

Diss. Nr. 5369

Neue Derivate der Chlorophyll-Reihe

ABHANDLUNG

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

HANS PETER ISENRING
dipl. Natw. ETH
geboren am 15. März 1947
von Stettfurt (TG) und Zürich

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. A. Eschenmoser, Referent
Prof. Dr. J. F. M. Oth, Korreferent

Juris Druck + Verlag Zürich
1974

Seite Leer /
Blank leaf

ISBN 3 260 03821 3

Meinen Eltern
und
Susy
in Dankbarkeit gewidmet

Seite Leer /
Blank leaf

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. A. Eschenmoser,

unter dessen Leitung ich die vorliegende Promotionsarbeit an diesem spannenden Projekt ausführen durfte, möchte ich für die wertvollen Diskussionen und die grosszügige Unterstützung herzlich danken.

Fräulein Dr. D. Felix und Herrn Dr. J. Schreiber danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und vielen praktischen Ratschläge.

Erwähnen möchte ich an dieser Stelle meine Kollegen von der "grünen Gruppe", mit denen ich direkt zusammenarbeitete, und denen ich für den guten Teamgeist und die Ueberlassung von Unterlagen zu grossem Dank verpflichtet bin:

Dr. G. Hoornaert, Dr. H. Falk,
J. L. Luisier, E. Walter,
E. Zass, B. Jaun und F. Thönen.

Dem Stipendienfonds zur Unterstützung von Doktoranden auf dem Gebiet der Chemie sowie dem Schweizerischen Nationalfonds danke ich für die finanzielle Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Allgemeiner Teil	9
1.1. Einleitung	9
1.2. Photosynthese: P700	15
1.3. Konzept zur Synthese von stabilen Chlorophyllenolderivaten	27
1.4. Synthese der metallfreien Modellverbindungen	29
1.5. Magnesiumkomplexe von Chlorinen und Porphyrinen	43
1.6. Ergebnisse orientierender Einbauversuche mit "10-Methoxy-diketon a" (7)	54
1.7. Zusammenstellung und Diskussion der physikalisch-chemischen Eigenschaften der synthetischen Chlorophyllenolderivate	57
Zusammenfassung	70
2. Experimenteller Teil	71
2.1. Darstellung und Eigenschaften von metallfreien Derivaten der Chlorophyll a-Reihe	74
2.1.1. Phäophytin a (1)	74
2.1.2. Methyl-phäophorbid a (2)	77
2.1.3. Methyl-pyrophäophorbid a (3)	80
2.1.4. Pyrophäophorbid a (4)	84
2.1.5. "Enol a" (5)	86
2.1.6. "Formyl-enol a" (6)	105
2.1.7. "10-Methoxy-diketon a" (7)	108
2.2. Darstellung und Eigenschaften von metallfreien Derivaten der Chlorophyll d-Reihe	112
2.2.1. Methyl-pyrophäophorbid d (8)	112
2.2.2. Methyl-pyrophäophorbid d-dimethylacetal (9)	115
2.2.3. "Enol d-dimethylacetal" (10)	118
2.2.4. "Enol d" (11)	121
2.3. Darstellung und Eigenschaften von metallfreien Derivaten der 2-Desvinyl-2-acetyl-chlorophyll a-Reihe	125
2.3.1. 2-Desvinyl-2-(α -hydroxy)äthyl-methyl-pyrophäophorbid a (12)	125
2.3.2. 2-Desvinyl-2-acetyl-methyl-pyrophäophorbid a (13)	128
2.3.3. 2-Desvinyl-2-acetyl-methyl-pyrophäophorbid a-ketal (14)	130
2.3.4. "2-Desvinyl-2-acetyl-enol a-dimethylketal" (15)	133
2.3.5. "2-Desvinyl-2-acetyl-enol a" (16)	136

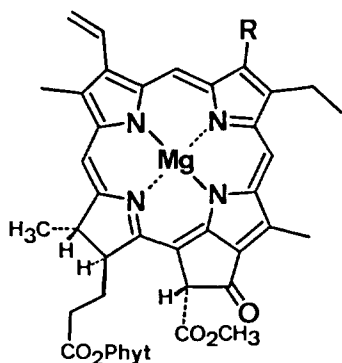
2. 4. Darstellung und Eigenschaften von metallfreien Derivaten der Chlorophyll b-Reihe	140
2. 4. 1. Methyl-phäophorbid b (18)	140
2. 4. 2. Methyl-pyrophäophorbid b (20)	144
2. 4. 3. "Enol b-dimethylacetal" (21)	148
2. 4. 4. "Enol b" (22)	151
2. 5. Darstellung und Eigenschaften von metallfreien Derivaten der Bakteriochlorophyll-Reihe	155
2. 5. 1. Bakterio-methyl-phäophorbid (23)	155
2. 5. 2. Bakterio-methyl-pyrophäophorbid (24)	158
2. 5. 3. "Bakterio-enol" (27)	160
2. 6. Magnesium Komplexe	166
2. 6. 1. Jodmagnesiumsalz von BHT	166
2. 6. 2. Methyl-chlorophyllid a (28)	167
2. 6. 3. Methyl-pyrochlorophyllid a (29)	181
2. 6. 4. Magnesium-oktaäthylporphin (31)	187
2. 6. 5. Chlorophyll a (32)	190
2. 6. 6. "Magnesium-enol a" (33)	194
2. 7. Zink Komplexe	208
"Zink-10-methoxy-diketon a" (34)	208
2. 8. Reduktionsversuche an Carbonylgruppen von Chlorophyllderivaten	211
2. 8. 1. Versuche mit Borhydrid in wässrigen Detergenzlösungen	211
2. 8. 2. Reduktionsversuche mit Bakteriochlorophyllderivaten in organischem Medium	214
2. 9. Versuche zur Entallomerisierung	215
Literaturverzeichnis	218
Lebenslauf	

1. ALLGEMEINER TEIL

1.1. EINLEITUNG

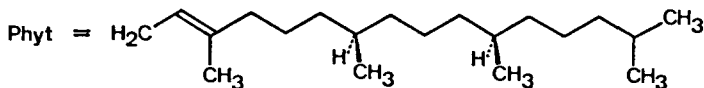
1.1.1. Geschichtlicher Ueberblick

Im Jahre 1772 entdeckte der englische Minister, Naturforscher und Philosoph J. Priestley ¹⁾ die Fähigkeit von Pflanzen, durch Kerzen verbrannte Luft wieder zu regenerieren. Fast 50 Jahre später gelang es den Franzosen F. Pelletier und J. B. Caventou ²⁾, einen grünen Farbstoff aus Blättern zu "isolieren", welchen sie Chlorophyll nannten.



R = CH₃: Chlorophyll a

R = CHO: Chlorophyll b

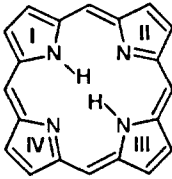


Die Chemie des Chlorophylls begann mit den Untersuchungen von J. Berzelius ³⁾, welcher eine Erhaltung der Farbe bei der Einwirkung von Säuren oder Basen auf einen Blattextrakt beobachtete, ohne jedoch die tiefgreifenden Veränderungen zu erkennen. Wenig später stellte F. Verdeil ⁴⁾ den Zusammenhang zwischen Chlorophyll und dem Blutfarbstoff Häm fest. Unterstützt wurde dieser Befund durch eine Analyse, nach welcher beide Substanzen Eisen enthalten sollten. Durch spektroskopische Untersuchungen kam G. G. Stokes ⁵⁾ zum Schluss, dass Chlorophyll aus

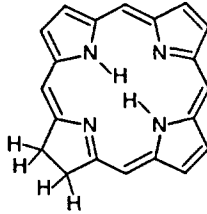
zwei verschiedenen, fluoreszierenden Komponenten besteht. M. Nencki ^{6) 7)} und Mitarbeitern gelang der Abbau von Chlorophyll und Häm auf die Pyrrolstufe, was einen weiteren Beweis der nahen chemischen Verwandtschaft lieferte. Am Anfang des 20. Jahrhunderts begann R. Willstätter ⁸⁾ mit einer systematischen Untersuchung der Chemie der Chlorophylle. Er erhielt die erste empirische Formel mit Magnesium anstelle von Eisen als Zentralatom. Zwischen den beiden Weltkriegen beschrieben und charakterisierten H. Fischer ⁹⁾ und Mitarbeiter unzählige Chlorophyllderivate, die durch Abbau oder Synthese erhalten wurden. Auch die Konstitution von Bakteriochlorophyll und seine grosse Aehnlichkeit mit Pflanzenchlorophyllen wurde richtig erkannt. 1930 wurde das Hämin von Fischer synthetisch hergestellt. Bis zu seinem Tode im Jahre 1945 gelang es ihm noch, Mesochlorophyll zu synthetisieren. In enger Anlehnung an Fischers Synthesep lan führten M. Strell ¹⁰⁾ und Mitarbeiter eine Formal-Synthese von Chlorophyll a zu Ende. 1956 begann R. B. Woodward ¹¹⁾ eine moderne Synthese von Chlorophyll a, die nach vier Jahren zum Erfolg führte. 1971 erweiterten H. H. Inhoffen ¹²⁾ und Mitarbeiter die Woodward'sche Synthese auf Chlorophyll b. Damit sind alle Pflanzenchlorophylle synthetisch zugänglich, zumal optisch aktives Phytol schon 1959 hergestellt wurde ¹³⁾. Eine Totalsynthese von Bakteriochlorophyll steht bis heute noch aus.

1.1.2. Nomenklatur

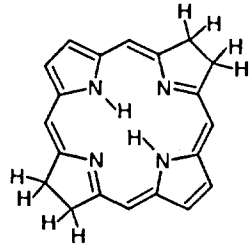
Die grünen Farbstoffe, welche in photosynthetisch aktiven Organismen vorkommen, werden ganz allgemein als Chlorophylle bezeichnet. Grundkörper ist die Tetrapyrrol-Verbindung Porphin. Durch Hydrierung der peripheren Doppelbindung im Ring IV kommt man zum Chlorin und durch eine weitere Hydrierung im Ring II zum Bakteriochlorin.



Porphin

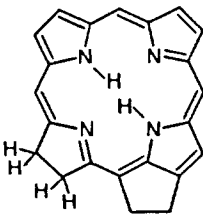


Chlorin

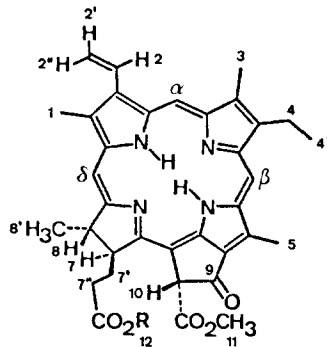


Bakteriochlorin

Bei allen Chlorophyllen ist ein Cyclopentanring (isocyclischer Ring) an den Makrocyclus kondensiert; diese Verbindungen heissen Phorbine oder Phorbide. H. Fischer¹⁴⁾ hat eine Nummerierung der Ringpositionen festgelegt, welche auch für die vorliegende Arbeit verwendet wurde. Die Seitenketten sind mit den entsprechenden gestrichenen Indizes bezeichnet.

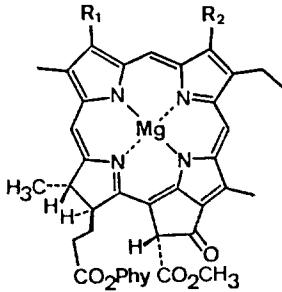


Phorbin

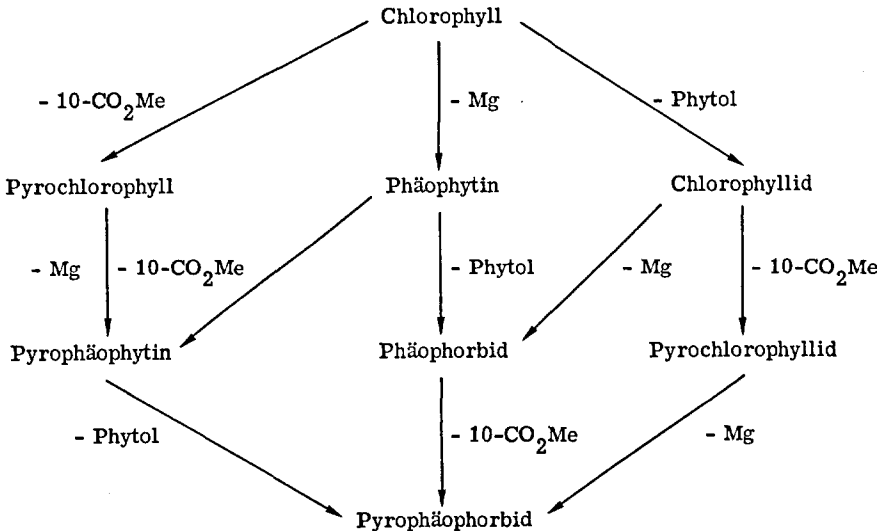


Phorbine, welche Magnesium als Zentralatom enthalten und an der Propionsäureseitenkette mit Phytol oder Farnesol (ev. auch Geranylgeraniol) verestert sind, heissen Chlorophylle, die übrigen Ester Methyl- bzw. Aethyl-chlorophyllide. Der Austausch von Magnesium gegen Wasserstoff führt zu Phäophytin, bzw. Methyl- oder Aethyl-phäophorbid. Derivate, bei welchen die 10-Methoxycarbonylgruppe durch Wasserstoff ersetzt ist, erhalten das Präfix: Pyro.

Die Chlorophylle der a-, b- und d-Reihe unterscheiden sich in der Funktionalisierung der Seitenketten in den Ringen I und II.



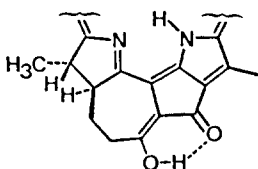
$R_1 = \text{Vinyl}, R_2 = \text{CH}_3$: Chlorophyll a
 $R_1 = \text{Vinyl}, R_2 = \text{CHO}$: Chlorophyll b
 $R_1 = \text{CHO}, R_2 = \text{CH}_3$: Chlorophyll d



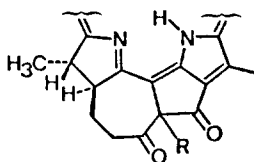
Die übrigen Derivate werden als Abkömmlinge dieser Reihen (i. allg. der a- oder b-Reihe) benannt. Wenn z. B. die Vinylgruppe in Stellung 2 von Methyl-phäophorbid a durch eine Acetylgruppe ersetzt ist, lautet die Bezeichnung: 2-Desvinyl-2-acetyl-methyl-phäophorbid a.

Derivate mit hydrierter Vinylgruppe (= 2-Desvinyl-2-äthyl) erhalten das Präfix meso.

In der vorliegenden Arbeit werden die Kondensationsprodukte, welche zu einem β -Diketonssystem führen, je nachdem als "Enol" oder "Diketon" bezeichnet.



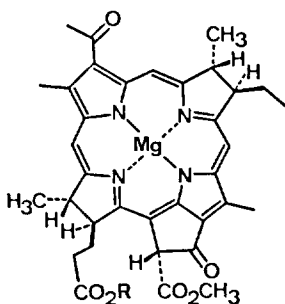
"Enol"



"Diketon"

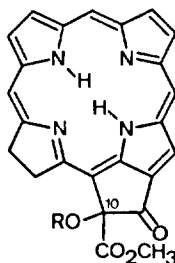
Bakteriochlorophyll unterscheidet sich von Chlorophyll a dadurch, dass am Ring I anstelle der Vinylgruppe eine Acetylgruppe sitzt, und der Ring II partiell hydriert vorliegt.

Allomerisierung bedeutet bei Chlorophyllderivaten die Oxidation des konjugierten π -Systems mit anschließender Einführung eines Sauerstoff-Substituenten am C-Atom 10.



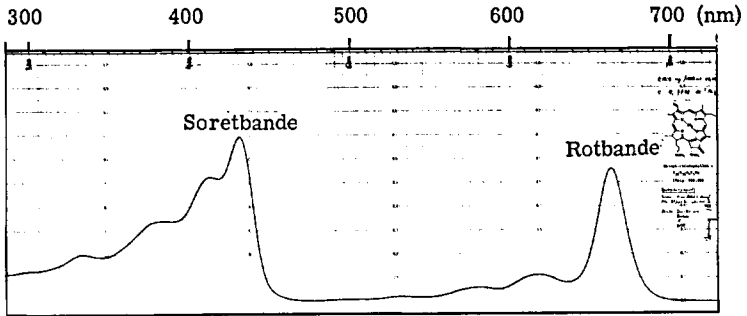
R = Phytol od. Farnesol

Bakteriochlorophyll



ein Allomer

Im UV/VIS-Spektrum von Chlorophyll- und Porphyrin-Derivaten wird die intensivste Bande im Bereich von 400-445 nm als Soretbande, die langwelligste Absorption normalerweise als Rotbande bezeichnet.



1. 2. PHOTOSYNTHESE: P700

1. 2. 1. Eigenschaften von P700

Die Photosynthese oder Assimilation des Kohlendioxids in den grünen Pflanzen ist der qualitativ wie quantitativ wichtigste biochemische Vorgang auf unserem Planeten. In den Zellen wird die Lichtenergie in speziellen Organellen, den Chloroplasten, in chemische Energie umgewandelt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die Chloroplasten von zahlreichen Lamellen, Thylakoide genannt, durchzogen sind, welche die Träger der Pigmente bilden. Dass Chlorophyll in der Absorption der Lichtquanten eine wichtige Rolle spielt und als primärer Photorezeptor agiert, wird heute kaum mehr angezweifelt. Der detaillierte Mechanismus liegt jedoch nach wie vor im Dunkeln und gibt Anlass zu vielen Hypothesen und Spekulationen.

Die Chlorophylle sind in eine Lipoproteinmatrix der Thylakoide eingebettet, wobei nur ein sehr kleiner Teil photochemisch aktiv ist. Die Hauptmenge der Pigmente, wobei auch die akzessorischen Pigmente eingeschlossen sind, wirken als Lichtsammeler. Die Aufgabe dieser Antennenchlorophylle ist es, die Lichtquanten in geeigneter Form auf ein Reaktionszentrum zu übertragen, welches nun seinerseits die Umwandlung in chemische Energie zustande bringt. Das geschieht durch eine Ladungstrennung, welche ein Redoxpotentialgefälle erzeugt und somit die biochemischen Folgeprozesse ermöglicht.

Die Anordnung des Antennenchlorophylls in den Membranen und die Struktur des Reaktionszentrums sind zur Zeit die wichtigsten, ungelösten Fragen der Photosyntheseforschung.

1943 untersuchte Emerson ¹⁵⁾ die photosynthetische Aktivität von Pflanzen bei der Bestrahlung mit monochromatischem Licht. Er stellte fest, dass eine Beleuchtung mit sehr langwelligem Licht (> 700 nm) nur bei der gleichzeitigen Einstrahlung von kürzerwelligem Licht (< 700 nm) effektiv war ("Emerson Effekt"). Daraus wurde geschlossen, dass die Photosynthese zwei verschiedene photochemische Stufen erfordert, eine hauptsächlich durch Chlorophyll a, die andere durch Chlorophyll b bedingt. Duysens ¹⁶⁾ nannte 1960 die beiden Pigmentsysteme Photosystem I (PS I) und Photosystem II (PS II) und stellte fest, dass die Hauptmenge an akzessorischen Pigmenten im PS II und die Hauptmenge an Chlorophyll a im PS I zu finden ist. Beide Systeme sind in der Lage, die Lichtenergie umzuwandeln.

Photosyntheseschema 17)

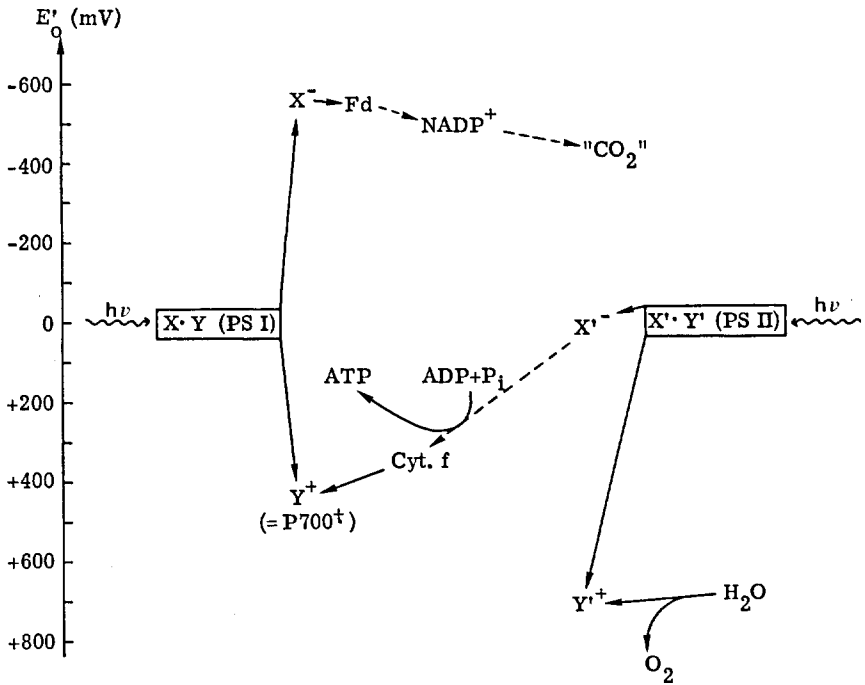


Fig. 1

Wie aus Fig. 1 hervorgeht, wird durch das längerwellige Licht im PS I ein relativ starkes Oxidationsmittel (Y^+) und ein sehr starkes Reduktionsmittel (X^-) erzeugt. Dieses X^- reduziert Ferredoxin, $NADP^+$ und dann formal Kohlendioxid. Im PS II, das durch das kürzerwellige Licht angeregt wird, entsteht ein sehr starkes Oxidationsmittel (Y'^+), welches letztlich die Oxidation des Wassers ermöglicht, während das Reduktionsmittel (X'^-) relativ schwach ist. Bei der Uebertragung des Elektrons vom X'^- auf das Y^+ durch eine Kette von Redoxpaaren wird auch der Energiespeicher ATP gebildet.

Die Oxidation eines Sauerstoffs aus Wasser und die Reduktion eines CO_2 -Moleküls erfordern 4 Elektronen. Das bedeutet, dass unter Einbeziehung beider Photosysteme in diese Reaktionen mindestens 8 Quanten aufgebracht werden müssen. Die Kenntnisse vom Photosystem I sind viel reichhaltiger als jene vom Photosystem II.

Im Hinblick auf die Untersuchungen in unserem Laboratorium beschränken wir uns hier auf das Aufzeigen der Eigenschaften des Photosystems I grüner Pflanzen. 1956 entdeckte Kok¹⁸⁾ in Algen und isolierten Chloroplasten durch Differenzspektroskopie eine lichtinduzierte Ausbleichung von Absorptionsbanden bei 430 nm und 700 nm. Da das Antennenchlorophyll in vivo ein Rotmaximum bei ~680 nm aufweist, jedoch eine Ausbleichung bei ~700 nm beobachtet wurde, könnte dieses Phänomen möglicherweise vom Reaktionszentrum herrühren. 1961 gelang es Kok¹⁹⁾ dieses Pigment 700 (= P700) etwas anzureichern, was für weitere Untersuchungen insofern fruchtbar war, als der natürliche Gehalt nur ca. 0,3% beträgt und die spezifischen Eigenschaften vom Antennenchlorophyll stark überlagert werden. Die erste Hypothese konnte durch die Beobachtung, dass die lichtinduzierte Ausbleichung von P700 mit einer Enelektronenoxidation einhergeht, untermauert werden. Die Titration von P700-Fractionen mit Ferricyanid/Ferrocyanid ergab ein Redoxpotential von $E'_0 = +430$ mVolt¹⁹⁾.

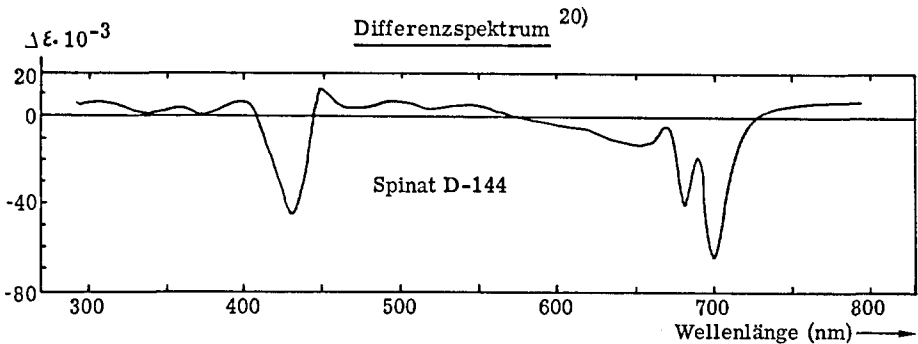


Fig. 2

Ebenfalls 1956 entdeckten Commoner et al.²¹⁾ ein lichtinduziertes ESR-Signal in photosynthetisch aktiven Organismen und ein Jahr später wurde das Auftreten von zwei Signalen publiziert²²⁾: Signal I ist eine symmetrische Resonanz mit einer Linienbreite von ~7 Gauss und einem g-Faktor von 2,0025; Signal II ist eine breite asymmetrische Resonanz mit partiell aufgelöster Hyperfeinstruktur (Linienbreite ~19 G, $g = 2,0045$). Das schnell zerfallende Signal I wurde dem PS I, das im Dunkeln deutlich stabilere Signal II dem PS II zugeordnet.

1962 wurde ein Zusammenhang zwischen der Ausbleichung von P700 und dem ESR-Signal I postuliert²³⁾. Aber erst 1972 zeigten Bolton et al.²⁴⁾ durch simultane Messung des ESR-Signals und des Absorptionsspektrums von P700 und der Registrierung der Zerfallskinetiken, dass die beiden Effekte mit grosser Sicherheit von

ein und derselben Spezies herrühren. Beide zerfallen gleich schnell nach einer Kinetik 1. Ordnung.

Im selben Jahr veröffentlichten Sauer et al.²⁵⁾ ein Differenz-Circulardichroismus-Spektrum einer P700-Präparation mit 1 P700 pro 60 Chlorophyllteilchen. Das differenzielle CD wies zwei Komponenten etwa gleicher Intensität bei 696,5 nm (+) und 688 nm (-) auf. P700 in dieser Präparation zeigte ein Maximum bei 697,5 nm. In neuerer Zeit wurden die Anreicherungsverfahren für P700 ziemlich verbessert. Im allgemeinen entfernt man zuerst einen grossen Teil des Chlorophylls und die Carotinoide mit einem organischen Lösungsmittel, und lässt dann die Teilchen unter der Wirkung von Detergentien in Pigmentproteinkomplexe oder Fragmente zerfallen. Es ist so möglich, bis zu einer Anreicherung von 15-30 Chlorophyllmolekülen pro 1 P700 zu kommen^{26) 27) 28)}.

Es wurde auch untersucht, ob P700 ev. eine Fluoreszenz zeige. Oga wa und Ver non²⁷⁾ kommen jedoch zur Ansicht, dass die beobachtete Fluoreszenz in P700-Fragmenten nicht vom Reaktionszentren-Chlorophyll selber kommt.

Es sollte noch erwähnt werden, dass Malkin und Bearden²⁹⁾ ein weiteres ESR-Signal (Linienbreite ~8 G, $g = 2,0026$) entdeckten, welches dem Reaktionszentrum-II-Chlorophyll zugeordnet wird.

1973 zeigten Oga wa et al.³⁰⁾, dass im Licht-Dunkel-Differenzspektrum von PS I bei 815 nm eine deutliche, wenn auch schwache, positive Bande auftritt, welche einen Extinktionskoeffizienten von ungefähr 12'000 aufweist.

Zusammenfassung der bekannten Eigenschaften von P700

Differenz-Absorptionsmaximum: 700 \pm 5 nm¹⁸⁾, 697,5 nm²⁵⁾, 698 nm²⁶⁾,
701 nm²⁷⁾, 696-697 nm²⁸⁾, 703 nm³⁰⁾.

Differenz-Extinktionskoeffizient: 64'000 - 70'000¹⁷⁾

Redoxpotential (Ferro/Ferricyanid-Titration): $E'_o = +430$ mVolt¹⁹⁾, = +480 mVolt²⁶⁾,
= +520 mVolt³¹⁾.

ESR-Signal: Linienbreite = 7 Gauss, g-Faktor = 2,0025^{21) 32)}

Differenz-Circulardichroismus: 695,5 (+), 688 (-)²⁵⁾

Fluoreszenz: nicht beobachtbar²⁷⁾

1. 2. 2. Hypothesen zur Struktur von P700

1. 2. 2. 1. Verschiedene Vorschläge

Nach der Entdeckung des P700 wurden naturgemäss verschiedene Hypothesen über dessen Struktur aufgestellt. 1961 schlug Kok ¹⁹⁾ für P700 ein Chlorophyll a vor, welches seine besonderen spektroskopischen Eigenschaften durch die Bindung an ein Protein erhält. Im selben Jahr veröffentlichte Butler ³³⁾ eine andere Hypothese, wonach ein Komplex von Chlorophyll a und Cytochrom vorliegt. Diese Idee wurde durch die Beobachtung von Kok ¹⁹⁾ unterstützt, welcher feststellte, dass in den P700-Präparationen Cytochrom f und P700 in sehr ähnlichen Konzentrationen vorkommen. Brody und Brody ³⁴⁾ folgerten aus Fluoreszenzexperimenten in vitro, dass die Spektraleigenschaften von P700 auch ohne das Mitwirken anderer Substanzen möglich sind. Sie schlugen für P700 das Zusammenwirken von aggregiertem Chlorophyll und Cytochrom vor.

1968 zeigte Weaver ³⁵⁾, dass sowohl bei der Lichtreaktion, wie auch bei der chemischen Oxidation ein ESR-Signal entsteht, was die Folgerung zulässt, dass beide Male ein P700⁺ auftritt.

1969 schlossen Oga wa und Vernon ²⁷⁾ aus genauen Analysen des Differenzspektrums (Auftreten der normalen Absorption bei 701 nm und einer neuen Bande bei ~ 680 nm), dass eine zweite Komponente im Reaktionszentrum vorhanden ist. Das Auftreten dieser Bande bei 682 nm wurde schon früher von Döring et al. ³⁶⁾ bei Blitzlichtexperimenten beobachtet.

Ebenfalls 1969 gelang es Wang et al. ³⁷⁾, einen Flavin-Chlorophyll a-Komplex herzustellen, der ein Absorptionsmaximum nahe 700 nm aufwies und reversibel durch Licht gebleicht werden konnte. ESR-Untersuchungen zeigten, dass die Ausbleichung mit einer Elektronenübertragung von Chlorophyll auf Flavin einherging. Es wurde vorgeschlagen, dass P700 aus einem Chlorophyll-Flavin-Komplex besteht, wobei dieses ein spezielles Chlorophyll ist und das Flavin von der NADP⁺-Reduktase herührt.

1970 publizierten Borg et al. ³⁸⁾ Untersuchungen über das Auftreten von ESR-Signalen bei der elektrochemischen Oxidation von Chlorophyll a. Aus der starken Ähnlichkeit der Differenzspektren von P700/P700⁺ sowie von Chlorophyll/Chlorophyll-Kation-Radikal und den ESR-Signalen, welche sich nur in der Linienbreite um ca. 2 Gauss unterschieden, wurde geschlossen, dass das oxidierte P700 (P700⁺) ein π -Kation-Radikal des Chlorophylls a ist.

1971 verglichen Katz et al.³²⁾ die ESR-Spektren von definierten Chlorophyll-Aggregaten in vitro mit den Daten aus in vivo-Experimenten. Der Vergleich der entsprechenden Absorptionsmaxima zusammen mit den ESR-Daten führte zu einem Modell für das Reaktionszentrum des PS I. Das aktive Zentrum besteht aus einer $\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Chl}$ -Einheit, in welcher die Ladungstrennung vor sich geht. Andererseits besteht das Antennenchlorophyll aus $(\text{Chl}_2)_n$ -Oligomeren. Diese Hypothese über die Struktur des Antennenchlorophylls wurde schon früher auf Grund von IR- und Absorptionsspektren in vitro aufgestellt³⁹⁾. Die Details dieses Modells werden im folgenden Kapitel ausführlich diskutiert.

1972 stellten Calvin et al.⁴⁰⁾ auf Grund einer Röntgenstrukturbestimmung von Methyl-phäophorbid a eine weitere Hypothese über die Struktur des Antennenchlorophylls a auf. Darin sind die Chlorophylle in den photosynthetischen Lamellen nicht ganz parallel angeordnet (Verknüpfung durch 2_1 -Drehachse) und durch Wassermoleküle zusammengehalten.

Aus Resultaten von Differenzzirkulardichroismus und Differenzabsorption von P700-Präparationen kommen Sauer et al.²⁵⁾ zur Auffassung, dass mindestens zwei Chlorophyllmoleküle im Reaktionszentrum vorhanden sind und eine Exiton-Interaktion zwischen den beiden herrscht. Während der Belichtung wird eines der beiden Moleküle oxidiert, wobei die Exiton-Wechselwirkung auseinanderfällt.

1973 untersuchten Oga wa et al.³⁰⁾ das Licht-Dunkel-Differenzspektrum von Photosystem I-Fragmenten im Bereich von 800 nm. Bei 815 nm wurde eine schwache, positive Absorption ($\epsilon \approx 12'000$) gefunden. Diese wurde als Bande des P700-Kation-Radikals betrachtet, weil die Untersuchungen von Borg et al.³⁸⁾ an Chlorophyll a für das Kation-Radikal ebenfalls eine Absorption bei 820 nm anzeigten.

1974 gelang Tollin et al.⁴¹⁾ die Herstellung eines lichtinduzierten Kation-Radikals von Chlorophyll a bei tiefen Temperaturen in organischen Lösungsmitteln ($g = 2,0025$, $\Delta H = 7,5$ Gauss). Notwendige Bedingungen waren dazu die Gegenwart von Alkohol und Magnesium als Zentralatom im Chlorin. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass in vivo der primäre Akzeptor als Ligand am Magnesium sitzt, d. h., dass das Elektron über das Magnesium das Chlorophyll- π -System verlässt. Die Kristallstrukturbestimmung von Strouse⁴²⁾ 1974 an Aethyl-chlorophyllid a eröffnete neue Interpretationsmöglichkeiten für die Struktur des Antennenchlorophylls. Das Magnesiumatom ist $0,4\text{\AA}$ unterhalb der Chlorinringebene, auf derselben Seite wie der Methylester am isocyclischen Ring lokalisiert. Ein Wassermolekül besetzt nun die fünfte Ligandstelle am Magnesium. Ein zweites Wassermolekül

verbindet das erste mit der Carbonylfunktion des Methylesters. Ausserdem bestehen Wasserstoffbrücken zu den Carbonylfunktionen der benachbarten Chlorophyllid-Moleküle. Zusammen mit einem Protein (Chlorophyllproteinkomplex) kann so eine eindimensionale Kette entstehen, wobei eine Ueberlappung der Vinylfunktion (Ring I) und des Ketons (Ring V) auftritt. Diese Anordnung liefert einen Weg für die Exitonwanderung im Antennenchlorophyll.

Die hier dargelegte Hypothese steht im Widerspruch zu den Ueberlegungen von Calvin et al.⁴⁰⁾. Auf Grund der Röntgenstrukturdaten des Chlorophylls ist sein Modell aus sterischen Gründen wenig wahrscheinlich. Ebenfalls als unwahrscheinlich wird der Vorschlag von Katz et al.⁴³⁾ angesehen, welche wasserfreie Chlorophyllpolymere (Keton koordiniert am Magnesium des Nachbarchlorophylls) als Modell für das Antennenchlorophyll vorgeschlagen hatten.

Fluoreszenzpolarisationsuntersuchungen von Van Nostrand et al.⁴⁴⁾ lassen den Schluss zu, dass die langwelligen spektroskopischen Formen von Chlorophyll in vivo höher organisiert sind als die kurzwelligen, d. h. Antennenchlorophyll ist hoch organisiert.

1. 2. 2. 2. Hypothese von Joseph J. Katz

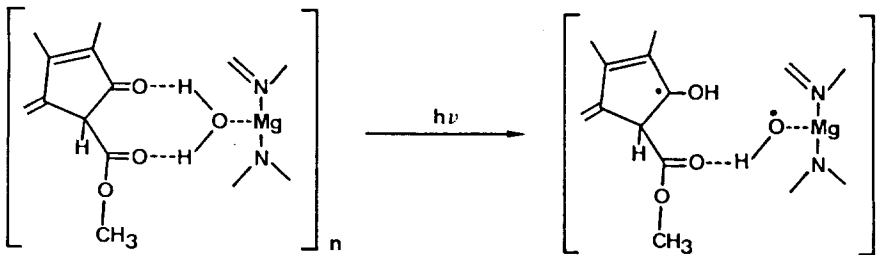
Seit Anfang der sechziger Jahre befasst sich J. J. Katz am Argonne National Laboratory, Argonne, Illinois USA, mit der Spektroskopie von Chlorophyllen und ihren Derivaten. Bis 1966 sind die Arbeiten über IR- und NMR-Spektroskopie im Buch von L. P. Vernon und G. R. Seely: "The Chlorophylls"⁴⁵⁾ ausführlich resümiert. Bis zu dieser Zeit erschienen keine Arbeiten, in welchen Strukturen für Chlorophylle in biologischen Systemen vorgeschlagen wurden. 1973 publizierte Katz einen Ueberichtsartikel mit den Hypothesen zur Struktur des Antennenchlorophylls und des Reaktionszentrums, wobei die spektroskopischen Ergebnisse, die dazu führten, angegeben wurden⁴⁶⁾.

Im IR-Spektrum erscheinen die Carbonylschwingungen von Chlorophyll a je nach Konzentration, Lösungsmitteln und möglichen Liganden an bestimmten Stellen mit unterschiedlicher Intensität. Es wurde möglich, eine Absorption bei 1660 cm^{-1} von wasserfreiem Chlorophyll in Hexadekan einer $\text{C}=\text{O}\cdots\text{Mg}$ -Aggregation zuzuordnen³⁹⁾. Das zugehörige UV/VIS-Spektrum zeigte ein Rotmaximum bei 673 nm. Aus Modellen ist ersichtlich, dass die Ringebenen nicht parallel liegen können und somit keine grössere Rotverschiebung aufweisen. Diese Erklärung basierte auf der Exiton-Theorie von Kasha⁴⁷⁾.

Im Gegensatz dazu weisen Chlorophyll-Wasser-Addukte eine starke Rot-Verschiebung nach 743 nm auf. Dieses kann nur durch eine parallele Lage der Ringebenen erklärt werden: $(\text{Chl}-\text{H}_2\text{O})_n$.

Für Chlorophyll *in vivo*, welches bei 673-675 nm absorbiert, wurde ein Chlorophyll-Oligomer vorgeschlagen, das aus (Chl-Chl)-Dimeren besteht, mit einer gelegentlichen $(\text{Chl}-\text{H}_2\text{O}-\text{Chl})$ -Brücke, welche die Oligomeren zusammenhält. Katz schlägt also an dieser Stelle ³⁹⁾ ein Modell für ein Antennenchlorophyll vor.

1968 konnten Katz et al. ⁴⁸⁾ in Chlorophyll-Wasser-Addukten (in Dodekan) ein licht-induziertes ESR-Signal mit einer Linienbreite von 1 Gauss ($g = 2,0025$) nachweisen. Dieses war das einzige Signal, welches durch rotes Licht erzeugt werden konnte. Quantitative Betrachtungen zeigen, dass das ungepaarte Elektron über wenigstens 100 Chlorophyllmoleküle delokalisiert sein muss, um diese Linienbreite zu erreichen. 1969 stellten Katz et al. ⁴⁹⁾ fest, dass die Chlorophyll-Wasser-Mizellen nicht in signifikanter Konzentration in Pflanzen vorkommen können. Aus der Kenntnis, dass die langwelligsten Absorptionsbanden in grünen Pflanzen bei 700-710 nm auftreten, wurde vorgeschlagen, eine Chlorophyll-Chlorophyll-Einheit (zusammengehalten durch $\text{C}=\text{O} \cdots \text{Mg}$ -Interaktion), in welchen gelegentlich Wasser eingeschlossen ist, sollte ein Modell für das P700 darstellen. Bei der Belichtung sollten sich dem Modell nach ein Chlorophyll-Kationradikal und ein Chlorophyll-Anionradikal folgender Struktur bilden:



Eingehende IR-Studien über Chlorophyll-Wasser-Wechselwirkungen ⁴³⁾ führten zu Strukturmodellen für Chlorophyll-Dimere und -Oligomere. Beide Strukturen sind auch mit den Ueberlappungsvorstellungen der Ringe, welche aus NMR-Untersuchungen ⁴⁵⁾ gewonnen wurden, vereinbar.

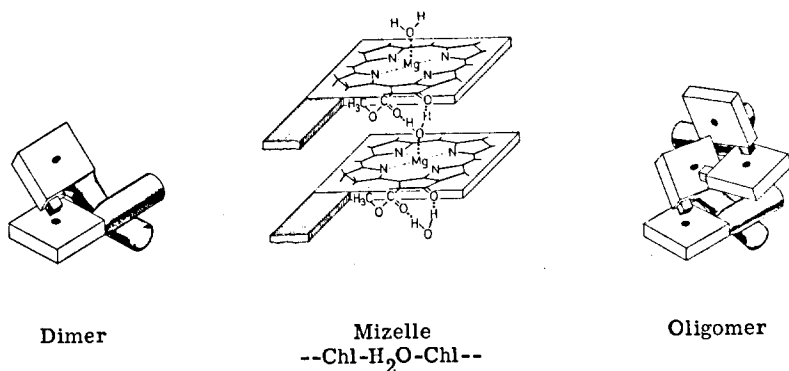
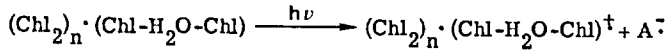


Fig. 3

Diese Strukturmodelle wurden 1972 durch die Ergebnisse aus ¹³C-NMR-Untersuchungen untermauert⁵⁰⁾. Beim Auftreten von Dimeren in Tetrachlorkohlenstoff erscheint das Signal des C-9 als ein schlecht definierter Hügel. Die Zugabe von Tetrahydrofuran als Liganden bewirkte ein um 2,42 ppm nach höheren Feld verschobenes, scharfes Signal. Die Lage der C-9-Resonanz wird im Dimer (Chl)₂ durch zwei sich überlagernde Effekte bestimmt: Eine Verschiebung nach höherem Feld durch den Ringstrom und eine Verschiebung nach tieferem Feld durch die C=O...Mg-Koordination, wobei letztere dominiert. Modellexperimente mit Cyclopentanon und Cyclohexanon mit Magnesiumhexafluoroacetylacetonat zeigen, dass die Ketonkohlenstoffresonanz durch die Koordination mit Magnesium um 6,5-8,7 ppm nach tieferem Feld verschoben werden kann.

1971 wurden chemisch erzeugte ESR-Signale von Chlorophyll-Monomeren, -Dimeren und -Oligomeren gemessen³²⁾. Alle diese Signale haben eine deutlich höhere Linienbreite (9-11 Gauss) als das Signal von P700 (7 Gauss). Nur das oben schon erwähnte Chlorophyll-Wasser-Oligomer wies eine Linienbreite von 1-2 Gauss auf. Zum Vergleich wurden Signale in mehreren, auch deuterierten Organismen gemessen. Um auf die gewünschten 7 Gauss zu kommen, musste man eine Kombination von Teilchen mit einer Linienbreite von 9-11 G und Chlorophyll-Wasser-Mizellen finden. Kasha-McRae-Betrachtungen (Exiton-Wechselwirkungen), beruhend auf dem 743 nm-Maximum von (Chl-H₂O)_n-Mizellen und dem 663 nm-Maximum von monomeren Chlorophyll (Chl-L), sagen für das Teilchen (Chl-H₂O-Chl) eine Absorption bei 700 nm voraus. Diese Voraussage gilt für alle Liganden L, wenn sie die beiden Chlorophyllringe in einer bestimmten Geometrie zueinander halten können. Ausser Wasser wurde noch kein anderer Ligand mit dieser Fähigkeit gefunden.

Man erhält nun das zur Zeit gültige Modell für die Struktur des P700 und des Antennenchlorophylls:



Diese Struktur ist nur möglich, wenn die Menge von Wasser in der nächsten Umgebung dieser Einheiten strikt limitiert ist.

ENDOR-Messungen in vivo ⁵¹⁾ unterstützen die Hypothese, da die Resultate mit einer Delokalisierung des ungepaarten Elektrons über zwei Chlorophyllmoleküle vereinbar sind.

Das ESR-Signal von oxidiertem Chlorophyll in vitro ist heute unbestritten ein π -Kationradikal. Aus den identischen ESR-Spektren von Chlorophyll mit ²⁴Mg und ²⁵Mg kann abgeleitet werden, dass in vitro der freie ungepaarte Elektronenspin sehr wenig Magnesium-s-Charakter aufweist ⁵²⁾.

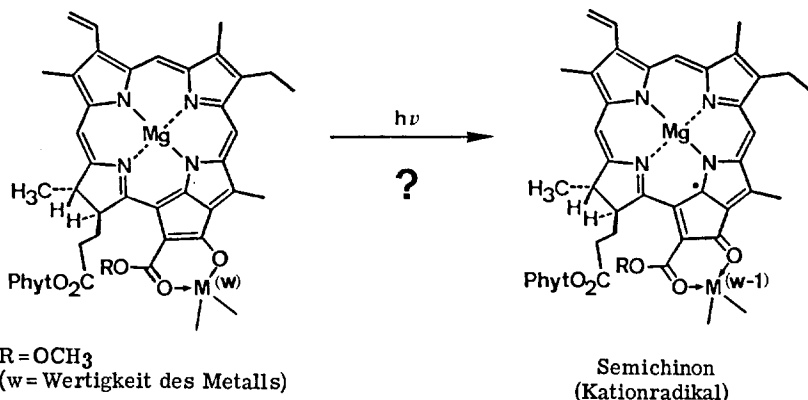
Der Vorschlag von Katz et al. ⁴⁹⁾, dass bei der Oxidation des P700 ein Chlorophyll-Anionradikal entsteht, scheint nicht richtig zu sein. Schon 1965 hatten Arnon et al. ⁵³⁾ ein Ferredoxin als einen möglichen Kandidaten für den primären Akzeptor postuliert. Neuere Untersuchungen scheinen diese Annahme zu bestätigen. Ke ¹⁷⁾ bezeichnet diese Spezies als P430, weil er glaubt, dass die Absorption bei 430 nm im P700 Differenzspektrum vom primären Akzeptor herrührt.

	P700	Chl · H ₂ O	Hypothetisches "P700" (Chl · H ₂ O · Chl)	(Chl · H ₂ O) _n
Absorption	700 [±] 5 nm	663 nm	→ "700 nm" ←	743 nm
ESR-Signal	7 Gauss	9 Gauss	→ "7 Gauss" ←	1-2 Gauss

Tab. 1

1. 2. 2. 3. Eine neue Frage zur Struktur von P700

Ausgehend von der im Zusammenhang mit der Totalsynthese von Vitamin B₁₂ entwickelten photochemischen Secocorrin \rightarrow Corrin-Cycloisomerisierung⁵⁴ ist an unserem Laboratorium die Frage aufgeworfen worden, ob P700 ein Derivat des enolisierten Chlorophylls a sein könnte.



Der Anreiz, diese Frage experimentell zu verfolgen, sie durch die Synthese von Modellverbindungen und die Untersuchung von deren chemischen und physikalischen Eigenschaften zu fundieren, kam aus folgenden Ueberlegungen:

- 1) Wenn P700 ein Enolchelat von Chlorophyll a wäre, würde trotzdem bei der Extraktion des Chlorophylls aus der natürlichen Umgebung nur Chlorophyll a isoliert, da in vitro bei Chlorophyllen das Tautomerengleichgewicht ganz auf der Seite der Ketoform liegt.
- 2) Ein Enolderivat dürfte sehr wohl gegenüber Chlorophyll a eine bathochrome Verschiebung der Rotbande aufweisen, wie dies für P700 charakteristisch ist.
- 3) Im Unterschied zum Chlorinligandensystem stellt ein Chlorinenolderivat eine typische hydrochinoide/chinoide Redoxstruktur dar. P700 erfüllt die Funktion eines Redoxsystems.
- 4) Für Enolderivate des Chlorophylls a dürfte sehr wohl ein gegenüber Chlorophyll a tiefer liegendes Oxidationspotential zu erwarten sein. Das Oxidationspotential von P700 liegt im Vergleich zu Chlorophyll a bei einem weniger positiven Wert.
- 5) Das Vorliegen einer Enolstruktur am Chlorinsystem schafft die Möglichkeit einer Elektronentransferreaktion in der π -Ebene des porphyrinoiden Ligandensystems.

Damit bestünden für ein solches System zwei orthogonal zueinander liegende Reaktionsrichtungen, was eine Vorstellung über die Funktionsweise von P700 erleichtert.

- 6) Ein enolisiertes Chlorophyll a bietet die Möglichkeit einer kovalenten Verknüpfung mit einem Akzeptor bzw. Donor via Chelierung der Enolgruppe mit einem externen Ligandsystem.

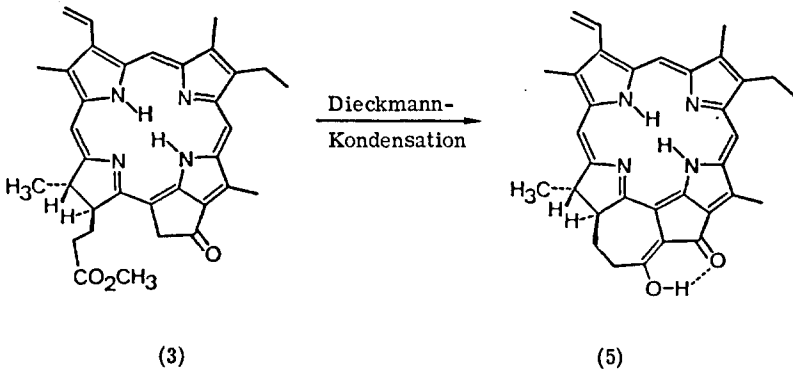
In Anbetracht dieser Perspektiven wurden anfangs 1970 in unserem Laboratorium Versuche zur Herstellung einer stabilen Enolform von Chlorophyll a-Derivaten aufgenommen, mit dem Ziel, die chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser bisher unbekanntem Chlorophyllderivate im Hinblick auf die oben erwähnte Frage systematisch zu untersuchen. Sämtliche bis anhin veröffentlichten Hypothesen zur Struktur von P700 nehmen ein nicht enolisertes Chlorophyll a in einer "speziellen Umgebung" an. Es ist jedoch unbewiesen, dass diese sog. "spezielle Umgebung" nicht auch eine "spezielle Konstitution" bedeuten könnte. Diese Frage muss ernsthaft aufgeworfen werden. Aus chemischer Sicht ist es ohnehin nicht leicht, sich mit der Hypothese abzufinden, dass die für das Leben wichtigste Funktion, die Umwandlung der Sonnenenergie in chemische Energie, allein durch die "spezielle Umgebung" eines Chlorophyllmoleküles bedingt sein könnte.

Es ist klar, dass Modelluntersuchungen niemals für den natürlichen Mechanismus beweisend sein werden. Sie können jedoch neue Schwerpunkte zur Erforschung der biologischen Systeme setzen. Zur Zeit werden an unserem Laboratorium von E. Walter ⁵⁵⁾ Reaktionszentren von photosynthetisch aktiven Bakterien untersucht.

1. 3. KONZEPT ZUR SYNTHESE VON STABILEN CHLOROPHYLLENOLDERIVATEN

Isolierbare Enolformen von Chlorophyllderivaten waren bis anhin unbekannt. Es ist wohl möglich, durch Deprotonierung ein Enolat in situ herzustellen. Ausser UV/VIS-Spektren sind jedoch keine weiteren Untersuchungsergebnisse bekannt. Eine genaue Betrachtung dieser Spektren ergab keinen Hinweis auf eine mögliche Verwandtschaft des Enolats mit P700. Ueber die Metallchelate dieser Enolformen wurde in der Literatur nichts gefunden.

In neutraler Umgebung liegen Chlorophyllderivate mit einem β -Ketoestersystem am isocyclischen Ring ausschliesslich in der Ketoform vor. Ein β -Diketon hat i. allg. eine grössere Tendenz als Enol vorzuliegen als ein β -Ketoester. Als elegante Lösung bot sich deshalb die Kondensation von Methyl-pyrophäophorbid a (3) zu einem β -Diketon an:



Da die Handhabung von Chlorophyllderivaten, welche Magnesium als Zentralatom enthalten, sehr heikel und aufwendig ist, sollten primär alle Strukturänderungen an den metallfreien Analoga ausgeführt werden, zumal uns eine beträchtliche Menge eines dekomplexierten Pflanzenextraktes zur Verfügung stand. Es ist deshalb auch notwendig, eine gute Magnesiumeinbaumethode zu finden, um als jeweils letzte Stufe die Produkte wieder zu komplexieren.

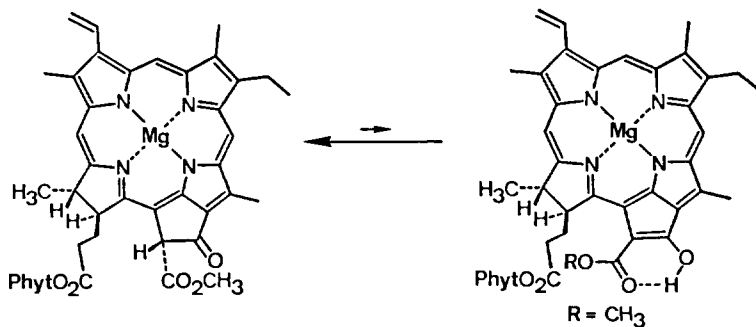
Des weiteren wurde geplant, definierte Enolchelate mit bestimmten Metallen herzustellen und ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften im Hinblick auf die P700-Hypothese zu prüfen. Das Ziel davon ist es, ein durch Licht reversibel ausbleichbares Komplexsystem zu finden.

Ausser Chlorophyll a interessierten uns auch die andern natürlichen Chlorophyllderivate, insbesondere Bakteriochlorophyll. Um einen möglichst umfassenden Einblick in die Chemie der "Enole" zu gewinnen, wurde die Synthese dieser Modellverbindungen auch in der 2-Desvinyl-2-acetyl-chlorophyll a-, der Chlorophyll b-, der Chlorophyll d- und der Bakteriochlorophyll-Reihe geplant.

1. 4. SYNTHESE DER METALLFREIEN MODELLVERBINDUNGEN

1. 4. 1. Keto-Enol-Gleichgewichte

1936 wies H. Fischer ⁵⁶⁾ mit der Zerewitinoff-Reaktion "aktiven" Wasserstoff in einer Reihe von Chlorophyllderivaten nach. Später wurde es möglich, mit Hilfe der IR- und NMR-Spektroskopie durch Deuteriumaustauschexperimente die Position dieses Wasserstoffs festzulegen ⁵⁷⁾. Man stellte ausserdem fest, dass auch das δ -Proton ausgetauscht werden kann, dieses jedoch ca. 100 mal langsamer. Die Verwendung von basischen Lösungsmitteln oder die Zugabe von wenig Säure begünstigte einen schnellen Austausch. Auf Grund dieser Beobachtungen wurde das Vorliegen einer Enolform postuliert:



Bei einer Modellverbindung (2-Carbäthoxy-cyclopentanon) wurde unter gleichen Bedingungen ein vergleichbar schneller Austausch des Protons bei der Zugabe von Deuteromethanol gefunden ⁵⁷⁾.

Hydroxylische Protonen tauschen im allgemeinen sofort aus, wenn sie in Kontakt mit deuterierten Alkoholen gebracht werden. Ein Enol-Proton sollte demzufolge ebenfalls sehr schnell austauschen. In allen untersuchten Chlorophyll-Derivaten, auch mit einem grossen Ueberschuss an Deuteromethanol, wurde jedoch immer nur ein relativ langsamer Austausch beobachtet ⁵⁸⁾.

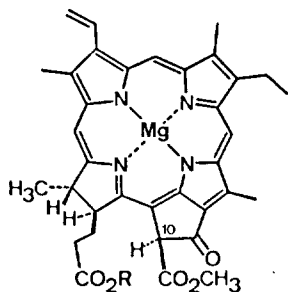
Austauschexperimente mit Pyrochlorophyllen verliefen negativ ⁵⁸⁾. Dieser Befund ist vernünftig interpretierbar, da Ketogruppen viel weniger leicht enolisierbar sind als β -Ketoester.

Das Vorliegen einer messbaren Menge Enolform in apolaren Lösungsmitteln (Aggregation) kann mit grosser Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da die Lösungs-

mittelabhängigkeiten der IR-Spektren in der Carbonylregion von Chlorophyll und Purochlorophyll sehr ähnlich sind ⁵⁸⁾.

Ueber die Struktur von Chlorophyll a' und b'

1973 veröffentlichte P. H. Hynninen ⁵⁹⁾ eine Arbeit, in welcher für die Chlorophylle a' und b' eine Enol-Struktur postuliert wurde. Er diskutierte ausführlich, weshalb diese Chlorophylle nicht C-10-Epimere sein können, wie das J. J. Katz et al. ⁶⁰⁾ 1968 auf Grund von NMR-Studien vorgeschlagen hatten.

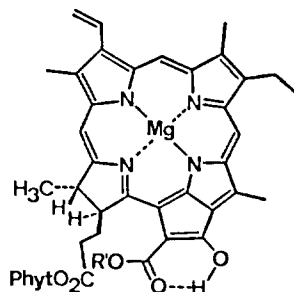


R = Phyt

Chlorophyll a' ?

(= 10-epi-Chlorophyll a)

oder



R' = CH₃

Chlorophyll a' ?

Chlorophyll a' und b' scheinen in der Natur nicht vorzukommen. Sie entstehen jedoch, wenn die Chlorophylle in Lösung stehen gelassen werden. Beim Erhitzen solcher Lösungen in Pyridin (100°C) während 20-30 Minuten bilden sich die Epimere zu 15-20%. Die Trennung geschieht durch eine Chromatographie an Puderzucker bei 0°C ⁶⁰⁾.

Argumente von P. H. Hynninen ⁵⁹⁾

- 1) Chlorophyll a' und b' sind in apolaren Lösungsmitteln besser löslich als Chlorophyll a und b, was durch die chelierte Enolform erklärt werden könne. Epimere sollten hingegen sehr ähnliches Löslichkeitsverhalten aufweisen und auch nicht so leicht an Puderzucker getrennt werden können.
- 2) Das VIS-Spektrum von Chlorophyll a' weicht deutlich von jenem von Chlorophyll a ab (Chl a: 660,5 nm; Chl a': 661,0 nm in Aether). Epimere sollten keinen Unterschied zeigen.

- 3) Chlorophyll a' hat eine grössere Tendenz, Magnesium zu verlieren. Das deutet auf eine "elektronische Umstrukturierung" dieses Derivates hin.
- 4) Der elektronenanziehende Effekt der Formylgruppe im Chlorophyll b' wirke dem Effekt der Enolisierung entgegen, sodass die Identität der VIS-Spektren von Chlorophyll b und b' nicht im Widerspruch zur Hypothese stehe.
- 5) Das austauschbare Proton am C-10 unterstütze die Enol-Hypothese.
- 6) Die Verwandtschaft zwischen Epimerisierung und Enolisierung sei ein wohlbekanntes Phänomen, z. B. in der Zuckerchemie.
- 7) Das wahrscheinlichste Zwischenprodukt bei der Bildung einiger Chlorophyllderivate (10-Alkoxy-Lakton, Chlorin e₆) sei das Enolat-Ion. Angenommen, das Zwischenprodukt sei ein C-10-Epimer, dann wäre die Labilität des Ringes V gegenüber Oxygenierung und Solvolyse schwieriger zu verstehen.
- 8) Chlorophyll a' und b' wurden bei der Flüssig-Flüssig-Verteilung nie gefunden. Dies sei nicht wegen einer schlechten Trennwirkung dieser Methode, sondern weil die chelierte Enolform in der unteren, stark polaren Phase des Lösungsmittelsystems instabil sei, d. h. vorhandene Enolform sofort mit Sauerstoff und Alkohol allomerisiert werde.

Argumente von J. J. Katz et al.⁶⁰⁾

- 1) Im NMR-Spektrum unterscheiden sich die Signale des Protons am C-10 von Chlorophyll a und a' je nach Lösungsmittel um 10-14 Hz. Dieser Befund steht im Einklang mit der Beobachtung, dass in Pyrochlorophyll a die beiden Protonen am C-10 Anlass zu einem AB-System geben mit einem Unterschied der chemischen Verschiebung von 15 Hz (in THF-d₈).
- 2) Das Signal des C-10-Methylesters von Chlorophyll a' wurde neben dem von Chlorophyll a mit einer Verschiebung um 8 Hz nach höherem Feld gefunden. In einer Lösung von reinem Chlorophyll a bildete sich dieses Signal mit derselben Geschwindigkeit wie das des C-10-Protons von Chlorophyll a'.
- 3) Ein Deuteriumaustausch der beiden isomeren C-10-Protonen verlief ungefähr gleich langsam, was die Wahrscheinlichkeit, dass eine der Substanzen in der Enolform vorliegt, sehr klein macht.
- 4) H. H. Inhoffen et al.⁶¹⁾ beschrieben die Herstellung und spektroskopischen Eigenschaften epimerer 10-Methoxy-methyl-phäophorbide. Die UV/VIS-Spektren zeigten bei der Rot- und Soretbande Differenzen der Maxima von 1-2 nm.

Die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der C-10-Methoxy-Protonen im NMR-Spektrum betragen 14 Hz, die der C-10-Carbomethoxy-Protonen 5 Hz. Die daraus hergestellten Pyroderivate (Carbomethoxygruppe unter Isomerisierung abgespalten, Identifizierung der aufgetrennten Epimeren mittels ORD- und NMR-Spektroskopie) unterschieden sich im UV/VIS-Spektrum nur noch in der Soretbande um 2 nm. Die C-10-Protonen zeigten Unterschiede von 23 Hz, die C-10-Methoxy-Protonen von 18 Hz.

Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Synthesen von Enol a (5), Enol b (22) sowie von Magnesium-enol a (33), deren Struktur nicht angezweifelt werden kann, gibt uns die Möglichkeit, die Argumente von Hynninen⁵⁹⁾ zu entkräften. Die Enolisierung bewirkt eine Verschiebung der Rotbande im UV/VIS-Spektrum um 21 nm, und das Auftreten eines Signals im NMR-Spektrum bei 12,9 ppm (Enol-Proton), welches bei der Zugabe von Deuteromethanol sehr schnell verschwindet.

Zusammenfassend kann gesagt werden:

- 1) Chlorophyll a' und b' sind sicher keine Enolformen von Chlorophyll a und b.
- 2) Die Hypothese von Katz et al.⁶⁰⁾, wonach es sich bei diesen Verbindungen um Epimere der natürlichen Chlorophylle a und b handeln soll, wird durch alle experimentellen Daten unterstützt.

1. 4. 2. Enolderivate der Chlorophyll a-Reihe

1970 begann Dr. G. Hoornaert ⁶²⁾ mit der Herstellung der Ausgangsverbindungen zur Synthese von Enol a (5). Nach vielen Misserfolgen gelang es ihm, im Dezember das erste stabile Chlorophyllenolderivat kristallin darzustellen. Vor seiner Abreise im Januar 1971 weihte er seinen Nachfolger Dr. H. Falk ⁶³⁾ in die Geheimnisse der Chlorophyllchemie und besonders der Enolsynthese ein. Im Folgenden gelang es H. Falk ⁶³⁾, die Methode für die präparativ befriedigende Darstellung von Enol a (5) zu optimieren. Zu Ostern 1971 kam für mich der Moment, in das interessante und vielversprechende Gebiet einzusteigen. Inzwischen war auch J. L. Luisier ⁶⁴⁾ zu der "grünen Gruppe" gestossen, der sich im Rahmen seiner Dissertation vor allem mit physikalisch-chemischen Messungen der Enolderivate beschäftigen sollte.

In der vorliegenden Arbeit sind die Ergebnisse von Dr. G. Hoornaert ⁶²⁾ und Dr. H. Falk ⁶³⁾ zum grössten Teil einbezogen.

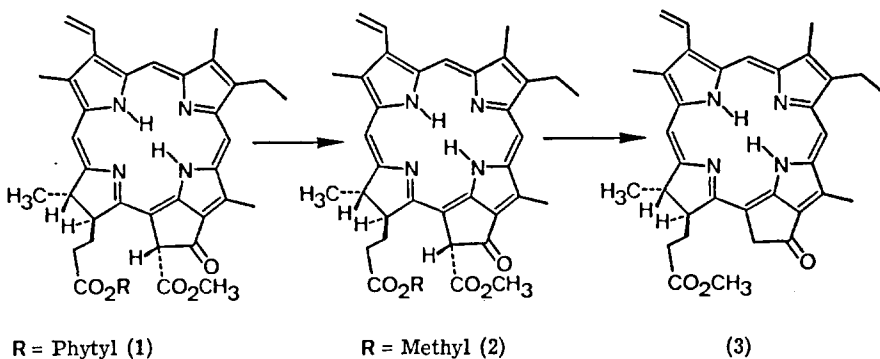
Ausgangsmaterial für alle unsere Produkte (ausser Bakteriochlorophylle) war ein Phäophytin-Gemisch, hergestellt von der Fa. Sandoz AG, welches uns von H. H. Inhoffen *) zur Verfügung gestellt worden war. Durch eine Chromatographie an Kieselgel konnte scheinbar reines Phäophytin a (1) erhalten werden. Wie es sich später bei der Einführung von Magnesium herausstellte, war das Material mit 10-20% einer farblosen Substanz verunreinigt. Das störte primär nicht, da das amorphe Phäophytin a (1) durch Umesterung mit methanolischer Schwefelsäure in das leicht kristallisierbare Methyl-phäophorbid a (2) überführt wurde, wobei die Verunreinigung zusammen mit dem abgespaltenen Phytol (oder Phytylmethyläther) in der Mutterlauge verblieben. (Vor kurzem gelang es der Gruppe von G. W. Kenner ⁶⁵⁾, Phäophytin a (1) aus Methylenchlorid/Methanol zu kristallisieren.)

Methyl-phäophorbid a (2) wurde in 85%-iger Ausbeute zum Methyl-pyrophäophorbid a (3) abgebaut, indem man es 4 Tage in Pyridin im Bombenrohr auf 100°C erhitzte. (G. W. Kenner et al. ⁶⁵⁾ erzielten eine Ausbeute von 91%, indem (2) in Collidin während 90 Minuten auf 190-200°C erhitzt wurde.)

Die UV/VIS-Spektren der beiden Methylester (2) und (3) waren nicht unterscheidbar. Auch im IR-Spektrum ist die einzige signifikante Aenderung bei der Estercarbonyl-Bande ($\sim 1735 \text{ cm}^{-1}$) zu finden, welche nach der Pyrolyse nur noch etwa halb so gross wie vorher erscheint.

*) Herrn Prof. H. H. Inhoffen danke ich für das grosszügige Geschenk.

Deutlich unterscheiden sich die beiden Produkte im NMR-Spektrum: Das Signal des Protons am C-10 bei 6,21 ppm verschwindet, dafür entsteht ein AB-System (2 Protonen am C-10) bei 5,03 und 5,17 ppm. Ausserdem verschwindet das scharfe Singlett des β -Ketomethylesters. In jüngster Zeit gelang es Dr. J. Schreiber aus unserem Laboratorium, die beiden Derivate (2) und (3) mittels Hochdruckchromatographie zu trennen.

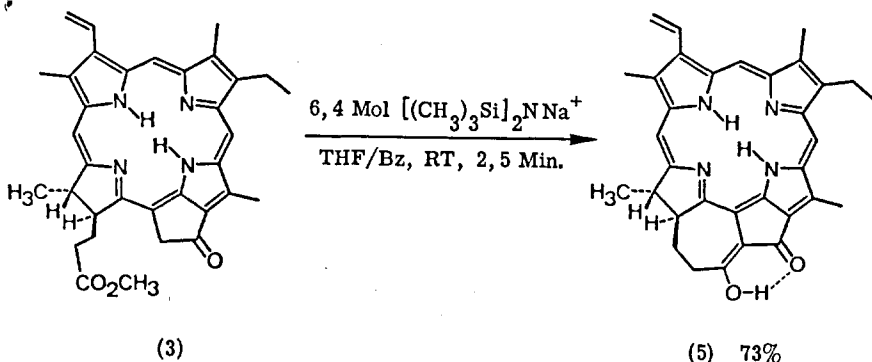


Methyl-pyrphäophorbid a (3) sollte nun durch eine Dieckmann-Kondensation in das gewünschte β -Diketon (5) überführt werden. Anhand von Dreiding-Modellen konnte man annehmen, dass die Ringspannung im Produkt eine Kondensation nicht verhindert. Zahlreiche Versuche von G. Hoornaert⁶²⁾ blieben erfolglos (vgl. Kap. 2.1.5.). Der Durchbruch gelang ihm erst, als er eine spezielle Base, Natriumhexamethyldisilazanat, verwendete.

Durch die Kenntnis über die Allomerisierung von Phäophorbiden in basischem Milieu wurde mit Recht angenommen, dass das β -Diketonsystem, welches ja eine aktivierte C-10-Position aufweist, sehr leicht durch Sauerstoff angegriffen wird. Wie es sich dann zeigte, war es unumgänglich, die Kondensationsreaktion unter striktem Ausschluss von Sauerstoff auszuführen.

Einer konzentrierten Lösung von Methyl-pyrphäophorbid a (3) in abs. Tetrahydrofuran wurden 6-7 Moläquivalente einer 0,2-molaren Lösung von Natriumhexamethyldisilazanat in abs. Benzol mittels einer Spritze zugegeben. Die Menge der so zugespritzten Base richtet sich nach einem charakteristischen Farbumschlag des Reaktionsgemisches. Die zuerst dunkelgraue Lösung färbte sich nach wenigen Tropfen Base schön grün. Beim weiteren Zugeben trat langsam eine braune Farbe auf.

Beendet war die Reaktion, wenn die Lösung schmutziggelb war. Nun wurde sofort aufgearbeitet. Vom Beginn der Basenzugabe bis zum Farbumschlag verstrichen ca. 2, 5 Minuten.

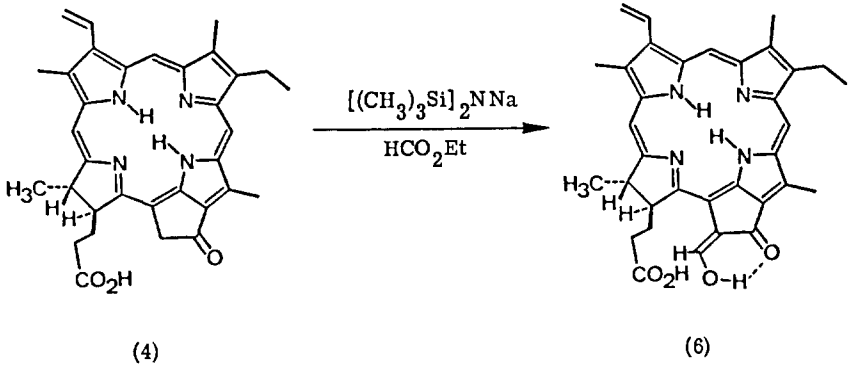


In einem Scheidetrichter wurde ein Gemisch von Methylenechlorid und Dihydrogenphosphatlösung bei 0°C mit Stickstoff gut gespült. Das Reaktionsgemisch überführte man nun so schnell wie möglich in diese vorbereitete Mischung und schüttelte intensiv. Dabei änderte sich die schmutziggelbe Farbe innert weniger Sekunden nach grün. Diese Farbänderung machte die erfolgreiche Protonierung des im Reaktionsgemisch vorgelegenen Enolats sichtbar. Von diesem Moment an war auch die Gefahr einer Allomerisierung weitgehend gebannt. Nach einer speziellen Filtration (Kieselgel + Cellulose) gelang es, Enol a (5) in einer Ausbeute von 73% bez. Methyl-pyrophosphorbid a (3) aus Benzol zu kristallisieren.

