

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CXCVIII^e comm.: *Helv.* 49, 1029 (1966).
 [2] Y. R. NAVES & P. ARDIZIO, *Helv.* 49, 617, 1226 (1966).
 [3] W. C. DOYLE, J. N. ROCKWELL, E. EARL ROYALS & J. H. STUMP, *J. org. Chemistry* 29, 3735 (1964).
 [4] B. A. ARBUSOW, A. R. VIL'CHINSKAYA, YU. YU. SAMITOV & L. K. YULDASHEVA, *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.* 164, 1041 (1965).
 [5] Y. R. NAVES & B. WOLF, *Bull. Soc. chim. France*, 1957, 1039.

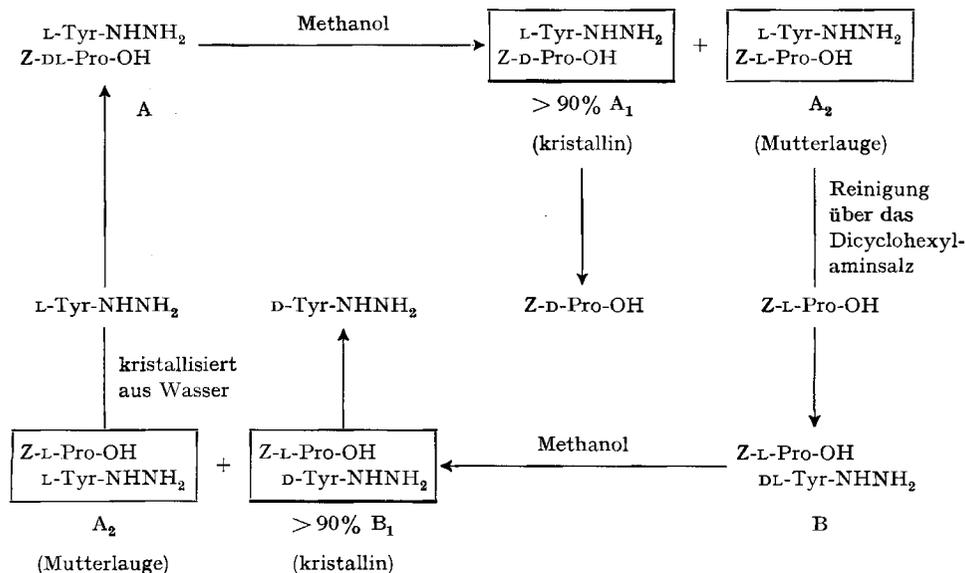
153. L-Tyrosinhydrazid als optisch aktive Base zur Spaltung von DL-Prolin, DL-Alanin und DL-Isoleucin in die optischen Antipoden

von K. Vogler und P. Lanz

(5. IV. 66)

Zur Synthese von Analoga verschiedener Polypeptid-Wirkstoffe mit D-Aminosäuren [1] wurde das schwer zugängliche D-Prolin benötigt. Dieses wurde bisher durch asymmetrische Verseifung von DL-Prolinamid [2] mittels Schweinenieren-Amidase oder totalsynthetisch aus D-Glutaminsäure [3] hergestellt.

Um den biochemischen Weg, der sich zur Herstellung grösserer Mengen wenig eignet, oder das langwierige totalsynthetische Verfahren zu umgehen, haben wir eine Racematspaltung ausgearbeitet, die sich in verschiedener Hinsicht als aussichtsreich, ergiebig und ausbaufähig erwies¹⁾.



¹⁾ Zum Patent angemeldet.

Dieses Verfahren läuft auf eine fraktionierte Spaltung diastereomerer Salze aus L-Tyrosinhydrazid und Benzyloxycarbonyl-DL-prolin (abgekürzt Z-DL-prolin) hinaus. Diese Base ist bereits zur Racemattrennung von DL-Glutaminsäure herangezogen worden [4]. Zur Spaltung neutraler Aminosäuren bedarf es dazu einer Ausschaltung der basischen Funktion, was meistens durch N-Acylierung, in unserem Falle mit Benzyloxycarbonylchlorid zum N-Benzyloxycarbonyl-Derivat (Z), bewerkstelligt wird. Der Spaltungsvorgang selbst wird anhand des vorstehenden Schemas erläutert.

Das Verfahren, das die Gewinnung von D-Prolin und D-Tyrosin in besonders guter Ausbeute erlaubt, kann dank der grossen Löslichkeitsunterschiede der betr. diastereomeren Salze auch zur Herstellung von L-Prolin und L-Tyrosin aus den Racematen dienen. Dasselbe gilt für die Antipoden von Alanin und Isoleucin.

