

- [7] R. HAYASHI, Chem. pharmac. Bull. Tokyo 15, 38 (1967).
 [8] L. H. KNOX, E. VELARDE & A. D. CROSS, J. Amer. chem. Soc. 85, 2533 (1963).
 [9] L. H. KNOX, E. BLOSSEY, H. CARPIO, L. CERVANTES, P. CRABBÉ, E. VELARDE & J. A. EDWARDS, J. org. Chemistry 30, 2198 (1965).
 [10] G. STORK & J. TSUJI, J. Amer. chem. Soc. 83, 2783 (1961); G. STORK, P. ROSEN, N. GOLDMAN, R. V. COOMBS & J. TSUJI, *ibid.* 87, 275 (1965).
 [11] A. J. BIRCH, J. M. H. GRAVES & J. B. SIDDALL, J. chem. Soc. 1963, 4234.
 [12] J. KALVODA, K. HEUSLER, G. ANNER & A. WETTSTEIN, Helv. 46, 1017 (1963).
 [13] R. GARDI & A. LUSIGNANI, J. org. Chemistry 32, 2647 (1967).
 [14] E. E. VAN TAMELEN & G. T. HILDAHL, J. Amer. chem. Soc. 78, 4405 (1956).

224. Zur Biosynthese von Brefeldin A

von U. Handschin¹⁾, H. P. Sigg²⁾ und Ch. Tamm¹⁾

Institut für Organische Chemie der Universität Basel und Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien der SANDOZ AG, Basel

(11. X. 68)

Summary. By feeding growing cultures of *Penicillium brefeldianum* DODGE with [1-¹⁴C]-acetate radioactive brefeldin A (C₁₆H₂₄O₄) was obtained. By extensive degradation of [¹⁴C]-brefeldin A, the individual radioactivity of 12 of the 16 carbon atoms was determined quantitatively. The pattern of the distribution of the radioactivity shows that 8 acetate units have been incorporated into the metabolite in a regular manner. These findings suggest an octaketide as an intermediate. Possible mechanisms for the formation of the *trans*-fused cyclopentane ring are discussed.

Brefeldin A ist ein Stoffwechselprodukt von *Penicillium brefeldianum* DODGE [1], für das kürzlich die Strukturformel **1** bewiesen wurde [2]. Das aus *Penicillium decumbens* THOM. isolierte Decumbin [3] erwies sich mit Brefeldin A als identisch [4]. Cyanein, das aus *Penicillium cyaneum* gewonnen wurde, ist ebenfalls identisch mit Brefeldin A [5]. Kürzlich wurde diese Verbindung auch in *Penicillium simplicissimum* [6], *Nectria radicipercola* [7], *Curvularia lunata* [8] und *Curvularia subulata* [8] nachgewiesen. Es handelt sich demnach um einen relativ weitverbreiteten Metaboliten. Mit 16 C-Atomen gehört Brefeldin A zu den kleinsten der bisher bekannten Makrolide. Im Gegensatz zu den aus Actinomyceten isolierten Vertretern enthält Brefeldin A keine Zuckerreste und sein 13-gliedriger Lactonring ist nur durch eine einzige Methylgruppe substituiert. Die gerade Zahl von C-Atomen und der relativ einfache Bau der Molekel lassen vermuten, dass als biogenetische Vorläufer nur Acetat resp. Malonat in Frage kommen. Bisher sind bei den Makroliden erst zwei aus höheren Pilzen stammende Stoffe bekanntgeworden, die nur aus Essigsäure aufgebaut sind, nämlich Curvularin [9] und Radicol [10]. Der aromatische Ring dieser Verbindungen dürfte durch eine interne, dem Aldol-Typ entsprechende Kondensation der intermediären Poly- β -carbonyl-Kette entstanden sein. Diese Reaktionsweise ist charakteristisch für die sog. Acetogenine³⁾. Man kann deshalb annehmen, dass auch bei der Biosynthese

¹⁾ Institut für Organische Chemie der Universität Basel.

²⁾ Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien der SANDOZ AG, Basel.

³⁾ Zur Erläuterung des Begriffs «Acetogenin» und Acetat-Hypothese mit vielen Beispielen vgl. [11].

des Brefeldins A eine Zwischenstufe vom Poly- β -carbonyl-Typ durchlaufen wird, wobei es sich um ein Octa-Ketid handeln müsste.

Im folgenden berichten wir über die Resultate einer ausgedehnten Untersuchung, welche diese Annahme bestätigen. Zur gleichen Auffassung sind kürzlich auch COOMBE *et al.* [12] gekommen, wobei sich die australischen Autoren lediglich auf einige wenige Versuche stützen. Von besonderem Interesse schien uns die Abklärung der Verhältnisse im Cyclopentan-Ring, eines in Makroliden bisher noch nie beobachteten Strukturelements.

Zu wachsenden Kulturen von *Penicillium brefeldianum* DODGE (Stamm S 498) wurde [1- 14 C]-Natriumacetat gegeben, das radioaktive Brefeldin A isoliert und mit Hilfe eines gezielten chemischen Abbaus die Verteilung der Radioaktivität in der Molekel bestimmt⁴⁾. Die Einbauraten betragen durchschnittlich 0,28%. In den Formelschemata 1, 2 und 3 sind die benützten Reaktionen und in der Tabelle die Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmungen zusammengestellt.

Oxydation des radioaktiven Brefeldins A (1) nach KUHN-ROTH [13] lieferte radioaktive Essigsäure (3), die als *p*-Bromphenacylester 5 isoliert wurde. Sie enthielt 13,6%, d. h. $\frac{1}{8}$ der ursprünglichen Radioaktivität (100%) des Brefeldins A.

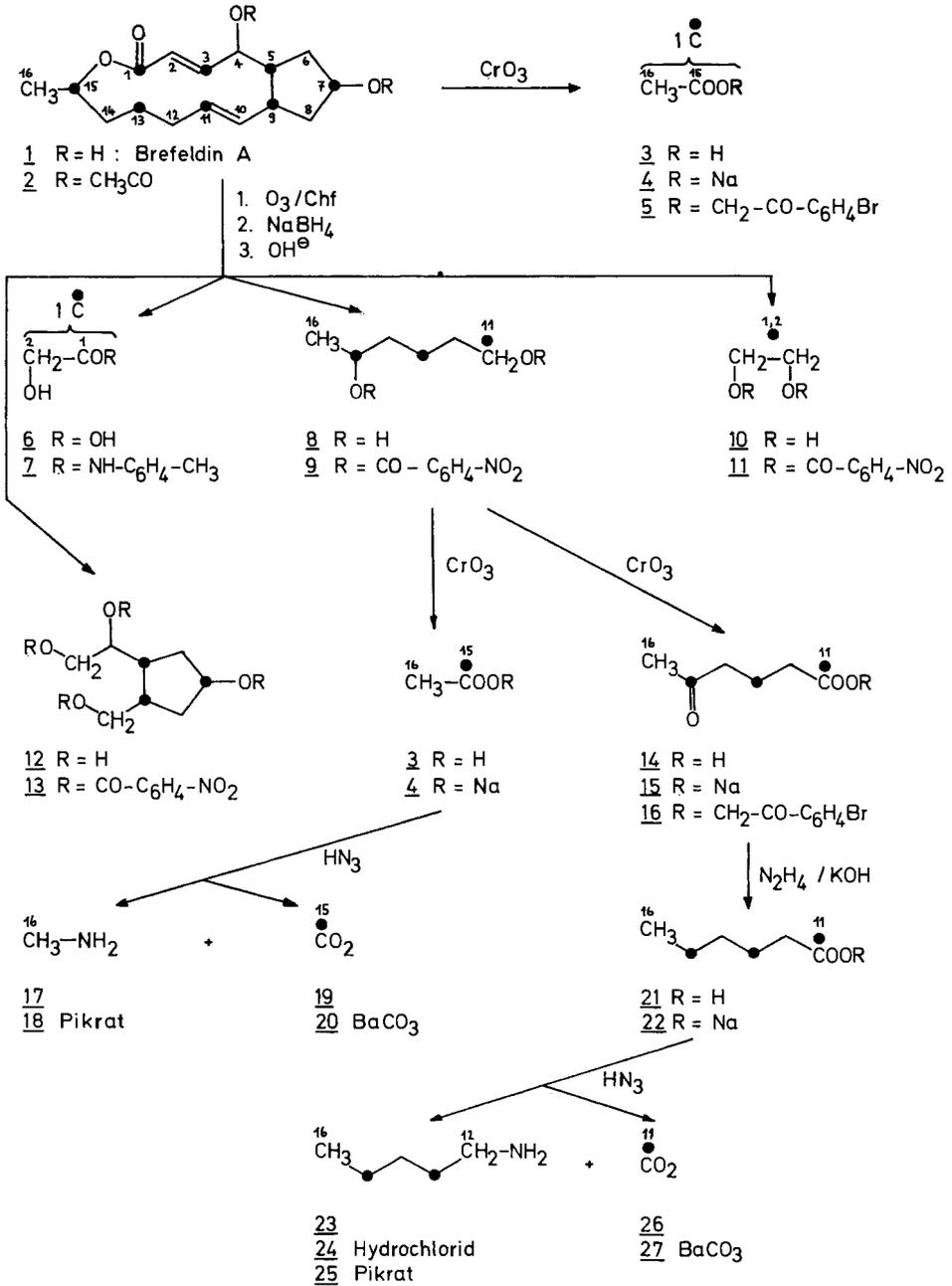
Für den weiteren Abbau des Brefeldins A benützten wir die reduktive Ozonolyse, eine Reaktion, die sich bereits bei der Strukturaufklärung des Metaboliten bewährt hatte [2]. Behandlung des Di-O-acetyl-brefeldins A (2) mit O₃, Reduktion des Ozonids mit NaBH₄ und anschliessende alkalische Hydrolyse lieferte drei Bruchstücke, nämlich Hexan-1,5-diol (8)⁵⁾, 3,4-*trans*-3-Hydroxymethyl-4-(1',2'-dihydroxyäthyl)-cyclopentan-1-ol (12), im folgenden kurz «Tetrol» genannt, und, je nach Bedingungen, Glykolsäure (6) oder Äthylenglykol (10). Die Glykolsäure, die durch den Gujakol-Test [15] nachweisbar ist und am besten in Form des *p*-Toluidids oder *p*-Bromphenacylesters fassbar ist, wird teilweise zu Äthylenglykol weiterreduziert⁶⁾. Die im ersten Versuch erhaltene Glykolsäure, als *p*-Toluidid 7 isoliert, enthielt wieder $\frac{1}{8}$ (12,9%) und Hexan-1,5-diol, das in Form seines Di-O-*p*-nitrobenzoylderivats 9 gefasst wurde, $\frac{3}{8}$ (37,3%) der im Brefeldin A ursprünglich vorhandenen Radioaktivität (100%). In einem weiteren Versuch, bei dem eine grössere Menge von Di-O-acetyl-brefeldin A eingesetzt wurde, entstand statt Glykolsäure hauptsächlich Äthylenglykol, das als Di-O-*p*-nitrobenzoylderivat 11 isoliert wurde. Es enthielt 14,3% der Brefeldin-A-Aktivität. Von den anderen beiden Bruchstücken wurde diesmal das Tetrol 12 in Form des Tetra-O-*p*-nitrobenzoylderivats 13 gefasst. In ihm waren genau 50% der ursprünglichen Radioaktivität enthalten. Nach diesen Ergebnissen ist in den C-Atomen Nr. 1, 2 und 11–16 die eine Hälfte, in den C-Atomen Nr. 3–10 die andere Hälfte der Radioaktivität des Brefeldins A lokalisiert, wobei C-1 und C-2 einem Mol eingebautem Acetat entsprechen.

4) Sämtliche Reaktionen wurden zuerst mit inaktivem Material durchgeführt, um optimale Ausbeuten zu erreichen und um die zur Radioaktivitätsbestimmung geeignetsten Derivate zu finden.

5) Ein Vergleichspräparat wurde nach einer Vorschrift von LIPP [14], allerdings mit schlechter Ausbeute, hergestellt.

6) Für den Nachweis der alkoholischen und reduzierenden Verbindungen in den Dünnschichtchromatogrammen erwies sich als Sprühreagenz die Phosphormolybdänsäure als besonders vorteilhaft.

FORMELSCHEMA 1



Bei der Oxydation des Hexan-1,5-diols (**8**) mit CrO_3 nach KUHN-ROTH wurde 1 Mol Essigsäure (**3**) erhalten, die als *p*-Brom-phenacylester **5** isoliert wurde. Der weitere Abbau der Essigsäure nach SCHMIDT mit NaN_3 und Polyphosphorsäure (Modifikation nach BRITT und ARIGONI [16]) lieferte in guter Ausbeute die C-Atome Nr. 15 des Brefeldins A als CO_2 (**19**) resp. BaCO_3 (**20**), das aktiv war, und Nr. 16 als Methylamin (**17**) resp. Methylaminpikrat (**18**), das sich als inaktiv erwies. Durch CrO_3 -Oxydation von Hexan-1,5-diol in H_2SO_4 -Aceton nach JONES [17] erhielten wir die radioaktive 5-Ketocaprinsäure (**14**)⁷⁾. Zur Messung kam der *p*-Bromphenacylester **16**. Dieses den C-Atomen Nr. 11–16 entsprechende Bruchstück enthielt 36,5%, d. h. wieder $\frac{3}{8}$ der ursprünglichen Radioaktivität. Die Oxydation des Na-Salzes **15** der 5-Ketocaprinsäure nach KUHN-ROTH ergab 1 Mol Essigsäure (**3**), die wie oben nach SCHMIDT weiter abgebaut wurde. Die Identifizierung und Charakterisierung beider aus dem Abbau erhaltenen Essigsäuremolekeln erfolgte gas-chromatographisch mit einer Neopentylglykolsuccinat-Säule [19]. Die gas-chromatographische Analyse der Abbau-säuren zeigte, dass die beiden KUHN-ROTH-Oxydationen keine weiteren niederen Carbonsäuren geliefert hatten.

Ein Versuch, die 5-Ketocaprinsäure (**14**) nach SCHMIDT abzubauen, ergab unbefriedigende Resultate. Wohl wurde CO_2 erhalten, doch das andere Fragment, das 4-Ketopentylamin, ging Sekundärreaktionen ein (vgl. [20]). Ebenso wenig erfolgreich verlief der SCHMIDT-Abbau der 5-Hydroxycaprinsäure. Deshalb reduzierten wir die radioaktive 5-Ketocaprinsäure nach WOLFF-KISHNER in der Modifikation von HUANG-MINLON [21] zur *n*-Caprinsäure (**21**). Der SCHMIDT-Abbau von **21** verlief jetzt glatt. Das dem C-Atom Nr. 11 entsprechende CO_2 (**26**) resp. BaCO_3 (**27**) war noch radioaktiv, und das als Hydrochlorid **24** und Pikrat **25** gut zu isolierende *n*-Pentylamin (**23**) enthielt 23,5%, d. h. $\frac{2}{8}$ der Brefeldin-A-Radioaktivität.

