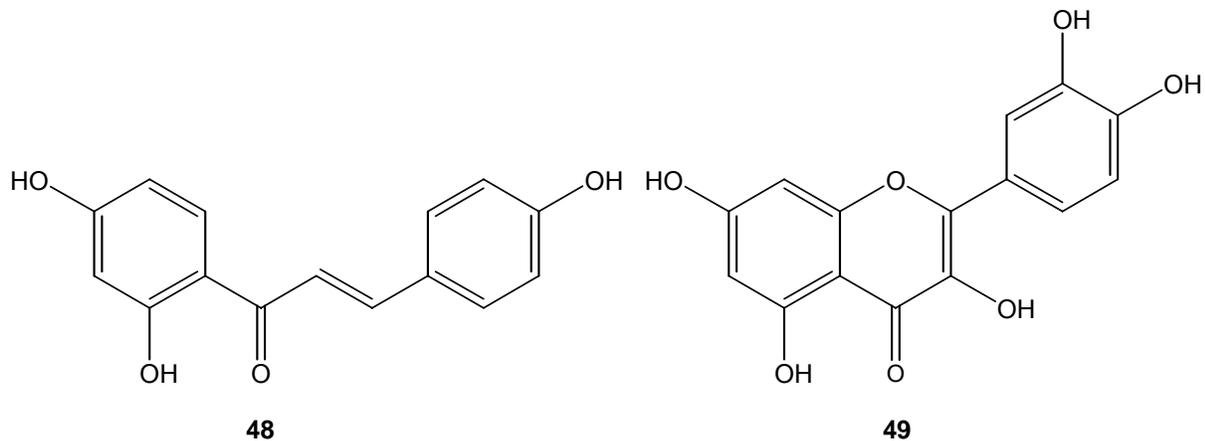


Abbildung 23: Isoliquiritigenin **48** aus Schalotten (*Allium cepa* var. *Aggregatum*) und Quercetin **49** aus der Zwiebel (*Allium cepa* L.).

1.9.2 Neuartige Proteine

Im Jahr 2002 isolierten Wang et al.^[81] das Peptid Ascalin mit einem Molekulargewicht vom 9.5 kDa aus den Schalotten-Zwiebeln. Ascalin inhibiert das Myzelwachstum vom *Botrytis cinerea*-Pilz und hemmt die menschliche reverse Immunschwächevirus-Type 1 (HIV-1)-Transkriptase mit einem sehr niedrigen IC₅₀-Wert von 10 µM. Das isolierte Peptid Allicepin^[82] aus den Zwiebelsamen wirkt gegen pflanzenschädige Pilze *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola* und *Physalospora piricola*. Das Knoblauchprotein Alliumin^[83] wirkt zum einen antimikrobiell und zum anderen antiproliferativ. Alliumin hat ein Molekulargewicht von 13 kDa.

1.9.3 Fruktane

Die Fruktane sind die Speicherform von Kohlenhydraten in Zwiebeln der *Allium*-Pflanzen. Die Fruktane sind Polysaccharide, die vollständig aus Oligofruktose-Einheiten aufgebaut sind.^[84] In den Schalotten bzw. in der Zwiebel liegt der Polymerisationsgrad bei bis zu 18 Zuckereinheiten.^[28] Im Knoblauch ist der Polymerisierungsgrad bedeutend höher und liegt bei bis zu 60 Einheiten.^[18] Die Kohlenhydraten sind für die Aromabildung und für den Süßgeschmack einiger *Allium*-Arten verantwortlich.^[8] Die Fruktane können in dem Dünndarm nicht verdauen werden und sind eine Energiequelle für die bakterielle Synthetisierung der β-Fruktosidase [EC 3.2.1.26] im Blinddarm.^[8] Laut Muir et al.^[84] können Polysaccharide, die einen

höheren Polymerisationsgrad besitzen, unerwünschte gastrointestinale Nebenwirkungen auslösen.

1.9.4 Steroidsaponine

Die Steroidsaponine sind in *Allium*-Pflanzen sehr weit verbreitet und bisher konnten Spirostanol- und Furostanolglykoside aus diesen Gewächsen isoliert werden.^[29] Bezogen auf das Trockengewicht in den Speicherorganen enthält Knoblauch 0.3-1.1% Saponine. Die vielfältigen Wirkungen^[8] der Knoblauch-Steroidsaponine sind bereits nachgewiesen. Sie umfassen u.a. hämolytische, antiparasitäre und fungizide, cytotoxische und Cholesterin senkende Wirkungen^[85].

1.9.5 Vitamine, Mineralstoffe und biologische Elektrolyte

Eine weitere Reihe von bioaktiven Inhaltsstoffen besteht aus verschiedenen Vitamine der B-Komplex Gruppe wie Thiamin (B₁), Riboflavin (B₂), Pyridoxin (B₆), Biotin, Nikotin-, Fol-, und Pantothensäure, Vitamin A (Retinoide), Vitamin C (Ascorbinsäure) sowie Apfel- und Zitronensäure, die aus den Extrakten der *Allium*-Arten isoliert werden konnten.^[18, 30, 33]

In *Allium*-Pflanzen sind außerdem eine Vielzahl an Mineralstoffen und biologischen Elektrolyten u.a. Manganesium, Kupfer, Eisen, Magnesium, Kalzium bzw. Kalium und Natrium, enthalten (United States Department of Agriculture (USDA), National Nutrient data base, Agricultural Research Service).

1.9.6 Wasser

Der Wassergehalt von frischen Zwiebeln beträgt ca. 90 % und vom Knoblauch ca. 65%. Abhängig von Anbauort, Transport- und Lagerungsbedingungen sowie Verarbeitung, kann der Wassergehalt zwischen den pflanzlichen Proben variieren.

1.10 Einsatz chromatographischer Trennverfahren bei der Isolierung von Naturstoffen

Chromatographische Trennverfahren nehmen eine zentrale Stellung in der Analytik und Auftrennung komplexer Substanzgemische u.a. Extrakte ein. Zusammen mit der multidimensionalen Kernspinresonanzspektroskopie und der hochauflösenden Massenspektrometrie als Kopplungstechniken bildet heute die Chromatographie eine eigenständige Methodik, nicht nur zur quantitativen Analyse, sondern auch zur Identifizierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen, auch wenn weniger als ein Milligramm Substanz isoliert werden kann.

Als Chromatographie wird die analytische sowie präparative Auftrennung von Zwei- oder Mehrkomponentensystem durch Transport- und Verteilungsvorgänge an der Grenzfläche zweier nicht miteinander mischbarer Phasen bezeichnet. Die stationäre Phase besteht aus einem hochporösen Trägermaterial, das von der mobilen Phase (Eluent) durchströmt wird.^[86, 87]

Neben der Flüssigkeitschromatographie (LC) gibt es als chromatographische Trennungsmethode für eine schnelle und grobe Extraktfraktionierung die radiale Dünnschichtchromatographie. Die beiden Trennverfahren werden in der vorliegenden Arbeit weiterhin berücksichtigt.

1.11 Flüssigkeitschromatographie

Vor allem wegen ihrer besseren Trennleistung und der Möglichkeit, die Inhaltsstoffkonzentration quantitativ zu bestimmen, wird die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie HPLC (ein Teil der LC) als Trennmethode zur chromatographischen Identifizierung und Isolierung der pflanzlichen Inhaltsstoffe eingesetzt. Die Pflanzenextrakte bestehen aus Produkten des Primär- bzw. Sekundärstoffwechsels. Diese strukturell ähnlichen Verbindungen gehören meistens zu einer bestimmten Substanzklasse und zeichnen sich durch eine hohe chemische und strukturelle Komplexität aus. Dabei führt die Auftrennung der Extrakte normalerweise zu sehr komplexen Chromatogrammen. Hierbei liefert die notwendige Gradientenelution eine bessere Auftrennung aufgrund der großen Polaritätsunterschiede der Substanzen innerhalb der Probe.^[86, 87]

Mittels HPLC können schwer- oder nichtflüchtige, stark polare oder ionische, als auch thermisch labile und leicht zersetzliche Substanzen chromatographiert werden. Der Trennerfolg hängt von der richtigen Auswahl der chemischen Natur der stationären Phase, der Zusammensetzung der

mobilen Phase und auch von den Kenntnissen über chemische Struktur und Eigenschaften der zu trennenden Substanzen ab.^[86-90]

1.11.1 Prinzip der linearen Adsorptionschromatographie

In der analytischen Chromatographie werden nur kleine Probenkonzentrationen auf die Trennsäule aufgebracht. Dies ermöglicht bei kurzer Analysezeit eine effiziente Stoffauftrennung. Die von dem Detektor erfassten Peaks besitzen eine Symmetrie, die die lineare und mathematische Beschreibung der Verteilungsgleichgewichte der Stoffe zwischen der mobilen und stationären Phase definiert. Deshalb wird dies auch als lineare Chromatographie bezeichnet.^[86-89, 91]

Zur Beschreibung des chromatographischen Trennprozesses werden einige grundlegende Definitionen wiedergegeben.^[86-89, 91]

Zum Zeitpunkt $t=0$ wird direkt am Säulenanfang das zuvor gelöste, zu trennende Substanzgemisch auf die mobile Phase gegeben. Die eluierten Substanzen werden von der mobilen Phase durch die Säule transportiert. Während dieses Transportes gehen die zu trennenden Moleküle unterschiedlich starke Wechselwirkung mit der stationären Phase ein, wobei sie sich verschieden lange an der Oberfläche der stationären Phase aufhalten. Ein Molekül wechselt mehrmals vom Eluenten an die stationäre Phase und zurück.^[86-89]

Die getrennten Komponenten verlassen nacheinander die Trennsäule und werden aufgrund ihrer physikalischen oder chemischen Eigenschaften vom Detektor erfasst. Der Detektor wandelt das stoffspezifische Signal eines Moleküls in ein elektrisches Signal um. Diese elektrischen Signale werden von einem Schreiber in Abhängigkeit von der Zeit als Chromatogramm (Peaks) dargestellt. Die Peaks liefern, in Form von Gaußverteilungen, qualitative und quantitative Information über das untersuchte Stoffgemisch. Die Retentionszeiten der Peaks geben die qualitative Information, da die Retentionszeit einer Komponente bei gleichen chromatographischen Bedingungen immer gleich groß ist. Die Peakfläche liefert die quantitative Information über der Zusammensetzung des Gemisches und ist proportional der injizierten Stoffmenge.^[86-89]

Das Chromatogramm liefert Informationen über den Verlauf der Trennung auf der Säule zwischen der Probenaufgabe und Detektion.^[86-89, 91] Abbildung 24 stellt ein Chromatogramm von drei Substanzen dar, von denen eine keine Wechselwirkung mit der stationären Phase zeigt. Die Elution einer Komponente, die in keine Wechselwirkung mit der stationären Phase tritt und somit durch das chromatographische Bett gespült wird, ergibt die Totzeit t_0 der Säule.^[86-89]

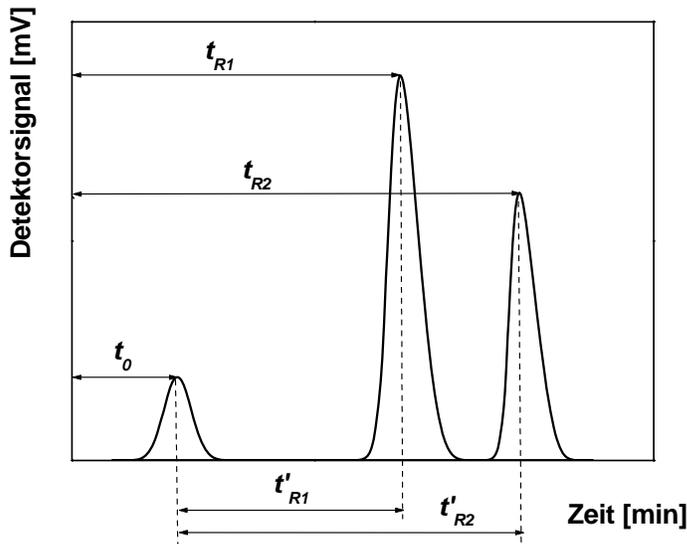


Abbildung 24: Das Chromatogramm eines Gemisches aus drei Komponenten.

Die Komponenten 1 und 2 werden nach dem Totzeitpeak zu den Zeiten t_{R1} und t_{R2} eluiert und vom Detektor als Peaks erfasst. Diese Zeiten nennt man Retentionszeiten. Retentionszeit $t_{R,i}$ entspricht der Zeit von der Injektion bis zum Elution des Maximums des Peaks. Zwei verschiedene Komponenten werden voneinander getrennt, wenn ihre Retentionszeiten nicht gleich groß sind. Die Differenz zwischen Retentionszeit t_{Ri} und Totzeit t_0 ist als Nettoretentionszeit t'_{Ri} bezeichnet:

$$t'_{Ri} = t_{Ri} - t_0. \quad (1.1)$$

Eine Komponente wird später eluiert, desto länger sie an der stationären Phase aufhält.

Ein Maß für die Retention einer adsorbierbaren Substanz ist der Kapazitätsfaktor k'_i , der als Quotient aus Nettoretentionszeit und Totzeit definiert wird:

$$k'_i = \frac{t_{Ri} - t_0}{t_0} = \frac{t'_{Ri}}{t_0}. \quad (1.2)$$

Der Kapazitätsfaktor ist von der Länge der Trennsäule und der Flussgeschwindigkeit des Eluenten unabhängig.^[87]

Die Trennung eines binären Systems kann mit dem Trennfaktor α beschrieben werden:

$$\alpha_{21} = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}, \quad k'_2 > k'_1. \quad (1.3)$$

Der Trennfaktor definiert die Selektivität des chromatographischen Systems. Zwei Substanzen werden voneinander nicht getrennt, wenn ihre Kapazitätsfaktoren gleich groß sind.

Zur Qualifizierung der Trennung zweier Komponenten sollen nicht nur die Peakmaxima, sondern auch die Peakflächen voneinander getrennt werden. Dabei lässt sich die Auflösung R zweier benachbarter Peaks durch die Breiten der Peaks $w_{0.5}$ auf halber Höhe $h_{0.5}$ berechnen:

$$R = 1.8 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{0.5,1} + w_{0.5,2}}. \quad (1.4)$$

Eine Auflösung von $R=1.25$ ist für die analytische Trennung ausreichend.

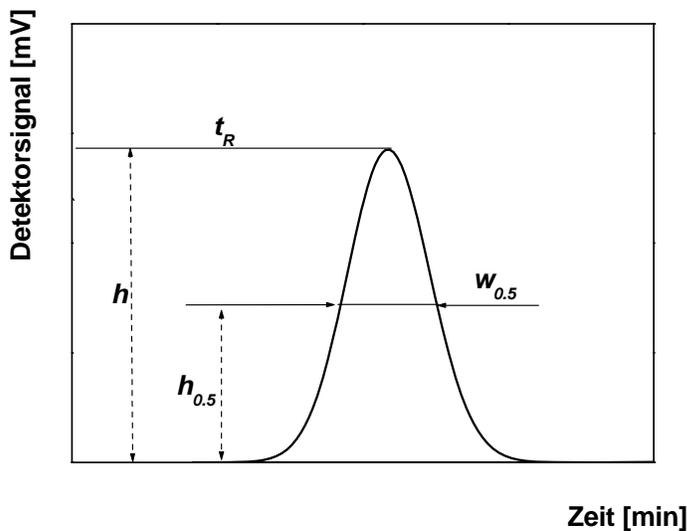


Abbildung 25: Parameter einer Gaußkurve.

Die Bodenzahl N charakterisiert die Leistungsfähigkeit der Trennsäule. Die Anzahl der theoretischen Böden für einen gaußförmigen Peak kann mit der folgenden Gleichung definiert werden:^[87]

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{0.5}} \right)^2. \quad (1.5)$$

Zur Bestimmung der Trennleistung einer chromatographischen Säule wird die zeitliche Peakbreite $w_{0.5}$ auf halber Höhe des Peaks verwendet. (Abbildung 25)

Eine Säule mit großer Anzahl der theoretischen Böden kann auch Komponenten trennen, die sich in ihrem Trennfaktor nicht stark unterscheiden.

1.11.2 Phasensystem in der Adsorptionschromatographie

Nach der Art der stationären Phasen, der eingesetzten Eluenten und der Art der Wechselwirkung zwischen stationärer Phase und den zu trennenden Stoffen lassen sich verschiedene Arten der chromatographischen Trennung unterteilen. Neben der Adsorptionschromatographie, die weiterhin in der Dissertation berücksichtigt wurde, existieren die Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie, die Ausschlusschromatographie und die Chromatographie durch ionische Effekte.^[86-89]

In der Adsorptionschromatographie wird zwischen zwei Typen von Phasen, dem Normalphasen- und Umkehrphasen-System unterschieden. Das Phasensystem in der Normalphasen-Chromatographie (NP) besteht aus einer polaren stationären (Siliciumdioxid) und einer unpolaren mobilen Phase. Die Moleküle der mobilen Phase und der zu trennenden Substanzen treten mit den freien Hydroxylgruppen (Silanolgruppen) des Kieselgels in Wechselwirkung. Um unpolare bis mittelpolare Moleküle zu chromatographieren, wird eine relativ unpolare mobile Phase wie z.B. Hexan verwendet. Eine unpolare mobile Phase eluieren langsamer als eine stärker polare, wobei die Retention mit zunehmender Polarität steigt.^[86-89]

Die chemische Umsetzung der freien Silanolgruppen mit Kohlenwasserstoffketten führt zur Umkehrung^[87] der Polarität der stationären Phase. Hierbei spricht man von Umkehrphasen-Chromatographie (Reversed-Phase-Chromatographie, RP). Neben der am häufigsten verwendeten stationären Phase Octadecylsilan (ODS, C-18-Ketten [RP-18]) werden auch C-8-Ketten [RP-8] oder kürzere Alkylketten, sowie Cyclohexyl- und Phenylgruppen eingesetzt. Als mobile Phase werden polare Lösungsmittel wie z.B. Wasser, wässrige Pufferlösungen, Methanol und Acetonitril verwendet, um polare Moleküle zu trennen. Die Moleküle treten in Wechselwirkung mit einer sehr unpolare Grenzfläche der stationären Phase.

Dabei nimmt die Retention mit zunehmender Alkyllänge den eingefügten Alkylresten zu und mit steigender Polarität ab.^[86-89]

Moleküle, die sich nur in ihrer sterischen Struktur unterscheiden, lassen sich gut durch Adsorptionschromatographie trennen.

1.11.3 Lösungsmittelgradienten

Die Auftrennung der Extrakte macht es erforderlich die chromatographischen Bedingungen während des Prozesses zu verändern, d.h. die sogenannte Gradientenelution anzuwenden. In vorliegender Arbeit wurden hauptsächlich Lösungsmittelgradienten betrachtet.

Die Lösungsmittelgradienten^[90-92] können nach der Anzahl der beteiligten Eluenten oder nach der zeitlichen Veränderung der Lösungsmittelzusammensetzung klassifiziert werden. Bei binären Lösungsmittelgradienten verwendet man in der Regel eine Mischung aus einem polaren und einem unpolaren Lösungsmittel, wobei die Elutionskraft der Mischung durch den Anteil des polaren Lösungsmittels gesteuert wird. Durch Variation dieser Elutionskraft gelingt es, dass gut adsorbierte Komponenten nicht gleich schnell bzw. konzentriert eluiert werden. Die chromatographische Trennung zweier Komponenten unter Einsatz eines linearen Gradienten (durchgezogene Linien) und bei isokratischen Bedingungen (punktierte Linien) ist in Abbildung 26 schematisch dargestellt.^[90]

Unter isokratische Arbeitsweise werden die chromatographischen Bedingungen wie Zusammensetzung der mobilen Phase, Druck und Temperatur, im Vergleich mit der Gradientenelution konstant gehalten.^[90]

Als Alternative ist neben dem linearen Gradienten ein einfacher stufen Gradient illustriert (Abbildung 26).

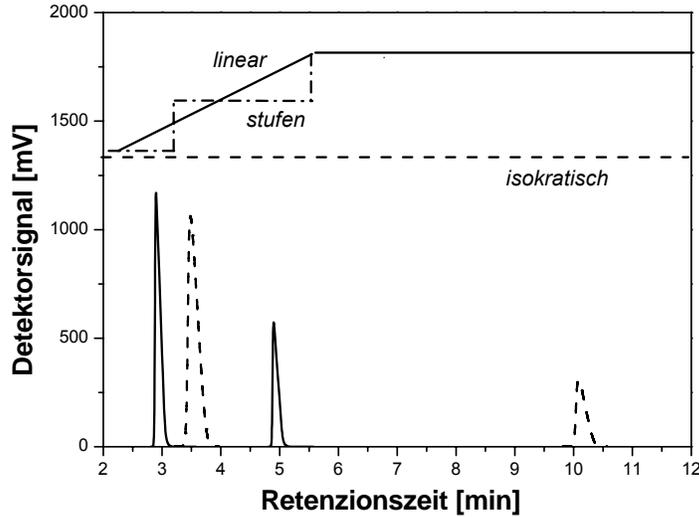


Abbildung 26: Einfluss eines linearen Gradienten auf den Verlauf der chromatographischen Trennung zweier Komponenten.

1.11.4 Kalibrierung des UV-Detektors

Die quantitative Bestimmung der komplexen Zusammensetzung der Extrakte benötigt die Anwendung von Kalibrationstechniken mit internen oder externen Standards. Die externen Standards (Referenzsubstanzen) werden aus Pflanzenextrakten isoliert, nach bekannten Methoden synthetisiert oder eingekauft. Ein ganz definierter interner Standard wird eingesetzt, wenn er ähnlichen Eigenschaften wie die Probe in Bezug auf Probenvorbereitung, Detektion und chromatographische Trennung besitzt.^[86, 87, 91]

Zur quantitativen Bestimmung der Zusammensetzung einer komplexen Matrix muss ein UV-Detektor mit der entsprechenden Komponente (interner oder externer Standard) genau bekannter Konzentrationen kalibriert werden. Diese Detektorkalibrierung führt zur Ermittlung eines funktionellen Zusammenhangs zwischen der Substanzkonzentration und dem Detektorsignal, wobei der Anstieg der Funktion dem stoffspezifischen Kalibrationsfaktor k_f entspricht.^[86, 87, 91]

Als Detektorantwort entsteht bei jeder Injektion ein Peak, der als Signal S [mV] über die Zeit erfassen wird. Das aufgelöste Signal wird über die Peakfläche als Menge dargestellt und bestimmt

die Detektorempfindlichkeit. Die Konzentration c_{inj} der jeweiligen Lösung wird mit dem Injektionsvolumen V_{inj} multipliziert und so ergibt sich die injizierte Menge m_{inj} .^[86, 87, 91]

$$m_{inj} = c_{inj} V_{inj} . \quad (1.6)$$

Sind die injizierte Menge und die Kalibrationsfläche A^{Kal} bekannt, kann man den Kalibrationsfaktor k_f bestimmen:

$$m_{inj} = k_f A^{Kal} . \quad (1.7)$$

Der Kalibrationsfaktor gibt den Zusammenhang zwischen dem Signal und der Konzentration c [mg/ml] und entspricht die Steigung der Kalibrierungskurve in dem Linearitätsbereich des chromatographischen Detektors:

$$c = k_f S . \quad (1.8)$$

Die Kalibrierung auf drei verschiedenen Weisen (externer Standard, interner Standard oder Standardaddition) ermöglicht die quantitative Analyse eines Extraktes. Eine entsprechende Substanzkonzentration lässt sich über die bereits ermittelte Peakfläche und den stoffspezifischen Kalibrationsfaktor der Referenzsubstanz bestimmen.^[86, 87, 91]

1.11.5 Präparative (nichtlineare) Chromatographie

Die Isolierung größerer Substanzmengen in einer hohen Reinheit ist anhand präparativer HPLC möglich.^[86-89]

Für die präparative Auftrennung eines Substanzgemisches wird diese mit höherer Konzentration auf der Säule eingebracht. In der Regel wird der lineare Bereich der Adsorptionschromatographie durch diese höhere Konzentration verlassen. Man spricht deshalb von nichtlinearer Chromatographie, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit nicht mehr konstant und von der Konzentration abhängig ist. Die komplexe Zusammensetzung der Probe führt auch zu Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten. Deshalb spielt die Konkurrenz um freie Adsorptionsplätze auf der stationären Phase eine entscheidende Rolle. Das resultierende

Chromatogramm besitzt nicht mehr die typische Gaußverteilung und die mathematische Beschreibung des Trennprozesses ist erschwert.^[86-89, 91]

Ein analytisches Chromatogramm definiert die chromatographische Bedingungen einer präparativen Chromatographie. Nach der Optimierung der analytischen Trennung überträgt man die chromatographischen Bedingungen auf die präparative Säule, die mit derselben stationären Phase gefüllt ist. Die Trennung größerer Substanzmengen bedarf auch einer höher dimensionierten Trennsäule, d.h. einer höheren Bodenzahl. Um eine identische lineare Flussgeschwindigkeit der mobilen Phasen und damit eine vergleichbare Retentionszeiten zu erhalten, lässt sich ein Volumenstrom im präparativen Bereich (V_P) mit der folgenden Gleichung beschreiben:^[86]

$$\frac{V_A}{r_A^2} = \frac{V_P}{r_P^2} \quad (1.9)$$

wobei r_A , r_P die Radien der analytischen sowie präparativen Säule und V_A der Volumenstrom in dem analytischen Bereich sind. In Tabelle 3 sind einige typische Parameter der analytischen und präparativen Auftrennung wiedergegeben.^[86]

Säulendimension [mm]	Volumenstrom [ml/min]	Probemenge [mg]	Injektionsvolumen [μl]
250-4	1	ca. 5	5-80
250-10	6	ca. 30	30-500
250-25	39	ca. 200	200-3000
250-59	156	ca. 800	800-12500

Tabelle 3: Chromatographische Parameter der analytischen und präparativen Auftrennung.

Die Zusammensetzung der Probe bestimmt die entsprechende Probemenge, die auf die Säule aufgebracht wird.

1.12 Die Radialchromatographie

Aufgrund der äußerst nahe beieinander liegenden R_f -Faktoren der Inhaltsstoffe (bei der Dünnschichtchromatographie) können die Extrakte säulenchromatographisch grundlegend nicht getrennt werden. Als geeignete Methode für eine schnelle und grobe Extraktfraktionierung erweist sich die Verwendung der radialen Dünnschichtchromatographie, wobei die einwirkende Zentrifugalkraft die Auftrennung zusätzlich beschleunigt.^[14, 93]

Der Vorteil der Radialchromatographie liegt auch darin, dass im Vergleich zur üblichen Säulenchromatographie eine wesentlich geringere Menge an Kieselgel und Laufmittel benötigt wird. Dabei können die zersetzlichen Komponenten unter Inertgasatmosphäre (Stickstoff) aufgetrennt werden.

2 Thematik und Aufgabenstellung

2.1 Thematik

Die vorliegende Arbeit ist ein Bestandteil des Verbundprojekts InnoRegio-Projekt REPHYNA Sachsen-Anhalt „Untersuchungen zur Entwicklung neuer hochwertiger pflanzlicher Inhaltsstoffe als Rohstoffe für Nahrungsergänzungsmittel, Functional Food sowie Pflegekosmetika“, das die Zielstellung hat, die einheimischen Heil- und Gewürzpflanzen (Gattung *Allium*) als Grundlage für die Herstellung innovativer Produkte zu benutzen. Abgesehen davon, dass die wertvollen, pharmakologisch wirksamen Inhaltsstoffe sich erst bei der Zerstörung der Zellstrukturen unter enzymatischen Reaktionen und anschließenden Sekundärreaktionen bilden, wird die Zusammensetzung der frischen Extrakte von den Reaktionsbedingungen abhängig. Im Rahmen des InnoRegio-Projektes sollten von dem Kooperationspartner LUS GmbH Verfahren entwickelt werden, die den Ablauf der enzymatischen Reaktionen in den Pflanzen steuern können. Damit sollten Extrakte mit einem optimierten und definierten Inhaltsstoffspektrum bereitgestellt werden. Eine Aussage zur Beziehung zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung der Inhaltsstoffe und synthetischen Naturstoffanaloga sollten durch die Zusammenarbeit mit der IMTM GmbH ermöglicht werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollten als eine wertvolle Grundlage zur gezielten Entwicklung standardisierter Extraktauszüge mit definiertem Inhaltsstoffspektrum für hochwertige Pflegekosmetika und innovative Phytopharmaka, sowie vor allem für die Lebensmittelindustrie als Nahrungsergänzungsmitteln dienen.

Die frischen Schalottenextrakte (*Allium cepa* var. *Aggregatum*) sind bezüglich ihrer biologischen Aktivität, ihrer Zusammensetzung und chemischen Struktur der Inhaltskomponenten derzeit wenig untersucht. Damit können diese als Forschungsobjekt des Teilprojektes vorgesehen werden. Um Erkenntnisse über die biologischen und chemischen Eigenschaften der Inhaltsstoffe zu erhalten, sollten die Schalotten weiterhin untersucht werden.

2.2 Untersuchungen der biologischen Aktivität von *Allium cepa* var. *Aggregatum*

Die gesundheitsfördernden Eigenschaften der frischen Schalottenextrakte konnten über die Kooperation zwischen LUS GmbH und IMTM GmbH ermittelt werden.

Extrakte der neuen Pflanzensorten *Bonilla* und *Ambition*, gezüchtet in der Agrargenossenschaft Calbe Sachsen-Anhalt, wurden bezüglich ihrer inflammatorischen und zytotoxischen Wirkung *in vitro* von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. S. Ansorge (IMTM GmbH) untersucht. Von allen Schalottenextrakten hemmt die *Bonilla*-Sorte die Histamin-Ausschüttung bis zu einer Konzentration von 0,24 g/L und zeigt eine signifikante Reduktion der allergischen Reaktion bei Insektenstichen. Bei diesen Untersuchungen konnten keine toxischen Effekte nachgewiesen werden. Konzentrationen bis zu 2 g/L rufen keine Hautirritationen hervor.^[6] Diese Ergebnisse waren die Grundlage der vorliegenden Dissertation, um zu erforschen, welche Komponenten für die pharmazeutische Wirkung des *Bonilla*-Extraktes verantwortlich sind.

Frische *Bonilla*-Extrakte mit definiertem Inhaltsstoffsspektrum wurden von der Arbeitsgruppe um Dr. L. Lücke (LUS GmbH) für die vorgesehenen Untersuchungen bereitgestellt.

2.3 Aufgabenstellung

Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben den Charakter der Grundlagenforschung und erfolgen in einer engen und parallelen Zusammenarbeit mit den Partnern LUS GmbH und IMTM GmbH innerhalb des Verbundprojekts InnoRegio-Projektes REPHYNA.

Das grundlegende Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung und Isolierung von literaturbekannten Thiosulfonaten und Sekundärmetaboliten aus dem Schalottenextrakt, Sorte *Bonilla*.

Der frische *Bonilla*-Extrakt sollte zuerst durch HPLC qualitativ und quantitativ charakterisiert werden. Hierzu sollten Primär- und Sekundärmetabolite isoliert werden. Zur Auftrennung des Pflanzenextraktes sollten geeignete Verfahren auf einer analytischen HPLC-Anlage (TechLab Chromatography GmbH (Eckeröde, Deutschland) mit UV-Detektor entwickelt werden. Zur Isolierung der einzelnen Komponenten sollte die neue entwickelte HPLC-Methodik auf eine präparative HPLC-Anlage (Merck/SepTechTM, Darmstadt, Deutschland) übertragen und optimiert werden.

Eine präparative Vortrennung sollte mit einem Chromatotron Modell 7924T (Harrison Research[®], USA) ausgeführt werden. Dabei sollte eine schnelle und grobe Extraktfraktionierung erfolgt werden, wobei die Unterfraktionen auf die HPLC-Anlage weiterhin chromatographiert werden sollten.

Zur quantitativen Bestimmung des Extraktes sollte der UV-Detektor mit einem externen Standard genau bekannter Konzentrationen kalibriert werden. Dazu sollten literaturbekannten

gesättigten und ungesättigten Thiosulfinate nach ausgewählten Synthesewegen hergestellt werden. Die Naturstoffanaloga sollten auch als Referenzsubstanzen verwendet werden, wobei deren chromatographische Auftrennung nach bereits entwickelten HPLC-Techniken durchgeführt werden sollte. Hierbei sollte eine qualitative Peak-Zuordnung bekannter Komponenten entstehen.

Die chemischen Strukturen der biologisch wirksamen Inhaltskomponenten des Extraktes sollten mittels verzahnter Anwendung von NMR, HPLC-MS, HR-MS aufgeklärt werden. Die Strukturaufklärung dieser Komponenten konnte durch die Kenntnisse von Kernspinresonanz-Spektren (NMR) der Referenzsubstanzen unterstützt werden.

Eine Übertragung der entwickelten HPLC-Techniken auf andere Extrakte sollte versucht werden. Hierfür sollten neben Extrakte des *Allium cepa* var. *Aggregatum* (Sorte *Bonilla*, *Ambition*) auch Extrakte des *Allium ursinum* (Bärlauch) mit der entwickelten Methodik qualitativ untersucht.

Um die entzündungshemmende Wirkung der Naturstoffanaloga von IMTM GmbH untersuchen zu können, sollte eine ausreichende Substanzmenge der empfindlichen und instabilen Strukturen zur Verfügung gestellt werden. Dadurch konnte eine Aussage getroffen werden, ob der Extrakt und die einzelnen Naturstoffanaloga gleich biologisch wirksam sind.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit sind die Vorstudien zur Totalsynthese von *cis*-/ *trans*-Zwiebelan. Die Naturstoffanaloga sollten über eine Thionierung von 2,3-substituierten 1,4-bis-Acylsilanen und darauffolgende intramolekulare [2+2]-Cycloaddition vom instabilen Intermediat **34c** zugänglich sein. Daher sollte ein neuer Syntheseweg entwickelt werden.

Im Rahmen dieses kurzen experimentellen Teils sollte zunächst ein effizienter Zugang zu den 2,3-substituierten 1,4-bis-Acylsilanen **62a** und **64a** erarbeitet werden. Hierbei sollte eine Thionierung von **62a** und **64a** versucht werden. Um den gewünschten bis-Thioamidverbindungen **67a**, **64b** bzw. **66c** zu erreichen, die möglicherweise in einer intramolekularen [2+2]-Cycloaddition spontan eingehen könnten, soll alternativ eine direkte Thionierung der *meso*-Dimethylbernsteinsäure-Derivate **67**, **64** bzw. **66** durchgeführt werden.

3 Theoretischer Teil

3.1 Isolierung und Strukturaufklärung von Aromakomponenten aus Schalotten (*Allium cepa* var. *Aggregatum*)

3.1.1 Gesättigte und ungesättigte Thiosulfinate

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von Dimethyl- **12** und Dipropylthiosulfinat **13** aus dem Extrakt standen in Übereinstimmung mit den entsprechenden Werten der synthetischen Substanzen bzw. den von Th. Bayer^[14] angegebenen. Die Co-Chromatographie der Naturstoffe mit dem synthetischen **12** und **13** ergab keine Abweichung.

Die NMR- und HPLC-Daten der α , β -ungesättigten Thiosulfinate stimmen mit den Ergebnissen synthetischer^[14] und literaturbekannter Verbindungen überein^[56]. Die olefinischen Protonen an der Doppelbindung (C1/C2-Atom) der *cis*-Verbindung [*Z*]-**14** und [*Z*]-**16** koppelten mit 9.0 Hz, wobei eine Fernkopplung von 1.5 Hz zwischen den Methylprotonen und den olefinischen Protonen ausgewertet wurde. Die Signale beider olefinischer Protonen des *trans*-Isomers **14** bzw. **16** überlagerten sich zu einem System höherer Ordnung und erschienen als Multipletts; die Kopplungskonstanten beider Thiosulfinate konnten jedoch nicht bestimmt werden. Die ermittelte Kopplungskonstante von 14.8 Hz bzw. 6.7 Hz bewies die *trans*-Konfiguration der Doppelbindung am C1/C2-Atom von **17**.

Die charakteristischen NMR-, MS-, HPLC-MS- und DC-Ergebnisse der Thiosulfinate (**12** - **14**, **16** und **17**) sind in Kapitel 5.5.1 bzw. Kapitel 5.5.2 dargestellt.

3.1.2 Zwiebelane

Die Zwiebelane **33** und **34** wurden aus der Extraktfraktion F2 isoliert und mittels NMR analysiert. Unter den „NP-HPLC System 1“ Bedingungen konnten **33** und **34** bei 254 nm nicht detektiert werden, da diese über keinen aromatischen Chromophor im Molekül verfügten. Die Zwiebelane wurden mit einem sehr schwachen Maximum bei 220 nm chromatographiert.

Unter den chromatographischen Bedingungen „NP-HPLC System 1“ fiel der *cis*-Zwiebelan **33** mit den Substanzen **30b** und [*Z*]-**27** in einem Peak mit der Retentionszeit von 17.24 min zusammen. Das Verhältnis der Integrale äquivalenter Peaks bestimmte in den NMR-Spektren

der Unterfraktion III das Verhältnis 2:1:0.5 des Stoffgemisches **30b:33:[Z]-27**. *trans*-Zwiebelan **34** wurde aus der lipophilen Unterfraktion II des F2 in geringer Menge isoliert. Eine reproduzierbare Einzelauftrennung des *cis*- und *trans*-Zwiebelans war leider nicht möglich, da die Retentionszeiten beider Verbindungen sich in der analytischen HPLC wenig unterschieden (mit ca. 0.2 min).

Die chemischen Strukturen von **33** und **34** konnten über den gemischten NMR-Spektren eindeutig aufgeklärt werden. Die ermittelten NMR-Daten der isolierten Zwiebelane mit einer molekularen Masse von 162 g/mol zeigten eine deutliche Übereinstimmung mit literaturbekannten Daten.^[14, 56] Die erhaltenen Ergebnisse der Strukturaufklärung (NMR-, DC-Werte) sind in Kapitel 5.4.2 dargestellt.

3.1.3 Cepaene

3.1.3.1 *trans, trans*-1-(1-Propenyldisulfanylpropan-1-sulfinyl)propen **30**

Cepaene mit einer molekularen Masse von 236 g/mol bzw. von 238 g/mol wurden anhand analytischer HPLC und *n*-Hexan/*i*-Propanol als Eluent aus der Unterfraktion IV des F3 semipräparativ isoliert. Die HPLC-Untersuchung der erhaltenen Substanzen zeigte, dass die Substanzen **30a**, **30b** und **[Z]-27** in einem Peak mit Retentionszeit von 17.24 min zusammenfielen. Die Substanz **30c** konnte aus der Unterfraktion III mit $t_R=15.81$ min einzeln isoliert werden. Die chromatographischen Bedingungen sind im Kapitel 5.3.3 beschrieben.

Durch die zusätzlichen HPLC-MS-Messungen „RP-HPLC System 2“ wurden die Cepaene **30a**, **30b** und **[Z]-27** einzeln an einer Umkehrenphasen-Säule chromatographiert und weiter analysiert. Die Retentionszeiten der Verbindungen sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Verbindung	[<i>E</i> , ?]- 30a	[<i>E</i> , <i>E</i>]- 30b	[<i>E</i> , <i>E</i>]- 30c	[Z]-27
t_R [min]	11.187	11.610	11.692	11.735

Tabelle 1: Retentionszeiten der Verbindungen [*E*, ?]-**30a**, [*E*, *E*]-**30b**, [*E*, *E*]-**30c**, **[Z]-27**.

Die online aufgenommenen DAD-Spektren bei 220 nm (**30b**) bzw. 270 nm (**30c**) wiesen auf die nichtaromatischen Chromophore in der chemischen Struktur der Substanzen hin.

3.1.3.1.1 MS-Fragmentierung

Die ES-API-Massenspektren wurden zur Strukturbestimmung von **30a**, **30b** und **30c** herangezogen, da mit Elektronenstoßionisation (EI) wiederum kein Molekülpeak $[M+H]^+$ mit m/z 237 nachgewiesen werden konnte. Die Substanzen wiesen die gleichartige MS/MS-Fragmentierung des Molekulargewichtes 236 auf, wobei die Fragmente mit unterschiedlichen Intensitäten erschienen.

