

Synthese und biologische Aktivitäten von (+)- und (-)-Multifiden

Wilhelm Boland^a, Lothar Jaenicke^{*a} und Dieter G. Müller^b

Institut für Biochemie der Universität zu Köln^a,
An der Bottmühle 2, D-5000 Köln 1

Fachbereich Biologie der Universität Konstanz^b,
D-7750 Konstanz

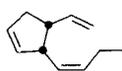
Eingegangen am 20. Februar 1981

(+)-Multifiden **1**, der spezifische Signalstoff für Androgameten der Braunalge *Cutleria multifida*, ist etwa 100fach wirksamer als das (-)-Enantiomere von **1**. Die optische Reindarstellung beider Antipoden gelingt durch chromatographische Trennung der diastereomeren Carbamate **5a/b** und **5c/d**, aus denen (+)- und (-)-**1** in nur wenigen Schritten zugänglich sind.

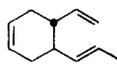
Synthesis and Biological Activities of (+)- and (-)-Multifidene

(+)-Multifiden **1**, the specific messenger for androgametes of the phaeophyte *Cutleria multifida*, is about 100 times more active than the (-)-enantiomer of **1**. Both enantiomers are conveniently prepared by chromatographic resolution of the diastereomeric carbamates **5a/b** or **5c/d** which give easy access to (+)- and (-)-**1** by only a few subsequent steps.

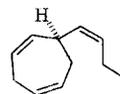
Bei der geschlechtlichen Vermehrung zahlreicher Braunalgenspecies geben die reifen weiblichen Gameten Botenstoffe in das umgebende Milieu ab^{1,2,3}, die den männlichen Geschlechtszellen das Auffinden des Partners ermöglichen. Diese Substanzen sind – soweit bisher untersucht – flüchtige, hydrophobe Kohlenwasserstoffe von überwiegend cyclischer Struktur^{3,4}. Die Gynogameten der mediterranen Braunalge *Cutleria multifida* geben drei solche olefinischen Kohlenwasserstoffe (+)-**1**, **2** und *S*(+)-**3** ab, von denen jedoch nur das Multifiden (+)-**1** als Lockstoff wirksam ist⁵.



(+)-**1**



2



S(+)-**3**

Umfangreiche Spezifitätsuntersuchungen⁶ an diesem Rezeptorsystem mit Homologen und Derivaten von (\pm)-**1** sowie seinen natürlichen Begleitern **2** und *S*(+)-**3** erwiesen seine außerordentliche Selektivität und Empfindlichkeit ($6.5 \cdot 10^{-12}$ mol/l); darüberhinaus führten sie zu Aussagen über den Bindungsmechanismus.

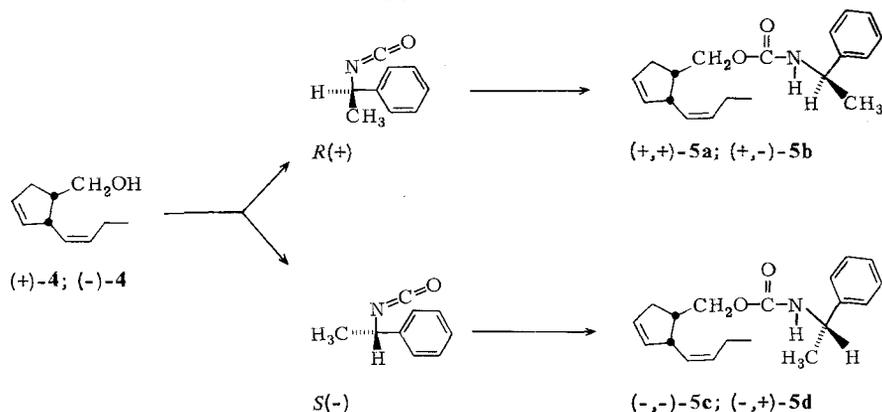
Diesem Funktionsmodell⁶ zufolge werden die π -Elektronen des Liganden (+)-**1** durch elektrophile Gruppen des Rezeptorproteins polarisiert und über induzierte

Liebigs Ann. Chem. 1981

Dipol-Dipol-Wechselwirkungen gebunden. Hierbei treten Botenstoff und Bindestelle spiegelbildlich⁷⁾ zueinander in Wechselwirkung, so daß die beiden Antipoden von **1** wegen der nur schwachen möglichen Interaktionen des nicht passenden Enantiomeren zu unterschiedlichen Reizschwellen führen sollten.

Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurde eine einfache Synthese für (+)-Multifiden und sein (-)-Enantiomeres entwickelt, über die im folgenden berichtet werden soll.

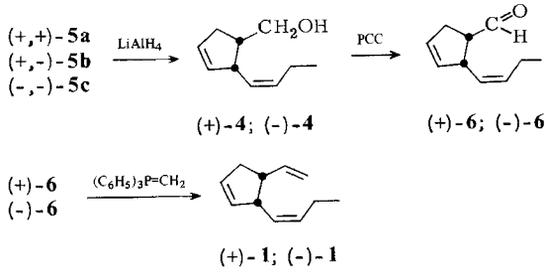
Über sehr gute Trennerfolge bei Flüssig-Chromatographie von diastereomeren Carbamaten (aus Alkoholen und α -Naphthylethylisocyanat) berichteten *Pirkle* und Mitarb.^{8,9)}, so daß auch hier ein analoger Trennversuch aussichtsreich erschien. Als geeignete Vorstufe bot sich im Rahmen der üblichen Synthese von racemischen **1** der Alkohol (\pm)-**4** an¹⁰⁾, da er leicht in ein Carbamat umgewandelt werden kann und aus diesem wiederum das Zielmolekül in nur wenigen nachfolgenden Schritten zugänglich ist. Tatsächlich ergibt Kondensation des Racemates (\pm)-**4** mit optisch aktivem *R*(+)- oder *S*(-)-Phenylethylisocyanat in praktisch quantitativer Ausbeute die diastereomeren Carbamate **5a/b** und **5c/d**, die an einer analytischen HPLC-Säule (Nucleosil 50-5, siehe Experimenteller Teil) vollständig getrennt werden konnten.



Zur Racematspaltung in präparativem Maßstab diente eine Niederdruck-Fertigsäule (LiChroprep Si 60, siehe Experimenteller Teil), an welcher nach zweifacher Chromatographie das jeweils zuerst eluierte Carbamat praktisch rein¹¹⁾ erhalten wurde, während sich die zweite Komponente **5b** bzw. **5d** auf ca. 90% anreichern ließ.

Im weiteren Verlauf der Synthese wurden die getrennten Carbamate **5a** und **5c** sowie **5b** mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert und die erhaltenen Alkohole (+)- bzw. (-)-**4** mit Pyridinium-chlorochromat¹²⁾ zu den entsprechenden Aldehyden (+)- und (-)-**6** oxidiert. Eine abschließende Wittig-Reaktion mit Methyltriphenylphosphoran ergab dann die optisch aktiven Multifidene (+)- und (-)-**1** in hoher sterischer Reinheit¹³⁾ und guter Ausbeute.

Beide Antipoden (+)- und (-)-**1** wurden gaschromatographisch nachgereinigt und die sterisch einheitlichen Substanzen zum Aktivitätstest nach *Müller*¹⁴⁾ verwendet. Hierbei werden Gametensuspensionen in Seewasser FC-78-Tropfen¹⁵⁾ mit genau bekannter Lockstoffkonzentration angeboten und nach vier Minuten Dunkel-Inkubation



die Populationsdichte über der Tropfenoberfläche photographisch dokumentiert. Durch Vergleich mit einem Blindwert (FC-78-Tropfen ohne Lockstoff) gewinnt man ein relatives Maß (Q -Werte) für die Attraktivität einer Substanz. Auf ihre tatsächliche Konzentration in der Wasserphase unmittelbar oberhalb der FC-78-Tropfen kann dann mit Kenntnis der substanzspezifischen Verteilungskoeffizienten⁶⁾ leicht geschlossen werden. Abbildung 1 zeigt die so gewonnenen Konzentrations-Attraktions-Profile für die enantiomeren Lockstoffmoleküle (+)- und (-)-1.