Für die weitere Zerlegung des C(12)–C(16)-Bruchstücks wurde *n*-Pentylamin (**23**) mit HNO_2 desaminiert. Es resultierte ein Gemisch der isomeren Pentanole **29** und **30** (gas-chromatographisch nachgewiesen), das direkt in ätherischer Lösung mit CrO_3 in H_2SO_4 [17] weiter oxydiert wurde. Das Pentan-2-on (**32**) wurde als 2,4-Dinitrophenylhydrazon **33** (ca. 7%) und die *n*-Valeriansäure (**34**) als *p*-Bromphenacylester **36** (ca. 23%) abgetrennt⁸⁾. In beiden Derivaten waren wie erwartet, zwei radioaktive C-Atome vorhanden, denn sie enthielten je $\frac{1}{4}$ (24,1% resp. 24,2%) der ursprünglichen Radioaktivität des Brefeldins A. Die *n*-Valeriansäure wurde auch durch katalytische Oxydation des *n*-Pentylamins mit H_2O_2 - NaWO_4 [22], Hydrolyse des gebildeten Oxims **28** und Nachoxydation des Aldehyds **31** erhalten.

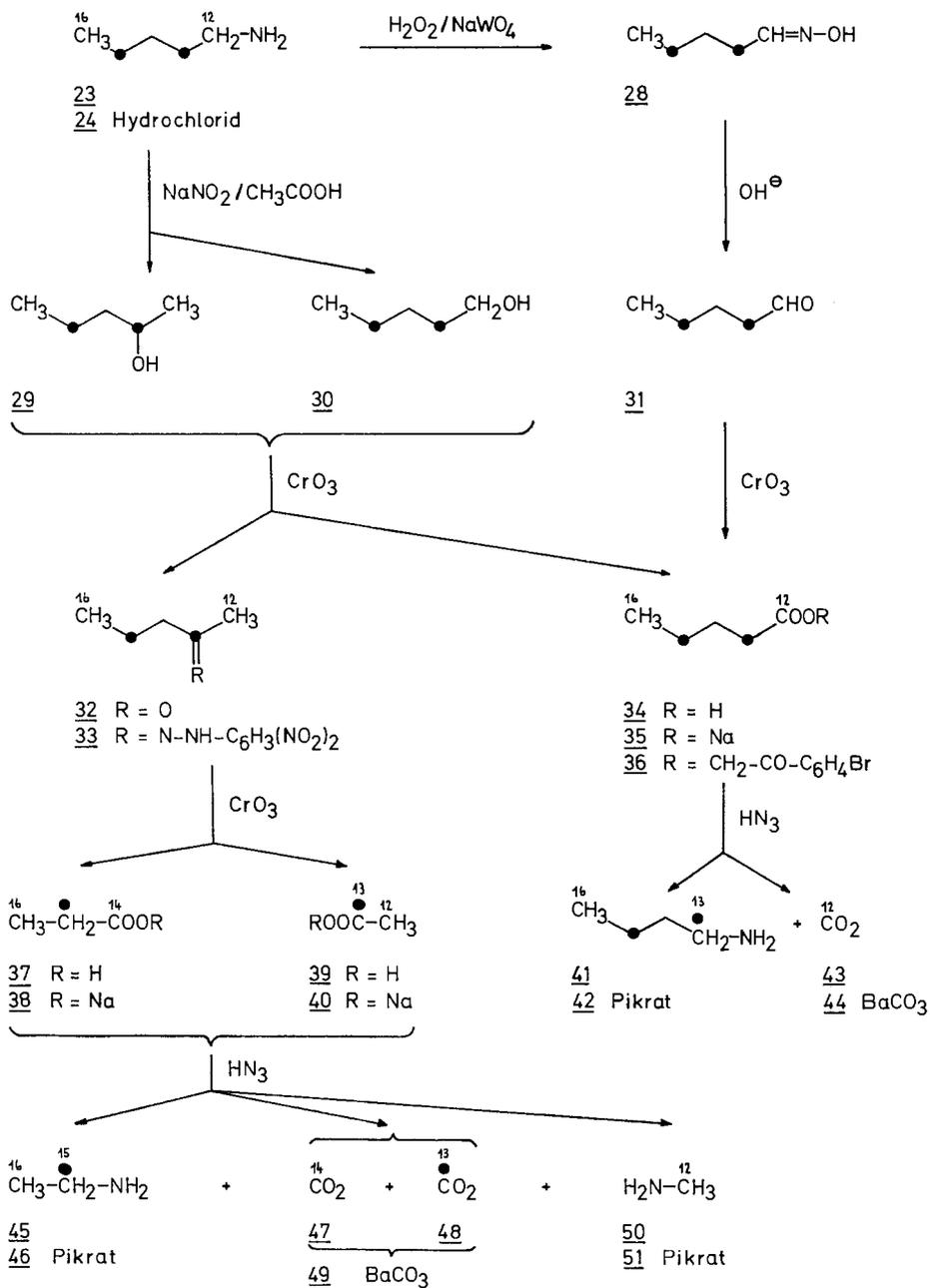
Der SCHMIDT-Abbau der radioaktiven *n*-Valeriansäure (**34**) lieferte C-Atom Nr. 12 als CO_2 (**43**) resp. BaCO_3 (**44**), das inaktiv war, sowie *n*-Butylamin (**41**), dessen Pikrat **42** 22,5% der Aktivität aufwies. Das C_{13} - C_{16} -Fragment enthielt zwei radioaktive C-Atome.

Bei der KUHN-ROTH-Oxydation des Pentan-2-on-2,4-dinitrophenylhydrazons (**33**) entstanden nicht, wie zuerst erwartet, zwei Mole Essigsäure aus den endständigen C-Methylgruppen, sondern gemäss Gas-Chromatogramm ein 1:1-Gemisch von Pro-

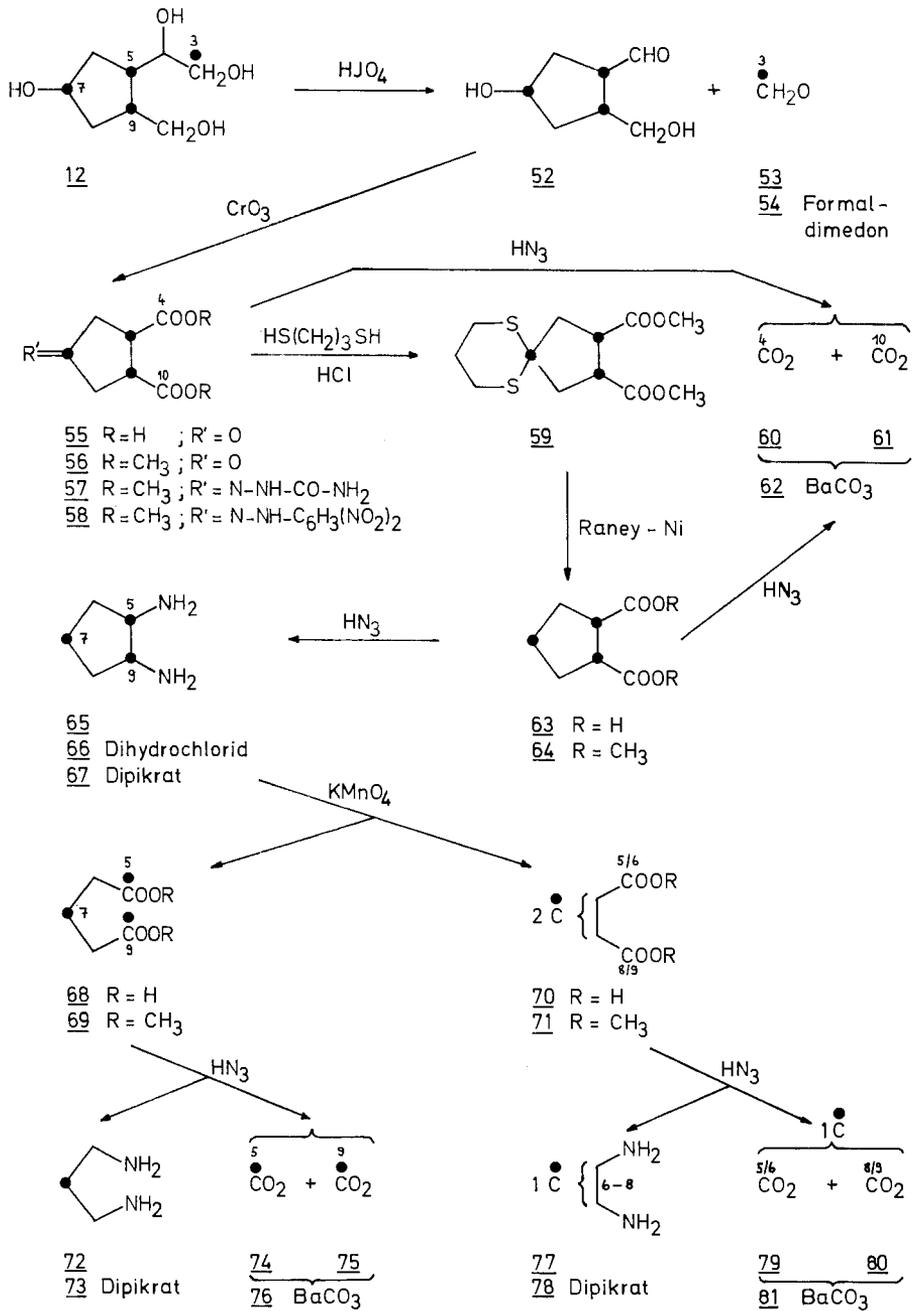
⁷⁾ Die Synthese der 5-Ketocaprinsäure gelang leicht nach den Angaben von STETTER [18].

⁸⁾ Dünnschichtchromatographisch wurden noch die Fragmentierungsprodukte Methyläthylketon und Aceton in Form ihrer 2,4-Dinitrophenylhydrazone nachgewiesen.

FORMELSCHEMA 2



FORMELSCHEMA 3



pionsäure (37) und Essigsäure (39) in ca. 85-proz. Ausbeute. Wegen Materialknappheit mussten wir auf die Trennung der Säuren verzichten und unterwarfen das Gemisch ihrer Na-Salze 38 und 40 dem SCHMIDT-Abbau. Die Amine 45 und 50 wurden durch Wasserdampfdestillation in eine Pikrinsäurelösung destilliert, aus der zuerst das Methylaminpikrat (51) und dann das Äthylaminpikrat (46) auskristallisierte. Das Äthylaminpikrat ergab eine molspezifische Aktivität von 7,1% anstatt der theoretischen 12,5%, vermutlich da das Präparat durch das inaktive Methylaminpikrat (51) verunreinigt war. Die Trennung der beiden Pikrate durch fraktionierte Kristallisation ist nicht quantitativ realisierbar. Doch erachten wir die Verteilung der Radioaktivität in den C-Atomen Nr. 12, 15 und 16 durch diesen Versuch als gesichert. – Das aus den beiden Carboxylgruppen der C-Atome Nr. 13 und 14 resultierende BaCO₃ (49) wies nur 1/16 (6,36%) der Brefeldin-A-Aktivität auf. Es setzt sich zu gleichen Teilen aus einem Mol aktivem (48) und einem Mol inaktivem (47) CO₂ zusammen.

Zur Erfassung der C-Atome Nr. 3–10 unterwarfen wir das Tetrol 12 einem weiteren Abbau. Die Spaltung mit HJO₄ lieferte das C-Atom Nr. 3 als Formaldehyd (53), der in Formal-dimedon (54) übergeführt wurde. Das Derivat war radioaktiv. Da die gleichzeitige Isolierung des Hydroxyaldehyds 52 nicht möglich war, wurde er durch CrO₃-Oxydation direkt in die Keto-dicarbonsäure 55 übergeführt⁹⁾. Zur Charakterisierung diente der Dimethylester 56¹⁰⁾ und dessen Semicarbazon 57 und 2,4-Dinitrophenylhydrazon 58. Sie enthielten 41,1% resp. 36,7% (theoret. Wert 37,5%) der ursprünglichen Aktivität, was 3 radioaktiven C-Atomen entspricht.

Abbauversuche mit symmetrischen Verbindungen, bei denen in der gleichen Reaktion zwei C-Atome herausgespalten werden, sind nur eindeutig, wenn beide radioaktiv oder inaktiv sind. Im Hinblick auf die Erfassung der C-Atome des Cyclopentanrings war es nötig, zuerst Auskunft über die C-Atome Nr. 4 und 10 zu erhalten. Der SCHMIDT-Abbau von 55 lieferte CO₂ (60 + 61) resp. BaCO₃ (62), das praktisch inaktiv war. Die Ausbeute war allerdings sehr schlecht und das Keto-diamin nicht fassbar¹¹⁾.

Für den weiteren Abbau der Keto-dicarbonsäure 55 führten wir dessen Dimethylester 56 in das Thioketal 59 über¹⁰⁾. Reduktive Entschwefelung des letzteren mit RANEY-Ni ergab den Cyclopentan-1,2-*trans*-dicarbonsäure-dimethylester (64), der zur Cyclopentan-1,2-*trans*-dicarbonsäure (63)¹²⁾ hydrolysiert wurde.

Der nach Verdünnung des Präparats mit inaktivem Material durchgeführte SCHMIDT-Abbau lieferte in ausgezeichneter Ausbeute vollständig inaktives CO₂ (60 + 61) resp. BaCO₃ (62) und radioaktives Cyclopentan-1,2-*trans*-diamin (65), das als Dihydrochlorid 66 oder Dipikrat 67 gut isolierbar war. Damit ist nochmals bewiesen, dass der Fünfring 3 radioaktive C-Atome enthält. Die Öffnung und der weitere Abbau des Cyclopentanrings gelang nach vielen erfolglosen Versuchen durch Oxydation einer

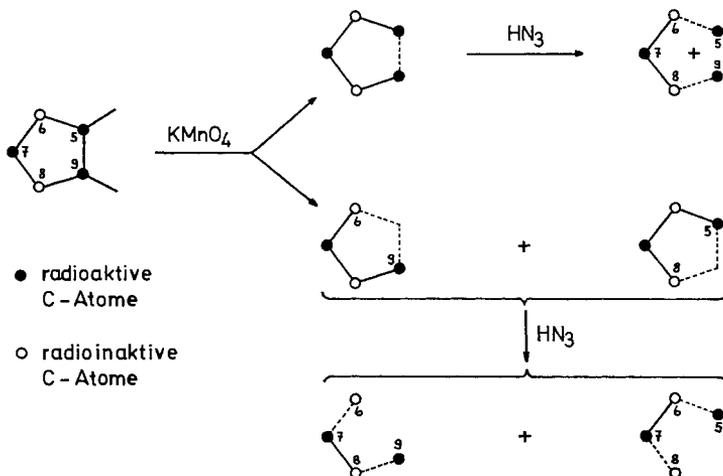
⁹⁾ Die Herstellung der *rac.*-Säure 55 gelingt am besten nach AUWERS [23] durch Kondensation von *trans*-Aconitsäure-triäthylester mit Malonsäure-diäthylester und anschliessende Hydrolyse und Decarboxylierung des Kondensationsprodukts.

