

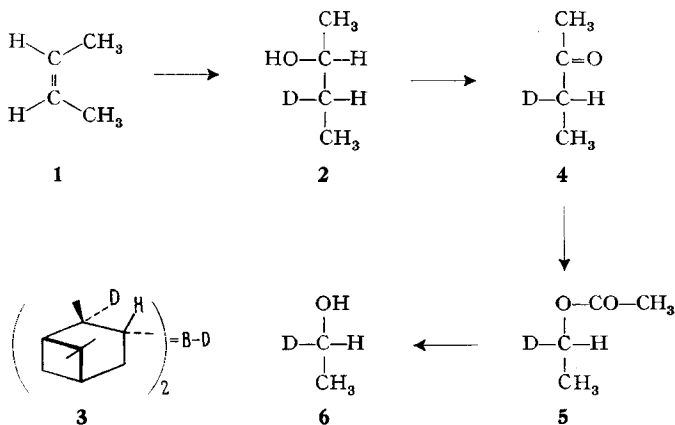
85. Die absolute Konfiguration von 1-²H₁-Äthanol

von H. Weber [1], J. Seibl und D. Arigoni

(6. XII. 65)

In einer Reihe von klassischen Untersuchungen haben vor Jahren WESTHEIMER, VENNESLAND und Mitarbeiter [2] gezeigt, dass die reversible enzymatische Reduktion von Acetaldehyd mit NADH¹⁾ und Hefe-ADH durch eine hohe Stereospezifität gekennzeichnet ist. In präparativen Ansätzen mit 1-²H-Acetaldehyd liess sich dabei ein optisch aktives 1-²H₁-Äthanol mit einer spezifischen Drehung von $[\alpha]_D^{20} = -0,28^\circ \pm 0,03^\circ$ (in Substanz) isolieren. Die Frage nach der absoluten Konfiguration dieses deuterierten Äthanols ist von verschiedenen Autoren [3] diskutiert worden, wobei bis vor kurzem keine Übereinstimmung erzielt werden konnte. In neuerer Zeit haben LEMIEUX & HOWARD [4] die Konfiguration des (+)-1-²H₁-Äthanols als (*R*) festlegen können, und zwar im wesentlichen durch Auslegung des NMR.-Spektrums eines Zuckerderivats. Nachfolgend berichten wir über eine unabhängige experimentelle Lösung dieser Frage²⁾.

Schema 1



Als Relaisverbindung für die konfigurative Verknüpfung wählten wir ein optisch aktives *erythro*-3-²H₁-Butanol-(2) (2). Diese Verbindung wurde schon von SKELL *et al.* [6] beschrieben. Wir haben sie direkt aus *cis*-Buten (1) in einer Stufe synthetisiert, was mit Hilfe einer Modifikation der asymmetrischen Hydroborierung nach BROWN [7] möglich ist. Das dazu notwendige optisch aktive deuterierte Diisopinocampheyl-

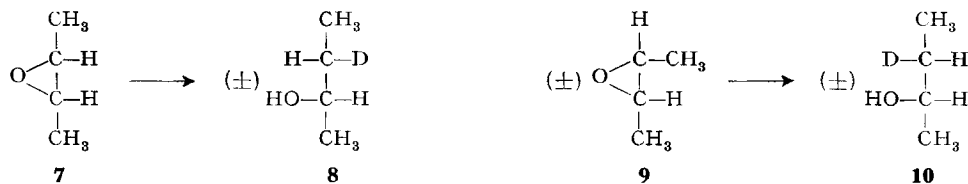
¹⁾ Folgende Abkürzungen werden verwendet: NAD = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid; NADH = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert; ADH = Alkohol-Dehydrogenase; LDH = Lactat-Dehydrogenase.

²⁾ Über die Ergebnisse dieser Arbeit wurde anlässlich des VII^o Corso Estivo di Chimica der Accademia Nazionale dei Lincei, Milano, September 1962, sowie des Chemikertreffens Schweiz-Österreich, Innsbruck, Oktober 1963, vorgetragen (vgl. [5]).

boran (**3**) liess sich durch Reaktion von (+)-(1*R*,5*R*)- α -Pinen³⁾ mit aus Lithiumdeuterid und Bortrifluorid-Ätherat zugänglichem Deutero-diboran herstellen. Die (2*R*)-Konfiguration des erhaltenen deuterierten Butanols-(2) (**2**) ist durch dessen negative Drehung festgelegt [8]; die optische Reinheit lässt sich durch Vergleich der optischen Daten des Alkohols bzw. seines kristallinen N-Phenylurethans mit den in der Literatur [9] für die optisch reinen Verbindungen angegebenen Werten zu $56 \pm 2\%$ abschätzen, ist es doch bekannt [6], dass der Drehungsanteil des deuterierten Kohlenstoffatoms von **2** vernachlässigbar klein ist. Unter Berücksichtigung der 87,5-proz. optischen Reinheit des verwendeten α -Pinsens berechnet sich daraus die optische Ausbeute der asymmetrischen Synthese zu 64%. Dieser Wert ist niedriger als der in der Literatur für die Herstellung der nicht deuterierten Verbindung angegebene [7]. Eine mögliche Ursache für den Unterschied ist darin zu suchen, dass im vorliegenden Fall aus praktischen Gründen für die *in situ*-Herstellung des Diborans eine abgeänderte Vorschrift zur Anwendung kam.

