

## Chemoenzymatische Synthese von <sup>13</sup>C-markierter S(-)-Äpfelsäure

A.C. Hillner, A.W.H. Jans und C. Winkel

Dortmund, Max-Planck-Institut für Systemphysiologie

Eingegangen am 21. August bzw. 19. Oktober 1992

### Chemoenzymatic Synthesis of <sup>13</sup>C-Labeled S(-)-Malic Acid

**Abstract.** The first regio- and stereospecific synthesis of S(-)-<sup>13</sup>C-malic acid **5** with a high incorporation of <sup>13</sup>C and excellent enantiomeric excess is described. S(-)-<sup>13</sup>C-malic acid **5** was synthesized in a three-step reaction starting with ethyl acetate **2** and diethyl oxala-

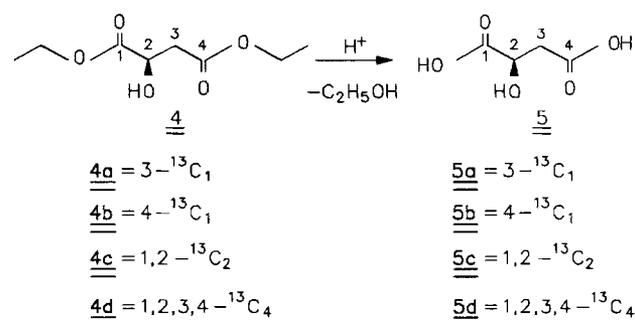
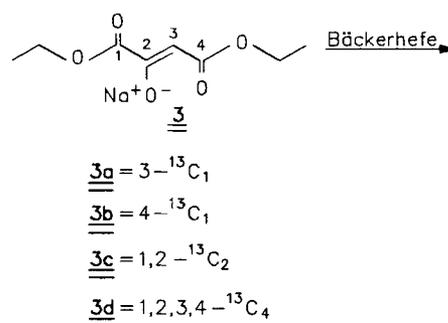
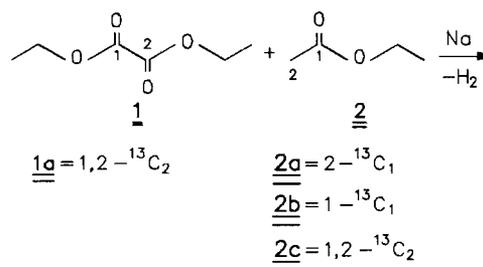
te **1**. The produced sodium diethyl oxaloacetate **3** was then enantioselectively reduced with bakers' yeast to S(-)-<sup>13</sup>C-malic acid diethylester **4** which was hydrolyzed to S(-)-<sup>13</sup>C-malic acid **5**.

<sup>13</sup>C-markierte Zitronen- oder Bernsteinsäure finden Anwendung bei der Bestimmung sowohl von Stoffwechselflüssen als auch der relativen Enzymaktivitäten des Krebs-Zyklus in Epithelien der Niere mit Hilfe der <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie [1–3]. Diese Untersuchungen werden unter normalen und ebenfalls unter pathologischen Bedingungen durchgeführt. Jedoch ist es nicht möglich, mit den oben genannten Substraten eine Aussage über den Effekt des sogenannten „Malat-Dehydrogenase-Fumarase-Systems“ sowie über die eventuelle Rolle des „malic enzyme“ [4, 5] zu machen. Eine Strategie, um diese gewünschten Zusatzinformationen in Epithelien der Niere zu erhalten, ist die Verwendung von enantiomerenreiner S(-)-<sup>13</sup>C-markierter Äpfelsäure **5**. Die herkömmlichen Synthesen für Äpfelsäure [6, 7] sind ungeeignet für die Darstellung von S(-)-<sup>13</sup>C-Äpfelsäure **5**, deshalb beschreiben wir hier einen neuen Syntheseweg.

Es gelang uns, S(-)-Äpfelsäure **5** sowohl einfach in 3- und 4-Stellung als auch mehrfach in 1,2- und 1,2,3,4-Stellung <sup>13</sup>C-markiert zu synthetisieren.