Nach unserem Schema werden molare Mengen von L-Tyrosinhydrazid [5] und Benzyloxycarbonyl-DL-prolin (A) aus niederen Alkoholen oder Wasser, mit Vorzug aus Methanol, kristallisiert, wobei 93% des schwerlöslichen Salzes A₁ aus Benzyloxycarbonyl-D-prolin und L-Tyrosinhydrazid gewonnen werden. Aus diesem Salz A₁ kann durch Zerlegen mit Salzsäure reines Benzyloxycarbonyl-D-prolin hergestellt werden, das als solches verwendet oder in D-Prolin durch einfache Hydrogenolyse mit Pd in Essigsäure umgesetzt wird. Aus dem optisch noch unreinen Salz A₂, bestehend zu ca. 90% aus L-Tyrosinhydrazid und Benzyloxycarbonyl-L-prolin, kann nach Zerlegen, die Prolinkomponente über das Dicyclohexylaminsalz gereinigt und dadurch ebenfalls optisch rein gewonnen werden. Besonders vorteilhaft ist es, wenn bei der Kristallisation des Salzes A nur ein halbes Mol-Äqu. L-Tyrosinhydrazid verwendet wird. Man erhält dann aus Methanol 88% des Salzes A₁. Die Mutterlauge enthält hauptsächlich optisch unreines Benzyloxycarbonyl-L-prolin, das über das Dicyclohexylaminsalz ebenfalls in guter Ausbeute optisch rein anfällt.

Zur Spaltung von DL-Tyrosin, erhalten durch Racemisierung des leicht zugänglichen L-Tyrosins [6], kann andererseits dessen Hydrazid in Kombination mit Benzyloxycarbonyl-L-prolin (Salz B), aus dem das schwerlösliche Salz B₁ (das Spiegelbild von A₁) in über 90-proz. Ausbeute aus Methanol kristallisiert wird, verwendet werden. Daraus gewinnt man nach Ansäuern, Extraktion mit Äther und Alkalisstellen mit NH₃ direkt das D-Tyrosinhydrazid in einer Ausbeute von über 80%. Aus dem Mutterlauge nsalz A₂ kann nach Zerlegen auch L-Tyrosinhydrazid optisch rein in guter Ausbeute erhalten werden durch blosses Umkristallisieren aus Wasser. Auch hier weist der L-Antipode gegenüber der DL-Form einen höheren Smp. und deshalb auch eine geringere Löslichkeit auf, wie dies bereits beim Dicyclohexylaminsalz des optisch unreinen Benzyloxycarbonyl-prolins beobachtet wurde, was die Regel durchaus bestätigt [7].

Vorliegende Spaltung ist überdies von einigem Vorteil für peptid-chemische Arbeiten, da Prolin in einer geschützten Form, die viel verwendet wird, anfällt. In dieser Hinsicht ähnelt unser Verfahren der Trennung diastereomerer Salze von N-*o*-Nitrophenylsulfenyl-aminosäuren [8], das kürzlich bekannt wurde.

Was für die diastereomeren Salze von L-Tyrosinhydrazid und Z-DL-Prolin nach Schema gilt, kann ohne Vorbehalt auch auf die Salze von L-Tyrosinhydrazid und Z-DL-Alanin bzw. Z-DL-Isoleucin übertragen werden.

Zudem sind auch noch andere Kombinationen als die im Schema angegebenen möglich, z. B. kann ein analoger Kreisprozess, beginnend mit D-Tyrosinhydrazid und

Z-DL-Prolin ausgeführt werden, der über spiegelbildliche Salze führt, deren Löslichkeiten gegenüber dem Schema nicht verändert sind.

Im Prinzip sind auch noch andere Z-Derivate von α -Aminosäuren nach diesem Verfahren spaltbar, z. B. Phenylalanin. Im letzteren Falle ist jedoch die Ausbeute der reinen Antipoden geringer.

Experimenteller Teil ²⁾

A) Optische Spaltung von Z-DL-Prolin. – 1. Z-DL-Prolin wurde nach der Vorschrift für Z-L-Prolin [9] hergestellt und aus Essigester-Petroläther kristallisiert; Smp. 74–75°.

$C_{13}H_{15}O_4N$ (249,26) Ber. C 62,64 H 6,07 N 5,62% Gef. C 62,42 H 6,07 N 5,63%

2. L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Prolin. – a) Mit der berechneten Menge L-Tyrosinhydrazid. 97,5 g (0,5 Mol) L-Tyrosinhydrazid [5] und 124,5 g (0,5 Mol) Z-DL-Prolin wurden in 2,2 l siedendem Methanol gelöst, die Lösung sofort filtriert, mit dem L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Prolin angeimpft und 20 Std. bei 25° gerührt. Die Kristalle wurden abgenutscht, mit insgesamt 200 ml Methanol gewaschen und getrocknet. Ausbeute 103,2 g (93%) L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Prolin, Smp. 187–189°, $[\alpha]_D^{23} = +74,2^\circ$ ($c = 1$, in Wasser).