Auf Grund der bekannten *cis*-Addition von Boranen an Doppelbindungen [vgl. 10] war die *erythro*-Konfiguration von **2** von vornherein als wahrscheinlich zu betrachten. Da allerdings die Vorstellungen über den *cis*-Mechanismus der Hydroborierung zur Hauptsache auf Experimenten mit alicyclischen Olefinen beruhen, da ferner eine genaue Kenntnis der relativen Konfiguration des deuterierten Alkohols **2** für den Ausgang der Untersuchung von wesentlicher Bedeutung war, schien eine unabhängige Beweisführung für diesen Punkt unerlässlich.

Schema 2



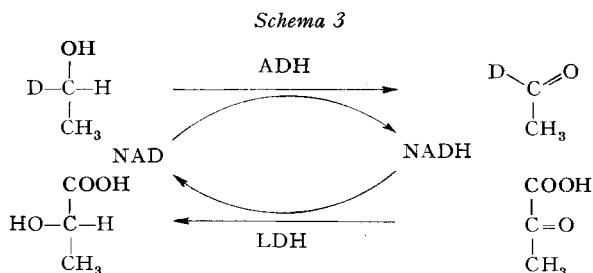
Zu diesem Zweck wurden authentische Proben von (±)-*threo*- und (±)-*erythro*-3-²H₁-Butanol-(2) (**8** und **10**) durch Reduktion von *cis*- bzw. (±)-*trans*-Epoxybutan (**7** bzw. **9**) mit Lithiumaluminiumdeuterid hergestellt. Der IR.-spektroskopische Vergleich der entsprechenden N-Phenylurethane erlaubte eine eindeutige Unterscheidung der zwei Isomeren und bestätigte gleichzeitig, dass dem durch Hydroborierung erhaltenen deuterierten Alkohol **2** die *erythro*-Konfiguration zukommt.

Die Oxydation von **2** mit molekularem Sauerstoff in wässriger Lösung in Gegenwart eines Platin-Katalysators [11] führte in guter Ausbeute zu 3-²H₁-Butanon-(2) (**4**), welches ohne weitere Reinigung in Methylenechlorid aufgenommen und nach Zusatz von Dinatriumphosphat mit Trifluor-peressigsäure [12] behandelt wurde. Das rohe Reaktionsprodukt, welches zur Hauptsache aus dem O-Acetylderivat **5** von 1-²H₁-Äthanol bestand, hydrolysierte man mit Kaliumhydroxid in Äthylenglykol. Abdestillieren der flüchtigen Anteile und anschliessende Reinigung derselben mittels präparativer Gas-Chromatographie lieferte eine Probe von 1-²H₁-Äthanol (**6**), welche als einzige Verunreinigung ca. 5% Methylenechlorid enthielt.

³⁾ Für die Überlassung grösserer Mengen dieses Materials sind wir Herrn Dr. G. OHLOFF, FIRMENICH & CIE., Genf, zu Dank verpflichtet.

Massenspektrometrische Untersuchungen an den kristallinen N-Phenylurethanen von **2** und **6** zeigten, dass im Laufe der Reaktionsfolge nur ein geringfügiger Verlust (2,5%) des schweren Isotopen stattgefunden hatte. Dieser Befund ist wichtig; dadurch wird nämlich bewiesen, dass eine an sich denkbare Racemisierung bei der Herstellung und Umsetzung des Ketons **4** praktisch vollständig unterbunden blieb. Da bekanntlich Retention ein charakteristisches Merkmal von BAEYER-VILLIGER-Oxydationen ist [13], darf dem erhaltenen deuterierten Äthanol die in Formel **6** wiedergegebene (S)-Konfiguration zugeschrieben werden.

Die Charakterisierung des Präparats liesse sich im Prinzip durch Messung der optischen Drehung vornehmen. In Anbetracht des geringen zu erwartenden Drehungswertes birgt aber diese Methode die Gefahr in sich, dass das Ergebnis bereits durch Spuren optisch aktiver Verunreinigungen verfälscht wird. Da ferner nur eine geringe Menge des Alkohols zur Verfügung stand, wurde es vorgezogen, für die Charakterisierung des deuterierten Äthanol die wohl umständlichere, aber weit empfindlichere Methode der enzymatischen Untersuchung heranzuziehen.



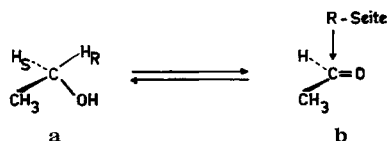
Zu diesem Zweck liess sich Hefe-ADH verwenden, wobei in Anlehnung an die von LOEWUS *et al.* [2] ausgearbeitete Methode vorgegangen wurde (vgl. Schema 3). Eine kleine Probe des (S)-1-²H₁-Äthanol (**6**) setzte man mit NAD in Gegenwart des Enzyms bis zur Einstellung des Gleichgewichtes um. Der entstandene Acetaldehyd wurde in Form des kristallinen 2,4-Dinitrophenylhydrazons isoliert. Zur weiteren Kontrolle wurde anschliessend das im Laufe der Oxydation auf die A-Seite des Coenzyms [14] [15] übergegangene Wasserstoffatom mittels LDH auf Pyruvat übertragen [16] und die hierbei gebildete (S)-Milchsäure als Phenacylester gefasst.

