

## 144. Zur Kenntnis des Faktors F430 aus methanogenen Bakterien: Über die Natur der Isolierungsartefakte von F430, ein Beitrag zur Chemie von F430 und zur konformationellen Stereochemie der Ligandperipherie von hydroporphinoiden Nickel(II)-Komplexen

von Andreas Pfaltz\*, Douglas A. Livingston, Bernhard Jaun, Gabriele Diekert<sup>1)</sup>, Rudolf K. Thauer<sup>1)</sup>  
und Albert Eschenmoser\*

Laboratorium für Organische Chemie, Eidgenössische Technische Hochschule, ETH-Zentrum,  
Universitätsstrasse 16, CH-8092 Zürich

(3. VI. 85)

---

### Factor F430 from Methanogenic Bacteria: On the Nature of the Isolation Artefacts of F430, a Contribution to the Chemistry of F430 and the Conformational Stereochemistry of the Ligand Periphery of Hydroporphinoid Nickel(II) Complexes

Factor F430 (1), a coenzyme from methanogenic bacteria, when heated in aqueous solution isomerizes to 12,13-di-epi-F430 (5) via 13-epi-F430 (3). The equilibrium mixture of the three F430 isomers in aqueous phosphate buffer solution (pH 7, 100°) contains 88% of 5, 8% of 3, and 4% of 1 (Scheme 1). The structural assignment for the F430 isomers rests on FAB-MS-, UV/VIS-, <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectra of their pentamethyl esters. Chemical proof for the double epimerization at the two chiral centers of F430's ring C was provided by ozonolytic degradation of the di-epimer to give a ring-C-derived succinimide derivative that was shown to be the enantiomer of the one previously obtained by ozonolysis of F430M (see Scheme 2). The two F430 ring-C epimers 3 and 5 are the isolation artefacts described in the earlier F430 literature. F430 is susceptible to autoxidation in air and the product, that absorbs at 560 nm, was shown to be the 12,13-didehydro derivative 8 of F430 by spectroscopic characterization of its pentamethyl ester 9. The dehydrogenation product 8 can be diastereoselectively reduced with Zn in AcOH to give natural F430 as the main product rather than the thermodynamically more stable F430-di-epimer (Scheme 3). In the double epimerization of F430, the two ring-C side chains change from a *trans*-quasi-diaxial arrangement to the (locally) enantiomorphous position in which the same side chains are again in a *trans*-quasi-diaxial arrangement. This equilibrium paradox as well as the kinetic diastereoselectivity of the reduction of 12,13-didehydro-F430 (8) are rationalized to be consequences of the general phenomenon documented earlier (see the preceding paper) according to which hydroporphinoid Ni(II) complexes all show a characteristic conformational ruffling of their ligand system due to the tendency of the (small) Ni(II) ion to contract the size of the ligand's central coordination hole (see Fig. 5 and 6).

---

**1. Einleitung.** – Faktor F430 (1) [1], das corphinoide [2] [3] Coenzym der Methylcoenzym-M-Reduktase [4] aus methanogenen Bakterien, lässt sich – wie man seit kurzem weiss [3] [5] – unter bemerkenswert milden Extraktionsbedingungen aus den Bakterienzellen (z. B. von *Methanobacterium thermoautotrophicum*) isolieren. Jener Anteil des Coenzym, der in den Zellen in 'freier' Form vorkommt, kann bereits mit 80% EtOH um 0° aus Bakterienzellen herausgelöst werden, während die Extraktion des in den Zellen (protein)gebundenen Anteils zusätzlich die Anwesenheit von Salzen (z. B. 2M LiCl in 80% EtOH, 0°) erfordert. Ursprünglich hatte man den Faktor durch Erhitzen von Zellsuspensionen (unter Luftausschluss) in wässrigen Puffermedien auf 100° [1] [6] [7], oder in 40

<sup>1)</sup> Fachbereich Biologie und Mikrobiologie, Philipps Universität Marburg, Lahnberge, D-3550 Marburg.

bzw. 60% EtOH auf 80° [8], gewonnen. In derart bereiteten F430-Isolaten beobachtete man chromatographisch nicht eine einzige Komponente mit dem für F430 charakteristischen UV/VIS-Spektrum, sondern bis zu deren drei; in den Marburger Arbeiten wurden letztere (ihrem chromatographischen Laufverhalten entsprechend) als F430 I, F430 II und F430 III bezeichnet [7]<sup>2</sup>). In der Folge konnten *Thauer* und seine Mitarbeiter [7b] zeigen, dass die Faktor-Varianten F430 I und F430 III Artefakte der Isolation bei erhöhter Temperatur darstellen. Ablösung des Faktors vom Zellmaterial mit wässriger HClO<sub>4</sub> (pH 2) bei 0–4° und Vermeidung von Temperaturen über 10° bei den nachfolgenden Reinigungsoperationen lieferte ein F430-Isolat, welches chromatographisch nebst einer violetten Nebenzone mit einem Absorptionsmaximum bei 560 nm (F560) nur noch eine einzige F430-Komponente, nämlich F430 II, aufwies. Beim Erhitzen eines F430-II-Isolats in einem wässrigen Puffermedium (pH 7,8) auf 100° unter Luftausschluss nahm die Konzentration von F430 II rasch ab und jene von F430 I zu, während die Konzentration von F430 III vorerst anstieg, um anschliessend zugunsten von F430 I wieder abzunehmen (vgl. *Abb.* in [7b]). Ein F430-III-Isolat ging nach 1 h (anaerobem) Erhitzen auf 100° fast vollständig in Faktor F430 I über. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass das durch Extraktion mit HClO<sub>4</sub> (pH 2) um 0° gewonnene F430-Isolat die natürliche Form des Faktors darstellt, diese Form (F430 II) jedoch thermisch labil ist und sich beim Erhitzen in wässrigen bzw. gepufferten Medien *via* die Zwischenform F430 III in die thermodynamisch stabilste (unnatürliche) Form F430 I umwandelt [7b]. Welcher Art diese UV/VIS-spektroskopisch und chromatographisch erfasste, zweischrittige Umwandlung sei, ob sie eine konstitutionelle und/oder konfigurationelle Veränderung des (damals strukturell noch nicht aufgeklärten) Naturstoffs beinhalte, war eine Frage, die offen bleiben musste.

Hier berichten wir über Experimente, die nachweisen, *dass die thermisch induzierte Umwandlung von Faktor F430 (I) in die thermodynamisch stabilere Form keine konstitutionelle Veränderung, sondern eine zweifache Epimerisierung der beiden Chiralitätszentren im Ring C des Ligandensystems darstellt.* Die Art, wie wir diese bemerkenswerte Doppelepimerisierung im Bereiche des Rings C deuten, macht die thermische Labilität von F430 zu einem hervorragenden Beleg für die Bedeutung von kürzlich erkannten Regeln über die Konformation, welche sich aus den im ETH-Laboratorium laufenden Arbeiten über die Chemie corphinoider Ni(II)-Komplexe im Verein mit den röntgenstrukturanalytischen Beiträgen von *Kratky* (Graz) ergeben haben [9] und die das allgemeine konformationelle und konfigurationelle Verhalten der Ligandperipherie hydroporphinoider Ni(II)-Komplexe betreffen (vgl. die vorstehende Arbeit [10]). Darüberhinaus scheint uns die Doppelepimerisierung von F430 im Hinblick auf die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Struktur und biologischer Funktion des Coenzym F430 indirekt von Belang zu sein (vgl. [11]).

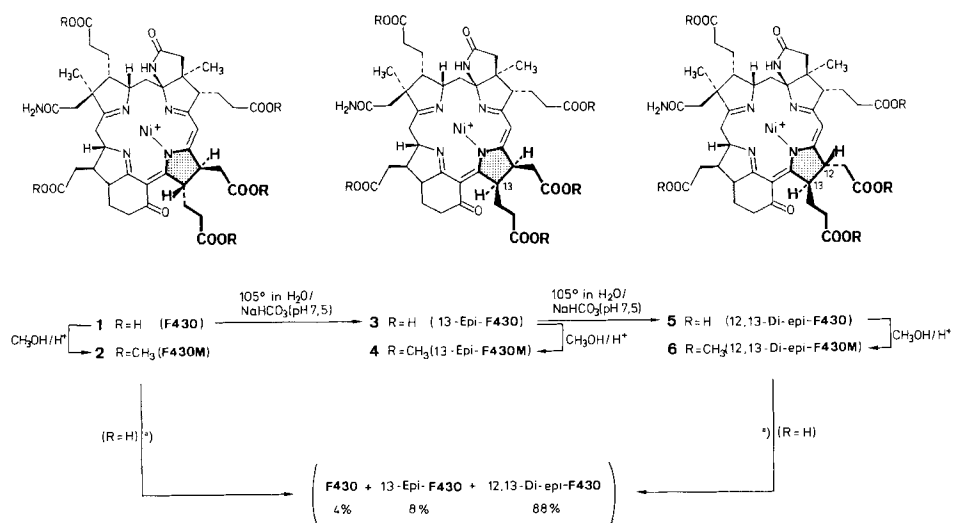
Des weiteren zeigen wir hier, dass das früher beobachtete [7c], bei 560 nm absorbierende Umwandlungsprodukt von F430 im Ring C dehydriert ist, und *dass die Rückreduktion dieses 12,13-Didehydro-F430 mit Zn/AcOH nicht das thermodynamisch stabilere F430-Isomer ergibt, sondern zum natürlichen Faktor F430 zurückführt.* Dieser Befund dürfte künftige chemosynthetische und biosynthetische Studien über F430 anregen.

<sup>2</sup>) Die in [6] beschriebenen Komponenten F430a und F430b entsprechen nach [7b] den Komponenten F430 I und F430 II gemäss (allerdings nicht in direktem Vergleich geprüfem) chromatographischem Verhalten.

**2. Isomerisierung von F430 (1) zu 12,13-Di-epi-F430 (5) via 13-Epi-F430 (3).** – *Schema 1* fasst unsere experimentellen Befunde über den Verlauf der thermisch-induzierten Umwandlung des Faktors F430 (1), sowie die Strukturzuordnung für die beiden hauptsächlichsten Umwandlungsprodukte zusammen. Diese beiden Produkte 3 und 5 wurden in Form ihrer Pentamethylester 4 und 6 in Experimenten des folgenden Typs präparativ isoliert: F430-Isolate, die ausgehend von einer Extraktion der Bakterienzellen mit wässriger  $\text{HClO}_4$  (pH 2, 0–4°) [2] gewonnen worden waren, wurden in entgaster wässriger Lösung von pH 7,5 ( $\text{NaHCO}_3$ ) in geschlossenem Rohr auf 105° erhitzt, die Rohprodukte direkt (wie früher bei F430M (2) [2] beschrieben) methanolisiert und das Gemisch der Methanolyselprodukte im präp. DC aufgetrennt<sup>3)</sup>. Ein Experiment mit einer Isomerisierungsreaktionszeit von 3 h lieferte als Hauptprodukt das Di-epimere 6 (56%;  $R_f$  ca. 0,37) nebst geringen Mengen des Mono-Epimeren 4 (7%;  $R_f$  ca. 0,41) und des (methanolysierten) Ausgangsmaterials 2 (9%;  $R_f$  ca. 0,30). In einem Experiment mit kürzerer Erhitzungsdauer (25 min) konnte ein grösserer Anteil (35%) von 4 nebst 6 (31%) und 2 (25%) isoliert werden. Die drei Komponenten F430 (1), 13-Epi-F430 (3) und 12,13-Di-epi-F430 (5) sind unter den verwendeten Reaktionsbedingungen auf dem Weg, sich untereinander ins Gleichgewicht zu setzen.

Dies zeigen zwei Äquilibrierungsexperimente, die sowohl ausgehend von gereinigtem (isomerenfreiem) 1 [3], als auch von isomerenfreiem (durch säurekatalysierte Hydrolyse des Pentamethylesters 6 hergestelltem) 5 durchgeführt wurden. Unter den in *Schema 1* aufgeführten Äquilibrierungsbedingungen liegt nach HPLC-Analyse (vgl. *Exper. Teil*) im Reaktionsgemisch beider Experimente nach 24 h die gleiche Verteilung der drei F430-Isomeren 1, 3 und 5 vor, wobei das Di-epimer 5 klar überwiegt. Die HPLC-Analyse

Schema 1

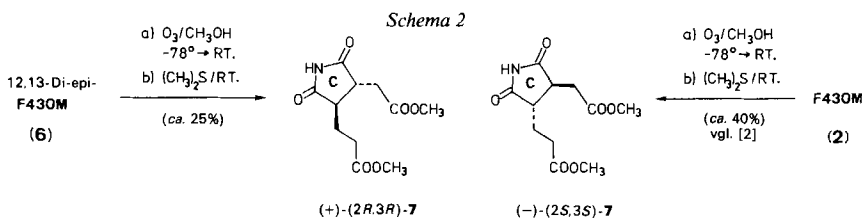


<sup>3)</sup> Unter den verwendeten Methanolysenbedingungen (wasserfreies  $\text{MeOH}$ ,  $\text{TsOH}$ , 40°, 3 h, unter  $\text{N}_2$ ) findet keine ins Gewicht fallende Isomerisierung statt, vgl. [2].

der Doppelreimerisierung ausgehend von **1** während der ersten 3 h bestätigte, dass die Konzentration des Mono-epimeren **3** in der ersten Reaktionsphase rascher ansteigt als jene des Di-epimeren **5**, die Konzentration des letzteren schliesslich jedoch überhandnimmt<sup>4)</sup>. F430M, der in organischen Lösungsmitteln lösliche Pentamethylester **2** von F430 (**1**) (vgl. [2]), epimerisiert sich tendenziell langsamer als die entsprechende Penta-säure. Definierte Reaktionsbedingungen für die Isomerisierung von **2** in das Di-epimer **6** wurden nicht bestimmt, aber man beobachtete, dass eine NMR-Probe von ursprünglich reinem **2** in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> nach 10 Monaten Aufbewahren (7 Monate bei ca. – 25°, 3 Monate RT.) schlussendlich aus einem Gemisch von ca. 17% **2**, 25% **4** und 59% **6** bestand (<sup>1</sup>H-NMR und präp. DC).