Bei der ES-API-MS-Messung der Substanzen fanden sich die positiv ionisierten **30a** und **30c** als Fragmente, wobei die Molekülpeaks $[M+2H]^+$ je mit m/z 238 eine Intensität von 6% bzw. 23% besaßen. Des Weiteren konnte das Fragment des gebildeten Dimers $[2M+2H]^+$ in der Ionenquelle mit m/z 474 (19% bzw. 8%) bestimmt werden. In der MS/MS-Fragmentierung wurde das Fragment $[CH_3CH=CHSSC_3H_6+H]^+$ von **30a** bzw. **30c** bei m/z 148 als Basispeak aufgenommen. Das ^{34}S -Isotopenmuster mit einer Intensität von 8% des Basispeaks entsprach dem Vorhandensein von zwei Schwefelatomen in dem Fragment. Im EI-MS-Spektrum wurde der Basispeak bei m/z 73.2 beobachtet, was für die Abspaltung des Fragmentes $[CH_3CH=CHS]^+$ aus dem Molekül von **30c** sprach.

Die ES-API-MS-Messung von **30b** und die literaturbekannten Daten ließen auf ein Molekül der Summenformel $C_9H_{16}OS_3$ $[M+2H]^+$ und einer Masse von 236 g/mol schließen, wobei zwei prominente Peaks bei höheren Massen mit m/z 148 (89%) bzw. m/z 474 (96%) erschienen. Das Fragment mit m/z 474 $[2M+2H]^+$ wies auf die Dimerbildung der Substanz nach. Der begleitende Peak mit 8% der Intensität des Fragmentes $[CH_3CH=CHSSC_3H_6]^+$ mit m/z 147 im EI-MS deutete wie bei **30a** und **30c** auf die Anwesenheit von zwei Schwefelatomen in diesem Fragment hin.

3.1.3.1.2 Strukturaufklärung mittels NMR

Zur Aufklärung der chemischen Strukturen von **30b** und **30c** wurden die Daten der NMR-Messungen mit Korrelationsexperimenten wie HH-COSY, HMBC, HSQC und NOESY herangezogen. Hochfeld- 1H -NMR-Spektren der Unterfraktion IV zeigten, dass die Substanz **30b** nicht einheitlich war. Es lag eine Mischung dreier Komponenten **30b:33:[Z]-27** im Verhältnis 2:1:0.5 vor, die chromatographisch unter „NP-HPLC System 1“ Bedingungen nicht getrennt werden konnten. Es war aber möglich, deren Strukturen aus den Spektren eindeutig zu ermitteln (Abbildung 1). Die Strukturaufklärung von **33** und **[Z]-27** wurde in Kapitel 5.4.1 bzw. Kapitel 5.4.2 diskutiert und beschrieben.

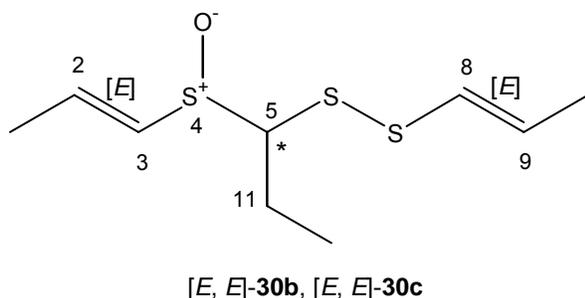


Abbildung 1: Struktur der natürlich vorkommenden Cepaene [E, E]-**30b** und [E, E]-**30c**.

Die NMR-Spektren der isolierten Verbindungen **30b** und **30c** mit der Masse von 236 g/mol zeigten starken Übereinstimmungen mit den NMR-Signalen der isolierten von Th. Bayer bzw. synthetisch hergestellter von Block *et al.* Cepaene.^[14, 56, 58] Die NMR-Daten bewiesen die Anwesenheit von zwei asymmetrischen Zentren im Molekül: eines am Kohlenstoff- (C5) bzw. eines am oxidierten Schwefelatom (S4). Das charakteristische Doppeldublett (dd) des entschirmten Protons am C5-Atom erschien bei 3.68 ppm für **30c** bzw. bei 3.51 ppm für **30b**. Die magnetisch nicht äquivalenten Methylenprotonen am C11-Atom koppelten mit dem entschirmten Proton und zeigten unterschiedliche chemische Verschiebungen. Deren Signale von Quartetts von Doppeldubletts waren zum Teil überlagert und erschienen als Multipletts bei 2.24-2.19 ppm und 1.47 - 1.40 ppm (**30c**) bzw. 2.29 - 2.25 ppm und 1.94 - 1.87 ppm (**30b**). Die beiden Verbindungen enthielten jeweils zwei Doppelbindungen (C2/C3- bzw. C8/C9-Atom) in *trans*-Konfiguration, da die olefinischen Protonen mit 15 Hz koppelten. Die charakteristischen ¹³C-NMR-Daten des C5- und C11-Atoms von **30b** und **30c** sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

¹ H-, ¹³ C-NMR	H (C5) [ppm]	C5 [ppm]	H (C11) [ppm]	H (C11) [ppm]	C11 [ppm]
30b	3.51 (dd)	74.74	2.29-2.25 (m)	1.94-1.87 (m)	20.19
30c	3.68 (dd)	73.90	2.24-2.19 (m)	1.47-1.40 (m)	18.50

Tabelle 2: Charakteristische ¹H- und ¹³C-NMR-Daten am C5- und C11-Atom von **30b** und **30c**.

Die ermittelten MS- und NMR-Ergebnisse von **30b** und **30c** sprachen für zwei Verbindungen, die als ein Diastereomerpaar bezeichnet werden konnten.

Die Verbindung **30a** mit einer Masse von 236 g/mol wurde durch ES-API-MS-Messung im Extrakt nachgewiesen (Abbildung 2). Eine Strukturaufklärung mittels NMR gelang nicht, da eine

sehr geringe Menge isoliert wurde. Auch konnte die *cis*- und *trans*-Geometrie der Doppelbindung am C8/C9-Atom nicht aufgeklärt werden.

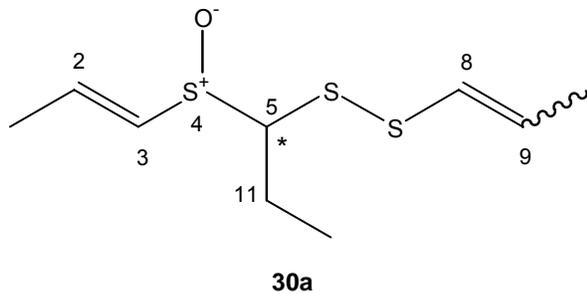


Abbildung 2: Struktur der natürlich vorkommenden Cepaene **30a**.

Die zugehörigen NMR, MS, HPLC-MS, DC-Ergebnisse der Cepaene **30a**, **30b** und **30c** sind in Kapitel 5.4.1 dargestellt.

Da die Cepaene **25**, **28**, **29**, [*Z*]-**30** als Diastereomerenpaare im Zwiebelextrakt (Zwiebelextrakt mit S-Propyl-*L*-Cysteinsulfoxid) isoliert wurden, konnte vermutet werden, dass eine Anwesenheit dieser Verbindungen im frischen Schalottenextrakt auch nicht ausgeschlossen werden sollte.^[14, 56, 58, 60] Die charakteristischen Doppeldoublets zwischen 3.80 ppm und 3.50 ppm in gemischten ¹H-NMR-Spektren der Fraktion F3 und F4 zeigten die typische chemische Verschiebung des entschirmten Protons am C5-Atom (SCHC₂H₅SS). Die zugehörigen chemischen Verschiebungen vom C5-Atom in ¹³C-NMR-Spektren wurden zwischen 77 ppm und 70 ppm aufgenommen. Der Vergleich dieser NMR-Spektren mit den literaturbekannten Daten von isolierten und synthetischen Cepaenen wiesen darauf hin, dass es sich bei diesen Verbindungen um weitere Cepaene handeln könnte.^[14, 56, 58, 60] Eine weitere Untersuchung von F3 und F4 konnte diese Vermutung eindeutig bestätigen.

3.1.3.2 *cis*-1-[1-(Propan-1-sulfinyl)propyl]disulfanyl]propen **27**, ein neu isolierter Naturstoff der Cepaen-Familie

Cepaen [*Z*]-**27** wurde mittels Normalphasen-HPLC aus der Unterfraktion IV der F3 in geringer Menge isoliert. Unter diesen chromatographischen Bedingungen fiel [*Z*]-**27** mit den Substanzen **30a** und **30b** in einem Peak mit Retentionszeit von 17.24 min zusammen. Eine methanolische Lösung des eingeeengten Gemisches aus [*Z*]-**27**, **30a** und **30b** wurde durch zusätzliches HPLC-

MS an einer Zorbax[®]CD8-Säule weiter chromatographiert. Unter den „RP-HPLC System 2“ Bedingungen konnte [Z]-27 mit einer Retentionszeit von 11.735 min einzeln identifiziert werden (Tabelle 1).

3.1.3.2.1 MS-Fragmentierung

Bei der ES-API-MS-Messung fand sich das positiv ionisierte Dimer von [Z]-27 als Fragment, wobei das Dimer-Ion $[2M+2H]^+$ mit m/z 478 eine relative Intensität von 80% besaß. Das Ion mit m/z 166 (relative Intensität 51%) konnte dem Fragment $[C_3H_7S(O)C_3H_6S+H]^+$ zugeordnet werden. Das Fragment $[MeCH=CHS+H]^+$ bei m/z 74 trat gegenüber m/z 166 in einer Intensität von 3% in Erscheinung. Bei der MS/MS-Fragmentierung zerfiel das Molekül noch in zwei Fragmenten mit m/z 106 (32%) und m/z 148 (46%), die $[MeCH=CHS_2+H]^+$ bzw. $[MeCH=CHSSC_3H_6+H]^+$ zugeordnet werden konnten. Bei der Elektronenstoßionisation (EI) wurde der Molekülpeak $[M+H]^+$ mit m/z 239.4 (2%) detektiert. Die MS-Fraktionierung im EI-MS und ES-API-MS der isolierten Komponente deutete auf eine Substanz mit drei Schwefelatomen und einer molekularen Masse von 238 g/mol (m/z 239.4, positive Ionisierung) hin.

3.1.3.2.2 Strukturaufklärung mittels NMR

Zur Strukturaufklärung von [Z]-27 wurden die Daten der ¹H-, HHCOSY-, HSQC- und HMBC-NMR-Messungen herangezogen. Die Struktur des in der Natur vorkommenden Cepaens [Z]-27 ist in Abbildung 3 dargestellt.

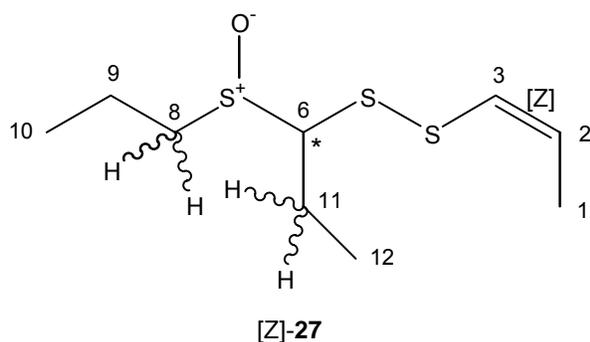


Abbildung 3: Struktur der natürlich vorkommenden Cepaene [Z]-27.

Aus dem gemischten NMR-Spektrum der Unterfraktion IV (F3) konnte die chemische Struktur der Substanz eindeutig abgeleitet werden. Das charakteristische Doppeldublett (3.50 ppm) des Protons am C6-Atom besaß Kopplungskonstanten von 10.6 Hz bzw. 3.5 Hz und eine chemische Verschiebung bei 72.05 ppm im HSQC-NMR Spektrum. Aufgrund der Asymmetrie des C6-Atoms zeigten die magnetisch nicht äquivalenten Methylenprotonen am C11-Atom stark unterschiedliche chemische Verschiebungen, wobei deren Signale als Multipletts bei 2.39-2.34 ppm und 1.94-1.91 ppm erschienen. Diese koppelten mit dem entschirmten Proton bei 3.50 ppm und den Protonen der Methylgruppe bei 1.14 ppm.

Die HMBC-Messung zeigte die Korrelation des Doppeldubletts bei 3.50 ppm mit dem Kohlenstoffatom (C8) bei 52.6 ppm. Hierdurch konnten beiden Molekülteilen zugeordnet werden. Die zugehörigen Protonen am C8-Atom zeigten unterschiedliche chemischen Verschiebungen und erschienen als Multipletts bei 3.12 ppm und 2.69 ppm, d.h. die Methylenprotonen waren, wie erwartet, magnetisch nicht äquivalent. Diese Protonen koppelten mit den Protonen bei 1.90 ppm (C9) sowie den Protonen der Methylgruppe bei 1.11 ppm (C10). Eine Korrelation zwischen den Protonen am C6- und C3-Atom konnte über die Disulfidbrücke nicht ermittelt werden.

Im Vergleich mit den olefinischen Protonen der *trans*-Doppelbindung an der Sulfoxidstruktur, der bereits diskutierten Cepaene **30a** und **30c**, erschienen die Signale zweier olefinischer Protonen der Substanz zwischen 6.12 ppm und 5.79 ppm. Dies lieferte ein weiteres Argument für das Vorliegen von Protonen an Doppelbindung in Nachbarschaft zu einer weniger elektronenziehenden Disulfidbrücke. Zusätzlich zu diesen Signalgruppen wurde im ^1H -NMR-Spektrum ein Doppeldublett (6.5 Hz und 1.5 Hz) einer Methylgruppe bei 1.80 ppm erkennbar. Die Analyse der Kopplungskonstanten sowie die H,H-COSY-Spektren zeigten, dass das obige Doppeldublett mit den olefinischen Protonen koppelte. Die Signalgruppe bei 5.79 ppm zeigte Aufspaltungen in Quartetts eines Dubletts mit 6.9 Hz und 9 Hz. Aufgrund der Kopplung mit der Methylgruppe in Stellung 1 wurden diese Signale dem Proton am C2-Atom zugeordnet. Das Proton am C3-Atom zeigte bei 6.12 ppm die erwartete Aufspaltung in Quartetts eines Dubletts mit 9 Hz und einer Fernkopplung von 1.5 Hz. Diese Dublettaufspaltung mit 9 Hz wies die *cis*-Konfiguration der C2/C3-Doppelbindung auf. Die charakteristischen ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von [**Z**]-**27** sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

[Z]-1-Propenyl-1-(Propylsulfinyl)propyldisulfid		
C-Atom	¹H [ppm]	¹³C [ppm]
10	1.11 (t)	12.80
9	1.91-1.87 (m)	16.50
8	3.14-3.09 (m) 2.73-2.67 (m)	52.34
6	3.50 (dd)	72.05
11	2.39-2.34 (m) 1.94-1.91 (m)	20.19
12	1.14 (t)	12.80
3	6.12-6.10 (qd)	128.50
2	5.82-5.76 (qd)	133.90
1	1.80 (dd)	18.50

Tabelle 3: Charakteristische ¹H- und ¹³C-NMR-Daten von [Z]-27.

Die zugehörigen MS-, HPLC-MS-, DC-Ergebnisse sind im Kapitel 5.4.1 dargestellt.

Die NMR-, HPLC-(ES-API)-MS-, EI-MS-Untersuchungen ließen auf ein Molekül mit der Summenformel C₉H₁₈S₃O schließen und bestätigten damit die Biosynthese vom Cepaen [Z]-27 als Sekundärmetabolit nach der enzymatischen Reaktion. Da jedes Cepaen als zwei Diastereomerenpaare in der Natur vorkommen könnte, konnte vermutet werden, dass das Diastereomer von [Z]-27 im frischen *Bonilla*-Extrakt vorlag. Leider war seine Identifizierung nicht möglich, da sich vermutlich nur eine sehr geringe Menge beim Zerschneiden der Zwiebeln bildete.

Aufgrund der Chiralität am Schwefel (S7)- und Kohlenstoffatom (C6) erschienen die magnetisch nicht äquivalenten Protonen am C8- und C11-Atom bei unterschiedlichen chemischen Verschiebungen. Eine Zuordnung zu einer stereochemischen Reihe anhand dieser Verschiebungen gelang nicht. Hierdurch konnte die tatsächliche Konfiguration des Naturstoffes nicht bestimmt werden.

Bei der Verbindung [Z]-27 handelte sich um einen neuen isolierten Naturstoff, der nach der enzymatischen Reaktion im frischen Schalottenextrakt entstand. Dieser Naturstoff wurde anhand NMR-Spektroskopie vollständig neu beschrieben und durch MS-Spektrometrie einzeln fragmentiert.

3.2 Quantitative Bestimmung des frischen Schalottenextraktes

Aufgrund der Komplexität des Extraktes erfolgte die optimale quantitative Bestimmung durch eine Co-Chromatographie der Naturstoffe mit den Naturstoffanaloga. Der Vergleich der Ergebnisse von der Strukturaufklärung isolierter Inhaltsstoffe aus den einzelnen Extraktfraktionen und der Referenzsubstanzen trug auch dazu bei.

Primär- und Sekundärmetabolite wurden im Schalottenextrakt eindeutig mit NMR-Messungen charakterisiert und quantitativ bestimmt. Die schnelle Bestimmung der Komponenten wurde mit einem internen Standard (Benzaldehyd) unterstützt. Für die NMR-Messungen wurde je 0.5 μ l (0.517 mg) Benzaldehyd im deuterierten Chloroform zugesetzt. Da die fünf aromatischen Protonen am Benzolring im tiefen Feld ($\delta=8.13-7.44$ ppm) erschienen, konnten die zugehörigen Protonensignale der Inhaltsstoffe getrennt ausgewertet werden. Das einzelne Proton der Aldehydgruppe wurde durch das Protonensignal bei 9.99 ppm charakterisiert. Hierdurch erfolgte die Bestimmung der Inhaltsstoffe mittels seines Integrals.

Durch den Vergleich des Schalotten-Chromatogramms (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) mit den von Referenzsubstanzen (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) sowie NMR-, MS- und HPLC-MS-Untersuchungen der Naturstoffe und Naturstoffanaloga, konnten die Inhaltsstoffe mit entsprechenden Retentionszeiten zugeordnet (Kapitel 5.3.5) und quantitativ bestimmt werden.

Aus dem ^1H -NMR-Spektrum des *Bonilla*-Extraktes konnte das relative Isomerenverhältnis [E]-**14**: [Z]-**14** 1.3:1 ermittelt werden. Aufgrund der leichten *cis*-, *trans*-Isomerisierung der α -, β -ungesättigten Thiosulfinate **14** bei Raumtemperatur wurde deren gesamte Konzentration im Extrakt bestimmt. Die relative Konzentration des Thiosulfinatgemisches [E]-**14** und [Z]-**14** wurde mittels Benzaldehyd-Standards berechnet, wobei die Verbindung **17** sowie das Isomeregemisch [E]- **16** und [Z]-1-Propenylmethylthiosulfinat **16** über den Benzylalkohol-Standard ermittelt werden konnte.

Die relative Konzentration an enthaltenen Thiosulfinate in *Bonilla*-Extrakt ist in Tabelle 4 zusammengefasst. Die Konzentration in Massenprozent ist auf die gesamte Menge der Inhaltsstoffe bezogen.

Substanz	Relative Konzentration, Massenprozent
[E]-CH ₃ CH=CH(S)OSCH ₂ CH ₂ CH ₃ 17	8%
[E]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₃ , [E]- 14 [Z]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₃ , [Z]- 14	15%
CH ₃ CH ₂ CH ₂ S(S)OCH ₂ CH ₂ CH ₃ 13	12%
[E]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₂ CH ₂ CH ₃ , [E]- 16 [Z]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₂ CH ₂ CH ₃ , [Z]- 16	16%
CH ₃ S(S)OCH ₃ 12	4%

Tabelle 4: Relative Konzentration an enthaltenen Thiosulfinaten im *Bonilla*-Extrakt.

Nicht nur die Primärmetabolite sondern auch die Zwiebelane wurden mittels des Benzaldehyd-Standards quantitativ bestimmt, da die zugehörigen NMR-Signale einzeln ausgewertet werden konnten. Die relative Konzentration des *cis*-Zwiebelans (in Massenprozent), bezogen auf die gesamte Menge der Inhaltsstoffe, entsprach 9%, wobei dem *trans*-Zwiebelan weniger als 1% zugeschrieben wurde.

Eine Konzentrationsbestimmung der einzelnen Cepaene über den Benzaldehyd-Standard war nicht möglich, da diese Verbindungen unter „NP-HPLC System 1“ Bedingungen voneinander nicht getrennt werden konnten. Aufgrund der Überlappung der charakteristischen NMR-Signale der Unterfraktionen konnte nur die gesamte relative Konzentration der Cepaene, bezogen auf die gesamte Extraktmenge, ermittelt werden. Ihre relative Konzentration betrug 5%.

3.3 Qualitative Bestimmung eines Extraktes aus Bärlauch (*Allium ursinum* L.)

Die qualitative Bestimmung des Bärlauchextraktes erfolgte unter den Bedingungen „NP-HPLC-System 1“. Das analytische Chromatogramm ist in Abbildung 4 dargestellt.

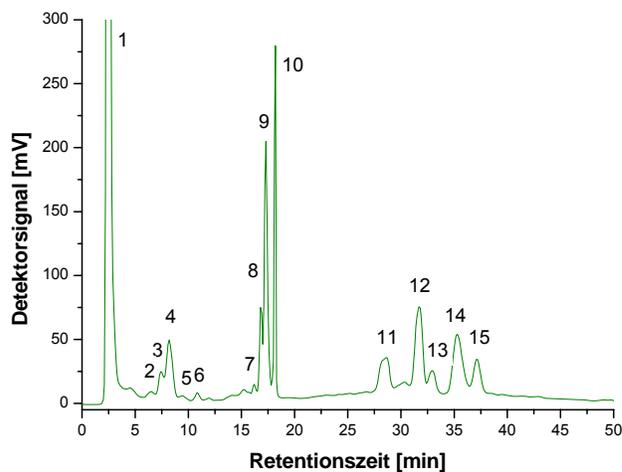


Abbildung 4: HPLC-Trennung eines Bärlauchextraktes (*Allium ursinum* L.) unter „NP-HPLC System 1“ Bedingungen.

Die Naturstoffanaloga konnten nachgewiesen werden (Tabelle 5).

Peak No	Substanz	Bärlauchextrakt
1	[E]-CH ₃ CH=CH(S)OSCH ₂ CH ₂ CH ₃ 16	entspricht
2	[E]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₃ , [E]- 14 [Z]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₃ , [Z]- 14	entspricht
3	CH ₃ CH ₂ CH ₂ S(S)OCH ₂ CH ₂ CH ₃ 13	entspricht
5	[E]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₂ CH ₂ CH ₃ , [E]- 16 [Z]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₂ CH ₂ CH ₃ , [Z]- 16	entspricht
6	CH ₃ S(S)OCH ₃ 12	entspricht

Tabelle 5: Identifizierung der Thiosulfinaten im Bärlauchextrakt.

Die qualitative Analyse der Inhaltsstoffe aus Bärlauchextrakt bewies die universelle Einsetzbarkeit und die Reproduzierbarkeit der Bedingungen „NP-HPLC-System 1“ bei der Auftrennung der *Allium*-Extrakte. Die einzelnen Fraktionen können aufgefangen, eingeeignet und mittels Strukturaufklärungsmethoden (NMR, MS, HPLC-MS) entsprechend analysiert werden. Das kann als ein zukünftiges Ziel in einer weiteren Forschung angesehen werden.

3.4 Synthese von Referenzsubstanzen

Die präparative Trennung der biologisch aktiven Inhaltsstoffe des *Allium*-Extraktes, u.a. *Allium cepa* var. *Aggregatum*, kann mit anderen Verfahren kombiniert werden, mit dem Zweck, nicht nur eine quantitative Komponentenbestimmung zu erzielen, sondern auch die chemische Struktur der Naturstoffe schneller aufzuklären. Als leistungsstarke Verfahren, um die Komplexität von Naturstoffe zu entschlüsseln, spielt heute neben der multidimensionalen NMR-Spektroskopie und der hochauflösenden Massenspektrometrie auch die chemische Synthese eine bedeutende Rolle.

Für die Untersuchung der biologischen Aktivität, u.a. der antiinflammatorische und cytotoxische Wirkung *in vitro*, sowie der Dosis-Wirkungsabhängigkeit einzelner Substanzen stehen die Synthese der Naturstoffanaloga und die Isolierung biologisch aktiver Komponenten aus den Extrakten gleichwertig da.

Die symmetrischen und asymmetrischen gesättigten und α -ungesättigten Thiosulfinate sind literaturbekannt, wobei die Methoden zu deren Synthese von unterschiedlichen Arbeitsgruppen publiziert wurden.^[95-102] Die ausgewählten Primäraromakomponenten wurden nach leicht modifizierten Literaturvorschriften synthetisiert und durch NMR-Spektroskopie und MS-Spektrometrie mit den Literaturangaben übereinstimmend charakterisiert. Die symmetrischen gesättigten Thiosulfinate **12** sowie **13** und das Thiosulfonat **50** wurden zur Untersuchung ihrer biologischen Aktivität zur Verfügung gestellt.

3.4.1 Monooxidation von symmetrischen Disulfiden

Verschiedenen Methoden sind bekannt, um das Schwefelatom eines Disulfides zum Sulfoxid zu oxidieren, z. B. Oxidation mit Peroxiden, Periodaten, Dimethyldioxiran und Perboranen.^[94] Die Oxidation zu Thiosulfiniten lässt sich durchführen, wenn die Reaktionsbedingungen und die äquimolare Stöchiometrie des Oxidationsmittels eingehalten werden, sonst führt die Oxidation zu einer Peroxidation oder zu einer Spaltung der S-S Bindung.

Nach Freeman *et al.*^[95] führte die Direktoxidation von kommerziellen symmetrischen Disulfiden (Dimethyl- und Dipropyldisulfid) mit äquimolaren Mengen von *m*CPBA zu Thiosulfiniten (Dimethyl- **12** und Dipropylthiosulfinit **13**).

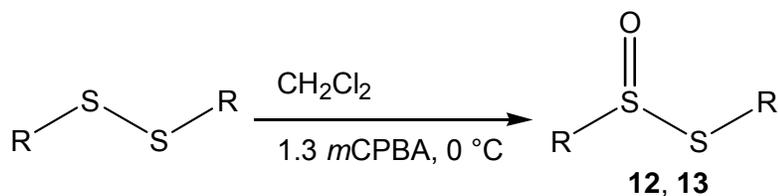


Abbildung 5: Monooxidation symmetrischer Disulfide **12** (R= CH₃) und **13** (R= *n*-C₃H₇) nach Freeman *et al.*

Die Monooxidation wurde bei 0 °C durchgeführt, wobei das Dimethylthiosulfinat **12** als stechendes gelbes Öl in einer Ausbeute von 76% entstand. In Fall des Dipropyldisulfid erhielt man das Dipropylthiosulfinat **13** als gelbes Öl mit einem charakteristischen Zwiebelaroma in 71%iger Ausbeute.^[95, 96] (Abbildung 5)

Thiosulfinat	Ausbeute
12	76%
13	71%

3.4.2 Symmetrische und asymmetrische Thiosulfonsäure-S-alkylester

Thiosulfonsäure-schwefelester sind starke Sulfonylierungsreagentien und werden in organischen Synthesen eingesetzt um eine Sulfonylgruppe (RS-) an einer Verbindung einzuführen. Die Schwefelester gehen leicht als Disulfide in die Reaktion ein, wobei sie als sehr reaktive Sulfonylhalogenide stabiler sind.^[97]

Am häufigsten lassen sich die symmetrischen Thiosulfonsäure-S-Ester leicht durch Oxidation von Disulfiden und Thiolen nach Brass *et al.* und Arterburn *et al.* synthetisieren.^[94, 96] 1998 berichtete Chemla *et al.*^[97] über die einfache Bildung der symmetrischen Alkylthiosulfonsäure-S-Ester durch Reduktion von entsprechenden kommerziellen Sulfonylchloriden mit Zink-Pulver.

Die asymmetrischen Thiosulfonsäure-S-Ester können über die einfache Alkyladdition aus Salzen der Alkylthiosulfonsäuren^[98] hergestellt werden.^[99]

3.4.2.1 Darstellung von Dimethylthiosulfonat

Die Darstellung des symmetrischen Thiosulfonsäure-S-Esters **50** erfolgte in dieser Arbeit über zwei Wege, da die Oxidation vom Dimethyldisulfid vorwiegend zur niedrigen Ausbeuten führte.

Nach erstem Syntheseweg wurde das kommerzielle Dimethyldisulfid mit 2.6 eq *m*CPBA bei 0 °C nach leicht modifizierter Vorschrift von Brass *et al.* oxidiert.^[94, 96] Während der Oxidation entstand Dimethylthiosulfonat **50** in 32%iger Ausbeute. Bei der zweiten Route^[97] wurde **50** über eine Reduktion vom Methansulfonylchlorid mit Zink-Pulver in einer Ausbeute von 55% synthetisiert. Zuerst wurde das Sulfonylchlorid mit Acetylchlorid aktiviert, wobei sich ein Oxosulfonium-Ion bildete. Die Reaktion ähnelt der Pummerer-Umlagerung. Eine folgende intermediäre Bildung des Methylsulfonylchlorides $\text{CH}_3\text{S}(\text{O})\text{Cl}$ ermöglichte schließlich den Zugang zum Thiosulfonat **50**.

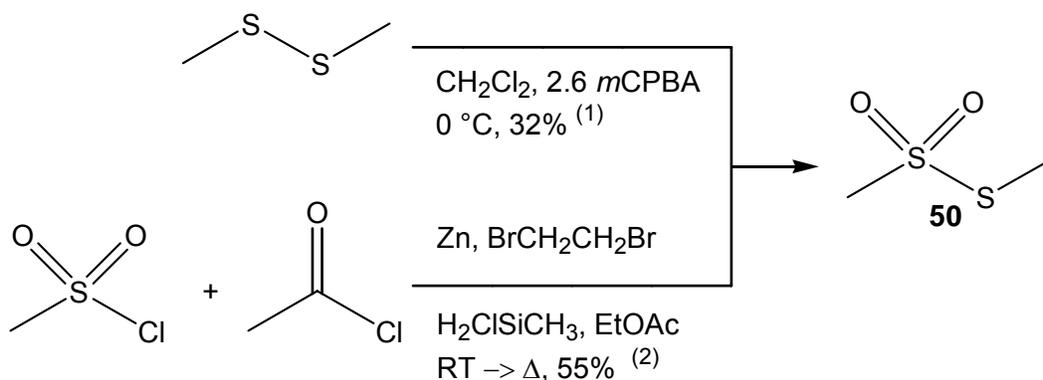


Abbildung 6: Synthese von Dimethylthiosulfonat **50** nach Brass *et al.*^[96] (1) und Chemla *et al.*^[97] (2)

Als Nebenprodukt beider Synthesewege (1) und (2) entstand das Dimethyldisulfon $\text{CH}_3\text{S}(\text{O})_2\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$. Wegen ihrer unterschiedlichen Polarität ließen sich die Thiosulfonate von Disulfonen flashchromatographisch trennen.

Das Dimethylthiosulfonat **50** wurde bezüglich seiner immunmodulatorischen Potenz untersucht. Die Ergebnisse sind in Anhang dargestellt.

3.4.2.2 Darstellung von S-Propylmethanthiosulfonat

Die Addition^[98] von Natriumhydrosulfid zu Methansulfonylchlorid gab das Natriumsalz der Thiosulfonsäure **51** in einer Ausbeute von 69%. Eine weitere Alkylierung^[99] des Salzes **51** mit *n*-Propylbromid führte zu S-Propylmethanthiosulfonat **52** in 60%iger Ausbeute.

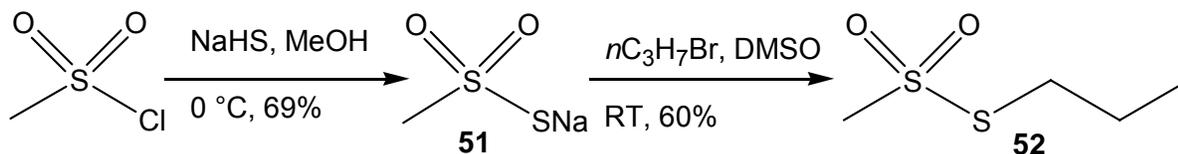


Abbildung 7: Synthese von S-Propylmethanthiosulfonat **52**.

3.4.3 Ausgewählte α -ungesättigte Thiosulfinate

Die ungesättigten, asymmetrischen Thiosulfinate wurden durch Oxidation von entsprechenden Disulfiden nach Block *et al.*^[101] regiospezifisch synthetisiert. Diese konnten mit *m*CPBA zum [*E*]-**14** und [*Z*]-1-Propenylmethylthiosulfinat **14**, S-[*E*]-**16** und S-[*Z*]-1-Propenylpropylthiosulfinat **16** und S-Propyl-1-Propenylthiosulfinat **17** oxidiert werden. Schlüsselverbindung dieser Synthese war (S)-1-Propinylpropylsulfid **54**, eine Verbindung, die durch basenkatalysierte Isomerisierung von (S)-2-Propinylpropylsulfid **53** zugänglich war.^[100-102]

3.4.3.1 Darstellung von S-[*E*]- und S-[*Z*]-1-Propenylpropylsulfid

Zunächst wurde eine S-Alkylierung von Propan-1-thiol mit 3-Brompropin unter basischen Bedingungen zu (S)-2-Propinylpropylsulfid **53** durchgeführt, dann folgte eine basenkatalysierte Isomerisierung zu (S)-1-Propinylpropylsulfid **54**.^[100-102] Durch LAH wurde Sulfid **54** zu [*E*]-1-Propenylpropylsulfid **55** in einer Ausbeute von 79% reduziert, während die Reduktion mit DIBAL zu [*Z*]-1-Propenylpropylsulfid **56** in 70%iger Ausbeute führte.^[101]

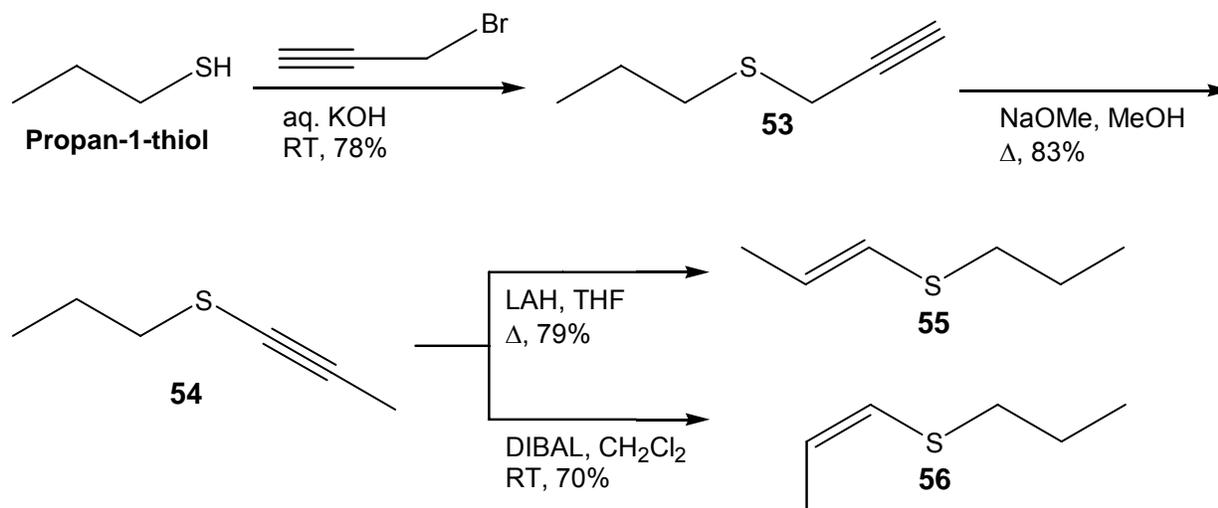


Abbildung 8: Synthese von [*E*]- **55** und [*Z*]-1-Propenylpropylsulfid **56**.

In Tabelle 6 ist den Einfluss der Reduktionsmittel auf die Selektivität der Olefingeometrie dargestellt. Eine *trans*-Geometrie des Olefins wurde mit LAH und eine *cis*-Geometrie mit DIBAL erzeugt.

Reagenz	Selektivität E:Z (55 : 56)	Ausbeute
LAH	1 : 11.5	79%
DIBAL	13.3 : 1	70%

Tabelle 6: Einfluss des Reduktionsreagenzes auf die Selektivität der Olefingeometrie.

3.4.3.2 Darstellung von S-[*E*]- und S-[*Z*]-1-Propenylmethylthiosulfinat, S-[*E*]- und S-[*Z*]-1-Propenylpropylthiosulfinat und S-Propyl-1-Propenylthiosulfinat

Die Spaltung der S-C Bindung mit Li/NH₃ in [*E*]- und [*Z*]-Propenylpropylsulfid **55** und **56** unter Beibehaltung der Olefingeometrie führte zu reaktiven Lithiumthiolaten ([*E*]-, [*Z*]-**40**), die mit den Thiosulfonaten **50** und **52** (RSS(O)₂R') zu den Thiosulfinaten **14**, **16** bzw. **17** (RSS(O)R') rasch reagieren konnten (Abbildung 9).^[101] Die Schlüsselverbindungen dieser Route waren ungesättigte, asymmetrische Disulfide **57** und **58**, die mit äquimolaren Mengen *m*CPBA weiter oxidiert werden konnten.

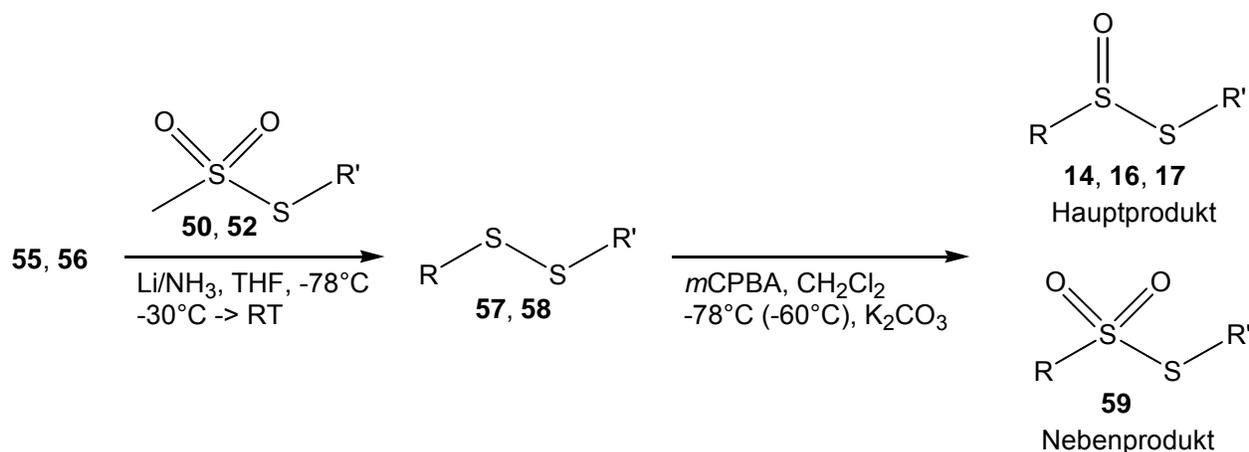


Abbildung 9: Synthese einiger ausgewählter ungesättigter Thiosulfonate **14**, **16** und **17**.^[101]

Verbindung	R	R'	Ausbeute	Selektivität <i>E:Z</i>
50	-	CH ₃	55%	-
[<i>E</i>]- 14	[<i>E</i>]-CH ₃ CH=CH	CH ₃	52%	1.8 : 1
[<i>Z</i>]- 14	[<i>Z</i>]-CH ₃ CH=CH	CH ₃		
[<i>E</i>]- 59	[<i>E</i>]-CH ₃ CH=CH	CH ₃	3%	2.7 : 1
[<i>Z</i>]- 59	[<i>Z</i>]-CH ₃ CH=CH	CH ₃		
[<i>E</i>]- 16	[<i>E</i>]-CH ₃ CH=CH	CH ₃ CH ₂ CH ₂	58%	1.25 : 1
[<i>Z</i>]- 16	[<i>Z</i>]-CH ₃ CH=CH	CH ₃ CH ₂ CH ₂		
17	CH ₃ CH ₂ CH ₂	[<i>E</i>]-CH ₃ CH=CH	2%	-
52	-	CH ₃ CH ₂ CH ₂	60%	-
[<i>E</i>]- 57	[<i>E</i>]-CH ₃ CH=CH	CH ₃	54%	1 : 1
[<i>Z</i>]- 57	[<i>Z</i>]-CH ₃ CH=CH	CH ₃		
[<i>E</i>]- 58	[<i>E</i>]-CH ₃ CH=CH	CH ₃ CH ₂ CH ₂	67%	11.6 : 1
[<i>Z</i>]- 58	[<i>Z</i>]-CH ₃ CH=CH	CH ₃ CH ₂ CH ₂		

Tabelle 7: Ausbeute synthetischer Thiosulfonate.