Die Struktur von Enol a (5) kann nicht angezweifelt werden (IR-Spektrum: Carbonylschwingung bei 1656 cm^{-1} , NMR-Spektrum: Resonanz des Enol-Protons: 12,9 ppm, UV/VIS-Spektrum: bathochrome Verschiebung um 21 nm bez. (3), MS: Molekularpik bei 516(59%), Phasentest: positiv). Die Details des Strukturbeweises, sowie die chemischen und physikalischen Eigenschaften findet man im Experimentellen Teil (Kap. 2.1.5.).

Das erste Arbeitskonzept zur Synthese von Enolen beinhaltet auch die Herstellung des β -Ketoaldehyds (6), welcher ebenfalls bevorzugt in der Enolform vorliegen sollte. Dazu kondensierte man Aethylformiat unter analogen Bedingungen an Pyrophosphorbid a (4). Um die intramolekulare Kondensation zu verhindern, wurde der Propionsäureester zuvor verseift. Obwohl die Reaktion ebensogut wie bei der

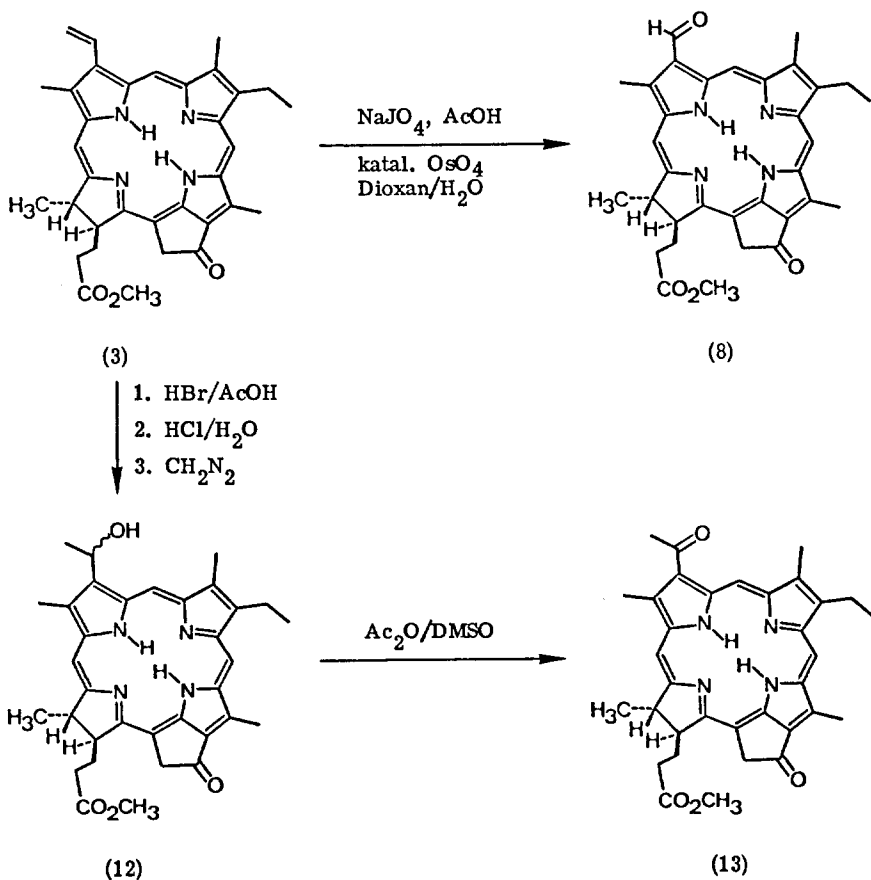
Herstellung von Enol a (5) verlief (UV/VIS-Spektroskopie), gelang es nicht "10-Formyl-enol a" (6) rein zu kristallisieren, was möglicherweise durch einen kleinen Anteil Aldehydform bedingt ist (UV/VIS-Spektrum: das auf DC-Platten abgetrennte Nebenprodukt wies kein typisches Allomer-Spektrum auf, NMR-Spektrum: der Anteil dieses Nebenproduktes war für eine schlüssige Betrachtung zu klein). Die UV/VIS-Spektren von Enol a (5) und "Formyl-enol a" (6) weisen denselben, für die Enolderivate charakteristischen Spektraltyp auf.



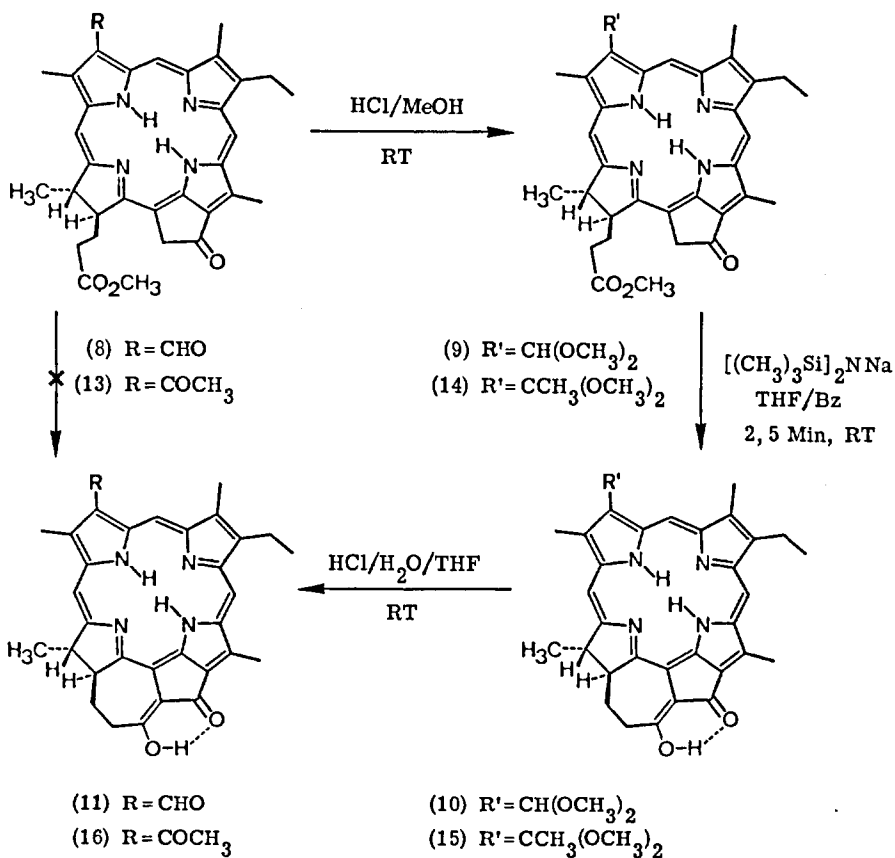
1. 4. 3. Enolderivate der Chlorophyll d- und der 2-Desvinyl-2-acetyl-chlorophyll a-Reihe

Die Ausgangsverbindung zur Synthese von Enol d (11), Methyl-pyrophäophorbid d (8), wurde durch Oxidation der Vinylgruppe von Methyl-pyrophäophorbid a (3) mit Natriumperjodat unter Osmiumtetroxidkatalyse hergestellt.

2-Desvinyl-2-acetyl-methyl-pyrophäophorbid a (13) stellte man durch Oxidation der 2(α -hydroxy)äthyl-Verbindung (12) mit Acetanhydrid und Dimethylsulfoxid her⁶⁶. Zum Hydroxy-Derivat gelangte man durch eine HBr-Anlagerung an die Vinylgruppe von Methyl-pyrophäophorbid a (3) und nachfolgender Substitution mit OH⁻⁶⁷.



In beiden Reihen (d und 2-Acetyl) war es nun nicht möglich, die Enole direkt auf die bekannte Art und Weise herzustellen. Diesbezügliche Versuche führten höchstens zu Spuren der gewünschten Produkte. Ein Ausweg wurde gefunden, indem man die Keto- bzw. Aldehydgruppe durch Ketalisierung bzw. Acetalisierung schützte.



Mit den geschützten Pyro-Derivaten konnte die Kondensation wie in der Chlorophyll a-Reihe ohne Schwierigkeiten realisiert werden. Auch die nachfolgende Hydrolyse zu den Enolen (11) und (16) verlief ohne Komplikationen.

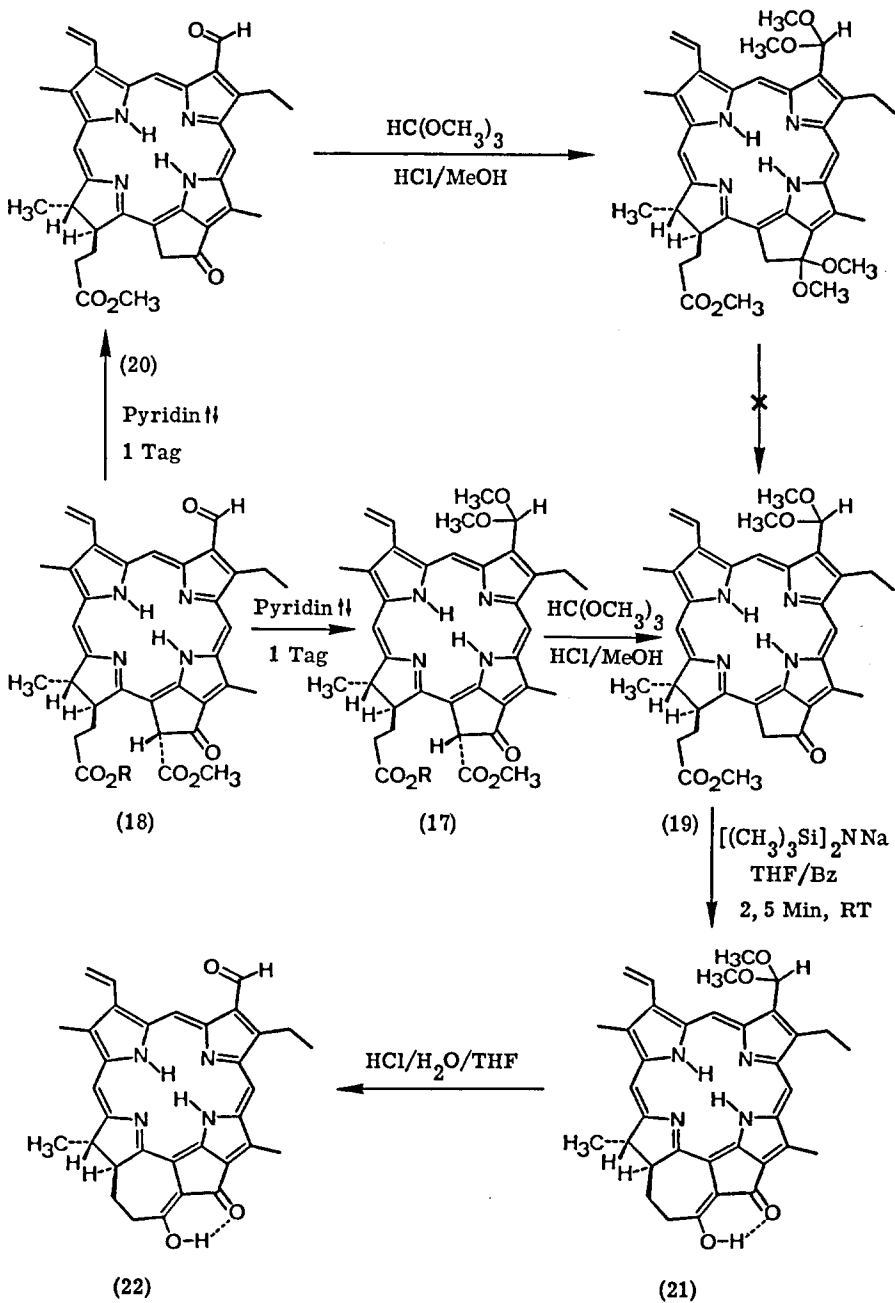
1. 4. 4. Enolderivate der Chlorophyll b-Reihe

Die Chromatographie des ursprünglichen Phäophytingemisches lieferte wohl Phäophytin a (1) in spektroskopisch reiner Form, nicht aber reines Phäophytin b. Da sich unser Interesse nur auf die Methylester konzentrierte, wurden die b-Fraktionen direkt mit Schwefelsäure in Methanol umgeestert. Um nun Methyl-phäophorbid b (18) gut von den allomeren a-Derivaten abtrennen zu können, wurde die Aldehydfunktion mit Orthoameisensäuretrimethylester in das Dimethylacetal (17) umgewandelt. Dieses Produkt (17) wies nun den grössten Rf-Wert auf und konnte an Kieselgel gereinigt werden. Nach der quantitativen Hydrolyse der Schutzgruppe liess sich Methyl-phäophorbid b (18) leicht aus Aceton kristallisieren.

Zur Herstellung des Pyro-Derivates kochte man das Acetal (17) einen Tag in Pyridin. Aus Vorversuchen konnte man annehmen, dass die Pyrolyse des Acetals (17) weniger Nebenprodukte zu Folge hatte, als die des ungeschützten Phäophorbids (18). (Vor kurzem beschrieb G. W. Kenner ⁶⁵ die Pyrolyse von Methyl-phäophorbid b. Anstelle von Pyridin wurde Collidin verwendet, wobei eine Ausbeute von 83% (20) erzielt wurde.)

Der entscheidende Grund für uns, das Acetal (17) zu pyrolisieren, lag darin, dass zur Synthese des Enols (22) das Pyro-Derivat mit geschützter Aldehydfunktion verwendet werden musste. Nun war es aber nicht mehr möglich, Methyl-pyrophäophorbid b (20) selektiv zu acetalisieren. Die freie Ketogruppe am C-9 wies nämlich unter den gewählten Bedingungen die Fähigkeit auf, bedeutend schneller ketalisiert zu werden, als der Aldehyd am C-3 acetalisiert.

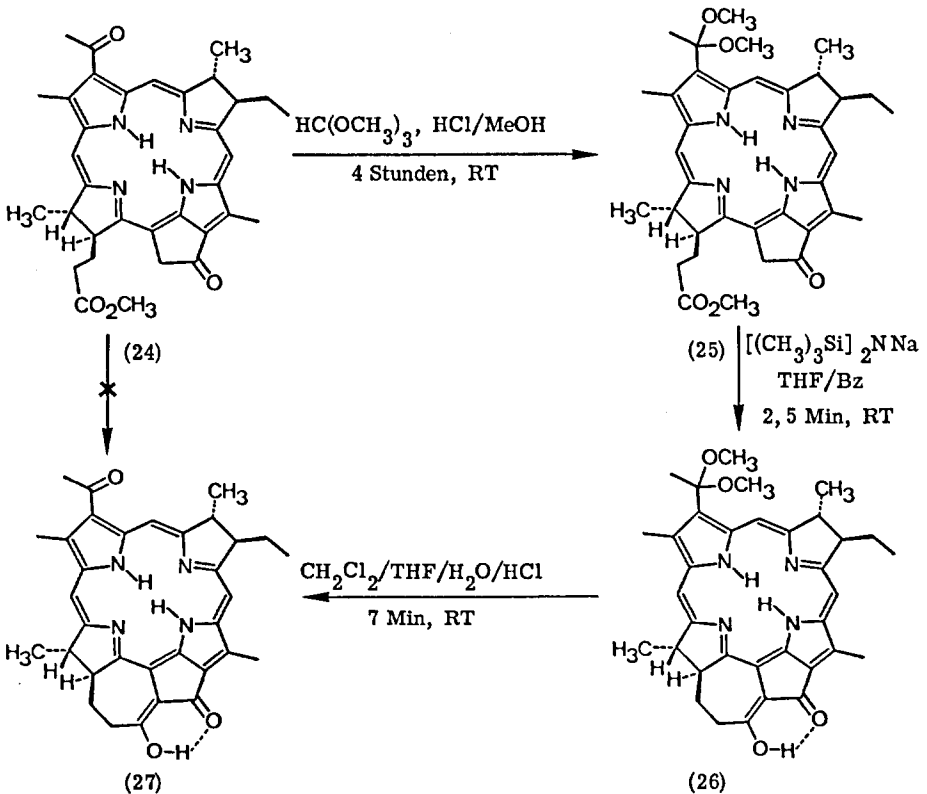
Methyl-pyrophäophorbid d-dimethylacetal (19) reagiert unter den üblichen Bedingungen zum Enol (21), welches nach der Hydrolyse Enol b (22) lieferte.



1. 4. 5. Derivate der Bakteriochlorophyll-Reihe

Ausgangsmaterial für unsere Versuche war ein Extrakt aus *Chromatium D*, welcher uns von H. Brockmann jr. *) zur Verfügung gestellt wurde. Zur Gewinnung von Bakterio-methyl-phäophorbid (23) wurde das Bakteriochlorophyll mit Methylenchlorid und 0,5 N-Salzsäure extrahiert (durch die Salzsäure wird das Magnesium entfernt → Bakterio-phäophytin), an Kieselgel chromatographiert, mit methanolischer Schwefelsäure umgeestert und anschliessend kristallisiert.

Zur Pyrolyse erhitzte man Bakterio-methyl-phäophorbid a (23) in Pyridin unter Sauerstoffausschluss im Bombenrohr während drei Tagen auf 105°C. Das so entstandene Bakterio-methyl-pyrophäophorbid (24) wurde an wenig Kieselgel chromatographiert und aus Aceton kristallisiert.



*) Wir danken Herrn Dr. H. Brockmann für das grosszügige Geschenk.

Versuche, Bakterio-Enol (27) direkt aus dem Pyro-Derivat (24) herzustellen, schlugen wie in der b-, d- und 2-Desvinyl-2-acetyl-Reihe fehl. Deshalb wurde die Acetylgruppe mit Orthoameisensäuretrimethylester und methanolischer Salzsäure katalysiert. Das Ketal (25), welches vollständig gebildet werden konnte, wurde nicht kristallisiert, sondern nach dem Trocknen am HV gleich zum entsprechenden Enol (26) kondensiert.

Der ungewöhnlich grosse Ueberschuss an Silylbase ist sehr wahrscheinlich wieder durch die kleine Eduktkonzentration bedingt. Die Cyclisierungsbedingungen sind nicht optimiert, da zu diesem Zeitpunkt unsere Substanzmengen sehr klein waren, und wir uns primär nur für die spektroskopischen Eigenschaften von Bakterio-Enol (27) interessierten.

Die Hydrolyse des Bakterio-Enol-dimethylketals (26) verlief wie gewohnt ohne Schwierigkeiten. Da im DC des Produktes ein schwacher Startfleck festgestellt wurde, chromatographierte (filtrierte ?) man es an Cellulose. Es gelang so, Bakterio-Enol (27) in einer Ausbeute von 52% (bez. Bakterio-methyl-pyrophäophorbid (24)) kristallin darzustellen.

Die physikalischen Eigenschaften der metallfreien Chlorophyllderivate werden in Kap. 1. 7. gemeinsam mit den Eigenschaften der Metallkomplexe behandelt.

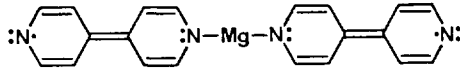
1. 5. MAGNESIUMKOMPLEXE VON CHLORINEN UND PORPHYRINEN

1. 5. 1. Publizierte Herstellungsmethoden

1. 5. 1. 1. Magnesiumchlorine

R. Willstätter und L. Forsén⁶⁸⁾ beschrieben 1913 Versuche, Magnesium in Derivate des Chlorophylls einzuführen. So wurde z. B. eine ätherische Lösung von Phäophytin a tropfenweise mit Methylmagnesiumjodid versetzt, bis eine Probe im Reagierglas beim Durchschütteln mit verdünnter Phosphorsäure eine nicht mehr olivstichige, sondern rein blaue Lösung lieferte. Dann war auch die gesamte Menge in hellgrünen Flocken ausgefallen. Man arbeitete mit Aether und wässrigem Natriumdihydrogenphosphat auf, fällte das gebildete Chlorophyll a mit Petroläther aus und trocknete es am HV bei 56°C bis zur Gewichtskonstanz. Von diesem amorphen Material wurden befriedigende Analysendaten erhalten (N, Mg, OCH₃, Phytol). H. Fischer et al.^{69) 70)} zweifelten die Qualität der von Willstätter erhaltenen Magnesiumkomplexe an und modifizierten die Einbauvorschrift. Die wesentlichste Neuerung bestand darin, dass nicht die Grignard-Lösung direkt eingesetzt wurde, sondern mit Alkohol desaktiviertes Aethylmagnesiumbromid. Die Ester- und Keto- gruppen der Chlorophyllderivate sollten von diesem Reagens nicht angegriffen werden. Das metallfreie Chlorin wurde in Pyridin mit einem grossen Ueberschuss an Reagens ca. 45 Minuten auf 100°C erhitzt. Anschliessend arbeitete man auf, indem man das Reaktionsgemisch auf Aether goss und mit einer wässrigen Lösung von Natriumdihydrogenphosphat und viel Wasser gründlich wusch. Mit dieser Methode gelang es, Aethyl-chlorophyllid a in Ausbeuten bis zu 77% aus Aether zu kristallisieren. Die Komplexierung von Methyl-phäophorbid a mit dem desaktivierten (mit Aethanol!) Aethylmagnesiumbromid führte ebenfalls zu kristallisierbarem Aethyl-chlorophyllid a, d. h. es war Umesterung aufgetreten. Um Magnesium in Phäophytin a einzubauen (zur Herstellung von Chlorophyll a), wurde die Grignard-Lösung mit Phytol desaktiviert. Unter den üblichen Bedingungen wurde ein vollständiger Einbau beobachtet; das Produkt wurde jedoch nicht isoliert. Aethyl-chlorophyllid b konnte mit dieser Methode nur in einer Ausbeute von 0,6% kristallin erhalten werden⁷¹⁾. Bei Bakteriochlorinen versagte die Methode^{72) 73)}. Auch nach mehrstündigem Erhitzen des Reaktionsgemisches wurde nur ein unvollständiger Einbau beobachtet.

A. H. Corwin und P. E. Wei ^{74) 75)} entdeckten 1962 drei Magnesiumkomplexe, welche die Fähigkeit aufwiesen, das Metall auf Chlorine zu übertragen. Es handelt sich dabei um folgende Verbindungen: Magnesium-4, 4'-dipyridyl, Magnesium-hexapyridindijodid und Magnesium-Viologen, welches sich als das wirksamste der drei erwies.



"Magnesium-Viologen"

Unter Stickstoff wurde das feste Chlorin zum *in situ* hergestellten Viologen (in abs. Pyridin) gegeben und am Rückfluss gekocht, bis eine entnommene Probe vollständigen Umsatz anzeigte. Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch abgekühlt und durch eine Nutsche mit einer dünnen Schicht Magnesol/Cellulose filtriert. Das adsorbierte Produkt wurde dann mit Chloroform extrahiert und die vereinigten Lösungen eingengt. Den festen Rückstand chromatographierte man an Magnesol/Cellulose und kristallisierte das Produkt.

Mit dieser Methode (Viologen) gelang es, kristallines Methyl-pyrochlorophyllid a (29) in einer Ausbeute von ca. 86% zu erhalten. Es wurden jedoch nur ein qualitatives VIS-Spektrum und eine C-, H-Analyse angegeben. In vergleichbarer Ausbeute wurde der Magnesiumkomplex von Chlorin-e₆-trimethylester kristallin erhalten. Ueber die Reaktionszeiten wurde nichts explizit angegeben. Der Einbau von Magnesium mit Viologen in Oktamethylporphyrin erforderte eine Reaktionszeit von 1 Stunde in siedendem Pyridin. Aus der Erfahrung, dass sich Porphyrine im allgemeinen leichter komplexieren lassen als die Chlorine, muss angenommen werden, dass die Reaktionszeiten in der Grössenordnung von Stunden liegen.

1969 komplexierte J. Fuhrhop ⁷⁶⁾ Oktaäthylchlorin mit Magnesiumperchlorat in abs. Pyridin durch vierstündiges Kochen am Rückfluss. Es wurden lediglich UV/VIS- und NMR-Spektren angegeben, da es nicht gelang, die Verbindung zu kristallisieren.

1970 stellten Adler et al. ⁷⁷⁾ Magnesium-mesotetraphenylchlorin her, indem das metallfreie Edukt mit Magnesiumsalzen in siedendem Dimethylformamid (150°C) in Reaktion gebracht wurde.

Eine Alternative zur Einführung des Magnesiums in Chlorophyllderivate bietet die Extraktion der intakten Pigmente aus den Pflanzen und deren Umwandlung ohne

Verlust des Zentralatoms in die gewünschten Derivate (enzymatische Umesterung, Pyrolyse). Eine typische Vorschrift findet man bei J. J. Katz et al.⁷⁸⁾. Das Vorgehen besteht im wesentlichen aus einer beträchtlichen Anzahl von Extraktionen mit verschiedenen Lösungsmittelsystemen und anschliessender mehrmaliger Chromatographie an Puderzucker. Trotz dem grossen zeitlichen Aufwand, welche die Extraktion mit sich bringt, wurde der weitaus grösste Teil des für die verschiedensten Zwecke gebrauchten Chlorophylls (oder Chlorophyllderivate) auf diese Art gewonnen.

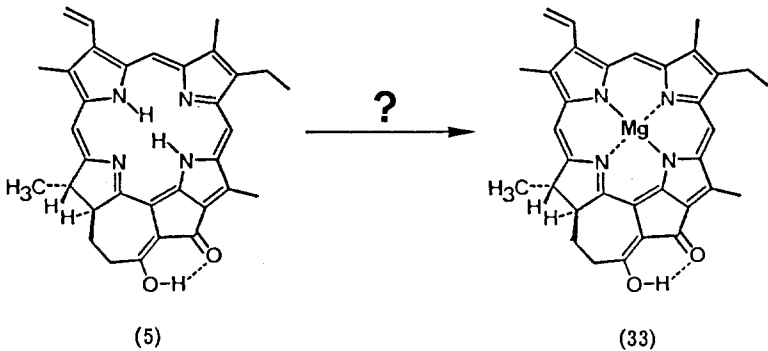
1. 5. 1. 2. Magnesiumporphyrine

Die Einführung von Magnesium in Porphyrine geht i. allg. leichter als in Chlorine. H. Fischer et al.⁷⁹⁾ haben über 25 Magnesiumkomplexe von Porphyrinen kristallin dargestellt. Als brauchbar erwiesen sich einerseits die Umsetzung der metallfreien Derivate mit Magnesiumoxid in konzentrierter alkalischer Lösung und andererseits die Reaktion mit Grignardreagenzien, wie bei den Chlorinen. Ein Beispiel ist der Magnesiumeinbau in Dipropionyl-deuteroporphyrinester⁸⁰⁾. Die Reaktionszeit betrug dabei in siedendem Propanol jedoch bis zu 24 Stunden. 1948 modifizierte S. Granick⁸¹⁾ diese Reaktionsbedingungen (reinste Reagenzien und Lösungsmittel, Sauerstoffausschluss), änderte aber nichts prinzipielles. Von Magnesium-protoporphyrin-dimethylester wurden gute Analysendaten (C, H, N, Mg), sowie UV/VIS-Spektren erhalten. J. E. Falk⁸²⁾ übernahm 1964 diese ausführliche Vorschrift in seinem Buch: "Porphyrins and Metalloporphyrins". Die Methode von Corwin und Wei^{74) 75)} war für Porphyrine ebenfalls anwendbar, wobei Ausbeuten zwischen 70 und 89% erzielt wurden. Vor der Kristallisation musste jedoch immer chromatographiert werden. Baum, Burnham und Plane⁸³⁾ fanden 1964, dass Magnesiumsalze in trockenem oder feuchtem Propanol und Pyridin Porphyrine komplexieren können. Dazu musste man das Reaktionsgemisch jeweils mehrere Stunden am Rückfluss kochen. Ob die Produkte kristallisiert werden konnten, wurde in dieser Arbeit nicht mitgeteilt. J. Fuhrhop⁷⁶⁾ modifizierte obige Vorschrift, indem er wasserfreies Pyridin und wasserfreies Magnesiumperchlorat einsetzte. Die Reaktionszeit zum Einbau des Metalls in Oktaäthylporphin betrug 4 Stunden in siedendem Pyridin. Es wurde eine Ausbeute von 67% an kristallinem Magnesium-oktaäthylporphin·2Pyridin erzielt, dessen Struktur durch Elementaranalyse, UV/VIS- und NMR-Spektren gesichert ist.

Die Methode von A. D. Adler et al.⁷⁷⁾ ist auch auf Porphyrine anwendbar. J. W. Buchler et al.⁸⁴⁾ stellten den entsprechenden Bis-chinolin-Komplex her, indem sie den metallfreien Liganden mit Magnesium-acetylacetonat in Chinolin 20 Minuten auf 270°C erhitzte. Die Kristalle des Magnesium-oktaäthylporphin·2Chinolins, welche in 72% Ausbeute erhalten wurden, wurden vollständig charakterisiert.

1.5.2. Einbauversuche

Die bis anhin bekannten Methoden, Magnesium in Chlorine (insbesondere Phäophorbide) einzubauen, erschien für unser Ziel, Enol a (5) zu komplexieren, praktisch hoffnungslos zu sein, da einerseits die Einbaubedingungen sehr drastisch sind, und andererseits Reinigungsoperationen benötigt werden.



H. Falk ⁶³⁾ versuchte erfolglos in den Lösungsmittelsystemen Benzol/Sulfolan, Benzol/Propionitril und Methylenechlorid/Propionitril mit Magnesiumbromid und einer Base (N-Aethyldiisopropylamin, Lithiumhexamethyldisilazanat oder Magnesium-bis-hexamethyldisilazanat), Enol a (5) mit Magnesium zu komplexieren. Die Verwendung von Magnesiumacetylacetonat in einer Imidazolschmelze, oder der Umsatz von Enol a (5) mit Di- μ -bromo-tetrakis-trimethylsilyl-diamido-dimagnesium-2-diäthyläther in Methylenechlorid führten zu Lösungen, welche im Absorptionsspektrum eine hypsochrome Verschiebung der Rotbande um ca. 5 nm aufwiesen, sehr leicht durch Luft allomerisiert wurden und bei der Magnesiumbestimmung (Atomabsorption) vernünftige Werte lieferten. Alle diese Versuche wurden in Schlenkapparaturen unter Argon ausgeführt.

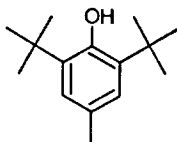
Wegen der extremen Sauerstoffempfindlichkeit der Lösungen kam eine normale Charakterisierung nicht in Frage. Wie sich später herausstellte, nachdem kristallines Magnesium-enol a (33) zur Verfügung stand, enthielten die Falk'schen Lösungen höchstens Spuren des gesuchten Komplexes (33).

An unserem Laboratorium versuchte K. Smith ⁸⁵⁾ die Magnesium-Viologen-Methode ⁷⁴⁾ mit Methyl-pyrophäophorbid a (3) zu reproduzieren. Er erzielte jedoch nur einen ca. 70%-igen Einbau (100°C, 1 Stunde) und beobachtete ausserdem

mindesten zwei Nebenprodukte (DC). Mit einem Thiophenol-Magnesiumreagens (äquimolare Mengen Thiophenol und Aethylmagnesiumjodid in Aether/Methylenchlorid) gelang es, Magnesium zu ungefähr 90% in Methyl-pyrophosphorbid a (3) einzubauen, wobei sich aber ein Nebenprodukt bildete (30 Minuten, RT; bis anhin mildeste Methode). Durch Chromatographie an Cellulose konnte ein Teil des Thiophenols und das metallfreie Edukt (3) abgetrennt werden. In der Folge zeigte es sich, dass Thiophenol magnesiumhaltige und auch metallfreie Chlorine chemisch veränderte. In Ermangelung einer besseren Methode wurde versucht, das Rohprodukt an desaktiviertem Kieselgel zu reinigen. Es gelang nun tatsächlich, kristallines Methyl-pyrochlorophyllid a (29) herzustellen. In den meisten folgenden Ansätzen war das Produkt nicht mehr kristallisierbar.

1. 5. 3. Jodmagnesiumsalz von BHT, ein hochwirksames Reagens zur Komplexie- rung von Chlorophyllderivaten der a-Reihe

In einer 1972 erschienenen Arbeit über Dünnschichtchromatographie von Chlorophyllen⁸⁶⁾ wurde mitgeteilt, dass der Zusatz eines Antioxidans in den Chlorophyllösungen die Stabilität der Substanzen während der Chromatographie signifikant verbesserte. Es handelte sich dabei um das Phenol BHT:

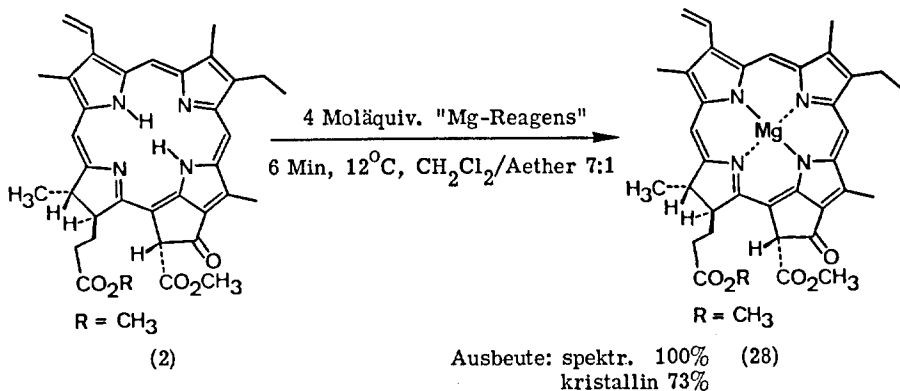


Die ursprüngliche Absicht war es nun, dieses Antioxidans dem "Thiophenolgrignard-Reagens" zuzusetzen, um die Bildung von Nebenprodukten zu verhindern. Da bis jetzt die Magnesiumkomplexe chromatographiert werden mussten, konnte man auch für diese Operation einen günstigen Einfluss von BHT erwarten. Die Realisierung dieser Versuche wurde fallen gelassen, da man inzwischen zur Auffassung gekommen war, dass BHT vielleicht anstelle eines Alkohols oder des Thiophenols auch als Reagenskomponente eingesetzt werden könnte.

Zur Herstellung des Reagenzes versetzte man eine Aethylmagnesiumjodid-Lösung mit einem Ueberschuss BHT und engte das Gemisch zur Trockene ein. Bei den ersten Versuchen wurde eine konzentrierte Lösung von Methyl-phäophorbid a (2) in Methylenchlorid mit einem grossen Ueberschuss des weissen, pulverförmigen Reagenzes versetzt. Das nach wenigen Minuten wässrig aufgearbeitete Reaktionsgemisch zeigte im DC zwei grüne Flecken (Eduktfleck verschwunden). Nun liess man auch Enol a (5) in Methylenchlorid 10 Minuten lang mit einem grossen Ueberschuss des festen Reagenzes bei RT reagieren. Im DC (Cellulose) des Reaktionsgemisches wurden neben den Flecken des Edukts (5) die grünen Flecken von Mg-enol a (33) und eines Allomers festgestellt.

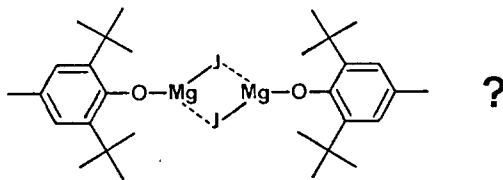
Auf Grund dieser Vorversuche ging man daran, die Reaktion zur Synthese von Methyl-chlorophyllid a (28) zu optimieren. Es erwies sich dann auch als einfacher, das Reagens nicht mehr in fester Form einzusetzen, sondern direkt eine 0,2-molare Reagenslösung zu verwenden. Zu ihrer Herstellung wurde BHT in abs. Methylenchlorid vorgelegt und mit einem Ueberschuss von Aethylmagnesiumjodid in Aether versetzt.

Mit 4 Moläquivalenten Reagens gelang es, Methyl-phäophorbid a (2) innert 6 Minuten bei 12°C praktisch vollständig in den Magnesiumkomplex (28) zu überführen.



In Untersuchungen zum Geschwindigkeitsverlauf des Magnesiumeinbaus (vgl. Exp. Teil 2. 6. 2.) stellte man fest, dass innert ca. 13 Sekunden 50% des Produkts gebildet wurden. Potentielle Liganden von Magnesium (Pyridin, Tetrahydrofuran, Aceton, etc.) zeigten einen starken Hemmeffekt. Unter den optimalen Reaktionsbedingungen bewirkte der Zusatz von 0,5% Aceton, dass der Einbau nur noch zu ca. 75% ablief! Ein Gehalt von 5% Aceton senkte die spektroskopische Ausbeute auf ca. 10%. Erstaunlicherweise hatte Aether keinen signifikanten negativen Einfluss auf den Erfolg des Magnesiumeinbaus.

Der Grund, weshalb dieses Reagens derart schnell und vollständig Magnesium einbaut, ist wahrscheinlich darin zu sehen, dass durch die beiden voluminösen tert.-Butylgruppen eine sterisch beschleunigte Umkomplexierung eintritt.



Bis jetzt wurden keine Untersuchungen zur Struktur des magnesiumübertragenden Teilchens gemacht. Es ist jedoch anzunehmen, dass in der Reagenslösung verschiedene Gleichgewichtsbeziehungen auftreten, wobei auch die Lösungsmittel eine

wichtige Rolle spielen.

Kristalle von Methyl-chlorophyllid a (28) wurden erhalten, indem man die nach der wässrigen Aufarbeitung erhaltene ätherische Lösung über Natriumsulfat trocknete, filtrierte und so lange im Argonstrom einengte, bis sich Kristallkeime bildeten.

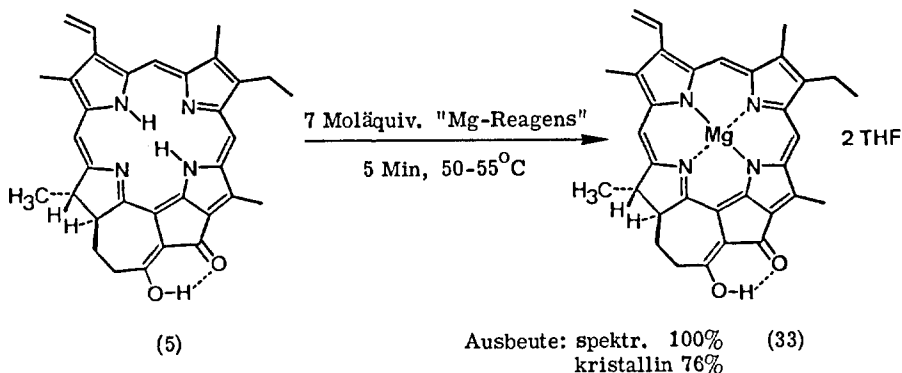
Anschliessend stellte man die blaue Lösung über Nacht in den Kühlschrank. Die abgetrennten Kristalle (Ausbeute: 73% bez. (2)) wurden getrocknet und direkt der Charakterisierung zugeführt.

Methyl-pyrochlorophyllid a (29) wurde in einer Ausbeute von 80% bez. (3) kristallin erhalten (spektroskopisch 100%), wobei die Reaktionsbedingungen etwas verschärft werden mussten (5 Minuten bei 50°C).

Wie erwartet, gelang es in Vorversuchen, auch Phäophytin a (1) zum Chlorophyll a (32) zu komplexieren. Das Produkt (32) wurde in 91%-iger Ausbeute bez. (1) aus Aceton/Wasser kristallisiert. Die Kristallinität konnte unter dem Mikroskop und anhand von Debye-Scherrer-Pulverdiagrammen⁸⁷⁾ festgestellt werden. Die Charakterisierung dieses Materials zeigte aber, dass es mit ca. 15-20% einer farblosen Substanz verunreinigt war. Ein NMR-Spektrum von Phäophytin a (1) (Ausgangsmaterial) deutete stark darauf hin, dass die Verunreinigung schon dort vorhanden war. Um reines Chlorophyll a (32) zu erhalten, müsste deshalb reinstes Phäophytin (1) eingesetzt werden, da die Kristallisation keinen Reinigungseffekt hatte.

Ohne Schwierigkeiten verlief der Einbau von Magnesium in Enol a (5). Innert 5 Minuten bei einer Temperatur von 50-55°C wurde mit einem 7-fachen Ueberschuss Reagens ein vollständiger Einbau erreicht (spektroskopisch 100%). Obwohl nicht unter strengen sauerstofffreien Bedingungen gearbeitet wurde, stellte man nach der Aufarbeitung im Rohprodukt keine allomeren Verunreinigungen fest. Dieser Befund wurde durch die Anwesenheit von BHT verursacht, dessen antioxidative Wirkung offensichtlich in der Lage war, Mg-Enol a (33) wirksam zu schützen.

Zur Kristallisation in der Drybox (Argonatmosphäre, O₂-Gehalt \leq 5 ppm) wurde das BHT nicht mehr gebraucht. Es liess sich zuvor sehr gut bei ca. 50°C am HV aus dem Rohprodukt wegsublimieren. Man erzielte eine Ausbeute von 76% bez. (5).



Zur weiteren Erprobung dieser neuen Magnesiumeinbaumethode wurde Magnesium-oktaäthylporphin (31) hergestellt. Im Gegensatz zu den Literaturmethoden^{75) 84)} wurde der Komplex ohne Lösungsmittel-Liganden (NMR) in einer Ausbeute von 80% bez. Oktaäthylporphin (30) kristallin erhalten. Man erreicht einen vollständigen Umsatz (spektroskopisch) bei einer Reaktionszeit von 3 Minuten bei 50°C. Es ist also auch möglich, Porphyrine unter sehr milden Bedingungen quantitativ zu komplexieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Jodmagnesiumsalz von BHT ein wirksames Reagens ergibt, um Chlorophyll-Derivate der a-Reihe in die Magnesiumkomplexe überzuführen. Sehr wahrscheinlich ist es auch in der Lage ausser Oktaäthylporphin andere Porphyrine zu komplexieren.

Derivate der Chlorophyll b- und der Bakteriochlorophyll-Reihe konnten unter diesen Bedingungen nicht komplexiert werden. E. Zass⁸⁸⁾ ist es jedoch vor kurzem gelungen, Methyl-phäophorbid b (18) quantitativ in das Chlorophyllid zu überführen. Dazu waren eine längere Reaktionszeit, höhere Temperatur, Thiophen als Lösungsmittel und der Zusatz von "Lithium-BHT" (= Lithiumphenolat) zum Reagens nötig. Bei den Bakteriochlorophyll-Derivaten scheint sich ebenfalls ein Erfolg abzuzeichnen.

Auf Grund unserer Erfahrungen kann man folgende Reihe der Leichtigkeit des Magnesiumeinbaus festlegen: Porphyrin > Chlorin (a-Reihe) > Pyrochlorin (a-Reihe) > Chlorin (b-Reihe) > Bakteriochlorin.

1. 5. 4. Röntgenstrukturbestimmungen von Chlorophyll-Derivaten

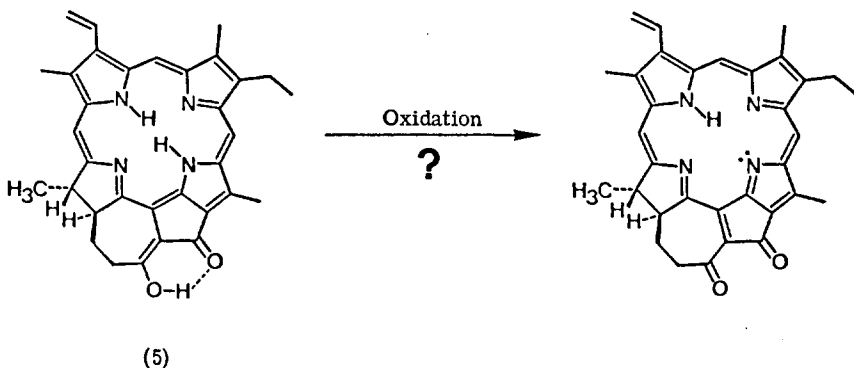
Von Methyl-pyrochlorophyllid a (29) gelang es, aus Aether mehrere Millimeter lange Kristallnadeln zu züchten. C. Kratky aus der Gruppe von Prof. J. Dunitz⁸⁷⁾ führte die Röntgenstrukturanalyse dieser Kristalle durch. Er konnte feststellen, dass ein Wassermolekül die 5. Ligandstelle des Mangesiums besetzte. Ausserdem wurde im Kristallgitter an einer bestimmten Stelle pro 1 Pyrochlorophyllid 1 Molekül Aether identifiziert. Dieser Befund stimmte ausgezeichnet mit der Elementaranalyse und dem NMR-Spektrum überein.

Da Methyl-pyrochlorophyllid a (29) die Estergruppe am C-10 nicht mehr besitzt, wurde versucht, von Methyl-chlorophyllid a (28), welches sich von Chlorophyll a (32) nur in der Propionsäureseitenkette unterscheidet (Methylester statt Phytylester), grössere Kristalle zu züchten. Erfolgreich war eine Kristallisation aus Aceton + 10% Wasser. Auf die gleiche Art und Weise gelang es auch, Aethyl-chlorophyllid a in genügend grossen Kristallen herzustellen.

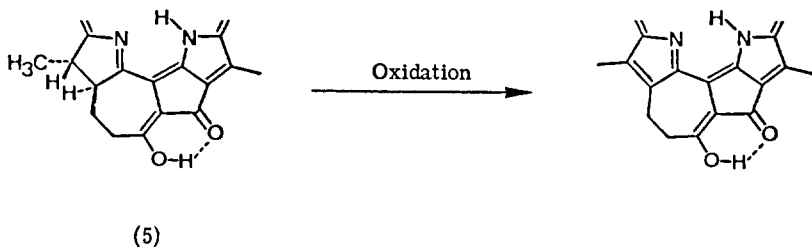
Während diesen Arbeiten erschien eine Publikation von C. E. Strouse⁴²⁾ mit der Kristall- und Molekularstruktur von Aethyl-chlorophyllid a. Das dazu verwendete Material wurde durch Isolierung und Umesterung von Chlorophyll a gewonnen, wobei dann ebenfalls das Gemisch Aceton + 10% Wasser zur Kristallisation verwendet wurde. Die bis anhin gesammelten Daten von C. Kratky stimmen mit den publizierten Ergebnissen von C. E. Strouse überein.

1. 6. ERGEBNISSE ORIENTIERENDER EINBAUVERSUCHE MIT "10-METHOXY-DIKETON a" (7)

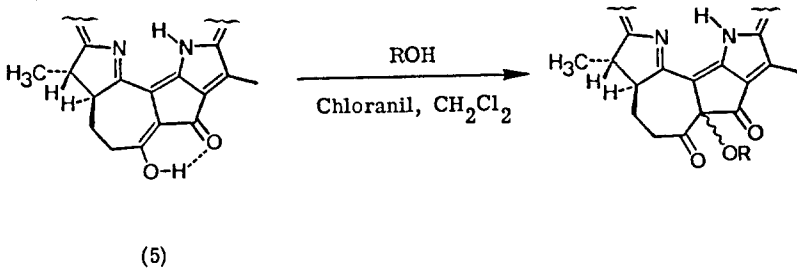
Enol a (5) enthält als Strukturelement ein Hydrochinonsystem. Es wurde nun versucht, durch eine Oxidation das entsprechende Chinon herzustellen.



Zahlreiche Experimente, die zum grossen Teil von J. L. Luisier ⁶⁴⁾ ausgeführt wurden, brachten nicht das gewünschte Resultat. Reaktionen mit verschiedenen Oxidationsmitteln (DDQ, J₂, MnO₂, NBS, Fremy-Salz) führten, falls überhaupt eine Reaktion beobachtet wurde, zum Porphyrinderivat:



Als weitere Möglichkeit wurde die Elimination von Alkohol aus den entsprechenden allomeren Diketonen studiert. Die Oxidation von Chlorophyllderivaten mit Chinonen (Chloranil) ist eine bewährte Methode, die allomeren Alkoxy-Verbindungen herzustellen ⁶¹⁾.



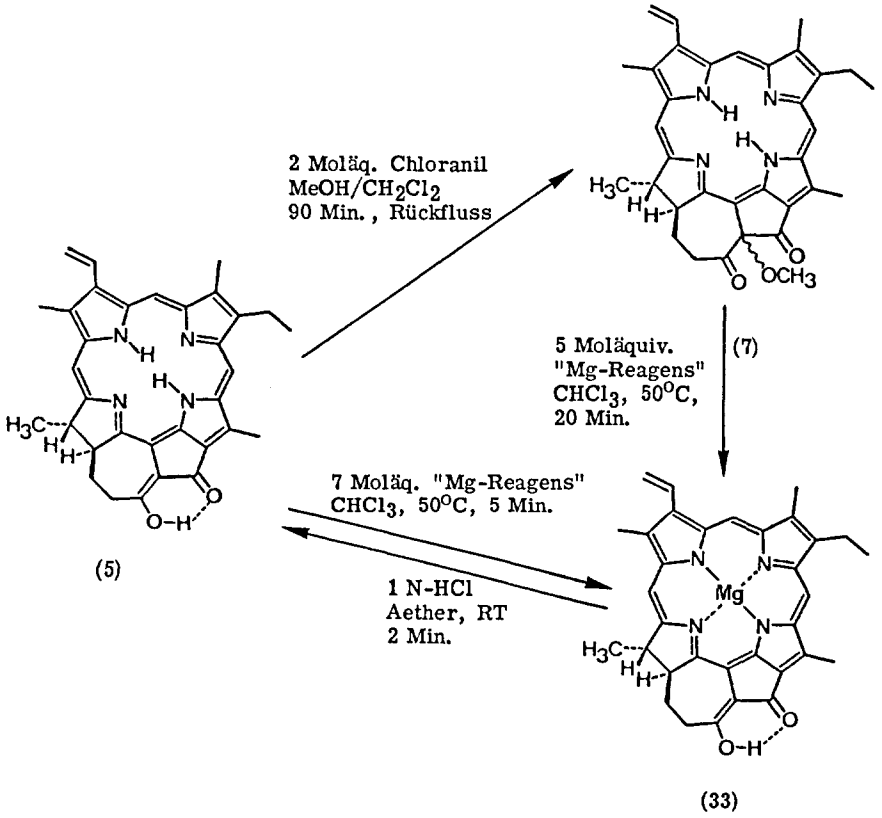
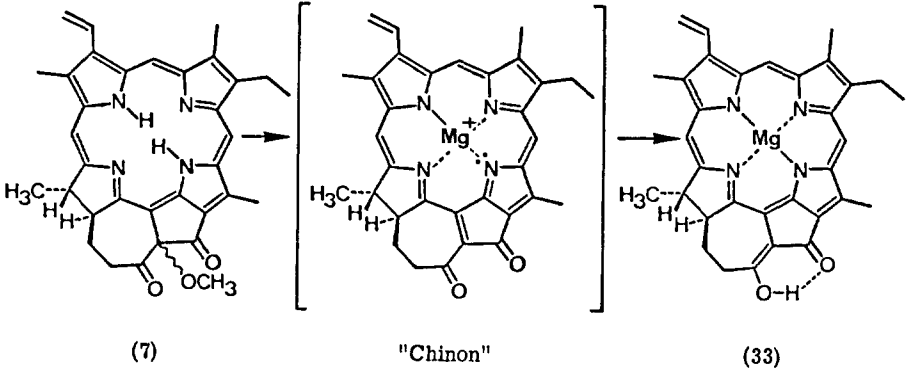
Durch eine 1,4-Eliminierung sollte daraus das Chinon entstehen. Jedoch auch die Versuche mit den Alkoxyderivaten blieben erfolglos ⁶⁴.

Für weitere Experimente wurde Zink-10-Methoxy-diketon a (34) hergestellt und die Komplexierung der Verbindung mit Magnesium geplant.

Auf Grund der Erfahrungen, welche beim Magnesiumeinbau in die Phäophorbide der a-Reihe und in Enol a (5) gewonnen wurden, erwartete man keine Schwierigkeiten bei der Komplexierung von 10-Methoxy-diketon a (7). Um einen vollständigen Einbau zu erreichen, mussten die Reaktionsbedingungen etwas verschärft werden. Zu unserem Erstaunen wurden im UV/VIS-Spektrum des Rohproduktes charakteristische Absorptionsbanden von Mg-Enol a (33) neben denen des erwarteten Mg-10-Methoxy-diketons a (35) festgestellt. Nach der anschliessenden Dekomplexierung mit 1 N-Salzsäure gelang es, etwas des gebildeten Enols a (5) aus einer benzolischen Lösung des rohen Gemisches zu kristallisieren und eindeutig zu identifizieren.

Die "Entallomerisierung" von (7) funktionierte auch mit dem Lithiumsalz des BHTs. In diesem Fall wurde nach der wässrigen Aufarbeitung direkt Enol a (5) erhalten. Ein Hinweis auf die Notwendigkeit eines komplexierenden Metallions bei dieser Elimination gibt die Beobachtung, dass die Reaktion in Tetrahydrofuran nicht abläuft. (Tetrahydrofuran ist eines der Lösungsmittel, welche den Einbau von Magnesium in Methyl-phäophorbid a (2) verhindern. Vgl. Exp. Teil 2. 6. 2.)

Als Zwischenprodukt, welches nicht nachgewiesen wurde, lässt sich ein Chinon postulieren. Dieses tritt jedoch unter den reduzierenden Reaktionsbedingungen (BHT = Antioxidans) wahrscheinlich nur in sehr kleinen Konzentrationen auf.



1. 7. ZUSAMMENSTELLUNG UND DISKUSSION DER PHYSIKALISCH-CHEMISCHEN EIGENSCHAFTEN DER SYNTHETISCHEN CHLOROPHYLLENOL-DERIVATE

1. 7. 1. UV/VIS-Spektren

Bei allen metallfreien Modellverbindungen bewirkte der Ringschluss zum β -Diketon-system eine Verschiebung der Rotbande im Absorptionsspektrum um 20-25 nm bez. des Phäophorbids oder Pyrophäophorbids, d. h. bei allen diesen Produkten lag das Keto-Enol-Gleichgewicht praktisch ausschliesslich auf der Seite des Enols. Ausserdem traten im Bereich der Soretbande tiefgreifende spektrale Aenderungen auf.

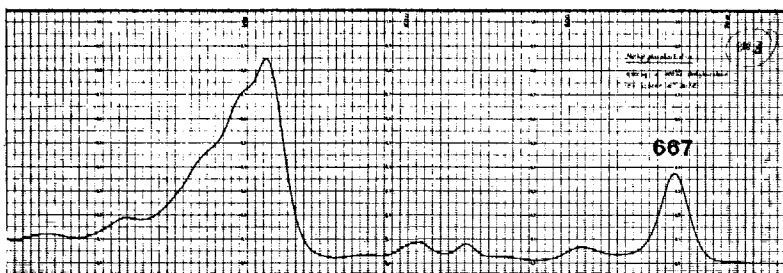


Fig. 4 Methyl-phäophorbid a (2) (in Methylenchlorid)

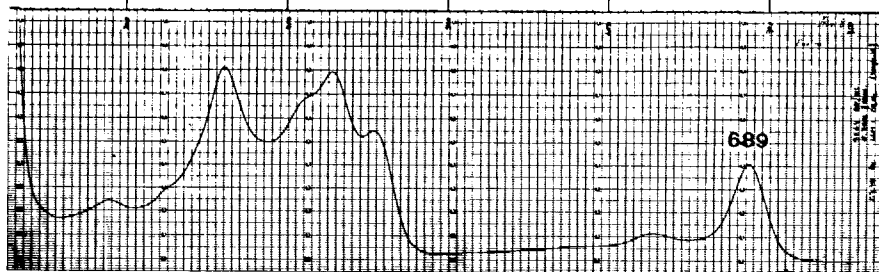


Fig. 5 Enol a (5) (in Methylenchlorid)

Positionen der Rotbanden

	Methyl-phäophorbid λ (nm) ϵ	Enol λ (nm) ϵ	$\Delta\lambda$ (nm)	$\Delta\epsilon$
a-Reihe	667, 2 (45'300)	688, 5 (33'000)	+ 21, 3	12'300
b-Reihe	655, 0 (33'100)	679, 8 (17'500)	+ 24, 8	15'600
Bakterio-Reihe	752, 6 (49'200)	778, 2 (38'000)	+ 25, 6	11'200
(Lösungsmittel: Methylenchlorid)				

Tab. 2

	Methyl-pyrophäophorbid λ (nm) ϵ	Enol λ (nm) ϵ	$\Delta\lambda$ (nm)	$\Delta\epsilon$
a-Reihe	667, 5 (45'300)	688, 5 (33'000)	+ 21, 0	12'300
2-Acetyl a-Reihe	682, 7 (41'600)	702, 4 (30'000)	+ 19, 7	11'600
d-Reihe	693, 8 (61'100)	715, 9 (26'200)	+ 23, 1	34'900
b-Reihe	655, 3 (30'000)	679, 8 (17'500)	+ 24, 5	12'500
Bakterio-Reihe	754, 4 (57'000)	778, 2 (38'000)	+ 23, 8	19'000
(Lösungsmittel: Methylenchlorid)				

Tab. 3

Aus den Tabellen 2 und 3 ist ersichtlich, dass die Rotbanden durch die Enolisierung deutlich in der Intensität abnehmen.

Die Abbildungen dieser UV/VIS-Spektren findet man im Exp. Teil, und zwar sind die Spektren des Methyl-phäophorbids (wenn nicht vorhanden, des Methyl-pyrophäophorbids) bei der Beschreibung des entsprechenden Enols den Spektren des Enols gegenübergestellt.

Im weiteren wurden die Absorptionsspektren der Zink-endo-Komplexe untersucht, da diese vor den Magnesiumkomplexen zugänglich waren ^{63) 64) 88)}. Die Herstellung und Charakterisierung dieser Derivate (a-, d- und 2-Desvinyl-2-acetyl-Reihe) sind in der Dissertation von J. L. Luisier ⁶⁴⁾ beschrieben.

Zn-Bakterio-enol wird zur Zeit noch von E. Zass ⁸⁸⁾ genauer untersucht.

Die hypsochrome Verschiebung der Rotbande, welche nach der Komplexierung der metallfreien Enole mit Zink beobachtet wurde (vgl. Tab. 4), war nicht überraschend. Bei den Phäophorbiden tritt eine Blauverschiebung um ca. 10 nm auf, wenn diese mit Zink komplexiert werden.

Positionen der Rotbanden

	Enol		Zink-Enol		$\Delta\lambda$ (nm)
	λ (nm)	ϵ	λ (nm)	ϵ	
a-Reihe	688,5	(33'800)	678,7	(33'800)	- 9,8
2-Acetyl a-Reihe	702,4	(30'000)	682,3		- 20,1
d-Reihe	715,9	(26'200)	702,0		- 13,9
Bakterio-Reihe	778,2	(38'000)	~801		~+ 23
(Lösungsmittel: Methylenchlorid)					

Tab. 4

Ungewöhnlich ist jedoch die in orientierenden Versuchen beobachtete, hypsochrome Verschiebung in der 2-Desvinyl-2-acetyl a-Reihe (- 20,1 nm). Das Phänomen kann erklärt werden, wenn man annimmt, dass die Anwesenheit von Zink als Zentralatom das Keto/Enol-Gleichgewicht des β -Diketonsystems auf die Seite der Ketoform bringt. Unterstützt wird diese Interpretation durch den UV/VIS-Spektraltyp, welcher eher einem Phäophorbid zugeordnet werden kann ⁶⁴).

Im Unterschied zu den Chlorinen hat die Einführung von Zink oder Magnesium in Bakteriochlorine einen bathochromen Einfluss auf die Rotbande.

Mit Magnesium wurde von den Enolen bis anhin nur das der a-Reihe komplexiert:

Positionen der Rotbanden

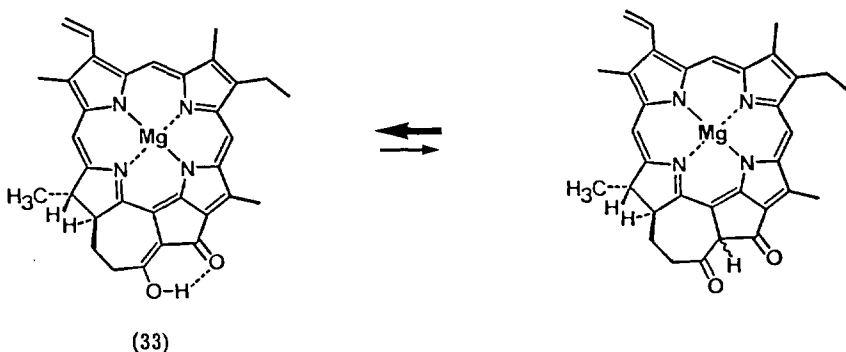
Enol a (5)		Mg-Enol a (33)		$\Delta\lambda$ (nm)	$\Delta\epsilon$
λ (nm)	ϵ	λ (nm)	ϵ		
688,5	(33'000)	687,7	(30'100)	- 0,8	2'900
(Lösungsmittel: Methylenchlorid)					

Tab. 5

Der Einfluss des Magnesiums auf die Rotbande ist sehr viel schwächer als der des Zinks. Alle drei Verbindungen (Enol a, Zn-Enol a und Mg-Enol a) weisen denselben Spektraltyp auf.

Ein von B. Jaun⁸⁹⁾ aufgenommenes Tieftemperaturspektrum (-60°C , Tetrahydrofuran) von Mg-enol a (33) wies im Bereich der Rotbande bemerkenswerte Unterschiede zum Spektrum bei RT auf (vgl. Exp. Teil 2. 6. 6. Abb. 50, 51). Durch die Erniedrigung der Temperatur wurde das Absorptionsmaximum um 4,2 nm hypsochrom verschoben. Diese Beobachtung kann vernünftig interpretiert werden, wenn man annimmt, dass der Anteil der Ketoform im Keto/Enol-Gleichgewicht bei tiefer Temperatur vergrößert wird.

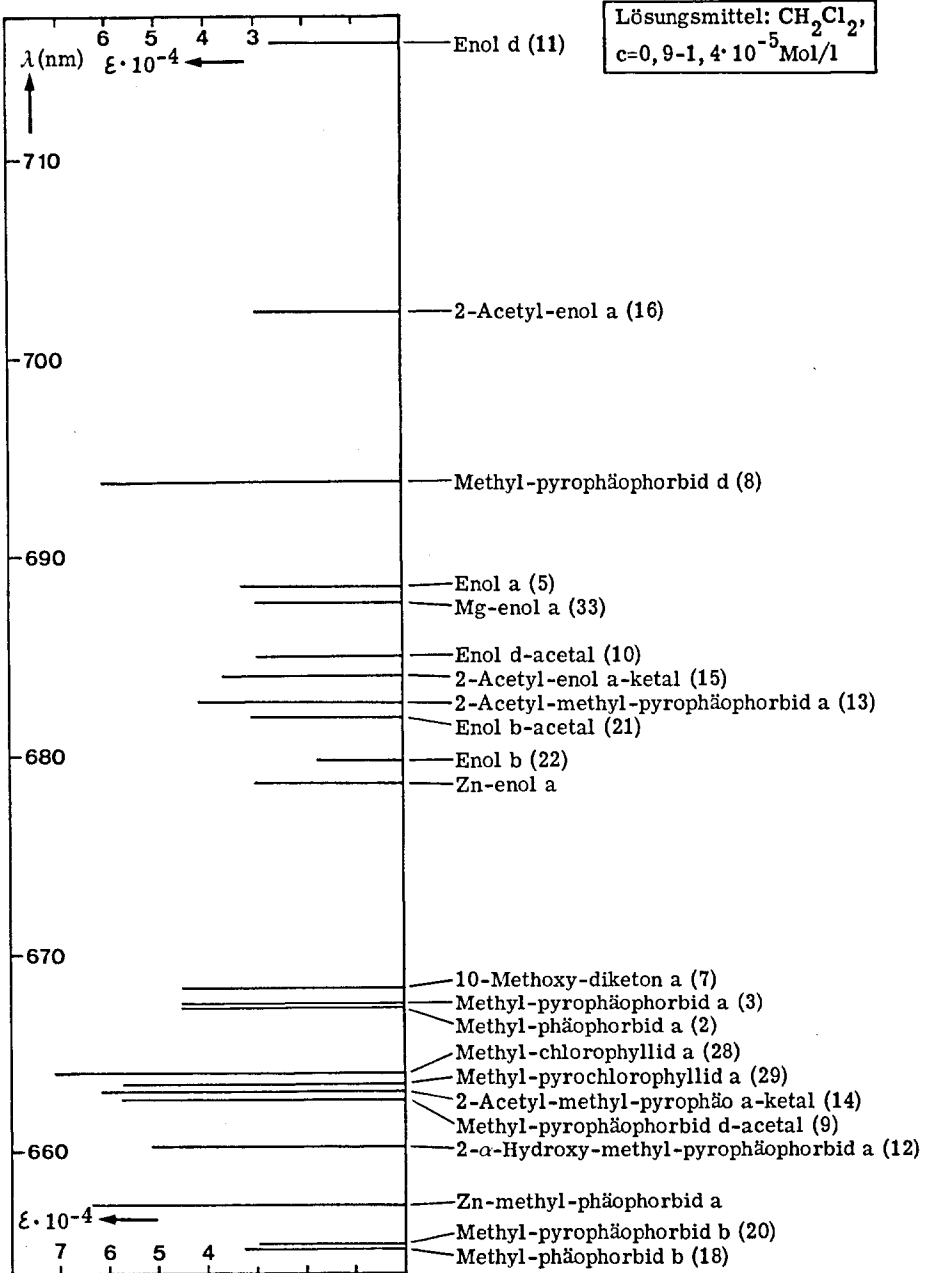
Ein weiteres Indiz für das Vorliegen eines Keto/Enol-Gleichgewichtes gewinnt man aus der Betrachtung des vor kurzem von B. Jaun⁸⁹⁾ aufgenommenen Differenzspektrums (elektrochemisch oxidiertes Mg-enol a/Mg-enol a (33)). Er konnte feststellen, dass bei der Oxidation die kürzerwellige Schulter der Rotbande bei tiefer Temperatur deutlich ausgeprägt wurde. Bei RT war der Effekt weniger signifikant. Diese Beobachtung deutet auf ein sich bei tiefer Temperatur (-52°C) langsam einstellendes Tautomerengleichgewicht hin, wobei nur die Enolspezies oxidiert wird.



In Tabelle 6 sind die Positionen und die Extinktionskoeffizienten ϵ der Rotbanden der untersuchten Verbindungen graphisch gezeichnet. Auffallend und analytisch verwertbar ist, dass bei den Phäophorbiden (oder Pyrophäophorbiden) die Entfernung der Vinylgruppe in Stellung 2 aus der Konjugation ausser den erwarteten hypsochromen Verschiebungen auch eine Vergrößerung der ϵ -Werte um ca. 20% mit sich bringt (Hydroxy-Derivat, Acetale, Ketale). Die Vergrößerung des ϵ findet man auch bei der Soretbande, jedoch weniger ausgeprägt.

Weiter kann man feststellen, dass die Einführung eines Metalles (Magnesium oder Zink) in ein Phäophorbid oder Pyrophäophorbid die Rotbande um ca. 30% vergrößert. Im Gegensatz dazu nimmt die Soretbande um ca. 15% ab (Lösungsmittel: Methylchlorid).

Tab. 6 Positionen und Extinktionskoeff. der Rotbanden von Chlorophyllderivaten



Die Phasentestspektren (Chlorin + Tetrabutylammoniumhydroxyd in entgastem Pyridin) von Methyl-phäophorbid a (2) und Enol a (5) sind sich sehr ähnlich, da durch die Deprotonierung ähnliche Chromophore entstehen. Bei der Zugabe von Metallionen, welche eher kovalente Bindungen (Chelate) eingehen, gehen die Phasentestspektren in Enol-Typ-Spektren über (vgl. Exp. Teil 2. 1. 5.).

Dieselben Beobachtungen machte H. Falk⁶³⁾ auch bei den entsprechenden Zink-endo-enolen. Man stellte weiter fest, dass einige am Enol chelierte Metallionen die Allomerisierungsgeschwindigkeit in Gegenwart von Sauerstoff im Vergleich zum Enolat drastisch erniedrigten. Dieser Effekt ist durch die Erhöhung des Oxidationspotentials und sehr wahrscheinlich auch durch die Komplexstabilität erklärbar.

Das Phasentestspektrum von Mg-enol a (33) (Fig. 6) weist sehr grosse Ähnlichkeit mit dem von Chlorophyll a⁹⁰⁾ auf. Deutliche Unterschiede bestehen jedoch zur protonierten (oder metallchelierten) Enolform (Fig. 7).

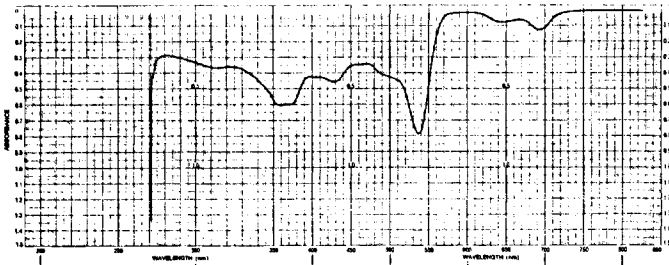


Fig. 6

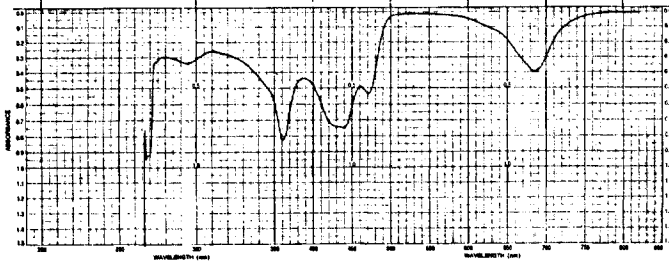


Fig. 7

Mg-enol a (33) in Dimethylacetamid $c=1,34 \cdot 10^{-5}$ Mol/l + 1 Tropfen 40% Tetrabutylammoniumhydroxyd-Lösung in Wasser in 3 ml Lösung

Mg-enol a (33) in Dimethylacetamid $c=1,34 \cdot 10^{-5}$ Mol/l

Die Rotbande im UV/VIS-Spektrum des Phasentestzwischenproduktes von Mg-enol a (33) ist gegenüber Mg-enol a (33) bathochrom verschoben (693 nm gegenüber 688 nm), wobei der Extinktionskoeffizient deutlich kleiner ist (9'400 gegenüber 30'500). Auffallend ist auch die intensive Bande des Enolats bei 537 nm.

Aus den seit langem bekannten Phasentestspektren von Chlorophyllen sind keine Hinweise auf den Spektraltyp des UV/VIS-Spektrums eines Chlorophyllenol-chelates zu gewinnen. Erst durch die Synthese von stabilen Enolderivaten konnten die drastischen spektralen Unterschiede aufgezeigt werden.

Die Zugabe von Metallperchloraten zu Lösungen von Mg-enol a (33) in Dimethylacetamid führte nach dem Zusatz von Tetrabutylammoniumhydroxyd zu den gewünschten Enolchelaten, deren Absorptionsmaxima der Rotbande vom jeweiligen Metall abhingen.

	λ (nm)	ϵ
Mg-enol a (33)	688	(30'500)
Mg-enol a (33) + Bu ₄ NOH	693	(9'400)
Mg-enol a (33) + Bu ₄ NOH + LiClO ₄	680	(22'200)
Mg-enol a (33) + Bu ₄ NOH + Mg(ClO ₄) ₂	676	(25'000)
Mg-enol a (33) + Bu ₄ NOH + Cd(ClO ₄) ₂	675	(28'500)

Tab. 7

Diese vorläufigen Spektren sind im Exp. Teil abgebildet (Kap. 2. 6. 6. Abb. 54-58).

Die oben erwähnte Stabilisierung gegenüber Allomerisierung durch Sauerstoff konnte auch bei den Exokomplexen von Mg-enol a (33) qualitativ festgestellt werden.

