

Anorganisch-chemisches Institut der Technischen Universität München

Racemisierung und dynamische kinetische Racematspaltung
von
Aminosäurederivaten und sekundären Alkoholen

Daniel Alexander Schichl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Beller, Universität Rostock

2. Univ.-Prof. Dr. O. Nuyken

Die Dissertation wurde am 17.04.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 14.5.2001 angenommen.

Daniel Alexander Schichl

**Racemisierung und dynamische kinetische
Racematspaltung von Aminosäurederivaten
und sekundären Alkoholen**



Technische Universität München

2001

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von März 1998 bis April 2001 am Anorganisch-chemischen Institut der Technischen Universität München und am Institut für Organische Katalyseforschung an der Universität Rostock e.V.

Besonderer Dank gebührt meinem sehr verehrten Lehrer

Herrn Prof. Dr. Matthias Beller

für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, sein großes Interesse am Gelingen der Arbeit und die vielfältigen wissenschaftlichen und persönlichen Freiheiten, die er mir zuteil werden ließ.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn *Dr. Martin Hateley* für die gemeinsame Zeit in Rostock und die hervorragende Zusammenarbeit bedanken, die trotz getrennter Arbeitsplätze nicht besser hätte sein können.

Mein Dank gilt ferner:

meinen Laborkollegen aus den Tagen in München, *Dr. Gabrielle Raudaschl-Siebers* und *Dr. Horst Schneider* und meinen Laborkollegen *Dr. Gene Stark*, *Dr. Wolfgang Mägerlein*, *Dipl.-Chem. Andreas Ehrentraut*, *Dr. Andreas Krotz* und Frau *Monika Heyken* für das freundschaftliche und exzellente Arbeitsklima in Labor.

meinen Arbeitskreiskollegen aus Münchner Zeiten, Frau *Dipl.-Chem. Dr. C. Breindl* und den Herren *Dipl.-Chem Dr. M. Eckert*, *Dr. J. Krauter*, *Dr. T. Riermeier*, *Dr. H. Trauthwein*, *Dr. F. Vollmüller* und *Dr. B. Zimmermann* für die stete Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre im Arbeitskreis.

meinen Arbeitskreiskollegen aus Rostocker Zeiten, den Damen *Dipl.-Chem Dr. K. Junge*, *Dr. I. Rietz*, und *U. Sundermeyer* sowie den Herren *Dipl.-Chem. D. Gördes*, *C. Hartung*, *Dr. R. Jackstell*, *A. Jakobi von Wangelin*, *Dr. H. Junge*, *H. Klein*, *G. Mehlretter*, *Dr. H. Neumann*, *Dr. M. Gomez*, *M. Sundermeyer*, *Dr. A. Zapf*, sowie allen weiteren Kollegen aus der Tutorgruppe Beller in Rostock für die angenehme Atmosphäre im Arbeitskreis und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Herrn *Dipl.-Ing. J. Bindernagel* (IfOK Rostock) für seine Hilfsbereitschaft bei computertechnischen Fragen.

Den Damen *Chem.-Ing. K. Kortus*, *Dr. C. Fischer*, *S. Buchholz* und *K. Mevius* (alle IfOK Rostock) für die Entwicklung und Durchführung zahlreicher Gas- und Flüssigkeitschromatographischer Messungen.

Frau *Chem.-Ing. H. Baudisch* (IfOK Rostock) für die Aufnahme vieler Massenspektren.

Frau *B. Harzfeld* und *Dr. W. Baumann* (beide IfOK Rostock) für die Durchführung zahlreicher NMR-Experimente.

Herrn *K. Schwemin* (IfOK Rostock) für die handwerkliche Hilfe beim Aufbau des neuen Labors.

Den Damen *I. Schmidt, H.-M. Schmidt, M. Verchow und B. Zenk* (alle IfOK Rostock) für die gewährte Unterstützung in bürokratischen Angelegenheiten.

Herrn Dipl.-Chem. *Dr. Wolfgang Mägerlein* für die gemeinsame Zeit in Rostock.

Abstract in Deutsch

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Gewinnung enantiomerenreiner Aminosäuren und sekundärer Alkohole nach dem Konzept der dynamischen kinetischen Racematspaltung durchgeführt. In Studien zur DKR von Aminosäureestern wurden signifikante Verbesserungen einer literaturbekannten Methode ausgearbeitet. Wesentliche Punkte sind hier die Verwendung gut zugänglicher Esterderivate von Aminosäuren und die Reduzierung und Strukturvereinfachung des Racemisierungskatalysators.

Den thematischen Schwerpunkt der Arbeit bildeten grundlegende Studien zur Entwicklung einer neuen katalytischen Racemisierungsmethode von *N*-Acylaminosäuren mit Hilfe von Übergangsmetallkatalysatoren.

Abschließend wurden Untersuchungen zur dynamischen kinetischen Racematspaltung von sekundären Alkoholen am Beispiel von 1-Phenylethanol durchgeführt. Ausgangspunkt waren Untersuchungen zur Racemisierungsaktivität eines neuen Katalysators, der schnelle Racemisierung bei gleichzeitig milden Reaktionsbedingungen ermöglicht. Es gelang, die neue Racemisierungsmethode in einer dynamischen kinetischen Racematspaltung von 1-Phenylethanol erfolgreich anzuwenden.

Abstract in english

In the following thesis studies towards the synthesis of optical pure amino acids and secondary alcohols via dynamic kinetic resolution are described. In the field of the DKR of amino acid esters significant improvements of the literature-known method could be archived. The main topics are the use of simplified amino acid esters as substrates and the reduction and structural simplification of the racemisation catalyst.

The major goal of the work were fundamental studies for the development of a new catalytic racemisation method for *N*-acyl amino acids with transition metal catalysts.

Finally studies of the dynamic kinetic resolution of 1-phenyl ethanol were done. In the beginning studies of the racemisation activity of a new racemisation catalyst, which allows fast racemisation under mild reaction conditions were undertaken. In the case of 1-phenyl ethanol the successful application of the new racemisation method could be shown.

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
acac	Acetylacetonat
Ala	Alanin
Äquiv.	Äquivalente
Ar.	Aryl
Asp	Asparaginsäure
br.	breit
Bu	Butyl
Bz	Benzoyl
Bzl	Benzyl
CAL	<i>Candida antarctica</i> Lipase
CI	Chemische Ionisation
cod	1,5-Cyclooctadien
Cy	Cyclohexyl
d	Dublett
dba	Dibenzylidenaceton
dd	Dublett von Dubletts
de	diastereomeric excess
DKR	Dynamische kinetische Racematspaltung
dt	Dublett von Tripletts
dppb	1,4-Bis(diphenylphosphino)butan
dppe	1,2- Bis(diphenylphosphino)ethan
ee	enantiomeric excess
EI	Elektronenstoß-Ionisation
Et	Ethyl
FAB	fast atom bombardment
GC	Gaschromatographie
gef.	gefunden
HPLC	high pressure liquid chromatography
<i>i</i>	iso
IR	Infrarotspektroskopie
Kat.	Katalysator

KR	Klassische Racematspaltung
L	Ligand
Leu	Leucin
LM	Lösungsmittel
m	Multiplett
M	Metall
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
Met	Methionin
MS	Massenspektroskopie
MTBE	<i>Tert.</i> -Butylmethylether
N	Nor (Aminosäurenomenklatur) / Normal
nbd	Norbornadien
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
PCL	<i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase
PFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Lipase
Phg	Phenylglycin
PS	<i>Pseudomonas species</i>
Ph	Phenyl
Phe	Phenylalanin
Phenac	Phenylacetyl
Pr	Propyl
Pro	Prolin
q	Quartett
R	Organischer Rest
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
t	Triplett
<i>tert.</i>	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluoressigsäure
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	DIE DYNAMISCHE KINETISCHE RACEMATSPALTUNG.....	4
2.1	Allgemeines	4
2.2	Die dynamische kinetische Racematspaltung	5
2.3	Kinetische Betrachtungen	6
3	ENTWICKLUNGEN AUF DEM GEBIET DER DYNAMISCHEN KINETISCHEN RACEMATSPALTUNG.....	12
3.1	Vorbemerkung	12
3.2	Enzymatische DKR-Reaktionen	13
3.2.1	Carbonsäuren.....	13
3.2.2	Aminosäuren.....	17
3.3	DKR-Reaktionen mit enantiomerdifferenzierenden Metall-katalysatoren	21
3.3.1	Vorbemerkung	21
3.3.2	DKR von sekundären Grignardreagenzien und Analogem.....	21
3.3.3	β -Ketoester	23
3.3.4	Weitere Beiträge	25
3.4	DKR-Reaktionen mit Enzym-Metallkombinationen	26
3.4.1	Vorbemerkung	26
3.4.2	Optisch aktive Amine.....	26
3.4.3	Optisch aktive Alkohole.....	27
4	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER DIPLOMARBEIT.....	31
4.1	Thema und Zielsetzung der Arbeit	31
4.2	Ergebnisse der Diplomarbeit	33
5	ZIELSETZUNG UND PLANUNG DER ARBEIT.....	36
6	DIE DYNAMISCHE KINETISCHE RACEMATSPALTUNG VON AMINOSÄUREESTERN.....	37
6.1	Allgemeine Betrachtungen	37
6.2	Praktische Ergebnisse	38
6.2.1	Erste Ergebnisse.....	38
6.2.2	Evaluierung kritischer Versuchsparameter	40
6.2.3	Reaktionen in Acetonitril/Wasser 1/1	42
6.2.4	Aufarbeitungsversuche.....	44
6.2.5	Weitere Optimierung der Reaktion	46
6.2.6	Simultane Beobachtung der zeitlichen Entwicklung der Enantiomerenverhältnisse der beteiligten Verbindungen	48
6.2.7	Neue Untersuchungen zur Racemisierung von Aminosäureestern	50
6.2.8	Synthese und Charakterisierung von Schiff'schen Basen.....	55
6.2.9	Eine weitere Anwendung der Aldehyd-katalysierten Racemisierung von Aminosäureestern ?....	59

7	ARBEITEN ZUR DYNAMISCHEN KINETISCHEN RACEMATSPALTUNG VON <i>N</i>-ACYLAMINOSÄUREN.....	65
7.1	Hintergrund.....	65
7.2	Motivation	66
7.3	Racemisierungsreaktionen von <i>N</i>-Acylaminosäuren	68
7.3.1	Die Wahl der Modellreaktion	68
7.3.2	Ergebnis des ersten Screenings	69
7.3.3	Racemisierungen bei erhöhter Reaktionstemperatur	70
7.3.4	Der Einfluß von Triphenylphosphan auf die Katalysatoraktivität.....	74
7.3.5	Untersuchungen zur Eignung alternativer Phosphanverbindungen.....	76
7.3.6	Variationen der Rhodiumkatalysatoren	79
7.3.7	Alternative Lösungsmittel	81
7.3.8	Erweiterung der Anwendung der Racemisierungsmethode auf andere Acylderivate von Phenylalanin.....	83
7.3.9	Erweiterung der Racemisierung auf andere <i>N</i> -Acetyl-aminosäuren	84
7.3.10	Neue Arbeiten zur Racemisierung von <i>N</i> -Acylaminosäuren in alternativen Lösungsmitteln	87
	Untersuchungen zur Kombination des Racemisierungsschrittes mit enzymatischer Racematspaltung.....	92
7.3.11	Die Palladium-katalysierte Racemisierung von <i>N</i> -Acylaminosäuren.....	98
7.3.12	Eine mögliche Racemisierung von Peptiden ?.....	111
7.3.13	Racemisierung anderer Verbindungen	116
7.3.14	Untersuchungen zum Mechanismus der Racemisierung von <i>N</i> -Acyl-aminosäuren.....	122
8	DIE DYNAMISCHE KINETISCHE RACEMATSPALTUNG VON SEKUNDÄREN ALKOHOLEN.....	127
8.1	Kenntnisstand	127
8.2	Motivation	127
8.3	Erste Ergebnisse.....	129
8.4	Arbeiten zur dynamischen kinetischen Racematspaltung	132
9	ZUSAMMENFASSUNG	139
10	EXPERIMENTELLER TEIL	146
10.1	Allgemeine Arbeitstechnik und Charakterisierung	146
10.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	149
10.2.1	Arbeitsvorschriften zum Themengebiet: DKR von Aminosäureestern	149
10.2.2	Enzymatisch dargestellte Verbindungen	153
10.2.3	Andere Verbindungen	157
10.2.4	Arbeitsvorschriften zum Themengebiet: Racemisierung von <i>N</i> -Acyl-aminosäuren	171
10.2.5	Dargestellte Verbindungen.....	172
10.2.6	Arbeitsvorschriften zum Themengebiet: Dynamische kinetische Racematspaltung von sekundären Alkoholen.....	198
10.2.7	Dargestellte und charakterisierte Verbindungen	198
11	LITERATURVERZEICHNIS.....	205

1 Einleitung

Die Synthese von optisch aktiven Verbindungen ist ein Gebiet mit einer mehr als hundertfünfzig-jährigen Geschichte. Im Jahr 1848 gelang Louis Pasteur die erste Trennung einer racemischen Verbindung in die jeweiligen Enantiomere.^[1] Im weiteren entwickelte er mit der Diastereomerentrennung^[2] und der Fermentation^[3] zwei grundlegende Methoden zur Enantiomerenseparation, die auch in heutiger Zeit noch immer einen bedeutenden Stellenwert bei industriell praktizierten Racematspaltungen einnehmen.

Vor wenigen Jahrzehnten war eine Trendwende bei der Synthese von optisch aktiven Verbindungen zu verzeichnen, die bis zu diesem Zeitpunkt häufig in racemischer Form dargestellt wurden. Die Ursache liegt im wachsenden Bewußtsein, daß jedes Enantiomer einer chiralen Verbindung unterschiedliche biologische Aktivität aufweisen kann.^[4]

Biologisch wirksame Substanzen wie Pestizide oder Pharmaka besitzen zumeist mindestens ein asymmetrisches Zentrum. Die Aktivität der Wirkstoffe beruht hauptsächlich auf chiraler Erkennung im Zielorganismus. Deshalb ist häufig nur eines der beiden (oder mehreren) Isomere für die gewünschte biologische Aktivität verantwortlich, andere Isomere verhalten sich im günstigsten Fall indifferent.^[5] Um die Effektivität von biologisch wirksamen Substanzen bzgl. selektiver Wirkung und Dosierung zu steigern, ist es ein erklärtes Ziel, das (eine) relevante, aktive Isomer zu identifizieren und in optisch reiner Form einzusetzen.^[6]

Damit erklärt sich das große Interesse an Verfahren und chemischen Synthesemethoden, die es erlauben, optisch reine Produkte zu gewinnen.^[7]

Die relevanten Methoden zur Darstellung von Substanzen in enantiomerenreiner Form sind Fermentation, chemische Modifikation von Verbindungen des „chiralen Pools“ sowie die asymmetrische Synthese.^[8]

Erst die asymmetrische Synthese ermöglichte das gezielte Erzeugen von Chiralitätszentren, die aus prochiralen^[9] oder *meso*-Verbindungen^[10] durch entsprechende Syntheseoperationen meist unter Mithilfe eines chiralen Auxiliars generiert werden. Besondere Bedeutung kommt allen Verfahren zu, die einen unterstöchiometrischen (und damit katalytischen) Einsatz des chiralen Hilfsreagenzes ermöglichen.^[11] Neben den seit Jahrzehnten entwickelten und sehr erfolgreichen Chemokatalyse spielt auch die Biokatalyse^[12] durch eine immer größer werdende Anzahl an preiswerten und einfach einzusetzenden Enzymen wie z.B. Hydrolasen eine immer größer werdende Rolle bei stereoselektiven Umsetzungen.

Bei den Racematspaltungen ist die Diastereomerenkristallisation ein seit langem erfolgreiches und in unzähligen Anwendungen praktiziertes Verfahren zur Enantiomerentrennung. Vor allem in der industriellen Darstellung optisch aktiver Verbindungen wird sie als eines der Standardverfahren verwendet.^[8] Grundlage der Trennung der Enantiomere ist die stöchiometrische Reaktion des Racemates mit einer chiralen und optisch reinen Säure oder Base. Die Enantiomere werden dadurch in ein Diastereomerenpaar mit unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften der einzelnen Diastereomere überführt, welche zur Trennung derselben ausgenutzt werden können.

Häufig erfolgt die Enantiomerentrennung durch diastereoselektive Kristallisation. Die maximale theoretische Ausbeute an enantiomerenreinem Produkt liegt hier wie bei allen klassischen Racematspaltungen bei 50 %, in der Praxis werden bei Diastereomerenkristallisationen jedoch häufig nur Ausbeuten um die 40 % bei einem d_e -Wert von > 95 % erreicht. Um dieses Verfahren dennoch wirtschaftlich praktizieren zu können, ist es von fundamentaler Bedeutung, sowohl das verbleibende Enantiomer schonend und verlustfrei zu racemisieren (optimalerweise *in-situ* während der Reaktion) und dem Prozeß wieder zuzuführen, als auch das chirale Hilfsreagenz möglichst quantitativ und ohne Minderung der Enantiomerenreinheit wiederzugewinnen.

Ein zweites wichtiges Verfahren zur Racematspaltung ist die kinetische Racematspaltung (Abbildung 1).

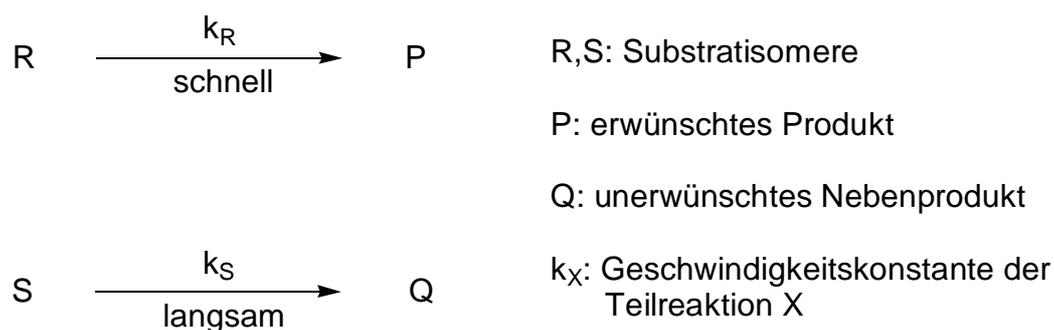


Abbildung 1: Teilreaktionen einer kinetische Racematspaltung.

Hierbei werden beide Isomere R und S in die korrespondierenden Produkte P und Q überführt. Eine kinetische Racematspaltung liegt vor, falls die Geschwindigkeitskonstanten beider Teilreaktionen sich deutlich voneinander unterscheiden. Die Reaktion wird sich circa bei der 50 % Umsatzmarke deutlich verlangsamen, da das schneller reagierende Enantiomer R nahezu verbraucht ist. Als Produkte werden im Idealfall P und das unveränderte Enantiomer S

erhalten. Ermöglicht werden Reaktionen dieser Art durch chirale Katalysatoren, in der Hauptsache handelt es sich um Enzyme, jedoch sind auch Racematspaltungen mit chiralen Katalysatoren auf chemischer Basis bekannt. Ein Nachteil des Verfahrens ist auch hier die maximal 50 %-ige Ausbeute an enantiomerenreinem Produkt. Ferner bereitet die Produktisolierung Probleme, vor allem, wenn einfache Trennoperationen wie Destillation oder Extraktion nicht angewendet werden können. Häufig stellt sich auch das Problem der Wieder- bzw. Weiterverwertung des verbleibenden nicht erwünschten Enantiomers. Daher ist häufig ein Racemisierungsschritt notwendig, der sich nur selten einfach und nebenreaktionsfrei bewerkstelligen läßt.^[75] Weiterhin nachteilig ist die Tatsache, daß die optische Reinheit des Produktes vom Umsatz der Racematspaltung abhängig ist, je weiter fortgeschritten die Reaktion, desto niedriger ist der ee-Wert des Produktes.

Aufgrund der Probleme „klassischer“ Racematspaltungen gibt es besonderes Interesse bessere Konzepte zur Darstellung enantiomerenreiner Produkte zu entwickeln. Ein wesentliches Ziel ist es, Racematspaltungen mit quantitativer Umsetzung zu dem Zielenantiomer durchzuführen.^[13] Eines dieser Verfahren, die dynamische kinetische Racematspaltung (DKR), ist ein relativ neues Konzept, das sich seit seiner Entdeckung^[17] durch eine immer größere Anzahl an Anwendungsmöglichkeiten zu einem attraktiven Verfahren entwickelt hat. Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit war es, neue und bedeutende Substanzklassen wie *N*-Acylaminosäuren auf ihre Eignung zur Darstellung nach diesem Verfahren zu überprüfen und bereits bestehende Methoden auf den Gebieten der Aminosäureester und sekundären Alkoholen effizienter zu gestalten.

2 Die dynamische kinetische Racematspaltung

2.1 Allgemeines

Wie bereits im Vorfeld angesprochen, nimmt die dynamische kinetische Racematspaltung einen immer größer werdenden Anteil unter den Deracemisierungsreaktionen ein, deren Prinzip in Abbildung 2 veranschaulicht wird.

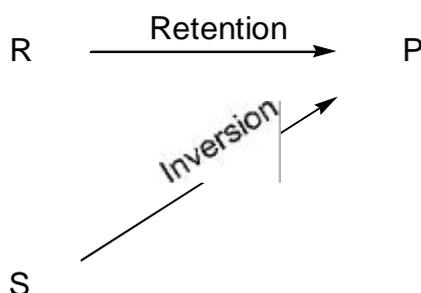


Abbildung 2: Prinzip der Deracemisierung.

Voraussetzung für Deracemisierungsreaktionen sind zwei voneinander unabhängige Reaktionsschritte vom racemischen Edukt zum Produkt P, die streng enantiomer-differenzierend auf jeweils ein Enantiomer angewendet werden. Eine der Transformationen muß unter Retention der Konfiguration, die ergänzende Transformation entsprechend unter Inversion der Orientierung verlaufen. Somit wird die Möglichkeit eröffnet, stöchiometrische Umwandlungen eines Racemates in ein enantiomerenreines Produkt zu erreichen.

Die auf den ersten Blick etwas abstrakt und simpel wirkende Darstellung des Prinzips der Deracemisierung täuscht über die tatsächliche Schwierigkeit zur Verwirklichung solcher Prozesse in chemischen Reaktionen hinweg. Dennoch führen viele Arbeiten^[14,15] mit teilweise sehr eleganten und phantasievollen Strategien eindrucksvoll vor Augen, daß es sich bei Deracemisierungen nicht nur um einen zu Papier gebrachten Wunsch nach effizienter und atomökologischer EPC-(*enantiomeric pure compound*)-Synthese handelt.

Ein Beispiel für Deracemisierungsreaktionen ist die dynamische kinetische Racematspaltung, welche im folgenden genauer erläutert wird.

2.2 Die dynamische kinetische Racematspaltung

Die eingangs erwähnten größten Nachteile der klassischen Racematspaltung, zum einen die maximal halbstöchiometrische Ausbeute, zum anderen das Weiterverarbeitungsproblem des unerwünschten Enantiomers, das überwiegend „reracemisiert“ wird, legen den Gedanken nahe, diese beiden notwendigen Schritte in einem neuen, dem der klassischen Racematspaltung überlegenem Verfahren zu vereinigen (Abbildung 3).

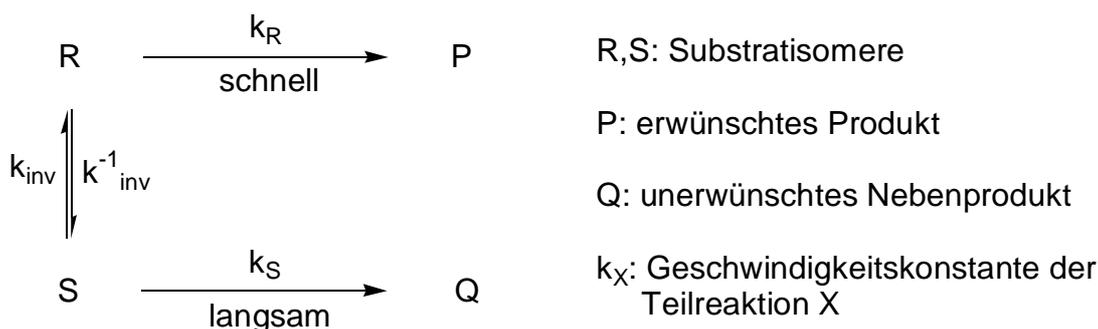


Abbildung 3: Prinzip der dynamischen kinetischen Racematspaltung.

Zunächst kommen bei der dynamischen kinetischen Racematspaltung einige aus der klassischen Racematspaltung bekannte Elemente zu tragen. Wie bereits bekannt werden die Enantiomere R und S mit Hilfe eines enantiomerdifferenzierenden Schrittes in das gewünschte Produkt P und das Nebenprodukt Q (ebenfalls zueinander enantiomer) transformiert. Die prinzipiell parallel ablaufenden Umsetzungen der beiden Enantiomere finden jedoch abhängig von der Enantiomerdifferenzierung des chiralen Katalysators mit unterschiedlicher Geschwindigkeit (z.B. $k_S > k_R$) statt, so daß diese Diskriminierung insgesamt zu einer schnelleren Bildung von P im Vergleich zu Q führt. Je höher die Fähigkeit des Katalysators ist, selektiv ein Enantiomer umzusetzen ($k_S \gg k_R$), desto besser ist das Ergebnis der Racematspaltung. Im optimalen Fall ($k_R = 0$) läßt sich Produkt P mit 50 %-iger Ausbeute und 100 % ee isolieren. Dabei wird sich die Reaktion mit fortschreitendem Umsatz zunehmend verlangsamen bis schließlich Umsatzstillstand bei exakt 50 % erreicht wird, da das reaktive Enantiomer komplett verbraucht worden ist.

Bei der dynamischen kinetischen Racematspaltung findet zusätzlich zur eigentlichen Umsetzung eine spontane Epimerisierung der Enantiomere S und R statt. Die beiden Enantiomere sind in der Lage, sich ineinander umzuwandeln, was einer Racemisierung gleichkommt. Je ausgeprägter die Umwandlung der beiden Enantiomere ist, desto größer ist

die Geschwindigkeit (k_{inv} , k_{inv}^{-1}), mit der sich die einzelnen Enantiomere ineinander umwandeln.

Ist die Epimerisierung der Edukt-enantiomere möglich, so wandelt sich sowohl S als auch R mit gleicher Wahrscheinlichkeit in S bzw. R um, insgesamt wird demnach das Enantiomer R vollständig in das bei der Umsetzung reaktive Enantiomer S umgewandelt, welches fortlaufend der Epimerisierung durch Produktbildung entzogen wird. Mit diesem zusätzlichen Racemisierungsschritt lassen sich folglich Racemate quantitativ in enantiomerenreine Produkte überführen.

2.3 Kinetische Betrachtungen

Es sei an dieser Stelle angemerkt, daß aufgrund der Komplexität eine genaue mathematische Lösung der sich ergebenden Ratengleichungen nicht sinnvoll erscheint, dennoch geben einige grundlegende Aussagen und Begriffsdefinitionen wertvolle Kriterien zur Charakterisierung von Racematspaltungen.

Die qualitative Analyse der klassischen Racematspaltung zeigt, daß es sich aus kinetischer Sicht um eine einfache Parallelreaktion handelt (siehe Abbildung 1). Die Geschwindigkeitskonstanten k_R und k_S (k_R =: schnelle Reaktion, k_S =: langsame Reaktion) charakterisieren im wesentlichen den Prozeß. Als Maß für die Güte der Racematspaltung ist die dimensionslose Kenngröße E („enantiomeric ratio“) definiert, die aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten gebildet wird und ebenfalls konstant für den kompletten Reaktionsverlauf ist.

$$E = \frac{k_R}{k_S}$$

Je höher der nominelle Wert von E , desto größer ist die Selektivität des Katalysators, die die Qualität der Racematspaltung, gemessen an der optischen Güte des Produktes, festlegt.

Bei der dynamischen kinetischen Racematspaltung (Abbildung 3) sind die beiden Parallelreaktionen der Edukte R und S mit Epimerisierungsreaktionen gekoppelt, es handelt sich also um eine Kombination aus Parallel- und Folgereaktionen. Die Ratengleichungen für die zeitabhängige Konzentrationsänderung der Edukte R und S sind im folgenden dargestellt:

$$-\frac{d[S]}{dt} = (k_S + k_{inv})[S] - k_{inv}[R]$$
$$-\frac{d[R]}{dt} = (k_R + k_{inv})[R] - k_{inv}[S]$$

Mit den Definitionsgleichungen für den Enantiomerenüberschuß von Produkt und Edukt läßt sich die zeitabhängige Entwicklung der optischen Reinheit der relevanten Komponenten abschätzen:

$$ee_R = \frac{R-S}{R+S} \quad ; \quad \text{damit} \quad ee_R(t) = \frac{R(t)-S(t)}{R(t)+S(t)}$$
$$ee_P = \frac{P-Q}{P+Q} \quad ; \quad \text{damit} \quad ee_P(t) = \frac{P(t)-Q(t)}{P(t)+Q(t)}$$

Die Enantiomerenüberschußwerte für Edukt und Produkt lassen sich ebenfalls mit der Definitionsgleichung für den Umsatz in Beziehung bringen.

$$U(t) = \frac{P(t)+Q(t)}{R(t=0)+S(t=0)}$$

In Abbildung 4 ist ein Vergleich der umsatzabhängigen Entwicklung der Enantiomerenzusammensetzungen für Edukt und Produkt für die klassische Racematspaltung ($ee(R)$ KR bzw. $ee(P)$ KR) und die dynamisch kinetische Racematspaltung ($ee(P)$ DKR) gegeben. Bei der Berechnung der Graphen wurde ein E-Wert von 10 festgelegt.

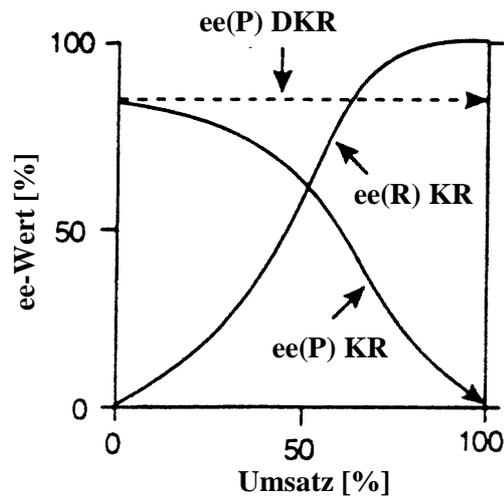


Abbildung 4: Vergleich der ee-Wert-Entwicklung aller Komponenten bei klassischer und dynamisch kinetischer Racematspaltung.

Zu Beginn der klassischen Racematspaltung wird das Produkt in ca. 83 % optischer Reinheit gebildet, mit steigendem Umsatz fällt der ee-Wert des Produktes jedoch zunehmend, bis er bei 50 %-igem Umsatz einen Wert von ca. 68 % ee erreicht. Grundsätzlich ist der E-Wert der Reaktion zwar konstant, jedoch sinkt mit fortschreitender Reaktion die Konzentration an R und damit die Produktbildungsgeschwindigkeit $P(t)$. Aus diesem Grund gewinnt mit steigendem Umsatz $Q(t)$ die Nebenproduktbildung immer mehr an Bedeutung, was zu der beschriebenen Abnahme von $ee(P)$ KR führt.

Hier wird eine weitere Schwäche des Verfahrens deutlich, die in der kontraproduktiven Beziehung des Produkt-ee-Wertes mit dem Umsatz zu finden ist. Um ein Produkt mit einem geforderten Mindest-ee-Wert zu erhalten, muß die Reaktion spätestens an einer festgelegten Umsatzmarke abgebrochen werden, andernfalls fällt die optische Reinheit des Produktes unter den Grenzwert.

Zwischen halbstöchiometrischem und quantitativem Umsatz fällt die optische Reinheit des Produktes von 68 % auf 0 %, das zu Anfang vorliegende Racemat wurde vollständig zum racemischen Produkt umgesetzt.

Im Falle der dynamischen kinetischen Racematspaltung beträgt der ee-Wert des Produktes zu Reaktionsanfang wie bei der klassischen Variante ca. 83 %. Die Konzentrationsverringerung von P (steigendes $ee(P)$ KR) während des weiteren Reaktionsverlaufes würde auch hier zu einem Sinken der optischen Produktreinheit führen, die Isomerisierung der Eduktenantimere

R und S führt jedoch zu einer Nachbildung des schneller abreagierenden Eduktes R aus S, so daß unter idealen Bedingungen ($k_{\text{inv}} = \infty$) die Eduktzusammensetzung während der gesamten Reaktionsdauer gleich bleibt. Damit ist zum einen die bereits angesprochene quantitative Überführung racemischer Ausgangsstoffe in optisch reine Produkte möglich, zum anderen ist die optische Reinheit des Produktes nicht wie im klassischen Fall vom Umsatz abhängig, sondern entkoppelt. Folglich bleibt $ee(\text{P})$ DKR während der Gesamtreaktion konstant (Abbildung 4) und ist nur von E abhängig.

Ist die Inversionsgeschwindigkeit k_{inv} der Edukte nicht beliebig schnell im Vergleich zu k_{R} bzw. k_{S} , so nimmt sie entscheidenden Einfluß auf $ee(\text{p})$ DKR.

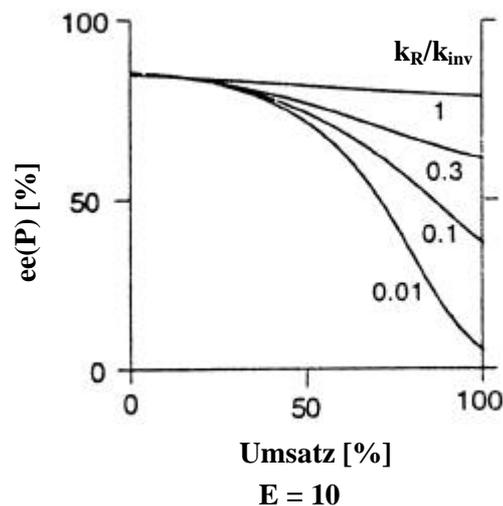


Abbildung 5: Abhängigkeit der optischen Reinheit des Produktes von der relativen Inversionsgeschwindigkeit in dynamischen kinetischen Racematspaltungen.

Am bereits diskutierten Fallbeispiel der dynamischen kinetischen Racematspaltung zeigt nun Abbildung 5 die eintretende Situation bei relativ geringen Inversionsgeschwindigkeiten k_{inv} . Die optische Reinheit $ee(\text{P})$ wird für den Fall $k_{\text{R}}/k_{\text{inv}} = 1$ kaum beeinflusst, da für die Gesamtreaktionsdauer immer noch eine ausreichende Konzentration an R im System erzeugt wird. Sinkt die Inversionsgeschwindigkeit jedoch unter die Umsetzungsgeschwindigkeit von R, so verliert die Reaktion zunehmend ihren dynamischen Charakter und der Kurvenverlauf für $ee(\text{p})$ DKR gleicht sich dem für den klassischen Fall der Racematspaltung an (Abbildung 4).

Für die erfolgreiche Durchführung von DKR-Reaktionen ist also die Racemisierungsgeschwindigkeit als einer der entscheidenden Faktoren anzusehen, eine Maximierung dieser Größe hat demnach bei allen derartigen Reaktionen eine hohe Priorität.

Für Fälle, in denen die Substratracemisierung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Reaktionsfolge akzeptiert werden muß, ist die erfolgreiche Durchführung der Reaktionen maßgeblich von der Selektivität des Katalysators abhängig (Abbildung 6).

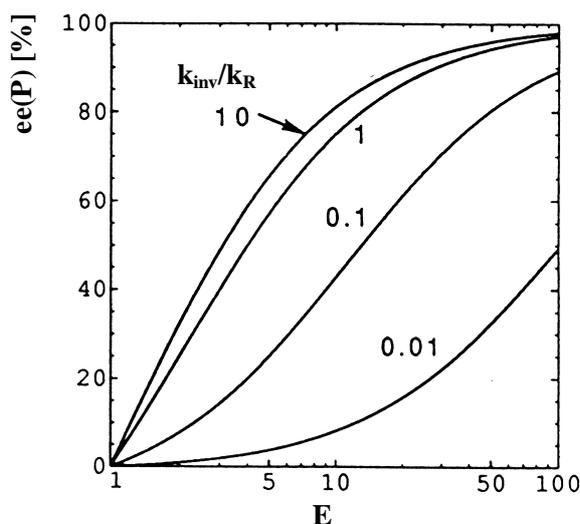


Abbildung 6: Einfluß der Selektivität E auf die Produktreinheit bei kritischen $k_{\text{inv}}/k_{\text{R}}$ Verhältnissen.

Für ein gegebenes E fällt zunächst auf, daß ab einem Verhältnis von $k_{\text{inv}}/k_{\text{R}} = 1$ (hier 1 und 10) die optische Reinheit von P nur noch unwesentlich durch eine Erhöhung der Inversionsgeschwindigkeit positiv beeinflusst werden kann, die Selektivität E ist in diesem Fall als wichtigste Größe zur Prozeßverbesserung anzusehen.

Bei einem Verhältnis $k_{\text{inv}}/k_{\text{R}} = 0.1$ kann trotz dieser ausgesprochen ungünstigen Voraussetzungen eine optische Reinheit des Produktes von über 80 % ee erhalten werden, sofern eine Selektivität E der Umsetzung von mindestens 100 realisierbar ist.

Die angestellten Betrachtungen lassen die Formulierung einiger Richtlinien zu, die bei der erfolgreichen Durchführung von dynamischen kinetischen Racematspaltungen beachtet werden sollten:

- Um Umsetzungen mit hoher Selektivität zu erhalten, sollte der Racematspaltungsschritt irreversibel verlaufen.
- Die Selektivität E der Reaktion sollte mindestens den Wert 20 betragen, damit möglichst enantiomerenreine Produkte erhalten werden.
- Die Racemisierungsgeschwindigkeit k_{inv} muß mindestens der Umsetzungsgeschwindigkeit k_R des schneller reagierenden Enantiomers entsprechen, alternativ ist bei geringerem k_{inv} eine sehr hohe Selektivität anzustreben.
- Bei Reaktionen mit geringer Selektivität ($E < 20$) ist eine vergleichsweise hohe Racemisierungsgeschwindigkeit ($k_{inv}/k_R > 10$) notwendig.
- Nebenreaktionen der Edukte, sowie Produktracemisierung müssen ausgeschlossen werden.

3 Entwicklungen auf dem Gebiet der dynamischen kinetischen Racematspaltung

3.1 Vorbemerkung

Seit der Entdeckung der dynamischen kinetischen Racematspaltung,^[17] die ein große Chance zur Verfahrensverbesserung bei einer Vielzahl von Synthesen enantiomerenreiner Verbindungen offeriert, ist folgender Trend beobachtbar:

In den ersten, wegbereitenden Arbeiten beschreiben Autoren dynamische kinetische Racematspaltungen, die mit Verbindungen durchgeführt werden, die entweder bekanntermaßen racemisierungsanfällig sind (z.B. Hydantoine^[37], Oxazolone^[35]) oder durch kleine Änderungen der Reaktionsführung von einer klassischen in die dynamische Variante wechseln (z.B. Thioester^[18]). So ist es nicht verwunderlich, daß auch im folgenden Überblick Reaktionen mit Racemisierungsmechanismen auf der Basis einfacher reversibler Protonierungs- und Deprotonierungsreaktionen bzw. Bildungs- und Zerfallsgleichgewichte vorherrschen. Die aktuelle Entwicklung auf diesem Sektor repräsentiert dagegen eher den Wunsch einer generell systematischeren Vorgehensweise mit dem Ziel, die Bedeutung der DKR abschätzen zu können. Entscheidend dabei ist nicht die Entwicklung der stereoselektiven Umsetzungsschritte, hier kann man primär auf die gewonnenen Erkenntnisse der asymmetrischen und enzymatischen Synthese in den letzten Jahrzehnten bauen, sondern die Bewältigung der folgenden ungewöhnlichen Aufgabe:

Welche konfigurativ stabilen funktionellen Gruppen lassen sich auf bekannte oder noch unbekannte Weise schonend und effektiv racemisieren, so daß sie sich *in-situ* mit einem vormals klassischen Racematspaltungsschritt kombinieren lassen ?

Belegbar ist diese Tendenz durch die Arbeiten von Chen^[68], Bäckvall^[64] usw., die bei ihren Arbeiten sich an deutlich schwieriger zu racemisierende Substanzen (sek. Alkohole, Aminosäureester) als Edukte verwenden.

Es ist voraussehbar, daß die Entwicklung von neuen Racemisierungsverfahren für eine möglichst große Anzahl an chiralen Verbindungen die Attraktivität des Konzeptes der dynamischen kinetischen Reaktionsführung bei zukünftigen Prozeßentwicklungen erhöht.

3.2 Enzymatische DKR-Reaktionen

3.2.1 Carbonsäuren

Als eines der ersten Beispiele für eine dynamische kinetische Racematspaltung unter Einbezug enzymatischer Methoden gilt die Synthese von „Ketorolac“¹, einer pharmakologisch wichtigen Verbindung, die entzündungshemmende und schmerzstillende Eigenschaften^[16] aufweist (Abbildung 7).

Die elektronenziehenden Gruppen in Verbindung **1** verursachen eine vergleichsweise hohe Acidität des Wasserstoffatoms am Chiralitätszentrum, wodurch eine leichte Enolisierbarkeit und damit Racemisierung der Verbindung unter basischen Bedingungen (pH 9.7) möglich ist.

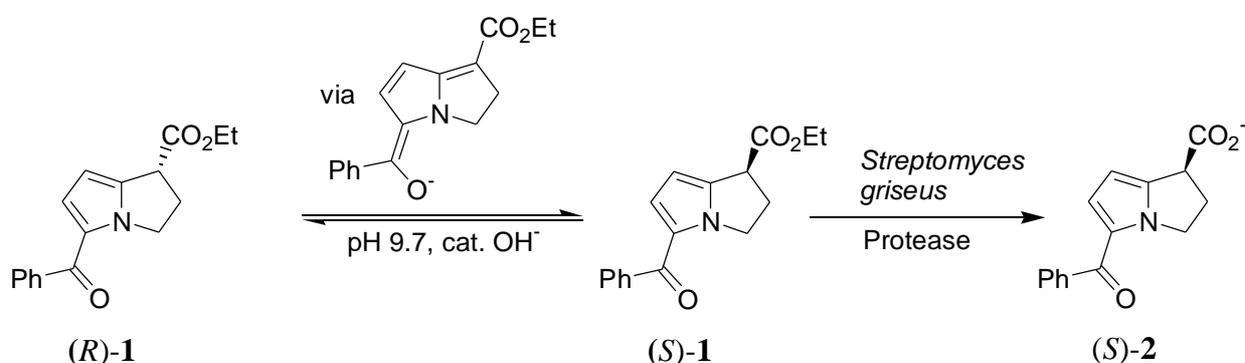
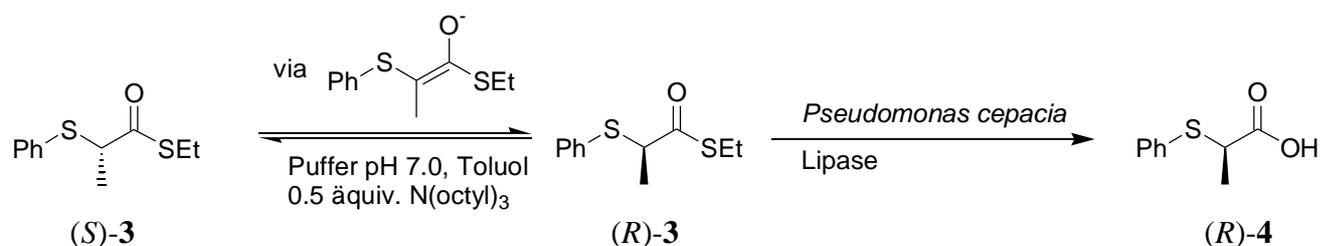


Abbildung 7: Ketorolac-Synthese nach Fülling und Sih^[17].

Die nach der enzymatischen Hydrolyse vorliegende deprotonierte Säure ist bezüglich des Racemisierungsmechanismus konfigurationsstabil und auf diese Weise mit 92 % Ausbeute und 85 % ee erhältlich. Durch einmaliges Umkristallisieren ist die enantiomerenreine Verbindung **2** zugänglich.

Das Konzept der Racemisierung über einen Enolisierungsmechanismus wurde auch von Drucekhammer et al.^[18,19] bei der dynamischen kinetischen Racematspaltung einiger Thioesterderivate angewandt.

¹ 5-Benzoyl-1,2-dihydro-3H-pyrrolo[1,2-a]pyrrol-1-carbonsäure.

Abbildung 8: DKR von (R,S) -2-(Phenylthio)-propionsäurethioethylester.

100 %, 96 % ee

Im hier skizzierten Zweiphasenprozeß (Toluol/wässr. Pufferlösung) wird die schnelle hydroxidionenvermittelte Racemisierung von **3** durch Zusatz von 50 mol% Trioctylamin ermöglicht, welche mit literaturbekannten klassischen enzymatischen Hydrolyse von Thioestern^[20] kombiniert wurde. Obgleich die α -H-Acidität von Thioestern stark strukturabhängig ist und sich damit nur ausgewählte Thioesterderivate mild enolisieren lassen, konnten in weiteren Arbeiten einige racemisierungstabile Verbindungen durch Variation des Thioesterrestes (z.B. die stark elektronenziehende $-\text{S-CH}_2\text{-CF}_3$ -Gruppe) deutlich aktiviert werden (max. Faktor 20 im Vgl. zum Thioethylderivat). Die ausgesprochen hydrolyseempfindlichen Verbindungen konnten mit Hilfe von enzymatischer Transesterifizierung in die korrespondierenden *n*-Butylester einer dynamischen kinetischen Racematspaltung unterzogen werden.

Ein neues Konzept zur Substratracemisierung wird bei der dynamischen kinetischen Racematspaltung von Cyanhydrinen eingesetzt (Abbildung 9). Hierbei wird die allgemein bekannte Instabilität dieser Verbindungsklasse ausgenutzt, die unter alkalischen Bedingungen mit ihren Edukten Blausäure (oder einer Blausäurequelle) und der Aldehydkomponente im Bildungsgleichgewicht steht. Neben einer Methode, die aus Mandelsäurenitril durch Einsatz einer (R) -spezifischen Nitrilase zur Bildung von (R) -Mandelsäure führt^[21], sind vor allem Verfahren bekannt, die Cyanhydrine durch basenvermittelte Racemisierung mit Lipase-katalysierter Acylierung kombinieren^[22,23] (Abbildung 9). Die hierbei gewonnenen enantiomerenreinen Cyanhydrinacetate stellen wertvolle Zwischenprodukte dar, weil vielfältige Folgereaktionen zu Ketonen, α -Hydroxycarbonsäuren oder Aminoalkoholen denkbar sind. Im von Oda et al. entwickelten Verfahren werden eine Reihe von Alkyl- und Arylcyanhydrinen *in-situ* aus Acetoncyanhydrin und der entsprechenden Aldehydkomponente mit Hilfe eines Anionenaustauscherharzes erzeugt. Eine Lipase katalysiert in einer irreversiblen Acylierung mit Isopropenylacetat die Umsetzung zu den korrespondierenden und unter Reaktionsbedingungen racemisierungstabilen Acetylverbindungen. Während die

Methode exzellente Ausbeuten (80-96 %) und Enantiomerenreinheiten (84-91 %) für aromatische Cyanhydrine liefert, müssen hinsichtlich Ausbeute (41-88 %) und Enantiomerenreinheit (15-85 %) deutliche Abstriche für aliphatische Vertreter verzeichnet werden. Verantwortlich hierfür ist die in diesen Fällen unerwünschte vergleichsweise höhere Stabilität aliphatischer Cyanhydrine, was sich negativ auf die Gleichgewichtsverteilung zugunsten der Cyanhydrinmenge und die Racemisierungsgeschwindigkeit auswirkt.

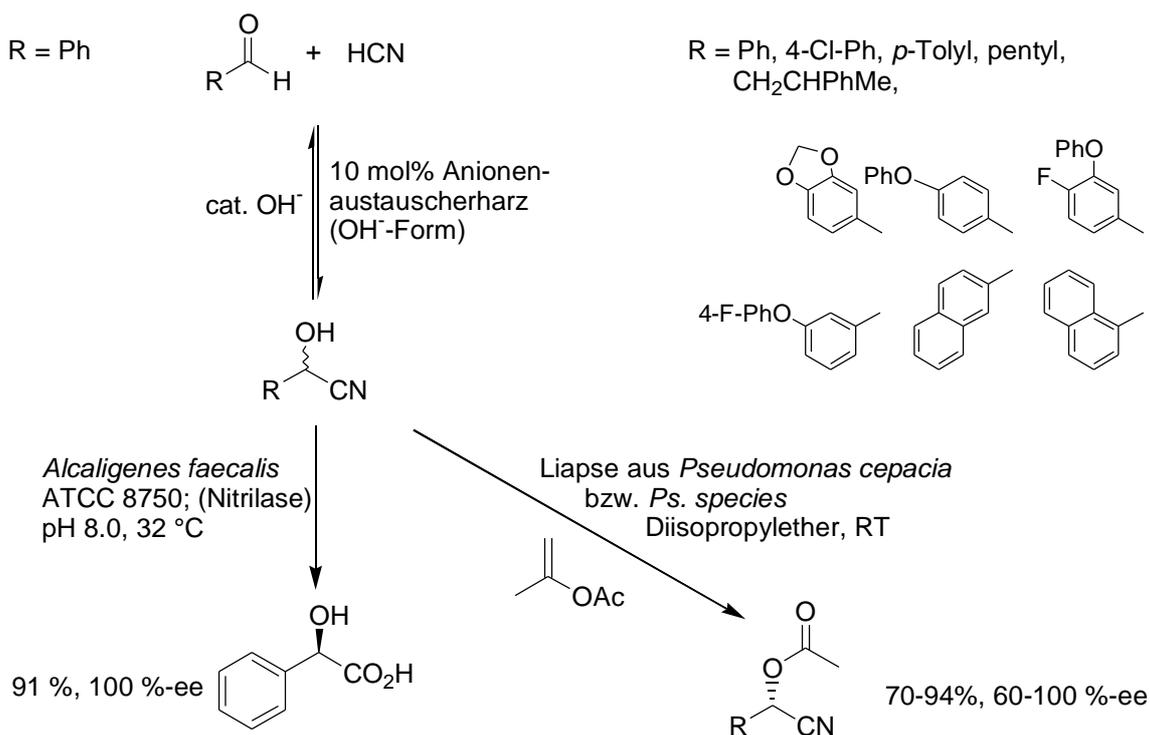


Abbildung 9: Produktspektrum der Lipase- bzw. Nitrilase-katalysierten DKR von Cyanhydrinen.

Weitere Fallbeispiele für DKR-Reaktionen von aktivierten Alkoholen sind in Abbildung 10 skizziert. Allen Beispielen gemeinsam ist ein Racemisierungsmechanismus auf der Grundlage eines dynamischen Bildungs- und Zerfallsgleichgewichtes.

Die dynamischen kinetischen Racematspaltungen von van Heuvel^[24], van der Deen^[25] und Thuring^[26] bedienen sich reversibler Ringöffnungsreaktionen chiraler Hemiacetalderivate, die mit Ausnahme der Pyrrolidonverbindung (T = 69 °C) bereits ausreichend schnell bei Raumtemperatur racemisieren. Verschiedene Lipasen katalysieren mitunter hochselektiv die enzymatische Acetylierung zu den aufgeführten Produkten.

Katalytische Mengen an Triethylamin sind nötig, um eine Racemisierung der von Taniguchi und Ogasawara^[27,28] eingesetzten Acyloinverbindungen über die intermediäre Bildung der entsprechenden *meso*-Endiolverbindungen zu ermöglichen.

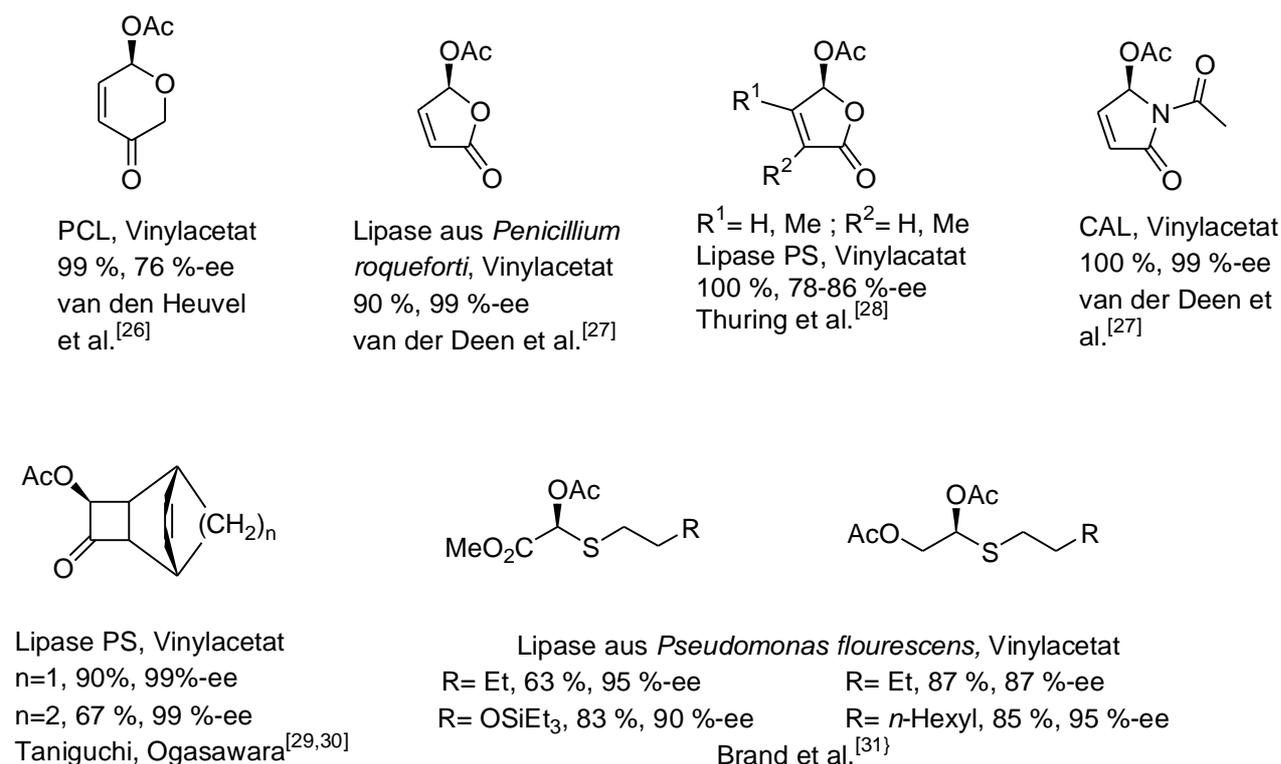


Abbildung 10: Dynamische kinetische Racematspaltung von racemisierenden Alkoholderivaten: Hemiacetale, Butenolide, Pyrrolidone, Acyloinderivate und Hemithioacetale.

Eine Reihe von racemischen Hemithioacetalen bilden sich durch Kondensationsreaktion *in-situ* aus einer Thiol- und einer Aldehydkomponente, die (*S*)-Enantiomere werden bevorzugt durch eine Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* mit Vinylacetat irreversibel zu den Acetatverbindungen umgesetzt. Durch Zusatz von Silicagel gelingt es, die Bildung der Hemithioacetale reversibel zu gestalten, wodurch moderate bis exzellente Ergebnisse erzielt werden können.^[29]

3.2.2 Aminosäuren

3.2.2.1 Allgemeines

α -Aminosäuren gehören zu den wichtigsten Naturstoffen, da sie für eine Vielzahl von biologischen Prozessen von elementarer Bedeutung sind.^[30] Die Strukturvielfalt der 20 proteinogenen Aminosäuren wird durch eine permanent steigende Anzahl an nicht-proteinogenen Aminosäuren natürlichen Ursprungs erweitert, deren Anzahl sich Ende der 90-iger Jahre auf über 2000 belaufen dürfte. Ferner bereichern zahllose auf chemischem Weg hergestellte nicht-natürliche Aminosäuren und deren Derivate die Aminosäurepopulation. Die Aminosäuren DL-Methionin (490000 t/a, 1995), L-Lysin (340000 t/a, 1995) und L-Glutaminsäure, die hauptsächlich als Futteradditive bzw. Süßstoffvorläufer Verwendung finden, dominieren die industrielle Produktion^[31]. Dennoch nimmt eine wachsende Zahl an biologisch aktiven natürlichen und nicht-natürlichen Aminosäuren als Komponenten von pharmakologisch wirksamen Substanzen einen wichtigen Sektor ein.

Neben Synthesemethoden wie Fermentation und chemische Synthese, die bei der aktuellen industriellen Produktion der drei obengenannten Aminosäuren angewendet werden, spielen enzymatische Methoden vor allem bei der Darstellung anderer Aminosäuren eine wichtige Rolle. Synthesen, über die Aminosäurederivate durch dynamische kinetische Racematspaltungen erhältlich sind, werden im folgenden vorgestellt.

3.2.2.2 Hydantoine

Hydantoine, erstmals von Bayer 1861 bei der Hydrierung von Allantoin dargestellt, sind als Aminosäurevorstufen besonders attraktiv, da sie einfach über die Bucherer-Bergs Syntheseroute darstellbar sind.^[32] Hydantoinasen katalysieren die hydrolytische Ringöffnung der Verbindungen zu den entsprechenden *N*-Carbamoyl-aminosäuren (Abbildung 11), die in einer Folgereaktion entweder enzymatisch mit Hilfe von Carbamoylasen² oder auf chemischem Weg durch Diazotierung zu den freien Aminosäuren umgesetzt werden. Durch die den Hydantoinasen eigene *D*-Spezifität^[33] lassen sich im Gegensatz zu anderen enzymatisch katalysierten Hydrolyseverfahren (z.B. durch Proteasen, Acylasen) *D*-Aminosäuren gewinnen, *L*-selektiv wirkende Enzyme dieser Art sind sehr selten. Der

² Oftmals enthalten geeignete Mikroorganismen neben Hydantoinase ebenfalls Carbamoylase, in seltenen Fällen weiterhin eine Hydantoinracemase.

notwendige Racemisierungsschritt der Hydantoine gelingt besonders leicht, sofern der Substituent in 5-Position aromatisch ist. Eine schnelle basenvermittelte Racemisierung über das Enolintermediat ist bereits im leicht alkalischen Milieu (pH 7-8) möglich. Für aliphatische Hydantoine bedarf es einer Hydantoinracemase, diese Enzyme sind jedoch nicht allgemein verfügbar.

Kanegafuchi Industries und DEBI Recordati nützen diese Methode zur Darstellung einiger D-Aminosäuren, in der Hauptsache D-Phenylglycin und D-4-Hydroxyphenylglycin, die in der Synthese der teilsynthetischen Penicilline Ampicillin und Amoxicillin Verwendung finden.^[34]

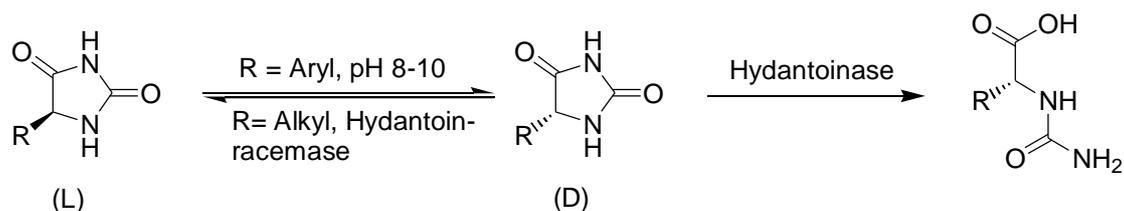


Abbildung 11: Enzymatische Hydantoinsspaltung zu *N*-Carbamoyl-aminosäuren.

3.2.2.3 Oxazolone

Die strukturell zu Hydantoinen eng verwandten Oxazol-5(4*H*)-one³ neigen ebenfalls zur Racemisierung unter neutralen bis leicht alkalischen Bedingungen, was im Vorfeld vor allem bei Peptidsynthesen negativ in Erscheinung trat, da hier *N*-Benzoylaminosäuren zu einem gewissen Grad in einer Nebenreaktion zu Oxazolonen zyklisieren. Auf dem Gebiet der dynamischen kinetischen Racematspaltung konnten nach anfänglichen Selektivitätsproblemen bei Protease-katalysierten Hydrolysereaktionen Sih et al.^[35,36] einen ersten Durchbruch erzielen.

³ genauer: in 4-Position substituierte 2-Phenylloxazolin-5-one.

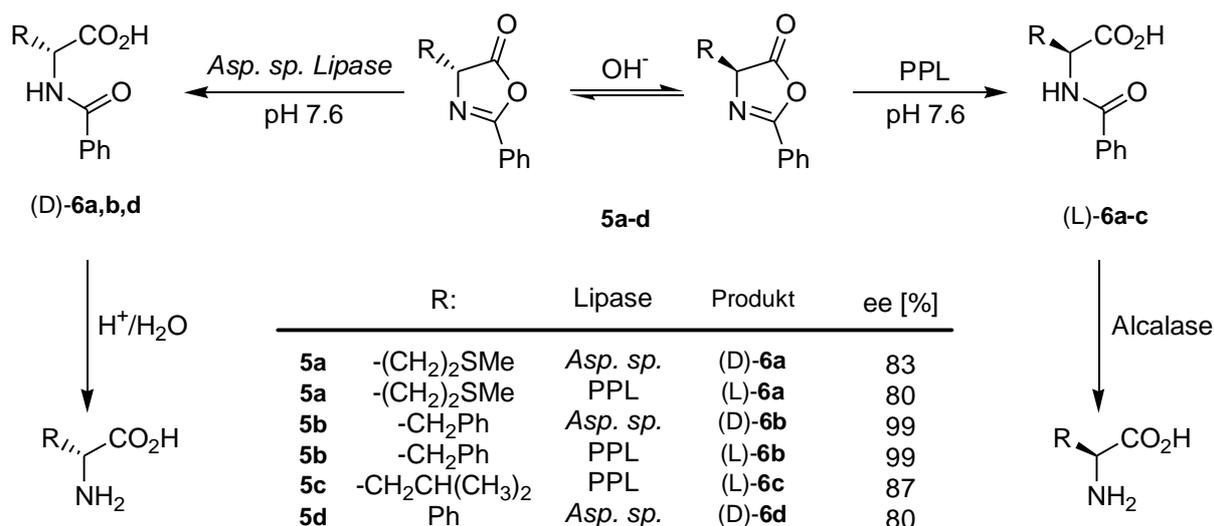


Abbildung 12: DKR von Oxazolonen nach Sih et al., die je nach eingesetzter Lipase bei quantitativem Umsatz zu beiden möglichen Aminosäureenantiomeren führen.

Die beiden eingesetzten Lipasen ergänzen sich eindrucksvoll durch entgegengesetzte Enantiomerdifferenzierung, wodurch sowohl D- als auch L-N-Benzoylamino-säuren in guter bis sehr guter Selektivität erhalten werden.

Die eingangs erwähnten Probleme der Protease-katalysierten Hydrolyse liegen nicht zuletzt in der parallel ablaufenden chemischen Hydrolyse der Oxazolone begründet. Durch eine Reaktionsführung in organischen Reaktionsmedien und gleichzeitigem Wechsel von Hydrolyse-reaktion auf Alkohololyse kann dieses Problem umgangen werden, wie Turner bei der Darstellung von L-*tert.*-Leucin^[37] und anderen Aminosäurederivaten^[38] zeigte. (*RS*)-2-Phenyl-4-*tert.*-butyloxazolin-5(4*H*)-on wird in einer Mischung aus Toluol, *n*-Butanol und katalytischen Mengen an Triethylamin mit einer Lipase aus *Mucor miehei* in 94 % Ausbeute und 99.5 % ee zu L-N-Benzoyl-*tert.*-butylleucinbutylester umgesetzt.

3.2.2.4 Aminosäureester

Für die Behandlung der Protease-katalysierten Hydrolyse von Aminosäurederivaten im Rahmen einer dynamischen kinetischen Racematspaltung wird auf Abschnitt 4.1 verwiesen. Während der Anfertigung der Dissertation berichteten Sheldon et al. einen neuen, jedoch vergleichbaren Prozeß,^[39] der die DKR von Aminosäureestern mit enzymatischer Ammonolyse beschreibt. Die detaillierte Studie über den Einfluß verschiedener Reaktionsparameter wie Lösungsmittel, Esterkomponente, Konzentration an Substrat und Racemisierungskatalysator an der Modellverbindung Phenylglycinamid führt unter

optimierten Reaktionsbedingungen bzgl. Ausbeute und Enantioselektivität in der in Abbildung 13 illustrierten Reaktion.

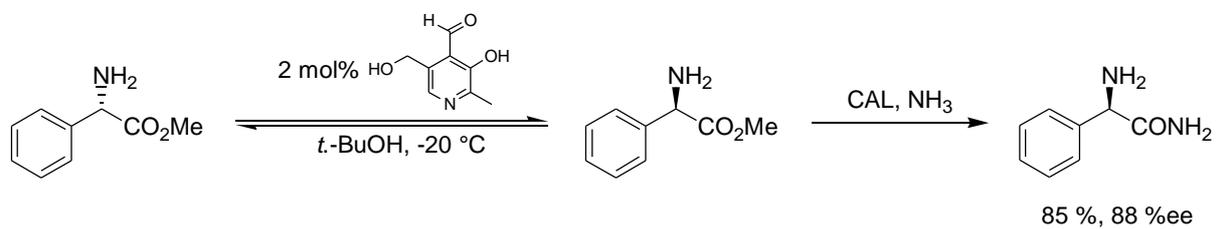


Abbildung 13: DKR von D,L-Phenylglycinmethylester mit CAL-katalysierter Ammonolyse.

3.3 DKR-Reaktionen mit enantiomerdifferenzierenden Metallkatalysatoren

3.3.1 Vorbemerkung

Chirale Metall- und Übergangsmetall-katalysatoren spielen mit ihrer Fähigkeit der enantiomerdifferenzierenden Erkennung und Umsetzung bei asymmetrischen katalytischen Reaktionen eine zentrale Bedeutung. Vor diesem Hintergrund ist es erstaunlich, daß nur wenige Beispiele im Bereich der dynamischen kinetischen Racematspaltung literaturbekannt sind, die sich einem enantioselektiven Schritt bedienen, der durch Metallkatalysatoren vermittelt wird.^[15] Bisher wird bei der Aufgabenstellung Racematspaltung⁴ die Verwendung von Biokatalysatoren im allgemeinen favorisiert. Dennoch ermöglichen Metallkatalysatoren Umsetzungen, die ein größeres oder zumindest um einige Bereiche erweitertes Reaktionsspektrum abdecken, was an den folgenden Beispielen deutlich wird.

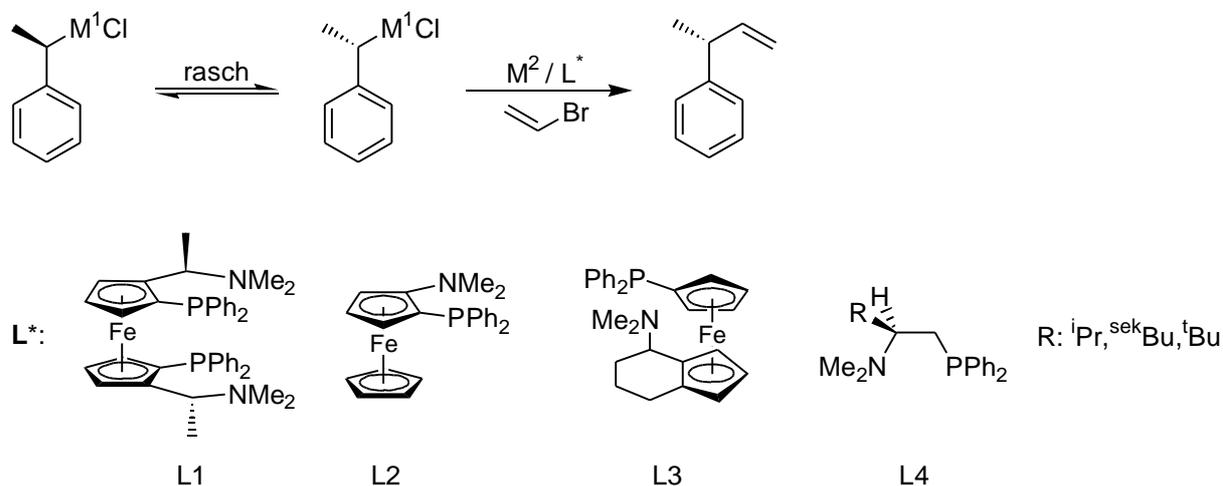
3.3.2 DKR von sekundären Grignardreagenzien und Analogen

Kumada^[40,41,42] konnte zeigen, daß konfigurativ labile sekundäre Alkylgrignardverbindungen enantioselektiv in überwiegend sehr guter Ausbeute und Selektivität (siehe Abbildung 14) in einer Kreuz-Kupplungsreaktion mit Vinylhalogeniden zu den Produkten umgesetzt werden können. Als Katalysatoren dienen chirale Nickel- bzw. Palladiumferrocenylphosphinkomplexe oder Komplexe mit β -Aminoalkylphosphinliganden. Die Umsetzung gelingt ebenfalls unter Verwendung von racemischem 1-Phenylethylzinkchlorid^[43] zum analogen Produkt.