Die Monooxidation der ungesättigten, asymmetrischen Disulfide wurde kurzzeitig bei niedriger Temperatur (-78 °C) durchgeführt. [*E*]-**57** und [*Z*]-1-Propenylmethyldisulfid **57** konnten zu [*E*]-**14** und [*Z*]-1-Propenylmethylthiosulfonate **14** in einer gesamten Ausbeute von 52% mit einer Selektivität von *E/Z* 1.8/1 oxidiert werden. Als Nebenprodukt dieser Monooxidation wurden 10 mg (3%ige Ausbeute) des Produktes in einem Gemisch von [*E*]-1-**59** und [*Z*]-1-Propenylmethylthiosulfonate **59** (Selektivität *E/Z* 2.7/1) als gelbes, nach Zwiebeln riechendes Öl isoliert.

Das Isomerengemisch von [*E*]- **58** und [*Z*]-1-Propenylpropyldisulfid **58** wurde mit 1 eq *m*CPBA in einer Gesamtausbeute von 58% mit einer Selektivität von *E/Z* 1.25/1 zu den entsprechenden Thiosulfinaten [*E*]- **16** und [*Z*]-1-Propenylpropylthiosulfinat **16** oxidiert. Neben dieser Mono-oxidation fand eine Oxidierung an dem Sulfenyl-Schwefelatom statt, wobei 20 mg (2%ige Ausbeute) der instabilen Komponente S-Propyl-1-Propenylthiosulfinat **17** erhalten werden konnten. Im Falle von Disulfiden [*E*]- und [*Z*]-**57** konnten Thiosulfinat mit oxidiertem Sulfenyl-Schwefelatom [*E*]-, [*Z*]-CH₃CH=CHS(O)SCH₃ nicht isoliert werden. Eine Erklärung dafür war die Unstabilität dieser Verbindungen, die sich unter Umgebungsbedingungen spontan zersetzten.

Die Trennung des Thiosulfinatgemisches [*E*]- und [*Z*]-**16** erfolgte mittels analytischer HPLC-Anlage an der LiChrospher[®]Si 60-Säule. Unter den chromatographischen Bedingungen „NP-HPLC System 1“ (Kapitel 5.3.3) konnten die Thiosulfinat mit den folgenden Retentionszeiten *t_R* bei 254 nm zugeordnet werden: die *t_R* von 9.95 min entspricht dem Thiosulfinat [*E*]-**16** sowie *t_R* von 8.64 min dem [*Z*]-**16**. Die Retentionszeiten sind in Tabelle 8 dargestellt.

Substanz	<i>t_R</i> [min]
[<i>E</i>]-CH ₃ CH=CH(S)OSCH ₂ CH ₂ CH ₃ 17	6.69
[<i>Z</i>]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₂ CH ₂ CH ₃ , [<i>Z</i>]- 16	8.64
[<i>E</i>]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₂ CH ₂ CH ₃ , [<i>E</i>]- 16	9.95

Tabelle 8: Retentionszeiten *t_R* von Thiosulfinaten [*E*]-**16**, [*Z*]-**16**, und **17**.

Unter bereits genannten analytischen Bedingungen konnte S-Propyl-[*E*]-1-Propenylthiosulfinat **17** mit einer Retentionszeit *t_R* von 6.69 min chromatographiert werden.

3.5 Retrosynthetische Analyse des *trans*-Zwiebelans

Bei der Struktur der Zwiebelane handelt es sich um ein Heterobicyclo[2.2.1]hexan-System (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**), das am C3- und C4-Atom mit einer Methylgruppe substituiert ist. Als Heteroatome sind zwei Schwefelatome in der Struktur enthalten, wobei eines davon oxidiert ist. Die beiden Zwiebelane unterscheiden sich voneinander in der räumlichen Anordnung der Methylgruppen. In Abbildung 10 ist ein Synthesepfad des *trans*-Zwiebelan **34** dargestellt, auf dem die Synthese von *cis*-Zwiebelan **33** basieren könnte.

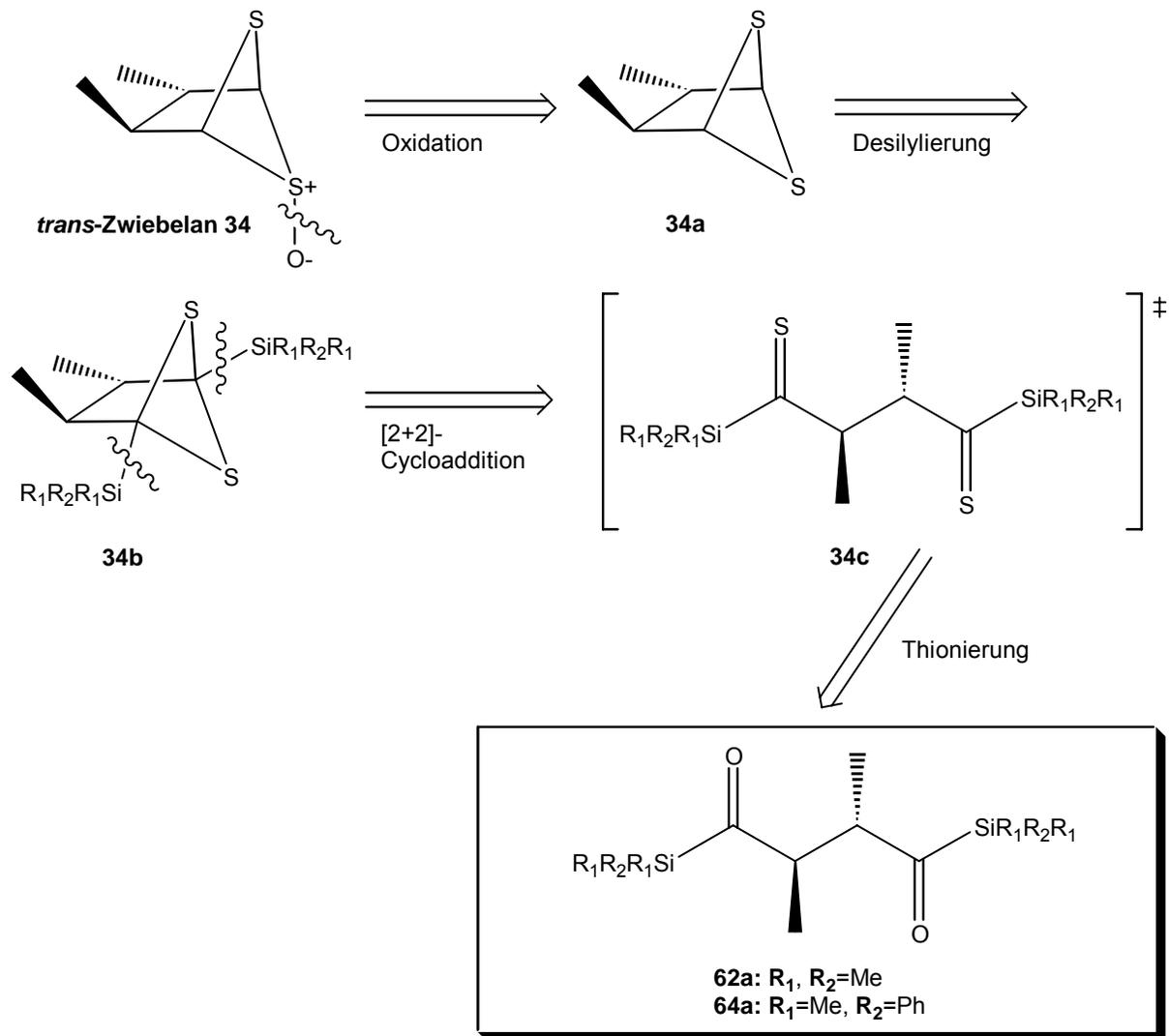


Abbildung 10: Synthesepfad für *trans*-Zwiebelan **34**.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden untersucht um einen effizienten Zugang zu 2,3-substituierten 1,4-bis-Acylsilanen **62a** und **64a** zu erarbeiten.

3.6 Synthese von 1,4-bis-Acylsilanen nach Saleur

Acylsilane sind wichtige Intermediate in einer Vielzahl von organischen Synthesen. Bis-Acylsilane sind sehr reaktive Verbindungen, zu deren Aufbau existieren einige Methoden.

Erstmals wurde 2000 von Saleur *et al.*^[103] eine Methode zur Herstellung der 1,4-bis-Acylsilane über eine zweistufige Synthese veröffentlicht. Eine nukleophile Substitution von 1,2-bis-Triflaten

mit 2-Lithio-2-trimethylsilyl-1,3-dithian bzw. bei Silylierung von 1,2-bis-([1,3]Dithian-2-yl)ethan und die nachfolgende Dethioketalisierung von 1,3-bis-Dithianen ermöglichen den Zugang zu 1,4-bis-Acylsilanen in einer moderaten bis guten Ausbeute. Die vorgenommene Hydrolyse des 2,3-dimethylsubstituierten Derivates **62** mit einem Gemisch aus MeI und CaCO₃ in MeCN/H₂O (1:1) schlug fehl. Die Autoren beobachteten eine Zersetzung des Eduktes **62**.

3.7 Strategien zur Synthese des 1,4-bis-Acylsilans **62a** und **64a**

In dieser Arbeit wurden zur Synthese der benötigten 1,4-bis-Acylsilane **62a** und **64a** hauptsächlich zwei verschiedene Wege untersucht. Die Route von Saleur *et al.*^[103] wurde gewählt, wobei die Hydrolyse des silylierten 1,3-bis-Dithians **61** mit Hilfe von Quecksilbersalzen nach D. Schinzer, Corey-Seebach untersucht wurde. (Abbildung 11)

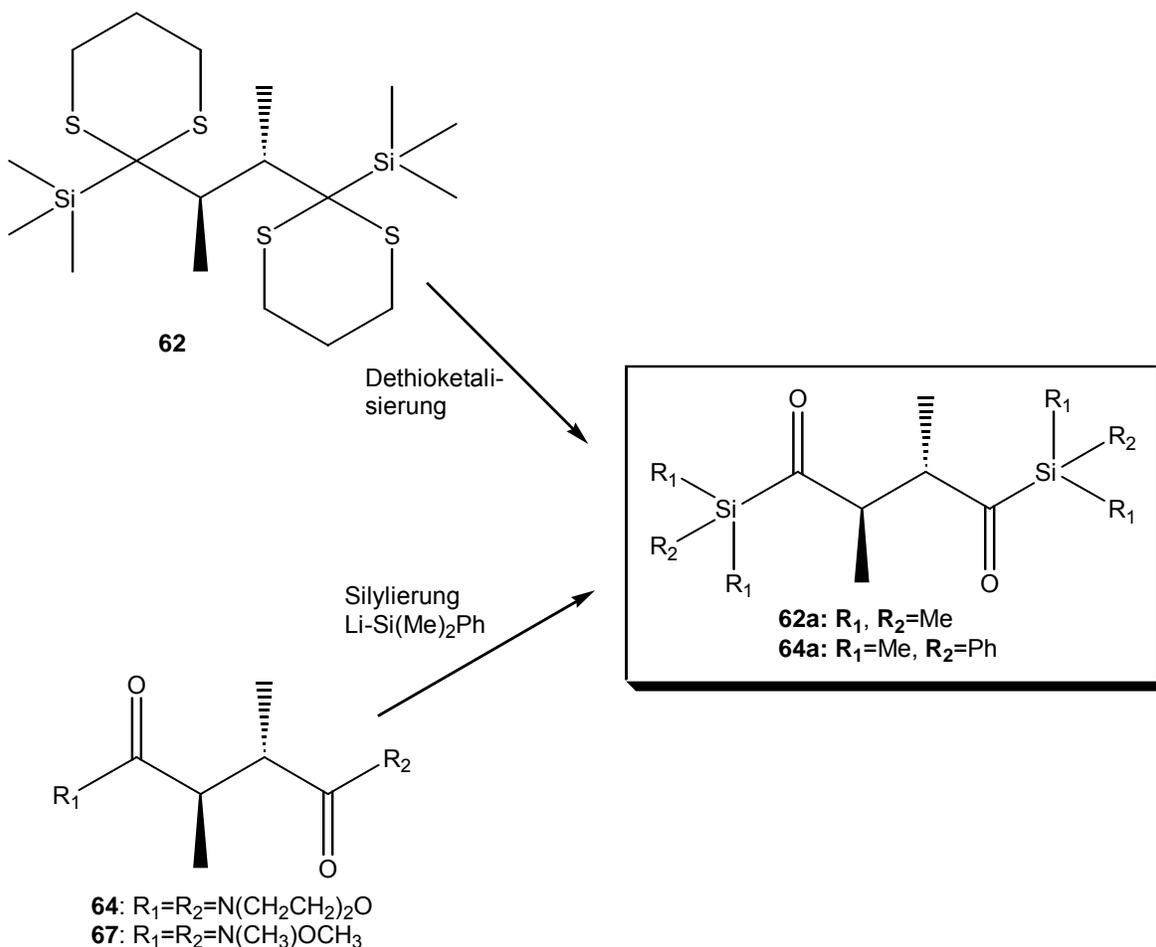


Abbildung 11: Strategien zur Synthese von Acylsilan **62a** nach Saleur *et al.*^[103] und **64a** nach Clark *et al.*^[116]

Die zweite Route nach Clark *et al.*^[116] beschrieb den Versuch zur Herstellung von bis-Acylsilan **64a** aus bis-Morpholinamid **63**. Hierbei wurde die Silylierung von bis-Weinrebamid **67** getestet.

Die Methode von Clark ermöglicht eine effiziente Synthese von Acylsilan **C** über die Addition des leicht zugänglichen Silyl-Anions **65** zum entsprechenden Amid **A**. Die Reaktion verläuft über das stabile tetraedrische Intermediat **B** in guten Ausbeuten.

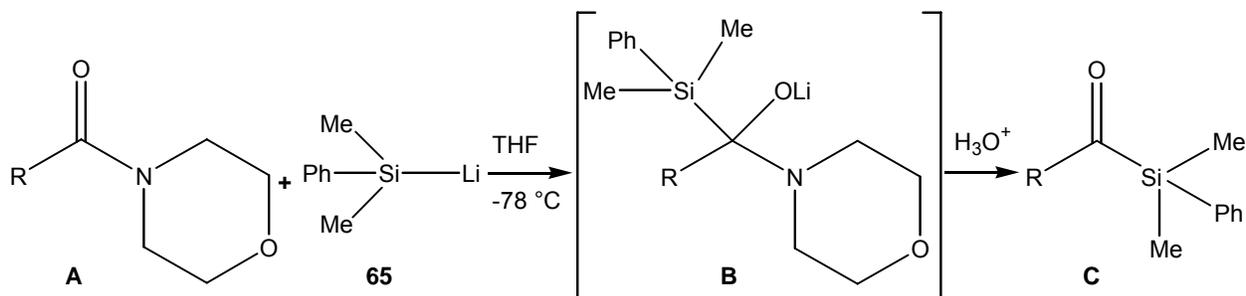


Abbildung 12: Allgemeine Synthese von Acylsilan **C** aus Morpholinamid **A** nach Clark *et al.*^[116]

Für die geplanten Studien wurde die kommerziell erhältliche *meso*-Dimethylbernsteinsäure **63** als Ausgangsverbindung für die Synthese des Schlüsselintermediats **64a** verwendet. Zur Herstellung der Schlüsselverbindung **62a** wurde *meso*-2,3-Butandiol **60** benutzt.

3.8 Synthese des 1,4-bis-Acylsilans **62a** und **64a**

3.8.1 Dethioketalisierung von bis-Dithian **62**

Die erwünschte Vorstufe 1,2-bis-Triflat **61** konnte durch eine Umsetzung des *meso*-2,3-Butandiols mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid nach Lindner *et al.* in 72%iger Ausbeute erreicht werden.

Zunächst führte die Substitution^[103] von **61** mit 2-Trimethylsilyl-1,3-dithian mit *n*-BuLi bei 0 °C zur Isolierung des Produktes 1,4-bis-(Dithian) **62** in nur sehr geringer Menge. Die Bedingungen von Saleur *et al.*^[103] konnten verbessert^[104] und durch Deprotonierung von 2-Trimethylsilyl-1,3-dithian mit *n*-BuLi in Gegenwart von äquimolarer Menge TMEDA **62** bei -78 °C in einer Ausbeute von 83% synthetisiert werden.

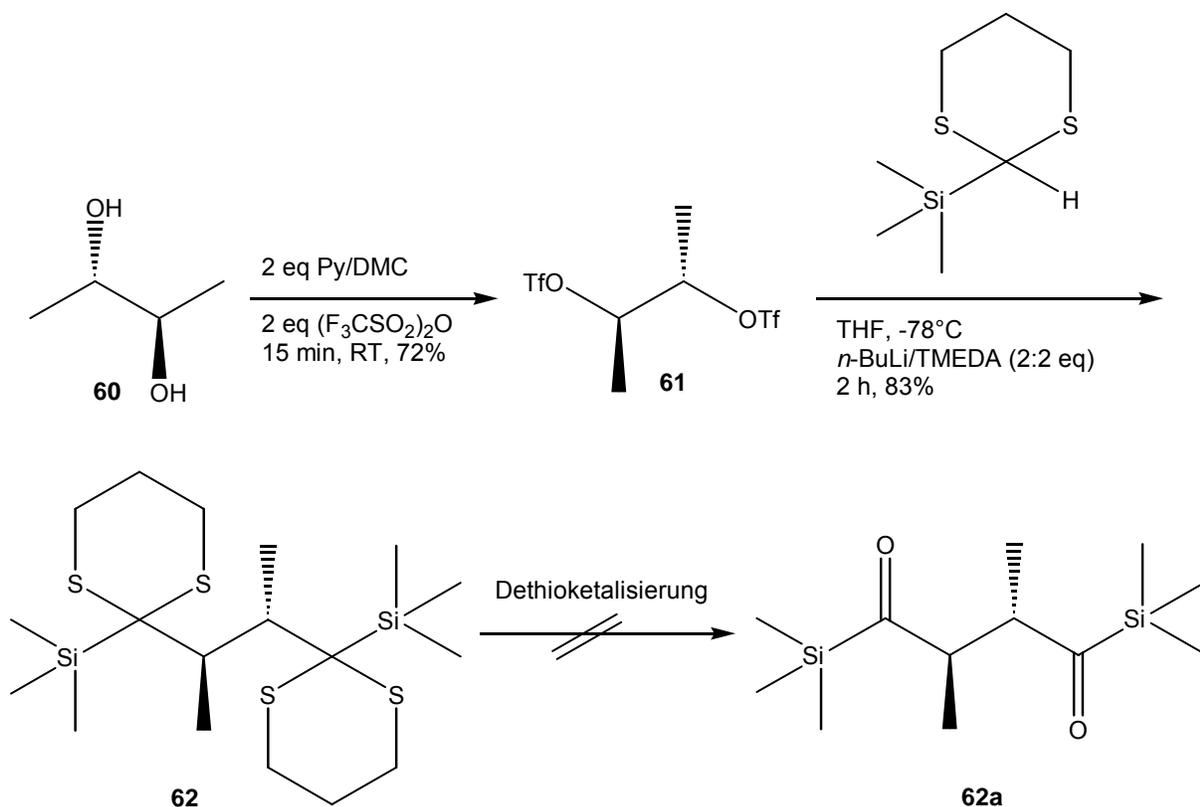


Abbildung 13: Synthese von Acylsilan **62a**.

Die nukleophile Substitution verlief ohne große Schwierigkeiten, doch schlug die Hydrolyse des bis-Dithians **62** zu bis-Acylsilan **62a** nach der optimierten Methode von Saleur *et al.*^[103] fehl. Hierbei wurden als Reagentien $Hg(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ und $CaCO_3$ in THF/ H_2O (4:1) bzw. MeI und $CaCO_3$ in MeCN/ H_2O (1:1) bei RT verwendet. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Acylsilane wurde die Dethioketalisierung im Dunkeln durchgeführt.

Die Dethioketalisierung mit Hilfe von Quecksilbersalzen nach D. Schinzer^[106], Corey-Seebach^[107], Bouillon *et al.*^[108], Roth *et al.*^[109] führte zu Spuren von 1,4-bis-Acylsilan **62a**, wobei eine Isolierung nicht möglich war. Eine weitere Reihe von verschiedenen Studien^[110-115] führte entweder zur substanziellen Zersetzung des Eduktes oder zu unerwünschten Gemischen aus Produkten. Die verwendeten Dethioketalisierungsmittel und Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Nr.	Reagenz	Bedingungen	Dauer	Produkt
1 ^[106]	HgCl ₂ , CdCO ₃	DMSO/H ₂ O (9:1), RT	2 h	Spuren, unerw. Produkte
2 ^[109]	HgCl ₂ , CaCO ₃	Aceton/H ₂ O (4:1), RT	3 d	Spuren, Zersetzung
3 ^[107]	HgCl ₂ , HgO	MeOH/H ₂ O (9:1), reflux	2 h	Spuren, unerw. Produkte
4 ^[108]	Hg(ClO ₄) ₂ ·3H ₂ O, CaCO ₃	THF/H ₂ O (4:1), RT	10 h	Spuren, Zersetzung
5 ^[110]	I ₂ , NaHCO ₃ (aq.)	MeCN, 0 °C → RT	1.5 h	Zersetzung
6 ^[111]	NBS (AgClO ₄)	Aceton/H ₂ O (4:1), 0 °C	5 min	Spuren, Zersetzung
7 ^[112]	DMP	MeCN/DCM/H ₂ O (8:1:1) RT	1 h	Spuren, Zersetzung
8 ^[108]	Chloramin-T-trihydrat	MeOH/H ₂ O (4:1), RT	4 d	keine Reaktion
9 ^[113]	IBX	DMSO/H ₂ O (9:1), RT → 45 °C	3d→12 h	keine Reaktion, Zersetzung
10 ^[114]	CAN	25% aq. MeCN, RT	3 d	keine Reaktion
11 ^[115]	SeO ₂	AcOH, RT	18 h	Zersetzung

Tabelle 9: Versuche zur Dethioketalisierung von 1,3-bis-Dithian **62**

Ein denkbarer Mechanismus der Zersetzung lässt sich über eine 1,4-Grob-Fragmentierung gut erklären, wobei unter den ausgewählten Reaktionsbedingungen eine Spaltung der zentralen C-C-Bindung (C2-C3-Atom) stattfindet. (Abbildung 14)

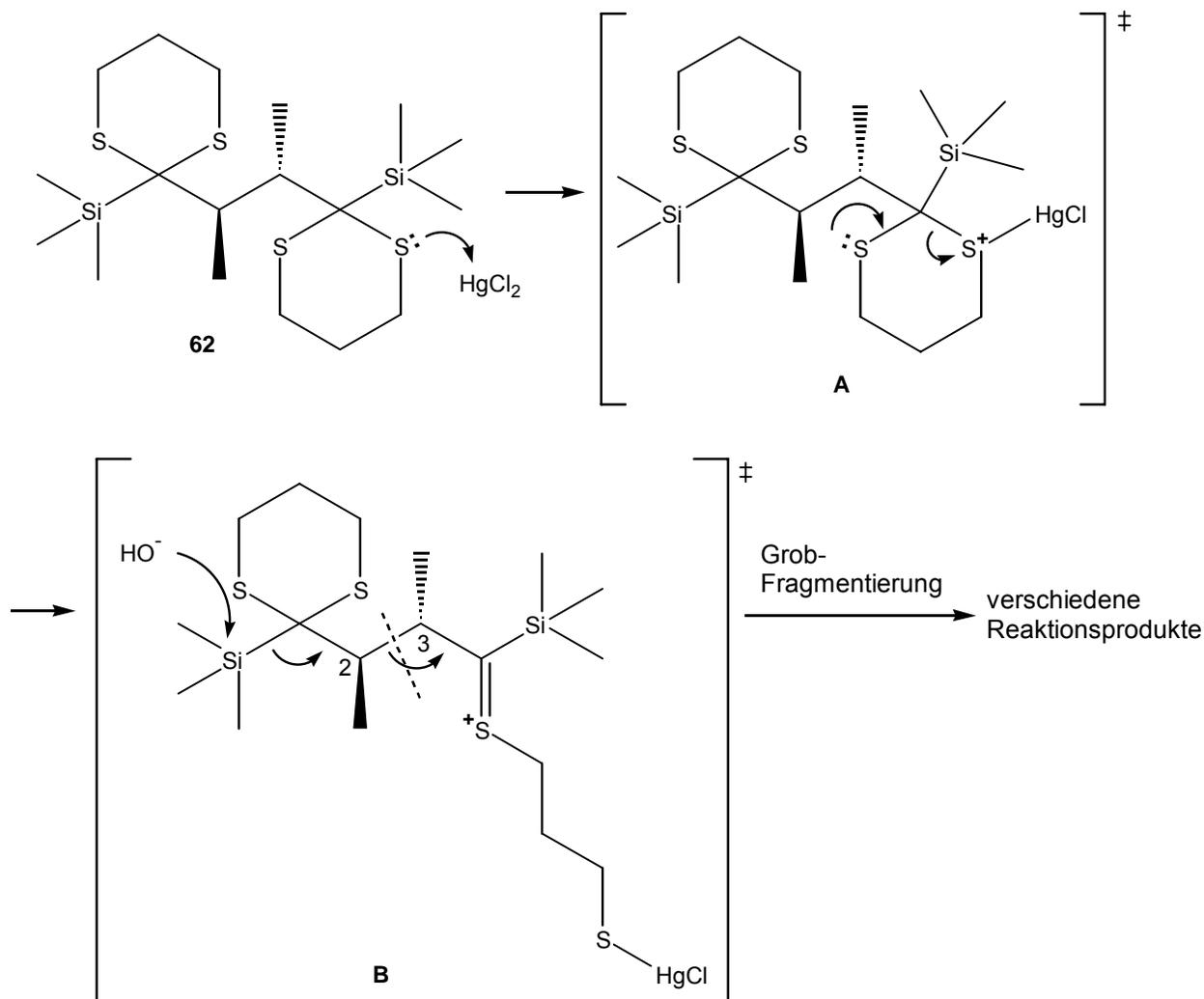


Abbildung 14: Denkbare Mechanismus der Hydrolyse von bis-Dithian **62**.

Die Zersetzung von bis-Dithian **62** kann mit der Hydrolyse **B** der Lewis-Säure aktivierten Thioacetalverbindung **A** aufgeklärt werden. Der nucleophile Angriff des Hydroxidions auf die Thiocarbonylgruppe ist durch die sterischen Effekte der Methylgruppe (am C2- oder am C3-Atom) und der voluminösen Substituenten am C1- und C2-Atom erschwert. Aufgrund dieser Hinderung muss das Nucleophil direkt am Silicium unter der Abspaltung eines instabilen „maskierten Acyl-Anion“ angreifen. Dadurch führt die Fragmentierung des Übergangszustandes **B** durch Stabilisierung dieses Anions zu verschiedenen Eliminierungsprodukten. Eine definitive Antwort, welche Reaktionsprodukte entstehen können, kann nur mit weiteren Untersuchungen gegeben werden.

Bedingt durch diese Probleme wurde diese Route abgeschlossen und eine neue Strategie entwickelt, das bis-Acylsilan **64a** aus bis-Morpholinamid **64** bzw. bis-Weinrebamid **67** nach Clark *et al.*^[116] zu synthetisieren.

3.8.2 Silylierung von bis-Morpholinamid **64**

Durch die im vorherigen Kapitel beschriebenen Probleme wurde die Silylierung von bis-Morpholinamid **64** nach Clark *et al.* zuerst untersucht. Zu diesem Zweck musste zunächst das bis-Morpholinamid **64** hergestellt werden. Das Amid konnte nach der Methode von Benoit *et al.*^[117] in einem Schritt aus der kommerziellen *meso*-Dimethylbernsteinsäure und der äquimolaren Menge Morpholin in guter Ausbeute synthetisiert werden.

Nach Ma *et al.*^[118] und Clark *et al.*^[116] konnte bis-Morpholinamid **64** alternativ aus *in situ* erzeugtem Dicarbonsäuredichlorid und Morpholin in mittlerer Ausbeute hergestellt werden. Die Reaktionsbedingungen der Amidierung sind in Kapitel 3.8.2 dargestellt.

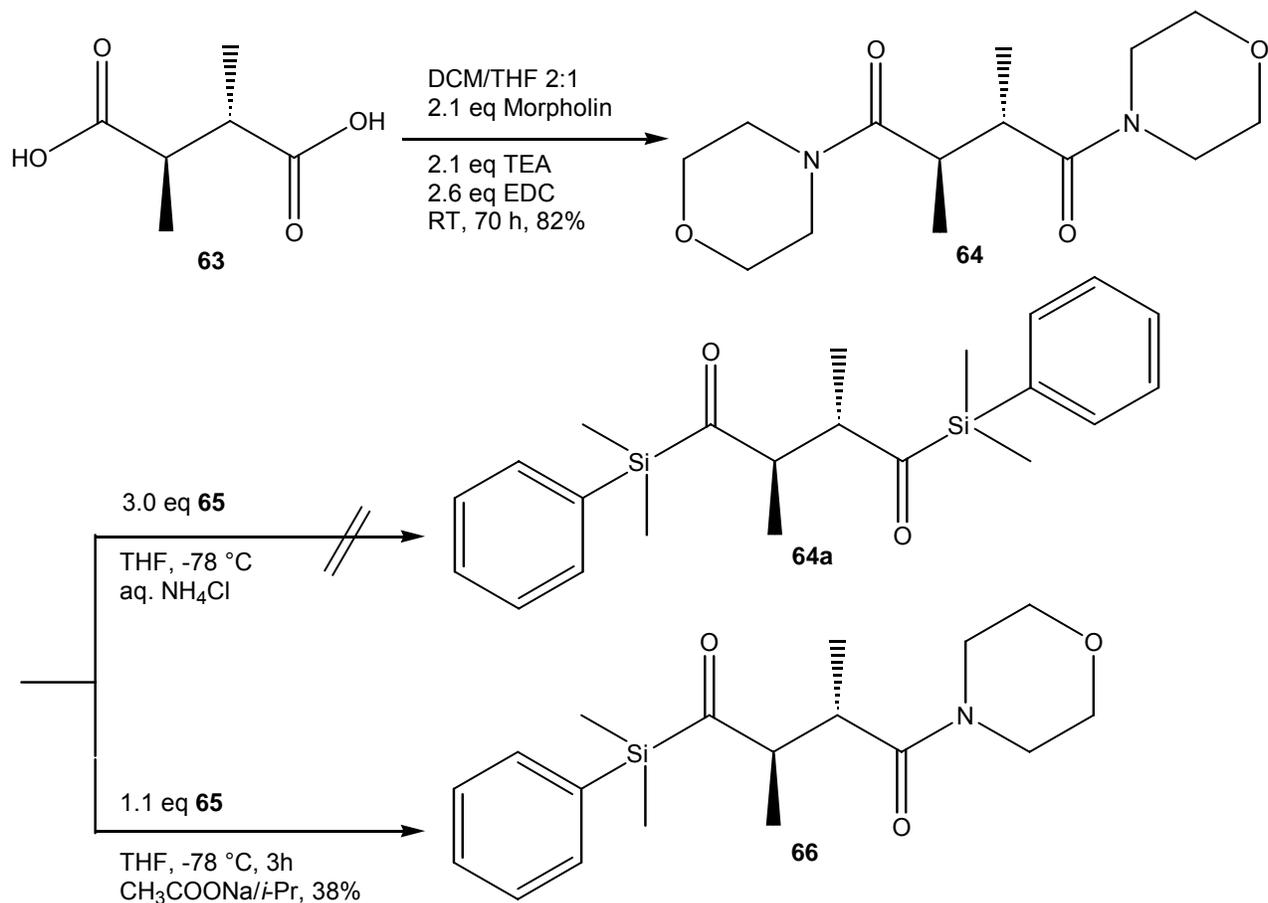


Abbildung 15: Synthese von Acylsilan **66**.

Nach dem Protokoll von Clark *et al.*^[116] wurde eine neue Methode zur Synthese von 1,4-bis-Acylsilane **64a** untersucht. Die direkte Silylierung vom bis-Morpholinamid **64** mit 3.0 eq Dimethylphenylsilyllithium **65** in THF bei -78 °C und anschließende Aufarbeitung mit aq. NH₄Cl führte zur Zersetzung des Eduktes. Nach Verbesserung der Reaktionsbedingungen konnte bei der Addition vom 1.1 eq metallorganischen Reagenz **65** und dem Quenchen mit einer Lsg. von CH₃COONH₄ in *i*-Propanol Acylsilan **66** in niedriger Ausbeute (38%) isoliert werden. Das benötigte Silyllithium-Reagenz **65** wurde leicht aus Dimethylphenylsilylchlorid (Me₂PhSi-Cl) in THF synthetisiert^[119] und seine Konzentration durch Titration bestimmt. Kritisch hierbei war die Dauer der Reaktion bei -78 °C, welche nicht länger als 3 h betragen sollte. Überzog man die Dauer, so zersetzte sich das Produkt, verkürzte man die Rührzeit, so war die Ausbeute ungenügend.

Die darauffolgende Silylierung^[116] von **66** mit 1.1 eq **65** führte zu einer Zersetzung des Eduktes. Unter gleichen Reaktionsbedingungen wurden 30 min nach dem Reaktionsstart Acylsilan **66a**^[116] und Morpholinamid **66b**^[120] isoliert.

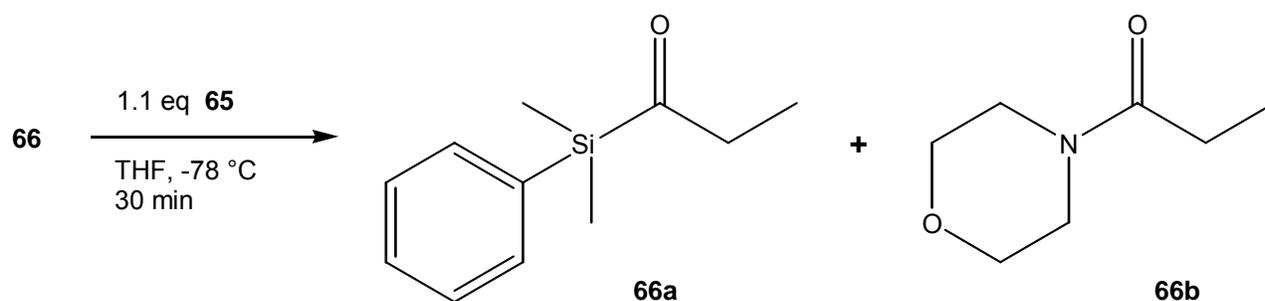


Abbildung 16: Zersetzung des Acylsilans **66** bei -78 °C.

Die Silylierung von **64** lässt sich mit dem folgenden Mechanismus beschreiben. (Abbildung 17)

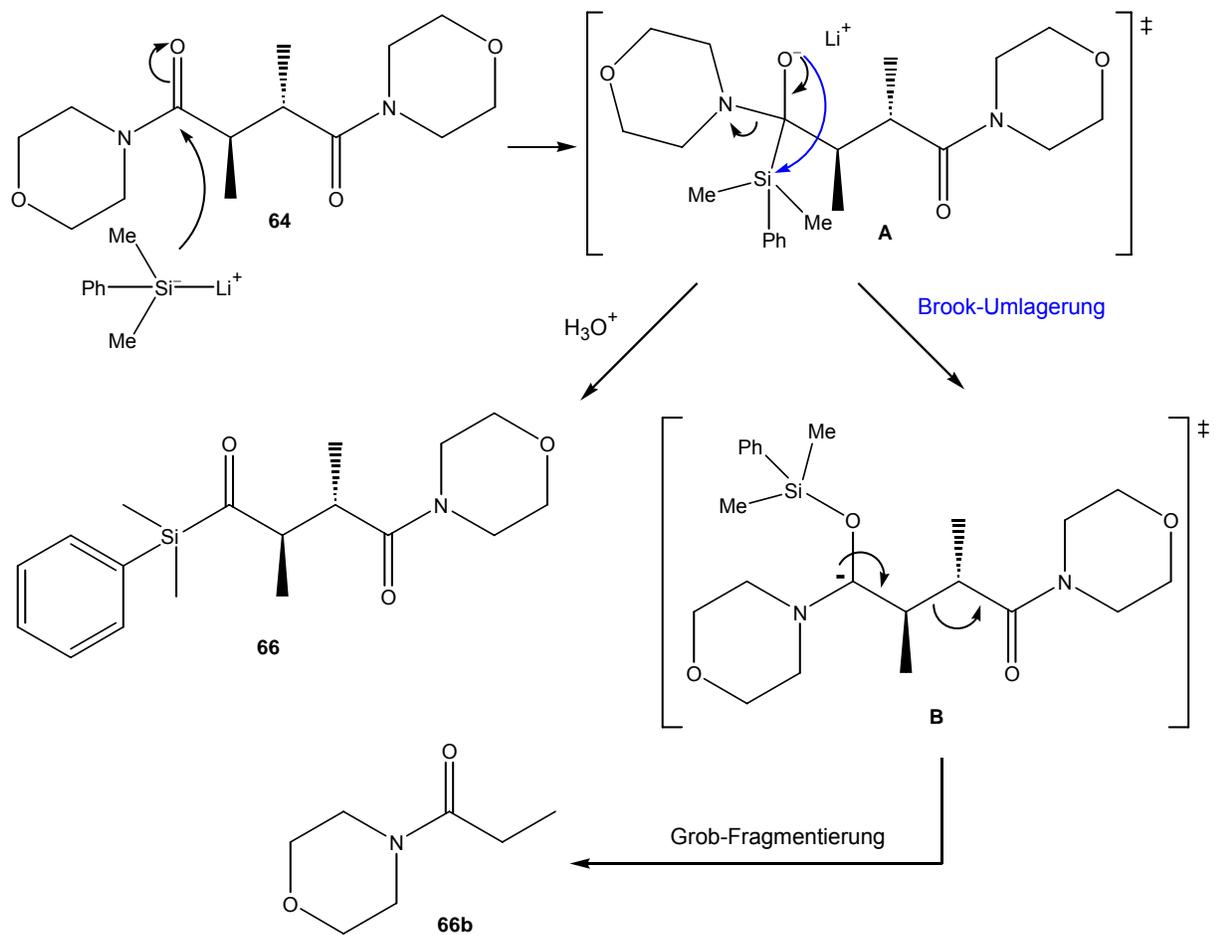


Abbildung 17: Der Mechanismus zur Silylierung von bis-Morpholinamid **64**.

Die Reaktion beginnt mit dem Angriff des Nucleophils (Silyl-Anion) an der Carbonylgruppe. Hierdurch entsteht das tetraedrische Intermediat **A**. Offensichtlich läuft neben der Bildung des Acylsilans **66** eine Brook-Umlagerung^[116] ab, wobei die Silyl-Gruppe vom Kohlenstoff zum Sauerstoff wandert. Eine 1,4-Grob-Fragmentierung stabilisiert das entstandene Acyl-Anion im Übergangszustand **B** und führt schließlich zur Abspaltung des höher substituierten Amid-Enolats.

Die Silylierung von **66** verläuft unter der sofortigen Brook-Umlagerung^[116] und darauffolgender 1,4-Grob-Fragmentierung. (Abbildung 18) Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist wahrscheinlich die Bildung des instabilen Carbanions (Übergangszustand **C** bzw. Übergangszustand **D**), wobei zunächst das Silyl- bzw. Amid-Enolat als gute Abgangsgruppe abgespalten wird.

