

68. Versuche zur Synthese von β -Biotin. (Vitamin H.)

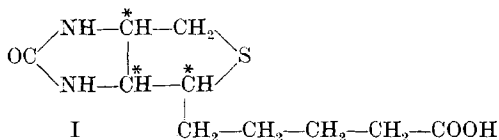
2. Mitteilung.

Synthese von *d,l*-2-(ω -Carboxybutyl)-3,4-(2'-oxo-tetrahydro-imidazol)-thiophanen (*d,l*- ψ - β -Biotin, *d,l*-iso- β -Biotin und *d,l*- β -Biotin)

von A. Grüssner, J.-P. Bourquin und O. Schnider.

(24. III. 45.)

In einer vorläufigen Mitteilung erwähnen *Harris* und Mitarbeiter¹⁾, dass ihnen unter Voraussetzung der von *du Vigneaud*²⁾ für das β -Biotin aufgestellten Formel I (vgl. 1. Mitteilung³⁾)



die Synthese einer optisch aktiven Verbindung gelungen sei, welche sich als mit dem natürlichen β -Biotin identisch erwiesen habe. Sie geben an, dass von den 4 Racemverbindungen, welche infolge der mit Sternchen bezeichneten 3 asymmetrischen C-Atome denkbar sind, 2 in Wegfall kommen, weil nach den Literaturangaben⁴⁾⁵⁾ und nach Versuchen am mechanischen Modell zwei o-kondensierte 5-Ringe nur dann existenzfähig sind, wenn die beiden planaren Ringe in cis-Stellung zueinander stehen. Die synthetisierte, mit dem natürlichen Biotin identische Verbindung würde demgemäss einer der 4 optischen Antipoden sein, welche in den beiden möglichen Racemverbindungen enthalten sind. Die Angaben über den Gang der Synthese werden jedoch von den amerikanischen Autoren¹⁾ für später in Aussicht gestellt⁶⁾, da

“the details of procuring best yields of desired intermediates, methods of resolution and other stereochemical problems, etc., are not completely worked out to our satisfaction for a detailed publication as a journal article”.

Im Gegensatz zu den Erwartungen von *Harris* (l. c.) konnten wir nun 3 racemische Modifikationen des 2-(ω -Carboxybutyl)-3,4-(2'-oxo-tetrahydro-imidazol)-thiophans I darstellen, nämlich das *d,l*- β -Biotin

¹⁾ *S. A. Harris, D. E. Wolf, R. Mazingo und K. Folkers, Sci.* **97**, 447 (1943).

²⁾ *D. B. Melville, A. W. Meyer, K. Hofmann, V. du Vigneaud, J. Biol. Chem.* **146**, 487 (1943).

³⁾ 1. Mitteilung *Helv.* **28**, 510 (1945).

⁴⁾ *Linstead und Meade, Soc.* **1934**, 935; *Cook und Linstead, ibid* **1934**, 946, 956.

⁵⁾ *Grigsby, Hind, Chanley und Westheimer, Am. Soc.* **64**, 2606 (1942).

⁶⁾ Anmerkung bei der Korrektur: Inzwischen ist uns die auf anderem Wege durchgeführte Synthese des Biotins von *Harris* und Mitarbeitern durch eine Zusammenfassung in der *Nature* **155**, 309 (1945) bekannt geworden.

Ic und 2 isomere Verbindungen Ia und Ib, die wir als *d,l-ψ-β*-Biotin und *d,l-iso-β*-Biotin bezeichnet haben. Die Schmelzpunkte sind in nachstehender Tabelle zusammengestellt. Die Mischprobe zwischen dem synthetischen *d,l-β*-Biotin und dem natürlichen optisch aktiven *β*-Biotin¹⁾ gibt eine Schmelzpunktserniedrigung von 12°.

Tabelle.
Vergleich der 3 stereoisomeren *d,l-β*-Biotine.

Substanz	Smp. der freien Säure	Smp. des Methylesters	Biologische Aktivität
1. <i>β</i> -Biotin (Naturprod.)	235—236 ^{0 2)}	166—167 ^{0 3)}	aktiv
2. <i>d,l-β</i> -Biotin	234—235 ⁰	130—132 ⁰	aktiv
3. <i>d,l-ψ-β</i> -Biotin	222 ⁰	149 ⁰	inaktiv
4. <i>d,l-iso-β</i> -Biotin	182—183 ⁰	166—167 ⁰	inaktiv

Diese 3 Antipodenpaare wurden einwandfrei als verschieden identifiziert. Sowohl die freien Säuren wie auch die Methylester geben bei der Bestimmung der Mischschmelzpunkte untereinander starke Schmelzpunktserniedrigungen. Dementsprechend müssen ein, bzw. zwei Racemate in der *cis*-Form und zwei, bzw. ein Racemat in der *trans*-Form vorliegen. Da jedoch die 3 Racemate unter ziemlich mild verlaufenden Reaktionsbedingungen nebeneinander entstehen, ist das Vorhandensein einer grossen Spannung der *trans*-Modifikation kaum wahrscheinlich.

Um das stereochemische Problem weiter abzuklären, werden die 4 möglichen racemischen *β*-Biotine durch die schematischen Formeln A bis D wiederzugeben versucht. In den Schemata A und B stehen beide Ringe in *cis*-Stellung zueinander. Die Seitenkette ist das eine Mal oberhalb (A), das andere Mal unterhalb (B) der Ebene des Schwefelringes gezeichnet. Dasselbe gilt für die beiden *trans*-Formen C und D. Wird der Schwefelring durch Eliminierung des Schwefels geöffnet, so reduzieren sich infolge Wegfalles eines Asymmetriezentrums die möglichen Modifikationen auf die beiden racemischen Imidazolidon-Verbindungen E und F (Desthiobiotine).

