

Analyse und Synthese
von quorum-sensing aktiven
N-Acylhomoserinlactonen

DIPLOMARBEIT

vorgelegt von

Andreas Hennig

aus Salzgitter

Technische Universität Braunschweig

Fachbereich für Chemie und Pharmazie

Februar 2004

Referent: Prof. Stefan Schulz

Korreferent: Prof. Monika Mazik

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2003 bis Februar 2004 am Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Braunschweig angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Stefan Schulz danke ich für die Überlassung des Themas, für die freundliche Unterstützung und zahlreiche Anregungen.

Frau Prof. Monika Mazik danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Dr. Uli Papke danke ich für Hilfe bei den massenspektrometrischen Untersuchungen und die Messung der ESI-Spektren, sowie für zahlreiche fruchtbare Diskussionen. Dr. Till Beuerle danke ich für die Messungen der NCI-Spektren.

Meinen Kolleginnen und Kollegen Elena Barcari, Gregor Brasse, Katalin Böröczky, Jeroen Dickschat, Nico Klewer, Birte Körner, Karsten Krückert, Jasmin Müller, Edyta Nagrodzka, Stephan Goller, Andreas Schmidt und Selma Yildizhan danke ich für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und für die freundschaftliche Aufnahme in den Arbeitskreis.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mein Studium durch finanzielle und persönliche Unterstützung erst möglich gemacht haben.

Weiterhin danke ich der Studienstiftung des deutschen Volkes für die Förderung während des Hauptstudiums, die meinen Horizont sehr erweitert hat.

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	4
2	EINLEITUNG	7
3	ZIELSETZUNG	11
4	THEORETISCHE BETRACHTUNGEN ZUR MASSENSPEKTROMETRIE	12
4.1	Aufbau eines Massenspektrometers	12
4.2	Ionenquellen	13
4.2.1	Elektronenstoß-Ionisierung (EI)	13
4.2.2	Negativ-Ionen Chemische Ionisierung (NICI)	14
4.2.3	Elektrospray-Ionisierung (ESI)	15
4.3	Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS-Techniken)	16
4.3.1	Produktionen-Analyse	16
4.3.2	Vorläuferionen-Analyse	16
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	18
5.1	Synthese von <i>N</i>-Acylhomoserinlactonen	18
5.2	Synthese von <i>N</i>-(3-Hydroxydecanoyl)-homoserinlacton	20
5.3	Analyse von <i>N</i>-Acylhomoserinlactonen	24
5.3.1	HPLC-Analyse	24
5.3.2	ESI-MS, Tandem-MS und LC/MS-Analyse	26
5.4	Derivatisierung von <i>N</i>-Acylhomoserinlactonen	29
5.4.1	Derivatisierung durch Lactonolyse	29
5.4.2	Reduktion der <i>N</i> -Acylhomoserinlactone mit Lithiumborhydrid	31

5.4.3	Deuterium-markierte, reduzierte AHLs	34
5.4.4	Heptafluorbuttersäurederivate für NICI-Massenspektrometrie	39
5.4.5	Derivatisierung mit Orthoameisensäuretrimethylester	41
5.5	EI-Fragmentierungsschema	45
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	48
7	EXPERIMENTELLER TEIL	49
7.1	Materialien und Methoden	49
7.2	Synthese von <i>N</i>-(3-Hydroxydecanoyl)-homoserinlacton	52
7.2.1	3-Oxodecansäureethylester	52
7.2.2	Herstellung des Ru(<i>S</i>)-BINAP)-Katalysators	53
7.2.3	(<i>R</i>)-3-Hydroxydecan säuremethylester	53
7.2.4	(<i>S</i>)-3-Hydroxydecan säuremethylester	54
7.2.5	(<i>R</i>)-3-Hydroxydecan säure	55
7.2.6	(<i>S</i>)-3-Hydroxydecan säure	55
7.2.7	rac. 3-Hydroxydecan säureethylester	56
7.2.8	rac. 3-Hydroxydecan säuremethylester	57
7.2.9	rac. 3-Hydroxydecan säure	57
7.2.10	<i>N</i> -((<i>S</i>)-3-Hydroxydecanoyl)-L-homoserinlacton	58
7.3	Derivatisierung für chirale GC	60
7.4	Derivatisierung von <i>N</i>-(Acyl)-homoserinlactonen	61
7.4.1	Basenkatalysierte Darstellung der γ -Hydroxymethylester	61
7.4.2	Säurekatalysierte Darstellung der γ -Hydroxymethylester	61
7.4.3	Reduktion mit Lithiumborhydrid	62
7.4.4	Darstellung von Lithiumbordeuterid	63
7.4.5	Reduktion mit Lithiumbordeuterid	63
7.4.6	Reduktion mit Natriumbordeuterid und Lithiumsalz	64
7.4.7	Reduktion mit LiBH ₄ und NaBD ₄ 1:1	64
7.4.8	Reduktion mit Hojos Reagenz	64

7.4.9	Darstellung der Anthracenoyl-Derivate	65
7.4.10	Darstellung der Heptafluorbuttersäure-Derivate	66
7.4.11	Reaktion mit TMSH	67
7.4.12	Derivatisierung mit Orthoameisensäuretrimethylester	67
7.4.13	Derivatisierung mit Orthoameisensäuretrimethylester (H9:D9 1:1)	68
7.4.14	Darstellung von γ -Methoxybutansäuremethylester-Derivaten mit Deutero-Ester-Markierung	69
7.4.15	Darstellung von γ -Methoxybutansäuremethylester-Derivaten mit Deutero-Ether-Markierung	69
8	ANHANG	71
8.1	Abkürzungen	71
8.2	Massenspektren	72
9	LITERATUR	97

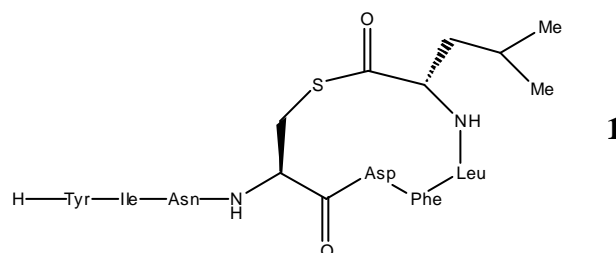
2 Einleitung

Die Kommunikation mit Hilfe von chemischen Botenstoffen ist in der belebten Welt ein allgegenwärtiges Phänomen. Ein System der chemischen Kommunikation ist das „quorum sensing“, das bei Bakterien beobachtet werden kann und von besonderem Stellenwert ist. Dieser Kommunikationsprozess ist abhängig von der Zelldichte: Unter der Annahme, dass die Konzentration der Signalmoleküle ein Maß für die Zelldichte repräsentiert, wird der Kommunikationsprozess erst wirksam, wenn die Konzentration der Botenstoffe einen bestimmten Schwellenwert übersteigt. Die Bezeichnung „quorum sensing“ wurde in Anlehnung an die römische Rechtsprechung gewählt, in welcher der Begriff „quorum“ die Mindestanzahl an Teilnehmern einer Versammlung darstellt, um beschlussfähig zu sein.

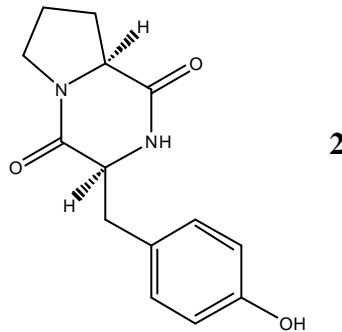
Die Signalmoleküle, die beim „quorum sensing“ als Autoinduktoren („autoinducers“) bezeichnet werden, werden auch bei einer geringen Zelldichte ausgeschieden. Aber erst beim Erreichen einer genügend hohen Konzentration kann das Signalmolekül an einen dafür vorgesehenen Rezeptor innerhalb der Zelle effektiv binden. Dadurch wird ein Regulationsprozess ausgelöst, der zur Expression spezifischer Gene führt. Dabei ist der Kommunikationsprozess nicht auf diejenige Art beschränkt, die Signalmoleküle aussendet sondern kann auch artübergreifend sein, sowohl unter Mikroorganismen, als auch zwischen Mikroorganismus und Pflanzen- oder Tierzellen.

Zu den vielfältigen Funktionen der exprimierten Gene zählen unter anderem die Bildung von Biofilmen, Konjugation und Transformation, Synthese von Pathogenen und Antibiotika oder die Biolumineszenz.¹

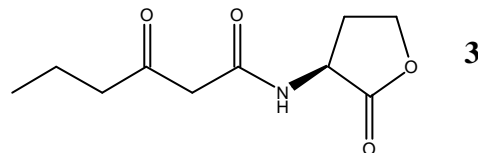
Von ihrer Struktur her sind die Signalmoleküle von verschiedener Art. Post-translational modifizierte Oligopeptide stellen die verbreitetste Strukturklasse unter den grampositiven Bakterien dar. Ein Beispiel dafür ist das cyclische Thiolacton (**1**), das die Virulenz in *Staphylococcus aureus* auslöst.



Eine weitere Strukturklasse sind die Diketopiperazine, die aus zwei Aminosäuren aufgebaut sind und sowohl in grampositiven, als auch in gramnegativen Bakterien zu finden sind. Cyclo(L-Pro-L-Tyr) (**2**) wird von *Pseudomonas aeruginosa* produziert und spielt eine Rolle im von *N*-Acylhomoserinlactonen abhängigen „quorum sensing“. Ihre genaue physiologische Bedeutung ist jedoch weiterhin ungeklärt.²



Die am besten untersuchte Strukturklasse stellen die *N*-Acylhomoserinlactone (AHLs) dar. Diese Klasse scheint auf gramnegative Bakterien beschränkt zu sein, obwohl strukturell verwandte γ -Butyrolactone in grampositiven Bakterien, wie z. B. in *Streptomyces* gefunden wurden. Als erstes AHL wurde *N*-(3-Oxohexanoyl)-L-homoserinlacton (**3**) im Zusammenhang mit der Biolumineszenz von *Vibrio fischeri* entdeckt.³

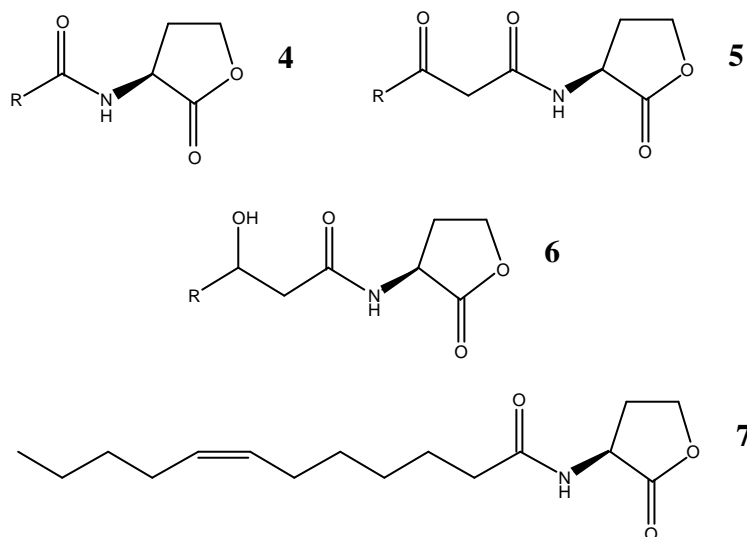


Bei *V. fischeri* handelt es sich um ein marines Bakterium, das entweder freilebend oder in Symbiose mit lumineszierenden Fischen und Tintenfischen vorkommt. Dabei bevölkert das Bakterium spezielle Organe in den Organismen, in denen es dann die Biolumineszenz erzeugt. Im Gegensatz dazu ist in der freilebenden Form keine Lumineszenz zu beobachten. Dies macht für das Bakterium - evolutionär gesehen - Sinn, da die Erzeugung von Lumineszenz ein energieintensiver Prozess ist, der somit einer Regulierung bedarf.⁴

Alle AHLs bestehen aus einem Homoserinlacton, das am Stickstoff mit Metaboliten des Fettsäurestoffwechsels acyliert wurde (**4**). Dabei wird im Allgemeinen von einer

L-Konfiguration des Homoserinlactons ausgegangen, da diese die natürliche ist und bis jetzt bei allen Untersuchungen bestätigt werden konnte.³

Die Seitenkette kann von verschiedener Länge sein und diverse Funktionalitäten aufweisen. Neben einer Funktionalisierung der 3-Position der Seitenkette mit einer Carbonyl- (**5**) oder Hydroxy-Gruppe (**6**), können auch ungesättigte Derivate, insbesondere mit Z-Konfiguration, auftreten (**7**). Die Länge der Seitenkette variiert dabei meist zwischen vier und vierzehn Kohlenstoffatomen, wobei nur Derivate mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen gefunden werden. Erst kürzlich wurden Derivate mit mehr als vierzehn Kohlenstoffatomen identifiziert. In einem Extrakt von *Sinorhizobium meliloti* konnten die bisher unbekanntenen Verbindungen *N*-(3-oxotetradecanoyl)-homoserinlacton, *N*-(3-Oxohehexadecanoyl)-homoserinlacton, *N*-(Hexadecanoyl)-homoserinlacton und *N*-(3-Octadecanoyl)-homoserinlacton dieser Naturstoffklasse massenspektrometrisch nachgewiesen werden.⁵



Alternativ zur IUPAC-Nomenklatur dieser Verbindungsklasse, in der die Amidbindung als elementare Funktion beschrieben wird, haben sich verschiedene Systeme in der Literatur durchgesetzt, von denen nur das in dieser Diplomarbeit verwendete vorgestellt werden soll. Basierend auf der Struktur der Seitenkette werden dabei Abkürzungen verwendet. Die Anzahl der Kohlenstoffatome der Seitenkette wird mit der Abkürzung für Homoserinlacton (HSL) kombiniert, wie z. B. C4-HSL für *N*-(Butyryl)-homoserinlacton. Treten zusätzliche Funktionalitäten auf, wird die Position der funktionellen Gruppe, sowie eine Bezeichnung für die funktionelle Gruppe der Abkürzung vorangestellt. Damit ergibt sich z. B. 3-OH-C12-HSL

für *N*-(3-Hydroxydodecanoyl)-homoserinlacton oder 3-O-C6-HSL für *N*-(3-Oxohexanoyl)-homoserinlacton als Kurzbezeichnung. Bei einer ungesättigten Seitenkette wird in der Literatur für gewöhnlich ein anderes System zur Beschreibung verwendet.

Als Bezeichnung für die gesamte Strukturklasse wird *N*-Acylhomoserinlactone (AHL) verwendet. Für bestimmte Vertreter der Strukturklasse wird die Bezeichnung für die Seitenkette in Klammern gesetzt, wie z. B. *N*-(Acyl)-homoserinlacton für AHLs mit underivatisierter Seitenkette.

3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden zwei zusammenhängende Themen bearbeitet.

Es sollte eine stereoselektive Synthese beider Diastereomere von *N*-(3-Hydroxydecanoyl)-L-homoserinlacton durchgeführt werden. Dieser Naturstoff wurde in einem Extrakt eines Stamms der Art *Roseobacter* vermutet. Biotests mit beiden Diastereomeren sollten zur Bestätigung der vorgeschlagenen Struktur, sowie zur Ermittlung der absoluten Konfiguration führen.

Weil die analytischen Möglichkeiten für diese Naturstoffklasse bisher aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften begrenzt sind, sollte ein neues Analyseverfahren für AHLs entwickelt werden. Mit Hilfe der Gaschromatographie können diese Naturstoffe nicht mit ausreichender Empfindlichkeit nachgewiesen werden, da wegen des Vorhandenseins der Amidbindung Substanzverluste im Injektor und in der Säule auftreten können. Weiterhin zeigen AHLs eine starke Peakverbreiterung sowie uncharakteristische Fragmentierungsmuster in der GC-MS-Analyse, was zu Problemen mit der Interferenz anderer Bestandteile von Naturstoffproben, und damit zu Schwierigkeiten bezüglich der Strukturaufklärung führen kann. Bei der Kopplung HPLC mit massenspektrometrischer Detektion sind die Probleme ähnlich. Man kann zwar davon ausgehen, dass in der HPLC kein Substanzverlust auftritt, doch findet man auch hier eine starke Peakverbreiterung, die auf ein dynamisches Gleichgewicht zwischen geschlossenem Lactonring und der durch Lactonolyse mit dem eingesetzten Wasser entstandenen Säure zurückzuführen ist. Weiterhin liefert die kollisionsinduzierte Fragmentierung keine Fragmentierungsmuster, die eine direkte Strukturaufklärung ermöglichen.

Zur Umgehung dieser Probleme sollten neue Mikroderivatisierungsreagenzien entwickelt werden, die zu Derivaten mit verbesserten chromatographischen und massenspektrometrischen Eigenschaften führen.

4 Theoretische Betrachtungen zur Massenspektrometrie

4.1 Aufbau eines Massenspektrometers

Ein Massenspektrometer besteht im wesentlichen aus den Einheiten Probeneinlasssystem, Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor. Abschließend steht ein System zur Verarbeitung der erhaltenen Daten.

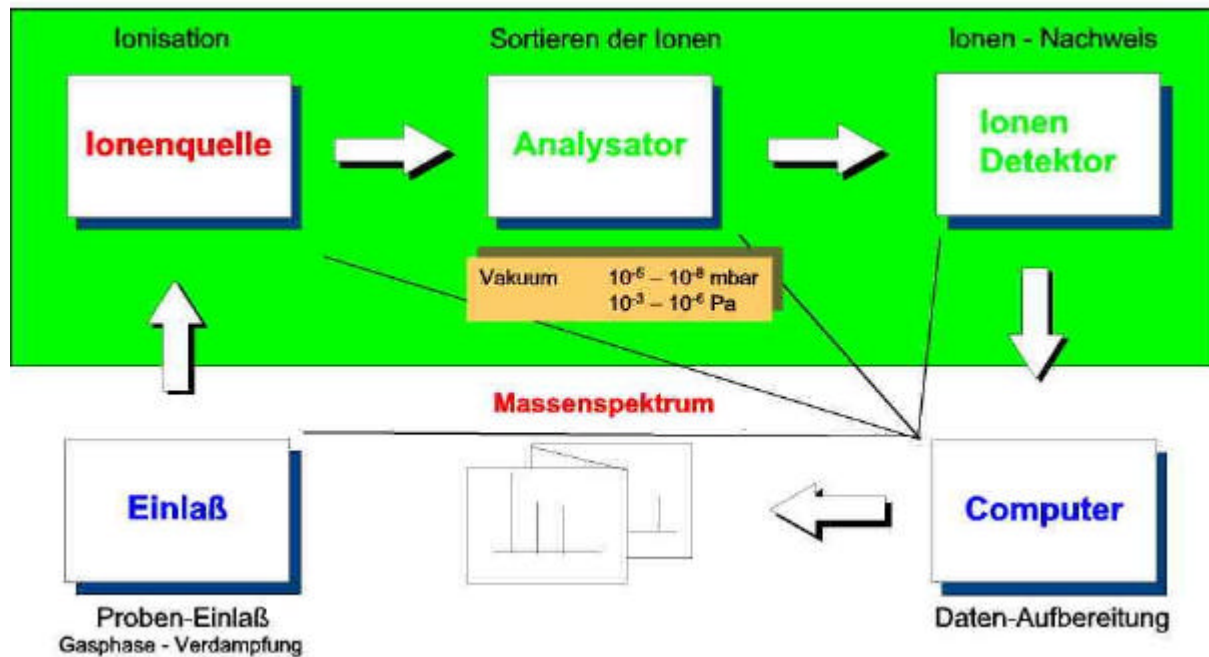


Abbildung 4-1: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers

Als Probeneinlasssysteme findet zum einen der Direkteinlass mit Hilfe einer Schubstange für feste oder einer Mikroliterspritze für flüssige Proben Verwendung. Zum anderen ergibt sich aus der Kopplung Chromatographie-Massenspektrometrie ein sehr selektives Analyseverfahren. Dabei trägt das chromatographische Verhalten gemeinsam mit den erhaltenen Massenspektren zur Identifizierung einer Substanz bei. Mit Hilfe der Kopplung kann man das Massenspektrometer als Chromatographiedetektor oder aber die Chromatographie als Einlasssystem des Massenspektrometers betrachten.

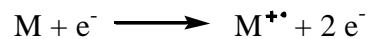
Für einen Gaschromatographen als Einlasssystem ist die Kopplung mit einer EI- sowie mit einer CI-Ionenquelle, für eine HPLC als Einlasssystem ist die Kopplung mit einer ESI-Ionenquelle gebräuchlich. Als Massenanalysatoren können bei allen Ionenquellen sowohl Sektorfeld- als auch Quadrupolgeräte verwendet werden.

4.2 Ionenquellen

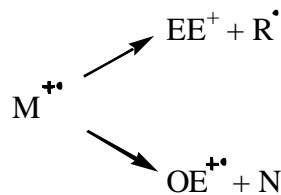
4.2.1 Elektronenstoß-Ionisierung (EI)

Die Elektronenstoß-Ionisierung ist in zweifacher Hinsicht eine harte Ionisierungsmethode. Zum einen müssen die Probenmoleküle gasförmig vorliegen, wobei sich beim Übergang in die gasförmige Phase thermisch instabile Moleküle zersetzen können. Zum anderen werden die Moleküle durch Beschuss mit energiereichen 70-eV-Elektronen ionisiert.

Bei der Elektronenstoß-Ionisierung ist die Energie der Elektronen so groß, dass nur mit geringer Wahrscheinlichkeit eine Anlagerung von Elektronen, und damit die Bildung negativ geladener Ionen, stattfindet. Vielmehr reicht die Energie aus, um aus den Molekülen ein Elektron herauszuschlagen, so dass ein Radikalkation des Moleküls verbleibt.



Durch den sehr niedrigen Druck von 10^{-5} Torr in der Ionenquelle können die entstandenen Ionen keine Energie mehr über thermische Stöße abgeben. Dadurch findet eine schnelle Umwandlung der elektronischen Energie in Schwingungsenergie statt, und das Molekülion zerfällt, wobei im Massenspektrum für jede Substanz ein charakteristisches Fragmentierungsmuster entsteht. Bei dem Zerfall kann durch Abspaltung eines neutralen Radikals ein Kation mit gerader Elektronenzahl (EE: even electron) oder durch Abspaltung eines neutralen Moleküls ein weiteres Radikalkation mit ungerader Elektronenzahl (OE: odd electron) entstehen.



Für diese Primärzerfälle eines Radikalkations sind die Fragmentierungsreaktionen gut charakterisiert und die Fragmente des Massenspektrums lassen Rückschlüsse auf Strukturelemente des Probenmoleküls zu. Für Produkte dieser Primärzerfälle mit ungerader Elektronenzahl sind weiterhin Zerfallsmechanismen für die Sekundärfragmentierung bekannt.

4.2.2 Negativ-Ionen Chemische Ionisierung (NICI)

Die chemische Ionisierung ist eine sanftere Ionisierungsmethode als die Elektronenstoß-Ionisierung. Dennoch verbleibt die Notwendigkeit die Probenmoleküle in die gasförmige Phase zu überführen, wobei sich labile Moleküle zersetzen können.

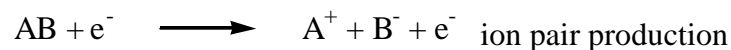
Die chemische Ionisierung ist sanfter, weil in die Ionenquelle ein Reaktantgas eingeleitet wird. Durch dieses Gas ist der Druck in der Ionenquelle mit 0.2-2 Torr höher als bei Elektronenstoß-Ionisierung. Daher bilden sich aus den mit 150 eV eingestrahlenen Elektronen durch Stöße mit dem Reaktantgas Elektronen thermischer Energie mit wenigen eV. Diese können sich an Probenmoleküle anlagern und unter Bildung eines Radikalanions ionisieren (resonance capture ionization).



Weiterhin kann der Ionisierung ein sehr schnell ablaufender dissoziativer Prozess folgen. Für den dissoziativen Prozess sind zwar Ionen geringfügig höherer Energie notwendig, dennoch verläuft dieser Prozess parallel zu dem assoziativen Elektroneneinfang.



Bei noch höheren Energien der Elektronen (ab etwa 15 eV) findet ein dritter, unerwünschter Prozess statt, bei dem das Probenmolekül in ein Ionenpaar zerfällt.



Der assoziative Anlagerungsprozess ist besonders effektiv für Gruppierungen mit hoher Elektronegativität. Daher werden z.B. Perfluor-Derivate bevorzugt eingesetzt. Bei Bevorzugung des dissoziativen Prozesses wird bei Perfluor-Derivaten häufig die Abspaltung des Derivatisierungsreagenz beobachtet und man erhält im Spektrum das Molekülanion des underivatisierten Moleküls.

Durch den sanften Ionisierungsprozess und die Möglichkeit der Probenmoleküle überschüssige Energie durch Stöße mit dem Reaktantgas abzugeben sind normalerweise im NICI-Spektrum eine wesentlich geringere Anzahl an Fragmenten als in vergleichbaren EI-Spektren zu sehen.

Die Kombination von Perfluor-Derivaten mit NICI ist gut für die Analyse komplexer Gemische geeignet, da die Derivatisierung nur Moleküle mit den zu derivatisierenden funktionellen Gruppen erfasst und anschließend nur die derivatisierten Komponenten effektiv

ionisiert werden können. Zusätzlich wird durch die geringe Anzahl von Fragmenten die Möglichkeit der Interferenz von MS-Signalen minimiert.

Bei der Suche nach einem Molekül, dessen Masse bekannt ist, kann durch einen SIM(selected ion monitoring)-Scan eine weitere Steigerung der Selektivität und Empfindlichkeit erreicht werden.

Ein Nachteil gegenüber der Elektronenstoß-Ionisierung besteht in dem Verlust von Strukturinformationen in den erhaltenen Spektren. Daher werden häufig zusätzliche tandem-massenspektrometrische Studien eingesetzt.

4.2.3 Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Die Elektrospray-Ionisierung ist die sanfteste der vorgestellten Ionisierungsarten, weil die Probenmoleküle direkt durch Versprühen einer flüssigen Phase in einem starken elektrischen Feld ionisiert werden.

Dabei tritt die zu analysierende Lösung aus einer Kapillare aus, die gleichzeitig als Elektrode dient. Wenige Millimeter davon entfernt befindet sich eine Gegenelektrode. Durch Anlegen eines starken positiven oder negativen elektrischen Feldes von typischerweise 3-6 kV werden die aus der Kapillare austretenden Flüssigkeitströpfchen fein vernebelt, da sie sich durch die Induzierung einer Ladung früher von der Kapillare lösen, als es durch ihre Oberflächenspannung gegeben wäre. Durch Erhitzen oder durch Anlegen eines koaxial geführten Gasstroms werden die Lösungsmittelmoleküle aus den Flüssigkeitstropfen verdampft. Damit steht der Ladung der Flüssigkeitstropfen immer weniger Raum zur Verfügung. Sobald die Coulomb-Abstoßungskräfte die Kohäsionskräfte der verbleibenden Lösungsmittelmoleküle übersteigen wird der Tropfen auseinanderfallen. Durch eine ständige Wiederholung dieses Prozesses auf dem Weg zur Gegenelektrode entstehen schließlich unsolvatisierte, geladene Probenmoleküle.

Im Zentrum der Gegenelektrode befindet sich eine Öffnung zum Massenanalysator. Hierbei ist die Kopplung von Ionenquelle und Massenanalysator mit besonderen Schwierigkeiten verbunden. Während bei der Kopplung von chemischer Ionisierung mit dem Massenanalysator eine Druckdifferenz von 5 Größeneinheiten aufrechterhalten werden muss, herrscht bei der Elektrospray-Ionisierung Atmosphärendruck in der Ionenquelle. Damit muss ständig eine Druckdifferenz von 8 Größeneinheiten aufrechterhalten werden.

Bei der Analyse mit ESI-MS wird in der Regel keine Fragmentierung beobachtet. Neben den charakteristischen einfach protonierten Molekülionen werden häufig mehrfach protonierte

Spezies oder Alkalimetalladdukte (insbesondere Natrium) beobachtet. Hinzu kommt, abhängig von den Eigenschaften des Lösungsmittels sowie der Analytmoleküle, das Auftreten von Clusterionen. Auch hier können wie bei der chemischen Ionisation zusätzliche MS/MS-Studien Strukturinformationen liefern.

4.3 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS-Techniken)

Tandem-Massenspektrometrie ist eine Technik, in der mindestens zwei Massenanalytoren hintereinander eingesetzt werden. Zwischen den beiden Analysen kann eine chemische Reaktion oder eine Dissoziation stattfinden.

4.3.1 Produktionen-Analyse

In der Produktionen-Analyse wird mit Hilfe eines ersten Massenanalytators ein Vorläuferion einer bestimmten Masse separiert, das dann entweder spontan oder kollisionsinduziert weitere Fragmentierungsreaktionen eingeht. Ein zweiter Massenanalytator dient darauffolgend zur Bestimmung der aus dem Vorläuferion erhaltenen Fragmente, in dem er im Scanmodus einen bestimmten Bereich überstreicht

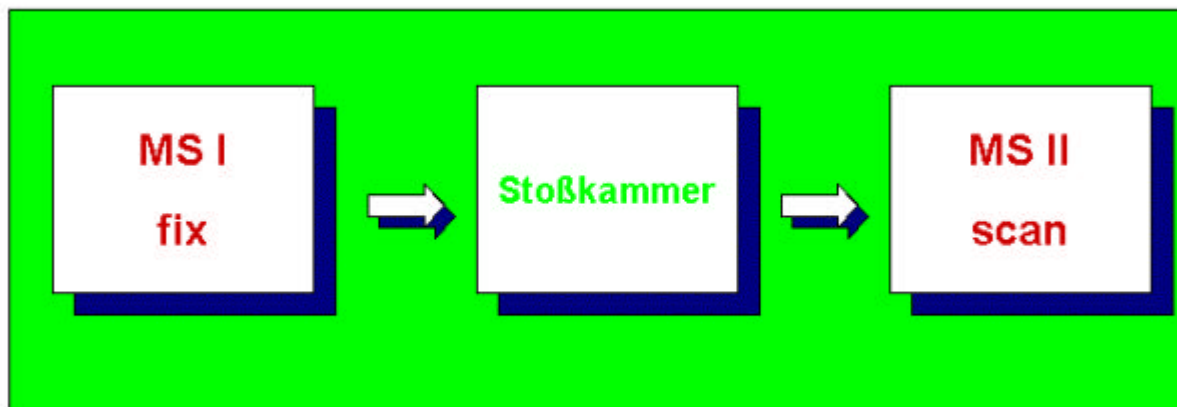


Abbildung 4-2: Produktionen-Analyse in der MS/MS-Kopplung

4.3.2 Vorläuferionen-Analyse

Werden die beiden Massenanalytoren umgekehrt betrieben, kann man eine Produktionen-Analyse durchführen. Während der erste Massenanalytator einen vorgewählten Massenbereich überstreicht, werden nachfolgend alle Ionen in die Stoßkammer transferiert. Der zweite Massenanalytator ist fest auf eine bestimmte Masse eingestellt, deren Vorläufer bestimmt werden sollen. Er detektiert somit nur dann, wenn Ionen vom ersten

Massenanalysator in die Stoßkammer transferiert wurden, aus denen sich das Produktion bildet.

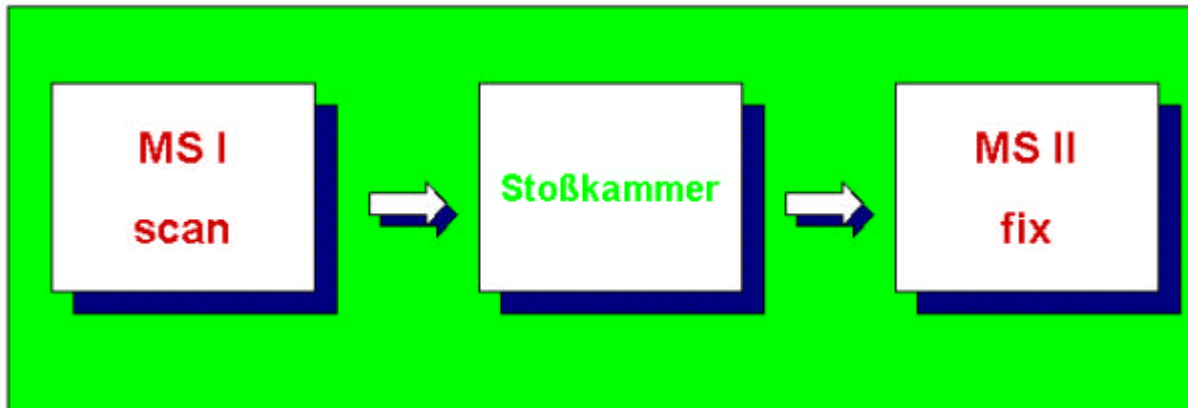


Abbildung 4-3: Vorläuferionen-Analyse in der MS/MS-Kopplung

Experimente wie die Vorläuferionen- und die Produktionen-Analyse, werden allgemein auch als MS-MS-Experimente bezeichnet. Bei diesem experimentellen Aufbau können letztendlich auch weitere Massenanalysatoren hinzugeschaltet werden. Bei drei Massenanalysatoren ergeben sich dann MS-MS-MS-Experimente oder kurz MS³-Experimente.

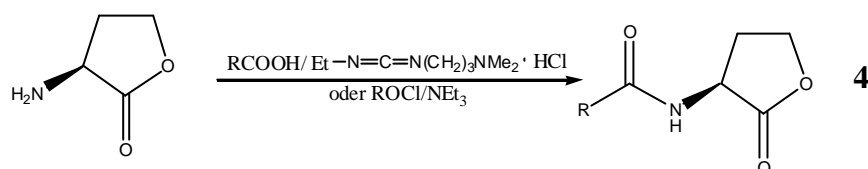
Solche tandem-massenspektrometrischen Methoden können in vielerlei Hinsicht Verwendung finden. In der Analyse komplexer Gemische ergibt sich, trotz des Verlustes an Signalintensität mit jeder weiteren Kopplung, ein Vorteil durch die Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses, wenn mit einer weichen Ionisierungsmethode, wie z. B. ESI, ionisiert wird und anschließend Moleküle nach ihrem Molekulargewicht selektiert werden können. Weiterhin können Zerfallsmechanismen, sowie Ionen-Molekülreaktionen in der Gasphase studiert werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Synthese von N-Acylhomoserinlactonen

Für die Darstellung von AHLs sind je nach der erwünschten Funktionalität der Seitenkette verschiedene Methoden etabliert.

Für die Synthese von *N*-(Acyl)-homoserinlactonen **4** verwendet man die kommerziell erhältlichen Carbonsäurechloride mit der gewünschten Länge der Seitenkette. Diese können mit kommerziell erhältlichem L-Homoserinlacton in Gegenwart von Triethylamin umgesetzt werden. Alternativ können die entsprechenden Carbonsäuren mit (3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) aktiviert und mit Homoserinlacton in einem Wasser/1,4-Dioxan 1:1-Gemisch umgesetzt werden.