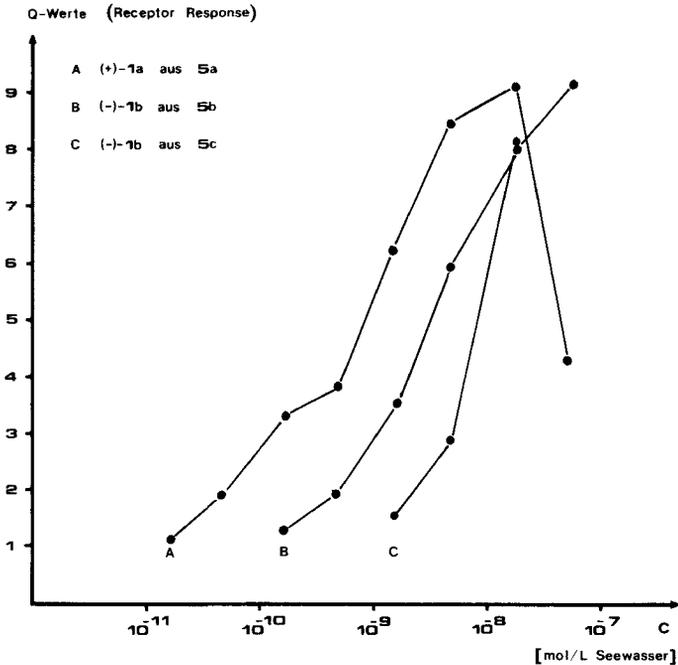


Abb. 1. Konzentrations-Wirkungs-Diagramm von (+)- und (-)-Multifiden; Verfahren nach Lit.⁶⁾.

Aufgetragen sind die Lock-Quotienten $Q = \text{Zahl der Gameten je Flächeneinheit über der Probe} / \text{Zahl der Gameten je Flächeneinheit über reinem Lösungsmittel (FC 78)}$ gegen die Lockstoffkonzentration c im Seewasser unter Berücksichtigung der Verteilungskoeffizienten. Die Kurven A, B und C entsprechen den optischen Reinheiten im Experimentellen Teil; vgl. auch Fußnote¹¹⁾.

Die annähernd 100fach höhere Wirksamkeit des natürlichen Pheromons (+)-**1** macht deutlich, daß die Bindestelle des Rezeptors, die selbst chiral angeordnet ist, ihre maximalen Wechselwirkungen nur mit dem (+)-Enantiomeren entfalten kann. Berücksichtigt man ferner die verbliebenen wechselseitigen Kontaminationen¹¹⁾ beider Antipoden, so verschiebt sich die Differenz ihrer Wirkungsprofile eher noch weiter zugunsten des Naturproduktes (+)-**1**.

Obwohl in den letzten Jahren von den Arbeitsgruppen *Pirkle* und *Helmchen* zuverlässige Regeln für die Korrelation von Retentionsverhalten (vgl. auch ¹N-NMR-Daten) und absoluter Konfiguration bei Carbamaten¹⁶⁾ und γ -Hydroxyamiden^{17,18)} aufgestellt wurden, ist im vorliegenden Fall eine derartige Aussage unzulässig, da die Derivatisierung nicht unmittelbar an einem asymmetrischen Zentrum von (\pm)-**4** vorgenommen wurde.

Eine zunächst allerdings noch vorläufige Zuordnung als (+)-(3*S*,4*S*)-*cis*-3-[(*Z*)-1-butenyl]-4-vinylcyclopenten folgt aus einer neueren Prostaglandinsynthese^{20,21)}, die ein **1** vergleichbares Grundgerüst mit bekannter absoluter Konfiguration als Ausgangsprodukt verwendet. Versuche, dies durch Röntgenbeugungsanalyse an einem kristallinen Derivat von **4** zu bestätigen, dauern noch an.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft*, Bonn-Bad Godesberg, und dem *Fonds der Chemischen Industrie*, Frankfurt/Main, für die Unterstützung dieser Arbeit. Frau *K. Jakob* und Frau *E. Fölster* sei für ihre Mitarbeit und Herrn *P. Metz* (Institut für Physiologische Chemie) für die Aufnahme der CD-Spektren gedankt.