Nachstehende Tabelle orientiert über die Resultate der massenspektrometrischen Deuteriumsbestimmungen an den Derivaten von Äthanol, Acetaldehyd und Milchsäure. Die theoretischen Werte wurden auf Grund der Annahme berechnet, dass das deuterierte Äthanol **6** die gleiche optische Reinheit aufweist wie das (–)-Butanol **2**, aus dem es stammt. Vergleichshalber sind in dieser Tabelle auch die Werte aufgeführt, welche unter gleichen Bedingungen bei Einsatz von (R,S)-1-²H₁-Äthanol erhalten wurden.

Resultate der massenspektrometrischen Deuteriumsbestimmungen

Äthanol		Acetaldehyd		Lactat	
Konfiguration	% d ₁	% d ₁ (gef.)	% d ₁ (ber.)	% d ₁ (gef.)	% d ₁ (ber.)
(S)	86,5	67	67,5	16	19
(R, S)	93	48	46,5	45	46,5

Aus den tabellierten Werten lässt sich entnehmen, dass bei der enzymatischen Oxydation des synthetischen, partiell racemischen (*S*)-1-²H₁-Äthanol (**6**) mittels Hefe-ADH vorwiegend das Protiumatom auf das Coenzym übertragen wird. Nachdem schon früher gezeigt wurde [2], dass ein solches Verhalten für das linksdrehende Enantiomere von 1-²H₁-Äthanol kennzeichnend ist, kann nunmehr dem letzteren die (*S*)-Konfiguration zugeteilt werden.



Dieses Ergebnis stellt eine unabhängige Bestätigung der anfangs erwähnten Resultate von LEMIEUX & HOWARD [4] dar. Durch die Ermittlung der (*S*)-Chiralität für (–)-1-²H₁-Äthanol wird gleichzeitig die Art der Stereospezifität von Hefe-ADH definiert. Es ist nunmehr gesichert, dass bei der durch dieses Enzym katalysierten Oxydation von Äthanol spezifisch das *R*-Wasserstoffatom⁴⁾ der Methylengruppe beansprucht wird, bzw. dass bei der Reduktion von Acetaldehyd das Wasserstoffatom von der *R*-Seite⁴⁾ an die Carbonylgruppe addiert wird (vgl. $a \rightleftharpoons b$).

Der SANDOZ AG., Basel, danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit. Der eine von uns (H. W.) dankt der MONSANTO-STIFTUNG für ein Stipendium.

Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen. Die Smp. wurden im Ölbad in einer im Hochvakuum abgeschmolzenen Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert. Die spezifischen Drehungen wurden im 1-dm-Rohr mit Hilfe eines lichtelektrischen Präzisionspolarimeters (ZEISS) gemessen. IR.-Spektren von Reinsubstanzen wurden auf einem PERKIN-ELMER-Spektrophotometer (Modell 21), solche von Rohprodukten auf einem PERKIN-ELMER-«Infracord»-Spektrographen aufgenommen. Die NMR.-Spektren wurden bei 60 MHz mit einem VARIAN-A-60-Spektrometer in Deuteriochloroform-Lösung mit Tetramethylsilan als interner Referenz gemessen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm, die Kupplungskonstanten in cps angegeben. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit einem AEI «MS 2/H» Massenspektrometer. Für die Säulenchromatographie fand neutrales Aluminiumoxid WOELM (Aktivität II) bzw. Silicagel MERCK (Korngrösse 0,08 mm) Verwendung.

Materialien. Lithiumdeuterid mit 91,3% LiD und 1% LiH wurde bei der Firma RHÔNE-POULENC, Paris, bezogen. Folgende Enzyme und Coenzyme stammen von BOEHRINGER & SÖHNE GMBH., Mannheim: Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe, Kristallsuspension 100 mg/3,5 ml; Lactat-Dehydrogenase aus Muskel, Kristallsuspension 50 mg/10 ml; NAD, enthaltend 85,5% enzymatisch bestimmtes β-NAD.

(–)-(2*R*,3*S*)-3-²H₁-Butanol-(2) (**2**) aus *cis*-Buten. In einen 1-l-Kolben wurden 250 ml abs. Diäthylenglykol-dimethyläther und 82,6 g α-Pinen ($[\alpha]_D^{20} = +44,9^\circ$ in Substanz) gegeben und die Mischung auf -5° gekühlt. Unter Stickstoff-Spülung schlämmte man darin 8,035 g Lithium-

⁴⁾ Bei der Bezeichnung der «identischen» a-Gruppen in Verbindung mit Kohlenstoffatomen vom Typus C(aabd) möchten wir uns konsequent an das folgende, von Prof. V. PRELOG in einer Diskussion vorgeschlagene System halten:

Man gibt jenem der beiden «identischen» Substituenten, den man spezifizieren will, den höhern Rang und verwendet die *R*- oder *S*-Bezeichnung, die man daraus für das zentrale Atom nach der üblichen Sequenzregel [17] ableiten kann, als Subskript für die Angabe des Substituenten.

