

Diss. Nr. 5352

**Totalsynthese von Vitamin B-12:
Darstellung von Zwischenprodukten und
partialsynthetische Endstufen**

ABHANDLUNG

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der
**EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH**

vorgelegt von
WALTER SCHILLING
dipl. Natw. ETH
geboren am 8. März 1945
von Zürich

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. A. Eschenmoser, Referent
Prof. Dr. D. Arigoni, Korreferent

Juris Druck + Verlag Zürich
1974

ISBN 3 260 03736 5

Meinem sehr verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. A. Eschenmoser

unter dessen Leitung ich die vorliegende Promotionsarbeit am packenden und erlebnisreichen Projekt der Totalsynthese von Vitamin B-12 in der spannenden Endphase ausführen durfte, möchte ich für zahlreiche Diskussionen, die vielen wertvollen Ratschläge und die grosszügige Unterstützung herzlich danken.

Herrn Dr. J. Schreiber,

möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Ich durfte von seinen vielen praktischen Ratschlägen und seiner grossen technischen und apparativen Sachkenntnis einen grossen persönlichen Nutzen davontragen.

Insbesondere hat die Entwicklung der sehr leistungsfähigen Hochdruckchromatographie sehr zur Lösung schwieriger Trennprobleme in dieser Arbeit beigetragen.

Die ca 12-jährigen Arbeiten an der Totalsynthese von Vitamin B-12 wurden von einem grossen Team ausgeführt. Zahlreichen Personen bin ich deshalb zu Dank verpflichtet. Stellvertretend für alle anderen sind die Namen jener Teamkollegen aufgeführt, mit welchen ich unmittelbar zusammenarbeitete und die mir wichtige Unterlagen hinterliessen.

Dr. W. Fuhrer, Dr. A. B. Holmes, Dr. H. Maag,
Prof. Dr. N. Obata und Dr. P. Schneider.

Ihnen allen, wie auch den Mitarbeitern der Harvard-Gruppe in Cambridge, danke ich herzlich für die fruchtbare Zusammenarbeit und die hinterlassenen Unterlagen.

Herrn Prof. Dr. W. Friedrich und Herrn Prof. Dr. K. Bernhauer danke ich für das Ueberlassen der authentischen Cobyrssäureproben.

Herrn Prof. Dr. R. Bonnett danke ich für das Ueberlassen einer neo-Cobyrssäureprobe.

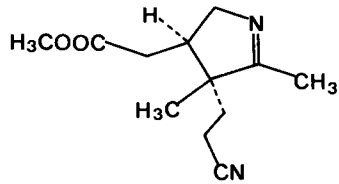
Der Firma Hoffmann-La Roche AG, Basel danke ich für das Ueberlassen einer Probe von Vitamin B-12.

Schliesslich danke ich meiner Frau Rosemarie für ihre Mithilfe zur Fertigstellung der Reinschrift dieser Arbeit.

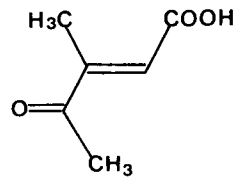
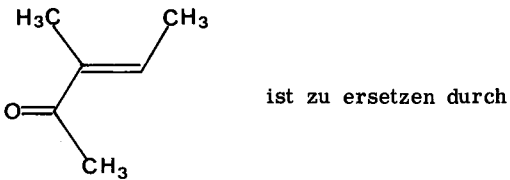
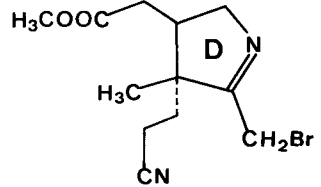
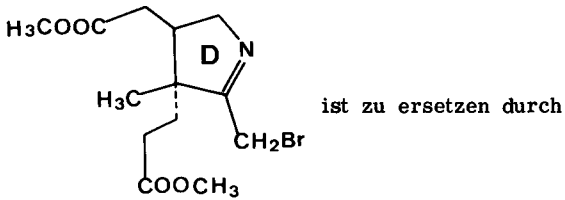
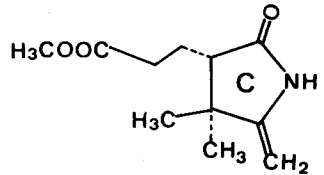
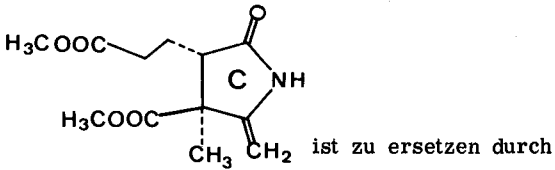
Seite Leer /
Blank leaf

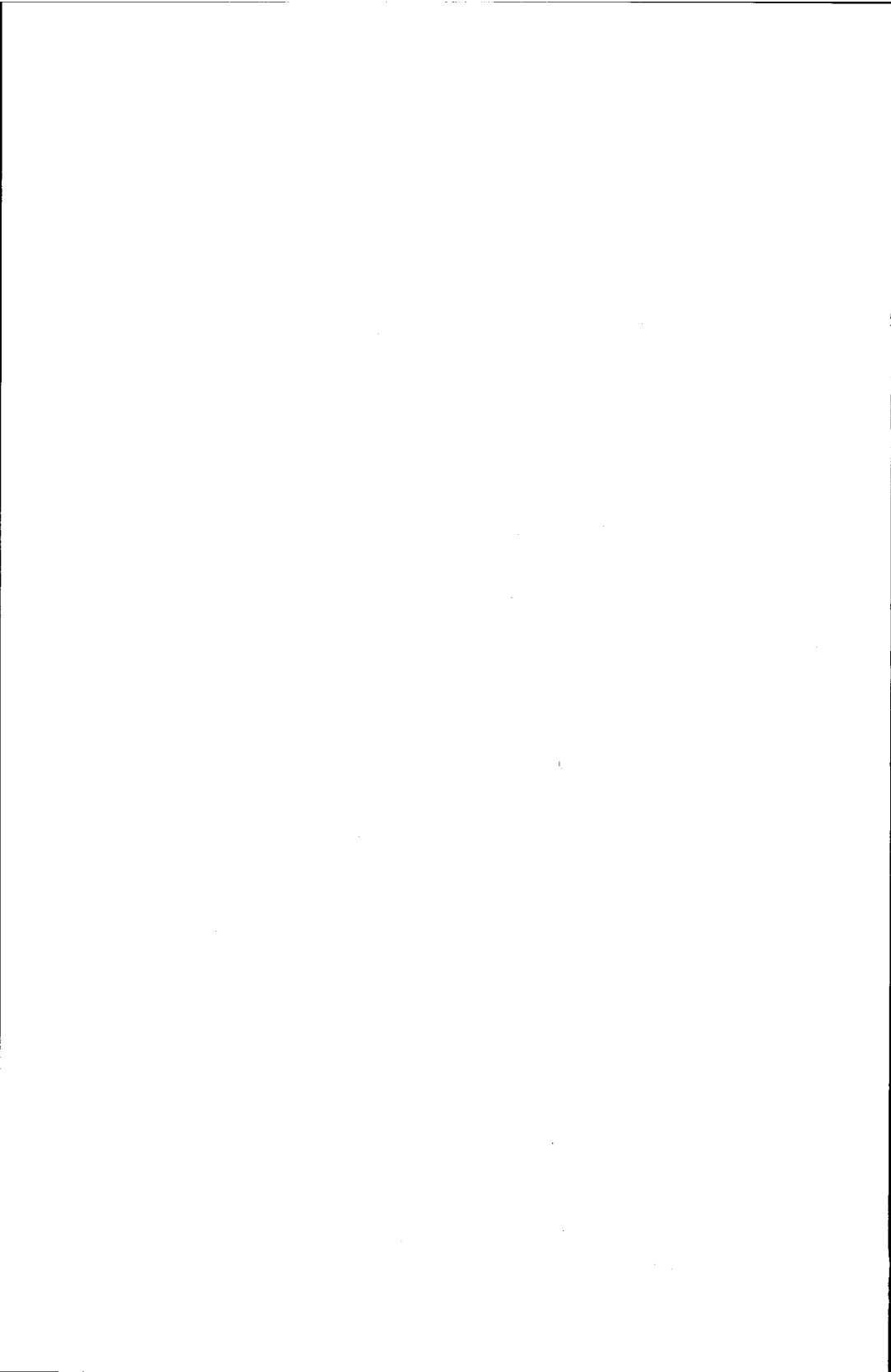
Errata

Formel 12 ist zu ersetzen durch:



Im Schema IV sind (nebst Formel 12) folgende Korrekturen anzubringen:





INHALTSVERZEICHNIS

1. ALLGEMEINER TEIL	12
1.1. Einleitung	12
1.2. Uebersicht über die 1972 abgeschlossenen Synthesen.	14
1.3. Die Synthese des Ring-D- Vorläufers. "(+)-Methyl-Imin (12)".	17
1.4. Oxidative Lactonisierung von 5, 15-bis-nor-Cobester-c-di-methylamid-f-nitril (22).	23
1.5. Die part. synth. Ueberführung von f-Amid (24) in f-Säure (27).	24
1.6. Die part. synth. Ueberführung von f-Säure (27) in Cobyr-säure (29).	26
2. EXPERIMENTELLER TEIL	30
2.1. Allgemeine Bemerkungen	30
2.2. Synthese des Ring-D- Vorläufers, "(+)-Methyl-Imin" (12).	40
2.2.1. Bemerkungen zur Synthese des (+)-Keto-Lactam-Esters (1).	40
2.2.2. "KETAL-METHODE", definitive Synthesevariante für das "(+)-Methyl-Imin" (12).	42
2.2.3. Vorversuche zur Synthese des Ring-D Vorläufers.	68
2.2.3.1. "KETON-METHODE", Versuche zur Synthese von Methyl-Imin (12) via direkte Reduktion von (+)-Keto-Thiolactam (14).	68
2.2.3.2. Beweis der Nichtepimerisierung der Essigsäureseitenkette bei Reduktion mit Raney-Nickel.	73
2.2.3.3. "DIOL-METHODE", Versuche zur Synthese von "Methyl-Imin" (12) via eine erschöpfende Reduktion des (+)-Keto-Lactam-Esters (1).	79
2.3. 5, 15-BIS-NOR-COBYRINSAEURE-PENTAMETHYLESTER-c-LACTON-f-NITRIL.	90
2.3.1. Lactonisierung von 5, 15-bis-nor-Cobester-c-di-methyl-amid-f-nitril (22).	90
- Rückschau auf die Information aus den Prä-Boston-Lactonierungsansätzen.	90
- typischer Nachschubansatz der Prä-Boston-Periode.	93

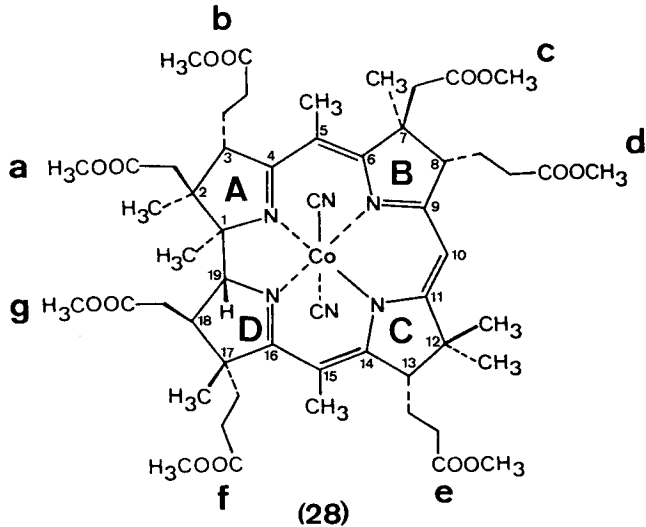
2. 3. 2.	Endgültige Reaktionsbedingungen zur Lactonisierung von 5, 15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril (22). typischer Nachschubansatz der Post-Boston-Periode.	101
2. 3. 3.	Lactonisierung der acht 5, 15-Bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril-Diastereomeren.	109
2. 3. 3. 1.	Allgemeines	109
2. 3. 3. 2.	Chromatographische Charakterisierung und Identifikation der Lacton-Diastereomeren.	115
2. 3. 3. 3.	Spektroskopische Charakterisierung der Lacton-nitril-Diastereomeren.	127
2. 3. 3. 4.	Diskussion der spektroskopischen Daten und Konfigurationszuordnung der 4 diastereomeren Lacton-nitrile.	138
2. 3. 4.	Trennung des Lacton-1 Gemisches in die Komponenten ($\alpha\cdot\alpha$ / $\alpha\cdot\beta$) mittels LLC.	146
2. 3. 5.	Isomerisierung von 5, 15-bis-nor-Cobester-c-lacton-f-nitril (Lacton-2 resp. Lacton -1 Gemische) bezügl. dem Kohlenstoffatom C-3.	148
2. 3. 5. 1.	Isomerisierung von Lacton-nitril-2 zum ($\alpha\cdot\alpha$ / $\alpha\cdot\beta$)-und ($\beta\cdot\alpha$ / $\beta\cdot\beta$)-Gemisch.	148
2. 3. 5. 2.	Isomerisierung von Lacton-nitril-1 zum ($\alpha\cdot\alpha$ / $\alpha\cdot\beta$)-und ($\beta\cdot\alpha$ / $\beta\cdot\beta$)-Gemisch.	153
2. 3. 5. 3.	Identifikation der Lactone 1 und 2 aus den Isomerisierungen von Lacton 1 und 2.	155
2. 4.	COBYRINSAEURE-HEXAMETHYLESTER-f-SAEURE (27) (f-SAEURE)	159
2. 4. 1.	Beispiel eines präparativen Ansatzes zur Synthese von f-Säure ohne Reinigung der Zwischenprodukte.	161
2. 4. 1. 1.	O-Alkylierung von f-Amid (24) und Hydrolyse des f-Nitronesters (25).	161
2. 4. 1. 2.	Aminolyse von "f-Propionaldoester".	164
2. 4. 1. 3.	Nachhydrolyse von f-Nitronester (25) zu f-Säure (27).	166
2. 4. 1. 4.	Kristallisation und Charakterisierung der f-Säure (27).	167
2. 4. 1. 5.	Veresterung von f-Säure (27) zu Cobester (28) und DC-Identifikation mit auth. Cobester.	172

2. 4. 2. Untersuchungen über die Struktur des "f-Propionaldoesters" (26a).	174
2. 4. 2. 1. Voruntersuchungen, LLC-Identifikation des Cobesters erhalten via Aminolyse und Veresterung der beiden mittels LLC erhältlichen Fraktionen von "f-Propionaldoester".	174
2. 4. 2. 2. Charakterisierung von "f-Propionaldoester" - LLC-Trennung mittels einer besseren Säule in drei einheitliche Fraktionen.	177
2. 5. PARTIALSYNTHESE VON AQUO-CYANO-COBYRSAEURE (29) AUS f-AMD (24) VIA f-SAEURE (27).	196
2. 5. 1. Amonolyse von kristalliner f-Säure (27) zu partial synthetischer Cobyrssäure (29). Kristallisation und Identifikation als α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form).	198
2. 5. 2. Kristallisation von part. synth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form, Probe H).	202
2. 5. 3. Vergleichsproben von authentischer Aquo-cyano-cobyrssäure (Proben I und II).	203
2. 5. 4. Analytische und spektroskopische Daten von part. synth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form) und Identifikation mit umkristallisierter auth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form).	204
2. 5. 5. Amonolysevorversuche von nicht-kristalliner f-Säure (27) zu part. synth. Cobyrssäure (29). Kristallisation und vorläufige Identifikation als α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form, Probe V)	217
2. 5. 6. Rückgewinnung der zur Charakterisierung verwendeten part. synth. Aquo-cyano-cobyrssäure in der b-Form und Ueberführung in die β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form) (Probe A und Probe AV).	222
2. 5. 7. Umkristallisation von part. synth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form) bei +3°C und Identifikation als β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form).	224
3. ZUSAMMENFASSUNG	244
Literaturverzeichnis	245

Bemerkung zur Nomenklatur

Einfachheitshalber wurde gegenüber der IUPAC-Nomenklatur [1] [2] , die von L. Werthemann [3] eingeführte Kurzbezeichnung Cobester für den Dicyano-kobalt-III-cobyrinsäure-heptamethylester (28) verwendet. Die Numerierung der Atome, die Bezeichnung der Seitenketten (a-g) und der Ringe (A, B, C und D), werden nach den IUPAC-Regeln vorgenommen. (Fig. I).

Fig. I.



Es wurden weiter folgende Vereinfachungen zur Bezeichnung von Cobester-Derivaten getroffen:

- Cobester-Derivate, die an den Stellen 5 und 15 keine Methylgruppen, sondern Protonen tragen, werden als 5,15-bis-nor-Cobester-Derivate bezeichnet.
- 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril (22) wird in Kurzschreibweise als Amid-nitril bezeichnet.
- Dicyano-kobalt-III-cobyrinsäure-hexamethylester-f-amid (24) resp. -f-Säure (27) werden kurz als f-Amid (Cobester-f-amid) resp. f-Säure (Cobester-f-Säure) bezeichnet.
- 5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton-f-nitril wird kurz als Lacton-nitril oder Lacton bezeichnet.
- Die Konfiguration der Seitenketten b, d und e an den Zentren C-3, C-8 und C-13 wird durch α (unterhalb-) oder β (oberhalb der Molekülebene liegend) angegeben.

- Die natürliche Konfiguration (in Fig. I - III angegeben) erhält demnach die Notierung $\alpha\alpha\alpha$, gleichbedeutend mit C-3 α , C-8 α , C-13 α . Für die Notierung $\alpha\alpha\beta$ wird oft auch die Vorsilbe neo (= $\alpha\alpha\beta$ -Konfiguration) (z. B. neo-Cobyr-säure) verwendet.
- Verbindungen mit einem c-Lacton Ring (Seitenkette c nach C-8) wird infolge der dadurch obligaten C-8 α -Konfiguration der d-Seitenkette ein Punkt gesetzt ; z. B. $\alpha \cdot \alpha$ -Lacton - nitril.
- Die Verbindungen wurden nach dem experimentellen Teil numeriert.
- Schemata im experimentellen Teil sind mit arabischen, jene im allgemeinen Teil mit römischen Zahlen numeriert.
- Die Bezeichnung E neben der Formelnummer (z. B. 16 E) bedeutet das Epimere zur betreffenden Verbindung (z. B. 16).

1. ALLGEMEINER TEIL.

1.1. Einleitung

Repräsentative Einleitungen zum Thema der Totalsynthese des Vitamins B-12 haben sich im Verlaufe der ca 12-jährigen Synthesearbeiten in zahlreichen Dissertationen in permutatorischer Weise niedergeschlagen [4 - 13] . Am Ausgangspunkt der Arbeiten über die Totalsynthese von Vitamin B-12 stehen die beiden Röntgenstrukturanalysen von Vitamin B-12 (Fig. II) und später auch der synthetisch angestrebten Cobyrinsäure (29) (Fig. III) durch D. C. Hodgkin [14] [15] im Jahre 1956 resp. 1971.

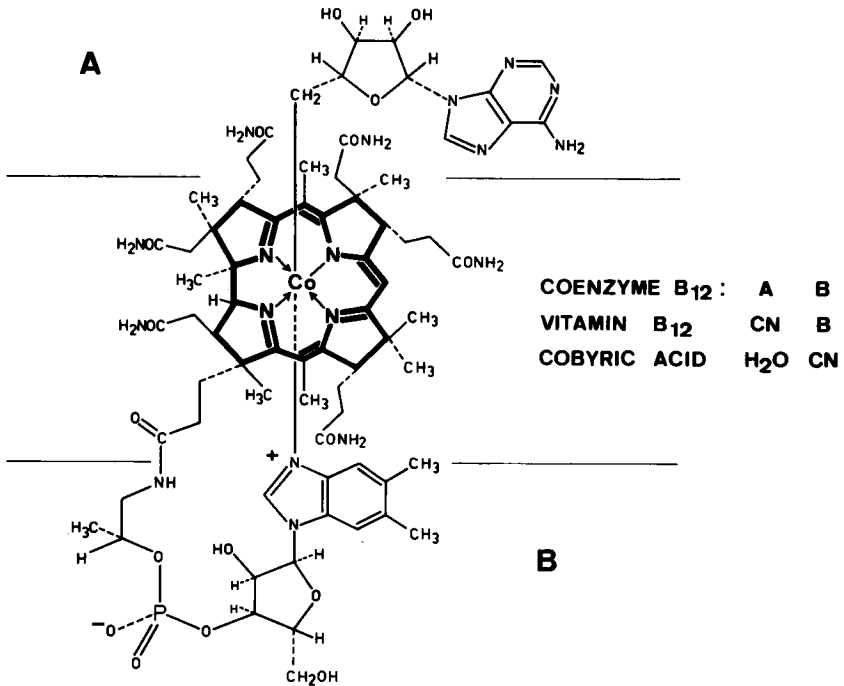
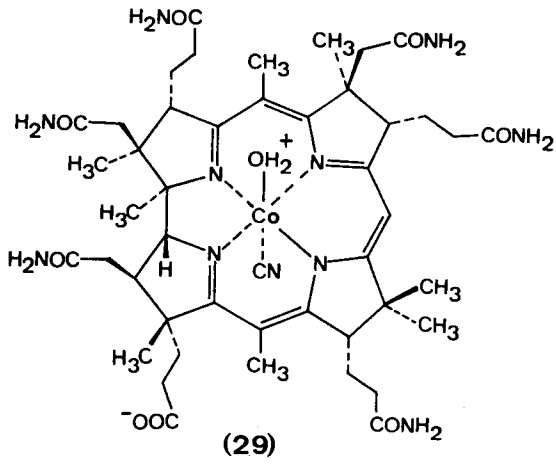


Fig. II.



Cobyräure

Fig. III.

1. 2. Uebersicht über die 1972 abgeschlossenen Synthesen.

(vgl. das herausklappbare Schema IV).

Bekanntlich wurde die Totalsynthese von Vitamin-B-12 in einer transatlantischen Zusammenarbeit unserer Gruppe mit dem Team der Harvard-Universität, unter Leitung von R. B. Woodward, bearbeitet.

Die Bemühungen zur Totalsynthese fruchteten 1970 erstmals in der Synthese des 5,15-bis-nor-Cobesters nach der AB-Variante [16], welche als zentrale, den Corrin-Ring aufbauende Reaktionsschritte die Kondensation einer die Ringe A-D (hergestellt von der Harvard-Gruppe) umfassenden Corrinhälfte mit einer die Ringe B-C (hergestellt von der ETH-Gruppe) enthaltenden Corrinringhälfte zum Tetracyclus A B und nachfolgende A-B-Cyclisierung (durch jodierende Kupplung [11]



zum geschlossenen Tetracyclus $\begin{array}{ccc} & \text{A} & \text{B} \\ & | & | \\ \text{D} & - & \text{C} \end{array}$ beinhaltete. Der dabei gewonnene 5,15-bis-nor-Cobester war jedoch an der f-Seitenkette noch nicht differenziert, d. h. alle Seitenketten lagen als Methylester vor. Dieses Zwischenprodukt eignete sich deshalb nicht zur Synthese der Cobyrssäure, in welcher die f-Seitenkette (als Carboxylgruppe vorliegend) gegenüber den anderen Seitenketten (als primäre Amide vorliegend) differenziert ist. Details dieser Synthesevariante sind am IUPAC-Symposium zu Riga [16] publiziert worden. Präparative Einzelheiten findet man in den Dissertationen von P. Schneider [11] und H. Maag [12].

In der Folge synthetisierte die Harvard-Gruppe mit einem A-D Zwischenprodukt, welches an der f-Seitenkette eine Nitrilgruppe trug, via das 5,15-bis-nor-c-dimethylamid-f-nitril das f-Amid (24).

Auf die Details der AB-Variante mit differenzierter f-Seitenkette wird hier nicht mehr eingegangen. Einzelheiten findet man in der Dissertation von H. Maag [12] und im Vortrag von R. B. Woodward am IUPAC-Symposium zu New-Delhi [17]. An der ETH wurde zur Synthese des 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitrils (22) ein neues Synthesekonzept, die sogen. AD-Variante, welche als Schlüsselstufe zur Bildung des Corrinringes eine photochemische Cyclisierung eines geeigneten tetracyclischen Corrinvorläufers $\begin{array}{ccc} & \text{A} & \text{B} \\ & | & | \\ \text{D} & - & \text{C} \end{array}$ zwischen den Ringen A und D beinhaltete



[13], und mit dem gleichen Zwischenprodukt, wie bei der AB-Variante, dem f-Amid (24) endete [18].

In diesem neuen Synthesekonzept war es ausserdem möglich, unabhängig vom Harvard A-D Zwischenprodukt, durch Verwendung der beiden Enantiomeren der Dilactonsäure (A) alle 4 Ring-Vorläufer zu synthetisieren. Das (+)-drehende Enantiomere fand dabei Verwendung für die Synthese des Ring-A, -B- und -C-Vorläufers, währenddem das (-)-drehende Enantiomere das Ausgangsprodukt für den Ring-D-Vorläufer darstellte. Für Nachschubzwecke wurde der Ring-C-Vorläufer nach einer von der Harvard-Gruppe ausgearbeiteten Methode aus (+)-Campher hergestellt. Auf der Stufe des f-Amids (24) wurde das totalsynthetische Material mit dem gleichen, durch Abbau von Vitamin-B-12 gewonnenen f-Amid (24) identifiziert [12]. Ueber diese Syntheseariate (AD-Variante) wurde erstmals am IUPAC-KONGRESS zu Boston (26. -30. Juli 1971) berichtet.

Zur Synthese der Cobyrssäure verblieben nun noch folgende Syntheseprobleme, welche von den beiden Gruppen gemeinsam gelöst wurden, nämlich:

1. Die Ueberführung des f-Amids (24) zur f-Säure (27).
2. Die Ueberführung der Methylestergruppen zu primären Amidgruppen.

1. Ueberführung des f-Amides zur f-Säure

Anfänglich unternommene Vorversuche zur Darstellung der f-Säure aus f-Amid mittels Nitrosierungsreagenzien scheiterten daran, dass der Corrinchromophor an C-10 nitrosiert wurde. In Kenntnis dieser Sachlage (Sommer 1971) wurden von den beiden Gruppen 2 verschiedene Wege zur Lösung dieses Syntheseproblems beschritten.

- Die Harvard-Gruppe bearbeitete die Nitrosierungsreaktion so lange, bis unter bestimmten Reaktionsbedingungen die f-Säure (27) in ca 70% Ausbeute erhalten wurde.
- Die ETH-Gruppe suchte nach einer neuen Methode und fand die unten diskutierte, in Schema III dargestellte Reaktionssequenz, in welcher α -Chlor-aldonitrone als Reagens verwendet wurden. Diese Reaktionssequenz wurde von N. Obata bearbeitet und führte in kurzer Zeit zum Erfolg, wobei die f-Säure (27) in ca 60-70% Ausbeute (bez. f-Amid) anfiel.

Die Syntheseschritte zur Cobyrssäure (29) wurden an der ETH nur mit authentischem, durch Abbau von Vitamin B-12 gewonnenen f-Amid (24) durchgeführt, währenddem die Harvard-Gruppe auch totalsynthetisches f-Amid (24) einsetzte.

2. Ueberführung der f-Säure zur Cobyrssäure

Die letzte Stufe bestand in der Amonolyse der 6 Methylestergruppen der Seiten-

ketten a, b, c, d, e und g zu primären Amidien, währenddem die f-Seitenkette, als Carboxylgruppe vorliegend, unangetastet bleiben sollte.

Die Harvard-Gruppe fand erstmals eine präparativ befriedigende Lösung dieses Syntheseproblems, welches unten eingehend diskutiert wird.

Die erhaltene Cobyrssäure (an der ETH nur partialsynthetische, an der Harvard auch totalsynthetische) wurde mit natürlicher, aus Klärschlamm [19] gewonnener Cobyrssäure identifiziert. An der ETH wurden die Vorarbeiten und Teile der Identifikation von A. B. Holmes ausgeführt.

Mit der Identifikation der partialsynthetischen mit der authentischen Cobyrssäure konnten die ca 12 Jahre dauernden Arbeiten an den beiden Synthesen des Vitamins B-12 im Jahre 1972 abgeschlossen werden. R. B. Woodward berichtete darüber am IUPAC-Kongress zu New-Delhi (12. Febr. 1972) [17] .

In der photochemischen AD-Variante, dargestellt im herausklappbaren Schema IV , fehlen noch folgende Syntheseschritte, die in dieser Arbeit beschrieben sind:

1. Die Synthese des Ring-D Vorläufers, (+)-Methyl-Imin (12). (vgl. 2. 2. ff)
2. Die Lactonisierungsreaktion, ausgehend vom 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril (22) zum 5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton -f-nitril (23). (vgl. 2. 3. ff)
3. Die part. synth. Ueberführung von f-Amid (24) in die f-Säure (27). (vgl. 2. 4. ff)
4. Die part. synth. Ueberführung von f-Säure (27) in Cobyrssäure (29) und deren Identifikation mit authentischer Cobyrssäure. (vgl. 2. 5. ff).

1. 3. Die Synthese des Ring-D Vorläufers, (+)-Methyl-Imin (12).

(vgl. Schema I und II)

Das spezielle Problem in dieser Synthese war die Differenzierung der Propionylseitenkette (= f-Seitenkette) aus den früher erwähnten Gründen. Ausserdem sind im Ring-D die Positionen der Acetyl- und Propionylseitenkette im Vergleich zu den 3 anderen Ringen vertauscht, weshalb sich die Synthese ausgehend von der (-)-drehenden Dilactonsäure (-)-(A) gegenüber den anderen Ringsynthesen komplizierter gestaltete.

Die Synthese des Ring-D Vorläufers wurde 1967 von R. Wiederkehr [7] in Angriff genommen und führte, ausgehend von der (-)-Dilactonsäure (-)-(A), zunächst zum (+)-Keto-lactam-ester (1) (Schema 1, unter 2. 2. 1.).

Die Keto-Funktion ergab sich dabei als Folge einer anomal verlaufenen Arndt-Eistert-Reaktion [7]. Als logische Konsequenz davon drängte sich zur Differenzierung der Propionylseitenkette eine Beckmann-Umlagerung 2. Art an. Diese führte, ausgehend vom Keto-Amin (10), einerseits zu einem Propionitril (=f-Seitenkette) und andererseits zur Methyl-Imin-Struktur, welche die gewünschte, zur weiteren Ringkondensation (D + B-C) notwendige Oxidationsstufe aufwies.

Die Ring-D-Synthese wurde in einer vorläufigen Variante von P. Dubs und W. Fuhrer [20] bearbeitet und führte 1969 mit der DIOL-METHODE (Schema I) (vgl. auch 2. 2. 3. 3.) erstmals zum Ziel.

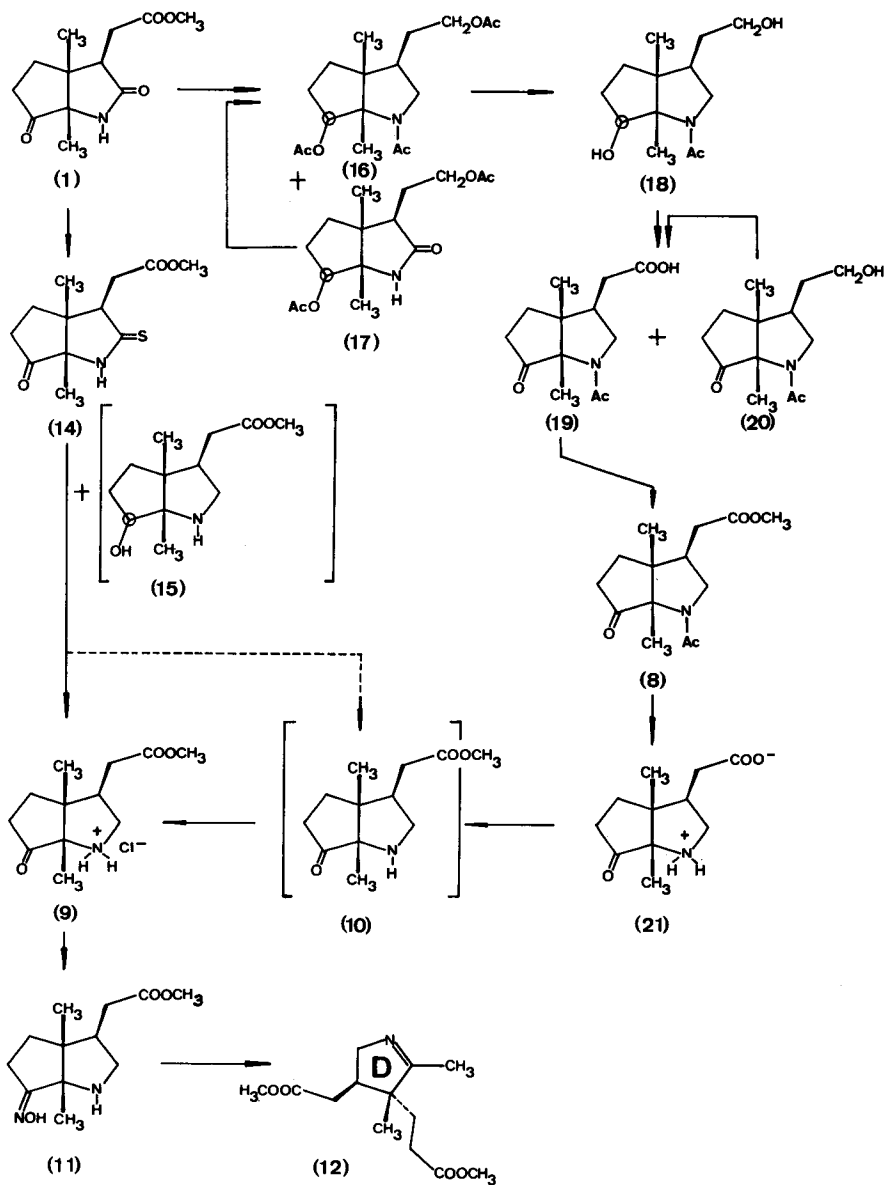
Diese Methode führte nach erschöpfender Reduktion aller 3 Funktionen des (+)-Keto-lactam-esters (1) und acetylierender Aufarbeitung zum Triacetat (16), welches nach partieller Hydrolyse zum Diol (18) führte. Auf dieser Stufe musste gleichzeitig die zum sek. Alkohol reduzierte Ketogruppe wieder zum Keton und der primäre Alkohol (ehemalige Acetylseitenkette) zur Säure aufoxidiert werden, wobei das bei der vorangegangenen Reduktion erhaltene sek. Amin als Acetamid gegen Oxidation geschützt blieb.

Die erhaltene N-Acetyl-keto-säure (19) wurde nach Veresterung mit Diazomethan in das N-Acetyl-keton (8) überführt, welches chromatographisch leicht gereinigt werden konnte.

Durch basische Verseifung des durch Acylierung geschützten sek. Amins (gleichzeitig wird aber auch die Methylestergruppe verseift; in der definitiven Methode wird sauer hydrolysiert, wobei die Methylestergruppe intakt bleibt) erhielt man die Keto-amino-säure (21), welche nach Veresterung zum Keto-amin (10) führte.

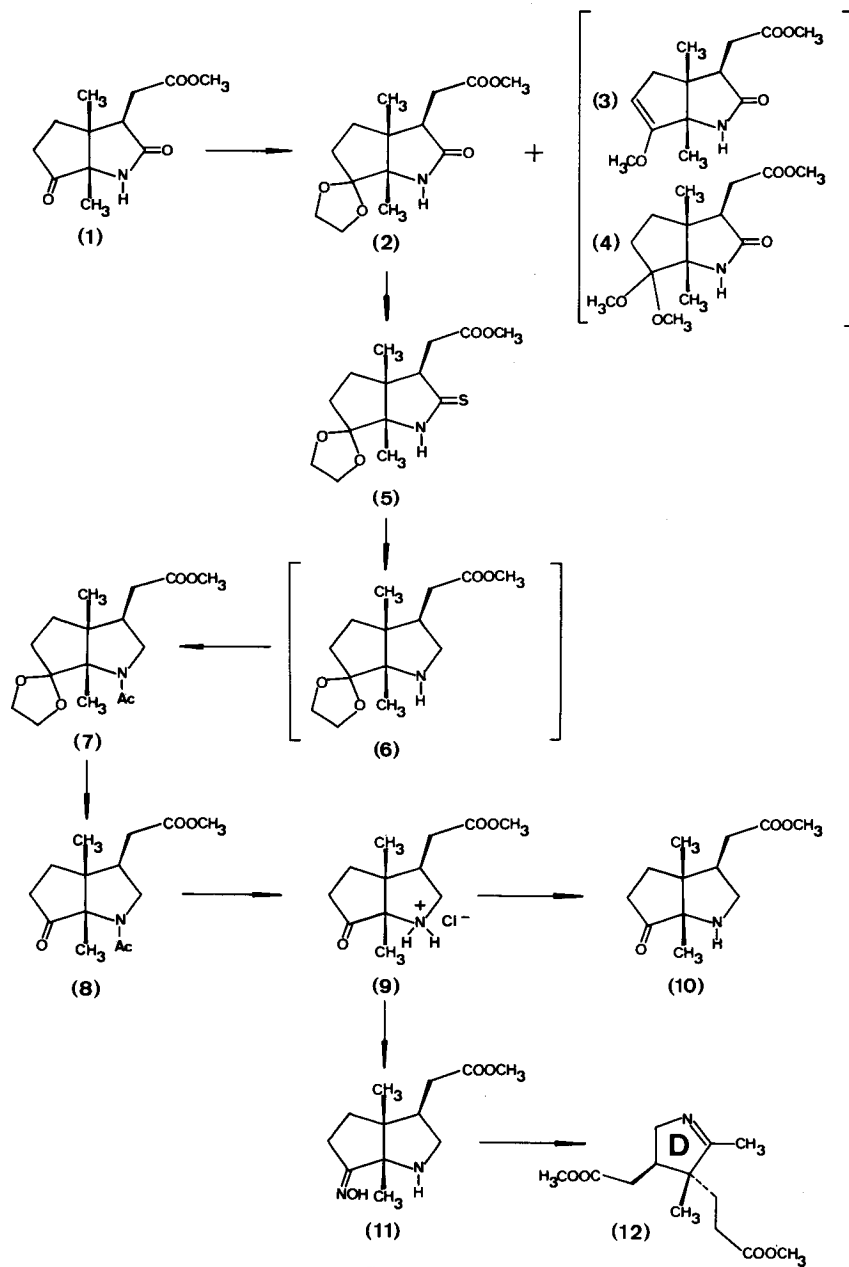
SYNTHESE DES RING - D - VORLAUFERS: (+)-Methyl-Imin (12).

DIOL-METHODE und KETON-METHODE (Schema I)



Schema I

KETAL - METHODE (Schema II)



Schema II

Das Keto-amin (10) ist sehr thermolabil. Es wurde deshalb in der thermodynamischen Form als Hydrochlorid (9) gewonnen. Dieses Produkt konnte direkt zur Oximierung verwendet werden. Das dabei erhaltene Amin-oxim (11) wurde ohne weitere Reinigung der Beckmann-Fragmentierung zum (+)-Methyl-Imin (12) zugeführt.

Das Erben des präparativen Weges der Beckmann-Fragmentierung 2. Art war insofern ein ziemlich schwieriges Problem, als nämlich die verschiedensten, gebräuchlichen Fragmentierungsreagenzien versagten (vgl. Diskussion im exp. Teil) und nur Thionylchlorid unter genau einzuhaltenden Bedingungen die Fragmentierung präparativ befriedigend ermöglichte.

Die Fragmentierungsreaktion wurde nicht im Detail studiert, weshalb nicht bekannt ist, ob die eigentliche Fragmentierung schon vor oder erst nach der Basebehandlung eingeleitet wird.

Die DIOL-METHODE lieferte die ersten Mengen des für den Corrinring-Aufbau notwendigen Ring-D-Vorläufers (12). Für Nachschubzwecke war diese Methode insofern etwas schwerfällig, als bei der erschöpfenden Reduktion stets Anteile (bis zu 30 %) an partiell reduziertem Lactam-diacetat (17) anfiel, welches in Nachreduktionen wieder in die Synthese eingeschleust wurde. Weiter verlief die Oxidation zum N-Acetyl-keton (8) präparativ unbefriedigend, indem auch hier stets partiell oxidiertes Material (20) anfiel, das allerdings durch Nachoxidationen wieder verwertet werden konnte.

Man suchte deshalb nach einer besseren Variante, welche sich in der KETON-METHODE anfänglich als vielversprechend erwies (vgl. unter 2. 2. 3. 1.).

Diese Variante beinhaltete die selektive Reduktion der Lactam-Funktion von (1) via das Keto-thiolactam (14) mittels Raney-Nickel zum Keto-amin (10) (als Hydrochlorid isoliert).

Diese Methode scheiterte an der Schwierigkeit, ein selektiv und reproduzierbar die Thiolactam-Funktion reduzierendes Raney-Nickel zu finden. In einer Nebenreaktion wurde nämlich stets die Keto-Funktion angegriffen, wobei der Aminoalkohol (15) im besten Falle zu immer noch 22% (bez. Edukt) anfiel.

Weitere Versuche zur selektiven Reduktion der Lactam-Funktion in (1) via den Methyl-iminoester oder Methyl-thioiminoester mittels Natriumcyanoborhydrid [21] schlugen auf Grund derselben Nebenreaktion fehl.

Die Synthese des Ring-D-Vorläufers wurde deshalb nochmals bearbeitet, was zur KETAL-METHODE (definitive Variante) führte.

KETAL-METHODE. (vgl. Schema II)

In dieser Methode, ausgehend von (+)-Keto-lactam-ester (1), wurden durch Schutz der Keto-Funktion durch Ketalisierung Nebenreaktionen mit der Keto-Funktion verunmöglicht.

Die Ketalisierung zum Ketal-lactam (2) war nicht so einfach herbeizuführen. Offenbar ist die Umgebung der Keto-Funktion durch die Anwesenheit eines quartären C-Atoms in α -Stellung und die cis-Verknüpfung der beiden 5-Ringe, was eine dachförmige Konformation des bicyclischen Ringsystems zur Folge hat, sterisch stark abgedeckt.

Die herkömmlichen Ketalisierungsmethoden (vgl. Diskussion unter 2. 2. 2.) genügten zur Ketalisierung nicht. Nur die angewandte Methode (Ketalisierung mit Glykol in Methanol mit Trimethoxiorthoformiat und p-Toluolsulfonsäure (als Katalysator)) ermöglichte eine glatte Ketalisierung, wobei allerdings durch Nebenreaktion je ca 5-7% Enoläther (3) und Dimethoxiketal (4) entstanden. Das Ketal-lactam (2) wurde sodann mittels P_2S_5 in THF glatt ins Ketal-thiolactam (5) überführt, welches in der nachfolgenden Reduktion mit Raney-Nickel und acetylierenden Aufarbeitung zum N-Acetyl-ketal (7) reagierte. Auch hier bot die Reduktion mit Raney-Nickel Schwierigkeiten. Diese wurden aber nicht durch Nebenreaktionen verursacht, sondern das Ablösen des intermediär entstandenen Ketal-amins (6) von der Katalysatoroberfläche bot etwelche Mühe. Zu aktive Katalysatoren hielten das Ketal-amin z. T. irreversibel fest; zu inaktive Katalysatoren reduzierten hingegen nur ungenügend. Die Lösung wurde durch die acetylierende Aufarbeitung gefunden. Danach wurde das offenbar zur Koordination mit der Nickeloberfläche neigende Ketal-amin (6) mittels Acetanhydrid in das N-Acetyl-ketal (7) überführt. Dieses Produkt zeigte eine stark verminderte Koordinationstendenz zur Nickeloberfläche und konnte deshalb leicht davon abgelöst werden. Die Acetylierung des Ketal-amins stellte jedoch keine zusätzliche Erschwerung der Synthese dar, da nämlich das Ketal-amin (6) durch saure Hydrolyse nicht zum Keto-amin (10) deketalisiert werden konnte. Der Grund dafür (es wurden nur wenige, erfolglose Versuche unternommen) ist folgender: Im Falle saurer Hydrolyse wird das Ketal-amin protoniert, wobei der dabei auf die Ketal-Funktion ausgeübte Feldeffekt (Coulombabstoßung) eine Protonierung der Ketalfunktion zur Einleitung der zur Hydrolyse notwendigen nukleophilen Substitution am potentiellen Carbonyl-C-Atom mit Wasser, verhindert. Demgegenüber liess sich das N-Acetyl-ketal (7) in 40% wässriger Essigsäure, wenn auch unter drastischen Bedingungen (16h/60⁰) glatt zum N-Acetylketon (8) verseifen.

Auf dieser Stufe trafen sich die KETAL-METHODE und die DIOL-METHODE wieder. In der KETAL-METHODE wurde das N-Acetyl-ke-ton (8) mittels HCl in Methanol solvolytisch gespalten und dabei direkt, ohne die Methylestergruppen anzutasten, das zur Oximierung verwendbare Keto-amin-hydrochlorid (9) erhalten. Die weiteren Stufen bis zum Methyl-imin (12) blieben nun dieselben wie in der DIOL-METHODE, wurden aber optimiert und lieferten das Methyl-imin (12) in ca 75% Ausbeute bez. N-Acetyl-ke-ton (8) resp. ca 38-40% (bez. eingesetztem (+)-Keto-lactam-ester (1)).

Mit dem Methyl-imin (12) stand nun ein in der f-Seitenkette (als Propionitril vorliegend) differenzierter Ring-D-Vorläufer mit korrekter Konstitution und Chiralität zum weiteren Corrinring-Aufbau [13] zur Verfügung.

Das Nichtauftreten einer event. bei der Reduktion mit Raney-Nickel auftretenden Epimerisierung der Acetylseitenkette konnte mittels eines Deuterierungsexperimentes (vgl. unter 2. 2. 3. 2.) nachgewiesen werden.

1. 4. Oxidative Lactonisierung von 5, 15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril.
(vgl. auch Rückschau auf die Information der Prä-Boston Lactonisierungsansätze und die Diskussion im exp. Teil) (vgl. das herausklappbare Schema IV).

Die Lactonisierungsreaktion diente dem Zweck, die C-10-Stellung gegen einen elektrophilen Angriff bei der nachfolgenden Alkylierungsreaktion zur Einführung der beiden Methylgruppen in 5- und 15-Stellung [12] sterisch abzudecken.

Die Gegenwart einer Lacton-Funktion im Ring-B führt zu 2 quartären Zentren in β -Stellung zum C-10. Die Zentren C-5 und C-15 wiesen hingegen nur 1 quartäres und ein tertiäres Zentrum auf. Im weiteren wurde auf der Stufe der Lacton-nitrile (23) die Abtrennung der C-3 β -Diastereomeren ausgeführt, die auf dieser Stufe einfacher auszuführen war als auf der Stufe der Amid-nitrile (22), indem die schnelle LLC-Chromatographie direkt 2 Lacton-Fractionen lieferte.

Die Lacton-Fraktion 1 (=Lacton-nitril 1) bestand aus dem C-13 Epimerengemisch ($\alpha \cdot \alpha / \alpha \cdot \beta$) und wurde für die nachfolgende Alkylierung [12] verwendet, währenddem die Lacton-Fraktion 2 (=Lacton-nitril 2) aus dem C-3 Epimerengemisch ($\beta \cdot \alpha / \beta \cdot \beta$) bestand. Dieses war für die Alkylierung nicht geeignet, da es nur monoalkyliert werden konnte [12]. Details der Lactonisierung werden im exp. Teil besprochen. Es werden hier nur die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst.

1. Die Lactonisierung findet regiospezifisch im Ring-B statt.
2. Die Lactonisierungsreaktion lässt die Konfiguration an C-3 und C-13 unberührt.
3. Die Propionylseitenkette (d-Seitenkette) in C-8 β -Amid-nitrilen wird bei der Lactonisierungsreaktion in die C-8 α -Konfiguration überführt.
4. Die Einzellactonisierung der 8 Amid-nitril Diastereomeren lieferte paarweise identische Lactone. Dies ermöglichte die Zuordnung der C-8 Epimerenpaare der Amid-nitrile (22).
5. Ausschlaggebend für das präparativ gute Gelingen der Lactonisierungsreaktion ist das Vorliegen einer c-Dimethylamid-Funktion im Ring-B. Der entsprechende Methyl ester lieferte unter den gleichen Bedingungen ebenfalls, jedoch in bedeutend geringerer Ausbeute (ca 25-30%), Lacton. Der Grund dafür dürfte in der bedeutend grösseren Elektrophilie des Amid-Sauerstoffes liegen.

Isomerisierung der Lacton-nitrile. (vgl. Diskussion im exp. Teil)

Diese hatte ursprünglich den Zweck, das für die Dialkylierung tote C-3/ β Lacton-nitril in das C-3- α -Diastereomere umzuwandeln. Die erwünschte Isomerisierung gelang, wenn auch in präparativ unbefriedigender Ausbeute (30-40%), zu einem Gleichgewichtsgemisch. Dieses lag zu Gunsten von Lacton-nitril ($\alpha\cdot\alpha / \alpha\cdot\beta$) (= Lacton 1) im Verhältnis Lacton 1 : Lacton 2 = 78 : 22 % vor.

Die C-3 α -Konfiguration ist demnach gegenüber der C-3 β -Konfiguration thermodynamisch stabiler. Das isolierte Lacton-nitril 1 lag als ca 1:1 Gemisch der beiden C-13 Epimeren ($\alpha\cdot\alpha / \alpha\cdot\beta$) vor.

Die Isomerisierungsreaktion ist präparativ nicht brauchbar, obwohl das eingestellte Gleichgewicht auf der gewünschten Seite (Lacton-nitril 1) liegt.

1. 5. Ueberführung von f-Amid (24) in f-Säure (27)

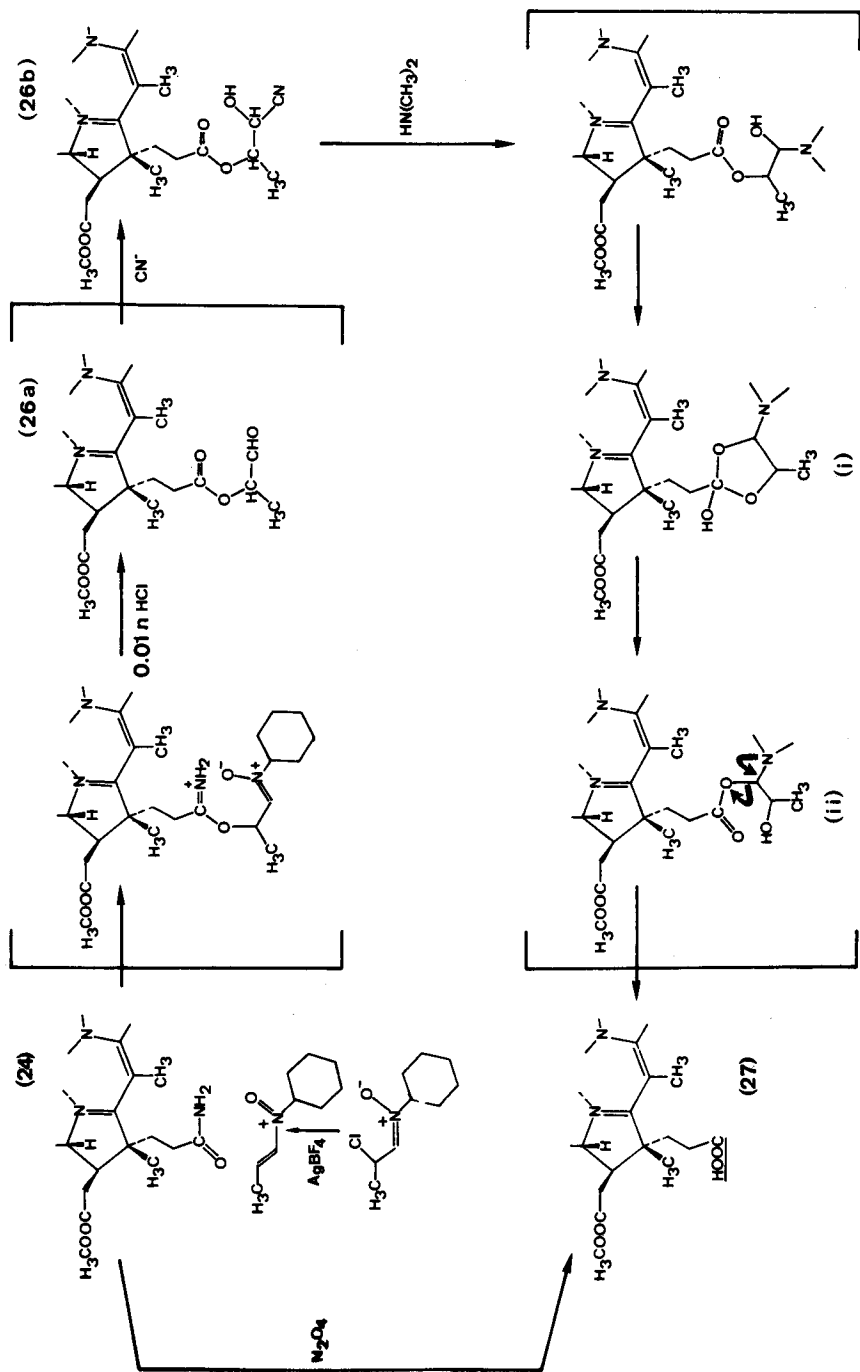
(vgl. Erläuterungen zu Beginn im exp. Teil und Diskussionen)

Diese Stufe wurde an der ETH nur mit authentischem Material durchgeführt, das weiter zur Ueberführung in Cobyrssäure (29) verwendet wurde. Es handelt sich demzufolge um partialsynthetische Untersuchungen.

Die Reaktionsschritte von f-Amid zu f-Säure sind in Schema III dargestellt. Diese Reaktionssequenz wird durch O-Alkylierung von f-Amid (24) mit dem stark elektrophilen N-Vinyl-nitrosoniumion, erhalten durch Einwirkung von Silbertetrafluoroborat auf α -Chlor-aldonitrone eingeleitet [22].

Nach saurer Hydrolyse (0, 01-nHCl in Wasser/Dioxan) gelangt man zu einem β -Aldoester, welcher in diesem Falle (bedingt durch die zur Stabilisierung von Kobalt-III-Corrinkomplexen notwendige Aufarbeitung in Gegenwart von Cyanidionen) nicht als solcher isoliert werden konnte, sondern als Cyanhydrin anfiel. Die Weiterreaktion zur f-Säure mit Dimethylamin verläuft via den im Gleichgewicht zurückgebildeten Aldehyd aus dem Cyanhydrin via das Amin-Halbacetal in einer intramolekularen nukleophilen Substitution zum cyclischen Zwischenprodukt (i), welches seinerseits reversibel zum Zwischenprodukt (ii) geöffnet wird. Das Produkt (ii) stellt das Additionsprodukt einer Carboxylgruppe mit einem Immoniumsalz dar, welches unter den Reaktionsbedingungen offenbar irreversibel zur f-Säure und Folgeprodukten des O-Alkylteils zerfällt. Der intramolekulare Weg des Angriffes mit Dimethylamin wurde dadurch belegt, dass die Verwendung von Trimethylamin an Stelle von Dimethylamin, unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen, keine f-Säure lieferte.

Diese Reaktionssequenz wurde von K. R. Lindner [23] an einfachen Modellver-



Scheme III

bindungen (vgl. den exp. Teil) genauer untersucht. Dabei konnte er zeigen, dass sowohl die Aldoesterfunktion als auch die entsprechenden Cyanhydrine in ungefähr gleicher Ausbeute ($\geq 90\%$) die entsprechende Säurefunktion lieferte.

1.6. Ueberführung von f-Säure (27) in Cobyrssäure (29).

Die präparative Lösung zur Ueberführung von f-Säure (27) in Cobyrssäure (29) wurde von der Harvard-Gruppe ausgearbeitet. Die als Amonolyse bezeichnete Reaktion wandelte die sechs Methylestergruppen a, b, c, d, e und g in primäre Amide um, währenddem die f-Carboxylgruppe als solche verblieb.

Diese Reaktion wurde an der ETH von A. B. Holmes nach den Vorschriften der Harvard-Gruppe nachvollzogen.

Die Reaktion gelang in einem Gemisch von Aethylenglykol und flüssigem Ammoniak in Gegenwart von Ammoniumchlorid unter Sauerstoffausschluss. Die Anwesenheit von Ammoniumchlorid ist hier notwendig, da es die Bildung des entsprechenden c-Lactams verhindert, das ohne die Zugabe von Ammoniumchlorid auch bei peinlich genauem Ausschluss von Luftsauerstoff gebildet wird.

Wir vermuten 2 Gründe, welche für die Wirkung des Ammoniumchlorides verantwortlich sind:

- Es ist bekannt, dass die Bildung des c-Lactams beim Vitamin B-12 durch Zugabe eines Ueberschusses an Cyanidionen unterdrückt werden kann [24]. Dabei wird angenommen, dass diese Oxidationsreaktion möglicherweise über einen pentakoordinierten Kobalt-II-Komplex abläuft. Die Bildung dieses Komplexes aus dem hexakoordinierten Dicyano-Komplex wird wahrscheinlich durch Bildung eines hexakoordinierten Chlorocyano-Komplexes (durch Ligandaustausch mit Ammoniumchlorid) verhindert, was das Entstehen eines c-Lactams unterdrücken könnte.
- Die Zugabe von Ammoniumchlorid ergibt in Kombination mit dem Ammoniak ein Puffersystem, dessen pH zur Deprotonierung der Amidgruppe in der c-Seitenkette offenbar nicht mehr ausreicht und dadurch die c-Lactam Bildung unterdrückt.

Die Amonolysereaktion verlief unter Retention der 3 gegenüber Epimerisierung (insbesondere unter bas. Bedingungen) labilen Zentren C-3, C-8 und C-13 und gelang in Ausbeuten bis zu 90%.

Ein spezielles Problem bot bei der Kristallisation der Cobyrssäure in der Aquocyano-Form (die Dicyano-Form konnte nicht kristallisiert werden) die Ligandisomerie (vgl. die Diskussion im exp. Teil).

Danach treten in wässrigen Lösungen von Aquo-cyano-cobyrssäure die beiden Aquo-cyano-Formen mit vertauschten Liganden (Wasser, CN) bezügl. der Molekülebene auf.

Die α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form, 29-b) mit unnatürlicher Ligandkonfiguration wurde durch Kristallisation bei Raumtemperatur gewonnen.

Die β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form, 29-a) mit der natürlichen Ligandkonfiguration erhielt man hingegen durch Kristallisation bei 0-3° C.

Die via f-Säure (27) aus authentischem f-Amid (24) erhaltene partial synthetische Cobyrssäure wurde vorläufig als α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form) kristallisiert (A. B. Holmes), spektroskopisch und chromatographisch charakterisiert und mit einer von W. Friedrich aus Klärschlamm (diese Friedrich'sche Probe lag vor der weiteren umkrist. in der a-Form vor, vgl. Diskussion im exp. Teil) gewonnenen, analog umkrist. auth. Cobyrssäureprobe, welche dadurch in die b-Form überführt wurde, verglichen.

Später wurde die α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form) durch Umkristallisation bei +3° C in die β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form) überführt und spektroskopisch und chromatographisch mit einer analog umkrist. auth. Cobyrssäureprobe verglichen (Probe von W. Friedrich, aus Klärschlamm gewonnen).

Es liegen folgende Daten der beiden part. synth. Cobyrssäure-Formen vor:

b-Form: UV/VIS, CD, IR, DC, LC, PC und Eph.

a-Form: UV/VIS, CD, IR, NMR, DC und LC.

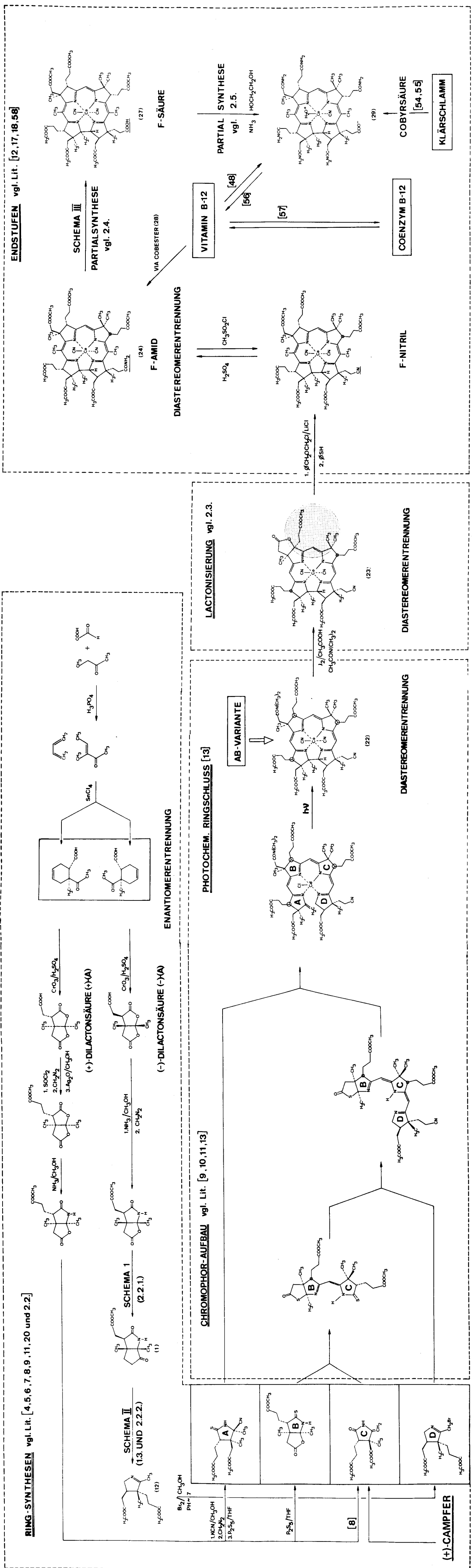
Nach diesen Daten sind die beiden part. synth. Proben nicht von den entsprechenden auth. Vergleichsproben zu unterscheiden. Insbesondere zeigte das DC der bei +3° C umkristallisierten Proben das Vorliegen der β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form). Die speziellen Schwierigkeiten, die beim Vergleich der IR-Spektren angetroffen wurden, sind im exp. Teil eingehend diskutiert.

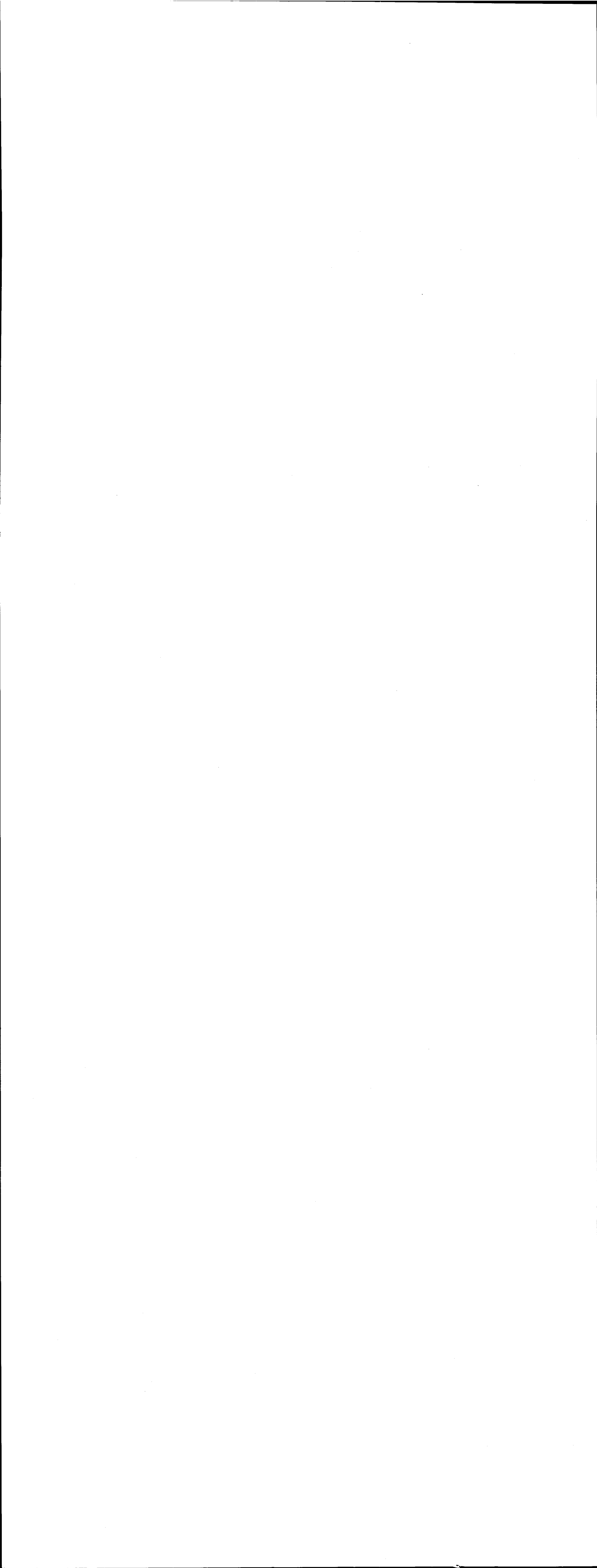
Die Identifikation der Cobyrssäure wurde an der ETH nur zwischen partial synthetischem und authentischem Material (an der Harvard auch totalsynthetisch) vorgenommen. Die eigentliche Identifikation des totalsynthetischen und authentischen Materials fand mit dem f-Amid (24) und dem f-Nitril statt [12]. Mit diesen Identifikationen wurde die Totalsynthese von Vitamin B-12 erfolgreich abgeschlossen.

Am IUPAC-Kongress zu New-Delhi (12. Febr. 1972) berichtete R. B. Woodward [17] über die Identifikation des totalsynth. und auth. f-Amids (24), sowie über die vorläufige Identifikation der part. synth. mit der auth. Cobyrssäure. Die definitive und vollständige Identifikation der part. synth. mit der auth. Cobyrssäure lag rund ein Jahr später vor.

Seite Leer /
Blank leaf

Schema IV (AD-Variante)





2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1. ALLGEMEINE BEMERKUNGEN

Mikroanalysen

pK_{MCS}

Molekulargewicht

Ich danke Herrn W. Manser für die Ausführung der Mikroanalysen, für die Bestimmung der pK_{MCS} -Werte [25] und die Bestimmung der Molekulargewichte (thermo-elektrische Methode) [26]

IR-Spektren

aufgenommen auf Perkin-Elmer-Gitterspektrographen PE 257 und PE 125. Für die Aufnahmen auf dem Gerät PE 125 danke ich den Herren Döhner und Hediger. Geschätzte Bandenintensitäten: s = stark, m = mittel, w = schwach. Bandenpositionen in cm^{-1} .

Lösungsmittel: Chloroform, Merck AG, zur Analyse
Tetrachlorkohlenstoff, Merck AG, zur
Analyse beide vor Gebrauch durch bas.
Alox (Woelm, Akt. 1) filtriert.

KBr: Es wurde KBr aus frisch gemörserten Einkristallen verwendet. Konzentration: ca 300mg/mg Substanz.

NMR-Spektren

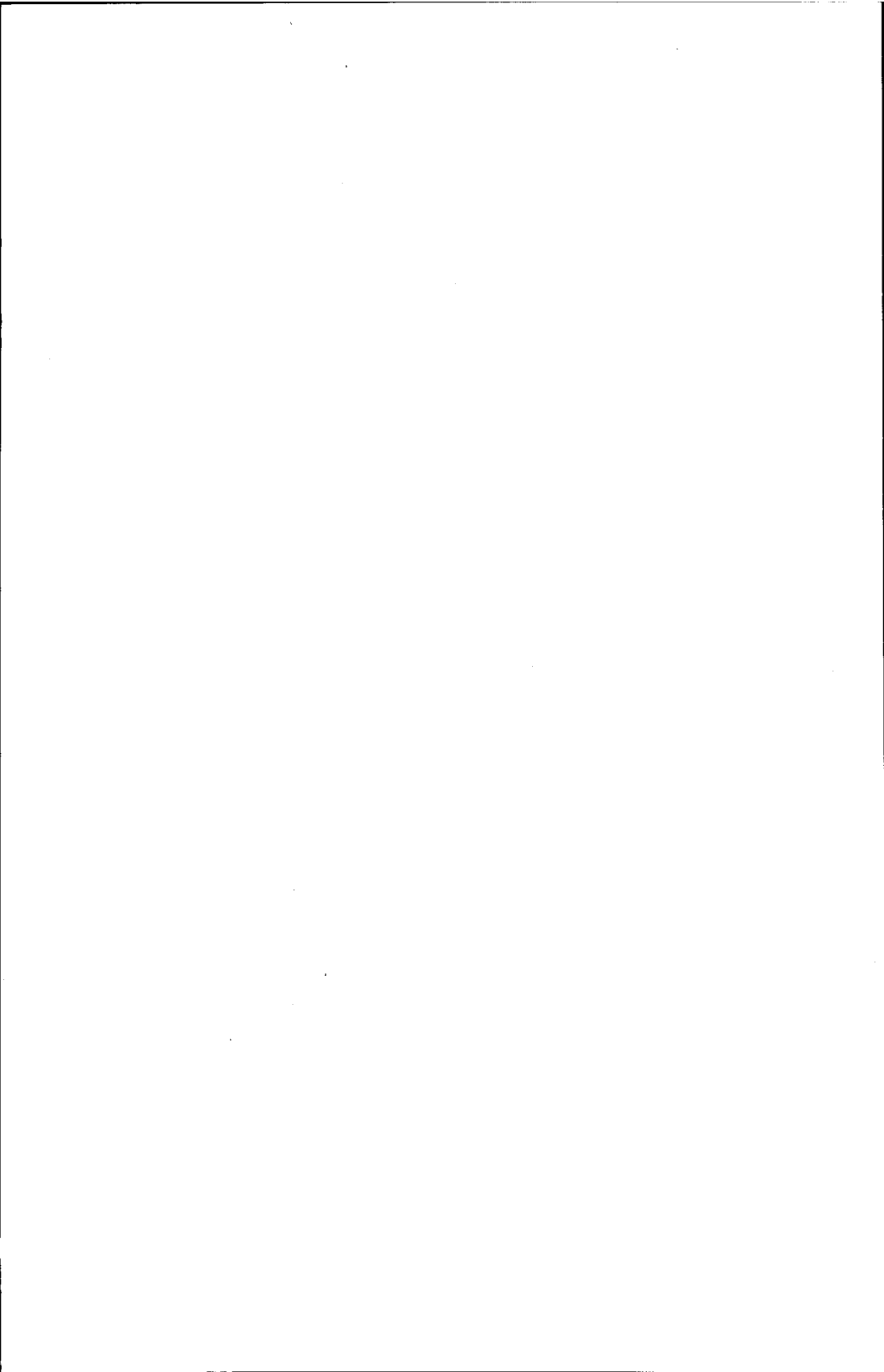
aufgenommen auf Varian Spektrometer A-60, T-60, HA-100 und XL-100. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm, bezogen auf TMS = 0 als internem Standard angegeben. Es bedeuten s = Singlett, d = Dublett, t = Triplett und m = Multiplett. Diese Angaben beziehen sich i. A. auf die Bandenstruktur und nicht auf die eigentliche Spinmultiplizität. Zur Auswertung der Integrale verglich man die theoretisch zu erwartende Protonenzahl mit dem meist bezüglich der Methylesterregion geeichten Integral. (Symbol \longleftrightarrow)

Ich danke Frl. J. Buhrow und Frl. B. Brandenberg für die Aufnahme der Spektren.

UV/VIS-Spektren

Analysenspektren: aufgenommen auf Cary-Spektrometer, Modell 14, geeicht mit Holmiumoxid.

Routinespektren: aufgenommen auf Perkin-Elmer Spektrometer 402 (PE 402). Im Allgemeinen waren die Bandenintensitäten auf Gerät PE 402 um ca 5% geringer gegenüber jenen auf



Cary 14. Die Bandenpositionen wichen je nach Zustand des Gerätes um ca \pm 5nm vom Sollwert ab. Angaben der Bandenpositionen in nm, ϵ -Werte in Klammern. Bei qualitativ aufgenommenen Spektren sind die Bandenintensitäten relativ zur höchsten Bande ($\epsilon_{rel=1}$) angegeben. Es bedeuten max = Maximum, min = Minimum und sh = Schulter.

Die Bezeichnung der Banden entspricht der in der Literatur [27a,27b]angewandten Nomenklatur. Die α -Bande bezeichnet die bathochromste VIS-Bande. Die β -Bande bezeichnet die gegenüber der α -Bande hypsochrom liegende VIS-Bande und die γ -Bande entspricht der intensivsten UV-Bande.

Verwendete Lösungsmittel:

Benzol, Merck AG, zur Analyse, kristallisierbar.

Methanol, Fluka AG, puriss, absolut und acetonfrei, unter Zugabe von 0.02% HCN oder 0.01% KCN (g/Vol)

Wasser, aus Quarzapparatur destilliertes Ionentauscherwasser unter Zusatz von 0.01% HCN resp. 0.01% KCN (g/Vol). Die Hauptmaxima sind unterstrichen.

Massenspektren

aufgenommen auf Massenspektrographen Hitachi RMU-6D resp. RMU-6M (Bei Corrinen auf RMU-6M mit Goldfolienobjektträger) Di = Direkteinlass, daneben Zuführungstemperatur in $^{\circ}$ C angegeben.

Im Allgemeinen sind Signale mit Intensitäten grösser 5% angegeben und durch Querstrich von der Massezahl getrennt.

Im Falle der Corrinoiden sind die Signale oberhalb $m/e = 800$ bezogen auf das intensivste Signal innerhalb dieses Bereichs angegeben.

Ich danke Herrn PD Dr. J. Seibl für die Aufnahme und Interpretation der Spektren.

opt. Drehung

gemessen im 5cm Rohr mit einem Zeiss-Präzisionspolarimeter Modell LEP-A1. Lösungsmittel: Chloroform, vor Gebrauch durch bas. Alox (Woelm Akt.1) filtriert.

CD-Spektren

Gemessen auf Cary-Spektrometer Modell 60. (Laboratorium von Prof. Pino) Man verwendete die gleichen Lösungsmittel wie für die UV-Spektroskopie. Die $\Delta\epsilon$ -Werte der Maxima, Minima und Schultern (sh) werden durch Querstrich getrennt von den Bandenpositionen angegeben. Die Bezeichnung 0/0

entspricht einem Schnittpunkt mit der Nulllinie. Die Berechnung der $\Delta\varepsilon$ -Werte geschah nach der Formel:

$$\Delta\varepsilon = \frac{\Theta}{33 \cdot l \cdot m} \left[\frac{\text{Grad. Liter}}{\text{Mol. cm}} \right]$$

Es bedeuten:

$\Delta\varepsilon$ = dekadischer molarer Circular-Dichroismus

Θ = Elliptizität in Grad (Messwert)

l = Küvettenlänge in cm (1cm)

m = Konzentration der Lösung in Mol/l.

Ich danke Frau Dr. E. Boedefeld und Herrn

R. Giger für die Aufnahme der Spektren.

Schmelzpunkte

Im offenen Röhrchen auf einer Apparatur nach Dr. Tottoli bestimmt. Die Werte sind unkorrigiert.

Rotovap

Wasserbad: 35-40° C

Kühlwasser: 0-5° C (Eiswasserbehälter)

Nach dem Absaugen der Lösungsmittel wurde das Vacuum durch Spülen der Apparatur mit Stickstoff aufgehoben.

Dünnschicht- chromatographie (DC)

Merck Fertigplatten Kieselgel 60F₂₅₄, 0.25 mm Schichtdicke. Für Corrine ausser der Cobyrssäure verwendete man als Laufmittel das System: Hexan: Isopropanol: Methanol= 5:2:1 unter Zusatz von 0.03% (g/Vol) HCN. In Klammern wird der relative R_f-Wert zu Cobester angegeben.

Cellulose (zur Chromatographie der Cobyrssäure):

DC-Alufolie, Cellulose, Merck, ohne Fluoreszenzindikator.

Laufmittel: sek-Butanol:Wasser 9.5:4) zur Chromatographie der Aquo-cyano-Formen.

Zur Chromatographie der Dicyanoform verwendete man einen Zusatz von 0.05% HCN (g/Vol) im obigen System. Es handelt sich dabei um das von R. A. Firth et al. entwickelte Laufmittel [28] .

Dickschicht- chromatographie (TLC)

Platten 20x20 cm. Als Schichtmaterial wurde verwendet:
a) für alle nichtcorrinoiden Verbindungen:

Kieselgel PF₂₅₄₊₃₆₆ (Doppelindikator), Merck AG.

Schichtdicke ca 1.2 -1.5mm. Die Platten wurden während 12 h bei 120° aktiviert und im Labor aufbewahrt.

Aluminiumoxid, neutral PF 254 (Typ E) zur Schichtchromatographie, Merck AG. Schichtdicke 0.8-1 mm, gleich aktiviert und gelagert wie Kieselgelplatten.

- b) für corrinoide Verbindungen ausser der Cobyrsäure: ab ca 2-3 mg; Kieselgel H nach Stahl (für Dünnschichtchromatographie, ohne Gipszusatz und Indikatoren) Schichtdicke ca 1mm. Aktivierung: während 12 h bei 120°, aufbewahrt im Labor. Gleiches Entwicklersystem wie für DC, normalerweise wurde 3 mal entwickelt. Dazu wurde die Platte zwischen den Entwicklungen mit Stickstoff getrocknet. Bei abgebildeten Chromatogrammen zeigt der Pfeil auf die Lösungsmittelfront, die Zahl daneben gibt die Anzahl der Entwicklungen an. Für Substanzmengen < 2-3 mg verwendete man Kieselgel DC-Platten, Kieselgel 60, F₂₅₄, Merck Fertigplatten.

Säulenchromatographie

Kieselgel zur Säulenchromatographie, Korngrösse: 0.05-0.2mm, Merck AG.

LLC, LC

vgl. unten.

Qualität der verwendeten Lösungsmittel

Es wurden Lösungsmittel der unten aufgeführten Qualität verwendet, falls im Text keine anderen Angaben aufgeführt sind.

Acetanhydrid	Merck AG, zur Analyse, unter N ₂ destilliert.
Aceton	Merck AG, zur Analyse, über Linde Molekular-Sieb Typ 4A getrocknet und unter N ₂ destilliert.
Acetonitril	Fluka AG, purum, dest über K ₂ CO ₃ .
Aether	Fluka AG, absolut über Natrium, vor Gebrauch durch bas.
(Diäthyläther)	Alox (Woelm) Akt. 1 filtriert.
Benzol	Merck AG, zur Analyse, kristallisierbar.
abs. Benzol	Merck AG, zur Analyse, über NaH rückflussiert (2h) und anschliessend unter Stickstoff destilliert.
Chloroform	Merck AG, zur Analyse, vor Gebrauch durch bas. Alox (Woelm) Akt. 1 filtriert.
Dioxan	gereinigt nach Hess und Fram, vor Gebrauch durch bas. Alox (Woelm) Akt. 1 filtriert.

Essigester	destilliert über Sikkon
<u>abs.</u> Essigester	2x destilliert über Sikkon
Essigsäure	Merck AG, zur Analyse, unter N ₂ destilliert.
Hexan	über P ₂ O ₅ destilliert.
Isooktan	Fluka AG, purum, über P ₂ O ₅ destilliert.
Isopropanol	über Al-Isopropylat (Fluka prakt.) unter N ₂ destilliert.
Methanol	Fluka AG, puriss. p. a. absolut und acetonfrei.
<u>abs.</u> Methanol	Methanol Fluka AG, puriss. p. a. über Magnesium destilliert.
Methylacetat	destilliert über Sikkon
<u>abs.</u> Methylacetat	2x über Sikkon destilliert.
Methylenchlorid	über Sikkon destilliert.
<u>abs.</u> Methylenchlorid	obiges Destillat unmittelbar vor Gebrauch durch bas. Alox Akt. 1 (Woelm) filtriert.

Abkürzungen

RV = Rotationsverdampfer	TLC = Dickschichtchromatographie
RT = Raumtemperatur	LLC = flüssig-flüssig-Verteilungschromatographie
HV = Hochvacuum	LC = flüssig-fest-Adsorptionsschromatographie
WV = Wasserstrahlvacuum	EPh = Elektrophorese
PC = Papierchromatographie	
DC = Dünnschichtchromatographie	

Hochdruck flüssig-flüssig Verteilungschromatographie (LLC)

Apparatur:

Es wurde die von Dr. J. Schreiber [29] entwickelte und im Eigenbau hergestellte Apparatur verwendet. Diese Apparatur zeichnet sich für die in unserem Falle grossen Substanzmengen (bis ca 1 mg/Injektion) durch ein grosses Trennvermögen aus (theoretische Bodenzahl bis ca 10000/m). Die zur Trennung verwendeten drei Chromatographie-Systeme wurden durch 4-5 stündiges Mischen der 4 Komponenten: Isooktan, Chloroform, Methanol und Wasser in den unten angegebenen Verhältnissen hergestellt, wobei sich beim Stehenlassen 2 Phasen bildeten: die spezifisch schwerere Stationärphase, welche hauptsächlich aus Methanol und Wasser bestand, sowie die spezifisch leichtere Mobilphase, hauptsächlich aus Isooktan und Chloroform bestehend.

Zur Stabilisierung der axialen Cyanid-Liganden während der Chromatographie wurden die Phasen anfänglich mit 0.01% Acetoncyanhydrin versetzt, später verwendete man an dessen Stelle 0.01 % HCN, da mit dem Cyanhydrin mehr "polymere Anteile" nach Einengen der Lösungsmittel anfielen (vgl. unten). Es wurden die folgenden 3 Systeme verwendet und zu deren Bezeichnung wird in dieser Beschreibung die von

H. Maag [12] eingeführte Nomenklatur verwendet. In Anführungszeichen sind die von W. Fuhrer [13] verwendeten Bezeichnungen angeführt.

	System I (SI) "schnelles-"	System II (SII) "langsames-"	System III (SIII) "Ur-System"
Isooktan	30	50	40
Chloroform	10	10	15
Methanol	10	10	10
Wasser	3	3	3
(% in g/Vol)	0.01% HCN	0.01% HCN	0.01% Aceton- cyanhydrin

Es wurden folgende 3 Säulen mit Kieselgur einheitlicher Korngrösse (erhalten durch wiederholte Flotation) verwendet: (alle 3 Säulen sind handgestopft).

Kolonne A: (KolA) : Länge 50 cm, Innen \varnothing 0.5 cm, gestopft mit Kieselgur der Korngrösse $\approx 32 \mu$.

Kolonne B: (KolB) : Länge 50 cm, Innen \varnothing 0.5 cm, Kieselgur, Korngrösse 5-10 μ .
(2xKolB): 2 mittels einer Stahlkapillare in Serie geschaltete KolB.

Kolonne C: (KolC) : Länge 50 cm, Innen \varnothing 0.3 cm, Kieselgur, Korngrösse 5-15 μ .

Zur Detektion der farbigen (durchwegs rot bis violetten) Kobaltkomplexe verwendete man den von Dr. J. Schreiber selbst gebauten Detektor, welcher in seinen Hauptbestandteilen aus einer Durchflussküvette (Inhalt ca 2 μ l) und einem um 570nm arbeitenden Halbleiterphotometer bestand. Die Detektionsgrenze lag bei ca 0.5 μ g/ml für Cobester.

Probeninjektion und Säulenregenerierung

Die Proben konnten in der sehr apolaren Mobilphase nicht gelöst werden. Deshalb löste man in einer Mischung von zusätzlichem Chloroform und Mobilphase. Im Falle von SI und SIII betrug das Verhältnis zusätzliches CHCl_3 : Mobilphase = 1:3, im Falle von SII 1:4. Das zusätzliche Chloroform hatte zur Folge, dass die auf der Säule sitzende Stationärphase z.T. ausgewaschen wurde, was die Trennung beeinträchtigte und eine Verkürzung der Retentionszeiten der Substanzen zur Folge hatte. Die Säule musste deshalb von Zeit zu Zeit regeneriert werden. Zu diesem Zwecke wurden ca 3-5 ml Stationärphase mittels Mobilphase so lange durch die Säule gepumpt, als keine Stationärphase mehr aus der Kolonne eluiert wurde. (erkennbar an einer stabilen

Nulllinie des Schreiberoutputs).

Dieses Prozedere hatte weiter den Vorteil, dass sich im Kolonnenkopf ansammelnde, mit Mobilphase nicht eluierbare polare Verunreinigungen auf diese Weise herauswaschen liessen. Die Regenerierung hatte oft eine geringe Aenderung des Säulenzustandes (Trennvermögen, Retentionszeit) zur Folge. Zur Identifikation zweier Substanzen mussten diese entweder unmittelbar hintereinander oder besser im Verhältnis 1:1 gemischt miteinander injiziert werden, um möglichst identische Bedingungen für beide Substanzen zu schaffen.

Die Angabe der Chromatographiedaten geschieht deshalb meistens in Bezug auf eine Referenzverbindung (Cobester (28) resp. Cobester-c-lacton). In einigen Fällen verursacht das zusätzlich eingespritzte Chloroform ein Dispersionssignal, welches als Referenzsignal herangezogen wurde und die Retentionszeit einer unverzögert an der Mobilphasenfront wandernden Substanz angibt. Ein praktisch mit der Retentionszeit von Chloroform identisches Signal lieferte eine Lösung von Guajazulen in Hexan, die ebenfalls als interner Standard diente.

Adsorptionschromatographie (LC, für Cobysäure)

Apparatur:

analog der LLC-Apparatur [29].

An Stelle der für die LLC notwendigen Kieselgursäulen verwendete man als Trägermaterial Kieselgel einheitlicher Korngrösse, welches ebenfalls wie bei Kieselgur durch wiederholte Flotation gewonnen wurde. Man verwendete für den grössten Teil der Trennarbeiten drei in Serie geschaltete Kolonnen mit folgenden Herstellungsdaten.

Adsorptionskolonne (Kol AS1): Länge 50cm, Innen \varnothing 0.3 cm, trocken gestopft mit Kieselgel, Korngrösse 15-20 μ .

Gegen Ende der Arbeiten verwendete man eine Säule, die mit in Laufmittel (siehe unten) aufgeschlammtem Kieselgel (Merckosorb Si 60, für Flüssigkeitschromatographie, mittlere Teilchengrösse 10 μ) im Slurry-pack Verfahren [30] hergestellt wurde. Diese Säule zeichnete sich bei nur halber Länge wie Kol AS 1 wesentlich durch eine bessere Trennwirkung aus.

Adsorptionskolonne (Kol AS2): Länge 25 cm, Innen \varnothing 0.9 cm, Merckosorb Si 60/10 μ , slurry-pack.

Für die Adsorptionschromatographie wurde das folgende Laufmittelsystem (Abkürzung AS) verwendet.

Laufmittelsystem (AS): Acetonitril:Wasser =5:1, mit einem Zusatz von 0.1% Tri-
äthylamin (Vol/Vol) und 0.04 % HCN (g/Vol). Als Referenz diente Guajazulen in
Hexan.

Probemengen: präparativ: ca 200-400 γ in 10 μ l Lösungsmittelgemisch.
analytisch: ca 10 γ /2 μ l Lösungsmittelgemisch.

Behandlung der Corrinoide nach LLC, LC, TLC und DC.

Wie oben erwähnt, dient der Zusatz von HCN der Stabilisierung der axialen Cyanid-
Liganden gegenüber Säurespuren. Von Nachteil ist allerdings die Polymerisations-
freudigkeit von HCN. Diese hat zur Folge, dass nach Einengen und Trocknung der
Fraktionen stets beträchtliche Anteile wachsartige, schwer methanollösliche Poly-
merisationsprodukte die Corrinoide verunreinigten. (primäres Polymerisations-
produkt: Diamino-maleinsäure-dinitril)

Diese Produkte gaben Anlass zu einer breiten, intensiven Bande bei ca 1.35 ppm
(C₃D₆) im NMR-Spektrum. Im IR-Spektrum hingegen waren intensive Banden im
Bereiche von 2920 resp. 2850 cm⁻¹ neben schwachen Banden bei 3440 resp. 1685
cm⁻¹ vorhanden. Es wurde dabei nicht abgeklärt, ob es sich nur um Polymerisations-
produkte oder zusätzlich noch um Lösungsmittelrückstände handelte. Diese Produkte
konnten durch nachfolgend beschriebene Verfahren, die immer nach LLC, LC, TLC
und DC angewandt wurden, weitgehend entfernt werden. Eine merkbare Entfernung
dieser Verunreinigungen aus den LLC oder LC getrennten Fraktionen wurde schon
mittels TLC und DC erreicht; anschliessend unterwarf man die erhaltenen Pro-
dukte den beiden nachfolgend beschriebenen Methoden.

Waschen mit Methanol

Man feuchtete die Corrinoide nach Einengen der Lösungsmittel und Trocknung (min-
destens 6h/HV/RT) in möglichst wenig abs. Methanol (im 250 ml Kolben ca 200-300
 μ l) an, pipettierte die nach Zusammenlaufen des Lösungsmittels erhaltene tiefrote
Lösung heraus und filtrierte sie durch einen kleinen Wattepfropf. Durch 3-4 maliges
Wiederholen dieses Vorgehens (total ca 1-1.2 ml Methanol) wurde das corrinoide
Material quantitativ transferiert.

Danach verdünnte man bei benzollöslichen Corrinen mit ca der doppelten Menge an
abs. Benzol und engte die Lösungsmittel am RV vollständig ein. Je nach Bedarf
wiederholte man das Prozedere ein weiteres Mal mit dem anfallenden roten Film.
Im ursprünglichen Kolben blieben stets weisse, wachsartige Produkte zurück.

Waschen mit Hexan

Eine weitere Entfernung von nichtcorrinoiden Rückständen gelang durch mehrmaliges

Überschichten des roten Lacks mit abs. Hexan für jeweils 2x5Min. und anschliessendes Dekantieren des überstehenden Hexans. Falls sich der rote Lack von der Kolbenwand löste, filtrierte man durch einen Wattepfropf, spülte mit Hexan nach und löste die corrinoiden Anteile auf der Watte mit Benzol resp. Methanol.

Durch diese beiden Methoden konnten die IR- und NMR-Banden der Verunreinigungen bei grossen Proben (> 2 mg) vollständig und bei kleinen Proben (< 2 mg) weitgehend entfernt werden. Diese Art der Reinigung war insbesondere bei der spektroskopischen Charakterisierung der Proben unerlässlich.

Analytische Kennwerte

Diese wurden in Anlehnung an J. J. Kirkland [31] wie folgt angegeben.

apparative Daten: in Klammern das Chromatographiesystem (SI, SII, SIII oder AS), die verwendete Kolonne (KolA, B, C oder AS) und die Durchflussmenge in ml/h.

ZB. (SI, KolA, 100 ml/h)

für die Substanz: die Retentionszeit (R_t), danach die theoretische Bodenzahl (N_{th}) und in einigen Fällen auch der Kapazitätsfaktor (k') in Klammern.

ZB. $R_t = 15'$, (3200, $k' = 3.1$)

Die theoretische Bodenzahl (N_{th}), die effektive Bodenzahl (N_{eff}) sowie der Kapazitätsfaktor (k') berechnen sich nach den angegebenen Formeln:

$$N_{th} = \left[\frac{R_t}{\sigma} \right]^2 \qquad N_{eff} = \left[\frac{R_t - R_x}{\sigma} \right]^2 \qquad k' = \left[\frac{R_t - R_0}{R_0} \right]$$

Dabei bedeuten:

σ : die Halbwertsbreite in 60 % der Peakhöhe.

R_x : Retentionszeit für einen internen Standard X (meist Guajazulen oder $CHCl_3$)

R_t : Retentionszeit der Substanz in Minuten.

R_0 : "nonsorbed Time": Frontdurchlaufzeit der Mobilphase, falls möglich an Hand des Chloroformdispersionssignals bestimmt. Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung der Frontdurchlaufzeit bietet die Bestimmung der Retentionszeit des Guajazulensignals einer gleichzeitig mit Substanz injizierten Lösung von Guajazulen in Hexan.

Zwei Substanzen heissen LLC-identisch, falls die Retentionszeiten und theoretischen Bodenzahlen der hintereinander einzeln und als ca 1:1 Gemisch eingespritzten Proben innerhalb des experimentellen Fehlers übereinstimmen. Der geschätzte Fehler der theoretischen Bodenzahl beträgt erfahrungsgemäss ca 10%. Die Retentionszeiten

hängen stark vom jeweiligen Säulen zustand ab. (vgl. Säulenregenerierung) und variieren innerhalb weiter Grenzen.

Beobachtungen

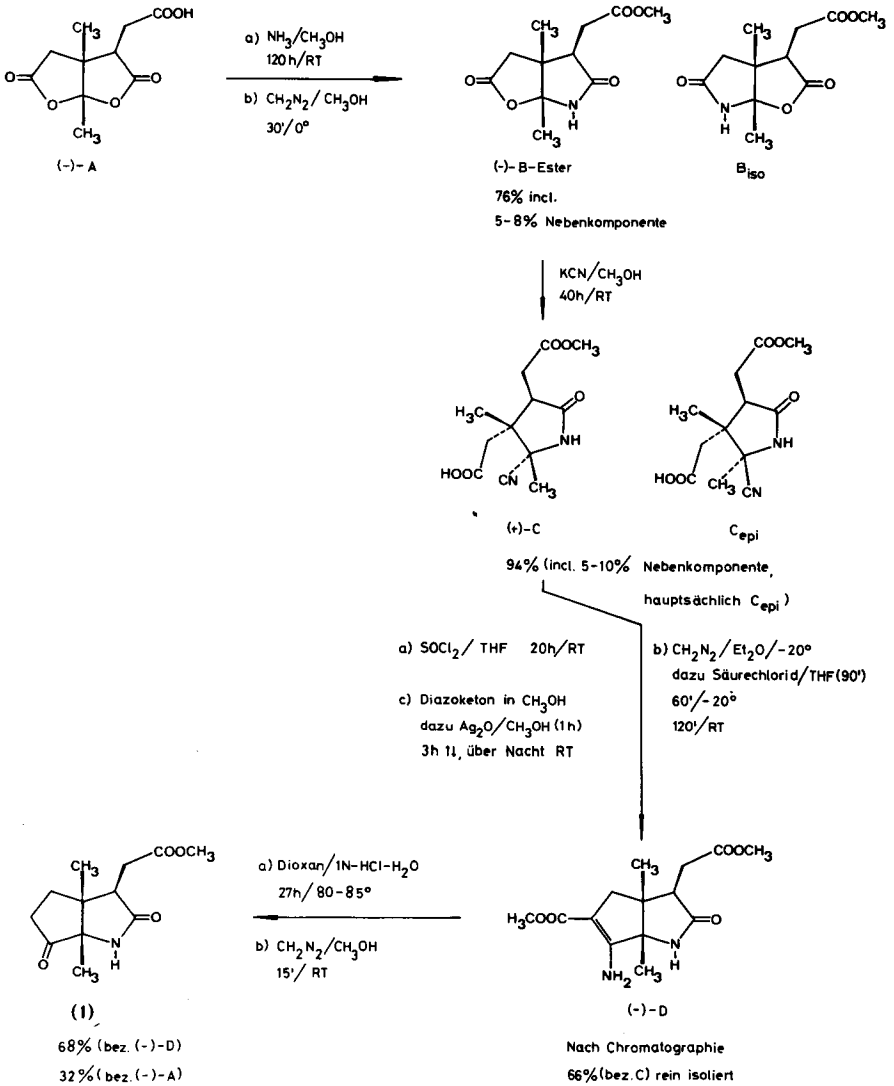
Das LLC-Verhalten einer Substanz kann sich gerade invers zum DC-Verhalten äussern, so wandern die 5,15-bisnor-Cobester-lacton-nitrile (23) im DC schneller als die Edukte (5,15-bis-nor-Cobester-dimethylamid-nitril (22)). Im LLC hingegen verhalten sich die Laufeigenschaften gerade umgekehrt.