Chirale Palladiumkatalysatoren wurden ebenfalls erfolgreich bei enantioselektiven Alkylierungs- und Aminierungsreaktionen von Allylacetaten eingesetzt.^[44,45,46,47] Es handelt sich hierbei in eigentlichen Sinne nicht um eine dynamische kinetische Racematspaltung, da der Katalysator im ersten katalytischen Schritt unselektiv Allylacetat unter Ausbildung eines π -Allyl-Komplexes addiert und erst in der weiteren Reaktionsfolge den enantioselektiven

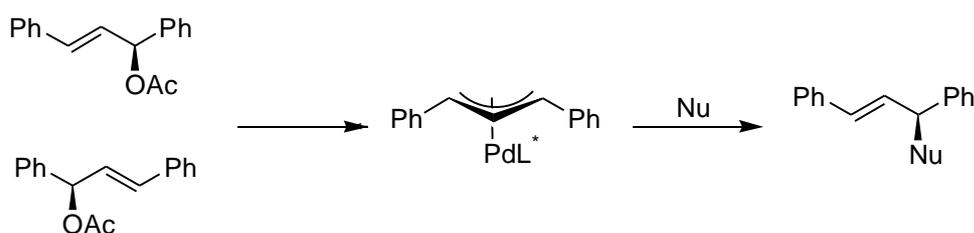
⁴ abgesehen von Enantiomerentrennungen z.B. durch Kristallisation.

Additionsschritt des Nucleophils ermöglicht (exemplarische Auswahl an Beispielen siehe Abbildung 15). Eine *in-situ* Racemisierung der enantiomeren Ausgangsverbindung findet also nicht statt, dennoch wird insgesamt das Racemat quantitativ und mit exzellenten Selektivitäten in ein Enantiomer überführt.



M ¹ :	M ² :	L*:	Ausbeute [%]	ee-Wert [%]
Mg	Pd	L3	95	79
Mg	Ni	L4	>95	>80
Mg	Ni	L2	95	66
Zn	Pd	L1	100	93

Abbildung 14: Übersicht über Kreuz-Kupplungsreaktionen von Grignard-Reagenzien mit Vinylhalogenid.



L*	Nu	Ausbeute [%]	ee-Wert [%]
L1	CH(CO ₂ Me) ₂	96	98 (S)
L2	PhCH ₂ NH ₂	93	97 (R)

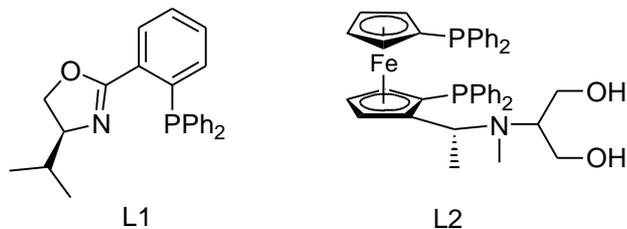


Abbildung 15: Palladium-katalysierte Aminierungs- und Alkylierungsreaktionen an Allyl-acetaten.

3.3.3 β -Ketoester

Die selektive Hydrierung von in 2-Position substituierten β -Ketoestern ist eines der ersten Beispiele dynamischer kinetischer Racematspaltung ohne Enzymbeteiligung^[48] (ein kürzlich erschienener Beitrag über chirale Ketone siehe^[49]). Ein aktueller Überblick zu synthetischen Anwendungen gibt Genet.^[50] Die Reaktion erfolgt unter Ruthenium- oder Nickel-Katalyse, die Ausgangsverbindungen racemisieren rasch über die bekannte Keto-Enol-Tautomerisierung. Besonders attraktiv an diesem Verfahren ist die Bildung zweier Stereozentren in unmittelbarer Nachbarschaft (Abbildung 16). Die enantiomer-differenzierende Auswahl zwischen (*S*)-**9** und (*R*)-**9** erfolgt hochselektiv und ist hauptsächlich vom eingesetzten Substrat abhängig. Eine wichtige Rolle spielt bei der Selektion der Isomeren die Natur des Substituenten an Position 2.

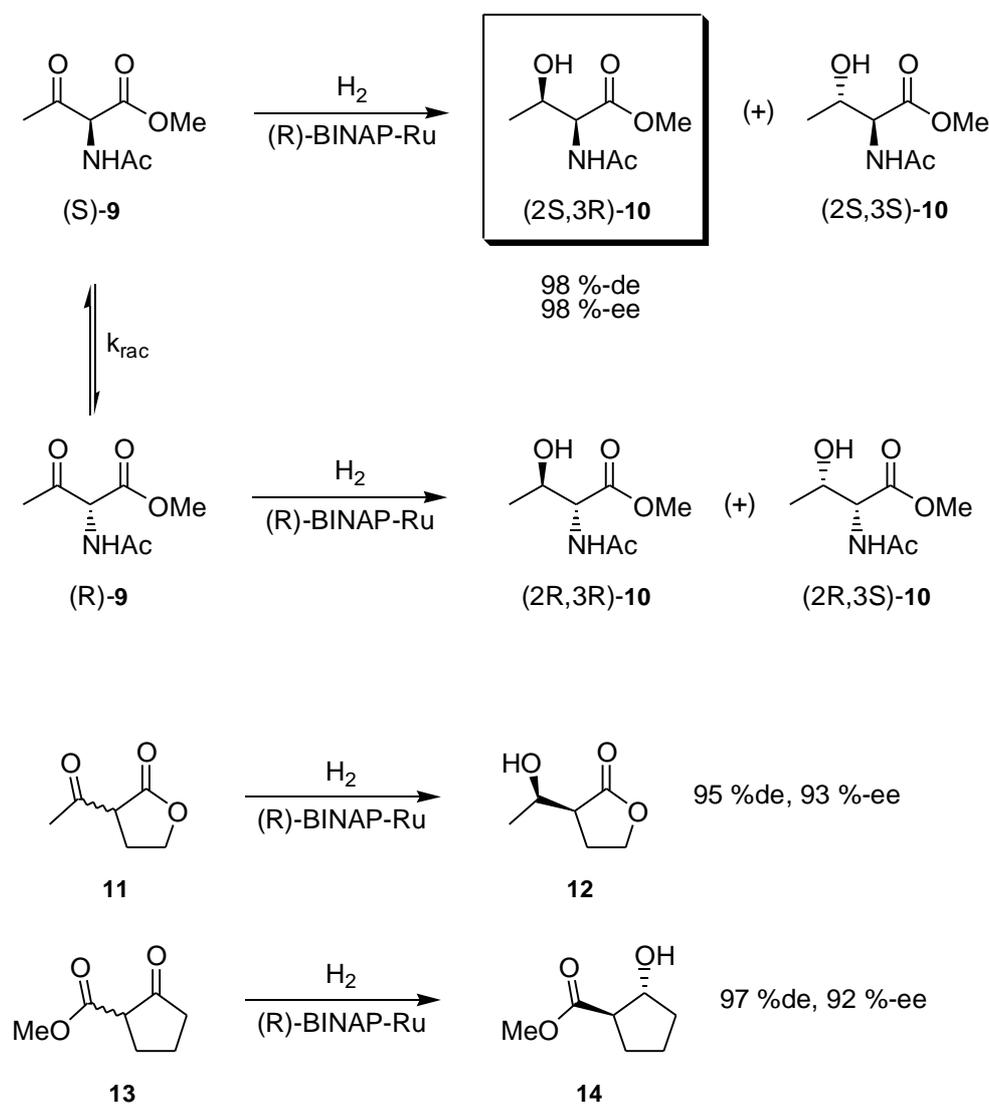


Abbildung 16: Ru-BINAP-katalysierte selektive Hydrierung von β -Ketoesterderivaten.

Die Selektivität der Hydrierung (hier z.B. (2*S*,3*R*-10) ? (2*R*,3*S*-10) hängt ausschließlich von der Stereochemie des eingesetzten BINAP-Liganden ab. Aus dem möglichen Produktspektrum gelingt es in vielen Beispielen, ein Produkt in quantitativer Ausbeute hoch enantio- und diastereoselektiv zu erhalten. Das Produktspektrum der in der Hauptsache erhältlichen *anti*-Produkte der Ru-katalysierten Hydrierung kann durch alternativ durchführbare enzymatische Reduktionen,^[51] die vornehmlich unter *syn*-Selektivität verlaufen, komplettiert werden. Damit sind in günstigen Fällen alle vier Stereoisomere mit hohen Ausbeuten isomerenrein erhältlich (siehe Abbildung 17).^[52,53]

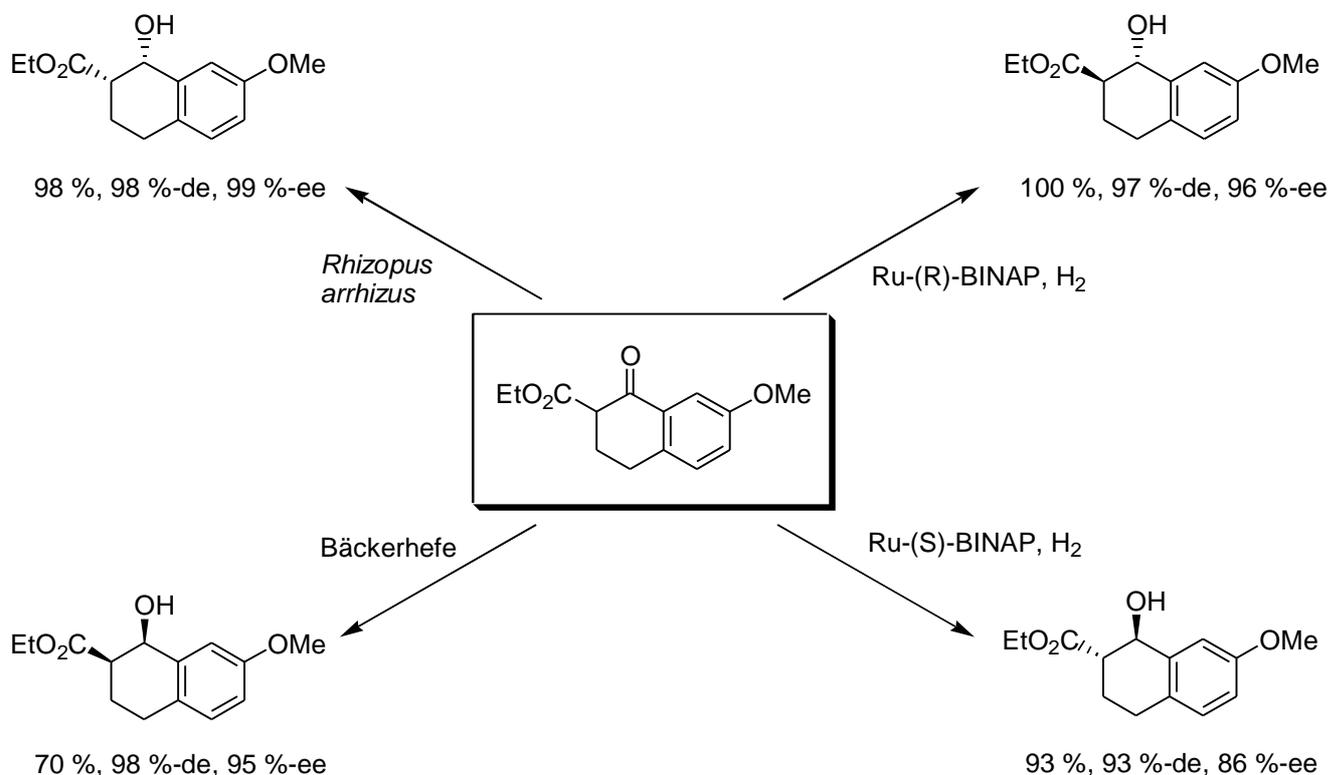
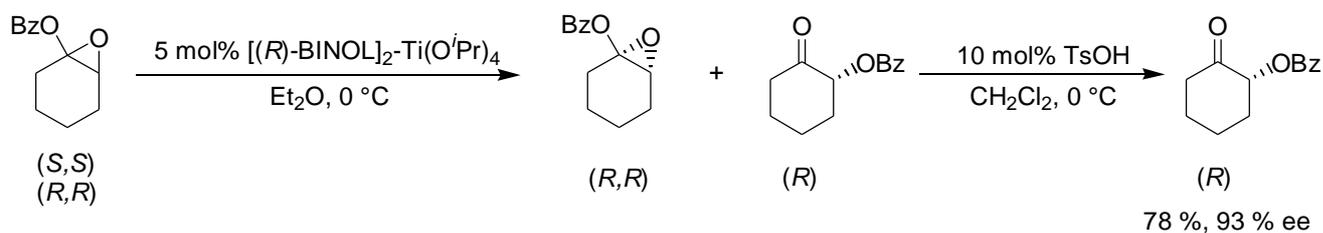


Abbildung 17: Die Kombination von Ru-BINAP-katalysierter und enzymatischer Hydrierung eröffnet die hocheffiziente Darstellung aller denkbaren Stereoisomere des gezeigten β -Ketoesters.

Eine Vielzahl von β -Hydroxyestern mit *syn*-Orientierung werden ebenfalls durch rekombinante *E. coli* erhalten.^[54]

3.3.4 Weitere Beiträge

Auf der Grundlage einer säurekatalytischen Umlagerung von Enolesterepoxiden in α -Acyloxyketone^[55] gelang Sih eine zweistufige Deracemisierungsreaktion einer Reihe von Exoxidverbindungen in α -Acyloxyketone (Gleichung 1). Die erste Teilreaktion ist eine klassische Racematspaltung racemischer Epoxide, die durch chirale Ti-Binol-Komplexe vermittelt wird. Anschließend erfolgt unter Inversion des chiralen Zentrums die säurekatalysierte Umlagerung der verbleibenden Epoxidverbindung in die Zielverbindung.^[56]



Gleichung 1: Deracemisierung von Enolesterepoxiden nach Sih et al.

3.4 DKR-Reaktionen mit Enzym-Metallkombinationen

3.4.1 Vorbemerkung

In den nachfolgend vorgestellten Beispielen werden enantioselektive enzymatische Transformationen mit Metall-vermittelter Racemisierung des Substrates kombiniert. In den Beispielen kommt der angewendeten Racemisierungsstrategie besondere Bedeutung zu, da konfiguratив stabile Ausgangsverbindungen effektiv und unter enzymkompatiblen Bedingungen racemisiert werden müssen.

3.4.2 Optisch aktive Amine

Reetz et al. berichteten über die klassische Racematspaltung chiraler Amine durch Lipase-katalysierte *N*-Acylierung, die mit 25-43 % Ausbeute und 96-98 % ee verlaufen.^[57] Dieser Beitrag kann als Ausgangspunkt für die Entwicklung der dynamischen kinetischen Racematspaltung von 1-Phenylethylamin angesehen werden.^[58] Das Hauptproblem bestand im Auffinden eines Racemisierungskatalysators, der die Enzymaktivität nicht vollständig neutralisiert. Aufbauend auf Arbeiten von Murahashi et al., die Racemisierungsreaktionen chiraler Amine mit Palladium auf Aktivkohle untersuchten,^[59] konnte die in Abbildung 18 illustrierte Reaktion entwickelt werden. Wasserstoffgesättigtes Palladium auf Aktivkohle dient als Racemisierungskatalysator, Novozym 435 katalysiert die in Triethylamin durchgeführte Acetylierung von (*R*)-1-Phenylethylamin mit Ethylacetat als Acylierungsmittel. Nach 8 Tagen Reaktionszeit konnten 64 % enantiomerenreines *N*-Acetyl-1-Phenylethylamin isoliert werden. Da nach bereits 2 Tagen Reaktionszeit halbstöchiometrischer Umsatz zu verzeichnen ist, stellt die Palladium-katalysierte Racemisierung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der DKR dar.

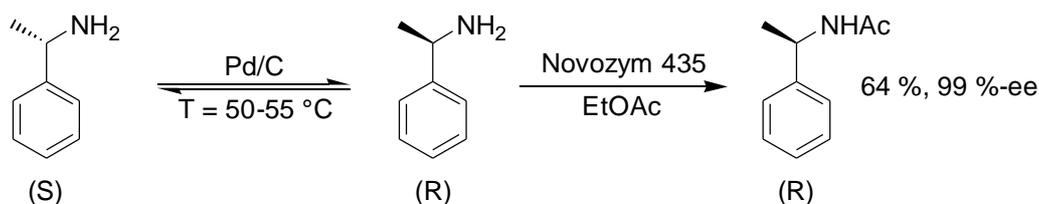


Abbildung 18: Lipase-katalysierte Acetylierung von 1-Phenylethylamin mit Pd-vermittelter *in-situ* Racemisierung des Substrates.

3.4.3 Optisch aktive Alkohole

Die vorteilhafte Kombination zweier bislang als unvereinbar geltender Teilgebiete der Chemie, Biokatalyse und Chemokatalyse, gelang Williams et al. die erstmaligen Verwirklichung einer dynamischen kinetischen Racematspaltung von Alkoholen. In Form ihrer Allylacetate werden die Produkte durch eine Kombination von enzymatischer Hydrolyse und Palladium-katalysierter Racemisierung erhalten.^[60] Die an zwei konkreten Beispielen erfolgreich durchgeführte Reaktion besitzt trotz der erforderlichen extrem langen Reaktionszeiten (bis zu 19 Tagen durch sehr geringe Racemisierungsgeschwindigkeit) große Bedeutung, weil das Konzept der DKR auf eine Verbindung mit nicht aktiviertem stereogenem Zentrum angewendet werden konnte.

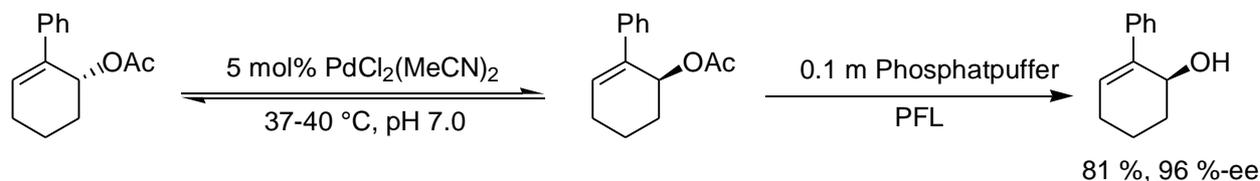


Abbildung 19: DKR zyklischer Allylacetate.

Bemerkenswert ist Durchführung der Reaktion im wässrigen Medium, das für eine Vielzahl von Enzymen immer noch als überlegenes Reaktionsmedium anzusehen ist. Eine praktische Anwendung dieser Reaktion beschreiben Ogasawara und Mitarbeiter.^[61]

Die oben gezeigte Racematspaltung läßt sich ebenfalls in organischen Medien bewerkstelligen, wie Kim et al. zeigen konnten. Mit dem Wechsel von Hydrolyse auf Alkoholyse und einem Pd(0)-Katalysator in organischen Lösungsmitteln sind eine Reihe weiterer, nicht zyklischer Allylalkohole zugänglich, die die von Williams bekannte Variante bisher nicht abdecken konnte.^[62] Die Reaktionsgeschwindigkeiten konnten deutlich erhöht werden, quantitativer Umsatz wird meist nach maximal 3 Tagen erreicht, jedoch senken Eliminierungs- und Substitutionsreaktionen als auftretende Nebenreaktionen des intermediären p-Allyl-Palladiumkomplexes die erzielbaren Ausbeuten (Abbildung 20).

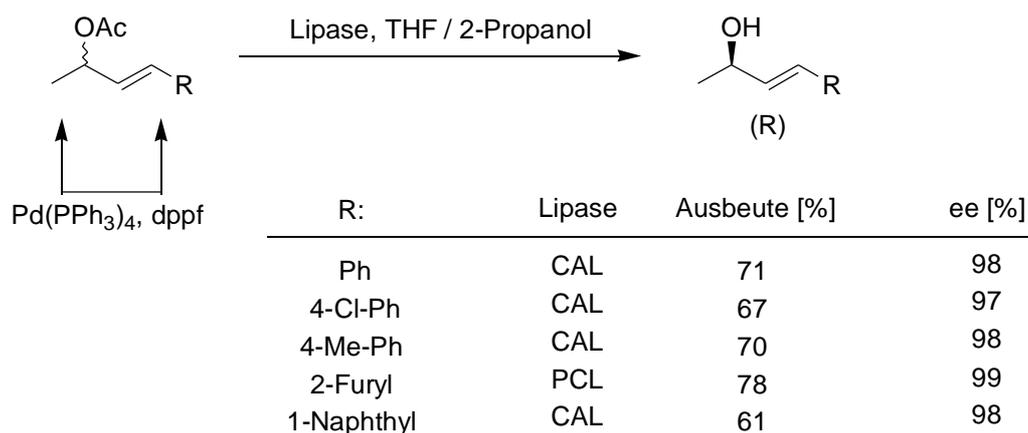


Abbildung 20: DKR von nicht zyklischen Allylacetaten nach Kim et al..

Eine weitere Möglichkeit einen Racematspaltungsprozeß für Alkohole zu erhalten, ist die *in-situ* Racemisierung der freien Alkohole, welche dann enantioselektiv mit Hilfe einer Lipase acyliert werden (Abbildung 21).^[63] Die Racemisierung freier Alkohole macht ein neues Racemisierungskonzept notwendig: durch eine reversible Oxidations-Reduktionssequenz unter Beteiligung eines Wasserstoff-Transfer-Katalysators und eines notwendigen Redoxpartners in Gestalt einer dem Alkohol strukturanalogen Ketonverbindung gelingt die Isomerisierung.

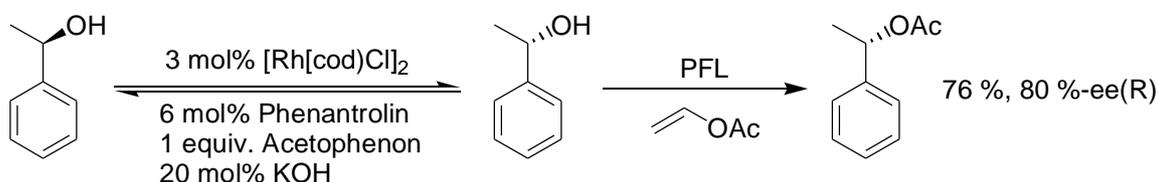
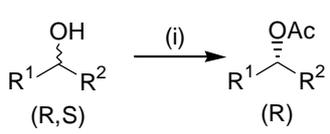
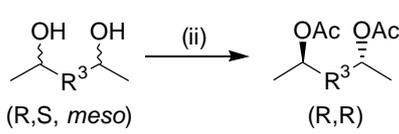
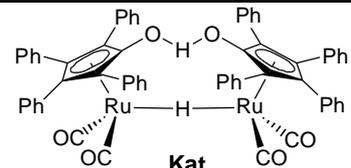
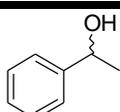
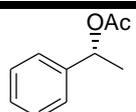
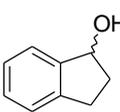
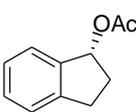
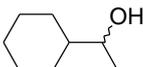
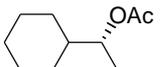
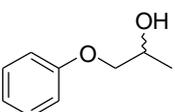
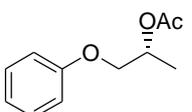
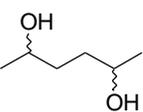
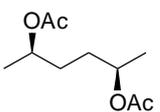
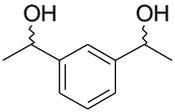
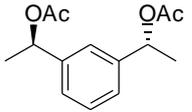
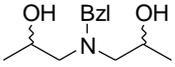
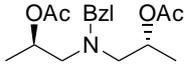


Abbildung 21: Erste erfolgreiche DKR von 1-Phenylethylalkohol mit *in-situ* Racemisierung des freien Alkohols.

Nach 6 Tagen Reaktionszeit bei 50 °C wurde mit 76 % Umsatz (*R*)-Methyl-phenylacetat in 80 %-iger optischer Reinheit gewonnen. Der im Vergleich zu vorangehenden Arbeiten deutlich angestiegene Schwierigkeitsgrad der Substratracesierung wird mit einer Vielzahl an verschiedenen Hilfsreagenzien bezahlt. Neben dem Rhodiumkomplex sind Acetophenon als Hydridakzeptor und Phenantrolin als Coligand sowie Kaliumhydroxid als Base nötig, die bzgl. ihrer einzusetzenden Menge der Reaktion einen unökonomischen Charakter verleihen.

Eine deutliche Verbesserung der Reaktion beschreiben Bäckvall und Mitarbeiter. Eine reversible Oxidations/Reduktions-Sequenz der Alkohole wird ebenfalls mit irreversibel verlaufender Acylierung gekoppelt.

Tabelle 1: Ru-katalysierte DKR von sekundäre Alkoholen und Diolen nach der Methode von Bäckvall.

Substrat	Produkt	Ausbeute [%]	ee (<i>R</i> bzw. <i>R,R/meso</i>) [%]
			
			
			
		80	99
		77	99
		79	99
		88	99
		63	99 (86/14)
		76	99 (98/2)
		64	96 (89/11)

(i): 2.0 mmol Substrat, 2 mol% Kat., 3 equiv. 4-Cl-PhOAc, 5.0 mL Toluol, Novozym 435, 70 °C
(ii): 0.5 mmol Substrat, 4 mol% Kat., 3 equiv. 4-Cl-PhOAc, 1.0 mL Toluol, Novozym 435, 70 °C.

Der verwendete dimere Katalysator zur Alkoholracemisierung zerfällt in Lösung (Toluol) in ein Metall-Hydrid- und ein Metall-Alkoxid-Fragment, welches als Base fungiert. Eine zusätzliche Base ist dementsprechend nicht nötig. Das Acylierungsmittel 4-Chlorphenylacetat verbindet sehr gute Reaktivität und Selektivität bei der enzymatischen Produktbildung mit einem sich nach erfolgter Acylierung indifferent verhaltendem Folgeprodukt 4-Chlorphenol.

Mit diesem System gelingt die enantiomerenreine Darstellung von (*R*)-1-Phenylethylacetat in 80 %-iger Ausbeute. In weiteren Arbeiten^[64,65] konnte sowohl das Anwendungsspektrum der Reaktion auf eine Vielzahl von einfachen sekundären Alkoholen und Diolverbindungen⁵ mit beeindruckenden Ausbeuten (64-88 %) und Selektivitäten (96-99 % ee) erweitert werden. Besonders attraktiv ist der Verzicht des Ketonäquivalents, ohne daß merkliche Produkteinbußen zu verzeichnen sind.

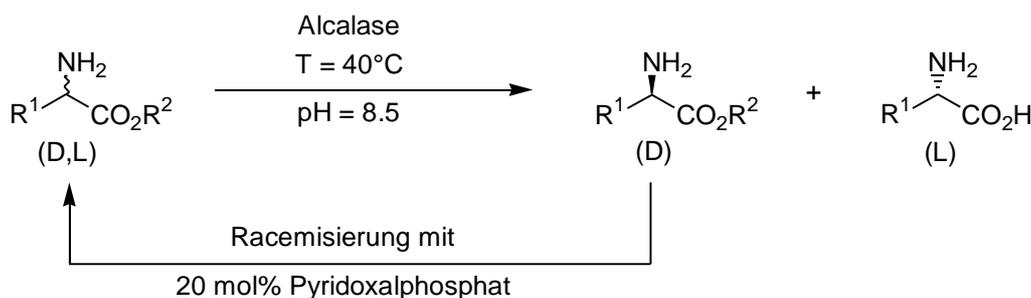
Ohne Ketonäquivalent kommt auch der von Park und Mitarbeitern eingesetzte Katalysator (η^5 -Indenyl)RuCl(PPh₃)₂ aus, der mit Sauerstoff als Redoxäquivalent in einer sonst den Bäckvallbedingungen identischen Reaktionsfolge eingesetzt wird.^[66,67] Die erzielten Ausbeuten (60-98 %) und Enantioselektivitäten von vergleichbaren Alkoholen (82-99 % ee) sind ebenfalls sehr gut, sie liegen im Schnitt aber etwas hinter den Bäckvall-Ergebnissen zurück.

⁵ Der maximal erreichbare Umsatz bei der klassischen Racematspaltungen von Diolen liegt bei 25 %, da im allgemeinen 50 % der Diolverbindung als indifferente *meso*-Verbindung vorliegt.

4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Diplomarbeit

4.1 Thema und Zielsetzung der Arbeit

In der Diplomarbeit wurden Arbeiten auf dem Gebiet der dynamischen kinetischen Racematspaltung von α -Aminosäureestern durchgeführt. Ausgangspunkt der eigenen Untersuchungen waren Arbeiten von Chen et al., die, beginnend mit klassischen Racematspaltungen von Aminosäureestern^[68], die erste erfolgreiche dynamische kinetische Racematspaltung von Aminosäureestern verwirklichten^[69] (Abbildung 22). Eine Reihe von racemischen Aminosäureestern wird enzymatisch hoch stereoselektiv zu den korrespondierenden L-Aminosäuren umgesetzt. Der in der Reaktionslösung sich anreichernde D-Aminosäureester wird *in-situ* mit Hilfe von Pyridoxal-5-phosphat racemisiert.



R¹: CH₂-C₆H₅, CH₂-(C₆H₄OH), CH₂-CH-(CH₃)₂, C₂H₅, C₃H₇.
 R²: Me, Et, *n*-Pr, *n*-Bu, Bzl.

Abbildung 22: Dynamische kinetische Racematspaltung von Aminosäureestern nach Chen.

Die freien Produktamino säuren werden in sehr guter Ausbeute (87-95 %) und optischer Reinheit (90-98 %) mit einer Reaktionszeit von wenigen Stunden gewonnen. Neben der Qualität der Produkte und der sehr einfachen Produktisolierung spricht die leichte Verfügbarkeit der preiswerten Alcalase für dieses Verfahren.

Zu den Schwächen des Verfahrens zählt unter anderem der zur *in-situ* Racemisierung verwendete Aldehyd Pyridoxal-5-phosphat, der zwar schnelle Racemisierung des D-Aminosäureesters realisiert, aber sowohl von seiner Verfügbarkeit (27.30 DM/g⁶) als auch von der eingesetzten Menge mit 20 mol% bzgl. des Aminosäureesters als ungeeignet für eine größere technische Anwendung erscheint.

⁶ Quelle: Aldrich Handbook of fine Chemicals and Laboratory Equipment 2000-2001.

Ein weiterer entscheidender Nachteil des von Chen et al. entwickelten Verfahrens zeigt sich in der Art des verwendeten Esters zur Racematspaltung. Benzylester bieten zwar im Vergleich zu einfacheren Alkylesterderivaten eine Reihe von verfahrenstechnischen Vorteilen wie z.B. ausgezeichnete chemische Hydrolysebeständigkeit, jedoch sind sie bei den zuvor durchzuführenden Esterifizierungsreaktionen überwiegend in nur 40-60 % Ausbeute darstellbar. Die Ausbeutevorteile der dynamischen kinetischen Racematspaltung gegenüber der klassischen Variante werden folglich bei der Synthese der Substrate verloren.

In eigenen Arbeiten sollten alternative Racemisierungskatalysatoren gefunden werden, die nicht die Nachteile des bekannten Systems aufweisen. Durch eine vereinfachte Aldehydstruktur sollte die Verbindung besser verfügbar und preiswerter sein. Die relevanten funktionellen Gruppen zur Racemisierung sollten durch ein breit angelegtes Screening identifiziert werden. Um chemische Desaktivierung des Aldehyds während der Reaktion zu vermeiden, sollte dieser ausreichend redoxstabil sein.

Zur Lösung dieser Aufgabe war es sinnvoll, Racemisierungsreaktionen an einer nicht aktivierten Modellverbindung (D-Phenylalaninbenzylester) mit den in Frage kommenden Aldehyden durchzuführen. Nachdem geeignete Racemisierungskatalysatoren identifiziert werden konnten, die selektiv den Aminosäureester und nicht die freie Aminosäure racemisieren, bestand die weitere Aufgabe darin, die Menge des benötigten Katalysators zu reduzieren. Um das Verfahren weiter zu verbessern, war es wichtig, alternative Esterverbindungen in der dynamischen kinetischen Racematspaltung zu untersuchen

Damit ergaben sich konkret folgende Aufgabenstellungen:

1. Synthese racemischer und optisch aktiver Aminosäureester.
2. Untersuchungen zur Racemisierung der Modellverbindung D-Phenylalaninbenzylester mit verschiedenen Aldehyden. Dabei sollen wesentliche Strukturelemente erkannt werden, die für effektive Racemisierung verantwortlich sind.
3. Anwendung der neu gefundenen Racemisierungskatalysatoren in der dynamischen kinetischen Racematspaltung von DL-Phenylalaninbenzylester bei gleichzeitiger Optimierung relevanter Reaktionsparameter.
4. Entwicklung dynamischer kinetischer Racematspaltungen von verschiedenen Estern von Phenylalanin.
5. Verallgemeinerung der Methode durch Anwendung auf andere Aminosäuren.

4.2 Ergebnisse der Diplomarbeit

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen von Chen et al.^[69], in denen Aminosäurebenzylester in *tert.*-Butanol/Wasser einer Alcalase-katalysierten dynamischen kinetischen Racematspaltung in Gegenwart von 20 mol% Pyridoxalphosphat unterzogen werden. In eigenen Arbeiten konnten die publizierten Ergebnisse nicht nachvollzogen werden, trotzdem konnte eine effektive Methode zur dynamischen kinetischen Racematspaltung von Aminosäureestern entwickelt werden.

Die Grundlage dazu bildeten Untersuchungen zur Racemisierung von D-Phenylalaninbenzylester mit verschiedenen im Vergleich zu Pyridoxalphosphat strukturell einfacheren Aldehyden.

Als racemisierungsaktive Aldehyde konnten 3,5-disubstituierte Salicylaldehyde wie 3,5-Dinitro-, 3,5-Dichlor- und 3,5-Dibromsalicylaldehyd sowie 5-substituierte Salicylaldehyde identifiziert werden. Abbildung 23 zeigt eine Auswahl an racemisierungsaktiven Aldehyden im direkten Vergleich. Ein Aldehyd racemisiert besonders schnell, wenn sich der Anteil an L-Enantiomer des Aminosäureesters sich der 50 %-Marke nähert (dies entspricht dem Racemat).

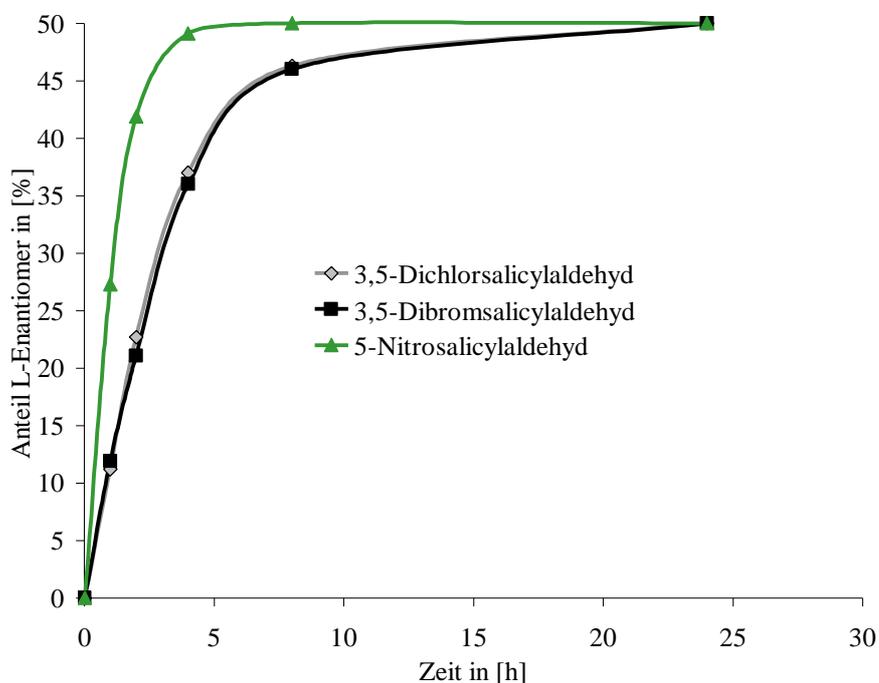


Abbildung 23: Racemisierungsreaktionen von in 3- und 5-Position substituierten Salicylaldehyden

Eine alternative Methode zur Einschätzung der Racemisierungsaktivität besteht in der kontinuierlichen Beobachtung des Drehwertes der Reaktionslösung in einem Polarimeter. In Abbildung 24 wird gezeigt, daß die Racemisierungsaktivität des natürlichen Vorbildes Pyridoxal von 3,5-Dinitrosalicylaldehyd noch übertroffen werden konnte. Diese Verbindung ist der aktivste Racemisierungskatalysator, der im Rahmen der Arbeit gefunden werden konnte.

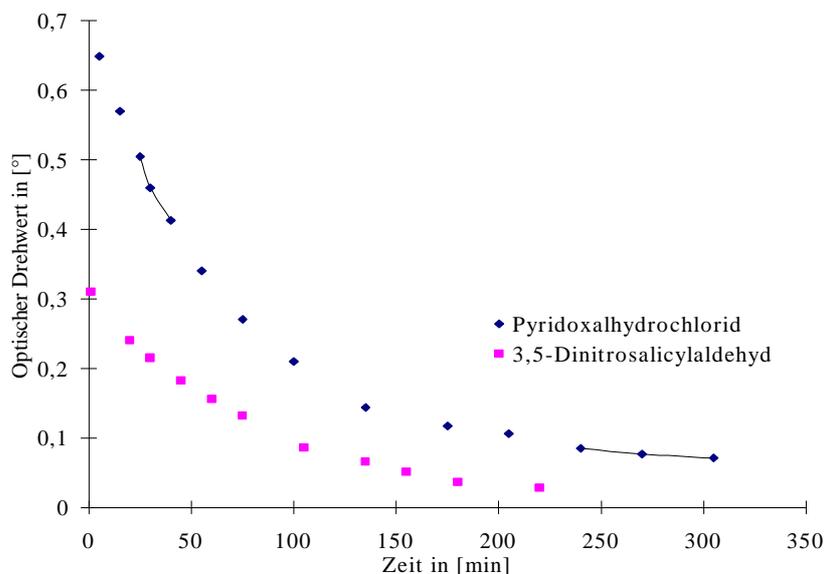


Abbildung 24: Polarimetrisch verfolgte Racemisierungsreaktionen von D-Phenylalanin-benzylester mit Pyridoxalhydrochlorid und 3,5-Dinitrosalicylaldehyd

Nach Abschluß der Untersuchungen gelang es, eine Reihe von alternativen Racemisierungskatalysatoren zu identifizieren, die in der dynamischen kinetischen Racematspaltung prinzipiell genutzt werden können (Abbildung 25).

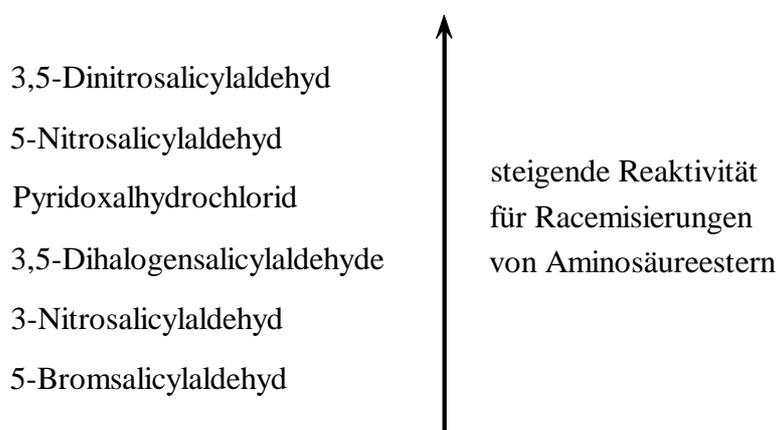


Abbildung 25: Überblick aller racemisierungsaktiver Aldehydverbindungen, geordnet nach relativer Geschwindigkeit

Wie in Tabelle 2 gezeigt, gelingt besonders unter Verwendung von 3,5-Dichlorsalicylaldehyd bei dynamischen kinetischen Racematspaltungen die Isolierung von NMR-reinen Aminosäuren in exzellenten Ausbeuten und Selektivitäten.

Tabelle 2: Überblick über die wichtigsten dynamischen kinetischen Racematspaltungen von Phenylalanin- und Tyrosinesterderivaten.

Substrat	Aldehyd	Ausbeute	ee(L)-Wert
D-PheOBzl	10 mol% B	71 %	86 %
DL-PheOBzl	10 mol% B	87 %	88 %
DL-PheOEt	5 mol% B	72 %	98,3 %
DL-PheOnBu	5 mol% B	63 %	92,3 %
DL-TyrOBzl	5 mol% A	95 %	99,2 %
DL-TyrOEt	5 mol% B	92 %	98,0 %
DL-TyrOiPr	5 mol% B	92 %	98,6 %

A: 3,5-Dinitrosalicylaldehyd B: 3,5-Dichlorsalicylaldehyd

Der wesentliche Erfolgsfaktor für die Entwicklung einer neuen effizienten Methode zur dynamischen kinetischen Racematspaltung von Aminosäureestern liegt in der Verwendung des Lösungsmittels Acetonitril mit geringem Wasseranteil. Alle anderen verwendeten Lösungsmittel erwiesen sich in den Untersuchungen als weit unterlegen. Eine weitere Verbesserung der Methode konnte durch Verringerung der Aldehydmenge von 20 mol% auf 5 mol% erreicht werden.

Die Vorteile der neuen Methode sind zusammengefasst:

1. Einfache und praktikable Durchführung im Labormaßstab.
2. Verwendung kostengünstigerer Aldehydkatalysatoren im Vergleich zu früher bekannten Systemen.
3. Einsatz einfacher *n*-Alkylester statt der bisher verwendeten Benzylester.
4. Sehr einfache Produktisolierung im Fall von Tyrosin.

5 Zielsetzung und Planung der Arbeit

Ziel und Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, Beiträge zur dynamischen kinetischen Racematspaltung zu leisten, neue Konzepte zu entwickeln und diese auf ihre Leistungsfähigkeit und ihr Anwendungsspektrum zu überprüfen.

Hierzu sollten schwerpunktmäßig folgende Untersuchungen angestellt werden:

1. Fortsetzung der Arbeiten auf dem Gebiet der dynamischen kinetischen Racematspaltung von Aminosäureestern. Das bereits in der Diplomarbeit entwickelte Verfahren für Phenylalanin- und Tyrosinderivate sollte hinsichtlich seiner Übertragbarkeit auf andere Aminosäuren abgeschätzt werden. Begleitende Untersuchungen zur Aufklärung racemisierungsrelevanter Substrukturen der Aldehydkomponente sollten zum besseren Verständnis des Racemisierungsmechanismus durchgeführt werden.
2. Entwicklung einer dynamischen kinetischen Racematspaltung von *N*-Acylaminosäuren mit Übergangsmetall-katalysierter Racemisierung eines Reaktionspartners. Schwerpunktmäßig sollten grundlegende Arbeiten zum Racemisierungsschritt unternommen werden, die, je nach Erfolg eine realistische Abschätzung erlauben, ob diese bis dato völlig unbekannte Racemisierungsmethode zu verwirklichen ist.
3. Beiträge zur dynamischen kinetischen Racematspaltung von sekundären Alkoholen. Auffinden von neuen aktiveren Racemisierungskatalysatoren, die eine vergleichsweise schnelle Racemisierung in Kombination mit enzymatischer Racematspaltung erlauben.

6 Die dynamische kinetische Racematspaltung von Aminosäureestern

6.1 Allgemeine Betrachtungen

Wie im Vorfeld bereits angesprochen, sollte nun die in der Diplomarbeit ausgearbeitete Methode der dynamischen kinetischen Racematspaltung auf andere Aminosäuren angewendet werden. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Reaktion von aliphatischen Aminosäureestern von z.B. Alanin, Leucin, Norleucin und Methionin. Es war zu erwarten, daß die vergleichsweise hohe Wasserlöslichkeit dieser Aminosäuren (vgl. Tabelle 3)^[70] zu Problemen bei der Produktisolierung führt. Obwohl die Racematspaltungsreaktionen in wasserarmen Lösungsmittelgemischen durchgeführt werden sollten, war auch hier eine erheblich größere Löslichkeit der untersuchten Aminosäuren wahrscheinlich.

Tabelle 3: Löslichkeit von Aminosäuren [g/1000 g H₂O] bei ausgewählten Temperaturen.

Temperatur	0 °C	20 °C	40 °C
L-Alanin	127.3	157.8	195.7
DL-Alanin	121.1	160.2	202.9
L-Leucin	22.7	23.7	26.6
DL-Leucin	8.0	9.4	12.0
DL-Methionin	18.2	30.0	48.2
DL-Norleucin	8.4	10.7	14.5
L-Phenylalanin	19.8	27.4	37.7
DL-Phenylalanin	10.0	13.1	18.2
L-Tyrosin	0.20	0.38	0.75
DL-Tyrosin	0.15	0.29	0.64
DL-Valin	59.6	68.1	81.7

Weiterhin von Bedeutung war die Frage, mit welcher Aktivität und Selektivität das verwendete Enzym an den neuen Substraten operiert. Eine grobe Einschätzung kann aus Tabelle 4 abgeleitet werden. Obwohl in eigenen Arbeiten die Verwendung von Methylesterderivaten aufgrund ihrer bekannten chemischen Hydrolyseempfindlichkeit

vermieden werden sollte, ließ sich dennoch eine Reaktivitätsrangfolge bzgl. der enzymspezifischen Hydrolyseaktivität aufstellen.

Neben sehr schnell reagierenden Aminosäureestern wie L-AlaOMe oder L-PheOMe weisen eine ganze Reihe von Verbindungen wie L-TyrOMe, L-Leu-OBzl, L-LeuOMe oder L-MetOMe durchschnittliche Aktivität auf.

Tabelle 4: Relative Hydrolysegeschwindigkeit verschiedener Aminosäureester mit Alcalase.

Substrat	verbleibender Ester [%]	Substrat	verbleibender Ester [%]
L-AlaOMe	< 3	D-Phe-OMe	90
L-PheOMe	< 3	D-Tyr-OMe	> 95
L-TyrOMe	10	L-Ala-OBzl	< 3
L-TrpOMe	10	L-Leu-OBzl	20
L-LeuOMe	30	D-Ala-OBzl	75
L-MetOMe	60		

Bed.: 0.1 mL Alcalase (A = 2.5 AU), 30 mL NaHCO₃-Lsg (0.2 m, pH 8.2), 2.0 mmol Substrat, 25 °C, 50 min. Der angegebene Wert entspricht dem prozentualen Restanteil an nicht hydrolysierter Esterverbindung.

6.2 Praktische Ergebnisse

6.2.1 Erste Ergebnisse

Die im Abschnitt 6.1 angestellten Überlegungen ließen eine erfolgreiche Erweiterung der Anwendbarkeit der bereits bestehenden Methode plausibel erscheinen. Dennoch mußte ein Wechsel des Lösungsmittelgemisches von MeCN/H₂O 4/1 auf 9/1 vorgenommen werden, was sich in der signifikant höheren Wasserlöslichkeit der Aminosäuren begründet. Durch den Einsatz eines neuen Autotitrators waren zunächst mehrere klassische Racematspaltungen notwendig, um die grundlegenden Dynamik- und Titrierparameter des Gerätes an die Reaktion anzupassen. Die während der Diplomarbeit eingesetzte Enzymcharge konnte in dieser Qualität (Aktivität 2.4 AU/ mL) nicht mehr bezogen werden, aus diesem Grund wurde mit einer Enzymcharge veringertes Aktivität (0.6 AU/ mL) gearbeitet. In einer ersten Reaktion wurde die DKR von DL-Tyrosinbenzylester zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter den neuen Gegebenheiten untersucht (Eintrag 4, Tabelle 5). Das sehr gute

Ergebnis entspricht mit einer Ausbeute von 93 % und einem ee-Wert von 95 % trotz des Lösungsmittelwechsels und veränderter Enzymqualität genau den Erwartungen.

Tabelle 5: Erste Ergebnisse der dynamischen kinetischen Racematspaltung von neuen Aminosäureestern.

Eintrag	Substrat	pH	Zeit [d]	Ausbeute [%]	ee (L) [%]
1	DL-Ala- <i>O</i> iPr	8.0	5	43	80
2	DL-NLeu-Bzl	8.5	7	23	74
3	DL-Leu-OBzl	8.5	8	95	91
4	DL-Tyr-OBzl	8.5	3	93	95
5	DL-2-Aminobutter- säurebenzylester	8.5	7	0	-

Bed.: 20 mmol Substrat, 1.0 mmol 3,5 Dichlorsalicylaldehyd, 1.0 mL Alcalase (600 U), 100 ml LM, T = 35-40 °C, gemäß AAV 7 (Abschnitt 10.2.1.7).

Es zeigt sich, daß alle neuen Substrate bei Umsatzstillstand⁷ mit Ausnahme von Eintrag **3** eine vergleichsweise niedrige Ausbeute (0-43 %) bei befriedigenden bis guten Produktselektivitäten liefern. Weiterhin fällt auf, daß im Vergleich zu **4** die Reaktionszeiten der neuen Substrate trotz niedriger Ausbeute deutlich länger sind.

In der DKR mit Alanin (Eintrag **1**) wurde der Isopropylester wegen anfänglicher Syntheschwierigkeiten des Benzylesterderivates eingesetzt. Der pH-Wert der Reaktion ist unter Berücksichtigung der leichteren chemischen Hydrolyse auf 8.0 gesenkt worden. Die geringe Ausbeute von 43 % ist mit einer nicht quantitativen Umsetzung zu erklären. Die Reaktion zeigt nach 3 Tagen Umsatzstillstand, eine erneute Enzymzugabe führt zu keiner Wiederaufnahme der Reaktion.

Zusätzlich ausbeutevermindernd wirkt sich die hohe Löslichkeit der Aminosäure aus, die nach der bisher üblichen Aufarbeitung (pH-Wert des Ansatzes auf 6.5, Produkt bei 0 °C ausfällen und isolieren) auf noch deutlich in der Mutterlauge nachzuweisen war. Der ee-Wert der isolierten Aminosäure ist befriedigend (80 % ee).

Analog verhalten sich Norleucinbenzylester (Eintrag **2**) und das Produkt Norleucin in der dynamischen kinetischen Racematspaltung. Bei Umsatzstillstand nach 4 Tagen Reaktionszeit läßt sich nach 7 Tagen nur 23 % reines Norleucin durch Fällung gewinnen.

Im Fall von DL-Leucinbenzylester (Eintrag 3) liegen die experimentellen Daten ähnlich, jedoch konnte hier erstmals ein nahezu quantitativer Umsatz beobachtet werden (nur Spuren des Esters konnte in einem Dünnschichtchromatogramm nachgewiesen werden). Es sei jedoch angemerkt, daß bei der Aufarbeitung des Produktes anders verfahren wurde. Durch die bisher praktizierte Fällung konnten 46 % des Produktes (89.9 % ee) direkt gewonnen werden. Weitere 49 % (92.3 % ee) ließen sich durch komplettes Entfernen des Lösungsmittels der Mutterlauge und erneutes Filtrieren einer Suspension aus dem gewonnenen Rückstand in 20 mL *tert*-Butanol/Wasser 9/1 isolieren. Es zeigt sich jedoch, daß diese Aufarbeitungsmethode nicht generell für andere Aminosäuren erfolgreich anwendbar ist. Weiterhin läßt sich feststellen, daß Alcalase keine präparativ nutzbare Aktivität bzgl. 2-Aminobuttersäurebenzylester zeigt, eine Produktbildung konnte nur in Spuren über DC nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wird auf weitere Reaktionen mit diesem Substrat verzichtet.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich als Hauptprobleme der Reaktion zum einen niedriger Umsatz und zum anderen hohe Produktlöslichkeiten abzeichnen.

6.2.2 Evaluierung kritischer Versuchsparameter

A) Substratracemisierung

Die bisherigen Untersuchungen zur Racemisierungsaktivität der ausgewählten Aldehydverbindungen wurden ausschließlich an D-Phenylalaninbenzylester vorgenommen. Das Problem des verfrühten Reaktionsstillstandes könnte durch mangelhafte Racemisierungsgeschwindigkeit zurückzuführen sein. Racemisierungsexperimente⁸ mit L-Ala-OEt, L-NLeu-OBzl und L-Met-OMe zeigten jedoch, daß da bei allen Aminosäureestern spätestens nach 24 Stunden Reaktionszeit komplette Racemisierung beobachtet wurde.

⁷ Die Reaktionen werden bei nicht quantitativem Umsatz 24 Stunden nach dem letzten Zugabe von NaOH-Lösung des Autotitrators abgebrochen.

⁸ Klassisches Racemisierungsexperiment: 0.686 mmol Ester, 20 mol% 3,5-Dichlorsalicylaldehyd, 2 mL H₂O, 8 mL DME, pH 8.5, RT.

B) Reaktionstemperatur, pH-Wert

Die Reaktionstemperatur (bisher Variationen von 20-40 °C) war als kritischer Parameter der Reaktion zu betrachten. Die Wahl des pH-Wertes bestimmt zwar einerseits Enzymaktivität und das Ausmaß basenkatalysierter chemischer Hydrolyse, welche die Enantiomerenreinheit des Produktes mitbestimmen, doch die vorgenommenen Variationen (pH 7.5-8.5) lagen im Bereich optimaler Enzymwirksamkeit^[71] (pH 6-9.5).

C) Enzymaktivität

Es ist allgemein bekannt, daß Enzymcharakteristika wie Stabilität, Aktivität und Selektivität, entscheidend von mehreren Einflußgrößen wie z.B. dem organischen Lösungsmittel, dem pH-Wert, der Wasseraktivität und der Enzymform abhängen. Eine aktuelle Übersicht zu Anwendungen und Eigenschaften von Enzymen in organischen Lösungsmitteln geben Carrea und Riga.^[72]

Im Fall eines Lösungsmittelsystems aus Wasser und einem mit Wasser mischbaren Lösungsmittels sind die Zusammenhänge zwischen Reaktionsmedium und Enzymaktivität jedoch noch nicht aufgeklärt. Als Faustregel gilt jedoch, daß, unabhängig vom gewählten Enzym und seiner Verwendungsform, für ausreichende Enzymaktivität ein Mindestwassergehalt von etwa 5 Vol% gegeben sein muß.

Für die eigenen Arbeiten war der entscheidende Gesichtspunkt neben der Aktivität zu Reaktionsbeginn die Langzeitstabilität des Enzyms, weil die Umsetzungen zum Teil Reaktionszeiten von mehr als 5 Tagen erforderten.

Es ist bekannt, daß ein Zusammenhang zwischen makroskopischer Enzymverteilung im Reaktionsmedium und Enzymaktivität besteht. Optimale Aktivität ist gewährleistet, sofern die Enzympräparation sich vollständig im Lösungsmittel verteilt und eine trübe, milchig erscheinende zweiphasige Fest-flüssig-Suspension entsteht. Im zeitlichen Verlauf der Reaktion kommt es zu einer teilweisen Aggregation der Enzymbestandteile, die sich zuerst in fein verteilten Proteinflocken bemerkbar macht. Hält die Flockenbildung an, so setzt sich in zunehmendem Maße das aggregierte Enzym an der Gefäßwand ab und die Reaktionslösung klart auf. Ist die Lösung wieder völlig klar, so verhält das Enzym weitgehend inaktiv.

Dieser recht einfache Zusammenhang ließ eine unkomplizierte, qualitative Beurteilung der Eignung verschiedener Lösungsmittel als Reaktionsmedium zu. Zu diesem Zweck wurden

verschiedene Mischungen aus Acetonitril und Wasser mit Alcalase auf ihr zeitliches Verhalten untersucht. Tabelle 6 gibt einen Überblick zur Alterung der Enzymlösungen aufgeschlüsselt nach den untersuchten Lösungsmittelgemischen.

Tabelle 6: Einfache Röhrexperimente zur Ermittlung besser geeigneter Lösungsmittel

Lösungsmittel	1 Stunde	24 Stunden	3 Tage	5 Tage
H ₂ O	klare Lösung	klare Lösung	leichte Flockenb.	deutliche Flockenb.
MeCN/H ₂ O 1/2	milchige Susp.	milchige Susp.	leichte Flockenb.	deutliche Flockenb.
MeCN/H ₂ O 1/1	milchige Susp.	milchige Susp.	leicht Flockenb.	deutliche Flockenb.
MeCN/H ₂ O 2/1	milchige Susp.	leichte Flockenbildung	deutl. Flockenb..	klare Lösung
MeCN/H ₂ O 5/1	milchige Susp.	deutliche Flockenb.	deutl. Flockenb.	klare Lösung
MeCN/H ₂ O 10/1	milchige Susp.	deutliche Flockenb.	klare Lösung	klare Lösung

Bed.: 20 mL Lösungsmittel, 1.0 mL Alcalase, RT. Die Mischung wird langsam mit Hilfe eines Magnetrührgerätes durchmischt.

Es zeigt sich, daß Alcalase in Mischungen von MeCN/H₂O 10/1 bis 1/2 in 24 Stunden nicht quantitativ ausfällt. Dennoch zeichnet sich, abgestuft nach steigendem Anteil an organischem Cosolvenz, eine schnellere Enzymalterung ab. Für die beabsichtigten Langzeitreaktionen kommen deshalb nur Gemische mit einem maximalen Acetonitrilanteil von 50 Vol% in Frage. Diese binären Mischungen besitzen trotz erheblicher Enzymausflockung nach 5 Tagen Rührzeit immer noch einen gewissen Trübheitsgrad.

Es ist wahrscheinlich, daß ein höherer Acetonitrilanteil mit einer schnelleren Deaktivierung des Enzyms einhergeht. Ist die Annahme des Zusammenhangs zwischen Enzymaktivität und Aussehen der Reaktionslösung richtig, so eignen sich Lösungsmittelgemische mit einem mindestens 50 %-igem Wasseranteil.

6.2.3 Reaktionen in Acetonitril/Wasser 1/1

Nach Abwägen der möglichen Fehlerquellen im vorherigen schien es von Vorteil, das Lösungsmittel zu ändern. Dadurch sollte es möglich sein, eine deutliche Umsatzsteigerungen zu erreichen. Ferner schien es ratsam, die Arbeitsvorschrift bzgl. des Aminosäureesters zu ändern. Um die Natriumchloridbeladung der Reaktion zu minimieren, wurde das Aminosäureesterhydrochlorid vor der Zugabe zuerst in den freien Ester überführt (siehe Abschnitt 10.2.1.8).

Tabelle 7 faßt die Ergebnisse der dynamischen kinetischen Racematspaltungen in Acetonitril / Wasser-Mischungen (1/1) zusammen.

Tabelle 7: DKR verschiedener Aminosäureester in MeCN/H₂O 1/1

Eintrag	Substrat	MeCN/H ₂ O	pH	Zeit [d]	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	ee (L) [%]
1	DL-Leu-OBzl	19/1	8.5	2	ca. 25 ^b	20	80
2	DL-Leu-OBzl ^c	1/1	8.5	7	> 95 ^a	38	26
3	DL-Leu-OBzl	1/1	8.0	4	> 95 ^a	42	90
4	DL-Met-OMe	1/1	8.0	4	> 95 ^a	67	78
5	DL-Met-OMe	1/1	7.5	4	> 95 ^a	68	69
6	DL-NLeu-OBzl	1/1	8.5	5	> 95 ^a	20	91
7	DL-NVal-OBzl	1/1	8.5	5	> 95 ^a	0	49
8	DL-Tyr-OEt	1/1	7.5	2	> 95 ^a	92	96

Bed.: 20 mmol Substrat, 1.0 mmol 3,5-Dichlorsalicylaldehyd, 1.0 mL Alcalase (600 U), 100 ml LM, T = RT, gemäß AAV 8 (Abschnitt 10.2.1.8).

^a Im Dünnschichtchromatogramm einer Probe des Ansatzes ließ sich das Edukt nicht mehr nachweisen.

^b Umsatzbestimmung durch Extraktion und Rückwiegen des Eduktes.

^c Reaktionstemperatur 35-40 °C.

Erfreulicherweise kann mit dem Lösungsmittelwechsel von MeCN/H₂O 4/1 auf 1/1 in allen Reaktionen trotz teilweise recht langer Reaktionszeiten (bis zu 7 Tagen, siehe Eintrag **2**) quantitativer Umsatz erreicht werden. Die Überlegenheit dieses Lösungsmittels kann an den Versuchen **1-3** verdeutlicht werden. Der mit 5 Vol% extrem niedrige Wassergehalt des bei Eintrag **1** eingesetzten Lösungsmittels ist für eine schnelle Enzymdesaktivierung und für den damit verbundenen frühzeitigen Umsatzstillstand bei etwa 25 % verantwortlich. Die enzymatische Aktivität bei den Racematspaltungen **2** und **3** bleibt stattdessen bis zum vollständigem Verbrauch des Substrates erhalten. Das wasserarme Lösungsmittel ist nur bzgl. der Produktisolierung deutlich überlegen (20 % Ausbeute bei 25 % Umsatz), da bereits nach 30 Minuten Reaktionszeit Leucin zu kristallisiert beginnt. Die Produktausbeuten (38 bzw. 42 % bei mind. 95 % Umsatz) für Eintrag **2** und **3** sind bei der konventionellen Aufarbeitungsweise zu niedrig. Weiterhin bemerkenswert sind die beobachteten starken Schwankungen der Enzymselektivität, die durch die geringen Änderungen von Reaktionstemperatur und pH-Wert nicht stichhaltig zu erklären sind, dennoch kann mit **3** ein sehr gutes und reproduzierbares Ergebnis erhalten werden.

Methioninmethylester (**4**, **5**) läßt sich innerhalb von 4 Tagen Reaktionszeit quantitativ mit 69 bzw. 78 % Enantioselektivität zu Methionin umsetzen. Auch hier sorgt die hohe Löslichkeit der Aminosäure für eine niedrige Ausbeute (67 bzw. 68 %). Noch gravierender wirkt sich die Produktlöslichkeit bei Norleucin und Norvalin (**6** und **7**) aus, da hier im Fall von Norleucin nur 20 % isolierbar waren und keine Ausbeute (durch Fällung) bei der Reaktion mit Norvalin erhalten wurde. Dagegen sorgt die relative Schwerlöslichkeit von Tyrosin (Eintrag **8**) auch in diesem Lösungsmittelgemisch für eine nahezu optimale Produktausbeute (92 %) und Enantioselektivität (96 % ee).

Es läßt sich zu diesem Zeitpunkt zusammenfassen, daß sich alle untersuchten Verbindungen mit gutem bis sehr guten Umsätze (mind. 95 % Umsatz, 49-96 % ee) zu den freien L-Aminosäuren gemäß der dynamischen kinetischen Racematspaltung umsetzen ließen. Es sollte noch darauf hingewiesen werden, daß in allen Fällen die Löslichkeit der Aminosäure in racemischer Form geringer ist als die enantiomerenreine Form. Die kristallisierte Aminosäure besitzt demnach eine geringere Enantiomerenreinheit als die in Lösung verbleibende. Die angegebenen ee-Werte charakterisieren mit Ausnahme von **7** die durch Fällung isolierbare Aminosäure. Die beschriebene Selektivität ist also als ein Mindestwert zu verstehen.

Die bestehenden Aufarbeitungprobleme, die zu hohem Produktverlust führten, gaben den Anlaß, alternative Isolierungsmethoden zu suchen, die einen besseren Produktzugang erlauben.

6.2.4 Aufarbeitungsversuche

Bevor auf konkrete Aufarbeitungsversuche eingegangen wird, soll nochmals die typische Zusammensetzung der Reaktionsmischung charakterisiert werden. Bei Abbruch der Reaktion liegen in einer 1/1 Mischung aus Acetonitril und Wasser neben der zum Teil ausgefallenen freien Aminosäure noch die Aldehydverbindung (2.5-5 mol%), Reste an Aminosäureester, Schiff'scher Base, Enzympräparation (homogen und heterogen vorliegend) und wechselnde Mengen an NaCl vor. Die im allgemeinen sehr voluminös ausfallende Aminosäure ist für eine breiartige Konsistenz der Reaktionsmischung verantwortlich.

Die bislang verwendete Methode zur Aufarbeitung bestand im Dekantieren der Lösung bzw. Suspension aus dem Reaktionskolben in ein weiteres Gefäß, um Enzymablagerungen abzutrennen. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1N HCl auf den isoelektrischen Punkt

neutraler Aminosäuren (5.5-6.5) eingestellt. Der Ansatz wurde 30-60 Minuten im Eisbad bei 0°C gerührt, im Anschluß wurde die ausgefallene Verbindung abfiltriert und mit reinem Acetonitril gewaschen. Eine Nachfällung war in einigen Fällen durch Verdünnen der Mutterlauge mit 100 mL DME, erneuter Temperierung auf 0 °C und wiederholter Filtration möglich, die einzelnen Fällfraktionen wurden zur Produktcharakterisierung vereinigt.

Wie bereits mehrfach angesprochen, war das Problem die nicht vollständige Produktgewinnung, die Aminosäuren ließen sich wegen ihrer hohen Wasserlöslichkeit nicht quantitativ fällen.

Eine Zusammenfassung der ersten Aufarbeitungsversuche ist nachfolgend tabellarisch gezeigt. Als Experimentierlösung diente die Mutterlauge nach konventioneller Aufarbeitung.

1) Entfernen des Acetonitrils bei RT im Vakuum.

Effekt: keine weitere Fällung.

2) Zusatz von Acetonitril.

Effekt: minimale Fällung.

3) Volumenreduzierung der Mutterlauge auf ca. 20 %.

Effekt: keine quantitative Aminosäurefällung, zuvor lösliche Enzymbestandteile und NaCl verunreinigten den Niederschlag.

4) Extraktion mit CH_2Cl_2 zur Abtrennung der Aldehydverbindung, dann Reduzierung der Wasserphase bis zur Trockene und erneutes Suspendieren in *tert.*-Butanol/ H_2O 19/1 um NaCl zu lösen.

Effekt: Nach der Trocknung verblieb ein Rückstand zäher Konsistenz (ausgefallene Bestandteile der Enzympräparation), der sich nicht mehr suspendieren ließ.

5) Extraktion mit CH_2Cl_2 , anschließende Acetylierung der freien Aminfunktion und bei pH 3 erneute Extraktion des acetylierten Produktes.

Effekt: Die Acetylierung verlief nicht quantitativ, zusätzlich wurde eine signifikante Racemisierung der Acetylverbindung festgestellt.

6) analog 5, jedoch Benzylierung der Aminosäure

Effekt: Reaktionsschritt nicht quantitativ, Produktracemisierung (ee-Wert der Aminosäure (hier: Leucin) in Lösung vor der Benzylierung 90 % ee, nach der Derivatisierung 80 % ee)

Nachdem alle Versuche mit unbefriedigendem Ergebnis verlaufen waren, wurde noch ein Verfahren mit Hilfe von Ionentauschermaterial in Betracht gezogen. Dabei sollte eine selektive Absorption der Aminosäure erreicht werden. Es bieten sich in der experimentellen Realisierung zum einen der säulenchromatographische Aufbau an, zum anderen kann auch ein Batchexperiment durchgeführt werden, in dem die sich in Lösung befindliche Aminosäure mit dem Tauschermaterial gerührt wird. Die am Tauschermaterial gebundene Aminosäure wird anschließend über Filtration und Waschoptionen von allen Nebenprodukten abgetrennt und durch einen geeigneten Eluenten (z.B. 1N NH₃-Lösung) wieder freigesetzt. Eine geeignete Vorschrift zur Durchführung der Ionentauscherchromatographie wurde in Lit^[73] gefunden. Es mußte jedoch beim Nachvollziehen der Vorschrift festgestellt werden, daß zwar eine quantitative Absorption der Aminosäure am Kationentauschermaterial erfolgt, das Tauschermaterial jedoch eine schnelle hydrolytische Aminosäureesterspaltung zur Aminosäure bewirkt, die natürlich erheblichen Einfluß auf die optische Reinheit des Produktes hat. Man kann nun entgegenhalten, daß der Ester im Vorfeld durch Extraktion abzutrennen wäre, jedoch ist die Schiff'sche Base durch den stark polaren und damit hydrophilen Aldehydpart nicht vollständig extrahierbar. Damit ist auch diese Methode der Aufarbeitung für das hier gestellte Problem nicht geeignet.