Ausgehend von Oxalsäurediethylester **1** und Essigsäureethylester **2** wurde eine Kondensationsreaktion nach Claisen in Diethylether durchgeführt.

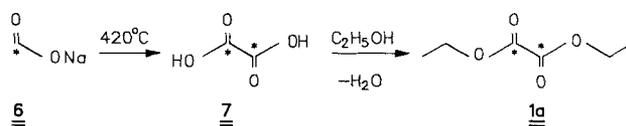
Das so erhaltene Oxalessigsäurediethylester-Natrium-Salz **3** wird mit einer Ausbeute von über 90% erhalten [8]. Die Identifizierung der Verbindung erfolgt durch NMR-Spektroskopie, wobei die <sup>13</sup>C-Markierung in der 3-Position im <sup>1</sup>H-Spektrum durch das Dublett bei 5,32 ppm mit einer <sup>1</sup>J(<sup>13</sup>C, H)-Kopplung von 161,8 Hz und im <sup>13</sup>C-Spektrum durch das Signal bei 85,9 ppm angezeigt wird. Die Anreicherung beträgt



94 %. Das  $^1\text{H}$ -Spektrum des 4- $^{13}\text{C}$ -markierten Natriumsalzes **3b** zeigt bei 5,32 ppm lediglich ein Singulett, im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum ein Signal bei 171,8 ppm für das angereicherte C-Atom.

Wichtig ist die Darstellung des enantiomerenreinen S(-)-Äpfelsäurediethylesters **4**, der durch anschließende Verseifung in die S(-)-Äpfelsäure **5** überführt wird. Diese stereoselektive Reduktion von **3** kann in Anlehnung an Seebach [9] und Sih [10] durch Umsetzung mit Bäckerhefe erzielt werden. Die säurekatalysierte Verseifung von **4** und vor allem die abschließende Aufarbeitung bereitet größere Schwierigkeiten bei dem Versuch, das Produkt in reiner Form zu erhalten. Als günstig hat sich eine Reinigung mittels Säulenchromatographie mit einem basischen Ionenaustauscherharz (Dowex,  $1 \times 8$ , Chloridform) erwiesen, das mit 2 M  $\text{HCOONa}$  in die Formiatform überführt wird [11]. Die S(-)-Äpfelsäure **5** wird mit 1 N  $\text{HCOOH}$  eluiert und fällt in sehr reiner Form an, so daß **5** nach kurzer Zeit auskristallisiert. Von diesem reinen Produkt werden  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren (Bruker AM 500) in Aceton- $d_6$  mit TMS als internem Standard aufgenommen. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt z. B. für die S(-)-3- $^{13}\text{C}$ -Äpfelsäure **5a** deutlich die durch die  $^{13}\text{C}$ -Markierung auftretenden zusätzlichen Kopplungen, die mit 129,5 Hz im Rahmen der literaturbekanntesten  $^1\text{J}(^{13}\text{C}-\text{H})$ -Kopplung liegen [12]. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigt bei 39,3 ppm die  $^{13}\text{CH}_2$ -Gruppe mit einer Anreicherung von 92 %. Der Drehwert der S(-)-3- $^{13}\text{C}$ -Äpfelsäure **5a** beträgt  $[\alpha]_D = -5,9^\circ$  ( $c = 3,54$ , Aceton).

Um S(-)-Äpfelsäure **5** mehrfachmarkiert herzustellen, ist es erforderlich, von markiertem Natriumformiat- $^{13}\text{C}$  **6** auszugehen. Durch Schmelzen von **6** bei  $420^\circ\text{C}$  wird das Natriumsalz der 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -Oxalsäure hergestellt. Die freie Säure **7** wird durch Reinigung über einer Kationenaustauschersäule in hochreiner Form gewonnen. Die Veresterung zum 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -Oxalsäurediethylester **1a** wird mit Ethanol in Tetrachlorkohlenstoff erreicht.



Formelbild 2

Die Synthesefolge (Formelbild 1) ermöglicht nun sowohl die Darstellung von S(-)-1,2- $^{13}\text{C}_2$ -Äpfelsäure **5c** als auch von S(-)-1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$ -Äpfelsäure **5d**.

