

108. Die absolute Konfiguration der 3,5-Diaminohexansäure aus der β -Lysin-Mutase-Reaktion

von Fritz Kunz, János Rétey¹⁾, Duilio Arigoni

Laboratorium für Organische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich

und Lin Tsai und Thressa C. Stadtman

Laboratory of Biochemistry, National Heart Institute,
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

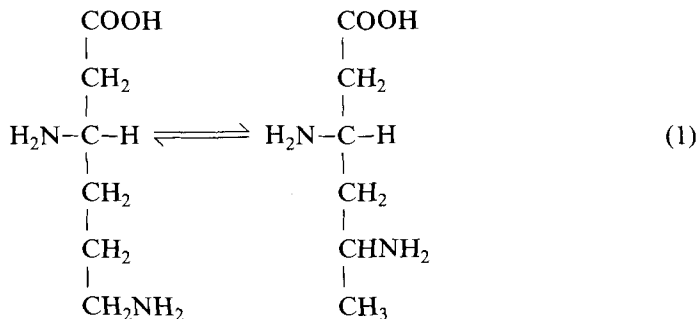
(6.1.78)

Absolute configuration of the 3,5-diaminohexanoic acid produced in the β -lysine mutase reaction

Summary

The (3*S*, 5*S*)-configuration of the 3,5-diaminohexanoic acid **3** produced by the coenzyme-B₁₂-dependent β -lysine mutase from *Clostridium sticklandii* has been determined by two different methods: by comparison of the ¹H-NMR.-spectrum of its δ -lactam with that of synthetic (\pm)-*cis*- and (\pm)-*trans*-4-amino-6-methyl-piperidones (**1** and **2**) and by chemical correlation with (+)-(6*S*)-6-methyl-piperidone-2 (**9**).

Eine 3,5-Diaminohexansäure unbekannter Konfiguration wurde vor einiger Zeit als Zwischenprodukt in der anaeroben Gärung von Lysin zu Buttersäure, Essigsäure und Ammoniak durch gewisse *Clostridium*-Stämme [1-3] nachgewiesen. Sie fällt als Produkt einer Coenzym-B₁₂-abhängigen Enzymreaktion an, in deren Verlauf die endständige Aminogruppe des (*S*)- β -Lysins nach C(5) wandert [4] (Gl. 1).



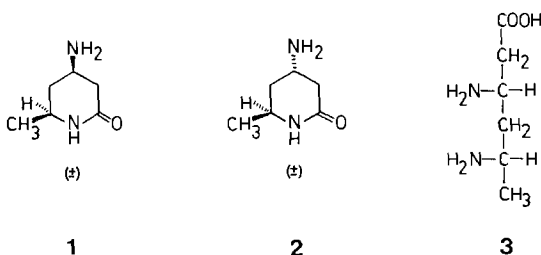
¹⁾ Neue Adresse: Lehrstuhl für Biochemie im Institut für Organische Chemie der Universität Karlsruhe.

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration der neuen Aminosäure ist nicht zuletzt im Hinblick auf den Mechanismus der Coenzym-B₁₂-katalysierten Umlagerungen von Interesse. Verwandte, vom selben Coenzym abhängige Reaktionen, die auf ihre Stereochemie bereits untersucht worden sind, gaben hinsichtlich ihres sterischen Verlaufs kein einheitliches Bild. Bei der Glutamat-Mutase- und Propandioldehydrase-Reaktion verläuft die Substitution der wandernden Gruppe mit Inversion [5-7], bei der Methylmalonyl-CoA-Mutase-Reaktion indessen mit Retention der Konfiguration [8-10].

Da im Laufe der β -Lysin-Mutase-Reaktion das chirale Zentrum am C(3) des Substrates nicht direkt betroffen wird, bleibt die (3*S*)-Konfiguration auch im Produkt erhalten. Die Frage nach der Konfiguration des Produktes kann somit durch Bestimmung der relativen Konfiguration seiner zwei chiralen Zentren, C(3) und C(5), oder durch eine unabhängige Ermittlung der absoluten Konfiguration am C(5) beantwortet werden.