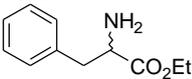
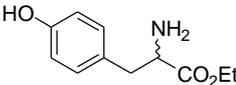
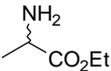
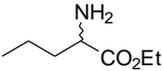
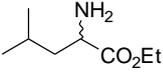
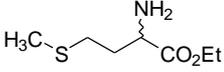
Nach den verschiedenen gescheiterten Experimenten wurde entschieden, die Aufarbeitungsproblematik zunächst nicht weiter zu verfolgen. und die nicht mögliche quantitative Gewinnung der Aminosäure hinzunehmen.

6.2.5 Weitere Optimierung der Reaktion

Um einen exakten Vergleich der Reaktion einzelner Aminosäurederivate vornehmen zu können, wurden alle Aminosäuren als Ethylesterderivate dargestellt und unter identischen Bedingungen der dynamischen kinetischen Racematspaltung unterworfen. Für die genaue Umsatzbestimmung wurden für Produkt und Edukt jeder Aminosäure GC bzw. HPLC-Methoden entwickelt. Um das Verfahren weiter zu optimieren, wurde als racemisierungsaktiver Aldehyd 3,5-Dinitrosalicylaldehyd eingesetzt, die zugesetzte katalytische Menge ist mit 2.5 mol% nochmals um 50 % reduziert worden. Dieser Aldehyd ist

der racemisierungsaktivste Vertreter, daher sollte trotz der vorgenommen Reduzierung der katalytischen Menge eine vergleichbare Racemisierungsgeschwindigkeit (verglichen mit 5.0 mol% 3,5-Dichlorsalicyl-aldehyd) gewährleistet sein. Die bewährte Durchführung der Reaktion bei Raumtemperatur (siehe Tabelle 8) sowie der durch einen Autotitrator konstant gehaltene pH-Wert von 7.5 für Ethylesterderivate von Aminosäuren wurde beibehalten.

Tabelle 8: 3,5-Dinitrosalicylaldehyd-katalysierte DKR verschiedener Aminosäureethylester

Eintrag	Substrat	Zeit [d]	pH	Ausbeute [%]	ee(L) [%]
1		2	7.5	93	99
2		1	7.5	87 ^{a,b}	97
3		3	7.5	93	90
4		4	7.5	98	64
5		3	7.5	99	98
6		2	7.5	96	89

Bed.: 20 mmol Substrat, 1 mL Alcalase, 50 mL MeCN, 50 mL H₂O, 2.5 mol% 3,5-Dinitrosalicylaldehyd, RT.

^a Ausbeute

^b 94 % Ausbeute, 95 % ee nach 2 Tagen Reaktionszeit.

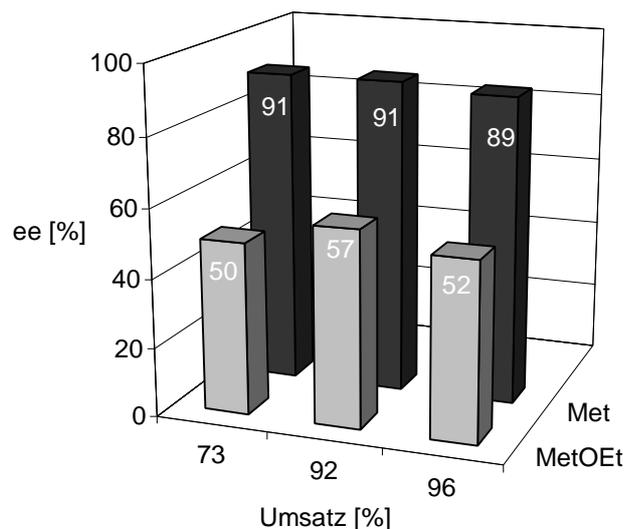
Die Einträge **1-6** zeigen, daß alle Aminosäureester in nahezu quantitativen Umsätzen (93-99 %) mit sehr guter bis absoluter Selektivität (89-99 % ee) zu den Produkten umgesetzt werden können. Die auch hier zu verzeichnende mäßige Selektivität im Fall von Norvalin ist angesichts der übrigen Ergebnisse einer geringeren Enzymselektivität zuzuschreiben, alle anderen Parameter der Reaktion sind gemessen an den Ergebnissen im optimalen Bereich. Die Reduzierung der Aldehydmenge wirkt sich wie erhofft nicht negativ bzgl. Reaktionszeit oder Produktselektivität aus. Vorteilhafterweise ist eine Selektivitätssteigerung und eine signifikante Verkürzung aller Reaktionszeiten eingetreten (zum Vergleich: Einträge **3,4,5,7** Tabelle 7). Als eine mögliche Erklärung kann folgende Überlegung dienen: Die sehr aktiven Aldehydverbindungen kondensieren nicht nur mit den Aminosäureestern zu Schiff'schen Basen, sondern binden sich ebenfalls an die Proteinstruktur des Enzyms, wodurch eine Konformationsänderung des Enzyms durch die eintretende Änderung der Proteinoberfläche

denkbar ist. Eine hohe Aldehydkonzentration führt entsprechend in einem höheren Ausmaß zu Kupplungsreaktionen mit dem Enzym, wodurch sowohl Aktivität und Selektivität negativ beeinflusst werden können. Eine Erniedrigung der Aldehydmenge kann im Umkehrschluß zu höherer Enzymaktivität und Selektivität führen, wie sie hier beobachtbar wird.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß bifunktionelle Aldehydverbindungen ein häufig eingesetztes Mittel zur Fixierung von Enzymen an Trägermaterialien sind. Die immobilisierten Enzyme weisen oftmals vorteilhafte Eigenschaften im Vergleich zu ihren nativen Vertretern auf. Generell besitzen sie jedoch eine geringere spezifische Aktivität unter Standardbedingungen.^[74]

6.2.6 Simultane Beobachtung der zeitlichen Entwicklung der Enantiomerenverhältnisse der beteiligten Verbindungen

Um Rückschlüsse auf die relativen Geschwindigkeiten der Eduktracemisierung und der enzymatischen Hydrolyse zu gewinnen, war es sinnvoll, die zeitliche Entwicklung der Enantiomerenverhältnisse zu verfolgen. Zu diesem Zweck sollte eine Analysenmethode entwickelt werden, die ohne Derivatisierungsschritte neben einer Umsatzbestimmung auch die gleichzeitige Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von Produkt und Edukt zuläßt. Im Fall der Stoffpaare Phenylalanin/Phenylalaninethylester und Methionin/Methioninethylester ist dies via HPLC gelungen. Für die besonders interessante Kombination mit Norvalin gelang dies leider nicht. Die Ergebnisse für Methionin/Methioninethylester zeigt Abbildung 26.

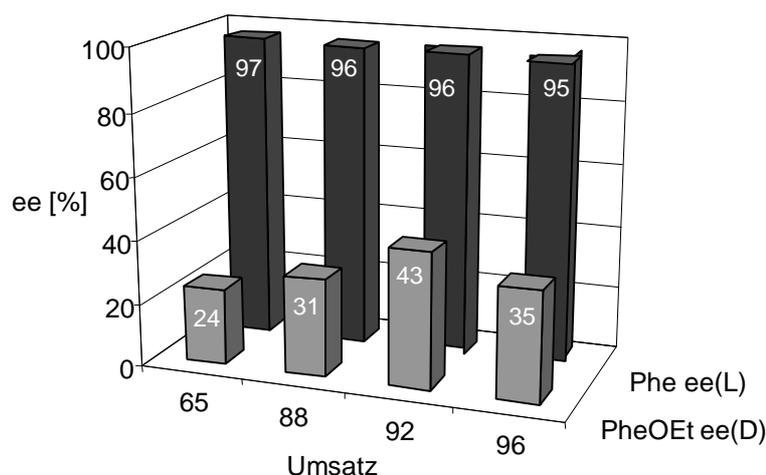


Bed.: 20 mmol MetOEt, 1.0 mL Alcalase, 50 mL MeCN, 50 mL H₂O, 2.5 mol% 3,5-Dinitro-salicylaldehyd, pH 7.5, RT.

Abbildung 26: Enantiomerenüberschüsse von L-Methionin und D-Methioninethylester in Abhängigkeit des Umsatzes

Es zeigt sich, daß sowohl Methionin als auch Methioninethylester ein nahezu konstantes Enantiomerenverhältnis unabhängig von Umsatz bewahren. Der mit etwa 50 % ee zu beziffernde Enantiomerenüberschuß von Met-OEt bedeutet eine prozentuale Enantiomerenzusammensetzung von 75 %D zu 25 %L in Lösung. Damit verschlechtert sich bei konstantem E-Wert des Enzyms die Selektivität der Produktbildung im Vergleich zu einer racemischen Mischung (50 %D, 50 %L) um den Faktor 3. Trotzdem ist das erzeugte Methionin mit etwa 90 % ee (95 %L, 5 %D) hoch enantiomerenrein, was auf einen außerordentlich hohen E-Wert des Enzyms schließen läßt.

Die Umsatzunabhängigkeit der Enantiomerenzusammensetzungen läßt aus kinetischer Sicht auf einen konstanten k_{rac}/k_{inv} -Wert schließen. Berücksichtigt man die Tatsache, daß bei der Eduktracemisierung unabhängig von der Eduktenantiomerenzusammensetzung nur mit 50 %iger Wahrscheinlichkeit das L-Enantiomer entsteht, so ist die Racemisierungsgeschwindigkeit im hier beobachteten Fall mindestens doppelt so hoch wie die Produktbildungsgeschwindigkeit (Abbildung 27). Phenylalanin wird zwischen 65 % und 96 % Umsatz mit konstant hoher Selektivität gebildet. Der minimale Selektivitätsverlust gegen Ende der Reaktion ist möglicherweise durch eine Verschiebung der Eduktenantiomeren-verhältnisse zu ungunsten des L-Esters zu erklären.



Bed.: 20 mmol PheOEt, 1.0 mL Alcalase, 50 mL MeCN, 50 mL H₂O, 2.5 mol% 3,5-Dinitro-salicylaldehyd, pH 7.5, RT.

Abbildung 27: Enantiomerenüberschüsse von L-Phenylalanin und D-Phenylalaninethylester in Abhängigkeit des Umsatzes

Die umsatzbezogene Entwicklung der Esterzusammensetzung folgt keinem einheitlichen Trend, was als Indiz für eine wechselnde Racemisierungs- oder Hydrolysegeschwindigkeit gelten könnte. Dennoch liegt der Ester mit einem durchschnittlichen ee-Wert von 33 % in einem Enantiomerenverhältnis von 66 %D zu 33 %L vor, bei gegebenem E-Wert sinkt die Selektivität der Produktbildung im Vergleich zum Racemat nur um den Faktor 2. Auch in dieser Umsetzung besitzt das Enzym einen hohen E-Wert, da das Produkt trotzdem fast enantiomerenrein gebildet wird.

6.2.7 Neue Untersuchungen zur Racemisierung von Aminosäureestern

6.2.7.1 Kenntnisstand

Die Racemisierung von Aminosäureestern mit Hilfe von Aldehyden oder Ketonen ist ein intensiv untersuchtes Gebiet, erlaubt es doch im Vergleich zur thermischer Racemisierung eine sehr viel kürzere und schonendere Reaktionsführung (häufig 50-100 °C statt 100-200 °C).^[75] Damit lassen sich Nebenreaktionen der Verbindungen auf ein Minimum reduzieren (Substanzwiedergewinnung: 70-100 %).^[75]

Der Racemisierungsmechanismus verläuft zunächst mit der reversiblen Kondensation von Ester und Carbonylkomponente zur Schiff'schen Base, welche sich im Vergleich zum Ester durch eine erhöhte Acidität des α -Wasserstoffatoms auszeichnet (Mechanismus siehe Abschnitt 6.2.8.1). Die nachfolgende De- und Reprotonierung der Schiff'schen Base vollzieht sich über die Keto-Enol-Tautomerisierung.^[76]

Von besonderem Interesse sind Verfahren, die eine *in-situ* Kombination mit einer fraktionierten Diastereomerenkristallisation zulassen. Dadurch kann prinzipiell analog zur dynamischen kinetischen Racematspaltung das enantiomerenreine Produkt in stöchiometrischer Ausbeute gewonnen werden. Verfahren dieser Art sind für Phenylglycinester,^[77] Phenylglycinamide,^[78,79,80] Phenylalaninmethylester^[81] und andere Verbindungen^[82] beschrieben.

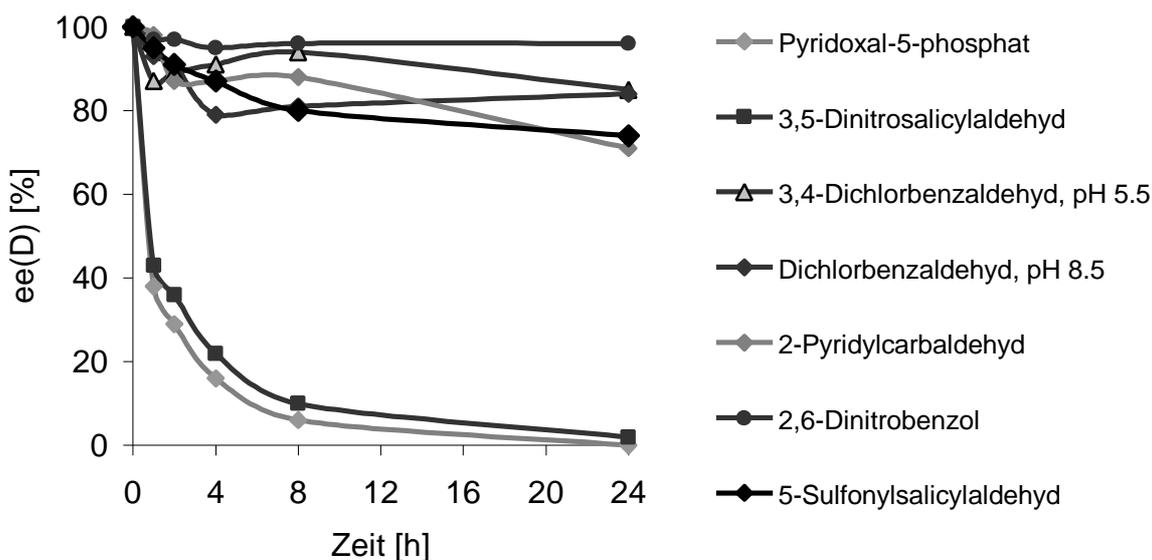
6.2.7.2 Eigene Untersuchungen

Die Kombination von aldehydvermittelter Racemisierung mit enzymatischer Hydrolyse ist von Chen für Aminosäuren^[68] und von Williams^[83] für 2-Phenylpropionsäure geschildert worden, doch sind keine Arbeiten über einen Vergleich des Racemisierungspotentials verschiedener Aldehyde an einem Substrat bekannt.

Obwohl in eigenen Arbeiten (siehe Diplomarbeit) eine Reihe von aktiven Verbindungen gefunden werden konnte, schien es lohnenswert im Sinne einer möglichen weiteren Verbesserung des DKR-Verfahrens, mit einem Screening weitere Aldehydverbindungen auf ihre Aktivität zu prüfen. Besonderer Augenmerk sollte dabei auf strukturell einfacher aufgebaute und damit preiswertere Verbindungen gelegt werden.

Hierzu eigneten sich Experimente, die die zeitliche Racemisierung einer enantiomerenreinen Verbindung unter Zusatz der Aldehydkomponente beschreiben. Für die nachfolgenden Versuche wurden jeweils nach 1,2,4,8 und 24 Stunden Proben der Reaktionslösung entnommen und die Enantiomerenverteilung mittels GC bestimmt.

Die Ergebnisse der Racemisierung von D-Phenylalaninbenzylester sind in Abbildung 28 zusammengefasst.



Bed.: 200 mg D-PheOBzl, 20 mol% Aldehyd, 10 mL DME/H₂O 3/1, pH = 8.5, RT.

Abbildung 28: Kinetiken zur Racemisierung von D-Phenylalaninbenzylester mit verschiedenen Aldehydverbindungen.

Es zeigt sich eindeutig, daß keine der neu untersuchten Verbindungen eine Racemisierung in befriedigender Geschwindigkeit gewährleistet, mit Ausnahme von 5-Sulfonylsalicylaldehyd, bei welchem eine sehr langsame aber stetige Abnahme der optischen Reinheit der Referenzverbindung zu beobachten war. Dies bestätigt die bisherige Annahme, daß racemisierungsaktive Verbindungen neben elektronenziehenden Substituenten am aromatischen Ring zusätzlich eine Hydroxygruppe in *ortho*-Position zur Aldehydfunktion aufweisen müssen.

In weiteren Experimenten wurden Benzaldehyd, substituierte Benzaldehyde, Fluorenderivate und andere Verbindungen analog untersucht, die in Tabelle 9 dargestellten Ergebnisse wurden jedoch größtenteils nicht selbst durchgeführt (eigene Versuche sind mit * markiert).⁹

⁹ Die Experimente wurden von Dr. Thomas Riermeier (Aventis Research & Technologies) durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Tabelle 9: : Screening zur Racemisierungsaktivität verschiedener Verbindungen an der Referenzsubstanz L-PheOEt.

Racemisierungskatalysator	pH-Wert	Zeit [h]	ee-Wert
Benzaldehyd*	8.5	24	96
Benzaldehyd	8.5	24	100
Benzaldehyd + LiBr	8.5	24	100
Benzaldehyd + Sc(CF ₃ SO ₃) ₃	8.5	24	100
Salicylaldehyd*	8.5	24	93
Salicylaldehyd	8.5	24	68
Salicylaldehyd + LiBr	8.5	24	60
Salicylaldehyd + Sc(CF ₃ SO ₃) ₃	8.5	24	24
2-Hydroxy-1-naphthaldehyd	8.5	24	56
4-Carboxybenzaldehyd*	8.5	24	98
2-Carboxybenzaldehyd	7.7	24	54
3-Carboxybenzaldehyd	7.5	24	100
2-Carboxybenzaldehyd	5.0	120	46
2-Carboxybenzaldehyd	7.0	120	12
2-Carboxybenzaldehyd	9.0	120	40
1-Carboxy-8-naphthaldehyd	8.5	24	100
2,2`-Dihydroxybenzophenon	8.5	24	100
5-Chlor-2-hydroxy-benzophenon	8.5	24	100
9-Fluorenon	7.8	24	100
9-Fluorenon-1-carbonsäure	5.0	120	62
9-Fluorenon-1-carbonsäure	7.0	120	2
9-Fluorenon-1-carbonsäure	9.0	120	36
Isatin*	8.5	24	100
3-Nitro-5-bromsalicylaldehyd*	8.5	24	0
4-Nitrobenzaldehyd*	8.5	24	100
ohne*	8.5	24	98
ohne	8.5	24	100

Bed.: 10 mmol L-Phe-OEt, 10 mol% Kat., MeCN/H₂O 9/1, 40 °C.

* 0.686 mmol Ester, 20 mol% 3,5-Dichlorsalicylaldehyd, 2 mL H₂O, 8 mL DME, pH 8.5, RT.

Das erweiterte Screening umfaßte neben der Variation des Katalysator an sich ebenso Modifikationen im pH-Wert der Reaktionsführung. In einigen Experimenten wurden zusätzlich Salze wie LiBr oder $\text{Sc}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ eingesetzt.

Es ist festzustellen, daß in keinem Experiment Verbindungen oder Bedingungen gefunden werden konnten, die eine nutzbare Racemisierungsaktivität erkennen lassen. Als Ausnahme ist nur das Experiment mit 3-Nitro-5-bromsalicylaldehyd zu nennen, welches den Erwartungen (hohe Racemisierungsaktivität) bei Verwendung eines elektronenarmen Derivates des Salicylaldehydes entspricht. Die Verbindung ist zwar eine gleichwertige Alternative zu den bisherigen Verbindungen, das kompliziertere Substitutionsmuster am Aromatenring unterstützt die Bestrebungen der angestrebten Vereinfachung der Gesamtreaktion allerdings nicht.

Die Variation des pH-Wertes bei Reaktionen mit 2-Carboxybenzaldehyd und 9-Fluorenon-1-Carbonsäure ergibt zwar bei $\text{pH} = 7$ im Vergleich zu $\text{pH} = 5$, bzw. $\text{pH} = 9$ eine signifikante Steigerung bei der Racemisierung, dennoch ist die Geschwindigkeit der Racemisierung für präparative Zwecke nicht ausreichend.

In einigen Fällen wurden Salze als Additive zugesetzt, Motivation hierzu war die Überlegung, daß Salze bekanntermaßen stabile Komplexe mit Schiff'schen Basen bilden können.^[84,85] Die Komplexierung erfolgt für gewöhnlich an der Aldimin- und Esterfunktion, in den Experimenten mit Salicylaldehyd alternativ über die 2-Hydroxygruppe. Eventuell kann durch diese Komplexierung eine weitere Aktivierung des α -Wasserstoffatoms im Hinblick auf eine vereinfachte Enolisierung der noch nicht ausreichend reaktiven Schiff'schen Base erreicht werden. Die experimentellen Daten stützen diese Überlegungen jedoch nicht.

Als Resümee der Untersuchungen über alternative Racemisierungskatalysatoren kann festgehalten werden, daß keine neuen potentiell interessanten Alternativen zu den bereits bekannten Racemisierungskatalysatoren wie den 3,5-disubstituierten Salicylaldehyden gefunden werden konnten, die folglich immer noch als Katalysatoren der Wahl gelten.

6.2.8 Synthese und Charakterisierung von Schiff'schen Basen

6.2.8.1 Hintergrund

Die in dieser Arbeit durchgeführte dynamische kinetische Racematspaltung von Aminosäureestern ist im wesentlichen von zwei Einflußgrößen abhängig. Zum einen bestimmt die Enzymselektivität bei der Hydrolyse der Aminosäureester die Enantiomerenreinheit des Produktes, zum anderen muß durch geeignete Katalysatoren eine ausreichende Racemisierungsgeschwindigkeit des Aminosäureesters gewährleistet werden, damit die enzymatische Verseifung des erwünschten L-Enantiomers bis hin zu quantitativem Umsatz aufrechterhalten werden kann. Der Mechanismus der Pyridoxal-katalysierten Racemisierung ist in Abbildung 29 gezeigt.

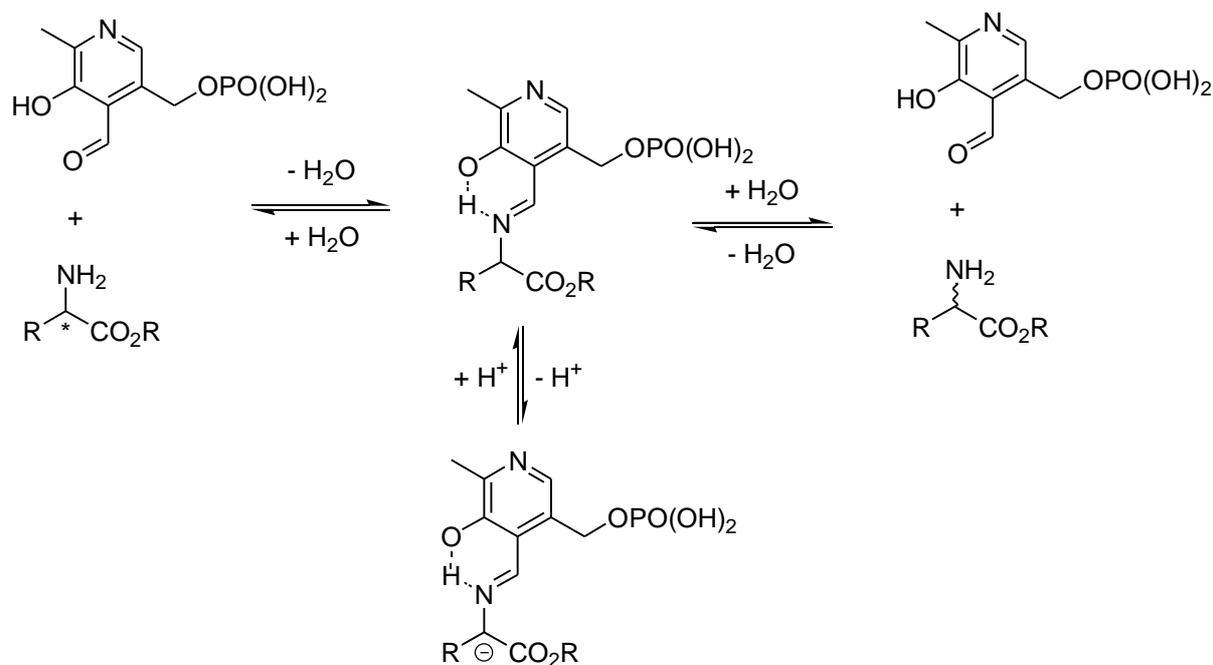


Abbildung 29: Racemisierung von Aminosäureestern mit Pyridoxal-5-phosphat

Im ersten Schritt kondensieren Aminosäureester und Pyridoxal zur korrespondierenden Schiff'schen Base. Durch die stattgefundene Derivatisierung der Aminogruppe zur Aldiminfunktion wird die Stabilität des chiralen Zentrums des Aminosäureesterfragmentes erniedrigt, so daß bereits ein neutrales bis leicht alkalisches Reaktionsmilieu ausreicht, die Schiff'sche Base reversibel zu deprotonieren. Dieser Schritt führt zur Racemisierung des Aminosäureesters. Die Kondensationsreaktion zur Schiff'schen Base selbst ist in ein

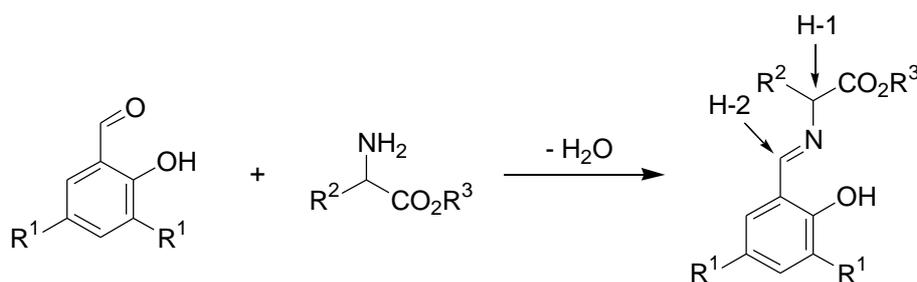
dynamisches Bildungs- und Zerfallsgleichgewicht eingebunden, was zur Folge hat, daß die Verbindung wieder in ihre Spaltprodukte Pyridoxal und Aminosäureester zerfällt.

In der eigenen Arbeit konnten sowohl eine Reihe von selektiven Racemisierungskatalysatoren identifiziert als auch grundlegende Richtlinien zur Abschätzung der Racemisierungswirkung von Aldehydverbindungen formuliert werden. Dennoch bestand weiterhin Bedarf an strukturell einfach aufgebauten Racemisierungskatalysatoren. Eine genauere Studie zur Art und Weise der Aktivierung von Aminosäureestern war deshalb sinnvoll. Die Aktivierung des α -Wasserstoffatoms des Aminosäureester sollte sich unter anderem $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch nachvollziehen lassen. Weiterführende Informationen könnten möglicherweise aus einer Röntgenstruktur von racemisierungsaktiven Schiff'schen Basen erhalten werden.

Daher wurde versucht, eine Reihe von Schiff'schen Basen von Aminosäuren und racemisierungsaktiven bzw. inaktiven Aldehyden darzustellen und über NMR-spektroskopische Methoden zu charakterisieren.

6.2.8.2 Ergebnisse

Für die Darstellung der entsprechenden Verbindungen mußten verschiedene Aminosäureester mit racemisierend wirkenden Aldehydverbindungen bzw. mit Salicylaldehyd als inaktive Aldehydverbindung kondensiert werden.¹⁰ Arbeitsvorschriften zur Darstellung Schiff'scher Basen finden sich in der Literatur^[86,87,88], die angewendeten Synthesemethoden sind in Abschnitt 10.2.3 beschrieben, die Reaktion ist in Gleichung 2 gezeigt.



Gleichung 2: Allgemeine Darstellung Schiff'scher Basen aus Aminosäureestern und Aldehyden

¹⁰ Zunächst sollte zur optimalen Vergleichbarkeit der auftretenden Effekte eine Reihe Schiff'scher Basen mit dem Fragment Phenylalaninbenzylester dargestellt werden. Auftretende Probleme bei Synthese und Charakterisierung (nicht identifizierbare Produkt-Edukt Gemische) führten zum Einsatz anderer Aminosäureesterderivate.

Während die Synthese von Salicylaldehydderivaten unproblematisch verlief, stellten sich erhebliche Syntheschwierigkeiten bei der quantitativen Kondensationsreaktion mit racemisierungsaktiven Verbindungen wie 3,5-mono- bzw. disubstituierten Salicylaldehydderivaten ein. Obwohl gerade diese Verbindungen bei dynamischen kinetischen Racematspaltungen unmittelbar mit dem vorhandenen Aminosäureester kondensieren, muß an dieser Stelle festgestellt werden, daß ein schwierig zu beeinflussendes Gleichgewicht zwischen dem Kondensationsprodukt (Schiff'sche Base) und seinen Fragmenten (Aldehyd und Aminosäureester) besteht. Selbst unter Verwendung von trockenen Lösungsmitteln mit wasserentziehenden Substanzen wie z.B. Molsieb, ließ sich keine vollständige Kondensation erzwingen, was vor allem die Charakterisierung der Produkte erschwerte. Dennoch konnten die in Tabelle 10 gezeigten Verbindungen NMR-spektroskopisch nachgewiesen und charakterisiert werden. Als Vergleich sind die chemischen Verschiebungen der Wasserstoffatome der freien Aminosäureester aufgeführt (die Aminosäureesterhydrochloride sind neutralisiert und deren Spektren in CDCl_3 aufgenommen worden).

Tabelle 10: NMR-spektroskopischen Resonanzen interessanter Wasserstoffatome

Eintrag	Verbindung	H-1	H-2
1	<i>N</i> -(2-Hydroxybenzyliden)-alaninethylester	4.30	8.61
2	<i>N</i> -(2-Hydroxy-5-nitrobenzyliden)-alaninethylester	4.15	8.25
3	Alaninethylester	4.01	-
4	<i>N</i> -(2-Hydroxy-3,5-Dichlorbenzyliden)-phenylalaninbenzylester	4.15	7.74
5	Phenylalaninbenzylester	4.22	-
6	<i>N</i> -(2-Hydroxybenzyliden)-phenylalaninethylester	4.08	7.95
7	<i>N</i> -(2-Hydroxy-5-nitrobenzyliden)-phenylalaninethylester	4.17	7.89
8	Phenylalaninethylester	4.00	-
9	<i>N</i> -(2-Hydroxy-3,5-dinitrobenzyliden)-tyrosinbenzylester	4.81	8.21
10	<i>N</i> -(2-Hydroxy-5-nitrobenzyliden)-tyrosinbenzylester	4.42	7.91
11	Tyrosinbenzylester	4.29	-

Die Änderung der chemischen Verschiebungen der α -Wasserstoffatome beim Übergang von der freien Aminosäureesterverbindung zur Schiff'schen Base folgt nicht wie erwartet einem

einheitlichen Trend. Es kann sowohl eine auffällige Tieffeldverschiebung des Signals für das α -Wasserstoffatom beim Vergleich von Tyrosinbenzylester (H-1 4.29 ppm, Eintrag **11**) zu *N*-(2-Hydroxy-3,5-dinitrobenzyliden)-tyrosinbenzylester (H-1 4.81, Eintrag **9**), als auch eine leichte Verschiebung zu hohem Feld im Fall von Verbindung **4** und Phenylalaninbenzylester beobachtet werden. Ein Vergleich von racemisierungsinaktiven Schiff'schen Basen und aktiven Verbindungen zeigt am Beispiel der Phenylalaninethylesterderivate (Einträge **6,7,8**), daß sich die chemischen Verschiebungen der beiden Schiff'schen Basen von der Ausgangsverbindung wenig unterscheiden.

In gleicher Weise unspezifisch verhalten sich die Signale der Wasserstoffatome der Aldimingruppen. Die chemischen Verschiebungen der Aldiminprotonen von den Verbindungen **1** (H-2 8.61 ppm) und **6** (H-2 7.95 ppm) sind etwas mehr zu tiefem Feld verschoben, als die korrespondierenden Signale der racemisierungsaktiven Schiff'schen Basen **2** (H-2 8.25 ppm) und **7** (H-2 7.89 ppm).

Die meisten Verbindungen fallen als Öle an, die in seltenen Fällen nach längerer Zeit zu kristallisieren beginnen, das Züchten röntgenfähiger Kristalle war in keinem Fall möglich. Es muß festgehalten werden, daß eine Einschätzung der Reaktivität von Schiff'schen Basen nicht über die chemischen Verschiebungen der an der Racemisierung beteiligten Wasserstoffatome möglich ist.

6.2.9 Eine weitere mögliche Anwendung der Aldehyd-katalysierten Racemisierung von Aminosäureestern ?

6.2.9.1 Hintergrund

In dieser Arbeit wurden aktive und schnelle Katalysatoren für die Racemisierung einer Reihe von Aminosäureestern erkannt, die sich zudem vorteilhaft mit der enzymatischen Hydrolysereaktion kombinieren ließen, womit eine effektive dynamische kinetische Racematspaltung von Aminosäureesterderivaten möglich wurde. Führt man sich die bisher literaturbekannten Anwendungen (siehe auch Abschnitt 6.2.7.1) der Aminosäureesterracemisierung vor Augen, die prinzipiell das Potential einer quantitativen Gewinnung optisch reiner Folgeprodukte haben, so läßt sich folgende vereinfachte Übersicht skizzieren.

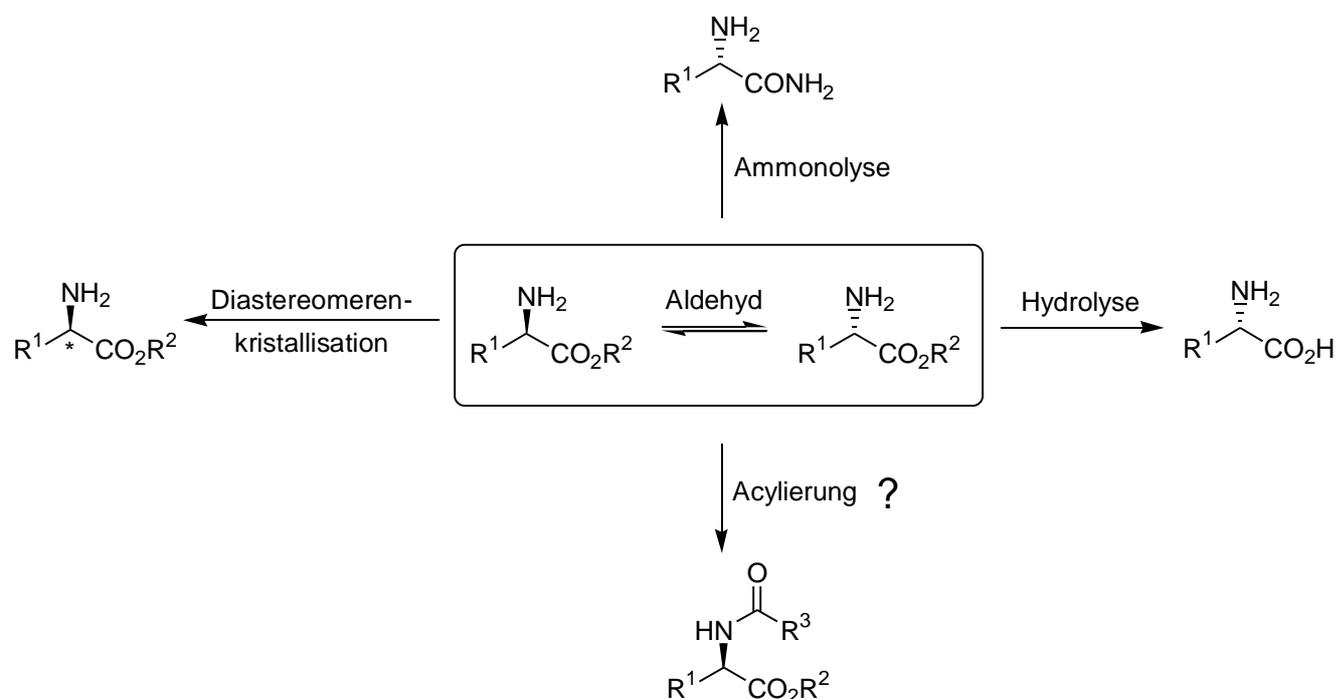
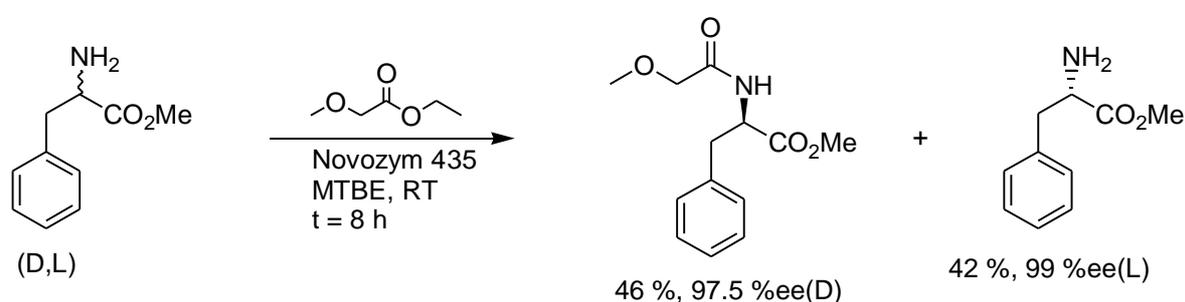


Abbildung 30: Bekannte Anwendungen der *in-situ* Racemisierung von Aminosäureestern

Neben der fraktionierten Diastereomertrennung, die als weitaus industriell relevante Methode mit zahlreichen Anwendungen einzuschätzen ist, sind die dynamischen kinetischen Racematspaltungen von Chen,^[69] die eigene vorliegende Arbeit und der Beitrag von Sheldon^[39] zu nennen. Auffällig an den Arbeiten mit Enzyμβeteiligung ist, daß die stereoselektiven Transformationen zu den racemisierungsstabilen Folgeprodukten sich auf die geschützte Carboxylgruppe beschränken. Die Vielzahl an Arbeiten, die effektive und praktikable enzymatische Transformationen unter C-O-Bindungsbildung oder -bruch

beschreiben^[74] machen diese Strategie verständlicherweise besonders attraktiv. Dennoch sollte spätestens nach dem Erscheinen von wegweisenden Arbeiten über die enzymatische Acylierung von racemischen Aminen^[89,90,91] auch diese Möglichkeit der Reaktionsführung bei der DKR von Aminosäureestern Beachtung finden. An dieser Stelle sei nochmals auf die erste dynamische kinetische Racematspaltung von 1-Phenylethylamin hingewiesen.^[57] Nach der Veröffentlichung eines Patentes zur Lipase-katalysierten enantioselektiven Acylierung von Phenylalaninmethylester^[92] schien es vielversprechend, diese Racematspaltung mit der selbst entwickelten Racemisierungsmethode zu kombinieren.

Die angesprochene Racematspaltung sei am Beispiel von Phenylalaninmethylester gezeigt.



Gleichung 3: Racematspaltung von DL-Phe-OMe durch Lipase-katalysierte Methoxyacetylierung

Die Racematspaltung verläuft mit minimaler Enzymmenge (ca. 1 Gewichtsprozent Novozym 435 bzgl. DL-PheOMe) bei Raumtemperatur. Nach nur 8 Stunden Reaktionszeit lassen sich 46 % annähernd enantiomerenreiner (97.5 % ee) *N*-Methoxyacetylphenylalaninmethylester isolieren.

6.2.9.2 Eigene Ergebnisse

Um eine dynamische Variante dieser Racematspaltung zu realisieren, erschien es zunächst sinnvoll zu überprüfen, ob sich die Aminosäureester im Lösungsmittel MTBE durch geeignete Aldehydverbindungen racemisieren lassen. Eine Racemisierung in einem organischen Lösungsmittel ohne signifikanten Wasseranteil könnte sich als schwierig herausstellen, da Wasser mehrere wichtige Funktionen bei der Racemisierung der Schiff'schen Base besitzt (siehe Racemisierungsmechanismus Abschnitt 6.2.8.1).

Die Racemisierungsreaktionen wurden wiederum mit *D*-Phenylalaninbenzylester als Testsubstanz und 20 mol% 3,5-Dichlorsalicylaldehyd durchgeführt, da die Ergebnisse sich

erfahrungsgemäß auf andere Esterderivate übertragen lassen. Da sich zu diesem Zeitpunkt die Geschwindigkeit der Racemisierung nicht abschätzen ließ, wurde eine relativ große Menge Racemisierungskatalysator gewählt. Eine weitere Einflußgröße der Racemisierung ist der pH-Wert der Reaktion, alle im Vorfeld durchgeführten Racemisierungsreaktionen wurden bei pH = 8.5 untersucht. Um die Bedeutung des pH-Wertes bei Reaktionen in MTBE abschätzen zu können, wurde die Lösung des Aminosäureesters vor der Reaktion mit einer wässrigen Pufferlösung behandelt, um so den pH-Wert des Reaktionsmediums zu definieren.

Testsubstanz	pH-Einstellung	Zeit [h]	ee(D)
D-PheOBzl	8.5	8	3
D-Phe-OBzl	5.5	8	10

Bed.: 200 mg D-Phe-OBzl, 20 mol% 3,5-Dichlorsalicylaldehyd, 10 mL MTBE, Vorbehandlung durch wässrige Pufferlösung, T = 40 °C

Die erhaltenen Ergebnisse nach 8 Stunden Reaktionszeit zeigen erfreulicherweise die nahezu komplette Racemisierung der Testsubstanz. Weiterhin fällt auf, daß der pH-Wert der Lösung entgegen bisheriger Annahmen keine entscheidende Einflußgröße der Racemisierung zu sein scheint. Wie spätere Untersuchungen zur Löslichkeit von Wasser in MTBE ergeben sollten, liegt der Wassergehalt der MTBE-Lösung durch die Behandlung mit wässriger Pufferlösung bei max. 1 Vol%. Es kann also davon ausgegangen werden, daß geringe Wassermengen im Lösungsmittel bzw. das bei der Kondensationsreaktion von Aminosäureester und Aldehyd zwischenzeitlich freigesetzte Wasser für die Racemisierung ausreichend sind.

Diese Tatsache ist besonders erfreulich, da größere Mengen an Wasser die Gefahr mit sich bringen, bei der enzymatischen Acylierung zu stören. Wasser als aktives Nukleophil würde mit Hilfe der Lipase das reaktive Acylierungsmittel Methoxyessigsäureethylester zu Methoxyessigsäure hydrolysieren.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde nun versucht, eine dynamische kinetische Racematspaltung von DL-Phenylalaninethylester durchzuführen. Die Arbeitsvorschrift des Patentes^[92] zur klassischen Racematspaltung via Methoxyacetylierung des racemischen Aminosäureesters (siehe Gleichung 3) wurde bei Reduzierung der Ansatzgröße und Durchführung der Reaktion unter Argonatmosphäre übernommen. Auf eine vorherige Einstellung des pH-Wertes wurde dementsprechend verzichtet. Die Freisetzung des Aminosäureesters aus der Hydrochloridverbindung erfolgte durch mehrmalige Extraktion der

wässrigen Lösung bei pH 8-9 mit Ethylacetat, welches nach Trocknung wieder am Vakuum entfernt wurde.

Tabelle 11: Erste Versuche der Lipase-katalysierten DKR von DL-Phe-OEt

Eintrag	Substrat	Aldehydmenge	T [°C]	t [h]	Ausbeute [%]	ee(D) [%]
1	DL-Phe-OEt	5 mol%	RT	20	0	-
2	DL-Phe-OEt	5 mol%	40	24	0	-
3	DL-Phe-OEt	kein	RT	24	0	-

Bed.: 16.0 mmol DL-Phe-OEt, 20 mL MTBE, 16.8 mmol Methoxyessigsäure-ethylester, 100 mg Novozym 435.

Die durchgeführten Reaktionen **1** und **2** zeigen völlig überraschend keinen Umsatz, nicht einmal Spuren an Produkt konnten nachgewiesen werden.

Es galt nun mögliche Ursachen für das Scheitern der Reaktion zu finden. Folgende Ursachen wurden in Erwägung gezogen:

1. Qualität aller beteiligten Reagenzien, wie Lösungsmittel, Acylierungsmittel, Substrat.
2. Enzymaktivität.
3. Eignung von DL-Phe-OEt.
4. störender Aldehydeinfluß auf die Reaktion.

Zunächst kann man annehmen, daß die Aldehydverbindung 3,5-Dichlorsalicylaldehyd das Enzym (hier: Novozym 435) inhibiert. Deshalb wurde versucht, die klassische Racematspaltung des Patentes nachzuvollziehen (Eintrag **3**). Es zeigte sich jedoch, daß die Patentvorschrift ebenso nicht reproduziert werden konnte. Die Präsenz des Racemisierungskatalysators im Reaktionsmedium war demnach nicht primär für das Nichtgelingen der Reaktion verantwortlich.

Die Aktivität der Enzymcharge wurde an der enantioselektiven Methoxyacetylierung von racemischen 1-Phenylethylamin getestet, die nach Literaturvorschrift^[91] durchgeführt wurde. Für diese Reaktion, die unter Argonatmosphäre durchgeführt wurde, sind über Natrium absolutiertes MTBE und die unter Schutzgas destillierten Verbindungen 1-Phenylethylamin und Methoxyessigsäureethylester eingesetzt worden. Nach 24 Stunden Reaktionszeit konnte *N*-Methoxyacetyl-1-phenylethylamin in 53 % Ausbeute und mit einem ee-Wert von 84 % (D) erhalten werden, was den Literaturwerten (52 %, 93 % ee(D)) gut entspricht. Damit schied auf der Suche nach der entscheidenden Fehlerquelle der beabsichtigten Reaktion das

immobilisierte Enzym ebenfalls aus. Für alle weiteren Reaktionen wurden nun die gereinigten Verbindungen in absoluten MTBE verwendet.

Eine Rücksprache mit R. Stürmer (einem der Erfinder des genannten Racematspaltungspatentes) erbrachte ein weiteres für die Reaktion wichtiges Faktum: Die Reaktion läuft nur dann zufriedenstellend, wenn sich keine Spuren von Chloridionen in der Reaktionslösung befinden. Diese wurden möglicherweise bei der im Vorfeld notwendigen Freisetzung des Aminosäureesters aus der Hydrochloridverbindung in die organische Phase verschleppt.

Um die eventuelle Anwesenheit von Chlorid zu überprüfen, wurde in einem typischen Extraktionsexperiment nach der Freisetzung der Esterverbindung mit AgNO₃-Lösung auf Chlorid getestet, wobei Chlorid nicht nachgewiesen werden konnte.

Mit den erwähnten Optimierungen des Verfahrens werden nun die Reaktionen wiederholt. Tabelle 12 zeigt die gemittelten Ergebnisse der jeweils 2-fach durchgeführten Reaktionen.

Tabelle 12: Reaktionen unter optimierten Bedingungen

Eintrag	Substrat	Aldehydmenge	T [°C]	t [h]	Ausbeute [%]	ee(D) [%]
1	DL-Phe-OEt	kein	RT	72	28	30
2	DL-Phe-OMe	kein	RT	48	24	33
3	DL-Phe-OEt	5 mol%	RT	24	21	35

Bed.: 16.0 mmol Substrat, 20 mL MTBE, 16.8 mmol Methoxyessigsäureethylester, 100 mg Novozym 435, 3,5-Dichlorsalicylaldehyd.

Die Ergebnisse (Eintrag 1,2) zeigen, daß mit Hilfe der vorgenommenen Änderungen bei der Realisierung der Reaktionen zum ersten Mal das Produkt isoliert werden konnte. Jedoch sind sowohl Ausbeute (21-28 %) als auch Enantiomerenreihheit (30-35 % ee) unbefriedigend. Eintrag 3 zeigt weiterhin, daß der Racemisierungskatalysator die Reaktion nicht negativ beeinflusst. Dennoch ist festzustellen, daß die Enzymaktivität und Selektivität bei weitem nicht ausreichen, um befriedigende Ergebnisse zu erhalten. Die teilweise geringe Aktivität von Enzymen hoher Reinheit in Acylierungsreaktionen von einigen Aminen ist literaturbekannt^[91]. Enzympräparationen geringer Reinheit erweisen sich als deutlich überlegen. In einem breit angelegten Enzymscreening wurden alle vorrätigen Lipasen (siehe verwendete Enzyme, Abschnitt 10.1) an der gewünschten Reaktion getestet. Novozym 435 erwies sich jedoch mit seiner bekannten geringen Aktivität nichtsdestotrotz als die aktivste Spezies.

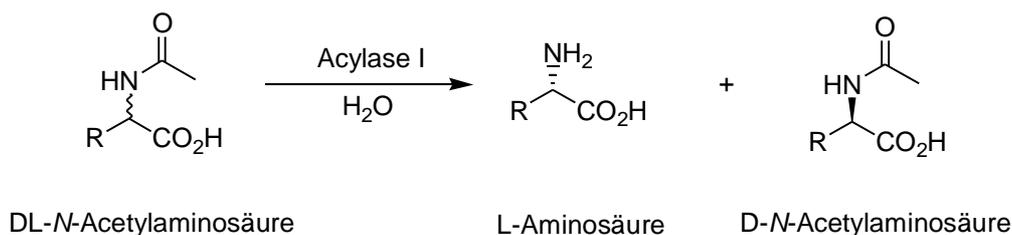
Da die in der Patentvorschrift eingesetzte Enzympräparation (Lipase aus *Burkholderia plantarii*) nicht allgemein verfügbar ist, und die Wahl eines geeigneten Enzyms nach den

bisherigen Ergebnissen der entscheidende Faktor zum Erfolg der Reaktion zu sein schien, war es nicht sinnvoll, auf diesem Gebiet weitere Arbeiten anzustrengen.

7 Arbeiten zur dynamischen kinetischen Racematspaltung von *N*-Acylaminosäuren

7.1 Hintergrund

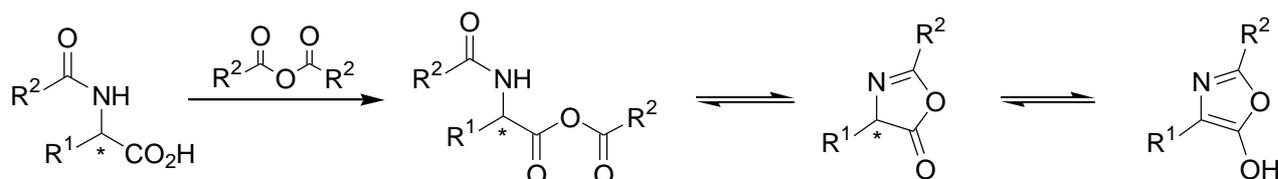
Die klassische enzymatische Racematspaltung von *N*-Acylaminosäuren hat sich seit ihrer Entdeckung^[93,94] und ersten grundlegenden Untersuchungen^[95,96] vor mehr als einem Jahrhundert als praktikable und wertvolle Methode erwiesen, eine Vielzahl von optisch reinen Aminosäuren aus ihren Racematen freizusetzen (Gleichung 4).^[84] Das Verfahren wurde auch im industriellen Maßstab eingesetzt^[97] und ist als Standardverfahren zur Darstellung von enantiomerenreinen Aminosäuren einzuschätzen. Die wirksamen Enzyme (Acylyase I und Acylyase II) konnten von Greenstein erstmals aus einem Schweinenierenextrakt (hog kidney) isoliert und charakterisiert werden.^[98]



Gleichung 4: Enzymatische Racematspaltung von DL-*N*-Acetyl-aminosäuren mit Acylase I

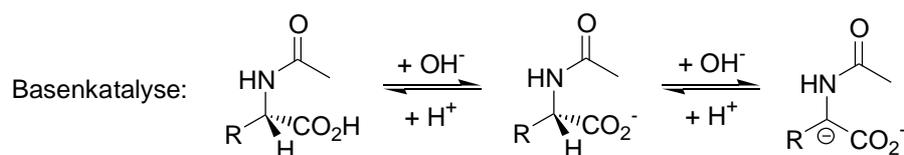
Die herausragende Bedeutung von Acylase I begründet sich in der geringen Substratspezifität bei gleichzeitig hoher Enantioselektivität, die vielfältige Anwendungen in Racematspaltungen sowohl natürlicher als auch nicht-natürlicher Aminosäuren zuläßt.^[84,99]

Die klassische Racematspaltung liefert als Produkte zum einen die gewünschte L-Aminosäure, zum anderen jedoch das verbleibende nicht hydrolysierte D-*N*-Acetyl-Enantiomer, das der Racematspaltung wieder zugeführt werden muß, um den Gesamtprozeß wirtschaftlich zu gestalten. Gängige Methoden zur obligaten Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren sind thermische Racemisierungen der Verbindungen in Gegenwart von Keten^[100] oder Säureanhydriden^[101,102,103,104] bei 80-200 °C (Gleichung 5). Die sauren Bedingungen begünstigen die *in-situ* Zyklisierung der *N*-Acylaminosäuren zu Azlactonen, welche vergleichsweise leicht racemisieren.

Gleichung 5: Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren mit Säureanhydriden

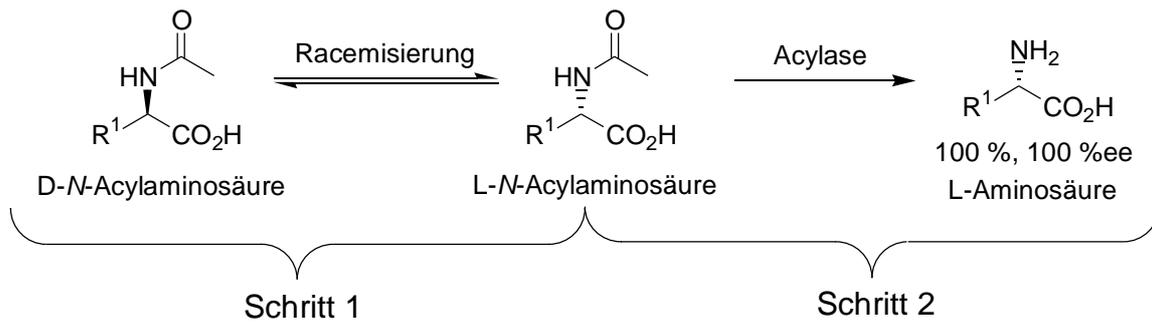
Die bei der Reaktion unter anderem vorliegenden Säureanhydride müssen nach der Reaktion hydrolysiert werden, was die Attraktivität des Verfahrens durch hohen Säure- und Basenverbrauch und daraus anfallendem Salzballast einschränkt.

Eine weitere praktizierte Methode zur Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren ist die Behandlung mit Basen wie Metallhydroxiden^[75] oder Aminen,^[105,106] der Mechanismus der Reaktion ist in Abbildung 31 skizziert. Doch auch hier werden drastische Reaktionsbedingungen (80-150 °C) benötigt, damit diese Racemisierungen in präparativ nutzbarer Geschwindigkeit ablaufen.

Abbildung 31: Allgemeiner Mechanismus zur Basen-katalysierten Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren

7.2 Motivation

Auch auf dem Gebiet der Acylase-katalysierten Racematspaltungen sind die Vorteile einer dynamischen Reaktionsführung gegenüber der klassischen Variante offensichtlich (Gleichung 6). Die quantitative Umsetzung racemischer *N*-Acylaminosäuren, die präparativ in vielfältiger Weise gut zugänglich sind, zu enantiomerenreinen Verbindungen spart den Racemisierungsschritt. Ferner liefert dieser naturgemäß nur 50 % erneut spaltbares Material aus dem ursprünglichen *D*-Enantiomer, das für die anschließende Racematspaltung zur Verfügung steht.



Gleichung 6: Konzept der dynamischen kinetischen Racematspaltung von *N*-Acylaminosäuren

Der kritische Punkt bei der Entwicklung der dynamischen kinetischen Racematspaltung ist, ob sich eine geeignete milde und damit enzymkompatible Racemisierungsmethode finden läßt, die sich für die notwendige *in-situ* Substratregeneration einsetzen läßt (Schritt 1). Die enzymatischen Methoden zur Produktbildung (Schritt 2) sind wohlbekannt und an vielfachen Beispielen beschrieben, sollten also bei **enzymkompatiblen Racemisierungsbedingungen** ohne besondere große Schwierigkeiten anzuwenden sein.

Eine Möglichkeit Racemisierungen von *N*-Acylaminosäuren unter milden Bedingungen durchzuführen, bieten Enzym-katalysierte Racemisierungen. Die bis dato gefundenen Racemasen^[75] wirken jedoch überwiegend auf die freien Aminosäuren, benötigen in einigen Fällen Cofaktoren und zeigen meist hohe bis moderate Substratspezifität, was ihren Einsatzbereich stark einschränkt. Der einzige dokumentierte Fall eines industriell durchgeführten Prozesses ist die Produktion von L-Lysin unter Mitwirkung der ACR-Racemase,^[107,108] die das zyklische Zwischenprodukt α -Amino- δ -valerolacton racemisiert bevor eine Hydrolase diese Verbindung zu L-Lysin hydrolisiert.

Unter den Racemasen ist bislang ein einziger Vertreter bekannt, der Racemisierungsaktivität bzgl. *N*-Acylaminosäuren bei gleichzeitiger geringer Substratspezifität zeigt.

Die *N*-Acylaminosäure-Racemase aus *Streptomyces atratus* racemisiert selektiv eine Reihe von sowohl D- als auch L-*N*-Acylaminosäuren,^[109] eine technische Anwendung des Enzyms ist allerdings bis dato nicht bekannt.

Alle Vertreter dieser Enzymklasse sind nicht kommerziell verfügbar, was eine Untersuchung ihrer Eignung in einer dynamischen kinetischen Racematspaltung in dieser Arbeit verhindert.

Es zeigt sich, daß zur Realisierung der Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren eine neue Racemisierungsmethode entwickelt werden muß. Das Verfahren muß vor allem unter möglichst schonenden Reaktionsbedingungen ablaufen und dabei gleichzeitig auf Reagentien wie reaktive Mineralsäuren oder Basen verzichten können.

Als besonders attraktiv wurde eine katalytische Variante der Racemisierung mit Hilfe von Übergangsmetallen bzw. Metallkomplexen erachtet.

Derartige katalytische Methoden zur Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren sind bislang unbekannt. Daher sollen in primären Screeningversuchen zunächst Metalle und Metallkomplexe, die eine bekannte Aktivität in Hydrierungsreaktionen oder Wasserstofftransferhydrierungen zeigen, auf ihre Eignung überprüft werden, da eine Racemisierung über einen reversiblen Redoxmechanismus als möglicherweise erfolgreiche Strategie angesehen wird.

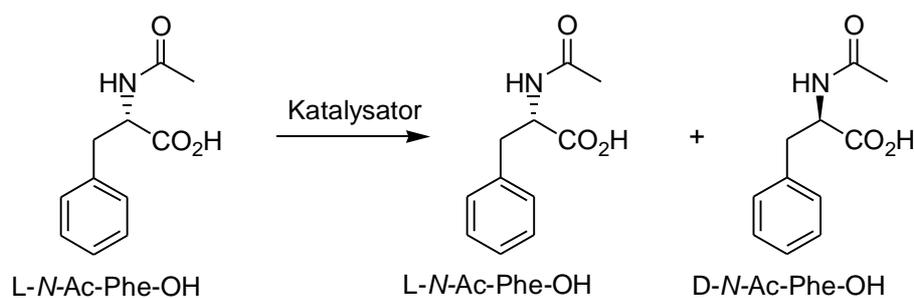
7.3 Racemisierungsreaktionen von *N*-Acylaminosäuren

7.3.1 Die Wahl der Modellreaktion

Die angestrebten Racemisierungstests erforderten ein standardisiertes Reaktionssystem, um die auftretenden Beobachtungen optimal deuten und eventuell positive Einzeleffekte wirkungsvoll miteinander kombinieren zu können. Als Indikatorgröße für auftretende Racemisierung diente die nach der Reaktion resultierende Enantiomerenzusammensetzung einer vormals enantiomerenreinen Verbindung. Zu diesem Zweck war die Wahl einer Modellverbindung notwendig, die sich durch folgendes Eigenschaftsprofil auszeichnen sollte.

1. Einfache Enantiomerenbestimmung durch GC- bzw. HPLC-Methoden.
2. Leicht darstellbare bzw. gut verfügbare Verbindung.
3. Natürlich vorkommendes Aminosäurederivat.
3. Möglichst allgemeine Aminosäurestruktur ohne aktivierende funktionelle Gruppen.
4. Innert gegen thermische Racemisierung.

Unter Berücksichtigung aller Kriterien fiel die Wahl für das Testsubstrat auf die Aminosäure *L*-*N*-Acetylphenylalanin. Dennoch wurden in den anstehenden Screeningversuchen auch andere Verbindungen stichprobenartig eingesetzt, um eine Verallgemeinerung der Testergebnisse zu überprüfen und gegebenenfalls zu sichern.

Abbildung 32: Modellreaktion zur Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren

Um die Anzahl der Versuche zu begrenzen, war die Wahl einer geeigneten Reaktionstemperatur sinnvoll. Im Hinblick auf die enzymatische Umsetzung wurde diese zunächst auf 40 °C festgelegt.

Die Bearbeitung dieses Kapitels der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. M. Hateley. Die Ergebnisse der Experimente wurden somit von einem weiteren Experimentator auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft.

7.3.2 Ergebnis des ersten Screenings

Das primäre Screening zur Racemisierung von *N*-Acetylphenylalanin umfaßte Katalysator- und Lösungsmittelvariationen, Reaktionen mit Zusätzen von Säuren, Basen und Benzophenon, sowie Reaktionen mit L-Phenylalanin als Testsubstrat. Alle verwendeten Komponenten sind in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Tabelle 13: Übersicht zu verwendeten Reagentien und Reaktionsmedien in Racemisierungsreaktionen

Katalysatoren:	Pd/C, Pd(OAc) ₂ , Rh(cod)acac, Rh(cod) ₂ BF ₄ , [Rh(cod)Cl] ₂ , Rh(PPh ₃) ₃ Cl, [Ir(cod)Cl] ₂ , [Ru(cod)Cl] ₂ _n
Lösungsmittel:	H ₂ O, MeOH, ^t Bu-OH, MeCN, THF, Dioxan, DMF, NEt ₃ , und binäre Mischungen
Additive	Benzophenon, NaOAc, NaHCO ₃ , Ac ₂ O

Bed.: 100 mg L-*N*-Ac-Phe (0.48 mmol), 5 mol% Katalysator, 10 mL LM, 40 °C, t = 48 h.

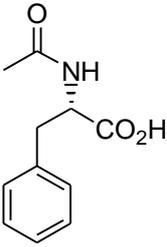
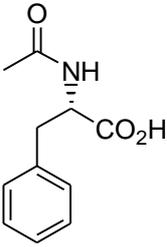
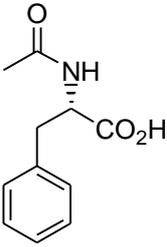
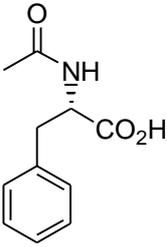
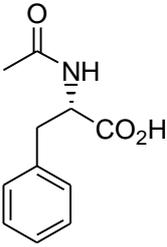
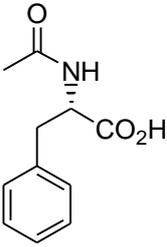
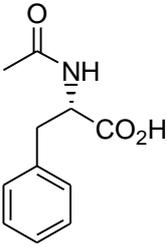
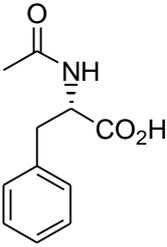
Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in den weit über 100 ! durchgeführten Einzelexperimenten keine Kombination an Lösungsmittel und Katalysator gefunden wurde, die eine reproduzierbare Mindestabnahme des ee-Wertes von 100 % ee auf < 90 % ee innerhalb von 2 Tagen Reaktionszeit bewirkte.

7.3.3 Racemisierungen bei erhöhter Reaktionstemperatur

Eine Steigerung der Reaktionstemperatur von 40 °C auf 60 °C sollte die Racemisierung erleichtern. Daher wurden bis auf weiteres alle Experimente bei dieser Reaktionstemperatur durchgeführt.

Eine erste deutliche Racemisierung der Modellverbindung konnte bei 60 °C mit dem Wilkinson Katalysator in Acetonitril beobachtet werden.

Tabelle 14: Racemisierungsreaktionen mit dem Katalysator Rh(PPh₃)₃Cl

Eintrag	Substrat	Lösungsmittel	Katalysator	Zeit [h]	ee(L) [%]
1		MeCN	Rh(PPh ₃) ₃ Cl	24	87
2		MeCN	ohne	24	100
3		MeCN	Rh(PPh ₃) ₃ Cl	48	62
4		MeCN	ohne	48	97
5		EtOAc	Rh(PPh ₃) ₃ Cl	48	99
6		EtOAc	ohne	48	100
7		MeCN	Rh(PPh ₃) ₃ Cl	48	61
8		MeCN	ohne	48	63

Bed.: 0.48 mmol Substrat, 5 mol% Katalysator, 10 mL LM, 60 °C.

Tabelle 14 faßt die erhaltenen Ergebnisse zusammen. Mit 5 mol% Rh(PPh₃)₃Cl als Katalysator läßt sich enantiomerenreines *L*-*N*-Acetylphenylalanin in Acetonitril nach 24 Stunden Reaktionszeit auf 87 % ee, nach 48 Stunden auf 62 % ee racemisieren (Eintrag **1**, **3**). Die Kontrollexperimente ohne Katalysator (Einträge **2**, **4**) zeigen, daß die Racemisierung eindeutig der Rhodiumverbindung zuzuschreiben ist. Ethylacetat ist als Lösungsmittel ungeeignet, *L*-*N*-Acetylphenylalanin zeigt keine Racemisierung. Die Einträge **7** und **8** zeigen,

daß das Phenylglycinderivat bereits thermisch ohne Katalysator gleichermaßen wie mit Katalysator racemisiert, *L*-*N*-Acetylglycin ist als Testsubstrat daher ungeeignet.

Es bleibt festzuhalten, daß mit $\text{Rh}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}$ ein erster aktiver Katalysator gefunden werden konnte, der *L*-*N*-Acetylphenylalanin zu racemisieren vermag. Aus diesem Grund erschienen weitere Versuche mit dieser Verbindung sinnvoll, insbesondere sollte untersucht werden, inwieweit sich eine Variation der relativen Katalysatormenge auf die Geschwindigkeit der Racemisierung auswirkt. Zu diesem Zweck wurde die Racemisierung von *L*-*N*-Acetylphenylalanin in Reaktionen mit 0.5-10 mol% Wilkinsonschem Katalysator in MeCN bei 60 °C durchgeführt.

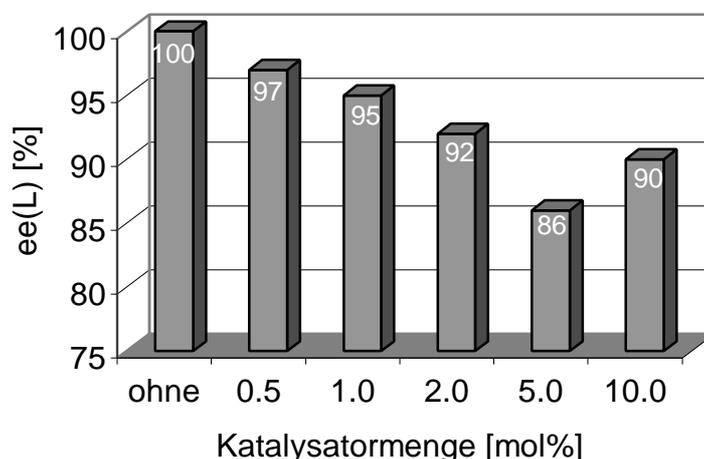


Abbildung 33: Abhängigkeit der Racemisierungsgeschwindigkeit von der Katalysatormenge

Die Experimente belegen nach 24 Stunden Reaktionszeit den erwarteten linearen Zusammenhang zwischen Katalysatormenge und Racemisierungsgeschwindigkeit. Je höher die Katalysatormenge, desto größer ist die Racemisierungsgeschwindigkeit der *N*-Acylaminosäure, die sich durch stetiges Abfallen der Enantiomerenreinheit auszeichnet. Die Verringerung der Racemisierung beim Übergang von 5 mol% auf 10 mol% Katalysator kann nicht plausibel erklärt werden, das überraschende Ergebnis ist jedoch reproduzierbar.