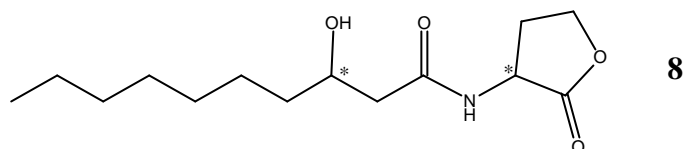
N-(3-Oxoacyl)-homoserinlactone können durch die Umsetzung einer 3-Oxosäure mit Homoserinlacton auf die gleiche Art und Weise hergestellt werden. Aufgrund der thermischen Labilität der 3-Oxosäuren werden diese aber erst nach Schützen der Ketogruppe als Ketal aus dem entsprechenden Ester hergestellt.³ Der Einsatz einer Schutzgruppe kann jedoch unter Verwendung von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) umgangen werden, was den synthetischen Aufwand reduziert.⁶

Üblicherweise wurden die 3-Oxosäureester für die Synthese von *N*-(3-Oxoacyl)-homoserinlactonen durch aldolartige Reaktionen mit Malonsäurederivaten und anschließender Decarboxylierung dargestellt. Weiterhin ist die Kondensation von 2-Ketonen mit Ethylchloroformat beschrieben

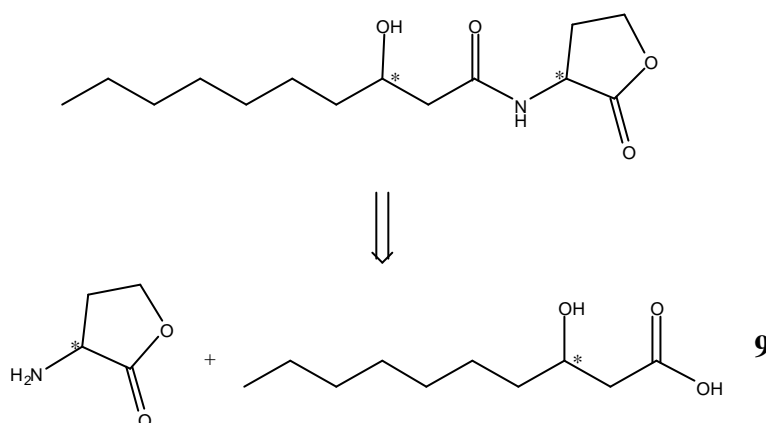
Für die Synthese von *N*-(3-Hydroxyacyl)-homoserinlactonen wurden zwei unterschiedliche Strategien verwendet. Zum einen kann eine 3-Hydroxysäure mit Homoserinlacton in Gegenwart von EDC in Wasser umgesetzt werden⁷, zum anderen kann ein *N*-(3-Oxoacyl)-homoserinlacton mit Natriumcyanoborhydrid zum Diastereomergemisch beider *N*-(3-Hydroxyacyl)-homoserinlactone reduziert werden.^{8,9} Wenn die entsprechenden

3-Hydroxycarbonsäuren kommerziell nicht erhältlich waren, wurden sie mit Hilfe der Reformatsky-Reaktion dargestellt.¹⁰

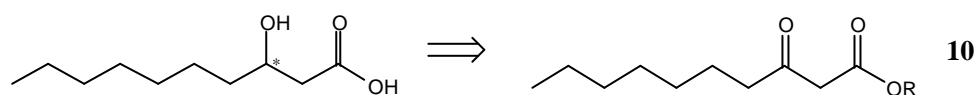
Im Rahmen dieser Diplomarbeit wird die erste stereoselektive Synthese von 3-Hydroxydekansäure(2-oxo-tetrahydrofuran-3-yl)amid (**8**) (3-OH-C10-HSL) beschrieben.



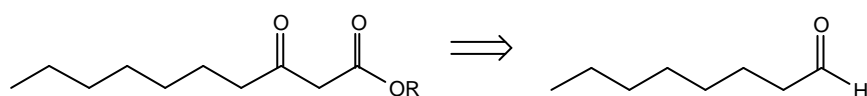
Das Zielmolekül besitzt zwei Stereozentren im Molekül. Diese sind zum einen am α -Kohlenstoffatom des Lactonrings und zum anderen am β -Kohlenstoffatom der Seitenkette lokalisiert. Da Homoserinlacton in beiden enantiomeren Formen kommerziell erhältlich ist, wird bei der Retrosynthese als erstes die Amidbindung gespalten.



Die β -Hydroxycarbonsäure **9** kann stereoselektiv aus dem entsprechenden β -Ketosäureester **10** via Reduktion und anschließender Verseifung dargestellt werden.

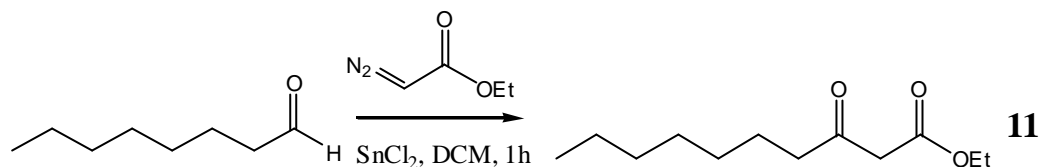


Für die Darstellung von β -Ketosäureestern sind viele Verfahren bekannt, die unter anderem von einer um zwei Kohlenstoffatome verkürzten Carbonylverbindung, z. B. dem Aldehyd, ausgehen.

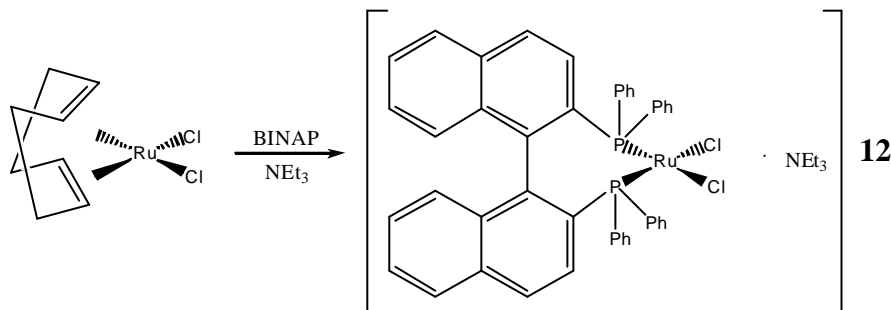


5.2 Synthese von N-(3-Hydroxydecanoyl)-homoserinlacton

Ausgehend vom Octanal wurde eine Kupplungsreaktion mit Diazoessigsäureethylester durchgeführt. Dabei wird 3-Oxodecansäureethylester (**11**) durch Reaktion von Octanal mit Diazoessigsäureethylester in Gegenwart substöchiometrischer Mengen an Zinn(II)-chlorid in guter Ausbeute synthetisiert.¹¹

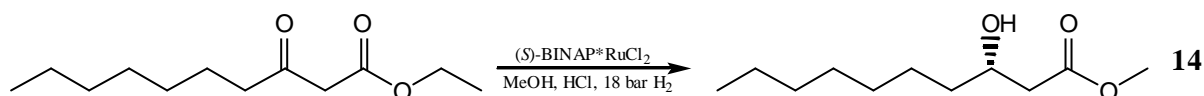
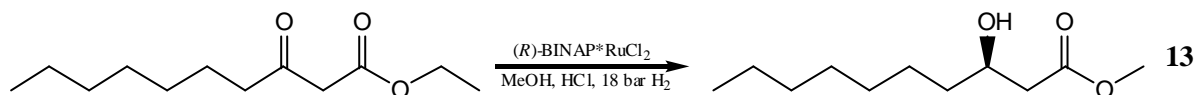


3-Oxodecansäureethylester stellt ein gutes Substrat für die enantioselektive Reduktion mit Ruthenium-Biaryl-bisphosphin-Katalysatoren dar.¹² Für die Reduktion von β -Ketosäureestern hat sich ein 1,1'-Binaphtyl-2,2'-diphenylphosphin(BINAP)-Ruthenium-Komplex (**12**), der aus der kommerziell erhältlichen polymeren Verbindung $(\text{RuCl}_2 \cdot \text{Octadien})_n$ mit BINAP und Triethylamin hergestellt werden kann, als geeignet erwiesen.¹³



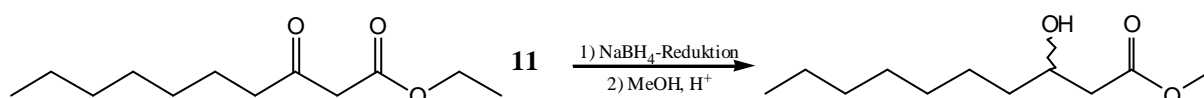
Durch Einsatz beider Enantiomere von BINAP, können beide Enantiomere von 3-Hydroxydecanensäureethylester dargestellt werden. Dabei entsteht unter Verwendung von (*R*)-BINAP das *R*-Enantiomer des 3-Hydroxydecanensäureesters (**13**), bei Verwendung von (*S*)-BINAP der (*S*)-3-Hydroxydecanensäureester (**14**).

Da die Reaktion unter Zusatz katalytischer Mengen an Salzsäure in Methanol durchgeführt wurde, fand parallel zur Reduktion eine Umesterung vom Ethyl- zum Methylester statt.



Die Ausbeute konnte durch Variation der Reaktionsbedingungen auf 87 % gesteigert werden. Die Bestimmung des Enantiomerenüberschuß wurde mit Hilfe von Gaschromatographie an chiraler stationärer Phase durchgeführt (siehe Abbildung 5-1).

Für diesen Zweck wurde eine Reduktion von **11** mit Natriumborhydrid, die ein racemisches Gemisch des 3-Hydroxydecansäureethylesters ergibt, und anschließend eine Umesterung unter Säurekatalyse in Methanol, durchgeführt.



Durch Variation des Temperaturprogramms während der Gaschromatographie konnte eine nahezu vollständige Grundlinien-Trennung der Enantiomere realisiert werden.

Für die Zuordnung der GC-Peaks zu den entsprechenden Enantiomeren wurde eine Koinjektion des racemischen Gemischs und des (*R*)-3-Hydroxydecansäuremethylesters vorgenommen. Dazu fand ein 1:1-Mischung von racemischem Gemisch und (*R*)-3-Hydroxydecansäuremethylester Verwendung. Die Zuordnung der absoluten Konfiguration wurde nicht separat durchgeführt, sondern beruht auf der empirischen Beobachtung, dass aus der Verwendung von (*S*)-BINAP als chiraalem Ligand der (*S*)-3-Hydroxysäureester resultiert und umgekehrt.

Aus dem Chromatogramm des (*R*)-3-Hydroxydecansäuremethylesters konnte durch Integration der Flächen unter den GC-Peaks ein Enantiomerenüberschuß von 97 % für (*R*)-3-Hydroxydecansäuremethylester und von >95 % für (*S*)-3-Hydroxydecansäuremethylester bestimmt werden (siehe Abbildung 5-1).

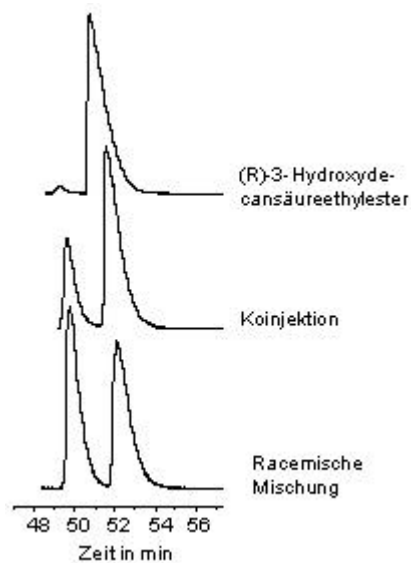


Abbildung 5-1: GC an chiraler Phase, fused-silica-Kapillare (15 m, 0.25 mm i. D.) mit Heptakis(6-O-TBDMS-2,3-di-O-acetyl)- β -cyclodextrin belegt, 5 Min. bei 60 °C, 2 °C/min auf 120 °C, dann isotherm

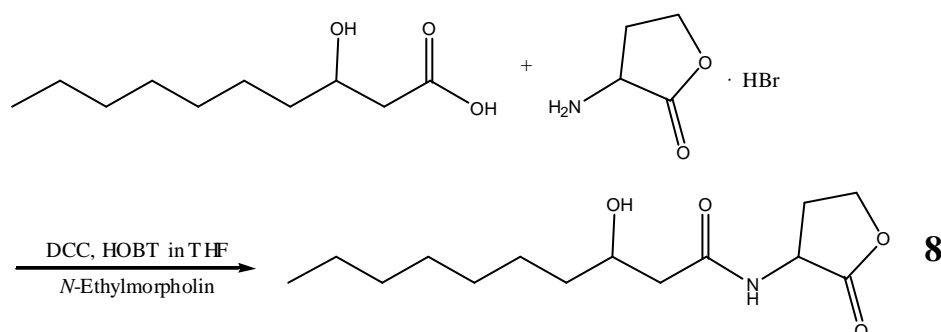
Da Ester in den meisten Fällen ungenügend reaktive Substrate zur Darstellung von Carbonsäureamiden sind¹⁴, musste der Ester in ein geeigneteres Derivat überführt werden. Im allgemeinen zählen Säurechloride zu den reaktivsten Carbonsäurederivaten. Hiervon wurde jedoch aufgrund der Hydroxyfunktion Abstand genommen, da dies zu einer Reaktion der Carbonsäurechloride mit sich selbst geführt hätte. Mit Hilfe der Schutzgruppentechnik hätte man dieses Problem zwar umgehen können, aber dadurch wären zwei zusätzliche Reaktionen, Anbringung und Entfernung einer Schutzgruppe, nötig gewesen.

Im Gegensatz dazu hat die Peptidchemie eine große Bandbreite an Reaktionen hervorgebracht, die eine Carbonsäure mit einer Aminfunktion zu einem Amid verknüpft, und dabei weitere Funktionalitäten, wie die im Serin vorkommende Hydroxy-Gruppe toleriert.

Aus diesem Grund wurde der Carbonsäureester verseift. Hierzu wurde der Carbonsäureester in Methanol gelöst und mit einem Überschuss an 2 N Natronlauge versetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel abdestilliert und nicht-ionische Bestandteile durch Waschen mit Dichlormethan entfernt. Die Erklärung für die zwischen 45 % und 100 % schwankenden Ausbeuten ist bei diesem Aufarbeitungsprozess zu suchen. Es wurde beobachtet, dass einerseits die Entfernung der nicht-ionischen Bestandteile unvollständig war und eine abschließende Säulenchromatographie erforderten, andererseits erhebliche Mengen des Carbonsäuresalzes durch den Filter ins Dichlormethan gelangten.

Bei den zum Amid führenden Reaktionen handelt es sich meist um eine in-situ-Aktivierung der Carbonsäure mit N,N' -Carbonyldiimidazol¹⁵ oder DCC¹⁶. Eine unter besonders geringer Racemisierung verlaufende Reaktion, kann durch Verwendung von DCC mit Zusatz von HOBT durchgeführt werden.¹⁷ Diese Methode wurde bereits zur Darstellung von N -(3-Oxoacyl)-homoserinlactonen, sowie von N -(3-Hydroxybutyryl)-homoserinlacton, verwendet.⁵

Mit Hilfe dieser Reaktion gelang die Darstellung von (*S*)-3-OH-C10-HSL mit 51 % Ausbeute. Aus den eigenen Beobachtungen kann jedoch darauf geschlossen werden, dass die Reaktion in Bezug auf die erzielbare Ausbeute sehr empfindlich gegenüber Verunreinigungen aus der Verseifung des Carbonsäureesters ist. Die eingesetzte (*R*)-3-Hydroxydecansäure war dem NMR-Spektrum nach zu urteilen, zwar sauber, zeigte jedoch eine gelbe Färbung. Die Ausbeute bei der Darstellung von (*R*)-3-OH-C10-HSL betrug nur 10 %. Im ESI-Massenspektrum waren ferner Reste von Dicyclohexylharnstoff zu sehen. Dies legt die Vermutung nahe, dass sowohl bei der Verseifung, als auch bei der Knüpfung der Amidbindung Wert auf eine sorgfältige Extraktion gelegt werden sollte.



Die Gesamtausbeute betrug unter der Annahme, dass die besten erzielten Ausbeuten reproduziert werden können, bezogen auf Octanal 39 %. Ein entscheidender Fortschritt besteht in der Stereoselektivität der durchgeführten Reaktionen. Die bisher bekannten Darstellungen von N -(3-Hydroxyacyl)-homoserinlactonen ergaben immer ein Diastereomergemisch, entsprechend den eingesetzten Enantiomeren der 3-Hydroxycarbonsäure. Im Falle des N -(3-Hydroxy-hexanoyl)-homoserinlactons gelang zwar eine Trennung der Diastereomeren mit Hilfe von präparativer HPLC, dennoch konnte keine Bestimmung der absoluten Konfiguration beider Diastereomere erzielt werden⁸.

5.3 Analyse von N-Acylhomoserinlactonen

5.3.1 HPLC-Analyse

Die Schwierigkeiten bei der gaschromatographischen Analyse von AHLs, insbesondere Substanzverluste im Injektor oder Peakverbreiterungen in der GC, legten eine Analyse per HPLC nahe, da sich dadurch derartige Substanzverluste vermeiden lassen. Unglücklicherweise lassen sich AHLs nur sehr schlecht UV-spektroskopisch nachweisen, da die Extinktionskoeffizienten für eine Carbonylgruppe und besonders für eine Estergruppe sehr klein sind. Daher musste mit sehr großen Substanzmengen gearbeitet werden, um eine zuverlässige Detektion zu gewährleisten. Es wurden einige kommerziell erhältliche AHLs mit verschiedenen Längen (C4-C14) und funktionellen Gruppen der Seitenkette (ohne, 3-OH, und 3-O) ausgewählt. Stammlösungen in Acetonitril angesetzt, und diese zu einer Mischung vereint (siehe Tabelle 1).

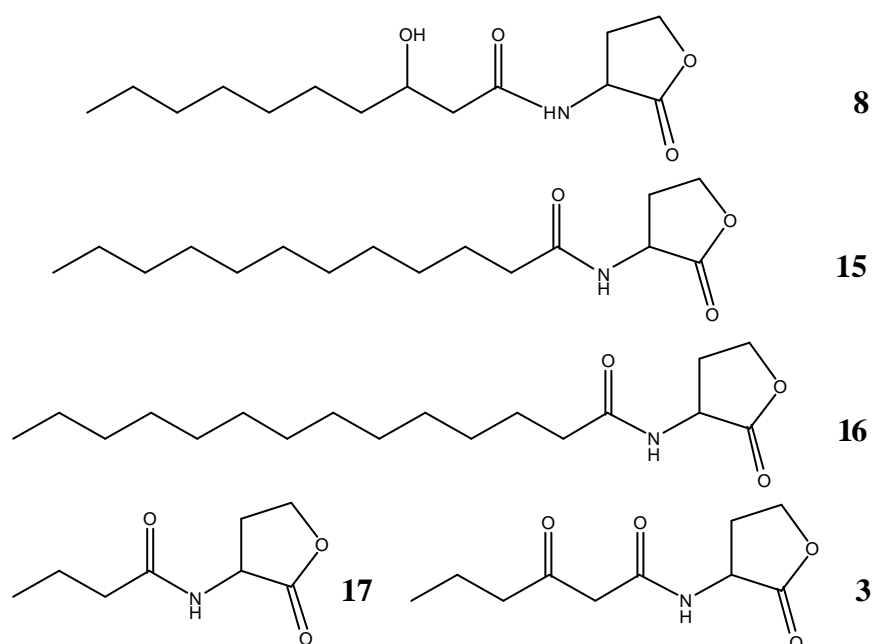


Tabelle 1: AHL-Standard für die HPLC-Analyse

AHL	Konzentration	Mischungsverhältnis (vol.)
3-O-C6-HSL (3)	5.1 mg/ml	2
3-OH-C10-HSL (8)	4.6 mg/ml	3
C12-HSL (15)	5.0 mg/ml	4
C14-HSL (16)	5.3 mg/ml	4
C4-HSL (17)	4.0 mg/ml	4

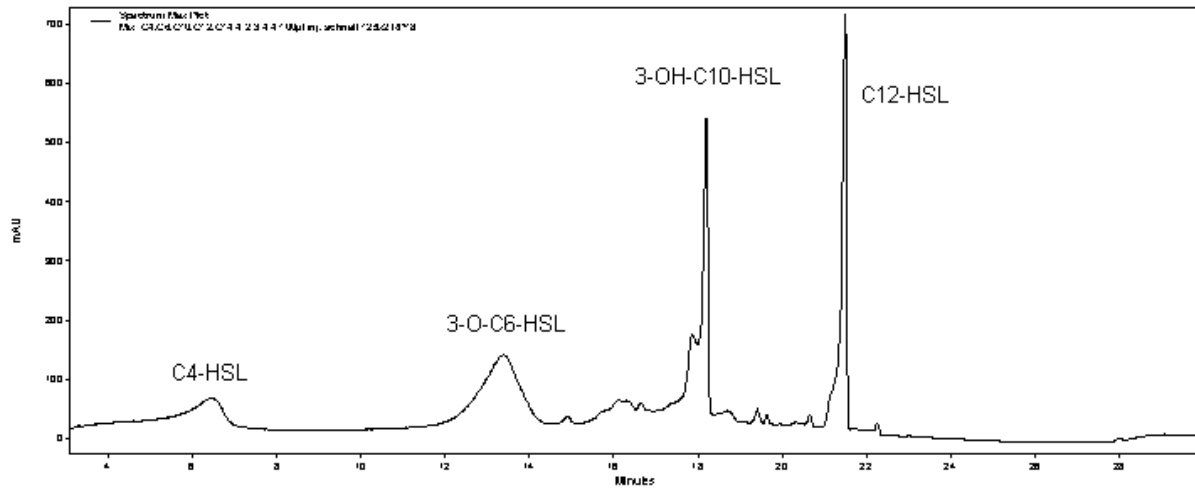


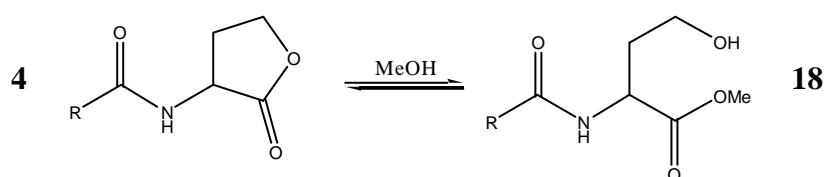
Abbildung 5-2: HPLC-Chromatogramm von einem AHL-Standard (siehe Tabelle 1), 125x2 RP18 end-capped, 100 μ l Injektionsvolumen, Flussrate: 0.25 ml/min, Laufmittel: H_2O mit 0.1% Ameisensäure und Acetonitril, Gradient: 5 min 5 % Acetonitril aq, 5-15 min linear auf 100 % Acetonitril, 15-20 min 100 % Acetonitril, 20-25 min linear auf 5 % Acetonitril aq, 25-30 min 5 % Acetonitril aq.

Die besten Trennbedingungen ergaben sich unter den in Abbildung 5-2 angegebenen Bedingungen. Zusätzlich zu der schlechten Nachweisempfindlichkeit sind die Peaks für die AHLs mit kurzer Seitenkette stark verbreitert, was bei der Analyse von Naturstoffproben zwangsläufig zur Interferenz mit anderen in der Probe enthaltenen Substanzen führen würde.

5.3.2 ESI-MS, Tandem-MS und LC/MS-Analyse

Die schlechte Empfindlichkeit der UV-Detektion von AHLs in der HPLC kann durch eine LC/MS-Kopplung umgangen werden, die bereits zur Detektion von *N*-(Acyl)-homoserinlactonen und *N*-(3-Oxoacyl)-homoserinlactonen Verwendung fand¹⁸. Diese Methode sollte reproduziert werden und nach Möglichkeit um die Klasse der *N*-(3-Hydroxyacyl)-homoserinlactone erweitert werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese Methode mit Problemen behaftet und insbesondere für eine quantitative Analyse nicht geeignet ist.

Für die Entwicklung einer LC/MS-Methode, wurden zunächst ohne Kopplung ESI-Massenspektren von C4-HSL und 3-OH-C10-HSL aufgenommen (siehe Abbildung 8-1 und Abbildung 8-2). In diesen Spektren sind zum einen Peaks zu beobachten, die eine um 23 Da höhere Masse als die AHLs haben, was auf Natriumaddukte der AHLs hindeutet, und deren Unterdrückung durch Optimierung der ESI-Parameter nur unvollständig gelingt. Durch Zugabe von Ammoniumacetat und Trifluoressigsäure zur Lösung wird die Bildung von $[M+H]^+$ -Ionen gegenüber $[M+Na]^+$ -Ionen leicht bevorzugt¹⁸. Des Weiteren sind bei der Verwendung von Methanol als Lösungsmittel Peaks zu beobachten, die eine um 32 Da höhere Masse als die einfach protonierten AHLs haben. Da es bekannt ist, dass AHLs in wässrigem Medium einer Lactonolyse unterliegen¹⁹, wurden diese Peaks als γ -Hydroxymethylesterderivate (**18**) gedeutet, die aus der Öffnung des Lactonrings durch Methanol resultieren. Weiterhin sind die Natriumaddukte von **18** zu beobachten.



Bei der Verwendung von Acetonitril (ACN) als Lösungsmittel erscheint immer ein neuer Peak bei 144 Da, der charakteristisch für Lösungsmitteladdukte ist.

Da die Unterdrückung der Natriumaddukte schwierig zu sein scheint, wurden diese neben den $[M+H]^+$ -Ionen der AHLs als analytische Zielmoleküle in Betracht gezogen. Während die letzteren jedoch in der kollisions-induzierten Dissoziation (CID) charakteristische Fragmentationen liefern (siehe Abbildung 8-3), können die Natriumaddukte nicht zur

Fragmentierung angeregt werden und scheiden somit als potentielle analytische Zielmoleküle aus. Mögliche Strukturen für die neben den $[M+H-18]^+$ -Ionen beobachteten Fragmentionen der $[M+H]^+$ -Ionen der AHLs sind in Abbildung 5-3 gezeigt.

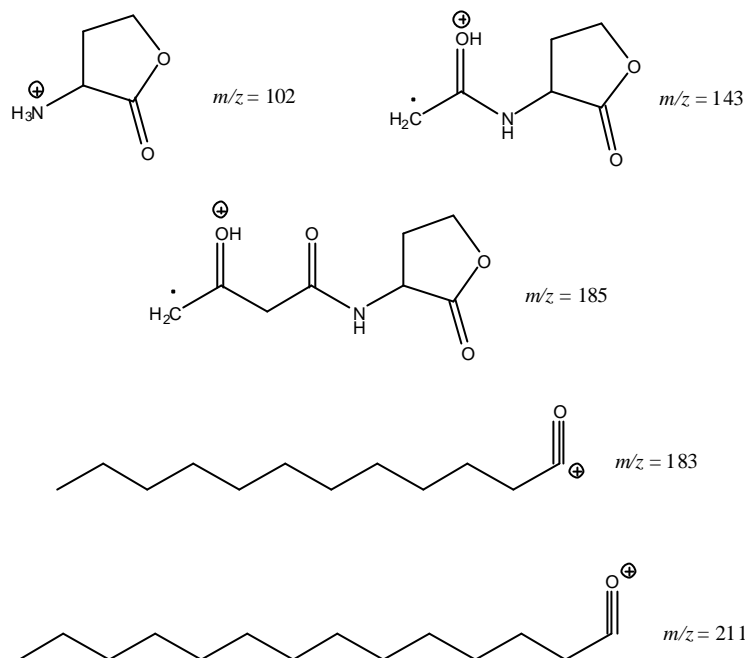


Abbildung 5-3: Mögliche Fragmentionen für die CID von $[M+H]^+$ -Ionen der AHLs

Leider wurden in der CID für die kurzkettigen AHLs (C4-HSL und 3-O-C6-HSL) sowie für das 3-OH-C10-HSL neben den $[M+H]^+$ - und den $[M+H-18]^+$ -Ionen keine weiteren Fragmente detektiert, die Informationen über die Struktur der Seitenkette liefern könnten. Für die langkettigen AHLs (C12-HSL und C14-HSL) konnten je ein weiteres charakteristisches Fragment detektiert werden.

Daher ist ein anderer Ansatz die Verwendung der γ -Hydroxymethylester als analytische Zielmoleküle. Aus diesem Grund wurde eine Mischung von AHLs in 50 % ACN in Wasser über Nacht bei 50 °C in der 80fachen Menge Methanol stengelassen. Anschließend wurde ein ESI-Massenspektrum unter Zusatz von 1.5 % Ammoniumacetat aufgenommen (siehe Abbildung 8-4).

Es bestand die Hoffnung, dass die γ -Hydroxymethylester einen geringeren Anteil an Natriumaddukten bilden oder aber die γ -Hydroxymethylester oder deren Natriumaddukte in der Tandem-Massenspektrometrie Fragmente bilden, die besser zur Ableitung von Strukturvorschlägen geeignet sind. Aus diesem Grund wurden MS^2 -Experimente mit den γ -Hydroxymethylestern durchgeführt (siehe Abbildung 8-5). Die γ -Hydroxymethylester

zeigen alle dieselben Fragmentierungsmuster. Neben einer charakteristischen Abspaltung von 18 Da tritt ein Fragment auf, dessen Masse dem entsprechenden $[M+H]^+$ -Ion des ursprünglichen AHLs entspricht und aus der Abspaltung von Methanol hervorgegangen sein könnte. Durch MS^3 -Experimente konnte die Vermutung bestätigt werden, dass es sich bei diesen Ionen um die entsprechenden $[M+H]^+$ -Ionen der AHLs handelt, da sie dieselben Fragmente zeigen (siehe Abbildung 8-6).

Aufgrund dieser Ergebnisse scheiden die γ -Hydroxymethylester als analytische Zielmoleküle aus, da sie außer den unspezifischen Abspaltungen von Wasser und Methanol keine charakteristischen Ionen aufweisen. Weiterhin ist es fraglich, ob Methanol als Elutionsmittel oder als Lösungsmittel in der LC/MS-Analyse verwendet werden kann. Dies ist abhängig von der Geschwindigkeit, mit der die Lactonolyse voranschreitet und der Dauer einer gewöhnlichen HPLC-Analyse. Wenn während der Analyse bereits ein beträchtlicher Anteil von γ -Hydroxymethylestern vorliegt, muss auf ein anderes Elutionsmittel zurückgegriffen werden.

Hierfür scheint Acetonitril als aprotisches Lösungsmittel zwar geeigneter zu sein, aber aufgrund der bereits beschriebenen Probleme in der HPLC und ESI-Massenspektrometrie dürfte eine LC/MS-Analyse mit Acetonitril auch nicht optimal sein.

Trotz dieser Ergebnisse wurde eine LC/MS-Analyse mit Acetonitril und mit Methanol durchgeführt.

Bei der Verwendung von Acetonitril als Lösungs- und Elutionsmittel (siehe Abbildung 8-7) sind wie bereits in der HPLC-Analyse für die kurzkettigen AHLs breite Peaks und Tailing zu beobachten. Weiterhin ist die Empfindlichkeit für eine LC/MS-Analyse ungewöhnlich schlecht. Eine mögliche Ursache hierfür ist der im gesamten Chromatogramm sehr hohe Background-Peak von 144 Da, der aus Acetonitril resultiert.

Bei der Verwendung von Methanol als Lösungs- und Elutionsmittel (siehe Abbildung 8-8) treten Substanzverluste durch Bildung von γ -Hydroxymethylestern auf. Weiterhin treten teilweise Peak-Überlappungen auf, die eine zuverlässige Analyse erschweren. Ungewöhnlich ist die Abnahme in der Differenz der Retentionszeiten für die AHLs und ihre entsprechenden γ -Hydroxymethylester mit zunehmender Kettenlänge. Es ist wahrscheinlich, dass für die drastische Abnahme von 1.5 Minuten für C4-HSL bis zur vollständigen Überlappung der Peaks für C14-HSL die zunehmende Ähnlichkeit der beiden Formen verantwortlich ist.

5.4 Derivatisierung von N-Acylhomoserinlactonen

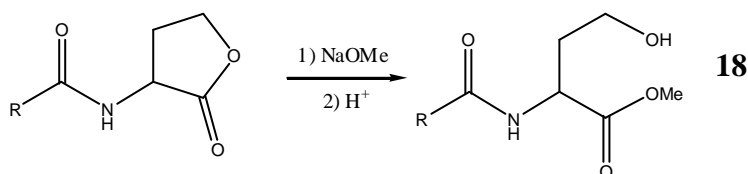
5.4.1 Derivatisierung durch Lactonolyse

Bei der Entwicklung einer Trennmethode für AHLs mittels HPLC wurde die Beobachtung gemacht, dass sich beim Stehenlassen in Methanol der Lactonring der AHLs öffnet und ein γ -Hydroxymethylesterderivat **18** entsteht. Mit Hilfe einer Schutzgruppe an der entstehenden Hydroxygruppe könnte die Öffnung des Lactonrings irreversibel gemacht werden, um die dadurch in der LC/MS-Analyse entstehenden Schwierigkeiten zu vermeiden.

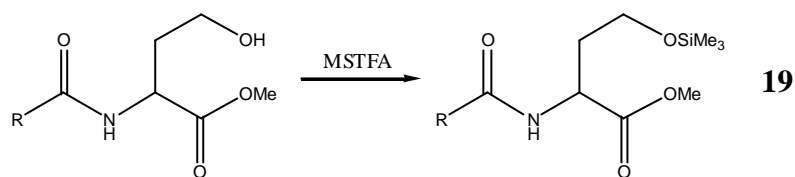
Diese Tatsache führte zu der Idee, die AHLs zu derivatisieren, um sie effizienter trennen und sensitiver nachweisen zu können. Die in der Reaktion entstehende freie Hydroxygruppe ist ein idealer Angriffspunkt, um mit diversen verfügbaren Derivatisierungsreagenzien Reaktionen eingehen zu können. Für die Analyse von Fettsäuren, sind viele Veresterungen, Umesterungen und Verseifungen beschrieben, die im Mikromaßstab durchführbar sind. Leider ist dies für Lactone nicht der Fall.²⁰

Da γ -Hydroxymethylester **18** eine große Tendenz haben sich zum Lacton zurück zu bilden, erschien die Gleichgewichtseinstellung zu Gunsten von **18** im Mikromaßstab sehr schwer zu erreichen. Dennoch wurden einige Versuche unternommen das Homoserinlacton in den γ -Hydroxymethylester zu überführen. Als Studienobjekt wurde dafür C4-HSL ausgewählt, da es die kürzeste Seitenkette aller natürlich vorkommenden AHLs besitzt und ansonsten keine weiteren funktionellen Gruppen aufweist.

Die Umsetzung von Triglyceriden zu den Fettsäuremethylestern gelingt quantitativ unter basischer Katalyse.



Um eventuelle Verluste des Produkts durch Wechselwirkungen der Hydroxy-Gruppe mit der GC-Säule zu minimieren, wurde nach der Reaktion die Hydroxy-Gruppe mit *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamid (MSTFA) derivatisiert (siehe **19**). Weiterhin kann damit die Rückreaktion zum Lacton verhindert werden.

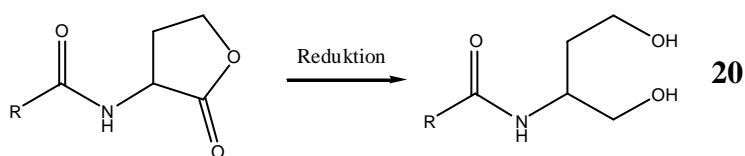


Trotz Variation der Reaktionsbedingungen in Temperatur, Reaktionsdauer, pH-Wert und Aufarbeitung konnte bei der Analyse der Reaktionsprodukte kein γ -Hydroxymethylesterderivat nachgewiesen werden. Insbesondere Variationen in der Aufarbeitung wurden durchgeführt, da davon auszugehen ist, dass eine Rückbildung zum Lacton während dieses Schrittes geschehen muss. Daher wurde die Entfernung des Lösungsmittels unter anderem auch bei 0 °C im Stickstoffstrom durchgeführt, weil eine erhöhte Temperatur bei der Entfernung des Lösungsmittels aufgrund entropischer Effekte die Bildung des Lactons begünstigen würde. Weiterhin wurde einerseits vor der Entfernung des Lösungsmittels sauer aufgearbeitet, andererseits auf die saure Aufarbeitung verzichtet und nach Entfernung des Lösungsmittels direkt mit MSTFA derivatisiert. Dennoch waren außer dem Edukt keine weiteren Substanzen nachweisbar.