¹⁰⁾ Im Gegensatz zur racemischen Verbindung kristallisierten die natürlichen optisch aktiven Derivate nicht.

¹¹⁾ Die oxydative Bis-Decarboxylierung mit Pb-tetraacetat nach GROB [24] ergab keine befriedigenderen Resultate.

¹²⁾ Ein racemisches Präparat der Dicarbonsäure 63 wurde nach einer Modifikation der Synthese von OWEN & PETO [25] bereitet.

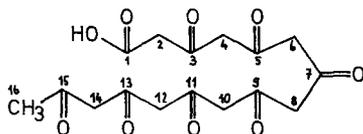
wässrigen Lösung des Dihydrochlorids **66** mit KMnO_4 bei ca. 50° . Als Hauptprodukte entstanden Glutarsäure (**68**) und Bernsteinsäure (**70**), die als Dimethylester (**69** resp. **71**) gas-chromatographisch identifiziert wurden¹³⁾. Ein drittes Hauptprodukt konnte wegen seiner Empfindlichkeit nicht aufgeklärt werden. Für den weiteren Abbau wurden die beiden Diester **69** und **71** gas-chromatographisch getrennt, wobei ein spezielles Auffangsystem zur Anwendung kam¹³⁾, und alkalisch hydrolysiert. Hierauf wurden die beiden Dicarbonsäuren **68** und **70** nach SCHMIDT abgebaut. Aus der Glutarsäure liessen sich dadurch die C-Atome Nr. 5 und 9 als CO_2 (**74** + **75**) resp. BaCO_3 (**76**), und die C-Atome Nr. 6–8 als Propan-1,3-diamin (**72**), das als Dipikrat **73** isoliert wurde, herauschälen. Beide Carboxylgruppen der Glutarsäure erwiesen sich als radioaktiv, denn die molspezifische Aktivität des BaCO_3 von 10,2% stimmte mit dem berechneten Wert von 12,5% befriedigend überein. Im Propan-1,3-diamin verblieb noch ein radioaktives C-Atom. Die Verteilung der Radioaktivität im Cyclopentanring und in den Abbausäuren **68** und **70** ist aus dem folgenden Schema ersichtlich:



Die Bernsteinsäure (**70**) muss aus Symmetriegründen zu gleichen Teilen aus den C-Atomen Nr. 5–8 und 6–9 bestehen. Somit stammt das nach dem SCHMIDT-Abbau erhaltene CO_2 (**79** + **80**) resp. BaCO_3 (**81**) aus den C-Atomen Nr. 5, 6, 8 und 9. Das Äthylendiamin wird aus den C-Atomen Nr. 6–8 gebildet. Aus jeder der beiden Varianten ist somit je ein aktives (C-5 und C-9) und ein inaktives (C-6 und C-8) Mol CO_2 , im Endeffekt also ein BaCO_3 mit einer molspezifischen Aktivität von 6,25%, zu erwarten. Der experimentelle Wert von 5,63% stimmt damit sehr gut überein. – Aus denselben Gründen enthält das Äthylendiamin (**77**) noch ein radioaktives C-Atom, was 12,5% der Brefeldin-A-Aktivität entspricht. Gefunden wurden 11,2%. Da sich nun C-5 und C-9 als radioaktiv erwiesen haben, kann die 1:1-Verdünnung der Radioaktivität des BaCO_3 (**81**) nur von C-6 und C-8 herrühren, die infolgedessen inaktiv sein müssen. Damit befindet sich die Radioaktivität des Propan-1,3-diamins (**72**) eindeutig in C-7, wodurch die gesamte Verteilung der Radioaktivität im Cyclopentanring bestimmt ist.

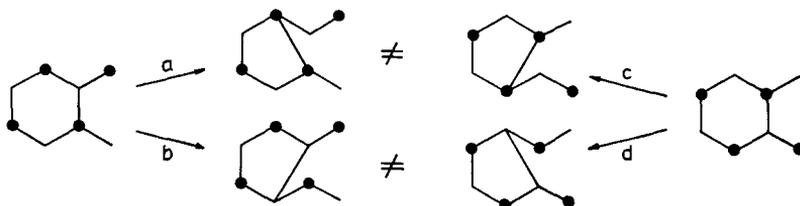
¹³⁾ Für Einzelheiten vgl. [26].

Diskussion der Ergebnisse. Unsere Versuche bestätigen die Vermutung, dass der Aufbau des Brefeldins A aus 8 Acetat-Einheiten erfolgt, in vollem Umfang. Durch die Abbaureaktionen wurden 12 der insgesamt 16 C-Atome quantitativ erfasst. Lediglich die zwei Paare C(1)-C(2) und C(13)-C(14) konnten nicht weiter aufgelöst werden, doch dürfte im ersteren die Radioaktivität höchstwahrscheinlich in C-1 lokalisiert sein. Die alternierende Verteilung der Radioaktivität in Brefeldin A nach dem Einbau von [1-¹⁴C]-Acetat und das Fehlen von Verzweigungen sprechen für eine regelmässige Kondensation der Acetylreste zu einem Octaketid:



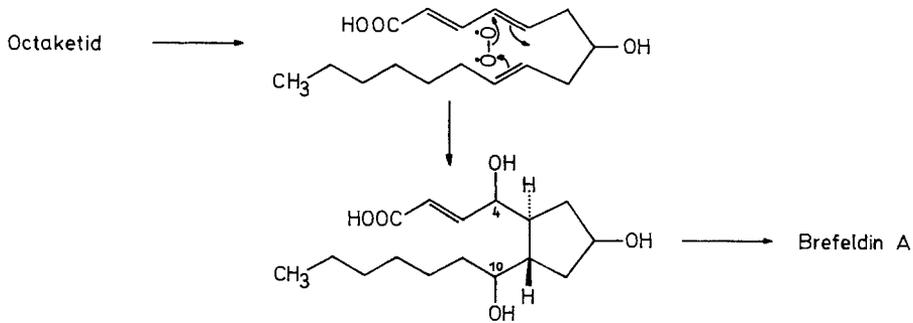
Danach dürfte auch im C(13)-C(14)-Paar C-13 die Radioaktivität tragen.

Über die weitere Umwandlung des postulierten Octaketids, wie die Sequenz der Reduktionen der Carbonylgruppen und den Mechanismus der Fünfringbildung, ist auf Grund der vorliegenden Versuche keine sichere Aussage möglich. Die Bildung des Cyclopentanrings durch Verengung eines Sechsrings kann *a priori* nicht ausgeschlossen werden¹⁴⁾. Sowohl nach Weg a als auch nach Weg c würde sie zu der gefundenen alternierenden Radioaktivitätsverteilung führen:



Wir vermuten aber eher, dass der Ringschluss nach einem der drei folgenden Mechanismen erfolgt: Nach dem ersten bildet sich der Fünfring durch eine radikalische Dimerisierung der ursprünglichen 5- und 9-Ketogruppen, was formal der oxydativen Kupplung, einer in der Biosynthese wohl bekannten Reaktion, entspricht. Nach dem zweiten Mechanismus erfolgt der Ringschluss durch eine intramolekulare Aldol-Kondensation, nachdem eine partielle Reduktion des Polyketids stattgefunden hat. Diese Reaktionsfolge scheint bei der Bildung des ϵ -Pyrromycinons [27] und anderer aromatischer Systeme, in denen gesättigte Sechsringe anelliert sind, verantwortlich zu sein. In der Literatur findet man jedoch keine Beispiele für analoge Fünfringsysteme. Im Falle des Brefeldins A wäre es denkbar, dass sich der Lactonring vor der Bildung des Fünfrings schliesst. Die Betrachtung eines entsprechenden Modells zeigt nämlich, dass eine Faltung des 16 gliedrigen Lactonrings die C-Atome Nr. 5 und 9 bereits in die räumliche Lage bringt, wie sie in Brefeldin A vorliegt. Doch vermögen weder die radikalische Dimerisierung noch die Aldol-Kondensation die *trans*-Verknüpfung des Lactonrings in Brefeldin A zu erklären. Diese würde sich jedoch ergeben, wenn der Ringschluss mit Hilfe von molekularem Sauerstoff (O₂) erfolgt:

¹⁴⁾ COOMBE *et al.* [12] haben zwar die Möglichkeit einer Ringkontraktion in einem Zwischenprodukt vom Typus des Palitantins aus uns nicht ersichtlichen Gründen verworfen.



Bei der Bildung der Prostaglandine [28] ist die Beteiligung von O_2 nachgewiesen worden. Der dort postulierte Mechanismus für den Ringschluss lässt sich jedoch nicht auf Brefeldin A übertragen, da er zu einer anderen Verteilung der Sauerstoff-Funktionen führt.

Tabelle. *Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmungen*

Substanzen	Radioaktivität in dpm/mg ¹⁵		Radioaktivität in dpm/mMol · 10 ⁶		Relat. Aktivität in % ¹⁶	
	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.
Brefeldin A (1) ¹⁷	–	424	0,1188	–	100,0	–
Essigsäure- <i>p</i> -bromphenacyl-ester (5)	57	63	0,1486	0,1657	12,5	13,8
Brefeldin A (1) ¹⁸	–	5640	0,1581	–	100,0	–
Glykolsäure- <i>p</i> -toluidid (7)	1196	1236	0,1976	0,2041	12,5	12,9
Di-O-(<i>p</i> -nitrobenzoyl)-hexan-1,5-diol (9)	1424	1415	0,5929	0,5888	37,5	37,3
Brefeldin A (1)	–	40260	11,2868	–	100,0	–
Di-O-acetyl-brefeldin A (2)	–	10866	3,9598	–	100,0	–
Für Ozon-Abbau 1:2 verdünnt						
Di-O-(<i>p</i> -nitrobenzoyl)-glykol (11)	1374	1400	0,4949	0,5044	12,5	12,7
Tetra-O-(<i>p</i> -nitrobenzoyl)-«tetrol» (13)	2562	2560	1,9798	1,9798	50,0	50,0
5-Ketocapronsäure- <i>p</i> -bromphenacyl-ester (16)	4538	4420	1,4849	1,4461	37,5	36,5
Methylaminpikrat (18)	0	8	0	0,0020	0,0	0,0
BaCO ₃ (20)	2507	2060	0,4949	0,4065	12,5	10,3
Pentylaminpikrat (25)	3232	3043	0,9899	0,9319	25,0	23,5
BaCO ₃ (27)	2507	1875	0,4949	0,3701	12,5	9,3
<i>n</i> -Valeriansäure- <i>p</i> -bromphenacyl-ester (36)	3244	3123	0,9899	0,9530	25,0	24,1
Pentan-2-on-2,4-dinitrophenylhydrazon (33)	3718	3597	0,9899	0,9577	25,0	24,2
Butylaminpikrat (42)	3275	3950	0,9899	0,8916	25,0	22,5
BaCO ₃ (44)	0	93	0	0,0183	0,0	0,4
Pentan-2-on-2,4-dinitrophenylhydrazon (33)	–	1780	0,4739	–	25,0	–
Für KUHN-ROTH-Abbau 1:1 verdünnt						
Äthylaminpikrat (46)	864	492	0,2369	0,1349	12,5	7,1
BaCO ₃ (49)	600	611	0,1185	0,1206	6,2	6,3
Methylaminpikrat (51)	0	23	0	0,0059	0,0	0,6

(Tabelle, Fortsetzung)

Substanzen	Radioaktivität in dpm/mg ¹⁵⁾		Radioaktivität in dpm/mMol · 10 ⁶		Relat. Aktivität in % ¹⁶⁾	
	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.
Formal-dimedon (54)	1693	1520	0,4949	0,4344	12,5	11,2
BaCO ₃ (62)	0	120	0	0,0236	0,0	0,6
Semicarbazon 57 von 55	5205	5707	1,4849	1,6279	37,5	41,1
2, 4-Dinitrophenylhydrazon 58 von 55	3904	3822	1,4849	1,4535	37,5	36,5
Cyclopentan-1, 2-dicarbon- säure (63)	9389	9150	1,4849	1,4472	37,5	36,5
Cyclopentan-1, 2-dicarbon- säure (63)	–	1200	0,897	–	37,5	–
	Für SCHMIDT-Abbau 1:6 verdünnt					
Cyclopentan-1, 2-diamin- dipikrat (67)	335	333	0,1898	0,1886	37,5	37,3
BaCO ₃ (62)	0	0	0	0	0,0	0,0
Propan-1, 3-diamin-dipikrat (73)	117	107	0,0633	0,0578	12,5	11,4
BaCO ₃ (76)	320	260	0,0633	0,0513	12,5	10,2
Äthylendiamin-dipikrat (78)	122	109	0,0633	0,0565	12,5	11,2
BaCO ₃ (81)	160	144	0,0316	0,0284	6,2	5,6

¹⁵⁾ Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen. Für Werte der einzelnen Kristallisate vgl. [26].

¹⁶⁾ Bezogen auf die ursprünglichen 8 radioaktiven C-Atome (= 100,0%) von Brefeldin A (1).

¹⁷⁾ Präparat für den 1. Versuch des Ozonabbaus.

¹⁸⁾ Präparat für den 2. Versuch des Ozonabbaus.

Der obige Mechanismus würde hingegen die Anwesenheit der 4-Hydroxygruppe zwanglos erklären. Die Ergebnisse der Radioaktivitätsverteilung in Brefeldin A haben gezeigt, dass das C-Atom Nr. 4 aus einer Methylgruppe der Essigsäure stammt und infolgedessen ursprünglich keine Sauerstoff-Funktion getragen hat. Daraus kann man schliessen, dass die HO-Gruppe durch einen nachträglichen Oxydationsvorgang in die C-Kette eingeführt worden ist. Das gleiche gilt für die Hydroxylgruppe in der analogen 10-Stellung, doch wird sie offenbar nachträglich eliminiert unter Bildung der Δ^{10} -Doppelbindung.

Experimenteller Teil

1. Allgemeines. – Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Die spez. Drehungen, IR.-Messungen und Mikroanalysen beziehen sich, falls nicht anders vermerkt, auf die mit radioaktivem oder synthetisch-racemischem Material durchgeführten Versuche. Substanzproben zur Messung der spez. Drehung und der IR.-Spektren wurden jeweils 5 Std. bei 0,01 Torr und 60°, Substanzproben für die Elementaranalyse und Radioaktivitätsbestimmung wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei 0,01 Torr und der angegebenen Zeit und Temperatur getrocknet.

Die IR.-Spektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125, im Spektrollaboratorium des Instituts für organische Chemie der Universität Basel (K. AEGERTER) aufgenommen. Die Analysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium des Instituts (E. THOMMEN) ausgeführt. Die Radioaktivitätsbestimmungen verdanken wir Herrn Dr. F. KALBERER vom Isotopenlaboratorium der SANDOZ AG in Basel. Zu diesem Zweck wurden die Substanzproben in reinem Sauerstoff verbrannt, das CO₂ in einer methanolischen Äthanolamin-Lösung absorbiert und nach Zusatz von Scintillatorklösung im Flüssigkeits-Scintillationszähler gemessen [29].