### Beschreibung der Versuche

Die NMR-Spektren wurden auf einem Bruker AM 500 Spektrometer, ausgestattet mit einem Aspect X 32 Computer, gemessen. Als Lösungsmittel wurden Aceton- $d_6$  und Chloroform- $d$  verwendet. Die Meßtemperatur betrug  $20^\circ\text{C}$ , als interner Standard wurde Tetramethylsilan (TMS) eingesetzt.

#### 3- $^{13}\text{C}$ -Oxallessigsäurediethylester-Natriumsalz (**3a**)

Einer Lösung von 1,64 g (11,22 mmol) Diethyloxalat (**1**) in 30 ml absolutem Ether werden portionsweise unter Rühren 0,25 g (11,22 mmol) Natrium zugegeben. Diesem Gemisch werden bei Raumtemperatur langsam 1,00 g (11,22 mmol) Ethylacetat-2- $^{13}\text{C}$  (**2a**) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird bis zur Bildung eines gelbbraunen festen Niederschlags gerührt. Der entstandene Feststoff wird mit Ether gewaschen und nach dem Trocknen über  $\text{CaCl}_2$  im Exsikkator gemörsert. Der Reinheitsgrad ist für die folgende Reaktion ausreichend.

Rohausbeute: 1,70 g (8,05 mmol)

Die Darstellung der Verbindungen **3b**, **3c** und **3d** erfolgt in analoger Weise, wobei die gewählten Ansätze und Rohausbeuten hier angegeben werden. Die spektroskopischen Daten sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefaßt.

#### 4- $^{13}\text{C}$ -Oxallessigsäurediethylester-Natriumsalz (**3b**)

1,64 g (11,22 mmol) Diethyloxalat **1**  
1,00 g (11,22 mmol) Ethylacetat-1- $^{13}\text{C}$  **2b**

Tabelle 1  $^1\text{H}$ -NMR-Daten (Aceton- $d_6$ ) für die Verbindungen **3a** – **3d**

$\delta$ [ppm]	$\text{CH}_2 \text{CH}_3$ 1,15	$\text{CH}_2 \text{CH}_3$ 1,24	$\text{CH}_2 \text{CH}_3$ 3,95	$\text{CH}_2 \text{CH}_3$ 4,12	$\text{CHCOOEt}$ 5,32
<b>3a</b>	t	t	q	q	d
$^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ [Hz]					161,8
<b>3b</b>	t	t	dq	q	s
$^3\text{J}(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ [Hz]			3,1		
<b>3c</b>	t	t	q	dq	m
$^2\text{J}(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ [Hz]					2,1
$^3\text{J}(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ [Hz]				1,9	
<b>3d</b>	t	t	dq	dq	m
$^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ [Hz]					161,8
$^2\text{J}(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ [Hz]					1,8/1,7
$^3\text{J}(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ [Hz]			3,1	2,2	

**Tabelle 2**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten (Aceton- $d_6$ ) für die Verbindungen **3 a** – **3 d**

$\delta$ [ppm]	$\text{CH}_3$ 14,5	$\text{CH}_3$ 15,1	$\text{CH}_2$ 58,2	$\text{CH}_2$ 61,2	$\text{CH}$ 85,9	$\text{C} = \text{CH}$ 168,9	$\text{OCC}(\text{ONa})$ 169,4	$\text{CHCO}$ 171,8
<b>3 a</b>	s	s	s	s	s	d	s	d
$^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^{12}\text{C})$ [Hz]						78,4		79,8
<b>3 b</b>	s	s	s	s	d	s	s	s
$^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^{12}\text{C})$ [Hz]					80,4			
<b>3 c</b>	s	s	s	s	d	s	s	s
$^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^{12}\text{C})$ [Hz]					65,9			
<b>3 d</b>	s	s	s	s	m	ss	s	d
$^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})$ [Hz]					60,1/58,6			81,6