Experimenteller Teil

Die angegebenen Schmelzpunkte sind nicht korrigiert. – ¹H-NMR-Spektren: Varian-NMR-Spektrometer EM 390 (90 MHz). – Massenspektren: GC/MS-Spektrometer Finnigan 3200. – IR-Spektren: Perkin-Elmer-Gerät 337. – Polarimetrie: Präzisionspolarimeter (0.005°) der Fa. Carl Zeiss. – CD-Messungen: JASCO J 41 A. – Analytische Gaschromatographie: Research-Gaschromatograph 5750 G der Fa. Hewlett-Packard (FID, Glassäulen 1.5 m \times 2 mm). Verwendete Trennphasen: a) 10% OV 101 auf Chromosorb P, 80–100 mesh, AW. b) 10% OV 225 auf Chromosorb W, 60–80 mesh, AW. – Präparative Gaschromatographie: Wilkens-Aerograph 1520 (Edelstahlsäulen 2 m \times 4 mm; 20% PEG 4000 auf Chromosorb P, 60–80 mesh, AW, DMSC behandelt).

Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und, falls erforderlich, absolutiert.

N-(1-Phenylethyl)carbamidsäure-*cis*-2-[(*Z*)-1-butenyl]-3-cyclopentenylnmethylester} (**5a/b**) und (**5c/d**): 1.52 g (0.01 mol) racemischer Alkohol (\pm)-**4**¹⁰⁾ und 1.61 g (0.011 mol) *R*(+)- oder *S*(-)-(1-Phenylethyl)isocyanat wurden ohne Lösungsmittel 5 h unter Schutzgas bei 90°C gerührt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung zur Racematspaltung eingesetzt.

Analytische Racematspaltung: Je 20 μ l einer 1proz. Lösung von **5a/b** bzw. **5c/d** in Dichlormethan wurden an Kieselgel (Nucleosil 50–5, Stahlsäule 200 \times 4 mm der Fa. Macherey & Nagel, Düren) mit Heptan/Ether (92:8) als Laufmittel und einer Flußrate von 1.0 ml min⁻¹ chromatographiert. Der Nachweis erfolgte mit einem Kontron-Spektrophotometer (Uvikon 720 LC) bei 254 nm und zeigte Grundlinientrennung für beide Carbamatpaare. Ihre Trennfaktoren errechneten sich wie folgt: $\alpha = 1.19$ für **5a/b** und $\alpha = 1.13$ für **5c/d**.

Präparative Racematspaltung: Jeweils 200 mg der Carbamate **5a/b** oder **5c/d** – gelöst in 2.0 ml Dichlormethan – wurden auf einer Niederdruck-Fertigsäule [Merck, Lobar; LiChroprep

Si 60 (40 – 60 μm), Größe BJ aufgegeben und mit Heptan/Ether (9 : 1) bei einer Flußgeschwindigkeit von 5.0 ml min⁻¹ eluiert. Die Detektion erfolgte wiederum photometrisch bei 254 nm. Aus den sich teilweise überlappenden Peaks wurden geeignete Fraktionen entnommen und rechromatographiert, wobei die Qualität der Trennung jeweils durch analytische HPLC beurteilt wurde.

Erhalten wurden farblose, viskose Öle, von denen nur das Carbat 5a zur Kristallisation gebracht werden konnte; Schmp. 50.0 °C (aus Heptan).

Alle spektroskopischen Messungen wurden an den getrennten Carbamaten 5a und 5b durchgeführt.

5a: ¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 0.94 (t; 3 H), 1.32 (d; 3 H), 1.82 – 2.75 (m; 5 H), 3.63 (t, breit; 1 H), 3.89 (ABX-System; J_1 = 12.6 Hz, J_2 = 11.0 Hz, J_3 = 7.5 Hz; der X-Teil liegt im Multipllett bei 1.82 – 2.75; 2 H), 4.64 (quint; 1 H), 4.93 – 5.85 (m; 4 H), 7.33 (s, breit; 5 H), 7.50 (d, breit; 1 H).