Für die *Säulenchromatographie* [30] nach der Durchlaufmethode oder in Anlehnung an die DUNCAN-Methodik diente Kieselgel der Firma MERCK, Darmstadt, Korngrösse 0,05–0,2 mm. Für die *Dünnschichtchromatographie* wurde Kieselgel G der Firma MERCK als Adsorbens und, wenn nicht anders vermerkt, Methylenchlorid mit 1–10% Methanol als Fließmittel verwendet. Für die präparative Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel PF₂₅₄ MERCK mit 0,3% 3-Hydroxypyren-5,8,10-trisulfonsaurem Natrium als Fluoreszenzindikator verwendet. Die Flecke wurden im Allgemeinen durch J₂-Dämpfe, reduzierende Verbindungen durch Phosphormolybdänsäure-Alkohol-Sprühreagens und kurzzeitiges Erwärmen auf 120°, und Ketone durch 2,4-Dinitrophenylhydrazin-H₃PO₄-Alkohol-Sprühreagens sichtbar gemacht.

Die *analytischen gas-chromatographischen Untersuchungen* wurden mit einem AEROGRAFHY-Fi-Gas-Chromatograph, Modell 600 B, Säule: 10% Neopentylglykolsuccinat + 2% H₃PO₄ auf «Firebrick», 60–80 mesh, 2 m × 2 mm, und mit einem F+M-Labor-Gas-Chromatograph, Modell 700, Säule: 10% SE 30 auf Chrom. W silan., 80–100 mesh, 2 m × 2 mm, ausgeführt.

Die *präparative Gas-Chromatographie* wurde im Gas-Chromatographie-Labor (Dr. A. WEHLI) der SANDOZ AG durchgeführt. Es wurde mit einem AEROGRAFHY-Fi-Gas-Chromatograph, Modell 1520, gearbeitet und als Säule 10% SE 30 auf Chrom. G, a. W., 30–45 mesh, 6 m × 10 mm, verwendet.

Übliches Aufarbeiten bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen des Rückstandes in Chloroform, Methylenchlorid oder Äther, Waschen mit 2N H₂SO₄, 2N Na₂CO₃ und Wasser, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen der Lösung im Vakuum.

Im Text werden folgende *Abkürzungen* verwendet: DC = Dünnschichtchromatographie, PDC = Präparative Dünnschichtchromatographie, SC = Säulenchromatographie, GC = Gas-Chromatographie, LM = Lösungsmittel, Ae = Äther, Alk = Äthanol, An = Aceton, Be = Benzol, Chf = Chloroform, Md = Methylenchlorid, Me = Methanol, Py = Pyridin, i.V. = im Vakuum.

2. Isolierung von [¹⁴C]-Brefeldin A (1)¹⁹⁾. – *Penicillium*-Stamm S 498 wurde in einem 5-Liter-Fermenter (NEW BRUNSWICK Co., New Brunswick, USA, Typ F 314) bei 27° einer Belüftung von 300 l pro Std. und einer Rührgeschwindigkeit von 300 Umdr. pro Min. während 10 Tagen in einem Nährmedium, das pro Liter 30 g Glucose, 8,5 g NaNO₃, 272 g KH₂PO₄, 123 g MgSO₄, 7H₂O, 25 mg FeSO₄, 7H₂O, 3 mg ZnSO₄ und entmineralisiertes H₂O (pH 5,5) enthielt, gezüchtet. Die sterile Zugabe von 16,213 mg [1-¹⁴C]-Natriumacetat (1,084 mC/mMol) erfolgte nach 3 Tagen Inkubation.

Die Kulturbrühe wurde filtriert und der Durchlauf mit 2mal 8 l Äthylchlorid extrahiert. Die mit 1mal 3 l Wasser gewaschenen Auszüge wurden über Na₂SO₄ getrocknet und i.V. eingedampft. Der Rückstand (124 mg) wurde an 4 g Sica chromatographiert. Die mit Chf-Essigester (1:1) eluierten Fraktionen (31 mg) gaben nach 3maliger Umkristallisation aus Me-Ae 19 mg Brefeldin A (1) mit 68900 dpm/mg.

16 mg Brefeldin A mit 68900 dpm/mg wurden mit 180 mg unmarkiertem Brefeldin A vermischt und gaben nach 2maliger Kristallisation 125 mg Brefeldin A (1) mit 5640 dpm/mg.

3. Abbaugesuche mit [¹⁴C]-Brefeldin A. – 3.1. **KUHN-ROTH-Abbau von [¹⁴C]-Brefeldin A.** – 18,323 mg (0,0645 mMol) [¹⁴C]-Brefeldin A (1) mit 424 dpm/mg wurden einem KUHN-ROTH-Abbau unterworfen. Das neutralisierte Destillat wurde i.V. zur Trockne gebracht. – 5 mg rohes Natriumacetat (4) und 17 mg p-Bromphenacylbromid wurden mit 10 ml Alk 1 Std. unter Rückfluss gekocht. Dann wurde i.V. zur Trockne gebracht und der Rückstand an 2 g Kieselgel chromatographiert. Die mit Be eluierten Fraktionen (10,4 mg) gaben nach 2maliger Umkristallisation aus Ae-Pentan 5 mg Essigsäure-p-bromphenacyl-ester (5) vom Smp. 84–85° und einer Aktivität von 63 dpm/mg.

3.2. **Ozon-Abbau von [¹⁴C]-Brefeldin A.** – 3.2.1. *Erster Versuch.* 125 mg (0,44 mMol) [¹⁴C]-Brefeldin A (1) mit 5640 dpm/mg wurden mit 2 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid 6 Std. bei 20° stehengelassen. Übliches Aufarbeiten gab 140 mg rohes Di-O-Acetyl-brefeldin A (2). Dieses wurde in 100 ml Essigester bei –70° mit O₃-O₂-Gemisch (5:95) behandelt bis die Lösung blau wurde. Das LM wurde i.V. abdestilliert, der farblose Rückstand in 70 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und mit 100 mg NaBH₄ während 16 Std. bei 20° gerührt. Nach Zugabe von 150 ml 0,5N

¹⁹⁾ Die mikrobiologischen Arbeiten verdanken wir den Herren Dres. E. HÄRRI und CH. STOLL aus den Forschungslaboratorien der SANDOZ AG.

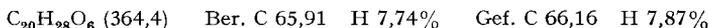
H₂SO₄ wurde das Tetrahydrofuran i.V. abdestilliert. Die wässrigen Phasen wurden in der Kälte sorgfältig mit einem Überschuss an konz. NaOH versetzt und dann 2 Std. bei 70° gehalten. Die abgekühlte Reaktionslösung wurde im KUTSCHER-STEUEDEL-Apparat mit Ae extrahiert; der Ae-Extrakt ergab 34 mg Neutralteil als farbloses Öl. Die wässrige Phase wurde kongosauer gestellt und ebenfalls im KUTSCHER-STEUEDEL-Apparat mit Ae extrahiert, wobei 36 mg Säureteil erhalten wurden.

Der Neutralteil wurde an 2 g Kieselgel chromatographiert und gab 23 mg [¹⁴C]-Hexan-1,5-diol (**8**) als farbloses Öl, das nach DC und IR. identisch war mit nichtmarkiertem, resp. (±)-Hexan-1,5-diol.

3.2.1.1. [¹⁴C]-Di-O-(*p*-nitrobenzoyl)-hexan-1,5-diol (**9**). 23 mg (0,195 mMol) [¹⁴C]-Hexan-1,5-diol (**8**) wurden mit 2 ml Py und 200 mg *p*-Nitrobenzoylchlorid 20 Std. bei 20° stehengelassen. Übliches Aufarbeiten und Chromatographie an 2,3 g Al₂O₃ neutral gab 31 mg Kristalle vom Smp. 106–108°, die nach DC, IR. und Misch-Smp. mit nichtmarkiertem Derivat identisch waren.

3.2.1.2. [¹⁴C]-Glykolsäure-*p*-toluidid (**7**). 36 mg Säureanteil aus Versuch 3.2.1. wurden mit 200 mg *p*-Toluidin in einem 15 cm langen Reagensglas innert 10 Min. auf 190° erwärmt und dann 30 Min. bei dieser Temperatur gehalten. Nach Erkalten wurde der zerkleinerte Rückstand in Chf aufgenommen und die Lösung mit 3mal 2N HCl und 1mal H₂O gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ wurde die Chf-Lösung mit etwas Kohle aufgeköcht, filtriert und eingedampft. Der Rückstand (30 mg) gab nach 3maligem Kristallisieren aus Me-Pentan 9 mg [¹⁴C]-Glykolsäure-*p*-toluidid (**7**) vom Smp. 141–142°. Die Mischprobe mit authent. Material schmolz gleich. Ebenso waren die IR-Spektren resp. Laufstrecken im DC (Chf-Me-9:1) identisch.

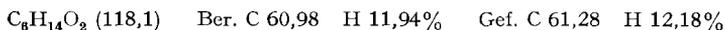
3.2.2. Zweiter Versuch. 1,0 g (3,53 mMol) [¹⁴C]-Brefeldin A mit 40260 dpm/mg wurde mit 2,0 g (7,06 mMol) radioaktivem Brefeldin A verdünnt und wie von HÄRRI *et al.* [1] beschrieben mit 24 ml Acetanhydrid in 48 ml abs. Py während 20 Std. bei 22° acetyliert. Der nach üblichem Aufarbeiten erhaltene Md-Extrakt wurde mit 250 mg Aktivkohle entfärbt und durch eine Schicht HYFLO-Celit filtriert. Nach Abdestillieren des LM i.V. resultierten 3875 mg (10,6 mMol) praktisch DC-reines (Fließmittel: Chf-Me-(95:5); J₂-aktiv) [¹⁴C]-Di-O-acetyl-brefeldin A (**2**), das bis zum konstanten Smp. aus Ae umkristallisiert wurde. $[\alpha]_D^{22} = +17^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,376$ in Me) (Radioaktivität: 10866 dpm/mg). Zur Analyse wurde 15 Std. bei 60° getrocknet.



Die Ozon-Spaltung wurde sicherheitshalber in zwei gleich grossen Ansätzen durchgeführt, von denen hier nur einer ausführlich beschrieben wird (vgl. dazu SIGG [2]: Ozon-Abbau mit reduktiver Aufarbeitung).

1850 mg (5,08 mMol) [¹⁴C]-Di-O-acetyl-brefeldin A (**2**) wurden in 500 ml Chf gelöst und während 35 Min. bei –15° mit O₃-O₂-Gemisch (5:95) behandelt (entspricht ca. 2 Äquiv. O₃). Die anschliessende Prüfung der Lösung im DC (Fließmittel: Chf-Me-(99:1); J₂-aktiv) zeigte kein Edukt mehr.

Das nach vorsichtigem Abdestillieren des LM in der Kälte erhaltene farblose und zähflüssige Ozonid wurde in 100 ml Alk aufgenommen und mit 950 mg NaBH₄ unter Rühren während 14 Std. bei 22° reduziert. Darauf wurde von den Hydroxiden abfiltriert, diese mehrmals mit Alk ausgekocht und die vereinigten Alk-Lösungen i.V. eingedampft. Nach Zugabe von 30 ml H₂O zum zähflüssigen Rückstand resultierte eine Lösung vom pH 10–11, die zur Hydrolyse 3 Std. unter Rückfluss erhitzt wurde. Die alkalisch-wässrige Lösung wurde im KUTSCHER-STEUEDEL-Apparat während 16 Std. mit Ae extrahiert und ergab nach Trocknen und Abdestillieren des LM 746 mg rohes [¹⁴C]-Hexan-1,5-diol, das an 90 g Kieselgel chromatographiert wurde. Die mit Md-Me-(93:7 bis 91:9) eluierten Fraktionen lieferten 501 mg (4,24 mMol) DC-einheitliches (Fließmittel: Md-Me-(90:10); Phosphormolybdänsäure-Alk-Sprühreagens (grau-blaue Flecke beim Erhitzen auf ca. 120°)) [¹⁴C]-Hexan-1,5-diol (**8**), $[\alpha]_D^{22} = +7^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,89$ in Me) (Lit.-Wert: $[\alpha]_D^{22} = +8^\circ$ ($c = 0,55$ in Me) [2]). Zur Analyse wurde 10 Std. bei 22° getrocknet.



Im 2. Ozonolysenansatz mit analoger Aufarbeitung resultierten weitere 496 mg (4,13 mMol) reines [¹⁴C]-Hexan-1,5-diol (**8**).

Die im KUTSCHER-STEUEDEL-Apparat extrahierte alkalisch-wässrige Lösung wurde mit 0,5 ml konz. H₂SO₄ stark angesäuert und weitere 25 Std. im selben Apparat mit Ae extrahiert. Der so

erhaltene Säureteil (217 mg) wurde als Natriumsalz isoliert und darin neben Bor-Verbindungen auch *Glykolsäure* (**6**) mit einem Gujakol-Test [15] nachgewiesen. Eine mit *p*-Bromphenacylbromid umgesetzte Probe des Natriumsalzes zeigte im DC [Fließmittel: Md-Me-(99:1); UV₂₅₄-aktiv] neben Essigsäure-*p*-bromphenacylester (aus der Hydrolyse der Acetylgruppen) auch den gesuchten *Glykolsäure-p-bromphenacylester* (Rf = 0,48) in kleiner Menge. Dieser konnte jedoch durch Säulenchromatographie (vermutlich infolge Hydrolyse an Kieselgel) nicht isoliert werden.

Aus der im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat basisch und sauer extrahierten wässrigen Lösung wurden sämtliche Ionen durch eine Mischbettsäule von ca. 45 ml IR. 120 + 90 ml IRA 400 (Ionen-austauscher der Firma MERCK AG, Darmstadt) entfernt. Nach Abdestillieren des Wassers aus dem Eluat verblieben 714 mg klare, sehr visköse Flüssigkeit. Diese wurden an 90 g Kieselgel mit Md-Me-(80:20) chromatographiert. Die Fraktionen 7–10 (126 mg) enthielten gemäss DC (Fließmittel: Md-Me-(70:30); Phosphormolybdänsäure-Alk-Sprühreagens) unter anderem auch *Äthylenglykol* (**10**) (hellblaue Flecke). Die Fraktionen 12–24 (560 mg) bestanden aus DC-reinem [¹⁴C]-3,4-(trans)-3-hydroxymethyl-4-(1',2'-dihydroxyäthyl)-cyclopentan-1-ol (**12**) (= «Tetrol») (blauschwarze Flecke), [α]_D²⁵ = -32° ± 2° (c = 1,28 in Me).

Aus dem 2. Ozonolyseansatz mit analoger Aufarbeitung resultierten weitere 444 mg (2,52 mMol) reines [¹⁴C]-Tetrol **12**.