Enzymatisch hergestellte 3,5-Diaminohexansäure stand nur in geringen Mengen zur Verfügung. Deshalb entschlossen wir uns, die Konfigurationszuteilung an synthetisch hergestelltem Material vorzunehmen und anschliessend das enzymatisch erhaltene Produkt mit einer der synthetisch gewonnenen Säuren zu identifizieren.

Das durch Anlagerung von Ammoniak an Sorbinsäure erhältliche Gemisch von 3,5-Diaminohexansäuren [11] wurde in leichter Abänderung der beschriebenen Methode [2] durch fraktionierte Kristallisation der Dihydrochloride in zwei Diastereomere getrennt. Das schwerer lösliche und höherschmelzende Dihydrochlorid gab nach Freisetzung der Aminosäure und anschliessender Cyclisierung das racemische δ -Lactam **1**, während aus dem löslicheren und niedrigerschmelzenden Dihydrochlorid nach der gleichen Prozedur das diastereomere Racemat **2** entstand.

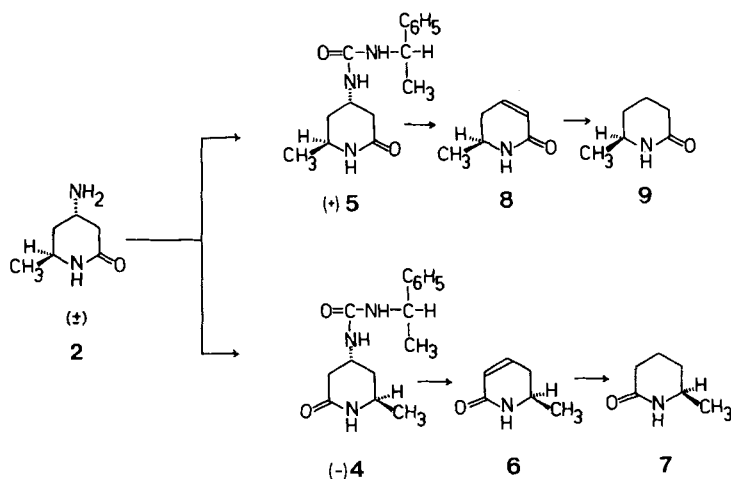


Ein erster Hinweis auf die relative Konfiguration von **1** und **2** ergab sich aus der Betrachtung ihrer ¹H-NMR.-Spektren, bei welchen die Signale der zwei H-Atome in Stellung 3 jeweils zwischen 2 und 3 ppm als der AB-Teil eines ABX-Systems erscheinen. Für Lactam **1** findet man die Kopplungskonstanten $J_{AX}=11$ und $J_{BX}=5,5$ im Einklang mit einer (annähernd) diaxialen Lage von H_A und H_X [12]. Diese diaxiale Beziehung fehlt hingegen beim diastereomeren Lactam **2**, dessen entsprechende Protonen sowohl für die H_A-H_X- als auch für die H_B-H_X-Wechselwirkung eine Kopplungskonstante von 5,5 aufweisen.

Unter Zugrundelegung einer Halbsesselkonformation der Lactamringe [13] und in der wohlbegründeten Annahme, dass die sperrige Methylgruppe in beiden Isomeren die stabilere, *quasi*-äquatoriale Lage einnehmen wird, lässt sich aus diesen Werten die in den Formeln 1 und 2 angegebene *cis*- bzw. *trans*-Anordnung der Substituenten ableiten.

Das aus der enzymatisch gewonnenen, am C(3) (*S*)-konfigurierten 3,5-Diaminohexansäure abgeleitete δ -Lactam [2] muss mit einer Komponenten von Racemat 2 identisch sein, besitzt es doch das gleiche $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum. Dies ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass von den zwei racemischen 3,5-Diaminohexansäuredihydrochloriden nur jenes teilweise durch *Clostridium*-Stämme vergoren wird, welches konfigurativ Racemat 2 entspricht. Dementsprechend lässt sich der enzymatisch gebildeten Säure die (3*S*, 5*S*)-Konfiguration zuteilen (vgl. 3).