Als *R*-Seite eines trigonal planaren Atoms C(abd) definieren wir jene Seite, von welcher aus betrachtet die drei Gruppen abd einander nach der Sequenzregel [17] im Uhrzeigersinn folgen.

deuterid auf und liess hierauf innert einer Stunde bei 0° bei heftigem Vibrieren unter Stickstoffatmosphäre 168 g frisch destilliertes Bortrifluorid-Ätherat zutropfen. Nach 22 Std. bei 0° liess man eine Lösung von 30 g *cis*-Buten in 50 ml abs. Äther auf einmal zufließen und vibrierte weitere 8 Std. bei 0°.

Die Mischung wurde unter heftigem Rühren möglichst schnell in eine auf –10° gekühlte Lösung von 56 g Natriumhydroxid in 400 ml Wasser gegossen. Innert 15 Min. liess man 92,5 ml 30-proz. Wasserstoffperoxid zutropfen, wobei durch intensives Kühlen und Rühren die Temperatur der stark exothermen Reaktion bei 20–25° gehalten wurde. Nach 30 Min. erwärmte man das Gemisch auf dem Wasserbad auf 40–45° und rührte noch 2 Std. bei dieser Temperatur. Nach der Zugabe von Eis schüttelte man mit 4 × 500 ml Äther aus, wusch die Ätherextrakte mit wenig ges. Kochsalzlösung neutral und trocknete sie über wasserfreiem Natriumsulfat.

Der Hauptteil des Äthers (ca. 1,7 l) wurde hierauf auf dem Wasserbad durch eine VIGREUX-Kolonnen von 40 cm Länge langsam abdestilliert. Den Rest destillierte man in einem CLAISEN-Destillationskolben bis zu einer Dampftemperatur von 150° weiter. Dieses Destillat (ca. 400 ml) enthielt die Hauptmenge des deuterierten 2-Butanols. Die Fraktion wurde über Natriumsulfat getrocknet und durch langsame VIGREUX-Destillation des noch verbliebenen Äthers auf 44 ml eingengt. Nach nochmaliger Trocknung über Molekularsieb und Filtration durch 15 g Aluminiumoxid (Akt. I) wurde das Produkt durch sorgfältige Destillation im 50-ml-VIGREUX-Kolben nochmals angereichert. Eine Mittelfraktion von 16 g mit Siedebereich von 70° bis 130° wurde schliesslich in einer 12"-PODBIELNIAK-Füllkörperkolonne feinfraktioniert. Innert 8 Std. erhielt man bei ca. 50° (122 Torr) und einem Rücklaufverhältnis von 200 6,5 g Butanol-(2), dessen Reinheit gas-chromatographisch auf mindestens 98,8% geschätzt wurde. Als einzige Verunreinigung konnte α -Pinen nachgewiesen werden, dessen Anwesenheit wahrscheinlich auf die Bildung eines azeotropen Gemisches mit 2-Butanol zurückzuführen ist. Ferner wurde durch Gas-Chromatographie bestimmt, dass mindestens 4 g Butanol-(2) sich noch in den Vorläufen und Rückständen der verschiedenen Reinigungsoperationen befanden, so dass die Ausbeute total ca. 10,5 g (51,5% d. Th.) betrug.

Das PODBIELNIAK-Destillat zeigte folgende Daten: $n_D^{22} = 1,3978$; $[\alpha]_D^{25} = -8,1^\circ$ (extrapoliert); $[\alpha]_{578}^{25} = -8,4^\circ$; $[\alpha]_{546}^{25} = -9,4^\circ$; $[\alpha]_{436}^{25} = -16,0^\circ$; $[\alpha]_{405}^{25} = -19,1^\circ$; $[\alpha]_{365}^{25} = -24,5^\circ$ ($c = 2,6$ in Feinsprit).

