

Lipase-katalysierte Acylierungen von Aminosäuren und Aminosäurederivaten

Enzymunterstützte Synthese von (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren



Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-
angefertigt im Fachbereich 9, Chemie
der Bergischen Universität-GH-Wuppertal

vorgelegt von
Stefan Müller
aus Urmitz/Rhein

2000

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2001

1. Gutachter: Prof. Dr. M. P. Schneider

2. Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Altenbach

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Prof. Dr. M. Schneider, dem ich herzlich für seine freundliche Unterstützung danke, im Fachbereich 9-Organische Chemie der Bergischen Universität-GH-Wuppertal in der Zeit von April 1996 bis November 2000 angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und so wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Den Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für das angenehme Arbeitsklima und für die stete Bereitschaft zur Diskussion, insbesondere Herrn Dr. O. Keil, Herrn G. Machmüller und Herrn F. Fazio.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. H.-J. Altenbach, Frau I. Polanz, E. Smets und Herrn Dr. C. M. Weissshuhn danke ich für die Aufnahme von Kernresonanz- und Massenspektren.

Der Firma Boehringer Mannheim (Roche Diagnostics) danke ich für die Überlassung von Enzymen (Hydantoinasen).

Den Firmen Eridania Béghin-Say und Condea danke ich für anteilige finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Herrn Dr. H. Koch, Herrn Dr. H. Röper, Herrn Dr. K. Kwetkat und Herrn Dr. W. Ruback danke ich für fruchtbare Diskussionen.

Dem Bundesministerium für Landwirtschaft und Ernährung danke ich für die anteilige Förderung dieser Arbeit.

Summary

Renewable raw materials represent a considerable reservoir for the chemical industry. This is particularly true in the detergent field where combination products of plant constituents such as carbohydrates, fats and oils or proteins are increasingly used as mild and biodegradable surfactants. Typical examples are "alkylpolyglucosides" (APGs) or "fatty acid-protein-conjugates". *N*-acylated amino acids are usually synthesized using classical methods such as the Schotten-Baumann reaction. As an attractive alternative biocatalysts (lipases) could be used advantageously. Lipase catalysed acylations must be carried out in aprotic organic solvents with low water content. Amino acids, however, are insoluble in such media and the problem was compromised *via* three different routes: a) conversion into *t*-Butyl esters; b) formation of contact ion pairs; c) complexation on ion exchange resins.

In the first part of this thesis the lipase catalysed acylation of amino acid *t*-butyl esters with fatty acids derived from natural fats and oils was studied. The required amino acid *t*-butyl esters were synthesized according to the procedure of Wright et al. by condensation of the corresponding cbz-amino acids with *t*-butanol MgSO_4 , followed by deprotection. The lipase derived from *Candida antarctica* B (Novozym SP435) showed the best substrate tolerance and highest activity for these reactions.

Under optimised conditions, product yields of > 92 % of *N*-acyl α -amino acid *t*-butyl esters were achieved. *N*-caproyl glycine *t*-butyl ester was synthesized on a preparative scale (< 100mmol) in excellent yield (95%) after only 3 hours reaction time. Racemic *t*-butyl (\pm)-3-aminobutyrate is converted into the corresponding, optically active *N*-acylated amidoester (93%ee) and unreacted β -amino ester (98%ee). The obtained results can be used as starting point for the synthesis of amino acid *t*-butyl esters on a commercial scale.

Also free amino acids can be acylated by the lipase from *Candida antarctica* B (Novozym SP435) if the amino acids are solubilised in organic solvents *via* formation of contact ion pair using the non-nucleophilic base TBD (1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en). NMR studies established that the amino acids form a contact ion pair with TBD. A broad range of such ion pairs with D- and L-amino acids were acylated with methylcaproate and -laurate. Alternatively the *N*-acylation of amino acids was also investigated by complex formation on ion exchange resins. This method provided an attractive route to the target molecules, especially as in technical applications the ion exchange resin can be reused.

The last section of this dissertation focussed on D-hydantoinase catalysed hydrolyses of 5-substituted oxazolidin-2,4-dione. (*R*)-5-substituted oxazolidin-2,4-dione are selectively hydrolysed producing *O*-carbamoyl-(*R*)- α -hydroxy acids which could be converted to the (*R*)- α -hydroxy acids. The required racemic 5-substituted oxazolidin-2,4-dione were synthesized using the procedure of Traube et al. by condensation of the corresponding α -hydroxy acid methylesters with guanidine. Optimisations of the method allowed the synthesis of numerous (*R*)- α -hydroxy acids in high chemical and optical yields. It was shown that 5-phenyl-substituted oxazolidin-2,4-dione racemise under these reaction conditions while 5-alkyl-substituted oxazolidin-2,4-dione do not.

1	Einleitung	1
1.1	Theoretischer Teil.....	3
1.1.1	Enzyme als Katalysatoren in der organischen Synthese.....	3
1.1.2	Lipasen.....	3
1.1.3	Lipase-katalysierte Reaktionen.....	5
1.1.4	Enantioselektivität von Lipasen.....	7
1.1.5	Lipase-katalysierte Acylierungen von Aminosäuren.....	9
1.1.6	Hydantoinasen.....	11
1.1.7	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	14
2	Diskussion und Ergebnisse	16
2.1	Lipase-katalysierte Acylierung von Aminosäureestern.....	16
2.1.1	Enzymatische Acylierungen von Aminosäurebenzylestern.....	16
2.1.2	Enzymatische Acylierungen von Aminosäuremethyl-, ethyl-, isopropylestern.....	18
2.1.3	Synthese von Aminosäure- <i>t</i> -butylestern.....	20
2.1.4	Enantiomerenreinheiten der Aminosäure- <i>t</i> -butylester.....	24
2.1.5	Optimierung der enzymatischen Acylierung von Aminosäure- <i>t</i> -butylestern.....	26
2.1.6	Auswahl der Biokatalysatoren.....	26
2.1.7	Enzymatische Acylierung von Glycin- <i>t</i> -butylester 13j - Lösungsmittelabhängigkeit.....	33
2.1.8	Enzymatische Acylierung von Glycin- <i>t</i> -butylester 13j - Einfluß des Acyldonors	35
2.1.9	Enzymatische Acylierung von Glycin- <i>t</i> -butylester 13j - Verhältnis von Substrat:Acyldonor.....	40
2.1.10	Lipase aus <i>Candida antarctica</i> B (Novozym SP435) - Temperaturabhängigkeit	43
2.1.11	Lipase-katalysierte Acylierung von Glycin- <i>t</i> -butylester 13j - Einfluß der Enzymmenge.....	45
2.1.12	Enzymatische Acylierung von Glycin- <i>t</i> -butylester 13j : Zusammenfassung der Optimierungsversuche.....	46
2.1.13	Enzymatische Acylierungen weiterer Aminosäure- <i>t</i> -butylester.....	47
2.1.14	Enantioselektive Acylierung von 3-Aminobuttersäure- <i>t</i> -butylester (\pm)- 13d	51
2.1.15	Einfluß der Molekülstruktur auf die enzymatische Acylierung von Aminosäure- <i>t</i> -butylestern.....	53

2.1.16	Enzymatische Acylierungen proteinogener L-Aminosäure- <i>t</i> -butylester - Capronsäuremethylester als Acyldonor.....	57
2.1.17	Enzymatische Acylierungen proteinogener L-Aminosäure- <i>t</i> -butylester mit Laurinsäuremethylester.....	58
2.1.18	Selektive Acetylierung von Gly-OtBu 13j und L-Lys-OtBu (<i>S</i>)- 13m	59
2.1.19	Präparativer Synthese von <i>N</i> -Caproylglycin- <i>t</i> -butylester 14e	60
2.1.20	Kontinuierliche enzymatische Acylierung von Glycin- <i>t</i> -butylester 13j in einem Säulenreaktor	60
2.1.21	Diskussion der Ergebnisse	63
2.2	Enzymatische Acylierungen von freien underivatisierten Aminosäuren.....	64
2.2.1	Einleitung.....	64
2.2.2	Acylase-katalysierte Acylierung von Aminosäuren.....	65
2.2.3	Enzymatische Acylierungen mit Penicillin Acylasen.....	71
2.2.4	Enzymatische Acylierungen in Gegenwart von Proteasen.....	74
2.2.5	Schlußfolgerungen.....	76
2.3	Lipasen-katalysierte Acylierung von freien Aminosäuren.....	77
2.3.1	Einleitung.....	77
2.3.2	Solubilisierung von Aminosäuren mittels Phasentransferkatalysatoren.....	77
2.3.3	Solubilisierung von Aminosäuren durch Bildung von Kontaktionenpaaren in Gegenwart nicht-nucleophiler Basen.....	80
2.3.4	Solubilisierung von Aminosäuren in Gegenwart von 1,1,3,3- Tetramethylguanidin (TMG): NMR-Studien	83
2.3.5	Kontaktionenpaare mit TMG: Enzymatische Acylierungen	85
2.3.6	Bildung von Aminosäure-Kontaktionenpaaren mit 1,5,7- Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en (TBD)	88
2.3.7	Enzymatische Acylierungen von Aminosäure-TBD-Kontaktionenpaaren	89
2.3.8	Enzymatische Acylierungen von Aminosäuren nach Komplexierung an Ionenaustauscher.....	92
2.3.9	Diskussion der Ergebnisse der Lipasen-katalysierten Acylierung von Aminosäuren.....	96
2.4	D-Hydantoinase-katalysierte Synthese von (<i>R</i>)-a-Hydroxycarbonsäuren.....	98
2.4.1	Einleitung.....	98
2.4.2	Synthesen 5-substituierter Oxazolidin-2,4-dione	101

2.4.3	D-Hydantoinase katalysierte Hydrolyse der Oxazolidin-2,4-dione	104
2.4.4	D-Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse: Optimierungsversuche	107
2.4.5	Optimierte Hydrolysen der Oxazolidin-2,4-dionen.....	109
2.4.6	Bestimmung der Enantiomerenreinheiten	112
2.4.7	Überführung der <i>O</i> -Carbamoyl-(<i>R</i>)- α -hydroxycarbonsäuren in (<i>R</i>)- α - Hydroxycarbonsäuren.....	115
2.4.8	Diskussion der Ergebnisse	117
2.4.9	D-Hydantoinase-katalysierte Hydrolysen von Hydantoinen und Oxazolidin-2,4- dionen: Ein Vergleich.....	117
3	Zusammenfassung	119
4	Experimenteller Teil.....	126
4.1	Allgemeine Versuchsvorschriften.....	131
4.1.1	AVV 1: Gaschromatographie: Meßbedingungen.....	131
4.1.2	AVV 2: Freisetzung von Aminosäureestern aus Aminosäureestersalzen	131
4.1.3	AVV 3: Synthese von Aminosäure-Isopropylestern	131
4.1.4	AVV 4: Synthese von Benzyloxycarbonyl- bzw. Dibenzylloxycarbonyl- Aminosäuren.....	131
4.1.5	AVV 5: Synthese von <i>Z</i> -Aminosäure- <i>t</i> -butylestern.....	132
4.1.6	AVV 6: Entfernung der <i>Z</i> -Schutzgruppe durch Hydrierung	132
4.1.7	AVV 7: Lipase-katalysierte Acylierung von Aminosäure- <i>t</i> -butylestern.....	133
4.1.8	AVV 8: Bildung von Aminosäure-TBD-Kontaktionenpaaren.....	133
4.1.9	AVV 9: Enzymatische Acylierungen von Aminosäure-TBD- Kontaktionenpaaren.....	133
4.1.10	AVV 10: Enzymatische Acylierung von Aminosäuren am Ionenaustauscher	134
4.1.11	AVV 11: Synthese der Cyanhydrine	134
4.1.12	AVV 12: Synthese racemischer α -Hydroxycarbonsäuremethylester.....	134
4.1.13	AVV 13: Synthese der Oxazolidin-2,4-dione	135
4.1.14	AVV 14: Enzymatische Hydrolyse der Oxazolidin-2,4-dione- Verfahrensoptimierung	135
4.1.15	AVV 15: Hydantoinase katalysierte Hydrolyse der Oxazolidin-2,4-dione	136
4.1.16	AVV 16: Synthese der Phenacylester bzw. 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5- Oxazolidin-2,4-dione	136

4.1.17	AVV 17: (<i>R</i>)- α -Hydroxycarbonsäuren aus den <i>O</i> -Carbamoyl-(<i>R</i>)- α -Hydroxycarbonsäuren.....	137
4.1.18	AVV 18: Synthese der (<i>R</i>)- α -Hydroxycarbonsäuremethylester zur Bestimmung der Enantiomerenreinheiten der (<i>R</i>)- α -Hydroxycarbonsäuren.....	137
4.2	Synthese von <i>N</i>-Acylaminosäureestern	137
4.2.1	Synthese von <i>N</i> -Acylaminosäure-benzyl-, -ethyl-, methyl-, isopropylestern.	137
4.2.2	Synthese von Aminosäureisopropylester-Hydrochloriden.....	138
4.2.3	Synthese von <i>Z</i> -Aminosäuren.....	144
4.2.4	Synthese von <i>Z</i> -Aminosäure- <i>t</i> -butylester	149
4.2.5	Synthese von Aminosäure- <i>t</i> -butylestern.....	160
4.2.6	Optimierung der enzymatischen Acylierung von Aminosäure- <i>t</i> -butylestern.	172
4.2.7	Synthese von <i>N</i> -Caproyl-aminosäure- <i>t</i> -butylestern.....	180
4.2.8	Enantioselektive Acylierung von DL-3-Aminobuttersäure- <i>t</i> -butylester (\pm)- 13d	193
4.2.9	Synthese von <i>N</i> -Lauroyl-L-Aminosäure- <i>t</i> -butylester	195
4.2.10	Synthese von <i>N</i> -Acetylglycin- <i>t</i> -butylester (selektive Acetylierung) 14a-2	204
4.2.11	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-L-lysin- <i>t</i> -butylester (selektive Acetylierung) (<i>S</i>)- 20	204
4.2.12	Kontinuierliche enzymatische Acylierung von Gly-OtBu 13j in einem Säulenreaktor	205
4.2.13	Acylase- und Protease-katalysierte Synthesen	205
4.3	Lipasen-katalysierte Acylierung von freien Aminosäuren.....	208
4.3.1	Solubilisierung von Aminosäuren mit Phasentransferkatalysatoren	208
4.3.2	Solubilisierung von Aminosäuren mit TMG: NMR-Studien	209
4.3.3	Bildung von Aminosäure-TBD-Kontaktionenpaaren.....	213
4.3.4	Enzymatische Acylierungen von Aminosäure-TBD-Kontaktionenpaaren	215
4.3.5	Enzymatische Acylierungen von Aminosäuren an Ionenaustauschern.....	225
4.4	D-Hydantoinase-katalysierte Synthesen von (<i>R</i>)-α-Hydroxycarbonsäuren.....	229
4.4.1	Synthese der Cyanhydrine (\pm)- 33 -(\pm)- 40	229
4.4.2	Synthese der racemischen α -Hydroxycarbonsäuremethylester (\pm)- 41 -(\pm)- 48	234
4.4.3	Synthese der Oxazolidin-2,4-dione (\pm)- 49 -(\pm)- 58	239
4.4.4	Synthese der <i>O</i> -Carbamoyl-(<i>R</i>)- α -Hydroxycarbonsäuren.....	245

4.4.5	Synthese von <i>O</i> -Carbamoyl-(<i>R</i>)- α -hydroxycarbonsäurephenacylester und 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-oxazolidin-2,4-dione	254
4.4.6	Semipräparative Trennung der <i>O</i> -Carbamoyl-(<i>R</i>)- α -hydroxysäurephenacylester und 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-oxazolidin-2,4-dione	266
4.4.7	Bestimmung der Enantiomerenreinheiten	267
4.4.8	Synthese von (<i>R</i>)-Mandelsäure (<i>R</i> -82a, (<i>R</i> -82b)	268
5	Literatur	270

Abkürzungsverzeichnis:

abs.	absolut
Ac	Acetyl
arom.	aromatisch
Bn	Benzyl
Bzl	Benzoyl
CAL	<i>Candida antarctica</i> B Lipase
CI	Chemische Ionisation
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Enantioselektivitätsfaktor
ee	Enantiomerenüberschuß
EE	Essigester
ES	Essigsäure
Et	Ethyl
GC	Gaschromatographie
ges.	gesättigt
h	Stunde
HE	Hexan
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
Hyd	Hydantoinase
IPA	Isopropylalkohol
IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante
konz.	konzentrierte
Lit.	Literatur
Lsgm.	Lösungsmittel
m	Multipllett
min	Minute
MS	Massenspektroskopie
NGIT	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -naphthoyl- β -D-gluco-pyranosyl-isothiocyanat
NMR	Kernmagnetische Resonanz
R _f	RF-Wert ("ratio of front")
R _t	Retentionszeit

RT	Raumtemperatur
Sdp.	Siedepunkt
Schmp.	Schmelzpunkt
Tab.	Tabelle
tBu	tertiär-Butyl
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolett
wässr.	wässrig
zers.	Zersetzung

Verwendete Aminosäuren

Ala	Alanin
2-ABU	2-Aminobuttersäure
3-ABU	3-Aminobuttersäure
4-ABU	4-Aminobuttersäure
6-Ahx	6-Aminohexansäure
Asp	Asparaginsäure
β-Ala	β-Alanin
Gly	Glycin
Glu	Glutaminsäure
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
Orn	Ornithin
Phe	Phenylalanin
Phg	Phenylglycin
Ser	Serin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

1 Einleitung

Ein zunehmendes Umweltbewußtsein und Vorteile wie Ressourcenschonung bei technischen Verfahren, biologische Abbaubarkeit und weitgehende CO₂-Neutralität sind wichtige Argumente für den Einsatz von "Nachwachsenden Rohstoffen" in der chemischen Industrie. Der heute dominierende Rohstoff Erdöl wird in absehbarer Zeit zur Neige gehen, weshalb man schon jetzt, neben den oben angeführten Argumenten, auf geschlossene Produktionskreisläufe achtet. Daneben gewinnen "Nachwachsende Rohstoffe" als Ergänzung und Alternative zu fossilen Ressourcen immer mehr an Bedeutung.

In der chemischen Industrie in Deutschland werden ca. 1,8 Mio. t "Nachwachsender Rohstoffe" eingesetzt. Davon entfallen 51 % auf Fette und Öle insbesondere Kokos- und Palmkernöl, Soja sowie aus heimischem Anbau Raps, Sonnenblume und Lein. Kohlenhydrate machen mit 43% den zweitgrößten Anteil aus. Proteine oder Proteinhydrolysate bilden mit 6 % den kleinsten Anteil¹. Als pflanzliche Proteinquellen dienen hauptsächlich Soja, Weizen, Mais und Reis. Diese drei Gruppen nachwachsender Rohstoffe lassen sich für die Tensidherstellung zu Produkten kombinieren, die zu 100 % aus nachwachsenden Rohstoffen aufgebaut sind. Durch gezielte Verknüpfung *lipophiler* Bestandteile (Fette und Öle) mit *hydrophilen* Komponenten wie Glycerin^{2,3,4,5}, Aminosäuren⁶, Proteinhydrolysaten⁷ oder Mono- und Disacchariden⁸ läßt sich unter Verwendung rein chemischer⁹ als auch biokatalytischer^{10,11} Verfahren so eine breite Palette oberflächenaktiver Verbindungen herstellen.

Eiweiß-Fettsäurekondensate aus Proteinen und Fettsäuren entsprechen der klassischen Tensidstruktur mit hydrophober (Fettsäure) und hydrophiler Komponente (Protein). In technischen Produkten variieren die eingesetzten Peptide zwischen 600 und 5000 Dalton. Als Proteinquelle werden in letzter Zeit neben dem klassischen Rohstoff Kollagen zunehmend pflanzliche Proteine insbesondere aus Weizen¹² oder Reis¹³ eingesetzt. Auf der Ölseite werden meist Fettsäuren aus der sog. „lauric range“ (Palmkern- und Kokosöl, C₁₂; C₁₄) eingesetzt. Die Verknüpfung erfolgt normalerweise über die altbekannte Schotten-Baumann-Reaktion unter Verwendung von Fettsäurechloriden. Anwendungsbereiche dieser hautfreundlichen Eiweiß-Fettsäurekondensate¹⁴ finden sich in der Kosmetik¹⁵, der Textiltechnik¹⁶ und bei Formulierungen von Spül- und Reinigungsmitteln¹⁷.

Als attraktive Alternative zu klassischen, chemischen Verknüpfungen von Fetten und Ölen mit Aminosäuren bzw. Proteinhydrolysaten, bieten sich besonders aus ökologischen, aber auch aus ökonomischen Gründen biotechnologische Verfahren an. Enzyme katalysieren unter besonders milden, energieneutralen und umweltfreundlichen Bedingungen vielfältige Transformationen sowohl natürlicher als auch synthetischer Substanzen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird die lipase-katalysierte Acylierung von Aminosäure-*t*-butylestern beschrieben. Wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche Synthese war die Auswahl eines geeigneten Aminosäureesters, des Enzyms und der Optimierung der Reaktion im Hinblick auf eine technische Anwendung.

Im zweiten Teil der Arbeit werden biokatalytische Methoden zur direkten Herstellung von *N*-Acylaminosäuren aus Fettsäureestern und nativen Aminosäuren beschrieben. Wichtigste Voraussetzung dafür war neben der Wahl des Enzyms ein geeignetes Verfahren zur Solubilisierung von Aminosäuren in organischen Medien mit nicht-nucleophilen Basen. Im Hinblick auf eine zukünftige technische Anwendung wurden lipase-katalysierte Acylierungen von Aminosäuren nach Komplexbildung an Ionenaustauschern entwickelt.

Im letzten Teil der Arbeit wird die Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse von 5-substituierten Oxazolidin-2,4-dionen beschrieben. Studien hinsichtlich der Hydrolysebedingungen und Untersuchungen zu Racemisierungseigenschaften der Substrate waren wichtigste Voraussetzungen für die Entwicklung neuartiger Wege zu enantiomerenreinen (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren.

1.1 Theoretischer Teil

1.1.1 Enzyme als Katalysatoren in der organischen Synthese

Enzyme sind katalytisch aktive, in der Regel hochmolekulare Proteine, die in der lebenden Zelle hochspezifisch chemische Reaktionen steuern. Die katalytische Wirkung dieser Biokatalysatoren resultiert aus ihrem strukturellen Aufbau¹⁸. Enzym-katalysierte Reaktionen zeichnen sich vor allem durch milde Reaktionsbedingungen, hohe Chemo-, Regio-, Diastereo- und Enantioselektivität aus. Da viele Enzyme neben ihren natürlichen Substraten auch ein breites Spektrum nicht natürlicher Verbindungen als Substrate akzeptieren, wurde die Verwendung von Biokatalysatoren in den letzten zwanzig Jahren für die organische Synthese eine zunehmende Alternative zu konventionellen chemischen Methoden¹⁹.

1.1.2 Lipasen

Als Lipasen (Triacylglycerol-Acylhydrolasen EC 3. 1. 1. 3.) werden Enzyme definiert, die die Hydrolyse von Triglyceriden, bevorzugt von langkettigen Fettsäureestern, an einer Öl/Wasser-Grenzfläche katalysieren²⁰. Dies unterscheidet sie von Esterasen, die nur wasserlösliche Triglyceride spalten. Nach ihrer Herkunft lassen sich Lipasen in tierische (menschliche Lipasen als Spezialfall), pflanzliche und mikrobielle Lipasen unterteilen. Bekanntester Vertreter der tierischen Lipasen ist die Schweinepankreaslipase (*Porcine pancreas lipase*; PPL). Das größte Potential zur Bereitstellung geeigneter Biokatalysatoren bieten die mikrobiellen Lipasen, die auch kommerziell in großer Auswahl zur Verfügung stehen. Vertreter dafür sind Lipasen aus *Candida*-Spezies, *Pseudomonas*-Spezies, *Rhizopus*-Spezies und Lipasen aus *Aspergillus*-Spezies.

Das ständig wachsende Interesse an dieser Enzymgruppe erklärt sich durch ihre biotechnologisch vielseitige Verwendbarkeit und der Tatsache, daß Lipasen ihre katalytische Aktivität auch in organischem Medium behalten²¹. Gründe für die notwendige Grenzflächenaktivierung von Lipasen wurde durch Röntgenstrukturanalyse zweier Lipasen^{22,23} aufgeklärt. Im Gegensatz zu anderen Hydrolasen, haben Lipasen ein amphiphiles Peptidsegment, das wie ein Deckel "lid" das aktive Zentrum des Enzyms bedeckt. Bei Wechselwirkungen mit einer hydrophoben Phase (Lipid) wird dieser Deckel im Zuge einer Konformationsänderung aufgeklappt, und ermöglicht somit dem Substrat den Zugang zum

aktiven Zentrum^{24, 25}. Nachgewiesen wurden diese unterschiedlichen Konformationen - geschlossenes „lid“ und geöffnetes „lid“- in den letzten Jahren für weitere Lipasen wie *Pseudomonas glumae*²⁶ und *Candida antarctica*²⁷ (Typ B), die auch im „Ruhezustand“ ein geöffnetes „lid“ besitzen. In diesen Fällen ist keine Grenzflächenaktivierung notwendig, diese Lipasen stellen damit Verbindungsglieder zu Esterasen dar, die kein „lid“ aufweisen.

Ausgehend von der Struktur des aktiven Zentrums werden Lipasen zu den sogenannten Serin-Proteasen gezählt. Unabhängig von ihrer Herkunft enthalten nahezu alle Lipasen eine den Serin-Proteasen analoge katalytische Triade, bestehend aus Serin, Histidin und Asparaginsäure^{28,29}. Die katalytische Triade und der katalytische Kreislauf sind in **Abb. 1** dargestellt.

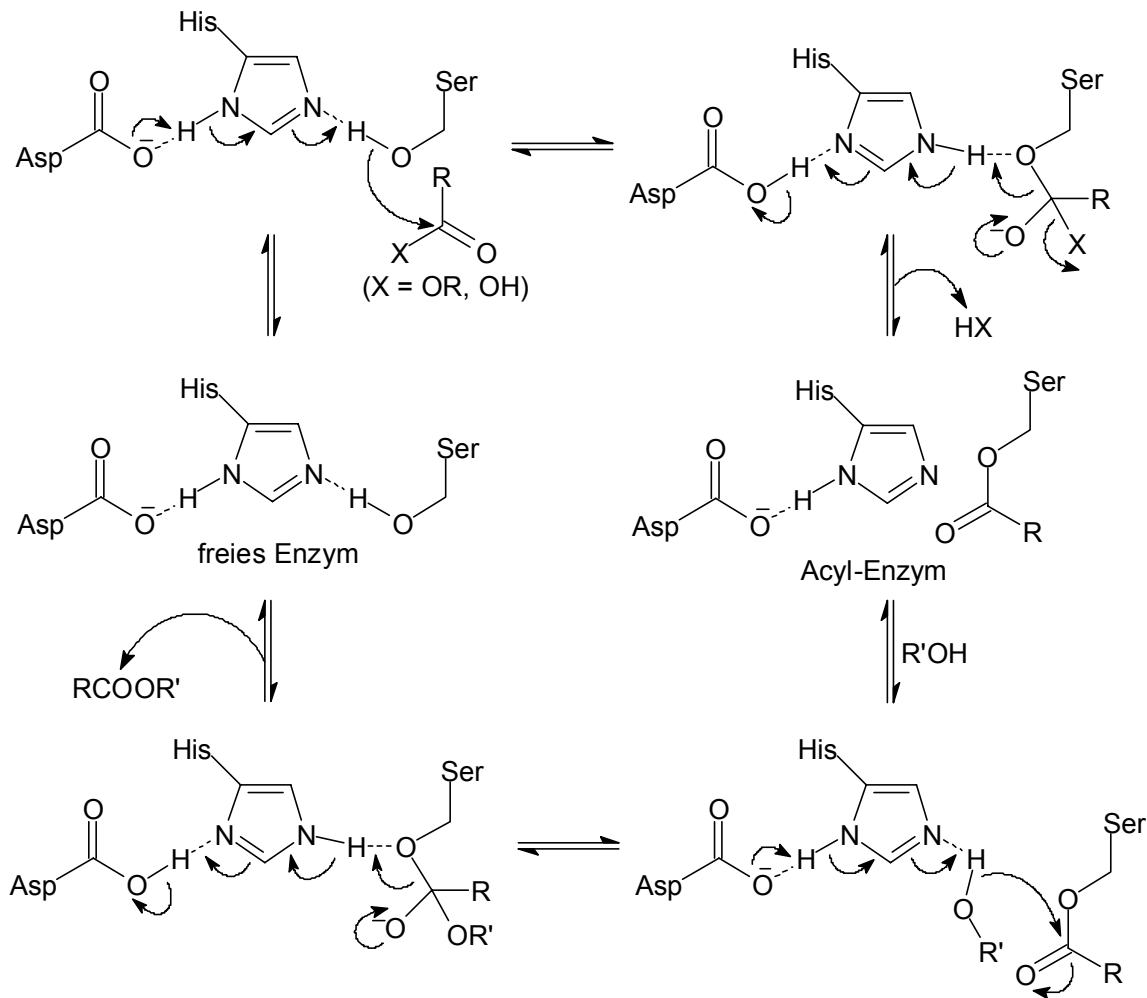


Abb. 1: Katalyse-Mechanismus von Serin-Proteasen.

Der nucleophile Angriff der Hydroxylgruppe des Serins auf Carbonsäureester oder Peptidbindungen führt zu einem tetraedrischen Übergangszustand, der nach Abspaltung der Alkoholkomponente des Esters in einen aktivierten Serinester übergeht. In diesem Acylenzym

ist die Carbonsäure kovalent an das Enzym gebunden³⁰. Elektronentransport von der Carboxylatgruppe der Asparaginsäure über den Imidazolring des Histidins, hin zur Hydroxylgruppe des Serins führt dabei zu einer Steigerung der Nucleophilie. Dieses sogenannte Acyl-Enzym kann durch Wasser oder in organischen Lösungsmitteln auch durch andere Nucleophile wie Alkohole, Amine etc. deacyliert werden, wodurch Carbonsäuren, Ester oder Amide gebildet werden³¹. Unterstützt wird diese Reaktion wiederum durch Elektronentransport von der Asparaginsäure zum Serin. Dem rückläufigen Elektronenfluß folgt dann die Regenerierung des Enzyms, der Kreislauf ist geschlossen.

Für die katalytische Wirkung von Serinproteasen ist die hier beschriebene Triade nicht Voraussetzung. Sowohl die Entfernung, als auch der Ersatz von Asparaginsäure durch Glutaminsäure führen wie der Ersatz von Histidin durch andere Aminosäuren nur zu geringen Aktivitätsverlusten. Das Vorhandensein von Serin ist hingegen essentiell, ein Austausch führt in jedem Fall zum vollständigen Verlust der Aktivität^{32,33}. Da bei Lipasen, daß vom Serin abstrahierte Proton nicht über den Imidazolring des Histidins hinaus transportiert wird, ist auch bei Lipasen die Notwendigkeit einer vollständigen Triade in Frage zu stellen³⁴. Während die Entfernung des "Oxyanion-Hohlraumes" bei Subtilisin zu erheblichen Aktivitätsverlust führt³⁵, ist dessen Funktion bei Lipasen noch weitgehend unklar²⁴. Nach den derzeit existierenden Modellvorstellungen haben Größe und Gestalt dieses Tunnels entscheidenden Einfluß auf die Spezifität einer Lipase³⁶.

1.1.3 Lipase-katalysierte Reaktionen

Die oben beschriebenen Modelle zur Struktur und Wirkungsweise von Lipasen erklären die beobachteten lipolytischen Reaktionen an Hydroxyfunktionen natürlicher und synthetischer Substrate. Lipasen weisen eine ungewöhnlich breite Substratspezifität auf, so setzen sie eine große Zahl aliphatischer, alicyclischer, bicyclischer, aromatischer und metallorganischer Ester um und weisen gegenüber racemischen Verbindungen meist eine hohe Enantio- oder Regioselektivität auf³⁷. Man unterscheidet so zwischen Hydrolyse (A), Veresterung (B) und Acyltransfer-Reaktionen (C). Die unterschiedlichen Reaktionen sind in **Abb. 2** aufgeführt.

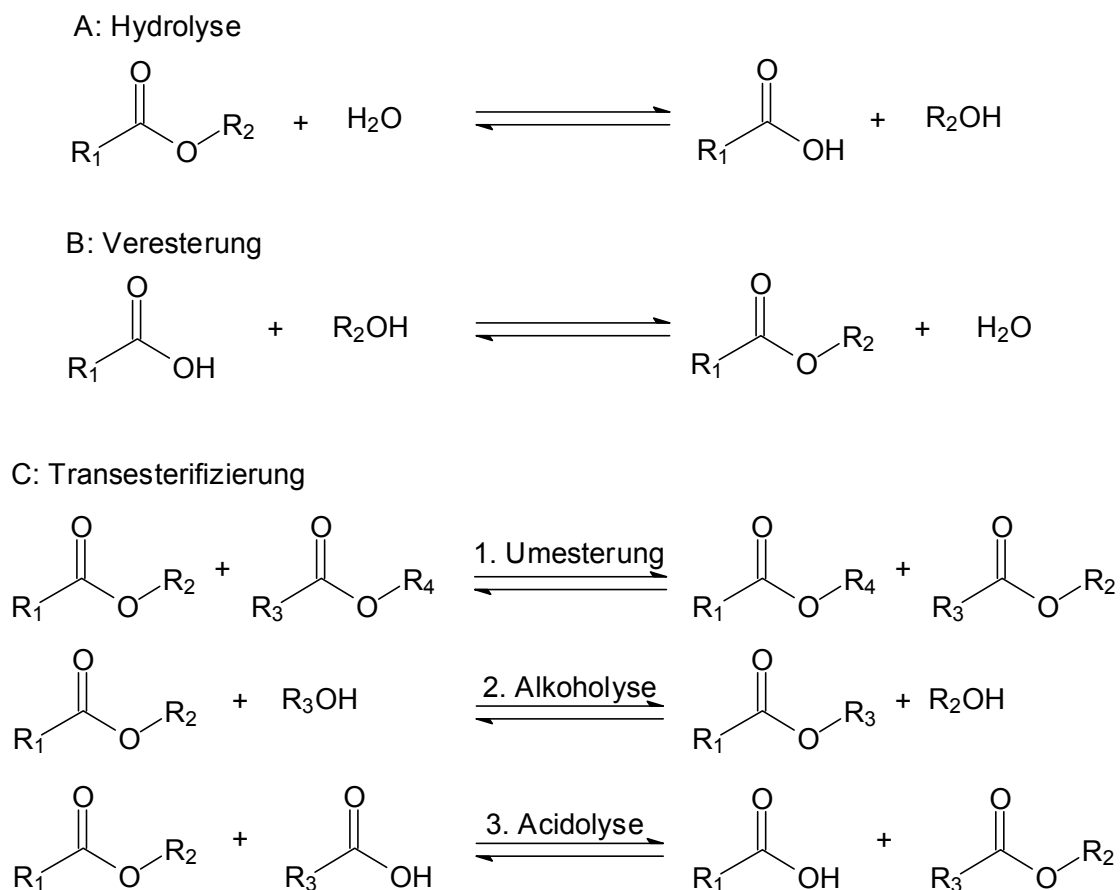


Abb. 2: Lipase-katalysierte Reaktionen

Die Hydrolyse (vgl. **Abb. 2**, A) von Estern zu Säure und Alkohol in Gegenwart von Lipasen erfolgt in wässrigen, gepufferten Systemen und dient hauptsächlich zur Synthese enantiomerenreiner Alkohole^{38,39,40} und Carbonsäuren^{41,42}. Daneben findet die Lipase-katalysierte Hydrolyse zunehmend Verwendung in der Zuckerchemie⁴³, Peptidchemie⁴⁴ und bei der Herstellung monofunktionalisierter Dicarbonsäuren⁴⁵. Da es sich bei enzymatischen Reaktionen immer um Gleichgewichtsreaktionen handelt, sind Lipasen auch in der Lage, in Umkehrung zur Hydrolyse, Veresterungen (vgl. **Abb. 2**, B) auszuführen. Das erste Beispiel einer Lipase-katalysierten Veresterung wurde schon 1900 von Kastle und Loevenhart⁴⁶ beobachtet. Der Nachteil der direkten Veresterung wird durch die freie Säure verursacht, die bei zu hoher Konzentration die Lipase inhibieren kann⁴⁷, wodurch diese Form der Veresterung kaum präparative Anwendung findet⁴⁸.

In organischen Reaktionsmedien werden in Gegenwart von Lipasen auch Acyltransferreaktionen (vgl. **Abb. 2**, C) katalysiert. Die Umesterungsreaktion (vgl. **Abb. 2**, C1) wird technisch zur Zeit von Unichema⁴⁹ und Fuji Oil⁵⁰ zur Herstellung von synthetischer

Kakaobutter genutzt. Eine der Umesterung verwandte Reaktion ist die Acidolyse von Carbonsäureestern (vgl. **Abb. 2**, C3). Diese Umesterung ist der Acidolyse vorzuziehen.

Die wichtigste Acyltransferreaktion ist die Alkoholyse (vgl. **Abb. 2**, C2) von Carbonsäureestern, die in der organischen Synthese bevorzugt Anwendung findet. Das Reaktionsgleichgewicht kann zur Produktseite hin verschoben werden, so bei großen Überschüssen an Alkohol oder durch Entfernung des gebildeten Alkohols aus dem Reaktionsgemisch⁵¹. Aktivierte Ester von Trihalogenalkoholen⁵², Oximester⁵³ sowie Enolester⁵⁴ können ebenfalls zur Gleichgewichtsverschiebung eingesetzt werden. Die entsprechenden Alkohole besitzen entweder nur geringe Nucleophilie oder lagern sich spontan wie z. B. Vinylalkohol in die entsprechenden Aldehyde oder Ketone um (vgl. **Abb. 3**).

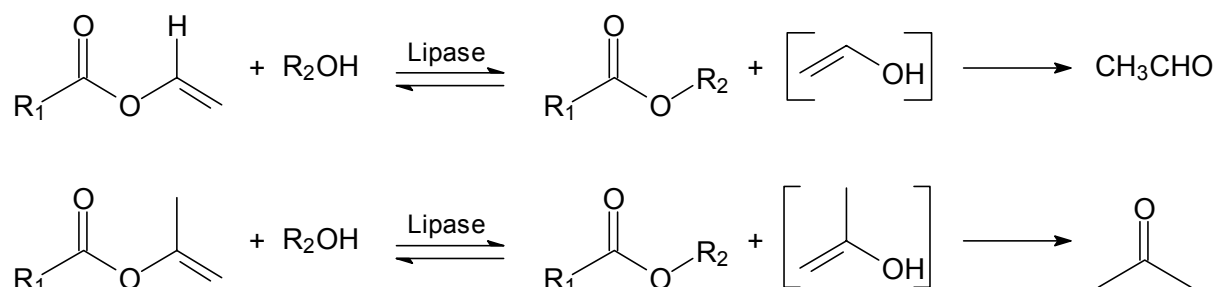


Abb. 3: Lipase-katalysierter, irreversibler Acyltransfer.

Diese Methode des irreversiblen Acyltransfers hat sich in der organischen Synthese fest etabliert, da unter schonenden Reaktionsbedingungen oft sehr gute Ausbeuten erhalten werden.

1.1.4 Enantioselektivität von Lipasen

Der wachsende Bedarf an enantiomerenreinen Verbindungen war eine wesentliche Triebkraft für den Einsatz von Lipasen in der organischen Synthese. Dabei ist die Differenzierung zwischen Enantiomeren racemischer Alkohole oder Carbonsäuren durch enantioselektive Hydrolysen bzw. Veresterungen die am häufigsten genutzte Anwendung. Daneben findet auch die Differenzierung enantiotoper Gruppen in *meso*-Substraten oder achiralen Verbindungen mit prochiralen Zentren synthetische Anwendung. Ganz aktuell wird zur Zeit von Schering-Plough ein antimykotisches Azolderivat (SCH 51048) für klinische Prüfungen synthetisiert⁵⁵. Dabei ist die enzymatische Acylierung in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) der Schlüsselschritt dieser Wirkstoffsynthese (vgl. **Abb. 4**).

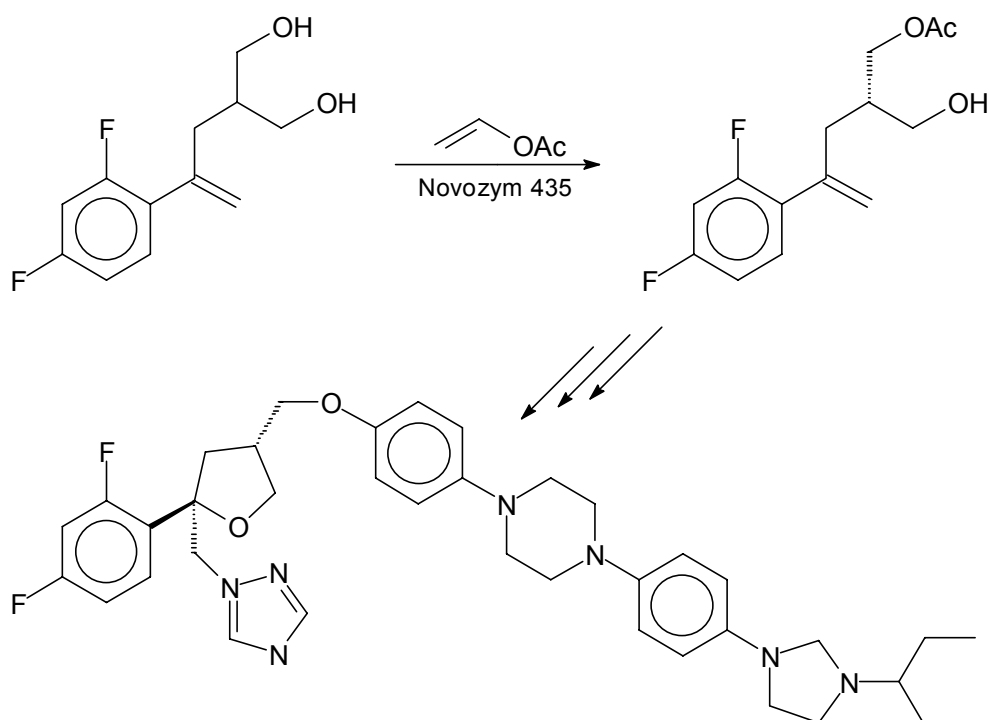
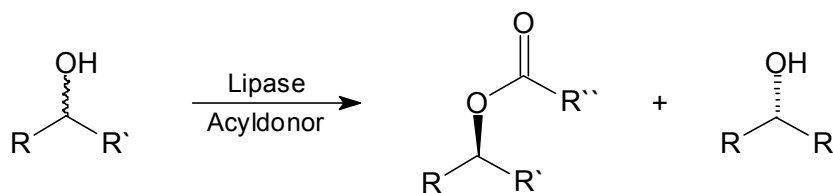


Abb. 4: Enzymatischer Schlüsselschritt zur Synthese von SCH 51048⁵⁵.

Während bei der lipase-katalysierten Differenzierung enantiotoper Gruppen in achiralen Verbindungen mit prochiralem Zentrum oder in *meso*-Verbindungen nur ein Enantiomeres bzw. Diastereomeres mit maximal 100 % Ausbeute erhalten werden kann, liefert die Racematspaltung nur maximal 50 % Ausbeute. Hierbei werden im Idealfalle, bei der Lipase-katalysierten Acylierung und der entsprechenden Hydrolyse enantiokomplementäre Verbindungen erhalten (vgl. **Abb. 5**).

A. Acylierung



B. Hydrolyse

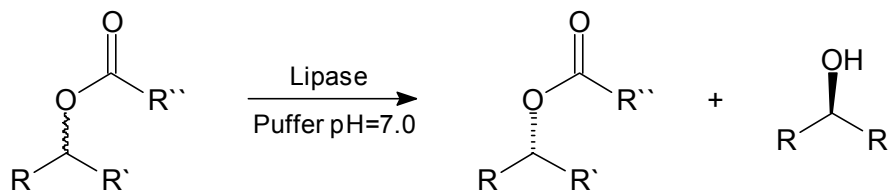


Abb. 5: Enantiomere mit entgegengesetzter absoluten Konfiguration durch Lipase-katalysierte Acylierung (A) bzw. Hydrolyse (B) aus racemischen Substraten.

1.1.5 Lipase-katalysierte Acylierungen von Aminosäuren

1.1.5.1 Einleitung

Acylierungen von Aminosäuren und Proteinhydrolysaten werden bislang nahezu ausschließlich auf klassische Weise unter Einsatz der Schotten-Baumann-Reaktion durchgeführt. Ausgehend von Säurechloriden mittelkettiger Fettsäuren ("lauric range") und Aminosäuren bzw. Proteinhydrolysaten erhält man so anionische Tenside mit besonders hautfreundlichen Eigenschaften für Anwendungen im Kosmetikbereich⁵⁶. Als interessante, innovative Alternative bietet sich die enzymatische Synthese durch direkte Übertragung von Fettsäuren auf Aminosäuren an (vgl. **Abb. 6**).

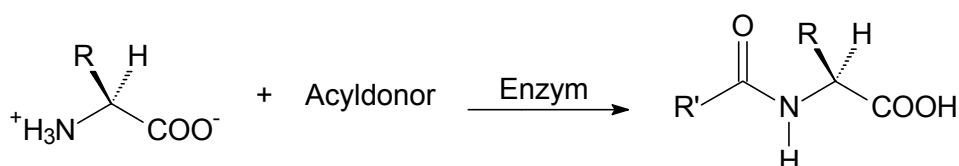


Abb. 6: Enzymatische Acylierung von Aminosäuren.

