

Über eine Racemat-Spaltung des DL-Allothreonins

VON HELMUT AROLD

Inhaltsübersicht

Die diastereomeren Brucinsalze des L- und D-N-Phthaloyl-allothreonins zeigen ausgeprägte Löslichkeitsunterschiede in Äthylenglykol-monomethyläther (Methylcellosolve). Dies ermöglicht eine einfache Trennung des DL-Allothreonins in die optischen Antipoden.

Durch die Untersuchungen von WEST und CARTER¹⁾ ist optisch aktives Allothreonin 1938 erstmalig zugänglich geworden. Die Spaltung in die optischen Antipoden wurde durch fraktionierte Kristallisation der diastereomeren Brucinsalze des L- und D-O-Methyl-N-formyl-allothreonins erreicht. Diese Spaltung ist ganz auf die Allothreoninsynthese dieser Autoren zugeschnitten, bei der O-Methyl-DL-allothreonin als Zwischenprodukt anfällt. Steht dagegen DL-Allothreonin selbst zur Verfügung, das nach anderen Verfahren²⁾ leicht zugänglich geworden ist, so ist diese Methode kaum anzuwenden.

Die seither veröffentlichten Methoden zur Racematspaltung des Allothreonins benutzen vorzugsweise die sterische Selektivität enzymatischer Reaktionen. So gelang GREENSTEIN und Mitarbeitern³⁾ die Trennung in die Antipoden durch enzymatische Hydrolyse des N-Chloracetyl-DL-allothreonins mit Hilfe von Acylase I (Schweinenierenacylase), wobei allein das Acylderivat der L-Form der Hydrolyse unterliegt. In Analogie dazu konnten KAMEDA und Mitarbeiter⁴⁾ zeigen, daß auch das Benzoyl-DL-allothreonin einer Spaltung mittels einer Acylase (aus Bodenbakterium KT 84) zugänglich ist.

¹⁾ H. D. WEST u. H. E. CARTER, *J. biol. Chemistry* **122**, 611 (1938).

²⁾ H. E. CARTER u. C. L. ZIRKLE, *J. biol. Chemistry* **178**, 709 (1949).

³⁾ J. P. GREENSTEIN u. L. LEVINTOW, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 2814 (1950); S. M. BIRNBAUM, L. LEVINTOW, R. B. KINGSLEY u. J. P. GREENSTEIN, *J. biol. Chemistry* **194**, 455 (1952).

⁴⁾ Y. KAMEDA, *J. pharmac. Soc. Japan* **78**, 769 (1958).

Die prinzipielle Möglichkeit, DL-Allothreonin auch durch papainkatalysierte enzymatische Synthese⁵⁾ in die Antipoden zu spalten, hat ALBERTSON⁶⁾ aufgezeigt, indem er, allerdings unreines, N-Benzoyl-L-allothreonin-anilid durch Inkubation von N-Benzoyl-DL-allothreonin mit Papain in Gegenwart von Anilin darstellte. Wir⁷⁾ haben diese Reaktion genauer untersucht und sowohl das Anilid als auch das p-Toluidid und Phenylhydrazid in reiner Form dargestellt⁸⁾. Wir fanden, daß sich auf diese Weise lediglich die entsprechenden Derivate der L-Form rein gewinnen ließen, D-Allothreonin dagegen auch bei genauer Kontrolle der Inkubationszeit nicht in reiner Form gewonnen werden kann. Dies ist ein schwerwiegender Nachteil dieser Methode und bestätigt im Falle des Allothreonins die Einwände, die GREENSTEIN gegen diese Methode erhoben hat.

VON VOGLER und LANZ⁹⁾ ist nun ein Verfahren zur Trennung des DL-Threonins beschrieben worden, das auf den beträchtlichen Löslichkeitsunterschieden der diastomeren Brucinsalze des L- und D-N-Phthaloylthreonins in Äthylenglykol-monomethyläther (Methylcellosolve) beruht und das eine wirksame Spaltung auch größerer Mengen von DL-Threonin gestattet. Nun zeigen die Derivate des Threonins und Allothreonins in ihrem Löslichkeitsverhalten ausgeprägte Ähnlichkeit, allerdings in dem Sinne, daß sich die Verhältnisse bei den Antipoden der beiden Aminosäuren jeweils umkehren. So schien es aussichtsreich, zu untersuchen, ob sich diese Methode auch zur Gewinnung optisch aktiven Allothreonins eignet.