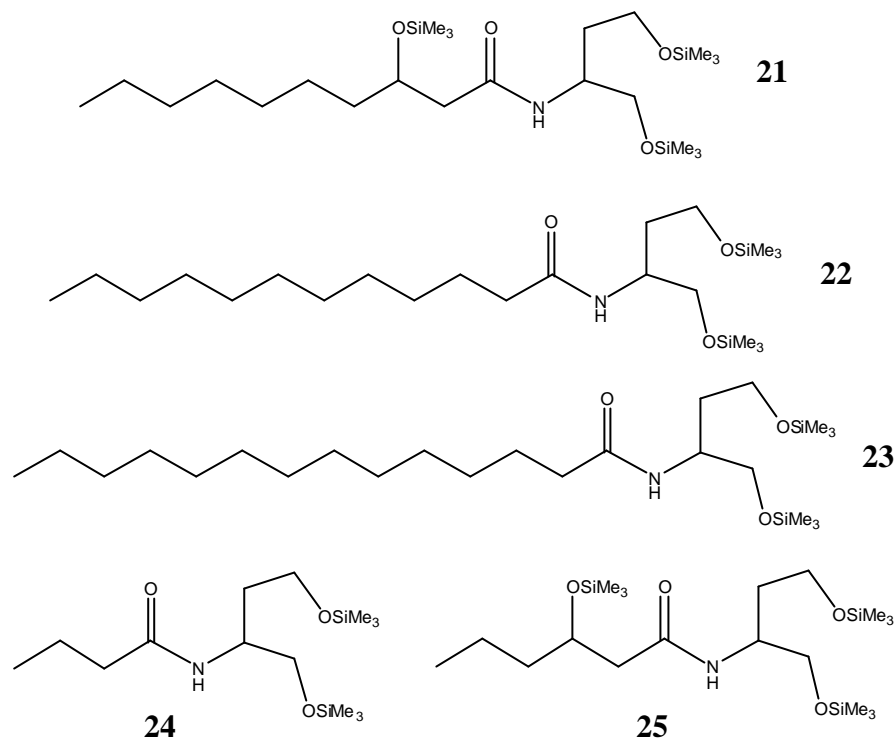
Für die saure Katalyse ist die Umsetzung von 11.6 mmol γ -Butyrolacton zum γ -Hydroxymethylester unter Einwirkung des sauren Katalysators Amberlyst-15 mit 96 % Ausbeute beschrieben.²¹ Dieses Ergebnis war jedoch für eine Derivatisierung im Mikromaßstab nicht reproduzierbar. Der entstandene 4-Hydroxybuttersäuremethylester wurde laut²¹ zur Reinigung destilliert, was der angenommenen Temperaturempfindlichkeit der γ -Hydroxymethylester widersprach. Daher wurde auf eine intensive Variation der Reaktionsbedingungen in diesem Fall verzichtet.

5.4.2 Reduktion der *N*-Acylhomoserinlactone mit Lithiumborhydrid

Eine alternative Methode zur Freisetzung eines Angriffspunktes für Derivatisierungsreagenzien geht von der Reduktion des Lactons in AHLs aus.



Unter den vielen zur Verfügung stehenden Reduktionsmitteln²² wurde Lithiumborhydrid als geeignetes Reagenz ausgewählt. Eine Studie über den Einfluss verschiedener Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische auf die Reaktivität von Lithiumborhydrid ermöglichte die Auswahl von Reaktionsbedingungen, die den Lactonring reduzieren, aber nicht die Amidbindung.²³ Auch die *N*-(3-Oxoacyl)-homoserinlactone **5** reagierten unter diesen Bedingungen nur unter Ringöffnung und Ketonreduktion, was anhand von 3-O-C6-HSL gezeigt werden konnte. Als geeignete Kombination erwies sich eine Mischung von Lithiumborhydrid und Methanol im molaren Verhältnis 1:1 in Diethylether. Mit dieser Mischung hatte ein zehnfacher Überschuss an Reduktionsmittel, sowie eine verlängerte Reaktionsdauer von bis zu drei Stunden keinen Einfluss auf die Reaktion. Bei den entstandenen Diolen **22-24** bzw. Triolen **21** und **25** war abschließend eine Derivatisierung mit MSTFA nötig, um Verluste bei der GC-Analyse zu vermeiden. Es konnten massenspektrometrisch neben dem gewünschten Produkt keine weiteren Nebenprodukte nachgewiesen werden.



Mit der erfolgreichen Reduktion (EI-Massenspektren der Verbindungen **21-25** siehe Abbildung 8-9 bis Abbildung 8-14) der AHLs ist eine Freisetzung von Hydroxy-Gruppen für Derivatisierungsreagenzien gelungen. Mit Hilfe von Anthranoylnitril²⁴ können Derivate hergestellt werden, die nach HPLC-Trennung fluoreszenzspektroskopisch mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden können. Leider konnte nicht sichergestellt werden, dass eine vollständige Derivatisierung aller Hydroxygruppen gelingt. Für *N*-(Acyl)-homoserinlactone **4** ergeben sich damit zwei mono-derivatisierte und ein di-derivatisiertes Produkt. Damit wird die Auswertung der Chromatogramme erschwert und eine Zuordnung der erhaltenen Peaks zu den verschiedenen Spezies war auch mit einer vergleichenden LC/MS nicht möglich. Da dieser Ansatz weniger Erfolg versprechend erschien als eine massenspektrometrische Analyse, wurde auf das Testen weiterer Derivatisierungsreagenzien, wie z. B. 2-Naphthoylimidazol²⁵ verzichtet.

Ein weiterer Nachteil der Reduktion besteht darin, dass sie für Mikroderivatisierungen nur begrenzt einsetzbar ist. Physikalisch-chemische Effekte bei der wässrigen Aufarbeitung, wie z.B. irreversible Adsorptionseffekte am Trockenmittel oder Effekte oberflächenaktiver Substanzen, die eine quantitative Extraktion verhindern, stellen den limitierenden Faktor dar. Zur Abschätzung derartiger Effekte wurde die Reaktion unter Zusatz eines internen Standards durchgeführt. Dafür wurde Heneicosan ausgewählt. Aufgrund seiner physikalisch-chemischen

Eigenschaften ist davon auszugehen, dass es bei der wässrigen Aufarbeitung nahezu vollständig in die organische Phase übergeht und somit eine höhere absolute Wiederfindungsrate als die reduzierten AHLs aufweist.

Tabelle 2: Wiederfindungsraten bei der Reduktion mit anschließender Silylierung von AHLs.

AHL	Edukt/Standard	Produkt/Standard	Wiederfindungsrate
C12-HSL	21678487:1281585	4833229:485516	0.59
C14-HSL	18658189:4160205	4036304:619994	1.45
C14-HSL	44263900:1841402	10872015:854039	0.53
3-OH-C10-HSL	24764779:6694533	1263764:982483	0.35
3-O-C6-HSL	816272:3578122	130331:1162484	0.49

Das Auftreten von Wiederfindungsraten, die größer als 1 sind, deutet darauf hin, dass mit der Derivatisierung eine Verbesserung der chromatographischen Eigenschaften einhergeht. Das Ergebnis ist zwar eindeutig, war jedoch in einem weiteren Versuch nicht reproduzierbar.

5.4.3 Deuterium-markierte, reduzierte AHLs

In komplexen Probengemischen, wie sie in der Naturstoffanalyse häufig vorkommen, sind geringe Mengen von AHLs oft sehr schwierig nachzuweisen. Eine spezifische Markierung durch stabile Isotope kann die Nachweisempfindlichkeit erhöhen. Dies soll durch eine Variante der Reduktion erreicht werden.

Wird die Derivatisierung mit einem 1:1-Gemisch von Lithiumborhydrid und Lithiumbordeuterid durchgeführt, sind im ESI-Spektrum, das ausschließlich Peaks $[M+H]^+$ -Ionen zeigt, charakteristische Isotopenmuster zu erkennen, die die Auswertung dieser Spektren erheblich vereinfachen. Ein mit dieser Methode reduziertes AHL, würde ein Triplett im Molekülion ergeben. Im Abstand von einer Masseneinheit ist die Abfolge von nicht deuteriertem, einfach deuteriertem und zweifach deuteriertem Produkt zu erwarten, wobei die Intensitäten der Statistik nach 1:2:1 betragen (Abbildung 5-4).

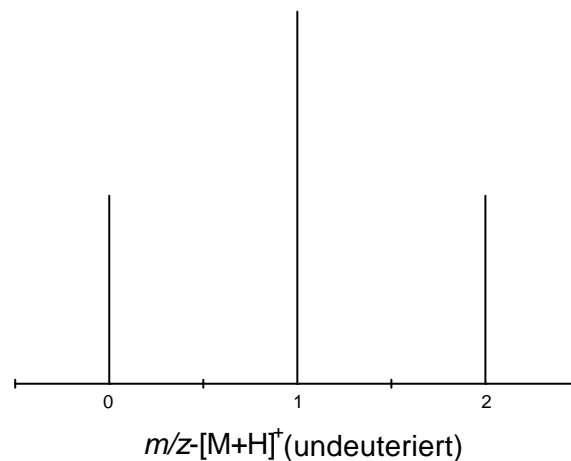


Abbildung 5-4: Erwartetes Isotopenmuster (ESI) nach Reduktion mit $\text{LiBH}_4/\text{LiBD}_4$ (1:1)

Da jedoch die in Naturstoffproben häufig anzutreffenden Carbonsäuren und Ester das gleiche Isotopenmuster ergeben, müsste dieser Methode eine weitere Derivatisierung folgen. Eine denkbare Methode stellt, die Acetylierung mit einem 1:1-Gemisch von Acetylchlorid und Acetylchlorid-d3 dar. Während bei den Carbonsäuren und Estern nur eine Hydroxy-Gruppe zur Reaktion mit Acetylchlorid vorhanden ist, spaltet das Triplett in ein Dublett von Triplett auf, wobei die Dubletts einen Abstand von drei Masseneinheiten haben (Abbildung 5-5).

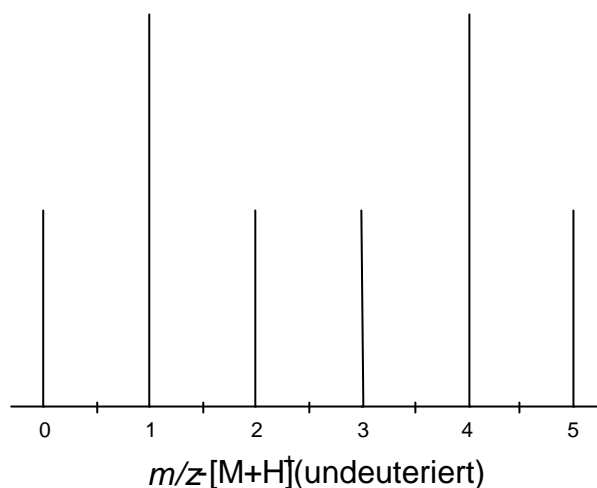


Abbildung 5-5: Isotopenmuster (ESI) für Carbonsäuren und Ester nach Reduktion mit $\text{LiBH}_4/\text{LiBD}_4$ (1:1) und anschließender Acetylierung mit $\text{CH}_3\text{COCl}/\text{CD}_3\text{COCl}$ (1:1)

Im Gegensatz dazu, entstehen bei der Reduktion eines Lactons zwei Hydroxy-Gruppen, und somit bei der anschließenden Acetylierung ein Triplett von Triplets (Abbildung 5-6).

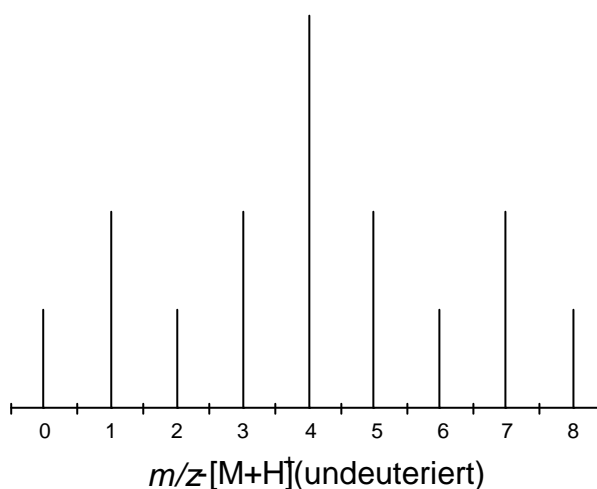


Abbildung 5-6: Isotopenmuster (ESI) für Lactone nach Reduktion mit $\text{LiBH}_4/\text{LiBD}_4$ (1:1) und anschließender Acetylierung mit $\text{CH}_3\text{COCl}/\text{CD}_3\text{COCl}$ (1:1)

Obwohl Hydroxyester und Hydroxycarbonsäuren das gleiche Isotopenmuster aufweisen, ist mit einer derartigen Methode eine erhebliche Reduktion des analytischen Aufwands verbunden. Auf einen Blick wäre es somit möglich, potentielle Zielmoleküle zu erkennen, ohne weitere Strukturinformationen aus tandemmassenspektrometrischen Methoden ableiten zu müssen. Leider wäre mit dieser Methode jedoch ein weiterer Verlust an Sensitivität

verbunden, da sich die ursprüngliche Intensität des Peaks nun auf neun Peaks verteilt. Für andersartig substituierte ergeben sich entsprechend andere Isotopenmuster.

Leider ist Lithiumbordeuterid kommerziell nicht erhältlich. Nach einem Versuch es analog einer Vorschrift zur Darstellung von Lithiumborhydrid aus dem käuflichen Natriumbordeuterid herzustellen²⁶, konnte bei der anschließenden Reduktion von C4-HSL nicht das gewünschte Produkt nachgewiesen werden. Überraschenderweise konnte bei dieser Reaktion in sehr geringer Ausbeute der nicht deuterierte Methylester **19** nachgewiesen werden.

Lithium übernimmt als hartes Kation eine aktivierende Rolle bei der Reduktion, indem es sich an den Carbonylsauerstoff der zu reduzierenden Carbonyl-Gruppe bindet. Dies ist der Grund für eine erhöhte Reaktivität von Lithiumborhydrid gegenüber Natriumborhydrid.²⁷

Eine gängige Methode, um den direkten Einsatz des relativ teuren Lithiumborhydrids zu umgehen, stellt der Zusatz von Lithiumsalzen zu der Reduktion mit Natriumborhydrid dar.²⁸

Variationen des Lösungsmittels (THF/Diethylether), des Lithiumsalzes (Lithiumbromid/Lithiumchlorid), der Reaktionsdauer (45 Minuten bis 16 Stunden) sowie der Temperatur (0 °C bis 50 °C) konnten dennoch nicht die zufriedenstellenden Ergebnisse der Reduktion mit Lithiumborhydrid reproduzieren.

Mit Hilfe einer 1:1-Mischung von Lithiumborhydrid und Natriumbordeuterid konnte jedoch gezeigt werden, dass die Methode des Kationenaustausches prinzipiell anwendbar ist. Ein Vergleich der [M-15]-Peaks zeigt die teilweise Erhöhung der Isotopenpeaks (Abbildung 5-7). Leider ist nicht das erwartete Isotopenmuster zu erkennen. Längeres Rühren der Stammlösung (1 Tag), um eine eventuell günstigere Gleichgewichtseinstellung zu erreichen, führte zu keiner Verbesserung der Peakverhältnisse, obwohl die Löslichkeit von Lithiumborhydrid in Ethern relativ groß ist, Natriumborhydrid jedoch nicht in nennenswertem Umfang löslich sein sollte²⁷. Solche Daten über die Löslichkeit von Bordeuterid als Anion sind jedoch nicht bekannt.

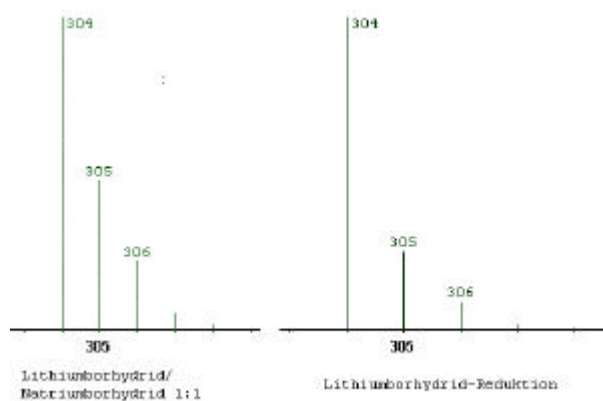
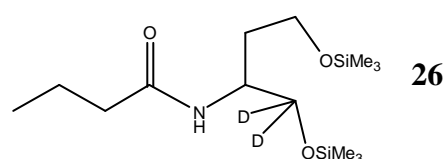


Abbildung 5-7: Vergleich der [M-15]-Peaks bei Reduktion mit LiBH_4 und $\text{LiBH}_4/\text{NaBD}_4$ (1:1)

Durch Verwendung einer Mischung aus Lithiumaluminium und getrocknetem Kieselgel, die als Hojos Reagenz²⁹ bezeichnet wird, ergab sich die Möglichkeit die Reaktivität von Lithiumaluminiumhydrid herabzusetzen, so dass eine Reduktion des Lactonrings im C4-HSL ohne Reduktion der Amidbindung durchgeführt werden konnte (siehe Abbildung 8-15). Eine Reduktion von *N*-(3-Oxoacyl)-homoserinlactonen wurde noch nicht durchgeführt. Daher ist noch nicht abzusehen, ob Hojos Reagenz für diese Klasse von AHLs geeignet ist.

Insbesondere die Aufarbeitung der Reaktion macht sie für Mikroderivatisierungen interessant. Dadurch, dass für die Hydrolyse wenige Tropfen einer konzentrierten Ammoniumchloridlösung verwendet wird, kann auf eine Extraktion verzichtet werden, was die Reaktion eventuell weniger anfällig für einen Substanzverlust macht. Dennoch besteht die Möglichkeit irreversibler Adsorption an dem verwendeten Kieselgel. Bei der Durchführung der Reaktion wurde festgestellt, dass Dimethoxyethan (DME) ein hervorragendes Lösungsmittel zum Spülen des Kieselgels nach der Reaktion darstellt. Dennoch scheint Dichlormethan (DCM) besser geeignet zu sein, da unter Verwendung dieses Lösungsmittels weniger Kontaminationen aus den Probengefäßen auftraten. DME scheint insbesondere Phthalate aus den Septen herauszulösen. Es wurde beobachtet, dass mit DCM ein exzessives Waschen des Kieselgels wichtig ist.

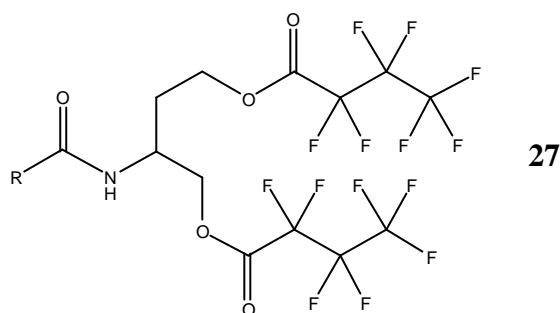
Unter Zusatz von Lithiumaluminiumdeuterid anstelle von Lithiumaluminiumhydrid konnte das entsprechend deuterierte, reduzierte C4-HSL (**26**) dargestellt werden (siehe Abbildung 8-16).



Mit einer molaren 1:1-Mischung von Lithiumaluminiumhydrid und Lithiumaluminiumdeuterid konnte gezeigt werden, dass der [M-15]-Peak ein Triplett ist (siehe Abbildung 8-17).

5.4.4 Heptafluorbuttersäurederivate für NICI-Massenspektrometrie

Abgesehen von einer weiteren Derivatisierung mit Acetylchlorid und MSTFA, kann eine Derivatisierung mit Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) an den Reduktionsprodukten **20** vorgenommen werden. Dies wurde für C4-HSL, C8-HSL, C12-HSL und C14-HSL durchgeführt. Daraus entstehen die zweifach derivatisierten reduzierten AHLs (**27**). Für 3-OH-C10-HSL ergibt sich dementsprechend ein dreifach derivatisiertes Produkt.



Deren EI-Massenspektren (siehe Abbildung 8-18 bis Abbildung 8-22), insbesondere die der AHLs mit langer Seitenkette, zeigen jedoch eine außergewöhnliche Fragmentarmut mit wenig Strukturinformation. Allerdings konnte nicht der gesamte Massenbereich erfasst werden, da gerätebedingt keine Peaks, die größer als $m/z = 600$ sind detektiert werden können.

Durch die große Anzahl an Fluoratomen sind derartige Verbindungen hervorragend für die Ionisierung mit der NICI-Ionenquelle geeignet. Durch die sanftere Ionisierungsmethode sind weniger Fragmente und ein größerer Anteil an Molekülionen zu erwarten.

Wie aus den NICI-Spektren (siehe Abbildung 8-23 bis Abbildung 8-27) ersichtlich ist, können bei keinem der Derivate Molekülionen oder einfache Fragmente detektiert werden, obwohl die Massendifferenzen in den beobachteten Massenspektren mit den Massendifferenzen der eingesetzten AHLs korrelieren. Weiterhin scheint die Methode nur für langkettige AHLs geeignet zu sein. Für C4-HSL und 3-OH-C10-HSL ist ein großer Anteil an unidentifizierten Nebenprodukten im Total-Ionenstrom-Chromatogramm (TIC) zu beobachten. Für C8-HSL, C12-HSL und C14-HSL sind die Spektren eindeutiger (siehe Abbildung 5-8 und Abbildung 5-9).

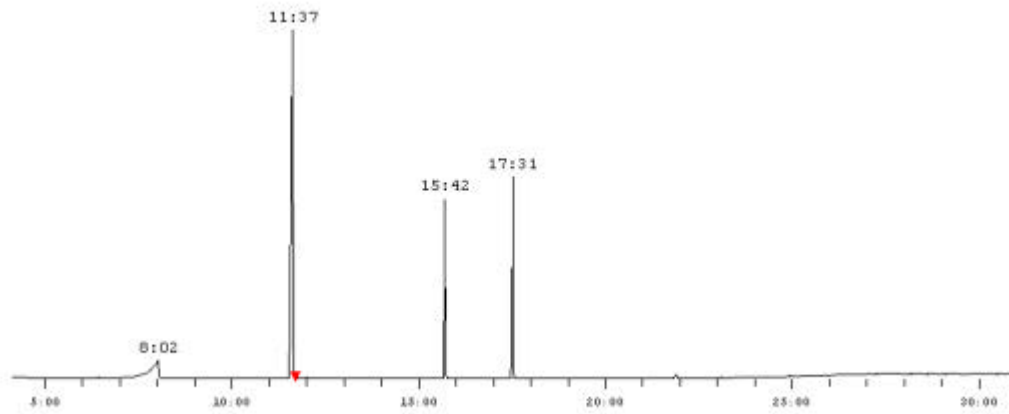


Abbildung 5-8: TIC von C8- (11:37 min), C12-(15:42 min), C14-HSL (17:31min) mit EI-Detektion

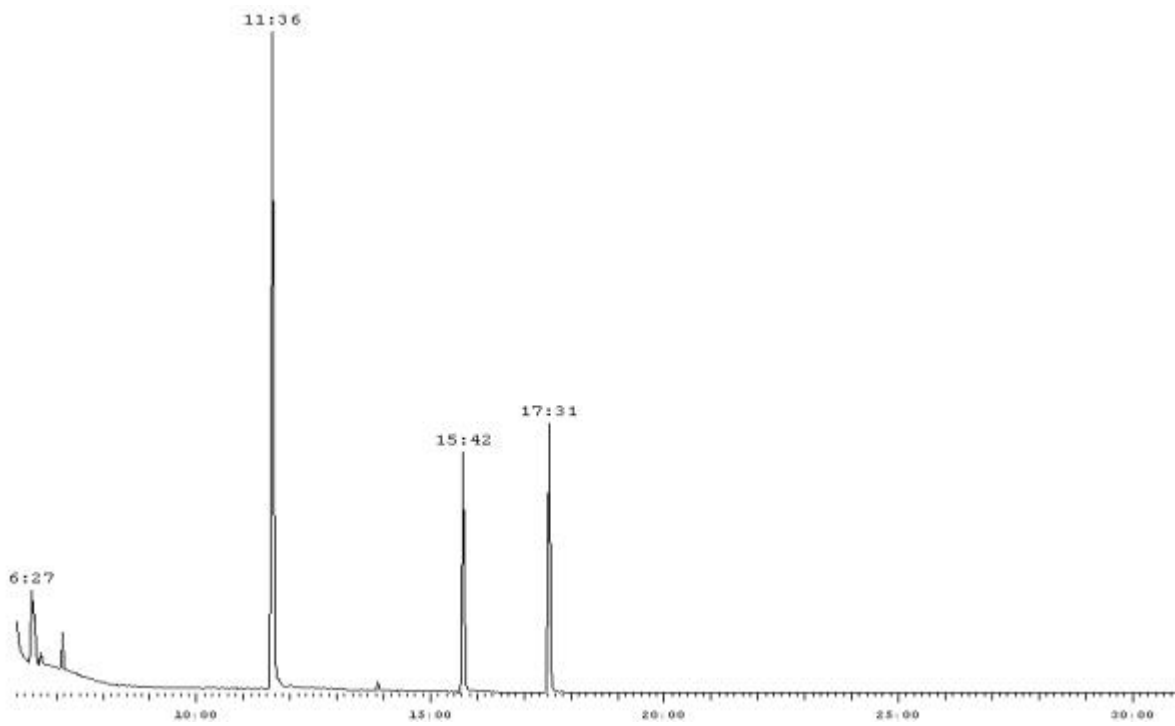
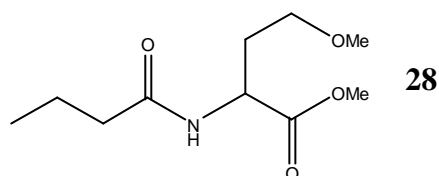


Abbildung 5-9: TIC von C8- (11:36 min), C12-(15:42 min), C14-HSL (17:31min) mit NICI-Detektion

5.4.5 Derivatisierung mit Orthoameisensäuretrimethylester

Bei den Versuchen mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) eine Umesterung des Homoserinlactons zum Methylester zu erzeugen, tauchte ein unerwartetes Nebenprodukt auf. Aus den EI-Spektren wurde der folgende Strukturvorschlag **28** abgeleitet.



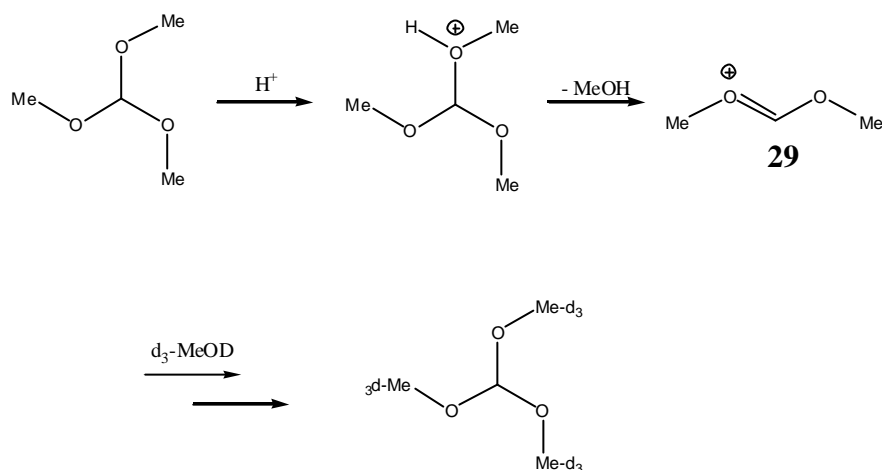
Aufgrund der bekannten Reaktionsweise von TMSH erschien ein γ -Methoxybutansäuremethylester-Derivat Reaktionsprodukt unwahrscheinlich. Daher wurde das Produkt auf einem unabhängigen Weg dargestellt. Mit Orthoameisensäuretrimethylester ist eine entsprechende Reaktion für Lactone beschrieben.³⁰ Damit konnte der angegebene Strukturvorschlag bestätigt werden. Aufgrund der guten in der Literatur angegebenen Ausbeuten, war davon auszugehen, dass die entsprechende Reaktion auch im Mikromaßstab durchführbar ist. Diese Derivatisierung wurde mit C4-HSL, C8-HSL, C12-HSL, C14-HSL und 3-OH-C10-HSL durchgeführt (EI-Spektren siehe Abbildung 8-28 bis Abbildung 8-31). Auf die gleiche Art wie bei der Reduktion mit Lithiumborhydrid wurden die Wiederfindungsraten bestimmt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Wiederfindungsraten bei der Derivatisierung mit Orthoameisensäuretrimethylester

AHL	Edukt/Standard	Produkt/Standard	Wiederfindungsrate
C4-HSL	8143576:9450684	22528707:16139736	1.62
C12-HSL	40462982:10305763	11202899:2852594	1.00
C14-HSL	41622084:8617115	18667418:5508232	0.70
3-O-C6-HSL	847442:10881119	167474:4031079	0.53

Trotz der erfolgreichen Derivatisierung der AHLs mit underivatisierter Seitenkette, gelang dies für 3-OH-C10-HSL nicht. Es traten immer wieder unidentifizierte Nebenprodukte auf. Variationen in der Reaktionsdauer ergaben, dass die Reaktion für AHLs bereits nach drei Stunden vollständig ist. Für 3-OH-C10-HSL traten dennoch weiterhin Nebenprodukte auf.

Diese Derivatisierung kann mit der bereits beschriebenen Methode der Deuteriummarkierung kombiniert werden. Dazu kann eine molare 1:1-Mischung von Orthoameisensäuretrimethylester und Orthoameisensäuretrimethylester-d₉ Verwendung finden. Obwohl Synthesen für Orthoameisensäuretrimethylester-d₉ in der Literatur beschrieben sind³¹, war davon auszugehen, dass in einer schwefelsauren Lösung von Methanol und Methanol-d₄ ein Austausch stattfindet, da für die Reaktion mit Orthoameisensäuretrimethylester ein mesomeriestabilisiertes Carbeniumion (**29**) als reaktive Zwischenstufe postuliert wurde.



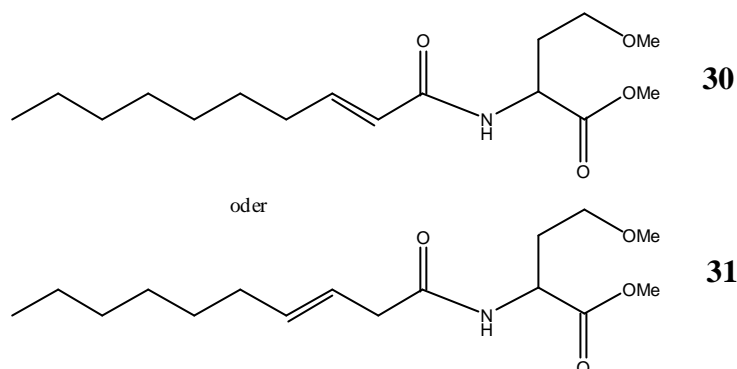
Die Tatsache, dass ein derartiger Austausch stattfindet, ist im Übrigen ein weiterer Hinweis auf die Existenz der Zwischenstufe **29**, für die bisher kein direkter Nachweis gelungen ist³⁰.

Damit war die Darstellung von Orthoameisensäuretrimethylester-d₉ in reiner Form nicht nötig. Die erfolgreiche Umsetzung der AHLs wurde anhand von EI-Massenspektren ermittelt (siehe Abbildung 8-32 bis Abbildung 8-35). Hierbei ergaben sich wiederum unidentifizierte Nebenprodukte bei der Derivatisierung von 3-OH-C10-HSL. Zur Überprüfung der Deuterium-Muster-Strategie wurden von den erhaltenen Derivaten ESI-Massenspektren aufgenommen (siehe Abbildung 8-36 bis Abbildung 8-39).

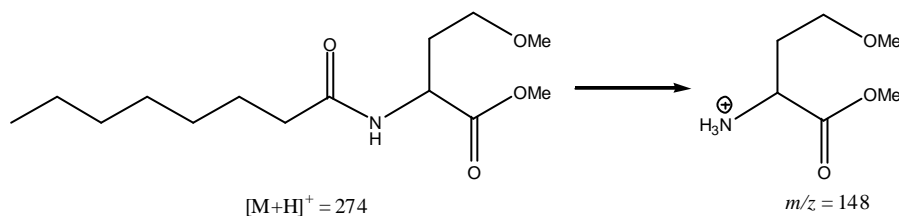
In den erhaltenen ESI-Spektren ergeben sich Parallelen zu den ESI-Spektren der AHLs. Es sind wiederum Natriumaddukte der AHLs zu beobachten, wobei auch hier durch den Zusatz von Ammoniumacetatlösung das Verhältnis von $[M+H]^+$ -Ionen gegenüber $[M+Na]^+$ -Ionen verbessert werden kann.

Erstaunlicherweise sind im ESI-Spektrum für das γ -Methoxybutansäuremethylester-Derivat von 3-OH-C10-HSL keine Nebenprodukte zu beobachten, wie es im EI-Spektrum der Fall war. Es aber gibt Hinweise darauf, dass es sich bei den Nebenprodukten um polymere

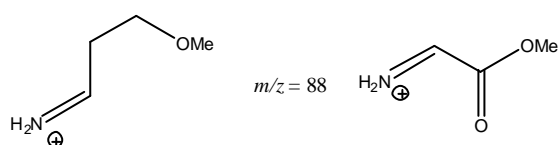
Verbindungen hoher Atommassen handelt, die im ESI-Massenspektrum nicht detektiert werden können, bei der EI-Massenspektrometrie jedoch aufgrund der hohen Injektortemperaturen zersetzt werden. Eines der Produkte scheint eine Atommasse von 299 zu besitzen und könnte demzufolge aus einer Eliminierung von Wasser resultieren. Als Strukturvorschläge kommen **30** und **31** in Frage.



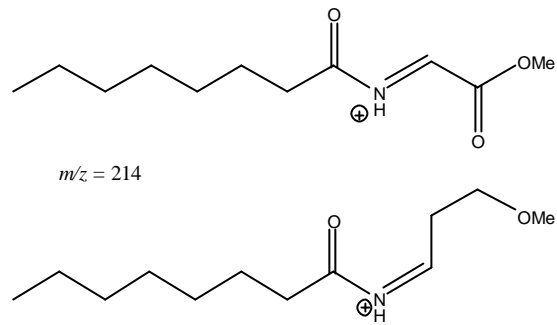
In der MS^2 - und MS^3 -Analyse, die leider nur für das γ -Methoxybutansäuremethylester-Derivat von C8-HSL durchgeführt wurde, zeigt sich ein interessantes Fragmentierungsverhalten (siehe Abbildung 8-40). In MS^2 von sind zwei Fragmente zu beobachten. Dabei geht das Fragment mit der Masse 148 wahrscheinlich auf einen Bruch der Amidbindung zurück.