1. 7. 2. IR-, NMR- und MS-Spektren

Das deutlichste Zeichen für das Vorliegen einer Enolform ist im IR-Spektrum die intensive Carbonylschwingung bei ca. 1655 cm^{-1} , während die Carbonylregion bei höheren Wellenzahlen leer bleibt (Ausnahme: "Formyl-enol a" (6)). Die Banden der O-H-Schwingungen wurden nicht beobachtet.

Signifikante Unterschiede zwischen einem Enol und dem zugehörigen Methyl-pyrophäophorbid findet man im NMR-Spektrum. So verschwindet durch die Kondensation zum enolisierten β -Diketon das Singlett des Propionsäuremethylesters und das AB-System der beiden Protonen am isocyclischen Ring (C-10). Dafür findet man bei allen untersuchten Enolderivaten ein scharfes Singlett zwischen 12,7 und 13,2 ppm (Ausnahme: "Formyl-enol a" (6); breites Signal). Diese Enolprotonen tauschen mit Deuteromethanol sehr schnell aus. Ausserdem sind sämtliche Signale der Enole bez. der Phäophorbide mehr oder weniger nach höherem Feld verschoben (bis 1,4 ppm). Eines der beiden N-H-Signale wurde in den metallfreien Derivaten immer bei negativen δ -Werten gefunden, während das zweite sehr oft unentdeckbar blieb. Bei 7 Verbindungen konnten beide N-H-Signale aufgefunden werden: 10-Methoxy-diketon a (7) (-2,10 und 0,49 ppm), Methyl-pyrophäophorbid d (8) (-2,61 und 0,72 ppm), 2-Acetyl-pyrophäophorbid a-dimethylketal (14) (-1,72 und 0,38 ppm), 2-Acetyl-enol a (16) (-2,95 und -1,26 ppm), Enol b (22) (-2,57 und -1,09 ppm), Bakterio-methylphäophorbid a (23) (-0,95 und 0,48 ppm), Bakterio-enol (27) (-0,42 und 0,91 ppm). Strukturänderungen sind in den NMR-Spektren durchwegs leicht ersichtlich, da sich die Signale über die ganze Breite eines normalen Spektrums ($\delta = 0-10\text{ ppm}$) verteilen, und nur sehr wenige Ueberlagerungen vorkommen. Erwähnenswert ist, dass die Positionen der Signale stark von der Konzentration (und ev. von der Temperatur) abhängig sind. So wird man i. allg. von der selben Substanz nur sehr schwer zwei deckungsgleiche Spektren erhalten.

Bei den metallfreien Phäophorbid- und Enol-Derivaten wurde im Massenspektrum immer ein mehr oder weniger intensiver Molekularpik beobachtet. Das Fragmentierungsmuster war jedoch meistens sehr mager und wenig aufschlussreich. Die Magnesiumkomplexe waren für die Aufnahme von Massenspektren zu wenig flüchtig und ergaben keine reproduzierbaren Resultate.

1. 7. 3. Redoxpotentiale

Im folgenden sind die polarographischen Halbwellenpotentiale (Oxidationspotentiale) der wichtigsten, in diesem Laboratorium synthetisierten Chlorophyllderivate angegeben. Alle diese Daten wurden von J. L. Luisier⁶⁴⁾ bestimmt, der sich im Rahmen seiner Dissertation mit der cyclischen Voltametrie der Chlorophyllderivate befasst hatte. Die Potentiale wurden auf einer rotierenden Platinelektrode gegenüber bestimmten Referenzelektroden gemessen. Die detaillierten Messmethoden und eine eingehende Diskussion der Potentiale findet man in seiner Dissertation⁶⁴⁾.

Für die metallfreien Derivate wurden folgende Oxidationspotentiale erhalten:

	Methyl-phäo E_O (Volt)	Methyl-pyrophäo E_O (Volt)	Enol E_O (Volt)	Δ (Phäo - Enol) ΔE_O (Volt)
a-Reihe	0,91	0,85	0,69	0,22
2-Acetyl a-Reihe	-	0,89	0,71	-
d-Reihe	-	0,92	0,73	-
b-Reihe	1,04	0,97	0,77	0,27
Bakterio-Reihe	0,69	0,61	0,64	0,05

(Lösungsmittel: Propionitril; Referenzelektrode: 1 N-KCl/Kalomel)

Tab. 8

Diese Potentiale beziehen sich auf die 1 N-Kaliumchlorid/Kalomel-Elektrode und sind nicht einfach mit Ferro/Ferricyanid-Potentialbestimmungen von P700 korrelierbar⁶⁴⁾. Wichtig ist jedoch die Differenz der Oxidationspotentiale des Phäophorbids (oder Pyrophäophorbids) zum entsprechenden Enol. Man findet, dass die Enole tiefere Oxidationspotentiale aufweisen als die nicht enolisierten Phäophorbide. Der Uebergang von Enol a (5) zu 2-Desvinyl-2-acetyl-enol a (16) und Enol d (11) ging mit einer Erhöhung des Potentials einher.

Die Einführung von Zink in die metallfreien Derivate der a-Reihe senkte die Oxidationspotentiale um 200-270 mVolt:

Zn-Methyl-phäophorbid a	$E_O = 0,64$ Volt
Zn-Methyl-pyrophäophorbid a	$E_O = 0,58$ Volt
Zn-enol a	$E_O = 0,49$ Volt

(Lösungsmittel: Propionitril; Referenzelektrode: 1 N-KCl/Kalomel)

Tab. 9

Die Magnesiumkomplexe konnten nicht im selben Lösungsmittelsystem gemessen werden. Es wurde auch eine andere Referenzelektrode verwendet. Von Bedeutung sind also wiederum nur die Potentialdifferenzen:

Methyl-chlorophyllid a (28)	$E_o = 0,550$ Volt
Methyl-pyrochlorophyllid a (29)	$E_o = 0,490$ Volt
Magnesium-enol a (33)	$E_o = 0,440$ Volt
(Lösungsmittel: CH_2Cl_2/THF 9:1; Referenzelektrode: 0,1 N-KCl/Kalomel)	

Tab. 10

Bei den Magnesiumkomplexen bewirkt der Uebergang vom Chlorophyllid zum Enol eine Senkung des Oxidationspotentials um 110 mVolt. Der Effekt ist also kleiner als bei den metallfreien (220 mVolt) und Zink-Derivaten (150 mVolt).

Erwähnenswert ist vielleicht noch, dass in der Chlorophyll a-Reihe der Unterschied im Potential von Phäophorbid und Pyrophäophorbid bei den metallfreien, wie auch bei den Zink- und Magnesium-Derivaten durchwegs ca. 60 mVolt beträgt.

1. 7. 4. Fluoreszenz- und ESR-Untersuchungen

Untersucht wurde nur das Fluoreszenzverhalten von Enol a (5) und Mg-enol a (33). Die Messungen von A. Syldatk⁹¹⁾ in sauerstoffreiem Methyltetrahydrofuran führten zu folgendem Ergebnis: Enol a (5) zeigte nur 0,19% der Fluoreszenzintensität von Methyl-phäophorbid a (2) (vgl. Exp. Teil 2. 1. 5.).

M. Hadorn bestimmte in einer Lösung von Magnesium-enol a (33) in sauerstofffreiem Dioxan eine Fluoreszenzintensität von 0,45% im Vergleich zu Methyl-chlorophyllid a (28) (vgl. Exp. Teil 2. 6. 6.).

Die gemessenen, sehr schwachen Emissionen sind mit grosser Wahrscheinlichkeit nicht der Enolform, sondern einer Beimengung (Ketoform?) zuzuschreiben, da man negative Stokes-Verschiebungen beobachtete.

B. Jaun⁸⁹⁾ gelang es, in einem Vorversuch elektrochemisch ein ESR-Signal von Magnesium-enol a (33) zu erzeugen. Er verwendete eine $5 \cdot 10^{-4}$ molare Lösung des Enols (33) in Methylenchlorid mit 5% Dimethylacetamid und Tetrabutylammoniumperchlorat (0,1 normal) als Leitsalz.

Bei RT wurde eine Linienbreite von $7,75 \pm 0,2$ Gauss mit einem g-Faktor von $2,0026 \pm 0,0002$ gemessen.

Weitere Untersuchungen sind zur Zeit noch in Arbeit.

1. 7. 5. Vergleich der Eigenschaften von P700 und Mg-enol a (33)

1) Im Vergleich zu Chlorophyll a (32) ist das Absorptionsmaximum der Rotbande von Mg-enol a (33) bathochrom verschoben. Je nach Lösungsmittel findet man folgende Werte:

Chlorophyll a (32):	660 - 666 nm	$\Delta\lambda = 22 - 24$ nm
Mg-enol a (33):	682 - 690 nm	
P700:	700 ± 5 nm ¹⁸⁾	
Chlorophyll a (in vivo):	680 nm	$\Delta\lambda = 15 - 25$ nm

2) Ein Unterschied tritt bei den Extinktionskoeffizienten der Rotbanden auf:

Mg-enol a (33):	$\epsilon = 28 - 33'000$	
P700:	$\epsilon = 64 - 70'000$ ¹⁷⁾	(indirekte Bestimmung)
Methyl-chlorophyllid a (28):	$\epsilon = 71 - 90'000$	

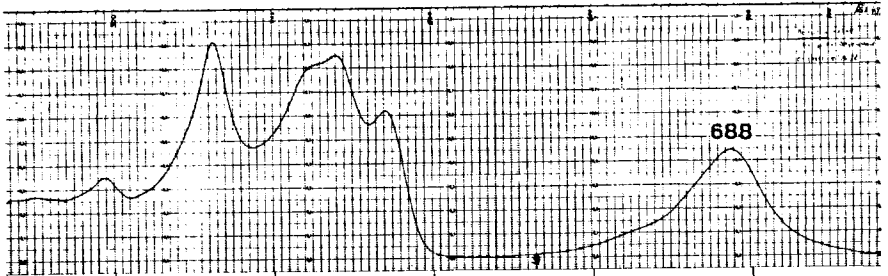


Fig. 8 Magnesium-enol a (33) (in Methylenchlorid)

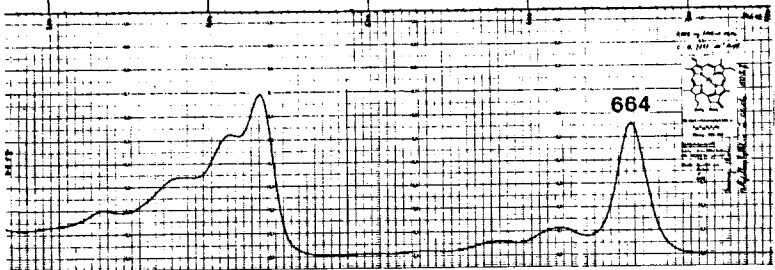


Fig. 9 Methyl-chlorophyllid a (28) (in Methylenchlorid)

- 3) Fluoreszenz wurde bei P700 ²⁷⁾ wie auch bei Mg-enol a (33) nicht beobachtet.
4) Die ESR-Signale von Chlorophyll a ³²⁾, Mg-enol a (33) ⁸⁹⁾ und P700 ^{21) 32)} weisen alle einen g-Faktor von $2,0025 \pm 0,0002$ auf.

Unterschiede findet man in den Linienbreiten:

P700:	$7,0 \pm 0,2$ Gauss ³²⁾
Chlorophyll a:	$9 - 11$ Gauss ³²⁾
Mg-enol a (33):	$7,75 \pm 0,2$ Gauss ⁸⁹⁾

- 5) Die Bestimmung des Oxidationspotentials von P700 durch Ferro/Ferricyanid-Titration lieferte Werte zwischen 430 und 520 mVolt ^{19) 26) 31)}. Chlorophyll a wurde bei diesen Experimenten nicht verändert, d. h. es muss somit ein positiveres Oxidationspotential aufweisen.

Aus den Messungen von J. L. Luisier ⁶⁴⁾ ist zu entnehmen, dass Mg-enol a (33) ein um 110 mVolt niedrigeres Oxidationspotential aufweist als Methyl-chlorophyllid a (28).

Wenn man einerseits die oben beschriebenen Eigenschaften von P700 mit Mg-enol a (33) und andererseits von P700 mit Chlorophyll a vergleicht, stellt man fest, dass fast alle Messwerte von Mg-enol a (33) zwischen denen von P700 und Chlorophyll a liegen. Ausgenommen davon sind die Extinktionskoeffizienten der Rotbande, welche beim Mg-enol a (33) deutlich kleiner sind. Dabei ist zu beachten, dass die UV/VIS-Spektroskopie die Ueberlagerung zweier Komponenten mit leicht verschieden liegender Rotbande erfassen könnte, dann nämlich, wenn das Proton asymmetrisch zwischen den beiden Sauerstoffen im Enolchelate liegt, d. h. wenn zwei miteinander im Gleichgewicht stehende Protonchelate existierten. Die Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass die Rotbande von Mg-enol a (33) deutlich breiter ist als die von Chlorophyll a. In diesem Zusammenhang ist auch zu berücksichtigen, dass gerade diesbezügliche Unterschiede zwischen dem Enol eines β -Diketons und eines β -Ketoesters auftreten könnten.

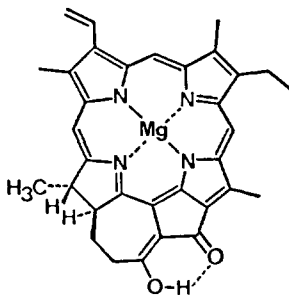
Untersuchungen, die interessierenden Eigenschaften von definierten Chlorophyll-enol-exo-Komplexen festzustellen, werden zur Zeit von F. Thönen ⁹²⁾ am Beispiel eines isolierbaren Borchelates ausgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Ausgehend von natürlichen Chlorophyllen (Pflanzen- und Bakterienextrakten), wurden erstmals Enolformen von daraus hergestellten metallfreien Derivaten synthetisiert und vollständig charakterisiert.

Zum Einbau von Magnesium in Chlorine und Porphyrine wurde ein neues Reagens entwickelt: Jodmagnesiumsalz von BHT. Damit gelang es, die Derivate der Chlorophyll a-Reihe unter milden Bedingungen quantitativ zu komplexieren. Man erhielt durchwegs leicht kristallisierbare Produkte.

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Enol-Derivate, insbesondere die von "Magnesium-enol a" (33), wurden mit denen des Reaktionszentrenchlorophylls grüner Pflanzen (P700) verglichen. Als Beitrag zur Diskussion um die Struktur von P700 wurde die Frage bearbeitet, ob es sich bei diesem biologisch so bedeutenden Molekül um ein Enolderivat von Chlorophyll a handeln könnte.



(33)

2. EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine Bemerkungen

Nach dem Absaugen der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (Wasserstrahlvakuum, Badtemperatur 50-60°C) wurde die Apparatur generell mit Stickstoff oder Argon gespült.

IR-Spektren:

aufgenommen auf Perkin-Elmer Gitterspektrographen PE 125 und PE 257. Für die Aufnahmen auf dem Gerät PE 125 möchte ich den Herren H. Hediger und R. Dohner danken. Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch durch basisches Alox (Woelm, Akt. I) filtriert. Die relativen Bandenintensitäten sind qualitativ charakterisiert mit den Symbolen: s = stark, m = mittel, w = schwach, vw = sehr schwach.

UV/VIS-Spektren:

aufgenommen auf Cary-Spektrophotometer, Modell 14 und 17. Für die Bestimmung der Extinktionen (ϵ -Werte in Klammern angegeben) wurde der Lösungsmittelgehalt berücksichtigt. Für Routinespektren verwendete man das Modell Perkin-Elmer PE 402. (Positionsabweichungen bei Messungen auf PE 402 gegenüber Cary 14, je nach Zustand des Geräts bis zu ± 5 nm; optische Dichten gemessen auf PE 402 generell um 5-8% niedriger als entsprechende Werte auf Cary 14). Die Lösungsmittel Benzol und Aether destillierte man vor Gebrauch über Natriumhydrid. Methylchlorid wurde durch basisches Alox (Woelm, Akt. I) filtriert. Es bedeuten: max = Maximum, min = Minimum, sh = Schulter.

NMR-Spektren:

für die Aufnahmen mit dem Gerät Varian Spektrometer HA-100 (100 MHz) danke ich Fräulein I. Buhrow und Fräulein B. Brandenburg. Orientierende Spektren wurden auf Varian T-60 (60 MHz) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ (in ppm) sind bezogen auf Tetramethylsilan als interne Reverenz. Es bedeuten: s = Singlett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, dd = Doppeldublett, m = Multiplett. Deuteriochloroform wurde vor Gebrauch durch

basisches Alox (Woelm, Akt. I) filtriert. In der Rubrik: "Anzahl Protonen, beobachtet", wird die aus dem Integral berechnete Protonenzahl aufgeführt, wobei das Integral bei einer Signalgruppe (meist Methinprotonen) geeicht wurde (Symbol \longleftrightarrow).

- Massenspektren: aufgenommen auf Massenspektrographen Hitachi RMU 6-A (einfach fokussierend) und RMU 6-D (doppelt fokussierend). Die Ionisationsenergie betrug 70 eV, die ungefähren Zuführungstemperaturen sind bei den einzelnen Spektren angegeben. Ich danke Herrn Prof. Dr. J. Seibl für die in seinem Laboratorium aufgenommenen Spektren.
- Elementaranalysen: wurden unter der Leitung von Herrn W. Manser ausgeführt.
- Schmelzpunkte: im offenen Röhrchen mit einer Apparatur nach Dr. Tottoli bestimmt; die Werte sind nicht korrigiert.
- Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (0,063 - 0,2 mm) Merck
Cellulose CF 11 (für Säulenchromatographie) Whatman
- Dünnschichtchromatographie: Kieselgel (DC-Folien) Woelm
Cellulose (DC-Alufolien, Schichtdicke 0,1 mm) Merck
- Abkürzungen: DC Dünnschichtchromatogramm
HV Hochvakuum
MG Molekulargewicht
RT Raumtemperatur
RV Rotationsverdampfer
Smp Schmelzpunkt

Qualität der meist verwendeten Lösungsmittel und Reagentien

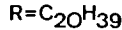
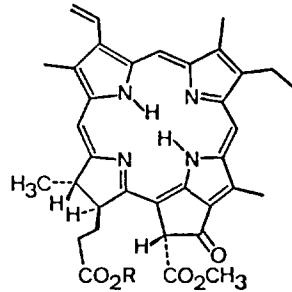
Soweit im Text keine speziellen Angaben gemacht werden, sind die Lösungsmittel und Reagenzien in der folgenden Qualität verwendet worden:

Aceton	Merck; zur Analyse
Acetonitril	Fluka AG; puriss. p. a., über Phosphorpentoxid destilliert
Aether (=Diäthyläther)	über Natriumhydrid destilliert
Aethyljodid	Fluka AG; puriss. p. a., vor Gebrauch destilliert
Benzol	Merck; zur Analyse, über Natriumhydrid destilliert
BHT	2, 6-Di-tert. -butyl-p-kresol ("Butylhydroxytoluol"): Fluka AG; purum, vor Gebrauch am HV bei 60°C sublimiert
Chloroform	Merck; zur Analyse, vor Gebrauch durch basisches Alox (Woelm, Akt. Super I) filtriert
1, 2-Dichloräthan	Fluka AG; puriss. p. a., vor Gebrauch durch basisches Alox (Woelm, Akt. Super I) filtriert
Dioxan	zweimal über Natriumhydrid und einmal über Lithium-aluminiumhydrid destilliert
Dimethylsulfoxid	Fluka AG; puriss. p. a., über Natriumhydrid am HV destilliert
Hexan	destilliert
Methanol	Fluka AG; puriss. p. a. absolut und acetonfrei
Methylenchlorid	destilliert, vor Gebrauch durch basisches Alox (Woelm, Akt. Super I) filtriert
N-Aethyl-diisopropylamin	Fluka AG; purum, unter Argon über Natrium am Vakuum destilliert
N,N-Dimethylacetamid	Fluka AG; purum, zweimal über Calciumhydrid am Vakuum destilliert
Natriumsulfat	Fluka AG; puriss. p. a. wasserfrei
Orthoameisensäure-trimethylester	Fluka AG; purum, über Natriumhydrid destilliert
Phosphatpuffer	gesättigte wässrige Lösung von Natriumdihydrogenphosphat (~pH 3) mit einer Spur Ascorbinsäure (kurz vor Gebrauch zugeben)
Pyridin	Fluka AG; puriss. p. a., über Kaliumhydroxyd destilliert
Salzsäure	Merck; zur Analyse, min. 37%
1 N Salzsäure	Merck; Titrisol
Tetrachlorkohlenstoff	destilliert
Tetrahydrofuran	Fluka AG; puriss. p. a., vor Gebrauch über Kalium destilliert

2.1. DARSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN VON METALLFREIEN DERIVATEN DER CHLOROPHYLL a-REIHE

2.1.1. Phäophytin a (1)

Pflanzenextrakt *1)



(1) MG 871,23

Der rohe Pflanzenextrakt *1) enthielt die Phäophytine a (1) und b im Verhältnis von ungefähr 3:1, zusätzlich etwa 10% Carotinoide und einige allomerisierte Derivate. 50 g dieses Extraktes wurden an Kieselgel fraktioniert *2):

Chromatographie: 1,5 kg Kieselgel 60 (Merck) ohne weitere Behandlung eingesetzt. Säule: 8cm x 70cm, aufgezo-gen mit Tetrachlorkohlenstoff. Extrakt in ca. 250 ml Methylenchlorid gelöst und aufgetragen. Mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 98:2 eluiert. Tropfgeschwindigkeit: 150 ml/Stunde.

Die schwarze Zone am Säulenkopf wanderte sehr langsam, sodass die gelben und orangen Carotinoide vollständig eluiert werden konnten, bevor ein Chlorophyllderivat die Säule ganz durchwandert hatte. Diese wurde jedoch nicht mehr ganz farblos. Phäophytin a (1) zeigte nun den grössten Rf-Wert und erschien als eine konzentrierte schwarze Lösung. Die Säule war nun vollständig schwarz geworden und zeigte keine Zonen. Die Reinheit des Produktes wurde durch DC (Cellulose und Kieselgel), sowie durch UV/VIS-Spektroskopie bestimmt. Mischfraktionen, welche ein Derivat der Chlorophyll b-Reihe enthielten, wiesen im Absorptionsspektrum die Soretbande der b-Derivate auf, welche gegenüber jener der a-Derivate ca. 25 nm bathochrom verschoben ist. Ausserdem wurde die Farbe der Lösungen bräunlicher. Phäophytin b konnte nicht rein erhalten werden, die Fraktionen enthielten immer noch a- und b-Allomere.

Die DC-reinen Phäophytin a-Fraktionen wurden vereinigt, und das Lösungsmittel am RV abgesogen. Nach mehrstündigem Trocknen bei RT am HV wog man 18,5 g reines, wachsartiges Phäophytin a (1).

*1) Geschenk von Prof. H. H. Inhoffen; Ursprung: SANDOZ AG (Dr. A. Stoll) Basel.

*2) Gleiches Material verwendet wie H. Bierre; Diss. TH Braunschweig (1966) Seite 57.

Aus Vorsicht wurde die Chromatographiesäule mit Aluminiumfolie abgedeckt, um die Substanzen vor direktem Licht zu schützen. Bei der Trennung von 50 g Pflanzenextrakt dauerte die Fraktionierung ca. 7 Tage. Eine Erhöhung des Acetongehaltes bewirkte eine drastische Verschlechterung der Trennung. Nachdem alles reine Phäophytin a (1) abgetrennt worden war, wurde der Rest (Phäophytin b und Allo- mere) mit 6% Aceton eluiert und als Gemisch aufbewahrt.

Zur Charakterisierung wurde die Substanz (1) am HV bei 100°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

DC Rf=0,85 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(einheitlich)

Rf=0,6 (Kieselgel, Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 95:5)
(einheitlich)

IR (cm⁻¹) CCl₄ aufgenommen auf PE 257
3397vw, 2958s, 2925s, 2870m, 1740s, 1708s, 1620m,
1580w, 1550w, 1540w, 1500m, 1464m, 1454m, 1435m,
1410w, 1401w, 1379m, 1369m, 1348m, 1300m, 1221m,
1162s, 1123m, 1091w, 1060w, 1034m, 985m, 910w,
895w, 850vw, 709w, 671w.

UV/VIS (nm) Et₂O qualitativ, aufgenommen auf PE 402
663(0,47), 606(0,07), 530(0,09), 503(0,11), 406(1,00).

UV/VIS (nm) CCl₄ qualitativ, aufgenommen auf PE 402
668(0,51), 612(0,08), 536(0,10), 508(0,11), 414(1,00).

Die IR- und UV/VIS-Daten stimmen mit den Literaturwerten *3) überein.

*3) L. P. Vernon, G. R. Seely, "The Chlorophylls" (1966), p. 154, 195

Drei Jahre nach dieser Charakterisierung entwickelte Dr. J. Schreiber an unserem Laboratorium ein Hochdruckchromatographie-System, um die Reinheit von Chlorophyllderivaten zu prüfen.

Eine Analyse des rohen Pflanzenextraktes ergab folgendes Bild:

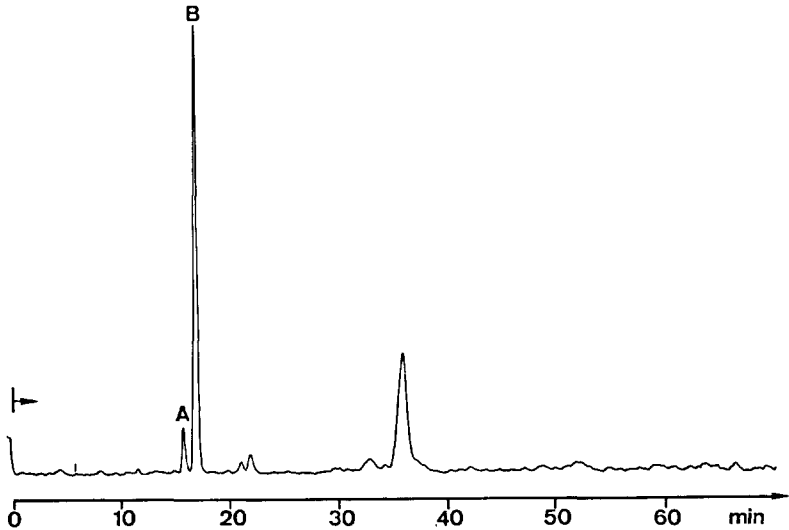


Abb. 1

Säule: 2 Säulen in Serie, je 7 x 240 mm, Partisil 5

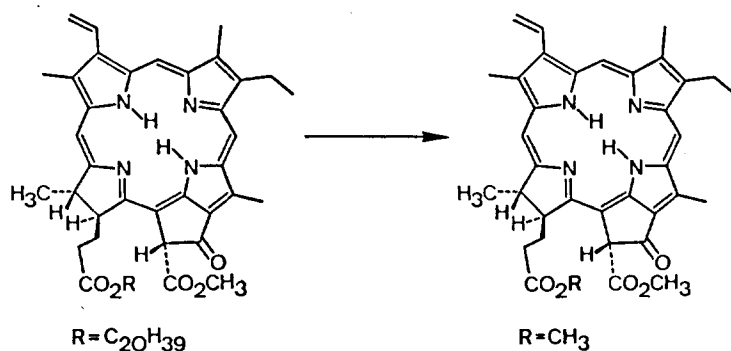
Lösungsmittel: Petroläther/Aether/Acetonitril 20:1:1; 65 ml/Stunde

Detektor: LDC-UV-Monitor (280 nm)

Wie man durch Einspritzen des chromatographierten "reinen" Phäophytins a (1) feststellte, liess sich durch die Kieselgelchromatographie die Phäophytin a-Fraktion sauber abtrennen. Man stellte aber immer noch das Auftreten von zwei Komponenten A und B fest. Qualitative UV/VIS-Spektren dieser, im folgenden voneinander getrennten Komponenten A und B waren praktisch identisch; es handelt sich also bei keiner der beiden Substanzen um ein Allomer, vermutlich jedoch um das C-10-Epimer. Untersuchungen, genaueren Einblick in die Natur dieser beiden Komponenten zu erhalten, sind zur Zeit noch im Gange.

2.1.2. Methyl-phäophorbid a (2)

Substanz erstmals dargestellt von R. Willstätter *4)



(1) MG 871,23

(2) MG 606,73

3,06 g (3,5 mMol) Phäophytin a (1) *5) wurden in einem Rundkolben mit 200 ml absolutem Methanol und 6 ml konzentrierter Schwefelsäure *6) versetzt. Die tiefblaue Lösung wurde viermal am Wasserstrahl evakuiert, mit Argon begast und anschließend eine Stunde am Rückfluss gekocht. Zur Aufarbeitung wurde die Lösung abgekühlt auf 1,2 l Eiswasser und 500 ml Methylchlorid gegossen und im Scheidetrichter intensiv geschüttelt. Zweimal wurde die organische Phase mit Eiswasser und etwas Phosphatpuffer gewaschen. Die Wasserphasen extrahierte man nun noch einige Male mit frischem Methylchlorid. Emulsionen konnten durch die Zugabe von etwas Aether gebrochen werden. Die vereinigten dunkelgrauen organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, dann filtriert, und das Lösungsmittel am RV abgesogen. Darauf wurde die Substanz einige Stunden am HV bei RT nachgetrocknet. Das freigesetzte Phytol und den Phytol-methyläther entfernte man durch dreimaliges Waschen der amorphen, trockenen Substanz mit wenigen ml Hexan. Zur Kristallisation löste man das Rohprodukt in möglichst wenig Methylchlorid und versetzte diese Lösung mit warmem Aceton. Das Lösungsmittel wurde am Wasserstrahlvakuum langsam abgesaugt, bis sich in der Wärme Kristallkeime bildeten. Nun liess man die Lösung langsam auf RT abkühlen. Zur Vervollständigung der Kristallisation wurde der Ansatz unter Argon über Nacht in den Kühlschrank (4°C) gestellt. Nach dem Entfernen der Mutterlauge wurden die blau glänzenden Kristalle einmal mit wenig kaltem Aceton gewaschen. Die Ausbeute an kristallinem, DC-reinem Methyl-phäophorbid a (2) betrug 1,83 g (=86% bez. Phäophytin a (1)).

Nicht mehr kristallisierbare Mutterlauge aus verschiedenen Nachschubansätzen wurden jeweils vereinigt und an der 50-fachen Menge Kieselgel chromatographiert. Man eluierte mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 94:6 und kristallisierte das so gereinigte Material wie oben beschrieben.

*4) R. Willstätter, A. Stoll; Untersuchungen über Chlorophyll, Berlin (1913), Seite 284

*5) DC-reines, getrocknetes Material, wie beschrieben

*6) Schwefelsäure 95-97%; Merck; zur Analyse

Verseiftes Produkt, welches mittels DC leicht erkannt wurde (Rf-Wert = 0), liess sich mit Diazomethan in Aether und Methylenchlorid sofort verestern. Die bei der Chromatographie des Pflanzenextraktes *1) angefallenen Gemischfraktionen, welche unter anderem noch Phäophytin a (1) enthielten, konnten ohne Schwierigkeiten umgeestert und anschliessend als Methylester an Kieselgel gereinigt werden.

Zur Analytik gelangte eine Probe, die zweimal aus Aceton umkristallisiert und 5 Stunden am HV (0,005 Torr) bei 75°C getrocknet worden war.

$C_{36}H_{38}N_4O_5$ ber. C 71,26 H 6,31 N 9,23 über Co_3O_4
gef. C 71,18 H 6,38 N 9,19 verbrannt

Smp. 223-224°C (Zers.)

DC Rf=0,49 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)

IR (cm⁻¹) $CHCl_3$ aufgenommen auf PE 257 c=1%
3400vw, 3030vw, 3000w, 2965w, 2930w, 2870w, 1737s,
1695s, 1620m, 1585w, 1553w, 1500m, 1451w, 1436w,
1410w, 1400w, 1370w, 1349w, 1300w, 1164m, 1122w,
1093w, 1060w, 1035m, 988m, 910w, 896w, 850vw.

NMR (ppm) $CDCl_3$ 0,05 molar in Normalzelle (Probe von F. Thönen) Abb. 2

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen		ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen	
	beob.	theor.		beob.	theor.
-1,82	1,0	s/1H N-H	4,24		
1,55 J=7,5Hz	3,6	t/3H 4'	4,45	2,3	{ m/1H 7 m/1H 8
1,84 J=7,5Hz	3,0	d/3H 8'	6,00 J=12Hz, J=1,5Hz	2,0	{ dd/1H 2' dd/1H 2''
~2,4	4,0	m/4H 7' 7''	6,09 J=18Hz, J=1,5Hz		
2,95	3,0	s/3H 3	6,25	1,0	s/1H 10
3,28		s/3H 1	7,71 J=18Hz, J=12Hz	1,0	dd/1H 2
3,37	5,6	q/2H 4	8,47	1,0	s/1H δ
3,60	6,0	s/6H 12 5	9,00	1,0	s/1H α
3,91	3,0	s/3H 11	9,19	1,0	s/1H β

UV/VIS (nm) C_6H_6 0,460 mg in 100 ml Benzol, c=0,758·10⁻⁵Mol/l
670,3(53'850), 613,0(7'980), 561,8(3'020), 537,6(9'910),
508,0(11'540), 470,0(4'090), 414,4(110'790), 401,8(88'370),
381,8(57'690), 324,1(21'100).

UV/VIS (nm) CH_2Cl_2 0,500 mg in 100 ml CH_2Cl_2 , c=0,824·10⁻⁵Mol/l
667,2(45'270), 610,0(8'130), 558,6(3'240), 537,6(9'710),
Abb. 3 508,1(10'680), 474,5(4'530), 413,1(102'520), 401,5(88'340),
380,0(58'610), 326,5(22'930), 278,1(14'560).

UV/VIS (nm) $C_4H_8O_2$ aufgenommen auf PE 402 (Probe von G. Hoornaert)
0,428 mg in 50 ml Dioxan, c=1,41·10⁻⁵Mol/l
663(48'600), 606(7'400), 532(9'160), 504(11'280),
409(105'700), 328(21'900).

UV/VIS (nm) C₅H₅N (Probe von H. Falk)
0,374 mg in 50 ml Pyridin, c=1,23·10⁻⁵ Mol/l
668,9(52'000), 611,2(9'000), 562,0(3'800), 539,2(11'000),
508,2(12'200), 475,0(4'900), 415,3(115'000),
402,0(93'500), 376,0(57'000).

Die Spektren von H. Falk, G. Hoornaert und F. Thönen sind nicht von dem analytischen Material aufgenommen. Der Vollständigkeit halber wurden sie hier trotzdem aufgeführt.

MS (m/e) 400^oC 610(7%), 609(9%), 608(7%), 607(29%), 606(60%/M⁺),
605(5%), 604(5%), 603(6%), 602(7%), 574(100%/M⁺-
CH₃OH), 548(66%/M⁺-COOCH₂), 519(10%/M⁺-
CH₂CH₂COOCH₃), 516(15%/M⁺-COOCH₂, -CH₃OH),
487(40%/M⁺-CH₂CH₂COOCH₃, -CH₃OH), 461(33%/M⁺-
COOCH₂, -CH₂CH₂COOCH₃), 459(35%/M⁺-COOCH₂, -
CH₂CH₂COOCH₃, -2H), 446(13%/M⁺-COOCH₂, -CH₃, -
CH₂CH₂COOCH₃), 433(15%/M⁺-COOCH₂, -CO, -
CH₂CH₂COOCH₃), 274(30%/M⁺).

Im Gegensatz zu den starken C-H-Absorptionen im IR-Spektrum von Phäophytin a (1), sind sie im Methyl-phäophorbid a (2) nur noch schwach, was durch das Fehlen der Phytolgruppe (C₂₀) bedingt ist. Die C=O-Carbonylschwingungen der beiden Ester und des Ketons ergeben zwei ungefähr gleichgrosse, starke Absorptionen. Der Erfolg der Umesterung ist jedoch eindeutig im DC ersichtlich, da der R_f-Wert des Methylesters (2) deutlich kleiner als der von Phäophytin a (1) ist.

Absorptionsspektren in den verschiedenen Lösungsmitteln unterscheiden sich lediglich in geringfügigen Verschiebungen der Maxima und kleinen Aenderungen der Extinktionskoeffizienten *7).

Die Resonanzlagen der Protonen im NMR-Spektrum sind sehr konzentrationsabhängig. Man kann oft Abweichungen in der Grössenordnung von 0,2 ppm beobachten. Die Zuordnung der Piks ist in der Literatur eingehend diskutiert *8).

Massenspektren mit gleichem Abspaltungsmuster aber verschiedenen relativen Intensitäten findet man in der Literatur *9) *10).

*7) B. Briat, D. A. Schooley, R. Records, E. Bunnenberg, C. Djerassi, J. Amer. chem. Soc. 89, 6170 (1967)

*8) L. P. Vernon, G. R. Seely, "The Chlorophylls" (1966), p. 223

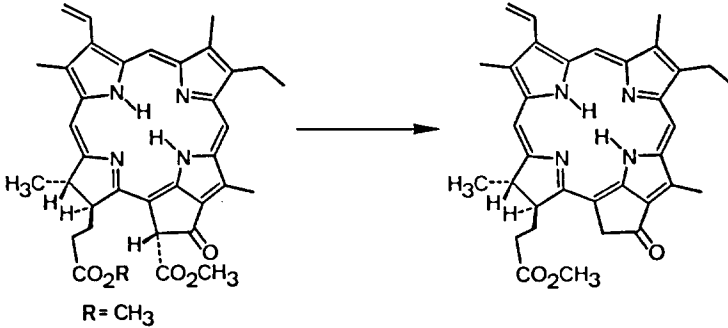
*9) D. R. Hoffman, J. Org. Chem. 30, 3512 (1965)

*10) A. H. Jackson, G. W. Kenner, K. M. Smith, R. T. Aplin, H. Budzikiewicz, C. Djerassi, Tetrahedron 21, 2913 (1965)

2. 1. 3. Methyl-pyrophäophorbid a (3)

Substanz erstmals dargestellt von J. B. Conant *11)

Leicht modifizierte Vorschrift von H. Fischer *12)



(2) MG 606, 73

(3) MG 548, 69

(Reaktionsbedingungen und spektroskopische Daten von G. Hoornaert)

5,0 g (8,25 mMol) Methyl-phäophorbid a (2) *13) wurden in 400 ml absolutem Pyridin gelöst, in einen 1000 ml-Glasautoklaven gegeben, fünfmal am Wasserstrahl evakuiert (Trockenturm mit Calciumchlorid zwischen Wasserstrahlpumpe und System) und jeweils dazwischen mit Argon bis zu einem Ueberdruck von zwei Atmosphären gefüllt. Zuletzt belass man den Autoklaven unter einem Ueberdruck von 0,3 Atmosphären und erhitzte ihn während 4 Tagen auf 104°C. Die Lösung wurde nun abgekühlt, in einen Rundkolben transferiert, und das Lösungsmittel am RV abgesogen. Den Rückstand versetzte man mehrmals mit Benzol und sog dieses wieder ab, bis kein Geruch von Pyridin mehr feststellbar war. Zur Kristallisation wurde die dunkelblaue Substanz mit möglichst wenig Methylenchlorid gelöst und mit warmem Aceton versetzt. Am Wasserstrahlvakuum wurde die Lösung vorsichtig so lange eingengt, bis sich Kristallkeime bildeten. Man liess nun langsam auf RT abkühlen und vervollständigte die Kristallisation, indem man den Kolben unter Argon über Nacht in den Kühlschrank (4°C) stellte. Die Mutterlauge wurde abpipettiert und die blau glänzenden Kristalle einmal mit kaltem Aceton gewaschen. Die Ausbeute betrug 3,84 g DC-reines Methyl-pyrophäophorbid a (3) (=85% bez. Methyl-phäophorbid a (2)).

Mutterlaugen aus verschiedenen Ansätzen wurden vereinigt und mit Diazomethan in Aether und Methylenchlorid behandelt, um zum Teil verseiftes Produkt wieder zu verestern. Nach der Chromatographie an der 50-fachen Menge Kieselgel mit Tetra-chlorkohlenstoff/Aceton 95:5 liess sich das so gereinigte Material (3) wieder gut kristallisieren.

*11) J. B. Conant, J. F. Hyde, J. Amer. chem. Soc. 51, 3668 (1929)

*12) H. Fischer, L. Filser, W. Hagert, O. Moldenhauer, Liebigs Ann. Chem. 490, 1 (1931)

*13) DC-reines, getrocknetes kristallines Material mit Smp. 223-224°C

Der Erfolg der Pyrolyse lässt sich nur im NMR- oder IR-Spektrum eindeutig feststellen. Im NMR verschwindet das Singlett des Protons am C-10 bei 6,21 ppm sowie das der Methoxycarbonylgruppe bei 3,86 ppm. Hingegen entsteht ein AB-System bei 5,1 ppm, welches von den diastereotopen Protonen am C-10 herrührt. Im IR-Spektrum erscheint die Esterbande bei 1732 cm^{-1} nach der Reaktion um ca. die Hälfte verkleinert.

Es wurde festgestellt, dass kristallines Methyl-pyrophäophorbid a (3) sich im Laufe eines Jahres zu einem kleinen Teil zersetzt; auf der DC zeigte sich ein minimaler Startfleck. Um wieder reines Material zu erhalten, musste chromatographiert werden. Das Zersetzungsprodukt ist mit Diazomethan unreaktiv und somit kein Hydrolyseprodukt der Estergruppe.

Zur Analytik gelangte eine Probe, die dreimal aus Aceton umkristallisiert, 5 Stunden bei 75°C und weitere 15 Stunden bei RT am HV (0,01 Torr) getrocknet worden war.

$\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_3$	ber.	C 74,42	H 6,61	N 10,21
	gef.	C 74,33	H 6,68	N 10,25

Smp. 217-218°C (Zers.)

DC Rf=0,49 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)

IR (cm^{-1}) CHCl_3 c=5%
 3400w, 3020w, 3004m, 2967m, 2928m, 2870w, 1732m, 1688s, 1620m, 1581w, 1553w, 1535w, 1498m, 1465w, 1451w, 1438w, 1409w, 1400w, 1378w, 1367w, 1346w, 1303w, 1161m, 1122w, 1110w, 1090w, 1058w, 1025m, 980m, 921w, 910w, 892w, 868w, 850w, 819w.

UV/VIS (nm) C_6H_6 (Probe aus analogem Ansatz)
 0,418 mg in 100 ml Benzol, c=0,7618·10⁻⁵ Mol/l
 670,3(53'020), 612,5(7'430), 561,2(2'760), 538,8(9'250), 508,3(11'370), 473,6(4'070), 414,8(111'380), 401,9(85'190), 381,9(55'660), 320,8(19'340).

UV/VIS (nm) CH_2Cl_2 (Probe aus analogem Ansatz)
 0,468 mg in 100 ml CH_2Cl_2 , c=0,8529·10⁻⁵ Mol/l
 667,5(45'310), 610,0(7'390), 558,4(2'770), 538,8(8'680), 509,0(10'150), 477,3(3'520), 413,7(103'760), 402,3(85'070), 382,7(58'620), 321,8(21'220).

UV/VIS (nm) $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ 0,230 mg in 50 ml Dioxan, c=0,8384·10⁻⁵ Mol/l
 668,2(51'300), 610,0(7'700), 560,7(2'920), 537,0(8'950), 507,7(11'620), 472,1(4'300), 412,4(110'900), 400,0(88'300), 380,0(58'700), 318,5(20'000).

MS (m/e) 300°C 551(4%), 550(15%), 549(41%), 548(100%/M⁺), 533(6%/M⁺-CH₃), 461(37%/M⁺-CH₂CH₂COOCH₃), 433(17%/M⁺-CH₂CH₂COOCH₃, -CO), 274(4%/M⁺⁺).

Die spektroskopischen Daten sind in Übereinstimmung mit den Literaturwerten *7) *9) *10).

NMR (CDCl ₃) 0,06 molar (Abb. 4)		NMR (CDCl ₃) 0,10 m (220 MHz)		NMR (C ₂ D ₅ N) 0,06 molar		Zuordnung + Anzahl Protonen theoretisch	
ppm	Anzahl Protonen beob.	ppm	Anzahl Protonen beob.	ppm	Anzahl Protonen beob.		N-H
-1,84	0,85					s/1H	4'
1,61 J=7Hz	6,2	1,50 J=7Hz	3,5	1,62 J=7Hz	5,7	t/3H	4'
1,80 J=7,5Hz		1,76 J=7Hz	3,5	1,80 J=7Hz		d/3H	8'
2,4	4,0	2,20 J=8Hz	2,5	2,6	4,3	m/2H	7'
3,09		2,54 J=8Hz	2,7	2,6	4,3	m/2H	7''
3,35	13,8	2,91	3,5	3,18	2,9	s/3H	3
3,52 J=7Hz		3,26	6,6	3,36	2,9	s/3H	1
3,56	3,5	3,32 J=7Hz	3,5	3,66 J=7Hz	7,4	q/2H	4
3,63		3,43	3,5	3,63		s/3H	12
4,25	2,1	3,60	3,5	3,67	2,1	s/3H	5
4,44		4,16 J=8Hz	1,2	4,37		m/1H	7
5,07 J=20Hz	1,9	4,38 J=8Hz	1,1	4,55	2,0	m/1H	8
5,20 J=20Hz		5,01 J=20Hz	2,1	5,22 J=20Hz		d/1H	10
6,07 J=12Hz, J=1,5Hz	2,0	5,15 J=20Hz	2,1	5,42 J=20Hz	2,0	d/1H	11
6,18 J=18Hz, J=1,5Hz		6,02 J=12Hz	2,1	6,16 J=12Hz, J=1,5Hz		dd/1H	2'
7,85 J=18Hz, J=12Hz	0,9	6,11 J=18Hz	1,0	6,30 J=18Hz, J=1,5Hz	1,0	dd/1H	2''
8,47		7,74 J=18Hz, J=12Hz	1,0	8,11 J=18Hz, J=12Hz		dd/1H	2
9,15	1,0	8,48	1,0	8,79	0,9	s/1H	8
9,23	1,0	9,03	2,0	9,58	0,8	s/1H	α
		9,09	2,0	9,71	0,8	s/1H	β

Auch beim Methyl-pyrophosphorbid a (3) sind die chemischen Verschiebungen der Protonen im NMR-Spektrum stark von der Konzentration abhängig. Die Signale lassen sich jedoch eindeutig zuordnen und sind in Übereinstimmung mit den Literaturwerten *8).

Nach Abschluss der synthetischen Arbeiten eröffnete sich die Möglichkeit, die Reinheit des Produktes (3) mittels der Hochdruckchromatographie zu bestimmen. Es gelang Dr. J. Schreiber, Methyl-phosphorbid a (2) und Methyl-pyrophosphorbid a (3) eindeutig zu trennen, wobei die Erfassungsgrenze die Möglichkeiten der NMR-Spektroskopie hoch übersteigt.

Hochdruckchromatographie: Kieselgur, 2 Säulen in Serie (je 240 x 5mm), N=2100, Hexan/Chloroform/Tetrahydrofuran/Oxydipropionitril
 20 5 2 1

Phäophytin a (1)	$k' = 0$
Methyl-pyrophosphorbid a (3)	$k' = 0,37$
10-Methoxy-diketon a (7)	$k' = 0,75$
Methyl-phosphorbid a (2)	$k' = 1,00$

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 \qquad k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

N = theoretische Bodenzahl

$\sigma = 1/2$ Halbwertsbreite in 0,6 der Pikhöhe

t_R = Retentionszeit bez. Injektionszeitpunkt

t_0 = Retentionszeit der Front

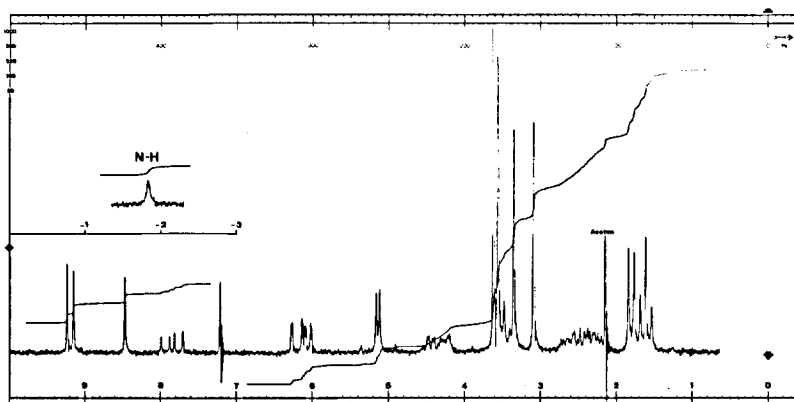
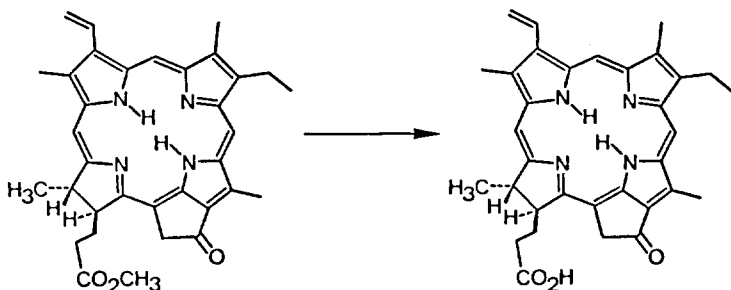


Abb. 4

2.1.4. Pyrophäophorbid a (4)

Substanz erstmals dargestellt von J. B. Conant *11)



(3) MG 548,69

(4) MG 534,66

(Dieses Experiment wurde von G. Hoornaert ausgeführt)

350 mg (0,64 mMol) Methyl-pyrophäophorbid a (3) *14) wurden in 7 ml Eisessig *15) gelöst und mit 14 ml 10%-iger Salzsäure *16) versetzt. Man rührte unter Argon während 20 Minuten bei 70°C. Die abgekühlte Lösung wurde auf 350 ml Methylenchlorid gegossen. Man wusch die organische Phase mit Eiswasser neutral, filtrierte sie durch Watte und saugte das Lösungsmittel am RV ab. Das amorphe Material wurde kurz am HV getrocknet, dann mit wenig Methylenchlorid gelöst und mit warmem Aceton versetzt. Die Lösung wurde langsam am Wasserstrahlvakuum eingeengt bis sich Kristallkeime bildeten. Zur Vervollständigung der Kristallisation stellte man die Lösung über Nacht in den Kühlschrank (4°C). Die Ausbeute an kristallinem, DC-reinem, blauglänzendem Pyrophäophorbid a (4) betrug 236 mg (=69% bez. Methyl-pyrophäophorbid a (3)).

Nicht mehr weiter kristallisierbare Mutterlaugen wurden vereinigt, an der 50-fachen Menge Kieselgel mit Methylenchlorid/Aceton/Methanol 1:1:0,15 chromatographiert und anschliessend kristallisiert.

Zur Analytik gelangte eine Probe, die einmal aus Aceton und dreimal aus Methanol/Chloroform kristallisiert und 75 Stunden am HV (0,01 Torr) bei 100°C getrocknet worden war.

$C_{33}H_{34}N_4O_3$	ber.	C 74,13	H 6,41	N 10,48
	gef.	C 74,05	H 6,45	N 10,41

Smp. 254-256°C (Zers.)

DC Rf=0,55 (Cellulose, Hexan/Aceton/Isopropanol 100:10:3)

*14) DC-reines, getrocknetes Material, wie beschrieben

*15) Eisessig 100%: Merck; zur Analyse

*16) Salzsäure rauchend: Merck; zur Analyse, auf 10% verdünnt

IR (cm⁻¹) CHCl₃

c 1%

3690w, 3605w, 3508w, 3400w, 3300-2500breit, 3000w, 2967m, 2928m, 2871w, 1743w, 1686s, 1620m, 1580w, 1552w, 1531w, 1495m, 1462w, 1450w, 1408w, 1398w, 1377w, 1365w, 1345w, 1300w, 1159w, 1121w, 1107w, 1089w, 1055w, 1023w, 978m, 910w, 890w, 865w, 847w.

NMR (C₅D₅N) 0,06 molar

NMR (DMSO) 0,05 molar

ppm	Anzahl Protonen beob.	ppm	Anzahl Protonen beob.	Zuordnung + Anzahl Protonen theoretisch
1,60 J=7Hz	6,4 {	1,40 J=7Hz	3,5	t/3H 4'
1,82 J=7Hz		1,74 J=7Hz	3,5	d/3H 8'
2,6	4,8		16 {	m/4H 7' 7''
3,14	3,2	2,85		s/3H 3
3,33	3,1	3,29	2,8 {	s/3H 1
3,62 J=7Hz	5,2 {			q/2H 4
3,64			3,38	s/3H 5
4,46	2,0 {	4,25	1,6 {	m/1H 7
4,59		4,53		m/1H 8
5,29 J=20Hz	2,1 {	5,09	2,0 {	d/1H 10
5,49 J=20Hz				6,04 J=12Hz, J=1,5Hz
6,14 J=12Hz, J=2Hz	2,0 {↔		0,7	dd/1H 2''
6,29 J=18Hz, J=2Hz		6,16 J=18Hz, J=1,5Hz		dd/1H 2
8,08 J=18Hz, J=12Hz	1,4	7,87 J=18Hz, J=12Hz	3 {↔↔	s/1H δ
8,77	1,0	8,71		s/1H α
9,53	0,9	8,92	9,11	s/1H β
9,66	0,9			

UV/VIS (nm) C₄H₈O₂

0,226 mg in 50 ml Dioxan, c=0,846·10⁻⁵ Mol/l
668,2(54'910), 611,2(7'910), 560,0(2'950), 537,1(9'450),
508,6(12'090), 472,4(4'680), 412,1(118'540), 401,2(95'640),
380,0(62'350), 319,0(21'250), 272,9(17'480).

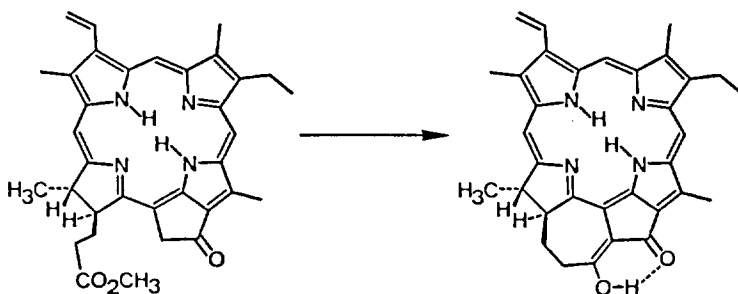
MS (m/e) 350°C

538(3%), 537(5%), 536(12%), 535(43%), 534(100%/M⁺),
519(11%/M⁺-CH₃), 489(6%/M⁺-COOH), 461(16%/M⁺-
CH₂CH₂COOH), 433(22%/M⁺-CH₂CH₂COOH, -CO),
267(11%/M⁺⁺).

Diese Verbindung zeigt im DC einen viel kleineren Rf-Wert als der Ester (3). Auch im IR-Spektrum findet man als Anhaltspunkt eine breitere Absorption zwischen 3200 und 2500 cm⁻¹, hingegen verschwindet die Esterbande bei 1732 cm⁻¹. Das Absorptionsspektrum ist praktisch identisch mit dem des Methylesters (3). Wegen der ungenügenden Löslichkeit der Pyrophosphorbid-a-Säure (4) in Chloroform wurden die NMR-Spektren in Pyridin und Dimethylsulfoxid aufgenommen.

2.1.5. "Enol a" (5)

Substanz erstmals beobachtet von G. Hoornaert *17)



(3) MG 548,69

(5) MG 516,65

(Versuch ausgeführt von H. Falk *18))

Vorbemerkungen:

Das Gelingen der Reaktion ist zum grossen Teil davon abhängig, dass Wasser und Sauerstoff bis zur Aufarbeitung rigoros ausgeschlossen werden. Weiter sollte die Reaktion von zwei Experimentatoren mit genau abgestimmtem Aufgabenbereich ausgeführt werden, um die optimalen Zeiten exakt einhalten zu können. Die mehrfach reproduzierte Reaktion wurde im allgemeinen in zwei oder mehreren parallelen Ansätzen mit 0,5 mMol Edukt (3) ausgeführt, wobei die Rohprodukte zur Reinigung und Kristallisation vereinigt wurden. Die Umsetzung der doppelten Menge (1,0 mMol) verlief ebenfalls ohne Schwierigkeiten, wenn die Zeiten richtig eingehalten wurden. Man beschränkte sich jedoch auf die kleineren Ansätze, da im Falle eines Misserfolges auch die Verluste kleiner würden.

2.Parallelsätze, ausgeführt im Abstand von ca. 1 Stunde

274,3 mg (0,5 mMol) Methyl-porphäophorbid a (3) *19) wurden in einem 50 ml-Rundkolben mit Y-Stück, Hahn und Serumkappe (Vgl. Abb. 5) in 15 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und durch dreimaliges Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und Abpumpen der Atmosphäre am Hochvakuum (0,01 Torr) entgast. Das System wurde danach mit einem Argonballon versehen und auf 25°C erwärmt. Man musste sich vergewissern, dass wirklich alles Edukt gelöst war.

*17) G. Hoornaert, Arbeitsbericht ETH (1970)

*18) H. Falk, Arbeitsbericht ETH (1971)

*19) DC-reines, zweimal aus Aceton kristallisiertes und 15 Stunden bei 80°C, sowie anschliessend 6 Stunden bei 95°C am HV (0,05 Torr) getrocknetes Material; Smp. 223°C (Sintern bei 216°C).

Unter stetigem Schwenken des Reaktionsgefäßes wurden mittels einer Injektions-spritze mit langer Hohnadel ($\varnothing=0,8\text{mm}$) insgesamt 16 ml (3,2 mMol) einer 0,2-molaren Natriumhexamethyldisilazanat-Lösung *20 über die dunkelgraue Lösung gespritzt; diese färbte sich zunächst moosgrün, nach erfolgtem Einfluss von 13 ml Baselösung trat ein Farbumschlag nach schmutziggelb auf (Dauer der Zugabe: 2-2 $\frac{1}{2}$ Minuten). Während der Basenzugabe blieb das Reaktionsgemisch homogen, d. h. es wurde kein Niederschlag beobachtet. Ausserdem stellte man eine leichte Erwärmung fest.

Hierauf wurde das Reaktionsgemisch so rasch wie möglich in einem Guss in eine Mischung von 400 ml Methylenchlorid, 100 ml Phosphatpuffer *21) und 100 ml Eis in einem Scheidetrichter, welche zuvor 15 Minuten lang mit Stickstoff durchspült worden war, gekippt und sofort kräftig geschüttelt. Vom Beginn der Basenzugabe bis zur Aufarbeitung verstrichen ca. 2 $\frac{1}{2}$ Minuten. Nach wenigen Sekunden Schütteln trat die prächtige grüne Farbe des Produktes (5) auf. Es ist ausserordentlich wichtig, dass das Reaktionsgemisch sehr schnell in die Pufferlösung gegossen wird, da das deprotonierte Produkt (Enolat) extrem sauerstoffempfindlich ist. Deshalb wurde das Reaktionsgefäß nie mit Lösungsmittel nachgespült. Im leicht sauren Milieu des Aufarbeitungsgemisches wird das Enolat protoniert und damit gegen Luft stabiler, was durch die Farbänderung von braun nach grün verfolgt werden kann.

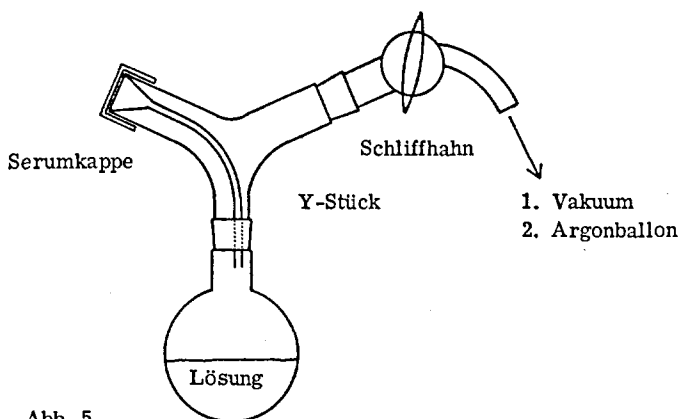


Abb. 5

*20) Natriumhexamethyldisilazanat: $[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]_2\text{NNa}$, Smp. 180-184°C, hergestellt aus Hexamethyldisilazan (Fluka AG; purum, dest.) und Natriumamid in Benzol (Vgl.: U. Wannagat, H. Niederprüm, Chem. Ber. 94, 1540 (1961)). In einem mit Y-Stück, Hahn und Serumkappe bestückten Kolben (Vgl. Abb. 5) wurde die nicht umkristallisierte weisse Base vorgelegt und mit soviel absolutem Benzol versetzt, dass eine 0,2 molare Lösung entstand. Diese wurde durch dreimaliges Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und Abpumpen der Atmosphäre am HV (0,01 Torr) entgast. Das System wurde anschliessend auf 25°C erwärmt und mit einem Argonballon versehen. Man erhielt eine schwach trübe Lösung mit etwas gelblichem Bodensatz. Die Lösung sollte vor Licht geschützt werden, da sonst eine langsame Vergilbung beobachtet wird.

*21) Phosphatpuffer: gesättigte wässrige Lösung von Natriumdihydrogenphosphat mit einigen mg Ascorbinsäure. Diese wurde vorsichtshalber als Antioxidans eingesetzt; die Notwendigkeit ihrer Zugabe aber nie nachgewiesen.

Die organische Phase wurde zweimal mit je 800 ml Eiswasser gewaschen. Dabei beobachtete man an der Phasengrenze braungelbe Flocken, welche mit den Waschwässern verworfen wurden. Der ersten Pufferlösung wurde mit etwas frischem Methylchlorid noch etwas Produkt entzogen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, durch Watte filtriert, und das Lösungsmittel bei 25°C am RV abgesaugt.

Der Erfolg der Reaktion konnte im Absorptionsspektrum (markante Unterschiede von Produkt (5) und Edukt (3)) und im DC (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol = 100:10:0, 45; Enol a (5), Rf=0, 4; Methyl-pyrophosphorbid a (3), Rf=0, 5) festgestellt werden. Edukt (3) wurde nicht mehr gefunden, jedoch ein Nebenprodukt, welches ein Phosphorbid-Absorptionsspektrum (allomer) aufwies und im DC als Startfleck auftrat.

Nach dem Trocknen des festen Rückstandes (2 Stunden bei RT am HV) erhielt man 260 mg dunkelgrünes Rohprodukt. Der Parallelansatz lieferte 263 mg. Da die DC und die UV/VIS-Spektren beider Präparationen praktisch gleich waren, wurden die Rohprodukte zur Reinigung und Kristallisation vereinigt.

Reinigung und Kristallisation von Enol a (5)

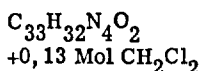
Der vereinigte Rückstand wurde in 50 ml Methylchlorid gelöst, auf ca. 0,5 ml eingengt und mit 20 ml warmem Benzol (ca. 40°C) versetzt. Unter Argon liess man die Lösung abkühlen. Das entstandene Kristallisat wurde von der Mutterlauge befreit, mit wenig Benzol/Hexan 1:1 gewaschen und 3 Stunden bei RT am HV getrocknet. Man erzielte so 365 mg eines weitgehend reinen (UV/VIS-Spektrum) Produktes, während in der Mutterlauge das allomere Nebenprodukt angereichert vorlag. Wegen der Schwerlöslichkeit des kristallinen Materials wurden die folgenden drei Kristallisationen in der Weise ausgeführt, dass die Substanz zunächst in ca. 40 ml Methylchlorid gelöst, diese Lösung auf ca. 5 ml eingengt und schliesslich mit 15-25 ml Benzol versetzt wurde. Nach der Zugabe einiger Tropfen Hexan in der Wärme liess man die Lösung abkühlen. Die Kristallisate wurden dann mit etwas Benzol/Hexan 1:1 gewaschen und bei RT am HV einige Stunden getrocknet. Die zweite Kristallisation ergab 332 mg (aus 365 mg). Die dritte Kristallisation ergab 320 mg (aus 332 mg). Die vierte Kristallisation ergab 303 mg (aus 320 mg). Erst jetzt waren die Absorptionsspektren von Kristallisat und Mutterlauge praktisch deckungsgleich, das DC zeigte bei beiden nur den Produktfleck.

Das mikrokristalline, metallisch blau glänzende Enol a (5) wurde nun mit 5 ml abs. Tetrachlorkohlenstoff versetzt (um Benzolrückstände zu entfernen), und dieser am Vakuum wieder abgesogen. Man trocknete anschliessend 5 Tage bei 40-55°C am HV (0,05-0,01 Torr).

Da die Elementaranalyse dieses Materials einen Gehalt von 7,5 Molprozenten Tetrachlorkohlenstoff vermuten liess, wurde die Substanz ein weiteres Mal auf die oben beschriebene Weise umkristallisiert und nach dem Entfernen der Mutterlauge 18 Stunden in abs. Benzol äquilibriert. Anschliessend trocknete man die Kristalle 75 Stunden bei 90°C am HV (0,01 Torr).

Dieses Material (Ausbeute: 57% bez. (3)) wurde der Charakterisierung unterworfen.

Charakterisierung



ber. C 75,41 H 6,16 N 10,61 Cl 1,74
gef. C 75,32 H 6,30 N 10,56 Cl 1,62

Smp. höher als 300°C (keine Zersetzungerscheinungen)

DC Rf=0,8 (Cellulose, Tetrachlorkohlenstoff/Methylenchlorid 10:1)
Rf=0,4 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Methyl-pyrophosphorbid a (3): Rf=0,49)

IR (cm⁻¹) CS₂ c̄=0,28% und c=0,056%: Banden praktisch identisch
3392m, 3190w, 3090w, 3008m, 2960s.

IR (cm⁻¹) CHCl₃ c=1,3%
Abb. 6 3390w, 3180w, 3000w, 2968m, 2930m, 2870w, 1656s,
1635w, 1604m, 1576w, 1558w, 1496m, 1465w, 1452w,
1442w, 1419w, 1400w, 1378m, 1367m, 1344w, 1304w,
1276w, 1246w, 1168w, 1150w, 1128w, 1103m, 1084m,
1060w, 1049w, 1019m, 990m, 962m, 924m, 909m, 890w,
880w, 835w.

IR (cm⁻¹) KBr 1,4 mg in 300 mg Kaliumbromid
3385w, 3200w, 2957m, 2920m, 2860m, 1656s, 1633w,
1608w, 1573w, 1556m, 1498m, 1465w, 1452w, 1440w,
1417w, 1378s, 1366s, 1344w, 1322w, 1312w, 1303w,
1280w, 1248m, 1228w, 1212s, 1202w, 1169m, 1150w,
1128m, 1104s, 1085m, 1060m, 1051w, 1019m, 990m,
961m, 937w, 924m, 909m, 881w, 837m, 817m, 796w,
782w, 770w, 756w, 739m, 718m, 699m, 671m, 630w,
610w, 600w, 565w, 540w, 461w.

NMR (CDCl₃) 0,05 molar

NMR (CDCl₃) 0,04 m (XL-100, CAT: 3 Scans)

ppm	Anzahl Protonen beob.	ppm (Abb. 7)	Zuordnung + Anzahl Protonen theoretisch
-2,38		-2,42	s/1H N-H
0,89 J=7Hz		0,84 J=7,5Hz	d/3H 8'
1,48 J=7,5Hz		1,42 J=7,5Hz	t/3H 4'
2,0	4,0	1,9	m/4H 7' 7"
2,79	10,0 {	2,74	3s/9H 3 1 5
2,84		2,80	
3,20 J=7,5Hz	2,2	3,13 J=7,5Hz	q/2H 4
5,95 J=12Hz, J=1,5Hz	2,2 {	5,88 J=12Hz, J=1,5Hz	dd/1H 2'
5,99 J=18Hz, J=1,5Hz		5,92 J=18Hz, J=1,5Hz	dd/1H 2"
6,81	0,9	6,74	s/1H δ
7,47 J=18Hz, J=12Hz		7,43 J=18Hz, J=12Hz	dd/1H 2
8,10	1,0	8,06	s/1H α
8,38	1,0 ↔	8,33	s/1H β
12,98		12,93	s/1H O-H

Die Signale der N-H- und O-H-Protonen verschwinden bei der Zugabe von 2 Tropfen CD₃OD sofort. Diese beiden Spektren sind von einer Probe, welche von G. Hoornaert hergestellt wurde (keine Unterschiede zum analyt. Material).

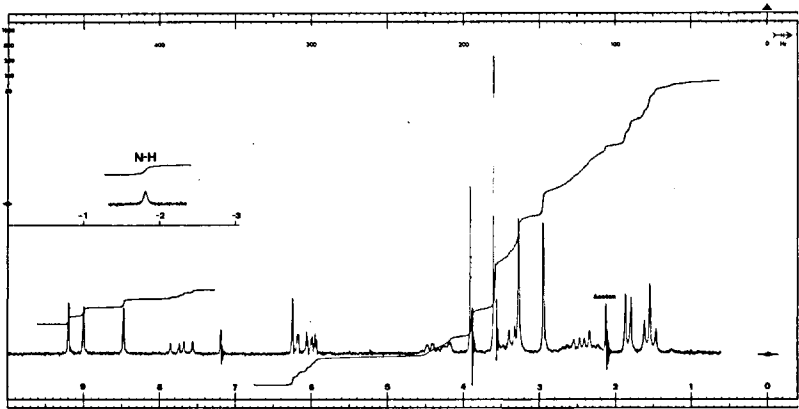


Abb. 2 Methyl-phäophorbid a (2)

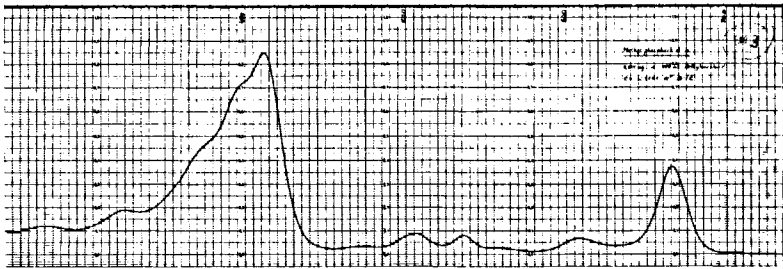


Abb. 3 Methyl-phäophorbid a (2)

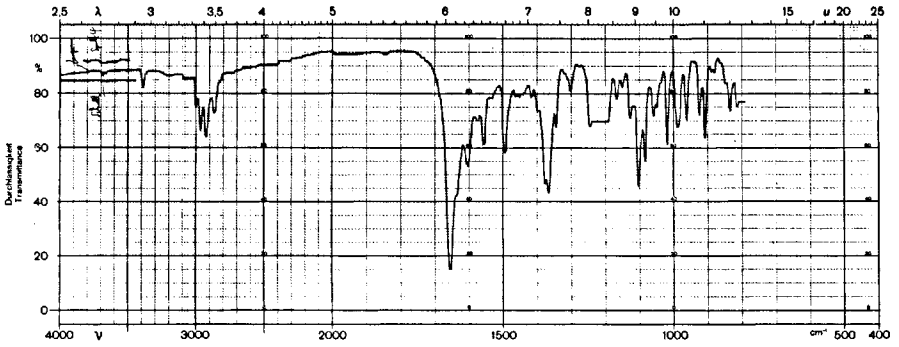


Abb. 6 Enol a (5)

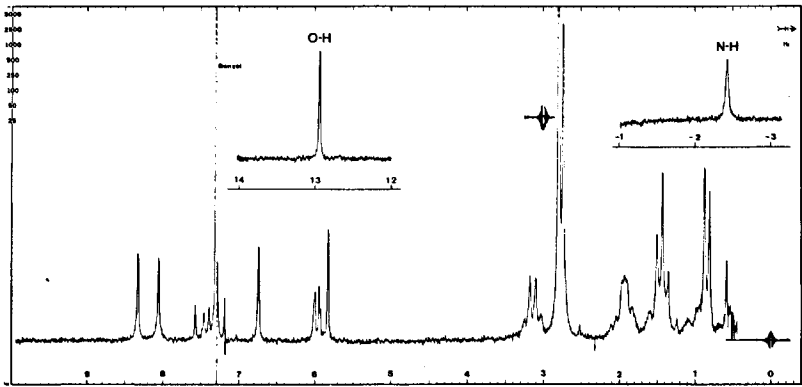


Abb. 7 Enol a (5)

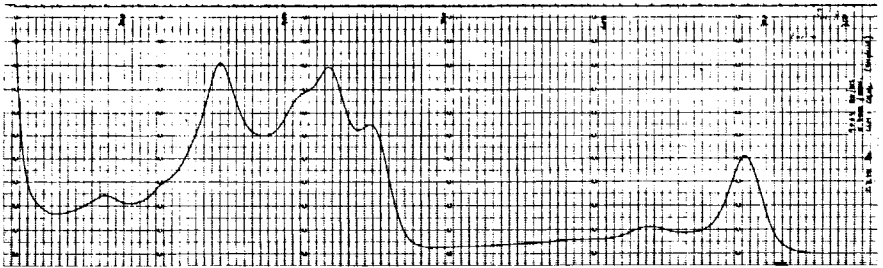


Abb. 8 Enol a (5)

UV/VIS (nm) C ₆ H ₆	1,672 mg in 100 ml Benzol, c=3,24·10 ⁻⁵ Mol/l 691,5(36'500 max), 654(6'600 min), 632(8'760 max), 594(4'440 sh), 557(3'090 sh), 520(2'190 sh), 495(2'000 min), 458(49'100 max), 447(40'750 min), 430(60'500 max), 416(54'000 sh), 389(36'400 min), 361(59'000 max), 328(25'600 sh), 313(19'000 min), 286(29'900 max).
UV/VIS (nm) CH ₂ Cl ₂ Abb. 8	0,639 mg in 100 ml CH ₂ Cl ₂ , c=1,236·10 ⁻⁵ Mol/l 687,9(33'000 max), 649,7(7'110 min), 628,5(9'100 max), 586,3(4'800 sh), 528,4(2'590 sh), 493,2(2'150 min), 454,5(44'400 max), 447,4(42'400 min), 428,5(64'000 max), 413,0(55'400 sh), 388,8(40'400 min), 361,3(65'500 max), 327,7(24'600 sh), 306,5(17'000 min), 289,5(19'500 max).
UV/VIS (nm) C ₅ H ₅ N	c=1,18·10 ⁻⁵ Mol/l 690(33'000 max), 652(6'900 min), 631(9'200 max), 496(2'550 min), 458(49'500 max), 449(42'600 min), 431(65'000 max), 417(54'500 sh), 392(38'800 min), 364(68'000 max).
UV/VIS (nm) DMSO	c=1,00·10 ⁻⁵ Mol/l 688,2(28'500 max), 651,2(6'500 min), 628,0(8'400 max), 533(4'200 sh), 495(2'000 min), 455,0(39'000 max), 448(37'900 min), 429,5(56'000 max), 413(49'000 sh), 391(36'500 min), 363,0(60'300 max).
UV/VIS (nm) KBr	c=5,80·10 ⁻⁴ Mol/l (KBr-Pressling, Dicke 0,95 mm) 703,5(10'700 max), 645(3'600 sh), 600(2'160 min), 462(15'400 sh), 417(20'500 max), 400(19'000 min), 365,5(23'400 max).

