

Tabelle 1. Enzymatische Hydrolyse der Malonsäuredialkylester **1** zu den monoalkylestern **2**.

	R'	R''	R	Enantiomerenverhältnis [a]
a	nBu	Me	Et	69 : 31
b	nBu	Me	Me	75 : 25
c	Et	Me	Et	60 : 40
d	nPr	Me	Et	54 : 46
e	Ph	Me	Et	93 : 7
f	Ph	Et	Me	92 : 8

[a] Bestimmt durch 250 MHz-¹H-NMR mit (+)-(R)-α-Methylbenzylamin.

f abhängen. Sie sind am größten, wenn die Größendifferenz der Substituenten R' und R'' ein Maximum erreicht. Methyl ester, die auch wegen ihrer höheren Verseifungsgeschwindigkeiten vorzuziehen sind, scheinen etwas höhere Enantiomerenreinheiten als Ethylester zu ergeben. Im Hinblick auf präparative Anwendungen erwiesen sich **1e** mit **1f** als besonders günstig. Die Monoester **2e** bzw. **2f** entstanden mit günstigen Enantiomerenverhältnissen, die durch Umkristallisation auf >97:3 (NMR) verbessert werden können.

Eingegangen am 30. Juni,
in veränderter Fassung am 18. November 1983 [Z 438]

- [1] D. Seebach, E. Hungerbühler, A. Fischli in R. Scheffold: *Modern Synthetic Methods*, Salle + Sauerländer, Aarau 1980; J. B. Jones, C. J. Sih, D. Perlman in A. Weissberger: *Techniques of Chemistry*, Vol. 1, 2, Wiley, New York 1975.
- [2] H. Kosmol, K. Kieslich, H. Gibian, *Justus Liebig's Ann. Chem.* 711 (1968) 38.
- [3] F.-C. Huang, L. F. Hsu Lee, R. S. D. Mittal, P. R. Ravikumar, J. A. Chan, C. J. Sih, E. Caspi, C. R. Eck, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 4144.
- [4] a) M. Schneider, N. Engel, H. Boensmann, *Angew. Chem.* 96 (1984) 52; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) Nr. 1; b) M. Schneider, N. Engel, P. Hönicke, G. Heinemann, H. Görlich, *ibid.* 96 (1984) 55 bzw. 23 (1984) Nr. 1.

Enzymatische Synthesen chiraler Bausteine aus prochiralen meso-Substraten: Herstellung von Methyl(hydrogen)-1,2-cycloalkandicarboxylaten**

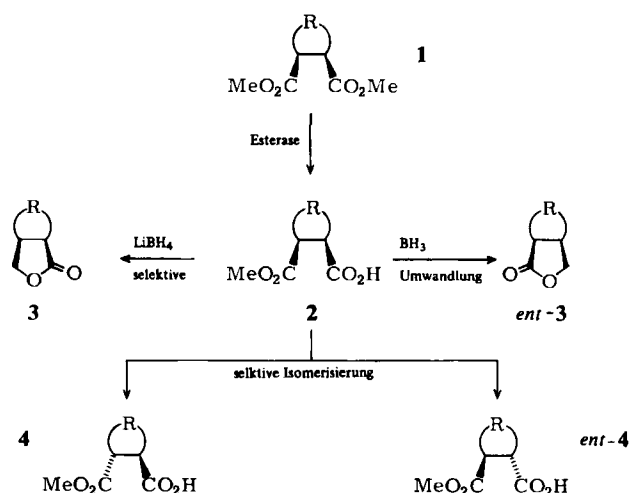
Von Manfred Schneider*, Norbert Engel, Petra Hönicke, Gerd Heinemann und Helmut Görlich

Die enantioselektive Hydrolyse der prochiralen *cis*-1,2-Diester **1a-f** zu den Monoestern **2a-f** führt zu chiralen Bausteinen für vielfältige Anwendungen, einschließlich der Naturstoffsynthese. Durch selektive Folgereaktionen, z. B. Umwandlung in die enantiomeren Lactone **3** und *ent*-**3** sowie selektive Isomerisierungen zu den *trans*-Enantiomeren **4** und *ent*-**4** und deren Folgeprodukten können aus **2a-f**, unabhängig von deren absoluten Konfigurationen, prinzipiell alle denkbaren enantiomeren Reihen potentieller Zielmoleküle gewonnen werden.