N-Phenylurethan von (–)-(2R,3S)-3-²H₁-Butanol-(2) (2). 107 mg durch VIGREUX-Destillation angereichertes, rohes 3-²H₁-Butanol-(2) (Siedebereich 95–105°) wurden mit 900 mg Phenylisocyanat und 4 Tropfen Pyridin vermischt und die Mischung bei Eintreten spontaner Erwärmung kurz gekühlt, dann 30 Min. bei Zimmertemperatur stehengelassen und schliesslich 10 Min. auf 80° erwärmt. Man goss die Mischung auf 30 ml 2N Schwefelsäure und extrahierte zweimal mit je 100 ml Äther. Normale Aufarbeitung gab 793 mg eines farblosen Kristallgemisches, das zwecks Entfernung des als Nebenprodukt entstandenen N,N'-Diphenylharnstoffs kurz mit 5 ml Hexan digeriert und warm filtriert wurde. Das Filtrat (290 mg) chromatographierte man an der 30fachen Menge Aluminiumoxid der Aktivität II. Mit Hexan-Benzol-Gemischen eluierte man 193 mg Kristalle, welche nach 2maligem Umkristallisieren aus Hexan und Sublimieren bei 55°/0,001 Torr bei 64° schmolzen. $[\alpha]_D^{25} = -16,1^\circ$ (extrapoliert); $[\alpha]_{578}^{25} = -16,8^\circ$; $[\alpha]_{546}^{25} = -19,0^\circ$; $[\alpha]_{436}^{25} = -32,3^\circ$; $[\alpha]_{405}^{25} = -38,9^\circ$; $[\alpha]_{365}^{25} = -50,4^\circ$ ($c = 3,5$ in Feinsprit). IR.-Spektrum (CHCl₃): neben den normalen Banden (3440, 3340, 2975, 1725, 1600 cm⁻¹ u. a.) schwache Absorption bei 2180 cm⁻¹ (C–D-Streckschwingung). Charakteristische Banden im «Fingerprint»-Gebiet: 1170, 1099, 975 cm⁻¹. NMR.-Spektrum (CDCl₃): $\delta = 0,93$ (d, $J = 7, 3$ H): CH₃-4; 1,26 (d, $J = 6, 3$ H): CH₃-1; 1,60 (Multiplett, 1 H): CHD-3; 4,85 (Quintett, $J = 6, 1$ H): CHOH-2; 6,70 (s, unscharf, 1 H): NH; 7,0–7,5 (Signalhaufen, 5 H): arom. H. Massenspektrum: 89% d₁; 11% d₀.

Cis-2,3-Epoxybutan (7). 10 g *cis*-Buten wurden bei –20° zu 250 ml einer ätherischen 0,32M Perphthalsäurelösung gegeben und der Verlauf der Epoxidierung titrimetrisch verfolgt. Nach 17 Std. bei –20° und weiteren 30 Std. bei 0° war 95% der Persäure verbraucht. Die Lösung wurde von der ausgefallenen Phtalsäure abfiltriert, mit 25 g Calciumhydroxid und 15 g wasserfreiem Natriumsulfat geschüttelt und 1/2 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Der voluminöse Niederschlag wurde durch ein Glasfilter abgenutscht und der Rückstand mit wenig Äther mehrmals gewaschen. Der Äther wurde sehr langsam über eine 40 cm lange VIGREUX-Kolonnen abdestilliert und die letzten 10 ml in einem kleinen VIGREUX-Kolben fraktioniert. Eine ca. 1 g

wiegende Fraktion mit Siedebereich 45–59° wurde für die Reduktion verwendet (Sdp. des reinen *cis*-Oxids = 59°).

(±)-*Trans*-2,3-Epoxybutan (9). Ausgehend vom *trans*-Buten wurden alle Operationen gleich wie bei dem *cis*-Isomeren ausgeführt. Zur Weiterverarbeitung gelangte eine bei 36–55° siedende Fraktion von 2,7 g (Sdp. des reinen *trans*-Oxids = 56°).

N-Phenylurethan von (±)-*threo*-3-²H₁-Butanol-(2) (8). 20 ml einer ca. 0,7 M LiAlD₄-Lösung versetzte man unter Rühren mit 1 g des angereicherten *cis*-Epoxybutans. Nach dem Abflauen der heftigen Reaktion wurde über Nacht unter Rückfluss weitergerührt. Durch vorsichtige Zugabe von 0,5 ml Wasser und 1 ml 15-proz. Natronlauge wurden die anorganischen Hydroxide ausgefällt und konnten nach 2stdg. Stehenlassen leicht abfiltriert werden. Nach dem Waschen des Niederschlags mit wenig Äther liess man das Filtrat an einer 40 cm langen VIGREUX-Kolonne langsam eindampfen. Das Konzentrat (3,5 ml) wurde direkt zur Herstellung des *N*-Phenylurethans verwendet: 1 ml der Lösung wurde mit 2 ml Benzol, 0,5 ml Pyridin und 1 g Phenylisocyanat vermischt und 20 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Durch Aufarbeitung des Urethans auf die oben beschriebene Weise erhielt man 1,2 g kristallisiertes Rohprodukt, von welchem 170 mg durch zweimalige Chromatographie an der 200fachen Menge Silicagel-Celite (Mischungsverhältnis 2:1, Elution mit Benzol), einmalige Kristallisation aus Hexan und Vakuumsublimation (55°, 0,005 Torr) gereinigt wurden. Smp. 64,5°. IR.-Spektrum (CHCl₃): Neben den normalen Banden (3440, 3340, 2975, 1725, 1600 cm⁻¹) schwache Absorption bei 2180 cm⁻¹ (C–D-Streckschwingung). Charakteristische Banden im «Fingerprint»-Gebiet: 1157, 1145, 986, 965, 849, 828 cm⁻¹. Das NMR.-Spektrum dieses Derivats war nicht von demjenigen des *N*-Phenylurethans von (±)-*erythro*-3-²H₁-Butanol-(2) (10) zu unterscheiden. Massenspektrum: 89% d₁; 4% d₂; 7% d₀.