Die Trennung der C-3-Epimere erwies sich als am Leichtesten, ausser bei der Trennung des Dimethylamid-nitril Gemisches $\alpha\beta\alpha$, $\beta\alpha\alpha$, $\beta\alpha\beta$, das nur in Kombination mit der DC-Chromatographie und dem langsamen LLC-System getrennt werden konnte. (vgl. [13]). Die Trennung der C-13-Epimere gelang nur in wenigen Fällen mittels LLC-Chromatographie. Die von der Harvard-Gruppe entwickelte Adsorptionschromatographie (Abkürzung LC) (vgl. 2.3.3.2.) zeigte im Falle der C-13-Epimerentrennung ein besseres, im Falle der C-3-Epimerentrennung ein gegenüber der LLC schlechteres Trennvermögen. Die beiden Methoden ergänzten sich somit in schöner Weise.

2.2. SYNTHESE DES RING-D VORLAUFERS: (+) - METHYL-IMIN (12)

2.2.1. Bemerkungen zur Synthese des Keto-Lactam-Esters (1) (Schema 1).

Schema 1



Die Synthese von (1) wurde von R. Wiederkehr [7], Seite 104-125 beschrieben. Die später von W. Fuhrer [20] erstmals in grossem Massstab ausgeführten Nachschubansätze gaben Anlass zu einigen Aenderungen an den Wiederkehr'schen Methoden. Diese Aenderungen brachten neben einer Rationalisierung des Nachschubes gleichzeitig eine Steigerung der Gesamtausbeute und betrafen vor allem die Stufen zum Nor-Lactam (-)-B resp. zum Cyanaddukt (+)-C, währenddem die übrigen Stufen unverändert übernommen wurden.

Ausgehend von total 60g (-)-Nor-Dilactonsäure (-)-A erhielt man in 2 Parallelansätzen zu je 30g (-)-A 16.4g (32% bez. (-)-A) (+)-Keto-Lactam-Ester (1).

R. Wiederkehr [7] erhielt 20-24 %

In der ersten Stufe (-)-A \rightarrow (-)-B (Schema 1) sieht die ursprüngliche Vorschrift eine Extraktion der vor Veresterung mit Diazomethan anfallenden (-)-B-Säure mit Essigester aus wässriger Lösung vor. Dieses Verfahren ist mit Substanzverlusten verbunden. Es wurde deshalb dahingehend abgeändert, dass die (-)-B-Säure direkt aus der methanolischen Reaktionslösung durch Zugabe von methanolischer Salzsäure freigesetzt wird. Dabei wird überschüssiger Ammoniak als Ammoniumchlorid gefällt und durch Filtration entfernt. Die rohe (-)-B-Säure wird durch Einengen des Filtratlösungsmittels gewonnen und ohne weitere Reinigung direkt mit Diazomethan verestert. Zur Trennung der isomeren Ester (-)-B und B_{iso} nützte man die Feststellung aus, dass bei der Veresterung des Säure-Isomerengemischs mit ätherischer Diazomethan

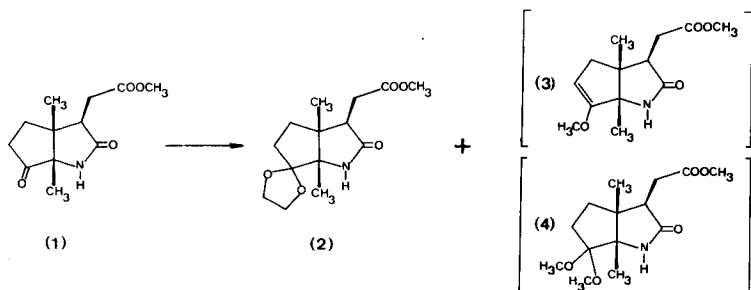
direkt DC-einheitliches und IR-spektroskopisch reines Lacton-Lactam (-)-B auskristallisiert, das einzig nach NMR-Spektrum ca 5-8% einer Nebenkompente enthielt, welche aber nicht Iso-Lacton-Lactam (B_{iso}) war. Letzteres wurde durch Chromatographie der Mutterlauge rein isoliert (8% bez. (-)-A). (Das Isomerenverhältnis ((-)-B:B_{iso}) im Rohprodukt hatte bei R. W. 9:1 betragen). Die Gesamtausbeute an (-)-B betrug 76% (R. W. 60-65%), erhalten durch direkte Kristallisation (73%) und durch Chromatographie des Mutterlauge rückstandes (3%).

Die Qualität von (-)-B genügte zur direkten Weiterverwendung in der Ringöffnungsreaktion mit KCN, die in 94% (bez. (-)-B) Rohausbeute das Gemisch der beiden Cyanaddukte ((+)-C und C_{epi}) im Verhältnis von ca 92:8% lieferte. (R. Wiederkehr hatte hier wiederum mittels Kristallisation unter erheblichen Ausbeuteeinbussen getrennt und 70-75% reines (+)-C erhalten). Dieses Cyanaddukt-Gemisch wurde direkt der nachfolgenden Arndt-Eistert-Reaktion unterworfen, da auf der Stufe des Enaminesters (-)-D das homologierte Nebenprodukt aus C_{epi} leicht von reinem (-)-D chromatographisch abgetrennt werden kann. Man erhielt in 66% Ausbeute (bez. rohem Cyanaddukt) (R. W. 68% bez. (+)-C) reinen Enaminester (-)-D. Die Gesamtausbeute an Enaminester (-)-D (bez. (-)-A) konnte durch diese Aenderungen auf 47% (R. W. 34%) angehoben werden.

Die letzten Stufen wurden unverändert von R. Wiederkehr übernommen. Die Gesamtausbeute an Keto-Lactam-Ester (1) erhöhte sich auf 32% (bez. (-)-A) (R. W. 20-24%). In zahlreichen, von Laboranten (K. Ineichen und R. Steiner) durchgeführten Nachschubansätzen gleicher Grössenordnung erzielte man ähnliche Ausbeuten.

2.2.2. KETAL-METHODE, definitive Synthesevariante des Methyl-Imins (12).

(+)-Ketal-Lactam (2) *1 (Charakterisierungsansatz)



478 mg (2mMol) (+)-Keto-Lactam (1) *2 (während 1h bei 0.02 Torr/RT getrocknet) löste man in 8.5 ml absolutem Methanol und gab nacheinander 0.87 ml (849 mg= 8 mMol= 4 Moläquivalente) Trimethoxiorthoformiat *3 und 0.67 ml (744 mg= 12 mMol = 6 Moläquivalente) Glykol *4 hinzu (alle Operationen unter Argon). Zu dieser klaren Lösung fügte man 45.5 mg p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat *5 hinzu und erhitzte unter Argon 18h unter Rückfluss (Oelbadtemperatur 78-84⁰). Danach kühlte man die jetzt schwach gelbe Lösung im Eiswasserbad und versetzte mit 40 μ l Pyridin *6, wobei sich die Lösung vollständig entfärbte. Die kalte Lösung transferierte man mit kaltem Essigester (10 ml) auf ein Gemisch bestehend aus 15g Eis, genügend Natriumchlorid *8 zum Sättigen der Wasserphase und ca 200 mg Natriumbicarbonat *9. Die Wasserphase ergänzte man mit kalter, gesättigter Natriumchloridlösung auf 30 ml und extrahierte 1x mit 40 ml und 2x mit 30 ml kaltem Essigester. Die organischen Phasen wusch man je 1x mit 25 ml kalter, gesättigter Natriumchloridlösung, vereinigte sie, trocknete für 30 Min. mit wasserfreiem Natriumsulfat *10, filtrierte durch Watte und entfernte das Lösungsmittel bei 40-50⁰Badtemperatur am RV. Nach Trocknung 18h/0.01 Torr/RT wog man 590 mg schwach gelbes, in Substanz kristallisierendes, rohes Ketal-Lactam (2) *11, welches im DC *12 (Methylacetat:Benzol 9 : 1/0.5% Pyridin *6) neben einem länglichen Hauptfleckchen bei Rf 0.31 für Ketal-Lactam (2) zwei schwache, nicht gut abgetrennte Nebenflecken mit Rf 0.38 für Dimethoxi-Ketal (4) resp. Rf 0.45 für Enoläther-Lactam (3) noch einen schwachen Flecken am Start aufwies.

- * 1 Dieses Produkt wurde in den nachfolgenden Nachschubansätzen (bis zu 2.5 g (1)) nicht gereinigt, sondern direkt als Rohprodukt der Schwefelung zugeführt.
- * 2 (+)-Keto-Lactam (1) mp 134⁰C, $[\alpha]_D^{25} = +90^0$, c=1/Chloroform.
Herstellung nach der von W. Fuhrer modifizierten Wiederkehr-Methode. vgl. Bemerkungen zur Synthese von (1), unter 2.2.1.
- * 3 Trimethoxiorthoformiat, Fluka purum, unter N₂ dest. bp. 96-98⁰.
- * 4 Glykol, Fluka puriss. unter N₂ dest. bp. 95-96⁰/15-16 Torr.
- * 5 p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat, Fluka puriss.
- * 6 Pyridin, Fluka puriss. unter N₂ über Kaliumhydroxid destilliert.
- * 7 Die Ausbeuten sind nur für reine Produkte nach Korrektur für das abgezweigte NMR-Material angegeben.
- * 8 Natriumchlorid p.a. Merck.
- * 9 Natriumbicarbonat p.a. Merck.
- * 10 Natriumsulfat wasserfrei, p.a. Merck.
- * 11 enthält noch wenig Pyridin (Geruch) und 2-Methoxi-1,3-Dioxolan bp 129⁰ (aus *3 und *4 entstanden).
- * 12 DC-Fertigplatten, Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄.

Das NMR-Spektrum von rohem (2) zeigte im Bereich von 3.2-3.7 ppm die Methoxybanden für (3) und (4) *13. Aus den Integralen für diese Banden liessen sich ungefähr gleiche Anteile der beiden Nebenprodukte zu je ca 5-6% errechnen. Das rohe Ketal-Lactam (abzüglich 15.6 mg für NMR) chromatographierte man auf 5 Dickschichtplatten *14 (Methylacetat:Benzol 9:1/0.5 % Pyridin *6) und eluierte Methylacetat:Methanol 85:15) eine Hauptzone und 2 Vorlaufzonen *15. Die Hauptzone, 490 mg DC-einheitliches Ketal-Lactam (2), kristallisierte man aus Aether-Hexan und wog nach Trocknung der Kristalle (18h/0.01 Torr/RT) 419 mg (1.481 mMol) (76.2%, bez. (1))DC-einheitliches, mit Analysenmaterial identisches Ketal-Lactam (2) in farblosen Blättchen vom mp. 96-97.5^o, *7.

Durch Kristallisation der Mutterlauge des 1. Kristallisates erhielt man 45.1 mg farblose Blättchen mit mp. 94-95.5^o, welche auf Grund des NMR ca 10 % (4) enthielten. Die semikristalline Mutterlauge des 2. Kristallisates wog 26.6 mg und bestand auf Grund des NMR-Spektrums zu je ca 50% aus (3) und (4).

Untersuchung der Vorlaufzonen: Die beiden Vorlaufzonen waren auf den Dickschichtplatten unter UV-Licht als schmale, von der Hauptzone schlecht abgetrennte Zonen sichtbar. Die schneller wandernde Vorlaufzone (Rf ca 0.45) wog 22 mg, war DC-einheitlich (Methylacetat:Benzol 9:1/0.5% Pyridin) und wurde mittels IR als Enoläther (3) identifiziert. Die langsamere, unmittelbar vor dem Hauptprodukt wandernde Vorlaufzone wog 17.2 mg und bestand auf Grund des DC (Methylacetat:Benzol 9:1/0.5% Pyridin) aus einem ca 1:1 Gemisch (zwei ca gleich intensive Flecken) von Enoläther (3) und Dimethoxiketal (4).

Analog ausgeführte Ansätze lieferten Ausbeuten in der gleichen Grössenordnung. Die Ausbeuten früherer Vorversuche (Ketalisierung in Benzol statt Methanol als Lösungsmittel) lagen infolge der Bildung von Glykolester um ca 5% tiefer.

Zur Charakterisierung des (+)-Ketal-Lactams (2) gelangte eine 2x umkristallisierte und getrocknete (18h/0.01 Torr/RT) probe des 1. Kristallisates aus einem analog ausgeführten Ansatz gleicher Grösse.

(+)-Ketal-Lactam (2)

C₁₄H₂₁NO₅ ber C 59.35 H 7.47 N 4.94 %

MG 283 gef C 59.37 H 7.47 N 4.98 %

mp 97.5 - 98.5^oC (2x aus Aether/Hexan)

* 13 Charakterisierung vgl. hinten.

* 14 Dickschichtplatten, 20x20 cm Schichtdicke ca 1.5 mm, Kieselgel PF_{254+366'} Merck.

* 15 Die geringen Rf-Unterschiede der 3 Produkte verunmöglichen eine vollständige, chromatographische Trennung. Ausserdem sind (3) und (4) sehr hydrolyseempfindlich. Zugabe von Pyridin unterdrückte die Hydrolyse weitgehend.

IR (CHCl_3)

Banden u. a. bei: 3600-3400 (breit), 3420s, 3020 (Schulter), 3000s, 2970s, 2950s, 2880s, 1735s, 1690s, 1455m, 1435s, 1410m, 1385m, 1372m, 1368 (Schulter), 1340w, 1313m, 1170s, 1145m, 1095m, 1060s, 1040-1015m triplettoid, 995w, 950s, 920w, 875w cm^{-1} .

Abb. 1

NMR (CDCl_3)

6.06 (br. s, 1H), 3.98 (s, 4H), 3.74 (s, 3H), 3.02-2.34 (m, ABC-System, 3H), 2.12-1.55 (m, 4H), 1.14 (s, 3H), 1.04 (s, 3H) ppm.

HA-100

Abb. 2

MS (200°C)

284/2, 283/ M^+ 16, 252/8, 183/7, 182/5, 124/10, 123/40
100/25, 99/100.

opt. Drehung

(CHCl_3 , c=1), 589 nm+36°, 546 nm+43°, 436 nm+71.6°,
405 nm+83°, 365 nm+105°.

DC *12

Rf = 0.275 (Methylacetat:Benzol=9:1/0.5% Pyridin)

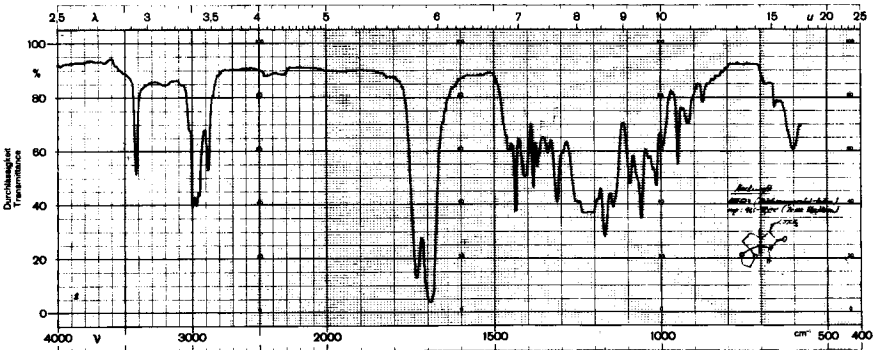


Abb. 1

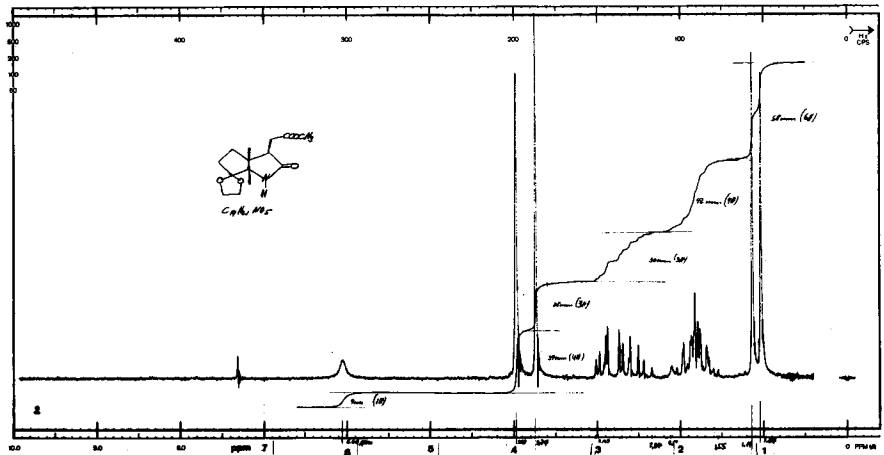


Abb. 2

Diskussion

Spektren: Im Gegensatz zur breiten, nicht aufgelösten Carbonylbande des Eduktes (1) erscheinen für das Ketal-Lactam (2) zwei deutlich aufgelöste, intensive Banden bei 1735 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$) des Esters und 1692 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$) des β -Lactams. Die Bande bei 950 cm^{-1} ist diagnostisch für die Anwesenheit der 1,3-Dioxolanstruktur.

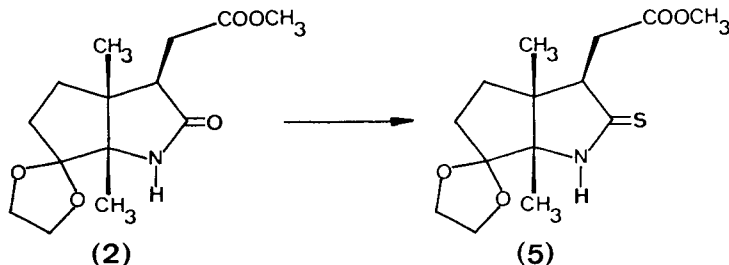
Im NMR erscheint das A₂ B₂-System des 1,3-Dioxolansystems von (2) als schwach verbreitertes Singlett bei 3.98 ppm.

Reaktionsbedingungen: Die folgenden herkömmlichen Methoden zur Ketalisierung versagten bei der Anwendung auf das (+)-Keto-Lactam(1).

- azeotrope Ketalisierung mit Glykol in Benzol oder Toluol (6-20 h/ Rückfluss am Wasserabscheider) mit den Katalysatoren: Oxalsäure, Salzsäure, p-Toluolsulfonsäure.
- Umketalisierung mit 1,3-Dioxolanen einfacher Ketone wie Aceton und Methyläthyl-Keton [32] in Benzol oder selbst den Dioxolanen als Lösungsmittel (6-20h/80° (Benzol), 110° (1,3-Dioxolane)) mit p-Toluolsulfonsäure als Katalysator.
- Umketalisierung mit dem hochreaktiven 1,3-Dioxolan des Dimethylformamids [33] in Benzol (16h Rückfluss, p-Toluolsulfonsäure als Katalysator).

Man erhielt stets wenig Ketal-Lactam neben vorwiegend Edukt und nicht weiter untersuchten Nebenprodukten. Der Grund für dieses Versagen ist vermutlich auf die stark sterisch gehinderte Umgebung des Ketons zurückzuführen, wie an Hand der folgenden Beispiele dokumentiert wird. Methode b) versagt im Falle von 17-Ketosteroiden [32]. Methode c) versagt im Falle von 17- und 20-Ketosteroiden [33]. Im Falle der Methode a) trat als Konkurrenzreaktion stets Umesterung der Methoxycarbonylseitenkette auf. In der vorliegend beschriebenen Methode konnte diese Nebenreaktion mit Methanol, an Stelle von Benzol, als Lösungsmittel unterdrückt werden. Das bei der Ketalisierung gebildete Wasser wird dabei anstatt durch azeotrope Destillation entfernt, mit Trimethoxyorthoformiat gebunden. Diese Methode führte auch bei der Ketalisierung von 17- und 20-Ketosteroiden [34] mit ähnlichen sterischen Verhältnissen wie auch der Ketalisierung von α -Keto-Carbonsäureestern [35] erfolgreich zum Ziel.

(+) - Ketal - Thiolactam (5) (Charakterisierungsansatz)



240 mg (0.848 mMol) Ketal-Lactam (2) *16 löste man unter Argon in 28.2 ml absolutem Tetrahydrofuran *17, gab 376 mg (1.696 mMol= 2Moläquivalente) fein gemörseres Phosphorpentasulfid *18 hinzu, verschloss unter Argon und rührte heftig während 5h unter Lichtausschluss bei RT. Dabei löste sich das Phosphorpentasulfid innert ca 30 Min. zu einer klaren, schwach gelben Lösung, welche sich unter Abscheidung einer weissen gallertigen Masse entfärbte. Die farblose, übelriechende Lösung filtrierte man zur Entfernung des Niederschlages durch eine mit Cellite belegte Argonnuttsche *19. Den weissen Niederschlag wusch man 3x mit 15 ml abs. THF *17 und 3x mit 15 ml abs. Methylenechlorid. Man entfernte die Lösungsmittel

des Filtrates vollständig am RV (Badtemperatur 30-40°), trocknete *20 (18h/0.05 Torr/RT) und wog 438 mg rohes, übelriechendes, öliges Ketal-Thiolactam *22, welches im DC *12 (Methylacetat:Benzol 1:1/0.5% Pyridin) neben dem Hauptfleckchen bei Rf 0.48 je einen schwachen Nebenfleckchen bei Rf 0.67, Rf 0.57 und am Start aufwies. Zur Entfernung der Phosphorverbindungen chromatographierte man das Rohprodukt in einer Säule *21 an der ca 50-fachen Menge Silikagel *23, 24 zuerst mit 50 ml abs. Benzol, dann mit 50 ml abs. Benzol: abs. Methylacetat (9:1) und schliesslich mit 170 ml abs. Benzol: abs. Methylacetat (6:4) (Alle Elutionsmittel enthalten 0.5% Pyridin).

Das letzte Lösungsmittelgemisch eluierte in den ersten 3 Fraktionen zu je 10 ml ca 5 mg stark übelriechendes, nicht mehr weiter analysiertes Oel. In den folgenden 8 Fraktionen gleicher Grösse wog man nach Entfernen der Lösungsmittel und Trocknung (15h/0.05 Torr/RT) 207 mg (0.693 mMol) farbloses, spontan kristallisierendes, schwach riechendes Ketal-Thiolactam (5).

Die 207 mg Ketal-Thiolactam kristallisierte man bei 0° aus ca 2.5 ml abs. Methylacetat unter tropfenweiser Zugabe von ca 10 ml Hexan, wobei als 1. Kristallisat 172 mg farblose, DC-einheitliche *12 (Laufmittel wie für Rohprodukt) Nadeln anfielen. Einengen und analoges Kristallisieren der Mutterlauge ergab weitere 28 mg farblose, DC-einheitliche Nadeln. Die angefallene schwach gelbe Mutterlauge des 2. Krist. (7 mg) chromatographierte man an einer Silikagelplatte *12 (Benzol: abs. Methylacetat 1:1/0.5% Pyridin *6) und eluierte (Methylacetat) 6.1 mg farbloses, spontan kristallisierendes Ketal-Thiolactam.

-
- * 16 mp 97.5-98.5°, $[\alpha]_D^{20} = +36^\circ$ (c=1, Chloroform) vgl. *1 und Nachschubansatz.
 - * 17 absolutes THF, über KOH vorgetrocknet, dann unter Argon über LiAlH_4 dest. Von diesem Pool destillierte man unmittelbar vor Gebrauch nochmals wie oben.
 - * 18 Phosphorpentasulfid, Fluka purum, bei 250°/0.01 Torr sublimiert. Nach der Entfernung eines "Vorlaufes" dunkelgelber Kristalle sammelte man die grossen hellgelben Kristallblöcke, vermörserte sie und bewahrte sie vor Feuchtigkeit geschützt unter Argon auf.
 - * 19 Cellite zuerst mehrmals mit abs. Methanol waschen, in der Nutsche für 4h bei 120° trocknen und unter Durchblasen von trockenem Stickstoff auf RT abkühlen. Dieses Prozedere war erforderlich, um eine partielle Hydrolyse des Ketals durch auf Cellite absorbiertes Wasser unter Katalyse von P_2S_5 zu verhindern.
 - * 20 Das Rohprodukt muss vom THF gut befreit sein, ansonst Phosphorverbindungen bei der Chromatographie miteluiert werden.
 - * 21 Säule mit Benzol/0.5% Pyridin aufziehen. Der Pyridinzusatz verhindert eine Hydrolyse des Ketals.
 - * 22 Das anfallende Oel ist extrem hydrolyseempfindlich.
 - * 23 Silikagel, Merck Kieselgel 60, Korngrösse 0.05-0.2 mm, zuerst mehrmals mit Methanol gewaschen, dann am WV getrocknet und bei 0.05 Torr/110-120° während ca 6h aktiviert. Dieses Prozedere diente zur Entfernung von an Silikagel adsorbierten Wassers und verhinderte die Hydrolyse von (5) unter saurer Katalyse von überschüssigem P_2S_5 im Rohprodukt.
 - * 24 Zum Auftragen der Säule wird P_2S_5 das Rohprodukt durch tropfenweise Zugabe von abs. Benzol in Lösung gebracht; wird zu reichlich und zu schnell Benzol zugegeben, fällt nicht mehr lösbares, gummiartiges Material (Schwefel?) aus.

Ausbeute

1. Kristallisat	171 mg (0.572 mMol)	67.4%	mp 111-111.5 ^o
2. Kristallisat	28 mg (0.0936 mMol)	11.0%	mp 110.5-111 ^o
rechrom. Mutterlauge	6.1 mg (0.0204 mMol)	2.4%	mp 110-111 ^o
total	205.1 mg (0.686 mMol)	80.8%	bezügl. (2)

Zur Charakterisierung gelangte eine nochmals umkristallisierte und getrocknete (3Tage/0.01 Torr /RT) Probe des 1. Kristallisates mit konstantem Schmelzpunkt von 111-111.5^o.

(+)-Ketal-Thiolactam (5)

C ₁₄ H ₂₁ NO ₄ S	ber C 56.17	H 7.07	N 4.68	S 10.71 %
MG 299	gef C 56.08	H 7.08	N 4.58	S 10.77 %

mp 111 - 111.5^oC (2x aus Methylacetat/Hexan)

IR (CHCl₃) Banden u. a. bei: 3500-3050w breit, 3390s, 3030 (Schulter) 2980s, 2950 (Schulter), 2890s, 1735s, 1505 Schulter, 1498s, 1470 (Schulter), 1438s, 1385m, 1375/65 m Dublett, 1312m, 1170s, 1152m, 1130m, 1105w, 1080/65m Dublett, 1040-1015 triplettoid, 995w, 970w, 950s, 935w, 870 w cm⁻¹.

Abb. 3.

NMR (CDCl₃) 7.85 (br. s, 1H), 3.99 (s, 4H), 3.74 (s, 3H), 3.46-2.93 (m, 2H), HA-100 2.73-2.34 (m, 1H), 2.10-1.62 (m, 4H), 1.18 (s, 3H), 1.04 (s, 3H) ppm.

Abb. 4.

MS (200^o) 302/1, 301/6, 300/16, 299/M⁺88, 268/14, 256/14, 226/10, 224/11, 200/22, 199/11, 198/26, 168/9, 167/17, 166/8, 140/13, 139/33, 101/15, 100/43, 99/100, 55/11, 43/6.

UV (Methanol) λ_{max} 271 nm ($\epsilon = 15800$)
Cary 14

opt. Drehung (CHCl₃, c = 1) 589 nm + 29^o, 546 nm + 27^o, 436 nm - 18^o, 405 nm - 108^o, 365 nm - 27^o.

DC *12 Rf = 0.52 (Methylacetat:Benzol=1:1/0.5% Pyridin)

Diskussion

Spektren: Intensive Thiolactambande bei 1498 cm⁻¹ zusammen mit starker N-H bei 3390 cm⁻¹. Die Deformationsschwingung des 1,3-Dioxolansystems erscheint gegenüber (2) unverändert bei 950 cm⁻¹.

Im NMR-Spektrum erscheint das A₂B₂-System des Dioxolansystems als Singlett bei 3.99 ppm.

Reaktionsbedingungen: Die Vorschrift folgt im Wesentlichen jener von R. Wiederkehr [7] zur Schwefelung von (1). Man verwendete aber nur 2 Moläquivalente P₂S₅ statt deren 10 wie bei der Schwefelung von (1).

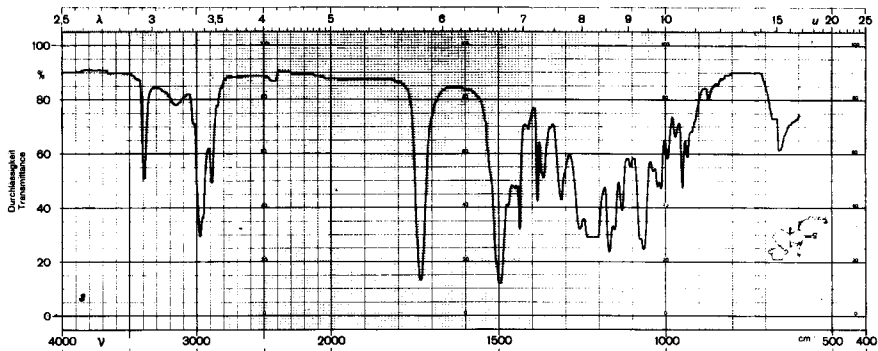


Abb. 3

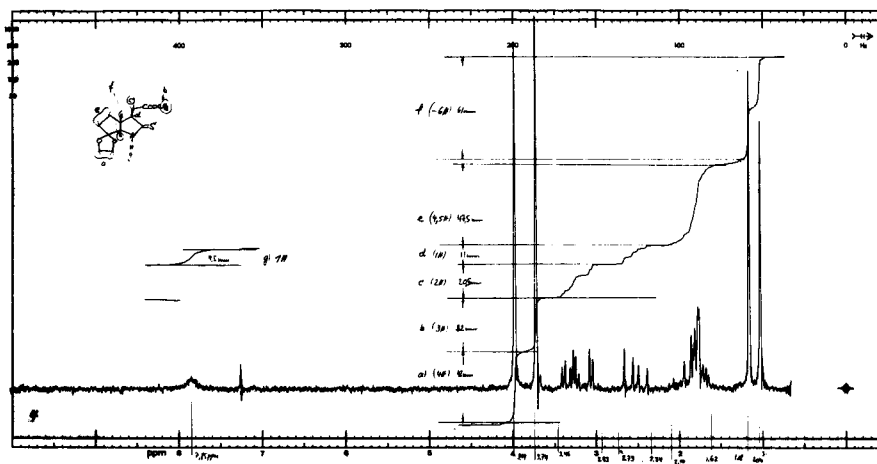
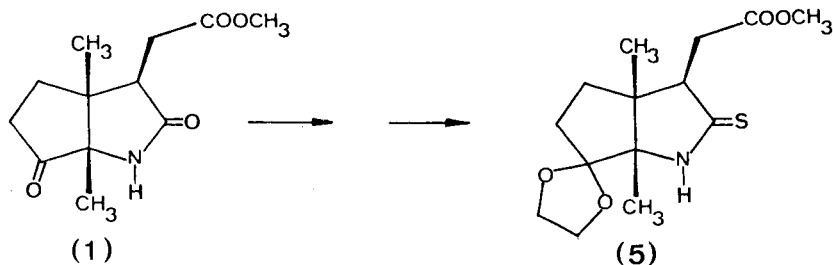


Abb. 4

Nachschubansatz (ohne Reinigung der Zwischenprodukte)



1.7 g (7.11 mMol) (+)-Keto-Lactam (1) *2 löste man in 30 ml abs. Methanol und gab nacheinander 3.11 ml (3.02g=4 Moläquivalente) Trimethoxyorthoformiat *3 und 2.38 ml (2.65g=6 Moläquivalente) Glykol *4 hinzu (Alle Operationen unter Argon) Nach Zugabe von 162 mg p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat *5 erhitzte man während 18h unter Argon und Rückfluss (Oelbadtemperatur 78-84°). Die schwach gelbe Lösung kühlte man im Eiswasserbad, versetzte mit ca 150 µl Pyridin und goss sie auf ein Gemisch aus Eis/Eiswasser, genügend Natriumchlorid zum Sättigen der Wasserphase und ca 500 mg Natriumbicarbonat *9. Man extrahierte 3x mit kaltem Essigester, wusch die org. Phasen 1x mit gesättigter Natriumchloridlösung, vereinigte sie, trocknete mit wasserfreiem Natriumsulfat *10, filtrierte durch Watte und entfernte das Lösungsmittel bei 40-50° am RV. Nach Trocknung wog man 2.12 g rohes Ketal-Lactam (2), das im DC *12 (Benzol:Methylacetat 1:9/0.5% Pyridin) neben dem Hauptfleck für (2) bei Rf 0.3 einen länglichen Flecken bei Rf 0.41 (Nebenprodukte (3) und (4)) aufwies.

Zwei weitere, analog ausgeführte Ansätze zu 0.478 g (2 mMol) und 1.63 g (6.81 mMol) (+)-Keto-Lactam (1) lieferten 0.590 g und 2.1 g rohes Ketal-Lactam (2) gleicher Qualität. Das rohe Ketal-Lactam wurde ohne weitere Reinigung der Schwefelung zugeführt.

Die Berechnung des Schwefelungsansatzes bezieht man auf eingesetztes (1).

Schwefelung

Die 2.12 g des obigen rohen Ketal-Lactams löste man unter Argon in 236 ml abs. THF *17, gab 3.15 g (14.2 mMol=2 Moläquivalente bez. eingesetztem (1)) fein gemörsertes Phosphorpentasulfid *18 hinzu, verschloss unter Argon und rührte heftig während 5h unter Lichtausschluss bei RT, wobei sich allmählich eine gallertige Masse bildete. Danach filtrierte man die farblose, überriechende Lösung zur Entfernung der Gallerte durch eine mit Cellite belegte Argonnutsche *19 und wusch die Gallerte mehrmals mit abs. THF *17 und abs. Methylenchlorid. Nach Entfernung des Filtratlösungsmittels und Trocknung am HV/RT wog man ca 5.5g rohes, überriechendes Reaktionsprodukt, welches im DC *12 (Benzol:Methylacetat 1:1/0.5% Pyridin) einen starken Flecken für (5) bei Rf 0.44, einen Nebenflecken mit Rf 0.52 und einen starken Flecken am Start (Phosphorverbindungen) aufwies.

Zwei weitere, analog ausgeführte Ansätze zu 0.59g, resp. 2.1g rohem Ketal-Lactam (2) lieferten 1.1g resp. 5.2g Rohprodukt gleicher Qualität. Das Rohprodukt *20 der drei Ansätze wurde vereinigt *25 (ca 11g) und zur Entfernung der Phosphorverbindungen an der ca 50-fachen Menge Silikagel *23 der Säulenchromatographie unterworfen *24 (Alle nachfolgend in diesem Ansatz verwendeten Elutionsmittel enthielten 0.5% Pyridin, vgl. Anmerkung).

Nach einem Vorlauf von 750 ml abs. Benzol und 600 ml (abs. Benzol/abs. Methylacetat 9:1) eluierte man mit abs. Benzol/Methylacetat (6:4), wobei die ersten 4 - Fraktionen zu 100 ml 160 mg nicht weiter untersuchtes Material enthielten. Die folgenden 5 Fraktionen zu 100 ml enthielten 3.53g DC-einheitliches (Benzol:Methylacetat

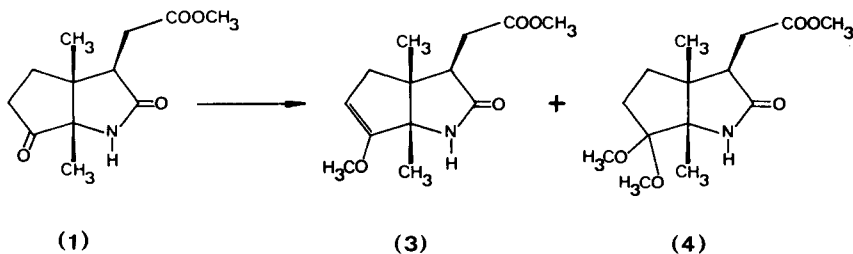
(1:1) Ketal-Thiolactam(5). 700 ml abs. Benzol/abs. Methylacetat (1:1) eluieren hierauf 200 mg Material, das nicht weiter untersucht wurde. Man kristallisierte die 3.53g Ketal-Thiolactam (5) bei 0° aus Aether und viel Hexan und wog nach Trocknung (HV/RT) der Kristalle 3.1g (10.35 mMol) (65.2% bez. (1)) DC-einheitliche und IR-spektroskopisch reine Nadeln mit mp. 107-108°. Die Mutterlauge wog nach Einengen und Trocknung 520 mg. Durch Kristallisation der Mutterlauge erhielt man 154 mg klebrige Kristalle mit mp. 92-109°, welche auf Grund des IR-Spektrums ein Gemisch von Keto-Thiolactam (14) und Ketal-Thiolactam (5) waren. Im DC verhielten sich die Mutterlauge und die daraus gewonnenen klebrigen Kristalle als einheitlich. Zur Weiterverwendung gelangten nur die reinen Kristalle.

Das Keto-Thiolactam (14) ist vermutlich durch sauer katalysierte Hydrolyse (P_2S_5 -Reste im Rohprodukt und beim Siedeverzug *25 eingeschleuste Wasserspuren) von (5) und den Thiolactam-Analogen von (3) und (4) entstanden. Es gelang weder durch Chromatographie noch durch vorsichtige Kristallisation der Mutterlauge weiteres, reines Ketal-Thiolactam zu gewinnen.

Anmerkung: In zahlreichen, früher ausgeführten Nachschubansätzen lag die Ausbeute an kristallinem (5) zwischen 58-68%. Nach Verwendung von 0.5% Pyridin, zur Verhinderung der Hydrolyse des beigemengten Dimethoxiketals (4) und Enoläthers (3) zum schwer von (5) abtrennbaren Keto-Thiolactam (14) in den Elutionsmitteln und den Lösungsmitteln zur Säulenherstellung, erzielte man Ausbeuten von 65-68% an kristallinem, reinem Ketal-Thiolactam (5).

Gezielte Herstellung und Charakterisierung der Nebenprodukte:

Dimethoxiketal-Lactam (4) und Enoläther-Lactam (3)



98.1 mg (0.411 mMol) (+)-Keto-Lactam (1) *2 löste man in 1.75 ml abs. Methanol, versetzte mit 179 µl (1.644 mMol = 4 Moläquivalente) Trimethoxyorthoformiat *3 und 8.1 mg p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat *5 (Alle Operationen unter Argon). Die klare Lösung liess man während 18h bei RT stehen. Danach pipettierte man die farblose Lösung auf ein Gemisch bestehend aus Eis und 1 ml 1n Natriumbicarbonatlösung *9, sättigte die Wasserphase mit genügend Natriumchlorid *8 und extrahierte 1x mit 20 ml und 2x mit 15 ml kaltem Essigester. Die organischen Extrakte wusch man 1x mit kalter, gesättigter Natriumchloridlösung, vereinigte sie, trocknete für 30 Min.

* 25 Beim Einengen des Lösungsmittels am RV ereignete sich ein Siedeverzug. Das verspritzte Material wurde mit THF zusammengewaschen und mit der Hauptverunreinigung vereinigt.

über wasserfreiem Magnesiumsulfat, filtrierte durch Watte und engte am RV bei 30-40° vollständig ein. Nach Trocknung am HV/lh/RT wog man 109 mg farbloses Oel. Das DC *12 (Benzol:Methylacetat 1:1) wies 2 Flecken für Enolätherlactam (3) Rf 0.28 und Dimethoxiketal (4) Rf 0.15 auf. Man trennte die beiden Produkte mittels der Dickschichtchromatographie *14 (Benzol:Methylacetat 1:1/0.5% Pyridin) und eluierte (Methylacetat) 23 mg (0.0908 mMol) 22.1% spontan kristallisierendes Enoläther-Lactam (3), *26 sowie 84 mg (0.295 mMol) 71.7% ebenfalls kristallisierendes Dimethoxiketal-Lactam (4) *26. Nach Kristallisation aus abs. Methylacetat und Hexan, trocken der Kristalle und Einengen der Mutterlauge ermittelte man folgende Ausbeuten:

Dimethoxiketal-Lactam (4)

1. Kristallisat	60.1 mg	(0.211 mMol)	51.3%	Nadeln	mp 122° scharf
Mutterlauge	23.2 mg	(0.0814 mMol)	19.8%		mp 118-119.5°

Enoläther-Lactam (3)

1. Kristallisat	7 mg	(0.0277 mMol)	6.7%	Blättchen	mp 117.5° scharf
2. Kristallisat	11.4 mg	(0.0395 mMol)	9.6%	Blättchen	mp 117.5° scharf

Die Mutterlauge beider Produkte enthielten gemäss DC schon durch Hydrolyse entstandenes (+)-Keto-Lactam (1). Zur Charakterisierung gelangten Proben der getrockneten (36h/0.01Torr/RT) Kristallisate.

Enoläther-Lactam (3)

C ₁₃ H ₁₉ NO ₄	ber	C 61.64	H 7.56	N 5.53 %
MG 253	gef	C 61.38	H 7.57	N 5.47 %

IR (CHCl₃)

Banden u. a. bei 3430s, 3000s, 2850m, 1730s, 1700s, 1650s, 1460m, 1450m, 1435m, 1400m, 1385m, 1370m, 1335s, 1245s, 1170s, 1140s, 1100s, 1065w, 1010s cm⁻¹.

NMR (CDCl₃)

5.8 (breit, 1H), 4.4 (m, 1H, X-Teil des Enoläther-Systems), 3.72 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.35-2.98 (m, 5H, AB-Teil des Enoläthersystems überlagert vom ABX-Spektrum der Acetoxiseitenkette), 1.09 (s, 3H), 1.00 (s, 3H). ppm.

MS D1 80°

255/0.6, 254/7, 253/M⁺ 52, 238/27, 222/20, 221/13, 210/8, 209/55, 207/7, 206/58, 179/5, 178/28, 177/11, 162/12, 161/15, 152/9, 151/5, 150/14, 149/9, 138/13, 137/10, 136/12, 135/10, 134/6, 126/6, 125/10, 124/49, 123/74, 122/100, 121/8, 119/8, 118/8, 115/12, 110/11, 109/11, 108/13, 107/12, 105/9, 103.5/5 vermutlich doppelt geladenes Fragment (207), etc.

* 26 Infolge der extremen Hydrolyseempfindlichkeit der beiden Produkte verzichtete man auf spektroskopische Daten auf dieser Reinigungsstufe. Man kristallisierte deshalb direkt und bestimmte die Daten der Kristallisate. Mehrmalige Kristallisation empfiehlt sich nicht und führt zu Hydrolyseverlusten.

opt. Drehung Chloroform, ($c=0.54$) 589 nm - 98.2°, 546 nm - 118.5°, 436 nm - 213°, 405 nm - 266.5°, 365 nm - 361°.

mp 117.5° (1x Methylacetat/Hexan)

DC *12 Rf = 0.42 (Methylacetat:Benzol = 9:1)

Dimethoxiketal-Lactam (4)

C₁₄H₂₃NO₅ ber C 58.93 H 8.13 N 4.91 %

MG 285 gef C 58.97 H 8.01 N 4.81 %

IR (CHCl₃) Banden u. a. bei: 3425m, 3000s, 2980s, 2950s, 2880w, 2840w, 1735s, 1695s, 1435m, 1405m, 1385m, 1370m, 1345w, 1310m, 1170s, 1140m, 1100m, 1070m, 1050s, 1020s, 995w, 915 w cm⁻¹.

NMR (CDCl₃) 6.08 (breit, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 3.29 (s, 3H), 3.10-2.20 (m, 3H, ABC-System der Acetoxiseitenkette), HA-100 2.05-1.30 (m, 4H, A₂B₂-System der Ketalringhälfte), 1.24 (s, 3H), 1.01 (s, 3H).ppm.

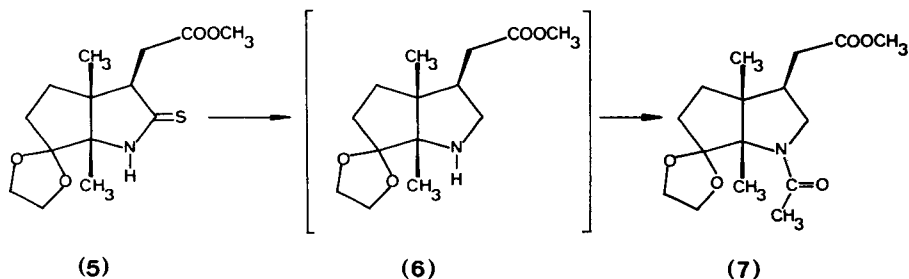
MS 50° 285/M⁺7.5, 270/10.4, 254/10, 253/25, 238/23, 222/17.6, 210/7.3, 209/16, 206/22, 182/5, 178/13, 150/6, 149/12, 124/16, 123/21, 122/28, 102/29, 101/100, etc.

opt. Drehung (Chloroform, $c=0.8$) 589 nm + 3.75°, 546 nm + 1.25°, 436 nm 0°, 405 nm - 1.25°, 365 nm + 5.0°.

mp 122° (1x Methylacetat/Hexan)

DC *12 Rf = 0.30 (Methylacetat:Benzol = 9:1)

(-)-N-Acetyl-Ketal (7)



Vorbemerkung

Die Ausbeute der folgenden Reduktion hängt sehr stark von der Qualität des verwendeten Raney-Nickels ab. Vorversuche mit käuflichen und verschiedenen selbst hergestellten Raney-Nickeln ergaben schlecht reproduzierbare Ausbeuten. Es wird deshalb vorgängig die Herstellung des erfolgreichsten Raney-Nickels, das gut reproduzierbare Resultate lieferte beschrieben.

Im weiteren wurde stets ein Reduktionsvorversuch ausgehend von ca 100 mg Ketal-Thiolactam (5) ausgeführt, wobei mit dem beschriebenen Katalysator das N-Acetyl-Ketal in 84-90 %-iger Ausbeute erhalten wurde. Stellte man an Hand des DC noch unumgesetztes Thiolactam fest, erhöhte man in einem weiteren Vorversuch gleicher Grösse die Katalysatormenge um 15%, lag die Ausbeute unter 80% verminderte man in einem weiteren Vorversuch die Katalysatormenge um 15%. Lag die Ausbeute des korrigierten Vorversuchs innerhalb obiger Schranke, führte man die Hauptansätze mit den korrigierten Werten für die Katalysatormenge durch. Eine nochmalige 2. Korrektur war nie notwendig.

Herstellung von Raney-Nickel *27.

In einem hohen 2000 ml Becherglas mit 480 ml Ionentauscherwasser löste man unter heftigem Rühren (KPG-Rührer mit Teflonblatt) 128 g festes Natriumhydroxid *28. Man liess die Temperatur auf 60° absinken und begann bei dieser Temperatur unter heftigem Rühren mit der portionenweisen Zugabe von 100 g *32 Nickel-Aluminiumlegierung *29 (Achtung exotherme Reaktion und starkes Aufschäumen). Dabei ist die Temperatur unbedingt innerhalb 62±2° konstant zu halten und die Suspension nötigenfalls mit bereitgestelltem Eiswasser zu kühlen (Zugabedauer 25-30 Min.). Nach beendeter Zugabe stellte man das Glas in ein 63-64° warmes Wasserbad und rührte weitere 50 Min. unter gutem Aufrühren des Schlammes bei 62° Innentemperatur. Danach liess man das Nickel absetzen, dekantierte die darüberstehende Natronlauge ab und wusch 4x mit je 500 ml Ionentauschwasser. Anschliessend transferierte man den Kontakt in einen 1000 ml Messzylinder und leitete mittels eines auf den Boden des Zylinders reichenden Glasrohres (Ø innen 6-7 mm) Ionentauscherwasser ein, bis das Washwasser neutrale Reaktion *30 zeigte (Dauer 30-45 Min.) *31. Der Wasserstrom ist dabei so einzustellen, dass das Nickel zu ca 1/3 der Zylinderhöhe aufgewirbelt wird, aber gerade noch nicht aus dem Zylinder geschwemmt wird. Vom so erhaltenen Raney-Nickel dekantierte man das Wasser ab, wusch 2x mit je 200 ml 95% Methanol, 2x mit je 200 ml Methanol und 2x mit je 200 ml absolutem Methanol. Das wasserfreie Raney-Nickel bewahrte man unter Stickstoff im Kühlschranks bei 0-4° auf. Dieses Raney-Nickel ist sehr pyrophor. Es konnte erfahrungsgemäss bis zu 5 Tagen ohne grosse Aktivitätsverluste verwendet werden. Lagert man das Raney-Nickel bei höherer Temperatur oder während längerer Zeit bei 0-4°, verliert es zunehmend an Aktivität. Zur Abmessung des Nickels sog man dieses jeweils in eine Stabpipette, der man die Kapillarspitze abbrach, und liess zur Bestimmung des Volumens während 3-4 Min. sedimentieren. (1 ml sedimentierter Schlamm wog nach Abbrennen an der Luft ca 1.5 g).

* 27 modifizierte Vorschrift aus Org.Synth.Coll. Vol. 3, 176.

* 28 Natriumhydroxid, Merck reinst.

* 29 Nickel-Aluminiumlegierung pulverisiert, 50% Nickel, Fluka purum.

* 30 Kontrolle mit Fein pH-Papier pH = 6.4-8.0, Fluka.

* 31 Eine Verlängerung der Waschzeit hat eine Desaktivierung des Raney-Nickels zur Folge.

* 32 Auch falls nur wenig Raney-Nickel verwendet wird, empfiehlt es sich einen Ansatz dieser Grössenordnung auszuführen, da die Reduktionseigenschaften des Kontaktes stark von der Ansatzgrösse bei dessen Herstellung abhängig sind.

* 33 vgl. Vorbemerkung und obige Herstellungsvorschrift.

* 34 hält Methanol zurück.

(-)-N-Acetyl-Ketal (7).

In einem 100 ml Rundkolben, versehen mit einem 2 cm langen Magnetrührer, legte man unter Stickstoff 5.6 ml Raney-Nickel Schlamm (pro 100 mg Thiolactam 1.3 ml Raney-Nickel *33) in 28.7 ml abs. Methanol vor. Unter heftigem Rühren und Argon tropfte man innert 2 Min. eine Lösung von 429 mg (1.434 mMol) Ketal-Thiolactam (5) (mp 109-110⁰) in ca 2/3 (10 ml) der zur Bereitung einer 0.1 m methanolischen Thiolactam-Lösung benötigten Menge abs. Methanol zu und wusch die Pipette mit der verbleibenden Menge (4.4 ml) abs. Methanol in 3 ca gleichen Portionen nach (Dauer ca 2-3 Min.). Dann wurde der schwach warm gewordene Kolben unter Argon verschlossen und die Suspension während total 30 Min. bei RT heftig gerührt. Hierauf liess man das Nickel absetzen, filtrierte die überstehende Lösung durch Cellite und schlammte das Nickel je 3x mit 15 ml abs. Methanol für 3 Min. auf, liess absetzen, dekantierte jeweils die überstehende Lösung, filtrierte durch das gleiche Cellite und erhielt den Methanolextrakt. Das verbleibende Raney-Nickel versetzte man unter Argon mit 6.15 ml Acetanhydrid (1 ml/70 mg Thiolactam) und rührte für 40 Min. bei RT. Sodann filtrierte man die schwach grüne Lösung mit dem Nickel durch das gleiche Cellite wie oben, wusch den Rückstand mit insgesamt 60 ml Methanol nach und erhielt den Acetanhydridextrakt.

Den Methanolextrakt befreite man am RV vom Lösungsmittel, nahm 1x in wenig abs. Benzol auf, engte erneut ein, trocknete das farblose Oel und wog nach Trocknung (3h/HV/RT) 301 mg rohes Ketal-Amin (6) *34, welches man ohne Reinigung der Acylierung zuführte. Dazu löste man das rohe Ketal-Amin unter Stickstoff in 6.8 ml Acetanhydrid/2% Pyridin *6 (ca 1.5 Moläquivalente Pyridin/Amin) und liess die klare, schwach gelbe Lösung unter Stickstoff und Lichtschutz für 16 h bei RT stehen. Danach entfernte man das überschüssige Acetanhydrid am HV bei 30-40⁰, trocknete das anfallende schwach gelbe Oel für 2h am HV bei RT und extrahierte anschliessend 1x mit 45 ml und 2x mit je 30 ml kaltem Essigester gegen 20 ml gesättigte, kalte Natriumchloridlösung und 100 mg Natriumbicarbonat *9. Die organischen Phasen wusch man 1x mit 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung, vereinigte sie, trocknete 20 Min. über Magnesiumsulfat, filtrierte durch Watte und entfernte den Essigester und 10 ml zugesetztes Benzol am RV bei ca 40⁰. Hierauf trocknete man für 8h bei RT am HV. Das dabei anfallende farblose N-Acetyl-Ketal (7) kristallisierte nach kurzem Kratzen spontan durch und wog 319 mg. Im DC *12 (Essigester:Methanol = 3:1) zeigte das Rohprodukt neben dem Hauptflecken bei Rf 0.52 zwei schwache Nebenflecken bei Rf 0.21 und Rf 0.05 nicht weiter analysierten Materials.

Das NMR-Spektrum des Methanolextraktes wies keine Fremdsignale von Verunreinigungen auf und war mit jenem des Analysenmaterials identisch. Das IR-Spektrum war mit jenem des Analysenmaterials mit Ausnahme der schwach verbreiterten Banden bei 1645 und 2970 cm⁻¹ identisch.

Den Acetanhydridextrakt befreite man am RV vom überschüssigen Methanol und anschliessend am HV bei 30-40⁰ vom überschüssigen Acetanhydrid. Das anfallende schwach grüne, glasartig erstarrte Oel trocknete man für 2h am HV, nahm es in ca 10g Eis, 20 ml kalter gesättigter Natriumchloridlösung, 100 mg Natriumbicarbonat *9 auf, sättigte mit Natriumchlorid und extrahierte 3x mit je 45 ml kaltem Essigester. Die org. Phasen wusch man 1x mit gesättigter Natriumchloridlösung, vereinigte sie, trocknete für 20 Min. über Magnesiumsulfat, filtrierte durch Watte, setzte 10 ml Benzol zu und entfernte die Lösungsmittel vollständig am RV. Das anfallend schwach beige Oel trocknete man am HV bei RT und wog weitere 87 mg spontan kristallisierendes, rohes N-Acetyl-Ketal, welches im DC *12 neben den gleichen Flecken wie der Methanolextrakt einen zusätzlichen schwachen Flecken unbekannter Natur bei Rf 0.27 aufwies. Im IR- und NMR-Spektrum war es identisch mit jenem des Methanolextraktes.

Diese 87 mg chromatographierte man an einer Dickschichtplatte *14 (Essigester: Methanol 7:3). Nach Elution (Methylacetat:Methanol 1:1), Einengen der Lösungsmittel und Trocknung (0.01 Torr/RT) wog man 80.5 mg farblose, DC-einheitliche Kristalle, deren IR- und NMR-Spektrum mit jenen aus Analysenmaterial identisch waren.

Ausbeute (bez. Ketal-Thiolactam (5))

Methanolextrakt (roh)	319 mg	(1.026 mMol)	71.5 %
Acetanhydridextrakt (chrom.)	80.5 mg	(0.259 mMol)	18 %
total	399.5 mg	(1.285 mMol)	89.5 %

Diese beiden Produkte wurden ohne weitere Reinigung direkt der Ketalverseifung zugeführt.

Zur Charakterisierung gelangte eine 2x aus warmem Hexan umkristallisierte Probe, welche als unumgesetztes Edukt aus einem Grossansatz der nachfolgenden Ketalverseifung zurückerhalten wurde. Die erhaltenen analytischen Daten sind identisch mit jenen einer analog umkristallisierten Probe des beschriebenen Methanolextraktes.

(-)-N-Acetyl-Ketal (7)

$C_{16}H_{25}NO_5$	ber	C 61.71	H 8.09	N 4.50 %
MG 311	gef	C 61.78	H 8.08	N 4.51 %

IR ($CHCl_3$)
Abb. 5

Banden u. a. bei 3020 Schulter, 3000 Schulter, 2980s, 2870m, 1730s, 1645s, 1605m, 1465/55m dublettoid, 1435s, 1410s, 1382s, 1370m, 1350m, 1325m, 1308w, 1285m, 1165w, 1095w, 1060s, 1030w, 1010 breit, 950s, 940m, 910m cm^{-1} .

NMR ($CDCl_3$)
HA-100
Abb. 6

vermutlich 2 Rotamere im Verhältnis ca 1:9
4.30-3.67 (m, 8H), darin bei 3.74 $COOCH_3$ -s, 3.24 (t, $J=10$ Hz, 1H), 2.90-1.90 (m, 8H), darin bei 2.06 CH_2 -s, 1.70-1.20 (m, 5 H), darin bei 1.48 CH_3 -s, 0.96 (s, ca 0.3 H), 0.92 (s, ca 2.7H)ppm.

MS 200°

312/3, 311/ M^+ 18, 280/4, 268/5, 212/7, 211/33, 210/13, 182/5, 168/6, 149/10, 139/6, 138/57, 108/8, 100/12, 99/100, 97/8 etc.

opt. Drehung

(Chloroform, $c=1$) 589 nm - 53°, 546 nm - 64°, 436 nm - 122.4°, 405 nm - 152°, 365 nm - 213°.

mp

91 - 92° (2x aus warmem Hexan)

DC *12

Rf = 0.45 (Essigester:Methanol = 3:1)

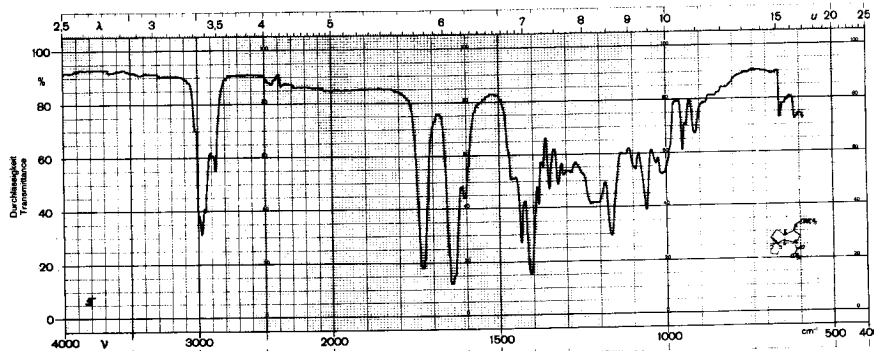


Abb. 5

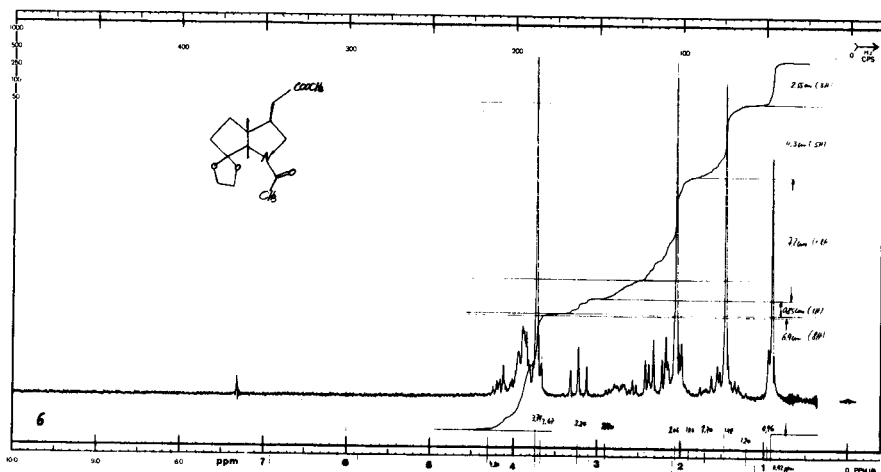


Abb. 6

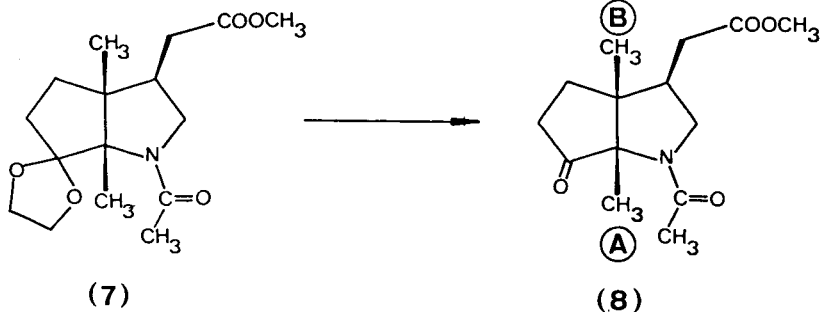
Diskussion.

IR-Spektrum: zwei Banden bei 1645 resp. 1605 cm^{-1} im Intensitätsverhältnis von ca 2:1, die vermutlich den $\nu\text{C}=\text{O}$ Schwingungen der Rotamere um die C-N Bindung der N-Acetylgruppe zuzuordnen sind. Die Deformationschwingung des 1,3-Dioxolansystems erscheint unverändert bei 950 cm^{-1} .

NMR-Spektrum: Die Signale für die beiden Methylengruppen des 1,3-Dioxolansystems erscheinen als kompliziertes A_2B_2 -System zwischen 4,3-3,67 ppm. Im Gegensatz dazu stehen die Singlette der entsprechenden Gruppierungen in (2) und (5). Im weiteren zeigt die zwischen der Ketal- und N-Acetyl-Gruppierung liegende Methylbande bei 0,92 ppm einen schwachen Satelliten bei 0,96 ppm, was auf das Vorliegen eines Rotamerengemisches im Verhältnis ca 9:1 hindeutet.

Reaktionsbedingungen: In zahlreichen Nachschubsätzen bis zu 1g (5) erzielte man Ausbeuten zwischen 80-90%. Der Erfolg der Reduktion hängt massgebend von der Qualität des Raney-Nickels ab. In zahlreichen Vorversuchen lag die Ausbeute des Methanolextraktes zwischen 50-60%, was vermutlich auf die Verwendung eines zu aktiven Raney-Nickels zurückzuführen war, welches das Produkt (6) stärker an der Katalysatoroberfläche adsorbierte. Zur Ablösung des adsorbierten (6) musste das Raney-Nickel bis zu 60 Min. mit Acetanhydrid nachbehandelt werden. Auf diese Weise gelangte man zu einer totalen Ausbeute von ca 80% (7).

(-)-N-Acetyl-Keton (8)



Man löste 289,2 mg (0,930 mMol) rohkristallines N-Acetyl-Ketal (7) des obigen Methanolextraktes unter Stickstoff in 10,9 ml 40 % wässriger Essigsäure *35, verschloss mit Rückflusskühler und Argonballon und erhitzte die schwach gelbe, klare Lösung für 16 h auf 60° (Oelbadtemperatur 58-62°). Danach kühlte man die nunmehr stärker gelbe Lösung auf RT und entfernte das überschüssige Essigsäure-Wassergemisch bei 0,05 Torr und 25° (Wasserbad) vollständig (Dauer ca 10 Min.). Man trocknete (130 Min./0,01 Torr/RT) und wog 340 mg schwach gelbes Oel, welches im DC *12 (Essigester:Methanol=3:1) neben dem Hauptfleck für N-Acetyl-Keton bei Rf 0,43 drei schwache Nebenflecken bei Rf 0,49 (herrührend von wenig unumgesetztem N-Acetyl-Ketal), Rf 0,22 (herrührend von Amino-Ketal (6)) und Rf 0,04 (unbekannter Natur) aufwies.

Man acylierte vorerst unter Stickstoff mit 4 ml Acetanhydrid/10% Pyridin *6 während 30 Min. bei 60° nach. Danach entfernte man das Acylierungsgemisch am HV, trocknete für 2h am HV und wog 320 mg schwach gelbes Oel. Dieses nahm man in 40 ml kaltem Essigester auf, wusch 1x mit 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung /+1ml In-Salzsäure und weitere 2x mit je 20 ml kalter gesättigter Natriumchloridlösung. Die wässrigen Phasen extrahierte man je 2x mit 30 ml kaltem Essigester, vereinigte die org. Extrakte, trocknete für 20 Min. über Magnesiumsulfat, filtrierte durch Watte und entfernte das Lösungsmittel am RV bei 30-40°. Nach Trocknung (2h/0,07 Torr/RT) wog man 243 mg rohes N-Acetyl-Keton (8), dessen DC *12 (Essigester:Methanol 3:1) neben dem Hauptfleck bei Rf 0,43 einen schwachen Flecken bei Rf 0,49 (für unumgesetztes Edukt (7)) aufwies.

Analog verseifte man 79 mg (0,254 mMol) rohkristallines, 1x chromatographiertes N-Acetyl-Ketal aus dem oben erhaltenen Acetanhydridextrakt und erhielt 74 mg rohes N-Acetyl-Keton gleicher Reinheit.

Man vereinigte diese Produkte und chromatographierte mit Essigester in einer Stufensäule *36 an der ca 120-fachen Menge Silikagel *23.

Nach einem Vorlauf von 750 ml fing man 20 ml Fraktionen auf und eluierte in den Fraktionen 1- 3 7,7 mg schwach gelbbraunes Oel, welches beim Rechromatographieren in 3 Zonen zerfiel und nicht mehr weiter analysiert wurde. Die Fraktionen 14-36 (je 20 ml) wogen nach Entfernung der Elutionsmittel am RV und Trocknung bis zur Gewichtskonstanz 297,5 mg. Dieses Material (N-Acetyl-Keton) wies im DC *12 (Essigester:Methanol=3:1) noch einen schwachen Schatten an der Front, herrührend von wenig unverseiftem N-Acetyl-Ketal (7), auf *37. Diese Verunreinigung störte in den nachfolgenden Reaktionen nicht, weshalb das chromatographierte (8) direkt weiterverwendet wurde.

Ausbeute

N-Acetyl-Keton (8) 297,5 mg (1,113 mMol) 94% bezügl. N-Acetyl-Ketal (7).
Zur Charakterisierung gelangte eine dickschichtchromatographierte *14 Essigester:Methanol=3:1, Elution mit Methylacetat:Methanol=4:1) und bei 140°/0,007 Torr kugelrohrdestillierte Probe.

* 35 Essigsäure, Merck p.a. 1x dest., 40 Volumen % in Wasser.

* 36 Stufensäule folgender Dimension, Höhe: 20/22/10 cm, Durchmesser: 10/15/25 mm.

* 37 N-Acetyl-Keton und N-Acetyl-Ketal weisen sehr ähnliche chromatographische Verhalten auf. Geringe Anteile von Ketal (7) lassen sich deshalb nicht mehr von Keton (8) abtrennen.

* 38 Amplitudenverhältnisse, nicht Verhältnisse der Integrale, wobei das intensivere Signal auf 1 normiert wurde.

Im MS der Charakterisierungsprobe erkennt man einen schwachen Peak bei $M^+ = 311$, der auf noch unumgesetztes Edukt (7) hinweist. Der Anteil kann an Hand der Intensität des Signals bei 0.91 ppm im NMR auf weniger als 4% bestimmt werden. Die ermittelten analytischen Daten (u. a. auch NMR-Spektrum A-60) stimmten mit Ausnahme einer etwas höheren optischen Drehung mit den von W. Fuhrer ermittelten Werten überein (vgl. 2. 2. 3. 3.).

(-)-N-Acetyl-Keton (8)

$C_{14}H_{21}NO_4$	ber	C 62.90	H 7.92	N 5.24 %
MG 267	gef	C 62.85	H 7.99	N 5.15 %

IR (CHCl₃)

Abb. 7

Banden u. a. bei: 3020 Schulter, 3000s, 2970 Schulter, 2945s, 2870m, 1745s, 1735s, 1645s, 1615s, 1450m, 1435s, 1400s, 1385 Schulter, 1365m, 1350m, 1320m, 1295m, 1270w, 1165s, 1100w, 1055m, 1020w, 995m, 940w cm^{-1} .

NMR (CDCl₃)

HA-100

Abb. 8

4.20 - 3.50 ppm (m, 4H), darin zwei durch ca 2Hz getrennte Singlette (Methylester bei 3.72/3.70 im Intensitätsverhältnis: 1:0.78 *38).

3.34-3.10 (m, 1H), 2.70-1.60 (m, 7H), darin zwei Singlette (Methyl der N-Acetylgruppe) bei 2.29 und 2.08 im Intensitätsverhältnis: 1:0.84. *38.

1.53 und 1.42: zwei Singlette (Methyl A) im Intensitätsverhältnis 1:0.9, jedes s ca 1.5 H entsprechend.

0.98 und 0.95: zwei Singlette (Methyl B) im Intensitätsverhältnis 1:0.9, jedes ca 1.5 H entsprechend.

Die Aufspaltung der Signale der Methylgruppen deutet auf das Vorliegen eines Rotamerengemisches (Rotation um die C-N Bindung der N-Acetylgruppe) im Verhältnis ca 1:1 hin. Schwache Fremdsignale bei 0.91 (s), 1.44 (s), 1.94 (s) und 2.04 (s) ppm rühren von unverseiftem (7) her. Auf Grund des Integrals des Signals bei 0.91 ppm wurde der Gehalt an Edukt (7) zu ca 4% berechnet.

MS 200°

Enthält Spur N-Acetyl-Ketal: $M^+ = 311/0.8\%$
 268/1.2, 267/M+4.2, 212/10, 211/71, 194/16, 139/10, 138/99, 108/11, 99/5, 97/8, 96/100, 95/6, 94/8, 90.5 metastabil (211 - 73 = 138).

opt. Drehung

(Chloroform, c=1.02) 589 nm - 110.8°, 546 nm - 141.2°, 436 nm - 321.5°, 405 nm - 456°, 365 nm - 890°.

DC *12

Rf 0.46 (Essigester: Methanol = 3:1)

Diskussion des IR-Spektrums: Die beiden Banden bei 1645 resp. 1615 cm^{-1} können vermutlich den beiden Rotameren um die C-N Bindung der N-Acetylgruppe zugeordnet werden.

Reaktionsbedingungen: Die Deketalisierung in Gegenwart des Methylesters erwies sich als sehr tückisch. Bei zu schwachen Bedingungen (6h-21h/ siedendes Aceton mit p-Toluolsulfonsäure als Katalysator isolierte man praktisch nur Edukt zurück. Deketalisierung mit Zinntetrabromid in Acetylbromid [36] (18h/RT) lieferte neben ca 70% N-Acetyl-Keton (8) ca 20-30% unbekannt Nebenprodukte. Die Deketalisierung mit wässriger Essigsäure lieferte bei milden Bedingungen (5-10-20% Essigsäure), verschiedenen Temperaturen (RT-60°) und verschiedenen Reaktionszeiten (6-12h), praktisch ausschliesslich Edukt zurück. Scharfe Bedingungen, d. h. höhere Säurekonzentrationen bis zu 60%, Reaktionszeiten von 6h und Temperaturen bis zu 100°, lieferten neben Produkt (8) zusätzlich durch Verseifung der Methyl-estergruppe N-Acetyl-Ketsäure (19) neben weiteren unbekannt Nebenprodukten. Als optimale Bedingungen resultierten die obig beschriebenen.

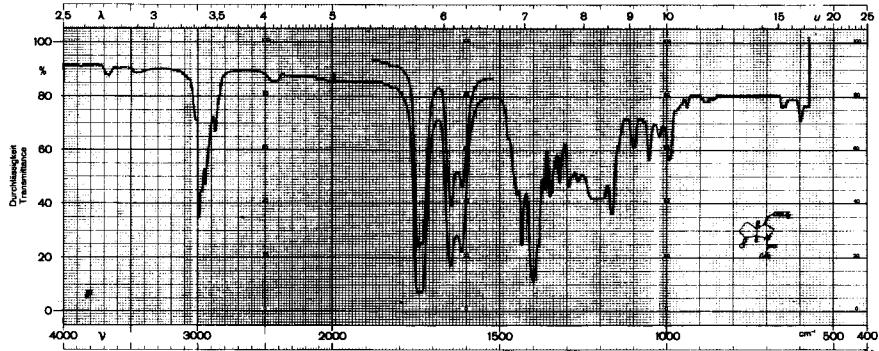


Abb. 7

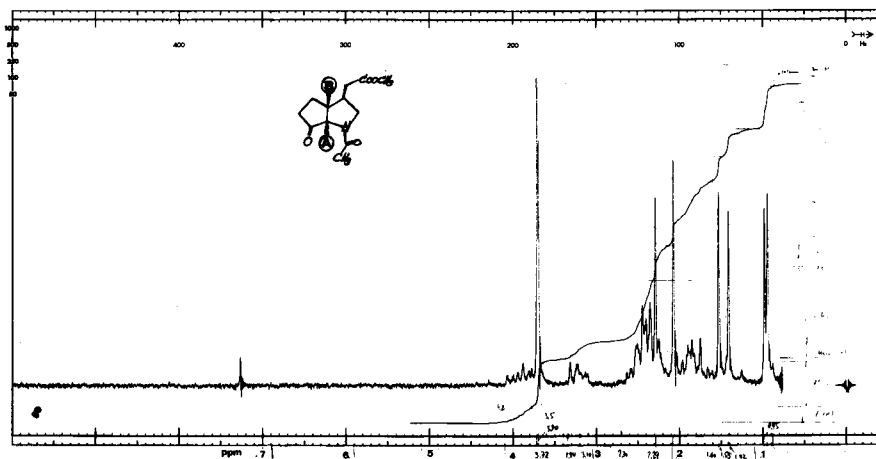
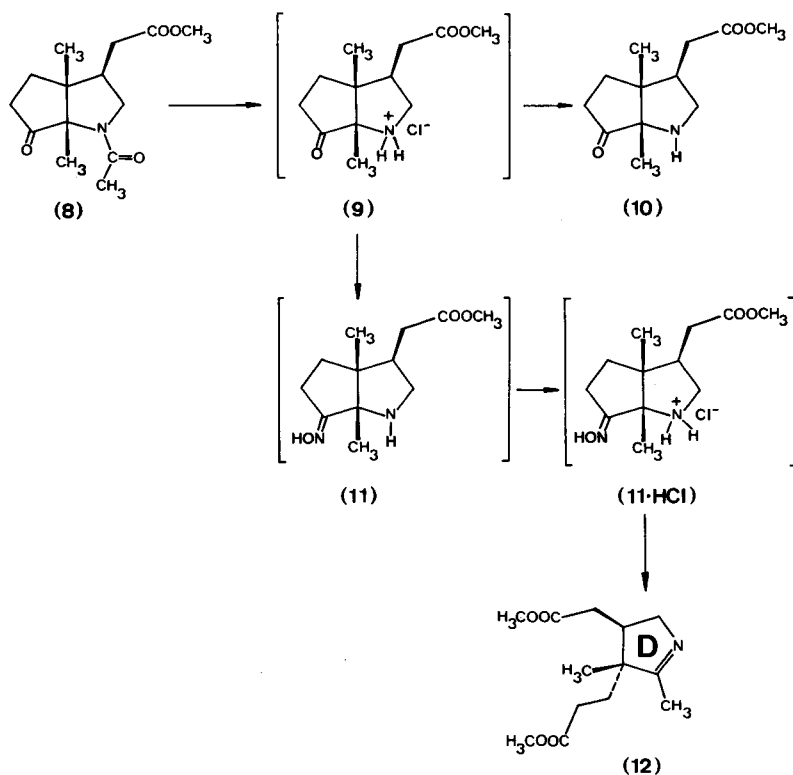


Abb. 8

(+)-Methyl-Imin (12) aus (-)-N-Acetyl-Keton (8) (definitive, optimierte Bedingungen)



(-)-N-Acetyl-Keton (8) wurde ohne Reinigung der Zwischenprodukte direkt in (+)-Methyl-Imin (12) überführt.

Keto-Amin-Hydrochlorid (9)

265.2 mg (0.995 mMol) 1x chromatographiertes N-Acetyl-Keton (8) löste man unter Feuchtigkeitsausschluss in 6.1 ml 3M absoluter methanolischer Salzsäure *39 und erhitzte für 16 h unter Argon und magnet. Rühren zum Rückfluss. Danach liess man die farblose bis schwach gelbe Lösung auf RT erkalten, entfernte den Magnetrührer und engte am RV bei 30-40° vollständig ein. Man nahm erneut in ca 5 ml abs. Methanol auf und engte wiederum vollständig ein. Diesen Vorgang zur Entfernung von HCl wiederholte man noch weitere 2x. Anschliessend trocknete man (6h/0.01 Torr/RT) und wog 257 mg (0.994 mMol) ca 100% (bezüglich 8) farbloses, glasartig erstarrtes Keto-Amin-Hydrochlorid, welches im DC *12 (Essigester:Methanol 3:1) einen starken, länglichen Flecken (freies Keto-Amin (10) *40) (Rf 0.3) und einen schwachen Flecken am Start aufwies.

Das IR-Spektrum aus einem analog ausgeführten Ansatz zeigte folgende Banden:
3000-2100 div. schwache Banden, 2970s, 1758s, 1735s, 1650w breit,
1600w, 1570w, 1460m, 1436s, 1405s, 1390s, 1378s, 1350w, 1320w, 1300w,
1265w breit, 1145w, 1110w, 1055s, 1010-995w breit, 970w cm^{-1} .

Infolge der thermischen Instabilität des freien Keto-Amino-Esters (10) *41 setzte man ihn als Hydrochlorid (9) ohne weitere Reinigung in der Oximierung ein. Analog ausgeführte Nachschubansätze bis zu 2g (8) gelangen mit gleichem Erfolg. Den freien Keto-Amino-Ester (10) hatte man in einem anderen Ansatz wie folgt erhalten. 48 mg (0.1835 mMol) Hydrochlorid (9) nahm man in ein Gemisch bestehend aus 25 ml kalten Essigesters (+5% Methanol), 10g Eis, 5 ml 1m Natriumcarbonatlösung und Natriumchlorid bis zur Sättigung auf. Die wässrige Phase extrahierte man weitere 2x mit je 20 ml eiskalten Essigesters und wusch die org. Phasen hernach 2x mit je 10 ml gesättigter, kalter Natriumchloridlösung. Die org. Phasen wurden vereinigt, über wasserfreiem Natriumsulfat *10 während 15 Min. getrocknet (Kühlung), durch Watte filtriert und am RV bei ca 20-30° vom Lösungsmittel befreit. Den anfallenden schwach gelben, spontan kristallisierenden Rückstand trocknete man (30 Min./0.01 Torr/RT) und wog 37 mg (0.1645 mMol) 89.6% bezüglich (9) rohes Keto-Amin (10). Das rohe Keto-Amin sublimierte *42 (0.008 Torr/45°) man in 3 Portionen und erhielt 28 mg (0.1244 mMol) 67.7% bezügl. (9) farbloses, kristallines und DC *12 (Essigester:Methanol = 1:1) -einheitliches Keto-Amin (10). NMR, IR, MS und die opt. Drehung stimmen mit den von W. Fuhrer ermittelten Daten des auf anderem Wege erhaltenen Keto-Amins' (10) überein. (vgl. Diol-Methode, 2. 2. 3. 3.)

Keto-Amin (10)

IR CHCl_3

Banden u. a. bei: 3320w, 3020 Schulter, 2970s, 2950s, 2880s, 1735s, 1460m, 1435s, 1405m, 1395w, 1382m, 1365m, 1320m, 1292m, 1268w, 1168s, 1100m, 1050s, 995m cm^{-1} .

NMR CDCl_3 A - 60

3.69 (s, 3H), 3.30-2.90 (m, 1H), 2.80-1.50 (m, 9H), 1.02 (s, 3H), 0.98 (s, 3H) ppm.

MS DI 45°

226/0.5, $225/\text{M}^+$ 1, 197/4, 194/6, 170/3, 169/29, 149/3, 108/7, 97/10, $96/100$.

opt. Drehung

Chloroform, $c = 0.525$) 589 nm + 69.5°, 546 nm + 84.2°, 436 nm + 196°, 405 nm + 286°, 365 nm + 648°.

mp

56.5 - 57° (1x sublimiert)

DC *12

Rf 0.3 (Essigester:Methanol = 3:1)

* 39 methanolische Salzsäure, HCl-Gas aus der Bombe durch konz. Schwefelsäure geleitet. Diese Stammlösung (jeweils ca 6-7 n) verdünnte man entsprechend mit abs. Methanol und titrierte gegen Methylrot.

* 40 Dass es sich bei diesem Flecken um den deprotonierten Amino-Ester (10) handelt, konnte durch DC-Vergleich mit isoliertem Amino-Ester (10) gezeigt werden.

* 41 Keto-Amino-Ester kann in reiner, kristalliner Form ohne starke Zersetzung bei 0° aufbewahrt werden (ca 1 Monat). Bei RT zersetzt er sich in ca 1 Tag und wird dabei rotbraun.

* 42 Die Sublimation gelingt nur unter grossen Substanzverlusten. Dabei ist darauf zu achten, dass das Sublimationsgut nicht über den Schmelzpunkt des kristallinen Rohproduktes erhitzt wird, ansonst ein klebriges rotbraunes Oel entsteht, aus welchem kein Amino-Ester mehr gewonnen werden kann.

Amin-Oxim (11)

Die 257 mg (0.994 mMol) Keto-Amin-Hydrochlorid (9) des oben beschriebenen Ansatzes löste man unter Feuchtigkeitsausschluss und Argon in 38 ml abs. Methanol, versetzte nacheinander unter jeweiligem Lösen mit 790 mg (ca 10 Moläquivalente) wasserfreiem Natriumacetat *43 und 334 mg (ca 5 Moläquivalente) Hydroxylamin-Hydrochlorid *44. Die schwach gelbe und klare Lösung erhitze man für 45 Min. unter Argon zum Rückfluss. Danach liess man erkalten und entfernte das Methanol bis auf ca 1 ml am RV *46. Den anfallenden Brei nahm man in 10 g Eis, 15 ml im Natriumcarbonatlösung auf, transferierte in einen Scheidetrichter *47, sättigte mit Natriumchlorid und extrahierte 1x mit 90 ml und 3x mit je 60 ml eiskaltem Essigester (wenig Eis zugeben). Die org. Phasen wusch man 2x mit je 10 ml kalter gesättigter Natriumchloridlösung, vereinigte sie und trocknete 30 Min. über Natriumsulfat *10, filtrierte durch Watte und entfernte das Lösungsmittel bei 30° am RV. Das rohe Oxim transferierte man mit 5 ml abs. Benzol durch wenig Watte in einen 250 ml Birnkolben, entfernte das Lösungsmittel erneut am RV bei 30°, trocknete (1h/0.03 Torr/RT) und wog 236 mg (0.984 mMol) 99% bezüglich (9) rohes, fast vollständig durchkristallisiertes Amin-Oxim (11) von schwach gelber Farbe. Im DC *12 (Essigester:Methanol = 1:2) waren 2 langgezogene Flecken (vermutlich syn- und anti-Oxim) mit den Zentren bei Rf 0.2 und Rf 0.36 neben einem Schatten vor dem schnelleren und hinter dem langsameren Flecken erkennbar. Dieses Produkt setzte man ohne weitere Reinigung in der nachfolgenden Fragmentierung ein. Analog ausgeführte Ansätze zu höchstens 500 mg (9) ergaben vergleichbare Ergebnisse.

Eine analog hergestellte, bei 0° dickschichtchromatographierte *14 Probe des Oxims (11) (Essigester:Methanol 1:3) ergab die folgenden analytischen Daten *47. Auf Grund der Intensitäten der Methylgruppensignale bei 1.18 resp. 0.92 ppm mit den zugehörigen schwachen Satelliten bei 1.32 resp. 0.82 ppm im NMR, kann das Vorliegen zweier diastereomerer Oxime im Verhältnis von ca 1:4 vermutet werden.

Amin-Oxim (11)

IR CHCl₃

Banden u. a. bei: 3580m, 3360-2450 breit, 2970s, 2955s, 2880m, 1735s, 1650w, 1605w, 1465m, 1440s, 1385m, 1372m, 1350m, 1325m, 1295m, 1175s, 1000m, 940 breit, 840w cm⁻¹.

NMR CDCl₃

6.54 (s, breit, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.40-3.00 (m, 1H), 3.00-2.15 (m, ca 8H), 2.15-1.40 (m, 3H), 1.32 (CH₃ - s, ca 0.6H), 1.18 (CH₃ - s, ca 2.4H), 0.92 (CH₃ - s, ca 2.4H), 0.82 (CH₃ - s, ca 0.6H), ppm.

T - 60

MS Di 80°

241/0.1, 240/M⁺0.3, 222/4, 191/15, 182/5, 181/21, 149/19, 141/14, 122/22, 121/39, 109/15, 108/38, 107/14, 106/6, 99/17, 81/44, 55/100, etc.

* 43 Natriumacetat wasserfrei, Fluka puriss.

* 44 Hydroxylamin-Hydrochlorid, Fluka puriss.

* 45 möglichst wenig Restvolumen, Achtung auf Spritzverluste gegen Ende des Einengens.

* 46 möglichst wenig Wasserphase, Oxim ist sehr gut wasserlöslich.

* 47 auf eine vollständige Charakterisierung wurde infolge der Instabilität bei der Chromatographie von (11) zur Trennung der Isomeren Oxime verzichtet.

* 48 abs. Chloroform, Merck p. a. vor Gebrauch durch bas. Alox, Akt. 1 (Woelm) filtriert.

* 49 starker Strom, aus der Bombe durch H₂SO₄ konz. geleitet. Für grössere Ansätze leitete man für 1 Min. HCl-Gas ein (ca 22 ml = 1mMol). Dieses Vorgehen schützte die Aminogruppe in (11) durch Protonierung gegen einen Angriff des Thionylchlorids.

(+)-Methyl-Imin (12) Ring-D Vorläufer

Die 236 mg (0.984 mMol) des oben beschriebenen rohen Oxims (11) löste man in 29.6 ml abs. Chloroform *48 und leitete für 30 Sek. unter Feuchtigkeitsschluss trockenes HCl-Gas *49 ein. Danach tropfte man unter magnet. Rühren, Argon und Feuchtigkeitsschluss schnell 1.78 ml (25 Moläquivalente) Thionylchlorid *50 zu. Man verschloss den Kolben unter Argon mit einem Schliffhahn (Schliff mit Parafilm abdichten) und rührte die schwach braune klare Lösung unter Lichtausschluss für 15 Min. bei RT (25°). Die nun stärker braune Lösung kühlte man im Eiswasserbad auf 0°, entfernte überschüssiges Thionylchlorid und das Chloroform bei 0° am HV (Dauer ca 12 Min.) und trocknete *51 (35 Min./0.04 Torr/RT) das braune Oel. Man entlüftete mit trockenem Argon, löste den Rückstand in 36 ml abs. Chloroform *48, gab 4.3g Piperidino-Methyl-Polystyrol *52 zur Entfernung von HCl und Thionylchlorid zu und rührte während 30 Min. bei RT. Anschliessend filtrierte man die nun gelbbraune Lösung durch eine mit Cellite belegte Stickstoffnutsche, wusch die Polymerbase 4x mit 20 ml abs. Chloroform *48 und entfernte das Lösungsmittel am RV bei 30-40°. Nach Trocknung (2h/0.04 Torr/RT) wog man 216 mg gelbbraunes Rohprodukt, das im DC *12 (Essigester:Methanol 3:1) neben dem Hauptflecken bei Rf 0.36 drei schwache Nebenflecken unbekannter Natur bei Rf 0.1, Rf 0.25 und Rf 0.6 aufwies. Das Rohprodukt chromatographierte man deshalb an 3 neutralen Aloxplatten *53 (Methylacetat:Benzol 1:1) und wog nach Elution (Methylacetat:Methanol = 4:1), Entfernung des Lösungsmittels am RV und Trocknung 170 mg gelbes Methyl-Imin. Aus den rechromatographierten Randzonen erhielt man weitere 3 mg Methyl-Imin. Die vereinigte Menge (173 mg) destillierte man bei 0.02 Torr/136-140° im rotierenden Kugelrohr durch 2 Kugeln und erhielt 165.7 mg (0.746 mMol) farbloses, öliges Methyl-Imin, das im DC *12 (Essigester:Methanol 3:1) neben dem Hauptflecken bei Rf 0.36 nur noch einen schwachen Nebenflecken bei Rf 0.1 unbekannter Natur aufwies.

Das so erhaltene Produkt kristallisierte man über Nacht unter Animpfen aus ca 1 ml Aether und ca 1.5 ml Hexan (langsam zugeben bis die Lösung eben noch nicht trübt) bei 0° und erhielt klotzige, farblose Kristalle (mp 39-40°). Am Morgen gab man nochmals ca 1 ml Hexan hinzu, stellte in den Kühlschränk und erhielt nochmals farblose, kleinere klotzige Kristalle. Aus der Mutterlauge erhielt man durch Rechromatographieren und Redestillieren 20.4 mg öliges, jedoch DC-einheitliches Methyl-Imin (12).

Ausbeute

1. Kristallinat	143 mg (0.644 mMol)
rechrom. Mutterlauge	20.4 mg (0.092 mMol)
total	163.4 mg (0.736 mMol) 74.1% bezügl. N-Acetyl-Keton (8)

- * 50 Thionylchlorid, Siegfried AG Zofingen, über Leinöl unter N₂ destilliert.
- * 51 Es ist auf sorgfältigstes Trocknen zu achten. Noch vorhandenes Thionylchlorid beeinträchtigt die Ausbeute.
- * 52 Piperidino-Methyl-Polystyrol, 2.9 mÄquiv/g während 48h/0.01 Torr getrocknet.
- * 53 Aluminiumoxid PF₂₅₄ (Typ E) zur Schichtchromatographie, Merck, 20x20x0.1 cm Platten. Methyl-Imin ist auf der Platte sehr schwer zu erkennen (UV-Licht). An der Front ist er jedoch durch ein scharfes rot-braunes Band von Verunreinigungen begrenzt. Der hintere Rand ebenso durch eine schwach gelbe Zone (Verunreinigungen). Am besten gelingt die Lokalisierung von Methyl-Imin auf der bis zu einem schmalen Streifen mit Alufolie abgedeckten Platte in Jod-dampf.

Die Kristalle und die rechromatographierte Mutterlauge dieses Ansatzes waren gemäss IR und DC identisch mit einem nach gleicher Vorschrift erhaltenen Nachschubmaterial, dessen spektroskopische Daten nachstehend aufgeführt sind. Diese Daten, nämlich IR, NMR, MS, opt. Drehung und DC, dokumentierten Identität mit dem von W. Fuhrer nach der Diol-Methode erhaltenen Methyl-Imin (12). Die Gesamtausbeute an Methyl-Imin (12) für den obigen Ansatz (Kristalle und rechrom. Mutterlauge) betrug 38% (bez. (+)-Keto-Lactam (1)). W. Fuhrer erzielte nach den ursprünglichen Methoden reproduzierbar 16-20% (bez. (1)) 1x chromatographiertes und kugelrohrdestilliertes Methyl-Imin. Nach einer anderen, nicht reproduzierbaren Methode (Keton-Methode) lag die Ausbeute an chromatographiertem und kugelrohrdestilliertem Methyl-Imin bei ca 28% (bez. (1)).

Charakterisierung von Methyl-Imin (12).

Das Material stammt (mit Ausnahme desjenigen der Elementaranalyse) aus mehreren analog nach obiger Vorschrift durchgeführten und gleich verlaufenen Nachschubansätzen. Dabei waren die 1x chromatographierten Produkte der einzelnen Ansätze vereinigt, zusammen destilliert und anschliessend kristallisiert worden (mp 39-40°). Die Elementaranalyse war früher mit Material nach den von P. Dubs und W. Fuhrer ausgearbeiteten Vorschriften der Diol-Methode ausgeführt worden.

Methyl-Imin (12)

IR CHCl_3 Banden u. a. bei 3020m, 2970sh, 2950s, 2860m, 2250m (Nitrilgruppe), 1735s (Methylestergruppe), 1655sh, 1645m verbreitert ($\nu_{\text{C}=\text{N}}$), 1635sh, 1605w, 1460m, 1440s, 1420sh, 1380s, 1305w, 1165s, 995m cm^{-1} .

Abb. 9

NMR CDCl_3 4.18-3.90 (m, 1H), 3.73 (s, 3H) (Methylestergruppe),
HA - 100 3.45-3.15 (m, 1H), 2.68-2.10 (m, 5H), 2.00-1.80 (m, 5H),
Abb. 10 darin bei 1.97 triplettoides Signal der Imin-Methylgruppe ($J = 2\text{Hz}$). 0.98 (s, 3H) (anguläres Methyl)ppm.

NMR C_6D_6 4.10-3.75 (m, 1H), 3.60-2.95 (m, 4H), darin bei 3.35 (s, Methyl-
HA - 100 estergruppe), 2.20-1.05 (m, 10H), darin bei 1.50 triplettoides
Abb. 11 Signal der Imin-Methylgruppe ($J = 2\text{Hz}$), 0.32 (s, 3H) (anguläres Methyl) ppm.

MS 200° 223/1.7, 222/ M^+10 , 192/4, 191/28, 182/9, 181/40, 150/5, 149/38, 141/25, 122/36, 121/64, 120/5, 109/22, 108/54, 107/22, 106/8, 99/22, 95/11, 94/12, 85/7, 81/53, 80/10, 79/12, 74/12, 67/16, 59/10, 56/8, 55/100.

opt. Drehung Chloroform, $c = 1$, 589 nm + 72.5°.

mp 39-40°, (Aether/Hexan)

DC *12 Rf 0.36 (Essigester:Methanol = 3:1)

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ ber. C 64.84 H 8.16 N 12.60 %

MG 222 gef. C 64.35 H 8.25 N 12.55 %

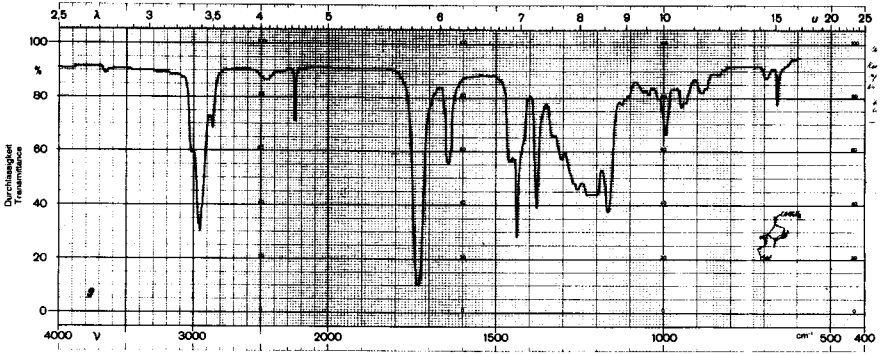


Abb. 9

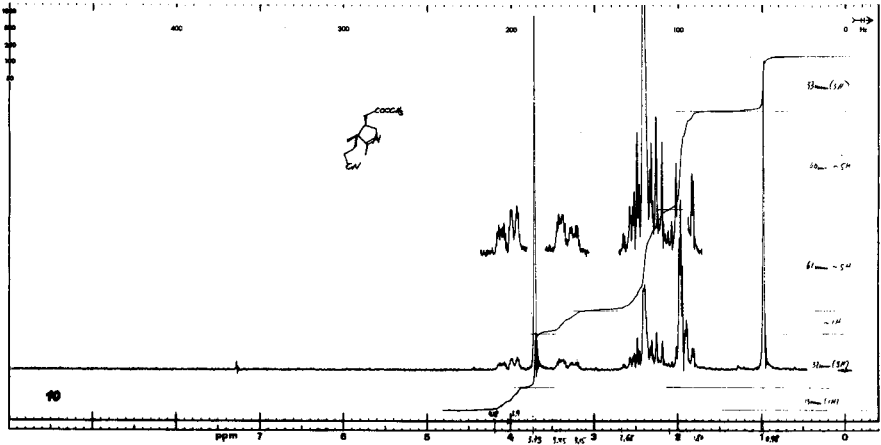


Abb. 10

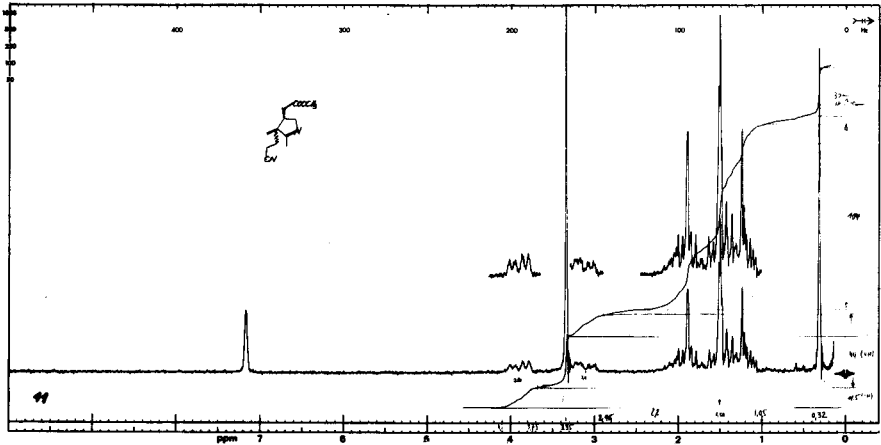


Abb. 11

Diskussion

Im IR-Spektrum erscheint die schwache Nitrilbande bei 2250 cm^{-1} . Die verbreiterte Bande bei 1645 cm^{-1} ist der C=N Absorption der Methyl-Imin Struktur zuzuordnen.