In MS^3 von 148 sind zwei weitere Fragmente zu beobachten. Ein Fragment der Masse 214 ist wahrscheinlich auf den Verlust von Methanol zurückzuführen. Für das Fragment der Masse 88 können zwei Strukturvorschläge gemacht werden.



Das zweite Fragment in MS^2 des γ -Methoxybutansäuremethylester-Derivats von C8-HSL der Masse 242 ist wahrscheinlich auf den Verlust von Methanol zurückzuführen. Die weiteren Produkte in MS^3 haben die Massen 214 und 182. Für das Fragment der Masse 214 sind wiederum zwei Strukturen möglich. Das Fragment der Masse 182 hat zusätzlich Methanol verloren.



Unter der Annahme der gezeigten Fragmentierungswege liefern die γ -Methoxybutansäuremethylester-Derivat zwei interessante Fragmente, von denen eines charakteristisch für alle γ -Methoxybutansäuremethylester-Derivate von AHLs, das andere charakteristisch für die Seitenkette ist. Der größte Vorteil dieser Derivatisierung liegt jedoch darin, dass nun in der LC/MS-Analyse Methanol verwendet werden kann.

5.5 EI-Fragmentierungsschema

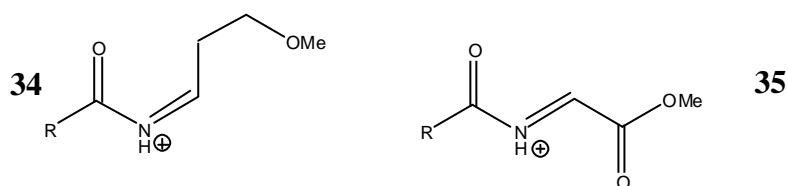
Die aus der Umsetzung von Orthoameisensäuretrimethylester (H/D 1:1) und den *N*-(Acyl)-homoserinlactonen (C4-, C8-, C12- und C14-HSL) erhaltenen EI-Massenspektren (siehe Abbildung 8-32 bis Abbildung 8-35) ermöglichten nähere Deutungen zu einem möglichen EI-Fragmentierungsschema der γ -Methoxybutansäuremethylester-Derivate.

Im Vergleich mit den EI-Spektren aus der Umsetzung ohne Deuterium (siehe Abbildung 8-28 bis Abbildung 8-31) fiel das Augenmerk zuerst auf die Fragmente M-58, M-59, 88, bei denen in der Umsetzung von Orthoameisensäuretrimethylester (H/D 1:1) um 3 amu höhere Fragmente in vergleichbarer Intensität zu beobachten waren.

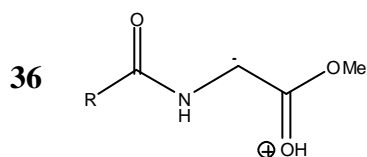
Aufgrund der Struktur der γ -Methoxybutansäuremethylester-Derivat, resultieren diese Fragmente aus der Abspaltung von genau einem Rest aus dem γ -Methoxybutansäuremethylester. Leider existieren für diese Fragmente jedoch mehrere Strukturvorschläge. Für Fragmente der Masse 88 sind die Strukturen **32** und **33** möglich.



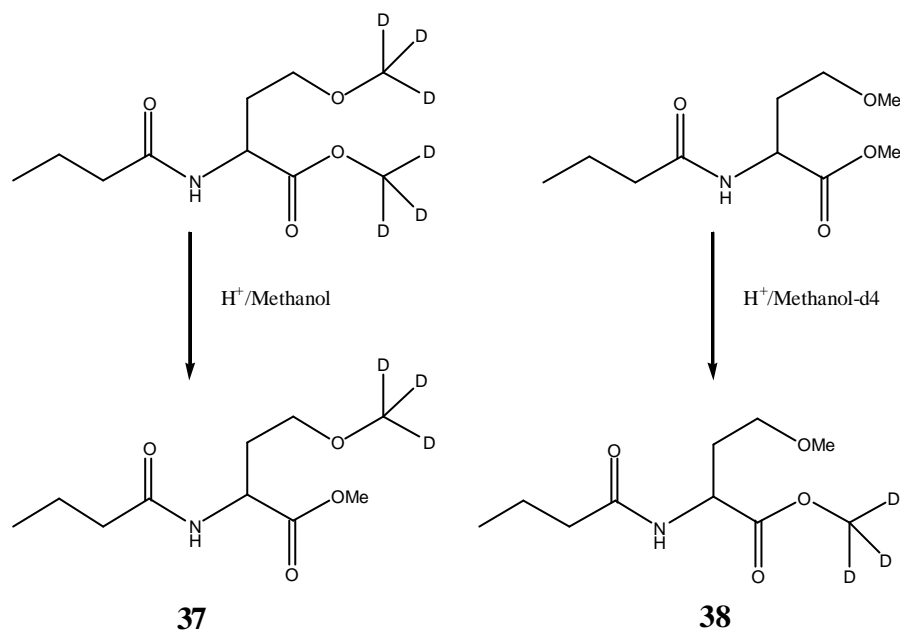
Als mögliche Vorläuferionen kommen die Fragmente **34** und **35** der Masse M-59 in Frage.



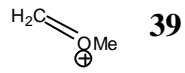
Das Fragment **36** ist ein möglicher Strukturvorschlag für die Masse M-58 und ist wahrscheinlich durch eine Mc-Lafferty-Umlagerung entstanden.



Für genauere Analysen wurden die Deuteriummarkierungen selektiv an der Ether- (**37**) und der Ester-Position (**38**) der γ -Methoxybutansäuremethylester-Derivate durchgeführt.



Aus einem Vergleich der relativen Intensitäten in den erhaltenen Massenspektren von **37** (siehe Abbildung 8-41) und **38** (siehe Abbildung 8-42) kann man erkennen, dass das Fragment der Masse M-59 streng als Ether **34** entsteht. Bei einer näheren Betrachtung des Fragments der Masse 88, stellt man fest, dass es zu einem großen Anteil als Ether **32**, wahrscheinlich per Onium-Reaktion aus **34**, entsteht. Bei der Derivatisierung als Ester entsteht jedoch ein Signal der Masse 91 mit ungefähr 8 % rel. Intensität für das die Struktur **33** wahrscheinlich ist. Da das Vorläuferion unbekannt ist, wurde eine Vorläuferionen-Analyse des Fragments der Masse 88 an dem γ -Methoxybutansäuremethylester-Derivat von C14-HSL durchgeführt (siehe Abbildung 8-43). Damit konnte der Abbauweg via M-59 und Onium-Reaktion bestätigt werden. Als weitere Vorläuferionen konnten Fragmente mit den ungefähren Massen 146 und 130 beobachtet werden, deren Massen jedoch nur sehr ungenau bestimmt werden konnten. Bei einer Tochterionen-Analyse des Fragments der Masse 146 (siehe Abbildung 8-44) konnte diese Masse jedoch bestätigt werden, für die allerdings kein Strukturvorschlag existiert. Weiterhin interessant ist das Fragment der Masse 45, für das die Struktur **39** wahrscheinlich ist, da für **37** ein Peak der Masse 48 erscheint. Eine Vorläuferionen-Analyse wurde nicht durchgeführt.



Damit ergibt sich als teilweises Fragmentierungsschema Abbildung 5-10.

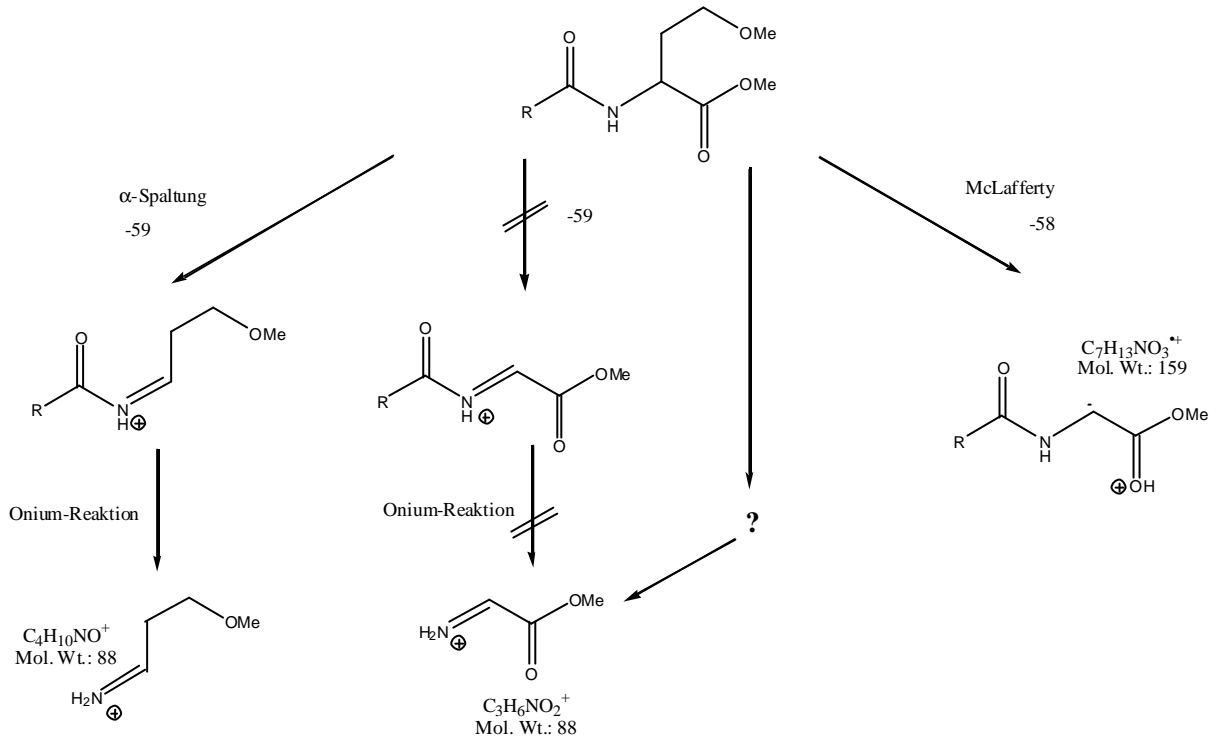


Abbildung 5-10: Fragmentierungsschema für den Zerfall von g-Methoxybutansäuremethylester-Derivaten der AHLs.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Diplomarbeit werden verschiedene Ansätze zur Entwicklung einer allgemeinen Analysenmethode dargestellt. Es ist dabei bereits abzusehen, dass es wahrscheinlich keine Analysenmethode geben wird, die für jeden Zweck universell einsetzbar ist. Vielmehr können die Methoden komplementär eingesetzt werden, je nach vorhandenem Problem.

Für erste Analysen ist die Derivatisierung mit Orthoameisensäuretrimethylester die Methode der Wahl. Zum einen kann durch die vollständige Unterdrückung des Lactonolyse-Gleichgewichts Methanol als Lösungs- und Elutionsmittel in der LC/MS-Analyse verwendet werden. Zum anderen ist durch die Deuteriummarkierung ein direkter Hinweis auf das Vorliegen eines Lactons gelungen.

Bei Zweifeln, ob ein Lacton vorliegt kann eine Markierung per Hojo-Reduktion mit anschließender Acetylierung durchgeführt werden. Hiermit ergeben sich durch das charakteristische Isotopenmuster Hinweise auf die Struktur.

Mit Hilfe der genauen Kenntnis von Fragmentierungswegen, können genauere Informationen über die Struktur eines analytischen Zielmoleküls erhalten werden.

Dennoch ist die Entwicklung der analytischen Methoden keineswegs abgeschlossen. Die Fragmentierungswege wurden bis jetzt nur teilweise und ausschließlich für *N*-(Acyl)-homoserinlactone untersucht. Weiterhin fehlt eine Quantifizierung der Methoden, um Aussagen über deren Empfindlichkeit und die Grenzen der Anwendbarkeit machen zu können.

Die Ergebnisse der Biotests mit den beiden synthetischen Diastereomeren von *N*-(3-Hydroxydecanoyl)-L-homoserinlacton liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vor.

7 Experimenteller Teil

7.1 Materialien und Methoden

Die Chemikalien waren von Fluka oder von Sigma-Aldrich und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Benutzung destilliert und soweit angegeben nach Standardmethoden absolutiert^{32,33}.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden auf mit 0.2 mm Kieselgel beschichteten Fertigfolien der Firma Machery-Nagel durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch ultraviolettes Licht oder mit Hilfe eines der folgenden Tauchbäder:

- 8 ml konz. Schwefelsäure, 3 g Molybdätophosphorsäure und 1 g Cer(II)-sulfat in 100 ml Wasser
- 0.5 % Kaliumpermanganat in 1 N Natronlauge

Die abschließende Entwicklung erfolgte durch Wärmezufuhr von einem Heißluftfön.

NMR-Spektren wurden auf einem Bruker AMX 400 aufgenommen. Als deuteriertes Lösungsmittel wurde Chloroform-d verwendet.

GC/EI-MS-Spektren wurden mit Geräten der Firma Hewlett-Packard, Wilmington, USA aufgenommen. Das GC-System hatte die Bezeichnung HP 6890 Series GC System und wurde mit einem Split/Splitless-Injektor und einer Fused-Silica-Kapillarsäule BPX5 (25 m, 0.22 mm Innendurchmesser, 0.25 μm Phasendicke) der Firma SGE Inc., Melbourne, Australien betrieben. Das Massenspektrometer war ein HP 5973 Mass Selective Detector, der bei 70 eV betrieben wurde. Als Trägergas fand Helium mit einem Volumenstrom von 1 ml/min Verwendung. Standardinjektionsvolumen war 1 μl bei einem Splitverhältnis von 1:20. Die Ofentemperatur wurde fünf Minuten isotherm bei 60 °C gehalten und dann mit einer Rampe von 10 °C/min auf 320 °C erhöht. Soweit nicht anders angegeben betrug die Injektortemperatur 250 °C.

Die Drehwerte optisch aktiver Verbindungen wurden auf einem Dr. Kernchen Propol Digital Automatic Polarimeter bestimmt.

Das HPLC-System war von der Firma Thermo Separation Products. Es bestand aus einem Pumpensystem P4000, die Probenaufgabe wurde mit einem Autosampler AS3000 durchgeführt, die Detektion erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor

GC/CI-MS-Spektren wurden mit einem Hewlett Packard 5890A Gaschromatographen mit einer Fused-Silica-Vorsäule (3 m, 0.32 mm Innendurchmesser, deaktiviert, Phenomenex) und einer analytischen Säule (ZB1, 30 m, 0.32 mm Innendurchmesser, Schichtdicke 0.25 μm , Phenomenex) aufgenommen. Als Trägergas fand Helium mit einem Volumenstrom von 1.6 ml/min Verwendung. Der Gaschromatograph wurde in direkter Kopplung mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (TSQ 700, Finnigan) im negativen Modus und Ammoniak als Reaktantgas (103 mTorr) betrieben. Standardinjektionsvolumen war 1 μl bei einem Splitverhältnis von 1:20. Die Ofentemperatur wurde drei Minuten isotherm bei 100 °C gehalten und dann mit einer Rampe von 10 °C/min auf 330 °C erhöht. Die Injektortemperatur betrug 280 °C. Die Quellentemperatur betrug 130 °C.

ESI-MS-Spektren wurden auf einem MAT 95 XLT Hybrid-Tandem-Massenspektrometer der Firma Thermo Electron Bremen GmbH, Deutschland, ausgestattet mit einem Standard-Elektrospray-Interface des Herstellers aufgenommen. Das Gerät besteht aus einem doppelt-fokussierenden Sektorfeld-Massenspektrometer in Kopplung mit einem Quadrupol-Ionenfallen-Massenanalysator. Der zweite Massenanalysator wurde zur Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens durch Kollisions-Aktivierung (collision induced dissociation, CID) von Vorläuferionen aus dem Sektorfeld-Massenspektrometer benutzt.

Für Microspra wurde die originale Fused-Silica-Sample-Transfer-Kapillare durch eine Edelstahl-Kapillare (SMS Service für Massenspektrometrie GmbH, Idstein, Deutschland) mit denselben Ausmaßen ersetzt. Die nichtleitende Ferrule wurde durch eine Graphit-Ferrule der entsprechenden Größe ersetzt. Die Flussrate betrug 0.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ und die Spray-Spannung lag bei 1.1 bis 2.2 kV. Die Temperatur der heated capillary war soweit nicht anders angegeben bei 195 °C. Die übrigen Spannungen des Elektrospray-Interfaces wurden entsprechend der maximalen Intensität des gewünschten Signals optimiert.

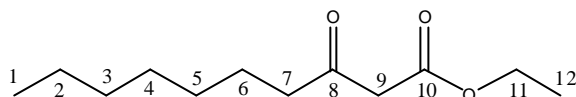
Für die LC/MS-Kopplung wurde eine HPLC-Pumpe (Rheos 2000, Flux Instruments, Schweiz) benutzt. Das Splitverhältnis wurde derart eingestellt, dass 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ in das

Massenspektrometer gelangten. Zur Vernebelung wurde ein zusätzlicher Gasstrom (sheath gas) von Stickstoff mit 4 arb. units Vordruck benutzt. Die Temperatur der heated capillary war bei 235 °C. Die ursprüngliche Fused-Silica-Sample-Transfer-Kapillare wurde durch eine Edelstahl-Kapillare (Firma Masscom, Bremen, Deutschland) mit 110 µm Innendurchmesser ersetzt.

Vorläuferionen- und Produktionen-Experimente wurden als linked scans im ersten feldfreien Raum ohne Stoßaktivierung auf einem Massenspektrometer MAT95 der Firma Thermo Electron Bremen GmbH, Deutschland, bei 70 eV und einer Quelltemperatur von 180 °C durchgeführt.

7.2 Synthese von N-(3-Hydroxydecanoyl)-homoserinlacton

7.2.1 3-Oxodecansäureethylester¹¹



Zu einer gut gerührten Suspension von 0.74 g (3.9 mmol) Zinn(II)-chlorid und 4.3 ml (41 mmol) Diazoessigsäureethylester in 80 ml abs. DCM wird langsam eine Lösung von 5.0 g (39 mmol) frisch destilliertem Octanal in 20 ml abs. DCM zugetropft. Dabei ist eine deutliche Gasentwicklung zu beobachten und die Lösung erwärmt sich leicht.

Die zu Beginn der Reaktion stark gelbe Lösung entfärbt sich im Verlauf der Reaktion bis zu einer schwach-gelben Färbung, die von einem Überschuss von Diazoessigsäureethylester stammt.

Nach 2½ Stunden Rühren bei RT wird die Reaktionslösung in einen Scheidetrichter überführt und mit 400 ml ges. Natriumchloridlösung versetzt. Anschließend wird dreimal mit je 300 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt über eine Säulenchromatographie an Kieselgel mit Pentan/Essigester 50:1 als mobile Phase.

Ausbeute: 7.38 g (34 mmol, 87 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 0.88 (t, 3H, CH₃, H-1, ³J = 6.8 Hz), 1.22-1.34 (m, 11H, CH₂, CH₃), 1.59 (m, 2H, CH₂, H-6, ³J = 7.3 Hz), 2.53 (t, 2H, CH₂, H-7, ³J = 7.3 Hz), 3.43 (s, 2H, CH₂, H-9), 4.19 (q, 2H, CH₂, H-11, ³J = 7.1 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ [ppm] = 13.9 (q), 14.0 (q), 22.5 (t), 23.4 (t), 28.9 (t), 28.9 (t), 31.5 (t), 42.9 (t, C-7), 49.2 (t, C-9), 61.2 (t, C-11), 167.2 (s, C-10), 202.8 (s, C-8).

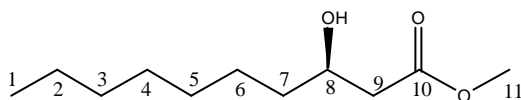
EI-MS (70 eV): m/z (%) = 39 (21), 41 (68), 42 (34), 43 (80), 45 (6), 53 (6), 55 (47), 56 (18), 57 (100), 58 (11), 67 (7), 69 (24), 70 (9), 83 (8), 87 (9), 88 (48), 97 (16), 98 (9), 102 (12), 109 (6), 115 (14), 127 (48), 130 (79), 131 (14), 143 (20), 172 (3), 196 (2), 214 (1).

7.2.2 Herstellung des Ru((S)-BINAP)-Katalysators¹³

In einem mehrfach ausgeheizten und mit Stickstoff befüllten Kolben werden 39 mg (0.14 mmol) Ruthenium(II)-chlorid-1,5-Cyclooctadien-Komplex, 100 mg (0.16 mmol) (S)-(-)-2,2'-tris(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl und 0.3 ml Triethylamin in 4 ml abs. Xylol gelöst. Es wird 2½ Stunden unter Rückfluss gekocht. Danach wird das Lösungsmittel per Vakuumdestillation entfernt und ein roter Feststoff bleibt zurück. Dieser wird in 10 ml abs. THF suspendiert und in 10 Portionen zu je 1 ml aufgeteilt.

Die Herstellung des R-Katalysators erfolgt analog.

7.2.3 (R)-3-Hydroxydecansäuremethylester¹²



Der Autoklav wird mit 1.5 g (7.0 mmol) 3-Oxodecansäureethylester in 10 ml abs. Methanol befüllt. Dazu gibt man 1 ml (R)-Katalysator, sowie 3 Tropfen konz. Salzsäure. Nach mehrfachem Spülen mit Stickstoff wird ein Wasserstoffdruck von 12 bar eingestellt. Anschließend wird unter Rühren auf 80 °C erwärmt. Während der Reaktion nahm der Wasserstoffdruck – wahrscheinlich wegen eines Lecks – stetig ab. Nach 5½ Stunden Reaktionsdauer lässt man abkühlen, spült mehrfach mit Stickstoff und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Zur Reinigung wird eine Säulenchromatographie an Kieselgel mit Pentan/Essigester 5:1 als mobile Phase durchgeführt.

Ausbeute: 640 mg (3.2 mmol, 45 %)

Ein Teil des Eduktes konnte als Methylester zurückgewonnen werden (668 mg, 3.3 mmol), eine längere Reaktionsdauer war auf Grund einer leeren Wasserstoffflasche nicht möglich.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 0.88 (t, 3H, CH₃, H-1, ³J = 6.8 Hz), 1.24-1.56 (m, 13H, CH₂, CH₃), 2.41 (dd, 1H, CH₂, H-9, ¹J = 16.3 Hz, ³J = 8.9 Hz), 2.52 (dd, 1H, CH₂, H-9, ¹J = 16.3 Hz, ³J = 3.3 Hz), 2.94 (br, 1H, OH), 3.71 (s, 3H, CH₃, H-11), 3.97-4.05 (m, 1H, CH, H-8).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ [ppm] = 14.0 (q), 22.6 (t), 25.4 (t), 29.2 (t), 29.4 (t), 31.7 (t), 36.5 (t, C-7), 41.1 (t, C-9), 51.6 (q, C-11), 68.0 (d, C-8), 173.4 (s, C-10).

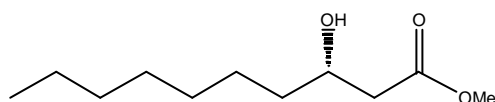
EI-MS (70 eV): m/z (%) = 39 (9), 41 (29), 43 (53), 55 (19), 57 (15), 59 (11), 61 (18), 69 (17), 71 (37), 74 (32), 103 (100), 184 (1).

e. e.: 97 %

$[\alpha]_{\text{D}}^{27} = -12.6^{\circ}$ (c = 18.98 g/100 ml, CHCl₃)

Literatur³⁴: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -13.5^{\circ}$ (c = 2.5 g/100 ml, CHCl₃)

7.2.4 (S)-3-Hydroxydecansäuremethylester



Ein Autoklav wird mit 1.79 g (8.4 mmol) 3-Oxodecansäureethylester und 0.46 g (2.3 mmol) 3-Oxodecansäuremethylester in 10 ml abs. Methanol befüllt. Dazu gibt man 2 ml (S)-Katalysator, sowie 4 Tropfen konz. Salzsäure. Nach mehrfachem Spülen mit Stickstoff wird ein Wasserstoffdruck von 18 bar eingestellt. Anschließend wird auf 80 °C erwärmt und dabei gerührt. Nach 6 Stunden Reaktionsdauer lässt man abkühlen, spült mehrfach mit Stickstoff und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Zur Reinigung wird eine Säulenchromatographie an Kieselgel mit Pentan/Diethylether 2:1 als mobile Phase durchgeführt.

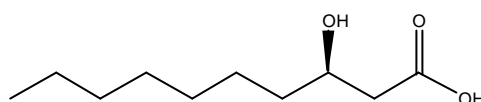
Ausbeute: 1.89 g (9.3 mmol, 87 %)

e. e.: >95 %

$[\alpha]_D^{21} = +16.4^\circ$ (c = 18.88 g/100 ml, CHCl_3)

Literatur³⁵: $[\alpha]_D^{20} = +16.4^\circ$ (c = 1.0 g/100 ml, CHCl_3)

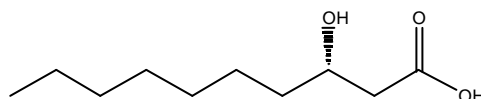
7.2.5 (R)-3-Hydroxydecansäure³⁶



1 g (4.9 mmol) (R)-3-Hydroxydecansäuremethylester werden in 40 ml Methanol gelöst. Dazu gibt man 7 ml 2 N Natronlauge und rührt 3 Stunden bei RT. Anschließend wird das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand zweimal in 70 ml DCM aufgeschlämmt, um nicht-ionische Bestandteile zu lösen. Der ionische Rückstand wird in 2 N Salzsäure gelöst und dreimal mit je 150 ml Essigester extrahiert. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel entfernt. Zur Reinigung wird eine Säulenchromatographie an Kieselgel mit Pentan/Diethylether 1:2 als Laufmittel durchgeführt.

Ausbeute: 492 mg (2.6 mmol, 53 %)

7.2.6 (S)-3-Hydroxydecansäure

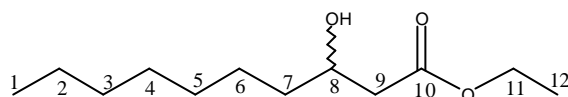


1.04 g (5.1 mmol) (S)-3-Hydroxydecansäuremethylester werden in 60 ml abs. Methanol gelöst. Dazu gibt man 7 ml 2 N Natronlauge und rührt 3 Stunden bei RT. Anschließend wird

das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand zweimal in 70 ml DCM aufgeschlämmt, um nicht-ionische Bestandteile zu lösen. Der ionische Rückstand wird in 2 N Salzsäure gelöst und dreimal mit je 200 ml DCM extrahiert. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel entfernt.

Ausbeute: 969 mg (5.1 mmol, 100 %)

7.2.7 rac. 3-Hydroxydecansäureethylester³⁷



In einem mit Stickstoff befüllten und mehrfach ausgeheizten Kolben werden 10 ml abs. Ethanol und 0.31 g (8.3 mmol) Natriumborhydrid vorgelegt. Dazu lässt man innerhalb von 15 Minuten 1.47 g (6.9 mmol) 3-Oxodecansäureethylester in 7 ml abs. Ethanol zutropfen. Dabei erwärmt sich die Reaktionsmischung leicht. Nach 2 Stunden Rühren bei RT wird vorsichtig mit 10 %iger Essigsäure hydrolysiert. Anschließend wird mit 20 ml ges. Natriumchloridlösung verdünnt und dreimal mit je 30 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Reinigung erfolgt per Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Gradienten von Pentan/Essigester 20:1 bis Pentan/Essigester 5:1

Ausbeute: 580 mg (2.7 mmol, 39 %)

Ein Teil des Eduktes war noch nicht umgesetzt, während ein anderer Teil bereits zum Diol weiterreagiert hatte.

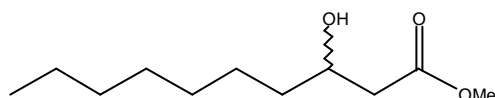
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 0.88 (t, 3H, CH₃, H-1, J = 6.9 Hz), 1.24-1.56 (m, 15H, CH₂, CH₃), 2.40 (dd, 1H, CH₂, H-9, 1J = 16.3 Hz, 3J = 8.9 Hz), 2.50 (dd, 1H, CH₂, H-9,

$^1J = 16.3$ Hz, $^3J = 3.2$ Hz), 2.97 (br, 1H, OH), 3.96-4.04 (m, 1H, CH, H-8), 4.17 (q, 2H, CH₂, H-11, $^3J = 7.1$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃, 100 MHz): δ [ppm] = 14.0 (q), 14.1 (q), 22.6 (t), 25.4 (t), 29.2 (t), 29.4 (t), 31.7 (t), 36.5 (t, C-7), 41.3 (t, C-9), 60.6 (t, C-11), 68.0 (d, C-8), 173.0 (s, C-10).

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 41 (32), 43 (46), 55 (21), 57 (19), 60 (13), 61 (9), 69 (19), 71 (46), 88 (24), 89 (26), 117 (100), 127 (9), 153 (6).

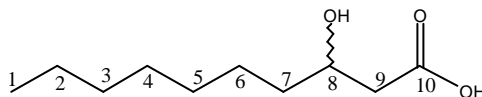
7.2.8 rac. 3-Hydroxydecansäuremethylester



370 mg (1.71 mmol) rac. 3-Hydroxydecansäureethylester werden in 5 ml Methanol gelöst. Dazu gibt man 2 Tropfen konz. Salzsäure und erhitzt unter Rückfluss 24 Stunden lang. Danach wurde das Lösungsmittel entfernt.

Ausbeute: 320 mg (1.58 mmol, 93 %)

7.2.9 rac. 3-Hydroxydecansäure



150 mg (0.69 mmol) rac. 3-Hydroxydecansäureethylester wird in 5 ml Methanol gelöst. Dazu gibt man 1 ml 2 N Natronlauge und rührt 3 Stunden bei RT. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand zweimal mit je 10 ml DCM aufgeschlämmt,

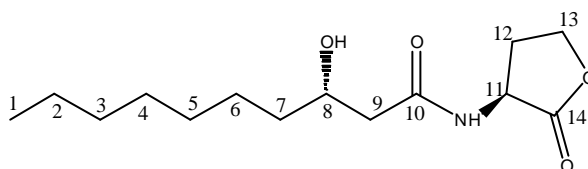
um nicht-ionische Bestandteile zu entfernen. Der ionische Rückstand wird mit 2 N Salzsäure gelöst und dreimal mit je 20 ml Essigester extrahiert. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel entfernt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Gradienten von Pentan/Diethylether 2:1 bis zu reinem Diethylether.

Ausbeute 58 mg (0.31 mmol, 45 %)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 0.88 (t, 3H, CH_3 , H-1, $J = 6.9$ Hz), 1.24-1.56 (m, 13H, CH_2 , CH_3), 2.47 (dd, 1H, CH_2 , H-9, $^1J = 16.5$ Hz, $^3J = 8.9$ Hz), 2.57 (dd, 1H, CH_2 , H-9, $^1J = 16.5$ Hz, $^3J = 3.2$ Hz), 4.01-4.07 (m, 1H, CH, H-8), 5.50-6.50 (br, 2H, OH, COOH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 14.1 (q, C-1), 22.6 (t), 25.4 (t), 29.2 (t), 29.4 (t), 31.8 (t), 36.5 (t, C-7), 41.1 (t, C-9), 68.1 (d, C-8), 177.8 (s, C-10).

7.2.10 *N*-((*S*)-3-Hydroxydecanoyl)-*L*-homoserinlacton^{5,17}



Es werden 150 mg (0.80 mmol) (*S*)-3-Hydroxydecanensäure, 146 mg (0.80 mmol) *L*-Homoserinlacton-Hydrobromid und 108 mg (0.94 mmol) *N*-Ethylmorpholin in 3 ml abs. THF vorgelegt. Dazu gibt man bei 0 °C 180 mg 1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat, sowie eine Lösung von 182 mg (0.88 mmol) DCC in 1 ml abs. THF. Es wird 30 Minuten bei 0 °C und anschließend 2 Stunden bei RT gerührt.

Danach wird der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat im Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in 20 ml Essigester aufgenommen und mit je 25 ml ges. Natriumhydrogencarbonatlösung, 2 N Zitronensäure, ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Anschließend wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt.

Zur Reinigung wird eine Säulenchromatographie an Kieselgel mit DCM/Methanol 20:1 als Laufmittel durchgeführt.

Ausbeute: 111 mg (0.41 mmol, 51 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 0.88 (t, 3H, CH₃, H-1, *J* = 6.9 Hz), 1.22-1.35 (m, 11H, CH₂), 1.40-1.55 (m, 2H, H-7), 2.24 (m, 1H, H-12, ³*J* = 11.5 Hz, ³*J* = 9.0 Hz), 2.35 (dd, 1H, H-9, ¹*J* = 15.1 Hz, ³*J* = 9.0 Hz), 2.44 (dd, 1H, H-9, ¹*J* = 15.1 Hz, ³*J* = 2.8 Hz), 2.73 (m, 1H, H-12, ³*J* = 8.7 Hz, ³*J* = 1.2 Hz), 3.61 (br, 1H, OH), 3.97-4.04 (m, 1H, H-8), 4.25-4.33 (m, 1H, H-13, ³*J* = 6.1 Hz), 4.47 (td, 1H, H-13, ³*J* = 9.0 Hz, ³*J* = 1.5 Hz), 4.66 (ddd, 1H, H-11, ³*J* = 11.5 Hz, ³*J* = 8.7 Hz, ³*J* = 7.0 Hz), 7.07 (d, 1H, NH, ³*J* = 7.0 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ [ppm] = 14.0 (q, C-1), 22.6 (t), 25.5 (t), 29.2 (t), 29.4 (t), 29.7 (t), 31.8 (t), 37.0 (t), 42.8 (t), 48.9 (d), 66.1 (t, C-13), 66.7 (d, C-8), 173.0 (s, C-10), 175.9 (s, C-14).

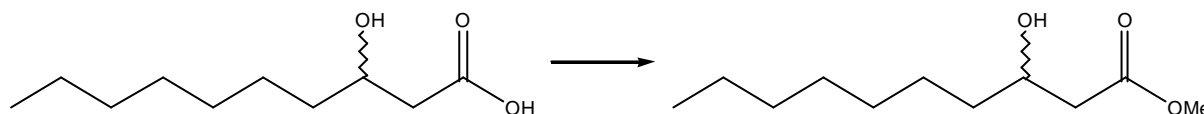
EI-MS (70 eV): *m/z* (%) = 41 (44), 42 (13), 43 (63), 44(16), 55 (31), 56 (34), 57 (84), 58 (7), 67 (8), 69 (30), 71 (12), 74 (18), 81 (6), 83 (15), 84 (10), 85 (10), 100 (9), 101 (15), 102 (100), 111 (6), 114 (7), 124 (6), 125 (13), 128 (7), 143 (37), 144 (21), 152 (10), 153 (6), 169 (18), 172 (90), 173 (8), 186 (11), 224 (2), 253 (4), 271 (2).

$[\alpha]_D^{22} = +21.6^\circ$ (c = 1.94 g/100 ml, CHCl₃)

Die Reaktion zu (*R*)-3-OH-C10-HSL erfolgt analog mit 300 mg (1.59 mmol) (*R*)-3-Hydroxydecansäure.