Eine unabhängige direkte Zuordnung der absoluten Konfiguration am C(5) der enzymatisch gebildeten 3,5-Diaminohexansäure konnte durch folgende Experimente erbracht werden: Umsetzung des synthetischen (\pm)- δ -Lactams 2 mit (+)-(*S*)-(1-Phenyläthyl)-isocyanat [15] führte zu zwei diastereomeren Harnstoffderivaten (-)-4 und (+)-5, welche chromatographisch getrennt werden konnten. Die Pyrolyse von (-)-4 bei 230° gab neben *N,N*-Di(1-phenyläthyl)-harnstoff ein Produkt, dem anhand der instrumental-analytischen Daten die Struktur 6 zugeteilt wurde²⁾. Katalytische Hydrierung von 6 in Gegenwart eines Pt-Katalysators führte zum 6-Methylpiperidon-2 7, welches eine negative optische Drehung zeigte ($[\alpha]_{\text{D}} = -21,9^\circ$). Übertragung dieser Reaktionsfolge auf das Harnstoffderivat (+)-5 führte erwartungsgemäss zum positiv drehenden 6-Methylpiperidon-2 9 ($[\alpha]_{\text{D}} = +26,6^\circ$). Für letzteres war schon früher von Červinka *et al.* [14] die (6*S*)-Konfiguration abgeleitet worden. Durch diese Verknüpfung wird für den δ -Lactamteil des Harnstoffderivates (-)-4 die (6*R*)- und für denjenigen des Harnstoffderivates (+)-5 die (6*S*)-Konfiguration festgelegt.



²⁾ Das Racemat von 6 ist bereits von *Edwards & Singh* [17] beschrieben worden.

Für die noch verbleibende Verknüpfung der enzymatisch gebildeten Aminosäure mit den Harnstoffderivaten (-)-4 und (+)-5 wurde eine in der Methylgruppe mit Tritium indizierte Probe von 3 verwendet, welche aus (S)- β -Lysin in Gegenwart der Mutase und 5'-[³H]-Coenzym-B₁₂ erhalten worden war [18]. Nach Vermischung dieser Probe mit einer grösseren Menge des racemischen δ -Lactams 2 als Träger wurde das Gemisch den Cyclisierungsbedingungen unterworfen und anschliessend durch Reaktion mit (+)-(S)-(1-Phenyläthyl)-isocyanat in die diastereomeren Harnstoffderivate (-)-4 und (+)-5 übergeführt. Nach chromatographischer Trennung verblieb praktisch die gesamte Radioaktivität im (6S)-konfigurierten Derivat (+)-5 während das (6R)-konfigurierte Derivat (-)-4 fast kein Tritium enthielt. Zur Überprüfung dieses Befundes wurde das radioaktive *trans*- δ -Lactam 2 auch noch mit (-)-(R)-(1-Phenyläthyl)-isocyanat umgesetzt. Nach Trennung der entstandenen Harnstoffderivate befand sich die Radioaktivität, wie erwartet, fast ausschliesslich im Enantiomeren von Derivat (-)-4. Durch diese Verknüpfung ist die (5S)-Konfiguration des Produktes 3 aus der β -Lysin-Mutase-Reaktion bewiesen.

Im Einklang mit diesem Resultat stehen Befunde von *Hong & Barker* [19], denen es gelungen ist, durch Kombination von mikrobiologischen und chemischen Methoden 3 zu (3S)-3-Aminobuttersäure abzubauen.

Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen. Die Smp. wurden in einer im Hochvakuum abgeschmolzenen Kapillare bestimmt und sind korrigiert. Optische Drehungen wurden in einem Rohr von 10 cm Länge auf einem photoelektrischen Polarimeter *Zeiss* gemessen und sind auf die Na-D-Linie extrapoliert. Die Aufnahme von ORD.-Spektren erfolgte auf einem *Jasco*, Modell ORD/UV.5 Spektropolarimeter mit einer Zelle von 1 cm Länge. Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit einem *Perkin-Elmer-257*-Spektrometer und die NMR.-Spektren mit den *Varian*-Modellen A-60, T-60 und HA 100 aufgenommen. Die Lage der NMR.-Signale ist in δ -Werten (ppm) bezogen auf internes Tetramethylsilan angegeben; *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *qa* = Quadruplett, *m* = Multiplett, *J* = Kopplungskonstante in Hz. Die Massenspektren wurden mit einem *Hitachi-Perkin-Elmer-RMU-6D*-Spektrometer aufgenommen. Die Scintillationsmessungen wurden mit einem *Nuclear Chicago Scintillation Mark I*-Apparat durchgeführt. Die Proben wurden in 0,02 ml Wasser, 0,5 ml Methanol und 15 ml Scintillationsflüssigkeit (1 l Toluol, 7 g Butyl-DBD (*Ciba*)) gelöst. Dünnschichtchromatogramme wurden auf Kieselgel HF₂₅₄₊₃₆₆ nach *Stahl (Merck)* ausgeführt. Die Entwicklung erfolgte durch Joddämpfe, konz. Schwefelsäure oder Ninhydrin-Reagens. Für die Säulenchromatographie kam Kieselgel G nach *Stahl (Merck)* und Kieselgel unter 0,08 mm (*Merck*) zur Anwendung. Proben von (+)-(S)- und (-)-(R)-(1-Phenyläthyl)-isocyanat wurden bei der Firma *Fluka AG*, Buchs, bezogen. Abkürzungen: RV. = Rotationsverdampfer.

cis- und trans-4-Amino-6-methylpiperidone 1 und 2. Die aus 20 g Sorbinsäure nach *Fischer & Schlotterbeck* [11] bereitete braune, zähflüssige Masse von diastereomeren 3,5-Diaminohexansäuren wurde in 300 ml abs. Äthanol aufgenommen und unter Kühlen im Eisbad mit Chlorwasserstoff gesättigt. Bei der Zugabe von 300 ml abs. Äther fiel zuerst ein klebriges braunes Harz aus, das sich beim Zerreiben in einen bräunlichen, amorphen Festkörper umwandelte. Letzterer wurde in 200 ml 5N HCl gelöst und 1 Std. unter Rückfluss erhitzt. Die gekühlte Lösung wurde bis zum Beginn der Kristallisation im RV. eingeeengt und nach Zugabe von 50 ml Äthanol 12 Std. bei 5° der weiteren Kristallisation überlassen. Nach Filtration wurde die Mutterlauge eingeeengt, wiederum mit Äthanol versetzt und auskristallisieren gelassen. Nach 5maliger Wiederholung dieses Vorgehens erhielt man insgesamt 16,05 g eines leicht bräunlichen, kristallinen 3,5-Diaminohexansäure-dihydrochlorids (Fraktion A). Aus der

letzten Mutterlauge kristallisierten noch 3,659 g Dihydrochlorid (Fraktion B) aus (Smp. 197-199°), welche durch 2stdg. Kochen unter Rückfluss in 200 ml HCl-gesättigtem Methanol [2] direkt in (\pm)-*trans*-4-Amino-6-methylpiperidon-2 (**2**) übergeführt wurden. Nach Sublimation bei 90-100°/0,01 Torr resultierten 1,492 g farblose Kristalle vom Smp. 119-121°. - ¹H-NMR. (D₂O, 100 MHz): 1,17 (*d*, *J* = 6,5, 3 H); 1,59 (*Octuplett*, *J*_{gem.} = 13, *J*₁ = 7, *J*₂ = 4, H-C(5)); 1,84 (*Octuplett*, *J*_{gem.} = 13, *J*₁ = 5, *J*₂ = 1, H-C(5)); 2,09 (*qa*, *J*_{gem.} = 18, *J*_{AX} = 5,5, (H-C(3)); 2,54 (*qa*, *J*_{gem.} = 18, *J*_{BX} = 5,5, H-C(3)); 3,35 (*m*, H-C(4)); 3,69 (*Sextuplett*, *J*₁ = 5, *J*₂ = 7, *J*₃ = 6,5, H-C(6)).