Vom Reaktionsmechanismus her gesehen ist die Epimerisierbarkeit der Zentren C(12) und C(13) (wenigstens grundsätzlich) plausibel; die Epimerisierungen dürften über entsprechende tautomere Formen des Chromophorsystems verlaufen (vgl. auch Kap. 3). Die Deprotonierbarkeit von α-Stellungen an der Peripherie corrinoider und corphinoider Chromophorsysteme unter basischen und/oder sauren Reaktionsbedingungen ist bekannt (vgl. z. B. [13]).

Die *Strukturzuordnung* für die beiden F430M-Umwandlungsprodukte **4** und **6** beruht vorab auf dem Ergebnis der Ozonolyse von **6**, sowie auf dem Vergleich der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-, UV/VIS-, CD- und FAB-MS-Daten von **4** und **6** mit jenen von **2**. Die Ozonolyse von **6** nach der gleichen Vorschrift, nach welcher früher F430M (**2**) ozonoly-siert worden war [2], lieferte das dem Ring C entsprechend substituierte Succinimidderivat (+)-(2*R*,3*R*)-**7** (vgl. *Schema 2*). Dieses erwies sich im direkten Vergleich der CD-, <sup>1</sup>H-NMR- und IR-Spektren als das Enantiomere des früher beschriebenen, in seiner absoluten Konfiguration aufgeklärten Ozonolyseprodukts (–)-(2*S*,3*S*)-**7** aus F430M [2]; die beiden CD-Spektren sind im wesentlichen enantiomorph (vgl. *Fig 1*).



Dass die Umwandlungsprodukte **4** und **6** Isomeren von F430M mit identischem Chromophorsystem sind, bezeugen die FAB(Kation)-Massenspektren (vgl. *Exper. Teil*) bzw. die in *Fig. 2* abgebildeten UV/VIS-Spektren. Die Auffassung, wonach sich die drei Verbindungen **2**, **4** und **6** durch nichts anderes als durch die Konfiguration an den Chiralitätszentren des Ringes C unterscheiden, beruht auf dem Vergleich der <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektren.

Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum des Di-epimeren **6** (vgl. *Tab. I*) finden sich sämtliche der im Spektrum von **2** zugeordneten Signalen wieder, und zwar mit höchstens geringen Abweichungen in den chemischen Verschiebungswerten (grösste Abweichungen 1,4 bzw. 1,6 ppm für C(11) und C(8)). Die doppelte Konfigurationsumkehr im Ring

<sup>4)</sup> Nach diesen Befunden (vgl. auch *Fussnote 2*) ist anzunehmen, dass die früher verwendeten Bezeichnungen F430a [6] bzw. F430 I [7b] dem Di-epimer **5**, F430 III [7b] dem Mono-epimer **3** und F430b [6] bzw. F430 II [7b] dem natürlichen Isomer **1** entsprechen.

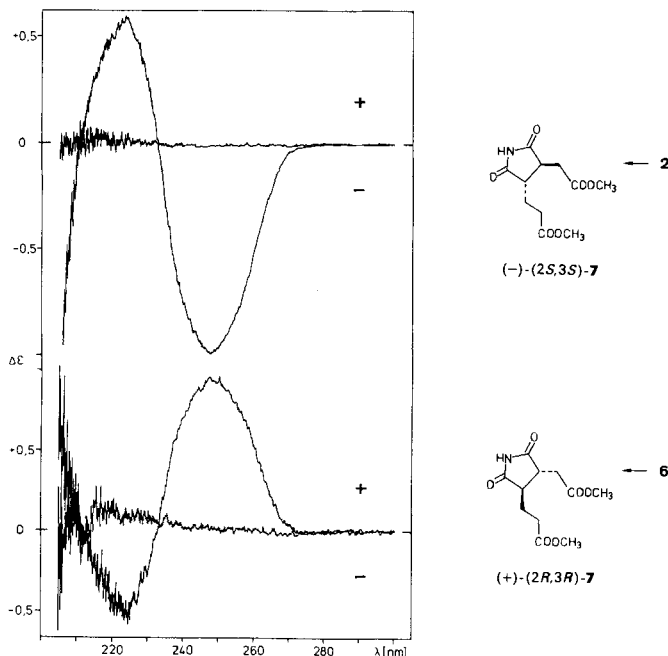


Fig. 1. CD-Spektren der Ring-C-Bruchstücke (-)-7 ( $c = 2,4 \cdot 10^{-4}$  M) und (+)-7 ( $c \approx 6,2 \cdot 10^{-5}$  M) in EtOH

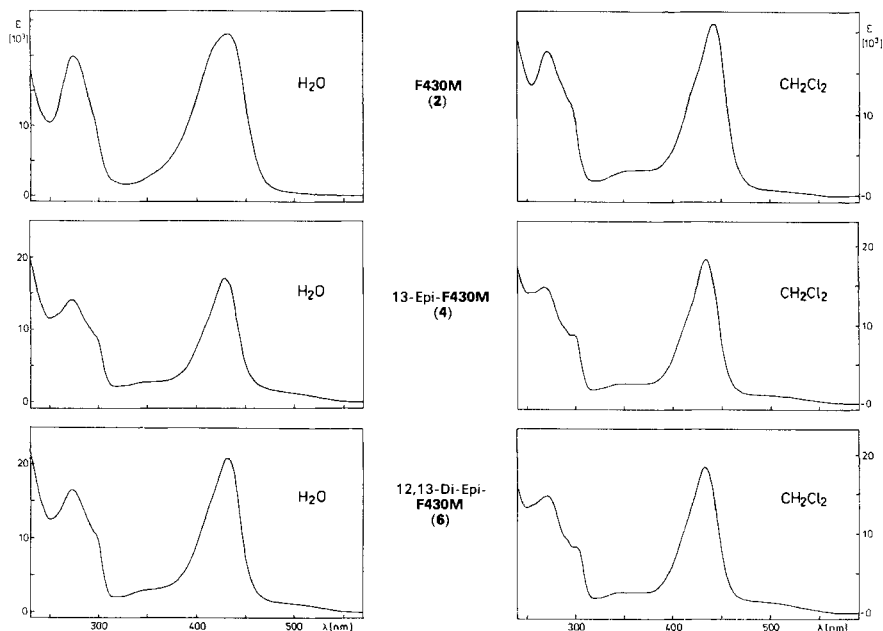


Fig. 2. UV/VIS-Spektren von 2, 4 und 6 in  $H_2O$  ( $c = 3,6-3,9 \cdot 10^{-5}$  M) und  $CH_2Cl_2$  ( $c = 4,1-4,2 \cdot 10^{-5}$  M)

Tab. 1. <sup>13</sup>C-NMR-Spektren<sup>a)</sup>

Zuordnung <sup>b)</sup>	F430M (2)	12,13-Di-epi-F430M (6)	13-Epi-F430M (4)	12,13-Didehydro-F430M (9)
C(17 <sup>3</sup> )	194,6	194,4	194,3	195,7
C(1)	188,9	187,8	187,6	188,2
C(16) oder C(14)	176,9	175,7	175,3	176,1
C(9)	176,7	174,4	174,7	173,2 (2C)
	173,6	174,2	173,3	
	173,5	173,34	172,9 <sup>c)</sup>	172,9
–CON<	173,4	173,26	172,5	172,8
–COO–	173,1	173,1	172,4	172,5
C(14) oder C(16)	172,6 (2C)	172,6	172,0 (2C?)	172,1
		172,2		171,2
	172,3	171,7	171,7	170,0
	171,7	171,3	171,1 <sup>c)</sup>	159,5 (C(14))
C(11)	169,2	167,8	167,2	154,9
C(15)	109,6	109,6	110,1	111,9
C(10)	98,4	98,8	96,7	101,3
C(6)	92,3	92,0	91,8	92,5
C(4)	65,5	65,2	65,3	65,2
C(19)	63,7	63,6	63,9	63,8
C(8)	57,0	56,4	56,6	57,1
C(2)	54,8	<sup>d)</sup>	54,4	54,4
	52,5	52,3 (4C)	52,6	53,0
CH <sub>3</sub> O	52,3 (3C)	52,1	52,5	52,3 (3C)
	52,0		52,3 (2C)	52,0
			52,2	
C(13)	50,8	51,6	47,8	146,6 (140,4)
C(17)	50,3	50,9	51,0	50,9
C(7)	50,2	50,1	50,4	50,0
C(18)	45,5	45,9	46,3	45,7
C(12)	45,2	45,8	44,5	140,4 (146,6)
C(3)	44,3	43,6	43,9	43,7
C(2 <sup>1</sup> )	43,8	43,5	43,6	43,5
C(7 <sup>1</sup> )	42,1	42,1	42,3	42,1
C(12 <sup>1</sup> )	39,7	38,8	31,9 (31,5)	30,8
C(17 <sup>2</sup> )	38,7	38,5	39,0	39,9
C(5)	36,1	36,1	36,3	35,8
C(18 <sup>1</sup> )	34,7	34,5	34,7	34,6
C(3 <sup>2</sup> )	32,8	32,7	32,7 (2C)	34,4
C(8 <sup>2</sup> )	32,6	32,5		32,6 (2C)
C(13 <sup>2</sup> )	31,7	32,1	31,5 (31,9)	
C(13 <sup>1</sup> )	29,8	29,1	24,4	22,5 (22,3)
C(20)	28,4	28,3	28,6	28,1
C(8 <sup>1</sup> )	25,7	25,1	25,4	26,4
C(3 <sup>1</sup> )	22,4	22,2	22,4	22,3 (22,5)
C(17 <sup>1</sup> )	20,2	20,2	20,5	20,4
CH <sub>3</sub> –C(2)	20,2	20,2	20,4	20,2
CH <sub>3</sub> –C(7)	15,6	15,5	15,7	15,7

<sup>a)</sup> <sup>1</sup>H-breitbandenkoppelte Spektren in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; δ-Werte in ppm bezogen auf δ(CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 53,84 ppm.

<sup>b)</sup> Zur Zuordnung der Signale von **2** vgl. [2]; die Interpretation der übrigen Spektren erfolgte durch Vergleich mit dem Spektrum von **2**.

<sup>c)</sup> Wegen des ungünstigen Signal/Rauschverhältnisses ist dieses Signal nicht eindeutig erkennbar.

<sup>d)</sup> Vermutlich bei 54,2 vom CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Signal verdeckt.