Ausbeute: 44 mg (0.16 mmol, 10 %)

7.3 Derivatisierung für chirale GC³⁸



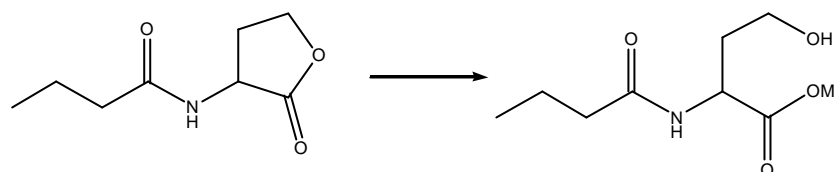
Zur Herstellung einer Diazomethanlösung werden 2 verschiedene Lösungen A und B hergestellt. Für Lösung A werden 2.59 g (12.1 mmol) *N*-Methyl-*N*-nitroso-*p*-toluolsulfonsäureamid (Diazald[®]) in einer Mischung aus 2.5 ml Diethylenglykolether und 2.5 ml Diethylether gelöst. Für Lösung B werden 0.75 g (13.4 mmol) Kaliumhydroxid in 2.5 ml Wasser und 2.5 ml Methanol gegeben.

In einer aus einem Schraubdeckelgläschen und einem Teflonschlauch konstruierten Mikrodestillationsapparatur werden 0.4 ml von Lösung A vorgelegt. Zu dieser Lösung werden rasch 0.4 ml von Lösung B gegeben. Es tritt sofort eine Gasentwicklung ein und das generierte Gas wird über einen kurzen Teflonschlauch mit einem dazwischenliegenden gasdichten Schraubdeckelgläschen als Waschflasche in ungefähr 1 ml einer 10 %igen Lösung von Methanol in Diethylether eingeleitet.

Für die Derivatisierung werden ungefähr 30 µl einer Naturstoffprobe mit 100 µl der frisch hergestellten Diazomethanlösung vereinigt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel zusammen mit dem überschüssigen Derivatisierungsreagenz im Stickstoffstrom bei 50 °C entfernt.

7.4 Derivatisierung von N-(Acyl)-homoserinlactonen

7.4.1 Basenkatalysierte Darstellung der γ -Hydroxymethylester²⁰



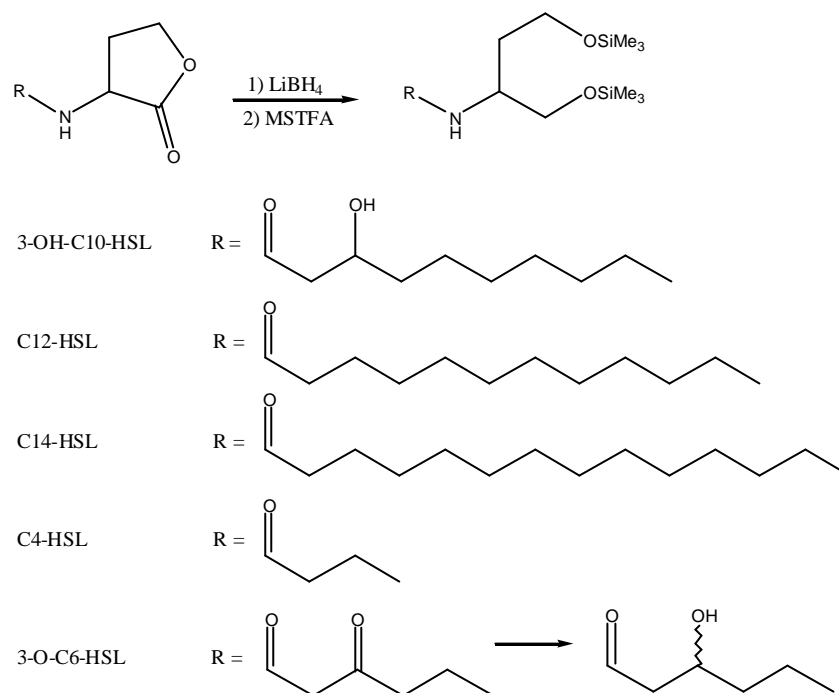
In einem ausgeheizten und mit Stickstoff befüllten Kolben werden 168 mg (7.3 mmol) Natrium vorgelegt. Dazu gibt man 14.6 ml abs. Methanol und rührt bis sich alles Natrium gelöst hat. Dies resultiert in einer 0.5 M Lösung von Natriummethanolat in Methanol.

0.6 mg C4-HSL werden in 50 μ l abs. DCM gelöst. Dazu werden 50 μ l der 0.5 M Natriummethanolat-Lösung gegeben. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei 50 °C erwärmt. Dann wird mit 20 μ l Eisessig angesäuert und 250 μ l Wasser hinzugefügt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 250 μ l DCM extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom bei 50 °C wird der Rückstand mit 100 μ l MSTFA versetzt. Nach 30 Minuten Reaktion bei 50 °C wird das überschüssige Derivatisierungsreagenz im Stickstoffstrom bei 50 °C entfernt. Der Rückstand wird in 200 μ l Methanol aufgenommen und per GC/MS analysiert.

7.4.2 Säurekatalysierte Darstellung der γ -Hydroxymethylester^{21,39}

0.6 mg C4-HSL werden in 100 μ l abs. Methanol gelöst. Dazu werden 10 mg Amberlyst-15 gegeben und man lässt für 20 Stunden bei RT stehen. Dann wird die Lösung vom Amberlyst-15 dekantiert und dreimal mit je 200 μ l abs. Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom bei 50 °C entfernt. Auf den zurückbleibenden Feststoff werden 50 μ l MSTFA gegeben und 30 Minuten bei 50 °C erhitzt. Abschließend wird das überschüssige Derivatisierungsreagenz bei 50 °C im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wird in ungefähr 100 μ l DCM aufgenommen und per GC/MS analysiert.

7.4.3 Reduktion mit Lithiumborhydrid^{22,23,27}



Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate bei Reaktionen im Mikromaßstab wird dem Reaktionsgemisch ein interner Standard hinzugegeben. Bei den folgenden Reaktionen fand eine Lösung von 13.9 mg Heneicosan in 2.3 ml DCM Verwendung (~20 mM).

Weiterhin wird für die Reaktionen eine Stammlösung des Reduktionsmittels hergestellt. Dazu werden in 12 ml abs. Diethylether 98 mg (4.5 mmol) Lithiumborhydrid und 180 µl (4.5mmol) Methanol gelöst.

Eine kleine Menge HSL (typischerweise 0.4-1.7 mg) werden eingewogen und mit 20 µl des internen Standards, sowie 200 µl DCM versetzt. Die Probe wird per GC/MS analysiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei 50 °C im Stickstoffstrom werden zum erhaltenen Feststoff 200 µl der Reduktionslösung gegeben und 1 h bei 50 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wird mit 150 µl 1 N Salzsäure hydrolysiert und mit 200 µl Wasser verdünnt. Nun wird mehrfach mit DCM extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom bei 50 °C entfernt. Nachdem das Lösungsmittel vollständig verdampft ist, gibt man 100 µl MSTFA zu dem Rückstand und erhitzt 30 Minuten lang bei 50 °C. Nachdem die Reaktionsrückstände bei 50 °C im Stickstoffstrom vollständig

entfernt worden sind, wird die Probe in ungefähr 100 µl DCM aufgenommen und per GC/MS analysiert.

7.4.4 Darstellung von Lithiumbordeuterid²⁶

In einem ausgeheizten und mit Stickstoff befüllten Kolben, der mit einem Magnetrührer versehen ist, werden 1.74 g (20 mmol) wasserfreies Lithiumbromid und 0.84 g (20 mmol) Natriumbordeuterid gegeben. Nach Zugabe von 20 ml abs. Diethylether entsteht eine weiße Suspension. Diese wird für 48 Stunden bei 35 °C unter Rückfluss erhitzt. Nachdem man die Lösung hat abkühlen lassen, wird der Rührer ausgeschaltet. Nach einiger Zeit des Stehenlassens, ist eine klare Lösung über einem weißen Feststoff zu erkennen. Die klare Lösung wird mit einer Spritze aufgenommen und in einen ausgeheizten, mit Stickstoff befüllten und gewogenen Kolben überführt. Aus diesem Kolben wird der Diethylether abdestilliert. Nachdem der aus der Lösung ausfallende Feststoff der Beobachtung nach trocken ist, wird auf 100 °C erhitzt, um letzte Spuren von Diethylether zu entfernen. Der erhaltene weiße Feststoff wird ohne weitere Reinigung für die Reduktionen eingesetzt.

7.4.5 Reduktion mit Lithiumbordeuterid

Es wird eine Stammlösung des Reduktionsmittels hergestellt. Dazu werden in 4.6 ml abs. Diethylether 44 mg (1.7 mmol) Lithiumbordeuterid und 70 µl (1.7 mmol) Methanol gelöst. Zu 0.5 mg C4-HSL werden 200 µl dieser Stammlösung gegeben und für 1 h bei 50 °C erhitzt. Anschließend wird mit 150 µl 1 N Salzsäure hydrolysiert und die Lösung mit 200 µl Wasser verdünnt. Nach mehrfacher Extraktion mit DCM wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom bei 50 °C entfernt. Zu dem Rückstand gibt man 100 µl MSTFA und erhitzt 30 Minuten lang bei 50 °C. Nachdem das überschüssige Derivatisierungsreagenz bei 50 °C im Stickstoffstrom vollständig entfernt worden sind, wird die Probe in ungefähr 100 µl DCM aufgenommen und per GC/MS analysiert.

7.4.6 Reduktion mit Natriumbordeuterid und Lithiumsalz²⁸

Für die Reduktion wird eine Stammlösung aus 191 mg (4.5 mmol) Lithiumchlorid und 170 mg (4.5 mmol) Natriumborhydrid in 12 ml abs. THF hergestellt. 200 µl dieser Stammlösung werden auf 0.5 mg Homoserinlacton gegeben und für 45 Minuten auf 50 °C erhitzt. Anschließend wird die Lösung mit 200 µl 1 N Salzsäure hydrolysiert und 200 µl Wasser hinzugegeben. Die wässrige Phase wird mehrfach mit DCM extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend bei 50 °C im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit. Zum Rückstand werden 100 µl MSTFA gegeben und für 30 Minuten auf 50 °C erhitzt. Die Reaktionsrückstände werden bei 50 °C im Stickstoffstrom entfernt und der zurückbleibende Feststoff in 100 µl DCM aufgenommen. Die Lösung wird per GC/MS analysiert.

7.4.7 Reduktion mit LiBH₄ und NaBD₄ 1:1

Es wird eine Stammlösung von 38 mg (0.91 mmol) Natriumbordeuterid und 19.8 mg (0.91 mmol) Lithiumborhydrid in 5 ml abs. Diethylether hergestellt. Nach 1 Stunde Rühren bei Raumtemperatur werden 200 µl dieser Lösung zu 0.5 mg C4-HSL gegeben und die Mischung 1 Stunde bei 50 °C erhitzt. Anschließend wird mit 200 µl 1 N Salzsäure hydrolysiert und 150 µl Wasser hinzugefügt. Es wird viermal mit je 200 µl DCM extrahiert und die vereinigten Extrakte über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei 50 °C im Stickstoffstrom wird auf den Rückstand 100 µl MSTFA gegeben und für 30 Minuten auf 50 °C erhitzt. Das überschüssige MSTFA wird im Stickstoffstrom bei 50 °C entfernt und der Rückstand in 100 µl DCM aufgenommen. Die Lösung wird per GC/MS analysiert.

7.4.8 Reduktion mit Hojos Reagenz²⁹

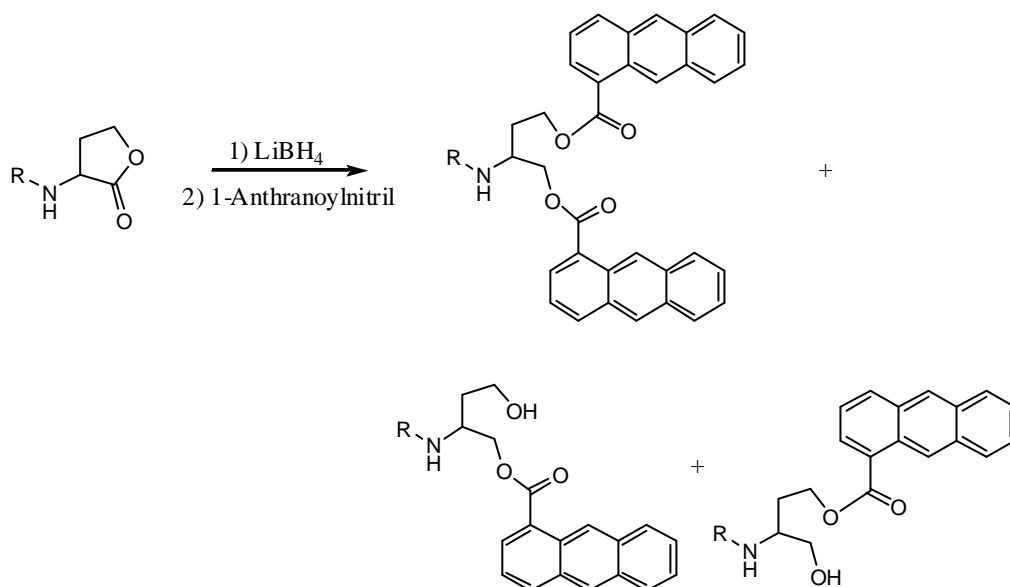
Kommerziell erhältliches Kieselgel für die Säulenchromatographie (0.063-0.200 mesh) wird 3 Stunden lang bei 170 °C im Hochvakuum getrocknet. 150 mg trockenes Kieselgel und 15 mg (0.4 mmol) fein gepulvertes Lithiumaluminiumhydrid werden sorgfältig gemischt. Dazu gibt man 500 µl abs. Diethylether und lässt für 1 Stunde bei RT stehen. Anschließend

werden 0.5 mg Homoserinlacton gelöst in 20 µl DME hinzugegeben und man lässt die Reaktionsmischung 3 Stunden lang bei RT stehen. Danach wird mit 1-2 Tropfen konz. Ammoniumchlorid-Lösung hydrolysiert. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird ein weiterer Tropfen konz. Ammoniumchlorid-Lösung hinzugegeben, um sicher zu sein, dass sie Hydrolyse vollständig ist. Die Lösung wird durch eine mit einem Wattebausch versehene Pasteurpipette filtriert und der Rückstand exzessiv mit DCM gewaschen (ungefähr 1 ml). Nach Entfernung des Lösungsmittels bei 50 °C im Stickstoffstrom, werden 50 µl MSTFA dazugegeben und 30 Minuten bei 50 °C erhitzt. Abschließend wird das überschüssige Derivatisierungsreagenz bei 50 °C im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wird in 100 µl DCM aufgenommen und per GC/MS analysiert.

Die Derivatisierung mit Lithiumaluminiumdeuterid verläuft analog.

Für die Derivatisierung zur Erzeugung des Isotopenmusters fand eine molare 1:1-Mischung von Lithiumaluminiumdeuterid und Lithiumaluminiumhydrid Verwendung.

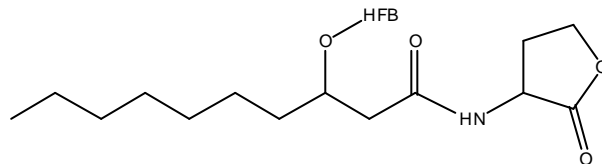
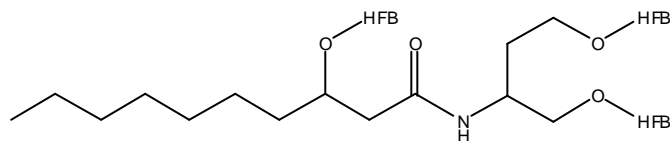
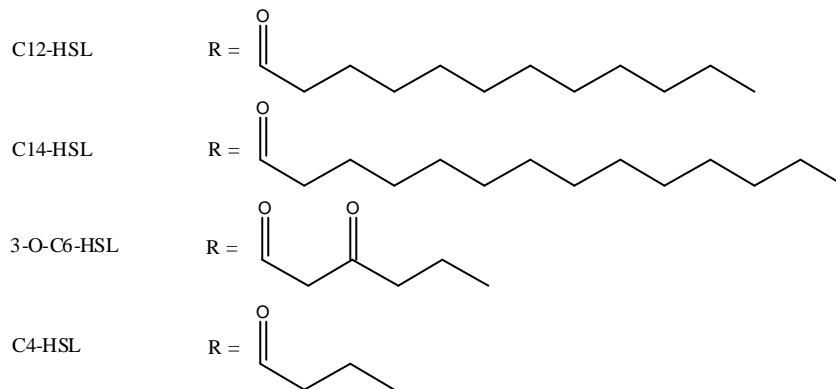
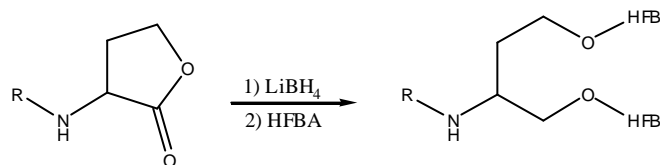
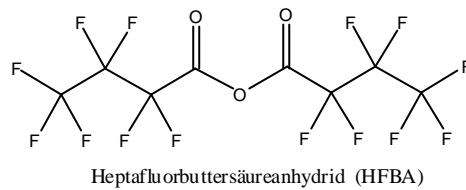
7.4.9 Darstellung der Anthracenoyl-Derivate²⁴



In einer typischen Reaktion werden 0.5 mg Homoserinlacton reduziert. Nach der Aufarbeitung werden zu den vom Lösungsmittel befreiten, vollständig reduzierten Homoserinlactonen 1 ml 0.1 % Triethylamin/Acetonitril gegeben. Nach Zugabe von 2 mg

Anthranoylnitril wird 3 Stunden lang bei 60 °C erhitzt. Die resultierende Lösung wird ohne weitere Aufarbeitung in die HPLC injiziert. Außerdem wird das so derivatisierte C4-HSL per GC/MS analysiert.

7.4.10 Darstellung der Heptafluorbuttersäure-Derivate



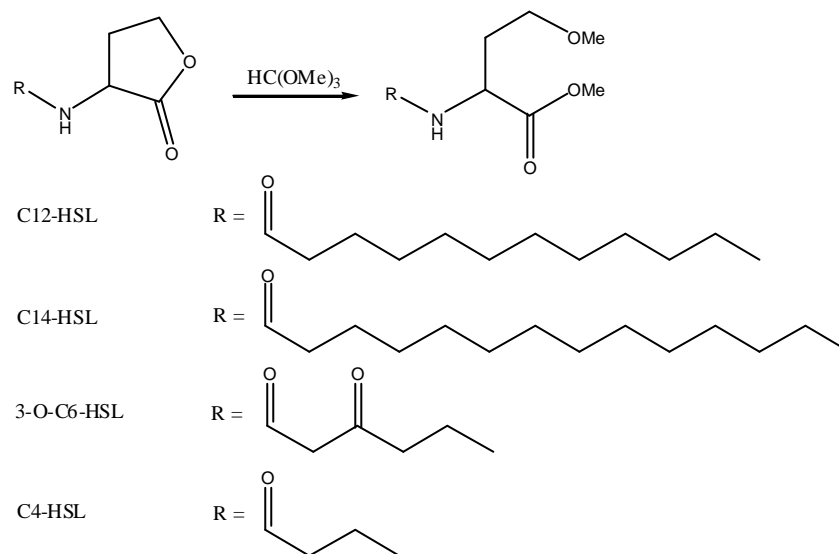
Die reduzierten AHLs werden in 15 μl Toluol gelöst. Dazu gibt man 40 μg DMAP in 20 μl Toluol und 35 μl Heptafluorbuttersäureanhydrid. Zum vollständigen Lösen wird die Lösung 5

min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wird für 20 min auf 60 °C erhitzt. Die flüchtigen Bestandteile werden im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 100 µl Toluol aufgenommen.

7.4.11 Reaktion mit TMSH

0.4 mg C4-HSL werden mit 100 µl TMSH-Lösung (0.25 M in Methanol) versetzt. Man lässt die Lösung für 3 Stunden bei RT stehen. Dann wird das Lösungsmittel bei 50 °C im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wird in 100 µl Methanol aufgenommen und eine Untersuchung per GC/MS durchgeführt.

7.4.12 Derivatisierung mit Orthoameisensäuretrimethylester³⁰



Es wird eine Stammlösung angesetzt. Dazu werden in einem ausgeheizten und mit Stickstoff befüllten Kolben 10 ml abs. Methanol, 1.1 ml (10 mmol) Orthoameisensäuretrimethylester und 50 µl (1 mmol) konz. Schwefelsäure gegeben. Diese Lösung wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wird ein interner Standard verwendet. Bei den folgenden Reaktionen fand eine Lösung von 13.9 mg Heneicosan in 2.3 ml DCM Verwendung (~20 mM).

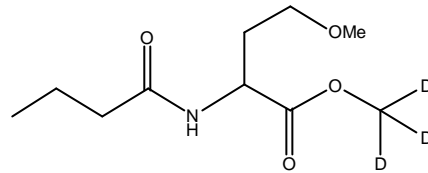
In einer typischen Reaktion werden zu 0.5 mg Homoserinlacton eingewogen und mit 20 µl des internen Standards, sowie 200 µl DCM versetzt. Von dieser Probe wird ein GC/MS aufgenommen. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei 50 °C im Stickstoffstrom werden 200 µl der Stammlösung dazu gegeben und 16 h lang bei 50 °C erhitzt. Anschließend wird bei 50 °C das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wird in 200 µl DCM aufgenommen und mit 200 µl ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrige Phase wird noch mindestens dreimal mit je 200 µl DCM extrahiert und die vereinigten Extrakte über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 100 µl DCM wieder aufgenommen.

7.4.13 Derivatisierung mit Orthoameisensäuretrimethylester (H9:D9 1:1)

Es wird eine Stammlösung angesetzt. Dazu werden in einem ausgeheizten und mit Stickstoff befüllten Kolben 2.84 ml abs. Methanol-d₄, 2.20 ml abs. Methanol, 0.55 ml (5 mmol) Orthoameisensäuretrimethylester und 25 µl (0.5 mmol) Schwefelsäure gegeben. Diese Lösung wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt.

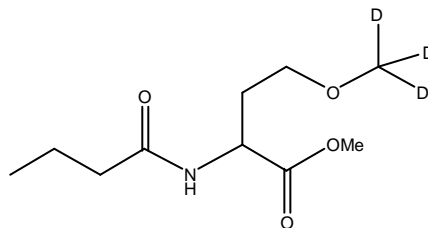
In einer typischen Reaktion werden zu 0.5 mg Homoserinlacton eingewogen, 200 µl der Stammlösung dazu gegeben und 16 h lang bei 50 °C erhitzt. Anschließend wird bei 50 °C das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wird in 200 µl DCM aufgenommen und mit 200 µl ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrige Phase wird noch mindestens dreimal mit je 200 µl DCM extrahiert und die vereinigten Extrakte über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 100 µl DCM wieder aufgenommen.

7.4.14 Darstellung von g-Methoxybutansäuremethylester-Derivaten mit Deutero-Ester-Markierung⁴⁰



80 mg Acetylchlorid werden in 1 ml Methanol-d₄ gelöst. 200 µl dieser Lösung werden auf den Rückstand aus einer mit C₄-HSL und Orthoameisensäuretrimethylester durchgeführten Derivatisierung gegeben. Die Mischung wird auf 50 °C erwärmt. Nach 20 Stunden wird das Lösungsmittel bei 50 °C im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wird in 100 µl DCM aufgenommen und per GC/MS analysiert.

7.4.15 Darstellung von g-Methoxybutansäuremethylester-Derivaten mit Deutero-Ether-Markierung⁴⁰



Es wird eine Stammlösung angesetzt. Dazu werden in einem ausgeheizten und mit Stickstoff befüllten Kolben 1 ml Methanol-d₄, 110 µl (1 mmol) Orthoameisensäuretrimethylester und 5 µl (0.1 mmol) Schwefelsäure gegeben. Diese Lösung wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Es werden zu 0.5 mg C₄-HSL 200 µl der Stammlösung gegeben und 16 h lang bei 50 °C erhitzt. Anschließend wird bei 50 °C das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wird in 200 µl DCM aufgenommen und mit 200 µl ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrige Phase wird noch mindestens dreimal mit je 200 µl DCM extrahiert und die vereinigten Extrakte über Magnesiumsulfat

getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 100 µl DCM wieder aufgenommen.

80 mg Acetylchlorid werden in 1 ml abs. Methanol gelöst. 200 µl dieser Lösung werden auf den Rückstand aus der Derivatisierung gegeben. Die Mischung wird auf 50 °C erwärmt. Nach 5 Stunden wird das Lösungsmittel bei 50 °C im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wird in 100 µl DCM aufgenommen und per GC/MS analysiert.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

abs.	absolutiert
ACN	Acetonitril
AHL	<i>N</i> -Acylhomoserinlacton
BINAP	1,1'-Binaphtyl-2,2'-diphenylphosphin
CID	collision-induced dissociation
δ	chem. Verschiebung in ppm
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DME	Dimethylethylether
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)pyridin
EDC	(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI-MS	Electron Impact Mass Spectrometry
GC	Gaschromatographie
GC/MS	gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie
ges.	gesättigt
HFB	Heptafluorbuttersäure
HFBA	Heptafluorbuttersäureanhydrid
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HSL	Homoserinlacton
Hz	Hertz
<i>J</i>	Kopplungskonstante
konz.	Konzentriert
MHz	Megahertz
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyl-trifluoracetamid
<i>m/z</i>	Masse pro Elementarladung
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ppm	parts per million
rac.	racemisch

RT	Raumtemperatur
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Total-Ionenstrom-Chromatogramm
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid

8.2 Massenspektren

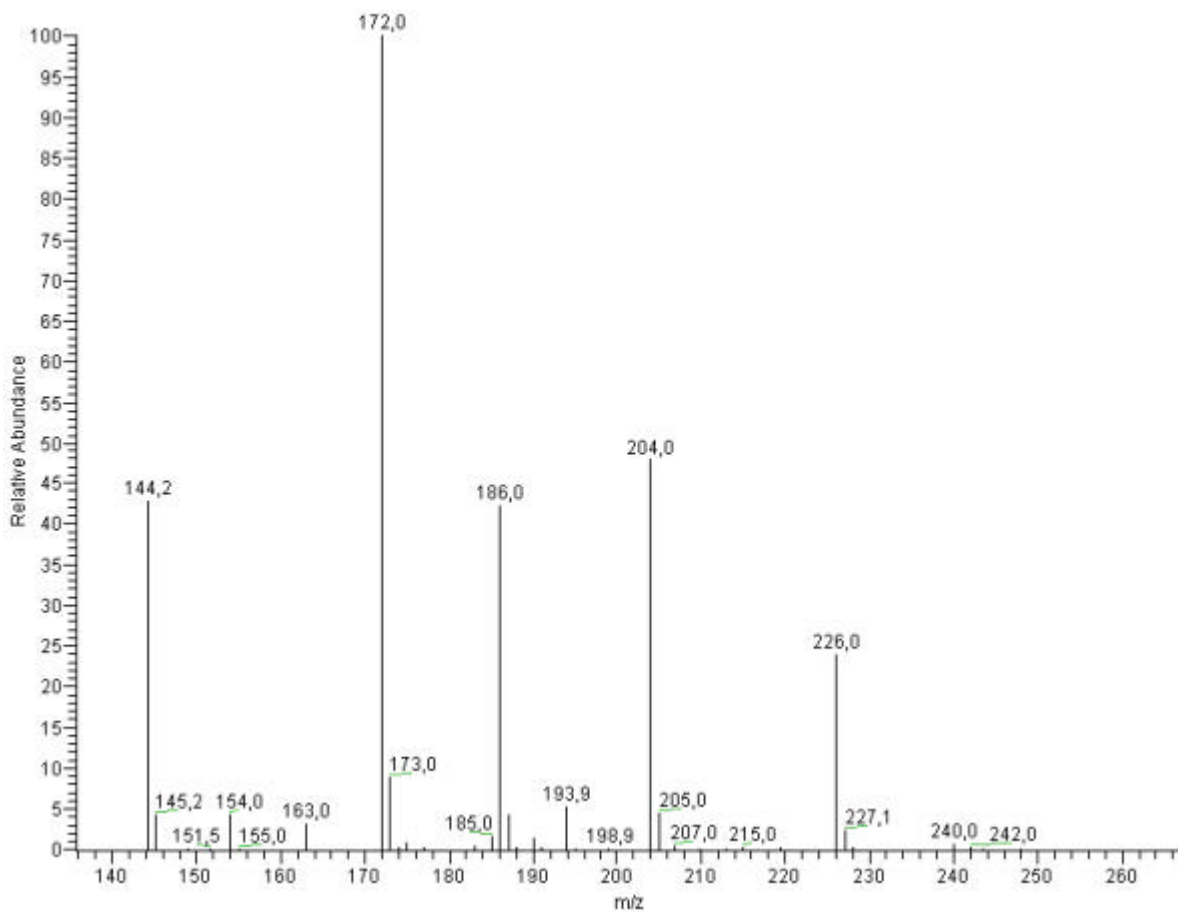


Abbildung 8-1: ESI-MS von C4-HSL, Stammlösung $c = 0.3 \text{ mg/ml}$ in 50 % MeOH (aq), 10 μl davon verdünnt in 500 μl ACN und 95 μl Wasser, 1 % Ameisensäure, heated capillary bei 180 °C, 144.2 = Background aus ACN, 172.0 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, 193.9 = $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 204.0 = $[\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}]^+$, 226.0 = $[\text{M}+\text{MeOH}+\text{Na}]^+$.

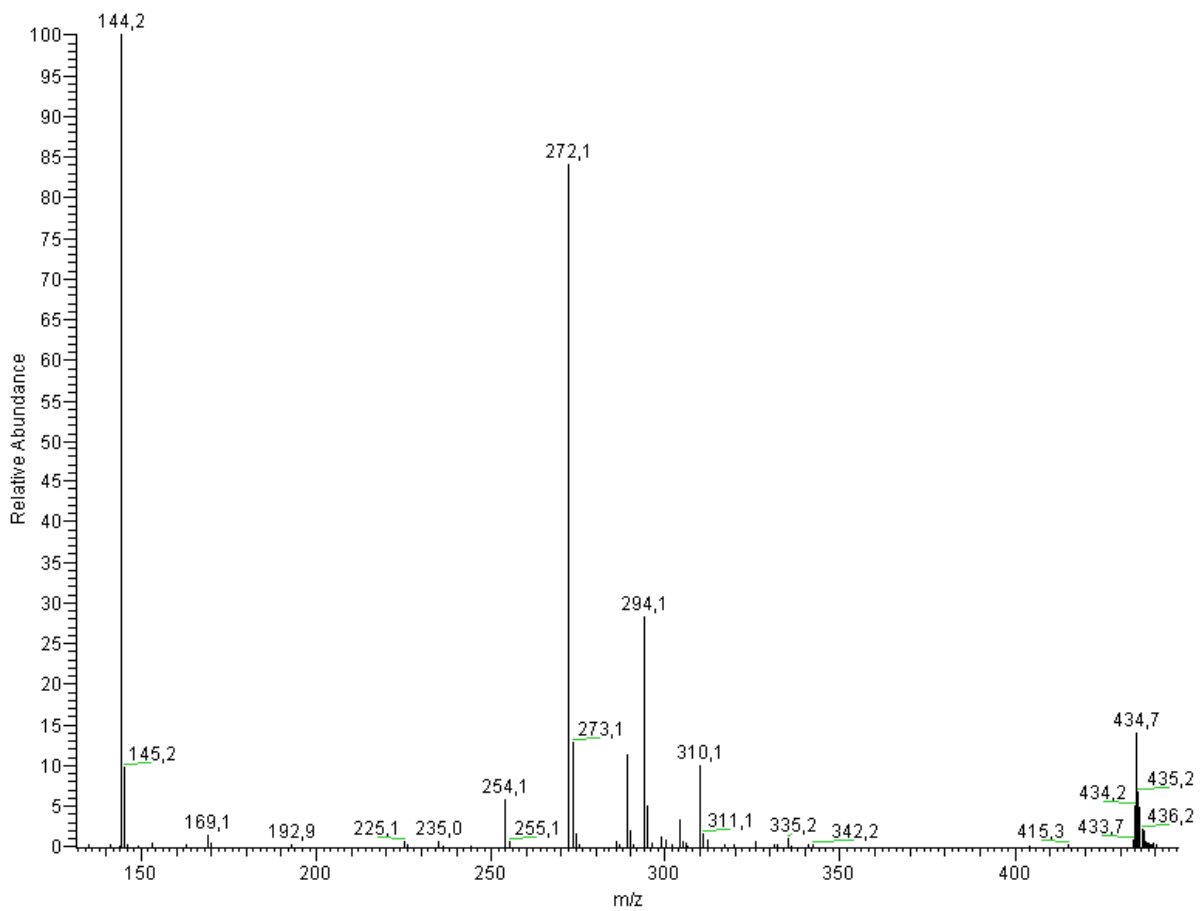


Abbildung 8-2: ESI-MS von 3-OH-C10-HSL, $c = 20 \mu\text{g/ml}$ in ACN, heated capillary bei $185 \text{ }^\circ\text{C}$, $144 = \text{Background aus ACN}$, $272.1 = [\text{M}+\text{H}]^+$, $294.1 = [\text{M}+\text{Na}]^+$, $310.1 = [\text{M}+\text{K}]^+$.

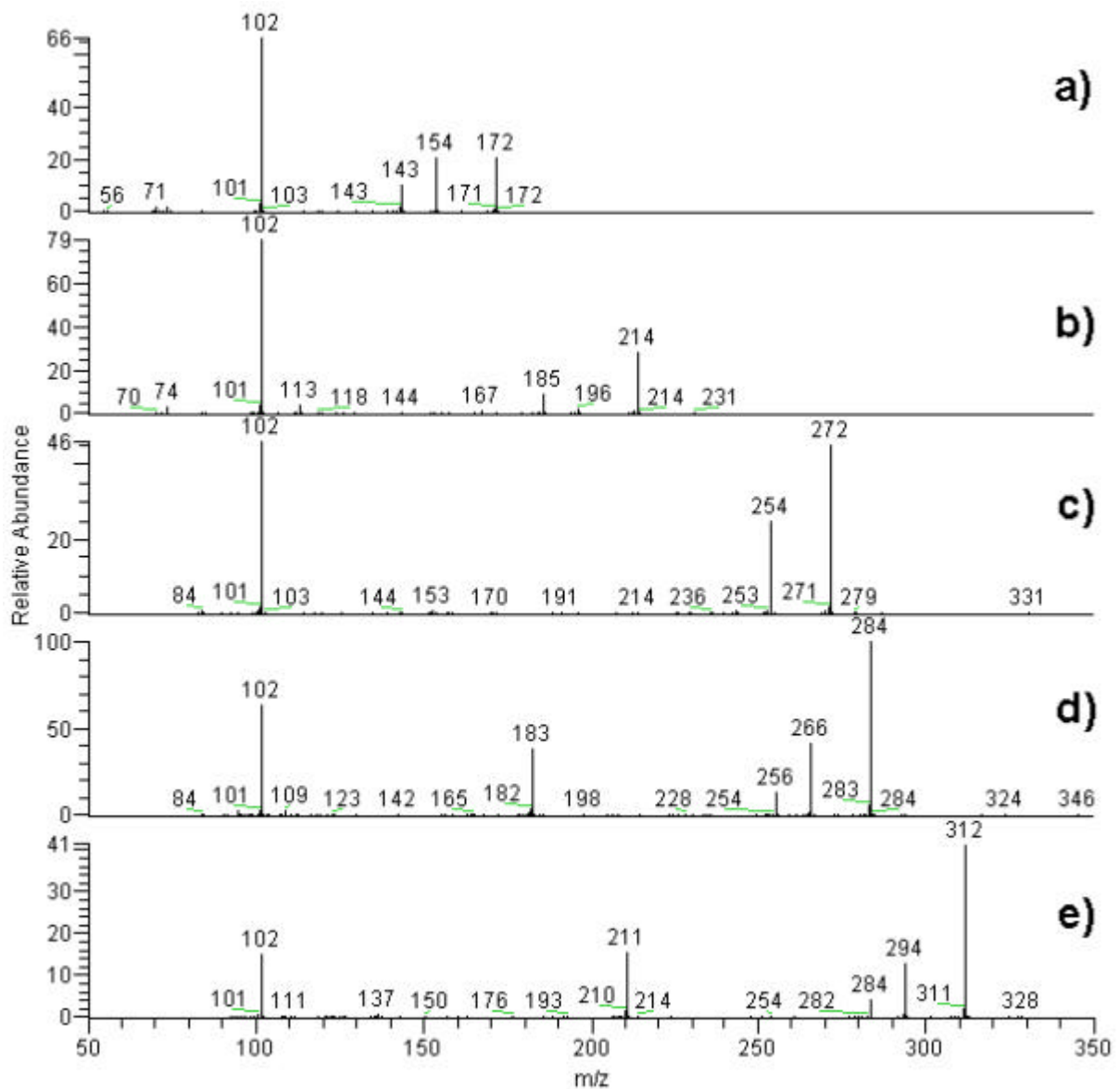


Abbildung 8-3: Produktions-Analyse (MS²) von a) [C4-HSL+H]⁺(172) bei 22 V, b) [3-O-C6-HSL+H]⁺(214) bei 22 V, c) [3-OH-C10-HSL+H]⁺(272) bei 22 V, d) [C12-HSL+H]⁺(284) bei 24 V, e) [C14-HSL+H]⁺(312) bei 24 V rel. Kollisionsenergie.

