

HANS PLIENINGER und HELGA IMMEL

## Die Darstellung von reinem $\gamma,\gamma$ -Dimethyl-allylpyrophosphat nach dem Verfahren von F. Cramer

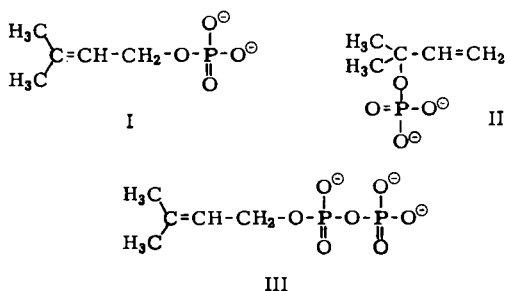
Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 4. August 1964)

Durch Chromatographie an Silicagel gelingt die Trennung des Reaktionsgemisches, das bei der Umsetzung von  $\gamma,\gamma$ -Dimethyl-allylalkohol mit Triäthylammoniumphosphat und Trichloracetonitril entsteht. Reines  $\gamma,\gamma$ -Dimethyl-allylpyrophosphat wird als Cyclohexylammonium- und als Ammoniumsalz isoliert. Nach dem Verfahren wird auch  $\gamma,\gamma$ -Di-[ $^{14}\text{C}$ -methyl]-allylpyrophosphat gewonnen.

Für enzymatische Untersuchungen auf dem Gebiete der Clavin-Alkaloide benötigten wir ein markiertes  $\gamma,\gamma$ -Dimethyl-allylpyrophosphat. Da die Durchführung der von F. LYNEN und H. EGGERER<sup>1)</sup> angegebenen Synthese umständlich und nicht immer erfolgreich ist, untersuchten wir die „Trichloracetonitril-Methode“ nach F. CRAMER<sup>2)</sup>.

Bei der Umsetzung des  $\gamma,\gamma$ -Dimethyl-allylalkohols mit Bis-triäthylammoniumphosphat und Trichloracetonitril in Acetonitril erhält man ein Gemisch aus anorganischen und organischen Mono- und Pyrophosphaten, die als Cyclohexylammoniumsalz gefällt werden<sup>\*)</sup>. Nach vergeblichen Versuchen an Ionenaustauschersäulen fanden wir, daß die Trennung an Silicagel in einem Gemisch n-Propanol/Ammoniak/Wasser möglich ist und papier- sowie dünnschichtchromatographisch<sup>3)</sup> verfolgt werden kann. Es wandern zuerst das  $\gamma,\gamma$ -Dimethyl-allylmonophosphat (I), danach eventuell durch Umlagerung entstandenes  $\alpha,\alpha$ -Dimethyl-allylmonophosphat (II), dann  $\gamma,\gamma$ -Dimethyl-allylpyrophosphat (III) und zuletzt wenig anorganische Phosphate.



\*) Herr Prof. F. CRAMER, mit dessen Einverständnis die vorliegende Arbeit ausgeführt wurde, sandte uns freundlicherweise die Diplomarbeit von S. HENNIG, Darmstadt 1962, in welcher die Abscheidung des  $\gamma,\gamma$ -Dimethyl-allylpyrophosphats als Benzylisothiuroniumsalz beschrieben ist. Wir konnten diesen Versuch nicht reproduzieren und konnten auch aus unseren reinen Dimethylallylpyrophosphatlösungen kein Benzylisothiuroniumsalz fällen.

1) Chem. Ber. **94**, 174 [1961].

2) F. CRAMER und W. BÖHM, Angew. Chem. **71**, 775 [1959]; F. CRAMER und G. WEIMANN, Chem. and Ind. **1960**, 46; F. CRAMER, W. RITTERSDORF und W. BÖHM, Liebigs Ann. Chem. **654**, 180 [1962].

3) Papierchromatographie s. auch Diplomarb. S. HENNIG, Darmstadt 1962.