Während die Racematspaltung von Alkoholen vielfältig in der Literatur^{19,21} beschrieben ist findet man entsprechende Verfahren für Amine eher selten. Erfolgreiche Acylierungen von Aminen wurden in Gegenwart der Lipasen aus *Candida antarctica*⁵⁷, *Pseudomonas cepacia*⁵⁸ und *Pseudomonas aeruginosa*⁵⁹ durchgeführt. Dabei stellte sich die Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) als am besten geeignet heraus¹⁹. Über die Lipase-katalysierte Acylierung von L-Lysin wurde bisher nur in einem Artikel von Montet et al.⁶⁰ berichtet. In Gegenwart von Lipozym, einer immobilisierten Lipase aus *Mucor miehei*, wurde L-Lysin mit Ölsäure oder Triolein als Acyldonor enzymatisch acyliert. In Abhängigkeit von dem Lösungsmittel und der Temperatur werden nach vier Tagen Reaktionszeit über Ausbeuten von max. 40 % berichtet (vgl. **Abb. 7**).

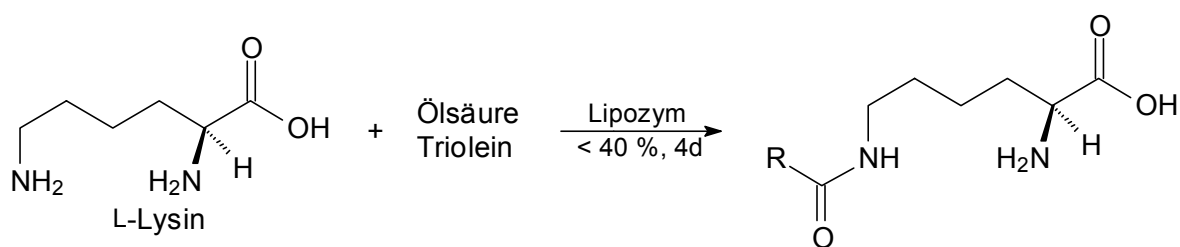


Abb. 7: Enzymatische Acylierung von L-Lysin nach Montet et al.⁶⁰.

Leider ließen sich diese Arbeiten in unseren Händen nicht reproduzieren; es wurden keine Umsätze beobachtet. Einen indirekten Hinweis auf eine möglicherweise erfolgreiche enzymatische Acylierung von Aminosäuren mit Lipasen lieferten die Arbeiten von Gotor et al.⁶¹, Balkenhohl et al.⁶² und Reetz et al.⁶³ Dabei wurden verschiedene, racemische Amine in Gegenwart von Lipasen unter Verwendung von sowohl α -aktivierten⁶² als auch nicht aktivierten⁶³ Carbonsäureestern enantioselektiv acyliert (vgl. **Abb. 8**).

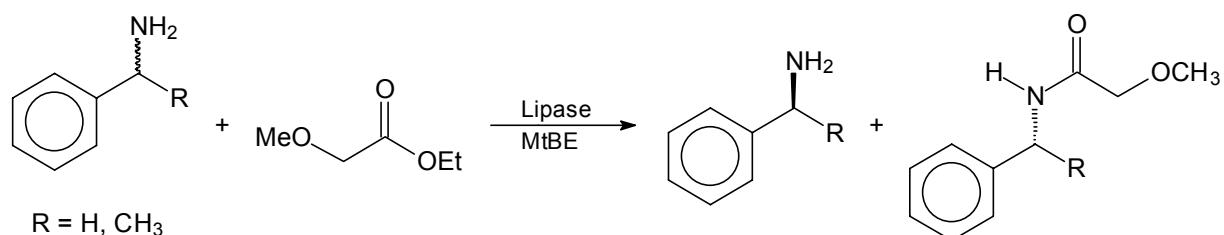


Abb. 8: Lipase-katalysierte Acylierung von Aminen nach Balkenhohl et al.⁶².

Derartige Umsetzungen müssen zur Vermeidung hydrolytischer Prozesse in nahezu wasserfreien organischen und/oder aprotischen Lösungsmitteln durchgeführt werden. Will man dieses Prinzip auf Aminosäuren übertragen, so muß zunächst die geringe Löslichkeit von Aminosäuren in organischen Lösungsmitteln überwunden werden. Die direkte enzymatische Acylierung von freien, d. h. underivatisierten Aminosäuren ist nicht durchführbar, da aufgrund der zwitterionischen Struktur der Aminosäuren diese auch in vielen polaren organischen Lösungsmitteln, wie z. B. DMSO, DMF unlöslich sind. Es muß also der lipophile Charakter von Aminosäuren direkt oder indirekt erhöht werden. Dazu bieten sich drei Methoden an (vgl. **Abb. 9**):

- Überführung in Ester
- Bildung von Kontaktionenpaaren
- Komplexierung an Ionenaustauschern

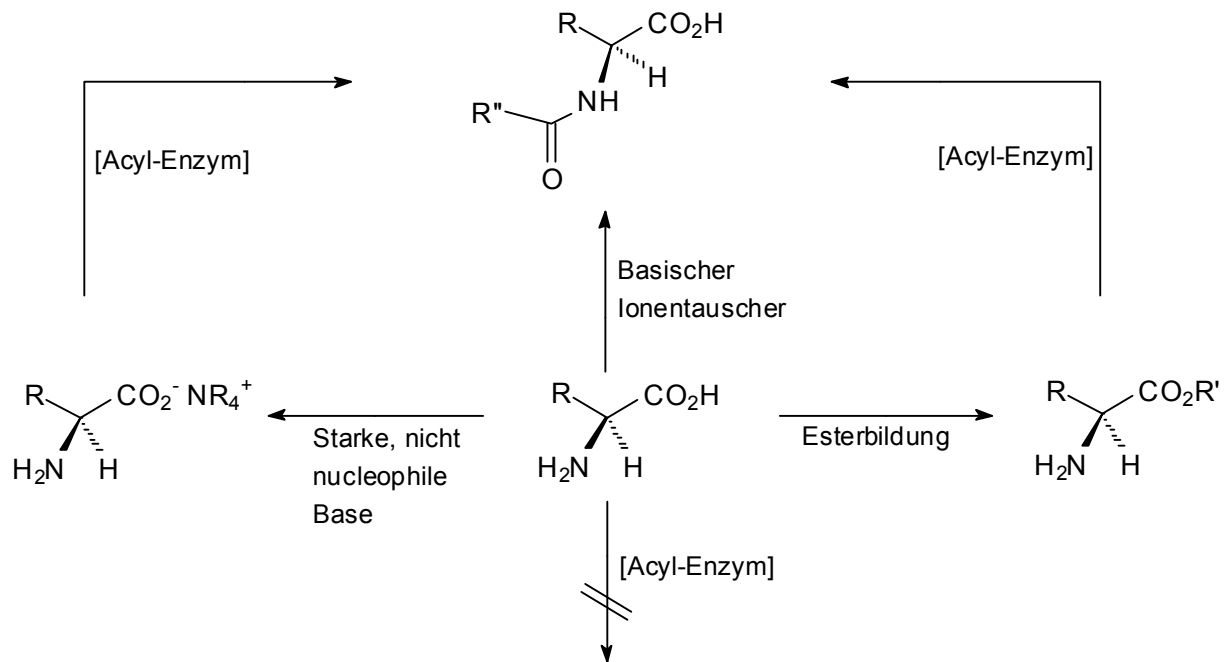


Abb. 9: Drei Methoden zur Solubilisierung und Acylierung von Aminosäuren

1.1.6 Hydantoinasen

1.1.6.1 Klassifizierung, biologische Funktion und Verwendung von Hydantoinasen

Das beachtliche Interesse an Hydantoinasen^{64,65} resultiert nicht nur aus der enzymatischen Funktion im Pyrimidinstoffwechsel sondern insbesondere aus der biotechnologischen Anwendung zur Synthese von enantiomerenreinen D- und L-Aminosäuren. Hydantoinasen katalysieren die Hydrolyse von 5-monosubstituierten Hydantoinen und sie werden daher auch als Dihydropyrimidasen oder 5,6-Dihydropyrimidin Amidohydrolasen bezeichnet. Nach der IUB-Klassifizierung gehören sie zur Gruppe EC 3.5.2, mit der Unterklasse EC 3.5.2.2. Die mit dieser Gruppe bezeichneten Hydrolasen sind in der Lage, C-N Bindungen in cyclischen Amiden zu spalten. Im Stoffwechselkreislauf sind Hydantoinasen für den reduktiven Abbau von Pyrimidinen⁶⁶ zuständig (vgl. **Abb. 10**).

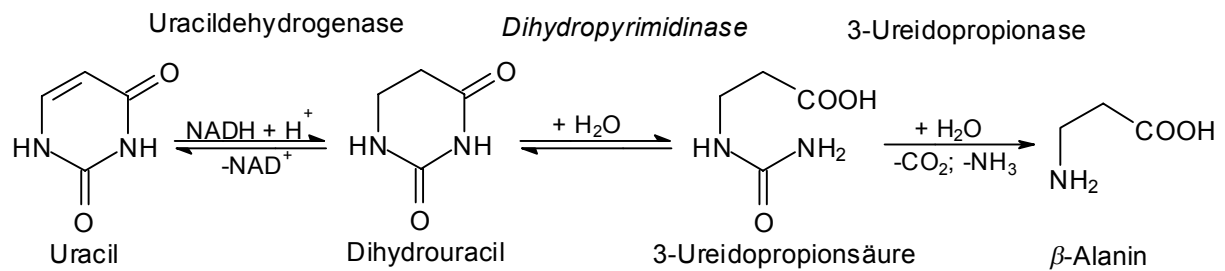


Abb. 10: Abbau von Pyrimidinen im Stoffwechselkreislauf.

Im ersten Reaktionsschritt erfolgt die enzymkatalysierte Reduktion von Uracil zu Dihydrouracil, welches dann durch Dihydropyrimidinase zu *N*-Carbamoyl- β -alanin hydrolysiert wird. Die darauffolgende Decarbamoylierung liefert β -Alanin, das in den Pyruvat-Stoffwechsel oder in die CoA-Biosynthese eingeht.

Neben Dihydrouracil wird durch die Hydantoinase z.B. auch das homologe Dihydrothymin und eine Vielzahl anderer Hydantoine hydrolysiert.

1926 konnten Gaebler und Keltch⁶⁷ zeigen, daß die Injektion von Hydantoin in Hunde zu einer Ausscheidung von Hydantoinensäure (= *N*-Carbamoylglycin) führt. Ende der 40er Jahre wurde erstmals von Bernheim et al.⁶⁸ über das Vorkommen eines Hydantoinhydrolysierenden Enzyms bei Pflanzen und Tieren berichtet. Die ersten Versuche zur Eigenschaftscharakterisierung der zum Teil partiell gereinigten Enzyme wurden 1957 von Wallach und Grisolia⁶⁹ durchgeführt. Zu dieser Zeit war das Interesse an Hydantoinasen ausschließlich auf die Rolle der natürlichen Hydantoinderivate⁷⁰ (Carboxymethylhydantoin) im Stoffwechselkreislauf beschränkt. Tsugawa et al.⁷¹ beschreibt erstmalig 1966 die Synthese von L-Glutaminsäure ausgehend von racemischem 5-Propionsäurehydantoin. Die Hydantoinase produzierte dabei ausschließlich L-Glutaminsäure und dies mit einem Umsatz von 90%. Die Entdeckung der breiten Substrattoleranz von Hydantoinasen bei strenger Stereospezifität^{72,73} und bei gleichzeitiger Racemisierung des nicht hydrolysierten Hydantoins führte zu einer intensiven Untersuchung dieser Enzymklasse. In den siebziger Jahren führte das steigende Interesse an unnatürlichen D-Aminosäuren als Bausteine für semisynthetische β -Lactam-Antibiotika zu ersten Patentanmeldungen^{74,75,76} für die Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse von Hydantoinen.

Aus diesem biotechnologischen Interesse heraus wurde von 1970 und bis in die 90er Jahre hinein die Verteilung von spezifischen Hydantoinasen in verschiedenen Mikroorganismen und anderen natürlichen Quellen erforscht^{77,78,79}. Die bis 1997 geltende Annahme, daß die Hydantoinasen mit Dihydropyrimidasen identisch sind, wird durch die Studien von Ogawa

und Shimizu⁸⁰ zum Teil angezweifelt. Ihre Ergebnisse zeigten, daß die von Ihnen gereinigten Hydantoinasen eine differenziertere Stoffwechselfunktion haben.

1.1.6.2 Enantioselektivität von Hydantoinasen

1973 beschrieben Dudley et al.⁷² die Stereospezifität von Dihydropyrimidinasen. Es ist in der Literatur üblich, die Enantioselektivität von Hydantoinasen für ihre Klassifizierung zu verwenden. Sie werden dabei als D-, L-, und unselektiv⁸¹ bezeichnet. Diese Klassifizierungen resultieren aus den industriellen Anwendungen und den daraus synthetisierten Produkten. Syldatk et al.⁸² konnte an Hand der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 beweisen, daß das gereinigte Enzym eine hohe L-Selektivität für Indolylmethylhydantoin ($E > 100$) besitzt, wodurch es als L-Hydantoinase bezeichnet werden sollte. Dieses Enzym ist unselektiv für Methylthioethylhydantoin ($E=3$) aber D-selektiv für Methylhydantoin ($E > 60$). Völkel et al.⁸³ berichtet ebenfalls von einem substratabhängigen Wechsel der Enantioselektivität einer Hydantoinase aus *Arthrobacter sp.* Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Hydantoinasen verwendet, die von Boehringer Mannheim (Roche Diagnostics) als D-Hydantoinasen bezeichnet werden, sie zeigten in den hier durchgeführten Hydrolysen ausschließlich D-Selektivität.

1.1.6.3 Wirkungsmechanismus der Hydantoinase-katalysierten Hydrolyse

Hydantoinasen enthalten im aktiven Zentrum ein Metallion welches als Chelatbildner direkt am Katalyseprozeß beteiligt ist. In dem von Jabri et al.⁸⁴ vorgeschlagenen Katalysemechanismus (vgl. **Abb. 11**) befindet sich ein für die proteolytische Aktivität essentielles Zinkatom im aktiven Zentrum. Soweit bislang bekannt, wird dieses Atom von zwei Histidineinheiten und sehr wahrscheinlich von einer Asparagineinheit koordiniert.

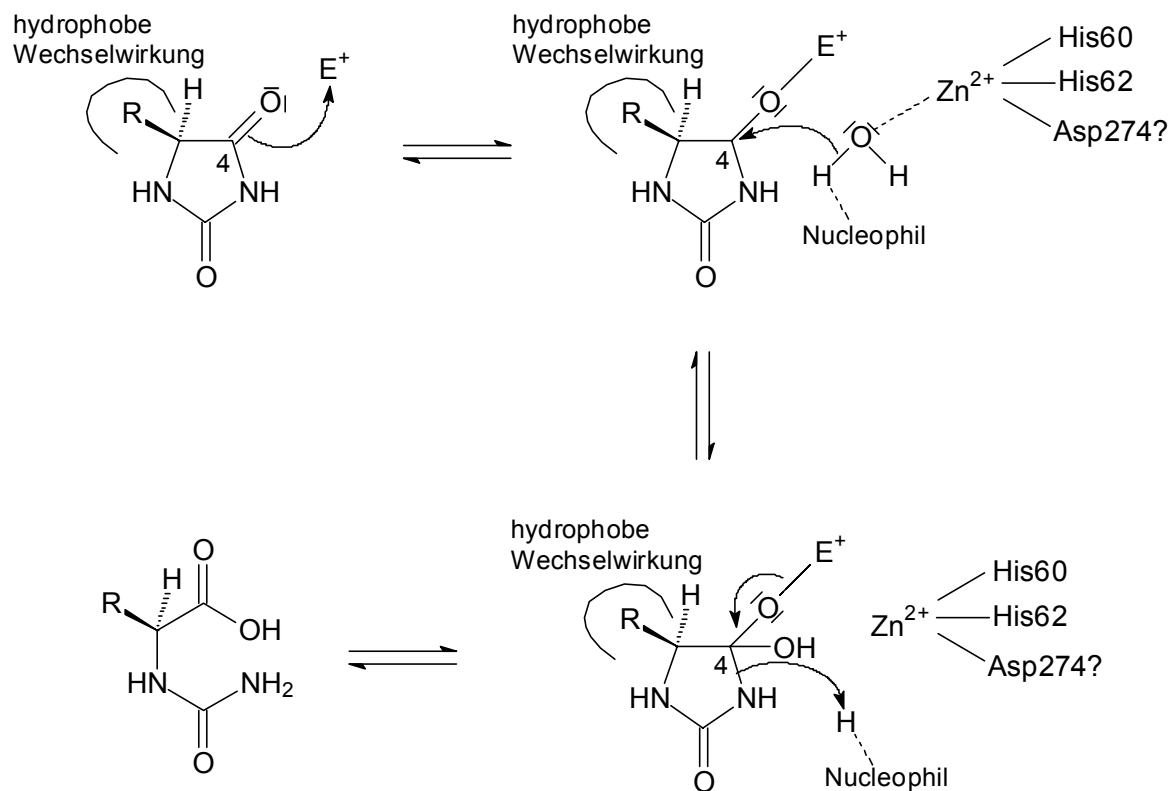


Abb. 11: Katalysemechanismus der Hydantoinase katalysierten Hydrolyse

Nachdem das Substrat im aktiven Zentrum des Moleküls gebunden ist, erfolgt eine Aktivierung des Carbonylsauerstoffes am C-4 Kohlenstoffatom. Nucleophiler Angriff von an Zink gebundenem Wasser auf das C-4 Atom des Substrates führt zur Bildung eines tetraedrischen Übergangszustandes. Die darauffolgende Protonierung des Stickstoffatoms führt gleichzeitig zur Ringöffnung und liefert die entsprechende *N*-Carbamoylaminosäure.

1.1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die biokatalytische Synthese von *N*-Acylaminosäuren stellt ein bislang weitgehend ungelöstes Problem dar. Die lipase-katalysierte Acylierung von Aminen zeigte, daß diese Enzymklasse in der Lage ist C-N-Bindungen zu knüpfen. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung selektiver, lipase-katalysierter Methoden zur einfachen und möglichst direkten Überführung von Fettsäuren und daraus herstellbarer Rohmaterialien (Fettsäureester) auf Aminosäuren und Aminosäurederivate.

Da diese Reaktionen nur in aprotischen organischen Lösungsmitteln stattfinden war es notwendig, lipophile Aminosäureester zu verwenden. Von besonderem Interesse ist die direkte Herstellung von *N*-Acylaminosäuren aus Fettsäuren und nativen Aminosäuren. Dazu mußte ein geeignetes Verfahren zur Solubilisierung von Aminosäuren erarbeitet werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die enantioselektive Hydrolyse 5-monosubstituierter Oxazolidin-2,4-dione in Gegenwart von D-Hydantoinasen. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Hydantoinen sollten sie als Substrate akzeptiert werden, und somit einen neuartigen Weg zu enantiomerenreinen α -Hydroxycarbonsäuren eröffnen.

2 Diskussion und Ergebnisse

2.1 Lipase-katalysierte Acylierung von Aminosäureestern

Die am einfachsten zugänglichen lipophilen Aminosäurederivate sind die entsprechenden Ester. Sie sind in organischen Lösungsmitteln gut löslich. Für erste Versuche wurden kommerziell erhältliche Aminosäureester in Form von Hydrochloriden (vgl. **Abb. 12**) oder Tosylaten eingesetzt.

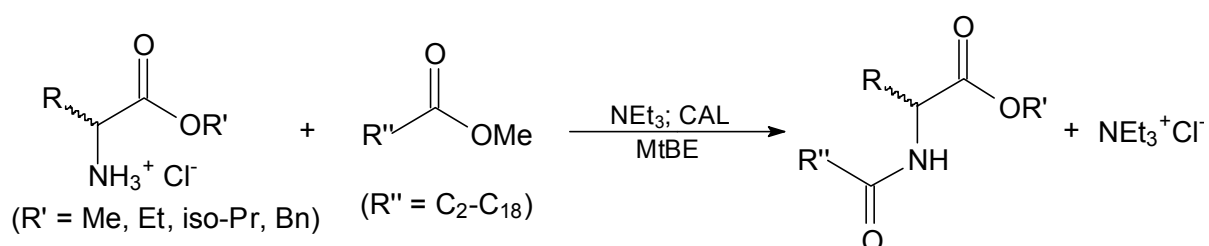


Abb. 12: Reaktionsschema zur enzymatischen Acylierung von Aminosäureestern (allgemein).

Diese wurden in MtBE suspendiert, danach mit der äquivalenten Menge Triethylamin freigesetzt und in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) mit einer Reihe von Fettsäureestern als Acyldonatoren enzymatisch acyliert. Nach Aufarbeitung der Reaktionsansätze konnten in der Tat enzymatisch acylierte Produkte nachgewiesen werden. Allerdings wurde die Reaktionsverfolgung und die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes durch das ausgefallene Triethylammoniumchlorid erschwert. Wegen dieser Schwierigkeiten wurden die Hydrochloride vor der enzymatischen Umsetzung durch Extraktion mit einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung in die freien Aminosäureester überführt. Dies bedingt zwar einen weiteren Arbeitsschritt, hat aber den entscheidenden Vorteil, daß nach erfolgter Reaktion nur noch das Enzym abfiltriert werden muß.

2.1.1 Enzymatische Acylierungen von Aminosäurebenzylestern

Aus der Literatur^{62,63} ist bekannt, daß Amine mit einem aromatischen Rest besonders erfolgreich enzymatisch acyliert werden können. Deshalb wurden zunächst kommerziell verfügbare Aminosäurebenzylester zur enzymatischen Acylierung verwendet. Dazu wurden

die entsprechenden *p*-Toluolsulfonsäuresalze durch Extraktion mit 5 % NaHCO₃ in die entsprechenden freien Aminosäurebenzylester überführt. Die folgende Tabelle gibt die Ausbeuten, GC-Reinheiten und Eigenschaften der freien Aminosäureester wieder (vgl. **Tab. 1**).

Tab. 1: Extraktion der *p*-Toluolsulfonsäuresalze, Ausbeute, Reinheit, Eigenschaften.

Produkt	Ausbeute	Reinheit (GC)	Eigenschaften
DL-Ala-OBn (±)-1a	60 %	97 %	gelbliches Öl
Gly-OBn 1b	44 %	95 %	gelbliches Öl
DL-Ile-OBn (±)-1c	56 %	97 %	gelbliches Öl
DL-Leu-OBn (±)-1d	53 %	96 %	gelbliches Öl
DL-Phe-OBn (±)-1e	64 %	98 %	gelbliches Öl
DL-Val-OBn (±)-1f	52 %	95 %	gelbliches Öl

Die so hergestellten Aminosäurebenzylester **(±)-1a-1f** wurden in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) enzymatisch acyliert (vgl. Abb. 13). Essigsäureethylester diente dabei als Acyldonor und Lösungsmittel.

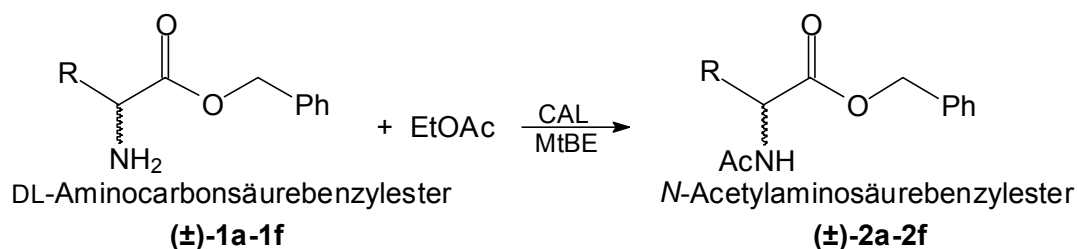


Abb. 13: Enzymatische Acylierung von Aminosäurebenzylestern.

Die Reaktionsverfolgung wurde mittels GC durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 6 h konnte bei der Acylierung der Aminosäuren DL-Ala-OBn **(±)-1a**, Gly-OBn **1b**, DL-Ile-OBn **(±)-1c**, DL-Leu-OBn **(±)-1d**, und DL-Phe-OBn **(±)-1e** jeweils eine Reihe unterschiedlicher Produkte nachgewiesen werden. Dies deutete auf unerwünschte Nebenreaktionen hin. Nach 24 h wurden die Umsetzungen durch Abfiltrieren des Enzyms abgebrochen und der überschüssige Essigester am Rotationsverdampfer entfernt. Die entsprechenden acylierten Aminosäurebenzylestern wurden mit Ausbeuten von 23 % und 36 % erhalten. DL-Val-OBn **(±)-1f** wurde nicht acyliert.

Bei der chromatographischen Aufreinigung an Kieselgel konnten drei Produkte isoliert werden. Neben der enzymatischen Acylierung beobachtete man zusätzlich Hydrolyse des Benzylesters und Bildung von Diketopiperazindionen (vgl. **Abb. 14**).

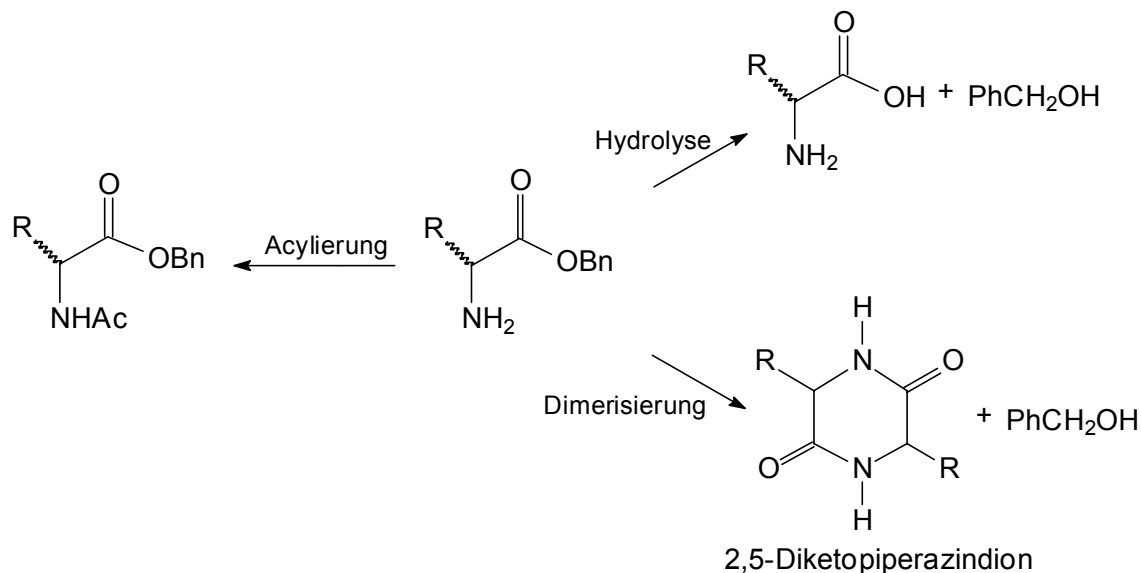


Abb. 14: Nebenreaktionen bei der enzymatischen Acylierung von Aminosäurebenzylestern.

2.1.2 Enzymatische Acylierungen von Aminosäuremethyl-, ethyl-, isopropylestern

Durch den Einsatz unterschiedlicher Ester sollte überprüft werden, inwieweit diese Nebenreaktionen unterbunden werden können. Neben den kommerziell verfügbaren Aminosäuremethyl- und ethylestern wurden dazu noch die sterisch anspruchsvolleren Aminosäureisopropylester synthetisiert. Diese wurden aus der entsprechenden Aminosäure mittels Thionylchlorid und 2-Propylalkohol dargestellt. Dabei erhält man direkt die Aminosäureisopropylester als Hydrochloride (vgl. **Abb. 15**).

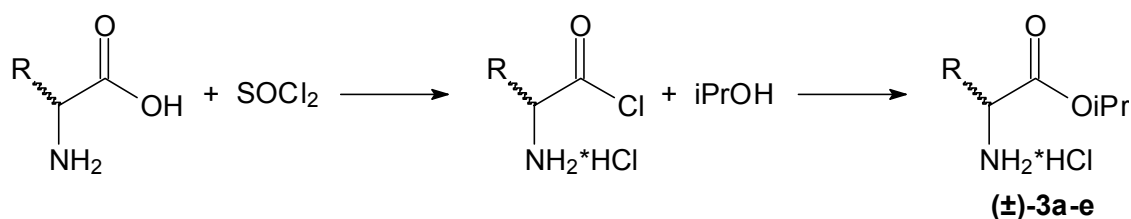


Abb. 15: Synthese der Aminosäureisopropylester

Für die enzymatischen Synthesen wurden sowohl aromatische als auch aliphatische Aminosäureisopropylester dargestellt. Die folgende Tabelle gibt die Ausbeuten und Eigenschaften der auf diese Weise synthetisierten Ester wieder (vgl. **Tab. 2**).

Tab. 2: Synthese der Aminosäureisopropylester: Ausbeuten und Eigenschaften.

Produkt	Ausbeute	Eigenschaften
DL-Ala-iso-Pr * HCl (±)-3a	93 %	gelblicher Feststoff
Gly-iso-Pr * HCl 3b	90 %	farbloser Feststoff
DL-Ile-iso-Pr * HCl (±)-3c	86 %	farbloser Feststoff
DL-Phe-iso-Pr * HCl (±)-3d	89 %	gelblicher Feststoff
DL-Phg-iso-Pr * HCl (±)-3e	91 %	gelblicher Feststoff

Die Isopropylesterhydrochloride **(±)-3a-3e** konnten als Feststoffe mit Ausbeuten zwischen 86 % und 93 % erhalten werden. In einer systematischen Untersuchung wurden diese Verbindungen zusammen mit den kommerziell verfügbaren Aminosäuremethyl- und ethylestern für enzymatische Acylierungen eingesetzt. Dazu wurden zunächst die Aminosäureester-Hydrochloride durch Extraktion mit 5 % NaHCO₃ in die entsprechenden freien Aminosäureester überführt. In der folgenden Tabelle sind Ausbeuten, Reinheiten (GC) und Eigenschaften wiedergegeben (vgl. **Tab. 3**).

Tab. 3: Aminosäureester, Ausbeuten, Reinheiten, Eigenschaften.

Produkt	Ausbeute	Reinheit (GC)	Eigenschaften
DL-Ala-OMe (±)-4a	51 %	98 %	farbloses Öl
Gly-OMe 4b	48 %	- ^a	farbloses Öl
DL-Ile-OMe (±)-4c	52 %	97 %	farbloses Öl
DL-Phe-OMe (±)-4d	65 %	95 %	gelbliches Öl
DL-Phg-OMe (±)-4e	61 %	96 %	gelbliches Öl
DL-Val-OMe (±)-4f	53 %	94 %	farbloses Öl
DL-Ala-OEt (±)-5a	42 %	96 %	farbloses Öl
Gly-OEt 5b	46 %	- ^a	farbloses Öl
DL-Leu-OEt (±)-5c	53 %	96 %	farbloses Öl
DL-Met-OEt (±)-5d	62 %	98 %	gelbliches Öl
DL-Phe-OEt (±)-5e	64 %	98 %	gelbliches Öl
DL-Ala-iso-Pr (±)-6a	50 %	94 %	gelbliches Öl
Gly-iso-Pr 6b	51 %	96 %	farbloses Öl
DL-Ile-iso-Pr (±)-6c	58 %	98 %	farbloses Öl

Produkt		Ausbeute	Reinheit (GC)	Eigenschaften
DL-Phe-iso-Pr	(±)- 6d	67 %	95 %	gelbliches Öl
DL-Phg-iso-Pr	(±)- 6e	61 %	96 %	farbloses Öl

a): Mittels GC nicht nachweisbar.

Diese wurden in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) und in Essigsäureethylester acyliert. Wiederum diente EtOAc als Acyldonor und zugleich als Lösungsmittel.

Nach 24 h Reaktionszeit und Aufarbeitung wurden die entsprechenden acylierten Aminosäureestern (±)-**7a-9e** in Ausbeuten zwischen 12 % und 42 % erhalten. Die GC-Chromatogramme zeigten allerdings schon nach einer Reaktionszeit von 2 h, daß auch hier neben der enzymatischen Acylierung Hydrolyse und Diketopiperazinbildung beobachtet werden (vgl. Abb. 14). In der Reihe Me > Et > iso-Pr ist eine tendenzielle Abnahme bei der Bildung von Diketopiperazinen zu erkennen. Dagegen nimmt aber die Hydrolyse der Ester zu. Aufgrund dieser Sachlage sind die bisher beschriebenen Acylierungen nicht praktikabel. Es galt also Esterderivate zu finden, die:

- a) hydrolysestabil sind;
- b) keine Diketopiperazine bilden;
- c) gut löslich in organischen Lösungsmitteln sind.

Als ideal geeignet erwiesen sich hier die entsprechenden Aminosäure-*t*-butylester.

2.1.3 Synthese von Aminosäure-*t*-butylestern

t-Butylester von Aminosäuren sind stabil und zwar sowohl gegenüber basischer als auch enzymkatalysierter Hydrolyse. Sie lassen sich unter sauren Bedingungen leicht zurückspalten. Allerdings ist ihre Synthese deutlich aufwendiger.

Die Methoden zur Synthese von Aminosäure-*t*-butylestern, ausgehend von *N*-geschützten Aminosäuren unter Verwendung von Di-*t*-butylacetal⁸⁵ in DMF, *O*-*t*-Butyl-*N,N'*-diisoharnstoff⁸⁶, BOC-Anhydrid⁸⁷, *t*-Butylbromid⁸⁸, *t*-Butyl-2,2,2-trichloracetimidat⁸⁹, Umsetzung der *S*-2-pyridinylester mit *t*-Butanol⁹⁰, sind sehr aufwendig und wenig ökonomisch. Die direkte Veresterung von Aminosäuren mit *t*-Butanol, katalysiert von 1,1'-Carbonyl-diimidazol⁹¹, *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid⁹² und durch Ultraschall⁹³ erfordern

lange Reaktionszeiten und liefern relativ schlechten Ausbeuten. Aminosäure-*t*-butylester können auch ausgehend von den freien Aminosäuren mittels *t*-Butylacetat/HClO₄⁹⁴ hergestellt werden. Bei Reaktionszeiten von bis zu vier Tagen variieren die Ausbeuten hierbei je nach Löslichkeit der Aminosäure zwischen 40 % und 70 %. Die am meisten verwendete Synthesemethode, die auch mit guten Ausbeuten (>70%) abläuft und nur Reaktionszeiten von maximal 12 Stunden erfordert, ist die säurekatalysierte Umsetzung freier Aminosäuren mit Isobuten⁹⁵. Bei dieser Methode ist allerdings das Einbringen des gasförmigen Isobutens und damit die Notwendigkeit einer Druckapparatur nachteilig. Eine neuartige, recht elegante Methode wurde von Wright et al.⁹⁶ erarbeitet. Hierbei wird aus *t*-Butanol mittels eines sauren Katalysators Isobuten *in situ* synthetisiert. Als hierfür am besten geeignet stellte sich eine Dispersion von wasserfreiem Magnesiumsulfat in konz. H₂SO₄ heraus. Das Reaktionsmedium gestattet simultan die Dehydrierung von *t*-Butanol zu Isobuten und die nachfolgende Überführung von Carbonsäuren in die entsprechenden *t*-Butylester (vgl. **Abb. 16**).

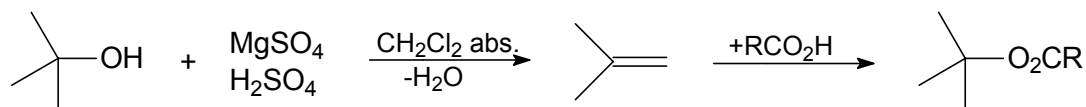


Abb. 16: *t*-Butylestersynthese nach Wright et al.⁹⁶.

Zur Übertragung der Methode auf Aminosäuren werden diese zunächst mit Chlorameisensäurechlorid ("Z-chlorid") in die entsprechenden *Z*-geschützten Derivate und danach im Sinne von Abb. 16 in die *Z-N*-Aminosäure-*t*-butylester überführt. Nachfolgende hydrogenolytische Abspaltung der *Z*-Schutzgruppe (H₂/Pd-C/5%) liefert die entsprechenden Aminosäure-*t*-butylester (vgl. **Abb. 17**).

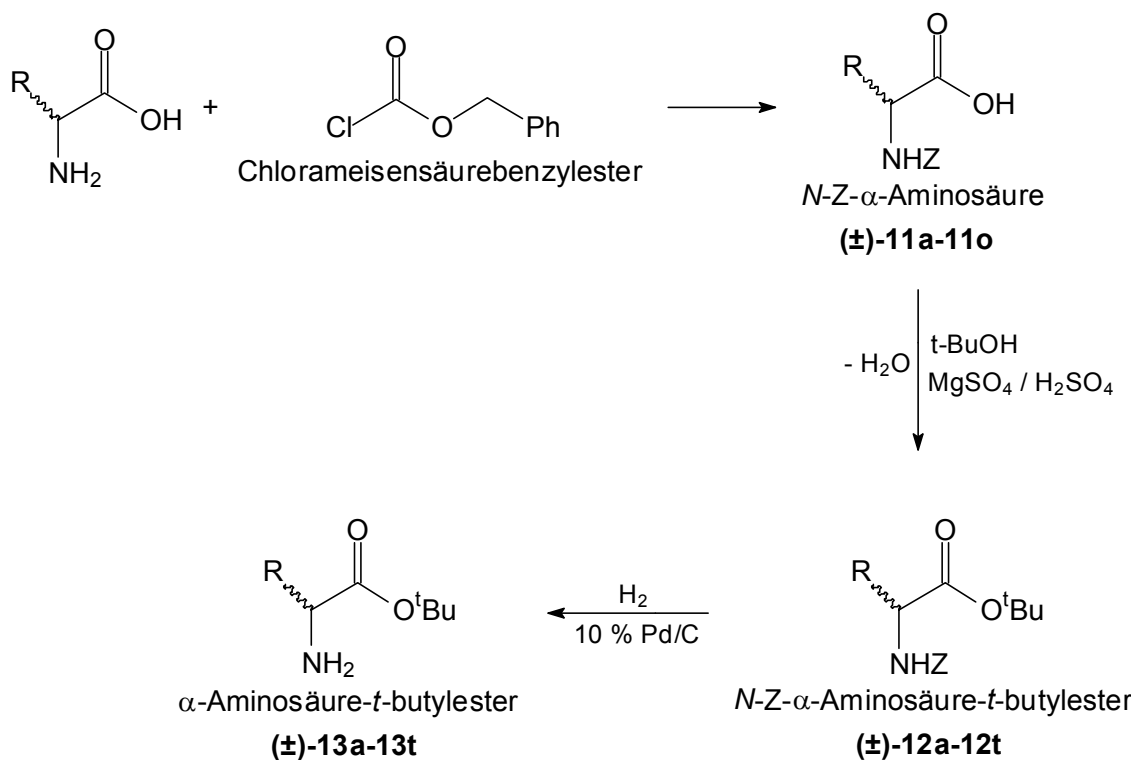


Abb. 17: Synthese von Aminosäure-*t*-butylestern

Auf diese Weise wurde über jeweils drei Stufen eine ganze Palette von Aminosäure-*t*-butylestern (**(\pm)-13a-13t**) synthetisiert. Da eine Reihe von *Z*-Aminosäuren bereits kommerziell verfügbar ist, konnte in diesen Fällen eine Stufe eingespart werden. Zur Überprüfung, ob die eingesetzten Lipasen bei der Acylierung Enantioselektivität zeigen oder nicht, wurden sowohl D- als auch L- bzw. racemische Aminosäure-*t*-butylester synthetisiert.

Tab. 4: Aminosäure-*t*-butylester-Syntheseschritte, Ausbeute und Reinheit

Aminosäure- <i>t</i> -butylester		Ausbeute [%]	Reinheit (GC) [%]
D-Alanin-	(R)-13a	61	98
DL-Alanin ^a	(\pm)-13a	76	98
L-Alanin ^a	(S)-13a	77	97
β -Alanin-	13b	56	97
DL-2-Aminobuttersäure-	(\pm)-13c	58	98
DL-3-Aminobuttersäure-	(\pm)-13d	53	97
4-Aminobuttersäure-	13e	59	98
DL- α -Aminoisobuttersäure-	(\pm)-13f	57	98
6-Aminohexansäure-	13g	61	98
L-Asparaginsäure-	(S)-13h	58	96
L-Glutaminsäure-	(S)-13i	54	97

Aminosäure- <i>t</i> -butylester		Ausbeute [%]	Reinheit (GC) [%]
Glycin- ^a	13j	79	99
DL-Isoleucin- ^a	(±)-13k	74	97
L-Isoleucin- ^a	(S)-13k	72	98
D-Leucin-	(R)-13l	51	98
DL-Leucin- ^a	(±)-13l	75	97
L-Leucin- ^a	(S)-13l	77	97
DL-Lysin- ^a	(±)-13m	50	96
L-Lysin-	(S)-13m	49	95
L-Methionin- ^a	(S)-13n	69	94
DL-Ornithin-	(±)-13o	52	95
D-Phenylalanin-	(R)-13p	62	98
DL-Phenylalanin- ^a	(±)-13p	81	98
L-Phenylalanin- ^a	(S)-13p	78	97
L-Phenylglycin-	(S)-13q	58	99
L-Serin- ^{ab}	(S)-13r	78	98
L-Tyrosin- ^a	(S)-13s	75	97
D-Valin- ^a	(R)-13t	79	98
DL-Valin- ^a	(±)-13t	76	97
L-Valin- ^a	(S)-13t	78	97

a) Kommerziell verfügbare *Z*-Derivate. b) Wurde bei der *t*-Butylestersynthese an der Hydroxyfunktion verethert.

Die Ausbeuten über drei Synthesestufen liegen zwischen 50 % und 60 %, während über zwei Synthesestufen Ausbeuten zwischen 70 % und 80 % erhalten werden. Die Reinheiten der so synthetisierten Aminosäure-*t*-butylester (**±**)-**13a-13t** liegen in der Regel bei > 97 % (GC). Im Falle von Serin (mit einer freien Hydroxygruppe in β -Stellung) wurde mit 81 % Ausbeute der *O-t*-Butyl-L-serin-*t*-butylester (**S**)-**13r** erhalten (vgl. **Abb. 18**). *t*-BuOH wird hier im achtfachen Überschuß eingesetzt.

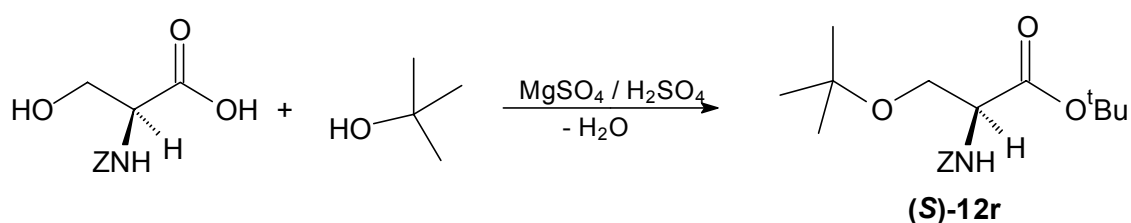


Abb. 18: Umsetzung von *Z*-L-Serin mit *t*-Butanol nach Wright et al.⁹⁶.

Dagegen wurde *Z*-*L*-Tyrosin nicht an der phenolischen Hydroxyfunktion verethert. Die auf diese Weise synthetisierten Aminosäure-*t*-butylester (\pm)-**13a-13t** wurden nun zunächst auf ihre Enantiomerenreinheiten hin überprüft.

2.1.4 Enantiomerenreinheiten der Aminosäure-*t*-butylester

2.1.4.1 Racemisierung von Aminosäuren - Allgemein

Zur Überprüfung der Enantioselektivität von Enzymen muß zunächst gewährleistet sein, daß bei der Synthese der Aminosäure-*t*-butylester keine Racemisierung stattfindet, d.h. aus enantiomerenreinen Aminosäuren enantiomerenreine *t*-Butylester entstehen. Racemisierungen von Aminosäuren können über zwei wichtige Hauptmechanismen erfolgen:

1) Durch Deprotonierung eines aciden Protons am α -Kohlenstoffatom von freien bzw. peptidgebundenen α -Aminosäurederivaten kommt es zur Enolisierung, gefolgt von unselektiver Reprotonierung des sp^2 -hybridisierten Enols (vgl. **Abb. 19**).

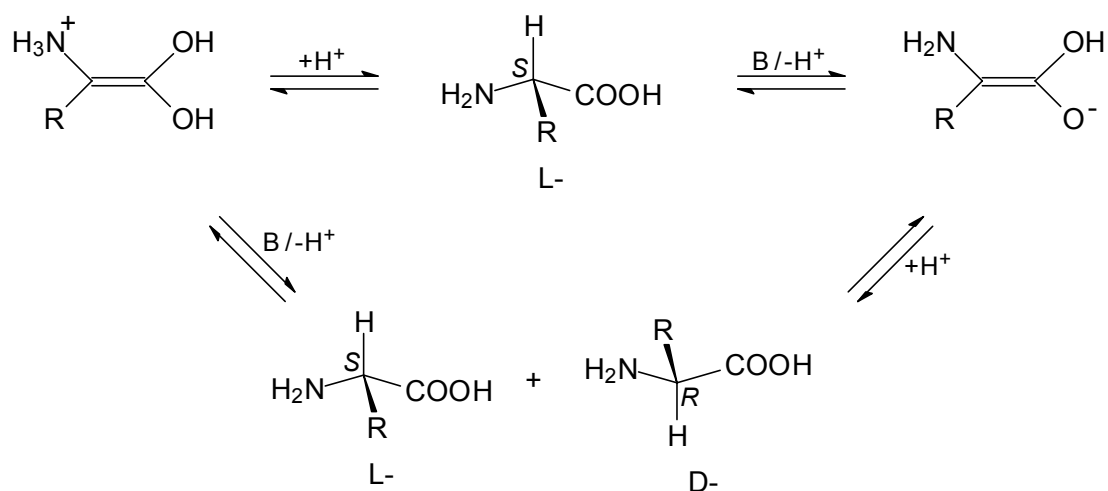


Abb. 19: Racemisierung von α -Aminosäuren durch Enolisierung.