3.2.2.1. [¹⁴C]-Tetra-O-(*p*-nitrobenzoat) **13** von Tetrol **12**. 20,0 mg (0,113 mMol) [¹⁴C]-3,4-trans-3-hydroxymethyl-4-(1',2'-dihydroxyäthyl)-cyclopentan-1-ol (**12**) wurden mit 100 mg (0,54 mMol) *p*-Nitrobenzoylchlorid in 1 ml abs. Py 2 Std. unter Rückfluss erhitzt, das Reaktionsgemisch auf wenig zerstoßenes Eis gegossen, wie üblich aufgearbeitet und das rohe Nitrobenzoat (98 mg) an 12 g Kieselgel mit Md chromatographiert. Die Fraktionen 11–15 ergaben 40 mg fast DC-reines (Fließmittel: Md, UV₂₅₄-aktiv) Nitrobenzoat **13**, das aus Md-Alk-(90:10) 3mal umkristallisiert wurde. Zur Analyse 16 Std. bei 60° getrocknet.

C₃₆H₂₈O₁₆N₄ (772,6) (radioakt. Präp.) Ber. C 56,23 H 3,71% Gef. C 55,96 H 3,65%

3.2.2.2. [¹⁴C]-Di-O-(*p*-nitrobenzoyl)-äthylenglykol (**11**). 30,0 mg unreines Äthylenglykol (**10**) aus den bei der SC des Tetrols **12** angefallenen Fraktionen 7–10 wurden mit 185 mg *p*-Nitrobenzoylchlorid in 1 ml abs. Py 1 Std. unter Rückfluss erhitzt, das Reaktionsgemisch auf wenig zerstoßenes Eis gegossen und wie üblich aufgearbeitet. Umkristallisation des Rohbenzoats (135 mg) aus Md-Me-(75:25) lieferte 55 mg Kristalle, die nach 2maligem Umkristallisieren eine unbekannte Substanz vom Smp. 155–157° und einer Aktivität von 2510 dpm/mg ergab. Aus der Mutterlauge der 1. Kristallisation resultierten 26 mg eines Substanzgemisches, das gemäss DC (Fließmittel Md, UV₂₅₄-aktiv) aus nicht umgesetztem *p*-Nitrobenzoylchlorid (Rf = 0,65) und Di-O-(*p*-nitrobenzoyl)-Äthylenglykol (**11**) (Rf = 0,5) bestand. Das Gemisch wurde durch PDC (5 × 20 cm Platte) weiter gereinigt (Fließmittel Md, UV₂₅₄-aktiv) und ergab als langsamer laufende Substanz 9,5 mg [¹⁴C]-Di-O-*p*-nitrobenzoyl-Äthylenglykol (**11**), das noch 2mal aus Alk umkristallisiert wurde. Zur Analyse wurde 5 Std. bei 60° getrocknet.

C₁₆H₁₂O₈N₂ (360,3) Ber. C 53,45 H 3,36% Gef. C 53,55 H 3,57%

3.3. KUHN-ROTH-Abbau von [¹⁴C]-Hexan-1,5-diol (**8**). – 32,0 mg (0,271 mMol) [¹⁴C]-Hexan-1,5-diol wurden mit 16,0 ml CrO₃-Oxydationslösung²⁰⁾ im Bombenrohr bei 125° während 2 Std. erhitzt (vgl. [12]). Die entstandene Essigsäure (**3**) wurde in der von SCHOENIGER *et al.* [31] beschriebenen Apparat abdestilliert. Hierzu wurde die Oxydationslösung aus dem Bombenrohr mit wenig Wasser in das Destilliergefäss gespült und mit gesättigter Na₂SO₄-Lösung auf ein Volumen von 15–20 ml nachgewaschen. Mit dem im Dampfgenerator erzeugten H₂O-Dampf wurde die Essigsäure aus der Oxydationslösung in die Vorlage hinüberdestilliert. Insgesamt wurden 3 Destillate à 100 ml aufgefangen, diese sofort und einzeln über der freien Flamme 20 Sek. aufgeköcht²¹⁾ und noch heiss mit genau eingestellter 0,00893N NaOH gegen Phenolphthalein (3 Tropfen 1 proz. alkoholische Lösung) auf schwache Rosafärbung titriert. Die Titerbestimmung der NaOH erfolgte mit KH(JO₃)₂ (Urtiter). Die unter analogen Bedingungen durchgeführten Blindversuche mit dest. H₂O allein (ohne Carbonsäurezusatz) ergaben bei 3 Destillationen à 100 ml Blindwerte von 0,72 ml (1. Destillat) und 0,50 ml (2. und 3. Destillat) 0,00893N NaOH-Verbrauch, welche bei den KUHN-ROTH-Oxydationsversuchen entsprechend berücksichtigt wurden.

²⁰⁾ CrO₃-Oxydationslösung: 100 g CrO₃ + 600 ml H₂O + 125 ml konz. H₂SO₄ (d = 1,83).

²¹⁾ Entfernen des CO₂ nach WIESENBERGER [32].

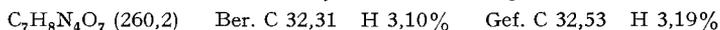
Nimmt man an, dass die Oxydation von Hexan-1,5-diol 1 Mol Essigsäure liefert, so beträgt die Ausbeute an titrierter Essigsäure 78,5% d. Th., nämlich 72,0% im 1. Destillat, 5,4% im 2. Destillat und 1,1% im 3. Destillat.

Die vereinigten Destillate wurden i.V. zur Trockne gebracht und das erhaltene amorphe Natriumacetat über das Silbersalz wie folgt gereinigt: Das Natriumacetat wurde in 6 ml H₂O gelöst und mit 6 Tropfen 2N AgNO₃-Lösung versetzt, die wässrige Lösung filtriert und i.V. auf ca. 1 ml eingengt. Das Silberacetat fiel in feinen weissen Nadeln aus. Zur Vervollständigung der Fällung wurde mit 5 ml Aceton versetzt, die Kristalle abfiltriert, 2mal mit Aceton gewaschen und i.V. getrocknet. Das so erhaltene [¹⁴C]-Silberacetat (27,5 mg) nahm am Licht bald eine leichte violett-graue Färbung an. Zur Rückgewinnung des Natriumacetats wurden die 27,5 mg (0,165 mMol) Silberacetat in 2 ml H₂O heiss gelöst und eine Lösung von 9,65 mg (0,165 mMol) NaCl in 1 ml H₂O zugetropft. Die abgekühlte Lösung wurde vom ausgefallenen, koagulierten AgCl abfiltriert. Nach Eindampfen der wässrigen Lösung und Trocknen i.V. resultierten 13,4 mg (0,159 mMol) [¹⁴C]-Natriumacetat (4), das für einen SCHMIDT-Abbau (siehe 3.4) verwendet wurde.

Wie gas-chromatographisch (Aerograph-Hifiy-Gas-Chromatograph, Modell 600 B, Kolonne: Neopentylglykolsuccinat, Temp.: 120°, Injector: 250°, Trägergas: 25 ml N₂/Min., LM: H₂O) gezeigt werden konnte, entstand bei dieser KUHN-ROTH-Oxydation ausschliesslich Essigsäure.

3.4. **SCHMIDT-Abbau von [¹⁴C]-Essigsäure (3).** – 13,0 mg (0,159 mMol) [¹⁴C]-Natriumacetat (4) (aus Kap. 3.3 des Exp. Teils) wurden in der von BRITT [16] beschriebenen Apparatur mit 26 mg NaN₃ und ca. 0,8 g Polyphosphorsäure (PPS) (zur Herstellung vgl. [33]) während 1 Std. unter häufigem Umschwenken bei 85° behandelt. Das CO₂ (19) wurde in Ba(OH)₂-Lösung absorbiert, die wie folgt zubereitet wurde: 900 ml gesättigte Ba(OH)₂-Lösung in bidestilliertem Wasser (aus Quarzapparatur) wurden mit 180 ml 10,75proz. BaCl₂-Lösung gemischt und unter N₂ durch eine Glasfritte filtriert. Das ausgefällte BaCO₃ (20) wurde abzentrifugiert, 3mal mit H₂O-Me-(1:1) gewaschen und unter der IR.-Lampe bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Dabei wurden 16,0 mg BaCO₃ erhalten. (Bei analog durchgeführten Blindversuchen ohne Carbonsäurezusatz betrug die BaCO₃-Ausbeute höchstens 0,5 mg.)

Die phosphorsaure Restlösung wurde mit 3 ml Wasser verdünnt, mit 5 ml 30proz. NaOH stark alkalisch gestellt und das Methylamin (17) nach Zugabe eines Pt-Tetraeders als Siedestein aus dem Reaktionsgefäss der SCHMIDT-Apparatur über einen Mikrokühler in eine Spezialvorlage, die 1,1 Äquiv. Pikrinsäure in 2,5 ml Alk. enthielt, vorsichtig hinüberdestilliert. Es wurden ca. 3 ml Destillat aufgefangen, dieses i.V. zur Trockne eingedampft und das Methylaminpikrat (18) (31,5 mg) 3mal aus Alk. umkristallisiert. Zur Analyse 6 Std. bei 70° getrocknet.



3.5. **CrO₃-Oxydation von [¹⁴C]-Hexan-1,5-diol (8) zur [¹⁴C]-5-Ketocaprinsäure (14).** – 965,0 mg (8,18 mMol) [¹⁴C]-Hexan-1,5-diol aus den beiden Ansätzen der Ozonspaltung (Kap. 3.2.2 des Exp. Teils) wurden in 80 ml An-H₂O (5:3) gelöst, mit 6,3 ml CrO₃-Oxydationslösung²²⁾ [30] versetzt und 7 Std. bei 22° geführt. Danach wurden weitere 0,63 ml CrO₃-Oxydationslösung²²⁾ und 70 ml H₂O (zum Lösen des klebrigen, grünen Chrom-Komplexes) zugegeben und noch 1 Std. unter Rückfluss weitergeführt. Nach Abdestillieren des Acetons i.V. wurde die grüne wässrige Lösung mit NaCl gesättigt und im KUTSCHER-STEUEDEL-Apparat während 40 Std. mit Ae extrahiert. Nach Waschen der Ae-Extrakte mit 2N H₂SO₄, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung, Trocknen mit Na₂SO₄ und Abdestillieren des LM i.V. verblieben 1008 mg rohe [¹⁴C]-5-Ketocaprinsäure (14). Diese wurde in 10 ml H₂O gelöst (pH 3,5), mit 5,1 ml 1N NaOH auf pH 9 neutralisiert und neutrale Anteile (83 mg) durch Ausäthern entfernt. Nach Eindampfen der wässrigen Lösung i.V. resultierten 716 mg rohes Natrium-[¹⁴C]-5-ketocapronat (15). – Durch die Rückextraktion der wässrigen Waschlösungen und analoge Aufarbeitung konnten weitere 129 mg rohes Natrium-[¹⁴C]-5-ketocapronat gewonnen werden.

Die Identifizierung der 5-Ketocaprinsäure erfolgte durch DC [FlieBsmittel: Md-Me-HCOOH-(94:5:1); Nachweis (sehr empfindlich) mit Vanillin-Schwefelsäure-Alk.-Sprühreagens (intensiv grün-blaue Flecke beim Erhitzen auf ca. 120°)].

3.5.1. [¹⁴C]-5-Ketocaprinsäure-p-bromphenacyl ester (16). 15,0 mg (ca. 0,1 mMol) rohes Natrium-[¹⁴C]-5-ketocapronat (15) wurden in Alk.-H₂O-(10:1) gelöst, mit 1 Tropfen 2N H₂SO₄ auf pH 5 ²²⁾ CrO₃-Oxydationslösung (vgl. [17]): 13,33 g CrO₃ + 11,5 ml konz. H₂SO₄ (d = 1,83) + H₂O ad 50 ml.

angesäuert, mit 30,5 mg (0,11 mMol) *p*-Bromphenacylbromid versetzt und 1 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach der Reaktion wurde das Gemisch mit 1 ml Alk verdünnt, filtriert und das LM mit N₂ abgeblasen. Das Rohprodukt (43 mg) zeigte im DC [Fließmittel: Md-Me-(99:1); UV₂₅₄-aktiv] neben dem gesuchten Ester (Rf = 0,21) überschüssiges *p*-Bromphenacylbromid (Rf = 0,7) und wenig *p*-Bromphenacylalkohol (Rf = 0,46). Der [¹⁴C]-5-Ketocapronsäure-*p*-bromphenacylester (**16**) konnte deshalb leicht durch PDC an einer 10-cm-Platte (Fließmittel und Nachweis wie DC) gereinigt werden. Das so erhaltene Produkt (17 mg) wurde noch 2mal aus Alk umkristallisiert. Zur Analyse wurde 5 Std. bei 45° getrocknet.

C₁₄H₁₅O₄Br (327,2) Ber. C 51,13 H 4,62% Gef. C 50,87 H 4,73%

3.6. **Reduktion von [¹⁴C]-5-Ketocapronsäure (14) zur [¹⁴C]-*n*-Capronsäure (21).** – 405 mg (ca. 2,85 mMol) rohes Natrium-[¹⁴C]-5-ketocapronat wurden mit 400 mg KOH, 0,8 ml Hydrazinhydrat und 6 ml Trimethylenglykol (als LM) während 1 Std. auf 110° erhitzt, anschliessend überschüssiges Hydrazinhydrat und Trimethylenglykol abdestilliert und zuletzt noch 2 Std. bei 200° unter Rückfluss gehalten. Das braune Reaktionsgemisch wurde mit 10 ml gesättigter NaCl-Lösung verdünnt und im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat während 22 Std. mit Ae extrahiert, wobei 472 mg Trimethylenglykol (LM) erhalten wurden. Die alkalisch-wässrige Lösung im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat wurde anschliessend mit 0,7 ml konz. H₂SO₄ angesäuert, mit ca. 4 ml Wasser verdünnt und weitere 22 Std. mit Ae extrahiert. Nach Trocknen des Ae-Extraktes und Abdestillieren des Ae resultierten 454 mg rohe [¹⁴C]-*n*-Capronsäure, die an 90 g Kieselgel gereinigt wurde (Fließmittel: Md-Me-HCOOH-(99:1:0,1)). Aus den Fraktionen 12–21 resultierten 303 mg (2,61 mMol) DC-reine [Fließmittel: Md-Me-HCOOH-(94:5:1); Nachweis: Chinidin-Chf-Sprühreagens (schwache blaue Fluoreszenz in UV₂₅₄) oder 1. Vanillin-Alk-Sprühreagens, 2. ClSO₃H und kurzes Erwärmen auf 120°] [¹⁴C]-*n*-Capronsäure (**21**). Diese wurde mit 104 mg (2,61 mMol) NaOH in 5,5 ml H₂O neutralisiert, das Wasser abdestilliert und der Rückstand im Hochvakuum bei 60° und 0,01 Torr getrocknet. Es resultierten 339 mg (2,48 mMol) trockenes Natrium-[¹⁴C]-*n*-capronat (**22**).