Obwohl mit $\text{Rh}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}$ eine erste aktive Katalysatorspezies gefunden werden konnte, waren die Einsatzmöglichkeiten dieser Verbindung aufgrund der sehr langsamen Substratracemisierung begrenzt. Es erschien jedoch lohnenswert, weitere Rhodium(I)-verbindungen auf ihre katalytische Aktivität zu prüfen.

Tabelle 15: Andere Rhodiumkatalysatoren im Vergleich

Eintrag	Lösungsmittel	Katalysator	Zeit [h]	ee(L) [%]
1	MeCN	Rh(PPh ₃) ₃ Cl	48	67
2	MeCN	[Rh(cod)Cl] ₂ ^{a)}	48	83
3	MeCN	Rh(cod)acac	48	32, 79, 94
4	MeCN	Rh(cod)acac	24	86
5	MeCN	Rh(cod) ₂ BF ₄	48	88

Bed.: 0.48 mmol *L-N*-Ac-Phe, 5 mol% Katalysator, 10 mL LM, 60 °C

a) 10 mol% „Rh“.

Die Untersuchungen zeigen, daß sowohl kationische als auch neutrale Rhodiumkomplexe deutliche Racemisierungsaktivität zeigen, sie sind jedoch mit Ausnahme von Rh(cod)acac weniger aktiv als Rh(PPh₃)₃Cl. Die mit Rh(cod)acac als Katalysator erhaltene Racemisierung erweist sich mit 32 % ee (Eintrag **3**) als deutlich schneller als die unter Eintrag **1**, dieser Katalysator liefert jedoch nach mehreren Wiederholungsversuchen allerdings keine reproduzierbaren Ergebnisse (Eintrag **3,4**).

Neben dem Auffinden eines aktiveren Katalysators spielte im Hinblick auf den enzymatischen Hydrolyseschritt auch die Wahl des Lösungsmittels eine entscheidende Rolle. Als besonders geeignete Reaktionsmedien konnten Wasser und Mischungen organischer Lösungsmittel mit Wasser als Cosolvens angenommen werden. Aus diesem Grund wurde bereits zu diesem frühen Stadium der Einfluß von Wasser auf die Racemisierungsaktivität von Rh(PPh₃)₃Cl untersucht. Als Lösungsmittel wurden binäre Mischungen aus Acetonitril und Wasser mit einem Wasseranteil von 5-50 Vol% unter den bisherigen Reaktionsbedingungen der Racemisierung eingesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten jedoch, daß bereits bei 5 Vol% Wasseranteil die Racemisierung nicht stattfindet (95 % ee nach 48 h).

Die weiteren Untersuchungen zur Racemisierung von *L-N*-Acetylphenylalanin in reinem Acetonitril dienten zur Klärung der Frage, ob die Aktivität der Rhodiumkatalysatoren durch weitere Zusätze gesteigert werden kann. Interessant war vor allem im Hinblick auf die bisher erzielten Ergebnisse mit dem Wilkinson Katalysator als phosphorhaltige Verbindung die Frage, inwieweit die Präsenz von PPh₃ die Katalysatoraktivität beeinflusst. Sofern die aktive Katalysatorspezies Phosphorliganden enthält, könnte durch Zusatz von PPh₃ aus nicht phosphorhaltigen Rhodiumkomplexen eine aktivere Spezies erzeugt werden. Weiterhin sollte der Einfluß von schwachen Säuren, Basen und die Rolle von Chloridionen auf die Racemisierungsgeschwindigkeit untersucht werden.

Tabelle 16: Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Additive auf die Rhodium-katalysierte Racemisierung von *L*-*N*-Ac-Phe

Eintrag	Katalysator	Additive	Zeit [h]	ee(L) [%]
1	Rh(cod)acac	ohne	24	86
2	Rh(cod)acac	30 mol% PPh ₃	24	85
3	Rh(cod)acac	3 equiv. PPh₃	48	2
4	Rh(cod)acac	5 mol% AcOH	48	49
5	Rh(cod)acac	5 mol% DBU	48	62
6	[Rh(cod)Cl] ₂ ^a	ohne	24	98
7	[Rh(cod)Cl]₂^a	30 mol% PPh₃	24	70
8	[Rh(cod)Cl]₂^a	3 equiv. PPh₃	48	1
9	Rh(PPh ₃) ₃ Cl	ohne	24	87
10	Rh(PPh ₃) ₃ Cl	1 equiv. Ag(CF ₃ SO ₃)	24	87
11	Rh(PPh ₃) ₃ Cl	5 mol% DBU	48	75
12	Rh(PPh ₃) ₃ Cl	5 mol% AcOH	48	72
13	ohne	3 equiv. PPh₃	48	67
14	ohne	5 mol% AcOH	48	98
15	ohne	5 mol% DBU	48	96

Bed.: 100 mg *L*-*N*-Ac-Phe (0.48 mmol), 5 mol% Katalysator, 10 mL MeCN, 60 °C. a) 10 mol% „Rh“.

Die Ergebnisse der Racemisierungen mit Rh(cod)acac als Katalysator (Einträge **1,4,5**) zeigen, daß geringe Mengen an Essigsäure und DBU (49 % ee, 62 % ee) die Reaktion geringfügig beschleunigen. Die Einträge **14** und **15** belegen, daß die Racemisierung nicht allein durch Säure oder Base vermittelt wird, sondern nach wie vor durch den Metallkatalysator bewirkt wird. Interessant sind die Ergebnisse mit PPh₃-Zusatz: Während 30 mol% PPh₃ nach 24 Stunden Reaktionszeit (Eintrag **2**) keine Wirkung auf die Racemisierung haben, findet komplette Racemisierung des Substrates mit 3 Äquivalenten PPh₃ innerhalb von 48 Stunden statt (Eintrag **3**). PPh₃ allein zeigt zwar mit 67 % ee nach 48 h Reaktionszeit (Eintrag **13**) ebenfalls eindeutige Aktivität in der Substratracemisierung, dennoch stellt die Kombination von Rh(cod)acac/PPh₃ das bislang aktivste Katalysatorsystem dar.

Eine vergleichende Aktivierung des Katalysators zeigt PPh₃ auch im Fall von [Rh(cod)Cl]₂ (Einträge **6-8**). Während 30 mol% PPh₃ nur eine geringfügige Beschleunigung der Reaktion verursachen, kann eine vollständige Racemisierung von *L*-*N*-Acetylphenylalanin bei Verwendung von 3 Äquivalenten PPh₃ mit 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂ festgestellt werden.

Die Reaktionen mit $\text{Rh}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}$ zeigen den bereits für die Umsetzungen mit $\text{Rh}(\text{cod})\text{acac}$ beschriebenen leicht beschleunigenden Effekt von Essigsäure und DBU (Einträge **9,11,12**). Bemerkenswert ist der Befund, daß die Chloridionen des Wilkinson Katalysators keinen wesentlichen Einfluß auf die Reaktion haben (Eintrag **9,10**). Es wurde im Vorfeld spekuliert, daß das quantitative Entfernen der stark koordinierenden Chloridionen mit Silbertriflat entweder eine Aktivitätssteigerung des Katalysators (Demaskierung einer inaktiven Rh-Cl-Spezies zur aktiven Form) mit resultierender Beschleunigung der Racemisierung mit sich bringt, oder genau das Gegenteil erreicht wird.

Insgesamt kann festgehalten werden, daß Kombinationen von Rh(I)-Katalysatoren mit PPh_3 -Zusatz als überlegenes Racemisierungssystem gefunden werden konnten. Natürlich ist die verwendete Menge an PPh_3 mit 3 Äquivalenten bezogen auf die zu racemisierende *N*-Acylaminosäure viel zu groß.

7.3.4 Der Einfluß von Triphenylphosphan auf die Katalysatoraktivität

Um diesen wichtigen Effekt der Phosphan-vermittelten Aktivierung des Rhodiumkatalysators genauer zu charakterisieren, wurden in weiteren Experimenten Racemisierungsreaktionen durchgeführt, die den Zusammenhang von Katalysatoraktivität und Phosphanzusatz aufklären sollten.

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse von Racemisierungsreaktionen von *L*-*N*-Acetylphenylalanin mit $\text{Rh}(\text{cod})\text{acac}$ mit unterschiedlichen Mengen an PPh_3 in Acetonitril zusammengefaßt. Das Rh:P-Verhältnis variiert zwischen 10:1 und 1:10.

Tabelle 17: Einfluß der PPh₃-Menge auf die Rh(cod)acac-vermittelte Racemisierung von *L-N*-Acetylphenylalanin

Eintrag	PPh ₃ [mol%]	Rh:P	ee(L) [%]
1	2	5:2	60
2	2	5:2	59
3	5	1:1	82
4	5	1:1	81
5	10	1:2	85
6	10	1:2	80
7	25	1:5	75
8	25	1:5	59
9	50	1:10	22
10	50	1:10	25
11	0.5	10:1	81
12	0.5	10:1	96
13	1	5:1	85
14	1	5:1	97
15	4	5:4	86
16	4	5:4	86

Bed.: 100 mg *L-N*-Ac-Phe (0.48 mmol), 5 mol% Rh(cod)acac, 10 mL MeCN, 60 °C, 48 h.

Es ist festzustellen, daß kein einheitlicher Trend zwischen der Racemisierungsgeschwindigkeit und der PPh₃-Menge existiert. Eine Reproduzierung der Experimente untermauert die erhaltenen Ergebnisse. Demzufolge findet bei einem Rh:P-Verhältnis von 10:1 eine schnelle Racemisierung des Substrates statt (Einträge **9,10**).

Mit sinkender PPh₃-Menge stagniert die Reaktionsgeschwindigkeit (Eintrag **7,8**) bis zu einem Rh:P-Verhältnis von 1:2 bis 1:1 eine konstante Geschwindigkeit erreicht wird. Überraschenderweise steigt die Geschwindigkeit der Racemisierung bei einem Rh:P-Verhältnis von 5:2 reproduzierbar wieder an (Einträge **1,2**). Um dieses Phänomen weiter zu untersuchen, werden nun Reaktionen mit unterstöchiometrischen Mengen an PPh₃ bzgl. Rhodium durchgeführt (Einträge **11-16**).

Die Auswertung der Experimente zeigt jedoch, daß keine signifikante Racemisierung beobachtbar ist, zum Teil treten Probleme bei der Reproduzierbarkeit auf. Offensichtlich sind derartige Katalysatormischungen für die angestrebte Reaktion ungeeignet.

Analoge Untersuchungen zum Einfluß von PPh_3 auf einen anderen Präkatalysator $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$ sollten zeigen, ob diese Rh(I)-Katalysatorvorstufe sich in ihrer Eignung signifikant unterscheidet.

Tabelle 18: Variationen der PPh_3 -Menge bei der $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$ -katalysierten Racemisierung

Eintrag	PPh_3 [mol%]	Rh:P	ee(L) [%]
1	2	5:1	89, 93
2	5	2:1	86, 86
3	10	1:1	82, 80
4	25	1:2.5	53, 50
5	50	1:5	32, 33

Bed.: 100 mg *L-N*-Ac-Phe (0.48 mmol), 5 mol% $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$, 10 mL MeCN, 60 °C, 48 h.

Die Ergebnisse der jeweils zweifach durchgeführten Reaktionen zeigen ein ähnliches Bild bzgl. des Einflusses der PPh_3 -Menge. Der lineare Zusammenhang zwischen abnehmendem Rh:P-Verhältnis und steigender Racemisierung ist über den gesamten Bereich gegeben, beste Ergebnisse (32 % ee, 33 % ee) werden bei einem Rh:P-Verhältnis von 1:5 erzielt (Eintrag 5).

7.3.5 Untersuchungen zur Eignung alternativer Phosphanverbindungen

Die Untersuchungen zur Racemisierung von *L-N*-Acetylphenylalanin zeigten, daß die Rhodium-katalysierte Reaktion bei Anwesenheit von Triphenylphosphan beschleunigt wird. Je niedriger das Rh:P-Verhältnis, desto aktiver verhielt sich das Katalysatorsystem. PPh_3 wurde mit Erfolg in den ersten Experimenten als typischer Vertreter dieser Ligandklasse eingesetzt, es konnte jedoch davon ausgegangen werden, daß sich mit einem Screening weiterer Phosphanverbindungen in Racemisierungsreaktionen die Reaktivität des Katalysatorsystems steigern läßt.

Der beobachtete Zusammenhang zwischen Triphenylphosphanmenge und katalytischer Aktivität konnte zu diesem Zeitpunkt nicht verallgemeinert werden, daher war in den folgenden Umsetzungen gleichzeitig eine Variation im Rh:P-Verhältnis sinnvoll. Zu diesem

Zeitpunkt zeigte sich noch keine Rhodiumquelle als überlegen, deshalb wurden sowohl Rh(cod)acac, [Rh(cod)Cl]₂ und andere Katalysatoren eingesetzt.

Tabelle 19 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Racemisierungsreaktionen mit Rh(cod)acac.

Tabelle 19: Ligandenscreening der Rh(cod)acac-katalysierten Racemisierung von L-*N*-Ac-Phe

Eintrag	Phosphan	Menge [mol%]	Rh:P	ee(L) [%]
1	Tris- <i>o</i> -tolylphosphan	5	1:1	61
2	Tris- <i>o</i> -tolylphosphan	15	1:3	63
3	Tris- <i>o</i> -tolylphosphan	25	1:5	74
4	Tri- <i>p</i> -Fluorphenylphosphan	5	1:1	82
5	Tri- <i>p</i> -Fluorphenylphosphan	15	1:3	81
6	Tri- <i>p</i> -Fluorphenylphosphan	25	1:5	79
7	Tricyclohexylphosphan	2	5:2	47
8	Tricyclohexylphosphan	5	1:1	69
9	Tricyclohexylphosphan	25	1:5	37
10	DPPE	2.5	1:1	96
11	DPPE	12.5	1:5	94
12	1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocen	2.5	1:1	95
13	1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocen	12.5	1:5	95

Bed.: 100 mg L-*N*-Ac-Phe (0.48 mmol), 5 mol% Rh(cod)acac, 10 mL MeCN, 60 °C, 48 h.

Es zeigt, daß im Vergleich zu den Ergebnissen mit PPh₃ sowohl das sterisch anspruchsvollere Tris-*o*-tolylphosphan (Einträge **1-3**) als auch das weniger basische Tris-*p*-Fluorphenylphosphan (Einträge **4-6**) keine Verbesserung der Racemisierungsgeschwindigkeit bewirken. Das basische Tricyclohexylphosphan (Einträge **7-9**) erweist sich in Verbindung mit dem Katalysator als das reaktivere System, mit 25 mol% PCy₃ läßt sich eine Racemisierung der *N*-Acylaminosäure bis auf 37 % ee erreichen (vgl. 59, 75 % ee, Einträge **7,8**, Tabelle 17).

Bemerkenswert sind die Ergebnisse mit den chelatisierenden Bisphosphanverbindungen (Einträge **10-13**), welche die Racemisierung des Substrates vollständig verhindern. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß die allein durch Rh(cod)acac vermittelte Racemisierung

der Testverbindung zu einer Racemisierung von 86 % ee nach 24 Stunden (vgl. Eintrag **1**, Tabelle 16) bei vergleichbaren Versuchsbedingungen führt. Die *cis*-Koordination des Chelatliganden am Metall scheint die Racemisierungsfähigkeit des Katalysators effektiv zu unterdrücken.

In den nächsten Versuchen wurde der Komplex $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$ als Katalysatorprecursor eingesetzt.

Tabelle 20: Screening verschiedener Phosphanverbindungen in der $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$ -katalysierten Racemisierung von *L-N*-Ac-Phe

Eintrag	Phosphan	Menge [mol%]	P:Rh	ee(L) [%]
1	Tris- <i>tert</i> -butylphosphan	10	1:1	50
2	Tris- <i>tert</i> -butylphosphan	20	2:1	61
3	Tris- <i>tert</i> -butylphosphan	50	5:1	68
4	DPPE	25	5:1	98
5	DPPB	25	5:1	73
6	PCy ₃	2	1:5	88, 88
7	PCy ₃	10	1:1	33
8	PCy ₃	20	2:1	82, 27
9	PCy ₃	30	3:1	70, 24
10	PCy ₃	40	4:1	85, 26
11	PCy ₃	25	5:2	25, 43
12	PCy₃	50	5:1	4,1,1,1
13	PCy ₃ ^{a)}	50	-	72

Bed.: 100 mg (0.48 mmol) *L-N*-Ac-Phe, 5 mol% $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$ 10 mL MeCN, 60 °C, 48 h. a) kein Rhodiumkatalysator.

Die Versuche mit Tris-*tert*-butylphosphan (Einträge **1-3**) zeigen mit den verbleibenden ee-Werten von 50-68 % nach 48 Stunden Reaktionszeit eine geringe Beschleunigung der Rhodium-katalysierten Racemisierung, das stark basische und sterisch anspruchsvolle Phosphan ist nicht für die schnelle Racemisierung des Substrates geeignet.

Auch bei diesem Präkatalysator wirken chelatisierende Bisphosphanverbindungen wie DPPE und DPPB der Racemisierung entgegen (Einträge **4,5**). Die im Vergleich zu DPPE fortgeschrittene Racemisierung bei DPPB (73 % ee) dürfte auf das geringere Ausmaß des Chelatisierungsgrades zurückzuführen sein. Dieser sinkt typischerweise mit dem steigenden

Abstand der Phosphoratome im Molekül und damit der Ringgröße des resultierenden Diphosphanmetallkomplexes.

Die Verwendung von Tricyclohexylphosphan führt bei einem Rh:P-Verhältnis von 1:5 zur vollständigen Racemisierung des Testsubstrates (Eintrag **12**). Diese Reaktion wurde als Referenzreaktion bei weiteren Untersuchungen oftmals wiederholt (mind. 20 Reaktionen), wobei sich das Ergebnis, von 2 Ausnahmen abgesehen, immer reproduzieren ließ. Alle Experimente mit hohem Rh:P-Verhältnis führen zu stark unterschiedlichen bzw. nicht zuverlässig reproduzierbaren Ergebnissen. Die Racemisierung mit 50 mol% PCy₃ und 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂ ist erfreulicherweise dem bisher aktivsten System mit PPh₃ deutlich überlegen (33 % ee, 32% ee, siehe **9,10**, Tabelle 18). Das aktive Phosphan racemisiert alleine ohne Rhodiumkatalysator die Testverbindung auf 72 % ee (Eintrag **13**), doch die Ergebnisse mit Katalysator sind eindeutig überlegen.

7.3.6 Variationen der Rhodiumkatalysatoren

Die gefundene Kombination aus 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂ und 50 mol% PCy₃ führte innerhalb von 48 Stunden Reaktionszeit bei 60 °C zur vollständigen Racemisierung von *L*-*N*-Acetylphenylalanin. Mit diesem Wissen war zu diesem Zeitpunkt ein erneutes Screening zur Eignung anderer Rhodiumkatalysatoren sinnvoll (Tabelle 21).

Tabelle 21: Racemisierungsreaktionen mit PCy₃ und verschiedenen Rhodiumverbindungen

Eintrag	Katalysator	Rh:P	Zeit [h]	ee(L) [%]
1	[Rh(nbd)Cl] ₂	1:1	48	85
2	[Rh(nbd)Cl] ₂	1:2	48	27
3	[Rh(nbd)Cl] ₂	1:5	48	18
4	Rh(cod) ₂ BF ₄	1:1	48	52
5	Rh(cod) ₂ BF ₄	1:2	48	51
6	Rh(cod) ₂ BF ₄	1:5	48	50
7	(CO) ₂ Rhacac	1:5	24	87, 88
8	(CO) ₂ Rhacac	1:5	48	70, 78
9	RhCl ₃	1:5	48	70

Bed.: 100 mg (0.48 mmol) *L*-*N*-Ac-Phe, 5 mol% Katalysator, 10 mL MeCN, 60 °C.

Die Reaktionen mit $[\text{Rh}(\text{nbd})\text{Cl}]_2$ (Einträge **1-3**) zeigen deutliche Racemisierungsaktivität, die Geschwindigkeit liegt jedoch etwas hinter der $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$ -katalysierten Reaktion zurück. Der kationische Komplex $\text{Rh}(\text{cod})_2\text{BF}_4$ zeigt sich unabhängig der zugesetzten PCy_3 -Menge als nur mäßig reaktiv (Einträge **4-6**).

Als Ursache kann die erschwerte Koordination des Phosphanliganden vermutet werden, die die Verdrängung eines Dienliganden voraussetzt. Vergleichsweise einfach sollte die Verdrängung aller Koordinationspartner im $(\text{CO})_2\text{Rh}(\text{acac})$ -Komplex vonstatten gehen, da das Reaktionsmedium zum einen durch die *N*-Acylaminosäure einen leicht sauren Charakter besitzt, zum anderen Acetonitril als Lösungsmittel stark koordinierende Eigenschaften besitzt. Dennoch ist diese Verbindung mit 70% ee bzw. 78 % ee verbleibender Enantiomerenreinheit des Substrates vergleichsweise inaktiv (Eintrag **8**). Es sei daran erinnert, daß PCy_3 ohne Katalysator eine Racemisierung dieser Größenordnung erwirkt (Einträge **13**, Tabelle 20). Rhodiumchlorid (Eintrag **9**) wäre aufgrund seiner vergleichsweise günstigen Verfügbarkeit ein attraktiver Katalysator, doch auch diese Verbindung zeigt sich nur wenig aktiv.

Ein weiterer Aspekt der Rhodium-katalysierten Racemisierung mit PCy_3 war die Frage, wie effektiv das System bei einer Erniedrigung der Katalysatorkonzentration bei konstantem Rh:P-Verhältnis die Referenzverbindung racemisiert (Tabelle 22).

Tabelle 22: Untersuchungen zur Reduzierung der Katalysatormenge

Eintrag	Katalysatormenge [mol%]	ee(L) [%]
1	5	0,1
2	2.5	57, 71
3	1	80, 80
4^{a)}	1	22
5^{b)}	5	55, 58

Bed.: 100 mg (0.48 mmol) *L-N*-Ac-Phe, PCy_3
 (Rh:P = 1:5), 10 mL MeCN, 60 °C, 48 h. a) 500
 mg *L-N*-Ac-Phe b) T = 50 °C.

Eintrag **1** zeigt zunächst mit 0 % ee bzw. 1 % ee Enantiomerenzusammensetzung das gewohnte Ergebnis der Reaktion mit 5 mol% Rhodiumkatalysator. Die Halbierung der Menge an Katalysator und Phosphan führt mit einer optischen Reinheit des Substrates von 57% ee bzw. 71 % ee zu einer deutlichen Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit (Eintrag **2**), was noch deutlicher bei Verwendung von 1 mol% $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$ in Erscheinung tritt (Eintrag **3**). Eintrag **4** beschreibt ein Experiment, bei dem die üblichen Mengen an Katalysator

und Phosphan eingesetzt wurden, jedoch die Substratmenge verfünffacht wurde. Das Ergebnis (22 % ee, Eintrag 5) zeigt, daß diese Variante der Reaktionsoptimierung eine bessere Alternative darstellt. Die Erniedrigung der Reaktionstemperatur von 60 °C auf 50 °C führt zu einer deutlichen Verringerung (55 % ee, 58 % ee) der Racemisierungsgeschwindigkeit, die Racemisierung findet aber immerhin noch statt. Dieses Ergebnis ist vor allem im Hinblick auf den noch zu integrierenden enzymatischen Teilschritt der Reaktion von Bedeutung, da im allgemeinen möglichst tiefe Reaktionsbedingungen für gute Aktivität, Selektivität und Langzeitstabilität des Enzyms ausschlaggebend sind.

7.3.7 Alternative Lösungsmittel

Alle durchgeführten Racemisierungsreaktionen von *L-N*-Acetylphenylalanin erfolgten bislang unter Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel, da in den ersten Screeningergebnissen Racemisierungsaktivität des Wilkinson Katalysators mit diesem Lösungsmittel beobachtet werden konnte. Im Laufe der Optimierung der Reaktion stand bislang nur die Steigerung der Katalysatoreffektivität durch Entwickeln eines möglichst aktiven Katalysatorsystems im Vordergrund. Im Sinne einer schrittweisen Verbesserung des Verfahrens bei Variation einer Einflußgröße standen nun Arbeiten zur Lösungsmitteloptimierung im Vordergrund. Diese Arbeiten waren aus folgenden Gründen von Bedeutung:

1. Weitere potentielle Aktivitätsverbesserung und damit Reaktionsbeschleunigung der Racemisierung.
2. Eine Auswahl an geeigneten Reaktionsmedien erhöht die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Kombination der Racemisierung mit der enzymatischen Racematspaltung zur dynamischen kinetischen Racematspaltung.
3. Die enzymatische Hydrolyse der Amidbindung der *N*-Acylaminosäure erfordert Wasser.

Alle in Tabelle 23 aufgeführten Experimente sind mit 100 mg *L-N*-Acetylphenylalanin, 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂ und 50 mol% PCy₃ durchgeführt worden.

Acetonitril zeichnet sich durch hohe Polarität, stark koordinierende Eigenschaften und die beliebige Mischbarkeit mit Wasser aus. Deshalb sind verschiedene Gesichtspunkte bei der Auswahl der organischen Lösungsmittel, wie Löseeigenschaften, Polarität, mögliche Koordinationsfähigkeit und unterschiedliche funktionelle Gruppen berücksichtigt worden.

Tabelle 23: Racemisierung von *L*-*N*-Ac-Phe in verschiedenen organischen Lösungsmitteln

Eintrag	LM	Zeit [h]	ee(L) [%]
1	DMSO	48	99
2	Aceton	48	97
3	CHCl ₃	48	99
4	Dioxan	48	100
5	THF	48	100
6	EtOH	48	100
7	Isobuttersäurenitril	48	52
8	Propionsäurenitril	48	93
9	Malonsäuredinitril	48	80

Bed.: 100 mg (0.48 mmol) *L*-*N*-Ac-Phe, 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂, 10 mL Lösungsmittel, 60 °C.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Racemisierung von *L*-*N*-Acetylphenylalanin in keinem untersuchten Lösungsmittel unter den angegebenen Reaktionsbedingungen möglich ist (Einträge **1-6**). Eine Ausnahme bilden Nitrilgruppen enthaltende Lösungsmittel (Einträge **7-9**), die in ihrer Eignung jedoch ebenfalls deutlich hinter Acetonitril einzustufen sind. In weiteren Reaktionen mit THF, Dioxan und EtOH wurden unterschiedliche Katalysatoren wie Rh(PPh₃)₃, Rh(cod)acac und (CO)₂Rhacac eingesetzt. Jedoch ist in keinem Experiment eine signifikante Racemisierung nachweisbar.

In zahlreichen weiteren Experimenten wurden binäre Mischungen von Wasser (Anteil 5-100 Vol%) und organischen Lösungsmitteln wie MeCN, EtOH, MeOH sowohl mit dem bestehenden Racemisierungskatalysatorsystem als auch mit anderen Katalysatoren wie z.B. (CO)₂Rhacac/TPPTS-Kombinationen auf ihre Eignung überprüft. Jedoch konnte auch hier keine Racemisierung beobachtet werden.

Diese Ergebnisse sowie die erwähnten Versuche untermauern die Sonderstellung von MeCN als Lösungsmittel der Wahl bei Racemisierungsreaktionen von *N*-Acylaminosäuren.

7.3.8 Erweiterung der Anwendung der Racemisierungsmethode auf andere Acylderivate von Phenylalanin

Die erfolgreiche Methode zur Racemisierung von *L-N*-Acetylphenylalanin sollte nun hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit bei unterschiedlichen Acylderivaten der Aminosäure überprüft werden. Auch hier können mögliche alternativ einsetzbare Strukturen für Acylase-katalysierte Anwendungen von Vorteil sein (insbesondere Phenacetyl- und Methoxyacetylreste). Zu diesem Zweck sind die in Tabelle 24 aufgeführten enantionmerenreinen *N*-Acylderivate von Phenylalanin dargestellt worden und unter Standardbedingungen der Racemisierung ausgesetzt worden. Für jede in der Tabelle dargestellten Verbindung wurde in zusätzlichen Kontrollexperimenten sichergestellt, daß sie weder thermisch noch unter alleinigem Einfluß von PCy₃ erwähnenswert racemisieren.

Die Resultate für *L-N*-Acetylphenylalanin sind bereits für 48 Stunden Reaktionszeit bekannt, bemerkenswert ist jedoch, daß bereits nach 24 Stunden ein verbleibender ee-Wert von ca. 17 % erreicht wird, die Racemisierung ist also bereits nach einem Tag zum überwiegenden Teil vollzogen. Annähernd quantitative Racemisierung wird ebenfalls mit *L-N*-Phenacetylphenylalanin erreicht. Dieser Acylrest besitzt eine einzigartige Aktivität und Selektivität bei enzymatischen Umsetzungen mit Penicillin G Amidase, welche neben den konventionellen Acylasen aus der Schweineiere oder Acylasen mikrobiellen Ursprungs eine möglicherweise wichtige Ergänzung bei der Verwirklichung der DKR von *N*-Acylaminosäuren darstellt.

Das Benzoylderivat racemisiert mit einem verbleibenden ee-Wert von ca. 26 % ebenso noch vergleichbar schnell. Die Phenylalaninderivate mit Methoxyacetyl- und Trifluoracetylrest zeigen, daß die Racemisierungsgeschwindigkeit mit steigendem elektronenziehendem Charakter der Gruppe sinkt. Eine Racemisierung bis auf ca. 52 % ee ist bei dem Methoxyacetylderivat beobachtbar, während bei Trifluoracetylphenylalanin keine Racemisierung mehr festgestellt werden kann.

Tabelle 24: Rhodium-katalysierte Racemisierung verschiedener Acylderivate von Phenylalanin

Verbindung		Zeit [h]	ee(L) [%]
<i>N</i> -Acetyl-phenylalanin		24	20,15
		48	0, 1
<i>N</i> -Trifluoracetyl-phenylalanin		24	100,100
		48	95, 96
<i>N</i> -Methoxyacetyl-phenylalanin		24	80, 82
		48	51, 54
<i>N</i> -Phenacetyl-phenylalanin		24	79, 25
		48	14, 0
<i>N</i> -Benzoyl-phenylalanin		24	58, 73
		48	21, 31

Bed.: 0.48 mmol Substrat , 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂, 50 mol% PCy₃ 10 mL MeCN, 60 °C.

Es kann also zusammengefaßt werden, daß schnelle Racemisierung bei Acetyl-, Benzoyl- und Phenacetylderivaten möglich ist, Acylreste mit elektronenschiebenden und mehr noch mit elektronenziehenden Gruppen verringern die Racemisierungsgeschwindigkeit.

7.3.9 Erweiterung der Racemisierung auf andere *N*-Acetyl-aminosäuren

Zu Beginn der Arbeiten zum Thema Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren war mit der Wahl der Modellverbindung *N*-Acetyl-phenylalanin ein Vertreter gewählt worden, der gewährleisten sollte, daß alle Maßnahmen und Erkenntnisse zur erstmaligen Ermöglichung und insbesondere zur Optimierung der Reaktion sich auf andere Aminosäuren übertragen lassen. Zu diesem Zeitpunkt sollte diese Annahme überprüft werden. Dazu wurden eine Reihe

von enantiomerenreinen *N*-Acetylaminosäuren unter den optimierten experimentellen Bedingungen auf ihre Racemisierungsaktivität überprüft (Tabelle 25). Auch hier wurden Experimente zur thermischen Racemisierbarkeit bzw. zur PCy₃-katalysierten Racemisierung aller Verbindungen durchgeführt.

Tabelle 25: Übersicht zur Racemisierung anderer *N*-Acetylaminosäuren

Verbindung		Zeit [h]	ee(L) [%]
L- <i>N</i> -Acetyl-alanin		48	1, 0 43 ^a , 99 ^b
L- <i>N</i> -Acetyl-valin		48	11, 6 64 ^a , 99 ^b
L- <i>N</i> -Acetyl-leucin		48	47, 47 82 ^a , 100 ^b
L- <i>N</i> -Acetyl-prolin		48	0, 1 100 ^a , 100 ^b
L- <i>N</i> -Acetyl-methionin		48	24, 26 35 ^a , 94 ^b
L- <i>N</i> -Acetyl-asparaginsäure		48	93, 94 55 ^a , 94 ^b

Bed.: 0.48 mmol Substrat, 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂, 50 mol% PCy₃, 10 mL MeCN, 60 °C. a) Reaktion ohne [Rh(cod)Cl]₂ b) *N*-Acylaminosäure in MeCN.

Die Ergebnisse mit *N*-Acetylalanin (0% ee, 1 % ee) und *N*-Acetylvalin (6 % ee, 11 % ee) zeigen eindrucksvoll, daß neutrale, aliphatische Aminosäuren innerhalb von 2 Tagen Reaktionszeit einer kompletten Racemisierung unterliegen. Die Übertragung der bei *N*-Acetylphenylalanin gefundenen Methode ist hier demnach ohne Reaktivitätsverlust

möglich. Die Racemisierungsgeschwindigkeit von *N*-Ac-Leu (47 % ee, 47 % ee) ist signifikant langsamer.

Als Grund kann die relative Schwerlöslichkeit der Verbindung in Acetonitril genannt werden, selbst bei Erreichen der Reaktionstemperatur von 60 °C bleibt die Verbindung zum überwiegenden Teil ungelöst. Eine effektive und reproduzierbare Racemisierung ist auch bei dem zyklischen *N*-Acetylprolin (0 % ee, 1 % ee) und dem schwefelhaltigem *N*-Acetylmethionin (24 % ee, 26 % ee) möglich. Keine Racemisierung kann dagegen bei der sauren Aminosäure *N*-Acetylasparaginsäure (93 % ee, 94 % ee) beobachtet werden. Möglicherweise koordiniert die zweite Carboxylgruppe zusätzlich an den Katalysator, wodurch eine Racemisierung nicht mehr möglich ist.

Keine der untersuchten *N*-Acetylaminosäuren zeigt in Acetonitril thermische Racemisierung bei 60 °C (Versuche mit Indizes b). Damit ist die alleinige Wirksamkeit des Katalysatorsystems belegt. Die PCy₃-katalysierte Racemisierung (Versuche mit Indizes a) ist bei *N*-Acetyllalanin (43 % ee), *N*-Acetylvalin (64 % ee), *N*-Acetylmethionin (35 % ee) signifikant, jedoch langsamer als die des kompletten Katalysatorsystems. Einzige Ausnahme ist *N*-Acetylasparaginsäure (55 % ee), welche sich unter Standardbedingungen als racemisierungsstabil zeigt, aber im Einfluß von PCy₃ ohne Rh-Katalysator der beobachteten Racemisierung unterliegt. Die PCy₃-vermittelte Racemisierung verläuft möglicherweise über die reversible Deprotonierung der *N*-Acylaminosäure am chiralen Kohlenstoffatom unter gleichzeitiger Bildung einer kationischen Phosphoniumspezies. Dieser Prozeß sollte parallel zur schnelleren Rhodium-katalysierten Racemisierung ablaufen, jedoch bleibt unklar, weshalb das im Überschuß vorliegende PCy₃ im Fall von *N*-Acetylasparaginsäure nicht in derselben Weise wirken kann.

Es kann zusammengefaßt werden, daß das Katalysatorsystem aus [Rh(cod)Cl]₂ und PCy₃ in MeCN sich für Racemisierungen einer Reihe von *N*-Acylderivaten wie Acetyl-, Benzoyl-, Phenacetyl- und eingeschränkt für Methoxyacetylderivate von Phenylalanin eignete. Weiterhin konnte eine allgemeine Anwendbarkeit des Verfahren an verschiedenen *N*-Acetylaminosäuren belegt werden, wobei sich insbesondere aliphatische und zyklische *N*-Acetylaminosäuren eigneten. Die Kombination der Ergebnisse der Untersuchungen zur Variation des Acylrestes und zur Variation der *N*-Acetylaminosäure belegten plausibel, daß sich eine Vielzahl weiterer Aminosäurederivate schnell und effektiv racemisieren ließen.

7.3.10 Neue Arbeiten zur Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren in alternativen Lösungsmitteln

Wie die bisherigen Arbeiten zum Einsatz anderer Lösungsmittel als Reaktionsmedium zeigten, war die Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren einzig und allein in MeCN möglich. Es war davon auszugehen, daß MeCN eine essentielle Rolle im Mechanismus der Rhodium-katalysierten Racemisierung spielen muß. Bei Einsatz von anderen Lösungsmitteln wie Toluol, Ethylacetat, THF und Dioxan war immer ein MeCN-Anteil von mindestens 50 Vol% nötig, um schnelle Racemisierung zu gewährleisten (z.B. *N*-Ac-Phe, Kat., Toluol/MeCN 1/1, 60 °C, 48 h, 20 % ee). Eine Anwendung der Reaktion in anderen Lösungsmitteln konnte also nur erfolgreich sein, wenn es gelang, die Funktion von Acetonitril durch andere geeignete Zusätze zu ersetzen. Die stark koordinierenden Eigenschaften von MeCN, die als wichtiges Merkmal dieses Lösungsmittels einzustufen sind, können evtl. durch andere koordinierend wirkende Substanzen wie z.B. Nitril- oder Halogenidionen simuliert werden. Um die Löslichkeit der Verbindungen zu gewährleisten, wurden vorzugsweise Tetraalkylammoniumverbindungen eingesetzt. Tabelle 26 zeigt die erste Versuchsreihe zur Racemisierung von *N*-Acetylphenylalanin in Gegenwart von Salzadditiven.

Tabelle 26: Racemisierungsreaktionen mit Salzadditiven

Eintrag	Salz	Lösungsmittel	ee(L) [%]
1	(Bu) ₄ N ⁺ CN ⁻	MeCN	29
2	(Bu) ₄ N ⁺ CN ⁻	EtOAc	45
3	(Bu) ₄ N ⁺ CN ⁻	Toluol/EtOAc 9/1	34
4	(Bu)₄N⁺Br⁻	EtOAc	2

Bed.: 100 mg *L*-*N*-Ac-Phe, 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂, 50 mol% PCy₃, 50 mol% Ammoniumsalz, 60 °C, 48 h.

Das Ergebnis aus Eintrag **1** zeigt, daß die Anwesenheit von [(Bu)₄N]⁺CN⁻ die Racemisierung von *L*-*N*-Acetylphenylalanin zwar nicht verhindert, wohl aber deutlich die Geschwindigkeit der Reaktion herabsetzt. Wird die Reaktion in EtOAc unter identischen Reaktionsbedingungen durchgeführt (Eintrag **2**), so kann *erstmal*s eine deutliche Racemisierung (45 % ee) der Testverbindung in einem anderen Lösungsmittel als MeCN erreicht werden. Im Lösungsmittelgemisch Toluol/EtOAc 9/1 (EtOAc ist nötig, um die Verbindungen zu lösen) ist die Racemisierung ebenfalls möglich, die Reaktion verläuft im Vergleich zu **2** sogar mit leicht erhöhter Geschwindigkeit (34 % ee nach 48 h, Eintrag **3**). Eine

komplette Racemisierung des Substrates wird unter Verwendung von 50 mol% [(Bu)₄N]Br erreicht (Eintrag 4). Die Geschwindigkeit der Reaktion in EtOAc ist vergleichbar mit der Racemisierung unter Standardbedingungen in MeCN.

Die Menge des Ammoniumsalzes war mit 50 mol% vergleichsweise groß, die weiteren Arbeiten sollten zeigen, inwieweit sich die Racemisierungsgeschwindigkeit bei Reduzierung der (Bu)₄NBr-Menge ändert. Bei den aufgeführten Experimenten wurde der (Bu)₄NBr-Gehalt schrittweise von 2-50 mol% variiert.

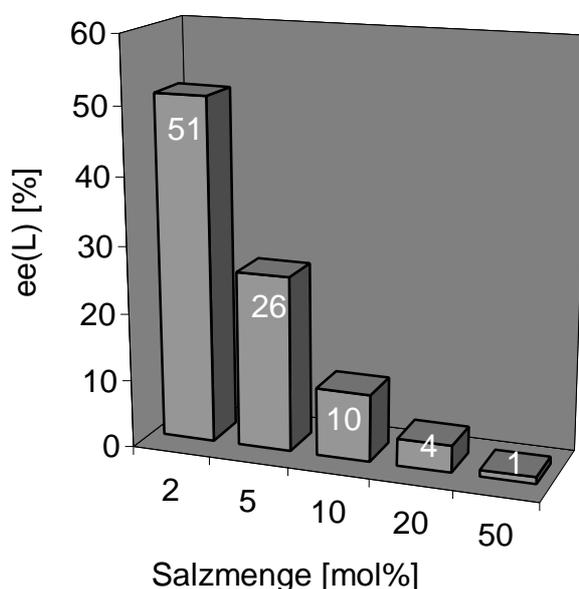


Abbildung 34: Einfluß der (Bu)₄NBr-Menge auf die Racemisierungsgeschwindigkeit von *L-N*-Ac-Phe in EtOAc unter Standardbedingungen

Sie belegen, daß schnelle Racemisierung der Testverbindung bereits mit 10 mol% (Bu)₄NBr (10 % ee nach 48 Stunden) erfolgt. Ein geringerer Anteil an Salz erniedrigt die Racemisierungsgeschwindigkeit erheblich (26 % ee bei 5 mol%, 51 % ee bei 2 mol%). Dennoch ist die Racemisierung in EtOAc mit einem vergleichsweise geringem Anteil (10 mol%) der Salzverbindung ähnlich effektiv, wie die entsprechende Reaktion in MeCN ohne Salzzusatz.

Zu diesem Zeitpunkt waren weitere Untersuchungen zur Eignung anderer Ammoniumverbindungen sinnvoll, da evtl. aktivere Verbindungen als (Bu)₄NBr gefunden werden können. Um die jeweiligen Unterschiede besser zu verdeutlichen, wurde zum einen

die katalytische Menge der Additive auf 25 mol% erhöht, zum anderen die Enantiomerenzusammensetzung von *N*-Ac-Phe zusätzlich nach 24 Stunden bestimmt. In den ersten Untersuchungen sollte gezeigt werden, welche Rolle das Anion bei der Racemisierung von *L*-*N*-Acetylphenylalanin spielt. Zu diesem Zweck sind alle Tetrabutylammoniumhalogenide in der Reaktion eingesetzt worden.

Tabelle 27: Screening zur Wirkung verschiedener Ammoniumverbindungen bei Racemisierungsreaktionen in Ethylacetat

Eintrag	Salz	ee(L) [%] 24 h	ee(L) [%] 48 h
1	(Bu) ₄ NBr	9	2
2	(Bu) ₄ NF	95	83
3	(Bu) ₄ NCl	28	5
4	(Bu) ₄ NI	5	(6)
5	(Bu) ₄ NOH	96	94
6	(Bu) ₄ NCN	59	46
7	(Et) ₄ NI	63	35
8	(Octyl) ₄ NBr	16	3
9	(Bu) ₄ NBF ₄ ^a	-	88
10	(Bu) ₄ NNO ₃ ^a	-	78
11	(Bu) ₄ NHSO ₄ ^a	-	96
12	Bu ₄ NBr ^b	-	100

Bed.: 100 mg *L*-*N*-Ac-Phe, 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂, 50 mol% PCy₃, 25 mol% Ammoniumsalz, 60 °C. a) 10 mol% Ammoniumsalz b) ohne PCy₃.

Es zeigt sich, daß die Halogenidionen in der Reihenfolge F < Cl < Br < I die Racemisierung beschleunigen (Einträge **1-4**). Die Racemisierung mit Bu₄NI gelingt zwar am schnellsten, doch setzt deren racemisierende Wirkung nach spätestens 24 Stunden aus, als Indiz hierfür kann der konstant gebliebene ee-Wert bei 48 Stunden herangezogen werden. Weiterhin ist ersichtlich, daß sich Bu₄NCN in seiner Aktivität bei 25 mol% (46 % ee, 48 h, Eintrag **6**) deutlich von Bu₄NBr (2 % ee, 48 h, Eintrag **1**) unterscheidet, damit liegt dessen Reaktivität zwischen Bu₄NF (83 % ee) und Bu₄NCl (5 % ee).

Um zu belegen, daß die racemisierende Wirkung den entsprechenden Halogenidionen zuzuschreiben ist, wurden weitere Reaktionen mit Ammoniumverbindungen durchgeführt, die ein nicht koordinierendes Anion besitzen, bzw. das Anion im sauren Reaktionsmedium

neutralisiert werden kann (OH^- im Fall von Bu_4NOH). Die erhaltenen Werte der Enantiomerenzusammensetzung von *L*-*N*-Acetylphenylalanin bestätigen, daß weder Ammoniumkationen noch nicht-koordinierende Anionen für die auftretende Racemisierung verantwortlich sind. Der geringe Einfluß des Ammoniumions auf die Geschwindigkeit der Reaktion wird auch an den Ergebnissen für Et_4NI (35 % ee, 48 Stunden, Eintrag **7**) und Octyl_4NBr (3 % ee, 48 Stunden, Eintrag **8**) im Vergleich zu Bu_4NBr (2 % ee, 48 Stunden) deutlich. Ein Kontrollexperiment (Eintrag **12**) bestätigt, daß nach wie vor die Anwesenheit von PCy_3 für die Racemisierung essentiell ist, Bu_4NBr allein wirkt demzufolge nicht racemisierend auf die *N*-Acylaminosäure.

Es kann festgehalten werden, daß der Zusatz von Bu_4NBr eine effektive Racemisierung in Ethylacetat gewährleistete. Entscheidender Faktor bei der Racemisierung war die Anwesenheit des Anions, die Natur des Kations spielte eine untergeordnete Rolle und garantierte nur eine ausreichende Löslichkeit der Verbindung im organischen Lösungsmittel. Weitere Untersuchungen sollten nun klären, ob mit dem Zusatz der in organischen Lösungsmitteln löslichen Salze auch in anderen Medien Racemisierung möglich ist. Um besonders geeignete Lösungsmittel zu identifizieren, wurde der Anteil an Bu_4NBr auf 5 mol% gesenkt.

Tabelle 28: Bu_4NBr vermittelte Racemisierung von *L*-*N*-Ac-Phe in verschiedenen organischen Lösungsmitteln

Eintrag	Lösungsmittel	ee(L) [%] 24 h	ee(L) [%] 48 h
1	Dioxan	69	43
2	Chloroform	78	63
3	Aceton	20	1,0
4	Toluol/EtOAc 9/1	83	56
5	THF	99	99
6	MTBE	75	59
7	Methanol	-	95
8	<i>tert</i> -Butanol	-	70

Bed.: 100 mg *L*-*N*-Ac-Phe, 5 mol% $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$, 50 mol% PCy_3 , 5 mol% Ammoniumsalz, 60 °C.

Die Ergebnisse zeigen, daß mit Ausnahme von THF und MeOH (Eintrag **5,7**) in allen Lösungsmitteln eine deutliche Racemisierung beobachtbar ist, die ohne Salzzusatz in diesem Ausmaß bisher nicht möglich war. Besonders gut gelingt die Reaktion in Aceton (0 % ee,

1 % ee, Eintrag **3**) sowie in Dioxan (43 % ee, Eintrag **1**). Das Ergebnis der Reaktion in THF ist im Hinblick auf die anderen Ergebnisse überraschend (99 % ee, Eintrag **5**).

Die Eignung von Aceton als Lösungsmittel bei der Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren eröffnete die Möglichkeit, Untersuchungen mit Aceton/Wasser-Mischungen durchzuführen. Es sei daran erinnert, daß die Anwesenheit von Wasser im Lösungsmittel eine Grundvoraussetzung für die enzymatische Hydrolyse ist. Die theoretisch notwendige Mindestmenge an Wasser liegt bei quantitativer Hydrolyse bei 0.48 mmol, was ca. einer Menge von 8.6 μL entspricht, dennoch kann ein wesentlich höherer Wasseranteil für die Sicherstellung der Enzymaktivität und aus kinetischen Gründen (Verschiebung des chemischen Gleichgewichtes zugunsten der Amidhydrolyse durch hohen Wasserüberschuß) notwendig sein.

Tabelle 29: Racemisierung von *L-N*-Ac-Phe in wässrigen Acetonlösungen

Eintrag	Lösungsmittel	T	ee(L) [%] 48 h
1	Aceton/Wasser 19/1	60	52, 53
2	Aceton/Wasser 19/1	50	53, 54
3	Aceton	50	21
4	Aceton/Wasser 8/2 ^b	60	82

Bed.: 100 mg *L-N*-Ac-Phe, 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂, 50 mol% PCy₃, 10 mol% Bu₄NBr, 60 °C. b) 20 mol% Bu₄NBr.

Wie die Ergebnisse zeigen, sinkt die Aktivität des Katalysatorsystems bei Anwesenheit von Wasser deutlich ab. Die Enantiomerenzusammensetzung von *N*-Acetylphenylalanin steigt bereits bei 5 Vol% Wasser im Vergleich zu reinem Aceton von 0 % ee (Eintrag **3**, Tabelle 28) auf ca. 52 % ee (Eintrag **1**), obwohl die Bu₄NBr-Menge von 5 mol% auf 10 mol% verdoppelt wurde. Interessanterweise erhält man die gleichen Ergebnisse bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C (Eintrag **2**), auch hier erweist sich die in reinem Aceton durchgeführte Reaktion mit 21 % ee (Eintrag **3**) als schneller. Die weitere Erhöhung des Wassergehaltes auf 20 Vol% führt trotz der vorgenommenen weiteren Verdopplung der Bu₄NBr-Menge auf 20 mol% nahezu zum Erliegen (82 % ee) der Racemisierung.

Untersuchungen zur Kombination des Racemisierungsschrittes mit enzymatischer Racematspaltung

7.3.10.1 Vorbemerkung

Die eingeschlagene Strategie zur Entwicklung der dynamischen kinetischen Racematspaltung von *N*-Acylaminosäuren lag in der getrennten Betrachtung der Teilreaktionen Racemisierung und enzymatische Racematspaltung. Da zu Beginn der Arbeiten unklar war, ob und unter welchen Bedingungen sich die bislang unbekannte Übergangsmetall-katalysierte Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren bewerkstelligen läßt, wurde das Hauptinteresse auf die Lösung dieser Problematik gelegt. Mit der Entdeckung des Katalysatorsystems aus $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$ und PPh_3 bzw. PCy_3 und dessen erfolgreiche Anwendung in Racemisierungsreaktionen bei einer Reihe von *N*-Acylaminosäuren in MeCN war die Grundlage für Untersuchungen zur dynamischen kinetischen Racematspaltung von *N*-Acylaminosäuren geschaffen worden.

7.3.10.2 Die Wahl des Enzyms

Wie bereits in Abschnitt 7.1 skizziert wurde, kommen als Enzyme für Racematspaltungen von *N*-Acylaminosäuren hauptsächlich Acylase I und Acylase II aus unterschiedlichen biologischen Quellen in variierenden Einsatzformen zum Einsatz. Die erfolgreiche Anwendung dieser Enzyme in den eigenen Arbeiten war jedoch wenig wahrscheinlich, da die erforderlichen Bedingungen für die Aktivität der Enzyme nicht gegeben waren. Problematisch ist neben der geringen Temperaturstabilität^[110] die nur mäßige Toleranz von organischen Cosolventien.^[111] In der Regel werden Racematspaltungen in reinem Wasser oder in wässrigen Pufferlösungen bei pH-Werten zwischen 6 und 9 durchgeführt, eine Steigerung der Enzymaktivität kann durch Zugabe von Cobalt(II)-Ionen erreicht werden.

Ein alternativ zu verwendendes Enzym ist die Penicillin G Amidase. Dieses Enzym weist eine einzigartige Aktivität bzgl. Phenacetylgruppen und ähnlich aufgebauten Strukturen auf.^[112]

Die synthetischen Anwendungen des Enzyms liegen in der stereoselektiven Spaltung dieser Gruppen von Amin- oder Alkoholfunktionen und umgekehrt in der Acylierung dieser Funktionen mit entsprechenden Acylierungsreagentien.

Die erforderlichen Reaktionsbedingungen zur Sicherstellung der Enzymaktivität sind zwar mit den Bedingungen für Acylase I,II vergleichbar, doch ist Penicillin G Amidase als CLEC-Präparation (Cross-Linked-Enzyme-Crystals) verfügbar. CLEC-EC[®] zeichnet sich durch eine

Tabelle 30: Versuche einer DKR von *N*-Acylaminosäuren mit dem CLEC-EC[®] Enzym

Eintrag	Substrat	Phosphan	Produkt
1	DL- <i>N</i> -Phenac-Phe	PPh ₃	nicht nachweisbar
2	DL- <i>N</i> -Phenac-Phe	PCy ₃	nicht nachweisbar
3	DL- <i>N</i> -Ac-Phe	PPh ₃	nicht nachweisbar
4	DL- <i>N</i> -Ac-Phe	PCy ₃	nicht nachweisbar

Bed.: 200 mg L-*N*-Ac-Phe, 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂, 50 mol% Phosphan, 10 mL Acetonitril, 60 °C, 100 µL CLEC-EC[®]-Lösung, 96 h.

Die Resultate aller durchgeführten Reaktionen zeigen, daß nach 4 Tagen Reaktionszeit das Produkt über DC nicht nachzuweisen ist. Dafür können mehrere Ursachen in Erwägung gezogen werden.

1. Der pH-Wert der Lösung liegt außerhalb des Aktivitätsbereiches des Enzyms.
2. Der Wassergehalt des Reaktionsmediums (hier 1 Vol%) ist zu niedrig.
3. Die zur Racemisierung notwendigen Verbindungen [Rh(cod)Cl]₂, PPh₃ bzw. PCy₃ oder ihre Folgeprodukte wirken inhibierend auf das Enzym.
4. Das Enzym ist in Acetonitril nicht aktiv.

zu 1)

Der Ladungszustand des Enzyms ist zweifelsohne eine sehr wichtige Einflußgröße für die Enzymaktivität. Während in wässrigen Lösungen diese Größe sehr einfach über den pH-Wert festgelegt werden kann, ist in organischen Lösungsmitteln die Einstellung des pH-Wertes schwierig.¹² [113,114] Als besonders problematisch sind Reaktionen einzuschätzen, die eine Veränderung der Säure- oder Basenkonzentration während des Reaktionsverlaufes mit sich bringen, wie es in den eigenen Arbeiten durch die Freisetzung von Phenylelessigsäure der Fall ist (siehe Gleichung 7).

Da dieser Umstand jedoch erst mit fortschreitender Reaktion an Bedeutung gewinnt, kann er nicht als Ursache für die beobachtete generelle Inaktivität des Enzyms herangezogen werden.

¹² Der pH-Wert ist ein Maß für die Hydroniumionenkonzentration in *Wasser*. Die Übertragbarkeit dieser Größe in organische Lösungsmittel ist zweifelhaft. Dennoch kann durch Verwendung von Enzymen, die aus wässrigen Lösungen (oder wässr. Pufferlösungen) mit definiertem pH-Wert gefällt oder lyophilisiert werden, der Ladungszustand des Enzyms festgelegt werden, der im organischen Lösungsmittel aufgrund des nicht möglichen Ladungsaustausches beibehalten wird.

zu 2)

Enzyme, die in organischen Lösungsmitteln eingesetzt werden, benötigen zur Gewährleistung ihrer Aktivität geringe Mengen an Wasser. Als Faustregel gilt für polare, mit Wasser mischbare Lösungsmittel ein empfohlener Wasseranteil von 1-5 Vol%.^[115,72] Die Untersuchungen zur Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren in wasserhaltigem Acetonitril zeigen jedoch, daß bereits bei 5 Vol% Wasseranteil die Racemisierung nicht mehr möglich ist. Sollte sich der Wassergehalt von Acetonitril als entscheidende Größe erweisen, so ist festzustellen, daß nach bisherigem Kenntnisstand die jeweiligen Anforderungen der Teilreaktionen in diesem Punkt unvereinbar sind.

zu 3 und 4)

Der Einfluß des Lösungsmittels bzw. der eingesetzten Komponenten kann an verschiedenen Modellreaktionen untersucht werden, was im folgenden beschrieben wird.

Zu diesem Zweck wurden einfache Hydrolysereaktionen von *L-N*-Phenac-Phe mit dem CLEC-EC[®]-Katalysator im Milliliter-Maßstab durchgeführt. Das primäre Interesse galt der Beobachtung der Enzymaktivität, daher eignete sich als Substrat auch das *L*-Enantiomer. Die qualitative Auswertung der Reaktionen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie.

Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 31 zusammengefaßt.

Tabelle 31: Untersuchung zur Wirkung einzelner Komponenten und Lösungsmittel auf die Enzymaktivität

Eintrag	Lösungsmittel	zugesetzte Verbindung	Produktbildung
1	MeCN/H ₂ O 9/1	keine	nein
2	MeCN/H ₂ O 1/1	keine	Spuren
3	H ₂ O/Aceton 4/1	keine	deutlich
4	H ₂ O/Aceton 4/1	PPh ₃	deutlich
5	H ₂ O/Aceton 4/1	[Rh(cod)Cl] ₂	deutlich
6	H ₂ O/Aceton 4/1	PPh ₃ /[Rh(cod)Cl] ₂	deutlich

Bed.: 1.0 mL Lösungsmittel, 20 mg *L*-Phenacetylphenylalanin, 25 µL CLEC-EC-Lösung, evtl. 10 mg PPh₃ bzw [Rh(cod)Cl]₂, 60 °C, 48 h.

Es zeigt sich, daß im Lösungsmittelgemisch Acetonitril/Wasser 9/1 keine Aktivität des Enzyms beobachtbar ist (Eintrag **1**). Selbst bei einem Wassergehalt von 50 Vol% sind nur Spuren des Produktes (Phenylalanin) nachweisbar (Eintrag **2**). Die möglichen Auswirkungen

von PPh₃ und des Rhodiumkatalysators auf die Enzymaktivität wurden ebenfalls untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen, daß weder PPh₃ noch [Rh(cod)Cl]₂ die enzymatische Hydrolyse vollständig unterbinden (Einträge **3-6**). In Kontrollexperimenten wurde sichergestellt, daß Phenacetylphenylalanin keiner nachweisbaren chemischen Hydrolyse unterliegt. Zusätzlich wurde überprüft, ob das gewählte Lösungsmittelgemisch (Cosolvenz Aceton zur Verbesserung der Löslichkeit von PPh₃- und [Rh(cod)Cl]₂) Enzymaktivität gewährleistet.

Es bleibt festzuhalten, daß die Inaktivität des CLEC-EC[®]-Katalysators in Gegenwart von Acetonitril als Ursache für das Scheitern der dynamischen kinetischen Racematspaltung anzusehen war. Die entwickelte Methode zur Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren war aufgrund ihrer signifikanten Empfindlichkeit gegenüber Wasser als Cosolvens und der geringen allgemeinen Lösungsmitteltoleranz nicht ausreichend flexibel, die notwendigen experimentellen Anforderungen der enzymatischen Hydrolyse zu erfüllen.

Diese experimentellen Befunde erforderten weitere Arbeiten zur Verbesserung des Verfahrens zur Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren. Ziel der Bemühungen sollte eine erweiterte Anwendbarkeit der Reaktion in alternativen Lösungsmitteln sein. Die Studien hierzu sind in Abschnitt 7.3.10 zusammengefaßt. Diese Arbeiten ebneten den Weg zur Durchführung der Racemisierungsreaktion in Aceton, Dioxan und Ethylacetat. Auch hier mußte in Untersuchungen mit wässrigen Acetonlösungen der negative Effekt von Wasser auf die Racemisierungsgeschwindigkeit hingenommen (Tabelle 29) werden, dennoch waren Racemisierungen in Aceton bei 5 Vol% Wasseranteil (evtl. auch mit 10 Vol%) möglich. Es schien also lohnenswert, erneute Untersuchungen zur Enzymaktivität von CLEC-EC[®] in wässrigen Acetonlösungen anzustreben.

Zunächst wurde die Aktivität des Enzyms in Aceton/Wasser 8/2 und 9/1 sowie in wässriger Pufferlösung mit Hilfe von Penicillin G als Testsubstrat bestimmt. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog der Vorschrift zur Bestimmung der Aktivität von Penicillin G Amidase (Activity Assay).¹³

¹³ Quelle: Altus Biologics, ChiroCLEC-EC[®] Informationsbroschüre.

Tabelle 32: Aktivitätsbestimmung des CLEC-EC[®]-Katalysators unter Standardbedingungen und wasserhaltigen Acetonlösungen.

Lösungsmittel	Aktivität [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]
Phosphatpuffer, pH 8.0	15.3
Aceton/H ₂ O 8/2, pH 8.0	1.7
Aceton/H ₂ O 9/1, pH 8.0	0

Bed.: 1.12 g Penicillin G Kaliumsalz, 10 mL 0.2M Phosphatpuffer, 90 mL Wasser, pH 8.0, 28 °C. Eine 20 mL-Probe dieser Lösung wird eingesetzt, Autotitrator (0.05N NaOH, pH 8.0), 25 μ L CLEC-EC[®]-Lösung. Der NaOH Verbrauch wird nach 5 Minuten Reaktionszeit ermittelt. Weitere Details zur Berechnung der Aktivität siehe¹³.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Aktivität des Katalysators von 15.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ unter Standardbedingungen auf 1.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ im Lösungsmittelgemisch Aceton/H₂O 8/2 sinkt, das entspricht einer relativen Aktivität von ca. 11%. In Aceton mit 10 Vol% Wasseranteil ist keine Aktivität (nach Korrektur mit dem NaOH-Verbrauch bei chemischer Hydrolyse) mehr zu beobachten. Damit ist klar, daß in einer Mischung von Aceton/H₂O 19/1 ebenfalls keine Aktivität beobachtet werden kann.

Trotz der ungünstigen Voraussetzungen sind Versuche zur klassischen Racematspaltung mit DL-*N*-Phenacetylphenylalanin in Aceton/H₂O 9/1 unter pH-Kontrolle eines Autotitrators unternommen worden. Es war jedoch nicht möglich, das Produkt Phenylalanin nach 4 Tagen Reaktionszeit in mehr als 3 % Ausbeute und 80 % ee zu isolieren. Die Enantiomerenzusammensetzung des Produktes ließ darauf schließen, daß das Enzym zumindest über einen sehr kurzen Zeitraum aktiv ist und mit mindestens befriedigender Selektivität¹⁴ das Produkt freisetzte.

Ferner stellte sich heraus, daß die Gegenwart von [Rh(cod)Cl]₂ und PCy₃ in der Reaktion zu einem erheblichen NaOH-Verbrauch während der Reaktion führte. Verantwortlich dafür war die basenvermittelte Bildung von Oxidationsprodukten der Phosphan(III)-verbindung.

¹⁴ Es ist weiterhin zu bedenken, daß innerhalb von 4 Tagen Reaktionszeit möglicherweise chemische Hydrolyse des Substrates den ee-Wert negativ beeinflusst.

7.3.11 Die Palladium-katalysierte Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren

Die Probleme bei der Kombination von Rhodium-katalysierter *N*-Acylaminosäure-racemisierung und enzymatischer Racematspaltung dieser Verbindungen erforderten weitere Verbesserungen des Racemisierungsschrittes. Zu diesem Zweck sollte die Eignung anderer Übergangsmetallverbindungen überprüft werden. Möglicherweise kann Racemisierungsaktivität bei zu Rh(I)-Verbindungen isoelektronischen Ru(II)- oder Pd(0)-Komplexen beobachtet werden. In den allerersten Screeningexperimenten wurden Vertreter dieser Verbindungsklasse zwar überprüft, doch war deren potentielle Racemisierungsaktivität aufgrund der zu niedrig gewählten Reaktionstemperatur von 40 °C möglicherweise übersehen worden.

Tabelle 33: Ru(II)- und Pd(0)-Katalysatoren bei der Racemisierung von *L-N*-Ac-Phe

Eintrag	Katalysator	Phosphan [mol%]	ee(L) [%], 24 h	ee(D) [%], 48 h
1	[Ru(cod)Cl] _n	ohne	-	91
2	[Ru(cod)Cl] _n	PCy ₃	-	74
3	[(<i>p</i> -Cymol)RuCl] ₂	ohne	-	97
4	[(<i>p</i> -Cymol)RuCl] ₂	PCy ₃	-	69
5	Pd(PPh₃)₄	ohne	13, 48	5, 18
6	Pd/C 5%	ohne	-	99, 99

Bed.: 100 mg *N*-Ac-Phe, 5 mol% Kat.(30 mg Pd/C), 25 mol% PCy₃, 10 mL MeCN, 60 °C.

In Tabelle 33 sind die Resultate des ersten Screenings bei 60 °C zusammengefaßt. Die Racemisierung von *L-N*-Acetylphenylalanin mit dem Rutheniumanalogon [Ru(cod)Cl]_n zu [Rh(cod)Cl]₂ ist mit dem Katalysator selbst nicht möglich (91 % ee, Eintrag **1**). In Kombination mit 25 mol% PCy₃ zeigt sich eine Racemisierung des Substrates auf 74 % ee (Eintrag **2**), ein Ergebnis, das bereits von PCy₃ ohne weitere Katalysatoren erreicht wird. Vergleichbare Ergebnisse werden mit [(*p*-Cymol)RuCl]₂ alleine (97 % ee, Eintrag **3**) und der entsprechenden Kombination mit PCy₃ (69 % ee, Eintrag **4**) erhalten. Inaktiv verhält sich ebenso der heterogene Katalysator Pd/C (99 % ee).

Eine schnelle Racemisierung (5 % ee, 18 % ee, 48 Stunden, Eintrag **5**) wird dagegen in Gegenwart von 5 mol% Pd(PPh₃)₄ beobachtet. Die Reproduktion des Ergebnisses zeigt zwar eine signifikante Schwankung in der Reaktionsgeschwindigkeit (vgl. 13 % ee bzw. 48 % ee

nach 24 Stunden), dennoch bleibt festzuhalten, daß diese Ergebnisse weitere Untersuchungen mit diesem Pd-Katalysator rechtfertigen.

Die nahezu vollständige Racemisierung von *L*-*N*-Acetylphenylalanin mit 5 mol% Pd(PPh₃)₄ legte nahe, Auswirkungen der Racemisierungsgeschwindigkeit bei Verringerung der Katalysatormenge zu untersuchen. Die mangelhafte Reproduzierbarkeit der Racemisierung konnte auf die relative Instabilität der Pd(0)-Verbindung zurückgeführt werden, da während der Reaktionen die Bildung von Palladiumschwarz beobachtbar war. Die Ursache hierfür lag möglicherweise in der übermäßigen Dissoziation der stabilisierenden PPh₃-Liganden. Diese Ligandabspaltung sollte durch zusätzlich eingebrachtes PPh₃ zurückgedrängt werden, damit sollten letztendlich die Ergebnisse der Einzelerperimente geringeren Schwankungen unterlegen sein.

Ein vor allem im Hinblick auf die Anwendung der Racemisierung in der dynamischen kinetischen Racematspaltung wichtiger Punkt waren Untersuchungen zu Lösungsmittelvariationen, einer der Hauptschwäche der bisher entwickelten Methoden. Tabelle 34 faßt die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Tabelle 34: Racemisierungen von *L*-*N*-Ac-Phe mit 1 mol% Pd(PPh₃)₄

Eintrag	Katalysator	Phosphan	LM	ee(L) [%], 48 h
1	Pd(PPh ₃) ₄	ohne	MeCN	14, 32
2	Pd(PPh ₃) ₄	1 mol% PPh ₃	MeCN	17, 12, 17, 13
3	Pd(PPh ₃) ₄	6 mol% PPh ₃	MeCN	11, 10, 11, 10
4	Pd(PPh ₃) ₄	ohne	THF	97, 97
5	Pd(PPh ₃) ₄	ohne	Toluol	98, 96
6	Pd(PPh ₃) ₄	ohne	EtOAc	96, 95
7	Pd(PPh ₃) ₄	ohne	Aceton	97, 97

Bed.: 100 mg *N*-Ac-Phe, 1 mol% Pd(PPh₃)₄, 10 mL LM, 60 °C.

Die Racemisierung der Testverbindung erfolgt selbst mit nur 1 mol% Pd(PPh₃)₄ sehr schnell (14 % ee, 32 % ee, Eintrag **1**), auch hier zeigt sich die nicht befriedigende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Trotzdem ist mit Pd(PPh₃)₄ der mit Abstand aktivste

Racemisierungskatalysator gefunden worden, was der Vergleich zum Rhodiumsystem eindeutig belegt (1 mol% $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$ / 5 mol% $\text{PCy}_3 \leftrightarrow 80\%$ ee, Eintrag 3 Tabelle 22).