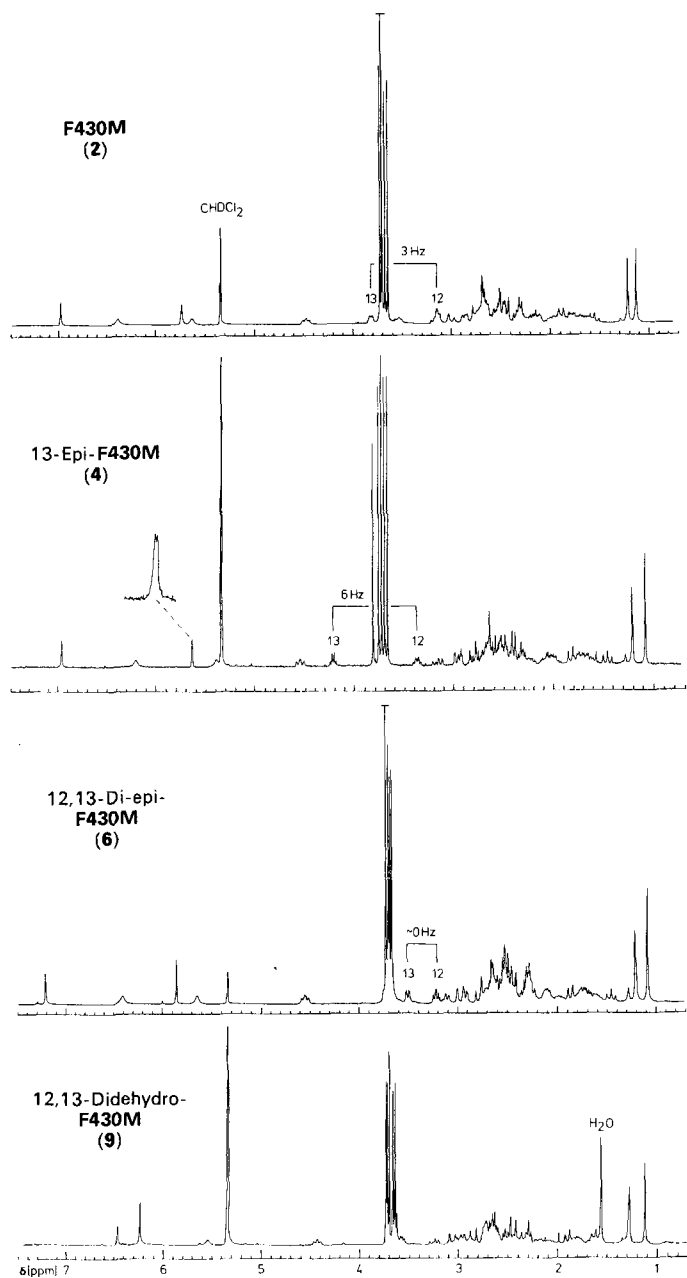
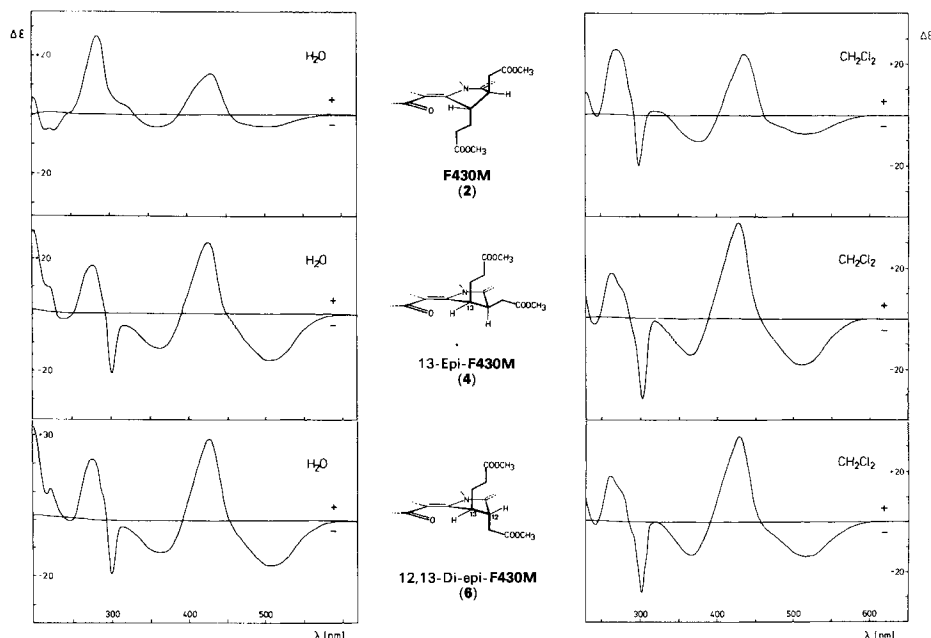


Fig. 3. <sup>1</sup>H-NMR-Spektren (300 MHz; CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) von  
**2** ( $c = 3 \cdot 10^{-2}$  M),  
**4** ( $c = 6 \cdot 10^{-3}$  M),  
**6** ( $c = 5 \cdot 10^{-2}$  M) und  
**9** ( $c = 4 \cdot 10^{-3}$  M)

C äussert sich im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (vgl. Fig. 3) vor allem in der Verschiebung von H–C(13) von 3,80 ppm (in **2**) zu 3,50 ppm (in **6**), wobei die Kopplung zwischen H–C(13) und H–C(12), wie es für die Inversion der *trans*-Verknüpfung der beiden Seitenketten zu erwarten ist, klein bleibt (< 1 Hz in **6** gegenüber ca. 3 Hz in **2**). Gestützt wird diese Interpretation durch die Tatsache, dass im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Mono-epimeren **4** das H–C(13) gegenüber dem Spektrum von **2** bei deutlich tieferem Feld ( $\Delta\delta = 0,41$  ppm) erscheint und nunmehr mit 6 Hz mit H–C(12) koppelt. Dies ist einer der beiden spektroskopischen Belege für die Zuordnung der *cis*-Konfiguration der

beiden Ring-C-Seitenketten im Isomeren **4**; der zweite Beleg ist die gegenüber dem Spektrum von **2** starke Hochfeld-Verschiebung der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale für die beiden Seitenketten-Haftatome C(12<sup>1</sup>) und C(13<sup>1</sup>) von 7,8 bzw. 5,4 ppm ( $\gamma$ -Effekt bei *cis*-Anordnung der Seitenketten). Von den beiden möglichen *cis*-Mono-epimeren, *epi* an C(13) oder *epi* an C(12), liegt das erstere vor. Sowohl im  $^1\text{H}$ -, wie auch im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **4** sind die die Position C(13) betreffenden Signale gegenüber den entsprechenden Signalen von **2** stärker verschoben als jene der Position C(12) (um 0,41 vs. 0,29 ppm im  $^1\text{H}$ -NMR und um 3,0 vs. 0,7 ppm im  $^{13}\text{C}$ -NMR). Schlüssig wird diese Zuordnung allerdings erst aus dem Vergleich der CD-Spektren, und zwar unter Einbezug der folgenden konformationellen Betrachtung.

Bereits in [2] haben wir auf die Relevanz des *Woodwardschen* Chlorophyll-Arguments [12] für die Konformationszuordnung im Ring-C-Bereich der F430-Struktur hingewiesen. Danach kann in F430 und seinen Derivaten (z. B. **2**) die Seitenkette an C(13) am Ring C nur eine quasi-axiale Lage einnehmen, da in einer quasi-äquatorialen Lage, wie Modellbetrachtungen deutlich zeigen, diese Seitenkette durch die Raumbeanspruchung der an der *meso*-Stellung C(15) fixierten Carbonylgruppe sterisch stark behindert ist (vgl. Formelbilder in *Fig. 4*). Eine Inversion am C(13) beim Übergang von **2** in das Mono-epimer **4** muss demnach von einer Halbsessel-Umklappung des Ringes C begleitet sein, damit in **4** die Seitenkette an C(13) wiederum quasi-axiale Lage einnehmen kann. Dieses Argument plziert die Seitenkette an C(12) von **4** in quasi-äquatoriale Lage. Der damit einhergehende Wechsel der Konformation von H–C(12) von quasi-äquatorial in **2** zu quasi-axial in **4** lässt sich im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **4** erkennen (vgl. *Fig. 3*): die Signale von H–C(12) und H–C(10) zeigen nunmehr eine deutliche allylische Kopplung ( $J = 1,2$  Hz), während eine solche im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **2** nicht erkennbar ist ( $J < 0,5$  Hz)<sup>5</sup>).



*Fig. 4.* CD-Spektren von **2**, **4** und **6** in  $\text{H}_2\text{O}$  ( $c = 3,6\text{--}3,9 \cdot 10^{-5}\text{ M}$ ) und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $c = 3,3\text{--}4,2 \cdot 10^{-5}\text{ M}$ )

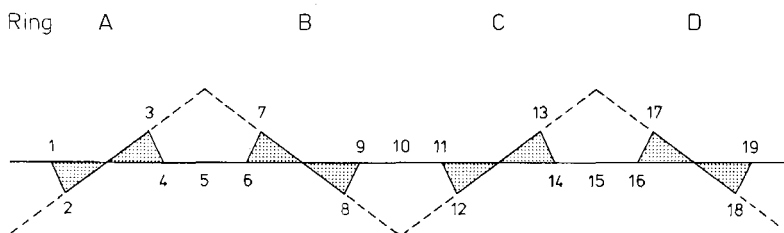
<sup>5</sup>) Das Ausmass allylischer Kopplung nimmt zu, je höher die  $\pi$ -Bindungsordnung der beteiligten Doppelbindung ist (vgl. z. B. [13]) und je eher die allylische (C–H)-Bindung quasi-orthogonal zur Doppelbindungsebene steht (vgl. z. B. [14]).



Der Reaktionsweg der Di-epimerisierung  $1 \rightarrow 3 \rightarrow 5$  (bzw.  $2 \rightarrow 4 \rightarrow 6$ ) verlangt eine Ring-C-Halbsesselumklappung im *ersten* Epimerisierungsschritt, der alternative Reaktionsweg  $1 \rightarrow 12$ -Epi- $1 \rightarrow 5$  würde diese Umklappung im *zweiten* Epimerisierungsschritt vornehmen. Dass der erstgenannte Reaktionsweg zutrifft, wird durch die in *Fig. 4* reproduzierten CD-Spektren der drei Isomeren **2**, **4** und **6** in  $H_2O$  und  $CH_2Cl_2$  bezeugt: die CD-Spektren des Mono- und Di-epimeren sind sich sehr ähnlich, beide aber sind deutlich verschieden vom CD-Spektrum des Edukts F430M. Dies dokumentiert konformationelle Ähnlichkeit der Chromophorperipherien der Isomeren **4** und **6** ebenso wie deren Verschiedenheit von **2**. Die konformationelle Umklappung des Ringes C findet also im ersten Epimerisierungsschritt statt.

Wie anhand des *Schemas 1* erläutert, geht **1** (bzw. **2**) via **3** (bzw. **4**) in das Di-epimere **5** (bzw. **6**) über, welches offenbar das thermodynamisch stabilste von allen drei Isomeren ist. Dass **5** (bzw. **6**) sich als *trans*-Isomeres stabiler erweist als das *cis*-Isomere **3** (bzw. **4**), ist trotz der quasi-diaxialen Anordnung der beiden Ring-C-Seitenketten in **5** (bzw. **6**) nicht unplausibel<sup>6)</sup>; warum es jedoch so deutlich stabiler sein soll als das natürliche Isomer **1** (bzw. **2**), das ja ebenfalls eine *trans*-quasi-diaxiale Anordnung der beiden Seitenketten aufweist, ist mit den bisherigen Argumenten nicht zu verstehen. Wenn die nachstehend erläuterte Deutung zutrifft, so ist die thermische Isomerisierung von F430 ein Phänomen, das über die lokale Chemie von F430 hinaus für das Gebiet der corphinoiden Metallkomplexe ganz allgemein von Belang ist.

**3. Zur Ursache der Doppel-Isomerisierung: Die Ligandperipherie von F430 weist einen 'falschen' Konformationstyp auf.** – Den Schlüssel für eine Deutung der Doppel-Epimerisierung von F430, d. h. des Übergangs der *trans*-quasi-diaxialen Anordnung der Ring-C-Seitenketten unter Ringkonformationsumklappung in die (lokal) enantiomorphe *trans*-quasi-diaxiale Anordnung, liefert die vorstehend publizierte Arbeit von *Kratky et al.* [10]. Dort wird anhand des gesamten bisherigen Beobachtungsmaterials aus dem Grazer und Zürcher Laboratorium gezeigt, dass Ni(II)-Komplexe der Hydroporphyrin-Reihe unabhängig von der Konstitution und Konformation generell eine charakteristische Sattelkonformation aufweisen, welche die durchwegs in Halbsesselform vorliegenden Pyrrolinyliden-Ringe des Ligandensystems dergestalt konformationell verkoppelt, dass die Ligandperipherie eine charakteristisch alternierende Konformation einzunehmen gezwungen ist. *Fig. 5* gibt diesen bisher bei sämtlichen röntgenographisch untersuchten



*Fig. 5. Schematische Darstellung der Ligandperipherie eines Nickel(II)-hydrocorphinates in der Zylinderprojektion*

<sup>6)</sup> Über die Bevorzugung der *trans*-Anordnung von benachbarten Seitenketten in Magnesium-Pyrrocorphinaten vgl. [15]. In corphinoiden Ni(II)-Komplexen scheint eine quasi-diaxiale Konformation benachbarter,  $C(sp^3)$ -gebundener Seitenketten und eine entsprechende quasi-diäquatoriale Anordnung energetisch vergleichbar zu sein [10].

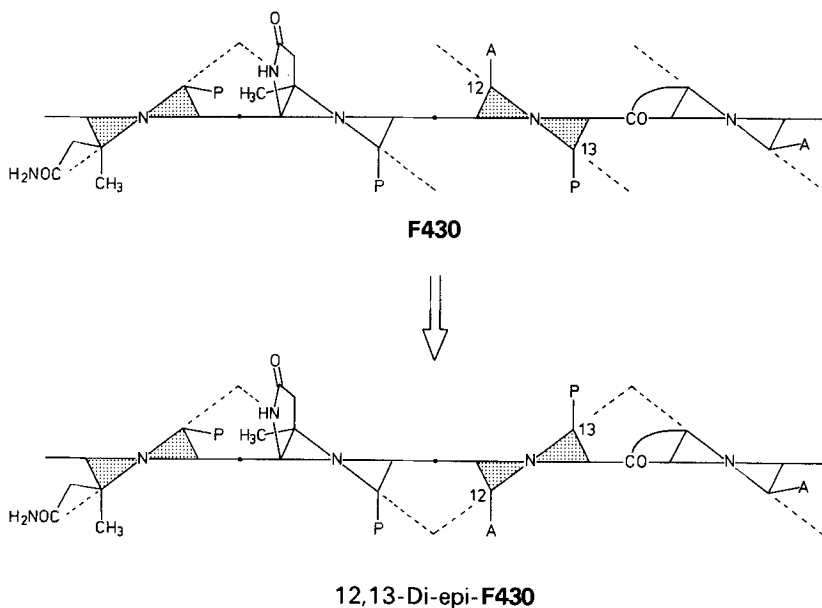


Fig. 6. Postulierte Konformationen der Ligandperipherie von F430 (1) und 12,13-Di-epi-F430 (5). A =  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ , P =  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ .

Nickel(II)-hydroporphinaten angetroffenen Konformationstyp der Ligandperipherie als Abstraktion einer Zylinderprojektion wieder (für die Wiedergabe realer Ligandkonformationen vgl. [10]).

Leider gibt es bislang keine Röntgenstrukturanalyse, aus welcher konformationelle Informationen über die Ligandperipherie von F430 (1) zu entnehmen wären. Hingegen lässt sich aus den früher beschriebenen  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Detailanalysen von F430M (2) (vgl. [2]) entnehmen, dass in dieser Verbindung die lokale Konformation der Ringperipherie der Ringe A und C jener entspricht, welche für diese beiden Ringe von F430M in Fig. 6 wiedergegeben ist. Grundlage dieser Zuordnung ist zum einen die NOE- $^1\text{H-NMR}$ -differenzspektroskopische Beobachtung, dass die anguläre  $\text{CH}_3$ -Gruppe an C(2) im Ring A mit dem  $\alpha$ -ständigen Proton der *meso*- $\text{CH}_2$ (5)-Gruppe eine NOE-Interaktion zeigt und deshalb quasi-axial am Ring A haften muss. Zum andern ist die quasi-diaxiale Lage der beiden *trans*-ständigen Seitenketten des Rings C von F430M (2) nicht nur eine von Modellbetrachtungen geforderte Annahme (vgl. oben), sondern auch  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch in mehrfacher Hinsicht belegt (vgl. [2]). Diese beiden Informationen legen den Konformationssinn der beiden Halbsessel der Ringe A und C *relativ zueinander* fest. Voraussetzung hierfür ist die Annahme, dass die absolute Konfiguration von F430 (1) im Bereiche der Ringe A und B<sup>7)</sup> tatsächlich jener des Sirohydrochlorins (und Vitamins B<sub>12</sub>) entspricht<sup>8)</sup>. Der Konformationssinn der Peripherie der Ringe B und

<sup>7)</sup> Für den Bereich des Ringes C ist die absolute Konfiguration von F430M bewiesen [2]. Infolge der trigonalen Struktur der *meso*-Position C(10) liessen sich die Ringbereiche C und A/B durch NOE-Spektroskopie nicht konfiguratv korrelieren.

<sup>8)</sup> Neue, noch unpublizierte experimentelle Daten bestätigen die Richtigkeit dieser Annahme; vgl. A. Fässler, Diss. ETH (erscheint demnächst).

D lässt sich aus den <sup>1</sup>H-NMR-Analysen von F430M (2) nicht schlüssig herleiten; die in Fig. 6 tentativ eingetragenen Varianten sind jene, die wir auf Grund von Modellbetrachtungen als die wahrscheinlichsten betrachten<sup>9)</sup>. Für die Argumentation ist die Konformationszuordnung für die Ringe B und D im Grunde auch nicht notwendig. Entscheidend ist folgendes: *In F430 ist die Korrelation der Halbsesselkonformationen der Ringe A und C invers zu jener, welche die beiden 'para'-ständigen Ringe aufweisen müssten, um der für Nickel(II)-hydroporphinate charakteristischen Sattelkonformation zu entsprechen. Die zweifache Epimerisierung der Konfigurationszentren am Ring C und die damit verbundene Halbsessel-Inversion des Ringes C stellt diese Entsprechung her (vgl. Fig. 6).*

Wie in [10] dargelegt, liegt der Ursprung der Sattelkonformation der Nickel(II)-hydroporphinate in der Kontraktion des äquatorialen Koordinationsraums des Ligandensystems durch das (für die Dimension dieses Koordinationsraumes zu kleine) Ni(II)-Ion. Die Sattelung des Ligandensystems induziert aus geometrischen Gründen die gegenseitige konformationelle Kopplung der Pyrrolinyliden-Ringhalbsessel in dem in Fig. 5 dargestellten Sinne. Dieser Typ der Ringkonformationskopplung muss demnach einem Spannungsminimum entsprechen, womit ihre Behinderung oder Verhinderung durch irgendwelche zusätzliche Faktoren einer Destabilisierung im Sinne einer über das gesamte Ligandensystem delokalisierten Spannung gleichkommt. Ein solcherart verhindernder Faktor scheint in der Struktur von F430 (1) darin zu bestehen, dass die (zumindest gegenüber dem Ring A) sattelgerechte Konformation des Ringes C, in welcher die  $\alpha$ -ständige Seitenkette an C(13) quasi-äquatorial liegen müsste, durch die (für F430 charakteristische) Präsenz des zusätzlichen Ringes an der benachbarten meso-Stellung verhindert wird. *Der Zwang zur quasi-axialen Lage der  $\alpha$ -ständigen Seitenkette an C(13) in F430 (1) bedeutet den Zwang zur 'falschen' Konformation des Ring-C-Halbsessels. Dieser Zwang entfällt durch die Doppel-Epimerisierung.*

Soll die hier gegebene Argumentation vollständig sein, so muss ein weiterer struktureller Faktor erkannt werden, der für Ring A die (relativ zum Ring C) nicht-sattelgerechte Halbsesselkonformation erzwingt<sup>10)</sup>. Nach Molekülmodellbetrachtungen könnte dieser Faktor in der Anellierung des Zusatzringes am Ring D<sup>9)</sup> und (eventuell) der Anellierung des Lactamringes am Ring B bestehen, wodurch diese Ringe in den (gegenüber Ring A) sattelgerechten Halbsesselkonformationen fixiert würden. Wohl nur zusätzliche, d. h. röntgenstrukturanalytische und molekülmechanische Informationen dürften hier die wünschbare Transparenz herbeiführen.

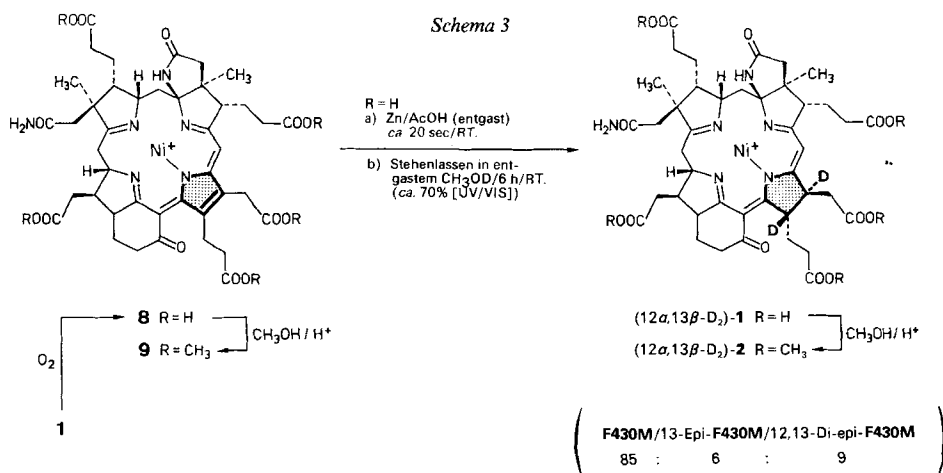
In einer Übersicht über die magnetischen und elektrochemischen Eigenschaften einer Reihe von synthetischen Ni(II)-Komplexen der Corrin- und Corphinreihe haben wir dargelegt [11], dass ein Charakteristikum der F430-Struktur die relativ hohe Elektrophilie des Ni(II)-Ions ist, was sich zum einen durch ein relativ wenig negativ liegendes Reduktionspotential [11] und zum andern darin ausdrückt, dass F430 (1) in nukleophilen Lösungsmitteln wie H<sub>2</sub>O oder MeOH paramagnetisch ist [3]. Das im F430-Ligandensystem

<sup>9)</sup> Dem bislang spektroskopisch nicht erfassten Proton an C(17) (vgl. [2]) schreiben wir deshalb quasi-axiale Lage am Ring D-Halbsessel zu (vgl. Fig. 6), weil bei Bicyclo[4.3.0]non-1-en-3-on-Systemen Konformere mit nicht-axialer Lage des Brückenkopf-Protons aus geometrischen Gründen stark gespannt sein müssen. Vgl. auch die Röntgenstrukturanalyse von Anhydro-bonellin [17].

<sup>10)</sup> Dass die Konformation des Ringes A relativ zum Ring C nicht sattelgerecht ist, entspricht einer experimentellen Beobachtung, in Frage steht hier die strukturelle Ursache hierfür. Die Konformation des Ringes A kann eine Folge der (relativ zu Ring C) nicht-sattelgerechten Konformation der Ringe B und/oder D sein.

komplexierte Ni(II)-ion ist magnetisch auf der Kippe: *F430M (2)* ist in wasserfreiem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  diamagnetisch ( $^1\text{H-NMR}$ ) [2], in  $\text{MeOH}$  paramagnetisch ( $\mu_B = 1,84 \pm 0,1$ ), in  $\text{MeCN}$  hingegen wieder diamagnetisch ( $\mu_B < 0,3$ ); *F430 (1)* in  $\text{H}_2\text{O}$  ist paramagnetisch ( $\mu_B = 2,0 \pm \text{ca. } 0,2$ ). Die darin zum Ausdruck kommende Affinität des  $\text{F430M-Ni(II)}$ -Ions für zusätzliche axiale Koordination mit Nukleophilen zeigt sich in der auffallenden Tatsache, dass das UV/VIS-Spektrum von *F430M (2)* in  $\text{H}_2\text{O}$  (bzw.  $\text{MeOH}$ ) deutlich verschieden ist vom UV/VIS-Spektrum in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (vgl. *Fig. 2*). Ebenso auffallend ist aber auch der Befund, dass im Falle des 12,13-Di-epi-*F430M (6)* die UV/VIS-Spektren in  $\text{H}_2\text{O}$  und in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sehr ähnlich sind, was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass dieses Di-epimere auch in  $\text{MeOH}$  praktisch diamagnetisch ist ( $\mu_B < 0,5$ ). Das  $\text{Ni(II)}$ -Ion ist demnach im natürlichen *F430M (2)* elektrophiler als im unnatürlichen, thermodynamisch stabileren Ligandensystem des 12,13-Di-epi-*F430M (6)*. Wenn tatsächlich die Ligandkontraktion in Nickel(II)-hydroporphinaten der tendenziellen Absättigung der Elektrophilie des  $\text{Ni(II)}$ -Ions dient und dieser Vorgang durch die Sattlung des Ligandensystems ermöglicht wird, dann sollte jegliche strukturelle Behinderung dieser Sattlung das effektive Ausmass der Elektrophilie-Absättigung verringern. Der Hinweis darauf, dass dieses Bild dem oben erwähnten Elektrophilie-Unterschied entspricht, dürfte sich trotz der zur Zurückhaltung mahnenden Komplexität der strukturellen Situation im Hinblick auf die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Struktur und biologischer Funktion von *F430* rechtfertigen (vgl. auch [11]).

**4. 12,13-Didehydro-*F430 (8)* und seine diastereoselektive Rückreduktion zum natürlichen *F430 (1)*.** – Sind in Metallkomplexen corrinoider und corphinoider Liganden die Pyrrolinyliden-Ringe nicht durch geminale Substituenten blockiert, findet leicht Dehydrierung zu entsprechenden Pyrrol-Derivaten statt (vgl. z. B. [16] [9]). Solch ein unblockierter Pyrrolinyliden-Ring liegt im Ring C des Faktors *F430 (1)* vor. Wie bereits früher erläutert (vgl. [2]), ist der Ring C von **1** aber insofern ein spezieller Fall, dass er zwar nicht durch geminale Substitution, wohl aber durch die Raumbeanspruchung des Extrarings zwischen den Ringen C und D gegenüber Dehydrierung geschützt ist, und zwar kinetisch, indem die beiden H-Atome an C(13) und C(12) quasi-äquatoriale Lage einnehmen müssen (vgl. *Kap. 3*) und auch thermodynamisch, da im pyrrolischen 12,13-Didehydro-Derivat eine starke Behinderung zwischen der pseudo-äquatorial an C(13) haftenden



Seitenkette und der an der *meso*-Stellung C(15) haftenden Carbonylgruppe angenommen werden muss. Dass dieser Dehydrierungsschutz nicht ein unbedingter sein kann, zeigt schon das Auftreten der Doppel-Epimerisierung von F430. In der Tat stellt das erstmals von Thauer und Mitarbeitern [7c] erwähnte, in der Regel bei chromatographischen Isolierungen von F430 (**1**) als rot-violette (auf Kieselgel polarere) Nebenzone zu beobachtende, eine Absorptionsbande bei 560 nm aufweisende F430-Begleitprodukt das im Ring C dehydrierte 12,13-Didehydro-F430 (= F560; **8**) dar (Schema 3). Eine entsprechende, violette und auf Kieselgel dicht vor F430M (**2**) wandernde Begleitzone war (in Spuren) immer auch bei der DC-Isolierung des Pentamethylesters **2** beobachtet worden. Das aus zahlreichen solchen Veresterungsansätzen zusammengefasste Material wurde durch wiederholte präp. DC gereinigt und als DC-einheitliche Verbindung **9** (dunkelvioletter amorpher Festkörper) spektroskopisch charakterisiert (vgl. UV/VIS und CD-Spektrum in Fig. 7 bzw. 8). Gleiches Material wurde auch durch säurekatalysierte Methanolyse