Im UV/VIS-Spektrum beobachtet man eine deutliche bathochrome Verschiebung der Rotbande und eine drastische Aenderung des Bandensystems im Soret-Bereich (Vgl. Abb. 8). Bemerkenswert ist ebenfalls das Verschwinden der beiden kleinen Absorptionen zwischen 500 und 540 nm. Das Fehlen dieser Banden ist ein sehr gutes Reinheitskriterium für Enol a (5). Die UV/VIS-Spektren in den verschiedenen Lösungsmitteln unterscheiden sich in kleinen Verschiebungen der Absorptionsmaxima und deren Extinktionen; der Spektraltyp bleibt jedoch immer erhalten.

Abhängigkeit von λ und ϵ der Rotbande von der Konzentration

(untersucht von H. Falk)

Aufgenommen in Methylenechlorid bei RT auf Gerät Cary 17.

Konz. (Mol/l)	λ (nm)	ϵ	Konz. (Mol/l)	λ (nm)	ϵ
3,50·10 ⁻³	688,6	28'400	2,19·10 ⁻⁴	687,6	35'100
1,75·10 ⁻³	688,1	30'900	4,36·10 ⁻⁵	687,8	34'400 ?
8,75·10 ⁻⁴	688,1	32'400	2,19·10 ⁻⁵	687,9	37'400

MS (m/e) 350°C

518(17%), 517(22%), 516(59%/M⁺), 512(10%/M⁺-4H),
466(10%), 452(14%), 437(11%), 314(15%), 313(69%),
277(11%), 263(10%), 262(53%), 259(12%), 258(19%/M⁺⁺),
257(43%), 235(11%), 234(15%), 218(10%), 217(25%),
216(16%), 201(10%), 199(10%), 191(10%), 190(11%),
189(31%), 188(13%), 187(14%), 177(10%), 176(17%),
175(43%), 174(23%), 173(17%), 171(12%), 161(28%),
159(19%), 149(17%), 147(20%), 145(20%), 143(14%),
142(13%), 141(14%), 136(10%), 135(40%), 134(10%),
133(23%), 131(19%), 129(17%), 123(15%), 122(11%),
121(29%), 120(14%), 119(40%), 117(14%), 115(18%),
112(10%), 111(17%), 110(11%), 109(24%), 107(25%),
105(35%), 98(22%), 97(25%), 96(18%), 95(54%), 94(13%),
93(32%), 91(38%), 85(20%), 84(17%), 83(40%), 82(12%),
81(45%), 80(10%), 79(35%), 78(53%), 77(29%), 73(18%),
71(28%), 70(29%), 69(80%), 68(15%), 67(20%), 60(20%),
57(58%), 56(20%), 55(98%), 54(17%), 53(24%), 52(10%),
50(14%), 49(16%), 48(28%), 44(34%), 43(100%).

Isotopenpek M+1: theoretisch 22%, gefunden: 22%

Es wurden alle Piks mit einer relativen Intensität grösser als 10% angegeben, bis zur Massenzahl 43. Die Fragmentierung liess sich nicht sinnvoll interpretieren.

CD (nm) CH₂Cl₂ *22) c=9,7 · 10⁻⁵ Mol/l
405(+11, 5), 465(-4, 4), 468(-4, 2), 693(-9, 97).

Fluoreszenz: In orientierenden Versuchen wurde das Fluoreszenzverhalten von Methylphosphorbid a (2) und Methyl-pyrophosphorbid a (3) im Vergleich zu Enol a (5) untersucht *23). Die Bestrahlung der Enol a-Probe zeigte ein ca. 100 mal schwächeres Fluoreszenzsignal als die Phosphorbid e. Aus den Anregungsmaxima wurde geschlossen, dass dieses Signal nicht vom Enol a (5), sondern von einer Verunreinigung (Ketoform oder Allomer) stammt. Die Messungen wurden ohne Sauerstoffausschluss gemacht:

Probe in C₆H₆ c=10⁻⁵ Mol/l
Ex: 400 nm Spalt: 4 nm
Em: Spalt: 8 nm
Fluoreszenzmaximum: 676 nm
Ex: Spalt: 8 nm
Em: 677 nm Spalt: 4 nm
Anregungsmaxima: 540, 508, 408, 400, 340 nm

Probe in CH₂Cl₂ c=10⁻⁵ Mol/l
Ex: 365 nm Spalt: 4 nm
Em: Spalt: 8 nm
Fluoreszenzmaximum: 674 nm
Ex: Spalt: 8 nm
Em: 675 nm Spalt: 4 nm
Anregungsmaxima: 540, 505, 405, 338 nm

*22) Messung ausgeführt von H. Falk auf einem Roussel-Jouan-Dichrographen Modell B. Schichtdicken: 2,5-5mm.

Zum selben Ergebnis kam A. Syl datk *24), welcher die selben Vergleiche, jedoch unter Ausschluss von Sauerstoff ausführte. Enol a (5) zeigte nur 0,19% soviel Fluoreszenz wie Methyl-phäophorbid a (2) in Methyltetrahydrofuran als Lösungsmittel. Dass die beobachtete Fluoreszenz von einer Verunreinigung stammt, wird erhärtet durch den Vergleich von Emissions- und Absorptionsspektrum und durch die fehlende Aehnlichkeit von Anregungsspektrum und Absorptionsspektrum.

Verbesserte Reinigungsmethode und Kristallisation von Enol a (5)

In Nachschubansätzen hatte es sich gezeigt, dass die direkte Kristallisation des Rohproduktes oft zu Schwierigkeiten führte. Man beobachtete zum Teil keinen Reinigungseffekt in aufeinanderfolgenden Kristallisationen. Deshalb wurde nach erfolglosen Chromatographieversuchen an desaktiviertem (10% H₂O) Kieselgel (Allomerisierung der Hauptmenge des Enols) die "Cellulose-Kieselgel-Filtration" entwickelt.

Zur Prüfung der neuen Reinigung wurden zwei analoge Ansätze wie beschrieben ausgeführt. Der einzige Unterschied lag in der Menge der zugegebenen Silazanbase: es wurden 17 ml (statt nur 16 ml) gebraucht, bis der gewünschte Farbumschlag genügend ausgeprägt war. Die beiden Rohprodukte wurden für die Reinigung ebenfalls vereinigt.

Eine Glaskolonne ($\varnothing=5\text{cm}$) mit Fritte (G2) wurde ca. 5cm hoch mit Cellulose *25) gut gestopft. Dann überschichtete man sorgfältig mit 4,0 g "desaktiviertem Kieselgel" *26). Darüber wurde eine weitere Lage (5cm) Cellulose aufgetragen. Mit ca. 200 ml Methylchlorid wurde das System gespült, und anschliessend gleich das in 20 ml Methylchlorid gelöste Rohprodukt aufgetragen. Man eluierte mit ca. 1 l Methylchlorid. Ohne Anwendung von Druck erreichte man einen schnellen Durchlauf des Lösungsmittels. Nachdem die grüne Produktfront die Kieselgellage passiert hatte, blieb diese schwarz. Alle grünen Fraktionen waren nach UV/VIS-Spektroskopie praktisch identisch und wurden vereinigt. Im DC zeigte sich die gute Reinigung durch das Fehlen des Startflecks. Die Prozedur ist weniger eine Chromatographie als eine Filtration, wobei das Nebenprodukt auf der Säule verbleibt. Deshalb nahm die Konzentration des Produktes (5) in den Fraktionen sehr schnell ab.



Abb. 9

*23) Wir danken Herrn Dr. Anliker von der Ciba-Geigy AG Basel für die Aufnahme dieser Spektren auf dem Gerät Perkin-Elmer MPF-2A.

*24) A. Syl datk, Diss. TH Braunschweig (1974), Seite 77.

*25) Cellulose: CF 11 (für Säulenchromatographie) Whatman

*26) "desaktiviertes Kieselgel": 4 g Kieselgel 60 (Merck) wurden mit 0,6 ml ges. Natriumdihydrogenphosphatlösung, welche noch 5 mg Ascorbinsäure enthält, versetzt und bis zum Verschwinden der Klümpchen geschüttelt.

Auf der Säule verblieb ausser der schwarzen Kieselgelzone ein nicht identifiziertes grünbraunes Material. Eine weitere Spülung der Säule mit mehr Methylenchlorid brachte keinen Gewinn mehr.

Das Eluat wurde nun am RV bei RT auf ca. 20 ml eingeengt, in einen 250 ml-Kolben transferiert und mit 100 ml warmem Benzol (ca. 40°C) versetzt. Am Wasserstrahlvakuum wurde das Lösungsmittel bei RT so lange abgesaugt, bis sich Kristallkeime bildeten. Der Kolben wurde mit Argon belüftet, und die Lösung auf dem Wasserbad auf ca. 50°C erwärmt. Anschliessend liess man sie abkühlen und vervollständigte die Kristallisation, indem man die grüne Lösung über Nacht in den Kühlschrank stellte (4°C).

Nach dem Abpipettieren der Mutterlauge (ca. 45 ml) und zweimaligem Waschen des Rückstandes erhielt man 359 mg DC- und UV/VIS-spektroskopisch reine, glänzende Kristalle. Die Mutterlauge wurde nochmals eingeengt, sodass weitere 14 mg Produkt ausfielen. Die zur Trockene eingeengte Mutterlauge ergab einen Rückstand von 146 mg. Dieser wurde nun abermals einer Filtration durch eine neu gestopfte Cellulosesäule (Abb. 9) unterworfen und brachte nach der Kristallisation aus Benzol weitere 18 mg DC-reines Material.

Alle kristallinen Fraktionen wurden vereinigt und 3 Tage bei RT am HV getrocknet. Man erzielte eine Ausbeute von 377 mg mikrokristallinem, metallisch blau glänzendem Enol a (5) (=73% bez. (3)), welches nach DC, UV/VIS- und NMR-Spektroskopie mit dem analytischen Material identisch war.

Wie im UV/VIS-Spektrum ersichtlich war, enthielt die letzte, nicht mehr kristallisierbare Mutterlauge immer noch etwas Enol a (5). Sie wurde deshalb zur Trockene eingeengt und aufbewahrt.

Zum Zeitpunkt der Arbeiten von H. Fischer wurden die meisten metallfreien Chlorophyllderivate auf Grund ihrer Basizitäten voneinander getrennt *27), d. h. je nach Basizität wurden diese Substanzen mehr oder weniger gut aus einer Salzsäurephase in die Aetherphase überführt. Dadurch ist die Trennung von Substanzen mit nicht zu ähnlicher Basizität prinzipiell möglich.

Es wurde nun versucht, ob sich ev. Enol a (5) auf diese Weise aus dem Rückstand extrahieren lasse. Man löste dazu die Rückstände mehrerer Ansätze in ca. 24%-iger Salzsäure und transferierte die Lösung in einen Kutscher-Stuedel-Perforator. Als Extraktionsmittel wurde Aether verwendet. Es zeigte sich, dass unser Enol a (5) von allen Produkten am leichtesten in die Aetherphase wanderte. Nach 36 Stunden hatte sich an den Rändern des Siedekolbens kristallines Enol a (5) abgesetzt, welches gelöst und aus Benzol umkristallisiert zu DC- und UV/VIS-spektroskopisch reinen Kristallen führte. Es ist also möglich, so die Ausbeuten noch geringfügig zu verbessern.

*27) H. Fischer, H. Orth, Die Chemie des Pyrrols, Band II/2 (1940), Seite 325

Löslichkeit

Enol a (5) ist deutlich schlechter löslich als Methyl-phäophorbid a (2) und Methylpyrophäophorbid a (3). In Methylenechlorid und Chloroform sind noch 0,03-0,04 molare Lösungen möglich. Aehnlich gute Lösungseigenschaften hat Dimethylformamid. 10^{-4} - 10^{-5} Mol/l sind lösbar in Benzol, Pyridin, Aceton, Essigester, Dioxan, Aether, Schwefelkohlenstoff, Propionitril und konzentrierter Salzsäure. Kaum löslich ist es in Acetonitril, Tetrachlorkohlenstoff, Dimethylsulfoxid, Hexamethylphosphorsäuretriamid und Sulfolan. In Hexan ist es total unlöslich. Die Löslichkeit ist jedoch von der Kristallqualität abhängig.

Assoziationen (untersucht von H. Falk)

Die scheinbaren Molekulargewichte ("MG") wurden mit einem Differential-Dampfdruckosometer *28) bestimmt. Als Lösungsmittel wurde Methylenechlorid verwendet. Temperatur: 30°C. Es wurde eine Probe des analytischen Enol a (5) verwendet. β = Osmotischer Koeffizient.

Konz. (Mol/l)	"MG"	β	Konz. (Mol/l)	"MG"	β
$3,48 \cdot 10^{-3}$	671	0,769	$6,74 \cdot 10^{-4}$	577	0,896
$2,64 \cdot 10^{-3}$	657	0,786	$3,25 \cdot 10^{-4}$	549	0,941
$1,75 \cdot 10^{-3}$	635	0,814	$1,47 \cdot 10^{-4}$	538	0,958
$1,29 \cdot 10^{-3}$	616	0,839			

Der Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit des Osmotischen Koeffizienten ($\beta = \text{MG}/\text{MG}_{\text{exp.}}$) mit normierten Kurven für die Dimerisierung mit gleicher Assoziationskonstante *29) gibt eine befriedigende Uebereinstimmung für das Vorliegen eines Dimerisierungsgleichgewichtes.

Für die UV/VIS-Spektroskopie (Konz. = 10^{-5} Mol/l) darf man mit dem Vorliegen von Monomeren rechnen. NMR- und IR-Spektren (Konz. = $6 \cdot 10^{-2}$ Mol/l) werden in Methylenechlorid und sicher auch in Chloroform von Dimeren oder sogar noch höheren Aggregaten beeinflusst.

Chemische Stabilität (untersucht von H. Falk)

Kristallines Enol a (5) kann ohne besondere Vorsicht über Monate hinweg bei RT gelagert werden, ohne dass irgend welche Zersetzungen festgestellt wurden. In den folgenden Lösungsmitteln ist Enol a (5) ohne Ausschluss von Sauerstoff während mindestens zwei Stunden, in der Regel aber einen Tag und länger stabil: Methylenechlorid, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Pyridin, Aceton, Essigester, Tetrahydrofuran, Dioxan, Aether, Propionitril, Schwefelkohlenstoff, Acetonitril, Dimethylsulfoxid, Hexamethylphosphorsäuretriamid und Sulfolan. 24%-ige Salzsäure hat auch keinen Zersetzungseffekt.

*28) R. E. Dohner, A. H. Wachter, W. Simon, *Helv.* **50**, 2193 (1967)

*29) A. H. Wachter, W. Simon, *Helv.* **52**, 371 (1969)

Enol a (5) wurde in Methanol innerhalb von 45 Stunden weitgehend allomerisiert (Isosbestik), wenn die Lösung in einem Glasgefäß aufbewahrt wurde. In einem Quarzgefäß trat dieser Vorgang nicht ein. Die Zugabe einer minimalen Menge Methanolat führte nun auch dort zur Allomerisierung. Im ersten Falle wurde sie offenbar durch Basespuren aus dem Glas ermöglicht.

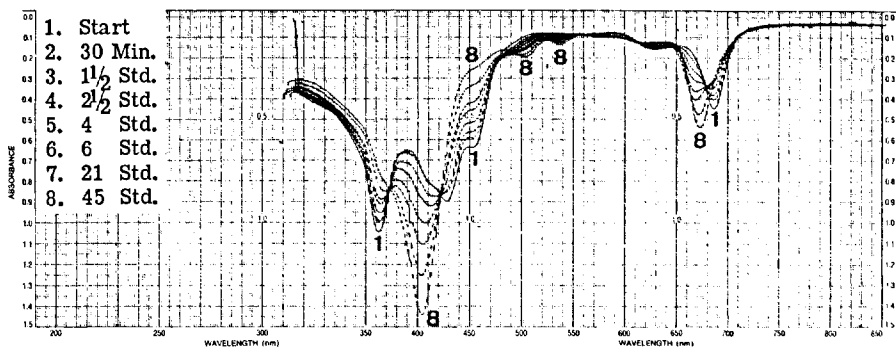


Abb. 10

0,85 mg Enol a (5) in 100 ml Benzol/Methanol 1:1 in einem Glaskolben mit Chlorzinkrohr intensiv gerührt. Kein Ausschluss von Sauerstoff.

Versuche zur Darstellung des Enoläthers von Enol a (5)

Man liess Enol a (5) in Methylenchlorid 1 Stunde unter der Wirkung von Diazome than in Aether und erhielt unverändertes Edukt zurück (DC, UV/VIS, Phasentest). Kochen von Enol a (5) in Methanol mit 5% Schwefelsäure konz. während 1 Stunde verlief ebenfalls ohne Erfolg (DC, UV/VIS, Phasentest).

Genauso negativ verlief ein Alkylierungsversuch mit Methyljodid in Aceton und Kaliumcarbonat als Base. Nach zweistündigem Kochen am Rückfluss, beobachtete man einen schwachen, gräulichen Fleck mit etwas grösserem Rf-Wert als das Edukt, welcher möglicherweise ein C-alkyliertes Produkt anzeigte.

Ausser diesen Vorversuchen wurden keine weiteren Experimente gemacht.

Differenzspektrum: Enol a (5) minus Enol a "oxidiert" (Versuch von H. Falk)

Enol a (5): $4,5 \cdot 10^{-8}$ Mol in 3 ml abs. Benzol (entgast) = Referenzküvette.

Enol a ox: $4,5 \cdot 10^{-8}$ Mol in 3 ml abs. Benzol (entgast) + $5,7 \cdot 10^{-8}$ Mol DDQ *30) in $5 \mu\text{l}$ Benzol = Messküvette.

Die beiden Quarzküvetten wurden je in den Proben- und in den Referenzstrahlengang des Photospektrometers (Cary 14) gestellt, dessen Nulllinie auf ca. die halbe Höhe des Registrierpapiers justiert worden war. Nach $1\frac{1}{2}$ Stunden wurde das Differenzspektrum aufgenommen.

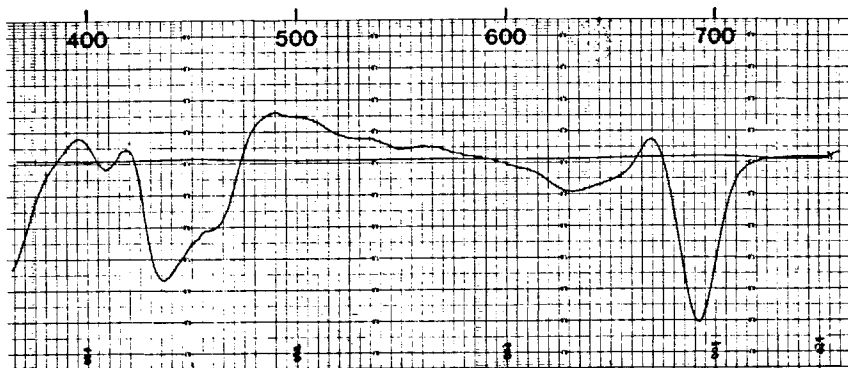


Abb. 11

Charakteristische Differenzbanden (nm): 692(-), 670(+), 632(-), 490(+), 460 sh (-), 436(-), 418(+), 408(-), 396(+).

Phasentestspektren, Enol-Chelate (ausgeführt von H. Falk)

Wie erwartet, gab Enol a (5) ebenso wie Methylphäophorbid a (2) oder Chlorophyll a (32) (nicht aber Methyl-pyrophäophorbid a (3)) einen positiven Phasentest. Für diesen Test wird 30%-ige methanolische KOH mit der Aetherlösung des Chlorins überschichtet. Wird an der Grenzfläche der beiden Phasen eine braune Zone beobachtet, so ist der Phasentest positiv *31). Unter striktem Sauerstoffausschluss kann man Absorptionsspektren dieser Deprotonierungsprodukte aufnehmen. Die Phasentestspektren von Methyl-phäophorbid a (2) und Enol a (5) unterscheiden sich kaum voneinander (vgl. auch Phasentestspektrum von Phäophytin a *32)).

*30) DDQ (=2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon): Fluka AG; purum

*31) H. Fischer, H. Orth, Die Chemie des Pyrrols, Band II/2 (1940), Seite 331

*32) L. P. Vernon, G. R. Seely, "The Chlorophylls" (1966), p. 89

Methyl-phäosphorbid a (2): $3,7 \cdot 10^{-8}$ Mol (2) + $0,2 \mu\text{l}$ Tetrabutylammoniumhydroxyd (40% in Wasser) *33) in 3 ml entgastem Pyridin:

716,0(3'700), 669(19'500), 611,7(4'000), 529,5(57'000),
500(30'000 sh), 455(17'000 sh), 413(52'000 sh),
379(71'000).

Enol a (5): $3,66 \cdot 10^{-8}$ Mol (5) + $0,2 \mu\text{l}$ Tetrabutylammoniumhydroxyd (40% in Wasser) *33) in 3 ml entgastem Pyridin:

715(4'100), 669(17'000), 537(47'000), 506(26'000 sh),
411(66'000), 387(66'600).

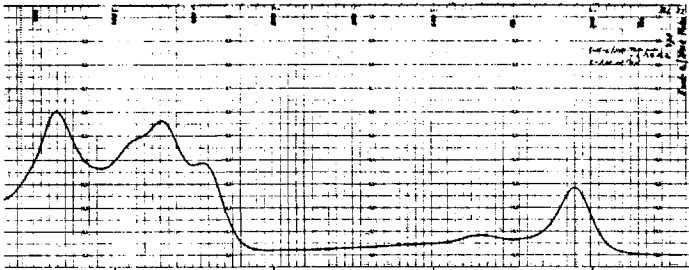


Abb. 12

Entgaste Lösung von Enol a (5) in DMSO ($c=1,00 \cdot 10^{-5}$ Mol/l)

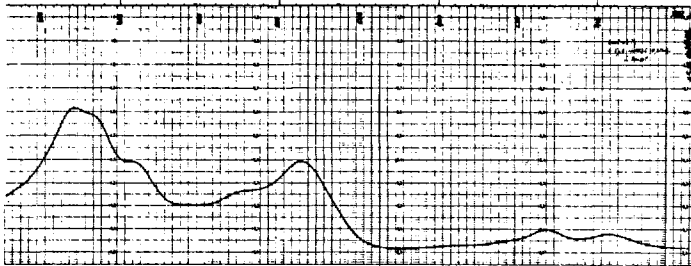


Abb. 13

Entgaste Lösung von Enol a (5) in DMSO ($c=1,00 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, 3 ml) + $5 \mu\text{l}$ 0,2-molare Lösung von Natriumhexamethyldisilazanat in Benzol (=NaHDS) *20).

*33) Tetrabutylammoniumhydroxyd: Fluka AG; purum, 40%-ige wässrige Lösung

Daten zu den Abbildungen 12 und 13:

Abb. 12		Abb. 13	
Enol a (5)		Enol a (5) + NaHDS	
$\lambda(\text{nm})$	ϵ	$\lambda(\text{nm})$	ϵ
688,2	28'500	708	8'000
628,0	8'400	668	10'000
533	4'200 sh	612	3'000 sh
509	2'000 sh	513	39'400
455,0	39'000	478	26'500
429,5	56'000	445	20'200 sh
413	49'000 sh	408	39'000 sh
363	60'300	384	58'500 sh
		371	61'800

Mit 5 μl Eisessig konnte das Spektrum des Enols (5) wieder zurückerhalten werden (eine Spur allomeres Produkt dürfte durch Sauerstoffspuren während der Einwirkung der Base entstanden sein).

Gegenüber der Enolatbildung mit Alkalimetallionen oder Ammoniumionen, wobei man Spektren vom Phasentest-Typ erhält, bleibt bei der Anwendung von Metallen, welche eher kovalente Bindungen (Chelate) geben, der Spektraltyp des freien Enols (5) weitgehend intakt. Diese Komplexe erhielt man durch Anwendung eines grossen Ueberschusses an Metallsalzlösungen zu Lösungen von Enol a (5) in Pyridin unter Argon.

H. Falk *18) untersuchte die Spektraländerung unter der Wirkung folgender Metallionen: Li^+ , Zn^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Co^{++} , Ni^{++} .

Sehr schön zeigt sich die Komplexierung bei der Zugabe von Tetrabutylammoniumjodid *34) und Lithiumjodid *35) in eine Pyridinlösung von Enol a (5) unter Argon. Im ersten Fall bleibt das Enol-Spektrum praktisch unverändert, im zweiten Fall, mit Li^+ als komplexierendes Metallion tritt der Typ des Phasenspektrums auf.

Abb. 14		Abb. 15		Abb. 16	
Enol a (5)		Enol a (5) + Bu_4NJ		Enol a (5) + LiJ	
$\lambda(\text{nm})$	ϵ	$\lambda(\text{nm})$	ϵ	$\lambda(\text{nm})$	ϵ
690	33'000	690	33'000	704	15'200
630	9'200	630	10'000	645	6'300
577	4'100 sh	580	4'600	533	2'400 sh
495	8'200 sh	505	3'400 sh	503	51'000
458	49'500	458	46'000	470	42'000
431	65'000	431	63'000	441	33'000
415	54'500 sh	415	55'000 sh	385	55'000 sh
365	68'000	365	65'000	370	72'000

*34) Tetrabutylammoniumjodid: Fluka AG; puriss. p. a. für Polarographie

*35) Lithiumjodid: Fluka AG; purum, $\text{LiJ} + \sim 2\text{H}_2\text{O}$

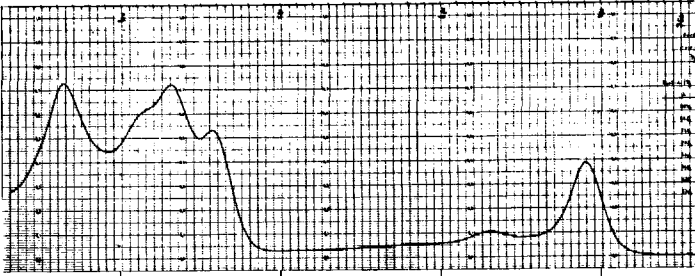


Abb. 14

Entgaste Lösung von Enol a (5) in Pyridin ($c=1,18 \cdot 10^{-5}$ Mol/l)

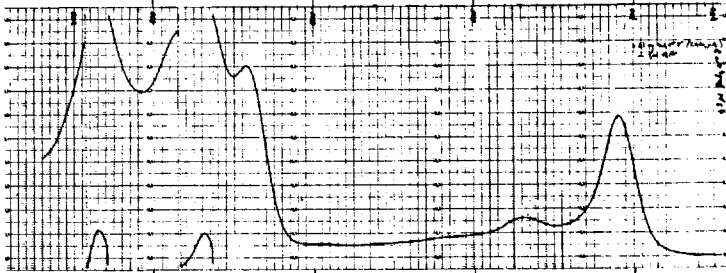


Abb. 15

Entgaste Lösung von Enol a (5) in Pyridin ($c=1,74 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, 3 ml) + 6,2 mg Tetra-butylammoniumjodid *34) in 5 μ l Acetonitril.



Abb. 16

Entgaste Lösung von Enol a (5) in Pyridin ($c=1,18 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, 3 ml) + 2,16 mg Lithiumjodid *35).

Versuche zur Enolat-Komplexstabilität des Enols (5) (ausgeführt von H. Falk)

Enol a (5) wurde in entgastem Methylenchlorid (ca. $2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, "Stammlösung") gelöst. In die, mit entgastem Pyridin gefüllte Küvette, wurde 10 Min. lang ein Luftstrom geleitet und hierauf zuerst die Stammlösung und dann die entsprechenden Reagenzien (Bu_4NOH *33), $\text{LiJ} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ *35) und $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2 \cdot x\text{CH}_3\text{CN}$ *36)) eingebracht. Hierauf wurde nochmals mit Luft abgesättigt und die UV/VIS-Spektren in bestimmten Zeitintervallen aufgenommen. Der Allomerisierungsgrad wurde aus den Absorptionen um 670 nm bzw. 410 nm abgeschätzt.

Zeit	Allomerisierung (%)		
	Bu_4N^+	Li^+	Ni^{++}
25 Min.	80	10	2
1 Stde.	90	40	5
2 Std.		80-90	5
16 Std.			20

Allomerisierung bedeutet in diesem Zusammenhang die Veränderung im UV/VIS-Spektrum von Enol a (5) zu einem Phäophorbid-Typ-Spektrum, d.h. die enolspezifischen Banden verschwinden, während Phäophorbidbanden auftauchen (vgl. Abb. 10).

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Empfindlichkeit des Enolats gegenüber Sauerstoff durch Komplexierung mit Metallen dramatisch verringert werden konnte. Der Effekt ist nicht von den Redoxeigenschaften der Metallionen abhängig, was durch Stabilisierungsversuche mit Fe^{++} und Ni^{++} gezeigt werden konnte.

Schlussbemerkungen

Die hier angegebenen Reaktionsbedingungen sind im Wesentlichen das Resultat zahlreicher Versuche von G. Hoornaert *17). Kondensationsversuche mit verschiedenen Basen (Kaliumamylat, Natriumhydrid, Kaliumtertiärbutilat) in diversen Lösungsmitteln (Benzol, Tetrahydrofuran, Monoglym, Methylenchlorid, Aether) führten nach Erhitzen während drei bis viereinhalb Stunden zu Gemischen mehrerer Produkte, wobei das gesuchte Enol a (5) höchstens als verschwindende Spur auftauchte.

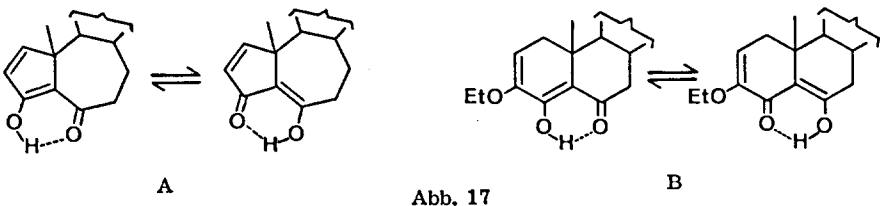
Erfolg brachte erst die Einführung einer neuen Base: Natriumhexamethylsilazanat. Beim Erhitzen von Methyl-pyrophäophorbid a (3) mit 5 Äquivalenten dieser Base in Benzol während 1 Stunde bildete sich eine ansehnliche Menge Enol a (5). Um die Ausbeute zu verbessern wurde nun 10 Stunden lang erhitzt. Das Resultat zeigte aber, dass alles Produkt (5) wieder verschwunden war. Diese Beobachtung führte dann zu der endgültigen Vorschrift. Das Produkt konnte nicht an Kieselgel chromatographiert werden, weil es sich dabei sehr schnell zersetzt (Allomerisierung). Andererseits ist die Chromatographie an Cellulose sehr aufwendig, da ihre Trennkapazität äusserst gering ist. Man war deshalb freudig überrascht, dass sich Enol a (5) direkt aus dem Rohprodukt kristallisieren liess.

*36) $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2 \cdot x\text{CH}_3\text{CN}$: $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fluka AG; purum), viermal in abs. Acetonitril gelöst, und das Lösungsmittel am HV wieder abgesaugt.

Später zeigte es sich aber, dass die direkte Kristallisation oft Anlass zu Schwierigkeiten gab, da das Nebenprodukt (Startfleck im DC) die Ausbildung schöner Kristalle verhinderte und so die Reinigung ausblieb. Ein Versuch, das Rohprodukt an deaktiviertem Kieselgel (Kieselgel 60 + 10% Wasser) zu chromatographieren, brachte eine kleine Menge sehr sauberes Enol a (5) (DC, UV/VIS), als Hauptmenge aber ein allomeres Produkt. Erst die Einführung der Cellulose-Kieselgel-Filtration (Vgl. Abb. 9) eliminierte sämtliche Schwierigkeiten, man erhielt bei allen Ansätzen durchwegs leicht kristallisierbares Enol a (5). Es gelang so, aus Benzol für eine Röntgenstrukturbestimmung genügend grosse Kristalle zu züchten (Kristallform: vierseitige, an der Spitze abgeschnittene Pyramiden). Leider war die Struktur durch die Komplexität der Einheitszelle nicht lösbar *37).

Zusammenfassung des Strukturbeweises für Enol a (5)

- a) Phasentest Enol a (5) kann ein Enolat bilden (Phasentest positiv). Die Phasentestspektren von Enol a (5) und Methyl-phosphorbid a (2) sind sehr ähnlich.
- b) Elementaranalyse Die Aenderungen der Prozentzahlen bez. Methyl-pyrophosphorbid a (3) sind für einen Beweis zu klein.
- c) IR-Spektrum Die Banden der Carbonylgruppe am isocyclischen Ring sowie der Estergruppe des Pyrophosphorbids sind abwesend. Dafür erscheint eine starke Absorption bei 1656 cm^{-1} , welche vom enolisierten β -Diketonsystem herrühren muss. Eine Absorption der O-H-Funktion wurde nicht beobachtet. Aus der Literatur *38) ist bekannt, dass cis-Enole sehr breite Banden von schwacher Intensität zwischen $3300\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$ aufweisen. O. Jeger *39) charakterisierte ein Androsten-Derivat, welches wie unser Enol a (5) ein β -Diketonsystem über den Brückenkopf eines 5- und 7-Ringes aufweist (Vgl. Abb. 17A). Man beobachtete dort eine Absorption im IR-Spektrum bei 1658 cm^{-1} , was ganz mit unseren Ergebnissen übereinstimmt.



*37) Privatmitteilung von Prof. J. Dunitz

*38) E. I. Matrosov, M. I. Kabachnik, *Spektrochim. Acta* 28A, 191 (1972)

*39) C. Lehmann, K. Schaffner, O. Jeger, *Helv.* 45, 1031 (1962)

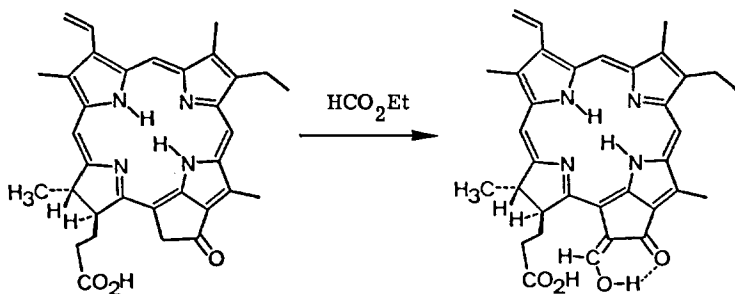
- d) NMR-Spektrum Die signifikanteste Aenderung gegenüber einem Phäophorbid ist das Auftreten eines scharfen, mit Deuteromethanol sehr schnell austauschbaren Signals bei ca. 12,9 ppm. Dieses Signal ist eindeutig dem chelatisierten Enol-Proton zuzuordnen. Im Androsten-Derivat (Vgl. Abb. 17A) erscheint das Enol-Proton bei 12-13 ppm als sehr breites Signal. Das Enol-Proton eines Cholestan-Derivates (Vgl. Abb. 17B) ergab andererseits ein scharfes Singlett bei 15,5 ppm *40). Das AB-System der Protonen am C-10 in Methyl-pyrophorbid a (3) ist ebenso wie das scharfe Singlett des Methylesters abwesend. Das NMR-Spektrum von Formyl-enol a (6) zeigte ein breites Signal bei 12,9 ppm (Vgl. Kap. 2.1.6.).
- e) UV/VIS-Spektrum Es ist ein neuer Spektraltyp mit einer bathochromen Verschiebung der Rotbande entstanden.
- f) Massenspektrum Man findet einen intensiven Molekularpik bei 516.
- g) Fluoreszenz Tritt nicht auf, was auf gegenüber den Phäophorbiden wesentlich veränderte elektronische Eigenschaften schließen lässt.
- h) Allomerisierung Durch die Allomerisierung von Enol a (5) entsteht ein Spektraltyp (UV/VIS-Spektrum), welcher mit dem eines allomeren Phäophorbids übereinstimmt. Das Methoxy-Allomer (7) von Enol a (5) (Vgl. Kap. 2.1.7) konnte chemisch wieder ins intakte Enol a (5) reduziert werden (Vgl. Kap. 2.9).
- i) Metallchelate Die Zugabe eines Ueberschusses von Metallsalzen (z. B. LiJ) in eine Lösung von Enol a (5) in Pyridin führte zur Ausbildung von Enol-Komplexen.

*40) J. T. Pinhey, E. Rizzardo, J. chem. Soc. Perkin I, 1358 (1972)

2. 1. 6. Vorversuch zur Herstellung von "Formyl-enol a" (6)

Allgemeine Bemerkungen:

Obwohl die Verbindung nicht völlig rein erhalten werden konnte, ist ihre Herstellung der Vollständigkeit halber hier beschrieben. Die Ähnlichkeit ihres Absorptionsspektrums mit dem von Enol a (5) ist ein starkes Indiz für die hier angegebene Struktur. Es stehen jedoch noch viele Fragen offen.



(4) MG 534, 66

(6) MG 562, 67

53,4 mg (0,1 mMol) Pyrophäophorbid a (4) *41) wurden in 30 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst *42). (Wegen der schlechten Löslichkeit dieser Säure (4) wurde so viel Tetrahydrofuran gebraucht.) Dazu fügte man 0,5 ml (6,3 mMol) Aethylformiat *43) und befreite anschließend die Lösung durch dreimaliges Ausfrieren mit flüssigem Stickstoff und Abpumpen der Atmosphäre am HV von Sauerstoff. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit einem Argonballon versehen. Mittels einer Injektionspritze mit langer Nadel wurden unter Argon 20 ml (4,0 mMol) 0,2-molare Natriumhexamethyldisilazanat-Lösung *20) schnell auf die Lösung gespritzt, wobei das Reaktionsgefäß leicht geschwenkt wurde. (Wegen der kleinen Eduktkonzentration wurde dieser enorme Ueberschuss an Base gebraucht, um den Farbumschlag zu erreichen.) Unterdessen waren in einem Dreihalskolben mit mechanischem Rührer 500 ml Methylenechlorid und 1 Liter Phosphatpufferlösung bei RT 15 Minuten mit Stickstoff gespült worden. Nach dem charakteristischen Farbumschlag nach gelbbraun wurde das Reaktionsgemisch so schnell wie möglich in das bei RT heftig gerührte Aufarbeitungsgemisch gegossen. Nach wenigen Sekunden erschien die erwartete grüne Farbe des Produktes (6).

Man transferierte das Gemisch in einen Scheidetrichter, verdünnte mit dest. Wasser, trennte die Phasen und wusch die organische Phase zweimal mit Eiswasser. Nach der Filtration durch Watte wurde das Lösungsmittel bei RT am RV abgesogen.

*41) DC-reines, kristallines, getrocknetes Material mit Smp. 254-256^oC (Zers.)

*42) Reaktionsgefäß: Vgl. Abb. 5 auf Seite

*43) Aethylformiat: vor Gebrauch über Kaliumcarbonat destilliert

Anschließend löste man den festen Rückstand in Methylenchlorid und filtrierte durch eine Cellulosesäule (15 x 135mm). Im DC war praktisch kein Startfleck mehr feststellbar. Die Kristallisation aus Aceton lieferte 37 mg Formyl-enol a (6). Eine zweite Kristallisation aus Benzol führte zu dem charakterisierten Material. Es gelang nicht, ein im DC (Cellulose) einheitlich erscheinendes Material zu erhalten. Man stellte knapp vor dem grünen Produktfleck einen schwächeren, graubraunen Fleck fest. Es wurden deshalb nur Routinespektren aufgenommen.

IR (cm⁻¹) Nujol 1700s, 1668s, 1624w, 1605w, 1578w, 1553w.

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂ qualitativ, aufgenommen auf PE 402
680,5(0,39), 619(0,11), 542(0,07), 512(0,06), 445(0,62), 420(1,00), 408(0,87), 362(0,85).

Zur Aufnahme eines Kernresonanzspektrums und eines Infrarotspektrums in Chloroform wurde die Substanz (6) wegen der besseren Löslichkeit mit Diazomethan in Aether verestert (UV/VIS-Spektrum identisch).

IR (cm⁻¹) CHCl₃ aufgenommen auf PE 257, c=2%
3390w, 3000w, 2960m, 2921m, 2860w, 1730m, 1685s, 1660s, 1620m, 1580w, 1551w, 1496m, 1464w, 1450w, 1435w, 1400w, 1367w, 1346w, 1305w, 1290w, 1137w, 1121w, 1109w, 1100w, 1052w, 1023w, 980m, 908w, 890w, 847w.

NMR (ppm) CDCl₃ 0,06 molar in Normalzelle (Signale des Hauptproduktes)

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen		ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen	
	beob.	theor.		beob.	theor.
-0,94		s/1H N-H	4,10		
0,90		s/1H N-H	4,31	2,4	{ m/1H 7
1,50 J=8Hz	7,7	t/3H 4'	6,01 J=11Hz, J=1,5Hz	2,0	{ dd/1H 2'
1,87 J=7,5Hz		d/3H 8'	6,11 J=18Hz, J=1,5Hz		{ dd/1H 2''
2,6	3,7	m/4H 7' 7''	7,70 J=18Hz, J=11Hz	0,8	dd/1H 2
2,93	15,2	4s/12H 3 1 5 q/2H 12 4	8,20	1,7	{ s/1H 11
3,25			8,26		{ s/1H δ
3,28			8,80	2,0	2s/2H αβ
3,72			12,90		s/1H O-H

Die Protonen am C-4 konnten nicht zugeordnet werden. Bei der Zugabe von Tri-fluoressigsäure erhält man die Methinprotonen als getrennte Singlette:

8,44 s/1H
8,81 s/1H
9,54 s/1H
9,76 s/1H

α, β, δ, 11

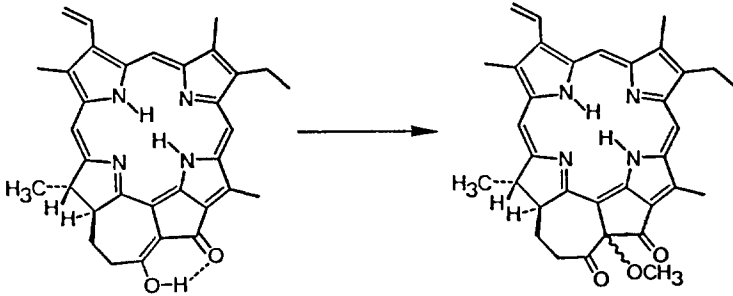
Im Spektrum findet man daneben kleine Signale, welche der Ketoform (oder allo-meren Spezies) zugeordnet werden können. Aus dem Integral ergibt sich ein Gehalt von Nebenprodukt von ca. 20-25%.

Ein DC (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45) des Methylesters zeigte den grünen Produktfleck und einen vorauslaufenden graubraunen Fleck. Auf der DC-Platte abgetrenntes Material hatte im UV/VIS-Spektrum ein typisches Phäophorbid-Verhalten. Die Absorptionen bei 537 nm und 508 nm wiesen ein Verhältnis der optischen Dichten von 92:100 auf, was mit keinem bekannten Allomer in Einklang steht. Das wäre ein Hinweis auf das Vorliegen einer Ketoform.

Bemerkenswert ist die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches: Bei der Verwendung eines intensiv gerührten, konzentrierten Puffergemisches bei RT wurde eine sehr gute Ausbeute an Formyl-enol a (6) erzielt. Andererseits führte die Aufarbeitung bei 0°C, welche für Enol a (5) optimale Ergebnisse zeitigte, beim Formyl-enol a (6) zu einem praktisch totalen Verlust des Materials. Genau umgekehrt war die Situation bei Enol a (5), wo die Verwendung des Puffers bei RT eine drastische Verschlechterung der Ausbeute bewirkte.

2.1.7. Herstellung des Epimerengemisches von "10-Methoxy-diketon a" (7)

Oxidationsmethode beschrieben von H. H. Inhoffen *44)



(5) MG 516,65

(7) MG 546,68

57 mg (0,11 mMol) Enol a (5) *45) wurden in 28,5 ml Methylenchlorid vollständig gelöst. Dazu fügte man 28,5 ml Methanol und 54 mg (0,22 mMol) Chloranil *46). Dieses Reaktionsgemisch wurde fünfmal am Wasserstrahl evakuiert und mit Argon begast. Man kochte anschliessend unter Argon während 90 Minuten am Rückfluss. Die nun dunkel gefärbte Lösung wurde mit 100 ml Methylenchlorid in einen Scheidetrichter transferiert und mit Bicarbonat-Puffer *47) geschüttelt. Die Phasen wurden getrennt, und die organische durch Watte filtriert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am RV und Trocknen des Rückstandes am HV bei RT, wurde die Substanz in wenig Methylenchlorid gelöst und zur Reinigung auf eine Kieselgelsäule aufgetragen. (Nach DC war alles Enol a (5) verschwunden.)

Chromatographie: 10 g Kieselgel, Säule: 10 x 180 mm, aufgezo-gen und eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 95:5.

Die nach DC einheitlichen Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel am RV entfernt, und der Rückstand aus Methylenchlorid/Methanol kristallisiert. Man erzielte eine Ausbeute von 39 mg kristallinem, dunkelbraunem, DC-reinem 10-Methoxy-diketon a (7) (=65% bez. Enol a (5)).

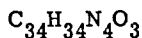
Zur Charakterisierung wurde die Substanz noch einmal auf die selbe Art kristallisiert und 5 Tage bei 60°C am HV (0,02 Torr) getrocknet.

*44) H. Wolf, H. Brockmann jr., H. Biere, H. H. Inhoffen, Liebigs Ann. Chem. 704, 208 (1967)

*45) DC-reines, kristallines Material

*46) Chloranil: Fluka AG; puriss

*47) Bicarbonat-Puffer: 10%-ige wässrige Lösung von Kaliumbicarbonat



ber. C 74,70 H 6,27 N 10,25
 gef. C 74,44 H 6,32 N 10,19

Smp. höher als 340°C

DC (scheinbar einheitlich)

Rf=0,50 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
 (Methyl-pyrophosphorbid a (3): Rf=0,49;
 Enol a (5): Rf=0,39)

Rf=0,34 (Kieselgel, Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 9:1)
 (Methyl-pyrophosphorbid a (3): Rf=0,34)

IR (cm⁻¹) CHCl₃

c=5%
 3390w, 3020w, 3005w, 2965w, 2930w, 2870w, 2825w,
 1722s, 1690s, 1625m, 1578w, 1552m, 1494m, 1465w,
 1451w, 1445w, 1426w, 1408w, 1400w, 1379w, 1366w,
 1350w, 1328w, 1308w, 1295w, 1270w, 1251w, 1176w,
 1163w, 1154w, 1141w, 1124w, 1110m, 1093w, 1069m,
 1060w, 1041m, 1020w, 1003w, 989m, 960w, 950w, 936w,
 923w, 907m, 890w, 886w, 858w, 836w, 825w, 818w,
 802w, 709w, 681w, 660m, 619w, 560w.

NMR (ppm) CDCl₃

0,06 molar in Normalzelle

<u>trans</u>		<u>cis</u>		Anzahl Protonen		
ppm	Kopplungen	ppm	Kopplungen	beob. (trans+cis)	theor.	Zuordnung
-2,10		-1,79		0,9	2s/1H	N-H
0,49					s/1H	N-H
1,64	J=7,5Hz			9,2	t/3H	4'
2,18	J=7Hz	2,13	J=7Hz		2d/3H	8'
2,7				2,8	m/4H	7' 7''
3,10					s/3H	3
3,33		3,25		11,0	2s/3H	1
3,39		3,28			2s/3H	11 (OCH ₃)
3,56		3,43			2q/2H	4
3,75		3,65			2s/3H	5
4,25				2,9	m/1H	7
4,71					m/1H	8
6,07	J=12Hz J=1,5Hz			2,0	dd/1H	2'
6,14	J=18Hz J=1,5Hz				dd/1H	2''
7,81	J=18Hz J=12Hz	7,78		1,0	2dd/1H	2
8,57				0,70	0,95	s/1H
		8,41		0,25		
9,24				0,80	1,05	s/1H
		9,15		0,25		
9,45				0,75	1,00	s/1H
		9,33		0,25		

Verhältnis trans/cis = 3:1

UV/VIS (nm) C₆H₆ 0,464 mg in 100 ml Benzol, c=0,849·10⁻⁵ Mol/l
 671,2(56'270), 614,3(7'100), 564,7(3'330), 535,4(9'140),
 506,7(13'620), 472,0(4'880), 415,2(118'410),
 401,2(90'830), 376,6(53'020).

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂ 0,506 mg in 100 ml CH₂Cl₂, c=0,926·10⁻⁵ Mol/l
 668,3(45'130), 611,2(7'660), 561,8(3'820), 535,9(9'330),
 507,1(11'650), 472,3(4'040), 415,3(112'290),
 401,5(89'200), 375,9(52'820).

Abb. 18

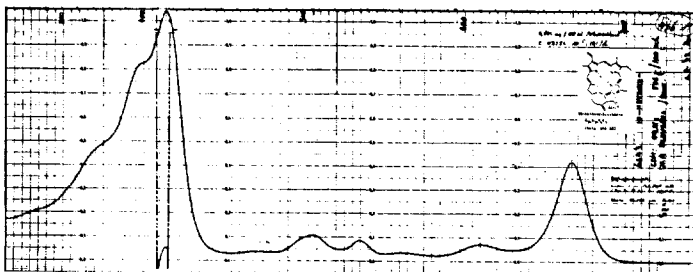


Abb. 18

MS (m/e) 290°C 549(3%), 548(12%), 547(37%), 546(94%/M⁺), 545(2%),
 518(19%), 517(37%), 516(100%), 515(10%), 514(11%),
 505(10%), 504(37%), 503(77%), 501(15%), 491(24%),
 490(60%), 489(17%), 487(10%), 477(10%), 476(36%),
 475(99%), 149(37%), 97(11%), 81(10%).

Isotopenpik M⁺+1: berechnet 35%, gemessen 37%

Bemerkungen zur Reaktion und den Daten

- Die Oxidation von Enol a (5) mit Chloranil verläuft schneller (1 $\frac{1}{2}$ Std.) als die von Methyl-phäophorbid a (2) (48 Std.) *44).
- Eine Chromatographie ist notwendig, um das Oxidationsmittel (grösserer Rf-Wert als Produkt) abzutrennen.
- Im IR-Spektrum tritt wieder eine C=O-Schwingung bei 1722 cm⁻¹ (isoliertes Keton) und eine bei 1690 cm⁻¹ auf (konjugiertes Keton).
- Das UV/VIS-Spektrum stammt dem Typ nach von einem allomeren Phäophorbid (Verhältnis der Banden bei 535 nm und 506 nm = 9:13; bei Methyl-phäophorbid a (2) = 9:11).
- Im NMR-Spektrum stellte man ein Diastereomergemisch fest, was durchaus zu erwarten war (= 3:1). Modellbetrachtungen zeigten, dass durch eine Addition trans zur Kette am C-7 weniger Spannung im siebengliedrigen Ring auftritt, als bei einer cis-Addition. Die kleine Verschiebung der Protonen, der in geringerer Menge vorkommenden Verbindung, nach höherem Feld bez. der Hauptkomponente könnte mit einer Auslenkung des π -Systems von der Planarität und somit Verkleinerung

des Ringstromes, hervorgerufen durch die erhöhte Spannung im 7-gliedrigen Ring, erklärt werden. Interessant war die Beobachtung, dass sich ein kristallines Gemisch der beiden Epimeren innerhalb eines Jahres völlig in die Hauptkomponente umwandelte (NMR). Diese muss also das thermodynamisch stabilere Produkt sein. Diese Indizien führten zur Zuordnung: Hauptkomponente = trans-Epimer
Nebenkompente = cis-Epimer

- f) Die von H. H. Inhoffen *44) beschriebenen epimeren 10-Methoxy-phäophorbide und -pyrophäophorbide zeigen im NMR-Spektrum nur Unterschiede der Signale von Protonen in der unmittelbaren Nachbarschaft der Methoxygruppe. Es kann jedoch auch keine vergleichbare Ringspannung auftreten.

Nach Abschluss der in dieser Arbeit beschriebenen Synthesen von Chlorophyll-Derivaten gelang es Dr. J. Schreiber, die Epimeren von 10-Methoxy-diketon a (7) mit Hilfe der Hochdruckchromatographie zu trennen. Die qualitative Abschätzung des Verhältnisses der beiden Komponenten (4:1) ist mit den Integralwerten aus dem NMR-Spektrum (3:1) befriedigend vereinbar.

In einem früher versuchten Lösungsmittelsystem (vgl. Kap. 2.1.3) wurde keine Trennung der Epimeren erreicht.

Hochdruckchromatographie: Partisil 5 (Reeve Angel), Säule: 7 x 240mm, Aether/Acetonitril 99:1, 55 ml/h, LDC-UV-Monitor (280 nm).

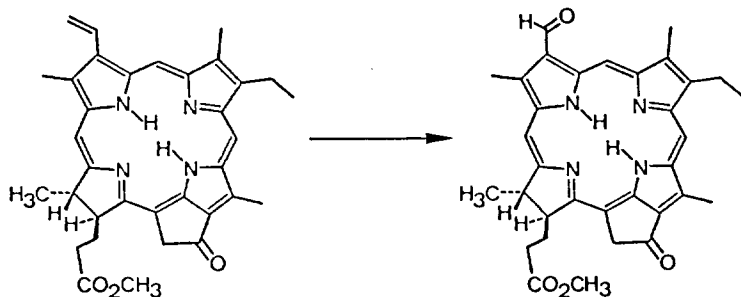
cis-Epimer: $k' = 0,81$ ($t_R = 13'$, $\sigma = 0,50$)

trans-Epimer: $k' = 0,92$ ($t_R = 14'$, $\sigma = 0,78$)

2. 2. DARSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN VON METALLFREIEN DERIVATEN DER CHLOROPHYLL d-REIHE

2. 2. 1. Methyl-pyrophäophorbid d (8)

Substanz erstmals hergestellt von H. Fischer *48)



(3) MG 548, 69

(8) MG 550, 66

548, 7 mg (1, 0 mMol) Methyl-pyrophäophorbid a (3) *49) wurden durch leichtes Erwärmen in 28 ml Dioxan vollständig gelöst. Dieser Lösung gab man 5, 08 mg (0, 02 mMol) Osmiumtetroxid *50) in 2 ml Dioxan zu und rührte 15 Minuten bei 26°C. Anschließend wurde während einer Stunde eine Lösung von 450 mg (2, 1 mMol) Natriumperjodat *51) und 0, 06 ml (1, 0 mMol) Eisessig *52) in 3, 5 ml Wasser zugetropft und 2 Stunden bei 26°C weitergerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC und UV/VIS-Spektroskopie verfolgt. Man brach die Reaktion ab, wenn das Verhältnis der Rotbanden des Produktes (694 nm) und des Eduktes (667 nm) sich nicht mehr verbesserte.

Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch mit 500 ml Methylenchlorid und 700 ml Eiswasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde noch zweimal mit der gleichen Menge Eiswasser gewaschen. Mit etwas Aether liessen sich die noch kräftig gefärbten Wasserphasen extrahieren. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am RV zur Trockene eingeeengt.

Zur Abtrennung des Produktes (8) vom Ausgangsmaterial (3) und Nebenprodukten musste chromatographiert werden:

*48) H. Fischer, H. Walter, Liebigs Ann. Chem. 549, 44 (1941)

*49) DC-reines, getrocknetes Material, wie beschrieben.

*50) Osmiumtetroxid: Fluka AG; puriss.

*51) Natriumperjodat: Fluka AG; puriss. p. a.

*52) Eisessig: Merck; 100%, zur Analyse

Chromatographie: 25 g Kieselgel, Säule: 15 x 300 mm, aufgezogen mit Tetrachlorkohlenstoff, Gemisch in Methylenchlorid aufgetragen und mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 94:6 eluiert.

Die Fraktionen konnten mit DC und UV/VIS-Spektren eindeutig identifiziert werden.

Die Ausbeuten betragen: 163 mg (30%) Methyl-pyrophosphorbid a (3) (DC-rein)

145 mg (26%) Methyl-pyrophosphorbid d (8) (DC-rein)

230 mg (42%) Nebenprodukte (nicht identifiziert)

Es wurden nur verschwindend kleine Mischfraktionen erhalten. Das zurückgewonnene Ausgangsmaterial (3) konnte wieder neu eingesetzt werden, was die effektive Ausbeute auf 38% bez. verbrauchtem (3) erhöhte.

Die Ausbeuten dieser Reaktion sind schlecht reproduzierbar. Als bestes Resultat wurden einmal 57% (8) erzielt.

Das grüne Nebenprodukt schien aus einem Gemisch von mehreren Komponenten zu bestehen mit, im üblichen DC-System, sehr kleinen Rf-Werten. In Methylenchlorid zeigte das Gemisch folgende Absorptionsmaxima: 750, 685 sh, 655 sh, 640, 596, 409 und 380 nm. Ohne Trennung dieses Gemisches sind keine Aussagen über die Natur dieser Produkte möglich.

Das DC-reine, chromatographierte Material wurde aus Aceton kristallisiert, wobei sich kleine, dunkelbraune Kristalldrüsen bildeten. Zur Analytik kristallisierte man noch zweimal aus Aceton um und trocknete 3 Tage am HV (0,05 Torr) bei 85°C.

$C_{33}H_{34}N_4O_4$ ber. C 71,98 H 6,22 N 10,18
gef. C 72,03 H 6,30 N 10,30

Smp. 234°C (Zers.)

DC Rf=0,26 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Methyl-pyrophosphorbid a (3): Rf=0,49)

IR (cm^{-1}) $CHCl_3$ c=4%
3390w, 3030w, 3000w, 2965w, 2930w, 2870w, 1730m,
1690s, 1675s, 1618m, 1585w, 1540w, 1499m, 1451w,
1438w, 1422w, 1380w, 1375w, 1365m, 1346m, 1230w,
1158w, 1148w, 1120w, 1106w, 1088w, 1059w, 1003m,
981m, 905w, 891w, 805w, 705w, 660w.

NMR (ppm) $CDCl_3$ 0,06 molar in Normalzelle

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen		ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen	
	beob.	theor.		beob.	theor.
-2,61		s/1H N-H	3,63		
-0,72		s/1H N-H	3,69	6,0	{ s/3H 12
1,54 J=7,5Hz	3,1	t/3H 4'	4,34		{ s/3H 5
1,73			4,53	2,3	{ m/1H 7
1,86 J=7,5Hz	3,0	d/3H 8'	5,13 J=21Hz		{ m/1H 8
2,18		s Aceton	5,27 J=21Hz	2,4	{ d/1H 10
2,54	4,3	m/4H 7' 7''	8,68	1,0	{ d/1H 11
3,00	3,1	s/3H 3	9,12	1,0	{ s/1H δ
3,39 J=7,5Hz		q/2H 4	9,74	1,0	{ s/1H β
3,53	6,0	s/3H 1	11,26		{ s/1H α
					{ s/1H 2

Die Signale der N-H sind mit CD_3OD schnell austauschbar.

UV/VIS (nm) C ₆ H ₆	0,300 mg in 50 ml Benzol, c=1,090·10 ⁻⁵ Mol/l 695,1(66'600), 633,9(5'600), 583,5(1'990), 554,0(12'200), 521,8(11'200), 485,0(4'400), 429,8(76'600), 388,0(57'800).
UV/VIS (nm) CH ₂ Cl ₂	0,304 mg in 50 ml CH ₂ Cl ₂ , c=1,104·10 ⁻⁵ Mol/l 693,8(61'050), 633,1(6'340), 581,0(2'260), 554,0(12'130), 521,3(11'050), 484,1(4'350), 428,4(75'630), 388,3(64'080).
Abb. 19	
MS (m/e) 250°C	553(2,5%), 552(12%), 551(51%), 550(100%/M ⁺), 549(8%), 548(5,5%), 463(14%/M ⁺ -CH ₂ CH ₂ COOCH ₃), 435(10%), 368(8%), 313(10%), 275(2%/M ⁺⁺), 236(16%), 129(10%), 111(10%), 109(11%).
	Isotopenpik M ⁺ +1: gemessen 51%, berechnet 37%

Die Methode von H. Fischer *48) (Kaliumpermanganat in Pyridin) und die von A. S. Holt *53) (Kaliumpermanganat in Aceton) führten zu Gemischen von Dihydroxy-Verbindung, Aldehyd und Säure. Vorversuche ergaben sehr schlechte Ausbeuten an Methyl-pyrophäophorbid d (8). Die mit Osmiumtetroxid katalisierte Perjodat-oxidation *54) führte ausschliesslich zum Aldehyd. Daneben trat noch eine beträchtliche Menge an stärker veränderten Produkten auf. Dihydroxy-Verbindung und Säure wurden nicht beobachtet.

Charakteristisch für Methyl-pyrophäophorbid d (8) ist die bathochrom verschobene Rotbande im Absorptionsspektrum, wobei der Spektraltyp erhalten bleibt.

Im NMR-Spektrum wurde das Aldehydproton bei 11,26 ppm gefunden.

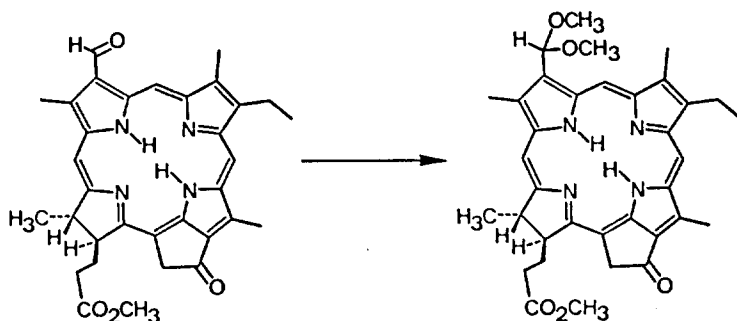
Das Massenspektrum enthält als höchstes Signal den Molekularpik.

Die UV/VIS- und IR-Daten von Methyl-phäophorbid d *53) sind mit unseren Werten vereinbar.

*53) A. S. Holt, H. V. Morley, Can. J. Chem. 37, 507 (1959)

*54) R. Pappo, D. S. Allen jr., R. U. Lemieux, W. S. Johnson,
J. org. Chem. 21, 478 (1956)

2. 2. 2. Methyl-pyrophäophorbid d-dimethylacetal (9)



(8) MG 550, 66

(9) MG 596, 73

330, 4 mg (0, 6 mMol) Methyl-pyrophäophorbid d (8) *55) wurden in 30 ml Methylenchlorid gelöst und mit 250 ml Methanol versetzt. Dieser Lösung wurde nun gerade soviel methanolische Salzsäure *56) zugetropft, bis eine Blaufärbung auftrat. Man rührte während 15 Minuten unter Argon. Anschliessend wurde die Lösung in einem Scheidetrichter mit 250 ml Methylenchlorid und 300 ml kalter Kaliumbicarbonat-Lösung *57) ausgeschüttelt und die organische Phase zweimal mit Eiswasser (+etwas Bicarbonat) gewaschen. Mit Aether entzog man den dunkelgrau gefärbten Wasserphasen das verbleibende Produkt. Die vereinigten, organischen Phasen wurden durch Watte filtriert, und das Lösungsmittel am RV abgesaugt. Die Rohausbeute betrug 350 mg (=98%)

Das Produkt zeigte im DC und UV/VIS-Spektrum keine Nebenprodukte, sodass die Reaktion als quantitativ betrachtet werden kann. Die Zugabe von mehr methanolischer Salzsäure ergibt eine zusätzliche Ketalisierung im Cyclopentanonring, was im DC durch einen Fleck mit höherem Rf-Wert als das Monoacetal, und im UV/VIS-Spektrum durch eine hypsochrome Verschiebung der Rotbande um 7, 5 nm, nachgewiesen werden kann.

Das Dimethylacetal (9) liess sich aus Aceton mit einer Spur N-Aethyl-diisopropylamin kristallisieren. Man erhielt 236 mg kristallines, DC-reines (9) (=66% bez. (8)). Ohne Zugabe des Amins beobachtete man bei Kristallisationsversuchen in Aceton eine teilweise Hydrolyse des Acetals zum Aldehyd.

*55) DC-reines, getrocknetes Material, wie beschrieben.

*56) Methanolische Salzsäure: 25% Chlorwasserstoff in abs. Methanol

*57) Kaliumbicarbonat-Lösung: 5%-ig in Wasser

Die nadelförmigen, dunkelblauen Kristalle wurden noch zweimal aus Aceton (+ 1 Tropfen N-Aethyl-diisopropylamin) umkristallisiert und 3 Tage bei 85°C am HV (0,05 Torr) getrocknet.

$C_{35}H_{40}N_4O_5$ ber. C 70,45 H 6,76 N 9,39
gef. C 70,32 H 6,79 N 9,36

Smp. 193°C (Zers.)

DC Rf=0,57 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Methyl-pyrophosphorbid d (8): Rf=0,26)

IR (cm^{-1}) $CHCl_3$ c=2,5%
3390w, 3030w, 3000w, 2965w, 2930w, 2870w, 2830w,
1730m, 1685s, 1620m, 1583w, 1553w, 1497m, 1465w,
1450w, 1436w, 1398w, 1380w, 1364w, 1347w, 1304w,
1230w, 1194w, 1160w, 1150w, 1122w, 1088m, 1058w,
1014w, 979w, 962w, 908w, 890w, 867w, 850w, 819w,
705w, 680w, 659w.

NMR (ppm) $CDCl_3$ 0,06 molar in Normalzelle

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen		ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen	
	beob.	theor.		beob.	theor.
-1,86	1,0	s/1H N-H	4,32	2,4	m/1H 7
1,68 J=7,5Hz	3,3	t/3H 4'	4,50		m/1H 8
1,83 J=7,5Hz	3,3	d/3H 8'	5,12 J=20Hz	2,1	d/1H 10
~2,48	4,2	m/4H 7' 7''	5,26 J=20Hz		d/1H 11
3,26	3,2	s/3H 3	6,82	1,0	s/1H 2
3,51	3,1	s/3H 1	8,58	0,9	s/1H δ
~3,6		q/2H 4	9,42	1,0	s/1H α
3,63	14	s/3H 12	9,73	1,0	s/1H β
3,64		s/3H 5			
3,72		s/6H 2			

Die Signale der N-H sind mit CD_3OD austauschbar.

UV/VIS (nm) C_6H_6 0,256 mg in 50 ml Benzol c=0,858 · 10⁻⁵ Mol/l
665,5(68'760), 634,9(4'200), 608,4(7'700), 557,8(2'910),
536,4(11'420), 506,2(11'480), 471,4(3'920),
411,5(125'870), 397,8(86'890), 378,6(61'590),
317,6(19'110).

UV/VIS (nm) CH_2Cl_2 0,258 mg in 50 ml CH_2Cl_2 , c=0,865 · 10⁻⁵ Mol/l
663,3(57'250), 634,2(4'510), 606,1(8'560), 557,0(3'560),
537,1(10'910), 506,0(11'000), 474,2(4'170),
410,4(112'900), 397,5(89'340), 378,0(65'920),
318,7(22'440).

Abb. 20

MS (m/e) 200°C	599(4%), 598(5%), 597(7%), 596(14%/M ⁺), 595(13%), 536(20%), 535(48%/M ⁺ -COOCH ₃ , -2H), 474(18%), 448(11%), 368(17%), 352(30%), 324(15%), 298(8%/M ⁺⁺), 295(10%), 274(10%), 258(17%), 256(18%), 240(11%), 236(12%), 235(10%), 231(12%), 227(12%), 224(11%), 223(13%), 219(15%), 218(10%), 213(13%), 211(10%), 210(13%), 208(10%), 205(16%), <u>149(100%)</u> .
----------------	--

Die Rotbande des Acetals (9) ist bezüglich der eines Phäophorbids a (2) ca. 2 nm hypsochrom verschoben. Diese Verschiebung ist jedoch kleiner als für ein Meso-phäophorbid *58) (Meso = Vinylgruppe zu Aethylgruppe hydriert), bei welchem sie ca. 8 nm hypsochrom wandert. Die Acetalfunktion zeigt also einen deutlichen Substituenteneffekt auf das Absorptionsspektrum. Der R_f-Wert des Acetals (9) ist höher als der des Aldehyds (8), was die DC-Kontrolle während der Reaktion sehr erleichterte.

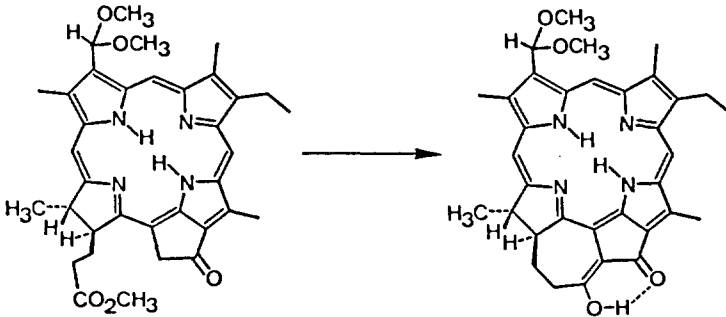
Im NMR-Spektrum ist das Signal des Aldehydprotons bei 11,2 ppm verschwunden. Durch die Acetalisierung wurde es auf 6,82 ppm verschoben.