0,25 g (11,22 mmol) Natrium  
Rohausbeute: 1,90 g (8,99 mmol)

**1,2- $^{13}\text{C}_2$ -Oxalessigsäurediethylester-Natriumsalz (3 c)**

1,05 g (11,95 mmol) Ethylacetat **2**  
1,77 g (11,95 mmol) 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -Oxalsäurediethylester **1 a**  
0,27 g (11,95 mmol) Natrium  
Rohausbeute: 1,70 g (8,01 mmol)

**1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$ -Oxalessigsäurediethylester-Natriumsalz (3 d)**

1,00 g (11,09 mmol) 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -Ethylacetat **2 c**  
1,64 g (11,09 mmol) 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -Oxalsäurediethylester **1 a**  
0,25 g (11,09 mmol) Natrium  
Rohausbeute: 1,40 g (6,54 mmol)

**S-(-)-3- $^{13}\text{C}$ -Äpfelsäurediethylester (4 a)**

Zu einer Lösung aus 200 ml Leitungswasser und 80 g Sucrose werden portionsweise unter kräftigem Rühren 20 g frische

Bäckerhefe gegeben. Dabei sollte die Innentemperatur 30 °C nicht überschreiten. Nach vollständiger Zugabe der Bäckerhefe werden dem Gemisch 1,70 g (8,05 mmol) Oxalessigsäurediethylester-Natriumsalz- $^{13}\text{C}$  (**3 a**) portionsweise zugeetzt. Die Reaktionszeit beträgt 4 Tage. Die Aufarbeitung erfolgt durch Zugabe von 30 g Celite und anschließendem Filtrieren der Lösung. Dem Filtrat werden 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{NaCl}$  bis zur Sättigung zugegeben. Aus dieser wässrigen Lösung wird das Produkt mit Diethylether extrahiert, die organische Phase abgetrennt, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und anschließend der Diethylether abdestilliert. Das Produkt wird ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Rohausbeute: 1,35 g (7,02 mmol)

Die Darstellung der Verbindungen **4 b**, **4 c** und **4 d** erfolgt in analoger Weise, wobei jeweils 85 g Sucrose, 28 g Bäckerhefe, 220 ml Leitungswasser sowie 35 g Celite eingesetzt werden. Die spektroskopischen Daten sind in Tabelle 3 und 4 zusammengestellt.

**Tabelle 3**  $^1\text{H}$ -NMR-Daten ( $\text{CDCl}_3$ ) für die Verbindungen **4 a** – **4 d**

$\delta$ [ppm]	$\text{CH}_2 \text{CH}_3$ 1,19	$\text{CH}_2 \text{CH}_3$ 1,26	$\text{CH}_2$ 2,79	$\text{CH}_2 \text{CH}_3$ 4,16	$\text{CH}_2 \text{CH}_3$ 4,27	$\text{CH}$ 4,52
<b>4 a</b>	t	t	dddd	q	m	m
$^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ [Hz]			131,3			
$^2\text{J}(\text{H}_3, \text{H}_3')$ [Hz]			16,2			
$^3\text{J}(\text{H}_2, \text{H}_3)$ [Hz]			4,7			4,7
$^3\text{J}(\text{H}_2, \text{H}_3')$ [Hz]			6,5			6,5
<b>4 b</b>	t	t	m	dq	m	m
$^3\text{J}(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ [Hz]				3,0		1,7
$^2\text{J}(\text{H}_3, \text{H}_3')$ [Hz]			16,2			
$^3\text{J}(\text{H}_2, \text{H}_3)$ [Hz]			4,7			4,7
$^3\text{J}(\text{H}_2, \text{H}_3')$ [Hz]			6,3			6,3
<b>4 c</b>	t	t	m	q	m	m
$^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ [Hz]						147,3
$^2\text{J}(\text{H}_3, \text{H}_3')$ [Hz]			16,2			
$^3\text{J}(\text{H}_2, \text{H}_3)$ [Hz]			2,4			4,7
$^3\text{J}(\text{H}_2, \text{H}_3')$ [Hz]			4,6			6,5
<b>4 d</b>	t	t	m	dq	m	m
$^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ [Hz]			131,2			147,3
$^2\text{J}(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ [Hz]			2,4			
$^3\text{J}(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ [Hz]				3,5		
$^2\text{J}(\text{H}_3, \text{H}_3')$ [Hz]			16,2			
$^3\text{J}(\text{H}_2, \text{H}_3)$ [Hz]			4,5			4,7
$^3\text{J}(\text{H}_2, \text{H}_3')$ [Hz]			6,5			6,5