Es gelang *du Vigneaud*⁴⁾, aus dem natürlichen optisch aktiven *β*-Biotin-methylester durch Abspaltung des Schwefels den optisch aktiven Desthiobiotin-methylester vom Smp. 69—70° darzustellen.

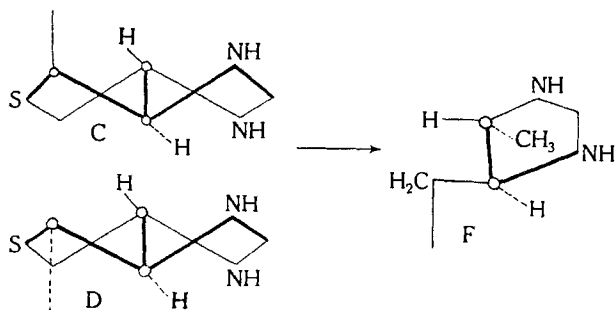
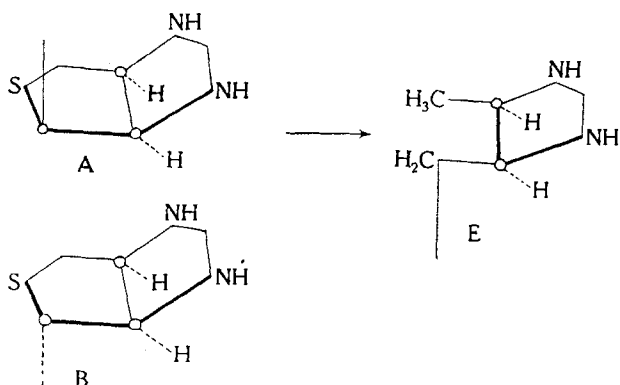
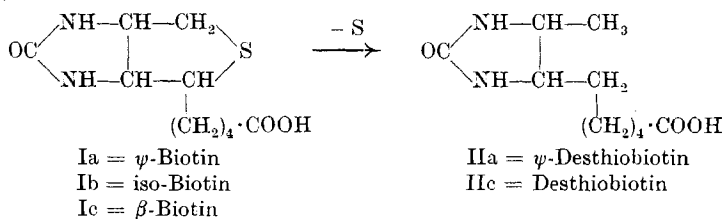
¹⁾ Das optisch aktive Vergleichspräparat verdanken wir Herrn Prof. Dr. T. Reichstein, Basel.

²⁾ Das optisch aktive Vergleichspräparat verdanken wir Herrn Prof. Dr. T. Reichstein, Basel.

³⁾ V. du Vigneaud, K. Hofmann, D. B. Melville und P. György, J. Biol. Chem. **140**, 643 und 763 (1941).

⁴⁾ V. du Vigneaud, D. B. Melville, K. Folkers, D. E. Wolf, R. Mozingo und J. C. Keresztesy mit S. A. Harris, J. Biol. Chem. **146**, 475 (1943).

Dieses Desthiobiotin ist biologisch aktiv auf *Saccharomyces cerevisiae*¹⁾.



Wir konnten nach *du Vigneaud*²⁾ aus dem *d,l-ψ*-Biotin Ia ein *d,l*-Desthiobiotin vom Smp. 148—149° erhalten und bezeichnen es als *d,l-ψ*-Desthiobiotin IIa. Dieses *d,l-ψ*-Desthiobiotin ist auf *Saccharomyces cerevisiae* biologisch unwirksam.

Andererseits wurde von uns ein synthetisches *d,l*-Desthiobiotin IIc vom Smp. 141—142° dargestellt³⁾, welches die von *du Vigneaud*

¹⁾ *V. du Vigneaud, K. Dittmer, D. B. Melville, Sci. 99, 203 (1944).*

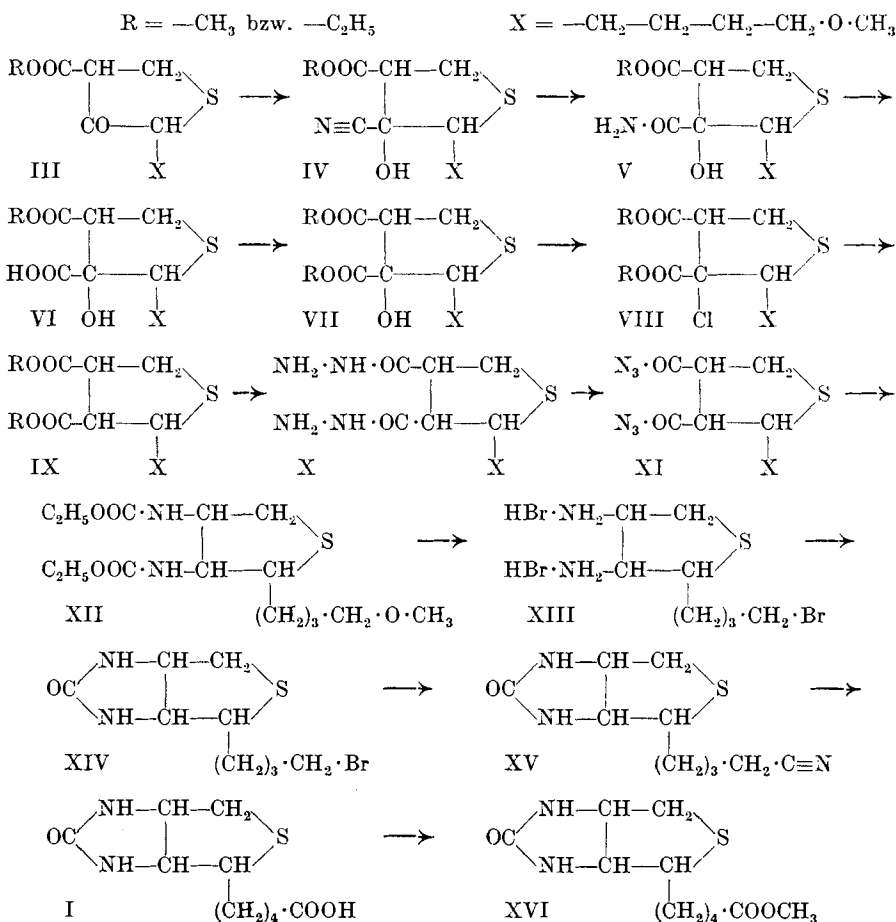
²⁾ *D. B. Melville, K. Dittmer, G. B. Brown und V. du Vigneaud, Sci. 98, 497 (1943).*