Das besonders empfindliche  $\gamma$ - $\gamma$ -Dimethyl-allylpyrophosphat (III) isoliert man, indem man die entsprechenden Fraktionen im Rotationsverdampfer im Hochvakuum auf ein kleines Volumen eindampft, von etwas ausgefallener Kieselsäure filtriert und mit Aceton zur Kristallisation bringt. Je nach der Art des Eindampfens und der Güte des Vakuums im Verdampfer isoliert man hierbei entweder ein Bis-cyclohexylammonium-ammoniumsalz in Nadeln vom Schmp. 118–119° oder ein Triammoniumsalz in Plättchen vom Schmp. 107–109°. Offenbar verdrängt bei besonders gutem Vakuum das im Überschuß vorhandene Ammoniak das Cyclohexylamin. Das Ammoniumsalz kann man durch Zusatz von Cyclohexylamin in das Cyclohexylammoniumsalz verwandeln.

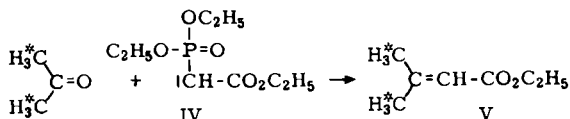
$\gamma$ - $\gamma$ -Dimethyl-allylmonophosphat (I) kann auf ähnliche Weise als Cyclohexylammoniumsalz vom Schmp. 170–173° isoliert werden.

Daß es sich bei den zuerst genannten Salzen um Pyrophosphate handelt, erkennt man auf den Chromatogrammen nach Besprühen mit „Isherwood-Hanes-Reagenz“<sup>(4)</sup> im UV-Licht an einer charakteristischen blauen Farbe, die sich von Monophosphaten unterscheidet<sup>1)</sup>. Außerdem stehen Isopentenylmonophosphat und Isopentenylpyrophosphat<sup>5)</sup> zum Vergleich der  $R_F$ -Werte der Dünnschichtchromatographie zur Verfügung ( $R_F$ -Werte s. Versuchsteil).

Der beste Beweis für das Vorliegen der gesuchten Verbindung III ist unseres Erachtens die gut stimmende Analyse des Triammoniumsalzes, das mit einem Mol. Wasser kristallisiert. Die Verbindung ist in Gegenwart von Lösungsmitteldämpfen sehr hygroskopisch, wird jedoch nach dem Trocknen beständiger und benetzt sich dann sogar schwer mit Wasser. Das IR-Spektrum ist wenig charakteristisch\*). Natriumcarbonatalkalische Kaliumpermanganatlösung wird augenblicklich entfärbt.

Die Ausbeute dieses Verfahrens liegt bei nur 2–3% d. Th., bezogen auf den Alkohol; dennoch ist es günstig, da man ein reines Produkt in kurzer Zeit gewinnen kann.

Anschließend haben wir aus methylmarkiertem Aceton durch eine modifizierte WITTIG-Synthese<sup>6)</sup> mit IV  $\beta$ , $\beta$ -Di-[<sup>14</sup>C-methyl]-acrylsäureester V dargestellt und diesen mit Lithiumaluminiumhydrid zu  $\gamma$ - $\gamma$ -Di-[<sup>14</sup>C-methyl]-allylalkohol reduziert. Schließlich wurde nach dem oben geschilderten Verfahren zum Pyrophosphat umgesetzt. (Spezif. Aktivität 1.81  $\mu$ C/mMol). Die Synthese gestattet die Einführung der Radioaktivität an jedem gewünschten Kohlenstoffatom.



\*<sup>1)</sup> *Ann. b. d. Korr.*: Das NMR-Spektrum in D<sub>2</sub>O zeigt, ebenso wie das des  $\gamma$ - $\gamma$ -Dimethyl-allylalkohols, die Signale der nicht äquivalenten Methylgruppen bei 8.25 und 8.30  $\tau$ , wogegen  $\alpha$ , $\alpha$ -Dimethyl-allylalkohol (Dimethylvinylcarbinol) ein scharfes Signal bei 8.70  $\tau$  aufweist. Ein enzymatischer Test, der im Max-Planck-Institut für Zellchemie in München ausgeführt wurde, ergab, daß das von uns gewonnene Bis-cyclohexylammonium-ammoniumsalz ebenso aktiv war wie ein nach LYNEN und EGGERER<sup>1)</sup> dargestelltes Präparat.

<sup>4)</sup> F. A. ISHERWOOD und C. S. HANES, *Nature* [London] **164**, 1107 [1949].