Mit einem zweiten gleich grossen Ansatz und analoger Aufarbeitung wurden weitere 222 mg (1,91 mMol) [¹⁴C]-*n*-Capronsäure (**21**) erhalten, die nach der Neutralisation 258 mg (1,87 mMol) Natrium-[¹⁴C]-*n*-capronat (**22**) ergaben.

3.7. **SCHMIDT-Abbau von [¹⁴C]-*n*-Capronsäure (21).** – 15,0 mg (0,11 mMol) Natrium-[¹⁴C]-*n*-capronat (**22**) wurden in der von BRITT [16] beschriebenen Apparatur mit 30 mg NaN₃ und ca. 0,7 g Polyphosphorsäure (PPS) [33] während 1,5 Std. unter häufigem Umschwenken bei 85° behandelt. Übliches, wie bei 3.4 beschriebenes Aufarbeiten lieferte 15,5 mg (0,078 mMol) [¹⁴C]-BaCO₃ (**27**). Der phosphorsaure Rückstand wurde mit 13 ml H₂O verdünnt, mit 2,5 ml 30-proz. NaOH alkalisch gestellt und im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat während 26 Std. mit Ae, der in der Vorlage 25 mg Pikrinsäure enthielt, extrahiert. Trocknen der ätherischen Pikrat-Lösung, Abdestillieren des LM und Umkristallisation des Rückstandes aus H₂O-Alk-(4:1) ergab 10,0 mg [¹⁴C]-*n*-Pentylaminpikrat (**25**), das noch zweimal aus H₂O-Alk-(4:1) umkristallisiert wurde. Zur Analyse wurde 15 Std. bei 50° getrocknet.

C₁₁H₁₆N₄O₇ (306,3) Ber. C 41,77 H 17,72% Gef. C 42,02 H 18,02%

Ein weiterer Versuch wurde im offenen Gefäss durchgeführt: zu einer Lösung von 250 mg (1,81 mMol) Natrium-[¹⁴C]-*n*-capronat (**22**) in 1,5 ml konz. H₂SO₄ wurden während 5 Std. bei 50° 130 mg NaN₃ eingerührt und anschliessend noch 15 Std. bei 22° weitergerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 10 ml H₂O und 20 ml gesättigter NaCl-Lösung verdünnt und unter Köhlen mit 5 ml 30-proz. NaOH alkalisch gestellt. Nach Extraktion mit Ae, Einleiten von HCl-Gas und Sublimation wurden 129,0 mg (1,045 mMol) [¹⁴C]-*n*-Pentylaminhydrochlorid (**24**) erhalten. Zur Analyse wurde 15 Std. bei 22° getrocknet.

C₅H₁₄ClN (123,6) Ber. C 48,58 H 11,42 N 11,33% Gef. C 48,46 H 11,70 N 11,37%

3.8. **Desaminierung von [¹⁴C]-*n*-Pentylamin (23) mit oxydativer Aufarbeitung.** – Eine Lösung von 307 mg (2,485 mMol) [¹⁴C]-*n*-Pentylaminhydrochlorid (**24**) in 2,5 ml H₂O wurde unter Rühren bei 0° mit 0,3 ml Eisessig und 0,6 ml 5N NaNO₂-Lösung versetzt. Nach 10 Std. wurden während weiteren 40 Std. insgesamt 4 Portionen à 0,12 ml Eisessig + 0,6 ml 5N NaNO₂-Lösung unter Rühren bei 0° zugegeben²³). Die gebildeten isomeren *Pentanole* **29** + **30** (ölige Schicht)

²³) Zur Methodik vgl. [34].

wurden durch mehrmaliges kräftiges Quirlen (Magnetrührer) mit Ae aus der Reaktionslösung extrahiert und die mitextrahierte Essigsäure durch Quirlen mit 0,3 ml 30-proz. NaOH aus dem Ae-Extrakt entfernt.

Die Pentanole wurden in dieser ätherischen Lösung durch Quirlen mit 2,5 ml CrO₃-Oxydationslösung²²⁾ unter Zugabe von 1,5 ml gesättigter NaCl-Lösung bei 22° während 44 Std. oxydiert. Die orange gefärbte Ae-Lösung wurde zum Abbinden der [¹⁴C]-*n*-Valeriansäure (**34**) mit 1,3 ml 30-proz. NaOH und 1,5 ml gesättigter NaCl-Lösung während 30 Min. kräftig gequirlt, die dadurch farblos gewordene Lösung (mit [¹⁴C]-*Pentan-2-on* (**32**)) abpipettiert, mit Na₂SO₄ getrocknet und mit 12 ml 0,2 N 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung²⁴⁾ und 4 ml Me versetzt. Nach Abdestillieren der LM und Umkristallisieren des Rückstandes aus Me wurden 51,5 mg rohes [¹⁴C]-*Pentan-2-on-2,4-dinitrophenylhydrazon* (**33**) vom Smp. 124–131° gewonnen.

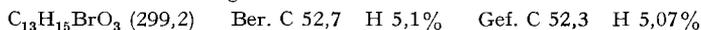
Aus der Mutterlauge konnten durch Reinigung an 22 g Kieselgel (Elutionsmittel: Be; Nachweis: orangegelbe Eigenfarbe) weitere 8,0 mg [¹⁴C]-*Pentan-2-on-2,4-dinitrophenylhydrazon* erhalten werden.

Die so gewonnenen 59,5 mg rohes **33** wurden an 10 g Kieselgel wie oben gereinigt und ergaben 21,5 mg DC-reines (Fließmittel: Be-Ae-(99:1)) [¹⁴C]-*Pentan-2-on-2,4-dinitrophenylhydrazon* (**33**). Die unreinen Fraktionen wurden durch SC (Fließmittel: Bz-Ae-(99:1)) und PDC (Fließmittel: Be-Ae-(97:3)) weiter gereinigt und ergaben nochmals 9,9 mg DC-reines **33**. – Durch analoge Aufarbeitung aller unreinen Fraktionen mittels PDC gelang es, noch 14,0 mg **33** vom Smp. 140–148° zu isolieren. Diese wurden für die Radioaktivitätsbestimmung noch 2mal aus Me umkristallisiert. Zur Analyse wurde 10 Std. bei 50° getrocknet.



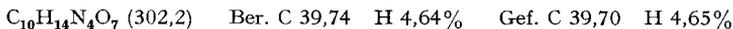
Zur Isolierung der [¹⁴C]-*n*-Valeriansäure (**34**) wurde die durch Ausquirlen erhaltene alkalisch-wässrige Lösung unter Kühlen vorsichtig mit konz. H₂SO₄ angesäuert und mehrmals mit Ae unter Quirlen (Magnetrührer) extrahiert, die Ae-Extrakte getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Die so erhaltene rohe [¹⁴C]-*n*-Valeriansäure (98 mg) wurde an 10 g Kieselgel chromatographiert (Fließmittel: Md-Me-HCOOH-(99:1:0,1)). Die Fraktionen 6–8 ergaben 57,0 mg (0,56 mMol) [¹⁴C]-*n*-Valeriansäure. Diese wurden mit 53 ml 0,01 N NaOH neutralisiert, die wässrige Lösung zur Trockne eingedampft und damit 71 mg Natrium-[¹⁴C]-*n*-valerianat (**35**) erhalten.

3.8.1. [¹⁴C]-*n*-Valeriansäure-*p*-bromphenacyl-ester (**36**). 15 mg (0,121 mMol) Natrium-[¹⁴C]-*n*-valerianat (**35**) wurden in 0,5 ml Alk + 0,1 ml 0,2 N HCl gelöst, mit 34,8 mg (0,125 mMol) *p*-Bromphenacylbromid versetzt und 2,5 Std. unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit wenig Alk verdünnt, filtriert und das Filtrat auf ein kleines Volumen eingengt. Die Lösung wurde heiss bis zur beginnenden Trübung mit H₂O versetzt und dadurch die Kristallisation ausgelöst. Das erhaltene 1. Kristallinat (19 mg) wurde noch 2mal aus Alk umkristallisiert. Zur Analyse wurde 10 Std. bei 20° getrocknet.



3.9. SCHMIDT-Abbau von [¹⁴C]-*n*-Valeriansäure (**34**). – 20,0 mg (0,16 mMol) Natrium-[¹⁴C]-*n*-valerianat (**35**) wurden in der von BRITT [16] beschriebenen Apparatur mit 40 mg NaN₃ und ca. 1,3 g PPS [33] während 1,5 Std. unter häufigem Umschwenken bei 85° behandelt. Übliches, in Kap. 3.4. des Exp. Teils beschriebenes Aufarbeiten lieferte 27,0 mg (0,137 mMol) BaCO₃ (**44**).

Der phosphorsaure Rückstand wurde mit 4,5 ml H₂O verdünnt, mit 4,5 ml 30-proz. NaOH alkalisch gestellt und das [¹⁴C]-*n*-Butylamin (**41**), wie unter 3.4 beschrieben, in eine Lösung von 53,0 mg (0,177 mMol) Pikrinsäure in 2,5 ml Alk hinüberdestilliert. Das Destillat wurde i.V. eingedampft und der Rückstand aus Alk umkristallisiert. Das so erhaltene [¹⁴C]-*n*-Butylaminpikrat (**42**) (26,0 mg) wurde noch 2mal aus Alk umkristallisiert. Zur Analyse wurde 5 Std. bei 60° getrocknet.



3.10. KUHN-ROTH-Abbau von [¹⁴C]-*Pentan-2-on-2,4-dinitrophenyl-hydrazon* (**33**). – 40,0 mg (0,15 mMol) **33** mit 1780 dpm/mg (1:1 verdünnt) wurden mit 14 ml CrO₃-Oxydationslösung²⁰⁾ im Bombenrohr bei 125° während 1,5 Std. erhitzt. Die entstandenen Säuren (1:1-Ge-

²⁴⁾ 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung: 1982 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin + 45,5 ml Me + 4,15 ml konz. H₂SO₄ (*d* = 1,83).

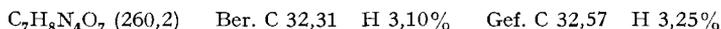
misch von *Essigsäure* (**39**) und *Propionsäure* (**37**)) wurden in der von SCHOENIGER *et al.* [31] beschriebenen Apparatur abdestilliert. 5 ml vom 1. Destillat wurden probenhalber mit 3 Tropfen Phenolphthalein-Lösung gegen 0,00893 N NaOH titriert und ergaben einen Verbrauch von 1,27 ml 0,00893 N NaOH. Die restlichen 95 ml des 1. Destillats wurden ohne Phenolphthalein mit 24 ml 0,00893 N NaOH versetzt, zur Trockne eingedampft und der Rückstand im Hochvakuum bei 60° getrocknet, wodurch 23,0 mg trockenes Gemisch von *Natriumacetat* (**40**) und *Natriumpropionat* (**38**) erhalten wurden (Weiterverarbeitung in einem SCHMIDT-Abbau).

Das 2. Destillat zeigte einen Verbrauch von 1,64 ml 0,00893 N NaOH, wurde aber, ebenso wie das 3. Destillat, nicht aufgearbeitet.

Auch hier wurden die gebildeten Säuren (**37** und **39**) gas-chromatographisch (AEROGRAPH-Hify-Gas-Chromatograph, Modell 600 B, Kolonne: Neopentylglykolsuccinat, Temp. 122°, LM: H₂O, vgl. Allgemeines) identifiziert und charakterisiert.

3.11. SCHMIDT-Abbau von [¹⁴C]-Essigsäure (39) und [¹⁴C]-Propionsäure (37) als Gemisch. – 19,5 mg (ca. 0,22 mMol) Gemisch von [¹⁴C]-Natriumacetat (**40**) und [¹⁴C]-Natriumpropionat (**38**) von Versuch 3.10 wurden in der von BRITT [16] beschriebenen Apparatur mit 40 mg NaN₃ und ca. 1,1 g Polyphosphorsäure (PPS) [32] während 2 Std. unter häufigem Umschwenken bei 85° behandelt. Übliches, bei 3.4 beschriebenes Aufarbeiten lieferte 39,0 mg (0,198 mMol) [¹⁴C]-BaCO₃ (**49**).

Der phosphorsaure Rückstand wurde mit 4,5 ml H₂O verdünnt, mit 5 ml 30-proz. NaOH alkalisch gemacht und das Gemisch von [¹⁴C]-Methylamin (**50**) und [¹⁴C]-Äthylamin (**45**) wie bei Versuch 3.4 beschrieben in eine Vorlage mit 66 mg (0,22 mMol) Pikrinsäure in 2,5 ml Alk destilliert. Das Destillat wurde i.V. zur Trockne eingedampft und der Rückstand aus Alk umkristallisiert. Das so erhaltene *Methylaminpikrat* (**51**) (22,0 mg) wurde noch 2mal aus Alk umkristallisiert. Zur Analyse wurde das Pikrat während 1 Std. bei 120° und 0,05 Torr sublimiert.



Aus der bei der Kristallisation des Methylaminpikrats erhaltenen 1. Mutterlauge wurden 17,5 mg [¹⁴C]-Äthylaminpikrat (**46**) gewonnen, das noch 2mal aus Alk umkristallisiert wurde. Zur Analyse wurde 5 Std. bei 60° getrocknet.



3.12. Perjodsäure-Spaltung von [¹⁴C]-3, 4-trans-3-Hydroxymethyl-4-(1', 2'-dihydroxyäthyl)-cyclopentan-1-ol (12) ([¹⁴C]-Tetrol). – 3.12.1. *Formal-dimedon* (**54**). Eine Lösung von 30 mg (0,17 mMol) [¹⁴C]-Tetrol **12** in 2 ml H₂O wurde innert 75 Min. portionenweise mit 41 mg (1,1 Äquiv.) HJO₄·2H₂O (Methodik vgl. [35]) versetzt und anschliessend 5 Std. bei 12° weitergerührt. Anschliessend wurde die Reaktionslösung mit 6 ml H₂O verdünnt und der [¹⁴C]-*Formaldehyd* (**53**) aus dem Reaktionsgefäss der SCHMIDT-Apparatur über den Mikrokühler in die Spezialvorlage mit 54 mg (1,1 Äquiv.) Dimedon in 2,5 ml Alk-H₂O (2:3) abdestilliert [35]. Nachdem auf diese Weise ca. 6 ml wässriges Destillat aufgefangen worden war, wurde dieses mit dem darin bereits zum Teil auskristallisierten [¹⁴C]-*Formal-dimedon* (**54**) kurz aufgeköcht, mit 5 Tropfen 2 N H₂SO₄ bis zur kongoroten Reaktion versetzt, das [¹⁴C]-Formaldimedon nach Erkalten abgenutscht und mit H₂O gewaschen. Umkristallisieren des Rohproduktes aus Alk ergab 25,0 mg **54**, das noch 2mal weiter umkristallisiert wurde. Zur Analyse wurde 5 Std. bei 60° getrocknet.