C₆H₁₂N₂O Ber. C 56,22 H 9,44 N 21,85% Gef. C 56,18 H 9,38 N 21,71%

Die Fraktion A des 3,5-Diaminohexansäure-dihydrochlorids (16,05 g) wurde mit 400 ml mit HCl-gesättigtem sowie 600 ml abs. Äthanol versetzt und 12 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach Filtration wurde die Lösung eingedampft und der scharf getrocknete Rückstand in 200 ml Methylenchlorid suspendiert. Nach Freisetzung der diastereomeren Aminolactame **1** und **2** durch Einleiten von Ammoniakgas wurden dieselben bei 90-95°/0,001 Torr sublimiert: 4,06 g farblose Kristalle Smp. 118-121°. Letztere wurden durch 2½stdg. Kochen in 400 ml 5N HCl wiederum in die diastereomeren 3,5-Diaminohexansäure-dihydrochloride übergeführt. Nach Eindampfen der Lösung bis zum Erscheinen der ersten Kristalle wurden 50 ml Äthanol zugegeben und bei 5° weiter auskristallisieren gelassen: Fraktion 1. 3,188 g, Smp. 232-234°. Aus der Mutterlauge konnten noch weitere Fraktionen von tieferem Smp. erhalten werden. 2,802 g der Fraktion 1 wurden durch Kochen in 100 ml HCl-haltigem Äthanol wieder in das Aminolactam übergeführt (vgl. weiter oben). Nach Sublimation wurden 120 mg farblose Kristalle von reinem (\pm)-*cis*-4-Amino-6-methylpiperidon-2 (**1**) erhalten, Smp. 128-131°. - ¹H-NMR. (D₂O, 100 MHz): 1,16 (*d*, *J* = 6, 3 H); 1,18 (*qa*, *J* = 12, 1 H, H_{ax}-C(5)); 2,02 (*m*, 1 H, H_{aq}-C(5)); 2,02 (*Octuplett*, *J*_{gem.} = 17, *J*_{AX} = 11, *J* (weitreichende Kopplung) = 1, 1 H, H_{ax}-C(3)); 2,55 (*Octuplett*, *J*_{gem.} = 17, *J*_{BX} = 5,5, *J* (weitreichende Kopplung) = 2, 1 H, H_{aq}-C(3)); 3,14 (*m*, 1 H, H-C(4)); 3,52 (*m*, 1 H, H-C(6)).

C₆H₁₂N₂O Ber. C 56,22 H 9,44 N 21,85% Gef. C 56,12 H 9,35 N 21,76%

Herstellung und Trennung der diastereomeren Harnstoffderivate (-)-4 und (+)-5 aus (+)-(S)-(1-Phenyläthyl)-isocyanat und (\pm)-trans-4-Amino-6-methylpiperidon-2. Die Lösung von 730 mg (+)-(S)-(1-Phenyläthyl)-isocyanat in 17 ml abs. Acetonitril wurde mit 575 mg (\pm)-*trans*-4-Amino-6-methylpiperidon-2 (**2**) versetzt, 2 Std. unter Rückfluss gekocht und 12 Std. bei 5° auskristallisieren gelassen. Nach Filtration, Waschen (2 × 14 ml abs. Acetonitril) und Trocknen (3 Std. i.HV. über P₂O₅) wurden 943 mg eines kristallinen Präparates erhalten (Smp. 163-164°), welches laut seines NMR-Spektrums aus einem Gemisch von **4** und **5** bestand. Dieses wurde durch Chromatographie an 500 g Silicagel (unter 0,08 mm) in Chloroform/Eisessig 4:1 in die Komponenten getrennt. Ausbeute: Harnstoffderivat (-)-4: 377 mg, Rf 0,47, Smp. (nach Umkristallisation aus Äthylacetat) 184-185°, [α]_D = -33,9° (*c* = 0,870, CHCl₃). - IR. (CHCl₃): 3380*m*, 1665-1645*vs*, 1545*s*, 1450*m*, 1410*w*, 1380*w*, 1343*m*, 1313*m*, 1240-1200 (br. Bande), 1180*w*, 1120*m*, 1085*m*, 1020*w* cm⁻¹. - ¹H-NMR. (CDCl₃): 1,18 (*d*, *J* = 6, 3 H); 1,38 (*d*, *J* = 6, 3 H); 1,92 (*m*, 2 H); 2,13 (*m*, 2 H); 3,36 (Signalhaufen, 1 H); 4,16 (Signalhaufen, 1 H); 4,86 (*m*, 1 H); 5,43 (*d*, *J* = 8, 1 H); 5,79 (*d*, *J* = 8, 1 H); 7,23 (*m*, 5 H). - MS. (*m/e*): u.a. 275 (19, M⁺), 152 (22), 132 (33), 120 (25), 112 (37), 106 (100), 96 (42), 77 (34), 70 (20), 57 (18), 51 (19), 42 (35).