NMR (CDCl₃-Spektrum)

- Methylestergruppe bei 3.73 ppm als scharfes Singlett.
- Vicinale Methylenprotonen in α -Stellung zum Imin-Stickstoff: komplexes ABX-System:
 - A-Teil: m zentriert um 4.03 ppm, J_{AB} ca 16 Hz, J_{AX} ca 7 Hz.
 - B-Teil: m zentriert um 3.32 ppm, J_{AB} ca 16 Hz, J_{BX} ca 7 Hz.

Das ABX-System ist zusätzlich long-range gekoppelt mit der Imin-Methylgruppe (J ca 2 Hz).

Evidenz: Im Spektrum des Trideuteromethyl-(12) (vgl. 2.2.3.2.) ist der AB-Teil des ABX-Systems in der zu erwartenden Weise durch Wegfallen der long-range Kopplung deutlicher strukturiert (vgl. Abb. 13A). Die long-range Koppelung ist ebenfalls durch Wegfallen der triplettoiden Signalstruktur der Imin-Methylgruppe (um 1.92 ppm) in Dideuteromethylen-(12) (vgl. Abb. 12) bestätigt.

Der X-Teil des ABX-Spektrums wurde durch ein Doppelresonanzexperiment im NMR des Trideuteromethyl-(12) als Multipllett um 2.5 ppm nachgewiesen (vgl. Abb. 13 B).

- Anguläre Methylgruppe: scharfes Singlett bei 0.98 ppm.

(C₆D₆)-Spektrum: Der Vergleich der beiden Aufnahmen in Deuterobenzol resp. Deuteriochloroform lässt eine drastische Verschiebung um 0.38 ppm für die Methylestergruppe und um 0.66 ppm (:) für die anguläre Methylgruppe erkennen. Die Methylestergruppe erscheint als scharfes Singlett bei 3.35 ppm, die anguläre Methylgruppe bei 0.32 ppm.

Der A-Teil des ABX-Systems erscheint als Multipllett um 3.90 ppm, der B-Teil als Multipllett um 3.11 ppm zentriert (Koppelungskonstanten gleich wie im CDCl₃-Spektrum). Das triplettoide Signal (J ca 2 Hz) für die Imin-Methylgruppe erscheint bei 1.5 ppm.

- In beiden Spektren werden keine Banden, welche auf Diastereomerenanteile hindeuten würden festgestellt. Das Methyl-Imin (12) ist auf Grund der NMR-Spektren frei von Seitenkettendiastereomeren.

Konfiguration: Die Essigsäureseitenkette in (12) steht *cis* zum angulären Methyl. Eine eventuell bei der Reduktion des Thiolactams (5) auftretende Epimerisierung dieser Seitenkette konnte von W. Führer auf Grund der Resultate der Reduktion mit deuteriertem Raney-Nickel (vgl. 2.2.3.2.) ausgeschlossen werden, da dabei kein Deuterium an der Ringverknüpfungstelle der Essigsäureseitenkette eingebaut worden war. Die Konfiguration wird auch durch die Tatsache bestätigt, dass identisches (12) auch nach der Diol-Methode erhalten wird.

Die Chiralität von (12) ergibt sich durch die Verwendung des (-)-Enantiomeren der Dilactonsäure (A). (-)-A ist das Spiegelbild von (+)-A, für welches die Chiralität durch Verknüpfung mit einem Abbauprodukt von Vitamin-B₁₂ feststeht. (vgl. Schema 1 unter 2.2.1.). [9, 37]

Weiter ergibt sich die Richtigkeit der Konfigurations- und Chiralitätszuordnung von (12) aus der Verwendung von (12) als Ring-D Vorläufer zur Synthese von Cobyriensäure-hexamethylester-f-Amid (24) [12] [13], welches mit dem aus Vitamin B₁₂ gewonnenen gleichen Produkt identisch ist.

Reaktionsbedingungen: In zahlreichen Nachschubansätzen nach den definitiven Bedingungen, ausgehend von höchstens 500-600 mg (8), erzielte man Gesamtausbeuten von 28-38 % bez. (+)-Keto-Lactam (1).

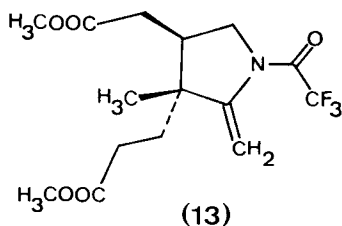
Bei der Fragmentierung ist vor allem darauf zu achten, dass genügend HCl-Gas zur Protonierung des Amin-Oxims (11) (Zur Verhinderung eines Angriffs von

Thionylchlorid) eingeleitet wird. Weiter ist nach Entfernung des Chloroform/Thionylchloridgemisches an gutem HV zu trocknen. Es zeigte sich, dass beide Faktoren die Ausbeute an Methyl-Imin merkbar beeinflussen.

Der Erfolg der Fragmentierung hängt von der verwendeten Thionylchloridmenge ab. Eine systematische Bearbeitung der von P. Dubs und W. Fuhrer erstmals durchgeführten Fragmentierung (100 Moläquivalente Thionylchlorid) führte zu den oben beschriebenen, optimierten Bedingungen (25 Moläquivalente). Die Ausbeute konnte somit von durchschnittlich 50% bez. (8) auf 70-75% erhöht werden.

Im weiteren wurden nochmals neue Fragmentierungsreagenzien untersucht, wobei sich herausstellte, dass Trifluoracetanhydrid in Dimethoxyäthan bei RT/45 Min. in ca 60% Ausbeute bez. (8) das mit HCl-Gas protonierte Oxim (11) zu rohem Methyl-Imin fragmentierte. Als Nebenprodukt dieser mild verlaufenden Fragmentierung entsteht auf Grund von

NMR-Indizien vermutlich das trifluoracetylierte, zum Methyl-Imin tautomere Enamin (13) in variablen Ausbeuten. Diese Variante der Fragmentierung wurde leider nicht zur präparativen Reife ausgearbeitet. In einem Fragmentierungsansatz mit auf anderem Wege gewonnenen Amin-Oxim (11) (Keton-Methode) versuchte W. Fuhrer nach der Fragmentierung eine wässrige Aufarbeitung, d. h. Zerstörung des nicht eingeeengten, eisgekühlten Fragmentierungsgemisches (Thionylchlorid in CHCl_3) mit 10-n Kaliumcarbonat bei 0° und anschließendes Extrahieren des rohen Methyl-Imins mit Chloroform. Der Weg erwies sich als grundsätzlich begehbar. Methyl-Imin (12) wurde dabei, bedingt durch eine andere Herstellungsart des Hydrochlorids (9), mit zusätzlichen, jedoch chromatographisch abtrennbaren Verunreinigungen erhalten.

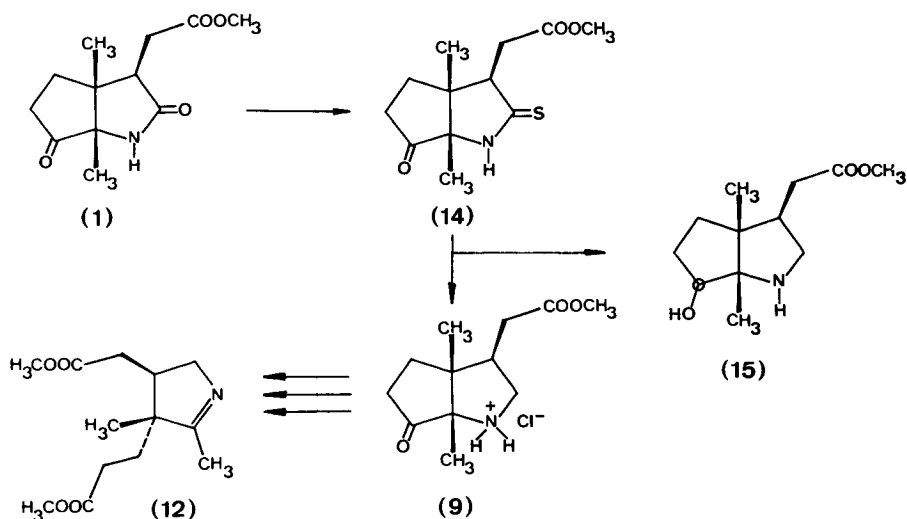


Der Fuhrer'sche Deuterierungsversuch von Methyl-Imin (12) (vgl. 2. 2. 3. 2.) dokumentiert die leichte Enolisierbarkeit des Imin-Methyls in (12).

2.2.3. Vorversuche zur Synthese des Ring-D Vorläufers; Methyl-Imin (12).

2.2.3.1. KETON - METHODE, Versuche zur Synthese von Methyl-Imin (12) via eine direkte Reduktion von (+)-Keto-Thiolactam (14).

(Versuch ausgeführt von W. Fuhrer)



(+)-Keto-Thiolactam (14) *54

478 mg (2 mMol) (+)-Keto-Lactam (1) *2 wurden in 50 ml Tetrahydrofuran *17 gelöst und mit 888 mg (4 mMol) Phosphorpentasulfid *18 versetzt. Die Suspension wurde während 5h unter Argon und Lichtschutz bei RT magnetisch gerührt. Im Verlaufe der Reaktion bildete sich eine weisse Gallerte, welche sich an den Wänden festsetzte. Man filtrierte durch Cellite, wusch 2x mit 10 ml abs. Tetrahydrofuran *17 und 2x mit 20 ml abs. Methylenchlorid nach und engte das Filtrat am RV bei 30-40° ein. Nach Trocknung während 2h bei RT/0.01 Torr wog man 1.4g kristallisierendes Oel *55. Zur Entfernung der Phosphorverbindungen chromatographierte man an 100 g Kieselgel *23 zuerst mit abs. Methylenchlorid (250 ml), dann mit abs. Methylenchlorid: Essigester (5:1) (250 ml) und schliesslich mit abs. Methylenchlorid: Essigester (3:1) (500 ml) und eluierte dabei 430 mg (84.3% bez. (1))

* 54 Die Herstellung erfolgte im wesentlichen nach Vorschrift von R. Wiederkehr. Diss. ETH, 1968. Die Verwendung von nur 2 Moläquivalenten P_2S_5 (statt 10), sowie eine modifizierte Aufarbeitung ergaben eine Ausbeutesteigerung.

* 55 Das Oel muss gut vom THF befreit werden, ansonst Phosphorverbindungen miteluiert werden.

* 56 Raney-Nickel, Fluka puriss, gebrauchsfertig unter Wasser. Die beschriebenen Ausbeuten wurden nur mit Raney-Nickel einer bestimmten Flasche erreicht. Für den obigen Ansatz und die Herstellung des deuterierten Raney-Nickels verwendete man Raney-Nickel derselben Flasche.

* 57 Natriumcarbonat, Merck, wasserfrei p. a.

dünnschichtchromatographisch *12 (Essigester) einheitliches, kristallines (+)-Keto-Thiolactam (14). Dieses Produkt wurde aus Methylenchlorid/Hexan umkristallisiert, wobei 402 mg 1. Kristallisat vom mp 139-140° und 17 mg 2. Kristallisat vom mp 138-139° erhalten wurden. Die beiden Kristallisate waren DC einheitlich.

Aus den Mischfraktionen der Säulenchromatographie konnten durch Dünnschichtchromatographie *12 und anschließende Kristallisation aus Methylenchlorid/Hexan weitere 9.5 mg Keto-Thiolactam vom mp 137-138° erhalten werden.

Ausbeute

1. Kristallisat	402 mg (1.575 mMol)	78.6 %	139-140°
2. Kristallisat	17 mg (0.0672 mMol)	3.3 %	138-139°
Aus Mischfraktion	9.5 mg (0.037 mMol)	1.8 %	137-138°
total	428.5 mg (1.6792 mMol)	83.7 %	bez. (+)-Keto-Lactam (1)

Das erhaltene Keto-Thiolactam war dünnschichtchromatographisch und IR-spektroskopisch mit dem von R. Wiederkehr *54 beschriebenen Material identisch, (R.W. 74.6%, mp 129-136°.)

Keto-Amin (10)

101.6 mg (0.4 mMol) kristallines (+)-Keto-Thiolactam (14) vom mp 139-140° wurden in einer Mischung von 9 ml Dioxan und 6 ml Wasser gelöst. In einem 100 ml Rundkolben wurden ca. 3.5 g Raney-Nickel *56 in 40 ml Dioxan/Wassergemisch (3:2) aufgeschlämmt und mit einem 2 cm langen Magnetrührer intensiv gerührt. Die (+)-Keto-Thiolactam-Lösung wurde im Verlaufe von 2 Minuten zugetropft und die Suspension während weiterer 40 Min. bei RT gut gerührt. Man liess das Raney-Nickel absetzen und filtrierte die überstehende Lösung durch Cellite in einen Kolben mit 1 ml 6n-Salzsäure/H₂O. Das Raney-Nickel wurde noch 2x mit 8 ml Dioxan-Wasser (3:2) aufgeschlämmt und die überstehende Lösung erneut abfiltriert. Das farblose Filtrat engte man am Rotationsverdampfer bei 40-50° ein und trocknete den Rückstand bei RT/0.1 Torr während 1h. Danach wog man 81 mg glasig erstarrtes, rohes (+)-Keto-Amin-Hydrochlorid (9) entsprechend 78 % bezüglich (+)-Keto-Thiolactam (14).

Das zurückgebliebene Raney-Nickel wurde während 10 Min. bei RT mit 10 ml 3n-Essigsäure verrührt. Man filtrierte die grüne, überstehende Lösung ab, fällte die Nickelsalze durch Zugabe von festem Natriumcarbonat *57 (bis pH 9) unter Eiskühlung und extrahierte die Suspension 4x mit eisgekühltem Methylenchlorid. Die Extrakte wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Filtrat mit einigen Tropfen methanolischer Salzsäure *39 versetzt. Nach Einengen am RV und Trocknung am HV resultierten weitere 12 mg (8,6% bez. (14)) rohes Keto-Amin-Hydrochlorid (9).

Die beiden Rohprodukte zeigten im DC *12 (Essigester:Methanol = 3:1) (Hydrochlorid des Keto-Amins direkt aufgetragen) das gleiche Bild:

Hauptfleck: Keto-Amin (10) *58 bei Rf 0.6, davor ein schwacher Nebenleck unbekannter Natur; schwacher Fleck am Start und davor (Rf ca 0.1) langgezogener mit Jod langsam anfärbender Fleck für (+)-Amino-Alkohol (15) (ca 20%; Identifizierung und Charakterisierung cf. unten).

Die beiden Rohprodukte wurden deshalb vereinigt und infolge der thermischen Instabilität des freien Keto-Amins (10) * 59 direkt als Hydrochlorid (9) ohne weitere Reinigung durch Oximierung nach der in 2.2.3.3. beschriebenen Vorschrift zum Amin-Oxim (11) umgesetzt.

* 58 freies (+)-Keto-Amin ist thermolabil. Es wurde deshalb in der stabileren, protonierten Form als Hydrochlorid isoliert.

* 59 Charakterisierung und Isolierung des freien (+)-Keto-Amins (10) (vgl. 2.2.3.3. und 2.2.2.).

Man erhielt 72 mg (75% bez. (14)) rohes Amin-Oxim, welches im DC *12 (Essigester/Methanol 1:2) einen langgezogenen Hauptfleck, einen ebenfalls langgezogenen Fleck am Start (Amino-Alkohol (15)), sowie zwei weitere schwache Flecken bei grösseren Rf-Werten zeigte.

Dieses Produkt wurde direkt der Fragmentierung zugeführt, wobei der Amino-Alkohol nicht störte und chromatographisch von Methyl-Imin abgetrennt werden konnte. Bei der Aufarbeitung wurde anstatt Polymerbase wässrige Base verwendet.

Fragmentierung

Die 72 mg des obig erhaltenen Oxims löste man in 40 ml Chloroform *48, leitete während 1 Min. unter Feuchtigkeitsausschluss trockenes HCl-Gas *49 in die Reaktionslösung ein, versetzte mit 4 ml (ca 100 Moläquivalente) Thionylchlorid *50 und liess das Reaktionsgemisch während 15 Min. bei RT stehen. Danach kühlte man dieses mit Eis, versetzte unter Rühren mit 25 ml 10-n Kaliumcarbonat-Lösung (starkes Aufschäumen) (Dauer ca 5 Min.). Nach weiteren 10 Min. bei 0° trennte man die organische Phase ab, wusch die Wasserphase 3x mit Chloroform und 1x mit Essigester. Die org. Phasen wusch man 1x mit gesättigter KCl-Lösung, vereinigte sie, trocknete über Natriumsulfat und entfernte die Lösungsmittel am RV. Nach Trocknung (RT/0.1 Torr) wog man 51 mg (bez. (14)) öliges Rohprodukt, das im DC *12 (Essigester/Methanol 3:1) neben dem Hauptfleck für Methyl-Imin (12) einen langgezogenen Flecken für Amino-Alkohol (15), sowie 2 weitere schwache Nebenflecken zeigte. Das Rohprodukt chromatographierte man auf einer frisch aktivierten Silikagel-Dickschichtplatte *14 (Essigester/Methanol 3:1) und eluierte mit Methylacetat 25.2 mg (28.4% bez. Keto-Thiolactam (14)) schwach gelbes Methyl-Imin. Durch Rechromatographie der Randzonen des obigen Chromatogramms erhielt man weitere 1.5 mg DC einheitliches Methyl-Imin. Die vereinigten chromatographierten Produkte destillierte man im Kugelrohr bei 110°/0.01 Torr. Man erhielt 25 mg (28.2% bez. (14)) DC einheitliches Methyl-Imin (12) als farbloses Oel. Die 25 mg Methyl-Imin aus dem obigen Ansatz wurden zusammen mit 17 mg Methyl-Imin gleicher Qualität (erhalten aus verschiedenen, gleich ausgeführten Ansätzen) vereinigt und auf neutralem Alox *53 (Benzol:Methylacetat 1:1) chromatographiert. Die Methyl-Imin haltige Zone unterteilte man in eine Mittelzone, eine vordere und hintere Randzone. Man eluierte mit Methylacetat aus der hinteren und vorderen Randzone zusammen 16 mg praktisch reines Methyl-Imin. Die Mittelzone enthielt 23 mg Methyl-Imin, das im Kugelrohr destilliert wurde. Von dieser öligen Probe liegen die folgenden Daten vor, welche mit den entsprechenden des unter 2. 2. 3. 3. beschriebenen Methyl-Imins übereinstimmen.

opt. Drehung (c = 0.615, Chloroform) 589 nm + 69.2°.

IR CHCl₃ Banden u. a. bei: 3020sh, 2955s, 2860w, 2250w, 1735s, 1645m, 1470m, 1440s, 1380s, 1305m, 1260m, 1165s, 995w cm⁻¹.

NMR CDCl₃ 4.27-3.75 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.55-3.00 (m, 1H),
A-60 2.65-1.50 (m, 10H), 0.95 (s, 3H) ppm.

Das obige NMR-Muster wurde nach Einengen des Lösungsmittels im Kühlschrank aufbewahrt. Dabei kristallisierte das Methyl-Imin erstmals (mp 38°). Das gesamte (incl. zurückgewonnene Material der Spektren) ölige, destillierte Material aus der Mittelzone wurde vereinigt und 2x aus Aether/Hexan bei -20° umkristallisiert, dabei erhielt man 15 mg grosse, farblose Kristalle mit mp 39-40°. Die folgenden Daten dieser kristallinen Probe stimmen mit den entsprechenden Daten des früher erhaltenen Methyl-Imins überein.

C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₂	ber.	C 64.84	H 8.16	N 12.60 %
MG: 222	gef.	C 64.39	H 8.11	N 12.43 %

NMR CDCl_3
HA - 100

geringe Verunreinigung bei 3.36 ppm (schwaches s), 1.26 ppm (schwaches breites Signal). Die Bandenauflösung ist in diesem Spektrum schlechter als die in Abb. 10 wiedergegebene. Insbesondere zeigt das Signal der Imin-Methylgruppe keine triplettoide Aufspaltung, sondern ist nur schwach verbreitert.
4.15-3.80 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.50-3.15 (m, 1H), 2.52-2.13 (m, 5H), 2.13-1.76 (m, 5H), darin Imin-Methyl-s 1.92, 0.95 (s, 3H) ppm.

MS 80°

223/3, 222/M⁺6, 191/16, 181/24, 149/23, 141/18, 108/43, 107/16, 106/6, 99/19, 95/9, 94/10, 85/7, 81/45, 80/10, 79/12, 74/9, 68/7, 67/17, 58/11, 56/14, 55/100, etc.

DC *12

Rf 0.39 (Methanol/Essigester 1:4)

(+)-Amino-Alkohol (15)

Zur Isolierung und Charakterisierung des (+)-Amino-Alkohols (15) wurde in einem analogen, gleich grossen Ansatz das rohe (+)-Keto-Amin-Hydrochlorid haltige Material (94 mg) mit Eis und 2 ml 2n Natriumcarbonat-Lösung versetzt, die Lösung mit Natriumchlorid gesättigt und 3x mit eiskaltem Methylenchlorid extrahiert. Der Extrakt wurde unter Kühlung über Natriumsulfat *10 getrocknet, bei 5-15^o am R V eingeeengt und der Rückstand während 3 Min. /0.1 Torr unter Eiskühlung getrocknet. Man erhielt 75 mg eines gelben Oeles, das man sofort auf einer Silikagel-Dickschichtplatte *14 (Methanol:Essigester 1:3) bei ca 0-3^o (Eiskühlung der Wanne) chromatographierte. Man eluierte mit kaltem Methylacetat aus der schneller wandernden Hauptzone (Rf ca 0.6) 41 mg (+)-Keto-Amin (10) (46% bez. (+)-Keto-Thiolactam (14)) und aus der langsameren Hauptzone (Rf ca 0.1) 20 mg (+)-Amino-Alkohol (15) (22% bez. (14)).

Zur weiteren Reinigung des Amino-Alkohols (15) wurde dieser im Gradientenrohr bei 0.01 Torr/100-110^o Ofentemperatur destilliert, das dabei anfallende rohe Kristallisat kristallisierte man aus Hexan und trocknete die anfallenden Kristalle während 15h am HV. Dieses Material zeigte folgende analytischen Daten.

(+)-Amino-Alkohol (15)

$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_3$	ber.	C 63.41	H 9.31	N 6.16 %
MG 227	gef.	C 63.11	H 9.14	N 5.90 %

IR CHCl_3

Banden u. a. bei: 3620w, 3340w breit, 3140wbreit, 2960s, 2875m, 1730s, 1435s, 1380m, 1340m, 1170m, 1065m, 1020m, 995m, 950w, 870w breit cm^{-1} .

NMR CDCl_3
A-60

4.0-3.79 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.25-2.95 (m, 1H), 2.76-2.50 (m, 1H), 2.40 (s, 2H), verschwindet bei Zugabe von D_2O), 2.38-1.47 (m, 7H), 1.08 (s, 3H), 0.91 (s, 3H) ppm.

MS 62°

228/5, 227/M⁺15, 212/9, 196/12, 182/6, 170/5, 169/25, 168/100, 154/6, 124/6, 111/8, 110/40, 109/13, 108/40, etc.

opt. Drehung

Chloroform, $c=0.595$, 598 nm + 16.8^o

mp

76 - 77^o (Hexan)

pK_{MCS}

8.28 (Methylcellosolve:Wasser = 8:2)

DC *12

Rf 0.2 (Methanol)

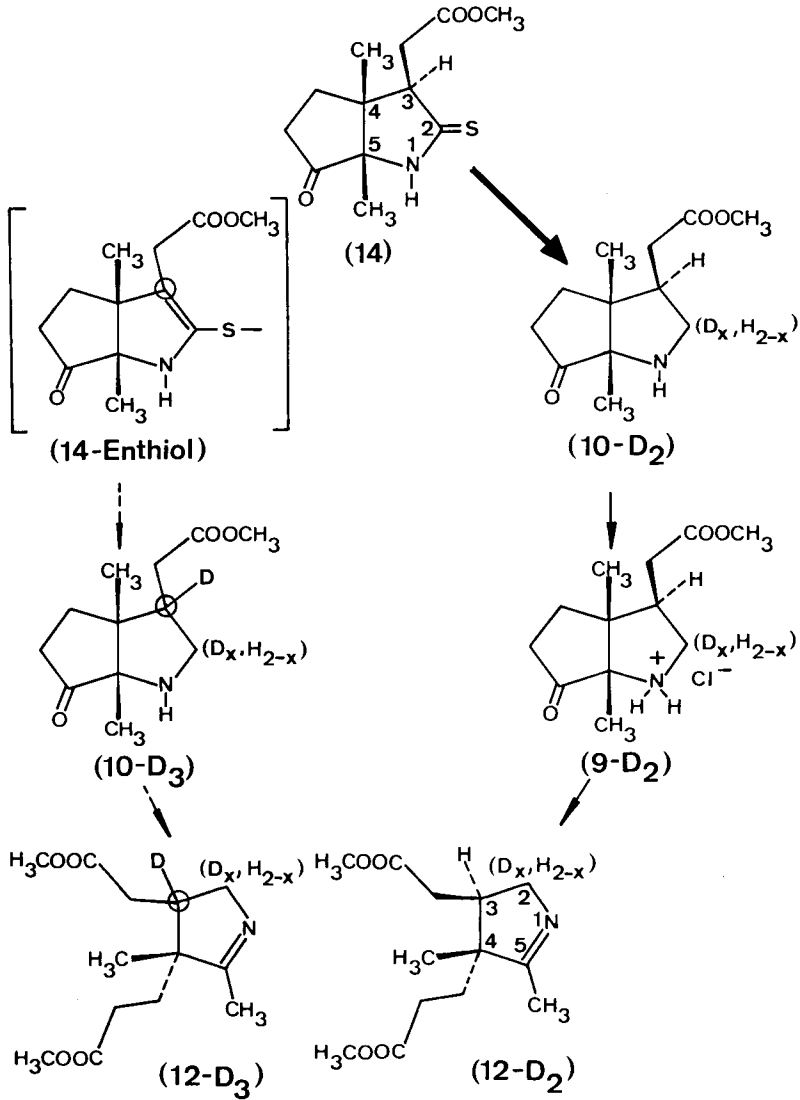
Anmerkung zur Raney-Nickel Reduktion

Bei Nachschubansätzen zur Produktion von Methyl-Imin (12) ergaben sich bei der Reduktion des Keto-Thiolactams (14) mit Raney-Nickeln gleicher Spezifikation *56 grosse Schwierigkeiten. Es war nicht mehr möglich die gleichen Ausbeuten zu erreichen. Der Grund für diese unterschiedlichen Ausbeuten lag in der verschiedenen Aktivität der verwendeten Raney-Nickel, selbstkäufliche Raney-Nickel *56 zeigen offenbar variierende Aktivitäten. Katalysatoren zu hoher Aktivität lieferten vorwiegend (+)-Amino-Alkohol (15), solche zu niedriger Aktivität reduzierten nur unvollständig. Die von Ansatz zu Ansatz verschiedene Qualität käuflicher, wie auch selbst hergestellter Raney-Nickel erlaubte nie eine reproduzierbare selektive Reduktion ohne Angriff der Keto-Funktion in (14). Es entstanden stets unterschiedliche Mengen an Amino-Alkohol (15). Es wurde deshalb die vorgängig beschriebene Methode unter Schutz der Keto-Funktion durch Ketalisierung (Ketal-Methode) entwickelt.

2. 2. 3. 2. Beweis der Nichtepimerisierung der Essigsäureseitenkette bei Reduktion mit Raney-Nickel.

Reduktion von Keto-Thiolactam (14) mit deuteriertem Raney-Nickel in Dioxan/D₂O.

Schema 2



Um zu beweisen, dass bei der Reduktion von Keto-Thiolactam (14) keine Epimerisierung der Essigsäureseitenkette am C-3 via eine Enolisierung auftritt, wurde (14) nach der vorher beschriebenen Methode mittels deuteriertem Raney-Nickel [38] zum Keto-Amin (10)-D₂ umgesetzt. Das gewonnene (10)-D₂ wurde als Hydrochlorid (9)-D₂ nach den bekannten Methoden via Oxim in Methyl-Imin (12) -D₂ überführt und dieses massenspektroskopisch und NMR-spektroskopisch untersucht.

Herstellung von deuteriertem Raney-Nickel

Ca 10g Raney-Nickel *56 (dieser Katalysator wurde schon erfolgreich zur Reduktion von Keto-Thiolactam (14) verwendet) wurden in 5 ml D₂O *60 aufgeschlämmt und während 30 Min. bei RT magnetisch gerührt. Danach dekantierte man das überstehende D₂O möglichst vollständig, gab erneut 5 ml D₂O zu und rührte wiederum während 30 Min. bei RT. Diese Behandlung wiederholte man mehrmals. Auf die Herstellung genuin deuterierten Raney-Nickels mittels NaOD/D₂O wurde wegen der Schwierigkeiten zur Herstellung eines Raney-Nickels mit der gewünschten Aktivität und der damit verbundenen Selektivität bei der Reduktion von Keto-Thiolactam (14) zum Keto-Amin (10) verzichtet.

Reduktion von Keto-Thiolactam (14) und Ueberführung in Dideuteromethylen-Methyl-Imin (12)-D₂.

Zur Reduktion wurde die oben wiedergegebene Vorschrift, zur Oximierung und Fragmentierung (Aufarbeitung mit Polymerbase) jene unter 2. 2. 3. 3. beschriebene befolgt. Man ging von 101.6 mg (0.4 mMol) (+)-Keto-Thiolactam (14) *54 aus und reduzierte mit 3.5 g deuteriertem (Deuterierungsgrad unbekannt) Raney-Nickel in 60 ml Dioxan/D₂O *60 (3:2). Nach der unter 2. 2. 3. 3. beschriebenen Oximierung resp. Fragmentierung erhielt man 9 mg (0.0405 mMol) (ca 10% bez. (14)) *61 2x chromatographiertes und 1x kugelrohrdestilliertes, farbloses, DC-einheitliches Dideuteromethylen-Methyl-Imin (12) -D₂. Dieses Produkt wurde mittels IR, NMR und MS charakterisiert.

Dideuteromethylen-Methyl-Imin (12) -D₂

<u>IR</u> CHCl ₃	geringe Intensitätsunterschiede im Bereiche 3100-2800 cm ⁻¹ . Identisch im Bereiche 2800-1300 cm ⁻¹ mit dem IR der undeutierten Probe (Abb. 9).
<u>NMR</u> CDCl ₃	4.20-3.80 (breites, nichtstrukturiertes Signal, 60±5% von 1 H (3 Integrationen), 3.67 (scharfes COOCH ₃ -s, 3H), 3.50-3.10 (breites, nicht strukturiertes Signal, 60±5% von 1 H (3 Integrationen), 2.70-2.05 (m, 5H), 2.05-1.70 (m, 5H), darin bei 1.92 (s-Imin-Methyl) Bande durch Wegfallen der long-range Kopplung gegenüber demselben Signal der undeutierten Spezies (Abb. 10) nicht mehr triplettoide, 0.95 (scharfes s, 3H) ppm.
HA-100	Auf Grund der breiten Multipletts bei 4.2-3.8 resp. 3.5-3.1 (herrührend vom AB-Teil des unter 2. 2. 2. beschriebenen ABX-Systems) berechnet sich der Deuterierungsgrad in der erhaltenen Probe zu 40±5%.
Abb. 12	Es sind keine Fremdsignale, welche auf Essigsäureseitenketten-Diastereomerenanteile hindeuten würden, feststellbar.

* 60 Deuteriumoxid, 99.8%, Fluka puriss.

* 61 Die geringe Ausbeute ist wahrscheinlich auf eine Desaktivierung des Raney-Nickels bei der D₂O-Behandlung zurückzuführen.

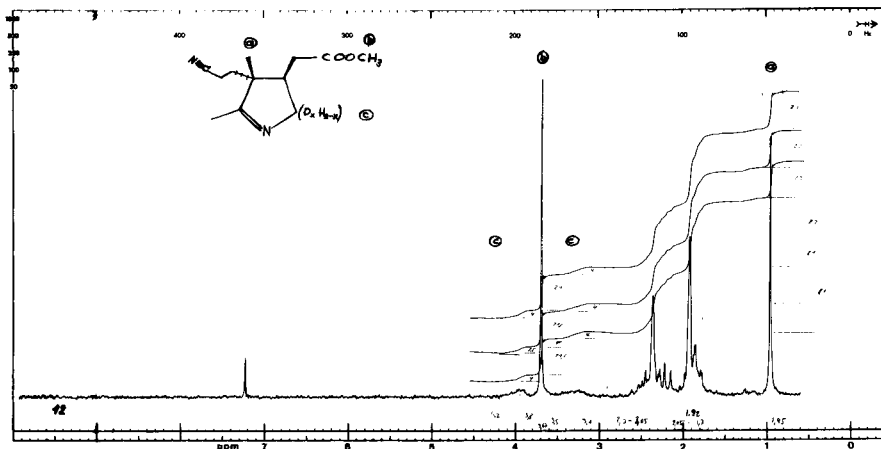


Abb. 12

Bestimmung der Deuteriumverteilung in Dideuteromethylen-Methyl-Imin (12)-D2 aus dem MS Spektrum *62

Dazu verwendete man das MS Spektrum der obig erhaltenen deuterierten Probe und dasjenige einer unter gleichen Bedingungen aufgenommen, nach der später beschriebenen Diol-Methode hergestellten, undeuterierten Probe.

<u>MS</u> 200 ⁰	225/0.25, 224/1.2, 223/1.7, 222/M ⁺ (D=0) 1.4, 194/1.25, 193/8.0, 192/12.9, 191/12.05 (M ⁺ (D=0)-Methoxi (31)), 184/2.8, 183/12.15, 182/19.9, 181/16.2 (M ⁺ (D=0)-Acetonitril (41)), 151/11, 150/21, 149/19, 144/1.18, 143/7.5, 142/13.9, 141/12.75 (M ⁺ (D=0)-Acetonitril, -CH ₂ CN-Radikal (81)) 124/11, 123/28, 122/49, 121/41, 110/28, 109/48, 108/46, 107/20, 100/15, 99/15, 96/13, 95/15, 94/12, 83/19, 82/42, 81/51, 80/16, 79/14, 74/19, 69/16, 68/18, 67/18, 59/22, 57/45, 56/91, 55/100.
<u>deuterierte</u>	
<u>Probe.</u>	

<u>MS</u> 200 ⁰	223/1.0, 222/M ⁺ 2.0, 194/0.11, 193/0.21, 192/1.77, 191/13.5 (M ⁺ -Methoxi (31)), 183/0.42, 182/3.7, 181/14.2 (M ⁺ -Acetonitril (41)), 149/19, 143/0.11, 142/1.03, 141/10.65 (M ⁺ -Acetonitril, -CH ₂ CN-Radikal (81)), 122/21, 121/28, 120/5, 109/16, 108/43, 107/15, 106/8, 99/14, 96/5, 95/9, 94/8, 84/6, 82/5, 81/38, 80/7, 79/9, 74/10, 69/5, 68/6, 67/11, 59/9, 55/100.
<u>undeuterierte</u>	
<u>Probe.</u>	

Grundsätzlich ergibt sich bei einer Substanz die nur aus undeuterierten (D₀), mono-deuterierten (D₁), dideuterierten (D₂) und eventuell trideuterierten (D₃) Anteilen besteht folgende Signalverteilung (Tabelle!), wobei der Einfachheit halber nur ¹³C als Isotop berücksichtigt worden war.

Tabelle 1

m/e	X	X+1	X+2	X+3	X+4
	<u>M Do</u>	$^{13}\text{C}(\text{M Do})$	$^{13}\text{C}(^{13}\text{C}(\text{M Do}))$		
		<u>M D1</u>	$^{13}\text{C}(\text{M D1})$	$^{13}\text{C}(^{13}\text{C}(\text{M D1}))$	
			<u>M D2</u>	$^{13}\text{C}(\text{M D2})$	$^{13}\text{C}(^{13}\text{C}(\text{M D2}))$
				<u>M D3</u>	$^{13}\text{C}(\text{M D3})$
	$\Sigma = I(X)$	$\Sigma = I(X+1)$	$\Sigma = I(X+2)$	$\Sigma = I(X+3)$	$\Sigma = I(X+4)$

Dabei bedeuten: - X, die Masse der undeuterten Spezies; X+1, die Masse des ^{13}C -Anteils der undeuterten Spezies (Symbol $^{13}\text{C}(\text{M Do})$) resp. die Masse der monodeuterten Spezies (D1); analog für X+2 etc.
 - I(X), etc., ist die Summe der Intensitäten der in Kolonne X angegebenen Spezies (analog für X+1 etc.). Dieser Wert wird direkt aus dem Spektrum abgelesen.

Zur Berechnung der Deuteriumverteilung ging man nach der von K. Biemann [39] beschriebenen Methode vor.
 Dazu verwendete man die 3 genau ausgemessenen Signalgruppen der oben aufgeführten Spektren um m/e 191 (M-Methoxy (31)), m/e 181 (M-Acetonitril (41)), und m/e 141 (M-Acetonitril (41), $-\text{CH}_2\text{CN}$ -Radikal (40), zusammen (-81)) der deuterierten Probe. Als Do-Muster (zur Subtraktion der Do-Anteile in der deuterierten Probe) verwendete man dieselben Signalgruppen der undeuterten Substanz (12). Die gemessenen Signalintensitäten sind in Tabelle 2 in Bezug auf die undeuterte Spezies (bei m/e 141, 181, 191 auf 100% normiert) angegeben.

Tabelle 2

Die Kolonne unter (12) bezieht sich auf undeutertes, jene unter (12)-D auf deuteriertes Methyl-Imin.

m/e (M-OCH ₃)			m/e (M-CH ₃ CN)			m/e (M-2CH ₃ CN)		
(12)-D	(12)		(12)-D	(12)		(12)-D	(12)	
191(X)	100.0	100.0	181(X)	100.0	100.0	141(X)	100.0	100.0
192(X+1)	107.0	13.1	182(X+1)	122.0	26.0	142(X+1)	107.0	9.6
193(X+2)	66.5	1.6	183(X+2)	75.3	3.0	143(X+2)	58.5	1.0
194(X+3)	10.5	0.8	184(X+3)	17.3	-	144(X+3)	9.3	-

Aus diesen Werten ergab sich nach K. Biemann [39] die mittlere Deuteriumverteilung in deuteriertem Methyl-Imin (12) zu:

Do:D1:D2:D3 = 40.3:38.5:20.5:0.5 (%), (Fehler ca 3%).

Daraus berechnet sich ein Deuterierungsgrad von $D = D1/2 + D2 + D3 = 40.25\%$.

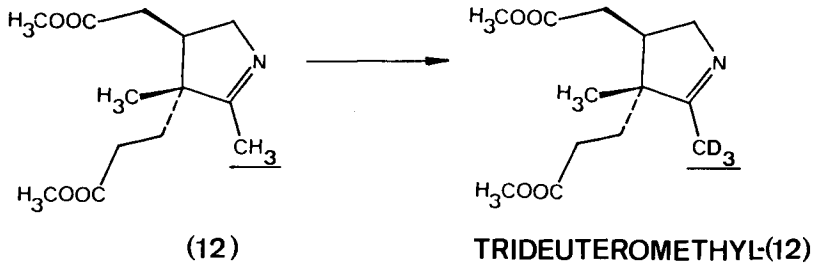
Dieser Wert stimmt recht gut mit dem aus dem NMR ermittelten (40±5%) überein * 62.

* 62 Ich danke Herrn Prof. J. Seibl für die Hilfe zur Auswertung der Massenspektren.

Diskussion

Bei einer Epimerisierung der Essigsäureseitenkette an Stelle C-3 (vgl. Schema 2) müsste die Zwischenstufe (14-Enthiol) durchlaufen werden, wobei diese durch Deuteronierung mit D_2O oder durch Reduktion mit deuteriertem Raney-Nickel an Stelle 3 zusätzliches Deuterium einbauen würde. Dies hätte das Auftreten wesentlicher Anteile von trideuteriertem Produkt (12- D_3) zur Folge. Die MS-Analyse des deuterierten Produktes zeigt jedoch, dass innerhalb der Fehlergrenze höchstens ca 3% trideuteriertes Methyl-Imin (12- D_3) entstanden war. Die Reduktion ist somit unter Retention der Konfiguration der Essigsäureseitenkette an Stelle 3 verlaufen.

Trideuteromethyl-Imin (Trideuteromethyl- (12)).



30 mg DC einheitliches Methyl-Imin (12) (hergestellt nach der Diol-Methode) wurden in 1 ml Tetradeuteromethanol (Merck AG, puriss., 99.7% D) während 24h bei RT stehen gelassen.

Eine IR-Probe davon (ca 2 mg) zeigte nach Entfernung des Lösungsmittels in Chloroform eine sehr schwache Absorption bei 2210 cm^{-1} (C-D Streckschwingung), eine ebenfalls schwache, neue Bande bei 1450 cm^{-1} , sowie zwei weitere stärkere Banden bei 1260 resp 1030 cm^{-1} .

Die Reaktionslösung wurde anschliessend weitere 24h bei RT stehen gelassen und hierauf während 2h unter Stickstoff unter Rückfluss erhitzt. Danach entfernte man das Lösungsmittel am WV und trocknete den Rückstand (RT/0.1 Torr). Das Produkt war DC-einheitlich. Im IR-Spektrum konnten keine weiteren Aenderungen festgestellt werden. Im NMR-Spektrum war ein deutlicher Intensitätsschwind des Imin-Methyl-Signals bei 1.95 ppm festzustellen. Der Deuterierungsgrad ergab sich aus dem Vergleich der Integrale für die anguläre Methylgruppe bei 0.95 ppm und den Signalhaufen von 2.05-1.70 ppm (undeutert 5H entsprechend) zu ca 60%. Man deuterte deshalb nach, dazu löste man das erhaltene partiell deutertierte Produkt erneut in 1 ml Tetradeuteromethanol und erhitzte die Lösung während 8h unter Stickstoff unter Rückfluss. Die gesamte Reaktionszeit ergab sich zu 48h RT und 10h Rückfluss. Der Deuterierungsgrad ergab sich nunmehr zu 80-90% auf Grund der obig erwähnten Integrale.

Mit diesem Material wurden Doppelresonanzexperimente durchgeführt. (Abb. 13 B).

Doppelresonanzexperiment an Trideuteromethyl -(12)

NMR CDCl_3 4.15-3.85 (m, 1H), 3.69 (s, 3H) (scharfes s der Methyl-estergruppe), 3.45-3.15 (m, 1H), 2.6-1.70 (m, ca 7.5H) darin bei 1.94 Restsignal des Imin-Methyls), 0.97 (scharfes Singlett der angulären Methylgruppe, 3H).

Diskussion: (vgl. dazu 2.2.2. und Abb. 10)
vicinale Methylenprotonen in α -Stellung zum Imin-Stickstoff: ABX-System:
A-Teil: m zentriert um 4.01 ppm, J_{AB} ca 16 Hz, J_{AX} ca 7 Hz.

B-Teil: m zentriert um 3.30 ppm, J_{AB} ca 16 Hz, J_{BX} ca 7 Hz.

Die long-range Kopplung mit der Imin-Methylgruppe fällt wegen der Deuterierung dieser Gruppe weg. Der AB-Teil des ABX-Systems ist durch dieses Wegfallen in der zu erwartenden Weise einfacher strukturiert.

Der X-Teil wurde durch das folgende Doppelresonanzexperiment (vgl. Abb. 13 B) um ca 2.5 ppm lokalisiert.

Einstrahlung im A-Teil bei ca 4.00 ppm (Einstrahlung (1)):

Vereinfachung der Signalstrukturierung der schwachen Signale um 2.5 ppm.

Einstrahlung im B-Teil bei ca 3.30 ppm (Einstrahlung (2)):

Vereinfachung der gleichen Signale um 2.5 ppm.

Einstrahlung im X-Teil bei ca 2.5 ppm (Einstrahlung (3)) (Kontrolle):

Vereinfachung der Signale des A- und B-Teils im Wesentlichen zu 2 breiten Dubletten zentriert um 4.0 ppm (A-Teil) mit J ca 18 Hz, resp. zentriert um 3.3 ppm (B-Teil) mit J ca 18 Hz. (Kopplungskonst. besser erkennbar).

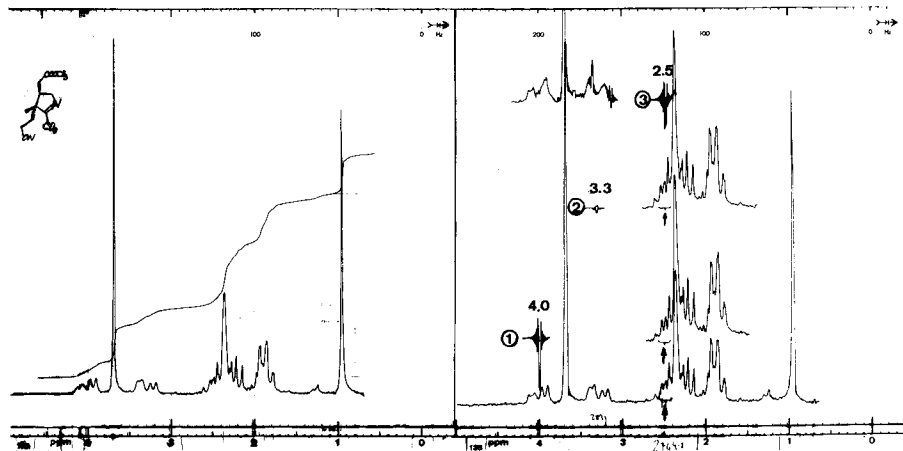


Abb. 13A

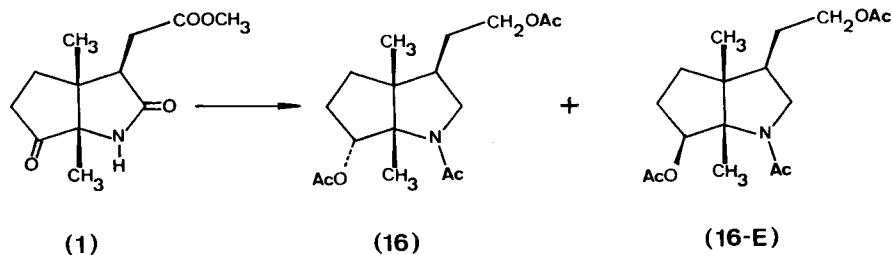
Abb. 13B

2.2.3.3. DIOL-METHODE, Versuche zur Synthese von Methyl-Imin (12) via eine erschöpfende Reduktion des (+)-Keto-Lactam-Esters (1).

(Experimente ausgeführt von P. Dubs und W. Fuhrer).

Dies war die erste Methode zur Synthese von (12), später wurde sie von den beiden anderen überholt).

(-)-N-Acetyl-Diacetat (16/16E)



1. 64 g (6.85 mMol) (+)-Keto-Lactam (1) *2 wurden in 150 ml Dimethoxiaethan *63 gelöst und bei RT portionenweise mit 1.52 g (41.2 mMol=6 Moläquivalente) Lithiumaluminiumhydrid * 64 versetzt (schwache Erwärmung). Die Suspension erhitze man für 30 h zum Rückfluss unter Stickstoff, kühlte danach und zerstörte überschüssiges

Lithiumaluminiumhydrid durch portionenweise Zugabe von Essigester. Das Reaktionsgemisch befreite man bei 40-50° am RV vom Lösungsmittel. Den grauen, pulverigen Rückstand nahm man in 180 ml Essigsäureanhydrid auf und erhitzte für 1h unter Stickstoff zum Rückfluss. Die abgekühlte Lösung filtrierte man zur Entfernung der Aluminiumsalze durch Cellite, entfernte das überschüssige Acetanhydrid bei 70-80° am RV, nahm den rotbraunen Rückstand in Eis und 30 ml 2-n Kaliumbicarbonatlösung auf und extrahierte die Wasserphase 2x mit 100 ml und 2x mit 80 ml kaltem Essigester. Die org. Extrakte wusch man 1x mit 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung, vereinigte sie, trocknete über Natriumsulfat und entfernte das Lösungsmittel bei 40-50° am RV. Nach Trocknung (1h/0.1 Torr) wog man 2.22 g rohes, spontan kristallisierendes N-Acetyl-Diacetat von rotbrauner Farbe. Dieses Produkt zeigte im DC *12 (Essigester) neben dem charakteristischen Doppelfleck für die beiden diastereomeren N-Acetyl-Diacetate Rf 0.26, Rf 0.35 einen Fleck an der Front, sowie zwei weitere schwache Flecken bei Rf 0.6 resp. Rf 0.4, letzterer von partiell reduziertem Edukt, nämlich Lactam-Diacetat (17), herrührend. Man chromatographierte an der 30-fachen Menge Kieselgel zuerst mit 180 ml Essigester, dann mit 750 ml Methylacetat und eluierte mit Methylacetat 1.62 g (72.4% bezügl. (1) dünnstichtchromatographisch reines Isomergemisch (16/16E) von schwach beiger Farbe. Das Gemisch bestand aus ca 5% Isomer 1 Rf 0.33 und ca 95% Isomer II Rf 0.28, wie auf Grund einer Dickschichtchromatographie-Analyse *14 (Methylacetat) gezeigt werden konnte. (Das Essigester-Eluat enthielt 490 mg (1.65 mMol)= 24% bezügl. (1) Lactam-Diacetat (17)). In einem Charakterisierungsansatz wurden die beiden isomeren Diacetate (16/16E), sowie das partiell reduzierte Edukt (17) dickschichtchromatographisch *14 (Methylacetat) getrennt. Vom Hauptprodukt (Isomer II, Rf 0.28), welches in langen Nadeln kristallisierte, gelangte eine 3x aus Aether/Hexan kristallisierte Probe vom mp 81-82° zur Analyse. Isomer I (Rf 0.33) liess sich nicht kristallisieren. Zur Analyse gelangte ein 2x chromatographisch gereinigtes Oel, welches 2 Tage bei RT am HV getrocknet wurde. Das partiell reduzierte Produkt (17) wurde 1x chromatographisch gereinigt und anschliessend 3x aus Aether/Hexan umkristallisiert. Die farblosen Nadeln vom mp 93-94° wurden über Nacht getrocknet (RT/0.1 Torr) und gelangten zur Analyse.

Ausbeute

N-Acetyl-Diacetat (16/16 E) 1.62 g (4.98 mMol) 72.4 % bez. (1)
 Lactam-Diacetat (17) 0.49 g (1.65 mMol) 24.1 % bez. (1)

(-)-N-Acetyl-Diacetat (Isomer II, Hauptprodukt, vermutlich (16) (kristallin)

$C_{17}H_{27}NO_5$ ber. C 62.75 H 8.36 N 4.30 %

MG 325 gef. C 62.75 H 8.39 N 4.25 %

IR $CHCl_3$ Banden u. a. bei: 3000m, 2990m, 1730s, 1640s, 1410s, 1370m, 1240s breit, 1130w, 1050m, 1030m cm^{-1} .

NMR $CDCl_3$ 5.28-5.16 (m, 1H), 4.15 (t, 2H, J=6.5Hz.), 3.92-3.04 (m, 2H), 2.35-1.40 (m, 7H, z. T. durch Methylsingulette verdeckt), 2.08 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 0.94 (s, 3H) ppm.

A-60

MS 200° 326/7, 325/M+ 27, 283/14, 282/72, 279/10, 266/9, 250/6, 241/16, 240/99, 226/14, 225/83, 224/100 etc.

opt. Drehung Chloroform, c=1, 589 nm - 80°.

mp 81-82° (3x aus Aether/Hexan)

DC *12 Rf 0.28 (Methylacetat)

(-)-N-Acetyl-Diacetat (Isomer I, vermutlich (16E)) (ölig).

C₁₇H₂₇NO₅ ber. C 62.75 H 8.36 N 4.30 %

MG 325 gef. C 62.41 H 8.21 N 4.24 %

IR CHCl₃ Banden u. a. bei: 3005m, 2990m, 1730s, 1645s, 1405s, 1385m, 1370m, 1230s breit, 1175w, 1030m cm⁻¹.

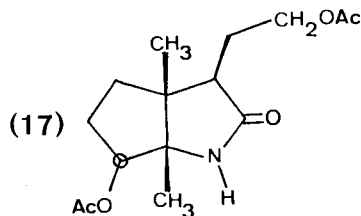
NMR CDCl₃ 5.52-5.36 (m, 1H), 4.08 (t, 2H, J=6.5 Hz), 3.72-3.10 (m, 2H), 2.03 (s, 6H), 1.97 (s, 3H), 2.00-1.38 (m, 7H, z. T. durch Methylsingulette verdeckt), 1.34 (s, 3H), 1.01 (s, 3H) ppm.

MS 105° 326/2, 325/M⁺6, 282/29, 240/44, 224/47, 223/48, 164/33, 138/60, 43/100 etc.

opt. Drehung Chloroform, c=1, 589 nm - 17°.

DC *12 Rf 0.33 (Methylacetat)

Lactam-Diacetat (17) partiell reduziertes Edukt



C₁₅H₂₃NO₅ ber. C 60.59 H 7.80 N 4.71 %

MG 297 gef. C 60.53 H 7.82 N 4.74 %

IR CHCl₃ Banden u. a. bei: 3430m, 3200w breit, 3005m, 2970m, 2880w, 1735s, 1695s, 1465m, 1450m, 1405m, 1385m, 1375m, 1365m, 1230s breit, 1035s cm⁻¹.

* 63 Dimethoxiaethan, Fluka purum, 1x über Natriumhydrid und 1x über Lithiumaluminiumhydrid unter N₂ destilliert.

* 64 Lithiumaluminiumhydrid, Metallgesellschaft Frankfurt.

NMR CDCl_3 5. 83 (breit, 1H), 4. 85 (t, 1H, $J=7$ Hz), 4. 35 (t, 2H, $J=7$ Hz),
A-60 2. 54-1. 72 (m, 7H, z. T. durch Methylsingulette verdeckt),
 2. 12 (s, 3H), 2. 08 (s, 3H), 1. 24 (s, 3H), 1. 07 (s, 3H) ppm.

MS 200° 298/0. 7, 297/ M^+ 2, 136/100. etc.

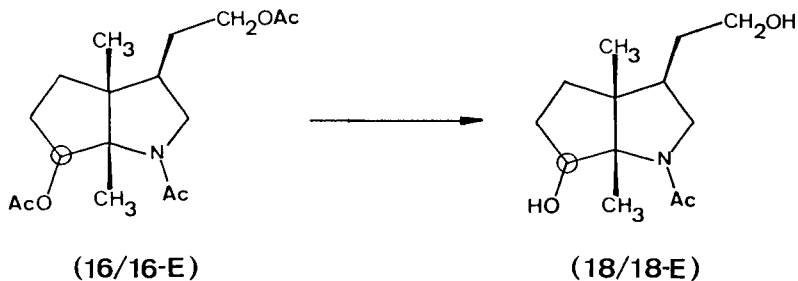
opt. Drehung Chloroform, $c=0.815$, 589 nm + 53°.

DC *12 Rf 0.39 (Methylacetat)

Diskussion

Die Reduktion der Lactam Funktion in (1) erfordert energische Bedingungen. Dies zeigt die vorwiegende Bildung von Lactam-Diacetat (17) in Vorversuchen bei der Reduktion mittels Lithiumaluminiumhydrid in siedendem Aether. Auch unter den beschriebenen Bedingungen wird stets partiell reduziertes Lactam-Diacetat (17) isoliert. Dieses Verhalten ist insofern bemerkenswert, als unsubstituierte Lactame mittels Lithiumaluminiumhydrid in siedendem Aether innert 3h in 60-96 % Ausbeute reduziert werden. [40]. Die Konfiguration des Hauptproduktes ist unbekannt. Ein β - Angriff des Hydrid-Ions auf das Keton dürfte aber sterisch begünstigt sein und deshalb vorwiegend zum α -Acetat führen. Die Konfiguration der Acetate ist allerdings für den Verlauf der Synthese irrelevant, da nach erfolgter Verseifung zum Diol (18) und nachfolgender Oxidation der Alkohol-Funktion beide Diastereomere dasselbe Produkt, N-Acetyl-Keton (8) liefern.

(-)-N-Acetyl-Diol (18)



2. 00 g (6. 16 mMol) chromatographiertes N-Acetyl-Diacetat (DC reines Diastereomerengemisch 16/16E) wurden in 150 ml Methanol und 150 ml 2. 5n-Kaliumcarbonatlösung gelöst und während 40h bei RT stehen gelassen. Danach entfernte man das Lösungsmittel am RV bis zur beginnenden Trübung, extrahierte die Wasserphase 2x mit 250 ml und 2x mit 200 ml kaltem Essigester und wusch die Extrakte mit je 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung. Die vereinigten Extrakte trocknete man über Natriumsulfat, entfernte das Lösungsmittel am RV bei 40-50° und wog 1. 58 g gelbes Oel, das im DC *12 (Essigester:Methanol 2:1) neben einem Hauptfleck mit Rf 0. 45 noch zwei schwache Nebenflecken mit kleineren Rf-Werten aufwies. Das rohe N-Acetyl-Diol wurde an der 30-fachen Menge Kieselgel mit 50 ml Essigester, dann mit 125 ml Methanol:Essigester (1:2) chromatographiert. Dabei eluierte man 1. 34 g *65 reines N-Acetyl-Diol als Diastereomerengemisch (18/18E), welches direkt der Oxidation zugeführt wurde.

Ausbeute

N-Acetyl-Diol (18/18E) 1.34 g (5.56 mMol) 90.3% bez. (16/16E).

In einem Charakterisierungsansatz wurde das N-Acetyl-Diol ausgehend von 460 mg reinem N-Acetyl-Diacetat, Isomer II (Rf 0.28) hergestellt. Nach chromatographischer Reinigung erhielt man 315 mg (92 % bez. (16)) DC-einheitliches N-Acetyl-Diol (18). Eine Probe davon destillierte man bei 180°/0.01 Torr im Kugelrohr. Diese Probe gelangte zur Analyse. Kristallisationsversuche schlugen fehl.

N-Acetyl-Diol (18), (vermutlich α -Konfiguration der sek. Alkoholgruppe)

C₁₃H₂₃NO₃ ber. C 64.70 H 9.61 N 5.80 %

MG 241 gef. C 64.41 H 9.66 N 5.70 %

IR CHCl₃ Banden u. a. bei: 3670w, 3620w, 3400m breit, 3000s, 2975s, 2880m, 1610s, 1450s Schulter, 1420s, 1385m, 1370m, 1355w, 1305w, 1220m, 1050m, 1030m Schulter cm⁻¹.

NMR CDCl₃ 4.20 (m, 1H), 4.08 (breit, 1H, verschwindet bei Zugabe von D₂O), 3.84 - 3.41 (m, 3H, Zugabe von D₂O bewirkt Intensitätsschwund bei 3.62 ppm), 3.26 (t, 2H, J=10Hz), 2.44-1.16 (m, 7H, z. T. durch Methylsingulette verdeckt), 2.10 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 0.92 (s, 3H)ppm.

MS 200° 242/1.2, 241/M⁺ 4, 223/44, 180/27, 164/34, 153/20, 136/29, m/e ≥ 15% 124/17, 123/30, 112/29, 111/82, 110/85, 43/100 etc.

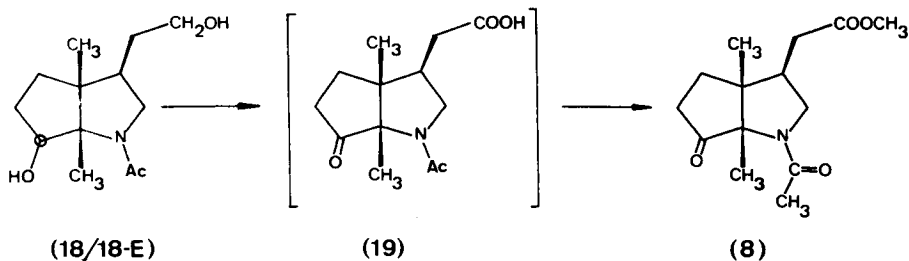
opt. Drehung Chloroform, c=1.1, 589 nm - 105°.

DC *12 Rf 0.45 (Essigester:Methanol=2:1)

* 65 N-Acetyl-Diol (18) hält auch bei Trocknung am HV Essigester zurück (Carbonylbande im IR-Spektrum). Es wurde deshalb mehrmals mit Methylencchlorid eingeeengt und erneut am HV getrocknet.

* 66 Jones-Reagens, 26.7 g Chromsäureanhydrid (CrO₃) gelöst in 23 ml konz. Schwefelsäure mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt (2.67 mMol CrO₃/ml).

N-Acetyl-Keton (8)



785 mg (3,26 mMol) DC-einheitliches (chromatographiertes Epimerengemisch) N-Acetyl-Diol (18) wurden in 200 ml Aceton gelöst und die Lösung auf 0° gekühlt. Im Verlaufe von 10 Min. tropfte man 4,8 ml (ca 2 Moläquivalente) Standard-Jones Reagens *66 unter intensivem Rühren zu. Dabei bildete sich vorerst ein flockiger Niederschlag, der sich im Verlaufe der Reaktion an den Wänden festsetzte. Nach einer Reaktionszeit von 1h bei 0° wurde der Ueberschuss an Jones-Reagens mit 3 ml Isopropanol zerstört und das Reaktionsgemisch am RV bei RT auf ca 50 ml eingengt. Man setzte 25 ml Wasser zu, pufferte die klare dunkelgrüne Lösung mit sekundärem Natriumphosphat *68 auf ca pH 1,5 und engte am RV bei RT auf ein Volumen von ca 30 ml ein.

Die Lösung sättigte man mit Natriumchlorid und extrahierte 5x mit 50 ml Essigester. Die Extrakte wusch man mit je 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung, trocknete über Natriumsulfat *10 und entfernte das Lösungsmittel am RV bei 40-50°. Nach Trocknung (RT/0,1 Torr/über Nacht) wog man 503 mg gelbe, amorphe N-Acetyl-Ketosäure (19).

Die vereinigten wässrigen Phasen wurden über Nacht mit Chloroform extrahiert *67, wobei weitere 190 mg rohe N-Acetyl-Ketosäure isoliert wurden. Die beiden Rohprodukte waren IR-spektroskopisch identisch. Eine schwache Bande bei 3620 cm⁻¹ deutete auf unvollständig oxidiertes N-Acetyl-Diol hin. Die Rohprodukte wurden vereinigt und verestert. Dazu löste man die 693 mg N-Acetyl-Ketosäure in 30 ml Methanol und versetzte unter Eiskühlung und Rühren mit 25 ml (ca 2 Moläquivalente) einer 0,3-m ätherischen Diazomethanlösung *69. Nach 10 Min. entfernte man das Lösungsmittel am RV bei 30-40°, trocknete das gelbe Öl während 2h/RT/0,1 Torr und wog 730 mg rohes N-Acetyl-Keton, das im DC *12 (Methylacetat) neben dem Hauptfleck bei Rf 0,4 einen starken Fleck am Start, sowie drei weitere Nebenflecken bei Rf 0,3, Rf 0,5 und Rf 0,8 aufwies. Man chromatographierte das Roh-

* 67 Kontinuierliche Extraktion, verwendet wurde ein flüssig-flüssig-Extraktor für Lösungsmittel schwerer als Wasser.

* 68 sekundäres Natriumphosphat, Na₂HPO₄, Merck p. a.

* 69 Diazomethan, hergestellt nach Org. Synth. Coll. Vol IV, 250.

produkt an der 100-fachen Menge Kieselgel zuerst mit 200 ml Essigester, dann mit 600 ml Methylacetat und eluierte mit Methylacetat 364 mg reines (-)-N-Acetyl-Keton (8).

Als polarste Fraktion eluierte man mit Methanol/Essigester (1:1) 248 mg eines gelben Oeles, das sich im IR und NMR-Spektrum als ein Gemisch von N-Acetyl-Diol (18) und N-Acetyl-Keto-Alkohol (20) erwies. (Verhältnis nach NMR-Spektrum: (18):(20) = 1:2). Dieses Gemisch wurde ohne weitere Reinigung der Nachoxidation unterworfen. Zur Charakterisierung des N-Acetyl-Ketons (8) gelangte ein nochmals dickschichtchromatographiertes *14 (Methylacetat) und anschliessend bei 130°/0.01 Torr im Kugelrohr destilliertes farbloses Oel, das nicht kristallisiert werden konnte.

(-)-N-Acetyl-Keton (8)

$C_{14}H_{21}NO_4$ ber. C 62.90 H 7.92 N 5.24 %

MG 267 gef. C 61.28 H 7.76 N 5.42 %

IR $CHCl_3$ (identisch mit dem IR des nach der Ketal-Methode erhaltenen (-)-N-Acetyl-Ketons (8)).
Banden u. a. bei: 3020 m Schulter, 3000s, 2970m, 2880w, 1745s, 1735s, 1650s, 1615s, 1435s, 1405s, 1370m, 1360m, 1325m, 1300m, 1215m breit, 1170m, 1100w, 995w cm^{-1} .

NMR $CDCl_3$ (identisch mit dem NMR (A-60) des nach der Ketal-Methode erhaltenen (-)-N-Acetyl-Ketons (8)).
Auf Grund der Signale bei 0.97 und 1.00 ppm handelt es sich bei (8) um ein Gemisch zweier rotamerer Acetamide im Verhältnis ca 1:1. (vgl. 2. 2. 2.)
3.98-3.08 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 2.67-1.07 (m, 7H, z. T. durch Methylsingulette überlagert), 2.29 (s, ca 1.5H), 2.09 (s, ca 1.5H), 1.55 (s, ca 1.5H), 1.45 (s, ca 1.5H), 1.00 (s, ca 1.5H), 0.97 (s, ca 1.5H) ppm.

MS 200° 268/1, 267/ M^+ 4, 212/8, 211/45, 194/14, 139/9, 138/85, 108/9, 97/9, 96/100, etc.

opt. Drehung Chloroform, c=1 589 nm - 104°.

DC *12 Rf 0.30 (Methylacetat)

Aus einer Nachoxidation des oben erhaltenen N-Acetyl-Diol- und N-Acetyl-Keto-Alkohol-Gemisches nach der beschriebenen Methode zur Oxidation des N-Acetyl-Diols (18), erhielt man ausgehend von den 248 mg Alkoholgemisch (18)/(20) weitere 117 mg reines N-Acetyl-Keton (8).

Ausbeute: (-)-N-Acetyl-Keton (8)

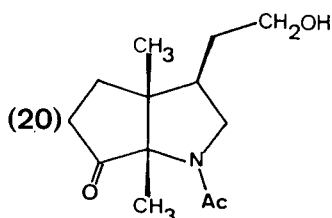
Hauptansatz	364 mg (1.363 mMol)	41.9 % bez. Diol (18)
Nachoxidation	117 mg (0.438 mMol)	13.4 % bez. Diol (18)
total	481 mg (1.801 mMol)	55.3 % bez. Diol (18)

Nebenprodukt: N-Acetyl-Keto-Alkohol (20)

1x dickschichtchromatographiert *14
(Essigester/Methanol (1:1))

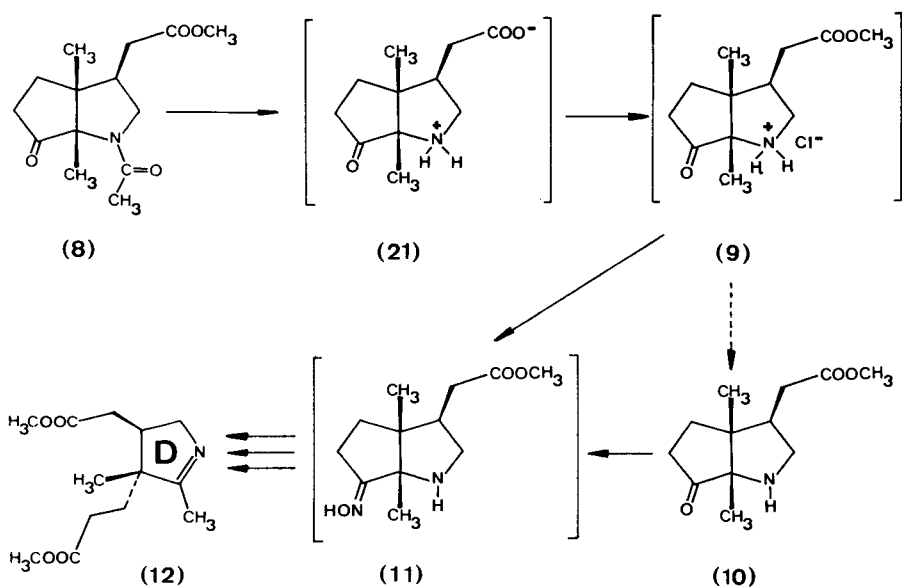
IR CHCl_3

Banden u. a. bei 3620w, 3400w, 3000m, 2880m, 1745s, 1615s, (Acetamid), 1410m, 1355m, 1220 breit, 1055 cm^{-1} .



Diskussion: Die unbefriedigende Ausbeute der Chromsäureoxidation war ein Grund, weshalb eine neue Synthesevariante gesucht wurde. Versuche zur Ausbeutesteigerung misslangen an der generellen Schwierigkeit primäre Alkohole zu den entsprechenden Carbonsäuren zu oxidieren. Dies wird auch im vorliegenden Falle durch die stets vorhandene Menge an partiell oxidiertem N-Acetyl-Keto-Alkohol (20) dokumentiert. Höhere Temperaturen oder längere Reaktionszeiten führten zu keiner Ausbeutesteigerung.

Methyl-Imin (12) aus N-Acetyl-Keton (8) (vgl. die modifizierte, definitive Methode unter 2. 2. 2.).



218 mg (0.817 mMol) DC-einheitliches N-Acetyl-Keton (8) wurden in 8 ml Methanol gelöst, mit 6 ml 1n-Natronlauge *70 (ca 8 Moläquivalente) versetzt und während 22h am Rückfluss erhitzt. Im UV Spektrum konnte nach Beendigung der Reaktion nur Endabsorption festgestellt werden (keine Aldolisierung). Das Reaktionsgemisch engte man am RV bei 30-40° auf ca 5 ml ein, pufferte die wässrige Phase mit festem primärem Natriumphosphat *71 auf pH 7 und entfernte das Lösungsmittel bei 30-40° am RV vollständig. Hierauf nahm man den kristallinen Rückstand noch 2x in ca 5 ml Methanol auf und engte jeweils erneut ein. Der Rückstand, bestehend aus

einem Gemisch anorganischer Phosphate und der Keto-Aminosäure (21) wurde 3x mit warmem Methanol extrahiert und die Extrakte durch Cellite filtriert. Nach Entfernung des Lösungsmittels am RV bei 40-50° und Trocknung (10Min. /RT/0.01 Torr) wog man 265 mg amorphes, gelbliches Produkt aus Keto-Aminosäure (21) und anorganischem Material bestehend.

Dieses Produkt wurde ohne weitere Reinigung verestert. Dazu löste man es in 22 ml 4n methanolischer Salzsäure*39, versetzte mit 0.7 ml Orthoameisensäuretrimethylester *3 und erhitze für 3h zum Rückfluss. Nach Abkühlung filtrierte man die trübe Lösung durch Cellite, entfernte das Lösungsmittel am RV, nahm erneut 3x in wenig Methanol auf und engte jeweils vollständig ein. Nach Trocknung wog man (20Min. /RT/0.1 Torr) 299 mg semikristallines Keto-Amin-Hydrochlorid (9).

Dieses Produkt wurde infolge der thermischen Instabilität *58 des freien Keto-Amins (10) nicht zum Keto-Amin aufgearbeitet (Charakterisierung von freiem (10) cf unten), sondern direkt der Oximierung zugeführt:

Dazu löste man die 299 mg rohes Keto-Amin-Hydrochlorid (9) in 50 ml Methanol, versetzte mit 266 mg (ca 5 Moläquivalente) Hydroxylamin-Hydrochlorid *44 und 672 mg (ca 10 Moläquivalente) wasserfreiem Natriumacetat *43 und erhitze für 45 Min. zum Rückfluss. Hierauf entfernte man das Lösungsmittel bei 30° am RV, nahm den Rückstand in wenig Eis und 15 ml 2n-Natriumcarbonatlösung auf und extrahierte *46 1x mit 70 ml und 3x mit 50 ml kaltem Essigester. Die Extrakte wusch man mit 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung, vereinigte sie und trocknete über Natriumsulfat. Nach Entfernung des Lösungsmittels am RV und Trocknung (über Nacht/0.1 Torr/RT) wog man 173 mg langsam kristallisierendes Amin-Oxim (11).

Im DC*12 (Essigester:Methanol 1:2) wies das Produkt einen langgezogenen Hauptfleck bei Rf 0.25 (möglicherweise syn- und anti-Oxim im gleichen Fleck), sowie einen schwachen Nebenfleck bei Rf 0.4 auf. Das Produkt war IR-spektroskopisch identisch mit einer 1x dickschichtchromatographisch gereinigten Probe. Allerdings ist die chromatographische Reinigung mit Schwierigkeiten verbunden. Das Produkt verfärbt sich stets wieder und zeigt im DC Nebenprodukte an. Auf eine vollständige Charakterisierung wurde deshalb verzichtet (vgl. die Daten unter 2.2.2.).

IR CHCl_3 Banden u. a. bei: 3580w, 3340w breit, 2960m, 2870m, 1730s, 1600w, 1435m, 1380m, 1370m, 1345m, 1320m, 1290m, 1170m, 995m, 930m breit cm^{-1} .

Ausbeute

Amin-Oxim (11) 173 mg (0.722 mMol) 88.2 % (88-93%) bez. N-Acetyl-Keton (8).

Zur Charakterisierung des Keto-Amins (10) wurde das rohe Hydrochlorid (9) mit Eis und 5n-Natriumcarbonatlösung versetzt, die wässrige Phase 3x mit kaltem Essigester extrahiert und die Extrakte mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Entfernung des Lösungsmittels

* 70 1n-Natronlauge, Titrisol Merck.

* 71 primäres Natriumphosphat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, Merck p. a.

am RV bei 30-40° erhielt man rohes Keto-Amin (10), das dickschichtchromatographisch *14 (Essigester: Methanol 1:1) gereinigt wurde. Zur Analyse gelangte ein bei 40-50°/0.01 Torr sublimiertes *42 farbloses Produkt, das in Plättchen kristallisierte und einen mp von 57-58° aufwies. Im DC *12 (Essigester:Methanol 1:1) war dieses Produkt einheitlich.

(+)-Keto-Amin (10)

$C_{12}H_{19}NO_3$	ber.	C 63.97	H 8.50	N 6.22 %
MG 225	gef.	C 63.70	H 8.45	N 6.19 %
<u>IR</u>	$CHCl_3$	Banden u. a. bei: 3320w, 3020m, 2955s, 2880w, 1735s, 1460m, 1445m, 1435s, 1385m, 1365m, 1320m, 1295m, 1170s, 1100w, 1050m, 995m cm^{-1} .		
<u>NMR</u>	$CDCl_3$ A-100	3.70 (s, 3H), 3.38-3.09 (m, 1H), 2.77-1.40 (m, 9H), 1.03 (s, 3H), 0.98 (s, 3H) ppm.		
<u>MS</u>	200°	226/1.6, 225/M ⁺ 1.5, 197/4, 194/5, 170/4, 169/32, 108/8, 97/9, 96/100, etc.		
<u>opt. Drehung</u>		Chloroform, c= 0.58, 589 nm + 69°, 546 nm + 84.5°, 436 nm + 150°, 405 nm + 286°, 365 nm + 644°.		
<u>PK</u>	MCS	6.41 (Methylcellosolve/Wasser= 8:2)		
<u>mp</u>		57 - 58° (sublimiert)		
<u>DC</u>	*12	Rf 0.50 (Essigester:Methanol= 1:1)		

(+)-Methyl-Imin (12)

173 mg (0.72 mMol) rohes Amin-Oxim (11) (gemäss DC mit schwacher Verunreinigung unbekannter Natur mit Rf 0.4 (Essigester:Methanol= 1:2)) löste man in 80 ml Chloroform *48 und leitete unter Feuchtigkeitsausschluss während 1 Min. trockenes HCl-Gas *49 in die Lösung ein. Hierauf versetzte man unter Stickstoff mit 5 ml Thionylchlorid *50 (ca 100 Moläquivalente) und liess die schwach gelbe Lösung während 15 Min. bei RT stehen. Anschliessend entfernte man das Chloroform und überschüssiges Thionylchlorid am RV und trocknete *51 den braunen Rückstand (10 Min./RT/0.1 Torr). Man löste erneut in 60 ml Chloroform *48, setzte 1.7 g Piperidino-Methyl-Polystyrol *52 (3.92 mAeq/g, entsprechend ca 6.6 mAeq. Base) zu und rührte die Suspension während 30 Min. bei RT. Danach filtrierte man durch Cellite, wusch die Polymerbase mehrmals mit Chloroform nach und engte das Filtrat am RV bei 30-40° ein. Nach Trocknung (20 Min./RT/0.1 Torr) wog man 149 mg rohen, rotbraunen Ring-D. Im DC *12 (Essigester:Methanol 3:1) sind neben dem starken Hauptfleck bei Rf 0.5 mehrere schwache Nebenflecken bei kleineren Rf-Werten erkennbar.

Das Rohprodukt wurde deshalb dickschichtchromatographisch *14 (Essigester:Methanol 5:1) gereinigt. Man eluierte mit Methanol 98 mg schwachgelbes Methyl-Imin, welches im DC unmittelbar hinter dem Hauptfleck eine schwache Verunreinigung anzeigte. Kugelrohrdestillation dieses Produktes (110°/0.01 Torr) ergab 92 mg farbloses Oel, das die erwähnte Verunreinigung, wenn auch schwächer, immer noch aufwies.

Ausbeute *72

(+)- Methyl-Imin 92 mg (0.415 mMol) 57.4% bez. Amin-Oxim (11)
50.7% bez. N-Acetyl-Keton (8)

In einem Charakterisierungsansatz, ausgehend von 100 mg dickschichtchromatographisch gereinigtem Amin-Oxim (11), erhielt man 68 mg (0.306 mMol) 73.5% bez. (11) 1x dickschichtchromatographiertes, DC-einheitliches Methyl-Imin (12). Eine bei 100°/0.01 Torr kugelrohrdestillierte Probe gelangte als Oel zur Analyse.

(+) Methyl-Imin (12)

$C_{12}H_{18}N_2O_2$ ber. C 64.84 H 8.16 N 12.60 %

MG 222 gef. C 64.35 H 8.25 N 12.55 %

IR $CHCl_3$ (identisch mit IR-Spektrum aus beiden anderen Methoden)
Banden u. a. bei: 3020m Schulter, 2955s, 2860w, 2250w, 1730s, 1645m, 1470m, 1440s, 1380s, 1305m, 1260m, 1220m breit, 1165s, 995w cm^{-1} .

NMR $CDCl_3$ (identisch mit T-60 Spektrum aus krist. (12) erhalten nach der
A-60 Ketal-Methode)
4.27-3.85 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.52-3.18 (m, 1H), 2.78-2.18 (m, 5H), 2.10-1.74 (m, 5H), 0.98 (s, 3H) ppm.

MS 200° cf unter 2.2.3.2.

opt. Drehung Chloroform, $c = 1.85$, 589 nm + 70°

DC *12 Rf 0.39 (Essigester:Methanol = 4:1)

Diese Fragmentierungsbedingungen sind das Resultat eingehender Vorversuche mit den verschiedensten Reagenzien. Thermisch induzierte Fragmentierungen in Anlehnung an die von R. Wiederkehr [7] ausgeführten Versuche mit dem Oxim (11) lieferten nur komplexe Substanzgemische. Dies ist in Kenntnis der Thermolabilität des Amin-Oxims (11) nicht erstaunlich. Fragmentierungen mit Reagenzien, welche eine Aktivierung der zu eliminierenden Oxim-Hydroxylgruppe im Sinne einer Beckmann-Fragmentierung 2. Art bewirken, ergaben entweder komplexe Substanzgemische oder im besten Falle schlechte Ausbeuten.

Folgende Reagenzien wurden erfolglos verwendet:

- a) p-Toluolsulfochlorid in Pyridin; liefert vorwiegend N-Tosyliertes Produkt.
- b) Diphenylcarbodiimid
- c) Mesylchlorid
- d) Dimethylchlorsilan

Der schliesslich gewählte Weg, Fragmentierung des protonierten Amin-Oxims (11. HCl) mit Thionylchlorid in Chloroform und anschliessende Behandlung mit Polymerbase, führte erstmals zu einem präparativ befriedigenden Erfolg.

* 72 Später erwies sich die Reinigung auf neutralem Alox *53 (cf. unter 2.2.2.) gegenüber der obig beschriebenen überlegen.
Ausgehend von einem dickschichtchromatographisch gereinigten Amin-Oxim (11) erzielte man Fragmentierungsreinausbeuten von 70-80%.

2.3. 5,15-BIS-NOR-COBYRINSAEURE-PENTAMETHYLESTER-c-LACTON-f-NITRIL

2.3.1. Lactonisierung von 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril (22)

Vorbemerkung

Die Beschreibung der Lactonisierungsstufe wird folgendermassen gegliedert:

1. Lactonisierung von Amid-nitril-cobalt-corrin, LLC-Fractionen 1-3. (typischer Nachschubansatz der Prä-Boston-Periode)
Lactonisierung der einzelnen LLC-Fractionen.
2. Lactonisierung von Amid-nitril-cobalt-corrin, LLC-Fractionen 1-3. (typischer Nachschubansatz der Post-Boston-Periode)
3. Charakterisierung der 4 diastereomeren Lacton-nitrile. (separate Lactonisierung der 8 diastereomeren Amid-nitrile)
4. Lactonisierung der Amid-nitril Fraktion $\alpha\alpha/\alpha\alpha\beta$ und präparative Trennung der $\alpha\cdot\alpha$ und $\alpha\cdot\beta$ Lacton-nitrile mittels LLC.
5. Isomerisierung von Lacton 2 (LLC-Fraktion 2 ($\beta\cdot\alpha/\beta\cdot\beta$)) zu Lacton 1 (LLC-Fraktion 1 ($\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta$)).

Die Bezeichnung der Isomeren folgt der von W. Fuhrer ([13], Seite 81) ursprünglich gewählten Nomenklatur. Die Isomerenzuordnung wird vorweggenommen und in 2.3.3.4. diskutiert.

Die Bezeichnung α und β folgt der üblichen Konvention (α unterhalb, β oberhalb der Molekülebene liegende Substituenten.)

Die Reihenfolge der Symbole bezeichnet die Stellung der Carbomethoxiseitenketten an den Positionen C-3, C-8, C-13 im Corrinssystem. Im Falle der Lacton-nitrile (23) wird die obligate C-8 α -Konfiguration für die Propionylseitenkette mit einem Punkt symbolisiert (ZB. $\alpha\cdot\alpha$).

Zur Mengenbestimmung verwendete man den arbeitshypothetischen ϵ -Wert von 12000 bezüglich der längstwelligsten Absorptionsbande im UV/VIS-Spektrum. Diese lag in Routinespektren (Lösungsmittel: Benzol) je nach Zustand des Gerätes (PE 402) zwischen 564-572 nm für das $\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta$ Lacton-Epimerengemisch (Lacton 1) und zwischen 576-584 nm für das $\beta\cdot\alpha/\beta\cdot\beta$ Lacton-Epimerengemisch (Lacton 2). Diesem ϵ -Wert liegen die Werte von krist. $\alpha\cdot\beta$ -Lacton (ϵ Benzol/575 = 11590) und krist. $\beta\cdot\alpha$ -Lacton (ϵ Benzol/582 = 10980) zugrunde.

Rückschau auf die Information aus den Prä-Boston Lactonisierungsansätzen

Erarbeitung der Lactonisierungsbedingungen

Ende Februar 1971 führte P. Schneider die ersten Versuche zur Lactonisierung von 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid (hergestellt durch klassische A-B Cyclisierung, beschrieben: P. Schneider [11], Seite 123) aus.

Man verwendete als Oxidationsmittel: eine 0,02m Lösung von Jod in Essigsäure (2-10 Moläquivalente); als Lösungsmittel: Essigsäure, Diglym und DMF (mit und ohne katalytische Mengen von Trifluoressigsäure); Temperaturen: zwischen RT und 100⁰, sowie Reaktionszeiten von 2/2 - 18 h.

Man erhielt jeweils ein Reaktionsprodukt, welches stets variierende Mengen an erwarteten Lactons, neben noch unumgesetzten Edukts enthielt. Die besten Bedingungen waren: ca. 0,75 mMolare Eduktlösung in DMF, 4 Moläquivalente einer 0.02m Lösung von Jod in Essigsäure, während 3.75-4h auf 95-96° erhitzt.

Nach diesen Bedingungen lactonisierte man am 15.3.1971 erstmals 2.7 μ Mol 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid (hergestellt von P. Schneider ([11], Seite126-135) (beschrieben in [11], Seite123) durch A-B Cyclisierung) und erhielt nach TLC-Chromatographie ca 55% Lacton und 29% Edukt.

Lactonisierung von 5,15-bis-nor-Cobester lieferte unter den gleichen Bedingungen nur ca 28% Lacton, aber 50% Edukt.

Am 25.5.1971 standen ca 24 mg 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril (22) (dargestellt von P. Schneider durch A-B Cyclisierung von Harvard-Material) zur Verfügung. Von diesem Material lactonisierte H. Maag (vom 26.5.1971 - 2.6.1971) nach den obigen Bedingungen ca 20 μ Mol (3 Ansätze zu ca 3, 8 resp. 10 μ Mol und 1 Nachlactonisierung zu ca 3 μ Mol) und erhielt ca 14 μ Mol (68%) TLC-chromatographiertes 5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton-f-nitril (23) (ex A-B Cyclisierung). Dieses Material stellte die erste Menge von 5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton-f-nitril (mit differenzierter f-Seitenkette) dar und wurde nicht LLC-getrennt, sondern von H. Maag direkt zu Alkylierungsvorversuchen verwendet ([12], Seite107). In der Zwischenzeit produzierte W. Fuhrer zunehmende Mengen an 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril (aus photochemischer Cyclisierung), die mit der soeben von J. Schreiber in Gang gesetzten LLC-Apparatur aufgetrennt wurden (vgl. W. Fuhrer [13], Seite 205).

Am 15.6.1971 lactonisierte man erstmals in 3 Ansätzen (beschrieben in dieser Arbeit unter 2.3.1.) ca 45 μ Mol der LLC-Fraktionen 1-3 (beschrieben [13], Seite 205). Das erhaltene Lacton wurde im Gegensatz zu den früheren Produkten LLC-getrennt und nur die eine der beiden auftretenden Fraktionen, nämlich die LLC-Fraktion 1 (Lacton 1 ($\alpha \cdot \alpha / \alpha \cdot \beta$), C-13 Epimerengemisch) zur Alkylierung weiterverwendet (vgl. H. Maag [12], Seite110, Fussnote 51). Die Verwendung von Lacton 1 äusserte sich bei der Alkylierung durch eine erhöhte Ausbeute an disubstituiertem Material (vgl. H. Maag [12], Seite107: 1. Abschnitt; Seite109: letzter Abschnitt).

Vom 15.6. - 29.6.1971 wurden insgesamt ca 126 μ Mol Amid-nitril (22) in 8 Ansätzen (zwischen 8-30 μ Mol) umgesetzt. Dabei sind nach den von P. Schneider gefundenen, unten beschriebenen Bedingungen ca 68 μ Mol Lacton 1 (($\alpha \cdot \alpha / \alpha \cdot \beta$) C-13-Epimerengemisch) und ca 9.6 μ Mol Lacton 2 (($\beta \cdot \alpha / \beta \cdot \beta$) C-13 Epimerengemisch) erhalten worden.

Das Lacton 1 wurde zu Alkylierungen ([12], Seite110, Fussnote 51) der Black-Friday Ansätze verwendet.

Das Lacton, das nach Black-Friday (9. Juli 1971, vgl. dazu H. Maag [12], Seite107) verwendet wurde (insgesamt ca 15 μ Mol) stammte sowohl aus der klassischen A-B Cyclisierung, als auch aus der photochemischen Cyclisierung, sowie aus zurückgewonnenem Amid-nitril aus Lactonisierungen. Es ist generell sämtliches, irgendwie aufzutreibendes und zu Lacton-nitril umsetzbares Edukt verwendet worden.

Bereits damals vorhandene Kenntnisse, welche eine Konfigurationszuordnung der Lacton-nitrile ermöglichen:

Die LLC-Trennung der Amid-nitrile (22) zeigte einen dominierenden Anteil an Fraktion 1 (W. Fuhrer [13], Seite 206, Abb. 69).

Unter der Annahme, dass die thermodynamisch günstigste Konfiguration jene mit $\alpha\alpha\alpha$ ist und ein C-13 Epimerengemisch offenbar im LLC-System III (Ursystem) nicht auftritt, ordneten wir der Amid-nitril Fraktion 1 das Diastereomeregemisch $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\beta$ zu. Diese Amid-nitril Fraktion 1 lieferte bei Lactonisierung Lacton 1; Zuordnung: $(\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta)$. (Dass es sich bei Lacton 1 um ein Gemisch, welches wir der C-13 Epimerie zugeschrieben handelte, war aus dem NMR-Spektrum Abb. 16 ersichtlich.) Die Amid-nitril Fraktion 3 lieferte unter Lactonisierungsbedingungen ebenso Lacton 1. Die Fraktion 3 unterscheidet sich offenbar von der Fraktion 1 durch umgekehrte Konfiguration am C-8 (C-8 β).

Die Amid-nitril Fraktionen 2 und 4 hingegen lieferten ein Gemisch der beiden Lactone 1 und 2. Die Fraktion 2 lieferte mehr Lacton 1, die Fraktion 4 mehr Lacton 2.

Die Alkylierungsvorversuche mit nicht LLC-getrennten Lactonen lieferten Ausbeuten von ca 30% Disubstitutionsprodukten (H. Maag, [12], Seite 107), Alkylierungsversuche mit LLC getrennten Lactonen, nämlich Lacton 1 ($\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta$) lieferten eine auf ca 45% erhöhte Ausbeute an Disubstitutionsprodukten ([12], Seite 111, 147).

Diesen Ausbeuteunterschied führten wir auf die Anwesenheit von Lacton 2 im nicht LLC getrennten Lacton zurück. Später konnte H. Maag zeigen, dass die Alkylierung von Lacton 2 tatsächlich kein Disubstitutionsprodukt, sondern lediglich Monosubstitutionsprodukt lieferte. Als noch variable Konfigurationsstelle bleibt somit nur noch die Stelle am Kohlenstoffatom C-3, die Seitenkette am C-3 liegt somit in β Position. Demzufolge ordneten wir dem Lacton 2 das Diastereomeregemisch $(\beta\cdot\alpha/\beta\cdot\beta)$ zu. (Das Vorliegen eines Gemisches ist wiederum im NMR (Abb. 18) bestätigt). Die zur obigen Argumentation verwendeten experimentellen Daten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

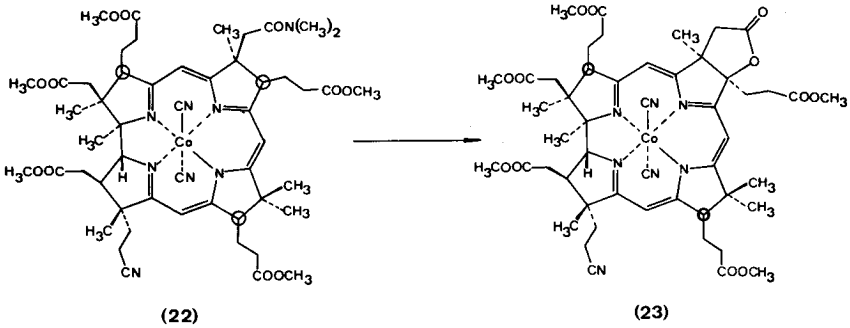
Diese Kenntnisse haben eine vorläufige Konfigurationszuordnung der Lactone, über welche am JUPAC-Kongress (Boston-1971) berichtet worden war ([18], Seite 96, Fig. 30) ermöglicht.

In der zitierten Literatur [18] muss folgende Korrektur angebracht werden:

Seite 96: Figur 30: richtig. Text: Im 1. Abschnitt lautet der letzte Satz irrtümlich: Two diastereomeric, chromatographically separable lactonisation products are observed. Amide fractions 1 and 3 give rise to only one of them ($\alpha, \alpha/\beta$), whereas amide fractions 2 and 4 produce a mixture of the two, the ($\beta, \alpha/\beta$)-isomer predominating.

richtig ist: Amid fractions 1 and 3 give rise to only one of them ($\alpha, \alpha/\beta$), whereas amid fractions 2 and 4 produce a mixture of the two; in case of fraction 2 the ($\alpha, \alpha/\beta$)-isomer predominates and in case of fraction 4 the ($\beta, \alpha/\beta$)-isomer.

Beispiel einer Lactonisierung (typischer Nachschubansatz der Prä-Boston-Periode)



44.6 μ Mol (ϵ Benzol/564 = 12000) 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril (22), enthaltend die LLC-Fraktionen 1-3, wurden in 3 Parallelansätzen (A = 1/5, B₁ = B₂ = 2/5 der obigen Menge) lactonisiert.