Die direkte Enolisierung ist in den meisten Fällen zu vernachlässigen, sie hängt von der katalysierenden Base, dem Lösungsmittel und den elektronenanziehenden Eigenschaften der gebundenen Gruppen ab. Während einer Aktivierung und Kupplung ist das Risiko der Racemisierung erheblich größer. Im Vergleich zur basenkatalysierten Racemisierung ist die säurekatalysierte Racemisierung bei Aminosäuren und deren Estern erschwert, da das zweite

Sauerstoffatom durch seinen -I-Effekt die Basizität des Carbonylsauerstoffes senkt und somit die Bereitschaft zur Protonierung.

2) Durch Cyclisierung von aktivierten *N*-Acylaminosäuren in Gegenwart von Basen. Dieser Mechanismus, bei dem Oxazolone (Azlactone) gebildet werden, verläuft über eine durch Resonanz stabilisierte tautomere Form (vgl. **Abb. 20**). Die Cyclisierung erfolgt besonders leicht, wenn die Hydroxygruppe der Carboxylgruppe durch eine gut elektronenziehende Abgangsgruppe ersetzt ist. Besitzt der Acylsubstituent eine Alkoxy-carbonylschutzgruppe (Z-, Boc-, Fmoc-), ist die Azlactonbildung erschwert. Der Grund für dieses gegensätzliche Verhalten ist nicht völlig geklärt, ein Hauptfaktor ist vermutlich die niedrigere NH-Acidität der *N*-Alkoxy-carbonyl- verglichen mit z. B. *N*-Benzoylaminosäuren.

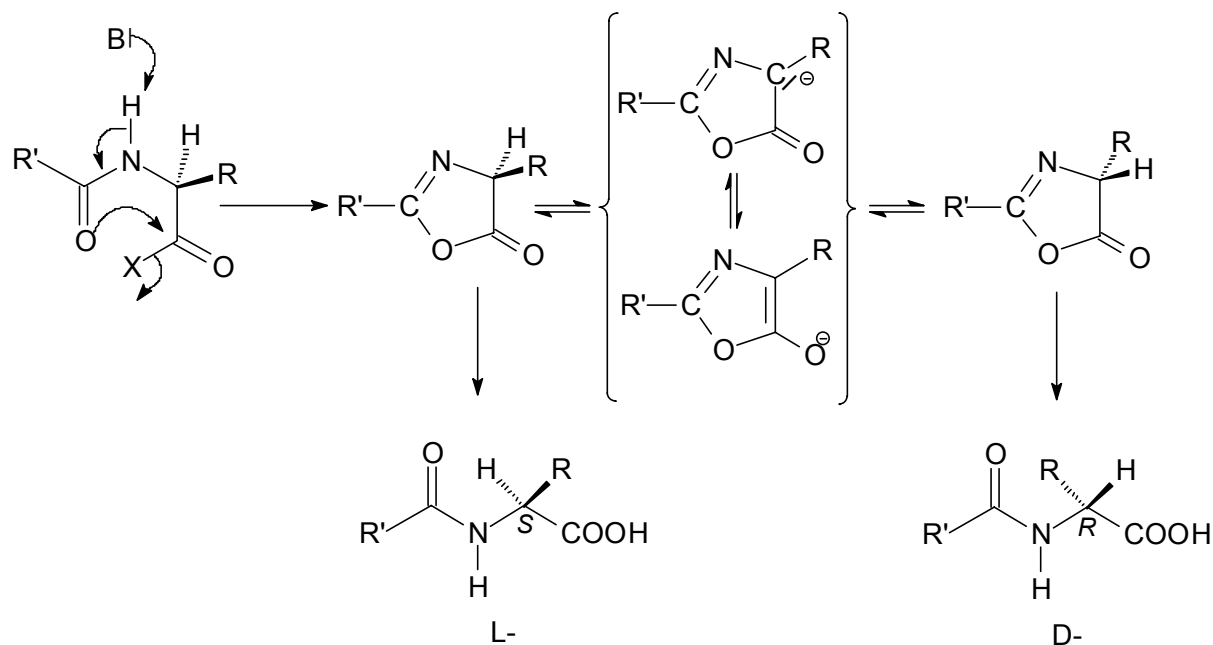


Abb. 20: Racemisierung von *N*-acylierten α -Aminosäuren über Oxazolone.

2.1.4.2 Enantiomerenreinheit von synthetisierten Aminosäure-*t*-butylestern

Um die Enantiomerenreinheit der synthetisierten Aminosäure-*t*-butylester zu bestimmen, wurden daraus die Hydrochloride generiert, deren Drehwerte gemessen und diese mit Literaturdaten verglichen (vgl. **Tab. 5**). Die Drehwerte sind meist zahlenmäßig groß genug, so daß diese Methode nur geringfügig fehlerbehaftet ist (z.B. $\pm 2\%$ ee, bei einem Drehwert von 10° und einem Meßfehler von $0,2^\circ$).

Tab. 5: Enantiomerenreinheit der Aminosäure-*t*-butylester Hydrochloride.

Aminosäure- <i>t</i> -butylester-Hydrochlorid		Drehwert $[\alpha]_D^{20} =$ (Literatur)	Drehwert $[\alpha]_D^{20} =$ (gemessen)	ee [%]
L-Ala-OtBu*HCl	(S)-13a	+ 6,1° (c=1,3 H ₂ O) ⁹⁷	+ 6,0 (c=1,3 H ₂ O)	99
D-Ala-OtBu*HCl	(R)-13a	- 6,1° (c=1,3 H ₂ O) ⁹⁷	- 6,0 (c=1,3 H ₂ O)	99
L-Asp(tBu)-OtBu*HCL	(S)-13h	+ 12,8° (c=1,0 EtOH) ⁹⁸	+ 12,0° (c=1,0 EtOH)	94
L-Glu(tBu)-OtBu*HCL	(S)-13i	+ 16,6° (c=1,5 DMF) ⁹⁹	+ 15,8° (c=1,5 DMF)	95
L-Ile-OtBu*HCl	(S)-13k	+ 30,9 (c=1,1 H ₂ O) ¹⁰⁰	+ 30,6 (c=1,1 H ₂ O)	99
L-Leu-OtBu*HCl	(S)-13l	+ 21,5° (c=2,3 EtOH) ¹⁰⁰	+ 20,8° (c=2,3 EtOH)	96
D-Leu-OtBu*HCl	(R)-13l	- 21,5° (c=2,3 EtOH) ¹⁰⁰	- 20,7° (c=2,3 EtOH)	96
L-Lys-OtBu*HCl	(S)-13m	+ 7,4° (c=1,4 H ₂ O) ¹⁰¹	+ 7,2° (c=1,4 H ₂ O)	97
L-Met-OtBu*HCl	(S)-13n	+ 9,5° (c=1,0 H ₂ O) ¹⁰²	+ 9,1° (c=1,0 H ₂ O)	96
L-Phe-OtBu*HCl	(S)-13p	+ 15,4 (c=1,2 DMF) ¹⁰³	+ 15,0 (c=1,2 DMF)	97
D-Phe-OtBu*HCl	(R)-13p	- 15,4 (c=1,2 DMF) ¹⁰³	- 14,9 (c=1,2 DMF)	96
L-Phg-OtBu*HCl	(S)-13q	+ 107° (c=1,7 MeOH) ¹⁰⁴	+ 109° (c=1,7 MeOH)	98
L-Ser(tBu)-OtBu*HCL	(S)-13r	+ 3,7° (c=1,0 EtOH) ¹⁰⁵	+ 3,6° (c=1,0 EtOH)	97
L-Tyr-OtBu*HCl	(S)-13s	+ 4,5° (c=1,2 H ₂ O) ¹⁰¹	+ 4,1° (c=1,2 H ₂ O)	95
L-Val-OtBu*HCl	(S)-13t	+ 50,9° (c=1,1 MeOH) ¹⁰⁶	+ 50,1° (c=1,1 MeOH)	98
D-Val-OtBu*HCl	(R)-13t	- 50,9° (c=1,1 MeOH) ¹⁰⁶	- 49,9° (c=1,1 MeOH)	98

2.1.5 Optimierung der enzymatischen Acylierung von Aminosäure-*t*-butylestern

In den folgenden Experimenten wurden die Reaktionsbedingungen der Lipase-katalysierten Acylierung von Aminosäure-*t*-butylestern optimiert, und zwar durch a) Enzymscreening, b) Variation von Lösungsmitteln, Acyldonor, Temperatur und hinsichtlich Enzymstabilität. Diese Optimierungsreaktionen wurden mit Glycin-*t*-butylester durchgeführt. Glycinester erwiesen sich in Vorversuchen (vermutlich wegen der Aminogruppe an einem primären C-Atom) für enzymatische Acylierungen als am besten geeignet.

2.1.6 Auswahl der Biokatalysatoren

Über die Auswahl eines geeigneten Biokatalysators konnte zunächst keine Entscheidung getroffen werden, da die Acylierung von Aminosäuren keine für Lipasen typische Reaktion darstellt. Deshalb wurden für ein erstes Enzymscreening 48 bekannte und käufliche Lipasen herangezogen (vgl. **Tab. 6**).

Tab. 6: Verwendete Lipasepräparationen mit Herstellernachweis

Nr.	Lipase aus:	Hersteller, Bezeichnung
1	<i>Alcaligenes species</i>	Boehringer Mannheim, L-10, lyo
2	<i>Arthrobacter species</i>	Boehringer Mannheim
3	<i>Aspergillus niger</i>	Amano
4	<i>Aspergillus oryzae</i>	Boehringer Mannheim, 1600834
5	<i>Aspergillus sojae</i>	Röhm, EL 47-88
6	<i>Burkholderia cepacia</i> (immobilisiert)	Boehringer Mannheim, L-1, c.-f., lyo
7	<i>Candida antarctica</i> Fraktion A, L-5	Boehringer Mannheim, c.-f., lyo
8	<i>Candida antarctica</i> Fraktion B, L-2	Boehringer Mannheim, c.-f., lyo
9	<i>Candida antarctica</i> Fraktion B, 2, L-2	Boehringer Mannheim, c.-f., C2, lyo
10	<i>Candida antarctica</i> Fraktion B	Novo, Novozym SP435
11	<i>Candida cylindracea</i>	Amano
12	<i>Candida cylindracea</i>	Boehringer Mannheim, 129046
13	<i>Candida cylindracea</i> (immobilisiert)	Amano
14	<i>Candida rugosa</i> (immobilisiert)	Boehringer Mannheim, L-3, c.-f., lyo
15	<i>Candida species</i>	Meito Sangyo, Lipase MY
16	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Toyo Yozo, Enzyme T-01
17	<i>Humicola</i>	Novo SP 523; PPW 3942
18	<i>Humicola lanuginosa</i>	Amano, Lipase CE
19	<i>Humicola species</i>	Boehringer Mannheim, L-8, lyo
20	Lipase 3A	Novo
21	Lipoproteinlipase	Amano
22	Lipoproteinlipase aus <i>Pseudomonas sp.</i>	Amano
23	Lipoproteinlipase aus <i>Pseudomonas sp.</i>	Boehringer Mannheim, 7344284
24	Lipoproteinlipase aus <i>Pseudomonas</i>	Amano, SAM III
25	Lipozym (<i>Mucor miehei</i>)	Novo
26	<i>Mucor javanicus</i>	Amano
27	<i>Mucor javanicus</i>	Röhm, EL 22-88
28	<i>Mucor miehei</i>	Fluka 46059
29	<i>Mucor miehei</i> (immobilisiert)	Boehringer Mannheim, L-9, c.-f., lyo
30	<i>Mucor miehei</i>	Novo, Lip SP 524
31	<i>Mucor miehei</i>	Gist-Brocades, Piccantase A
32	<i>Mucor miehei</i>	Novo, Lipase SP 225
33	<i>Pancreas</i>	Röhm, EL 136-88
34	<i>Porcine pancreas</i>	Boehringer Mannheim, L-7, lyo
35	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano
36	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Röhm, EL 237-87
37	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Röhm
38	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (immobilisiert)	Amano, Toyonite-200-P
39	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (immobilisiert)	Amano, Diatomeen Erde
40	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (immobilisiert)	Amano, Kieselgur
41	<i>Pseudomonas species</i>	Amano

Nr.	Lipase aus:	Hersteller, Bezeichnung
42	<i>Pseudomonas species</i>	Boehringer Mannheim, L-6, Iyo
43	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Boehringer Mannheim, 186791
44	<i>Rhizopus delemar</i>	Amano, Lipase D
45	<i>Rhizopus javanicus</i>	Amano, Lipase F-AP15
46	<i>Rhizopus niveus</i>	Amano, Lipase N
47	Schweinepankreas	Fluka 62300
48	Schweinepankreas PPL	Sigma, Lot 67F-0270

2.1.6.1 Enzymatische Acylierung von Glycin-*t*-butylester-Lipase Screening

In einer systematischen Studie wurde die Substrattoleranz der oben aufgeführten Lipasen (vgl. **Tab. 6**) gegenüber Glycin-*t*-butylester **13j** mit Essigester als Acyldonor ermittelt (vgl. **Abb. 21**).

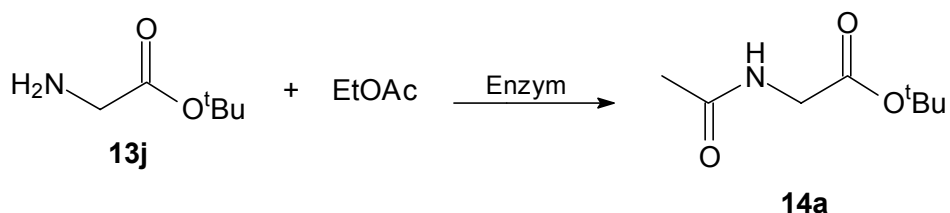


Abb. 21: Enzymatische Synthese von *N*-Acetylglycin-*t*-butylester **14a**

Hierzu wurden jeweils 1 mmol Gly-OtBu **13j** mit 2 ml Essigester versetzt und die Reaktion bei 40°C durch Zugabe von 5 mg Enzym gestartet. Zur Reaktionsverfolgung wurden bis zur ersten Stunde alle 10 min und danach jede weitere Stunde eine Probe entnommen. 20 µl des Reaktionsgemisches wurden dazu in 350 µl Schraubdeckelgläschen pipetiert, mit 300 µl Essigester versetzt und direkt gaschromatographisch untersucht. Ein typischer Reaktionsverlauf für Edukt und Produkt aus dieser Versuchsreihe wird in **Abb. 22** gezeigt.

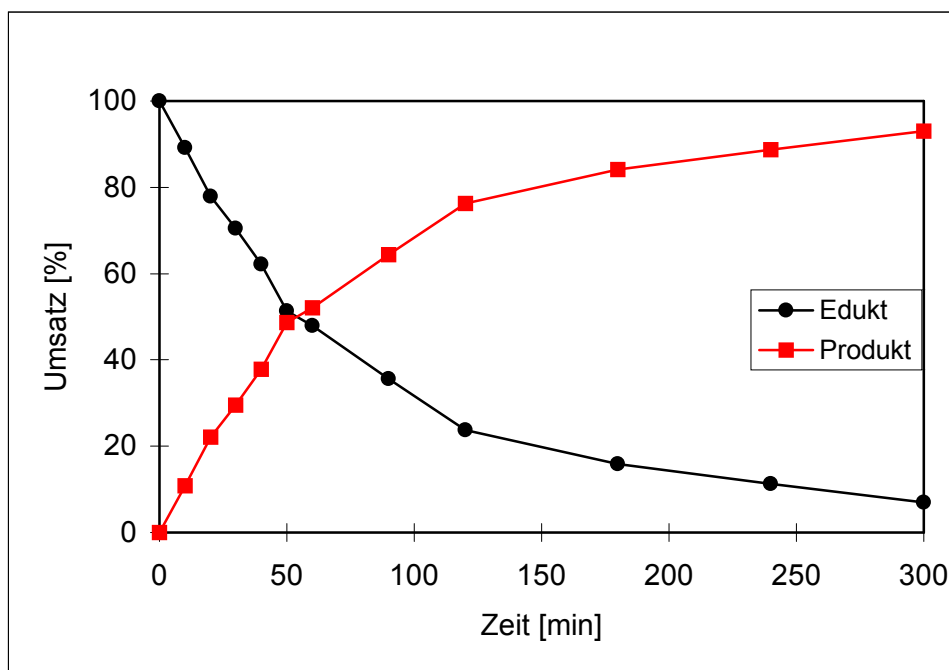


Abb. 22: Enzymatische Acylierung von Gly-OtBu **13j**, Reaktionsverfolgung mittels GC.

Dabei wurde der Gaschromatograph so programmiert, daß Ausgangsverbindung und Produktverbindung basisliniengetrennt vermessen werden konnten. Man erhält damit gleichzeitig Daten über die Reaktionsentwicklung von Produkten und Edukten (vgl. **Tab. 7**). Die Enzymnummerierung in **Tab. 7** entspricht den Angaben aus **Tab. 6**. In Spalte 4 ist der Umsatz in Abhängigkeit von der in Spalte 3 angegebenen Reaktionszeit aufgelistet. In Spalte 5 sind die entsprechenden spezifischen Aktivitäten in mU/mg Enzym aufgeführt, berechnet aus der Steigung der Umsatz-Zeit-Kurve nach einer Reaktionszeit von 60 min.

Tab. 7: Lipasescreening; Reaktionszeit, Umsatz und spezifischen Aktivität.

Nr.	Lipase	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
1	<i>Alcaligenes species</i>	6	49	165
2	<i>Arthrobacter species</i>	6	12	45
3	<i>Aspergillus niger</i>	6	21	68
4	<i>Aspergillus oryzae</i>	6	20	62
5	<i>Aspergillus sojae</i>	6	18	55
6	<i>Burkholderia cepacia</i> (immobilisiert)	6	11	29
7	<i>Candida antarctica</i> Fraktion A, L-5	12	8	7
8	<i>Candida antarctica</i> Fraktion B, L-2	3	98	1448
9	<i>Candida antarctica</i> Fraktion B, 2, L-2	3	81	1148
10	<i>Candida antarctica</i> Frakt. B (Novozym 435)	3	97	1498

Nr.	Lipase	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
11	<i>Candida cylindracea</i>	12	16	15
12	<i>Candida cylindracea</i>	12	18	16
13	<i>Candida cylindracea</i> (immobilisiert)	12	15	12
14	<i>Candida rugosa</i> (immobilisiert)	6	8	12
15	<i>Candida species</i>	6	38	116
16	<i>Chromobacterium viscosum</i>	12	7	5
17	<i>Humicola</i>	12	9	6
18	<i>Humicola lanuginosa</i>	24	3	3
19	<i>Humicola species</i>	12	9	8
20	Lipase 3A	24	3	2
21	Lipoproteinlipase	24	0	0
22	Lipoproteinlipase aus <i>Pseudomonas sp.</i>	24	0	0
23	Lipoproteinlipase aus <i>Pseudomonas sp.</i>	24	0	0
24	Lipoproteinlipase aus <i>Pseudomonas</i>	24	0	0
25	Lipozym (<i>Mucor miehei</i>)	6	11	24
26	<i>Mucor javanicus</i>	6	12	28
27	<i>Mucor javanicus</i>	6	12	31
28	<i>Mucor miehei</i>	6	11	23
29	<i>Mucor miehei</i> (immobilisiert)	6	10	17
30	<i>Mucor miehei</i>	6	10	19
31	<i>Mucor miehei</i>	6	11	21
32	<i>Mucor miehei</i>	6	11	20
33	<i>Pancreas</i>	6	18	56
34	<i>Porcine pancreas</i>	6	17	49
35	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6	23	71
36	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6	22	68
37	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6	21	65
38	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (immobilisiert)	6	29	78
39	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (immobilisiert)	6	30	82
40	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (immobilisiert)	6	30	80
41	<i>Pseudomonas species</i>	6	22	71
42	<i>Pseudomonas species</i>	6	21	65
43	<i>Rhizopus arrhizus</i>	6	13	34
44	<i>Rhizopus delemar</i>	6	15	39
45	<i>Rhizopus javanicus</i>	6	16	42
46	<i>Rhizopus niveus</i>	6	11	24
47	Schweinepankreas	6	22	68
48	Schweinepankreas PPL	6	26	75

Dieses Enzymscreening wurde zunächst auf 24 Stunden begrenzt. Zum besseren Vergleich der einzelnen Enzyme untereinander wurde in der Regel der Umsatz nach 6 Stunden

Reaktionszeit angegeben. Bei Reaktionsansätzen mit nur geringer enzymatischer Aktivität wurde die Reaktionszeit auf 12 bzw. 24 Stunden verlängert. Bei keinem der Reaktionsansätze wurde Hydrolyse des *t*-Butylesters beobachtet. Auch wurde kein Diketopiperazin gebildet.

Es zeigte sich, daß für die Synthese von *N*-Acetyl-glycin-*t*-butylester **14a** nur die Lipasen aus *Candida antarctica* Fraktion B (8, 9, 10) gut geeignet sind. Im Vergleich zu dem zweitbesten Enzym aus *Alcaligenes species* (1) hat Novozym SP435 (10) eine um den Faktor 10 höhere Aktivität. Das bedeutet, daß nur die Lipasen 8, 9 und 10 für die enzymatische Acylierung von Aminosäuren eingesetzt werden können. Die Ergebnisse des Enzymscreenings sind aus Gründen der Anschaulichkeit nochmals graphisch dargestellt (vgl. **Diagramm 1**). Hier sind die nach 6 Stunden erreichten Umsätze direkt nebeneinander gezeigt. Auch die Reaktionen mit geringen Umsätzen (< 10%) sind mit einbezogen.

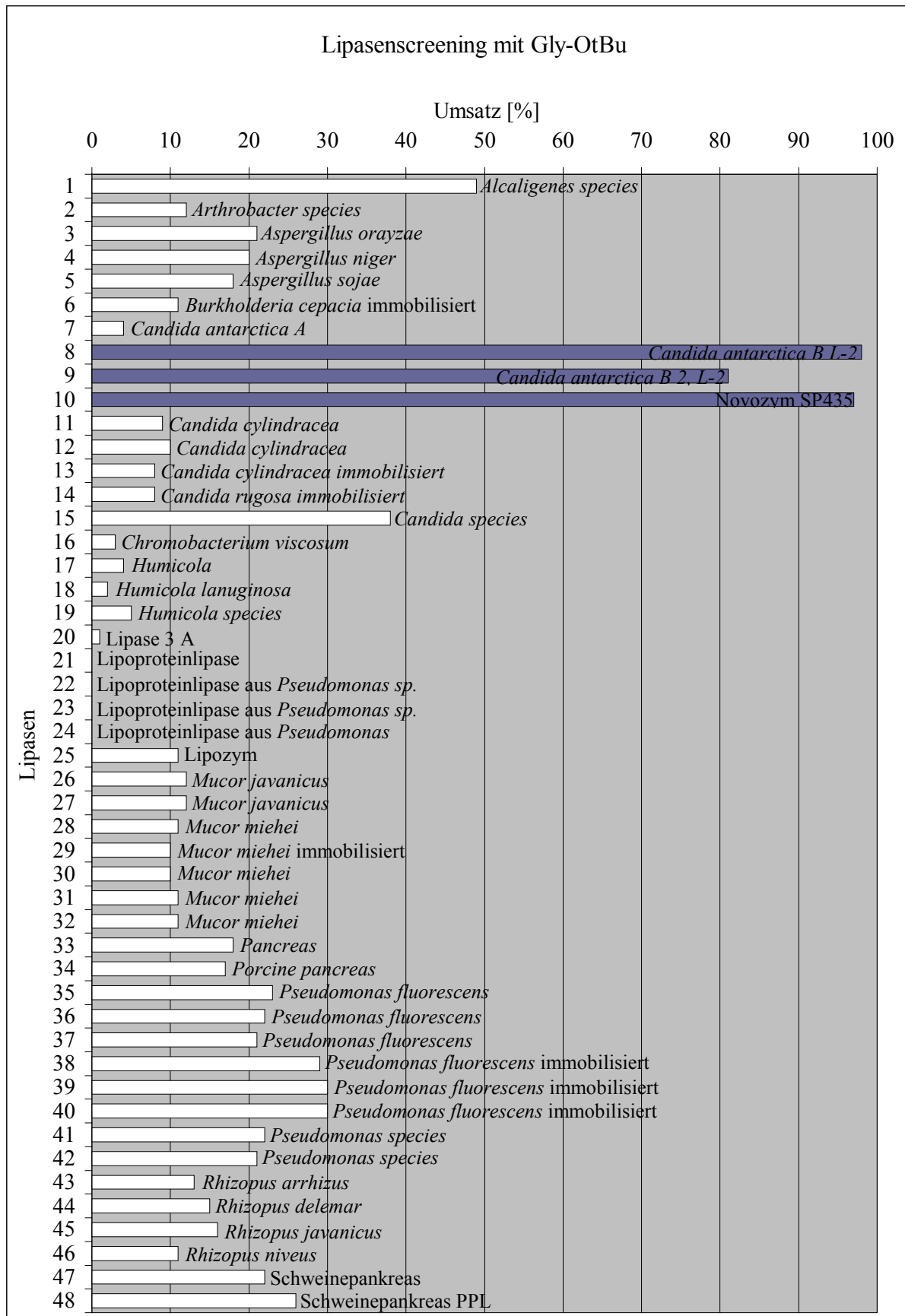


Diagramm 1: Lipasenscreening mit Glycin-*t*-butylester 13j.

2.1.7 Enzymatische Acylierung von Glycin-*t*-butylester **13j**-Lösungsmittelabhängigkeit

Diese Studien wurden mit Glycin-*t*-butylester **13j** in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) durchgeführt. Als Acyldonor diente wiederum Essigsäureethylester, weil damit der Umsatz zur acetylierten Aminosäure mittels GC gut verfolgt werden kann. In einem 4 ml Glasgefäß wurde dazu 1 mmol Gly-OtBu **13j** mit 3 mmol Ethylacetat und jeweils 3 ml Lösungsmittel versetzt. Bei 70°C wurden zu jeder Mischung 5 mg Novozym SP435 zugesetzt. Zur Aktivitätsbestimmung wurden bis zur ersten Stunde alle 10 min und danach im Stundentakt Proben entnommen. Nach genau 4 Stunden wurden die enzymatischen Acylierungen durch Abfiltrieren des Enzyms beendet. Der Umsatz von **14a** wurde aus dem GC-Chromatogramm berechnet. **Tab. 8** gibt die Umsätze und die spezifischen Aktivitäten des Enzyms im jeweiligen Lösungsmittel wieder.

Tab. 8: Einfluß des Lösungsmittels, Umsatz und spezifische Aktivität von Novozym SP435

Nr.	Lösungsmittel	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
1	Acetonitril	24	325
2	Aceton	41	862
3	Chloroform	13	104
4	Cyclohexan	35	671
5	Cyclohexanon	26	615
6	Dichlormethan	-	-
7	Diethlenglycoldimethylether (Diglyme)	59 ^b	- ^a
8	Diethylether	58	767
9	Diisopropylether	38	511
10	1,2-Dimethoxyethan (Monoglyme)	99	1332
11	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	38 ^b	- ^a
12	Dimethylsulfoxid	16 ^b	- ^a
13	1,4-Dioxan	70	914
14	1,3-Dioxolan	54	720
15	Ethylmethylketon	19	521
16	Heptan	51	688
17	Hexan	53	698
18	2-Methyl-2-butanol	55	739
19	<i>N</i> -Methylpyrolidon	32 ^b	- ^a
20	Methyl- <i>t</i> -butylether	56	754
21	Propylencarbonat	28 ^b	- ^a
22	Pyridin	11	42
23	Tetrahydrofuran	29	233

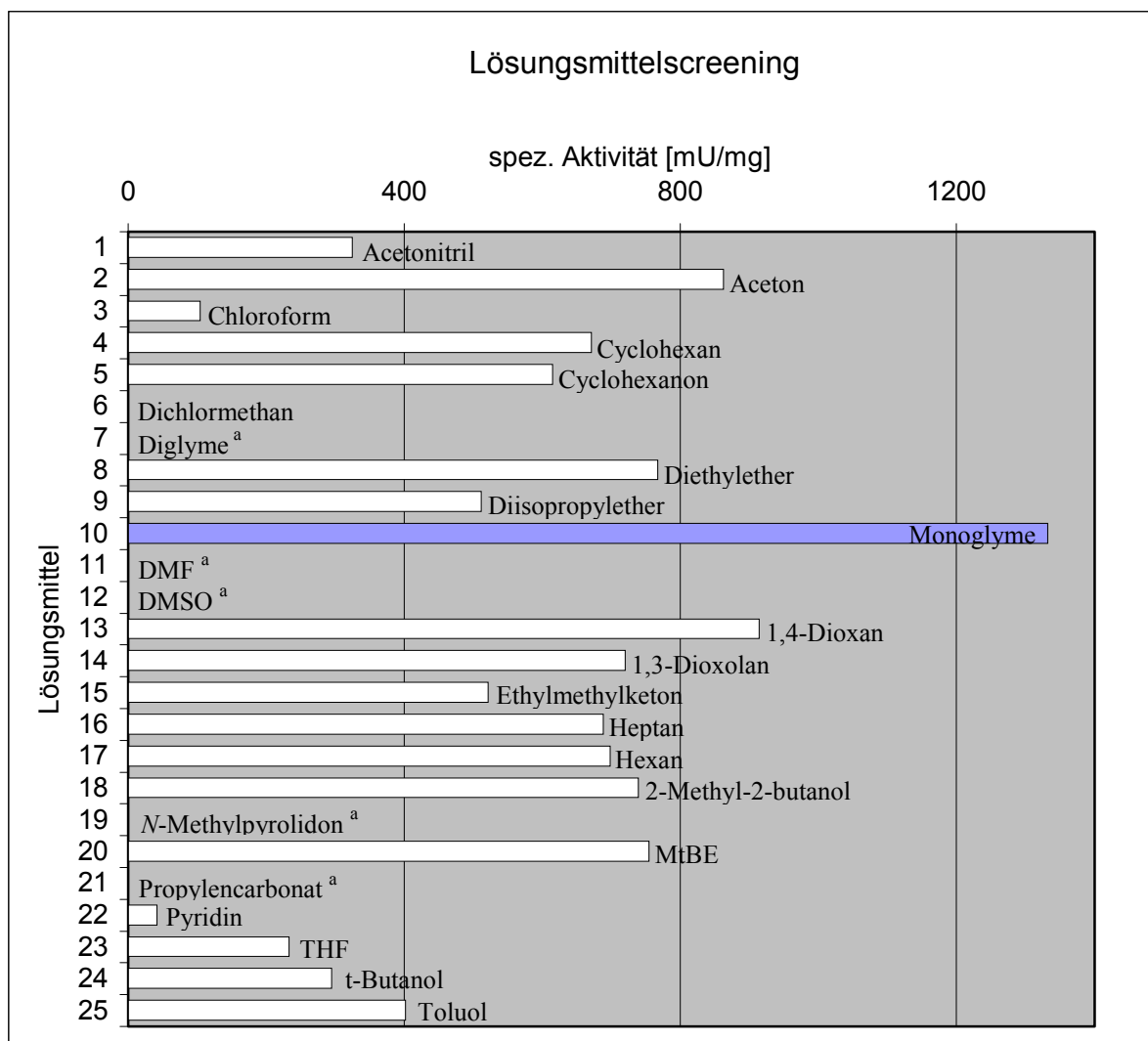
Nr.	Lösungsmittel	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
24	<i>t</i> -Butanol	37	295
25	Toluol	50	402

a) spezifische Aktivität konnte mittels GC nicht bestimmt werden. b) Ausbeute nach Aufarbeitung der Reaktion.

Die spezifischen Aktivitäten beziehen sich auf mg Enzymimmobilisat, da nicht bekannt ist, wieviel Protein sich auf dem Trägerharz befindet. In den chlorierten Lösungsmitteln (3, 6) findet kein oder nur sehr geringer Umsatz statt. In den unpolaren Lösungsmitteln (4, 16, 17,) kann eine spezifische Aktivität von ca. 700 mU/mg berechnet werden. Monoglyme (10) erweist sich mit 1332 mU/mg als am besten geeignet. In den Lösungsmitteln (7, 11, 12, 19, 21) konnten nach Aufarbeitung der Reaktion Ausbeuten bis 59 % (7) erhalten werden. Die spezifischen Aktivitäten in diesen Lösungsmitteln konnten aufgrund sich überlagernder Signale (Produkt und Lsgm.) im GC-Chromatogramm nicht bestimmt werden.

Lösungsmittel mit einer Ketofunktion sind für enzymatische Acylierungen von Aminosäuren ungeeignet. So zeigt zwar Aceton mit 862 mU/mg eine sehr hohe spezifische Aktivität der Lipase, der Umsatz hingegen erweist sich mit 41 % als sehr gering. Als Nebenreaktion beobachtet man einen nucleophilen Angriff der Aminofunktion auf die Ketogruppe des Lösungsmittels (Bildung von Schiff-Basen).

Im Hinblick auf eine technische Anwendung des Verfahrens sind nur die Lösungsmittel 4, 16, 17, 18 und 24 von Interesse. Davon zeigt 2-Methyl-2-butanol (18) mit 739 mU/mg die höchste spezifische Aktivität. Zur besseren Übersicht sind in **Diagramm 2** die spezifischen Aktivitäten der Lipase in den unterschiedlichen Lösungsmitteln aufgetragen.



a) spezifische Aktivität konnte nicht bestimmt werden.

Diagramm 2: Enzymatische Acylierung von Gly-OtBu **13j**: Lösungsmittelabhängigkeit

2.1.8 Enzymatische Acylierung von Glycin-*t*-butylester **13j** - Einfluß des Acyldonors

Die für enzymatische Acylierungen idealen Acyldonatoren sollten eine rasche Acylierung ermöglichen, irreversibel zum Produkt führen und im Hinblick auf eine technische Anwendung kostengünstig sein.

Für die Synthese von acylierten Aminosäuren ist der Kostenfaktor sehr wichtig, aus diesem Grund wurden dafür einfache Ester bzw. Säuren als Acyldonatoren verwendet. Die Acylierungen mit diesen Donatoren sind reversibel mit einer Gleichgewichtskonstante in der Nähe von eins. Das bei der enzymatischen Acylierung entstehende Gleichgewicht zwischen Produkt und dem abgespaltenen Alkohol kann durch einen großen Acyldonorüberschuß auf die Produktseite verschoben werden. Ebenfalls durch kontinuierliches Entfernen des

entstehenden Alkohols mittels Verdampfen¹⁰⁷, azeotrope Destillation¹⁰⁸ oder durch den Einsatz von Molekularsieben¹⁰⁹.

2.1.8.1 Nichtaktivierte Acyldonatoren - Fettsäureester

Zur Optimierung der Acylierung von Glycin-*t*-butylester **13j** hinsichtlich der Kettenlänge des Acyldonors wurde in einem 4 ml Glasgefäß zu 1 mmol Gly-OtBu **13j** der 3-fache Überschuß an Acyldonor mit jeweils 3 ml Monoglyme gemischt und bei einer Reaktionstemperatur von 70°C mit 5 mg Novozym SP435 versetzt. Bis zur ersten Stunde wurden alle 10 min und danach jede weitere Stunde eine Probe entnommen und mittels GC analysiert (vgl. **Tab. 9**).

Tab. 9: Enzymatische Acylierung von Glycin-*t*-butylester **13j**: C-Anzahl, spez. Aktivität.

Nr.	Carbonsäureethylester	Produkt	C-Anzahl	Spez. Aktivität [mU/mg]
1	Essigsäure-	14a	C-2	1332
2	Propionsäure-	14b	C-3	1361
3	Buttersäure-	14c	C-4	1490
4	Valeriansäure-	14d	C-5	1519
5	Capronsäure-	14e	C-6	1532
6	Capronsäuremethylester	14f	C-6	1592
7	Heptansäure-	14g	C-7	1412
8	Caprylsäure-	14h	C-8	1216
9	Nonansäure-	14i	C-9	1187
10	Caprinsäure-	14j	C-10	1110
11	Undecansäure-	14k	C-11	1021
12	Laurinsäure-	14l	C-12	681
13	Myristinsäure-	14m	C-14	497
14	Palmitinsäure-	14n	C-16	369
15	Stearinsäure-	14o	C-18	276
16	Ölsäure-	14p	C-18/1	285
17	Trilaurin	14l-1	-	236

Ausgehend von Essigsäure (1332 mU/mg) beobachtet man eine kontinuierliche Zunahme der Aktivität bis zur Capronsäure (1532 mU/mg). Danach ist festzustellen, daß die spezifische Aktivität beginnend mit Nr. 7 (1412 mU/mg) bis hin zu Nr. 16 (285 mU/mg) mit zunehmender Kettenlänge stetig abnimmt. Für eine technische Anwendung wäre

Laurinsäureethylester Nr. 12 mit 681 mU/mg recht gut geeignet. Am Beispiel von Trilaurin (17) konnte gezeigt werden, daß auch native Öle zur enzymatischen Acylierung geeignet sind. Zur Veranschaulichung wurden die Zeit-Umsatz-Kurven von vier verschiedenen Acyldonatoren (C-2, C-6, C-12, C-18/1) nebeneinander graphisch dargestellt (vgl. **Abb. 23**).

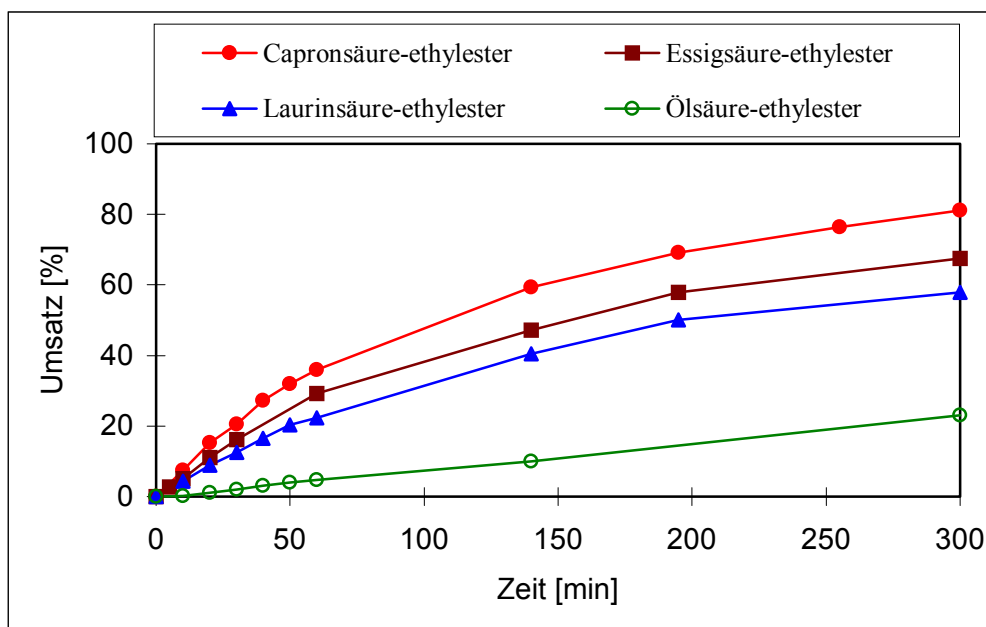


Abb. 23: Lipase-katalysierte Acylierung von Gly-OtBu **13j** - Abhängigkeit vom Acyldonor.

Beim Wechsel von Ethyl- auf Methyl ester beobachtet man z. B. bei der Capronsäure eine Aktivitätssteigerung von ca. 5 %. Durch die Verwendung von Molekularsieb (4Å für Methanol und 5Å für Ethanol) konnte auch der gebildete Alkohol weitgehend abgefangen und damit das Gleichgewicht auf die Produktseite verschoben werden. Daraus resultierte insgesamt eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit von ca. 20 %.

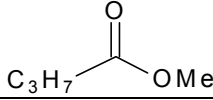
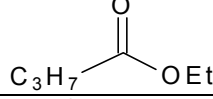
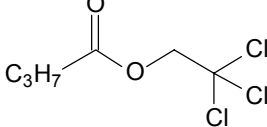
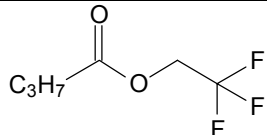
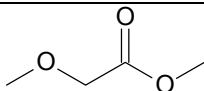
2.1.8.2 Einsatz aktivierter Acyldonatoren

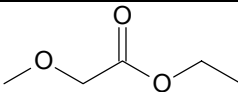
Der Einsatz aktivierter Acyldonatoren hat den Vorteil, daß dadurch das Reaktionsgleichgewicht in Richtung Produkt verschoben wird. Geeignete, aktivierte Ester sind z. B. Anhydride¹¹⁰, Cyanomethylester¹¹¹, Enolester¹¹², Oximester¹¹³, Thioester¹¹⁴ und Trihaloethylester¹¹⁵. Durch deren Einsatz wird das Gleichgewicht auf die Seite der Produkte verschoben, da die daraus freigesetzten Alkohole eine zu geringe Nucleophilie besitzen um wieder in den Reaktionsverlauf einzutreten. Im Hinblick für eine technische Anwendung sind

nur die aktivierten Enolester, Trihaloethylester und die Anhydride interessant, da die Thioester eine nicht unerhebliche Geruchsbelästigung darstellen, während bei der Verwendung von Cyanomethylestern toxische Cyanohydrine entstehen. Die Oximester bilden schwerflüchtige Oxime, so daß bei der Aufarbeitung der Reaktion Schwierigkeiten zu erwarten sind.

Beim Einsatz von Anhydriden zur enzymatischen Acylierung wurde in Vorversuchen chemische Acylierung beobachtet. Der Einsatz von Vinylestern erscheint zunächst sinnvoll, da der entstehende Vinylalkohol spontan zum Acetaldehyd tautomerisiert und dem Reaktionsgleichgewicht damit kontinuierlich entzogen wird. Allerdings kann im Fall der *N*-Acylierung von Aminosäuren genau wegen der Tautomerisierung zum Acetaldehyd kein Vinylester eingesetzt werden. Es erfolgt, wie auch beim Einsatz von Ketonen als Lösungsmittel die Bildung von Schiff-Basen. So bleiben zum Vergleich zwischen aktivierten und nicht aktivierten Acyldonatoren nur die Trihaloethylester. Von Balkenhohl et al.⁶² wurde bei enzymatischen Acylierungen eine Aktivierung durch Methoxyessigsäureester beobachtet, die durch den -I-Effekt der Methoxygruppe begründet wurde. Zum Vergleich der einzelnen Acyldonatoren wurden verschiedene Buttersäurederivate in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) für die enzymatische Acylierung von Glycin-*t*-butylester **13j** eingesetzt (vgl. **Tab. 10**).

Tab. 10: Buttersäurederivate als Acyldonatoren; Struktur, spez. Aktivität.

Nr.	Acyldonor	Produkt	Struktur	Spez. Aktivität [mU/mg]
1	Buttersäuremethylester	14c-1		1580
2	Buttersäureethylester	14c		1490
3	Buttersäure-2,2,2-trichlorethylester	14c-2		2876
4	Buttersäure-2,2,2-trifluorethylester	14c-3		3341
5	Methoxyessigsäuremethylester	15a		9140

Nr.	Acylldonor	Produkt	Struktur	Spez. Aktivität [mU/mg]
6	Methoxyessigsäureethylester	15a-1		8970

Im Folgenden sind die Unterschiede der spezifischen Aktivitäten verschiedener Acylldonatoren durch die entsprechenden Zeit-Umsatz-Kurven dokumentiert (vgl. **Abb. 24**).

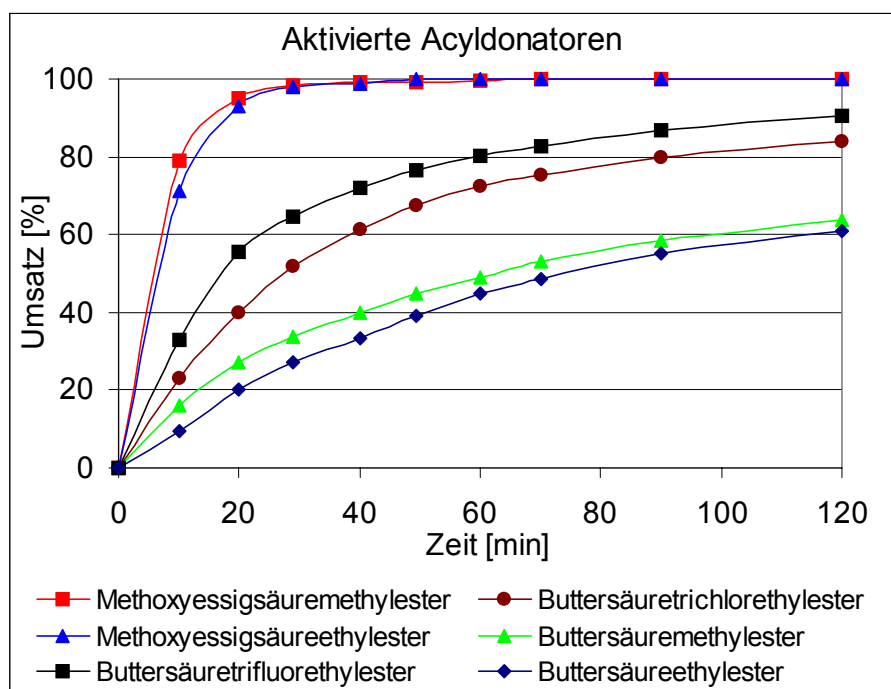


Abb. 24: Aktivierte Acylldonatoren

Methoxyessigsäureester zeigen bei der Acylierung eine um den Faktor 10 höhere Aktivität. Man kann davon ausgehen, daß für den aktivierenden Effekt die erhöhte Carbonylaktivität durch den elektronegativen Substituenten (-I-Effekt) in der α -Position verantwortlich ist⁶². Die Methylester weisen im Vergleich zu den Ethylestern eine tendenziell höhere Aktivität auf. Die Ethyltrihalogenester der Buttersäure zeigen im Vergleich zu den einfachen Estern, eine ca. doppelt so große spezifische Aktivität. Das Trifluorderivat ist (Faktor 2,2) mehr aktiviert als das Trichlorderivat (Faktor 1,9) was vermutlich aus dem stärkeren I-Effekt der Fluoratome resultiert.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die besten Ergebnisse mit Methoxyessigsäuremethylester erhalten werden. Im Hinblick auf eine technische Anwendung und die damit verbundene Ökonomie sind trotz allem die einfachen Methylester der Carbonsäuren

vorzuziehen. Daher wurden die weiteren Untersuchungen auch mit Fettsäuremethylestern durchgeführt.