$C_{22}H_{28}O_6N_4$ (444,48) Ber. C 59,44 H 6,35 N 12,61% Gef. C 59,50 H 6,55 N 12,55%

Die Mutterlauge, die das optisch noch nicht reine L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-L-Prolin enthält, wurde gemäss A5a) verarbeitet.

b) Mit der halben Menge L-Tyrosinhydrazid. 48,75 g (0,25 Mol) L-Tyrosinhydrazid und 124,5 g (0,50 Mol) Z-DL-Prolin wurden in 750 ml siedendem Methanol gelöst. Die Lösung wurde heiss filtriert, mit dem L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Prolin angeimpft und 20 Std. bei 25° gerührt. Die Kristalle wurden abgenutscht, mit 100 ml Methanol gewaschen und getrocknet. Ausbeute 97,8 g (88%) L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Prolin, Smp. 187–189°, $[\alpha]_D^{22} = +73,9^\circ$ ($c = 1$, in Wasser).

Die Mutterlauge wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit 300 ml Äther vermischt, 2 Std. bei 0° belassen, abgenutscht, mit 200 ml Äther gewaschen und getrocknet; Ausbeute 5,5 g Zwischenfraktion, Smp. 164–168°, $[\alpha]_D^{23} = +23,5^\circ$ ($c = 1$, in Wasser).

Filtrat und Waschlösung enthielten zur Hauptsache optisch noch nicht reines Z-L-Prolin; sie wurden gemäss A5b) weiterverarbeitet.

3. Z-D-Prolin. Eine Suspension von 222 g (0,5 Mol) L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Prolin in 200 ml Wasser und 100 ml konz. Salzsäure wurde im Scheidetrichter mit insgesamt 1 l Äther extrahiert. Die Ätherlösungen wurden mit Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, im Vakuum eingedampft, der Rückstand aus Äther-Petroläther kristallisiert, abgenutscht und im Wasserstrahl- und Hochvakuum bei 60° getrocknet. Ausbeute 119,5 g (96%), Smp. 76–77°, $[\alpha]_D^{23} = +61,2^\circ$ ($c = 5,3$, in Eisessig). Literaturwert für Z-L-Prolin [9]: $[\alpha]_D^{20} = -61,7^\circ$ ($c = 5,3$ in Eisessig).

$C_{13}H_{15}O_4N$ (249,26) Ber. C 62,64 H 6,07 N 5,62% Gef. C 62,94 H 5,94 N 5,60%

Das L-Tyrosinhydrazid wurde aus den salzsauren Lösungen analog B2) regeneriert.

4. D-Prolin. 25 g (0,1 Mol) Z-D-Prolin wurden in 150 ml 80-proz. Essigsäure mit 3 g 5-proz. Pd-Kohle in üblicher Weise hydriert, vom Katalysator abgetrennt, im Vakuum eingedampft und mehrmals mit Benzol abgedampft. Der Rückstand wurde in möglichst wenig siedendem Alkohol gelöst, filtriert, mit Äther ausgefällt, abgenutscht und aus Alkohol-Äther umkristallisiert. Ausbeute 10,2 g (89%), $[\alpha]_D^{23} = +85,2^\circ$ ($c = 3,5$, in Wasser). Literaturwerte für L-Prolin: $[\alpha]_D = -84,9^\circ$ [10], $-86,5^\circ$ [11], $-85,6^\circ$ [12].

$C_5H_9O_2N$ (115,13) Ber. C 52,16 H 7,88 N 12,17% Gef. C 52,19 H 8,00 N 12,28%

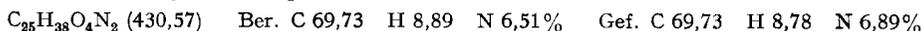
5. Isolierung des optisch unreinen Z-L-Prolins. – a) Die Mutterlauge aus der Spaltung A2a) wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 100 ml Wasser und 50 ml konz. Salzsäure sus-

²⁾ Die Smp. wurden auf dem Schmelzpunktsbestimmungsapparat nach TORTOLI der Firma BÜCHI, Flawil (Schweiz), bestimmt; sie sind korrigiert. Fehlergrenze der Werte der spezifischen Drehungen: $\pm 2^\circ$. Die Analysenmuster wurden 18 Std. über P_2O_5 bei 0,01 Torr und bei 60° getrocknet.

pendiert und mehrmals mit Äther extrahiert. Die Ätherlösungen wurden mit Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, im Vakuum eingedampft, aus Äther-Petroläther kristallisiert, abgenutscht und getrocknet. Ausbeute 63 g optisch unreines Z-L-Prolin, $[\alpha]_D^{23} = -55,4^\circ$ ($c = 5$, in Eisessig); es wurde gemäss A6b) über das Dicyclohexylaminsalz optisch gereinigt. Das L-Tyrosinhydrazid wurde aus den salzsauren Lösungen analog B2) regeneriert.

b) Die Äthermutterlauge und der Waschäther aus der Spaltung A2b) wurden im Scheidetrichter mehrmals mit 1N Salzsäure und Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, im Vakuum eingedampft, aus Äther-Petroläther kristallisiert und getrocknet. Ausbeute 62 g optisch unreines Z-L-Prolin, $[\alpha]_D^{23} = -53,5^\circ$ ($c = 5$, in Eisessig); es wurde gemäss A6b) über das Dicyclohexylaminsalz optisch gereinigt.