Die Stabilität der Verbindung (9) im Massenspektrum ist gegenüber (8) erniedrigt, weist doch der Molekularpik nur eine relative Intensität von 14% auf.

Die IR- und UV/VIS-Daten sind in guter Uebereinstimmung mit den von A. S. Holt *53) publizierten Werten des Dimethylacetals von Methyl-phäophorbid d.

*58) A. Stern, U. Wenderlein, Z. physikal. Chem. (A) 174, 321 (1935)

2. 2. 3. "Enol d-dimethylacetal" (10)



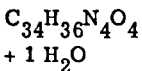
(9) MG 596, 73

(10) MG 564, 69

322 mg (0,54 mMol) Methyl-pyrophäophorbid d-dimethylacetal (9) *59) wurden in 25 ml Tetrahydrofuran gelöst *42), und durch dreimaliges Ausfrieren mit flüssigem Stickstoff und Evakuieren am HV entgast. Dieser Lösung wurden nun bei RT 14 ml (2,8 mMol) einer 0,2 molaren Natriumhexamethyldisilazanat-Lösung *20) mittels einer Spritze zugegeben. Wie bei der Darstellung von Enol a (5) zeigte sich der Endpunkt der Basenzugabe in einer Farbänderung von zuerst dunkelgrün nach schmutziggelb an. Die Menge der Base kann etwas variieren, wichtig ist der deutliche Farbumschlag. Nun wurde das Reaktionsgemisch so schnell wie möglich in einen Scheidetrichter transferiert, in welchem 400 ml Methylenchlorid, 100 ml Phosphatpuffer und 100 g Eis zuvor gut mit Stickstoff durchspült worden waren. Durch intensives Schütteln erschien nach wenigen Sekunden die grüne Produktfarbe. Eine Spur Ascorbinsäure im Aufarbeitungspuffer scheint die Bildung von Oxidationsprodukten zu unterdrücken. Die entstandene Emulsion konnte durch die Zugabe von 700 ml Wasser gebrochen werden. Die organische Phase wurde zweimal mit je 500 ml Eiswasser gewaschen, durch Watte filtriert und am RV zur Trockene eingengt. Im DC stellte man neben dem Produktfleck einen schwachen Startfleck fest.

Das Rohprodukt (317 mg) wurde in Aceton und einem Tropfen N-Aethyl-diisopropylamin gelöst und kristallisiert. Man erhielt 186 mg Kristalle von (10) (61% bez. Methyl-pyrophäophorbid d-dimethylacetal (9)).

Zur Charakterisierung wurden die DC-reinen, dunkelblaugrünen Kristalle noch zweimal auf die selbe Weise umkristallisiert und 4 Tage bei 85°C am HV (0,05 Torr) getrocknet.



ber.	C 70,08	H 6,57	N 9,61
gef.	C 69,93	H 6,48	N 9,59

Smp.

höher als 340°C

*59) DC-reines, kristallisiertes und getrocknetes Material, wie beschrieben.

DC

Rf=0,45 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Enol a (5): Rf=0,39)

IR (cm⁻¹) CHCl₃

c=3,5%
3390w, 3030w, 3000w, 2965w, 2930m, 2865w, 2830w,
1655s, 1634m, 1602w, 1560w, 1530w, 1494w, 1465w,
1441w, 1418w, 1398w, 1379m, 1368m, 1346w, 1304w,
1248w, 1195w, 1169w, 1150w, 1128w, 1105w, 1083s,
1059w, 1015m, 980w, 960w, 926w, 910w, 883w, 834w,
817w.

UV/VIS (nm) C₆H₆

0,330 mg in 50 ml Benzol, c=1,168 · 10⁻⁵ Mol/l
688,1(33'820), 629,7(7'660), 576,5(3'850), 456,6(41'270),
428,7(51'970), 410,1(47'770), 361,7(54'920).

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂

0,357 mg in 50 ml CH₂Cl₂, c=1,264 · 10⁻⁵ Mol/l
684,8(29'750), 626,1(7'790), 575,4(4'120), 454,5(38'600),
426,3(53'800), 408,7(51'260), 359,9(60'280).

Abb. 21

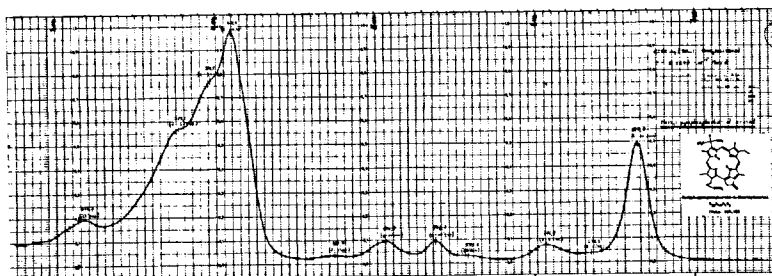


Abb. 20 Methyl-pyrophosphorbid d-dimethylacetal (9)

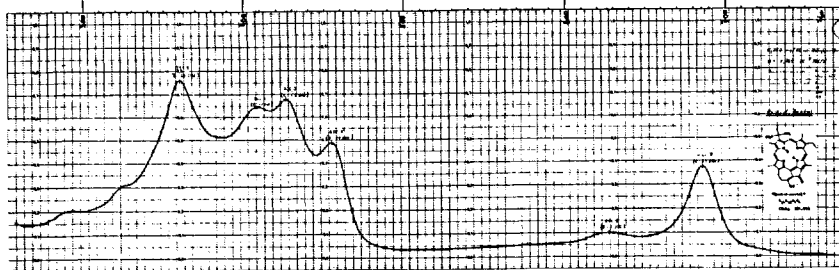


Abb. 21 Enol d-dimethylacetal (10)

NMR (ppm) CDCl₃ 0,05 molar in Normalzelle

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen			ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen		
	beob.	theor.			beob.	theor.	
-1,53	0,8	s/1H	N-H	3,70	7,0	s/6H	2'
1,49 J=7, 5Hz	7,8	d/3H	8'	6,63	1,0	s/1H	2
1,51 J=7, 5Hz		t/3H	4'	7,60	1,0	s/1H	δ
2,3	3,3	m/4H	7' 7''	8,27	1,0	↔ s/1H	α
2,86	3,0	s/3H	3	9,17	1,0	s/1H	β
3,0	3,1	m/2H	7,8	13,10	1,0	s/1H	O-H
3,07		s/3H	1				
3,25	5,7	s/3H	5				
3,29 J=7, 5Hz		q/2H	4				

MS (m/e) 568(3%), 567(6%), 566(18%), 565(40%), 564(80%/M⁺), 563(7%), 562(4%), 561(9%), 536(21%/M⁺-CO), 534(36%), 533(17%/M⁺-OCH₃), 518(43%), 504(17%/M⁺-COOCH₃, -H), 503(14%/M⁺-COOCH₃, -2H), 369(10%), 368(22%), 353(13%), 352(40%), 324(14%), 282(12%/M⁺⁺).

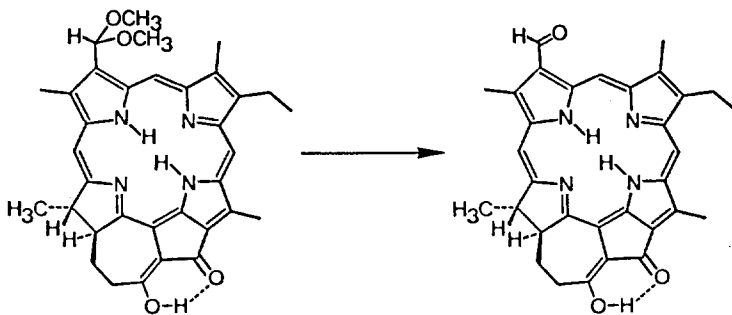
Die folgenden Piks wurden nur noch angegeben, wenn die relative Intensität grösser als 20% war.

220(22%), 205(39%), 185(33%), 169(23%), 161(21%), 159(30%), 156(23%), 155(64%), 154(34%), 153(30%), 152(27%), 151(22%), 149(75%), 147(33%), 145(31%), 143(23%), 142(40%), 141(100%).

Direkte Kondensation von Methyl-pyrophosphorbid d (8) zum Enol d (11) führte im besten Fall zu Spuren des gewünschten Produkts. Deshalb wurde mit der Acetalisierung eine Schutzfunktion eingeführt. Enol d-dimethylacetal (10) liess sich auf analoge Weise wie das Enol a (5) herstellen. Die gute Kristallisation wurde hier nicht durch ein Nebenprodukt (Startfleck) verhindert. Um eine Hydrolyse des Acetals zu unterbinden, wurde eine Spur N-Aethyl-diisopropylamin zugegeben, welches die Stabilität der Verbindung gegen Allomerisierung nicht zu verringern schien.

Wie erwartet zeigte das IR-Spektrum die Bande des enolisierten β-Diketons bei 1655 cm⁻¹. Die UV/VIS-Maxima waren bezüglich Enol a (5) minim hypsochrom verschoben. Im NMR erschien das Enol-Signal als scharfes Singlett bei 13,1 ppm. Die Verbindung zeichnete sich im MS durch eine erhöhte Stabilität aus. Der Molekularpik wurde mit einer relativen Intensität von 80% registriert.

2. 2. 4. "Enol d" (11)



(10) MG 564,69

(11) MG 518,62

60 mg (0,107 mMol) Enol d-dimethylacetal (10) *60 wurden in 15 ml Methylenchlorid gelöst und mit 5 ml Tetrahydrofuran sowie 1,2 ml Wasser versetzt. Dieses Gemisch wurde viermal am Wasserstrahl evakuiert und mit Argon begast. Darauf wurden 9 Tropfen konz Salzsäure zugegeben und 15 Minuten unter Argon gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 45 ml Methylenchlorid und 100 ml Eiswasser in einen Scheidetrichter gespült und gut geschüttelt. Mit Eiswasser wusch man die hellgrüne Lösung neutral, filtrierte durch Watte, und sog das Lösungsmittel am RV ab. Man kristallisierte aus Benzol und erhielt 39 mg graugrünes, DC-reines Enol d (11) (= 70% bez. Enol d-dimethylacetal (10)).

Das UV/VIS-Spektrum zeigte quantitativen Umsatz. Das Produkt ist deutlich schwerer löslich als Enol a (5). (In einem Nachschubansatz konnte der schlechten Löslichkeit wegen kein IR und NMR mehr in Chloroform aufgenommen werden.)

Für die Charakterisierung wurde die Substanz zweimal aus Benzol kristallisiert und 6 Tage am HV (0,05 Torr) bei 75°C getrocknet.

$C_{32}H_{30}N_4O_3$	ber.	C 74,73	H 5,94	N 10,25
+0,1 H_2O +0,33 C_6H_6	gef.	C 74,78	H 5,95	N 10,16

Smp. höher als 340°C

DC Rf=0,14 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Enol a (5): Rf=0,39)

*60) DC-reines, kristallisiertes und getrocknetes Material, wie beschrieben.

IR (cm⁻¹) CHCl₃

Abb. 22

c=3,3%

3380w, 3025w, 3000w, 2965w, 2930w, 2860w, 2740w,
1655s, 1628w, 1600w, 1580w, 1550w, 1540w, 1496w,
1465w, 1420w, 1378s, 1367m, 1344w, 1310w, 1280w,
1246w, 1195w, 1168w, 1148w, 1125w, 1100w, 1081m,
1059w, 1028w, 1007s, 962w, 940w, 925w, 908w, 882w,
865w, 837w, 816w.

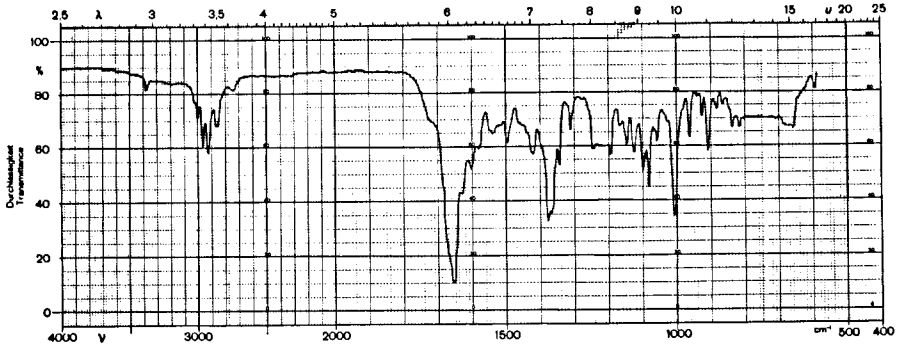


Abb. 22

NMR (ppm) CDCl₃

0,006 molar (XL-100, CAT: 100 Scans) Abb. 23

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen theoretisch	ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen theoretisch
-1,36	s/1H N-H	~4,1	m/2H 7 8
1,68 J=8Hz	t/3H 8'	5,39	s CH ₂ Cl ₂
2,09 J=7,5Hz	d/3H 4'	7,44	s Benzol
~2,5	m/4H 7' 7''	8,29	s/1H δ
~3,1	m/2H 4	9,03	s/1H β
3,22	s/3H 3	9,88	s/1H α
3,47	s/3H 1	11,54	s/1H 2
3,63	s/3H 5	13,40	s/1H O-H

(Die Signale bei: δ = -1,36, 11,54 und 13,40 ppm wurden auf einem anderen Spektrum aufgenommen.)

Eine ~0,05 molare Lösung führte zu breiten Signalen.

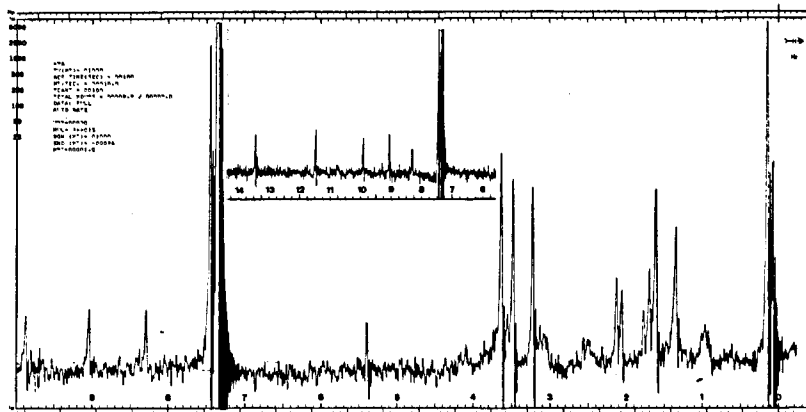


Abb. 23 Enol d (11)

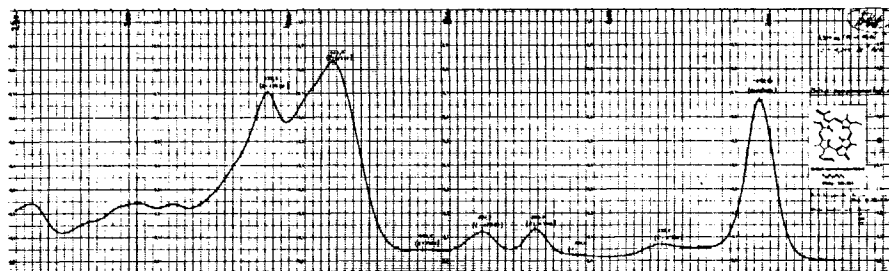


Abb. 19 Methyl-pyrophosphorbid d (8)

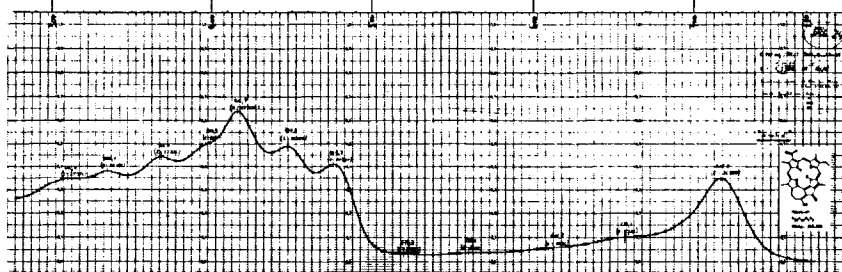


Abb. 24 Enol d (11)

UV/VIS (nm) C ₆ H ₆	0,290 mg in 50 ml Benzol, c=1,118·10 ⁻⁵ Mol/l 718,7(28'990 max), 658,9(7'310 sh), 616,4(4'470 sh), 560,6(2'800 sh), 538,0(2'200 min), 477,6(31'750 max), 465,0(33'900 min), 418,1(48'300 max), 399,3(36'900 sh), 380,0(30'400 min), 369,6(32'500 max), 349,0(25'400 min), 336,4(27'300 max).
UV/VIS (nm) CH ₂ Cl ₂	0,347 mg in 50 ml CH ₂ Cl ₂ , c=1,338·10 ⁻⁵ Mol/l 715,9(26'150 max), 656,2(7'710 sh), 612,1(4'380 sh), 559,4(2'760 sh), 536,3(2'200 min), 475,3(30'700 max), 464,5(27'900 min), 447,0(36'600 max), 427,2(34'600 min), 416,3(47'830 max), 399,3(38'000 sh), 379,0(31'700 min), 368,8(33'200 max), 347,4(27'000 min), 335,1(28'400 max), 316,8(25'900 min), 310,4(25'950 max).
MS (m/e)	523(6%), 522(15%), 521(7%), 520(14%), 519(38%), 518(100%/M ⁺), 517(12%), 516(21%), 504(23%), 503(12%/M ⁺ -CH ₃), 352(17%), 282(10%), 281(12%), 280(10%), 279(10%), 259(22%/M ⁺⁺), 256(16%), 241(10%), 240(18%), 239(19%), 228(12%), 227(14%), 226(14%), 225(16%), 223(12%), 218(10%), 214(12%), 213(15%), 212(10%), 211(17%), 206(11%), 205(35%), 203(10%), 201(10%), 199(11%), 189(11%), 187(10%), 185(25%), 181(11%), 157(11%), 156(13%), 155(23%), 149(57%), 148(10%), 147(12%), 145(18%), 143(10%), 142(17%), 141(53%). (alle Piks grösser als 10% angegeben)

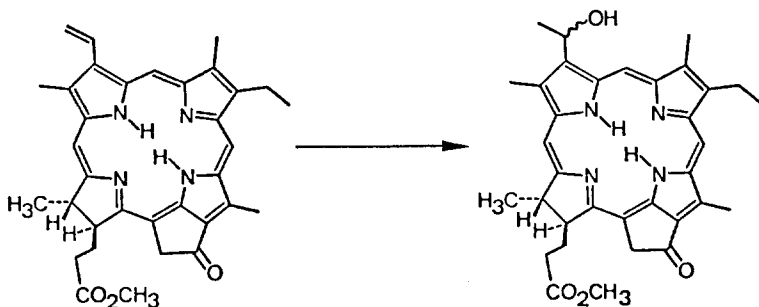
Die wichtigste Eigenschaft dieser Verbindung ist ihr Absorptionsmaximum zwischen 716 und 719 nm, wobei der Spektraltyp, wie er bei Enol a (5) beobachtet wurde, weitgehend erhalten bleibt. NMR- und IR-Spektren stimmen mit der Struktur überein. Im Massenspektrum findet man den Molekularpik wieder sehr stark ausgeprägt (100%).

Eine unangenehme Eigenschaft von Enol d (11) kam in einem Nachschubansatz zu Tage. Einmal kristallines Material konnte nur noch sehr schwer gelöst werden, sodass ein IR- oder NMR-Spektrum in Chloroform unmöglich war. Ein Vergleich der IR-Spektren vom analytischen (löslichen) Material mit dem vom neuen (unlöslichen) Material in Nujol zeigte identische Banden. Die Löslichkeit der Substanzen scheint stark von der Qualität der Kristalle abzuhängen.

2. 3. DARSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN VON METALLFREIEN DERIVATEN DER 2-DESVINYL-2-ACETYL-CHLOROPHYLL a-REIHE

2. 3. 1. 2-Desvinyl-2-(α -hydroxy)äthyl-methyl-pyrophäophorbid a (12)

Reaktionsbedingungen wie beschrieben bei H. Fischer *61), aber mit vereinfachter Aufarbeitung.



(3) MG 548, 69

(12) MG 566, 71

1,1 g (2,0 mMol) Methyl-pyrophäophorbid a (3) *62) wurden in 22 ml Bromwasserstoff-Eisessig *63) während 3 Stunden bei 40°C unter Argon gerührt. Darauf wurde das Reaktionsgemisch mit 20 ml 20%-iger Salzsäure und 20 ml Wasser versetzt und zur Hydrolyse des intermediär gebildeten Bromids 20 Minuten auf 72°C erwärmt. Mit 500 ml Methylenchlorid wurde die Lösung in einen Scheidetrichter gespült und mit 1 Liter Eiswasser geschüttelt. Die Wasserphase wurde mit frischem Methylenchlorid nachextrahiert. Man vereinigte die organischen Phasen, wusch mit Eiswasser neutral und trocknete über Natriumsulfat. Anschliessend wurde filtriert und das Lösungsmittel am RV abgesaugt.

Der Rückstand wurde in 500 ml Aether aufgenommen und mit einem Ueberschuss von Diazomethan *64) in Aether versetzt (quantitative Veresterung, nach DC). Nach einer Stunde wurden das Lösungsmittel und das überschüssige Reagens am RV abgesogen. Da die Additionsreaktion nicht vollständig ablief, musste chromatographiert werden.

*61) H. Fischer, J. Hasenkamp, Liebigs Ann. Chem. 519, 42 (1935)

*62) DC-reines, kristallines und getrocknetes Material

*63) HBr in Eisessig (~33%): trockenes HBr wurde in Eisessig (Merck) zur Analyse 99 - 100% eingeleitet (farblose Lösung!).

*64) Diazomethan: ätherische Lösung, hergestellt aus Nitrosomethylharnstoff und KOH; destilliert

Chromatographie: 100 g Kieselgel, Säule: \varnothing 27 mm, aufgezogen und eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 93:7; Substanzgemisch gelöst und aufgetragen in wenig Methylenchlorid.

Die Reinheit der Fraktionen wurden mittels DC und UV/VIS-Spektren getestet. Als erstes Produkt wurde das Edukt (Methyl-pyrophosphorbid a (3)) eluiert und, nach unbedeutenden Mischfraktionen, das 2-Desvinyl-2-(α -hydroxy)äthyl-methyl-pyrophosphorbid d (12) isoliert.

Die Ausbeuten betragen: 320 mg (29%) Edukt (3) (DC-rein)
700 mg (64%) Produkt (12) (DC-rein)

Das Edukt (3) konnte wieder eingesetzt werden, sodass eine Ausbeute von 90% an (12) resultierte.

Die Substanz (12) liess sich leicht aus Aceton kristallisieren (dunkelgraue Kristalle). Zur Charakterisierung wurde die DC-reine, chromatographierte Substanz zweimal aus Aceton kristallisiert und drei Tage am HV (0,05 Torr) bei 80°C getrocknet.

$C_{34}H_{38}N_4O_4$ ber. C 71,81 H 6,85 N 9,64
+0,25 Aceton gef. C 71,63 H 6,84 N 9,65

Smp 256°C

DC Rf=0,15 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Methyl-pyrophosphorbid a (3): Rf=0,49)

IR (cm^{-1}) $CHCl_3$ c=3%
3605w, 3395w, 3005w, 2965w, 2920m, 2870w, 2850w,
1730m, 1685s, 1620m, 1582w, 1554w, 1531w, 1498m,
1465w, 1450w, 1436w, 1408w, 1399w, 1379w, 1366w,
1348w, 1304w, 1241w, 1229w, 1161w, 1121w, 1110w,
1090w, 1066w, 1028w, 1010w, 978m, 910w, 890w, 876w,
850w, 835w, 819w.

NMR (ppm) $CDCl_3$ 0,06 molar in Normalzelle

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen		ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen	
	beob.	theor.		beob.	theor.
-1,99	0,9	s/1H N-H	4,12	1,1	m/1H 7
1,7	9,0	m/7H 4' 8' O-H	4,38	1,1	m/1H 8
2,09 J=6, 5Hz	3,4	d/3H 2'	5,02	2,2	m/2H 10 11
2,18		s Aceton	6,25	1,0	m/1H 2
2,5	4,8	m/4H 7' 7''	8,40	0,9	s/1H δ
3,21	3,0	s/3H 3	8,42		
3,34	3,0	s/3H 1	9,24	2,0	s/1H β
3,36		s/3H 1 (Epi)	9,50		α (Epi)
3,53	8,1	s/3H 5	9,55	s/1H α	
3,5		m/2H 4			
3,64		s/3H 12 (Epi)			
3,66		s/3H 12			

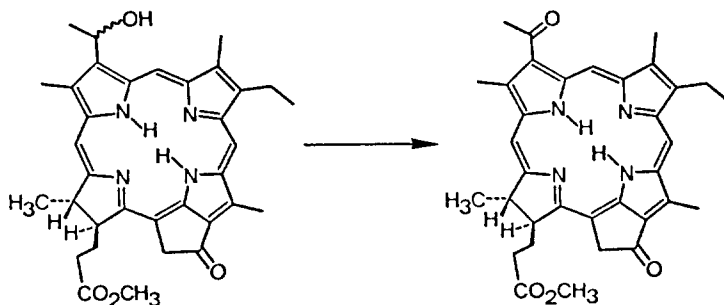
UV/VIS (nm) C ₆ H ₆	0,236 mg in 50 ml Benzol, c=0,833·10 ⁻⁵ Mol/l 662,5(62'970), 633,4(4'290), 605,6(8'240), 557,4(3'290), 535,3(11'030), 504,5(11'030), 471,8(4'290), 411,0(121'800), 399,1(87'400), 379,8(59'350), 317,2(20'000).
UV/VIS (nm) CH ₂ Cl ₂	0,242 mg in 50 ml CH ₂ Cl ₂ , c=0,854·10 ⁻⁵ Mol/l 660,3(51'600), 631,5(4'310), 604,1(8'650), 552,4(3'510), 535,3(10'060), 504,6(10'070), 472,2(3'750), 409,8(111'800), 397,5(86'900), 380,0(62'250), 318,2(21'600).
MS (m/e)	568(8%), 567(22%), 566(59%/M ⁺), 565(6%), 564(9%), 552(10%), 551(38%/M ⁺ -CH ₃), 550(68%), 549(41%), 548(100%/M ⁺ -H ₂ O), 536(10%), 499(16%), 498(13%), 497(22%), 496(15%), 495(28%), 494(13%), 489(20%), 488(22%), 487(29%), 486(12%), 481(10%), 479(16%), 478(10%), 464(11%), 463(20%), 462(15%), 461(27%), 435(10%), 434(10%), 433(12%), 283(3%/M ⁺⁺), 270(12%), 269(22%), 268(20%), 265(11%), 264(18%), 254(10%), 246(21%), 244(10%), 243(10%), 241(10%), 239(16%), 238(17%), 237(25%), 236(10%), 232(12%), 231(10%), 227(10%), 224(15%), 223(12%), 219(11%), 211(11%), 185(22%), 182(18%), 181(25%), 169(10%), 167(11%), 156(11%), 155(18%), 154(10%), 152(10%), 150(10%), 149(68%). (alle Piks grösser als 10% angegeben)

Der erste Schritt der Reaktion ist eine Bromwasserstoffanlagerung an die Vinylgruppe. Anschliessend wird das Bromid durch Hydroxyl substituiert, wobei auch der Ester der Propionsäureseitenkette hydrolysiert. Mit Diazomethan konnte dieser ohne Schwierigkeiten wieder gebildet werden. Das Gemisch von Produkt und nicht umgesetztem Edukt konnte infolge der grossen Unterschiede der R_f-Werte sehr gut chromatographisch getrennt werden. Nebenprodukte wurden nicht festgestellt. Obwohl ein Epimerengemisch vorlag, konnte die Substanz leicht kristallisiert werden. Dieses zeigte sich, wenn auch nicht sehr deutlich, in der Aufspaltung weniger Linien im NMR-Spektrum. Die Absorptionsspektren von (12) haben gegenüber dem Edukt (3) ein etwas hypsochrom verschobenes Rotmaximum.

Im IR-Spektrum tritt die O-H-Schwingung bei 3605 cm⁻¹ als schwache Bande auf. Durch die Abspaltung von H₂O entsteht im Massenspektrum der intensivste Pik (548). Der Molekularpik weist jedoch immer noch eine relative Intensität von 59% auf.

2. 3. 2. 2-Desvinyl-2-acetyl-methyl-pyrophosphorbid a (13)

Vorschrift beschrieben bei H. H. Inhoffen *65)



(12) MG 566, 71

(13) MG 564, 69

425 mg (0,75 mMol) 2-Desvinyl-2-(α -hydroxy)äthyl-methyl-pyrophosphorbid a (12) *66) wurden in 21 ml Dimethylsulfoxid gelöst und mit 2,1 ml Acetanhydrid *67) versetzt. Unter Argon liess man die Lösung 45 Minuten bei 100°C rühren. Mit 400 ml Methylenchlorid wurde das Reaktionsgemisch anschliessend in einen Scheidetrichter transferiert und mit 1 Liter Eiswasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wusch man noch zweimal mit der selben Menge Eiswasser. Die braunen, wässrigen Phasen wurden mit frischem Methylenchlorid nachextrahiert. Man trocknete die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat und saugte das Lösungsmittel nach der Filtration am RV ab. Aufgrund von UV/VIS-Spektren und DC konnte ein vollständiger, nebenproduktfreier Umsatz festgestellt werden.

Zur Analytik wurde dieses Material an der 50-fachen Menge Kieselgel mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 93:7 chromatographiert, um den Rest des Dimethylsulfoxids abzutrennen. Man isolierte 346 mg DC-reines 2-Desvinyl-2-acetyl-methyl-pyrophosphorbid a (13) (=80% bez. (12)). Die Substanz kristallisierte aus Aceton in feinen, braunen Nadeln. Zur Charakterisierung wurde das chromatographierte Produkt (13) zweimal aus Aceton kristallisiert und 4 Tage am HV (0,05 Torr) bei 75°C getrocknet.

$C_{34}H_{36}N_4O_4$
+0,1 Aceton

ber.	C 72,22	H 6,45	N 9,82
gef.	C 72,24	H 6,46	N 9,80

*65) H. H. Inhoffen, P. Jäger, R. Mählehop, C.-D. Mengler, Liebig's Ann. Chem. 704, 188 (1967)

*66) DC-reines, kristallines Material mit Smp. 256°C

*67) Acetanhydrid: über Kaliumcarbonat destilliert

Smp. 256°C
 DC Rf=0,30 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
 (Methyl-pyrophäophorbid a (3): Rf=0,49)

IR (cm⁻¹) CHCl₃ c=3,5%
 3380w, 3025w, 3000w, 2965w, 2925w, 2865w, 1730m,
 1689s, 1618m, 1580w, 1550w, 1538w, 1499m, 1464w,
 1451w, 1437w, 1411w, 1395w, 1378m, 1365m, 1346m,
 1304w, 1263w, 1243w, 1227m, 1190m, 1155m, 1135w,
 1121w, 1109w, 1090w, 1057w, 1013m, 985m, 960w, 941w,
 910w, 881m, 850w, 818w, 659w.

NMR (ppm) CDCl₃ 0,06 molar in Normalzelle

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen	ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen
	beob. theor.		beob. theor.
-2,10	0,7 s/1H N-H	4,34	2,0 { m/1H 7
1,66 J=8Hz	t/3H 4'	4,54	
1,86 J=7,5Hz	2,9 d/3H 8'	5,14 J=20Hz	2,0 { d/1H 10
2,18	s Aceton	5,29 J=20Hz	
2,5	4,0 m/4H 7' 7''	8,72	0,9 s/1H δ
3,22	6,4 { s/3H 2'	9,38	0,9 s/1H β
3,26		s/3H 3	9,86
3,60 J=8Hz	12,0 { q/2H 4		
3,61		s/3H 1	
3,65		s/6H 5 12	

UV/VIS (nm) C₆H₆ 0,215 mg in 50 ml Benzol, c=0,762·10⁻⁵Mol/l
 685,9(50'690), 626,2(5'780), 569,4(2'480), 548,1(9'460),
 515,9(10'620), 478,8(4'180), 419,4(86'670), 385,2(63'030),
 325,9(19'170).

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂ 0,251 mg in 50 ml CH₂Cl₂, c=0,889·10⁻⁵Mol/l
 682,7(41'610), 624,2(5'700), 572,3(2'250), 547,1(8'210),
 514,6(9'410), 478,2(3'690), 416,7(78'180), 388,2(61'740),
 326,2(18'560).

MS (m/e) 566(10%), 565(37%), 564(100%/M⁺), 563(3%), 477(16%/M⁺
 -CH₂CH₂COOCH₃), 435(10%), 245(10%).

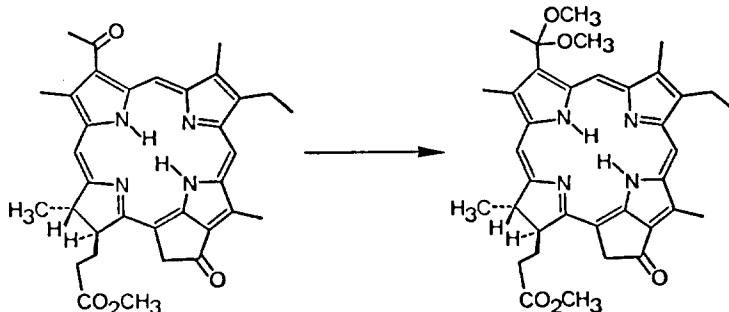
Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Angaben von H. H. Inhoffen *65) und H. Brockmann jr. *68) überein.

In Nachschubansätzen hatte sich gezeigt, dass man, um zu reinem 2-Desvinyl-2-acetyl-methyl-pyrophäophorbid a (13) zu kommen, mit Vorteil das Gemisch der Hydroxy-Verbindung (12) und Methyl-pyrophäophorbid a (3) direkt auf die oben beschriebene Weise oxidierte. Dabei wurde die Verbindung (3) nicht angegriffen und konnte anschliessend durch Chromatographie an der 100-fachen Menge Kieselgel leicht vom Produkt (13) abgetrennt werden. Man sparte dadurch eine Chromatographie.

*68) H. Brockmann jr., Habilitationsschrift (1969), Seite 50

2.3.3. 2-Desvinyl-2-acetyl-methyl-pyrrophäophorbid a-dimethylketal (14)

Die Beschreibung des Ketals (14) wurde in der Literatur nicht aufgefunden.



(13) MG 564, 69

(14) MG 610, 76

89 mg (0,157 mMol) 2-Desvinyl-2-acetyl-methyl-pyrrophäophorbid a (13) *69 wurden in 10 ml Methylenchlorid gelöst und mit 100 ml Methanol versetzt. Zu dieser Lösung gab man 1,5 ml methanolische Salzsäure *56) und rührte bei RT 2 1/2 Stunden unter Argon. Die Reaktionslösung wurde sodann mit 100 ml Methylenchlorid in einen Scheidetrichter überführt und mit 100 ml eiskalter Pufferlösung *57) geschüttelt. Die organische Phase wurde noch einmal mit kaltem Wasser (+ einige Tropfen Puffer) gewaschen, und die Waschwasser mit Methylenchlorid nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen filtrierte man durch Watte und sog das Lösungsmittel am RV ab.

Das Rohprodukt zeigte im DC nur die Flecken des Edukts und des Produkts in vergleichbarer Farbintensität.

Chromatographie: 7,5 g Kieselgel, Säule: 10 x 240 mm, aufgezogen und eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton/N-Aethyl-diisopropylamin 93,5:6:0,5. Das Substanzgemisch wurde in Methylenchlorid gelöst und aufgetragen.

Als erste Fraktion wurde eine kleine Menge Diketal (Ketal in 2 und 9) aufgefangen (UV/VIS: Rotmaximum bei ca. 644 nm, hypochrome Verschiebung bez. der freien Ketogruppen = 35 nm). Als nächstes erschien das gewünschte Monoketal (14) (UV/VIS: Rotmaximum bei 662 nm, hypochrome Verschiebung bez. der freien Ketogruppe = 20 nm). Nach unbedeutenden Mischfraktionen folgte nicht umgesetztes Edukt (13).

Die Ausbeuten betragen: 55 mg (57%) Ketal a (14) (DC-rein)
40 mg (41%) Edukt (13) (DC-rein). Dieses konnte wieder neu eingesetzt werden.

*69) DC-reines, kristallines Material mit Smp. 256°C

Zur Charakterisierung wurde das Ketal (14) zweimal aus Methanol (+ 1 Tropfen N-Aethyl-diisopropylamin) in feinen, dunkelblauen Nadeln kristallisiert. Man trocknete 5 Tage am HV (0,05 Torr) bei 80°C.

$C_{36}H_{42}N_4O_5$ ber. C 70,79 H 6,93 N 9,17
gef. C 70,54 H 6,88 N 8,97

Smp. 184°C (Zers.)

DC Rf=0,60 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Methyl-pyrophosphorbid a (3): Rf=0,49)

IR (cm⁻¹) CHCl₃ c=5%
3385w, 3025w, 3000m, 2960m, 2930m, 2865w, 2830w,
1730m, 1685s, 1620s, 1579w, 1553w, 1497m, 1465w,
1450w, 1436w, 1410w, 1399w, 1369m, 1346m, 1304w,
1215w, 1180m, 1159m, 1139m, 1123w, 1110w, 1090w,
1068m, 1029w, 999w, 981w, 964w, 910w, 895w, 869w,
850w, 840w, 820w, 708w, 693w, 680w, 660w, 620w.

NMR (ppm) CDCl₃ 0,05 molar in Normalzelle

ppm		Zuordnung + Anzahl Protonen		ppm		Zuordnung + Anzahl Protonen	
		beob.	theor.			beob.	theor.
-1,72	0,9	s/1H	N-H	4,31	3,0 {	m/1H	7
0,38	0,9	s/1H	N-H	4,49		m/1H	8
1,70 J=7,5Hz	7,3 {	t/3H	4'	5,11 J=20Hz	2,5 {	d/1H	10
1,82 J=7,5Hz		d/3H	8'	5,25 J=20Hz		d/1H	11
2,26	8,0 {	s/3H	2'	8,59	1,0	s/1H	δ
2,44		m/4H	7' 7''	9,44	1,0	s/1H	α
3,30	3,5	s/3H	3	10,18	1,0 ↔	s/1H	β
3,54	19,0 {	s/3H	1				
3,63		s/12H	2 5				
3,66		s	12				
3,70 J=7,5Hz		q/2H	4				

UV/VIS (nm) C₆H₆ 0,205 mg in 50 ml Benzol, c=0,6713·10⁻⁵ Mol/l
664,7(69'710), 635,0(4'470), 607,9(8'490), 557,6(3'580),
537,1(12'290), 507,2(11'620), 473,5(4'470), 411,4(124'680),
399,7(91'170), 380,5(63'310), 316,5(22'350).

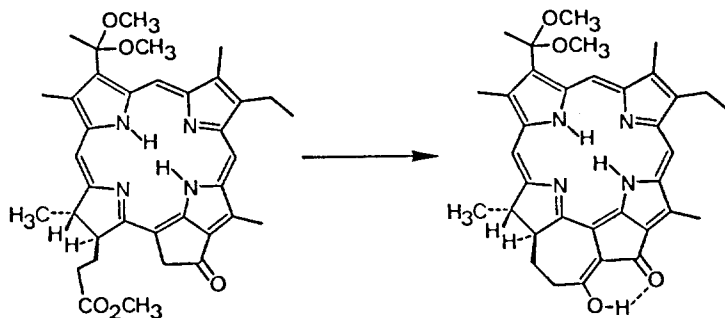
UV/VIS (nm) CH₂Cl₂ 0,214 mg in 50 ml CH₂Cl₂, c=0,7008·10⁻⁵ Mol/l
662,6(57'370), 633,0(4'710), 605,9(8'990), 556,8(4'280),
538,0(11'560), 507,1(10'770), 474,0(4'280), 410,0(115'580),
399,5(91'750), 380,3(66'900), 318,8(21'690).

MS (m/e) 610(1%/M⁺), 581(3%), 580(11%), 579(41%), 578(100%/M⁺-HOCH₃), 577(3%), 564(11%), 491(15%), 252(13%).

Die Reaktion wurde wie bei der Acetalisierung von Methyl-pyrophäophorbid d (8) ausgeführt. Die verminderte Reaktionsfähigkeit der Acetylgruppe äusserte sich in einem Umsatz zu nur 57% Ketal (14). Die UV/VIS-, IR- und NMR-Spektren des Produktes (14) hatten die erwartete grosse Aehnlichkeit mit denen des entsprechenden Acetals der d-Reihe (9) (vgl. Kap. 2. 2. 2.).

Es sei hier noch angefügt, dass Phäophorbide oder Pyrophäophorbide, welche in Stellung 2 gesättigt sind (Meso-Derivate) deutlich höhere ϵ -Werte der Absorptionsbanden im UV/VIS-Spektrum aufweisen als die entsprechenden Derivate mit einer Vinylgruppe. Eine Zusammenstellung der Beobachtungen findet man im Allgemeinen Teil auf Seite 61.

2. 3. 4. "2-Desvinyl-2-acetyl-enol a-dimethylketal" (15)



(14) MG 610, 76

(15) MG 578, 72

122 mg (0, 20 mMol) 2-Desvinyl-2-acetyl-methyl-porphäophorbid a-dimethylketal (14) *70) wurden in 12 ml Tetrahydrofuran gelöst *42), und diese Lösung durch dreimaliges Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und Abpumpen der Atmosphäre am HV von Sauerstoff befreit. Unter Argon gab man dieser Lösung bei RT 5 ml (1, 0 mMol) Natriumhexamethyldisilazanat-Lösung *20) mittels einer Spritze zu. Auch hier wurde so lange Base zugegeben, bis der charakteristische Farbumschlag nach schmutziggelb den Endpunkt der Reaktion anzeigte (Dauer: 2 - 2 1/2 Minuten). Nun wurde das Reaktionsgemisch so schnell wie möglich auf eine vorbereitete Mischung von 150 ml Methylenchlorid, 40 ml Phosphatpuffer und 40 ml Eis, welche zuvor mit Stickstoff durchspült worden war, gegossen und kräftig geschüttelt. Wiederum trat nach wenigen Sekunden die grüne Farbe des Produktes auf. Die Zugabe von zusätzlich 300 ml Eiswasser bewirkte eine gute Phasentrennung. Die organische Phase wurde noch zweimal mit je 300 ml Eiswasser gewaschen, durch Watte filtriert und am RV eingengt. Nach kurzem Trocknen am HV wurde das Produkt aus Aceton (+ 1 Tropfen N-Aethyl-diisopropylamin) kristallisiert. Man erzielte eine Ausbeute von 79 mg kristallinem, DC-reinem, dunkelgrünblauem 2-Desvinyl-2-acetyl-enol a-dimethylketal (15) (= 68% bez. Edukt (14)).

Zur Charakterisierung wurde die Substanz noch dreimal auf die selbe Weise umkristallisiert. Man trocknete 4 Tage am HV (0, 03 Torr) bei 90°C.

C ₃₅ H ₃₈ N ₄ O ₄	ber.	C 72, 63	H 6, 62	N 9, 68
	gef.	C 72, 64	H 6, 63	N 9, 77

Smp. höher als 300°C

DC Rf=0, 55 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0, 45)
(Enol a (5): Rf=0, 39)

*70) DC-reines, kristallines Material mit Smp. 184°C.

IR (cm⁻¹) CHCl₃

c=2,3%

3380w, 3000w, 2960w, 2930w, 2860w, 2830w, 1654s,
1634w, 1601w, 1575w, 1557w, 1492w, 1465w, 1440w,
1418w, 1375m, 1367s, 1345w, 1303w, 1241w, 1180w,
1169w, 1148w, 1132w, 1105m, 1083w, 1064m, 1020w,
1000w, 980w, 962w, 927w, 910w, 876w, 867w, 850w,
831w, 817w, 655w.

NMR (ppm) CDCl₃

0,05 molar in Normalzelle

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen		ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen	
	beob.	theor.		beob.	theor.
-0,92	0,9	s/1H N-H	7,93	1,0	s/1H δ
1,40-2,00	ca. 11	m/6H 4' 8'	8,53	1,0 ↔	s/1H α
2,00-2,60	6,4	m/4H 7' 7''	9,80	1,0	s/1H β
2,26		s/3H 2'	13,18	0,9	s/1H O-H
2,60-3,90	ca. 24	m/4H 4 7 8			
2,99		s/3H 3			
3,18		s/3H 1			
3,40		s/3H 5			
3,68		s/6H 2			

UV/VIS (nm) C₆H₆

0,343 mg in 50 ml Benzol, c=1,1855 · 10⁻⁵ Mol/l
687,1(43'860), 628,1(9'290), 577,0(4'490), 455,9(51'880),
428,1(65'540), 410,7(56'940), 361,8(67'140), 328,3(27'990).

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂

0,385 mg in 50 ml CH₂Cl₂, c=1,3305 · 10⁻⁵ Mol/l
683,6(36'520), 625,2(9'390), 574,7(4'750), 453,6(46'990),
425,8(65'090), 408,3(57'120), 359,9(70'650), 325,9(26'410).

Abb. 26

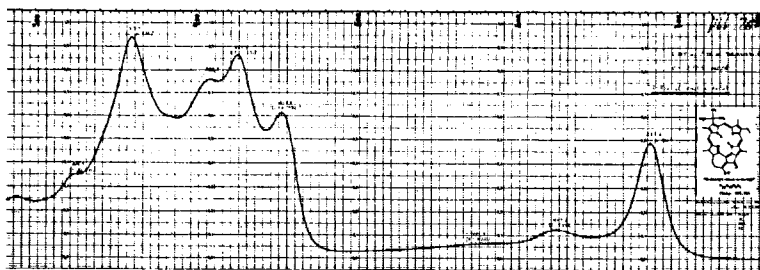


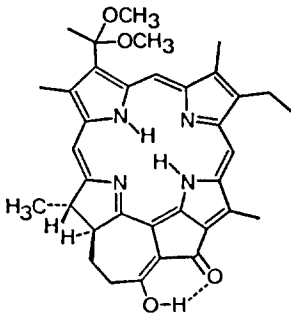
Abb. 26

MS (m/e)	580(4%), 579(6%), 578(11%/M ⁺), 549(12%), 548(36%), 547(99%/M ⁺ -OCH ₃), 546(100%/M ⁺ -HOCH ₃), 533(14%), 532(34%), 531(23%), 518(13%/M ⁺ -COOCH ₃ , -H), 517(12%/M ⁺ -COOCH ₃ , -2H), 516(14%), 503(12%), 289(3%/M ⁺⁺), 273(31%/M ⁺⁺ -HOCH ₃), 251(14%), 152(18%), 149(27%), 141(13%), 128(11%).
	Es wurden alle Piks grösser als 10% angegeben, bis zur Massenzahl 128.

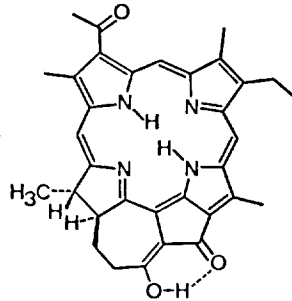
Wie in der Chlorophyll-d-Reihe war es auch hier nicht möglich, die Pyro-Verbindung mit freier Acetylgruppe direkt zum Enol zu cyclisieren. Wenige diesbezügliche Versuche führten zu Spuren von 2-Acetyl-enol a (16), etwas Edukt (13) und zu Nebenprodukten (Startfleck im DC), welche nicht untersucht wurden. Da eine Chromatographie dieses Gemisches nicht in Frage kam (Labilität des Enols (16)), wurde der Ausweg über die Ketale in Angriff genommen. Das Ketal (14) reagierte wie erwartet ohne Schwierigkeiten zum Enol (15), welches nach der Aufarbeitung ohne weitere Reinigung direkt aus Aceton mit einer Spur N-Aethyl-diisopropylamin DC-rein kristallisiert werden konnte.

2-Desvinyl-2-acetyl-enol a-dimethylketal (15) zeigt sehr ähnliche spektroskopische Eigenschaften wie Enol d-dimethylacetal (10). Im Massenspektrum dominieren die Abspaltungsfragmente von Methoxy und Methanol die Piks.

2. 3. 5. "2-Desvinyl-2-acetyl-enol a" (16)



(15) MG 578, 72



(16) MG 532, 65

79 mg (0,136 mMol) 2-Desvinyl-2-acetyl-enol a-dimethylketal (15) *71) wurden in 20 ml Methylenchlorid gelöst und mit 1,5 ml Wasser in 7 ml Tetrahydrofuran versetzt. Dieses Gemisch wurde viermal am Wasserstrahlvakuum evakuiert und jeweils dazwischen mit Argon begast. Darauf setzte man 12 Tropfen konzentrierte Salzsäure zu und rührte 15 Minuten bei RT. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in 60 ml Methylenchlorid und 120 ml Eiswasser aufgenommen und in einen Scheidetrichter überführt. Die organische Phase wurde mit Eiswasser neutral gewaschen, durch Watte filtriert und das Lösungsmittel am RV abgesaugt. Das UV/VIS-Spektrum, sowie das DC zeigten vollständigen Umsatz. Die Substanz wurde aus Benzol kristallisiert (Einengen am Vakuum, bis sich Keime bildeten; über Nacht in Kühlschrank ~4°C). Man isolierte 52 mg kristallines, DC-reines 2-Acetyl-enol a (16) in blau glänzenden Nadeln (= 71% bez. Edukt (15)).

Zur Charakterisierung wurde die Substanz noch zweimal aus Benzol umkristallisiert und 4 Tage am HV (0,05 Torr) bei 95°C getrocknet.

$C_{33}H_{32}N_4O_3$	ber.	C 74,41	H 6,06	N 10,50
	gef.	C 74,32	H 6,06	N 10,53

Smp. höher als 340°C

DC Rf=0,15 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Enol a (5): Rf=0,39)

*71) DC-reines, kristallines und einen Tag bei RT am HV getrocknetes Material.

IR (cm⁻¹) CHCl₃

Abb. 27

c=4%

3375w, 3025w, 3000w, 2965w, 2930w, 2865w, 1654s,
1630w, 1600m, 1576w, 1553w, 1534w, 1497w, 1464w,
1440w, 1430w, 1420w, 1395m, 1378s, 1365m, 1345m,
1320w, 1311w, 1280w, 1260w, 1244w, 1190m, 1166w,
1150w, 1127w, 1104m, 1083m, 1058w, 1049w, 1035w,
1012m, 980w, 961w, 939w, 926w, 909w, 881w, 865w,
845w, 838w, 819w, 695w, 660s.

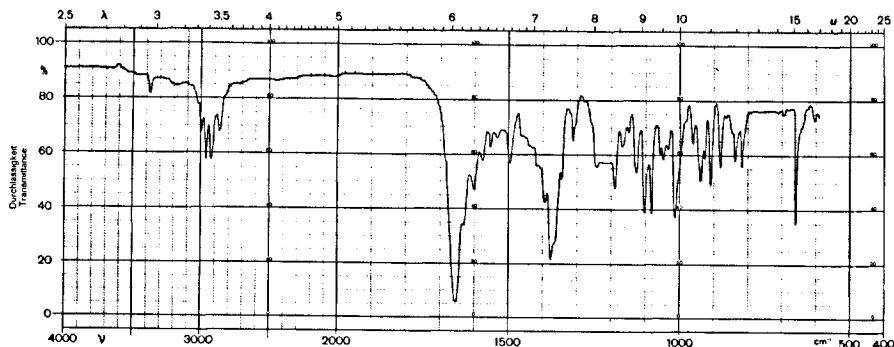


Abb. 27

NMR (ppm) CDCl₃

0,056 molar in Normalzelle

Abb. 28

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen		ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen
	beob. theor.			beob. theor.
-2,95	1,0	s/1H N-H	3,00	12,0
-1,26	0,7	s/1H N-H	3,05	s/3H 1
0,80 J=7,5Hz	3,6	d/3H 8'	3,10 J=7,5Hz	s/3H 5
1,10-2,20	9,0	m/4H 7' 7''	6,89	q/2H 4
1,40 J=7,5Hz	3,0	t/3H 4'	6,89	1,0
2,65		s/3H 2'	7,94	1,0
2,75-3,30	3	m/2H 7 8	9,09	1,0
2,91		s/3H 3	12,67	1,0
				s/1H δ
				s/1H β
				1,0 ↔ s/1H α
				1,0 s/1H O-H

UV/VIS (nm) C₆H₆

0,385 mg in 50 ml Benzol, c=1,446 · 10⁻⁵ Mol/l

706,8(32'710 max), 660,0(8'780 min), 646,4(8'830 max),
604,6(5'610 sh), 559,8(3'530 sh), 512,0(2'780 min),
464,7(40'880 max), 458,8(40'200 min), 439,2(48'350 max),
430,6(47'250 min), 414,7(57'480 max), 396,0(43'580 sh),
381,0(4'150 min), 365,6(47'720 max), 337,1(31'670 sh).

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂

0,400 mg in 50 ml CH₂Cl₂, c=1,502 · 10⁻⁵ Mol/l

702,4(30'000 max), 655,0(8'840 min), 643,8(8'990 max),
599,2(5'330 sh), 559,2(3'470 sh), 511,0(2'530 min),
461,4(39'840 max), 457,7(39'800 min), 433,5(49'270 sh),
413,0(58'040 max), 395,3(46'430 sh), 379,6(43'500 min),
364,2(51'180 max), 334,6(32'280 sh).

Abb. 29

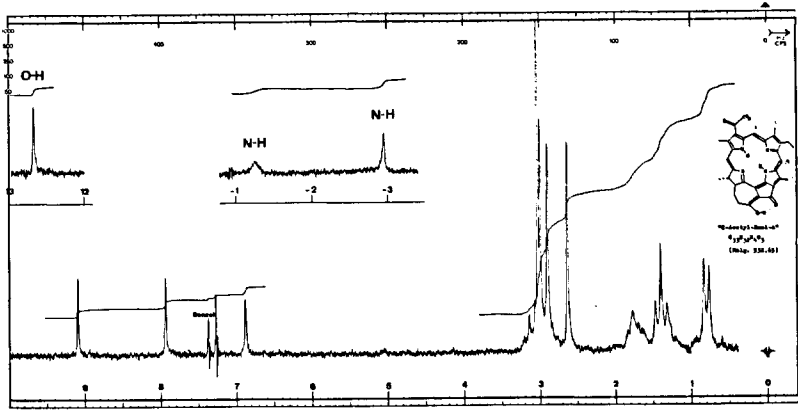


Abb. 28 2-Desvinyl-2-acetyl-enol a (16)

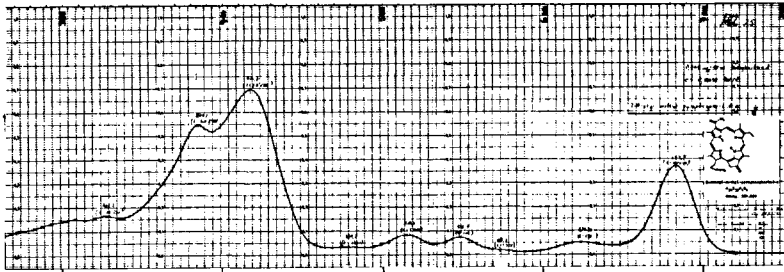


Abb. 25 2-Desvinyl-2-acetyl-methyl-pyrophosphorbid a (13)

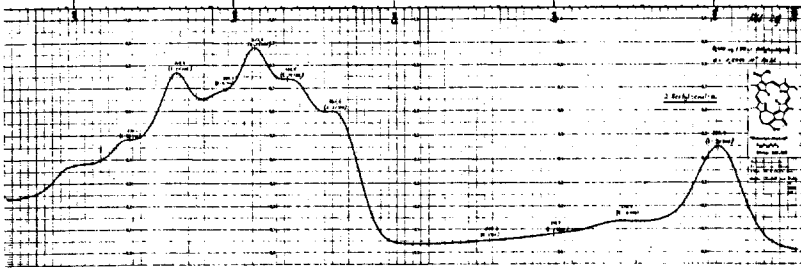


Abb. 29 2-Desvinyl-2-acetyl-enol a (16)

MS (m/e)	539(5%), 538(9%), 537(21%), 536(52%), 535(18%), 534(19%), 533(47%), 532(100%/M ⁺), 531(12%), 530(17%), 518(16%), 517(12%/M ⁺ -CH ₃), 491(11%), 490(21%), 489(19%), 294(12%), 281(18%), 280(10%), 266(17%/M ⁺⁺), 256(13%), 239(15%), 225(11%), 211(17%), 202(33%), 201(11%), 200(16%), 199(11%), 194(20%), 193(17%), 185(11%), 155(17%), 154(13%), 153(11%), 152(45%), 149(42%), 141(25%).
----------	---

Die Hydrolyse des Ketals (15) verlief quantitativ ohne Schwierigkeiten wie beim entsprechenden Acetal der Chlorophyll-d-Reihe. Von diesem Produkt gelang es, makroskopisch sichtbare Nadelchen zu erhalten. In der Mutterlauge bildeten sich nach mehreren Tagen langsam Allomere (UV/VIS, DC). In einem Nachschubansatz wurde festgestellt, dass auch aus stark mit Allomeren angereicherten Lösungen (DC ohne Startfleck!) noch makrokristallines, DC- und UV/VIS-reines 2-Acetyl-enol a (16) gewonnen werden konnte.

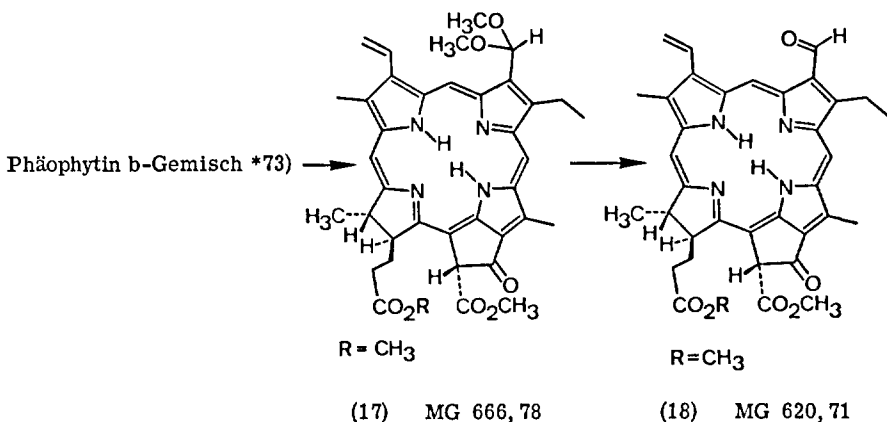
IR- und NMR-Spektren entsprachen den Erwartungen. Das Absorptionsspektrum zeigt eine bathochrome Verschiebung der Rotbande auf 702-707 nm, wobei der Spektrotyp des Enols weitgehend erhalten bleibt.

Im Massenspektrum beobachtet man einen erhöhten Isotopenpik $M+1 = 47\%$ (theor.: 37%) sowie weitere intensive Piks bis $M^{+}+7$. Aus den anderen Charakterisierungsdaten kann man jedoch eine Verunreinigung mit anderen Chlorophyll-Derivaten ausschliessen.

2.4. DARSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN VON METALLFREIEN DERIVATEN DER CHLOROPHYLL b-REIHE

2.4.1. Methyl-phäophorbid b (18)

Substanz erstmals beschrieben von R. Willstätter *72)



a) Umesterung

2,0 g Phäophytin b-Gemisch *73) wurden mit 200 ml Methanol und 9 ml konz. Schwefelsäure *6) versetzt. Man evakuierte die Lösung 5 mal am Wasserstrahlvakuum und begaste mit Argon. Anschliessend wurde eine Stunde unter Argon am Rückfluss gekocht. Zur Aufarbeitung kühlte man die Lösung und überführte mit 400 ml Methylenchlorid in einen Scheidetrichter. Mit Eiswasser wurde die organische Phase neutral gewaschen, diese durch Watte filtriert und am RV zur Trockene eingengt. Im DC stellte man vollständige Umesterung (Methyl-phäophorbid b (18) + allomere Methyl-ester) und zum Teil Acetalbildung fest (das Acetal (17) hat einen grösseren Rf-Wert als der Aldehyd (18)).

*72) R. Willstätter, A. Stoll; Untersuchungen über Chlorophyll, Berlin (1913), Seite 285

*73) Phäophytin b-Gemisch: Material aus der Chromatographie des Pflanzenextraktes (vgl. Kap. 2. 1. 1.); enthält neben Phäophytin b auch noch allomere a- und b-Derivate, aber kein Phäophytin a (1) mehr.

b) Acetalisierung (Vorschrift von H. Fischer *74)

Das amorphe, jetzt pulverförmige Material (ca. 1,6 g) versetzte man mit 35 ml Orthoameisensäuremethylester, 5 ml methanolischer Salzsäure *56) und 80 ml absolutem Methanol. Unter Argon wurde die Lösung 4 Stunden bei 60°C gerührt. Anschliessend überführte man die abgekühlte Lösung in einen Scheidetrichter und schüttelte mit 300 ml Methylenchlorid und 600 ml eiskalter Bicarbonat-Lösung *57). Nach dem Absaugen des Lösungsmittels am RV und Trocknen am HV stellte man im UV/VIS-Spektrum fest, dass die Rotbande des Acetals (17) (~662 nm in Methylenchlorid) eine schwach ausgeprägte Schulter bei ~646 nm aufwies. Diese Beobachtung führte zur Vermutung, dass dieses Nebenprodukt erstens in Stellung 3 acetalisiert und zweitens am C-9 tetrahedral substituiert sein sollte. Man wurde darin durch folgende Ergebnisse bestärkt: Bei der chromatographischen Reinigung von 2-Desvinyl-2-acetylmethyl-pyrophäophorbid a-dimethylketal (14) (vgl. Kap. 2.3.3.) wurde als erste Fraktion eine Substanz aufgefangen, welche eine Rotabsorption bei 644 nm aufwies und mit grosser Wahrscheinlichkeit ein Diketal darstellt, d. h. am C-9 tetrahedral substituiert ist.

Man löste deshalb das Produkt nochmals in 300 ml Methylenchlorid (sauer?) und schüttelte die Lösung bei RT mit Bicarbonat aus. Ein UV/VIS-Spektrum, welches anschliessend aufgenommen wurde, zeigte dieses Nebenprodukt nicht mehr. Dieses Material wurde zur Herstellung von Methyl-pyrophäophorbid b-dimethylacetal (19) und Methyl-pyrophäophorbid b (20) verwendet (vgl. Kap. 2.4.2.).

c) Reinigung des Dimethylacetals (17) und Hydrolyse zum Methyl-phäophorbid b (18)

200 mg des getrockneten, pulverisierten Acetalgemisches wurden an Kieselgel gereinigt.

Chromatographie: 25 g Kieselgel, Säule: \varnothing 15 mm, aufgezogen und eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton/N-Aethyl-diisopropylamin 93, 5:6:0, 5.

Das Substanzgemisch wurde in Methylenchlorid gelöst und aufgetragen.

Das gewünschte Dimethylacetal (17) befand sich in den ersten, dunkel gefärbten Fraktionen.

DC Rf=0,43 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Methyl-phäophorbid b (18): Rf=0,2)

UV/VIS (nm) CH_2Cl_2 qualitativ aufgenommen auf PE 402
660(0,33), 604(0,05), 552(0,02 sh), 538(0,05), 509(0,09),
483(0,03), 415(1,00), 402(0,80 sh).

Die Struktur des Acetals (17) wurde bewiesen, indem man das hydrolysierte Derivat (18) kristallin darstellte und die spektroskopischen Daten mit den Literaturwerten verglich.

*74) H. Fischer, S. Breitner, A. Hendschel, L. Nüssler, Liebigs Ann. Chem. 503, 1 (1933)

Ca. 80 mg des DC-reinen Methyl-phäophorbid b-dimethylacetals (17) wurden in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 0,5 ml Wasser sowie 5 Tropfen konz. Salzsäure versetzt. Man rührte unter Argon während 10 Minuten. Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch mit 100 ml Methylenchlorid in einen Scheidetrichter gespült und mit Wasser neutral gewaschen. Das DC-reine Methyl-phäophorbid b (18) (100% Umsatz) wurde aus Aceton kristallisiert (grün-schwarze Kristalle).

Zur Charakterisierung wurde das einmal aus Aceton kristallisierte Material verwendet, welches 2 Tage am HV (0,01 Torr) bei 45°C getrocknet worden war.

$C_{36}H_{36}N_4O_6$ ber. C 69,66 H 5,85 N 9,03
gef. C 69,54 H 5,88 N 8,99

Smp. 260°C (Zers.)

DC Rf=0,20 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Methyl-phäophorbid a (2): Rf=0,5)

IR (cm⁻¹) CHCl₃ c=3,3%
3400w, 3080w, 3030w, 3005w, 2965w, 2955w, 2930w,
2870w, 2840w, 2830w, 2755w, 2730w, 1737s, 1704s,
1663s, 1619m, 1588w, 1560w, 1545w, 1498s, 1468w,
1452w, 1436m, 1405w, 1386m, 1370m, 1350w, 1299w,
1270w, 1230m, 1163m, 1120w, 1110w, 1100w, 1075w,
1060w, 1033m, 994w, 969w, 938w, 918w, 891w, 855w,
840w, 824m, 704w, 661w.

NMR (ppm) CDCl₃ 0,055 molar in Normalzelle

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen beob. theor.	ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen beob. theor.
-1,98	0,8 s/1H N-H	4,15	
1,54 J=8Hz	3,1 t/3H 4'	4,46	2,2 { m/1H 7
1,91 J=7Hz	3,0 d/3H 8'	6,11 J=12Hz, J=1Hz	m/1H 8
2,17	s Aceton	6,22	3,0 { dd/1H 2'
~2,5	4,4 m/4H 7' 7''	6,23 J=18Hz, J=1Hz	dd/1H 2''
3,32	s/3H 1	7,76 J=18Hz, J=12Hz	1,0 dd/1H 2
~3,4	8,2 { q/2H 4	8,46	1,0 ↔ s/1H δ
3,50	s/3H 5	8,96	1,0 s/1H β
3,64	3,1 s/3H 12	9,76	0,9 s/1H α
3,97	3,0 s/3H 11	10,62	0,9 s/1H 3

UV/VIS (nm) C₆H₆ 0,300 mg in 100 ml Benzol, c=0,483·10⁻⁵Mol/l
657,0(34'970), 601,6(8'920), 556,8(8'810), 526,3(13'000),
439,6(166'030), 417,6(63'630), 372,3(25'260),
328,9(26'420).

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂ 0,325 mg in 100 ml CH₂Cl₂, c=0,524·10⁻⁵Mol/l
655,0(33'080), 600,4(9'280), 554,4(9'260), 527,0(13'370),
Abb. 30 438,5(163'410), 417,4(67'040), 371,3(27'850),
340,1(28'460).

MS (m/e) 380°C 622(13%), 621(44%), 620(100%/M⁺), 561(19%/M⁺-COOCH₃),
473(10%/M⁺-147), 149(16%), 57(10%), 55(11%), 44(13%),
43(26%), 41(16%), 31(11%), 29(17%), 28(24%), 18(20%).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturwerten *75) *76) überein.

Bemerkungen zur Chromatographie

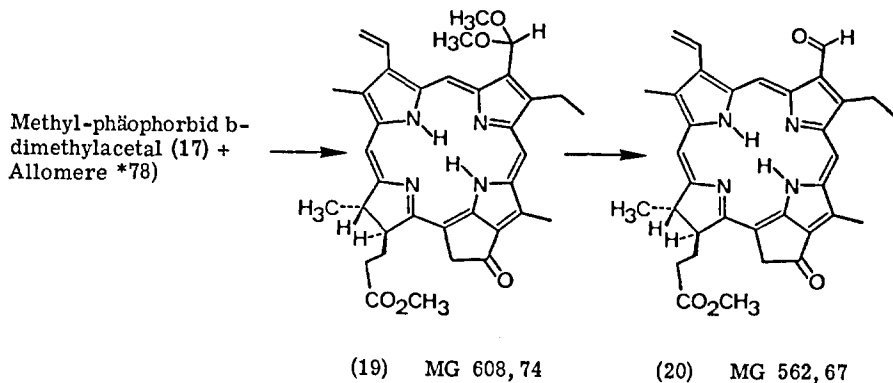
Wie im Kapitel 2.1.1. schon beschrieben, fiel Phäophytin b bei der Chromatographie des Pflanzenextraktes *1) nicht in reiner Form an. Auch Methyl-phäophorbid b (18) liess sich praktisch durch eine Chromatographie an Kieselgel nicht DC-rein isolieren. Als Dimethylacetal (17) zeigte es jedoch sehr ähnliche Eigenschaften wie Methyl-phäophorbid a (2) und konnte dementsprechend leicht gereinigt werden.

*75) H. Wolf, I. Richter, H. H. Inhoffen, Liebigs Ann. Chem. 725, 177
(1969)

*76) L. P. Vernon, G. R. Seely, "The Chlorophylls" (1966), p. 224
(Abb. des NMR: Seite 226)

2. 4. 2. Methyl-pyrophäophorbid b (20)

Substanz erstmals dargestellt von H. Fischer *77)



a) Methyl-pyrophäophorbid b-dimethylacetal (19)

1,0 g des beschriebenen, rohen Gemisches *78) wurden in 100 ml abs. Pyridin gelöst. Diese Lösung wurde nun fünfmal am Wasserstrahl evakuiert und dazwischen mit Argon begast. Anschliessend liess man sie (Argonballon) 24 Stunden am Rückfluss kochen. Das am RV eingeeengte Material wurde einige Stunden bei RT am HV getrocknet.

Chromatographie: 100 g Kieselgel, Säule: ϕ 26 mm, aufgezogen und eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton/N-Aethyldiisopropylamin 93, 5:6:0, 5. Das Substanzgemisch wurde in Methylenchlorid gelöst und aufgetragen.

Das zuerst eluierte Produkt war das gewünschte Methyl-pyrophäophorbid b-dimethylacetal (19). Man erhielt 170 mg DC-reines, nicht kristallines Acetal (19). Dieses Material wurde zusammen mit analog hergestelltem Nachschubmaterial direkt als Edukt für die Kondensation verwendet (vgl. Kap. 2. 4. 3.).

*77) H. Fischer, E. Lakatos, J. Schnell, Liebigs Ann. Chem. 509, 201 (1934)

*78) Methyl-phäophorbid b-dimethylacetal (17) + Allomere: Material, welches nach der Acetalisierung (vgl. Kap. 2. 4. 1. b) erhalten wurde; 1 Tag bei RT am HV getrocknet.

DC Rf=0,44 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Methyl-pyrophäophorbid b (20): Rf=0,21)

IR (cm⁻¹) CHCl₃ aufgenommen auf PE 257
3390w, 3000w, 2960m, 2925m, 2900w, 2870w, 2820w,
1732m, 1688s, 1620m, 1548w, 1552w, 1498m, 1465w,
1451w, 1438w, 1386w, 1368w.

NMR (ppm) CDCl₃ aufgenommen auf Varian T-60
10,10 s, 9,57 s, 8,57 s Methinprotonen
8,05 dd, 6,43 dd, 6,16 dd Vinylgruppe in 2
6,57 s Acetalproton
5,17 s (verbreitert) Protonen am C-10
4,4 7, 8
4,0-3,0 (3,73s, 3,63s, 3,40s) Bereich der Protonen 1,
4, 5, 12, 3 (Acetal): total
17H aus Integral: 17-18H

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂ qualitativ aufgenommen auf PE 402
662(0,32), 606(0,06), 558(0,05 sh), 543(0,07), 514(0,09),
421(1,00), 405(0,71 sh).