Der zusätzliche Einsatz von PPh_3 führt bereits bei einer zugesetzten Menge von 1 mol% zur Stabilisierung des Katalysators (Eintrag 2). Die Ergebnisse der Substratracemisierung (ca. 15 % ee) liegen genau im Bereich der „guten“ Racemisierungsreaktion aus Eintrag 1. Setzt man der Reaktion 6 mol% PPh_3 zu (Pd:P-Verhältnis 1:10), so ist die Streuung der Ergebnisse der Einzelexperimente noch geringer (Eintrag 3) und die Racemisierungsgeschwindigkeit nochmals leicht erhöht (11 % ee). Beide Effekte können der PPh_3 -vermittelten Stabilisierung des aktiven Katalysators zugeschrieben werden.

Die Versuche zur Eignung alternativer Lösungsmittel belegten auch im Fall von Palladium-katalysierter *N*-Acylaminosäureracemisierung die Sonderstellung von MeCN als Lösungsmittel, in keinem der verwendeten Reaktionsmedien konnte eine Racemisierung der Testverbindung *L*-*N*-Acetylphenylalanin beobachtet werden.

Es stellte sich heraus, daß $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ als weit überlegener Katalysator zur Aminosäureracemisierung erkannt wurde. Es bestand jedoch nur eine geringe Wahrscheinlichkeit einer Anwendung in der DKR aufgrund der auch hier festgestellten Ausnahmestellung von MeCN als Lösungsmittel. Trotzdem waren die Ergebnisse so attraktiv, daß die Untersuchungen zur Palladium-katalysierten Racemisierung intensiviert wurden. Hier nicht aufgeführte Untersuchungen zeigten, daß die synthetisierte $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ -Charge nicht über längere Zeit lagerfähig war, deshalb sollte ein gleichwertiger Ersatz für diese Verbindung gesucht werden. Demzufolge waren stabilere Pd(0)- sowie Pd(II)-Katalysatoren Gegenstand weiterer Arbeiten.

Tabelle 35 zeigt die erhaltenen Ergebnisse mit Pd₂(dba)₃ und Pd(OAc)₂ als Präkatalysatoren. Mit den Katalysatorvorstufen Pd₂(dba)₃ und PPh₃ (1 mol% Pd, 5 mol% PPh₃) läßt sich ein zu Pd(PPh₃)₄ gleichwertiger *in-situ* Katalysator generieren, der *L*-*N*-Acetylphenylalanin innerhalb von 48 Stunden Reaktionszeit nahezu zur racemischen Verbindung umwandelt (11 % ee, 13 % ee, Eintrag 1).

Tabelle 35: Racemisierungen mit Pd₂(dba)₃- Pd(OAc)₂-Phosphankombinationen

Eintrag	Katalysator	Phosphan	ee(L) [%], 48 h
1	Pd ₂ (dba) ₃ ^a	5 mol% PPh ₃	11, 13
2	1 mol% Pd(OAc) ₂	5 mol% PPh ₃	6, 10
3	2.5 mol% Pd(OAc) ₂	12.5 mol% PPh ₃	2
4	1 mol% Pd(OAc) ₂	5 mol% PCy ₃	76
5	5 mol% Pd(MeCN) ₂ Cl ₂	25 mol% PPh ₃	97, 97

Bed.: 100 mg *N*-Ac-Phe, 10 mL MeCN, 60 °C.

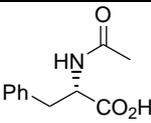
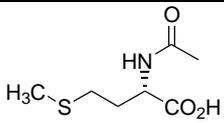
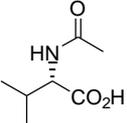
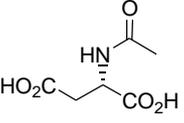
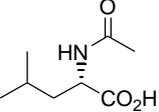
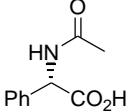
a) 1 mol% Pd als Pd₂(dba)₃.

Das Racemisierungsvermögen von 2.5 mol% Pd(OAc)₂/ 12.5 mol% PPh₃ ist mit der erhaltenen Enantiomerenzusammensetzung von 2 % ee ebenfalls sehr hoch einzuschätzen (Eintrag 3). Wird nur 1 mol% Katalysator eingesetzt, kann das verwendete Substrat *L*-*N*-Acetylphenylalanin zu 6 % ee bzw. 10 % ee racemisiert werden (Eintrag 2). Die bei Untersuchungen zu [Rh(cod)Cl]₂ erzielte Beschleunigung der Racemisierungsgeschwindigkeit beim Übergang von PPh₃ auf PCy₃ ist bei Verwendung von Pd(OAc)₂ als Katalysator nicht zu beobachten. Die Kombination aus Pd(OAc)₂/PCy₃ führt mit einem ee-Wert von 76 % ee zur deutlichen Reduzierung der Racemisierung. Pd(MeCN)₂Cl₂ ist trotz der verwendeten hohen Katalysatormenge inaktiv, möglicherweise stören Chloridionen den Racemisierungsprozeß (97 % ee, Eintrag 5).

Im folgenden sollte die Anwendbarkeit der Pd-katalysierten Racemisierung an anderen *N*-Acylaminosäuren untersucht werden. In weiteren Untersuchungen wurde die mögliche Anwendung des Pd(OAc)₂/PPh₃-Katalysatorsystems in verschiedenen organischen Lösungsmitteln wie THF, Toluol, Aceton, Dioxan, Ethanol und wässrigen Acetonitrillösungen¹⁵ mit 20 mol% Bu₄NBr getestet, jedoch konnte in keinem Experiment eine Substratracesierung beobachtet werden.

¹⁵ In wässrigen Acetonitril- bzw. Ethanolösungen wurde anstatt PPh₃ TPPTS verwendet.

Tabelle 36: Racemisierung verschiedener *N*-Acetylaminosäuren mit 1 mol% Pd₂(dba)₃/5 mol% PPh₃

Eintrag	Substrat	ee(L) [%], 48 h	Eintrag	Substrat	ee(L) [%], 48 h
1		11, 13	4		58, 74
2		49, 51	5		94, 95
3		31, 30	6		83, 87

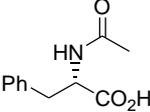
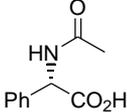
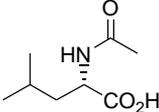
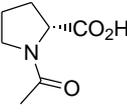
Bed.: 100 mg *N*-Ac-Phe, 10 mL MeCN, 60 °C. 1 mol% Pd als Pd₂(dba)₃, 5 mol% PPh₃.

Die Ergebnisse zeigen, daß neben *L*-*N*-Acetylphenylalanin sich auch *L*-*N*-Acetylleucin mit durchschnittlich 30 % ee (Eintrag **3**) sehr gut unter den gewählten Bedingungen racemisieren läßt. Mäßige Racemisierbarkeit liegt bei *L*-*N*-Acetylvalin (50 % ee, Eintrag **2**) und *L*-*N*-Acetylmethionin vor (ca. 66 % ee, Eintrag **4**). Die Racemisierung von *L*-*N*-Acetylasparaginsäure mit 94 % ee und *L*-*N*-Acetylphenylglycin mit 85 % ee (Einträge **5, 6**) verbleibender Enantiomerenzusammensetzung gelingt vergleichsweise schlecht.

Die Resultate der Untersuchungen zeigten, daß sich *L*-*N*-Acetylphenylalanin unter den gewählten Bedingungen am besten racemisieren ließ, mit deutlichem Abstand folgten alle anderen untersuchten *N*-Acetylaminosäuren. Es wurde angenommen, daß die Racemisierungsgeschwindigkeit bei allen Aminosäurederivaten durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur gesteigert werden kann, deshalb schien als nächster Schritt Racemisierungsexperimente bei 80 °C sinnvoll.

Tabelle 37 zeigt die Ergebnisse einer kleinen Auswahl an *N*-Acetylaminosäuren, die Palladium-katalysiert bei 80 °C racemisiert werden.

Tabelle 37: Racemisierung von *N*-Acetylaminosäuren mit Pd₂(dba)₃/PPh₃ bei 80 °C

Eintrag	Substrat	ee(L) [%], 48 h
1		0, 1
2		6, 21
3		23, 5
4		11

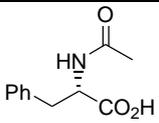
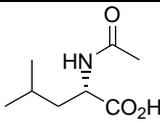
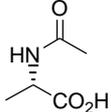
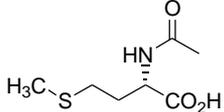
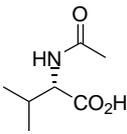
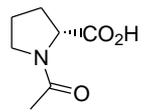
Bed.: 100 mg *N*-Ac-Phe, 10 mL MeCN, 80 °C.
1 mol% Pd als Pd₂(dba)₃, 5 mol% PPh₃.

Unter diesen Bedingungen läßt sich die komplette Racemisierung von *L*-*N*-Acetylphenylalanin (0 % ee, 1 % ee, Eintrag **1**) erreichen. In gleicher Weise führt die Erhöhung der Reaktionstemperatur bei *L*-*N*-Acetylleucin mit durchschnittlichen 14 % ee (Eintrag **3**) zu weit fortgeschrittener Racemisierung (vgl. 30 % ee bei 60 °C, Eintrag **3**, Tabelle 36). Das Katalysatorsystem zeigt bzgl. der Racemisierung von *L*-*N*-Acetylalanin identische Reaktivität (ca. 14 % ee, Eintrag **2**), ähnlich effektiv reagiert es bei der Racemisierung des zyklischen *N*-Acetylprolins (11 % ee, Eintrag **4**).

Insgesamt zeigte sich, daß der sich aus Pd₂(dba)₃ und 5 Äquivalenten PPh₃ bildende *in-situ* Katalysator bei 60 °C effektiv *L*-*N*-Acetylphenylalanin zu racemisieren vermochte. Moderate Racemisierungsaktivität konnte bei Derivaten wie *L*-*N*-Acetylvalin, *L*-*N*-Acetylleucin und *L*-*N*-Acetylmethionin beobachtet werden. Sehr gute Racemisierungsergebnisse ließen sich bei allen getesteten *N*-Acylaminosäuren durch eine Reaktionsführung bei 80 °C erzielen.

In nachfolgenden Experimenten wurden vergleichbare Reaktionen mit dem Pd(OAc)₂/PPh₃-Katalysator beschrieben. Auch hier wurde zunächst die Anwendungsbreite der Reaktion mit 1 mol% Pd(OAc)₂ und 5 mol% PPh₃ an einer Reihe von *N*-Acetylaminosäuren bei 60 °C abgeschätzt (Tabelle 38).

Tabelle 38: Racemisierung verschiedener *N*-Acetylamino-säuren mit 1 mol% Pd(OAc)₂/5 mol% PPh₃

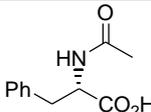
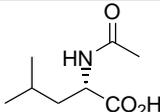
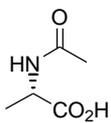
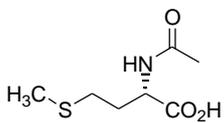
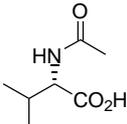
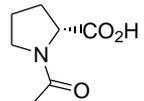
Eintrag	Substrat	ee(L) [%], 48 h	Eintrag	Substrat	ee(L) [%], 48 h
1		8, 8	4		30, 35
2		36, 28	5		76, 77
3		27, 29	6		23, 28

Bed.: 100 mg *N*-Ac-Phe, 10 mL MeCN, 60 °C. 1 mol% Pd(OAc)₂, 5 mol% PPh₃.

Es ist ersichtlich, daß die bereits beobachtete Überlegenheit von Pd(OAc)₂ im Vergleich zu Pd₂(dba)₃ bei der Racemisierung von *L*-*N*-Acetylphenylalanin (8 % ee, Eintrag **1**, Tabelle 38, 11 % ee, Eintrag **1**, Tabelle 36) sich ebenfalls bei Verwendung aller anderen *N*-Acetylamino-säuren zeigt. Die einzige Ausnahme bildet *L*-*N*-Acetylmethionin, das sich mit Pd(0)-Katalysator auf durchschnittlich 66 % ee (Eintrag **4**, Tabelle 36), mit Pd(OAc)₂ jedoch nur bis zu einer Enantiomerenzusammensetzung von 77 % ee racemisieren läßt. Das Racemisierungsverhalten der einzelnen aliphatischen Aminosäuren ist mit verbleibenden 32 % ee Enantiomerenüberschuß für *L*-*N*-Acetylalanin (Eintrag **2**), 28 % ee für *L*-*N*-Acetylvalin (Eintrag **3**) und 33 % ee im Fall von *L*-*N*-Acetylleucin (Eintrag **4**) nahezu identisch. In analoger Weise gelingt mit 26 % ee (Eintrag **6**) die effektive Racemisierung von *L*-*N*-Acetylprolin.

Zur Verbesserung der Racemisierungsergebnisse sind in weiteren Studien zum einen die eingesetzte Palladiumacetatmenge mit Beibehaltung des Pd:P Verhältnisses von 1:5 von 1 mol% auf 2.5 mol% erhöht (Tabelle 39), zum anderen unter Beibehaltung der ursprünglichen Katalysatormenge die Reaktionstemperatur auf 80 °C gesteigert worden (Tabelle 40).

Tabelle 39: Racemisierungsreaktionen von *N*-Acetylamino-säuren mit 2.5 mol% Pd(OAc)₂/12.5 mol% PPh₃

Eintrag	Substrat	ee(L) [%], 48 h	Eintrag	Substrat	ee(L) [%], 48 h
1		2, 1	4		5, 12
2		3, 7	5		9, 65
3		18, 24	6		12, 15

Bed.: 100 mg *N*-Ac-Phe, 10 mL MeCN, 60 °C. 2.5 mol% Pd(OAc)₂, 12.5 mol% PPh₃

Die erhaltenen Enantiomerenzusammensetzungen aller getesteten *N*-Acetylamino-säurederivate bestätigen die allgemeine Reaktionsbeschleunigung unter Verwendung der 2.5-fachen Menge an Racemisierungskatalysator. Mit Ausnahme von *L*-*N*-Acetylmethionin sind alle Reaktionen mit nur minimalen Schwankungen in den Einzelergebnissen reproduzierbar. Vollständige Racemisierung gelingt mit *L*-*N*-Acetylphenylalanin (ca. 2 % ee, Eintrag **1**), *L*-*N*-Acetylalanin (ca. 5 % ee, Eintrag **2**) und *L*-*N*-Acetyl-leucin (ca. 9 % ee, Eintrag **4**), eine nahezu abgeschlossene Racemisierung ist für *L*-*N*-Acetylvalin (ca. 21 % ee, Eintrag **3**) und *L*-*N*-Acetylprolin (ca. 14 % ee, Eintrag **6**) feststellbar.

Tabelle 40: Racemisierung von *N*-Acetylamino-säuren mit 1 mol% Pd(OAc)₂/5 mol% PPh₃ bei 80 °C

Eintrag	Substrat	ee(L) [%], 48 h
1	<i>L</i> - <i>N</i> -Ac-Phe	2, 3
2	<i>L</i> - <i>N</i> -Ac-Ala	7, 16
3	<i>L</i> - <i>N</i> -Ac-Val	2, 5
4	<i>L</i> - <i>N</i> -Ac-Leu	10, 17
5	<i>L</i> - <i>N</i> -Ac-Met	4, 21
6	<i>L</i> - <i>N</i> -Ac-Pro	8, 11

Bed.: 100 mg *N*-Ac-Phe, 10 mL MeCN, 80 °C.
1 mol% Pd(OAc)₂, 5 mol% PPh₃.

Auch mit diesem Katalysatorsystem (vgl. Pd₂(dba)₃ Tabelle 36, 60 °C und Tabelle 37, 80 °C) sollte sich durch Erhöhung der Reaktionstemperatur um 20 °C eine allgemeine Beschleunigung der Reaktion erzielen lassen, was die Ergebnisse in) feststellbar.

Tabelle 40 bestätigen. Der Grad der Reaktionsbeschleunigung, die durch die vorgenommene Temperaturerhöhung erzielt werden kann, ist vergleichbar mit den Resultaten, die bei Erhöhung der Katalysatormenge beobachtet werden.

Es konnte gezeigt werden, daß die selektive Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren mit dem Wechsel vom Rhodiumsystem auf Palladiumkatalysatoren eine eindeutige Verbesserung des Verfahrens darstellt. Neben der Tatsache, daß Palladiumverbindungen im allgemeinen preiswerter als Rhodiumverbindungen sind¹⁶, ermöglichen die Palladiumkatalysatoren gleichwertige bzw. überlegene Racemisierung einer Vielzahl von *N*-Acylaminosäuren bei gleichzeitiger erheblicher Reduzierung der notwendigen Katalysatormenge (1 bzw. 2.5 mol% Pd ↔ 10 mol% Rh).

Ferner kann auf den Einsatz von PCy₃ zugunsten des wesentlich preiswerteren PPh₃ verzichtet werden.¹⁷

Die auch hier gegebene deutliche Reduzierung der notwendigen Einsatzmenge von 50 mol% (im Fall von PCy₃) auf 5 bzw. 12.5 mol% ermöglicht eine ökonomischere Reaktionsführung, die vor allem bei Reaktionen im größerem Maßstab von Bedeutung sind.

¹⁶ 1 mmol PdCl₂ 18 DM, 1 mmol RhCl₃ 66 DM (Strem 1999-2001).

¹⁷ 1 mol PPh₃ 33 DM, 1 mol PCy₃ 4650 DM (Aldrich 2000-2001).

7.3.11.1 Kontinuierliche Beobachtung der Palladium- und Rhodiumkatalysierten Racemisierungsreaktion

In den Studien zur Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren wurde ein Verfahren entwickelt, das sich auf die katalytische Aktivität von Rhodium- und von Palladiumkatalysatoren stützt. Die Entwicklung und Optimierung der Racemisierung beruhte auf der Bestimmung der Enantiomerenzusammensetzung der vormals optisch reinen Testverbindung. Dazu wurden routinemäßig Proben im Verlauf der Racemisierungsreaktion entnommen, in der Regel nach 24 bzw. 48 Stunden Reaktionszeit, welche anschließend über geeignete chirale GC-Analytik charakterisiert wurden.

Um genauere Informationen zum Fortgang der Racemisierung zu erhalten, ist eine kontinuierliche Beobachtung des Racemisierungsprozesses über die gesamte Reaktionsdauer nützlich. Als sehr gut geeignete Methode stellte sich die kontinuierliche Beobachtung der Racemisierung durch ein polarimetrisches Verfahren heraus. Dabei wurde die zeitabhängige Veränderung des optischen Drehwertes α der gesamten Reaktionsmischung unter Standardreaktionsbedingungen in Gegenwart von Rhodium- als auch eine Palladium-Katalysatoren beobachtet.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 35 dargestellt. Nachdem Löseschwierigkeiten mit 50 mol% PCy₃ auftraten, wurde im Fall der Rhodium-katalysierten Racemisierung als Testreaktion die Racemisierung von 100 mg *L-N*-Acetylphenylalanin mit 2.5 mol% [Rh(cod)Cl]₂ und 25 mol% PCy₃ als Testreaktion untersucht. Ergänzend hierzu wurde die Racemisierungswirkung von 25 mol% PCy₃ überprüft. Für die Palladium-katalysierten Reaktionen wurde eine Umsetzung von 100 mg *L-N*-Acetylphenylalanin mit 1 mol% Pd(PPh₃)₄ ausgewählt. Als Vergleich diente auch hier eine Untersuchung zur PPh₃-katalysierten Racemisierung, die im Hinblick auf die mit Pd(OAc)₂-katalysierten Reaktionen mit einer Menge von 5 mol% durchgeführt wurde.

Es sei darauf hingewiesen, daß die erhaltenen Werte nicht direkt Aufschluß über die Enantiomerenzusammensetzung geben können, da die gemessenen spezifischen Drehwerte die gesamte Lösung einschließlich aller Reaktionspartner charakterisieren. Dieser Effekt führte beispielsweise zu unterschiedlichen Startwerten des absoluten (gemessenen) Drehwertes α aller Einzelreaktionen (Schwankungen um ± 15 % bzgl. des gemittelten Startwertes). Deswegen ist in den Abbildungen der zeitliche Verlauf des *relativen* Drehwertes

angegeben. Die einzelnen dargestellten Datenpunkte entsprechen den Drehwerten nach einem Zeitintervall von 50 Minuten.¹⁸

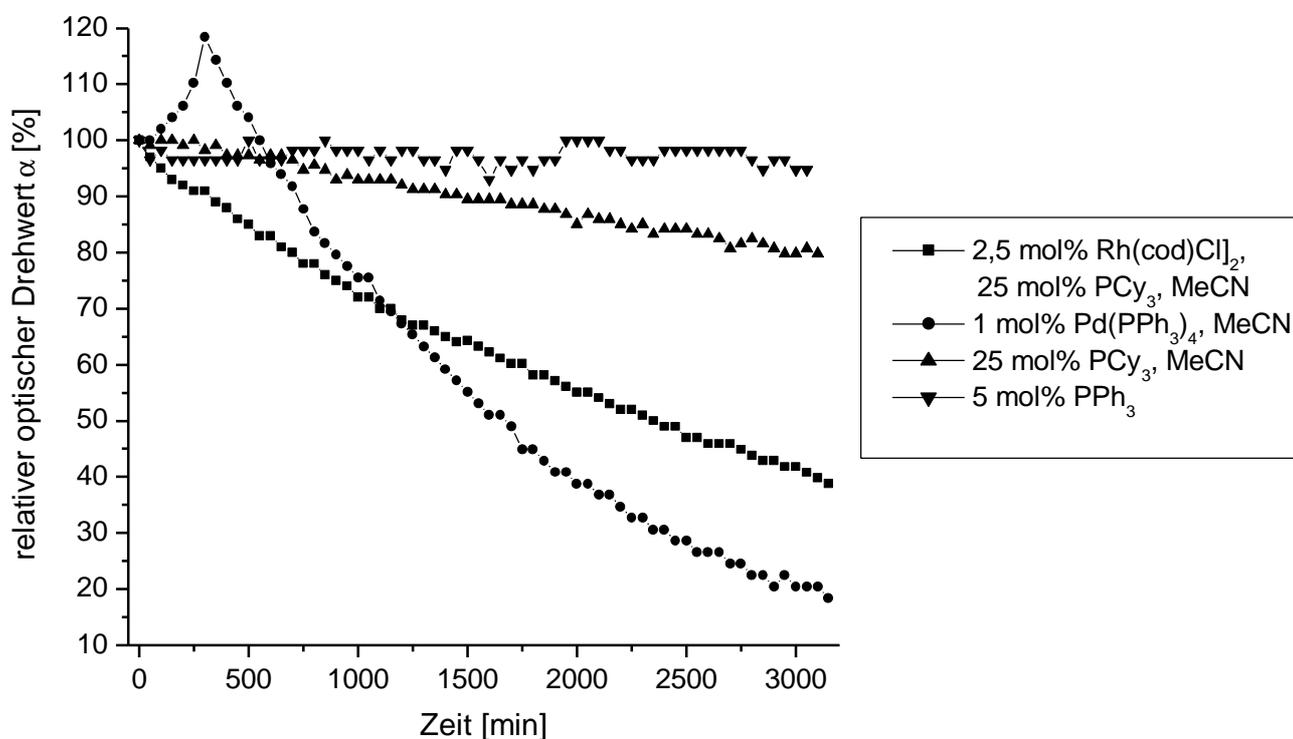


Abbildung 35: Kontinuierliche Beobachtung der zeitlichen Entwicklung des relativen Drehwertes α verschiedener Racemisierungsreaktionen mit *L*-*N*-Acetylphenylalanin

¹⁸ **Arbeitsvorschrift:** In einem 10 mL Eichkolben werden die jeweils erforderlichen zuvor fein vermahlene Reagentien in 10 mL heißem Acetonitril ($T = 60^\circ\text{C}$) möglichst zügig gelöst. Sehr gut eignet sich hierfür ein temperiertes ($T = 65^\circ\text{C}$) Ultraschallbad. Die Experimente werden gestartet, indem die gesamte Reaktionsmischung in eine Küvette überführt wird, die über einen angeschlossenen Wasserkreislauf ebenfalls auf 60°C temperiert ist. Der Nullabgleich des Polarimeters erfolgt zuvor mit dem entsprechenden gleichtemperierten Lösungsmittel. Während der ersten Stunden Reaktionszeit muß die Meßzelle auf evtl. auftretende Gasbläschen und Niederschläge überprüft werden. Das Polarimeter ermittelt kontinuierlich den Durchschnittswert des spezifischen Drehwertes der Lösung über einen Zeitraum von 50 Sekunden. Die Datenausgabe erfolgt mit Hilfe eines an das Polarimeter angeschlossenen Druckers. Aus den mehr als 3000 erhaltenen Drehwertdaten pro Experiment wird jeder 60igste ausgewählt.

Die Racemisierung von *L-N*-Acetylphenylalanin zeigt ab Beginn der Messung ein stetiges Abfallen des relativen Drehwertes ohne erkennbare Induktionsperiode. Der Verlauf der Kurve deutet auf eine konstante Racemisierungsgeschwindigkeit hin, die naturgemäß bei fortschreitender Racemisierung zu einer allmählichen Abflachung des Graphen führt. Nach 3000 Minuten (50 Stunden) Reaktionszeit ist der Drehwert auf ca. 40 % des Ursprungswertes abgesunken.

Der zeitliche Verlauf der PCy_3 -katalysierten Racemisierung zeigt ähnliche Charakteristika. Auch hier sinkt der gemessene Drehwert stetig und ohne Induktionsperiode. Das Sinken des Drehwertes erfolgt im Vergleich zur vorherigen Reaktion erwartungsgemäß wesentlich langsamer. Nach 50 Stunden Reaktionszeit sinkt der optische Drehwert auf ca. 80 % des Startwertes ab, damit kann auf eine langsam fortschreitende Racemisierung der Testverbindung geschlossen werden.

Im Fall der PPh_3 -katalysierten Racemisierung sind Schwankungen in der zeitlichen Entwicklung des Drehwertes zu beobachten, die nicht erklärt werden können. Insgesamt spiegelt der eher lineare Verlauf der erhaltenen Werte eine kaum feststellbare Racemisierung von *L-N*-Acetylphenylalanin wieder.

Einen unerwarteten Kurvenverlauf zeigt das Experiment zur $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ -katalysierten Racemisierung von *L-N*-Acetylphenylalanin. Der relative optische Drehwert erhöht sich ab Reaktionsbeginn innerhalb von 350 Minuten auf 120 %. Der Quotient der relativen Änderung des Drehwertes pro Zeiteinheit steigt ebenfalls bis zum Zeitpunkt von 350 Minuten an, was dem Graphen in

Abbildung 35 ein parabelförmiges Aussehen verleiht.¹⁹ Bei einer Reaktionszeit von 350 Minuten setzt diese beobachtete Tendenz jedoch aus und im weiteren Kurvenverlauf sinkt der optische Drehwert stetig und zeigt ein zu den anderen Graphen vergleichbares Verhalten.

Dieser ungewöhnliche Kurvenverlauf kann durch eine nicht genauer bekannte Palladiumspezies, die an die Aminosäure koordiniert erklärt werden. Bei der Koordination entsteht ein chiraler Palladiumkomplex, der den gemessenen optischen Drehwert additiv beeinflusst. Um das beobachtete Verhalten des Graphen zu erklären, müßte der spezifische Drehwert dieses Palladium-Aminosäure-Komplexes den 20-fachen Absolutwert der freien Aminosäure besitzen, was aber unwahrscheinlich ist (*L-N*-Ac-Phe $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 40^\circ$ ($c = 1, \text{MeOH}$)). Weiterhin konnten keine experimentellen Befunde (Gasbläschen oder

¹⁹ Dieser Effekt ist reproduzierbar, jedoch verursachte ein Glühlampeneffekt des Polarimeters vorzeitigen Reaktionsabbruch.

Niederschläge im Strahlengang der Meßzelle) bei der Ausführung des Experimentes gefunden werden. Die anfängliche Erhöhung kann demnach nicht stichhaltig erklärt werden.

In Gegenwart von Pd(PPh₃)₄ ist nach 50 Stunden Reaktionszeit der gemessene Drehwert auf ca. 15 % des Anfangswertes abgesunken. Insgesamt konnte die überlegene Reaktivität der Palladium-katalysierten Racemisierung im Vergleich zur Rhodiumvariante demonstriert werden.

Abbildung 36 stellt graphisch die erhaltenen Ergebnisse der Rhodium-katalysierten Racemisierung in Ethylacetat dar. *L*-*N*-Acetylphenylalanin wird mit 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂, 25 mol% PCy₃ und 10 mol% Bu₄NBr zur Reaktion gebracht.

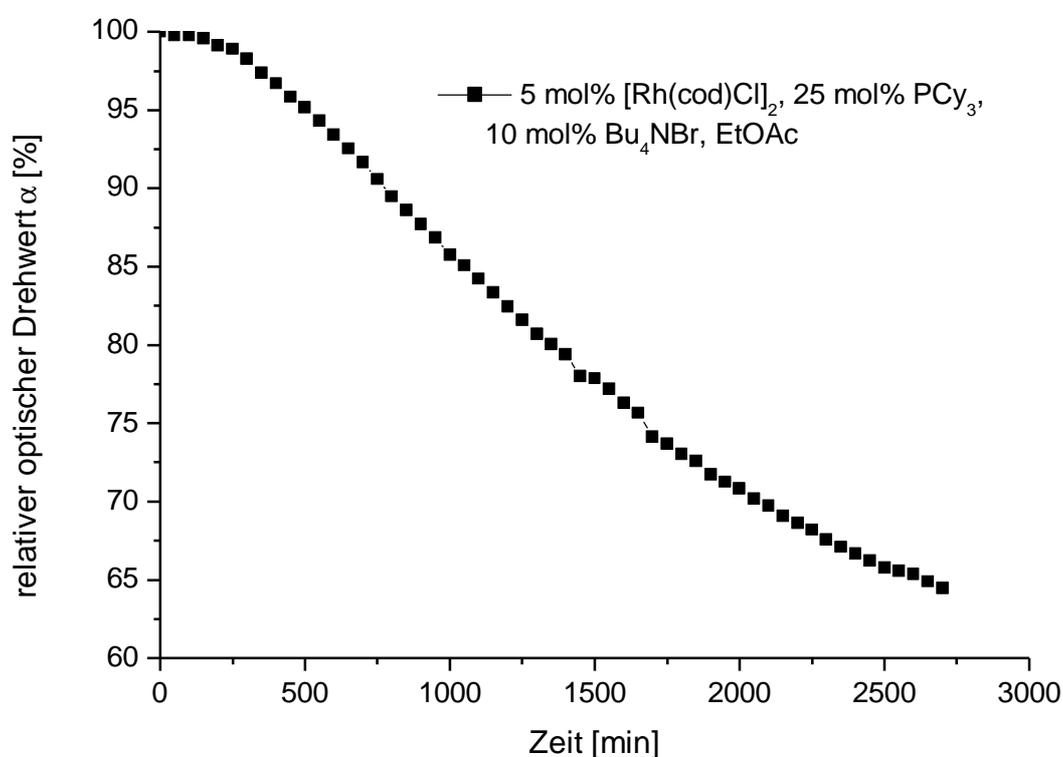


Abbildung 36: Racemisierung von *L*-*N*-Acetylphenylalanin in Ethylacetat

Das Kurvenverhalten ist mit der bereits beschriebenen Rhodium-katalysierten Variante in MeCN vergleichbar. Auffällig ist jedoch eine Induktionsphase von ca. 150 Minuten, in der sich die Geschwindigkeit der Racemisierung auf ein konstantes Niveau erhöht. Nach 48 Stunden Reaktionszeit sinkt der ursprüngliche Drehwert auf ca. 65 % ab. Damit ist trotz doppelter Rhodiummenge (5 mol% [Rh(cod)Cl]₂) diese Reaktion deutlich langsamer als die Rhodium-katalysierte Reaktion in MeCN (2.5 mol% [Rh(cod)Cl]₂).

7.3.12 Eine mögliche Racemisierung von Peptiden ?

7.3.12.1 Motivation und Hintergrund

Nach der erfolgreichen Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren, stellte sich die Frage, ob Peptide, insbesondere Dipeptide, ebenfalls mit den gefundenen Katalysatoren racemisierbar sind. Die strukturelle Ähnlichkeit von *N*-Acylaminosäuren und Peptiden ist in Abbildung 37 dargestellt.

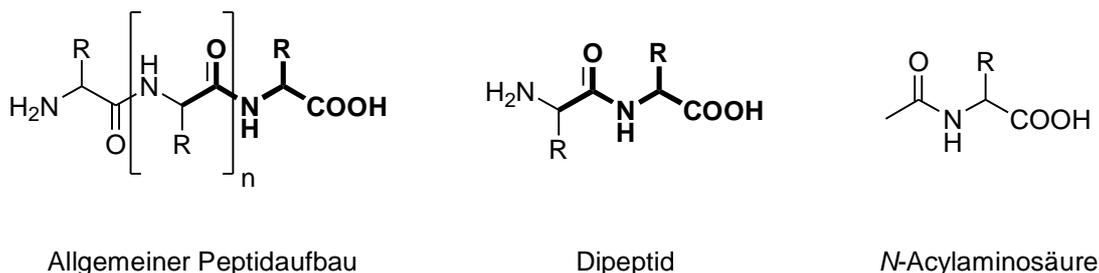


Abbildung 37: *N*-Acylaminosäurestruktur in Peptiden

Peptide erfüllen wichtige physiologische und biochemische Lebensfunktionen^[116] und sind demzufolge als pharmokologisch wirksame Substanzen bedeutsam.^[117] Die generelle Bedeutung der Peptide und ihre Eigenschaften sind dabei von ihrer Größe unabhängig, wie zwei bekannte Beispiele Aspartam (Asp-Phe-OMe) und Insulin (aus 51 Aminosäuren aufgebaut) belegen mögen. Die Verfahren zur Darstellung von Peptiden umfassen sowohl einfache chemische Darstellungsmethoden wie im Fall von Aspartam^[118], als auch Chemosynthese in Lösung unter Einsatz von Schutzgruppenchemie und unterschiedlicher Kupplungsmethoden, sowie Festphasensynthese und gentechnische Methoden, wie sie im Fall zur Darstellung von Insulin^[119,120,121] angewendet werden.

Im Rahmen der Entwicklung von neuen Strategien zur effektiven pharmazeutischen Wirkstoffsuche, wurden in der neunziger Jahren die Synthese von Peptidbibliotheken untersucht^[122], die Hunderttausende von verschiedenen Einzelpeptiden enthalten können. Durch geeignete Testverfahren kann der Weg zum Auffinden einzelner aktiver Strukturen heute erheblich verkürzt werden.^[123]

Die Anwendungsmöglichkeiten eines Peptidracemisierungsverfahrens sind schwer abzuschätzen. Beispielsweise könnte die vorgegebene Strukturvielfalt von Peptidbibliotheken durch eine schonende Racemisierung der Peptidaminosäuren um ein Vielfaches erweitert

werden. Bei selektiver Racemisierung einzelner Aminosäuren oder Positionen in der Peptidstruktur könnten gezielte Variationen in bereits bestehende Peptide eingeführt werden. Diese denkbaren Anwendungen lassen eine Untersuchung der Racemisierung von Peptiden interessant erscheinen.

7.3.12.2 Vorgehensweise

Die Racemisierungstendenz verschiedener *N*-Acylaminosäuren war aus den vergangenen Arbeiten bereits in den Grundzügen bekannt, deshalb sollten zunächst Peptidstrukturen mit racemisierungsaktiven Aminosäuren eingesetzt werden. Es konnte erwartet werden, daß in Abhängigkeit von ihrer Position im Peptid, Unterschiede in der Racemisierungsneigung einzelner Peptidaminosäuren bestehen. Prinzipiell können folgende drei Fälle unterschieden werden: N-terminale, C-terminale und interne Aminosäuren.

Um eine mögliche Racemisierung zu quantifizieren, mußten Verfahren zur Bestimmung der Isomerenzusammensetzung jeder einzelnen chiralen Aminosäure im intakten Peptid ausgearbeitet werden. Um den analytischen Aufwand möglichst überschaubar zu halten, wurden ausschließlich Dipeptide für die folgenden Untersuchungen ausgewählt, da in diesem Fall nur 4 mögliche Stereoisomere quantitativ getrennt werden müssen. Zur Entwicklung der Isomerentrennungen war es notwendig, das komplett racemische Dipeptid (1*RS*,2*RS*) herzustellen. Durch achirale säulenchromatographische Methoden konnten aus dieser Verbindung zwei zueinander diastereomere Fraktionen erhalten werden, die jeweils aus zwei enantiomeren Verbindungspaaren bestanden (Abbildung 38). Die so erhaltenen einzelnen Diastereomerenpaare reduzierten die Anzahl der notwendigen Synthesen an isomerenreinen Verbindungen, da auf diese Weise nur 2 weitere isomerenreine Dipeptide zur vollständigen Identifizierung aller Einzelisomeren erforderlich waren.

Eine weitere Möglichkeit den Schwierigkeitsgrad der analytischen Aufgabenstellung zu erniedrigen, war die Verwendung eines Dipeptides, das an einer Stelle den achiralen Aminosäurebaustein Glycin enthält. Damit reduzierte sich die mögliche Anzahl an Stereoisomeren auf zwei.

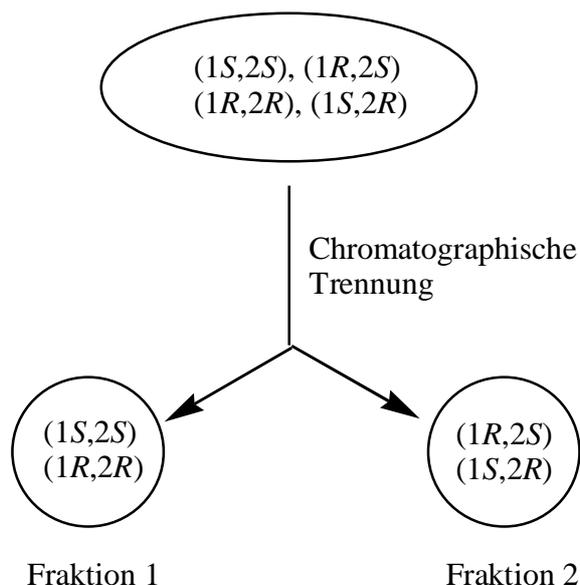


Abbildung 38: Trennung der 4 Stereoisomeren eines Dipeptides in 2 Diastereomerenfraktionen

7.3.12.3 Erste Ergebnisse

Gemäß der zuletzt angestellten Überlegungen sind zunächst die enantiomerenreinen und racemischen Dipeptide *N*-Acetylphenylalanylglycin und *N*-Acetylglycylphenylalanin dargestellt und in Racemisierungsreaktionen getestet worden. Tabelle 41 zeigt die erhaltenen Ergebnisse mit *L*-*N*-Phe-Gly.

Tabelle 41: Racemisierungsversuche von *L*-*N*-Acetylphenylalanylglycin mit Rhodium- und Palladiumkatalysatoren

Substrat	Katalysator	Phosphan	ee(L) [%]
<i>L</i> - <i>N</i> -Ac-Phe-Gly-OH			
	5 mol% [Rh(cod)Cl] ₂	50 mol% PCy ₃	100
	5 mol% Pd(OAc) ₂	25 mol% PPh ₃	100
	5 mol% Pd(OAc) ₂	25 mol% PPh ₃	100
	-	-	100

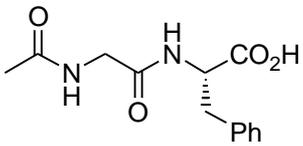
Bed.: 100 mg Substrat, 8 mL MeCN, 60 °C, 48 Stunden.

Die erhaltenen Ergebnissen zeigen, daß eine Racemisierung des Substrates weder unter Verwendung des Rhodium- noch des Palladiumsystems möglich ist. Das Peptid zeigt sich

ebenso inert gegen thermische Racemisierung bei 60 °C. Das Ergebnis deutet darauf hin, daß eine Racemisierung von *N*-Acetylaminosäureamidverbindungen nicht möglich ist.²⁰

In einer Versuchsreihe mit identischen Reaktionsbedingungen wurde dann die Racemisierungsneigung von *L*-*N*-Acetylglycylphenylalanin untersucht.

Tabelle 42: Racemisierungsversuche von *L*-*N*-Acetylglycylphenylalanin mit Rhodium- und Palladiumkatalysatoren

Substrat	Katalysator	Phosphan	ee(L) [%]
<i>L</i> - <i>N</i> -Ac-Gly-Phe-OH	5 mol% [Rh(cod)Cl] ₂	50 mol% PCy ₃	30
	5 mol% [Rh(cod)Cl] ₂	50 mol% PCy ₃	32
	5 mol% Pd(OAc) ₂	25 mol% PPh ₃	6
	5 mol% Pd(OAc) ₂	25 mol% PPh ₃	2
	-	-	100

Bed.: 100 mg Substrat, 8 mL MeCN, 60 °C, 48 Stunden.

Die Resultate der Untersuchungen zeigen, daß das Dipeptid *L*-*N*-Acetylglycylphenylalanin sich sowohl unter Rhodium- als auch unter Palladiumkatalyse racemisieren läßt. Dabei zeigt sich auch hier die größere Effizienz des Palladium/PPh₃-Systems in der beabsichtigten Racemisierung. Unter Verwendung von 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂/50 mol% PCy₃ kann die zu Reaktionsbeginn enantiomerenreine Verbindung bis auf eine Isomerenzusammensetzung von durchschnittlich 31 % ee racemisiert werden, unter Palladiumkatalyse ist nahezu vollständige Racemisierung (ca. 4 % ee) möglich. Mit dem Kontrollversuch zur thermischen Stabilität des Dipeptides (100 % ee, 48 Stunden) ist die racemisierende Wirkung der eingesetzten Katalysatoren bestätigt.

Berücksichtigt man die Ergebnisse beider Substrate, so wird deutlich, daß die Racemisierung von Dipeptiden bevorzugt an der C-terminalen Aminosäure erfolgt. Die beobachtete Selektivität soll am Beispiel des Dipeptides (1*S*,2*S*)-*N*-Acetylphenylalanylphenylalanin überprüft werden. Ist die aufgestellte These korrekt, sollte eine Racemisierung lediglich am

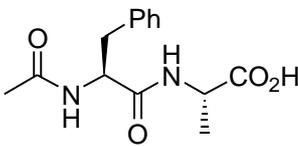
²⁰ Führt man sich die Probleme bei der Entwicklung der DKR von *N*-Acylaminosäuren vor Augen, so eröffnet sich eine zusätzliche Möglichkeit der Reaktionsführung. Sollte sich das racemisierungsstabile Verhalten auch für *N*-Acetylphenylalaninamid bestätigen, kann als alternativer enzymatischer Schritt bei der DKR eine Ammonolysereaktion erwogen werden. Zu diesem Thema wurden allerdings keine Untersuchungen durchgeführt.

C-terminalen Ende stattfinden. Bei der experimenteller Durchführung der Racemisierung mit (1*S*,2*S*)- *N*-Acetylphenylalanylphenylalanin stellt sich jedoch heraus, daß die Verbindung in Acetonitril schwerlöslich ist. Alternative Lösungsmittel wie Aceton zeigen ebenfalls keine signifikant besseren Löseeigenschaften. Zusätze wie (Octyl)₄NOH, die die Löslichkeit des Dipeptides in MeCN erhöhen sollen, erweisen sich als ineffektiv.

Zur Erhöhung der Löslichkeit der Dipeptide bietet sich eine Verlängerung des Alkylrestes der Acetylgruppe der N-terminalen Aminosäure an (z.B. C₇H₁₅CO- statt CH₃CO-), doch ist in diesem Fall eine erneute Entwicklung der Isomerentrennung mit zusätzlicher Synthese von mindestens 3 weiterer Dipeptidverbindungen erforderlich. Daher wurde von dieser Möglichkeit zur Verbesserung der Löseeigenschaften vorerst abgesehen.

Mit den Dipeptiden *N*-Acetylalanylphenylalanin und *N*-Acetylphenylalanylalanin sind zwei weitere Verbindungen dargestellt und analytisch erfolgreich charakterisiert worden. Eine Racemisierung der C-terminalen Aminosäure sollte sich auch an diesem Dipeptidpaar eindeutig nachweisen lassen. Leider mußte auch hier festgestellt werden, daß das Dipeptid *N*-Ac-Ala-Phe-OH mangelhafte Löslichkeit in MeCN besitzt, daher sind hier nur die Ergebnisse der Racemisierung von *N*-Ac-Phe-Ala-OH gezeigt.

Tabelle 43: Racemisierung von (1*S*,2*S*)-*N*-Ac-Phe-Ala-OH mit Rhodium- und Palladiumkatalysatoren

Substrat	Katalysator	Phosphan	Lösungsmittel	de [%]
	5 mol% [Rh(cod)Cl] ₂	50 mol% PCy ₃	MeCN	34
	5 mol% [Rh(cod)Cl] ₂	50 mol% PCy ₃	MeCN	0
	5 mol% [Rh(cod)Cl] ₂	50 mol% PCy ₃	Aceton ^a	82
	5 mol% [Rh(cod)Cl] ₂	50 mol% PCy ₃	Aceton ^a	80
	5 mol% Pd(OAc) ₂	25 mol% PPh ₃	MeCN	73
	5 mol% Pd(OAc) ₂	25 mol% PPh ₃	MeCN	46
	-	-	MeCN	95

Bed.: 100 mg Substrat, 8 mL MeCN, 60 °C, 48 Stunden. a) zusätzlich 10 mol% Bu₄NBr.

Die HPLC-Chromatogramme zeigen für alle Versuche eindeutige Racemisierung. Dabei wird als selektives Racemisierungsprodukt das Diastereomerenpaar mit (1*S*,2*RS*)-Konfiguration gebildet. Mit diesem Ergebnis wird die getroffene Annahme der selektiven und positionsabhängigen Racemisierung der C-terminalen Aminosäure unterstützt. Die Ergebnisse der Rhodium-katalysierten Racemisierung (0 % de, 34 % de) in Acetonitril sind relativ starken

Schwankungen unterworfen. Dennoch ist mit durchschnittlich 17 % Diastereomenüberschuß die Geschwindigkeit der Racemisierung vergleichsweise hoch (vgl. Racemisierung von *N*-Ac-Ala unter identischen Bedingungen ergibt 0 % ee, Tabelle 25). Wird die Reaktion in Aceton durchgeführt, ist eine geringere, aber sehr gut reproduzierbare Substratracemisierung festzustellen (80 %de, 82 %de). Die Geschwindigkeit der Palladium-katalysierten Reaktion fällt mit ca. 60 %de überraschenderweise geringer aus als die Rhodium-katalysierte Variante, auch hier ist die starke Schwankung der Ergebnisse auffällig.

Die bisherigen Ergebnisse der Untersuchungen zur Racemisierung von Dipeptiden lassen zum aktuellen Zeitpunkt den Schluß zu, daß Racemisierung vorzugsweise am C-terminalen Aminosäurebaustein stattfindet.

7.3.13 Racemisierung anderer Verbindungen

Die Arbeiten zur Entwicklung effizienter Racemisierungskatalystoren für *N*-Acylaminosäuren wurden während der gesamten Dauer von Untersuchungen zur Racemisierung anderer funktioneller Verbindungen begleitet. Der Grundgedanke bestand darin, ob sich die ausgearbeiteten Methoden auch an anderen besonders interessanten optisch aktiven Verbindungsklassen anwenden lassen.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß für Verbindungsklassen wie chirale Amine, Alkohole, α -Hydroxycarbonsäuren u.ä. bis dato kaum schonende Racemisierungsprozeduren existieren oder die bestehenden Verfahren den Wunsch nach Verbesserungen offenlassen. Hier zeigt sich wieder der besonders hohe Schwierigkeitsgrad, einfache mono- bzw. wenig funktionalisierte optisch aktive Verbindungen unter milden Reaktionsbedingungen zu racemisieren.

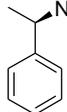
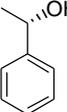
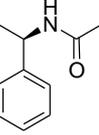
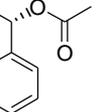
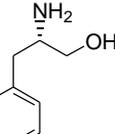
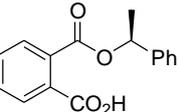
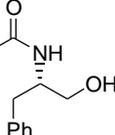
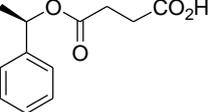
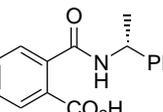
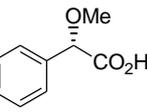
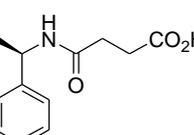
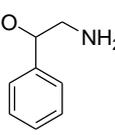
Angesichts der industriellen Bedeutung vieler sekundärer Amine oder Alkohole wurden Vertreter dieser Verbindungsklassen und verschiedene Derivate als Substrate mit den ausgearbeiteten Racemisierungsmethoden getestet. Jede der in Tabelle 44 aufgeführten Verbindungen wurde als enantiomerenreine und racemische Verbindung synthetisiert (außer (*S*)-Methylphenylcarbinol, (*R*)-1-Phenylethylamin). Außerdem wurde eine für die jeweilige Verbindung geeignete Enantiomerenanalytik ausgearbeitet. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf 1-Phenylethanol bzw. 1-Phenylethylamin und deren Derivate. Eine gängige Methode zur Racemisierung von chiralen Aminen ist die Umsetzung mit Wasserstoff bei Temperaturen von 140-300 °C. Metallkatalysatoren wie Pd^[124], Co,^[125] oder Ni^[126]

katalysieren die Racemisierung über einen reversiblen Redoxprozeß. Quellen, die Auskunft über gängige Racemisierungsmethoden von Alkoholen geben, sind nicht bekannt. Naheliegend ist jedoch ein ein- oder zweistufiger Prozeß über das korrespondierende Ketonintermediat.

Die dargestellten Verbindungen stellen in der Mehrzahl gut zugängliche Ester- und Amidderivate dar, die auch bei einer Darstellung im größeren Maßstab keinen erheblichen Synthesaufwand nach sich ziehen. Ferner gelingt es auf diese Weise, die wichtigen Teilstrukturen von racemisierbaren *N*-Acylaminosäuren in das zu untersuchende Zielmolekül zu integrieren.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß mit 1-Phenylethylamin, 1-Phenylethanol und deren Derivaten unter den angewendeten Methoden keine Racemisierung möglich ist. Die erhaltenen ee-Werte liegen bei allen Versuchen über 90 % ee. Tabelle 44 zeigt eine Zusammenstellung aller getesteten Verbindungen. Ferner erweisen sich die nicht explizit aufgeführten Verbindungen *L-N*-BOC-Phenylalanin und *L-N*-FMOC-Phenylalanin als racemisierungstabil unter den genannten Standardbedingungen.

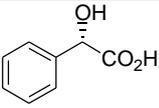
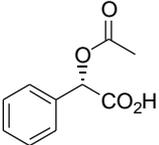
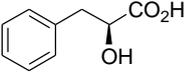
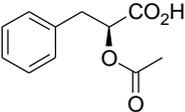
Tabelle 44: Zusammenstellung aller in Racemisierungsreaktionen getesteten Verbindungen

Verbindung	Methode	Racemisierung ?	Verbindung	Methode	Racemisierung ?
	1	nein		2	nein
	2	nein		3	nein
	1	nein		2	nein
	2	nein		3	Zersetzung
	1	nein		2	nein
				3	nein
	1	nein		2	nein
				3	nein
	2	nein		1	nein
	3	nein			
	2	nein		1	nein
	3	nein			

Racemisierungsmethoden: 1: 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂/ 50 mol% PCy₃, MeCN, 60 °C, 48 h; 2: wie 1 T = 100 °C; 3: 5 mol% Pd(OAc)₂/25 mol% PPh₃, MeCN, 60 °C, 48 h.

Gegenstand weiterer Untersuchungen zur Anwendung der etablierten Racemisierungsmethoden war schwerpunktmäßig die Klasse der α -Hydroxycarbonsäuren und ihre acetylierten Derivate. Diese Verbindungen stellen wertvolle chirale Syntheseintermediate dar, weil sie vielfältige weitere Umsetzungen zu chiralen Folgeprodukten erlauben. Zahlreiche enzymatische Umsetzungen zur Racematspaltung von Alkoholen und Derivaten (wie α -Hydroxycarbonsäuren) sind in der Literatur^[75] bekannt und eröffnen eventuell die Möglichkeit einer Kombination mit der gefundenen Racemisierung. Häufig sind die zur Racematspaltung verwendeten Enzyme Lipasen, die sich im Vergleich zu Acylasen durch eine größere Temperaturstabilität und eine höherer Toleranz gegenüber organischen Reaktionsmedien auszeichnen. Unter diesem Gesichtspunkt scheint die Durchführung einer Racematspaltung unter den gegebenen Racemisierungsbedingungen als eher realisierbar. Tabelle 45 zeigt die Racemisierungsergebnisse der zwei ausgewählten Testverbindungen (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Phenylmilchsäure.

Tabelle 45: Untersuchungen zur Rhodium-katalysierten Racemisierung von α -Hydroxycarbonsäuren und deren Acetylderivaten

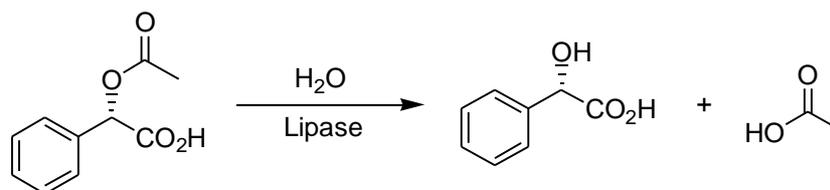
Eintrag	Verbindung	ee(L) [%]
1		87, 91
2		22, 0
3		93, 98
4		16, 4

Bed.: 0.48 mmol Substrat, 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂, 25 mol% PCy₃, MeCN, 60 °C, 48 Stunden.

Wie Eintrag **1** zeigt, verhält sich (*S*)-Mandelsäure mit den resultierenden Enantiomerenzusammensetzung von durchschnittlich 89 % ee weitgehend racemisierungstabil. Die entsprechende Acylverbindung (Eintrag **2**) läßt sich dagegen mit ca. 11 % ee sehr effektiv racemisieren. Ein ähnliches Verhalten zeigen (*S*)-Phenylmilchsäure und (*S*)-*O*-Acetylphenylmilchsäure. Während letztere Verbindung durch die angewendete Racemisierungsmethode nahezu vollständiger Racemisierung unterliegt (ca. 10 % ee, Eintrag **4**), verhält sich (*S*)-Phenylmilchsäure racemisierungstabil (Eintrag **3**).

Damit ist gezeigt, daß die Rhodium-katalysierte Racemisierung ein geeignetes System zur DKR von α -Acetoxycarbonsäuren ist.

Im folgenden wurde ein ausgeprägtes Enzymscreening zum Auffinden einer geeigneten Lipase durchgeführt. Als aktivstes Enzym der in Wasser durchgeführten Reaktion (Gleichung 8) stellten sich Novozym 435 und Lipase PS (Amano) heraus. In weiteren Testreaktionen zeigte sich, daß Novozym 435 bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C Aktivität in MeCN, Aceton und Toluol (jeweils 1 Vol% Wasseranteil) zeigt.

Gleichung 8: Enzymatische Deacylierung von (*S*)-*O*-Acetylmandelsäure

Versuche zur DKR von (*R,S*)-*O*-Acetylmandelsäure konnten dennoch nicht erfolgreich durchgeführt werden, da sich in weiteren Studien zur Enzymaktivität herausstellte, daß Novozym 435 durch Phosphanverbindungen wie PPh_3 , PCy_3 und TPPTS deaktiviert wird. Die folgenden Tabellen zeigen exemplarisch die Ergebnisse eines DKR-Versuches mit parallel durchgeführter klassischer Racematspaltung in Toluol.

Tabelle 46: Klassische Racematspaltung von (*R,S*)-*O*-Acetylmandelsäure in Toluol.

Zeit [d]	Umsatz	ee-(<i>S</i>)-Substrat [%]	ee-(<i>R</i>)-Produkt [%]
1	28	54	100
2	29	54	94
3	29	-	-
4	29	46	85
5	31	55	88
6	31	55	84

Bed.: 100 mg (*R,S*)-*O*-Acetylmandelsäure, 10 mL Toluol, 25 μl Wasser (3 Äquiv.), 100 mg Novozym 435, $T = 65\text{ }^\circ\text{C}$, geschüttelt.

Wie der Vergleich der Umsätze beider Reaktionen zeigt (Tabelle 46 und Tabelle 47), ist die Enzymaktivität bei der dynamischen kinetischen Racematspaltung deutlich vermindert. Die im Verlauf von 6 Tagen Reaktionszeit leicht beobachtete Steigerung des Umsatzes ist vor allem im Hinblick auf das zeitliche Verhalten der Enantiomerenzusammensetzung von Produkt und Edukt hauptsächlich unselektiver chemischer Hydrolyse zuzuschreiben. Die Racematspaltung liefert unter vergleichbaren Bedingungen nach einem Tag Reaktionszeit immerhin 28 % enantiomerenreines Produkt. Im Anschluß dürfte die beobachtete Umsatzsteigerung unter Berücksichtigung der fallenden Enantiomerenreinheit des Produktes ebenfalls auf chemische Hydrolyse zurückzuführen sein.

Tabelle 47: Versuch einer DKR von (*R,S*)-*O*-Acetylmandelsäure in Toluol.

Zeit [d]	Umsatz	ee-(<i>S</i>)-Substrat [%]	ee-(<i>R</i>)-Produkt [%]
1	12	16	62
2	16	17	46
3	18	16	40
4	20	15	32
5	35	17	29
6	37	17	28

Bed.: 400 mg (*R,S*)-*O*-Acetylmandelsäure, 10 ml Toluol, 100 μ L H₂O, 400 mg Novozym, 2,5 mol% [Rh(cod)Cl]₂, 25 mol% PCy₃, 10 mol% Bu₄NBr, T = 65 °C, geschüttelt.

Zusammenfassend zeigt sich, daß das Rhodium-katalysierte Racemisierungsverfahren sich für selektive Racemisierung von α -*O*-Acetylcarbonsäuren eignet, was an zwei Beispielen belegt wurde. Die korrespondierenden freien α -Hydroxycarbonsäuren verhalten sich unter identischen Racemisierungsbedingungen inert. Die Kombination mit Lipase-katalysierter Deacylierung ist jedoch nicht möglich. Entscheidend für den Mißerfolg der dynamischen kinetische Racematspaltung war die deaktivierende Wirkung von Phosphanverbindungen auf Novozym 435. Der Einsatz von Phosphanen ist jedoch zur Sicherstellung effektiver *in-situ* Racemisierung unvermeidbar.

7.3.14 Untersuchungen zum Mechanismus der Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren

7.3.14.1 Allgemeine Bemerkungen und Motivation

Bei der Entwicklung jeder neuen katalytischen Reaktion wie z.B. der Übergangsmetall-katalysierten Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren sind gesicherte Erkenntnisse über den Reaktionsmechanismus besonders wertvoll, da sie zum besseren Verständnis der Reaktion beitragen. Weiterführende Reaktionsoptimierungen können somit zielgerichteter und deshalb effizienter erfolgen. Deshalb sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus durchgeführt werden.

7.3.14.2 Erste Untersuchungen

Die selektive Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren gelingt unter Einsatz von $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$ mit monodentaten Phophanen wie PCy_3 in MeCN bei 40-60 °C. Ferner können mit diesem Katalysatorsystem α -Acetoxycarbonsäuren racemisiert werden.

Zunächst erschien es sinnvoll, Arbeiten zur Aufklärung der Wirkung des Katalysators durchzuführen. Die Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren kann im Prinzip auf dreierlei Arten erfolgen:

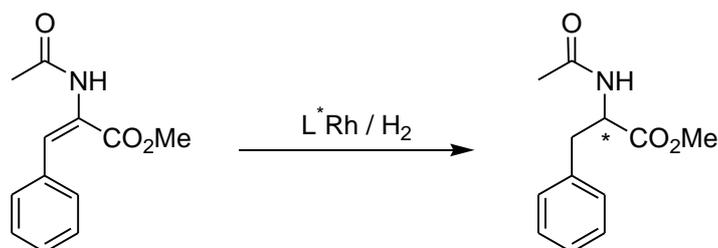
1. Basen-vermittelte Racemisierung (siehe Abschnitt 7.1)
2. Säurekatalysierte Racemisierung (siehe Abschnitt 7.1)
3. Racemisierung mit Hilfe eines Redox-Prozesses.

Die Racemisierung, welche einem Mechanismus nach Punkt 1 oder 2 folgt, sollte sich durch Zusätze von Säure- oder Basenäquivalenten beeinflussen lassen. Zu diesem Zweck wurde der Effekt von NEt_3 , DBU und AcOH auf die Geschwindigkeit der Racemisierungsreaktion nach Standardvorschrift (5 mol% $\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$, 50 mol% PCy_3 , MeCN, 60 °C) mit *L*-*N*-Acetylphenylalanin untersucht. Die Menge der eingesetzten Additive beträgt 20 mol%. Außerdem werden im Fall von NEt_3 110 mol% bzgl. der *N*-Acylaminosäuremenge eingesetzt.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß weder Säuren noch Basen die Rhodium-katalysierte Reaktion wesentlich beeinflussen. *L*-*N*-Acetylphenylalanin kann mit 20 mol% DBU und NEt_3 auf 17 bzw. 21 % ee (nach 48 Stunden) racemisiert werden, der Einsatz von 20 mol% AcOH führt zu einem verbleibenden ee-Wert von 25 %. Der Zusatz von 1.1 Äquivalenten NEt_3 zur

Racemisierungsreaktion verhindert die Racemisierung. Daraus läßt sich schließen, daß eine quantitative Deprotonierung der *N*-Acylaminosäure sich nachteilig auswirkt.

In weiteren Experimenten sollte geklärt werden, ob die Racemisierung möglicherweise über einen Reduktions-Oxidations-Prozeß verläuft. In diesem Fall müßte die Racemisierung der *N*-Acylaminosäure über eine Dehydrierung/Hydrierung am asymmetrischen C-2-Kohlenstoffatom verlaufen. Dabei ist damit zu rechnen, daß der abstrahierte Wasserstoff intermediär vom Rhodiumkatalysator aufgenommen wird. An dieser Stelle sei auf die Arbeiten zur enantioselektiven Hydrierung von ungesättigten Zimtsäureamiden zu den korrespondierenden *N*-Acylaminosäureestern hingewiesen (Gleichung 9).^[127] Ein chiraler Rhodium(I)-katalysator addiert oxidativ Wasserstoff unter Ausbildung einer Rh(III)-Dihydridspezies und überträgt diesen auf das ungesättigte Substrat.



Gleichung 9: Rhodium-katalysierte Enantioselektive Hydrierung von Acetamidozimtsäuremethylester

Es kann vermutet werden, daß im Fall der katalytischen Racemisierung ein vergleichbarer Prozeß zum Tragen kommt.

Daher sollte in ersten Experimenten die übliche Racemisierungsreaktion unter Wasserstoffatmosphäre durchgeführt werden. Verhält sich der Katalysator nach wie vor aktiv, so müßte der Einbau von Deuteriumatomen am C-2-Kohlenstoffatom der *N*-Acylaminosäure bei Verwendung von Deuterium statt Wasserstoff nachzuweisen sein.

Weitere Untersuchungen, die einen Redox-mechanismus unterstützen, wurden wie folgt durchgeführt:

Der Zusatz von Acetamidozimtsäure sollte die Geschwindigkeit der Racemisierung erhöhen, da die Konzentration des vom Katalysator erzeugten Intermediats erhöht wird. Der Zusatz von Styrol zur Racemisierungsreaktion müßte dazu führen, daß die Racemisierung nicht bzw. eingeschränkt stattfindet, da Styrol eine höhere Aktivität bzgl. der Hydrierung aufweist. Als Folgeprodukt der Reaktion sollte sich demnach Ethylbenzol nachweisen lassen.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 48 zusammengestellt. Eintrag **1** zeigt, daß die Racemisierungsgeschwindigkeit der Reaktion in Gegenwart von H₂ sinkt, so daß nach 48 Stunden ein mittlerer ee-Wert von ca. 60 % ee erhalten wird. Die Experimente in Deuteriumatmosphäre verlaufen jedoch schneller, die vollständige Racemisierung des Substrates ist zu beobachten (0, 1 % ee, Eintrag **2**). Die Aminosäure wurde isoliert und mittels NMR- und IR-Spektroskopie auf ihren Deuteriumgehalt untersucht, es konnte jedoch keine Deuterierung festgestellt werden. Wie Eintrag **3** zeigt, ist die Racemisierung des Substrates bei Gegenwart von Acetamidozimtsäure nicht möglich.

Die Präsenz von Styrol wirkt sich allgemein verlangsamernd auf die Reaktion aus, die vermutete Hydrierung zu Ethylbenzol findet nicht statt.

Tabelle 48: Experimente zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus

Eintrag	Einflußgröße	ee(L) [%]
1	H ₂ -Atmosphäre	57, 62
2	D ₂ -Atmosphäre	1, 0
3	1 Äquiv. Acetamidozimtsäure	92
4	10 mol% Styrol	57
5	100 mol% Styrol	30

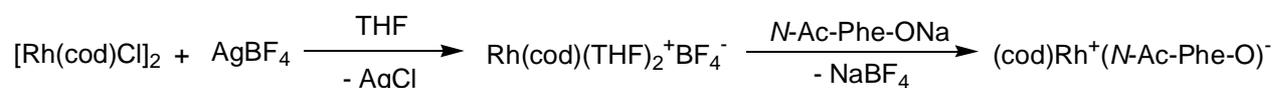
Bed.: 100 mg *L-N*-Ac-Phe, 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂, 50 mol% PCy₃, MeCN, 60 °C, 48 Stunden

Alle erhaltenen Ergebnisse können einen Redox-Mechanismus weder ausschließen noch eindeutig belegen.

Um genauere Informationen über den sich bildenden *in-situ* Katalysator aus [Rh(cod)Cl]₂ und PPh₃ zu erhalten, wurde in NMR-Experimenten das Verhalten der Katalysatormischung in Acetonitril bei 60°C mit und ohne *N*-Acylaminosäure untersucht (Rh/As 1/1). Ohne *N*-Acylaminosäure ist die erwartete schnelle Bildung des Wilkinson Katalysators (³¹P-NMR) neben freiem PPh₃ zu beobachten, weitere Rh-Spezies sind nicht detektierbar. Die Zugabe von 1 Äquivalent *N*-Acetylphenylalanin führt zu keiner Veränderung der Signale im ³¹P-Spektrum (auch nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden bei 60 °C). Die jetzt für *N*-Acetylphenylalanin detektierbaren Signale im ¹³C- und ¹H-NMR-Spektrum sind mit den Signalen der freien *N*-Acylaminosäure identisch, was darauf hindeutet, daß die Aminosäure keine Wechselwirkungen mit der im System vorhandenen Spezies eingeht bzw. diese Wechselwirkung spektroskopisch nicht belegbar ist.

Da auch diese Experimente keine weiteren Rückschlüsse zuließen, war es sinnvoll, ein mögliches Katalyseintermediat darzustellen. In der Literatur sind zahlreiche Beispiele über Aminosäure-Metallkomplexe bekannt^[128,129,130], ebenso über rhodiumhaltige Carbonylkomplexe mit Aminosäuren^[131,132] und über Rhodium-Cyclooctadien-Komplexe von Aminosäuren.^[133] Es verwundert jedoch, daß keine Komplexe von *N*-Acylaminosäuren mit Rh(I)-Verbindungen beschrieben sind. Die Synthese und Charakterisierung dieser Komplexe ist besonders interessant, da Informationen über den Bindungsmodus des Aminosäureliganden erhalten werden können (η^1 - oder η^2 -Koordination der Carboxylgruppe, Koordination der Acylgruppe über Stickstoff oder Carbonylsauerstoff). Zu diesem Zweck wurde folgende Synthese des Komplexes (cod)Rh(L-*N*-Ac-Phe-O⁻) versucht. Die eingeschlagene Syntheseroute ist in Gleichung 10 gezeigt.

Die Charakterisierung des erhaltenen Produktes läßt jedoch entscheidende Fragen offen. Die Signale des Aminosäureliganden im ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum entsprechen in ihrer chemischen Verschiebung den Signalen des *N*-Acetylphenylalanin-Natriumsalzes. Im Massenspektrum des Reaktionsproduktes konnte das Molekülionensignal nicht gefunden werden.