³⁾ Über die Synthese des biologisch aktiven *d,l*-Desthiobiotins siehe nächste Mitteilung.

angegebene biologische Aktivität besitzt. Die Mischung des *d,l*- ψ -Desthiobiotins und des *d,l*-Desthiobiotins zeigte eine starke Schmelzpunktserniedrigung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es uns gelungen ist, 3 der 4 möglichen racemischen β -Biotine darzustellen. Es kann mit Sicherheit gesagt werden, dass im β -Biotin und im ψ - β -Biotin je ein Vertreter der möglichen racemischen *cis*- bzw. *trans*-bicyclischen Modifikationen vorliegt. Die Zugehörigkeit des *iso*- β -Biotins, des dritten der 4 möglichen stereoisomeren Racemate, konnte wegen Materialmangel noch nicht abgeklärt werden.

Die Synthese verläuft, ausgehend von dem von *H. Schmid*¹⁾ beschriebenen 2-(ω -Methoxybutyl)-3-oxo-thiophan-4-carbonsäure-ester III über folgende Stufen:

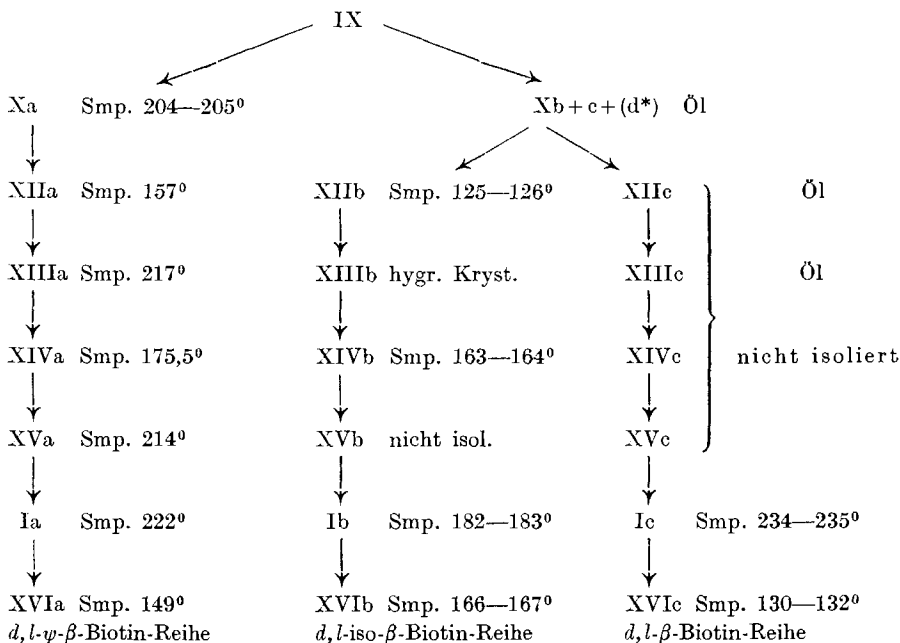


¹⁾ *H. Schmid*, *Helv.* **27**, 128 (1944).

Der Thiophanon-carbonsäure-ester III wurde mit Kaliumcyanid und Salzsäure in das krystallisierte Cyanhydrin IV übergeführt. Dieses konnte durch Kochen mit verdünnter Salzsäure über das Säureamid V zur Carbonsäure VI verseift und zum Oxy-dicarbonsäure-diester VII verestert werden. Die Zwischenstufen V und VI wurden als krystallisierte Verbindungen isoliert. Die Oxygruppe von VII wurde mit Hilfe von Thionylchlorid in Pyridin durch Chlor ersetzt und das Chlor der so erhaltenen Verbindung VIII mit Zinkstaub in Essigsäure in Gegenwart von Natriumjodid wegreduziert.

Die ganze Synthese vom Thiophanon-carbonsäureester III bis zum Dicarbonsäure-diester IX wurde sowohl mit dem Methylester als auch mit dem Äthylester durchgeführt. Der Dicarbonsäure-diester IX wurde mit Hydrazinhydrat in das Dihydrazid X umgewandelt.