N-Phenylurethan von (±)-*erythro*-3-²H₁-Butanol-(2) (10). Für die LiAlD₄-Reduktion wurde eine bei 36–55° siedende Fraktion (2,7 g) des (±)-*trans*-Epoxybutans verwendet. Alle Operationen wurden genau gleich wie mit dem *cis*-Isomeren ausgeführt. Aus einer konzentrierten ätherischen Lösung des 2-Butanols (3,5 ml) wurde ebenfalls 1 ml zur Herstellung des *N*-Phenylurethans verwendet. Unter identischen Bedingungen erhielt man hier 0,5 g eines kristallinen Rohproduktes, wovon 100 mg auf analoge Weise gereinigt wurden. Smp. 64,5°. IR.-Spektrum (CHCl₃): identisch mit demjenigen des *N*-Phenylurethans von (–)-(2*R*,3*S*)-3-²H₁-Butanol-(2) (2). Massenspektrum: 90% d₁; 3,5% d₂; 6,5% d₀.

(S)-3-²H₁-Butanon-(2) (4). 515 mg Platinoxid in 10 ml Wasser wurden in der Hydrierapparatur 2,5 Std. lang bei 23° und 728 Torr vorhydriert, hierauf die Wasserstoffatmosphäre erst gegen Stickstoff, dann gegen Sauerstoff ausgetauscht und der Katalysator weitere 30 Min. voroxydiert. Nun gab man 3,1 g des Butanols-(2) (2) in 18 ml Wasser auf einmal zur Katalysatorsuspension und rührte bei Zimmertemperatur in Sauerstoffatmosphäre kräftig weiter. Die anfangs schnelle Sauerstoffaufnahme flaute nach einigen Stunden beträchtlich ab und blieb schliesslich beinahe stehen, so dass die Oxydation bei 82% Umsatz nach 11¼ Std. abgebrochen wurde. Das Reaktionsgemisch wurde sofort anschliessend durch eine 2 cm dicke Celite-Schicht filtriert, wobei bis zu einem Totalvolumen von 40 ml wässriger Lösung nachgewaschen wurde. Diese versetzte man mit 12 g Kochsalz und extrahierte mit zweimal 35 ml Methylenchlorid (Emulsion!). Die Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet, vereinigt und möglichst schnell weiter umgesetzt. Das mit der rohen Methylenchlorid-Lösung direkt aufgenommene IR.-Spektrum wies neben den normalen Banden des Butanons (1710 cm⁻¹ u. a.) eine deutliche Absorption bei 2180 cm⁻¹ auf (C–D-Streckschwingung). Ferner liess sich anhand einer kleinen Bande bei 3600 cm⁻¹ (O–H) durch Vergleich mit Eichspektren ein Gehalt von 10–15% an unumgesetztem 2-Butanol abschätzen.

(S)-1-²H₁-Äthanol (6). 3 ml einer 90-proz. Wasserstoffperoxid-Lösung (hergestellt durch Eindunstenlassen von 30-proz. Lösung über Phosphorperoxid im Exsikkator) wurden in 20 ml Methylenchlorid suspendiert und die Mischung bei 0° tropfenweise unter Rühren mit 18,6 ml (= 28,1 g = 0,134 Mol) Trifluoracethanhydrid versetzt, wobei eine klare Lösung entstand. Das Reagens wurde 30 Min. bei 0° weitergerührt und dann innert 30 Min. zu einer Suspension von 41,5 g wasserfreiem Dinatriumphosphat (30 Std. bei 150° getrocknet) in 65 ml einer ca. 4-proz. Lösung des Butanons 4 in Methylenchlorid getropft. Das Reaktionsgemisch wurde dabei gerührt und verblieb während der Zugabe infolge der Reaktionswärme in heftigem Sieden. Anschliessend liess man bei ständigem Rühren weitere 2½ Std. unter Rückfluss kochen. Nach Beendigung der Reaktion filtrierte man das Gemisch mit Hilfe von Druckluft durch eine Sandschicht und spülte

mehrere Male mit kleinen Portionen Methylenchlorid nach, bis das Totalvolumen des Filtrates ca. 75 ml betrug. Es wurde mit kleinen Mengen Hydrogensulfit- und Soda-Lösung, schliesslich mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das IR.-Spektrum der rohen Methylenchlorid-Lösung zeigte neben den Banden des Äthylacetats wiederum eine kleine Bande bei 2180 cm^{-1} (C–D-Streckschwingung). Den Hauptteil des Lösungsmittels liess man über eine 40 cm lange VIGREUX-Kolonne langsam abdestillieren. Ein Rückstand von 6 ml wurde in einem kleinen VIGREUX-Kolben weiter fraktioniert destilliert, wobei aber eine saubere Trennung nicht gelang, so dass eine rohe, zwischen 60° und 75° siedende Fraktion von 2,16 g direkt zur Verseifung verwendet wurde. Diese Fraktion wurde unter Stickstoffatmosphäre mit einer Lösung von 1,5 g pulverisiertem Kaliumhydroxid in 2 ml Äthylenglykol vermischt und 1 Std. auf dem Wasserbad unter Rückfluss erwärmt. Bei der nachfolgenden Destillation im HICKMANN-Kragenkolben gingen bis 110° 1,3 g über, welche gemäss der gas-chromatographischen Analyse ca. 35% Äthanol enthielten (weitere Komponenten waren Methylenchlorid, Butanon, 2-Butanol). Durch präparative Gas-Chromatographie bei 80° , zuerst an einer apolaren (Apiezon), dann einer polaren Kolonne (Emulphor 0), wurde das deuterierte Äthanol unter Verlusten von 30% bei jedem der beiden Durchgänge weitgehend gereinigt⁵⁾. Als Endprodukt wurden schliesslich 250 mg $1\text{-}^2\text{H}_1$ -Äthanol isoliert, das als einzige Verunreinigung ca. 5% Methylenchlorid enthält. Die Ausbeute, bezogen auf 2, betrug 12% d. Th.