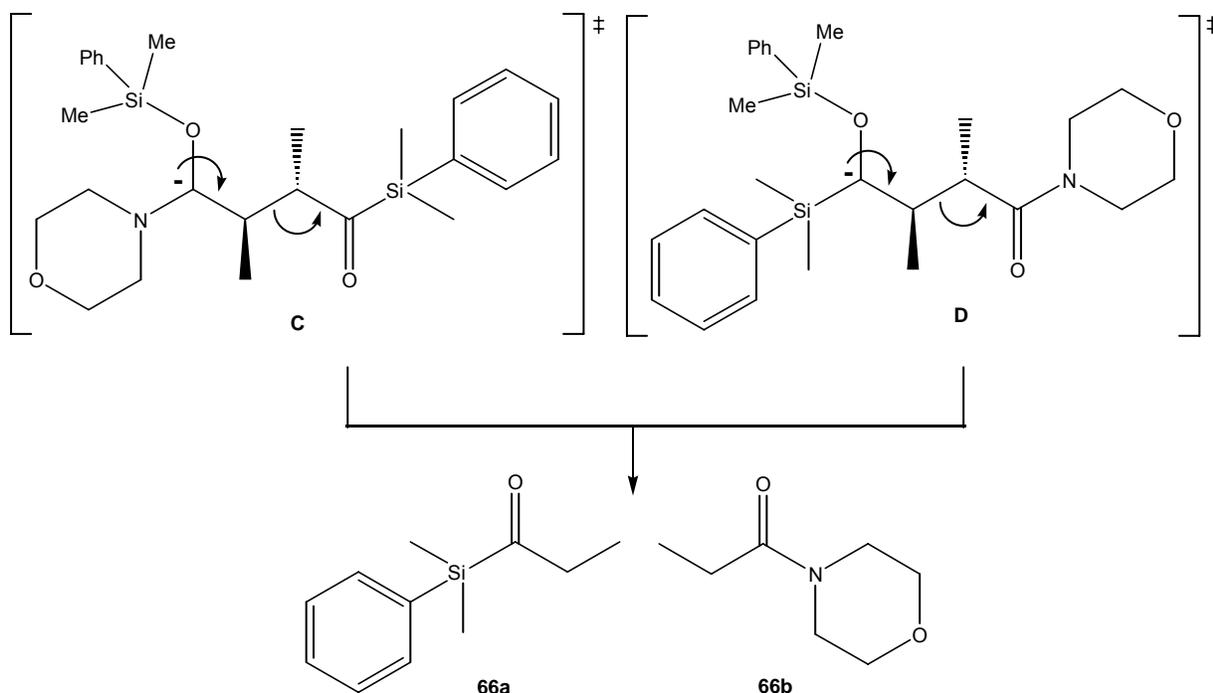


Abbildung 18: 1,4-Grob-Fragmentierung des Intermediats **C** bzw. **D**.

Da die Silylierung von bis-Morpholinamid **66** nur teilweise erfolgte, wurde auch diese Route zur Synthese von **64a** verworfen und stattdessen über eine Silylierung des bis-Weinrebamids **6** versucht, die Schlüsselverbindung **64a** aufzubauen.

3.8.3 Silylierung von bis-Weinrebamid **67**

Der Versuch, durch den nukleophilen Angriff des Dimethylphenylsilyllithiums **65**^[120] am bis-Weinrebamid **67** (Abbildung 26) bei niedriger Temperatur zu dem erwünschten Produkt **64a** zu gelangen, scheiterte an der kompletten Zersetzung des Eduktes nach 2 h. (Abbildung 19)

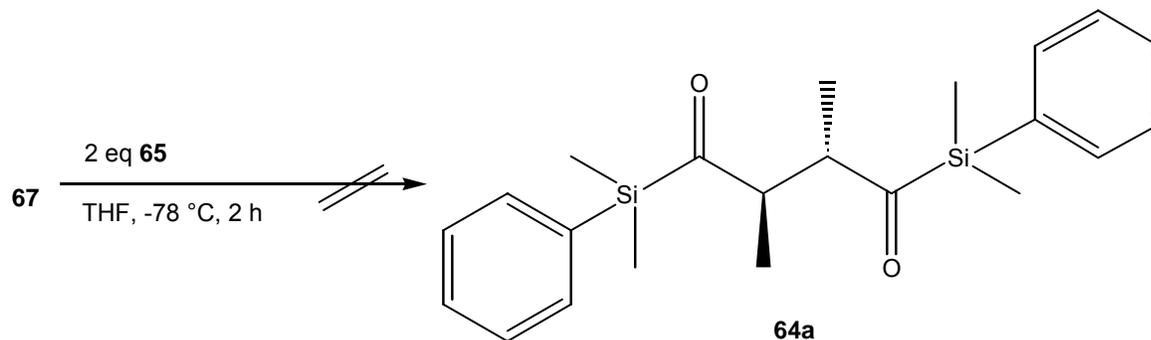


Abbildung 19: Zersetzung des Diweinrebamides **67** bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Im weiteren wurde die Silylierung des Amids **67** mit *in situ* hergestelltem Triethylsilyllithium bzw. Trimethylsilyllithium untersucht.^[116, 121] Bei der Reaktion mit Triethylsilyllithium wurden weder ein Umsatz bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ noch eine Zersetzung von **67** nach 2 h beobachtet. Überraschenderweise fand bei der Silylierung mit Trimethylsilyllithium bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ keine Reaktion statt, wobei als Cosolvent das toxikologisch weniger bedenkliche DMPU verwendet wurde. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.^[116, 121]

Nr.	Reagenz	Bedingungen	Dauer	Produkt
1	$\text{Et}_3\text{Si-H}$, <i>n</i> -BuLi/TMEDA	THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$	2 h	Zersetzung
2	$(\text{Me}_3\text{Si})_2$, DMPU, MeLi	THF, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$	24 h	keine Reaktion

Tabelle 10: Versuche zur Silylierung von bis-Weinreb-Amid **67**.

Die Dethioetalisierung bzw. Silylierung verlief jedoch nicht erfolgreich. Es wurde alternativ eine direkte Thionierung der *meso*-Dimethylbernsteinsäurederivate **67**, **64** bzw. **66** durchgeführt, um den gewünschten bis-Thioamidverbindungen **67a**, **64b** bzw. **66c** zu erreichen. (Abbildung 25)

3.9 Thionierung von 1,4-Dicarbonylverbindungen

Derzeit existieren einige Methoden zur Herstellung von 1,4-Thiocarbonylverbindungen. Als klassischen Thionierungsmittel wurden das Lawesson-Reagenz^[122-125, 128, 132] bzw. das vergleichbare Phosphor(V)-sulfid^[126-128], Bortisulfid^[135] und Hexamethyldisilathian^[129-131] in der Literatur beschrieben.

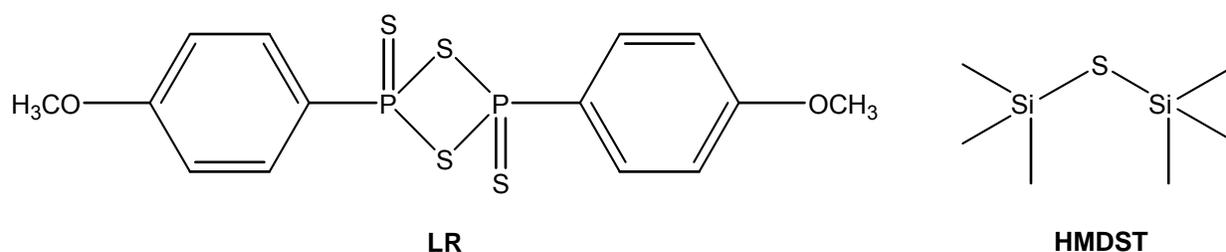


Abbildung 20: Lawesson-Reagenz (LR) und Hexamethyldisilathian (HMDTS) als Thionierungsmittel.

Die Thionierung von aromatischen, enolisierbaren und nicht enolisierbaren 1,4-Diketo-Derivaten wurde von verschiedenen Forschungsgruppen untersucht. Dies beruht auf die effiziente Paal-Knorr-Synthese zur Herstellung von Thiophenen.

Die Thionierung von nicht enolisierbaren Diketonen mit LR wurde von Ishii *et. al.*^[124] beschrieben. Die Reaktion ist temperaturabhängig. Die Autoren konnten bei 50 °C 1,3-Dithietan **70d** isolieren.

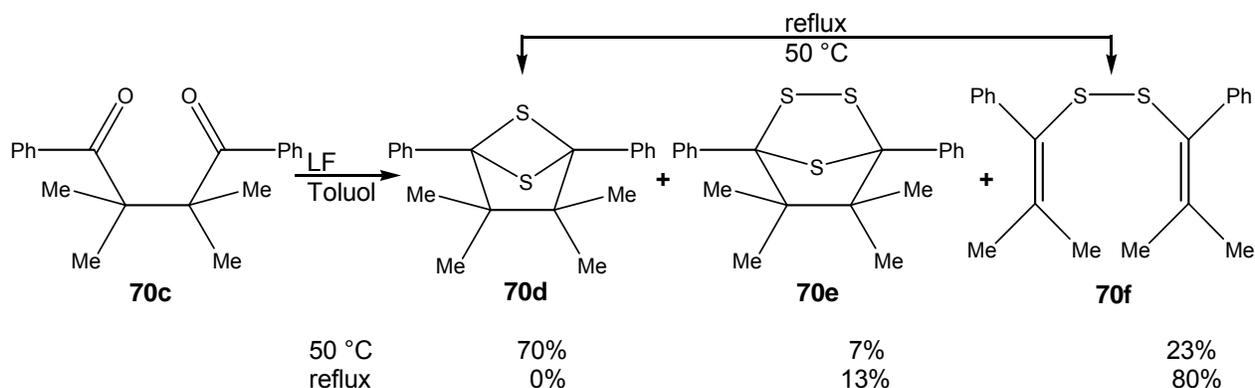


Abbildung 21: 1,3-Dithietan **70d**-Bildung nach Ishii *et al.*^[124]

Nishio^[125] postulierte den Mechanismus für die Bildung von 2,5-disubstituierten Thiophenen **69d** unter der Thionierung von γ -Keto-Amiden **69c** mit LR und anschließender Eliminierung vom Schwefelwasserstoff.

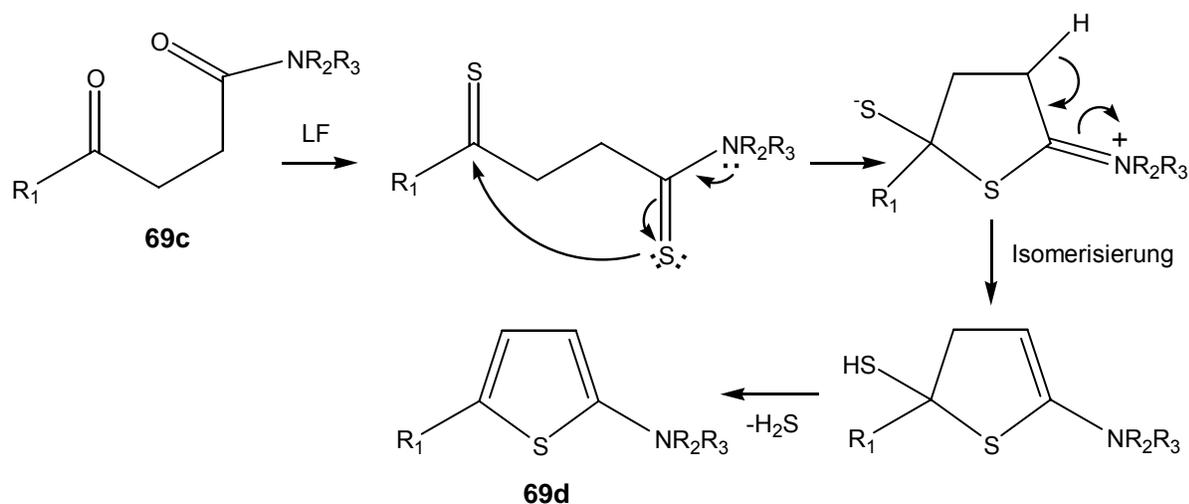


Abbildung 22: Thionierung von γ -Keto-Amiden **69c** mit LR nach Nishio *et al.*^[125]

Im Jahr 2004 publizierte Bouillon *et al.*^[130] die erste Synthese von silylierten Schwefelheterocyclen (5-, 6- und 7-Ring) durch Thionierung von bis-Acylsilanen mit HMDST. Die Kombination sehr reaktive C=S-Doppelbindung (als Dienophil) mit den besonderen Eigenschaften der Organosilan-Funktion führte zur Isolierung von Kondensationsprodukten. Bei der Thionierung von 1,4-bis-Acylsilanen **69** konnten von Bouillon *et al.* 2,5-disubstituierten Thiophen- **70** und Furan-Derivate **71** als Gemische isoliert werden.

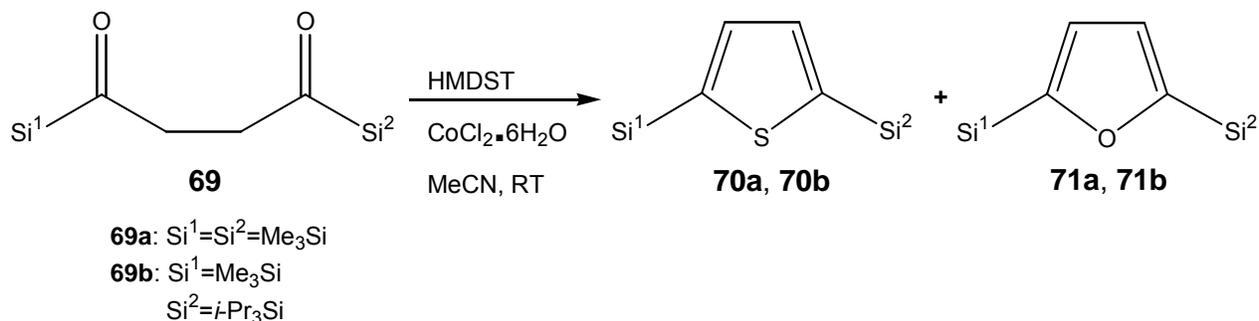


Abbildung 23: Thionierung von 1,4-bis-Acylsilan **69** mit HMDS nach Bouillon *et al.*^[130]

Die Reaktion verläuft unter einer intramolekularen Cyclokondensation von *Z*- α -Enethiol^[123]-Form der Thioacetyl-silane. Das Vorhandensein von Silyl-Gruppen begünstigt die Enethiol-Bildung, wobei das Proton am α -C-Atom der Carbonylgruppe leicht abgespalten werden kann.^[123, 130]

Feldkamp und Tullar^[126] berichteten 1963 über die Paal-Knorr-Synthese von 3-Methylthiophen **71d** aus Natriumsalz der Brenzweinsäure **71c**, wobei die Cyclokondensation bei einer sehr höheren Temperatur verlief.

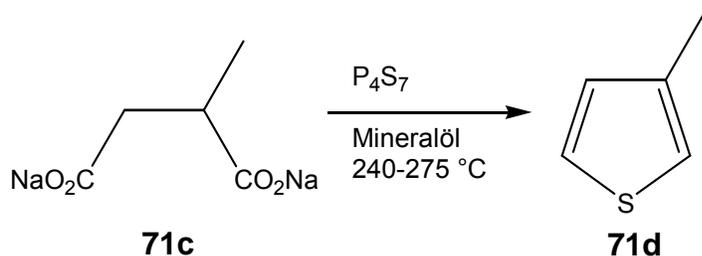


Abbildung 24: Paal-Knorr-Synthese von 3-Methylthiophen **71d** nach Feldkamp und Tullar.^[126]

Im diesen Teil sollte eine neue Methode erarbeitet werden um die benötigten 2,3-substituierten bis-Thioamid-Verbindungen **67a** und **64b** bzw. Thioacysilan **66c** darzustellen^[122-125, 128-124] (Abbildung 25). Diese können möglicherweise in einer intramolekularen [2+2]-Cycloaddition^[120c] zur Bildung von 1,3-Dithietan-Derivaten spontan eingehen.

3.9.1 Reaktion mit Lawesson-Reagenz

Zur Herstellung von bis-Thioamid-Derivaten **67a**, **64b** und Thioamid **66c** wurden bis-Weinrebamid **67**, bis-Morpholinamid **64** bzw. Acylsilan **66** unter Standardbedingungen mit Lawesson-Reagenz in Toluol eingesetzt.^[122-125, 128, 132]

Die Reaktion zwischen **67** und LR verlief bei 50 °C bzw. bei 110 °C (Abbildung 25) und führte nach 5 h zur Bildung von verschiedenen Produkten, wobei eine eindeutige Strukturaufklärung unmöglich war. Das gemischte ¹³C-NMR-Spektrum zeigte im tiefen Feld die Anwesenheit von C-Atomen mit einer chemischen Verschiebung zwischen $\delta=220$ ppm und $\delta=179$ ppm. Eine weitere Untersuchung der Reaktionsbedingungen könnte zur Synthese der entsprechenden Thiocarbo-nylverbindung **67a** herangezogen werden.

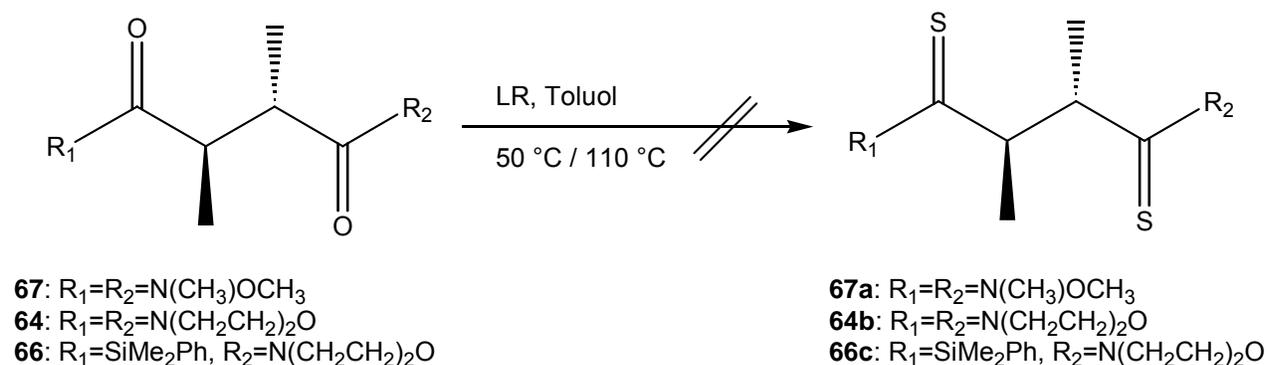


Abbildung 25: Thionierung von bis-Weinrebamid **67**, Dimorpholinamid **64** und Acylsilan **66** mit LR.

Die Thionierung von bis-Morpholinamid **64** bei 110 °C führte in 3 h zur Bildung von verschiedenen Reaktionsprodukten. Das gemischte ¹³C-NMR-Spektrum zeigte im tiefen Feld die Anwesenheit von C-Atomen zwischen $\delta=202$ ppm und $\delta=175$ ppm, d.h. ein Austausch zwischen S- und O-Atom vermutlich stattgefunden hat. Die geringe Menge konnte nicht isoliert werden.

Setzte man Acylsilan **66** in Toluol mit LR bei 50 °C ein, so zersetzte sich das Edukt nach 12 h vollständig.

Die Reaktionsbedingungen und Ergebnisse zur Thionierung von *meso*-Dimethylbernsteinsäure-Derivaten sind in Tabelle 11 kurz zusammengefasst.

Nr.	Edukt	Bedingungen	Dauer	Produkt
1	67	LR, Toluol, 50 °C / 110 °C	5 h	verschied. Produkte
2	64	LR, Toluol, 110 °C	3 h	verschied. Produkte
3	66	LR, Toluol, 50 °C	12 h	Zersetzung

Tabelle 11: Versuche zur Thionierung von bis-Weinrebamid **67**, bis-Morpholinamid **64** und Acylsilan **66**.

3.9.2 Reaktion mit Hexamethyldisilathian

3.9.2.1 Synthese von Thioamid **68**

Das bis-Weinrebamid **67** wurde durch Amidierung^[133] von *meso*-Dimethylbernsteinsäure mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid mit Hilfe des Kupplungsreagenzes EDC bei RT in einer Ausbeute von 75% synthetisiert. Als nukleophiler Katalysator diente DMAP.

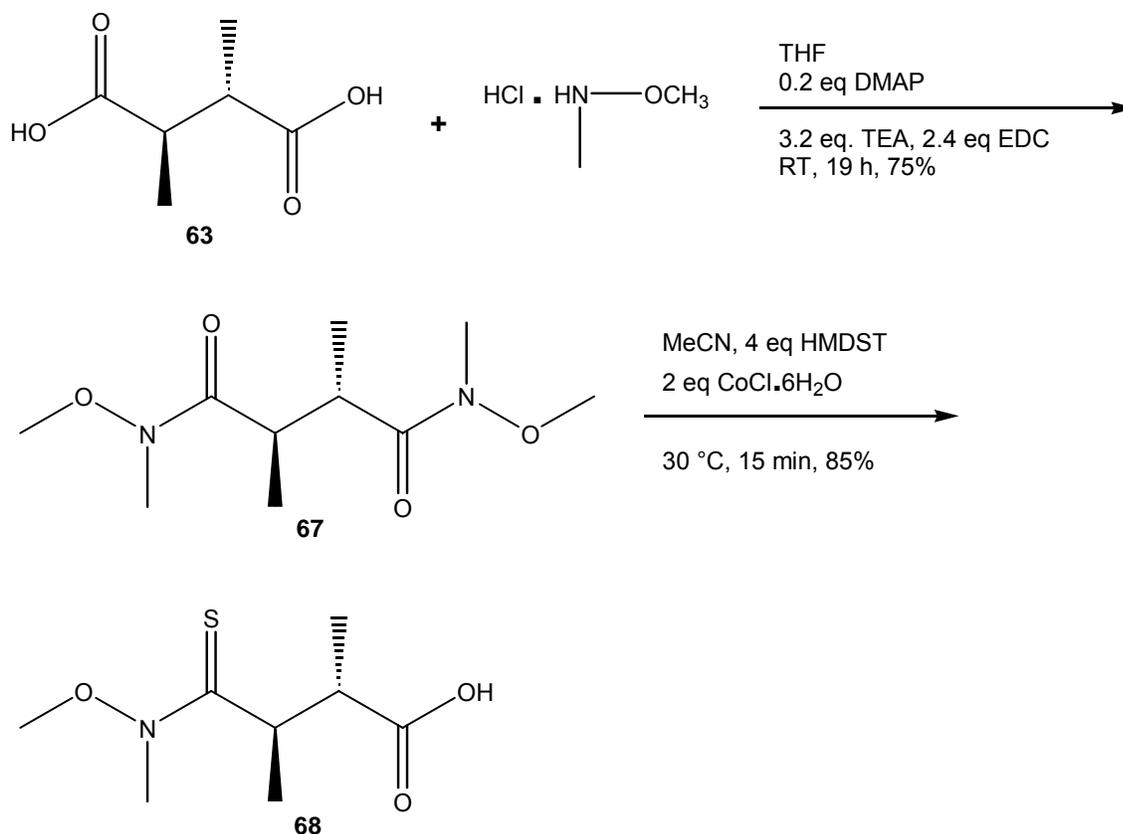


Abbildung 26: Synthese von Thioamid **68**.

Die Thionierung von Diweinebamid **67** mit HMDST nach Bouillon *et al.*^[130] lieferte Thioamid **68** in einer 85%igen Ausbeute. Die Reaktion dauerte 15 min bei 30 °C.^[130, 131] Unter diesen Bedingungen wurde nur ein Sauerstoff- gegen ein Schwefelatom ausgetauscht, obwohl die Reaktion mit 4 eq HMDST durchgeführt wurde. Nach der Auswertung von NOESY, COSY und C, H-Korrelation NMR-Spektren stellte es sich fest, dass unter den Bedingungen eine reversible Reaktion erfolgte, welche die zweite Amid-Funktion zur Carbonsäure überführte. Die synthetisierte Verbindung ist eine neue Substanz, die für die weitere Umsetzung verwendet werden könnte bzw. zum Verstehen der chemischen Reaktivität der 2,3-substituierten 1,4-Dicarbonsäure-Derivate.

Diese Strategie könnte weiter verfolgt werden. Durch Amidierung der Carbonsäure-Funktion und nachfolgender Sulfurierung mit HMDST könnte das bis-Thioamid hergestellt werden. Da die Reaktion bei 30 °C durchgeführt werden kann, könnte eine Thionierung und darauffolgende intramolekulare [2+2]-Cycloaddition unter Lichteinwirkung gelingen. Eine weitere Reduktion (z. B. mit LAH, DIBAL-H) der Amid-Funktion und anschließende Aufarbeitung mit verdünnter, wässriger Säure könnte die Vorstufe **34a** des *trans*-Zwiebelans **34** freisetzen.

3.9.2.2 Darstellung der Reaktion mit bis-Morpholinamid **64**

Bis-Morpholinamid **64** wurde mit Hexamethyldisilathian in abs. MeCN und einer katalytischen Menge $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ bei RT versetzt. Unter diesen Bedingungen^[131] fand keine Reaktion statt. Nach der Zugabe von weiterem HMDST (> 8 eq) bzw. Katalysator unter Erwärmung der Reaktion auf 30 °C konnte bis-Morpholinamid nur teilweise umgesetzt werden. Das ^{13}C -NMR-Spektrum des Reaktionsproduktes **64d** zeigte keine chemische Verschiebung $\delta > 200$ ppm, die dem C-Atom aus der Thion-Gruppe ($>\text{C}=\text{S}$) entsprechen würde. Die NMR-, HPLC-MS, MS-Auswertungen zeigten, dass bei dem Versuch zur Herstellung von bis-Thiocarbonyl-Verbindungen nur eine Morpholin-Funktion gegen EtO-Gruppe ausgetauscht wurde.

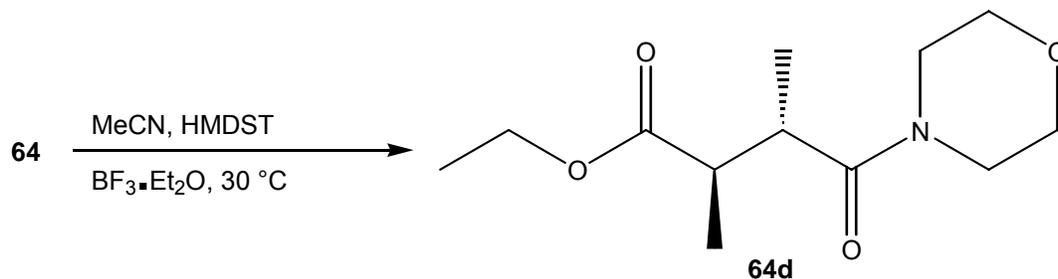


Abbildung 27: Thionierung von bis-Morpholinamid **64**.

3.9.2.3 Isomerisierung von Acylsilan **66**

Die Thionierung vom 2,3-substituierten Acylsilan **66** mit Hexamethyldisilathian HMDST nach Bouillon *et al.*^[130] und Ricci *et al.*^[131] unter milden Bedingungen bei RT verlief mit Schwierigkeiten. Die Reaktion wurde in Gegenwart von katalytischer Menge $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ durchgeführt. Nach 18 h wurden 33% des Eduktes **66** umgesetzt, wobei das Reaktionsprodukt **72** in 20%iger Ausbeute isoliert werden konnte.

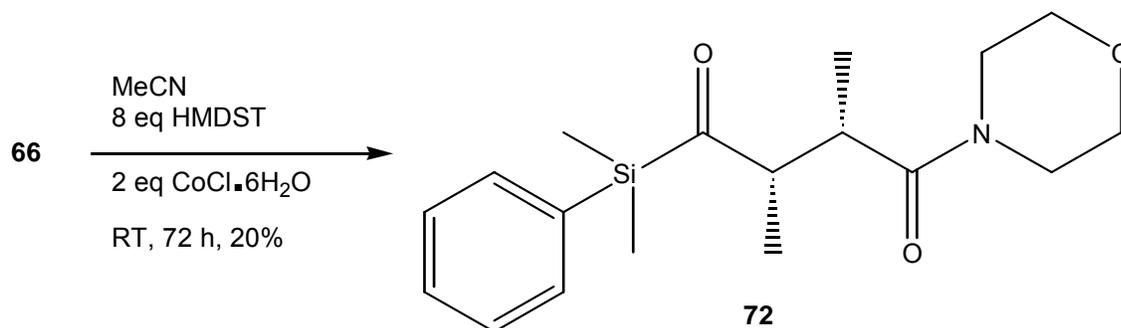


Abbildung 28: Isomerisierung von *meso*-**66** in *rac*-Acylsilan **72**.

Das Produkt **72** und das Edukt **66** konnten flashchromatographisch voneinander getrennt werden. Ein Vergleich zwischen NMR-, HPLC-MS-, MS- und IR-Messungen zeigte, dass beide Verbindungen über identische analytische Daten (u.a. chemische Verschiebung, MS-Fragmentierung) verfügten. Die folgende NOE-NMR-Untersuchung von **72** wies die *trans*-Geometrie der einzelnen Protonen am C2- und C3-Atom nach, wobei die Kopplungskonstante 8.4 Hz betrug. Nach der Strukturaufklärung von **72** konnte festgestellt werden, dass es sich bei beiden Verbindungen um ein Diastereomerenpaar handelte. Offenbar sprach diese Reaktion für eine Isomerisierung^[134] von *meso*-**66** in *rac*-**72**. Eine ungewöhnliche Epimerisierung stellten Sharp und Heathcock^[134] 1994 bei der Thionierung von δ -Lactam-Derivaten mit Lawesson-Reagenz unter Standardbedingungen fest. Die Autoren beschrieben diese Isomerisierung durch eine 1,3-dipolare Cycloreversion.

Unter diesen Reaktionsbedingungen konnte das gewünschte Thioacetylsilan **66c** nicht erreicht werden. Eine weitere Untersuchung der Reaktionsbedingungen mit einer katalytischen Menge an $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ und $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ^[131] könnte zu Thioamidderivaten führen. Nach dem Protokoll von Stelious *et al.*^[135] könnte versucht werden, die Thiocarbonylverbindungen über *in situ* synthetisiertes Bortrisulfid (B_2S_3) aus stöchiometrischen Menge Bortrichlorid (BCl_3) herzustellen.

Die synthetisierten Verbindungen **64**, **66**, **67** und **72** wurden bis heute in der Literatur noch nicht beschrieben. Die untersuchten Reaktionen könnten zu der Aufklärung der chemischen Reaktivität von 2,3-substituierten Acetylsilan- **66**, bis-Weinrebamid- **67**, **72** bzw. bis-Morpholinamid-Derivaten **64**, **64d** beitragen, wobei es eine Vielzahl Schwierigkeiten während der Synthesewege auftraten. Dennoch dienten diese Studien als grundlegende Vorversuche zur Synthese von *cis*-, *trans*-Zwiebelan.

4 Zusammenfassung, Ausblick und biologische Evaluierung

4.1 Zusammenfassung

Die frischen Extraktauszüge aus Schalotten *Bonilla* (*Allium cepa* var. *Aggregatum*) wurden bezüglich ihrer Zusammensetzung bzw. chemischen Struktur und biologischen Aktivität ihrer Inhaltsstoffe untersucht. Die Forschungsarbeiten erfolgten in der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Dr. L. Lücke (LUS GmbH), welche frische Extraktauszüge bereit stellte sowie der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. S. Ansorge (IMTM GmbH), die die immunmodulatorische Potenz der Naturstoffanaloga untersuchte.

Die ausgewählten symmetrischen und asymmetrischen gesättigten und α -ungesättigten Thiosulfinate wurden nach leicht modifizierten Literaturvorschriften synthetisiert. Die Direktoxidation von kommerziellem symmetrischem Dimethyl- bzw. Dipropyl-disulfid mit äquimolaren Mengen von *m*CPBA führte zu Dimethyl- **12** und Dipropylthiosulfinat **13**. Die ungesättigten asymmetrischen Thiosulfinate wurden durch Oxidation von entsprechenden Disulfiden regiospezifisch synthetisiert. Diese konnten mit *m*CPBA zum [*E*]- **14** und [*Z*]-1-Propenylmethylthiosulfinat **14**, [*E*]- **16** und [*Z*]-1-Propenylpropylthiosulfinat **16** und S-Propyl-1-Propenylthiosulfinat **17** oxidiert werden. Schlüsselverbindung dieser Synthese war 1-Propinylpropylsulfid **54**, eine Verbindung, die durch basenkatalysierte Isomerisierung von 2-Propinylpropylsulfid **53** zugänglich war.

Die Isolierung der Primär- und Sekundärmetabolite aus dem frischen *Bonilla*-Extrakt erfolgte über eine Kombination aus Radial- und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bei Raumtemperatur. Die durch Radialchromatographie präparativ vorgetrennten Extraktfraktionen wurden an einer Normalphasen-LiChrospher[®]Si 60-Säule weiter chromatographiert, wobei die Eluation der Metabolite über einen Gradienten *i*-Propanol/*n*-Hexan erfolgte. Die Analysezeit des Extraktes betrug 50 min/Lauf. Unter gleichen chromatographischen Bedingungen fand bei der präparativen Auftrennung die typische Peakverschiebung und -überlappung in dem Chromatogramm statt. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und aufkonzentriert. Eine weitere Aufreinigung erfolgte durch den semipräparativen Modus der analytischen HPLC-Anlage.

In einem weiteren Schritt wurden die Sekundärmetabolite anhand einer Umkehrphasen-Zorbax[®] CD-8-Säule einzeln identifiziert. Die Cepaene **27**, **30a**, **30b** und **30c** konnten hier durch einen

Gardienten von $\text{NH}_4\text{OH}/\text{MeCN}$ eluiert und mittels ES-API-MS identifiziert werden. Eine eindeutige Zuordnung von Peaks zu Massen wurde durch HPLC-MS ermöglicht. Die Analysezeit betrug 15 min/Lauf.

Die qualitative Analyse der Komponenten aus Bärlauchextrakt (*Allium ursinum*, L) bewies die universelle Einsetzbarkeit und die Reproduzierbarkeit der ausgearbeiteten chromatographischen Bedingungen "NP-HPLC-System 1".

Die beste Auftrennung der *Allium*-Extrakte konnte an einer Umkehrphasen-LiChrosorb[®] RP 18-Säule nicht erreicht werden.

Die synthetischen Substanzen dienten als Referenzsubstanzen und wurden qualitativ unter den Bedingungen "NP-HPLC-System 1" chromatographiert. Als interner Standard für die qualitative Bestimmung und Zuordnung der Peaks wurde Benzylalkohol eingesetzt. Eine vollständige Auftrennung von [E]-**14**, [Z]-1-Propenylmethylthiosulfinat **14** mit der vorliegenden Methode war nicht möglich, da Thiosulfinate sehr schnell bei Raumtemperatur isomerisierten. Unter diesen chromatographischen Bedingungen lösten sich Thiosulfinat **13** und [E]-**16** ebenfalls in einem gemeinsamen Peak mit einer Retentionszeit von 9.2 Minuten auf.

Aufgrund der Komplexität des Extraktes erfolgte die Zuordnung der Peaks durch eine Co-Chromatographie der Naturstoffe mit den Naturstoffanaloga durch HPLC-MS. Ein Vergleich der Ergebnisse aus der Strukturaufklärung isolierter Inhaltsstoffe der einzelnen Extraktfraktionen und der Referenzsubstanzen trug auch dazu bei.

Die chemischen Strukturen des *cis*- und *trans*-Zwiebelans sowie der Cepaene wurden über den gemischten NMR-Spektren einzelner Extraktunterfraktionen eindeutig aufgeklärt. Bei der Verbindung [Z]-**27** handelte sich um einen neuen, isolierten Naturstoff, der mittels EI-MS jedoch nur als Stereoisomerengemisch in *Allium cepa* nachgewiesen und in der Literatur beschrieben wurde. Eine Isolierung des Diastereomers von [Z]-**27** aus *Bonilla*-Extrakt war nicht möglich. Die ermittelten MS- und NMR-Ergebnisse von **30b** und **30c** sprachen für zwei Verbindungen, die als ein Diastereomerpaar bezeichnet wurden. Eine vollständige Strukturaufklärung u.a. *cis/trans*-Geometrie der Doppelbindung am C8/C9-Atom von **30a** gelang nicht, da eine zu sehr geringe Menge anhand ES-API-MS-Messung im Extrakt nachgewiesen wurde. Bisher existieren keine literaturbekannten Daten über eine Isolierung der Cepaene aus *Allium cepa* var. *Aggregatum*. Die erhaltenen Ergebnisse wiesen darauf hin, dass diese Verbindungen nach der enzymatischen Reaktion im frischen *Bonilla*-Extrakt entstanden.

Eine quantitative Bestimmung der symmetrischen bzw. asymmetrischen gesättigten und α -gesättigten Thiosulfinate, Zwiebelane sowie Cypaene erfolgte mittels des Benzaldehyd-Standards. Aufgrund der leichten *cis/trans*-Isomerisierung der α -, β -ungesättigten Thiosulfinate bei Raumtemperatur wurde deren gesamte Konzentration im Extrakt bestimmt. Die gesamte relative Konzentration der Cypaene wurde ermittelt, da diese unter "NP-HPLC System 1" voneinander nicht getrennt werden konnten.

Die gesättigten synthetischen Naturstoffanaloga **12** und **13** wiesen keine toxischen Effekte in einem Proliferationsgrad-Testsystem nach. Das Histaminrelease-Testsystem zeigte, dass **12** und **13** die Histaminausschüttung signifikant hemmten (Signifikanz $p < 0.01$). Mit dem Basophilen-Aktivierungstest konnte bewiesen werden, dass durch die Thiosulfinate eine signifikante Reduktion der allergischen Reaktion bei Insektenstichen erfolgte (Signifikanz $p < 0.05$).

Die Dethioketalisierung bzw. Silylierung und direkte Thionierung von 2,3-substituierten Bernsteinsäure-Derivaten verliefen mit Schwierigkeiten. Die daraus resultierende Problematik lässt sich mit einer 1,4-Crobb-Fragmentierung gut erklären, wobei dies zur Spaltung der zentralen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung (C2-C3-Atom) führt. Die Dethioketalisierung des bis-Dithians **62** mit Hilfe von Quecksilbersalzen führte entweder zu Spuren von 1,4-*bis*-Acylsilan **62a**, zur Zersetzung des Eduktes oder zu Gemischen aus unerwünschten Produkten. Eine Isolierung von **62a** war nicht möglich. Das 2,3-substituierte *meso*-Acylsilan **66** isomerisierte ungewöhnlich zur *rac*-Form **72** bei Thionierung mit Hexamethyldisilathian unter milden Bedingungen. Die Thionierung von bis-Weinrebamid **67** mit HMDST lieferte Thioamid **68**.

Die untersuchten Reaktionen können zur Aufklärung der chemischen Reaktivität von 2,3-substituierten Acylsilan- **66**, bis-Weinrebamid- **67**, **72** bzw. bis-Morpholinamid-Derivaten **64**, **64d** beitragen. Dennoch dienten diese Studien als grundlegende Vorversuche zur Synthese von *cis*-, *trans*-Zwiebelan.

4.2 Ausblick

Die charakteristischen Doppeldoublets zwischen 3.80 ppm und 3.50 ppm in gemischten ^1H -NMR-Spektren der Fraktion F3 und F4 zeigten die typische chemische Verschiebung des entschirmten Protons am C5-Atom ($\text{SCHC}_2\text{H}_5\text{SS}$). Die zugehörigen chemischen Verschiebungen vom C5-Atom in ^{13}C -NMR-Spektren wurden zwischen 77 ppm und 70 ppm aufgenommen. Der Vergleich der NMR-Ergebnisse mit den literaturbekannten Daten von

isolierten und synthetischen Cepaenen wies darauf hin, dass es sich bei diesen Verbindungen um weitere Cepaene handeln könnte. Eine weiter gehende Untersuchung der F3 und F4 könnte diese Vermutung eindeutig bestätigen.

Die ausgearbeitete HPLC-Methodik kann für die Auftrennung weiterer *Allium*-Extrakte dienen. Aufgrund der Komplexität der Zusammensetzung der Extrakte kann diese Methode natürlich weiter verbessert werden. Hier sind Faktoren wie Instabilität und chemische Struktur der Inhaltsstoffe sowie aufgewendete Zeit, Stationärphase bzw. Eluationsmittel der analytischen HPLC-Technik zu nennen. Auch die Trennung an der präparativen HPLC-Anlage kann in diesen Punkten weiter optimiert werden.

Die Reaktionsbedingungen mit LR zur Synthese des entsprechenden bis-Thionamids **67a** sowie **64b** könnten weiter untersucht werden. Durch eine Amidierung der Carbonsäure-Funktion in **68** und nachfolgender Thionierung mit HMDST könnte das bis-Thionamid **67a** hergestellt werden. Da die Reaktion bei 30 °C bzw. unter Reflux durchgeführt werden kann, könnte eine Thionierung und darauffolgende intramolekulare [2+2]-Cycloaddition gelingen.