6. *Optische Reinigung von Z-L-Prolin über das Dicyclohexylaminsalz.* – a) *Modellversuch.* Das Dicyclohexylaminsalz von Z-DL-Prolin wurde nach der Vorschrift für das entsprechende Z-L-Prolinsalz [13] hergestellt; Smp. 160° .



Es ist etwas leichter löslich als das Dicyclohexylaminsalz von Z-L-Prolin; der Löslichkeitsunterschied ist ausreichend für eine optische Reinigung. Je 1 g Z-L-Prolin und Z-DL-Prolin wurden in 40 ml Essigester bei 50° gelöst, mit 1,45 g Dicyclohexylamin versetzt, nach 45 Min. abgenutscht, mit 40° warmem Essigester gewaschen und getrocknet. Ausbeute 1,6 g (95%) Dicyclohexylaminsalz von Z-L-Prolin, Smp. $178\text{--}180^\circ$, $[\alpha]_D^{23} = -25^\circ$ ($c = 2$, in Methanol). Literaturwert [13]: Smp. $179\text{--}180^\circ$, $[\alpha]_D = -25,5^\circ$ ($c = 2$, in Methanol).

Die Mutterlauge wurde im Vakuum stark eingeengt, mit Äther ausgefällt, abgenutscht, und getrocknet; Smp. $160\text{--}162^\circ$, $[\alpha]_D^{23} = -2^\circ$ ($c = 2$, in Methanol) (Racemat).

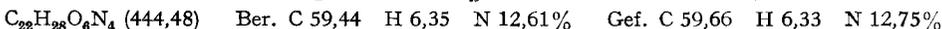
b) *Anwendungsbeispiel.* 60 g optisch unreines Z-L-Prolin aus A5a) bzw. A5b), $[\alpha]_D^{23} = -54^\circ$ ($c = 5$, in Eisessig), wurden in 600 ml Essigester auf 60° erwärmt, mit 51,6 g Dicyclohexylamin versetzt und sofort mit dem Dicyclohexylaminsalz von Z-L-Prolin angeimpft. Man liess zur Kristallisation langsam abkühlen, nutschte nach 45 Min. ab, wusch portionenweise mit insgesamt 250 ml 40° warmem Essigester nach und trocknete im Vakuum bei 60° . Ausbeute 91,4 g (83,5%) optisch reines Dicyclohexylaminsalz von Z-L-Prolin, Smp. 178° , $[\alpha]_D^{23} = -25,3^\circ$ ($c = 2$, in Methanol). Literaturwert [13]: Smp. $179\text{--}180^\circ$, $[\alpha]_D = -25,5^\circ$ ($c = 2$, in Methanol).

Aus der Mutterlauge konnten wir 13,2 g *rac.*-Salz isolieren, Smp. $161\text{--}164^\circ$ $[\alpha]_D^{23} = -2,7^\circ$ ($c = 2$, in Methanol).

7. *Z-L-Prolin.* 343 g optisch reines Dicyclohexylaminsalz von Z-L-Prolin wurden in 300 ml Wasser, 400 ml Essigester und 80 ml konz. Salzsäure 3 Std. stark gerührt. Das Dicyclohexylaminhydrochlorid wurde abgenutscht und mit 300 ml Essigester nachgewaschen. Das Filtrat wurde im Scheidetrichter mehrmals mit 1N Salzsäure und Wasser gewaschen, die Essigesterphase über $MgSO_4$ getrocknet, im Vakuum eingedampft und bei 60° getrocknet. Der dicke Sirup wurde aus Äther-Petroläther kristallisiert, abgenutscht, mit Petroläther gewaschen, im Wasserstrahl- und Hochvakuum bei 60° getrocknet. Ausbeute 179 g (90%), Smp. $76\text{--}77^\circ$, $[\alpha]_D^{22} = -61,7^\circ$ ($c = 5,3$, in Eisessig). Literaturwert: $[\alpha]_D = -61,7^\circ$ ($c = 5,3$, in Eisessig) [9]. Zur Kristallisation von Z-L-Prolin vgl. [14].