**Tabelle 4** <sup>13</sup>C-NMR-Daten (CDCl<sub>3</sub>) für die Verbindungen **4a** – **4d**

δ [ppm]	CH <sub>3</sub> 14,1	CH <sub>2</sub> 60,9	CH <sub>2</sub> 62,0	CH <sub>2</sub> C(OH) 38,7	CH(OH) 67,3	CH <sub>2</sub> CO 170,6	CH(OH)CO 173,4
<b>4a</b>	s	s	s	s	d	d	s
<sup>1</sup> J( <sup>13</sup> C, <sup>12</sup> C) [Hz]					39,1	57,8	
<b>4b</b>	s	s	s	d	s	s	s
<sup>1</sup> J( <sup>13</sup> C, <sup>12</sup> C) [Hz]				58,2			
<b>4c</b>	s	s	s	d	d	s	d
<sup>1</sup> J( <sup>13</sup> C, <sup>12</sup> C) [Hz]				38,9			
<sup>1</sup> J( <sup>13</sup> C, <sup>13</sup> C) [Hz]					60,3		60,3
<b>4d</b>	s	s	s	dd	dd	d	d
<sup>1</sup> J( <sup>13</sup> C, <sup>13</sup> C) [Hz]				58,3 58,7	60,3 60,5	58,0	58,7

**S-(–)-4-<sup>13</sup>C-Äpfelsäurediethylester (4b)**

1,90 g (8,99 mmol) 4-<sup>13</sup>C-Oxalessigsäurediethylester-Natriumsalz **3b**

Rohausbeute: 1,47 g (7,64 mmol)

**S-(–)-1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Äpfelsäurediethylester (4c)**

1,70 g (8,01 mmol) 1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Oxalessigsäurediethylester-Natriumsalz **3c**

Rohausbeute: 1,32 g (6,91 mmol)

**S-(–)-1,2,3,4-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-Äpfelsäurediethylester (4d)**

1,40 g (6,54 mmol) 1,2,3,4-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-Oxalessigsäurediethylester-Natriumsalz **3d**

Rohausbeute: 1,15 g (5,95 mmol)

**S-(–)-3-<sup>13</sup>C-Äpfelsäure (5a)**

Der ungereinigte Äpfelsäurediethylester **4a** wird in 50 ml 1 N HCl aufgenommen und 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird die Lösung eingeengt. Das auf diese Weise erhaltene Öl wird in wenig Wasser aufgenommen. Die abschließende Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an einem basischen Ionenaustauscherharz. Hierzu werden 15 g Ionenaustauscherharz (DOWEX, 1 × 8, Chloridform) in 2 M HCOONa aufgeschlämmt und die Säule mit 2 M HCOONa in die Formiatform überführt. Nach vollständigem Austausch der Chlorid-Ionen (Nachweis mit 3,5 %iger AgNO<sub>3</sub>-Lösung) wird das Säulenmaterial mit 50 ml konz. HCOOH und abschließend mit 300 ml Wasser gespült. Die Rohsubstanz wird, in wenig Wasser gelöst, auf die Säule gebracht. Das reine Produkt wird mit 1 N HCOOH eluiert. Es werden 15 Fraktionen mit einem Volumen von je 14 ml aufgefangen, wobei das Produkt in den Fraktionen 8 – 12 isoliert werden kann.

Ausbeute: 480 mg (31,6 % d. Th. über alle Stufen)  
[α]<sub>D</sub> = – 5,9° (c = 3,54, Aceton)

Die Verbindungen **5b**, **5c** und **5d** werden auf gleiche Weise durch Verseifung mit jeweils 50 ml 1 N HCl dargestellt. Die NMR-spektroskopischen Daten sind in den Tabellen 5 und 6 zusammengestellt.