In der Tat wird das Brucinsalz des N-Phthaloyl-D-allothreonins in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten, wenn man zu einer Lösung von Brucin in Äthylenglykol-monomethyläther bei 80° unter Rühren die berechnete Menge N-Phthaloyl-DL-allothreonin zusetzt. Das L-Salz bleibt unter diesen Bedingungen vollständig gelöst. Zur Gewinnung des D-Allothreonins wird das Salz mit Natronlauge zerlegt, das Brucin mit Chloroform extrahiert und der Phthaloylrest anschließend durch Kochen mit Salzsäure abgespalten. Aus der eingeeengten sauren Lösung wird nach Abtrennung der Phthalsäure das D-Allothreonin durch Neutralisation ausgefällt. Es wird durch Umkristallisation aus Wasser-Alkohol und aus Wasser gereinigt. Das Brucinsalz des N-Phthaloyl-L-allothreonins hinterbleibt nach dem Abdampfen des Lösungsmittels als glasige Masse, die nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Die Aufarbeitung geschieht analog der D-Verbindung.

⁵⁾ M. BERGMANN u. H. FRAENKEL-CONRAT, *J. biol. Chemistry* **119**, 707 (1937).

⁶⁾ N. F. ALBERTSON, *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 452 (1951).

⁷⁾ Diplomarbeit U. WÄHNERT, Jena 1959.

⁸⁾ Vgl. H. AROLD u. H.-J. DORNBERGER, *J. prakt. Chem.* **21**, 53 (1963).

⁹⁾ K. VOGLER u. P. LANZ, *Helv. chim. Acta* **42**, 209 (1959).

Die Ausbeute an L-Allothreonin beträgt 67% und die an D-Allothreonin 78% bezogen auf das eingesetzte Racemat.

Zur Darstellung des benötigten DL-N-Phthaloyl-allothreonins ist allerdings die direkte Umsetzung des Allothreonins mit Phthalsäureanhydrid wenig geeignet. Sie gelingt nur durch Zusammenschmelzen der Komponenten¹⁰⁾ und liefert nur schwer zu reinigende Produkte, während unter den von SHEEHAN¹¹⁾ für das Threonin angegebenen milderer Bedingungen durch Erhitzen in Dioxan als Lösungsmittel keine Phthaloyl-Verbindung entsteht. Die günstigste Methode zu dessen Synthese scheint die von NEFKENS et al.¹²⁾ beschriebene Umsetzung der Aminosäure mit N-Carbäthoxy-phthalimid zu sein, die auch im Falle des Allothreonins mit etwa 70% Ausbeute verläuft.

Für experimentelle Mithilfe habe ich Fräulein CHRISTA KOWACZEK und Fräulein HILTRUD BÖSE sehr zu danken.

Beschreibung der Versuche

N-Phthaloyl-DL-allothreonin

Zu einer Lösung von 71,4 g DL-Allothreonin (0,6 Mol) und 172,8 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ in 750 ml Wasser werden unter kräftigem Rühren 135 g feinpulverisiertes N-Carbäthoxy-phthalimid gegeben und bei Zimmertemperatur so lange gerührt, bis alles in Lösung gegangen ist. Danach wird filtriert und unter Kühlung das pH der Lösung mit 6 n HCl auf 2 eingestellt. Es scheidet sich zunächst ein farbloses Öl ab, das bei weiterem kräftigem Rühren kristallin wird. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit kaltem Wasser nachgewaschen und getrocknet. Ausbeute 112 g (70% d. Th.) fast reines N-Phthaloyl-DL-allothreonin. Schmp. 144–146°. Zur Analyse wurde noch zweimal aus Essigester umkristallisiert. Schmp. unverändert 144–146°.

$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_5$ (249,22) ber.: C 57,83; H 4,45; N 5,62;
gef.: C 57,78; H 4,72; N 5,78.