B) Optische Spaltung von-DL-Tyrosinhydrazid. – 1. Z-L-Prolinsalz von D-Tyrosinhydrazid.

– a) *Mit der berechneten Menge Z-L-Prolin.* 97,5 g (0,5 Mol) DL-Tyrosinhydrazid [5] und 124,5 g (0,5 Mol) Z-L-Prolin wurden in 2,2 l siedendem Methanol gelöst, sofort filtriert, mit dem Z-L-Prolinsalz von D-Tyrosinhydrazid angeimpft, 20 Std. bei 25° gerührt, abgenutscht, mit 200 ml Methanol nachgewaschen und im Vakuum bei 90° getrocknet. Ausbeute 100 g (90%) Z-L-Prolinsalz von D-Tyrosinhydrazid, Smp. $187\text{--}189^\circ$, $[\alpha]_D^{22} = -74^\circ$ ($c = 1$, in Wasser).



Die Mutterlauge, die optisch unreines Z-L-Prolinsalz von L-Tyrosinhydrazid enthielt, wurde gemäss B4b) weiterverarbeitet.

b) *Mit der halben Menge Z-L-Prolin.* 9,75 g (0,05 Mol) DL-Tyrosinhydrazid wurden in 250 ml siedendem Methanol gelöst, mit 6,23 g (0,025 Mol) Z-L-Prolin versetzt, sofort filtriert, mit dem Z-L-Prolinsalz von D-Tyrosinhydrazid angeimpft, 20 Std. bei 25° gerührt, abgenutscht, mit Alkohol gewaschen und getrocknet. Ausbeute 6 g (54%) Z-L-Prolinsalz von D-Tyrosinhydrazid, Smp. 184--

186°, $[\alpha]_D^{23} = -73^\circ$ ($c = 1$, in Wasser). – Die Mutterlauge wurde nicht weiter untersucht, da diese Spaltmethode eine schlechte Ausbeute ergab.

2. *D-Tyrosinhydrazid*. 89 g Z-L-Prolinsalz von D-Tyrosinhydrazid wurden im Scheidetrichter mit 80 ml Wasser und 40 ml konz. Salzsäure zersetzt, 3mal mit je 150 ml Äther extrahiert und die Ätherlösungen mit 100 ml Wasser nachgewaschen. Die sauren, wässrigen Lösungen wurden vereinigt, im Vakuum bei 45° vom Äther befreit, mit überschüssigem konz. Ammoniak alkalisch gestellt und 3 Std. bei 0° aufbewahrt. Das D-Tyrosinhydrazid wurde abgenutscht, mit Eiswasser gewaschen und aus siedendem Wasser umkristallisiert. Ausbeute 34,8 g (89%), Smp. 198–200°, $[\alpha]_D^{23} = -70,3^\circ$ ($c = 2$, in 3N Salzsäure).

$C_9H_{13}O_2N_3$ (195,22) Ber. C 55,37 H 6,71 N 21,53% Gef. C 55,34 H 6,67 N 21,24%

Aus den gesammelten Ätherlösungen wurde das Z-L-Prolin nach dem Trocknen über $MgSO_4$ Eindampfen und Kristallisation aus Äther-Petroläther regeneriert.

3. *D-Tyrosin*. 111 g Z-L-Prolinsalz von D-Tyrosinhydrazid wurden gemäss B2) mit Salzsäure zersetzt, mit Äther extrahiert und die gesammelten wässrigen Lösungen im Vakuum auf ca. $\frac{1}{3}$ des ursprünglichen Volumens eingedampft. Die Lösung wurde mit 160 ml konz. Salzsäure 6 Std. unter Rückfluss gekocht und im Vakuum eingedampft. Die Lösung des Rückstands in 400 ml Wasser wurde mit konz. Ammoniak auf ein pH von 6 gestellt; nach 3 Std. wurde abgenutscht. Das D-Tyrosin wurde in 400 ml 1N Salzsäure unter Erwärmen gelöst, filtriert, mit konz. Ammoniak auf ein pH von 6 eingestellt, nach 2 Std. abgenutscht, mit Wasser und Alkohol gewaschen und getrocknet. Ausbeute 39,5 g (88%), $[\alpha]_D^{23} = +14,5^\circ$ ($c = 1$, in 3N NaOH), $[\alpha]_D^{23} = +8,8^\circ$ ($c = 1$, in 6,3N Salzsäure). Literaturwert [15]: $[\alpha]_D = +8,64^\circ$.