N-Phenylurethan von $1\text{-}^2\text{H}_1$ -Äthanol. 60 mg des rohen Destillats aus der Verseifung wurden mit 2 ml Benzol, 1 ml Pyridin und 800 mg Phenylisocyanat gemischt und 20 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Gemisch wurde auf verdünnte Schwefelsäure gegossen und mit Benzol extrahiert. Neutralwaschen, Trocknen und Eindampfen ergab 180 mg öliges Rohprodukt, das an der 300fachen Menge Silicagel-Celite (2:1; Elution mit Benzol) chromatographiert wurde. Das Urethan wurde hierauf im Hochvakuum bei ca. 60° destilliert und mit einer Spur ($< 0,1\text{ }\mu\text{g}$) undeutlierter Verbindung zur Kristallisation gebracht. Für die Massenspektrometrie wurde die Substanz noch zweimal aus Hexan umkristallisiert und sublimiert: Smp. 52° . Massenspektrum: 86,5% d_1 ; 13,5% d_0 .

Enzymatische Untersuchung von $1\text{-}^2\text{H}_1$ -Äthanol. Der Verlauf der enzymatischen Oxydation und Reduktion wurde anhand der Veränderung der NADH-Absorption bei 366 nm im EPPENDORF-Spektrophotometer verfolgt. Der präparative Ansatz enthielt: 5,0 ml 0,2M Natriumpyrophosphat pH 10,0, 383 mg (= 5,2 mMol) NAD, 21,3 mg (= 0,42 mMol) $1\text{-}^2\text{H}_1$ -Äthanol, 0,05 ml ADH-Suspension entspr. 61 Einheiten. Mit Wasser auf 10,0 ml aufgefüllt. Reaktion bei Zimmertemperatur. Da das Reaktionsgleichgewicht vom pH der Lösung abhängt, musste durch sukzessive Zugabe von 1N Natronlauge das pH der Lösung oberhalb 10 gehalten werden. Nach 35 Min. waren (bei pH 10,9) 105 μMol umgesetzt (entsprechend 25% des eingesetzten Äthanols). Die Reaktionslösung wurde sofort eingefroren und die flüchtigen Anteile im Hochvakuum unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in eine wässrigsalzsaure, 0,1-proz. Dinitrophenylhydrazin-Lösung eindestilliert. Der lyophilisierte, völlig trockene Rückstand wurde bis zur Weiterverwendung bei -20° aufbewahrt. Aus der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung fiel beim Auftauen ein Niederschlag aus, der nach 4stdg. Stehenlassen bei Zimmertemperatur abfiltriert und mit wenig Wasser gewaschen wurde. Die Fällung wog nach dem Trocknen 13 mg und bestand aus einem Gemisch der Derivate von Acetaldehyd und Aceton, da das bei der Reaktion verwendete Coenzym ca. 2% Aceton als Verunreinigung enthielt. Zur Trennung der beiden Verbindungen wurde das Gemisch an 50 g Silicagel-Celite (2:1) mit Ligroin-Äther-Gemischen (max. 10% Äther) als Elutionsmittel chromatographiert, wobei 5,5 mg Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon erhalten wurden, das nach 2maliger Umkristallisation aus Methanol und Hochvakuumsublimation bei 140° einen Smp. von 166° aufwies. Massenspektrum: 67% d_1 ; 33% d_0 .

Der lyophilisierte Rückstand der enzymatischen Oxydation wurde in 10 ml Wasser gelöst, mit 1N Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt und mit 1 ml 0,1M Natriumpyruvatlösung versetzt. Das Gesamtvolumen betrug 13 ml. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,05 ml LDH-Suspension (entspr. 69 Einheiten) gestartet. Nach 22 Min. bei Zimmertemperatur hatten sich 51 μMol umgesetzt, und die Reaktion wurde durch 2minütiges Erwärmen auf 90° abgestoppt. Man säuerte

⁵⁾ Den Herren Dr. H. STRICKLER und Dr. E. KOVÁTS sei für ihre Hilfe bei der Ausführung der gas-chromatographischen Trennungen bestens gedankt.