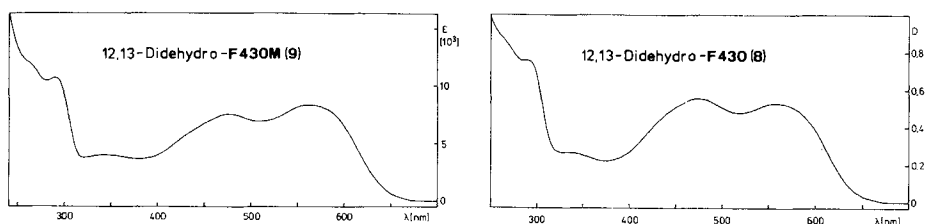


Fig. 7. UV/VIS-Spektren von **8** ( $c \approx 6 \cdot 10^{-5}$  M in 0,01N  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) und **9** ( $c = 6,2 \cdot 10^{-5}$  M in  $\text{H}_2\text{O}$ )

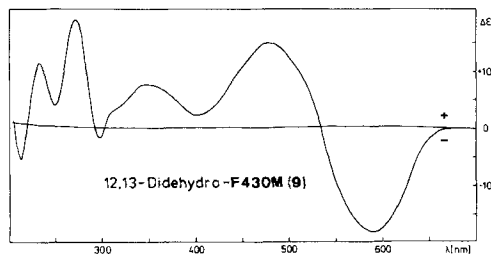


Fig. 8. CD-Spektrum von **9** ( $c = 6,2 \cdot 10^{-5}$  M in  $\text{H}_2\text{O}$ )

chromatographierter Sammelpuben von violettem 12,13-Didehydro-F430 (**8**) gewonnen. Die Strukturzuordnung im Sinne der Formel **9** (12,13-Didehydro-F430M) beruht auf dem FAB-MS (Molmasse [ $M - \text{ClO}_4^-$ ] = 973, unter Aufnahmebedingungen, unter welchen F430M den Wert 975 ergibt) sowie insbesondere der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren im Vergleich zu jenen der drei F430M-Isomeren. Die in den Spektren aller drei F430M-Isomeren gut erkennbaren Signale von H–C(12) und H–C(13) fehlen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **9** (vgl. Fig. 3), ebenso die entsprechenden  $\text{CH}(\text{sp}^3)$ -Signale im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum, wo hingegen zwei neue  $\text{C}(\text{sp}^2)$ -Signale (140,4 und 146,6 ppm, vgl. Tab. 1) auftreten.

Im Zusammenhang mit den unten erörterten Reduktionsstudien an **8** ist die Frage nach der präparativen Durchführung der Luftoxidation von F430 (**1**) zu **8** untersucht und folgendes beobachtet worden. Generell ist **1** leichter autoxidierbar als sein Pentamethylester **2**; 12,13-Di-epi-F430M (**6**) sowie 13-Epi-F430M (**4**) sind gegenüber Autoxidation praktisch stabil. Hochgereinigtes **1** ist am labilsten und deutlich autoxidationsempfindlicher als F430-Proben, die noch einen Teil ihrer natürlichen Beimengungen enthalten. Die Autoxidation von **1** ist milieuhabhängig; sie verläuft von den vier Lösungsmitteln

AcOH  $\gg$  MeOH  $>$  2,2,2-Trifluorethanol [3]  $>$  H<sub>2</sub>O am raschesten im erstgenannten. Es konnten keine Anhaltspunkte dafür gewonnen werden, dass die Autoxidation Singlett-Sauerstoff benötigen würde (keine vermehrte Bildung von **8** bei Belichtung in Gegenwart von Bengalrosa in MeOH-Lösung oder auf Kieselgel). Die Gesamtheit der Erfahrungen weist eher darauf hin, dass Autoxidation und Deprotonierung an C(13) (oder C(12)) am Ring C parallel gehen. In 0,4 mm H<sub>2</sub>O/MeOH-Lösung (4:1, pH 7, Phosphatpuffer) unter reinem O<sub>2</sub> (2 atm) bei Raumtemperatur wandelt sich gereinigtes F430 (**1**), von teilweiser Epimerisierung am Ring C begleitet, langsam in 12,13-Didehydro-F430 (**8**) um (Halbwertszeit *ca.* 1 Woche).

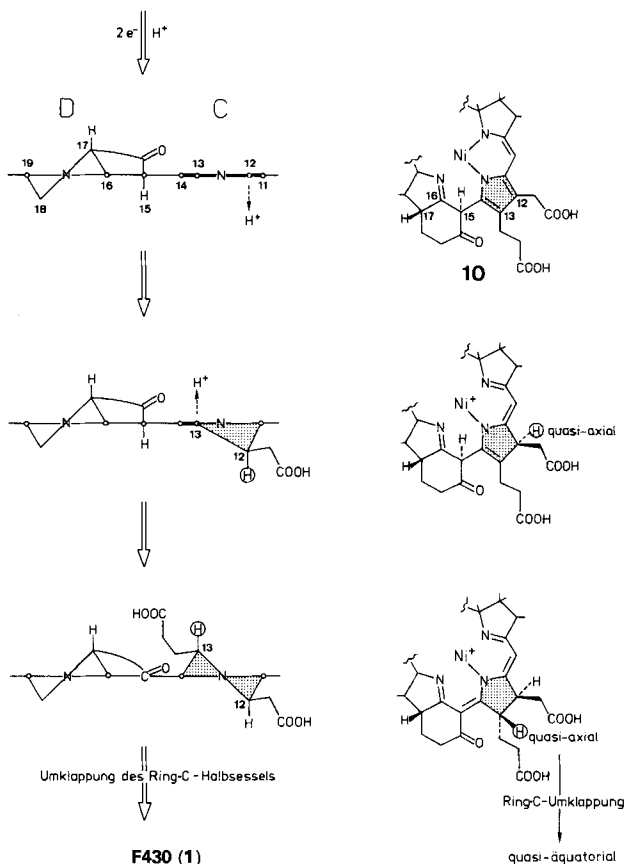
12,13-Didehydro-F430 (**8**) wird durch Zn in MeOH/AcOH momentan reduziert<sup>11)</sup>. UV/VIS-spektroskopische Analyse der Reaktion zeigte die Bildung eines Primärprodukts mit einer Hauptabsorptionsbande bei 380 nm; diese kehrte bei Luftzutritt in Abwesenheit von Zn rasch wieder zu 560 nm zurück, wandelte sich jedoch in Abwesenheit von Luft (und Zn) langsam zur Absorptionsbande von F430 (**1**). Potentiell präparativ liess sich die Reaktion so durchführen, dass man die violette Lösung von **8** in entgastem AcOH unter N<sub>2</sub>-Druck durch eine kurze Säule von Zn-Staub innert *ca.* 20 sec in ein Auffanggefäss mit entgastem MeOH presste und die praktisch nunmehr farblose Reaktionslösung unter Luftausschluss solange sich selbst überliess, bis die maximale Extinktion der Absorptionsbande bei 430 nm erreicht war (innert Stunden; vgl. Fig. 9 im *Exper. Teil*). Im *Exper. Teil* ist ein Ansatz beschrieben, in welchem die Reduktionslösung in MeOD aufgefangen, das Rohprodukt durch säurekatalysierte Methanolyse (vgl. [2]) verestert und das im DC isolierte Hauptprodukt durch HPLC, DC, <sup>1</sup>H-NMR-Spektren, UV/VIS-Spektrum und FAB-MS (Molmasse [ $M - ClO_4^-$ ] = 977) als (12 $\alpha$ ,13 $\beta$ -D<sub>2</sub>)-F430M (12 $\alpha$ ,13 $\beta$ -D<sub>2</sub>)-**2**) identifiziert wurde (präp. Ausbeute 45%). Nach HPLC-Analyse enthielt das rohe Methanolyseproduktgemisch (nebst geringen Mengen unbekannter Nebenprodukte und 12% Edukt-Pentaester **9**) die drei F430-Isomeren in *ca.* 60% Ausbeute in folgendem Verhältnis relativ zueinander: 85% F430M (**2**), 6% 13-Epi-F430M (**4**) und 9% 12,13-Di-epi-F430M (**6**) (als entsprechend deuterierte Derivate). Führte man die Reduktionsstufe mit Zn in AcOD, die abschliessende (380 nm  $\rightarrow$  430 nm)-Tautomerisierungsstufe jedoch in undeutertem Medium durch, so wurde ein Hauptprodukt isoliert, das kein D enthielt, und das nach HPLC, DC, UV/VIS-, <sup>1</sup>H-NMR- und FAB-MS mit F430M (**2**) identisch war.

Analog durchgeführte Reduktionsansätze ausgehend von Pentamethylester **9** anstelle der Pentasäure **8** verliefen präparativ weniger gut (Chromophor-Ausbeute 45–50%) und stereochemisch weniger einheitlich; nebst geringen Anteilen (< 5%) des Di-epimers **6** wurden ungefähr gleiche Mengen von F430M (**2**) und 13-Epi-F430M (**4**) nachgewiesen (identifiziert durch HPLC und DC, **4** auch durch UV/VIS).

In Anbetracht der anzunehmenden gegenseitigen Behinderung der *meso*-ständigen Carbonylgruppe und der Seitenkette an C(13) im Ring C ist die grosse Leichtigkeit, mit der sich 12,13-Didehydro-F430 (**8**) reduzieren lässt, nicht überraschend. Hingegen ist die Diastereoselektivität, mit der dabei F430 (**1**) mit der natürlichen, thermodynamisch unstabileren Konfiguration am Ring C zurückgebildet wird, ein unerwartetes und wichtiges Ergebnis. Retrospektiv erkennt man, dass diese durch kinetische Kontrolle zustande

<sup>11)</sup> Dass sog. F560 sich zu Material mit der Absorptionsbande bei 430 nm zurückreduzieren lässt, haben bereits *Keltjens et al.* [8b] beobachtet.

## Schema 4

12,13-Didehydro-F430 (**8**)

kommende Selektivität wiederum eine Folge der (anzunehmenden) konformationellen Sattelung des F430 Ligandensystems sein könnte. Dies ist im *Schema 4* erläutert; da die darin vorkommenden strukturellen Annahmen experimentell nicht weiter belegt sind, hat diese Deutung betont tentativen Charakter; sie vermag aber das Prinzip zu illustrieren, wie die konformationelle Ligandendeformation in Nickel(II)-hydroporphinaten kinetisch bedingte Stereoselektivität von Reaktionen an der Ligandperipherie bestimmen kann.

Ausgangspunkt ist der feststehende Befund, dass Zn/AcOH unter momentaner Entfärbung aus **8** ein bei 380 nm absorbierendes (durch Luft sehr leicht rückoxidierbares) Zwischenprodukt erzeugt, welches in MeOH oder H<sub>2</sub>O langsam unter Protonenaufnahme an C(12) und C(13) in F430 (**1**) übergeht. Sinnvoll ist die Annahme, dass dieses Zwischenprodukt den Ring C als Pyrrol-Ring enthält und dass der Übergang in **1** eine Tautomerisierung darstellt. Unabhängig davon, ob diese Protonierung den Weg zum *trans*-Isomer 12 $\beta$ /13 $\alpha$  ( $\rightarrow$ F430) oder zum di-epimeren *trans*-Isomer 12 $\alpha$ /13 $\beta$  einschlägt, wird sie, falls sie die stereoelektronische Forderung nach quasi-diaxialer Addition erfüllt, primär zu jener der jeweiligen Halbsesselform des Ringes C führen, die sterisch behindert

ist (Ring C-Seitenketten quasi-diäquatorial). Entscheidend sollte demnach die Energetik der diastereoisomeren Reaktionswege nicht zu den stabilen, sondern zu den sterisch behinderten Ring-C-Konformeren sein. Dies steht damit in Übereinstimmung, dass der konfigurative Verlauf der Reduktion von 12,13-Didehydro-F430 (8) zu F430 einer quasi-diaxialen Protonierung zum Ring C in seiner unstabilen, jedoch sattelgerechten Halbsesselform entspricht. Das Schema 4 erläutert dies anhand der Hypothese, dass dem 380-nm-Zwischenprodukt die Konstitution 10 zukommt und dass die erste Ring-C-Protonierung an C(12) stattfindet. Intermediäre Umklappung des Ringes C vor der zweiten Protonierung würde zum *cis*-Isomeren 3 bzw. 4 führen.

Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt.

### Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Für die Reduktionsversuche (Kap. 7, unten) wurde mit HCl aktivierter Zn-Staub verwendet. Es erwies sich als unnötig, das Zn vor Gebrauch jedesmal frisch zu aktivieren; beim Aufbewahren an der Luft wurde keine Abnahme der Reaktivität gegenüber F560 beobachtet. CH<sub>3</sub>OD: Fluka puriss. 99% D; CD<sub>3</sub>COOD: Ciba-Geigy 99,9% D. Gehaltsbestimmungen auf Grund des UV/VIS-Spektrums beziehen sich auf die im Kap. 3 und in [2] angegebenen  $\epsilon$ -Werte der VIS-Bande bei 430 nm (F430M und F430M-Isomeren) bzw. 560 nm (F560M). Für die Pentasäuren (F430, F430-Isomeren, F560) wurden die gleichen  $\epsilon$ -Werte verwendet wie für die entsprechenden Pentamethylester. DC: Freie Säuren (F430, F430-Isomeren, F560): vgl. [3]. Pentamethylester (F430M, F430M-Isomeren, F560M): vgl. Fussnoten 36 und 37 in [2]. R<sub>F</sub>-Werte (Kieselgel/NaClO<sub>4</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 13:1; 2mal entwickelt über eine Strecke von 10 cm): 0,28 (F430M), 0,30 (F560M), 0,31 (12,13-Di-epi-F430M), 0,32 (13-Epi-F430M). HPLC: System 1 für F430M und F430M-Derivate: 9 × 250 mm Säule; Lichrosorb Si 100-5  $\mu$  (Merck); CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>CN/*i*-PrOH/0,02N wässr. LiClO<sub>4</sub> 500:100:25:4; Druck ca. 30 bar; Fluss ca. 2 ml/min; Retentionszeiten (*t<sub>R</sub>*) und theoret. Bodenzahlen (*N*): F430M (2): *t<sub>R</sub>* = 82,0 min (*N* = 8700); F560M (9): 54,5 min (7500); 12,13-Di-epi-F430M (6): 50,3 min (8100); 13-Epi-F430M (4): 42,6 min (8600). Detektorwellenlänge 430 nm. Zur Berechnung der Zusammensetzung von Substanzgemischen wurden die  $\epsilon$ -Werte in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bei 430 nm verwendet:  $\epsilon$  = 16 800 (2), 18 200 (4), 17 500 (6), 6200 (9). System 2 für F430 und F430-Derivate: Apparat vgl. [3]<sup>12</sup>. Vorsäule 4,6 × 30 mm, analyt. Säule 4,6 × 250 mm; Speri-5 RP-18, 5  $\mu$  (Brownlee Labs); Lsgm.: A: 0,01N KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O (pH 5,6); B: MeOH/H<sub>2</sub>O 4:1. Das System wurde 10 min mit A äquilibriert; nach dem Einspritzen wurde die Konz. an B während 20 min linear von 0 auf 20 Vol-% erhöht. Dann wurde 10 min isokratisch mit 20 Vol-% B weitereluiert. Fluss 1 ml/min; Druck 190 bar; Detektion bei 430 nm. Retentionszeiten und theoret. Bodenzahlen: 12,13-Di-epi-F430 (5): *t<sub>R</sub>* = 19,5 min (*N* = 29000); F430 (1): 20,6 min (32000); F560 (8): 21,9 min (20000); 13-Epi-F430 (3): 22,7 min (33000). Die Berechnung der Produktanteile in Substanzgemischen beruht auf den  $\epsilon$ -Werten der entsprechenden Pentamethylester in H<sub>2</sub>O bei 430 nm:  $\epsilon$  = 23000 (2), 17000 (4), 20 600 (6), 6200 (9). NMR-Spektren: Bruker WM-300 (300 MHz für <sup>1</sup>H, 75 MHz für <sup>13</sup>C).  $\delta$ -Werte in ppm bezogen auf  $\delta$  (CHDCl<sub>2</sub>) = 5,33 ppm bzw.  $\delta$  (<sup>13</sup>CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 53,8 ppm. CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: Merck 99% D, über CaH<sub>2</sub> destilliert. Probenherstellung: vgl. [2]. Die NMR-Lsg. wurden im Handschuhsack unter N<sub>2</sub> abgefüllt und in einem mit Plastikstopfen und Parafilm verschlossenen 5-mm-Röhrchen bzw. einer 5-mm-Mikrozelle gemessen. FAB-MS [18]. Kratons MS-50 mit FAB-Ausrüstung (M-Scan Ltd.). Matrix: sofern nicht anders vermerkt Glycerin. Die Spektren wurden von Dr. J. Meili aufgenommen (MS-Gruppe des Laboratoriums für Organische Chemie, Leitung Prof. J. Seibl).

2. *Isomerisierung von F430 (1).* 2.1. In einer Lsg. von 30,1 mg (nach UV/VIS ca. 0,02 mmol) F430-Isolat (Isolierung und Reinigung vgl. [7b]) in 7 ml H<sub>2</sub>O wurde der pH mit 0,1N NaHCO<sub>3</sub> auf 7,5 eingestellt. Die Lsg. wurde bei 10<sup>-3</sup> Torr entgast und in einer unter Vakuum abgeschmolzenen Ampulle 3 h bei 105° gerührt. Das H<sub>2</sub>O wurde i. HV. bei 30° abdestilliert, der Rückstand 0,5 h i. HV. bei RT. getrocknet, in 50 ml H<sub>2</sub>O-freiem MeOH aufgenommen und nach Zugabe von 700 mg H<sub>2</sub>O-freier TsOH nach der Vorschrift in [2] methanolysiert. Die Aufarbeitung, Chromatographie (6 Kieselgel-DC-Platten mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 13:1 3mal entwickelt) und Isolierung

<sup>12</sup>) Wir danken Herrn Dr. R. Hobi, Institut für Pharmakologie und Biochemie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich für den Hinweis auf dieses System und für die Erlaubnis, seine HPLC-Apparatur zu benutzen.



der Produkte aus den 3 gelben Hauptzonen erfolgte analog der Beschreibung in [2]. Die 3 DC-reinen F430M-Isomeren **2** ( $R_f$  ca. 0,30), **4** ( $R_f$  ca. 0,41) und **6** ( $R_f$  ca. 0,37) wurden über Nacht bei 0,001 Torr/RT. getrocknet. Neben diesen 3 Produkten waren noch Spuren der violetten Dehydroverbindung **9** ( $R_f$  ca. 0,33) und weiterer nicht identifizierter Produkte (vor allem im  $R_f$ -Bereich 0–0,15) zu erkennen. Ausbeuten: 12,0 mg (56% nach Gewicht) 12,13-Di-epi-F430M (**6**), 2,0 mg (9%) F430M (**2**) und 1,5 mg (7%) 13-Epi-F430M (**4**).

In einem anderen Experiment, in welchem man 23 mg (nach UV/VIS ca. 0,013 mmol) F430-Isolat [7b] auf sonst analoge Art (3 ml H<sub>2</sub>O), aber nur 25 min auf 105° erhitzt und dann methanolysiert hatte, betrug die Ausbeuten 5,7 mg (35%) **4**, 5,1 mg (31%) **6** und 4,1 mg (25%) **2**.

Zur spektroskopischen Charakterisierung wurde **4** aus den beiden Ansätzen nochmals auf 3 NaClO<sub>4</sub>-imprägnierten Kieselgel-DC-Platten mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 13:1 chromatographiert. Mit demselben Lsgm.-Gemisch wurde **6** aus beiden Ansätzen zuerst auf 3 NaClO<sub>4</sub>-imprägnierten und dann auf 2 nicht-imprägnierten DC-Platten gereinigt. Die beiden Produkte wurden, wie in [2] beschrieben, vom Kieselgel abgelöst und nochmals auf je einer 3 × 15-cm-Kieselgel-DC-Platte nachgereinigt (zuerst mit 0,5% NaClO<sub>4</sub> in AcOEt, dann mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 13:1 entwickelt). Die als amorphe, rotgelbe Festkörper isolierten Proben (5 mg **4**, 13 mg **6**) wurden 14 h bei RT./0,001 Torr getrocknet.

2.2. *Bestimmung der Isomerenverteilung im Gleichgewicht.* Eine i. HV. entgaste Lsg. von 1 mg DC-reinem **1** [3] in 2 ml 0,01N KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7,0;  $c \approx 0,5$  mM) wurde in einer unter HV. abgeschmolzenen Ampulle 24 h auf 100° erhitzt. HPLC-Analyse (System 2) der Lsg. (ohne Aufarbeitung): 88% 12,13-Di-epi-F430 (**5**;  $t_R$  18,9 min), 4% F430 (**1**; 20,0 min), 8% 13-Epi-F430 (**3**; 22,1 min) sowie ein nicht identifiziertes Nebenprodukt (17,5 min; 13% der Intensität des Hauptpeaks bei 18,9 min).

Das analoge Experiment ausgehend von **5** zeigte folgende Isomerenverteilung: 88% **5** ( $t_R$  18,9 min), 4% **1** (20,0 min), 8% **3** (22,1 min). Daneben war ebenfalls das unbekannte Produkt bei  $t_R$  17,5 min vorhanden (11% des Hauptpeaks bei 18,9 min).

Die Pentasäure **5** wurde durch Hydrolyse des Pentamethylesters **6** (0,1N HCl, 80°, 7 h, N<sub>2</sub>) hergestellt. Das nach präp. DC (Kieselgel; BuOH/H<sub>2</sub>O/AcOH 4:1:1; vgl. [3]) in ca. 70% Ausbeute (UV/VIS) isolierte Produkt zeigte im HPLC (System 2) neben **5** ( $t_R$  19,6 min) 11% eines unbekanntes Nebenproduktes ( $t_R$  17,9 min), aber kein **1** oder **3**.

2.3. *Kinetik der Isomerisierung (Tab. 2).* Eine i. HV. entgaste Lsg. von ca. 1 mg **1** in 2 ml 0,01N KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7,0) wurde in einer mit Teflon-Schraubverschluss unter HV. abgeschlossenen Ampulle auf 100° erhitzt. Zur Probenentnahme wurde die Ampulle im Eiswasser auf RT. abgekühlt und unter N<sub>2</sub> geöffnet. Nachdem man 20 µl für die HPLC-Analyse entnommen hatte, wurde die Lsg. wiederum entgast und weiter auf 100° erhitzt.

Tab. 2. Kinetik der Isomerisierung

Reaktionszeit [min]	F430 ( <b>1</b> ) [%]	13-Epi-F430 ( <b>3</b> ) [%]	12,13-Di-epi-F430 ( <b>5</b> ) [%]
7,5	67	25	8
15	48	38	14
30	35	44	22
60	23	40	37
180	13	19	68

2.4. *Korrelation der freien Pentasäuren **3** und **5** mit den entsprechenden Pentamethylestern **4** und **6**.* Auf eine spektroskopische Charakterisierung der F430-Isomeren **3** und **5** wurde wegen des grossen Aufwandes (vgl. [3]) verzichtet. Ihre Struktur und auch die getroffenen Zuordnungen im HPLC und DC sind durch Korrelation mit den entsprechenden Pentamethylestern **4** und **6** gesichert. Dazu wurde eine im UV/VIS und HPLC charakterisierte Probe von **5** (Herstellung s. oben) sowie mehrere Proben von HPLC-definierten Gemischen 3/5 nach der Vorschrift in [2] verestert und im HPLC (System 1) mit authentischem 13-Epi-F430M (**4**) bzw. 12,13-Di-epi-F430M (**6**) verglichen.

3. *Spektroskopische Daten der F430M-Isomeren.* 3.1. 13-Epi-F430M (**4**). UV/VIS (H<sub>2</sub>O): ca. 508 (sh, 1100), 429 (17 100), 342 (sh, 2700), 299 (sh, 8900), 272 (14 100). UV/VIS (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): ca. 510 (sh, 1300), 433 (18 500), 341 (sh, 2600), 300 (8300), 292 (sh, 9100), 270 (14 800), 255 (sh, 13 600); vgl. Fig. 2. CD (H<sub>2</sub>O): 506 (–16,0), 451 (0), 426 (+25,1), 390 (0), 362 (–11,7), 301 (–20,8), 293 (0), 276 (+16,8), 252 (0), 238 (–1,9), 230 (0), 221 (+8,5). CD (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): ca. 508 (br., –18,3), 456 (0), 452 (sh, +2,9), 428 (+37,1), 389 (0), 366 (–14,5), 319 (min., –1,5), 303 (–32,3), 289 (sh, –2,2), 287 (0), 278 (sh, +10,1), 264 (+17,3), 248 (0), 242 (–3,4), 236 (0); vgl. Fig. 4. IR (CHCl<sub>3</sub>):