Das verwendete 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril (22) stammte aus der photochemischen Cyclisierung des Zn-secco-Corrins; W. Fuhrer [13], Seite 188. Es wurden die im "Ursystem" (SIII) abtrennbaren LLC-Fraktionen 1-3 verwendet ([13], Seite 204, 205 (letzte 6 Zeilen)). Diese Fraktionen enthielten die diastereomeren Amid-nitrile:

Fraktion 1: $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\beta$

Fraktion 2: $\alpha\beta\alpha/\beta\alpha\alpha/\beta\alpha\beta$

Fraktion 3: $\alpha,\beta\beta$

und somit alle 4 Isomeren (unterstrichen), welche Lactone mit natürlicher (C-3 α)-Konfiguration liefern. Die LLC-Fraktion 2 wurde mitlactonisiert, da mittels LLC das anfallende unnatürliche C-3 β -Lacton (C-13-Epimerengemisch) leicht vom natürlichen C-3 α -Lacton (C-13-Epimerengemisch) abgetrennt werden konnte. Eine Trennung der Amid-nitril Fraktion 2 in einen Anteil mit natürlicher C-3 α -Konfiguration resp. mit unnatürlicher C-3 β -Konfiguration gelang zu jenem Zeitpunkt noch nicht. Die genaue Zusammensetzung des verwendeten Amid-nitril Gemisches ist nicht bekannt, entspricht aber im Wesentlichen der beschriebenen Verteilung ([13], Seite 204).

Nachfolgend ist ein Ansatz der Grösse B beschrieben:

17.82 μMol 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril (22) *73 wurden in einem Rundkölbchen während 1h am HV getrocknet. Den roten Film löste man unter Argon in 24.4 ml abs. Dimethylformamid *74 und versetzte unter magnetischem Rühren und Argon mit 3.57 ml (4 Moläquivalente) einer 0.02m Lösung von reinstem Jod in Essigsäure *75. (Farbwechsel von rot nach dunkelorange.) Man verschloss unter Argonspülung mit einem Schliffstopfen und erhitze dann unter Lichtausschluss (Oelbad mit Alufolie umwickelt) und magnetischem Rühren für 4h auf 95-97° C (Badtemperatur) im Oelbad. Dabei veränderte sich die Farbe der Lösung von orange zunächst nach braunrot und schliesslich nach dunkelrot.

Man liess die Reaktionslösung erkalten (Eiswasserbad), öffnete den Kolben, setzte einen Schliffhahn auf und entfernte die flüchtigen Anteile am HV unter gelinder Erwärmung im Wasserbad (50-60°) bis auf ein Restvolumen von ca 0.5 ml (Dauer ca 20-25 Minuten). Das tiefrote Oel nahm man in 2 ml abs. Benzol auf, transferierte in einen Schütteltrichter auf 20 ml Benzol und 10 ml vorgekühlte gesättigte KCl*76/0.1% KCN*77 -Lösung und wusch die org. Phase 3x mit gekühlter KCl/0.1% KCN-Lösung. Die wässrigen Phasen (schwach rosa) extrahierte man 2x mit 20 ml Benzol, filtrierte die org. Phasen durch Watte und engte am RV vollständig ein.

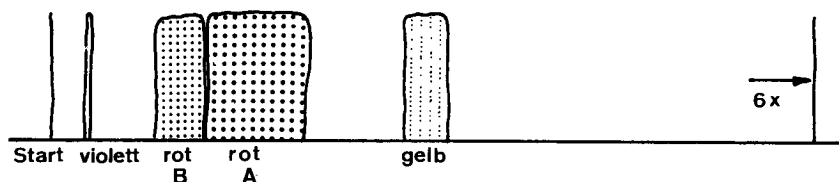
Auf Grund des Elektronenspektrums bestimmte man folgende Chromophorausbeuten:

A)	7.5 μMol (Σ Benzol/568: 12000) *78 :	84.2 %
-----	---	--------

B ₁)	16.05 μMol	"	: 90 %
------------------	-----------------------	---	--------

B ₂)	15.95 μMol	"	: 89.5 %
------------------	-----------------------	---	----------

Die vereinigten Rohprodukte wurden auf 4 TLC-Platten*79 chromatographiert:



*73 Ich danke W. Fuhrer für das Ueberlassen grösserer Mengen von Amidnitril (22).

*74 abs. Dimethylformamid, DMF, Fluka puriss, 1x über P_2O_5 am WV destilliert und 2x durch eine Vacuummantelvigreuxkolonne am WV destilliert.

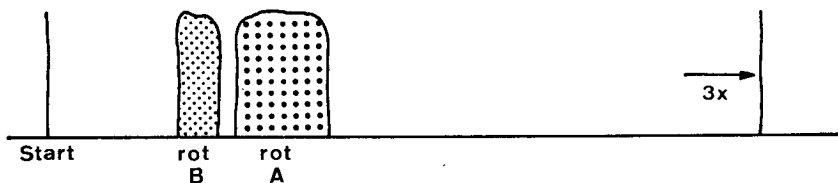
*75 Jod, 3x bei RT sublimiertes Jod ex Fluka puriss. resubl. Ph. Helv. V. Essigsäure, Merck AG, zur Analyse, destilliert unter N_2 . Diese Lösung kann ohne Ausbeuteeinbusse während 14 Tagen verwendet werden. Aeltere Lösungen wurden nie verwendet.

*76 Kaliumchlorid reinst, Siegfried, Zofingen.

*77 Kaliumcyanid, Merck AG, zur Analyse.

*78 Es handelt sich hier um einen arbeitshypothetischen Σ -Wert, der generell zur Mengenbestimmung der Lactone und die Dimethylamid-nitrile verwendet wurde.

Das Silikagel der beiden Zonen A und B wurde je mit Methanol abs. Methylchlorid (15:85%) extrahiert und die Extrakte am RV eingengt. Infolge der ungenügenden Trennung (Ueberladung?) wurden die wieder vereinigten Zonen A und B auf 6 TLC-Platten*79 rechromatographiert:



Nach Eluation der Zonen A und B und Einengen der Lösungsmittel wie oben, bestimmte man folgende spektroskopischen Ausbeuten:

Zone A (Lacton) *80	26.9 μ Mol	(ϵ Benzol/568: 12000)	60.2 %
Zone B (Edukt) *81	10.0 μ Mol	(ϵ Benzol/564: 12000)	22.4 %

Auftrennung in die C-3-epimeren Lactone *82

Die Lactonzone A ist DC einheitlich (DC, vgl. 2.1.). Die Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie (LLC, vgl. 2.1.) ermöglichte hingegen eine Auftrennung in 2 Fraktionen. Von der obigen Menge (26.9 μ Mol) Lacton wurden ca 5 μ Mol von H. Maag [12] (Seite 109 letzte 4 Zeilen) direkt zu Alkylierungsvorversu-

*79 vgl. 2.1.

*80 Dass es sich bei dieser Zone um ein Lacton handelt wird auf Grund der IR-Bande um ca 1795 cm^{-1} , sowie der ähnlichen Strukturierung im UV und ähnlicher Bandenlagen im IR von 5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton und 5,15-Cobester-c-lacton vermutet (vgl. H. Maag [12] Seite 75 und 222). (Vgl. auch den allgemeinen Teil.)

*81 Die Zone B zeigt im UV-Spektrum Eduktstrukturierung. Diese Zone wurde jeweils aus verschiedenen Ansätzen gepoolt, vereinigt und nach Rechromatographie (TLC) nach der beschriebenen Methode lactonisiert (Nachlactonisierung). Dabei zeigte sich wieder eine analoge Produktverteilung. Später erwies sich die Nachlactonisierung infolge einer besseren Lactonisierungsmethode als überflüssig. Eine analytische Untersuchung der zurückgewonnenen Edukte wird unter 2.3.3.1. beschrieben.

*82 Da zu diesem Zeitpunkt nicht alle diastereomeren Amid-nitrile unnatürlicher Konfiguration am C-3 (C-3 β) von jenen natürlicher Konfiguration an C-3 (C-3 α) abgetrennt werden konnten [13], geschah diese Trennung auf der Stufe der Lactone. H. Maag [12] konnte zeigen, dass sich die Lactone mit C-3 β -Konfiguration nicht dialkylieren lassen. Eine Abtrennung dieser Isomere war deshalb erwünscht. Das Lacton mit C-3 α -Konfiguration hingegen zeigte diese Reaktionseinschränkung nicht und weiter übt die Epimerie am C-13 ebenfalls keinen Einfluss auf die Alkylierung in 5- und 15-Stellung aus.

chen verwendet. Der Rest (ca 21.9 μMol) wurde unter folgenden Bedingungen LLC getrennt (Abb. 14):

(S III, Kol B, 90 ml/h)

Fraktion 1 (Lacton 1) : $R_t = 8.9$ Min.

Fraktion 2 (Lacton 2) : $R_t = 10.4$ Min.

Ausbeute	Isomeren- verteilung
Lacton 1 18.58 μMol	88.4 %
Lacton 2 2.44 μMol	11.6 %
21.02 μMol	100 %
	Isomerie *83
Lacton 1	$\alpha \cdot \alpha / \alpha \cdot \beta$
Lacton 2	$\beta \cdot \alpha / \beta \cdot \beta$

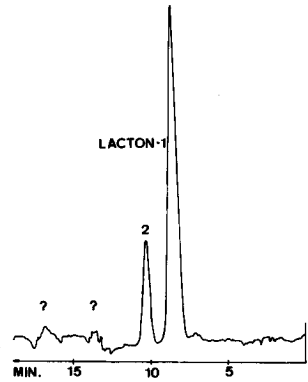


Abb. 14

Das Material der LLC-Fraktion 1 wurde auf drei, jenes der LLC-Fraktion 2 auf einer TLC-Platte rechromatographiert. Nach Eluation mit Methanol/abs. Methylenchlorid (15:85) und Einengen der Lösungsmittel am RV nahm man das Material in je ca 10 ml Benzol auf, wusch die organischen Phasen je 1x mit $\text{KCl}/0.1\% \text{ KCN}$ -Lösung, filtrierte durch Watte und engte am RV vollständig ein. Die roten Rückstände trocknete man über Nacht bei RT am HV. Vom Material der LLC-Fraktion 1 (= Lacton 1) wurde direkt das UV, IR und NMR-Spektrum aufgenommen, anschließend diente es zu Alkylierungsversuchen ([12] Seite 110, Fussnote 51). Dieselben Spektren wurden auch von der LLC-Fraktion 2 (= Lacton 2) aufgenommen. Dazu verwendete man das obige Material, vereinigt mit Lacton 2 analoger Ansätze.

Die beiden Produkte enthielten den in 2.1. beschriebenen Ballast, da zu jenem Zeitpunkt die Methode des Waschens mit Methanol und Hexan noch nicht bekannt war.

5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton-f-nitril (23) (Lacton 1) (C-13 Epimerengemisch $\alpha \cdot \alpha / \alpha \cdot \beta$).

(($\alpha \cdot \alpha$) ($\alpha \cdot \beta$)-Verhältnis ca 1:1)

UV Benzol	qualitativ
PE-402	568/0.445 max, 547/0.290 min, 533/0.343 max, 495/0.16 sh, 445/0.122 min, 417/0.214 max, 395/0.214 sh, 358/1.000 max, 335/0.400 min, 320/0.425 max, 313/0.395 min, 308/0.400 max, 294/0.346 min. $\delta^*/\alpha = 2.25$

IR CHCl_3	2242w (f-CN), 2120w (Co-CN), 1794m (Lactongruppe), 1732s
(21.6.1971)	(COOCH_3), 1642w, 1600m/1578m (Chromophor), cm^{-1} . Die

*83 Die hier vorweggenommene Isomerenzuordnung wird unter 2.3.3.4. diskutiert.

Abb. 15

schwachen Banden bei 3580, 3430 und die starken Banden bei 2920 resp. 2842 cm^{-1} weisen auf Ballast hin (keine Methanol/Hexan Waschung).

NMR C_6D_6

HA-100
(22. 6. 1971)

Abb. 16

16.5 mg in Normalzelle

- Chromophorgebundene Vinylprotonen bei: 5.97s, 5.86s, 5.61/5.58 ppm.
- Methylester: 8 Singulette bei: 3.59, 3.51, 3.45, 3.42, 3.41, 3.33, 3.31, 3.27 ppm.
- Methylgruppen: 6 Singulette bei: 1.13, 1.04, 0.94, 0.88, 0.84, 0.77 ppm (Signal für die an C1 gebundene Methylgruppe ist offenbar durch die Verunreinigung bei 1.38 ppm verdeckt).
- Die Häufigkeit der Methylester- und Methylgruppensignale, sowie das dublette Signal um 5.6 ppm lässt das Vorliegen eines C-13-Epimerengemisches vermuten.
- Kontaminationssignale bei: 6.38 und 1.38 ppm. (Signal bei 1.38 ppm in späteren Ansätzen durch Waschen mit Hexan und Methanol entfernt).

5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton-f-nitril (23) (Lacton 2) (C-13-Epimerengemisch

$\beta\text{-}\alpha/\beta\text{-}\beta$)

UV Benzol

PE-402

qualitativ

573/0.442 max, 551/0.302 min, 537/0.340 max, 500/0.170 sh, 448/0.108 min, 422/0.212 max, 396/0.218 sh, 362/1.000 max, 337/0.415 min, 423/0.445 max, 315/0.437 min, 310/0.455 max, 394/0.392 min. $\delta/\alpha = 2.26$

IR CHCl_3

(21. 6. 1971)

2242w (f-CN), 2120w, (Co-CN), 1795m (Lactongruppe), 1732s (COOCH_3), 1635w, 1595m/1572m (Chromophor) cm^{-1} . Verunreinigungen bei 3580w, 3430w und 2920s resp. 2840s und Schulter bei 1680 cm^{-1} (aus HCN, später wegwaschbar). (Vergleich zu IR des $\alpha\text{-}\alpha/\alpha\text{-}\beta$ Lactons wird in 2.3.3.4. kommentiert)

Abb. 17

NMR C_6D_6

HA-100

(20. 7. 71)

Abb. 18

6.5 mg in Mikrozele

- Chromophorgebundene Vinylprotonen bei: 5.86s, 5.64s (verbreitert) 5.56s (verbreitert) ppm.
- Methylester: 6 Singulette bei 3.52, 3.48, 3.44, 3.41, 3.35, 3.34 ppm.
- Methylgruppensignale: Die Methylgruppen erscheinen sehr schlecht aufgelöst in einem breiten Signal von 1.10-0.75 ppm.
- Die an C-1 gebundene Methylgruppe ist durch das bei 1.38 ppm liegende Kontaminationssignal verdeckt.
- Weitere Kontaminationssignale bei: 6.31 (Lösungsmittel?), 1.41 (H_2O ?) und um 1.38 (aus HCN, später wegwaschbar) ppm.
- Die Häufigkeit der Methylester-, die schlecht aufgelösten Methylgruppensignale und die verbreiterten Signale der Vinylprotonen lässt das Vorliegen eines C-13-Epimerengemisches vermuten.

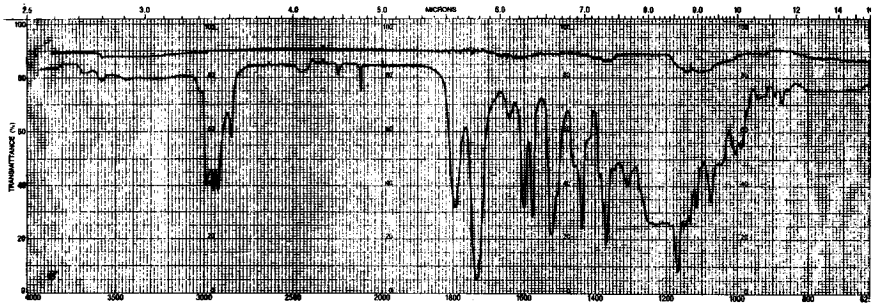


Abb. 15

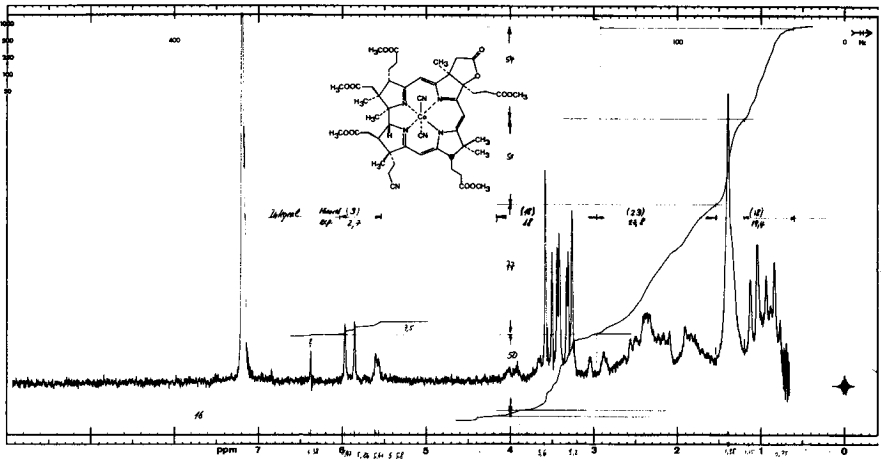


Abb. 16

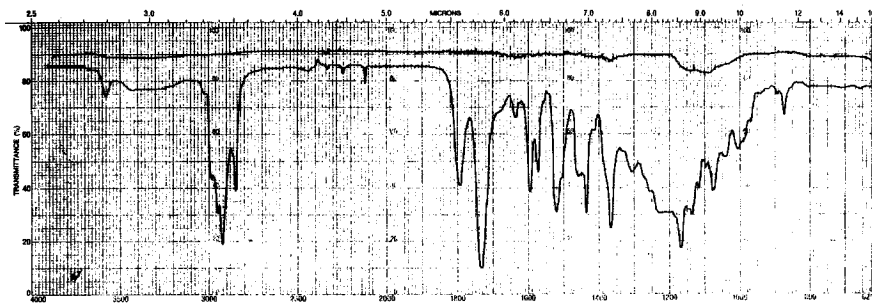


Abb. 17

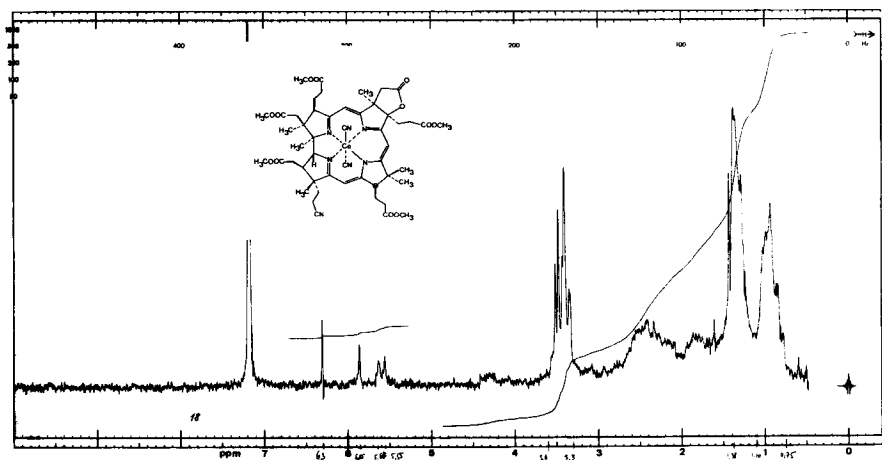


Abb. 18

Lactonisierung der einzelnen Amid-nitril LLC-Fraktionen

In Tabelle 3 sind die Resultate von Lactonisierungen unter den obig beschriebenen Bedingungen aufgeführt. Diese Resultate üben vor allem auf die Abklärung der Diastereomerieverhältnisse der Fuhrer'schen Amid-nitril LLC-Fraktionen einen grossen Einfluss aus und gestatteten erstmals eine provisorische Zuordnung der Konfiguration der bei der photochemischen Cyclisierung auftretenden Diastereomere mit den LLC-Fraktionen (vgl. Rückschau auf die Information aus den Prä-Boston-Lactonisierungsansätzen in 2. 3. 1.).

Tabelle 3

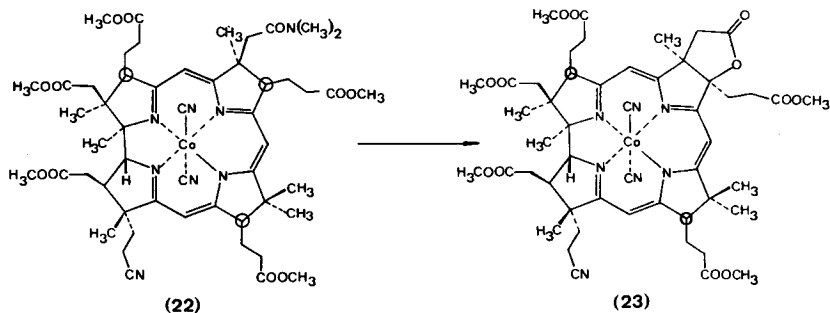
Mengenbestimmung: spektroskopisch in benzolischer Lösung; es wurde die längstwellige Absorptionsbande im UV/VIS-Spektrum ($\epsilon = 12000$, hypothetisch) für alle aufgeführten Substanzen verwendet.

Edukt (Amid-nitril)	Chromophorausbeute vor Chromatographie	Produkte nach TLC	Lactone nach LLC
LLC-Fraktion 1 ($\alpha\delta\delta/\alpha\delta\beta$) 18.55 μMol	15.41 $\mu\text{Mol}/83.2\%$	-Lacton 10.86 μMol (58.5%) -Edukt 1.17 μMol (6.3%)	→ Lacton 1 ($\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta$) → Spur Lacton 2
LLC-Fraktion 2 ($\alpha\beta\delta/\beta\delta\alpha/\beta\delta\beta$) 0.962 μMol	0.792 $\mu\text{Mol}/82.3\%$	-Lacton 0.125 μMol (13%) -Edukt 0.542 μMol (56.3%)	→ "Lacton 1" ($\alpha\cdot\alpha$) → Lacton 2 ($\beta\cdot\alpha/\beta\cdot\beta$) im Verhältnis: 64 : 36 %.
LLC-Fraktion 3 ($\alpha\beta\beta$) 0.406 μMol	0.371 $\mu\text{Mol}/91.5\%$	-Lacton 0.05 μMol (12.3%) -Edukt 0.235 μMol (57.4%)	→ "Lacton 1" ($\alpha\cdot\beta$)
LLC-Fraktion 4 ($\beta\delta\delta/\alpha_4$) 16 μMol *85	13 $\mu\text{Mol}/81.4\%$	-Lacton 3.13 μMol (19.5%) -Edukt 7.67 μMol (47.9%)	→ "Lacton 1" ($\alpha\cdot\beta$) → "Lacton 2" ($\beta\cdot\alpha$) → Lacton 3 (Unnat. Lacton mit falscher Helix) *84. Verhältnis: 23:59:18 %.

*84 Das IR-Spektrum dieser Zone zeigt eine Absorption bei 1795 cm^{-1} , wie sie für Lactone dieser Reihe typisch ist. Infolge kleiner Substanzmengen liegen keine weiteren Daten vor.

*85 Die Fraktion 4 enthielt infolge der damals noch ungenügenden Abtrennung der Fraktion 3 noch Anteile dieser, Lacton 1 liefernden Fraktion.

2.3.2. Endgültige Reaktionsbedingungen zur Lactonisierung von 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril (22) (typischer Nachschubansatz der Post-Boston-Periode)



9.92 μ Mol (ϵ Benzol/564: 12000) 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril (22) (enthaltend die LLC-Fractionen 1-3) *87 wurden mit einem Magnetrührstab über Nacht am HV bei RT getrocknet.

Den roten Film löste man unter Argon in 13.4 ml absolutem Dimethylacetamid *86 und versetzte unter magnetischem Rühren unter Argon mit 1.485 ml (3Mol-äquivalente) einer 0.02m Lösung von reinstem Jod in Essigsäure *75 (Farbwechsel nach orange, schwache Erwärmung). Man verschloss mit einem Schliffstopfen unter Argonspülung und erhitze unter Lichtausschluss und magnetischem Rühren während 3h auf 93-96° (Badtemperatur) im Oelbad. (Farbänderung von zunächst

*86 abs. Dimethylacetamid (DMAA), Fluka AG, puriss. p.a., 1x über P₂O₅ am WV und anschließend 2x durch Vacuumantelvigreuxkolonne am WV destilliert.

*87 Das zur Lactonisierung verwendete 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril aus photochemischer Cyclisation am Cadmiumkomplex hatte folgende Isomerenverteilung ([13], Seite 180 ff.):

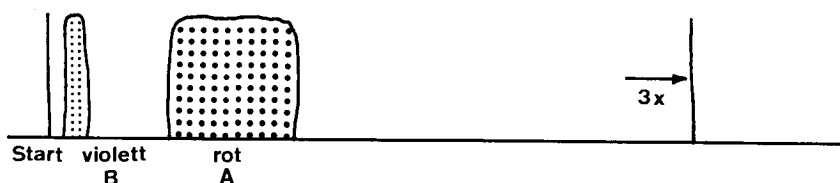
C-3	C-8	C-13	Fraktion	Gehalt	
α	α	α	1 α	30.3 %	Anteil mit richtiger (C-3 α)-Konfiguration 77.15 %
α	α	β	1 β	29.1 %	
α	β	β	3	9.25 %	
α	β	α	2'	8.5 %	Anteil mit falscher (C-3 β)-Konfiguration 22.85 %
β	α	α	2 α	11.55 %	
β	α	β	2 β	11.3 %	

orange über braunrot nach tief-rot). Danach liess man die Reaktionslösung erkalten (Eiswasserbad), verdünnte das Reaktionsgemisch mit 20 ml Rein-Benzol (\approx abs. Benzol) und goss die Lösung auf ein Gemisch bestehend aus 30 ml Benzol, 30g Eis, 30 ml Eiswasser, 12 ml KCl/0.1% KCN Lösung und 0.6 ml 0.1 m Natriumthiosulfatlösung *88 im Scheidetrichter und spülte den verbleibenden Kolbeninhalt mit insgesamt 10 ml Rein-Benzol nach. Die wässrige Phase extrahierte man weitere 3x mit je 60 ml Benzol und wusch die organischen Phasen je 1x mit halbgesättigter KCl/0.1% KCN Lösung und anschliessend je 2x mit gesättigter KCl/0.1% KCN Lösung. Das anfallende Waschwasser war schwach rosa, wurde aber nicht mehr weiter extrahiert.

Dieses Prozedere ermöglicht eine vollständige Extraktion des DMAA. Dazu sollten obige Mengenangaben unbedingt eingehalten werden, ansonst Produkt durch den Waschprozess verschleppt wird und das Lösungsmittel nicht vollständig entfernt werden kann.

Die organischen Phasen filtrierte man durch Watte, engte das Lösungsmittel am RV ein und bestimmte folgende Chromophorausbeute (\approx Benzol/568: 12000) 9.08 μ Mol 91.6 % bez. Edukt.

Nach Einengen des Lösungsmittels am RV trug man den Rückstand, in wenig Benzol aufgenommen, auf 2 TLC-Platten auf und chromatographierte im System: Hexan:Isopropanol:Methanol = 5:2:1/0.02 % HCN (vgl. 2.1.). Dabei zeigte sich folgendes Bild:



Man extrahierte das Silikagel der Hauptzone A und der violetten Nebenzone B mit Methylenchlorid/Methanol (85:15%) und bestimmte folgende spektroskopische Ausbeute:

Zone A (Lacton)	(\approx Benzol/568: 12000)	8.74 μ Mol	88.0 %
Zone B (?)	(\approx Benzol/584: 12000)	0.223 μ Mol	2.25%

LLC-Chromatographie

Die violette Zone B, im DC unmittelbar vor dem Start, wandert im LLC (SI/ Kola) nicht und wurde auch wegen der geringen Menge nicht mehr weiter untersucht. Die Zone A (Hauptprodukt = Lacton) konnte hingegen mittels LLC in 2 Zonen zerlegt werden:

(SI, Kola, ca 75 ml/h) (Abb. 19)

*88 0.1 m Natriumthiosulfatlösung, Merck AG, Titrisol.

Fraktion 1 (Lacton 1) R_t : 25.5 Min.

Fraktion 2 (Lacton 2) R_t : 31 Min.

Ausbeute (bez. Edukt)	μMol	%	Isomerenverteilung		Isomerie *83
			beobachtet	erwartet*89	
Lacton 1	6.05	61.0	75.5 %	77.15 %	$\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta$
Lacton 2	1.96	19.7	24.5 %	22.85 %	$\beta\cdot\alpha/\beta\cdot\beta$
Zwischen- fraktionen	0.57	5.7			
		86.4			

Die Vor- und Nachfraktionen (Abb. 19) enthielten auf Grund des LLC hauptsächlich Lacton 1 und 2 neben wenig Edukt und unbekanntem, nicht näher untersuchten Produkten.

Eine später durchgeführte analytische Trennung dieser Lacton-1 Fraktion mit dem erst später entwickelten LLC-System II (vgl. 2.3.4.) zeigte eine Verteilung der $(\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta)$ -Epimere im Verhältnis 1:1.

(SII, Kol C, 40 ml/h) (Abb. 20)

R_t ($\alpha\cdot\alpha$) : 60 Min.

R_t ($\alpha\cdot\beta$) : 63 Min.

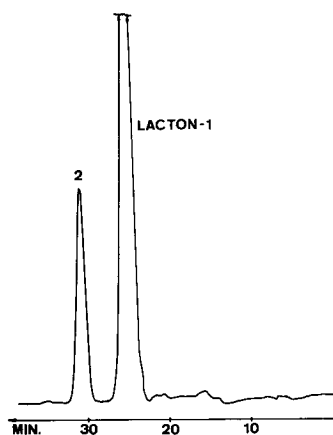


Abb. 19

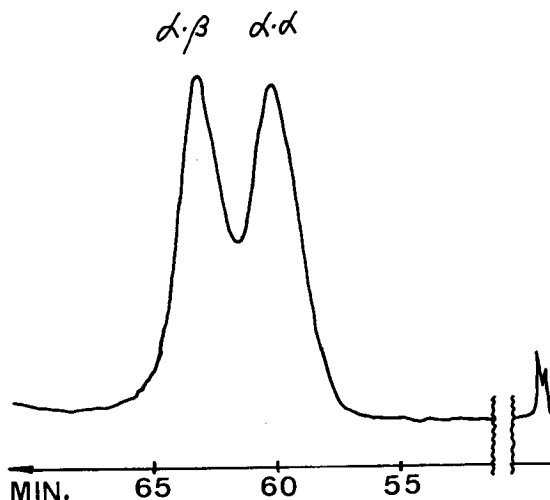


Abb. 20

Die beiden obigen LLC-einheitlichen Lactonfraktionen 1 und 2 rechromatografierte man zur Entfernung der polymeren Anteile je auf einer TLC-Platte (2x entwickelt), eluierte mit abs. Methylenechlorid/Methanol (85:15), nahm nach Einengen der Lösungsmittel die roten Rückstände in je ca 10 ml Benzol auf, schüt-

*89 Auf Grund der Verteilung der Eduktisomeren*87 bei Nichtisomerisierung des Zentrums 3 während der Lactonisierung.

telte je 2x gegen gesättigte KCl/0.1% KCN Lösung und extrahierte die wässrigen Lösungen je 1x mit Benzol. Die durch Watte filtrierten org. Phasen engte man am RV ein und trocknete die roten Filme für 6h am HV. Danach unterwarf man die beiden Produkte der Methanol- und Hexan-Waschung und bestimmte folgende spektroskopischen Ausbeuten *90:

Lacton 1 : 5.5 μ Mol 55.5 % bez. eingesetztem Amid-nitril (22)

Lacton 2 : 1.79 μ Mol 18.1 %

Lacton 1 dieser Qualität wurde zu Alkylierungen für die New-Delhi-Identifikation der f-Amide *91 und die definitive Charakterisierung der f-Amide *91 verwendet.

Zur Aufnahme der unten aufgeführten Spektren dienten die auf gleichem Weg erhaltenen Produkte zweier Grossansätze (Eduktmenge 8 μ Mol resp. 16 μ Mol).

5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton-f-nitril (23) (Lacton 1) (C-13 Epimerengemisch $\alpha\text{-}\alpha\text{'}/\alpha\text{'}/\beta$) (Verhältnis ca 1:1)

UV
Cary 14 Methanol/0.02% HCN, qualitativ
566.5/0.386 max, 544/0.258 min, 531.5/0.281 max,
494/0.170 sh, 440/0.080 min, 413/0.136 max, 400/0.102 min,
389/0.125 sh, 356.5/1.000 max, 320/0.267 min,
306/0.304 max, 297/0.284 sh, 286/0.238 min, 275/0.402 max,
259/0.261 min, $\gamma/\alpha = 2.59$
Das UV/VIS-Spektrum dieses C-13 Epimerengemisches ist praktisch deckungsgleich mit jenen der reinen Isomeren in 2.3.3.3.

IR CHCl_3 2250w (f-CN), 2120w (Co-CN), 1795s (Lactongruppe), 1735s
(6.5.72) (COOCH_3), 1642w, 1602m/1578m (Chromophor) cm^{-1} .
Abb. 21 Im Vergleich mit dem entsprechenden IR aus der DMF-Methode (Abb. 15) ist kein Ballast in der Probe.

NMR C_6D_6 ca 14 mg in Normalzelle
HA-100 -Chromophorgebundene Vinylprotonen bei: 5.96s, 5.84s,
(25.5.72) 5.57/5.54 ppm.
Abb. 22 -Methylestergruppen: 8 Singulette bei: 3.56, 3.48, 3.42, 3.39,
3.37, 3.30, 3.28, 3.23 ppm.
-Methylgruppen: 7 Singulette bei: 1.42, 1.11, 1.02, 0.92, 0.86,
0.82, 0.75 ppm.
-Die Häufigkeit der Methylester- und Methylgruppensignale, sowie das dublette Signal um 5.5 ppm zeigt das Vorliegen eines C-13 Epimerengemisches.
-Die im NMR-Spektrum des Lactons aus der DMF-Methode (Abb. 16) sichtbaren Kontaminationssignale sind in dieser Probe nicht sichtbar.

*90 Die Verwendung frisch aktivierter TLC-Platten hatte eine Ausbeuteeinbusse von je ca 9% bezügl. LLC-einheitlichem Lacton zur Folge.

*91 vgl. H. Maag [12], Seite 126ff. (New Delhi), Seite 146ff. (definitiv).

5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton-f-nitril (23) (Lacton 2) (C-13 Epimerengemisch $\beta\cdot\alpha/\beta\cdot\beta$)

UV
Cary 14 Methanol/0.02% HCN, qualitativ
571.5/0.383 max, 549/0.267 min, 535/0.298 max,
502/0.170 sh, 443/0.080 min, 417/0.144 max, 404/0.108 min,
393/0.130 sh, 359/1.000 max, 327/0.265 min, 316/0.292 max,
313/0.288 min, 307/0.302 max, 288/0.236 min,
275.5/0.411 max, 259/0.268 min. $\gamma/\alpha = 2.61$
Das UV/VIS-Spektrum dieses C-13 Epimerengemisches ist
praktisch deckungsgleich mit jenen der reinen Isomere in
2.3.3.

IR CHCl_3 2250w (f-CN), 2120w (Co-CN), 1795m (Lactongruppe), 1735s
(COOCH_3), 1635w, 1598m/1575m (Chromophor) cm^{-1} .
Abb. 23 Der Vergleich mit dem entsprechenden IR (Abb. 17) (Lacton
2 aus der DMF-Methode) zeigt, dass die obige Probe ballast-
frei ist.

NMR C_6D_6 ca 5 mg in Mikrozelle
HA-100 -Chromophorgebundene Vinylprotonen bei: 5.87s, 5.62s (ver-
(19.6.1972) breitetert), 5.55s ppm.
Abb. 24 -Methylester: 6 Singulette bei: 3.52, 3.48, 3.43, 3.41, 3.35,
3.33 ppm.
-Methylgruppensignale: 6 z. T. schlecht aufgelöste und verbrei-
terte Singulette bei: 1.30, 1.04, 1.00, 0.92, 0.85, 0.78 ppm.
-Die Häufigkeit der Methylestersignale, sowie die verbreiter-
ten Methylgruppensignale und das verbreiterte Signal um 5.62
ppm zeigt das Vorliegen eines C-13 Epimerengemisches.
-Die in Abb. 18 (NMR von Lacton 2 aus der DMF-Methode)
sichtbaren Kontaminationsignale sind ausser dem schwachen
Signal um 1.38 ppm nicht vorhanden.

Die Spektren mit Lacton der DMAA-Methode zeigen im Vergleich mit den ent-
sprechenden Spektren mit Lacton aus der DMF-Methode das gleiche Bild, jene
sind aber deutlich weniger stark verunreinigt als diese. Insbesondere liegt auf
Grund der Methylestersignale und Methylgruppensignale im NMR ein Gemisch
zweier Isomere vor (C-13-Epimerengemisch).

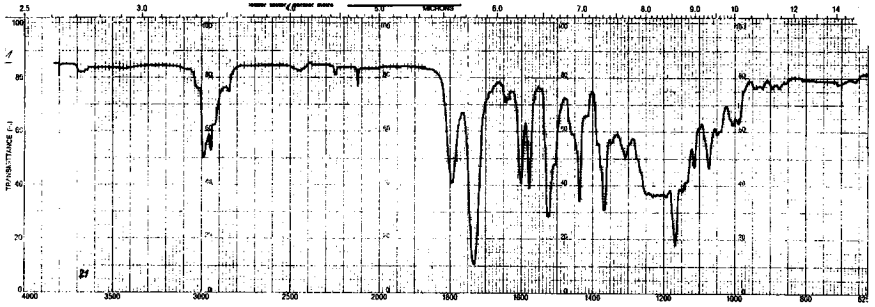


Abb. 21

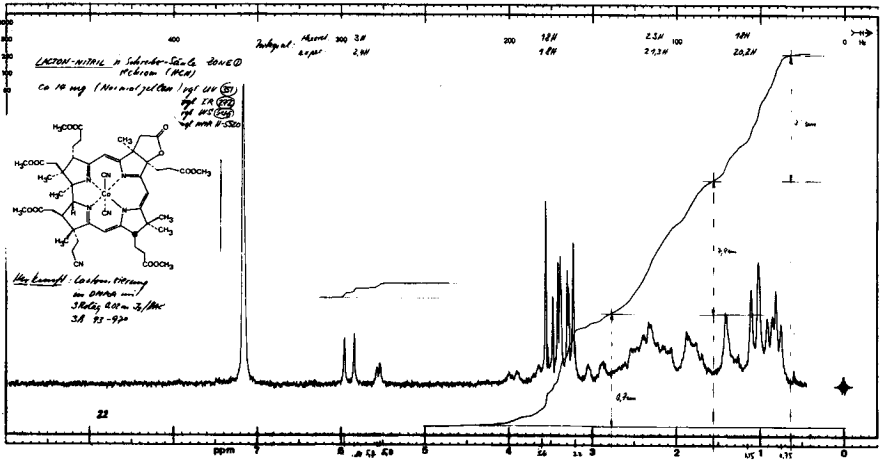


Abb. 22

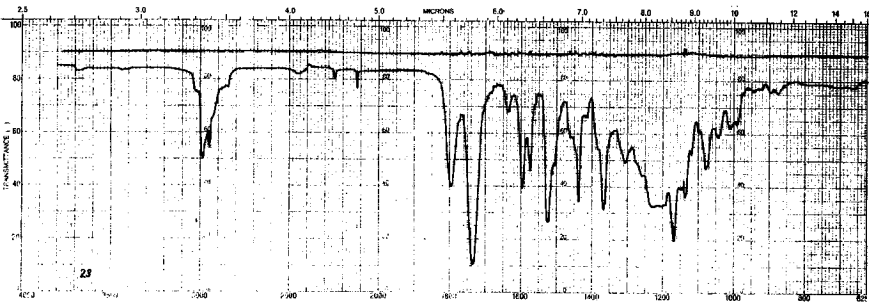


Abb. 23

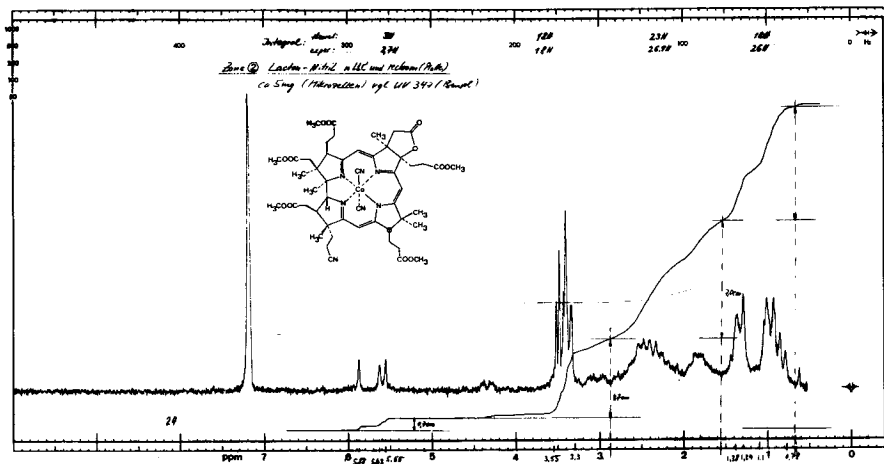


Abb. 24

Diskussion der Reaktionsbedingungen: Die ursprünglich gefundenen Bedingungen von P. Schneider (beschrieben in 2.3.1.) ermöglichten erstmals die Ueberführung der Amid-nitrile in präparativ befriedigender Ausbeute in die Lacton-nitrile (= Lactone). Von Nachteil war bei dieser Methode, dass stets grössere Mengen (in der Regel ca 20-60%) unumgesetztes Edukt zurückerhalten wurde, das in analog ausgeführten Nachlactonisierungsansätzen wiederverwertet wurde.

Aenderungen der Reaktionsbedingungen, nämlich höhere Reaktionstemperaturen, verlängerte Reaktionszeiten und andere Reagenzienverhältnisse ergaben stets schlechtere Ausbeuten an Lacton. Das eingesetzte Amid-nitril konnte wohl praktisch vollständig umgesetzt werden, doch sank dabei die Gesamtausbeute an Lacton bezüglich eingesetzten Amid-nitrils; dh. die Zerstörung des Chromophors konkurriert mit der Lactonisierung.

Eine letzte systematische Untersuchung der Lactonisierungsreaktion nach der Prä-Boston Periode führte zur Entdeckung, dass die Verwendung von Dimethylacetamid an Stelle von Dimethylformamid eine glatte, praktisch eduktfreie Lactonisierung der Amid-nitrile ermöglicht. Die Reaktionszeit konnte mit der neuen Methode auf 3h (vorher 4h) gesenkt werden, ebenso genügten schon 3 Moläquivalente Jod-Essigsäurelösung (vorher 4 Moläq.) für einen vollständigen Umsatz des Amid-nitrils. In kleinen Lactonisierungsansätzen (vor allem bei Ansätzen \leq ca 2mg) wurden im schlechtesten Fall (Lactonisierung von Amid-nitril $\beta\beta\alpha$) höchstens ca 10% Edukt zurückgewonnen. Diese Erscheinung wird auf einen erhöhten Gehalt an "polymeren Rückständen" (vgl. 2.1.) zurückgeführt, der bei kleinen Proben mit Hexan und Methanol nicht vollständig gewaschen werden kann. Dieser Rückstand konsumierte vermutlich einen Teil des Jod-Essigsäure Reagen-ses, das somit der Lactonisierungsreaktion entzogen wurde.

Die Verwendung von reinstem Jod und sorgfältig gereinigten Dimethylacetamid ist für den Erfolg der Lactonisierung wichtig.

Ausschlaggebend für den Erfolg der Lactonisierung nach den beschriebenen Methoden ist die funktionelle Gruppe der c-Seitenkette. Die Lactonisierung von

5,15-bis-nor-Cobester (vgl. Rückschau auf die Information aus den Prä-Boston Lactonisierungen) (nach der Methode in 2.3.1.) lieferte nur ca 28 % Lacton, aber 50 % Edukt. Lactonisierung desselben Eduktes nach den endgültigen Bedingungen (in 2.3.2. beschrieben) lieferte ein mit den alten Bedingungen vergleichbares Resultat, nämlich 27 % Lacton und ca 59 % Edukt.

Die Lactonisierung der 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamide lieferte deutlich höhere Ausbeuten an Lacton. Diese funktionelle Gruppe ergab sich, bedingt durch die Oeffnung eines Thiolactons mit Dimethylamin zur Vorbereitung von Ringkondensationen) (vgl. P. Schneider [11], Seite 96 (A-B Cyclisierung) und W. Fuhrer ([13], Seite 151): (Kondensation von Ring A und BCD-Tri-cyclus) und hatte einen äusserst günstigen Einfluss auf die Lactonisierungsreaktion.

2.3.3. Lactonisierung der 8 reinen 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitril-Diastereomeren und Charakterisierung der 4 daraus erhaltenen 5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton-f-nitril-Diastereomeren

2.3.3.1. Allgemeines

Im Gegensatz zu den 8 auftretenden Amid-nitril Fraktionen natürlicher Helizität, die mittels DC- und LLC-Trennung rein erhalten wurden ([13], Seite 179, 207), gelang eine vollständige LLC-Trennung der Lactone in die 4 reinen Diastereomeren nicht. In einer Vorversuchsreihe wurden 6 der 8 möglichen reinen Amid-nitril-Diastereomeren (die $\beta\alpha\alpha$ und $\beta\alpha\beta$ - Diastereomeren konnten damals noch nicht getrennt werden) in kleinen Mengen (ca je 500 μ) separat lactonisiert. Die erhaltenen Produkte wurden von der Harvard-Gruppe mit dem dort entwickelten Adsorptions-Hochdruckchromatographiesystem (LC, vgl. unten) analytisch untersucht. Mittels dieses Systems war nämlich eine Trennung der 4 Lacton-Diastereomeren möglich. Die LC-Resultate zeigten eindeutig, dass bei der Lactonisierung keine C-13-Epimerisierung auftritt. Somit wurde für uns die Herstellung reiner Lacton-Diastereomere ausgehend von reinen Amid-nitrilen (ausser den damals noch nicht mit LLC trennbaren $\beta\alpha\alpha$ - und $\beta\alpha\beta$ -Diastereomeren) ermöglicht.

Zu einem späteren Zeitpunkt gelang in unserer Gruppe nicht nur die Trennung der $\beta\alpha\alpha$ - und $\beta\alpha\beta$ -Amid-nitril-Diastereomeren, sondern auch die Trennung des $\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta$ (= Lacton 1)-Diastereomerengemischs zu den reinen Isomeren $\alpha\cdot\alpha$ resp. $\alpha\cdot\beta$ mittels des LLC-Systems II. Für die präparative Trennung von Lacton 1 verwendete man 2 Kolonnen B; für die analytische Trennung die Kolonne C (vgl. 2.1.). Leider gelang in unserer Gruppe die Trennung der $\beta\cdot\alpha/\beta\cdot\beta$ (= Lacton 2)-Diastereomeren auf diesem Wege nicht.

Zur Charakterisierung verwendete man deshalb die reinen Lacton Diastereomeren, welche durch separate Lactonisierung erhalten wurden. Am Beispiel der Lactonisierung der Amid-nitril Fraktion 1 ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\beta$) wird zusätzlich die Isolierung der reinen Lacton-Diastereomeren $\alpha\cdot\alpha$ resp. $\alpha\cdot\beta$ mittels präparativer LLC-Trennung beschrieben.

Durchführung

Die Lactonisierungsansätze der 8 reinen Amid-nitril-Diastereomeren sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Zur Lactonisierung verwendete man die 8 reinen Amid-nitril-Diastereomeren natürlicher Helizität des von W. Fuhrer ([13], Seite 207-211) beschriebenen Analysenmaterials. Die Lactonisierungsansätze wurden jeweils mit ca 2 μ Mol Amid-nitril nach der in 2.3.2. beschriebenen Vorschrift in einem 2-3 ml fassenden Spitzkolben ausgeführt (Ansätze A-H in Tabelle 4). Die dazu benötigten Reagenismengen wurden linear verkleinert. Zur Aufarbeitung und Reinigung verfuhr man mit geringen, nachfolgend aufgeführten Aenderungen nach 2.3.2.

Die Lactonisierungsrohprodukte wurden nach Extraktion der TLC-Chromatographie unterworfen. Dabei eluierte man (vgl. 2.3.2.) eine Hauptzone A und eine Schwanzzone B (z.T. deutlich von der Hauptzone A abgetrennt, siehe unten). Die Hauptzonen wurden hierauf der schnellen (SI) LLC-Chromatographie, danach zur Entfernung polymerer Rückstände der TLC-Chromatographie und der Waschung mit Methanol und Hexan unterworfen. Von den Lacton-Diastereomeren dieser Reinheit registrierte man die UV/VIS-, die CD- und IR-Spektren, sowie die LLC- und LC-Chromatogramme.

Auf Grund der CD-Spektren (Abb. 29-A-H), der LLC-Chromatogramme (langsa-
mes System/S II) und der LC-Chromatogramme (von der Harvard Gruppe ausge-
führt) wurde gezeigt, dass die aus den 8 reinen Amid-nitrilen erhaltenen Lacto-
ne paarweise identisch sind. Die UV/VIS-, sowie die IR-Spektren sind für die
Beurteilung der paarweisen Identität wenig aussagekräftig (vgl. unten).

Die Einheitlichkeit der erhaltenen Lacton-Diastereomeren wurde mittels DC-,
LLC- und LC (LC von der Harvard-Gruppe ausgeführt) geprüft.

Danach wurden die paarweise identischen Lacton-Diastereomeren (geringe Mate-
rialmengen!) gemischt, sofern möglich (d.h. bei den Diastereomeren α - β und
 β - α) kristallisiert, und mittels UV/VIS, IR, NMR und MS charakterisiert.

Zusammenfassung der Ausbeuten der Lactonisierungsansätze

Tabelle 4

Mengenbestimmung:

Edukte: alle $\xi = 12000$ in Benzol, gemessen an der α -Bande: 560-568 nm.

Produkte: alle $\xi = 12000$ in Benzol, gemessen an der α -Bande: 575-582 nm.

Qualität der Edukte: Analysenmaterial von W. Fuhrer ([13], Seite 207 -211).

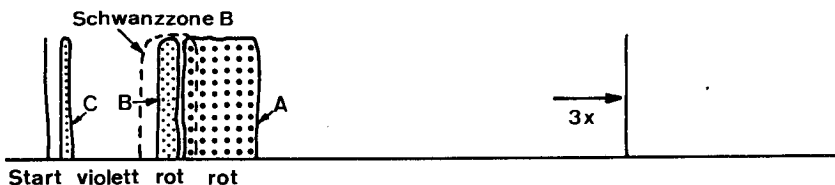
Ansatz	Edukt: Amid- nitril (μ Mol)	Chromophorausbeute *92		
		im Rohprodukt (μ Mol/ %) bez. Edukt	nach 1x TLC (μ Mol/ %) bez. Edukt	nach LLC-, der TLC-Hauptzonen A und TLC (μ Mol/%) bez. Edukt
A ($\alpha\alpha\alpha$)	2.08	1.96 / 94	A 1.895 / 91 B 0.053 / 3	1.604 / 77
B ($\alpha\beta\alpha$)	1.875	1.833 / 98	A 1.50 / 80 B 0.167 / 9	1.332 / 71
C ($\alpha\alpha\beta$)	2.11	2.12 /100	A 2.05 / 97 B -- --	1.700 / 81
D ($\alpha\beta\beta$)	2.04	2.04 /100	A 1.916 / 94 B 0.085 / 4	1.625 / 80
E ($\beta\alpha\alpha$)	2.06	1.96 / 95	A 1.77 / 86 B 0.058 / 3	1.500 / 73
F ($\beta\beta\alpha$)	1.916	1.855/ 97	A 1.625 / 85 B 0.200 / 10	1.375 / 72
G ($\beta\alpha\beta$)	2.12	2.12 /100	A 2.08 / 98 B 0.037 / 2	1.750 / 83
H ($\beta\beta\beta$)	1.875	1.875/100	A 1.56 / 83 B 0.179 / 10 C 0.068 / 4	1.332 / 71 *93

*92 Die Ausbeuten wurden auf dem Spektrometer PE 402 (Routine) bestimmt.
Die Wellenlänge (auch der α -Bande) stimmen dabei nicht mit den Analy-
senspektren (Cary-14) überein (vgl. 2.1.).

*93 Die Zone C (violett) beim Ansatz H zeigt dieselben DC-Eigenschaften wie
jene violette Zone des in 2.3.2. beschriebenen Ansatzes. Sie tritt bei den
Ansätzen A-G nur in Spuren, beim Ansatz H jedoch deutlich auf. Die α -
Bande im UV Spektrum dieser Zone (Benzol) ist mit ca 584 nm gegenüber
572 nm (PE 402) deutlich bathochrom verschoben.

Bemerkung zur TLC-Chromatographie der Rohprodukte (Kolonne 4, Tabelle 4)

Substanzmengen unter ca 3 μ Mol (ca 3 mg) wurden generell, und so auch hier, auf DC-Platten *12 im Corrinlaufmittelsystem (vgl. 2.1.) 3x entwickelt. Die TLC-Chromatographie war vor der nachfolgenden LLC-Chromatographie erforderlich, um eventuell noch vorhandenes, nicht umgesetztes Edukt (Grund cf. Diskussion 2.3.2.) vom Produkt abzutrennen. Eine direkte Abtrennung nicht umgesetzter Edukte (Amid-nitrile) mittels der schnellen LLC-Chromatographie (SI) wäre nicht in allen Fällen möglich gewesen. Die Lacton LLC-Fraktion 1 überlappt nämlich infolge zu geringer Retentionszeitunterschiede mit den Amid-nitril LLC-Fraktionen 2 (enthält $\alpha\beta\alpha$, $\beta\alpha\alpha$ und $\beta\alpha\beta$) und 3 (enthält $\alpha\beta\beta$), während die Lacton LLC-Fraktion 2 mit den Amid-nitril LLC-Fraktionen 4a ($\beta\beta\alpha$) resp. 5a ($\beta\beta\beta$) überlappt. Dieses Verhalten verunmöglichte eine saubere Edukt-Produkt Trennung mittels LLC allein. Die Rohprodukte wurden deshalb vor der LLC-Chromatographie zur Abtrennung event. vorhandener Edukte (diese wandern auf TLC- oder DC-Platten wenig langsamer als die daraus erhaltenen Lactone) der TLC-Chromatographie unterworfen. Dabei zeigte sich generell folgendes Bild:



Es wurde jeweils das Kieselgel der Hauptzone A, der Schwanzzone B und, wenn vorhanden, auch jenes der Zone C wie üblich (vgl. 2.3.2.) eluiert.

Die Hauptzone A enthält die entsprechenden Lactone. Die Natur der Zone C ist unbekannt und wurde infolge der kleinen Substanzmengen nicht weiter untersucht. Die Zonen B waren infolge der geringen Rf-Unterschiede gegenüber der Hauptzone A auch nach mehrmaligem Entwickeln nicht sauber abtrennbar. (Diese enthielten nicht umgesetzte Edukte, vgl. unten.) Um sicher zu sein, dass keine Edukte mehr die Hauptzone A verunreinigten, hatte man jeweils den hinteren Teil der Hauptzone A zusammen mit der nicht immer sauber abtrennbaren Zone B (zusammen Schwanzzone B) eluiert. Bei den Ansätzen A, C, E und G (Edukte mit C-8 α -Konfiguration) war die Zone B praktisch nicht vorhanden, sondern bestand hauptsächlich aus dem hinteren Rand der Hauptzone A. Die UV-Spektren dieser Schwanzzonen zeigten denn auch vorwiegend Produktstrukturierung, während die UV Spektren der Schwanzzonen der übrigen Ansätze B, D, F und H (Edukte mit C-8 β -Konfiguration) die Strukturierung der Eduktspektren dokumentierten. Die LLC-Analyse der Schwanzzonen ergab folgende Resultate:

LLC-Analyse der Schwanzzonen B

Tabelle 5 *95

Zuordnungskriterium: Retentionszeiten (Diese bleiben im System I im Gegensatz zum System II während längerer Zeit, jedenfalls während der LLC-Analyse, stabil)

Bedingungen: (S I, Kol A, 90 ml/h)

Bestimmung der Anteile: durch graphische Integration der Peakflächen (Summe der Flächen aller Peaks = 100 %)

Schwanzzone aus Ansatz	festgestellte Komponenten in der Schwanzzone:								Lactone *96	
	Amid-nitrile								($\alpha\alpha/\alpha\beta$)	($\beta\alpha/\beta\beta$)
	$\alpha\alpha\alpha$	$\alpha\beta\alpha$	$\alpha\alpha\beta$	$\alpha\beta\beta$	$\beta\alpha\alpha$	$\beta\beta\alpha$	$\beta\alpha\beta$	$\beta\beta\beta$	Lacton1	Lacton2
A ($\alpha\alpha\alpha$)	--	--							100%	
B ($\alpha\beta\alpha$)	16%	84%								
C ($\alpha\alpha\beta$)			kein	Edukt						
D ($\alpha\beta\beta$)		ca 1%	35%	64%						
E ($\beta\alpha\alpha$)					Spur	5%				95%
F ($\beta\beta\alpha$)					12%	63%				25%
G ($\beta\alpha\beta$)	*94					Spur	7%	Spur		38%
H ($\beta\beta\beta$)	*94						14%	30%		20%
R _t (Min.)	17.9	20.5	18.6	23.0	20.5	26.3	20.5	28.8	21.6	28.0

LLC-Chromatographie der TLC-Hauptzonen A (Tabelle 4, Kolonne 5)

Allgemeines: Die weitere Reinigung der TLC-Hauptzonen A geschah mittels LLC (S I, Kol A, 90 ml/h). Dabei zeigte sich generell folgendes, am Beispiel des $\alpha\cdot\beta$ -Lactons (Ansatz C) aufgezeigtes Bild, Abb. 25.

- *94 Die beiden Ansätze G und H enthalten ein unbekanntes Nebenprodukt. Die Retentionszeiten dieser Nebenprodukte sind grösser als sämtliche für Edukt oder Produkt gemessenen Werte und sind mit keinem dieser Werte korrelierbar. Auf eine weitere Untersuchung der Nebenprodukte wurde infolge der geringen Menge (ca je 50 μ g) verzichtet (Anteil aus G: 55%/R_t = 32.6 Min., Anteil aus H: 36%/R_t = 32.3 Min.)
- *95 Die Besprechung dieser Tabelle erfolgt im Zusammenhang mit der Isomerenzuordnung unter 2.3.3.4.
- *96 Eine Unterscheidung zwischen den Diastereomeren $\alpha\cdot\alpha$ und $\alpha\cdot\beta$ resp. $\beta\cdot\alpha$ und $\beta\cdot\beta$ ist in diesem LLC System nicht möglich.

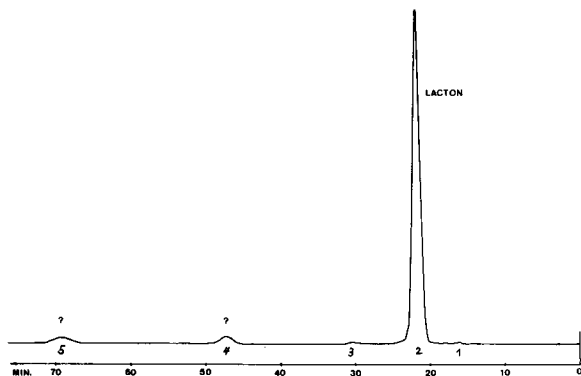


Abb. 25

- Vorfraktion 1: orange, nicht weiter untersucht, Retentionszeit ca 16 Min., Anteil 1 %.
- Hauptfraktion 2: Lactonzonen, Retentionszeiten je nach Säulenzustand zwischen 20-22 Min. für Lacton 1 und 28-31 Min. für Lacton 2. Diese Unterschiede ergaben sich, da nicht alle TLC-Hauptzonen A unter identischen Säulenbedingungen (bedingt durch Säulenregenerierung) chromatographiert werden konnten.
- Nachfraktion 3: rosa, nicht weiter untersucht, Retentionszeit ca 30 Min., Anteil 1 %.
- Nachfraktion 4: rot-violett, Retentionszeit ca 47-55 Min.
- Nachfraktion 5: rot-violett, Retentionszeit ca 69-75 Min., beide Fraktionen sehr breit, nicht mehr weiter untersucht. Auf Grund der Retentionszeiten handelt es sich vermutlich um partiell hydrolysierte Ester, Anteil je ca 1-2 %.

Durchführung

Das Abwarten der Nachfraktionen 4 und 5 erforderte für die LLC-Chromatographie der TLC-Hauptzonen A einen grossen Zeitaufwand. Dieser wurde folgendermassen erniedrigt: Bei der präparativen LLC-Chromatographie der TLC-Hauptzonen A wurde vor der Elution der Nachfraktionen 4 und 5 erneut Substanz (ca 300-500 μ g/Injektion) eingespritzt. Durch geeignete Wahl der Injektionsabstände wurde erreicht, dass sich die getrennten Fraktionen jedoch nicht mischten. Es waren jeweils ca 3-4 Injektionen zur Trennung der TLC-Hauptzonen A notwendig. Abbildung 26 (LLC-Chromatogramm von Lacton β · α , Ansatz F) zeigt ein Beispiel einer solchen präparativen Trennung.

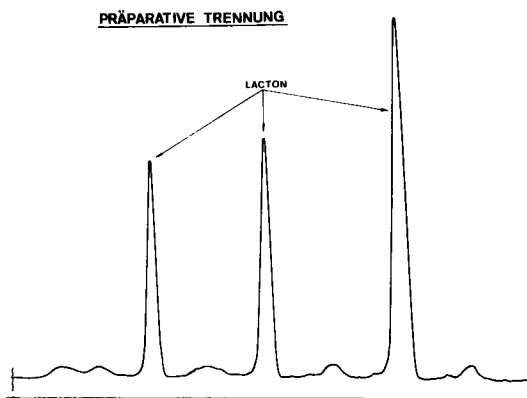


Abb. 26

Zur Trennung der TLC-Hauptfraktionen verfuhr man wie folgt: von den LLC-Hauptfraktionen wurden Randfraktionen abgeschnitten, um sicher zu sein, dass sich bei der präparativen Trennung der TLC-Hauptzonen A kein Material der oben beschriebenen Vor- resp. Nachfraktionen beimischt. Es wurden nur die Mittelfraktionen weiterverwendet, die wie üblich (vgl. 2.3.2.) nach Einengen der Lösungsmittel auf DC-Platten rechromatographiert, in Benzol gegen gesättigte KCl/0.1% KCN-Lösung gewaschen, schliesslich mit Hexan und Methanol gewaschen und über Nacht am HV bei RT getrocknet wurden. Die Ausbeuten der so erhaltenen Produkte sind in Tabelle 4 (Kolonne 5) zusammengefasst. Die derart gereinigten Lactone dienten der vorläufigen Charakterisierung der 8 erhaltenen Lactone mittels der CD-, IR- und UV/VIS-Spektroskopie, sowie der Identifikation und Charakterisierung mittels DC, LLC und LC.

2.3.3.2. Chromatographische Charakterisierung und Identifikation der Lacton-Diastereomeren

I) Dünnschichtchromatographie: Abb. 27 zeigt das DC-Verhalten der 8 isolierten, je paarweise identischen (Resultat vorweggenommen, vgl. LLC-Identifikation unten) Lacton-nitrile.

- Bedingungen:
- DC-Fertigplatten (Kieselgel, vgl. 2.1.)
 - ca 20 μ g Substanz/Fleck.
 - Referenz: Cobester, Cobesterlacton ([12], Seite 67, 75)
 - ix im Corrinlaufmittelsystem (vgl. 2.1.) entwickelt.
 - Laufdistanz ca 15 cm, Dauer ca 5h.

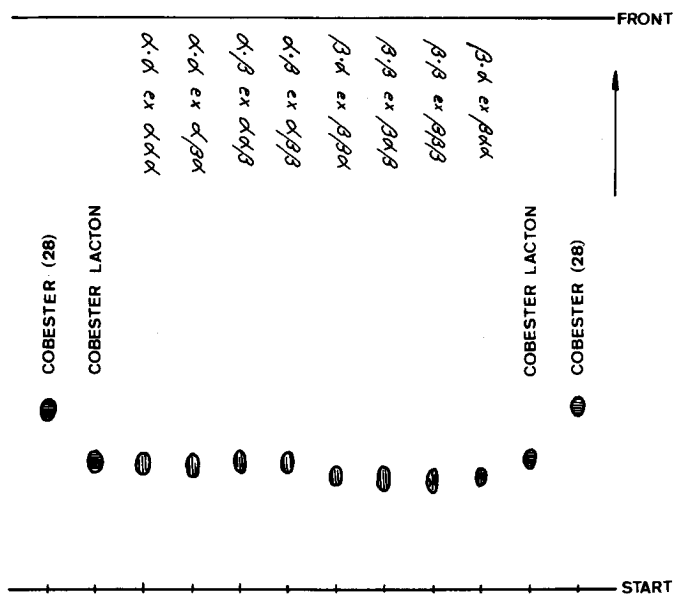


Abb. 27

Bemerkung: Auf die Angabe von Rf-Werten wurde verzichtet. Die Rf Unterschiede sind zu klein, und wegen der länglichen Fleckenform entstehen Rf Fehler, die mit den Unterschieden vergleichbar sind.

Es deutet sich ein langsames Wandern der C-3 β -Diastereomeren an. Eine Abtrennung dieser mittels DC ist jedoch auch nach mehrmaligem Entwickeln nicht möglich (zu kleine Rf Unterschiede).

Die erhaltenen Lactone waren in diesem DC einheitlich.

II) LLC-Chromatographie

Bemerkung: Die Retentionszeiten der Substanzen variieren je nach Zustand der Kolonne. Auch gegenüber einer gleichzeitig mit Substanz injizierten Referenz (meist Guajazulen gelöst in Hexan) ergeben sich für zwei identische Substanzen, vor allem im System II (langsameres System), meist um bis zu 10% abweichende Retentionszeiten. Ein Vergleich der Retentionszeiten allein ist deshalb, besonders bei der Verwendung des langsamen Systems (S II), ungenügend.

Zur Identifikation zweier Substanzen wurden diese zuerst einzeln mit Referenz und anschliessend als 1:1 Gemisch unmittelbar hintereinander injiziert. Die Werte für die theoretische Bodenzahl (vgl. 2.1.), sowie die Retentionszeiten wurden für das Gemisch und die Einzelsubstanzen verglichen. Diese Werte stimmten bei LLC Identität meist nur mit kleinen Abweichungen überein.

LLC-Identifikation im schnellen System (S I) (Zugehörigkeit der diastereomeren Lactone zu Lacton 1 und Lacton 2)

Bedingungen: (S I, Kol A, 90 ml/h), Referenz: Guajazulen gelöst in Hexan, ca 5mg/ml. Zuordnungskriterium: hier Retentionszeiten, da relat. gut reproduzierbar (schnelles System (S I)).

Tabelle 6

Retentionszeiten und theoretische Bodenzahlen

Lacton-Diastereomer aus Ansatz:	R _t (Min.)	R _o (Min.)	N _{th} / N _{eff}	Bemerkung
Referenz	5.6	0	3970/2400	
A α·α ex ααα	25.2	19.6	3970/2400	-Lactone aus den Ansätzen A, B, C, D im schnellen System (SI) identisch (Komponenten von Lacton 1).
B α·α ex αβα	24.8	19.6	3840/2300	
C α·β ex ααβ	24.8	19.6	3840/2300	
D α·β ex αββ	24.8	19.6	3840/2300	
E β·α ex βαα	33.0	27.4	3740/2570	-Lactone aus den Ansätzen E, F, G, H im schnellen System (SI) identisch (Komponenten von Lacton 2).
F β·α ex ββα	32.0	26.6	3520/2420	
G β·β ex βαβ	33.2	27.8	3780/2650	
H β·β ex βββ	33.6	28.0	3870/2680	
E+F+G+H =1:1:1:1	29.0	23.6	4150/2780	

Kommentar: Mit diesem LLC-System ist eine Trennung der bezügl. C-13 epimeren Lactone nicht möglich, wohl gelingt die Trennung der bezügl. C-3 epimeren Lactone in 2 einheitliche LLC-Fractionen, nämlich Lacton 1 und Lacton 2.

Identifikation der vier Lacton-Diastereomeren im langsamen LLC-System (S II) und dem LC-System

Bemerkung: In unserem Labor gelang nur die Trennung des Lacton-Diastereomeregemischs $\alpha \cdot \alpha / \alpha \cdot \beta$ mittels des LLC-Systems S II (langsam System). Dieses System wurde deshalb zur Identifikation und Reinheitsprüfung der erhaltenen Lacton-Diastereomeren herangezogen.

Die Trennung des $\beta \cdot \alpha / \beta \cdot \beta$ -Lacton-Diastereomeregemischs gelang mit unseren LLC-Systemen nicht.

Mittels der Hochdruck-Adsorptionschromatographie (LC) gelang es der Harvard-Gruppe nicht nur das $\alpha \cdot \alpha / \alpha \cdot \beta$ -Lacton-Diastereomeregemisch, sondern auch das $\beta \cdot \alpha / \beta \cdot \beta$ -Lacton-Diastereomeregemisch zu trennen. Die Identifikation und Reinheitsprüfung unserer Lacton-Diastereomeren, insbesondere für die $\beta \cdot \alpha$ und $\beta \cdot \beta$ -Diastereomeren, wurde freundlicherweise von der Harvard-Gruppe ausgeführt *98/*99.

LLC-Identifikation der Lacton Diastereomeren $\alpha \cdot \alpha$ und $\alpha \cdot \beta$

Tabelle 7

Retentionszeiten, Bodenzahlen

Bedingungen: (S II, Kol C, 45 ml/h), Referenz: Guajazulen. Die Retentionszeiten und Bodenzahlen sind auf den Injektionszeitpunkt (Spalte R_t , N_{th}) und auf die Referenz (Spalte R_G , N_{eff}) bezogen.

Injektionsmenge: ca 100 μ l / 10 μ l Injektionsgemisch (vgl. 2.1.)

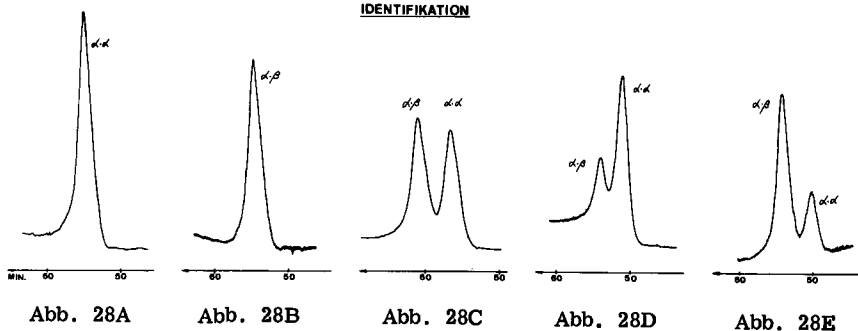
Ansatz (Diastereomer)	R_t *97 (Min.)	R_G *97 (Min.)	N_{th} / N_{eff}	Bemerkungen
A ($\alpha \cdot \alpha$ ex $\alpha \cdot \alpha$)	56.1	52.9	4820/4360	einheitlich
B ($\alpha \cdot \alpha$ ex $\alpha \cdot \beta$)	55.6	52.2	4830/4260	"
A+B (1:1)	55.2 Abb. 28A	51.9	4760/4220	"
C ($\alpha \cdot \beta$ ex $\alpha \cdot \alpha$)	54.8	51.6	3720/3280	"
D ($\alpha \cdot \beta$ ex $\alpha \cdot \beta$)	54.0	50.7	4550/4020	"
C+D (1:1)	54.6 Abb. 28B	51.4	4450/4020	"
Testgemisch: A+B+C+D=1:1:1:1	56.4 } 60.8 } Abb. 28C	53.4 57.8	3920/3520 4100/3700	beide Signale mit gleicher Intensität.
Testgemisch +A+B (2:1:1)	51.0 } 54.0 } Abb. 28D	47.8 50.4	4750/4170	1. Signal ca doppelt so intensiv wie 2. Signal
Testgemisch +C+D (2:1:1)	50.2 } 54.4 } Abb. 28E	46.6 50.8	4600/3970 4620/4030	2. Signal ca doppelt so intensiv wie 1. Signal

*97 vgl. 2.1. und Bemerkung unter LLC-Chromatographie.

*98 Herrn V. Jäger sei an dieser Stelle dafür herzlich gedankt.

*99 M. A. Wuonola, Arbeitsbericht Harvard, 17. 5. 73. Herrn M. A. Wuonola sei an dieser Stelle dafür herzlich gedankt.

IDENTIFIKATION



Durchführung und Diskussion: Die Lactone der Einzelactonierungen A-H wurden separat hintereinander injiziert; sodann wurden die entsprechenden Lactone gemischt (A mit B und C mit D) und erneut injiziert. Dabei wurde keine Auftrennung der injizierten Gemische beobachtet; die Lactone liefen in den Mischchromatogrammen einheitlich und mit vergleichbaren Retentionszeiten und Bodenzahlen wie in den Chromatogrammen der einzeln injizierten Proben. Die Lactone aus den Amid-nitrilpaaren ($\alpha\alpha\alpha$), ($\alpha\beta\alpha$) (Lactonierungsansätze A und B) resp. der Paare ($\alpha\alpha\beta$), ($\alpha\beta\beta$) (Lactonierungsansätze C und D) sind somit identisch. Ein zusätzliches Kriterium für die Identität lieferten die CD-Spektren (vgl. unten).

Eine Komplizierung der Identifikation ergab sich durch die sukzessive Verkürzung der Retentionszeiten während des Identifikationsexperiments, bedingt durch partielles Auswaschen von Stationärphase (vgl. 2.1.). Dies war vor allem bei der zur Identifikation verwendeten Kolonne C ein regelmässig beobachtetes Phänomen.

Das Auswaschen der Stationärphase hatte zur Folge, dass sich für das $\alpha\beta$ -Lacton-Diastereomere kürzere Retentionszeiten als für das $\alpha\alpha$ -Diastereomere ergaben. Richtigerweise sollte das $\alpha\beta$ -Diastereomere aber eine gegenüber dem $\alpha\alpha$ -Diastereomeren längere Retentionszeit aufweisen.

Der Nachweis wurde folgendermassen erbracht: Zuerst wurde ein 1:1:1:1 Gemisch (Testgemisch) der 4 einheitlichen Lactone der Ansätze A-D injiziert, welches im oben erwähnten LLC-System zu zwei Fraktionen auftrennte, deren Schreiberoutput zwei gleich intensive Signale lieferte. Danach mischte man zu diesem Testgemisch ca gleich viel Lacton $\alpha\alpha$ (1:1 Gemisch der Ansätze A und B) bei und injizierte erneut. Das 1. Signal des Schreiberoutputs dieses Mischchromatogrammes zeigte gegenüber dem 2. Signal (bei grösserer Retentionszeit) doppelte Intensität. Analoges Vorgehen mit den $\alpha\beta$ -Diastereomeren (1:1 Gemisch der Ansätze C und D) lieferte ein Mischchromatogramm, in welchem das 2. Signal (Schreiberoutput) doppelte Intensität aufwies. Damit ist das $\alpha\alpha$ -diastereomere Lacton als das schneller wandernde, das $\alpha\beta$ -Diastereomere als das langsamer wandernde Lacton-nitril identifiziert worden. Die Retentionszeiten variieren innerhalb weiter Grenzen und sind somit nur unter identischen Säulenbedingungen, die hier schwierig zu realisieren sind, ein charakteristisches Substanzmerkmal.

Ergänzung: Die entsprechenden Lactone (erhalten aus einer Lactonierungsvorversuchsreihe mit je ca 500 $\%$ Amid-nitril unter gleichen Bedingungen wie in

2.3.2.) wurden an der Harvard-Universität von V. Jäger *98 hinsichtlich Einheitlichkeit und Identität mittels der Hochdruck-Adsorptionschromatographie (LC) geprüft. Die Resultate bestätigen die Einheitlichkeit und die paarweise Identität der Diastereomeren $\alpha \cdot \alpha$ und $\alpha \cdot \beta$ (apparative Details vgl. unten).

Retentionszeiten der LC-Chromatogramme laut Angabe der Harvard-Gruppe:

Tabelle 8

Lacton	R_t (Min.)
$\alpha \cdot \alpha$ ex Amid $\alpha\alpha\alpha$	46.6
$\alpha \cdot \alpha$ ex Amid $\alpha\beta\alpha$	47.0
$\alpha \cdot \beta$ ex Amid $\alpha\alpha\beta$	43.2
$\alpha \cdot \beta$ ex Amid $\alpha\beta\beta$	44.0

LC-Identifikation der Lacton-nitril Diastereomeren $\beta \cdot \alpha$ und $\beta \cdot \beta$

In unserem Labor gelang die Trennung des $\beta \cdot \alpha / \beta \cdot \beta$ -Lacton-Diastereomeren-gemisches mit den vorher beschriebenen Methoden nicht. Die Identifikation und Reinheitsprüfung wurde deshalb an der Harvard-Universität ausgeführt, wo V. Jäger *98 mit der Hochdruck-Adsorptionschromatographie (LC) die Trennung des $\alpha \cdot \alpha / \alpha \cdot \beta$ und $\beta \cdot \alpha / \beta \cdot \beta$ -Diastereomeren-gemischs gelang. Laut Mitteilung von V. J. (Arbeitsbericht Harvard, Juni 1972) wurde dazu folgende Apparatur verwendet:

Apparatur: Hochdruck-Chromatograph der Firma Waters, Typ ALC-202-A
 Kolonne: 5 x 2ft, 0.09 in \varnothing .
 Trägermaterial: Corasil II (37-53 μ)
 Laufmittelsystem: Hexan (220):Methylalkohol(60):Isopropanol(10):0.02% HCN in Methanol(10).
 Flussmenge: ca 50 ml/h
 Detektor: UV 254 nm
 Injektionsmenge: ca 20-50 μ l.

Die Identifikation wurde von M. A. Wuonola *99 nach der von V. Jäger ausgearbeiteten Methode an der Harvard-Universität mit der oben beschriebenen Apparatur durchgeführt (in Vorversuchen hat V. Jäger die Einheitlichkeit der Lactone $\beta \cdot \alpha$ (aus Amid $\beta\beta\alpha$) und $\beta \cdot \beta$ (aus Amid $\beta\beta\beta$), hergestellt in Lactonisierungsvorversuchen nach 2.3.2., nachgewiesen. Die Amid-nitrile $\beta\alpha\alpha$ resp. $\beta\alpha\beta$ konnten damals noch nicht rein erhalten werden).

Das Material der nachstehend kurz zusammengefassten Identifikation stammte aus den Ansätzen E-H (Tabelle 4, letzte Kolonne).

Tabelle 9

Retentionszeiten:

Ansatz	Lacton		Edukt	R_t (Min.)
E	$\beta \cdot \alpha$	ex	$\beta\alpha\alpha$	49.7
F	$\beta \cdot \alpha$	ex	$\beta\beta\alpha$	49.9
G	$\beta \cdot \beta$	ex	$\beta\alpha\beta$	46.1
H	$\beta \cdot \beta$	ex	$\beta\beta\beta$	46.3

Die Resultate bestätigten die Einheitlichkeit und Identität der Lactone aus den Amid-nitrilpaaren E und F ($\beta\alpha\alpha$ und $\beta\beta\alpha$) resp. G und H ($\beta\alpha\beta$ und $\beta\beta\beta$).

Kommentar: Ein Vergleich der LC-Retentionszeiten (Tabellen 8 und 9) (diese sind bei LC besser reproduzierbar) zeigt, dass die Diastereomeren Lactone $\alpha.\alpha$ resp. $\beta.\beta$ mittels LC kaum getrennt werden können. Hingegen gelingt eine Trennung dieser Lacton-Diastereomere mittels LLC, da das $\alpha.\alpha$ -Diastereomere in Lacton 1, das $\beta.\beta$ -Diastereomere hingegen in Lacton 2 enthalten ist und Lacton 1 von Lacton 2 im schnellen LLC-System (S I) voneinander getrennt werden können (vgl. 2. 3. 2.).

In diesem Fall zeigt sich, dass die LLC-Chromatographie die Trennung von C-3 Epimeren, die LC-Chromatographie jedoch die Trennung von C-13 Epimeren besser gewährleistet. Die beiden Methoden ergänzen sich somit in schöner Weise.

Spektroskopische Identifikation der Lacton-Diastereomeren

Von den 8 reinen Lacton-Proben (vgl. Tabelle 4) wurden die IR-, UV- und CD-Spektren registriert. Dabei zeigte sich, dass die IR- und UV-Spektren, im Gegensatz zu den CD-Spektren, nicht für einen Identitätsnachweis herangezogen werden können, denn sie zeigen nur signifikante Unterschiede bezügl. der C-3 Epimerie, nicht aber bezügl. der C-13 Epimerie. Die IR- und UV-Spektren werden deshalb nicht hier, sondern bei der spektroskopischen Charakterisierung besprochen.

CD-Spektroskopie

Wie die CD-Spektren der Amid-nitril Diastereomeren ([13], Seite 236, 253) werden auch die CD-Spektren der Lacton-nitril Diastereomeren von der Konfiguration der Seitenketten stark beeinflusst (Besprechung cf. unten).

Die CD-Spektren der 8 reinen Lacton-Proben (erhalten aus den 8 Amid-nitrilen, vgl. Tabelle 4) sind in den Abb. 29A-H dargestellt.

Aufnahmebedingungen

Alle Spektren wurden in Methanol/0.02 % HCN aufgenommen. Die Konzentrationen wurden im UV/VIS für alle Diastereomeren auf 7.73×10^{-5} Mol/l, gemessen an der α -Bande (566-572 nm) mit dem hypothetischen $\epsilon = 11000$ eingestellt. Die Spektren der Diastereomeren $\alpha.\alpha$ ex $\alpha\alpha\alpha$ (Abb. 29A), $\alpha.\beta$ ex $\alpha\alpha\beta$ (Abb. 29C), $\beta.\alpha$ ex $\beta\alpha\alpha$ (Abb. 29E) und $\beta.\beta$ ex $\beta\alpha\beta$ (Abb. 29G) wurden in Tabelle 10 numerisch angegeben.

Kommentar:

Die Abbildungen 29A-H zeigen, dass je 2 Spektren paarweise identisch (deckungsgleich) sind, nämlich die Spektren der Diastereomeren $\alpha.\alpha$ ex $\alpha\alpha\alpha$ (Abb. 29A) mit $\alpha.\alpha$ ex $\alpha\beta\alpha$ (Abb. 29B), $\alpha.\beta$ ex $\alpha\alpha\beta$ (Abb. 29C) mit $\alpha.\beta$ ex $\alpha\beta\beta$ (Abb. 29D), $\beta.\alpha$ ex $\beta\alpha\alpha$ (Abb. 29E) mit $\beta.\alpha$ ex $\beta\beta\alpha$ (Abb. 29F) und $\beta.\beta$ ex $\beta\alpha\beta$ (Abb. 29G) mit $\beta.\beta$ ex $\beta\beta\beta$ (Abb. 29H).

Die Identität derselben Lacton-Diastereomeren ergibt sich auch aus der LLC- und der LC-Analyse (vgl. Tabellen 7 und 9).

In Abb. 29-AA ist das CD-Spektrum des von H. Maag charakterisierten 5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton (trägt an Stelle der f-Nitrilgruppe in (23) eine Methyl-estergruppe) (erhalten als Nebenprodukt bei der Herstellung des 5,15-bis-nor-Cobesters, vgl. [12], Seite 75) abgebildet. Dieses Lacton erwies sich auf Grund des NMR-Spektrums als isomerenrein und zeigt ein mit Abb. 29-A (Lacton-nitril $\alpha\cdot\alpha$) praktisch deckungsgleiches CD-Spektrum (vgl. 2.3.3.3.).

Schlussfolgerung:

Während der Lactonisierungsreaktion tritt weder an den Kohlenstoffatomen C-3 noch C-13 eine Epimerisierung auf.

Tabelle 10

CD-Spektren in Methanol/0.02% HCN. Die Konzentration basiert auf dem hypothetischen ξ -Wert (Methanol/0.02% HCN/bez. der α -Bande: 566-572 nm : 11000) und wurde für alle Isomere konstant auf 7.73×10^{-5} Mol/l eingestellt. Da die Konz. in die Berechnung der $\Delta\varepsilon$ -Werte eingeht, sind diese wegen des unsicheren ξ -Wertes ebenfalls fehlerbehaftet. Nullinienschwankungen absolut in $\Delta\varepsilon$ ca. 1° .

<u>Lacton-Nitril *100</u>			
<u>$\alpha\cdot\alpha$</u>	<u>$\alpha\cdot\beta$</u>	<u>$\beta\cdot\alpha$</u>	<u>$\beta\cdot\beta$</u>
566/-12.3 nm/ $\Delta\varepsilon$	568/-15.2	571/- 8.6	572/-11.1
543/- 7.7	543/-10.5	548/- 4.8	549/- 7.7
533/- 8.2	533/-10.7	537/- 5.5	537/- 8.0
477/ 0.0	463/ 0.0	480/ 0.0	465/ 0.0
416/+ 9.5	415/+ 6.6	419/+10.9	418/+ 8.5
408/+ 7.7	407/+ 6.0	410/+ 8.9	409/+ 7.4
392/+11.8	390/+10.0	395/+13.4	392/+11.8
385/+11.2	379/+10.6	390/+12.9	387/+11.5
375/+12.3	357/ 0.0	380/+14.6	382/+12.1
354/ 0.0	338/- 5.8	360/ 0.0	360/ 0.0
338/- 5.4	327/ 0.0	342/- 8.6	341/- 8.0
327/ 0.0	320/+ 4.5	327/ 0.0	328/ 0.0
320/+ 4.8	310/+ 0.6	324/+ 2.4	322/+ 3.1
315/ 0.0	308/ 0.0	319/ 0.0	316/ 0.0
298/-11.4	298/- 5.2	314/- 4.3	310/+ 1.4
282/- 2.8	285/ 0.0	302/-11.1	307/ 0.0
274/- 5.8	277/+ 2.2	283/- 2.6	300/- 4.3
267/- 3.5	261/+ 0.3	276/- 5.1	286/ 0.0
264/- 3.9	257/+ 0.8	269/- 3.2	274/+ 2.8
259/- 3.2 Abb.	253/ 0.0 Abb.	266/- 3.8 Abb.	262/+ 1.8 Abb.
248/-14.8 29-A	250/- 0.9 29-C	262/- 3.1 29-E	258/+ 2.3 29-H
		251/-14.5	252/+ 0.9

*100 Die aufgeführten Lacton-nitrile gelangten alle als Oele zur Charakterisierung. Es handelt sich dabei um die nicht gemischten, in Tab. 4 aufgeführten Lacton-nitrile folgender Herkunft: Lacton $\alpha\cdot\alpha$ ex Amid $\alpha\alpha\alpha$, Lacton $\alpha\cdot\beta$ ex Amid $\alpha\alpha\beta$, Lacton $\beta\cdot\alpha$ ex Amid $\beta\alpha\alpha$ und Lacton $\beta\cdot\beta$ ex Amid $\beta\beta\beta$. Die entsprechenden CD-Spektren der nach dem Identitätsnachweis gemischten Lactone liegen nicht vor, da in der Zwischenzeit die CD-Apparatur umgebaut wurde. Die neuen Spektren wiesen deshalb eine andere Darstellungsweise (Computerzeichnung) auf und hätten nicht direkt mit den früher erhaltenen verglichen werden können.

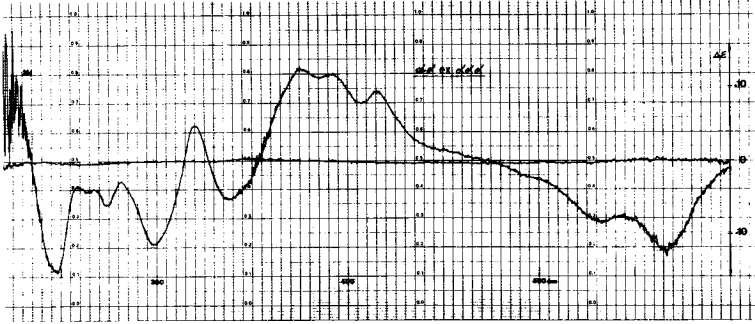
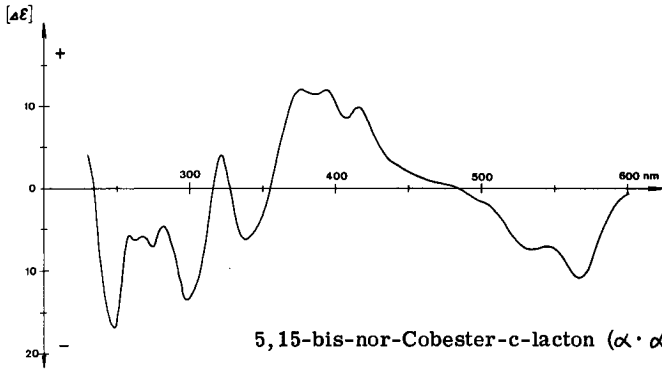


Abb. 29A



5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton ($\alpha \cdot \alpha$)

Abb. 29AA

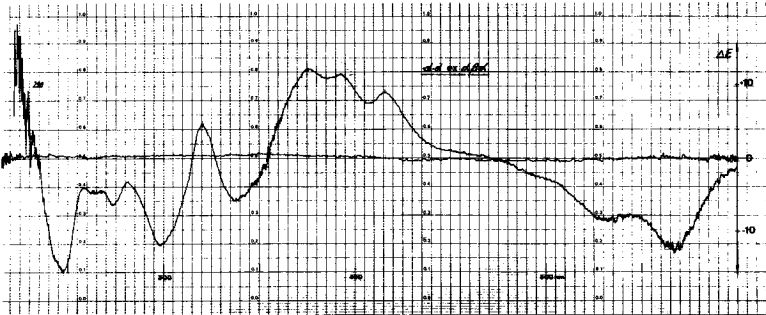


Abb. 29B

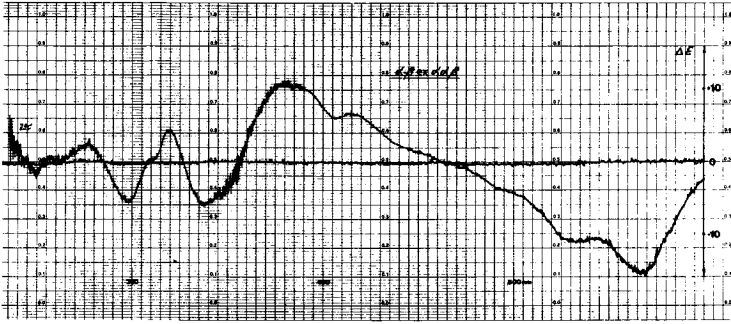


Abb. 29C

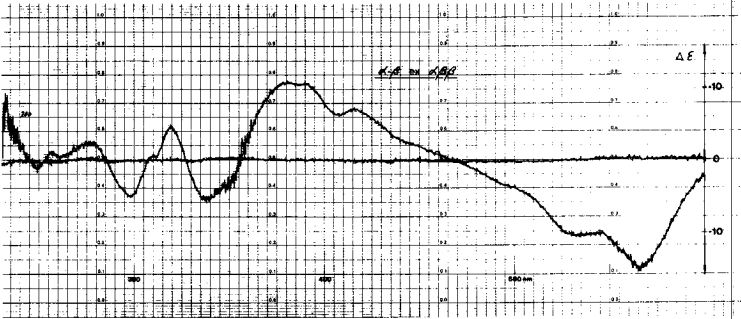


Abb. 29D

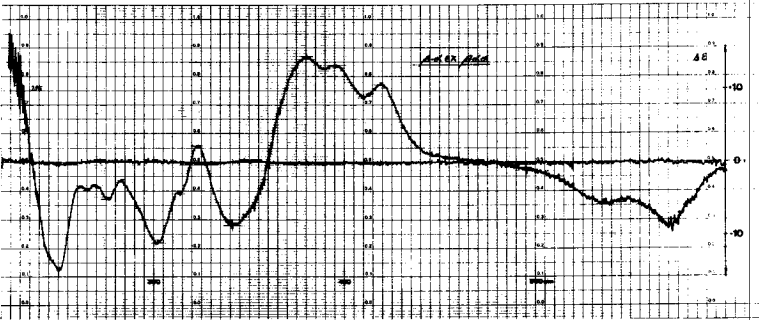


Abb. 29E

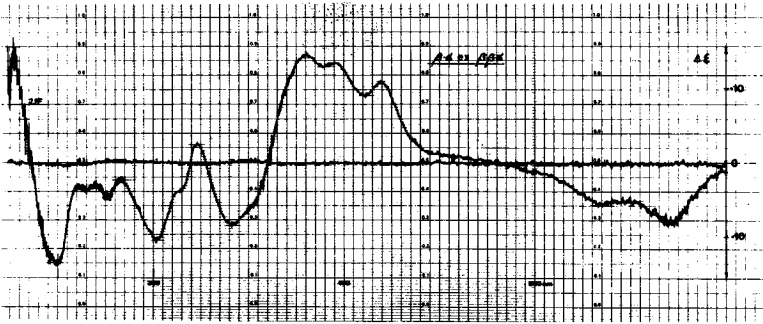


Abb. 29F

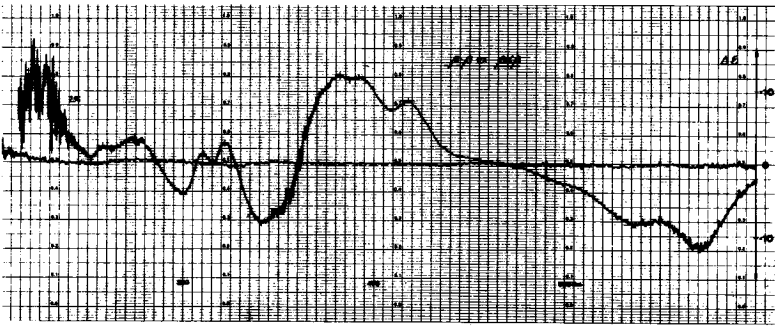


Abb. 29G

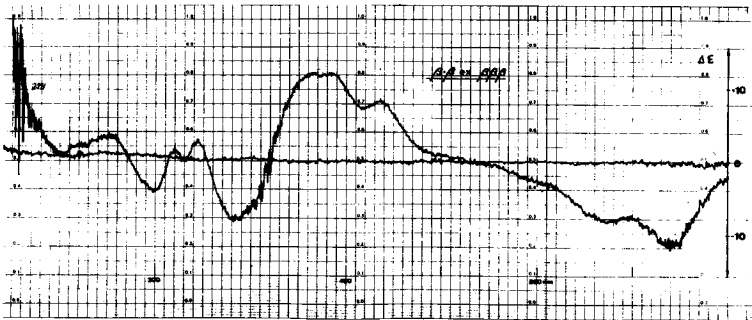


Abb. 29H

Vereinigung der identischen Lacton-Diastereomeren und Kristallisation der $\alpha\cdot\beta$ - und $\beta\cdot\alpha$ -Diastereomeren

Auf Grund des oben beschriebenen Identitätsnachweises vereinigte man die paarweise identischen LLC-, LC- und DC-einheitlichen Lactone zur weiteren Charakterisierung (je ca 1.5 μMol = ca 1.5 mg Material vor der Vereinigung). Kristallisationsvorversuche (Hexan/Benzol, Methylacetat/Hexan, Aethylacetat/Hexan) zur weiteren Reinigung der Lactone verliefen in unserem Laboratorium erfolglos. Die Lactone sind generell schwierig zu kristallisierende Substanzen.

Das 5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton trotzte allen während längerer Zeit von H. Maag [12] ausgeführten Kristallisationsversuchen, das Cobester-c-lacton konnte er schliesslich kristallin erhalten.

In der Zwischenzeit unternahm auch die Harvard-Gruppe intensive Kristallisationsversuche. Dabei gelang die Kristallisation des $\alpha\cdot\beta$ - und $\beta\cdot\alpha$ -Diastereomeren, von welchen wir freundlicherweise Impfkristalle erhalten hatten.