<sup>5)</sup> H. PLIENINGER, R. FISCHER, G. KEILICH und H. D. ORTH, *Liebigs Ann. Chem.* **642**, 214 [1961].

<sup>6)</sup> W. S. WADSWORTH und W. D. EMMONDS, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 1733 [1961].

Wir danken der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT und dem VERBAND DER CHEMISCHEN INDUSTRIE für Sachbeihilfen.

Herr Dr. J. KNAPPE hat uns durch wertvolle Ratschläge wesentlich geholfen; Herrn Dr. H. D. ORTH, Institut für Virusforschung, Heidelberg, danken wir für die Bestimmung der Radioaktivität unserer Präparate. Besonderen Dank schulden wir Herrn Prof. F. LYNEN und Herrn Dr. J. BERNDT für den enzymatischen Test.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

**Gaschromatographie:** Alle Untersuchungen wurden mit den Perkin-Elmer-Apparaten Modell 116 oder F6/4F vorgenommen.

Prenolacetat:	2 m R-Säule 130°	Retentionszeit: 10.9 (wenig 13.4)
$\gamma$ - $\gamma$ -Dimethyl-allylalkohol:	2 m R-Säule 130°	Retentionszeit: 9.5 (wenig 13.4)
$\beta$ - $\beta$ -Dimethyl-acrylsäure-äthylester:	2 m O-Säule 160°	Retentionszeit: 8.2
Phosphonoessigsäure-triäthylester (IV):	1 m Q-Säule 180°	Retentionszeit: 9.0

**Papierchromatographie:** Papier Schleicher & Schüll 2043 b. Laufmittel: n-Propanol/NH<sub>3</sub>/1-proz. wäßr. Komplexonlösung (6:3:1) absteigend. Laufzeit 15–18 Stdn.; die einzelnen Substanzen wurden als Striche von etwa 2 cm Länge aufgetragen.

**Dünnschichtchromatographie:** Schicht Kieselgel H (Merck, Darmstadt) ohne Bindemittel. Laufmittel wie oben. Laufzeit 2 Stdn. für 9–11 cm aufsteigend.

	$R_F$ -Werte	
	-monophosphat	-pyrophosphat
$\alpha$ - $\alpha$ -Dimethyl-allyl-	0.34	0.14 (Zers.)
Isopentenyl-	0.38	0.17
$\gamma$ - $\gamma$ -Dimethyl-allyl-	0.43	0.18

**Verseifung von Prenolacetat<sup>\*)</sup> ( $\gamma$ - $\gamma$ -Dimethyl-allylacetat):** Da die von T. LENNARTZ<sup>7)</sup> beschriebene Methode zu unbefriedigenden Ergebnissen führte, arbeiteten wir folgendermaßen: In einem Dreihalskolben werden 100 g Prenolacetat in 20 ccm Äthylenglykol und 54 g Kaliumcarbonat in möglichst wenig Wasser unter Rühren 48 Stdn. auf 140° erhitzt. Sobald der Geruch nach Prenolacetat verschwunden ist, wird eine Probe im IR-Spektrum auf die Abwesenheit der C=O-Bande bei 1730/cm untersucht. Nachdem die Reaktion beendet ist, wird mehrmals mit Äther extrahiert. Nach dem Verdampfen des Äthers destilliert man langsam über eine kleine Kolonne. Sdp. 135–142°, 61 g (90%),  $n_D^{20}$  1.4432.

**Phosphorylierung<sup>8)</sup>:** Das hierfür benötigte Trichloracetonitril<sup>9)</sup> wird aus Trichloracetamid durch Erhitzen mit POCl<sub>3</sub> gewonnen. Das Rohprodukt wird vor Gebrauch mehrmals über eine Kolonne destilliert.

Eine Lösung von 1.13 g (20 mMol) 85-proz. Phosphorsäure in 10 ccm Acetonitril schüttelt man kräftig mit 2.0 g (20 mMol) Triäthylamin, bis sich das Salz löst; notfalls gibt man wenige Tropfen Wasser zu. Diese Lösung tropft man bei 20° im Laufe von 3 Stdn. zu einer kräftig gerührten Mischung aus 1.75 g (20 mMol)  $\gamma$ - $\gamma$ -Dimethyl-allylalkohol und 4.33 g (30 mMol)

<sup>\*)</sup> Der BADISCHEN ANILIN- & SODA-FABRIK sei für die Überlassung von Prenolacetat gedankt.  
<sup>7)</sup> Ber. dtsh. chem. Ges. 76, 831 [1943].