$C_9H_{11}O_3N$ (181,19) Ber. C 59,66 H 6,12 N 7,73% Gef. C 59,89 H 6,16 N 7,78%

4. *Optische Reinigung von partiell racemischem L-Tyrosinhydrazid*. – a) *Modellversuch*. 4 g L-Tyrosinhydrazid und 2 g DL-Tyrosinhydrazid wurden in 40 ml siedendem Wasser gelöst, mit L-Tyrosinhydrazid angeimpft, langsam abgekühlt, nach 1 Std. abgenutscht, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute 3,6 g (90%) L-Tyrosinhydrazid, Smp. 198–200°, $[\alpha]_D^{23} = +70^\circ$ ($c = 2$, in 3N Salzsäure). Trockenrückstand der Mutterlauge 2,3 g, Smp. 169–172°, $[\alpha]_D^{23} = +7,3^\circ$ ($c = 2$, in 3N Salzsäure).

b) *Anwendungsbeispiel*. Die Mutterlauge aus dem Spaltungsbeispiel B7a), die optisch unreines Z-L-Prolinsalz von L-Tyrosinhydrazid enthielt, wurde im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde mit 80 ml Wasser und 40 ml konz. Salzsäure zersetzt und 3mal mit je 150 ml Äther extrahiert. (Aus den gesammelten Ätherlösungen wurde das Z-L-Prolin regeneriert.) Die sauren, wässrigen Lösungen wurden im Vakuum bei 45° vom Äther befreit, mit überschüssigem konz. Ammoniak versetzt, 3 Std. bei 0° aufbewahrt, die ausgeschiedenen Kristalle abgenutscht und getrocknet: 47 g optisch noch nicht reines L-Tyrosinhydrazid, $[\alpha]_D^{23} = +64^\circ$ ($c = 2$, in 3N Salzsäure). 46,5 g dieses Hydrazides wurden aus 400 ml siedendem Wasser umkristallisiert. Nach 3 Std. bei 25° wurde abgenutscht, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute 40,8 g L-Tyrosinhydrazid, Smp. 198–200°, $[\alpha]_D^{23} = +70,2^\circ$ ($c = 2$, in 3N Salzsäure).

Aus diesem optisch reinen L-Tyrosinhydrazid erhielten wir durch Hydrolyse mit Salzsäure analog B3) L-Tyrosin.

C) *Optische Spaltung von Z-DL-Alanin*. – 1. *L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Alanin*. – a) *Mit der berechneten Menge L-Tyrosinhydrazid*. 44,6 g (0,2 Mol) Z-DL-Alanin [16] wurden in eine siedende Suspension von 39 g (0,2 Mol) pulverisiertem L-Tyrosinhydrazid in 800 ml Alkohol eingetragen und unter Rückfluss gekocht. Man filtrierte von wenig ungelöster Substanz ab, impfte das Filtrat mit dem L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Alanin an, rührte 2 Std. während des Abkühlens und bewahrte den Kristallbrei 20 Std. bei 25° auf. Nach dem Abnutschen, sorgfältigem Nachwaschen mit 200 ml Alkohol und 100 ml Äther und Trocknen erhielt man 38,3 g (91%) L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Alanin, Smp. 149–150°, $[\alpha]_D^{23} = +55,2^\circ$ ($c = 2$, in H_2O).

$C_{20}H_{26}O_6N_4$ (418,44) Ber. C 57,40 H 6,26 N 13,39% Gef. C 57,51 H 6,33 N 13,47%

Die Mutterlauge, die zur Hauptsache das L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-L-Alanin enthielt, wurde gemäss C3) zum Dicyclohexylaminsalz von Z-L-Alanin umgesetzt.

b) *Mit der halben Menge L-Tyrosinhydrazid*. 22,3 g (0,1 Mol) Z-DL-Alanin und 9,75 g (0,05 Mol) pulverisiertes L-Tyrosinhydrazid wurden in 300 ml Alkohol am Rückflusskühler gekocht, heiss

filtriert, mit dem L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Alanin angeimpft, 2 Std. gerührt und 20 Std. bei 25° aufbewahrt. Nach dem Abnutschen, Waschen mit Alkohol und Essigester sowie Trocknen erhielt man 15,8 g (75%) L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Alanin, Smp. 148–150°, $[\alpha]_D^{25} = +54,5^\circ$ ($c = 2$, in H₂O).

2. Z-D-Alanin. 50,3 g (0,12 Mol) L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Alanin wurden in 200 ml 3N Salzsäure suspendiert, 3mal mit je 150 ml Essigester extrahiert, die Essigesterphasen 2mal mit je 40 ml Wasser nachgewaschen, über MgSO₄ getrocknet, im Vakuum eingedampft und der Rückstand aus Essigester-Petroläther kristallisiert. Ausbeute 25,8 g (96%) Z-D-Alanin, Smp. 84–86°, $[\alpha]_D^{25} = +13,8^\circ$ ($c = 2$, in Eisessig). Literaturwert [17]: Smp. 84°, $[\alpha]_D = +13,9^\circ$ ($c = 8,5$, in Eisessig).