3.12.2. *Dicarbonssäure* **55**. Eine Lösung von 944,0 mg (5,34 mMol) [¹⁴C]-Tetrol **12** in 50 ml H₂O wurde innert 4 Std. bei 22° portionenweise mit 1335 mg (1,1 Äquiv.) HJO₄·2H₂O versetzt und noch 7 Std. bei 22° weitergerührt. Darauf wurde die saure Reaktionslösung mit 4,5 ml 2 N Na₂CO₃ auf pH 5 gebracht, mit NaCl gesättigt und während 80 Std. im KUTSCHER-STEUEDEL-Apparat mit Ae extrahiert.

Der rohe Ae-Extrakt (*Dihydroxyaldehyd* **52**, 760 mg viskose Flüssigkeit) wurde zur Oxydation nach JONES [17] in 70 ml An-H₂O (10:1) gelöst und unter Rühren bei 22° 30 Min. mit 5,25 ml CrO₃-Oxydationslösung²⁰⁾ stehengelassen. Nach 5-minütigem Erwärmen auf 50° wurde der Überschuss an Oxydationsmittel mit 2 ml Alk zerstört, das An weitgehend abdestilliert, der grüne zähflüssige Rückstand mit 80 ml gesättigter NaCl-Lösung verdünnt und während 60 Std. im KUTSCHER-STEUEDEL-Apparat mit Ae extrahiert. Aus dem Ae-Extrakt resultierten 664 mg (ca. 3,85 mMol) rohe, grösstenteils kristalline [¹⁴C]-*Cyclopentanon-3,4-trans-dicarbonssäure* (**55**).

Die Dicarbonsäure **55** wurde zur Veresterung in Ae-Me-(4:1) gelöst und bei 0° mit einem schwachen Überschuss einer ätherischen Diazomethanlösung versetzt. Überschüssiges Diazomethan wurde mit einem Tropfen Eisessig zerstört. Nach Abdestillieren der LM wurden 730 mg gelbe viskose Flüssigkeit als roher ^{14}C -Cyclopentanon-3,4-trans-dicarbonsäure-dimethylester (**56**) erhalten. Ein Kristallisationsversuch (Kühlen, Animpfen mit inaktivem, racemischem Material) blieb erfolglos.

Zur Reinigung wurde der rohe Ester **56** an 70 g Kieselgel mit Md-Me-(98:2 bis 94:6) chromatographiert. Die Fraktionen 8–9 (580 mg) bestanden zur Hauptsache aus dem Dimethylester **56**, der durch Destillation im Molekularkolben bei 90–110°/12 Torr während 10 Std. 478 mg etwas reineren, farblosen Dimethylester **56** lieferte. Eine weitere Reinigung an 60 g Kieselgel mit Md-Me-(97:3 bis 95:5) ergab 434 mg immer noch nicht ganz DC-reinen [Fließmittel: Md-Me-(97:3); Nachweis: 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Sprühreagens (gelbe bis orange Flecke)] Dimethylester **56**. 50 mg davon wurden für Derivate verwendet (Versuche 3.12.3.1 und 3.12.3.2). Weitere 99 mg Dimethylester wurden für einen Versuch zur Thiokeetal-Bildung (vgl. 2.14) verwendet, wobei schwer abtrennbare Nebenprodukte entstanden, so dass die restlichen 285 mg Dimethylester in 3 gleichen Portionen an 3 20-cm-PDC-Platten weitergereinigt wurden (Fließmittel: Md-Me-(95:5), schwach UV₂₅₄-aktiv). So konnten noch insgesamt 220 mg reiner ^{14}C -Cyclopentanon-3,4-trans-dicarbonsäure-dimethylester (**56**) gewonnen werden: $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -118^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,93$ in Chf) (Lit.-Wert: $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -119^\circ$ ($c = 0,55$ in Chf) [23]).

3.12.3.1. Semicarbazon **57** von ^{14}C -Cyclopentanon-3,4-trans-dicarbonsäure-dimethylester (**56**). 30,0 mg (0,15 mMol) Dimethylester **56** wurden in 1 ml Me gelöst, mit 0,35 ml Semicarbazid-Lösung versetzt und 30 Min. bei 22° stehengelassen; anschliessend wurde das LM mit N₂ abgeblasen, der Rückstand (ca. 15 mg) mit H₂O gewaschen und 3mal aus wenig Me umkristallisiert. Zur Analyse wurde 15 Std. bei 60° getrocknet.

C₁₀H₁₅N₃O₅ (285,3) Ber. C 46,96 H 5,88 N 16,34% Gef. C 46,80 H 6,15 N 16,44%

3.12.3.2. 2,4-Dinitrophenylhydrazon **58** von ^{14}C -Cyclopentanon-3,4-trans-dicarbonsäure-dimethylester (**56**). Eine Lösung von 20,0 mg (0,1 mMol) Dimethylester **56** in 1 ml Me wurde mit 0,44 ml 0,25 N 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung versetzt, das ausgefallene Hydrazon abgenutscht, mit wenig Wasser gewaschen und aus Me-Md-(5:1) umkristallisiert. Das 1. Kristallisat (29,0 mg) wurde für die Radioaktivitätsbestimmung noch 3mal aus obigem LM-Gemisch umkristallisiert. Das racemische Derivat vom Smp. 149–152° wurde zur Analyse 10 Std. bei 50° getrocknet.

C₁₅H₁₆N₄O₈ (380,3) Ber. C 47,37 H 4,24% Gef. C 47,59 H 4,42%

3.13. SCHMIDT-Abbau von ^{14}C -Cyclopentanon-3,4-trans-dicarbonsäure (**55**). – 21,0 mg (ca. 0,122 mMol) rohe ^{14}C -Cyclopentanon-3,4-trans-dicarbonsäure (aus Versuch 3.12.2) wurden in der von BRITT [16] beschriebenen Apparatur mit 62 mg NaN₃ und ca. 1,1 g Polyphosphorsäure (PPS) [33] während 4 Std. unter häufigem Umschwenken bei 85° behandelt. Übliches wie bei Versuch 3.4 beschriebenes Aufarbeiten lieferte 13,0 mg (0,066 mMol) BaCO₃ (**70**).

Das 2. Spaltprodukt der SCHMIDT-Reaktion, ^{14}C -Cyclopentanon-3,4-trans-diamin, konnte nicht gefasst werden.

3.14. Thiokeetal **59** von ^{14}C -Cyclopentanon-3,4-trans-dicarbonsäure-dimethylester (**56**). – Eine Lösung von 219,0 mg (1,095 mMol) Dimethylester **56** in 20 ml Md wurde mit 2 ml Propan-1,3-dithiol versetzt. Durch diese Lösung wurde bei –15° während 2,5 Std. trockenes HCl-Gas geleitet. Anschliessend wurde das LM i.V. bei 22° und das Propan-1,3-dithiol bei ca. 40° im Hochvakuum abdestilliert. Die zurückgebliebene gelbliche, viskose Flüssigkeit (375 mg), die noch Reste von Propan-1,3-dithiol enthielt, wurde an zwei 20-cm-PDC-Platten ein 1. Mal gereinigt (Fließmittel: Md-Me-(99:1), schwach UV₂₅₄-aktiv). Das so erhaltene noch nicht ganz reine Thiokeetal (230 mg) wurde noch ein 2. Mal an zwei gleichen PDC-Platten auf dieselbe Art gereinigt und ergab nach Trocknen im Hochvakuum während 1 Std. bei 22° 185 mg (0,635 mMol) reines ^{14}C -Thiokeetal **59**, $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -12,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,115$ in Md).

Aus einem analogen Ansatz mit 99,0 mg (0,495 mMol) Dimethylester **56** in 10 ml Md mit 1 ml Propan-1,3-dithiol wurden nach 2maliger Reinigung auf je einer 20-cm-PDC-Platte noch 64,0 mg (0,266 mMol) reines ^{14}C -Thiokeetal **59** erhalten.

Das racemische, radioinaktive Thiokeetal vom Smp. 65,5–66° wurde zur Analyse 2 Std. bei 22° getrocknet.

C₁₂H₁₈O₄S₂ (291,4) Ber. C 49,65 H 6,25 S 22,08% Gef. C 49,91 H 6,42 S 21,80%

3.15. **Reduktion des $[^{14}\text{C}]$ -Thioketals 59 mit RANEY-Nickel und Hydrolyse.** – Eine Lösung von 185,0 mg (0,637 mMol) $[^{14}\text{C}]$ -Thiokeetal **59**, in 9 ml abs. Me gelöst, wurde mit ca. 3 g RANEY-Nickel (FLUKA AG, Buchs/SG) 4,5 Std. unter Rückfluss und Rühren erhitzt. Danach wurden weitere 3 g RANEY-Nickel zugesetzt und nochmals 5,5 Std. unter Rückfluss weitergerührt. In einem DC [Fließmittel: Md-Me-(99:1); J_2 , Phosphormolybdänsäure-Alk-Sprühreagens (graublau Flecke, sehr empfindlich)] konnte kein Thiokeetal mehr nachgewiesen werden. Das RANEY-Nickel wurde durch mit Celit abgedichtetes Filterpapier vorsichtig abfiltriert und zuerst mit Me, dann mit Md gewaschen. Das milchige, opaleszierende Filtrat wurde i.V. eingedampft, die verbliebene Flüssigkeit in wenig Md aufgenommen, vom ausgefallenen Schwefel abfiltriert und erneut i.V. eingedampft.

Der so erhaltene rohe $[^{14}\text{C}]$ -Cyclopentan-1,2-trans-dicarbonsäure-dimethylester (**64**) wurde zur Hydrolyse in ca. 1 ml Ae aufgenommen und während 12 Std. bei 22° in geschlossenem Gefäss mit 1,5 ml 2N NaOH kräftig gequirlt (Magnetrührer). Darauf wurde die alkalisch-wässrige Lösung unter Kühlen mit 6 Tropfen konz. H_2SO_4 angesäuert und die zum Teil schon ausgefallene Dicarbonsäure mit mehreren Portionen Ae unter Quirlen (Magnetrührer) im selben Reaktionsgefäss extrahiert. Es resultierten 82,0 mg (0,556 mMol) weisse $[^{14}\text{C}]$ -Cyclopentan-1,2-trans-dicarbonsäure (**63**).

Mit einem analogen Ansatz von 64,0 mg (0,22 mMol) $[^{14}\text{C}]$ -Thiokeetal **59** in 3 ml abs. Me mit ca. 2 g RANEY-Nickel wurden nach 4-stdg. Rückfluss (unter Rühren) und anschliessender Hydrolyse während 4 Std. bei 22° mit 0,5 ml 2N NaOH 27,0 mg (0,171 mMol) Dicarbonsäure **63** erhalten.

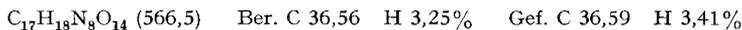
Die rohe Dicarbonsäure (109,0 mg) wurde ein 1. Mal durch Sublimation bei 100–110°/0,01 Torr gereinigt und so 105,0 mg Dicarbonsäure **63** vom Smp. 125–177° erhalten. 3maliges Umkristallisieren des Sublimats aus Ae lieferte 82,0 mg (0,518 mMol) reine $[^{14}\text{C}]$ -Cyclopentan-1,2-trans-dicarbonsäure (**63**) vom Smp. 170–181° und $[\alpha]_D^{25} = -82 \pm 2^\circ$ ($c = 0,937$ in Ae). Davon wurden insgesamt 6,0 mg für IR.-Spektren, $[^{14}\text{C}]$ -Bestimmung und C, H-Analyse verwendet. Zur Analyse des radioaktiven Präparates wurde 6 Std. bei 40° getrocknet.



Für die Folgereaktionen wurden die 76,0 mg $[^{14}\text{C}]$ -Cyclopentan-1,2-trans-dicarbonsäure der Aktivität 9150 dpm/mg mit 456,0 mg reiner radioinaktiver, racemischer Cyclopentan-1,2-dicarbonsäure verdünnt. Durch 4maliges Umkristallisieren aus Ae resultierten 469,0 mg $[^{14}\text{C}]$ -Cyclopentan-1,2-dicarbonsäure (**63**).

3.16. **SCHMIDT-Abbau von $[^{14}\text{C}]$ -Cyclopentan-1,2-trans-dicarbonsäure (63).** – 25,0 mg (0,158 mMol) der 1:6 verdünnten $[^{14}\text{C}]$ -Cyclopentan-1,2-trans-dicarbonsäure der Aktivität 1225 dpm/mg wurden in der von BRITT [16] beschriebenen Apparatur mit 100 mg NaN_3 und ca. 1,5 g Polyphosphorsäure (PPS) [33] während 2,5 Std. unter häufigem Umschwenken bei 85° behandelt. Übliches, in Versuch 3.4 beschriebenes Aufarbeiten lieferte 50,5 mg (0,256 mMol) BaCO_3 (**62**).

Der phosphorsaure Rückstand wurde mit 30 ml H_2O verdünnt, mit 4 ml 30-proz. NaOH alkalisch gestellt und nach Zugabe von 40 ml gesättigter NaCl-Lösung während 22 Std. im KUTSCHER-STEUEDEL-Apparat mit Ae, der in der Vorlage 84 mg (1,1 Äquiv.) Pikrinsäure in 1 ml Alk gelöst enthielt, extrahiert. Aufarbeiten des Ae-Extraktes ergab 19,0 mg schwerlösliches $[^{14}\text{C}]$ -Cyclopentan-1,2-trans-diamin-dipikrat (**67**), das noch 2mal aus Alk umkristallisiert wurde. Zur Analyse wurde 15 Std. bei 60° getrocknet.



In analoger Weise wurden 444,0 mg (2,81 mMol) 1:6 verdünnte $[^{14}\text{C}]$ -Cyclopentan-1,2-trans-dicarbonsäure (**63**) der Aktivität 1225 dpm/mg in 5 ml konz. H_2SO_4 ($d = 1,83$) gelöst und unter Rühren im offenen Gefäss 1,0 g NaN_3 portionenweise während 4 Std. bei 75–80° zugegeben. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde noch 2 Std. bei 80° weitergerührt, das viskose Reaktionsgemisch anschliessend mit 45 ml H_2O verdünnt, mit 11 g KOH in 25 ml H_2O stark alkalisch gestellt und während 46 Std. im KUTSCHER-STEUEDEL-Apparat mit Ae extrahiert. Der Ae-Extrakt wurde mit K_2CO_3 getrocknet und während 15 Min. trockenes HCl-Gas bis zur Sättigung eingeleitet, wobei sich die ätherische Lösung infolge Hydrochlorid-Bildung stark trübte. Nach Abdestillieren des Ae und Trocknen des Rückstandes im Hochvakuum bei 50° resultierten 385,0 mg (2,13 mMol) trockenes, weisses $[^{14}\text{C}]$ -Cyclopentan-1,2-trans-diamin-dihydrochlorid (**66**), das direkt für die KMnO_4 -Oxydation (Versuch 3.17) weiterverwendet wurde.