C₁₅H₂₁N₃O₂ Ber. C 65,43 H 7,69 N 15,26% Gef. C 65,20 H 7,72 N 15,11%

Harnstoffderivat (+)-5: 500 mg, Rf 0,41, amorphes Pulver, das zwischen 84 und 85° in einen farblosen Schaum übergang. [α]_D = +35,0° (*c* = 0,790, CHCl₃). - IR. (CHCl₃): 3380*m*, 1665-1645*vs*, 1545*s*, 1450*m*, 1410*w*, 1380*w*, 1343*m*, 1313*m*, 1240-1200 (br. Bande), 1180*w*, 1120*m*, 1085*m*, 1020*w* cm⁻¹. - ¹H-NMR. (CDCl₃): 1,07 (*d*, *J* = 6, 3 H); 1,40 (*d*, *J* = 6, 3 H); 1,97 (*m*, 2 H); 2,33 (*m*, 2 H); 3,41 (Signalhaufen, 1 H); 4,21 (Signalhaufen, 1 H); 4,86 (*m*, 1 H); 5,60 (*d*, *J* = 8, 1 H); 5,81 (*d*, *J* = 8, 1 H); 7,25 (*s*, 5 H). - MS. (*m/e*): u.a. 275 (12, M⁺), 152 (21), 132 (27), 120 (40), 112 (40), 106 (100), 96 (40), 77 (42), 70 (21), 57 (22), 51 (22), 42 (49). Es wurden mehrere Elementaranalysen von Harnstoffderivat (+)-5 durchgeführt, die Fehler von 3-8% ergaben.

Überführung von Harnstoffderivat (-)-4 in (-)-(R)-6-Methylpiperidon-2 (7). 145 mg (-)-4 wurden unter Durchleiten von Stickstoff während 7½ Std. bei 230° pyrolysiert und das in den aufgesetzten Kühler sublimierte Produkt anschließend mit Methylenchlorid herausgelöst. Der erhaltene Festkörper

wurde aus Äthylacetat/Petroläther umkristallisiert [Kristalle: 30 mg *N,N*-Di(1-phenyl-äthyl)-harnstoff] und die Mutterlauge (69 mg) an 25 g Silicagel (unter 0,08 mm) mit Chloroform/Aceton 1:1 chromatographiert. Nach Sublimation bei 70–80°/0,001 Torr wurden 26 mg (6*R*)-6-Methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-2-on (**6**) erhalten, welches in geschlossener, aber nicht evakuierter Kapillare bei 135,5–137° schmolz. - UV. (Äthanol): 233 ($\epsilon = 1310$), 241 ($\epsilon = 1395$) [Lit. [17] (\pm)-**6** Smp. 105–106°, UV. 235 ($\log \epsilon = 3,15$), 241 ($\log \epsilon = 3,17$)]. - ¹H-NMR. (CDCl₃): 1,30 (*d*, *J* = 6, 3 H); 2,30 (*m*, 2 H); 3,77 (*Octuplett*, *J* = 6, 1 H); 5,95 (*Doppel-t*, *J*₁ = 10, *J*₂ = 2, 1 H); 6,63 (*Octuplett*, *J*₁ = 4, *J*₂ = 2, 1 H); 7,27 (Signalhaufen, 1 H).