Eine Thionierung von **66** mit HMDST in Gegenwart katalytischer Mengen an $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ und $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}^{[131]}$ könnte durchgeführt werden. Nach dem Protokoll von Stelious *et al.*^[135] könnte versucht werden, das Thioacetylsilan **66c** über *in situ* synthetisiertes Bortrisulfid (B_2S_3) aus stöchiometrischen Mengen Bortrichlorid (BCl_3) herzustellen.

4.3 Biologische Evaluierung

Die immunmodulatorische Potenz von *Allium*-Naturstoffanaloga wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. S. Ansorge (IMTM GmbH) untersucht. Für die Untersuchung wurden die Dimethyl-**12** und Dipropylthiosulfinat **13** bereitgestellt. Diese Substanzen sorgen für das charakteristische Zwiebelaroma.

4.3.1 Proliferationsgrad

Mit den Thiosulfinaten **12** und **13** wurde zur Untersuchung zytotoxischer Effekte ein nichtradioaktiver Proliferationsstest durchgeführt. Keine Toxizität konnte nachgewiesen werden. Der Proliferationsgrad nach 24 Stunden nach Inkubation mit **12** und **13** ist in Abbildung 1 bzw. Abbildung 2 dargestellt.

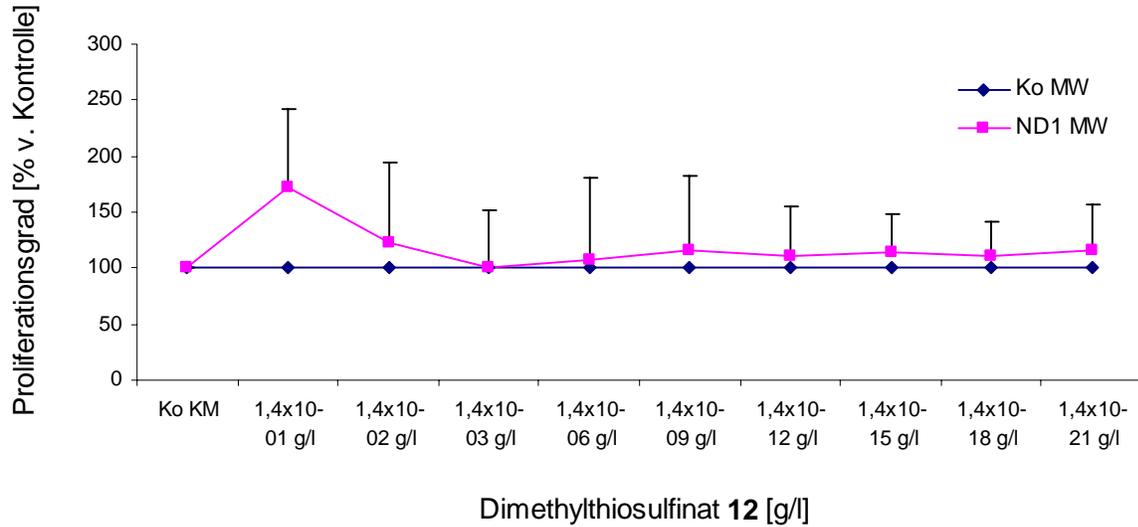


Abbildung 1: Proliferationsgrad nach 24 Stunden nach Inkubation mit Dimethylthiosulfinat 12 (ND1).

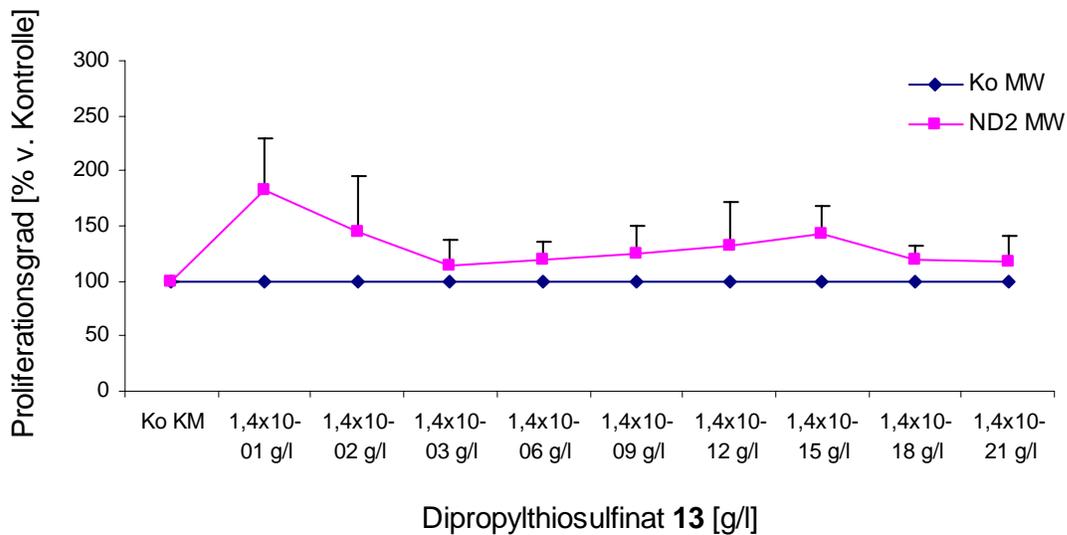


Abbildung 2: Proliferationsgrad nach 24 Stunden nach Inkubation mit Dipropylthiosulfinat 13 (ND2).

4.3.2 Histaminrelease

Bei Kontakt mit allergieauslösenden Antigenen wird Histamin in der Haut freigesetzt, wobei eine Entzündung und ein Juckreiz auftreten.

Mit dem etablierten Testsystem (Histaminrelease) wurde die allergische Reaktion wie bei einem Insektenstich sehr realitätsnah durchgeführt und die Beeinflussung der Histaminausschüttung bei gleichzeitiger Stimulation mit 10^{-3} g/l IgE und Zugabe von **12** und **13** bestimmt. Aus den Abbildung 3 bzw. Abbildung 4 ist zu erkennen, dass die Thiosulfinate die Histaminausschüttung signifikant hemmten (Signifikanz $p < 0.01$).

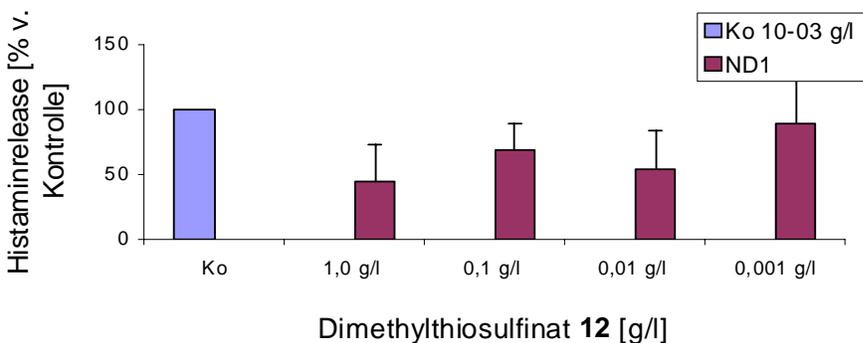


Abbildung 3: Beeinflussung der Histaminausschüttung nach Stimulation mit 10^{-3} g/l IgE und Zugabe von Dimethylthiosulfinat **12** (ND1).

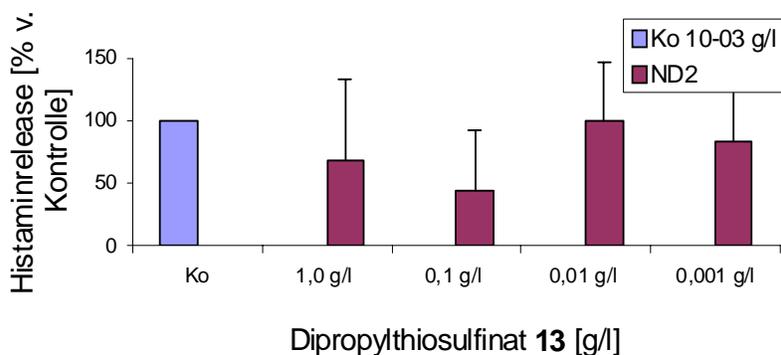


Abbildung 4: Beeinflussung der Histaminausschüttung nach Stimulation mit 10^{-3} g/l IgE und Zugabe von Dipropylthiosulfinat **13** (ND2).

4.3.3 Aktivierungsgrad basophiler Granulozyten

Mit dem Basophilen-Aktivierungstest erfolgte die Charakterisierung der spezifischen Immunantwort im Zusammenhang mit einer Sofortreaktion, wie sie bspw. bei Insektenstichen auftritt. Mit diesem Testsystem konnte bewiesen werden, dass durch die Thiosulfinate eine signifikante Reduktion der allergischen Reaktion bei Insektenstichen erfolgte (Signifikanz $p < 0.05$). Die Beeinflussung des Aktivierungsgrades basophiler Granulozyten nach Stimulation mit 10^{-3} g/l IgE und Zugabe von **12** bzw. **13** ist in Abbildung 5 und Abbildung 6 dargestellt.

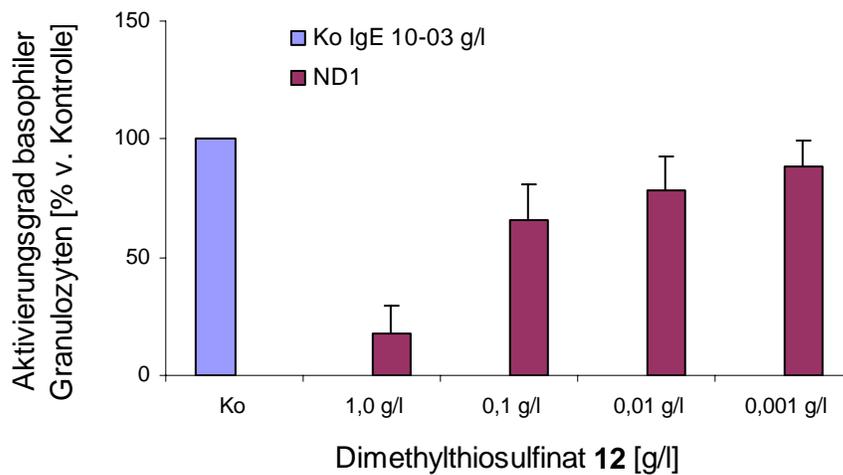


Abbildung 5: Beeinflussung des Aktivierungsgrades basophiler Granulozyten nach Stimulation mit 10^{-3} g/l IgE und Zugabe von Dimethylthiosulfinat **12** (ND1).

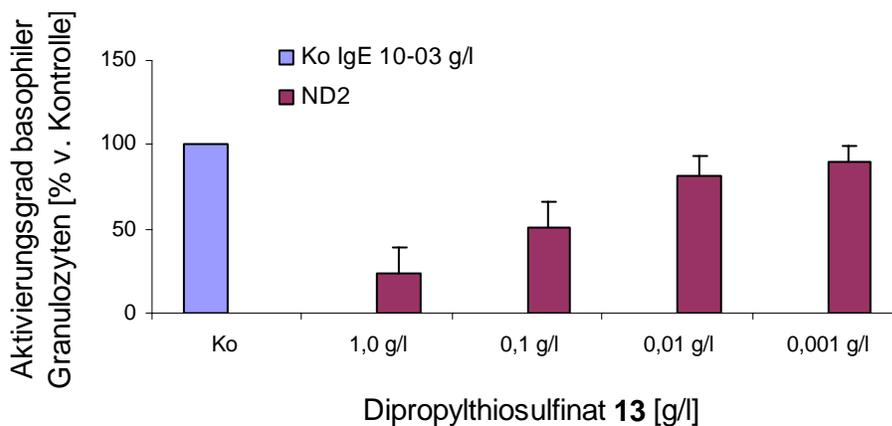


Abbildung 6: Beeinflussung des Aktivierungsgrades basophiler Granulozyten nach Stimulation mit 10^{-3} g/l IgE und Zugabe von Dipropylthiosulfinat **13** (ND2).

5 Experimenteller Teil

5.1 Chromatographisches System

5.1.1 Analytisches HPLC-Anlage

Die qualitative und quantitative Bestimmung der Inhaltstoffe aus dem Extrakt „*Bonilla*“ wurde mit einer HPLC-Anlage von der Techlab Chromatographie GmbH (Eckeröde, Deutschland) durchgeführt. Diese Anlage bestand aus einem Vakuumdegaser, zwei Kolbenpumpen „Binary Gradient Pump“ für die Arbeitsbereich von 0.1-10 ml/min, einem Mischventil, einem Injektionsventil, einer Trennsäule und einem Shimadzu UV-Detektor „Ultraviolet Spectrophotometric Detector SPD-6 Modul“ (für den Spektralbereich 195-350 nm). Die chromatographischen Daten wurden mit der Systemsoftware „Andromeda“ erfasst und ausgewertet. Das Arbeitsprinzip einer HPLC-Anlage ist schematisch in Abbildung 1 wiedergegeben.

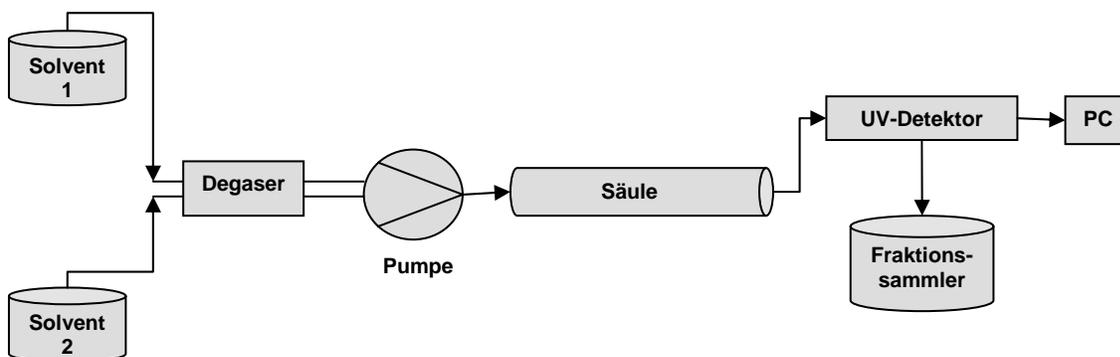


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage.

Es wurden Edelstahlsäulen mit einer Länge von 125 und 250 mm bei einem Innendurchmesser von 4.6 mm verwendet. Die Trennung erfolgte auf unterschiedlichen NP- und RP-Packungsmaterialien der Firmen Techlab Chromatographie GmbH, VWR™ International (Merck, Darmstadt) und M&W Chromatographietechnik GmbH mit Partikelgröße von 5 µm. Die untersuchten chromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

stationäre Phase	LiChrospher® Si 60	LiChrosorb® Si 60	LiChrosorb® RP 18, Zorbax CD-8
mobile Phase	<i>n</i> -Hexan, <i>i</i> -Propanol, Chloroform	<i>n</i> -Hexan, <i>i</i> -Propanol, Ethylacetat	Acetonitril, Methanol, Wasser, Pufferlösung
Volumenstrom	1.0-1.6 ml/min	1.6-1.8 ml/min	0.8-1.0 ml/min
Injektionsvolumen	5, 20, und 50 µl	5, 20 und 50 µl	5, 20 und 50 µl
UV-Detektion	210, 230 und 254 nm	210, 230 und 254 nm	210, 230 und 254 nm
Elution	Gradient	Gradient	isokratischer Lauf, Gradient

Tabelle 1: Chromatographische Bedingungen der Normal- und Umkehrphasen HPLC.

Zur Elution im isokratischen Lauf bei Raumtemperatur diente ein Gemisch aus Acetonitril, Methanol und Wasser.^[54] Im Fall einer Gradientenelution wurde eine Mischung von *n*-Hexan, *i*-Propanol oder Ethylacetat sowie Acetonitril/NH₄Acetat verwendet.^[136] Auf die Säule wurden je 5-50 µl einer ethanolischen Lösung der Probe aufgetragen. Die Zeit bis zur vollständigen Peakauflösung betrug 25-40 min.

Die analytische HPLC-Anlage wurde auch als semi-präparative eingesetzt.

5.1.2 Präparative HPLC-Anlage

Zur Isolierung der biologisch aktiven Komponenten wurde eine präparative HPLC-Anlage Modell ST-140 G der Firma Merck/SepTech™ (Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Die Anlage ist mit zwei Pumpen ausgerüstet, die bei isokratischem Betrieb in einem Flussbereich von 5 bis 140 ml/min und bei Gradientenbereich in einem Flussbereich von 35 bis 140 ml/min arbeiteten. Der maximale Betriebsdruck des Systems war 340 bar. Vor Edelstahlsäule mit einem Innendurchmesser von 25 mm wurde ein manuelles Rheodyne-Injektionsventil mit einer 2000 µl Probenschleife eingebaut. Das chromatographische Signal wurde von einem L-4000 Merck/Hitachi UV-Detektor erfasst und mit dem Software „TurboPrep“ ausgewertet. Die Trennung erfolgte auf einer LiChrosorb® Si 60 Säule (250x25 mm) mit Partikelgröße des Packungsmaterials von 7 µm. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus *n*-Hexan und Ethylacetat verwendet. Die chromatographische Bedingungen wurden durch die Systemsoftware über einen Controller individuell gesteuert.

5.1.3 Das Chromatotron

Die Radialchromatographie wurde mit einem Chromatotron™, Modell 7924T (Harrison Research, USA), einer Pumpe Lab Pump Jr., Modell RHSY (Fluid Metering Inc., USA) und durch Elution mit den ausgewiesenen Laufmitteln ausgeführt. Der schematische Aufbau des Chromatotrons^[137] ist in Abbildung 2 wiedergegeben. Die Kieselgel/Gips **A** beschichtete Glasplatte **B** wurde auf den Motor **F** fest verbunden. Eine PTFE-Abdeckung **C** schloss den Innenraum des Chromatotrons dicht ab. Das Trägermaterial ließ sich anschließend über das entsprechende Laufmittel, das aus einem Vorratsgefäß auf die rotierende Platte tropfte, konditionieren. Dann wurde das Extrakt in wenig Lösungsmittel gelöst und langsam zugegeben. Am Ende dieses Vorganges läßt man wieder das Laufmittel zutropfen und der Extrakt begann sich durch Elution mit dem Laufmittel aufzutrennen. Die verschiedenen Fraktionen wanderten mit dem Lösungsmittel als konzentrische Kreise, verließen die Glasplatte und flossen im Lösungsmittelkanal **E** zum Abfluss **G**. Dort wurden die unterschiedlichen Extraktfraktionen in Reagenzgläser aufgefangen.^[93, 137]

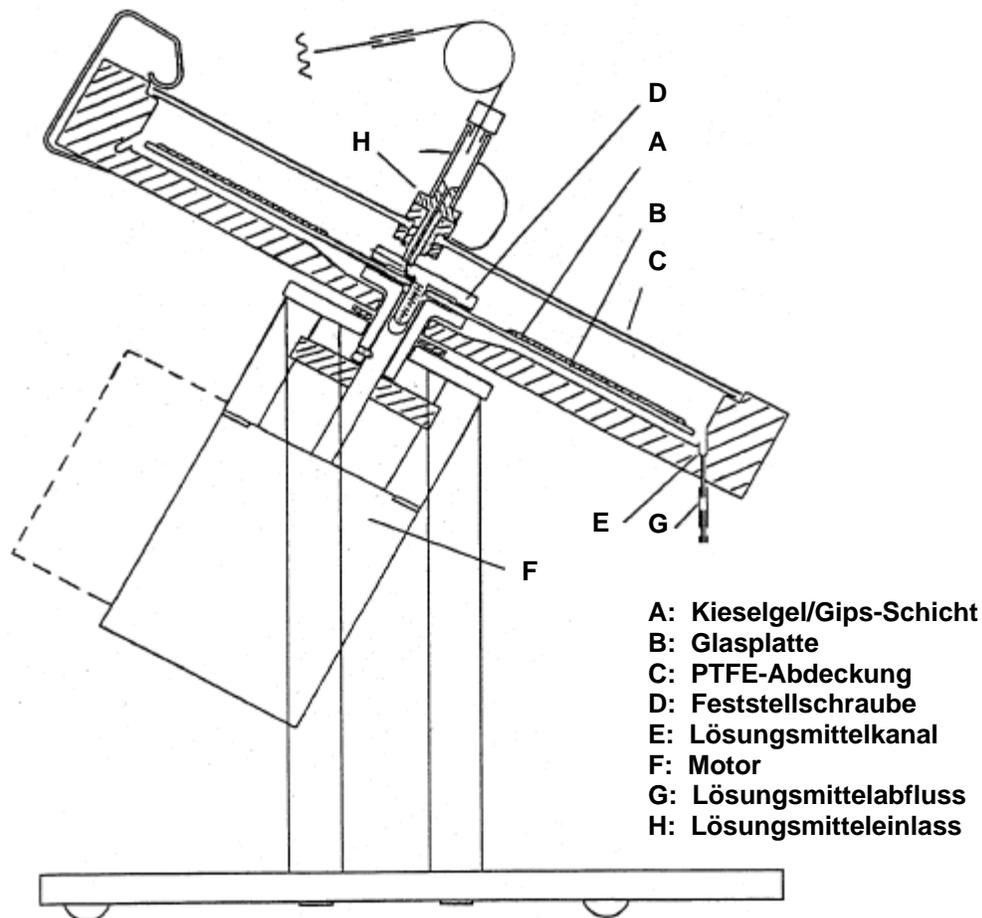


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Chromatotrons™79243 (Harrison Research).^[137]

Da die PTFE-Abdeckung des Chromatotrons UV-Licht-transparent ist, konnten die UV-aktiven Verbindungen, die in verschieden großen konzentrischen Kreisen gruppiert waren, unter einer UV-Handlampe Benda, Modell NU-8-KL (KW254 nm / LW366 nm) detektiert werden.

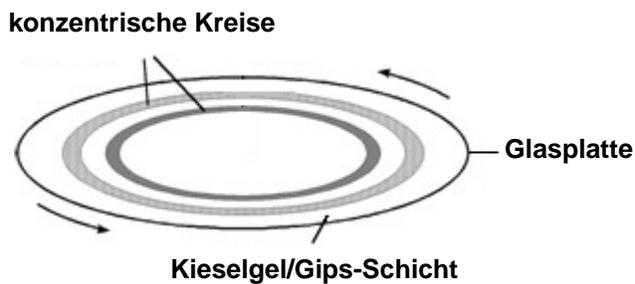


Abbildung 3: Konzentrische Kreise^[137] auf Kieselgel/Gips beschichtete Glasplatte.

Die Auftrennung erfolgte auf einer vorgefertigten Kieselgel/Gips-Glasplatte (Klaus Ziemer Chromatographie) mit einer Schichtdicke von 2 mm. Zur Elution im isokratischen Lauf diente eine Mischung von *n*-Hexan/*i*-Propanol. Nach einem Wechsel des Laufmittels zu reinem Aceton wurden die Verunreinigungen aus der Glasplatte gewaschen, so dass die Platte wiederverwendet werden konnte. Die chromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

stationäre Phase	Silikagel-GF
Schichtdicke	2 mm
mobile Phase	<i>n</i> -Hexan/ <i>i</i> -Propanol (7:1)
Flussgeschwindigkeit	6 ml/min
Elution	isokratischer Lauf
UV-Detektion	254 nm

Tabelle 2: Chromatographische Bedingungen der Radialchromatographie.

5.2 Allgemeine Arbeitstechniken

Arbeitstechnik

Sämtliche feuchtigkeits- oder luftempfindlichen Reaktionen wurden unter einer Stickstoffgasatmosphäre durchgeführt. Die Reaktionsapparaturen wurden zuvor mit einer Heißluftpistole im Ölpumpenvakuum ausgeheizt. Flüssige Reagenzien oder Lösungen wurden mit Spritzen durch Septen in die Reaktionsgefäße zugegeben. Die Zugabe von Feststoffen erfolgte im Stickstoff-Gegenstrom.

Ausgangsverbindungen und Lösungsmittel

Die kommerziell erhältlichen **Chemikalien** wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Lösungsmittel als Reaktionsmedien wurden nach üblichen Methoden gereinigt bzw. absolutiert oder als getrocknete Lösungsmittel über Molekularsieb von der Firma Fluka aufbewahrt (H₂O-Gehalt <0.01%). Tetrahydrofuran und Diethylether wurden über Natrium/Benzophenon, Dichlormethan über Calciumhydrid unter Stickstoff absolutiert und vor Gebrauch destilliert.

Präparative Säulenchromatographie

Zur **Niederdrucksäulenchromatographie** (bis zu 0.4 bar Stickstoff-Überdruck) wurde Kieselgel 60 der Firma Fluka mit einer Korngröße von 40-63 µm verwendet. Sämtliche Laufmittel wurden vor Gebrauch destilliert. Bei den Lösungsmittelgemischen handelte es sich um Volumenverhältnisse.

Analytik

Analytische **HPLC**-Trennung erfolgte mit einer Agilent 1100 LC/MSD-Anlage.

Für die analytische **Dünnschichtchromatographie** wurde auf DC-Fertigfolien Polygram®SIL G/UV254 mit Fluoreszenzindikator der Firma Macherey&Nagel durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sowie durch Eintauchen der entwickelten DC-Karten in eine der beschriebenen Färbereagenzlösungen und anschließendes Erhitzen mit einem Heißluftfön.

Färbereagenzien:*Vanilin-Reagenz:*

8.6 g Vanillin werden in 200 ml dest. Ethanol gelöst und tropfenweise mit 2.5 ml konz. Schwefelsäure versetzt.

Cer(IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure-Reagenz:

5 g Molybdätosphorsäure und 16 ml konz. Schwefelsäuren werden in 200 ml Wasser gelöst. Man gibt 2 g Cer(IV)-Sulfat zu.

¹H-NMR-Spektren wurden auf den DPX 400 und AV 600 (400 bzw. 600 Hz) Spektrometern der Firma Bruker in CDCl₃ aufgenommen. Als interner Standard diente Tetramethylsilan (0.00 ppm). Die chemischen Verschiebungen sind in [ppm] (δ -Skala), Kopplungskonstanten J in [Hz] angegeben. Für die Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, dd = Dublett eines Dubletts, dt = Dublett eines Triplets, dq = Dublett eines Quartetts, ddd = Dublett eines Doppeldubletts, br = breiteres Signal.

¹³C-NMR-Spektren wurden auf den DPX 400 und AV 600 (400 bzw. 600 Hz) Spektrometern der Firma Bruker in CDCl₃ aufgenommen. Als interner Standard diente CDCl₃ (77.01 ppm). Zur Bestimmung der Signalmultiplizitäten wurde die DEPT-135-Technik angewendet. Die Kohlenstoffmultiplizitäten sind folgendermaßen angegeben:

s = Singulett; quartäre C-Atome, d = Dublett; CH-Gruppen, t = Triplett; CH₂-Gruppen, q = Quartett; CH₃-Gruppen.

Signalzuordnungen wurden zum Teil anhand von Vergleichsdaten und unter Zuhilfenahme von NOESY- und zweidimensionalen Kopplungsexperimenten (H, H-COSY-; HSQC/HMQC- und HMBC) vorgenommen.

Massenspektren wurden mit einem Finnigan SSQ 7000-Massenspektrometer aufgenommen. Die relativen Intensitäten sind in [%] bezogen auf den Basispeak (100%) angegeben. Als Ionisierungsmethode wurde die Elektronenstoßionisation (EI) mit einem Ionisierungspotential von 70 eV angewendet.

MS-Hochauflösungen (HRMS) erfolgten auf den Finnigan MAT 95-Massenspektrometer nach der escan-Methode.

IR-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer FT-IR-2000-Spektrometer gemessen. Die Proben wurden als dünner Film auf KBr-Scheiben oder als KBr-Pressling angefertigt. Für die Bezeichnung der relativen Intensitäten der Adsorptionsbanden wurden nachstehende Abkürzungen verwendet:

w = schwach, m =mittel, s = stark, b = breites Signal

UV/VIS-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer Lambda 19-Spektrometer aufgenommen.

Elementaranalysen wurden mit einem LECO CHNS 932 gemessen.

Schmelzpunkte wurden mit einem Electrothermal 9100 der Firma BÜCHI in offenen Kapillaren ermittelt und sind unkorrigiert angegeben.

Nomenklatur

Die nachfolgenden Verbindungen wurden im Wesentlichen nach IUPAC-Regeln benannt. Die abweichende von den IUPAC-Regeln Nummerierung der Kohlenstoffatome wurde innerhalb einer Syntheseroute bzw. bei der Strukturaufklärung der Naturstoffe beibehalten und diente der leichteren Zuordnung der spektroskopischen Daten.

5.3 Extraktauftrennung des frischen Schalottenextraktes

Für die Isolierung der Primär- und Sekundärmetabolite aus dem frischen *Bonilla*-Extrakt wurde eine Kombination aus Radialchromatographie und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie HPLC bei Raumtemperatur verwendet.

5.3.1 Fraktionierung mittels Chromatotron

Als erster Schritt wurde eine schnelle Fraktionierung an einem Chromatotron durchgeführt.^[14] Die Radialchromatographie erlaubte in kurzer Zeit (30 - 40 min je Trennvorgang) eine Grobfractionierung des Schalotten-Extraktes. Bei der Verwendung einer Kieselgel/Gipsschichtdicke von 2 mm wurden je Lauf 300 mg frischer Extrakt aufgetragen. Die Fraktionen wurden anschließend mit einem Gemisch aus *n*-Hexan/*i*-Propanol (7:1) eluiert. Nach einem Wechsel des Laufmittels zu reinem Aceton wurden anschließend polare Inhaltsstoffe ohne chromophore Systeme sowie Verunreinigungen aufgefangen, sodass relativ geringe Verluste an *Bonilla* Extrakt möglich waren. Die Inhaltsstoffe wurden an einer DC-Platte in *n*-Hexan/*i*-Propanol 7:1 chromatographiert. Das Laufmittel wurde am Rotationsverdampfer bei RT eingengt. Die gewonnenen sechs Fraktionen ließen sich den R_f -Faktoren entsprechend unterteilen: eine sehr unpolare Fraktion F0 (3%), eine unpolare Fraktion F1 (21%), zwei mittelpolaren Fraktionen F2 (16%) und F3 (7%) sowie zwei polaren Fraktion F4 (23%) und F5 (26%). Die Fraktionen F1 - F5 wurden für eine weitere HPLC-Auftrennung bereitgestellt.

Die Fraktionierung verlangte eine schnelle Aufarbeitung, da die Inhaltsstoffe bei Raumtemperatur nur kurzzeitig stabil waren. Ein längerer Verbleib der Komponenten im Eluent bzw. der lösungsmittelfreien Extraktfraktionen führte sogar bei tiefen Temperaturen bis zu -20 °C zu einer Zersetzung. Trotz wiederholter Durchläufe auf dem Chromatotron war eine analysenreine Darstellung der einzelnen Inhaltsstoffe jedoch nicht möglich.

5.3.2 Normalphasen- und Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie

Die Bestimmung der Primär- und Sekundärmetabolite aus Extrakten der Schalotten *Bonilla* wurde durch Normalphasen- und Umkehrphasen-HPLC anhand eines UV-Detektors gewonnen. Zwei Methoden für die Identifizierung der Inhaltsstoffe durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurden erstellt.

Zunächst wurde der Extrakt aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen gesammelt. Die Bestandteile wurden mittels der vorhandenen Strukturaufklärungsanalytik (NMR, MS, HPLC-MS) bestimmt. Die zweite Variante bestand darin, die Chromatogramme der synthetischen Substanzen mit dem Extrakt zu vergleichen.

5.3.3 Qualitative Analyse

Nach Block *et al.*^[54] wurde ein Gradient für die Auftrennung des frischen *Bonilla*-Extraktes an einer Normalphasen-Säule und an der Techlab Chromatography HPLC-Anlage entwickelt.

Die analytischen Daten wurden mit einer LiChrospher[®]Si 60-Säule, 250x4.6 mm mit 5 µm Teilchengröße bei 254 nm erhalten. Auf die Säule wurden je 20 µl einer ethanolischen Lösung aufgetragen. Die chromatographischen Bedingungen „NP-HPLC System 1“ sind in Tabelle 3 wieder-gegeben. Für die vollständige Auflösung diente ein Gradientenprogramm bei einer konstanten Flussrate von 1.6 ml/min. Das Verhältnis von 2% *i*-Propanol/98% *n*-Hexan wurde zu Beginn für 7 min konstant gehalten. Danach wurde die Konzentration auf 10% *i*-Propanol innerhalb der nächsten 20 min erhöht und für 10 min beibehalten, bevor man auf die Anfangsbedingungen (10 min) zurückkehrte.

stationäre Phase	LiChrospher [®] Si 60
Dimensionen	250x 4.6 mm, 5 µm
mobile Phase	<i>n</i> -Hexan/ <i>i</i> -Propanol
Flussrate	1,6 ml/min
Elution	Gradient
UV-Detektion	254 nm

Tabelle 3: Chromatographische Bedingungen der analytischen-HPLC (NP-HPLC System 1).

Der Extrakt mit einer Konzentration von 20 mg Extraktmasse pro 1 ml Ethanol wurde qualitativ analysiert. Als interner Standard wurde Benzylalkohol in der Extraktlösung eingesetzt. Die Analysezeit betrug 50 min. Das Chromatogramm der analytischen HPLC ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Peaks sind in der Reihenfolge der Elution mit den Zahlen von 1 bis 16 zugeordnet.

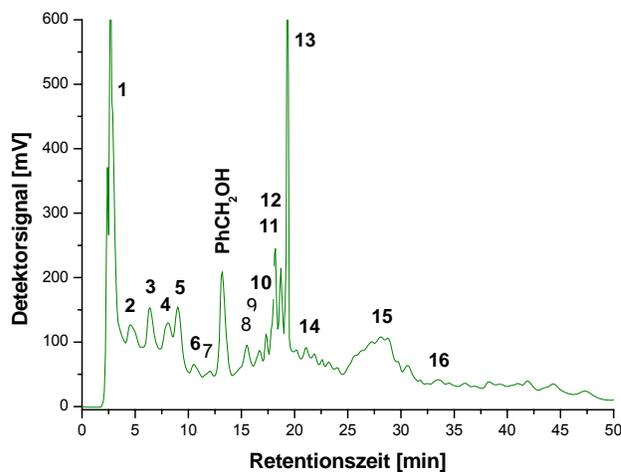


Abbildung 4: HPLC-Trennung des *Bonilla*-Extraktes mit Benzylalkohol. Bedingungen: „NP-HPLC System 1“.

An der LiChrospher® Si 60-Säule erfolgte die vollständige Peakauflösung des Benzylalkohols. Keine Überlappung der Inhaltkomponenten mit dem Standard konnte beobachtet werden. Die chromatographischen Bedingungen „NP-HPLC System 1“ wurden bei der Auftrennung anderer *Allium*-Extrakte u.a. Extrakte aus Bärlauch (*Allium ursinum*) erfolgreich eingesetzt, d.h. eine reproduzierbare und universelle HPLC-Methode war gewährleistet (Kapitel 3.3).

5.3.4 Kalibrierung des UV-Detektors mit einem Benzylalkohol-Standard

Der UV-Detektor für die quantitative Auswertung der Thiosulfinate wurde mit einem Benzylalkohol-Standard kalibriert. Hierbei wurde eine Alkohol-Standardlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL verwendet. Aus diesem Ansatz wurden 4 Verdünnungen hergestellt, wobei jede Verdünnung mindestens dreimal bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen wurde. Als Eluenten wurden *n*-Hexan und *i*-Propanol verwendet. Bezogen auf die Stoffmenge [mg/ml] und die Detektorantwort [10^{-3} mV.s] der jeweiligen Verdünnungen konnte eine Kalibriergerade ermittelt werden. Da die aromatische Struktur des Benzylalkohols für die Absorption bei 254 nm verantwortlich ist, konnte diese Kalibriergerade für die quantitative Bestimmung untersuchter Thiosulfinate verwendet werden. Die Kalibriergerade des Alkohol-Standards ist hier nicht dargestellt.

5.3.5 Qualitative Bestimmung der synthetischen Substanzen

Die synthetischen Substanzen wurden qualitativ unter den ausgewählten chromatographischen Bedingungen (siehe Kapitel 5.3.3) chromatographiert. Als interner Standard für die qualitative Bestimmung wurde Benzylalkohol eingesetzt. Das Gemisch aus Thiosulfonaten (Dimethyl- **12**, Dipropylthiosulfonat **13**, [*E*]- **14**, [*Z*]-1-Propenylmethylthiosulfonat **14**, [*E*]- **16**, [*Z*]-1-Propenylpropylthiosulfonat **16** sowie S-Propyl-1-propenylthiosulfonat **17** und Benzylalkohol wurde mit einer Konzentration von je 1 mg Substanz pro 1 ml Ethanol verdünnt. Auf die Säule wurden 20 µl einer ethanolischen Lösung aufgetragen.

Eine Peakauflösung der Substanzen mit unterschiedlichen Retentionszeiten (t_R) ist in Abbildung 5 bzw. Tabelle 4 dargestellt.

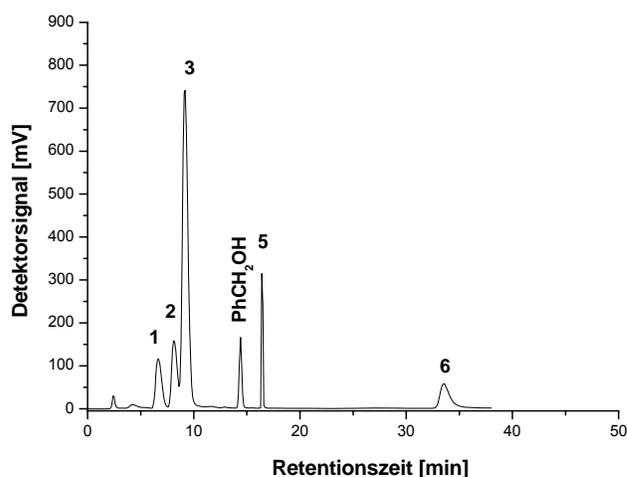


Abbildung 5: HPLC-Analyse des Referenzsubstanzengemisches mit einem internen Standard (PhCH₂OH). „NP-HPLC System 1“ Bedingungen.

Leider war eine vollständige Auftrennung von [*E*]- **14**, [*Z*]-1-Propenylmethylthiosulfonat **14** mit der vorliegenden Methode nicht möglich, da Thiosulfonate sehr schnell bei Raumtemperatur isomerisierten. Die Retentionszeit von 16.5 min entspräche dem Peak des Thiosulfonat-Gemisches **14**. Unter diesen chromatographischen Bedingungen konnten **13** und [*E*]-**16** ebenfalls nicht aufgetrennt werden. Die beiden Komponenten lösten sich in einem gemeinsamen Peak mit der Retentionszeit von 9.2 min auf. Die Retentionszeiten der Naturstoffanaloga sind in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Peak No	Substanz	t_R [min]
1	[E]-CH ₃ CH=CH(S)OSCH ₂ CH ₂ CH ₃ 17	6.7
2	[Z]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₂ CH ₂ CH ₃ , [Z]- 16	8.1
3	[E]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₂ CH ₂ CH ₃ , [E]- 16 CH ₃ CH ₂ CH ₂ S(S)OCH ₂ CH ₂ CH ₃ 13	9.2
PhCH ₂ OH	C ₆ H ₅ CH ₂ OH	14.4
5	[E]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₃ , [E]- 14 [Z]-CH ₃ CH=CHS(S)OCH ₃ , [Z]- 14	16.5
6	CH ₃ S(S)OCH ₃ 12	33.5

Tabelle 4: Retentionszeiten synthetischen Thiosulfinaten und Benzylalkohol.

Unter den chromatographischen Bedingungen „NP-HPLC System 1“ wurde die vollständige Peak-auflösung des Benzylalkohols mit einer Retentionszeit von 14.4 Minuten chromatographiert.

5.3.6 Präparative Trennung

Die präparative Trennung erfolgte an einem LiChrosorb[®]Si 60-Sorbent. Zuerst wurden die chromatographischen Bedingungen an einer analytischen Säule bestimmt. Für die vollständige Auflösung der Inhaltsstoffe diente ein Gradientenprogramm mit *n*-Hexan/EtOAc mit einer konstanten Flussrate von 1.6 ml/min (Abbildung 66 A, B). Der Extrakt der Sorte *Bonilla* wurde mit einer Konzentration von 46 mg Extraktmasse in 1 ml Ethanol qualitativ analysiert. Zunächst wurde die entwickelte Methode auf die präparative HPLC-Anlage übertragen. Die präparative Trennung wurde mit einer konstanten Flussrate von 48 ml/min durchgeführt. In Abbildung 66 (A) und Abbildung 66 (B) sind das analytische und präparative Chromatogramm des *Bonilla*-Extraktes dargestellt. Die Peaks sind in der Reihenfolge der Elution mit den Zahlen von 1 bis 12 und von I bis VI zugeordnet.