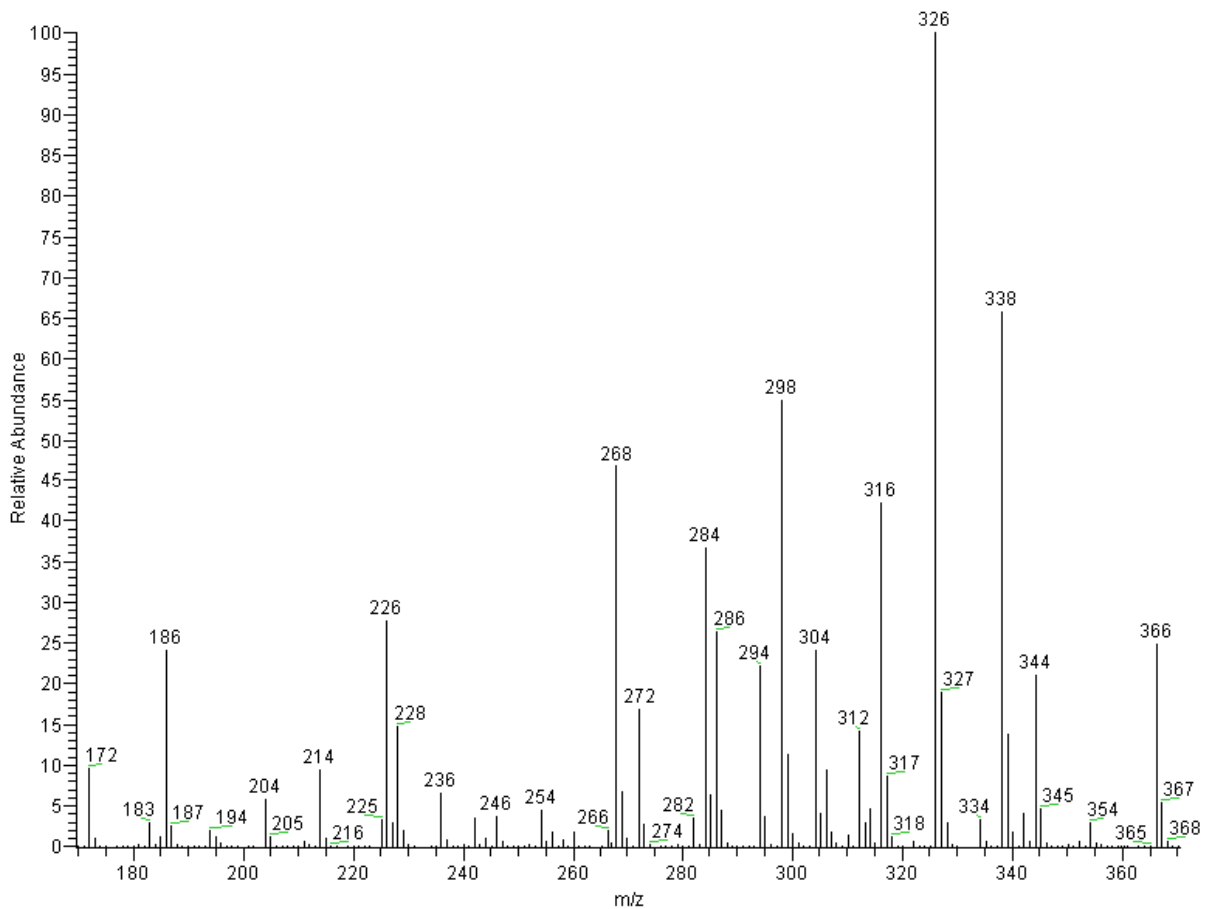


Abbildung 8-4: ESI-Massenspektrum von einem HSL-Mix: $c(\text{C4-HSL}) = 0.9 \text{ mg/ml}$, $c(3\text{-O-C6-HSL}) = 0.6 \text{ mg/ml}$, $c(3\text{-OH-C10-HSL}) = 0.9 \text{ mg/ml}$, $c(\text{C12-HSL}) = 1.2 \text{ mg/ml}$, $c(\text{C14-HSL}) = 1.2 \text{ mg/ml}$ in 50 % ACN (aq), über Nacht bei 50 °C in der 80fachen Menge MeOH, Zusatz von 1.5 % Ammoniumacetat, 172 = $[\text{C4-HSL}+\text{H}]^+$, 194 = $[\text{C4-HSL}+\text{Na}]^+$, 204 = $[\text{C4-HSL}+\text{MeOH}+\text{H}]^+$, 214 = $[\text{3-O-C6-HSL}+\text{H}]^+$, 226 = $[\text{C4-HSL}+\text{MeOH}+\text{Na}]^+$, 236 = $[\text{3-O-C6-HSL}+\text{Na}]^+$, 246 = $[\text{3-O-C6-HSL}+\text{MeOH}+\text{H}]^+$, 268 = $[\text{3-O-C6-HSL}+\text{MeOH}+\text{Na}]^+$, 272 = $[\text{3-OH-C10-HSL}+\text{H}]^+$, 284 = $[\text{C12-HSL}+\text{H}]^+$, 294 = $[\text{3-OH-C10-HSL}+\text{Na}]^+$, 304 = $[\text{3-OH-C10-HSL}+\text{MeOH}+\text{H}]^+$, 306 = $[\text{C12-HSL}+\text{Na}]^+$, 312 = $[\text{C14-HSL}+\text{H}]^+$, 316 = $[\text{C12-HSL}+\text{MeOH}+\text{H}]^+$, 326 = $[\text{3-OH-C10-HSL}+\text{MeOH}+\text{Na}]^+$, 334 = $[\text{C14-HSL}+\text{Na}]^+$, 338 = $[\text{C12-HSL}+\text{MeOH}+\text{Na}]^+$, 344 = $[\text{C14-HSL}+\text{MeOH}+\text{H}]^+$, 366 = $[\text{C14-HSL}+\text{MeOH}+\text{Na}]^+$.

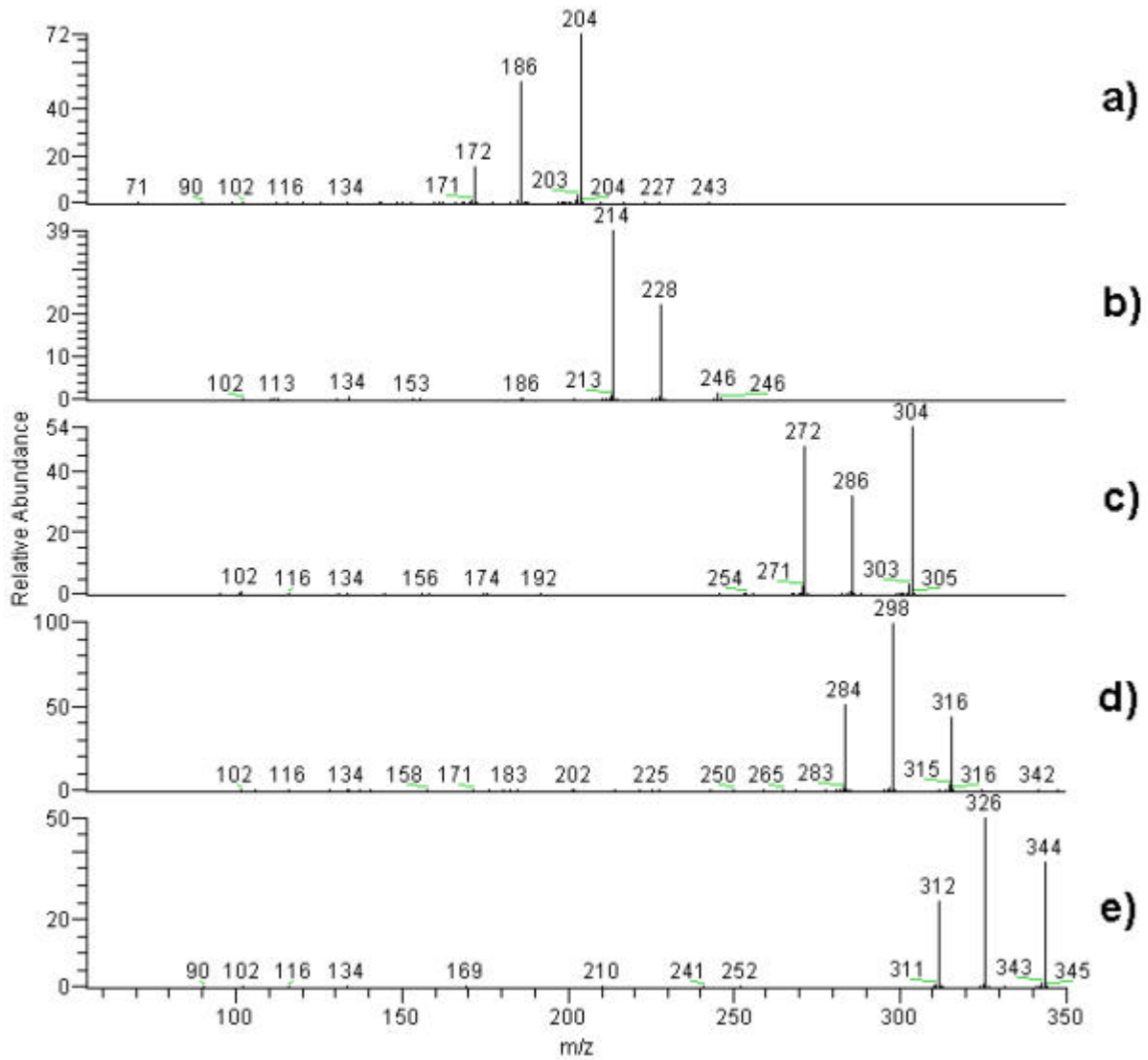


Abbildung 8-5: Produktions-Analyse (MS²) der g-Hydroxymethylester von a) [C4-HSL+MeOH+H]⁺(204) bei 18 V, b) [3-O-C6-HSL+MeOH+H]⁺(246) bei 15 V, c) [3-OH-C10-HSL+MeOH+H]⁺(304) bei 20 V, d) [C12-HSL+MeOH+H]⁺(316) bei 22 V, e) [C14-HSL+MeOH+H]⁺(344) bei 20 V rel. Kollisionsenergie.

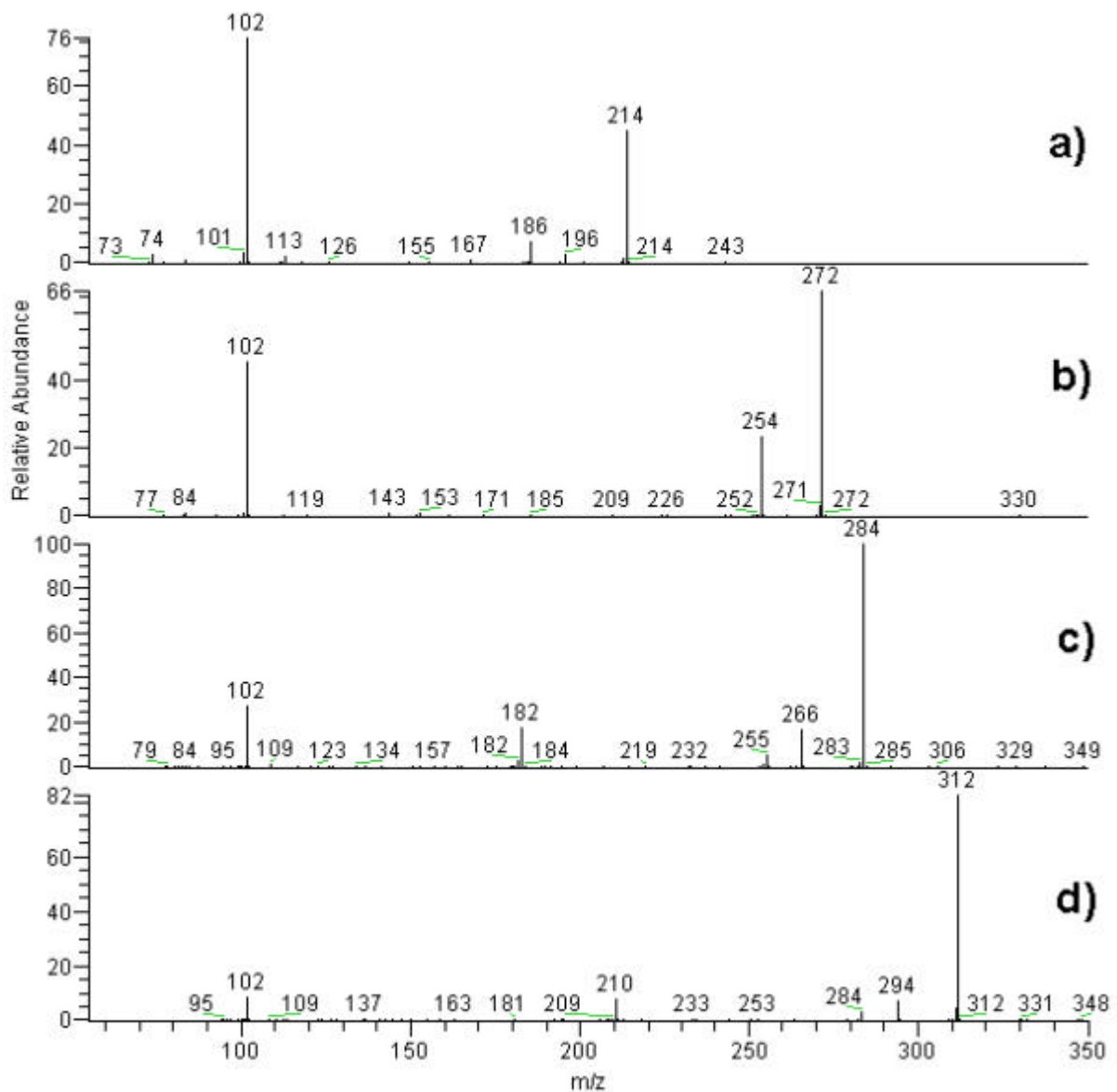


Abbildung 8-6: Produktions-Analyse (MS³) von a) [3-O-C6-HSL+H]⁺(214) aus [3-O-C6-HSL+MeOH+H]⁺(246) bei 20 V, b) [3-OH-C10-HSL+H]⁺(272) aus [3-OH-C10-HSL+MeOH+H]⁺(304) bei 20 V, c) [C12-HSL+H]⁺(284) aus [C12-HSL+MeOH+H]⁺(316) bei 21 V, d) [C14-HSL+H]⁺(312) aus [C14-HSL+MeOH+H]⁺(344) bei 22 V rel. Kollisionsenergie.

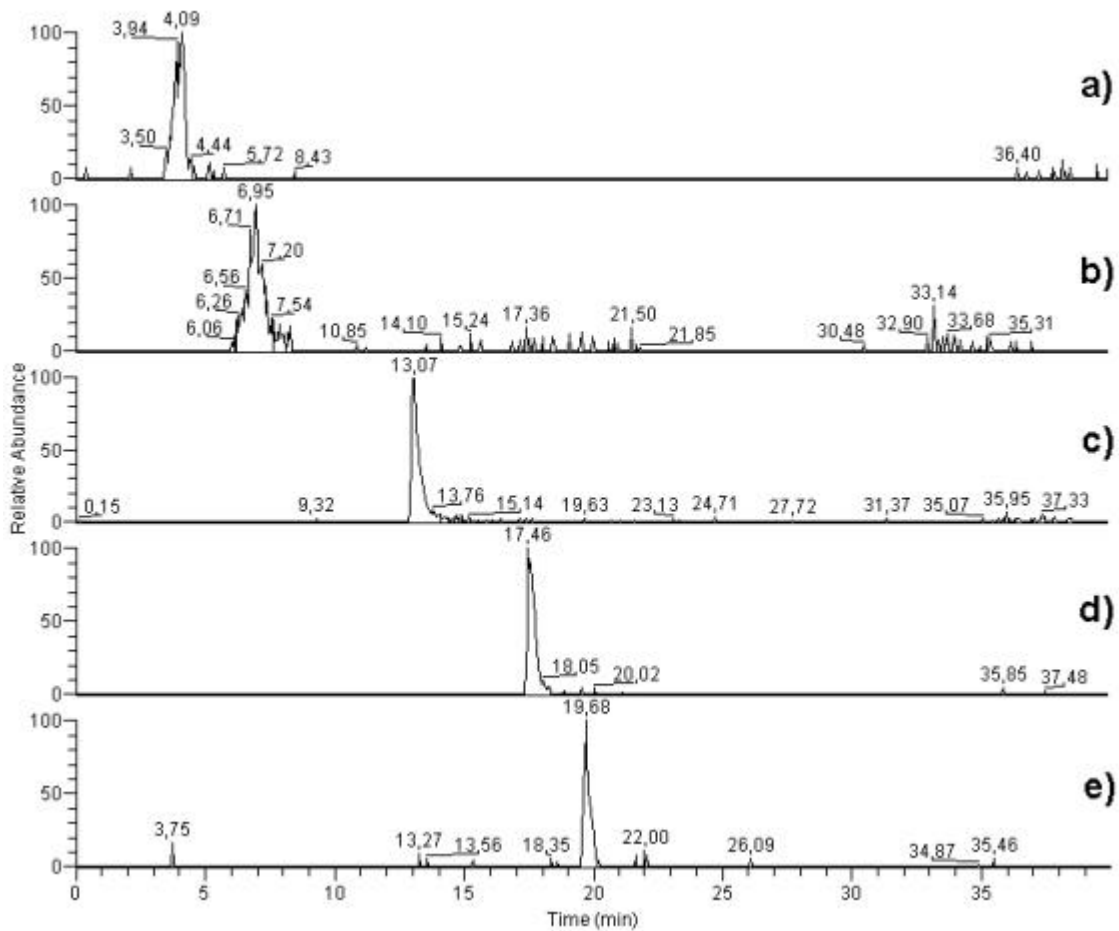


Abbildung 8-7: Einzelmassenchromatogramme einer LC/MS von a) $M = 194 \pm 0.5 [M+Na]^+$ (C4, 1.1 $\mu\text{g/ml}$ ACN 50 % (aq)), b) $M = 236 \pm 0.5 [M+Na]^+$ (3-O-C6, 0.8 $\mu\text{g/ml}$ ACN 50 % (aq)), c) $M = 294 \pm 0.5 [M+Na]^+$ (3-OH-C10, 1.1 $\mu\text{g/ml}$ ACN 50 % (aq)), d) $M = 306 \pm 0.5 [M+Na]^+$ (C12, 1.5 $\mu\text{g/ml}$ ACN 50 % (aq)), e) $M = 334 \pm 0.5 [M+Na]^+$ (C14, 1.3 $\mu\text{g/ml}$ ACN 50 % (aq)) an 125x2 RP18 end-capped, 10 μl Injektionsvolumen, Flussrate: 0.3 ml/min, Laufmittel: H_2O und Acetonitril, Gradient: 3 min 5 % Acetonitril (aq), 3-23 min linear auf 100 % Acetonitril, 23-33 min 100 % Acetonitril.

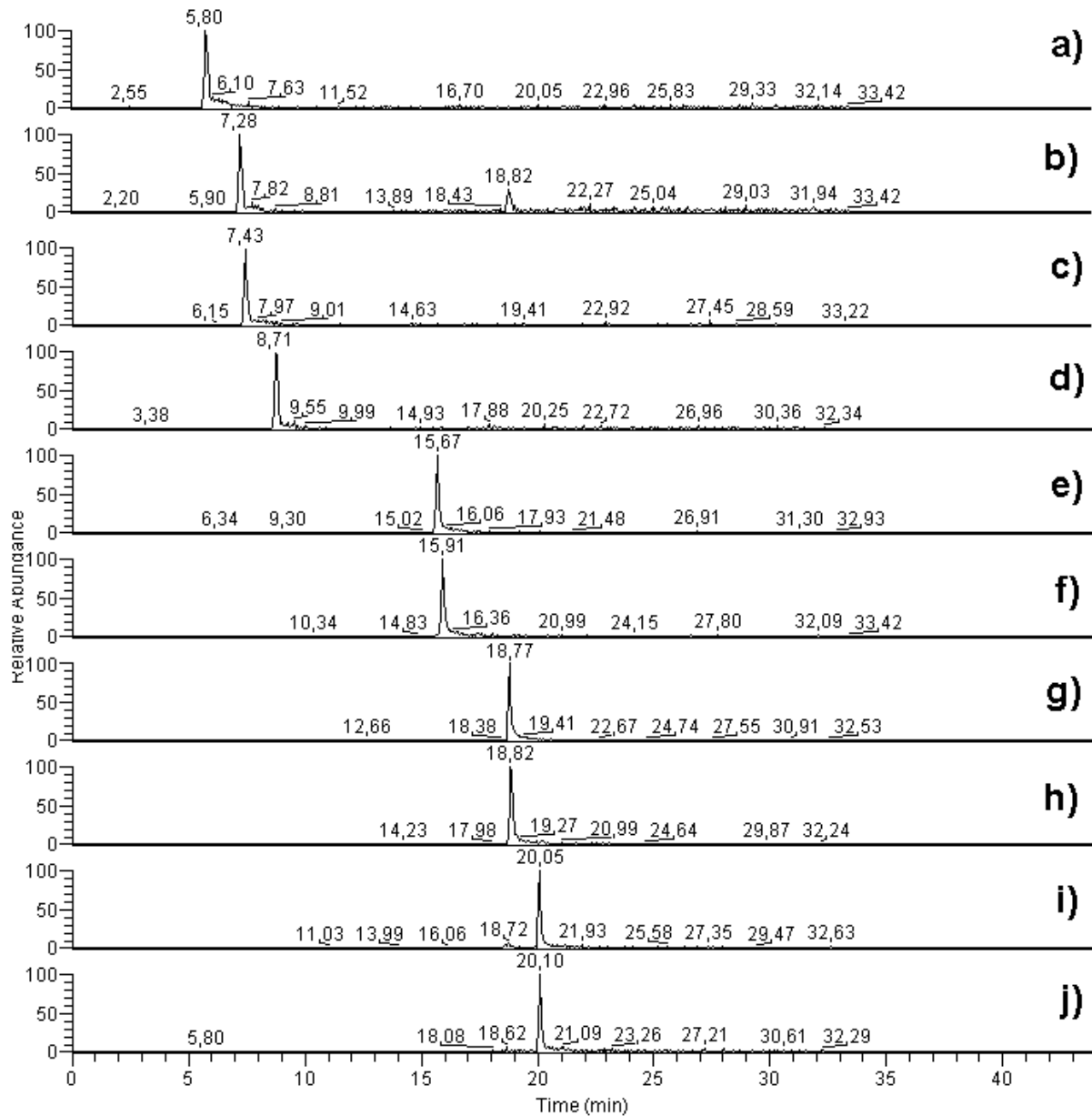


Abbildung 8-8: Einzelmassenchromatogramme einer LC/MS von a) $M = 194 \pm 0.5$ $[C4+Na]^+$, b) $M = 226 \pm 0.5$ $[C4+MeOH+Na]^+$, c) $M = 236 \pm 0.5$ $[3-O-C6+Na]^+$, d) $M = 268 \pm 0.5$ $[3-O-C6+MeOH+Na]^+$, e) $M = 294 \pm 0.5$ $[3-OH-C10+Na]^+$, f) $M = 326$ $[3-OH-C10+MeOH+Na]^+$, g) $M = 306$ $[C12+Na]^+$, h) $M = 338$ $[C12+MeOH+Na]^+$, i) $M = 334$ $[C14+Na]^+$, j) $M = 366$ $[C12+MeOH+Na]^+$, an 125x4 RP18 end-capped, 10 μ l Injektionsvolumen, Flussrate: 0.8 ml/min, Laufmittel: H_2O und Methanol, Gradient: 3 min 5 % Methanol (aq), 3-23 min linear auf 100 % Methanol, 23-33 min 100 % Methanol. Eingesetzte Konzentrationen: C4: 1.1 μ g/ml, 3-O-C6: 0.8 μ g/ml, 3-OH-C10: 1.1 μ g/ml, C12: 1.5 μ g/, C14: 1.3 μ g/ml in MeOH 50 % (aq).

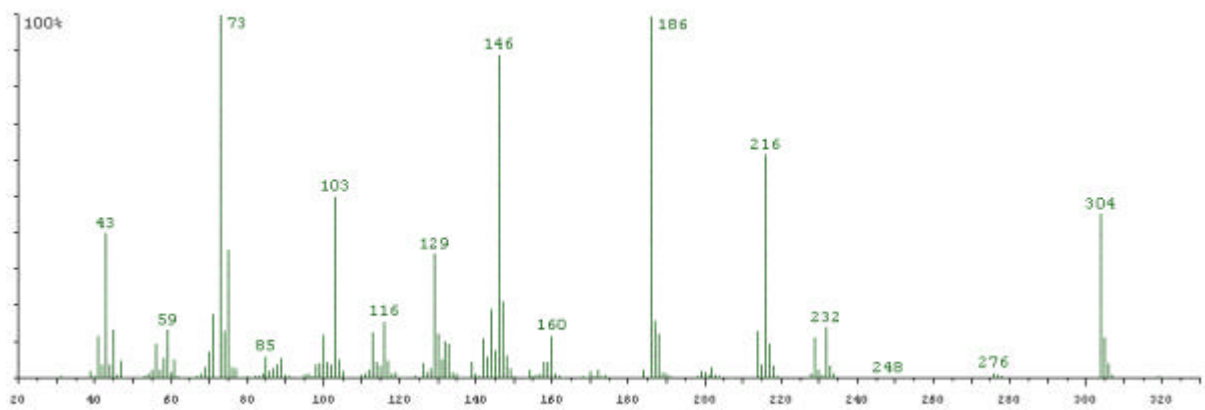


Abbildung 8-9: EI-Massenspektrum von C4-HSL reduziert und silyliert.

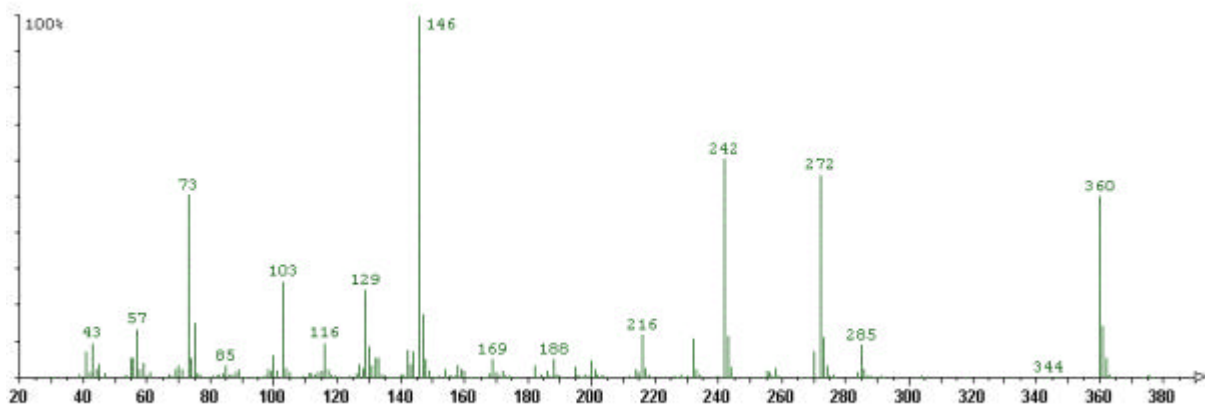


Abbildung 8-10: EI-Massenspektrum von C8-HSL reduziert und silyliert.

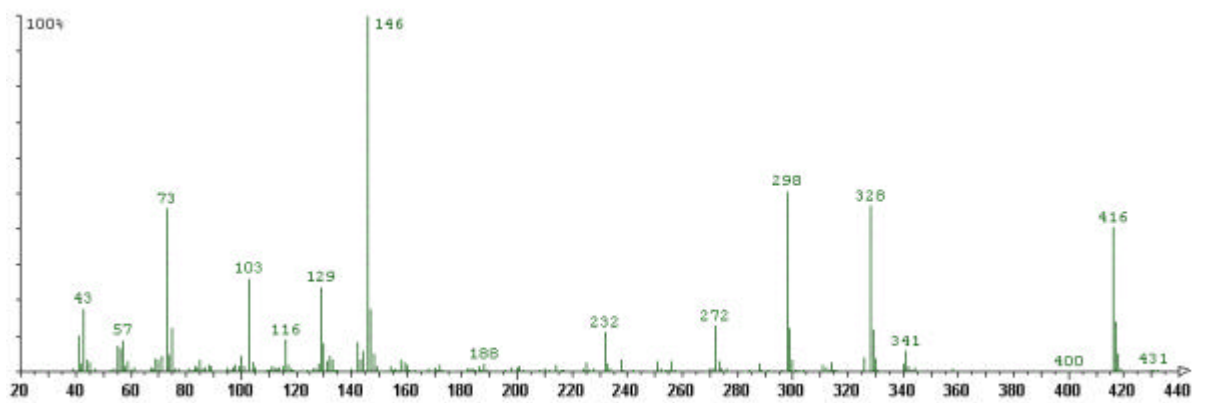


Abbildung 8-11: EI-Massenspektrum von C12-HSL reduziert und silyliert.

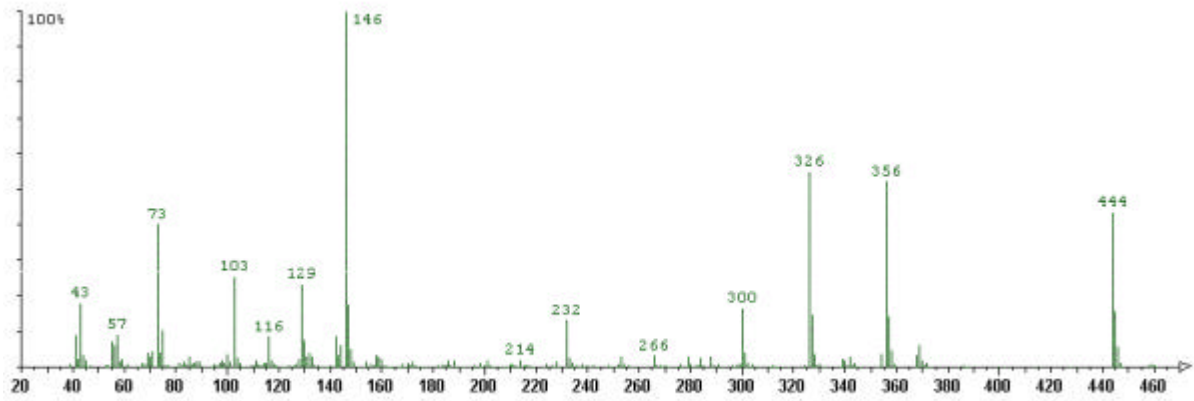


Abbildung 8-12: EI-Massenspektrum von C14-HSL reduziert und silyliert.

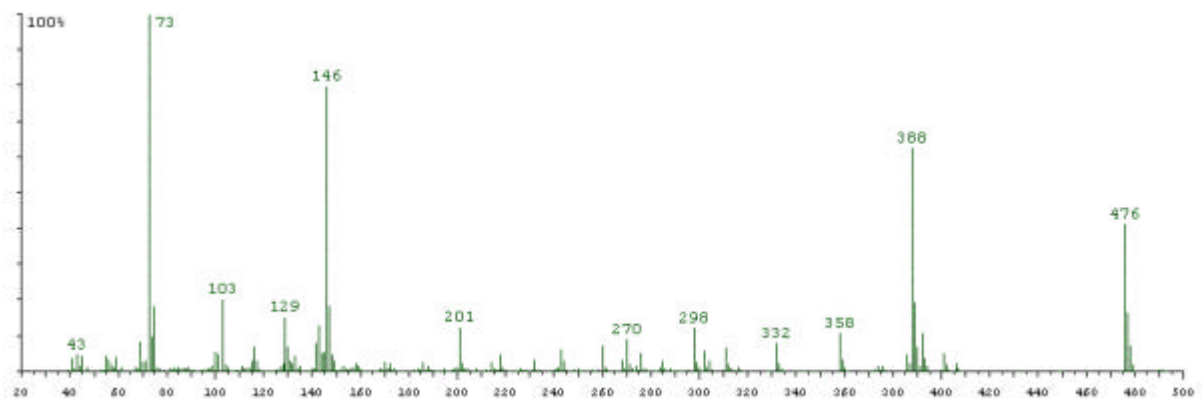


Abbildung 8-13: EI-Massenspektrum von 3-OH-C10-HSL reduziert und silyliert.

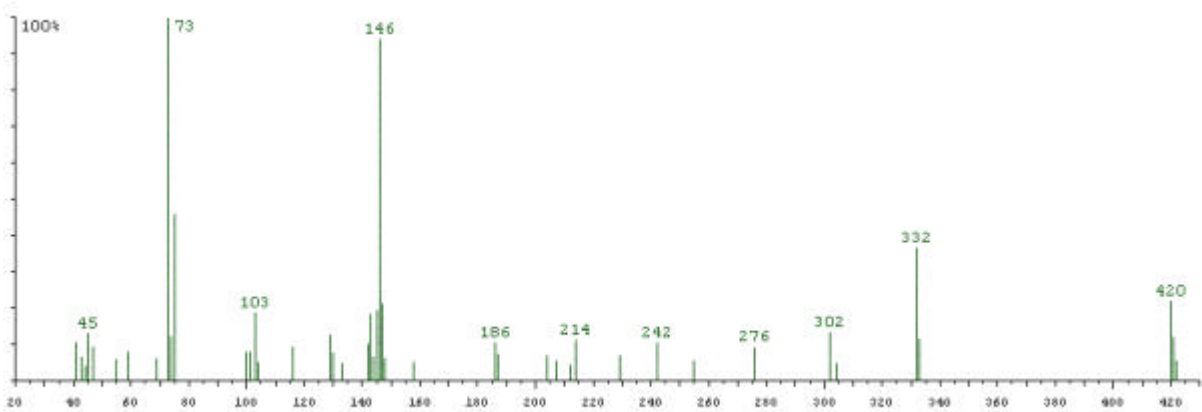


Abbildung 8-14: EI-Massenspektrum von 3-O-C6-HSL reduziert und silyliert.