5b: ¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ = 0.93 (t; 3 H), 1.34 (d; 3 H), 1.82 – 2.80 (m; 5 H), 3.63 (t, breit; 1 H), 3.87 (ABX-System; J_1 = J_2 = J_3 = 6.7 Hz; der X-Teil liegt im Multipllett bei 1.82 – 2.80; 2 H), 4.67 (quint; 1 H), 4.90 – 5.90 (m; 4 H), 7.32 (s, breit; 5 H), 7.53 (d, breit; 1 H). – Charakteristische IR-Frequenzen (gemessen an 5a; KBr, Preßling): 3340 (NH), 3070, 3060 (CH, arom.), 3040, 3005 (HC = CH), 2980, 2950, 2910, 2850 (CH), 1700 (C = O), 1550 (CH, arom.), 1255 (stark), 1070 (stark, C – O), 780, 760 (CH, arom.), 720, 700 (HC = CH), 640 (breit), 590, 540 cm⁻¹. – MS (70 eV, gemessen an 5a): m/z = 299 M⁺ (3 %), 262 (5), 226 (1), 214 (3), 158 (6), 143 (3), 120 (20), 105 (100), 77 (41). – Polarimetrie (CCl₄): **5a:** $[\alpha]_{578}^{20}$ = +37 (c = 2.005); **5b:** $[\alpha]_{578}^{20}$ = –144 (c = 1.305); **5c:** $[\alpha]_{578}^{20}$ = –27 (c = 2.350).

C₁₉H₂₅O₂N Ber. 299.1885 Gef. 299.1886 (MS)

(+)-*cis*-2-[(*Z*)-1-Butenyl]-3-cyclopentenylmethanol [(+)-4] und (–)-4: Zur Lösung von 174.0 mg (0.600 mmol) Carbat 5a, b oder besser 5c in 4.0 ml absol. Tetrahydrofuran gab man unter Rühren 0.20 g (5.30 mmol) Lithiumaluminiumhydrid. Sodann wurde 3 h unter Inertgas zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen vorsichtig mit 2 N Salzsäure hydrolysiert. Die wäßrige Phase wurde anschließend zweimal mit je 50 ml Ether extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte mit wenig Wasser neutral gewaschen. Man trocknete mit MgSO₄ und entfernte das Lösungsmittel i. Vak. Das klare Filtrat wurde eingengt und an Kieselgel mit Pentan/Ether (4 : 1) als Laufmittel chromatographiert; Ausb. 0.052 g (58 %). Eine vollständige spektroskopische Beschreibung findet sich in Lit.¹⁰. – Polarimetrie (CCl₄): (+)-4: $[\alpha]_{578}^{20}$ = +223 (c = 1.530); (–)-4: $[\alpha]_{578}^{20}$ = –191 (c = 1.535).

(+)-*cis*-3-[(*Z*)-1-Butenyl]-4-vinyl-1-cyclopenten [(+)-1] und (–)-1. – a) Oxidation: Jeweils 20.0 mg (0.13 mmol) der Alkohole (+)-4 oder (–)-4 wurden mit 86.0 mg (0.40 mmol) Pyridinium-chlorochromat¹² in 2.0 ml Dichlormethan bei Raumtemp. gerührt, bis die Umsetzung beendet war (GC-Kontrolle an Säule A). Die Chromate wurden durch Zugabe von 5.0 ml Pentan gefällt und das bräunliche Filtrat vorsichtig eingengt. Eine zweite Fällung mit Pentan ergab die rohen Aldehyde (+)-6 bzw. (–)-6, die unmittelbar zum Olefin weiterverarbeitet wurden.

b) Einführung der Vinylgruppe: Zur Lösung von 0.5 mmol Methyl(triphenyl)phosphoran in 3.0 ml absol. Tetrahydrofuran (*n*-Butyllithium als Base) gab man den rohen Aldehyd [erhalten aus 20.0 mg Alkohol (+)-4 bzw. (–)-4] und rührte 30 min. Man hydrolysierte durch Zugabe von 5.0 ml Wasser, extrahierte dreimal mit je 10.0 ml Pentan und chromatographierte das eingengte Rohprodukt an Kieselgel mit reinem Pentan als Laufmittel. Verunreinigungen durch *trans*-Isomere (maximal ca. 5 %; Vergleiche Lit.¹⁰) wurden durch präparative Gaschromatographie an PEG 4000 als stationäre Phase vollständig abgetrennt; Ausb. 12.0 mg (51 %).