Im Gegensatz zu Methyl-pyrophäophorbid d-dimethylacetal (9) und 2-Desvinyl-2-acetyl-methyl-pyrophäophorbid a-dimethylketal (14), welche ein Phäophorbid a-Absorptionspektrum aufweisen, wurde beim Methyl-phäophorbid b-acetal (17) und Methyl-pyrophäophorbid b-acetal (19) ein Allomer-Typ-Phäophorbid-a-Spektrum erhalten. Das äusserte sich in den relativen Absorptionen der Banden bei 538 und 509 nm bei Verbindung (17) resp. 543 und 514 nm bei Verbindung (19), welche Absorptionsverhältnisse von 0,6:1 aufweisen (Phäophorbide: 0,9:1).

b) Hydrolyse zum Methyl-pyrophäophorbid b (20)

Zur Charakterisierung des Pyro-Aldehyds (20) verwendete man die anschliessend eluierten Gemischfraktionen (Acetal (19) Methyl-pyrophäophorbid b (20)) der Chromatographie. Die Mischfraktionen wurden in wenig Tetrahydrofuran gelöst, mit einigen Tropfen Wasser und konz. Salzsäure versetzt und 10 Minuten bei RT gerührt. Anschliessend transferierte man das Reaktionsgemisch in einen Scheidetrichter, versetzte mit Methylenchlorid und wusch die organische Phase mit Wasser neutral. Das im DC einheitliche Material wurde aus Methylenchlorid/Methanol kristallisiert (grün-schwarze Kristalle).

Zur Charakterisierung wurde die Substanz noch einmal aus Methylenchlorid/Methanol umkristallisiert. Man trocknete 3 Tage bei 70°C am HV (0,01 Torr).

C₃₄H₃₄N₄O₄ ber. C 72,58 H 6,09 N 9,96
gef. C 72,35 H 6,14 N 9,93

Smp. 228°C

IR (cm⁻¹) CHCl₃ c=5%
 3400w, 3090w, 3020w, 3000w, 2970w, 2950w, 2930w,
 2900w, 2870w, 2825w, 2730w, 1731m, 1693s, 1660s,
 1619s, 1585w, 1559w, 1541w, 1528w, 1495s, 1466w,
 1451w, 1436w, 1403w, 1384m, 1368w, 1350w, 1302w,
 1226m, 1167w, 1128w, 1117w, 1106w, 1098w, 1074w,
 1060w, 1046w, 1028w, 989w, 964w, 938w, 917w, 890w,
 852w, 822w, 705w, 684w, 661w, 607w.

NMR (ppm) CDCl₃ 0,065 molar in Normalzelle

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen		ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen	
	beob.	theor.		beob.	theor.
-2,32	0,9	s/1H N-H	4,97 J=20Hz	2,2	d/1H 10
1,48 J=7,5Hz	3,1	t/3H 4'	5,12 J=20Hz		d/1H 11
1,90 J=7,5Hz	3,1	d/3H 8'	6,09 J=12Hz, J=2Hz	2,0	dd/1H 2'
~2,5	4,4	m/4H 7' 7''	6,21 J=18Hz, J=2Hz		dd/1H 2''
3,32	8,6	s/6H 1 5	7,74 J=18Hz, J=12Hz	1,0	dd/1H 2
3,39		q/2H 4	8,38	0,9	s/1H δ
3,69	3,1	s/3H 12	8,67	1,0	s/1H β
4,21	2,3	m/1H 7	9,66	1,0	s/1H α
4,42		m/1H 8	10,64	1,0	s/1H 3

UV/VIS (nm) C₆H₆ 0,285 mg in 100 ml Benzol, c=0,5065·10⁻⁵ Mol/l
 657,2(32'140), 601,8(9'120), 554,0(9'600), 528,9(13'190),
 439,7(161'070), 418,7(60'400), 371,2(23'260),
 326,5(27'640).

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂ 0,325 mg in 100 ml CH₂Cl₂, c=0,5776·10⁻⁵ Mol/l
 655,3(29'970), 600,0(9'330), 554,1(9'350), 530,0(12'660),
 439,0(158'410), 418,6(63'180), 371,4(25'170),
 326,2(29'640).

MS (m/e) 360°C 566(3%), 565(6%), 564(17%), 563(41%), 562(100%/M⁺),
 41(10%).

Bemerkungen zur Reaktion

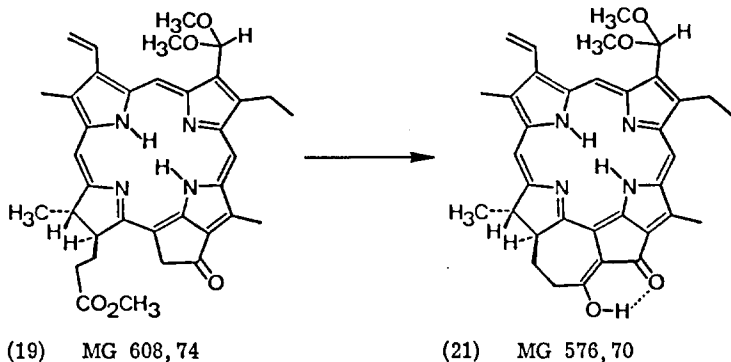
a) Für die Cyclisierung des Pyro-Derivates zum Enol b (22) musste wiederum die Aldehydfunktion geschützt werden. Versuche, Methyl-pyrophosphorbid b (20) selektiv in Stellung 3 zu acetalisieren, schlugen fehl, da sich die Ketogruppe in 9 als die reaktivere Carbonylfunktion erwies. Unter den Acetalisierungsbedingungen wurde nicht das oben beschriebene Acetal (19) erhalten, sondern das Diketal (zusätzlich Ketal am C-9), dessen Absorptionsspektrum das Rotmaximum bei ca. 648 nm aufweist, und ausserdem anstelle der zwei Banden bei 543 und 514 nm nur noch eine bei ca. 506 nm mit einer Schulter bei 500 nm besitzt. Deshalb wurde die Schutzgruppe vor der Pyrolyse eingeführt.

b) Als Strukturbeweis wurde das Methyl-pyrophäophorbid b-dimethylketal (19) hydrolysiert und das entstandene Methyl-pyrophäophorbid b (20) vollständig charakterisiert. Die erhaltenen Daten stimmen mit den Literaturwerten *75) gut überein.

c) Nach unseren Beobachtungen sind die Derivate der Chlorophyll b-Reihe besser chromatographisch zu reinigen, wenn die Aldehydgruppe zuvor acetalisiert wurde. G. W. Kenner und K. M. Smith *79) lösten das Problem der Trennung von metallfreien Derivaten der a- und b-Reihe, indem sie das Gemisch mit Girard-T-Reagens umsetzten. Dieses reagierte nur mit den b-Derivaten, was deren Eigenschaften bei der nachfolgenden Chromatographie stark veränderte. Die Schutzgruppe wurde mit Säure wieder abgespalten.

*79) G. W. Kenner, S. W. McCombie, K. M. Smith, J. chem. Soc. Perkin I, 2517 (1973)

2.4.3. "Enol b-dimethylacetal" (21)



4 Parallelansätze mit je 183 mg Edukt (19)

183 mg (0,3 mMol) Methyl-pyrophäophorbid b-dimethylacetal (19) *80) wurden in 24 ml Tetrahydrofuran gelöst *42), viermal mit flüssigem Stickstoff ausgefroren und dazwischen die Atmosphäre am HV abgesogen. Unter Argon wurde mittels einer Spritze mit langer Nadel 7,3 ml (1,5 mMol) einer 0,2 molaren Natriumhexamethyldisilazanat-Lösung *20) zugegeben. Der Endpunkt der Basenzugabe (2 - 3 Minuten nach Beginn) ist deutlich an einer intensiven Verfärbung des Reaktionsgemisches nach rostrot feststellbar. Im Gegensatz zu den Cyclisierungen in der a- und b-Reihe geht der Farbumschlag nicht nach schmutziggelb, sondern nach rostrot. Nun wurde die Lösung so schnell wie möglich auf ein, mit Stickstoff gut gespültes Gemisch von 180 ml Methylenchlorid, 90 ml Phosphatpuffer und 90 g Eis in einem Scheidetrichter gegossen und kräftig geschüttelt. Nach wenigen Sekunden erschien die grüne Farbe des gewünschten Produktes. Die Wasserphase wurde mit frischem Methylenchlorid noch nachextrahiert. Man vereinigte die organischen Phasen, wusch sie nochmals mit Eiswasser, filtrierte durch Watte und sog das Lösungsmittel am RV ab. Die Kondensation verlief nicht ganz ohne Schwierigkeiten. Im UV/VIS-Spektrum stellte man einen beträchtlichen Anteil an allomerem Produkt fest, was im DC als Startfleck neben dem grünen Produktfleck in Erscheinung trat. Da das Rohprodukt nicht direkt kristallisiert werden konnte, musste chromatographiert werden.

*80) DC-reines, nicht kristallisiertes Material, über Nacht bei RT am HV getrocknet. Herkunft: Mehrere Chromatographien des Gemisches von Methyl-pyrophäophorbid b-dimethylacetal + Allomere (vgl. Kap. 2.4.2.)

Chromatographie: Cellulose, Säule: 15 x 220 mm (trocken gestopft), Substanzgemisch in wenig Methylenchlorid gelöst, mit etwas Cellulose versetzt und nach ca. 1 Minute am Vakuum zur Trockene eingengt. Dieses wurde auf die Säule aufgetragen. Man eluierte mit Hexan/Aceton/N-Aethyldiisopropylamin 90:9,5:0,5.

Die ersten Fraktionen enthielten das gewünschte Enol b-dimethylacetal (21). Sobald im DC neben dem Produktfleck (21) noch weitere Flecken entdeckt wurden, eluierte man mit reinem Aceton (0,5% Aminbase) das restliche, sowie das am Säulenkopf unlöslich gebliebene Material. Dieses wurde zur Trockene eingengt und nochmals über eine neue Säule auf die gleiche Art chromatographiert. Die Prozedur musste mehrere Male wiederholt werden.

Zur Kristallisation vereinigte man das chromatographierte, DC-reine Enol b-dimethylacetal (21) aus den 4 Parallelansätzen. Als Lösungsmittel wurde Aceton mit einer Spur Aminbase verwendet. Aus den 4 Ansätzen erzielte man total 153 mg kristallines, DC-reines Enol b-dimethylacetal (21) (= 22% bez. Methyl-pyrophosphorbid b-dimethylacetal (19)).

Zur Charakterisierung wurde das Produkt nochmals umkristallisiert. Man erhielt aus den 153 mg jetzt 130 mg dunkelblaue Nadelchen (21), welche 3 Tage bei 55°C am HV (0,01 Torr) getrocknet wurden.

$C_{35}H_{36}N_4O_4$ ber. C 72,89 H 6,29 N 9,72
gef. C 72,78 H 6,39 N 9,72

Smp. höher als 340°C

DC Rf=0,34 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Methyl-pyrophosphorbid a (3): Rf=0,49)

IR (cm⁻¹) CHCl₃ c=5%
3635w, 3395w, 3020w, 3007w, 2970w, 2932m, 2875w,
2830w, 2730w, 1710w, 1655s, 1637w, 1604w, 1550m,
1495m, 1467w, 1442w, 1420w, 1380m, 1367s, 1303w,
1280w, 1249m, 1198w, 1170w, 1138w, 1106s, 1090m,
1075w, 1060w, 1044w, 1020m, 995w, 965w, 940w, 929w,
918w, 887w, 869w, 854w, 840w, 830w, 817w.

NMR (ppm) CDCl₃ 0,06 molar in Normalzelle

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen beob. theor.	ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen beob. theor.
-1,78	0,8 s/1H N-H	6,04 J=11Hz, J=1,5Hz	3,1 { dd/1H 2'
0,98 J=7,5Hz	4,7 s/3H 8'	6,17 J=18Hz, J=1,5Hz	3,1 { dd/1H 2''
1,59 J=7,5Hz	t/3H 4'	6,32	s/1H 3
~1,9	7,6 { m/2H 7' 7''	7,06	1,0 s/1H δ
~2,1	{ m/2H	7,70 J=11Hz, J=18Hz	1,1 dd/1H 2
2,84	7,5 { s/3H 1	8,37	0,9 s/1H α
2,96	{ s/3H 5	9,37	1,0 ↔ s/1H β
3,50 J=7,5Hz	{ q/2H 4	12,88	1,0 s/1H O-H
3,66	9,0 { s/3H 3		
3,68	{ s/3H 3'		

UV/VIS (nm) C_6H_6 0,635 mg in 100 ml Benzol, $c=1,1011 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
686,1(34'430), 626,4(9'170), 572,4(5'020), 462,6(57'120),
434,7(68'510), 420,0(55'850), 363,8(60'850),
330,3(26'060), 289,6(21'530).

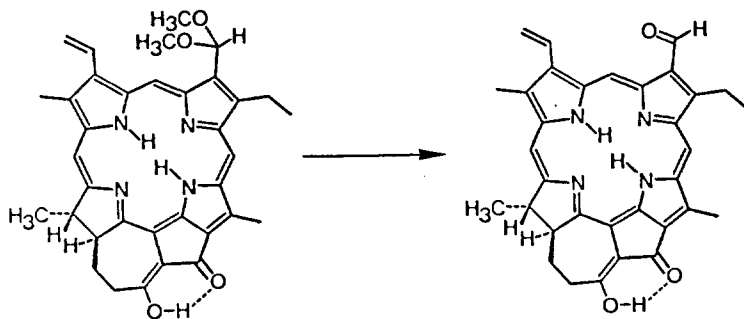
UV/VIS (nm) CH_2Cl_2 0,665 mg in 100 ml CH_2Cl_2 , $c=1,1531 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
682,4(31'130), 623,7(9'190), 571,5(5'120), 460,5(53'330),
432,7(69'690), 418,0(57'150), 362,5(63'650),
329,9(26'020), 288,6(21'390).

MS (m/e) $380^\circ C$ 579(7%), 578(7%), 577(17%), 576(28%/M⁺), 575(9%),
572(13%), 571(13%), 570(25%), 569(10%), 568(21%),
556(12%), 554(13%), 548(11%), 547(26%), 546(74%),
545(53%), 544(76%/M⁺-HOCH₃), 540(10%), 532(21%),
531(35%), 530(77%), 529(12%), 528(12%), 518(15%),
517(27%), 516(57%), 515(32%), 514(37%), 513(19%),
512(11%), 502(13%), 501(25%), 500(12%), 279(13%),
273(13%), 272,5(12%), 257(10%), 256(12%), 219(12%),
185(18%), 167(21%), 160(10%), 150(11%), 149(100%),
147(10%), 143(10%), 141(19%).

Die spektroskopischen Daten unterscheiden sich kaum von denen der Acetal-enole der d- und 2-Acetyl a-Reihe.

Die Herstellung des Derivates (21) ist alles andere als befriedigend. Da die Derivate der Chlorophyll b-Reihe, d.h. die Enole, nicht im Zentrum unserer Interessen standen, wurden keine weiteren Anstrengungen unternommen, die Reaktion zu optimieren.

2. 4. 4. "Enol b" (22)



(21) MG 576, 70

(22) MG 530, 63

75 mg (0,13 mMol) Enol b-dimethylacetal (21) *81) wurden in 20 ml Methylenchlorid gelöst und mit 7 ml Tetrahydrofuran, sowie 1,5 ml Wasser versetzt. Diese Lösung wurde fünfmal am Wasserstrahl evakuiert und mit Argon begast. Darauf gab man 10 Tropfen konz. Salzsäure zu und rührte das Gemisch bei RT während 15 Minuten. Das Reaktionsgemisch wurde in einen Scheidetrichter transferiert und nochmals mit Eiswasser neutral gewaschen. Die organische Phase wurde durch Watte filtriert und am RV zur Trockene eingengt. Man kristallisierte aus Methylenchlorid und wenig Tetrahydrofuran. Ausbeute: 63 mg kristallines, DC-reines Enol b (22) (= 91% bez. Enol b-dimethylacetal (21)).

Charakterisiert wurde ein Material, welches zweimal aus Methylenchlorid/Tetrahydrofuran umkristallisiert und 4 Tage am HV (0,01 Torr) bei 65°C getrocknet worden war.

$C_{33}H_{30}N_4O_3$	ber.	C 71,40	H 5,52	N 9,98	Cl 4,55
+0,36 CH_2Cl_2	gef.	C 71,11	H 5,59	N 10,02	Cl 4,09

Smp. höher als 340°C

DC Rf=0,10 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Methyl-pyrophäophorbid a (3): Rf=0,49)

IR (cm^{-1}) $CHCl_3$ c=2,5%
 3395w, 3090w, 3030w, 3000w, 2970w, 2930w, 2875w,
 2855w, 2830w, 2760w, 2730w, 1653s, 1636m, 1603w,
 1590w, 1564m, 1542w, 1524w, 1495s, 1467m, 1441w,
 1419w, 1402w, 1380s, 1366s, 1320w, 1301w, 1280w,
 1249m, 1170w, 1140w, 1110m, 1090w, 1075w, 1061w,
 1043w, 1020m, 995w, 989w, 965w, 928w, 917w, 885w,
 869w, 850w, 839w, 828w, 817w.

*81) DC-reines, kristallines und 3 Tage bei 55°C am HV getrocknetes Material

IR (cm⁻¹) KBr

1,1 mg in 300 mg Kaliumbromid
 3385w, 2965w, 2920m, 2865w, 2820w, 2720w, 1652s,
 1634m, 1587w, 1560m, 1541w, 1525w, 1493s, 1466w,
 1441w, 1419w, 1400w, 1379s, 1363s, 1321w, 1300w,
 1280w, 1248m, 1228w, 1210m, 1202m, 1169w, 1137w,
 1120w, 1110m, 1089w, 1075w, 1060w, 1041w, 1020m,
 990w, 963w, 939w, 927m, 915w, 893w, 883w, 840w,
 828w, 817m, 790m, 763w, 740w, 730w, 724s, 710m,
 698w, 690w, 673m, 635w, 611w, 600w, 561w, 538w, 505w.

NMR (ppm) CDCl₃

0,06 molar in Normalzelle

Abb. 32

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen		ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen	
	beob.	theor.		beob.	theor.
-2,57	0,8	s/1H N-H	6,03 J=12Hz, J=1Hz	2,0	{ dd/1H 2'
-1,09	1,0	s/1H N-H	6,09 J=18Hz, J=1Hz	2,0	{ dd/1H 2''
1,06 J=7Hz	13,6	d/3H 8'	6,92	0,8	s/1H δ
1,36 J=7Hz		t/3H 4'	7,49	2,0	{ s/1H β
1,5-2,3		m/4H 7' 7''	7,53 J=18Hz, J=12Hz		{ dd/1H 2
2,43	3,1	s/3H 1	9,22	1,0	s/1H α
2,84	3,1	s/3H 5	10,59	1,0	s/1H 3
3,1	2,2	m/2H 7 8	12,74	1,0	s/1H O-H

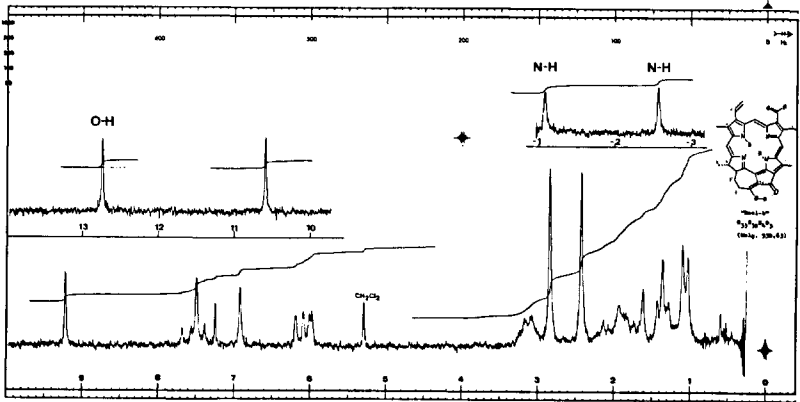


Abb. 32

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂

0,707 mg in 100 ml CH₂Cl₂, c=1, 2598·10⁻⁵ Mol/l
 679,8(17'480 max), 648,2(4'760 min), 620,1(9'650 max),
 596,5(6'040 min), 570,6(7'540 max), 533,5(5'560 min),
 478,7(80'800 max), 462,2(54'600 min), 451,8(59'130 max),
 427,9(40'000 sh), 396,5(31'000 min), 368,9(49'650 max),
 338,4(36'400 sh), 300,4(20'650 min), 290,3(21'900 max).

Abb. 33

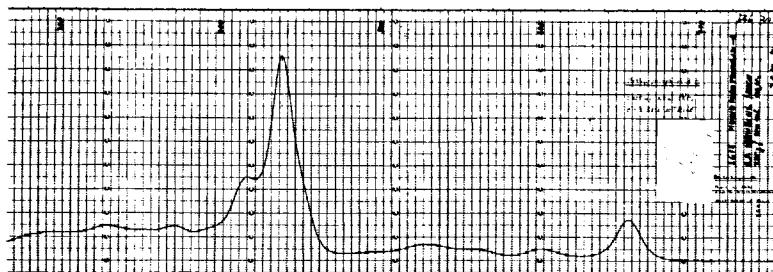


Abb. 30 Methyl-phäophorbid b (18)

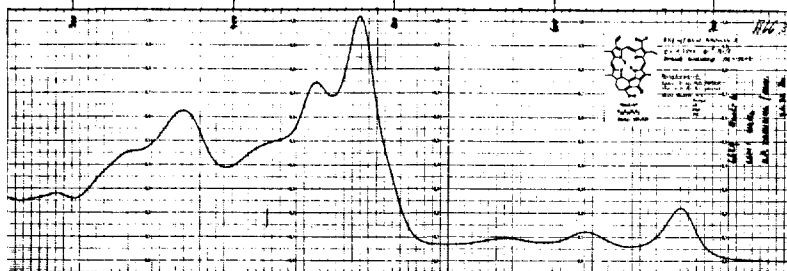


Abb. 33 Enol b (22)

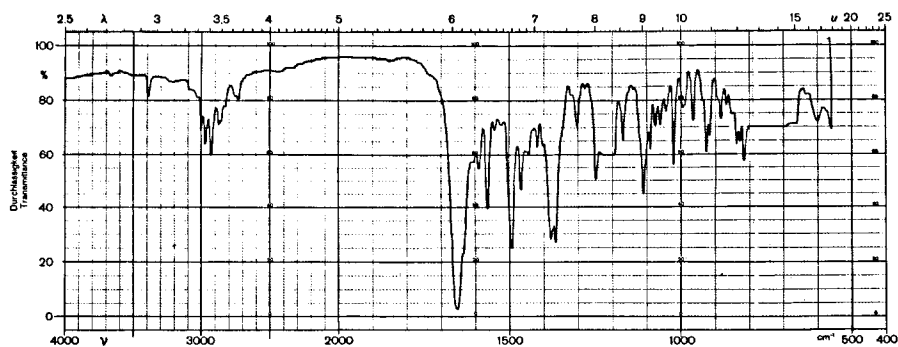


Abb. 31 Enol b (22)

UV/VIS (nm) C ₆ H ₆	0,630 mg in 100 ml Benzol, c=1,1226 · 10 ⁻⁵ Mol/l 682,3(18'620 max), 649,1(4'600 min), 622,3(9'290 max), 597,0(5'620 min), 570,6(7'190 max), 536,8(5'350 min), 480,3(83'740 max), 463,6(52'600 min), 452,7(59'060 max), 431,6(38'640 sh), 397,7(28'600 min), 370,6(48'400 max), 340,5(33'850 sh), 301,8(19'600 min), 290,8(21'640 max).
MS (m/e) 380°C	534(3%), 533(6%), 632(12%), 531(10%), 530(22%/M ⁺), 279(11%), 265(6%/M ⁺), 256(11%), 185(15%), 183(10%), 176(14%), 167(12%), 157(10%), 155(10%), 150(12%), 149(100%), 142(10%), 141(21%), 129(22%), 123(10%), 121(10%).

Nicht mehr kristallisierbare Mutterlaugen aus Vorversuchen und diesem Ansatz wurden vereinigt und durch Chromatographie an Cellulose gereinigt. Man löste die Substanz in wenig Methylenchlorid, gab etwas Cellulose dazu, saugte das Lösungsmittel am Vakuum ab und brachte das Gemisch trocken auf die Säule. Man eluierte mit Hexan/Aceton 9:1. Das so erhaltene DC-reine Material konnte anschliessend aus Methylenchlorid/Tetrahydrofuran kristallisiert werden.

Die vorgeschlagene Struktur von Enol b (22) wird durch die spektroskopischen Daten bestätigt. Im IR-Spektrum findet man wie bei allen bisher beschriebenen Enolen (Enol a (5), Enol d (11), 2-Acetyl-enol a (16), Acetal-enol (10) und Ketal-enol (15)) die Enol-Schwingungsbande bei 1652 - 53 cm⁻¹. Die C-O-Bande der Aldehydgruppe ist wie im Falle von Enol d (11) verdeckt.

Im NMR-Spektrum erscheint das Signal des Enolprotons bei 12,74 ppm und das Proton der Formylgruppe bei 10,59 ppm (das Formylproton von Methyl-phäophorbid b (18) sowie von Methyl-pyrophäophorbid b (20) liegt an der selben Stelle: 10,62 resp. 10,64 ppm). Auch die übrigen Protonen sind gut zuzuordnen. Zu bemerken ist hier vielleicht noch, dass beide N-H-Signale aufgefunden wurden, was bei den anderen drei Derivaten der Chlorophyll b-Reihe (Methyl-phäophorbid b (18), Methyl-pyrophäophorbid b (20) und Enol b-dimethylacetal (21)) nicht zutraf.

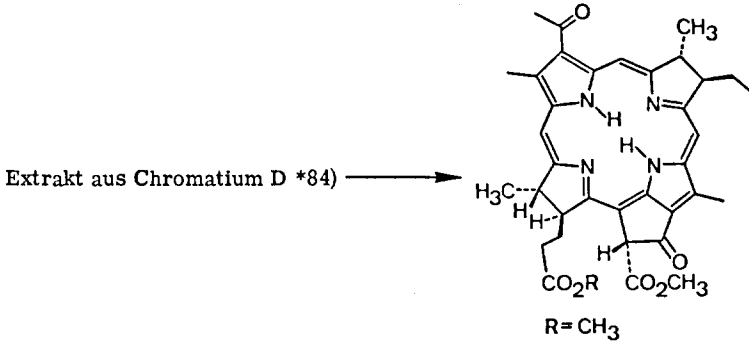
Im UV/VIS-Spektrum beträgt der Extinktionskoeffizient ϵ der Rotbande des Enols nur 18'000, was etwa halb so hoch ist, wie das ϵ der übrigen Enole. Bezüglich Methyl-phäophorbid b (18) liegt die Abnahme des ϵ -Wertes der Rotbande durch die Enolisierung in der selben Grössenordnung wie bei den entsprechenden Verbindungen der Chlorophyll a-Reihe. Besonders ausgeprägt ist jedoch das Maximum bei 480 nm mit einem ϵ von ca. 80'000, was jetzt deutlich höher ist als beim Enol a (5) (60'000). Das Massenspektrum zeigt ein sehr mageres Fragmentierungsmuster. Der Molekularpik ist aber mit einer Intensität von 22% deutlich sichtbar.

2. 5. DARSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN VON METALLFREIEN DERIVATEN DER BAKTERIOCHLOROPHYLL-REIHE

2. 5. 1. Bakterio-methyl-phäophorbid (23)

Substanz erstmals hergestellt von H. Fischer *82)

Vorschrift im Wesentlichen wie beschrieben von H. Brockmann jr. *83)



(23) MG 624, 75

47 g feuchter Aethanolextrakt wurden in 4 gleichen Portionen mit je 750 ml Methylenchlorid und 750 ml 0,5 N-Salzsäure in einem Scheidetrichter intensiv geschüttelt. Um die dabei aufgetretene Emulsion zu brechen, wurde gesättigte Kochsalzlösung hinzugefügt. Die rote, organische Phase wurde zweimal mit kaltem Wasser gewaschen, durch Watte filtriert und am RV eingeengt. Der Rückstand enthielt nun das Bakteriophäophytin sowie andere Inhaltsstoffe der Bakterien. Man chromatographierte den Rückstand in zwei Portionen.

Chromatographie: 70 g Kieselgel, Säule: ϕ 23 mm, aufgezogen und eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 94:6. Das Substanzgemisch wurde in wenig Methylenchlorid gelöst und aufgetragen.

Die ersten roten Fraktionen enthielten reines Bakteriophäophytin (ein roter Fleck im DC). Die folgenden, sehr konzentrierten Fraktionen wurden dünn-schichtchromatographisch auf ihre Reinheit geprüft und vereinigt. In den weiteren, nun immer dünner werdenden Fraktionen konnte man im DC neben dem Produktfleck einen rötlichen Fleck mit kleinerem Rf-Wert nachweisen.

*82) H. Fischer, J. Hasenkamp, Liebigs Ann. Chem. 515, 148 (1935)

*83) H. Brockmann jr., Habilitationsschrift (TH Braunschweig) (1969) Seite 89

*84) Extrakt aus Chromatium D: 47 g feuchter Aethanolextrakt durch Einengen auf 10% und Fällung bei pH 3 gewonnen (ca. 800 g Bakterien aus 150 l Kulturlösung). Geschenk von Dr. H. Brockmann jr., Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung mbH, D-3301 Stöckheim über Braunschweig (BRD).

Diese Mischfraktionen wurden vorerst aufbewahrt. Man beobachtete keine anderen Substanzen. Das reine Bakteriophäophytin aus den beiden Chromatographien (ca. 1,65 g) wurde in drei gleich grossen Portionen umgeestert. Ca. 550 mg Bakteriophäophytin wurden in 300 ml Methanol gelöst, mit 13,5 ml konz. Schwefelsäure *6) versetzt, viermal am Wasserstrahl evakuiert und mit Argon begast. Unter Rühren wurde die Lösung 100 Minuten am Rückfluss gekocht (Argonballon). Man kühlte ab, überführte in einen Scheidetrichter mit 400 ml Methylenchlorid und 500 ml Eiswasser und trennte die Phasen. Die organische Phase wurde mit Eiswasser neutral gewaschen, durch Watte filtriert und das Lösungsmittel am RV abgesogen. Die drei parallelen Ansätze wurden wieder vereinigt und das DC-reine Produkt aus warmem Aceton kristallisiert (einengen der Lösung am Wasserstrahlvakuum bis sich Kristallkeime bildeten). Man erhielt 980 mg DC-reine, blauschwarz glänzende Kristalle. Die Mutterlauge, welche im DC noch etwas nicht umgeestertes Phäophytin zeigte (deutlich höherer Rf-Wert als (23)), wurde zur Trockene eingeeengt zusammen mit den Mischfraktionen der Phäophytinchromatographie in 100 ml Methanol + 4,5 ml konz. Schwefelsäure gelöst und nochmals wie oben beschrieben 100 Minuten am Rückfluss gekocht. Nach der Aufarbeitung chromatographierte man an der 50-fachen Menge Kieselgel mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 94:6. Das DC-reine Bakterio-methylphäophorbid a (23) wurde aus Aceton kristallisiert (130 mg DC-reine Kristalle). Aus den 47 g Extrakt erhielt man total 1,10 g kristallines, blauschwarzglänzendes Bakterio-methylphäophorbid (23).

Zur Charakterisierung wurde die Substanz noch zweimal aus Aceton umkristallisiert und 4 Tage am HV (0,005 Torr) bei 45°C getrocknet.

$C_{36}H_{40}N_4O_6$

ber. C 69,21 H 6,45 N 8,97
gef. C 69,18 H 6,41 N 8,94

Smp.

239 - 241°C

DC

Rf=0,31 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Methyl-pyrophäophorbid a (3): Rf=0,49)

IR (cm⁻¹) CHCl₃

c=3%

3400w, 3340w, 3025w, 3000w, 2955w, 2920w, 2870w,
1733s, 1690s, 2629m, 1580w, 1525w, 1487w, 1450w,
1433w, 1400w, 1380m, 1364m, 1296w, 1270w, 1232m,
1201m, 1155w, 1130w, 1118w, 1095w, 1010w, 989m,
928m, 890w, 875m, 844w, 820w, 690w, 652m, 614w.

UV/VIS (nm) C₆H₆

0,201 mg in 50 ml Benzol, c=0,6435 · 10⁻⁵ Mol/l
758,1(72'740), 687,6(9'470), 625,8(2'950), 531,4(26'820),
498,8(5'810), 389,2(55'800), 362,4(105'270).

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂

0,272 mg in 50 ml CH₂Cl₂, c=0,8708 · 10⁻⁵ Mol/l
752,6(49'140), 682,3(10'850), 624,4(4'200), 529,5(23'420),
499,1(6'110), 387,8(47'970), 360,3(92'360).

Abb. 34

NMR (ppm) CDCl_3

0,055 in Normalzelle

Abb. 35

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen			ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen		
	beob.	theor.			beob.	theor.	
-0,95	1,0	s/1H	N-H	3,62	3,1	s/3H	12
0,48	0,9	s/1H	N-H	3,88	3,1	s/3H	11
1,12 J=7,5Hz	3,2	t/3H	4''	4,04	2,2	m/2H	4 7
1,76 J=7,5Hz	6,9 {	d/3H	8'	4,28	2,2 {	m/1H	3 8
1,81 J=7,5Hz		d/3H	3'	4,30		m/1H	
1,9-2,8	7,1	m/6H	7' 7'' 4'	6,09	1,0	s/1H	10
3,18	3,0	s/3H	2'	8,41	2,0 {↔	s/1H	δ
3,48	6,2 {	s/3H	5	8,48		s/1H	β
3,50		s/3H	1	8,96		1,0	s/1H

MS (m/e) 330°C

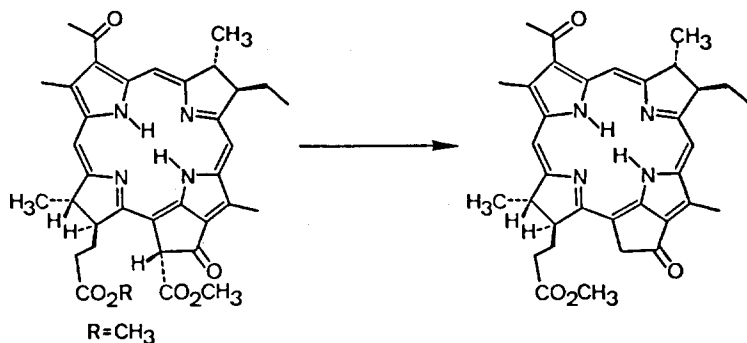
627(3%), 626(12%), 625(47%), 624(100%/M⁺), 623(4%),
 593(18%/M⁺-OCH₃), 592(33%/M⁺-HOCH₃), 566(19%),
 477(14%/M⁺-147), 149(11%), 141(10%), 69(12%), 57(13%),
 55(13%), 44(12%), 43(12%).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturwerten *68), *76), *83), und *85) überein.

*85) J. H. Golden, R. P. Linstead, G. H. Whitham, J. org. Chem. 1725 (1958)

2. 5. 2. Bakterio-methyl-pyrophäophorbid (24)

Substanz erstmals hergestellt von H. Brockmann jr. *86)



(23) MG 624, 75

(24) MG 566, 70

624, 7 mg (1,0 mMol) Bakterio-methyl-phäophorbid (23) *87) wurden in einem Bombenrohr in 50 ml absolutem Pyridin gelöst. Die braunrote Lösung wurde von Sauerstoff befreit, indem man sie dreimal mit flüssigem Stickstoff ausfror und die Atmosphäre am HV entfernte. Das Bombenrohr wurde anschliessend unter Vakuum zugschmolzen und drei Tage auf ca. 105°C erhitzt.

Die Lösung wurde am RV eingeeengt, dreimal mit Benzol versetzt und dieses wieder abgesogen, um die letzten Spuren des Pyridins zu entfernen. Ein IR-Spektrum des Rohproduktes zeigte die typische Verkleinerung der Esterbande bei 1735 cm⁻¹ auf ungefähr die Hälfte. Zur Abtrennung eines Nebenproduktes (im DC Fleck mit kleinerem Rf-Wert als Produkt (24) + Startfleck) wurde die Substanz an Kieselgel gereinigt. Chromatographie: 20 g Kieselgel, Säule: 26 x 85 mm, aufgezogen mit Tetrachlorkohlenstoff. Substanzgemisch gelöst und aufgetragen in wenig Methylenchlorid; eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 96:4.

Als erstes Produkt wurde Bakterio-methyl-pyrophäophorbid a (24) eluiert und die Reinheit im DC kontrolliert. Identische Fraktionen wurden vereinigt und der Rückstand aus Aceton kristallisiert (305 mg DC-reine, dunkelblaue Kristalle).

Das Nebenprodukt mit kleinerem Rf-Wert ist wahrscheinlich ein Allomer. Es zeigte im Elektronenspektrum eine relative Vergrößerung der Absorption bei 682 nm bez. der Rotbande bei 752 nm.

Die Gemischfraktionen und die Mutterlauge wurden vereinigt, nochmals chromatographiert und kristallisiert (49 mg DC-reine Kristalle). Die totale Ausbeute betrug 354 mg Bakterio-methyl-pyrophäophorbid (24) (=62% bez. Bakterio-methyl-phäophorbid (23)) in tiefdunkelblauen Kristallen.

*86) H. Brockmann jr., Habilitationsschrift (1969) Seite 90

Vgl. auch: H. Brockmann jr., I. Kleber, Angew. Chem. 81, 626 (1969)

*87) Kristallines, getrocknetes Material mit Smp. 238-241°C, wie beschrieben.

Zur Analytik wurde die Substanz noch zweimal aus Aceton kristallisiert und 5 Tage am HV (0,005 Torr) bei 45°C getrocknet.

$C_{34}H_{38}N_4O_4$ ber. C 70,49 H 6,85 N 9,67
 + 0,7 H₂O gef. C 70,27 H 6,66 N 9,76

Smp. 240 - 241°C (Zers.)

DC Rf=0,32 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
 (Methyl-pyrophosphorbid a (3): Rf=0,49)

IR (cm⁻¹) CHCl₃ c=3,3%
 3675w, 3400w, 3340w, 3025w, 3005w, 2960w, 2925w,
 2875w, 1731m, 1678s, 1620m, 1580w, 1535w, 1488w,
 1451w, 1436w, 1400m, 1380m, 1364m, 1239w, 1201w,
 1180w, 1161w, 1130w, 1119w, 1110w, 1096m, 1050w,
 1009w, 980m, 930m, 873m, 846w, 823w, 657s, 620w.

NMR (ppm) CDCl₃ 0,06 molar in Normalzelle

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen beob. theor.	ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen beob. theor.
-1,04	1,0 s/1H N-H	3,65	3,3 s/3H 12
1,12 J=7,5Hz	3,7 t/3H 4"	3,9-4,5	4,8 m/4H { 3 4 7 8
1,76 J=7,5Hz	8,0 { d/3H 8'	4,95 J=20,5Hz	2,4 { d/1H 10
1,83 J=7,5Hz	{ d/3H 3'	5,11 J=20,5Hz	{ d/1H 11
1,9-2,8	7,5 m/6H { 4' 7'	8,42	2,0 {↔ s/1H δ
3,19	3,5 s/3H 2'	8,47	{ s/1H β
3,48	6,8 { s/3H 5	8,98	1,0 s/1H α
3,52	{ s/3H 1		

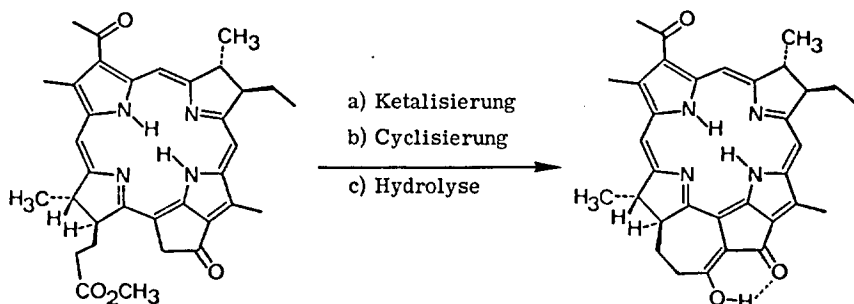
UV/VIS (nm) C₆H₆ 0,240 mg in 50 ml Benzol, c=0,847·10⁻⁵ Mol/l
 757,6(73'200), 686,5(7'200), 627,1(2'480), 534,1(24'070),
 501,2(4'970), 464,6(1'770), 387,6(49'460), 362,2(93'390).

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂ 0,255 mg in 50 ml CH₂Cl₂, c=0,899·10⁻⁵ Mol/l
 754,4(56'960), 683,6(8'200), 624,3(2'780), 531,7(22'220),
 499,4(4'810), 466,4(2'020), 386,6(46'330), 360,5(93'090).

MS (m/e) 260°C 569(2%), 568(11%), 567(42%), 566(100%/M⁺), 149(13%),
 106(12%), 83(16%), 81(11%), 79(24%), 73(20%), 71(13%),
 70(10%), 69(22%), 67(14%), 60(20%), 57(34%), 56(12%),
 55(41%), 45(19%), 44(16%), 43(45%), 41(41%), 39(15%),
 32(13%), 28(64%), 27(11%).

Die spektroskopischen Daten stehen in Einklang mit den von H. Brockmann erwähnten Werten *68) und *86).

2. 5. 3. "Bakterio-enol" (27)



(24) MG 566, 70

(27) MG 534, 66

a) Ketalisierung

56,7 mg (0,1 mMol) Bakterio-methyl-pyrophosphorbid (24) *88) wurden in einem 50 ml-Rundkolben in 15 ml Methylenchlorid gelöst und mit 3 ml Orthoameisensäuretrimethylester, 3 ml methanolischer Salzsäure *56), sowie 15 ml Methanol versetzt. Unter Argon rührte man während 4 Stunden bei 25°C. Der Fortschritt der Ketalisierung wurde verfolgt, indem man kleine Proben mit Bicarbonatlösung *47) und Methylenchlorid ausschüttelte und ein Absorptionsspektrum aufnahm. Im UV/VIS-Spektrum des Ketals findet man eine hypsochrome Verschiebung der Rotbande um ca. 40 nm bez. der freien Acetylgruppe. Das empfindlichste Kriterium für die Ketalisierung ist die Verschiebung der Soretbande von Bakterio-methyl-pyrophosphorbid (24) bei ca. 383 nm auf 354 nm (vgl. folgendes Kontrollspektrum).

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂ qualitativ, aufgenommen auf PE 402, nach ca. 3 1/2 Stunden Reaktionsdauer. Dieses Material enthielt noch etwas Edukt.
 716(0,41), 653(0,13), 602(0,05), 517(0,28), 487(0,08),
 457(0,04), 383(0,53) Edukt, 354(1,00) Soretbande des Ketals.

Nachdem vollständiger Umsatz festgestellt worden war (nach 4 Stunden), wurde das Reaktionsgemisch in einen Scheidetrichter gespült und mit 100 ml Bicarbonatlösung *47), 50 ml Eiswasser und 100 ml Methylenchlorid geschüttelt (die Lösung ist tiefblau bis violett), durch Watte filtriert, und das Lösungsmittel am RV abgesaugt. Die Substanz wurde in einen 100 ml-Kolben überführt und über Nacht am HV bei RT getrocknet.

*88) DC-reines, kristallines und 2 Tage bei 45°C am HV getrocknetes Material.

b) Cyclisierung

Man löste den Rückstand in 33 ml Tetrahydrofuran und befreite die Lösung *42) durch dreimaliges Ausfrieren und Abpumpen der Atmosphäre von Sauerstoff. In einer Argonatmosphäre wurden 25 ml (5,0 mMol) einer 0,2 molaren Lösung von Natriumhexamethyldisilazanat *20) bei RT mittels zweier Spritzen schnell zugegeben. Nachdem wenige ml zugegeben waren, beobachtete man eine intensive Blaufärbung. Am Ende der Zugabe wurde die Lösung gelbgrün (kein schöner Farbumschlag wie bei Enol a (5); nicht signifikant!). Das Reaktionsgemisch wurde so schnell als möglich (Reaktionsdauer ca. 2 1/2 Minuten) auf ein Gemisch von 200 ml Phosphatpuffer, 200 ml Eiswasser und 300 ml Methylenchlorid, welches zuvor mit Stickstoff gut durchspült worden war, gegossen und intensiv geschüttelt. Nach wenigen Sekunden zeigte sich eine dunkelblaue Farbe. Die organische Phase wurde einmal mit Eiswasser gewaschen, durch Watte filtriert, und das Lösungsmittel am RV abgesogen. Im UV/VIS-Spektrum (CH₂Cl₂) fand man das Absorptionsmaximum der Rotbande bei 735 nm. Wie erwartet hatte sich das Bakterio-enol-dimethylketal (26) gebildet.

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂ qualitativ, aufgenommen auf PE 402 (Rohprodukt)
735(0,32), 673(0,15), 620(0,12), 516(0,12), 381(0,88),
347(1,00).

c) Hydrolyse

Zur Hydrolyse wurde das rohe Ketal (26) in 14 ml Methylenchlorid gelöst und mit 1 ml Wasser in 4 ml Tetrahydrofuran versetzt. Dazu gab man 10 Tropfen konz. Salzsäure und rührte während 7 Minuten bei RT. Darauf wurde das Reaktionsgemisch mit 200 ml Methylenchlorid in einen Scheidetrichter gespült und mit Eiswasser neutral gewaschen. Man filtrierte durch Watte und engte am RV zur Trockene ein. Die Substanz wurde an Cellulose gereinigt, da im DC neben dem blauen Produktfleck auch ein Startfleck, sowie etwas allomeres Material (rot) beobachtet wurde.

Chromatographie: Cellulose, Säule: 15 x 220 mm (trocken gestopft). Substanz in wenig Methylenchlorid gelöst und aufgetragen; eluiert mit Hexan/Aceton 98:2.

Bakterio-enol (27) wurde in den ersten Fraktionen DC-rein isoliert. Da bei dieser Chromatographie etwas Substanz auf dem Säulenkopf ausfiel, wurde diese am Schluss mit Methylenchlorid extrahiert und der Rückstand anschliessend nochmals chromatographiert.

Das DC-reine Material wurde in ca. 4 ml Methylenchlorid gelöst, mit der gleichen Menge Hexan versetzt und leicht erwärmt. Man liess unter Argon auf RT abkühlen und stellte die Lösung, die nun schon Kristalle enthielt, für 3 Stunden in den Kühlschrank. Darauf wurden die Kristalle (blauglänzende, makroskopisch sichtbare Nadelchen) mittels einer Glasfilternutsche abgetrennt, mit wenig Hexan gewaschen und am HV getrocknet. Die totale Ausbeute betrug 28 mg Bakterio-enol (27) (= 52% bez. Bakterio-methyl-pyrophäophorbid (24)).

Bemerkungen zur Reaktion

- a) Vorversuche, Bakterio-methyl-pyrophosphorbid (24) direkt mit Base zum Enol zu kondensieren, führten höchstens zu Spuren von Bakterio-enol (27). Im DC stellte man praktisch nur Startfleck fest und wählte deshalb den erprobten Weg über das Ketal.
- b) Falls die Ketalisierung unter den angegebenen Bedingungen nicht vollständig abläuft, führt die Zugabe von etwas mehr Orthoester zum Erfolg.
- c) Die Mengen des Lösungsmittels und der Base wurden in kleinsten Ansätzen getestet. Es ist sehr wohl möglich, dass eine Verminderung der Lösungsmittel- und Basenmengen auch zum gewünschten Resultat führt. Aus Substanzmangel wurden keine diesbezüglichen Versuche unternommen.
- d) Zur Kristallisation von Nachschubmaterial empfiehlt es sich, Impfkristalle zu verwenden.
- e) Auch aus Lösungen, die viel allomerisiertes Material enthalten, aber keinen Startfleck im DC zeigen, sind reine Bakterio-enol-Kristalle isolierbar.

Zur Charakterisierung wurden die Kristalle aus zwei identischen Ansätzen (28 mg + 27 mg) vereinigt und nochmals umkristallisiert. Man erhielt 43 mg DC-reine Kristalle, die 4 Tage am HV (0,005 Torr) bei 50°C getrocknet wurden.

$C_{33}H_{34}N_4O_3$	ber.	C 74,13	H 6,41	N 10,48
	gef.	C 73,96	H 6,46	N 10,39

Smp. 268°C (Zers.)

DC Rf=0,30 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
(Bakterio-methyl-pyrophosphorbid (24): Rf=0,32)

IR (cm⁻¹) CHCl₃ c=3,3%
3395w, 3320w, 3025w, 3005w, 2960w, 2925w, 2875w,
2860w, 1655s, 1635w, 1604s, 1578w, 1528w, 1504w,
1485w, 1456w, 1441w, 1420w, 1398m, 1379s, 1360s,
1312w, 1247w, 1180w, 1165w, 1154w, 1136w, 1118w,
1108m, 1096w, 1087m, 1049w, 1030w, 1010w, 992m,
965w, 950w, 928s, 920w, 888w, 878m, 862w, 848w,
838w, 811w, 704w, 690w, 652s.

IR (cm⁻¹) KBr 1 mg in 300 mg Kaliumbromid
3390w, 3310w, 2955w, 2920w, 2870w, 2850w, 1653s,
1603s, 1576w, 1557w, 1528w, 1504w, 1485w, 1454w,
1441w, 1416w, 1392m, 1377s, 1360s, 1310w, 1276w,
1247m, 1232w, 1212w, 1180w, 1165w, 1155w, 1136w,
1118w, 1108m, 1097w, 1085m, 1048w, 1030w, 995s,
965w, 928s, 877s, 860w, 837m, 810m, 790w, 782w,
762w, 748w, 740w, 725w, 710w, 690w, 675w, 653s,
600w, 590w, 560w, 548m, 510w, 456m, 434w.

NMR (ppm) CDCl_3

0,06 molar in Normalzelle

Abb. 37

auf CH_2Cl_2 gelockt ppm	auf TMS gelockt ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen beob. theor.		
-0,42	-0,42	0,8	s/1H	N-H
0,91	0,91	1,2	s/1H	N-H
1,12	1,12 J=7Hz	6,8	t/3H	4"
1,13	1,13 J=7Hz		d/3H	8'
	1,67		s	H_2O
1,78	1,78 J=7Hz	10,0	d/3H	3'
-2,1	-2,1		m/6H	4' 7' 7"
-2,6	-2,6	10,0	s/3H	5
3,08	3,08		s/3H	1
3,16	3,14		s/3H	2'
3,80	3,80	1,4	m/2H	4 7
4,10	4,10	1,3	m/2H	3 8
7,36	7,28	1,0	s/1H	δ
7,93	7,91	1,0	s/1H	β
8,65	8,66	1,0	\leftrightarrow s/1H	α
12,92	12,93	1,1	s/1H	O-H

Die Signale von N-H, O-H und H_2O verschwinden bei der Zugabe von Deuteromethanol (separates Spektrum).

UV/VIS (nm) C_6H_6 $c=1,1581 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$
 783,7(49'300 max), 731,2(10'500 min), 716,3(11'220 max),
 679,5(6'470 min), 639,5(9'500 max), 610,0(7'760 sh),
 491,0(860 min), 401,0(56'500 sh), 389,4(69'420 max),
 374,4(59'000 sh), 357,1(51'600 min), 353,7(51'900 max).

UV/VIS (nm) CH_2Cl_2 $c=1,0867 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$
 778,2(38'220 max), 721,7(11'000 min), 711,2(11'040 max),
 670,0(7'070 min), 634,8(9'200 max), 490,8(920 min),
 400,0(50'600 sh), 386,5(70'210 max), 372,1(60'000 sh),
 357,7(54'800 min), 350,7(56'040 max).

UV/VIS (nm) KBr $c=0,53 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$, Schichtdicke 0,85 mm
 792,4(11'800 max)

MS (m/e) 350°C 537(2%), 536(10%), 535(40%), 534(100%/M⁺), 505(24%/M⁺-C₂H₅), 267(8%/M⁺⁺).

Die spektroskopischen Eigenschaften von Bakterio-enol (27) entsprechen weitgehend den Erwartungen, welche durch die Kenntnis der Daten der andern Enole gemacht wurden. Im IR-Spektrum erscheint die Absorption des Enolcarbonyls bei 1655 cm^{-1} als intensives Signal. Auch das NMR-Spektrum ist vollständig interpretierbar.

Die Verschiebung der Rotbande von Bakterio-enol (27) bez. des Pyro-Derivates (24) um 26 nm (bathochrom) zeigt das sehr ähnliche Verhalten der Rotbande aller untersuchten Enole. Ebenso verschwinden die kleineren Maxima zwischen der Soret- und der Rotbande. Wesentliche Unterschiede zu den übrigen beschriebenen Enolen liegen im Bereich der Soretbande. Die schöne Strukturierung, wie sie z. B. bei Enol a (5) (vgl. Abb. 8) beobachtet wird, tritt im Bakterio-enol (27) nicht auf (vgl. Abb. 38). Wie bei den andern Bakteriochlorophyll-Derivaten (23 und 24) hat der Molekularpik im Massenspektrum die maximale Intensität. Die Höhe des Isotopenpiks M^{+1} (40%) stimmt sehr gut mit dem theoretischen Wert (37%) überein.

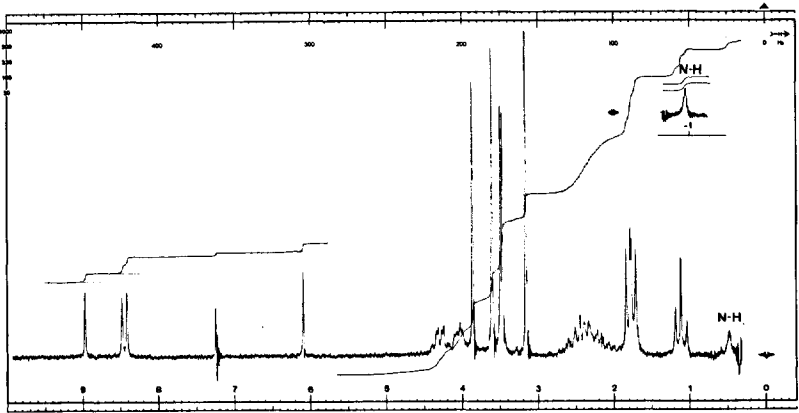


Abb. 35 Bakterio-methyl-phäophorbid (23)

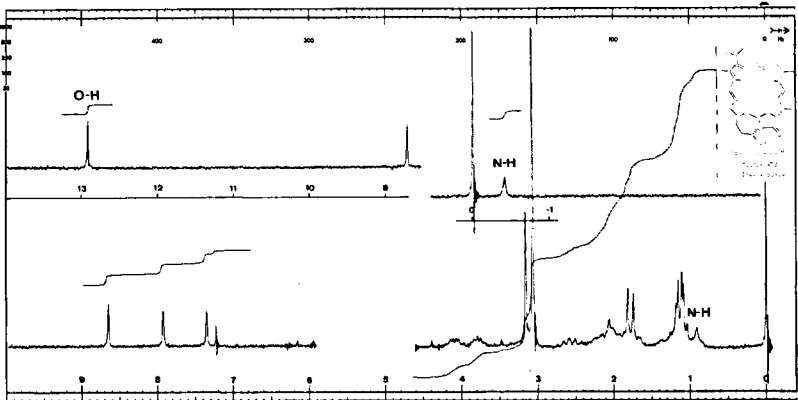


Abb. 37 Bakterio-enol (27)

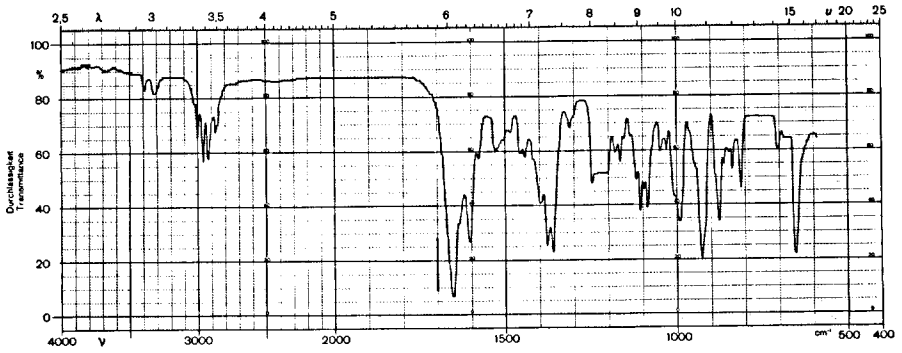


Abb. 36 Bakterio-enol (27)

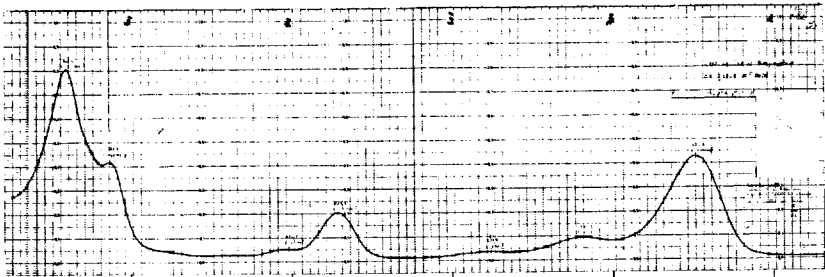


Abb. 34 Bakterio-methyl-phäophorbid (23)

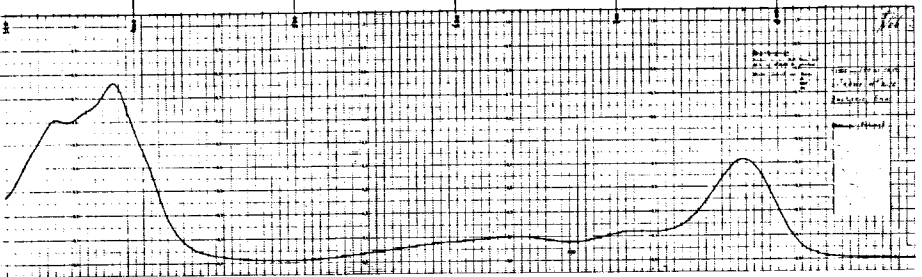


Abb. 38 Bakterio-enol (27)

2. 6. MAGNESIUM KOMPLEXE

2. 6. 1. Jodmagnesiumsalz von BHT *89)

a) Grignard-Lösung

1,0 g (41 mMol) Magnesiumspäne wurden in einem 100 ml-Zweihalskolben vorgelegt. Man gab einen Magnetrührer zu und setzte einen Rückflusskühler, sowie einen Tropftrichter mit Druckausgleich auf. Die Apparatur wurde mit Argon gespült. Man gab nun soviel abs. Aether zu, dass die Späne gerade bedeckt waren. Unter Rühren tropfte man 3,2 ml (38,5 mMol) Aethyljodid *90) in ca. 40 ml Aether so zu, dass die Reaktion ohne Kühlung leicht am Rückfluss kochte. Nachdem alles zugetropft war, liess man die Lösung noch weitere zwei Stunden am Rückfluss kochen. Man bestimmte den Gehalt, indem man eine Probe zu einem Ueberschuss 1 N-Salzsäure gab und mit 1 N-Natronlauge titrierte (Phenolphthalein).

b) 0,2 molares "Magnesiumreagens"

780 mg (3,55 mMol) frisch sublimiertes BHT *89) wurden in einem 25 ml-Kolben mit 13 ml abs. Methylenchlorid (dest. über CaH_2) gelöst. Auf den Kolben wurde ein Y-Stück mit Serumkappe und Hahn (mit Argonballon) gesetzt (vgl. Abb. 39). Unter intensivem magnetischem Rühren wurden mittels einer Spritze mit langer Nadel 4,0 ml (3,48 mMol) einer 0,87 molaren Grignard-Lösung innert ca. 15 Sekunden zugetropft. Man stellte eine heftige Reaktion fest. Der Kolben wurde vor Licht geschützt, und nach 10 Minuten konnte das Magnesiumreagens verwendet werden.

Das frische Reagens ist eine klare, farblose Lösung und sollte immer innert 30 Minuten gebraucht werden. Nach längerem Stehenlassen (mit Argonballon) wird es langsam gelb und ist nach mehreren Stunden schwarz. Alle Versuche wurden nur mit klarem, farblosem Reagens ausgeführt.

Die Menge des eingesetzten BHT und des Methylenchlorids richten sich nach dem Gehalt der Grignard-Lösung. Wichtig ist, dass immer ein kleiner Ueberschuss BHT vorgelegt wird, da überschüssiges Aethylmagnesiumjodid die Chlorophyll-Derivate an den Carbonylfunktionen angreifen würde. Ausserdem wurde festgestellt, dass mehrere Tage alte Grignard-Lösung die Qualität des Magnesiumreagenzes ungünstig beeinflusst; man stellte bei den Magnesiumeinbaureaktionen im DC einen mehr oder weniger intensiven Startfleck fest. Deshalb wurde die Grignard-Lösung jeweils am Abend vor dem Einbauversuch hergestellt.

Versuche mit dem Brommagnesiumsalz von BHT ergaben etwas weniger gute Einbaureultate (vgl. 2. 6. 2. 5.), während mit Aethylmagnesiumchlorid kein homogenes Reagens mehr hergestellt werden konnte.

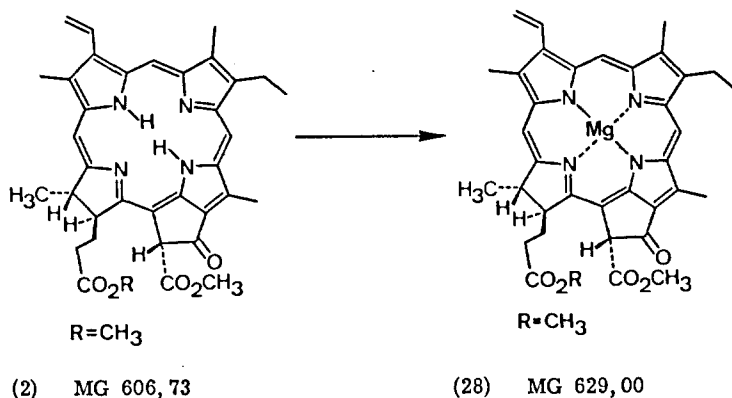
*89) BHT (Butyl-hydroxy-toluol) = 2,6-Di-tert.-butyl-p-kresol: Fluka AG; purum, vor Gebrauch sublimiert (60°C, HV).

*90) Aethyljodid: Fluka AG; puriss. p. a. stab. mit Silberwolle

2.6.2. Methyl-chlorophyllid a (28)

Erstmals hergestellt (enzymatisch aus Chlorophyll a) von R. Willstätter *91).
Aethylester hergestellt (durch Magnesiumeinbau) von H. Fischer *92) *93).

2.6.2.1. Charakterisierungsansatz



2 Parallelansätze

121,3 mg (0,20 mMol) Methyl-phäophorbid a (2) *94) wurden in 4,0 ml abs. Methylenchlorid gelöst (vgl. Abb. 39). Unter Argon wurde auf 12°C gekühlt und mit einer Injektionsspritze mit langer Nadel 4,0 ml (0,80 mMol) des 0,2 molaren Magnesiumreagens *95) schnell zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 6 Minuten bei 12°C magnetisch gerührt. Anschliessend überführte man die grüne Lösung in einen Scheidetrichter und schüttelte mit 60 ml Aether, 50 ml Phosphatpuffer und 50 ml Wasser bei RT gut durch. Die grünblaue organische Phase wurde fünfmal mit Wasser gewaschen. Man filtrierte durch eine Glasfilternutsche G3, welche 0,5 cm hoch mit Natriumsulfat gefüllt worden war. Die Nutsche wurde anschliessend mit Aether farblos gewaschen.

*91) R. Willstätter, A. Stoll; Untersuchungen über Chlorophyll, Berlin (1913), Seite 201

*92) H. Fischer, G. Spielberger, Liebigs Ann. Chem. 510, 156 (1934)

*93) H. Fischer, S. Goebel, Liebigs Ann. Chem. 524, 269 (1936)

*94) DC-reines, kristallines, 5 Stunden am HV bei 75°C getrocknetes Material mit Smp. 223°C.

*95) Magnesiumreagens: Vgl. Kap. 2.6.1.

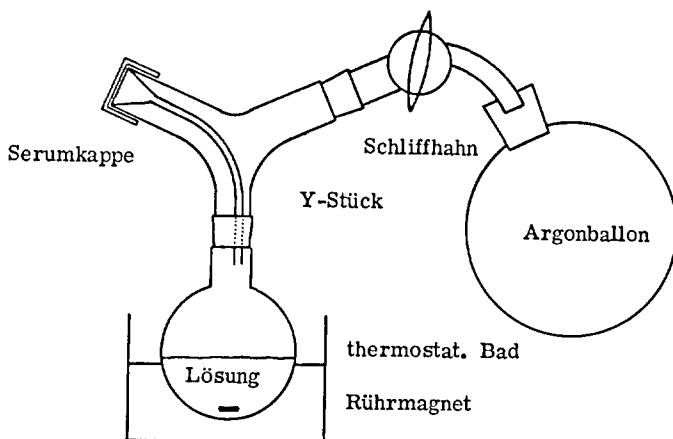
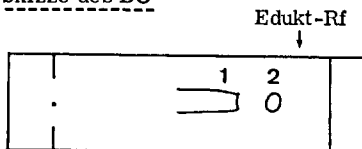


Abb. 39

Ein UV/VIS-Spektrum dieser Lösung deutete auf vollständigen Einbau, da das Verhältnis der Absorptionen bei 427 und 407 nm den Wert von ca. 1,4 angenommen hatte. Unkomplexiertes Edukt würde die Absorption bei 407 nm (Soretbande des Edukts (2)) vergrößern.

Im DC (Cellulose, Hexan/Aceton ~10:2) war ebenfalls kein grauer Eduktfleck mehr feststellbar.

Skizze des DC



- 1: Methyl-chlorophyllid a (28) (blaugrün)
 - 2: Magnesiumhaltiges Nebenprodukt (grün)
- (kein grauer Eduktfleck mehr)

Zur Kristallisation wurden die beiden Parallelansätze vereinigt. Auf einem warmen Wasserbad (ca. 40°C) wurde die blaue Lösung so lange im Argonstrom eingeeengt, bis sich an der Glaswand des Kölbchens schwerlösliche Substanz festsetzte. Man liess die Lösung nun unter Argon auf RT abkühlen und stellte sie nach zwei Stunden über Nacht in den Kühlschrank (4°C). Am andern Morgen wurde die Mutterlauge von den Kristallen entfernt und diese zweimal mit wenig absolutem Aether gewaschen und kurz am HV getrocknet. Man erhielt so aus den beiden Parallelansätzen insgesamt 136 mg kristallines, DC-reines, blauglänzendes Methyl-chlorophyllid a (28) (= 52% bez. Methyl-phäophorbid a (2)).

Die Mutterlauge (45 ml) enthielt noch hauptsächlich das gleiche Produkt (28) und das Nebenprodukt (DC: Fleck 2), welches während der Reaktion entstanden war. Daneben hatte sich während der Kristallisation etwas allomerer Produkt gebildet (DC: Nebenprodukt hat grösseren Rf-Wert als das Chlorophyllid (28), Allomer hat kleineren Rf-Wert).

Zur Charakterisierung wurden die Kristalle 24 Stunden am HV (0,05 Torr) bei RT getrocknet.

$C_{36}H_{36}N_4O_5Mg$	ber.	C 66,36	H 5,96	N 8,60	Mg 3,73
+1,25 H ₂ O	gef.	C 66,18	H 5,97	N 8,44	Mg 3,84 *96)

Smp. höher als 320°C

DC (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
stark verschiedene Rf-Werte, je nach Konz., Substanz
schleppt vom Start an. Es wurden keine weiteren Flecken
entdeckt.

IR (cm⁻¹) CHCl₃ c=1%
3690w, 3660w, 3600w, 3090w, 3000w, 2965m, 2925m,
Abb. 40 2870w, 1730s, 1678s, 1640s, 1610s, 1553s, 1525m,
1490m, 1465w, 1450m, 1433w, 1420w, 1390w, 1380w,
1346m, 1327w, 1305w, 1286s, 1171m, 1149m, 1130m,
1101w, 1069w, 1041m, 1020w, 1000w, 988w, 918w.

Die schwachen Banden zwischen 3690 und 3600 cm⁻¹ können leicht als O-H-Streck-
schwingungen des Wassers (1,25 Moläquivalente) interpretiert werden. Auch die
Absorptionen zwischen 1750 und 1600 cm⁻¹ können gut zugeordnet werden *97):
1730 (Estercarbonyl), 1678 (Ketoncarbonyl), 1640 (aggregiertes Ketoncarbonyl),
1610 (C=C-Skelettschwingung).

UV/VIS (nm) C₆H₆ 0,505 mg in 100 ml Benzol, c=0,775·10⁻⁵ Mol/l
665,2(76'380 max), 637,7(8'100 min), 619,3(12'770 max),
594,2(5'800 min), 580,5(7'740 max), 547,9(2'700 min),
534,2(3'300 max), 507,5(1'320 min), 498,6(1'470 max),
474,1(650 min), 432,4(97'340 max), 416,5(59'400 min),
413,0(60'000 max), 391,8(37'500 min), 385,6(36'860 max),
344,1(19'500 min), 330,2(21'610 max).

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂ 0,508 mg in 100 ml CH₂Cl₂, c=0,7797·10⁻⁵ Mol/l
Abb. 41 663,8(71'440 max), 636,8(10'120 min), 618,4(14'240 max),
591,8(6'540 min), 580,9(7'500 max), 545,9(2'450 min),
535,8(2'720 max), 499,5(1'280 sh), 474,1(640 min),
431,2(88'680 max), 418,2(66'100 min), 413,0(67'150 max),
388,9(43'500 min), 383,8(43'610 max), 345,9(24'200 min),
333,6(25'650 max).

*96) Magnesiumbestimmung durch Atomabsorption auf dem Gerät Perkin-Elmer
Atom Absorption Spektrophotometer PE 303, Resonanzlinie des Magnesiums:
2852 Å, Flamme: Luft/Acetylgemisch, Proben gelöst und eingespritzt in Di-
methylformamid, Eichsubstanz: Mg(NO₃)₂ in Dimethylformamid.
Ich danke Herrn PD Dr. B. Magyar (ETH) für die Ausführung dieser Magne-
siumbestimmungen.

*97) L. P. Vernon, G. R. Seely, "The Chlorophylls" (1966), p. 200

UV/VIS (nm) $C_4H_{10}O$ 0,565 mg in 100 ml Aether, $c=0,8671 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
 660,6(90'490 max), 632,9(8'180 min), 614,5(13'490 max),
 589,2(4'730 min), 575,9(7'220 max), 548,8(2'420 min),
 532,2(3'600 max), 496,5(1'640 sh), 473,2(750 min),
 428,3(115'770 max), 414,2(70'600 min), 409,2(72'550 max),
 387,8(43'800 min), 381,3(44'970 max), 339,1(21'150 min),
 325,3(24'020 max).

Die UV/VIS-Spektren stimmen sehr gut mit den Literaturspektren *98) überein.