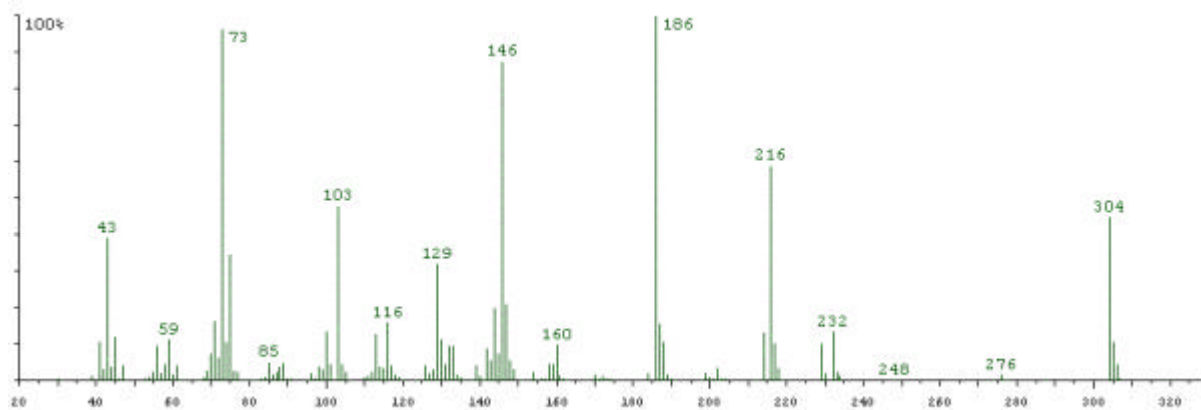


Abbildung 8-15: EI-Massenspektrum von C4-HSL mit Hojos Reagenz reduziert und silyliert.

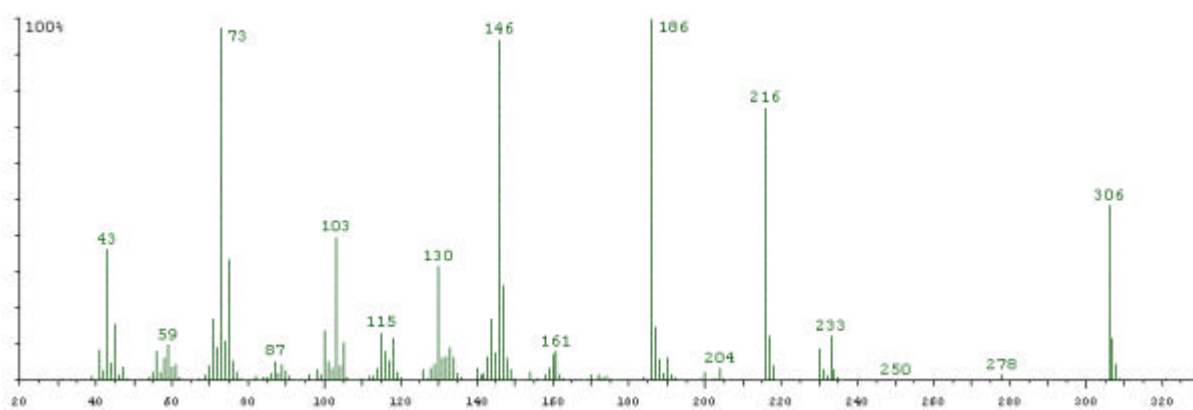


Abbildung 8-16: EI-Massenspektrum von C4-HSL mit Hojos Reagenz (deuteriert) reduziert und silyliert.

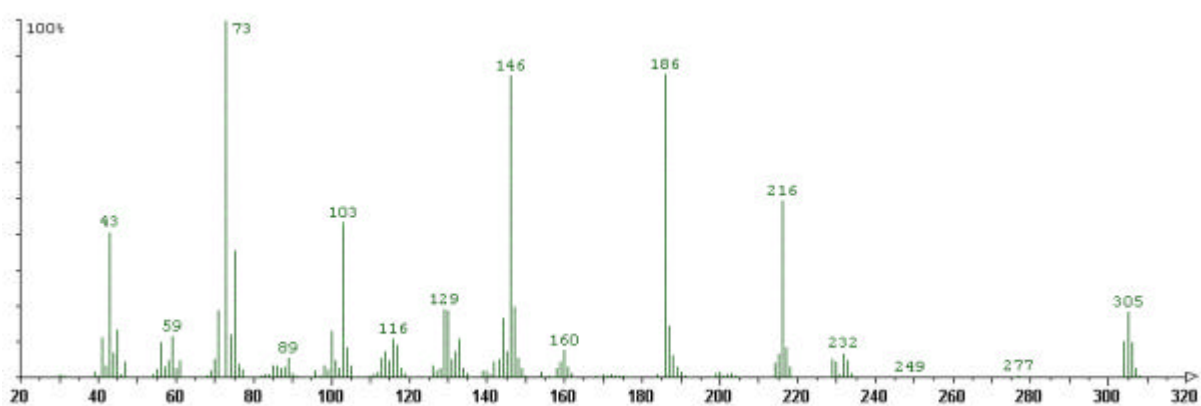


Abbildung 8-17: EI-Massenspektrum von C4-HSL mit Hojos Reagenz (H/D 1:1) reduziert und silyliert.

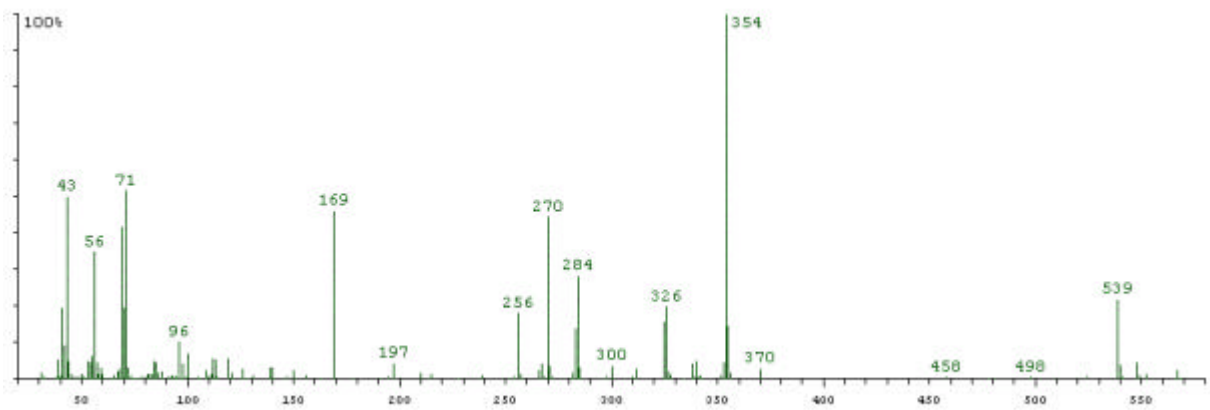


Abbildung 8-18: EI-Massenspektrum von C4-HSL reduziert, HFBA-Derivat.

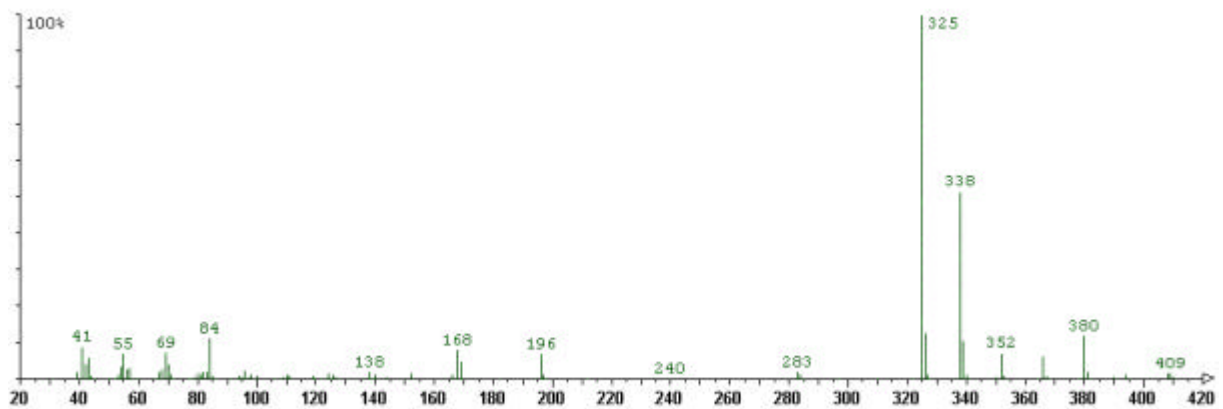


Abbildung 8-19: EI-Massenspektrum von C8-HSL reduziert, HFBA-Derivat.

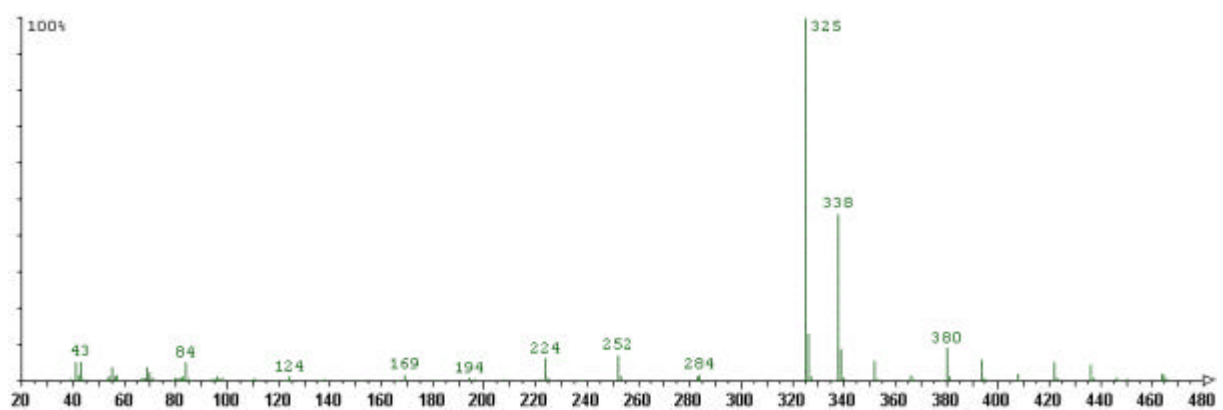


Abbildung 8-20: EI-Massenspektrum von C12-HSL reduziert, HFBA-Derivat.

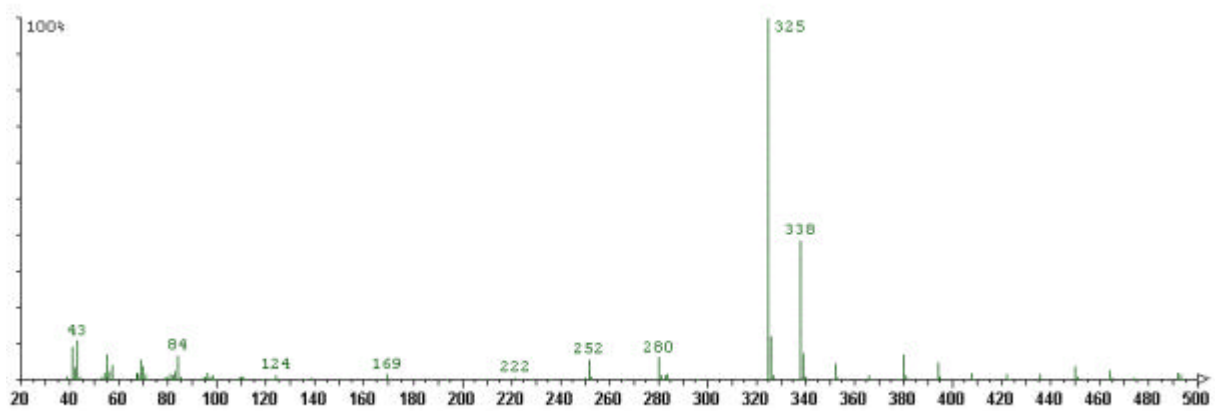


Abbildung 8-21: EI-Massenspektrum von C14-HSL reduziert, HFBA-Derivat.

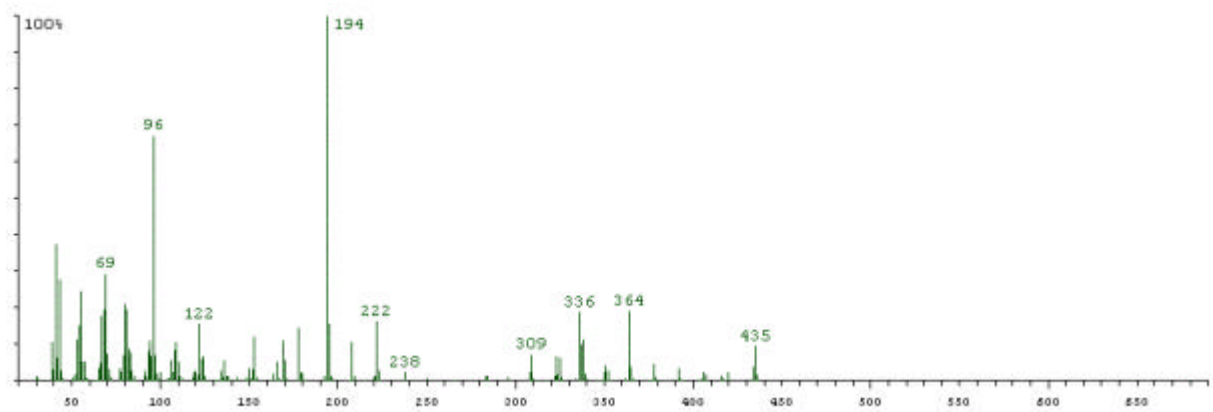


Abbildung 8-22: EI-Massenspektrum von 3-OH-C10-HSL reduziert, HFBA-Derivat.

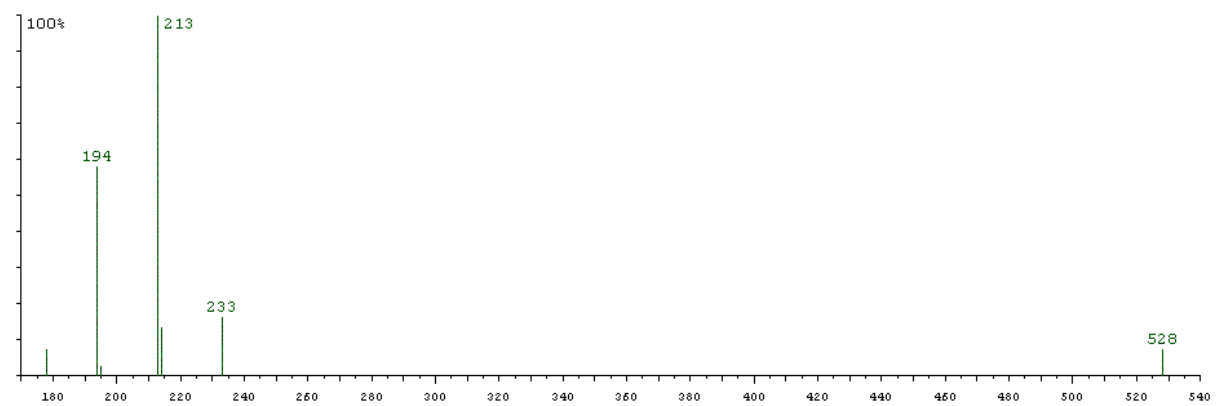


Abbildung 8-23: NICI-Massenspektrum von C4-HSL reduziert, HFBA-Derivat.

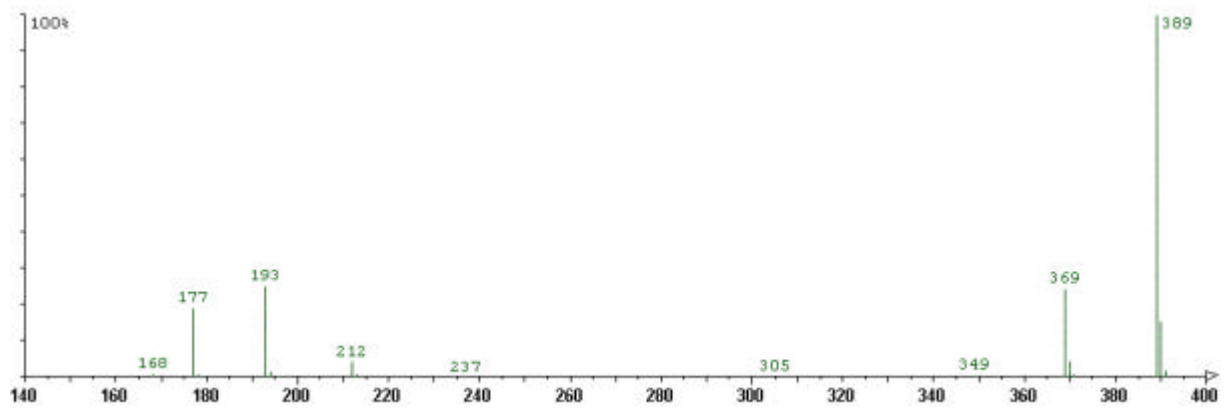


Abbildung 8-24: NICI-Massenspektrum von C8-HSL reduziert, HFBA-Derivat.

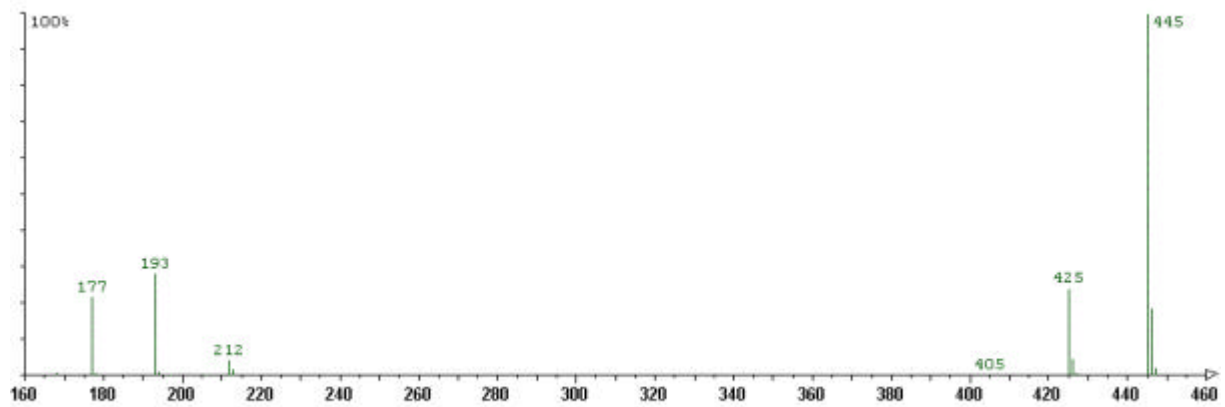


Abbildung 8-25: NICI-Massenspektrum von C12-HSL reduziert, HFBA-Derivat.

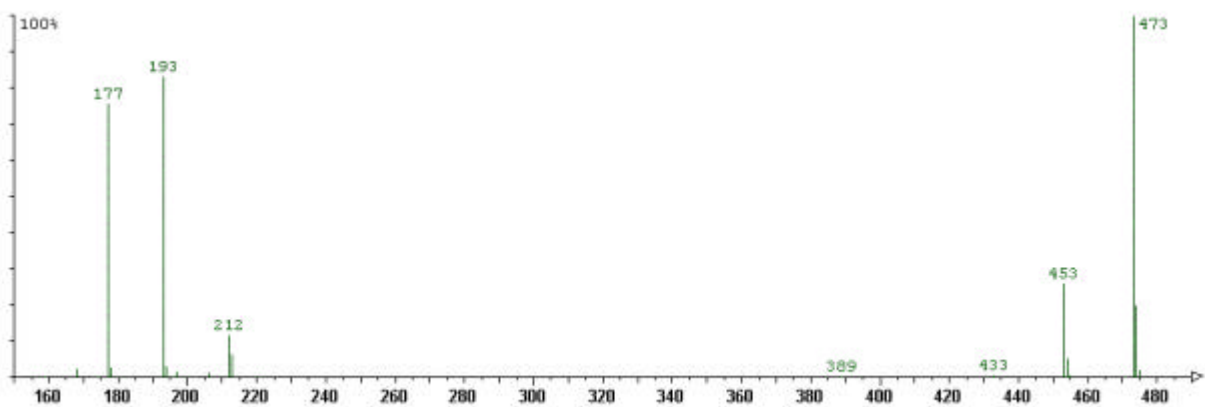


Abbildung 8-26: NICI-Massenspektrum von C14-HSL reduziert, HFBA-Derivat.

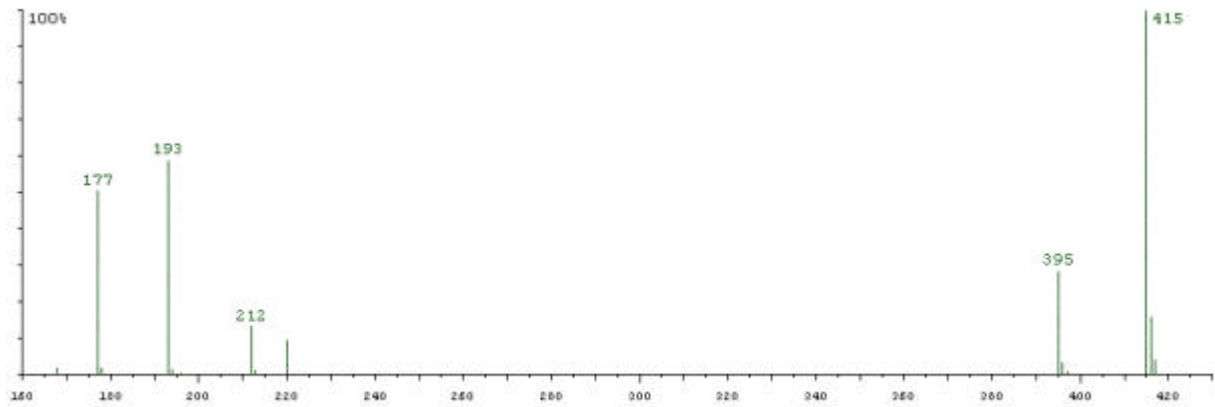


Abbildung 8-27: NICI-Massenspektrum von 3-OH-C10-HSL reduziert, HFBA-Derivat.

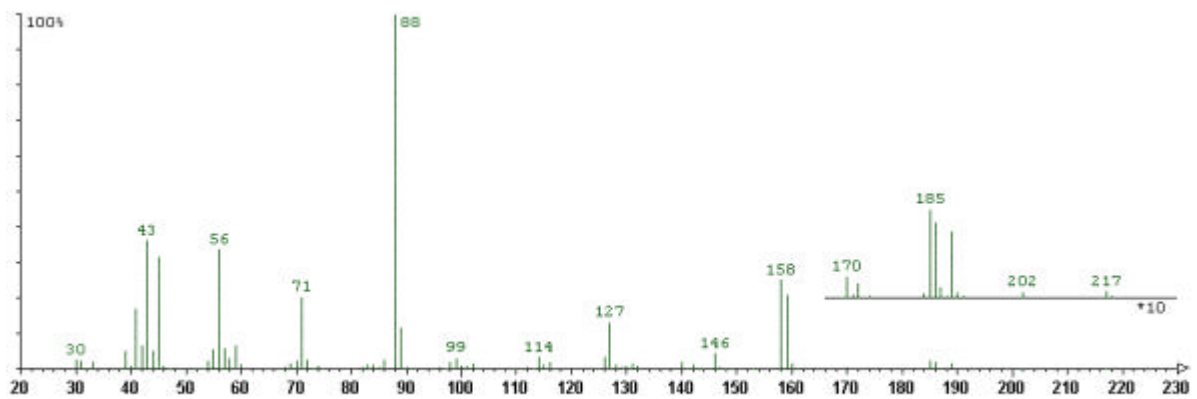


Abbildung 8-28: EI-Massenspektrum des g-Methoxybutansäuremethylester-Derivats von C4-HSL.

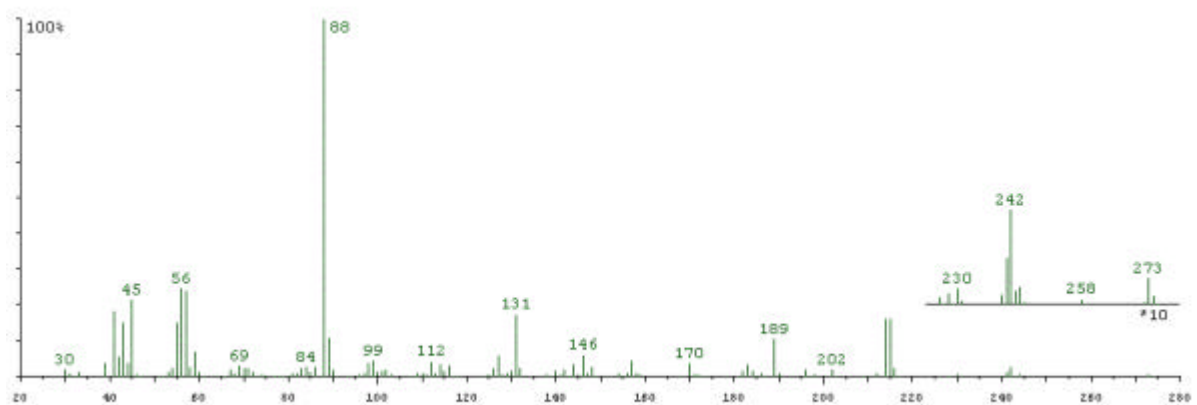


Abbildung 8-29: EI-Massenspektrum des g-Methoxybutansäuremethylester-Derivats von C8-HSL.

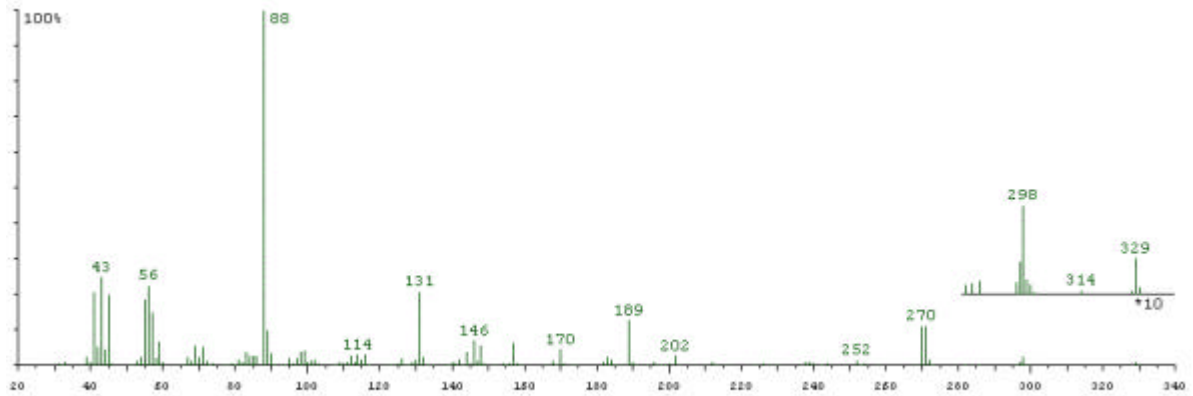


Abbildung 8-30: EI-Massenspektrum des g-Methoxybutansäuremethylester-Derivats von C12-HSL.

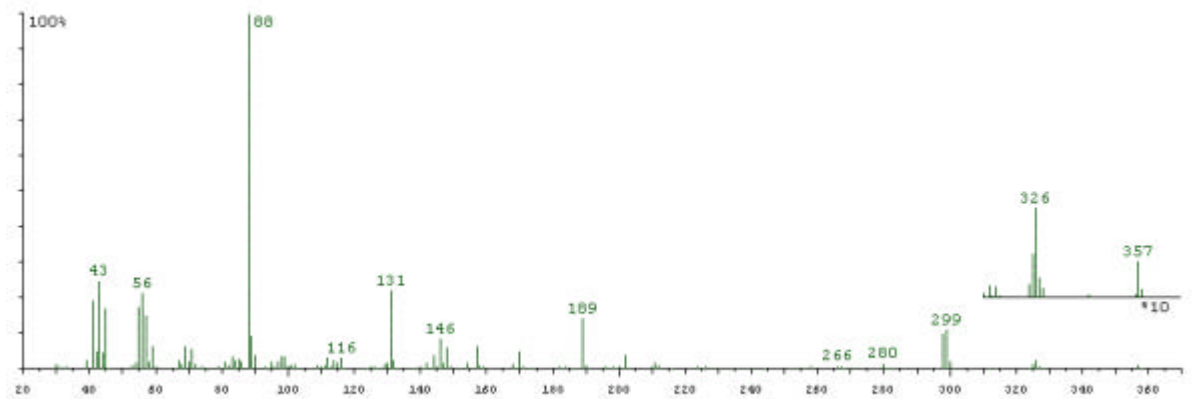


Abbildung 8-31: EI-Massenspektrum des g-Methoxybutansäuremethylester-Derivats von C14-HSL.

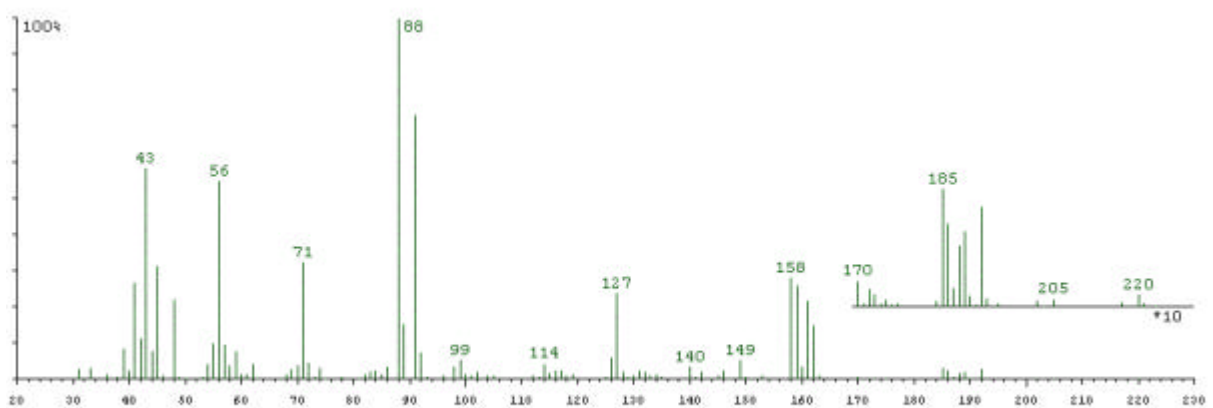


Abbildung 8-32: EI-Massenspektrum von C4-HSL Orthoameisensäuretrimethylester(H:D 1:1)-Produkt.

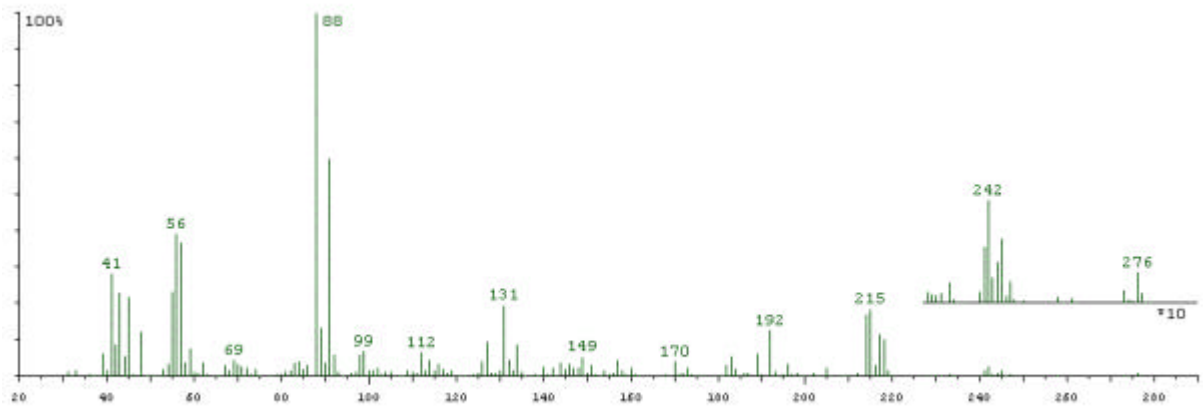


Abbildung 8-33: EI-Massenspektrum von C8-HSL Orthoameisensäuretrimethylester(H:D 1:1)-Produkt.

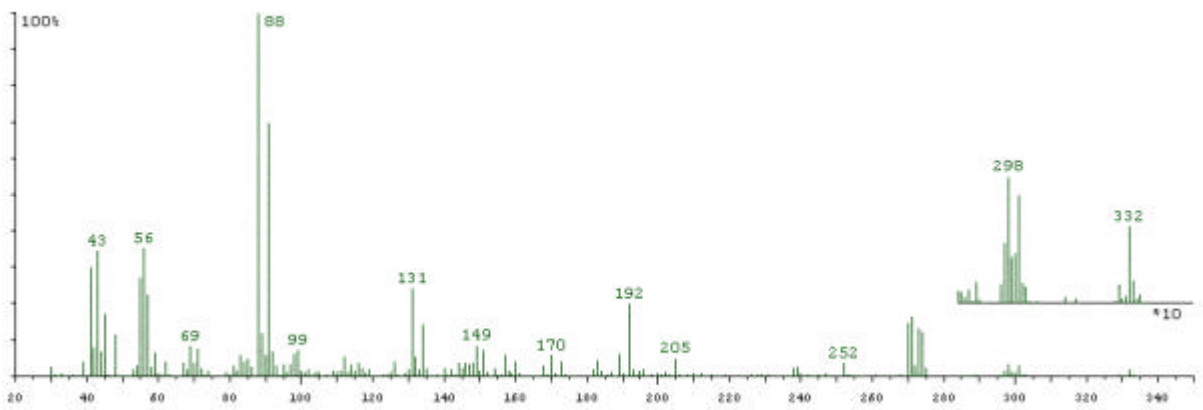


Abbildung 8-34: EI-Massenspektrum von C12-HSL Orthoameisensäuretrimethylester(H:D 1:1)-Produkt.

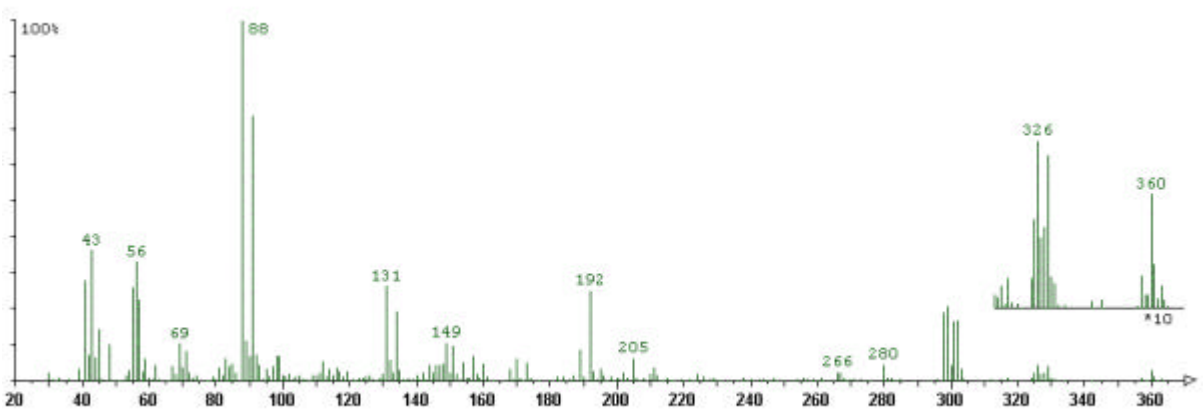


Abbildung 8-35: EI-Massenspektrum von C14-HSL Orthoameisensäuretrimethylester(H:D 1:1)-Produkt.