Die spektroskopischen Eigenschaften von Multifiden (\pm)-1 sind in Lit.¹⁹ ausführlich beschrieben. – Polarimetrie (CCl₄): (+)-1 $[\alpha]_{578}^{20}$ = +261 (c = 0.830) aus (+, +)-5a; (–)-1 $[\alpha]_{578}^{20}$ = –214 (c = 0.410) aus (+, –)-5b; (–)-1 $[\alpha]_{578}^{20}$ = –271 (c = 0.428) aus (–, –)-5c.

CD-Spektren (Pentan): (+)-**1** $[\Psi]_{217} = +3170$ aus (+, +)-**5a**; (-)-**1** $[\Psi]_{217} = -3640$ aus (-, -)-**5c**.

- 1) *L. Jaenicke* und *D. G. Müller*, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **30**, 61 (1973).
- 2) *D. G. Müller*, *Pure Appl. Chem.* **51**, 1885 (1979).
- 3) *L. Jaenicke*, *Naturwiss. Rundsch.* **31**, 236 (1978).
- 4) *L. Jaenicke*, *J. Sci. Ind. Res.* **39**, 819 (1980).
- 5) *L. Jaenicke*, *D. G. Müller* und *R. E. Moore*, *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 3324 (1974).
- 6) *W. Boland*, *K. Jakoby*, *L. Jaenicke*, *D. G. Müller* und *E. Fölster*, *Z. Naturforsch., Teil C* **36**, 262 (1981).
- 7) *L. H. Easson* und *E. Stedman*, *Biochem. J.* **27**, 1257 (1933).
- 8) *W. H. Pirkle* und *M. S. Hoekstra*, *J. Org. Chem.* **39**, 3904 (1974).
- 9) *W. H. Pirkle* und *P. L. Rinaldi*, *J. Org. Chem.* **43**, 3803 (1978).
- 10) *W. Boland* und *L. Jaenicke*, *J. Org. Chem.* **44**, 4819 (1979).
- 11) Die Carbamate **5a** und **5c** erwiesen sich bei der analytischen HPLC als $\geq 97\%$ einheitlich. Da jedoch der Drehwinkel von natürlichem Multifiden (+)-**1** unbekannt ist, kann keine abschließende Beurteilung über die erzielte Enantiomerenreinheit gemacht werden.
- 12) *E. J. Corey* und *J. W. Suggs*, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 2647.
- 13) Der Alkohol (\pm)-**4** fällt bei seiner Darstellung in ca. 96proz. sterischer Reinheit an¹⁰⁾. Isomerisierungen treten im weiteren Verlauf dieser Synthese nicht ein.
- 14) *D. G. Müller*, *Z. Pflanzenphysiol.* **80**, 120 (1976).
- 15) FC 78 ist ein Fluorkohlenwasserstoff hoher Dichte, dessen inertes Verhalten den Attraktionsvorgang nicht überlagert (3M-Company, Düsseldorf, West Germany).
- 16) *W. H. Pirkle* und *J. R. Hauske*, *J. Org. Chem.* **42**, 1839 (1977).
- 17) *G. Helmchen*, *R. Ott* und *K. Sauber*, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 3873.
- 18) *G. Helmchen*, *H. Völter* und *W. Schühle*, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 1417.
- 19) *W. Boland* und *L. Jaenicke*, *Chem. Ber.* **111**, 3262 (1978).
- 20) *L. A. Paquette* und *G. D. Crouse*, *Tetrahedron* **37**, 281 (1981).
- 21) *G. D. Crouse* und *L. A. Paquette*, *J. Org. Chem.*, in Vorbereitung.

[24/81]