Zur Charakterisierung mittels der NMR-, IR-, UV/VIS- und MS-Spektroskopie gelangten die $\alpha\cdot\alpha$ - und $\beta\cdot\beta$ -Diastereomeren als Oele; die $\alpha\cdot\beta$ - resp. $\beta\cdot\alpha$ -Diastereomeren gelangten kristallin zur Charakterisierung. Die Kristalle erhielt man folgendermassen:

Kristallisation des $\alpha\cdot\beta$ und $\beta\cdot\alpha$ -Lacton-Diastereomeren.

Kristallisation des $\alpha\cdot\beta$ -Diastereomeren.

Nach Vereinigung der Lactone der entsprechenden Ansätze C und D (abzüglich ca 300-400 μg Material für LLC-Tests) aus Tabelle 4, wusch man das Oel 2x mit Hexan und Methanol (vgl. 2.1.) und trocknete die roten Rückstände über Nacht am HV.

Das rote Oel (ca 3 μMol) löste man in 250 μl abs. Essigester, gab 250 μl Hexan mittels einer Mikrospritze unter die Lösungsmitteloberfläche zu und impfte mit nicht sichtbaren Spuren von kristallinem $\alpha\cdot\beta$ Lacton der Harvard-Gruppe *101 an. (Kristallisation bei RT unter Lichtschutz.) Nach ca 5h erschienen die ersten Kristalle. Nach 3 Tagen gab man 200 μl Hexan und nach weiteren 2 Tagen (total nach 5 Tagen) nochmals 70 μl Hexan auf die gleiche Weise zu. Nach 8 Tagen pipettierte man die Mutterlauge (0.063 $\mu\text{Mol}/\epsilon$ Benzol/568: 12000) ab, wusch die roten feinen Nadeln mit Hexan und kristallisierte nach kurzem Trocknen am HV noch 2x analog wie oben beschrieben.

2. Mutterlauge: 0.124 μMol (ϵ Benzol/568: 12000)

3. Mutterlauge: 0.076 μMol (ϵ Benzol/568: 12000)

Die vereinigten und gereinigten (TLC, Extraktion, Waschen) Mutterlauen konnten nicht mehr kristallisiert werden.

Die erhaltenen Kristalle (ca 2.6 μMol , 85 %) wurden getrocknet (HV/RT/2 Tage) und für die NMR- (Abb. 47), IR- (Abb. 39), UV/VIS- (Abb. 31, 35) und MS- (Abb. 43) Charakterisierung verwendet.

*101 Ich danke Herrn V. Jäger, der Harvard-Gruppe, für das Ueberlassen von Impfkristallen.

Anmerkung

Die Kristalle waren in Deuterobenzol (NMR-Lösungsmittel) nicht mehr gut löslich. Man löste sie deshalb zuerst in Chloroform *48, entfernte dieses am RV, löste die Probe danach 2x in ca 0.5 ml Deuterobenzol, sog jeweils am RV das Lösungsmittel ab und trocknete über Nacht bei RT am HV. Von dieser Probe registrierte man das NMR (Abb. 47). Die NMR-Probe filtrierte man anschliessend mit zusätzlichem Chloroform *48 durch Watte, engte das Lösungsmittel am RV ein und trocknete wie oben. Von dieser Probe registrierte man das IR-Spektrum (Abb. 39). Die wiederum mit Chloroform *48 durch Watte filtrierte Probe engte man am RV ein und kristallisierte die Probe analog obiger Vorschrift 1x. Von dieser Probe registrierte man die UV-Spektren (Abb. 31, 35) und das MS-Spektrum (Abb. 43).

Kristallisation des β - α -Diastereomeren

Nach Vereinigung der beiden Ansätze E und F (abzüglich ca 300-400 μ g LLC-Testmaterial) aus Tabelle 4 und analoger Vorbehandlung wie bei der Kristallisation des α - β -Diastereomeren, löste man das rote Oel (ca 2.4 μ Mol) in 160 μ l abs. Methylacetat und gab mittels einer Mikrospritze langsam 200 μ l Hexan unter die Lösungsoberfläche zu (bei zu schneller Zugabe entsteht Trübung und Ausölen). Diese Probe impfte man mit nicht sichtbaren Mengen von Harvard-Impfkristallen *101 an. Nach ca 1 Tag erschienen die ersten Kristallspuren. Man liess deshalb während 2 Wochen bei RT und Lichtausschluss kristallisieren. Danach entfernte man die 1. Mutterlauge 0.066 μ Mol (ϵ Benzol/582: 12000), wusch die klotzigen Kristalle mit Hexan und kristallisierte nach kurzem Trocknen am HV/RT noch 2x analog der beschriebenen Methode.

2. Mutterlauge: 0.292 μ Mol (ϵ Benzol/582: 12000)

3. Mutterlauge: 0.094 μ Mol (ϵ Benzol/582: 12000)

Die vereinigten und gereinigten (TLC, Extraktion und Waschen) Mutterlauen konnten nicht mehr kristallisiert werden.

Die erhaltenen Kristalle (ca 1.9 μ Mol, 80 %) wurden getrocknet (HV/RT/2 Tage) und für die Charakterisierung verwendet (gleiche Behandlung wie das α - β -Diastereomere, siehe oben). NMR: Abb. 48, IR: Abb. 40, UV/VIS: Abb. 32/36, MS: Abb. 44.

2.3.3.3. Spektroskopische Charakterisierung der 5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton-f-nitril-Diastereomeren (Lacton-nitrile) *102

Summenformel: $C_{50}H_{62}N_7O_{12}Co$: 1011 für alle Isomeren (1 μ Mol = ca 1 mg)

Tabelle 11

<u>UV/VIS Benzol/0.02% HCN</u>		<u>Lacton-Nitril *103</u>			
<u>$\alpha\cdot\alpha$</u>		<u>$\alpha\cdot\beta$</u>	<u>$\beta\cdot\alpha$</u>		<u>$\beta\cdot\beta$</u>
qualitativ		894 δ /25 ml	931 δ /25 ml		qualitativ
(Ablesegenauigkeit: 1 nm)					
576/0.475	max/Ex1	575/11590	582/10980	max/Ex1	580/0.446
553/0.272	min/Ex2	551/7500	559/7240	min/Ex2	557/0.283
539/0.314	max/Ex3	537/8220	543/8610	max/Ex3	542/0.328
497/0.140	sh	496/3900	504/4060	sh	503/0.142
469/0.096	sh			sh	471/0.103
446/0.069	min	448/2340	450/1730	min	451/0.075
420/0.180	max	419/4630	426/4500	max	424/0.170
407/0.132	min	407/2730	413/3470	min	412/0.138
397/0.175	sh	396/4460	402/4330	sh	402/0.167
362/1.000	max/Ex4	362/25900	365/24500	max/Ex4	365/1.000
334/0.329	min	334/9600	337/8540	min	337/0.338
329/0.335	sh	328/9750	323/9350	max	322/0.384
319/0.361	max	320/10000	315/8400	min	315/0.341
308/0.331	sh	308/8900	310/8450	max	310/0.352
291/0.268	min	292/7000	292/6180	min	293/0.282
278/0.480	max	278/10450	280/10620	max	279/0.500
$\delta/\alpha = 2.11$		$\delta/\alpha = 2.24$	$\delta/\alpha = 2.24$		$\delta/\alpha = 2.24$
Abb. 30		Abb. 31	Abb. 32		Abb. 33

Für die Aufnahme der qualitativen UV-Spektren wurden Chromophorkonzentrationen zwischen $3.5\text{-}3.65 \times 10^{-5}$ Mol/l (hypothetisches ϵ der α -Bande = 12000) verwendet.

*102 Die CD-Spektren sind unter 2.3.3.2. aufgeführt.

*103 Das $\alpha\cdot\alpha$ und $\beta\cdot\beta$ Diastereomere wurde als öliges, das $\alpha\cdot\beta$ und $\beta\cdot\alpha$ Diastereomere hingegen als 3x krist. Produkt charakterisiert (vgl. oben).

Tabelle 12

UV/VIS		Methanol/0.02% HCN	Lacton-Nitril *103		
$\alpha \cdot \alpha$		$\alpha \cdot \beta$	$\beta \cdot \alpha$	$\beta \cdot \beta$	
qualitativ (Ablesegenauigkeit: 1 nm)		894 δ / 25 ml	931 δ / 25 ml	qualitativ	
567/0.386	max/Ex1	566/10450	572/10300	max/Ex1	571/0.377
545/0.252	min/Ex2	542/7060	550/7000	min/Ex2	548/0.257
531/0.284	max/Ex3	530/7500	535/8050	max/Ex3	534/0.282
493/0.160	sh	490/4660	496/4250	sh	494/0.155
437/0.069	min	440/2480	442/1870	min	444/0.075
413/0.137	max	412/3820	418/3880	max	416/0.133
400/0.100	min	398/3050	404/2760	min	402/0.104
391/0.120	sh	392/3390	395/3340	sh	394/0.120
356/1.000	max/Ex4	356/28100	359/29800	max/Ex4	359/1.000
319/0.255	min	320/8050	328/7050	min	328/0.270
314/0.280	sh	314/8540	316/7830	max	316/0.294
307/0.398	max	307/8900	307/8100	max	307/0.302
296/0.282	sh	295/8250	289/6580	min	288/0.238
287/0.220	min	287/7500	275/12200	max	275/0.400
274/0.400	max	274/11750			
$\delta/\alpha = 2.58$		$\delta/\alpha = 2.57$	$\delta/\alpha = 2.65$		$\delta/\alpha = 2.65$
Abb. 34		Abb. 35	Abb. 36		Abb. 37

Zur Aufnahme der qualitativen Spektren wurden Chromophorkonzentrationen zwischen $3.2-3.4 \times 10^{-5}$ Mol/l (hypothetisches $\epsilon = 11000$) verwendet.

Tabelle 13

IR (CHCl₃) ca 2%-Lösung in Chloroform, Schichtdicke der Zellen: 0.207 mm. Es werden nur die wichtigsten Banden angegeben.

Lacton-Nitril *103

	$\alpha \cdot \alpha$	$\alpha \cdot \beta$	$\beta \cdot \alpha$	$\beta \cdot \beta$
f-Nitril	2250 w cm ⁻¹	2250 w cm ⁻¹	2250 w cm ⁻¹	2250 w cm ⁻¹
axiale CN-Liganden	2120 w	2122 w	2122 w	2122 w
Lactongruppe	1795 m	1795 m	1795 m	1795 m
COOCH ₃	1735 s	1735 s	1735 s	1735 s
	1642 w	1642 w	1635 w	1635 w
Chromophor I	1602 m	1600 m	1596 m	1596 m
Chromophor II	1577 m	1578 m	1574 m	1573 m
	1524 m	1525 m	1524 m	1523 m
	1438 m	1438 m	1438 m	1438 m
	1368 m	1368 m	1368 m	1368 m
	1168 m	1168 m	1170 m	1170 m
	1075 w	1075 m	1080 w	1078 m
	Abb. 38	Abb. 39	Abb. 40	Abb. 41

Tabelle 14

<u>MS</u>	Direct Inlet, Goldfolienobjektträger, RMU-6M.			
	<u>Lacton-Nitril</u> *103 (Fragmente unterhalb m/e = 912 und Peaks ≤ 10 % nicht tabelliert).			
	<u>$\alpha \cdot \alpha$</u>	<u>$\alpha \cdot \beta$</u>	<u>$\beta \cdot \alpha$</u>	<u>$\beta \cdot \beta$</u>
Einlasstemperatur:	185°	185°	180°	180°
M ⁺	nicht beobachtet!		1012/10	1012/10
			1011/10	1011/10
			1010/10	1010/10
	943/15	943/14		
	942/15	942/10		
M ⁺ - CO ₂ - CN	941/19	941/14		
	940/12			
	930/19	930/18	930/10	
	929/37	929/36	929/25	929/31
	928/37	928/20	928/14	928/19
	927/44	927/36	927/22	927/27
	917/25	917/18		
	916/56	916/50	916/50	916/38
M ⁺ - CO ₂ - 2 CN	915/100	915/100	915/100	915/100
	914/37	914/45	914/60	914/58
	913/56	913/82	913/90	913/77
	912/19			
	Abb. 42	Abb. 43	Abb. 44	Abb. 45

NMR C_6D_6 100 MHz Spektrum, aufgenommen auf Varian XL-100 mit Varian Computer 620 L, CAT, je 20 scans *104. Substanz in Mikrozelle ca 120 μ l C_6D_6 *105. chem. Verschiebung in ppm bez. TMS.

Tabelle 15

	<u>Lacton-Nitril</u> *103			
	<u>$\alpha\cdot\alpha$</u>	<u>$\alpha\cdot\beta$</u>	<u>$\beta\cdot\alpha$</u>	<u>$\beta\cdot\beta$</u>
Chromophorgebundene Protonen	5.98 (C-5)	5.97 (C-5)	5.85 (C-10)	5.87 (C-10)
Zuordnung: (vgl. 2. 3. 3. 4.)	5.86 (C-10)	5.85 (C-10)	5.56 (C-15)	5.60 (C-5)
H - C - 19	3.89/3.99(d)	3.90/4.00(d)	4.24/4.34(d)	4.28/4.39(d)
Methylester	3.56	3.54	3.48	3.44
	3.46	3.38	3.44	3.38
	3.35	3.34	3.35 (2)	3.36
	3.26	3.26	3.28	3.34
	3.19	3.18		3.30
Nicht interpretierbarer Signalhaufen der übrigen Protonen	3.70-1.50(m)	3.70-1.50(m)	3.20-1.50(m)	3.20-1.50(m)
Methylgruppen: CH_3-C_1	1.38	1.38	1.32	1.32
restliche CH_3	1.08	1.08	1.22	1.22
	0.97	0.98	0.90	1.00
	0.88	0.80 (2)	0.88	0.93 (2)
	0.78 (2)	0.70	0.84	
			0.78	0.73
Fremdsignale:	6.39	6.40		6.40
	6.25	6.23	6.20	6.25
	5.62	5.61		
	1.40		1.40	1.40
		0.96		
		0.89		
Menge:	ca 2 mg	ca 2 mg	ca 1.5 mg	ca 2 mg
	Abb. 46	Abb. 47	Abb. 48	Abb. 49

Die Fremdsignale sind von schwacher Intensität. Sie sind nicht mit NMR-Banden der Edukte oder der Produkte korrelierbar. Auf Grund der Abwesenheit von Fremdsignalen im Bereiche der sehr intensiven Methylestersignale vermuten wir, dass sie nicht-corrinoiden Ursprungs sind. H_2O -Signal immer um 0.8 - 0.9 ppm.

*104 Ich danke Herrn Prof. J. F. M. Oth (ETH-Zürich) für die Aufnahme dieser Spektren.

*105 vgl. Anmerkung bei Kristallisation der $\alpha\cdot\beta$ - und $\beta\cdot\alpha$ -Diastereomeren.

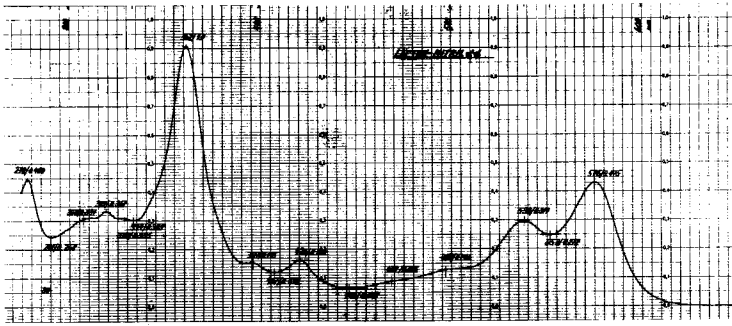
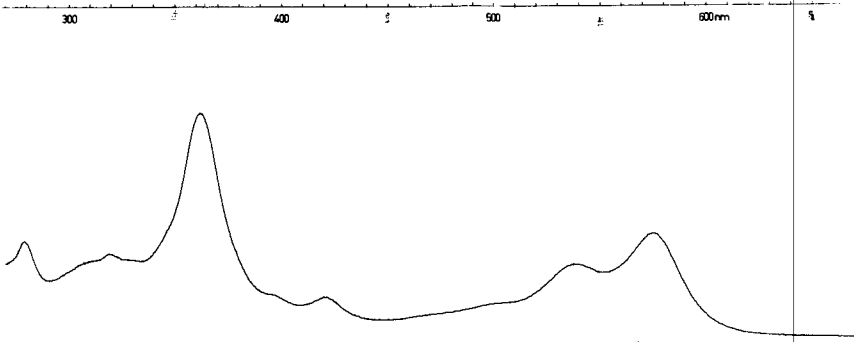


Abb. 30



5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton ($\alpha' \alpha$)

Abb. 30A

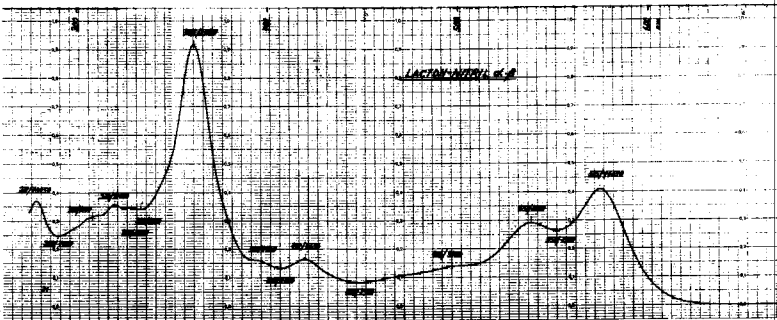


Abb. 31

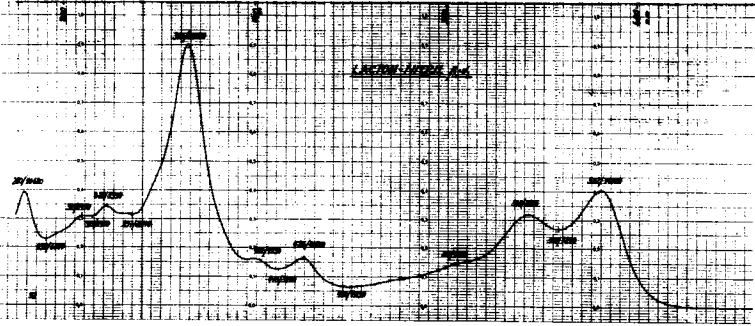


Abb. 32

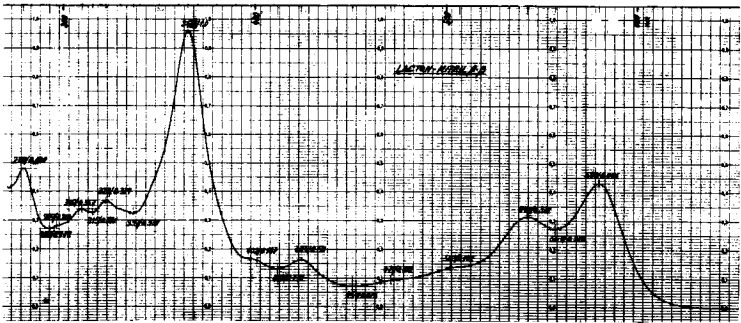


Abb. 33

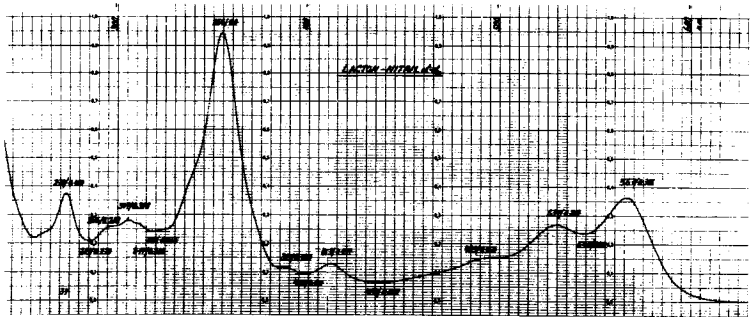


Abb. 34

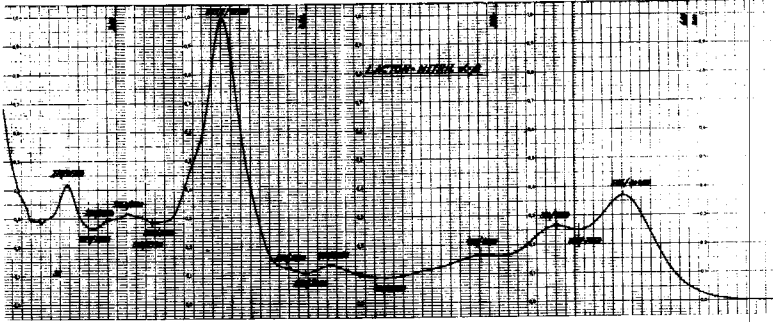


Abb. 35

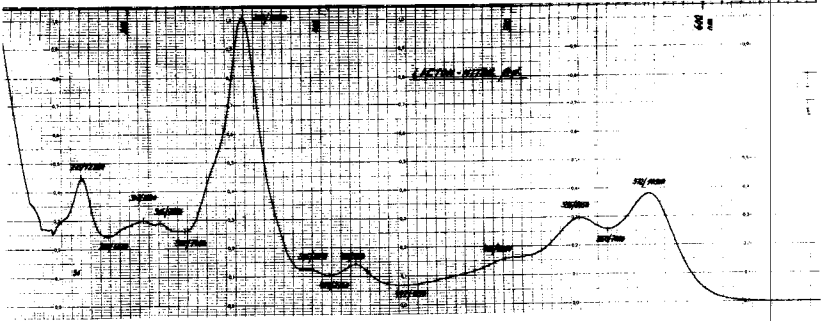


Abb. 36

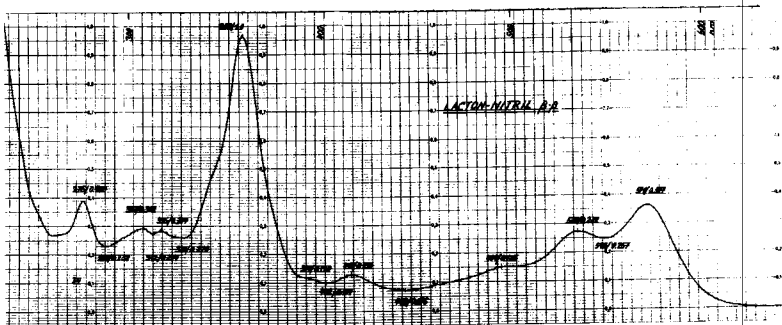


Abb. 37

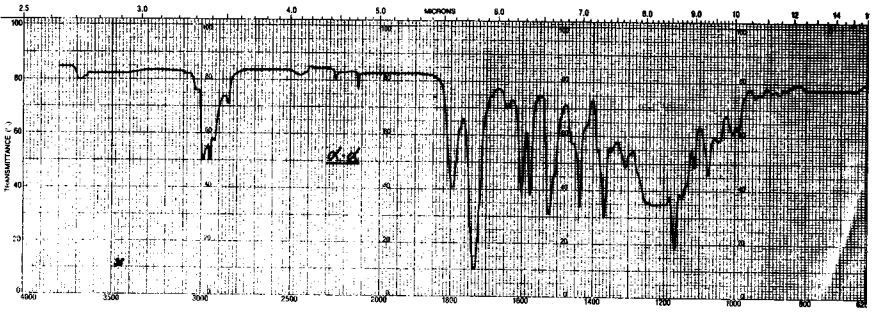


Abb. 38

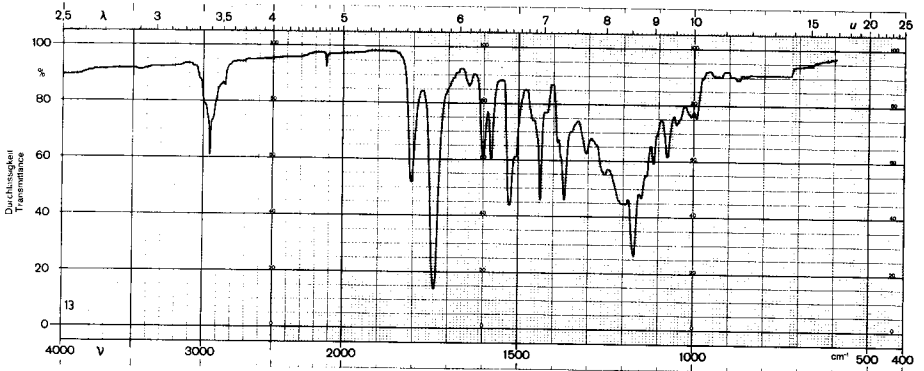


Abb. 38A 5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton ($\alpha \cdot \alpha$)

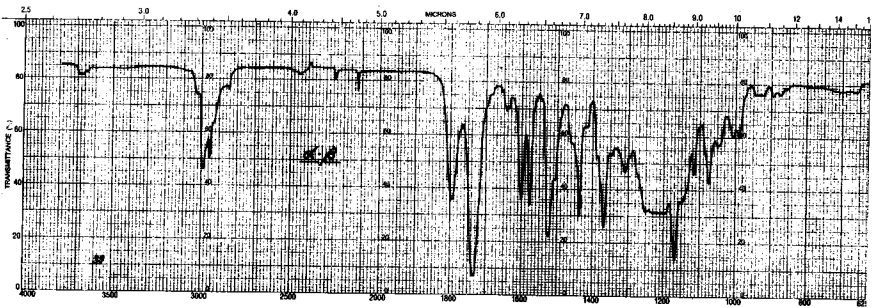


Abb. 39

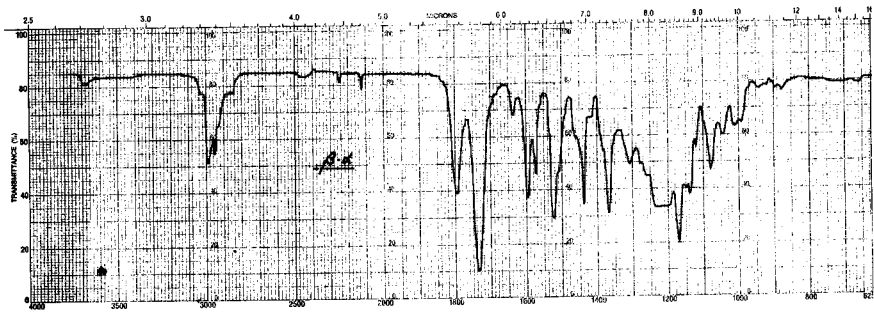


Abb. 40

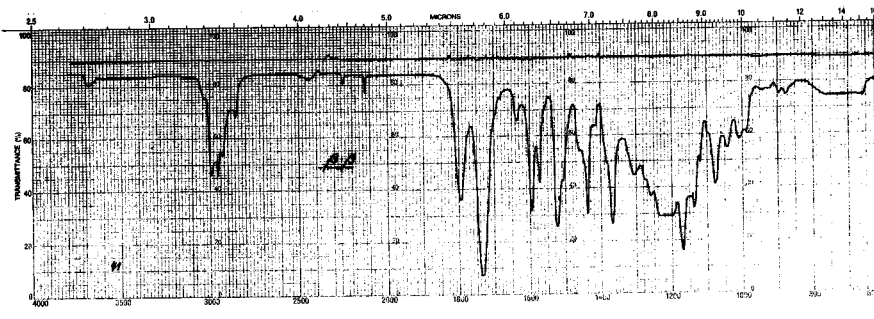


Abb. 41

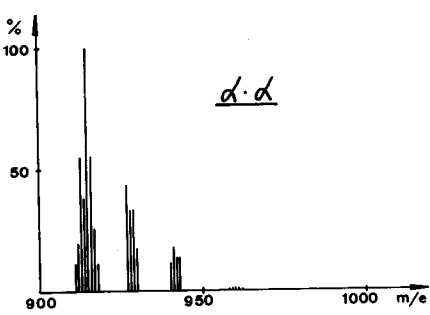


Abb. 42

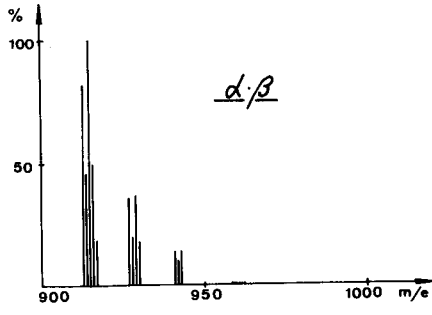


Abb. 43

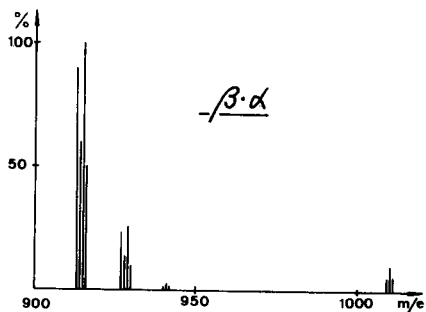


Abb. 44

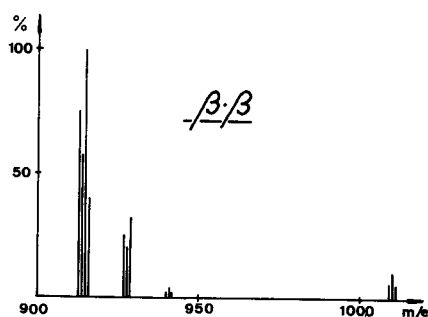


Abb. 45

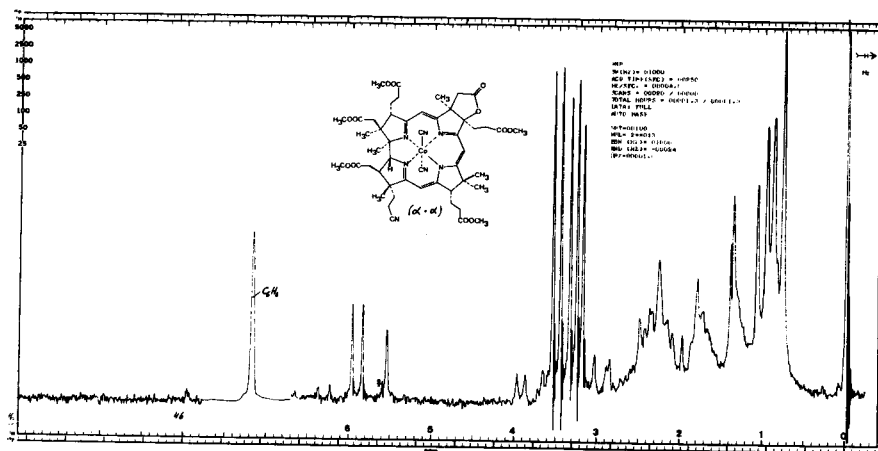


Abb. 46

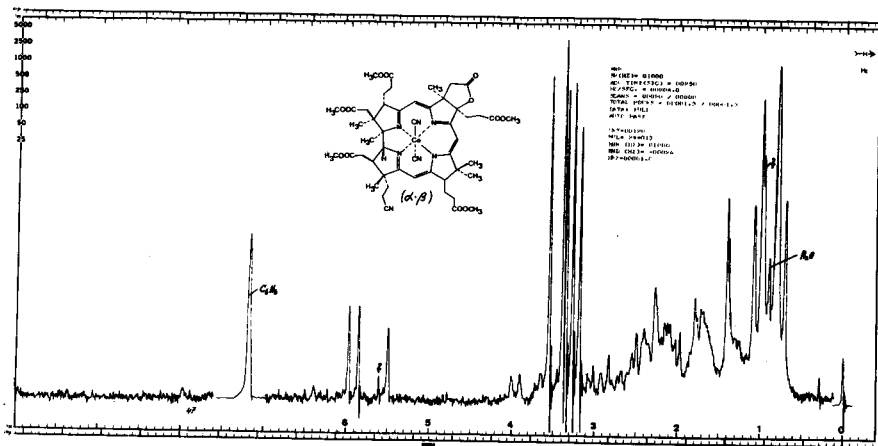


Abb. 47

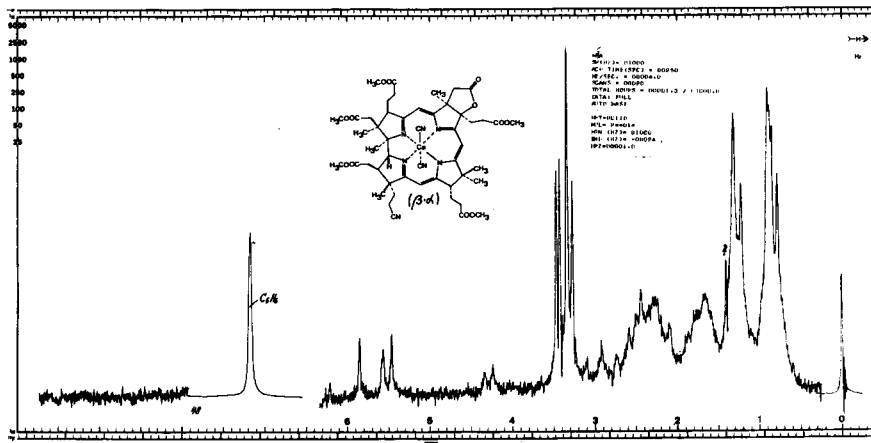


Abb. 48

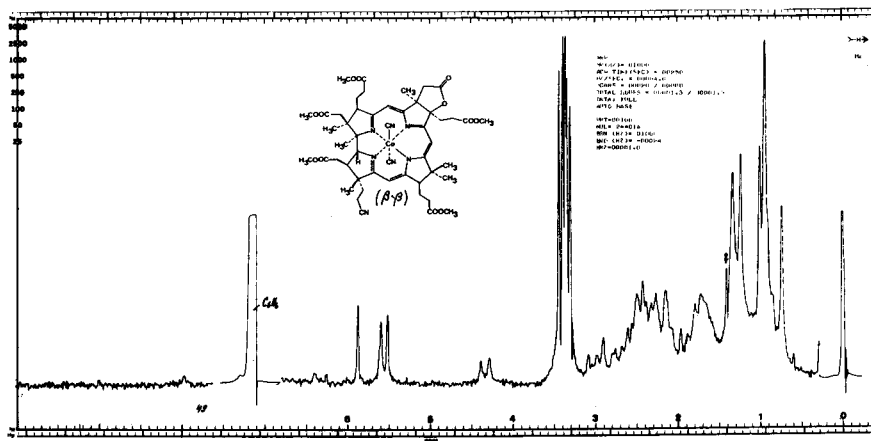


Abb. 49

2.3.3.4. Diskussion der spektroskopischen Daten und Konfigurationszuordnung der vier diastereomeren Lactone

I. Diskussion der Spektren

UV/VIS

Der Vergleich der Intensitäten (Tabelle 16) der 4 Absorptionsextremata und die Positionen derselben (Tabellen 11 und 12) lässt folgende Tendenzen erkennen.

- Das Spektrum des $\alpha \cdot \alpha$ -Isomeren (Abb. 30) ist praktisch identisch mit dem Spektrum des auth. 5,15-bis-nor-Cobester-c-lactons (vgl. Abb. 30A und H. Maag [12]).
- unnatürliche Konfiguration am Ring A (C-3 β) hat eine bathochrome Verschiebung des ganzen Spektrums zur Folge, insbesondere beträgt die Verschiebung im VIS-Teil bis ca 6 nm.
- unnatürliche Konfiguration am Ring C (C-13 β) hat praktisch keinen Einfluss auf die Bandenpositionen. Der sogenannte "Neo-Effekt" (signifikant kleineres Verhältnis von Extremum 1 : Extremum 2 (Ex1/Ex2) wird im Falle der Lacton-Nitrile $\alpha \cdot \alpha$ und $\alpha \cdot \beta$ stark, im Falle $\beta \cdot \alpha$ und $\beta \cdot \beta$ kaum beobachtet. Im Gegensatz dazu stehen die signifikanten Unterschiede bei den Amid-Nitrilen (22) (vgl. [13], Seite 252) und am ausgeprägtesten beim Vitamin B₁₂ resp. Neo-Vitamin B₁₂, wo er auch erstmals entdeckt worden war [41].

Tabelle 16

Vergleich der Intensitätsverhältnisse der Extremata 1, 2, 3 und 4
(vgl. Tabellen 11 und 12)

Werte in Benzol, in Klammern Werte in Methanol.

Intensitäten (rel. ϵ -Werte)

Isomer	$(\alpha$ -Bande)		$(\beta$ -Bande)		$(\gamma$ -Bande)		Ex1/Ex3	Ex4/Ex1
	Ex 1	Ex 2	Ex 3	Ex 4	Ex1/Ex2	Ex4/Ex1		
$\alpha \cdot \alpha$	0.475 (0.386)	0.272 (0.252)	0.314 (0.284)	1.000 (1.000)	1.75 (1.53)	1.51 (1.36)	2.11 (2.58)	
$\alpha \cdot \beta$	0.447 (0.372)	0.289 (0.252)	0.317 (0.267)	1.000 (1.000)	1.55 (1.48)	1.41 (1.39)	2.24 (2.57)	
$\beta \cdot \alpha$	0.448 (0.346)	0.295 (0.235)	0.351 (0.270)	1.000 (1.000)	1.52 (1.47)	1.28 (1.28)	2.24 (2.65)	
$\beta \cdot \beta$	0.446 (0.373)	0.283 (0.257)	0.328 (0.282)	1.000 (1.000)	1.58 (1.47)	1.36 (1.34)	2.24 (2.65)	
auth. 5,15- bis-nor- Cobester- c-Lacton [12], S. 75	0.460 (0.385)	0.288 (0.267)	0.324 (0.292)	1.000 (1.000)	1.60 (1.44)	1.42 (1.32)	2.18 (2.60)	

IR

Die IR-Spektren zeigen nur kleine Unterschiede.

C-13-Epimerie:

-Das Spektrum des $\alpha \cdot \alpha$ Isomeren ist praktisch identisch mit jenem des $\alpha \cdot \beta$ Isomeren. Das Gleiche gilt für die $\beta \cdot \alpha$ resp. $\beta \cdot \beta$ Isomeren.

C-3- Epimerie:

- Die sehr schwache und relativ breite Bande bei 1640 cm^{-1} bei den C-3 α -Lactonen wird schlanker und intensiver bei den C-3 β -Lactonen.
- Die Chromophorbanden bei 1602 resp. 1568 cm^{-1} bei den C-3 α -Lactonen sind bei den C-3 β -Lactonen schwach (ca $2-3 \text{ cm}^{-1}$) nach rot verschoben. Insbesondere treten beim Uebergang von C-3 α -Konfiguration (kurzwellige Bande schwächer als langwellige) nach C-3 β -Konfiguration (kurzwellige Bande intensiver als langwellige) gerade umgekehrte Intensitätsverhältnisse dieser beiden intensiven Chromophorbanden auf. Dies ist der einzige signifikante Unterschied in den IR-Spektren der $\alpha \cdot \alpha / \alpha \cdot \beta$ (= Lacton 1) und $\beta \cdot \alpha / \beta \cdot \beta$ (=Lacton 2)-Diastereomerenmische (vgl. 2. 3. 1. und 2. 3. 2.);
- weniger deutlich ist die Intensitätszunahme der schwachen, bei 1138 cm^{-1} liegenden Bande beim Uebergang von C-3 α nach C-3 β -Konfiguration. Umgekehrtes gilt für die schwache, bei ca 1120 cm^{-1} liegende Bande.
- Im IR wird deutlich die paarweise Zugehörigkeit zweier Spektren (C-13-Epimerenpaare) offenbar. Die paarweise Uebereinstimmung dieser Spektren ist ausserdem eine Bestätigung, dass die richtigen *106 Epimeren zu Paaren geordnet worden sind (vgl. dazu auch die CD- und NMR-Spektren).

CD

Die deutlichsten Unterschiede zwischen den 4 Lacton-Diastereomeren treten neben in den NMR-Spektren vor allem im CD-Spektrum auf und dokumentieren das Vorliegen von 4 "Individuen" (= reine Diastereomeren). Insbesondere zeigt sich die paarweise Identität der CD-Spektren (Abb. 29A-H), welche aus Lacton-Nitril, durch Lactonisierung der reinen Amid-Nitril Fraktionen erhalten wurden. Im weiteren zeigt das CD des $\alpha \cdot \alpha$ Isomeren eine sehr gute Uebereinstimmung mit auth. 5,15-bis-nor-Cobester-c-Lacton (Abb. 29AA, vgl. H. Maag [12], Seite 75). Die geringen Unterschiede sind wahrscheinlich auf die unterschiedliche Funktionalisierung der f-Seitenkette (Methylester gegenüber Nitril) zurückzuführen.

- Zur Analyse der CD-Spektren wurden die sogenannten "Differenz-CD-Spektren" durch graphische Subtraktion des β -Epimeren vom entsprechenden α -Epimeren gezeichnet. Ausgehend von den beiden konfigurativen labilen Zentren C-3 und C-13 (die Seitenkette an C-8 hat infolge der Lactonisierung obligate C-8 α -Konfiguration) erhielt man 2 Gruppen zu je 2 Differenzspektren (Abb. 50A-D). Innerhalb der Fehlergrenze (ca $2-4^\circ$ absolut in $\Delta \epsilon$) lässt sich eine recht gute Uebereinstimmung der erhaltenen Differenzspektren feststellen. Diese Uebereinstimmungen wurden erstmals von W. Fuhrer an Hand der Differenzspektren der 8 reinen Amid-Nitril Fraktionen festgestellt und dahin gedeutet, dass die Umkehr der Konfiguration eines bestimmten Zentrums eine Aenderung des CD-Spektrums bewirkt, welche von der Konfiguration der anderen Zentren weitgehend unabhängig ist (vgl. W. F. [13], Seiten 249, 253).

*106 'richtig' bedeutet, dass nur Epimerenpaare vereinigt sind, die sich bezüglich der Konfiguration desselben Zentrums unterscheiden.

Die Uebereinstimmung der Differenzspektren gilt nicht nur innerhalb der Lacton-Nitrile und Amid-Nitrile, sondern auch zwischen entsprechenden Differenzspektren der beiden verschiedenen Substanzgruppen. Die Uebereinstimmung innerhalb und zwischen diesen Substanzgruppen ist wiederum eine Bestätigung dafür, dass jeweils die richtigen *106 Epimeren zu Paaren geordnet wurden (vgl. Diskussion der IR-Spektren).

Allerdings ist daraus nicht ersichtlich, an welchem Zentrum (C-3 oder C-13) sie sich unterscheiden. Ein Hinweis ergibt sich für die C-13-Epimerie auf Grund des Differenz-CD-Spektrums von Vitamin B₁₂ resp. Neo-Vitamin B₁₂ *107. Dieses Differenzspektrum zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf, wie ihn die Differenzspektren der Ring-C-Epimere aufweisen *108.

RING-A

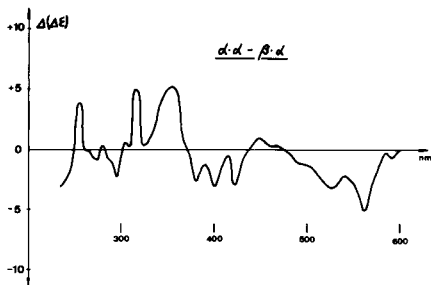


Abb. 50A

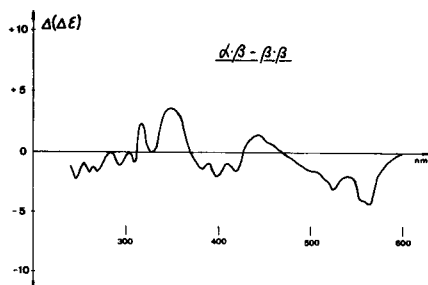


Abb. 50B

RING C

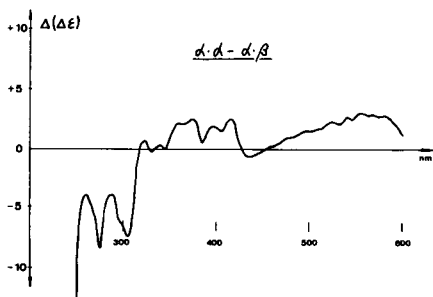


Abb. 50C

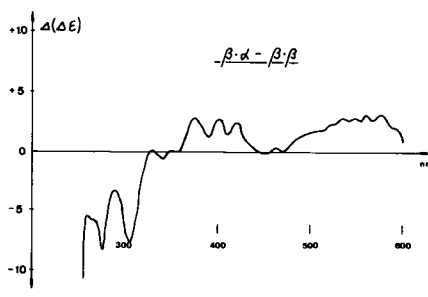


Abb. 50D

- *107 Die Konfiguration dieser beiden Verbindungen ist auf Grund von Röntgen-Strukturanalysen [14] und [41a] bekannt (vgl. dazu [13], Seite 253).
- *108 Das Differenz-CD-Spektrum von auth. Neo- ($\alpha\alpha\beta$) und Normal- ($\alpha\alpha\alpha$)-cobyrynsäure-hexamethylester-f-amid (24) zeigt ebenfalls einen ähnlichen Verlauf (vgl. H. Maag [12]).

NMR - Signalzuordnung

Analog den NMR-Spektren der Amid-Nitrile (22), lassen sich 5 Regionen unterscheiden.

Region I

Im Bereiche von 0.7-1.4 ppm erkennt man die Singlette der angulären Methylgruppen (theoretisch 6, nicht immer vollständig aufgelöst).

Region II

Der Bereich von 0.7-2.8 ppm enthält komplexe, nicht detailliert interpretierbare Multipletts, die den Methylenprotonen aller Seitenketten und vermutlich dem nichtallylischen Proton an C-18 zuzuordnen sind.

Region III

Im Bereiche von ca 2.8-3.6 ppm liegen die Methylestersinglette (theoretisch 5, nicht immer alle aufgelöst). Im selben Bereich findet man, meist verdeckt durch die Methylestersinglette die Multipletts von vermutlich 2 allylischen Protonen (Protonen an C-3 und C-13).

Region IV

Im Bereiche 3.8-4.4 ppm findet man das an C-19 gebundene Ring-D Proton deutlich von der Region III getrennt.

Region V

Der Bereich von ca 5.4-6.0 ppm enthält 3 Singlette, die den chromophorgebundenen Vinylprotonen in Stellung C-5, C-10 und C-15 zuzuordnen sind.

Zuordnung der Vinylprotonen

In allen 4 Spektren ist eines der 3 Singlette schwach bis deutlich verbreitert. Im Falle des $\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta$ Paares erscheint dieses Signal bei höchstem Feld, beim $\beta\cdot\alpha/\beta\cdot\beta$ Paar hingegen erscheint ein verbreitertes Signal in der Mitte der 3 Singlette. Für das $\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta$ Epimerenpaar ist dieses Signal vermutlich dem C-15-Proton zuzuordnen (vgl. dazu: Zuordnung und Argumentation W. Fuhrer [13], Seite 256).

Beim $\beta\cdot\alpha/\beta\cdot\beta$ - Paar fällt eine Zuordnung nicht eindeutig auf das C-15 Proton. Vergleicht man zur Abklärung dieser Frage die Region V der entsprechenden C-3 α und C-3 β -Epimere (Abb. 51A-B) (Paarbildung, Zuordnung eindeutig auf Grund der Isomerisierung der Lactone), so ist ersichtlich, dass jeweils 2 Signale ihre Position beibehalten, währenddem jeweils 1 Signal eine starke Verschiebung (ca 0.4-0.6 ppm) erleidet. Insbesondere bleibt aber eines der 3 Signale innerhalb aller Diastereomeren an gleicher Position bei ca 5.85 ppm. Ordnet man diesem Signal das Proton an C-10 zu, welches zu keinem konfiguratativ labilen Zentrum (C-3 und C-13) benachbart und somit von der Epimerie schwächer beeinflusst ist als die C-3 und C-13 Protonen, lässt sich folgende Zuordnung treffen:

	tiefes Feld	—————▶	hohes Feld	
$\alpha\cdot\alpha$	H-C-5		H-C-10	H-C-15
$\alpha\cdot\beta$	H-C-5		H-C-10	H-C-15
$\beta\cdot\alpha$	H-C-10		H-C-15	H-C-5
$\beta\cdot\beta$	H-C-10		H-C-5	H-C-15

MS

Den MS Spektren kommt keine Bedeutung zur Isomerenzuordnung zu. Die Strukturierung hängt stark von den Aufnahmebedingungen ab. Das intensivste Fragment oberhalb $m/e=900$ wurde bei $m/e=915$ gefunden, was der Abspaltung von (M^+ , $-2CN$, $-CO_2$?) entspricht. Unterhalb $m/e=900$ folgen die Signalgruppen einem für alle Kobaltcorrinkomplexe der B_{12} -Reihe typischen Muster in Abständen von durchschnittlich ca 15 Masseinheiten (Methyl ?) (vgl. H. Maag [12], Seiten 59, 60).

II. Konfigurationszuordnung der 4 diastereomeren Lactone

Die Konfiguration der 4 diastereomeren Lactone ergibt sich eindeutig aus der Konfiguration der Amid-nitrile. Zur Konfigurationszuordnung der Amid-nitrile wurde nur folgendes, von der jeweiligen Lactonkonfiguration unabhängiges, Ergebnis der Einzellactonisierungen verwendet: Es gibt Amid-nitrile, die paarweise identisches Lacton liefern.

Dieses Ergebnis der Einzellactonisierungen und eine grosse Fülle spektroskopischer Daten der Amid-nitrile erlaubten W. Fuhrer die Zuordnung aller Amid-nitril-Diastereomeren natürlicher Helizität (vgl. die detaillierte Uebersicht [13], Seite 251 - 260).

III. Unabhängige Konfigurationszuordnung der Lacton-Diastereomeren

Spektroskopische Indizien zur Konfigurationszuordnung

Zur Bedeutung der UV/VIS-, IR- und CD-Spektren vgl. oben.

NMR-Spektren: In Abb. 51A-B sind die NMR-Daten so geordnet, dass jeweils zusammengehörige Epimerenpaare untereinander stehen.

Abb. 51A stellt den Vergleich der Ring-A Epimerie, Abb. 51B jenen der Ring-C Epimerie dar. Insbesondere ist die Paarbildung in Abb. 51-A eindeutig auf Grund der Isomerisierung der Lactone gegeben (vgl. 2.3.5.).

Folgende konfigurationsabhängige Signalverschiebungen wurden beobachtet:

Ring-C-Epimerie

- bei natürlicher Konfiguration (C-3 α) am Ring A (Abb. 51B):
 - alle Vinylprotonensignale schwach nach höherem Feld verschoben, wovon die Verschiebung des C-15 Protons am grössten ist.
 - gleiche Position des C-19 Protons.
 - Ein Estersinglett (vermutlich Seitenkette am Ring-C) deutlich nach höherem Feld verschoben.
 - Auseinanderrücken von 2 Methylgruppen unterhalb 1 ppm (vermutlich geminale Methylgruppen am Ring-C).
- bei unnatürlicher Konfiguration (C-3 β) am Ring A (Abb. 51B):
 - schwache Verschiebung der Vinylprotonensignale nach tieferem Feld.
 - gleiche Position des C-19 Protons.
 - generelles Zusammenrücken der Estersinglette.
 - Auseinanderrücken von 2 Methylgruppen unterhalb 1 ppm (vermutlich geminale Methylgruppen am Ring-C).

Dieser Vergleich ist nicht in allen Regionen gleichläufig, er zeigt jedoch innerhalb der Isomerenpaare sehr gute Uebereinstimmung der Positionen.

Ring-A-Epimerie

- - starke Verschiebung (bis ca 0.6 ppm) des dritten Vinylprotons (H-C-5) nach höherem Feld.
- Lagekonstanz des C-10 Protons in allen 4 Diastereomeren.
- paarweise Lagekonstanz des C-15 Protons ($\alpha\cdot\alpha$ und $\beta\cdot\alpha / \alpha\cdot\beta$ und $\beta\cdot\beta$).
- deutliche Verschiebung des C-19 Protons.
- generelles Zusammenrücken aller Methylestersinglette.
- paarweises Zusammenrücken der Methylgruppensignale.

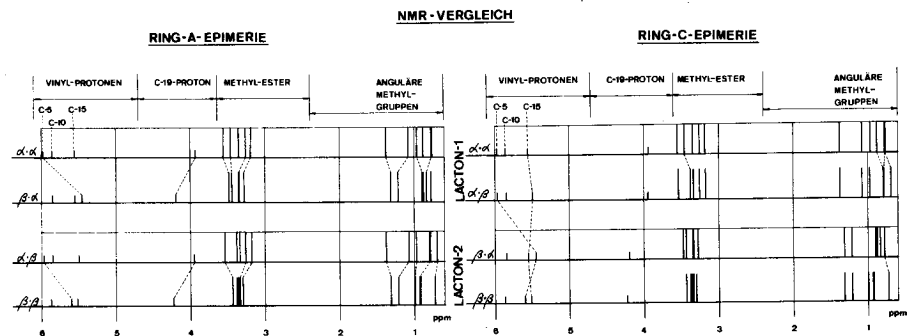


Abb. 51A

Abb. 51B

Andere Indizien zur Konfigurationszuordnung

Tabelle 3 (2.3.1.) zeigt, dass bei der Lactonisierung der Amid-nitril Fraktion-2 und Fraktion-3 in DMF *109 neben wenig Lacton hauptsächlich Edukt isoliert wurde. Dieses Verhalten kann dahin gedeutet werden, dass die Fraktionen 2 und 3 Isomeren mit falscher C-8 β -Konfiguration der d-Seitenkette enthalten, was die Lactonisierungsgeschwindigkeit (bedingt durch eine Isomerisierung zur obligaten C-8 α -Konfiguration) vermutlich verlangsamen würde. Unter gleichen Lactonisierungsbedingungen liefert die Amid-nitril Fraktion 1 *109 neben wenig Edukt hauptsächlich Lacton. Die Konfiguration der $\alpha\alpha\alpha$ -Komponente der Amid-nitril Fraktion 1 ist gesichert, da W. Fuhrer [13] die Ueberführung des Amid-nitrils $\alpha\alpha\alpha$ zu 5,15-bis-nor-Cobester und dessen Identifikation mit einer authentischen Vergleichsprobe gelang.

Die Lactonisierung der Amid-nitril-Fraktion 2 *109 zeigte gleichzeitig, dass noch Isomere mit C-3- β -Konfiguration in dieser Edukt-Fraktion vorhanden gewesen sein müssen, da neben Lacton-1 auch Lacton-2 entstand (später konnte W. F. zeigen, dass die Amid-nitril-Fraktion-2 die diastereomeren Amid-nitrile $\alpha\beta\alpha$, $\beta\alpha\alpha$ und $\beta\alpha\beta$ enthalten hatte).

*109 Auf Grund der Einzellactonisierungen der 8 isomerenreinen Amid-Nitrile in DMAA konnte gezeigt werden, dass die Lactonisierung keine Epimerisierung der Zentren C-3 und C-13 zur Folge hat.

Die Tabellen 5 und 6 zeigen ebenfalls, aber in verfeinerter Form, den beschriebenen Sachverhalt, der wie folgt zusammengefasst wird:

- a) Es gibt Amid-nitril Paare, die paarweise identisches Lacton liefern, nämlich A und B, C und D, E und F, G und H. Diese Amid-nitril Paare unterscheiden sich offenbar in der Konfiguration des Rings-B. Bei der Einzellactonisierung der obigen Amid-nitril Paare (Eduktpaare) erkannte man mittels LLC in der Schwanzzone B neben z. T. den entsprechend erwarteten Lactonen hauptsächlich 2 Komponenten. Diese erwiesen sich als identisch mit den Komponenten der entsprechenden Eduktpaare (Tabelle 5). Offenbar tritt während der Lactonisierungsreaktion spurenweise eine Isomerisierung am C-8 (aber nicht am C-13!) auf (Schwanzzonen B machen nur ca 2-10% aus).
- b) In den Paaren unter a) gibt es Amid-nitrile, welche bei der Lactonisierung deutlich mehr Edukt zurückliefern (Tabellen 3 und 5), nämlich B, D, F und H (in Tabelle 5). Diese Amid-nitrile besitzen C-8 β -Konfiguration. Aus den Lactonisierungsansätzen der Amid-nitrile A, E und G (vermutlich auch C) fand man praktisch kein Edukt. Diese Amid-nitrile besitzen C-8 α -Konfiguration.

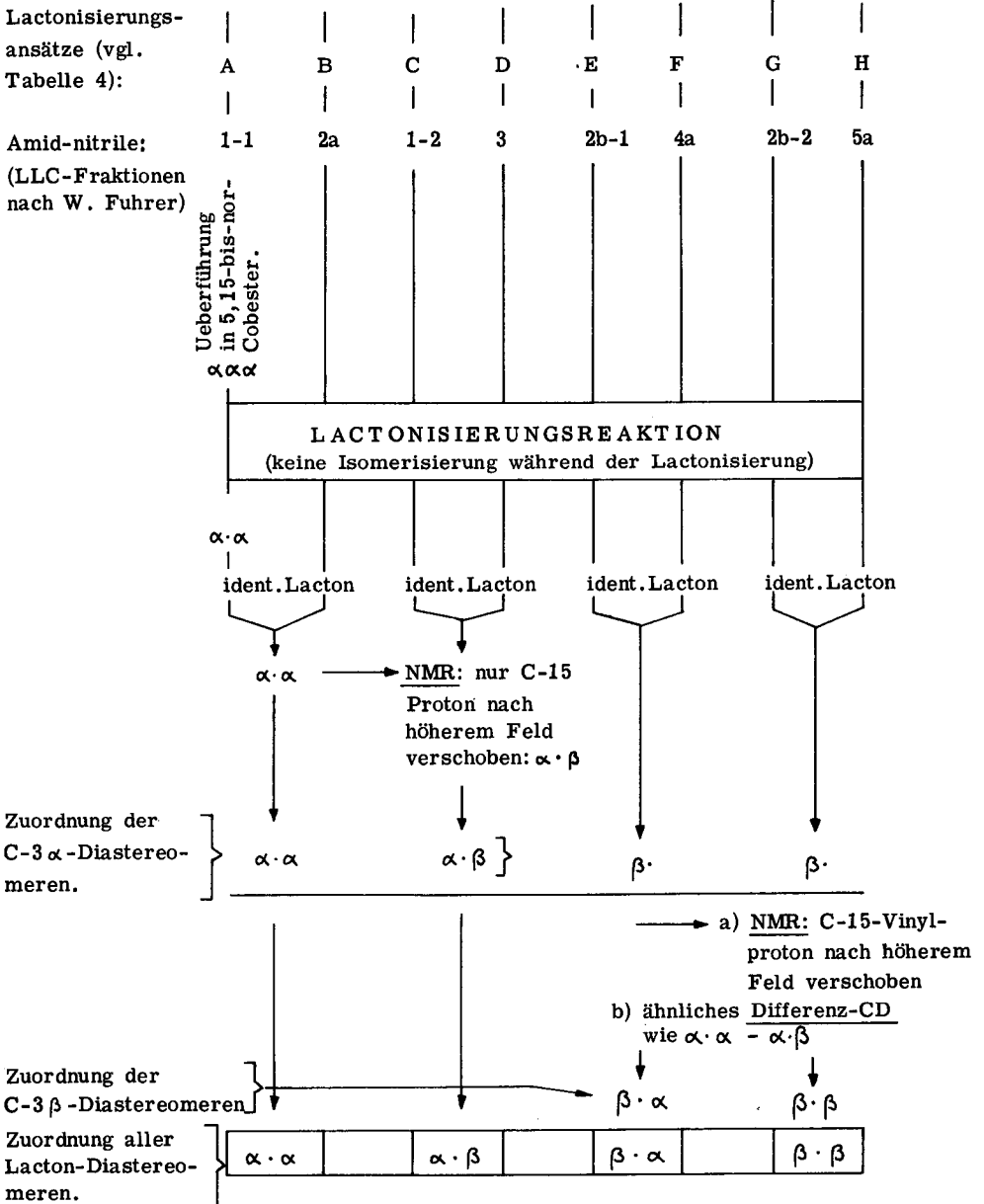
Systematische Konfigurationszuordnung der 4 diastereomeren Lactone

Das nachfolgende Schema fasst den Versuch einer systematischen Zuordnung aller Lactondiastereomeren auf Grund folgender experimenteller und spektroskopischer Tatsachen zusammen.

1. Die Lactonisierung verläuft unter Retention der Konfiguration des Zentrums C-13.
2. Das Diastereomere mit der $\alpha\cdot\alpha$ -Konfiguration ist via die Identifikation des Amid-nitrils $\alpha\alpha\alpha$ mit 5,15-bis-nor-Cobester und die unter Retention verlaufende Lactonisierung bekannt.
3. Signal des C-15 Vinylprotons bekannt (schwach verbreitertes Signal).
4. Ring-C- β Epimere erkennbar mittels NMR (C-15 Vinylproton bei höherem Feld) und mittels CD (Differenz-CD).

Die getroffene Diastereomerenzuordnung ist mit allen übrigen spektroskopischen Daten und vor allem mit der von W. Fuhrer getroffenen und von der obigen Zuordnung unabhängigen Diastereomerenzuordnung der Amid-nitrile (vgl. [13], Seite 251-260) völlig vereinbar.

Schematische Darstellung der Diastereomerenzuordnung der Lactone.



2.3.4. Trennung des Lacton-1-Gemisches in die Komponenten $\alpha\cdot\alpha$ und $\alpha\cdot\beta$ mittels LLC

Bemerkung: Im Gegensatz zur bis heute nicht möglichen Trennung der diastereomeren Lactone $\beta\cdot\alpha$ und $\beta\cdot\beta$ in unseren LLC-Systemen (an der Harvard gelang eine Trennung dieser Diastereomeren (= Komponenten von Lacton 2) mittels LC an Corasil, vgl. 2.3.3.2.) gelang die Trennung des Lacton-1-Gemisches in die Komponenten $\alpha\cdot\alpha$ und $\alpha\cdot\beta$ mittels des LLC-Systems II (S II). Allerdings ist die Herstellung der $\alpha\cdot\alpha$ und $\alpha\cdot\beta$ -Lacton-Diastereomere via die Einzellactonisierung einfacher. Die dazu notwendigen Amid-nitrile $\alpha\alpha\alpha$ und $\alpha\alpha\beta$ lassen sich durch die LLC-Trennung der Amid-nitril-Fraktion-1 im schnellen System (S I) oder auch im langsamen System (S II) (bessere Trennung, vgl. die Details in [13], Seite 179, 207) mit weniger Zeitaufwand erhalten, als zur Trennung des Lacton-Diastereomeregemisches $\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta$ (= Lacton 1) erforderlich wäre.

Bei der präparativen Trennung von Lacton-1 sind folgende Punkte von Nachteil: Die Retentionszeiten der beiden Epimeren sind lang und variieren je nach Säulenzustand zwischen 160 und 210 Minuten. Die geringe Säulenbeladung (ca 200-250 μ l pro Injektion) hat grosse Injektionszahlen zur Folge. Das schnelle Zusammenbrechen des Trennvermögens infolge partieller Elution der Stationärphase beschränkte die Injektionszahl auf ca 10 hintereinander injizierte Chargen; anschliessend war jeweils eine Regenerierung der Säule (vgl. 2.1.) notwendig. Dies dauerte ca 24-36 h, da innert kürzerer Zeit keine befriedigenden, stationären Säulenbedingungen erreicht werden konnten.

Herstellung des Lacton-nitrils: Man ging nach der in 2.3.2. beschriebenen Methode vor.

Ausgehend von 12.71 μ Mol Amid-nitril der LLC-Fraktion 1 (ε Benzol/ α -Bande: 12000) erhielt man 11.89 μ Mol (ε Benzol/ α -Bande: 12000) Rohprodukt, aus welchem nach TLC-Chromatographie und anschliessender LLC-Chromatographie (schnelles System (S I)) 10.41 μ Mol (82 % bez. Edukt) einheitliches (DC, LLC) Lacton-1 ($\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta$) erhalten wurden.

Die verwendete Amid-nitril-LLC-Fraktion 1 bestand aus dem Diastereomeregemisch $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\beta$. Das Verhältnis wurde nach W. Fuhrer ([13], Seite 179) mittels des langsamen LLC-Systems bestimmt und betrug: $\alpha\alpha\alpha : \alpha\alpha\beta = 56.4 : 43.7$ %.

Das im schnellen LLC-System einheitlich wandernde Lacton-1 (Abb. 52-A) wurde in 5 Arbeitsgängen à je ca 2 mg bei einer jeweiligen Injektionsmenge von ca 200 μ l/10 μ l Injektionsgemisch (vgl. 2.1.) getrennt.

Dazu sammelte man die zwischen den in Abb. 52-B angegebenen Marken liegenden Fraktionen $\alpha\cdot\alpha$ resp. $\alpha\cdot\beta$, vereinigte den Vorlauf 1, die Zwischenfraktion 2 und den Nachlauf 3 und trennte das Gemisch erneut. Dabei war darauf zu achten, dass die Zwischenfraktion 2 genügend gross gewählt wurde, da sonst eine vollständige Trennung der beiden Diastereomere nicht erreicht werden konnte. (Grund: Ueberlappung der beiden Signale für die beiden Diastereomeren.) Trotz dieser relativ gross gewählten Zwischenfraktionen enthielten die getrennten Lactone geringe Anteile des jeweils anderen Diastereomeren (Anteil ca 1-2%).

Bedingungen: (S II, 2 x 50 cm Kol B, ca 90 ml/h)
ca 200-250 μ l / 10 μ l Injektionsgemisch (vgl. 2.1.).

<u>Ausbeute:</u>	Lacton $\alpha\cdot\alpha$ (ϵ Benzol/568: 12000)	5.92 μ Mol	41.6% bez. Edukt
	Lacton $\alpha\cdot\beta$	4.17 μ Mol	32.8% "
			<u>74.4%</u>

Das Epimerenverhältnis der Produkte betrug somit:
 $\alpha\cdot\alpha : \alpha\cdot\beta = 55.9 : 44.1 \%$

Das Eduktepimerenverhältnis betrug:
 $\alpha\alpha\alpha : \alpha\alpha\beta = 56.4 : 43.7 \%$

Die getrennten Lactone enthielten auf Grund der LLC-Analyse im gleichen System noch Spuren (ca 1-2%) vom jeweils anderen Isomeren (vgl. Abb. 52C-D).

Das $\alpha\cdot\alpha$ -Diastereomere wurde nach der üblichen Reinigungsmethode (TLC, Waschen gegen gesättigte KCl/0.1 % KCN-Lösung, Waschen mit Hexan und Methanol) spektroskopisch (NMR, IR, UV) und mittels LLC analysiert. Die erhaltenen Werte waren mit jenen des entsprechenden Lactons $\alpha\cdot\alpha$ der Einzellactonisierungen (Ansätze A und B) identisch.

Das $\alpha\cdot\beta$ -Diastereomere (4.17 μ Mol) wurde 3x aus Essigester/Hexan (vgl. 2.3.3.2.) kristallisiert und lieferte 3.7 μ Mol (88 %) feine rote Nadeln (indirekt durch Spektroskopie der Mutterlauge (0.46 μ Mol) bestimmt). Die Mutterlauge konnte nicht mehr kristallisiert werden. Die spektroskopischen- (NMR, IR und UV) und LLC-Daten der Kristalle waren identisch mit den Daten des Lactons $\alpha\cdot\beta$ aus den Einzellactonisierungen (Ansätze C und D).

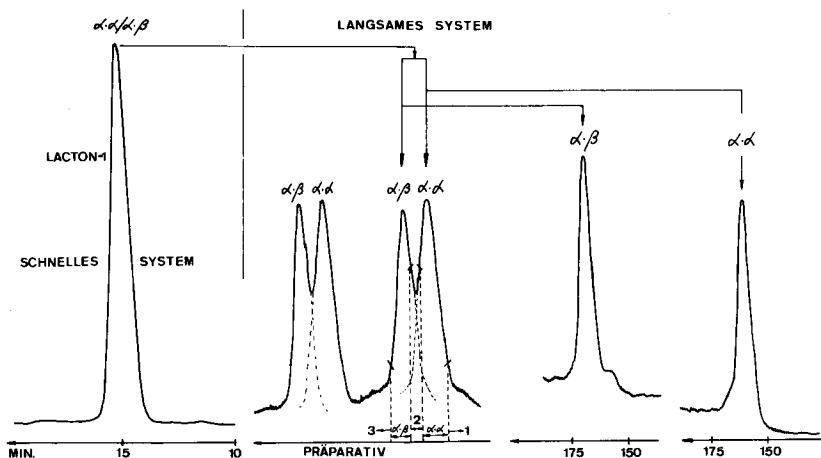


Abb. 52A.

Abb. 52B

Abb. 52C

Abb. 52D

2.3.5. Isomerisierung von 5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton-f-nitril (Lacton-2, resp. Lacton-1 Gemisch) bezüglich dem Kohlenstoffatom C-3 von der C-3 β (unnatürlichen) zur C-3 α (natürlichen) Konfiguration

Kurze Uebersicht: Die Zeit nach dem Black-Friday Ereignis (vgl. H. Maag [12], Seite 107) kann wie folgt charakterisiert werden: Die Amid-nitrile natürlicher Helizität waren via Lactonisierung und Alkylierung praktisch vollständig aufgebraucht worden.

Es waren jedoch noch ca 10 mg Lacton ($\beta\cdot\alpha/\beta\cdot\beta$) (= Lacton 2) vorhanden, von welchem wir allerdings wussten, dass es unter Alkylierungsbedingungen im Gegensatz zum Lacton ($\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta$) (= Lacton 1) an Stelle der gewünschten Disubstitutionsprodukte praktisch ausschliesslich Monosubstitutionsprodukte lieferte (vgl. H. Maag [12], Seite 174).

Mit Lacton 1 wird das C-13 Epimerengemisch $\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta$, mit Lacton 2 das C-13 Epimerengemisch $\beta\cdot\alpha/\beta\cdot\beta$ bezeichnet.

Das Lacton 2 war deshalb nicht direkt zur Alkylierung verwendbar, sondern sollte vorerst zu Lacton 1 isomerisiert werden. Mit der Isomerisierung erhofften wir damals den akut gewordenen Materialmangel ein wenig lindern zu können. Die erhoffte Isomerisierungsreaktion gelang damals, jedoch war sie leider infolge kleiner Ausbeuten an Lacton 1 und experimenteller Schwierigkeiten präparativ kaum verwendbar. Es wurde denn auch kein Lacton 1 für präparative Zwecke durch Isomerisierung von Lacton 2 hergestellt.

Nachfolgend wird die Isomerisierung sowohl von Lacton 2 ($\beta\cdot\alpha/\beta\cdot\beta$) als auch von Lacton 1 ($\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta$) ausgehend beschrieben. Es wurden keine Isomerisierungen ausgehend von reinen Lacton-Diastereomeren ausgeführt.

Die aus den beiden Isomerisierungen erhaltenen Lactone 1 und 2 (Gleichgewichtsgemisch von Lacton 1 und 2) wurden mit den entsprechenden Isomerisierungsprodukten (= Lacton 2 resp. Lacton 1, hergestellt durch Lactonisierung von Amidnitril (vgl. 2.3.2.)), mittels LLC und UV/VIS (im Falle des Lactons 1 auch mit IR, im Falle des Lactons 2 reichte die Substanz nicht für ein IR) identifiziert.

Vorbemerkung: Bei der vorliegenden Vorschrift ist auf rigorose Abwesenheit von Wasserspuren und Sauerstoff zu achten.

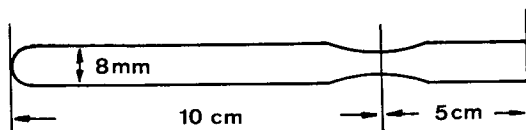
2.3.5.1. Isomerisierung von Lacton 2 (Lacton $\beta\cdot\alpha$ und $\beta\cdot\beta$, Verhältnis unbestimmt, vermutlich 1:1-Gemisch). *110.

0.5 μ Mol (ϵ Benzol/582: 12000) reines Lacton 2 (LLC-Fraktion 2, hergestellt nach 2.3.2.) wurden mit abs. Benzol in eine kleine Ampulle (Länge: ca 10 cm/Innen \emptyset : 8 mm) transferiert, das Lösungsmittel mit trockenem, O₂-freiem Argon *111 abgeblasen und der rote Film während 2 Tagen bei 0.001 Torr (in die Vacuumlinie Kühlfalle mit Trockeneis/Isopropanol dazwischengeschaltet) über P₂O₅ getrocknet.

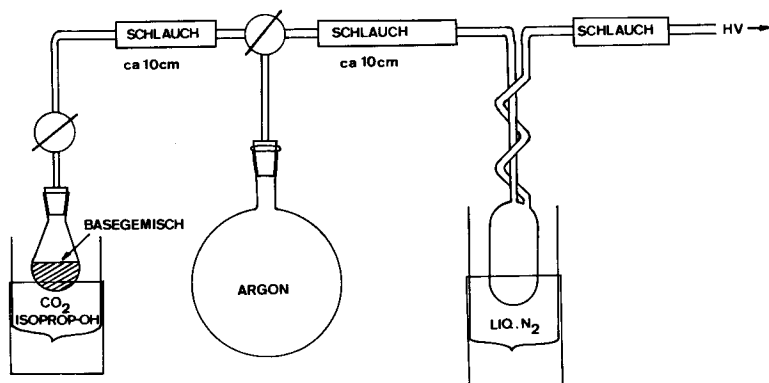
*110 Alle Geräte vor Gebrauch mindestens 2h bei 120⁰ getrocknet und unter trockenem Argonstrom erkalten lassen.

*111 Argon, der Sauerstoff- und Wasserstoffwerke Luzern (nach Werkangabe 99.99%) wurde zur Trocknung durch Calciumchlorid und Blaugel, zur Entfernung von O₂ durch "BTS-Kupfer-Katalysator" (BASF) geleitet.

Ampulle: Pyrexglas



Den roten Film überschichtete man in der Ampulle unter Argon *111 (alle folgenden Operationen werden generell unter Argon *111 ausgeführt) mittels einer langnadeligen mit Argon gespülten Injektionsspritze (Totalvolumen 2 ml) mit 375 μ l einer wie folgt entgasten, sauerstofffreien Baselösung. Diese bestand aus 5 ml Sulfolan *112, 1 ml DBU *113 und 70 μ l Trifluoressigsäure *114 (es wurden unabhängig von der Ansatzgröße stets dieselben Mengen zur Entgasung verwendet). Zur Entgasung der Baselösung wurde der mit obigem Basegemisch gefüllte 10 ml Kolben mittels eines geraden Schliffhahnes über einen Dreiweghahn einerseits an die Hochvacuumleitung (mit flüssigem Stickstoff gekühlte Kühlfalle dazwischengeschaltet), andererseits an einen mit Argon *111 gefüllten Ballon angeschlossen. vgl. Skizze.



- *112 Sulfolan, Fluka AG purum, gereinigt nach Whiting et al. J. chem.Soc. 4707 (1964), und dreimal durch eine Vacuummantel-Vigreuxkolonne am HV destilliert.
- *113 DBU, 1,5-Diazabicyclo-[5,4,0]-undec-5-en, Fluka AG purum, 1x destilliert, Sdp. 72^o/0.1 Torr.
- *114 Trifluoressigsäure, Fluka AG purum, unter Argon destilliert.

Der Kolben mit der Baselösung wurde evakuiert (0.001-0.005 Torr) und nach kurzem Umschwenken sofort im Kältebad abgekühlt, bis alles erstarrte. Nach jeweils ca 2-3 Min. liess man (stets noch unter HV) unter Erwärmung mit lauwarmem Wasser (30-35°) auftauen. Diesen Vorgang wiederholte man insgesamt 5x, danach entlüftete man mit trockenem, O₂-freiem Argon *111 aus dem Ballon, öffnete den Kolben und entnahm mit der Spritze unter ausströmendem Argon ca 1 ml Baselösung, von welcher man die benötigte Menge in die Lacton-Ampulle einfüllte. Danach schloss man die Lacton-Ampulle an Stelle des Kolbens und Schliffhahns mittels Gummischlauch an obige Apparatur an und evakuierte. Nach ca 2-3 Sek. liess man die Lösung im Kältebad erstarren und evakuierte für 2-3 Min. Anschliessend wurde vorsichtig aufgetaut (Vacuumleitung mittels Dreiweghahn unterbrochen). Durch gelegentliches Schütteln der Ampulle wird das Lacton gleichzeitig gelöst. Die Ampulle ist vorsichtig von oben nach unten langsam aufzutauen, da sonst die erstarrte Lösungsmittelmenge im Ampullenrohr durch das zwischen dem Ampullenboden und dem auftauenden Lösungsmittelzapfen austretende Gas in die Höhe und eventuell in den Schlauch getrieben wird. Es entstand eine dunkelrote, zähflüssige Lösung. Hierauf liess man Argon einströmen, kühlte ab bis alles erstarrt war, und evakuierte von neuem für 2-3 Min. Diesen Vorgang wiederholte man weitere 4x jedoch ohne Einströmen von Argon.

Nach dem Entgasen schmolz man die Ampulle unter gutem HV (0.001 Torr) ab und erhitzte die dunkelrote, zähe Lösung unter Lichtschutz für 3h auf 80 ± 2° C im Ölbad (Farbwechsel von dunkelrot nach rot-violett).

Danach kühlte man die Ampulle im Kaltwasserstrom, trocknete aussen gut, öffnete sie, überschichtete die violette Lösung sofort mit ca 2 ml abs. Benzol und transferierte sie zusammen mit dem Benzol (beim Aufsaugen mischen sich die Phasen gleichzeitig) mittels einer trockenen Pipette innert ca 15-20 Sek. tropfenweise auf ein heftig mit Eis/Kochsalz gekühltes Gemisch (Benzol soll nicht gefrieren, schnell arbeiten) bestehend aus 10 ml Acetatpuffer *115, 2 ml KCl/0.1 % KCN und 20 ml Benzol (Farbänderung: violett nach rosa: Bildung der Dicyanform des Lacton-nitril-Kobaltkomplexes). Die Ampulle wusch man mit insgesamt 2 ml abs. Benzol nach. Nach ca 2 Min. transferierte man das Gemisch in einen Scheidetrichter, wusch mit ca 8 ml Benzol nach und trennte die Phasen (org. Phasen: Totalvolumen ca 30 ml).

Man extrahierte die wässrigen Phasen noch 2x mit je 20 ml kaltem Benzol und wusch die org. Phasen 1x mit 5 ml kalter 0.1n H₂SO₄/gesättigt mit KCl und 1x mit 10 ml gesättigter KCl/0.1% KCN-Lösung.

Zur Entfernung des Sulfolans *116 verdünnte man das Benzol (30 resp. 20 ml) mit 7.5 resp. 5 ml Hexan (1/4 des Benzolvolumens) und extrahierte jenes mit 7 10 ml Portionen KCl/0.1% KCN-Lösung. Die ersten 2-3 Extrakte waren schwach rosa gefärbt.

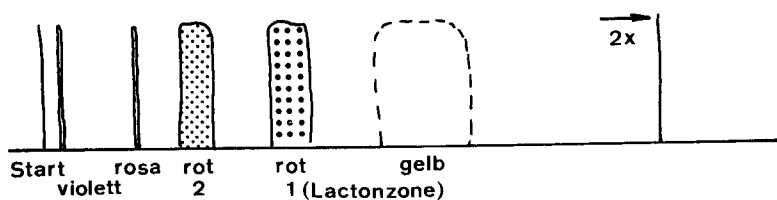
*115 Acetat-Puffer pH 5, hergestellt aus 200 ml 4m-Natriumacetatlösung und 100 ml 4m-Essigsäure, gesättigt mit KCl.

*116 Diese bequeme Methode zur Entfernung des Sulfolans stammt von P. Schneider, Diss. ETH 1972.

Die organischen Phasen filtrierte man durch Watte, entfernte das Lösungsmittel am RV und erhielt den Neutralteil, der u. a. die isomerisierten Lactone enthielt. Die vereinigten Wasserphasen der beiden Extraktionen extrahierte man 3x mit Methylchlorid, wusch die org. Phasen 1x gegen 0.1n H₂SO₄/0.1% KCN Lösung (gesättigt mit KCl), filtrierte sie durch Watte, engte das Lösungsmittel am RV ein und erhielt den in Sulfolan gelösten Säureteil *117.

Neutralteil:	0.278 µMol (ϵ Benzol/572: 12000)	57.6 %
Säureteil:	0.092 µMol (ϵ Benzol/568: 12000)	18.3 %
(enthält noch Sulfolan)		75.9 %

Der Neutralteil wurde auf einer 6 cm breiten DC-Kieselgelplatte *12 chromatographiert, mit Methylchlorid : Methanol (85 : 15) eluierte man das Silikagel der Zonen 1 und 2 *118.



- *117 Dieser Säureteil ist nur schwer vom Sulfolan abtrennbar. Er enthält vermutlich Komplexe mit unspezifisch hydrolysierten Methylesterseitenketten. Eine Hydrolyse durch Einwirkung von DBU in nicht wässrigem Medium ist bekannt, vgl. D. Howard Miles, J. org. Chem. 38, 223 (1973). Die Veresterung dieses Säureteils mit ätherischem Diazomethan in Methanol bei RT und 0° gelang nicht. Bei der Veresterung verfärbte sich die anfänglich rote Lösung via orange nach gelb (Zerstörung des Chromophors). Diese Erscheinung deckt sich mit den von H. Maag gemachten Beobachtungen bei der Veresterung saurer 5,15-bis-nor-Cobester-Derivate mit Diazomethan (nicht publiziert). Im Gegensatz dazu lassen sich saure, an der 5- und 15-Stelle alkylierte Cobester-Derivate in einigen Fällen leicht mit Diazomethan bei RT verestern (vgl. H. Maag, Seite 105). Der Säureteil wurde wegen der Veresterungsschwierigkeiten und geringen Mengen wegen (ca 50-100%) nicht weiter untersucht. Die Veresterung mit Schwefelsäure/Methanol, die bei der Herstellung des 5,15-bis-nor-Cobesters gelang (vgl. [12], Seite 64), konnte wegen des f-Nitrils, das in Veresterungsvorversuchen unter den sauren Veresterungsbedingungen in den Methylester überführt worden war, nicht angewandt werden.
- *118 Die TLC-Zone 2 wurde infolge der geringen Menge nicht mehr weiter untersucht. Bei der LLC-Trennung (S I) blieben ca 50 % nicht eluierbar an der Säule haften.

Nach Einengen der Lösungsmittel bestimmte man folgende spektroskopische Ausbeuten:

Zone 1: 0.190 μMol (ϵ Benzol/572: 12000) 38 % (Lactonzone)

Zone 2: 0.060 μMol (ϵ Benzol/570: 12000) 12 % ?

violette Zone: nur andeutungsweise vorhanden, wurde nicht weiter untersucht.

Die beiden TLC-Zonen 1 und 2 *118 des obigen Ansatzes unterwarf man der schnellen LLC-Trennung. Dabei erzielte man nach Einengen der Lösungsmittel und Waschen mit Methanol und Hexan (vgl. 2.1.) folgende Ausbeuten (bezogen auf eingesetztes Edukt).

Bedingungen: (S I, Kol A, 90 ml/h)

Zuordnungskriterium hier: UV/VIS

Identifikation nach Vereinigung mit dem Nachschubmaterial mittels LLC, UV/VIS und sofern möglich mittels IR (vgl. unten).

LLC-Chromatogramm der TLC-Zone 1:

Lacton 1 ($R_t = 19.8$ Min.)	0.136 μMol	(ϵ Benzol/570: 12000)	27.2 %
Lacton 2 ($R_t = 25.2$ Min.)	0.039 μMol	(ϵ Benzol/578: 12000)	<u>7.9 %</u>
			35.1 %

LLC-Chromatogramm der TLC-Zone 2: *118

Fraktion 1 (?) ($R_t = \text{ca } 73$ Min.)	0.0166 μMol	(ϵ Benzol/568: 12000)	3.3 %
Fraktion 2 (?) ($R_t = \text{ca } 79$ Min.)	0.0125 μMol	(ϵ Benzol/568: 12000)	<u>2.5 %</u>
			5.8 %

Die Natur der beiden letztgenannten Fraktionen ist unbekannt. Auf Grund der grossen Retentionszeiten könnte es sich um Säuren handeln. Dieses Material wurde wegen der geringen Mengen nicht mehr weiter untersucht.

Nachschubansätze: Analog der obigen Vorschrift erzielte man ausgehend von 2 Nachschubansätzen gleicher Grösse (0.5 μMol) und einem Nachschubansatz doppelter Grösse folgende, in Tabelle 17 zusammengefassten Ausbeuten bezüglich eingesetztem Lacton 2. Die aufgeführten Reaktionsprodukte, TLC-Zonen und LLC-Fraktionen wurden im Sinne der Pfeile vereinigt und gemäss der in der letzten Spalte angegebenen Reinigungsmethoden gereinigt. Anschliessend vereinigte man das Lacton 1 resp. Lacton 2 des obigen, ausführlich beschriebenen Ansatzes mit den entsprechenden Lactonen der 3 Nachschubansätze. Dieses Material diente der Identifikation mit den entsprechenden Lactonen (Eduktlactone), welche durch Lactonisierung (vgl. 2.3.2.) erhalten wurden (vgl. unten).

Tabelle 17

Mengen in μMol (bestimmt in Benzol bez. der α -Bande (ca 570-578 nm)
 $\varepsilon = 12000$ für alle Substanzen. Ausbeuten durch Querstrich getrennt in % bez. Edukt.

Eduktmenge:	0.5 μMol	0.5 μMol	1.0 μMol	Reinigung mittels
Neutralteil Säureteil	0.296/59.2 0.063/12.7	0.292/58.4 0.082/16.3	0.466/46.6 0.233/23.3	Extraktion
Zone 1 Zone 2	0.396/39.6 0.101/10.1		0.300/30 0.156/15.6	TLC
Lacton 1 ($R_t=21$ Min.) Lacton 2 ($R_t=26.5$ Min.)	0.488/24.4 0.143/6.15			schnelle LLC (S I/Kol A/90ml/h) Abb. 53 *120

Die TLC-Zone 2 wurde nicht mehr weiter untersucht *118.

Identifikation der Isomerisierungsprodukte (Lacton 1 und 2) mittels LLC, UV/
 VIS und IR (nur bei Lacton 1) weiter unten.

2.3.5.2. Isomerisierung von Lacton 1 (Lacton $\alpha\cdot\alpha$ und $\alpha\cdot\beta$, Verhältnis
 49:51 %) *110

Diese Isomerisierung wurde in 2 Parallelansätzen à je 0.5 μMol Lacton 1 *119
 unter genau analogen Bedingungen wie die Isomerisierung von Lacton 2 ausge-
 führt. Die erzielten Ausbeuten - bezüglich eingesetztem Edukt - sind in Tabelle
 18 zusammengefasst. Beim Edukt handelt es sich um Lacton 1, hergestellt
 nach 2.3.2.

*119 Herstellung nach 2.3.2. Die Diastereomerenverteilung $\alpha\cdot\alpha/\alpha\cdot\beta$ im Edukt-
 Lacton 1 beträgt auf Grund einer LLC-Analyse (SII, Kol C, 40 ml/h):
 $\alpha\cdot\alpha:\alpha\cdot\beta = 49:51$ %. Details zur Trennung vgl. 2.3.4.

*120 Die Auswertung der LLC-Chromatogramme erfolgte durch spektroskopi-
 sches Ausmessen der aufgefangenen Fraktionen (ε Benzol = 12000, gemes-
 sen an der α -Bande) oder durch Auswaage der ausgeschnittenen Peakflä-
 chen. Die Abweichungen der beiden Werte betrug ca ± 1 %.

Tabelle 18

Mengen in μMol (bestimmt in Benzol bez. der α -Bande (ca 570-578 nm) $\epsilon = 12000$ für alle Substanzen. Ausbeuten durch Querstrich getrennt in % bez. Edukt.

Eduktmenge:	0.5 μMol	0.5 μMol	Reinigung mittels
Neutralteil	0.308/59.7	0.334/64.6	Extraktion
Säureteil	0.101/10.0	0.081/8.0	
Zone 1	0.450/43.6	←	TLC
Zone 2	0.104/11.0		
Lacton 1 ($R_t=20.4$ Min.)	0.350/33.9	←	schnelle LLC (S I, Kol A, 90 ml/h) Abb. 54 *120
Lacton 2 ($R_t=25.5$ Min.)	0.098/ 9.5		

Die TLC-Zone 2 wurde nicht mehr weiter untersucht *119.
Identifikation der Isomerisierungsprodukte (Lacton 1 und 2) mittels LLC, UV/
VIS und IR (nur bei Lacton 1) cf unten.

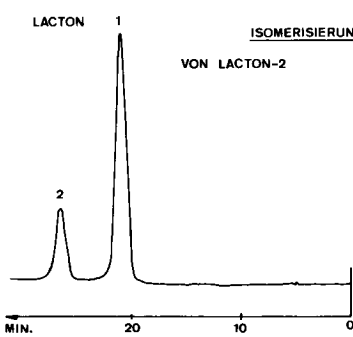


Abb. 53

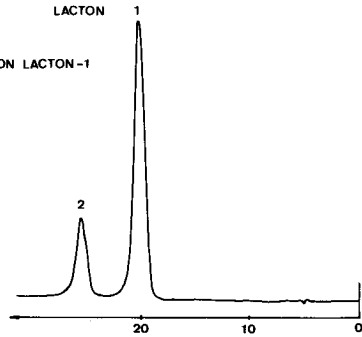


Abb. 54

Das erhaltene Lacton 1 aus der Isomerisierung von Lacton 1 *119 wurde zusätzlich analytisch der langsamen LLC-Analyse (S II, Kol C, 40 ml/h) unterworfen und ergab ein Isomerenverhältnis von Lacton $\alpha\text{-}\alpha$: $\alpha\text{-}\beta$ (Komponenten von Lacton 1) von 49:51 %. Dieser Wert ist identisch mit dem Verhältnis der beiden Lacton-1-Komponenten im Eduktlacton *119. Diese Übereinstimmung ist wohl zufällig. Das Verhältnis der C-13 Epimeren in anderen Corrincomplexen liegt in der gleichen, stets ca 1:1 betragenden, Größenordnung (vgl. die Amidnitrile, [13], Seite 258).

2.3.5.3. Identifikation der Lactone 1 und 2 aus den Isomerisierungen von Lacton 1 und 2 und Vergleich der Resultate der Isomerisierungen von Lacton 1 und 2

Die durch Isomerisierung erhaltenen Lactone 1 und 2 der beiden Isomerisierungen wurden infolge der geringen Substanzmengen nicht TLC-rechromatographiert, sondern nach Einengen der LLC-Lösungsmittel am RV direkt mit Methanol und Hexan gewaschen (vgl. 2.1.) und anschliessend getrocknet (HV/RT/ über Nacht). Das so erhaltene Material verwendete man zur Identifikation mittels LLC, UV/VIS und IR (nur Lacton 1, von Lacton 2 war zuwenig Material vorhanden).

Identifikation

LLC

Die erhaltenen Lactone wurden hinsichtlich ihres LLC-Verhaltens auf Identität hin geprüft. Die LLC-Daten der Einzelinjektionen der Lactone aus den Isomerisierungen, sowie die Daten der entsprechenden 1:1 Gemische (Mischchromatogrammidentifikation) sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19

Zuordnungskriterium: Mischchromatogramme
Bedingungen: (S I, Kol A, 90 ml/h)

Ansatz ausgehend von	Produkt	R _t (Min.)	N _{th}	
Lacton 1	Lacton 1	14.7	2110	einheitlicher LLC-Peak
Lacton 2	Lacton 1	14.3	1890	
Identifikation a) von Lacton 1	1:1 Gemisch	14.2	1850	
Lacton 1	Lacton 2	18.4	2460	"
Lacton 2	Lacton 2	18.35	2460	
Identifikation b) von Lacton 2	1:1 Gemisch	18.75	2430	
Referenz: c+d, 1:1-Gemisch	c)Lacton 1 (Edukt) d)Lacton 2 (Edukt)	15.1 19.35	1870 2450	2 ca gleich intensive Peaks
Identifikation mit Referenz	a) + c) (1:1) b) + d) (1:1)	13.9 17.9	2150 2220	einheitliche LLC-Peaks

Kommentar zu Tabelle 19: Die Unterschiede der theoretischen Bodenzahlen von Lacton 1 und 2 sind auf die im obigen System schwach beginnende Trennung von Lacton 1 in die Komponenten $\alpha \cdot \alpha$ und $\alpha \cdot \beta$ zurückzuführen.

Die Abweichungen der Retentionszeiten haben ihren Grund in der durch die sukzessive partielle Elution von Stationärphase bedingten Veränderung des Säulenzustandes (vgl. 2.1. und 2.3.3.2.). Abweichungen in der theoretischen Bodenzahl bis zu 10 % sind erfahrungsgemäss üblich. Die Grössenordnung der Abweichungen der Retentionszeiten hängen stark vom Säulenzustand ab.

UV/VIS

Lacton 1 ex Isomeris. von Lacton 1: in Benzol 0.02% HCN, qualitativ, PE 407
572/0.445 max, 549/0.284 min, 536/0.315 max, 495/sh 0.140, 446/0.08 min,
418/0.170 max, 395/sh 0.170, 358/1.00 max, 336/0.362 min, 318/0.385 max,
308/sh ca 0.36, 292/0.292 min. $\delta^*:\alpha = 2.24$.

Lacton 1 ex Isomeris. von Lacton 2: in Benzol 0.02% HCN, qualitativ, PE 407
572/0.445 max, 549/0.284 min, 536/0.314 max, 495/sh 0.14, 446/0.08 min,
418/0.170 max, 395/sh 0.170, 358/1.00 max, 336/0.360 min, 318/0.385 max,
308/sh ca 0.36, 292/0.30 min. $\delta^*:\alpha = 2.26$.

Lacton 2 ex Isomeris. von Lacton 1: in Benzol 0.02% HCN, qualitativ, PE 407
576/0.460 max, 554/0.316 min, 540/0.358 max, 500/0.165 sh, 452/0.108 min,
424/0.219 max, 363/1.00 max, 337/0.480 min, 322/0.535 max, 315/0.500 min,
308/0.520 max. $\delta^*:\alpha = 2.12$. (Aufgenommen in Mikrozelle)

Lacton 2 ex Isomeris. von Lacton 2: in Benzol 0.02% HCN, qualitativ, PE 407
576/0.457 max, 553/0.310 min, 539/0.35 max, 500/0.170 sh, 452/0.11 min,
423/0.22 max, 363/1.00 max, 337/0.48 min, 322/0.560 max, 315/0.540 min,
307/0.575 max. $\delta^*:\alpha = 2.18$ (Aufgenommen in Mikrozelle).

Die geringen Unterschiede der relativen Intensitäten im UV-Teil der letzten beiden UV/VIS-Spektren ist auf geringe Anteile nichtcorrinoider Substanzen zurückzuführen. Dies wurde bei derart kleinen, nicht kristallinen Proben stets beobachtet.

IR

Lacton 1 ex Isomeris. von Lacton 1: ca 350 δ^* Lacton/40 μ l CHCl₃, PE 257

Lacton 1 ex Isomeris. von Lacton 2: ca 600 δ^* Lacton/40 μ l CHCl₃, PE 257

Beide IR-Spektren zeigen vor allem bei 1685 cm⁻¹ starke Banden, welche wir den in 2.1. beschriebenen Verunreinigungen zuschreiben. Auf die Rechromatographie zur Entfernung dieser Verunreinigungen wurde, um weitere Substanzverluste zu vermeiden, verzichtet. Das sonst angewandte und erfolgreiche Waschen mit Methanol und Hexan zur Entfernung dieser Verunreinigungen ist insbesondere bei derart kleinen Proben nicht erfolgreich.