2.1.9 Enzymatische Acylierung von Glycin-*t*-butylester **13j** - Verhältnis von Substrat:Acyldonor

Ziel dieser Versuche war es, ein optimales Verhältnis zwischen Substrat und Acyldonor im Hinblick auf Reaktionszeit und Umsatz zu erreichen. Dazu wurden unterschiedliche molare Mischungen von Glycin-*t*-butylester **13j** und Capronsäuremethylester in Gegenwart von Novozym SP435 in 4 ml 2-Methyl-2-butanol als Lösungsmittel der enzymatischen Acylierung unterworfen. Das Verhältnis zwischen Substrat und Acyldonor wurde zwischen 1:1 bis 1:10 variiert. Alternativ dazu wurde ohne Verwendung von 2-Methyl-2-butanol direkt Capronsäuremethylester als Lösungsmittel und Acyldonor eingesetzt (1:21). Die aus den enzymatisch-katalysierten Acylierungen erhaltenen spezifischen Aktivitäten und der entsprechende Umsatz nach 3h Reaktionszeit bei 70°C sind in **Tab. 11** wiedergegeben.

Tab. 11: Substrat-Acyldonor-Verhältnis; spezifische Aktivität und Umsatz.

Substrat : Acyldonor Gly-OtBu : C ₆ -OMe	Spez. Aktivität [mU/mg]	Umsatz [%] nach 3 h
1 : 1	409	36
1 : 1,1	485	41
1 : 2	609	52
1 : 3	782	62
1 : 4	816	63
1 : 5	883	66
1 : 10	886	69
Ohne Lösungsmittel 1:21	2732	98

Die Zeit-Umsatz-Kurven der enzymatischen Acylierungen sind zum besseren Vergleich in **Abb. 25** nochmals graphisch dargestellt.

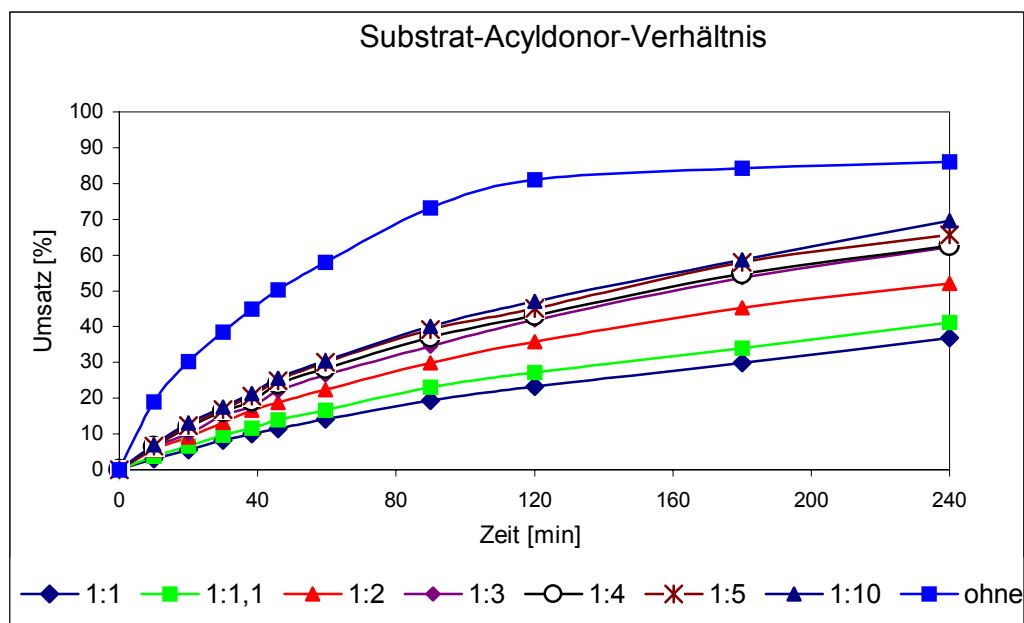


Abb. 25: Lipasenkatalysierte Acylierung; Substrat-Acyldonor-Verhältnis.

Es wird deutlich, daß Reaktionsmischungen im equimolaren Verhältnis zwischen Substrat und Acyldonor nicht für enzymatische Acylierungen geeignet sind (vgl. **Abb. 25**). Die spezifische Aktivität liegt hier mit 409 mU/mg deutlich unter denjenigen Mischungen bei denen der Acyldonor im Überschuß eingesetzt wird. Auch nach 24 h Reaktionszeit bleibt durch das Reaktionsgleichgewicht der Umsatz bei 62 % konstant. Die spezifische Aktivität von Novozym SP435 steigert sich bis zu einem Substrat-Acyldonor-Verhältnis von 1:3, bleibt dann aber nahezu konstant bei ca. 800 mU/mg. Der Überschuß an Acyldonor verschiebt auch das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite, so daß nach 24 h nahezu vollständiger Umsatz zu beobachten ist. Überraschenderweise zeigt die Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) ohne Lösungsmittel im reinen Acyldonor eine wesentlich höhere spezifische Aktivität von 2732 mU/mg. Dies ist zum einen vermutlich auf die Erhöhung des Substrat-Acyldonor-Verhältnisses auf 1:21 zurückzuführen, zum anderen ist wahrscheinlich die spezifische Aktivität im Acyldonor generell größer als in 2-Methyl-2-butanol.

2.1.9.1 Enzymatische Acylierungen von Gly-OtBu in reinen Fettsäuremethylestern

Bei den Optimierungen hinsichtlich des besten Substrat-Acyldonor-Verhältnis (vgl. 2.1.9) stellte sich heraus, daß die enzymatischen Acylierungen von Aminosäure-*t*-butylestern vorteilhafter Weise ohne Lösungsmittel (höhere spezifische Aktivität) direkt in

Fettsäuremethylestern durchgeführt werden. Hierzu wurde Glycin-*t*-butylester **13j** mit den Acyldonatoren von C-2 bis C-18/1 in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) bei 70°C der enzymatischen Acylierung unterworfen. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick der verschiedenen Acyldonatoren und den Umsatz zu der angegebenen Zeiten wieder (vgl. **Tab. 12**).

Tab. 12: Enzymatische Acylierung von Gly-OtBu **13j** mit unterschiedlichen. Acyldonatoren.

Acyldonor -methylester	C-Anzahl	Produkt	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
Essigsäure ^a -	C-2	14a-1	3	96	2349
Propionsäure-	C-3	14b-1	3	96	2576
Buttersäure-	C-4	14c-4	3	96	2550
Valeriansäure-	C-5	14d-1	3	96	2646
Capronsäure-	C-6	14e-4	3	98	2732
Heptansäure-	C-7	14f-1	3	95	2472
Caprylsäure-	C-8	14g-1	3	95	2245
Nonansäure-	C-9	14h-1	4	94	2087
Caprinsäure-	C-10	14i-1	4	95	2095
Undecansäure-	C-11	14j-1	4	95	2048
Laurinsäure-	C-12	14k-2	4	95	2016
Myristinsäure-	C-14	14l-1	5	97	1775
Palmitinsäure-	C-16	14m-1	6	96	1706
Stearinsäure-	C-18	14n-1	6	95	1292
Ölsäure-	C-18/1	14o-1	6	95	1260

a) Hier wurde der Ethylester eingesetzt.

Diese Versuche zeigen, daß die enzymatische Acylierung von Gly-OtBu nach 3 Stunden im Fall des Capronsäuremethylesters ohne Lösungsmittel mit einem Umsatz von 98 % durchgeführt werden kann. Im Falle der längerkettigen Acyldonatoren wie z. B. der Laurinsäure kann *N*-Lauroylglycin-*t*-butylester **14k-2** schon nach 4 Stunden mit einem Umsatz von 95 % erhalten werden. Die spezifischen Aktivitäten der Carbonsäuren bis C-10 sind im Vergleich zu den Reaktionen in Monoglyme (**Tab. 9**) in der Regel fast doppelt so hoch. Bei den längerkettigen Fettsäuren sind die spezifischen Aktivitäten (im Vergleich zu den Reaktionen in Monoglyme, vgl. **Tab. 9**), z.B bei Laurinsäure, etwa drei mal und bei der Ölsäure sogar vier mal so hoch. Vielleicht erweist sich somit neben dem höheren molaren Verhältnis zwischen Substrat und Acyldonor auch die Verdrängung von

Lösungsmittelmolekülen aus dem aktiven Zentrum des Enzyms als geschwindigkeitsbestimmend. Möglicherweise kann beim Verzicht auf ein Lösungsmittel das "nackte" Substrat direkt mit dem aktiven Zentrum in Wechselwirkung treten. Dieser beschleunigende Effekt scheint bei den länger-kettigen Acyldonatoren eine größere Rolle zu spielen als bei den mittleren bzw. den kleineren Kettenlängen.

2.1.10 Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) - Temperaturabhängigkeit

Die Lipase aus *Candida antarctica* Novozym SP435 ist ein sehr robustes Protein. Die Denaturierungstemperatur der nativen Lipase aus *Candida antarctica* Fraktion B liegt im Bereich von 50°C bis 60°C¹¹⁶. Die Immobilisierung dieser Lipase zum kommerziell erhältlichen Novozym SP435 führte zu einer Stabilisierung. So wurde für die Umesterung von Soyaöl mit Laurinsäure ein Temperaturoptimum von 85°C gefunden (Heldt-Hensen et al.¹¹⁷), während Björkling et al.¹¹⁸ bei einer Veresterung von Glycosiden ein Optimum von 70°C angibt. In der Regel wird mit Novozym SP435 bei Reaktionstemperaturen zwischen 60°C und 80°C gearbeitet¹¹⁹. Es ist weiterhin bekannt¹²⁰, daß die Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) bis zu Temperaturen von 90°C aktiv ist. Da die enzymatische Acylierung von Aminosäure-*t*-butylestern in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SP435) eine bislang nicht beschriebene Reaktion darstellt, wurde der Einfluß der Temperatur auf die spezifische Aktivität des Enzyms untersucht (vgl. **Abb. 26**). Dazu wurde 1 mmol Gly-OtBu **13j** mit 4 ml Capronsäuremethylester (Acyldonor und zugleich Lösungsmittel) in Gegenwart von Novozym SP435 bei unterschiedlichen Temperaturen enzymatisch acyliert. Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten bei der jeweiligen Temperatur wurde aus der Anfangssteigung (innerhalb von 60 min) der Produktkurve ermittelt.

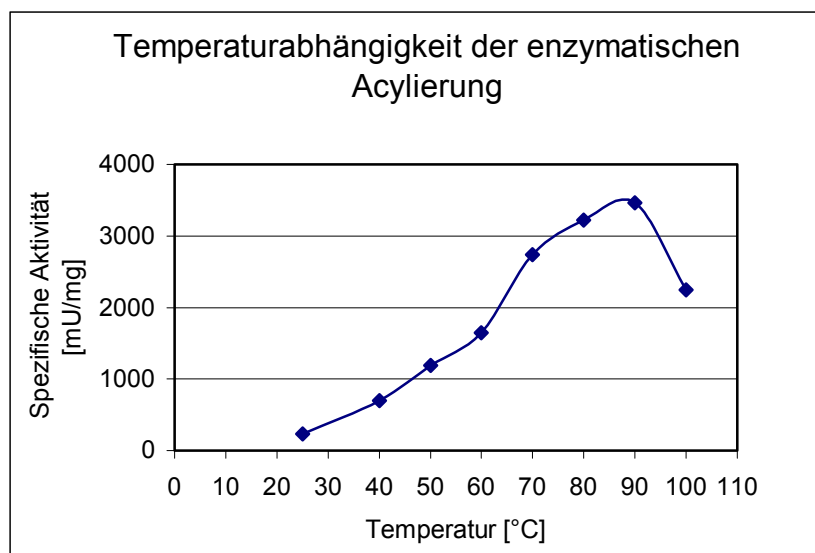


Abb. 26: Enzymatische Acylierung von Gly-OtBu **13j**; Einfluß der Temperatur.

Der Aktivitätsverlauf zeigt mit einer spezifischen Aktivität von 3463 mU/mg bei 90°C ein Maximum auf. Temperaturen über 90°C führen zur Deaktivierung des Enzyms. Aus dieser Kurve läßt sich allerdings nicht ablesen, inwieweit die Lipase nach einer erfolgten Reaktion bei 90°C noch wiederverwendbar ist. Im Hinblick auf eine technische Anwendung ist dies aber ein entscheidendes Kostenkriterium. Daher wurde eine Stabilitätsuntersuchung durchgeführt. Die immobilisierte Lipase (Novozym SP435) wurde dazu 24 Stunden bei der jeweiligen Temperatur (60°C, 70°C, 80°C, 90°C) für enzymatische Acylierungen eingesetzt. Nach dem Abfiltrieren wurde das Enzym wiederum für 24 Stunden eingesetzt und dieser Vorgang insgesamt fünf mal wiederholt. Daraus wurde die Temperaturstabilität des Enzyms ermittelt (vgl. **Abb. 27**).

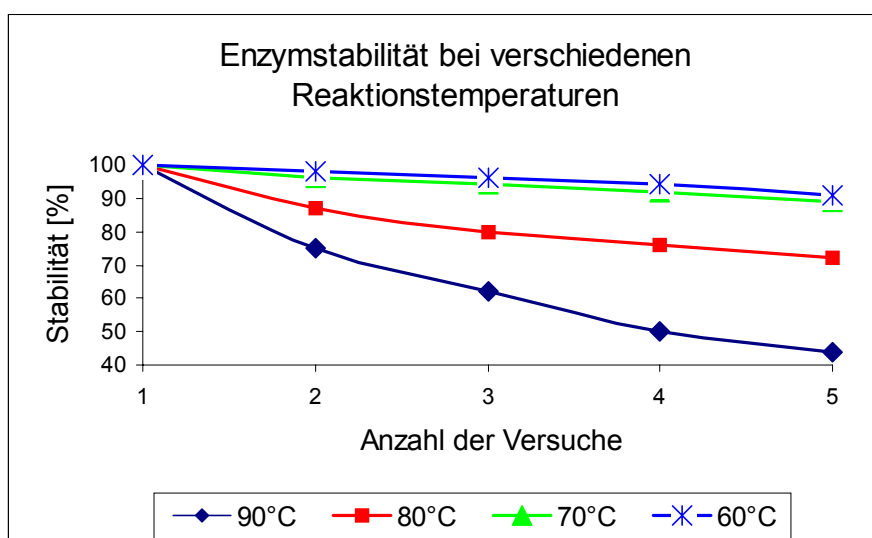


Abb. 27: Enzymstabilität bei verschiedenen Reaktionstemperaturen.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, daß bei Reaktionstemperaturen ab 80°C die immobilisierte Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) zunehmend denaturiert wird. Bei 70°C ist hingegen auch nach fünf Reaktionsabfolgen noch keine deutlich erkennbare Denaturierung nachzuweisen. So erwies sich für die lipase-katalysierten Acylierungen von Aminosäure-*t*-butylestern in Gegenwart von *Candida antarctica* B (Novozym SP435) eine Reaktionstemperatur von 70°C als optimal.

2.1.11 Lipase-katalysierte Acylierung von Glycin-*t*-butylester **13j** - Einfluß der Enzymmenge

Das Verhältnis von Enzym zu Substrat ist für eine Kostenminimierung und Reaktionsoptimierung von großer Bedeutung. Auch wenn das Enzym nach der Reaktion wiedergewonnen werden kann, ist es aufschlußreich, zu wissen, ab welcher Enzymkonzentration eine weitere Enzymzugabe die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr beeinflusst. Hierzu wurde Glycin-*t*-butylester **13j** mit Capronsäuremethylester in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) bei 70°C acyliert. Für diese Bestimmungen wurden unterschiedliche Enzym-Substrat-Verhältnisse (1:3, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 bezogen auf mg Immobilisat) verwendet. Die folgende Tabelle gibt die jeweiligen Umsätze sowie die spezifischen Aktivitäten nach 2 h Reaktionszeit wieder (vgl. **Tab. 13**).

Tab. 13: Enzym-Substrat-Verhältnis: Reaktionszeit, Umsatz, spezifische Aktivität.

Enzym : Substrat- Verhältnis	Produkt	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
1 : 100	14e-5	2	61	7530
1 : 50	14e-6	2	82	6180
1 : 20	14e-7	2	91	4820
1 : 10	14e-8	2	98	2890
1 : 5	14e-9	2	99	1470
1 : 3	14e-10	2	99	891

Die Zeit-Umsatz-Kurven der einzelnen Reaktionen lassen sich aus der folgenden **Abb. 28** ablesen.

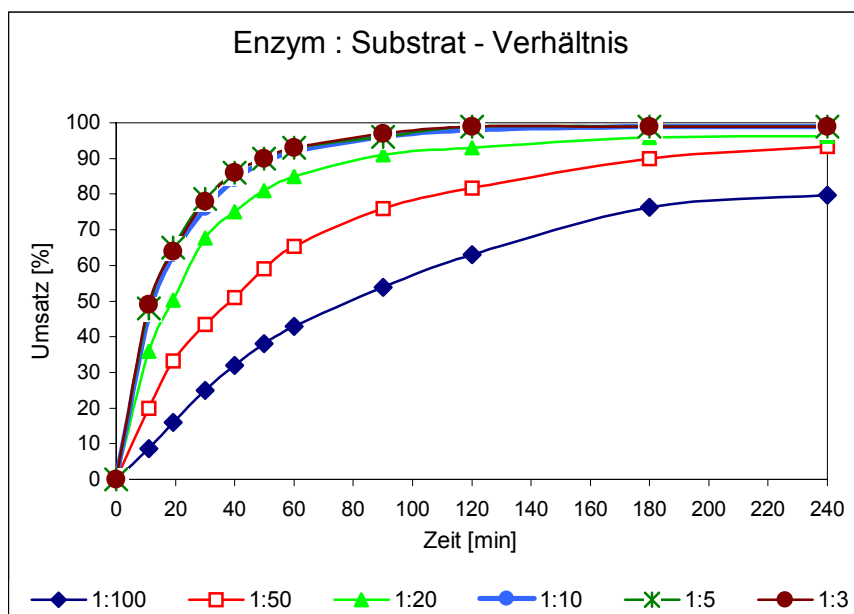


Abb. 28: Enzymatische Acylierung: Enzym : Substrat-Verhältnis.

Aus den Zeit-Umsatz-Kurven ist klar ersichtlich, daß ab einem Enzym-Substratverhältnis von 1:10 eine weitere Erhöhung der Enzymmenge keinen Einfluß mehr auf die Reaktionszeit nimmt (vgl. Abb. 28). Deutlich wird dies durch den Vergleich der spezifischen Aktivitäten von 1:10 und 1:5. Bei Verdopplung der Enzymmenge wird gleichzeitig auch eine Verdopplung der spezifischen Aktivität beobachtet (Faktor 1,97). Vergleicht man dagegen das Verhältnis von 1:100 mit 1:50, was ebenfalls einer doppelten Enzymmenge entspricht, so beobachtet man hier nur einen spezifischen Aktivitätsfaktor von 1,22. Somit nimmt bei einem Enzym-Substratverhältnis kleiner 1:10 auch die Reaktionszeit erheblich zu. Für weitere Reaktionsansätze ist dadurch ein Verhältnis von Enzym und Substratmenge von 1:10 mit der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) sinnvoll.

2.1.12 Enzymatische Acylierung von Glycin-*t*-butylester **13j** : Zusammenfassung der Optimierungsversuche

Im Hinblick auf eine technische Anwendung der enzymatischen Acylierung von Aminosäure-*t*-butylestern war ein wichtiges Ziel dieser Arbeiten eine optimale Raum-Zeit-Ausbeute für diesen Reaktionsschritt zu erzielen. Mit Glycin-*t*-butylester **13j** als Substrat wurden in einer systematischen Studie 48 Lipasen hinsichtlich ihrer diesbezüglichen Eigenschaften untersucht. Als am besten geeignetes Enzym wurde die Lipase aus *Candida antarctica* B

(Novozym SP435) ermittelt. Zur Erreichung einer optimalen Raum-Zeit-Ausbeute mit diesem Enzym wurden a) das Lösungsmittel, b) die Acyldonatoren, c) das Substrat-Acyldonor Verhältnis, d) die Temperaturabhängigkeit und e) das Enzym-Substrat-Verhältnis variiert sowie die Enzymstabilität untersucht. Die oft für lipase-katalysierten Veresterungen eingesetzten, aktivierten Acyldonatoren wie Fettsäurevinylester und Fettsäureanhydride konnten hier nicht verwendet werden. Das aus den Vinylestern entstehende Acetaldehyd bildet mit der Aminogruppe der Aminosäure Schiff-Basen mit Anhydriden werden chemische Acylierungen beobachtet.

Als besonders interessante Acyldonatoren erwiesen sich Methoxyessigsäureester, bei denen eine Erhöhung der spezifischen Aktivität um den Faktor 10 gegenüber den nicht aktivierten Estern beobachtet wurde. Auch Fettsäuretrihalogenester zeigten mit einer Erhöhung der spezifischen Aktivität um den Faktor 2 interessante Möglichkeiten. Im Hinblick auf eine technische Umsetzung und die damit verbundene Kostenrechnung erweisen sich allerdings Fettsäuremethylester als besonders attraktiv. Es stellte sich in diesem Zusammenhang heraus, daß Novozym SP435 in reinem Acyldonor eine besonders hohe Aktivität besitzt, so daß schließlich auf ein Lösungsmittel ganz verzichtet werden konnte. Als nichtaktivierter Acyldonor mit der höchsten spezifischen Aktivität zeigte sich der Capronsäuremethylester als am besten geeignet. Weiterhin erwies sich eine Durchführung mit einem Enzym-Substratverhältnis von 1:10 bei einer Temperatur von 70°C als optimal. Temperaturen > 70°C führten zwar zu einer Reaktionsbeschleunigung, erlauben aber durch die Denaturierung der Lipase keine Wiederverwendung des Enzyms. Mit diesen optimierten Bedingungen konnte Glycin-*t*-butylester **13j** in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) in reinem Capronsäuremethylester als Acyldonor und Lösungsmittel nach ca. 2 h Reaktionszeit zu *N*-Caproylglycin-*t*-butylester **14e-8** acyliert werden. Hierbei wurden Rohausbeuten von > 95 % erzielt.

2.1.13 Enzymatische Acylierungen weiterer Aminosäure-*t*-butylester

Zur Übertragung der Studien zur enzymatischen Acylierung von Glycin-*t*-butylester auf weitere Aminosäure-*t*-butylester wurden folgende drei Themenkreise überprüft:

- a) Besitzt die Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) bei enzymatischen Acylierungen eine ausgeprägte Enantioselektivität?

- b) Welchen Einfluß hat die Molekülstruktur (Molekülgröße) auf die enzymatische Acylierung?
- c) Welchen Einfluß haben Substitutionsmuster in Nachbarschaft der zu acylierenden Aminogruppe?

Die Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) erweist sich als sehr geeignet für die Herstellung enantiomerenreiner Alkohole¹¹⁶. So werden bei der Veresterung von sekundären Alkoholen wahlweise *R*-¹²¹ als auch *S*-Enantiomere¹²² mit hohen Enantiomerenüberschüssen erhalten. Ein ähnliches Verhalten zeigt sich auch bei der Acylierung von Aminen. Auch hier erhält man ebenfalls enantiomerenreine Produkte mit *R*-¹²³ und *S*-Konfiguration¹²⁴. Zur Überprüfung der Enantioselektivität der Lipase bei der Acylierung von Aminosäure-*t*-butylestern wurden daher zunächst racemische Verbindungen verwendet. Dazu wurden die jeweiligen Aminosäure-*t*-butylester in einem 4 ml Glasgefäß mit 3 ml Acyldonor (Capronsäuremethylester zugleich auch Lösungsmittel) und einem Enzym-Substratverhältnis von 1:10 in Gegenwart von Novozym SP435 bei 70°C Reaktionstemperatur enzymatisch acyliert. Der Reaktionsverlauf wurde jeweils gaschromatographisch durch Aufnahme der Zeit-Umsatz-Kurve verfolgt. Die Ergebnisse dieser enzymatischen Acylierungen sind in **Tab. 14** zusammengestellt.

Tab. 14: Enzymatische Acylierung von racemischen Aminosäure-*t*-butylestern.

Substrat Aminosäure- <i>t</i> -butylester	Produkt	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
DL-Ala-OtBu (±)- 13a	(±)- 16a	48	96	108
DL-Ile-OtBu (±)- 13k	(±)- 16b	48	61	13,3
DL-Leu-OtBu (±)- 13l	(±)- 16c	48	65	15,2
DL-Lys-OtBu (±)- 13m	(±)- 16d	4	97 ^a	1442
DL-Orn-OtBu (±)- 13o	(±)- 16e	3	97 ^b	1906
DL-Phe-OtBu (±)- 13p	(±)- 16f	48	43	7,6
DL-Val-OtBu (±)- 13t	(±)- 16g	48	57	12,5
DL-3-ABU-OtBu (±)- 13d	(±)- 16h	48	62	58

a) Acylierung der ε-Aminogruppe b) Acylierung der δ-Aminogruppe

Die enzymatischen Acylierungen der racemischen Aminosäure-*t*-butylester von Alanin (±)-**13a**, 3-Aminobuttersäure (±)-**13d**, Isoleucin (±)-**13k**, Leucin (±)-**13l** und Phenylalanin (±)-

13p erforderten im Vergleich zu Glycin-*t*-butylester **13j** erheblich längere Reaktionszeiten und zeigten dementsprechend niedrigere spezifische Aktivitäten.

Die Aminosäureester von Lysin (\pm)-**13m** und Ornithin (\pm)-**13o** mit einer zweiten Aminofunktion in ϵ - bzw. δ -Stellung werden dagegen sehr schnell acyliert und zwar an diesen Positionen. Die Bestimmung der Drehwerte von Produkten nach einem Umsatz von 50 % (GC) zeigen nur im Fall von 3-Aminobuttersäure (\pm)-**13d** und Alanin (\pm)-**13a** eine gewisse Enantioselektivität. Aus allen anderen Aminosäuren erhält man ausschließlich racemische, acylierte Produkte. Dies wird auch deutlich, wenn man die Zeit-Umsatz-Kurven der enzymatischen Acylierungen der racemischen *t*-Butylester von Alanin (\pm)-**13a**, 3-Aminobuttersäure (\pm)-**13d** und Leucin (\pm)-**13l** betrachtet. In der nachstehenden Abbildung sind die Zeit-Umsatz-Kurven der Reaktionen DL-3-ABU-OtBu (\pm)-**13d**, DL-Ala-OtBu (\pm)-**13a** und DL-Leu-OtBu (\pm)-**13l** miteinander verglichen (vgl. **Abb. 29**).

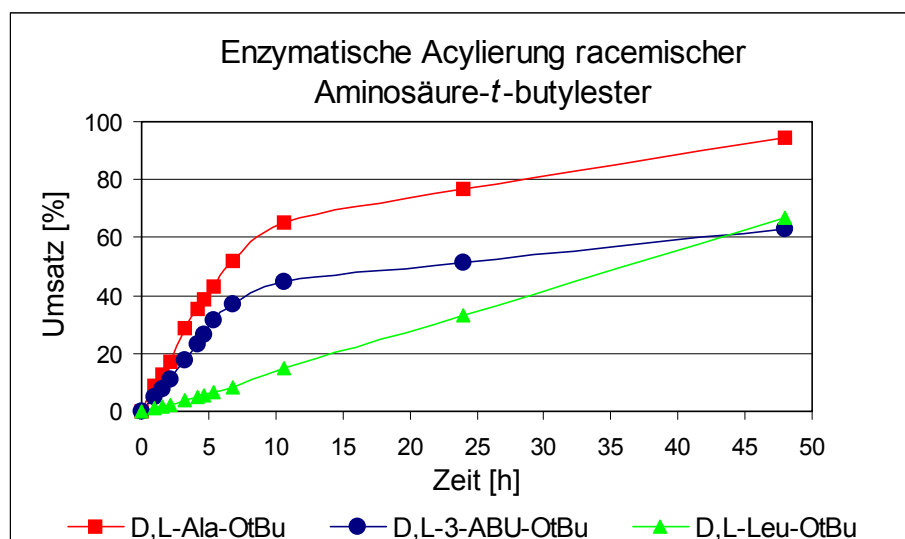


Abb. 29: Enzymatische Acylierung mit Capronsäuremethylester von racemischen Aminosäure-*t*-butylestern.

Die Zeit-Umsatz-Kurven von DL-Ala-OtBu (\pm)-**13a** und insbesondere DL-3-ABU-OtBu (\pm)-**13d** deuten durch die geringere Steigung der Kurven nach einem Umsatz von ca. 50 % auf eine gewisse Enantiomerendifferenzierung hin. Die Zeit-Umsatz-Kurve von DL-Leu-OtBu (\pm)-**13l** steht stellvertretend für die anderen, untersuchten Aminosäure-*t*-butylester. Hier zeigt sich auch nach einem Umsatz größer als 50 % keine Änderung im Verlauf der Zeit-Umsatzkurve. Für eine noch genauere Untersuchung der enzymatischen Acylierung in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) wurden

enantiomerenreine Aminosäure-*t*-butylester eingesetzt. 3-Aminobuttersäure ist kommerziell nur als Racemat erhältlich und daher hier nicht aufgeführt (vgl. 2.1.14). Die nachstehende Tabelle gibt die eingesetzten Verbindungen mit Reaktionszeit, Umsatz und spezifischer Aktivität wieder (vgl. **Tab. 15**).

Tab. 15: Enzymatische Acylierung von enantiomerenreinen Aminosäure-*t*-butylestern.

Substrat Aminosäure- <i>t</i> -butylester	Produkt	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
D-Ala-OtBu (R)- 13a	(R)- 16a	48	98	129
L-Ala-OtBu (S)- 13a	(S)- 16a	48	82	42
D-Leu-OtBu (R)- 13l	(R)- 16c	144	93	15,6
L-Leu-OtBu (S)- 13l	(S)- 16c	144	91	15,1
D-Phe-OtBu (R)- 13p	(R)- 16f	144	84	7,4
L-Phe-OtBu (S)- 13p	(S)- 16f	144	80	7,2
D-Val-OtBu (R)- 13t	(R)- 16g	144	91	12,8
L-Val-OtBu (S)- 13t	(S)- 16g	144	90	12,3

Die spezifischen Aktivitäten der enantiomerenreinen Aminosäure-*t*-butylester von Leu (**R**)- bzw. (**S**)-**16c**, Phe (**R**) bzw. (**S**)-**16f** und Val (**R**)- bzw. (**S**)-**16g** sind den jeweiligen der racemischen Vertreter sehr ähnlich. Man findet tendenziell für die D-Enantiomeren nur eine leicht höhere spezifische Aktivität. Ausnahme ist D-Ala-OtBu (**R**)-**13a**, hier ist die spezifische Aktivität der Lipase ca. 3 mal so hoch wie beim L-Enantiomeren (**S**)-**13a**. Das D-Enantiomere von Ala-OtBu (**R**)-**13a** wird im Vergleich zu den anderen D-Enantiomeren erheblich schneller acyliert (vgl. Tab. 15). Die erreichten Umsätze zeigen alle Werte > 95 %. Die Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) zeigt also mit Ausnahme von Ala-OtBu keine Enantiomerendifferenzierung bei der Acylierung der eingesetzten Aminosäure-*t*-butylestern. Deutlich ist diese Differenzierung beim Vergleich der Zeit-Umsatz-Kurven von D- (**R**)-**13a** und L-Ala-OtBu (**S**)-**13a** mit denjenigen von D- (**R**)-**13l** und L-Leu-OtBu (**S**)-**13l** zu erkennen (vgl. **Abb. 30**).

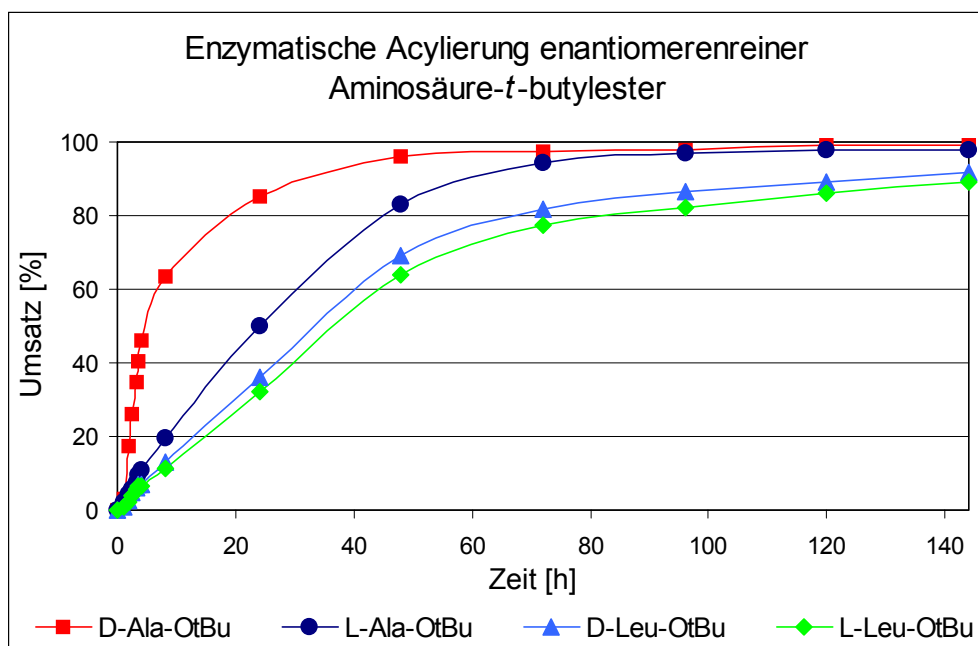


Abb. 30: Enzymatische Acylierung enantiomerenreiner Aminosäure-*t*-butylester

Bei einem Umsatz von 50 % D-Alanin (**R**)-**13a** werden nur 16 % L-Alanin (**S**)-**13a** umgesetzt. Dies ist bei D- (**R**)-**13l** und L-Leucin (**S**)-**13l** nicht mehr zu beobachten, hier sind die jeweiligen Umsätze gut vergleichbar. Ähnliches gilt für Phe-OtBu (**R**) bzw. (**S**)-**16f** und Val-OtBu (**R**) bzw. (**S**)-**16g**.

2.1.14 Enantioselektive Acylierung von 3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-**13d**

Die bei der Acylierung racemischer 3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-**13d** beobachtete Enantiomerendifferenzierung wurde näher untersucht. Dazu wurde die Acylierung in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) mit Essigester als Acyldonor und Lösungsmittel durchgeführt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels GC verfolgt und bei einem Umsatz von 50 % durch Abfiltrieren des Enzyms abgebrochen. Die Enantiomerenreinheit des *N*-Acetyl-D-3-Aminobuttersäure-*t*-butylesters (**R**)-**17** wurde mittels GC an einer Chiralphase (Cyclodex Beta-I/P) bestimmt. Eine vollständige Basislinientrennung der beiden Enantiomeren gelang nur bei den Acetylderivaten. Die Enantiomerenreinheit des verbleibenden L-3-Aminobuttersäure-*t*-butylesters (**S**)-**13d** konnte mittels GC und HPLC nicht bestimmt werden. Deshalb wurde der *t*-Butylester mit TFA in Dioxan gespalten und durch Extraktion mit Essigester vom acetylierten Produkt befreit. Die

dadurch erhaltene freie 3-Aminobuttersäure (**S**)-**18** konnte nun durch Derivatisierung mittels NGIT (vgl. Kap. 4.2.8.3) und durch Vergleich des Drehwertes auf ihre Enantiomerenreinheit überprüft werden (vgl. **Abb. 31**).

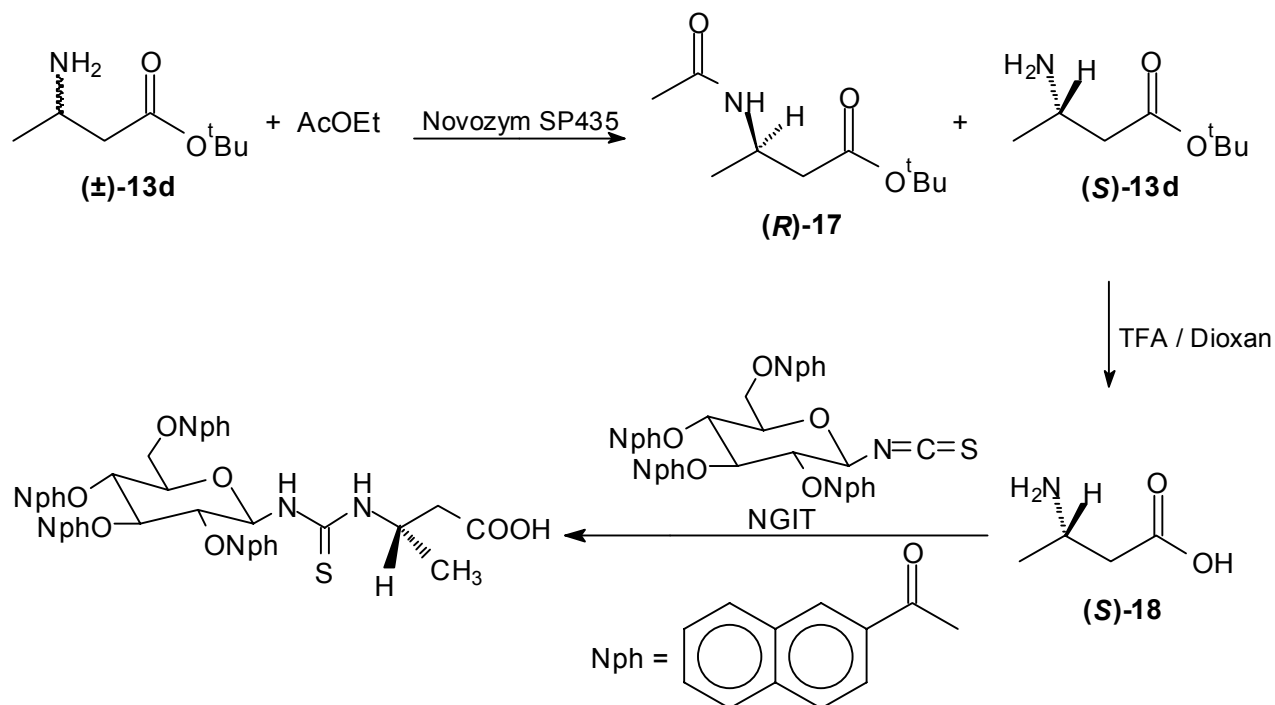


Abb. 31: Enzymatische Acylierung von DL-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (**±**)-**13d**.

Die folgende Tabelle gibt die erhaltenen Ausbeuten, Umsätze, den Enantiomerenüberschuß und die Enantioselektivität (E) bei der enzymatischen Acylierung von DL-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (**±**)-**13d** wieder (vgl. **Tab. 16**).

Tab. 16: Bestimmung der Enantioselektivität bei der enzymatischen Acylierung von DL-3-ABU-OtBu (**±**)-**13d**.

Produkte	Zeit [h]	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	ee [%]	E
L-3-ABU-OH (S)- 18a	15	47	42	68	71
<i>N</i> -Acetyl-D-3-ABU-OtBu (R)- 17a			45	93	
L-3-ABU-OH (S)- 18b	30	55	39	98	41
<i>N</i> -Acetyl-D-3-ABU-OtBu (R)- 17a			51	78	

Aus diesen Untersuchungen ergab sich, daß die enzymatische Acylierung von DL-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (**±**)-**13d** zur kinetischen Racematspaltung dieser Aminosäure sehr gut geeignet ist. Für das acylierte Produkt (**R**)-**17a** werden Enantiomerenüberschüsse von

93 % ee erreicht, und bei längeren Reaktionszeiten kann der nicht umgesetzte Ester (**S**)-**18b** mit 98 % ee erhalten werden. Durch die Bestimmung des Drehwertes der erhaltenen L-3-ABU-OH (**S**)-**18b** mit $[\alpha]_D^{20} + 38,1^\circ$ ($c=0,48$ H₂O; 98 % ee) kann durch Vergleich mit Literaturdaten¹²⁵ auch die absolute L-Konfiguration gesichert werden.

2.1.15 Einfluß der Molekülstruktur auf die enzymatische Acylierung von Aminosäure-*t*-butylestern.

Die folgende Versuchsreihe sollte klären, inwieweit die Entfernung zwischen Carboxyl- und Aminogruppe einen Einfluß auf die enzymatische Acylierung der entsprechenden Aminosäure-*t*-butylester in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) hat. Dazu wurden verschiedene Aminosäure-*t*-butylester mit Aminogruppen in α , β , γ , und ϵ Stellung zur Carboxylgruppe einer enzymatischen Acylierung unterworfen. Einbezogen wurden auch die Diaminosäuren DL-Lys-OtBu (\pm)-**13m** und DL-Orn-OtBu (\pm)-**13o**.

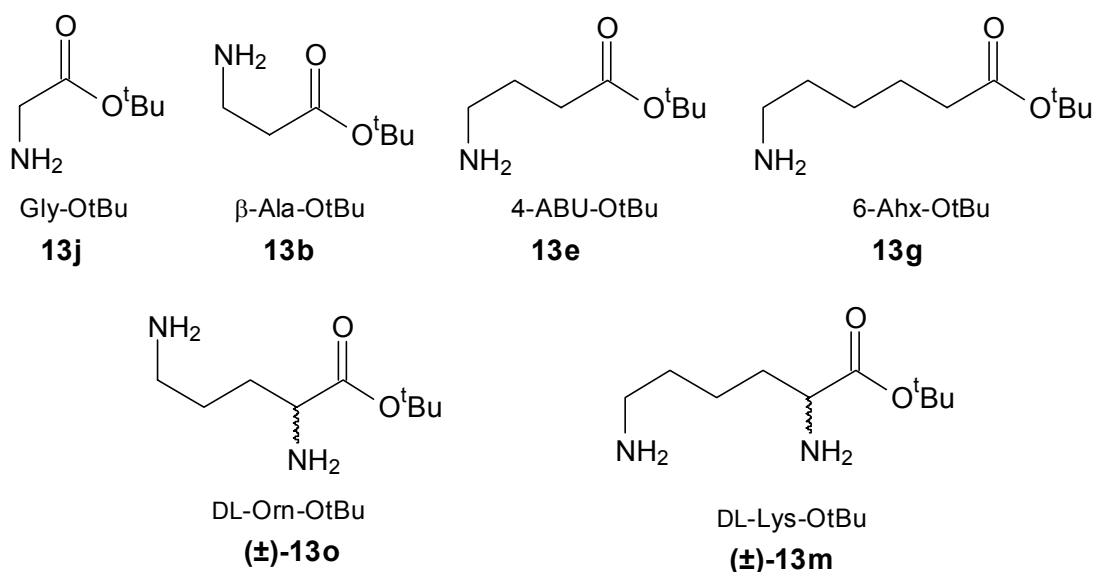


Abb. 32: Enzymatische Acylierung unterschiedlicher Aminosäure-*t*-butylester.

In einer systematischen Studie wurden jeweils 1 mmol der entsprechenden Aminosäure-*t*-butylester mit 3 ml Capronsäuremethylester (Acyldonor und zugleich Lösungsmittel) im 4 ml Gefäß enzymatisch zur Reaktion gebracht. Der Reaktionsverlauf wurde alle 10 min durch Aufnahme eines GC-Chromatogramms ermittelt. Die Ergebnisse sind in **Tab. 17** zusammengestellt.

Tab. 17: Enzymatische Acylierung unterschiedlicher Aminosäure-*t*-butylester: Einfluß des Abstandes von Carboxyl- und Aminogruppe.

Edukt	Produkt	Zeit [min]	Umsatz [%]	Spezifische Aktivität [mU/mg]
Gly-OtBu 13j	14e-9	150	98	2732
β -Ala-OtBu 13b	16i	120	98	3016
4-ABU-OtBu 13e	16j	180	97	2267
6-Ahx-OtBu 13g	16k	240	98	1428
DL-Orn-OtBu (\pm)- 13o	(\pm)- 16e	180	97	1906
DL-Lys-OtBu (\pm)- 13m	(\pm)- 16d	240	97	1442

Es wird ersichtlich, daß die Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) für β -Ala-OtBu **13b** die höchste Aktivität zeigt. Der direkte Vergleich von Gly-OtBu **13j** und β -Ala-OtBu **13b** zeigt einen Anstieg der spezifischen Aktivität. Vermutlich ist die größere Entfernung der Aminogruppe von der Carboxylfunktion für diesen Anstieg verantwortlich. Beim Übergang von β -Ala-OtBu **13b** zu 4-ABU-OtBu **13e** fällt dagegen die spezifische Aktivität. Diese Tendenz setzt sich mit zunehmender Kettenlänge fort. Bei den Diaminocarbonsäuren DL-Orn-OtBu (\pm)-**13o** und DL-Lys-OtBu (\pm)-**13m**, bei denen die δ - bzw. ϵ -Position acyliert wird, ist dieser Trend ebenfalls zu beobachten. Die Verbindungen 6-Ahx-OtBu **13g** und DL-Lys-OtBu (\pm)-**13m**, beide mit einer Aminofunktion in der ϵ -Position, werden mit vergleichbarer spezifischer Aktivität (1428 bzw. 1442 mU/mg) acyliert. Dieser Zusammenhang wird durch die graphische Darstellung deutlich (vgl. **Abb. 33**).