Die folgende Tabelle bringt eine Zusammenstellung der Synthese mit den Schmelzpunkten der Vertreter der stereoisomeren Reihen. In der a-Reihe resultiert als Endprodukt das *d, l-ψ-β*-Biotin Ia, in der b-Reihe das *d, l-iso-β*-Biotin Ib und in der c-Reihe das *d, l-β*-Biotin Ic. Die vierte mögliche Modifikation (d) konnte bisher noch nicht isoliert werden.



*) Die 4. Modifikation (d) konnte bisher nicht isoliert werden.

a-Reihe. Synthese von *d, l-ψ-β*-Biotin Ia. Das aus dem Dicarbonsäure-ester IX erhaltene Dihydrazid Xa gab nach dem Curtius'schen Abbau über das Diazid XI das Diurethan XIIa,

welches mit Bromwasserstoffsäure in das Diamino-dihydrobromid XIIIa übergeführt wurde, wobei die Methoxygruppe in der Seitenkette gleichzeitig durch Brom ersetzt wird. Nach dem Ringschluss mit Phosgen konnte der Bicyclus XIVa erhalten werden, aus welchem durch Kochen mit Kaliumcyanid in Alkohol das Nitril XVa gewonnen wurde. Nach alkalischer Verseifung und Ansäuern erhielten wir das *d, l- ψ - β* -Biotin Ia, welches mit Diazomethan in den Methylester XVIa übergeführt wurde. Sowohl die freie Säure als auch der Methylester waren auf *Saccharomyces cerevisiae* unwirksam.

b-Reihe. Synthese von *d, l*-iso- β -Biotin Ib. Nach der Abscheidung des krystallisierten Dihydrazids Xa wurde die ölige Mutterlauge Xb, c, d, auf die gleiche Weise wie in der a-Reihe in das Diurethan XIIb, c, d übergeführt. Durch chromatographische Trennung des öligen Diurethangemisches wurde das krystallisierte Diurethan XIIb isoliert. Nach Behandeln mit Bromwasserstoffsäure wurde eine hygroskopische, krystallisierte Masse XIIIb erhalten, welche nach Ringschluss mit Phosgen den Bicyclus XIVb gab. Die krystallisierte Verbindung wurde mit Kaliumcyanid in das Nitril XVb übergeführt, auf dessen Isolierung verzichtet wurde, und gab nach Verseifung mit Alkali das *d, l*-iso- β -Biotin Ib. Den Methylester XVIb erhielten wir durch Veresterung mit Diazomethan. Im biologischen Test auf *Saccharomyces cerevisiae* war die Iso-Verbindung unwirksam.

c-Reihe. Synthese von *d, l*- β -Biotin Ic. Nach der chromatographischen Abtrennung des Diurethans XIIb (Benzoleluat) wurde das mit Chloroform erhaltene Eluat ohne Isolierung der Zwischenstufen denselben Reaktionen unterworfen, wie dies in der a- bzw. b-Reihe der Fall war. Das Verseifungsprodukt, welches das *d, l*- β -Biotin Ic enthielt, wurde mit Diazomethan verestert und der Methylester XVIIc durch chromatographische Reinigung isoliert. Aus dem reinen Methylester wurde durch Verseifung das krystallisierte *d, l*- β -Biotin Ic erhalten, welches sowohl auf *Saccharomyces cerevisiae* wie auf *Lactobacillus casei* die erwartete Biotinwirkung zeigte.

Die Auswertungen wurden in unserer mikrobiologischen Abteilung (Dr. M. Walter und Fräulein I. Weiss) ausgeführt und von Herrn Prof. Dr. Schopfer, Bern bestätigt. Wir danken ihm auch an dieser Stelle für seine Bemühungen.

Bei der Bereitstellung der vielen Ausgangsmaterialien und Zwischenprodukte haben die Herren Dr. Axelrod, Dr. Rey-Bellet, Dr. Roniger und Dr. Urban tatkräftig mitgewirkt.

Experimenteller Teil.

2-(ω -Methoxybutyl)-3-oxy-3-cyan-thiophan-4-carbonsäure-äthylester IV.

Zu einer Lösung von 193 g Thiophanon-carbonsäure-ester III¹⁾ in 400 cm³ Äther wurden 59,5 g pulverisiertes Kaliumcyanid gegeben. Unter Rühren und Eiskühlung wurden 78,8 cm³ konz. Salzsäure innerhalb von 8 Stunden zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht in Eiswasser stehen gelassen und das auskrystallisierte Cyanhydrin

¹⁾ H. Schmid, Helv. 27, 128 (1944).

mit Kaliumchlorid von der Ätherlösung durch Absaugen getrennt. Das Cyanhydrin wurde vom Kaliumchlorid durch Auflösen in Chloroform getrennt, die Chloroformlösung mit Natriumsulfat getrocknet und nach Filtration im Vakuum bei 30° Badtemperatur zur Trockne gebracht. Als Rückstand wurden 123 g vom Smp. 88° korr. gewogen. Aus der Ätherlösung krystallisieren nach Eindampfen noch 11 g Cyanhydrin aus. Die Ausbeute beträgt somit 134 g = 63,2%. Der ölige Rückstand, 87 g, wurde wiederum mit der entsprechenden Menge Kaliumcyanid wie oben angesetzt und ergab nochmals 35 g reines Cyanhydrin. Bei wiederholtem Einsetzen des öligen Rückstandes kann die Ausbeute praktisch die theoretisch berechnete erreichen. Nach Umkrystallisieren aus Benzol-Petroläther ergab die Analyse folgende Werte:

$C_{13}H_{21}O_4NS$	Ber. C 54,30	H 7,35%
	Gef. ,, 54,52	,, 7,25%

Methylester: Smp. 81,5—83,5° korr.