3480<sub>w</sub>, 3400<sub>w</sub>, 3340<sub>w</sub>, 1730<sub>s</sub> mit sh bei 1700, 1675<sub>m</sub>, 1570<sub>m</sub>, 1528<sub>w</sub>, 1477<sub>m</sub>, 1452<sub>w</sub>, 1437<sub>w</sub>, 1413<sub>w</sub>, 1381<sub>m</sub>, 1360<sub>w</sub>, 1321<sub>w</sub>, 1172<sub>m</sub>, 1090<sub>s</sub>, 974<sub>w</sub>, 622<sub>w</sub>. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 1,08 (s, CH<sub>3</sub>C(2)); 1,22 (s, CH<sub>3</sub>-C(7)); 1,46 (t, J = 13, H-C(5α)); 1,49–1,89 (m, 4H), überlagert von 1,83 (d, J = 13, H-C(5β)); 1,89–2,16 (m, 3H); 2,16–2,75 (komplexe Überlagerung von Signalen, 18H), darunter 2,60 (dd, J = 8,17, H-C(12<sup>1'</sup>)) und 2,37/2,44 (AB, J = 16, 2H-C(7<sup>1'</sup>)); 2,81 (d, J = 17, H-C(2<sup>1'</sup>)), überlagert von 2,79 (dd, J = 17,6, H-C(12<sup>1'</sup>)); 2,96 (dd, J = 18, i, H-C(20β)), überlagert von 2,94 (dd, J = 10,3, H-C(8)); 3,16 (ddd, J = 18, 10, 1, H-C(20α)); 3,37 (q-artiges m, J = 5–8, H-C(12)); 3,66, 3,70, 3,73, 3,76, 3,81 (5s, 5 CH<sub>3</sub>O) überlagert von 3,7 (m, H-C(19)) (zusammen 16H); 4,21 (q, J = 6, H-C(13)); 4,54 (t-artiges m, J ≈ 11, H-C(4)); 5,63 (d, J = 1, H-C(10)); 5,39, 6,20 (2 br. s., je 1 H, CONH<sub>2</sub>)<sup>13</sup>; 6,96 (s, 1H, H-N(6<sup>1'</sup>))<sup>13</sup>; vgl. Fig. 3: Entkopplungsexperimente: Sättigung von H-C(12): H-C(10)→s, H-C(13)→t (J = 6), H-C(12<sup>1'</sup>) und H-C(12<sup>1'</sup>)→d (J = 17); Sättigung von H-C(13): H-C(12)→t (J ≈ 6); H-C(19), 2H-C(7<sup>1'</sup>) und H-C(12<sup>1'</sup>) konnten durch inversion recovery-Exper. (vgl. [2]) lokalisiert werden. <sup>13</sup>C-NMR: vgl. Tab. 1. FAB-MS (Kation-Spektrum): 973(5), 974(15), 975(97, [M - ClO<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (<sup>58</sup>Ni)), 976(64), 977(100), 978(67), 979(58), 980(35), 981(22), 982(13), 983(9); ber. Isotopenverteilung vgl. [2]<sup>14</sup>.

3.2. 12,13-Di-*epi*-F430M (6). UV/VIS (H<sub>2</sub>O): ca. 506 (sh, 1000), 431 (20 700), 345 (sh, 2900), 289 (sh, 10 300), 272 (16 400). UV/VIS (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): ca. 512 (sh, 980), 434 (18 300), 342 (sh, 2500), 298 (8800), 290 (sh, 9400), 268 (14 700); vgl. Fig. 2. CD (H<sub>2</sub>O): 507 (-15,6), 453 (0), 428 (+28,1), 392 (0), 365 (-11,2), 300 (-19,2), 293 (0), 275 (+21,3), 249 (0), 244 (-0,8), 239 (0), 222 (+10,4); CD (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): ca. 517 (br., -13,9), 457 (sh, 0), 430 (+33,8), 391 (0), 367 (-13,3), 319 (min., 0), 301 (-28,6), 288 (sh, -2,6), 285 (0), 278 (sh, +9,7), 263 (+18,4), 246 (0), 242 (-1,6), 238 (0); vgl. Fig. 4. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3480<sub>w</sub>, 3405<sub>w</sub>, 3350<sub>w</sub>, 1730<sub>s</sub> mit sh bei 1700, 1674<sub>m</sub>, 1570<sub>m</sub>, 1528<sub>m</sub>, 1477<sub>m</sub>, 1437<sub>m</sub>, 1411<sub>w</sub>, 1382<sub>m</sub>, 1360<sub>w</sub>, 1171<sub>m</sub>, 1090<sub>s</sub>, 976<sub>w</sub>, 622<sub>w</sub>. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 1,09 (s, CH<sub>3</sub>-C(2)); 1,22 (s, CH<sub>3</sub>-C(7)); 1,48 (t, J = 13, H-C(5α)); 1,5–2,8 (komplexe Überlagerung von Signalen, 27H), darunter 1,86 (d, J = 13, H-C(5β)); 2,78 (d, J = 16, H-C(2<sup>1'</sup>)); 2,91 (dd, J = 3, 10, H-C(8)) überlagert von 2,97 (verbreitertes d, J = 18, H-C(20β)); 3,13 (dd, J = 18, 10, H-C(20α)) überlagert von 3,21 (dd, J = 9, 6, H-C(12)); 3,50 (dd, J = 9, 3, H-C(13)); 3,66, 3,68, 3,70, 3,72 (doppelte Int.) (4s, darunter ein verdecktes m, 16H, 5 CH<sub>3</sub>O, H-C(19)); 4,54 (t-artiges m, J ≈ 11, H-C(4)); 5,85 (s, H-C(10)); 5,46, 6,40 (2 br. s., je 1 H, CONH<sub>2</sub>)<sup>13</sup>; 7,20 (s, H-N(6<sup>1'</sup>))<sup>13</sup>; vgl. Fig. 3. Entkopplungsexperimente: Sättigung von H-C(19): H-C(20α)→d (J = 18), H-C(20β) wird schärfer; Sättigung von H-C(12) bzw. H-C(13) lässt H-C(13) bzw. H-C(12) praktisch unverändert. <sup>13</sup>C-NMR: vgl. Tab. 1. FAB-MS (Kation-Spektrum): 973 (9), 974 (9), 975 (76, [M - ClO<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (<sup>58</sup>Ni)), 976 (59), 977 (100), 978 (72), 979 (58), 980 (36), 981 (23), 982 (10), 983 (7); ber. Isotopenverteilung vgl. [2]<sup>14</sup>.

3.3. F430M (2). UV/VIS (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): ca. 520 (flache sh, 600), 442 (21 000), 420 (sh, 13 100), 351 (sh, 3100), 297 (sh, 11 300), 271 (17 600); vgl. Fig. 2. CD (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): ca. 515 (br., -7,3), 465 (sh, -1,7), 462 (0), 436 (+24,0), 401 (0), 375 (-10,3), 330 (0), 317 (+1,5), 310 (0), 298 (-20,1), 292 (0), 290 (sh, +4,6), 270 (+25,7), 248 (0), 245 (-1,1), 241 (0); Übrige Daten in [2].

4. Magnetische Momente von F430 (1), F430M (2) und 12,13-Di-*epi*-F430M (6). Die Werte wurden nach der NMR-Methode von Evans [19], wie von Löliger und Scheffold [20] beschrieben, bestimmt. (5-mm-NMR-Röhrchen, Schmp.-Röhrchen (Ø = 1 mm), c = 2–9 · 10<sup>-2</sup> M, Spektrometer: Bruker WP-80 CW). 1: μ<sub>B</sub> (3% *t*-BuOH in D<sub>2</sub>O) = 2,0 ± 0,2. 2: μ<sub>B</sub> (2% *t*-BuOH in CD<sub>3</sub>OD) = 1,84 ± 0,10; μ<sub>B</sub> (2% TMS in CD<sub>3</sub>CN) < 0,3 (nicht messbar). 6: μ<sub>B</sub> (2% *t*-BuOH in CD<sub>3</sub>OH) < 0,5 (nicht messbar).

5. Ozonolyse von 6. Nach der Vorschrift in [2] wurden 5,1 mg (4,7 μmol) 6 ozonisiert. Das Ring-C-Bruchstück 7 wurde wie dort beschrieben isoliert und durch 2malige Säulenchromatographie gereinigt. Es resultierten ca. 0,3 mg (ca. 25%) DC-reines (+)-7 als farbloses Öl, das durch <sup>1</sup>H-NMR, IR, CD und MS (in dieser Reihenfolge) charakterisiert wurde. CD (ca. 6,2 · 10<sup>-5</sup> M in EtOH): ca. 275 (0), 248 (+0,9 ± 0,2), 233 (0), 223 (-0,6 ± 0,1), ca. 211 (0); vgl. Fig. 1. IR (CHCl<sub>3</sub>): mit jenem von (-)-7 [2] bis auf eine schwache zusätzliche Bande bei 1600 und die etwas intensiveren CH-Streckschwingungen um 2900 cm<sup>-1</sup> übereinstimmend. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): Alle H-Signale von (+)-7 weisen dieselbe chem. Verschiebung (Abweichung ≈ 0,01 ppm) und Form auf wie die entsprechenden Signale von (-)-7 (vgl. Fig. 10 in [2]). Das Spektrum unterscheidet sich von jenem von (-)-7 lediglich durch die etwas intensiveren Fremdsignale bei 0,9 und 1,3, ein viel stärkeres H<sub>2</sub>O-Signal, ein zusätzliches s bei 5,30 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und ein schwaches s bei 2,18 ppm (< 0,1 H). MS: 257 (11, M<sup>+</sup>), 240 (12), 226 (98), 225 (98, M<sup>+</sup> - CH<sub>3</sub>OH), 198 (39), 197 (100, M<sup>+</sup> - CH<sub>3</sub>OH - CO), 194 (71, M<sup>+</sup> - CH<sub>3</sub>OH - OCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>) Die chem. Verschiebungen der 3 NH-Signale sind stark konzentrationsabhängig (Abwanderung nach höherem Feld beim Verdünnen der Messlg.).

<sup>14</sup>) Die Intensitäten der Pike mit höherer Massenzahl als 975 sind verglichen mit der berechneten Isotopenverteilung deutlich zu gross (partielle Hydrierung der Probe durch die Glycerin-Matrix). F430M (2) zeigte unter gleichen Aufnahmebedingungen ein sehr ähnliches Intensitätsmuster.

6. 12,13-Didehydro-F430M (= F560M; **9**). Das durch Luftoxidation gebildete **9** ist an seiner charakteristischen violetten Farbe leicht erkennbar. Bei der Methanolyse von **1** [2] wurden jeweils geringe Mengen von **9** isoliert. Gesammeltes Material aus zahlreichen Methanolyse-Ansätzen wurde durch wiederholte DC, zuerst an  $\text{NaClO}_4$ -imprägniertem Kieselgel, dann 2mal an nicht-imprägniertem Kieselgel (jeweils  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  13:1), von restlichem **2** und **6** abgetrennt. (**9** läuft dicht hinter **6** und dicht vor **2**; vgl. die in Kap. 1 angegebenen  $R_f$ -Werte.) Es wurden 2 mg DC-einheitliches **9** als dunkelvioletter amorpher Festkörper isoliert. UV/VIS ( $\text{H}_2\text{O}$ ): 561 (8300), 476 (7500), 342 (4000), 290 (10700), 266 (sh, 11700), 219 (sh, 27400); vgl. Fig. 7<sup>15</sup>. CD ( $\text{H}_2\text{O}$ ): 590 (-18,4), 534 (0), 478 (+14,6), 347 (+7,6), 311 (sh, +3,1), 302 (0), 296 (-1,8), 292 (0), 270 (+18,7), 232 (+10,7), 219 (0), 212 (-6,5); vgl. Fig. 8<sup>15</sup>). IR ( $\text{CHCl}_3$ ): u. a. 3480w, 3410w, 3350w, 1730s, 1675m, 1603w, 1550m, 1510w, 1460s, 1437m, 1415w, 1381m, 1360m, 1322w, 1172m, 1138m, 1098s, 972w, 622m.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ): 1,12 (s,  $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(2)$ ); 1,27 (s,  $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(7)$ ); 1,56 (s,  $\text{H}_2\text{O}$ ); 1,55–3,05 (komplexe Überlagerung von Signalen, 29H), darunter 1,61 (t,  $J = 13$ ,  $\text{H}-\text{C}(5\alpha)$ ); 1,89 (d,  $J = 13$ ,  $\text{H}-\text{C}(5\beta)$ ); 2,84 (d,  $J = 17$ ,  $\text{H}-\text{C}(2^1)$ ); 2,95 (dd,  $J = 11,3$ ,  $\text{H}-\text{C}(8)$ ); 3,06 (d,  $J = 18$ ,  $\text{H}-\text{C}(20\beta)$ ); 3,25 (dd,  $J = 18, 10$ ,  $\text{H}-\text{C}(20\alpha)$ ); 3,57 (m,  $\text{H}-\text{C}(19)$ ); 3,63 (s,  $2\text{H}-\text{C}(12^1)$ ); 3,65, 3,67, 3,70, 3,72, 3,73 (5s,  $5\text{CH}_3\text{O}$ ); 4,43 (t-artiges m,  $J \approx 11$ ,  $\text{H}-\text{C}(4)$ ); 5,54 (br. s, 1H,  $\text{CONH}_2$ ); 6,23 (s, 2H, Überlagerung von  $\text{H}-\text{C}(10)$  und  $\text{CONH}_2$ ); 6,46 (s,  $\text{H}-\text{N}(6^1)$ )<sup>15</sup>; vgl. Fig. 3.  $^{13}\text{C-NMR}$ : vgl. Tab. 1. FAB-MS (Kation-Spektrum): 971 (10), 972 (15), 973 (100,  $[\text{M} - \text{ClO}_4]^+$  ( $^{58}\text{Ni}$ )), 974 (61), 975 (57), 976 (28), 977 (17), 978 (6). In Glycerin als Matrix wurde 975 als Basispektr. beobachtet (Reduktion unter den Aufnahmebedingungen). Es wurde deshalb (2-Nitrophenyl)octylether als Matrix verwendet. F430M (**2**) als Referenzverbindung zeigte in dieser Matrix den erwarteten Basispeak bei 975 ( $[\text{M} - \text{ClO}_4]^+$  ( $^{58}\text{Ni}$ )).