Optisch noch nicht reines Z-D-Alanin kann notfalls analog C3) über das Dicyclohexylaminsalz gereinigt werden.

3. Dicyclohexylaminsalz von Z-L-Alanin. Die Mutterlauge der Spaltung C7) wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand analog C2) mit 3N Salzsäure und Essigester zersetzt. Man erhielt 22,7 g (95%) optisch noch nicht reines Z-L-Alanin, $[\alpha]_D^{25} = -9,4^\circ$ ($c = 2$, in Eisessig). 21,7 g dieses Rohproduktes wurden in 200 ml Alkohol gelöst, mit 17,6 g Dicyclohexylamin versetzt, nach 1 Std. abgenutscht, mit 50 ml Alkohol sorgfältig nachgewaschen und getrocknet. Ausbeute 26,1 g (67%) Dicyclohexylaminsalz von Z-L-Alanin, Smp. 180–182°, $[\alpha]_D^{25} = +5,2^\circ$ ($c = 2$, in Alkohol). Literaturwert [13]: Smp. 180–181,5°, $[\alpha]_D = +5,0^\circ$ ($c = 2,11$, in Alkohol).

Aus der Mutterlauge des Dicyclohexylaminsalzes erhielten wir nach dem Einengen und Ausfällen mit Äther 8 g (20,6%) Salz, $[\alpha]_D^{25} = +1,5^\circ$ ($c = 2$, in Alkohol).

4. Z-L-Alanin. Die erste Fraktion des Dicyclohexylaminsalzes von Z-L-Alanin von C3) wurde gemäss [13] in Z-L-Alanin übergeführt; Ausbeute 93%, Smp. 83–85°, $[\alpha]_D^{25} = -13,8^\circ$ ($c = 2$, in Eisessig). Literaturwert [16]: Smp. 84°, $[\alpha]_D^{17} = -14,3^\circ$ ($c = 9$, in Eisessig).

5. Dicyclohexylaminsalz von Z-DL-Alanin. Es wurde hergestellt aus Z-DL-Alanin und Dicyclohexylamin gemäss der allgemeinen Vorschrift für das Dicyclohexylaminsalz von Z-L-Alanin [13] und aus wenig Alkohol umkristallisiert: Smp. 172–173°. Das DL-Salz war etwas leichter löslich als das L- bzw. D-Salz. Der Löslichkeitsunterschied war ausreichend für die optische Reinigung von partiell racemischen Z-L-Alanin bzw. Z-D-Alanin.

C₂₃H₃₆O₄N₂ (404,53) Ber. C 68,28 H 8,97 N 6,93% Gef. C 68,26 H 9,00 N 6,96%

D) Optische Spaltung von Z-DL-Isoleucin. – 1. L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Isoleucin. 53 g (0,2 Mol) Z-DL-Isoleucin und 39 g (0,2 Mol) L-Tyrosinhydrazid wurden in 800 ml Methanol unter Erwärmen gelöst, filtriert, im Vakuum eingedampft und getrocknet. Das glasige Harz wurde in 300 ml siedendem Alkohol gelöst, auf 50° abgekühlt und mit authentischem L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Isoleucin angeimpft. Man liess 1 Std. bei 25° und 24 Std. bei 0° stehen, nutschte das Salz ab, wusch es sorgfältig mit 200 ml Isopropylalkohol und 150 ml Äther und trocknete im Vakuum bei 90°. Ausbeute 42,4 g, Smp. 154–156°, $[\alpha]_D^{25} = +46,5^\circ$ ($c = 2$, in H₂O).

C₂₃H₃₂O₆N₄ (460,52) Ber. C 59,98 H 7,00 N 12,17% Gef. C 60,25 H 7,11 N 12,23%

Aus der Mutterlauge kristallisierten 3,8 g einer Zwischenfraktion, $[\alpha]_D^{25} = +66,8^\circ$ ($c = 2$, in H₂O). – Die Mutterlauge wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand gemäss D3) zum Dicyclohexylaminsalz von Z-L-Isoleucin weiterverarbeitet.

2. Dicyclohexylaminsalz von Z-D-Isoleucin. 42 g L-Tyrosinhydrazidsalz von Z-D-Isoleucin wurden in 40 ml Wasser, 20 ml konz. Salzsäure und 80 ml Essigester suspendiert und im Scheidetrichter mit Essigester extrahiert. Die Essigesterphasen wurden mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Man erhielt 23,2 g (96%) öliges Z-D-Isoleucin, das in 45 ml Alkohol gelöst, mit 15,9 g Dicyclohexylamin und zur Vervollständigung der Kristallisation mit 45 ml Essigester versetzt wurde. Man liess 2 Std. bei 0° stehen, nutschte ab, wusch mit Essigester und Äther und trocknete im Vakuum bei 90°. Ausbeute 34,8 g (89%) Dicyclohexylaminsalz von Z-D-Isoleucin, Smp. 156–158°, $[\alpha]_D^{25} = -4,3^\circ$ ($c = 2$, in Alkohol).