das Gemisch durch Zugabe von 1 ml 50-proz. Schwefelsäure an und extrahierte während 18 Std. kontinuierlich mit Äther. Der Extrakt wurde mit 0,3 ml Wasser versetzt und der Äther bei Zimmertemperatur im Stickstoffstrom entfernt. Die zurückgebliebene wässrige Lösung brachte man durch Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat auf pH 6, fügte eine Lösung von 9 mg Phenacylbromid (= 45 μ Mol) in 0,45 ml Äthanol zu und kochte 2 Std. unter Rückfluss im Wasserbad. Nach Zugabe von 10 ml Wasser wurde die Lösung zweimal mit 50 ml Äther extrahiert, die Extrakte mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Als Rohprodukt erhielt man 11 mg kristallines Derivat, welches nach dreimaliger Umkristallisation aus Hexan-Methylenchlorid und Sublimation bei 70° im Hochvakuum einen Smp. von 85° zeigte. Ausbeute an reinem Phenacyllactat 1,6 mg. Massenspektrum: 16% d_1 ; 84% d_0 .

($\pm$)-1- 2H_1 -Äthanol. Zu 5 ml einer 2-proz. wässrigen Lösung von 1- 2H_1 -Acetaldehyd (vgl. [2]) gab man eine Lösung von 200 mg Natriumborhydrid in 2 ml Wasser und liess das Gemisch eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen. Anschliessend stellte man das pH der Lösung durch Zugabe von 2N Schwefelsäure auf 7 und destillierte das Gemisch bei Normaldruck. Von dem an Äthanol angereicherten Vorlauf wurden 3 Tropfen mit 3 ml Pyridin vermischt und die Lösung mit 0,5 g Phenylisocyanat versetzt. Die Isolierung des N-Phenylurethans von ($\pm$)-1- 2H_1 -Äthanol sowie die enzymatische Untersuchung des deuterierten Alkohols erfolgte nach dem oben beschriebenen Verfahren. Für die Deuteriumsbestimmungen vgl. Tabelle.

SUMMARY

(S)-1- 2H_1 -Ethanol (6) has been prepared in three steps from (–)-*erythro*-(2R,3S)-3- 2H_1 -butan-2-ol (2), itself available from *cis*-butene by asymmetric hydroboration. In enzymatic tests with yeast alcohol dehydrogenase this deuterated ethanol proved to be indistinguishable from the laevorotatory isomer. This establishes the (S)-chirality of the latter and at the same time defines the stereospecificity of the yeast alcohol dehydrogenase.

Organisch-Chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. WEBER, Diss. ETH, Zürich 1965, Prom. Nr. 3591.
- [2] F. A. LOEWUS, F. H. WESTHEIMER & B. VENNESLAND, J. Amer. chem. Soc. 75, 5018 (1953); H. R. LEVY, F. A. LOEWUS & B. VENNESLAND, *ibid.* 79, 2949 (1957).
- [3] A. STREITWIESER JR., J. R. WOLFE JR. & W. D. SCHAEFFER, Tetrahedron 6, 338 (1959); J. H. BREWSTER, Tetrahedron Letters No. 20, 23 (1959); J. V. EYS & N. O. KAPLAN, J. Amer. chem. Soc. 79, 2782 (1957).
- [4] R. U. LEMIEUX & J. HOWARD, Canad. J. Chemistry 41, 308 (1963).
- [5] H. WEBER & D. ARIGONI, Österr. Chemiker-Ztg. 64, 299 (1963).
- [6] P. S. SKELL, R. G. ALLEN & G. K. HELMKAMP, J. Amer. chem. Soc. 82, 410 (1960).
- [7] H. C. BROWN & G. ZWEIFEL, J. Amer. chem. Soc. 83, 486 (1961).
- [8] P. A. LEVENE, A. WALTI & H. L. HALLER, J. biol. Chemistry 71, 465 (1926).
- [9] R. H. PICKARD & J. KENYON, J. chem. Soc. 99, 45 (1911); 103, 1923 (1913); P. A. LEVENE & H. L. HALLER, J. biol. Chemistry 74, 343 (1927).
- [10] H. C. BROWN: «Hydroboration», W. A. Benjamin, Inc., New York 1962.
- [11] R. P. A. SNEEDEN & R. B. TURNER, J. Amer. chem. Soc. 77, 190 (1955).
- [12] W. D. EMMONS & G. B. LUCAS, J. Amer. chem. Soc. 77, 2287 (1955).
- [13] K. MISLOW & J. BRENNER, J. Amer. chem. Soc. 75, 2318 (1953).
- [14] H. F. FISHER, E. E. CONN, B. VENNESLAND & F. H. WESTHEIMER, J. biol. Chemistry 202, 687 (1953).
- [15] J. W. CORNFORTH, G. RYBACK, G. POPJAK, C. DONNINGER & G. SCHROEPFER JR., Biochem. biophys. Res. Commun. 9, 371 (1962).
- [16] F. A. LOEWUS, P. OFNER, H. F. FISHER, F. H. WESTHEIMER & B. VENNESLAND, J. biol. Chemistry 202, 699 (1953).
- [17] R. S. CAHN, C. K. INGOLD & V. PRELOG, Experientia 12, 81 (1956).