NMR (Aceton- d_6 *99)) 0,05 molar NMR ($CDCl_3$ + 12% CD_3OD *99)) 0,05 molar

ppm	Anzahl Protonen beob.	ppm Abb. 42	Anzahl Protonen beob.	Zuordnung + Anzahl Protonen theor.
1,10		1,18		Aether
1,70 J=7,5Hz	6,0 {	1,73 J=7,5Hz	6,5 {	t/3H 4'
1,76 J=7,5Hz		1,82 J=7,5Hz		d/3H 8'
2,06				Aceton
2,4	4,0	2,45	4,4	m/4H 7' 7"
2,63	3,0	3,27	23,0 {	H_2O
3,26	3,0	3,31		s/3H 3
3,32	3,0	3,53		s/3H 1
3,46	3,0	3,56		H_2O
3,58	7,6 {	3,64		s/3H 12
3,76 J=7,5Hz		3,74 J=7,5Hz		s/3H 5
3,81	2,0 {	3,99	4,0 {	q/2H 4
4,12		4,0	4,0	s/3H 11
4,53	3,0 { ←	4,41	1,0	m/1H 7
5,97 J=12Hz, J=2Hz		5,99 J=12Hz, J=2Hz	3,0 { ←	m/1H 8
6,13	1,0	6,24	1,1	dd/1H 2'
6,18 J=18Hz, J=2Hz		6,16 J=18Hz, J=2Hz		3,0 { ←
8,04 J=18Hz, J=12Hz	1,0	7,95 J=18Hz, J=12Hz	1,1	dd/1H 2"
8,47	0,9	8,29	1,0	dd/1H 2
9,29	1,0	9,21	1,1	s/1H δ
9,61	1,0	9,49	1,0	s/1H α
				s/1H β

In den NMR-Spektren wurden die Signale für alle Protonen aufgefunden und zugeordnet. Sie stimmen befriedigend mit den Daten von Katz *98) überein (Chlorophyllid hergestellt durch enzymatische Umesterung von Chlorophyll a). Wie bei den metallfreien Derivaten können die Resonanzlagen verschiedener Aufnahmen etwas voneinander abweichen. In den obigen Spektren ist das Wassersignal durch das Lösungsmittel vergrößert.

*98) F. C. Pennington, H. H. Strain, W. A. Svec, J. J. Katz, J. Amer. chem. Soc. 86, 1418 (1964)

*99) Aceton- d_6 : Merck; Uvasol, Deuterierungsgrad mind. 99%
 Methanol- d_4 : Merck; Uvasol, Deuterierungsgrad mind. 99%

MS (m/e) 305⁰C

575(11%) ist der Pik mit der höchsten Massenzahl (M⁺theoretisch: 628). Es wurden keine Massenspektren mit vernünftig interpretierbaren Fragmenten erhalten.

Zur Rückgewinnung des Edukts (2) aus der Mutterlauge wurde dieselbe mit 10 ml 1 N Salzsäure in einem Scheidetrichter geschüttelt, bis die blaue Farbe nach graubraun umgeschlagen hatte. Die Lösung wurde neutral gewaschen, durch Watte filtriert und am RV zur Trockene eingengt. Das dekomplexierte Gemisch wurde nun chromatographisch getrennt:

Chromatographie: 15,0 g Kieselgel, Säule: 10 x 250 mm, aufgezogen und eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 94:6. Das Substanzgemisch wurde in wenig Methylenchlorid gelöst und aufgetragen.

Man erhielt folgende Produkte (DC-identifizierte Chromatographiefraktionen) in dieser Reihenfolge: 223 mg BHT (farblos)

21 mg Nebenprodukt (braungrau)

45 mg Edukt (2) (grau)

35 mg Methyl-phäophorbid a-Allomer (grau)

Dekomplexierung des analytisch reinen Materials (28)

Zur Sicherung der Struktur des Chlorophyllids (28) wurde dieses dekomplexiert, und das metallfreie Derivat charakterisiert:

25 mg kristallines Methyl-chlorophyllid a (28) wurden in wenig Aceton gelöst, auf 10 ml 1 N Salzsäure gegossen und bis zum Farbwechsel nach grau gerührt. Man überführte mit Methylenchlorid in einen Scheidetrichter und wusch mit Wasser neutral. Die organische Phase wurde durch Watte filtriert, und das Lösungsmittel am RV abgezogen. Zur Entfernung von Wasserspuren wurde die Substanz zweimal mit absolutem Tetrachlorkohlenstoff versetzt, und dieser am HV wieder entfernt. Anschließend trocknete man das Produkt 24 Stunden bei RT am HV.

Trotzdem die Substanz nicht kristallisiert wurde, waren die analytischen Daten mit denen von Methyl-phäophorbid a (2) (vgl. 2. 1. 2) praktisch identisch. DC: auf Kieselgel und Cellulose gleiche R_f-Werte wie die Referenzprobe. IR: identische Positionen und Intensitäten der Absorptionsbanden. UV/VIS: Identität der Maximalagen mit denen einer Referenzprobe in einem qualitativen Spektrum in Methylenchlorid. NMR: alle Signale sind eindeutig zuzuordnen; die chemischen Verschiebungen der Protonen der Referenzprobe und dieser Probe sind nicht genau gleich; dieses Phänomen ist jedoch bei Chlorophyllderivaten sehr oft anzutreffen.

Bemerkungen zur Reaktion

- a) Die Durchführung der Reaktion unter striktem Sauerstoffausschluss (vakuumt-gaste Lösungsmittel) hatte keinen beobachtbaren Einfluss auf die Menge des Nebenproduktes.
- b) Die Grignardlösung zur Herstellung des Magnesiumreagens musste jeweils frisch eingesetzt werden. Mehrere Tage alte Grignardlösungen führten zum Auftreten eines Startflecks im DC des Chlorophyllid-Rohproduktes und verhinderten die Ausbildung reiner Kristalle.
- c) Höhere Temperaturen als 12⁰C schienen die Bildung des Nebenproduktes zu begünstigen. Tiefere Temperaturen ergaben auch bei Verlängerung des Reaktionszeit keinen vollständigen Magnesiumeinbau mehr.

- d) Lösungen, welche neben dem Chlorophyllid (28) noch Edukt (2) enthielten, brachten Mischkristalle der beiden Verbindungen.
- e) Eine Vergrößerung des Ueberschusses an BHT im Magnesiumreagens bez. des Aethylmagnesiumjodidgehaltes hatte keinen Einfluss auf den Verlauf der Reaktion.
- f) In allen Nachschubansätzen wurde unter diesen Bedingungen quantitativer Magnesiumeinbau beobachtet (DC: nur Flecken des Produktes (28) und des Magnesium-Nebenproduktes).
- g) Unter den Aufarbeitungsbedingungen (ges. Lösung von Natriumdihydrogenphosphat mit der selben Menge Wasser verdünnt, pH \cong 4, 5) wurde keine Dekomplexierung beobachtet.
- h) Die Höhe der Ausbeute wird durch zwei Nebenprodukte negativ beeinflusst. Das während der Reaktion entstehende kann unter Berücksichtigung aller Vorsichtsmassnahmen nicht weiter unterdrückt werden. Die Bildung des Allomers während der Kristallisation kann jedoch durch strikten Ausschluss von Sauerstoff (Drybox mit Argonatmosphäre) vollständig verhindert werden.
- i) Die spektroskopischen Daten (IR, NMR und UV/VIS) sind in Uebereinstimmung mit den Ergebnissen von J. J. Katz *98), welcher Methyl-chlorophyllid a (28) mit Hilfe der Chlorophyllase enzymatisch aus Chlorophyll a hergestellt hatte. Die in der Literatur gefundenen Methoden, Magnesium in Chlorophyllderivate einzubauen, werden im Allgemeinen Teil der vorliegenden Arbeit im Detail diskutiert.

2. 6. 2. 2. Kristallisation von Methyl-chlorophyllid a (28) für Röntgenanalyse

10 mg Methyl-chlorophyllid a (28), aus Aether kristallisiertes, DC-reines Material, wurden unter Argon (Drybox: O₂-Gehalt \cong 5 ppm) in möglichst wenig Aceton + 10% Wasser (von Sauerstoff befreites Lösungsmittelgemisch) gelöst, sodass eine bei RT gesättigte Lösung resultierte. Diese wurde sodann durch Watte filtriert und in ein kleines Rundkölbchen gespült. Auf das Kölbchen wurde ein Schliffstopfen gesetzt, welcher durch etwas eingeklemmte Aluminiumfolie nicht dicht sitzen konnte. Unter Vermeidung von direktem Lichteinfall liess man die Lösung so während mehrerer Tage langsam bei RT eindunsten. Als diese gut durchsichtig geworden war, pipettierte man die Mutterlauge von den Kristallen ab und liess sie einen Tag in der Drybox trocknen. Die Kristalle zeigten eine schöne rhomboedrische Ausbildung (dünne Plättchen). Es waren jedoch nur wenige für eine Röntgenstrukturanalyse gross genug. Weitere gleiche Versuche führten teils zu guten, teils zu sehr kleinen Kristallen.

Die anfänglichen Schwierigkeiten, genügend grosse Kristalle von Methyl-chlorophyllid a (28) zu züchten, veranlassten uns, Aethyl-chlorophyllid a herzustellen. Das metallfreie Derivat wurde durch Umesterung von Methyl-phäophorbid a (2) mit Aethanol und Schwefelsäure erhalten. Magnesium konnte anschliessend ohne Schwierigkeiten wie beim Methylester eingebaut werden. Aethyl-chlorophyllid a liess sich aus Aether leicht kristallisieren, wobei jedoch nur sehr kleine Kristalle erhalten wurden. Erfolg brachte die Kristallisation aus Aceton + 10% Wasser (Drybox).

Die beiden Chlorophyllide wurden von C. Kratky (Prof. J. Dunitz) *100) untersucht. Während diesen Arbeiten erschien eine Publikation von C. E. Strouse *101) mit einer Röntgenstrukturbestimmung von Aethyl-chlorophyllid a. Die aus dem gleichen Lösungsmittelgemisch (Aceton/Wasser) hergestellten Kristalle enthielten pro Chlorophyllid je zwei Moleküle Wasser. Die Identität der Röntgendaten von Strouse mit den von Kratky bis anhin bestimmten ist ein weiterer Beweis für die Struktur unserer durch Magnesiumeinbau hergestellten Chlorophyllide.

2. 6. 2. 3. Produktionsansatz

303,4 mg (0,5 mMol) Methyl-phäophorbid a (2) *94) wurden in 10,0 ml Methylchlorid gelöst (vgl. Abb. 39). Unter Argon wurde auf 12°C gekühlt und mittels einer Spritze 10,0 ml (2,0 mMol) eines 0,2 molaren Magnesiumreagenzes *95) schnell zugegeben. Man rührte 6 Minuten bei 12°C unter Argon. Anschliessend überführte man die grüne Lösung in einen Scheidetrichter und schüttelte mit 170 ml Aether, 100 ml Phosphatpuffer und 100 ml Wasser bei RT gut durch. Reste des Reaktionsgemisches wurden mit etwas abs. Aceton aus dem Kölbchen in den Scheidetrichter gespült. Die organische Phase wurde mehrmals mit insgesamt 2 Liter Wasser gewaschen. Man filtrierte durch eine Nutsche G4, welche 0,5 cm hoch mit Natriumsulfat gefüllt worden war. Mit abs. Aether wusch man die Nutsche anschliessend farblos. Aus dem warmen Wasserbad (40°C) wurde die blaue Lösung so lange eingengt, bis sich an der Glaswand Kristallkeime bildeten (ca. 40 ml Aether). Nun liess man auf RT abkühlen (Argonballon) und stellte den Kolben nach 3 Stunden in den Kühlschranks (4°C). Am andern Morgen wurde die Mutterlauge von den Kristallen abpipettiert und diese mehrmals mit wenig abs. Aether gewaschen. Man trocknete die DC-reinen, dunkelblau glänzenden Kristalle 3 Tage am HV (0,005 Torr) bei RT. Man erhielt 238 mg Methyl-chlorophyllid a (28) (=73% bez. Methyl-phäophorbid a (2)).

Zur Rückgewinnung des Eduktes (2) wurde die Mutterlauge durch Schütteln mit 1 N Salzsäure in einem Scheidetrichter dekomplexiert, mit Wasser neutral gewaschen, das Lösungsmittel am RV abgesogen, und der Rückstand chromatographiert.

Chromatographie: 15 g Kieselgel, Säule: 15 x 190 mm, aufgezogen und eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 95:5. Das Gemisch wurde in Methylchlorid gelöst und aufgetragen.

Man eluierte in folgender Reihenfolge: BHT (nicht gewogen)
12 mg Nebenprodukt
52 mg Methyl-phäophorbid a (2)

Unter Berücksichtigung des zurückgewonnenen Eduktes (2) (DC-rein, nicht kristallisiert) berechnet man eine Ausbeute von 88% an Methyl-chlorophyllid a (28) bez. verbrauchtem Methyl-phäophorbid a (2).

2. 6. 2. 4. Bemerkungen zum Nebenprodukt (aus den beiden beschriebenen Ansätzen)

Nach der Aufarbeitung des Reaktionsproduktes, und noch deutlicher in der Mutterlauge der Kristallisation, ist im DC (Cellulose, Hexan/Aceton ~ 9:1) über dem grünen Produktfleck ein schwacher grünlicher Fleck sichtbar. Bei der Chromatographie der dekomplexierten Mutterlauge wurde das metallfreie Nebenprodukt zwischen BHT und Methyl-phäophorbid a (2) eluiert. Von diesem DC-reinen Material (nicht kristallin) wurden die üblichen Spektren aufgenommen.

UV/VIS (nm) CH₂Cl₂ qualitativ, aufgenommen auf PE 402
668(0,32), 613(0,02), 562(0,01 sh), 539(0,04), 507(0,08),
480(0,02 sh), 410(1,00).

*100) Privatmitteilung von Prof. J. D. Dunitz und C. Kratky.

*101) C. E. Strouse, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 325 (1974)

Dieses Spektrum weist den Allomer-Typ auf, d. h. das Verhältnis der Banden bei 539 und 507 nm ist ca. 0,5 (Methyl-phäophorbid a (2): 0,9). Allomere, metallfreie Chlorophyllderivate der a-Reihe, d. h. Phäophorbide, die am C-10 neben der Estergruppe noch einen weiteren Substituenten tragen, zeigen bei diesen zwei Absorptionsbanden ein Extinktionsverhältnis kleiner als 0,9 *102).

IR (cm⁻¹) CHCl₃ aufgenommen auf PE 257
 3750-3470w (breit), 3320w, 3080w, 3020w, 2990w, 2960s,
 2920m, 2860m, 1717s, 1665w, 1640s, 1600s, 1576sh,
 1500w, 1480w, 1450w, 1441s, 1390w, 1380m, 1375m,
 1349m, 1330s, 1320sh, 1301w, 1282w.

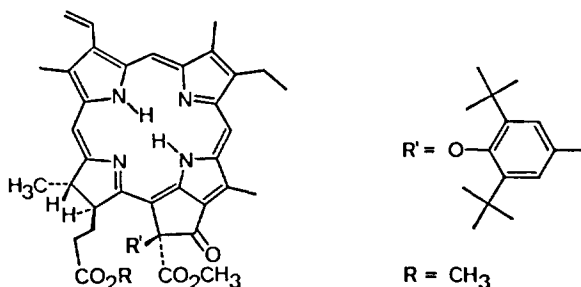
Die kurzwelligste Carbonylschwingung tritt bei 1717 cm⁻¹ auf, während beim Methylphäophorbid a (2) die Schwingungsbanden der beiden Methylester bei 1737 cm⁻¹ liegen.

NMR (ppm) CDCl₃ 0,06 molar in Normalzelle

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen		ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen			
	beob.	theor.		beob.	theor.		
1,27	21,4	m	?	6,4	s/3H	11	
1,42		m	?		m/1H	7	
1,72 J=8Hz		t/3H	4'		m/1H	8	
1,82 J=8Hz		d/3H	8'		dd/1H	2'	
2,2-2,8	5,5	m/4H	7' 7''	2,3	dd/1H	2''	
3,28		s/3H	3		s/1H	?	
3,46	15,0	s/3H	1	8,00 J=18Hz, J=12Hz	1,0 ↔ dd/1H	2	
3,53		s/3H	12	8,71	s/1H	δ	
3,56		s/3H	5	9,52	2,0	s/1H	α
3,74 J=8Hz		q/2H	4	9,63		s/1H	β
				13,52	1,0	s/1H	?

Im NMR-Spektrum sind die meisten Signale den bekannten Chlorophyllstrukturen zuzuordnen. Zwischen 1,0 und 1,5 ppm tritt jedoch zusätzlich ein Multiplett auf mit einem Integral, das ca. 21 Protonen entspricht. Weiter findet man noch zwei Signale bei 6,53 und 13,52 ppm. Das Singlett bei 13,52 ppm konnte durch die Zugabe von Deuteromethanol verbreitert werden.

Aus den Spektraldaten lässt sich für das metallfreie Nebenprodukt folgende Struktur ableiten:



*102) H. Biere, Diss. TH Braunschweig (1966), Seite 39

Somit sind die fraglichen Signale im NMR-Spektrum zuzuordnen: Die Multiplette zwischen 1,0 und 1,5 ppm (Integral: 21,4 H) werden durch die 7 Methylgruppen am Aromaten hervorgerufen. Die Signale bei 6,53 und 13,52 ppm müssen demzufolge von den aromatischen Protonen stammen. Die grosse Differenz ihrer Positionen kann durch eine Ueberlappung des Chlorinsystems und des Benzolrings erklärt werden, wenn die beiden Protonen im unterschiedlichen Einfluss der Ringströme stehen.

2. 6. 2. 5. Geschwindigkeit des Magnesiumeinbaus in Methyl-phäophorbid a (2)

Um Anhaltspunkte über die Geschwindigkeit des Magnesiumeinbaus und mögliche Lösungsmiteleinflüsse zu erhalten, wurden folgende Versuche gemacht:

Standardbedingungen:

30 mg (0,05 mMol) Methyl-phäophorbid a (2) wurden in einem 5 ml-Birnkölbchen mit 1,0 ml Lösungsmittel versetzt. Auf das Kölbchen wurde nach einem ca. 10 cm langen Zwischenstück ein Y-Stück mit Serumkappe, sowie Hahn mit Argonballon aufgesetzt (vgl. Abb. 43).

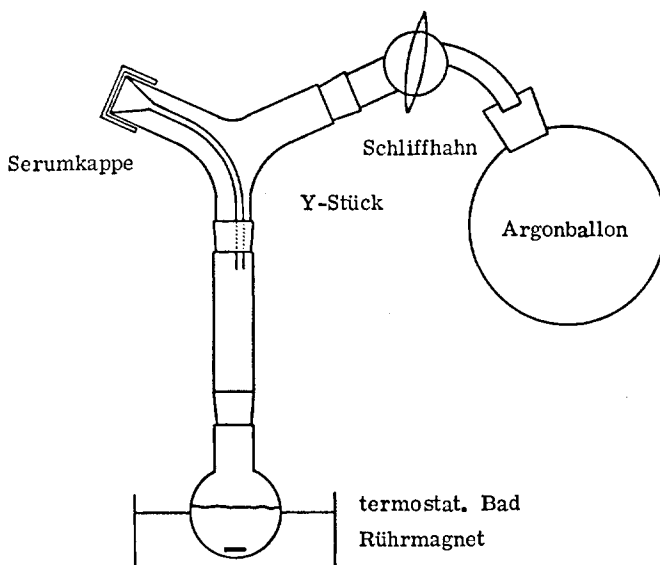


Abb. 43

Mittels einer Spritze mit langer Nadel wurden 1,0 ml (0,2 mMol) eines Magnesiumreagenzes *95) schnell zugegeben. Zur Probenentnahme wurde das Y-Stück kurz abgehoben und mit einer dicken Kapillare etwas Gemisch entnommen. Diese Probe wurde sofort in einem Glühröhrchen mit Aether und Phosphatpuffer (Natriumdihydrogenphosphat, pH \approx 4,5) geschüttelt. Die organische Phase wurde abpipettiert, mit Aether verdünnt und zur Aufnahme eines Absorptionsspektrums in eine Küvette eingefüllt. Man bildete nun den Quotienten der optischen Dichten (OD) bei 427 und 407 nm und las den Gehalt an Produkt in der Eichkurve ab.

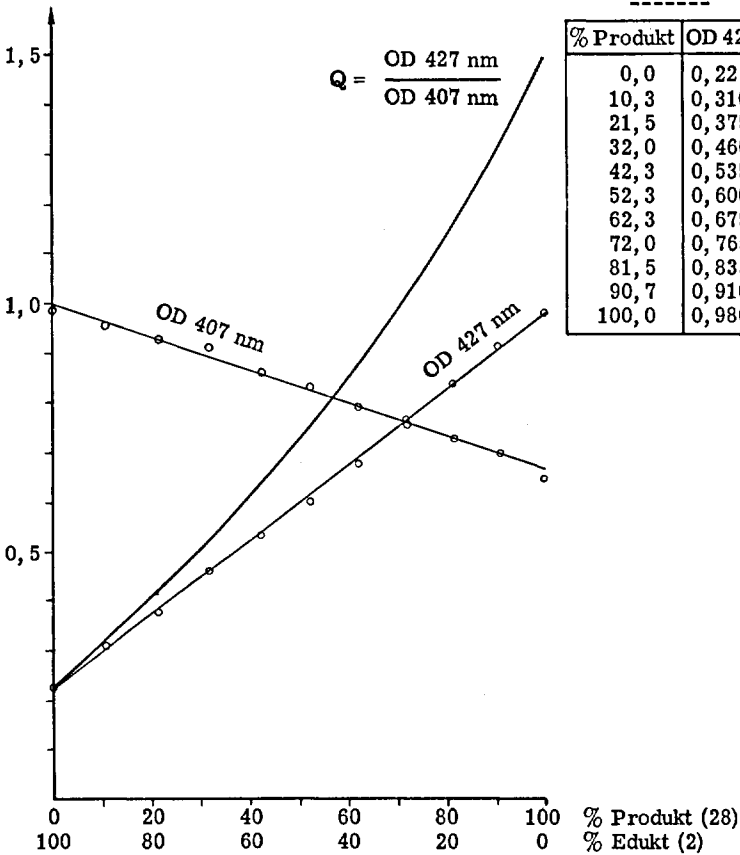
Eichkurve:

Man stellte je eine Stammlösung von Methyl-phäophorbid a (2) ($c=0,811 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) und von Methyl-chlorophyllid a (28) ($c=0,835 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) in Aether her. Durch Zusammengeben bestimmter Volumen dieser beiden Lösungen konnten 9 definierte Gemische hergestellt werden. (vgl. Tabelle). In den Absorptionsspektren wurden nun die optischen Dichten (OD) bei 407 nm (Soretbande des Eduktes (2)) und 427 nm (Soretbande des Produktes (28)) gemessen und deren Quotienten (Q) gebildet. Diese Werte, aufgetragen gegen den prozentualen Gehalt an Produkt (28), ergibt die Eichkurve.

(Die Summe der Konzentrationen ist nicht ganz konstant: $0,811-0,835 \cdot 10^{-5}$ Mol/l. Die Aenderung von ca. 3% ist jedoch unbedeutend, da der Quotient der optischen Dichten verwendet wird).

Tabelle

% Produkt	OD 427	OD 407	Q
0,0	0,225	0,985	0,23
10,3	0,310	0,955	0,32
21,5	0,375	0,925	0,41
32,0	0,460	0,910	0,51
42,3	0,535	0,860	0,62
52,3	0,600	0,830	0,72
62,3	0,675	0,790	0,85
72,0	0,765	0,755	1,01
81,5	0,835	0,725	1,15
90,7	0,910	0,695	1,31
100,0	0,980	0,645	1,52



Einbaugeschwindigkeit unter den optimierten Bedingungen

Lösungsmittel: 87,8% Methylenchlorid + 12,2% Aether *103)

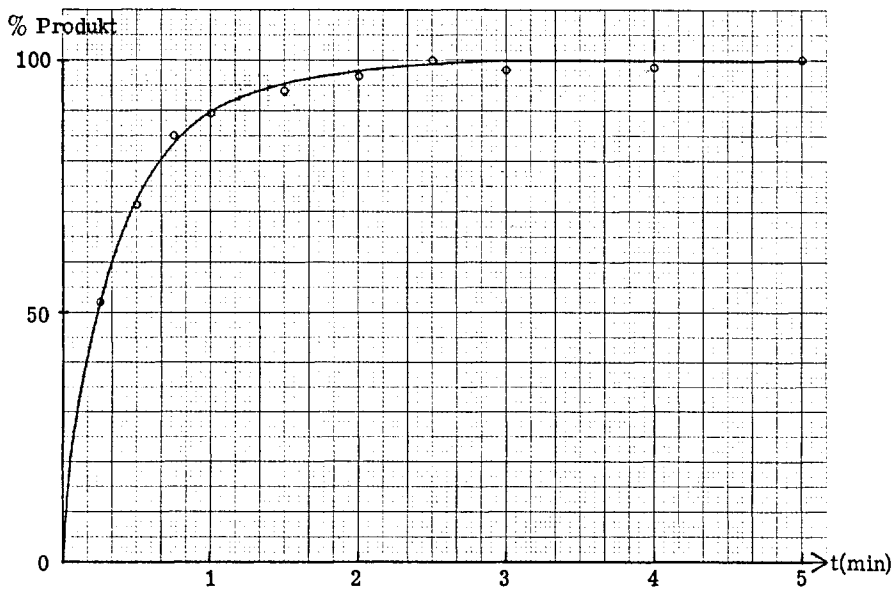
Reaktionsgemisch: 0,025 molar an Methyl-phäophorbid a (2)

0,100 molar an Magnesiumreagens (= 4-fache Menge bez. (2))

Temperatur: 12°C

(gleiche Reaktionsbedingungen wie beim Beschreibungsansatz)

Die ersten 4 Proben wurden alle 15 Sekunden entnommen.



*103) Aether: stammt aus dem Magnesiumreagens

Einbaugeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Lösungsmittel

Reaktionsgemisch: 0,025 molar an Methyl-phäophorbid a (2)
0,100 molar an Magnesiumreagens

Temperatur: 12°C

Lösungsmittel: a) 86% Methylenchlorid + 14% Aether *103)

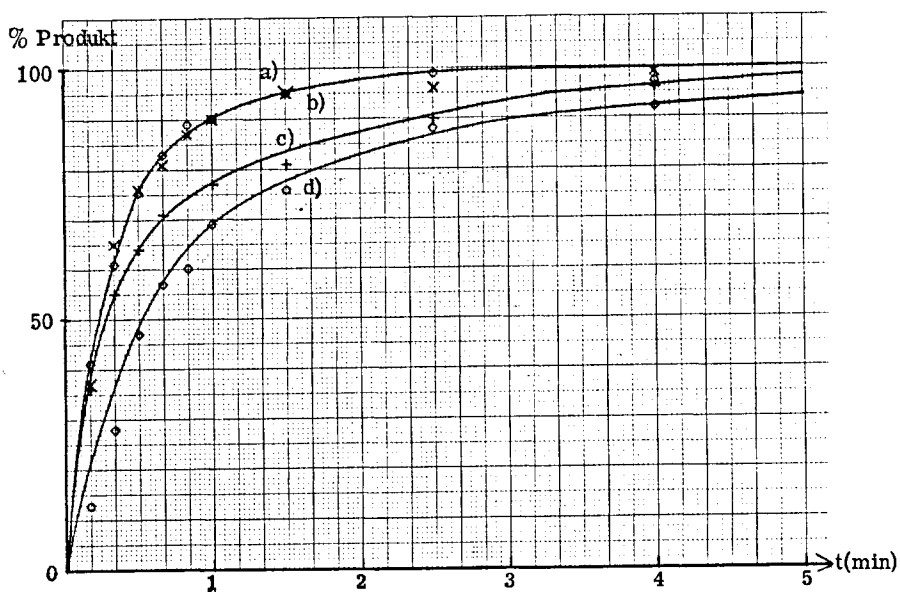
b) 50% Chloroform + 36% Methylenchlorid + 14% Aether

c) 50% Dichloräthan + 36% Methylenchlorid + 14% Aether

d) 50% Tetrachlorkohlenstoff + 36% Methylenchlorid + 14%

Aether

Die ersten Proben wurden alle 10 Sekunden entnommen.



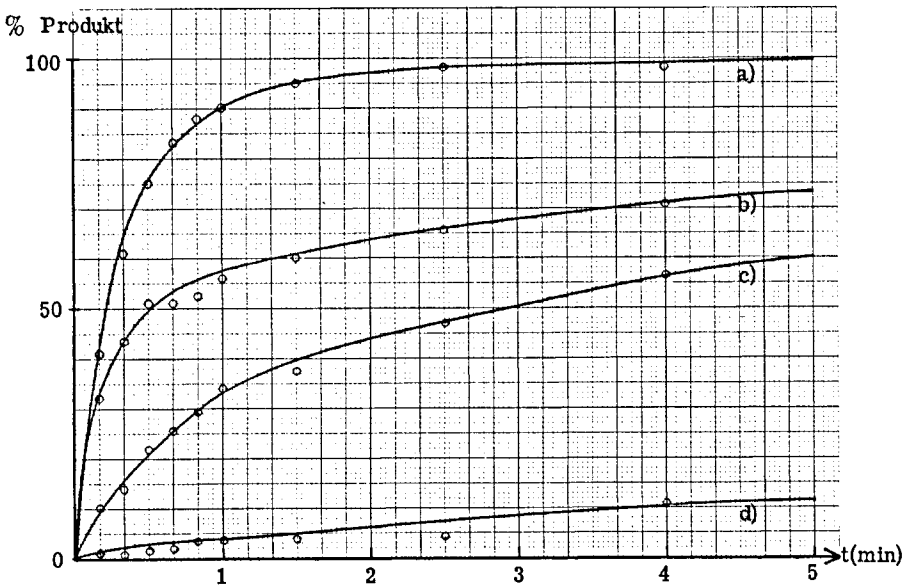
Hemmung des Magnesiumeinbaus durch Aceton im Reaktionsgemisch

Reaktionsgemisch: 0,025 molar an Methyl-phäosphorbid a (2)
0,100 molar an Magnesiumreagens

Temperatur: 12°C

Lösungsmittel: a) 86% Methylenchlorid + 14% Aether *103
b) 85,5% Methylenchlorid + 14% Aether + 0,5% Aceton
c) 83,5% Methylenchlorid + 14% Aether + 2,5% Aceton
d) 81,0% Methylenchlorid + 14% Aether + 5,0% Aceton

Die ersten Proben wurden alle 10 Sekunden entnommen.



Ergebnisse

a) Das übliche Einbaureagens wurde mit Aethylmagnesiumjodid hergestellt. Die Verwendung von Aethylmagnesiumbromid führte zu einer deutlichen Verlangsamung der Reaktion. Versuche mit Aethylmagnesiumchlorid ergaben kein homogenes, klares Reagens mehr.

b) Magnesiumeinbau in Methyl-phäophorbid a (2) war in folgenden Lösungsmitteln unter den üblichen Bedingungen (12°C, 6 Minuten) möglich: Methylenchlorid, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, 1, 2-Dichloräthan.

c) Nur wenig Chlorophyllid (28) erhielt man in Thiophen (höhere Temperatur als 12°C nötig).

d) In folgenden Lösungsmitteln wurde unter den üblichen Bedingungen kein Einbau beobachtet: Pyridin, Dimethylacetamid, tert.-Butanol, Dioxan, Tetrahydrofuran, und Aceton.

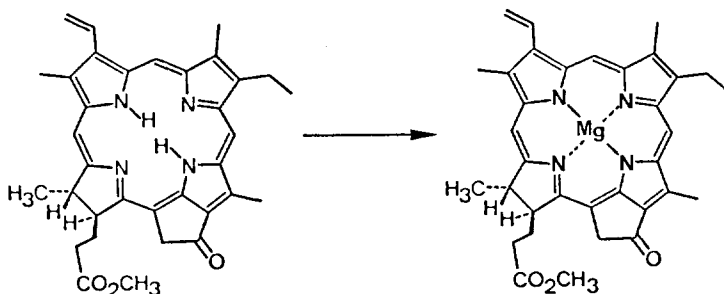
e) Wegen der ungenügenden Löslichkeit von Methyl-phäophorbid a (2) in einigen Lösungsmitteln, wurde der Einbau mit Phäophytin a (1) als Edukt versucht. Man beobachtete Einbau in Benzol, Brombenzol und Schwefelkohlenstoff.

Bei allen diesen Versuchen war zu berücksichtigen, dass die Eduktlösung in den bestimmten Lösungsmitteln mit der gleichen Menge Reagenslösung versetzt wurden. Das bedeutete, dass das zu testende Lösungsmittel zu 50% neben ca. 36% Methylenchlorid und 14% Aether vorhanden war.

Man interessierte sich nun, ob Aether eventuell eine Hemmwirkung auf den Einbau haben könnte. Ein Versuch mit 64% Aether + 36% Methylenchlorid brachte nur eine kleine Verminderung der Einbaugeschwindigkeit, was möglicherweise auf die schlechte Löslichkeit des Eduktes (2) in Aether zurückzuführen war. Im Gegensatz dazu zeigte Aceton schon in kleinsten Konzentrationen einen deutlichen Hemmeffekt. In Methylenchlorid und Chloroform wurden bei 12°C nach 13 Sekunden 50% Magnesiumkomplex beobachtet. Dieses Experiment wurde mehrfach wiederholt und ergab immer das selbe Resultat.

2. 6. 3. Methyl-pyrochlorophyllid a (29)

Substanz erstmals hergestellt von Corwin und Wei *104) durch Magnesiumeinbau mit dem "Mg-Viologen-Reagens" in einer Ausbeute von 86%.



(3) MG 548, 69

(29) MG 570, 96

274, 3 mg (0, 5 mMol) Methyl-pyrophäophorbid a (3) *105) wurden in 10, 0 ml Chloroform gelöst (vgl. Abb. 39). Unter Argon wurde auf 50°C erwärmt und mittels einer Injektionsspritze mit langer Hohnadel 10, 0 ml (2, 0 mMol) des 0, 2 molaren Magnesiumreagenzes *95) schnell zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Minuten unter Argon bei 50°C gerührt. Vorsichtig entfernte man darauf das Lösungsmittel bei RT am Wasserstrahlvakuum. Die Bedingungen, welche im Falle des Methyl-chlorophyllids a (28) vollständigen Einbau ergeben hatten, versagten hier, d. h. bei einer Reaktionstemperatur von 12°C und normaler Aufarbeitung des Reaktionsgemisches wurde ausschliesslich das metallfreie Edukt (3) zurückerhalten. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass das Einengen des Reaktionsgemisches für einen quantitativen Einbau notwendig war. Der grüne Rückstand wurde mit wenig abs. Aceton gelöst und mit 200 ml Aether in einen Scheidetrichter überführt. Man schüttelte mit 100 ml Phosphatpuffer (pH ≈ 4, 5) und 100 ml Wasser gut durch. Die organische Phase wurde mehrmals mit insgesamt 2 Liter Wasser gewaschen. Man filtrierte durch eine Glasfilternutsche G4, welche 0, 5 cm hoch mit Natriumsulfat gefüllt worden war. Zu der filtrierten blauen Lösung (DC: ein Fleck !) gab man 10 ml Hexan und engte auf dem warmen Wasserbad im Argonstrom so lange ein, bis sich an der Glaswand Kristallkeime bildeten (ca. 37 ml). Nach 30 Minuten waren schon deutliche Nadeln feststellbar. Nach 12 Stunden bei RT wurden die Kristalle abfiltriert und zweimal mit wenig absolutem Aether gewaschen. Man trocknete 5 Tage am HV bei RT und erzielte so eine Ausbeute von 228 mg blau glänzender, DC-reiner Nadeln von Methyl-pyrochlorophyllid a (29) (= 80% bez. Methyl-pyrophäophorbid a (3)).

*104) A. H. Corwin, P. E. Wei, J. org. Chem. 27, 4285 (1962)

*105) DC-reines, kristallines Material, welches 1 Tag bei RT am HV getrocknet worden war.

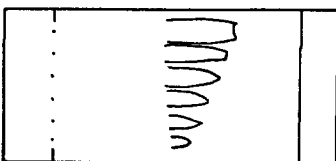
Zur Charakterisierung wurden diese Kristalle noch weitere 3 Tage am HV (0,001 Torr), aber bei 63°C getrocknet.

$C_{34}H_{34}N_4O_3Mg$ +0,25 H ₂ O	ber. C 70,96 H 6,04 N 9,74 Mg 4,22
	gef. C 70,80 H 6,04 N 10,10 Mg 4,57 *96)

Smp. höher als 320°C (Zers.)

DC (Cellulose, Hexan/Aceton ~ 10:2) Der Rf-Wert ist sehr stark von der Konzentration abhängig.

Skizze des DC (Konzentrationsreihe, qualitativ)



IR (cm⁻¹) CHCl₃

Abb. 44

c=1%
3690w, 3650w, 3600w, 3000w, 2965m, 2925w, 2865w,
1729m, 1715w, 1665m, 1637s, 1612s, 1552s, 1526s,
1490m, 1464w, 1450m, 1436w, 1420w, 1397w, 1380w,
1346m, 1327w, 1304w, 1286m, 1176w, 1154w, 1126w,
1101w, 1070w, 1059w, 1034w, 983w, 946w, 918m, 884w,
755w.

Wie bei Methyl-chlorophyllid a (28) treten zwischen 3700 und 3600 cm⁻¹ die schwachen Banden des Wassers auf. Die Ester-carbonylbande bei 1729 cm⁻¹ tritt wie erwartet nur mit halber Intensität auf.

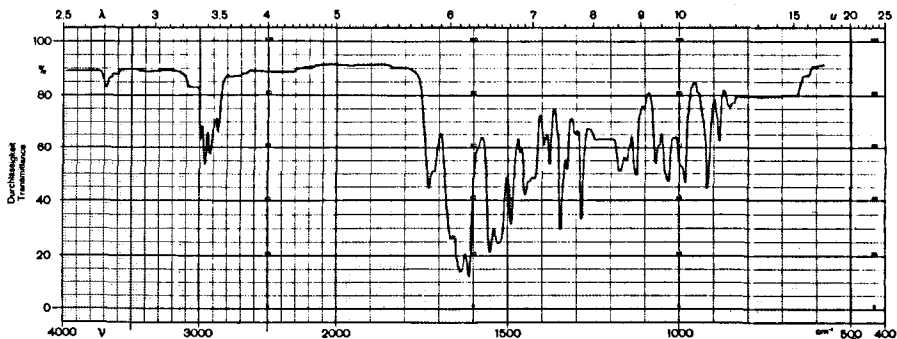


Abb. 44

NMR (ppm) $\text{CDCl}_3 + 11\% \text{CD}_3\text{OD} *99$ 0,065 molar in Normalzelle Abb. 45

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen		ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen	
	beob.	theor.		beob.	theor.
1,74 J=7,5Hz	6,1	t/3H 4'	4,44	1,2	m/1H 8
1,82 J=7,5Hz		d/3H 8'	4,86 J=20Hz	2,2	d/1H 10
2,5	4,5	m/4H 7' 7''	5,03 J=20Hz		d/1H 11
3,03		s	H ₂ O	2,0	dd/1H 2'
3,27	15,2	s/3H 3	6,17 J=18Hz, J=1,5Hz		dd/1H 2''
3,31		s/3H 1	7,95 J=18Hz, J=11Hz	1,2	dd/1H 2
3,43		s/3H 12		8,26	0,9
3,53		s/3H 5	9,19	2,0	s/1H α
3,74 J=7,5Hz		q/2H 4	9,44		s/1H β
4,21	1,1	m/1H 7			

Alle Signale in diesem Spektrum konnten eindeutig zugeordnet werden und entsprechen den von Katz publizierten Werten *98). Der Zusatz von 11% Deuteriomethanol war notwendig, da die Verbindung in reinem Chloroform assoziiert vorliegt, und die Signale dadurch breit werden. Die chemische Verschiebung des Wassers (3,03 ppm) ist sehr stark von der Konzentration abhängig; in zwei anderen Spektren wurden die Peaks bei 3,16 und 3,35 ppm gefunden, während die übrigen Resonanzsignale praktisch konstant blieben.

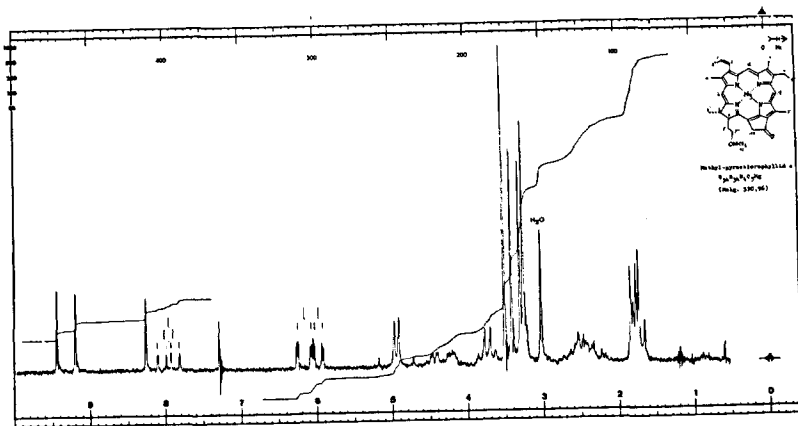


Abb. 45

UV/VIS (nm) C_6H_6

0,509 mg in 100 ml Benzol, $c=0,8836 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
 663,5(67'400 max), 636,5(7'020 min), 619,5(11'180 max),
 595,5(6'170 min), 581,7(8'620 max), 552,7(4'100 min),
 538,0(4'530 max), 504,2(2'320 sh), 472,1(1'450 min),
 432,0(99'820 max), 417,1(56'100 min), 412,3(56'590 max),
 391,8(35'100 min), 385,9(35'560 max), 365,9(27'000 sh),
 343,0(18'200 min), 326,0(20'940 max).

UV/VIS (nm) CH_2Cl_2 0,600 mg in 100 ml CH_2Cl_2 , $c=1,0426 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
663,0(61'480 max), 636,2(7'200 min), 618,5(11'030 max),
Abb. 46 591,0(4'790 min), 583,5(5'070 max), 548,1(1'230 min),
536,2(1'520 max), 512,3(470 min), 488,8(1'130 sh),
431,7(88'050 max), 416,9(56'600 min), 411,8(57'660 max),
391,0(38'400 min), 385,0(39'050 max), 344,5(19'800 min),
329,4(21'770 max).

UV/VIS (nm) $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ 0,450 mg in 100 ml Aether, $c=0,782 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
658,3(88'240 max), 637,4(7'540 min), 612,6(12'780 max),
588,6(4'480 min), 575,9(6'110 max), 548,5(2'400 min),
531,5(3'200 max), 497,3(1'280 sh), 467,6(380 min),
427,8(124'180 max), 413,0(68'500 min), 407,8(69'490 max),
387,0(41'250 min), 380,0(42'660 max), 362,3(32'000 sh),
337,2(19'500 min), 320,3(23'910 max).

Die Lage der Rotbande und der Soretbande (Aether) stimmen sehr gut mit den Literaturwerten *98) überein, während unsere ϵ -Werte ca. 20% höher liegen

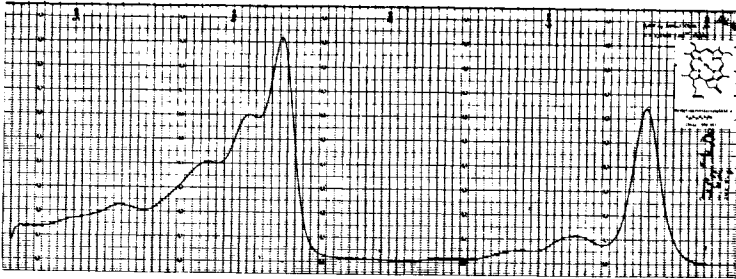


Abb. 46

MS (m/e) 200°C 571(3%), 570(6%/M⁺), 285(1%/M⁺⁺), 205(20%), 167(15%),
150(18%), 149(100%).

Im Gegensatz zum Methyl-chlorophyllid a (28) tritt beim Methyl-pyrochlorophyllid a (29) ein Molekularpik auf. Ein interpretierbares Fragmentierungsmuster wurde nicht beobachtet.

Zur Rückgewinnung des Eduktes (3) aus der Mutterlauge, wurde diese mit etwas Aceton verdünnt, auf 10 ml 1 N-Salzsäure gegossen und gerührt. Nach zwei Minuten hatte die blaue Farbe vollständig nach grau umgeschlagen (Dekomplexierung). Die Lösung wurde in einen Scheidetrichter überführt und mit Wasser neutral gewaschen. Wegen der schlechten Löslichkeit des metallfreien Eduktes (3) in Aether wurde soviel Methylenchlorid zugegeben, dass die organische Phase unter die Wasserphase sank. Die graue Lösung wurde nun am RV zur Trockene eingeeengt, und der Rückstand chromatographiert.

Chromatographie: Kieselgel, Säule: 15 x 190 mm, aufgezogen und eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 95:5. Die Substanz wurde in Methylenchlorid gelöst und aufgetragen.

Man isolierte 45 mg DC-reines, nicht kristallines Edukt (3). Unter Berücksichtigung des zurückgewonnenen Methyl-pyrophosphorbid a (3) berechnete man eine Ausbeute an analytischem, kristallinem Methyl-pyrochlorophyllid a (29) von 95%.

Bemerkungen zur Reaktion

- a) Es gelten die selben Anforderungen an die Qualität des Reagenzes wie beim Methyl-chlorophyllid a (28).
- b) Die hier beschriebene Einbaumethode (50°C, 5 Minuten, Einengen des Reaktionsgemisches) führte zu einem quantitativen Einbau von Magnesium in Methyl-pyrophosphorbid a (3) ohne die Bildung von Nebenprodukten. Unter den selben Bedingungen wurde ohne Einengen des Reaktionsgemisches nur unvollständiger Einbau beobachtet.
- c) Einbauversuche bei 12°C (6 Minuten) verliefen im Gegensatz zum Methyl-phosphorbid a (2) beim Pyroderivat (3) absolut negativ. Man isolierte ausschliesslich metallfreies Edukt (3).
- d) Während der Kristallisation entstanden keine Allomere (grössere Stabilität der Pyro-Derivate gegen Oxidation am C-10).
- e) Man erhielt bei jedem Ansatz makroskopisch sichtbare, blauglänzende Kristallnadelchen in reproduzierbaren Ausbeuten.
- f) Die spektroskopischen Daten (IR, NMR und UV/VIS (ausser ϵ -Werte)) stimmen mit den Ergebnissen von J. J. Katz *98) überein, welcher Methyl-pyrochlorophyllid a (29) durch Pyrolyse von Methyl-chlorophyllid a (28) in Pyridin hergestellt hatte.

Kristallisation von Methyl-pyrochlorophyllid a (29) für Röntgenanalyse

19 mg Methyl-pyrochlorophyllid a (29) wurden mit wenig Aceton und Methanol gelöst und in einen Scheidetrichter überführt. Man gab Wasser zu und extrahierte mit 50 ml Aether. Die Aetherphase wurde mit Wasser gewaschen, bis noch ca. 25 ml übrig blieben. Man filtrierte auf die übliche Weise durch Natriumsulfat, spülte mit wenig abs. Aether nach und versetzte die Lösung mit 1 ml Hexan. Ueber Nacht bildeten sich bei RT mehrere Millimeter lange blaue Nadeln. Die Kristalle wurden von der Mutterlauge befreit, mit wenig abs. Aether gewaschen und 30 Minuten bei RT am HV getrocknet.

Ein NMR-Spektrum dieser Kristalle zeigte ca. 1 Moläquivalent Aether pro Pyrochlorophyllid. Aus den Elementaranalysen ergab sich 1 Mol Aether + 1 Mol Wasser.

$C_{34}H_{34}N_4O_3Mg$	ber.	C 68,83	H 6,99	N 8,45
+ 1 H_2O + 1 $C_4H_{10}O$	gef.	C 68,88	H 7,01	N 8,48

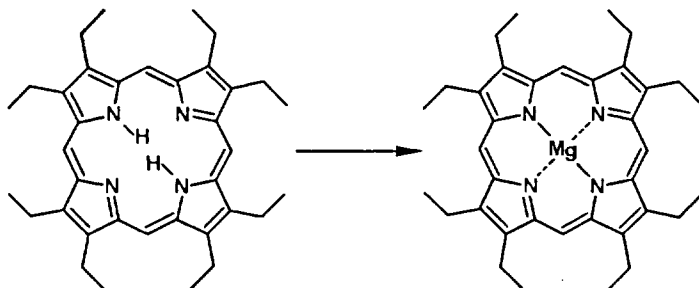
Weitere, unabhängige Kristallisationen auf dieselbe Art und Weise führten zu folgenden Analysendaten:

gef.	C 68,83	H 6,99	N 8,35
gef.	C 68,74	H 7,02	N 8,50

Man erhielt also immer dieselbe gute Qualität von Kristallen. Die Röntgenstrukturanalyse zeigte ein am Magnesium koordiniertes Wassermolekül und den Aether an einem bestimmten Ort im Kristallgitter (*100). Diese Ergebnisse sind ein weiterer Beweis für die Struktur des Methyl-pyrochlorophyllids a (29).

2. 6. 4. Magnesium-oktaäthylporphin (31)

Erstmals beschrieben von J. H. Fuhrhop *106)



(30) MG 534, 8

(31) MG 557, 1

160, 4 mg (0, 3 mMol) Oktaäthylporphin (30) *107) wurden in 20 ml Chloroform unter Argon im Dunkeln durch leichtes Erwärmen vollständig gelöst (vgl. Abb. 39). Man erwärmte unter Argon auf 50°C und gab mittels einer Spritze 12 ml (2, 4 mMol) des 0, 2 molaren Magnesiumreagenzes *95) zu. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Minuten bei einer Badtemperatur von 50°C unter Argon gerührt. Man überführte mit 300 ml Aether in einen Scheidetrichter und schüttelte mit einem Gemisch von 50 ml Phosphatpuffer (pH=4, 5) und 250 ml Wasser gut durch. Die organische Phase wurde noch zweimal mit derselben Menge Wasser gewaschen. Man filtrierte durch eine Glasfilternutsche G3, die 0, 5 cm hoch mit Natriumsulfat gefüllt worden war, spülte mit abs. Aether nach, und entfernte das Lösungsmittel am RV. Auf den 500 ml-Rundkolben mit dem Rückstand wurde ein Kühlfinger gesetzt. Bei einer Badtemperatur von 60°C liess sich das BHT am HV (0, 01 Torr) aus dem Produkt absublimentieren (2 Stunden).

Man kristallisierte im Dunkeln aus Methylenchlorid/Hexan. Eine erste Kristallisation ergab 88 mg kristallines, DC-reines Magnesium-oktaäthylporphin (31). Weiteres Einengen der Mutterlauge lieferte nochmals 39 mg DC-reines Material.

*106) J. H. Fuhrhop, D. Mauzerall, J. amer. Chem. Soc. 91, 4174 (1969)
Vgl. auch: J. H. Fuhrhop, Habilitationsschrift (TH Braunschweig) (1969)

Magnesium wurde eingebaut, indem man Oktaäthylporphin in abs. Pyridin mit einem grossen Ueberschuss wasserfreiem Magnesiumperchlorat 4 Stunden unter Lichtausschluss am Rückfluss kochte. Nach der wässrigen Aufarbeitung wurde Magnesium-oktaäthylporphin-dipyridinat in 67%-iger Ausbeute kristallin erhalten. Das pyridinfreie Magnesium-oktaäthylporphin wurde durch Behandeln der ätherischen Lösung mit 0, 1 N Salzsäure hergestellt.

*107) Oktaäthylporphin: kristallines, DC- und UV/VIS-reines Material

Die Mutterlauge zeigte nun im UV/VIS-Spektrum eine kleine Menge an metallfreiem Porphyrin (schwache Bande bei ~620 nm). Man dekomplexierte auf die übliche Art mit dem Unterschied, dass halbkonzentrierte Salzsäure verwendet werden musste. Das neutral gewaschene, und vom Lösungsmittel befreite Edukt (30) wurde aus Methylchlorid/Methanol kristallisiert. Man erhielt 22 mg DC-reines, kristallines Oktaäthylporphyrin (30) zurück. Der Magnesiumkomplex (31) wurde 4 Tage bei RT am HV (0,01 Torr) getrocknet und der Charakterisierung zugeführt. Die gesamte Ausbeute betrug 135 mg (= 80% bez. OEP (30)). Mit Berücksichtigung des zurückgewonnenen Edukts berechnet man eine Ausbeute von 93,5%.

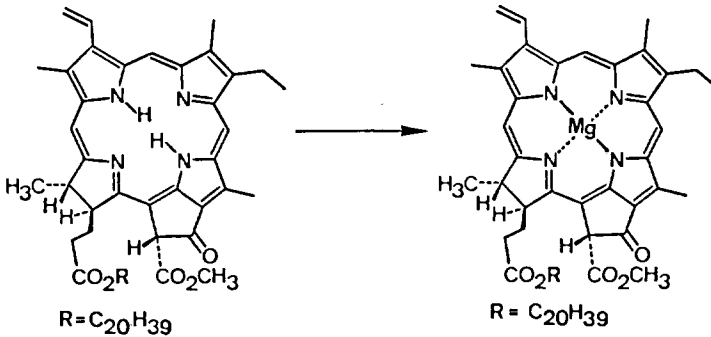
$C_{36}H_{44}N_4Mg$	ber. C 77,61 H 7,96 N 10,06 Mg 4,36 gef. C 77,59 H 7,99 N 10,13 Mg 4,58 *96)
Smp.	320°C (Zers.)
DC	Rf=0,16 (Kieselgel, Hexan/Aceton 9:1) (Oktaäthylporphyrin (30): Rf=0,45)
IR (cm ⁻¹) CH ₂ Cl ₂	c=0,4% 3635w, 3560w, 2930s, 2870s, 2760w, 1685w, 1604m, 1575w, 1372w, 1143m, 1108m, 1061m, 1057s, 1013s, 979m, 958s, 841s.
IR (cm ⁻¹) KBr	1,2 mg in 300 mg Kaliumbromid 3600-3200 breit, 3128w, 3075w, 3038w, 2960s, 2928s, 2868s, 2765w, 1670w, 1602w, 1578w, 1467s, 1452s, 1389w, 1370m, 1317w, 1269m, 1219w, 1149s, 1108w, 1065m, 1058s, 1017s, 980m, 959s, 913m, 846w, 837s, 830m, 750s, 735s, 708m.
NMR (ppm) CDCl ₃	1,95 J=7,5Hz t/24H 4,12 J=7,5Hz q/16H 10,07 s/4H
UV/VIS (nm) C ₆ H ₆	0,750 mg in 50 ml Benzol, c=2,693·10 ⁻⁵ Mol/l 581,2(19'250), 545,0(18'430), 506,5(2'930), 410,9(397'690), 390,0(38'100), 333,5(21'950).
UV/VIS (nm) CH ₂ Cl ₂	0,894 mg in 50 ml CH ₂ Cl ₂ , c=3,201·10 ⁻⁵ Mol/l 580,0(15'690), 543,1(17'850), 504,0(2'410), 408,5(408'720), 388,0(36'480), 335,0(21'800).
UV/VIS (nm) C ₄ H ₁₀ O	0,802 mg in 50 ml Aether, c=2,879·10 ⁻⁵ Mol/l 579,0(23'300), 543,4(19'970), 504,5(2'080), 407,2(525'000), 386,5(40'690), 331,6(25'700).
MS (m/e)	560(1%), 559(7%), 558(26%), 557(52%), 556(100%/M ⁺), 555(2%), 554(1%), 541(12%/M ⁺ -CH ₃), 526(7%/M ⁺ -CH ₃), -CH ₃), 511(6%/M ⁺ -CH ₃ , -CH ₃ , -CH ₃), 278(26%/M ⁺⁺), 263(10%).

Bemerkungen zur Reaktion

- a) Kristallines OEP (30) ist ziemlich schlecht löslich, sodass man relativ viel Lösungsmittel brauchte. Es dauerte ca. 3 Stunden, bis sich alles gelöst hatte.
- b) Die grössere Menge an Magnesiumreagens ist wahrscheinlich durch die kleinere Konzentration des Eduktes bedingt.
- c) Lösungen von Magnesium-oktaäthylporphin sind in Benzol (Veränderung mit isobestischen Punkten) und Methylenchlorid lichtempfindlich. Lösungen in Aether sind stabil.
- d) Im Absorptionsspektrum treten durch den Metalleinbau starke Aenderungen auf. So haben die metallfreien Porphyrine i. allg. neben der Soretbande im Rotbereich 4 Absorptionsmaxima, die Metalloporphyrine jedoch nur zwei.
- e) Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturwerten *106) *108) überein.

*108) H. Ogoshi, N. Masai, Z. Yoshida, J. Takemoto, K. Nakamoto, Bull. Soc. chim. Jap. 44, 49 (1971)

2.6.5. Vorversuch zur Komplexierung von Phäophytin a (1)



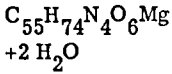
(1) MG 871, 23

(32) MG 893, 51

190 mg (0,218 mMol) Phäophytin a (1) *109) wurden in 2 ml Methylenchlorid gelöst (vgl. Abb. 39). Unter Argon wurde auf 11-12°C abgekühlt und mit einer Injektions-spritze 4,7 ml (0,94 mMol) eines 0,2 molaren Magnesiumreagenzes *95) schnell zu-gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 6,5 Minuten bei dieser Temperatur gerührt. Man überführte in einen Scheidetrichter und schüttelte mit 100 ml Aether, 80 ml Was-ser und 20 ml Phosphatpuffer (+ Spur Ascorbinsäure) gut durch. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser gewaschen, durch eine Filternutsche G3, die 0,5 cm hoch mit Natriumsulfat gefüllt worden war, filtriert und am RV zur Trockene einge-engt. Mit abs. Aether wurde die Nutsche farblos gewaschen. Der Kolben wurde mit einem Kühlfinger versehen, und das BHT während 3 Stunden am HV bei 40-50°C aus dem Rückstand wegsublimiert. Anschliessend transferierte man den Kolben in die Drybox. Man löste die Substanz mit 20 ml Aceton/Wasser 88:12, filtrierte durch eine Nutsche G3 und liess diese Lösung unter einer Argonatmosphäre (Drybox: O₂-Gehalt ≤ 5 ppm) langsam eindunsten. Nach 18 Tagen wurden die ersten Kristalle von der Mutterlauge entfernt.

Unter dem Mikroskop zeigten sich "Kristalligel". Nach 3 Tagen Trocknen am HV bei RT wog man 143 mg DC-reine Kristalle (= ohne gefärbte Nebenprodukte). Die Mutter-lauge wurde noch weiterhin in der Drybox belassen, sodass man schlussendlich noch-mals 40 mg DC-reine Kristalle isolieren konnte. Die totale Ausbeute betrug 183 mg Chlorophyll a (32) (= 91% bez. Phäophytin a (1) unter Berücksichtigung von 2 Mol-äquivalenten Wasser).

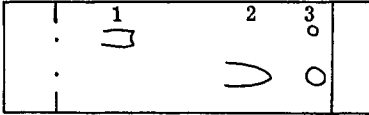
*109) DC-reines, bei 100°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes Material (vgl. Kap. 2.1.1.)



ber. C 71,07 H 8,24 N 6,02
 gef. C 69,30 H 8,34 N 5,27

Unter der Annahme, dass die Verunreinigung keinen Stickstoff enthält, wäre die Reinheit des Chlorophylls (32) ca. 87%.

DC Cellulose, (Hexan/Aceton 9:1)



1: Chlorophyll a (32) grün
 2: Phäophytin a (1) grau
 3: Nebenprodukt (farblos, mit J_2 sichtbar)

IR (cm^{-1}) THF

aufgenommen auf PE 257
 1739s, 1695s, 1628w, 1598m, 1580w, 1549m, 1520w.

IR (cm^{-1}) CCl_4

aufgenommen auf PE 257, c=10%!
 3700-3100 breit, 2950s, 2920s, 1736s, 1690s, 1652s,
 1609s, 1528m, 1490m, 1465m, 1450m, 1432m, 1377m,
 1344s, 1327w, 1304w, 1283s, 1240w, 1221w, 1188s,
 1165m, 1130m, 1100w, 1067w, 1040m, 996w, 984w, 919m.

Die Positionen der Carbonylbanden entsprechen den Literaturdaten *110)

NMR (ppm) $CDCl_3 + 12\% CD_3OD$ 0,06 molar in Normalzelle

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen	
	beob.	theor.
0,84		s/6H CH ₃ -
0,90		s/6H CH ₃ -
1,59		s/3H CH ₃ -C=C
1,72 J=8Hz		t/3H 4'
1,81 J=7Hz		d/3H 8'
0,7-2,2	69,0	42H
2,2-2,7	4,7	m/4H 7' 7''
3,27		s/3H 3
3,31	22,0	s/3H 1
3,65		s/3H 5 H ₂ O
3,65 J=8Hz		q/2H 4
4,00		s/3H 11
3,8-4,6	9,2	m/2H 7 8
4,40		m/2H -CH ₂ -OCO-
5,0-5,4	2,5	m/1H Vinyl des Phy
5,99 J=11Hz, J=1,5Hz		dd/1H 2'
6,16 J=17Hz, J=1,5Hz	2,4	dd/1H 2''
6,26		s/1H 10
7,95 J=17Hz, J=11Hz	1,0	dd/1H 2
8,29	1,0	s/1H δ
9,22	1,0 ↔	s/1H α
9,49	1,0	s/1H β

Die Protonen am Makrocyclus von Chlorophyll a (32) sind gut zuzuordnen. Man findet keine Hinweise, dass das Material mit anderen Chlorophyll-Derivaten verunreinigt ist. Im Bereich von 0,7-2,2 ppm ist jedoch das Integral (geeicht auf Methinprotonen) zu gross: 69 Protonen statt theor. 42. Die Verunreinigung könnte demzufolge eine phytolähnliche Substanz sein.

UV/VIS (nm) C_3H_6O qualitativ, aufgenommen auf PE 402
656(0,77), 612(0,14), 575(0,07), 530(0,03), 498(0,02),
429(1,00), 409(0,77), 389(0,50 sh).

UV/VIS (nm) CCl_4 qualitativ, aufgenommen auf PE 402
658(0,73), 615(0,13), 576(0,07), 530(0,03), 495(0,02),
431(1,00), 415(0,73), 384(0,45 sh).

UV/VIS (nm) C_6H_6 0,780 mg in 100 ml Benzol, $c=0,839 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
665,5(69'130 max), 636,2(8'220 min), 618,5(11'900 max),
593,6(5'360 min), 580,0(7'900 max), 547,5(2'740 min),
533,9(3'570 max), 505,0(2'470 sh), 472,4(1'190 min),
432,4(89'700 max), 417,8(62'000 min), 413,1(62'800 max),
388,5(38'200 sh), 342,1(19'100 min), 330,3(20'400 max).

UV/VIS (nm) CH_2Cl_2 0,795 mg in 100 ml CH_2Cl_2 , $c=0,855 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
663,8(60'240 max), 635,3(8'070 min), 616,9(11'700 max),
591,8(5'730 min), 580,0(6'430 max), 546,1(2'550 min),
532,9(2'910 max), 511,6(2'100 min), 480,0(2'200 sh),
431,0(74'900 max), 418,2(59'000 min), 412,1(60'600 max),
388,8(39'800 sh), 343,8(21'100 min), 332,7(22'200 max).

UV/VIS (nm) $C_4H_{10}O$ 0,730 mg in 100 ml Aether, $c=0,785 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
660,2(67'500 max), 633,2(6'750 min), 613,2(10'200 max),
587,6(3'820 min), 573,8(5'350 max), 545,9(2'250 min),
530,3(3'100 max), 500,0(1'900 sh), 471,5(1'000 min),
427,7(88'400 max), 413,5(60'500 min), 408,5(61'700 max),
384,9(37'800 sh), 335,2(17'200 min), 323,8(18'600 max).

Die Maxima der Rot- und der Soretbanden entsprechen den Literaturwerten *111):

Benzol	665,5	(Lit. 665,6)
	432,4	(Lit. 432,8)
Aether	660,2	(Lit. 660,6)
	427,7	(Lit. 428,8)

Die ϵ -Werte sind hingegen zu klein. Aus den Extinktionskoeffizienten in Benzol berechnet man eine Reinheit des Chlorophylls von 88%. Die Werte in Aether ergeben eine Reinheit von nur 80% (die ϵ -Werte in Aether sind jedoch stark vom Wassergehalt des Lösungsmittels abhängig).

*110) L. P. Vernon, G. R. Seely, "The Chlorophylls" (1966), p. 202

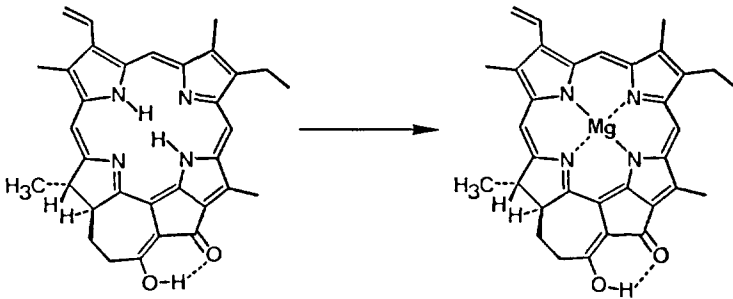
*111) G. R. Seely, R. G. Jensen, Spectrochim. Acta 21, 1835 (1965)

Kommentar zur Reaktion und zu den analytischen Daten

- a) Die Reaktion verlief genau wie beim Einbau von Magnesium in Methyl-phäophorbid a (2). Im DC (Cellulose, Hexan/Aceton ~ 9:1) stellte man einen sehr schwachen, grünen Fleck oberhalb des grünen Produktfleckes fest.
- b) Wegen der Kristallisation in Aceton/Wasser musste das BHT zuvor aus dem Rohprodukt absublimiert werden (BHT ist schlecht löslich in Aceton/Wasser).
- c) Kristallisationsversuche in Aether/Hexan schlugen fehl. Es wurde nur amorphes Material gewonnen (Lösung steigt an der Glaskölbchenwand hoch).
- d) Unter dem Mikroskop ist ersichtlich, dass alles Material in "Igel" kristallisiert war (ev. Zentrum der Strukturen amorph?). Mit diesen Kristallen konnten die besten bis anhin von Chlorophyll a (32) erhaltenen Pulverdiagramme aufgenommen werden *112).
- e) Das IR-Spektrum gibt keinen Hinweis auf die Qualität des Materials. Aus dem UV/VIS-Spektrum kann man entnehmen, dass die Verunreinigung nicht ein Chlorophyll-Derivat ist (relative Extinktionen und Bandenlagen korrekt). Ebenfalls unerstützt wird diese Annahme durch das NMR-Spektrum. Die Vergrößerung des Integrals tritt hauptsächlich zwischen 0,7 und 2,2 ppm auf (C-H-Verunreinigung?).
- f) Aus den oben beschriebenen Gründen ist die Reinheit des kristallinen Chlorophylls ca. 80-85%.
- g) Die Verunreinigung wurde nicht beim Magnesiumeinbau eingeschleppt, sondern war schon im Phäophytin a (1) vorhanden. Es handelt sich dabei mit Sicherheit nicht um das Epimer von Phäophytin a (1) (vgl. 2.1.1., Hochdruckchromatographie).

*112) Privatmitteilung von C. Kratky.

2. 6. 6. "Magnesium-enol a" (33)



(5) MG 516, 65

(33) MG 538, 94

155 mg (0,3 mMol) Enol a (5) *113) wurden in einem 50 ml-Rundkolben (vgl. Abb. 39) mit 24,0 ml Chloroform versetzt. Unter Argon wurde so lange bei 40°C gerührt, bis sich alles gelöst hatte (ca. 3 Stunden). Im DC war keine Veränderung des Materials feststellbar. Bei einer Badtemperatur von 52-55°C wurden unter Argon mittels einer Injektionsspritze mit langer Hohnadel 10,5 ml (2,1 mMol) eines 0,2 molaren Magnesiumreagenzes *95) schnell zugegeben. Man rührte bei dieser Temperatur während 5 Minuten unter Vermeidung von direktem Lichteinfall und arbeitete dann auf. Zu diesem Zweck waren in einem 2-Liter Scheidetrichter 900 ml Aether, 90 ml ges. Natriumdihydrogenphosphat-Lösung (pH ~ 4, 5) und 300 ml Wasser bei RT ca. 30 Minuten lang mit Argon gespült worden. Das grüne Reaktionsgemisch wurde bei Dämmerlicht in den Scheidetrichter überführt und intensiv geschüttelt. Die organische Phase wurde dreimal mit Wasser gewaschen, bis ca. 500 ml Aether zurückblieben. Man filtrierte durch eine Glasfilternutsche G3 (β 6 cm), welche 1 cm hoch mit Natriumsulfat gefüllt worden war. Die smaragdgrüne Lösung wurde am RV unter Vakuum zur Trockene eingeeengt, auf den Kolben mit dem Rückstand ein Kühlfinger aufgesetzt, und das BHT bei einer Badtemperatur von ca. 50°C am HV (0,02 Torr) in 3 Stunden absublimiert (416 mg BHT entspricht 88% des eingesetzten Reagenzes). Danach transferierte man den Kolben mit dem rohen Mg-enol a (33) so schnell wie möglich in die Drybox (Argonatmosphäre: O₂-Gehalt \leq 5 ppm). Man löste die Substanz mit 20 ml sauerstofffreiem abs. Tetrahydrofuran und filtrierte durch eine Glasfilternutsche G3 in einen 50 ml-Kolben. Mit etwas zusätzlichem Tetrahydrofuran wurde nachgespült. Auf den Kolben setzte man einen Schliffstopfen mit eingeklemmter Alufolie. Drei Wochen später war das Lösungsmittel genügend verdampft, sodass man die Kristalle von der Mutterlauge trennen konnte. Diese wurden mit wenig Tetrahydrofuran zweimal kurz gewaschen. Man liess die Kristalle einen Tag in der Drybox trocknen, dann noch 2 Stunden am HV (0,001 Torr) bei RT. Die Mutterlauge ergab noch einiges mehr an kristallinem Magnesium-enol a (33), welches gleich behandelt wurde. Insgesamt erhielt man 109,5 + 46 mg = 155,5 mg DC-reines, blauschwarz glänzendes Magnesium-enol a (33) \cdot 2 THF (= 76% bez. Enol a (5)).

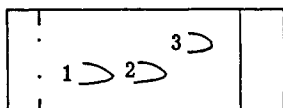
*113) DC-reines, 2 Tage am HV bei RT getrocknetes, kristallines Material.

Bemerkungen zur Reaktion

In qualitativen Versuchen hatte sich gezeigt, dass bei RT kein vollständiger Einbau erreicht werden konnte. Aus der Erfahrung, dass Gemische von Magnesiumkomplexen und ihren metallfreien Analoga zusammen kristallisieren (z. B. Enol a (5) und Zink-enol a in THF *114), wurden Einbaubedingungen gewählt, welche sicher 100%igen Einbau gewährleisten.

Die Abschätzung des Magnesiumgehaltes im UV/VIS-Spektrum ist nur sehr beschränkt möglich, da die Unterschiede von Enol a (5) und Mg-enol a (33) zu klein sind. Im DC ist die Bestimmung günstiger, wobei aber an der Luft ein mehr oder weniger grosser Teil des Mg-enols (33) allomerisiert wird.

Skizze des DC



Cellulose, (Hexan/Aceton 85:15)

1: Mg-enol-allomer (blaugrün)

2: Mg-enol a (33) (hellgrün)

3: Enol a (5) (grün)

Die Allomerisierung trat während des Eintrocknens der Lösung auf dem DC-Plättchen auf. Nach dem Herausnehmen aus dem Lösungsmittel tank wurde der hellgrüne Fleck des Mg-enols (33) beim Eintrocknen blaugrün (allomer). Andere Flecken wurden nicht beobachtet.

Die schlechtere Löslichkeit von Enol a (5) bez. Methyl-phäophorbid a (2) in Chloroform verlangte eine grössere Lösungsmittelmenge und demzufolge auch einen grösseren Ueberschuss an Reagens (7-fache Menge). Die Eduktlösung und das Reagens wurden auch hier nicht durch Ausfrieren und Abpumpen der Atmosphäre entgast; man arbeitete jedoch immer unter einer Argonatmosphäre (Argonballon). Das Licht wurde während der Reaktion und der Aufarbeitung möglichst gedämpft, da nach unseren Erfahrungen die Allomerisierung durch Licht beschleunigt wird. Das Aufarbeitungsgemisch wurde vorsichtshalber mit Argon gespült.

UV/VIS-Spektren zeigten nach der Filtration der organischen Phase durch Natriumsulfat eine leichte Asymmetrie der Rotbande nach der kürzerwelligen Seite. Dieser Effekt könnte durch eine Spur Allomer oder durch das Vorliegen von wenig Ketoform des Produktes (33) verursacht sein.