Beide IR-Spektren zeigen die charakteristischen Banden von Lacton 1, insbesondere liegt auf Grund der Intensitätsverhältnisse der beiden Chromophorbanden bei 1600 resp. 1578 cm⁻¹ (Bande um 1600 cm⁻¹ weniger intensiv als Bande um 1578 cm⁻¹) eindeutig Lacton 1 vor (vgl. 2.3.3.3.). Die beiden IR-Spektren sind, abgesehen von Intensitätsunterschieden (bedingt durch die unterschiedlichen Konzentrationen der beiden IR-Spektren), identisch.

Vergleich der Ausbeuten an Lacton der Isomerisierung von Lacton 1 und 2

Tabelle 20

Isomerisierung ausgehend von	Ausbeute $\mu\text{Mol}/\%$ bez. Edukt	Verhältnis *120 Lacton 1/Lacton 2
Lacton 2	Lacton 1 0.488/24.4 Lacton 2 0.142/ 7.15	77.4 : 22.6
Lacton 1	Lacton 1 0.35 /33.9 Lacton 2 0.098/ 9.5	77.6 : 22.4

Schlussfolgerung: Lacton 1 aus der Isomerisierung von Lacton 1 und Lacton 1 aus der Isomerisierung von Lacton 2 ist identisch mit Lacton-1-Referenz (vgl. Tabelle 19). Dasselbe gilt sinngemäss für Lacton 2 aus den beiden Isomerisierungen mit Lacton-2-Referenz (vgl. Tabelle 19).

Das Verhältnis von Lacton 1 : Lacton 2 beträgt unter den Isomerisierungsbedingungen ca 78:22 % zu Gunsten des Lactons mit natürlicher Konfiguration am Kohlenstoffatom C-3, nämlich C-3 α (vgl. LLC, Abb. 53-54). Dieses Verhältnis wurde sowohl durch Isomerisierung von Lacton 1, als auch durch Isomerisierung von Lacton 2, also von beiden Seiten her eingestellt. Demzufolge ist das Isomerisierungsgleichgewicht eingestellt.

Obwohl das Gleichgewicht der Isomerisierung zu Gunsten des richtigen Lactons (Lacton 1) vorliegt, ist die Isomerisierung infolge der geringen Ausbeute präparativ nicht verwendbar.

Diskussion der Reaktionsbedingungen

Die vorliegenden Reaktionsbedingungen zur Isomerisierung von Lacton 1 und 2 sind das Resultat von ca 50 Vorversuchen mit je ca 0.1 μMol (ca 100 μg) Eduktmaterial. In diesen Vorversuchen wurden sowohl Basen als auch Säuren als Isomerisierungskatalysatoren und verschiedene Lösungsmittel verwendet.

verwendete Basen: Pyridin, N-äthyl-diisopropylamin, 1,5-Diaza-bicyclo-[5,4,0]-undec-5-en(DBU) und 1,5-Diaza-bicyclo-[4,3,0]-non-5-en (DBN).

verwendete Säuren: Trifluoressigsäure, Trifluormethansulfonsäure.

verwendete Lösungsmittel: Toluol, Diglym, Methanol, Dimethylformamid, Dimethylacetamid und Sulfolan.

Die Temperaturen wurden innerhalb RT und 80 $^{\circ}$, die Reaktionszeiten innerhalb 30 Min.-270 Min. variiert.

Die Vorversuche zeigten, dass nur mittels starker Basen eine Isomerisierung erreicht werden kann. Beispielsweise lieferte die Isomerisierung von Lacton 2 in Sulfolan/10 % Trifluoressigsäure (180 Min./RT) ca 90 % einheitliches, nicht isomerisiertes Lacton 2. Selbst die Isomerisierung von Lacton 2 in Sulfolan/10 % Trifluormethansulfonsäure (30 Min./80 $^{\circ}$) lieferte nur einheitliches, nicht isomerisiertes Lacton 2.

Die besten Bedingungen zur Isomerisierung von Lacton 2 resultierten mit DBU (wovon 10 % mittels Trifluoressigsäure protoniert waren). Der Zusatz von TFE

bei den ausgeführten Versuchen war nicht unbedingt notwendig; offenbar ist in den kleinen Isomerisierungsproben genügend Wasser (?) vorhanden, um eine Re-protonierung des durch Baseangriff am C-3 Kohlenstoffatom generierten, via den Chromophor stabilisierten, Carbanions zu gewährleisten. Als Lösungsmittel verwendete man Sulfolan unter den Reaktionsbedingungen: 180 Min./80°. Diese Reaktionsbedingungen erforderten denn auch drastisch den Ausschluss von Sauerstoff und Wasserspuren. War das nicht der Fall, konnten bei keiner Isomerisierungsreaktion Isomerisierungsprodukte isoliert werden. Es entstanden nur violette und gelbe, wasserlösliche, unbekannte Produkte (möglicherweise Hydrolyse- und Oxidationsprodukte).

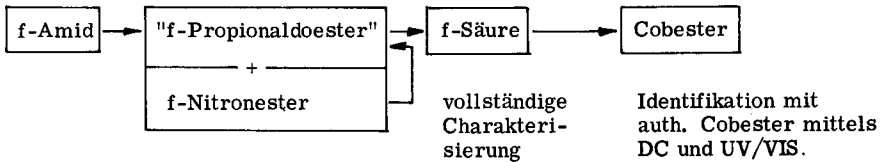
Die Isomerisierungsbedingungen gestatteten allerdings die wünschenswerte Isomerisierung zu Gunsten von Lacton 1 in leider nur schlechter Gesamtausbeute (ca 24-30%). Eine Verkürzung der Reaktionszeit, eine Erniedrigung der Basekonzentration und eine Senkung der Reaktionstemperatur hatte ein nicht eingestelltes Gleichgewichtsverhältnis zur Folge.

Die Reaktionsbedingungen haben offenbar auch Chromophorverluste zur Folge, wie die Chromophorausbeuten von ca 75 % zeigen. Im weiteren entstehen saure Nebenprodukte, deren Strukturen unbekannt sind. Experimente mit schwächeren Basen (cf oben) zeigen, dass Wasserspuren nicht allein für den grossen Anteil saurer Produkte (ca 15-20 %) verantwortlich sind. Bei der Verwendung von N-äthyl-diisopropylamin (in Toluol/180 Min./80°) wurde unverändertes Lacton 2 in ca 95 % Ausbeute isoliert. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass DBU unter den Reaktionsbedingungen unselektiv Ester verseift. Diese Vermutung wird gestützt durch die Beobachtung, wonach stark sterisch gehinderte Triisopropylacetate mittels DBU in Xylol bei 165°/48h in hoher Ausbeute zu den entsprechenden Säuren verseift werden können (vgl. dazu: D. Howard Miles, J.org. Chem 38, 223 (1973)).

2.4. COBYRINSAEURE - HEXAMETHYLESTER - f - SAEURE (27) ("f-Säure").

Vorbemerkung: Die im folgenden Kapitel beschriebenen Experimente wurden von Prof. N. Obata ausgeführt (vgl. sein Arbeitsbericht, Juli 1972) und wurden, um alle wichtigen Stufen zur Synthese von Vitamin B-12 in Dissertation festgehalten zu haben, in die vorliegende Dissertation integriert. Die präparativen Arbeiten von Prof. Obata werden in historischer Reihenfolge beschrieben, wobei das nachstehende Schema eine Uebersicht über diese Arbeiten gibt.

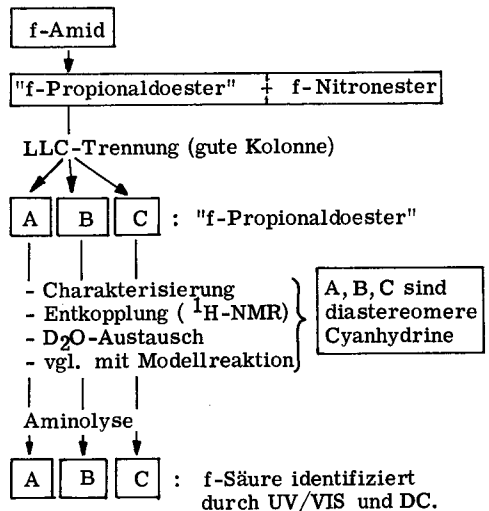
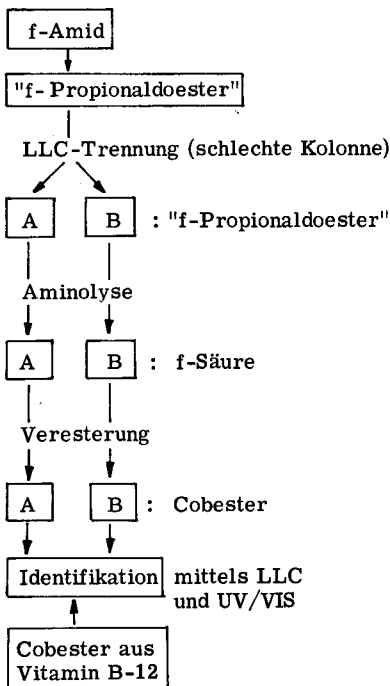
2.4.1. Präparative Herstellung von f-Säure.



2.4.2. Untersuchungen am "f-Propionaldoester".

Voruntersuchungen

Charakterisierung von "f-Propionaldoester"



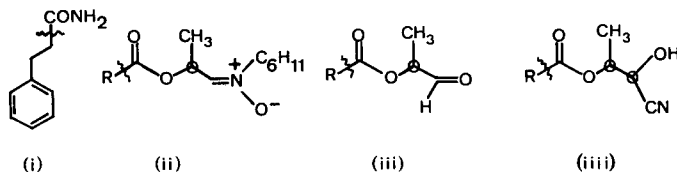
Erläuterung der Gründe für dieses komplizierte Vorgehen.

Beim präparativen Ansatz zur Synthese von f-Säure wurde das nach Hydrolyse von Nitronester (25) erhaltene Reaktionsprodukt anfänglich nicht der LLC-Chromatographie unterworfen, sondern nur TLC-gereinigt der Aminolyse zur f-Säure zugeführt. Anfänglich war man der Meinung, dass das TLC-gereinigte Hydrolyseprodukt von Nitronester als "f-Propionaldoester" (26a) vorliege.

In einer systematischen Voruntersuchung dieses Hydrolyseproduktes, bei welcher die LLC-Chromatographie (Kol B) zur Reinigung des Hydrolyseproduktes von Nitronester ("f-Propionaldoester") eingesetzt wurde, sind 2 einheitliche LLC-Fractionen (je ca 1 μ Mol ca 1 mg) isoliert worden. Beide Fractionen konnten durch Einzelaminolyse in f-Säure überführt werden, wobei die erhaltenen f-Säuren via Veresterung mit Diazomethan in partial synth. Cobester (28) und dieser mittels LLC und UV/VIS mit auth. Cobester identifiziert worden sind.

In einer weiteren, an die Voruntersuchungen anschliessenden Untersuchung mit mehr (ca 20 μ Mol ca 21 mg) "f-Propionaldoester", verwendete man zur LLC-Trennung die Kol A (die Kol B wurde für die Trennung der Lactone benötigt). Die Trennung mit der Kolonne A (die besten Trenneigenschaften aufweisend) lieferte dann auch 3 einheitliche Fractionen im ungefähren Verhältnis 1:1:2, die kristallisiert werden konnten. Die NMR- und IR-Daten der Charakterisierung dieser 3 kristallinen LLC-Fractionen zeigten für keine Fraction Evidenz für das Vorliegen einer Aldehydfunktion. Da bei der TLC- und LLC-Chromatographie von Corrin-Komplexen die Laufmittelsysteme zur Stabilisierung der axialen Liganden des Kobaltzentralatoms HCN enthielten, wurde deshalb vermutet, dass die "f-Propionaldehydfunktion" durch Addition von HCN in das Cyanhydrin (26b) umgewandelt worden war. Auf Grund der vorhandenen 2 asymmetrischen C-Atome im Cyanhydrinteil müssen 2 diastereomere Enantiomerenpaare vorliegen. Die vorhandenen spektroskopischen Daten liessen aber nicht direkt auf das Vorliegen eines Cyanhydrins schliessen.

In der Zwischenzeit führte K. R. Lindner [23] die Reaktionssequenz zur Ueberführung von f-Amid in f-Säure an der Modellschubstanz: 3-Phenyl-Propionsäureamid (i) durch.

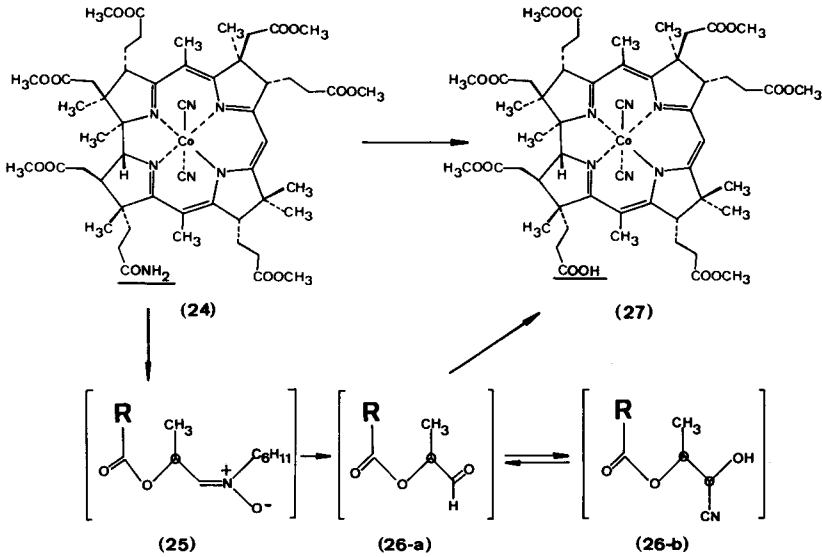


Dabei isolierte er sämtliche Zwischenprodukte, insbesondere den Nitronester (ii) und den Aldoester (iii). Letzterer wurde via KCN/H₂O oder via das Bisulfidaddukt und KCN in die entsprechenden Cyanhydrine (iiii) überführt.

K. R. Lindner isolierte zusätzlich mittels TLC-Trennung die beiden diastereomeren Enantiomerenpaare der Cyanhydrine (iiii). Diese Modellcyanhydrine dienen dem NMR-Vergleich mit den isolierten Corrin-"f-Propionaldoester"-Fractionen A, B, C, woraus insbesondere durch Doppelresonanz- und HD-Austauschexperimente der Beweis erbracht wurde, dass die isolierten Corrin-"f-Propionaldoester"-Fractionen A, B und C (bedingt durch die Chromatographie mit HCN-haltigen Lösungsmitteln) als Cyanhydrine (26b) vorgelegen haben müssen. Die Modellcyanhydrine (iiii) und der Modellaldoester (iii) wurden nach den Aminolysebedingungen glatt zu 3-Phenylpropionsäure umgewandelt.

Ebenso lieferten die Einzelaminolysen der 3 "f-Propionaldoester"-Fractionen 3 f-Säuren, welche sich im UV und DC als identisch erwiesen (keine Identifikation via Veresterung zu Cobester wie in den Voruntersuchungen).

2.4.1. Beispiel eines präparativen Ansatzes zur Synthese von f-Säure ohne Reinigung der Zwischenprodukte (25) und (26).



2.4.1.1. O-Alkylierung von f-Amid und Hydrolyse des f-Nitronesters (25).

20.80 μ Mol (ϵ CH₂Cl₂/592=12000) (23.05 mg (gewogen) kristallines f-Amid (24) * 121 wurden in einem 30 ml Dreihalskolben, versehen mit Innenthermometer, P₂O₅-Trockenrohr, Magnetührstab und Serumkappe unter Argon in 3 ml absolutem 1, 2-Dichloräthan *122 gelöst und die Lösung im Eiswasserbad (0°C) gekühlt. Zur gekühlten und magnetisch gerührten Lösung tropfte man innert 20 Minuten gleich schnell und gleichzeitig eine Lösung von 225 mg (1.15 mMol) Silbertetrafluoroborat *123 in 8 ml 1, 2-Dichloräthan *122 und eine Lösung von 225 mg (1.18 mMol) α -Chlor-Propionaldonitron *124 in 8 ml 1, 2-Dichloräthan *122 mittels zweier in durch die Serumkappe eingestochenen Injektionsspritzen (je ca 10 ml Totalvolumen).

- * 121 f-Amid mit natürlicher Konfiguration ($\alpha\alpha\alpha$), hergestellt durch partielle Aminolyse von auth. Cobester (28) nach H. Maag [12], Seite 226 ff.
- * 122 1, 2-Dichloräthan, Fluka AG puriss, destilliert und vor Gebrauch durch bas. Alox, Akt. 1 (Woelm) filtriert.
- * 123 Silbertetrafluoroborat, wasserfrei, Fluka AG purum, gereinigt über den Aetherkomplex nach H. Meerwein et. al. Arch. Pharm. 291, 541 (1958).
- * 124 α -Chlor-Propionaldonitron, hergestellt nach A. Eschenmoser et. al. Helv. 55, 2187 (1972).
- * 125 hergestellt aus 2 ml wässriger 0.1n HCl-Lösung (Titrisol, Merck) und 18 ml Dioxan.

Dabei blieb die Temperatur des Reaktionsgemisches innerhalb 0-2°C konstant. Das Reaktionsgemisch rührte man nach beendeter Zugabe für weitere 10 Min. bei 0°C. Danach goss man das Reaktionsgemisch auf 30 ml kalte, gesättigte KCl-Lösung, welche zusätzlich wenig Eis enthielt, wusch den Reaktionskolben mit insgesamt 100 ml Methylenchlorid nach und goss dieses ebenfalls auf die gekühlte KCl-Lösung. Nach der Phasentrennung wusch man die org. Phase 4x mit je 30 ml kalter, gesättigter KCl-Lösung (+ wenig Eis), filtrierte die org. Phase durch Watte, entfernte das Lösungsmittel am RV bei RT und trocknete den violetten Lack für 20 Min. am HV bei RT.

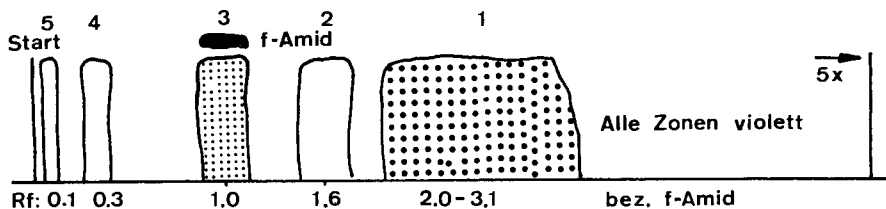
Dieses Reaktionsprodukt wurde nie vollständig spektroskopisch charakterisiert. Auf Grund der gut fundierten Daten derselben Reaktionsfolge an einer Modellverbindung [23] ist anzunehmen, dass der Nitronester (25) vorlag.

Hydrolyse des f-Nitronesters (25).

Nach Trocknung löste man den obigen Rückstand ohne weitere Reinigung unter Argon in 20 ml 0,01 n-HCl in Wasser/Dioxan (1:9) *125 und rührte magnetisch während 30 Min. unter Argon bei RT.

Danach verdünnte man die Reaktionslösung mit 100 ml Methylenchlorid, goss auf 30 ml kalte, gesättigte KCl-Lösung (mit wenig Eis), trennte die Phasen und extrahierte die wässrige Phase mit 10 ml Methylenchlorid. Die vereinigten org. Phasen wusch man 2x gegen 30 ml kalte gesättigte KCl-Lösung (mit wenig Eis) und 2x mit 30 ml kalter, gesättigter KCl/0,1% KCN-Lösung (mit wenig Eis), filtrierte die org. Phasen durch Watte, entfernte die Lösungsmittel bei RT am RV und trocknete den violetten Rückstand am HV.

Rohchromophorausbeute: 20,42 μ Mol (ϵ CH₂Cl₂/592=12000) 98% bez. Edukt. Das Rohprodukt chromatographierte man auf 3 TLC-Platten im Corrinlaufmittelgemisch * 79:



Das Silikagel der einzelnen Zonen wurde mit Methylenchlorid/Methanol Zone 1-3: 95:5. Zone 4+5: 50:50 eluiert und die Eluate am RV eingengt (Zonen 1 und 2 bei RT, Zonen 4+5 bei ca 40-50°). Darauf bestimmte man die spektroskopischen Ausbeuten (bez. Edukt) der einzelnen Zonen:

(Alle UV in CH₂Cl₂ nach Zugabe von ca 1-2 Tropfen 0,4% HCN in Methanol: von den Nebenprodukten sind die Positionen der α -, β - und δ -Banden angegeben).

Zone 1	: "f-Propionaldoester"*126	15,42 μ Mol (ϵ CH ₂ Cl ₂ /590=12000)	74 %
		UV: 590/0,395 max, 550/0,321 max, 373/1,00 max.	
Zone 2	: f-Nitronester (vgl. Diskussion)	1,96 μ Mol (")	9,4%
		UV: 590/0,438 max, 551/0,364 max, 374/1,00 max. (IR vgl. Diskussion unten). UV nicht unterscheidbar vom UV des "f-Propionaldoesters".	
Zone 3	: unumgesetztes f-Amid	0,80 μ Mol (ϵ CH ₂ Cl ₂ /588=12000)	3,8%
		(Identifikation mittels DC, UV/VIS, IR)	
Zone 4+5:	"Säuren"	0,65 μ Mol (")	3,1%
		corrinoide UV: 588 nm, 550 nm, ca 375 nm (relat. Int. sind infolge zu	

konzentriert aufgenommenener UV's (Int. für γ -Bande nicht auf Skala ablesbar, nicht berechenbar).

Diskussion: (f-Nitronester)

Auf Grund des chemischen Verhaltens (die TLC-Zone 2 liefert bei der Nachhydrolyse in HCl/H₂O/Dioxan (vgl. 2. 4. 1. 3.) dieselben Reaktionsprodukte wie die Hydrolyse des oben beschriebenen "f-Propionaldoesters" TLC-Zone 1) wird vermutet, dass es sich bei der TLC -Zone 2 um f-Nitronester (25) handelt. Diese Vermutung wird durch die Resultate der von K. R. Lindner [23] studierten Modellreaktionen (vgl. Vorbemerkung zu 2. 4.) gestützt.

Diskussion des IR: Der Modellnitronester (ii) (vgl. Vorbemerkung zu 2. 4.) zeigt im IR-Spektrum eine gegen den Bandenfuss hin verbreiterte Nitronbande bei 1600 cm⁻¹ mit ca 20-30% der Intensität der dazugehörigen Estercarbonylbande. Im IR des f-Nitronesters (25) (total 7 Estergruppen) würde hingegen auf Grund derselben Intensitätsverhältnisse eine Nitronbande mit ca 3-4% der Estercarbonylintensität erwartet. Bei 1580 cm⁻¹ liegt jedoch eine intensive, gegen den Bandenfuss hin schwach verbreiterte, Chromophorbande, welche die zu erwartende schwache Nitronbande verdeckt. Der Rest des Spektrums ist mit Ausnahme geringerer Intensitätsunterschiede zwischen 1390-1350 cm⁻¹ praktisch identisch mit dem Spektrum des "f-Propionaldoesters" (vgl. hinten).

Reaktionsbedingungen

Einfluss anderer α -Chlor-Nitrone:

α -Chlor-N-Cyclohexyl-acetaldonitron: Mittels dieses Nitrons wurden ursprünglich die oben beschriebenen Reaktionsbedingungen der O-Alkylierung, Hydrolyse des f-Nitronesters und Aminolyse des betreffenden Aldoesters erarbeitet. Nach den Reaktionsbedingungen für die O-Alkylierung von f-Amid und die Hydrolyse des f-Nitronesters (beide Methoden praktisch identisch mit den definitiv beschriebenen) erhielt man aber nur höchstens ca 35-45% des entsprechenden Aldoesters. Die Umwandlung dieses Aldoesters nach der definitiven, schon damals gefundenen Methode in f-Säure, gelang in ca 50-80% Ausbeute. Die Reaktion konnte später nicht mehr verbessert werden.

Anschliessend an die vorhergegangenen Untersuchungen verwendete man das α -Chlor-N-Cyclohexyl-propionaldonitron, welches die Umwandlung von f-Amid zu f-Säure mit gutem Erfolg gewährleistete. Diese definitive Methode ist in der vorliegenden Arbeit beschrieben.

Zusätzlich wurde noch der Einfluss von α -Chlor-N-Cyclohexyl-butylaldonitron auf die Reaktionssequenz zur Umwandlung von f-Amid in f-Säure untersucht. Nach den oben beschriebenen, definitiven Bedingungen isolierte man unter Verwendung von Butylaldonitron ca 42-47% "f- Butylaldoester", ca 14-23% f-Nitronester und ca 20% zurückgewonnenes f-Amid neben ca 6% unbekanntenen Nebenprodukten.

-
- * 126 Nach den vorhandenen spektroskopischen Daten liegt die TLC-Zone 1 nicht als isolierter Aldehyd, sondern als Cyanhydrin-Diastereomergemisch vor. Ueber die Struktur der TLC-Zone 1 (f-Propionaldoester): vgl. 2. 4. 2.
- * 127 Hergestellt durch Lösen von 10 g Dimethylamin (wasserfrei, Siegfried AG, Zofingen) in 20 ml abs. Isopropanol (destilliert über Aluminiumisopropylat, vgl. 2. 1.). Dieses Gemisch wurde unter Wasserausschluss mittels eines Gaseinleitungsrohres mit wasser- und sauerstofffreiem Argon * 111 während ca 3h geflutet. Das Gemisch wurde jeweils auch für kleine Ansätze mit obigen Mengen frisch hergestellt.

Es wurden mit diesem Butylnitron keine besseren Ausbeuten an Aldoester erzielt. Die Aminolyse des erhaltenen Butylaldoesters nach den definitiven Bedingungen lieferte ca 80% (bez. Aldoester) f-Säure. Dieses Resultat ist mit dem Resultat der definitiven Methode vergleichbar.

Einfluss des Lösungsmittels auf die O-Alkylierung

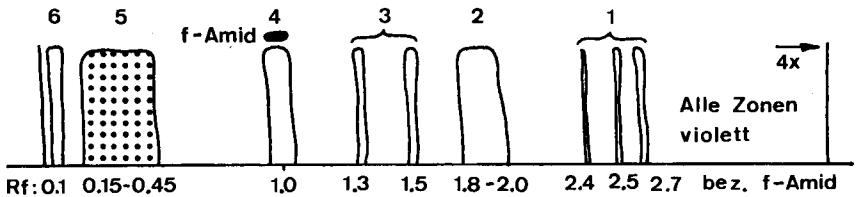
In einigen Versuchen verwendete man für die O-Alkylierung SO_2 als Lösungsmittel. Diese Experimente wurden folgendermassen ausgeführt: Zu 2 ml flüssigen Schwefeldioxids gab man 1 μ Mol in ca 200 μ l 1, 2-Dichloräthan gelöstes f-Amid bei $-20^\circ C$. Zu dieser Lösung gab man gleichzeitig mittels 2 Injektionspritzen ca 65 Mol-äquivalente (ca 12.6 mg) Silbertetrafluorborat gelöst in ca 400 μ l 1, 2-Dichloräthan und ca 67 Moläquivalente (ca 12.6 mg) Chlor-Propionaldonitron, gelöst in ca 400 μ l des gleichen Lösungsmittels. Nach beendeter Zugabe (ca 15 Min.) liess man noch 2h bei -20° reagieren, liess das Schwefeldioxid unter Erwärmung auf RT entweichen, hydrolysierte und arbeitete analog den unter 2. 4. 1. 1. beschriebenen Bedingungen auf. Dabei isolierte man nach dem erfolgreichsten Experiment ca 32% "f-Propionaldoester", ca 21% f-Nitronester und ca 27% f-Amid. Diese Experimente wurden nicht weiter verfolgt. Schwefeldioxid ist als Lösungsmittel insbesondere bei kleinen Ansätzen infolge seiner grossen Hygroskopizität nicht zu empfehlen. Ansätze mit mehr als 1 μ Mol (ca 1 mg) f-Amid wurden nie ausgeführt.

2. 4. 1. 2. Aminolyse von "f-Propionaldoester" (26a) * 126.

Das Material der TLC-Zone 1 (vgl. 2. 4. 1. 1.) 15.42 μ Mol "f-Propionaldoester" (26) wurde in 3.0 ml eines wasserfreien und sauerstofffreien Gemisches von Dimethylamin in Isopropanol (1:2) *127 gelöst und während 1h bei RT unter Argon stehen gelassen. Danach saugte man das Lösungsmittel und das Dimethylamin am HV ab, nahm den anfallenden violetten Lack 2x in je 5 ml abs. Benzol auf und entfernte jeweils das Benzol am RV (Entfernung von Dimethylaminspuren).

Roh-Chromophorausbeute: 15.0 μ Mol ($\epsilon CH_2Cl_2/593=12000$) 98%

Das Rohprodukt chromatographierte man auf 4 DC-Platten *12 im Corrin-Laufmittelsystem *79:



Das Silikagel der einzelnen Zonen wurde mit Methylenechlorid/Methanol (Zone 1-3: 95:5, Zone 4-6: 50:50) eluiert und die Eluate am RV vollständig eingengt. Es wurden folgende Substanzmengen (nach Zugabe von ca 1-2 Tropfen 0.4% HCN in Methanol zur Lösung der Substanzen in Methylenechlorid spektroskopiert) bezüglich eingesetztem "f-Propionaldoester" erhalten. Bei den UV/VIS der Nebenprodukte sind nur die Bandenpositionen für die α -, β - und γ -Bande angegeben. Sofern der Intensitätswert der δ -Bande auf dem Spektrum ablesbar war, wurden auch die relativen Intensitäten dieser 3 Banden angegeben.

- Zone 1 : 0.2 μ Mol (ϵ CH₂Cl₂/590=12000) 1.3 % (nicht weiter untersucht)
UV: 590 nm, 553 nm, 372 nm.
- Zone 2 : 0.68 μ Mol (ϵ CH₂Cl₂/590=12000) 4.4 % (nicht weiter untersucht)
UV: 590/0.377 max, 552/0.304 max, 372/1.00 max.
- vermutlich f-Isopropylester; Evidenz: Aus Aminolysevorversuchen in Methanol (vgl. Diskussion unten) isolierte man bis zu 19% Cobester (28), der ungefähr den gleichen Rf-Wert aufwies.
- Zone 3 : 0.29 μ Mol (") 1.9 % (nicht weiter untersucht)
UV: 590/0.385 max, 551/0.340 max, 372/1.00 max.
- Zone 4 : 1.08 μ Mol (") 6.3 % (auf Grund des IR-Spektrums möglicherweise f-Dimethylamid, mit Bande bei 1640 cm⁻¹, vgl. dazu die gleiche Bandenlage für die c-Dimethylamide (22) (vgl. [13]).
UV: 591/0.388 max, 552/0.320 max, 372/1.00 max.
- Zone 5 : 11.25 μ Mol (ϵ CH₂Cl₂/590=12000) 73.0 % (HAUPTPRODUKT, f-Säure (27))
- Zone 6 : 0.14 μ Mol (") 1.0 % (nicht weiter untersucht)
UV: 590/0.340 max, 550/0.300 max, 370/1.00 max.

Diskussion: Die Aminolyse von "f-Propionaldoester" ergab für die obigen Bedingungen mit Isopropanol als Lösungsmittel die besten Resultate. Vorversuche mit anderen Lösungsmitteln unter sonst analogen Bedingungen ergaben folgende Resultate:

Methanol : 57 % f-Säure und ca 19% Cobester (28).
Aethanol : 76 % f-Säure und ca 16% einer Zone mit vergleichbarem Rf-Wert wie Cobester (28), vermutlich f-Aethylester.

Isopropanol: 84 % f-Säure und ca 10% einer Zone mit vergleichbarem Rf-Wert wie Cobester (28), vermutlich f-Isopropylester.

Eine Verkürzung der Reaktionszeit auf 30 Min. (nur für Isopropanol ausgeführt) ergab für die Aminolyse von "f-Propionaldoester" dieselbe Ausbeute an f-Säure (bez. Edukt) wie für 1-stündige Reaktionszeit.

Diskussion der Vorversuche zur Erarbeitung der Reaktionsbedingungen zur Aminolyse von "f-Propionaldoester":

Die Vorversuche wurden an "d-Propionaldoester" (hergestellt nach den obigen Methoden für "f-Propionaldoester" aus d-Amid) (Herstellung von d-Amid, vgl. H. Maag [12], Seite 230) mit je ca 60 δ Material qualitativ ausgeführt. Die Reaktionszeit betrug 1h, Zubereitung und Entgasung der Solvolysegemische wie im Hauptansatz, Analyse der Reaktionsgemische mittels DC.

Resultate:

Solvolysegemische: ca 200 μ l/60 δ "d-Propionaldoester"

- a) Dimethylamin/Methanol (1:2)
- b) " /Dioxan (1:2)
- c) " /Methanol/Dioxan (1:1:1)
- d) " /Benzol (1:2)
- e) " /Methanol/Benzol (1:1.5:0.5)

In den Experimenten a), c), und e) wurde mittels DC neben wenig Cobester und wenig d-Dimethylamid (?) hauptsächlich d-Säure (auf Grund des kleinen Rf-Wertes) festgestellt. In den Experimenten b) und d) stellte man neben wenig "d-Säure" und d-Dimethylamid (?) praktisch nur Edukt fest. Anschliessend wurde der Einfluss verschiedener Alkohole auf die Aminolyse des "f-Propionaldoesters" (cf.oben) untersucht, was zu den definitiven, oben beschriebenen Reaktionsbedingungen führte.

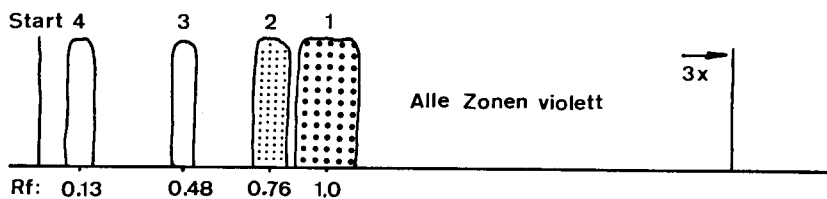
andere Amine: Erwartungsgemäss gab die Verwendung von Trimethylamin an Stelle von Dimethylamin in den definitiven Aminolysebedingungen kaum f-Säure. Die DC-Analyse des Reaktionsproduktes zeigte, dass neben wenig f-Säure praktisch nur Edukt vorhanden war.

2. 4. 1. 3. Nachhydrolyse von f-Nitronester (25) zu f-Säure (27).

Die 1.96 μ Mol des im obigen Hauptansatz zurückgewonnenen f-Nitronesters (25) (Zone 2, 2. 4. 1. 1.) wurden unter Argon in 1 ml 0.01 n-HCl in Wasser/Dioxan (1:9) * 125 gelöst und während 30 Min. unter Argon bei RT magnetisch gerührt. Danach verdünnte man die violette Reaktionslösung mit 20 ml Methylenchlorid und goss anschliessend auf 15 ml kalte, gesättigte KCl-Lösung. Man wusch den Kolben mit 5 ml Methylenchlorid nach und goss ebenfalls auf obige gesättigte KCl-Lösung. Nach Trennung der Phasen wusch man die organische Phase 2x mit je 15 ml kalter, gesättigter KCl-Lösung, 1x mit 15 ml kalter, gesättigter KCl/0.1 % KCN-Lösung (mit wenig Eis), filtrierte die org. Phase durch Watte, entfernte die Lösungsmittel bei RT am RV und trocknete den violetten Rückstand am HV.

Roh-Chromophorausbeute: 2 μ Mol (ϵ CH₂Cl₂/590=12000) 100%

Das Rohprodukt chromatographierte man wie üblich an einer DC-Platte *12 im Corrin-Laufmittelsystem *79:



Das Silikagel der einzelnen Zonen eluierte man mit Methylenchlorid/Methanol (Zonen 1-3: 95:5, Zone 4: 50:50), engte die Eluate am RV (Eluat 1-3 bei RT, Eluat 4 bei ca 40-50°) ein und bestimmte folgende spektroskopischen Ausbeuten (bez. Edukt): (UV/VIS in Methylenchlorid nach Zugabe von ca 1-2 Tropfen 0.4% HCN in Methanol).

Zone 1 :	"f-Propionaldoester"	0.924 μ Mol (ϵ CH ₂ Cl ₂ /590=12000)	47.2%
		UV: 590/0.404 max, 552/0.322 max, 374/1.00 max.	
		IR: identisch mit IR der gleichen Zone des Hauptansatzes.	
Zone 2 :	"f-Nitronester"	0.55 μ Mol (")	28.0%
		UV: 590/0.375 max, 551/0.310 max, 373/1.00 max.	
		IR: identisch mit IR der gleichen Zone des Hauptansatzes.	
Zone 3 :	?	0.05 μ Mol (")	2.7%
		UV: 588/0.338 max, 550/0.304 max, 372/1.00 max. (nicht weiter untersucht).	
Zone 4 :	?	0.14 μ Mol (")	7.2%
		UV: 588/0.370 max, 548/0.304 max, 370/1.00 max. (nicht weiter untersucht).	

In zwei weiteren Nachhydrolysen (mit Material aus anderen Ansätzen) ca gleicher Grössenordnung nach den beschriebenen Bedingungen isolierte man 66 resp. 54% "f-Propionaldoester".

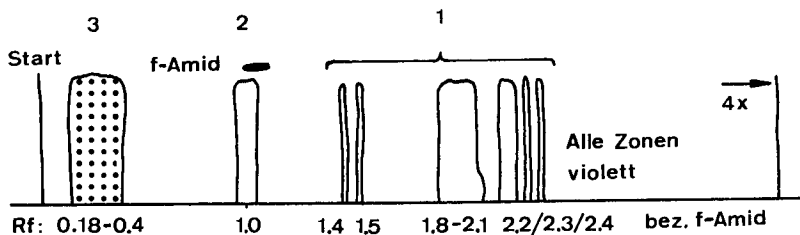
Die TLC-Zone 1 wurde ohne weitere Reinigung wie folgt aminolysiert.

Aminolyse des "f-Propionaldoesters" aus der Nachhydrolyse von f-Nitronester.

Das Material der obigen TLC-Zone 1 (0.924 μ Mol "f-Propionaldoester") unterwarf man den in 2.4.1.2. beschriebenen Aminolysebedingungen in 1 ml sauerstoff-freiem und wasserfreiem Dimethylamin/Isopropanol (1:2) *127.

Roh-Chromophorausbeute: 0.924 μ Mol (ϵ CH₂Cl₂/592=12000) 100%

Nach Chromatographie (vgl. 2.4.1.2.) bestimmte man die Ausbeute (bez. Edukt) analog.



- Zone 1 :** ? 0.159 μ Mol (ϵ CH₂Cl₂/590=12000) 17.2 %
enthält mehrere Zonen, die gemeinsam eluiert wurden. Diese Zonen entsprechen in ihren Rf-Werten den unter 2.4.1.2. beschriebenen Zonen.
- Zone 2 :** ? 0.034 μ Mol (" ") 3.7 %
entspricht auf Grund des Rf-Wertes der Zone 4 (vgl. 2.4.1.2.) (f-Dimethylamid (?)). UV dieser Zone nicht unterscheidbar von UV der Zone 4 (2.4.1.2.).
- Zone 3 :** f-Säure 0.617 μ Mol (" ") 65.6 %
Die erhaltene f-Säure war UV-spektroskopisch und im DC nicht zu unterscheiden von der f-Säure des Hauptansatzes.

Ausbeuteübersicht.

Die Ausbeute an "f-Propionaldoester" analog ausgeführter Ansätze gleicher und kleinerer Größenordnung variierte zwischen 65-74 %, jene für f-Säure lag zwischen 47-57 % bez. eingesetztem f-Amid (24).

Hauptansatz:

20.85 μ Mol f-Amid (Edukt) 15.42 μ Mol (74 %) "f-Propionaldoester" (26a)
11.25 μ Mol (53.9%) f-Säure (27).

Aus Nachhydrolyse des zurückgewonnenen f-Nitronesters.

1.96 μ Mol f-Nitronester 0.924 μ Mol (4.4%) "f-Propionaldoester" (26a)
0.62 μ Mol (2.9%) f-Säure (27).
Beide Ausbeuten bezogen auf f-Amid (24)

Gesamtausbeute an f-Säure (27).

11.25 + 0.62 μ Mol = 11.87 μ Mol (56.8 %, bez. f-Amid (24))

2.4.1.4. Kristallisation und Charakterisierung der f-Säure

Bemerkung: Die Kristallisation der nach obiger Reaktionsfolge erhaltenen f-Säure wurde anfänglich in Methylacetat/Hexan ausgeführt. Dabei zeigte es sich, dass entweder feine Nadeln oder klotzige kubische Kristalle mit identischen lösungsspektroskopischen Daten anfielen. Die Rekrystallisation zweier vereinigter Kristallisate, eines nadelige, das andere kubische Kristalle aufweisend) lieferte beide Kristallformen nur langsam kristallisierend. Im Verlaufe weiterer Kristallisationsversuche zeigte sich, dass die Kristallisationslösungsmittel Aceton/Hexan gut reproduzierbare und stets

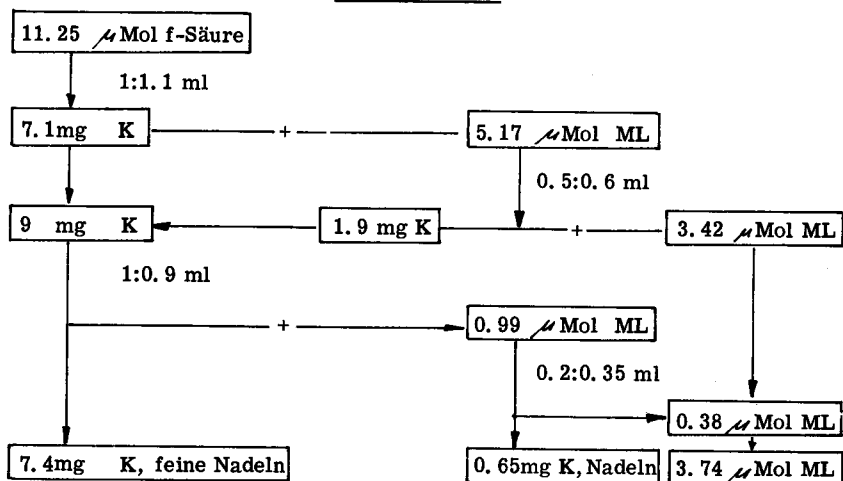
einheitliche, nadelige Kristallisate lieferte. In der Folge wurde stets aus der letzten Lösungsmittelkombination kristallisiert. Die Kristallisation der vorliegenden f-Säure zur Charakterisierung wird jedoch detailliert in historischer Reihenfolge beschrieben.

Kristallisation.

11.25 μ Mol f-Säure aus dem oben beschriebenen Hauptansatz (das Material der Nachhydrolyse (2.4.1.3.) nicht damit vereinigt) wurde in 1 ml Methylenchlorid gelöst, durch einen Wattepfropf filtriert, am RV vom Lösungsmittel befreit, am HV bei RT getrocknet und anschliessend wie folgt kristallisiert.

Dazu löste man 11.25 μ Mol (ca 12.1 mg gewogen) f-Säure in 1 ml abs. Methylacetat und versetzte tropfenweise mit insgesamt ca 1.1 ml Hexan. Nach heftigem Kratzen des Kolbens mittels eines Nickelspatels erschienen die ersten feinen Nadeln. Nach einem Tag pipettierte man die Mutterlauge ab, wusch die Kristalle mit Hexan und trocknete die feinen Nadeln am HV bei RT. Zur weiteren Kristallisation verfuhr man nach Schema 2.

Schema 2. *128.

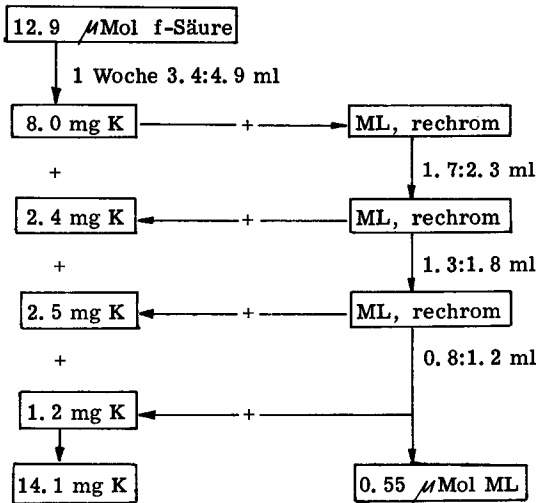


Ein analog ausgeführter Nachschubansatz ausgehend von 21.04 μ Mol f-Amid lieferte 10.42 μ Mol (ca 11.5 mg) f-Säure, die nach obig beschriebener Kristallisation 8.4 mg (gewogen) klotzige, kubische Kristalle lieferten.

* 128 Die Buchstaben in den Kästchen bedeuten: K=Kristalle, ML=Mutterlauge. Die erste Zahl neben den Pfeilen bezieht sich auf die Methylacetatmenge (Schema 2, 4) resp. Acetonmenge (Schema 3,). Die zweite Zahl gibt stets die Hexanmenge an.

Die 7.4 mg feinen Nadeln der vorher beschriebenen Kristallisation vereinigte man mit den 8.4 mg kubischen Kristallen des Nachschubansatzes (zusammen 15.5 mg, gewogen) und kristallisierte wie oben beschrieben aus Methylacetat/Hexan. Dabei erfolgte die Kristallisation nur langsam und das anfallende Kristallisat enthielt die beiden morphologisch verschiedenen Kristallformen. Zugabe von weiterem Hexan bewirkte das "Ausölen" der f-Säure. Die Kristallisation wurde abgebrochen, die Lösungsmittel am HV entfernt und das anfallende Oel wie üblich der TLC-Chromatographie unterworfen. Dabei erhielt man 12.9 μ Mol (Σ CH₂Cl₂/590=12000) (14.2 mg, gewogen) f-Säure, die nun aus Aceton/Hexan kristallisiert wurden. Dieses Kristallisationssystem bewährte sich in der Folge sehr gut und lieferte, stets reproduzierbar, kristalline f-Säure in feinen Nadeln. Die dabei anfallenden Mutterlaugen wurden wie üblich rechromatographiert und erneut kristallisiert. Die Details der Kristallisation sind aus Schema 3 ersichtlich.

Schema 3 * 128.



Die vereinigte Kristallisate (14.1 mg, violette Nadeln) wurden am HV bei RT getrocknet und dienten dann zur Aufnahme des NMR-Spektrums und IR-Spektrums. Nach analoger Kristallisation wurden noch die übrigen Spektren (UV/CD) registriert und das Molekulargewicht bestimmt.

Cobyrinsäure-Hexamethylester-f-Säure (27) ("f-Säure") (kristallin).

Molekulargewicht: bestimmt nach der thermoelektrischen Methode [26].

theoretisch: C₅₃H₇₁N₆O₁₄Co : 1075

(3.934 mg/g Methylenchlorid/25⁰)

Durch Zufall wurde gefunden, dass das Molekulargewicht zeitabhängig ist. Es wurde nach erfolgter Probeherstellung in folgenden Intervallen gemessen. Die folgenden Werte wurden dabei erhalten:

Zeit nach Probeherstellung	Molekulargewicht
15 Minuten	1169
35 "	1436

Zeit nach Probeherstellung	Molekulargewicht
45 Minuten	1968
50 "	2207

Diese Molekulargewichtszunahme ist vermutlich auf eine Assoziation der gelösten f-Säure zurückzuführen.

UV

1. 442 mg in 50 ml Methanol/0.02 % HCN.

Abb. 55

583/10200 max, 560/7350 min, 544/8400 max, 514/5400 sh,
442/1650 min, 420/2400 max, 410/2160 min, 368/29100 max,
354/13800 sh, 330/4550 min, 314/9000 max, 306/8650 max,
288/5400 min, 277/9500 max.

IR CHCl₃

Banden u. a. bei: 3440w breit (OH assoziiert), 2122 w (Co-CN),
1730s (COOCH₃), 1580s mit breitem Signal überlagert (Chromophor,
Carboxylat der f-Seitenkette), 1500s (Chromophor) cm⁻¹.

Abb. 56

IR Nujol

Banden u. a. bei 3700-3100m breit (OH assoziiert),
2120w (Co-CN), 1730s (COOCH₃), 1580s mit breitem Signal
überlagert (Chromophor, Carboxylat der f-Seitenkette), 1500s
(Chromophor) cm⁻¹.

NMR CDCl₃

HA-100

Abb. 57

11. 4mg in ca 0. 4ml

	Bereich	theor.	Integral exp.
-H-C-10	5. 54	1	0. 87
-Ester: 3. 76/3. 73/ 3. 70/3. 68/3. 63	4. 0-3. 50	22	22
-C-5-Methyl, C-15- Methyl und übrige Ring- und Seitenket- tenprotonen.	3. 5-1. 70 (darin 2CH ₃ -s bei 2. 27 und 2. 20)	30	34
-Methyl: 1. 58/1. 51/ 1. 37/1. 27/1. 25/1. 20	1. 7-1. 00	18	19

Kommentar zum NMR: Das vorliegende NMR (Abb. 57) ist schlecht aufgelöst. Der Grund dafür ist in der erst später bei der Bestimmung des Molekulargewichts durch Zufall entdeckten Assoziationstendenz der f-Säure in Methylenchloridlösung zu suchen. In der NMR-Probe (Lösungsmittel: Deuteriochloroform) liegen wahrscheinlich sehr ähnliche Assoziationsverhältnisse vor. Die Assoziation äussert sich im NMR durch schlecht aufgelöste Methylestergruppensignale und eine gegenüber ähnlichen Spektren viel schlechtere Auflösung (verbreiterte, diffuse Banden) der zwischen 3. 5-1. 7 ppm liegenden Signalhaufen. Auch die Methylgruppensignale (zwischen 1. 7-1. 00ppm) sind schlecht aufgelöst. Leider wurden keine anderen, weniger zu Assoziationen einladenden Lösungsmittel zur Aufnahme der NMR-Spektren ausprobiert.

Das vorliegend aufgeführte und abgebildete Spektrum ist die beste Aufnahme von ca 3 NMR-Spektren die seinerzeit von f-Säure registriert wurden.

CD

Abb. 58

c = 3. 91 x 10⁻⁵ Mol/l (ε Methanol/0.02 % HCN = 12000)
583/-3. 7, 540/-1. 8, 473/0. 0, 425/+15. 3, 416/+14. 6,
395/+24. 4, 373/0. 0, 367/-8. 2, 360/-6. 1, 349/-12. 2,
320/-3. 1, 310/-9. 8, 293/0. 0, 280/+2. 4, 253/-12. 8.

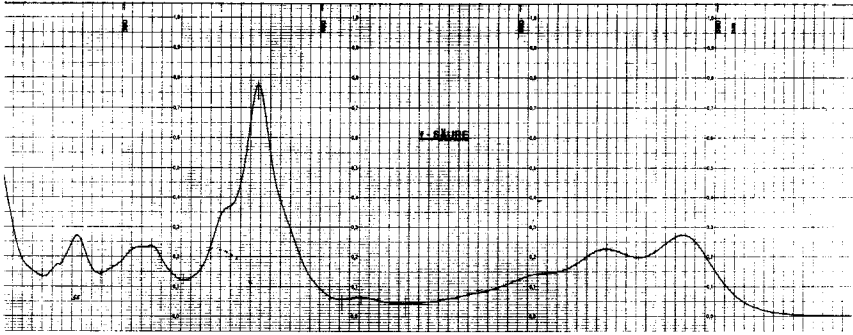


Abb. 55

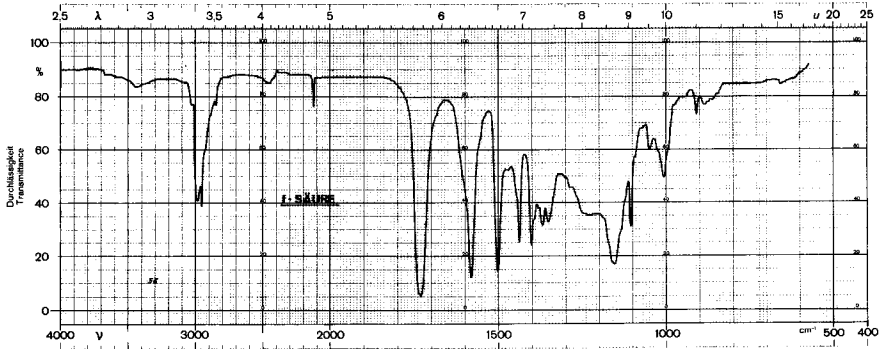


Abb. 56

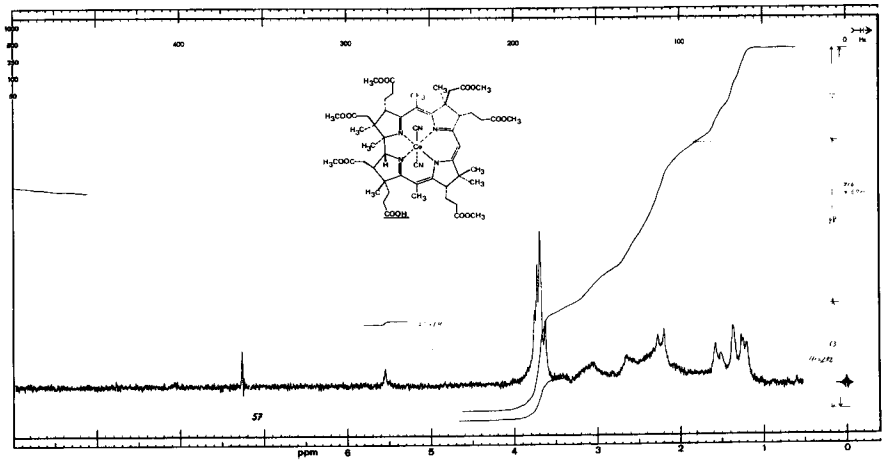


Abb. 57

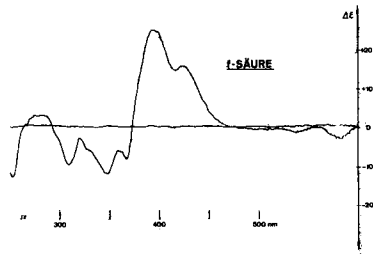
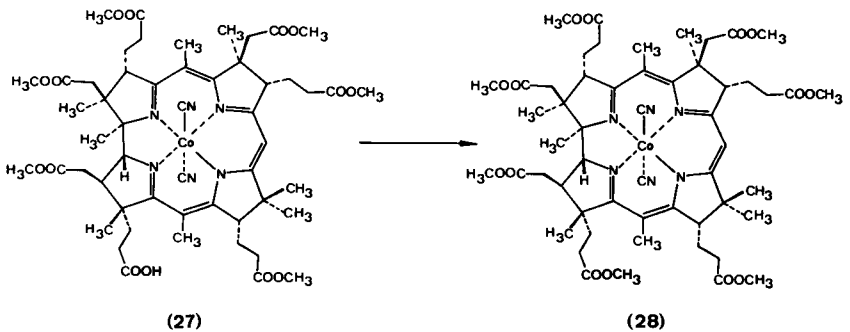
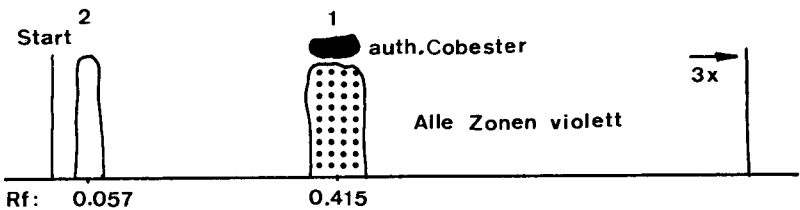


Abb. 58

2. 4. 1. 5. Veresterung von f-Säure (27) zu Cobester (28) und DC-Identifikation mit authentischem Cobester (28) * 129. (vgl. Identif. mittels LLC in 2. 4. 2. 1.)



0,2 μ Mol (ϵ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/590=12000$) kristalline f-Säure des vorigen Ansatzes wurden in 1 ml Methanol gelöst und mit 10 Tropfen einer frisch hergestellten 0,25 m ätherischen Diazomethanlösung *69 versetzt. Die schwach gelbe Lösung liess man während 5 Min. bei RT stehen, saugte danach die Lösungsmittel und überschüssiges Diazomethan am RV ab und chromatographierte das violette Rohprodukt direkt auf einer DC-Platte *12 im Corrin-Laufmittelsystem *79:



Das Silikagel der Zonen 1 und 2 eluierte man mit Methylenchlorid/Methanol (Zone 1: 95:5, Zone 2:50:50) und bestimmte nach Einengen der Eluate am RV die folgenden spektroskopischen Ausbeuten bez. Edukt.

- Zone 1: Cobester 0.142 μ Mol (ϵ CH₂Cl₂/592=12000) 71 %
Identifiziert mittels DC (Rf=0.415, vgl. obiges DC).
Das UV/VIS-Spektrum dieser Zone ist nicht unterscheidbar vom UV/VIS der authentischen Vergleichsprobe, (vgl. LLC-Identifikation in 2. 4. 2. 1.).
- Zone 2: f-Säure 0.027 μ Mol (ϵ CH₂Cl₂/590=12000) 13.5 %
UV/VIS-Spektrum dieser Zone ist nicht unterscheidbar vom UV/VIS des Eduktes.

Anmerkung: Die Veresterung von f-Säure in Methylenchlorid als Lösungsmittel, unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen, ist schwer reproduzierbar. Die Ausbeuten solcher Veresterungsansätze gleicher Grössenordnung wie oben variierten zwischen 52-67 % bez. Edukt; dabei wurde allerdings mehr (bis ca 38 %) nicht veresterte f-Säure zurückgewonnen.

Reaktivität der Methylestergruppen gegenüber O-Alkylierung mit α -Chlor-Propionaldonitron in Cobester (28) als Estermodellverbindung.

Um zu prüfen, inwieweit die Methylestergruppen unter Alkylierungsbedingungen mit α -Chlorpropionaldonitron reagieren, wurde Cobester (28) den unter 2. 4. 1. 1. beschriebenen Bedingungen zur Alkylierung von f-Amid unterworfen.

1.07 μ Mol kristallinen, authentischen Cobester (28) unterwarf man den in 2. 4. 1. 1. und 2. 4. 1. 2. beschriebenen Bedingungen zur Ueberführung von f-Amid in f-Säure.

Resultat:

- Zurückgewonnener Cobester nach Alkylierung und saurer Hydrolyse in 0.01n-HCl in Wasser/Dioxan (1:9) und Chromatographie wie in 2. 4. 1. 1. (DC: 1 Flecken): 0.95 μ Mol (ϵ CH₂Cl₂/584=12000) 89 % (bez. Edukt). Identifikation des Reaktionsproduktes mittels DC und LLC. Das UV/VIS-Spektrum dieses Reaktionsproduktes ist nicht unterscheidbar vom UV/VIS des Eduktes. Diese Cobesterfraktion wurde anschliessend der Aminolysebedingung unterworfen.
- Zurückgewonnener Cobester nach Aminolyse und Chromatographie wie in 2. 4. 1. 2. : 0.884 μ Mol (ϵ CH₂Cl₂/584=12000) 82.7% (bez. ursprünglich eingesetztem Cobester). Identifikation mittels DC und LLC (LLC vgl. unten) Das UV/VIS-Spektrum dieses Reaktionsproduktes ist nicht unterscheidbar vom UV/VIS des auth. Cobesters.

Die beiden obigen Reaktionsprodukte wurden zusätzlich mittels LLC identifiziert. In Tabelle 21 sind die Identifikationsdaten zusammengefasst.

* 129 Herstellung vgl. L. Werthemann, Diss. ETH, 1968.

Tabelle 21.

Bedingungen: (S I, Kol A, 90 ml/h)
Zuordnungskriterium: Mischchromatogramme

	R _t	N _{th}	
1 auth. Cobester	4.2 Min.	1760	einheitlicher
2 Cobester nach Alkylierung	4.2 Min.	1760	LLC-Peak
3 Cobester nach Aminolyse	4.2 Min.	1760	"
1 und 2 (1:1) gemischt	4.2 Min.	1760	"
1 und 3 (1:1) gemischt	4.2 Min.	1760	"

Kommentar: Die aus der Alkylierungsreaktion resp. Aminolysereaktion zurückgewonnenen Reaktionsprodukte sind identisch (DC, LLC und UV/VIS) mit dem Edukt, nämlich authentischem Cobester (28).

Mit Berücksichtigung der Chromatographieverluste bei der Reinigung der Reaktionsprodukte (bei Chromatographie von Substanzmengen dieser Grössenordnung erfahrungsgemäss ca 5-10%) darf angenommen werden, dass mindestens 90% des eingesetzten Cobesters keine Nebenreaktionen erlitten haben.

2. 4. 2. Untersuchungen über die Struktur des "f-Propionaldoesters" (26a).

(vgl. dazu den Ueberblick in der Vorbemerkung zu 2. 4.)

2. 4. 2. 1. Voruntersuchungen

LLC-Identifikation des Cobesters erhalten via Aminolyse und Veresterung der beiden mittels LLC erhältlichen Fraktionen von "f-Propionaldoester".

Ausgehend von 5.08 μ Mol f-Amid (24) *121 erhielt man nach den unter 2. 4. 1. 1. und 2. 4. 1. 2. beschriebenen Methoden 3.58 μ Mol (71 %) bez. f-Amid "f-Propionaldoester".

LLC-Trennung des "f-Propionaldoesters".

Die 3.58 μ Mol "f-Propionaldoester" des obigen Ansatzes wurden der schnellen LLC-Chromatographie unterworfen. Man sammelte die in Abb. 59 angegebenen Fraktionen und bestimmte nach Entfernung der Lösungsmittel am RV folgende spektroskopischen Ausbeuten (bez. eingesetzten f-Amids).

Bedingungen: (S I, Kol B, 90 ml/h) Abb. 59
Ausbeute gemessen mit ϵ CH₂Cl₂/590=12000
für alle aufgeführten Fraktionen.

- Fraktion a 0.48 μ Mol 10.3 %
Vorfraktion; komplexes Gemisch
- Fraktion A 1.13 μ Mol 24.4 % R_t = 6.3 Min.
Hauptfraktion A: sogen. "Aldoester A".
- Fraktion B 1.34 μ Mol 29.3 % R_t = 6.8 Min.
Hauptfraktion B: sogen. "Aldoester B".
- Fraktion b 0.28 μ Mol 6.1 %
Nachfraktion:komplexes Gemisch

- Die IR-Spektren der beiden Fraktionen A und B sind nicht voneinander unterscheidbar. Es sind auch keine Anzeichen für das Vorliegen eines Aldehyds vorhanden. Die beiden Spektren sind auch nicht unterscheidbar von den 3 unter

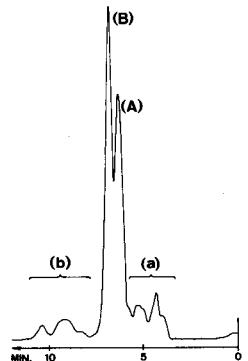


Abb. 59

2. 4. 2. 2. beschriebenen IR-Spektren der Aldoesterfraktionen A, B und C.
- Die UV/VIS-Spektren der aus dem obigen Chromatogramm erhaltenen 4 Fraktionen sind von corrinoidem Charakter und voneinander nicht unterscheidbar.
 - Die 4 Fraktionen des obigen Chromatogramms wurden separat den nachfolgenden Aminolysebedingungen zugeführt.

Nachbemerkung: Bei der erst später erfolgten Trennung mit mehr Material verwendete man eine bessere Kolonne (Kol A). Dies hatte eine Auftrennung des nach gleicher Methode hergestellten "f-Propionaldoesters" in 3 (statt 2) Hauptfraktionen zur Folge (vgl. 2. 4. 2. 2.).

Einzelaminolyse der 4 LLC-Fraktionen der vorhergegangenen Trennung.

Das Material der 4 LLC-Fraktionen a, A, B und b wurde mit den entsprechenden Fraktionen einer Vortrennung (ausgehend von ca 800 μ g nicht LLC getrennten "f-Propion - Aldoesters") vereinigt. Dieses vereinigte Material unterwarf man anschliessend einzeln den unter 2. 4. 1. 2. beschriebenen Aminolysebedingungen. Dabei wurden folgende Ausbeuten (bez. eingesetztem "f-Propionaldoester") erzielt (alle UV gemessen mit ϵ CH₂Cl₂/590=12000).

LLC-Fraktionen nach Trennung
von "f-Propionaldoester"

f-Säure (bez. Edukt)

Fraktionen a (0.5 μ Mol)		f-Säure a (0.27 μ Mol) 48%
" A (1.38 μ Mol)		" A (1.21 μ Mol) 88%
" B (1.62 μ Mol)	AMINOLYSE	" B (1.34 μ Mol) 83%
" b (0.32 μ Mol)	(2. 4. 1. 2.)	" b (0.05 μ Mol) 16%

Das Material der f-Säuren A resp. B war im UV/VIS-Spektrum nicht von der unter 2. 4. 1. beschriebenen f-Säure zu unterscheiden.

Das Material der "f-Säuren a resp. b" ist aus dem komplexen Gemisch der bei der LLC-Trennung von "f-Propionaldoester" angefallenen Fraktionen a resp. b (vgl. Abb. 59) erhalten worden und wurde nicht mehr weiter untersucht. Die UV-Spektren dieser beiden Fraktionen sind gegenüber den Spektren der f-Säure A resp. B um ca 2 nm schwach hypsochrom verschoben und sind ebenfalls corrinoid.

Einzelveresterung der obigen f-Säure A resp. B und LLC-Identifikation via Cobester (28).

0.205 μ Mol f-Säure-A (resp. f-Säure B) der obigen Einzelaminolysen löste man in je 1 ml Methylenchlorid, versetzte die beiden violetten Lösungen mit je 0.2 ml einer 0.25n-ätherischen Diazomethanlösung *69 und liess während 10 Min. bei RT stehen. Danach entfernte man die Lösungsmittel am RV, nahm die Rückstände in je 5 ml Benzol auf und engte erneut am RV vollständig ein. Nach üblicher chromatographischer Aufarbeitung (vgl. 2. 4. 1. 5.) bestimmte man die folgenden spektroskopischen Ausbeuten (bez. Edukt).

Die Ausbeuten des vorliegenden Ansatzes liegen ca 4-34% tiefer als ein analog in Methanol ausgeführter Veresterungsansatz (vgl. 2. 4. 1. 5.).

Cobester A	: 0.138 μ Mol	(ϵ CH ₂ Cl ₂ /584=12000)	67 %
f-Säure	: 0.05 μ Mol	(" ")	24 % (unumgesetzt)
Cobester B	: 0.071 μ Mol	(" ")	37 %
f-Säure	: 0.11 μ Mol	(" ")	55 % (unumgesetzt)

Die beiden Cobester A und B wurden mittels LLC mit authentischem Cobester identifiziert.

LLC-Identifikation.

Die Identifikation beruht auf dem Vergleich der theoretischen Bodenzahlen und der Retentionszeiten der einzeln injizierten Cobester A resp. B und auth. Cobester mit den entsprechenden Werten der 1:1 Gemische von Cobester A und auth. Cobester resp. Cobester B und auth. Cobester, sowie den Werten von auth. Cobester allein.

Die LLC-Chromatogramme zeigten stets einheitliche, scharfe Peaks mit vergleichbaren Retentionszeiten und theoretischen Bodenzahlen (Tabelle 22). Die erhaltenen Cobester A und B sind innerhalb des experimentellen Fehlers (geschätzt ca 10 %) identisch mit authentischem Cobester *129. Im weiteren weisen sie voneinander nicht unterscheidbare UV/VIS-Spektren auf.

Tabelle 22.

Bedingungen: (S I, Kol A, 90 ml/h)

Zuordnungskriterium: Mischchromatogramme

	R_t	N_{th}	
1 auth. Cobester	3.75 Min.	1740	einheitlicher
2 Cobester A	3.7 Min.	1690	LLC-Peak
3 Cobester B	3.8 Min.	1780	"
1+2 (1:1)	3.7 Min.	1690	"
1+3 (1:1)	3.8 Min.	1780	"

2. 4. 2. 2. Charakterisierung von "f-Propionaldoester" (26a).

LLC-Trennung von "f-Propionaldoester" mittels einer besseren Säule in drei Fraktionen.

Zur Herstellung des "f-Propionaldoesters" wurde nach den in 2. 4. 1. 1-2. 4. 1. 2. beschriebenen Vorschriften verfahren. Ausgehend von 26. 67 μ Mol (30 mg gewogen) kristallinem f-Amid (24) erhielt man 18. 75 μ Mol "f-Propionaldoester" aus dem Hauptansatz und 1. 92 μ Mol "f-Propionaldoester" durch Nachhydrolyse und Aminolyse aus zurückgewonnenem f-Nitronester (25). Die vereinigte Menge "f-Propionaldoester" (20. 67 μ Mol, 77. 5% bez. eingesetztem f-Amid) wurden der schnellen LLC-Chromatographie unterworfen. Dabei erzielte man mittels einer besseren Kolonne (Kol A statt Kol B) eine Auftrennung des "f-Propionaldoesters" in drei einheitliche LLC-Fraktionen (vgl. Abb. 60). Zum Vergleich ist Abb. 59 nochmals reproduziert.

<u>Bedingungen:</u>	alte Trennung (Abb. 59) (S I, Kol B, 90 ml/h)	neue Trennung (S I, Kol A, 90 ml/h)
---------------------	--	--

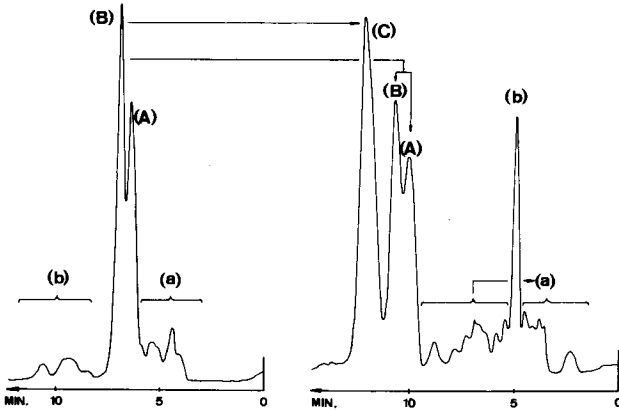


Abb. 59

Abb. 60

Nach Einengen der Lösungsmittel am RV ermittelte man folgende spektroskopischen Ausbeuten bezogen auf eingesetztes f-Amid. Alle Substanzen gemessen mit $\epsilon = 12000$ in CH_2Cl_2 bez. der α -Bande (592 nm).

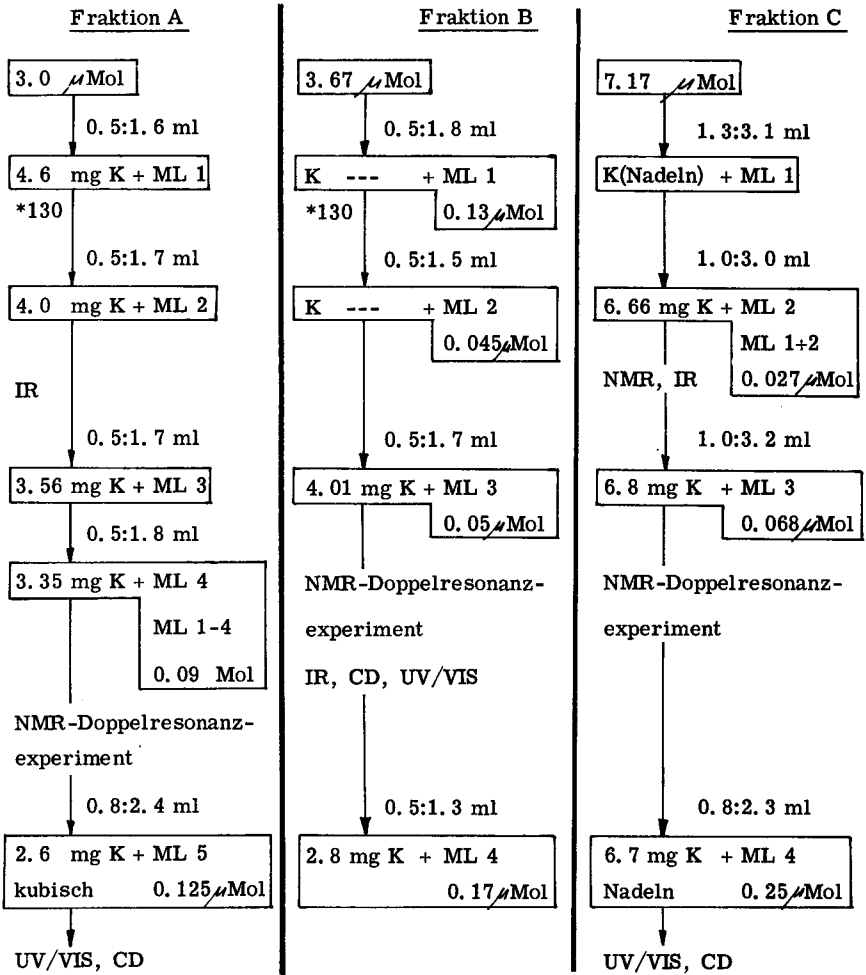
- | | | | |
|-------------------|-----------------|--------|--|
| Vorfraktionen a : | 4. 29 μ Mol | 16. 1% | komplexes nicht weiter untersuchtes Gemisch. UV zeigt corrinoiden Charakter. |
| Vorfraktion b : | 1. 75 μ Mol | 6. 6% | Nitronester, $R_t = 4. 9$ Min. |
| Hauptfraktion A : | 3. 0 μ Mol | 11. 3% | sogen. "f-Propionaldoester A", $R_t = 10. 0$ Min. |
| Hauptfraktion B : | 3. 67 μ Mol | 13. 8% | sogen. "f-Propionaldoester B", $R_t = 10. 8$ Min. |
| Hauptfraktion C : | 7. 17 μ Mol | 26. 9% | sogen. "f-Propionaldoester C", $R_t = 12. 2$ Min. |

Die Vorfraktion b entspricht f-Nitronester, wie durch Vergleich der Retentionszeiten einer Probe zurückgewonnenen Nitronesters (TLC-Zone 2, vgl. 2. 4. 1. 1.) gezeigt werden konnte. Die TLC-Trennung des rohen "f-Propionaldoesters" vor LLC ist oft ungenügend, sodass geringe Anteile von f-Nitronester in der "f-Propionaldoesterzone" (TLC-Zone 1) miteluiert werden. Diese Nebenkomponente kann jedoch mittels LLC vollständig abgetrennt werden.

Das IR-Spektrum dieser Vorfraktion b (Nitronester) ist nicht unterscheidbar vom entsprechenden Spektrum des in 2. 4. 1. 1. zurückgewonnenen f-Nitronesters. Die 3 "LLC-einheitlichen" Fraktionen A, B, C wurden kurz am HV bei RT getrocknet, danach zur Entfernung polymerer Rückstände (vgl. 2. 1.) der Hexan- und Methanolwaschung unterworfen, erneut am HV bei RT getrocknet und wie folgt aus Methylacetat/Hexan (Schema 4) kristallisiert. Zur Aufnahme der Charakterisierungsspektren bediente man sich der in Schema 4 angegebenen Kristallqualitäten von "f-Propionaldoester" A, B und C. Die Kristalle wurden zuvor während 3 Tagen bei RT am HV getrocknet.

Schema 4. *128

"f-Propionaldoester"



Spektroskopische Charakterisierung der "f-Propionaldoesterfraktionen" A, B und C.

Einleitung: Anfänglich erwartete man, dass der "f-Propionaldoester" sich im LLC einheitlich verhalte. Nach den Voruntersuchungen (2. 4. 2. 1.) stellte sich heraus, dass entgegen den Erwartungen die LLC-Chromatographie die "f-Propionaldoesterzone" in 2 Hauptfraktionen (ca 1:1) auftrennte. Man vermutete deshalb, dass die 2 diastereomeren "f - Propionaldoester" (26a) getrennt wurden. Die weitere Untersuchung (2. 4. 2. 2.) ergab jedoch, dass sich der "f-Propionaldoester" nicht nur in 2, sondern sogar in 3 einheitliche LLC-Fraktionen zerlegen liess (Verhältnis ca 1:1:2). Im Falle des Vorliegens eines f-Propionaldehyds (1 asymmetr. C-Atom in der f-Seitenkette) sind mit dem opt. aktiven Corrinrest zusammen aber nur 2 (event. trennbare) Diastereomere zu erwarten, was in Widerspruch zu den isolierten 3 Fraktionen stand. Läge die Aldehydfunktion aber, bedingt durch die Aufarbeitung mit Cyanidionen (vgl. Vorbemerkung zu 2. 4.) als Cyanhydrin vor, so erwartete man durch das zusätzlich in der f-Seitenkette generierte asymmetrische C-Atom unter Berücksichtigung des opt. aktiven Corrinrestes 4 diastereomere Cyanhydrine.

Hätte das Hydrat des Aldehydes vorgelegen (wiederum nur 1 asymmetr. C-Atom in der f-Seitenkette), so wären wie im Falle des Vorliegens des isolierten Aldehyds nur 2 diastereomere Hydrate zu erwarten gewesen. Das Vorliegen eines Aldehydhydrates wie auch eines Aldehyds konnte deshalb ausgeschlossen werden.

Die erhaltenen spektroskopischen Daten der 3 LLC-einheitlichen "f-Propionaldoester" wurden deshalb sehr eingehend auf Anzeichen für das Vorliegen von Cyanhydrinen untersucht (vgl. Diskussion hinten).

Die CD-Spektren der 3 Fraktionen erwiesen sich als kongruent. Die IR- und UV/VIS-Spektren sind voneinander nicht zu unterscheiden. Einzig in den NMR-Spektren sind geringe Unterschiede im Bereiche von ca 4. 0-5. 4 ppm erkennbar.

Zur Abklärung der Ursachen für diese Unterschiede wurden ¹H-NMR-Entkopplungsexperimente und H-D-Austauschexperimente sowohl mit den "f-Propionaldoestern A, B und C", als auch mit Modellcyanhydrinen (iiii) (vgl. Uebersicht in der Vorbemerkung zu 2. 4.) ausgeführt. Die Resultate dieser Studien (am Schluss der Charakterisierung aufgeführt) zeigten, dass die 3 LLC-einheitlichen "f-Propionaldoesterfraktionen A, B und C" nicht als isolierte Aldehyde, sondern als Cyanhydrine vorgelegen haben müssen. Dabei erwiesen sich die beiden Fraktionen A und B als im NMR einheitlich. Die Fraktion C (ca doppelt so viel Material wie die Fraktionen A resp. B) war auf Grund der Entkopplungsexperimente möglicherweise ein 1:1Gemisch zweier Cyanhydrindiastereomere.

Spektroskopische Charakterisierung

Molekulargewicht: Hydrat des Aldoesters : $C_{56}H_{77}N_6O_{16}Co$: 1149

Cyanhydrine " : $C_{57}H_{76}N_7O_{15}Co$: 1158

"f-Propionaldoester A" (kristallin)

<u>UV</u>	0. 512 mg in 20 ml CH_2Cl_2 , ϵ berechnet mit MG = 1158 (Cyanhydrin).
Cary-14	590/11500 max, 567/7870 min, 550/9050 max, 517/5400 sh, 448/1950 min, 423/3120 max, 413/2760 min, 372/31600 max,
Abb. 61	355/14700 sh, 336/5600 min, 315/10200 max breit, 291/6500 min, 279/13100 max. nm.

* 130 vereinigt mit ca 0. 6 mg Kristallen aus einem Kristallisationsvorversuch.

Das vorliegende Spektrum ist nicht unterscheidbar von den entsprechenden Spektren der beiden anderen "f-Propionaldoestern A und B".

IR CHCl_3
Abb. 62³

Banden u. a. bei: 3430w breit (OH assoziiert), 2120w (Co-CN), 1730s (COOCH_3), 1600w, 1580s, 1550w, 1500s (Chromophor) cm^{-1} kein Aldehyd-Carbonyl sichtbar.

Das vorliegende Spektrum ist nicht unterscheidbar von beiden entsprechenden Spektren der "f-Propionaldoester A und B".

CD

$c = 3.91 \times 10^{-5} \text{ Mol/l}$ (ϵ Methanol/585 = 12000).

Abb. 63

580/-4.5, 540/-3.0, 458/0.0, 425/+12.3, 417/+11.7, 395/+21.6, 374/0.0, 366/-11.1, 360/-7.8, 348/-13.2, 319/-4.8, 308/-11.4, 280/0.0, 252/-14.1.

Die CD-Spektren der beiden anderen Fraktionen sind mit dem vorliegenden Spektrum kongruent: cf Abb. 66 und 69.

"f-Propionaldoester B" (kristallin)

UV

0.322 mg in 10 ml CH_2Cl_2 , ϵ berechnet mit MG = 1158 (Cyanhydrin).

Cary-14

591/11850 max, 567/8000 min, 551/9250 max, 518/5400 sh, 446/1730 min, 423/2700 max, 413/2520 min, 372/31750 max, 355/14700 sh, 336/5330 min, 315/9900 max breit, 291/5960 min, 279/12600 max. nm.

Abb. 64

Das vorliegende Spektrum ist nicht unterscheidbar von beiden entsprechenden Spektren der "f-Propionaldoester A und C".

IR CHCl_3

Banden u. a. bei: 3420w breit (OH assoziiert), 2120w (Co-CN), 1730s (COOCH_3), 1610w, 1580s, 1550w, 1500s (Chromophor). kein Aldehyd-Carbonyl sichtbar.

Abb. 65

Das vorliegende Spektrum ist nicht unterscheidbar von beiden entsprechenden Spektren der "f-Propionaldoester A und C".

CD

$c = 3.91 \times 10^{-5} \text{ Mol/l}$ (ϵ Methanol/585 = 12000)

Abb. 66

vgl. die Werte für "f-Propionaldoester A"; die CD-Spektren der 3 LLC-einheitlichen Fraktionen sind kongruent.

"f-Propionaldoester C" (binäres Diastereomerengemisch, kristallin)

UV

0.547 mg in 20 ml CH_2Cl_2 , ϵ berechnet mit MG = 1158 (Cyanhydrin).

Cary-14

590/11500 max, 567/7700 min, 550/9050 max, 518/5300 sh, 446/1820 min, 422/2960 max, 413/2540 min, 372/30900 max, 355/14300 sh, 336/5250 min, 315/9650 max breit, 291/5800 min, 279/12300 max. nm.

Abb. 67

Das vorliegende Spektrum ist nicht unterscheidbar von beiden entsprechenden Spektren der "f-Propionaldoester A und B".

IR CHCl_3
Abb. 68³

Banden u. a. bei: 3430w breit (OH assoziiert), 2120w (Co-CN), 1730s (COOCH_3), 1610w, 1580s, 1550w, 1500s (Chromophor). kein Aldehyd-Carbonyl sichtbar.

Das vorliegende Spektrum ist nicht unterscheidbar von beiden

entsprechenden Spektren der "f-Propionaldoester A und B".

CD
Abb. 69

$c = 3.91 \times 10^{-5}$ Mol/l (ϵ Methanol/585 = 12000)
vgl. die Werte für "f-Propionaldoester A"; die CD-Spektren
der 3 LLC-einheitlichen Fraktionen sind kongruent.

UV-Spektren

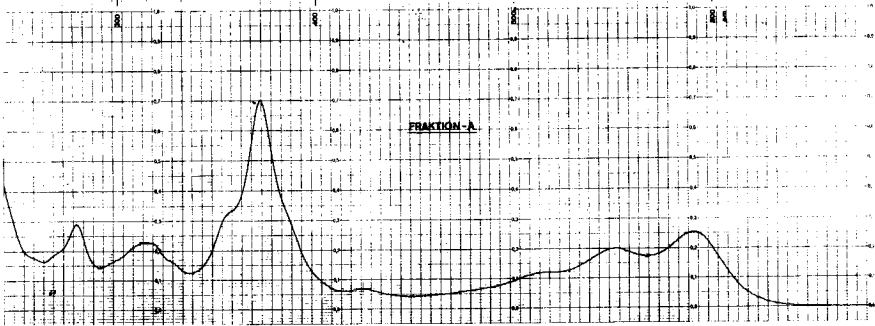


Abb. 61

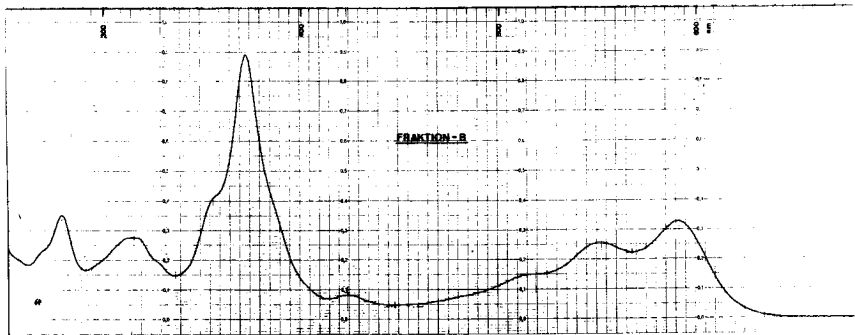


Abb. 64

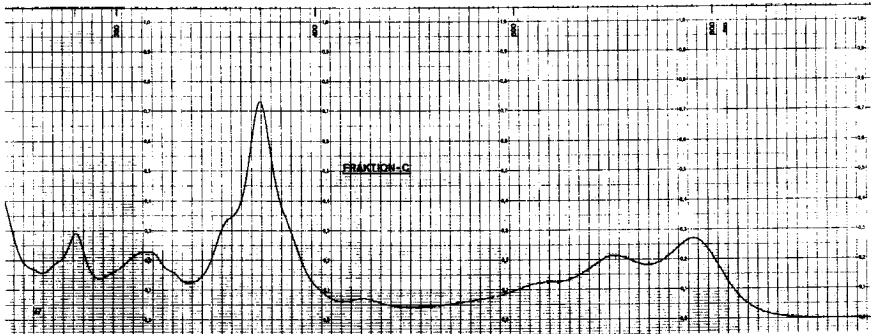


Abb. 67

IR-Spektren

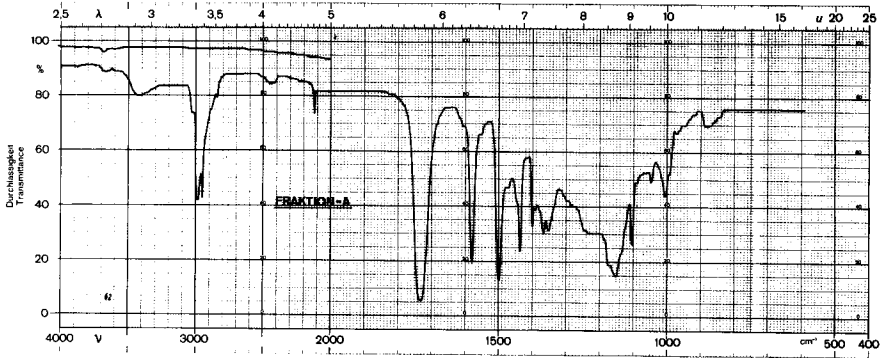


Abb. 62

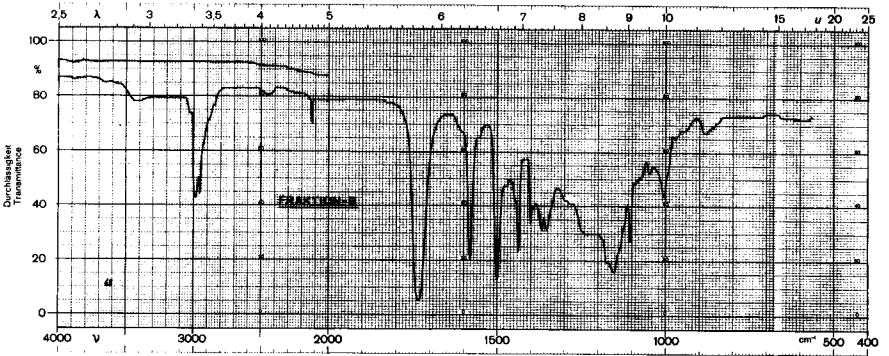


Abb. 65

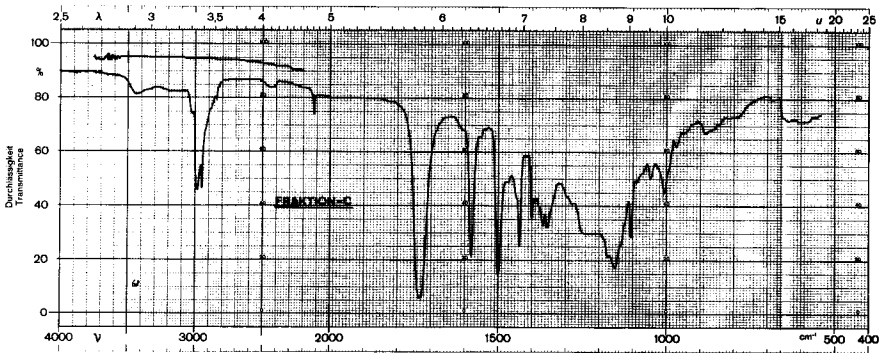


Abb. 68

CD-Spektren

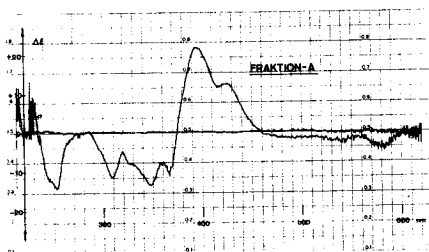


Abb. 63

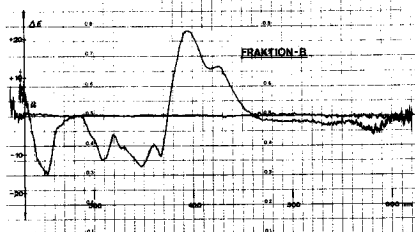


Abb. 66

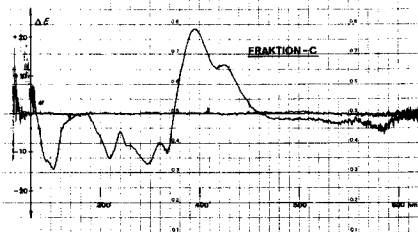


Abb. 69

NMR-Spektren

Die NMR-Spektren dieser 3 "f-Propionaldoester-Proben" wurden zuerst normal in CDCl_3 auf dem Gerät XL-100 aufgenommen. Anschliessend entkoppelte man in den Bereichen von 5.0-5.2 ppm, 4.4-4.5 ppm und 1.35-1.40 ppm.

Auswertung der Integrale (ausser bei der Fraktion C)

Die experimentell gemessenen Integrale wurden auf die theoretisch zu erwartenden Protonen im Bereiche 4.0-1.0 ppm geeicht. Die auf Grund dieser Eichung zu erwartenden Protonenzahlen sind in Kolonne B aufgeführt. In der Kolonne A sind die zu erwartenden Protonenzahlen nach Eichung des experimentellen Integrals im Bereiche von 4.0-3.3 (Methylestergruppen- und Allylprotonenregion) mit der theoretischen Protonenzahl (22) aufgeführt.

Die Integrale oberhalb 4.0 ppm wurden separat ausgewertet und sind zusammen mit den Positionen angegeben. Diese Integrale wurden bezüglich des H-C-10 Protons (theoretisch gleich 1 H) geeicht.

H-D-Austausch

Dazu wurden die 3 Proben nach durchgeführten Doppelresonanzexperimenten mit je 5 μ l Perdeuteromethanol (CD_3OD , Merck AG) versetzt (ca 5% bez. Totalvolumen der NMR-Lösung). Die Lösungen liess man nach kurzem Schütteln ca 10 Min. bei Rt stehen und registrierte hierauf die Spektren.

Am Schluss wurden die Resultate der Entkopplungs- und H-D-Austauschexperimente zusammengefasst und mit den von K. R. Lindner [23] erhaltenen Daten der Modellcyanhydrine (vgl. Vorbemerkung zu 2. 4.) verglichen.

"f-Propionaldoester A". (Zuordnung der Protonen im Cyanhydrin teil vgl. Doppelresonanz- und HD-Austauschexperimente unten).

NMR ca 3 mg / 80 μ l CDCl_3 in Mikrozelle, XL-100.

normale Aufnahme, nicht entkoppelt: Abb. 70 A.

Bereich (ppm)	Interpretation	Integral				
		theoretisch	experimentell A	experimentell B		
5.7-4.2	H-C-10 : 5.6 (s, 1H) COO-CH-(CH ₃)-CH (OH) (CN): 5.2 (m, 2H), 1 H tauschbar mit CD ₃ OD. COO-CH (CH ₃)-CH (OH) (CN): 4.4 (m, 1H).	1 2 1	} 4.0	} 3.7		
4.2-3.3	Estergruppen- und Allylprotonen: 4 COOCH ₃ -s bei: 3.78, 3.72, 3.70, 3.66.	22			22	20
3.3-1.9	C-5-CH ₃ /C-15-CH ₃ (je 1 CH ₃ -s bei: 2.27 und 2.20, Zuordnung unbekannt) und übrige Ring- und Seitenkettenprotonen.				30	28
1.9-1.1	1.82 (Wasser, tauschbar mit CD ₃ OD) Methylgruppensignale: 6-CH ₃ -s bei: 1.59, 1.53, 1.38 (breites m mit Spitzen bei: 1.41/1.39/1.37/1.35; enthält CH ₃ -gruppe des Cyanhydrin teils) 1.30, 1.22.	21	22	21		

Doppelresonanzexperiment Abb. 70 B.

Position des Störfeldes	beobachtetes Signal	Resultat der Beobachtung
5.20 ppm	4.40 (m)	→ 4.37 (singlettoid)
	1.38 (CH ₃ -m)	→ 1.36 (s, deutlich schärferes Signal, m ausgewischt)
4.41 ppm	5.20 (m)	→ ? (Signal durch Seitenbande des Störfeldes verdeckt.)
	1.38 (CH ₃ -m)	→ 1.38, (keine Veränderung)
1.39 ppm	5.20 (m)	→ 5.04 (d, J = 6 Hz)
	4.40 (m)	→ 4.43 (d, J = 6 Hz)

H-D-Austausch (+5 μ l CD₃OD) Abb. 70C. (Lokalisation des Cyanhydrin-OH)

5.20 (m, 2H) → 5.06 (m, 1H) (bez. H-C-10 = 1H)
4.40 (m, 1H) → 4.37 (d, J = 6 Hz/1H)

Cyanhydrin-OH liegt bei 5.20 ppm. CD₃OH nicht sichtbar.

"f-Propionaldoester B". (Zuordnung der Protonen im Cyanhydrin-Teil vgl. Doppelresonanz- und H-D-Austauschexperimente unten)

NMR ca 4 mg / 80 μ l CDCl₃ in Mikrozelle, XL - 100.
normale Aufnahme, nicht entkoppelt: Abb. 71 A.

Bereich (ppm)	Interpretation	Integral		
		theoretisch	experimentell	
			A	B
5.7-4.2	H-C-10 5.59 (s, 1H)	1	} 6.1	} 5.2
	COO-CH-(CH ₃)-CH(OH)(CN):5.09 (m, 2H) 1 H tauschbar mit CD ₃ OD.	2		
	COO-CH-(CH ₃)-CH(OH)(CN):4.49 (m, 1H)	1		
4.2-3.3	Estergruppen- und Allylprotonen: 4 COOCH ₃ -s bei: 3.76, 3.72, 3.68, 3.65.	22	22	19
3.3-1.8	1.88 (H ₂ O, tauschbar mit CD ₃ OD) C-5-CH ₃ /C-15-CH ₃ (je 1 CH ₃ -s bei 2.25 und 2.18 ppm, Zuordnung unbekannt) und übrige Ring- und Seitenkettenprotonen.	29	31	27
1.8-1.1	Methylgruppensignale, 5-CH ₃ -s bei: 1.57, 1.52, 1.37 (breites s, enthält CH ₃ -Gruppe des Cyanhydrin-Teils) 1.29, 1.21.	21	24	21

Doppelresonanzexperiment Abb. 71 B.