$C_{12}H_{19}O_4NS$	Ber. C 52,72	H 7,00	N 5,12%
	Gef. ,, 52,68	,, 7,07	,, 5,14%

2-(ω -Methoxybutyl)-3-oxy-thiophan-3,4-dicarbon säure-diäthylester VII.

145 g Cyanhydrin IV wurden in einem Gemisch von 300 cm³ konz. Salzsäure, 150 cm³ Wasser und 550 cm³ Alkohol 48 Stunden am Rückfluss gekocht. Die Reaktionslösung wurde bei 50° Badtemperatur im Vakuum eingedampft und durch abermaliges Abdampfen mit absolutem Alkohol getrocknet. Nach Auflösen des Rückstandes in absolutem Alkohol konnten durch Filtrieren 21,2 g Ammoniumchlorid = 79,8% abgetrennt werden. Die alkoholische Lösung wurde mit absolutem Alkohol auf 1000 cm³ aufgefüllt und unter Eiskühlung mit trockenem Salzsäuregas gesättigt. Nach 24-stündigem Stehen wurde der Alkohol im Vakuum abgedampft und der Rückstand darauf nochmals mit Hilfe von Alkohol und Salzsäure verestert. Nach Einengen der alkoholischen Lösung wurde der Rückstand in Benzol aufgenommen und mit Wasser und Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die Benzollösung wurde mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde im Hochvakuum destilliert und ergab 96,6 g Oxyester VII vom Sdp._{0,07 mm} 145—147°. Ausbeute: 57,3%.

$C_{15}H_{26}O_6S$	Ber. C 53,87	H 7,83	S 9,58%
	Gef. ,, 53,75	7,89	,, 9,53%

Dimethylester: Sdp._{0,09 mm} 146—149°.

$C_{13}H_{22}O_6S$	Ber. C 50,96	H 7,23	—OCH ₃ 30,38%
	Gef. ,, 51,16	,, 7,38	,, 29,73%

Aus dem Destillationsrückstand wurde eine krystallisierte Verbindung isoliert, welche sich als 2-(ω -Methoxybutyl)-3-oxy-thiophan-3-carbonsäureamid-4-carbonsäure-äthylester V erwies. Sie schmolz nach dem Umkrystallisieren aus Benzol-Petroläther bei 123—124° korr.

$C_{13}H_{23}O_5NS$	Ber. C 51,13	H 7,59%
	Gef. ,, 51,12	,, 7,66%

Aus der Natriumhydrogencarbonatlösung fällt beim Ansäuern eine feste Substanz aus, welche den 2-(ω -Methoxybutyl)-3-oxy-thiophan-3-carbonsäure-4-carbonsäure-äthylester VI darstellt. Es wurden 27 g erhalten. Nach Umkrystallisieren aus Benzol-Petroläther war der Smp. 113—114° korr.

$C_{13}H_{22}O_6S$	Ber. C 50,96	H 7,23	S 10,45%
	Gef. ,, 50,76	,, 7,32	,, 10,43%

2-(ω -Methoxybutyl)-3-chlor-thiophan-3,4-dicarbon säure-diäthylester VIII.

114 g Oxy-dicarbon säure-ester VII wurden in 236 cm³ Chloroform gelöst und mit 54,3 cm³ absolutem Pyridin und 47,2 cm³ Thionylchlorid unter Eiskühlung versetzt. Die

Lösung wurde 2 Stunden bei Zimmertemperatur und $\frac{1}{2}$ Stunde bei 50—60° gehalten und am Ende noch 10 Minuten gekocht. Die Gasentwicklung hört nie vollständig auf. Nach Abkühlung wurde die Reaktionslösung auf Eis gegossen, mit Chloroform ausgeschüttelt, die Chloroformlösung mit Wasser und eiskalter Hydrogencarbonatlösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Teilvakuum eingedampft. Der Chlorester siedet unter 0,03 mm bei 138—143° und wurde in einer Ausbeute von 102,6 g = 85,3% erhalten.

$C_{15}H_{25}O_5SCl$	Ber. C 51,05	H 7,14	Cl 10,04%
	Gef. ,, 50,46	,, 7,03	,, 10,11%

Dimethylester: Sdp. $_{0,03 \text{ mm}}$ 134—137°.

$C_{13}H_{21}O_3SCl$	Ber. C 48,07	H 6,51%
	Gef. ,, 48,39	,, 6,71%

2-(ω -Methoxybutyl)-thiophan-3,4-dicarbon säure-diäthylester IX.

102,5 g Chlorester VIII wurden in 1520 cm³ 80-proz. Essigsäure gelöst und mit 68,2 g Kaliumjodid versetzt. Bei einer Temperatur von maximal 20—25° wurden unter Rühren 460 g Zinkstaub (*Merek*) innert 4 Stunden in kleinen Portionen eingetragen. Nach Stehenlassen über Nacht wurde vom auskrystallisierten Zinkacetat filtriert, mit 80-proz. Essigsäure nachgewaschen und die Lösung im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde zwischen Wasser und Benzol verteilt und die Benzollösung mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die noch mit Wasser neutralgewaschene Benzollösung wurde mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es wurden 89 g Dicarbon säure-ester vom Sdp. $_{0,03 \text{ mm}}$ 148—150° erhalten, was einer Ausbeute von 94,5% entspricht.