7. Reduktion von 12,13-Didehydro-F430 (**8**) zu F430 (**1**). 7.1. 12,13-Didehydro-F430 (= F560; **8**). F430 (**1**) wird in Gegenwart von  $\text{O}_2$  langsam oxidiert. Die Oxidationsgeschwindigkeit hängt vom Lsgm. ab; in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$  ist **1** recht stabil und kann bei  $-20^\circ$  während Monaten ohne merkliche Veränderung aufbewahrt werden. Die Oxidationsgeschwindigkeit nimmt in der Reihe  $\text{H}_2\text{O} < \text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH} < \text{CH}_3\text{OH} \ll \text{AcOH}$  zu. In  $\text{CH}_3\text{OH}/20$  Vol.-% 0,02N wässr. Phosphatpuffer (pH 7,0) unter 2 atm  $\text{O}_2$  bei RT. im Dunkeln betrug die Halbwertszeit von **1** (DC-gereinigtes Material [3],  $c = 0,3$  mM) ca. 1 Woche. Nach 30 Tagen zeigte das HPLC (System 2) der Lsg. folgende Zusammensetzung: 8% **1**, 5% **5**, 67% **8** und 20% **3**.

Der im Laufe der Arbeiten zur Strukturklärung von **1** [3] angefallene F560 (**8**) wurde gesammelt und durch präparative DC (Kieselgel;  $\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$  4:1:1; vgl. Exper. Teil in [3]) gereinigt. Das als dunkelvioletter amorpher Festkörper isolierte **8** war im DC und HPLC (System 2) einheitlich. UV/VIS (0,01N  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7;  $D$  in Klammern): 557 (0,53), 475 (0,55), 338 (sh, 0,26), 288 (0,76), 266 (sh, 0,86); vgl. Fig. 7. Die Intensität der VIS-Banden ist pH-abhängig: bei tieferem pH wird die Bande bei 557 nm relativ zur 475-nm-Bande intensiver.

7.2. Reduktion von **8**. Es wurden verschiedene Vorversuche im 0,1- $\mu\text{mol}$ -Maßstab und schliesslich 2 präp. Ansätze unter optimierten Bedingungen durchgeführt, die anschliessend beschrieben sind. Die präp. Versuche waren gleichzeitig Deuterierungsexperimente. Exper. A: Die Reduktion wurde im Handschuhsack unter  $\text{N}_2$  durchgeführt. Eine Lsg. von 4,4  $\mu\text{mol}$  **8** in 0,2 ml entgastem AcOH wurde unter Anlegen von  $\text{N}_2$ -Druck durch eine kurze Säule aus Zn-Staub gepresst (ca. 50 mg Zn-Staub in der Spitze einer Pasteur-Pipette zwischen 2 Kleenex-Pfropfen eingebettet;  $\varnothing$  ca. 1 mm,  $h$  ca. 5 mm). Während der Kontaktzeit mit dem Zn von ca. 20 sec wurde die violette Lsg. praktisch vollständig entfärbt. Das Reduktionsprodukt wurde in 10 ml  $\text{CH}_3\text{OD}$  aufgefangen. Nachdem man mit 2 Portionen AcOH (zusammen 0,3 ml) nachgewaschen hatte, liess man die blassgelbe  $\text{CH}_3\text{OD}$ -Lsg. bei RT. unter  $\text{N}_2$  stehen. Die Isomerisierung des primären Reduktionsproduktes ( $\lambda_{\text{max}} = 380$  nm) zu **1** liess sich im UV/VIS-Spektrum verfolgen (vgl. Fig. 9). Nach ca. 6 h hatte die Intensität der VIS-Bande bei 434 nm ein Maximum erreicht. Die aus der Extinktion bei 434 nm geschätzte Ausbeute an F430 und F430-Isomeren betrug 3,6  $\mu\text{mol}$  (ca. 80%) neben 0,2  $\mu\text{mol}$  (ca. 5%) **8**. Die intensiv gelbe Lsg. wurde eingengt und das Rohprodukt nach der Vorschrift in [2] methanolysiert. HPLC (System 1) des Methanolysates (deuteriert): 85% **2**, 6% **4** und 9% **6**. Daneben waren noch F560M (**9**; 14% bzgl. **2**) und geringe Mengen unbekannter Nebenprodukte vorhanden. Präp. DC (Kieselgel;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  13:1; vgl. [2]) ergab 2 mg ( $12\alpha,13\beta\text{-D}_2$ )-F430M ( $(12\alpha,13\beta\text{-D}_2)$ )-**2**; nach UV-Bestimmung 0,2  $\mu\text{mol}$ ; 45% bzgl. **8**). Das Produkt war im DC, HPLC (System 1) und UV/VIS von **2** [2] nicht zu unterscheiden.  $^1\text{H-NMR}$  (vgl. Fig. 10): C(12) und C(13) sind beide zu  $> 90\%$  deuteriert (fehlende Signale von  $\text{H}-\text{C}(12)$  und  $\text{H}-\text{C}(13)$  bei 3,12 und 3,80 ppm). FAB-MS (Kation-Spektrum, Matrix: (2-Nitrophenyl)octylether): im Einklang mit zweifacher Deuterierung; 974 (8), 975 (21), 976 (39), 977 (100,  $[\text{M} - \text{ClO}_4]^+$  ( $^{58}\text{Ni}$ )), 879 (77), 979 (63), 980 (35), 981 (18), 982 (8).

<sup>15</sup>) Die UV/VIS- und CD-Daten stammen von einer HPLC-nachgereinigten (System 1) Probe von **9**. Dabei wurden ca. 1 mol-% **6** (erkennbar an schwacher sh bei 430 nm) abgetrennt.

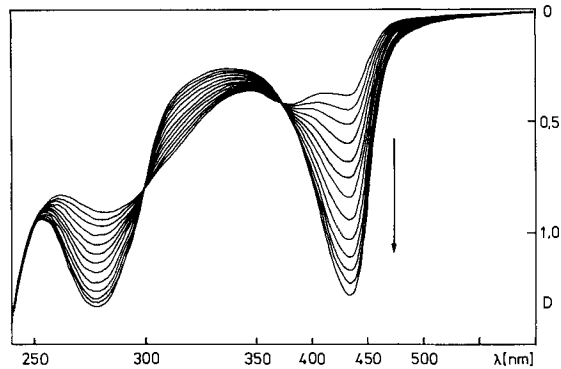


Fig. 9. Reduktion von 12,13-Didehydro-F430 (**8**): UV/VIS-spektroskopische Verfolgung der Tautomerisierung des Primärproduktes zu F430 (**1**)

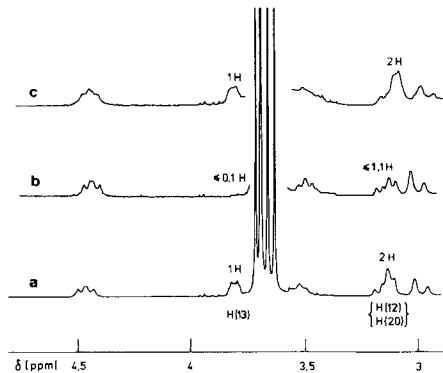


Fig. 10. Ausschnitte der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  von: a) F430M (**2**; Referenz), b)  $(12\alpha,13\beta\text{-D}_2)$ -F430M ( $(12\alpha,13\beta\text{-D}_2)$ -**2**) aus der Reduktion von **8** mit  $\text{Zn}/\text{AcOH}/\text{CH}_3\text{OD}$  (Exper. A), c) F430M (**2**) aus der Reduktion von **8** mit  $\text{Zn}/\text{AcOD}/\text{H}_2\text{O}$  (Exper. B)

*Exper. B:* Wie in *Exper. A* beschrieben, wurden 5,6  $\mu\text{mol}$  **8** in AcOD mit Zn reduziert und in 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefangen. Da die Isomerisierung des Primärproduktes zu **2** in  $\text{H}_2\text{O}$  nur sehr langsam abließ, gab man 0,5 ml 25% wässr.  $\text{NH}_3$ -Lsg. zu ( $\rightarrow \text{pH } 4,7$ ), was die Reaktion stark beschleunigte. Als nach 5 h bei RT. die Intensität der VIS-Bande bei 430 nm ihr Maximum erreicht hatte, wurde wie in *Exper. A* aufgearbeitet und methanolysiert. HPLC (System 1) des Rohproduktes: **2/4/6** im Verhältnis 89:2:9. Nach präp. DC wurden 2,0  $\mu\text{mol}$  (ca. 36% bzgl. **8**) **2** isoliert.  $^1\text{H-NMR}$  (vgl. Fig. 10) und FAB-MS: keine Hinweise auf D-Einbau. FAB-MS (Matrix: (2-Nitrophenyl)octylether): 973 (12), 974 (19), 975 (100), 976 (98), 977 (81), 978 (48), 979 (29), 980 (13).

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. P. Gunsalus, R. S. Wolfe, *FEMS Microbiol. Lett.* **1978**, *3*, 191.
- [2] A. Pfaltz, B. Jaun, A. Fässler, A. Eschenmoser, R. Jaenchen, H. H. Gilles, G. Diekert, R. K. Thauer, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 828.
- [3] D. A. Livingston, A. Pfaltz, J. Schreiber, A. Eschenmoser, D. Ankel-Fuchs, J. Moll, R. Jaenchen, R. K. Thauer, *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 334.
- [4] W. L. Ellefson, R. S. Wolfe, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 4259; W. L. Ellefson, W. B. Whitman, R. S. Wolfe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 3707.

- [5] R. P. Hausinger, W. H. Orme-Johnson, Ch. Walsh, *Biochemistry* **1984**, *23*, 801.
- [6] W. B. Whitman, R. S. Wolfe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *92*, 1196.
- [7] a) G. Diekert, H. H. Gilles, R. Jaenchen, R. K. Thauer, *Arch. Microbiol.* **1980**, *128*, 256; b) G. Diekert, U. Konheiser, K. Piechulla, R. K. Thauer, *J. Bacteriol.* **1981**, *148*, 459; c) R. K. Thauer, G. Diekert, P. Schönherr, *Trends Biochem. Sci.* **1980**, 304.
- [8] a) J. T. Keltjens, W. B. Whitman, C. G. Caerteling, A. M. van Kooten, R. S. Wolfe, G. D. Vogels, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *108*, 495; b) J. T. Keltjens, C. G. Caerteling, A. M. van Kooten, H. F. van Dijk, G. D. Vogels, *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *223*, 235.
- [9] C. Angst, M. Kajiwara, E. Zass, A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 139; *ibid. Int. Ed.* **1980**, *19*, 140; J. E. Johansen, C. Angst, C. Kratky, A. Eschenmoser, *ibid.* **1980**, *92*, 141; *ibid. Int. Ed.* **1980**, *19*, 141; C. Kratky, C. Angst, J. E. Johansen, *ibid.* **1981**, *93*, 204; *ibid. Int. Ed.* **1981**, *20*, 211; J. E. Johansen, V. Piermattie, C. Angst, E. Diener, C. Kratky, A. Eschenmoser, *ibid.* **1981**, *93*, 273; *ibid. Int. Ed.* **1981**, *20*, 261; C. Angst, C. Kratky, A. Eschenmoser, *ibid.* **1981**, *93*, 275; *ibid. Int. Ed.* **1981**, *20*, 261; A. Fässler, A. Pfaltz, P. M. Müller, S. Farooq, C. Kratky, B. Kräutler, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 812; R. Waditschatka, A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 639; *ibid. Int. Ed.* **1983**, *22*, 630.
- [10] C. Kratky, R. Waditschatka, C. Angst, J. E. Johansen, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 1312.
- [11] C. Kratky, A. Fässler, A. Pfaltz, B. Kräutler, B. Jaun, A. Eschenmoser, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 1368.
- [12] R. B. Woodward, *Angew. Chem.* **1960**, *72*, 651.
- [13] D. Bormann, A. Fischli, R. Keese, A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1967**, *79*, 867; *ibid. Int. Ed.* **1967**, *6*, 868.
- [14] L. M. Jackman, S. Sternhell, 'Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry', Pergamon, Oxford, 1969, S. 316ff.
- [15] R. Waditschatka, A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 639; *ibid. Int. Ed.* **1983**, *22*, 630.
- [16] A. Eschenmoser, *Pure Appl. Chem.* **1963**, *7*, 297; I. D. Dicker, R. Grigg, A. W. Johnson, H. Pinnock, K. Richardson, P. van den Broek, *J. Chem. Soc. (C)* **1971**, 536.
- [17] L. Agius, J. A. Ballantine, V. Ferrito, V. Jaccarini, P. Murray-Rust, A. Pelter, A. F. Psaila, P. J. Schembri, *Pure Appl. Chem.* **1979**, *51*, 1847.
- [18] D. H. Williams, C. Bradley, G. Bojesen, S. Santikarn, L. C. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5700; M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, *Nature (London)* **1981**, *293*, 270.
- [19] D. F. Evans, *J. Chem. Soc.* **1959**, 2003.
- [20] J. Löliger, R. Scheffold, *J. Chem. Educ.* **1972**, *49*, 646.