Aus der Erfahrung, dass allomere Produkte nicht zusammen mit dem gewünschten Produkt kristallisieren (z. B. Methyl-chlorophyllid a (28)) und normalerweise besser löslich sind als die Enole, hoffte man, dass die Kristallisation einen Reinigungseffekt haben sollte.

Da wir aus möglichst reinen Lösungen kristallisieren wollten, wurde das BHT absublimiert. Während der Reaktion und der Aufarbeitung hatte dieses offenbar einen günstigen Einfluss auf die Stabilität des Magnesium-enols (33) (Antioxidans). Zur Kristallisation in der Drybox (Argonatmosphäre) konnte darauf verzichtet werden. Während der Kristallisation (3 Wochen) wurden keine Zersetzungen (UV/VIS, DC) festgestellt.

In der Drybox war es nun auch möglich, DC ohne Allomerisierung herzustellen.

*114) J. L. Luisier, Diss. ETH (1974)

Zur Charakterisierung wurde die Substanz noch einmal in der Drybox aus absolutem Tetrahydrofuran umkristallisiert. Man trocknete 3 Stunden am HV (0,01 Torr) bei RT.

$C_{33}H_{30}N_4O_2Mg$ ber. C 72,09 H 6,78 N 8,20 Mg 3,55
 +2 THF gef. C 72,09 H 6,86 N 8,14 Mg 4,00 *96)

Smp. höher als 320°C (Zers.)

DC Rf=0,44 (Cellulose, Benzol/Tetrahydrofuran 99:1)
 (Enol a (5): Rf=0,78)

IR (cm⁻¹) THF gesättigte Lösung (schwerlöslich, c[∞] 1%)
 1660s, 1626w, 1618w, 1603w, 1576w, 1555m, 1543w, 1511w.

IR (cm⁻¹) KBr 0,6 mg in 300 mg Kaliumbromid
 2960w, 2920w, 2860w, 1652s, 1620m, 1600m, 1576w,
 1555s, 1525w, 1511m, 1479m, 1460w, 1417w, 1392w,
 1381m, 1370m, 1365w, 1331m, 1303w, 1290m, 1262w,
 1240m, 1202s, 1171w, 1155w, 1144w, 1130w, 1105s,
 1090m, 1075m, 1051w, 1040w, 1018m, 991m, 967s, 925m,
 912m, 895w, 871w, 854w, 840w, 827m, 800m, 788w,
 765w, 757w, 744w, 730m, 710w, 694w.

NMR (ppm) *115)

Dioxan-d8 c=0,009 molar CAT: 25 Scans ppm	DMF-d7 c=gesättigt ppm	Anzahl Protonen Signalstruktur Zuordnung
1,62 J=8Hz	1,66 J=8Hz	t/3H 4'
1,78	1,83	m THF
2,17 J=7,5Hz	2,20	d/3H 8'
2,40		s LM
	2,80	m DMF
	2,97	m DMF
3,16	3,18	s/3H 3
3,20	3,25	s/3H 1
3,45	3,35	s/3H 5
3,55		s Dioxan
3,63	3,67	m THF
5,94 J=11Hz, J=2Hz	6,02 J=11Hz, J=2Hz	dd/1H 2'
6,16 J=18Hz, J=2Hz	6,23 J=18Hz, J=2Hz	dd/1H 2''
7,96 J=18Hz, J=11Hz	8,07 J=18Hz, J=11Hz	dd/1H 2
	8,08	s DMF
8,04	8,15	s/1H δ
9,00	9,01	s/1H α
9,24	9,34	s/1H β
13,18	13,4 (breit)	s/1H O-H

Die Protonen in Stellung 4, 7, 7', 7'' und 8 konnten nicht zugeordnet werden.

*115) Herrn R. Kirchen (ETH) möchte ich für die Aufnahme des Spektrums danken.

UV/VIS (nm)

Abb. 49

Aether

0, 440 mg in 50 ml
c=1, 2881·10⁻⁵Mol/l

681, 7(33' 210 max)
630, 0(8' 150 sh)
580, 0(1' 560 sh)

515, 0(100 min)
466, 4(44' 410 max)
455, 6(38' 400 min)
436, 5(60' 790 max)
428, 0(57' 800 min)
420, 3(59' 780 max)
381, 8(28' 550 min)
357, 0(58' 410 max)
306, 2(17' 050 min)
290, 4(22' 510 max)

Methylenchlorid

0, 506 mg in 50 ml
c=1, 4813·10⁻⁵Mol/l

687, 7(30' 090 max)
630, 0(7' 900 sh)

530, 0(200 min)
470, 0(41' 700 max)
460, 0(37' 950 min)
439, 4(57' 520 max)

427, 7(54' 920 sh)
387, 4(31' 700 min)
361, 8(61' 490 max)
310, 0(17' 900 min)
293, 8(23' 560 max)
267, 9(17' 300 min)
250, 0(18' 160 max)

Dioxan

0, 535 mg in 50 ml
c=1, 5663·10⁻⁵Mol/l

683, 6(29' 430 max)
635, 0(9' 440 sh)
547, 5(2' 100 min)
521, 7(2' 600 max)
514, 0(2' 550 min)
474, 3(48' 600 max)
462, 3(41' 500 min)
444, 2(58' 110 max)
435, 3(54' 800 min)
427, 6(56' 320 max)
389, 1(29' 500 min)
362, 5(58' 430 max)

Abb. 54

Pyridin

0, 513 mg in 50 ml
c=1, 5018·10⁻⁵Mol/l

686, 1(27' 890 max)
637, 7(7' 310 sh)
582, 7(900 sh)
542, 8(100 min)
481, 3(45' 080 max)
473, 6(43' 900 min)
453, 4(53' 780 max)
441, 7(52' 380 sh)
398, 3(30' 000 min)
369, 1(55' 020 max)
314, 4(21' 100 min)

Dimethylacetamid

0, 465 mg in 50 ml
c=1, 3613·10⁻⁵Mol/l

688, 7(30' 490 max)
640, 0(10' 090 sh)

535, 3(575 min)
471, 8(41' 500 max)
461, 2(37' 500 min)
440, 0(57' 840 max)
432, 5(57' 150 sh)
388, 2(33' 300 min)
362, 5(63' 340 max)
309, 5(18' 750 min)
293, 7(24' 070 max)

Benzol

gesättigt
c=0, 4·10⁻⁵Mol/l

690, 5

472, 3
460, 5
442, 7
427, 6

362, 7

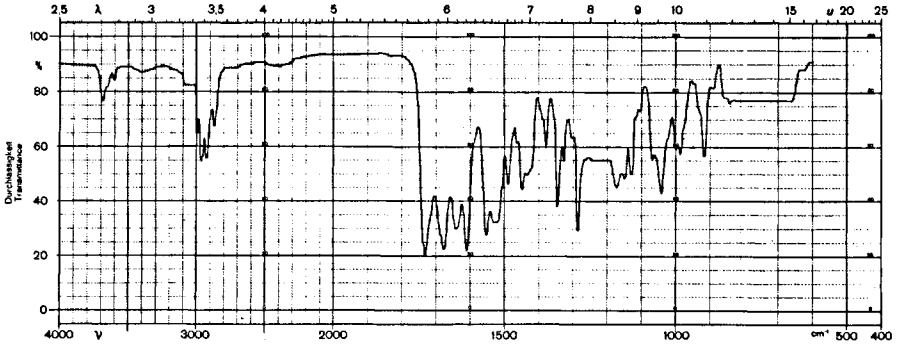


Abb. 40 Methyl-chlorophyllid a (28)

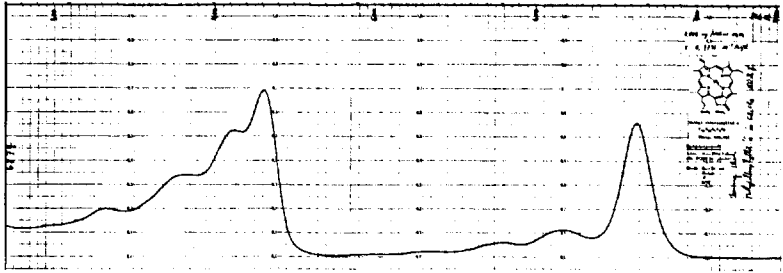


Abb. 41 Methyl-chlorophyllid a (28)

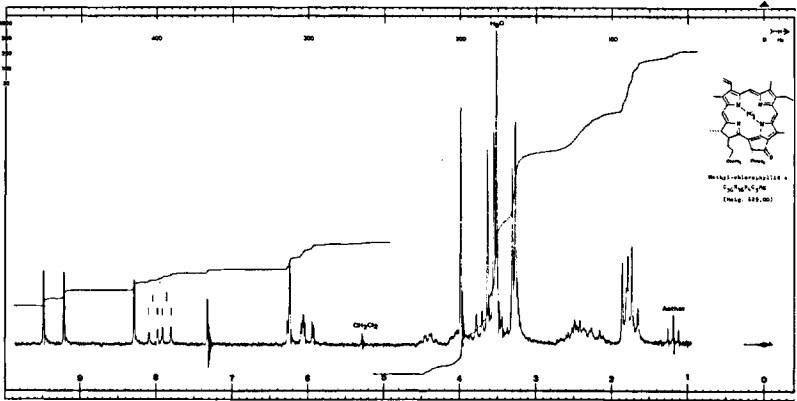


Abb. 42 Methyl-chlorophyllid a (28)

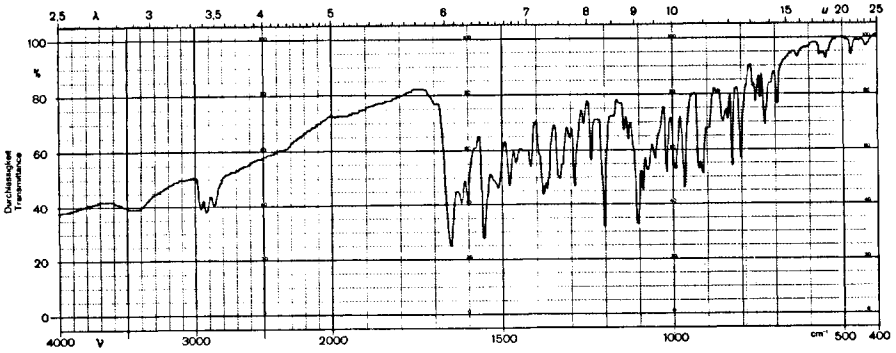


Abb. 47 Magnesium-enol a (33)

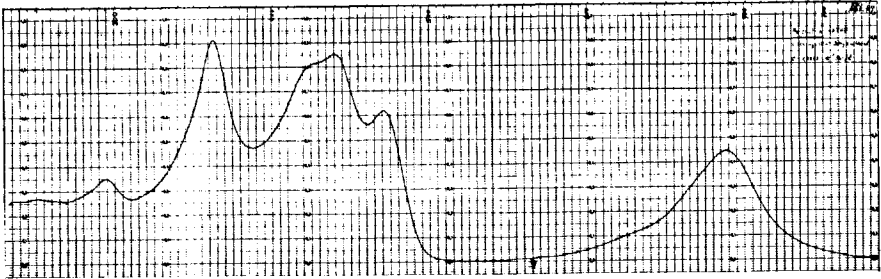


Abb. 49 Magnesium-enol a (33)

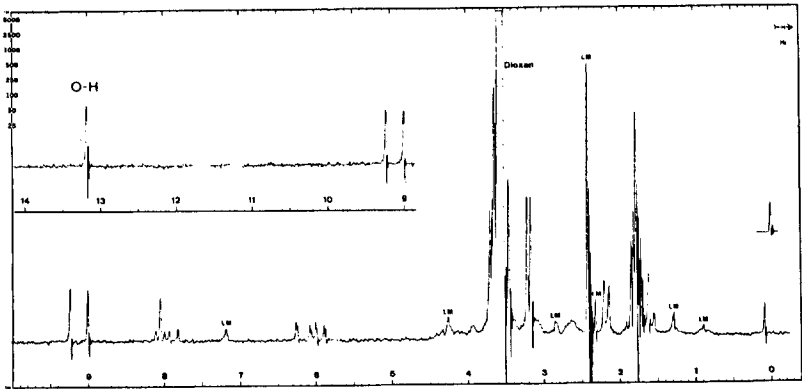


Abb. 48 Magnesium-enol a (33)

Abb. 50

Tetrahydrofuran (RT)

0,471 mg in 50 ml
 $c=1,3790 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

685,5(29'660 max)
 630,0(8'350 sh)

530,0(1'450 min)
 476,0(45'850 max)
 465,9(42'750 min)
 445,4(58'320 max)
 438,8(57'500 min)
 431,8(58'670 max)
 390,1(32'300 min)
 362,4(60'380 max)
 311,8(26'100 min)

Abb. 51

Tetrahydrofuran (-60°C) *116)

0,471 mg in 50 ml
 $c=1,3790 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

681,3(33'840 max)
 630,0(10'160 sh)
 580,0(3'260 sh)

525,0(1'700 min)
 480,1(54'760 max)
 467,7(44'700 min)
 449,0(64'540 max)
 440,9(60'900 min)
 431,6(65'190 max)
 393,0(36'200 min)
 365,0(71'720 max)
 312,9(27'400 min)
 294,5(35'680 max)

Abb. 50

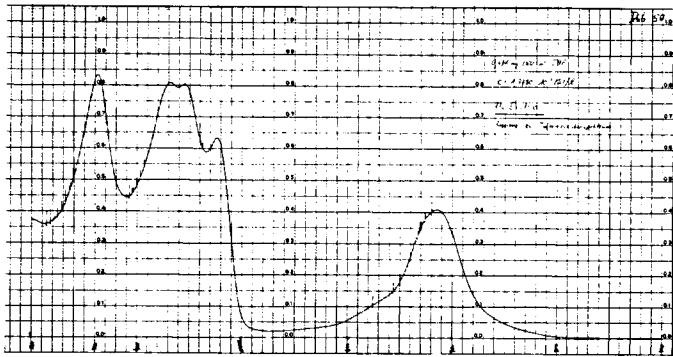
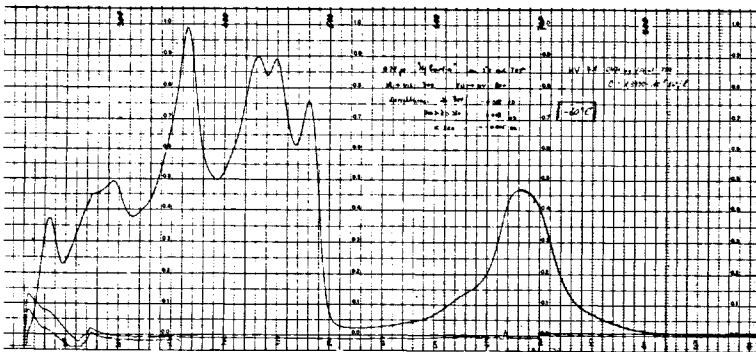


Abb. 51



*116) B. Jaun danke ich für die Aufnahme des Tieftemperatur-Spektrums.

MS (m/e) Es gelang nicht, ein reproduzierbares, vernünftiges Massenspektrum zu erhalten.

CD (nm) Dioxan $c=1,5663 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
*117) 292(+7, 9), 308(+8, 4), 363(-10, 8), 425(+1, 7), 446(-3, 1),
476(-5, 1).

Vergleich der Fluoreszenz von Mg-enol a (33) und Methyl-chlorophyllid a (28)

Alle Aufnahmen wurden bei RT ausgeführt *118)

Mg-enol a (33): $c=1,566 \cdot 10^{-5}$ Mol/l Chlorophyllid a (28): $c=0,573 \cdot 10^{-5}$ Mol/l

Lösungsmittel: Dioxan (entgast)

Lösungsmittel: Dioxan (nicht entgast)

a) Fluoreszenz:

Ex: 428 nm Spalt: 5 nm
Em: Spalt: 8 nm
Fluoreszenzmaximum: 664 nm
relative Intensität: 0,45

Ex: 428 nm Spalt: 5 nm
Em: Spalt: 8 nm
Fluoreszenzmaximum: 666,1 nm
relative Intensität: 100

(korrigiert bez. der Konzentrationen)

b) Anregungsspektrum:

Ex: 300-600 nm Spalt: 5 nm
Em: 664 nm Spalt: 8 nm
Anregungsmaxima: 582, 7(0,11)
533, 8(0,07)
Abb. 52 505, 0(0,04)
429, 7(1,00)
408, 5(0,66)
381, 8(0,43)
331, 0(0,32)

Ex: 300-600 nm Spalt: 5 nm
Em: 664 nm Spalt: 8 nm
Anregungsmaxima: 587, 5(0,09)
527, 0(0,04)
Abb. 53 502, 5(0,02)
431, 7(1,00)
410, 3(0,67)
382, 1(0,47)
331, 2(0,33)

relative Intensität: 1

relative Intensität: 100

(korrigiert bez. der Konzentrationen)

Aus der sehr schwachen Fluoreszenz von Mg-enol a (33) und der grossen Aehnlichkeit der Anregungsspektren von Mg-enol a (33) und Methyl-chlorophyllid a (28) darf man mit grosser Sicherheit annehmen, dass das Fluoreszenzsignal von einer minimalen Verunreinigung mit einem allomeren Produkt oder von einer β -Diketonform stammt. Diese Ergebnisse sind in Uebereinstimmung mit den Fluoreszenzuntersuchungen, welche am Enol a (5) gemacht wurden (vgl. Kap. 2.1.5.).

*117) Frau Dr. E. Boedefeld danke ich für die Aufnahme auf dem Gerät Cary 60.

*118) Herrn M. Hadorn, (Org. chem. Lab. ETH) möchte ich für die Aufnahmen der Spektren auf dem Gerät Perkin-Elmer MPF-3 herzlich danken.

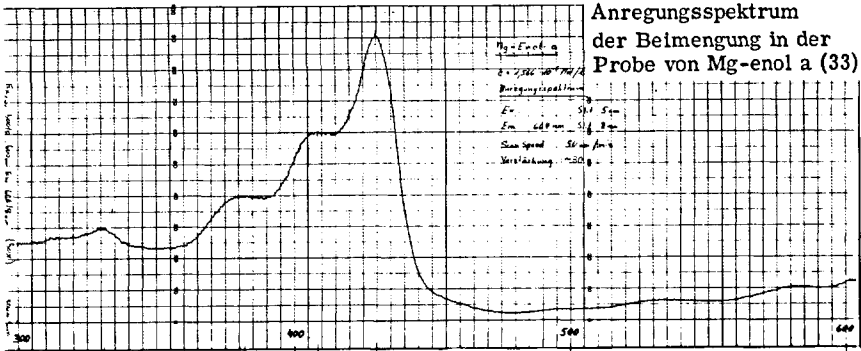


Abb. 52 Magnesium-enol a (33)

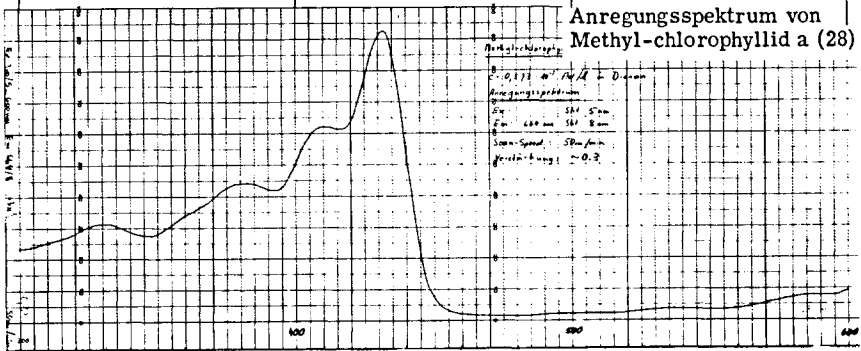


Abb. 53 Methyl-chlorophyllid a (28)

Löslichkeit

Magnesium-enol a (33) löst sich am besten in Tetrahydrofuran, Dimethylformamid und Dimethylacetamid (THF: $\sim 3 \cdot 10^{-2}$ Mol/l, DMF: $3-4 \cdot 10^{-2}$ Mol/l). Die Löslichkeit in Dioxan beträgt ca. $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l.

In Aether, Methylenchlorid und Pyridin gelang es noch gut eine Konzentration von $2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l zu lösen, falls das analytische Material mit zwei koordinierten THF-Molekülen verwendet wurde. Am HV bei erhöhter Temperatur getrocknetes Mg-enol a (33) ist in diesen Lösungsmitteln praktisch nicht mehr aufzulösen.

In Benzol wurde eine Konzentration von $4 \cdot 10^{-6}$ Mol/l erreicht. Einen Tag später jedoch beobachtete man im UV/VIS-Spektrum nur noch die halbe Intensität. Es scheint, dass sich die Substanz mit dem koordinierten THF löste, dieses aber in der Benzollösung mit der Zeit abgelöst wurde und so das Magnesium-enol wieder unlöslich machte. Mindestens 10^{-5} Mol/l sind in wässrigen 5%-igem Triton X-100 löslich.

Chemische Stabilität von Magnesium-enol a (33)

Lösungen in DMA, THF, Dioxan, Aether, Pyridin und Methylenchlorid sind unter striktem Ausschluss von Sauerstoff (Drybox) mehrere Wochen in UV/VIS-Konzentration (10^{-5} molar) stabil. Licht hat unter diesen Bedingungen keinen negativen Effekt. Eine Lösung des Rohproduktes von Magnesium-enol a (33) + BHT (Reaktionsprodukt nach Ausschütteln mit Phosphatpuffer, anschliessend eingengt) in nicht entgastem, trockenem THF ($c=10^{-5}$ Mol/l) veränderte sich im Dunkeln nur sehr langsam. Nach drei Wochen konnten im UV/VIS-Spektrum neben dem allomeren Material noch Spuren von Magnesium-enol festgestellt werden.

Magnesium-enol a (33) ist in 5% wässrigem Triton X-100 stabil.

Es war nicht möglich, kristallines Mg-enol a (33) in einem der oben beschriebenen, jetzt aber nicht entgasten Lösungsmitteln aufzulösen, ohne dass im sofort anschliessend aufgenommenen UV/VIS-Spektrum etwas allomeres Produkt festgestellt werden musste. Ein Kristallisationsversuch von Mg-enol a (33) in Benzol (Rohprodukt + BHT) führte innert 3 Tagen bei 4°C unter Argon (Argonballon, nicht vakuum-entgastes Benzol) zu einer vollständigen Allomerisierung.

Phasentest (Vergleich von Enol a (5) mit Magnesium-enol a (33))

(Alle Lösungen wurden in der Drybox (O_2 -Gehalt ≤ 5 ppm) hergestellt.)

Enol a (5) gelöst in Dimethylacetamid ($c=10^{-5}$ Mol/l) gab mit 4 Tropfen DBU *119) in 3 ml Lösung ein Phasentestspektrum, welches wenigstens 2 Stunden am Licht stabil blieb.

Der selbe Versuch mit Mg-enol a (33) führte nur zu einem unvollständigen Phasentestspektrum, d. h. Mg-enol a (33) ist weniger sauer als das metallfreie Enol a (5). In Methylenchlorid an Stelle von Dimethylacetamid wurde unter gleichen Bedingungen bei beiden Verbindungen kein Phasentestspektrum erhalten.

Ein Tropfen Tetrabutylammoniumhydroxyd *33) in 3 ml einer Lösung von Mg-enol a (33) in Dimethylacetamid ergab ein vollständiges Phasentestspektrum.

Enol-Chelate

(Alle Lösungen wurden in der Drybox (O_2 -Gehalt ≤ 5 ppm) hergestellt.)

Man hatte festgestellt, dass selbst sehr grosse Ueberschüsse von Metallsalzen (LiClO_4 , $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ *120) in Lösungen von Mg-enol a (33) in Dimethylacetamid nicht in der Lage waren, eine vollständige Enolkomplexierung zu erreichen. Mit einem Tropfen DBU *119) pro 3 ml 10^{-5} -molarer Enol-Lösung konnte jedoch das Gleichgewicht vollständig zum Enol-Komplex verschoben werden, wobei die grünen Lösungen eine gelbe Farbe annahmen.

*119) DBU (=Diazabicycloundecen): Fluka AG; purum, dest. über Kalium bei 0,1 Torr.

*120) LiClO_4 : Merck; zur Analyse
 $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$: Fluka AG; puriss. p. a. zur Mikroanalyse (Dihydrat)
 $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$: Präparat von B. Hardegger

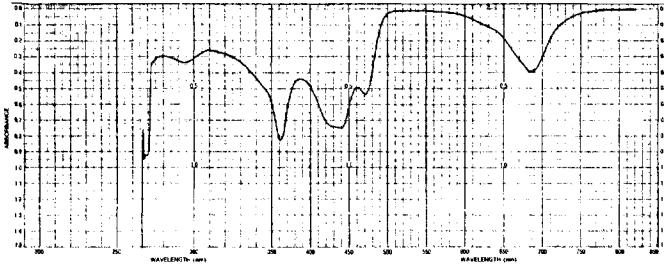


Abb. 54

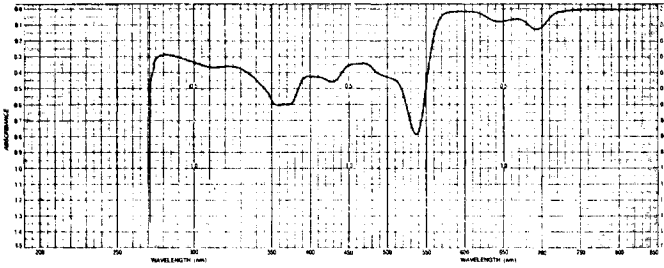


Abb. 55

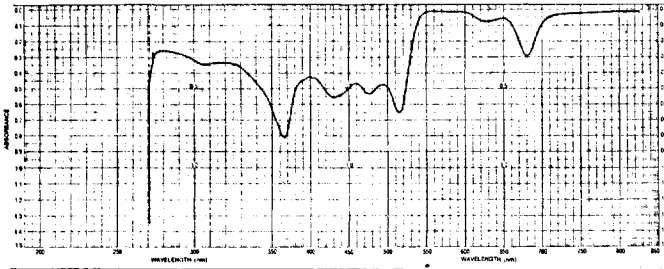


Abb. 56

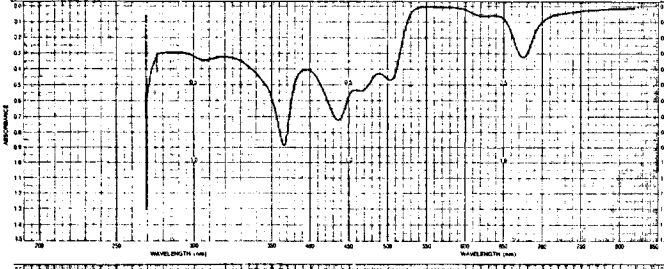


Abb. 57

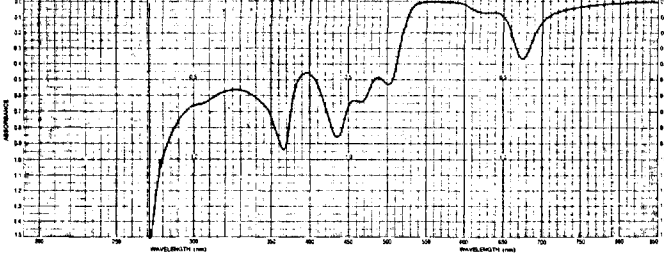


Abb. 58

Mg-enol a in DMA Abb. 54	Mg-enol a in DMA + 1 Tropfen Base + LiClO ₄ Abb. 55	Mg-enol a in DMA + 1 Tropfen Base + LiClO ₄ Abb. 56	Mg-enol a in DMA + 1 Tropfen Base + Mg(ClO ₄) ₂ Abb. 57	Mg-enol a in DMA + 1 Tropfen Base + Cd(ClO ₄) ₂ Abb. 58
688(30'500 max)	693(9'400 max)	680(22'200 max)	676(25'000 max)	675(28'500 max)
640(10'100 sh)	668(4'600 min)	650(3'500 min)	640(4'500 min)	637(5'400 min)
	645(5'800 max)	628(4'600 max)	625(5'000 max)	626(5'500 max)
	600(800 min)	590(0 min)	590(800 sh)	590(800 sh)
		580(100 max)		
472(41'500 max)	537(60'500 max)	560(0 min)	550(200 min)	551(300 min)
	508(33'400 sh)	515(49'400 max)	504(36'200 max)	501(40'900 max)
461(37'500 min)	470(26'200 min)	494(35'500 min)	489(33'200 min)	488(37'500 min)
	454(27'000 sh)	476(40'000 max)	465(41'700 max)	466(49'400 max)
440(57'850 max)	428(35'000 max)	459(35'000 min)	438(40'900 min)	457(48'600 min)
432(57'200 sh)	400(32'400 min)	430(41'700 max)	437(55'700 max)	435(66'400 max)
388(33'300 min)	370(46'000 sh)	400(32'000 min)	396(31'000 min)	398(35'500 min)
362(63'300 max)	358(46'500 max)	366(62'500 max)	366(68'000 max)	366(72'000 max)

In Dimethylacetamid wurden die Enolchelate mit Lithium, Magnesium und Cadmium spektroskopisch untersucht. 0,458 mg Mg-enol a (33) wurden in 50 ml Dimethylacetamid (c=1, 34·10⁻⁵Mol/l) gelöst. Die Lösungen wurden jeweils in der Drybox direkt in der UV-Küvette (~3 ml) mit einem grossen Überschuss festem Metallsalz sowie einem Tropfen der 40%-igen Tetrabutylammoniumhydroxyd-Lösung *33) versetzt.

Diese Spektren wurden auf dem Gerät PE 402 aufgenommen.

Die Farbe des Phasentestproduktes ist rötlich, während die Enolchelate dieser drei Metalle gelb gefärbt sind. Beim Öffnen der UV-Küvetten an der Luft wurden die Lösungen zeitlich in folgender Reihenfolge farblos: Enolat > Li-Komplex > Mg-Komplex ~ Cd-Komplex. Die primären Folgeprodukte sind nicht die klassischen, blaugrünen Allomere.

Die Verschiebung der charakteristischen Enolatbande (537 nm) durch Komplexbildung mit Li^+ (515 nm), Mg^{++} (504 nm) und Cd^{++} (501 nm) stimmen mit den Erfahrungen überein, welche beim metallfreien Enol a (5) gewonnen wurden (vgl. Kap. 2. 1. 5.).

Bestrahlungsversuche (Die UV-Küvetten wurden in der Drybox gefüllt)

Versuchsordnung: Entgaste Lösungen wurden in einer Fluoreszenzküvette im Probenraum des Spektrometers (Cary 17) von der Seite mit monochromatischem Licht bestrahlt. Gleichzeitig wurde das Absorptionsspektrum registriert.

- a) Mg-enol a (33) gelöst in Tetrahydrofuran ($c=10^{-5}$ Mol/l) zeigte keine Aenderung im UV/VIS-Spektrum über die ganze Spektralbreite des Hg-Lichtes *121)
- b) Mg-enol a (33) gelöst in Dimethylacetamid ($c=1,36 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) mit einem grossen Ueberschuss von $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ und $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{ClO}_4^-$ *122) (es bildete sich nur eine Spur Cd-Enol-Komplex, Schulter bei 501 nm): keine Aenderung unter Belichtung bei 366 nm (Hg-Linie).
- c) Mg-enol a (33) gelöst in Dimethylacetamid/Methylenchlorid 1:1 ($c=1,42 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) mit einem grossen Ueberschuss von $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ und $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{ClO}_4^-$ (es bildete sich wiederum nur eine Spur Cd-enol-Komplex): keine Aenderung unter Belichtung bei 366 nm.
- d) Mg-enol a (33) in Dimethylacetamid ($c=10^{-5}$ Mol/l)
Zugabe von festem 1,2-Dinitrobenzol oder 1,3-Dinitrobenzol *123) (grosser Ueberschuss).
Die Lösungen waren im Dunkeln stabil. Die Bestrahlung während einer Minute mit intensivem weissem Licht führte sofort zu einer vollständigen Allomerisierung.
- e) Mg-enol a (33) in Methylenchlorid ($c=10^{-5}$ Mol/l)
Zugabe von festem 1,2-Dinitrobenzol oder 1,3-Dinitrobenzol (grosser Ueberschuss)
Die Lösungen waren auch nach der Belichtung mit demselben Licht während zwei Minuten unverändert.

Bis jetzt wurde noch kein System (Lösungsmittel + Akzeptor) gefunden, welches eine lichtinduzierte, reversible Ausbleichung des Absorptionsspektrum ermöglichte.

*121) Hg-Licht: Quecksilberdampflampe + Monochromator (Bausch + Lomb)

*122) Tetrabutylammoniumperchlorat: Probe von J. L. Luisier

Kommentare zu den physikalischen und chemischen Eigenschaften von Mg-enol a (33)

Aus der Elementaranalyse und auch aus dem NMR-Spektrum geht hervor, dass die blauschwarz glänzenden Kristalle von Mg-enol a (33) 2 Moläquivalente Tetrahydrofuran enthalten.

Im IR-Spektrum (KBr und THF) tritt wie bei allen untersuchten metallfreien Enolen die Carbonylschwingung des enolisierten β -Diketonsystems bei 1660 cm^{-1} (THF) bzw. 1652 cm^{-1} (KBr) auf. Streckschwingungsbanden einer Ketoform wurden nicht beobachtet.

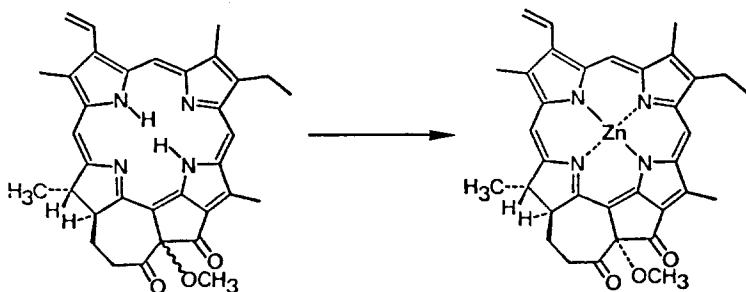
Die NMR-Spektren entsprachen vollständig den Erwartungen. In Dioxan- d_8 erscheint das Signal des Enol-Protons als scharfes Singlett bei 13,18 ppm, während das Signal in DMF- d_7 bei 13,4 breit auftritt. In diesen beiden Lösungsmitteln konnten die Signale der Protonen 4, 7, 7', 7'' und 8 nicht aufgefunden werden. Sie liegen aber mit grosser Wahrscheinlichkeit unter denen der Lösungsmittel und der Methylgruppen. Es wurden keine Verunreinigungen festgestellt.

Die UV/VIS-Spektren von Mg-enol a (33) gleichen sehr stark denen des metallfreien Enol a (5). Die Rotbande ist in Methylenchlorid und Benzol nicht verschoben, in Pyridin nur wenig hypsochrom (4 nm) bez. Enol a (5). In der Soretregion beobachtet man jedoch eine bathochrome Verschiebung um ca. 10 nm, während das kurzwelligste Maximum um 360 nm praktisch am selben Ort bleibt. Die bathochrome Verschiebung der Soretregion durch den Magnesiumeinbau wird auch bei den Phäophorbiden beobachtet. Zu bemerken ist auch, dass die Rotbande vom Mg-enol a (33) je nach Lösungsmittel mehr oder weniger asymmetrisch ausgebildet ist. Normalerweise ist die Bande auf der bathochromen Seite etwas steiler. Ein Spektrum in Tetrahydrofuran bei RT und -60°C zeigte in dem Bereich interessante Effekte. Bei -60°C kehrte die Asymmetrie der Rotbande um, d. h. der steilere Abfall trat auf der hypsochromen Seite auf, wobei das Maximum um 4,2 nm hypsochrom verschoben wurde. Ausserdem sind die übrigen Absorptionsbanden deutlicher voneinander getrennt und weisen höhere Extinktionskoeffizienten als bei RT auf.

Das CD-Spektrum konnte auf diesem Gerät (Cary 60) nur zwischen 280 und 500 nm aufgenommen werden. Interessant wäre eine Aufnahme im Bereich der Rotbande. Sämtliche Aufnahmen wurden unter striktem Sauerstoffausschluss (Drybox: O_2 -Gehalt $\leq 5\text{ ppm}$) hergestellt!

2.7. ZINKKOMPLEXE

2.7.1. "Zink-10-methoxy-diketon a" (34)



(7) MG 546,68

(34) MG 610,03

82 mg (0,15 mMol) 10-Methoxy-diketon a (7) *123) wurden in 26 ml Methylenchlorid gelöst und mit 26 ml Methanol versetzt. Dazu gab man 316 mg (1,20 mMol) Zinkacetylacetonat *124) und rührte während 45 Minuten bei RT unter Lichtausschluss. Der Verlauf der Reaktion wurde im DC verfolgt. Nachdem neben dem grünen Produktfleck nur noch ein sehr schwacher Eduktfleck feststellbar war, goss man die Lösung auf 200 ml gesättigte Kochsalzlösung und extrahierte das Reaktionsprodukt mit 250 ml Benzol. Die organische Phase wurde einmal mit 200 ml halbkonzentrierter Kochsalzlösung und dann mit 500 ml Wasser gewaschen. Man filtrierte durch Watte und entfernte das Lösungsmittel am RV. Da im DC neben Produkt- und Eduktfleck ein kleiner Startfleck festgestellt wurde, war eine Reinigung nötig.

Chromatographie: 14 g Kieselgel, Säule: 15 x 190 mm, aufgezogen und eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff/Aceton/Methanol/N-Aethyl-diisopropylamin 88, 7:10:1:0, 3. Das Substanzgemisch wurde in wenig Methylenchlorid gelöst und aufgetragen.

Man eluierte zuerst das Edukt (7) und nach unbedeutenden Mischfraktionen das blau-grüne Produkt (34). Die nach DC einheitlichen Fraktionen wurden vereinigt, und das Lösungsmittel am RV entfernt. Kristallisiert wurde aus Methylenchlorid und Methanol/Wasser 96:4 (ca. 80 ml). Es wurde eine Ausbeute von 57 mg DC-reinem, blau-grünem, epimerem Zinkkomplex (34) erreicht (=62% bez. 10-Methoxy-diketon a (7)).

*123) DC-reines, kristallines Material; Epimerengemisch, 1 Tag bei RT am HV getrocknet.

*124) Zinkacetylacetonat: Fluka AG; puriss

Zur Charakterisierung wurde die Substanz viermal auf die oben beschriebene Weise umkristallisiert und 2 Tage bei RT am HV (0,01 Torr) getrocknet.

$C_{34}H_{32}N_4O_3Zn$ ber. C 65,02 H 5,46 N 8,92
 +1 H_2O gef. C 65,40 H 5,56 N 9,03

Smp. höher als 340°C

DC Rf=0,16 (Cellulose, Hexan/Aceton/Propanol 100:10:0,45)
 (Methyl-pyrophosphorbid a (3): Rf=0,49)

DC Rf=0,19 (Kieselgel, Tetrachlorkohlenstoff/Aceton 9:1)
 (Methyl-pyrophosphorbid a (3): Rf=0,34)

IR (cm^{-1}) $CHCl_3$ $c \approx 5\%$
 3690w, 3670w, 3625w, 3090w, 3020w, 3005w, 2965w,
 2930w, 2915w, 2870w, 2825w, 1715s, 1686s, 1628m,
 1588w, 1557s, 1535m, 1494w, 1465w, 1451w, 1445w,
 1436w, 1427w, 1393w, 1379w, 1360w, 1343w, 1330w,
 1306w, 1294m, 1262w, 1199w, 1177m, 1143w, 1129w,
 1113w, 1098w, 1079m, 1070m, 1058w, 1045w, 1021w,
 1000w, 987w, 974w, 956w, 950w, 920m, 892w, 865w,
 836w, 829w, 810w, 660w.

NMR (ppm) $CDCl_3$ 0,04 molar in Normalzelle

ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen		ppm	Zuordnung + Anzahl Protonen	
	beob.	theor.		beob.	theor.
1,32	J=7,5Hz	? t/3H 4'	4,3	3,3	m/1H 7
2,21	J=7,5Hz	3,3 d/3H 8'	4,6		m/1H 8
2,53	6,2	s/3H 10-MeO m/4H 7' 7''	5,88	2,1	dd/1H 2'
2,6			5,90		dd/1H 2''
3,03	J=7,5Hz	5,6	7,50	1,4	dd/1H 2
3,26	s/3H 5		8,31		2,0 \leftrightarrow s/2H $\alpha \delta$
3,37	3,2	s/3H 3	8,85	1,0	s/1H β
3,62	3,2	s/3H 1			

UV/VIS (nm) C_6H_6 0,345 mg in 100 ml Benzol, $c=0,5656 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
 658,3(79'460), 611,8(10'110), 567,1(4'190), 520,7(3'540),
 484,1(1'110), 428,6(111'890), 410,0(66'300),
 379,2(31'280), 324,9(18'020).

UV/VIS (nm) CH_2Cl_2 0,322 mg in 100 ml CH_2Cl_2 , $c=0,5278 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
 656,2(71'330), 608,6(11'080), 553,4(4'570), 512,6(4'340),
 480,0(1'910), 426,1(90'750), 406,8(74'380), 373,0(37'120),
 327,0(19'690).

MS (m/e) 400°C	610(5%/M ⁺), 580(16%), 579(10%), 578(21%), 577(12%), 576(17%), 568(12%), 567(10%), 566(39%), 565(14%), 564(23%), 563(11%), 562(18%), 561(10%), 560(14%), 552(13%), 551(10%), 550(18%), 549(15%), 548(20%), 547(14%), 546(21%), 542(13%), 541(10%), 540(16%), 539(11%), 538(15%), 537(10%), 536(18%), 526(13%), 525(13%), 524(20%), 523(11%), 522(17%), 521(13%), 520(13%), 519(12%), 518(12%), 517(10%), 508(14%), 219(18%), 185(19%), <u>149(100%)</u> .
----------------	---

Bei der Chromatographie des Zink-Komplexes (34) wurde festgestellt, dass sich in Fraktionen, welche starkem Licht ausgesetzt waren (indirektes Sonnenlicht), ein rotes Nebenprodukt bildete, welches aber nicht weiter untersucht wurde. Es empfiehlt sich deshalb, die Chromatographie vor direktem Licht zu schützen. Kristallines Produkt hingegen ist an der Luft und am Licht stabil. Auch nach der Komplexierung des Epimerengemisches (7) wurden im NMR zwei Produkte gefunden. Zur Charakterisierung kristallisierte man das Produkt insgesamt viermal um und erhielt schlussendlich einen einheitlichen Zink-Komplex, d. h. im NMR wurden nur noch die Signale eines Epimers beobachtet (trans?).

2. 8. REDUKTIONSVERSUCHE AN CARBONYLGRUPPEN VON CHLOROPHYLL-DERIVATEN

2. 8. 1. Versuche mit Borhydrid in wässrigen Detergenslösungen

Es wurde die Frage gestellt, ob es möglich sei, in biologischen Systemen die Keto-carbonylgruppe von Chlorophyll mit einem Borhydrid zu reduzieren, ohne dass eine Enolform angegriffen wird. Deshalb untersuchten wir die Borhydridreduktion von Chlorophyllderivaten in wässrigen Detergenslösungen und besonders die Auswirkungen im Absorptionsspektrum.

Um Angaben über die spektroskopischen Eigenschaften der 9-Desoxo-9-hydroxy-methyl-phäophorbide und deren Zink- und Magnesium-Komplexe zu erhalten, wurde Methyl-phäophorbid a (2) und Zink-methyl-phäophorbid a *125) nach einer bekannten Methode *126) mit Natriumborhydrid in Pyridin/Methanol umgesetzt.

1, 5 mg (2, 5 μ Mol) Methyl-phäophorbid a (2) wurden in 0, 2 ml Pyridin gelöst und mit 1, 0 ml Methanol versetzt. Anschliessend gab man 11, 0 mg (0, 3 mMol) Natriumborhydrid *127) zu und rührte während 10 Minuten bei RT. Das Reaktionsgemisch wurde nun in einen Scheidetrichter überführt, Wasser zugegeben, das Produkt mit Methylchlorid extrahiert, und die organische Phase mehrmals mit Wasser neutral gewaschen. Im DC stellte man das Verschwinden des Eduktflecks und das Auftauchen eines neuen Flecks mit kleinerem Rf-Wert fest. Auch das UV/VIS-Spektrum zeigte vollständigen Umsatz (Rotbande bei 654 nm).

Zink-methyl-phäophorbid a *125) wurde analog ebenfalls quantitativ reduziert.

9-Desoxo-9-hydroxy-methyl-phäophorbid a (Spektrum qualitativ)
UV/VIS (nm) CH₂Cl₂ 654(0, 27), 598(0, 02), 500(0, 08), 398(1, 00).

Zn-9-desoxo-9-hydroxy-methyl-phäophorbid a (Spektrum qualitativ)
UV/VIS (nm) CH₂Cl₂ 633(0, 23), 588(0, 03), 517(0, 03), 414(1, 00).

Durch die Reduktion wurde die Rotbande um 13 bzw. 23 nm hypsochrom verschoben. Beim metallfreien Derivat gehen die beiden kleinen Absorptionsbanden bei 538 und 508 nm durch die Reduktion in eine einzige bei ~ 500 nm über.

Die oben beschriebenen Versuchsbedingungen führten beim Enol a (5) nicht zu einer Reduktion. Nach einer Stunde Reaktionszeit wurden wohl Absorptionsbanden von reduzierten Phäophorbid-Spezies gefunden, der grösste Teil des Enols war jedoch noch intakt. Sehr wahrscheinlich wurde das Enol unter diesen Reaktionsbedingungen (O₂, Methanol/Pyridin) langsam allomerisiert, und die so gebildete Ketoform reduziert.

Diese Versuche zeigten, dass das Absorptionsspektrum ein sehr guter Indikator für den Erfolg der Reduktion darstellt, da die Verschiebungen der Rotbande relativ gross sind.

*125) Vgl. Herstellung bei: J. L. Luisier, Diss ETH (1974)

*126) H. Wolf, H. Scheer, Liebigs Ann. Chem. 745, 87 (1971)

*127) Natriumborhydrid: Fluka AG; purum

Versuche in wässrigen Detergenslösungen

Es wurden folgende Detergentien untersucht: Natriumlaurylsulfat, Tween-80 und Triton X-100 *128). Man versetzte jeweils 5%-ige Lösungen mit einigen μ l konz. Phäophorbidlösung in Methylenchlorid, schüttelte, sodass man UV-Konzentrationen (10^{-5} Mol/l) erhielt. Den Lösungen (3 ml in UV-Küvetten) wurden einige Milligramme Borhydrid zugegeben und die Reaktion direkt im Spektrophotometer beobachtet. Von den untersuchten Borhydriden (Natriumborhydrid, Kaliumborhydrid, Lithiumcyanoborhydrid und Natriumtrimethoxyborhydrid *129) waren nur die beiden ersten aktiv. Die folgenden Versuche wurden deshalb ausschliesslich mit Natriumborhydrid ausgeführt.

- a) Natriumlaurylsulfat: Es wurde mit allen untersuchten Derivaten unter den oben beschriebenen Bedingungen (5% Detergens) keine Reduktion beobachtet. Bei einer Detergengkonzentration von 0,2% gelang es eine langsame Reduktion auszulösen.
- b) Tween 80, Triton X-100: alle Derivate (ausser Enol a (5)) liessen sich in 5%-igen Lösungen innert weniger Minuten reduzieren.

Man fand folgende bathochrome Verschiebungen der Rotbande durch die Reduktion mit Natriumborhydrid:

Edukt	5% Tween 80	5% Triton X-100
Methyl-phäophorbid a (2)	17 nm	16 nm
Methyl-pyrophäophorbid a (3)		16 nm
Zn-methyl-phäophorbid a	31 nm	31 nm
Zn-methyl-pyrophäophorbid a		31 nm
Methyl-pyrochlorophyllid a (29)	32 nm	32 nm

Bei allen diesen Substanzen wurde nach einmaliger Zugabe von Natriumborhydrid eine saubere Reduktion beobachtet, die Anlass zu isosbestischen Punkten im Absorptionsspektrum gab. Signifikant für die Reduktion ist ausserdem die Vergrösserung der Soretbande, während die Rotbande gleich bleibt oder sogar etwas abnimmt. Die Derivate reagierten verschieden schnell. Eine qualitative Abschätzung führte zu folgender Reihe: Metallfreie > Zinkkomplexe > Magnesiumkomplexe. Der Grund, weshalb die Reduktionen in Natriumlaurylsulfat fehlschlugen, ist möglicherweise in der ionischen Struktur dieses Lösungsvermittlers zu suchen. Triton X-100 und Tween 80 sind nicht ionische Polyoxyäthylen-Verbindungen.

-
- *128) Natriumlaurylsulfat: Fluka AG; prakt. 90-93% Aktivsubstanz
 Tween 80: Fluka AG; puriss. für Bakteriologie
 Triton X-100: Fa. Bender + Hohbein, Zürich
 - *129) Kaliumborhydrid: Fluka AG; purum
 Lithiumcyanoborhydrid: Präparat von S. Farooq
 Natriumtrimethoxyborhydrid: Alfa Inorganics Inc., 80%

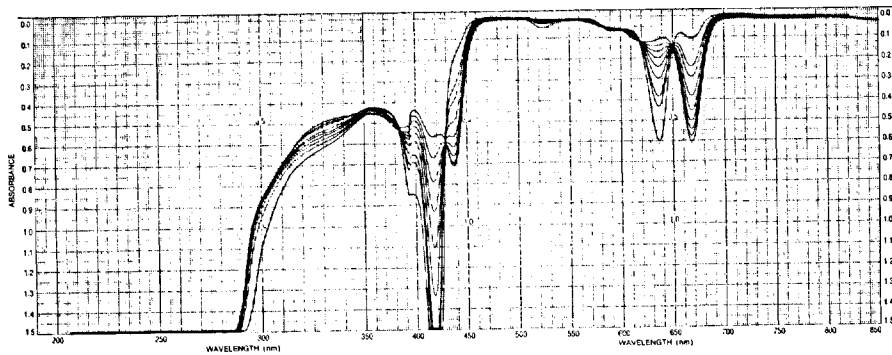


Abb. 59 Methyl-pyrochlorophyllid a (29) + NaBH₄

2. 8. 2. Reduktionsversuche mit Bakteriochlorophyll-Derivaten in organischem Medium

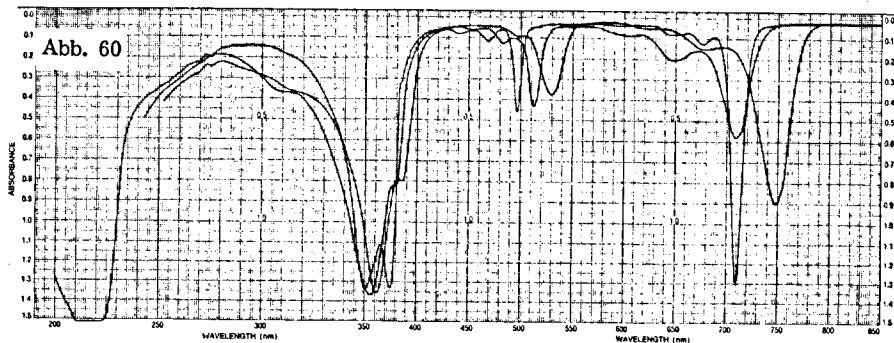
Die untersuchten Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10^{-5} Mol/l (Tetrahydrofuran/Methanol 1:1) direkt in der UV-Küvette mit einigen Körnchen festem Natriumborhydrid versetzt. Man konnte so den Reaktionsverlauf im Spektrophotometer verfolgen.

Bei den Derivaten in der Bakteriochlorophyll-Reihe liegen zwei Ketogruppen vor, die durch Natriumborhydrid prinzipiell reduzierbar sind. Falls die Acetylgruppe in Stellung 2 zuerst reduziert wird, sollte das Spektrum grosse Aehnlichkeit mit jenem von Bakterio-methyl-pyrophäophorbid-dimethylketal aufweisen, welches bei der Herstellung von Bakterio-enol (27) (vgl. Kap. 2. 5. 3.) aufgenommen wurde (Maximum der Rotbande 716 nm).

Man beobachtete nun tatsächlich unter den oben angegebenen Bedingungen primär eine Reduktion der Carbonylgruppe in 2 und sekundär jener in Stellung 9. Die zweite Reduktion verschob die Rotbande nicht mehr weiter, vergrösserte jedoch den ϵ -Wert um ca. einen Faktor 2. Die Absorptionsbanden bei 529 nm wurden bei der zweiten Reduktion um nochmals den selben Betrag wie bei der ersten Reduktion hypsochrom verschoben.

Resultate: Rotbande, Bande bei 529 nm: Hypsochrome Verschiebung

THF/MeOH 1:1	Reduktion in 2 Rotbande, Bande 529		Reduktion in 2 + 9 Bande 752, Bande 529	
Bakterio-methyl-phäophorbid (23)	36	16	35	32
Bakterio-methyl-pyrophäophorbid (24)	38	16	38	32
Bakterio-enol (27)	45	-	-	-



Wie erwartet wurde die Rotbande von Bakterio-enol (27) durch die Reduktion um 45 nm verschoben. Die selbe Verschiebung wurde festgestellt, wenn man Bakterio-enol (27) mit dem Enol-dimethylketal verglich, welches bei der Synthese von (27) als Zwischenprodukt auftrat (vgl. Kap. 2. 5. 3.).

2.9. VERSUCHE ZUR ENTALLOMERISIERUNG

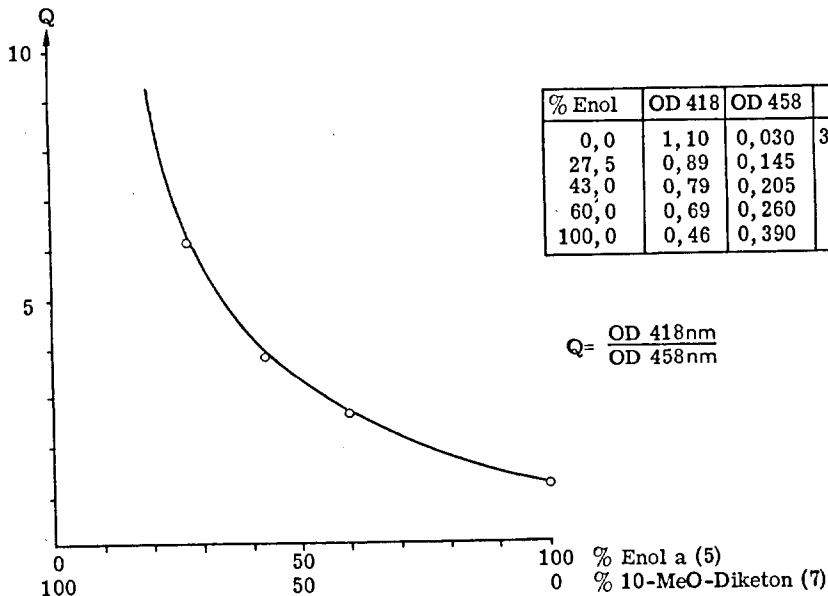
Bei Versuchen, Magnesium in 10-Methoxy-diketon a (7) einzubauen, wurde neben dem gewünschten Mg-diketon auch Mg-Enol a (33) festgestellt.

Standardbedingungen: 10,9 mg (0,02 mMol) 10-Methoxy-diketon a (7) (Epimerengemisch) wurden in 0,5 ml abs. Lösungsmittel gelöst (Reaktionsgefäß: vgl. Abb. 39). Man erwärmte auf ca. 50°C und gab unter Argon 1,0 ml eines 0,2 molaren Magnesiumreagens *95) oder Lithiumreagens *130) zu. Nach Ablauf der gewählten Reaktionszeit wurde das Gemisch in einem Scheidetrichter mit 50 ml Aether, 25 ml Phosphatpuffer (pH~4,5) und 25 ml Wasser geschüttelt. Die wässrige Phase wurde abgetrennt, die organische Phase mit 1 N-Salzsäure dekomplexiert, anschliessend mit Wasser neutral gewaschen und zur Trockene eingengt.

Die Bestimmung des Mg-enol/Mg-10-methoxy-diketon-Verhältnisses war ungünstig, da Mg-enol a (33) sehr leicht allomerisiert wird und demzufolge das Ergebnis mehr oder weniger verfälschte.

Zur groben Abschätzung des Gehaltes von Enol a (5) wurden UV/VIS-Spektren des metallfreien Gemisches in Methylenchlorid aufgenommen. Man bildete den Quotienten der optischen Dichten (OD) bei 418 und 458 nm und las das zugehörige Edukt/Produkt-Verhältnis in der Eichkurve ab.

Eichkurve



Man stellte eine Stammlösung von Enol a (5) ($c=0,787 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) und von 10-Methoxy-diketon a (7) ($c=1,045 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) her. Man gab bestimmte Volumen dieser Lösungen zusammen und rechnet den Quotienten der optischen Dichten der Absorptionsbanden bei 418 nm (Soretbande des Eduktes (7)) und 458 nm (charakteristische Enolbande) aus. Diese Werte sind korrekt unter der Annahme, dass im Bereich der optischen Dichten zwischen 0,5 und 1,5 die Konzentrationseffekte auf die Lage und die Extinktionskoeffizienten vernachlässigbar klein sind.

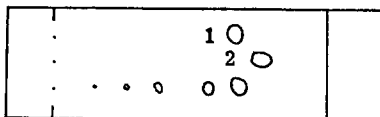
Resultate:

Lösungsmittel	Ueberschuss Reagens	Temp.	Reaktionszeit	Resultat
CHCl ₃	5-fach	RT	6 Min	kein Mg-Einbau
CHCl ₃	5-fach	50°C	5 Min	unvollständiger Einbau
CHCl ₃	10-fach	45°C	6 Min	unvollständiger Einbau
CHCl ₃	10-fach	50°C	20 Min	vollst. Einbau 45% Enol a
CHCl ₃	10-fach	50°C	60 Min	vollst. Einbau 45% Enol a
Thiophen	10-fach	50°C	20 Min	vollst. Einbau 45% Enol a
THF	10-fach	50°C	20 Min	kein Mg-Einbau, kein Enol a

Bei einem 0,4 mMol-Ansatz (CHCl₃, 20 Minuten, 50°C, 10-facher Ueberschuss Reagens) wurden 55% Enol a (5) gemessen. Es gelang nun, in Benzol aus dem metallfreien Gemisch nach Zugabe von einigen Impfkristallen, etwas kristallines, DC- und UV/VIS-reines Enol a (5) zu erhalten. Ein NMR-Spektrum des rohen Gemisches zeigte bei 13,01 ppm das typische Enol-OH-Signal.

Die Bildung von Enol a (5) aus 10-Methoxy-diketon a (7) wurde ebenfalls bei der Verwendung des Lithiumsalzes von BHT beobachtet. Im Gegensatz zu den Reaktionen mit dem Magnesiumreagens, wo nach der Reaktion nur Enol a (5) und 10-Methoxydiketon a (7) beobachtet wurde, entstanden mit dem Lithiumreagens Enol a (5) und Nebenprodukte mit kleineren Rf-Werten als das Diketon (7), welches völlig verschwunden war.

Skizze des DC



(Cellulose, Hexan/Aceton ~ 10:2)

- 1: Enol a (5) (grün)
- 2: 10-Methoxy-diketon a (7) (grau)

*130) Das Lithiumsalz von BHT wurde analog dem Magnesiumreagens hergestellt. An Stelle der Grignardlösung wurde Butyllithium in Hexan (1,27 molar) zu einem Ueberschuss BHT in Methylenchlorid gegeben, sodass eine 0,2 molare Reagenslösung entstand

Lösungsmittel	Ueberschuss Reagens	Temperatur	Reaktions- zeit	Resultat
CHCl ₃	10-fach	RT	6 Min	Spur Enol a (5)
CHCl ₃	10-fach	45-50°C	5 Min	Spur Enol a (5)
CHCl ₃	10-fach	45-50°C	20 Min	40-52% Enol a (5)
CHCl ₃	10-fach	45-50°C	60 Min	40% Enol a (5)

Bemerkungen zu den Reaktionen

- a) Nur unter Bedingungen, welche den Einbau von Magnesium in 10-Methoxy-diketon a (7) ermöglichen, wurde die Bildung von Enol beobachtet.
- b) Bei keinem Versuch wurde mehr als 55% Enol a (5) gefunden.
- c) Mit dem Magnesiumreagens entstand primär neben dem Mg-enol a (33) Mg-10-methoxy-diketon a, während mit dem Lithiumreagens auch unter den mildesten Bedingungen kein 10-Methoxy-diketon a (7) mehr feststellbar war.
- d) Die Ausbeuten an spektroskopisch identifiziertem und mengenmässig erfasstem Enol a (5) variieren unter gleichen Bedingungen ziemlich stark (45-55%).
- e) Man kann vermuten, dass BHT durch das chinoide Zwischenprodukt oxidiert wird.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) J. Priestley, Phil. Trans. Roy. Soc. London 62, 147 (1772)
- 2) F. Pelletier, J. B. Caventou, Ann. Chim. Phys. |2| 9, 194 (1818)
- 3) J. Berzelius, Ann. Chem. 27, 296 (1838)
- 4) F. Verdeil, J. Prakt. Chem. 33, 478 (1844)
- 5) G. G. Stokes, Ann. Physik |2| 4, 220 (1854); Proc. Roy. Soc. 13, 144 (1864); J. Chem. Soc. 17, 304 (1864)
- 6) M. Nencki, J. Zaleski, Ber. deutsch. chem. Ges. 34, 997 (1901)
- 7) M. Nencki, L. Marchlewski, Ber. deutsch. chem. Ges. 34, 1687 (1901)
- 8) R. Willstätter, A. Stoll, "Untersuchungen über Chlorophyll", Springer Verlag Berlin (1913)
- 9) H. Fischer, A. Stern, "Die Chemie des Pyrrols", Bd. 2/II, Akad. Verlagsges. Leipzig (1940)
- 10) M. Strell, A. Kalojanoff, H. Koller, Angew. Chem. 72, 169 (1960)
- 11) R. B. Woodward, Angew. Chem. 72, 651 (1960)
- 12) H. H. Inhoffen, P. Jäger, R. Mähle, Liebigs Ann. Chem. 749, 109 (1971)
- 13) J. W. K. Burrell, L. M. Jackmann, B. C. L. Weedon, Proc. chem. Soc., 263 (1959)
- 14) H. Fischer, H. Orth, "Die Chemie des Pyrrols", Bd. 1, Akad. Verlagsges. Leipzig (1934)
- 15) R. Emerson, C. M. Lewis, Am. J. Botany 30, 165 (1943)
- 16) L. N. M. Duysens, Proc. 3rd. Intern. Congr. Photobiol., Copenhagen (1960), p. 135, Elsevier, Amsterdam (1961)
- 17) B. Ke, Biochim. Biophys. Acta Bioenergetic Reviews 401, 1 (1973)
- 18) B. Kok, Biochim. Biophys. Acta 22, 399 (1956)
- 19) B. Kok, Biochim. Biophys. Acta 48, 527 (1961)
- 20) T. Hyama, B. Ke, Biochim. Biophys. Acta 267, 160 (1972)
- 21) B. Commoner, J. J. Heise, J. Townsend, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 42, 710 (1956)
- 22) B. Commoner, J. J. Heise, B. B. Lippincott, R. E. Norbert, J. V. Passonneau, J. Townsend, Science 126, 57 (1957)
- 23) H. Beinert, B. Kok, G. Hoch, Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 209 (1962)
- 24) J. T. Warden, J. R. Bolten, J. Amer. chem. Soc. 94, 4351 (1972)
- 25) K. D. Philipson, V. L. Sato, K. Sauer, Biochemistry 11, 4591 (1972)
- 26) H. Y. Yamamoto, L. P. Vernon, Biochemistry 8, 4131 (1969)
- 27) T. Ogawa, L. P. Vernon, Biochim. Biophys. Acta 180, 334 (1969)
- 28) P. V. Sane, R. B. Park, Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 206 (1970)

- 29) R. Malkin, A. J. Bearden, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 294 (1973)
- 30) Y. Inoue, T. Ogawa, K. Shibata, Biochim. Biophys. Acta 305, 483 (1973)
- 31) D. B. Knaff, R. Malkin, Arch. Biochem. Biophys. 159, 555 (1973)
- 32) J. R. Norris, R. A. Uphaus, H. L. Crespi, J. J. Katz, Proc. Natl. Sci. USA 68, 625 (1971)
- 33) W. L. Butler, Arch. Biochem. Biophys. 93, 413 (1961)
- 34) S. S. Brody, M. Brody, Arch. Biochem. Biophys. 110, 583 (1965)
- 35) E. C. Weaver, Biochim. Biophys. Acta 162, 286 (1968)
- 36) G. Döring, J. L. Bailey, W. Kreutz, J. Weikard, H. T. Witt, Naturwissenschaften 55, 219 (1968)
- 37) S-I. Tu, J. H. Wang, Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 79 (1969)
- 38) D. C. Borg, J. Fajer, R. H. Felton, D. Dolphin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 813 (1970)
- 39) K. Ballschmiter, J. J. Katz, Nature 220, 1231 (1968)
- 40) M. S. Fischer, D. H. Templeton, A. Zalkin, M. Calvin, J. Amer. chem. Soc. 94, 3613 (1972)
- 41) J. R. Harbour, G. Tollin, Photochem. Photobiol. 19, 69 (1974)
- 42) C. E. Strouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 325 (1974)
- 43) K. Ballschmiter, J. J. Katz, J. Amer. chem. Soc. 91, 2661 (1969)
- 44) J. F. Becker, N. E. Geacintov, F. Van Nostrand, R. Van Metter, Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 597 (1973)
- 45) J. J. Katz, R. C. Dougherty, L. J. Boucher in L. P. Vernon and G. R. Seely, "The Chlorophylls", p. 185, Acad. Press. New York and London (1966)
- 46) J. J. Katz, Naturwissenschaften 60, 32 (1973)
- 47) E. G. McRae, M. Kasha, J. chem. Phys. 28, 721 (1958)
- 48) J. J. Katz, K. Ballschmiter, M. Garcia-Morin, H. H. Strain, R. A. Uphaus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 100 (1968)
- 49) M. Garcia-Morin, R. A. Uphaus, J. R. Norris, J. J. Katz, J. Phys. Chem. 73, 1066 (1969)
- 50) J. J. Katz, T. R. Janson, A. G. Kostka, R. A. Uphaus, G. L. Closs, J. Amer. chem. Soc. 94, 2883 (1972)
- 51) J. R. Norris, M. E. Druyan, J. J. Katz, J. Amer. chem. Soc. 95, 1680 (1973)
- 52) M. E. Druyan, J. R. Norris, J. J. Katz, J. Amer. chem. Soc. 95, 1682 (1973)
- 53) D. I. Arnon, Science 149, 1460 (1965)
- 54) Y. Yamada, D. Milkovic, P. Wehrli, B. Golding, P. Löliger, R. Keese, K. Müller, A. Eschenmoser, Angew. Chem. 81, 301 (1969)
- 55) E. Walter, Diss. ETH, noch nicht erschienen
- 56) H. Fischer, S. Goebel, Liebigs Ann. Chem. 522, 168 (1936)

- 57) R. C. Dougherty, H. H. Strain, J. J. Katz, J. Amer. chem. Soc. 87, 104 (1965)
- 58) J. J. Katz, R. C. Dougherty, L. J. Boucher in L. P. Vernon and G. R. Seely, "The Chlorophylls", p. 247, Acad. Press. New York and London (1966)
- 59) P. H. Hynninen, Acta chem. scand. 27, 1487 (1973)
- 60) J. J. Katz, G. D. Norman, W. A. Svec, H. H. Strain, J. Amer. chem. Soc. 90, 6841 (1968)
- 61) H. Wolf, H. Brockmann jr., H. Biere, H. H. Inhoffen, Liebigs Ann. Chem. 704, 208 (1967)
- 62) G. Hoornaert, Arbeitsbericht ETH (1970)
- 63) H. Falk, Arbeitsbericht ETH (1971)
- 64) J. L. Luisier, Diss. ETH, erscheint demnächst
- 65) G. W. Kenner, S. W. McCombie, K. M. Smith, J. chem. Soc. Perkin I, 2517 (1973)
- 66) H. H. Inhoffen, P. Jäger, R. Mählpf, C. D. Mengle, Liebigs Ann. Chem. 704, 188 (1967)
- 67) H. Fischer, J. Hasenkamp, Liebigs Ann. Chem. 519, 42 (1935)
- 68) R. Willstätter, L. Forsén, Liebigs Ann. Chem. 396, 180 (1913)
- 69) H. Fischer, G. Spiegelberger, Liebigs Ann. Chem. 510, 156 (1934)
- 70) H. Fischer, S. Goebel, Liebigs Ann. Chem. 524, 269 (1936)
- 71) H. Fischer, G. Spiegelberger, Liebigs Ann. Chem. 515, 130 (1935)
- 72) E. Schneider, Z. physiol. Chem. 226, 221 (1934)
- 73) H. Fischer, R. Lambrecht, H. Mittenzwei, Z. physiol. Chem. 253, 1 (1938)
- 74) P. E. Wei, A. H. Corwin, R. Arellano, J. org. Chemistry 27, 3344 (1962)
- 75) A. H. Corwin, P. E. Wei, J. org. Chemistry 27, 4285 (1962)
- 76) J. Fuhrhop, Habilitationsschrift TH Braunschweig (1969)
- 77) A. D. Adler, F. R. Longo, F. Kampas, J. Kim, J. Inorg. Nucl. Chem. 32, 2443 (1970)
- 78) F. C. Pennington, H. H. Strain, W. A. Svec, J. J. Katz, J. Amer. chem. Soc. 86, 1418 (1964)
- 79) H. Fischer, H. Orth, "Die Chemie des Pyrrols", Bd. 2/I+II, Akad. Verlags-ges. Leipzig (1940)
- 80) H. Fischer, M. Dürr, Liebigs Ann. Chem. 501, 107 (1933)
- 81) S. Granick, J. biol. Chemistry 175, 333 (1948)
- 82) J. E. Falk, "Porphyrins and Metalloporphyrins", Elsevier Pub. Comp. (1964)
- 83) S. J. Baum, B. F. Burnham, R. A. Plane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52, 1439 (1964)
- 84) J. W. Buchler, G. Eikelmann, L. Puppe, K. Rohbock, H. H. Schneehage, D. Weck, Liebigs Ann. Chem. 745, 135 (1971)

- 85) K. Smith, Arbeitsbericht ETH (1972)
- 86) I. D. Jones, L. S. Butler, E. Gibbs, R. C. White, J. Chromatogr. 70, 87, 206 (1972)
- 87) Privatmitteilung von Prof. J. D. Dunitz und C. Kratky
- 88) E. Zass, Diss. ETH, noch nicht erschienen
- 89) B. Jaun, Diss. ETH, noch nicht erschienen
- 90) L. P. Vernon and G. R. Seely, "The Chlorophylls" p. 88 (1966)
- 91) A. Syldatk, Diss. TH Braunschweig (1974), Seite 77
- 92) F. Thönen, Diss. ETH, noch nicht erschienen

Seite Leer /
Blank leaf

LEBENS LAUF

Am 15. März 1947 wurde ich als Sohn von Karl Heinz und Ruth Isenring-Dubno in Zürich geboren. Nach dem Besuch der Primar- und Sekundarschule meines Geburtsortes trat ich in die Oberrealschule Zürich ein, wo ich 1966 die Maturitätsprüfung (Typus C) ablegte. Im November des selben Jahres immatrikulierte ich mich an der Abteilung für Naturwissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich. Im Herbst 1970 erwarb ich das Diplom. Anschliessend arbeitete ich am organisch-chemischen Institut der ETH unter der Leitung von Prof. Dr. A. Eschenmoser an der vorliegenden Promotionsarbeit.

Zürich, September 1974

Hans Peter Isenring

Seite Leer /
Blank leaf