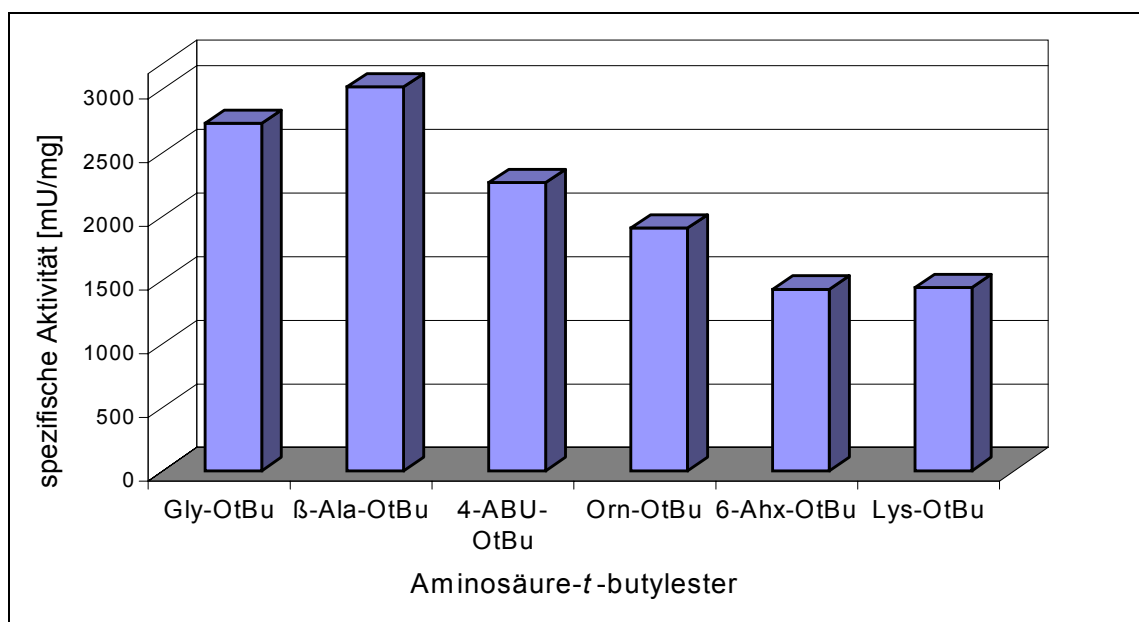
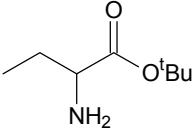
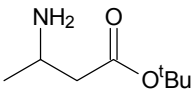


Abb. 33: Einfluß der Molekülstruktur auf die enzymatische Acylierung von unterschiedlichen Aminosäure-*t*-butylestern.

2.1.15.1 Vergleich der enzymatischen Acylierung von α - und β -Aminosäuren am Beispiel von DL-2-ABU-OtBu (\pm)-13c und DL-3-ABU-OtBu (\pm)-13d

Ein Vergleich von zwei Aminosäuren mit gleichem Molekulargewicht und vergleichbarer Struktur läßt weitere Rückschlüsse auf den Einfluß der Entfernung von Amino- und Carbonsäuregruppe zu. Wie schon in Kapitel 2.1.14 gezeigt, unterscheidet die Lipase bei DL-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-13d zwischen den beiden Enantiomeren. Hier stellt sich nun die Frage, ob a) dieses auch für DL-2-ABU-OtBu (\pm)-13c gilt, und b) welcher Unterschied zwischen einer α - bzw. β -Stellung der Aminogruppe zu beobachten ist. Dazu wurde DL-2-ABU-OtBu (\pm)-13c in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) mit Capronsäuremethylester acyliert und mit den Ergebnissen aus Kapitel 2.1.14 verglichen (vgl. **Tab. 18**).

Tab. 18: Vergleich der enzymatischen Acylierung von DL-2-ABU-OtBu (\pm)-**13c** und DL-3-ABU-OtBu (\pm)-**13d**.

Substrat	Produkt	Zeit [h]	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
DL-2-ABU-OtBu (\pm)- 13c	 (\pm)- 16l	96	97	27
DL-3-ABU-OtBu (\pm)- 13d	 (<i>R</i>)- 16h	24	50	58

Eine Enantiomerendifferenzierung wie bei DL-3-ABU-OtBu (\pm)-**13d** konnte bei DL-2-ABU-OtBu (\pm)-**13c** nicht beobachtet werden. Nach Abbruch der enzymatisch-katalysierten Acylierung von DL-2-ABU-OtBu (\pm)-**13c** bei 50 % igem Umsatz wurde (Drehwert) nur racemisches Produkt beobachtet. Die spezifischen Aktivitäten von DL-2-ABU-OtBu (\pm)-**13c** und DL-3-ABU-OtBu (\pm)-**13d** weisen ebenfalls deutliche Unterschiede auf. So wird DL-3-ABU-OtBu (\pm)-**13d** fast doppelt so schnell acyliert (58 mU/mg) wie DL-2-ABU-OtBu (\pm)-**13c** (27 mU/mg). Die hier durchgeführten Untersuchungen belegen nun, daß die Entfernung der Aminogruppe um eine weitere Position von der Carboxylgruppe zu einer Steigerung der spezifischen Aktivität führt. Ein weiteres Ergebnis dieser Versuche ist der Verlust an Enantioselektivität der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) beim Übergang von β -zur α -Aminosäure.

2.1.15.2 Einfluß unterschiedlich substituierter C-Atome in Nachbarschaft zur Aminogruppe auf die enzymatische Acylierung von Aminosäure-*t*-butylestern

Bei den ersten Versuchen zur enzymatischen Acylierung hatte sich schon angedeutet, daß die Substitution des Kohlenstoffatoms in Nachbarschaft zur Aminogruppe einen entscheidenden Einfluß auf die enzymatische Acylierung ausübt (vgl. **Tab. 14**). Beim Übergang von Glycin-*t*-butylester **13j** mit einer Aminogruppe am primären α -Kohlenstoffatom (vgl. **Tab. 17**) zu DL-Ala-OtBu (\pm)-**13a** (vgl. **Tab. 14**) zeigte sich schon eine Erniedrigung in der spezifischen Aktivität um einem Faktor von ca. 25. Im Falle von β -Ala-OtBu **13b** (vgl. **Tab. 17**) ist die spezifische Aktivität sogar ca. um den Faktor 30 höher als bei DL-Ala-OtBu (\pm)-**13a** (vgl. **Tab. 14**). Welchen Einfluß ein tertiäres Kohlenstoffatom zur Aminofunktion besitzt, wurde

durch den Einsatz von α -Aminoisobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-**13f** ermittelt. Dazu wurde 1 mmol der Aminosäure (\pm)-**13f** mit 3 ml Capronsäuremethylester (Acyldonor und zugleich Lösungsmittel) im 4 ml Gefäß mit der Lipase CAL B versetzt. Bei dieser Reaktion konnte auch nach einer Reaktionszeit von acht Tagen kein Produkt erhalten werden. Somit katalysiert die Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) bevorzugt die Acylierung von Aminogruppen, die in der Reihenfolge an prim. > sek. > tert. C-Atomen sitzen. Das hat für eine praktische Anwendung den entscheidenden Vorteil, daß sich aus einem Gemisch von Aminosäure-*t*-butylestern die Verbindungen mit Aminogruppen an primären C-Atomen (Glycin **13j**, Lysin (\pm)-**13m** und Ornithin (\pm)-**13o**) abtrennen lassen (vgl. 2.1.18).

2.1.16 Enzymatische Acylierungen proteinogener L-Aminosäure-*t*-butylester - Capronsäuremethylester als Acyldonor

Im Hinblick auf eine technische Umsetzung der enzymatischen Acylierungen von Aminosäure-*t*-butylestern wurden weitere proteinogene Aminosäurederivate eingesetzt. Analog zu den bisher durchgeführten Acylierungen wurden die jeweiligen Aminosäure-*t*-butylester mit Capronsäuremethylester als Acyldonor eingesetzt. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle zusammengefaßt (vgl. **Tab. 19**).

Tab. 19: Enzymatische Acylierungen proteinogener Aminosäure-*t*-butylester mit Capronsäuremethylester als Acyldonor.

Substrat	Produkt	Zeit [h]	Ausbeute [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
L-Asp-(OtBu)-(OtBu) (S)- 13h	(S)- 16m	192	91	8
L-Glu-(OtBu)-(OtBu) (S)- 13i	(S)- 16n	192	90	7
L-Ile-OtBu (S)- 13k	(S)- 16b	136	94	13
L-Lys-OtBu (S)- 13m	(S)- 16d	4	97 ^a	1436
L-Met-OtBu (S)- 13n	(S)- 16o	120	94	20
L-Phg-OtBu (S)- 13q	(S)- 16p	192	93	6
L-Ser-(tBu)-OtBu (S)- 13r	(S)- 16q	168	95	7
L-Tyr-OtBu (S)- 13s	(S)- 16r	192	92	5

a) Acylierung der ϵ -Aminogruppe.

Die aromatischen Aminosäuren L-Phg-OtBu (**S**)-**13q** und L-Tyr-OtBu (**S**)-**13s** lösen sich nur teilweise in reinem Capronsäuremethylester und werden nur mit einer geringen spezifischen Aktivität von 5-6 mU/mg acyliert. Im Verlauf der Reaktion werden allerdings die Edukte dem Gleichgewicht entzogen, so daß gegen Ende der Reaktion alles gelöst und acyliert ist. Die Aminodicarbonsäurederivate L-Asp-(OtBu)-OtBu (**S**)-**13h** und L-Glu-(OtBu)-OtBu (**S**)-**13i** und auch L-Ser-(tBu)-OtBu (**S**)-**13r** werden mit spezifischen Aktivitäten zwischen 7-8 mU/mg acyliert. Sie liegen damit zwischen den aromatischen und aliphatischen Aminosäuren. L-Met-OtBu (**S**)-**13n** wird mit ca. 20 mU/mg schnell acyliert.

2.1.17 Enzymatische Acylierungen proteinogener L-Aminosäure-*t*-butylester mit Laurinsäure-methylester

Für eine praktische Anwendung sind insbesondere die *N*-Lauroyl-Aminosäuren interessant, da diese Fettsäure sich vielfach für Anwendungen im Tensidbereich bewährt hat. Dazu wurden die L-Aminosäure-*t*-butylester der proteinogenen Aminosäuren der enzymatischen Acylierung unterworfen. Analog zu dem in Kapitel 2.1.16 beschriebenen Verfahren wurde Laurinsäuremethylester als Acyldonor ohne weiteres Lösungsmittel eingesetzt. Die folgende Tabelle gibt die Reaktionszeiten, Umsätze und die spezifischen Aktivitäten wieder (vgl. **Tab. 20**).

Tab. 20: Enzymatische Acylierungen proteinogener L-Aminosäure-*t*-butylester mit Laurinsäuremethylester.

Substrat	Produkt	Zeit [h]	Ausbeute [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
L-Ala-OtBu (S)- 13a	(S)- 19a	72	91	32
L-Asp-(OtBu)-OtBu (S)- 13h	(S)- 19b	216	88	6
L-Glu-(OtBu)-OtBu (S)- 13i	(S)- 19c	216	86	5
Gly-OtBu 13j	14-k2	4	95	2016
L-Ile-OtBu (S)- 13k	(S)- 19d	144	91	10
L-Leu-OtBu (S)- 13l	(S)- 19e	144	93	11
L-Lys-OtBu (S)- 13m	(S)- 19f	6	95	1067
L-Met-OtBu (S)- 13n	(S)- 19g	96	92	15
L-Phe-OtBu (S)- 13p	(S)- 19h	216	93	5
L-Phg-OtBu (S)- 13q	(S)- 19i	216	92	5
L-Ser-(tBu)-OtBu (S)- 13r	(S)- 19j	192	90	5

Substrat	Produkt	Zeit [h]	Ausbeute [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
L-Tyr-OtBu (S)- 13s	(S) - 19k	216	82	5
L-Val-OtBu (S)- 13t	(S) - 19l	144	92	9

Die enzymatischen Acylierungen mit Laurinsäuremethylester gelangen durchweg mit Ausbeuten von > 82 %. Die Aminosäuren Gly-OtBu **13j** und L-Lys-OtBu (**S**)-**13m** wurden im Vergleich zu allen anderen Edukten besonders schnell (3 bzw. 6 h) vollständig acyliert (L-Lys-OtBu (**S**)-**13m** in der ϵ -Position). Im Vergleich zu Capronsäuremethylester wurden alle weiteren Aminosäure-*t*-butylester mit einer etwas geringeren spezifischen Aktivität von Novozym SP435 acyliert. Die besonders geringe spezifische Aktivität von L-Tyr-OtBu (**S**)-**13s** läßt sich wahrscheinlich auf die schlechte Löslichkeit im Acyldonor zurückführen, aber auch hier war nach Abbruch der Reaktion quantitativer Umsatz zu beobachten.

2.1.18 Selektive Acetylierung von Gly-OtBu **13j** und L-Lys-OtBu (**S**)-**13m**

Die rasche Acylierung der Aminogruppen (vgl. Tab. 20) von Gly-OtBu **13j** und L-Lys-OtBu (**S**)-**13m** konnte für deren selektive Abtrennung aus einem Gemisch mit den L-Aminosäure-*t*-butylestern von Phe (**S**)-**13p**, Gly **13j**, Tyr (**S**)-**13s**, Leu (**S**)-**13l**, Lys (**S**)-**13m** und Val (**S**)-**13t** genutzt werden (vgl. Abb. 34).

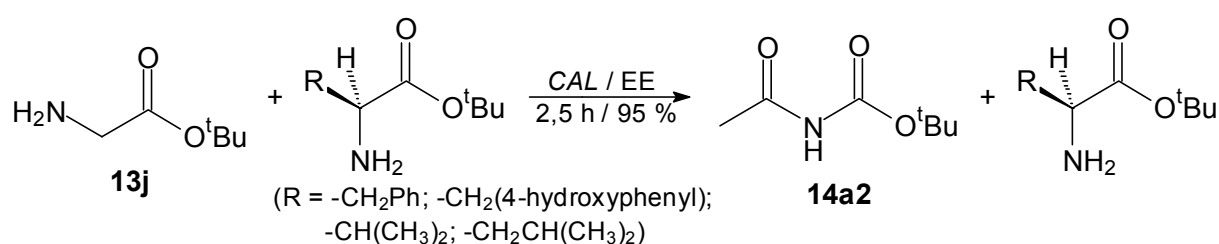


Abb. 34: Selektive Acylierung von Gly-OtBu **13j** aus einem Gemisch verschiedener Aminosäure-*t*-butylester.

Dazu wurden jeweils in zwei unterschiedlichen Reaktionsansätzen 1 mmol Gly-OtBu **13j** bzw. L-Lys-OtBu (**S**)-**13m** mit 4 x 1 mmol der anderen L-Aminosäure-*t*-butylester in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) acyliert. Essigester diente dabei als Acyldonor und Lösungsmittel. Nach einer Reaktionszeit von 2,5 h war ein Umsatz an *N*-

Acetylglycin-*t*-butylester **14a2** von > 95 % (GC) erreicht. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel konnte *N*-Acetyl-Gly-OtBu **14a2** mit einer isolierten Ausbeute von 75 % erhalten werden. Der Reaktionsansatz mit L-Lys-OtBu (**S**)-**13m** wurde nach 4 h Reaktionszeit mit Umsätzen von > 92 % (GC) beendet und nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel konnte L-Lys-(Ac)-OtBu (**S**)-**20** mit 63 % Ausbeute erhalten werden.

2.1.19 Präparative Synthese von *N*-Caproylglycin-*t*-butylester **14e**

Es sollte nun an einem Beispiel gezeigt werden, daß sich nach dem oben beschriebenen Verfahren auch große Mengen an *N*-Acylierten Aminosäure-*t*-butylester in hohen Ausbeuten darstellen lassen. Dazu wurden 9,6 g (73,2 mmol) Glycin-*t*-butylester **13j** mit 32,4 ml (220 mmol) Capronsäuremethylester (Acyldonor und zugleich Lösungsmittel) vermischt und nach Zugabe von 0,5 g Novozym SP435 die Reaktion bei 70°C gestartet. Nach 3 Stunden Reaktionszeit wurde vom Enzym abfiltriert und der überschüssige Acyldonor im Ölpumpenvakuum an der Kugelrohdestille abdestilliert. Man erhielt 15,9 g (69,6 mmol, 95 %) *N*-Caproylglycin-*t*-butylester **14e**.

2.1.20 Kontinuierliche enzymatische Acylierung von Glycin-*t*-butylester **13j** in einem Säulenreaktor

In Hinblick auf eine technische Umsetzung der enzymatischen Acylierung von Aminosäure-*t*-butylestern in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) wurde ein kontinuierliches Verfahren in einem Säulenreaktor entwickelt. Dazu wurde eine temperierbare Glassäule mit einem Volumen von ca. 15 ml verwendet, die mittels eines Ölthermostaten auf 90°C beheizt werden kann. Für die enzymatischen Acylierungen wurde 5,5 g der immobilisierten Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) in die Säule gefüllt und die Reaktionsmischungen mittels einer Schlauchpumpe über die Säule gepumpt. Zur Verfolgung der enzymatischen Acylierung und damit auch zur Bestimmung der Enzymstabilität wurde in einem Temperaturbereich zwischen 70°C und 90°C gearbeitet. Die Reaktionen wurden mit den Substrat-Acyldonor-Verhältnissen von 1:10, 1:3 und 1:1 bei unterschiedlichen Flußraten durchgeführt. Als Substrat diente hier zunächst Gly-OtBu **13j** mit Capronsäuremethylester als Acyldonor, die in dem jeweiligen Verhältnis vorgemischt und wegen besserer Benetzung am Immobilisat von unten über die Säule gepumpt wurden. Die

Reaktionszeiten wurden mittels den Flußraten der eingesetzten Schlauchpumpe variiert. Die folgende Tabelle gibt die Umsätze bei den jeweiligen Reaktionszeiten, Mischungsverhältnissen und entsprechenden Säulentemperaturen wieder (vgl. **Tab. 21**).

Tab. 21: Enzymatische Acylierung von Gly-OtBu **13j** in einem Säulenreaktor; Temperatur, Mischungsverhältnis, Reaktionszeit und Umsatz.

Säulentemperatur	Verhältnis Substrat:Acyldonor	Zeit [min] / Umsatz [%]		
70°C	1:1	15 / 85,2	30 / 88,4	85 / 88,6
	1:3	15 / 98,1	30 / 99,6	85 / 99,5
	1:10	15 / 99,4	30 / 99,7	85 / 99,7
80°C	1:1	15 / 87,6	30 / 92,3	85 / 92,6
	1:3	15 / 98,6	30 / 99,0	85 / 99,1
	1:10	15 / 98,9	30 / 99,0	85 / 99,2
90°C	1:1	15 / 92,1	30 / 93,5	85 / 94,0
	1:3	15 / 99,2	30 / 99,2	85 / 99,4
	1:10	15 / 99,5	30 / 99,5	85 / 99,6

Bei Substrat-Acyldonor-Verhältnissen von 1:10 und 1:3 konnte bei der Acylierung von Gly-OtBu **13j** in Capronsäuremethylester bei 70°C, 80°C und 90°C bereits nach 15 min > 97% Umsatz erhalten werden. Von besonderem technischen Interesse ist natürlich ein Verhältnis von 1:1, da hierbei mit equimolaren Mengen gearbeitet werden kann und somit eine Abtrennung des überschüssigen Acyldonors nicht erforderlich ist. Bei 70°C konnten auf diese Weise noch Umsätze von 85 % erreicht werden. Bei Reaktionstemperaturen von 80°C und 90°C werden nach 15 min sogar Umsätze von 87 % bzw. 92 % beobachtet. Hierbei wird das Reaktionsgleichgewicht während der Reaktion zum Produkt hin verschoben, da sich das entstehende Methanol am Kopf der Säule sammelt und damit aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Einen Überblick über diese Reaktionen mit unterschiedlichen Verweilzeiten bei einem Mischungsverhältnis von 1:1 gibt die folgende **Abb. 35** wieder.

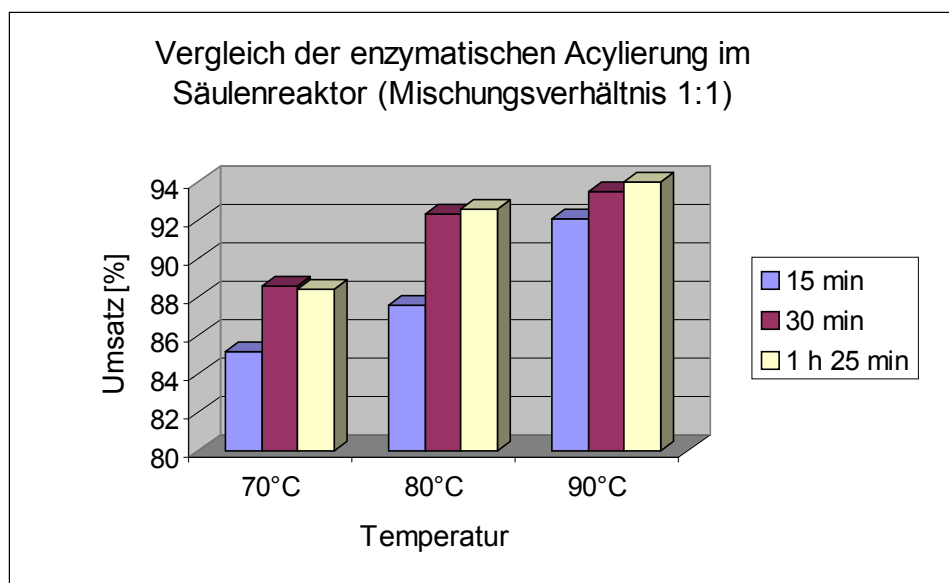


Abb. 35: Enzymatische Acylierungen im Säulenreaktor.

Deutlich zeigt sich hier die Steigerung des Umsatzes beim Übergang von 70°C zu 90°C. Dies ist vermutlich nicht nur auf die höhere Aktivität der Lipase zurückzuführen, sondern auch auf das schon erwähnte Abdestillieren des Methanols. Die Enzymstabilität der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) wurde bei den Arbeiten im “Batch-Verfahren“ (vgl. Kapitel 2.1.16) mit 70 °C als optimal ermittelt. Nach einer Verweildauer des Enzyms von 48 h in der Säule bei der jeweiligen Temperatur wurde auch hier die Enzymstabilität bestimmt. Dazu wurde 1 mmol Gly-OtBu **13j** in Monoglyme mit Buttersäuremethylester mit dem jeweils aus der Säule entnommenen Novozym SP435 enzymatisch acyliert. Die folgende Tabelle gibt die entsprechenden spezifischen Aktivitäten bei der jeweiligen Temperatur wieder (vgl. **Tab. 22**).

Tab. 22: Bestimmung der Enzymstabilität der Säulenreaktorversuche.

Spez. Aktivität [mU/mg]	70°C	80°C	90°C	Ausgangsaktivität
	1099	1054	441	1102

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß im Säulenreaktor bei einer Reaktionstemperatur von 80°C ohne wesentlichen Aktivitätsverlust gearbeitet werden kann. Exemplarisch wurde nun Leu-OtBu mit Capronsäuremethylester im Substrat-Acyldonor-Verhältnis 1:3 im Säulenreaktor enzymatisch acyliert. Nach einer Reaktionszeit von 85 min konnte hier bereits ein Umsatz zum acylierten Produkt von ca. 15 % beobachtet werden. Mit diesem Verfahren

lassen sich also auch die Aminosäure-*t*-butylester, die im "Batch-Verfahren" mehrere Tage für die enzymatische Acylierung benötigten, in einigen Stunden umsetzen. Im Hinblick auf eine industrielle Anwendung ist die Entwicklung eines Schleifenreaktors geplant, in dem auch der entstehende Alkohol direkt abdestilliert werden kann.

2.1.21 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Verfahren zu Lipase-katalysierten *N*-Acylierung von Aminosäureestern entwickelt. Durch den Einsatz von *t*-Butylestern (\pm)-**13a-t** konnten im Gegensatz zu den entsprechenden Methyl- (\pm)-**4a-f**, Ethyl- (\pm)-**5a-e**, *iso*-Propyl- (\pm)-**3a-e** und Benzylestern (\pm)-**1a-f** unerwünschte Nebenreaktionen (Hydrolyse, Diketopiperazinbildung) vollständig unterdrückt werden. Die Synthesen dieser *t*-Butylester (\pm)-**13a-t** gelangen ausgehend von den *Z*-geschützten Aminosäurederivaten (\pm)-**11a-o** mittels *t*-Butanol, wasserfreiem MgSO₄ und H₂SO₄ als Katalysator. Im Rahmen einer systematischen Studie konnten für die Acylierung von Glycin-*t*-butylester **13j** aus 48 unterschiedlichen Lipasepräparationen die immobilisierte Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) als am besten geeignetes Enzym ermittelt werden. Durch Optimierung der Acylierungen von Aminosäure-*t*-butylestern hinsichtlich Lösungsmittel, Acyldonatoren, Substrat-Acyldonor-Verhältnis, Temperaturabhängigkeit, Enzym-Substrat-Verhältnis und der Enzymstabilität konnte z. B. *N*-Lauroylglycin-*t*-butylester **14k** nach einer Reaktionszeit von vier Stunden mit einer Ausbeute von 95 % erhalten werden (vgl. **Tab. 20**).

In einer umfangreichen Studie konnte auch eine Vielzahl proteinogener (**S**)-**13a-t** und nicht-proteinogener Aminosäure-*t*-butylester (\pm)-**13b-g,o** in unterschiedlichen Reaktionszeiten mit Ausbeuten von bis zu 95 % erhalten werden. Aminosäure-*t*-butylester mit einer Aminogruppe an einem primären Kohlenstoffatom (\pm)-**13a-t** wurden dabei im Vergleich zu den Verbindungen mit Aminogruppe an einem sekundären Kohlenstoffatom **13b,e,g,j** sehr schnell acyliert. Dadurch konnten Gly-OtBu **13j** und Lys-OtBu (**S**)-**13lm** selektiv aus einer Mischung unterschiedlicher L-Aminosäure-*t*-butylester (**S**)-**13l,p,t** jeweils **14a2** und (**S**)-**20** mit Ausbeuten von 75 % bzw. 63 % erhalten werden. Durch den Einsatz racemischer (\pm)-**13a,d,k-p,t** und enantiomerenreiner (**R**)- bzw. (**S**)-**13a,l,p,t** Aminosäure-*t*-butylester konnte bewiesen werden, daß die Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SP435) zwischen enantiomeren α -Aminosäuren nicht differenzieren kann. Bei der β -Aminosäure (\pm)-**13d** konnte dagegen hohe

Enantioselektivität beobachtet werden. Je nach Reaktionsführung konnten so Enantiomerenreinheiten für *N*-Acetyl-D-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (**R**)-**17a** mit 93 % ee und 98 % ee für die verbleibende L-3-Aminobuttersäure (**S**)-**18b** erreicht werden. Der Einfluß der Molekülstruktur bei Lipase-katalysierten Acylierungen von Aminobuttersäure-*t*-butylestern konnte durch den Einsatz von **13b,e,g,j** und (\pm)-**13m,o** beobachtet werden. So zeigte die Lipase ihre höchste Aktivität bei der β -Aminosäure **13b**, die Aktivität fiel aber sowohl beim Übergang zur α -Aminosäure **13j** als auch bis hin zur ε -Aminosäure **13g** und (\pm)-**13m** deutlich ab.

Nach der gelungenen Erarbeitung der (bisher in der Literatur nicht beschriebenen) enzymatisch-katalysierten Acylierung von Aminosäure-*t*-butylestern in Gegenwart von *Candida antarctica* B (Novozym SP435) wurde im Hinblick auf eine technische Umsetzung ein kontinuierliches Verfahren in einem Säulenreaktor entwickelt. Dieses Verfahren benötigt im Vergleich zum "Batch-Reaktor" keinen Aufarbeitungsschritt, da mit equimolaren Mischungen von Substrat und Acyldonor gearbeitet werden kann. Durch die große Enzymmenge in der Säule wird die Reaktionszeit stark verringert, so daß schon nach 30 min bei einer Säulentemperatur von 80°C ein Umsatz von > 92 % an *N*-Caproylglycin-*t*-butylester **14e** beobachtet werden kann. Die Konstruktion eines verbesserten Säulenreaktors ("loop-reaktors") ist in Arbeit.

2.2 Enzymatische Acylierungen von freien underivatisierten Aminosäuren

2.2.1 Einleitung

Neben der enzymatisch-katalysierten Acylierung von Aminosäureestern (vgl. 2.1) ist die direkte Übertragung von Fettsäuren auf Aminosäuren in einem einzigen Reaktionsschritt von großem, praktischem Interesse. Die Produkte können sofort und ohne weitere Bearbeitung als anionische Tenside eingesetzt werden, so in der Kosmetik⁵⁶, der Textiltechnik¹²⁶ und in Spül- und Reinigungsmitteln.¹²⁷ Aufgrund der in Zukunft immer stärker wachsenden Nachfrage nach rein biokatalytischen Prozessen bietet sich die Synthese von *N*-Acylaminosäuren auf enzymatisch-katalysiertem Wege geradezu an.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zunächst versucht, durch den Einsatz von Acylasen und Proteasen eine biokatalytische Synthese von *N*-Acylaminosäuren zu entwickeln.

Weiterhin wurde auf der Basis verschiedener Solubilisierungstechniken nach Verfahren zu enzymatisch-katalysierten Acylierungen von Aminosäuren in Gegenwart von Lipasen gesucht.

2.2.2 Acylase-katalysierte Acylierung von Aminosäuren

Acylasen gehören zur Enzymklasse EC 3.5. Sie katalysieren enantioselektiv die Hydrolyse *N*-acylierter Aminosäuren zu freien Aminosäuren¹²⁸. Die kinetische Racematspaltung von *N*-Acetyl-DL-aminosäuren durch Aminoacylasen ist ein zuerst in Japan industriell eingesetztes Verfahren¹²⁹, Herstellung von L-Aminosäuren. Man kann hier kontinuierlich arbeiten, so daß durch Einbeziehung eines Racemisierungsschrittes hohe Ausbeuten erzielt werden (vgl. **Abb. 36**)¹³⁰.

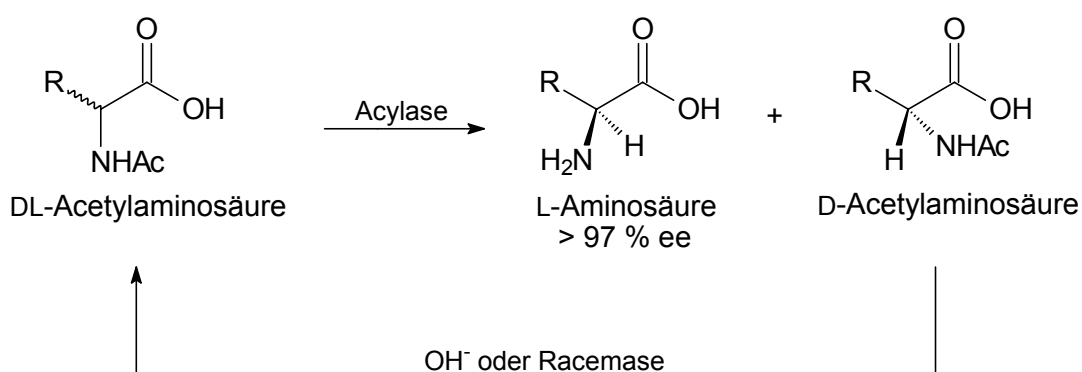


Abb. 36: Acylase-katalysierte Racematspaltung von *N*-Acetylaminosäuren¹³⁰.

Kommerziell erhältliche Aminoacylasen aus *Aspergillus species* bzw. *Hog Kidney* weisen eine hohe Selektivität für L- α -Aminosäuren auf. Sie hydrolysieren mehr als 50 verschiedene *N*-Acylaminosäuren¹³¹. Die Hydrolyse in Gegenwart der Acylasen wurde bisher sehr umfangreich in Bezug auf unterschiedliche Aminosäurereste untersucht. Die Variation der *N*-Acylkette beschränkte sich in der Regel auf *N*-Acetyl-, *N*-Chloracetyl-, *N*-Trifluoracetyl-, und *N*-Methoxyacetyl-derivate¹³². Dabei zeigten die Acylasen mit einem *N*-Acetyl- und *N*-Chloracetylrest die höchsten Aktivitäten. Inwieweit länger-kettige *N*-Acylreste für Acylasen-katalysierte Hydrolysen geeignet sind, konnte durch die folgenden Versuche bestimmt werden.

2.2.2.1 Hydrolysen von *N*-Acylaminosäuren mit Acylasen

Da Acylasen für die enantioselektive Hydrolyse racemischer *N*-Acylaminosäuren weit verbreitet eingesetzt und zur Herstellung enantiomerenreinen Aminosäuren auch technisch verwendet werden, kann man mit Einschränkungen davon ausgehen, daß aufgrund der Reversibilität enzymatischer Reaktionen (hier die Hydrolyse) möglicherweise auch die Rückreaktion durch diese Enzyme katalysiert wird.

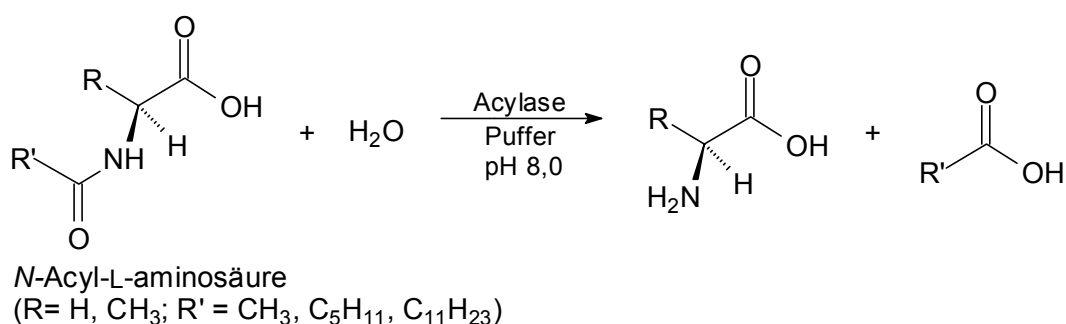


Abb. 37: Hydrolyse von *N*-Acyl-L-aminosäuren mit Acylasen

Durch die Hydrolyse entsprechender *N*-Acylaminosäuren in Gegenwart der Acylasen aus *Hog Kidney* und *Aspergillus* sollten Informationen über die Substrattoleranz dieser Enzyme gewonnen werden. Zur Hydrolyse wurde dazu jeweils 1 mmol der entsprechenden *N*-Acyl-L-aminosäure bei Raumtemperatur in einem Phosphat-Puffer mit dem entsprechenden Enzym versetzt. Der pH-Wert des Phosphat-Puffers wurde entsprechend den optimalen Hydrolyse-Bedingungen des jeweiligen Enzyms gewählt. Der Umsatz wurde mittels HPLC (RP-Bedingungen) bestimmt.

Tab. 23: Acylasen-katalysierte Hydrolyse von *N*-Acyl-L-aminosäuren: Substrat, Phosphat-Puffer, Reaktionszeiten und Umsatz.

Enzym	Substrat	Puffer	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]
Hog Kidney	<i>N</i> -Acetyl-Gly	0.1 M pH 7.8	2	> 97
	<i>N</i> -Caproyl-Gly		24	< 5
	<i>N</i> -Acetyl-L-Ala		2	> 97
	<i>N</i> -Caproyl-L-Ala		24	< 5
	<i>N</i> -Lauroyl-L-Ala		24	-
Aspergillus	<i>N</i> -Acetyl-Gly	0.1 M	2	> 97
	<i>N</i> -Caproyl-Gly		24	< 5

Enzym	Substrat	Puffer	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]
	<i>N</i> -Acetyl-L-Ala	pH 8.0	2	> 97
	<i>N</i> -Caproyl-L-Ala		24	< 5
	<i>N</i> -Lauroyl-L-Ala		24	-

Die Acylasen aus *Hog Kidney* und *Aspergillus* hydrolysieren die beiden *N*-Acetylderivate, wie zu erwarten war, sehr schnell¹³³, weisen aber bei den *N*-Caproylderivaten eine sehr geringe Aktivität auf (nach 24 h ca. 5 %). Hydrolyse der Lauroylderivate wurde überhaupt nicht beobachtet. Schließt man nun von diesen Ergebnissen auf die Umkehrreaktion, also die enzymatische Acylierung von Aminosäuren, so erscheinen beide Acylasen grundsätzlich dafür geeignet, jedoch nur für die Acetylierung.

2.2.2.2 Enzymatische Acylierungen in Gegenwart von Aminoacylasen

Während die kinetische Racematspaltung von *N*-Acylaminosäuren durch Hydrolyse in Gegenwart von Acylasen zur Herstellung enantiomerenreiner Aminosäuren umfangreich in der Literatur beschrieben ist, findet man für die enzymatische Acylierung von Aminosäuren nur wenige Beispiele (vgl. **Abb. 38**).^{134, 135, 136}

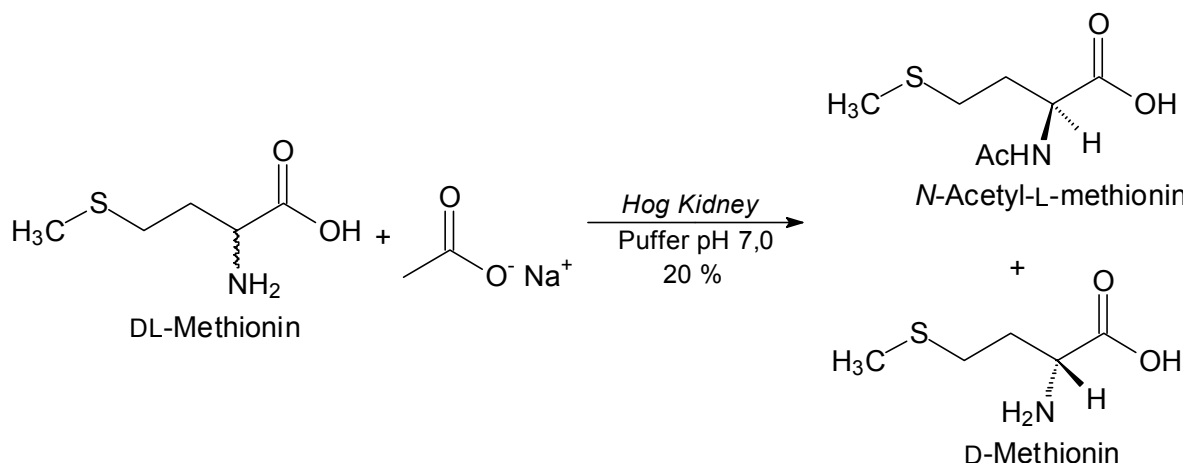


Abb. 38: Enzymatische Acylierung von L-Methionin¹³⁴.

So beschreiben Yokoigawa et al.¹³⁵ die Acetylierung von L-Methionin in Gegenwart der Aminoacylase I aus *Hog Kidney* mit Natriumacetat in Essigester mit 3.2 % (w/w) Wassergehalt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ausbeuten von bis zu 90 % wurden mittels HPLC bestimmt. Allerdings erwiesen sich unsere Versuche zur Reproduktion dieser

Ergebnisse als erfolglos. Es war weder möglich, DL-Methionin in Essigester zu lösen, noch konnte durch eine Variation der Reaktionsbedingungen ein Umsatz zum gewünschten Produkt beobachtet werden. Auch ließ sich *N*-Acetyl-L-methionin in dem angegebenen Lösungsmittel in Gegenwart dieser Acylase nicht hydrolysieren. Eine vielversprechende Synthese von *N*-Acetyl-L-methionin wird von Kosáry et al.¹³⁶ beschrieben. Dabei wird DL-Methionin in Gegenwart der Acylase I aus *Hog Kidney* mit equimolaren Mengen Natriumacetat in apolaren Lösungsmitteln DMF bzw. Dioxan acetyliert. In Dioxan wurden hierbei nach 72 h Reaktionszeit Ausbeuten von max. 25 % erhalten. Die höchsten Ausbeuten wurden in DMF und Dioxan mit 1 % (w/w) Wassergehalt erhalten. Wird der Wassergehalt auf 4 bzw. 5 % (w/w) erhöht, so findet man keinen Umsatz mehr. Ferjancic-Biagini et al.¹³⁴ beschreiben die enzymatische Acylierung von L-Methionin in Gegenwart der Acylase I aus *Hog Kidney* in einem wässrigen Puffersystem. Sie verwendeten hier die Natriumsalze der Carbonsäuren mit Kettenlängen < C-6 als Acyldonatoren. Nach 17 h Reaktionszeit wurde dabei unter Verwendung von Buttersäure-Natrium Salz als Acyldonor eine Ausbeute von 34 % erzielt, wiederum bestimmt durch HPLC-Analyse. Auf der Basis dieser Arbeiten und den eigenen Hydrolyseexperimenten wurden nun Versuche zur enzymatischen Acylierung von Aminosäuren in Gegenwart von Acylasen durchgeführt.

2.2.2.3 Enzymatische Acylierung von L-Methionin in organischen und wässrigen Lösungsmitteln

Für die enzymatischen Acylierungen wurden die kommerziell verfügbaren Acylasen aus *Aspergillus melleus*, *Hog Kidney*, *Aspergillus species* und aus *Aspergillus* (immobilisiert) eingesetzt. Die enzymatischen Acylierungen wurden zunächst in apolaren, organischen Lösungsmitteln mit einem Wassergehalt von 1-4 % (w/w) durchgeführt. In einer systematischen Studie wurden jeweils 3 mmol L-Methionin und 3 mmol Natriumacetat als Acyldonor in den Lösungsmitteln DMF und Dioxan suspendiert und die Mischungen mit 10 mg des jeweiligen Enzyms versetzt. Zur Enzymaktivierung wurden 10 μ M ZnCl₂ zugesetzt. Nach 24 und 48 Stunden Reaktionszeit bei 37°C wurden Proben entnommen und mittels HPLC untersucht. Die Ergebnisse sind in der **Tab. 24** zusammengestellt.

Tab. 24: Enzymatische Acetylierung von L-Methionin mit Natriumacetat in apolaren organisch Lösungsmitteln.

Acylase aus	Lösungsmittel	Wassergehalt [%]	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]
<i>Aspergillus melleus</i>	Dioxan	1	24	13
		2	24	6
		3	48	3
		4	48	0
	DMF	1	24	11
		2	24	6
		3	48	2
		4	48	1
<i>Aspergillus species</i>	Dioxan	1	24	12
		2	24	7
		3	48	3
		4	48	0
	DMF	1	24	12
		2	24	7
		3	48	2
		4	48	1
<i>Aspergillus immobilisiert</i>	Dioxan	1	24	20
		2	24	11
		3	48	5
		4	48	0
	DMF	1	24	25
		2	24	11
		3	48	4
		4	48	2
Hog Kidney	Dioxan	1	24	12
		2	24	7
		3	48	3
		4	48	0
	DMF	1	24	13
		2	24	7
		3	48	3
		4	48	2

Der höchste Umsatz wird in Gegenwart der immobilisierten Acylase aus in DMF (1% H₂O) *Aspergillus* mit 25 % beobachtet. Die anderen (nicht immobilisierten) Acylasen zeigen maximale Umsätze von nur 13 %. Wird der Wasseranteil bis auf 4 % erhöht, so sinkt der Umsatz vielfach auf 0 % ab. Eine Verlängerung der Reaktionszeiten auf 72 h brachte keine signifikante Umsatzsteigerung. Auch eine Erhöhung der Acyldonorkonzentration erbrachte keine Umsatzverbesserung. Essigester wurde als Acyldonor nicht akzeptiert. Enzymatische Acylierungen in Gegenwart der Acylase aus *Aspergillus* (immobilisiert) wurden darüber hinaus auch noch in den Lösungsmitteln DMSO, Acetonitril und Pyridin mit einem Wassergehalt von jeweils 1 % H₂O durchgeführt. Hierbei wurden außer in DMSO mit max.

6 % Umsatz keine Produkte nachgewiesen. Bei Reaktionsansätzen in trockenen Lösungsmitteln wurden ebenfalls keine Produkte beobachtet. Der Einsatz von Natriumbutyrat als Acyldonor ergab in DMF mit *Aspergillus* (immobilisiert) einen Umsatz von 16 %. Natriumcaprylat wurde von keiner Acylase akzeptiert.

Weitere enzymatische Acylierungen wurden nach Ferjancic-Biagini et al.¹³⁴ in einem wässrigen Puffersystem durchgeführt. Dazu wurde L-Methionin in einem 200 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) in Gegenwart der bekannten Acylasen zu *N*-Acetyl-L-methionin umgesetzt. Als Acyldonatoren dienten Natriumacetat, Natriumbutyrat und Natriumcaprylat. Zur Enzymaktivierung wurde 10 μ M ZnCl₂ zugesetzt. Die Ergebnisse dieser enzymatischen Acylierungen sind in der **Tab. 25** zusammengestellt.