Nach Sättigung von 10 mg Platinoxid in 1 ml abs. Äthanol während 15 Min. bei RT. wurden 25 mg 6-Methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-2-on siehe (**6**) in 1,5 ml abs. Äthanol hinzugefügt und 30 Min. hydriert. Der Katalysator wurde über *Celite* abfiltriert, das Filtrat eingedampft und der farblose Rückstand bei 70–80°/0,001 Torr sublimiert. Ausbeute: 22,5 mg (-)-(*R*)-6-Methylpiperidon-2 (**7**), Smp. 82–83°. [α]_D²² = -21,9° (*c* = 1,92, Wasser) [Lit. [14] für das Enantiomere, vgl. weiter unten]. - ORD. (*c* = 0,110, Wasser): neg. *Cotton*-Effekt, [α]₂₂₉ = -1140°. - IR. (CHCl₃): u.a. 3400*m*, 1655*vs*, 1470*s*, 1450*s*, 1345*s*, 1330*s* cm⁻¹. - MS. (*m/e*): u.a. 113 (20, *M*⁺), 98 (100), 85 (4), 70 (8), 57 (17), 55 (35).

C₆H₁₁ON Ber. C 63,68 H 9,80 N 12,39% Gef. C 63,45 H 9,62 N 12,23%

Überführung des Harnstoffderivates (+)-**5** in (+)-(*S*)-6-Methylpiperidon-2 (**9**). 300 mg (+)-**5** gaben nach dem gleichen Verfahren wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, 10,5 mg (6*S*)-6-Methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-2-on (**8**). Smp. (wie oben) 135–137°. [α]_D²² = +124° (*c* = 1,42, Äthanol). - ORD. (*c* = 0,011, Wasser): pos. *Cotton*-Effekt, [α]₂₆₃²² = +5460°, [α]₂₆₆²² = -9250°. - UV. und NMR. wie beim Enantiomeren.

Hydrierung von 7,5 mg **8**, wie oben, gab 7 mg (+)-(*S*)-6-Methylpiperidon-2 (**9**). Smp. 82–83°. [α]_D²² = +26,6° (*c* = 1,20, Wasser), [Lit. [14]: Smp. 81–82°, [α]_D²⁰ = +27,8° (*c* = 2,03, Wasser)]. - ORD. (*c* = 0,136, Wasser): pos. *Cotton*-Effekt [α]₂₂₉ = +1250°.

Cyclisierung einer enzymatisch gewonnenen Probe von 6-[³H₁]-3,5-Diaminohexansäure zum δ -Lactam und Identifizierung des letzteren mit dem Lactamteil des Harnstoffderivates (+)-**5**. Eine Probe von mit Hilfe der Lysinmutase gewonnener 6-[³H₁]-3,5-Diaminohexansäure (50000 Imp./Min._{total}) wurden mit 100 mg synthetischem Lactam **2** versetzt und mit 2 ml 5*N* HCl 2 Std. unter Rückfluss erhitzt. Das so erhaltene radioaktive Präparat gab nach dünnenschichtchromatographischer Reinigung eine Probe von 3,5-Diaminohexansäure, welche anschliessend in 15 ml 0,5*N* HCl (in Äthanol) ½ Std. unter Rückfluss gekocht wurde. Das dabei gebildete [³H₁]- δ -Lactam schmolz nach Sublimation bei 118–119°. Ausbeute: 46,5 mg, 9,1 Imp./Min. pro μ mol. 42 mg dieses Lactams wurden mit 54 mg (+)-(*S*)-(1-Phenyläthyl)-isocyanat in 1,4 ml abs. Acetonitril zu den diastereomeren Harnstoffderivaten (-)-**4** und (+)-**5** umgesetzt. Nach demselben Trennungsverfahren, wie weiter oben für das tritiumfreie Material angegeben ist, wurden 28 mg (-)-**4** und 20,5 mg (+)-**5** erhalten.