N-Phthaloyl-D-allothreonin-brucinsalz

118,2 g Brucin werden in 150 ml Äthylenglykol-monomethyläther (Methylcellosolve) bei 80° gelöst und unter Rühren 74,4 g (0,3 Mol) N-Phthaloyl-DL-allothreonin zugegeben. Der sofort entstehende gelbe Kristallbrei wird noch 15 Minuten bei 80° gerührt und anschließend 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wird das Salz angesaugt, 5mal mit je 50 ml Methanol gewaschen und getrocknet. Es werden 93,5 g Salz (97% d. Th.) vom Schmp. 223–225° (Zers.) erhalten. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 13,1^\circ$ (c = 1; Dimethylformamid). Zur Analyse wurde noch zweimal aus Äthylenglykol-monomethyläther umkristallisiert. Schmp. 227–228° (Zers.); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 15,2^\circ$ (c = 1; Dimethylformamid).

$\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_9$ (643,67) ber.: C 65,31; H 5,79; N 6,53;
gef.: C 65,34; H 5,49; N 6,79.

¹⁰⁾ J. H. BILLMAN u. W. F. HARTING, J. Amer. chem. Soc. **70**, 1473 (1948); M. FLING, F. M. MINARD u. S. W. FOX, J. Amer. chem. Soc. **69**, 2466 (1947).

¹¹⁾ J. C. SHEEHAN, M. GOODMAN u. G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **78**, 1367 (1956).

¹²⁾ G. H. L. NEFKENS, Nature [London] **185**, 309 (1960); G. H. L. NEFKENS, G. J. TESSER u. R. J. NIVARD, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **79**, 688 (1961).

D-Allothreonin

60 g N-Phthaloyl-D-allothreonin-brucinsalz werden mit 145 ml 2 n NaOH und 200 ml Chloroform 1 Stunde kräftig gerührt. Das Brucinsalz löst sich dabei vollständig auf. Die wäßrige Phase wird noch zweimal mit je 100 ml Chloroform extrahiert, während die vereinigten Chloroform-Extrakte noch zweimal mit je 50 ml 0,5 n NaOH ausgeschüttelt werden. Die vereinigten wäßrigen Phasen werden mit HCl auf pH 3 eingestellt und im Vakuum auf etwa $\frac{1}{3}$ des ursprünglichen Volumens eingedampft. Nach Zusatz von 56 ml konz. HCl wird $2\frac{1}{2}$ Stunden unter Rückfluß gekocht und nach dem Abkühlen die ausgeschiedene Phthalsäure abgesaugt, zweimal mit je 20 ml Wasser nachgewaschen und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 40 ml Wasser aufgenommen, von ungelöstem NaCl und etwas Phthalsäure durch Filtration befreit und die wäßrige Lösung erneut im Vakuum zur Trockne eingedampft. Das D-Allothreonin-hydrochlorid wird mit 80 ml Methanol herausgelöst, NaCl durch Filtration abgetrennt und das Filtrat durch Zugabe von Diäthylamin auf pH 6 gebracht. Nach mehrstündigem Stehen wird das D-Allothreonin abgesaugt, mit Methanol gründlich nachgewaschen und getrocknet. Ausbeute 9,5 g; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 31,7^{\circ}$ ($c = 1$; 1 n HCl). Das Rohprodukt wird in siedendem Wasser gelöst und mit dem doppelten Volumen Alkohol ausgefällt, abgesaugt, mit Alkohol nachgewaschen und getrocknet. Ausbeute 8,9 g; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 32,4^{\circ}$ ($c = 1$; 1 n HCl). Papierchromatographisch einheitlich bei 48 Stunden Laufzeit (aufsteigend) im System Butanol-Wasser-Ammoniak-(20proz.)-Aceton (100:69:18,5:12,5)¹³.

L-Allothreonin

Das Filtrat vom N-Phthaloyl-D-allothreonin-brucinsalz wird im Vakuum zur Trockne eingedampft. Die Zersetzung des L-Salzes (etwa 92 g) erfolgt mit 245 ml 2 n NaOH in Gegenwart von 245 ml Chloroform. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie beim D-Allothreonin. Letzte Kristallisation aus Wasser allein. Ausbeute 13 g (67% d. Th.); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 32,8^{\circ}$, ($c = 1$; 1 n HCl). Reinheitsprüfung wie oben angegeben.

¹³) K. N. F. SHAW u. S. W. FOX, J. Amer. chem. Soc. **75**, 3421 (1953).

Jena, Institut für Organische Chemie und Biochemie der Friedrich-Schiller-Universität.

Bei der Redaktion eingegangen am 5. August 1963.