Gleichung 10: Synthese des Komplexes (cod)Rh⁺(*N*-Ac-Phe-O)⁻

Die Elementaranalyse ergibt folgende Zusammensetzung des Produktes: C 53.06 %, H 5.83 %, N 3.28 % (berechnet: C 54.09 %, H 5.80 %, N 3.36%). Das IR-Spektrum der Verbindung kann leider keinen Aufschluß über den Bindungsmodus der Carboxylgruppe und der Acylgruppe geben, da die Signale der symmetrischen und anti-symmetrischen $\nu(\text{CO}_2)$ -Bande und der Amid-I bzw. Amid-II-Bande im gleichen Wellenzahlenbereich beobachtbar sind. Eine Zuordnung der Signale kann deshalb nicht getroffen werden. Die Verbindung besitzt einen spezifischen Drehwert von $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -12.97^\circ$, ($c = 0.05$, CHCl_3). Trotz der durchgeführten Charakterisierung kann nicht zweifelsfrei belegt werden, daß der Komplex tatsächlich vorhanden ist, oder das Aminosäurefragment neben einer Rhodiumspezies mit identischen Löse- und Fällungseigenschaften vorliegt. Röntgenfähige Kristalle der Verbindung konnten nicht erhalten werden. Die Synthese wurde mehrfach mit anderen *N*-Acylaminosäuren durchgeführt, führte jedoch ebenfalls nicht zum Erfolg.

Somit konnte keine sicheren Informationen zum Mechanismus der Racemisierung gewonnen werden. Weitere Arbeiten zur Aufklärung des Mechanismus sind daher sinnvoll, insbesondere auf dem Gebiet der Palladium-katalysierten Variante.

8 Die dynamische kinetische Racematspaltung von sekundären Alkoholen

8.1 Kenntnisstand

Eine dynamische kinetische Racematspaltung von sekundären Alkoholen kann prinzipiell über 2 mögliche Strategien erreicht werden:

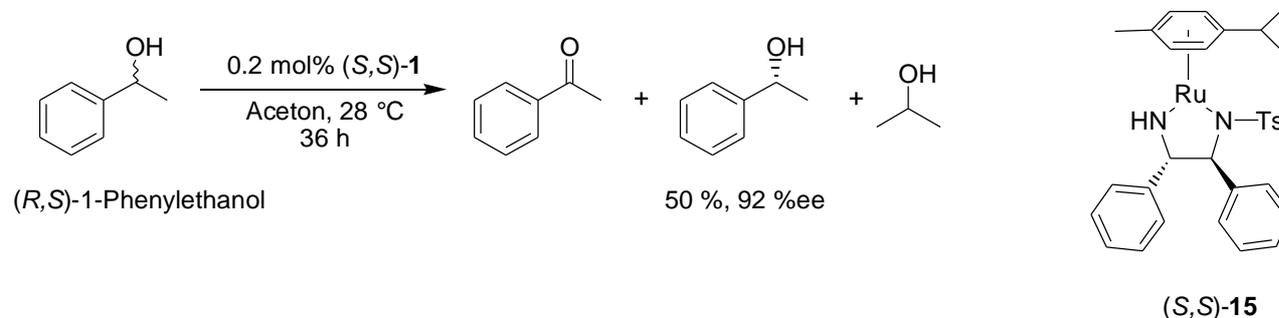
- 1) *In-situ* Racemisierung des racemischen Alkohols in Kombination mit einer enantioselektiven Derivatisierung zum optisch stabilen Produkt (z.B. enzymatische Acylierung der Alkohole).
- 2) Kombination einer *in-situ* Racemisierung von racemischen Alkoholderivaten (z.B. Acetatverbindungen) mit stereoselektiver Freisetzung eines Alkoholenantiomers.

Beide Möglichkeiten wurden bereits mit Erfolg verwirklicht^[63-69], die bisherigen Arbeiten zur dynamischen kinetischen Racematspaltung von sekundären Alkoholen sind in Abschnitt 3.4.3 zusammengefaßt.

8.2 Motivation

Auf der Suche nach neuen aktiven Katalysatoren zur Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren haben wir uns dem Studium der Literatur zu asymmetrischen Transferhydrierungen gewidmet.^[134,135] In neueren Arbeiten von Noyori et al. werden außergewöhnlich reaktive chirale Metallkomplexe eingesetzt, mit denen bedeutende Fortschritte bei dieser Reaktion erzielt werden konnten.^[136,137,138] Besonderes Interesse erweckten Ruthenium(II)-Komplexe mit chiralen Diaminliganden, die die enantioselektive Reduktion prochiraler Ketonverbindungen unter besonders milden Reaktionsbedingungen katalysieren. Als Reduktionsmittel können Alkohole wie 2-Propanol^[139] oder Ameisensäure^[140,141] verwendet werden. Im Zusammenhang mit dynamischen kinetischen Racematspaltungen ist eine neuere Arbeit von besonderem Interesse.^[142] In diesem Beitrag katalysiert ein chiraler Rutheniumkatalysator^[143] effektiv und unter besonders milden Reaktionsbedingungen die kinetische Racematspaltung einer Reihe von sekundären Alkoholen durch stereoselektive Oxidation eines Alkoholenantiomers zur Ketonverbindung (Gleichung 11). Als Oxidationsmittel dient das Lösungsmittel Aceton. Der ungewöhnlich aktive 16-Elektronen

Komplex **15** katalysiert die Racematspaltung ohne weitere Zusätze von starken Basen wie KOH, die normalerweise für derartige Umsetzungen notwendig sind. Ferner findet die Reaktion bei Raumtemperatur statt.



Gleichung 11: Kinetische Racematspaltung von (*R,S*)-1-Phenylethanol durch den chiralen Rutheniumkatalysator **15**

In den eigenen Arbeiten sollte der chirale Komplex nicht den stereoselektiven Schritt katalysieren, sondern als Racemisierungskatalysator eingesetzt werden. Dazu sind folgende Modifikationen notwendig:

1. Synthese und Einsatz des racemischen Katalysators **15**.
2. Verzicht auf das Oxidationsmittel Aceton und Verwendung einer zum Alkohol korrespondierenden Ketonverbindung.

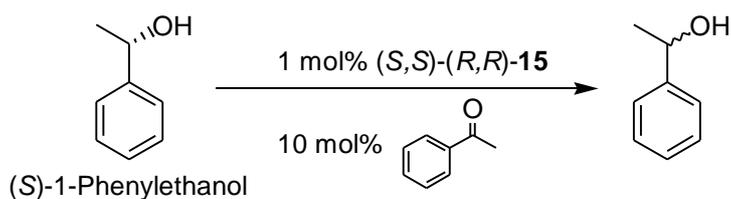
In diesem Reaktionssystem reduziert die (*S,S*)-Form von **15** das Keton zum (*R*)-Alkohol. Als Wasserstoffquelle dient bereits vorhandener Alkohol, wobei der Katalysator in der Lage ist, sowohl vom (*R*)- als auch vom (*S*)-Enantiomer des Alkohols den notwendigen Wasserstoff zu beziehen. Das (*R,R*)-Enantiomer des Katalysators erzeugt dementsprechend aus der Ketonverbindung den (*S*)-Alkohol.

Der entscheidende Faktor, der eine Racemisierung der Alkohole zuläßt ist, daß die Enantioselektivität der Reduktion der Ketonverbindung **unabhängig** von der Chiralität der Wasserstoffdonoren ist.^[143] In Kombination mit dem (*R,R*)-Katalysator wird demnach der racemische Alkohol erzeugt, unabhängig von der Chiralität des bereits vorhandenen Alkohols. In der Summe der Einzelreaktionen entspricht dies einer Racemisierung des Alkohols.

Damit dieser Prozeß ablaufen kann, müssen alle Reaktionen in einem reversiblen Gleichgewicht stehen. Die Reversibilität der Transferhydrierung ist für diesen Katalysator gezeigt.^[143]

8.3 Erste Ergebnisse

Die im letzten Abschnitt angestellten Überlegungen müssen nun experimentell belegt werden. Dazu wurde der racemische Katalysator **15** dargestellt^[143] und mit einem optisch aktiven Alkohol zur Reaktion gebracht (gemäß Abschnitt 10.2.6.1, AAV 11). Als Testsubstrat wurde (*S*)-1-Phenylethanol eingesetzt. Als korrespondierendes Ketonäquivalent wurden 10 mol% Acetophenon verwendet (Gleichung 12).



Gleichung 12: Überprüfung der Racemisierungsfähigkeit des Katalysators an (*S*)-1-Phenylethanol

Da die Reaktion nicht in Aceton durchgeführt werden kann (Reduktion des Lösungsmittels), sind mehrere Lösungsmittel auf ihre Eignung untersucht worden. Tabelle 49 faßt die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Tabelle 49: Ergebnisse der Racemisierung von (*S*)-1-Phenylethanol

Eintrag	Lösungsmittel	ee(<i>S</i>) [%], 24 h	ee(<i>S</i>) [%] 48 h
1	Toluol	69	55
2	MTBE	91	89
3	<i>tert</i> -Butanol	93	88

Bed.: ca. 100 μ L (*S*)-Alkohol, 10 mol% Acetophenon, 1 mol% Kat., 2.5 mL Lösungsmittel, RT.

Eintrag **1** zeigt, daß eindeutige Racemisierung (69 % ee) des Substrates im Lösungsmittel bereits nach 24 Stunden Reaktionszeit beobachtbar ist. Nach weiteren 24 Stunden sinkt das Enantiomerenverhältnis auf 55 % ee ab. MTBE (Eintrag **2**) und *tert*-Butanol (Eintrag **3**) sind als Reaktionsmedien im Vergleich zu Toluol weniger geeignet.

Damit kann bestätigt werden, daß der synthetisierte racemische Ru(II)-Katalysator in der Lage ist, bei Raumtemperatur und ohne weiteren Basenzusatz (*S*)-1-Phenylethanol über eine reversible Oxidations-Reduktionssequenz zu racemisieren.

In zwei weiteren Reaktionen wurde zum einen die Racemisierungsaktivität des Katalysators bei leicht erhöhter Reaktionstemperatur ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) über einen längeren Zeitraum beobachtet,

zum anderen sollte Methylenchlorid als weiteres Lösungsmittel eingesetzt werden. Das Verhältnis von Substrat / Keton / Kat. von 100/10/1 wurde beibehalten (Abbildung 39).

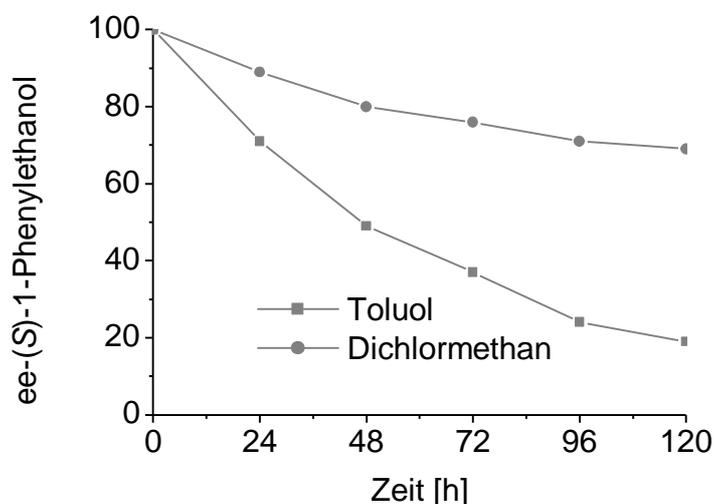


Abbildung 39: Vergleich der Racemisierung von (*S*)-1-Phenylethanol in Toluol und CH₂Cl₂ über einen Zeitraum von 6 Tagen

Auch hier zeigt sich die deutliche Überlegenheit von Toluol als Lösungsmittel. Nach 48 Stunden Reaktionszeit entspricht das Enantiomerenverhältnis von 1-Phenylethanol in Toluol 49 % ee und in CH₂Cl₂ 80 % ee. Nach einer Reaktionszeit von ca. 72 Stunden kann in beiden Lösungsmitteln das Auftreten eines weißen Niederschlags beobachtet werden, der vermutlich abgespaltenem Diaminliganden entspricht. Ferner bildet sich ein Rutheniumspiegel am Reaktionsgefäß. Daher kann davon ausgegangen werden, daß die katalytische Aktivität des Komplexes aufgrund seiner Zersetzung vermindert wird. Weiterhin ändert sich die Farbe der Reaktionsmischung bei fortschreitender Reaktion von tiefviolett nach braun. Der Farbwechsel deutet auf die Bildung der hydrierten Form^[143] des Katalysators hin.

In weiteren Experimenten wurde der Zusammenhang zwischen Acetophenonmenge und Racemisierungsgeschwindigkeit des Alkohols geklärt. Darüberhinaus wurde der Einfluß von NEt₃ auf die Racemisierungsgeschwindigkeit dokumentiert. Die in der Legende von Abbildung 40 aufgeführten Zahlenverhältnisse entsprechen den relativen Verhältnissen von Alkohol / Keton / Katalysator / (Triethylamin). Die Ketonmenge wurde von 0.5 mol% bis 20 mol% variiert. Alle Umsetzungen wurden bei 40 °C durchgeführt.

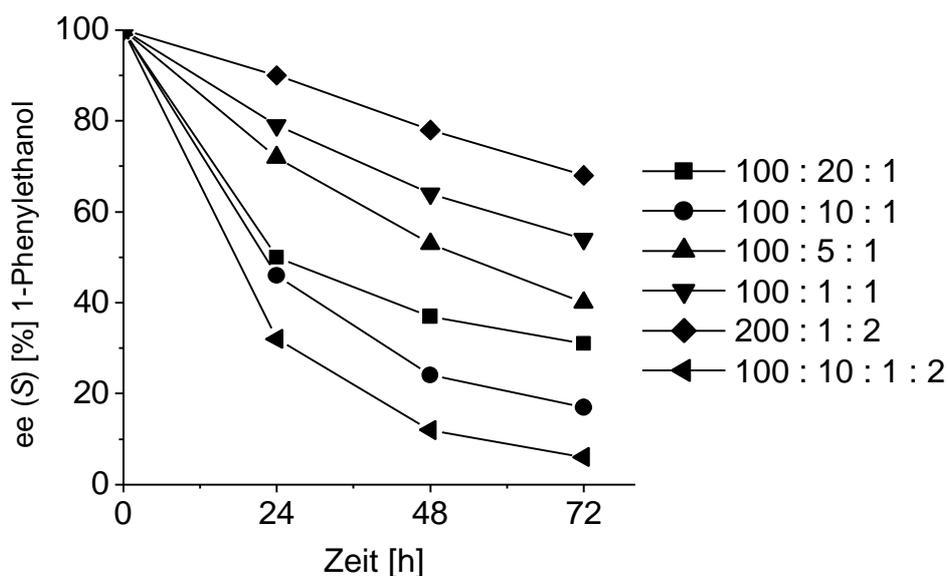


Abbildung 40: Zeitliche Beobachtung der Racemisierungsgeschwindigkeiten von (*S*)-1-Phenylethanol bei variablem Alkohol/Ketonverhältnis

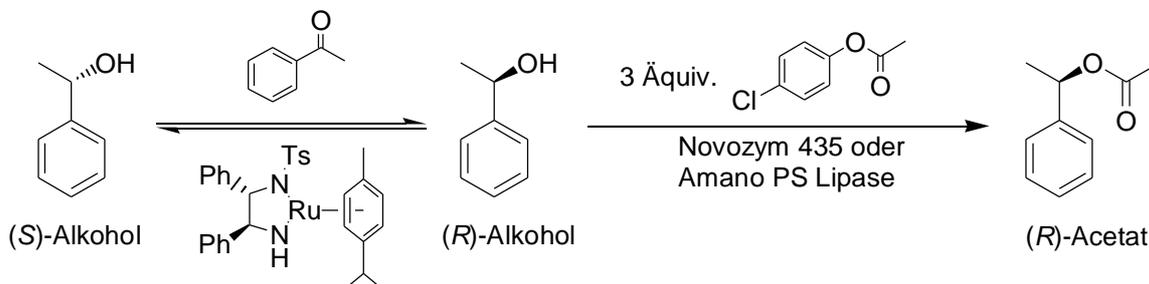
Die Ergebnisse der einzelnen Reaktionen zeigen den erwarteten Zusammenhang zwischen Racemisierungsgeschwindigkeit und Acetophenonmenge. Je höher der Anteil an Keton, desto schneller verläuft die Racemisierung von (*S*)-1-Phenylethanol.

Bemerkenswert ist der Einfluß von Triethylamin auf die Reaktion. Selbst die vergleichsweise geringe Menge von 2 mol% NEt_3 führt zu einer deutlichen Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit. Ein Vergleich der eigenen Ergebnisse (z.B. **1 mol% Kat., 10 mol% Acetophenon, 2 mol% NEt_3 , 40 °C, 48 Stunden, 11 % ee**) mit den Racemisierungsergebnissen von Bäckvall^[144] (**2 mol% Kat., 100 mol% Acetophenon, 70 °C, 0 % ee**) zeigt trotz der nicht identischen Racemisierungsbedingungen, daß der eigene Katalysator in seiner Reaktivität mindestens gleichwertig ist.

Die bisher erhaltenen Ergebnisse bestätigen die Racemisierungsaktivität des racemischen Katalysators. Die Geschwindigkeit der Racemisierung der Referenzverbindung sind ausreichend, um Untersuchungen Kombination der Racemisierung mit einer enzymatischen Racematspaltung durchzuführen.

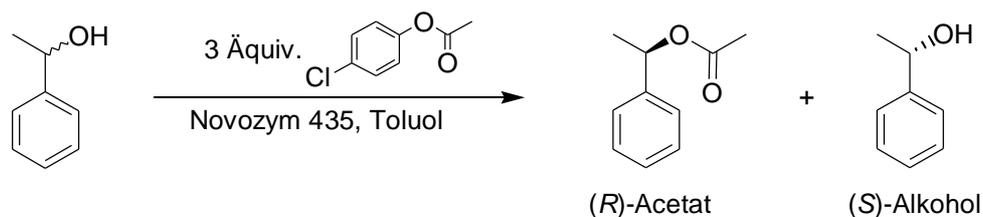
8.4 Arbeiten zur dynamischen kinetischen Racematspaltung

Die dynamische kinetische Racematspaltung von sekundären Alkoholen sollte nach Gleichung 13 mit enzymatischer Acylierung des Alkohols verwirklicht werden.



Gleichung 13: Reaktionsfolge der DKR von sekundären Alkoholen mit eigenem Ru-Katalysator am Beispiel von 1-Phenylethanol

Um sich der dynamischen kinetischen Racematspaltung von 1-Phenylethanol experimentell zu nähern, wurden zunächst einleitende Arbeiten zur klassischen Racematspaltung dieser Verbindung, d.h. zur enantioselektiven Acylierung von (*R*)-1-Phenylethanol zu (*R*)-Essigsäure-1-phenylethylester durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde das bei den Racemisierungsreaktionen erfolgreich eingesetzte Toluol verwendet. Der Racematspaltungsschritt wurde bzgl. eingesetztem Enzym und Acylierungsmittel analog den optimierten Bedingungen von Bäckvall^[144] durchgeführt (Gleichung 14).



Gleichung 14: Klassische Racematspaltung von (*R,S*)-1-Phenylethanol nach Bäckvall

Tabelle 50: Variationen des Substrat/Enzym-Verhältnisses bei der klassischen Racematspaltung von (*R,S*)-1-Phenylethanol

Eintrag	Enzymmenge	Umsatz [%]	ee (<i>S</i>) Alkohol [%]	ee (<i>R</i>) Acetat [%]
1	200 mg	53	- ^a	96
2	100 mg	53	- ^a	95
3	50 mg	52	- ^a	96
4	20 mg	50	100	97
5	10 mg	50	100	99
6	5 mg	50	100	99

Bed.: 100 μL (*R,S*)-1-Phenylethanol, 3 Äquiv. 4-Chlorphenylacetat, 2.5 mL Toluol, 40 °C, 24 Stunden. a) keine Bestimmung des Enantiomerenverhältnis.

Die Ergebnisse in Tabelle 50 zeigen eindrucksvoll, daß nur 5 mg an Enzymimmobilisat notwendig sind, um vollständigen Umsatz bei der Racematspaltung innerhalb von 24 Stunden Reaktionszeit zu erreichen. Die Selektivität der Umsetzung ist selbst bei unnötig (und damit nachteilig) hoher Enzymmenge als hervorragend zu bezeichnen (Einträge **1-5**, ee(Acetat) 96-99 %).

Mit diesen Ergebnissen scheint nun die Kombination der beiden getrennt untersuchten Teilreaktionen zu einer DKR möglich. Um erste Informationen zur den relativen Geschwindigkeiten der enzymatischen Umsetzung und der Ru-katalysierten Racemisierung zu erhalten, die zur Optimierung des Gesamtprozesses dienen können, wurde die Katalysatormenge variiert. Zusätzlich ist auch hier die Enantiomerenzusammensetzung des Alkohols bestimmt worden. Tabelle 51 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

Tabelle 51: Erste Versuche zur DKR von 1-Phenylethanol

Eintrag	Enzymmenge [mg]	Kat.-menge [mol%]	Umsatz [%]	ee(<i>S</i>)-Alkohol [%]	ee(<i>R</i>)-Acetat [%]
1	10 mg	1 mol %	50.5	100	98.(6)
2	10 mg	5 mol%	53.4	100	97.(4)

Bed.: 100 μL 1-Phenylethanol, 10 mol% Acetophenon, 10 mol% NEt_3 , Novozym 435, 2.5 mL Toluol, 40 °C, 48 Stunden.

Die DKR von 1-Phenylethanol läßt sich laut der Ergebnisse nicht erreichen. Nach 48 Stunden Reaktionszeit sind ca. 50 % Umsatz bei beiden Reaktionen beobachtbar. Die ee-Werte des Produktes sind mit 98 bzw. 97 % ee als sehr gut zu bezeichnen. Damit steht fest, daß das Enzym nicht nachteilig durch den Ru-Katalysator beeinflusst wird. Die Enantiomerenzusammensetzung des Alkohols im Reaktionsmedium mit jeweils 100 % ee zeigt eindeutig, daß zu keinem Zeitpunkt der Reaktion eine Racemisierung des Alkohols erfolgte. Der Katalysator ist demnach nicht in der Lage, unter den kombinierten DKR-Bedingungen den *in-situ* Racemisierungsschritt zu gewährleisten.

Mit diesem Resultat kann davon ausgegangen werden, daß eine oder mehrere Komponenten, die für den Racematspaltungsschritt erforderlich sind, den Katalysator deaktivieren. In hier nicht weiter aufgeführten Testreaktionen konnte festgestellt werden, daß sowohl das Acylierungsreagenz 4-Chlorphenylacetat als auch das Enzymimmobilisat Novozym 435 die Racemisierung des Alkohols unterbinden. Daraufhin wurden alle an der Reaktion beteiligten Reagenzien (4-Chlorphenylacetat, 1-Phenylethanol, Acetophenon, NEt_3) auf einen Mindestreinheitsgrad von 99 % (GC-Analyse) gereinigt und unter Schutzgasatmosphäre destilliert bzw. umkondensiert. Auf diese Weise sollten Verunreinigungen oder Wasserspuren möglichst vollständig entfernt werden.

Das Enzymimmobilisat wurde 1 Stunde am Hochvakuum entgast bzw. getrocknet und unter Argon aufbewahrt.

Mit den gereinigten und getrockneten Reagenzien zeigte sich in weiteren Testversuchen, daß die Katalysatoraktivität weniger stark beeinträchtigt wurde. Dennoch muß nach wie vor hingegenommen werden, daß neben Novozym 435 vor allem größere Mengen an 4-Chlorphenylacetat (die Reaktion benötigt 3 Äquivalente !) die Effizienz des Katalysators deutlich mindern.²¹ In weiteren Versuchen wurde versucht, Novozym durch andere Lipasen wie z.B. durch Amano PS Lipase zu ersetzen. Die Umsetzungen verlaufen jedoch mit geringerer Selektivität zum Produkt (20-65 % ee).

Eine wesentliche Verbesserung der Reaktion ist erst mit deutlicher Erhöhung der Reaktionstemperatur möglich. Um eine schnelle Racemisierung des Alkohols zu gewährleisten und der beobachteten Deaktivierung des Katalysators entgegenzuwirken, werden statt 1 mol% Katalysator jetzt 5 mol% eingesetzt. Ferner wird die Menge an

²¹ Besonders deutlich werden die beschriebenen Beobachtungen an folgenden Racemisierungsexperimente mit optisch reinem Alkohol (Bedingungen analog **Bed.**, Tabelle 51):
mit Zusatz von 10 mg Novozym: 49 % ee nach 24 Stunden Reaktionszeit.
mit Zusatz von 348 μL (3 Äquiv.) 4-Chlorphenylacetat: 96 % ee nach 24 Stunden Reaktionszeit.

Triethylamin von 10 mol% auf 100 μL (ca. 1 Äquiv.) erhöht und die Menge an verwendetem Enzym von 10 mg auf 1-2 mg gesenkt.

Tabelle 52: DKR von 1-Phenylethanol bei erhöhter Reaktionstemperatur

Eintrag	Reaktions- temperatur [°C]	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]	ee(S) Alkohol [%]	ee(R) Acetat [%]
1	70	24	56	96	96
		48	67	78	95
2	80	24	61, 61	96, 96	99, 98
		48	77, 80	96, 96	99, 99
		72	80, 87	- ^a	97, 96
		96	88, ^a	^a	96, ^a

Bed.: 100 μL (*R,S*)-1-Phenylethanol, 10 mol% Acetophenon, 100 μL NEt_3 , 5 mol% Kat., 1-2 mg Novozym 435, 3 Äquiv. 4-Chlorphenylacetat. a) Enantiomerenbestimmung nicht gelungen.

Mit dem Experiment unter Eintrag **1** kann zum ersten Mal bewiesen werden, daß die dynamische kinetische Racematspaltung von 1-Phenylethanol mit dem neuen racemischen Ru-Katalysator möglich ist. Nach 48 Stunden Reaktionszeit beträgt der Umsatz der Reaktion 67 % bei einer optischen Reinheit von 95 % ee des Produktes. Diese Werte können bei einer klassischen Racematspaltung nicht erreicht werden. Die Enantiomerenzusammensetzung des Alkohols verdeutlicht mit 96 % ee nach 24 Stunden Reaktionszeit, daß die Racemisierung nach wie vor trotz der vorgenommenen Optimierungen relativ langsam abläuft.

Dies ist auch daran zu erkennen, daß sich zwischen 24 und 48 Stunden Reaktionszeit der Umsatz nur um 11 % erhöht, was nicht durch mangelhafte Enzymaktivität verursacht wird, sondern durch die schleppend verlaufende Racemisierung des Alkohols.

Eintrag **2** beschreibt die Reaktion unter identischen Reaktionsbedingungen bei 80 °C Reaktionstemperatur. Die Reaktionsgeschwindigkeit beider Reaktionen ist im Vergleich zu Eintrag **1** leicht erhöht (61 %, 24 Stunden bzw. ca. 79 %, 48 Stunden). Auch hier deutet der außerordentlich hohe ee-Wert (96 % ee) des verbleibenden Alkohols in Lösung an, daß die Ru-katalysierte Racemisierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Nach 72 Stunden Reaktionszeit ist das Produkt mit 80 bzw. 87 % Umsatz und einem Enantiomerenverhältnis von 97 bzw. 96 % ee gebildet worden. Wie die Ergebnisse bei 96

Stunden Reaktionszeit zeigen, findet spätestens ab 72 Stunden Reaktionsdauer kein Umsatz mehr statt.

Es ist festzuhalten, daß die DKR von 1-Phenylethanol trotz beobachteter Katalysatordeaktivierung bei 70 bzw. 80 °C möglich ist. Das beste Ergebnis ist mit 87 % Umsatz bei einem ee-Wert von 96 % nach 3 Tagen Reaktionszeit erhalten worden (Eintrag **2**, Tabelle 52). Bemerkenswert ist die außerordentliche Stabilität des Enzyms, welches trotz minimaler Menge (1-2 mg) in ausreichender Geschwindigkeit hochselektiv die Racematspaltung katalysiert.

Aufgrund der positiven Resultate bei 80 °C wurden weitere Reaktionsoptimierungen durchgeführt. Tabelle 53 faßt die erhaltenen Ergebnisse zusammen. Eintrag **1** zeigt, daß die DKR von 1-Phenylethanol bei 80 °C Reaktionstemperatur befriedigend reproduzierbar (vgl. Tabelle 52) ist. Auch hier wird das acylierte Produkt nach 48 Stunden Reaktionsdauer mit durchschnittlich 83 % Umsatz und ca. 95 % ee erhalten. Die Abwesenheit von Acetophenon (Eintrag **2**) wirkt sich negativ auf den Umsatz der Reaktion (und damit die Racemisierungsgeschwindigkeit des Alkohols) aus, nach 2 Tagen sind nur 66 % Umsatz beobachtbar. Trotzdem wird das Produkt in hoher Enantioselektivität (95 % ee) gebildet.

Tabelle 53: DKR von 1-Phenylethanol bei 80 und 100 °C mit und ohne Acetophenon

Eintrag	Reaktions- temperatur [°C]	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]	ee(<i>S</i>) Alkohol [%]	ee(<i>R</i>) Acetat [%]
1	80	24	64, 58	89, ^a	97, ^a
		48	90, 75	98, 97	97, 94
2	80 [*]	24	54	94	97
		48	66	96	95
3	100	24	49, 54	50, 58	98, 98
		48	55, 61	66, 80	96, 97
4	100 [*]	24	62	92	97
		48	66	96	95
5	90	24	41, 43	88, 87	97, 96
		48	53, 53	85, 85	98, 98

Bed.: 100 µL (*R,S*)-1-Phenylethanol, 10 mol% Acetophenon, 100 µL NEt₃, 5 mol% Kat., 1-2 mg Novozym 435, 3 Äquiv. 4-Chlorphenylacetat. *) ohne Acetophenon

a) Enantiomerenbestimmung nicht gelungen.

Die Ergebnisse der DKR bei 100 °C mit Acetophenon (Eintrag **3**) zeigen mit einem durchschnittlichen Umsatz von ca. 52 % nach 24 Stunden, daß die Acylierungsgeschwindigkeit und damit die Enzymaktivität unter diesen Reaktionsbedingungen sinkt. Trotzdem findet die Umsetzung zum Produkt hochselektiv (98 % ee) statt. Die korrespondierende Enantiomerenzusammensetzung des Alkohols (ca. 54 % ee) kann nicht eindeutig interpretiert werden, weil der Umsatz der Reaktion im Vergleich zu **1** geringer ausfällt. Die Reaktion ohne Acetophenon (Eintrag **4**) zeigt bzgl. Umsatz und ee-Wert des Produktes ähnliche Charakteristika wie **3**, die erhaltenen Werte der Reaktion werden auch hier vornehmlich durch die allmählich stattfindende Deaktivierung von Racemisierungskatalysator und Enzym bestimmt. Auffällig ist jedoch die mit 92 bzw. 96 % ee (Eintrag **4**) wesentlich langsamere verlaufende Racemisierung des Alkohols als bei Eintrag **3** (ca. 54 % ee bzw. ca. 73 % ee). Die Anwesenheit der Ketonverbindung bei Eintrag **3** beschleunigt demnach die Racemisierungsgeschwindigkeit.

Die Ergebnisse der DKR bei 90 °C (Eintrag **5**) deuten mit den schlechten Umsätzen ebenfalls an, daß bessere Reaktionsbedingungen bei 80 °C gegeben sind.

Es bleibt festzuhalten, daß das Screening zur Reaktionstemperatur gezeigt hat, daß die besten Ergebnisse bei 80 °C in Gegenwart von 10 mol% Acetophenon erreicht werden (siehe Eintrag **1**, Tabelle 53, Eintrag **2**, Tabelle 52).

Jetzt war es sinnvoll, die Übertragbarkeit des entwickelten Verfahrens der DKR von 1-Phenylethanol auf andere Substrate abzuschätzen. Dazu werden folgende Substrate ausgewählt:

- 1) 1-(4-Chlorphenyl)ethanol
- 2) 1-(4-Methoxyphenyl)ethanol
- 3) 1-Indanol
- 4) 2-Octanol

Vor dem Einsatz der neuen Substrate war es notwendig, diese Verbindungen, die entsprechenden Acetatverbindungen und die korrespondierenden Ketone darzustellen und jeweilige Enantiomeren- und Umsatzanalytik zu entwickeln. Dies ist mit Ausnahme der Enantiomerenanalytik von 2-Octanol gelungen.

In einer ersten Erprobung aller Substrate in der DKR bei standardisierten Reaktionsbedingungen (siehe Bed. Tabelle 52, Eintrag **2**) zeigte sich, daß der Umsatz bei allen Umsetzungen bei ca. 50-55 % nach 48 Stunden Reaktionszeit liegt und die Acetatverbindungen hochselektiv (ee aller Produkte > 90 %) gebildet werden. Die unbefriedigenden Umsätze werden durch die nicht stattfindende Ru-katalysierte Alkoholracemisierung erklärt.

Wahrscheinlich kommt es zu einer Katalysatordeaktivierung durch Nebenreaktion des eingesetzten Liganden. Weitere Untersuchungen mit anderen Ligandensystemen (z. B. dem Dimethylaminoderivat des eingesetzten Liganden) konnten jedoch nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden.

9 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Gewinnung enantiomerenreiner Aminosäuren und sekundärer Alkohole nach dem Konzept der dynamischen kinetischen Racematspaltung durchgeführt. In Studien zur DKR von Aminosäureestern wurden signifikante Verbesserungen einer literaturbekannten Methode ausgearbeitet. Wesentliche Punkte sind hier die Verwendung gut zugänglicher Esterderivate von Aminosäuren und die Reduzierung und Strukturvereinfachung des Racemisierungskatalysators.

Den thematischen Schwerpunkt der Arbeit bildeten grundlegende Studien zur Entwicklung einer neuen katalytischen Racemisierungsmethode von *N*-Acylaminosäuren mit Hilfe von Übergangsmetallkatalysatoren. Die Anwendbarkeit der gefundenen Methoden in einer dynamischen kinetischen Racematspaltung von *N*-Acylaminosäuren sollte abgeschätzt werden.

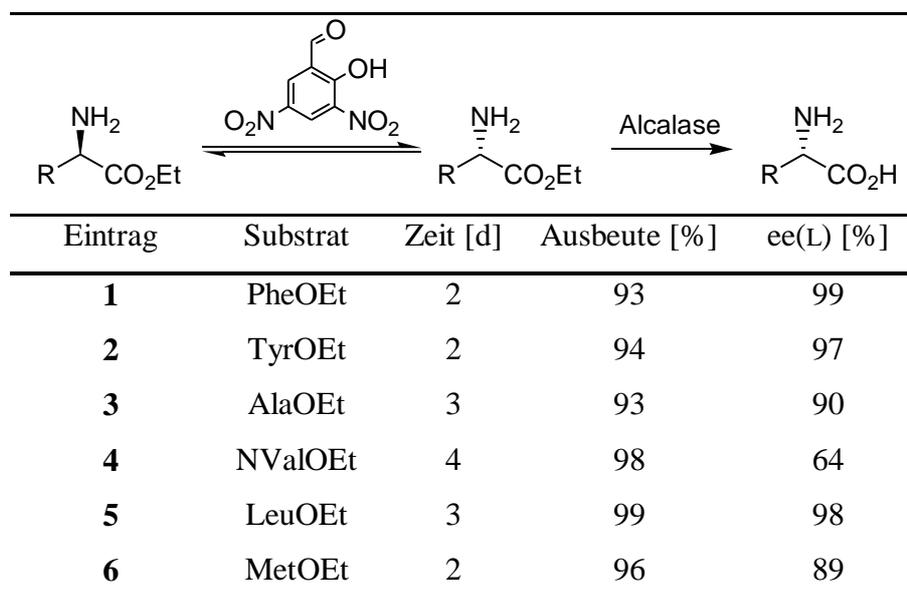
Dieses bislang nicht realisierte Verfahren vereinigt die Vorteile der preiswerten Synthese racemischer *N*-Acylaminosäuren mit potentiell quantitativer Gewinnung enantiomerenreiner Aminosäuren.

Abschließend wurden Untersuchungen zur dynamischen kinetischen Racematspaltung von sekundären Alkoholen am Beispiel von 1-Phenylethanol durchgeführt. Ausgangspunkt waren Untersuchungen zur Racemisierungsaktivität eines neuen Katalysators, der schnelle Racemisierung bei gleichzeitig milden Reaktionsbedingungen ermöglicht. Es gelang, die neue Racemisierungsmethode in einer dynamischen kinetischen Racematspaltung von 1-Phenylethanol erfolgreich anzuwenden.

Die dynamische kinetische Racematspaltung von Aminosäureestern

Zu Beginn der Arbeit stand die Weiterentwicklung der in der Diplomarbeit erarbeiteten Methode der dynamischen kinetischen Racematspaltung von Phenylalanin- und Tyrosinesterderivaten im Vordergrund. Eine Übertragung des Verfahrens auf andere natürliche Aminosäureester war durch Verwendung des Lösungsmittelgemisches Acetonitril/Wasser 1/1 möglich. Es konnte gezeigt werden, daß sich bei korrekter Abstimmung der Reaktionsparameter wie pH-Wert, Reaktionstemperatur, Enzymmenge und Lösungsmittel einfach zugängliche racemische Aminosäureethylester in beinahe quantitativen Umsätzen zu hoch enantiomerenreinen Aminosäuren umsetzen lassen. Ferner gelang es, die notwendige Menge an Racemisierungskatalysator auf 2.5 mol% zu senken. Damit ist die

Katalysatormenge des Racemisierungsschrittes im Vergleich zur literaturbekannten Methode um den Faktor 8 gesenkt worden. Die gleichzeitige Beobachtung der Enantiomerenverhältnisse von allen beteiligten Reaktionspartnern während der dynamischen kinetischen Racematspaltung zeigte an den Beispielen von DL-Methioninethylester und DL-Phenylalaninethylester, daß eine gute Abstimmung der relativen Geschwindigkeiten von Racemisierung und enzymatischer Hydrolyse gelungen ist. Eine Reihe racemischer Aminosäureethylester konnte nach einer standardisierten Reaktionsvorschrift effektiv zu den korrespondierenden Aminosäuren umgesetzt werden.



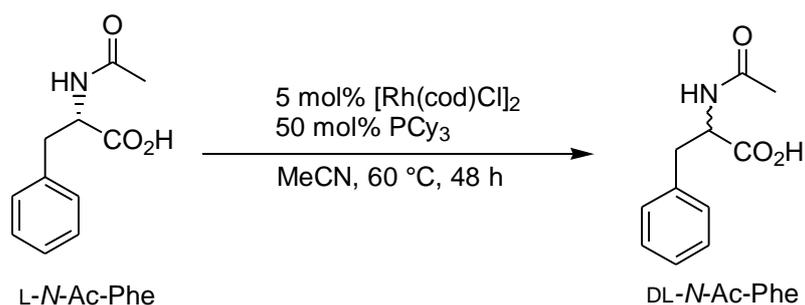
Bed.: 20 mmol Substrat, 1 mL Alcalase, 50 mL MeCN, 50 mL H₂O, 2.5 mol% 3,5-Dinitrosalicylaldehyd, RT, pH 7.5.

Die schnelle und selektive Racemisierung von Aminosäureestern mit aktivierten Salicylaldehydderivaten wie 3,5-Dichlor- oder 3,5-Dinitrosalicylaldehyd zeigt eine breite Anwendbarkeit bzgl. der untersuchten Aminosäureester und ist, wie am Beispiel von Phe-OMe gezeigt wurde, in einem pH-Bereich von 5.5-8.5 auch ohne Gegenwart von Wasser anwendbar. Studien zur Racemisierungsaktivität von einfacher aufgebauten Verbindungen zeigten die Sonderstellung der eingesetzten Aldehyde.

Die Entwicklung einer Übergangsmetall-katalysierten Racemisierung von *N*-Acyl-aminosäuren

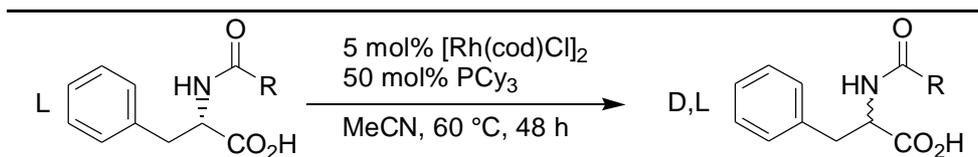
Der Hauptteil der Arbeit widmete sich der Entwicklung einer milden katalytischen Racemisierungsmethode für *N*-Acylaminosäuren, welche mit Hilfe von Übergangsmetallen realisiert werden sollte. An der Modellverbindung *L*-*N*-Acetylphenylalanin wurde ein breit angelegtes Screening zur Racemisierungsaktivität verschiedener einfacher Metallkomplexe in unterschiedlichen Lösungsmitteln durchgeführt.

Nachdem erste Anzeichen der katalytischen Aktivität von Rhodium(I)-verbindungen in Acetonitril erkannt worden waren, führten weitere Experimente mit Rhodium/Phosphan-Kombinationen in MeCN zur Entwicklung **der ersten Übergangsmetall-katalysierten Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren**. Als besonders aktiv stellte sich ein Katalysatorsystem aus 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂ und 50 mol% PCy₃ in MeCN heraus.



Mit diesem Katalysatorsystem gelingt die vollständige Racemisierung von *L*-*N*-Acetylphenylalanin (verbleibender ee-Wert 0-10 %) bei 60 °C in MeCN innerhalb von 48 Stunden Reaktionszeit.

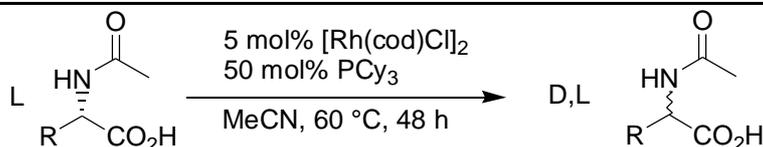
Weiterführende Untersuchungen zur allgemeinen Anwendbarkeit der Methode zeigten, daß sich Phenylalaninderivate mit unterschiedlichen *N*-substituierten Acylresten effektiv racemisieren lassen. Schnelle Racemisierung läßt sich neben *N*-Acetylphenylalanin auch mit dem aus enzymatischer Sicht wichtigen *N*-Phenacetylphenylalanin erzielen. Während Benzoyl- und Methoxyacetyl-derivate von Phenylalanin ebenfalls racemisiert werden können, verhindern elektronenziehende Acylreste wie in *N*-Trifluoracetylphenylalanin die Racemisierung.



Verbindung	Zeit [h]	ee(L) [%]
<i>N</i> -Acetylphenylalanin	48	0
<i>N</i> -Trifluoracetylphenylalanin	48	96
<i>N</i> -Methoxyacetylphenylalanin	48	53
<i>N</i> -Phenacetylphenylalanin	48	7
<i>N</i> -Benzoylphenylalanin	48	26

Bed.: 0.48 mmol Substrat , 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂, 50 mol% PCy₃ 10 mL MeCN, 60 °C.

Die allgemeine Anwendbarkeit der Racemisierungsmethode wurde in Untersuchungen zur Racemisierbarkeit anderer *N*-Acetylaminosäuren bestätigt. Aliphatische wie zyklische *N*-Acetylaminosäuren lassen sich schnell und selektiv racemisieren, Ausnahme bildet *N*-Acetylasparaginsäure, welches sich unter standardisierten Reaktionsbedingungen als racemisierungsstabil zeigt.



Verbindung	ee(L) [%]	Verbindung	ee(L) [%]
L- <i>N</i> -Acetylalanin	0	L- <i>N</i> -Acetylprolin	0
L- <i>N</i> -Acetylvalin	9	L- <i>N</i> -Acetylmethionin	25
L- <i>N</i> -Acetylleucin	47	L- <i>N</i> -Acetylasparaginsäure	94

Bed.: 0.48 mmol Substrat , 5 mol% [Rh(cod)Cl]₂, 50 mol% PCy₃ 10 mL MeCN, 60 °C, 48 Stunden.

Die Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren gelang zunächst nur mit Acetonitril als Lösungsmittel. Durch Zusätze wie Tetraalkylammoniumhalogenide lassen sich die Rhodium-katalysierten Racemisierungen in Aceton, Ethylacetat, Dioxan und Toluol durchführen. Die entscheidende Rolle spielt dabei das zugesetzte Halogenidion, mit steigender Ordnungszahl erhöht sich die Fähigkeit, Racemisierung zu vermitteln.

Trotz der erfolgreichen Entwicklung der ersten Übergangsmetall-katalysierten Racemisierung von *N*-Acylaminosäuren sind die Mengen der einzusetzenden Katalysatoren (5 mol% [Rh(cod)Cl]₂/50 mol% PCy₃) als sehr hoch zu bezeichnen. Eine deutliche Verbesserung der Reaktion ist im folgenden mit der Verwendung von Palladium(0)-Verbindungen wie Pd(PPh₃)₄ gelungen. Aufgrund der Instabilität dieser Verbindung ist mit einem gleichwertigen Palladium(0)-katalysator aus Pd₂(dba)₃ und PPh₃ gearbeitet worden, darüber hinaus zeigen selbst luftstabile Pd(II)-Vorstufen wie Pd(OAc)₂ gleichwertige Reaktivität. Auch mit diesen Katalysatoren lassen sich mit Ausnahme von *N*-Acetylasparaginsäure alle verwendeten *N*-Acylaminosäuresubstrate unter milden Bedingungen racemisieren. Die Geschwindigkeit der Palladium-katalysierten Racemisierung ist so hoch, daß eine Reduzierung der katalytischen Menge von Metallvorstufe und Phosphan um den Faktor 10 möglich war. Ferner sind neben der erheblichen Mengenreduzierung die Kosten der Katalysatoren durch den Wechsel von Rhodium auf Palladium und von PCy₃ auf PPh₃ erheblich gesenkt worden. Nachfolgende Tabelle faßt ausgewählte Resultate der Palladium-katalysierten Racemisierung mit Pd(OAc)₂ zusammen.

Eintrag	Substrat	Bedingungen	ee(L) [%], 48 h
1	L- <i>N</i> -Ac-Phe	1, 2, 3	2, 8, 1
2	L- <i>N</i> -Ac-Ala	1, 2, 3	12, 32, 5
3	L- <i>N</i> -Ac-Val	1, 2, 3	4, 28, 21
4	L- <i>N</i> -Ac-Leu	1, 2, 3	13, 33, 8
5	L- <i>N</i> -Ac-Met	1, 2, 3	15, 76, 9
6	L- <i>N</i> -Ac-Pro	1, 2, 3	10, 25, 13

- Bed.:** 1) 100 mg Substrat, 10 mL MeCN, 80 °C, 1 mol% Pd(OAc)₂, 5 mol% PPh₃.
 2) 100 mg Substrat, 10 mL MeCN, 60 °C, 1 mol% Pd(OAc)₂, 5 mol% PPh₃.
 3) 100 mg Substrat, 10 mL MeCN, 60 °C, 2.5 mol% Pd(OAc)₂, 12.5 mol% PPh₃.

Anwendung der Racemisierungsmethoden in der dynamischen kinetischen Racematspaltung von *N*-Acylaminosäuren

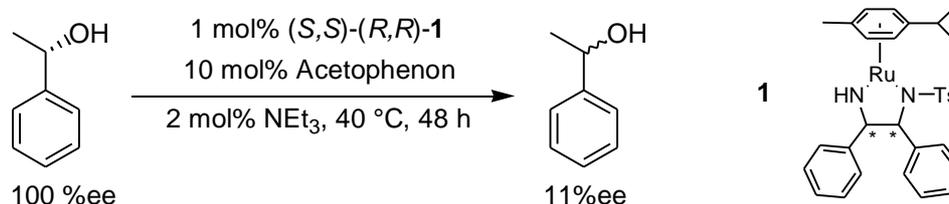
Die *in-situ* Kombination von Rhodium- bzw. Palladium-katalysierter Racemisierung mit enzymatischer Hydrolyse ist nicht gelungen. Die Racemisierungskatalysatoren werden bereits durch geringe Mengen an Wasser im Lösungsmittel stark gehemmt, die Durchführung der Racemisierung ist auf wenige Lösungsmittel wie Acetonitril, Dioxan, Aceton, und Toluol beschränkt.

Die bei der enzymatischen Racematspaltung von *N*-Acylaminosäuren vielfach verwendeten Enzyme Acylase I,II unterschiedlicher biologischer Quellen sind einerseits nicht in der Lage, Langzeitaktivität bei erhöhten Temperaturen wie z.B. 60 °C zu gewährleisten, andererseits verlieren die Enzyme ihre Aktivität in Lösungsmitteln mit hohen organischen Cosolvenzanteil. Auch eine CLEC-Version von Penicillin G Amidase, welche sich bei 60 °C als länger aktiv zeigte, ist nicht in der Lage enzymatische Aktivität in Acetonitril zu gewährleisten.

Der hohe Schwierigkeitsgrad der DKR von *N*-Acylaminosäuren liegt nach bisherigem Kenntnisstand in der Unvereinbarkeit der jeweils erforderlichen Reaktionsbedingungen.

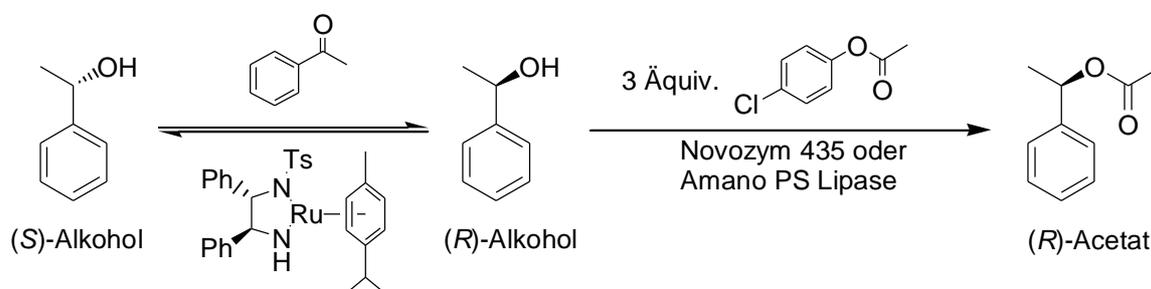
Die dynamische kinetische Racematspaltung von sekundären Alkoholen

Anstoß für den Einstieg in diesen Themenbereich gab eine Idee, einen bereits literaturbekannten chiralen Rutheniumkatalysator in modifizierter Form auf seine Fähigkeit für Racemisierungsreaktionen von sekundären Alkoholen zu überprüfen.



Der racemische Rutheniumkatalysator **15** (*p*-Cymol)Ru[(1*S*,2*S*)-(1*R*,2*R*)-TsDPEN] ist, wie anschließende Studien zur Racemisierung von 1-Phenylethanol zeigten, ein hochreaktiver Racemisierungskatalysator für sekundäre Alkohole, der schnelle Racemisierung unter milden Reaktionsbedingungen ermöglicht. In weiteren Arbeiten wurde gezeigt, daß sich die

Racemisierungsgeschwindigkeit mit steigender Menge an Ketonäquivalent erhöht, doch sind bereits 10 mol% an Redoxäquivalent für schnelle Racemisierung ausreichend. Dieser Katalysator konnte erfolgreich in einer dynamischen kinetischen Racematspaltung von 1-Phenylethanol eingesetzt werden. Als geeigneter enzymatischer Schritt wurde die enantioselektive Acylierung mit 4-Chlorphenylacetat und Novozym 435 ausgewählt. Der beobachtete Reaktivitätsverlust des Racemisierungskatalysators bei Gegenwart von Enzym und Acylierungsmittel führten zu einer erzwungenen Reaktionsführung bei erhöhter Temperatur. Damit kommt die herausragende Eigenschaft des Katalysators schnelle Racemisierung bei niedrigen Temperaturen wie 25 oder 40°C zu vermitteln vorerst nicht zum Tragen.



In weiteren Untersuchungen wurden Parameter wie Katalysatormenge, Reaktionstemperatur und Reaktionszeit optimiert. Das beste Ergebnis konnte mit einem Umsatz von durchschnittlich 84 % bei 97 % optischer Reinheit an 1-Phenylethylacetat bei 80 °C nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden erzielt werden.

Erste Arbeiten zur Übertragung der DKR auf andere Substrate wie substituierte 1-Phenylethanole, 1-Indanol und 2-Octanol zeigten, daß unter kombinierten Reaktionsbedingungen der Racemisierungskatalysator nicht aktiv war.

10 Experimenteller Teil

10.1 Allgemeine Arbeitstechnik und Charakterisierung

Allgemeines

Alle durchgeführten klassischen bzw. dynamisch kinetischen Racematspaltungen, die Hydroxid- oder Hydronium-ionen während der Reaktion verbrauchen, wurden mit einem Autotitratoren der Fa. Schott (Titrolinie alpha) auf konstantem pH-Wert gehalten. Soweit nicht anders angegeben, ist auf eine Reaktionsführung unter Inertgasbedingungen verzichtet worden. Umsetzungen mit immobilisierten Enzymen wurden mit einem thermostatisierbaren Schüttelgerät der Fa. Eppendorf durchmischt.

Inertgastechnik

Soweit notwendig (in der entsprechenden Vorschrift erwähnt) wurden die chemischen Umsetzungen unter sorgfältigem Ausschluß von Luft und Feuchtigkeit in ausgeheizten, standardisierten Glasapparaturen (Schlenkrohrtechnik) durchgeführt. Als Schutzgas wurde Schweißargon der Reinheit 5.0 verwendet, das über ein Reduzierventil und einen Feindruckminderer auf etwa 200 mbar Überdruck eingestellt wurde. Geschlossene Glasapparaturen waren durch Ölüberdruckventile gesichert.

Zum Trocknen von Kolben und Substanzen im Vakuum wurde mit einer Anlage gearbeitet, die über zwei mit flüssigem Stickstoff gefüllte Kühlfallen an eine zweistufige Öldrehschieberpumpe ($p < 10^{-2}$ mbar) angeschlossen war. Das Einengen von Lösungen erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, im Vakuum an einer Membranpumpe ($p > 20$ mbar).

Lösungsmittel

Die für die Racematspaltungen von sekundären Alkoholen verwendeten, absoluten Lösungsmittel wurden von der Fa. Fluka bezogen und unter Argon gelagert. Die Lösungsmittel THF, Diethylether, Benzol, Toluol und *n*-Hexan wurden über Natriumdraht einen Tag in einer Umlaufapparatur refluxiert und nach der Destillation unter Argon zusammen mit Molekularsieb (4 Å) aufbewahrt. Acetonitril wurde analog mit CaH_2 absolutiert. Die für die NMR-Spektroskopie verwendeten deuterierten Lösungsmittel (C_6D_6 , CDCl_3 , CD_3OD , CD_3CN) wurden einen Tag über CaH_2 bei Raumtemperatur gerührt, umkondensiert und unter Argon gelagert. Die deuterierten Lösungsmittel DMSO- d_6 und D_2O wurden ohne weitere Reinigungsschritte eingesetzt.

Säulen- und Dünnschichtchromatographie

Für die säulenchromatographische Reinigung von Reaktionsprodukten wurden technische Lösungsmittel verwendet, die vor Gebrauch einmal destilliert wurden. Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 (63 – 200 μm) der Fa. Merck verwendet. Für die dünnschichtchromatographische Identifizierung / Charakterisierung (R_F -Wert) der Verbindungen wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete DC-Platten der Fa. Merck benutzt. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption oder mit Hilfe geeigneter Färbereagentien wie Ninhydrin, KMnO_4 oder Vanillin.

Gaschromatographie

Zur *qualitativen* Analyse (GC-MS) der Reaktionsprodukte wurde ein Gaschromatograph GC HP 5890 der Fa. Hewlett Packard, der mit einem Massenspektrometer Engine der Fa. Hewlett Packard gekoppelt war, verwendet. Die Trennung erfolgte auf einer Kapillarsäule vom Typ HP-5.

Quantitative und *qualitative* Analysen flüssiger Reaktionsmischungen wurden mittels eines HP 6890 Gaschromatographen (Fa. Hewlett Packard) mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) durchgeführt. Zur Trennung wurde eine Kapillarsäule des Typs HP 5, HP 1, bzw. Carbowax eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe interner Standards wie Diethylglykoldi-*n*-butylether, 1,2-Dichlorbenzol oder Hexadecan.

Flüssigkeitschromatographie

Die Methoden, die zur *quantitativen* Enantiomerenanalytik eingesetzt wurden, sind bei den jeweiligen Verbindungen genau beschrieben.

Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektren wurden auf einem Gerät vom Typ Bruker ARX 400 aufgenommen. Die Meßfrequenzen für die Kerne betragen für ^1H 400.13 MHz, für ^{13}C 100.63 MHz und für ^{31}P 161.98 MHz. Die ^{13}C - bzw. ^{31}P -NMR-Spektren waren routinemäßig protonenbreitbandenkoppelt.

Für die NMR-Messungen wurden hochreine deuterierte Lösungsmittel der Fa. Deutero GmbH verwendet. Die Angabe der chemischen Verschiebung erfolgt nach der δ -Konvention in ppm relativ zum Restsignal des deuterierten Lösungsmittel als internem Standard. Im Falle von ^{31}P -NMR-Spektren diente 85 %-ige Phosphorsäure als externer Standard. Relativ zum Standard tieffeldverschobene Signale tragen ein positives Vorzeichen. In Klammern sind die

Signalmultiplizität, die Kopplungskonstanten (in Hertz) ohne Angabe des Vorzeichens, das Integral und die Zuordnung angegeben. Die in der graphischen Darstellung der jeweiligen Verbindung verwendete Numerierung bezieht sich nur auf die Signalzuordnung und nicht auf die korrekte Nomenklatur nach IUPAC.

Infrarotspektroskopie

Zur Aufnahme der Infrarotspektren wurden Verreibungen der jeweiligen Verbindung mit Kaliumbromid hergestellt und Differenzspektren erstellt. Die Messungen wurden an einem Nicolet Magna 550-Spektrometer durchgeführt. Die Lage der Absorptionsbanden wird in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] angegeben.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden auf einem AMD 402/3-Spektrometer der Fa. AMD Intectra GmbH aufgenommen. Als Ionisationsmethoden wurden EI (Ionisation mit 70 eV) und CI (Reaktandgas: *i*-Butan) angewandt. Für FAB-Differenzspektren wurde die Substanz in eine Matrix aus *m*-Nitrobenzylalkohol eingebettet und mit Cäsium-Ionen beschossen.

Elementaranalytik

Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Labor der Technischen Universität München und am Institut für Organische Katalysforschung in Rostock durchgeführt.

Reagenzien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle eingesetzten Reagenzien von den Firmen Aldrich, Fluka, Merck, Strem und Nova Biochem bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Enzymscreening

Enzymscreeningreaktionen wurden im 1-2 mL Maßstab in einem rühr- und beheizbaren Thermomixer der Fa. Eppendorf (max. 24 Reaktionsgefäße) durchgeführt.

Verwendete Enzyme

Alle Enzyme wurden gemäß den Herstellerempfehlungen aufbewahrt.

Lipase von *Pseudomonas cepacia*, Aktivität: 40 U/mg, EC 3.1.1.3, Bezugsquelle: Fluka.

Lipase aus *Schweinepankreas*, Aktivität: 21 U/mg, EC 3.1.1.3, Bezugsquelle: Fluka.

Lipase aus *Rhizopus niveus*, Aktivität: 2.6 U/mg, EC 3.1.1.3, Bezugsquelle: Fluka

Lipase aus *Candida cylindracea*, Aktivität: 2.4 U/mg, EC 3.1.1.3, Bezugsquelle: Fluka.

Lipase aus *Aspergillus niger*, Aktivität: 1.0 U/mg, EC 3.1.1.3, Bezugsquelle: Fluka.

Lipase aus *Candida antarctica*, Aktivität: 3.2 U/mg, EC 3.1.1.3, Bezugsquelle: Fluka.

Lipase aus *Pseudomonas fluorescens*, Aktivität: 42.5 U/mg, EC 3.1.1.3, Bezugsquelle: Fluka.

Lipase aus *Rhizopus arrhizus*, Aktivität: 2.0 U/mg, EC 3.1.1.3, Bezugsquelle: Fluka.

Lipase aus *Mucor miehei*, Aktivität: 1.3 U/mg, EC 3.1.1.3, Bezugsquelle: Fluka.

Alcalase: Proteinase aus *Bacillus licheniformis*, Aktivität 600 U/mL, EC 3.4.21.62, Bezugsquelle: Novo Nordisk, Dänemark.

NOVOZYM 435, Lipase immobilisiert aus *Candida antarctica*, EC 3.1.1.3, Bezugsquelle: Novo Nordisk, Dänemark. Dieses Enzym wurde vorab 24 Stunden am Hochvakuum bei RT getrocknet und unter Argon gelagert.

α -Chymotrypsin aus *bovine pancreas*, Aktivität: 50 U/mg, EC 3.4.21.1, Bezugsquelle: Fluka.

Penicillin Amidase aus *E. coli*, Aktivität: 8-16 U/mg, EC 3.5.1.11, Bezugsquelle: Fluka.

Penicillin Amidase aus *E. coli*, immobilisiert auf Eupergit C, Aktivität 100 U/g, EC 3.5.1.11, Bezugsquelle: Fluka.

10.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

10.2.1 Arbeitsvorschriften zum Themengebiet: DKR von Aminosäureestern

10.2.1.1 Darstellung von racemischen und optisch aktiven Aminosäurealkylesterhydrochloriden (AAV 1).

200 mmol Aminosäure werden in 750 mL des entsprechenden Alkohols suspendiert, anschließend wird bei RT eine Lösung aus 220 mmol Thionylchlorid in 100 mL Toluol innerhalb 15 Minuten zugegeben. Die entstandene Lösung wird 30 Minuten ohne Wärmezufuhr gerührt, im Anschluß mindestens 8 Stunden zum Rückfluß erhitzt. Nach Umsatzstillstand (Kontrolle mittels DC) läßt man die Lösung erkalten, entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und kristallisiert das Rohprodukt in einer Mischung aus Ethylacetat und des entsprechenden Alkohols um. Eventuell ist es nötig, die Produkte durch Animpfen in kristalliner Form zu gewinnen. Die Ausbeuten liegen zwischen 80 und 100 %.

10.2.1.2 Darstellung von racemischen und optisch aktiven Aminosäureestertosylaten (AAV 2).

200 mmol Aminosäure, 200 mmol *p*-Toluolsulfonsäuremonohydrat und 500 mmol des entsprechenden Alkohols werden mit 750 mL Toluol versetzt und an einer Wasserabscheiderapparatur (Ausführung für Flüssigkeiten, die leichter als Wasser sind) für mindestens 12 Stunden zum Rückfluß erhitzt. Hat sich das theoretisch berechnete Volumen an Wasser (400 mmol = 7.2 mL) abgeschieden (auch Umsatzkontrolle via DC), wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird in einer Mischung aus Hexan/Dibutylether oder *Tert.*-butyl-methylether mit einer geringen Menge des entsprechenden Alkohols umkristallisiert.

Die Ausbeuten liegen zwischen 40 und 100 %.

10.2.1.3 Überführung von Aminosäureestertosylaten in die korrespondierenden Hydrochloridverbindungen (AAV 3).

200 mmol Aminosäureestertosylat wird in 500 mL Wasser suspendiert, der pH-Wert der Emulsion wird mittels 1N NaOH auf 8.5 eingestellt. Anschließend wird mindestens 3 mal mit 200 mL Diethylether extrahiert, der pH-Wert der wäßrigen Phase wird mehrmals kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen wird in diese Lösung 15 Minuten lang HCl-Gas eingeleitet, worauf das Hydrochlorid ausfällt bzw. ausölt und isoliert werden kann. Die Ausbeuten an Hydrochlorid liegen zwischen 60 und 90 %.

10.2.1.4 Überführung von Aminosäuren und Carbonsäurederivaten in die entsprechenden Methylester im analytischen Maßstab zur Enantiomerenbestimmung (AAV 4).

5.0-10.0 mg der Aminosäure wird in einem gut funktionierenden Abzug auf einem Uhrglas in etwa 3 mL Methanol gelöst, anschließend werden 200-300 µL Trimethylsilyldiazomethanlösung (ca. 1 molare Lösung in Hexan, Bezugsquelle Fluka) zupipettiert. Die Menge des zugegebenen Methylierungsreagenzes sollte so gewählt werden, daß die Lösung mindestens 30 Sekunden eine deutlich gelbe Farbe aufweist. Nach gründlicher Durchmischung der Lösung läßt man bis zur Trockene eindampfen und nimmt anschließend den Rückstand in 1.0-2.0 mL Methanol auf.

10.2.1.5 Überführung von Aminosäureestern in die entsprechenden Methylester im analytischen Maßstab zur Enantiomerenbestimmung (AAV 5).

In einem Schlenkgefäß werden ca. 20 mL Methanol unter starkem Rühren solange tropfenweise mit Acetylchlorid versetzt bis die Lösung zu sieden beginnt (Achtung, stark exotherme Reaktion !). 5.0-10.0 mg des Aminosäureesters werden nun mit 1.0 mL der noch heißen Lösung in einem druckbeständigem Schraubglas (Volumen 1.5 mL, Fa. Weaton) versetzt und gut verschlossen mindestens 1 Stunde bei 110 °C im Trockenschrank temperiert (Achtung, erheblicher Überdruck im Reaktionsgefäß !). Nach zehnminütiger Abkühlphase wird das Schraubglas vorsichtig geöffnet und die Lösung im Gefäß selbst am Stickstoff- bzw. Argonstrom bis zur Trockene eingeeengt. Der Veresterungsprozeß wird einmal wiederholt, anschließend wird das Methylesterderivat in 1.0 mL Methanol aufgenommen.

10.2.1.6 *N*-Funktionalisierung von Aminosäuremethylestern im analytischen Maßstab zur Enantiomerenbestimmung (AAV 6).

Die Derivatisierung der Aminogruppe wird üblicherweise im Anschluß an evtl. notwendige Veresterungsreaktionen ausgeführt, daher kann dieser Schritt direkt im vorher benutzen Schraubgefäß vollzogen werden. Da diese Derivate sehr leicht zersetzlich sind, erfolgte die Enantiomerenanalytik möglichst unverzüglich nach der Derivatisierung.

N-Perfluorpropionyl- und *N*-Trifluoracetyl-derivate:

5.0-10.0 mg der Aminosäureesterverbindung werden unter dem Abzug sehr vorsichtig mit 200 µL des entsprechenden Säureanhydrids versetzt (Achtung, möglicherweise stark exotherme Reaktion) und kräftig geschüttelt. Das überschüssige Säureanhydrid wird im Stickstoff- bzw. Argonstrom entfernt. Anschließend löst man den öligen Rückstand mit 1.0 mL Methanol (Vorsicht, evtl. exotherme Reaktion durch restliches Säureanhydrid möglich).

N-Acetylderivate:

Etwa 10 mg des Aminosäuremethylesters werden in 2.0 mL MeOH gelöst und auf ein Uhrglas pipettiert. Nach dem Eindunsten unter dem Abzug nimmt man in 4 mL CH₂Cl₂ auf, gibt 400 µL Essigsäureanhydrid, dann 400 µL NEt₃ zu, deckt mit einem Uhrglas ab, und wartet 5 Stunden. Dann entfernt man das Uhrglas und läßt die Lösung über Nacht eindampfen.

Anschließend wird die Probe in Methanol aufgenommen und mit entsprechender GC-Methoden die Enantiomerenzusammensetzung bestimmt.

10.2.1.7 Durchführung von dynamisch kinetischen Racematspaltungen von Aminosäureestern in wasserarmen Acetonitrillösungen unter pH-stationären Bedingungen (AAV 7).

20 mmol Aminosäureesterhydrochlorid werden in einem 100 mL Meßzylinder unter intensiven Rühren in 50 mL Acetonitril/Wasser (4/1) gelöst und der pH-Wert der Lösung mit einem pH-Meter und 1N Natronlauge auf ca. 7.0 eingestellt. Während der Neutralisation kommt es zur Phasenseparation, die Wasserphase wird verworfen. Die organische Phase wird in einen 100 mL Mehrhalskolben überführt und die entsprechende Menge an Aldehydverbindung (2.5-10 mol%) zugesetzt. Die Reaktion wird mit Hilfe eines Ölbad auf die gewünschte Reaktionstemperatur gebracht (die Temperaturkontrolle erfolgt über ein in die Reaktionslösung tauchendes Kontaktthermometer) und an den Autotitrator angeschlossen.

Der Autotitrator (Titrationslösung: 2N NaOH, Programm: permanente pH-stationäre Titration, Reaktionstendenz: sinkender pH-Wert, maximale Dosiermenge: 50 µL/min) wird aktiviert und dient zur genauen Einstellung des gewählten pH-Wertes der Racematspaltung. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1.0 mL Alcalase gestartet (bei Reaktionen mit Tyrosinderivaten werden 200 µL Alcalase verwendet).

10.2.1.8 Durchführung von dynamischen kinetischen Racematspaltungen von Aminosäureestern in wäßrigen Acetonitrillösungen unter pH-stationären Bedingungen (AAV 8).