[*] Prof. Dr. M. Schneider, Dr. N. Engel, P. Hönicke, G. Heinemann
FB 9 - Organische Chemie der Universität - GH
Gaußstraße 20, D-5600 Wuppertal 1

Priv.-Doz. Dr. H. Görlich
Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim, Stuttgart

[**] Hydrolytische Enzyme in der organischen Synthese, 3. Mitteilung. Vorgetragen beim 2nd International Symposium on Synthesis and Biotechnology of Biologically Active Natural Products, 14.-19. August 1983 in Budapest. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Wir danken der Bayer AG für Chemikalien und die Bestimmung der Enantiomerenreinheiten durch Hochfeld-¹H-NMR-Spektroskopie (Dr. J. Kurz) und Boehringer Mannheim für Enzyme. Professor J. B. Jones, Toronto, danken wir für Diskussionsbeiträge und für die Mitteilung von Ergebnissen. - 2. Mitteilung: [4].



Voraussetzung dafür ist, daß **1a-f** isomerenrein und in größeren Mengen einfach zugänglich sind. Bei **1e,f** ist dies der Fall; dagegen sind die bekannten Wege zu **1a,c,d** weniger zufriedenstellend, und eine stereoselektive Synthese für **1b** war bisher unbekannt. Wir haben daher eine einfache, allgemeine Methode zur simultanen Isomerisierung und Cyclisierung von *trans*-1,2-Cycloalkandicarbonsäuren mit (CF₃CO)₂O entwickelt; die erhaltenen *cis*-Anhydride lassen sich direkt mit MeOH/HC(OMe)₃ zu **1a-f** umsetzen^[2].

Enzyme können die enantiotopen Gruppen in (prochiralen) *meso*-Formen unterscheiden und diese enantioselektiv in chirale Moleküle umwandeln^[1,3]. Schweineleber-Esterase hat sich bereits bei der Verseifung vieler strukturell unterschiedlicher Carbonsäureester bewährt^[1a,3-5]. Sie erschien uns daher besonders attraktiv als Reagens für die Umsetzungen **1** → **2**.

1a-f wurden dazu in 0.1 M Phosphatpuffer suspendiert und mit der Esterase versetzt. Die beginnende Verseifung zeigt sich durch Abnahme des pH-Wertes, der durch 1 N NaOH auf pH 7 oder 8 gehalten wird. Nur eine Estergruppe wird verseift. Nach Ansäuern ließen sich **2a-f** mit Ether extrahieren. Die Diastereomerenreinheiten (zur Prüfung auf mögliche Isomerisierungen) wurden durch GC an wiederveresterten (MeOH/HC(OMe)₃) Proben von **2a-f** ermittelt. Die Enantiomerenverhältnisse wurden an den Rohprodukten durch 250MHz-¹H-NMR-Spektroskopie nach Derivatisierung mit (+)-(R)-α-Methylbenzylamin bestimmt (Tabelle 1).

Die absolute Konfiguration von **2a** war bekannt^[7]. **2b**^[8] wurde durch selektive, basekatalysierte (NaH/Dimethylsulfoxid) Isomerisierung mit dem bekannten *trans*-Enantiomer **4b** korreliert, **2c**^[8] durch Cyclisierung zu den bekannten^[1b] Lactonen **3c/ent-3c**. Die absoluten Konfigurationen von **1e,f** sind durch Röntgen-Strukturanalysen gesichert^[9].