Tab. 25: Enzymatische Acetylierung von L-Methionin in Natriumphosphat-Puffer.

Acylase aus	Acyldonor	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]
<i>Aspergillus melleus</i>	Natriumacetat	48	8
	Natriumbutyrat	72	5
	Natriumcaprylat	72	2
<i>Aspergillus species</i>	Natriumacetat	48	8
	Natriumbutyrat	72	6
	Natriumcaprylat	72	2
Aspergillus immobilisiert	Natriumacetat	48	7
	Natriumbutyrat	72	6
	Natriumcaprylat	72	1
<i>Hog Kidney</i>	Natriumacetat	48	6
	Natriumbutyrat	72	7
	Natriumcaprylat	72	3

Dabei konnten die in der Literatur¹³⁴ berichteten Umsätze von 18-34 % keinesfalls reproduziert werden. Den höchsten Umsatz zeigte die Acylase aus *Aspergillus melleus* mit 8 %. Für alle *Aspergillus* Acylasen beobachtet man beim Übergang vom Acetat zum Butyrat eine Verringerung des Umsatzes, der sich beim Übergang zum Caprylat weiter fortsetzt. Im Falle der Acylase aus *Hog Kidney* ist eine Steigerung vom Acetat zum Butyrat zu beobachten, allerdings fällt der Umsatz bei Verwendung von Caprylat wieder ab. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Fortführung der enzymatischen Acylierung in Gegenwart von Acylasen aus *Aspergillus* und *Hog Kidney* nicht weiter verfolgt. Entsprechende Versuche in einem Zweiphasensystem bzw. in wässrigen Systemen mit verschiedenen Kosolventien zeigten keinen Erfolg.

2.2.3 Enzymatische Acylierungen mit Penicillin Acylasen

Penicillin-Acylasen (E.C. 3.5.1.11) werden in der pharmazeutischen Industrie zur Herstellung von 6-Aminopenicillansäure¹³⁷ etc. verwendet. Das sind Ausgangsmaterialien für semisynthetische Penicilline und Cephalosporine¹³⁷ (vgl. **Abb. 39**).

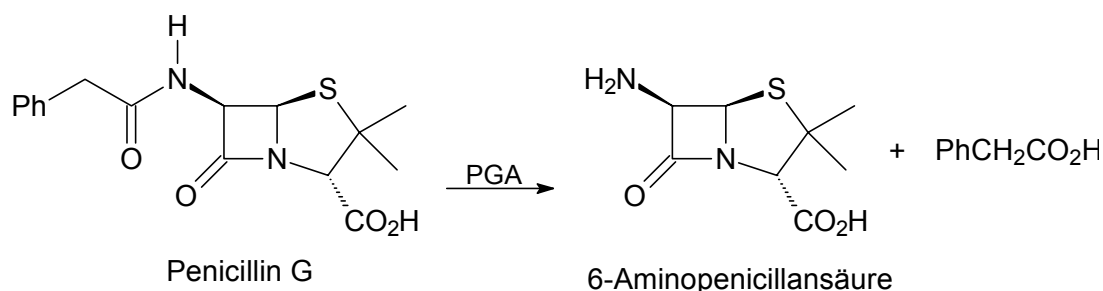


Abb. 39: Enzym katalysierte Synthese von 6-Aminopenicilliansäure¹³⁷.

Von 6-Aminopenicillansäure werden schätzungsweise 7000 t im Jahr 2000 hergestellt¹³⁸. Typisch für die Penicillin Acylasen ist die hohe Spezifität hinsichtlich des Phenylelessigsäurerests. So wird die Spaltung von Phenylelessigsäureresten von α -Aminosäuren¹³⁹, β -Aminosäuren¹⁴⁰, Peptiden¹⁴¹, Aminen¹⁴² und Alkoholen¹⁴³ mit L-Konfiguration bevorzugt katalysiert.

Neben diesen hydrolytischen Eigenschaften der Penicillin Acylase rücken immer stärker die synthetischen Eigenschaften in den Vordergrund, so zur Einführung von Schutzgruppen in der Peptidsynthese.¹⁴⁴ Penicillin Acylasen tolerieren nur kleine Strukturänderungen auf Seiten des Acyldonors, weisen aber auf der Amin- und Alkoholseite eine hohe Substrattoleranz auf¹⁴⁵. Dadurch können zur Hydrolyse von Phenylelessigsäuregruppen, von *N*- α -Aminogruppen¹⁴⁶ und der *N*- ϵ -Aminogruppe von Lysin¹⁴⁷ in der Peptidchemie eingesetzt werden. Enzymatische Synthesen von Amidbindungen in Gegenwart von Penicillin Acylase in wässrigen Puffer- und organisch/wässrigen Puffersystemen wurde von Luisi et al.¹⁴⁸ intensiv untersucht, ein pH-Bereich zwischen 5,0-8,5 ist dabei optimal.¹⁴⁸ Allerdings wird von Gardossi et al.¹⁴⁹ und Kim et al.¹⁵⁰ berichtet, daß organische Kosolventien bzw. rein organische Lösungsmittel Penicillin Acylase denaturieren und dadurch keine oder nur geringe Ausbeuten zu erzielen sind. Diese Nachteile konnten zum einen durch die Zugabe hoher Konzentrationen von Na₂HPO₄ und durch die Immobilisierung des Enzyms beseitigt werden¹⁵¹. Enzymatisch acyliert wurden in Gegenwart der Penicillin Acylase bisher allerdings nur derivatisierte Aminosäuren mit Phenylelessigsäureethylester.

In den hier beschriebenen Versuchsreihen wurde versucht, diese Arbeiten auf freie Aminosäuren zu übertragen. Da nach Fité et al.¹⁵² nur nicht-ionisierte Substanzen von Penicillin Acylasen als Substrate akzeptiert werden, könnte hier wie im Falle der Oxazolidin-2,4-dione (vgl. 2.4) die nicht ionisierte Verbindung acyliert und damit dem Reaktionsgleichgewicht entzogen werden (vgl. **Abb. 40**).

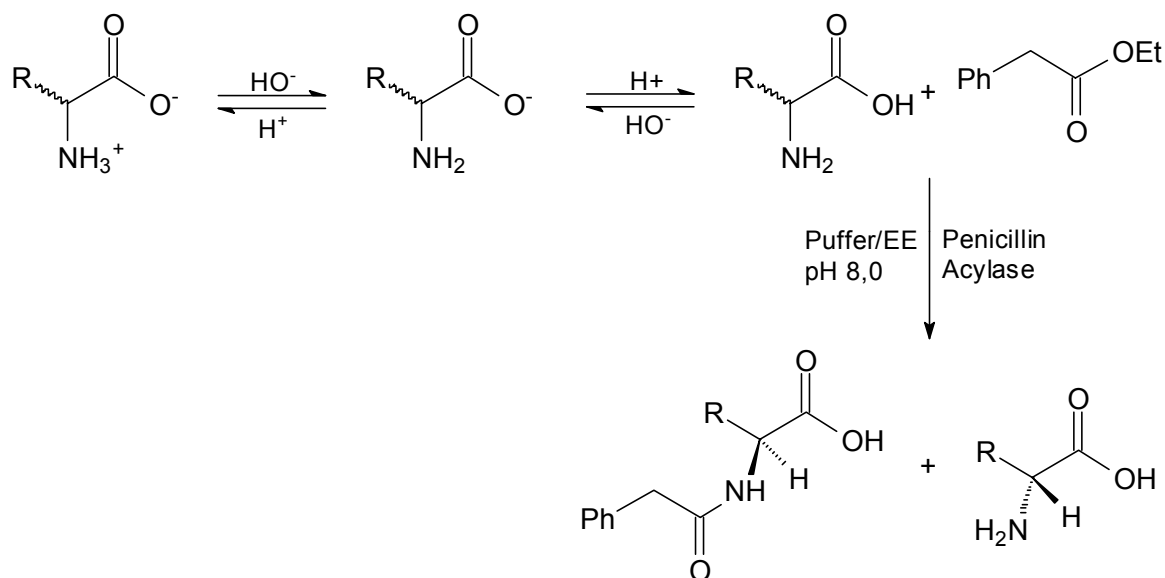


Abb. 40: Penicillin Acylase katalysierte Acylierung von freien Aminosäuren-Konzept.

Zur einfachen Reaktionsverfolgung mittels HPLC (UV-Detektor) wurden zunächst Aminosäuren mit aromatischen chromophoren wie Phe und Tyr (zusätzlich Lys) eingesetzt. In typischen Experimenten wurden 3 mmol Phenyllessigsäureethylester und 1 mmol der jeweiligen Aminosäure in einem Zweiphasengemisch aus Ethylacetat und 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer (pH 8,0/20 mM Na₂HPO₄) gelöst und in Gegenwart von zwei unterschiedlich immobilisierten Penicillin Acylasen acyliert. Bei diesen Reaktionen konnten allerdings auch nach Reaktionszeiten von 6 t keine Produkte nachgewiesen werden. Auch in rein wässrigen bzw. H₂O/MeOH-Gemischen¹⁵¹ konnte keine Reaktion beobachtet werden. Aufgrund dieser schlechten Erfahrungen wurde nun versucht den Einfluß der Carboxylatgruppe durch Einsatz von Diaminosäuren zu untersuchen.

Für weitere Untersuchungen zur Penicillin Acylase katalysierten Acylierung wurden die Diaminosäuren Asp und Glu verwendet. Bei diesen Versuchen wurde der Einfluß der Carboxylatgruppe bestimmt, indem die freien Aminosäuren, die Monoester und die Diester

einer enzymatischen Acylierung in Gegenwart von Penicillin Acylasen unterworfen wurden (vgl. **Abb. 41**).

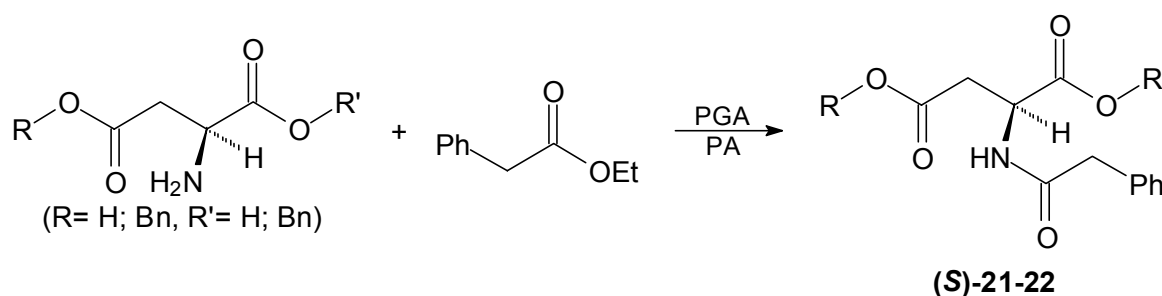


Abb. 41: Penicillin Acylase katalysierte Acylierung von Asparaginsäurederivaten.

Zur vereinfachten chromatographischen Reaktionsverfolgung mittels HPLC (UV-Detektor) wurden daher die Benzylester der Diaminosäuren gewählt. Dazu wurden 6 mmol Phenyllessigsäureethylester und 3 mmol der Diaminosäurederivate in einem Gemisch aus Methanol und 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer (pH 8,0/20 mM Na₂HPO₄) gelöst und in Gegenwart von zwei immobilisierten Penicillin Acylasen acyliert (vgl. **Tab. 26**).

Tab. 26: Acylierung von Diaminosäuren mit Phenyllessigsäureethylester in Gegenwart von immobilisierten Penicillin Acylasen.

Substrat	Produkt	Enzym	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]
L-Asp-OH	<i>N</i> -PhAc-L-Asp-OH	PGA PA	144 144	- -
L-Asp-OBzl	<i>N</i> -PhAc-L-Asp-OBzl	PGA PA	48 48	18 15
L-Asp(OBzl)-OBzl	<i>N</i> -PhAc-L-Asp(OBzl)-OBzl	PGA PA	48 48	64 ^a 58
L-Glu-OH	<i>N</i> -PhAc-L-Glu-OH	PGA PA	144 144	- -
L-Glu-OBzl	<i>N</i> -PhAc-L-Glu-OBzl	PGA PA	48 48	12 9

a) Ausbeute 53% nach Aufarbeitung und Säulenchromatographie.

Aus **Tab. 26** ist klar ersichtlich, daß freie Aminosäuren von den Penicillin Acylasen als Substrate nicht akzeptiert werden. Dagegen werden die etwas hydrophoberen, der in α -Position einfach veresterten Aminosäuren (**S**)-**21a** mit bis zu 18 % umgesetzt. Die zweifach veresterte Asparaginsäure wird dagegen gut akzeptiert und mit Umsätzen von bis zu 64 %

(*S*)-**22a** acyliert. In allen Versuchen zeigt die auf Eupergit C immobilisierte Penicillin G Acylase höhere Umsätze. Der Einfluß der freien Carboxylgruppen läßt sich beim Übergang vom Di- zum Monoester am besten beobachten. Der Umsatz verringert sich von 64 % (*S*)-**22a** auf 18 % (*S*)-**21a**, beim weiteren Übergang zur freien Aminosäure werden keine Produkte mehr beobachtet. Zusammenfassend läßt sich somit feststellen, daß Penicillin Acylasen wahrscheinlich nicht für die enzymatische Acylierung von freien Aminosäuren geeignet sind.

2.2.4 Enzymatische Acylierungen in Gegenwart von Proteasen

2.2.4.1 Hydrolysen von *N*-Acylaminosäuren mit Proteasen

Proteasen gehören zur Enzymklasse EC 3.4. und katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen. In der Peptidsynthese stellen protease-katalysierte Reaktionen zur Knüpfung von C-N-Bindungen eine interessante Alternative zu konventionellen, chemischen Verfahren dar¹⁵³. Dagegen ist eine einfache *N*-Acylierung von Aminosäuren in Gegenwart von Proteasen bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Bekannt ist jedoch die Hydrolyse von Benzoyloxycarbonyl-Schutzgruppen von Peptidsegmenten in Gegenwart der Proteasen *α*-Chymotrypsin¹⁵⁴ bzw. Trypsin¹⁵⁵. In der Peptidsynthese haben sich allerdings protease-katalysierte Abspaltungen von Z-Schutzgruppen durch Hydrolyse wegen der Gefahr von Nebenreaktionen (Peptidhydrolyse) nicht durchgesetzt. Inwieweit sich Proteasen für die enzymatische Acylierung von Aminosäuren eignen, sollte zunächst durch Hydrolyseexperimente von *N*-Acylaminosäuren in Gegenwart der Proteasen *Papain*, *α*-Chymotrypsin und *Subtilisin* untersucht werden (vgl. **Abb. 42**).

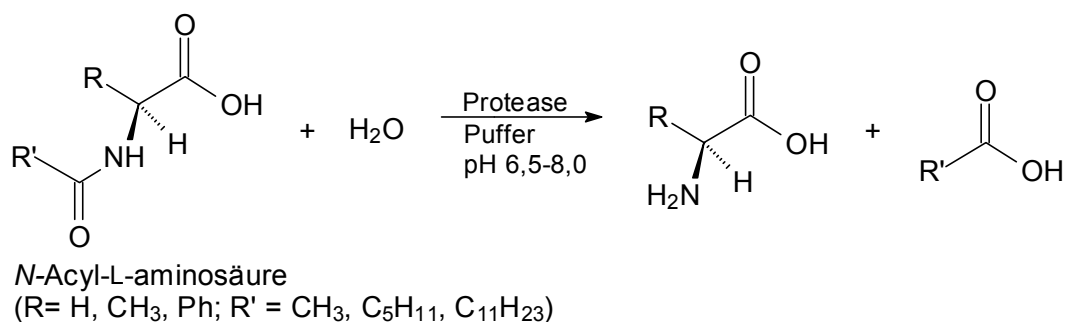


Abb. 42: Hydrolyse von *N*-Acyl-L-aminosäuren mit Acylasen

Zur Bestimmung der Substrattoleranz dieser Enzyme wurden zur Hydrolyse jeweils unterschiedliche *N*-Acyl-L-aminosäuren (1 mmol) bei Raumtemperatur in einem Phosphat-Puffer mit den Proteasen versetzt. Der pH-Wert des Phosphat-Puffers wurde entsprechend der optimalen Hydrolyse-Bedingungen des jeweiligen Enzyms gewählt. Der Umsatz wurde mittels HPLC (RP-Bedingungen) bestimmt (vgl. **Tab. 27**).

Tab. 27: Protease-katalysierte Hydrolyse von *N*-Acyl-L-aminosäuren: Substrat, Phosphat-Puffer, Reaktionszeiten und Umsatz.

Enzym	Substrat	Puffer	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]
<i>Papain</i>	<i>N</i> -Acetyl-Gly	0.1 M pH 6,5	12	12
	<i>N</i> -Caproyl-Gly		24	< 5
	<i>N</i> -Acetyl-L-Ala		12	15
	<i>N</i> -Caproyl-L-Ala		24	< 5
	<i>N</i> -Lauroyl-L-Ala		48	-
	<i>N</i> -Acetyl-L-Phe		12	18
α - <i>Chymotrypsin</i>	<i>N</i> -Acetyl-Gly	0.1 M pH 8.0	12	24
	<i>N</i> -Caproyl-Gly		24	< 5
	<i>N</i> -Acetyl-L-Ala		12	21
	<i>N</i> -Caproyl-L-Ala		24	< 5
	<i>N</i> -Lauroyl-L-Ala		48	-
	<i>N</i> -Acetyl-L-Phe		12	26
<i>Subtilisin</i>	<i>N</i> -Acetyl-Gly	0.1 M pH 7.5	12	22
	<i>N</i> -Caproyl-Gly		24	< 5
	<i>N</i> -Acetyl-L-Ala		12	23
	<i>N</i> -Caproyl-L-Ala		24	< 5
	<i>N</i> -Lauroyl-L-Ala		48	-
	<i>N</i> -Acetyl-L-Phe		12	24

Die Proteasen *Papain*, α -*Chymotrypsin* und *Subtilisin* hydrolysieren die *N*-Acetyl-derivate von Glycin, L-Alanin und L-Phenylalanin mit Umsätzen von bis zu 26 %. Bei länger-kettigen Derivaten (Caproyl- und Lauroyl-) werden nur sehr geringe oder keine Hydrolyseaktivitäten (nach 24 h ca. 5 % Umsatz) beobachtet. Mit diesen Informationen lassen sich somit nur bedingt Hoffnungen auf eine enzymatische Acylierung in Gegenwart von Proteasen erfüllen. Trotzdem wurden einige Acylierungen von Aminosäuren in organisch-wässrigen Medien in Gegenwart von Proteasen durchgeführt. Als Reaktionsbedingungen wurden die in der Peptidsynthese erfolgreich verwendeten organisch-wässrigen Puffersysteme gewählt. Dazu

wurden die Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Alanin und Glycin mit einem 3-molaren Überschuß des Acyldonors in einem 50 gew. % igem DMF-Phosphatpuffer pH 9,0 inkubiert. Als Acyldonor wurde Essigester und Capronsäuremethylester verwendet. Nach Zugabe der Proteasen *Papain*, α -*Chymotrypsin* bzw. *Trypsin* konnte mittels HPLC-Analyse auch nach 48 h kein Produkt beobachtet werden. Beobachtet wurde dagegen teilweise Acyldonorhydrolyse. Beim Einsatz von L-Phenylalaninmethylester anstatt der freien freien Aminosäure konnte nur die vollständige Hydrolyse des Aminosäuremethylesters nachgewiesen werden. Die in **Tab. 28** zusammengefaßten negativen Ergebnisse machten es erforderlich nach weiteren, besser geeigneten Methoden zu suchen.

Tab. 28: Enzymatische Acylierungen von Aminosäuren in Gegenwart von Proteasen in einem 50 gew. % igem DMF-Phosphatpuffer pH 9,0.

Aminosäure	Protease	Acyldonor	Ausbeute	Hydrolyseprodukt
L-Phe-OH	<i>Papain</i>	Ac-OMe bzw.	0	AcOH bzw.
	α - <i>Chymotrypsin</i>	Caproyl-OMe	0	Caproyl-OH
	<i>Trypsin</i>		0	
L-Phe-OMe	<i>Papain</i>	AcOMe bzw.	0	AcOH bzw. Caproyl-OH
	α - <i>Chymotrypsin</i>	Caproyl-OMe	0	und L-Phe-OH
	<i>Trypsin</i>		0	
L-Ala-OH	<i>Papain</i>	AcOMe bzw.	0	AcOH bzw.
	α - <i>Chymotrypsin</i>	Caproyl-OMe	0	Caproyl-OH
	<i>Trypsin</i>		0	
Gly-OH	<i>Papain</i>	AcOMe bzw.	0	AcOH bzw.
	α - <i>Chymotrypsin</i>	Caproyl-OMe	0	Caproyl-OH
	<i>Trypsin</i>		0	

2.2.5 Schlußfolgerungen

Für die in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen zur enzymatischen Acylierung von Aminosäuren wurden ausschließlich Acylasen und Proteasen verwendet. Mit der Acylase aus *Aspergillus* (immobilisiert) wurden in DMF Ausbeuten bis 25 % erzielt. Beim Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit Literaturdaten stellte sich heraus, daß ausschließlich Acetat als Acyldonor für die Acylasen aus *Aspergillus* und *Hog kidney* geeignet ist. Bei Verwendung von *Penicillin* Acylasen erwies sich die enzymatische Acylierung freier Aminosäuren als nicht durchführbar. Durch den Einsatz der Diaminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure

(verestert und als freie Säuren) konnte gezeigt werden, daß *Penicillin Acylasen* diese nur in nicht ionischer Form akzeptieren. So wurde in Gegenwart der *Penicillin G Acylase* mit L-Asp(OBzl)-OBzl und Phenyllessigsäureethylester eine Ausbeute von 64 % an **(S)-22a** erhalten. Bei Einsatz des Monoesters (L-Asp-OBzl) fällt die Ausbeute auf 18 % **(S)-21a** ab, während bei Verwendung von freier Asparaginsäure überhaupt kein Umsatz zu beobachten ist. Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß Acylasen sich nicht zur enzymatischen Acylierung von Aminosäuren eignen. Leider erwiesen sich auch Proteasen zur enzymatischen Acylierung von Aminosäuren als ungeeignet. Aus diesen Gründen wurden im Rahmen dieser Arbeit noch weitere Methoden zur Lipase-katalysierten Acylierung von freien Aminosäuren gesucht (vgl. 2.3).

2.3 Lipasen-katalysierte Acylierung von freien Aminosäuren

2.3.1 Einleitung

Eine wesentliche Voraussetzung für die erfolgreiche, biokatalytische Synthese von *N*-Acylaminosäuren in Gegenwart von Lipasen ist die Hydrophobisierung der polaren Aminosäuren. Aus Vorversuchen zur Acylierung freier Aminosäuren in Fettsäureestern suspendiert, ergab sich, daß so keine acylierten Produkte erhalten werden konnten. Auch der Einsatz von Ultraschall zur teilweisen Solubilisierung von Aminosäuren führte nicht zu irgendwelchen Produkten. Auch ließ sich in einem Zweiphasensystem, in dem die Aminosäuren in der wässrigen Phase gelöst sind, nur die Hydrolyse der eingesetzten Fettsäureester nachweisen. Ebenso waren Versuche in wässrigen Systemen unter Zusatz von Kosolventien, Arbeiten in aprotischen Systemen und in Zweiphasensystemen erfolglos. Stets wurde nur die Hydrolyse des Acyldonors beobachtet.

Es mußte also ein Weg gefunden werden, die zwitterionische Struktur der Aminosäuren so zu verändern, daß eine gewisse Löslichkeit in organischen Medien erreicht werden kann. Eine Möglichkeit zur Lösung dieses Problems wurde in der Solubilisierung von freien Aminosäuren durch die Bildung unterschiedlicher Kontaktionenpaare gefunden.

2.3.2 Solubilisierung von Aminosäuren mittels Phasentransferkatalysatoren

Freie Aminosäuren liegen normalerweise als Zwitterionen vor und sind daher in organischen Lösungsmitteln unlöslich. Eine Möglichkeit, Aminosäuren ohne chemische Derivatisierung hydrophober und damit in organischen Lösungsmitteln besser löslich zu machen, besteht in der Bildung von Kontaktionenpaaren.

Aus den Arbeiten von Maugart et al.¹⁵⁶ ist bekannt, daß Lipasen auch Ionenpaare direkt acylieren können. Beschrieben wird die Acylierung eines Aminosuckers mit Ölsäure in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) (vgl. **Abb. 43**).

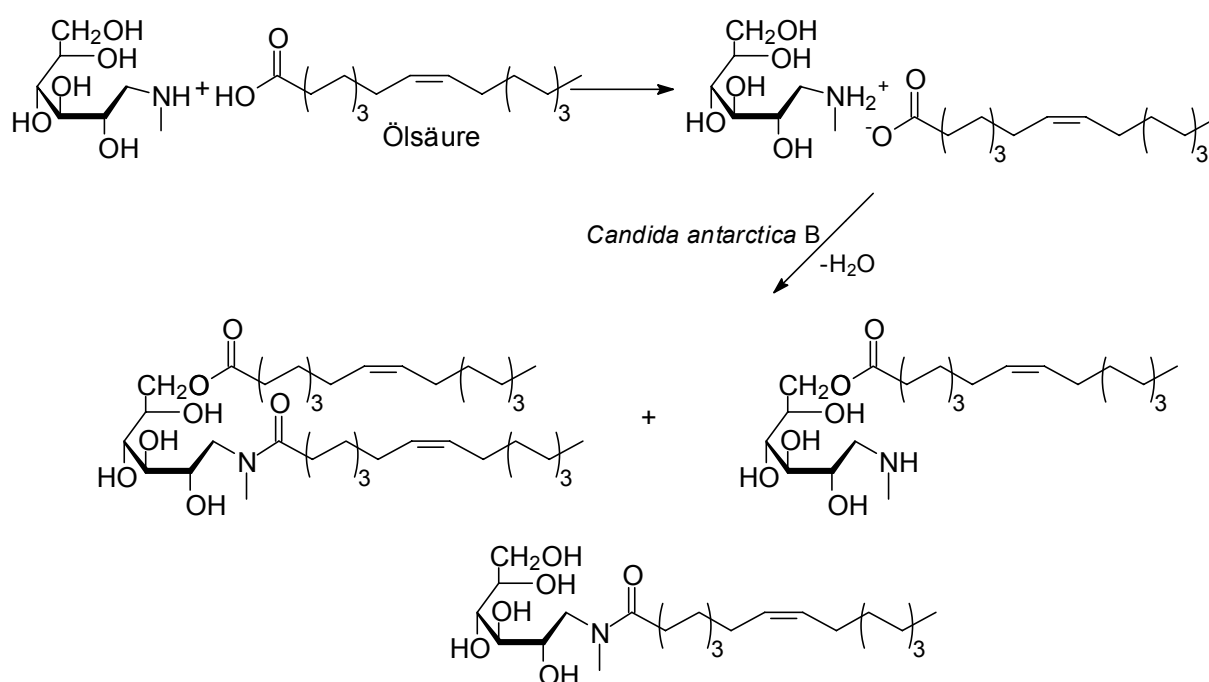


Abb. 43: Enzymatische Acylierung eines Kontaktionenpaares nach Maugart et al.¹⁵⁶.

Als Lösungsmittel konnte in diesen Fall sogar *n*-Hexan verwendet werden, in dem der Zucker völlig unlöslich ist. Die Bildung eines derartigen Kontaktionenpaares zwischen Aminosäuren und Fettsäuren gelingt aufgrund des hohen pK_s-Wertes der Aminosäuren nicht. Es wurde daher zunächst versucht, ein derartiges Aminosäure-Kontaktionenpaar mittels eines Phasentransferkatalysators herzustellen. Als Phasentransferkatalysator wurde Tetrabutylammoniumlaurat eingesetzt, welches aus Tetrabutylammoniumchlorid und der equimolaren Menge Natriumlaurat synthetisiert werden kann. Die freie Aminosäure wurde in equimolaren Mengen mit dem Phasentransferkatalysator in Methanol gelöst und das Lösungsmittel nach Ausbildung des Komplexes am Rotationsverdampfer entfernt (vgl. **Abb. 45**). Die so

hergestellten Aminosäure-Kontaktionenpaare wurden als Öle erhalten und lösten sich in den Lösungsmitteln wie z.B. 2-Methyl-2-butanol, Monoglyme und THF. Die NMR-Analyse zeigt auch eindeutig, daß die Aminosäure mit dem Phasentransferkatalysator und der Fettsäure das entsprechende Kontaktionenpaar bildet (vgl. **Abb. 44**).

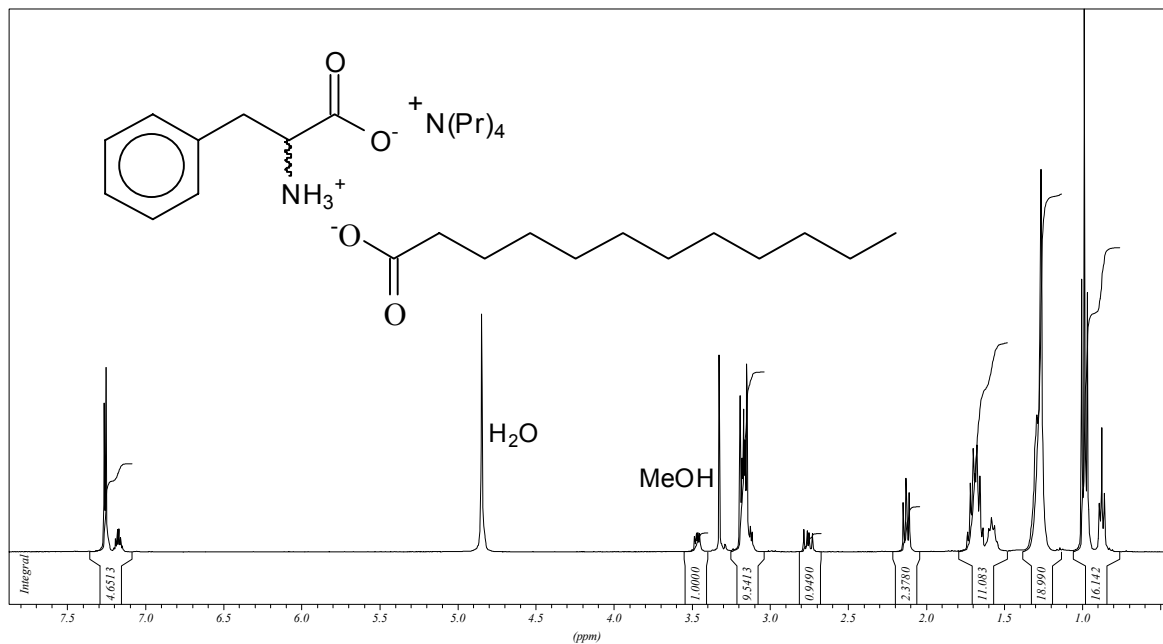


Abb. 44: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Phenylalanin komplexiert mit Phasentransferkatalysator und Laurinsäure.

Für die enzymatischen Acylierungen wurden die komplexierten Aminosäuren Glycin, DL-Alanin und DL-Phenylalanin in 2-Methyl-2-butanol als Lösungsmittel in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SP435) (vgl. **Abb. 45**) eingesetzt.

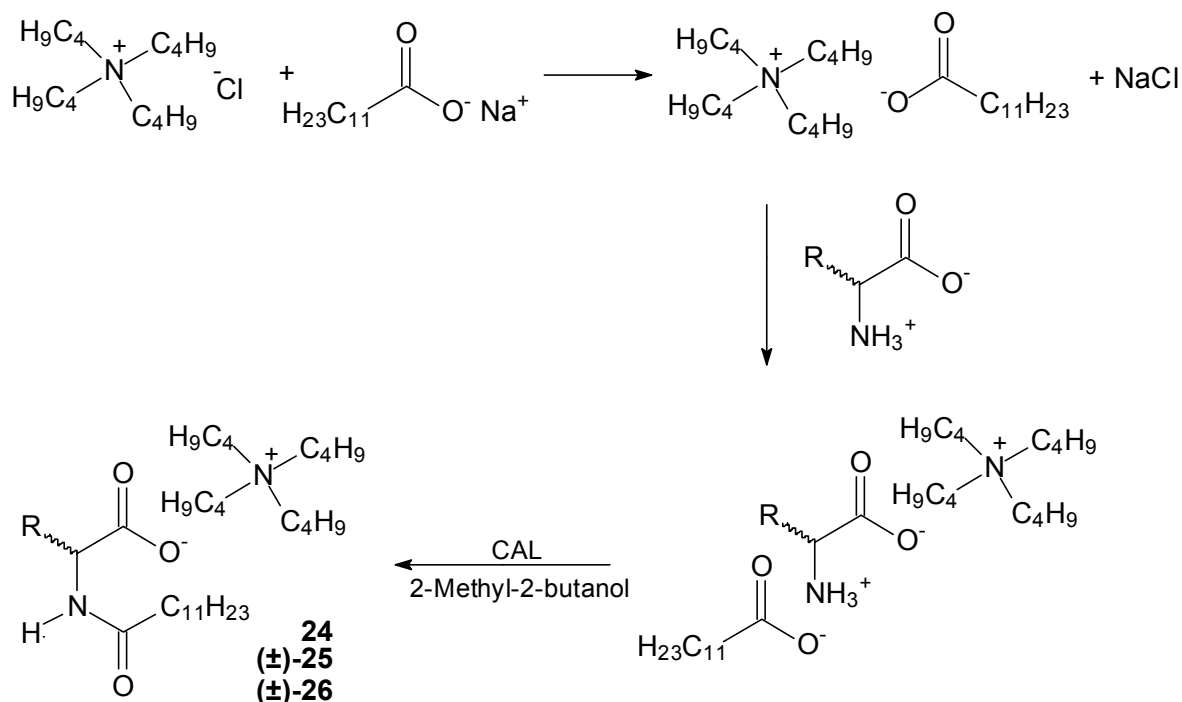


Abb. 45: Enzymatische Acylierung einer freien Aminosäure in Gegenwart von *Candida antarctica* B (Novozym SP435) mit Tetrabutylammoniumlaurat.

Nach vier Tagen Reaktionszeit bei 70 °C wurden mittels HPLC Umsätze von max. 17 % bei DL-Phenylalanin (±)-26 beobachtet, bei Glycin 24 und DL-Alanin (±)-25 ca. 8 %. Allerdings gelang es nicht die Umsätze zu erhöhen, da die gebildeten Kontaktionenpaare nicht stabil sind. Nach ca. zwei Stunden beginnt die Aminosäure aus der Lösung auszukristallisieren. Nach diesen Ergebnissen wurde die Bildung von Aminosäure-Kontaktionenpaaren mit Phasentransferkatalysatoren nicht weiter verfolgt. Eine Alternative dazu stellen nicht-nucleophile Basen dar.

2.3.3 Solubilisierung von Aminosäuren durch Bildung von Kontaktionenpaaren in Gegenwart nicht-nucleophiler Basen

Zur alternativen Solubilisierung von freien Aminosäuren können anstatt Phasentransferkatalysatoren auch nicht-nucleophile Basen eingesetzt werden. Die eingesetzte Base sollte dabei die zwitterionische Form der Aminosäure deprotonieren und mit der Carboxylgruppe das entsprechende Kontaktionenpaar bilden. Die Aminogruppe stünde dann für eine Acylierung zur Verfügung (vgl. **Abb. 46**).

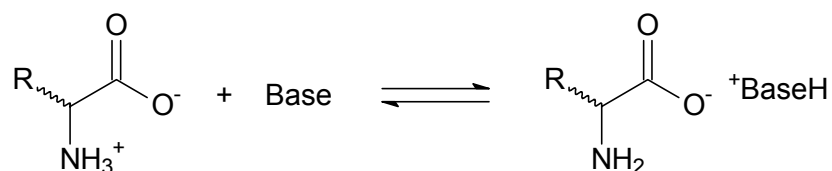


Abb. 46: Konaktionenpaare von Aminosäuren mit nicht-nucleophilen Basen.

Zur entsprechenden Verschiebung des Gleichgewichtes auf die Seite der Konaktionenpaare sind pk_b -Werte > 10 für die eingesetzten Basen erforderlich. Verdeutlicht wird dies durch den Vergleich unterschiedlicher pk_b -Werte ausgewiesener Aminosäuren (vgl. **Tab. 29**). Phenylalanin hat hier mit einem pk_b -Wert von 9,24 die geringste Basizität.

Tab. 29: Ausgewählte pk_b -Werte verschiedener Aminosäuren.

Aminosäure	pk_b	Aminosäure	pk_b
Alanin ¹⁵⁷	9,87	Phenylalanin ¹⁵⁸	9,24
Glycin ¹⁵⁹	9,78	Tryptophan ¹⁶⁰	9,39
Isoleucin ¹⁵⁷	9,76	Valin ¹⁵⁷	9,72

Für Versuche zur Solubilisierung von Aminosäuren durch nicht-nucleophile Basen wurden die folgenden Verbindungen verwendet (vgl. **Abb. 47**).

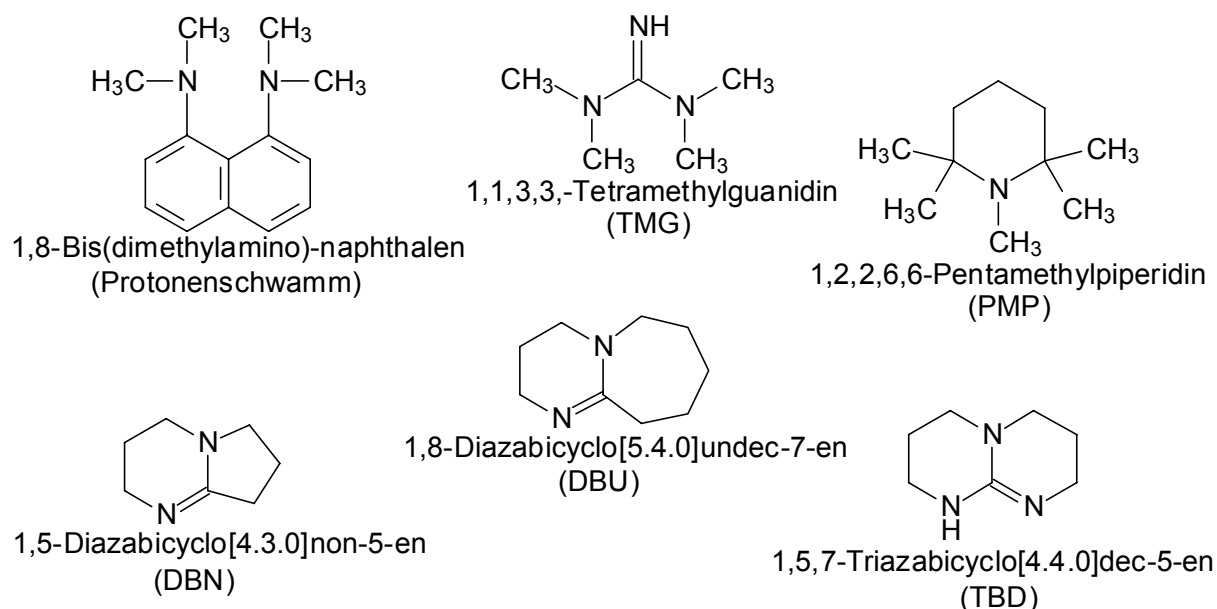


Abb. 47: Starke nicht-nucleophile Basen.

In **Tab. 30** sind die pK_b -Werte dieser Basen in Wasser aufgeführt. Auf starke Basen hat Wasser eine nivellierende Wirkung, dadurch erklärt sich das gleichartige Verhalten unterschiedlich starker Basen in Wasser. In organischen Lösungsmitteln ist der nivellierende Effekt nicht vorhanden, so daß hier ein Vergleich der unterschiedlichen Basen vorgenommen werden kann. Deshalb ist in **Tab. 30** auch die relative Basizität in Acetonitril, bestimmt durch Titration mit Ammonium-(ethyl-diisopropyl)-tetraphenylborat¹⁶¹, aufgeführt.

Tab. 30: Nicht-nucleophile Basen: pK_b -Werte, relative Basizität.

Base	Abkürzung	pK_b -Wert in H ₂ O	relative Basizität ¹⁶¹
1,8-Bis(diamino)-nahthalen	proton sponge	12,1 ¹⁶²	-
1,1,3,3-Tetramethylguanidin	TMG	13,6 ¹⁶³	< 0,6
1,2,2,6,6-Pentamethylpiperidin	PMP	11,2 ¹⁶⁴	-
1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en	DBN	23,4 ^{a165}	0,063
1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en	TBD	11,4 ¹⁶⁶	9,39
Pentamethylguanidin	PMG	13,8 ¹⁶⁷	1
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en	DBU	23,9 ^{a165}	0,214

a) pK_b -Werte wurden in Acetonitril bestimmt.

So findet man für TMG einen pK_b -Wert in H₂O von 13,6 aber nur eine relative Basizität von ca. 0,6. Das unterschiedliche Verhalten dieser Basen in wässrigen und organischen Medien ist auch bei TBD erkennbar; hier findet man die höchste relative Basizität mit 9,39 zu finden, obwohl der pK_b -Wert in H₂O nur 11,4 beträgt. Zur Untersuchung, welche Basen für die enzymatische Acylierung von Aminosäuren am geeignetsten sind, wurde Phenylalanin mit der dreifachen molaren Menge nicht-nucleophiler Base in Methanol suspendiert und für 24 Stunden bei 70°C im Schüttler inkubiert. Diese Aminosäure konnte in Gegenwart von DBU, DBN und PMP nicht vollständig in Lösung gebracht werden. Beim Einsatz von 1,8-Bis(diamino)-nahthalen wurde eine starke Braunfärbung der Lösung beobachtet. Brauchbare Ergebnisse wurden mit TMG und TBD erzielt, die Aminosäure war vollständig löslich. Auch trat keine Verfärbung der Lösung auf. Daher wurde TMG und TBD für die weiteren Versuche eingesetzt.

2.3.4 Solubilisierung von Aminosäuren in Gegenwart von 1,1,3,3-Tetramethylguanidin (TMG): NMR-Studien

Die Aminosäuren Glycin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan und L-Valin wurden mit der entsprechenden Base versetzt und in den Lösungsmitteln CD₂Cl₂, Methanol-d₄, Aceton-d₆ und DMSO-d₆ mittels NMR-Spektroskopie hinsichtlich der Kontaktionenpaar-Bildung untersucht (vgl. **Abb. 48**).

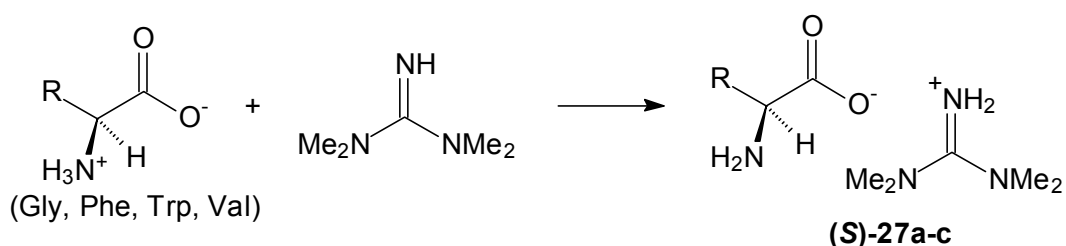


Abb. 48: Kontaktionenpaare aus Aminosäuren und TMG.

Dazu wurde jeweils 1 mmol der entsprechenden Aminosäure mit equimolaren Mengen TMG in diesen Lösungsmitteln suspendiert. Nach 10 min Schütteln bei 800 rpm wurde filtriert und der Überstand mittels NMR analysiert. Die relative Löslichkeit der Aminosäuren wurde durch Integration bestimmt. Unabhängig davon wurde die Löslichkeit durch Auswaage der abfiltrierten Aminosäure bestimmt (vgl. **Tab. 31**).

Tab. 31: Löslichkeit von Aminosäuren durch Komplexierung mit TMG.

Aminosäure	Lösungsmittel	Löslichkeit im Verhältnis zu TMG [%]
Glycin	CD ₂ Cl ₂	unlöslich
	Methanol-d ₄	< 10
	Aceton-d ₆	unlöslich
	DMSO-d ₆	< 5
L-Phenylalanin (S)-27a	CD ₂ Cl ₂	< 5
	Methanol-d ₄	65-70
	Aceton-d ₆	< 5
	DMSO-d ₆	< 10
L-Tryptophan (S)-27b	CD ₂ Cl ₂	< 5
	Methanol-d ₄	55-60
	Aceton-d ₆	< 5
	DMSO-d ₆	< 5

Aminosäure	Lösungsmittel	Löslichkeit im Verhältnis zu TMG [%]
L-Valin (S)-27c	CD ₂ Cl ₂ Methanol-d ₄ Aceton-d ₆ DMSO-d ₆	unlöslich 20-25 unlöslich < 5

Die Kontaktionenpaare von Glycin und Valin (S)-27c sind nur in geringem Maße in Methanol löslich, in den anderen verwendeten Lösungsmitteln sind sie praktisch unlöslich. Dagegen weisen die hydrophoben Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan in Methanol eine Löslichkeit von 70 % (S)-27a auf, wiederum sind sie aber in unpolaren Lösungsmitteln nur gering löslich (< 10 %). Charakteristisch für die Bildung von Kontaktionenpaaren, ist die chemische Verschiebung des zentralen Guanidin-Kohlenstoffatoms im ¹³C-NMR-Spektrum. In Methanol erscheint dieser Kohlenstoff bei 169,3 ppm, während man im Kontaktionenpaar eine Hochfeldverschiebung auf 163,2 ppm beobachtet (vgl. Abb. 49, Abb. 50).