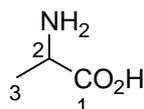
20 mmol Aminosäureesterhydrochlorid werden in 50 mL Wasser gelöst, der pH-Wert der Lösung wird mit 1N NaOH auf pH 8.0 eingestellt. Nach dreimaliger Extraktion mit 20 mL Methylenchlorid werden die vereinigten organischen Phasen mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 50 mL Acetonitril aufgenommen und mit 50 mL Wasser versetzt. Die weitere Verfahrensweise erfolgt analog Abschnitt 10.2.1.7.

10.2.2 Enzymatisch dargestellte Verbindungen

Alanin

3.07 g (20.0 mmol) DL-Alaninethylesterhydrochlorid wurden nach AAV 8 bei RT mit 106.1 mg (0.50 mmol) 3,5-Dinitrosalicylaldehyd und 1.0 mL Alcalase bei pH 7.5 umgesetzt (3 Tage Reaktionszeit).

Ausbeute: 93 % ee-Wert: 90 %



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 297 K):

$\delta = 1.01$ (d, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, H-3) ; 3.65 (pss, br, 1H, H-2).

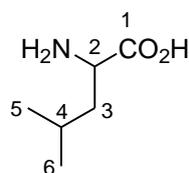
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 297 K):

$\delta = 14.5$ (C-3) ; 50.3 (C-2) ; 173.3 (C-1).

Leucin

3.91 g (20.0 mmol) DL-Leucinethylesterhydrochlorid wurden nach AAV 8 bei RT mit 106.1 mg (0.50 mmol) 3,5-Dinitrosalicylaldehyd und 1.0 mL Alcalase bei pH 7.5 umgesetzt (3 Tage Reaktionszeit).

Ausbeute: 99 % ee-Wert: 98 %



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 297 K):

$\delta = 1.02$ (t, 6H, $^3J(\text{H,H}) = 5.6$ Hz, H-5, H-6) ; 1.86 (m, 2H, H-3) ; 1.99 (m, 1H, H-4) ; 4.34 (m, 1H, H-2).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 297 K):

$\delta = 19.7$ (C-5) ; 20.3 (C-6) ; 24.2 (C-4) ; 38.9 (C-3) ; 52.7 (C-2) ; 173.7 (C-1).

Enantiomerenanalytik:

GC (25 m Chirasil-Val, Alltech, 90°C isotherm, 1.0 mL Argon/min):

Leucin als *N*-Perfluorpropionyl-*O*-methylesterderivat

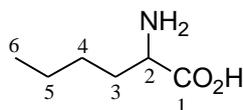
D-Enantiomer: 6.60 min

L-Enantiomer: 7.69 min

Norleucin

5.43 g (20.0 mmol) DL-Norleucinbenzylesterhydrochlorid wurden nach AAV 8 bei RT mit 191.0 mg (1.0 mmol) 3,5-Dichlorsalicylaldehyd und 1.0 mL Alcalase bei pH 8.5 umgesetzt (4 Tage Reaktionszeit).

Ausbeute: 20 % ee-Wert: 91 %



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 297 K):

$\delta = 0.95$ (t, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, H-6) ; 1.39-1.58 (m, 4H, H-5, H-4) ; 2.05-2.22 (m, 2H, H-3) ; 4.36 (pst, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 6.1$ Hz, H-2).

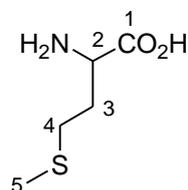
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 297 K):

$\delta = 14.3$ (C-6) ; 23.9 (C-5) ; 28.9 (C-4) ; 32.0 (C-3) ; 56.2 (C-2) ; 176.0 (C-1).

Methionin

4.27 g (20.0 mmol) DL-Methioninethylesterhydrochlorid wurden nach AAV 8 bei RT mit 106.1 mg (0.5 mmol) 3,5-Dinitrosalicylaldehyd und 1.0 mL Alcalase bei pH 7.5 umgesetzt (2 Tage Reaktionszeit).

Ausbeute: 96 % ee-Wert: 89 %



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 297 K):

$\delta = 2.24$ (s, 3H, H-5) ; 2.47 (m, 1H, H-3) ; 2.62 (m, 1H, H-3) ; 2.93 (t, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 6.4$ Hz, H-4) ; 4.65 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 4.7$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 7.4$ Hz, H-2) ; 8.02 (s, br, 2H, NH_2).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 297 K):

$\delta = 13.0$ (C-5) ; 27.1 (C-4) ; 29.1 (C-3) ; 53.9 (C-2) ; 172.9 (C-1).

Enantiomerenanalytik:

GC (25 m Chirasil-Val, Alltech, 120°C isotherm, 1.0 mL Argon/min):

Methionin als *N*-Perfluorpropionyl-*O*-methylesterderivat

D-Enantiomer: 7.57 min

L-Enantiomer: 8.06 min

oder GC (25 m XE-60, L-Valin-tert.-butylamid, 105°C isotherm, 1.0 mL Argon/min):

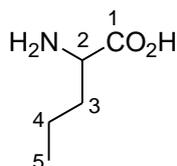
D-Enantiomer: 6.50 min

L-Enantiomer: 7.30 min

Norvalin

3.63 g (20.0 mmol) DL-Norvalinethylesterhydrochlorid wurden nach AAV 8 bei RT mit 106.1 mg (0.5 mmol) 3,5-Dinitrosalicylaldehyd und 1.0 mL Alcalase bei pH 7.5 umgesetzt (4 Tage Reaktionszeit).

Ausbeute: 98 % ee-Wert: 64 %



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 297 K):

$\delta = 1.02$ (t, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.4$ Hz, H-5) ; 1.54 (m, 2H, H-4) ; 2.09 (m, 2H, H-3) ; 4.34 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.9$ Hz, H-2) ; 7.34 (s, br, 2H, NH_2).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 297 K):

$\delta = 13.5$ (C-5) ; 19.7 (C-4) ; 33.8 (C-3) ; 56.3 (C-2) ; 175.6 (C-1).

Enantiomerenanalytik:

GC (25 m Chirasil-Val, Alltech, 90°C isotherm, 1.0 mL Argon/min):

Norvalin als *N*-Perfluorpropionyl-*O*-methylesterderivat

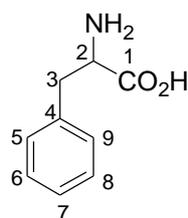
D-Enantiomer: 4.78 min

L-Enantiomer: 5.25 min

Phenylalanin

4.59 g (20.0 mmol) DL-Phenylalaninethylesterhydrochlorid wurden nach AAV 8 bei RT mit 106.1 mg (0.5 mmol) 3,5-Dinitrosalicylaldehyd und 1.0 mL Alcalase bei pH 7.5 umgesetzt (2 Tage Reaktionszeit).

Ausbeute: 93 % ee-Wert: 99 %



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 297 K):

$\delta = 3.58$ (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 8.7$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 15.0$ Hz, H-3) ; 3.86 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 4.7$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 15.0$ Hz, H-3) ; 4.88 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 4.7$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.7$ Hz, H-2) ; 7.5 - 7.7 (m, 5H, H-5-H-9).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 297 K):

$\delta = 37.3$ (C-3) ; 57.3 (C-2) ; 130.8 (C-7) ; 130.9 (C-5, C-9) ; 131.7 (C-6, C-8) ; 133.3 (C-4) ; 174.5 (C-1).

MS (CI, Isobutan): m/z : 166 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 147 ; 136 ; 120 ; 103 ; 91 ; 73 ; 60.

Enantiomerenanalytik:

GC (25 m Chirasil-Val, Alltech, 120°C isotherm, 1.0 mL Argon/min):

Phenylalanin als *N*-Perfluorpropionyl-*O*-methylesterderivat

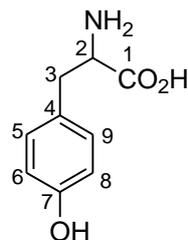
D-Enantiomer: 11.03 min

L-Enantiomer: 11.56 min

Tyrosin

4.91 g (20.0 mmol) DL-Tyrosinethylesterhydrochlorid wurden nach AAV 8 bei RT mit 106.1 mg (0.5 mmol) 3,5-Dinitrosalicylaldehyd und 0.2 mL Alcalase bei pH 7.5 umgesetzt (1 Tag Reaktionszeit).

Ausbeute: 87 % ee-Wert: 97 %



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 297 K):

$\delta = 3.51$ (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 8.7$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 15.1$ Hz, H-3) ; 3.72 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 4.8$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 15.1$ Hz, H-3) ; 4.84 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 4.8$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.5$ Hz, H-2) ; 7.22 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.5$ Hz, H-5, H-9) ; 7.45 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.5$ Hz, H-6, H-8).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 297 K):

$\delta = 34.5$ (C-3) ; 55.1 (C-2) ; 116.6 (C-6, C-8) ; 125.1 (C-5, C-9) ; 130.6 (C-4) ; 154.2 (C-7) ; 172.5 (C-1).

Enantiomerenanalytik:

GC (25 m Chirasil-Val, Alltech, 130°C isotherm, 1.0 mL Argon/min):

Tyrosin als *N*-Perfluorpropionyl-*O*-methylesterderivat

D-Enantiomer: 18.04 min

L-Enantiomer: 19.08 min

10.2.3 Andere Verbindungen

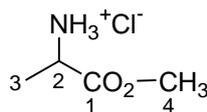
Alaninmethylesterhydrochlorid

Enantiomerenreine Verbindungen wurden wie das Racemat gemäß AAV 1 dargestellt.

Eingesetzte Mengen: 17.81 g (200 mmol) Alanin, 26.17 g (220 mmol) SOCl_2 , 750 mL MeOH

D,L-Alaninmethylesterhydrochlorid:

Ausbeute: 87 % ; Smpkt.: 105 °C (Lit: 105 °C).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, Methanol- d_4 , 297 K):

$\delta = 1.85$ (d, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.2$ Hz, H-3) ; 4.14 (s, 3H, H-4) ; 4.43 (q, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.2$ Hz, H-2) ; 5.15 (s, 3H, NH_3).

MS (EI, 70 eV): m/z : 139 ($[M-Cl]^+$); 125; 123; 111; 104; 88; 59; 44; 36; 32.

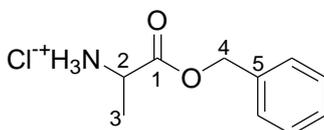
Alaninbenzylesterhydrochlorid

Die Darstellung des Racemates erfolgte nach AAV 2 und 3, die L-Verbindung wurde käuflich erworben.

Eingesetzte Mengen: 17.81 g (200 mmol) DL-Alanin, 41.85 g (220 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurehydrat, 54.1 g (500 mmol) Benzylalkohol

D,L-Alaninbenzylesterhydrochlorid:

Gesamtausbeute: 75 % ; Smpkt.: 99 °C (Lit: 100-102 °C).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

δ = 1.44 (d, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.2$ Hz, H-3) ; 4.08 (q, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.2$ Hz, H-2) ; 5.19 (dd, 2H, $^2J(\text{H,H}) = 15.5$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 12.6$ Hz, H-4) ; 7.30-7.40 (m, 5H, H-arom.) ; 8.83 (s, br, 3H, NH_3).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

δ = 16.0 (C-3) ; 48.2 (C-2) ; 67.2 (C-4) ; 128.3, 128.8 (C-arom.) ; 135.6 (C-5) ; 170.2 (C-1).

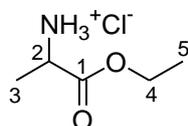
Alaninethylesterhydrochlorid

Die Darstellung des Racemates erfolgte nach AAV 1, die L-Verbindung wurde käuflich erworben.

Eingesetzte Mengen: 17.81 g (200 mmol) D,L-Alanin, 26.17 g (220 mmol) SOCl_2 , 750 mL EtOH

D,L-Alaninethylesterhydrochlorid:

Ausbeute: 91 % ; Smpkt.: 89 °C (Lit: 87-88 °C).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

$\delta = 1.18$ (t, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, H-5) ; 1.39 (d, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, H-3) ; 3.95 (q, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, H-2) ; 4.14 (q, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, H-4) ; 8.75 (s, 3H, NH_3).

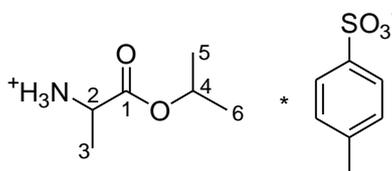
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

$\delta = 14.3$ (C-5) ; 16.0 (C-3) ; 48.1 (C-2) ; 61.9 (C-4) ; 170.2 (C-1).

Alaninisopropylestertosylat

Die Darstellung des Racemates und der L-Verbindung wurde nach AAV 2 durchgeführt.

Eingesetzte Mengen: 17.81 g (200 mmol) Alanin, 41.85 g (220 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurehydrat, 30.0 g (500 mmol) 2-Propanol



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

$\delta = 1.41$ (2d, 6H, $^3J(\text{H,H}) = 3.2$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 6.2$ Hz, H-5, H-6) ; 1.55 (d, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, H-3) ; 2.48 (s, 3H, CH_3 -tosyl) ; 4.22 (m, 1H, H-2) ; 5.17 (hept., 1H, $^3J(\text{H,H}) = 6.2$ Hz, H-4) ; 7.30 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 7.7$ Hz, CH-tosyl) ; 7.67 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 7.7$ Hz, CH-tosyl) ; 8.47 (s, br, 3H, NH_3).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

$\delta = 16.0$ (C-5, C-6) ; 21.1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -tosyl) ; 21.7 (C-3) ; 48.3 (C-2) ; 70.0 (C-4) ; 125.8 (CH-tosyl) ; 128.5 (CH-tosyl) ; 138.2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -tosyl) ; 145.7 (C-tosyl) ; 169.9 (C-1).

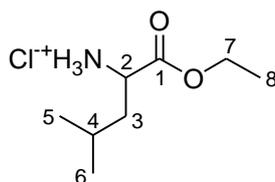
Leucinethylesterhydrochlorid

Das Racemat wurde gemäß AAV 1 dargestellt.

Eingesetzte Mengen: 26.22 g (200 mmol) D,L-Leucin, 26.17 g (220 mmol) SOCl_2 , 750 mL EtOH

D,L-Leucinethylesterhydrochlorid:

Ausbeute: 63 % ; Smpkt.: 147°C (Lit: 145°C).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, DMSO-d_6 , 297 K):

$\delta = 1.07$ (d, 6H, $^3J(\text{H,H}) = 6.5$ Hz, H-5, H-6) ; 1.41 (t, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, H-8) ; 1.83 (m, 2H, H-3) ; 1.95 (hept., 1H, $^3J(\text{H,H}) = 6.5$ Hz, H-4) ; 4.05 (t, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, H-2) ; 4.37 (q, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, H-7) ; 8.87 (s, br, 3H, NH_3).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, DMSO-d_6 , 297 K):

$\delta = 14.3$ (C-8) ; $22.3, 22.4$ (C-5, C-6) ; 24.1 (C-4) ; 39.6 (C-3) ; 50.8 (C-2) ; 62.0 (C-7) ; 170.1 (C-1).

Methioninmethylesterhydrochlorid

Das Racemat und die L-Verbindung wurden gemäß AAV 1 dargestellt.

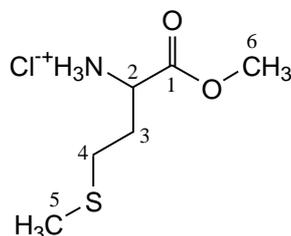
Eingesetzte Mengen: 29.81 g (200 mmol) Methionin, 26.17 g (220 mmol) SOCl_2 , 750 mL MeOH

D,L-Methioninmethylesterhydrochlorid:

Ausbeute: 78 % ; Smpkt.: 84°C (Lit: $81\text{-}82^\circ\text{C}$).

L-Methioninmethylesterhydrochlorid:

Ausbeute: 82 % ; Smpkt.: 149°C (Lit: $151\text{-}153^\circ\text{C}$) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$: $+26.2^\circ$, $c=1$, H_2O) (Lit: $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 25.9^\circ$ ($c=1$, H_2O)).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, DMSO-d_6 , 297 K):

$\delta = 2.52$ (s, 3H, H-5) ; $2.47\text{-}2.55$ (m, 2H, H-3) ; 2.97 (t, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 6.7$ Hz, H-4) ; 4.18 (s, 3H, H-6) ; 4.52 (pst, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 6.0$ Hz, H-2) ; 9.22 (s, br, 3H, NH_3).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, DMSO-d_6 , 297 K):

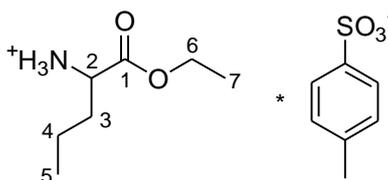
$\delta = 14.4$ (C-5) ; 28.5 (C-4) ; 29.5 (C-3) ; 51.0 (C-6) ; 53.0 (C-2) ; 169.8 (C-1).

Norvalinethylestertosylat

Das Racemat wurde nach AAV 2 dargestellt.

Eingesetzte Mengen: 23.43 g (200 mmol) DL-Norvalin, 41.85 g (220 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurehydrat, 23.0 g (500 mmol) EtOH

Ausbeute: 71 %.



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

δ = 0.78-0.88 (m, 6H, H-7, H-5) ; 1.26-1.43 (m, 2H, H-4) ; 1.72 (m, 2H, H-3) ; 2.27 (s, 3H, CH₃-tosyl) ; 3.85 (q, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 7.3$ Hz, H-6) ; 3.90 (m, 1H, H-2) ; 7.12 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 7.8$ Hz, CH-tosyl) ; 7.49 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 7.8$ Hz, CH-tosyl) ; 8.21 (s, br, 3H, NH₃).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

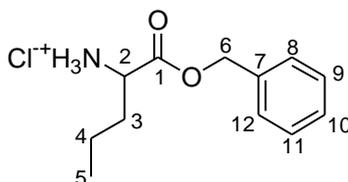
δ = 13.8 (C-5) ; 14.7 (C-7) ; 18.0 (C-4) ; 21.1 (CH₃-tosyl) ; 32.0 (C-3) ; 52.2 (C-2) ; 61.7 (C-6) ; 125.8 (CH-tosyl) ; 128.5 (CH-tosyl) ; 138.4 (C-tosyl) ; 145.3 (C-tosyl) ; 171.4 (C-1).

Norvalinbenzylesterhydrochlorid

Das Racemat wurde gemäß AAV 2 und AAV 3 dargestellt.

Eingesetzte Mengen: 23.43 g (200 mmol) DL-Norvalin, 41.85 g (220 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurehydrat, 54.1 g (500 mmol) Benzylalkohol

Ausbeute: 73 % ; Smpkt.: 127 °C (Lit: 124 °C).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

δ = 0.82 (t, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.4$ Hz, H-5) ; 1.17-1.45 (m, 2H, H-4) ; 1.78 (m, 2H, H-3) ; 3.99 (t, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 6.6$ Hz, H-2) ; 5.21 (2d, 2H, $^2J(\text{H,H}) = 12.4$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 14.8$ Hz, H-6) ; 7.34 (m, 5H, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12) ; 8.77 (s, br, 3H, NH₃).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

$\delta = 13.8$ (C-5) ; 17.9 (C-4) ; 32.4 (C-3) ; 52.1 (C-2) ; 67.3 (C-6) ; 128.5 - 128.8 (C-8, C-9, C-10, C-11, C-12) ; 135.6 (C-7) ; 169.8 (C-1).

Phenylalaninmethylesterhydrochlorid

Sowohl die racemische als auch die L-Verbindung wurden nach AAV 1 dargestellt.

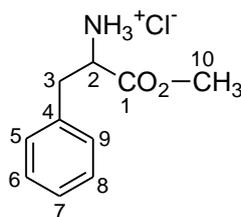
Eingesetzte Mengen: 33.16 g (200 mmol) Phenylalanin, 26.17 g (220 mmol) SOCl_2 , 750 mL MeOH

D,L-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid:

Ausbeute: 96 % ; Smpkt.: $113\text{ }^\circ\text{C}$.

L-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid:

Ausbeute: 94 % ; Smpkt.: $156\text{ }^\circ\text{C}$ (Lit: $159\text{ }^\circ\text{C}$) ; $[\alpha]_D^{22} = +32.4^\circ$, $c = 2$, EtOH) (Lit: $[\alpha]_D^{22} = +32.4^\circ$ ($c = 1$, EtOH)).



^1H -NMR (400.1 MHz, Aceton- d_6 , 297 K):

$\delta = 3.35$ - 3.49 (ddd, 2H, $^3J(\text{H},\text{H}) = 6.3\text{ Hz}$, $^3J(\text{H},\text{H}) = 7.3\text{ Hz}$, $^2J(\text{H},\text{H}) = 14.5\text{ Hz}$, H-3) ; 3.99 (s, 3H, H-10) ; 4.52 (dd, 1H, $^3J(\text{H},\text{H}) = 6.3\text{ Hz}$, $^3J(\text{H},\text{H}) = 7.3\text{ Hz}$, H-2) ; 5.03 (s, br, 3H, NH_3) ; 7.45 - 7.59 (m, 5H, H-5-H-9).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, Aceton- d_6 , 297 K):

$\delta = 37.8$ (C-3) ; 54.1 (C-10) ; 55.7 (C-2) ; 129.4 (C-7) ; 130.6 (C-5, C-9) ; 130.9 (C-6, C-8) ; 135.8 (C-4) ; 170.9 (C-1).

MS (CI, Isobutan): m/z : 180 ($[\text{M}-\text{Cl}]^+\bullet$) ; 143 ; 120 ; 88 ; 65.

Tyrosinbenzylesterhydrochlorid

Das Racemat sowie die L-Verbindung wurden gemäß AAV 1 dargestellt.

Eingesetzte Mengen: 36.24 g (200 mmol) Tyrosin, 26.17 g (220 mmol) SOCl_2 , 750 mL Benzylalkohol

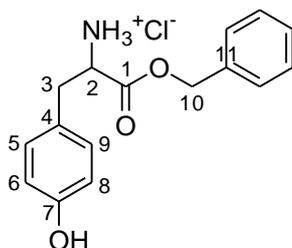
D,L-Tyrosinbenzylesterhydrochlorid:

Ausbeute: 76 % ; Smpkt.: 177 °C (Lit: 174-176 °C).

L-Tyrosinbenzylesterhydrochlorid:

Ausbeute: 80 % ; Smpkt.: 185 °C (Lit: 189-191 °C) ; $[\alpha]_D^{22} = -23.3^\circ$, $c = 1$, 1N HCl) (Lit:

$[\alpha]_D^{22} = -23.4^\circ$ ($c = 1$, 1N HCl).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

$\delta = 3.12$ (dd, 1H, $^2J(\text{H,H}) = 14.1$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 7.5$ Hz, H-3) ; 3.25 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.7$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 14.1$ Hz, H-3) ; 4.35 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.7$ Hz, H-2) ; 5.28 (s, 2H, H-10) ; 6.82 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.3$ Hz, H-5, H-9) ; 7.09 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.3$ Hz, H-6, H-8) ; 7.40 - 7.51 (m, 5H, H-12-H-16) ; 8.83 (s, 3H, NH_3) ; 9.63 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

$\delta = 35.5$ (C-3) ; 53.8 (C-2) ; 67.3 (C-10) ; 115.2 (C-6, C-8) ; 124.6 (C-14) ; 128.7 (C-5, C-9, C-13, C-15) ; 130.8 (C-12, C-16) ; 135.2 (C-11) ; 157.0 (C-7) ; 169.3 (C-1).

Tyrosinethylesterhydrochlorid

Das Racemat sowie die L-Verbindung wurden gemäß AAV 1 dargestellt.

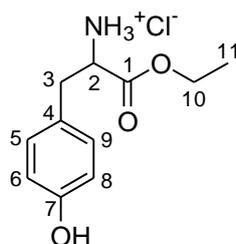
Eingesetzte Mengen: 36.24 g (200 mmol) Tyrosin, 26.17 g (220 mmol) SOCl_2 , 750 mL EtOH

D,L-Tyrosinethylesterhydrochlorid:

Ausbeute: 95 % ; Smpkt.: 121 °C.

L-Tyrosinethylesterhydrochlorid:

Ausbeute: 97 % ; Smpkt.: 164 °C (Lit: 166 °C) ; $[\alpha]_D^{22} = -6.5^\circ$, $c = 2$, H_2O) (Lit: $[\alpha]_D^{22} = -6.5^\circ$ ($c = 1$, H_2O)).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

$\delta = 1.11$ (t, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, H-11) ; 2.94 (dd, 1H, $^2J(\text{H,H}) = 14.1$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 7.4$ Hz, H-3) ; 3.06 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.7$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 14.1$ Hz, H-3) ; 4.07 - 4.13 (m, 3H, H-2, H-10) ; 6.70 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.5$ Hz, (H-6, H-8) ; 7.00 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.4$ Hz, H-5, H-9) ; 8.58 (s, br, 3H, NH_3) ; 9.45 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

$\delta = 14.0$ (C-11) ; 35.4 (C-3) ; 53.5 (C-2) ; 61.8 (C-10) ; 115.6 (C-6, C-8) ; 130.6 (C-5, C-9) ; 135.5 (C-4) ; 156.9 (C-7) ; 169.2 (C-1).

Valinbenzylestertosylat

Das Racemat sowie die L-Verbindung wurden gemäß AAV 2 dargestellt.

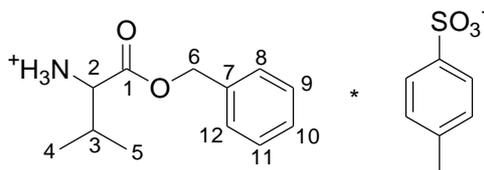
Eingesetzte Mengen: 23.43 g (200 mmol) Valin, 41.85 g (220 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurehydrat, 54.0 g (500 mmol) Benzylalkohol

D,L-Valinbenzylestertosylat:

Ausbeute: 74 % ; Smpkt.: 130 °C (Lit: 134-138 °C).

L-Valinbenzylestertosylat:

Ausbeute: 74 % ; Smpkt.: 157 °C (Lit: 158 °C) ; $[\alpha]_D^{22} = -3.6^\circ$, $c = 2$, MeOH) (Lit: $[\alpha]_D^{22} = -3.6^\circ$ ($c = 2$, MeOH)).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

$\delta = 0.91$ (2d, 6H, $^3J(\text{H,H}) = 12.2$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 12.2$ Hz, H-4, H-5) ; 2.15 (dq, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 12.2$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 4.6$ Hz, H-3) ; 2.28 (s, 3H, CH_3 -tosyl) ; 3.95 (d, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 4.6$ Hz, H-2) ; 5.23 (2d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 12.2$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 19.5$ Hz, H-6) ; 7.11 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 7.8$ Hz,

CH-tosyl) ; 7.33-7.38 (m, 5H, H-8-H-12) ; 7.50 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 7.8$ Hz, CH-tosyl) ; 8.37 (s, br, 3H, NH_3).

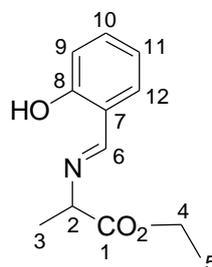
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, DMSO-d_6 , 297 K):

$\delta = 17.8, 18.5$ (C-4, C-5) ; 21.1 (CH_3 -tosyl) ; 29.2 (C-3) ; 57.6 (C-2) ; 67.5 (C-6) ; 125.9 (CH-tosyl) ; 128.5-128.9 (C-8, C-9, C-10, C-11, C12) ; 135.4 (C-7) ; 138.3 (CH-tosyl) ; 145.6 (C-tosyl) ; 169.1 (C-1).

N-(2-Hydroxybenzyliden)-alaninethylester

2.0 mmol (244.24 mg = 213 μL) Salicylaldehyd, 2.0 mmol (307.2 mg) D,L-Alaninethylesterhydrochlorid und 1.0 g Na_2CO_3 werden in einem Schlenkgefäß mit 25 mL THF und 5.0 mL Wasser versetzt und 1 Stunde bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt und 30 mL CH_2Cl_2 und 10 mL Wasser zugegeben und 2 Tage bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels verbleibt ein gelbes Öl.

Ausbeute: 90 % ; $M = 221.25$ g/mol.



^1H -NMR (400.1 MHz, DMSO-d_6 , 297 K):

$\delta = 1.19$ (t, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, H-5) ; 1.43 (d, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, H-3) ; 4.13 (q, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, H-4) ; 4.30 (q, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, H-2) ; 6.90 (m, 2H, H-10, H-12) ; 7.35 (dt, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.8$ Hz, $^4J(\text{H,H}) = 1.5$ Hz, H-11) ; 7.45 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.5$ Hz, $^4J(\text{H,H}) = 1.5$ Hz, H-9) ; 8.61 (s, 1H, H-6) ; 13.17 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 297 K):

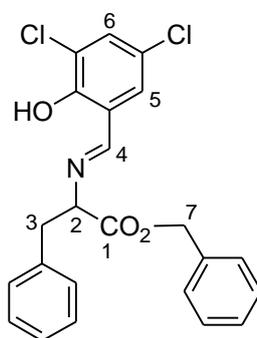
$\delta = 13.1$ (C-5) ; 18.5 (C-3) ; 60.3 (C-2) ; 65.1 (C-4) ; 116.1 (C-9) ; 118.2 (C-11) ; 130.7 (C-12) ; 132.2 (C-10) ; 160.0 (C-8) ; 165.0 (C-6) ; 170.8 (C-1).

MS (EI, 70 eV): m/z : 221 [$\text{M}^{+\bullet}$] ; 205 ; 148 ; 122 ; 77 ; 40.

***N*-(2-Hydroxy-3,5-dichlor-benzyliden)-phenylalaninbenzylester**

1.0 mmol (191.0 mg) 3,5-Dichlorsalicylaldehyd, 1.0 mmol (291.0 mg) D,L-Phenylalaninbenzylesterhydrochlorid und 1.0 g Na₂CO₃ werden in einem Schlenkgefäß mit je 20 mL CH₂Cl₂ und Wasser versetzt und 3 Tage bei RT gerührt. Anschließend wird die organische Phase abgetrennt, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel über Nacht am Vakuum entfernt. Es verbleibt ein orangefarbenes Pulver.

Ausbeute: 89 % ; M = 428.31 g/mol.



¹H-NMR (400.1 MHz, CDCl₃, 297 K):

δ = 3.03 (dd, 1H, ²J(H,H) = 13.6 Hz, ³J(H,H) = 9.2 Hz, H-3) ; 3.31 (dd, 1H, ²J(H,H) = 13.6 Hz, ³J(H,H) = 4.5 Hz, H-3) ; 4.15 (dd, 1H, ³J(H,H) = 4.5 Hz, ³J(H,H) = 9.2 Hz, H-2) ; 5.13 (m, 2H, H-7) ; 6.88 (d, 1H, ³J(H,H) = 2.5 Hz, H-6) ; 7.00-7.30 (m, 10 H, H-arom.) ; 7.32 (d, 1H, ⁴J(H,H) = 2.5 Hz, H-5) ; 7.74 (s, 1H, H-4) ; 13.75 (s, 1H, OH).

¹³C{¹H} NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 297 K): nur teilweise zuordbar

δ = 40.3 (C-3) ; 67.8 (C-7) ; 73.0 (C-2) ; 119.8 ; 123.1 ; 123.4 ; 127.6 ; 128.8 ; 129.0 ; 129.1 ; 129.7 ; 129.9 ; 133.0 ; 135.6 ; 136.5 ; 156.3 (C-4) ; 165.7 (C-OH) ; 170.4 (C-1).

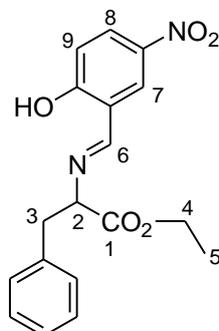
MS (EI, 70 eV): *m/z*: 429 [M+H⁺] ; 336 ; 292 ; 200 ; 91 ; 40.

***N*-(2-Hydroxy-5-nitro-benzyliden)-phenylalaninethylester**

1.0 mmol (167.1 mg) 5-Nitrosalicylaldehyd, 1.0 mmol (219.6 mg) D,L-Phenylalaninethylesterhydrochlorid und 200 mg Na₂CO₃ werden in einem Schlenkgefäß mit je 20 mL CH₂Cl₂ und Wasser versetzt und 2 Tage bei RT gerührt. Anschließend wird die organische Phase abgetrennt, mit MgSO₄ getrocknet und mit 3.0 g Molsieb versetzt. Nach weiteren 2

Tagen Reaktionszeit wird das Molsieb abfiltriert und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Es verbleibt ein orangefarbenes Pulver.

Ausbeute : 54 % ; M = 342.33 g/mol.



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, CDCl_3 , 297 K):

δ = 1.22 (t, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, H-5) ; 3.05 (dd, 1H, $^2J(\text{H,H}) = 13.6$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 9.0$ Hz, H-3) ; 3.33 (dd, $^2J(\text{H,H}) = 13.6$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 4.5$ Hz, H-3) ; 4.05-4.20 (m, 3H, H-2, H-4) ; 6.95 (d, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 9.0$ Hz, H-9) ; 7.05-7.21 (m, 5H, H-arom.) ; 7.89 (s, 1H, H-6) ; 7.98 (d, 1H, $^4J(\text{H,H}) = 3.0$ Hz, H-7) ; 8.12 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 9.0$ Hz, $^4J(\text{H,H}) = 3.0$ Hz, H-8) ; 14.10 (s, 1H, OH).

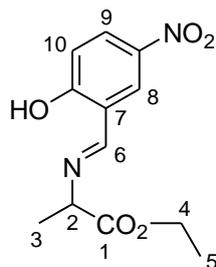
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 297 K):

δ = 14.1 (C-5) ; 39.8 (C-3) ; 61.8 (C-4) ; 72.3 (C-2) ; 118.3 (C-9) ; 127.2-131.6 (8 C-arom.) ; 136.1 (C-quartär) ; 139.5 (C- NO_2) ; 165.2 (C-6) ; 167.0 (C-OH) ; 170.1 (C-1).

***N*-(2-Hydroxy-5-nitro-benzyliden)-alaninethylester**

1.0 mmol (167.1 mg) 5-Nitrosalicylaldehyd, 1.0 mmol (153.6 mg) D,L-Alaninethylesterhydrochlorid und 200 mg Na_2CO_3 werden in einem Schlenkgefäß mit je 20 mL CH_2Cl_2 und Wasser versetzt und 2 Tage bei RT gerührt. Anschließend wird die organische Phase abgetrennt, mit MgSO_4 getrocknet und mit 3.0 g Molsieb versetzt. Nach weiteren 2 Tagen Reaktionszeit wird das Molsieb abfiltriert und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Es verbleibt ein orangefarbenes Pulver.

Ausbeute: 45 % ; M = 266.25 g/mol.



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, CDCl_3 , 297 K):

$\delta = 1.21$ (t, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, H-5) ; 1.50 (d, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, H-3) ; 4.15 (2q, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, H-2, H-4) ; 7.11 (d, 1H, $^4J(\text{H,H}) = 2.3$ Hz, H-10) ; 7.35 (d, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.8$ Hz, H-10) ; 7.35 (d, 1H, $^4J(\text{H,H}) = 2.3$ Hz, H-8) ; 7.89 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 7.8$ Hz, $^4J(\text{H,H}) = 2.3$ Hz, H-9) ; 8.25 (s, 1H, H-6) ; 14.17 (s, 1H, OH).

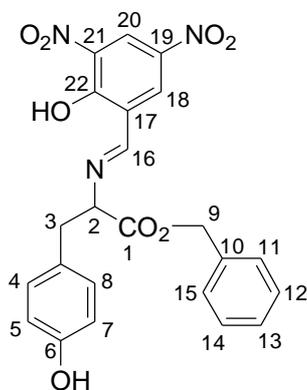
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 297 K):

$\delta = 14.1$ (C-5) ; 19.3 (C-3) ; 61.7 (C-4) ; 65.3 (C-2) ; 118.4 (C-10) ; 125.9 (C-7) ; 128.0 , 128.2 (C-9, C-8) ; 140.1 (C- NO_2) ; 164.6 (C-6) ; 166.1 (C-OH) ; 171.0 (C-1).

***N*-(2-Hydroxy-3,5-dinitrobenzyliden)-tyrosinbenzylester**

1.0 mmol (212.1 mg) 3,5-Dinitrosalicylaldehyd, 1.0 mmol (259.2 mg) freier D,L-Tyrosinbenzylester und 2.0 mL NEt_3 werden in einem Schlenkgefäß mit 20 mL CH_2Cl_2 und 5.0 g Molsieb 3 Tage bei RT gerührt. Anschließend wird das Molsieb abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Es verbleibt ein rotes Pulver.

Ausbeute: 87.5 % ; $M = 465.41$ g/mol.



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, MeCN-d_3 , 297 K):

$\delta = 3.19$ (dd, 1H, $^2J(\text{H,H}) = 14.3$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.0$ Hz, H-3) ; 3.32 (dd, 1H, $^2J(\text{H,H}) = 14.3$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 5.5$ Hz, H-3) ; 4.81 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.5$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.0$ Hz, H-2) ; 5.17 - 5.23 (m, 2H, H-9) ; 6.66 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.4$ Hz, H-5, H-7) ; 6.93 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.4$ Hz, H-4, H-8) ; 7.33 (m, 5H, H-11-H-15) ; 8.21 (s, 1H, H-16) ; 8.34 (d, 1H, $^4J(\text{H,H}) = 2.9$ Hz, H-18) ; 8.67 (d, 1H, $^4J(\text{H,H}) = 2.9$ Hz, H-20) ; 14.20 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, MeCN- d_3 , 297 K):

$\delta = 38.8$ (C-3) ; 65.9 (C-9) ; 68.9 (C-2) ; 116.6 (C-5, C-7) ; 117.5 (C-20) ; 118.4 (C-11, C-15) ; 126.1 (C-17) ; 128.8 (C-13) ; 129.5 (C-12, C-14) ; 131.7 (C-4, C-8) ; 132.4 (C-18) ; 135.9 (C-23) ; 137.7 (C-21) ; 141.7 (C-10) ; 157.4 (C-6) ; 168.6 (C-22) ; 169.2 (C-16) ; 171.3 (C-1).

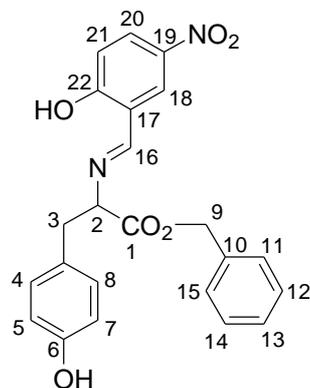
***N*-(2-Hydroxy-5-nitrobenzyliden)-tyrosinbenzylester**

Synthese analog *N*-(2-Hydroxy-3,5-dinitrobenzyliden)-tyrosinbenzylester.

Eingesetzte Mengen: 259.2 mg (1.0 mmol) D,L-Tyrosinbenzylester, 167.1 mg (1.0 mmol)

5-Nitrosalicylaldehyd

Ausbeute: 92 % ; M = 420.39 g/mol.



^1H -NMR (400.1 MHz, CDCl_3 , 297 K):

$\delta = 3.08$ (dd, 1H, $^2J(\text{H,H}) = 13.7$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.0$ Hz, H-3) ; 3.24 (dd, 1H, $^2J(\text{H,H}) = 13.7$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 5.4$ Hz, H-3) ; 4.42 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.4$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.0$ Hz, H-2) ; 5.17 (m, 2H, H-9) ; 6.60 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.4$ Hz, H-5, H-7) ; 6.87 (d, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 9.1$ Hz, H-21) 6.91 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.4$ Hz, H-4, H-8) ; 7.02 - 7.25 (m, 5H, H-11-H-15) ; 7.91 (s, 1H, H-16) ; 7.98 (d, 1H, $^4J(\text{H,H}) = 2.6$ Hz, H-18) ; 8.06 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 9.1$ Hz, $^4J(\text{H,H}) = 2.6$ Hz, H-20).

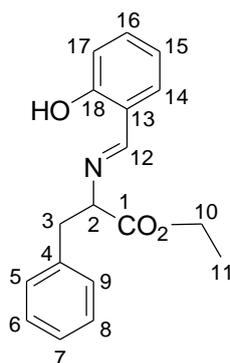
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 297 K): (nur partielle Zuordnung möglich)

$\delta = 39.6$ (C-3) ; 67.9 (C-9) ; 71.7 (C-2) ; 116.2 ; 119.5 ; 121.0 ; 128.1 ; 129.2 ; 129.3 ; 129.5 ; 129.6 ; 130.4 ; 131.7 ; 132.4 ; 136.7 ; 156.9 ; 157.4 ; 166.7 ; 167.4 ; 171.1 (C-1).

***N*-(2-Hydroxybenzyliden)-phenylalaninethylester**

2.0 mmol (244.24 mg = 213 μL) Salicylaldehyd, 2.0 mmol (439.2 mg) D,L-Phenylalaninethylesterhydrochlorid und 1.0 g Na_2CO_3 werden in einem Schlenkgefäß mit 25 mL THF und 5.0 mL Wasser versetzt und 1 Stunde bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt und 30 mL CH_2Cl_2 und 10 mL Wasser zugegeben und 2 Tage bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels verbleibt ein gelbes Öl.

Ausbeute: 73 % ; $M = 237.35$ g/mol.



^1H -NMR (400.1 MHz, CD_2Cl_2 , 297 K):

$\delta = 1.16$ (t, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.2$ Hz, H-11) ; 3.04 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 8.6$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.5$ Hz, H-3) ; 3.27 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.2$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.5$ Hz, H-3) ; 4.08 (dd, q 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.2$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 5.2$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.6$ Hz, H-10, H-2) ; 6.76 (dt, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.6$ Hz, $^4J(\text{H,H}) = 1.0$ Hz, H-14) ; 6.83 (m, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 8.4$ Hz, H-17) ; 7.05 - 7.25 (m, 7H, H-15, H-16, H-5-H-9) ; 7.95 (s, 1H, H-12) ; 12.86 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, CD_2Cl_2 , 297 K):

$\delta = 14.3$ (C-11) ; 40.3 (C-3) ; 61.7 (C-10) ; 73.3 (C-2) ; 117.2 (C-17) ; 118.9 (C-15) ; 127.1 (C-7) ; 128.8 (C-5, C-9) ; 129.9 (C-6, C-8) ; 132.1 (C-14) ; 133.1 (C-16) ; 137.4 (C-4) ; 161.3 (C-18) ; 167.2 (C-12) ; 171.1 (C-1).

10.2.4 Arbeitsvorschriften zum Themengebiet: Racemisierung von *N*-Acyl-aminosäuren

10.2.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Durchführung von Racemisierungsreaktionen von *N*-Acyl-aminosäuren (AAV 9).

In einem verschraubaren Druckreaktionsrohr (Fa. ACE) werden im Argonstrom Nach 24 bzw. 48 Stunden Reaktionszeit werden im Argonstrom Proben entnommen, die nach Entfernen des Lösungsmittels ohne weitere Aufreinigung nach Abschnitt 10.2.1.4 derivatisiert werden.

Alle Palladium-katalysierten Racemisierungsreaktionen werden streng unter Inertgasbedingungen entsprechend in Schlenkrohren durchgeführt. 0.482 mmol *L*-*N*-Acylaminosäure, 0.0048-0.0241 mmol (1.0-5.0 mol%) Palladiumkatalysator und 0.0096-0.0241 mmol (5-12.5 mol%) Phosphanligand mit 10 mL Lösungsmittel versetzt und in einem Ölbad auf die gewünschte Reaktionstemperatur gebracht. Dabei ist zu beachten, daß die Reaktionstemperatur aus Sicherheitsgründen keinesfalls über 80 °C liegen darf.

10.2.4.2 *N*-Acylierung von racemischen und optisch reinen Aminosäuren (AAV 10).

60 mmol Aminosäure und 120 mmol NaHCO₃ werden in einem Kolben in einer Mischung aus 150 mL Wasser und 150 mL Dioxan suspendiert und leicht erwärmt bis sich eine klare Lösung ergibt. 63 mmol Acylierungsreagenz (Säureanhydride bzw. Säurechloride) werden als verdünnte Lösung in Toluol vorsichtig zugetropft, danach wird die Reaktion eine Stunde bei RT gerührt und schließlich über Nacht auf 60 °C temperiert. Nach einer Abkühlphase wird das Volumen des Ansatzes um die Hälfte eingeengt und die verbleibende Lösung 3 mal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen mit MgSO₄ entfernt man das Lösungsmittel im Vakuum und kristallisiert das Rohprodukt um.

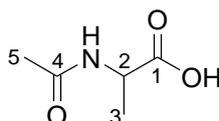
10.2.5 Dargestellte Verbindungen

N-Acetyl-alanin

Die enantiomerenreinen Verbindungen wurden käuflich erworben, das Racemat gemäß AAV 10 dargestellt.

Eingesetzte Mengen: 5.34 g (60 mmol) D,L-Alanin, 6.43 g (63 mmol) Acetanhydrid

Ausbeute: 87 % ; Smpkt.: 131 °C (Lit: 132-133 °C).



¹H-NMR (400.1 MHz, DMSO-d₆, 297 K):

δ = 1.22 (d, 3H, ³J(H,H) = 7.3 Hz, H-3) ; 1.81 (s, 3H, H-5) ; 4.15 (m, 1H, H-2) ; 8.13 (d, 1H, ³J(H,H) = 7.1 Hz, NH), 12.78 (s, 1H, CO₂H).

¹³C{¹H} NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, 297 K):

δ = 17.5 (C-3) ; 22.6 (C-5) ; 47.8 (C-2) ; 169.4 (C-4) ; 174.6 (C-1).

Enantiomerenanalytik:

GC (25 m Chirasil Val, Alltech, 120°C, 1.0 mL Argon/min):

N-Acetyl-alanin als Methylesterderivat

D-Enantiomer: 4.33 min

L-Enantiomer: 4.56 min

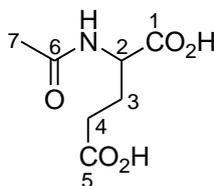
N-Acetyl-asparaginsäure

Gemäß AAV 10 wurden die racemische Verbindung hergestellt, die L-Verbindung wurde käuflich erworben.

Eingesetzte Mengen: 7.99 g (60 mmol) D,L-Asparagin, 6.43 g (63 mmol) Acetanhydrid

D,L-*N*-Acetyl-asparaginsäure:

Ausbeute: 73 % ; Smpkt.: 145-149°C (Lit: 140-141°C).



Enantiomerenanalytik:

GC (25 m Chirasil Val, Alltech, 100°C/10-2-150, 1.0 mL Argon/min):

N-Acetyl-asparaginsäure als *O,O'*-Dimethylesterderivat

D-Enantiomer: 28.75 min

L-Enantiomer: 29.17 min

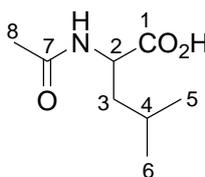
***N*-Acetyl-leucin**

Die L-Verbindung wurde käuflich erworben, die racemische Verbindung gemäß AAV 10 dargestellt.

Eingesetzte Mengen: 7.87 g (60 mmol) D,L-Leucin, 6.43 g (63 mmol) Acetanhydrid

D,L- *N*-Acetyl-leucin:

Ausbeute: 85 % ; Smpkt.: 181 °C (Lit: 185 °C).



Enantiomerenanalytik:

GC (25 m Chirasil-Val, Alltech, 80°C isotherm, 1.0 mL Argon/min):

N-Acetyl-leucin underivatisiert

D-Enantiomer: 29.69 min

L-Enantiomer: 30.89 min

oder GC (25 m Chirasil-Val, Alltech, 90°C isotherm, 1.0 mL Argon/min):

N-Acetyl-leucin als *O*-Methylesterderivat

D-Enantiomer: 6.86 min

L-Enantiomer: 7.74 min

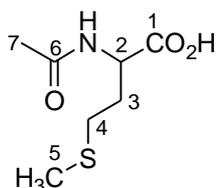
***N*-Acetyl-methionin**

Das Racemat wurde gemäß AAV 10 synthetisiert.

Eingesetzte Mengen: 8.95 g (60 mmol) D,L-Methionin, 6.43 g (63 mmol) Acetanhydrid

D,L- *N*-Acetyl-methionin:

Ausbeute: 77 % ; Smpkt.: 117 °C (Lit: 117-119 °C).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, DMSO-d_6 , 297 K):

$\delta = 2.02\text{-}2.16$ (m, 5H, H-4, H-7) ; 2.26 (s, 3H, H-5) ; 2.69 (m, 2H, H-3) ; 4.47 (m, 1H, H-2) ; 8.36 (d, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.8$ Hz, NH) ; 12.81 (s, 1H, CO_2H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, DMSO-d_6 , 297 K):

$\delta = 14.9$ (C-5) ; 22.7 (C-7) ; 30.0 (C-4) ; 31.0 (C-3) ; 51.2 (C-2) ; 169.8 (C-6) ; 173.8 (C-1).

***N*-Acetyl-phenylalanin**

Gemäß AAV 10 wurden sowohl die racemische als auch die L-Verbindung hergestellt, jeweils umkristallisiert in Aceton.

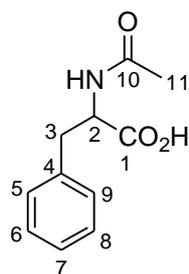
Eingesetzte Mengen: 9.91 g (60 mmol) Phenylalanin, 6.43 g (63 mmol) Acetanhydrid

D,L-*N*-Acetyl-phenylalanin:

Ausbeute: 67 % ; Smpkt.: $145\text{-}147^\circ\text{C}$ (Lit: $145\text{-}147^\circ\text{C}$).

L-*N*-Acetyl-phenylalanin:

Ausbeute: 64 % ; Smpkt.: $164\text{-}167^\circ\text{C}$ (Lit: 171°C) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 39.7^\circ$, $c = 1$, MeOH) (Lit: $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 40^\circ$ ($c = 1$, MeOH)).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, Aceton-d_6 , 297 K):

$\delta = 2.12$ (s, 3H, H-11) ; 3.23 (dd, 1H, $^2J(\text{H,H}) = 13.9$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.3$ Hz, H-3) ; 3.42 (dd, 1H, $^2J(\text{H,H}) = 13.9$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 5.4$ Hz, H-3) ; 4.29 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.4$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.3$ Hz, H-2) ; $7.43\text{-}7.54$ (m, 5H, H-5-H-9) ; 8.31 (d, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 8.0$ Hz, NH) ; 12.91 (s, 1H, CO_2H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, Aceton- d_6 , 297 K):

$\delta = 23.0$ (C-11) ; 38.5 (C-3) ; 54.5 (C-2) ; 127.8 (C-7) ; 129.5 (C-5, C-9) ; 130.5 (C-6, C-8) ; 138.7 (C-4) ; 170.6 (C-10) ; 173.4 (C-1).

MS (CI, Isobutan): m/z : 208 ($[\text{M}+\text{H}]^{+\bullet}$) ; 161 ; 146 ; 120 ; 91 ; 60.

***N*-Trifluoracetyl-phenylalanin**

Nach Literaturvorschrift^[145] wurde sowohl die racemische, als auch die *L*-Verbindung hergestellt.

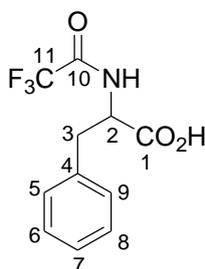
Eingesetzte Mengen: 3.30 g (20 mmol) Phenylalanin, 4.41 g (21 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid

L-N-Trifluoracetyl-phenylalanin:

Ausbeute: 33 % ; Smpkt.: 114-132°C, (Lit: 118-121°C) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +14.9^\circ$, (c = 2, EtOH), (Lit: $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 14.6^\circ$ (c = 2, EtOH)).

D,L-N-Trifluoracetyl-phenylalanin:

Ausbeute: 50 % ; Smpkt.: 122-126°C.



^1H -NMR (400.1 MHz, Methanol- d_4 , 297 K):

$\delta = 3.29$ (dd, 1H, $^3J(\text{H},\text{H}) = 10.3$ Hz, $^2J(\text{H},\text{H}) = 14.1$ Hz, H-3) ; 3.59 (dd, 1H, $^3J(\text{H},\text{H}) = 4.8$ Hz, $^2J(\text{H},\text{H}) = 14.1$ Hz, H-3) ; 4.96 (dd, 1H, $^3J(\text{H},\text{H}) = 4.8$ Hz, $^3J(\text{H},\text{H}) = 10.3$ Hz, H-2) ; 7.46 - 7.65 (m, 6H, H-5-H-9, NH) ; 12.77 (s, 1H, CO_2H).

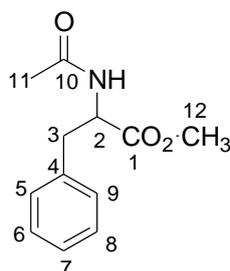
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, Methanol- d_4 , 297 K):

$\delta = 38.1$ (C-3) ; 55.9 (C-2) ; 128.4 (C-7) ; 129.9 (C-5, C-9) ; 130.6 (C-6, C-8) ; 138.6 (C-4) ; 173.7 (C-1).

***N*-Acetyl-phenylalaninmethylester**

Die racemische Verbindung wurde aus *N*-Acetylphenylalanin nach AAV 1 dargestellt.

Eingesetzte Mengen: 4.14 g (20 mmol) *N*-Acetylphenylalanin, 2.50 g SOCl₂, 200 mL MeOH
 Ausbeute: 78 % ; Smpkt.: 67 °C.



¹H-NMR (400.1 MHz, CDCl₃, 297 K):

δ = 2.17 (s, 3H, H-11) ; 3.30 (m, 2H, H-3) ; 3.92 (s, 3H, H-12) ; 5.06 (dd, 1H, ³J(H,H) = 5.9 Hz, ³J(H,H) = 7.7 Hz, H-2) ; 6.28 (d, 1H, ³J(H,H) = 7.1 Hz, NH) ; 7.26-7.50 (m, 5H, H-5-H-9).

¹³C{¹H} NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 297 K):

δ = 24.3 (C-11) ; 39.0 (C-3) ; 53.5 (C-12) ; 54.4 (C-2) ; 128.2 (C-7) ; 129.7 (C-5, C-9) ; 130.4 (C-6, C-8) ; 137.0 (C-4) ; 171.1 (C-1) ; 173.3 (C-10).

MS (EI, 70 eV): *m/z*: 221 ([M⁺]) ; 205 ; 190 ; 178 ; 162 ; 149 ; 131 ; 120 ; 103 ; 91 ; 88 ; 77 ; 65 ; 51 ; 43.

***N*-Phenacetyl-phenylalanin**

Gemäß AAV 10 wurden sowohl die racemische als auch die L-Verbindung hergestellt, jeweils umkristallisiert in Ethylacetat/Petrolether.

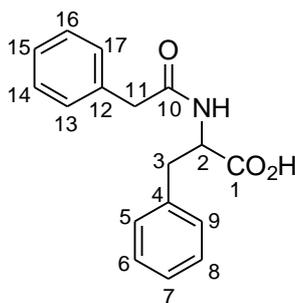
Eingesetzte Mengen: 9.91 g (60 mmol) Phenylalanin, 9.74 (63 mmol) Phenacetylchlorid

D,L-*N*-Phenacetyl-phenylalanin:

Ausbeute: 33 % ; Smpkt.: 126 °C.

L-*N*-Phenacetyl-phenylalanin:

Ausbeute: 32 % ; Smpkt.: 128-138°C (Lit: 136-137°C) ; [α]_D²² = 27.4°, c = 1, EtOH) (Lit: [α]_D²² = 30.3° (c = 1, EtOH).



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton- d_6 , 297K):

δ = 3.23 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 8.1$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.9$ Hz, H-3) ; 3.40 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.2$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.9$ Hz, H-3) ; 3.76 (dd, 2H, $^2J(\text{H,H}) = 14.5$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 17.8$ Hz, H-11) ; 4.97 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.2$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.1$ Hz, H-2) ; 7.38-7.51 (m, 10H, H-5-H-9, H-13-H-17) ; 8.29 (d, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.9$ Hz, NH) ; 12.77 (s, 1H, CO_2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Aceton- d_6 , 297 K):

δ = 38.4 (C-3) ; 43.7 (C-11) ; 54.5 (C-2) ; 127.8 (C-7, C-15) ; 129.5 (C-5, C-9, C-13, C-17) ; 129.5 (C-5, C-9, C-14, C-16) ; 137.2 (C-12) ; 138.4 (C-4) ; 171.5 (C-10) ; 173.3 (C-1).

MS (EI, 70 eV): m/z : 283 ($[\text{M}^+]$) ; 265 ; 239 ; 205 ; 192 ; 180 ; 164 ; 148 ; 135 ; 120 ; 91 ; 65 ; 51 ; 39.

Enantiomerenanalytik:

N-Phenacetyl-phenylalanin als Methylesterderivat

HPLC (Chiralcel OD-H, Hexan:Isopropanol 97:3, Fluß = 1.0 mL/min)

D-Enantiomer: 33.37 min

L-Enantiomer: 38.32 min

***N*-Benzoyl-phenylalanin**

Gemäß AAV 10 wurden sowohl die racemische als auch die L-Verbindung hergestellt, jeweils umkristallisiert in Wasser.

Eingesetzte Mengen: 9.91 g (60 mmol) Phenylalanin, 8.86 (63 mmol) Benzoylchlorid

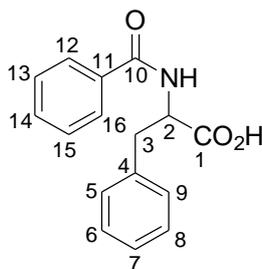
D,L-*N*-Benzoyl-phenylalanin:

Ausbeute: 62 % ; Smpkt.: 182-184°C (Lit: 184-86°C).

L-*N*-Benzoyl-phenylalanin:

Ausbeute: 68 % ; Smpkt.: 139-140°C (Lit: 141-143), $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -39.3^\circ$, $c = 1$, MeOH) (Lit:

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -41.4^\circ$ ($c = 1$, MeOH).



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton- d_6 , 297K):

δ = 3.42 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 13.9$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 9.1$ Hz, H-3) ; 3.59 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 13.9$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 5.0$ Hz, H-3) ; 5.18 (m, 1H, H-2) ; 7.40-8.08 (m, 11H, H-5-H-9, H-12-H-16, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Aceton- d_6 , 297 K):

δ = 38.5 (C-3) ; 55.5 (C-2) ; 128.1 (C-7) ; 128.7 (C-12, C-16) ; 129.8 (C-5, C-9) ; 130.8 (C-6, C-8) ; 132.9 (C-13, C-15) ; 135.9 (C-14) ; 139.2 (C-11) ; 168.2 (C-10) ; 173.9 (C-1).

MS (CI, Isobutan): m/z : 270 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ; 252 ; 240 ; 224 ; 206 ; 192 ; 178 ; 166 ; 147 ; 131 ; 120 ; 105 ; 91 ; 77 ; 65.

Enantiomerenanalytik:

N-Benzoyl-phenylalanin als Methylesterderivat

HPLC (Chiralcel OD-H, Hexan:Isopropanol 90:10, Fluß = 1.2 mL/min)

L-Enantiomer: 10.39 min

D-Enantiomer: 7.67 min

***N*-Methoxyacetyl-phenylalanin**

Gemäß AAV 10 wurden sowohl die racemische als auch die L-Verbindung hergestellt.

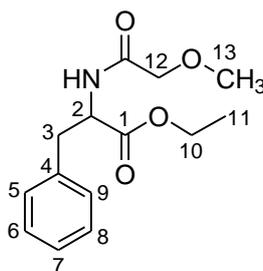
Eingesetzte Mengen: 9.91 g (60 mmol) Phenylalanin, 6.84 g (63 mmol) Methoxyessigsäurechlorid

D,L-*N*-Methoxyacetyl-phenylalanin:

Ausbeute: 84 % ; Smpkt.: 95-98°C.

L-*N*-Methoxyacetyl-phenylalanin:

Ausbeute: 99 % ; farblose Flüssigkeit, $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = + 28.4^\circ$, (c = 1.1, MeOH).



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton- d_6 , 297K):

$\delta = 3.30$ (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.5$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.9$ Hz, H-3) ; 3.42 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 8.5$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.9$ Hz, H-3) ; 3.48 (s, 3H, H-12) ; 3.96 (d, 2H, $^2J(\text{H,H}) = 3.0$ Hz, H-11) ; 4.95 (m, 1H, H-2) ; 7.32 - 7.48 (m, 5H, H-5-H-9) ; 8.12 (s, 1H, NH) ; 11.0 - 11.5 (s, br, 1H, CO_2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Aceton- d_6 , 297 K):

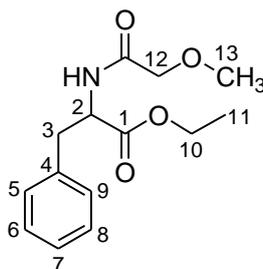
$\delta = 38.3$ (C-3) ; 53.7 (C-12) ; 59.4 (C-2) ; 72.8 (C-11) ; 128.0 (C-7) ; 129.4 (C-5, C-9) ; 130.6 (C-6, C-8) ; 138.3 (C-4) ; 170.3 (C-10) ; 173.1 (C-1).

MS (CI, Isobutan): m/z : 238 ($[\text{M}^+]$) ; 220 ; 192 ; 180 ; 147 ; 120 ; 91 ; 63.

***N*-Methoxyacetyl-phenylalaninethylester**

Gemäß AAV 1 wurde das Racemat aus *N*-Methoxyacetyl-phenylalanin dargestellt.

Eingesetzte Mengen: 15.92 g (60 mmol), *N*-Methoxyacetyl-phenylalanin, 200 mL EtOH



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 297K):

$\delta = 1.21$ (t, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, H-11) ; 3.11 (dd, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 6.2$ Hz, $^4J(\text{H,H}) = 8.3$ Hz, H-3) ; 3.33 (s, 3H, H-13) ; 3.86 (s, 2H, H-12) ; 4.14 (q, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, H-10) ; 4.87 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 8.3$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 6.2$ Hz, H-2) ; 6.93 (d, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 8.3$ Hz, NH) ; 7.10 - 7.26 (m, 5H, H-5-H-9).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 297K):

$\delta = 14.5$ (C-11) ; 38.5 (C-3) ; 52.9 (C-13) ; 59.7 (C-2) ; 61.9 (C-10) ; 72.2 (C-12) ; 127.5 (C-7) ; 129.0 (C-5, C-9) ; 129.7 (C-6, C-8) ; 136.2 (C-4) ; 169.8 (C-14) ; 171.1 (C-1).

Enantiomerenanalytik:

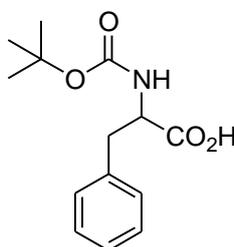
HPLC (Chiracel OD-H, Hexan:Isopropanol 97:3, Fluß 1.0 mL/min)

L-Enantiomer: 15.32 min

D-Enantiomer: 21.21 min

***N*-Boc-Phenylalanin**

Die racemische und die L-Verbindung wurden käuflich erworben.



Enantiomerenanalytik:

N-Boc-Phenylalanin als Methylesterderivat

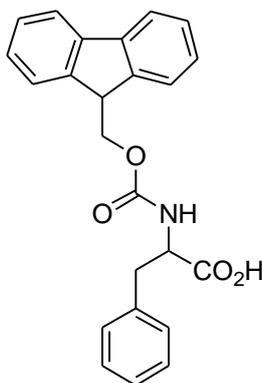
HPLC (Chiralcel OD-H, Hexan:Ethanol 98:2, 0.8 mL/min)

L-Enantiomer: 10.12 min

D-Enantiomer: 9.43 min

***N*-Fmoc-Phenylalanin**

Die racemische und die L-Verbindung wurden käuflich erworben.



Enantiomerenanalytik:

N-Fmoc-Phenylalanin als Methylesterderivat

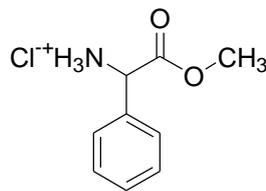
HPLC (Chiralcel OD-H, Hexan:Ethanol 8:2, Fluß = 3.0 mL/min):

L-Enantiomer: 4.89 min

D-Enantiomer: 3.37 min

***N*-Acetyl-phenylglycinmethylester**

Das Racemat und die L-Verbindung waren im Hause vorrätig.



Enantiomerenanalytik:

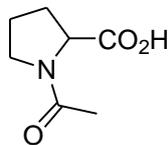
HPLC (Chiralpak AD, Hexan:Ethanol 90:10, 1.0 mL/min):

D-Enantiomer: 9.40 min

L-Enantiomer: 11.82 min

***N*-Acetyl-prolin**

Das Racemat und die L-Verbindung wurden käuflich erworben.



Enantiomerenanalytik:

GC (25 m Chirasil Val, Alltech, 100°C isotherm, 1.0 mL Argon/min):

N-Acetyl-prolin als *O*-Methylesterderivat

D-Enantiomer: 44.90 min

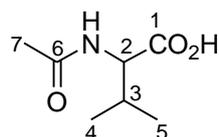
L-Enantiomer: 45.87 min

N-Acetyl-valin

Das Racemat wurde gemäß AAV 10 dargestellt.

Eingesetzte Mengen: 7.03 g (60 mmol) D,L-Valin, 6.43 g (63 mmol) Acetanhydrid

Ausbeute: 77 % ; Smpkt.: 147 °C (Lit: 148 °C).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

δ = 1.86 (s, 3H, H-7) ; 1.99 (m, 6H ; H-4, H-5) ; 4.11 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.8$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.4$ Hz, H-2) ; 7.96 (d, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 8.4$ Hz, NH) ; 12.78 (s, 1H, CO₂H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

δ = 18.3, 19.4 (C-4, C-5) ; 22.6 (C-7) ; 30.1 (C-3) ; 57.5 (C-2) ; 169.9 (C-6) ; 173.5 (C-1).

Enantiomerenanalytik:

GC (25 m Chirasil Val, Alltech, 120°C, 1.0 mL Argon/min):

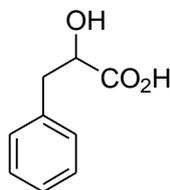
N-Acetyl-valin als Methylesterderivat

D-Enantiomer: 6.88 min

L-Enantiomer: 7.27 min

2-Hydroxy-3-phenylpropionsäure

Das Racemat sowie die (*S*)-Verbindung wurden käuflich erworben.



Enantiomerenanalytik:

GC (50 m Cyclodextrin IP, 150°C, 1.0 mL Argon/min):

2-Hydroxy-3-phenylpropionsäure als Methylesterderivat

(*R*)-Enantiomer: 24.76 min

(*S*)-Enantiomer: 25.41 min

2-Acetoxy-3-phenylpropionsäure

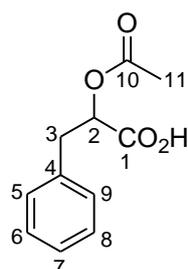
Die racemische und die (*S*)-Verbindung wurde nach Literaturvorschrift^[146] dargestellt.

(*R,S*)-2-Acetoxy-3-phenylpropionsäure:

Ausbeute: 76 % ; farbloses Öl.

(*S*)-2-Acetoxy-3-phenylpropionsäure:

Ausbeute: 82 % ; farbloses Öl.



¹H-NMR (400.1 MHz, CDCl₃, 297 K):

δ = 1.98 (s, 3H, H-11) ; 3.02 (dd, 1H, ³*J*(H,H) = 9.1 Hz, ²*J*(H,H) = 14.5 Hz, H-3) ; 3.16 (dd, 1H, ²*J*(H,H) = 14.5 Hz, H-3) ; 5.16 (dd, 1H, ³*J*(H,H) = 9.1 Hz, ³*J*(H,H) = 10.3 Hz, H-2) ; 7.14-7.24 (m, 5H, H-5-H-9) ; 9.67 (s, br, 1H, CO₂H).

¹³C{¹H} NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 297 K):

δ = 20.9 (C-11) ; 37.5 (C-3) ; 73.1 (C-2) ; 127.6 (C-7) ; 129.0 (C-5, C-9) ; 129.7 (C-6, C-8) ; 136.2 (C-4) ; 171.2 (C-10) ; 175.5 (C-1).

MS (EI, 70 eV): *m/z*: 163 ([M-57]⁺•) ; 148 ; 131 ; 103 ; 91 ; 77 ; 65 ; 43.

Enantiomerenanalytik:

GC (50 m Cyclodextrin IP, 128°C, 1.0 mL Argon/min):

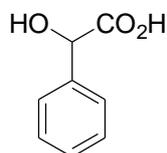
O-Acetylphenylmilchsäure als Methylesterderivat

(*R*)-Enantiomer: 86.50 min

(*S*)-Enantiomer: 88.24 min

Mandelsäure

Die (*S*)-Verbindung und das Racemat wurden käuflich erworben.