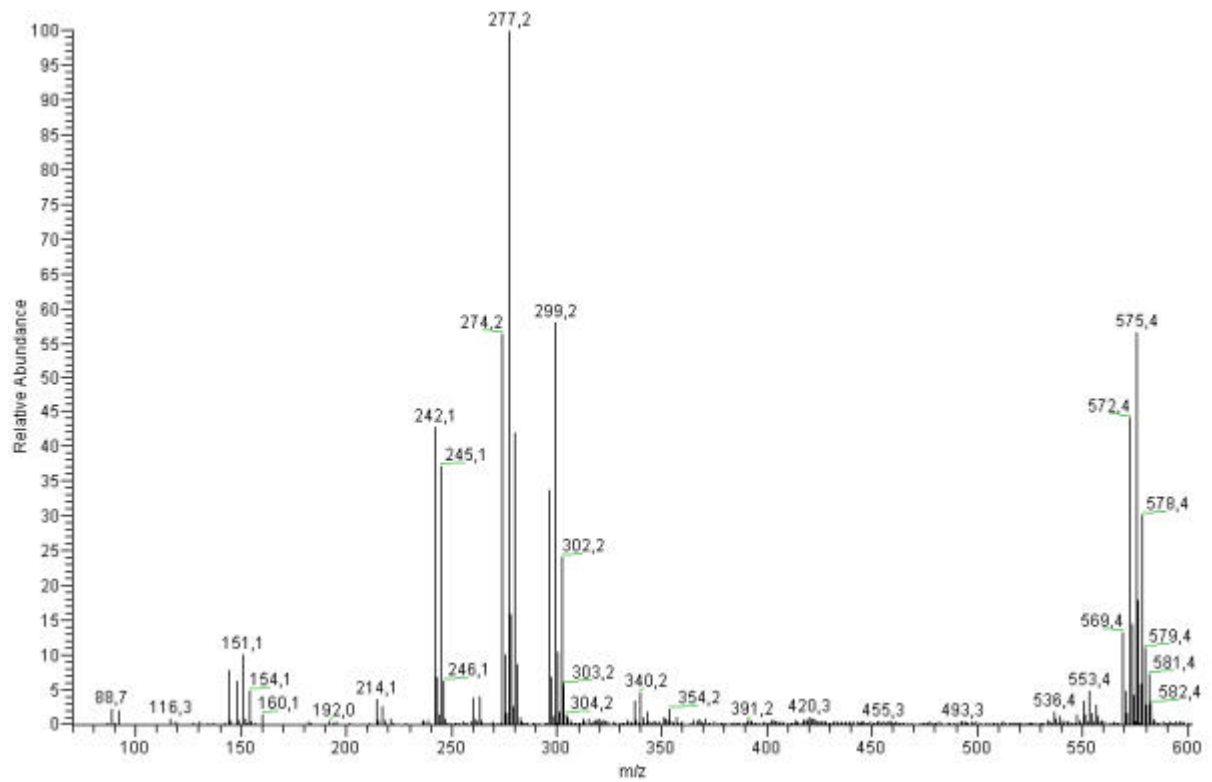


Abbildung 8-36: ESI-Massenspektrum von C8-HSL-Orthoameisensäuretrimethylester(H/D 1:1)-Produkt mit 1.5 % Ammoniumacetat, optimiert auf maximale Intensität von $M = 274.2 [M+H]^+$.

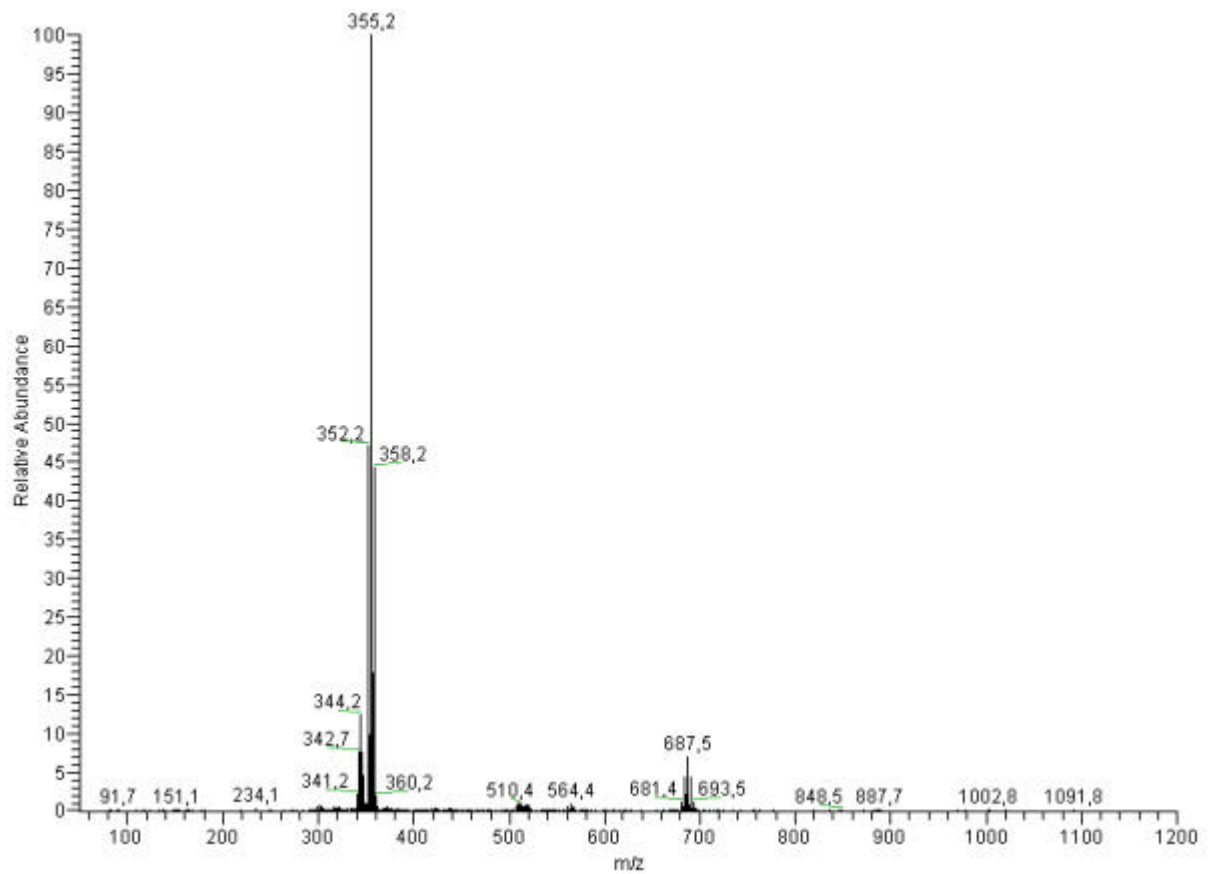


Abbildung 8-37: ESI-Massenspektrum von C12-HSL-Orthoameisensäuretrimethylester(H/D 1:1)-Produkt, in 100 μ l DCM, 12,5fach mit MeOH verdünnt, optimiert auf maximale Intensität von $M = 352,2$ $[M+Na]^+$.

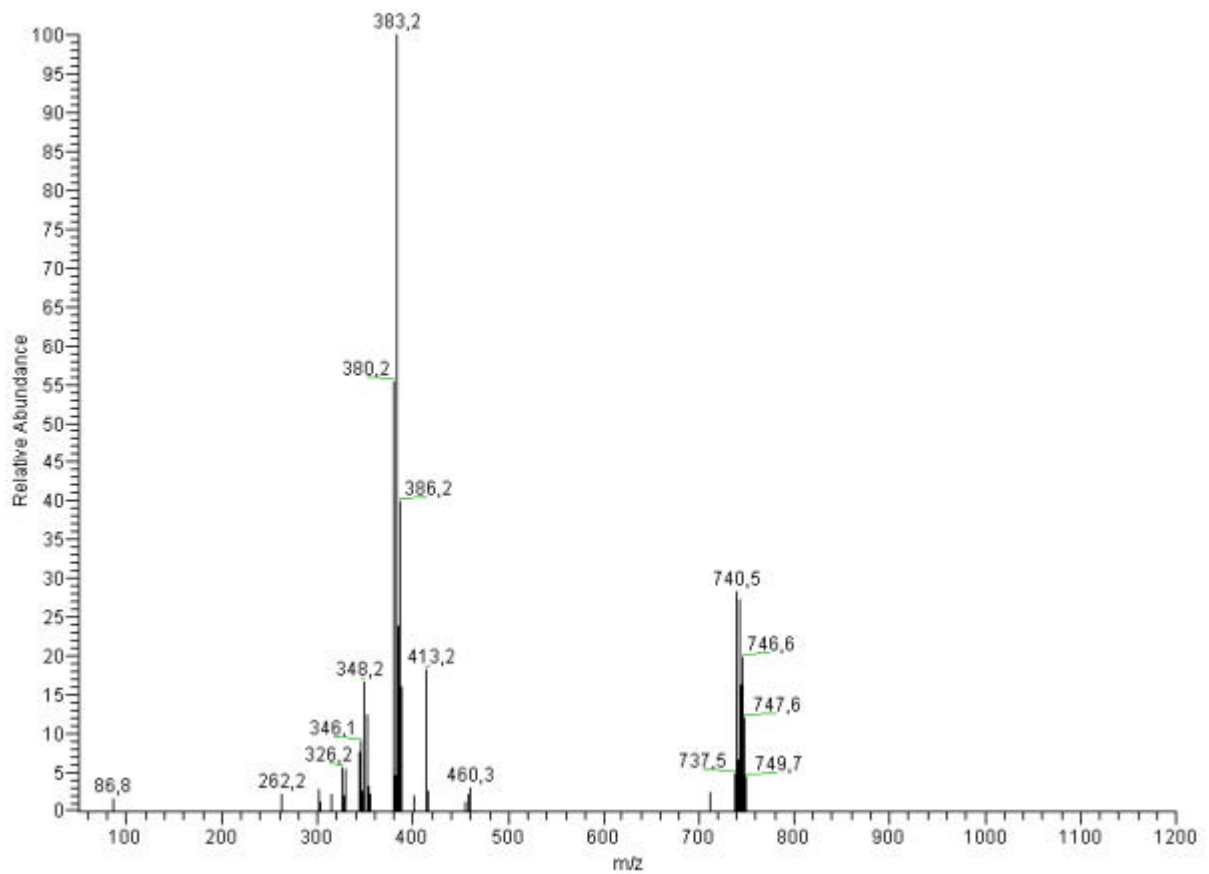


Abbildung 8-38: ESI-Massenspektrum von C14-HSL-Orthoameisensäuretrimethylester(H/D 1:1)-Produkt, in 100 µl DCM, 12,5fach mit MeOH verdünnt, optimiert auf maximale Intensität von $M = 380.2$ $[M+Na]^+$.

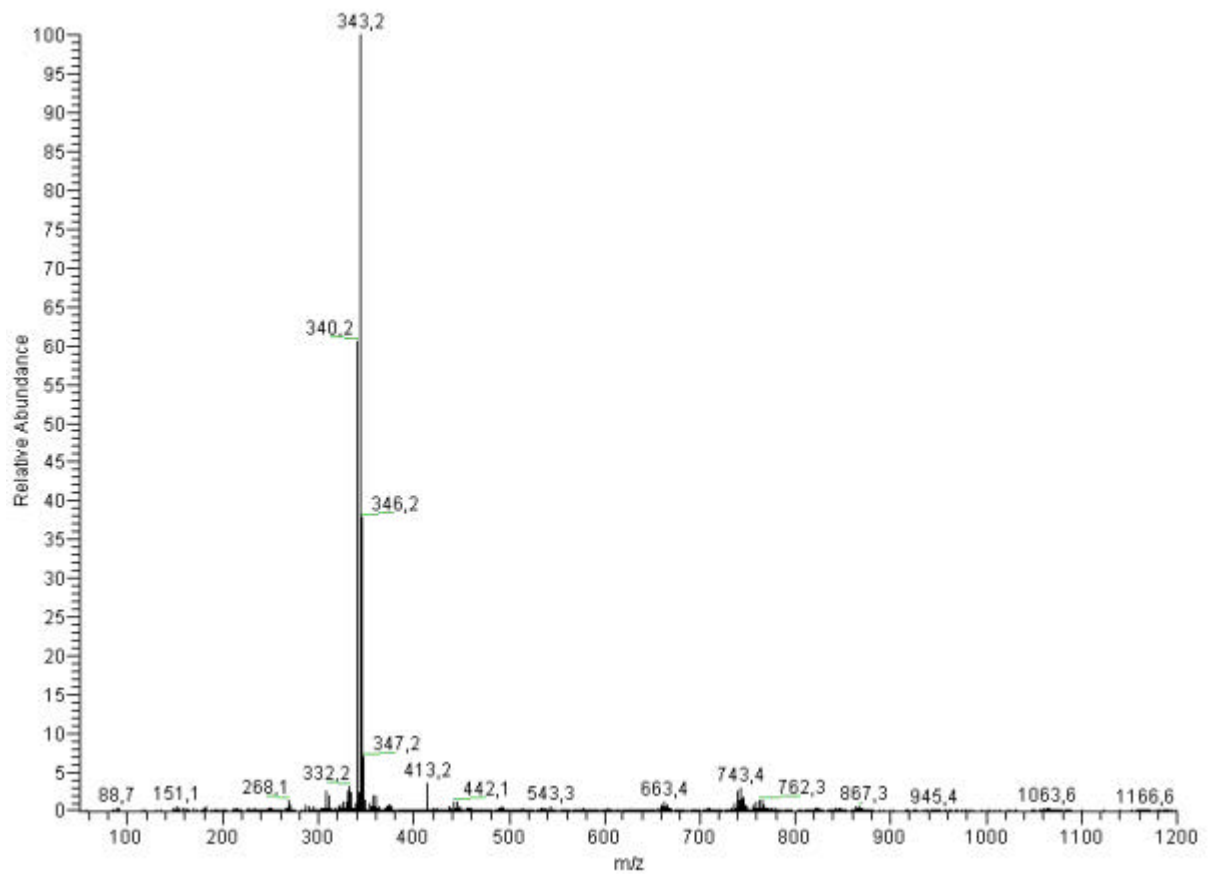


Abbildung 8-39: ESI-Massenspektrum von 3-OH-C10-HSL Orthoameisensäuretrimethylester(H:D 1:1)-Produkt, in 100 μ l DCM, 12,5fach mit MeOH verdünnt, optimiert auf maximale Intensität von $M = 340.2$ $[M+Na]^+$.

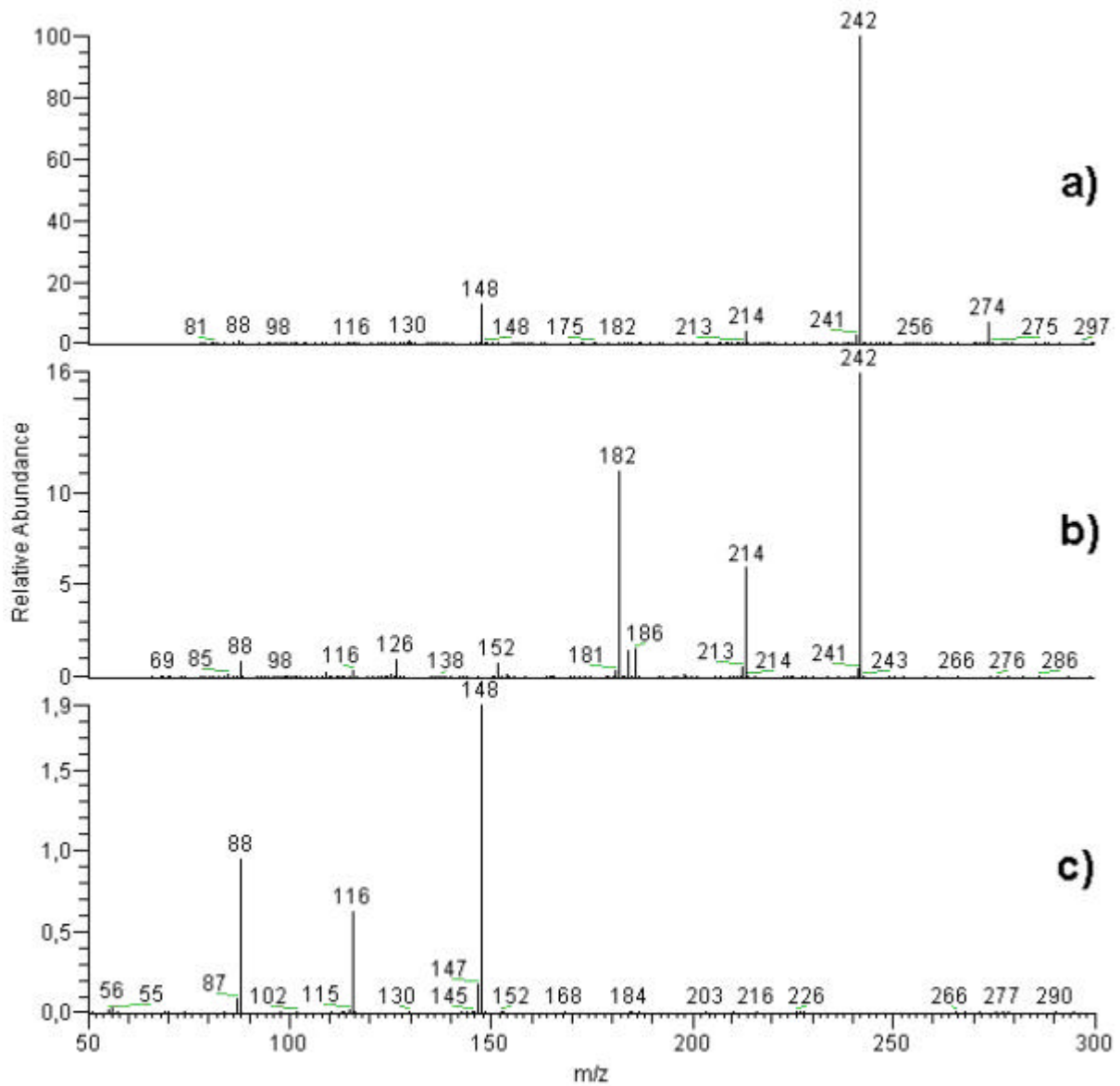


Abbildung 8-40: Produktions-Analyse (MS² und MS³) des g-Methoxybutansäuremethylester-Derivats von C8-HSL, a) MS² von [M+H]⁺(274) bei 27 V, b) MS³ von 242 aus [M+H]⁺(274) bei 36 V, c) MS³ von 148 aus [M+H]⁺(274) bei 24 V rel. Kollisionsenergie.

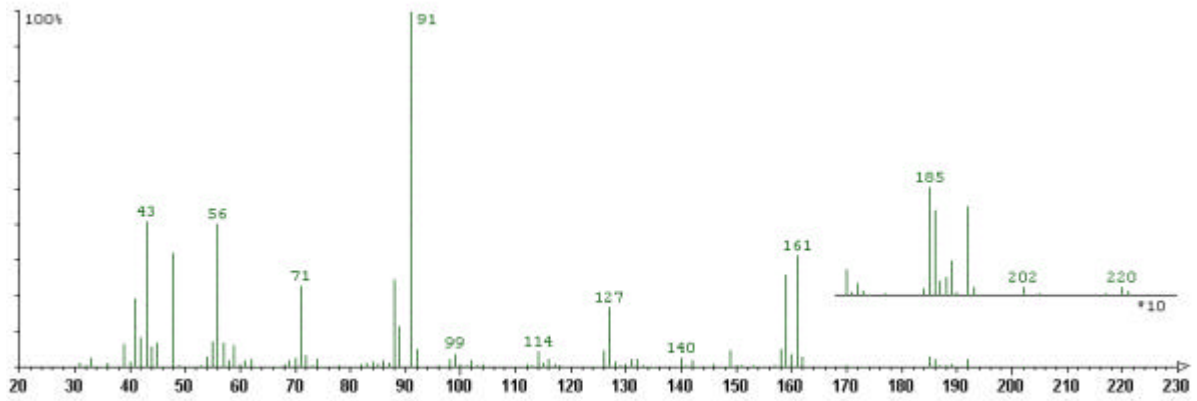


Abbildung 8-41: EI-Massenspektrum C4-HSL Orthoameisensäuretrimethylester-Produkt (d4-Ether).

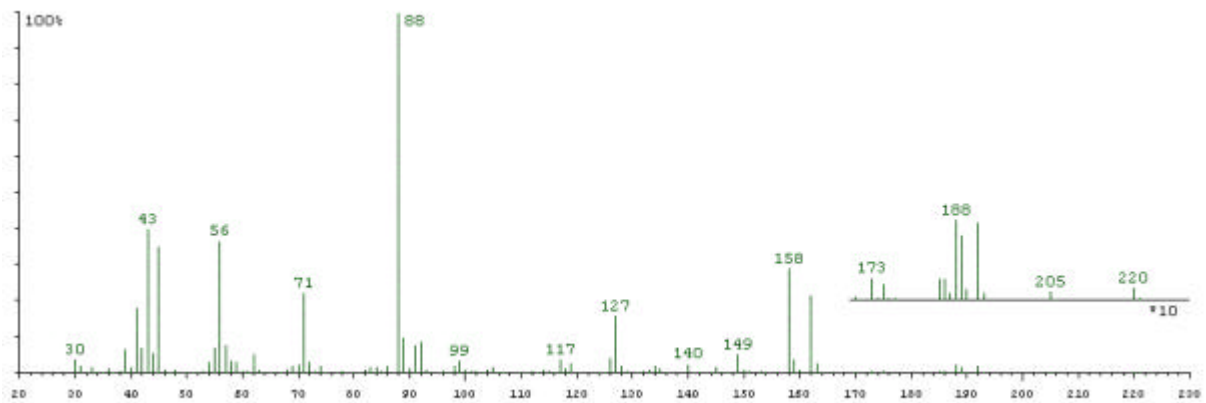


Abbildung 8-42: EI-Massenspektrum C4-HSL Orthoameisensäuretrimethylester-Produkt (d4-Ester).

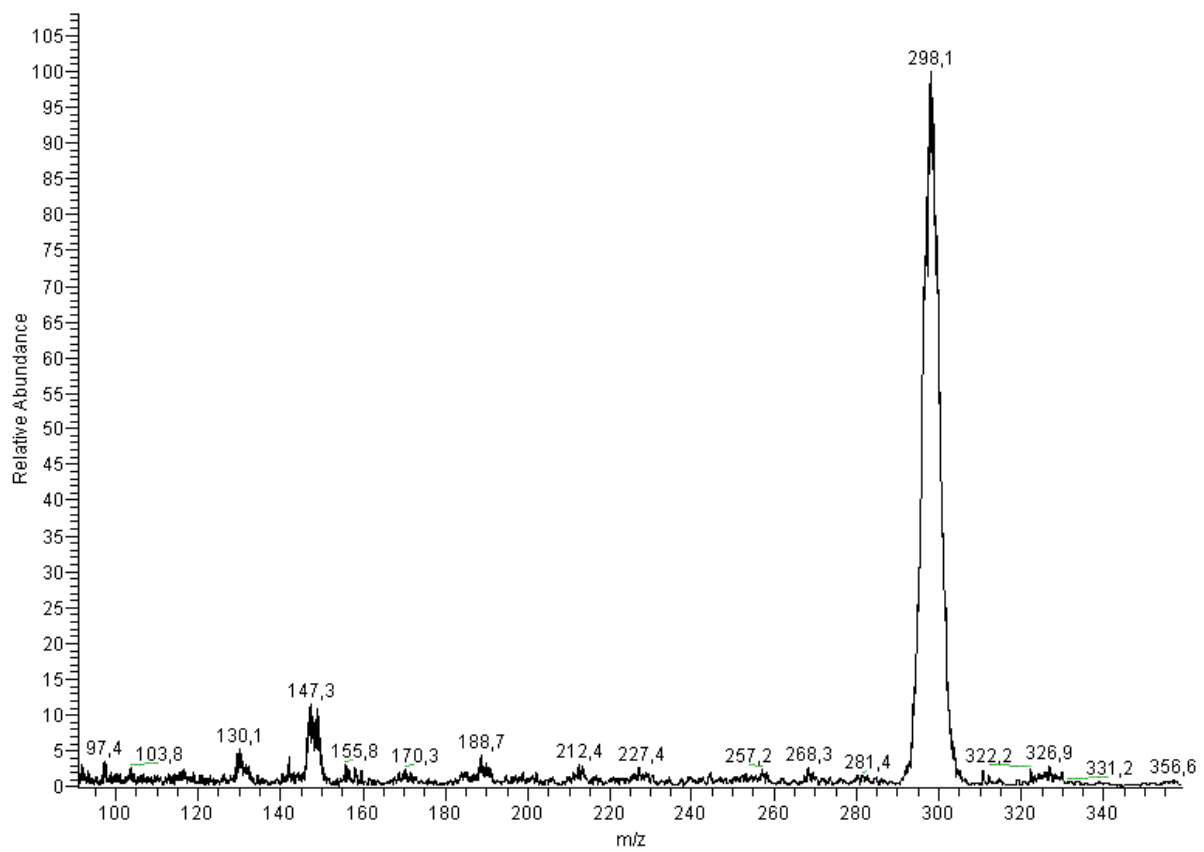


Abbildung 8-43: Vorläuferionen-Analyse von 88 an dem *g*-Methoxybutansäuremethylester-Derivat von C14-HSL.

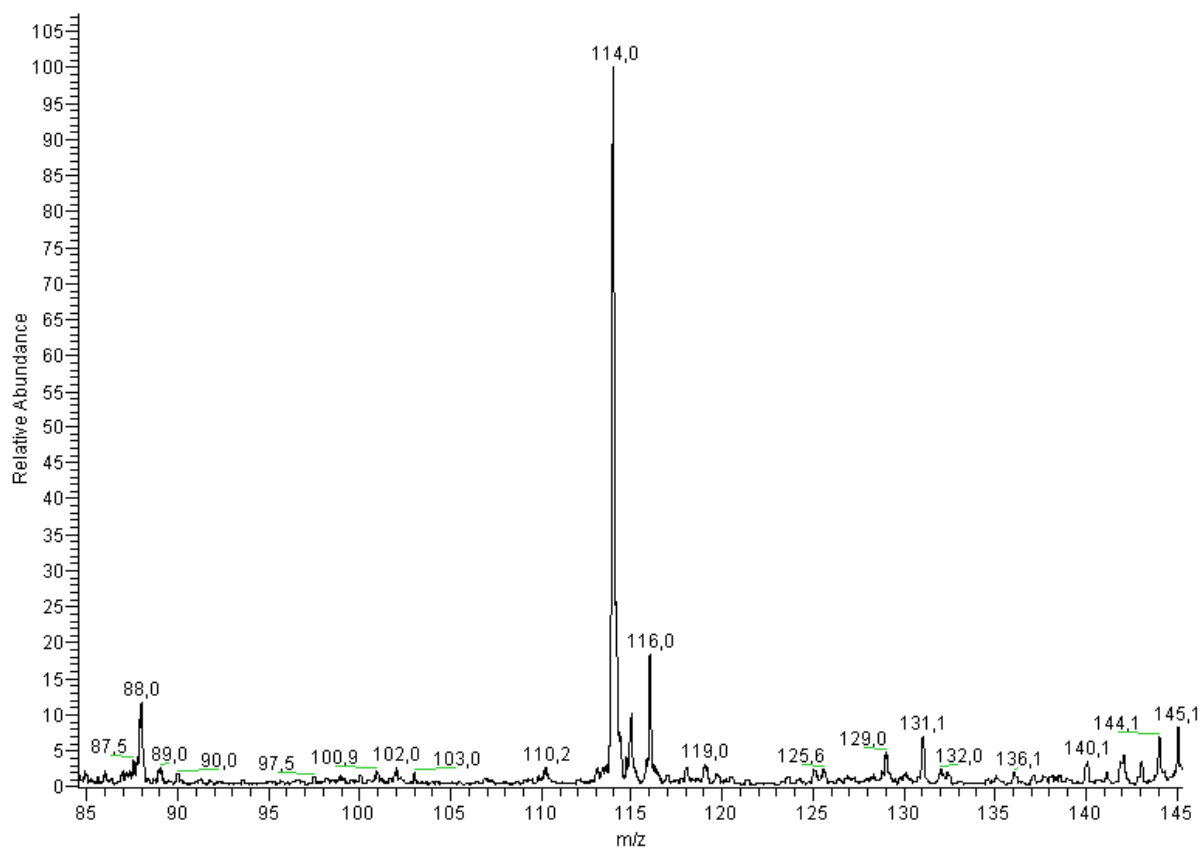


Abbildung 8-44: Tochterionen-Analyse von 146 an dem des *g*-Methoxybutansäuremethylester-Derivats von C14-HSL.

9 Literatur

- ¹ <http://www.wissenschaft-online.de/>
- ² P. Williams, T. J. Baldwin, J. A. Downie in *Microbial Signalling and Communication*, Cambridge University Press, **1999**, 1-32.
- ³ S. R. Chhabra, B. Phillip, L. Eberl, M. Givskov, P. Williams, M. Cámara, Extracellular Communication in Bacteria in *Advances in Chemical Ecology, Vol. 1*, Academic Press, im Druck.
- ⁴ E. S. Kempner, F. E. Hanson, *J. Bacteriol.*, **1968**, *95*, 975-979.
- ⁵ M. M. Marketon, M. R. Gronquist, A. Eberhard, J. E. González, *J. Bacteriol.*, **2002**, *184*, 5686-5695.
- ⁶ M. Dekhane, K. T. Douglas, P. Gilbert, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 1883-1884.
- ⁷ I. G. Cao, E. A. Meighen, *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 21670 ff.
- ⁸ S. R. Chhabra, P. Stead, N. J. Bainton, G. P. C. Salmond, G. S. A. B. Stewart, P. Williams, B. W. Bycroft, *J. Antibiotics*, **1993**, *46*, 441 ff.
- ⁹ S. R. Chhabra, C. Harty, D. S. W. Hooi, M. Daykin, P. Williams, G. Telford, D. I. Pritchard, B. W. Bycroft, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 97 ff.
- ¹⁰ A. Eberhard, C. A. Widrig, P. MacBath, J. B. Schineller, *Arch. Microbiol.*, **1986**, *146*, 35 ff.
- ¹¹ C. R. Holmquist, E. J. Roskamp, *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 3258-3260.
- ¹² D. J. Ager, S. A. Laneman, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 3327-3355.
- ¹³ D. F. Taber, L. J. Silverberg, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 4227-4230.
- ¹⁴ F. A. Carey, R. J. Sundberg, *Organische Chemie – ein weiterführendes Lehrbuch*, VCH Weinheim, 1. Auflage, **1995**, 891 ff.
- ¹⁵ a) E. Gruszecka-Kowalik, L. H. Zalkow, *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 3398-3403. b) L. T. Gelbaum, M. M. Gordon, M. Miles, L. H. Zalkow, *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 2501-2504. c) J. Huang, J. Meinwald, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 861-867.
- ¹⁶ P. H. Dussault, C. T. Eary, K. R. Woller, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 1789-1797.
- ¹⁷ W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **1970**, *103*, 788-798.
- ¹⁸ D. Morin, B. Grasland, K. Vallée-Réhel, C. Dufau, D. Haras, *J. Chromatography A*, **2003**, *1002*, 79-92.

-
- ¹⁹ E. A. Yates, B. Philipp, C. Buckley, S. Atkinson, S. R. Chhabra, R. E. Socket, M. Goldner, Y. Dessaux, M. Cámara, H. Smith, P. Williams, *Infect. Immun.*, **2002**, *70*, 5635-5646.
- ²⁰ W. W. Christie, *Gas Chromatography and Lipids – A Practical Guide*, The Oily Press, 1. Auflage, **1989**.
- ²¹ R. C. Annand, N. Selvapalam, *Synth. Comm.*, **1994**, *24*, 2743-2747.
- ²² S. D. Burke, R. L. Danheiser, *Handbook of Reagents for Organic Synthesis – Oxidizing & Reducing Agents*, John Wiley & Sons, **1999**, 209-212.
- ²³ K. Soai, A. Ookawa, *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 4000-4005.
- ²⁴ J. Goto, N. Goto, F. Shamsa, M. Saito, S. Komatsu, K. Suzaki, T. Nambara, *Anal. Chim. Acta*, **1983**, *147*, 397-400.
- ²⁵ N. Ikemoto, L. C. Lo, K. Nakanishi, *Angew. Chem.*, **1992**, *104*, 918-919.
- ²⁶ a) H. C. Brown, Y. M. Choi, S. Narasimhan, *Inorg. Chem.*, **1981**, *20*, 4456-4457. b) H. C. Brown, Y. M. Choi, S. Narasimhan, *Inorg. Chem.*, **1982**, *21*, 3657-3661.
- ²⁷ H. C. Brown, S. Narasimhan, Y. M. Choi, *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 4702-4708.
- ²⁸ D. Hamprecht, J. Josten, W. Steglich, *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 10883-10902.
- ²⁹ a) Y. Kamitori, M. Hojo, R. Masuda, T. Inoue, T. Izumi, *Tetrahedron Lett.*, **1982**, *23*, 4585-4588. b) Y. Kamitori, M. Hojo, R. Masuda, T. Inoue, T. Izumi, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 2575-2576. c) P. F. Keusenkothen, M. B. Smith, *Synth. Comm.*, **1989**, *19*, 2859-2868.
- ³⁰ S. A. King, *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 2253-2256.
- ³¹ a) G. I. Nikishin, M. N. Elinson, I. V. Makhova, *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 895-905. b) Y. S. Agasimundin, F. T. Oakes, L. J. Kostuba, N. J. Leonard, *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 2468-2474.
- ³² Heinz G. O. Becker et al., *Organikum*, Johann Ambrosius Barth Verlag, Hüthig GmbH, 20. Auflage, **1999**, 685 ff.
- ³³ D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, D. R. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, 2. Auflage, **1980**.
- ³⁴ P. J. Kocienski, B. Pelotier, J.-M. Pons, H. Prideaux, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1998**, *8*, 1373-1382.
- ³⁵ A. S. Franklin, S. K. Ly, K. Sylvie, G. H. Mackin, L. E. Overman, A. J. Shaka, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 1512-1519.
- ³⁶ C. N. Hsiao, L. Liu, M. J. Miller, *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 2201-2206.

-
- ³⁷ J. A. Katzenellenbogen, T. Utawanit, *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, *36*, 6153-6158.
- ³⁸ Christian-Gabriel Arsene, *Strukturaufklärung und Reaktivität langkettiger Lipide von Lepidopteren*, Tenea Verlag für Medien Berlin, 1. Auflage, **2003**.
- ³⁹ M. Petrini, R. Ballini, E. Marcantoni, G. Rosini, *Synth. Comm.*, **1988**, *18*, 847-853.
- ⁴⁰ Karl Blau und John Halket, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, John Wiley & Sons, 2. Auflage, **1993**.