Position des Störfeldes	beobachtetes Signal	Resultat der Beobachtung
5.09 ppm	4.49 (m)	→ 4.46 (singlettoid)
	1.37 (CH ₃ -m)	→ 1.36 (s, deutlich intensiver und schlanker)
4.49 ppm	5.09 (m)	→ 5.10 (q ?, J = 6 Hz)
	1.37 (CH ₃ -m)	→ 1.36 (m, keine signifikante Änderung, Blindprobe durch Einstrahlung bei 5.7 ppm ergibt gleiches Bild).
1.36 ppm	5.09 (m)	→ 5.08 (d, J = 4 Hz)
	4.49 (m)	→ 4.48 (m, breit J nicht bestimmbar)

H-D-Austausch (+ 5 μ l CD₃OD) Abb. 71 C. (Lokalisation des Cyanhydrin-OH)

5.09 (m, 2H)	→ 5.07 (m, 1H) (bez. H-C-10 = 1H)
4.49 (m, 1H)	→ 4.51 (d, J = 4 Hz, ca 1H)

Cyanhydrin-OH liegt bei 5.09 ppm. CD₃OH vermutlich bei 4.42 ppm (breit).

"f-Propionaldoester C" (Zuordnung der Protonen im Cyanhydrin-Teil vgl. Doppelresonanz- und H-D-Austauschexperimente unten).

NMR ca 5 mg / 80 μ l $CDCl_3$ in Mikrozelle, XL - 100
normale Aufnahme, nicht entkoppelt: Abb. 72 A.

Bereich (ppm)	Interpretation	Integrale	
		theoretisch	experimentell A B
5.7-4.2	H-C-10 5.59 (s, 1H)	1	
	COO-CH(CH ₃)-CH(OH)(CN):5.15 (m, 2.3H) 1 H tauschbar mit CD ₃ OD.	2	
	COO-CH(CH ₃)-CH(OH)(CN):4.41 (m, 1.4H)	1	Integrale nicht gemessen unterhalb 4.00 ppm.
4.2-3.3	Estergruppen- und Allylprotonen: 4 COOCH ₃ -s bei: 3.76, 3.71, 3.68, 3.62.	22	
3.3-1.8	C-5-CH ₃ /C-15-CH ₃ (je 1 CH ₃ -s bei: 2.27 und 2.20 ppm, Zuordnung unbekannt) und übrige Ring- und Seitenkettenprotonen.	29	
1.8-1.1	Methylgruppensignale, 5 CH ₃ -s bei: 1.57, 1.49, 1.37 (breites s, enthält CH ₃ -Gruppe des Cyanhydrin-Teils) 1.30, 1.21.	21	

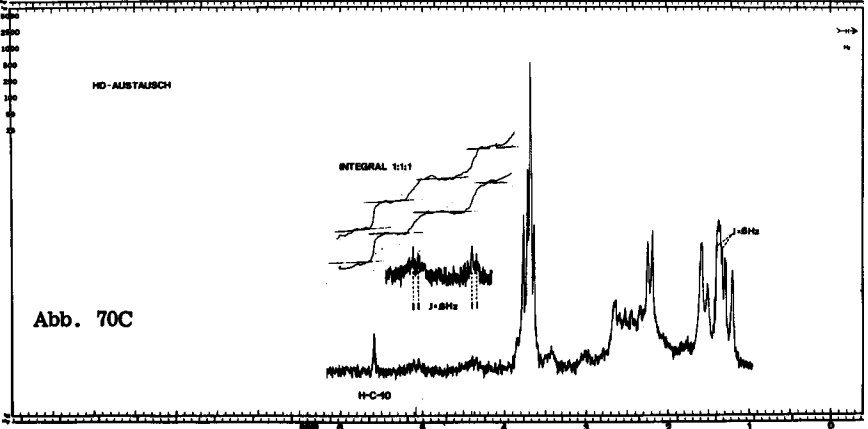
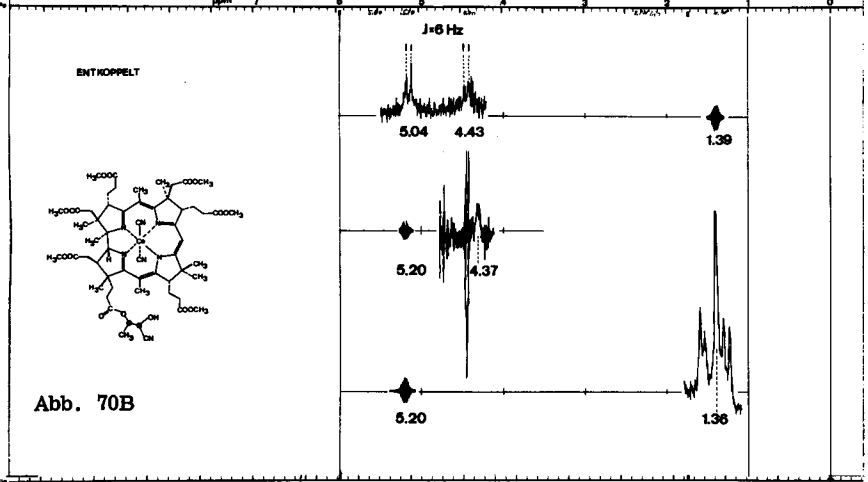
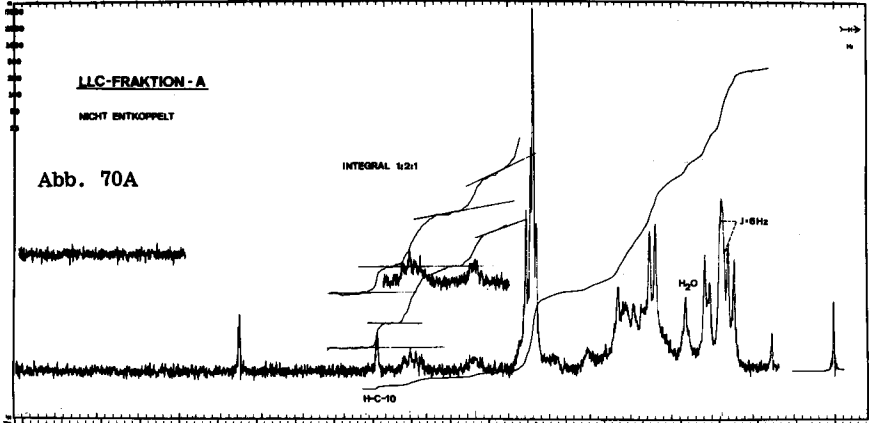
Doppelresonanzexperiment Abb. 72 B.

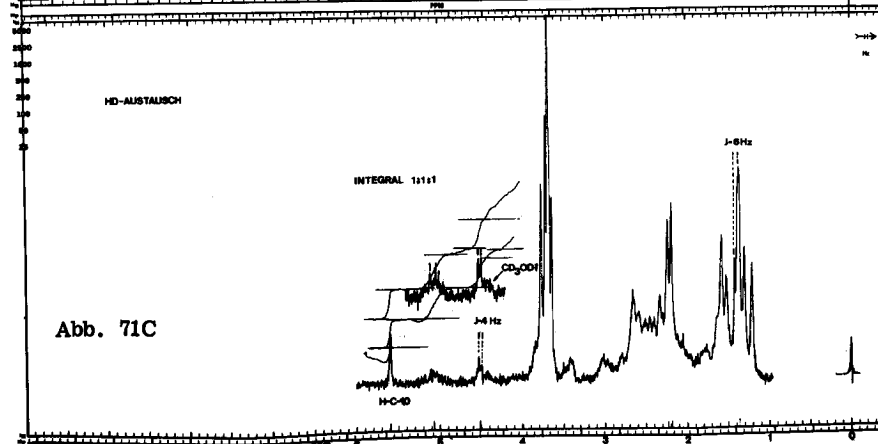
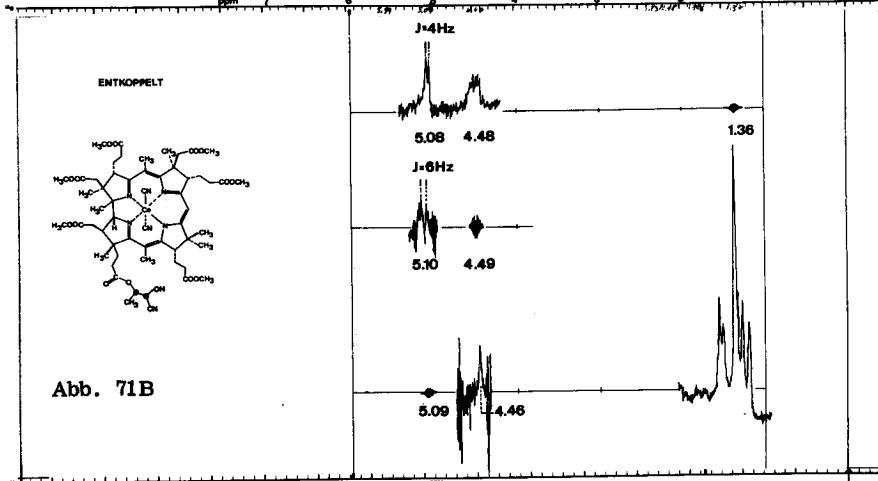
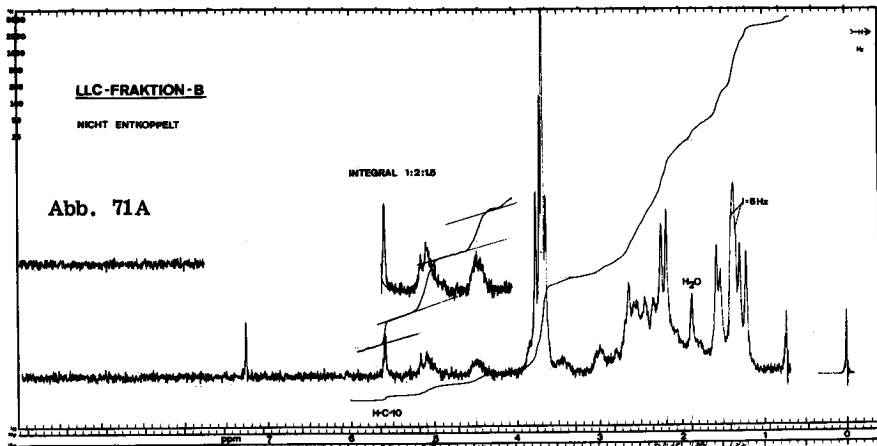
Position des Störfeldes	beobachtetes Signal	Resultat der Beobachtung
5.05 ppm	4.41 (m)	→ 4.40 (singlettoid)
4.40 ppm	1.37 (CH ₃ -m)	→ 1.36 (nur geringe Intensitätszunahme des Signals).
	5.15 (m)	→ ? (Signal durch Seitenbande des Störfeldes verdeckt).
1.36 ppm	1.37 (CH ₃ -m)	→ 1.36, (keine Veränderung)
	5.15 (m)	→ 5.04 (d, J = 4 Hz) die beiden Signale sind überlagert.

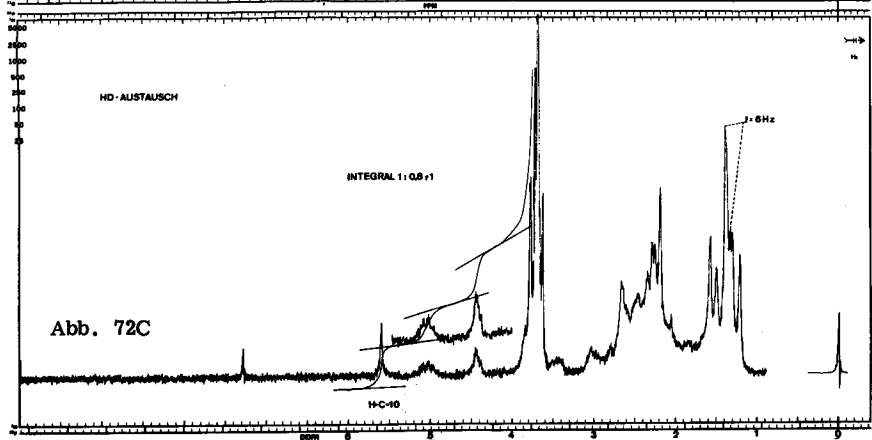
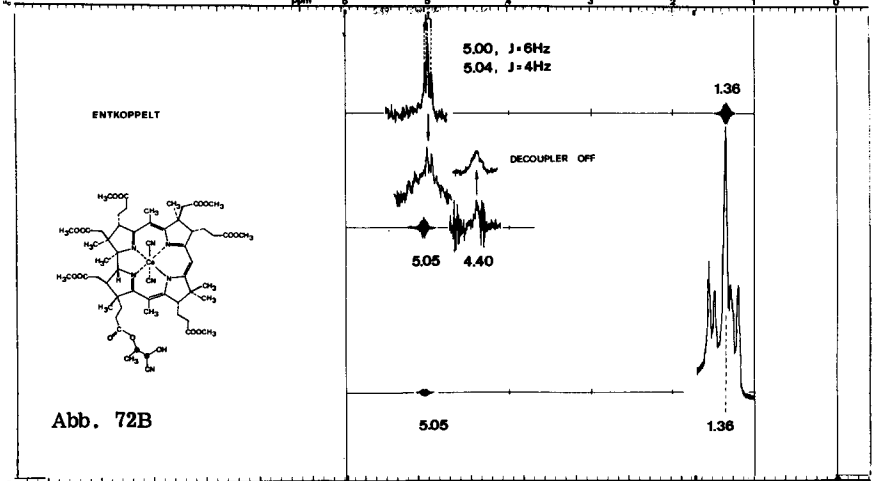
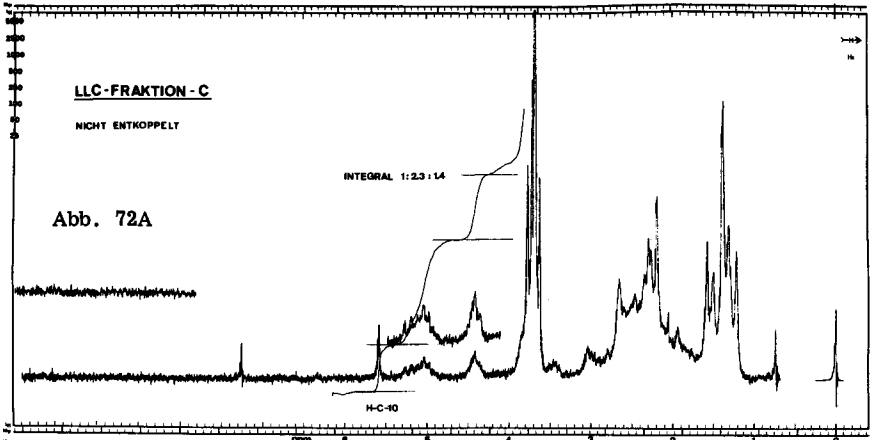
H-D-Austausch (+5 μ l CD₃OD Abb. 72 C. (Lokalisierung des Cyanhydrin-OH))

5.15 (m, 2.3 H) → 5.04 (m, 0.8 H) (bez. H-C-10 = 1 H)
4.41 (m, 1.4 H) → 4.35 (m, 1.0 H)

Cyanhydrin-OH liegt bei 5.15 ppm. CD₃OH nicht sichtbar.

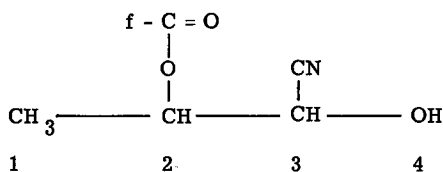






Zusammenfassung

Resultate der "f-Propionaldoester"



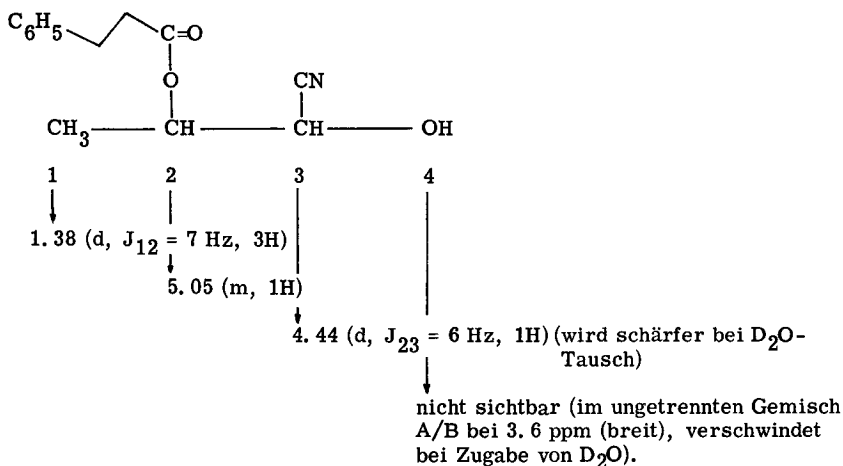
A	1.38	5.20	4.40	5.20 :	$J_{2,3} = 6 \text{ Hz}$
B	1.37	5.09	4.49	5.09 :	$J_{2,3} = 4 \text{ Hz}, J_{1,2} = 6 \text{ Hz}$
C	1.37	5.15	4.41	5.15 :	Gemisch zweier Cyanhydrine mit $J_{2,3} = 4 \text{ Hz}$ und $J_{2,3} = 6 \text{ Hz}$. Erkennbar durch 2 überlagerte Dublette.

Resultate der Untersuchungen an den Modellcyanhydrinen.

(Die Versuche wurden von K. R. Lindner [23] ausgeführt)

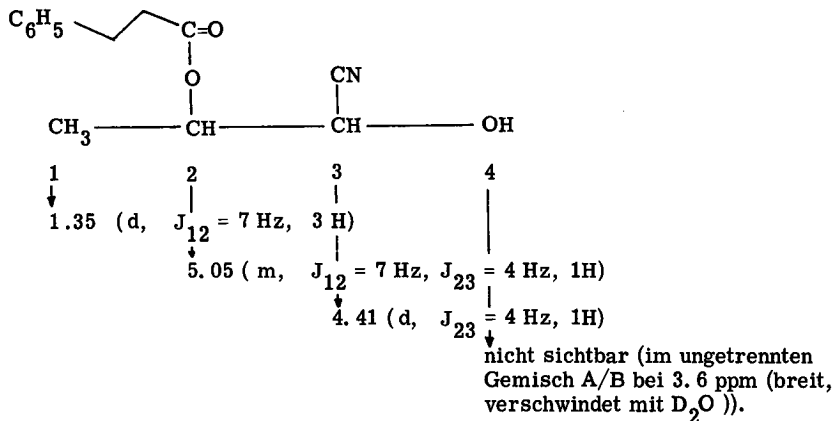
1. NMR-Spektren der getrennten diastereomeren Enantiomerengemische A und B.

Enantiomerengemisch A



Mit dem Enantiomerengemisch A wurden keine Entkopplungsexperimente ausgeführt.

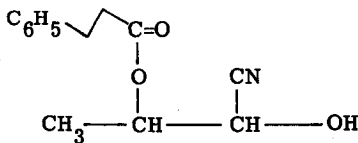
Enantiomergemisch B



Doppelresonanzexperiment an B

Position des Störfeldes	beobachtetes Signal	Resultat der Beobachtung
5.05 ppm	4.41 (d, 1H)	4.41 (s, 1H)
	1.35 (d, 3H)	1.35 (s, 3H)
4.41	5.05 (m, 1H)	5.05 (q, $J = 7$ Hz, 1H)
	1.35 (d, 3H)	nicht verändert
1,35	4.41 (d, 1H)	4.41 (d, $J = 4$ Hz, 1H)
	5.05 (m, 1H)	5.05 (d, $J = 4$ Hz, 1H)

Zusammenfassung



Enantiomergemisch

A	1.38 (d)	5.05 (m)	4.44 (d) :	$J_{1,2} = 7$ Hz, $J_{2,3} = 6$ Hz $J_{1,2} = 7$ Hz, $J_{2,3} = 4$ Hz (OH - Signal infolge raschen Austauschs nicht beobachtbar)
B	1.35 (d)	5.05 (m)	4.41 (d) :	

2. Reaktivität der Modellcyanhydrine und Modellaldoester gegenüber den Aminolysebedingungen.

Sowohl der Modellaldoester als auch die Modellcyanhydrine (vgl. Vorbemerkung zu 2. 4.) lassen sich unter den in 2. 4. 1. 2. beschriebenen Aminolysebedingungen (Versuche ausgeführt von K. R. Lindner [23]) in die 3-Phenyl-Propionsäure überführen. Die Modellaldoester ergaben Ausbeuten von ca 94 %, die Modellcyanhydrine ca 87 % (bez. Edukt) an reiner 3-Phenylpropionsäure.

Diskussion der spektralen Daten.

IR

Die IR-Spektren der 3 "f-Propionaldoesterfraktionen A, B und C" geben keine Auskunft über die funktionellen Verhältnisse in der f-Seitenkette. Es sind weder die Absorptionsbanden für das Aldehydproton noch Anzeichen für die Aldehydcarbonylschwingung vorhanden. Es ist auch keine Nitrilabsorption für die postulierten Cyanhydrine sichtbar. Oberhalb 3000 cm^{-1} liegt eine breite, schwache Bande, welche vermutlich auf assoziiertes OH des Cyanhydrins zurückzuführen ist. Die 3 IR-Spektren sind voneinander nicht zu unterscheiden.

CD

Die CD-Spektren der 3 "f-Propionaldoester" A, B und C stimmen mit dem CD-Spektrum des f-Amids (24) überein.

Die Kongruenz der CD-Spektren der vorliegenden 3 Fraktionen ist ein Hinweis dafür, dass bezüglich der 3 labilen Chromophorzentren (C-3, C-8, C-13) gegenüber Epimerisierung, Isomerenreinheit vorliegt. Die CD-Spektren sind nämlich eine äusserst empfindliche Sonde, um Isomerenunterschiede an den 3 labilen Chromophorzentren zu erkennen. Die CD-Spektren ändern sich schon drastisch bei der Aenderung von nur einem der oben erwähnten labilen Zentren (vgl. 2. 3. 3. 4. und W. Fuhrer [13]).

NMR

Die Esterregion der NMR-Spektren, sowie die Region des C-10 Protons zeigt deutlich, dass bezüglich der labilen Chromophorzentren (C-3, C-8, C-13) Isomerenreinheit besteht (scharfe Signale). Die Ursache für das Auftreten von 3 isomeren Fraktionen (eine Fraktion ist vermutlich ein Gemisch) muss deshalb in den Seitenketten selbst gesucht werden (vgl. auch Einleitung zur Charakterisierung).

In den NMR-Spektren der 3 Fraktionen ist kein Aldehydproton sichtbar. Das Aldehydproton würde in Analogie mit dem Modellaldehyd (vgl. Einleitung zu 2. 4.) bei 9. 41 ppm erwartet, demzufolge liegen die Fraktionen A, B und C nicht als freie Aldehyde vor.

Würde ein Aldehydhydrat vorliegen, so sollte das Signal des Hydratprotons ($\text{R-CH}(\text{OH})_2$) um 5. 1 ppm auftreten *131.

Die Integrale der 3 Fraktionen im Bereiche oberhalb 4. 00 ppm ergeben nach H-D-Austausch ca 1 Proton weniger. Im Falle des Vorliegens eines Aldehydhydrates müssten 2 Protonen verschwinden. Demzufolge liegen mit grosser Wahrscheinlichkeit keine Aldehydhydrate vor.

Der Verlust von nur einem Proton nach H-D-Austausch stimmt sehr gut mit dem Vorliegen eines Cyanhydrins überein. Vergleicht man nun die Positionen der gemessenen Signale oberhalb 4. 00 ppm der 3 "f-Propionaldoesterfraktionen A, B und C" mit den Positionen der Signale der Modellcyanhydrine, so stellt man nicht nur eine sehr gute Uebereinstimmung der Positionen der Signale, sondern auch eine ebenso gute Uebereinstimmung der Kopplungskonstanten fest (Ermittlung z. T. durch Doppelresonanzexperimente).

Die Doppelresonanzexperimente zeigen weiter, dass die Fraktionen A und B vermutlich als reine Isomeren vorlagen, währenddem die Fraktion C auf Grund der beiden überlappenden Dublette bei 5. 04 (d, J = 4 Hz) und 5. 00 (d, J = 6 Hz) ppm

nach Entkopplung bei 1.36 ppm als Isomerengemisch im Verhältnis ca 1:1 vorgelegen haben dürfte. Das beobachtete Verhältnis der 3 Fraktionen A, B und C betrug ca 1:1:2 das folgendermassen gedeutet wird: Bei der Bildung der Cyanhydrine entstehen diese im Verhältnis 1:1:1, wobei 2 Diastereomere nicht trennbar sind und die Komponenten der Fraktion C (mit doppelt so viel Material wie die einheitlichen Fraktionen A und B) bilden.

Auf Grund der vorliegenden Resultate vermutet man, dass die isolierten Fraktionen A, B und C (bisher als "f-Propionaldoester-fraktionen A, B und C" bezeichnet) als Cyanhydrindiastereomeren vorgelegen haben.

* 131 Durch K. R. Lindner im folgenden NMR-Experiment bestimmt. Eine ca 7 %-ige Lösung von Acetaldehyd in CDCl_3 versetzte man mit ca 150 μl D_2O und einer Spur Trifluoressigsäure. Eine Aufnahme unmittelbar nach der Probeherstellung zeigte eine sehr schwaches Signal bei ca 5.1 ppm. Man liess deshalb über Nacht (ca 10h) bei RT stehen und registrierte danach ein weiteres Spektrum. Dieses zeigte nun ein Quadruplett bei 5.10 ppm ($J = 5 \text{ Hz}$) für das Aldehydhydratproton ($\text{R}-\text{CH}(\text{OH})_2$). Das Hydrat lag in der obigen Probe zu ca 10 % vor.

Aminolyse der drei LLC-isolierten Cyanhydrinfraktionen A, B und C.

Die Ansätze wurden nach der in 2. 4. 1. 2. wiedergegebenen Vorschrift mit folgenden Aenderungen ausgeführt: Die Konzentration des Dimethylamins in Isopropanol wurde verdoppelt *127 (neu: 10 g Dimethylamin/10 ml Isopropanol). die Reaktionszeit wurde von 1h auf 30 Min. verkürzt. In Tabelle 23 sind die Ausbeuten bez. eingesetztem Aldoester, berechnet für das hypothetische $\epsilon = 12000$ und für die analytisch bestimmten ϵ aufgeführt. Der Vergleich mit den Ausbeutewerten unter 2. 4. 2. 1. zeigt, dass die ursprünglichen Bedingungen (2. 4. 1. 2.) vergleichbare Ausbeuten liefern.

Tabelle 23.

Cyanhydrine (krist.) (=Edukt)	f-Säure (% bez. Edukt)
<u>A</u> 0. 394 μ Mol (ϵ CH ₂ Cl ₂ /590=11400)	0. 300 μ Mol (ϵ CH ₂ Cl ₂ /586=12000) 76. 2% 0. 343 μ Mol (ϵ CH ₃ OH/ 584=10200) 87 %
<u>B</u> 0. 390 μ Mol (" =11800)	0. 292 μ Mol (ϵ CH ₂ Cl ₂ /586=12000) 75 % 0. 333 μ Mol (ϵ CH ₃ OH/ 584=10200) 85. 5%
<u>C</u> 0. 438 μ Mol (" =11400)	0. 363 μ Mol (ϵ CH ₂ Cl ₂ /586=12000) 83 % 0. 421 μ Mol (ϵ CH ₃ OH/ 584=10200) 96 %

Die erhaltenen f-Säuren dieser Einzelaminolysen sind UV-spektroskopisch identisch mit der in 2. 4. 1. beschriebenen f-Säure.

Das Material dieser Ansätze wurde nicht via Veresterung in Cobester (28) überführt und nicht mit auth. Cobester identifiziert.

Die Modellcyanhydrine lassen sich mit 87% (bez. Edukt), die Modellaldoester mit 94% (bez. Edukt) in die entsprechende Säure überführen [23]. Die Resultate für die Modellcyanhydrine stimmen sehr gut mit denjenigen in der oben aufgeführten Tabelle überein.

In Tabelle 23 wurden die Edukte mit dem experimentell bestimmten ϵ der Fraktionen A,B und C (vgl. 2. 4. 2. 2.) bestimmt. Die Produkte berechnete man einerseits mit dem hypothetischen $\epsilon = 12000$ (CH₂Cl₂) und zudem mit dem für krist. f-Säure gemessenen ϵ -Wert (vgl. 2. 4. 1.) in Methanol: 10200.

Die berechneten Ausbeutezahlen divergieren um ca 10% und dürften de facto über 80 % liegen.

2.5. PARTIALSYNTHESE VON AQUO-CYANO-COBYRSÄURE (29) AUS

f-AMD (24) VIA f-SÄURE (27).

Vorbemerkung Die im folgenden Kapitel beschriebenen Experimente wurden von A. B. Holmes ausgeführt (vgl. sein Arbeitsbericht, August 1972). Das unten aufgeführte Schema gibt dabei eine Uebersicht über diese Experimente.

Die vorliegend beschriebenen Reaktionsbedingungen der Aminolyse von f-Säure (27) sind von der Harvard-Gruppe ausgearbeitet und auch in unserem Laboratorium von A. B. Holmes nachvollzogen worden. *132.

Eigenschaften der Cobyrssäure.

Cobyrssäure wurde erstmals im Arbeitskreise von K. Bernhauer [42] als orange-rote Nadeln aus Wasser durch Zugabe von Aceton bei +3° als β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form) kristallisiert. Derart erhaltene Kristalle zeigten auf Grund der Röntgenstrukturanalyse [15] neben der abs. Konfiguration der Cobyrssäure die β -Aquo- α -cyano-Konfiguration (29-a) für die axialen Kobaltliganden (H₂O und CN). Bernhauer erwähnte später die Kristallisation von Cobyrssäure und corrinoiden Polysäuren in Gegenwart von Essigsäure aus wässrigen Lösungen [43]. In der Literatur wird diese β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (29-a) als Cobyrssäure-a oder kurz a-Form bezeichnet.

W. Friedrich erkannte, dass diese einheitliche Cobyrssäure-a in wässriger Lösung schon bei RT, insbesondere aber bei erhöhter Temperatur, zu einem 1:1 Gemisch zweier ligandisomerer Komponenten isomerisierte. Die Komponenten dieses Gemisches konnten im Arbeitskreise von W. Friedrich mittels Säulenchromatographie oder Papierchromatographie aufgetrennt und charakterisiert werden. Die eine, langsamer wandernde Komponente, war identisch mit Cobyrssäure-a, für welche die Konfiguration mittels Röntgenstrukturanalyse feststand. Die andere, schneller wandernde Komponente, welche W. Friedrich Cobyrssäure-b nannte, war UV/VIS und CD-spektroskopisch von den gleichen Spektren der Cobyrssäure-a schwach verschieden. [44]. W. F. schloss daraus, dass die Cobyrssäure-b als α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (Cobyrssäure-b, 29-b) vorlag [45].

kurze Zusammenfassung: Der CN-Ligand liegt in der Cobyrssäure-a auf der Seite der Propionylseitenketten, in der Cobyrssäure-b auf der Seite der Acetylseitenketten.

Wie R. A. Firth [28] später fanden, gelingt eine bessere Trennung der beiden ligandisomeren Cobyrssäuren a und b auf Cellulose-DC-Platten im Laufmittelsystem: sek. Butanol/Wasser 9, 5:4. Die R_f-Werte betragen:

R_f (Cobyrssäure-a) : 0.35 bez. R_fB-12 = 1 (R_fB-12 = 0.25)

R_f (Cobyrssäure-b) : 0.60 " "

Diese Autoren fanden auch, dass eine frisch hergestellte wässrige Lösung von Cobyrssäure-a noch keine im DC feststellbaren Mengen an Cobyrssäure-b enthielt. Weiter konnte R. A. Firth ebenfalls die Identität der Cobyrssäure-a (langsamer wandernde Form) mit kristalliner Cobyrssäure (von Prof. Bernhauer), für welche die β -Aquo- α -cyano-Konfiguration aus der Röntgenanalyse [15] feststand, mittels DC nachweisen.

Der Einfluss der Ligandisomerie der Aquo-cyano-cobyrssäure-Formen a und b kann durch Zugabe von HCN oder KCN zu einer Lösung von Aquo-cyano-cobyrssäure durch Bildung der Dicyano-Form der Cobyrssäure [42] aufgehoben werden. Diese sogenannte a-b Isomerie wurde besonders gut an den Corrinoid-Tetrasäuren (beide Formen kristallin) untersucht [46].

Die Cobyrssäure-b ist in der recherchierten Literatur noch nicht kristallin beschrieben. Die Cobyrssäure ist in der Literatur mittels UV/VIS [44] [42], IR [42] [47] [48], CD [44] [49], ORD [50], Elektrophorese und Papierchromatographie [48] [51] charakterisiert worden. ¹H-NMR sind bis jetzt

keine publiziert worden. Wohl aber liegen ^{13}C -NMR-Spektren der Aquo-cyano- und Dicyano-cobyrssäure vor [52].

Resultate eigener Untersuchungen

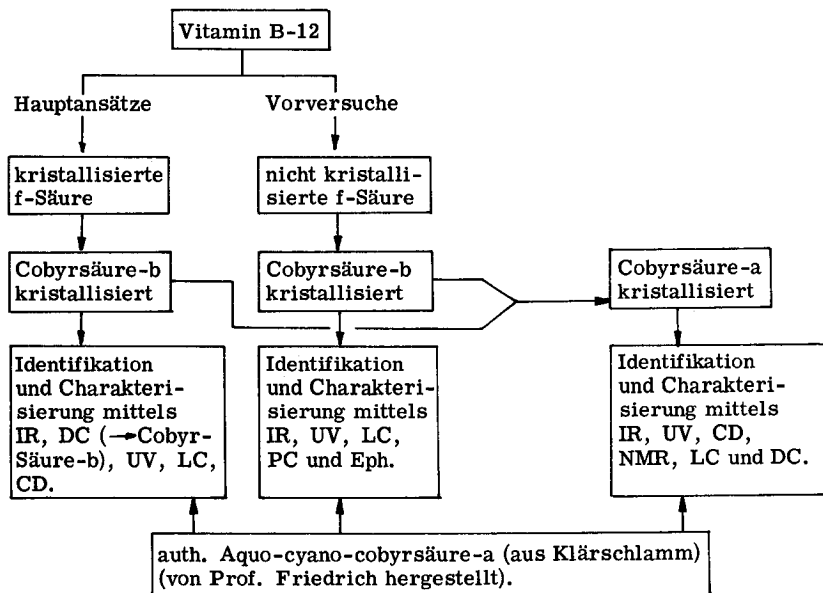
Die Cobyrssäure-a kristallisiert bei Raumtemperatur aus Wasser/Aceton als Cobyrssäure-b (29-b) (A. B. Holmes).

Die Cobyrssäure-a kristallisierte aus 0.1 m Essigsäure/Aceton bei ca 3°C besser als aus Wasser/Aceton (bei gleicher Temp.) und lieferte kristalline Cobyrssäure-a. Der Zusatz von Essigsäure bei der Kristallisation hatte dann allerdings Schwierigkeiten bei der Aufnahme der IR-Spektren zur Folge (vgl. unten und 2. 5. 4. /2. 5. 7.). In Lösung (Wasser, Methanol) bei RT bildet sich aus den reinen Cobyrssäuren-a resp. b innert ca 24h ein Gleichgewichtsgemisch von Cobyrssäure-a und -b im Verhältnis ca 1:1.

NMR-Spektren der beiden Formen können in D_2O aufgenommen werden. Dabei entsteht aber schon nach kurzem Stehenlassen die jeweils andere Cobyrssäure-Form. Durch Zugabe von KCN (Ueberführung in die Dicyano-Form (29-CN)) verschwinden die Signale der beiden Aquo-cyano-cobyrssäuren (29-a resp. 29-b) und man erhält das Spektrum der Dicyano-cobyrssäure-Form (29-CN).

IR-Spektren können in KBr registriert werden. Bei der Trocknung der Kristalle wird aber unkontrollierbar (insbesondere bei Kristallisation aus 0.1 m Essigsäure/Aceton) HCN abgespalten, weshalb es schwierig ist, identische IR-Spektren aus kristallinen Cobyrssäureproben zu Vergleichszwecken zu erhalten.

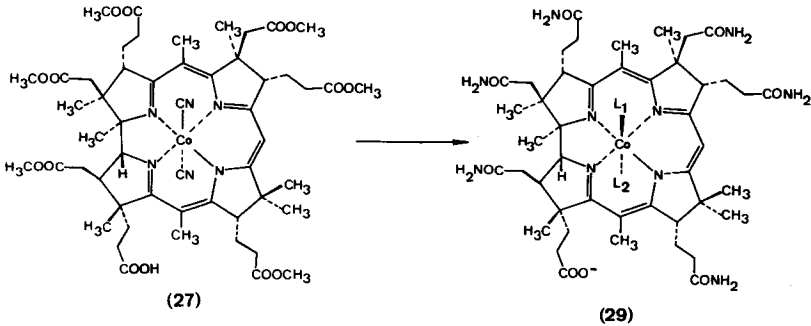
Das nachfolgende Schema gibt einen Ueberblick über das Vorgehen bei den Arbeiten über die Cobyrssäure:



* 132 Wir danken der Harvard-Gruppe (Leitung Prof. R. B. Woodward) für die Mitteilung experimenteller Details.

2. 5. 1. Amonolyse von kristalliner f-Säure (27) zu partial synthetischer Cobyr-säure (29) (Hauptansätze).

Kristallisation und Identifikation als α -Aquo- β -cyano-cobyr-säure (b-Form).



L_1 (β)	L_2 (α)		
H_2O	CN	(29-a) (a-Form) [15]	$C_{46}H_{67}N_{11}O_9Co$: MG = 977
CN	H_2O	(29-b) (b-Form)	" : MG = 977
CN	CN	(29-CN) (Dicyano-Form)	$C_{47}H_{66}N_{12}O_8Co$: MG = 985

Zur Mengenbestimmung wurden 5.3 mg kristalline Dicyano-cobyrinsäure-hexa-methylester-f-säure (27) *133 abgewogen, in Methanol gelöst und spektroskopiert. Die Messung ergab $4.8 \mu\text{Mol}$ (\approx Methanol/583 = 10200), entsprechend 5.16 mg f-Säure (27). Das Methanol wurde am RV entfernt, der Rückstand mit insgesamt 2 ml abs. Methylchlorid portionenweise in eine Schliffampulle transferiert (Fig. 1), welche 15 mg Ammoniumchlorid *134 enthält.

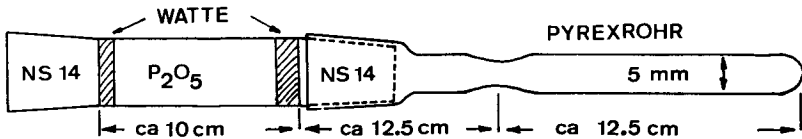


Fig. 1

Das Methylchlorid wurde mittels eines feinen Argonstromes bei RT abgelassen und der violette Rückstand mit dem Ammoniumchlorid während 12h bei 0.05 Torr und Rt in Gegenwart von P_2O_5 getrocknet *135. (Fig. 1). Danach löste man den Rückstand in 0.33 ml absolutem Aethylenglykol *136 (Füllhöhe ca 2 cm, Zugabe mittels Injektionsspritze) unter Argon *111. Die Ampulle wurde hierauf zur Entgasung der Lösung an die in Fig. 2 beschriebene Apparatur angeschlossen.

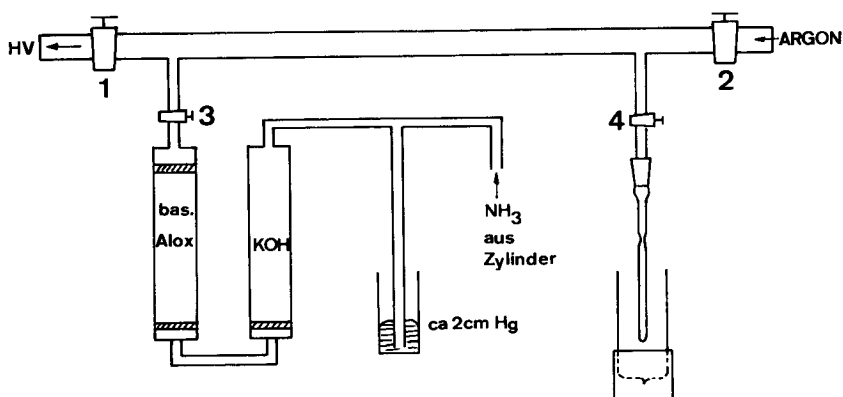


Fig. 2

Entgasung: Die violette Lösung wurde unter Vacuum (0.001 Torr) mit flüssigem Stickstoff zum Erstarren gebracht. Danach wurde das Vacuum unterbrochen und die Lösung ohne Kältebad langsam aufgetaut, bis RT erreicht war *137. Dieser Prozess wurde 5x ausgeführt.

Kondensation des Ammoniaks: Die violette Aethylenglykollösung wurde mittels Isopropanol/Trockeneis auf -78° gekühlt und gleichzeitig evakuiert (0.001 Torr). Dann flutete man die unter Vacuum stehende Apparatur ohne das Volumen der Reaktionsampulle (Fig. 2, Hahn 1, 2 und 4 geschlossen) mit trockenem Ammoniak * 138, evakuierte und flutete die Apparatur noch 2x. Hierauf kondensierte man (Hahn 4 offen) ca. 0.3 ml (= 2 cm Füllhöhe) trockenes Ammoniak *138 in die Ampulle und schloss Hahn 4 wieder. Das Kältebad (-78°) wurde sofort entfernt, gegen ein solches mit flüssigem Stickstoff ausgetauscht und nachdem die Lösung incl. kondensiertes Ammoniak ganz erstarrt waren evakuierte man das ganze System (0.001 Torr). Danach wurde die evakuierte Ampulle bei geschlossenem Hahn 4 abgeschmolzen. Anschliessend kühlte man während 5h bei -78° (langsameres Auftauen des Ammoniaks) und liess sodann langsam auf RT aufwärmen, wobei eine tief violette Lösung entstand.

Die violette Lösung erhitze man nach dem Auftauen während 12h auf 75° (Badtemperatur) im Oelbad unter Lichtausschluss. (Farbänderung: rot nach rot-violett). Die Ampulle kühlte man nach erfolgter Reaktion in flüssigem Stickstoff, öffnete sie und transferierte den Inhalt mit Methanol (ca 10 ml) in einen 25 ml-Kolben. Zur Entfernung des Ammoniaks engte man die methanolische Lösung am RV bei RT ein.

* 133 Herstellung 2. 4. 1.

* 134 Ammoniumchlorid, Riedel de Haen AG, analysenrein, frisch sublimiert bei $200^{\circ}/0.01$ Torr. Dieser Zusatz verhindert die Bildung eines γ -Lactams mit der c-Acetamidseitenkette im Ring B. (interne Mitteilung der Harvard-Gruppe).

*135 Phosphorpentoxid, granuliert, Trocknungsmittel, Fluka AG.

*136 Aethylenglykol, Fluka AG puriss. 2x über Natrium und Argon destilliert. bp. $62.5^{\circ}/0.6$ Torr.

Den in Aethylenglykol gelösten Rückstand löste man in 10 ml Methanol, verdünnte einen aliquoten Teil (1 ml) dieser Lösung auf 10 ml mit Methanol und 2 Tropfen 0.4 % HCN in Methanol und spektroskopierte die zuletzt erhaltene Lösung: Rohchromophorausbeute: *139 4.65 μ Mol (ϵ Methanol/578=10200) 97 %
Danach entfernte man das Methanol bei RT am RV und anschliessend das Glykol bei 50° (Badtemperatur) und 0.02 Torr, wobei ein kristalliner Rückstand (enthält Ammoniumchlorid) anfiel.

Zur Entfernung des Ammoniumchlorids unterwarf man das rot-violette Reaktionsgemisch der Phenolextraktion [53] wie folgt:

Phenolextraktion [53]

Dazu transferierte man den violetten Rückstand mit insgesamt 5 ml Wasser in einen Scheidetrichter und extrahierte den corrinoiden Anteil portionenweise mit insgesamt 5 ml eines Gemisches von Phenol *140 und Chloroform *48 (3:2, Gewichtsverhältnis) unter schwachem Umschwenken (nicht schütteln). Dabei war die wässrige Lösung am Schluss praktisch farblos (Restfarbe rührt von der Eigenfarbe des Phenols her). Die von der wässrigen Phase getrennten und nachher vereinigten Phenol/Chloroform-Portionen wusch man zur Entfernung wasserlöslicher Salzanteile mit 5 ml Wasser (kräftig schütteln). Dabei wurden z. T. auch corrinoiden Anteile wieder ins Wasser mitgeschleppt. Man trennte die Phasen und extrahierte die im Wasser mitgeschleppten Corrinanteile erneut mit insgesamt 3 ml Phenol/Chloroform-Gemisch. Hierauf vereinigte man die org. Phasen (zusammen ca 8 ml), verdünnte mit 8 ml n-Butanol *141 und 16 ml Chloroform *48 (Corrinanteile werden dadurch wasserlöslich). Anschliessend extrahierte man die Corrine aus der org. Phase 1x mit 10 ml und 4x mit je 5 ml Wasser (die dabei oft auftretende Emulsion kann durch Zugabe von ca 5 ml Diisopropyläther *142 gebrochen werden). Die vereinigten Wasserphasen (ca 30 ml) wurden zur Entfernung des Phenols 10x mit je 5 ml Chloroform und 3x mit je 5 ml Diisopropyläther *142 extrahiert. Die so erhaltene Lösung (frei von wasserlöslichen, nichtcorrinoiden Anteilen) engte man am RV bei 40° vollständig ein und erhielt einen roten Rückstand, den man mit Methanol verdünnte (ganzer Rückstand in 10 ml gelöst, 1 ml dieser Lösung auf 10 ml verdünnt) und spektroskopierte nach Zugabe von ca 1-2 Tropfen 0.4 % HCN in Methanol zur Endlösung:

Rohausbeute (nach Phenolextraktion) 4.56 μ Mol (ϵ Methanol/578=10200) 95% bez. Edukt.

Anmerkung: Die Farbänderung von violett nach rot beim Einengen wässriger Cobyrssäurelösungen ist auf die Abspaltung von HCN aus der violetten Dicyano-Form (29-CN) unter Bildung der orange-roten Aquocycano-Formen (29-a und 29-b) zurückzuführen. (vgl. dazu K. Bernhauer et al. [42]).

-
- * 137 Der erste Auftauvorgang soll langsam erfolgen, da zu Beginn viel Gas entweicht und dadurch die Substanz im Reaktionsgefäss umhergespritzt werden kann. Am besten geschieht das Auftauen stufenweise, indem zuerst auf -78° (Isopropanol/Trockeneis) und erst nachher auf RT erwärmt wird. Dauer ca 30 Min.
 - * 138 trockenes Ammoniak, aus Stahlzylinder via Hg-Druckausgleichsgefäss, KOH-Turm und bas. Alox Trockenturm (gefüllt mit bas Alox, Akt. 1, Woelm) eingeschleust. (Fig. 2).
 - * 139 Die Bestimmung der Ausbeuten wurde auf Grund der Absorption der α -Bande um 578 nm (für die Di-CN-Form) nach Zugabe von 1-2 Tropfen 0.4 % HCN in Methanol ausgeführt.
 - * 140 Phenol, lose Kristalle, Fluka AG puriss. p. a.
 - * 141 n-Butanol, Fluka AG puriss. p. a., 1x destilliert.
 - * 142 Diisopropyläther, Fluka AG puriss., vor Gebrauch frisch durch bas-Alox Akt. 1 (Woelm) filtriert.

LC-Chromatographie

Das Rohprodukt wurde nach Entfernung des Methanols am RV direkt mittels der Adsorptionschromatographie (LC, vgl. unten 2. 1.) gereinigt.

Bedingungen: AS, 3x 50 cm Kol AS-1. 50 ml/h Abb. 73

Injektionsmenge: ca 400-500 μ g/10 μ l Laufmittelgemisch

Laufmittelgemisch: Acetonitril/Wasser = 5:1 mit 0. 4 % HCN und 0. 1 % Triäthylamin (Vol %).

Ausbeute gemessen in Methanol/
0. 02 % HCN bez. der λ -Bande
um 578 nm mit $\epsilon = 10200$.

LC-Fraktion A: $R_t = 19. 85$ Min.

(575). 0. 54 μ Mol 11. 2% bez.
Edukt.

LC-Fraktion B: $R_t = 23. 35$ Min.

(750). Hauptfraktion: Dicyano-
Cobyrssäure 3. 48 μ Mol 72. 5%
bez. Edukt.

LC-Fraktion C: R_t ca 30 Min.

wenig Material, nicht aufge-
fangen.

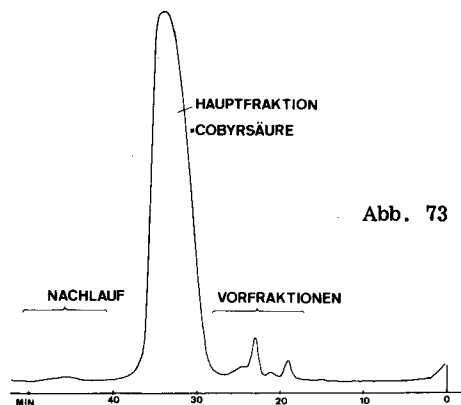


Abb. 73

Ein zweiter, analog ausgeführter Ansatz, ausgehend von 4. 75 μ Mol (entsprechend 5. 12 mg) kristalliner f-Säure (27) lieferte folgende Materialmengen:

Rohausbeute vor Phenolextraktion: 4. 52 μ Mol (ϵ Methanol/578=10200) 95 % bez.

" nach " : 4. 22 μ Mol " 89 % "

LC-Fraktion A : $R_t=21. 0$ Min. (490) 0. 826 μ Mol (ϵ Methanol/578=10200) 17. 4 %
mit Fraktion C vereinigt aufgefangen.

LC-Fraktion B : $R_t=24. 9$ Min. (660) 2. 85 μ Mol (ϵ Methanol/578=10200) 60 %
(Hauptfraktion) Cobyrssäure (29) (Dicyanoform)

LC-Fraktion C : R_t ca 30 Min. vereinigt mit Fraktion A.

LC-Identifikation der beiden Hauptfraktionen B aus den beiden Ansätzen. Je eine analytische Probe (ca 20-30 μ g) der beiden Hauptfraktionen B wurden unter den folgenden Bedingungen mittels eines Mischchromatogramms identifiziert.

Bedingungen: (AS, 3x 50 cm Kol AS-1, 50 ml/h)

LC-Fraktion B aus erstem Ansatz : $R_t = 24. 0$ Min. (670) einheitlicher, symmetrischer LC-Peak.

LC-Fraktion B aus zweitem Ansatz: $R_t = 24. 1$ Min. (710) "

1:1 Gemisch mit Material der beiden Ansätze : $R_t = 24. 2$ Min. (720) "

Die Hauptfraktion B der beiden Ansätze wurden nach LC-Identifikation vereinigt, der Phenolextraktion unterworfen (Entfernung von miteluiertem Kieselgel) und in Methanol (Verdünnung: ganze Substanzmenge in 10 ml Methanol gelöst, 1 ml davon mit Methanol auf 10 ml aufgefüllt) nach Zugabe von 1-2 Tropfen 0. 4 % HCN in Methanol zur Endlösung spektroskopiert:

Ausbeute: 6. 09 μ Mol (ϵ Methanol/578=10200) 64 % bez. eingesetzter f-Säure.

Das vereinigte Material der LC-Fraktionen A und C aus beiden Ansätzen (1.366 μ Mol) wurde mittels Phenolextraktion vom miteluierten Kieselgel befreit und direkt LC getrennt.

Bedingungen: (AS, 3x 50 cm Kol AS-1, 50 ml/h) Abb. 74

Fraktionen	R _t (Min.)	N _{th}	Ausbeute	(% bez. Edukt) *139
F1	18.5	700	1.03 %	(0.098 μ Mol) (ϵ Methanol/578=10200)
F2	20.5	580	5.2 %	(0.490 μ Mol) "
F3	24.0	710	0.73 %	(0.067 μ Mol) "
F4	29.1	1045	0.8 %	(0.076 μ Mol) "

Die Fraktionen 1 und 4 zeigen mit Cobyrssäure ähnliche UV/VIS Spektren, wurden aber nicht weiter untersucht.

Bei Fraktion 3 handelt es sich auf Grund der Retentionszeit und des UV-Spektrums um Cobyrssäure.

Bei der Fraktion 2 handelt es sich vermutlich um das von der Harvard-Gruppe *134 erwähnte Nebenprodukt mit einem γ -Lactam im Ring-B, sogenannte ψ -Cobyrssäure.

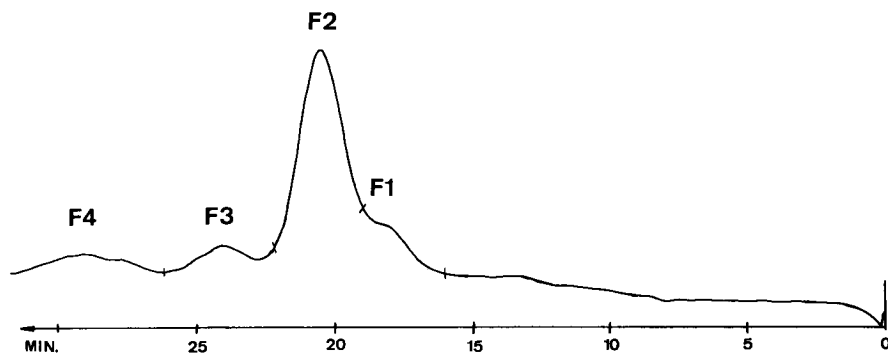


Abb. 74

2. 5. 2. Kristallisation von partial synthetischer α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form) (Probe H) (Kristallisation bei RT).

Die nach LC-Chromatographie vereinigten und anschliessend der Phenolextraktion (zur Befreiung von miteluiertem Kieselgel) unterworfenen Hauptfraktionen B der beiden Hauptansätze (vgl. 2. 5. 1.) (zusammen 6.09 μ Mol, entsprechend ca 6 mg) wurden nach UV-spektroskopischer Mengenbestimmung in Methanol/0.02 % HCN (Cobyrssäure liegt als Di-CN-Form, 29-CN vor) am RV vom Methanol befreit. Den violetten Rückstand löste man in 50 ml destilliertem Wasser, welchem man 20 Tropfen (0.6 ml) 0.1 % (Vol%) wässrige Essigsäure hinzufügte. Dieser Zusatz hat den Zweck, überschüssiges HCN der Dicyano-Form (29-CN) zu entfernen und diese beim Einengen am RV in die Aquo-cyano-Formen (29-a, b) überzuführen (interne Mitteilung der Harvard-Gruppe). Dabei veränderte sich die Farbe von violett nach dunkelrot (Uebergang von der Di-CN-Form in die Aquo-CN-Form). Danach engte man die Lösungsmittel bei ca 40° am RV vollständig ein, wobei überschüssiges HCN entwich (deutliche Rotverschiebung der Lösungsfarbe) und ein prächtig roter Film erhalten wurde. Diesen nahm man abermals in 100 ml Wasser auf und engte erneut ein. Danach löste man den Rückstand in wenig Methanol und filtrierte die rote Lösung mit total 1 ml Methanol durch einen Wattepfropf in einen

kleinen Kolben. Nach Entfernung des Lösungsmittels am RV trocknete man den roten Rückstand (30 Min./0.01 Torr/RT). Zur Kristallisation (stets unter Lichtschutz ausgeführt) löste man den roten Film bei RT in 300 μ l Wasser (pro mg Corrin ca 50 μ l Wasser) und gab mittels einer Injektionsspritze langsam 1.1 ml Aceton bis zur gerade wieder verschwindenden Trübung unter die Lösungsmitteloberfläche zu. (Acetonmenge ca 3-4 mal die Wassermenge).

Nach 2 Tagen erschienen die ersten Kristalle. Danach gab man 100 μ l Aceton und nach einem weiteren Tag nochmals 180 μ l Aceton auf die gleiche Weise zu. Nun kristallisierte man während 16 Tagen weiter, indem man jeden 2. Tag bis zur gerade wieder verschwindenden Trübung (ca 100-300 μ l) Aceton zusetzte (total 1.7 ml). Nach 20 Tagen pipettierte man die Mutterlauge von den dunkelroten Kristallen (stark verdruste Nadeln in Rosetten angeordnet) ab, wusch diese 2x mit 300 μ l Wasser/Aceton (1:15) und 1x mit 100 μ l Aceton und trocknete anschliessend (2h/0.01 Torr/RT).

Zur Auswaage transferierte man die Kristalle in einen tarierten Kolben und vereinigte die nicht transferierbaren Kristallrückstände mit der Mutterlauge (Mutterlauge 1):

Kristalle: 5.4 mg (entsprechend 5.52 μ Mol) (gewogen)
Mutterlauge 1: (0.730 μ Mol) (spektroskopisch bestimmt)

Zur Umkristallisation (unter Lichtschutz) löste man die 5.4 mg Kristalle in 10 ml Wasser, engte die Lösung am RV ein, transferierte den Rückstand mit insgesamt 2 ml Methanol durch Watte in einen kleinen Kolben, entfernte das Methanol am RV und trocknete (10 Min./0.01 Torr/RT). Den roten Rückstand kristallisierte man aus 300 μ l Wasser und 1.04 ml Aceton (Zugabe wie oben) unter Lichtschutz bei RT. Nach einem Tag gab man 100 μ l Aceton zu. Die ersten Kristalle erschienen darauf nach einem weiteren Tag. Nach 3 Tagen gab man erneut 100 μ l Aceton zu und wiederholte die Zugabe der gleichen Menge nach 4 Tagen. Nach einem weiteren Tag (total nach 10 Tagen) pipettierte man die Mutterlauge ab und wusch die Kristalle 2x mit 300 μ l Wasser/Aceton (1:10) und 1x mit 100 μ l Aceton. Danach trocknete man die stark verdrusten roten Kristalle zuerst während 48h/0.01 Torr/RT/ P_2O_5 und anschliessend 6h/0.01 Torr/ $50^\circ/P_2O_5$.

Die Kristalle wurden wie oben gewogen (Auswaage : 3.53 mg (3.58 μ Mol)) und die verbliebenen, nicht transferierbaren Kristallrückstände der Mutterlauge zuge schlagen (Mutterlauge II, 1.45 μ Mol, spektroskopisch bestimmt).

Diese Kristalle der part. synth. α -Aquo- β -cyano-cobyrsäure (b-Form) (Probe H) gelangten zur Charakterisierung und Identifikation mit einer analog umkristallisierten authentischen Cobyrsäureprobe, die wie folgt erhalten wurde:

2. 5. 3. Vergleichsprobe von auth. Aquo-cyano-cobyrsäure (29).

Die authentische Cobyrsäure, die in unserem Laboratorium Experimenten zu Identifikationszwecken diente, wurde im Arbeitskreise von Prof. W. Friedrich eigens zu diesen Zwecken frisch aus Klärschlamm hergestellt.

- An dieser Stelle sei Prof. W. Friedrich für sein grosszügiges Entgegenkommen herzlich gedankt.

Laut Angaben von Prof. Friedrich wurden 2 cobyrsäurehaltige Kieselguradsorbate (50 resp. 150 g) aus Klärschlamm gewonnen [54] [55].

Diese beiden Adsorbate wurden folgendermassen aufgearbeitet:

Die in Wasser suspendierten Präparate wurden mit wenig Blausäure versetzt und mit verd. Ammoniak auf pH ca 7 gebracht. Nach Abfiltrieren oder Abzentrifugieren der Kieselgur wurde auf ein kleines Volumen eingengt und an einer Carbomethoxy-Cellulose-Säule (CM-Säule) mit Wasser/0.01 % HCN und 0.03 % Toluol (als Antisepticum) chromatographiert. Die dabei erhaltene Cobyrsäure wurde zur weiteren Reinigung nochmals an einer CM-Säule rechromatographiert. Dabei lief die Cobyr-

säure praktisch völlig einheitlich. Das Cobyrssäure enthaltende Eluat wurde via Phenolextraktion gereinigt und die dabei anfallende wässrige Cobyrssäurelösung auf einige ml eingengt, wobei die Cobyrssäure beim Stehenlassen bei +3° in feinen rhombischen Blättchen kristallisierte. Insgesamt wurden 493 mg kristalline β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form) erhalten, die nach Angabe von Prof. Friedrich folgende Eigenschaften zeigten *143:

1. Elektrophorese (pH ca 8): Die erhaltene Cobyrssäure enthielt nur sehr geringe Spuren an Corrinoid-Dicarbonsäuren und wanderte einheitlich und identisch mit einer Standardprobe.
2. Papierchromatographie: sowohl im sauren (wassergesätt. sek-Butanol+1% Essigsig), als auch im basischen (wassergesätt. sek-Butanol+NH₃) Laufmittelsystem, wandert die erhaltene Cobyrssäure einheitlich und identisch mit der Standardprobe.
3. Auf Grund des UV/VIS-Spektrums liess sich ein Wassergehalt von ca 8.5% berechnen.

Umkristallisation der auth. Cobyrssäure ex Prof. Friedrich.

Um möglichst identische Bedingungen zur Herstellung der auth. Vergleichsprobe zu schaffen, wurde die von Prof. Friedrich erhaltene kristalline Cobyrssäure, wie bei der part. synth. Cobyrssäure geschehen, zuerst der Phenolextraktion (vgl. 2. 5. 1.) unterworfen. Es wurden 2 Proben zu Vergleichszwecken hergestellt.

Probe I (Kristallisation bei RT)

5.92 mg (entspricht 6.02 μ Mol) auth. Aquo-cyano-cobyrssäure wurden in 5 ml Wasser gelöst und mittels Phenolextraktion (vgl. 2. 5. 1.) gereinigt. Die nach Phenolextraktion erhaltene wässrige Lösung (ca 30 ml) versetzte man mit ca 0.6 ml 0.1% wässriger Essigsäurelösung (Vol%) und entfernte das Wasser am RV (die Zugabe von wässriger Essigsäure hat den Zweck, überschüssiges HCN der Di-cyano-Form (29-CN) zu entfernen und diese beim Einengen in die Aquo-Cyano-Form (29a, b) überzuführen). Den anfallenden roten Film löste man erneut in ca 50 ml Wasser und engte erneut am RV ein. Der rote Rückstand wurde nun mit wenig (ca 1 ml) Methanol durch einen Wattepfropf filtriert, am RV vom Lösungsmittel befreit und am HV bei RT kurz getrocknet.

Diesen Rückstand kristallisierte man aus 300 μ l Wasser und 1.15 ml Aceton bei RT unter Lichtausschluss, indem man das Aceton wie unter 2. 5. 2 beschrieben zugab. Innert einer Zeitdauer von ca 20 Tagen bei RT gab man jeden 2. Tag portionenweise ca 100-300 μ l Aceton bis zur gerade noch verschwindenden Trübung (total ca 1.7 ml) zu. Danach pipettierte man die Mutterlauge ab und engte diese am RV ein (1.22 μ Mol, ϵ Methanol/578=10200).

Die Kristalle (fein verdruste Kristallhäufchen) wusch man 2x mit je 300 μ l Wasser/Aceton (1:15) und 1x mit 100 μ l Aceton. Nach Trocknung (2h/RT/0.01 Torr) wog man 5 mg (5.07 μ Mol) sich schwach zusammenballende (Feuchtigkeit?) rote Kristalle. Diese Kristalle kristallisierte man erneut bei RT aus 300 μ l Wasser und 1.2 ml Aceton bei RT unter Lichtschutz, indem man während 10 Tagen jeden 3. Tag ca 100 μ l (total 300 μ l) Aceton zugab. Nach Entfernung der Mutterlauge (1.56 μ Mol) wusch man die Kristalle 2x mit je 300 μ l Wasser/Aceton (1:10) und 1x mit 100 μ l Aceton. Danach trocknete man die roten verdrusten Kristallhäufchen wie folgt: (2h/RT/0.01 Torr), dann (48h/RT/0.01 Torr/P₂O₅) und schliesslich während 6h/50°/0.01 Torr/P₂O₅ (gewogen 3.0 mg).

* 143 Von dieser Probe wurden ca 100 mg der Harvard-Gruppe (Leitung Prof. R. B. Woodward) zur Verfügung gestellt.

Probe II (Kristallisation bei RT)

Die nach Phenolextraktion, ausgehend von 15 mg kristalliner β -Aquo- α -cyano-cobyr-säure (a-Form) (von Prof. Friedrich) * 144, angefallene wässrige Cobyr-säurelösung (ca 50 ml) wurde am RV zur Trockne eingengt. Den Rückstand löste man in möglichst wenig Methanol (ca 1 ml) und filtrierte die Lösung durch einen Wattepfropf. Den nach Einengen am RV erhaltenen Rückstand kristallisierte man aus 800 μ l Wasser und 2.9 ml Aceton (Zugabe wie bei Probe I) unter Lichtschutz bei RT während 3 Wochen (keine weitere Acetonzugabe). Nach Entfernung der Mutterau-gewusch man die Kristalle mit 400 μ l Aceton und trocknete die fein verdrusten Kristallhäufchen wie folgt: zuerst 2h/RT/0.01 Torr, dann 48h/RT/0.01 Torr über P_2O_5 und schliesslich während 6h/60⁰/0.01 Torr über P_2O_5 . Man wog 11.27 mg, entsprechend 11.4 μ Mol α -Aquo- β -cyano-cobyr-säure (b-Form).

- * 144 Die 15 mg kristalline β -Aquo- α -cyano-cobyr-säure (von Prof. Friedrich) wurden vor der Umkristallisation in 3 Proben zu je 5 mg im ¹H-NMR getestet. Als Lösungsmittel verwendete man CD₃OD, d₆-DMSO und D₂O. Nach Aufnahme der Spektren entfernte man die Lösungsmittel der 3 Proben separat am RV, vereinigte die Rückstände und reinigte sie mittels Phenolextraktion (vgl. 2.5.1.). Die dabei angefallene wässrige Cobyr-säurelösung wurde für die obige Umkristallisation verwendet.
- Bemerkung zu den ¹H-NMR-Spektren: CD₃OD eignet sich wegen der schlechten Löslichkeit von Aquo-cyano-cobyr-säure nicht als NMR-Lösungsmittel. Es konnte kein Spektrum registriert werden. Bei der Verwendung von d₆-DMSO als Lösungsmittel konnte ein NMR-Spektrum registriert werden. Dieses zeigt jedoch eine sehr schlechte Bandenauflösung (hochviskose Lösung), insbesondere waren keine scharfen, sondern nur verbreiterte, diffuse Signale erkennbar. Die Verwendung von D₂O als Lösungsmittel ergab hingegen ein brauchbares NMR-Spektrum mit relativ scharfen Signalen. Ein derart registriertes NMR-Spektrum zeigt Abb. 84. Die Verwendung von D₂O (die Cobyr-säure liegt in der Aquo-cyano-Form vor) eignete sich aber wegen Auftretens der a,b-Isomerisierung von Aquo-cyano-cobyr-säure in wässrigen Lösungen nicht. Die registrierten Spektren zeigten im NMR denn auch Signale (vor allem im Bereich des H-C-10 Signals), welche der jeweils anderen Form von Aquo-cyano-cobyr-säure zugeordnet wurden. Die Lösung des Problems zur Aufnahme einheitlicher NMR-Spektren ergab sich durch die Verwendung von D₂O als Lösungsmittel in Gegenwart von KCN. In diesem Medium liegt die Cobyr-säure in der Dicyano-Form vor, welche nicht in zwei ligandisomeren Formen auftreten kann.

2. 5. 4. Analytische und spektroskopische Daten von part. synth. α -Aquo- β -cyano-cobyr-säure (b-Form) und Identifikation mit umkristallisierter auth. α -Aquo- β -cyano-cobyr-säure (b-Form).

A) DC-Vergleich

Für den DC-Vergleich wurde das von R. A. Firth entwickelte Chromatographie-system verwendet [28]. Die Resultate des Vergleichs sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Die Resultate der in den beiden Tabellenhälften reproduzierten DC-Analyse sind aus zwei separat ausgeführten, zeitlich auseinander liegenden DC-Analysen hervorgegangen.

Bedingungen: DC-Cellulose auf Alufolie, Merck, ohne Fluoreszenzindikator

Laufmittel: sek. Butanol/Wasser 9. 5: 4

Entwicklung: 12-15h/RT, Laufristanz ca 16 cm.

Probe in Methanol gelöst und unmittelbar danach aufgetragen (ca 20-25 %).

Als Referenz wurde Vitamin B-12 (Probe der Firma Hoffmann-La Roche AG) mitlaufen gelassen.

Tabelle 24.

	R_f	rel. R_f (B-12 \equiv 1)	Bemerkung
Vitamin B-12 (als Referenz)	0.27 \leftrightarrow	1.00	einheitlich
auth. Aquo-cyano-cobyr-säure Probe I (vgl. 2. 5. 3)	0.14	0.52	einheitlich b-Form
auth. Aquo-cyano-cobyr-säure Probe II (vgl. 2. 5. 3)	0.14	0.52	einheitlich b-Form
auth. Aquo-cyano-cobyr-säure, nicht umkrist. Vergleichsprobe von Prof. Friedrich. (vgl. 2. 5. 3)	0.065	0.25	einheitlich a-Form
part. synth. Aquo-cyano-cobyr- säure Probe V (vgl. 2. 5. 5.)	0.14	0.52	einheitlich b-Form
Vitamin B-12 (als Referenz)	0.27 \leftrightarrow	1.00	einheitlich
part. synth. Aquo-cyano-cobyr- säure Probe H (vgl. 2. 5. 2.)	0.14	0.52	einheitlich b-Form
auth. Aquo-cyano-cobyr-säure (analog umkrist. wie Probe I)	0.14	0.52	einheitlich b-Form
Referenz: auth. Aquo-cyano- cobyr-säure (nicht umkrist. Probe von Prof. Friedrich) 24h bei RT stehen gelassen.	2 ca gleich inten- sive Flecken bei: 0.14 0.52 0.07 0.24		1:1 Gemisch (vi- suell geschätzt von: b-Form a-Form

Anmerkung: Wurden frisch gelöste Proben direkt auf DC-Cellulose aufgetragen, so wanderten die Proben als einheitliche, beinahe runde Flecken. Liess man dieselben Proben nach dem Lösen bei RT stehen und trug nach 2 resp. 24h auf Cellulose-DC auf, so wurde nach 2h ein zusätzlicher schwacher Fleck mit dem Rf-Wert der jeweils anderen Form beobachtet. Nach 24h aufgetragene und anschliessend entwickelte Lösungen zeigten deutlich 2 völlig voneinander getrennte Flecken für die a- resp. b-Form im ungefähren Intensitätsverhältnis 1:1 (visuell geschätzt).

Diese Beobachtungen stehen mit den von R. A. Firth gemachten in Einklang [28]. Die gleichen Beobachtungen wurden auch von W. Friedrich [44, 45, 49, 51] an Hand der Papierchromatographie von Aquo-cyano-cobyrssäure und insbesondere an Hand der beiden kristallinen ligandisomeren Formen der Corrinoid-Tetracarbonsäuren gemacht. Allerdings war die Trennung der beiden Formen durch PC weniger gut als durch Verwendung von DC-Cellulose.

- Folgerungen: - Die Probe H und V sind DC-identisch mit den Proben I und II in Bezug auf die Farbe (orange-rot) und Form (beinahe runde Flecken), sowie auch der Rf-Werte der Flecken.
- Die kristallisierten Aquo-cyano-cobyrssäureproben lagen in der b-Form (Cyanid auf der Seite der Essigsäureseitenketten an Kobalt koordiniert) vor.
- Die Umkristallisation von β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form, 29-a) (auth. Friedrich'sche Probe bei Raumtemperatur lieferte offenbar DC-einheitliche α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form, 29-b).

B) LC-Chromatographie

Bedingungen: (AS, 3x 50 cm Kol AS-1, 50 ml/h) (Mischchromatogrammidentifikation) Injektionsmenge ca 10 μ l, gelöst in 10 μ l Laufmittelgemisch AS. Referenz: Guajazulen gelöst in Hexan (vgl. 2. 1.) zur Bestimmung der Frontdurchlaufzeiten.

Probe	R _t (Min.)	N _{th}	Bemerkungen
part. synth. Aquo-cyano-cobyrssäure (b-Form (Probe H))	23. 8	740	einheitlicher LC-Peak
auth. Aquo-cyano-cobyrssäure (b-Form) (Probe II)	23. 8	745	"
1:1 Gemisch der Probe H und Probe II, (Mischchromatogramm)	24. 0	720	"
Referenz	11. 6	1600	"

Kommentar: Die Proben laufen (bedingt durch das HCN-haltige Laufmittelsystem) in der Dicyanoform. Es kann deshalb keine Ligandisomerie auftreten, weshalb mit dieser Methode nicht von Aquo-cyano-cobyrssäure-a resp. b unterschieden werden kann. Die Abweichungen in den Retentionszeiten und den theoretischen Bodenzahlen liegen innerhalb der Fehlergrenze (geschätzt aus Erfahrung ca 10% für N_{th} und ca 5% für R_t). Die beiden Aquo-cyano-cobyrssäureproben sind durch LC nicht unterscheidbar. Die theoret. Bodenzahl und die Retentionszeit des Mischchromatogramms sind innerhalb der Fehlergrenze mit den Daten der Einzelchromatogramme identisch.

C) Papierchromatographie (PC) (ausgeführt mit den Proben V und III, vgl. 2. 5. 5.)

Die verwendeten Papiersorten wurden mit Methanol/Wasser (2:3) gewaschen und anschliessend luftgetrocknet.

Die Proben wurden in Methanol gelöst und unmittelbar danach auf die nachstehend beschriebene Weise auf das Papier aufgetragen. Als Referenz liess man Vitamin B-12 (Probe der Firma Hoffmann-La Roche AG) links und rechts der Cobyrssäureproben mitlaufen.



Die Proben wurden in Abständen von ca 1. 5 cm voneinander in der Mitte des Papiers aufgetragen und nach Trocknung entwickelt.

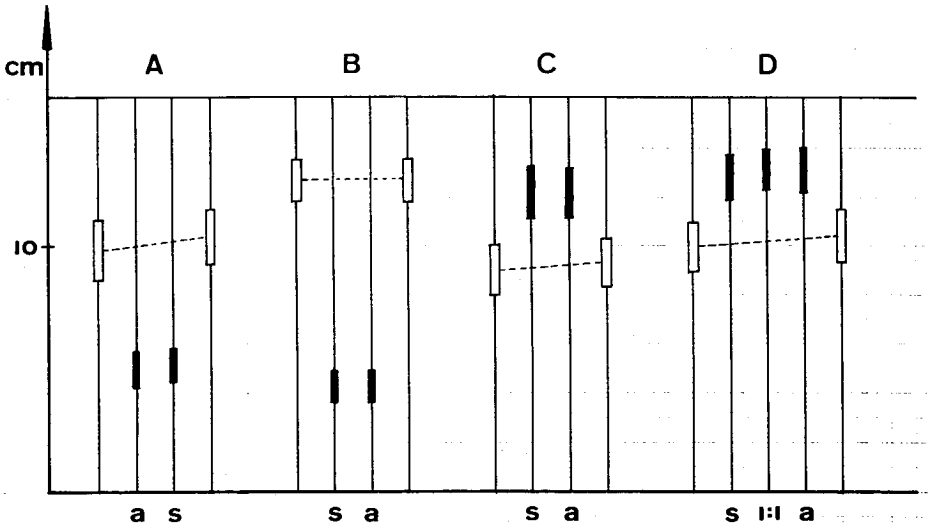
Alle aufgetragenen Substanzen liefen als ovale, einheitliche Flecken. Die Cobyrssäureflecken waren (bedingt durch das im Laufmittel vorhandene HCN) in der violetten Dicyanoform gewandert. Ligandisomerie kann deshalb nicht auftreten.

Beim Entwickeln der Chromatogramme lief die B-12 Referenzfront asymmetrisch (vgl. die schematische Skizze).

Zur Auswertung der Chromatogramme bestimmte man durch Mittelung der Frontlaufdistanz und Schwanzlaufdistanz den Schwerpunkt der Flecken. Zur Angabe der rel. Rf-Werte (bez. B-12 \equiv 1) der Cobyrssäureproben extrapolierte man die Schwerpunkte der asymmetrisch gelaufenen B-12 Flecken, indem man die Schwerlinie der beiden B-12 Flecken mit den Lauflinien der Cobyrssäureflecken schnitt. Die erhaltenen Schnittpunkte stellten nun die korrigierten Schwerpunkte für die Referenz (B-12) dar. Die relativen Rf-Werte ergaben sich nun als Quotient der Schwerpunktdistanz des betreffenden Cobyrssäurefleckens und der korrigierten Schwerpunktdistanz der Referenzflecken (B-12).

PC-Skizze (Massstab 1:2)

-  — : Vitamin B-12 (als Referenz mitlaufen lassen)
-  — : Cobyrssäureproben (p = part. synth., a = auth.)



Nachstehend sind die Laufdistanzen der Fleckenfronten und Fleckenschwänze für die einzelnen Chromatogramme (jeweils von links beginnend) in cm angegeben.

- A) 11. 0/8. 6, 5. 7/4. 2, 5. 8/4. 45, 11. 5/9. 25.
 B) 13. 55/11. 85, 4. 95/3. 65, 4. 90/3. 65, 13. 55/11. 85.
 C) 10. 0/8. 0, 13. 3/11. 05, 13. 2/11. 1, 10. 25/8. 35.
 D) 10. 9/8. 9, 13. 7/11. 9, 13. 9/12. 3, 14. 0/12. 2, 11. 5/9. 3.

Rf-Werte (korrigiert bez. der extrapolierten Referenzschwerpunkte, vgl. oben).

Papiersorte	Chromatogramme	Laufmittelsystem	Zeit (h)	Rf-Werte (Rf B-12 ≡ 1)		
				synth.	auth.	1:1 Gemisch
Whatmann No 1	A	1	52. 5	0. 49	0. 50	-
Whatmann No 1	B	2	24	0. 34	0. 34	-
Whatmann No 1	C	3	24	1. 33	1. 32	-
Whatmann 3 MM	D	3	24	1. 27	1. 28	1. 29

Experimentelles:

Laufmittelsysteme: (vgl. R. Bonnett et al. J. Chem. Soc. (C) 1163 (1969).

- 1) sek. Butanol, gesättigt mit Wasser enthaltend 0. 04 % HCN.
- 2) sek. Butanol/Wasser/Konz. NH_3 ($d=0. 91$)/ 4% HCN in Wasser (150:59:15:1).
- 3) sek. Butanol/Essigsäure/Wasser bis zur Sättigung/ 4% HCN in Wasser (150:0. 4:65:1. 5) Entwicklung: absteigend bei ca 24°, Entwicklergefäß gegen Licht geschützt. Papierdimension: 45 x 19 cm.

D) Elektrophorese (EPH) (ausgeführt mit der Probe V und Probe III, vgl. 2. 5. 5.)

- Apparatur : ELPHOR Niederspannungs-Elektrophorese Apparat mit horizontaler Papierhalterung, nicht gekühlt.
- Papier : Whatmann No 1 (30 x 14 cm) gewaschen mit Methanol/Wasser (vgl. PC)
- Elektrolyt : A) 0. 05 m NaHCO_3 enthaltend 0. 01 % KCN pH ca 8. 9
 B) 0. 5 m CH_3COOH " 0. 01 % KCN pH ca 3. 5
- Prob Zubereitung : Die Proben wurden als methanolische Lösungen auf das getrocknete Papier aufgetragen. Nach Trocknung der Proben befeuchtete man das Papier von beiden Enden her mit Elektrolyt, dass die Elektrolytfronten ungefähr gleich schnell von beiden Papierenden her gegen die in der Papiermitte aufgetragenen Proben wanderten und diese zu einem schmalen Substanzstreifen zusammenlaufen liessen. Danach entfernte man überschüssigen Elektrolyten mit einem Wattestück und befestigte das Papier zwischen den Elektroden.
- Zur Entwicklung legte man zuerst eine niedrige Spannung während ca 10 Minuten an (ca 20 Volt). Danach erhöhte man die Spannung auf den angegebenen Wert über eine effektive Wirkungsdistanz von 30 cm.
- Die Anordnung der Substanzen war gleich wie im PC. Am Rand wurde ebenfalls Vitamin B-12 mitlaufen gelassen.

Resultate: A) 0.05 m NaHCO_3 /0.01 % KCN pH ca 8.9

Spannung: 4.15 Volt/cm, Strom: 2.5 mA, Zeit: 7.5 h, Temp.: 17°C .
Die part. synth. und auth. Cobyrsäureproben wanderten in der Dicyano-Form als einheitliche, violette, beinahe runde Flecken zur Anode. Die Wanderungsdistanz betrug in beiden Fällen 2.6 cm (am Fleckenschwerpunkt gemessen). Die B-12 Flecken blieben im Wesentlichen stehen.

B) 0.5 m CH_3COOH /0.01 % KCN pH ca 3.5.

Spannung: 10 Volt/cm, Strom: 1.5 mA, Zeit: 3.5 h, Temp.: 17°C .
Die part. synth. und auth. Cobyrsäureproben wanderten in der Dicyano-Form als einheitliche, violette, beinahe runde Flecken zur Kathode. Die Wanderungsdistanz betrug in beiden Fällen 6.6 cm (am Fleckenschwerpunkt gemessen). Die B-12 Flecken blieben im Wesentlichen stehen.

Folgerung: Die part. synth. und die auth. Cobyrsäureproben waren in den beiden Elektropherogrammen nicht zu unterscheiden.

E) UV-Spektren (alle Cary-14)

Abb. 75 0.708 mg part. synth. α -Aquo- β -cyano-cobyrsäure (Probe H)
Aquo-cyano- in 25 ml Wasser.
Form $\frac{526}{7400}$ max, $\frac{513}{7200}$ max, $\frac{496}{7700}$ max, $\frac{423}{2800}$ min,
 $\frac{405}{4200}$ max, $\frac{396}{4100}$ min, $\frac{353}{23900}$ max, $\frac{324}{9300}$ min,
 $\frac{320}{9400}$ max, $\frac{293}{7000}$ min, $\frac{274}{10500}$ max, nm. $\lambda^*: \alpha = 3.23$.

Abb. 76 0.722 mg auth. α -Aquo- β -cyano-cobyrsäure (Probe II) in
Aquo-cyano- 25 ml Wasser.
Form $\frac{526}{7700}$ max, $\frac{513}{7500}$ max, $\frac{496}{8100}$ max, $\frac{423}{2800}$ min,
 $\frac{405}{4400}$ max, $\frac{396}{4200}$ min, $\frac{353}{25400}$ max, $\frac{324}{9800}$ min,
 $\frac{320}{9900}$ max, $\frac{293}{7000}$ min, $\frac{274}{10500}$ max, nm. $\lambda^*: \alpha = 3.30$

Abb. 77 0.708 mg part. synth. α -Aquo- β -cyano-cobyrsäure (obige Probe H)
Dicyano- in 25 ml Wasser. Ein aliquoter Teil dieser Lösung versetzte man
Form mit KCN (totale Konzentration an KCN: 0.05 %). (Dicyano-Form der Probe H)
 $\frac{578.5}{9500}$ max, $\frac{556}{7000}$ min, $\frac{539}{8200}$ max, $\frac{511}{5400}$ sh,
 $\frac{439}{1400}$ min, $\frac{416}{2100}$ max, $\frac{408}{1900}$ min, $\frac{367}{29000}$ max,
 $\frac{351}{13600}$ sh, $\frac{327}{4200}$ min, $\frac{312.5}{8900}$ max, $\frac{306}{8900}$ max,
 $\frac{287.5}{5900}$ min, $\frac{276}{9500}$ max. nm. $\lambda^*: \alpha = 3.06$

Abb. 78 0.722 mg auth. α -Aquo- β -cyano-cobyrsäure (obige Probe II) in
Dicyano- 25 ml Wasser. Ein aliquoter Teil dieser Lösung wurde mit KCN
Form (totale Konzentration an KCN: 0.05 %) versetzt. Dicyano-Form der Probe II)
 $\frac{578.5}{9900}$ max, $\frac{556}{7300}$ min, $\frac{539}{8600}$ max, $\frac{511}{5600}$ sh,
 $\frac{439}{1300}$ min, $\frac{416}{2100}$ max, $\frac{408}{1900}$ min, $\frac{367}{30600}$ max,
 $\frac{351}{14200}$ sh, $\frac{327}{4200}$ min, $\frac{312.5}{9200}$ max, $\frac{306}{9200}$ max,
 $\frac{287.5}{5900}$ min, $\frac{276}{9600}$ max. nm. $\lambda^*: \alpha = 3.09$

Kommentar: Die UV-Spektren der beiden Proben H und II sind sowohl in der α -Aquo- β -cyano-Form (b-Form), als auch in der Dicyano-Form nicht voneinander zu unterscheiden.

F) CD-Spektren

CD part. synth. Cobyrssäure, Dicyano-Form der Probe H.

Abb. 79 0.05 % wässrige KCN-Lösung, $c = 4.61 \times 10^{-5}$ Mol/l
($\epsilon \pm 0.05$ % KCN in $H_2O/578 = 10200$)
574/-2.7, 555/-0.8, 530/-2.6, 512/-1.8, 498/-2.5,
462/0.0, 423/+13.7, 413/+13.0, 394/+21.5, 372/0.0,
366/-6.3, 360/-3.6, 347/-8.4, 328/-5.6, 322/-6.6,
318/-5.8, 306/-13.7, 284/-0.6, 278/-1.7.

CD auth. Cobyrssäure, Dicyano-Form der Probe II.

Abb. 80 0.05 % wässrige KCN-Lösung, $c = 4.61 \times 10^{-5}$ Mol/l
($\epsilon \pm 0.05$ % KCN in $H_2O/578 = 10200$)
574/-2.6, 555/-1.3, 530/-2.8, 512/-2.5, 498/-2.7,
460/0.0, 423/+13.1, 413/+12.3, 394/+21.2, 373/0.0,
366/-7.8, 359/-4.7, 347/-10.5, 328/-6.3, 322/-7.4,
318/-6.7, 306/-14.2, 284/-1.2, 278/-1.9.

Kommentar

Die beiden CD-Spektren sind deckungsgleich. Sie sind weiter praktisch identisch mit den CD-Spektren der f-Säure (vgl. 2.4.1.4.), des f-Amids und f-Nitrils (vgl. H. Maag [12], Seiten 218 resp. 194). Dies ist einer der sichersten Hinweise für die stets noch intakte $\alpha\alpha\alpha$ -Konfiguration der 3 gegenüber Epimerisierung labilen Chromophorzentren C-3, C-8 und C-13. Die CD-Spektren sind eine sehr empfindliche Sonde, um Isomerenunterschiede an den 3 labilen Chromophorzentren zu erkennen. Die CD-Spektren ändern sich schon drastisch bei der Aenderung von nur einem der oben erwähnten labilen Zentren (vgl. 2.3.3.4. und W. Fuhrer [13]).

G) IR-Spektren

IR ca 1 mg part. synth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (Probe H) in
300 mg KBr.

Abb. 81 Banden u. a. bei: 3410sh, 3330s, 3180s, 2960m, 2930m, 2125m,
1675-1660s, 1605s, 1575s, 1555sh, 1498s, 1470sh, 1440m,
1400-1388s, 1370sh, 1345m, 1295w, 1280w, 1200-1190w, 1157s, 1115m,
1100sh, 1070w, 1053w, 1040w cm^{-1} .

IR ca 1 mg auth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (Probe I) in 300 mg KBr.

Abb. 82 Banden u. a. bei: 3410sh, 3330s, 3180s, 2960m, 2930m, 2125m,
1675-1660s, 1605s, 1575s, 1555sh, 1498s, 1470sh, 1440m, 1398-
1388s, 1370sh, 1345m, 1295w, 1280w, 1200-1190w, 1157s, 1115m,
1100sh, 1068w, 1050w, 1040w, cm^{-1} .

IR ca 1 mg auth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (Probe II) in 300 mg
KBr.

Abb. 83 Banden u. a. bei: 3420s, 3320s, 3290s, 3200s, 2970m, 2940m, 2130m,
1665s, 1650s, 1610s, 1580s, 1498s, 1400s, 1380s etc. cm^{-1} .

Bandenzu- Banden oberhalb 3000 cm^{-1} : Assoziatenbanden der primären Amide
ordnung: (6) und der Säure (1).

2125-2130 cm^{-1} : Co-CN, Absorption des koordinierten Cyanids.

1675-1600 cm^{-1} : Amid-I und Amid-II Banden.

1580-1575 cm^{-1} (zusammen mit 1400-1380 cm^{-1}): Carboxylat-
Absorptionen.

1500-1498 cm^{-1} : Chromophor.

Diskussion

Die Bandenpositionen der part. synth. Probe H (Abb. 81) und der auth. Probe I (Abb. 82) sind identisch. Die beiden Festkörperspektren sind aber von leicht unterschiedlicher Auflösung. Ein geringer Intensitätsunterschied besteht bezüglich der Nitrilbande bei 2125 cm^{-1} , der vermutlich auf unterschiedliche HCN-Verluste beim Trocknen oder Pressen der Proben zurückzuführen ist.

Beide oben erwähnten IR-Spektren zeigen im Vergleich mit der Probe II (Abb. 83) eine schlechtere Bandenauflösung und vor allem eine deutlich weniger intensive CN-Bande. Ueberdies zeigt das Spektrum (Abb. 83) der auth. Probe II, welche gemäss DC (vgl. oben) aus b-Form bestand, bemerkenswert geringe Unterschiede gegenüber dem Spektrum (Abb. 99, bestes Spektrum) einer nicht weiter umkristallisierten Friedrich'schen Cobyrssäureprobe, welche auf Grund des DC (vgl. oben) aus a-Form bestand. Offenbar sind beide Isomeren IR-spektroskopisch kaum zu unterscheiden. Wie aus Abb. 82 und 83 hervorgeht, können verschiedene Kristallisate der gleichen auth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure Festkörper-IR-Spektren unterschiedlicher Auflösung liefern. Dies zeigt, dass es schwierig ist, befriedigend übereinstimmende IR-Spektren zu Vergleichszwecken zu erhalten. Der Grund hiezu kann im Folgenden liegen:

- unterschiedliche Isomerisierung zwischen der a- und b-Form beim Pressen der KBr-Pillen. Diese Vermutung wurde auch von W. Friedrich [49] gemacht.
 - Die Kristalle können amorphe Anteile enthalten.
 - Beim Trocknen der Kristallisate oder beim Pressen der KBr-Pillen kann HCN-Abspaltung in unterschiedlichem Ausmass erfolgen. Auf diese Möglichkeiten weisen vor allem die unterschiedlichen Intensitäten der CN-Bande bei $2125\text{-}2130\text{ cm}^{-1}$ hin.
- Das einzige reproduzierte IR-Spektrum befindet sich bei Bernhauer [42]. Dieses Spektrum ist jedoch von sehr geringer Auflösung.

NMR-Spektren

Zur Zeit, da diese Identitätsarbeiten der Cobyrssäure-b in unserem Laboratorium durchgeführt wurden, stand diesem die Puls-Fourier-Transform NMR-Technik noch nicht zur Verfügung. Vorversuche zur Entwicklung der Aufnahmetechnik der NMR-Spektren mit auth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure lieferten unbefriedigende Ergebnisse. Grund dafür waren unter anderem:

- Löslichkeit in CD_3OD zu gering.
- NMR-Spektren in d_6 -DMSO (hochviskose Lösung) gaben sehr geringe Signalauflösung.

Als einziges Lösungsmittel kam auf Grund solcher Vorversuche D_2O in Betracht. Bei der Spektrenaufnahme in D_2O stellte man fest, dass ausgehend von reiner a- oder b-Form Gemische von a- und b-Form unterschiedlicher Zusammensetzung entstanden und Spektren unbefriedigender Qualität erhalten wurden. Diese Gemische entstanden durch Isomerisierung während der Aufnahmezeit (ca 1 h; ca 1 mg Substanz, CAT-Methode, ca 30 scans auf XL-100). Insbesondere gelang es zu jener Zeit mit diesen Mitteln nicht, ein Spektrum ausgehend von einer DC-einheitlichen Probe das einheitliche Spektrum der α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form) zu erhalten. Die Lösung des experimentellen Problems, synth. und auth. Cobyrssäure mittels NMR-Spektroskopie zu vergleichen, war erst mit Hilfe der Puls-Fourier-Transform Aufnahmetechnik möglich. Diese Technik war zuerst der Harvard-Gruppe zugänglich, wo denn auch die Identifikation der in unserem Labor hergestellten part. synth. und auth. Cobyrssäureproben in ihrer β -Aquo- α -cyano- (a-Form) und Dicyano-Form durchgeführt wurden (vgl. 2. 5. 7.).

Das qualitativ beste, aber immer noch unbefriedigende Spektrum, das mit der α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form, part. synth. Probe H) nach der CAT-Methode erhalten wurde, ist nachfolgend in Abb. 84 wiedergegeben. Referenz: 3-Trimethylsilyl-2, 2, 3, 3-Tetradeteropropionsäure - Na-Salz / $\delta = 0$ ppm. (ca 1 mg Cobyrssäure-b (Probe H) in $100\text{ }\mu\text{l}$ D_2O (Mikrozelle), CAT, 29 scans,

XL-100) 6.48 (s), 6.41 (s), 5.50-5.00 (Signalhaufen), ca 4.74 (HDO-Signal), 4.50-4.00 (Signalhaufen), 4.00-3.00 (Signalhaufen), 3.00-2.00 (Signalhaufen, darin 3-s bei: 2.42, 2.40, 2.36), 1.80 (s) 1.70 (s), 1.58 (s), 1.38 (s), 1.34 (s) und 1.16 (s) ppm.

Auf Grund des Vergleichs von Spektren mit verschiedenen a/b-Verhältnissen, ausgehend von DC-einheitlicher b-Form, sind im obigen Spektrum (Abb. 84) folgende Signale den beiden Formen zuzuordnen:

H-C-10 : 6.48 (a), 6.41 (b) (im Spektrum der Abb. 84 im Verhältnis ca 1:1)

Chromophorgebundene Methylgruppen: 2.42 (b), 2.40 (a), 2.36 (b) ppm.

Periphere Methylgruppen: 1.80 (b), 1.70 (a), 1.58 (b), 1.38 (b), 1.34 (a), 1.16 (b) ppm.

Aus einem vorläufigen NMR-Spektrum der Cobyrssäure (als Dicyano-Form vorliegend) konnten folgende Bandenpositionen entnommen werden:

Aufnahmebed.: ca 4 mg auth. Aquo-cyano-cobyrssäure (Friedrich'sche Probe) in $D_2O/0.05\%$ KCN und gleicher Referenz wie vorher, HA-100.

H-C-10: 5.85 (s), Chromophorgebundene CH_3 : 2.33 (s), und 2.26 (s), Periphere CH_3 : 1.71 (s), 1.56 (s), 1.44 (s), 1.32 (s), 1.20 (s) ppm.

Diese Werte wurden später zu Eichzwecken verwendet (vgl. NMR in 2.5.7.).