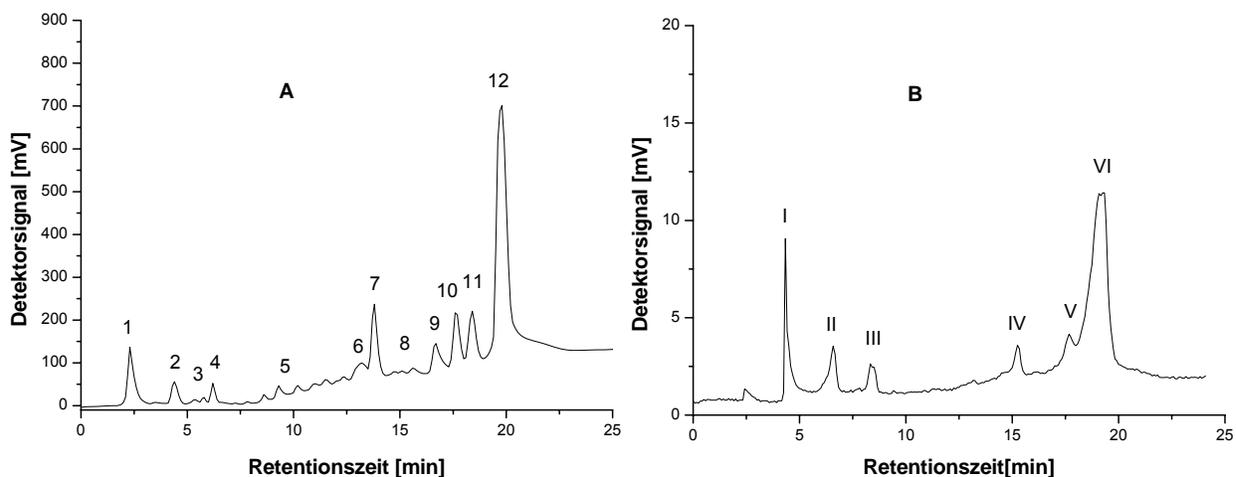


Abbildung 6: HPLC-Trennung des *Bonilla*-Extraktes. Bedingungen: LiChrosorb[®]Si 60-Säule, *n*-Hexan/EtOAc, 254nm. A (analytisch): 250x4.6 mm, 5 μ m, 1.6 ml/min, 20 μ l, B (präparativ): 250x25 mm, 7 μ m, 48 ml/min, 2 ml.

Im analytischen Bereich wurden die Peaks voneinander getrennt, man konnte sie sofort fraktionieren und die entsprechenden Komponenten bestimmen (Abbildung 66 (A)). Bei der präparativen Auftrennung fand eine Peakverschiebung und -überlappung in dem Chromatogramm statt, wobei die Peakflächengröße [mV.s] von der Inhaltsoffenkonzentration abhängig war (Abbildung 66 (B)). Die einzelnen Fraktionen (I - VI) wurden gesammelt, aufkonzentriert und für die semipräparative Aufreinigung bereitgestellt. Die lösungsmittelfreien Extraktfraktionen wurden bei -20°C gelagert.

Die Überprüfung der Reinheit der einzelnen Fraktionen erfolgte durch die analytische HPLC Methode unter Kapitel 5.3.3.

5.3.7 Semipräparative Aufreinigung

Eine weitere Aufreinigung der Sekundärmetabolite erfolgte durch den semipräparativen Modus der analytischen HPLC-Anlage. Nach der Konditionierung der Säule mit *n*-Hexan/*i*-Propanol (98%/2%) wurde eine Extraktlösung je 200 μ l aufgetragen. Die besten Ergebnisse erzielten die chromatographischen Bedingungen „NP-HPLC-System 1“. Die einzelnen Fraktionen wurden aufgefangen, eingengt und für die Strukturaufklärungsmethoden (NMR, MS, HPLC-MS) aufbereitet und analysiert.

Die instabilen Inhaltsstoffe wurden bei -20 °C aufbewahrt. Sogar bei diesen tiefen Temperaturen konnte deren Zersetzung im deuterierten Chloroform nach einigen Tagen detektiert werden.

5.3.8 HPLC-MS-Einstellungen für die Analyse von Cepaenen

Die aktiven Fraktionen der semipräparativen Aufreinigung wurden zusätzlich mit HPLC-MS-Messungen analysiert. Die Auswertung wurde mittels massenspektrometrischer- und UV-Detektion bei 254 nm und 220 nm durchgeführt.

Die Auftrennung der Sekundärmetabolite u.a. so genannte Cepaene, erfolgte an an einer Umkehrphasen-Säule. Hierzu wurden die Fraktionen an einer Zorbax CD-8-Säule chromatographiert. Die chromatographischen Bedingungen „RP-HPLC System 2“ sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

stationäre Phase	Zorbax CD-8
Dimensionen	150x4.6 mm, 5 µm
mobile Phase	10 mM NH ₄ Acetat/MeCN
Flussrate	1 ml/min
Elution	Gradient 10%-19% MeCN in 15 min
UV-Detektion	254 nm

Tabelle 5: Chromatographische Bedingungen der Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC System 2).

Eine optimale Auftrennung der *Allium*-Extrakte konnte durch Chromatographie an einer LiChrosorb® RP 18-Säule nicht erreicht werden. Aufgrund der Komplexität der Zusammensetzung der Komponenten konnte keine vollständige Peakauflösung durch die Eluentbedingungen (Wasser/Acetonitril/Methanol 50:41:9 bzw. Methanol/Wasser) im isokratischen Lauf erreicht werden. Für eine bessere Auftrennung der gesamten frischen Extrakte können diese chromatographischen Bedingungen weiter optimiert werden.

5.4 Physikalische Daten der isolierten Verbindungen

5.4.1 Cepaene

trans, trans-1-(1-Propenyldisulfanylpropan-1-sulfinyl)propen (**[E, E]-30b**):

Allgemeine Daten: C₉H₁₆OS₃; MG: 236.42; $t_{R, 254\text{ nm}}$ =11.610 min (HPLC-System 2); DC: R_f =0.19 (*n*-Hexan/*i*-Propanol 100:5), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

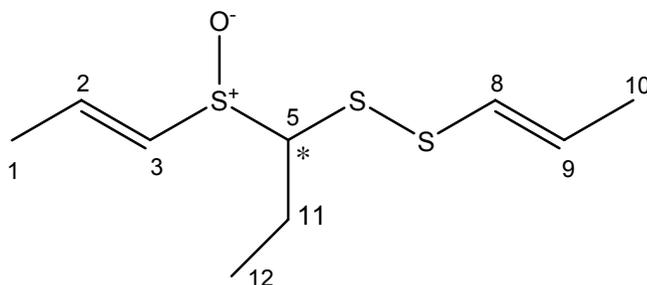
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ =6.57-6.51 (dq, 6.5 Hz, ~15 Hz, 1 H; 2-H), 6.47-6.43 (dq, 6.5 Hz, ~15 Hz, 1H; 3-H), 6.07-6.05 (m, 1 H; 8-H), 6.04-5.99 (dq, 6.4 Hz, ~15 Hz, 1 H; 9-H), 3.53 (dd, 3.5 Hz, 10.6 Hz, 1 H; H-5), 2.29-2.25 (m, 1 H; 11-H), 1.97 (dd, 1.5 Hz, 6.5 Hz, 3 H; 1-H₃), 1.94-1.87 (m, 1 H; 11-H), 1.80 (dd, 1.2 Hz, 6.4 Hz, 3 H; 10-H₃), 1.13 (t, 7.3 Hz, 3 H; 12-H₃).

HSQC (600 MHz, CDCl₃): δ =138.30 (d, C-2), 133.0 (d, C-9), 131.1 (d, C-3), 124.1 (d, C-8), 74.74 (d, C5), 20.19 (t, C-11), 18.5 (q, C-10), 18.1 (q, C-1), 10.98 (q, C-12) ppm.

LC/MS (ES-API, Pos.), m/z (%): 474.0 (100, [2M⁺+2H⁺]), 238.0 (10), 164.0 (34), 148.0 (93), 106.0 (56), 74 (3); MSD1 SPC, time=11.674.

MS (EI), m/z (%): 236.3 (<1, [M⁺]), 147.2 (100), 131.1 (8) 105.1 (98), 73.1 (62), 41.1 (63).

trans, trans-1-(1-Propenyldisulfanylpropan-1-sulfinyl)propen (**[E, E]-30c**). Diastereomer von **[E, E]-30b**:



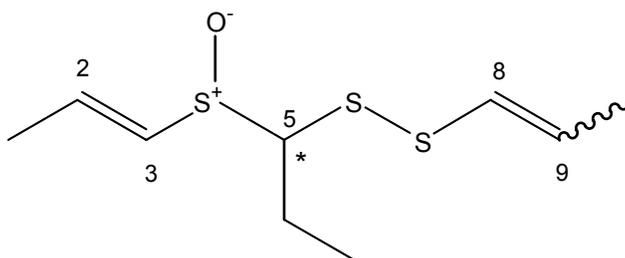
Allgemeine Daten: C₉H₁₆OS₃; MG: 236.42; $t_{R, 254 \text{ nm}}$ =11.692 min (HPLC-System 2); DC: R_f =0.21 (*n*-Hexan/*i*-Propanol 100:5), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ=6.54-6.48 (dq, ~1.5 Hz, ~7 Hz, 1 H; 2-H), 6.34-6.31 (dq, ~1.5 Hz, ~15 Hz, 1H; 3-H), 6.14-6.11 (dq, ~1.5 Hz, ~15 Hz, 1 H; 8-H), 6.07-6.02 (dq, ~1.5 Hz, ~7 Hz, 1 H; 9-H), 3.69 (dd, ~4 Hz, ~11 Hz, 1 H; H-5), 2.24-2.19 (m, 1 H; 11-H), 1.97 (dd, ~1.5 Hz, ~7 Hz, 3 H; 1-H₃), 1.82 (dd, ~1.5 Hz, ~7 Hz, 3 H; 10-H₃), 1.47-1.40 (m, 1 H; 11-H), 1.15 (t, 7.0 Hz, 3 H; 12-H₃).

HSQC (600 MHz, CDCl₃): δ=138.60 (d, C-2), 133.20 (d, C-9), 127.8 (d, C-3), 124.7 (d, C-8), 73.90 (d, C5), 18.50 (t, C-11), 18.20 (q, C-10), 18.20 (q, C-1), 11.70 (q, C-12) ppm.

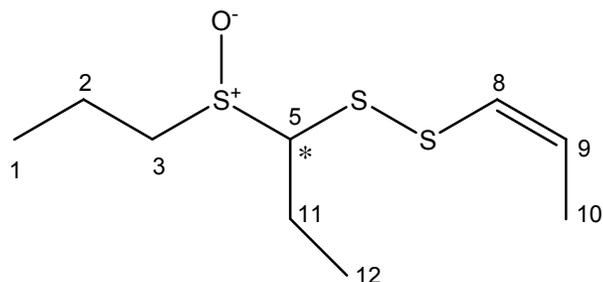
LC/MS (ES-API, Pos.), *m/z* (%): 474.0 (7.5, [2M⁺+2H⁺]), 238.0 (21), 164.0 (17), 148.0 (100), 106.0 (29), 74 (19) ; MSD1 SPC, time=11.789.

***trans*, ?-1-(1-Propenyldisulfanylpropan-1-sulfinyl)propen ([*E*, ?]-101a)Cepaen (30a):**



Allgemeine Daten: C₉H₁₆OS₃; MG: 236.42; $t_{R, 254 \text{ nm}}$ =11.187 min (HPLC-System 2); DC: R_f =0.19 (*n*-Hexan/*i*-Propanol 100:5), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

LC/MS (ES-API, Pos.), *m/z* (%): 474.0 (20, [2M⁺+2H⁺]), 238.0 (6), 164.0 (10), 148.0 (100), 106.0 (6), 74 (6); MSD1 SPC, time=11.230.

***cis*-1-[1-(Propan-1-sulfinyl)propyl]disulfanyl]propen ([Z]-27):**

Allgemeine Daten: C₉H₁₈OS₃; MG: 238.43; $t_{R, 254\text{ nm}}$ =11.735 min (HPLC-System 2); DC: R_f =0.19 (*n*-Hexan/*i*-Propanol 100:5), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ=6.12-6.10 (m, 1 H; 8-H), 5.81-5.76 (dq, 6.9 Hz, ~9 Hz, 1H; 9-H), 3.52 (dd, 3.5 Hz, 10.6 Hz, 1 H; H-5), 3.14-3.09 (m, 1 H; 3-H₂), 2.73-2.67 (m, 1 H; 3-H₂), 2.39-2.34 (m, 1 H; 11-H₂), 1.97 (dd, 1.5 Hz, 6.5 Hz, 3 H; 1-H₃), 1.94-1.91 (m, 1 H; 11-H₂), 1.14 (t, 7.4 Hz, 3 H; 12-H₃), 1.11 (t, 7.4 Hz, 3 H; 1-H₃).

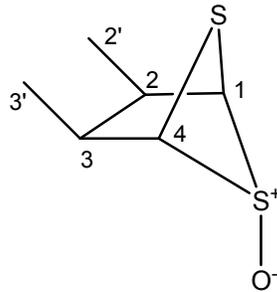
HSQC (600 MHz, CDCl₃): δ=133.90 (d, C-9), 128.5 (d, C-8), 72.05 (d, C5), 52.34 (t, C-3), 20.19 (t, C-11), 18.50 (q, C-10), 16.50 (t, C-2), 12.80 (q, C-1), 12.80 (q, C-12) ppm.

LC/MS (ES-API, Pos.), m/z (%): 478.0 (100, [2M⁺+2H⁺]), 238.0 (1), 166.0 (51), 148.0 (46), 106.0 (32), 74 (3) ; MSD1 SPC, time=11.806.

MS (EI), m/z (%): 239.4 (2, [M⁺+H⁺]), 223.2 (2) 147.2 (100), 105.1 (98), 73.1 (62), 43.1 (17).

5.4.2 Zwiebelane

***cis*-2,3-Dimethyl-5,6-dithiabicyclo[2.1.1]hexan-5-oxid, *cis*-Zwiebelan (33):**

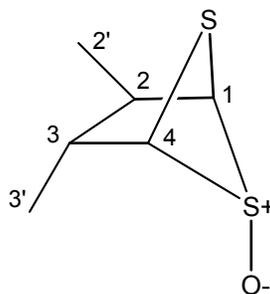


Allgemeine Daten: C₆H₁₀OS₂; MG: 162.27; DC: R_f = 0.136 (CH₂Cl₂/Aceton 100:1), UV (-), Vanillin: rose.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ=4.14 (s, 2 H; H-1/2), 2.95-2.90 (m, 2 H; H-2/3), 1.16 (d, 7.4 Hz, 6 H; 2'/3'-H₃) ppm.

HSQC (600 MHz, CDCl₃): δ=79.50 (d, C-1/4), 33.3 (d, C-2/3), 12.8 (q, C-2'/3') ppm.

***trans*-2,3-Dimethyl-5,6-dithiabicyclo[2.1.1]hexan-5-oxid, *trans*-Zwiebelan (34):**



Allgemeine Daten: C₆H₁₀OS₂; MG: 162.27; DC: R_f = 0.186 (*n*-Hexan/*i*-Propanol 100:5), UV (-), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta=4.31$ (dd, 6.6 Hz, 1 H; H-1), 4.28 (dd, 6.6 Hz, 1 H; H-4), 2.84-2.80 (m, 1 H; H-2), 2.35-2.31 (m, 1 H; H-3), 1.48 (d, 7.4 Hz, 3 H; 3'-H₃), 1.42 (d, 7.4 Hz, 3H; 2'-H₃) ppm.

HSQC (600 MHz, CDCl_3): $\delta=79.40$ (d, C-1), 77.62 (d, C-4), 47.90 (d, C-3), 39.20 (d, C-2), 15.70 (q, C-2'), 14.20 (q, C-3') ppm.

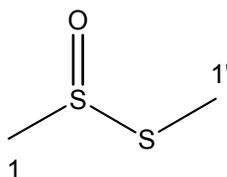
5.5 Beschreibung der Versuche

5.5.1 Versuche zu Kapitel 3.4.1

Monooxidation von Disulfiden. Allgemeine Vorschrift.

Zu einer Lösung von Disulfid (20 mmol, 1 eq) in 10 ml CH_2Cl_2 tropft man langsam bei 0 °C eine Lösung von *m*CPBA (20 mmol, 1 eq) in 50 ml CH_2Cl_2 zu. Die Reaktionsmischung wird bei 0 °C 15 min gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und filtriert. Das Filtrat wird mit einer Lösung von 20 ml 5%- NaHCO_3 und 20 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wird flashchromatographisch (Pentan/Ether) gereinigt^[86, 87].

Dimethylthiosulfinat (12):



Nach der allgemeinen Vorschrift werden Dimethyldisulfid (0.300 g, 3.185 mmol, 1 eq), 77% *m*CPBA (0.714 g, 4.136 mmol, 1.3 eq) und CH_2Cl_2 (9.5 ml) miteinander umgesetzt. Nach flashchromatographischer Trennung (Pentan/Ether 1/1) erhält man 0.268 g (76%) Dimethylthiosulfinat **12** als gelbes Öl.

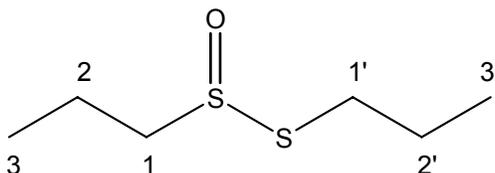
Allgemeine Daten: C₂H₆OS₂; MG: 110.19; DC: R_f=0.12 (Pentan/Ether 1/1), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.00 (s, 3H, H-1), 2.68 (s, 3H, H-1').

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 42.52 (C-1), 14.31 (C-1').

MS (EI), m/z (%): 110 (18, [M⁺]), 95 (4, [M⁺-CH₃]), 79 (7), 64 (100), 63 (38), 48 (11), 47 (98).

Dipropylthiosulfinat (13):



Nach der allgemeinen Vorschrift werden Dipropyldisulfid (0.300 g, 1.996 mmol, 1 eq), 77% *m*CPBA (0.447 g, 2.594 mmol, 1.3 eq) und CH₂Cl₂ (9.5 ml) miteinander umgesetzt. Nach flashchromatographischer Trennung (Pentan/Ether 5/2) erhält man 0.237 g (71%) Dipropylthiosulfinat **13** als gelbes Öl.

Allgemeine Daten: C₆H₁₄OS₂; MG: 166.31; DC: R_f=0.38 (Pentan/Ether 1:1), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

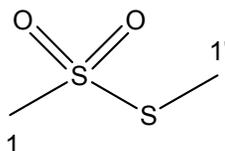
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.04-3.20 (m, 4H, H-1, 1'), 1.78-1.96 (m, 4H, H-2, 2'), 1.09 (t, J=7.4 Hz, 3H, H-3), 1.04 (t, 3H, J=7.3 Hz, H-3').

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 57.95 (C-1), 34.84 (C-1'), 24.23 (C-2'), 17.14 (C-2), 13.14 (C-3), 13.14 (C-3').

MS (EI), m/z (%): 166 (18, [M⁺]), 150 (4, [M⁺-CH₃]), 124 (61), 106 (19), 92 (16), 82 (24), 75 (100), 73 (16), 63 (30), 59 (35).

5.5.2 Versuche zu Kapitel 3.4.2 und Kapitel 3.4.3

Dimethylthiosulfonat (50):



Variante 1:

Zu einer Lösung von 7.567 g (68.67 mmol, 1 eq) Dimethylthiosulfinat **1** in 35 ml CH₂Cl₂ tropft man langsam bei 0 °C eine Lösung von 30.80 g (178.5 mmol, 2.6 eq) 77%iger *m*CPBA in 446 ml CH₂Cl₂ zu. Die Reaktionsmischung wird bei 0 °C 3 h gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und filtriert. Das Filtrat wird mit einer Lösung von 178 ml 5%-NaHCO₃ und 178 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wird flashchromatographisch (Pentan/Ether 1/2) gereinigt. Man erhält 2.788 g (32%) Dimethylthiosulfonat **50** als dunkelgelbes Öl.

Variante 2:

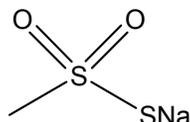
Man versetzt 14.7 g (0.225 mol, 1.5 eq) Zinkstaub in 0.300 ml (0.0036 mol) 1,2-Dibromethan mit 0.612 ml (0.0047 mol) Chlormethylsilan und 150 ml Ethylacetat. Die Reaktionsmischung wird bei RT 15 min gerührt, dann kurz erhitzt um die Reaktion zu aktivieren und mit 17.184 g (0.15 mol, 1 eq) Methansulfonylchlorid tropfenweise versetzt. In einer Stunde ist der größte Teil des Zn aufgelöst. Zu dieser Mischung tropft man 11.175 g (0.15 mol, 1 eq) Acetylchlorid und lässt unter Rückfluss rühren. Nach der vollständigen Addition entsteht eine klare Lösung, die noch 15 min erhitzt wird. Die Reaktionsmischung wird auf RT abgekühlt, der Überschuss an Zn wird mit 1 M HCl-Lsg. hydrolysiert, und die Phasen werden getrennt. Die wässrige Phase wird drei Mal je mit 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen werden mit 60 ml NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird flaschchromatographisch (Pentan/Ether 1/2) gereinigt. Man erhält 5.172 g (55%) des Dimethylthiosulfonats **50**.

Allgemeine Daten: C₂H₆O₂S₂; MG: 126.20; DC: R_f=0.19 (Pentan/Ether 1/2), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.3 (s, 3H, H-1), 2.71 (s, 3H, H-1').

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 48.96 (C-1), 18.32 (C-1').

Natriummethanthiosulfonat (51):



Zu einer Lösung von 3.620g (64.57mol, 7.42 eq) 68%iger $\text{NaHS}\cdot x\text{H}_2\text{O}$ in 19 ml MeOH bei 0 °C wird unter Rühren 1g (0.0087 mol, 1 eq) $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ zugetropft. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend 15 h gerührt. Die Reaktionsmischung wird über Baumwolle filtriert und den Rest mit MeOH gewaschen. Das Filtrat und die Eluate werden konzentriert. Nach flashchromatographischer Trennung (1: EtOAc/Aceton/EtOH, 2: Aceton/EtOH) des Rückstandes erhält man 0.802 g (69%) Natriummethanthiosulfon **51** als weißen Feststoff.

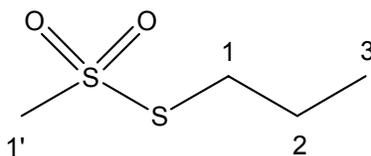
Allgemeine Daten: $\text{CH}_3\text{NaO}_2\text{S}_2$; MG: 134.16; DC: $R_f=0.39$ (EtOAc/EtOH 7/3), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 3.32 (s, 3H, H-1).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, D_2O), δ (ppm): 5.70 (C-1).

IR (Film, KBr), $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}): 1323 (m), 1200 (br s, SO_2S), 1099 (br s, SO_2S), 977 (m), 769 (s, CH_3).

S-Propylmethanthiosulfonat (52):



Zu einer Lösung von 161 mg (1.2 mmol, 1.2 eq) Natriummethanthiosulfonat **29** in 10 ml wasserfreiem DMSO tropft man unter N₂-Atmosphäre unter Rühren 123 mg (1 mmol, 1 eq) Propylbromid. Die Reaktionsmischung wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird unter intensivem Rühren mit einer vorgekühlten gesättigten NaCl-Lsg. (20 ml) verdünnt und die wässrige Phase wird viermal mit je 10 ml Ether extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen werden wieder mit gesättigter NaCl-Lsg. (3x10 ml) und Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand flashchromatographisch (Pentan/Ether 2/1) getrennt. Man erhält 92.3 mg (60%) des Produktes S-Propylmethanthiosulfonat **52** als nach Zwiebeln riechendes Öl.

Allgemeine Daten: C₄H₁₀O₂S₂; MG: 154.25; DC: R_f=0.35, (Pentan/Ether 2:1), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.33 (s, 3H, H-1'), 3.16 (t, J=7.28 Hz, 2H, H-1), 1.80 (sextett, 2H, H-2), 1.05 (t, J=7.35 Hz, 3H, H-3).

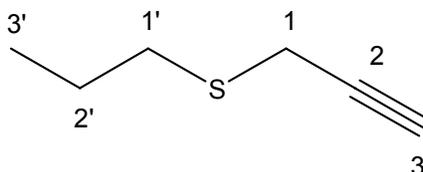
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 50.57 (C-1'), 38.25 (C-1), 22.88 (C-2), 13.03 (C-3).

MS (EI), m/z (%): 154 (40, [M⁺]), 139 (M⁺-CH₃), 79 (80), 75 (100), 63 (16).

Elementanalyse:

berechnet:	% C 31.15	% H 6.53	% S 41.58
gefunden:	% C 30.78	% H 6.64	% S 42.94.

S-2-Propinylpropylsulfid (**53**):



Zu einer Lösung von 30.7 ml (338.4 mmol, 1 eq) Propan-1-thiol in 85%iger Kalilauge (398.1 mmol, 1.17 eq; 22.34 g KOH in 79 ml Wasser) bei 0 °C tropft man 70.7 ml (793.1 mmol, 1.5 eq) 64% 3-Brompropin. Die Reaktionsmischung wird bei 0 °C 15 min gerührt. Man entfernt das

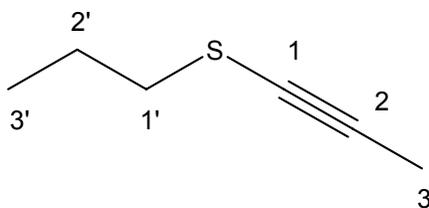
Kältebad und rührt anschließend 2-3 h bei Raumtemperatur. Dann wird die organische Phase abgetrennt, mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wird flashchromatographisch getrennt (Pentan) und man erhält 30.150 g (78%) S-2-Propinylpropylsulfid **53** als farblose Flüssigkeit.

Allgemeine Daten: $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{S}$; MG: 114.21; DC: $R_f=0.16$ (Pentan), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.23 (d, $J=2.6$ Hz, 2H, H-1), 2.66 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, H-1'), 2.22 (t, $J=3.7$ Hz, 1H, H-3), 1.60-1.69 (m, 2H, H-2'), 1.00 (t, $J=7.4$ Hz, 3H, H-3').

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 80.14 (C-2), 70.70 (C-3), 33.58 (C-1'), 22.25 (C-2'), 19.03 (C-2), 13.38 (C-3').

S-1-Propinylpropylsulfid (**54**):



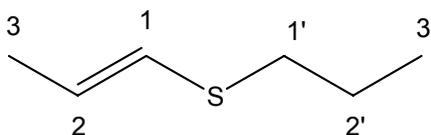
Zu einer Lösung von 5.180 g (95.9 mmol, 1 eq) NaOMe in 150 ml MeOH (95.1 mmol, 1 eq) wird 10.95 g (95.9 mmol, 1 eq) S-2-Propinylpropylsulfid **53** getropft. Die Reaktionsmischung wird 36 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur quencht man vorsichtig mit einer Mischung von Eis und Wasser, trennt die organische Phase ab und extrahiert die wässrige Phase dreimal mit Pentan. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet. Abdestillieren der Lösungsmittel und flashchromatographische Trennung (Pentan) des Rückstandes liefert 7.4 g (68%) S-1-Propinylpropylsulfid **54** als farblose Flüssigkeit.

Allgemeine Daten: $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{S}$; MG: 114.21; DC: $R_f=0.39$ (Pentan), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 2.64 (t, $J=7.25$ Hz, 2H, H-1'), 1.94 (s, 3H, H-3), 1.70-1.79 (m, 2H, H-2'), 1.01 (t, $J=7.36$ Hz, 3H, H-3').

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 89.37 (C-2), 67.38 (C-1), 37.26 (C-1'), 22.61 (C-2'), 12.89 (C-3'), 4.96 (C-3).

S-[E]-1-Propenylpropylsulfid (55):

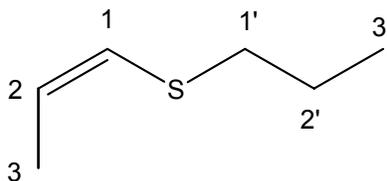


Zu einer Suspension von 1.163 g (30.64 mmol, 1 eq) LAH in 30.6 ml THF (1.0 M Lsg. in THF) tropft man bei 0 °C unter N_2 -Atmosphäre 3.5 g (30.64 mmol, 1 eq) S-1-Propinylpropylsulfid **54**. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemperatur erwärmt, anschließend 18 h unter Rückfluss erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Reaktionsmischung wird unter intensivem Rühren in eine vorgekühlte Mischung von 2N NaOH (40 ml) und Pentan (80 ml) geschüttet und die organische Phase abgetrennt. Die kombinierten wässrigen Phasen werden viermal mit je 20 ml Pentan extrahiert und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer eingeeengt, der Rückstand wird flashchromatographisch getrennt, und man erhält 2.802 g (79%) des Produktes in einer Mischung von S-[E]-1-Propenylpropylsulfid **55** und S-[Z]-1-Propenylpropylsulfid **56** als farblose Flüssigkeit (Selektivität **E/Z** 11.5/1).

Allgemeine Daten: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{S}$; MG: 116.23; DC: $R_f=0.36$ (Pentan), UV (+), Vanillin: lila.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5.92 (dq, $J=14.96, 1.5$ Hz, 1H, H-1), 5.64 (dq, $J=14.96, 6.7$ Hz, 1H, H-2), 2.60 (t, $J=7.29$ Hz, 2H, H-1'), 1.74 (dd, $J=6.6, 1.5$ Hz, 3H, H-3), 1.64 (sextett, $J=7.35, 3.70$ Hz, 2H, H-2'), 0.990 (t, $J=7.35, 3\text{H}$, H-3').

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 125.57 (C-2), 123.65 (C-1), 34.84 (C-1'), 22.85 (C-2'), 18.50 (C-3), 13.34 (C-3').

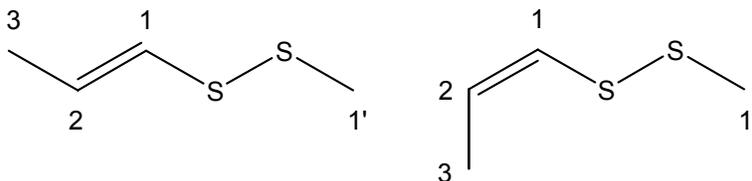
S-[Z]-1-Propenylpropylsulfid (56):

Eine Lösung von 0.500 g (4.4 mmol, 1 eq) S-1-Propenylpropylsulfid **54** in 4.4 ml abs. Pentan bei $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird unter Ar-Atmosphäre tropfenweise mit 7.5 ml (7.6 mmol, 1.0 M in CH_2Cl_2) DIBAL-Lsg. versetzt. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemperatur erwärmt und 22 h bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die Reaktionsmischung wird unter intensivem Rühren in der vorgekühlten ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$) Mischung von 3N NaOH (20 ml) und Eis langsam gequenchet, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase viermal mit je 5 ml Et_2O extrahiert. Die vereinigte organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeeengt. Nach flashchromatographischer Trennung (Pentan) des Rückstands erhält man 0.356 g (70%) des Produktes in der Mischung von S-[Z]-1-Propenylpropylsulfid **56** und S-[E]-1-Propenylpropylsulfid **55** als farblose Flüssigkeit (Selektivität **E/Z** 1/13.3).

Allgemeine Daten: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{S}$; MG: 116.23; DC: $R_f=0.32$ (Pentan), UV (+), Vanillin: lila.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5.92 (dq, $J=9.4, 1.5$ Hz, 1H, H-2), 5.60 (dq, $J=9.4, 6.7$ Hz, 1H, H-1), 2.64 (t, $J=7.35$ Hz, 2H, H-1'), 1.71 (dd, $J=6.8, 1.5$ Hz, 3H, H-3), 1.65 (sextett, $J=7.30, 3.62$ Hz, 2H, H-2'), 0.995 (t, $J=7.33$ Hz, 3H, H-3').

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 125.98 (C-2), 123.57 (C-1), 35.77 (C-1'), 23.65 (C-2'), 14.52 (C-3), 13.18 (C-3').

S-[E]-1-Propenylmethylsulfid ([E]-57), S-[Z]-1-Propenylmethylsulfid ([Z]-57):

In einen Dreihalskolben werden bei -78°C unter N_2 -Atmosphäre 20 ml NH_3 einkondensiert. Man addiert kleine Stückchen von 0.140 g Li, wobei sofort eine blaue Färbung auftritt. Nach der vollständigen Auflösung des Li tropft man eine Lösung von 1.160 g (0.01 mol, 1 eq) der Mischung S-[E]- **55** und S-[Z]-1-Propenylpropylsulfid **56** in 10 ml abs. THF zu. Nach Ablauf der Addition wird das Gemisch aus **56** und **55** langsam dazugegeben, bis eine Farbänderung der Reaktion von dunkelblau zu hellgelb auftritt. Dann wird die Reaktionsmischung auf -30°C erwärmt und das überschüssige NH_3 wird vorsichtig entfernt. Der Rest wird mit 5 ml abs. THF verdünnt, man addiert sehr schnell eine Lösung von 2.524 g (0.02 mol, 2 eq) Dimethylthiosulfonat **50** in 5 ml abs. THF und lässt die Reaktion auf Raumtemperatur langsam erwärmen. Die Reaktionsmischung wird unter kräftigem Rühren mit einer vorgekühlten Mischung von gesättigter NH_4Cl -Lsg. und *n*-Hexan gequenchet, die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit *n*-Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird flashchromatographisch (Pentan) getrennt. Man erhält 0.650 g (54%) des Produktes in einer Mischung von [E]-1-Propenylmethyldisulfid ([E]-**57**) und [Z]-1-Propenylmethyldisulfid ([Z]-**57**) als gelbes Öl (Selektivität **E/Z** 1/1).

Charakterisierung von [E]-**57**:

Allgemeine Daten: $\text{C}_4\text{H}_8\text{S}_2$; MG: 120.24; DC: $R_f=0.5$ (Pentan), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.07-5.91 (m, 2H, H-1, 2), 2.39 (s, 3H, H-1'), 1.8 (dd, $J=6.3$, 1.2 Hz, 3H, H-3).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 130.28 (C-2), 124.39 (C-1), 22.08 (C-1'), 18.05 (C-3).

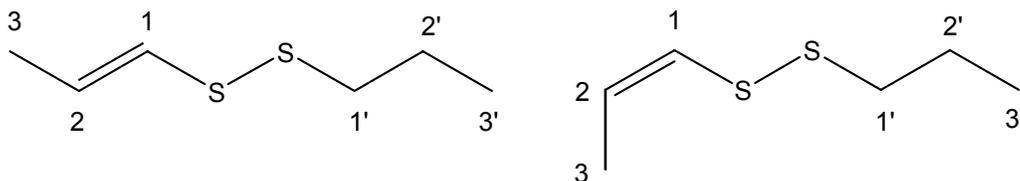
Charakterisierung von [Z]-**57**:

Allgemeine Daten: $\text{C}_4\text{H}_8\text{S}_2$; MG: 120.24; DC: $R_f=0.5$ (Pentan), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.11 (dq, $J=9.3$, 1.5 Hz, 1H, H-1), 5.76 (dq, $J=9.3$, 6.9 Hz, 1H, H-2), 2.43 (s, 3H, H-1'), 1.76 (dd, $J=6.9$, 1.5 Hz, 3H, H-3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 128.89 (C-2), 128.00 (C-1), 23.01 (C-1'), 14.33 (C-3).

S-[E]-1-Propenylpropylsulfid ([E]-58) und S-[Z]-1-Propenylpropylsulfid ([Z]-58):



In einen Dreihalskolben werden bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ unter N_2 -Atmosphäre 17 ml NH_3 , 0.12 g Li, 1.000 g (8.5 mmol, 1 eq) des Mischung S-[Z]-1-Propenylpropylsulfid **56** und S-[E]-1-Propenylpropylsulfid **55** in 10 ml abs. THF versetzt. Wenn die Addition beendet ist, wird das Gemisch aus **55** und **56** zugegeben, bis die Färbung von dunkelblau zu hellgelb sich ändert. Überschüssiges NH_3 wird bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ für 2 h mittels Vakuumpumpe vorsichtig entfernt, der Rest wird mit 5 ml THF verdünnt, und dann gibt man sehr schnell einer Lösung von 2.632 g (0.0171 mol, 2eq) S-Propylmethanthiosulfonat **52** in 5 ml abs. THF zu. Nach der Aufarbeitung wird der Rückstand flashchromatographisch (Pentan) getrennt. Man erhält 0.910 g (72%iger einer Gesamtausbeute) des Produktes in einer Mischung 607 mg (67%) von [E]-1-Propenylpropylsulfid ([E]-**58**), [Z]-1-Propenylpropylsulfid ([Z]-**58**) (Selektivität **E/Z** 11.6/1) und 303 mg (33 %) Dipropylsulfid **13** als gelbes Öl (Dipropylsulfid/([E]-, [Z-]) 1/2).

Charakterisierung von [E]-58:

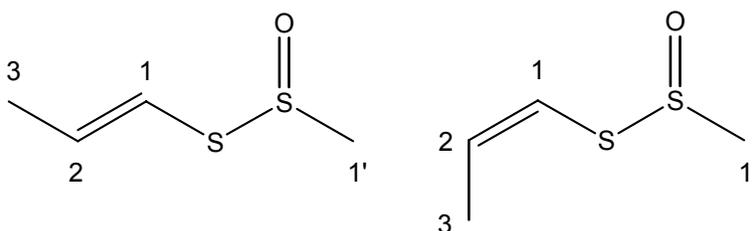
Allgemeine Daten: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{S}_2$; MG: 148.29; DC: $R_f=0.51$, (Pentan), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.01 (dq, 1H, $J=14.73$, 1.22 Hz, H-1), 5.95 (dq, 1H, $J=14.69$, 6.53 Hz, H-2), 2.80 (t, 2H, $J=7.2$ Hz, H-1'), 1.77 (t, 3H, $J=7.2$ Hz, H-3), 1.70 (sextett, 2H, H-2'), 0.99 (t, 3H, $J=7.33$ Hz, H-3').

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 129.33 (C-2), 125.70 (C-1), 40.29 (C-1'), 22.27 (C-2'), 18.01 (C-3), 13.06 (C-3').

Monooxidation von ungesättigter unsymmetrischen Disulfiden. Allgemeine Vorschrift.

Zu einer Lösung von Disulfid (2.75 mmol, 1 eq) in 20 ml CH₂Cl₂ tropft man unter Rühren bei -78 °C unter N₂-Atmosphäre eine Lösung von *m*CPBA (2.75 mmol, 1 eq) in 5 ml CH₂Cl₂ zu. Die Reaktionsmischung wird 30 min bei -78°C gerührt. Man lässt die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur innerhalb von 2 h erwärmen und fügt dann portionsweise K₂CO₃ hinzu, filtriert über eine kurze, mit Celite[®] gefüllte Säule und eluiert mit Et₂O. Das Filtrat und die Eluate werden sehr schnell bei Raumtemperatur konzentriert und nach flashchromatographischer Trennung (Pentan/Ether) des Rückstands erhält man die entsprechenden Thiosulfinate in einem Isomergemisch als gelbes, nach Zwiebeln riechendes Öl.

S-[*E*]-1-Propenylmethylthiosulfinat ([*E*]-14) und S-[*Z*]-1-Propenylmethylthiosulfinat ([*Z*]-14):

Nach der allgemeinen Vorschrift werden der Mischung S-[*E*]-1-Propenylmethylthiosulfid ([*E*]-57), S-[*Z*]-1-Propenylmethylthiosulfid ([*Z*]-57) (0.330 g, 2.75 mmol, 1 eq), 77% *m*CPBA (0.616 g, 3.57 mmol, 1.3 eq) in CH₂Cl₂ (6.5ml) miteinander versetzt. Nach flashchromatographischer Trennung (Pentan/Ether 3/2) des Rückstands erhält man 36 mg (10%) des Produktes in einer Mischung von S-[*E*]-1-Propenylmethylthiosulfinat ([*E*]-14) und S-[*Z*]-1-Propenylmethylthiosulfinat ([*Z*]-14) als gelbes Öl (Selektivität *E/Z* 1.8/1).