**S-(–)-4-<sup>13</sup>C-Äpfelsäure (5b)**

1,47 g (7,64 mmol) S-(–)-4-<sup>13</sup>C-Äpfelsäurediethylester **4b**

Ausbeute: 210 mg (13,8 % d. Th. über alle Stufen)

[α]<sub>D</sub> = – 5,7° (c = 3,41, Aceton)

**S-(–)-1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Äpfelsäure (5c)**

1,32 g (6,91 mmol) S-(–)-1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Äpfelsäurediethylester **4c**

Ausbeute: 250 mg (15,5 % d. Th. über alle Stufen)

[α]<sub>D</sub> = – 5,7° (c = 3,41, Aceton)

**S-(–)-1,2,3,4-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-Äpfelsäure (5d)**

1,15 g (5,95 mmol) S-(–)-1,2,3,4-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-Äpfelsäurediethylester **4d**

Ausbeute: 210 mg (12,7 % d. Th. über alle Stufen)

[α]<sub>D</sub> = – 5,4° (3,57, Aceton)

**1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Oxalsäure (7)**

10,00 g (0,14 mol) Natriumformiat-<sup>13</sup>C **6** werden bei 420 °C

**Tabelle 5** <sup>1</sup>H-NMR-Daten (Aceton-d<sub>6</sub>) für die Verbindungen **5a** – **5d**

δ [ppm]	CH <sub>2</sub> 2,77	CH 4,52
<b>5a</b>	dddd	m
<sup>1</sup> J( <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H) [Hz]	129,4/130,3	
<sup>2</sup> J( <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H) [Hz]		4,0
<sup>2</sup> J(H3, H3') [Hz]	16,2	
<sup>3</sup> J(H2, H3) [Hz]	4,5	4,5
<sup>3</sup> J(H2, H3') [Hz]	7,5	7,5
<b>5b</b>	dddd	m
<sup>3</sup> J( <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H) [Hz]		3,1
<sup>2</sup> J(H3, H3') [Hz]	16,2	
<sup>3</sup> J(H2, H3) [Hz]	4,5	4,5
<sup>3</sup> J(H2, H3') [Hz]	7,5	7,5
<b>5c</b>	m	m
<sup>1</sup> J( <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H) [Hz]		145,8
<sup>2</sup> J( <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H) [Hz]	4,1/2,4	2,9
<sup>2</sup> J(H3, H3') [Hz]	16,2	
<sup>3</sup> J(H2, H3) [Hz]	4,9	4,4
<sup>3</sup> J(H2, H3') [Hz]	7,5	7,5
<b>5d</b>	m	m
<sup>1</sup> J( <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H) [Hz]	129,3/130,4	145,9
<sup>2</sup> J( <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H) [Hz]	4,1/2,4	2,5
<sup>2</sup> J(H3, H3') [Hz]	16,2	
<sup>3</sup> J(H2, H3) [Hz]	4,9	4,6
<sup>3</sup> J(H2, H3') [Hz]	7,3	7,3

**Tabelle 6**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten (Aceton- $d_6$ ) für die Verbindungen **5 a** – **5 d**

$\delta$ [ppm]	$\text{CH}_2 \text{C}(\text{OH})$ 39,3	$\text{CH}(\text{OH})$ 67,9	$\text{CH}_2 \text{COOH}$ 172,6	$\text{CH}(\text{OH}) \text{COOH}$ 174,3
<b>5 a</b>	s	d	d	s
$^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^{12}\text{C})$ [Hz]		39,0	78,6	
<b>5 b</b>	d	s	s	s
$^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^{12}\text{C})$ [Hz]	57,4			
<b>5 c</b>	d	d	s	d
$^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^{12}\text{C})$ [Hz]	39,5			
$^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})$ [Hz]		60,9		59,2
<b>5 d</b>	dd	dd	dd	dd
$^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C})$ [Hz]	56,2	61,1	59,2	59,2
	39,5	59,0		
$^3\text{J}(^{13}\text{C} \ ^{13}\text{C})$ [Hz]			2,4	3,2