$C_{15}H_{26}O_5S$	Ber. C 56,57	H 8,22	S 10,07%
	Gef. ,, 55,99	,, 7,92	,, 9,53%

Dimethylester: Sdp. $_{0,03 \text{ mm}}$ 141—143°.

$C_{13}H_{22}O_3S$	Ber. C 53,76	H 7,63	S 11,04%
	Gef. ,, 53,45	,, 7,49	,, 10,89%

2-(ω -Methoxybutyl)-thiophan-3,4-dicarbon säure-dihydrazid Xa.

89 g Dicarbon säure-diäthylester IX wurden in 460 cm³ Methanol mit 56,2 g Dihydrazinhydrat 72 Stunden am Rückfluss gekocht. Beim Abkühlen scheidet sich das Dihydrazid Xa in farblosen Nadeln ab und zeigt einen Schmelzpunkt von 204—205° korr. Dasselbe Dihydrazid wird auch aus dem entsprechenden Dimethylester erhalten. Die nicht krystallisierenden Mutterlaugen werden später bei der Herstellung von XIIb und c besprochen. Die Analyse ergab:

$C_{11}H_{22}O_3N_4S$	Ber. C 45,49	H 7,63	N 19,29%
	Gef. ,, 45,37	,, 7,63	,, 19,63%

2-(ω -Methoxybutyl)-3,4-diurethano-thiophan. XIIa.

13,4 g Dihydrazid Xa wurden in 38,5 cm³ 3-n. Salzsäure gelöst, mit 370 cm³ peroxidfremem Äther überschiebtet und unter Rühren und Kühlen mit Eis-Kochsalz 8,13 g Natriumnitrit in 46 cm³ Wasser langsam zugetropft. Die Reaktionstemperatur betrug 0 bis +2°. Die Ätherschicht wurde im Scheidetrichter abgetrennt, mit Natriumsulfat getrocknet und bei 25° im Vakuum zur Trockne gebracht. Das ölige Diazid wurde mit 324 cm³ absolutem Alkohol versetzt und auf 70° erwärmt. Bei 65° fing die Stickstoffabspaltung an und war in ca. 30 Minuten beendet. Die alkoholische Lösung wurde mit demselben Volumen Wasser versetzt. Beim Abkühlen krystallisiert das Diurethan XIIa in einer Ausbeute von 8 g entsprechend 51,2% der Theorie aus. Die feinen farblosen Nadeln zeigten einen Smp. von 157° korr. Die noch teilweise krystallisierenden Mutterlaugen wurden bisher nicht eingehend untersucht.

$C_{15}H_{28}O_5N_2S$	Ber. C 51,68	H 8,10	N 8,04	S 9,20%
	Gef. ,, 51,72	,, 8,20	,, 8,16	,, 9,12%

2-(ω -Brombutyl)-3,4-diamino-thiophan-dihydrobromid XIIIa.

7,0 g Diurethan XIIa wurden in 80 cm³ 48-proz. Bromwasserstoffsäure auf 120 bis maximal 123° erwärmt. Bei 90° Innentemperatur begann die Kohlendioxydabspaltung, welche nach 40 Minuten beendet war. Um die Methoxygruppe vollständig zu verseifen, ist es am vorteilhaftesten, eine weitere Stunde auf diese Temperatur zu erhitzen. Die Reaktionslösung wurde im Vakuum bei 40—50° zur Trockne gebracht, der Rückstand in wenig Wasser gelöst, mit einer Spur Kohle entfärbt und im Vakuum eingedampft. Nach Anreiben mit Methanol und Absaugen wurden 6 g Krystalliat erhalten. Nach Umlösen aus wenig Wasser und Aceton zeigt es den Schmelzpunkt von 217° korr.

C ₈ H ₁₉ N ₂ SBr ₃	Ber. N 6,75	Br 57,77	S 7,72%
	Gef. ,, 6,91	,, 56,35	,, 7,52%

2-(ω -Brombutyl)-3,4-(2'-oxo-tetrahydro-imidazol)-thiophan XIVa.

6 g Diamino-dihydrobromid XIIIa wurden in 3 cm Wasser gelöst, mit 29 cm³ n. Natriumhydroxydlösung versetzt und unter Eiskühlung und Rühren mit 8,45 cm³ Toluol-Phosgenlösung (20% Phosgen) und 35 cm³ n. Natronlauge unter gleichzeitigem Eintropfen der Lauge und der Toluol-Phosgenlösung so versetzt, dass das p_H der Lösung stets 7—8 betrug. Das Reaktionsprodukt wurde nach Zugabe von Eisessig im Vakuum zur Trockne gebracht und mit wenig Wasser angerührt. Das in Wasser schwerlösliche Produkt zeigte nach Umlösen aus Methanol einen Schmelzpunkt von 175,5° korr. Die Ausbeute betrug 4,2 g.

C ₉ H ₁₅ ON ₂ BrS	Ber. C 38,71	H 5,42	N 10,03	Br 28,62	S 11,48%
	Gef. ,, 38,91	,, 5,44	,, 10,44	,, 28,51	,, 11,64%

2-(ω -Cyanbutyl)-3,4-(2'-oxo-tetrahydro-imidazol)-thiophan XVa.

1,5 g 2-(ω -Brombutyl)-3,4-(2'-oxo-tetrahydro-imidazol)-thiophan XIVa wurden in 20 cm³ absolutem Alkohol gelöst und mit einer Lösung von 0,5 g Kaliumcyanid in 1 cm³ Wasser auf dem Dampfbad 20 Stunden gekocht. Die alkoholische Lösung wurde im Vakuum eingedampft, mit 10 cm³ Wasser angerieben, die Krystalle abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Es wurden 0,9 g vom Smp. 194—198° erhalten. Nach 3-maligem Umkrystallisieren aus Methanol-Wasser und Methanol-Isopropylalkohol stieg der Schmelzpunkt auf 210—212° korr.