Allgemeine Daten: C₄H₈OS₂; MG: 136.24; DC: R_f=0.22 (Pentan/Ether 1:1), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

Charakterisierung von [*E*]-14:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.29-6.41 (m, 2H, H-1, 2), 2.97 (s, 3H, H-1'), 1.93 (dd, J=3.8, 1.4 Hz, 3H, H-3).

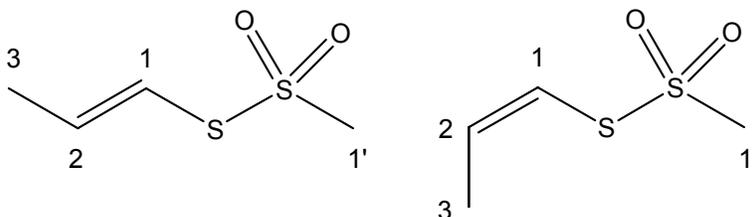
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 144.32 (C-2), 115.76 (C-1), 42.19 (C-1'), 15.24 (C-3).

Charakterisierung von [Z]-14:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.29-6.41 (m, 2H, H-1, 2), 3.03 (s, 3H, H-1'), 1.87 (dd, $J=6.7, 1.6$ Hz, 3H, H-3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 137.52 (C-2), 116.90 (C-1), 42.70 (C-1'), 19.01 (C-3).

Als Nebenprodukt bei dieser Monooxidation werden 10 mg (2%) des Produktes in einer Mischung von S-[E]-1-Propenylmethylthiosulfonat ([E]-59) und S-[Z]-1-Propenylmethylthiosulfonat ([Z]-59) (Selektivität *E/Z* 2.7/1) als gelbes Öl erhalten.



Allgemeine Daten: $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{S}_2$; MG: 152.24; DC: $R_f=0.34$ (Pentan/Ether 1:1), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

Charakterisierung von [E]-59:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.36-6.41 (m, 2H, H-1, 2), 3.28 (s, 3H, H-1'), 1.95 (dd, $J=6.2, 0.9$ Hz, 3H, H-3).

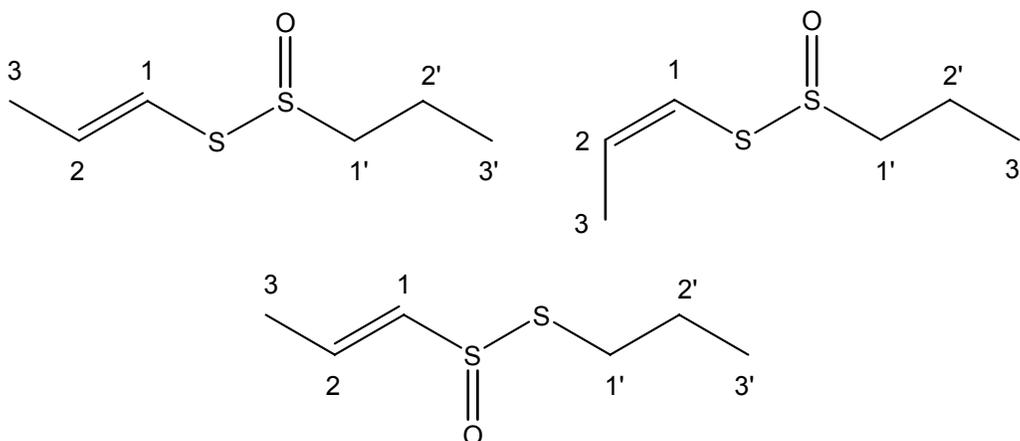
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 145.12 (C-2), 116.59 (C-1), 47.87 (C-1'), 19.05 (C-3).

Charakterisierung von [Z]-59:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.36-6.41 (m, 2H, H-1, 2), 3.27 (s, 3H, H-1'), 1.92 (dd, $J=3.8, 1.4$ Hz, 3H, H-3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 139.30 (C-2), 117.17 (C-1), 48.73 (C-1'), 15.31 (C-3).

S-[E]-1-Propenylpropylthiosulfinat ([E]-16), S-[Z]-1-Propenylpropylthiosulfinat ([Z]-16) und S-Propyl-[E]-1-Propenylthiosulfinat (17):



Nach der allgemeinen Vorschrift werden S-[E]-1-Propenylpropyldisulfid ([E]-58), S-[Z]-1-Propenylpropyldisulfid ([Z]-58), Dipropyldisulfid **13** (0.900 g, 6.07 mmol, 1 eq) und 77% *m*CPBA (1.360 g, 7.88 mmol, 1.3 eq) in CH_2Cl_2 (14 ml) miteinander versetzt. Nach flashchromatographischer Trennung (Pentan/Ether 5/1) des Rückstands erhält man 20 mg (2%) S-Propyl-[E]-1-propenylthiosulfinat **17** und 517 mg (51%) des Produktes in einer Mischung von S-[E]-1-Propenylpropylthiosulfinat ([E]-16), S-[Z]-1-Propenylpropylthiosulfinat ([Z]-16) und Dipropylthiosulfinat **13** als gelbe Öle (Selektivität *E/Z* 1.25/1; (*E/Z*)/**13** 2/1).

Die Trennung des Thiosulfinatgemisches [E]- und [Z]-**16** wird mittels der analytischen HPLC-Anlage an der LiChrospher[®] Si 60-Säule durchgeführt. Unter die chromatographischen Bedingungen „HPLC System 1“ (Kapitel 3.2.1) konnten die Thiosulfinate bei 254 nm mit folgenden Retentionszeiten zugeordnet werden: die Retentionszeit 9.95 min entspricht dem Thiosulfinat [E]-**16** sowie Retentionszeit 8.64 min entspricht dem [Z]-**16**. S-Propyl-[E]-1-Propenylthiosulfinat **17** hat eine Retentionszeit von 6.69 min.

Charakterisierung von [E]-16:

Allgemeine Daten: C₆H₁₂OS₂; MG: 164.29; DC: R_f=0.29 (Pentan/Ether 3:2), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.27-6.36 (m, 2H, H-1, 2), 3.15-3.00 (m, 2H, H-1'), 1.89 (dd, 3H, J=3.2, 1.9 Hz., H-3), 1.81-1.76 (m, 2H, H-2'), 1.07 (t, 3H, J=7.4 Hz, H-3').

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 143.40 (C-2), 115.88 (C-1), 57.44 (C-1'), 18.95 (C-3), 17.14 (C-2'), 13.11 (C-3').

Charakterisierung von [Z]-16:

Allgemeine Daten: C₆H₁₂OS₂; MG: 164.29; DC: R_f=0.29 (Pentan/Ether 3:2), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.42 (dq, 1H, J=9.03, 1.58 Hz, H-1), 6.27 (dq, 1H, J=9.02, 6.78 Hz, H-2), 3.15-3.00 (m, 2H, H-1'), 1.84 (dd, 3H, J=6.7, 1.6 Hz, H-3), 1.81-1.76 (m, 2H, H-2'), 1.08 (t, 3H, J=7.4 Hz, H-3').

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 136.55 (C-2), 117.13 (C-1), 57.90 (C-1'), 17.14 (C-2'), 15.11 (C-3), 13.11 (C-3').

MS (EI), m/z (%), (Z/E-Gemisch): 164 (24, [M⁺]), 148 (2, [M⁺-CH₃]), 122 (4), 92 (13), 75 (25), 74 (50), 73 (100), 63 (14), 57 (13).

Charakterisierung von 17:

Allgemeine Daten: C₆H₁₂OS₂; MG: 164.29; DC: R_f=0.37 (Pentan/Ether 3:2), UV (+), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

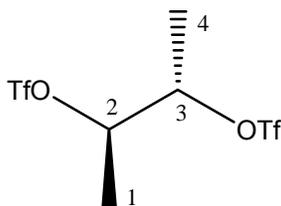
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.53 (dq, 1H, $J=14.9, 6.7$ Hz, H-2), 6.46 (dq, 1H, $J=14.9, 1.3$ Hz), 3.14-3.00 (m, 2H, H-1'), 1.94 (dd, 3H, $J=6.7, 1.2$ Hz, H-3), 1.81 (sextett, 2H, H-2'), 1.02 (t, 3H, $J=7.3$ Hz, H-3').

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 135.34 (C-2), 133.24 (C-1), 35.00 (C-1'), 24.23 (C-2'), 17.29 (C-3), 13.42 (C-3').

MS (EI), m/z (%): 164 (44, $[\text{M}^+]$), 149 (63, $[\text{M}^+-\text{CH}_3]$), 105 (40), 87 (16), 73 (100), 57 (82).

5.5.3 Versuche zu Kapitel 3.8.1

meso-Butan-2,3-diyl-bis(trifluoromethansulfonat) (61):



Das Trifluormethansulfonsäureanhydrid (2.25 ml, 13.32 mmol; 2.0 eq) wird in 13 ml abs. CH_2Cl_2 vorgelegt. Man kühlt die Lösung auf 0°C ab und tropft langsam eine Lösung von *meso*-2,3-Butandiol **60** (600 mg, 6.66 mmol) in 5 mL abs. CH_2Cl_2 und wasserfreien Pyridin (1.08 ml, 13.32 mmol; 2.0 eq) hinzu. Man lässt die Mischung auf Raumtemperatur erwärmen und rührt noch weitere 15 min. Die Reaktionsmischung wird mit Wasser (5 ml) gewaschen und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und anschließend der Rückstand mit Pentan/Ether 4:1 säulenchromatographisch gereinigt. Man erhält das Bistrifluormethansulfonat **61** (1.698 g, 72%) als farblose Flüssigkeit.

Allgemeine Daten: $\text{C}_6\text{H}_8\text{F}_6\text{O}_6\text{S}_2$; MG: 354.24; Smp.: 8°C ; DC: $R_f = 0.27$ (Pentan/Ether=8:2), UV (-), Vanillin: grün.

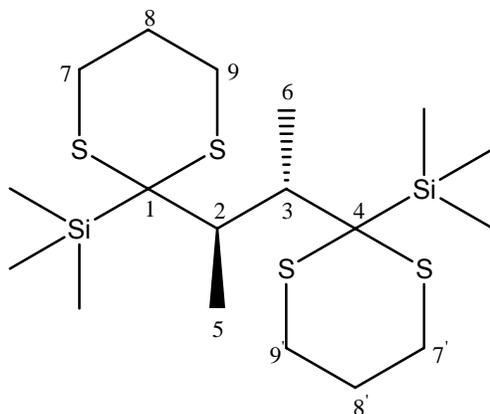
IR (kap. Film): ν (cm^{-1})=3435 (w), 3005 (w), 1420 (vs), 1248 (vs), 1212 (vs), 1148 (vs), 1074 (m), 990 (m), 943 (vs), 906 (vs), 621 (s), 605 (s).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5.13-5.07 (dq, ~ 2 Hz, 6,5 Hz, 2H; H-2/3), 1.56 (m, 6.5 Hz, 6H; 1/4-H₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 119.96, 116.79 (q, $\text{S}(\text{O}_2)\text{CF}_3$), 85.14 (d, C-2/3), 15.83 (q, C-1/4).

MS (EI): m/z (%): 354.8 (<1, $[\text{M}]^+$), 338.7 (<1), 204.8 (18), 176.8 (100), 132.8 (10), 112.9 (80), 98.9 (10), 68.9 (1), 55.0 (2).

***meso*-(2,2'-(Butan-2,3-diyl)bis(1,3-dithian-2,2-diyl))bis(trimethylsilan) (62):**



Zu einer Lösung von Trimethylsilyldithian (2.27 ml, 12.3 mmol; 1.8 eq) in 100 ml abs. THF tropft man bei -78 °C langsam *n*-BuLi (8.53 ml, 1.6 M in Hexan, 13.6 mmol; 2 eq) und TMEDA (2.03 ml, 13.6 mmol; 2 eq) zu. Man lässt 1 h deprotonieren und gibt tropfenweise eine Lösung von Bis(trifluormethansulfonat) **61** (2.417 g, 6.8 mmol) in 11 ml abs. THF hinzu. Anschließend wird nach 2 h rühren die Mischung mit ges. NH_4Cl -Lsg. gequenchet. Man erwärmt auf Raumtemperatur, trennt die organische Phase ab und extrahiert die wässrige Phase viermal mit EtOAc. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird flashchromatographisch (Pentan/Ether 10:1) gereinigt. Man erhält das 2,2'-Bis(1,3-dithian) **62** (2.486 g, 83%) als farblosen, stehend riechenden Feststoff.

Allgemeine Daten: C₁₈H₃₈S₄Si₂; MG: 438.93; Smp.: 119-122°C; DC: R_f=0.35 (Pentan/Ether=10/1), UV (+), Vanillin: schwarz.

IR (Film, KBr): ν (cm⁻¹)=2945 (m), 2899 (m), 1422 (w), 1245 (s), 1071 (w), 842 (s).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.01-2.96 (m, 2H; 7/7'-H₂), 2.84-2.77 (m, 2 H; 7/7'-H₂), 2.72-2.60 (m, 4 H; 9/9'-H₂), 2.59-2.52 (m, 2 H; H-2/3), 1.98-1.93 (m, 4 H; 8/8'-H₂), 1.59 (d, ~7 Hz, 6 H; 5/6-H₃), 0.32 (s, 18 H; Si(CH₃)₃).

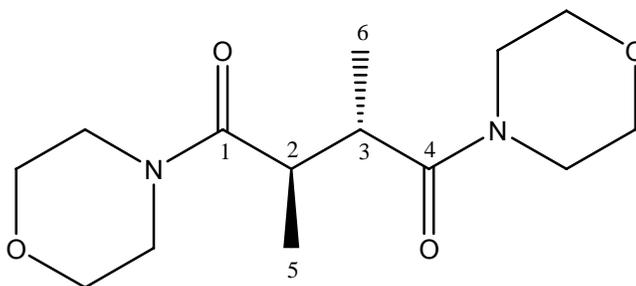
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 46.45 (d, C-2/3), 44.31 (s, C-1/4), 26.63, 26.36 (t, C-7/7'/9/9'), 24.25 (t, C-8/8'), 22.17 (q, C-5/6), 1.42 (q, Si(CH₃)₃).

MS (EI): *m/z* (%): 440.2 (2, [M+2H]⁺), 379.2 (6), 335.2 (8), 302.2 (3), 259.2 (100), 199.2 (3), 181.2 (6), 147.2 (1), 105.2 (1).

HRMS (EI): C₁₈H₃₈S₄Si₂
berechnet: 438.1395
gefunden: 438.1411.

5.5.4 Versuche zu Kapitel 3.8.2

meso-2,3-Dimethyl-1,4-dimorpholinbutan-1,4-dion (64):



Variante 1:

Eine Lösung von 1 g (6.84 mmol) *meso*-Dimethylbernsteinsäure **63** in 30 ml CH₂Cl₂/THF (2/1) kühlt man auf -60 °C ab und tropft Triethylamin (2.0 ml, 14.37 mmol; 2.1 eq) und Morpholin (1.26 ml, 14.37 mmol; 2.1 eq) nacheinander zu. Man gibt EDC (3.41g, 17.79 mmol; 2.6 eq) in einer Portion hinzu und lässt 1 h rühren. Das Kühlbad wird entfernt und die Mischung 70 h bei Raumtemperatur weiter gerührt. Man addiert eine Lösung von 1.37 g Zitronensäure in 5 ml Wasser und lässt 10 min lang rühren. Die organische Phase wird mit Wasser (10 ml) gewaschen und die wässrige Phase viermal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeeengt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (CH₂Cl₂/CH₃OH 97:3) erhält man das Dimorpholinamid **64** (1.596 g, 82%) als weißen Feststoff.

Variante 2:

Zu einer Lösung von *meso*-Dimethylbernsteinsäure **63** (100 mg, 0.68 mmol) in 1 ml abs. THF gibt man in einer Portion eine katalytische Menge DMF (5 mg, 0.068 mmol; 0.1 eq) dazu, versetzt mit Thionylchlorid (250 µl, 3.44 mmol; 5.02 eq) und lässt 40 h bei Raumtemperatur rühren. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand mit 1 ml abs. CH₂CH₂ verdünnt. Man kühlt die Mischung auf 0 °C ab, tropft Morpholin (359 µl, 4.11 mmol; 6 eq) zu und lässt langsam auf Raumtemperatur erwärmen. Zu der Reaktionsmischung gibt man Chloroform (1 ml) und rührt 30 min lang. Man wäscht die organische Phase mit 1M HCl (2x), ges. NaHCO₃-Lsg. (2x), und ges. NaCl-Lsg. (2x), extrahiert die wässrige Phase viermal mit Chloroform und trocknet die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄. Die flashchromatographische Reinigung des Rückstandes (CH₂Cl₂/ CH₃OH 97:3) liefert Dimorpholinamid **64** (85.6 mg, 44%,) als weißen Feststoff.

Allgemeine Daten: C₁₄H₂₄N₂O₄; MG: 284.35; Smp.: 186-189 °C; DC: R_f=0.22 (CH₂Cl₂/CH₃OH 97:3), UV (-), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

IR (KBr): ν (cm⁻¹)=2973 (w), 2899 (w) 2851 (m), 1634 (vs, C=O), 1464 (m), 1446 (s), 1429 (m), 1290 (m), 1265 (m), 1214 (m), 1109 (s), 1069 (w), 1033 (m), 841 (w), 584 (w).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.69-3.52 (m, 16H; H_{Morpholin}), 3.14-3.06 (m, 2H; H-2/3), 1.04 (m, 6H; 5/6-H₃).

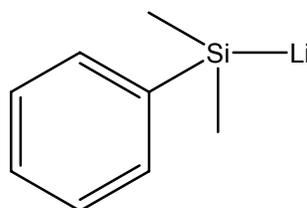
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 173.91 (s, C-1/4), 67.02, 66.89 (t, $-\text{CH}_2(\text{O})\text{CH}_2-$), 46.24, 42.19 (t, $-\text{CH}_2(\text{N})\text{CH}_2-$), 38.80 (d, C-2/3), 16.93 (q, C-5/6).

LC/MS (ES-API, Pos.), m/z (%): 307.2 (10), 285.2 (90, $[\text{M}+\text{H}]^+$) 198 (100); $t_{\text{R}, 230 \text{ nm}}=9.449$ min.

MS (EI): m/z (%): 284.2 (1, $[\text{M}^+]$), 198.2 (100), 170.2 (4), 143.2 (3), 114.1 (26), 86.1 (12), 71.1 (31), 56.0 (8).

HRMS (EI): $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$
berechnet: 284.1736
gefunden: 284.1737.

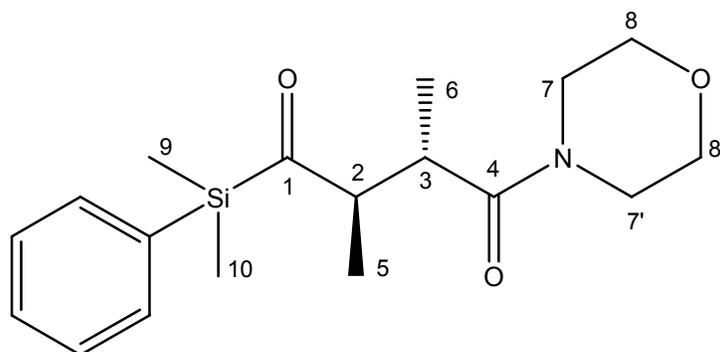
(Dimethyl(phenyl)silyl)lithium (65):



Unter N_2 -Atmosphäre werden kleine Stückchen Li (1.043 g, 150 mmol; 10 eq) in 30 ml abs. THF vorgelegt. Man lässt die Mischung 30 min lang in einem Ultraschallbad, dann kühlt man auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ ab und gibt tropfenweise $\text{Me}_2\text{PhSi-Cl}$ (2.5 ml, 15 mmol) hinzu. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemperatur erwärmt und 16 h gerührt.

Titration: Zu 1 ml von der dunkelbraunen Reaktionsmischung werden 10 ml Wasser gegeben. Man tropft 0.1 N HCl hinzu, bis der in der Probelösung enthaltene Indikator (Phenolphthalein) farblos wird. Nach drei Titrationen wird die Konzentration auf 0.52 M THF-Lsg. des Silyllithium-Reagenzes **65** bestimmt.

Allgemeine Daten: $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{LiSi}$; MG: 142.20; 0.52 M in THF-Lsg.

meso-1-(Dimethyl(phenyl)silyl)-2,3-dimethyl-4-morpholinbutan-1,4-dion (66):

Zu einer Lösung von Dimorpholinamid **64** (1.40 g, 4.9 mmol) in 16 ml abs. THF tropft man bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ langsam die Dimethylphenylsilyllithium-Lsg. **65** (10.83 ml, 0.52 M in THF; 1.1 eq) zu und lässt 3 h rühren. Man quencht mit einer Lösung von $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (417 mg; 1.1 eq) in 5 ml *i*-Propanol, lässt die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmen und filtriert nach 30 min Rühren über eine kurze Kieselgel-Säule (Et_2O). Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung des Rückstandes (Ether/Pentan 99:1) erhält man das Acylsilan **66** (620 mg, 38%,) als dunkelgelbes zähes Öl.

Allgemeine Daten: $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_3\text{Si}$; MG: 333.50; DC: $R_f = 0.23$ (Ether/Pentan=99:1), UV (+, nachleuchtende Flecke), Vanillin: gelb.

IR (kap. Film): ν (cm^{-1})=3070 (w), 3049 (w), 2964 (s), 2926 (m), 2856 (m), 1731 (w), 1644 (vs, C=O), 1634 (vs, C=O), 1461 (s), 1430 (s), 1251 (m), 1224 (m), 1116 (s), 1032 (m), 837 (s), 739 (m), 703 (m), 572 (w).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.58-7.55 (m, 2H; *H*-Ph), 7.42-7.35 (m, 3H; *H*-Ph), 3.66-3.56 (m, 6H; $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$), 3.53-3.45 (m, 2H; $-\text{NCH}_2-$), 3.41-3.33 (dq, 7.0 Hz, 14.0 Hz, ~ 10 Hz, 1H; H-2), 3.06-2.98 (dq, 6.7 Hz, 9.8 Hz, 1H; H-3), 0.82 (d, 6.7 Hz, 3H; 6- H_3), 0.76 (d, 7.0 Hz, 3H; 5- H_3), 0.52 (s, 3H; SiCH_3), 0.51 (s, 3H; SiCH_3).

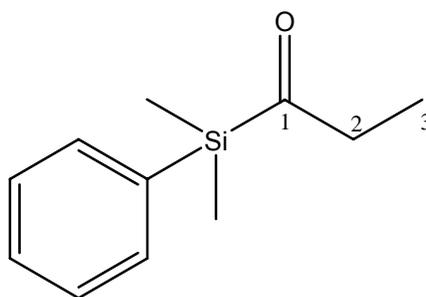
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 249.1 (s, C-1), 174.01 (s, C-4), 134.08 (d, Ph), 133.89 (s, Ph), 129.99 (d, Ph), 128.19 (d, Ph), 67.03, 66.84 (t, $-\text{CH}_2(\text{O})\text{CH}_2-$), 52.92 (d, C-2), 46.21, 42.04 (t, $-\text{CH}_2(\text{N})\text{CH}_2-$), 35.90 (d, C-3), 16.71 (q, C-6), 14.55 (q, C-5), -4.78 (q, SiCH_3), -4.86 (q, SiCH_3).

LC/MS (ES-API, Pos.), m/z (%): 334 (100, $[M+H]^+$); $t_{R, 230\text{ nm}}=14.569$ min.

MS (EI), m/z (%): 334.3 (<1, $[M+H]^+$), 318.3 (4), 305.3 (25), 290.3 (46), 276.3 (11), 260.3 (6), 248.2 (17), 248.2 (17), 198.2 (20), 163.2 (6), 155.2 (13), 144.2 (21), 140.2 (49), 135.2 (100), 126.2 (26), 112.1 (12), 105.1 (4), 86.1 (8), 55.1 (8).

HRMS (EI): $C_{18}H_{27}NO_3Si$
berechnet: 333.1760
gefunden: 333.1756.

1-(Dimethyl(phenyl)silyl)propan-1-on (66a):

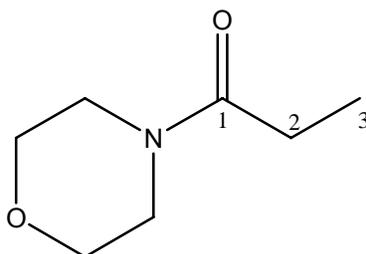


Allgemeine Daten: $C_{11}H_{16}OSi$; MG: 192.33; DC: $R_f = 0.32$ (Pentan/Ether=95:5), UV (+, nachleuchtende Flecke), Vanillin: rot.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.59-7.56 (m, 2H; *H*-Ph), 7.44-7.38 (m, 3H; *H*-Ph), 2.62 (q, 7.2 Hz, 2H; 2- H_2), 0.93 (t, 7.2 Hz, 3H; 3- H_3), 0.51 (s, 6H; $SiCH_3$).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 246.25 (s, C-1), 134.59 (s, Ph), 133.93 (d, Ph), 129.81 (d, Ph), 128.11 (d, Ph), 41.91 (t, C-2), 6.08 (q, C-3), -4.76 (q, $SiCH_3$).

LC/MS (ES-API, Pos.), m/z (%): 210.2 (16), 193.2 (8, $[M+H]^+$), 115.2 (100); $t_{R, 254\text{ nm}}=14.569$ min.

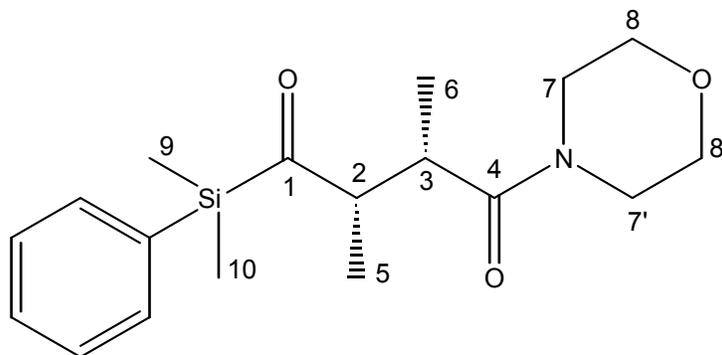
1-Morpholinpropan-1-on (66b):

Allgemeine Daten: C₇H₁₃NO₂; MG: 143.18; farblose Flüssigkeit; DC: R_f = 0.24 (EtOAc/Pentan 99:1), UV (-), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 3.72-3.63 (m, 4H; H_{Morpholin}), 3.58-3.54 (m, 4H; H_{Morpholin}), 2.43 (q, 7.5 Hz, 2H; 2-H₂), 1.11 (t, 7.5 Hz, 1.6 Hz, 3H; 3-H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 175.23 (s, C-1), 67.78, 67.74 (t, -CH₂(O)CH₂-), 47.20, 43.24 (t, -CH₂(N)CH₂-), 27.11 (t, C-2), 9.88 (q, C-3).

LC/MS (ES-API, Pos.), *m/z* (%): 144.2 (100, [M+H]⁺); *t_R*, 230 nm=8.877 min.

rac-1-(Dimethyl(phenyl)silyl)-2,3-dimethyl-4-morpholinbutan-1,4-dion (72):

Zu einer Lösung von Acylsilan **66** (62 mg, 0.19 mmol) in 0.5 ml abs. CH₃CN gibt man HMDST (279 µl, 1.49 mmol; 8 eq) und tropft eine Lösung von CoCl₂·6H₂O (88.5 mg, 0.37 mmol; 2 eq) in 1.5 ml abs. CH₃CN hinzu. Man lässt 72 h bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktionsmischung wird mit Et₂O verdünnt, über eine kurze Kieselgel-Säule (Et₂O) filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird säulen-chromatographisch (flashchromatographisch) gereinigt (Pentan/Ether 1:4, dann Pentan/Ether 3:97). Man erhält das

Acylsilan **72** (12.6 mg, 20%) als gelbes zähes Öl. Neben dem Acylsilan **72** wird die nicht isomerisierte *meso*-Verbindung **66** (42 mg, 67%) isoliert.

Allgemeine Daten: C₁₈H₂₇NO₃Si; MG: 333.50; DC: R_f = 0.25 (Pentan/Ether=2:8), UV (+, nachleuchtende Flecke), Vanillin: gelb.

IR (kap. Film): ν (cm⁻¹)=3070 (w), 3049 (w), 2965 (s), 2925 (s), 2858 (s), 1731 (w), 1645 (vs, C=O), 1635 (vs, C=O), 1430 (s), 1248 (s), 1230 (s), 1114 (s), 1035 (m), 1021 (m), 837 (s), 738 (s), 704 (s), 575 (m), 468 (m).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.61-7.59 (m, 2H; *H*-Ph), 7.41-7.36 (m, 3H; *H*-Ph), 3.75-3.72 (m, 1H; 8-H₂), 3.65-3.55 (m, 5H; 7/7'/8/8'-H₂), 3.45-3.39 (m, 3H; 7/7'-H₂, H-2), 2.91-2.86 (dq, 7.3 Hz, 8.4 Hz, 1H; H-3), 1.04 (d, 7.3 Hz, 3H; 6-H₃), 0.80 (d, 7 Hz, 3H; 5-H₃), 0.55 (s, 3H; SiCH₃), 0.46 (s, 3H; SiCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 249.13 (s, C-1), 174.65 (s, C-4), 135.08 (s, Ph), 134.16 (d, Ph), 129.71 (d, Ph), 128.3 (d, Ph), 66.92, 66.83 (t, -CH₂(O)CH₂-), 52.21 (d, C-2), 46.15, 42.05 (t, -CH₂(N)CH₂-), 36.69 (d, C-3), 15.01 (q, C-6), 12.29 (q, C-5), -4.31 (q, SiCH₃), -4.20 (q, SiCH₃).

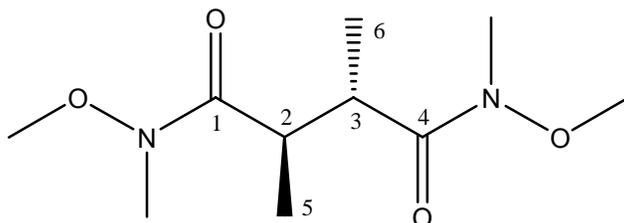
LC/MS (ES-API, Pos.), *m/z* (%): 334 (100, [M+H]⁺); *t_R*, 230 nm=14.763 min.

MS (EI): *m/z* (%): 332.2 (<1, [M-2H]⁺), 318 (4), 305.3 (24), 290.2 (41), 276.2 (10), 248.2 (18), 198.2 (10), 163.1 (8), 149.1 (9), 135.1 (100), 114.1 (7), 83.1 (7), 55.1 (10).

HRMS (EI): C₁₈H₂₇NO₂SSi
berechnet: 333.1760
gefunden: 333.1582.

5.5.5 Versuche zu Kapitel 3.9.2

meso-N¹,N⁴-dimethoxy-N¹,N⁴,2,3-tetramethylsuccinamid (**67**):



Zu eine Lösung von *meso*-Dimethylbernsteinsäure **63** (700 mg, 4.79 mmol) in 7 ml abs. THF gibt man *N,O*-Dimethylhydroxylamin-HCl (1.243 g, 12.74 mmol; 2.66 eq) und DMAP (117 mg, 0.96 mmol; 0.2 eq). Man kühlt die Reaktionsmischung auf 0 °C ab, tropft langsam Triethylamin (2.23 ml, 16 mmol; 3.34 eq) zu und fügt in einer Portion EDC (2.204g, 11.5 mmol; 2.4 eq) hinzu. Nach 1 h Rühren wird das Eisbad entfernt und die Mischung bei Raumtemperatur 19 h gerührt. Man wäscht mit 1 N HCl (2x), ges. NaHCO₃-Lsg. (2x), und ges. NaCl.-Lsg. (2x) und extrahiert viermal mit EtOAc. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt. Nach der flashchromatographischen Reinigung (EtOAc/Pentan 98:2) erhält man das Diweinrebamid **67** (835 mg, 75 %) als weißen Feststoff.

Allgemeine Daten: C₁₀H₂₀N₂O₄; MG: 232.28; Smp.: 105-107 °C; DC: R_f = 0.28 (EtOAc/Pentan 99:1), UV (-), Cer (IV)-Sulfat/Phosphormolybdänsäure: blau.

IR (Film, KBr): ν=2983 (w), 2961 (m), 2938 (m), 1654 (vs, C=O), 1463 (s), 1422 (m), 1388 (s), 1179 (m), 1064 (w), 987 (s), 744 (w).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.69 (s, 6 H; OCH₃), 3.23 (br s, 2 H; H-2/3), 3.19 (s, 6 H; NCH₃), 1.07 (m, 6 H, 5/6-H₃).

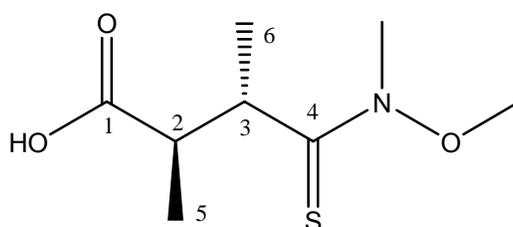
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 176.54 (s, C-1/4), 61.66 (q, OCH₃), 38.42 (d, C-2/3), 32.09 (q, NCH₃), 16.46 (q, C-5/6).

LC/MS (ES-API, Pos.): *m/z* (%): 233 (20, [M+H]⁺), 172 (100); t_{R, 230 nm}=8.897 min.

MS (EI): m/z (%): 231.0 (<1, $[M-H]^+$), 184.1 (4), 172.1 (100), 156.1 (3), 144.1 (18), 116.1 (2), 88.1 (25), 83.1 (6), 60.1 (8), 55.1 (10).

HRMS (EI): $C_{10}H_{20}N_2O_4$
berechnet: 232.1423
gefunden: 232.1420.

meso-4-(Methoxy(methyl)amino)-2,3-dimethyl-4-thioxobutansäure (68):



Eine Lösung von Diweinrebamid **67** (50 mg, 0.22 mmol) in 1.5 ml abs. CH_3CN wird mit $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (102 mg, 0.43 mmol; 2 eq) versetzt. Zur blauen klaren Mischung wird HMDST (181 μ l, 0.86 mmol; 4 eq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird auf 30 °C erwärmt und 15 min gerührt. Anschließend wird die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt, über eine kurze Kieselgel-Säule (EtOAc) filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Die flashchromatographische Reinigung (Pentan/ EtOAc 1:1) liefert Carboxylthioweinrebamid **68** (37.6 mg, 85%) als gelbe ölige Flüssigkeit.

Allgemeine Daten: $C_8H_{15}NO_3S$; MG: 205.27; DC: $R_f = 0.21$ (Pentan/EtOAc 4:6), UV (+), Vanillin: grün.

IR (kap. Film): $\nu=3419$ (br s), 2971 (s), 2938 (s), 2639 (w), 1707 (vs, C=O; COOH), 1636 (w), 1416 (s), 1378 (m), 1279 (m), 1209 (m), 1127 (s), 1062 (m), 999 (m), 980 (m), 820 (w), 539 (w).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 10.0-8.0 (br s, 1 H; COOH), 3.82 (s, 3H; OCH_3), 3.71 (s, 3H; NCH_3), 3.64-3.60 (dq, 6.7 Hz, 1H; H-3), 3.03-2.99 (dq, 6.9 Hz, 1H; H-2), 1.30 (dd, 6.7 Hz, 3H; 6- H_3), 1.19 (dd, 6.9 Hz, 3H; 5- H_3).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 202.97 (s, C-4), 181.59 (s, C-1), 61.87 (q, OCH_3), 45.73 (d, C-2), 43.04 (d, C-3), 38.88 (q, NCH_3), 20.22 (q, C-6), 16.54 (q, C-5).

LC/MS (ES-API, Pos.): m/z (%): 228 (8), 206 (100, $[M+H]^+$), 188 (23); $t_{R, 254\text{ nm}}=8.270$ min.

MS (EI): m/z (%): 205 (16, $[M]^+$), 188 (1), 175 (6), 157 (100), 142 (90), 129 (14), 114 (18), 96 (22), 89 (16), 74 (41), 56 (84).

HRMS (EI): $C_8H_{15}NO_3S$
berechnet: 205.0703
gefunden: 205.0757.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Li Q.-Q., Zhou S.-D., He X.-J., Yu Y., Zhang Y.-C. and Wei X.-Q., Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Alliaceae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast rps16 sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China, *Annals of Botany* **2010**, 106, 709-733.
- [2] N. Friesen, Die Gattung *Allium*-Taxonomischer Überblick und wissenschaftliche Sammlung im Botanischen Garten der Universität Osnabrück, *Osnabrücker Naturwissenschaftliche Mitteilungen* **2008**, 33/34, 95-110.
- [3] Friesen N., Fritsch R. M. and Blattner F. R., Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences, *Aliso* **2006**, 22, 372-395.
- [4] E. Block, *Spektrum der Wissenschaft* **1985**, 66-72.
- [5] APG III. Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III", *Bot. J. Linn. Soc.* **2009**, 161(2), 105-121.
- [6] Fritsch R. M. and Friesen N., Chapter 1: Evolution, Domestication and Taxonomy, *Allium Crop Science: Recent Advances*, CAB Publishing **2002**, 5-30, Wallingford, UK.
- [7] Anja Vogt, Untersuchungen zu Schwefelverbindungen und Enzymaktivitäten in *Allium*-Arten des Subgenus *Melanocrommyum*, *Dissertation* **2008**, Marburg, Deutschland; Jan Kusterer, Neue Erkenntnisse der Schwefelchemie und Chemotaxonomie in Arten des Genus *Allium*, *Dissertation* **2010**, Marburg, Deutschland.
- [8] Chope G. A., Cools K. and Terry L. A., Chapter 2: *Alliums* [Onion, Garlic, Leek and Shallot], *Health-Promoting Properties of Fruits & Vegetables* **2011**, 5-26, *CABI International*, Wallingford, UK.
- [9] E. Block, The Organosulfur Chemistry of the Genus *Allium*-Implications for the Organic Chemistry of Sulfur, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 1158-1203.
- [10] Stoll A. und Seebeck E., Über Alliin, die genuine Muttersubstanz des Knoblauchöls. 1. Mitteilung über *Allium*-Substanzen, *Helvetica Chemica Acta* **1948**, 31, 189-210; Stoll A. und Seebeck E., Über die Spezifität der Alliinase und die Synthese mehrerer dem Alliin verwandter Verbindungen, *Helv. Chim. Acta* **1949**, 32, 866-876; Stoll A. and Seebeck E., Chemical investigations on Alliin, the active principle of garlic, *Adv. Enzymol.* **1951**, 11, 377-400.

- [11] Cavallito C. J., Bailey J. H. and Buck J. S., The Antibacterial Principle of *Allium sativum*. III. Its Precursor and "Essential Oil of Garlic", *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, 67, 1032-1033.
- [12] Corzo-Martinez M., Corzo N., Villamiel N., Biological properties of onions and garlic, *Trends Food Sci. Tech.*, **2007**, 18, 609–625; Shariatzadeh S. M. A., Soleimani Mehranjani M., Mahmoodi, M., Abnosi, M. H., Momeni H. R., Dezfulian A. R., Noori, M., Effects of Garlic (*Allium sativum*) on Blood Sugar and Nephropathy in Diabetic Rats, *Journal of Biological Sciences* **2008**, 8(8), 1316-1321.
- [13] Seyfi P., Mostafaie A., Mansouri K., Arshadi D., Mohammadi-Motlagh H. R. and Kiani A., In vitro and in vivo anti-angiogenesis effect of shallot (*Allium ascalonicum*): a heat-stable and flavonoid-rich fraction of shallot extract potently inhibits angiogenesis, *Toxicol. In Vitro* **2010**, 24(6), 1655-1661.
- [14] Bayer Th., Neue schwefelhaltige Inhaltsstoffe aus *Allium cepa* L. mit antiasthmatische und antiallergischer Wirkung, *Dissertation* **1988**, München, DE; Bayer Th., Breu W., Seligmnnn O., Wray V. and Wagner H., Biologically active thiosulfinates and α -sulphinyl-disulphides from *Allium cepa*, *Phytochemistry* **1989**, 28(9), 2373-2377.
- [15] Dorsch W., Wagner H. und Bayer Th., Asthmaschutzwirkung von Zwiebelextrakten: Wirkprofil von Thiosulfinaten, *Allergologi* **1989**, 12, 388-396.
- [16] Kawakishi S., Morimitsu Y., New Inhibitor of Platelet aggregation in onion oil, *Lancet* **1988**, 332, 330.
- [17] Reuter H. D., *Allium sativum* und *Alium ursinum*: Part 2; Pharmacology and Medical Application, *Phytomedicine* **1995**, 2, 73-91.
- [18] Koch H. P. and Lawson L. D., Garlic: The Science and Therapeutic Application of *Allium sativum* L. and Related Species, *Williams & Wilkins* **1996**, 2nd edn., Baltimore, Maryland, USA.
- [19] Hunter R., Kaschula C. H., Parker I. M., Caira M. R., Richards P., Travis S., Taute F., and Qwebani T., Substituted ajoenes as novel anti-cancer agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 5277-5279.
- [20] *Allium*-Extrakt, Pflanzenextrakte für Kosmetika & Phytopharmaka, Produktinnovation durch Netzwerkkompetenz, BioPro AG, Bernburg, DE.
- [21] Guyonnet D., Siess M. H., Le Bon A. M., Suschetet M., Modulation of phase II enzymes by organosulfur compounds from *allium* vegetables in rat tissues, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, 154, 50-58; Belloir C., Singh V., Daurat C., Siess M. H. and Le Bon A. M., Protective effects of garlic sulfur compounds against DNA damage induced by direct- and indirect- acting genotoxic agents in HepG2 cells, *Food Chem. Toxicol.* **2006**, 44(6), 827-834.