Zusammenfassung der Identifikationsarbeiten.

DC: Die part. synth. erhaltene Cobyrssäureprobe H ist nach Kristallisation bei Raumtemperatur aus Wasser/Aceton auf Grund der DC-Analyse die α -Aquo- β -cyano-Form (b-Form) und zeigt identisches DC-Verhalten mit auth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure, die durch Umkristallisation von β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (von Prof. Friedrich) erhalten worden ist.

Die part. synth. und auth. Cobyrssäureproben sind in folgenden Vergleichsexperimenten nicht unterscheidbar: UV/VIS, CD, PC (in 3 Systemen), Eph und LC-Chromatographie. Alle diese analytischen Daten betreffen die Dicyano-Form (29-CN). Zur weiteren Identifikation ist das part. synth. Material in die a-Form (29-a) überführt worden und durch weitere Daten vervollständigt.

UV/VIS-Spektren

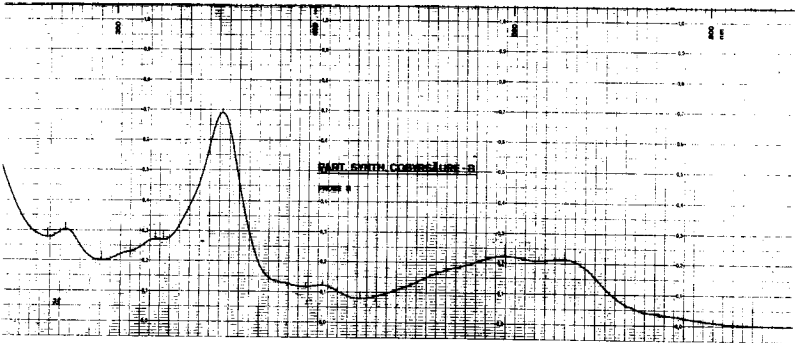


Abb. 75

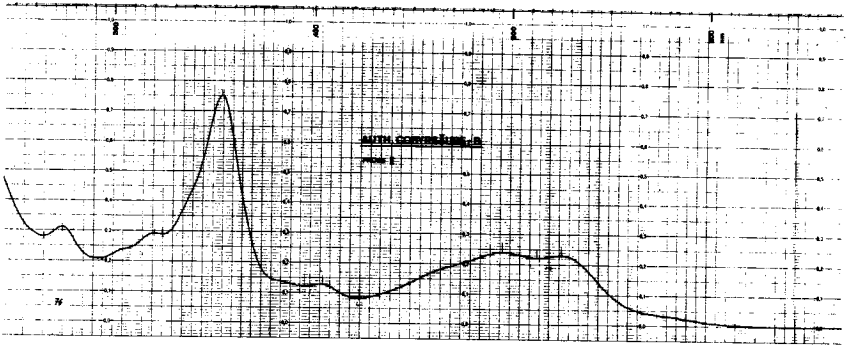


Abb. 76

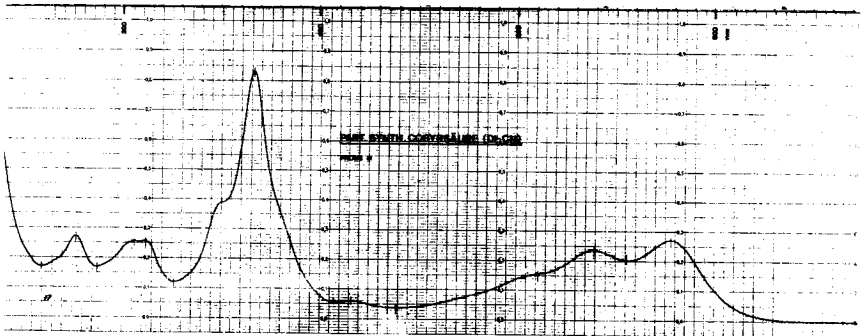
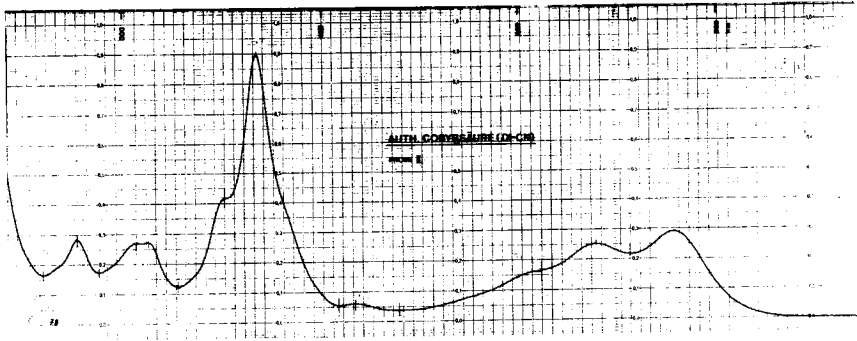


Abb. 77



CD-Spektren

Abb. 78

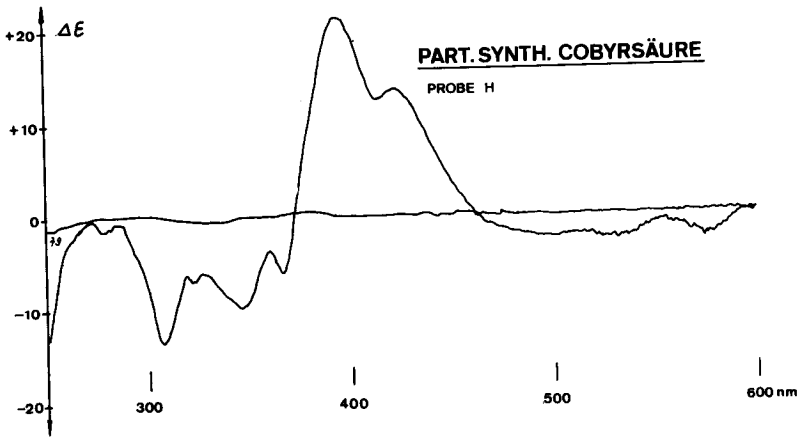
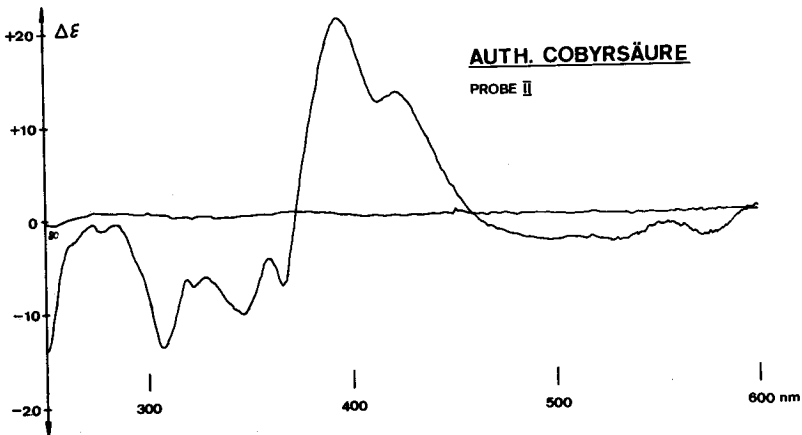


Abb. 79



IR-Spektren

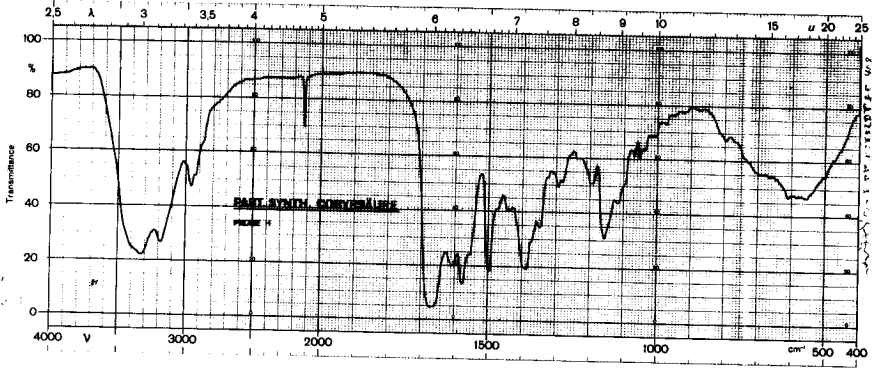


Abb. 81

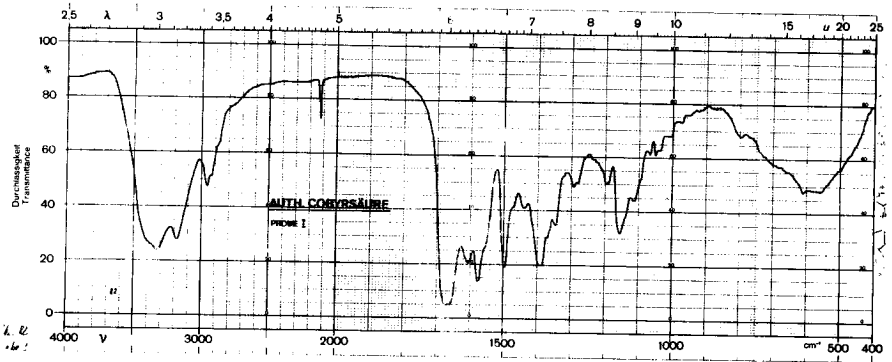


Abb. 82

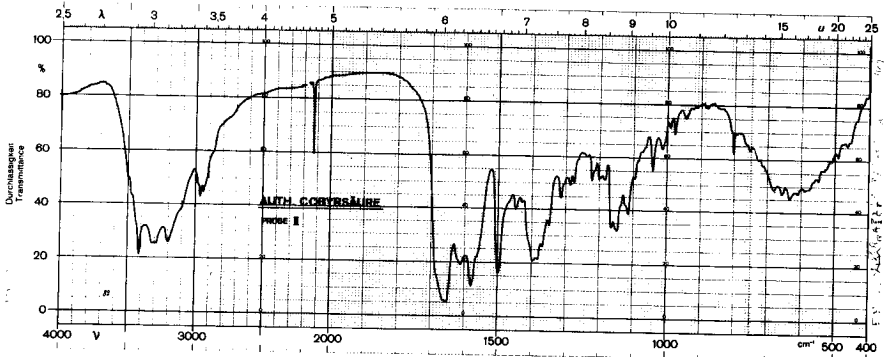


Abb. 83

NMR-Spektrum

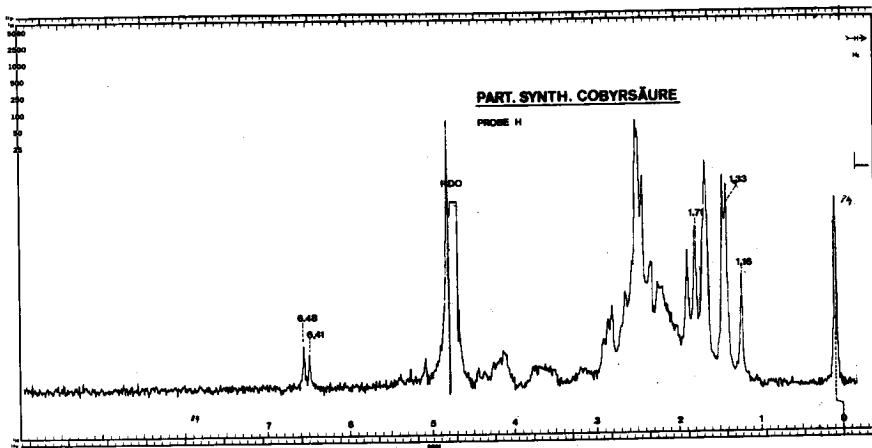


Abb. 84

2. 5. 5. Amonolysevorversuche von nicht-kristalliner f-Säure (27) zu partial synthetischer Cobyrsäure (29).

Kristallisation und vorläufige Identifikation als α -Aquo- β -cyano-cobyrsäure (b-Form).

Bemerkung: Die vorliegenden Amonolysen von nicht kristalliner f-Säure sind zeitlich vor den Ansätzen mit kristalliner f-Säure ausgeführt worden und ermöglichten erstmals einen Vergleich der dabei erhaltenen part. synth. Aquo-cyano-cobyrsäure (Probe V) mit der auth. Aquo-cyano-cobyrsäure (Probe III mittels IR, UV, LC, Papierchromatographie (PC), Elektrophorese (Eph) und Dünnschichtchromatographie (DC). Der PC- und EPh-Vergleich, sowie die zeitlich auseinanderliegende DC-Analyse der Probe V sind unter 2. 5. 4. aufgeführt. Wie sich erst später (auf Grund der DC-Analyse) herausstellte, lagen die part. synth. Probe V, sowie die auth. Probe III als α -Aquo- β -cyano-cobyrsäure (b-Form) (29-b) vor.

Der spektroskopische und chromatographische Vergleich wurde (mit Ausnahme der IR-Spektroskopie mit Aquo-cyano-cobyrsäure) an der Dicyano-cobyrsäure (29-CN) vorgenommen und dokumentierte Identität des part. synth. Materials mit der auth. Vergleichsprobe III.

Die Ausbeuten der Amonolyseansätze, welche das Material der part. synth. Probe V lieferten, sind nachfolgend in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25.

Die in Tabelle 25 aufgeführten Ansätze wurden nach den in 2. 5. 1. beschriebenen Amonolysebedingungen gleich ausgeführt und lieferten folgende Ausbeuten: (Dabei bedeuten f-Säure (A) resp. (B): f-Säure, erhalten durch Aminolyse von LLC-getrenntem "f-Propionaldoester" A resp. B (vgl. dazu 2. 4. 2. 1.). f-Säure (A, B) bedeutet: f-Säure, erhalten aus nicht LLC-getrenntem "f-Propionaldoester" (vgl. dazu 2. 4. 1.)

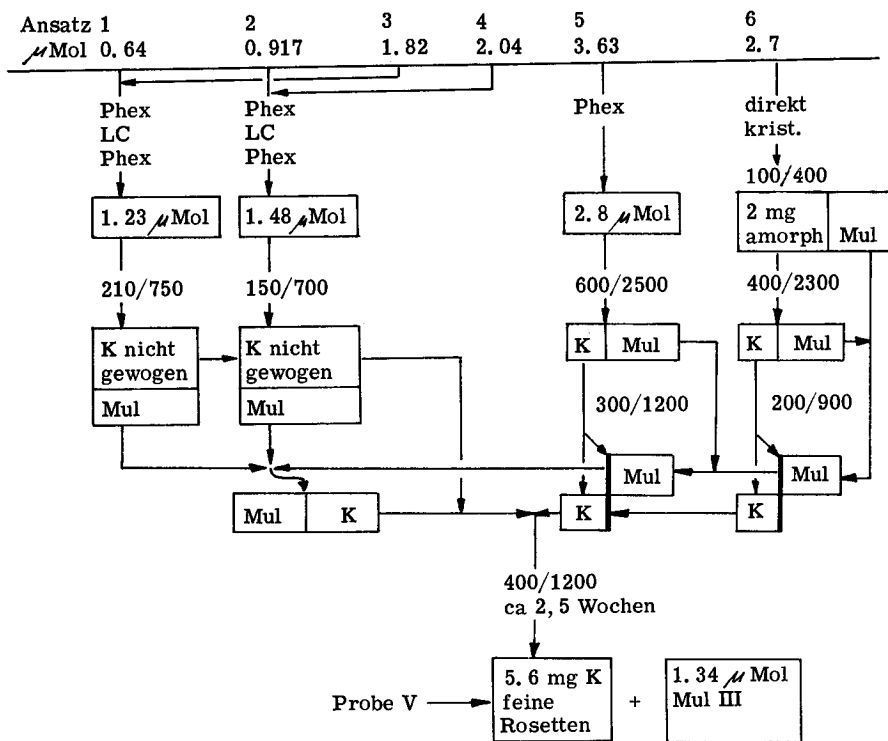
Edukt (nicht krist. f-Säure) μMol	Reagensmengen			Ausbeute (% bez. Edukt nach Phenol- extraktion, spek- troskop. best.)	Ausbeute (μMol/%) der LC-Haupt- fraktionen B, spektroskop. best.)
	NH ₃ ml	Glykol ml	NH ₄ Cl mg		
1) 1. 145 (A)	0.15	0.15	3.45	85	0.64 / 56
2) 1. 33 (B)	0.15	0.15	4.0	86	0.917/69
3) 2. 23 (A)	0.2	0.2	6.9	88	1.82 /81
4) 2. 545 (B)	0.2	0.2	7.86	89	2.04 /80
5) 4. 58 (A, B)	0.32	0.32	13.8	95	3.63 /78
6) 4. 49 (A, B)	0.32	0.32	13.5	95	2.70 /60

Die obigen Ausbeuten beziehen sich auf 1 x LC-chromatographiertes Material. Ein analytischer LC-Test dieses Materials ergab, dass das Material der Ansätze 1-4 noch mit einer schneller wandernden, unbekanntem und nicht weiter untersuchten Substanz (entsprechend der unter 2. 5. 1 beschriebenen LC-Fraktion A) verunreinigt waren. Das Material wurde zur weiteren Reinigung folgendermassen vereinigt (Ansatz 1 mit 3 und Ansatz 2 mit 4), der Phenolextraktion unterworfen, daran anschliessend nochmals LC-chromatographiert und phenolextrahiert. Die Gesamtausbeute der Ansätze 1-4 sank dadurch auf ca 40% bez. Edukt, was deutlich unter jener der Ansätze 5 und 6 lag. Dieser Unterschied ist auf Substanzverluste bei der weiteren Reinigung zurückzuführen. Die oben erwähnte Verunreinigung wurde durch die weitere Reinigung entfernt.

Kristallisation (part. synth. Aquo-cyano-cobyrssäure Probe V).

Das Material der Ansätze 1-6 wurde nach dem folgenden Schema zur Kristallisation weiterverwendet. Es bedeuten: Phex (Phenolextraktion), K (Kristalle), Mul (Mutterlauge) und LC (vgl. 2. 1.). Die erste Zahl neben den Pfeilen gibt die zur Krist. verwendete Menge Wasser in μl, die zweite Zahl die verwendete Menge Aceton in μl an. Die erhaltenen Mutterlaugen wurden vor Verwendung zur Weiterkristallisation generell der LC-Chromatographie und anschliessend der Phex. unterworfen. Die nach Phenolextraktion erhaltenen Materialmengen wurden wie unter 2. 5. 2 beschrieben vor der Kristallisation mit wässriger Essigsäure behandelt. Kristallisate wurden wie unter 2. 5. 2 umkristallisiert.

Die Substanzmengen im folgenden Schema sind für Kristallisate im mg (falls gewogen) angegeben. Die Mutterlaugenmengen wurden spektroskopisch bestimmt (Dicyano-Form) und wurden in μMol angegeben. Alle Kristallisationen wurden bei RT ausgeführt.



Die Kristalle der Aquo-cyano-cobyrssäure (Probe V) wurden wie folgt getrocknet: zuerst 2h/RT/HV, dann 16h/RT/HV/P₂O₅ und schliesslich 4h/65⁰/HV/P₂O₅.

Auth. Vergleichsprobe der Vorversuchsreihe (Probe III).

7 mg kristalline auth. Aquo-cyano-cobyrssäure (von Prof. Friedrich) wurden 2 x aus 400 μl Wasser und ca 1.7 ml Aceton bei RT unter Lichtausschluss kristallisiert. Nach Entfernung der Mutterlaugen wusch man die Kristalle mit 3x 300 μl Aceton und trocknete die feinen, zu Rosetten geordneten Kristalle analog der oben beschriebenen Probe V (gewogen 4.5 mg). Zur Zeit der Bereitung dieser Probe, wurde die DC-Chromatographie noch nicht verwendet. Bei der erst später ausgeführten DC-Analyse der Proben H, V, I und II stand kein Material der Probe III mehr zur Verfügung. Auf Grund der Beobachtungen bei der Umkristallisation von Aquo-cyano-cobyrssäure aus Wasser/Aceton bei RT (sämtliche DC-analysierten Proben lagen in der b-Form vor) vermuten wir, dass die Probe III ebenfalls in der b-Form vorlag.

Vorläufige analytische und spektroskopische Daten von part. synth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form, Probe V) und Identifikation mit umkristallisierter auth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form, Probe III).

Die Daten der Papierchromatographie und Elektrophorese, sowie der zeitlich auseinanderliegenden DC-Analyse sind unter 2. 5. 4 aufgeführt.

LC-Chromatographie.

Bedingungen: (AS, 3x50 cm Kol AS-1, 50 ml/h) (Mischchromatogrammidentifikation) Injektionsmenge ca 10 μ l, gelöst in 10 μ l Laufmittelgemisch (AS).

Probe	R _t	N _{th}	Bemerkungen
part. synth. Aquo-cyano-cobyrssäure (Probe V) (b-Form)	22. 90	770	einheitlicher LC-Peak
auth. Aquo-cyano cobyrssäure (Probe III) (b-Form)	22. 90	790	"
1:1 Gemisch der Probe V und Probe III. (Mischchromatogramm)	22. 90	770	"

Kommentar: Die part. synth. und auth. Cobyrssäureproben sind im LC-Chromatogramm nicht voneinander zu unterscheiden. Die part. synth. und auth. Cobyrssäureprobe sind innerhalb der Fehlergrenze mit den Daten des Mischchromatogramms in Bezug auf die Retentionszeit und die theoretische Bodenzahl identisch. Erfahrungsgemäss liegt die Fehlergrenze der theoretischen Bodenzahl bei ca 10 %.

IR-Spektren .

IR 1 mg part. synth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (Probe V) in 300 mg KBr.

Banden u. a. bei: 3410s, 3330s, 3190s, 2960m, 2930m, 2125m, 1670s, 1610s, 1580s, 1560m, 1500s, 1395s cm⁻¹.

Dieses Spektrum ist identisch mit jenem der Probe H, vgl. Abb. 81.

IR 0. 9 mg auth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (Probe III) in 300 mg KBr.

Banden u. a. bei: 3410s, 3330s, 3190s, 2960m, 2930m, 2125m, 1670s, 1610s, 1580m, 1560sh, 1500s, 1395s cm⁻¹.

Die Bandenpositionen dieses Spektrums sind identisch mit jenen der Spektren der Proben V, H und I. Die Bandenauflösung ist etwas geringer als im Spektrum der Probe I, vgl. Abb. 82.

Diskussion und Interpretation der später erhaltenen und besseren IR-Spektren vgl. 2. 5. 4. und 2. 5. 7.

UV-Spektren (alle Cary-14)

- UV 1. 467 mg part. synth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (Probe V) in 50 ml Wasser.
527/7350 max, 514/7150 min, 496/7700 max, 422.5/3050 min,
405/4350 max, 395/4100 min, 354/23000 max, 324/9250 min,
320/9500 max, 292.5/6950 min, 275/10250 max, $\lambda^* : \alpha = 3.13.$
- UV 1. 435 mg auth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (Probe III) in 50 ml Wasser.
527/7500 max, 514/7200 min, 496/7850 max, 422.5/3100 min,
405/4450 max, 395/4150 min, 354/23900 max, 324/9550 min,
320/9700 max, 292.5/6900 min, 275/10300 max. $\lambda^* : \alpha = 3.18.$
- UV 0.0264 mg part. synth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (Probe V) pro ml Wasser/0.05 % KCN. (Dicyano-Form).
578/9200 max, 556/7050 min, 539/8200 max, 511/5600 sh,
439/1600 min, 416.5/2300 max, 408/2100 min, 367/27400 max,
351/13100 sh, 327/4300 min, 308.5/8800 max, 287/5950 min,
277/9300 max, $\lambda^* : \alpha = 2.98.$
- UV 0.0258 mg auth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (Probe III) pro ml Wasser/0.05 % KCN. (Dicyano-Form).
578/9350 max, 556/7200 min, 539/8350 max, 511/5700 sh,
439/1700 min, 416.5/2300 max, 408/2250 min, 367/28200 max,
351/13500 sh, 327/4550 min, 308.5/9150 max, 287/6350 min,
277/9850 max, $\lambda^* : \alpha = 3.02.$

Kommentar: Die UV/VIS-Spektren der Proben V und III sind gleich und stimmen nach Bandenposition und Bandenstruktur überein mit den in Abb. 75-78 reproduzierten Spektren der Proben H und II.

2. 5. 6. Rückgewinnung der zur Charakterisierung verwendeten part. synth.

Aquo-cyano-cobyrssäure der Hauptansätze (Probe H) und der Vorversuche (Probe V) für die Ueberführung in β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form).

Sämtliches part. synth. Material der Hauptansätze und der Vorversuche, welches in der b-Form zur Charakterisierung gelangte, wurde als α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form) zurückgewonnen. Daran anschliessend wurde dieses Material in die β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form) überführt.

Die Rückgewinnung wurde für das Material der Hauptansätze und Vorversuche getrennt vorgenommen, wie im nachstehend aufgeführten Schema angegeben ist.

Das Kristallisationsgut, das mittels Phenolextraktion gereinigt wurde, behandelte man vor der Kristallisation wie unter 2. 5. 2. beschrieben mit wässriger Essigsäure. Kristalline Proben wurden wie unter 2. 5. 2. umkristallisiert.

Die Kristallisation geschah bei RT unter Argon und Lichtausschluss aus Wasser (ca 50 μ l/ mg Corrin) und Aceton (ca 3-4 faches Wasservolumen, dh. ca 150-200 μ l/ mg Corrin). Die Kristallisation dauerte wie üblich ca 3-4 Wochen, wobei in der Zwischenzeit gelegentlich Aceton bis zur gerade wieder verschwindenden Trübung zugegeben wurde.

Mengenbestimmung: kristalline Proben wurden gewogen, Mutterlaugen und Materialmengen nach Phenolextraktion wurden spektroskopisch bestimmt (Dicyano-Form) und bez. dem MG der Dicyano-Form (985) in mg berechnet.

Abkürzungen: Phex= Phenolextraktion, LC = LC-Chromatographie, K = Kristalle, Mul = Mutterlauge. Die Zahlen neben den Pfeilen geben die verwendeten Kristallisationslösungsmittel (Wasser/Aceton) in μ l an.

vereinigtes Charakterisierungsmaterial der Probe H (ursprünglich 3.53 mg) (vgl. 2.5.2.) wurde mittels Phex. gereinigt. Man erhielt 2.73 mg gereinigtes Mat.

vereinigtes Charakterisierungsmaterial der Probe V (vgl. 2.5.5.) wurde mittels Phex. gereinigt. Man erhielt 4.1 mg gereinigtes Material

2.73 mg vereinigt mit Mul II (1.42 mg) Durch einen Unfall verlor man ca 1 mg. zur Krist. verwendet: 3.2 mg

Mul I ex 2.5.2. 0.72 mg

4.1 mg

Mul III ex 2.5.5. 1.3 mg

250/1190

LC Phex.

2.91 mg K Material VA-1
7h/50⁰/HV/
P₂O₅

Mul 1.2 mg

150/600

1.95 mg K Material HA
3h/RT/HV

Mul 1.145 mg

LC

Phex.

Mul HA 1.78 mg nicht krist.

1.7 mg Mul 1.04 mg

LC

Phex.

0.92 mg

140/620

1.445 mg K Material VA-2
2h/RT/HV

Mul VA ca. 1.3 mg

Zusammenfassung des zurückgewonnenen Materials:

Kristalline Proben: Material HA : 1.95 mg Auf Grund der DC-Analyse (analog
Material VA-1 : 2.91 mg 2.5.4.) lagen alle Proben als
Material VA-2 : 1.445mg α -Aquo- β -cyano-cobyrsäure (b-Form)
vor und waren LC-einheitlich und
identisch.

Mutterlagen : Mul HA : 1.78 mg Auf Grund der DC-Analyse ca 1:1
Mul VA : 1.3 mg Gemisch der beiden Aquo-cyano-cobyr-
säure Formen a und b.

2. 5. 7. Umkristallisation von part. synth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form) bei ca +3°C und Identifikation als β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form).

(eigene Arbeiten)

Vorbemerkung: Kristallisationsvorversuche aus Wasser/Aceton bei 30°C verliefen wenig erfolgreich. Es entstanden stets langsam wachsende kleine Kristalle, die oft amorphe Anteile enthielten und in den meisten Fällen stets auch unterschiedliche Mengen an Aquo-cyano-cobyrssäure (b-Form) enthielten (im DC festgestellt). Bernhauer [42] beschreibt die Kristallisation von Aquo-cyano-cobyrssäure aus Wasser/Aceton bei +3°. Dabei isolierte er reine β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form). Eine unter obigen Bedingungen von Bernhauer kristallisierte Cobyrssäure-probe gelangte zur Röntgenstrukturanalyse [15], wobei sich herausstellte, dass die untersuchte Probe als β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form) vorlag. In der Literatur von D. Hodgkin [15] sind Hinweise enthalten, wonach die Cobyrssäure in Gegenwart von Säure (keine genaue Spezifizierung) kristallisiert wurde. Ebenso beschrieb Bernhauer in einer später erschienenen Publikation [43] die Kristallisation von Aquo-cyano-cobyrssäure in Gegenwart von Essigsäure aus wässriger Lösung bei 0-4°. Deshalb unternahmen wir weitere Kristallisationsvorversuche aus 0.1 m wässriger Essigsäure/Aceton bei +3°. Diese ermöglichten auf Anhieb und reproduzierbar reine β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form) in feinen, zu Rosetten geordneten Nadeln zu erhalten.

Der eigentlichen Kristallisation ging eine Aequilibrierung voran, welche bezweckte, die Dicyano-Form (aus der vorangegangenen spektroskopischen Mengenbestimmung) in ein 1:1 Gemisch der beiden Aquo-cyano-Formen a resp. b umzuwandeln.

Zur Umkristallisation gelangten 2 vereinigte kristalline part. synth. α -Aquo- β -cyano-cobyrssäureproben (b-Form), nämlich die Probe VA-1 (2.91 mg) und die Probe HA (1.95 mg) (vgl. 2. 5. 6.) zur Probe A. In einem Kristallisationsvorversuch wurde auch die Probe VA-2 (1.445 mg) analog der nachfolgend beschriebenen Vorschrift umkristallisiert und dabei die part. synth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure-Probe AV erhalten.

Umkristallisation des vereinigten part. synth. Materials VA-1 und HA zur Probe A.

Das vereinigte Material löste man in 10 ml abs. Methanol (orange-rote Lösung), verdünnte 1 ml dieser Lösung mit abs. Methanol auf 10 ml und spektroskopierte die Endlösung nach Zugabe von 2 Tropfen 0.4 % HCN in Methanol (Farbumschlag nach violett, Bildung der Dicyano-Form (29-b)).

Menge: 4.43 μ Mol (entsprechend 4.36 mg) (ϵ Methanol, HCN/578 = 10200)
Zur Aequilibrierung vereinigte man die beiden methanolischen Lösungen, gab 50 μ l 0.4 % HCN in Methanol zu (quantitative Bildung der tief violetten Dicyano-Form) und entfernte das Lösungsmittel am RV bei ca 40°. Nach kurzem Trocknen (10 Min. /HV/RT) löste man den violetten Rückstand in 12 ml bidestilliertem Wasser, gab 0.65 ml 0.2 % wässrige Essigsäurelösung zu (Farbumschlag nach rotviolett), liess 30 Min. bei RT stehen und entfernte danach das Wasser bei ca 50-60° Badtemperatur am RV (Dauer ca 20-25 Min.). Dabei veränderte sich die Farbe der Lösung durch Verlust von HCN unter Bildung der Aquo-cyano-Formen nach orange-rot. Gleichzeitig entstanden die beiden Aquo-cyano-cobyrssäure-Formen a und b in etwa gleichen Mengen (feststellbar durch DC, vgl. unter 2. 5. 4.). Man nahm erneut in 6 ml bidest. Wasser auf und engte die orange Lösung zur Entfernung von überschüssigem HCN und Komplettierung der Bildung der beiden Aquo-cyano-Formen am RV analog ein. Danach trocknete man den orange-roten Film (10 Min. /HV/RT), löste ihn in möglichst wenig abs. Methanol und filtrierte zur Entfernung von Festkörpern durch eine kleine G-3 Glasfilternutsche in einen

kleinen Kolben (ca 2 ml). Hierauf entfernte man das Methanol am RV bei ca 40° und trocknete den orange-roten Film (30 Min. /HV/RT).

Diesen Film löste man zur Kristallisation unter Kühlung auf +3°C in 240 μ l 0.1 m wässriger Essigsäure (50 μ l/ mg Corrin) und gab bei gleicher Temperatur mittels einer Injektionsspritze langsam 960 μ l Aceton unter die Flüssigkeitsoberfläche zu bis zur gerade noch verschwindenden Trübung. Die Lösung darf keine bleibende Trübung zeigen, da sonst amorphe Cobyrssäure ausfällt. Diese Lösung zeigte auf DC-Cellulose (vgl. 2. 5. 4.) zwei ca gleich intensive Flecken mit den relativen Rf-Werten (bezogen auf den Rf-Wert von Vitamin B-12 = 1) von Rf ca 0.2 (entsprechend β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form)) und Rf ca 0.4 (entsprechend der α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form)).

Diese Lösung impfte man bei +3° mit nicht sichtbaren Mengen von β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (part. synth. Material der Probe AV (a-Form), erhalten aus einer analogen Umkristallisation der α -Aquo- β -cyano-cobyrssäureprobe VA-2) an. Danach liess man die Lösung bei +3°C unter Lichtausschluss und Argon stehen. Nach 2 Tagen erschienen kleine rote, zu Rosetten geordnete Nadeln. Nach 5 Wochen resp. 7 Wochen gab man nochmals 300 μ l resp. 250 μ l Aceton auf die gleiche Weise zu und kristallisierte bei 1-3° weiter. Nach total 8 Wochen war die Mutterlauge deutlich schwächer rot. Man pipettierte die Mutterlauge aus dem in Eiswasser gekühlten Kölbchen ab, wusch die Kristalle 2x mit 1 ml und 1x mit 0.5 ml eiswassergekühltem 0.1 m Essigsäure/Aceton-Gemisch (1:5) und trocknete die Kristalle wie folgt: 2 Tage/RT/0.02 Torr/P₂O₅ und anschliessend 6h/60°/0.01 Torr/P₂O₅. Die Mutterlauge (vereinigt mit den Waschlösungsmitteln) wurde am RV bei 40° eingeeengt und enthielt (spektroskopisch bestimmt) 0.705 μ Mol (ϵ Methanol, HCN/578 = 10200) corrinoides Material.

Ausbeute: Kristalle durch Differenz der Menge vor Kristallisation und Mutterlaugeanteil bestimmt.).

Kristalle : 3.725 μ Mol (entsprechend 3.64 mg) 84 % Probe A
Mutterlauge: 0.705 μ Mol (" 0.695 mg) 15 % Mutterlauge A

Die Kristalle der Probe A gelangten zur Charakterisierung mittels NMR und IR. Die CD- und UV-Spektren wurden mit den Kristallen der Probe AV aufgenommen, welche unter analogen Kristallisationsbedingungen wie oben mit der Probe VA-2 erhalten worden waren.

Umkristallisation von auth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (auth. Vergleichsprobe)

(Probe IV)

37.55 μ Mol (gewogen 39.2 mg) authentische β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form von Prof. Friedrich) wurden analog der vorgängig beschriebenen Kristallisation äquilibriert und nach Filtration durch eine G-3 Glasfilternutsche getrocknet (2h/HV/RT).

Danach kristallisierte man unter Argon und Lichtschutz aus 1.96 ml 0.1 m wässriger Essigsäure und 8 ml Aceton bei 3°C durch Animpfen mit einer nicht sichtbaren Menge authentischer β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (von Prof. Friedrich). Die ersten Kristalle erschienen nach 3 Tagen und wuchsen nur langsam. Man versetzte deshalb nach ca 2.5 Wochen mit 0.5 ml Aceton (danach wuchsen die Kristalle schneller) und nach total 3 Wochen gab man nochmals 0.4 ml Aceton zu. Nach total 4.5 Wochen löste man die feinen, zu Rosetten geordneten Nadeln mittels eines Nickelspatels von der Kolbenwand ab und trennte die Mutterlauge mittels Filtration durch eine G-3 Glasfilternutsche ab. Man wusch die Kristalle 1x mit der Mutterlauge und portionenweise mit total 10 ml eiswassergekühltem 0.1 m wässrigem Essigsäure/Aceton-Gemisch (1:5), saugte danach die Waschlösungsmittel scharf ab und trocknete die Kristalle auf der Nutsche wie folgt: 2 Tage/RT/0.01 Torr/P₂O₅ und anschliessend 6h/60°/0.01 Torr/P₂O₅.

Die Mutterlauge engte man am RV bei 40° ein und bestimmte folgende Ausbeute:
Kristalle: Differenz zwischen der Menge vor Kristallisation und Mutterlaugeanteil:

Ausbeute:

Kristalle	:	27.75 μ Mol	(entsprechend	27.3 mg)	Probe IV
Mutterlauge	:	9.8 μ Mol	(" "	9.65 mg)	(spektroskopisch bestimmt)

Spektroskopische und analytische Daten von part. synth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form) (Probe A) und Identifikation mit umkristallisierter (3^0)
auth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form) (Probe IV).

A) DC-Vergleich

Für den DC-Vergleich wurde wiederum das von R. A. Firth entwickelte Chromatographiesystem verwendet [28] vgl. auch 2. 5. 4.)

Die untersuchten Cobyrssäureproben wurden sowohl in der Aquo-cyano-Form, als auch der Dicyano-Form auf DC-Cellulose laufen gelassen.

Bedingungen: DC-Cellulose auf Alufolie, Merck, ohne Fluoreszenzindikator.

Laufmittel: sek. Butanol/Wasser 9:5:4 für Aquo-cyano-Formen. Für die Dicyano-Formen trug man wässrige Lösungen der Aquo-cyano-Formen auf und entwickelte im obigen Laufmittelgemisch mit einem Zusatz von 0.02 % HCN.

Entwicklung: 12-15 h/RT, Frontlaufdistanz ca 16 cm.

Probe in Wasser gelöst und unmittelbar danach aufgetragen (ca 20-25 μ). Als Referenz liess man Vitamin B-12 mitlaufen.

Aquo-cyano-cobyrssäure	R_f	rel. R_f (B-12 \approx 1)	Bemerkungen
Vitamin B-12 (als Referenz)	0.27	↔ 1.00	einheitlich
auth. Aquo-cyano-cobyrssäure Probe IV (vgl. 2. 5. 7.)	0.065	0.27	einheitlich a-Form (orange)
part. synth. Aquo-cyano-cobyr- säure Probe A (vgl. 2. 5. 7.)	0.065	0.27	einheitlich a-Form (orange)
auth. Aquo-cyano-cobyrssäure nicht umkrist. Vergleichsprobe von Prof. Friedrich (vgl. 2. 5. 3.)	0.065	0.27	einheitlich a-Form (orange)
Referenz: auth. Aquo-cyano- cobyrssäure nicht umkrist. Probe von Prof. Friedrich 24h bei RT stehen gelassen.	2 ca gleich inten- sive Flecken bei: 0.15 0.55 0.07 0.27		1:1 Gemisch (visuell best.) b-Form (orange) a-Form (")
Dicyano-Form der Cobyrssäure (alle Flecken violett)			
Vitamin B-12 (als Referenz)	0.40	↔ 1.00	einheitlich
auth. Probe IV	0.47	1.17	einheitlich
part. synth. Probe A	0.47	1.17	einheitlich
obige nicht umkrist. auth. Ver- gleichsprobe	0.47	1.17	einheitlich
obige auth. Probe, welche 24 h bei RT stand.	0.47	1.17	einheitlich

Kommentar: (vgl. auch unter 2. 5. 4.) Auf Grund der DC-Analyse steht fest, dass die bei ca 1-3^o kristallisierten Aquo-cyano-cobyrssäureproben in der a-Form (29-a) (CN auf der Seite der Propionsäureketten an Kobalt koordiniert) vorlagen. Im Gegensatz dazu lagen bei RT kristallisierte Aquo-cyano-cobyrssäureproben in der b-Form (CN auf der Seite der Essigsäureseitenketten an Kobalt koordiniert) vor. Mit dieser DC-Analyse ist bewiesen worden, dass die part. synth. Aquo-cyano-cobyrssäureprobe A in der a-Form vorlag.

Die Proben A und IV sind DC-identisch sowohl in ihrer β -Aquo- α -cyano-Form (orange), als auch in ihrer Dicyano-Form (violett) in Bezug auf die Farbe und Form (beinahe runde Flecken), sowie auch der R_f -Werte der Flecken.

B) LC-Chromatographie

In einer erst am Schluss dieser Arbeit (Mai 1974) ausgeführten LC-Analyse mit einer besseren Säule, (Kol AS-2, vgl. 2. 1.) wurden die part. synth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäureprobe A mit der umkrist. auth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäureprobe IV in der Dicyano-Form (bedingt durch das HCN-haltige Laufmittelsystem) identifiziert und zudem mit nicht umkristallisierter β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (Probe von Prof. Friedrich) LC-chromatographisch verglichen.

Die Trennleistung der Säule wurde zusätzlich mittels eines 1:1 Gemisches von auth. neo-Aquo-cyano-cobyrssäure ($\alpha\alpha\beta$ -Konfiguration) (gefriergetrocknete Probe von Prof. R. Bonnett) und auth. Aquo-cyano-cobyrssäure (Probe von Prof. Friedrich) ($\alpha\alpha\alpha$ -Konfiguration) getestet.

- Bedingungen:
- (AS, 25 cm Kol AS-2, 40-45 ml/h)
 - Mischchromatogrammidentifikation
 - Injektionsmenge: ca 20 μ l, gelöst in 10 μ l Laufmittelsystem AS mit ca 2 μ l zusätzlichem Wasser.
 - Referenz: Guajazulen gelöst in Hexan (vgl. 2.1.) zur Bestimmung der Frontdurchlaufzeit.

Probe	R _t (Min.)	N _{th}	k'	
part. synth. Aquo-cyano-cobyr-säure (a-Form) (Probe A)	32.2	3840	0.87	Abb. 85A
auth. Aquo-cyano-cobyr-säure (a-Form) (Probe IV)	32.2	3300	0.87	Abb. 85B
auth., nicht umkrist. Aquo-cyano-cobyr-säure (von Prof. Friedrich)	32.5	3370	0.89	Abb. 85C
1:1-Gemisch von Probe A und Probe IV.	32.5	3370	0.89	Abb. 85D
Referenz	17.2	-		
auth., nicht umkrist. Aquo-cyano-cobyr-säure (von Prof. Friedrich)	34.4	nicht best.	0.89	
auth. neo-Aquo-cyano-cobyr-säure (gefriergetrocknet) (von Prof. R. Bonnett)	42.8	nicht best.	1.35	Abb. 85E
1:1-Gemisch	2 ca gleich intensive, deutlich voneinander getrennte Signale:			Abb. 85F
	34.2	3870	($\alpha\alpha\alpha$)-Cobyr-säure	
	41.8	4130	neo-Cobyr-säure ($\alpha\alpha\beta$)	
Referenz	18.2	-	-	

Kommentar: (vgl. 2.5.4. B.)

Die hier verwendete Säule (nur 25 cm), wies gegenüber der in 2.5.4. B. verwendeten Säule (1.5 m) eine sehr viel bessere Trennwirkung auf (anderes Packverfahren vgl. 2.1.). Die part. synth. Cobyr-säureprobe A und die auth. Cobyr-säureprobe IV sind durch LC-Chromatographie nicht zu unterscheiden. Die theoret. Bodenzahl und die Retentionszeiten des Mischchromatogrammes sind innerhalb der Fehlergrenze mit den Daten der Einzelchromatogramme identisch.

Die untere Tabellenhälfte zeigt eindeutig, dass event. vorhandene neo-Cobyr-säure ($\alpha\alpha\beta$ -Konfiguration, β -Konfiguration an C-13) von der richtigen Cobyr-säure (mit $\alpha\alpha\alpha$ -Konfiguration) mittels LC abgetrennt werden könnte.

Es wurde in keiner der untersuchten Cobyrsäureproben, insbesondere nicht in der part. synth. Probe A, irgendwelche Neo-Anteile festgestellt. Dies ist ein gutes Kriterium für die stets noch intakte $\alpha\alpha\alpha$ -Konfiguration der part. synth. Cobyrsäure. Die Reaktionssequenz: f-Amid (24) \rightarrow Cobyrsäure (29) gestattet demnach die Synthese von Cobyrsäure, ohne die Konfiguration der gegenüber Epimerisierung potentiell labilen Chromophorzentren C-3, C-8 und C-13 anzutasten.

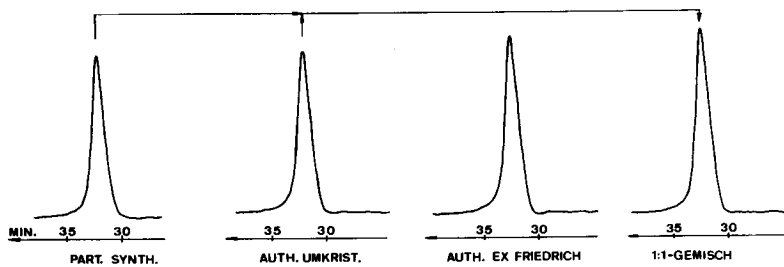


Abb. 85A

Abb. 85B

Abb. 85C

Abb. 85D

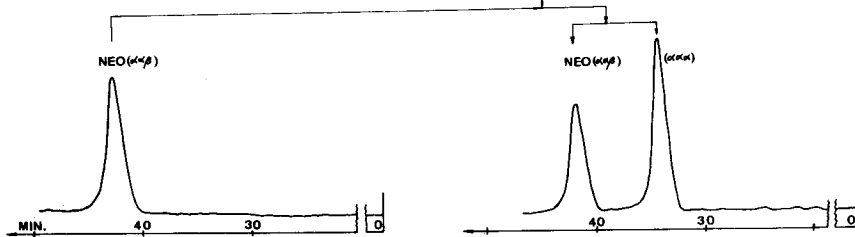


Abb. 85E

Abb. 85F

C) UV-Spektren (alle Cary-14)

- Abb. 86 (Aquo-cyano-Form) 0.300 mg part. synth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (Probe AV) in 10 ml Wasser.
 526/7260 max, 514/6960 min, 495/7720 max, 462/5800 sh,
 423/2640 min, 404/4230 max, 395/3900 min, 386/4140 max,
 354/24400 max, 325/9630 min, 320/9760 max, 304/7810 sh,
 293/6930 min, 274/10090 max, 266/9300 min, nm. γ : α
 = 3.36.
- Abb. 87 (Aquo-cyano-Form) 0.302 mg auth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (Probe IV) in 10 ml Wasser.
 526/7440 max, 514/7220 min, 495/7960 max, 462/6050 sh,
 423/2850 min, 404/4470 max, 395/4040 min, 386/4370 max,
 354/25160 max, 325/10000 min, 320/10100 max, 303/8000 sh,
 292/7050 min, 274/10250 max, 266/9550 min, nm. γ : α
 = 3.37
- Abb. 88 (Dicyano-Form) 0.300 mg part. synth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (obige Probe AV) in 10 ml Wasser. Ein aliquoter Teil dieser Lösung versetzte man mit KCN (totale Konz. an KCN: 0.05%).
 578/9200 max, 557/6840 min, 539/8040 max, 503/4970 sh,
 439/1300 min, 418/2150 max, 367/28500 max, 350/13500 sh,
 328/4450 min, 312/9050 max, 307/9000 max, 287/6020 min,
 277/9500 max, 260/6080 min, nm. γ : α = 3.10
- Abb. 89 (Dicyano-Form) 0.302 mg auth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (obige Probe IV) in 10 ml Wasser. Ein aliquoter Teil dieser Lösung versetzte man mit KCN (totale Konz. an KCN: 0.05%).
 578/9500 max, 557/7020 min, 539/8120 max, 503/5240 sh,
 438/1360 min, 418/2140 max, 367/29000 max, 350/13700 sh,
 327/4530 min, 312/9260 max, 307/9050 max, 287/5930 min,
 276/9470 max, 260/9180 min, nm. γ : α = 3.07

Kommentar: Auf Grund der UV-Spektren der Aquo-cyano-Formen ist nicht zu unterscheiden, ob die Aquo-cyano-cobyrssäure in der a-Form oder der b-Form vorliegt. Die Absorptionen der a-Form liegen gegenüber jenen der b-Form nur ca 1-1.5 nm hypsochrom verschoben. Die Unterschiede sind am deutlichsten an den 3 Hauptmaxima, der α -, β - und γ -Bande erkennbar. Nachstehend sind die von Friedrich [44] ermittelten Werte für die Hauptmaxima der beiden Aquo-cyano-cobyrssäure-Formen reproduziert.
 a-Form: 527/8420 max α , 495/9000 max β , 353.5/28260 max γ , nm.
 b-Form: 528/8190 max α , 496/8670 max β , 355.0/27360 max γ , nm.
 Es sind sowohl die UV/VIS-Spektren der part. synth. und auth. Cobyrssäureproben in der Aquo-cyano-Form, als auch in der Dicyano-Form nicht voneinander unterscheidbar.

D) CD-Spektren

CD
 Abb. 90 part. synth. Cobyrssäure, Dicyano-Form der Probe AV, in 0.05 % wässriger KCN-Lösung, $c = 4.61 \times 10^{-5}$ Mol/l (bez. $\epsilon = 10200$ in 0.05 % KCN in H_2O bei 578 nm.)
 573/-2.9, 552/-0.9, 526/-3.0, 460/0.0, 423/+13.8,

414/+13.1, 395/+21.7, 372/0.0, 366/-7.1, 360/-4.3,
346/-10.5, 328/-5.8, 323/-7.0, 319/-6.4, 306/-13.8,
285/-0.5, 279/-1.0, 272/0.0, 250/-12.5.

CD
Abb. 91

auth. Cobyrsäure, Dicyano-Form der Probe IV.
in 0.05 % wässriger KCN-Lösung, $c = 4.61 \times 10^{-5}$ Mol/l
(bez. $\epsilon = 10200$ in 0.05 % KCN in H_2O bei 578 nm.
573/-3.0, 552/-0.9, 525/-3.1, 459/0.0, 422/+13.5,
414/+12.5, 395/+21.0, 373/0.0, 366/-7.5, 359/-4.6,
346/-10.5, 328/-6.0, 323/-7.0, 318/-6.2, 306/-14.0,
284/-0.5, 279/-1.0, 272/-0.2, 250/-11.9.
Nullinienschwankung in $\Delta \epsilon$ absolut ca 1.0° .

Kommentar: Die CD-Spektren der part. synth. und auth. Cobyrsäureprobe (in der Dicyano-Form aufgenommen) sind identisch. Im weiteren sind die CD-Spektren praktisch identisch mit jenen des f-Amids (24) und f-Nitrils (vgl. H. Maag [12], Seite 218 und 194), sowie auch mit jenem der f-Säure (27).

Wie wir wissen, sind schon geringe Konfigurationsänderungen (z. B. Aenderung der Konfiguration an nur einem der 3 gegenüber Epimerisierung labilen Chromophorzentren C-3, C-8 und C-13) mit drastischen Aenderungen in den CD-Spektren verbunden (vgl. 2. 3. 3. 4. und W. Fuhrer [13], Seite 253).

Die sehr gute Uebereinstimmung der CD-Spektren der part. synth. Cobyrsäure (in der Dicyano-Form) mit den CD-Spektren des f-Amids (24), des f-Nitrils und der f-Säure (27), sowie hauptsächlich mit der auth. Cobyrsäureprobe (in der Dicyano-Form) bestätigt für das f-Amid (24), f-Nitril, die f-Säure (27) und die Cobyrsäure die $\alpha\alpha\alpha$ -Konfiguration bez. der 3 labilen Chromophorzentren C-3, C-8 und C-13.

E) NMR-Spektren

100-MHz Fourier-Transform Spektren, aufgenommen auf Varian XL-100 an der Harvard-Universität *144.

Aufnahme der Aquo-cyano-Form: Beide Proben in je 0.4 ml D_2O gelöst und danach sofort registriert, um die Isomerisierung der Aquo-cyano-Form in Wasser möglichst klein zu halten.

Aufnahme der Dicyano-Form : Zugabe von 2.5 mg festem KCN/0.4 ml D_2O zu den Lösungen der obigen Aquo-cyano-Formen.

Infolge der unterschiedlichen Mengen mussten verschiedene Pulszahlen verwendet werden.

Das Spektrometer wurde auf die Deuteriumresonanz von D_2O gelockt. Es wurde keine Referenz verwendet. Alle Spektren wurden mit identischem sweep offset (45031.6 Hz) registriert.

Zur Angabe der chem. Verschiebung in ppm wurden die Spektren der part. synth. und auth. Aquo-cyano-Formen an Hand der beiden schwachen Signale bei 141 Hz resp. 676 Hz (Computer-output) geeicht. Diese Signale sind der α -Aquo- β -cyano-cobyrsäure zuzuordnen, welche durch Isomerisierung von β -Aquo- α -cyano-cobyrsäure (a-Form) während der Aufnahme entstanden war. Diesen beiden Signalen entsprechen die Signale bei 1.16 ppm (eine anguläre Methylgruppe) resp. 6.48 ppm (H-C-10) im Spektrum der α -Aquo- β -cyano-cobyrsäure (Abb. 84). Als Referenz diente dort: 3-Trimethylsilyl-2, 2, 3, 3-tetradeuteropropionsäure-Na-Salz ($\delta = 0$ ppm) als interner Standard.

Zur Eichung der Spektren der in der Dicyano-Form aufgenommenen Cobyrsäureproben bediente man sich der im Computer-output angegebenen Resonanzen bei

147.3 Hz (bei höchstem Feld absorbierende Methylgruppe) und 616.3 Hz (H-C-10). Diese beiden Banden entsprechen den bei 1.20 ppm (Methylgruppe bei höchstem Feld) resp. 5.85 ppm (H-C-10) liegenden Resonanzsignalen, welche in einem Vorversuchs-NMR (an der ETH aufgenommen) ermittelt wurden (vgl. 2.5.4.).

Die Pfeile in den Abb. 92 und 93 zeigen auf die von α -Aquo- β -cyano-cobyr-säure (b-Form, durch Isomerisierung während der Aufnahme entstanden) her-rührenden Banden.

Probe:

	<u>β-Aquo-α-cyano-cobyr-säure</u>			
	<u>part. synth. Probe A</u>		<u>auth. Probe IV</u>	
Menge	ca 1.0 mg		ca 1.3 mg	
Pulsdauer (μ sec)	40		40	
Repetitionszeit (sec)	2		2	
Pulszahl (K-Trans)	997		866	
	Computer-		Computer-	
	output (Hz)		output (Hz)	
	ppm		ppm	
H-C-10 (b-Form) (Spur)	676	↔ 6.48	676	↔ 6.48
H-C-10 (a-Form)	668	6.40	668	6.40
Chromophor-				
gebundene CH ₃ (2)	268.1	2.40	267.9	2.40
anguläre CH ₃ (2)	198.9	1.71	198.7	1.71
" (1)	190.1	1.62	189.9	1.62
" (1)	183.8	1.56	183.6	1.56
" (2)	160.6	1.33	160.4	1.32
Spur anguläre				
CH ₃ von b-Form	141	↔ 1.16	141	↔ 1.16

Abb. 92

Abb. 93

Probe:

Dicyano-Form der obigen Aquo-cyano-cobyr-säureproben.

	<u>part. synth. Probe A</u>		<u>auth. Probe IV</u>	
	Menge	ca 1.0 mg		ca 1.3 mg
Pulsdauer (μ sec)	40		40	
Repetitionszeit (sec)	2		2	
Pulszahl (K-Trans)	1094		1311	
	Computer-		Computer-	
	output (Hz)		output (Hz)	
	ppm		ppm	
H-C-10	616	↔ 5.85	616	↔ 5.85
Chromophor-	259.5	2.31	259.5	2.31
gebundene CH ₃	253.9	2.25	253.9	2.25
anguläre CH ₃ (1)	197.1	1.68	197.1	1.68
" (1)	182.0	1.53	182.0	1.53
" (1)	178.6	1.51	178.6	1.50
" (1)	171.7	1.43	171.9	1.43
" (1)	158.6	1.30	158.6	1.30
" (1)	147.5	↔ 1.20	147.3	↔ 1.20

Abb. 94

Abb. 95

* 144 Ich danke Herrn Dr. P. Balaram der Harvard-Gruppe für die Aufnahme dieser NMR-Spektren.

Kommentar: Die NMR-Spektren der auth. und part. synth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäureproben stimmen bis auf einen nur schwach unterschiedlichen Gehalt von α -Aquo- β -cyano-cobyrssäure (b-Form) (geschätzt ca 5-10 %) sehr gut überein. Die unterschiedliche Kontamination mit der b-Form kann darauf zurückgeführt werden, dass die Spektren mit verschiedenen Pulszahlen und somit verschiedener Aufnahmezeiten, welche einen unterschiedlichen Isomerisierungsgrad der beiden Proben zur Folge hatten, aufgenommen worden sind. Nach Zugabe von KCN, was die Bildung der Dicyano-Form zur Folge hat, wurde die Ligandisomerie aufgehoben. Die entsprechenden NMR-Spektren zeigten danach denn auch befriedigende Übereinstimmung. Das NMR-Spektrum ist in diesem Falle das beste Kriterium für den Identitätsnachweis der beiden Proben.

F) IR-Spektren

Die mit dem kristallinen Material der part. synth. und auth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (Probe H und IV) aufgenommenen IR-Spektren waren von unterschiedlicher Intensität und Bandenauflösung. Insbesondere betrug die Cyanid-Absorption bei 2125-2130 cm^{-1} im IR der auth. Probe IV ca 30 % gegenüber der gleichen Absorption eines IR-Spektrums der nicht umkristallisierten Friedrich'schen Cobyrssäurevergleichsprobe (Abb. 99). Die Cyanidabsorption der part. synth. Probe H betrug hingegen ca 80 % gegenüber der gleichen Absorption der Vergleichsprobe.

Parallel zur Intensitätsabnahme der Cyanid-Absorptionsbande bei 2125-2130 cm^{-1} nahm auch die Spektrenauflösung ab. Schultern oder nahe beieinander liegende Banden in Spektren schlechter Bandenauflösung (immer Spektren geringer Cyanidabsorption) verschmolzen zu verbreiterten, gemeinsamen Banden. Diese Erscheinung wurde schon früher (vgl. Abb. 81-83) gemacht. Es gelang dort allerdings 2 identische Spektren zu erhalten.

Der Grund für das Auftreten dieser Intensitätsunterschiede der Cyanidbande führen wir auf Cyanid-Verluste zurück. Diese wurden möglicherweise durch in die Kristallstruktur eingebaute Essigsäure (im Kristallisationslösungsmittel enthalten) beim Trocknen der Proben am HV katalysiert.

Die Frage, wonach solche Unterschiede durch Kristalldimorphie verursacht werden, wurde nicht abgeklärt, da es nicht gelang ein geeignetes Lösungsmittel zur Aufnahme von Lösungs-IR-Spektren zu finden, Lösungsspektren würden Unterschiede, verursacht durch Kristalldimorphie nicht aufzeigen. Diese Fragestellung ist insofern von Bedeutung, als bei der Kristallisation von f-Säure (27) (vgl. 2. 4. 1. 4.) dimorphe Kristalle erhalten worden waren.

Um den Einfluss der Essigsäure bei der Kristallisation zu vermeiden, wurde das ganze zur Charakterisierung verwendete part. synth. Material incl. der Mutterlaugen HA, VA und A und das Material der Vorversuchkristallisation VA-2 nochmals mittels LC gereinigt, anschliessend phenolextrahiert und hierauf aus Wasser/Aceton (ohne Zusatz von Essigsäure) umkristallisiert.

Dabei ging man wie folgt vor:

Das Material der IR-Spektren (ca 1 mg) und das Material der CD-, UV- und NMR-Spektren wurde zur Entfernung des Kaliumbromids (IR-Spektrum) und Kaliumcyanids (UV, CD und NMR-Spektrum) der Phenolextraktion unterworfen und anschliessend getrennt vom Mutterlaugenmaterial HA, VA und A mittels LC-gereinigt.

Bedingungen (AS, 25 cm Kol AS-2, 40-45 ml/h) (Abb. 96)

Injektionsmenge ca 300-400 μl / 10 μl Laufmittelgemisch AS und ca 2 μl zusätzliches Wasser.

Dabei zeigte sich folgendes Bild:
Sämtliche Materialproben waren nur sehr geringfügig mit 4 schneller und einer langsamer wandernden Verunreinigung mit $R_t = 19.0$, $R_t = 21.0$, $R_t = 23.0$, $R_t = 24.4$ und $R_t = 46.0$ Min. (total ca 2-3 % bez. der Hauptfraktion, spektroskopisch in der Dicyano-Form bestimmt) verunreinigt.

Man sammelte die Hauptfraktionen ($R_t = 34.0$ Min.) aller Chromatogramme, vereinigte diese und reinigte danach mittels der Phenolextraktion (zur Entfernung von miteluiertem Kieselgel). Man erhielt ca 6.2 μ Mol (spektroskopisch in der Dicyano-Form bestimmt) Cobyrsäure.

Diese Probe vereinigte man mit ca 1 mg verbleibender kristalliner part. synth.

β -Aquo- α -cyano-cobyrsäure (Probe-A) (LC-einheitlich auf Kol AS-2, vgl.

LC-Chromatographie unter 2. 5. 7.) und bestimmte spektroskopisch 7.12 μ Mol

part. synth. Cobyrsäure. Dieses part. synth. Material wurde für die nachfolgende Kristallisation verwendet.

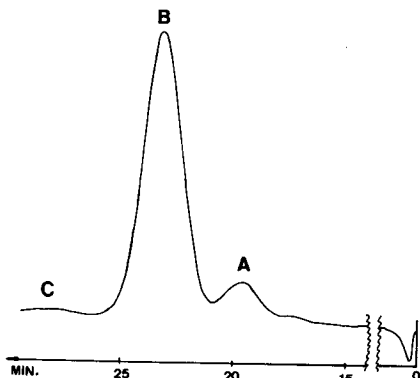


Abb. 96

Kristallisation von partial synthetischer Cobyrsäure als β -Aquo- α -cyano-cobyr-säure (a-Form) (Probe S)

Die nach obiger Reinigung erhaltenen 6.2 μ Mol part. synth. Cobyrsäure wurden mit ca 1 mg verbliebener kristalliner part. synth. Cobyrsäure-a vereinigt und in 25 ml bidest. Wasser gelöst. Zur Mengenbestimmung verdünnte man 1 ml dieser Lösung mit bidest. Wasser auf 10 ml und spektroskopierte die Endlösung. Menge: 7.12 μ Mol (ϵ Wasser/0.05 % HCN/578 = 10200).

Die beiden Lösungen wurden danach vereinigt und mit 2 Tropfen 3% HCN in Wasser vollständig in die Dicyano-Form überführt. Danach gab man 10 Tropfen 0.2 % Essigsäure in Wasser zu und engte am RV bei ca 40-50° vollständig ein und trocknete während 30 Min. am HV bei RT. Dieses Prozedere bezweckt die Ueberführung der Dicyano-Form in ein 1:1 Gemisch der beiden Aquo-cyano-Formen a und b, sowie die Entfernung der zur Katalyse dieser Ueberführung zugesetzten Essigsäure. Nach dem Trocknen nahm man den nun rot-violetten Rückstand erneut in 20 ml bidest. Wasser auf und engte wiederum am RV vollständig ein. Dabei wurde die Lösung unter Bildung der Aquo-cyano-Form orange-rot. Diesen Rückstand nahm man in wenig bidest. Wasser auf und transferierte die orange Lösung quantitativ in Portionen von ca 100 μ l durch einen Wattepfropf in einen ca 5 ml fassenden Spitzkolben (ca 0.4 ml bidest. Wasser wurden total benötigt). Das Wasser wurde sodann unter einem schwachen Argonstrom unter gelindem Erwärmen (ca 40° im Wasserbad) vollständig abgeblasen. (Dauer ca 40 Min.). Hierauf trocknete man nochmals während 15 Min. am HV bei RT.

Zur Kristallisation kühlte man das Kölbchen im Eiswasserbad (0°C) und löste den orangen Film in 350 μ l bidest. Wasser. Diese stark orange Lösung versetzte man bei 0°C langsam mittels einer Injektionsspritze (Aceton unter Lösungsoberfläche zugeben, es darf keine bleibende Trübung auftreten) portionenweise mit total 1.4 ml Aceton. Danach impfte man mit nicht sichtbaren Spuren von kristalliner part. synth. β -Aquo- α -cyano-cobyrsäure (part. synth. Probe A) an, kratzte heftig mit einem dünnen Glasstab und liess unter Argon verschlossen bei +3°C im Kühlschrank kristallisieren. Nach ca 2 Tagen erschienen die ersten

Kristalle als feine orange Nadeln zu Rosetten geordnet. Man liess während 34 Tagen ohne weitere Acetonzugabe kristallisieren, wobei sich die überstehende Mutterlauge deutlich aufhellte.

Danach entfernte man die überstehende Mutterlauge bei 0°C (Eiswasserbad) mittels einer feinen Pipette, wusch die feinen Nadeln 2x mit je 2 ml Wasser/Aceton (1:3) bei 0°C und 2x mit je 1 ml Aceton bei 0°C. Anschliessend trocknete man die feinen orangen, zu Rosetten geordneten Nadeln während 3h bei RT und 0.001 Torr. Die Mutterlauge enthielt, spektroskopisch in der Dicyano-Form bestimmt, 1.275 μ Mol Cobyrssäure.

Auf Grund einer DC-Analyse auf DC-Cellulose (analog wie unter 2.5.7.A.) lagen die erhaltenen Kristalle als β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form) vor.

Ausbeute: (Kristallmenge durch Differenz der Menge vor Kristallisation und Mutterlauge menge bestimmt).

Kristalle : 5.845 μ Mol (82.1 %) β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (Probe-S)
Mutterlauge-S : 1.275 μ Mol (17.9 %)

Diese Probe-S diente ausschliesslich dem IR-spektroskopischen Vergleich mit einer unter genau gleichen Bedingungen kristallisierten auth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäureprobe (Probe-VF) (vgl. unten).

Umkristallisation von authentischer β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form)

(Probe-VF)

7.12 μ Mol auth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (Friedrichprobe) wurde unter genau gleichen Bedingungen spektroskopisch ausgemessen und kristallisiert, wie in der vorangegangenen Vorschrift beschrieben worden war.

Dabei wurde mit nicht sichtbaren Spuren von auth. Friedrich'schen Cobyrssäure-*a* angeimpft.

Die ersten Kristalle erschienen nach ca 1 Tag und waren ebenfalls als Nadeln zu feinen Rosetten angeordnet.

Nach 34 Tagen wurde analog wie vorher beschrieben aufgearbeitet, wobei man ebenfalls feine, etwas grössere, zu feinen Rosetten geordnete orange Nadeln erhielt. Diese Kristalle wurden während 3h bei RT und 0.001 Torr getrocknet und deren Anteil ebenfalls durch Subtraktion der Mutterlauge menge (spektroskopisch in der Dicyano-Form bestimmt) von der Substanzmenge vor der Kristallisation bestimmt.

Die erhaltenen Kristalle lagen auf Grund einer DC-Analyse (analog wie unter 2.5.7.A.) auf DC-Cellulose als β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form) vor.

Ausbeute:

Kristalle : 6.67 μ Mol (93.8 %)
Mutterlauge: 0.45 μ Mol (6.3 %)

Diese Probe-VF diente dem IR-spektroskopischen Vergleich mit der oben erhaltenen Probe-S.

IR-Spektren

IR 1.0 mg part. synth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (Probe S)
Abb. 97 in 300 mg KBr.
3420s, 3320s, 3300s, 3200s: Spitzen der breiten Absorption von 3600-2300 cm^{-1} der Assoziationsschwingungen der primären Amidgruppen (6) und der Carboxylgruppe (1).
2970m, 2950m : C-H stretch,

2130m: Absorption des axial an das Kobaltatom koordinierten Cyanids.

1660s breit, 1610s, 1580s : Amid I und Amid II Banden sowie Bande für die Carboxylatgruppe, 1500s Chromophor, 1395m, 1385m : Carboxylat, cm^{-1} .

IR
Abb. 98

1.0 mg auth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (Probe VF)
in 300 mg KBr.

3420s, 3320s, 3300s, 3200s : Spitzen der breiten Absorption von 3600-2300 cm^{-1} der Assoziatenschwingungen der primären Amidgruppen (6) und der Carboxylgruppe (1).

2970m, 2950m : C-H stretch,

2130m: Absorption des axial an das Kobaltatom koordinierten Cyanids. Die Intensität dieser Bande ist etwas geringer als bei der part. synth. Probe-S.

1660s breit, 1610s, 1580s : Amid I und Amid II Banden sowie Bande für die Carboxylatgruppe, 1500s Chromophor.

1400-1382 breit m : Carboxylat, cm^{-1} .

Die Bandenauflösung in diesem Spektrum ist etwas geringer als jene der obigen part. synth. Probe-S.

IR
Abb. 99

1.0 mg auth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (Friedrichprobe,
nicht durch uns umkristallisiert.)

3420s, 3320s, 3300s, 3210s, 2970m, 2950m, 2130m (deutlich intensiver als in beiden obigen Proben : Co-CN, 1660s breit, 1615s, 1584s, 1560sh, 1502s, 1400m, 1385m cm^{-1}).

Dies ist im Vergleich zu allen aufgenommenen Spektren jenes mit der besten Bandenauflösung und mit der intensivsten Cyanid-absorptionsbande.

Kommentar:

(vgl. auch die Bemerkungen zu Beginn dieses IR-Kapitels und die früher gemachten Bemerkungen betreffend die IR-Spektren von Cobyrssäure unter 2. 5. 4.).

Die hier reproduzierten Spektren der part. synth. und auth. β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (a-Form) zeigen gute Uebereinstimmung und sind nur hinsichtlich der Bandenauflösung (bei der auth. Probe VF etwas schlechter gegenüber der part. synth. Probe S) schwach unterschiedlich. Zahl und Lage aller Absorptionsbanden dieser beiden Proben stimmen exakt überein. Es zeigte sich, dass die Kristallisation von Cobyrssäure aus Wasser/Aceton im Gegensatz zur Kristallisation aus 0.1 m Essigsäure/Aceton für die IR-Spektroskopie in KBr (Festkörperspektren) besser geeignete Kristallisate lieferte. Der Grund dafür ist wahrscheinlich in der Abwesenheit von Essigsäure bei der Kristallisation zu suchen. Essigsäure katalysiert vermutlich, eingebaut in das Kristallgitter, die Abspaltung von HCN in nicht reproduzierbarer und unkontrollierbarer Weise beim Trocknen der kristallinen Proben am HV. Um auch einen eventuellen Verlust von HCN beim Trocknen bei erhöhter Temperatur zu vermeiden (alle früheren Proben wurden über P_2O_5 bei 50-60°C getrocknet) wurden die obigen beiden Proben nur kurz bei RT ohne P_2O_5 am guten HV getrocknet. Wie sehr die Qualität eines IR-Spektrums von krist. Cobyrssäure in KBr von der Kristallisationsvorgeschichte abhängt, zeigt der Vergleich der IR-Spektren der Proben S und VF, sowie die IR-Spektren unter 2. 5. 4. mit dem IR-Spektrum der nicht von uns umkristallisierten Friedrich'schen Cobyrssäureprobe. (Abb. 99).

Gegenüberstellung der Bandenlagen und relat. Intensitäten der IR-Spektren der part. synth. Cobyrssäureprobe-S und auth. Cobyrssäureprobe VF.

<u>part. synth. Probe S</u>	
	3420s
	3320s
ca	3290s
	3200s
	2970m
	2550m
	2130m
ca	1665s
	1650s
ca	1620sh
	1610s
	1580s
ca	1560sh
	1500s
ca	1470sh
	1448w
	1430w
ca	1410sh
	1395m
	1385m
	1370sh
	1350sh
	1312w
	1305sh
	1288w
	1275w
	1235w
	1220w
ca	1210sh
	1200w
	1185w
	1165m
	1150m
ca	1135sh
	1112m
	1095sh
ca	1085sh
	1040w
	1012w
	990w
	975w
	945w
	880w
	800w cm ⁻¹

Abb. 97

<u>auth. Probe VF</u>	
	3420s
	3320s
ca	3300s
	3200s
	2970m
	2950m
	2130m
ca	1665s
	1650s
ca	1620sh
	1610s
	1580s
ca	1560sh
	1500s
ca	1470sh
	1448w
	1015w
ca	1410sh
ca	1400m
ca	1385m
	1370sh
	1350sh
	1312w
	1305sh
	1290w
	1275w
	1235w
	1220w
	1200w
	1185w
	1165m
	1150m
ca	1135sh
	1112m
ca	1095sh
ca	1085sh
	1042w
	990w
	978w
	945w
	880w
	800w cm ⁻¹

Abb. 98

UV/VIS-Spektren

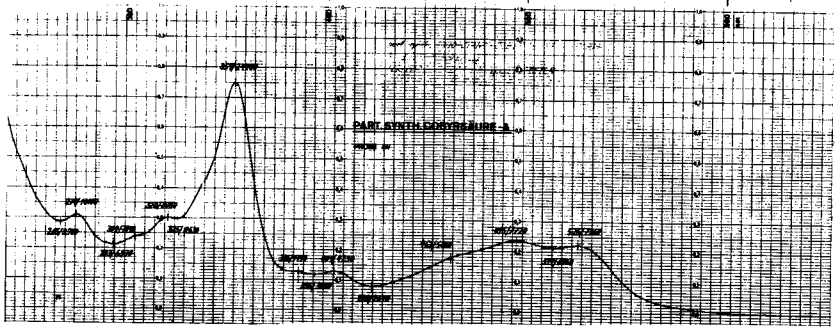


Abb. 86

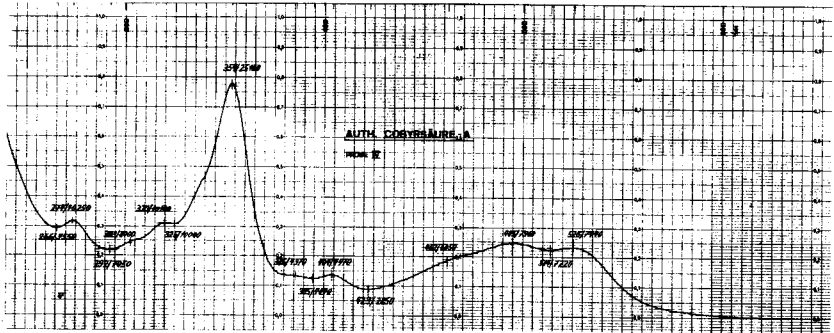


Abb. 87

UV/VIS-Spektren

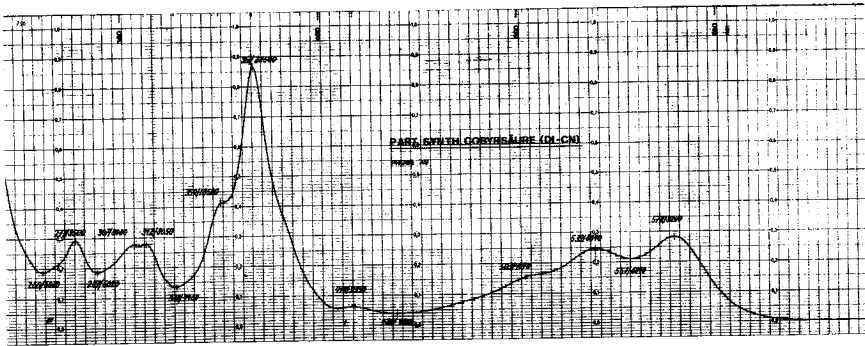


Abb. 88

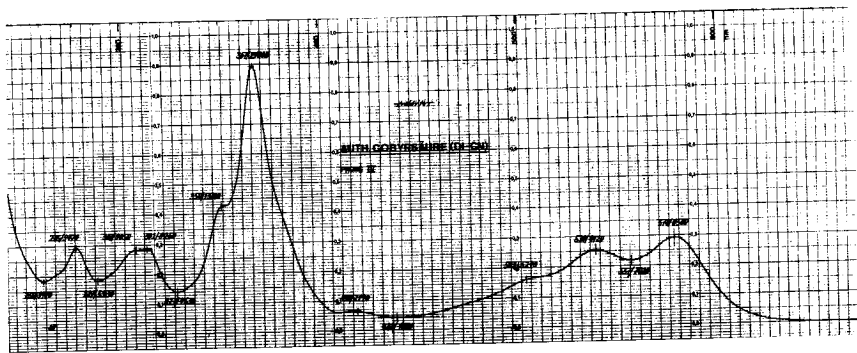


Abb. 89

CD-Spektren

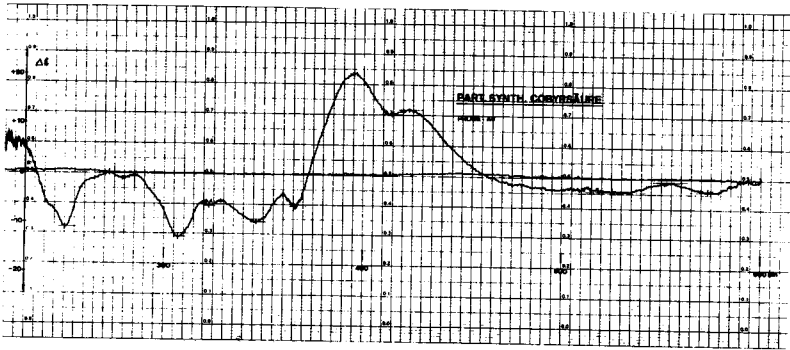


Abb. 90

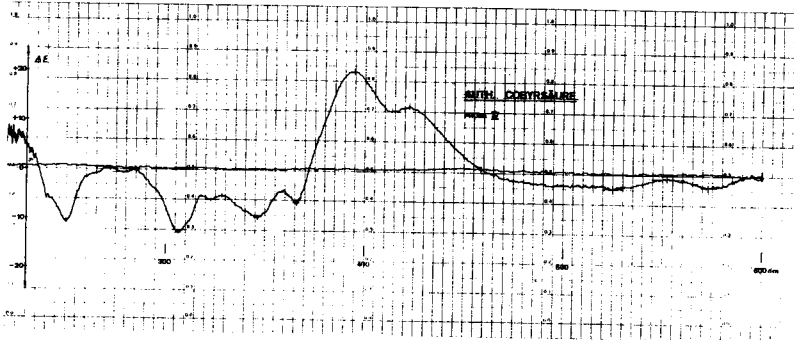


Abb. 91

NMR-Spektren

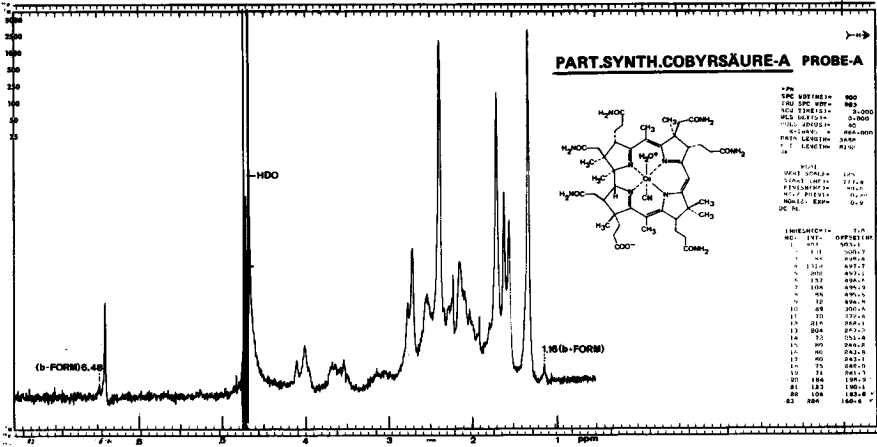


Abb. 92

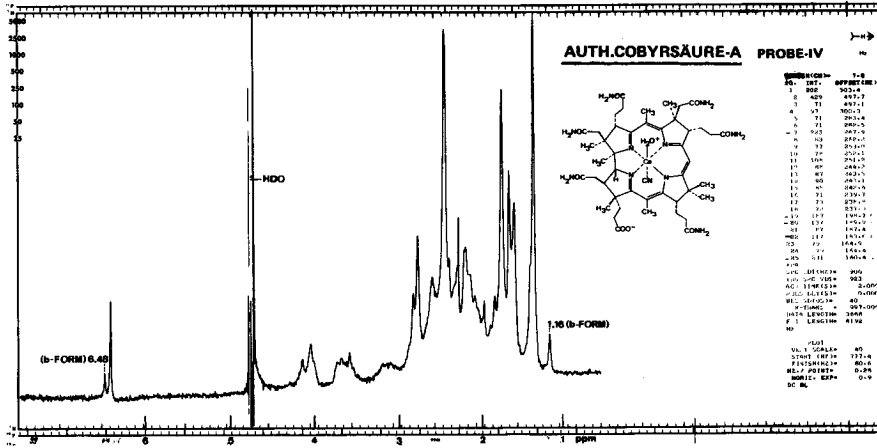


Abb. 93

NMR-Spektren

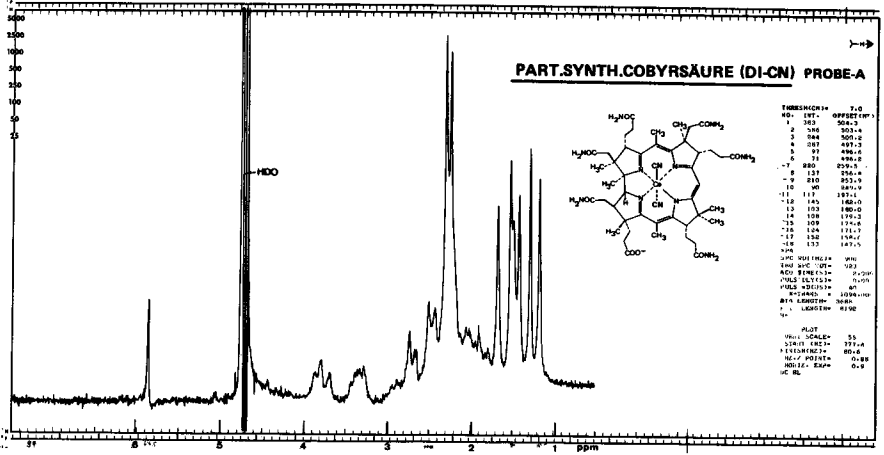


Abb. 94

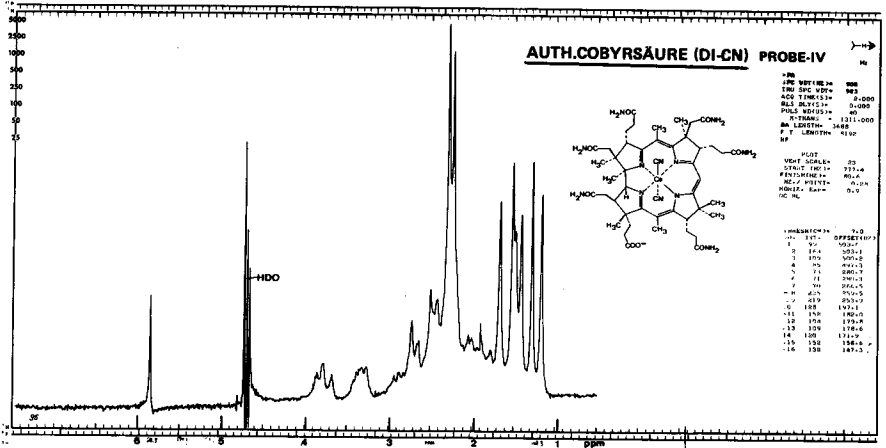


Abb. 95

IR-Spektren

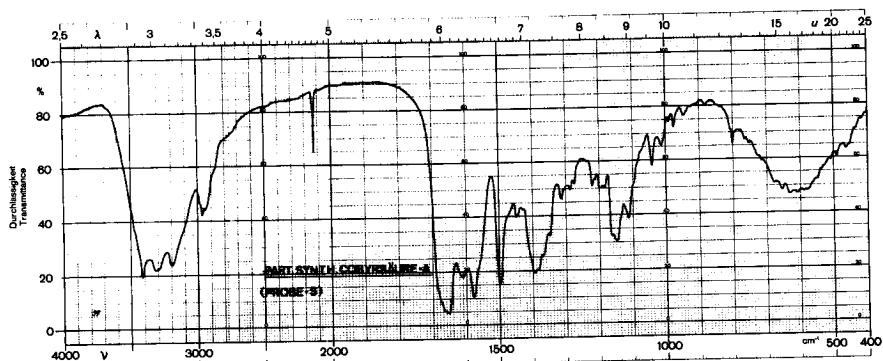


Abb. 97

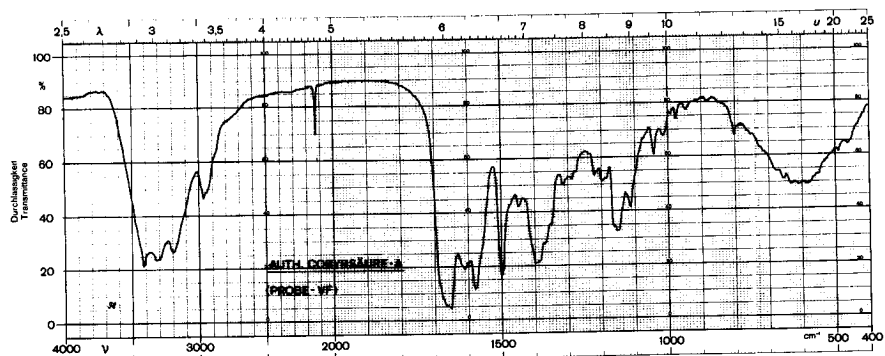


Abb. 98

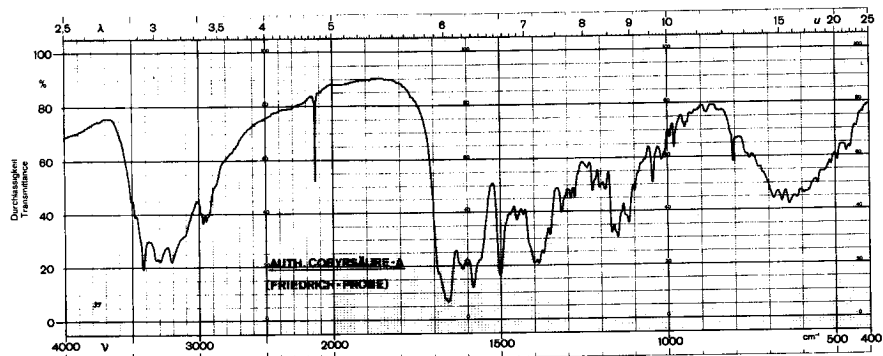


Abb. 99

Zusammenfassung

In einem ersten Teil wird ausgehend vom (+)-Keto-lactam-ester (1) die Synthese eines optisch aktiven Ring-D Vorläufers ((+)-Methyl-imin (12)) beschrieben. Dieses wird für den Corrinchromophoraufbau nach der photochemischen AD-Variante [13] benötigt.

In einem zweiten Teil wird die oxidative Lactonisierung des 5,15-bis-nor-Cobester-c-dimethylamid-f-nitrils (22) zum 5,15-bis-nor-Cobester-c-lacton-f-nitril (23), welches zum Schutz der C-10-Vinylposition bei der nachfolgenden Alkylierung [12] dient, beschrieben.

Der dritte und vierte Teil umfasst die partialsynthetische Ueberführung von f-Amid (24) in einer neuartigen "Amidhydrolyse" mit Hilfe von α -Chloraldonitronen zur f-Säure (27) und deren partialsynthetische Ueberführung in die β -Aquo- α -cyano-cobyrssäure (29-a). Dieses partialsynthetische Endprodukt in der Synthese des Vitamins B-12 wird mit aus Klärschlamm gewonnener auth. Aquo-cyano-cobyrssäure (29) [54, 55] sowohl in β -Aquo- α -cyano- (29-a, a-Form), als auch in der α -Aquo- β -cyano-Form (29-b, b-Form) identifiziert.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 274 (1967)
- [2] IUPAC-IUB, Biochemistry 13, 7, 1555 (1974)
- [3] L. Werthemann, Diss. ETH 1968
- [4] U. Locher, Diss. ETH 1964
- [5] J. Wild, Diss. ETH 1964
- [6] A. Wick, Diss. ETH 1964
- [7] R. Wiederkehr, Diss. ETH 1968
- [8] P. Dubs, Diss. ETH 1969
- [9] P. Löliger, Diss. ETH 1968
- [10] W. Huber, Diss. ETH 1969
- [11] P. Schneider, Diss. ETH 1972
- [12] H. Maag, Diss. ETH 1973
- [13] W. Fuhrer, Diss. ETH 1973
- [14] D. C. Hodgkin, J. Kamper, J. Lindsey, M. MacKey, J. Pickworth, J. H. Robertson, C. Brink-Shoemaker, J. G. White, R. J. Prosen und K. N. Trueblood, Proc. Roy. Soc. 242A, 228 (1957)
- [15] K. Venkatesan, D. Dale, D. C. Hodgkin, C. E. Nockolds, F. H. Moore, B. H. O'Connor, Proc. Roy. Soc. 323A, 455 (1971)
- [16] R. B. Woodward, Pure and Appl. Chem. 25, 283 (1971)
- [17] R. B. Woodward, Pure and Appl. Chem. 33, 145 (1973)
- [18] A. Eschenmoser, XXIII rd. IUPAC-Kongress, Vol 2, 69 (1971)
- [19] K. Bernhauer, H. Dellweg, W. Friedrich, G. Grosse, F. Wagner und P. Zeller Helv. 43, 693 (1960)
- [20] W. Fuhrer, Diplomarbeit 1969
- [21] Richard F. Borch, Tetrahedron Lett. 61 (1968)
Richard F. Borch, H. Dupont Durst, J. Amer. chem. Soc. 91, 3996 (1969)
- [22] P. Gygax, T. K. Das Gupta und A. Eschenmoser, Helv. 55, 2205 (1972)
- [23] K. R. Lindner, Diss. ETH in Vorbereitung
- [24] R. Bonnett, J. R. Cannon, V. M. Clark, A. W. Johnson, L. F. J. Parker, E. L. Smith and A. Todd, J. chem. Soc. 1158 (1957)
- [25] W. Simon, Helv. 41, 1835 (1958)
- [26] W. Simon und A. Thomlinson, Chimia 14, 301 (1960)
- [27] a) R. A. Firth, H. A. O. Hill, J. M. Pratt, R. J. P. Williams and W. R. Jackson, Biochemistry 6, 2178 (1967)
b) P. Day, Theoret. chim. Acta 7, 328 (1967)
P. O. D. Offenhartz, B. H. Offenhartz and M. M. Fung, J. Amer. chem. Soc. 92, 2966 (1970)
A. J. Thomson, J. Amer. chem. Soc. 91, 2780 (1969)

- [28] R. A. Firth, H. A. O. Hill, J. M. Pratt and R. G. Thorp, *J. chem. Soc. (A)* **453** (1968)
R. A. Firth, H. A. O. Hill, J. M. Pratt and R. G. Thorp, *Analytical Biochemistry* **23**, 429 (1968)
- [29] J. Schreiber, *Chimia* **25**, 405 (1971)
- [30] Privatmitteilung von J. Schreiber
- [31] J. J. Kirkland, *Modern Practice of liquid Chromatographie*, Wiley Interscience, 1971
- [32] H. J. Dauben Jr., Bjarte Løken and H. J. Ringold, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 1359 (1954)
- [33] H. Vorbrueggen, *Steroids* **1**, 45 (1963)
- [34] A. Marquet et al, *Bull. Soc. chim. France* **1822** (1961)
- [35] E. Vogel und H. Schinz, *Helv.* **33**, 116 (1950)
- [36] *Methoden der Org. Chemie*, Houben-Weyl, Sauerstoffverbindungen I, Teil 3, 154 (1965). Vgl. die dort angegebene Literatur.
- [37] T. Bogard, interner Arbeitsbericht ETH.
- [38] W. Bonner, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 6350 (1954)
J. Amer. chem. Soc. **78**, 4369 (1956)
- [39] K. Biemann, *Massspectrometry, organic chemical Applications*, Mac Graw Hill 223ff, (1967)
- [40] L. Ruzicka, M. Kobelt, O. Häfliger, V. Prelog, *Helv.* **32**, 544 (1949)
- [41] a) R. Bonnett et al, *Nature* **229**, 473 (1971)
b) R. Bonnett, J. M. Godfrey and V. B. Math, *J. chem. Soc (C)*, 3736 (1971)
- [42] K. Bernhauer, F. Wagner und D. Wahl, *Biochem. Z.* **334**, 279 (1961)
- [43] K. Bernhauer, H. Vogelmann und F. Wagner, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **349**, 1281 (1968)
- [44] W. Friedrich, *Z. Naturforsch.* **21b**, 595 (1966)
- [45] W. Friedrich, *Biochem. Z.* **342**, 143 (1965)
- [46] W. Friedrich, H. Ohlms, W. Sandeck und R. Bieganowski, *Z. Naturforsch.* **22b**, 839 (1967)
- [47] W. Friedrich und M. Moskophidis, *Z. Naturforsch.* **23b**, 804 (1968)
- [48] R. Bonnett, J. M. Godfrey and D. G. Redmann, *J. chem. Soc (C)* 1163 (1969)
- [49] W. Friedrich, H. Ohlms, W. Sandeck und R. Bieganowski, *Z. Naturforsch.* **22b**, 839 (1967)
- [50] R. Bonnett, J. M. Godfrey and V. B. Math, *J. chem. Soc. (C)*, 3736 (1971)
- [51] W. Friedrich, *Z. Naturforsch.* **21b**, 138 (1966)
- [52] D. Dodrell and A. Allerhand, *J. chem. Soc. (D) (Chem. Comm.)* 728 (1971)
- [53] V. Kopenhagen, Diss. TH Stuttgart (1967)
- [54] W. Friedrich und K. Bernhauer *Z. Naturforsch.* **9b**, 755 (1954)

- [55] K. Bernhauer, Hw. Dellweg, W. Friedrich, G. Gross, F. Wagner und P. Zeller, *Helv.* 43, 693 (1960)
- [56] W. Friedrich, G. Gross, K. Bernhauer und P. Zeller, *Helv.* 43, 704 (1960)
- [57] E. L. Smith, L. Mervyn, A. W. Johnson and N. Shaw, *Nature* 194, 1175 (1962)
K. Bernhauer, O. Müller und G. Müller, *Biochem. Z.* 336, 102 (1962)
- [58] W. Fuhrer, P. Schneider, W. Schilling, J. Schreiber, A. Eschenmoser, *Chimia* 26, 320 (1972)
- H. Maag, N. Obata, A. Holmes, P. Schneider, W. Schilling, J. Schreiber, A. Eschenmoser, *Chimia* 26, 320 (1972)

LEBENS LAUF

Am 8. März 1945 wurde ich in Zürich geboren. Dort besuchte ich die Primar- und Sekundarschule. 1960 trat ich in die Oberrealschule in Zürich ein, wo ich im Herbst 1964 die Maturitätsprüfung (Typus C) ablegte. Daran anschliessend begann ich ein von Militärdienst durchsetztes Chemiestudium an der Abteilung für Naturwissenschaften (Abt. X) der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich, welches ich im Frühjahr 1970 mit dem Diplom als Naturwissenschaftler abschloss. Anschliessend arbeitete ich am Organisch-chemischen Laboratorium der ETH unter Leitung von Prof. Dr. A. Eschenmoser an der vorliegenden Promotionsarbeit. Seit dem Herbst 1973 war ich ausserdem als Assistent tätig.

Zürich, im Juli 1974

Walter Schilling