in einem Schmelzofen ca. 8 min geschmolzen. Nach Abkühlen erstarrt das Gemisch zu einer weißen Masse. Das entstandene Natriumsalz der 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -Oxalsäure wird in ca. 250 ml dest. Wasser gelöst und auf eine Kationenaustauschersäule (80 g) gegeben, die zuvor mit dest. Wasser bis zu einer farblosen Waschlösung als Eluat gewaschen wird. Es werden 25 Fraktionen mit einem Volumen von 14 ml mit dest. Wasser eluiert, die einen pH-Wert von 1–3 aufweisen. Nach Einengen der vereinigten Fraktionen bleibt ein weißer Feststoff zurück.

Rohausbeute: 8,85 g (96,17 mmol)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, Aceton- $d_6$ , 20 °C, TMS):

$^{13}\text{C}$ -Anreicherung (93 %):  $\delta = 160,9$  (s,  $^{13}\text{COOH}$ )

#### 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -Oxalsäurediethylester (**1 a**)

In einem 250 ml-Einhalskolben mit Wasserabscheider und Rückflußkühler wird das Reaktionsgemisch aus 8,85 g (96,17 mmol) 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -Oxalsäure **7**, 25,00 g (0,54 mol) Ethanol und 150 ml Tetrachlorkohlenstoff solange unter Rückfluß erhitzt, bis sich kein Wasser mehr abscheidet (ca. 24 h). Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand fraktioniert im Vakuum destilliert. Das Produkt siedet bei 90–95 °C (12 Torr).

Ausbeute: 7,10 g (34,2 % d. Th. über beide Stufen)

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 20 °C, TMS):

$\delta = 1,38$  (t, 6H;  $\text{CH}_2 \text{CH}_3$ ), 4,39 (ddd,  $^3\text{J}(^{13}\text{C}, ^1\text{H}) = 2,6$  Hz, 4H;  $\text{CH}_2 \text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 20 °C, TMS):

natürliche Häufigkeit:  $\delta = 13,8$  (s,  $\text{CH}_3$ ), 64,1 (s,  $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C}$ -Anreicherung (92 %):  $\delta = 158,5$  (d,  $^1\text{J}(^{13}\text{C}, ^{13}\text{C}) = 58,5$  Hz,  $^{13}\text{COO}$ ).

#### Literatur

- [1] A.W.H. Jans, C. Winkel, L. Buitenhuis, J. Lugtenburg, *Biochem. J.* **257** (1989) 425
- [2] A.W.H. Jans, R. Willem, *Magn. Reson. Med.* **14** (1990) 148
- [3] A.W.H. Jans, R. Willem, *Eur. J. Biochem.* **195** (1991) 97
- [4] L. Stryer: *Biochemie*. Friedr. Vieweg und Sohn Braunschweig/Wiesbaden 1979
- [5] A.L. Lehninger, *Biochemie*, VCH Weinheim 1987
- [6] M. Popp, C.B. Osmond, R.E. Summons, *Plant Physiol.* **69** (1982) 1289
- [7] T.V. Ramamurthy, K.V. Viswanathan, *J. Labelled Compt. Radiopharm.* **20** (1983) 999
- [8] W. Wislicenus, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **246** (1888) 306
- [9] D. Seebach, *Synthesis* **1986**, 37
- [10] C.J. Sih, C.-S. Chen, *Angew. Chem.* **96** (1984) 556; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **23** (1984) 570
- [11] C. Davies, R.D. Harley, G.J. Lawson, *J. Chromatogr.* **18** (1965) 47
- [12] R.M. Horak, P.S. Steyn, R. Vleggar, *Magn. Res. Chem.* **23** (1985) 995

Korrespondenzanschrift:

Prof. Dr. A.W.H. Jans  
Max-Planck-Institut für Systemphysiologie  
Rheinlanddamm 201  
W-4600 Dortmund 1, Bundesrepublik Deutschland