3.17. **KMnO₄-Oxydation von [¹⁴C]-Cyclopentan-1,2-trans-diamin (65).** – Eine Lösung von 385,0 mg (2,13 mMol) [¹⁴C]-Cyclopentan-1,2-trans-diamin-dihydrochlorid (66) in 25 ml H₂O wurde mit 2,0 g KMnO₄ unter Rühren während 20 Min. bei 65° oxydiert. Ein schwacher KMnO₄-Überschuss wurde mit 2 ml Alk zerstört, die neutrale Lösung mit 1,5 ml 2N NaOH auf pH 9 eingestellt und das MnO₂ durch ein mit wenig Celit gedichtetes Filter abfiltriert. Das klare, farblose Filtrat wurde anschliessend auf kleines Volumen eingengt, mit 2N H₂SO₄ angesäuert, mit NaCl gesättigt und während 30 Std. im KUTSCHER-STEUEDEL-Apparat mit Ae extrahiert. Nach Eindampfen des getrockneten Ae-Extraktes verblieben 214 mg halb flüssiger, halb kristalliner, schwach gelblicher Rückstand.

Zur Gewinnung der gewünschten Komponenten ([¹⁴C]-Glutarsäure (68) und [¹⁴C]-Bernsteinsäure (70)) kam nur eine gas-chromatographische Reinigung in Frage. Das rohe, stark verunreinigte Säuregemisch (214 mg) wurde zu diesem Zweck in wenig Ae-Me-(2:1) gelöst und bei 0° mit einer ätherischen Diazomethanlösung in das Gemisch der Dimethylester verwandelt. Nach vorsichtigem Abdestillieren der LM resultierten ca. 210 mg rohes Estergemisch, das, wie später aus dem Gas-Chromatogramm ersichtlich war, immer noch etwas LM (Me) enthielt.

Die präparative gas-chromatographische Auftrennung wurde mit einem AEROGRAPH-1520-Gas-Chromatograph, Moduline Serie B, und einem speziellen Auffangsystem gearbeitet, das ein praktisch quantitatives Auffangen der getrennten Komponenten erlaubte. Als Säule diente 10% SE 30 auf Chrom. G. DMCS a.w. 30–45 mesh, 4 m lang und 10 mm Durchmesser; flow: 90 ml He pro Min.

In einem ersten Durchlauf konnten als Hauptpik 5 ca. 28 mg reiner [¹⁴C]-Glutarsäure-dimethylester (69) aufgefangen werden. Der zur Hauptsache aus den Piken der Bernsteinsäure und der unbekanntem 3. Hauptsubstanz bestehende Vorlauf wurde in 2 weiteren Durchgängen zuerst grob, dann fein gereinigt, wobei nur der Pik 4 sauber als [¹⁴C]-Bernsteinsäure-dimethylester (71) (ca. 14 mg) isoliert werden konnte. Bei den in diesem flüssigen Dimethylester 71 trotz einheitlichem Pik regelmässig auftretenden farblosen Kristallen vom Smp. 119–119,5° handelt es sich nach Misch-Smp. um Bernsteinsäureanhydrid. Sie wurden infolgedessen ohne Bedenken für die Folgereaktionen (Hydrolyse und SCHMIDT-Abbau) mitverarbeitet.

Bei der Feinreinigung unreiner Fraktionen fielen weitere 6 mg von reinem [¹⁴C]-Glutarsäure-dimethylester (69) an.

Eine andere Substanz (3. Hauptpik, ca. 15 mg) sowie zwei andere Substanzen (ca. 14 mg und ca. 26 mg) konnten infolge Zersetzung und Verfärbung nie rein erhalten werden, weshalb die Aufklärung dieser Nebenprodukte (durch IR.- und NMR.-Spektren) nicht gelang.

Zur Hydrolyse wurden der [¹⁴C]-Glutarsäure-dimethylester (69) (ca. 34 mg) und der [¹⁴C]-Bernsteinsäure-dimethylester (71) (ca. 14 mg) mit je ca. 1 ml Ae-Me (2:1) aus dem GC-Auffangröhrchen gespült und in geschlossenem Gefäss unter kräftigem Quirlen mit je 1 ml 2N NaOH während 40 Std. bei 22° und während 1 Std. bei 55° behandelt.

KUTSCHER-STEUEDEL-Extraktion der [¹⁴C]-Glutarsäure (68) während 28 Std. mit Ae lieferte 27,5 mg Rohprodukt, Sublimation bei 75°/0,01 Torr ergab 26,4 mg [¹⁴C]-Glutarsäure vom Smp. 88–94°. Durch 1maliges Umkristallisieren aus Chf resultierten noch 25,5 mg (0,193 mMol) [¹⁴C]-Glutarsäure vom Smp. 92,5–96,5°, die direkt für einen SCHMIDT-Abbau (3.18) weiterverwendet wurde.

KUTSCHER-STEUEDEL-Extraktion der [¹⁴C]-Bernsteinsäure (70) während 40 Std. mit Ae lieferte 11,5 mg weisse Säure 70 vom Smp. 185° (sublimiert und verdunstet ab ca. 140°). Nach Sublimation bei 90°/0,01 Torr verblieben noch 10,5 mg (0,089 mMol) reine [¹⁴C]-Bernsteinsäure vom Smp. 185°, die ebenfalls direkt in einem SCHMIDT-Abbau (Versuch 3.19.) weiterverarbeitet wurde.

3.18. **SCHMIDT-Abbau von [¹⁴C]-Glutarsäure (68).** – 25,5 mg (0,193 mMol) [¹⁴C]-Glutarsäure (aus Versuch 3.17) wurden in der von BRITT [16] beschriebenen Apparatur mit 100 mg NaN₃ und ca. 1,2 g Polyphosphorsäure (PPS) [33] während 4 Std. unter häufigem Umschwenken bei 85° behandelt. Übliches wie in Versuch 3.4 beschriebenes Aufarbeiten lieferte 52,1 mg (0,264 mMol) [¹⁴C]-BaCO₃ (76).

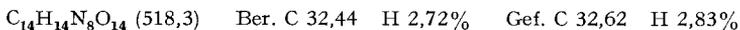
Der phosphorsaure Rückstand wurde wie in Versuch 3.7. beschrieben mit Wasser und gesättigter NaCl verdünnt und nach Alkalisich-stellen 40 Std. im KUTSCHER-STEUEDEL-Apparat mit Ae, der 115 mg Pikrinsäure in 1 ml Alk gelöst enthielt, extrahiert. Das an der Kolbenwand der Vorlage fein auskristallisierte Pikrat wurde mit wenig H₂O-Alk (1:1) gelöst, die Lösung auf

kleines Volumen eingeengt und aus ca. 1 ml H₂O kristallisiert. Das in dünnen goldgelben Plättchen erhaltene [¹⁴C]-*Propan-1,3-diamin-dipikrat* (**73**) (10,1 mg) zersetzt sich ab ca. 240° ohne zu schmelzen. Für die Radioaktivitätsbestimmung wurde noch 2mal aus H₂O umkristallisiert. (Aus dem aufgearbeiteten Ae-Extrakt kristallisierte kein Pikrat mehr, sondern nur noch Pikrinsäure.) Zur Analyse wurde 15 Std. bei 60° getrocknet.



3.19. **SCHMIDT-Abbau von [¹⁴C]-Bernsteinsäure (70).** – 10,5 mg (0,089 mMol) [¹⁴C]-Bernsteinsäure (aus Versuch 3.17) wurden in der von BRITT [16] beschriebenen Apparatur mit 40 mg NaN₃ und ca. 0,7 g Polyphosphorsäure (PPS) [33] während 1 Std. unter häufigem Umschwenken bei 85° behandelt. Übliches wie bei Versuch 3.4. beschriebenes Aufarbeiten lieferte 17,2 mg [¹⁴C]-BaCO₃ (**81**).

Der phosphorsaure Rückstand wurde mit 15 ml H₂O verdünnt, mit 3 ml 30-proz. NaOH alkalisch gestellt und während 40 Std. im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat mit Ae, der 53 mg Pikrinsäure in 0,5 ml Alk gelöst enthielt, extrahiert. Ähnlich wie bei der Isolierung des Pikrats **73** in Versuch 3.18 kristallisierte aus dem Ae-Extrakt nur noch Pikrinsäure. Das an der Kolbenwand der Ae-Vorlage auskristallisierte [¹⁴C]-Äthylendiamin-dipikrat (**78**) gab aus H₂O 3,2 mg hellgelbe, rhomboedrische Plättchen vom Smp. 233° (Zers.). Zur Analyse wurde 15 Std. bei 60° getrocknet.



LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. HÄRRI, W. LOEFFLER, H. P. SIGG, H. STÄHELIN & CH. TAMM, *Helv.* **46**, 1235 (1963).
- [2] H. P. SIGG, *Helv.* **47**, 1401 (1964).
- [3] V. L. SINGLETON, N. BOHONOS & A. J. ULLSTRUP, *Nature* **187**, 1072 (1958).
- [4] V. L. SINGLETON & N. BOHONOS, *Agr. biol. Chemistry (Jap.)* **28**, 77 (1964).
- [5] V. BETINA, P. NEMEČ, J. DOBIAS & Z. BARATH, *Folia Microbiol. (Prag)* **7**, 353 (1962); V. BETINA, P. NEMEČ & S. KOVAC, *Acta chem. scand.* **19**, 519 (1965).
- [6] V. BETINA, J. FUSKA, A. KJAER, M. KUTKOVA, P. NEMEC & R. H. SHAPIRO, *J. Antibiotics* **19A**, 115 (1966).
- [7] R. N. MIRRINGTON, E. RITCHIE, C. W. SHOPPEE, S. STERNHELL & W. C. TAYLOR, *Austral. J. Chemistry* **19**, 1265 (1966).
- [8] R. G. COOMBE, J. J. JACOBS & T. R. WATSON, *Austral. J. Chemistry* **21**, 783 (1968).
- [9] A. J. BIRCH, O. C. MUSGRAVE, R. W. RICKARDS & H. SMITH, *J. Chem. Soc.* **1959**, 3146.
- [10] R. N. MIRRINGTON, E. RITCHIE, C. W. SHOPPEE, W. C. TAYLOR & S. STERNHELL, *Tetrahedron Letters* **1964**, 365.
- [11] J. H. RICHARDS & J. B. HENDRICKSON, «The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins», Edit. W. A. Benjamin Inc., New York 1964.
- [12] R. G. COOMBE, P. S. FOSS & T. R. WATSON, *Chem. Commun.* **1967**, 1229.
- [13] R. KUHN & F. L'ORSA, *Angew. Chem.* **44**, 847 (1931); F. PREGL & H. ROTH, *Quantitative Organische Mikroanalyse*, 7. Aufl., Verlag Springer, Wien 1958.
- [14] A. LIPP, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **18**, 3280 (1885).
- [15] Vgl. M. DENIGES, *Bull. Soc. chim. France* [4] **5**, 648 (1909).
- [16] Vgl. J. J. BRITT, *Diss. ETH Nr. 2948*, Zürich 1959, sowie Privatmitteilung von Prof. Dr. D. ARIGONI, für die wir bestens danken.
- [17] K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES & B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc.* **1946**, 39.
- [18] H. STETTER, *Angew. Chem.* **67**, 769 (1955).
- [19] J. R. HUNTER, V. H. ORTEGREN & J. W. PENCE, *Analyt. Chemistry* **32**, 682 (1960); L. D. METCALF, *Nature* **188**, 142 (1960).
- [20] C. SCHUERCH & E. H. HUNTRESS, *J. Amer. chem. Soc.* **71**, 2233 (1948).
- [21] HUANG-MINLON, *J. Amer. chem. Soc.* **68**, 2467 (1946).
- [22] Vgl. K. KAHR & C. BERTHER, *Chem. Ber.* **93**, 132 (1960).
- [23] K. AUWERS, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **26**, 270 (1893).
- [24] C. A. GROB, *Angew. Chem.* **70**, 343 (1958).
- [25] L. N. OWEN & A. G. PETO, *J. chem. Soc.* **1955**, 2383.
- [26] U. HANDSCHIN, *Diss. Basel* 1968.

- [27] W. D. OLLIS, I. O. SUTHERLAND, R. C. CODNER, J. J. GORDON & G. A. MILLER, *Proc. chem. Soc.* 1960, 347.
 [28] S. BERGSTRÖM, H. DANIELSSON, D. KLEINBERG & B. SAMUELSSON, *J. biol. Chemistry* 239, PC 4006 (1964); B. SAMUELSSON, *J. Amer. chem. Soc.* 87, 3011 (1965); M. HAMBERG & B. SAMUELSSON, *ibid.* 88, 2349 (1966); M. HAMBERG & B. SAMUELSSON, *J. biol. Chemistry* 242, 5336 (1967).
 [29] F. KALBERER & J. RUTSCHMANN, *Helv.* 44, 1956 (1961).
 [30] Vgl. T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Discuss. Farad. Soc. Nr. 7*, 305 (1949); G. R. DUNCAN, *J. Chromatogr.* 8, 37 (1962).
 [31] W. SCHÖNIGER, H. LIEB & M. G. EL. DIN. IBRAHIM, *Mikrochimica Acta* 1954, 96; W. SCHÖNIGER & W. und A. HAACK, *ibid.* 1956, 1369.
 [32] E. WIESENBERGER, *Mikrochem.* 33, 51 (1947).
 [33] R. C. GILMORE, J. R. und W. J. HORTON, *J. Amer. chem. Soc.* 73, 1411 (1951).
 [34] HOUBEN-WEYL: *Methoden der Organischen Chemie*, Bd. 11, 133 (1958).
 [35] HOUBEN-WEYL: *Methoden der Organischen Chemie*, Bd. 2, 456 (1953) und Bd. 7, 352 (1954).

225. Synthesen in der Isochinolinreihe

Synthesen von 7-Hydroxy-6-methoxy-2-methyl-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxy-phenäthyl)-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolin, einem wichtigen Zwischenprodukt zur Synthese von Homoapomorphin-Alkaloiden

von A. Brossi, J. Van Burik und S. Teitel

Chemische Forschungsabteilung der HOFFMANN-LA ROCHE, INC.,
 Nutley, New Jersey, USA

(12. X. 68)

Summary. Polymethoxylated 1-phenethyl-3,4-dihydro- and -1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolines were selectively demethylated by varying the mineral acid treatment. Under these conditions, the 6-methoxyl was the most stable, while the 4'-methoxyl was the most labile. Based on this study and by employing an unprotected phenolic intermediate in the BISCHLER-NAPIERALSKI cyclization, an efficient, simple and technically feasible synthesis of the diphenol **1**, an important intermediate in the synthesis of homoapomorphine alkaloids, was achieved.

Vor einigen Jahren haben wir zusammenfassend über Darstellung und Eigenschaften der in anderem Zusammenhang synthetisierten 1-phenäthyl-substituierten Tetrahydro-isochinoline **2**, **3** und **4** berichtet [1].