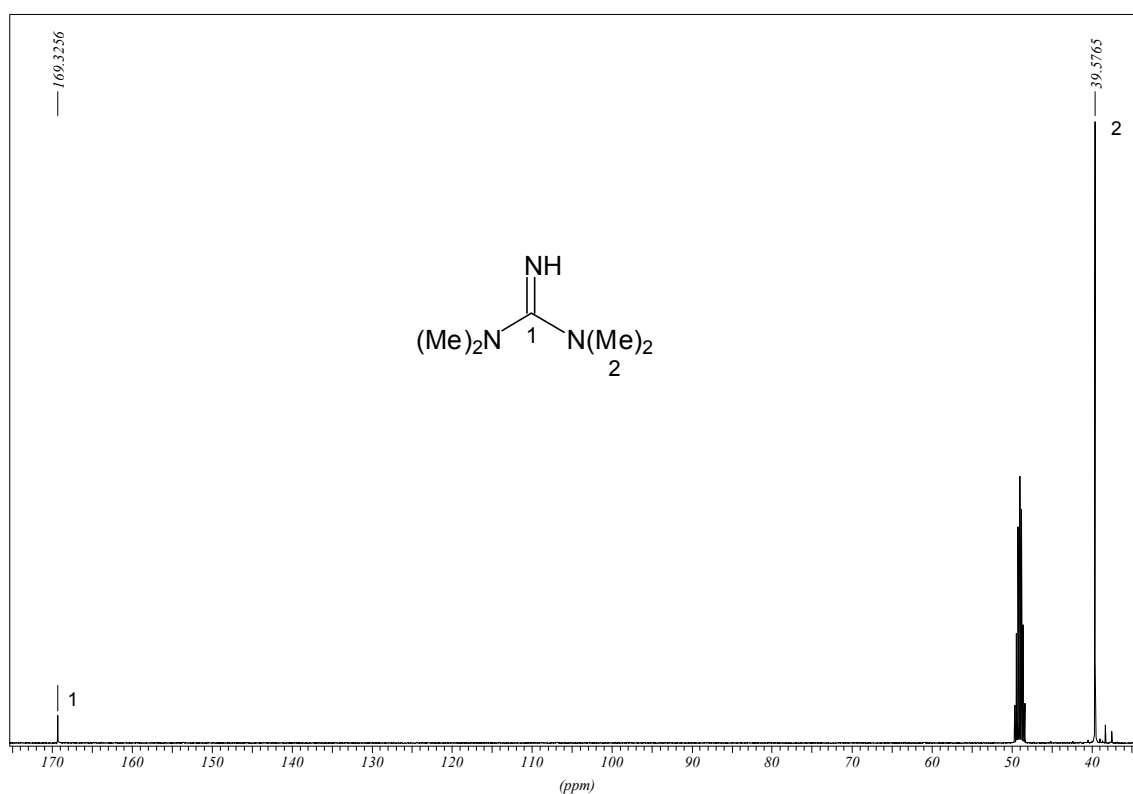


Abb. 49: ¹H}-¹³C-NMR-Spektrum von TMG in Methanol-d₄.

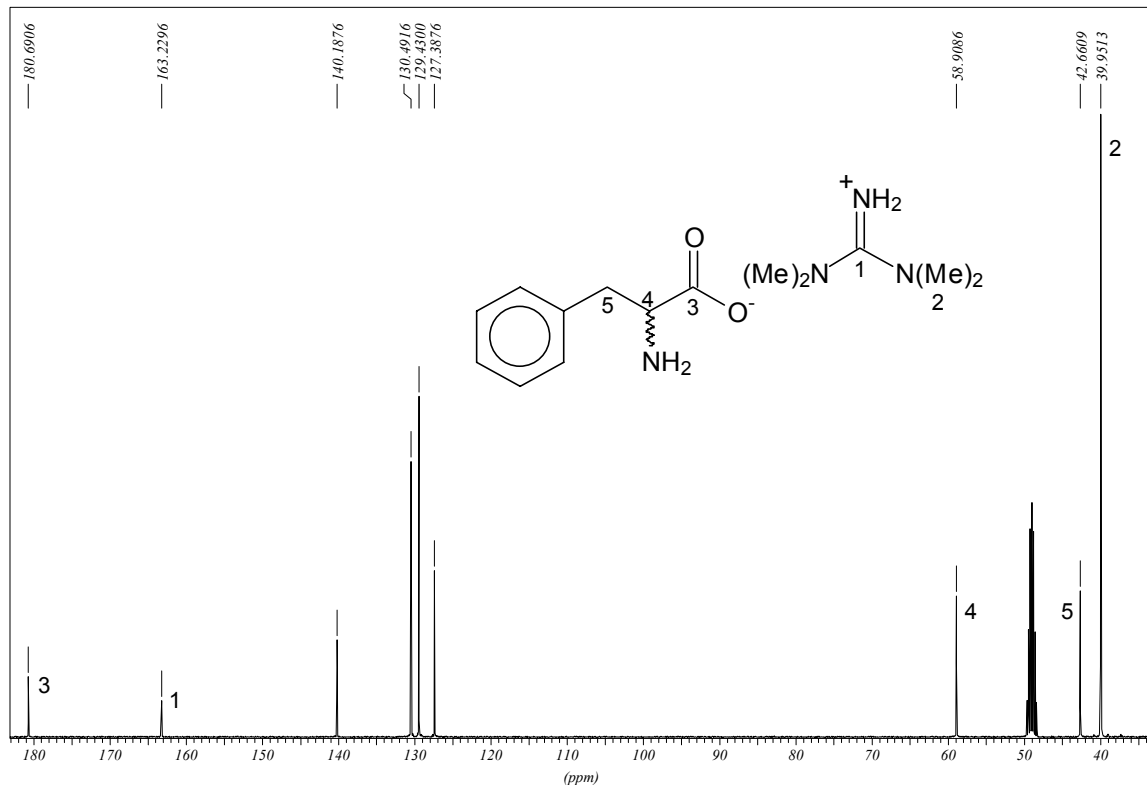


Abb. 50: $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C -NMR-Spektrum von Phenylalanin mit TMG in Methanol- d_4 .

2.3.5 Kontaktionenpaare mit TMG: Enzymatische Acylierungen

Die so erhaltenen Kontaktionenpaare von Glycin, DL-Phenylalanin, DL-Alanin, DL-Valin, DL-Phenylglycin und DL-Tryptophan wurden Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SP435) enzymatisch acyliert. Dafür wurde TMG im 5-fachen Überschuß eingesetzt. Als Lösungsmittel diente 2-Methyl-2-butanol bzw. Monoglyme mit Capronsäuremethylester als Acyldonor (vgl. **Abb. 51**).

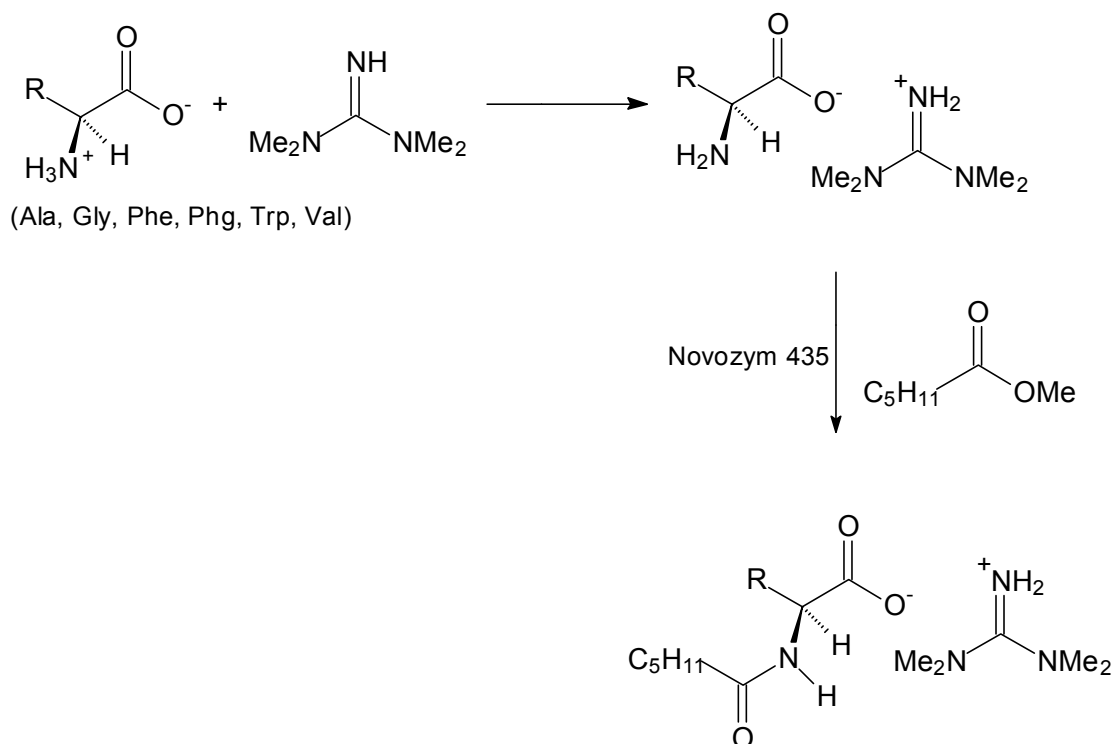


Abb. 51: Enzymatische Acylierung von Aminosäure-TMG-Kontaktionenpaaren.

Leider konnten auch nach Reaktionszeiten von 6 Tagen bei 70°C in keiner der Umsetzungen acylierte Produkte nachgewiesen werden. Daher wurden weitere Versuche ohne Lösungsmittel, aber unter sonst vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Nach Reaktionszeiten von 5 Tagen bei 70°C wurden die Umsetzungen durch Abfiltrieren des Enzyms abgebrochen. Das Filtrat wurde mit 2 N HCl extrahiert und die wässrige Phase mit Essigester ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen über MgSO₄ und Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt.

Es gelang auf diese Weise *N*-Caproyl-DL-phenylalanin (\pm)-**28** mit einer Ausbeute von 22 % zu erhalten. Glycin, DL-Alanin und DL-Valin führten nicht zu Produkten. Tryptophan war unter den Bedingungen nicht stabil (Schwarzfärbung). Beim Einsatz von Phenylglycin findet man überraschenderweise Capronsäurebenzylamid **29**, als Hauptprodukt; 46 % nach chromatographischer Reinigung (vgl. **Abb. 52**).

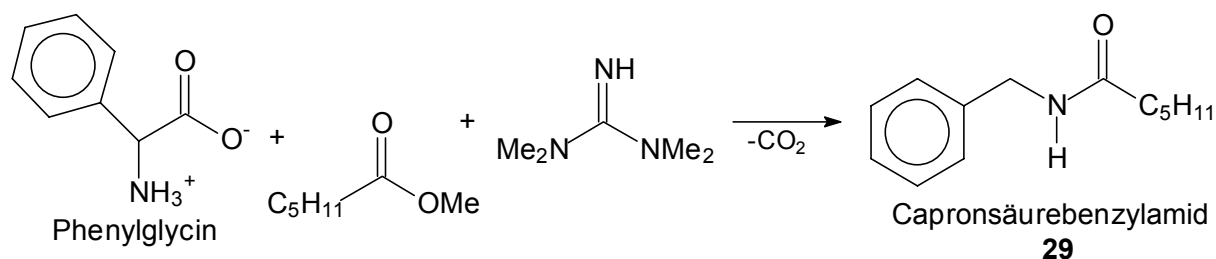


Abb. 52: Capronsäurebenzylamid **29** aus TMG und Capronsäuremethylester.

Es handelt sich eindeutig um eine Decarboxylierung nach oder vor der erfolgten Acylierung. Eine Beteiligung des Enzyms kann dabei ausgeschlossen werden. Eine mögliche mechanistische Erklärung ist in **Abb. 53** gezeigt.

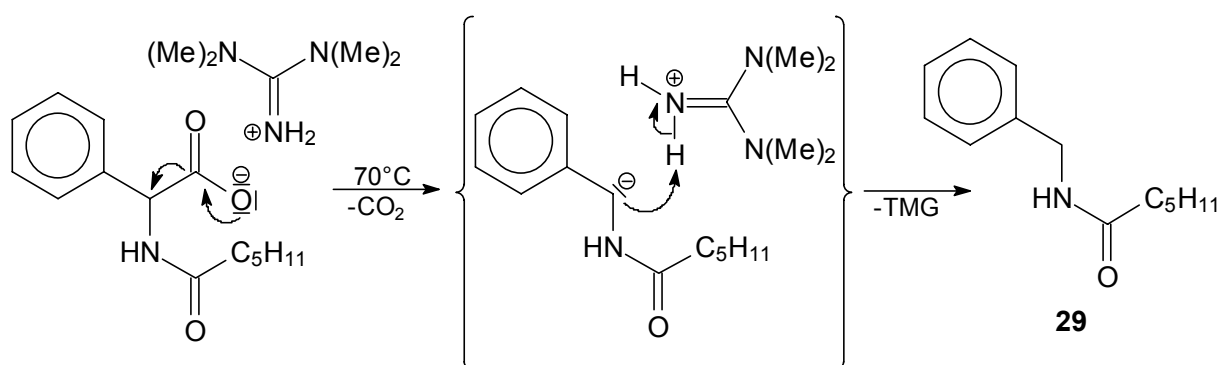


Abb. 53: Decarboxylierung von *N*-Caproyl-phenylglycine (Mechanismuß)

Das bei der Decarboxylierung entstehende Carbanion könnte in diesem Fall durch den Benzolring stabilisiert werden und danach durch Deprotonierung eines TMG-Kations das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des ladungsneutralen Capronsäurebenzylamids verschieben. Auf jeden Fall hat der phenylische Rest den entscheidenden Einfluß bei dieser Reaktion da bei Verwendung von Phenylalanin (Benzylrest) keine Decarboxylierung beobachtet werden konnte. Die Struktur von **29** läßt sich anhand der ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren, sowie der UV/VIS- und Massen-Spektren belegen (vgl. **Abb. 54**; vgl. Exp. Teil).

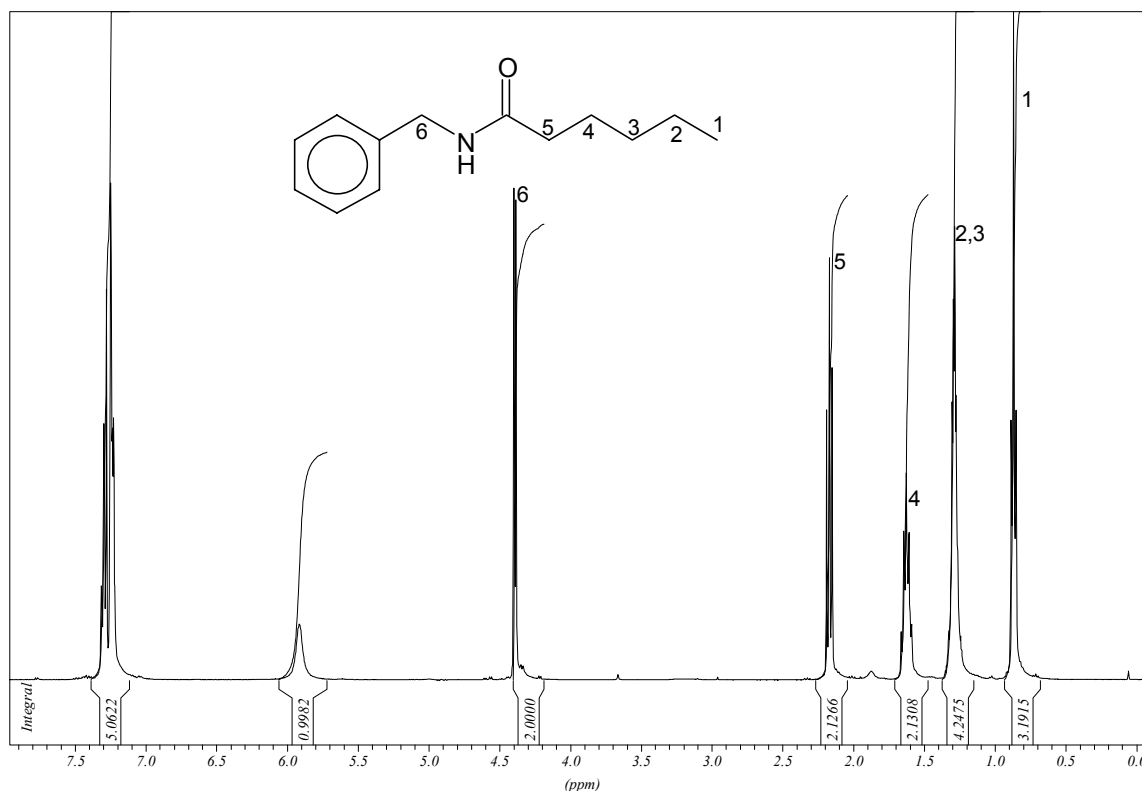


Abb. 54: ¹H-NMR-Spektrum von Capronsäurebenzylamid **29** (vgl. **Abb. 52**).

2.3.6 Bildung von Aminosäure-Kontaktionenpaaren mit 1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en (TBD)

Zur oben diskutierten Verbesserung der Löslichkeit von Aminosäuren erwies sich in Vorversuchen TBD (1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en) als besonders gut geeignet. TBD zeigt aufgrund der ca. 10-fachen höheren relativen Basizität¹⁶⁸ im Vergleich zu TMG erheblich bessere Lösungseigenschaften für Aminosäuren (vgl. **Tab. 30**). So reichte hier der Einsatz equimolarer Mengen TBD zum Lösen der Aminosäuren aus. Auf diese Weise konnten z. B. 0,5 mmol L-Leucin mit 0,5 mmol TBD in DMSO-d₆ vollständig gelöst werden. Dieses Verhalten ist auch im ¹H-NMR-Spektrum deutlich zu sehen (vgl. **Abb. 55**).

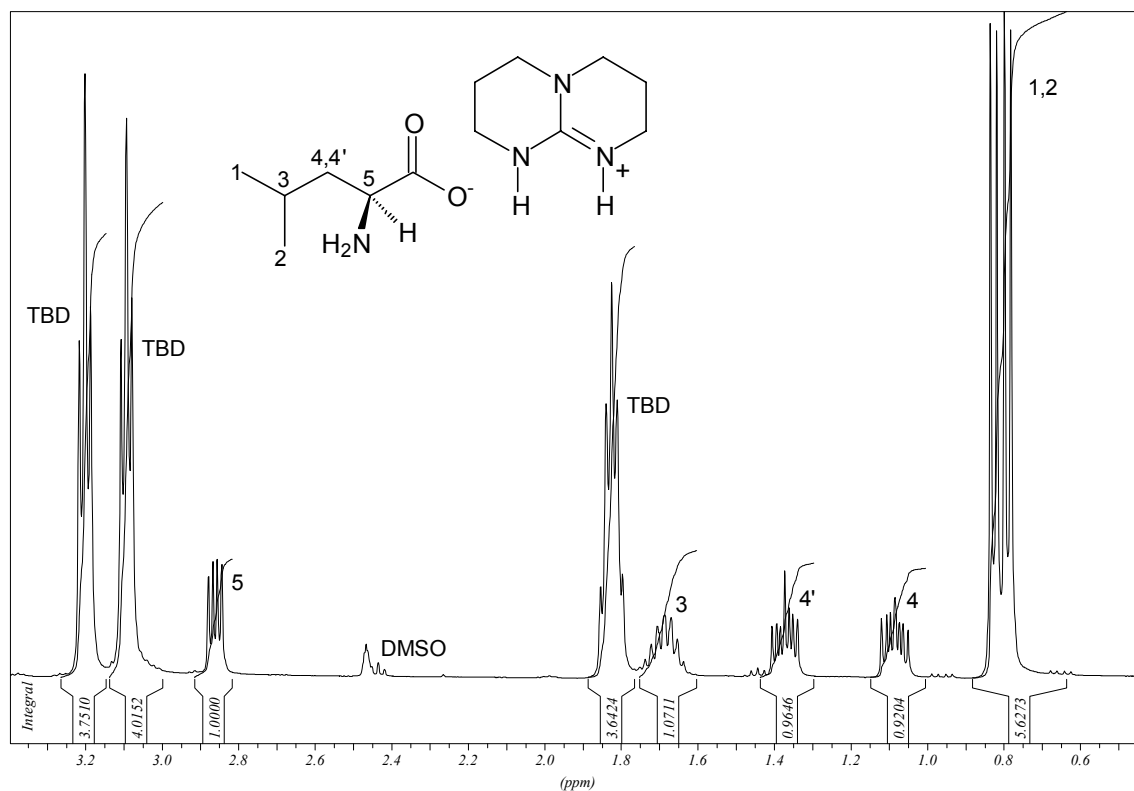


Abb. 55: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von L-Leucin-TBD-Kontaktionenpaar (*S*)-30c.

2.3.7 Enzymatische Acylierungen von Aminosäure-TBD-Kontaktionenpaaren

Die so erhaltenen Kontaktionenpaare der Aminosäuren L-Alanin (*S*)-30a, Glycin 30b, L-Leucin (*S*)-30c, L-Phenylalanin (*S*)-30d, L-Phenylglycin (*S*)-30e, und L-Valin (*S*)-30f wurden enzymatisch acyliert (vgl. Abb. 56).

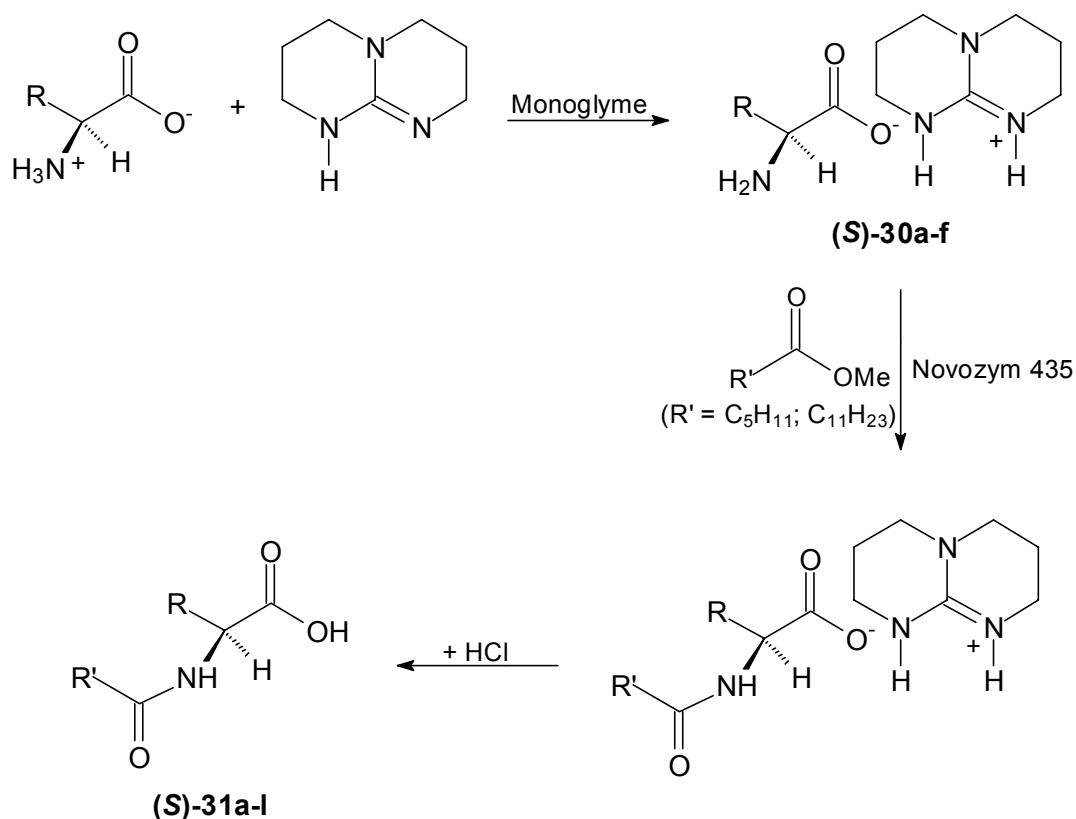


Abb. 56: Enzymatische Acylierung von L-Aminosäure-TBD-Konjugatenpaaren **(S)-30a-f**.

Dafür wurden jeweils 3 mmol des entsprechenden L-Aminosäure-TBD-Konjugatenpaares **(S)-30a-f** in Monoglyme gelöst und mit der Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SP435) sowie mit 9 mmol Capronsäuremethylester bzw. Laurinsäuremethylester versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 6 Tagen (Capronsäuremethylester) und 10 Tagen (Laurinsäuremethylester) bei 70 °C wurden die Umsetzungen durch Abfiltrieren des Enzyms abgebrochen. Das Filtrat wurde mit 2 N HCl extrahiert und die wässrige Phase mit Essigester ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen über MgSO₄ und Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt. Die Resultate dieser Umsetzungen sind in **Tab. 32** zusammengestellt.

Tab. 32: Enzymatische Acylierung von L-Aminosäuren nach Komplexierung mit TBD.

Substrat	Produkt	Acyldonor	Reaktionszeit [d]	Ausbeute ^a [%]
L-Alanin (S)-30a	<i>N</i> -C ₆ -L-Ala-OH (S)-31a	C ₆ -OMe	6	56
	<i>N</i> -C ₁₂ -L-Ala-OH (S)-31b	C ₁₂ -OMe	10	43
Glycin 30b	<i>N</i> -C ₆ -Gly-OH 31c	C ₆ -OMe	6	45
	<i>N</i> -C ₁₂ -Gly-OH 31d	C ₁₂ -OMe	10	40

Substrat	Produkt	Acyl donor	Reaktionszeit [d]	Ausbeute ^a [%]
L-Leucin	<i>N</i> -C ₆ -L-Leu-OH (S)-31e	C ₆ -OMe	6	53
(S)-30c	<i>N</i> -C ₁₂ -L-Leu-OH (S)-31f	C ₁₂ -OMe	10	48
L-Phenylalanin	<i>N</i> -C ₆ -L-Phe-OH (S)-31g	C ₆ -OMe	6	71
(S)-30d	<i>N</i> -C ₁₂ -L-Phe-OH (S)-31h	C ₁₂ -OMe	10	62
L-Phenylglycin	<i>N</i> -C ₆ -L-Phg-OH (S)-31i	C ₆ -OMe	6	66
(S)-30e	<i>N</i> -C ₁₂ -L-Phg-OH (S)-31j	C ₁₂ -OMe	10	60
L-Valin	<i>N</i> -C ₆ -L-Val-OH (S)-31k	C ₆ -OMe	6	51
(S)-30f	<i>N</i> -C ₁₂ -L-Val-OH (S)-31l	C ₁₂ -OMe	10	42

a) isoliertes Produkt

Alle enzymatischen Acylierungen gelangen auf diese Weise mit Ausbeuten zwischen 40 und 70 %. So wurden die aliphatischen Aminosäuren **30a,b,c,f** mit Ausbeuten zwischen 40-56 % acyliert, die aromatischen Vertreter **30d,e** mit 60-71 %. Es zeigte sich wiederum, daß Capronsäuremethylester eine höhere spezifische Aktivität gegenüber der Lipase zeigt, was sich in den kürzeren Reaktionszeiten und höheren Produktausbeuten widerspiegelt.

Zur Überprüfung der Enantioselektivität der Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SP435) bei der enzymatischen Acylierung von Aminosäuren wurden auch die entsprechenden D-Aminosäuren acyliert (vgl. **Abb. 57**).

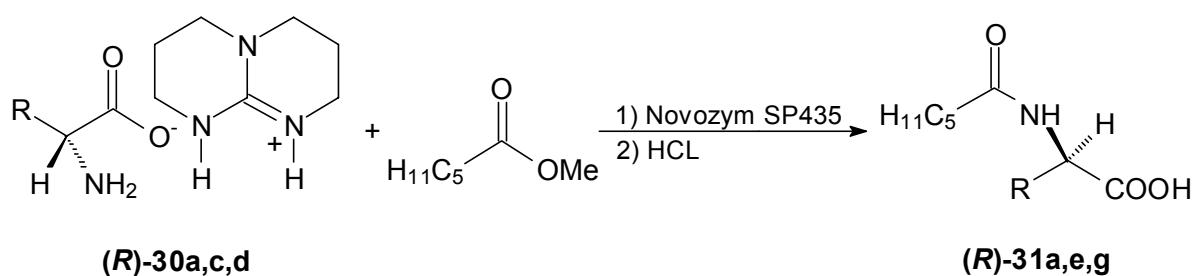


Abb. 57: Enzymatische Acylierung von D-Aminosäure-TBD-Kontaktionenpaaren **(R)-30a,c,d**.

Dazu wurden jeweils 3 mmol der entsprechenden D-Aminosäure mit 3 mmol TBD in Monoglyme gemischt. Die so erhaltenen Lösungen wurden mit der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) sowie mit 9 mmol Capronsäuremethylester bei 70 °C enzymatisch acyliert. Nach einer Reaktionszeit von 6 Tagen wurden die Umsetzungen durch Abfiltrieren des Enzyms abgebrochen. Das Filtrat wurde mit 2 N HCl extrahiert und die

wässrige Phase mit Essigester ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen über MgSO₄ und Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt. Die Resultate dieser Umsetzungen sind in **Tab. 33** zusammengestellt.

Tab. 33: Enzymatische Acylierung von D-Aminosäure-TBD-Kontaktionenpaaren

(R)-30a,c,d.

Substrat	Produkt	Acyldonor	Reaktionszeit [d]	Ausbeute ^a [%]
D-Ala- (R)-30a	<i>N</i> -C ₆ -D-Ala-OH (R)-31a	C ₆ -OMe	6	59
D-Leu- (R)-30c	<i>N</i> -C ₆ -D-Leu-OH (R)-31e	C ₆ -OMe	6	54
D-Phe- (R)-30d	<i>N</i> -C ₆ -D-Phe-OH (R)-31g	C ₆ -OMe	6	70

a) isoliertes Produkt

Die Ausbeuten bei der Acylierung von D-Ala **(R)-30a**, D-Leu **(R)-30c** und D-Phe **(R)-30d** sind mit 54 und 74 % denjenigen der L-Aminosäuren **(S)-30a,c,d** vergleichbar. *Candida antarctica* B (Novozym SP435) zeigt also bei der enzymatischen Acylierung von Aminosäuren unter diesen Bedingungen keine Enantioselektivität. Obgleich auf die beschriebene Weise hohe Ausbeuten an *N*-Acylaminosäuren erhalten werden können, stehen bei einer technischen Nutzung dieses Verfahrens die hohen Kosten, für eine mögliche Regenerierung sowie die Toxizität der Base entgegen.

2.3.8 Enzymatische Acylierungen von Aminosäuren nach Komplexierung an Ionenaustauscher

Im Gegensatz zur Solubilisierung mit nicht-nucleophilen Basen wäre im Hinblick auf niedrige Kosten die entsprechende Bildung von Kontaktionenpaaren an Ionenaustauschern interessant. Durch Komplexierung der Aminosäure am Ionenaustauscher sollte die Carboxylat-Gruppe der Aminosäure mit einem Anion des Ionenaustauschers in Wechselwirkung treten. Die so erreichte temporäre ionische Bindung der Aminosäure am Ionenaustauscherharz könnte eine erhöhte Reaktivität der Aminofunktion zur Folge hat. Das Prinzip ist in **Abb. 58** dargestellt.

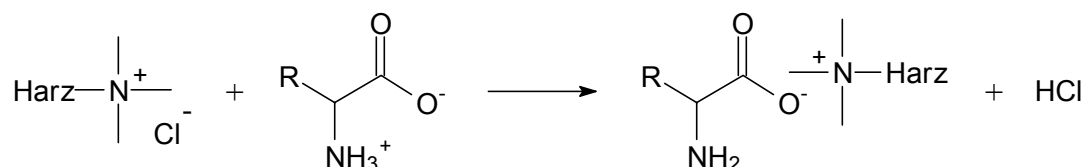


Abb. 58: Komplexierung von Aminosäuren an basischen Ionenaustauschern.

Als Träger wurden stark basische Anionenaustauscher gewählt, die in organischen Medien stabil sind und eine große Oberfläche besitzen. In Vorversuchen wurden diese mit Phenylalanin beladen und im Schüttler bei 800 rpm und 70°C einen Tag lang in Gegenwart von Essigester auf ihre Stabilität getestet. Während dieser Zeit wurde die Färbung der Lösung und der Abrieb durch die mechanische Beanspruchung beobachtet. Wenn nur eine leichte Gelbfärbung und geringer Abrieb festgestellt wurde, wurde die Stabilität als mit gut bewertet. Bei starker Färbung der Lösung und/oder starkem Abrieb wurde der Ionenaustauscher als nicht geeignet eingestuft (vgl. **Tab. 34**).

Tab. 34: Eignung verschiedener Ionenaustauscher zur Komplexierung von Aminosäuren.

Ionenaustauscher	Kopfgruppe	Partikelgröße [mesh]	Kapazität [mmol/g]	Stabilität
Amberlite IRA-400	$-\text{N}(\text{R})_3^+\text{Cl}^-$	20-50	3,8	n.g. ^a
Amberlite IRA-910	$-\text{N}(\text{R})_3^+\text{Cl}^-$	16-50	3,8	n.g. ^{a,b}
Amberlite A26	$-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$	20-50	4,4	gut
Amberlite A27	$-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$	20-50	2,6	gut
Dowex 1x8	$-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$	50-100	3,5	n.g. ^b
Dowex 2x8	$(\text{CH}_3)_2\text{NC}_2\text{H}_5\text{OH}^+\text{Cl}^-$	50-100	3,5	n.g. ^b
Dowex 550 A	$-\text{N}(\text{R})_3^+\text{Cl}^-$	20-50	1,3	n.g. ^{a,b}
Duolite A147	$-\text{N}(\text{R})_3^+\text{Cl}^-$	20-50	3,1	n.g. ^b

n.g.) nicht geeignet; a) starker Abrieb; b) starke Gelbfärbung

Aus den Vorversuchen ergab sich, daß die Ionenaustauscher Amberlite A26 und A27 für diesen Zweck am besten geeignet sind. Sie zeigten kaum Abrieb und führten nur zu einer geringen Färbung der Lösung. Aufgrund der höheren Kapazität von Amberlite A26 wurde dieses Material für die weiteren Versuche eingesetzt.

2.3.8.1 Enzymatische Acylierungen von Aminosäuren am Ionenaustauscher: Lipase-Screening

In Vorversuchen stellte sich heraus, daß die bisher meist verwendete, immobilisierte Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) für Reaktionen am Ionentauscher nicht geeignet ist. Daher mußte über ein sog. Screening einer Palette lyophilisierter Lipasen nach einer geeigneten Lipase gesucht werden. Dazu wurden 10g Ionentauscher mit Glycin beladen, der Ionentauscher neutral gewaschen und getrocknet. Zur enzymatischen Acylierung wurden jeweils 1g des beladenen Ionenaustauschers mit 4 ml Capronsäuremethylester (Lösungsmittel und Acyldonor) vermischt und in Gegenwart von jeweils 50 mg der untersuchten Lipasen bei 50 °C sechs Tage zur Reaktion gebracht. Die Reaktionsmischungen wurden filtriert, der Ionentauscher gewaschen und die acylierte Aminosäure durch Zugabe von HCl vom Ionentauscher eluiert. Die Ausbeutebestimmung erwies sich als schwierig, da die Menge der gebundenen Aminosäure nicht eindeutig bestimmt werden kann. Es wurde daher eine gravimetrische Bestimmung der am Ionenaustauscher gebundenen Aminosäure durchgeführt (vgl. **Tab. 35**). Zum Vergleich wurde das gewonnene Produkt mit der maximalen Kapazität von Amberlite 26 (4,4 mmol/g) korreliert. Beide Verfahren erwiesen sich einigermaßen als brauchbar für die Ausbeutebestimmung der enzymatischen Acylierungen am Ionenaustauscher (vgl. **Tab. 35**).

Tab. 35: Enzymatische Acylierung von Aminosäuren am Ionenaustauscher-Lipasenscreening.

Lipase	Reaktionszeit [d]	Ausbeute [%]
<i>Alcaligines species</i>	4	12
<i>Aspergillus oryzae</i>	6	<5
<i>Candida antarctica</i> B	4	52
<i>Candida cylindracea</i>	6	- ^a
<i>Candida species</i>	4	11
<i>Mucor miehei</i>	4	9
<i>Porcine pancreas</i>	6	8
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4	9
<i>Pseudomonas species</i>	4	<5
<i>Rhizopus javanicus</i>	6	<5

a) kein Produkt beobachtet

Wiederum erwies sich die (hier lyophilisiert) Lipase aus *Candida antarctica* B für diese enzymatischen Acylierungen als am besten geeignet. Mit Ausbeuten von 12 % bzw. 11 %

erweisen sich die Lipasen aus *Alcaligenes species* und *Candida species* als bedingt geeignet. Alle anderen Lipasen sind ungeeignet.

2.3.8.2 Enzymatische Acylierung von Aminosäuren am Ionenaustauscher

Nach diesen Vorversuchen wurde nun eine ganze Palette von Aminosäuren am Ionenaustauscher komplexiert und der enzymatischen Acylierung unterworfen. Dazu wurden die Aminosäuren D- bzw. L-Alanin, Glycin, D- bzw. L-Phenylalanin, L-Lysin und L-Leucin mit dem Ionenaustauscher, wie beschrieben komplexiert und nach der Neutralisation getrocknet. Zur Überprüfung der Enantioselektivität der lyophilisierten Lipase aus *Candida antarctica* B wurden wiederum D-Alanin und D-Phenylalanin in die Studien mit einbezogen. Jeweils 1g des mit der jeweiligen Aminosäure beladenen Ionenaustauschers wurden in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B zur Reaktion gebracht. Als Acyldonor und gleichzeitig Lösungsmittel wurde Capronsäuremethylester bzw. Laurinsäuremethylester verwendet (vgl. **Abb. 59**).

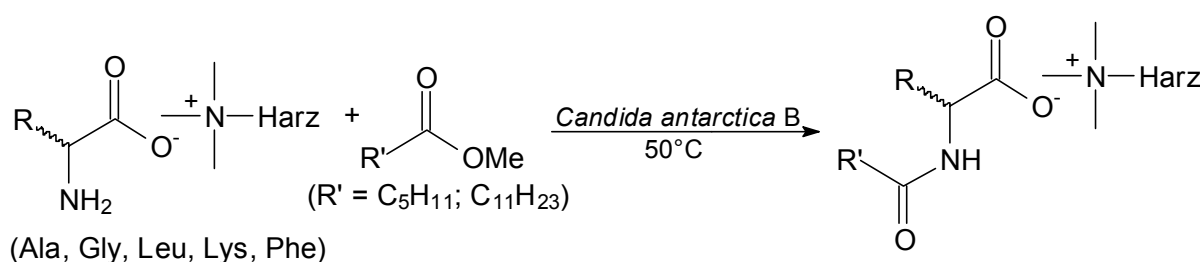


Abb. 59: Lipase-katalysierte Acylierung von an Amberlite A26 komplexierten Aminosäuren.

Nach einer Reaktionszeit von 6 Tagen bei 50°C wurden die Reaktionen durch Abtrennung des Ionenaustauschers vom Enzym beendet. Nach dem Eluieren der Aminosäuren vom Ionenaustauscher und Extraktion der acylierten Produkte mit Essigester wurden die Ausbeuten an acylierten Aminosäuren, wie oben beschrieben bestimmt (vgl. **Tab. 36**).

Tab. 36: Lipase-katalysierte Acylierung von Aminosäuren am Ionenaustauscher

Aminosäure	Produkt	Acyldonor	Ausbeute [%]
L-Alanin	<i>N</i> -C ₆ -L-Ala-OH (S)-32a	C ₆ -OMe	47
	<i>N</i> -C ₁₂ -L-Ala-OH (S)-32b	C ₁₂ -OMe	44
Glycin	<i>N</i> -C ₆ -Gly-OH 32c	C ₆ -OMe	52
	<i>N</i> -C ₁₂ -Gly-OH 32d	C ₁₂ -OMe	55

Aminosäure	Produkt	Acyldonor	Ausbeute [%]
L-Leucin	<i>N</i> -C ₆ -L-Leu-OH (S)-32e	C ₆ -OMe	38
	<i>N</i> -C ₁₂ -L-Leu-OH (S)-32f	C ₁₂ -OMe	45
L-Lysin	<i>N</i> ε-C ₆ -L-Phe-OH	C ₆ -OMe	- ^a
	<i>N</i> ε-C ₁₂ -L-Phe-OH	C ₁₂ -OMe	- ^a
L-Phenylalanin	<i>N</i> -C ₆ -L-Phe-OH (S)-32g	C ₆ -OMe	56
	<i>N</i> -C ₁₂ -L-Phe-OH (S)-32h	C ₁₂ -OMe	61
D-Alanin	<i>N</i> -C ₆ -D-Ala-OH (R)-32a	C ₆ -OMe	45
	<i>N</i> -C ₁₂ -D-Ala-OH (R)-32b	C ₁₂ -OMe	48
D-Phenylalanin	<i>N</i> -C ₆ -D-Phe-OH (R)-32g	C ₆ -OMe	55
	<i>N</i> -C ₁₂ -D-Phe-OH (R)-32h	C ₁₂ -OMe	53

a) kein Produkt beobachtet

Die enzymatischen Acylierungen gelangen auf diese Weise mit Ausbeuten zwischen 38 und 61 %. Eine Verlängerung der Reaktionszeiten auf bis zu 10 Tagen führte nicht zu einer Ausbeutesteigerung. D- und L-Aminosäuren zeigten ähnliche Ausbeuten, so daß man keine Hinweise auf eine Enantioselektivität der Lipase findet. Lysin konnte auf diese Weise nicht acyliert werden.

Damit konnte die lipasen-katalysierte Acylierung von Aminosäuren auch durch Komplexierung am Ionenaustauscher erfolgreich durchgeführt werden. Als problematisch für eine technische Anwendung erweist sich allerdings der unvermeidbare Verlust der lyophilisierten Lipase. Vielleicht kann hier eine Co-Immobilisierung der Lipase auf dem gleichen Träger eine Lösung darstellen.

2.3.9 Diskussion der Ergebnisse der Lipasen-katalysierten Acylierung von Aminosäuren

Durch die Bildung von Kontaktionenpaaren wurde die erforderliche Solubilisierung von Aminosäuren in organischen Reaktionsmedien erreicht. Zur Solubilisierung wurden nicht-nucleophile Basen verwendet; wobei sich die Guanidinderivate TMG und TBD als gut geeignet erwiesen. So konnte mittels NMR die Bildung von Kontaktionenpaaren aus verschiedenen Aminosäuren und equimolaren Mengen TBD beobachtet werden. Die auf diese Weise erhaltenen Kontaktionenpaare **(R)**- und **(S)**-**30a-f** konnten in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) erfolgreich acyliert werden. Bei Reaktionen in

Gegenwart von TBD konnten Ausbeuten zwischen 40 % und 71 % (**R**)- und (**S**)-**31a-l** erhalten werden. Unpolare Aminosäuren wie z. B. Phenylalanin weisen bei der Reaktion höhere Ausbeuten auf (71 % (**S**)-**31g**). Enantioselektivität wird mit der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) nicht beobachtet. Bei der enzymatischen Acylierung von Phenylglycin in reinem TMG mit Capronsäuremethylester als Acyldonor wird als Hauptprodukt mit 46 % überraschend Capronsäurebenzylamid **29** erhalten, offensichtlich zerfällt das Primärprodukt der Acylierung unter Decarboxylierung. Die für eine Solubilisierung ebenfalls gut geeigneten Phasentransferkatalysatoren zeigten bei der enzymatischen Acylierung nur geringe Ausbeuten, so daß zusammenfassend festgestellt werden kann, daß TBD für die Bildung von Kontaktionenpaaren und deren enzymatischen Acylierung am besten geeignet ist.

Zur Bildung von Aminosäure-Kontaktionenpaaren können auch basische Ionenaustauscher verwendet werden. Unter Verwendung der lyophilisierten Lipase aus *Candida antarctica* B konnten *N*-acylierte Aminosäuren in Ausbeuten zwischen 38 % und 61 % (**R**)- und (**S**)-**32a-h** erhalten werden. Auch hier findet man keine Enantioselektivität.

2.4 D-Hydantoinase-katalysierte Synthese von (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren

2.4.1 Einleitung

2.4.1.1 Vorarbeiten mit D-Hydantoinasen

Eine sehr effiziente Methode zur Synthese enantiomerenreiner D- α -Aminosäuren ist die Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse von 5-monosubstituierten Hydantoinen. Diese Reaktion soll im folgenden anhand der Synthese von 4-Hydroxy-D-phenylglycin ausgehend von DL-5-(4-Hydroxyphenyl)-hydantoin erläutert werden (vgl. **Abb. 60**). Diese Reaktion wird seit 1983 industriell genutzt, da 4-Hydroxy-D-phenylglycin einen Baustein für nicht natürliche β -Lactam-Antibiotika darstellt^{169,170,171}.