C ₁₀ H ₁₅ ON ₃ S	Ber. C 53,35	H 6,71	N 18,7	S 14,25%
	Gef. ,, 53,04	,, 6,59	,, 18,1	,, 14,36%

2-(ω -Carboxybutyl)-3,4-(2'-oxo-tetrahydro-imidazol)-thiophan.
d,l- ψ - β -Biotin Ia.

220 mg Nitril XVa wurden mit 4 cm³ n. Natronlauge 1 Stunde auf 70° erwärmt. Die klare Lösung wurde mit Salzsäure kongosauer gestellt und abgekühlt, worauf das *d,l*- ψ - β -Biotin krystallisiert ausfiel. Nach dem Umlösen aus Wasser zeigte es den Schmelzpunkt von 221—222° korr. und ergab folgende Analysenwerte:

C ₁₀ H ₁₆ O ₃ N ₂ S	Ber. C 49,20	H 6,61	N 11,46	S 13,10%
	Gef. ,, 49,03	,, 6,74	,, 11,42	,, 13,35%

Der mit Diazomethan hergestellte *d,l*- ψ - β -Biotin-methylester XVIa zeigte nach Umlösen aus Methanol einen Schmelzpunkt von 149° korr.

C ₁₁ H ₁₈ O ₃ N ₂ S	Ber. C 51,19	H 7,03	N 10,83%
	Gef. ,, 50,75	,, 6,76	,, 10,50%

4-Methyl-5-(ω -carboxy-n-pentyl)-2-oxo-tetrahydro-imidazol.
d,l- ψ -Desthiobiotin IIa.

100 mg *d,l*- ψ - β -Biotin Ia wurden in 30 cm³ 0,5-proz. Sodalösung gelöst und mit 5 g bei 50° hergestelltem Raney-Nickel während 15 Minuten auf 75° erhitzt. Nach Abkühlen, Zentrifugieren, Waschen der Nickelabscheidung mit 4 cm³ Sodalösung und zwei-

malgem Waschen mit Wasser wurde die Lösung mit Salzsäure angesäuert und im Vakuum auf ein Volumen von 4—5 cm³ eingengt. Es kristallisierten 70 mg *d, l-ψ*-Desthio-biotin aus, welches nach Umlösen aus Wasser einen Schmelzpunkt von 148—149° korr. zeigt.

$C_{10}H_{18}O_3N_2$	Ber. C 56,05	H 8,47%
	Gef. ,, 56,10	,, 8,30%

Methylester: Smp. 96—97° korr.

2-(*ω*-Methoxybutyl)-3,4-diuethano-thiophan XIIb.

65 g nicht kristallisierende Dihydrasid-Mutterlaugen, welche nach Abtrennung von Xa und nach Eindampfen des Alkohols zurückblieben, wurden in 193 cm³ 3-n. Salzsäure gelöst, mit 1900 cm³ peroxydfreiem Äther überschichtet und unter Rühren und Kühlen mit einer Lösung von 40,5 g Natriumnitrit in 200 cm³ Wasser versetzt. Das entstandene Diazid wurde mit Alkohol wie bei der Darstellung von XIa erwärmt und die Lösung im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wog 60 g und wurde auf einer Säule von 1500 g Aluminiumoxyd chromatographiert. Das Benzol- und Benzol-Äther-(1:1)-Eluat kristallisierte in feinen Nadeln und zeigte nach Umlösen aus Benzol-Petroläther einen Schmelzpunkt von 125—126° korr. Es konnten 4,5 g dieses Diurethans XIIb isoliert werden. Das Chloroformeluat des Chromatogramms, welches 15 g wog und nicht zur Krystallisation gebracht werden konnte, wird später in der *c*-Reihe bei der Herstellung des racemischen *β*-Biotins erwähnt.

$C_{15}H_{28}O_3N_2S$	Ber. C 51,68	H 8,10	S 9,20%
	Gef. ,, 51,48	,, 7,98	,, 9,32%

2-(*ω*-Brombutyl)-3,4-(2'-oxo-tetrahydro-imidazol)-thiophan XIVb.

1,8 g Diurethan XIIb wurden in 30 cm³ 48-proz. Bromwasserstoffsäure 2 Stunden auf 120—125° erwärmt, im Vakuum bei 50° Badtemperatur zur Trockne gebracht, in Wasser gelöst, mit 0,1 g Kohle entfärbt, filtriert und die Lösung im Vakuum eingedampft. Der Rückstand stellte eine hygroskopische Krystallmasse dar (XIIIb), welche ohne Isolierung in 10 cm³ n. Natronlaugc gelöst und mit 4 cm³ Toluol-Phosgenlösung (20% Phosgen) und 10 cm³ n. Natronlaugc versetzt wurde. Nach Eindampfen der Lösung wurde der Rückstand mit Chloroform extrahiert. Nach Einengen der Chloroformlösung kristallisierte das 2-(*ω*-Brombutyl)-3,4-(2'-oxo-tetrahydro-imidazol)-thiophan XIVb aus. Die aus Methanol umgelösten Krystalle zeigten einen korrigierten Schmelzpunkt von 163—164° und gaben mit XIVa vom Smp. 175,5° eine Schmelzpunktserniedrigung von 30°.