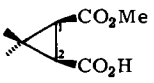
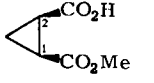
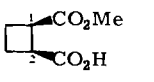
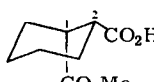
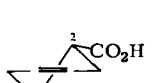
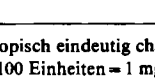
Die Enantiomerenverhältnisse sind in den meisten Fällen hoch (etwas höher bei pH 7 als bei pH 8, vielleicht wegen partieller nichtenzymatischer Hydrolyse) und können durch Umkristallisationen weiter erhöht werden. **2b** und **2f** entstehen fast enantiomerenrein. Die einzige Ausnahme ist (+)-**2d**, welches sich mit sehr geringer Enantiomerenreinheit bildet.

Die absoluten und relativen Reaktionsgeschwindigkeiten (Tabelle 1) wurden unter standardisierten Bedingungen bestimmt. Die Enzymkonzentration kann in präparativen Ansätzen leicht von 100 (oder 1000) auf 10 Einheiten/mmol Substrat verringert werden.

Während die Umsetzungen von **1b–f** mit akzeptablen Geschwindigkeiten ablaufen (2- bis 5mal schneller bei pH 8 als bei pH 7), wird **1a** unter diesen Bedingungen nicht verseift^[4]. Auch bei 10fach höherer Enzymkonzentration ist die Reaktion **1a** → **2a** sehr langsam. Trotz der relativ hohen Enantiomerenreinheit hat sie also nur geringen präparativen Wert.

bei –30°C kristallisiert. Die farblosen Kristalle von (–)-**2b**, 13.5 g (93%), $F_p = 82^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{22} -13.2$ (*c* 1.7, CHCl_3), werden durch Filtration isoliert. Umkristallisation aus Benzol (20 mL) ergibt 12 g enantiomerenreines (–)-**2b**, $[\alpha]_D^{22} -15.3$ (*c* 1, CHCl_3); 250MHz- ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 1.36$ (m, 1 H), 1.72 (m, 1 H), 2.14 (m, 2 H), 3.74 (s, 3 H), 11.36 (bs, 1 H).

Tabelle 1. Enzymatische Hydrolyse von prochiralen *meso*-Diestern **1** zu chiralen Monoestern **2** [a, b].

Substrat	R	Produkt	pH	Reaktions- dauer $t_{1/2}$ [h] (rel.)	$[\alpha]_D^{22}$	Enantiomeren- verhältnis (NMR)	Ausb. [%]
1a	CMe_2		(–)-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)- 2a	8	nicht meßbar	—	—
				7	100 (1.5) [c]	17.5 [e]	90:10
				8	50 (3) [c]	–17.0 [e]	85:15
1b	CH_2		(–)-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)- 2b	7	9 (17)	–15.0 [d]	>97:3
				8	3 (50)	–13.2 [d]	93:7
1c	$(\text{CH}_2)_2$		(+)-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)- 2c	7	2 (75)	+1.6 [d]	93:7
				8	1.5 (100)	+1.5 [e]	90:10
1d	$(\text{CH}_2)_3$		(+)- 2d [h]	8	14 (10)	± 0 [d, e]	55:45
1e	$(\text{CH}_2)_4$		(+)-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)- 2e	7	14 (10)	+4.1 [e]	90:10
				8	1.5 (100)	+3.6 [e]	85:15
1f	$(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_2$		(+)-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)- 2f	7	5 (30)	+2.9 [d]	>97:3 [f]
				8	1.5 (100)	+2.8 [d]	>97:3 [f]

[a] Alle Produkte wurden spektroskopisch eindeutig charakterisiert [6]. [b] Alle Experimente wurden unter standardisierten Bedingungen ($T = 26^\circ\text{C}$, 10 mmol Substrat, 40 mL 0.1 M Phosphatpuffer, 100 Einheiten = 1 mg Schweineleber-Esterase/mmol Substrat) durchgeführt. [c] Experimente mit 1000 Einheiten = 10 mg/mmol **1a**. [d] (*c* 1, CHCl_3). [e] (*c* 1, MeOH). [f] Vgl. [9]. [g] **2a** wurde nicht wie eine Caronsäure, sondern in Analogie zu **2b**, **c**, **e**, **f** numeriert. [h] Wegen der niedrigen Enantioselektivität der Reaktion wurde die absolute Konfiguration von (+)-**2d** bisher nicht bestimmt.