In einem ähnlichen Experiment wurden 42 mg 4-Amino-6-[³H₁]methylpiperidon-2 (8,5 Imp./Min. pro μ mol) mit 54 mg (-)-(*R*)-(1-Phenyläthyl)-isocyanat umgesetzt. Die in den Harnstoffderivaten gemessenen Radioaktivitätswerte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Spezifische Radioaktivität

δ -Lactam 2	Harnstoffderivat (-)- 4 (4 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 2' <i>S</i>)		Harnstoffderivat (+)- 5 (4 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 2' <i>S</i>)	
	Imp./Min. pro μ mol	% bezügl. Substrat	Imp./Min. pro μ mol	% bezügl. Substrat
9,09 ± 0,29	0,48 ± 0,24	5 ± 3	15,8 ± 0,2	174 ± 3
δ -Lactam 2	Harnstoffderivat (+)- 4 (4 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 2' <i>R</i>)		Harnstoffderivat (-)- 5 (4 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 2' <i>R</i>)	
8,55 ± 0,36	16,9 ± 0,4	198 ± 5	1,75 ± 0,18	20 ± 3

Die NMR.-Spektren wurden in der Abteilung für Instrumentalanalyse des Organisch-chemischen Laboratoriums der ETHZ (Leitung Prof. *W. Simon*) aufgenommen. Die massenspektroskopischen Analysen verdanken wir Herrn Prof. *J. Seibl*. Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der ETHZ (Leitung *W. Manser*) ausgeführt. Für die Aufnahme der ORD.-Spektren danken wir den Herren Dr. *C. de Haen* und *M. Caviezel* vom Laboratorium für Molekularbiologie der ETHZ (Leitung Prof. *R. Schwyzer*). Die Radioaktivitätsmessungen wurden im Isotopenlaboratorium der ETHZ (Leitung PD Dr. *P. Jordan*) ausgeführt. Herrn Dipl.-Chem. ETHZ *Thomas Scholl* danken wir für die Vorbereitung einiger Proben für Elementaranalysen und NMR.-Spektren.

Der *Sandoz AG* Basel danken wir für finanzielle Unterstützung.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *T. C. Stadtman & P. Renz*, *Archiv. Biochemistry Biophysics* 125, 226 (1968).
- [2] *L. Tsai & T. C. Stadtman*, *Archiv. Biochemistry Biophysics* 125, 210 (1968).
- [3] *E. E. Dekker & H. A. Barker*, *J. biol. Chemistry* 243, 3232 (1968).
- [4] *R. C. Bray & T. C. Stadtman*, *J. biol. Chemistry* 243, 381 (1968).
- [5] *M. Sprecher, R. L. Switzer & D. B. Sprinson*, *J. biol. Chemistry* 241, 864 (1966).
- [6] *J. Rétey, A. Umani-Ronchi & D. Arigoni*, *Experientia* 22, 72 (1966).
- [7] *B. Zagalak, P. A. Frey, G. L. Karabatsos & R. H. Abeles*, *J. biol. Chemistry* 241, 3028 (1966).
- [8] *M. Sprecher, M. J. Clark & D. B. Sprinson*, *J. biol. Chemistry* 241, 872 (1966).
- [9] *J. Rétey*, zitiert durch *D. Arigoni & E. L. Eliel*, *Top. Stereochemistry* 4, 203 (1969).
- [10] *J. Rétey & B. Zagalak*, *Angew. Chem.* 85, 721 (1973).
- [11] *E. Fischer & F. Schlotterbeck*, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 37, 2357 (1904).
- [12] *M. Karplus*, *J. chem. Physics* 30, 11 (1959); *J. Amer. chem. Soc.* 85, 2870 (1963).
- [13] *C. Romers, E. W. M. Rutten, C. A. A. van Driel & W. W. Sanders*, *Acta crystallogr.* 22, 893 (1967).
- [14] *O. Červinka, A. Fábryová & U. Novák*, *Coll. Czech. chem. Commun.* 30, 1742 (1965).
- [15] *R. B. Woodward*, *Pure appl. Chemistry* 17, 519 (1968).
- [16] *S. Petersen*, *Liebigs Ann. Chem.* 562, 205 (1949).
- [17] *O. E. Edwards & T. Singh*, *Canad. J. Chemistry* 32, 683 (1954).
- [18] *J. Rétey, F. Kunz, T. C. Stadtman & D. Arigoni*, *Experientia* 25, 801 (1969); *Helv. in Vorbereitung*.
- [19] *S. L. Hong & H. A. Barker*, *J. biol. Chemistry* 248, 41 (1973).