Enantiomerenanalytik:

GC (50 m Cyclodextrin IP, 120°C, 1.0 mL Argon/min):

Mandelsäure als Methylesterderivat

(*R*)-Enantiomer: 52.62 min

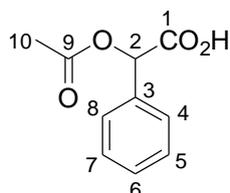
(*S*)-Enantiomer: 53.60 min

O-Acetyl-mandelsäure

1.0 g (6.57 mmol) (*S*)-Mandelsäure wird in 10.5 mL Pyridin vorgelegt und zur Lösung 1.34 g (13.14 mmol) Essigsäureanhydrid tropfenweise zugesetzt. Der Ansatz wird 2 Tage bei RT gerührt, danach fügt man 10 mL Wasser zu und extrahiert 3 mal mit 25 mL Chloroform. Die vereinigten Chloroformphasen werden 3 mal mit 1N Salzsäure gewaschen, getrocknet und zur Trockene eingengt. Es verbleibt ein Öl, das in Benzol umkristallisiert einen farblosen Feststoff ergibt.

(*S*)-*O*-Acetyl-mandelsäure:

Ausbeute: 76 % ; Smpkt.: 79-80°C (Lit: 79-80°C) ; $[\alpha]_D^{22} = -153.5^\circ$, $c = 2$, Aceton) (Lit: $[\alpha]_D^{22} = 153.5^\circ$ ($c = 2.2$, Aceton)).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, CDCl_3 , 297 K):

$\delta = 2.10$ (s, 3H, H-10) ; 5.85 (s, 1H, H-2) ; 7.17 - 7.41 (m, 5H, H-4-H-8) ; 10.33 (s, br, 1H, CO_2H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 297 K):

$\delta = 21.0$ (C-10) ; 74.5 (C-2) ; 128.1 (C-5, C-7) ; 129.3 (C-4, C-8) ; 129.9 (C-6) ; 133.5 (C-3) ; 170.9 (C-9) ; 174.8 (C-1).

MS (EI, 70 eV): m/z : 194 ($[\text{M}^{+\bullet}]$) ; 166 ; 149 ; 134 ; 107 ; 91 ; 79 ; 63 ; 51 ; 43 ; 39.

Enantiomerenanalytik:

HPLC (OB-H, Hexan:Ethanol 98:2, Fluß = 1.0 mL/min):

O-Acetyl-mandelsäure als Methylesterderivat

(*R*)-Enantiomer: 12.25 min

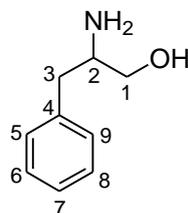
(*S*)-Enantiomer: 10.53 min

Phenylalaninol

Die racemische Verbindung wurde nach Literaturvorschrift^[147] dargestellt.

(*R,S*)-Phenylalaninol:

Ausbeute: 58 % ; farblose Flüssigkeit.



^1H -NMR (400.1 MHz, CDCl_3 , 297 K):

$\delta = 1.40$ - 2.3 (2s, 3H, NH_2 , OH) ; 2.78 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 8.7$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.5$ Hz, H-3) ; 3.05 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.2$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.5$ Hz, H-3) ; 3.36 (m, 1H, H-2) ; 3.91 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 3.5$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 11.0$ Hz, H-1) ; 4.26 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 3.5$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 11.0$ Hz, H-1).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 297 K):

$\delta = 41.2$ (C-3) ; 54.1 (C-2) ; 66.5 (C-1) ; 126.9 (C-4) ; 127.8 (C-7) ; 129.1 (C-6, C-8) ; 129.7 (C-5, C-9).

MS (CI, Isobutan): m/z : 152 ($[\text{M}+\text{H}]^{+\bullet}$) ; 134 ; 120 ; 91 ; 77 ; 60.

Enantiomerenanalytik:

GC (50 m Cyclodextrin IP, 120°C, 1.0 mL Argon/min):

Phenylalaninol als *N*-Perfluorpropionylderivat

(*R*)-Enantiomer: 47.24 min

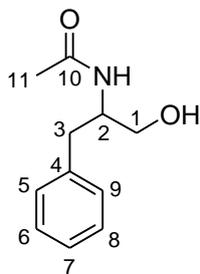
(*S*)-Enantiomer: 52.67 min

***N*-Acetyl-phenylalaninol**

400 mg (2.65 mmol) (*S*)-Phenylalaninol und 4.39 g (31.74 mmol) K₂CO₃ werden in einer Mischung aus 20 mL Wasser und 20 mL Dichlormethan vorgelegt. Unter intensivem Rühren tropft man 0.83 g (10.58 mmol) Acetylchlorid zu und rührt weitere 4 Stunden bei RT. Nach Zusatz weiterer 20 mL Dichlormethan wird die wäßrige Phase abgetrennt und verworfen. Die organische Phase wird 3 mal mit 10%-iger NaHCO₃-Lösung gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel vollständig im Vakuum entfernt. Es verbleibt ein Feststoff wachsartiger Konsistenz.

(*S*)-*N*-Acetyl-phenylalaninol:

Ausbeute: 89 % ; Smpkt.: 94-97°C (Lit: 90-95°C), $[\alpha]_D^{22} = -20.4^\circ$, (c = 2.5, CHCl₃) (Lit: $[\alpha]_D^{22} = -23^\circ$ (c = 1, CHCl₃)).



¹H-NMR (400.1 MHz, Methanol-d₄, 297 K):

$\delta = 2.16$ (s, 3H, H-11) ; 3.07 (ddd, 2H, ³*J*(H,H) = 8.3 Hz, ³*J*(H,H) = 6.3 Hz, ³*J*(H,H) = 8.3 Hz, ²*J*(H,H) = 13.7 Hz, H-3) ; 3.79 (m, 2H, H-1) ; 4.35 (m, 1H, H-2) ; 7.41 - 7.62 (m, 5H, H-5-H-9).

¹³C{¹H} NMR (100.6 MHz, Methanol-d₄, 297 K):

$\delta = 23.1$ (C-11) ; 38.4 (C-3) ; 54.7 (C-2) ; 64.6 (C-1) ; 127.8 (C-7) ; 129.8 (C-5, C-9) ; 130.7 (C-6, C-8) ; 140.3 (C-4) ; 173.5 (C-10).

MS (CI, Isobutan): *m/z*: 194 ([M+H]⁺) ; 175 ; 162 ; 150 ; 134 ; 119 ; 102 ; 91 ; 77 ; 65 ; 60 ; 51 ; 43 ; 31.

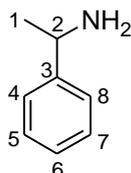
Enantiomerenanalytik:

HPLC (Chiracel OD-H, Hexan:Ethanol 98:2, Fluß = 2.5 mL/min):

(*R*)-Enantiomer: 45.34 min

(*S*)-Enantiomer: 55.78 min

1-Phenylethylamin



Enantiomerenanalytik:

GC (50 m Lipodex C, 115°C, 1.0 mL Argon/min):

1-Phenylethylamin als *N*-Trifluoracetylderivat

(*R*)-Enantiomer: 14.42 min

(*S*)-Enantiomer: 14.88 min

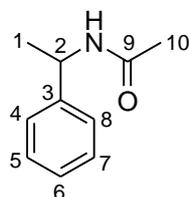
N-Acetyl-1-phenylethylamin

5.0 g (41.26 mmol) (*R*)-1-Phenylethylamin werden in 40 mL Toluol gelöst und tropfenweise mit einer Lösung von 4.63 g (45.39 mmol) Acetylchlorid in 10 mL Toluol versetzt. Nach 90 minütigem Erhitzen der Reaktionslösung auf 90°C kühlt man ab und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird mit 40 mL Dichlormethan versetzt und 3 mal mit 40 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Das organische Lösungsmittel wird nach Trocknung entfernt und man erhält das Produkt als farblosen Feststoff.

(*R*)-*N*-Acetyl-phenylethylamin:

Ausbeute: 89 % ; Smpkt.: 101-102°C, (Lit: 99-100°C).

$[\alpha]_D^{22} = +149.0^\circ$, $c = 0.99$, EtOH) (Lit: $[\alpha]_D^{22} = +151^\circ$ ($c = 1$, EtOH)).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, Methanol- d_4 , 297 K):

$\delta = 1.71$ (d, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 6.9$ Hz, H-1) ; 2.22 (s, 3H, H-10) ; 5.17 (s, 1H, NH) ; 5.27 (q, $^3J(\text{H,H}) = 6.9$ Hz, H-2) ; $7.56-7.79$ (m, 5H, H-4-H-8).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, Methanol- d_4 , 297 K):

$\delta = 22.9$ (C-10) ; 23.1 (C-1) ; 50.6 (C-2) ; 127.5 (C-4, C-8) ; 128.5 (C-6) ; 129.9 (C-5, C-7) ; 145.6 (C-3) ; 172.6 (C-9).

MS (EI, 70 eV): m/z : 163 ($[\text{M}^+]$) ; 147 ; 120 ; 106 ; 104 ; 91 ; 79 ; 77 ; 60 ; 43 ; 28.

Enantiomerenanalytik (das Racemat wurde käuflich erworben):

HPLC (Chiralpak AD, Hexan:Ethanol 95:5, Fluß = 1.2 mL/min):

(*R*)-Enantiomer: 8.39 min

(*S*)-Enantiomer: 10.76 min

***N*-(1-Phenylethyl)-phthalsäuremonoamid**

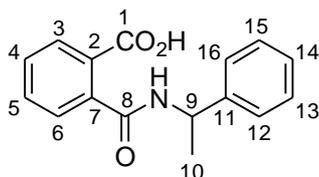
Man löst 350 mg (2.89 mmol) 1-Phenylethylamin in 10 mL Dichlormethan, dann gibt man hintereinander 292 mg (2.89 mmol) Triethylamin, 428 mg (2.88 mmol) Phthalsäureanhydrid und eine Spatelspitze 4-Dimethylaminopyridin zu und rührt die Reaktionsmischung 3 Stunden bei RT. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: Petrolether/Ethylacetat/Essigsäure 49/49/2).

(*R,S*)-*N*-(1-Phenylethyl)-phthalsäuremonoamid:

Ausbeute: 41 % ; Smpkt.: 179-181°C (Lit: 180°C).

(*R*)-*N*-(1-Phenylethyl)-phthalamidsäure:

Ausbeute: 45 % ; Smpkt.: 134°C (Lit: 134°C) $[\alpha]_D^{22}$: -46.8° , $c = 2$, EtOH) (Lit: $[\alpha]_D^{22} = -47.1^\circ$ ($c = 2$, EtOH)).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, Methanol- d_4 , 297 K):

$\delta = 1.61$ (d, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, H-10) ; 5.30 (q, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, H-9) ; $7.29-7.52$ (m, 6H, H-4, H-12-H-16) ; $7.55-7.64$ (m, 1H, H-5) ; $7.67-7.71$ (m, 1H, H-6) ; $8.00-8.05$ (m, 1H, H-3).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, Methanol- d_4 , 297 K): nur teilweise Zuordnung möglich

$\delta = 22.6$ (C-10) ; 51.0 (C-9) ; 127.8 (C-13, C-15) ; 128.5 (C-14) ; 129.3 ; 129.9 (C-12, C-16) ; 130.9 ; 131.4 ; 131.7 (C-3, C-4, C-5, C-6) ; 133.4 (C-11) ; 140.4 (C-7) ; 145.5 (C-2) ; 169.9 (C-8) ; 172.4 (C-1).

MS (EI, 70 eV): m/z : 269 ($[\text{M}^+]$) ; 251 ; 236 ; 208 ; 194 ; 176 ; 160 ; 120 ; 106 ; 101 ; 76 ; 65 ; 50 ; 44.

Enantiomerenanalytik:

N-(1-Phenylethyl)-phthalsäuremonoamid als Methylesterderivat

HPLC (Chiralpak AD, Hexan:Ethanol 90:10, Fluß = 1.0 mL/min)

(*R*)-Enantiomer: 6.14 min

(*S*)-Enantiomer: 8.04 min

***O*-(1-Phenylethyl)-phthalsäuremonoester**

(*R,S*)-*O*-(1-Phenylethyl)-phthalsäuremonoester:

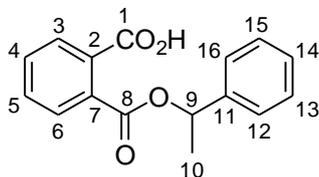
3.0 g (24.56 mmol) 1-Phenylethylalkohol werden in 10 mL Pyridin vorgelegt und 3.57 g (24.07 mmol) Phthalsäureanhydrid zugegeben. Die Mischung wird für 2 Stunden auf 110 °C erhitzt, dann wird die Lösung abgekühlt. Es werden 20 mL Wasser und 50 mL 0.5N Natrolauge zugesetzt und 3 mal mit 30 mL Ethylacetat gewaschen. Die wäßrige Phase wird mit 1N-Salzsäure auf pH 1 angesäuert, dann 3 mal mit 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: Methanol/Ethylacetat 1/9).

Ausbeute: 52 % ; Smpkt.: 107-108 °C.

(*S*)-*O*-(1-Phenylethyl)-phthalsäureester:

350 mg (2.86 mmol) (*S*)-1-Phenylethanol werden in 10 mL Methylenchlorid gelöst, dann gibt man 289.8 mg (2.86 mmol) Triethylamin, 424 mg (2.86 mmol) Phthalsäureanhydrid und eine Spatelspitze DMAP zu und rührt die Reaktionslösung 3 Stunden bei RT. Nach Entfernen des Lösungsmittels verbleibt ein orangefarbenes Öl, das säulenchromatographisch gereinigt wird (Eluent: Petrolether/Ethylacetat 1/1).

Ausbeute: 69 % ; Smpkt.: 80-81 °C (Lit: 81-82 °C), $[\alpha]_D^{22} = +22.7^\circ$, $c = 4$, MeOH) (Lit: $[\alpha]_D^{22} = +22.0^\circ$ ($c = 4$, MeOH)).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, Methanol- d_4 , 297 K):

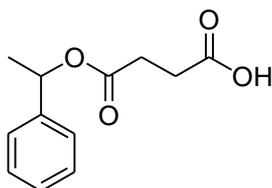
$\delta = 1.58$ (d, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 6.6$ Hz, H-10) ; 6.07 (q, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 6.6$ Hz, H-9) ; 7.18 - 7.35 (m, 5H, H-12-H-16) ; 7.48 - 7.52 (m, 2H, H-4, H-5) ; 7.55 - 7.66 (m, 1H, H-6) ; 7.75 - 7.85 (m, 1H, H-3) ; 11.31 (s, 1H, CO_2H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, Methanol- d_4 , 297 K): teilweise nicht zuordbar

$\delta = 25.5$ (C-10) ; 74.6 (C-9) ; 125.8 , 126.7 , 128.9 , 129.0 , 130.3 , 130.6 , 131.3 , 132.5 , 133.7 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16) ; 141.4 (C-7) ; 146.1 (C-2) ; 167.7 (C-8) ; 172.2 (C-1).

***O*-(1-Phenylethyl)-succinsäureester**

Die (*S*)-Verbindung und das Racemat wurden gekauft.



Enantiomerenanalytik:

O-(1-Phenylethyl)-succinsäureester als Methylesterderivat

HPLC (Chiralpak AD, Hexan:Ethanol 90:10, Fluß = 1.0 mL/min):

(*R*)-Enantiomer: 6.12 min

(*S*)-Enantiomer: 8.14 min

N-Acetyl-phenylalanyl-phenylalanin (N-Ac-Phe-Phe-OH)(1*S*,2*S*)- N-Acetyl-phenylalanyl-phenylalanin (*N*-Ac-Phe-Phe-OH)

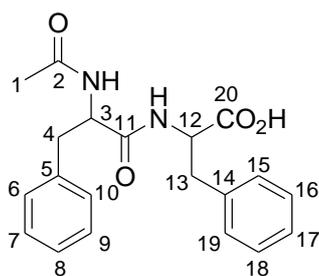
630 mg (1.71 mmol) (1*S*,2*S*)-*N*-Ac-Phe-Phe-OMe werden mit 67.7 mg (2.82 mmol) LiOH in 50 mL eines Methanol/Wasser (2/1) Gemisches für 20 Minuten gerührt. Nach Ansäuern des Reaktionsansatzes mit konz. HCl wird das Lösungsmittel entfernt, das Rohprodukt in Aceton aufgeschlämmt und filtriert.

Ausbeute: 93 % ; Smpkt.: 228-233°C (Lit: 238-242°C) ; $[\alpha]_D^{22} = +5.52$ (c = 0.47, Pyridin).

(1*RS*,2*RS*)-*N*-Ac-Phe-Phe-OH

Synthese analog der (1*S*,2*S*)-Verbindung.

Ausbeute: 89 % ; Smpkt.: 238-248 °C.



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

$\delta = 1.72$ (s, 3H, H-1) ; 2.68, 2.96, 3.09 (4d, 4H, $^3J(\text{H,H}) = 10.3$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.7$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.9$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 14.1$ Hz, H-4, H-13) ; 4.42-4.56 (m, 2H, H-3, H-12) ; 7.16-7.31 (m, 10H, H-6-H-10, H-15-H-19) ; 8.08, 8.29 (2d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.5$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 7.7$ Hz, 2NH) ; 12.79 (s, br, 1H, H-20).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

$\delta = 22.7$ (C-1) ; 36.9, 37.8 (C-4, C-13) ; 53.8, 53.9 (C-3, C-12) ; 126.5, 126.8 (C-8, C-17) ; 128.3, 128.5 (C-6, C-10, C-15, C-19) ; 129.5 (C-7, C-9, C-16, C-18) ; 137.8, 138.4 (C-5, C-14) ; 169.3 (C-2) ; 171.8 (C-11) ; 173.1 (C-20).

MS (CI, Isobutan): m/z : 355 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ; 337 ; 295 ; 251 ; 206 ; 166 ; 120 ; 91 ; 77.

Enantiomerenanalytik der (1*RS*,2*RS*)-Verbindung:

(HPLC, AD, Hexan:Isopropanol 90:10, Fluß = 2.0 mL/min)

N-Ac-Phe-Phe-OH als Methylesterderivat

(1*S*,2*S*), (1*R*,2*R*) Enantiomerenpaar:

(1*S*,2*S*)-Enantiomer: 7.78 min

(1*R*,2*R*)-Enantiomer: 10.36 min

(1*S*,2*R*), (1*R*,2*S*) Enantiomerenpaar:

(1*R*,2*S*)-Enantiomer: 16.89 min

(1*S*,2*R*)-Enantiomer 23.22 min

N-Acetyl-phenylalanyl-phenylalaninmethylester (N-Ac-Phe-Phe-OMe)

(1*S*,2*S*)-N-Acetyl-phenylalanyl-phenylalaninmethylester (N-Ac-Phe-Phe-OMe)

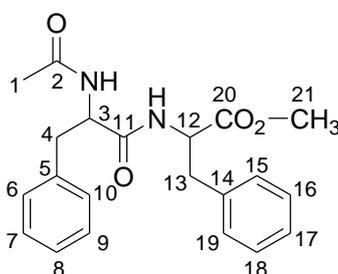
Unter Schutzgasatmosphäre werden 2.0 g (9.66 mmol) (*S*)-*N*-Acetylphenylalanin in 200 mL Dichlormethan suspendiert, anschließend setzt man 3.78 g (19.72 mmol) und ca. 5 mg 4-Dimethylaminopyridin zu, woraufhin eine klare Lösung entsteht. Nach 10 Minuten Rühren tropft man eine Suspension von 2.13 g (9.86 mmol) Phenylalaninmethylesterhydrochlorid in 200 mL Dichlormethan zu und läßt die Reaktion 4 Tage bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktionslösung wird dann mit 200 mL 0.2N NaOH und zweimal mit 200 mL Wasser extrahiert, die vereinigten wäßrigen Phasen werden zweimal mit je 300 mL Dichlormethan gewaschen. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen und Entfernen des Lösungsmittels wird das Produkt erhalten.

Ausbeute: 53 % ; Smpkt.: 172 °C (Lit: 172°C) ; $[\alpha]_D^{22} = +23.4^\circ$, (c = 0.85, CHCl₃) (Lit: $[\alpha]_D^{22} = +24.3^\circ$, (c = 1, CHCl₃)).

(1*S*,2*S*)-N-Acetyl-phenylalanyl-phenylalaninmethylester (N-Ac-Phe-Phe-OMe)

Darstellung analog (1*S*,2*S*)-*N*-Ac-Phe-Phe-OMe.

Ausbeute: 76 % ; Smpkt.: 162-164 °C.



¹H-NMR (400.1 MHz, DMSO-d₆, 297 K):

$\delta = 1.91$ (s, 3H, H-1) ; 2.68, 2.96, 3.09 (2dd, 4H, ³*J*(H,H) = 6.5 Hz, ²*J*(H,H) = 13.8 Hz, ³*J*(H,H) = 6.5 Hz, ²*J*(H,H) = 13.0 Hz, H-4, H-13) ; 3.64 (s, 3H, H-21) ; 4.65 (2dd, 2H, ³*J*(H,H)

= 6.5 Hz, $^3J(\text{H,H}) = 6.7$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 13.0$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 13.8$ Hz, H-3, H-12) ; 6.16, 6.28 (2s, 2H, NH) ; 7.16-7.38 (m, 10H, H-6-H-10, H-15-H-19).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , 297 K):

$\delta = 23.5$ (C-1) ; 38.3, 38.5 (C-4, C-13) ; 52.8 (C-21) ; 53.8, 53.8 (C-3, C-12) ; 127.5, 127.6 (C-8, C-17) ; 129.0, 129.1 (C-6, C-10, C-15, C-19) ; 129.6, 129.7 (C-7, C-9, C-16, C-18) ; 136.0, 136.7 (C-5, C-14) ; 170.5 (C-2) ; 170.9 (C-20) ; 171.7 (C-11).

MS (EI, 70 eV): m/z : 368 ($[\text{M}^+\bullet]$) ; 336 ; 324 ; 309 ; 277 ; 235 ; 206 ; 175 ; 162 ; 147 ; 131 ; 120 ; 104 ; 91 ; 77 ; 65 ; 43.

***N*-Acetyl-alanyl-phenylalaninmethylester (*N*-Ac-Ala-Phe-OMe)**

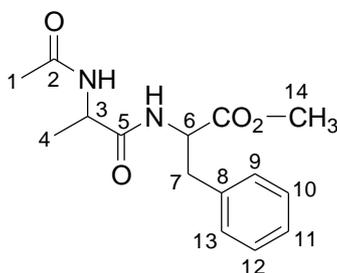
(1*S*,2*S*)- *N*-Acetyl-alanyl-phenylalaninmethylester (*N*-Ac-Ala-Phe-OMe)

Die (1*S*,2*S*)-Verbindung wurde käuflich erworben.

(1*RS*,2*RS*)-*N*-Acetyl-alanyl-phenylalaninmethylester (*N*-Ac-Ala-Phe-OMe)

300 mg (2.3 mmol) *N*-Acetyl-alanin und 897 mg (4.68 mmol) EDCI werden in 20 mL Dichlormethan suspendiert, mit der Zugabe von 5.0 mg DMAP klart die Lösung vollständig auf. Nach Zugabe von D,L-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid suspendiert in 20 mL Dichlormethan läßt man die Reaktion 3 Tage bei Raumtemperatur rühren. Nach Waschen mit 2 mal 50 mL Wasser wird die organische Phase mit NaSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es verbleibt das farblose Produkt.

Ausbeute: 66 % ; Smpkt.: 150-153 °C.



^1H -NMR (400.1 MHz, CDCl_3 , 297 K):

$\delta = 1.24$ (2d, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, H-4) ; 1.94 (2s, 3H, H-1) ; 3.02 (2dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.9$ Hz, H-7) ; 3.14 (2dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.7$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.9$ Hz, H-7) ;

3.69 (s, 3H, H-14) ; 4.42-52 (m, 1H, H-6) ; 4.75-83 (m, 1H, H-3) ; 6.36 (2d, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, NH) ; 6.77 (2d, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.8$ Hz, NH) ; 7.13-7.23 (m, 5H, H-9-H-13).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 297 K):

$\delta = 18.9$ (C-4) ; 23.5 (C-1) ; 38.2 (C-7) ; 49.1 (C-14) ; 52.8 (C-3) ; 53.6, 53.8 (C-6) ; 127.6 (C-11) ; 129.0 (C-9, C-13) ; 129.6, 129.7 (C-10, C-12) ; 136.1, 136.2 (C-8) ; 170.5 (C-2) ; 172.1, 172.2 (C-15) ; 172.4 (C-5).

MS (CI, Isobutan): m/z : 279 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ; 261 ; 234 ; 206 ; 166 ; 147 ; 120 ; 86 ; 60.

Enantiomerenanalytik:

(HPLC, Chiralcel AD 062, Hexan:Isopropanol 90:10, Fluß = 2.0 mL/min)

N-Ac-Ala-Phe-OH als Methylesterderivat

(1*S*,2*S*), (1*R*,2*R*) Enantiomerenpaar:

(1*S*,2*S*)-Enantiomer: 11.92 min

(1*R*,2*R*)-Enantiomer: 13.79 min

(1*S*,2*R*), (1*R*,2*S*) Enantiomerenpaar:

(1*R*,2*S*) Enantiomer: 16.31 min

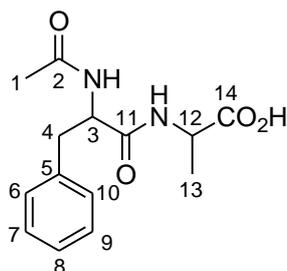
(1*S*,2*R*) Enantiomer: 22.91 min

***N*-Acetyl-phenylalanyl-alanin (*N*-Ac-Phe-Ala-OH)**

(1*S*,2*S*)-*N*-Acetyl-phenylalanyl-alanin (*N*-Ac-Phe-Ala-OH)

1.00 g (4.23 mmol) (1*S*,2*S*)-Phe-Ala-OH und 711 mg (8.46 mmol) NaHCO_3 werden in 60 mL Wasser 10 Minuten gerührt bis sich eine klare Lösung ergibt. Nach der Zugabe von 864 mg (8.46 mmol) Essigsäureanhydrid wird für 24 Stunden gerührt. Die Lösung wird im Anschluß mit 1N Natronlauge auf pH 11 eingestellt und 2 mal mit 50 mL Ethylacetat gewaschen. Nach Ansäuern der Lösung auf pH 1 mit wäßriger HCl wird 6 mal mit 50 mL Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit MgSO_4 getrocknet und das Produkt durch Entfernen des Lösungsmittels am Vakuum gewonnen.

Ausbeute: 80 % ; Smpkt.: 170-172 °C.



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, Methanol- d_4 , 297 K):

δ = 1.65 (d, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.3$ Hz, H-13) ; 2.13 (s, 3H, H-1) ; 3.11 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 9.6$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 14.1$ Hz, H-4) ; 3.43 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.0$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 14.1$ Hz, H-4) ; 4.64 (q, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 7.3$ Hz, H-12) ; 4.92 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.0$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 9.6$ Hz, H-3) ; 7.44-7.56 (m, 5H, H-6-H-10).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, Methanol- d_4 , 297 K):

δ = 18.1 (C-13) ; 22.8 (C-1) ; 39.4 (C-4) ; 56.2, 56.3 (C-3, C-12) ; 128.2 (C-8) ; 129.8 (C-6, C-10) ; 130.8 (C-7, C-9) ; 139.0 (C-5) ; 173.6 (C-2) ; 174.0 (C-11) ; 176.2 (C-14).

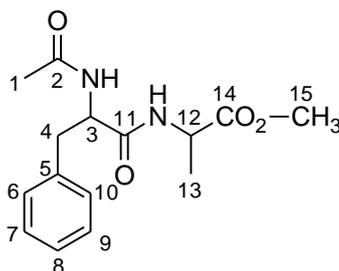
MS (EI, 70 eV): m/z : 278 ($[\text{M}^+]$) ; 260 ; 219 ; 200 ; 190 ; 175 ; 162 ; 145 ; 131 ; 120 ; 99 ; 91 ; 77 ; 60 ; 43 ; 30.

(1*RS*,2*RS*)-*N*-Acetyl-phenylalanyl-alaninmethylester (*N*-Ac-Phe-Ala-OMe)

Die Darstellung erfolgte analog der Synthese von (1*RS*,2*RS*)-*N*-Ac-Ala-Phe-OMe.

Eingesetzte Mengen: 1.00 g (4.83 mmol) *N*-Acetylphenylalanin, 925 mg EDCI, 674 mg Alaninmethylesterhydrochlorid

Ausbeute: 93 % ; Smpkt.: 137 °C (Lit: 137 °C).



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, Methanol- d_4 , 297 K):

δ = 1.13, 1.27 (2d, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 7.3$ Hz, H-13) ; 1.90 (2s, 3H, H-1) ; 2.88-3.05 (2dd, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 6.3$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.3$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 13.7$ Hz, H-4) ; 3.63 (2s, 3H, H-15) ; 4.35-4.41 (m, 1H, H-12) ; 4.63-4.68 (m, 1H, H-3) ; 6.36-6.53 (m, 2H, 2NH) ; 7.12-7.23 (m, 5H, H-6-H-10).

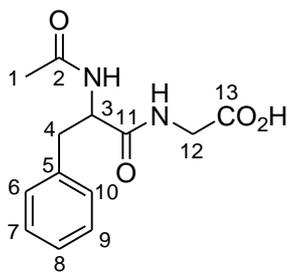
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, Methanol- d_4 , 297 K):

$\delta = 18.3, 18.5$ (C-13) ; 23.6 (C-1) ; $38.9, 39.1$ (C-4) ; $48.3, 48.6$ (C-15) ; 52.9 (C-12) ; $54.7, 54.8$ (C-3) ; 127.4 (C-8) ; 129.0 (C-6, C-10) ; 129.7 (C-7, C-9) ; $136.1, 137.0$ (C-5) ; 170.5 (C-2) ; $170.8, 171.0$ (C-11) ; $173.1, 173.3$ (C-14).

***N*-Acetyl-phenylalanyl-glycin (*N*-Ac-Phe-Gly-OH)**

Die Darstellung von (*S*)-*N*-Acetyl-phenylalanyl-glycin und (*R,S*)-*N*-Acetyl-phenylalanyl-glycin erfolgte analog der Synthesevorschrift für *N*-Acetyl-glycyl-phenylalanin.

Eingesetzte Mengen: 1.00 g (4.83 mmol) *N*-Acetylphenylalanin, 925 mg EDCl, 606 mg Glycinmethylesterhydrochlorid



(*S*)-*N*-Acetyl-phenylalanyl-glycin:

Ausbeute: 49 % ; Smpkt.: 158-160 °C (Lit: 159-161°C) ; $[\alpha]_D^{22} = -1.96^\circ$, (c = 0.92, MeOH)
(Lit: $[\alpha]_D^{22} = -1.9^\circ$, (c = 1, MeOH).

(*RS*)-*N*-Acetyl-phenylalanyl-glycin

Ausbeute: 53 % ; Smpkt.: 175°C (Lit: 179-180°C).

^1H -NMR (400.1 MHz, Methanol- d_4 , 297 K):

$\delta = 2.09$ (s, 3H, H-1) ; 3.08 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 9.5$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 14.1$ Hz, H-4) ; 3.42 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.2$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 14.1$ Hz, H-4) ; 4.12 (s, 2H, H-12) ; 4.88 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 5.2$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 9.5$ Hz, H-3) ; $6.86, 7.11$ (s,d, 2H, $^4J(\text{H,H}) = 6.9$ Hz, 2NH) ; $7.37-7.54$ (m, 5H, H-6-H-10).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, Methanol- d_4 , 297 K):

$\delta = 22.8$ (C-1) ; 39.2 (C-4) ; 42.2 (C-12) ; 56.4 (C-3) ; 128.1 (C-8) ; 129.8 (C-6, C-10) ; 130.7 (C-7, C-9) ; 139.1 (C-5) ; 173.1 (C-2) ; 173.6 (C-11) ; 174.6 (C-13).

MS (CI, Isobutan): m/z : 265 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ; 247 ; 190 ; 162 ; 131 ; 120 ; 91.

Enantiomerenanalytik:

(HPLC, Chiralcel OD-H, Hexan:Ethanol 98:2, Fluß = 2.0 mL/min)

N-Ac-Phe-Gly als Methylesterderivat

(*S*)-Enantiomer: 22.73 min

(*R*)-Enantiomer: 26.61 min

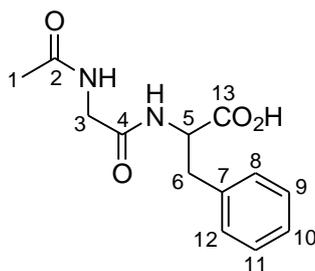
***N*-Acetyl-glycyl-phenylalanin (*N*-Ac-Gly-Phe-OH)**

Die racemische Verbindung wurde käuflich erworben.

(*S*)- *N*-Acetyl-glycyl-phenylalanin (*N*-Ac-Gly-Phe-OH)

222 mg (1.0 mmol) Glycyl-phenylalanin und 128 mg (1.5 mmol) NaHCO₃ werden in 10 mL Wasser gelöst und im Anschluß zur Lösung 175 µL (1.5 mmol) Essigsäureanhydrid zugegeben. Nach 16 Stunden Reaktionszeit wird der pH-Wert der Lösung mit NaOH auf ca. 11 eingestellt und die Lösung 3 mal mit 30 mL Ethylacetat gewaschen. Die wäßrige Phase wird nun mit HCl angesäuert (pH-Wert ca. 1) und erneut 3 mal mit 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet und das Produkt durch Entfernen des Lösungsmittels am Vakuum erhalten.

Ausbeute: 70 % ; Smpkt.: 158-162 °C (Lit: 163°C) ; $[\alpha]_D^{22} = +40.0^\circ$, (c = 0.8, EtOH) (Lit: $[\alpha]_D^{22} = +44.0^\circ$, (c = 2, EtOH)).



¹H-NMR (400.1 MHz, Methanol-d₄, 297 K):

δ = 2.19 (s, 3H, H-1) ; 3.23 (dd, 1H, ³*J*(H,H) = 8.1 Hz, ²*J*(H,H) = 13.9 Hz, H-6) ; 3.41 (dd, 1H, ³*J*(H,H) = 5.2 Hz, ²*J*(H,H) = 13.9 Hz, H-6) ; 4.06 (dd, 2H, ²*J*(H,H) = 16.8 Hz, ²*J*(H,H) = 22.6 Hz, H-3) ; 4.90 (dd, 1H, ³*J*(H,H) = 5.2 Hz, ³*J*(H,H) = 8.1 Hz, H-5) ; 6.76, 7.04 (s,d, 2H, ⁴*J*(H,H) = 7.0 Hz, 2NH) ; 7.41-7.53 (m, 5H, H-8-H-12).

¹³C{¹H} NMR (100.6 MHz, Methanol-d₄, 297 K):

δ = 22.9 (C-1) ; 38.8 (C-6) ; 43.8 (C-3) ; 55.4 (C-5) ; 128.3 (C-10) ; 130.0 (C-8, C-12) ; 130.9 (C-9, C-11) ; 138.7 (C-7) ; 171.9 (C-4) ; 174.2 (C-2) ; 174.9 (C-13).

MS (EI, 70 eV): m/z : 264 ($[M^{+\bullet}]$); 246; 220; 203; 182; 166; 148; 131; 120; 91; 72; 65; 43; 36.

Enantiomerenanalytik:

(HPLC, Chiralcel OD-H, Hexan:Ethanol 95:5, Fluß = 0.8 mL/min)

N-Acetyl-glycyl-phenylalanin als Methylesterderivat

(*S*)-Enantiomer: 21.66 min

(*R*)-Enantiomer: 26.02 min

10.2.6 Arbeitsvorschriften zum Themengebiet: Dynamische kinetische Racematspaltung von sekundären Alkoholen

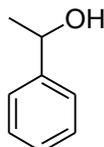
10.2.6.1 Durchführung von Racemisierungsreaktionen von sekundären Alkoholen (AAV 11).

5.0-30.0 mg (1.0-5.0 mol%) Rutheniumkatalysator werden möglichst zügig in ein Schlenkgefäß eingewogen, das anschließend 5 Minuten lang securiert wird. Im Argongegenstrom werden nun entsprechend der vorliegenden Katalysatormenge und des beabsichtigten Alkohol/Katalysator-Verhältnisses der (*S*)-Alkohol, 5-20 mol% des entsprechenden Ketons, evtl. 10-200 μ L Triethylamin und 2.5 mL Lösungsmittel zugesetzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung im Ölbad auf die gewünschte Reaktionstemperatur gebracht. Zur Umsatz- und zur Enantiomerenbestimmung aller chiralen Reaktionspartner werden 100 μ L Proben entnommen und mit Toluol auf 1.0 mL verdünnt, die ohne weitere Derivatisierung analysiert werden können.

10.2.7 Dargestellte und charakterisierte Verbindungen

1-Phenylethylethanol

Die (*S*)-Verbindung und das Racemat wurden gekauft.



Enantiomerenanalytik:

GC (50 m Lipodex E, 90°C, 1.0 mL Argon/min):

1-Phenylethylethanol underivatisiert

(*R*)-Enantiomer: 15.60 min

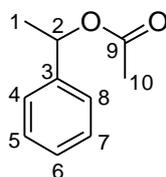
(*S*)-Enantiomer: 16.29 min

Essigsäure-1-phenylethylester

400 mg (3.27 mmol) (*S*)-1-Phenylethylalkohol werden in 60 mL Dichlormethan vorgelegt, anschließend fügt man 364 mg (3.60 mmol) Triethylamin und 435 mg (4.26 mmol) Essigsäureanhydrid zu und rührt die Reaktion einen Tag bei RT. Die Lösung wird 3 mal mit 1N-Salzsäure gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Eluent: Ethylacetat/Petrolether 1/1).

(*S*)- Essigsäure-1-phenylethylester:

Ausbeute: 99 % ; farbloses Öl, $[\alpha]_D^{22} = -106^\circ$ ($c = 1$, EtOH).



¹H-NMR (400.1 MHz, CDCl₃, 297 K):

$\delta = 1.44$ (d, 3H, ³*J*(H,H) = 6.6 Hz, H-1) ; 1.98 (s, 3H, H-10) ; 5.80 (q, 1H, ³*J*(H,H) = 6.6 Hz, H-2) ; 7.19 - 7.27 (m, 5H, H-4-H-8).

¹³C{¹H} NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 297 K):

$\delta = 21.8$ (C-10) ; 22.6 (C-1) ; 72.7 (C-2) ; 126.5 (C-4, C-8) ; 128.3 (C-6) ; 128.9 (C-5, C-7) ; 142.1 (C-3) ; 170.7 (C-9).

Enantiomerenanalytik (das Racemat wurde käuflich erworben):

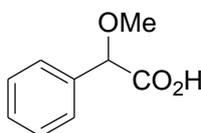
GC (50 m ChiralDEX β -PM, 110°C, 1.0 mL Argon/min):

(*R*)-Enantiomer: 18.57 min

(*S*)-Enantiomer: 19.65 min

2-Methoxyphenylelessigsäure

Die (*S*)-Verbindung und das Racemat wurden gekauft.



Enantiomerenanalytik:

2-Methoxyphenylelessigsäure als Methylesterderivat

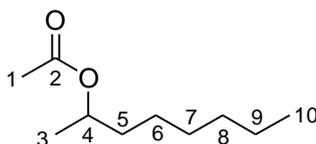
HPLC (Chiralcel OD-H, Hexan:Isopropanol 9:1, Fluß = 0.8 mL/min)

(*R*)-Enantiomer: 6.505 min

(*S*)-Enantiomer: 10.63 min

Essigsäure-2-octylester

Das Racemat wurde nach Literaturvorschrift^[148] dargestellt.



¹H-NMR (400.1 MHz, CDCl₃, 297 K):

δ = 1.14 (t, 3H, ³*J*(H,H) = 6.5 Hz, H-10) ; 1.45 (d, 3H, ³*J*(H,H) = 6.3 Hz, H-3) ; 1.72 (m, 8H, H-6-H-9) ; 1.85 (m, 2H, H-5) ; 2.28 (s, 3H, H-1) ; 5.14 (m, 1H, ³*J*(H,H) = 6.3 Hz, H-4).

¹³C{¹H} NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 297 K):

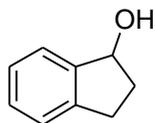
δ = 14.5 (C-10) ; 20.4 (C-3) ; 21.8 (C-1) ; 23.0 (C-9) ; 25.8 (C-8) ; 29.5 (C-7) ; 32.1 (C-6) ; 36.3 (C-5) ; 71.5 (C-4) ; 171.2 (C-2).

Enantiomerenanalytik:

Die Trennung der Enantiomeren ist nicht gelungen.

1-Indanol

Die (*S*)-Verbindung und das Racemat wurden gekauft.



Enantiomerenanalytik:

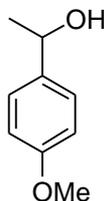
HPLC (Chiralcel OB-H, Eluent Hexan/Isopropanol 90/10, Fluß = 2.5 mL/min):

(*R*)-Enantiomer: 2.27 min

(*S*)-Enantiomer: 3.29 min

1-(4-Methoxyphenyl)-ethanol

Die (*S*)-Verbindung und das Racemat wurden gekauft.



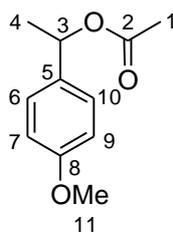
Enantiomerenanalytik: HPLC (Chiralcel OB-H, Eluent Hexan/Isopropanol 90/10, Fluß = 1.5 mL/min)

(*R*)-Enantiomer: 27.3 min

(*S*)-Enantiomer: 29.1 min

Essigsäure-1-(4-Methoxyphenyl)-ethylester

Das Racemat wurde nach Literaturvorschrift^[148] dargestellt.



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, CDCl_3 , 297 K):

$\delta = 1.75$ (d, 3H, $^3J(\text{H,H}) = 6.6$ Hz, H-4) ; 2.28 (s, 3H, H-1) ; 4.03 (s, 3H, H-11) ; 7.11 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.7$ Hz, H-7, H-9) ; 7.52 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.7$ Hz, H-6, H-10).

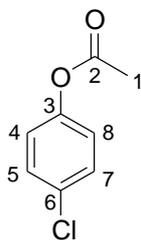
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 297 K):

$\delta = 21.8$ (C-1) ; 22.4 (C-4) ; 55.7 (C-11) ; 72.4 (C-3) ; 114.3 (C-7, C-9) ; 128.0 (C-6, C-10) ; 134.2 (C-5) ; 159.7 (C-8) ; 170.8 (C-2).

Essigsäure-4-chlorphenylester

18.3 g (233 mmol) Acetylchlorid werden in 100 mL Dichlormethan gelöst und tropfenweise zu einer Lösung aus 20.0 g (156 mmol) 4-Chlorphenol und 18.5 g (233 mmol) Pyridin in 400 mL Dichlormethan getropft. Die Reaktion wird 24 Stunden zu Rückfluß erhitzt, anschließend weitere 24 Stunden bei RT gerührt. Die Lösung wird um die Hälfte eingengt, dann mit 3 mal 100 mL 1.5 N HCl und 2 mal 100 mL Wasser gewaschen. Zuletzt trocknet man die organische Phase über MgSO_4 und entfernt das Lösungsmittel am Vakuum.

Das Rohprodukt wird 2 mal säulenchromatographisch aufgereinigt (über Kieselgel, Eluent Hexan/Ethylacetat 20/3) bis eine GC-Reinheit von über 99.5 % erreicht wird.



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, CDCl_3 , 297 K):

$\delta = 2.20$ (s, 3H, H-1) ; 6.94 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.7$ Hz, H-4, H-8) ; 7.25 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.7$ Hz, H-5, H-7).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 297 K):

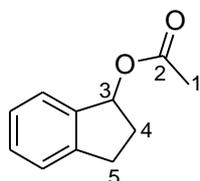
$\delta = 20.0$ (C-1) ; 121.9 (C-4, C-8) ; 128.4 (C-5, C-7) ; 130.1 (C-6) ; 148.1 (C-3) ; 168.2 (C-2).

Essigsäure-1-indanylester

Das Racemat und die (*S*)-Verbindung wurden nach folgender Vorschrift dargestellt.

Eine Lösung aus 1.66 g (22.0 mmol) Acetylchlorid in 30 mL trockenem Benzol werden zu einer Lösung aus 2.68 g (20 mmol) 1-Indanol in 1 mL Pyridin und 50 mL trockenem Benzol zugetropft und für 24 Stunden gerührt. Der Ansatz wird nacheinander mit 50 mL Wasser, 2 mal 20 mL 1N HCl, 1N NaOH und schließlich 50 mL Wasser gewaschen. Die Benzolphase wird getrocknet, das Lösungsmittel einrotiert und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel, Eluent Hexan/Essigester 4/1) zu einer Reinheit von 99.5 % aufgereinigt.

Ausbeute : 72 %.



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, CDCl_3 , 297 K):

δ = 2.07 (s, 3H, H-1) ; 2.06-2.17 (m, 1H, H-4) ; 2.42-2.55 (m, 1H, H-4) ; 2.80-2.95 (m, 1H, H-5) ; 3.03-3.15 (m, 1H, H-5) ; 6.19 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 6.8$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 3.8$ Hz, H-3) ; 7.21-7.40 (m, 4H, H-arom.).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 297 K):

δ = 21.3 (C-1) ; 30.2 (C-4) ; 32.3 (C-5) ; 78.3 (C-3) ; 124.8, 125.4, 126.7, 128.9 (CH-arom) ; 141.0, 144.4 (C-arom.) ; 171.1 (C-2).

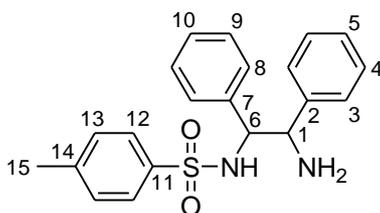
(1*S*,2*S*)-(1*R*,2*R*)-1,2-Diphenylethylendiamin-monotosylat

Die Synthese der Verbindung erfolgte in Anlehnung an eine Darstellungsmethode von (1*R*,2*R*)-*N*-Tosyl-*N,N'*-dimethyl-1,2-diphenyl-1,2-ethandiamin.^[149]

1.0 g (4.7 mmol) (1*S*,2*S*)-(1*R*,2*R*)-1,2-Diphenylethylendiamin werden in 5 mL Triethylamin und 30 mL Methylenchlorid gelöst und die Mischung auf exakt 0°C gekühlt. Zu dieser Lösung wird innerhalb von 30 Minuten eine Lösung aus 0.9 g (4.7 mmol) Tosylchlorid in 20 mL Methylenchlorid zugetropft. Nach einer Reaktionszeit von 2 Tagen wäscht man die Lösung zweimal mit 20 mL 0.5N NaOH, trocknet die organische Phase mit MgSO_4 und entfernt schließlich das Lösungsmittel. Das erhaltene Produktgemisch wird nun unter

intensivem Rühren für 30 Minuten in 500 mL Diethylether aufgeschlämmt, anschließend filtriert man vom Ungelösten. Die Lösung wird nun unter starkem Rühren vorsichtig tropfenweise mit konz. HCl versehen, wobei das Produkt als Hydrochlorid ausfällt. Es darf nicht zur Phasenseparation kommen, da sich das Produkt sonst löst. Das Hydrochlorid wird sofort in 20 mL 0.5N Natronlauge aufgenommen und 4 mal mit 20 mL Methylenchlorid extrahiert. Nach Trocknung und Entfernen des Lösungsmittels wird das Produkt erhalten.

Ausbeute: 45 % ; Smpkt.: 64 °C.



$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, CDCl_3 , 297 K):

$\delta = 2.22$ (s, 3H, H-15) ; 4.27 (d, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 6.7$ Hz, H-1) ; 4.45 (d, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 6.7$ Hz, H-6) ; 6.86 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.2$ Hz, H-13) ; 6.99 - 7.20 (m, 10H, H-3-H-5, H-8-H-10) ; 7.25 (d, 2H, $^3J(\text{H,H}) = 8.2$ Hz, H-12).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400.1 MHz, CDCl_3 , 297 K): nur teilweise Charakterisierung möglich

$\delta = 21.8$ (C-15) ; 60.7 (C-6) ; 63.4 (C-1) ; 127.0 ; 127.3 ; 127.5 ; 128.2 ; 128.5 ; 128.9 ; 129.4 ; 129.7 (C-3, C-4, C-5, C-8, C-9, C-10, C-12, C-13) ; 136.2 (C-11) ; 138.7 (C-14) ; 142.9 (C-2, C-7).

11 Literaturverzeichnis

- [1] L. Pasteur, *C. R. Hebd. Seance Acad. Sci.* **1848**, 26, 535.
- [2] L. Pasteur, *C. R. Hebd. Seance Acad. Sci.* **1857**, 45, 1032.
- [3] L. Pasteur, *C. R. Hebd. Seance Acad. Sci.* **1858**, 46, 615.
- [4] E. J. Ariens, J. J. S. van Rensen, W. Welling, *Stereoselectivity of pesticides: biological and chemical Problems*, Elsevier, Amsterdam, **1988**.
- [5] C. C. Pfeiffer, *Science* **1956**, 7, 29.
- [6] Food & Drug Administration, *Chirality* **1992**, 4, 338.
- [7] A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby, *Chirality in Industry*, Wiley, Chichester, **1992**.
- [8] R. Sheldon, *Chemistry & Industry*, **1990**, 4, 212.
- [9] Übersicht zu biokatalytischen Methoden: E. Schöffers, A. Golebiowski, C. R. Jonson, *Tetrahedron* **1996**, 52, 3769.
- [10] H. B. Kagan, J. C. Fiaud, *Top. Stereochem.* **1988**, 18, 249.
- [11] D. J. Morrison, H. S. Mosher, *Asymmetric Organic Reactions*, American Chemical Society, Washington D. C., **1971**.
- [12] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Heidelberg, **1997**.
- [13] H. Stecher, K. Faber, *Synthesis* **1997**, 1.
- [14] Versuch einer Klassifizierung:
Synthese im Blickpunkt, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1997**, 45, 789.
- [15] a) G. Balavoine, A. Moradpour, H. B. Kagan, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 5152; b) V. S. Martin, S. S. Woodward, T. Katsuki, Y. Yamada, M. Ikeda, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 6237; c) C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 7294; d) M. Kitamura, M. Tokunaga, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 144; e) R. Noyori, M. Tokunaga, M. Kitamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, 68, 36; f) R. S. Ward, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 1475; g) S. Caddick, K. Jenkins, *Chem. Soc. Rev.* **1996**, , 447.
- [16] J. M. Muchowski, S. H. Unger, J. Ackrell, P. Cheung, J. Cook, P. Gallegra, O. Halpern, R. Koehler, A. F. Kluge, *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 1037.
- [17] G. Fülling, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2845.
- [18] D. S. Tan, M. M. Günther, D. G. Drueckhammer, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 117, 9093.
- [19] P.-J. Um, D. G. Drueckhammer, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5605.
- [20] z.B: S. Iriuchijima, N. Kojima, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, 185.

- [21] K. Yamamoto, K. Oishi, I. Fujimatsu, K. Komatsu, *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 3028.
- [22] M. Inagaki, J. Hiratake, T. Nishioka, J. Oda, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9360.
- [23] M. Inagaki, J. Hiratake, T. Nishioka, J. Oda, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5643.
- [24] M. van den Heuvel, A. D. Cuiper, H. van der Deen, R. M. Kellogg, B. L. Feringa, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1655.
- [25] H. van der Deen, A. D. Cuiper, R. P. Hof, A. van Oeveren, B. L. Feringa, R. M. Kellogg, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3801.
- [26] J. W. J. F. Thuring, A. J. H. Klunder, G. H. L. Nefkens, M. A. Wegman, B. Zwanenburg, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4759.
- [27] T. Taniguchi, K. Ogasawara, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6429.
- [28] T. Taniguchi, R. M. Kanada, K. Ogasawara, *Tetrahedron Asymmetry* **1997**, *8*, 2773.
- [29] S. Brand, M. F. Jones, C. M. Rayner, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8493.
- [30] a) G. M. Coppola, H. F. Schuster, *Asymmetric Synthesis: Construction of Chiral Molecules Using Amino Acids*, Wiley, New York, **1987**; b) H. Waldmann, *Synlett*, **1995**, 133; c) M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1559.
- [31] K. Weissermel, H.J. Arpe, *Industrielle Organische Chemie*, VCH, Weinheim, **1998**.
- [32] H. T. Bücherer, W. Steiner, *J. Prakt. Chem.* **1934**, *140*, 291.
- [33] a) D. P. Wallach, S. Grisolia, *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 277; b) R. Olivieri, E. Frascetti, L. Angelini, *Biotechnol. Bioeng.* **1981**, *23*, 2173; c) H. Yamada, S. Shimizu, H. Shimada, Y. Tani, S. Takahashi, T. Ohashi, *Biochemie* **1980**, *62*, 395.
- [34] C. Syldatk, R. Müller, M. Siemann, F. Wagner, *Biocatalytic production of amino acids and derivatives*, Hanser Verlag, New York, **1992**.
- [35] R.-L. Gu, I.S. Lee, C. J. Sih, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1953.
- [36] J. Z. Crich, R. Brieva, P. Marquart, R.-L. Gu, S. Flemming, C. J. Sih, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3252.
- [37] N. J. Turner, J. R. Winterman, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1113.
- [38] S. A. Brown, M.-C. Parker, N. J. Turner, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1687.
- [39] M. A. Wegman, M. A. P. J. Hacking, J. Rops, P. Pereira, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Tetrahedron Assymetry*, **1999**, *10*, 1739.
- [40] T. Hayashi, M. Konishi, M. Fukushima, T. Mise, M. Kagotani, M. Tajika, M. Kumada, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 180.

- [41] T. Hayashi, M. Konishi, M. Fukushima, K. Kanehira, T. Hioki, M. Kumada, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2195.
- [42] T. Hayashi, M. Konishi, Y. Okamoto, Y. Kabeta, M. Kumada, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3772.
- [43] T. Hayashi, A. Yamamoto, M. Hojo, Y. Ito, *J. Chem. Soc. Chem Commun.* **1989**, 1329.
- [44] T. Hayashi, *Pure & Appl. Chem.* **1988**, *60*, 7.
- [45] T. Hayashi, A. Yamamoto, Y. Ito, E. Nishioka, H. Miura, K. Yanagi, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6301.
- [46] G. Huttner, O. Walter, L. Zsolnai, M. Reggelin, J. Sprinz, M. Kiefer, G. Helmchen, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1523.
- [47] J. Sprinz, G. Helmchen, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *11*, 1769.
- [48] a) A. Tai, H. Watanabe, T. Harada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1468; b) R. Noyori, T. Ikeda, T. Ohkuma, M. Widhalm, M. Kitamura, H. Takeya, S. Akutagawa, N. Sayo, T. Saito, T. Taketomi, H. Kumobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9134; c) M. Kitamura, M. Tokunaga, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 115; d) R. Noyori, M. Tokunaga, M. Kitamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 36; e) K. Mashima, Y. Matsumura, K. Kusano, H. Kumobayashi, N. Sayo, Y. Hori, T. Ishizaki, S. Akutagawa, H. Takaya, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 609; f) M. Kitamura, M. Tokunaga, R. Noyori, *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 1853; f) R. Noyori, *Science* **1990**, *248*, 1194.
- [49] R. Noyori, T. Ohkuma, *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 1493.
- [50] V. Ratovelomanana-Vidal, J.-P. Genet, *Can. J. Chem.* **2000**, *78*, 846.
- [51] a) T. Kitahara, H. Kurata, K. Mori, *Tetrahedron* **1994**, *35*, 147; b) D. Seebach, S. Roggo, T. Maetzke, H. Braunschweiger, J. Cercus, M. Krieger, *Helv. Chim. Acta.* **1987**, *70*, 1605; c) R. Bhide, R. Mortezi, A. Scilimati, C. J. Sih, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4829; d) R. W. Hofmann, W. Ladner, *Chem Ber.* **1983**, *116*, 1631; e) R. W. Hofmann, W. Ladner, W. Helbig, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1170.
- [52] D. Buisson, R. Cecchi, J. A. Laffitte, U. Guzzi, R. Azerad, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3091.
- [53] J. P. Genet, X. Pfister, V. Ralovelomanana-Vidal, C. Pinet, J. A. Laffitte, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4559.
- [54] S. Rodríguez, K. T. Schroeder, M. M. Kayser, J. D. Steward, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2586.
- [55] Y. Zuh, K. J. Manske, Y. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4080.

- [56] X. Feng, L. Shu, Y. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11002.
- [57] M. T. Reetz, C. Dreisbach, *Chimia* **1994**, *48*, 570.
- [58] M. T. Reetz, K. Schimossek, *Chimia* **1996**, 668.
- [59] S. I. Murahashi, N. Yoshimura, T. Tsumiyama, T. Kojima, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *37*, 7623.
- [60] J. V. Allen, J. M. J. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1859.
- [61] H. Nagata, M. Kawamura, K. Ogasawara, *Synthesis* **2000**, *13*, 1825.
- [62] Y. K. Choi, J. H. Suh, D. Lee, I. T. Lim, J. Y. Jung, M.-J. Kim, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8423.
- [63] P. M. Dih, J. A. Howarth, A. R. Hudnott, W. Harris, M. J. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623.
- [64] B. A. Persson, F. F. Huerta, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5237.
- [65] B. A. Persson, A. L. E. Larsson, M. Le Ray, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1645.
- [66] J. H. Koh, H. M. Jeong, J. Park, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5545.
- [67] J. H. Koh, H. M. Jung, M.-J. Kim, J. Park, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6281.
- [68] a) S.-T. Chen, W.-H. Huang, K.-T. Wang, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 1514; b) S.-T. Chen, S.-Y. Chen, S.-C. Hsiao, K.-T. Wang, *Biotechnology Letters* **1991**, *13*, 773-778; c) S.-T. Chen, S.-C. Hsiao, A.-J. Chiou, S.-H. Wu, K.-T. Wang, *Journal of the Chinese Chemical Society* **1992**, *39*, 91; d) S.-T. Chen, C.-C. Tu, K.-T. Wang, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1993**, *3*, 539; e) S.-T. Chen, W.-H. Huang, K.-T. Wang, *Chirality* **1994**, *6*, 572-576.
- [69] S.-T. Chen, W.-H. Huang, K.-T. Wang, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7580.
- [70] E. Abderhalden, W. Zeisset, *Z. physiol. Chem.* **1931**, *195*, 121.
- [71] B. Aleksiev, P. Schamljan, G. Widenov, S. Stoev, S. Zachariev, E. Golovinsky, *Z. Physiol. Chem.* **1981**, *362*, 1323.
- [72] G. Carrea, S. Riga, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2312.
- [73] V. S. Parmar, A. Singh, K. S. Bisht, N. Kumar, Y. N. Belokon, K. A. Kochetkov, S. A. Orlova, V. I. Tararov, T. F. Saveleva, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1223.
- [74] K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH Verlag, Weinheim, **1995**.
- [75] E. J. Ebberts, G. J. A. Ariaans, J. P. M. Houbier, A. Bruggink, B. Zwannenburg, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9417.

- [76] S. K. Yang, Z. Bao, *Chirality* **1994**, 6, 321.
- [77] a) J. C. Clark, G. H. Phillips, M. R. Steer, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1976**, 475 ; b) BE 795874, Glaxo, 25-02-72.
- [78] NL 9000386, NL 9000387, DSM/Stamincarbo, 1990
- [79] a) *Chem. Abstr.* 1069535, 800108 (751209), Stamincarbo B. V., Neth. ; *Chem. Abstr.* **93**:47200 ; b) BE 849170, Stamincarbo, 09-12-75.
- [80] EP 442585, 910821 (910214), Stamincarbo B. V., Neth.; *Chem. Abstr.* **116**:42063.
- [81] A. M. Honnoraty, L. Mion, H. Collet, R. Teissedre, A. Commeyras, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, 132, 709.
- [82] a) EP 89886, 830928 (830316), Centre National de la Recherche Scientifique, Fr. b) Institut National de la Sante et la Recherche Medicale (INSERM), *Chem Abstr.* **110**: 24309.
- [83] P. M. Dinh, M. J. Williams, W. Harris, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 749
- [84] J. P. Greenstein, M. Winitz, *Chemistry of the Amino Acids*, Vol 1, Krieger Publishing Company, Malabar, Florida, **1984**.
- [85] P. Pfeiffer, W. Offerman, H. Werner, *J. prakt. Chem.* **1942**, 159, 313.
- [86] O. Gerngross, A. Olcay, *Chem. Ber.* **1963**, 96, 2550.
- [87] P. V. Kamat, N. B. Laxmeshwar, M. G. Datar, *J. Ind. Chem. Soc.* **1969**, 46, 345.
- [88] R. Herscovitch, J. J. Charette, E. de Hoffmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 5135.
- [89] A. M. Klibanov, *Acc. Chem Res.* **1990**, 23, 114.
- [90] a) M. J. Garcia, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, 3, 1519 ; b) M. J. Garcia, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 2199 ; c) V. Gotor, E. Menedez, Z. Mouloungui, A. Gaset, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 2453 ; M. Quiros, V. M. Sanchez, R. Brieva, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron* **1993**, 49, 4007.
- [91] F. Balkenhohl, K. Ditrich, B. Hauser, W. Ladner, *J. Prakt. Chem.* **1997**, 339, 381.
- [92] a) R. Stürmer, K. Ditrich, W. Siegel, DE 19727517 A1 ; b) F. Balkenhohl, B. Hauer, U. Pressler, DE 4332738 A1.
- [93] O. Schiedeberg, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1881**, 13, 379.
- [94] I. A. Smorodinzev, *Z. Physiol. Chem.* **1922**, 124, 123.
- [95] K. Nawa, *J. Biochem. (Tokyo)* **1938**, 28, 237.
- [96] T. Mori, *J. Biochem. (Tokyo)* **1939**, 29, 225.
- [97] a) T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, *Enzymologia*, **1966**, 31, 214; b) T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, *Agric. Biol. Chem.* **1969**, 33, 1047; c) I. Chibata, T. Tosa, T.

- Sato, T. Mori, *Meth. Enzymol.* **1976**, *44*, 746; d) Tanabe Seiyaku, *Ger. Pat.* 2828194, **1982**; Tanabe Seiyaku, *UK Pat. Appl.* 2082188, **1982**; e) C. Wandrey, E. Flaschel, *Adv. Biochem. Eng.* **1979**, *12*, 147; f) Degussa/GBF, *US Pat.* 4,304, 858, **1981**; g) W. Leuchtenberger, M. Karrenbauer, U. Plöcker, *Ann. N. Y. Acad. Sci. (Enzyme Eng. 7)* **1984**, *434*, 78; h) W. Gerhartz, *Enzymes in Industry*, VCH, Weinheim, FRG, **1990**, 130.
- [98] S. M. Birnbaum, L. Levintow, R. B. Kingsley, J. P. Greenstein, *J. Biol. Chem.* **1952**, *194*, 455.
- [99] H. K. Chenault, J. Dahmer, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6354.
- [100] a) BE 870318, Dynamit Nobel AG, 08-09-77; b) DE 2740380, 790315 (770908), Dynamit Nobel AG, Fed. Rep. Ger.: *Chem Abstr.* **91**: 5454.
- [101] DE 3435095, 860327 (840925), Degussa AG, Fed. Rep. Ger., *Chem Abstr.* **105**:227290.
- [102] H. Titze, H. Teubner, H. Stopsack, DD 149214, 810701 (800218), Ger. Dem. Rep., *Chem. Abstr.* **96**: 85979.
- [103] EP 342575, 891123 (890516), Hoechst AG, Fed. Rep. Ger., *Chem. Abstr.* **112**:217266.
- [104] DE 1963991, 710715 (691220), Dynamit Nobel AG, *Chem Abstr.* **75**:141173.
- [105] H. Miyazaki, T. Shiraiwa, H. Kurokawa, *Chem. Express* **1991**, *6*, 91.
- [106] T. Shiraiwa, S. Sakata, H. Kurokawa, *Chem. Express* **1988**, *3*, 415.
- [107] T. Fukumura, *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 1327.
- [108] S. A. Ahmed, N. Esaki, H. Tanaka, K. Soda, *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 1887.
- [109] S. Tokuyama, H. Miya, K. Hatano, T. Takahashi, *Appl. Microbiol. Microtechnol.* **1994**, *40*, 835.
- [110] I. Gentzen, H.-G. Löffler, F. Schneider, *Z. Naturforsch.* **1980**, *35c*, 544.
- [111] H. K. Chenault, J. Dahmer, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6354.
- [112] C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, **1994**, *12*, 45.
- [113] A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3192.
- [114] P. J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 178.
- [115] C. S. Chen, C. J. Sih, Y. Fujimoto, G. Girdaukus, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294.
- [116] H.-D. Jakubke, *Peptide*, Spektrum Acad. Verl., Heidelberg, **1996**.
- [117] Übersicht zur Anwendung von Pharmapeptiden: D. Blom, C. Bollschweiler, H. Hillen, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 213.
- [118] D. M. Anderson, *Microb. Eng. Enzyme Technol.* **1987**, *1*, 41.

- [119] D. V. Goeddel, D. G. Kleid, F. Bolivar, H. L. Heyneker, D. G. Ansura, R. Crea, T. Horose, A. Kraszewski, K. Itakura, A. D. Riggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1979**, 76, 106.
- [120] L. Villa-Komaroff, A. Efstratiadis, S. Broome, P. Lomedico, R. Tizard, S. P. Nabes, W. L. Chick, W. Gilbert, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **1978**, 75, 3727.
- [121] Übersicht zur Insulinproduktion: F. Wengenmayer, *Angew. Chem.* **1993**, 95, 874.
- [122] G. Jung, A. S. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 375.
- [123] G. Wess, K.-H. Baringhaus, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1994**, 42, 163.
- [124] US 4339603, 820713 (790108), American Cyanamid Co., USA: *Chem. Abstr.* **98**: 53374.
- [125] JP 63185943, 880801 (870127), Kanegafuchi Chemical Industry Co., Japan: *Chem. Abstr.* **110**: 23517.
- [126] EP 320898, 890621 (881214), Schering Corp., USA: *Chem. Abstr.* **111**:232269.
- [127] K. Drauz, A. Kleemann, J. Martens, *Angew. Chem.* **1982**, 94, 590, und dort zitierte Lit.
- [128] K. Severin, R. Bergs, W. Beck, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1722.
- [129] K. Severin, D. Koch, K. Polborn, W. Beck, *Z. anorg. allg. Chem.* **1996**, 622, 562.
- [130] M. Prem, K. Polborn, W. Beck, *Z. Naturforsch.* **1998**, 53b, 1501.
- [131] K. Severin, S. Mihan, W. Beck, *Chem. Ber.* **1995**, 128, 1127.
- [132] A. A. Ioganson, *Russ Chem. Rev.* **1985**, 54, 277.
- [133] C. Potvin, L. Davignon, G. Pannetier, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1975**, 3-4, 507.
- [134] G. Zassinovitch, G. Mestroni, S. Gladiali, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1051.
- [135] C. F. de Graauw, J. A. Peters, H. van Bekkum, J. Huskens, *Synthesis* **1994**, 1007.
- [136] S. Hashiguchi, A. Fujii, J. Takehara, T. Ikariya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7562.
- [137] J. Takehara, S. Hachiguchi, A. Fujii, S. Inoue, T. Ikariya, R. Noyori, *Chem. Commun.* **1996**, 233.
- [138] J.-X. Gao, T. Ikariya, R. Noyori, *Organometallics* **1996**, 15, 1087.
- [139] a) R. L. Chowdhury, J.-E. Bäckvall, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1063; b) J.-P. Genet, V. Ratovelomanana-Vidal, C. Pinel, *Synlett* **1993**, 478; c) P. Krasik, H. Alper, *Tetrahedron* **1994**, 50, 4347.
- [140] N. Uematsu, A. Fujii, S. Hashiguchi, T. Ikariya, R. Noyori, *Angew. Chem.* **1996**, 118, 4916.

- [141] A. Fujii, S. Hashiguchi, N. Uematsu, T. Ikariya, R. Noyori, *Angew. Chem.* **1996**, *118*, 2521.
- [142] S. Hashiguchi, A. Fujii, K.-J. Haack, K. Matsumura, T. Ikariya, R. Noyori, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 300.
- [143] K.-J. Haack, S. Hashiguchi, A. Fujii, T. Ikariya, R. Noyori, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 297.
- [144] A. L. E. Larsson, B. A. Persson, J.-E. Bäckvall, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1256.
- [145] *Russ. J. Bioorg. Chem.* **1995**, *21*, 742-750.
- [146] *J. Am. Chem Soc. Perkin I* **1997**, 1646.
- [147] *J. Am. Chem Soc. Perkin I* **1997**, 3101
- [148] J. A. Pincock, P. J. Wedge, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4067.
- [149] R. Halle, A. Breheret, E. Schulz, C. Pinel, M. Lemaire, *Tetrahedron: Assymetry* **1997**, *13*, 2101.