$C_9H_{15}ON_2BrS$	Ber. C 38,71	H 5,42	Br 28,62%
	Gef. ,, 38,69	,, 5,53	,, 28,97%

2-(*ω*-Carboxybutyl)-3,4-(2'-oxo-tetrahydro-imidazol)-thiophan.
d, l-iso-*β*-Biotin Ib.

400 mg 2-(*ω*-Brombutyl)-3,4-(2'-oxo-tetrahydro-imidazol)-thiophan XIVb wurden 20 Stunden in 20 cm³ absolutem Alkohol mit einer Lösung von 100 mg Kaliumcyanid in 0,5 cm³ Wasser am Rückfluss gekocht. Nach Eindampfen der Lösung zur Trockne wurde der Rückstand mit 5 cm³ n. Natronlaugc 2 Stunden auf 90° erwärmt. Nach Filtration der alkalischen Lösung, Ansäuern mit Salzsäure auf congosaure Reaktion und Eindampfen zur Trockne wurde der Rückstand in absolutem Alkohol aufgenommen, die Lösung durch Filtration von anorganischen Salzen getrennt und abermals eingengt. Der mit wenig Wasser angeriebene Rückstand kristallisierte nach kurzer Zeit und zeigte nach Umlösen aus Wasser einen Schmelzpunkt von 182—183° korr.

$C_{10}H_{16}O_3N_2S$	Ber. C 49,20	H 6,61%
	Gef. ,, 49,38	,, 6,69%

Der mit Diazomethan bereitete Methylester XVIIb schmolz nach Umkrystallisieren aus Aceton-Äther bei 166—167° korr.

2-(*o*-Carbomethoxybutyl)-3,4-(2'-oxo-tetrahydro-imidazol)-thiophan.
d,l- β -Biotin-methylester XVIc.

Das bei der chromatographischen Trennung der Urethane erhaltene Chloroformeluat, 15 g (XIIIc), wurde mit 200 cm³ 48-proz. Bromwasserstoffsäure 2 Stunden auf 120—125° erwärmt und nach Eindampfen zur Trockne und Auflösen in Wasser mit 2 g Kohle entfärbt. Der nach Eindampfen der wässrigen Lösung erhaltene Sirup (12 g) enthält das Diamino-dihydrobromid XIIIc, dessen Isolierung nicht versucht wurde.

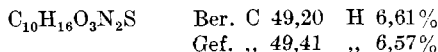
12 g Sirup XIIIc wurden in 58 cm³ n. Natronlauge gelöst und mit 17 cm³ Toluol-Phosgenlösung (20-proz.) und 60 cm³ n. Natronlauge wie bei der Herstellung der isomeren Verbindung XIVa versetzt. Der nach Eindampfen der Lösung zurückbleibende Rückstand wurde mit Chloroform ausgezogen und der nach dem Einengen der Chloroformlösung erhaltene Sirup mit 1,1 Mol Kaliumcyanid in Alkohol 20 Stunden gekocht. Nach Abdampfen des Alkohols wurde das rohe Cyanid mit verdünnter Natronlauge durch zweistündiges Erwärmen auf 90° verseift. Die filtrierte alkalische Lösung wurde nach Ansäuern mit Salzsäure im Vakuum zur Trockne gebracht und durch 3-maliges Abdampfen mit Methanol vollständig getrocknet. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst und die Lösung mit Diazomethan verestert. Der nach Eindampfen der Lösung zurückbleibende Rückstand wurde in Aceton aufgenommen und von unlöslichen festen Anteilen filtriert. Der acetonlösliche Teil wog nach dem Abdampfen des Lösungsmittels 7,2 g. Der dunkelbraune Sirup wurde in 500 cm³ Benzol gelöst und auf 210 g Aluminiumoxyd chromatographiert. Zum Eluieren wurden für jede Fraktion je 250 cm³ Lösungsmittel verwendet.

Fraktion Nr.	Lösungsmittel	g	Prüfung auf biolog. Aktivität*)
1—15	Benzol	Öl 0,75	inaktiv
16—27	Chloroform	„ 1,88	45 mg rac. Biotin
28—31	Aceton	„ 0,75	20 mg „
32—40	Aceton	Smp. 120—30° 0,11	110 mg „
41—45	Aceton : Methanol (8 : 2)	Öl 0,2	4 mg „
46—53	„ „	„ 0,58	29 mg „
54—60	Aceton : Methanol (1 : 1)	„ 2,09	inaktiv
61—70	Methanol	„ 0,7	inaktiv

*) Die zur Chromatographie eingesetzten 7,2 g enthielten nach der Auswertung von Prof. Dr. Schopfer 274 mg racemisches Biotin. Die Auswertungen der einzelnen Fraktionen wurden in unserem Laboratorium ausgeführt.

Die Fraktionen 32—40 wurden zusammen aus Essigester umkristallisiert und der so erhaltene *d,l*- β -Biotin-methylester XVIc zeigte einen Schmelzpunkt von 130—132° korr. Es wurden 105 mg erhalten.

Das aus dem Methylester XVIc durch Verseifen mit verdünnter Natronlauge erhaltene *d,l*- β -Biotin Ic schmolz nach Umlösen aus Wasser bei 234—235° korr. Die Mischprobe mit optisch aktivem natürlichem β -Biotin gab eine Schmelzpunktserniedrigung von 12°.



Wissenschaftliches Laboratorium der
F. Hoffmann-La Roche & Co., A.-G., Basel.