<sup>8)</sup> W. RITTERSDORF, Dissertat. Techn. Hochschule Darmstadt 1962 (etwas abgeändert).

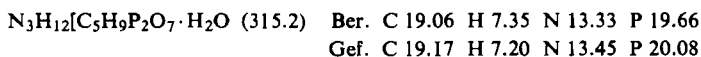
<sup>9)</sup> L. SPIEGEL und P. SPIEGEL, Ber. dtsh. chem. Ges. 40, 1730 [1907]; A. CLERMONT, C. R. hebdomadaire Acad. Sci. 133, 737 [1901]; J. v. BRAUN und W. RUDOLPH, Ber. dtsh. chem. Ges. 67, 1762 [1934].

*Trichloracetoneitril*, wobei sie sich zuerst gelb, später braunrot färbt. Nach Rühren über Nacht wird mit Aceton auf 100 ccm verdünnt und mit 7.5 ccm *Cyclohexylamin* versetzt, wobei sofort ein Niederschlag ausfällt, der sich im Kühlschrank noch vermehrt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Aceton und Äther gewaschen, wobei er fast farblos wird. Ausb. (nach dem Trocknen) 1.7–2 g.

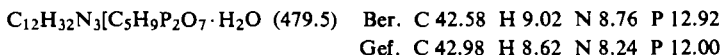
*Säulenchromatographie*: 500 g Kieselgel (E. Merck, 0.05–0.2 mm für die Chromatographie) wurden mit 1 l *n*-Propanol/Ammoniak/Wasser (6:3:1) verrührt und auf Filterpapier an der Luft etwas getrocknet. Völlige Trocknung ist zu vermeiden. Die 90 × 4.8 cm-Säule wird in der üblichen Weise naß gefüllt und spätestens am nächsten Tag verwendet.

1.7–2 g des Phosphatgemisches werden 3 mal mit je 50 ccm des Eluierungsmittels aufgeschlämmt, wobei anorganische Phosphate teilweise ungelöst bleiben. Man dekantiert die schwach gelbe Lösung direkt auf die Säule und chromatographiert unter möglichst konstantem Volumen im Vorratsgefäß.

Nach einer gelben Front erscheint im Eluat zuerst das  $\gamma$ - $\gamma$ -Dimethyl-allylmonophosphat, erkenntlich an der Trübung, die beim Vermischen mit Aceton auftritt. Jetzt fängt man etwa einen Liter in 50-ccm-Fractionen auf (6–7 Std.), danach wird nur noch anorganisches Phosphat eluiert. Die nach dem Dünnenschichtchromatogramm III enthaltenden Fractionen dampft man in einem Rotationsverdampfer bei 0.05–1 Torr auf etwa 10 ccm ein. Den als Vorlage dienenden Zueihalskolben kühlt man mit CO<sub>2</sub>/Methanol, wobei der eine Hals an die Pumpe angeschlossen wird. Die von etwas ausgeschiedenem Kieselgel filtrierte Lösung versetzt man mit 300 ccm Aceton. Nach längerem Stehenlassen im Kühlschrank haben sich farblose Plättchen abgeschieden, die möglichst schnell abgesaugt werden, da sie bei Anwesenheit von Lösungsmitteldämpfen hygroskopisch sind. Nach Waschen mit Äther und Trocknen sind die Kristalle an der Luft beständig. Ausb. 60 mg (2.2 %, bez. auf Dimethylallylalkohol). Schmp. 107–109° (Monoskop).



Versetzt man die Lösung vor der Zugabe des Acetons mit *Cyclohexylamin* oder dampft man im Rotationsverdampfer mit etwas schlechterem Vakuum ein, so erhält man nach dem Zusatz von Aceton das in weichen Nadeln kristallisierende *Bis-cyclohexylammonium-ammoniumsalz* vom Schmp. 118–119°.