- [22] Blok E., Purcell P. F. and Yolen S. R., Onions and heartburn, *Am. J. Gastroenterol* **1992**, 87, 679-680.
- [23] Whitaker J. R., Development of flavor, odor and pungency in onion and garlic, *Adv. Food Res.*, **1976**, 22, 73-133; Burks J. W., Classic aspects of onion and garlic dermatitis in housewives, *Ann. Allergy* **1954**, 12, 592-596; Falleroni A. E., Zeiss R. and Levitz D., Occupational asthma secondary to inhalation of garlic dust, *J. Allergy Clin. Immunol.* **1981**, 68, 156-160; Papageorgiou C., Corbet J. P., Menezes-Brandao F., Pecegueiro M. and Benezra C., Allergic contact dermatitis to garlic (*Allium sativum* L). Identification of the allergens: the role of mono-, di- and trisulfides present in garlic: a comparative study in man and animal (guinea-pig), *Arch. Dermatol. Res.* **1983**, 275, 229-234.
- [24] Virtanen A. I., Studies on organic sulphur compounds and other labile substances in plants, *Phytochemistry* **1965**, 4, 207-228; A. I. Virtanen, Organische Schwefelverbindungen in Gemüse- und Futterpflanzen, *Angew. Chem.* **1962**, 74, 374-382; Matikkala E. J. and Virtanen A. I., On the quantitative determination of the amino acids and γ -glutamyl peptides of onion, *Acta Chem. Scand.* **1967**, 21, 2891-2893; Virtanen A. I. and Spåre C.-G., Isolation of the precursor of the lachrimatory factor in onion (*Allium cepa*), *Soum Kemistilehti* **1961**, 34, 72.
- [25] Lancaster J. E. and Shaw M. L., Metabolism of γ -glutamyl peptides during development, storage and sprouting of onion bulbs, *Phytochemistry* **1991**, 30, 2857-2859.
- [26] Brewster J. L., Onion and Other Vegetable *Alliums* **2008**, CAB International, 2nd edn., Wellingford, UK.
- [27] Amin M. and Kapadnis B. P., Heat stable antimicrobial activity of *Allium ascalonicum* against bacteria and fungi, *Indian J. Exp. Biol.* **2005**, 43(8), 751-754.
- [28] Ernst M. K., Chatterton N. J., Harrison P. A. and Matitscha G., Characterization of Fructane Oligomers from Species Genus *Allium* L., *J. Plant Physiol.* **1998**, 153, 53-60; Suzuki M. and Cutcliffe J. A., Fructans in Onion Bulb in Relation to Storage Life, *Can. J. Plant Sci.* **1989**, 69, 1327-1333.
- [29] Lanzotti V., Bioactive saponins from *Allium* and *Aster* plants, *Phytochemistry Reviews* **2005**, 4, 95-110; Carotenuto A., Fattorusso E., Lanzotti V. and Magno S., Spirostanol saponins of *Allium porrum* L, *Phytochemistry* **1999**, 51, 1077-1082.
- [30] Rodríguez Galdón B., Rodríguez Rodríguez E. and Díaz Romero C., Flavonoids in Onion Cultivars (*Allium cepa* L.), *Journal of Food Science* **2008**, 73, 599-605; Gorinstein S., Leontowicz H., Leontowicz M., Namiesnik J., Najman K., Drzewiecki J., Cvikrova M., Martincová O., Katrich E. and Trakhtenberg S., Comparison of the main bioactive

- compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 4418-4426.
- [31] Wang H. X. and Ng T. B., Isolation of allicepin, a novel antifungal peptide from onion (*Allium cepa*) bulbs, *J Pept. Sci.* **2004**, 10(3), 173-177.
- [32] Xia L. and Ng T. B., Isolation of alliumin, a novel protein with antimicrobial and antiproliferative activities from multiple-cloved garlic bulbs, *Peptides* **2005**, 26(2), 177-183.
- [33] Breu W., *Allium cepa* L. (Onion). Part 1: Chemistry and Analysis, *Phytomedicine* **1996**, 3, 293-306.
- [34] Arnault I. and Auger J., Seleno-compounds in garlic and onion, *J Chromatogr A.* **2006**;1112 (1-2), 23-30; Auger J, Yang W, Arnault I, Pannier F and Potin-Gautier M., High-performance liquid chromatographic-inductively coupled plasma mass spectrometric evidence for Se-"alliins" in garlic and onion grown in Se-rich soil, *J Chromatogr A.* **2004**, 1032(1-2), 103-107; Wrobel K., Wrobel K., Kannamkumarath S. S., Caruso J. A., Wysocka I. A., Bulska E., Swiajek J. and Wietzbicka M., HPLC-ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves a potential dietary source of Se-methylselenocysteine, *Food Chemistry* **2004**, 86(4), 617-623.
- [35] Coolong T. M. and Randle W. M., Temperature Influences Flavor Intensity and Quality in 'Granex 33' Onion, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **2003**, 128(2), 176-181.
- [36] W. M. Randle, Onion germplasm interacts with sulfur fertility for plant sulfur utilization and bulb pungency, *Euphytica* **1992** 59(2), 151-156; Randle W. M., Increasing Nitrogen Concentration in Hydroponic Solutions Affects Onion Flavor and Bulb Quality, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **2000**, 125(2), 254-259; Randle W. M, Block E., Littlejohn M. H., Putman D. and Bussard M. L., Onion (*Allium cepa* L.) Thiosulfinates Respond to Increasing Sulfur Fertility, *J. Agric. Food. Chem.* **1994**, 42(10), 2085-2088.
- [37] Freeman G. G. and Mossadeghi N., Studies on the relationship between water regime and flavour strength in watercress (*Rorippa nasturtium-aquaticum* (L) Hayek), cabbage (*Brassica oleracea capitata*) and onion (*Allium cepa*), *J. Hort. Sci.* **1973**, 48, 365-78.
- [38] Fritsch R.M., Keusgen M., Occurrence and Taxonomic Significance of Cysteine Sulfoxides in the Genus *Allium* L. (*Alliaceae*), *Phytochemistry* **2006**, 67, 1127-1135.
- [39] Kubec R., Svobodová M. and Velíšek J., Distribution of S-Alk(en)ylcysteine Sulfoxides in Some *Allium* Species. Identification of a New Flavor Precursor: S-Ethylcysteine Sulfoxide (Ethiin), *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48(2), 428-433; Kubec R., Kim S., McKeon D. M. and Musah A., Isolation of S-butylcysteine Sulfoxide and Six Butyl-containing Thiosulfinates from *Allium sicutum*, *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 960-964; Kubec R., Kim S.

- and Musah A., S-Substituted Cysteine Derivatives and Thiosulfinate Formation in *Petiveria alliacea*-part II, *Phytochemistry* **2002**, 60, 675-680; Kubec R. and Musah A., Cysteine Sulfoxide Derivatives in *Petiveria alliacea*, *Phytochemistry* **2001**, 58, 981-985.
- [40] Lancaster J. E., Shaw M. L., Joyce M. D., McCallum J. A. and McManus M. T., A novel alliinase from onion roots, Biochemical characterization and cDNA cloning, *Plant Physiol.* **2000**, 122, 1269-1279.
- [41] Randle W. M. and Lancaster J. E., Chapter 14: Sulphur compounds in *Alliums*, in: H. D. Rabinowitch and L. Currah (eds.), *Allium Crop Science-Recent Advantages* **2000**, 332-339, *CABI Publishing*, Wallingford, UK.
- [42] Küttner E. B., Hilgenfeld R. and Weiss M. S., Purification, characterization, and crystallization of alliinase from garlic, *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, 402, 192-200.
- [43] Krest I., Glodek J. and Keusgen M., Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species, *J. Agric. Food. Chem.* **2000**, 48, 3753-3760.
- [44] Edwards S. J., Britton G. and Collin H. A., The biosynthetic pathway of the S-alk(en)yl-L-Cysteine sulphoxides (flavour precursors) in species of *Allium*, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **1994**, 38, 181-188.
- [45] Lancaster J. E. and Collin H. A., Presence of alliinase in isolated vacuoles and alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs in onion (*Allium cepa*), *Plant Sci. Lett.* **1981**, 22, 169-176.
- [46] Krest I. and Keusgen M., Biosensoric flow-through method for the determination of cysteine sulfoxides, *Analytica Chimica Acta* **2002**, 469, 155-164.
- [47] Keusgen M., Jünger M., Krest I. and Schöning M. J., Development of a biosensor specific for cysteine sulfoxides, *Biosensors & Bioelectronics* **2003**, 18, 805-812.
- [48] Whitaker R. J., Development of flavour, odor and pungency in onion and garlic, *Adv. Food Res.* **1976**, 22, 73-133.
- [49] Imai S., Tsuge N., Tomotake M., Nagatome Y., Sawada H., Nagata T. and Kumagai H., An onion enzyme that makes the eyes water, *Nature* **2002**, 419, 685; Musah R. A., He Q. and Kubec R., Discovery and Characterization of a Novel Lachrymatory Factor Synthase in *Petiveria alliacea* and Its Influence on Alliinase-Mediated Formation of Biologically Active Organosulfur Compounds, *Plant Physiol.* **2009**, 151, 1294-1303.
- [50] Eady C. C., Kamoi T., Kato M., Porter N. G., Davis S., Shaw M., Kamoi A. and Imai S., Silencing Onion Lachrymatory Factor Synthase Causes a Significant Change in the Sulfur Secondary Metabolite Profile, *Plant Physiol.* **2008**, 147, 2096-2106.

- [51] Aoyagi M., Kamoi T., Kato M., Sasako. H, Tsuge. N and Imai S., Structure and bioactivity of thiosulfinates resulting from suppression of lachrymatory factor synthase in onion, *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59(20),10893-10900.
- [52] Ferary S. and Auger J., What is the true odour of cut *Allium*? Complementarity of various hyphenated methods: Gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with particle beam and atmospheric pressure ionization interfaces in sulphenic acids rearrangement components discrimination, *Journal of Chromatography A* **1996**, 750, 63-74.
- [53] Lawson L. D. and Hughes B. G., paper presented at the *International Joint Symposium* **1990**, July, Bonn, Germany; Lawson L. D., Wood S. G. and Hughes B. G., HPLC analysis of allicin and other thiosulfmates in garlic clove homogenates, *Planta Med.* **1991**, 57, 263-270.
- [54] Block E., Naganathan S., Putman D. and Zhao S-H., *Allium* chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive, and Chinese chive. Uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples, *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 2418-2430
- [55] Virtanen A. I. and Spåre C.-G., Isolation of the precursor of the lachrymatory factor in onion (*Allium cepa*), *Soum Kemistilehti* **1961**, 34, 72; Virtanen A. I., Studies on organic sulphur compounds and other labile substances in plants, *Phytochemistry* **1965**, 4, 207-228; Brodnitz M. H., Pascale J. V. and van Derslice L., Thiopropanal S-oxide: a lachrymatory factor in onions, *J. Agric. Food. Chem.* **1971**, 19, 269-272.
- [56] Block E., Gulati H., Putman D., Sha D., You N. and Zhao S.-H., *Allium* Chemistry: Synthesis of 1-[Alk(en)ylsulfinyl]propyl Alk(en)yl Disulfides (Cepaenes), Antithrombotic Flavorants from Homogenates of Onion (*Allium cepa*), *J. Agric. Food. Chem.* **1997**, 45, 4414-4422.
- [57] Winkler G., Iberl B. and Knobloch K., Neue Ergebnisse über Allicin-Folgeprodukte in lipophilen Medien, *Deutsche Apotheker Zeitung* **1991**, 131, Suppl. 24, 6-8.
- [58] Kawakishi S. and Morimitsu Y., New inhibitor of platelet aggregation in onion oil, *Lancet* **1988**, 330; Morimitsu Y., Morioka Y. and Kawakishi S., Inhibitors of platelet aggregation generated from mixtures of *Allium* species and/or S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides, *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 368-372.
- [59] Morimitsu Y. and Kawakishi S., Inhibitors of platelet aggregation from onion, *Phytochemistry* **1990**, 29(11), 3435-3439.
- [60] Calvey E., Matusik J., White K., DeOrazio R., Sha D. and Block E., *Allium* Chemistry: Supercritical Fluid Extraction and LC-APCI-MS of Thiosulfinates and Related

- Compounds from Homogenates of Garlic, Onion and Ramp. Identification in Garlic and Ramp and Synthesis of 1-Propanesulfinothioic Acid S-Allyl Ester, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 4406-4413.
- [61] Oaks D. M., Hartmann H., Dimick K. P., Analysis of Sulfur Compounds with Electron Capture Flame Dual Channel Chromatographie, *Anal. Chem.*, **1964**, 36, 1560-1565
- [62] Wagner H., Dorsch W., Bayer Th., Breu W. and Willer F., Antiasthmatic effects of onions: Inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase in vitro by thiosulfinates and "Cepaenes", *Prostaglandins Leukotriene and Essential Fatty Acids* **1990**, 39, 59-62; Bayer T., Wagner H., Wray V. and Dorsch W., Inhibitor of cyclooxygenase and lipoxygenase in onions, *Lancet* **1988**, 906.
- [63] E. Block, M. Aslam, Serendipitous synthesis of alkyl trimethylsilyldithioformates by trapping of bis(trimethylsilyl)thione with alkanesulfenic acids. Synthesis of bis- and tris(trimethylsilyl)methanethiols, *Terahedron Lett.* **1985**, 26, 2259-2262.
- [64] M. Yagami, S. Kawakishi, M. Namika, Identification of intermediates in the formation of onion flavour, *Agric. Biol. Chem.* **1980**, 44(11), 2533-2538.
- [65] Bayer Th., Wagner H., Block E., Grisoni S., Zhao S.-H. and Neszmelyi A., Zwiebelanes: Novel 2,3-Dimethyl-5,6-dithiabicyclo[2.1.1]hexanes from Onion, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 3085-3086.
- [66] Block E., Bayer T., Naganathan S. and Zhao S.-H., Allium Chemistry: Synthesis and Sigmatropic Rearrangements of Alk(en)yl 1-Propenyl Disulfide S-Oxides from Cut Onion and Garlic, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118(12), 2799-2810.
- [67] Block E. and Bayer Th., (Z,Z)-d,l-2,3-Dimethyl-1,4-butanedithial 1,4-Dioxide: A Novel Biologically Active Organosulfur Compound from Onion. Formation of vic-Disulfoxides in Onion Extracts, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4584-4585.
- [68] a) Block E., Bayer T., DeOrazio R., Grisoni S., Thiruvazhi M., Toscano P., Zhao S.-H., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2431-2438; b) Block E., Thiruvazhi M., Toscano P. J., Bayer T., Grisoni S. and Zhao S.-H., "Allium Chemistry: Structure, Synthesis, Natural Occurrence in Onion (*Allium cepa*), and Reactions of 2,3-Dimethyl-5,6-dithiabicyclo[2.1.1]hexane S-Oxides", *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2790-2798.
- [69] Farkas P., Hradský P. and Kovác M., Novel flavour components identified in the steamn distillate of onion (*Allium cepa* L.), *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, 195, 459-462.
- [70] Rose P., Whiteman M., Moore P. K. and Zhu Y. Z., Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, 22(3), 351-68.

- [71] Lancaster J. E. and Shaw M. L., γ -glutamyl peptides in the biosynthesis of S-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides (flavour precursors) in *Allium*, *Phytochemistry* **1989**, 28, 455-460; Kasai T. and Larsen P. O., Chemistry and Biochemistry of γ -Glutamyl Derivates from Plants Including Mushrooms (*Basidiomycetes*), *Prog. Chem. Nat. Prod.* **1980**, 39, 173-285.
- [72] Kubec R. and Dadáková E., Chromatographic methods for determination of S-substituted cysteine derivatives-A comparative study, *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216(41), 6957-6963.
- [73] Wetli H. A., Brenneisen R., Tschudi I., Langos M., Bigler P., Sprang T., Schürch S. and Mühlbauer R. C., A γ -Glutamyl Peptide Isolated from Onion (*Allium cepa* L.) by Bioassay-Guided Fractionation Inhibits Resorption Activity of Osteoclasts, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53(9), 3408-3414; Yeh Y.-Y. and Liu L., Cholesterol-Lowering Effect of Garlic Extracts and Organosulfur Compounds: Human and Animal Studies, *J. Nutr.* **2001**, 131(3), 989S-993S.
- [74] Block E., Biological activity of *Allium* compounds: recent results, *Acta Horticulturae* **2005**, 688, 41-57.
- [75] El-Bayoumy K., Sinha R., Pinto J. T. and Rivlin R. S., Cancer chemoprevention by garlic and garlic containing sulfur and selenium compounds, *J. Nutr.* **2006**, 136(3), 864-869.
- [76] Nuutila A. M., Puupponen-Pimiä R., Aarni M., Oksman-Caldentey K. M., Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity, *Food Chemistry* **2007**, 10(3), 1389-1393; Lin J.-Y. and Tang C.-Y., Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation, *Food Chemistry* **2007**, 101(1), 140-147.
- [77] Downes K., Chope G. A. and Terry L. A., Postharvest application of ethylene and 1-methylcyclopropene either before or after curing affects onion (*Allium cepa* L.) bulb quality during long term cold storage. *Postharvest Biology and Technology* **2010**, 55, 36-44.
- [78] Sliemstad R., Fossen T. and Vågen I. M., Onions: a source of unique dietary flavonoids, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55(25), 10067-10080.
- [79] Bonaccorsi P., Caristi C., Gargiulli C. and Leuzzi U., Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC-DAD-ESI-MS-MS, *Food Chem.* **2008**, 107, 1668-1673; Kuo P.-L., Hsu Y.-L. and Lin C.-C., The Chemopreventive Effects of Natural Products Against Human Cancer Cells, *International Journal of Applied Science and Engineering* **2005**, 3, 203-214.
- [80] Lanzotti V., The analysis of onion and garlic, *J. Chromatogr. A* **2006**, 1112(1-2), 3-22.

- [81] Wang H. X. and Ng T. B., Ascalin, a new anti-fungal peptide with human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase-inhibiting activity from shallot bulbs, *Peptides* **2002**, 23(6), 1025-1029; Mahmoudabadi A Z. and Nasery M. K. G., Anti fungal activity of shallot, *Allium ascalonicum* Linn. (Liliaceae), *in vitro*, *Journal of Medicinal Plants Research* **2009**, 3(5), 450-453.
- [82] Wang H. X. and Ng T. B., Isolation of allicepin, a novel antifungal peptide from onion (*Allium cepa*) bulbs, *J. Pept. Sci.* **2004**, 10(3), 173-177.
- [83] Xia L. and Ng T. B., Isolation of alliumin, a novel protein with antimicrobial and antiproliferative activities from multiple-cloved garlic bulbs, *Peptides* **2005**, 26(2), 177-183.
- [84] Muir J. G., Shepherd S. J., Rosella O., Rose R., Barrett J. S and Gibson P. R., Fructan and free fructose content of common Australian vegetables and fruit, *J Agric Food Chem.* **2007**, 55(16), 6619-6627.
- [85] H. Amagase, Significance of garlic and its constituents in cancer and cardiovascular disease. Clarifying the real bioactive constituents of garlic, *J. Nutr.* **2006**, 136, 716-725; Matsuura H., Saponins in Garlic as Modifiers of the Risk of Cardiovascular Disease, *J. Nutr.* **2001**, 131, 1000-1005.
- [86] Unger K. K., Handbuch der HPLC, Teil 1, **1992**, Darmstadt, Deutschland.
- [87] Meyer V. R., Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, Laborbücher Chemie **1999**, 8. Auflage, Otto Salle Verlag, Deutschland.
- [88] Meyer V. R., Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern, **1995**, Heidelberg, Deutschland.
- [89] Keiser R. E. and Oelrich E., Optimierung in der HPLC, **1979**, Heidelberg, Deutschland.
- [90] Belcheva D., Theoretische und experimentelle Studie der Gradienten-Gegenstromchromatographie unter linearen Bedingungen, *Dissertation* **2004**, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, DE.
- [91] Gueorguieva L., Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung auf Adsorptionsgleichgewichte und den Verlauf chromatographischer Trennungen, *Dissertation* **2010**, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, DE.
- [92] P. Jandera and S. Churasek, *Gradient Elution in Liquid Chromatography* **1995**, Elsevier.
- [93] Bitter U., Die Synthese von Referenzsubstanzen für die wirkungsbezogene Analytik von Östrogenen in der Umwelt, *Dissertation* **2001**, München, DE.
- [94] Arterburn J. B., Perry M. C., Nelson S. L., Dible B. R. and Holguin M. S., Rhenium-Catalyzed Oxidation of Thiols and Disulfides with Sulfoxides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119 (39), 9309-9310.

- [95] F. Freeman and Ch. N. Angeletakis, Formation of .alpha.-disulfoxides, sulfinic anhydrides, and sulfines during the m-chloroperoxybenzoic acid oxidation of symmetrical S-alkyl alkanethiosulfinates, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105(12), 4039-4049.
- [96] Brass S. W and Evans S. A. Jr., Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectral properties of alkyl disulfides, thiosulfinates, and thiosulfonates, *J. Org. Chem.* **1980**, 45(4), 710-715.
- [97] Cemla Fabrice, An easy and practical synthesis of symmetrical thiosulfonic S-esters, *Synlett* **1998**, 8, 894-896.
- [98] Болдырев Б. Г. и Захарчук А. Т., Синтезы и свойства некоторых аналогов псевдоаллицина, Доклады Академии Наук СССР **1954**, XCIV (5), 877-879, Boldyrew B. G. et al., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 1954, 94, 877-879; Macke J. D. and Field L., Sulfinic acids and related compounds. 19. Synthesis and properties of 1-propane-, 1-butane-, and 1-pentanesulfinates terminally substituted with di- and trisulfide functions, *J. Org. Chem.* **1988**, 53 (2), 396-402; Kita M., Watanabe M., Takada N., Suenaga K. and Yamada K., Hedathiosulfonic acids A and B, novel thiosulfonic acids from the deep-sea urchin *Echinocardium cordatum*, *Tetrahedron* **2002**, 58, 6405-6412; King J. F. and Harding D. D. K., Organic sulfur mechanisms. 18. The sulfo-Cope rearrangement and other thermal reactions of unsaturated sulfonyl species, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98 (11), 3312-3316.
- [99] Weidner J. P. and Block S. S., Alkyl and aryl thiosulfonates, *Notes* **1964**, 671-673; R. Otto, Synthese von Aethern der Thiosulfonsäuren, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1880**, 13, 1282-1283 (DOI: 10.1002/cber.18800130209/ 2006); Zefirov N. S., Zyk N. V., Beloglazkina E. K. and Kutateladze A. G., Thiosulfonates: Synthesis, Reactions and Practical Applications, *Sulfur Chemistry (Taylor&Francis)* **1993**, 14, 223-240; Smirnov A. I., Ruuge A., Reznikov V. A., Voinov M. A. and Grigor'ev I. A., Site-Directed Electrostatic Measurements with a Thiol-Specific pH-Sensitive Nitroxide: Differentiating Local pK and Polarity Effects by High-Field EPR, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (29), 8872-8873.
- [100] Golovnya R. V., Misharina T. A. and Garbuzov V. G., Gas chromatographic characterization of sulfur-containing compounds. 4. The effect of unsaturated radicals on the retention indices of the vinyl, allyl, and propargyl alkyl sulfides, *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim.* **1978**, 11, 2266-2270, In original 2539-2543.
- [101] Block E., Bayer T., Naganathan S. and Zhao S.-H., Allium Chemistry: Synthesis and Sigmatropic Rearrangements of Alk(en)yl 1-Propenyl Disulfide S-Oxides from Cut Onion and Garlic, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118(12), 2799-2810.

- [102] Brandsma L., Wijers H. E. and Arens J. F., Chemistry of acetylenic ethers, 67: Allenyl thioethers from alkynyl thioethers, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1963**, 82, 1040-1046.
- [103] Saleur D., Bouillion J.-Ph., Portelle Ch., First synthesis of 1,4-bis(acylsilanes), *Tetrahedron Letters* **2000**, 41, 321-324.
- [104] Plantier-Royon R., Portella C., A General Synthesis of β -Hydroxy Acylsilanes, α,β -Unsaturated Acylsilanes, and β -Oxo Acylsilanes. Application to the Synthesis of Sugar Derived Acylsilanes, *Synlett* **1994**, 527-529; Brandsma L., Preparative Polar Organometallic Chemistry 2, **1990**; Brandsma L. and Verkruijsse H. D., Preparative Polar Organometallic Chemistry 1, **1987**.
- [105] Lindler E., von Au G. and Eberle H.-J., Darstellung und Eigenschaften von und Reaktionen mit metallhaltigen Heterocyclen, XI ¹)Darstellung und Eigenschaften von Ethandiyl-, Propandiyl-, Pentandiyl- und Decandiyl-bis(trifluormethansulfonat), *Chem. Ber.* **1981**, 114, 810-813.
- [106] Schinzer D., Sterische Lenkung durch Silylderivate, *Habilitationsschrift* **1985**, Hannover, DE.
- [107] Corey E.J, Seebach D. and Freedman R., Synthesis of α -Silyl Ketones via 1,3-Dithianes, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 434-436.
- [108] Jean-Philippe Bouillon and Charles Portella, Synthesis and Intramolecular Aldol Reactions of 1,6- and 1,7-Bis(acylsilanes), *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1571-1580.
- [109] Roth W. R., Wildt H. and Schlemenat A., Trimethylenemethane Derivatives Stabilized by Conjugation II-Concerted or Nonconcerted Generation?, *Eur. J. Org. Chem.* 2001, 4081-4099.
- [110] Gaunt M. J., Jessiman A. S., Orsini P., Tanner H. R., Hook D. and Ley S. V., Synthesis of the C-1-C-28 ABCD Unit of Spongistatin 1, *Org. Lett.* **2003**, 5 (25), 4819-4822.
- [111] Nicolaou K. C., Ajito K., Patron A. P., Khatuya H., Richter P. K. and Bertinato P., Total Synthesis of Swinholide A., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3059-3060.
- [110] Langille N. F., Dakin L. A. and Panek J. S., A Mild Chemoselective Protocol for the Removal of Thioketals and Thioacetals Mediated by Dess-Martin Periodinane, *Org. Lett.* **2002**, 5 (4), 575-578.
- [112] Nicolaou K. C., Mathison C. J. and Montagnon T., New Reactions of IBX: Oxidation of Nitrogen- and Sulfur-Containing Substrates to Afford Useful Synthetic Intermediates, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 4211-4216.

- [114] La Clair J. J., Lansbury P. T., Zhi B. and Hoogsteen K., A Stereoselective Total Synthesis of (+)-Alliacol A and Congeners of *Marasmius Alliaceus*, *J. Org. Chem.* **1995**, 60(15), 4822-4833.
- [115] Serkos A. Haroutounian, Selenium(IV) Oxid Mediated Cleavage of 1,3-Dithiolanes: A Convenient Method of Dedithioacetalization, *SYNTHESIS* **1995**, 39-40.
- [116] Cklarc Ch. T., Milgram B. C. and Scheidt K. A., Efficient synthesis of acylsilanes using morpholine amides, *Org. Lett.* **2004**, 6(22), 3977-3980.
- [117] Benoit G.-E., Carey J., Chapman A., Chima R., Hussain N., Popkin M. E., Roux G., Tavassoli B., Vaxelaire C., Webb M. R., Whatrup D., Large-Scale Preparation of 2-Methyloxazole-4-carboxaldehyde, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, 12(1), 88-95.
- [118] Ma L., Du D.-M. and Xu J., Rational Tuning Chelate Size of Bis-Oxazoline Ligands to Improve Enantioselectivity in the Asymmetric Aziridination of Chalcones, *J. Org. Chem.* **2005**, 70(24), 10155-10158.
- [119] Masahiro M., Miyamoto Y. and Ito Y., Stereoselective Synthesis of Isomeric Functionalized 1,3-Dienes from Cyclobutenones, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, **123**(26), 6441-6442; D. L. J. Clive, Chengzhi Zhang, Studies on the Degradation of Mevinolin and Compactin: A Formal Route to Semisynthetic Analogs, *J. Org. Chem.* **1995**, **60**(5), 1413-1427; Fleming I., Newton T. W. and Roessler F., The silylcupration of acetylenes: a synthesis of vinylsilanes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1981**, 2527-2532.
- [120] Hama T., Culkin D. A. and Hartwig J. F., Palladium-Catalyzed Intermolecular α -Arylation of Zinc Amide Enolates under Mild Conditions, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128(15), 4976-4985.
- [121] Kim Y. O. and Goff H. M., Synthesis and Reactivity of Silyliron Porphyrin Complexes, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 8706-9707; W. C. Still, Conjugate addition of trimethylsilyllithium. A preparation of 3-silyl ketones, *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 3063-3064.
- [122] Jesberger M., Davis Th. P. and Barner L., Applications of Lawesson's Reagent in Organic and Organometallic Syntheses, *Synthesis* **2003**, 13, 1929-1958.
- [123] Bonini B. F. and Fochi M., Synthesis and Chemistry of Thioacylsilanes, *Advances in Sulfur Chemistry* **2000**, 2, 1-35.
- [124] Ishii A., Nakayama J., Ding M., Kotaka N. and Hoshino M., Sulfurization of nonenolizable diketones, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 2421-2427; Ishii A., Hoshino M. and Nakayama J., Recent advances in chemistry of dithirane and small ring compounds containing two chalcogen atoms, *Pure & Appl. Chem.* **1996**, 68(4), 869-874.
- [125] Takehiko Nishio, Sulfur-Containing Heterocycles Derived by Reaction of ω -Keto Amides with Lawesson's Reagent, *Helv. Chim. Acta* **1998**, 81(5-8), 1207-1214.

- [126] Feldkamp R. F. and Tullar B. F., 3-Methylthiophene, *Organic Syntheses* **1963**, *Coll. Vol.* 4, 671.
- [127] Campaigne E. and Foye W., The Synthesis of 2,5-Diarylthiophenes, *J. Org. Chem.* **1952**, 17(10), 1405-412.
- [128] a) Minetto G., Raveglia L. F., Sega A. and Taddei M., Microwave-Assisted Paal-Knorr Reaction - Three-Step Regiocontrolled Synthesis of Polysubstituted Furans, Pyrroles and Thiophenes, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 5277-5288.
- [129] Degl'Innocenti A., Capperucci A. Castagnoli G. and Malesci I., Hexamethyldisilathiane-Based Thionation of Carbonyl Compounds: A Versatile Approach to Sulfur-Containing Heterocycles, *Synlett* **2005**, 13, 1965-1983.
- [130] Bouillon J.-Ph., Capperucci A., Portelle Ch. and Degl'Innocenti A., Synthesis of new silylated sulfur-containing heterocycles through thionation of bis(acylsilanes), *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 87-90.
- [131] Ricci A., Degl'Innocenti A., Capperucci A. and Reginato G., Cobalt(II) chloride-promoted thionation of carbonyl compounds: a simple access to silyl thio ketones and thio aldehydes, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 19-20;
- [132] Black D. St. C. and Ooi K. L., Nitrones and Oxaziridines. XXXVI. Synthesis of Cyclic Thiohydroxamic Acids, *Aust. J. Chem.* **1988**, 41, 37-47.
- [133] Myers M. C., Pokorski J. K. and Appella D. H., Peptide Nucleic Acids with a Flexible Secondary Amine in the Backbone Maintain Oligonucleotide Binding Affinity, *Org. Lett.* **2004**, 6(25), 4699-4702.
- [134] Sharp M. J., Heathcock C. H., An unusual isomerization under Lawesson thiation conditions, *Tetrahedron Letters* **1994**, 35(22), 3651-3652.
- [135] K. Stelious and M. Mrani, Tin-assisted sulfuration: a highly potent new method for the conversion of carbonyl units into their corresponding thiocarbonyl analogues, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 3104-3106.
- [136] Iberl B., Winkler G. and Knobloch K., *Planta Med.* **1990**, 56, 202-211.
- [137] Chromatotron™79243 Harrison Research, *Operation manuel*, T-Squared Technology Inc., California, USA.

Anhang

Die immunmodulatorische Potenz von Dimethylthiosulfonat 50

Das Dimethylthiosulfonat **50** wurde in den unter Kapitel 4.3 beschriebenen Methoden eingesetzt. In dem Proliferationsgrad-Testsystem zeigte **50** keine toxischen Effekte (Abbildung 1). Seine signifikante Reduktion der allergischen Reaktion bei Insektenstichen konnte durch den Basophilen-Aktivierungsgrad-Testsystem bewiesen werden (Signifikanz $p < 0.05$) (Abbildung 2). Das Thiosulfonat hemmte signifikant die Histaminausschüttung in dem Histaminrelease-Testsystem (Signifikanz $p < 0.01$) (Abbildung 3).

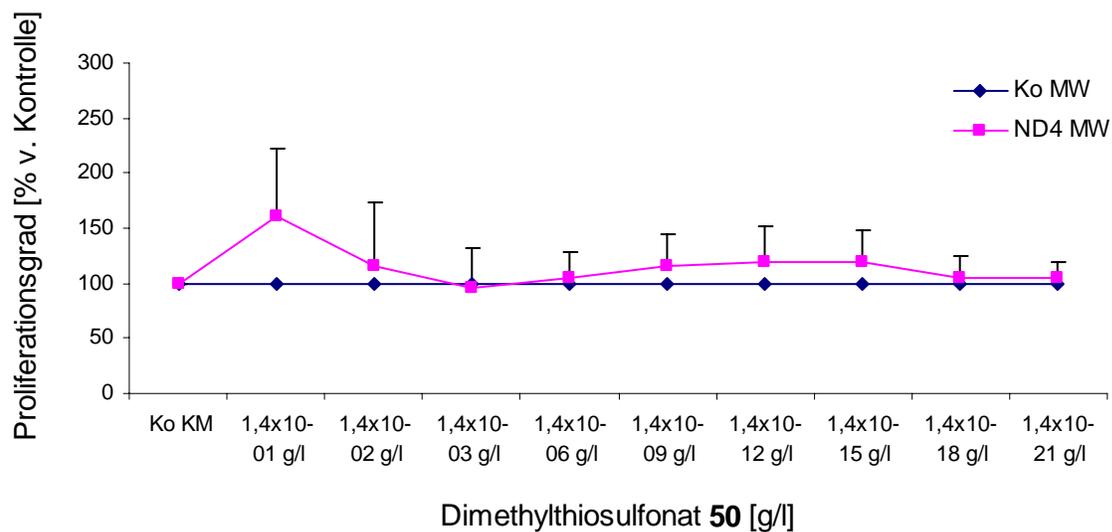


Abbildung 1: Proliferationsgrad nach 24 Stunden nach Inkubation mit Dimethylthiosulfonat **50** (ND4).

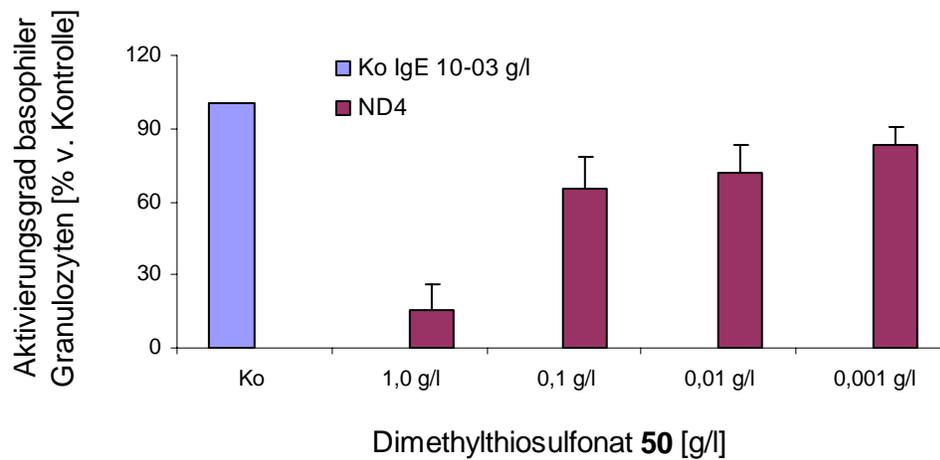


Abbildung 2: Beeinflussung der Histaminausschüttung nach Stimulation mit 10^{-3} g/l IgE und Zugabe von Dimethylthiosulfonat 50 (ND4).




Abbildung 3: Beeinflussung des Aktivierungsgrades basophiler Granulozyten nach Stimulation mit 10^{-3} g/l IgE und Zugabe von Dimethylthiosulfonat 50 (ND4).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nadya Radeva Dimitrova
Geburtsdatum: 12.03.1975
Geburtsort: Sliven, Bulgarien
Staatsangehörigkeit: bulgarisch

Ausbildung

09/1982-06/1989 Gesamtschule "Cyril and Methodius" in Kamen, Bulgarien
09/1989-06/1993 Abiturabschluss am *Natur-Mathematischen Gymnasium "Dobri Tschintulov"* in Sliven, Bulgarien
10/1994-10/2000 Studium an der *Sofioter Universität "Der Heilige Kliment Ohridski"*, Bulgarien
10/1999-02/2000 Diplomarbeit am Department für Astronomie der Fakultät Physik, Thema: „Fundamentale Parameter der klassischen Cepheiden in den Sternmengen NGC 1866 und NGC 2157 in der großen Magellanwolke“, Sofia
03/2000-07/2000 Diplomarbeit an der Fakultät Chemie, Thema: Ausarbeitung vom Lehrinhalt des Themas "Aromatische Verbindungen", Sofia
11/2000 Abschluss als Magister für Chemie und Physik, Lehrer für die Fächerkombination Chemie und Physik
02/2002-07/2002 Praktikum am Lehrstuhl für Organische Chemie der *Otto-von-Guericke-Universität-Magdeburg* unter der Leitung von Prof. Dr. D. Schinzer
03/2003-04/2008 Promotionsstudium am Lehrstuhl für Organische Chemie der *Otto-von-Guericke-Universität-Magdeburg* unter der Leitung von Prof. Dr. D. Schinzer

05/2008-06/2008 Stipendiatin des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD), Abschlussbeihilfe für internationale Doktoranden, Anfertigung des Zusammenschreibens der Doktorarbeit

Berufserfahrung

11/2000-01/2002 Technische Mitarbeiterin, *Sales Support Management and Service*, REAL-SALDJI Ltd. Sofia, Bulgarien

08/2002-02/2003 Wissenschaftliche Arbeit am Institut für Klinische Pharmakologie an der *Otto-von-Guericke-Universität-Magdeburg* unter der Leitung von Prof. Dr. D. Schinzer, Thema: "Synthese von Wirkstoffen und Metaboliten"

08/2009-heute Project Manager "Product Safety"; Bewertung von Industriechemikalien nach der europäischen REACH-Verordnung, Einstufung und Kennzeichnung von Mischungen nach GHS UN, Erstellung von Sicherheitsdatenblätter, Knoell Group, Mannheim

Poster Presentation

Untersuchungen zur Charakterisierung ausgewählter pflanzlicher Inhaltsstoffe aus Pflanzen der Gattung *Allium*.

Schinzer D., Dimitrova N., *50 Jahre verfahrenstechnische Forschung und Lehre in Magdeburg*, Magdeburg, Oktober **2006**.