C₂₆H₄₂O₄N₂ (446,61) Ber. C 69,92 H 9,48 N 6,27% Gef. C 69,99 H 9,42 N 6,40%

3. Dicyclohexylaminsalz von Z-L-Isoleucin. 44 g Trockenrückstand der Spaltungsmutterlauge von D7) wurden analog D2) zersetzt. Man erhielt 22,8 g (90%) optisch noch nicht reines Z-L-Isoleucin. Es wurde in 45 ml Alkohol und 45 ml Essigester gelöst, mit 15,6 g Dicyclohexylamin

versetzt, 1 Std. bei 25° aufbewahrt, abgenutscht, mit 40 ml Essigester gewaschen und getrocknet. Ausbeute 32,6 g (85%) Dicyclohexylaminsalz von Z-L-Isoleucin, Smp. 153–154°, $[\alpha]_D^{25} = +4,1^\circ$ ($c = 2$, in Alkohol). Literaturwerte [13]: Smp. 153–154°, $[\alpha]_D = +4,1^\circ$ ($c = 1$, in Alkohol).

4. *Dicyclohexylaminsalz von Z-DL-Isoleucin*. Herstellung nach [13] aus Z-DL-Isoleucin, Smp. 143–145°. Das Salz von Z-DL-Isoleucin war etwas leichter löslich als das entsprechende L- bzw. D-Salz. Der Löslichkeitsunterschied konnte zur optischen Reinigung von partiell racemischem Z-L-Isoleucin bzw. Z-D-Isoleucin ausgenützt werden.

$C_{26}H_{42}O_4N_2$ (446,61) Ber. C 69,92 H 9,48 N 6,27% Gef. C 69,86 H 9,30 N 6,26%

SUMMARY

A new procedure for the resolution of DL-proline, DL-alanine and DL-isoleucine into the optical antipodes is outlined. It is based on the separation of diastereoisomeric salts of D- or L-tyrosine hydrazide with Z-DL-proline, Z-DL-alanine and Z-DL-isoleucine, by means of fractional crystallization in suitable solvents such as lower aliphatic alcohols and water. It is shown that the new method gives excellent yields even with half the molar amount of the optically active resolving agent.

Chemische Forschungsabteilung

F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. A.G., Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. VOGLER, R. O. STUDER, W. LERGIER & P. LANZ, *Helv.* **48**, 1407 (1965); K. VOGLER, P. LANZ, W. LERGIER & W. HAEFELY, *Helv.* **49**, 390 (1966).
- [2] V. E. PRICE, L. LEVINTOW, J. P. GREENSTEIN & R. B. KINGSLEY, *Arch. Biochem.* **26**, 92 (1950); D. HAMER & J. P. GREENSTEIN, *J. biol. Chemistry* **193**, 81 (1954); E. G. BACKER & H. A. SOBER, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 4058 (1953).
- [3] MASAO TANAKA, TERNO KISHI & SHUKUO KINOSHITA, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **34**, 782 (1960); *Chem. Abstr.* **59**, 6509 (1963).
- [4] I. SOLLIN, U. S. Pat. 2945879, Canadian Pat. 584240, German Pat. 1081467; *Chem. Abstr.* **56**, 2510 (1962).
- [5] T. CURTIUS, *J. prakt. Chem.* [2], **95**, 349 (1917).
- [6] M. BERGMANN & L. ZERVAS, *Biochem. Z.* **203**, 280 (1928); C. E. MEYER & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* **98**, 295 (1932).
- [7] W. KUHN & K. VOGLER, *Z. Naturforsch.* **6b**, 232 (1951).
- [8] J. KÖNIG, L. NOVÁK & J. RUDINGER, *Angew. Chem.* **52**, 453 (1965).
- [9] A. BERGER, J. KURTZ & E. J. KATCHALSKI, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 552 (1954).
- [10] J. KOPFFHAMMER & R. ECK, *Z. physiol. Chem.* **170**, 294 (1927).
- [12] H. J. BERGMANN, *J. biol. Chemistry* **110**, 471 (1935).
- [13] E. KLIEGER, E. SCHRÖDER & H. GIBIAN, *Liebigs Ann. Chem.* **640**, 157 (1961).
- [14] M. ZAORAL, *Chem. Listy* **48**, 1583 (1954).
- [15] E. FISCHER, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **32**, 3638 (1899).
- [16] M. BERGMANN & L. ZERVAS, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **65**, 1192 (1932).
- [17] M. BERGMANN, L. ZERVAS, J. S. FRUTON, F. SCHNEIDER & H. SCHLEICH, *J. biol. Chemistry* **109**, 325 (1935).