Kleine Mengen an SiO<sub>2</sub> lassen sich von den Pyrophosphaten nur schwer abtrennen, wodurch die Analysenwerte oftmals nicht gut werden.

$\beta$ -*Di-[<sup>14</sup>C-methyl]-acrylsäure-äthylester* (V): Durch Arbusow-Reaktion wird nach B. ACKERMAN<sup>10)</sup> *Phosphonoessigsäure-triäthylester* (IV) hergestellt. Nach Vakuumdestillation ist er gaschromatographisch rein.  $n_D^{25}$  1.4286.

Zu 6 g einer 20-proz. Suspension von NaH in Paraffinöl und 100 ccm absol. Äthylenglykoldimethyläther gibt man unter Rühren bei 20° 11.5 g des *Esters IV*. Nach einer Stde. ist die Wasserstoffentwicklung beendet, und man versetzt mit 3 g 1.3-[<sup>14</sup>C]Aceton (1.95  $\mu$ C/mMol). Wichtig ist, daß die Temperatur bei 30–35° gehalten wird. Man läßt 1 Stde. bei 30° rühren und gießt in 200 ccm Wasser, das man mit NH<sub>4</sub>Cl auf pH 7 bringt. Nun extrahiert man den Ester 4 mal mit je 100 ccm Äther, trocknet diesen und dampft vorsichtig ab. Das zurückbleibende Öl wird i. Vak. destilliert. Sdp.<sub>40</sub> 60–61°. Ausb. 3.78 g (64%).

<sup>10)</sup> B. ACKERMAN, R. M. CHILADEK und D. SWERN, J. Amer. chem. Soc. 79, 6524 [1957].

Nach unseren Erfahrungen mit dem unmarkierten Ester ist die Verbindung für die weitere Umsetzung genügend rein.

$\gamma,\gamma$ -Di-[ $^{14}\text{C}$ -methyl]-allylalkohol\*): 3.7 g (29 mMol) des Esters V werden in 100 ccm über  $\text{LiAlH}_4$  dest. Äther bei  $17-19^\circ$  unter kräftigem Rühren in kleinen Anteilen mit 1.2 g (31.5 mMol)  $\text{LiAlH}_4$  versetzt. Nun läßt man 1–2 Std. bei  $20^\circ$  rühren, wobei sich Wasserstoff entwickelt. Jetzt wird bei  $-10^\circ$  vorsichtig tropfenweise mit 2 n HCl zersetzt, wobei die Innentemperatur möglichst auf  $-10^\circ$  konstant bleiben soll, da man sonst auch umgelagerten Alkohol findet. Sobald keine Wärme mehr entwickelt wird, setzt man vorsichtig Wasser zu. Schließlich gibt man 50 ccm mit NaCl gesättigtes Wasser zu, puffert auf pH 7–8 und trennt die Ätherschicht ab. Die wäßr. Phase extrahiert man noch 3 mal mit je 100 ccm Äther. Nach dem Trocknen und vorsichtigen Verdampfen der vereinigten Ätherfraktionen destilliert man den Dimethylallylalkohol unter Normaldruck. Sdp.  $135-140^\circ$ . Ein geringer Vorlauf und Nachlauf wird verworfen. Ausb. 1.2 g (48% d. Th.).

Der radioaktive Alkohol wird, wie oben beschrieben, phosphoryliert, wobei man 148 mg des markierten Dimethylallylpyrophosphats als Bis-cyclohexylammonium-ammoniumsalz isoliert. Schmp.  $118-121^\circ$ . Die Verbindung ist im Papier- und Dünnschichtchromatogramm einheitlich. Spezif. Aktivität  $1.81 \mu\text{C}/\text{mMol}$  bzw.  $3.5 \cdot 10^6 \text{ cpm}/\text{mMol}$ .

Die Messungen wurden mit einem Packard Tricarb-Liquid-Scintillation Spectrometer ausgeführt.

\*) Die Reduktion wurde an der nichtmarkierten Verbindung eingehend studiert. Sie führt nach der angegebenen Vorschrift zu einem ziemlich reinen  $\gamma,\gamma$ -Dimethyl-allylalkohol.