Wegen der günstigen Enantiomerenverhältnisse und Reaktionsgeschwindigkeiten ist die Herstellung von **2b**, **c**, **e**, **f** dagegen von Interesse. Diese Reaktionen wurden von den üblichen 10–50 mmol auf einen Maßstab von 700–1000 mmol gebracht. 100 g (–)-**2b** konnten auf diese Weise in einem einzigen Experiment erhalten werden. Erste Experimente mit Esterase, die an CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiert (1.3 mg Protein/mL Gel; spezifische Aktivität: 50% des löslichen Enzyms) ist, zeigten, daß damit die gleichen Enantiomerenreinheiten erzielt werden.

Allgemeine Arbeitsvorschrift

(–)-**2b**: Zu 15 g (0.1 mol) **1b** und 100 mL Phosphatpuffer (0.1 M, pH 8) wurden unter Rühren 1000 Einheiten (ca. 10 mg) Schweineleber-Esterase gegeben. Der pH-Wert wird durch Zugabe von 1 N NaOH aus einem Autotitrator während der gesamten Reaktion ($t \approx 25$ h) auf pH 8 gehalten. Nach Zugabe von 100 mL (0.1 mol) NaOH hört die Reaktion von selbst auf. Man bringt das Gemisch mit 5 N HCl unter Rühren und Kühlen auf pH 2 und extrahiert kontinuierlich mit Et_2O . Die organische Phase wird getrocknet, und alle Lösungsmittel werden entfernt. Der Rückstand wird mit 15 mL Et_2O versetzt und zuerst bei 0°C , dann 2 d

Eingegangen am 30. Juni,
ergänzt am 12. Oktober 1983 [Z 437/587]

- [1] a) F.-C. Huang, L. F. Hsu Lee, R. S. D. Mittal, P. R. Ravikumar, J. A. Chan, C. J. Sih, E. Caspi, C. R. Eck, *J. Am. Chem. Soc.* **97** (1975) 4144; b) I. J. Jakovac, H. B. Goodbrand, K. P. Lok, J. B. Jones, *ibid.* **104** (1982) 4659.
- [2] M. Schneider, N. Engel, P. Hönicke, unveröffentlicht.
- [3] Frühere Veröffentlichungen auf diesem Gebiet siehe: H. Kosmol, K. Kieslich, H. Gibian, *Justus Liebig's Ann. Chem.* **711** (1968) 38.
- [4] M. Schneider, N. Engel, H. Boensmann, *Angew. Chem.* **96** (1984) 54; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **23** (1984) Nr. 1.
- [5] M. Arita, K. Adachi, Y. Ito, H. Sawai, M. Ohno, *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 4049.
- [6] C. C. Shroff, W. S. Stewart, S. J. Uhm, J. W. Wheeler, *J. Org. Chem.* **36** (1971) 3356.
- [7] M.-J. De Vos, A. Krief, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 4282.
- [8] Da die Zuordnungen für **2b**, **c** nach unserer Meinung nicht frei von Fehlern sind, stellen wir gegenwärtig Derivate von **2a–c** für Röntgen-Strukturanalysen her.
- [9] Wir danken Dr. H.-J. Gais, Darmstadt, für die Überlassung früherer Ergebnisse mit **1e**, **f**. H.-J. Gais, Habilitationsschrift, Technische Hochschule Darmstadt 1980, bestimmte die absoluten Konfigurationen von **1e**, **f** an den Ephedrinsalzen durch Röntgen-Strukturanalyse. Anwendungen bei der Naturstoffsynthese: H.-J. Gais, K. L. Lukas, *Angew. Chem.*, im Druck.