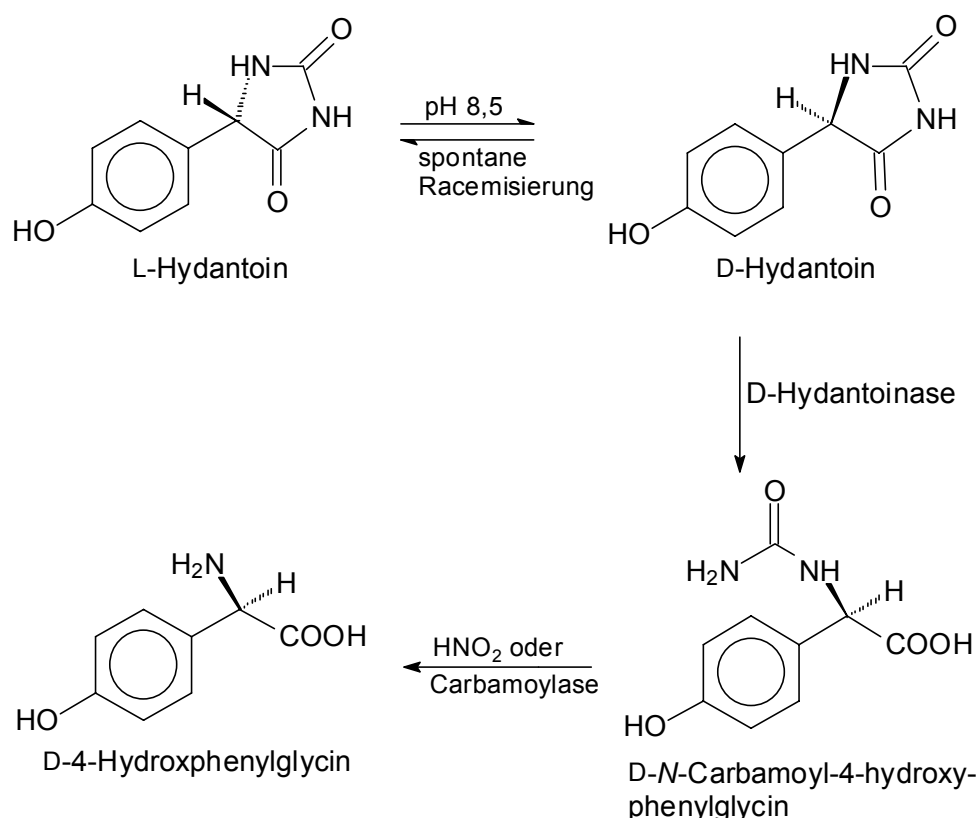


Abb. 60: Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse von DL-5-(4-Hydroxyphenyl)-hydantoin mit anschließender chemischer bzw. enzymatischer Hydrolyse.

Bei dieser Reaktion katalysiert die D-Hydantoinase selektiv die Hydrolyse des D-Enantiomeren unter Bildung von *N*-Carbamoyl-D-(4-hydroxyphenyl)glycin. Das nicht umgesetzte L-Enantiomere racemisiert unter den leicht alkalischen Reaktionsbedingungen spontan, so daß theoretisch ein quantitativer Umsatz zum *N*-Carbamoyl-D-(4-hydroxyphenyl)glycin möglich ist. Der zweite Hydrolyseschritt zu D-(4-Hydroxyphenyl)glycin kann sowohl chemisch als auch enzymatisch¹⁷² durchgeführt werden. Für die Synthese nach Abb. 60 werden nach Optimierung chemische Ausbeuten $\geq 96\%$ und Enantiomerenreinheiten $\geq 98\%$ ee erhalten¹⁷³.

In unserer Arbeitsgruppe wurden, ausgehend von C(5)-substituierten Hydantoinen sowohl proteinogene¹⁷⁴ als auch nichtproteinogene¹⁷⁵ D-Aminosäuren als Produkte dieser Hydrolysen erhalten. 5,5-disubstituierte Hydantoinen, sowie solche mit geladenen Substituenten in der Nähe des Hydantoinringes, wie z.B. 5- γ -Aminopropylhydantoin⁷³ werden von den Hydantoinasen nicht als Substrate akzeptiert. Der Reaktionsverlauf der Hydantoinase-katalysierten Hydrolyse wurde von Dudley et al.¹⁷⁶ beschrieben. Er konnte eine rasche Racemisierung der Hydantoinen im wässrigen Medium bei $\text{pH} > 6$ nachweisen. Auch konnte die Reversibilität der Hydrolysereaktion bewiesen¹⁷⁶ werden, wobei aber das Reaktionsgleichgewicht deutlich auf Seite der *N*-Carbamoylamino-säure liegt (vgl. **Abb. 61**).

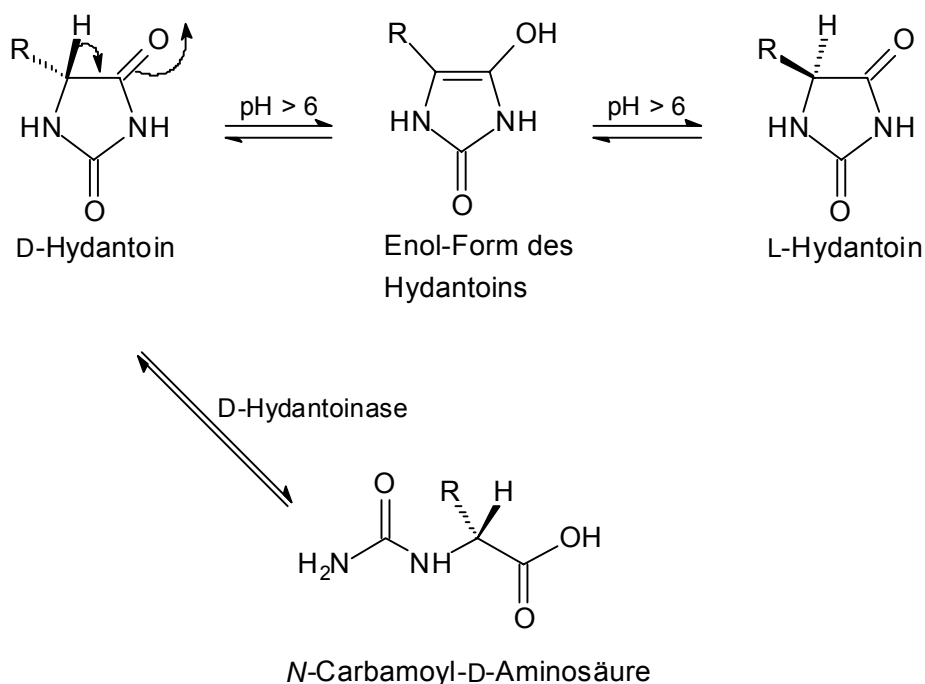


Abb. 61: D-Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse von racemischen Hydantoinen.

In der Struktur von Hydantoinen findet man Keto-Enol sowie Lactam-Lactim-Tautomerie, beide führen zu einer Racemisierung am asymmetrisch substituierten C(5)-Kohlenstoffatom. Die Hydrolysegeschwindigkeit wird dabei wesentlich durch den pH-Wert der Lösung und durch die Art des Substituenten beeinflusst. Substituenten, die durch mesomere bzw. induktive Effekte die Elektronendichte an C(5) reduzieren und somit die Acidität des Protons erhöhen, begünstigen die Enol-Struktur und damit die Racemisierung (vgl. **Abb. 61**).

2.4.1.2 Strukturelle Verwandtschaft von Hydantoinen und Oxazolidin-2,4-dionen

Bislang war in der Literatur nur die Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse von Hydantoinen (Imidazolidin-2,4-dione) bekannt. Durch Ersatz der NH-Gruppe in 1-Position mit einem isoelektronischen Sauerstoffatom leiten sich davon die entsprechenden Oxazolidin-2,4-dione ab (vgl. **Abb. 62**). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit sollten Oxazolidin-2,4-dione daher auch Substrate für Hydantoinasen darstellen.

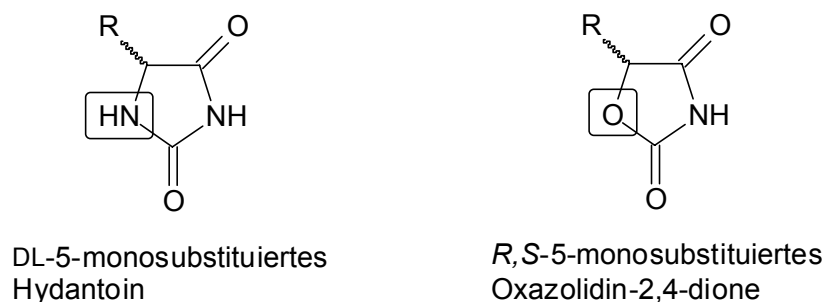


Abb. 62: Strukturelle Verwandtschaft von Hydantoinen mit Oxazolidin-2,4-dionen

2.4.1.3 Aufgabenstellung

Auf der Basis dieser Hypothese sollte versucht werden, auf diese Weise zu enantiomerenreinen α -Hydroxycarbonsäuren zu gelangen. Dazu wurde eine Palette strukturell unterschiedlicher Oxazolidin-2,4-dione synthetisiert und zwar sowohl mit aliphatischen als auch aromatischen Resten am C(5)-Kohlenstoffatom. Neben der enzymatischen Hydrolyse sollte dabei auch die entsprechende Racemisierung von Oxazolidin-2,4-dionen untersucht werden.

2.4.2 Synthesen 5-substituierter Oxazolidin-2,4-dione

Racemische Oxazolidin-2,4-dione sind aus racemischen α -Hydroxycarbonsäureestern durch Kondensation mit Guanidin in ethanolischer Lösung nach einer Vorschrift von Traube et al.¹⁷⁷ erhältlich. Dabei bilden sich zunächst die Dihydrooxazol-Derivate, welche unter schonenden, leicht sauren Bedingungen zu den gewünschten, racemischen Oxazolidin-2,4-dionen hydrolysiert werden können. Die für die hier durchgeführten Umsetzungen benötigten racemischen α -Hydroxycarbonsäureester können aus Aldehyden über die daraus erhältlichen Cyanhydrine¹⁷⁸ durch Methanolyse erhalten werden. Anschließende Hydrolyse der so erhaltenen Imidoester-hydrochloride führt dann zu den entsprechenden α -Hydroxycarbonsäureethylestern¹⁷⁹ (vgl. **Abb. 63**).

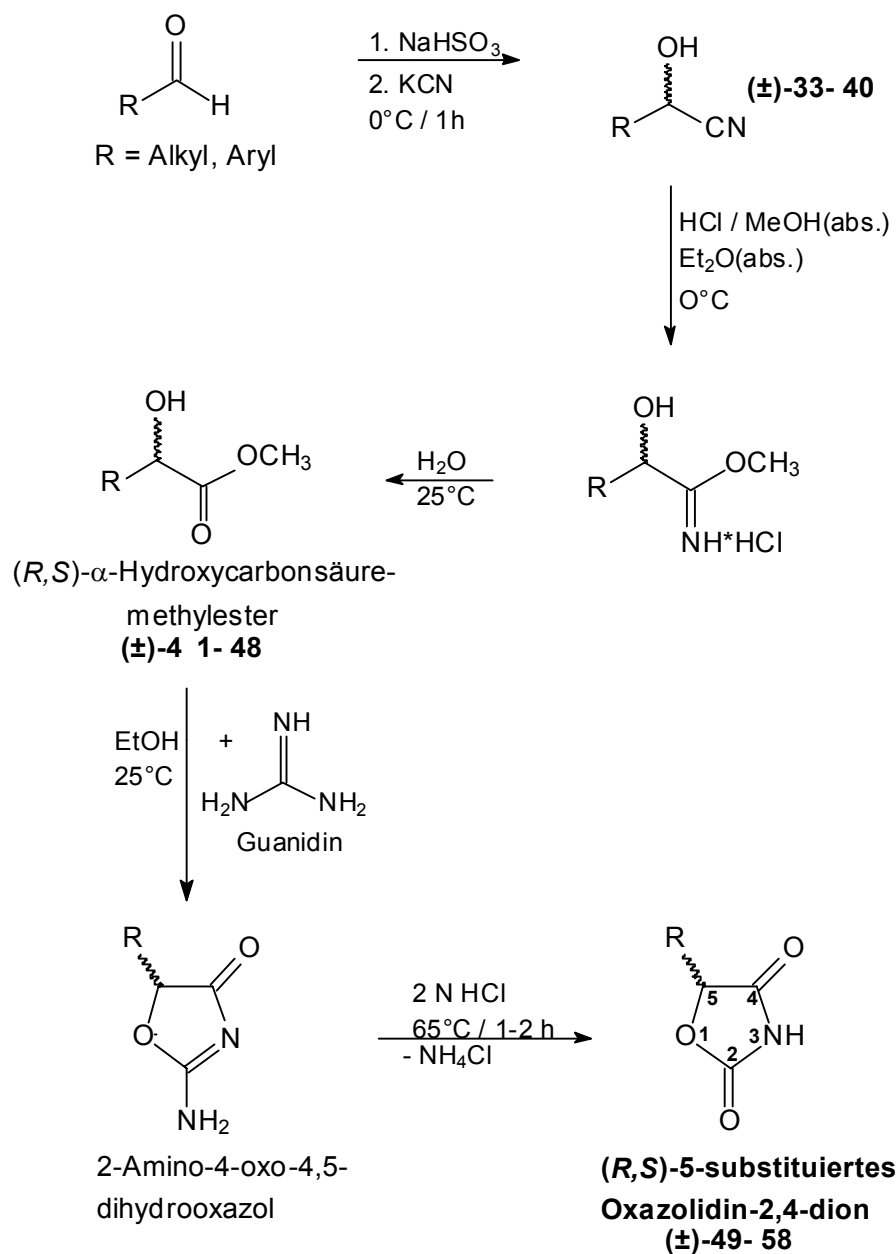
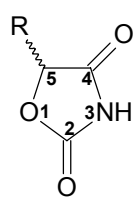


Abb. 63: Darstellung 5-substituierter Oxazolidin-2,4-dione (allgemein).

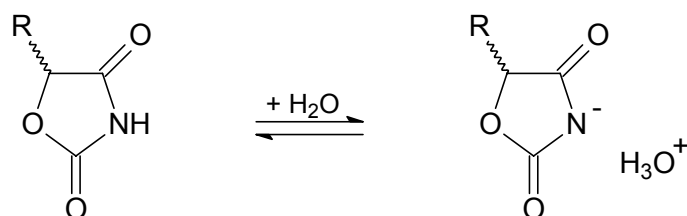
Nach dieser Methode wurden, ausgehend von den entsprechenden Aldehyden, die folgenden Oxazolidin-2,4-dione dargestellt (vgl. **Tab. 37**).

Tab. 37: Oxazolidin-2,4-dione-Ausbeuten und Eigenschaften

Oxazolidin-2,4-dione; R- 	Ausbeute [%] ^a	Schmp. [°C] und Eigenschaften
(<i>R,S</i>)-5-Phenyl- (±)- 49	39	104-106, farblose Kristalle
(<i>R,S</i>)-5-(<i>p</i> -Chlorphenyl)- (±)- 50	29	161-163, farblose Kristalle
(<i>R,S</i>)-5-(<i>o</i> -Chlorphenyl)- (±)- 51	28	106-108, farblose Kristalle
(<i>R,S</i>)-5-(<i>p</i> -Methoxyphenyl)- (±)- 52	36	128-130, farblose Kristalle
(<i>R,S</i>)-5-(<i>o</i> -Methoxyphenyl)- (±)- 53	35	175-177, farblose Kristalle
(<i>R,S</i>)-5-(<i>p</i> -Methylphenyl)- (±)- 54	37	112-114, farblose Kristalle
(<i>R,S</i>)-5-Benzyl- (±)- 55	25	86-88, farblose Kristalle
(<i>R,S</i>)-5-β-Phenylethyl- (±)- 56	24	92-93, farblose Kristalle
(<i>R,S</i>)-5-Butyl- (±)- 57	25	78-79, farblose Kristalle
(<i>R,S</i>)-5-(<i>m</i> -Chlorphenyl)- (±)- 58	31	142-144, farblose Kristalle

a) isoliert über fünf Stufen, ausgehend vom entsprechenden Aldehyd.

Die Eigenschaften der Oxazolidin-2,4-dione sind denjenigen der entsprechenden Hydantoine sehr ähnlich, ihre Schmelzpunkte liegen jedoch generell tiefer. Die Imid-Protonen der Oxazolidin-2,4-dione sind acider, so daß schon im neutralen, wäßrigen Medium der größte Teil (> 95 %) der Verbindungen in ionischer Form vorliegt.

**Abb. 64:** Dissoziation von Oxazolidin-2,4-dionen in wässrigem Medium.

2.4.3 D-Hydantoinase katalysierte Hydrolyse der Oxazolidin-2,4-dione

In Übereinstimmung mit unserer Hypothese erwiesen sich in der Tat auch racemische 5-Oxazolidin-2,4-dione als geeignete Substrate für D-Hydantoinasen. So führte die D-Hydantoinase-katalysierte enzymatische Hydrolyse zu den entsprechenden *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren (vgl. **Abb. 65**), welche nachfolgend in die entsprechenden (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren umgewandelt werden können.

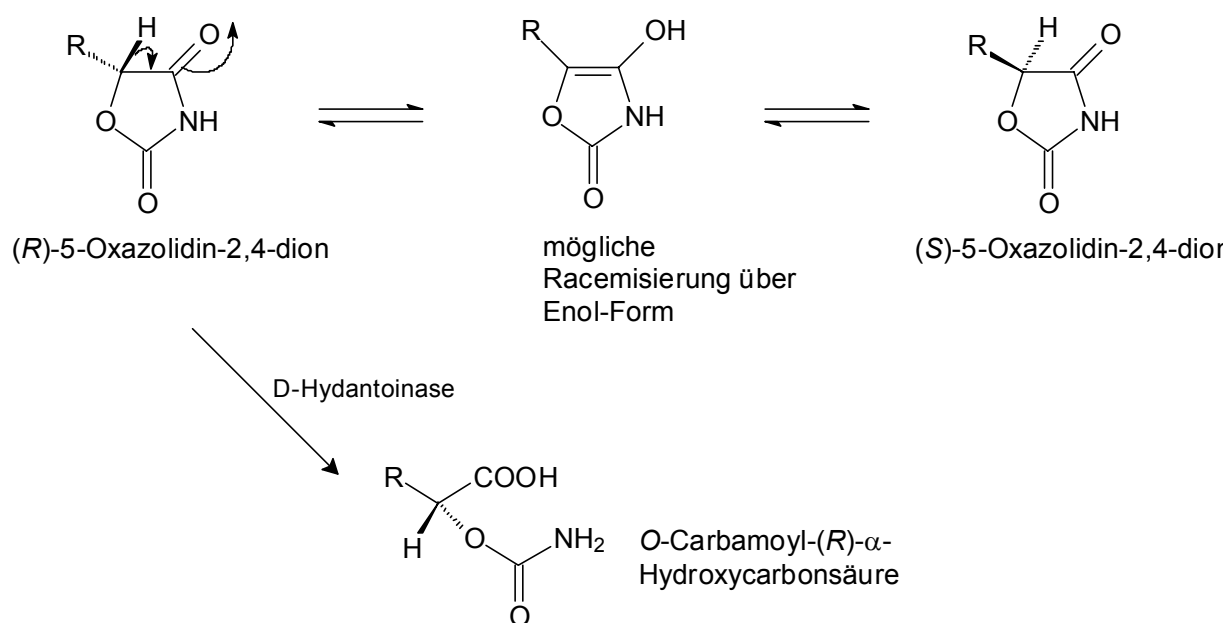


Abb. 65: Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse racemischer 5-Oxazolidin-2,4-dione

2.4.3.1 Reaktionsverfolgung mittels HPLC

Da wie bereits oben (vgl. **Abb. 64**) beschrieben, die Oxazolidin-2,4-dione in der Reaktionslösung nahezu vollständig dissoziiert vorliegen, sinkt der pH-Wert bei Lösung der Substrate im Puffer stark ab und muß deshalb zunächst auf den für die Reaktion benötigten pH-Wert gebracht werden. Dies hat natürlich zur Folge, daß während der Reaktion selbst keine nachweisbare Menge Natronlauge (Autotitrator) verbraucht wird. Daher kann auch keine Titrationskurve aufgezeichnet werden. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität mußte somit durch Verfolgung des Reaktionsumsatzes mittels HPLC erfolgen.

Man erhält so eine „absolute“ spezifische Aktivität, da der Verbrauch des Substrates und die Entstehung des Produktes direkt aus dem Chromatogramm entnommen werden können. **Abb.**

66 zeigt eine typische Zeit-Umsatz-Kurve am Beispiel von *(R,S)*-5-(*p*-Chlor-phenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**50**.

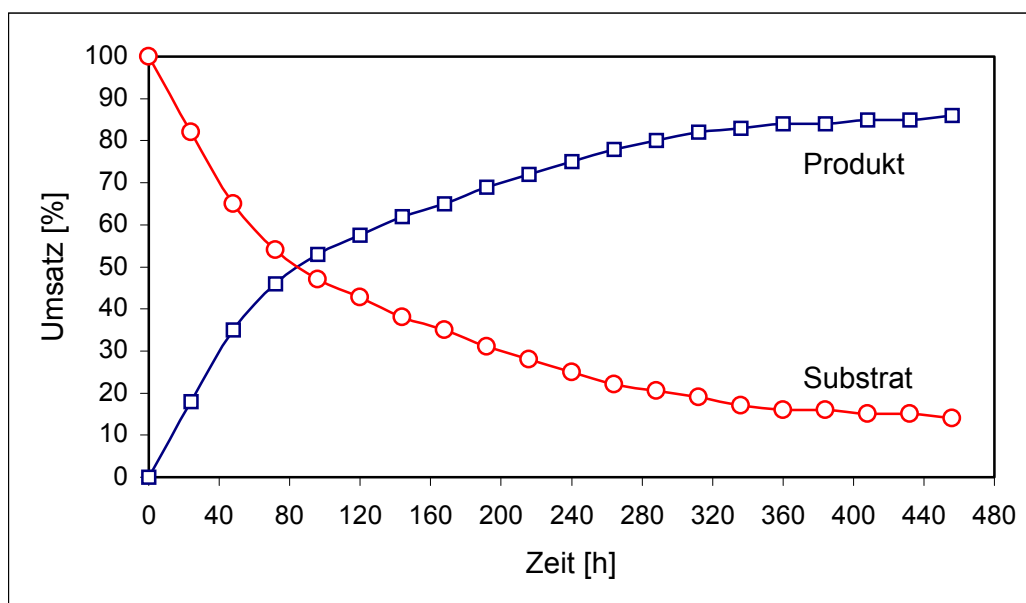


Abb. 66: *(R,S)*-5-(*p*-Chlorphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**50** Zeit-Umsatz-Kurve.

Erste Versuche zur Hydantoinase-katalysierten Hydrolyse von racemischen Oxazolidin-2,4-dion-Derivaten unter den für Hydantoinen üblichen Bedingungen lieferten enttäuschenderweise ausschließlich racemische α -Hydroxycarbonsäuren. Als Ursache dafür konnte beträchtliche chemische Hydrolyse der 5-Oxazolidin-2,4-dione unter den Reaktionsbedingungen nachgewiesen werden. Das folgende Diagramm (vgl. **Abb. 67**) zeigt die Zeit-Umsatz-Kurve bei der Hydantoinase-katalysierten Hydrolyse von 5-Phenyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-**49** mit und ohne Enzym.

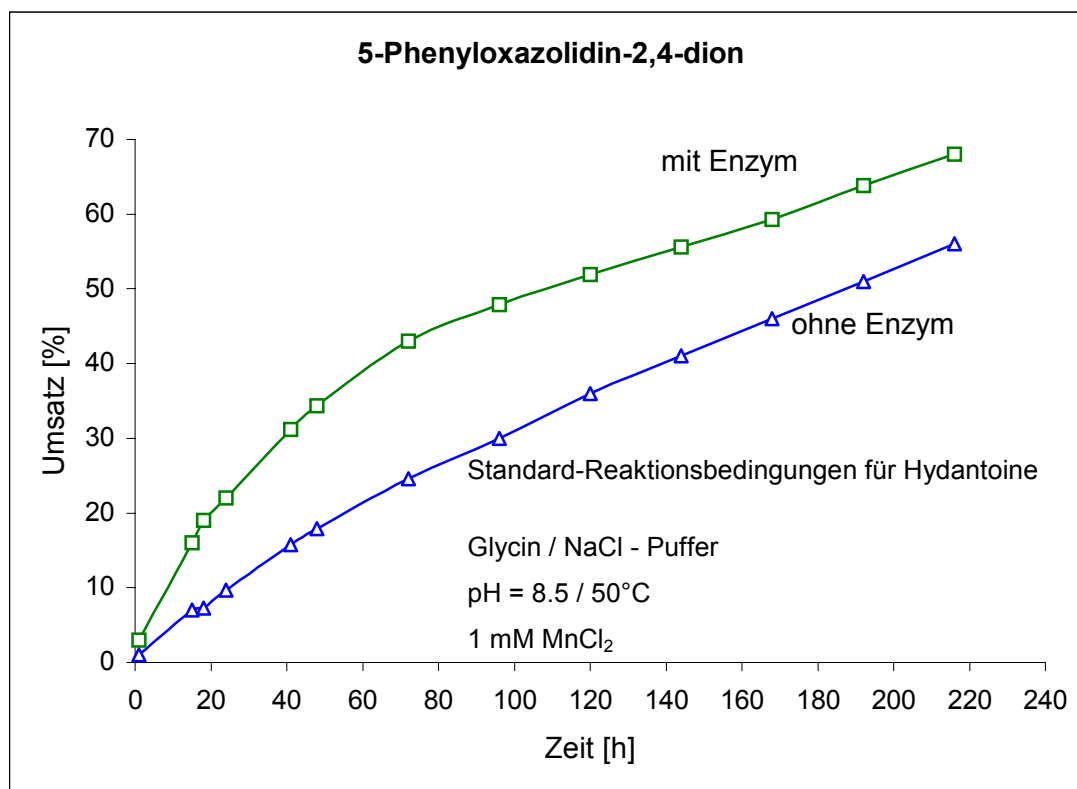


Abb. 67: Zeit-Umsatz-Kurve bei der Hydantoinase-katalysierten Hydrolyse von 5-Phenylloxazolidin-2,4-dion (\pm)-**49** (mit und ohne Enzym).

Zur konsequenten Vermeidung dieser konkurrierenden, chemischen Hydrolyse mußten also Bedingungen gefunden werden, unter denen dieser Prozess vernachlässigbar und gleichzeitig die Hydantoinasen eine möglichst hohe spezifische Aktivität zeigen.

Man sollte zunächst erwarten, daß die Erniedrigung des pH-Wertes sowie eine geringere Temperatur die chemische Hydrolyse unterbinden sollten. Die Abhängigkeit der Hydrolyseaktivitäten der unterschiedlichen Hydantoinasen vom pH-Wert mit dem jeweiligen pH-Optimum kann aus der Literatur entnommen^{180,181,182,183} (vgl. **Tab. 38**) werden.

Tab. 38: Hydrolyseaktivität von verschiedenen Hydantoinasen in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Hydantoinase aus Mikroorganismus	Hydrolyseaktivität im pH-Bereich	pH-Wert Optimum
<i>Pseudomonas striata</i> ¹⁸⁰	7-9.5	8.0-8.3
<i>Pseudomonas sp</i> AJ 11220 ¹⁸¹	7.5-9.0	≈8.0
<i>Agrobact. sp</i> IP-671 ¹⁸²	7-11	9-10
Hydantoinase 1 bzw. 2 ¹⁸³	8.0-10.0	8.5

Daraus ist ersichtlich, daß die Hydantoinasen die höchste Aktivität im alkalischen Medium besitzen, während im sauren Bereich die gesamte Aktivität verloren geht.

2.4.4 D-Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse: Optimierungsversuche

Als erstes wurde der pH-Wert erniedrigt und die Reaktionstemperatur von 50° C auf Raumtemperatur herabgesetzt. Der bisher für die D-Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse verwendete Glycin-NaCl-Puffer besitzt nur bis pH 8.0 Puffereigenschaften.

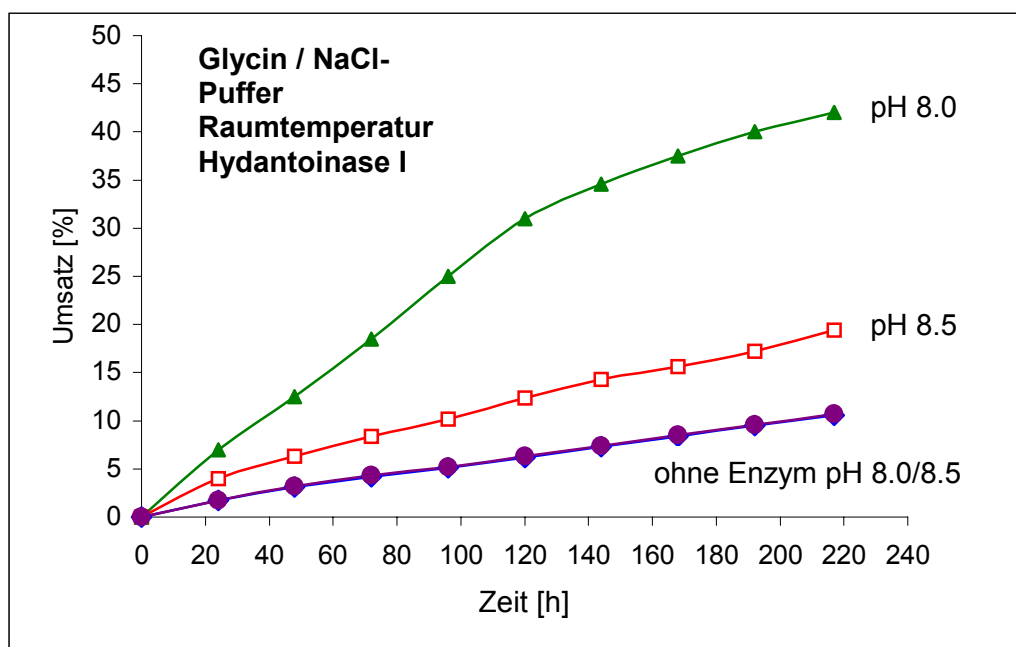


Abb. 68: Umsatz-Zeit-Diagramm von 5-Phenylloxazolidin-2,4-dion (\pm)-49 bei pH 8.0 und pH 8.5 im Gly/NaCl-Puffer.

Überraschenderweise war festzustellen, daß dabei die Hydantoinase I gegenüber den Oxazolidin-2,4-dionen eine deutlich erhöhte Aktivität aufweist (vgl. **Abb. 68**). Der Anteil der chemischen Hydrolyse bleibt mit ca. 10 % unverändert. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde daher der pH-Bereich zwischen 6.5-9.0 näher untersucht.

Da zur Aktivierung der Hydantoinasen 1 mM MnCl_2 zugesetzt werden muß, konnte der für pH-Wert <8 üblicherweise verwendete Phosphat-Puffer wegen der Schwerlöslichkeit von

$\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$ nicht benutzt werden. Als für diese Reaktion am besten geeignet wurde ein 0,1 M Tris/HCl-Puffer ermittelt. Als Substrat diente *R,S*-5-Phenyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-49.

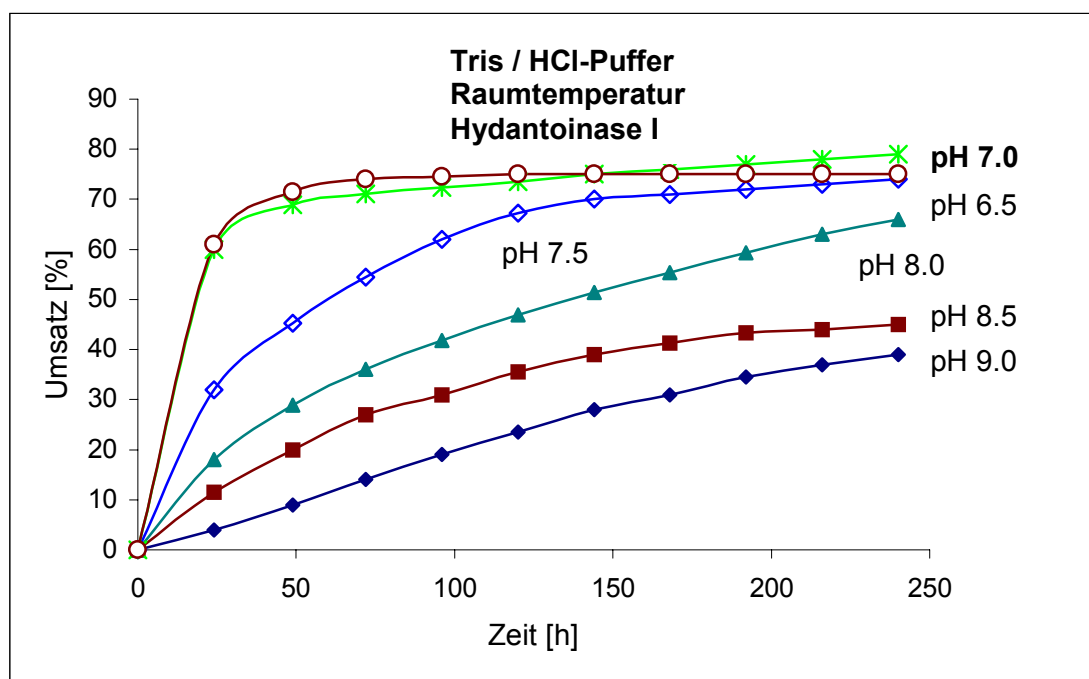


Abb. 69: Abhängigkeit des Umsatzes von Hydantoinase I vom pH-Wert des Puffers.

In Tab. 39 sind die spezifischen Aktivitäten der Hydantoinase I bei pH 9,0-6,5 zusammen mit dem Umsatz (HPLC) aufgelistet. Die gesamte Reaktionszeit betrug 240h.

Tab. 39: Hydantoinase I-Abhängigkeit der spezifischen Aktivität vom pH-Wert.

pH-Wert	Spez. Aktivität [mU/mg]	Umsatz [%]
9.0	62	41
8.5	122	44
8.0	140	50
7.5	255	79
7.0	917	79
6.5	950	75

Reaktionszeit 240h

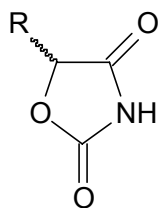
Man findet also im Vergleich zu den Hydantoinen eindeutig eine Verschiebung des pH-Optimums von 8.5-9.0 (bei Hydantoinen) zu 6.5-7.0 bei den Oxazolidin-2,4-dionen.

Die höchste Aktivität mit 950 mU/mg bei einem Umsatz von 75 % ist bei einem pH-Wert von 6,5 zu finden. Ein noch höherer Umsatz (79 %) wird bei pH 7,0 erreicht. Bemerkenswert ist insbesondere eine Steigerung der spezifischen Aktivität um eine Größenordnung beim Übergang von pH 9 auf 7. Bei pH < 6.5 lösen sich die Oxazolidin-2,4-dione in dem Medium nicht mehr ausreichend.

Bei einem pH-Wert von 7 (Tris/HCl-Puffer) war auch die chemische Hydrolyse nicht mehr nachweisbar. Eine Ausnahme bildeten die Oxazolidin-2,4-dione (\pm)-50, (\pm)-51, (\pm)-58 bei denen sich ca. 4 %, 10 % bzw. 25 % chemische Hydrolyse nachweisen läßt.

2.4.5 Optimierte Hydrolysen der Oxazolidin-2,4-dionen

Die im folgenden beschriebenen racemischen, 5-substituierten Oxazolidin-2,4-dione wurden in Gegenwart von Hydantoinase-I und Hydantoinase-II in die entsprechenden *O*-Carbamoyl-*(R)*- α -Hydroxycarbonsäuren überführt. Die Hydrolyse erfolgte dabei unter den zuvor optimierten Reaktionsbedingungen (RT, 0.1 M TRIS/HCl-Puffer pH 7.0, Argon-Atmosphäre). Dazu wurden jeweils 5 mmol des entsprechenden Substrates in 80 ml Puffer gelöst und die Lösung mit 200 μ l Hydantoinase-I bzw. 50 μ l Hydantoinase-II versetzt. Zur Aktivierung der Enzyme wurde 1 mM MnCl₂ zugesetzt. Die auf diese Weise erhaltenen *O*-Carbamoyl-*(R)*- α -Hydroxycarbonsäuren kristallisieren zusammen mit dem jeweiligen, noch nicht umgesetzten Oxazolidin-2,4-dion nach Einengen des Reaktionsansatzes und Ansäuern auf pH 1-2 aus der Reaktionslösung aus. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch semi-präparative HPLC. Folgende Oxazolidin-2,4-dione wurden auf diese Weise der enzymatischen Hydrolyse unterworfen (vgl. **Tab. 40**).

Tab. 40: Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse von (\pm)-**49-58**.**R,S-5-subst.-Oxazolidin-2,4-dion**

R-	R-
<p style="text-align: right;">-(\pm)-49</p>	<p style="text-align: right;">-(\pm)-54</p>
<p style="text-align: right;">-(\pm)-50</p>	<p style="text-align: right;">-(\pm)-55</p>
<p style="text-align: right;">-(\pm)-51</p>	<p style="text-align: right;">-(\pm)-56</p>
<p style="text-align: right;">-(\pm)-52</p>	<p style="text-align: center;">CH₃-(CH₂)₃-</p> <p style="text-align: center;">-(\pm)-58</p>
<p style="text-align: right;">-(\pm)-53</p>	<p style="text-align: right;">-(\pm)-58</p>

Zur Untersuchung der Substrattoleranz der beiden Hydantoinasen wurden sowohl Oxazolidin-2,4-dione mit aliphatischen Substituenten als auch solche mit verschiedenen aromatischen Substituenten der enzymatischen Hydrolyse unterworfen. Auf die Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse von (\pm)-**58** wurde wegen der besonders leicht ablaufenden chemischen Hydrolyse (vgl. 2.4.4) verzichtet. Durch den Einsatz von *o,p*-substituierten Systemen sollten zusätzliche Informationen über die Substrattoleranz der verwendeten Enzyme gewonnen werden.

Tabelle 5 gibt die bei der enzymatischen Hydrolyse der oben genannten Substrate erhaltenen Ergebnisse wieder. Angegeben ist das jeweils verwendete Enzym, die bestimmte spezifische Aktivität, die Reaktionszeit und der Umsatz (HPLC).

Tab. 41: Enzymatische Hydrolysen der Oxazolidin-2,4-dione (\pm)-**49-57**.

Substrat Rest R	Enzym	Produkt	Spez. Aktivität [mU/mg]	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]
<i>(R,S)</i> -5-Phenyl- (\pm)- 49	Hyd-I	<i>(R)</i> - 59a	1036	186	91
	Hyd-II	<i>(R)</i> - 59b	454	186	93
<i>(R,S)</i> -5-(<i>p</i> -Chlorphenyl)- (\pm)- 50	Hyd-I	<i>(R)</i> - 60a	805	164	83
	Hyd-II	<i>(R)</i> - 60b	175	263	84
<i>(R,S)</i> -5-(<i>o</i> -Chlorphenyl)- (\pm)- 51	Hyd-I	<i>(R)</i> - 61a	25	787	43
	Hyd-II	<i>(R)</i> - 61b	14	832	35
<i>(R,S)</i> -5-(<i>p</i> -Methoxyphenyl)-(\pm)- 52	Hyd-I	<i>(R)</i> - 62a	519	280	85
	Hyd-II	<i>(R)</i> - 62b	60	450	81
<i>(R,S)</i> -5-(<i>o</i> -Methoxyphenyl)-(\pm)- 53	Hyd-I	<i>(R)</i> - 63a	18	832	19
	Hyd-II	<i>(R)</i> - 63b	5	814	6
<i>(R,S)</i> -5-(<i>p</i> -Methylphenyl)- (\pm)- 54	Hyd-I	<i>(R)</i> - 64a	682	262	77
	Hyd-II	<i>(R)</i> - 64b	221	354	72
<i>(R,S)</i> -5-Benzyl- (\pm)- 55	Hyd-I	<i>(R)</i> - 65a	87	402	49
	Hyd-II	<i>(R)</i> - 65b	13	480	27
<i>(R,S)</i> -5- β -Phenylethyl- (\pm)- 56	Hyd-I	<i>(R)</i> - 66a	152	385	49
	Hyd-II	<i>(R)</i> - 66b	52	447	47
<i>(R,S)</i> -5-Butyl- (\pm)- 57	Hyd-I	<i>(R)</i> - 67a	- ^a	450	48 ^b
	Hyd-II	<i>(R)</i> - 67b	- ^a	450	35 ^b

a) Produkt konnte mit HPLC nicht Detektiert werden b) Produktausbeuten nach Aufarbeitung der Hydrolyse

Aus **Tab. 41** wird ersichtlich, daß alle eingesetzten Oxazolidin-2,4-dione von den Hydantoinasen als Substrate akzeptiert werden. Allerdings sind die spezifischen Aktivitäten im Vergleich zu den entsprechenden Hydantoinen um ca. 3-Größenordnungen geringer. Auffällig ist auch die deutlich höhere Aktivität der Hydantoinase-1 im Vergleich zur Hydantoinase-2 (insbesondere bei (\pm)-**50** und (\pm)-**54** die sich um den Faktor 10 unterscheiden). Die beiden in *ortho*-Stellung substituierten Oxazolidin-2,4-dione (\pm)-**51** und (\pm)-**53** zeigen besonders geringe spezifische Aktivität, liefern niedrige Umsätze, und erfordern daher extrem lange Reaktionszeiten. Diese Umsetzungen sind für eine präparative Nutzung daher wenig geeignet. (\pm)-**49**, (\pm)-**51**, (\pm)-**52** und (\pm)-**54** mit aromatischen Substituenten am Oxazolidin-Ring zeigen besonders hohe spezifische Aktivitäten bei Hydantoinase-1 mit

Umsätzen von bis zu 93 %. Dies deutet auch auf eine besonders effektive Racemisierung hin. Oxazolidin-2,4-dione, die keine benzyliche Funktion am C(5)-Kohlenstoffatom des Ringes aufweisen, wie z. B. (\pm)-**55**, (\pm)-**56** und (\pm)-**57**, zeigen dagegen eine deutlich geringere spezifische Aktivität. Alle Ausbeuten liegen hier auch unter 50 %. Dies ist wahrscheinlich auf fehlende Racemisierung zurückzuführen, da hier das postulierte Enolat (Carbanion) nicht über den aromatischen Ring stabilisiert werden kann. Weitere Auskunft darüber geben die Enantiomerenreinheiten der nicht umgesetzten Edukte.

Die Reaktionszeiten lagen meist zwischen 180 und 450 Stunden. (\pm)-**51** und (\pm)-**53** bilden mit Reaktionszeiten > 780 h deutliche Ausnahmen.

2.4.6 Bestimmung der Enantiomerenreinheiten

Die Bestimmung der Enantiomerenreinheiten der *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren erfolgte durch Derivatisierung mit Phenacylbromid zu den entsprechenden *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -Hydroxycarbonsäureestern (Abb. 70). Dies hat den Vorteil, daß auf diese Weise eine direkte Bestimmung der Enantiomerenreinheit aus dem Primär-Produkt der enzymatischen Hydrolyse möglich ist.

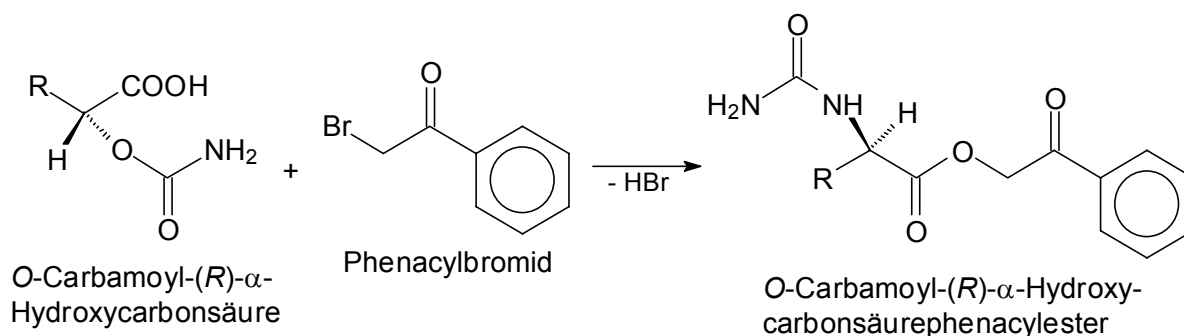


Abb. 70: Veresterung der *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren (*R*)-**59-67** mit Phenacylbromid

Die *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -Hydroxycarbonsäurephenacylester werden nach semi-präparativer HPLC-Reinigung (RP-18 Phase) in kristalliner Form erhalten. Die anschließende Bestimmung der Enantiomerenreinheit erfolgte auf einer chiralen HPLC-Säule (R,R-Whelk 01; OD-R). **Tab. 42** gibt die bestimmten Enantiomerenreinheiten wieder.

Tab. 42: Enantiomerenreinheiten der *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxycarbonsäure-phenacyl-ester.

Edukt <i>O</i> -Carbamoyl-(<i>R</i>)- α -		Produkt <i>O</i> -Carbamoyl-(<i>R</i>)- α -		Enzym	[% ee]
Mandelsäure	(<i>R</i>)- 59a	Mandelsäure-	(<i>R</i>)- 68a	Hyd-I	> 99
	(<i>R</i>)- 59b	OPac	(<i>R</i>)- 68b	Hyd-II	> 99
<i>(p</i> -Chlor)-Mandelsäure	(<i>R</i>)- 60a	<i>(p</i> -Chlor)-	(<i>R</i>)- 70a	Hyd-I	79
	(<i>R</i>)- 60b	Mandelsäure-OPac	(<i>R</i>)- 70b	Hyd-II	64
<i>(p</i> -Methoxy)-Mandelsäure	(<i>R</i>)- 62a	<i>(p</i> -Methoxy)-	(<i>R</i>)- 72a	Hyd-I	n.b. ^a
	(<i>R</i>)- 62b	Mandelsäure-OPac	(<i>R</i>)- 72b	Hyd-II	n.b. ^a
<i>(p</i> -Methyl)-Mandelsäure	(<i>R</i>)- 64a	<i>(p</i> -Methyl)-	(<i>R</i>)- 74a	Hyd-I	> 99
	(<i>R</i>)- 64b	Mandelsäure-OPac	(<i>R</i>)- 74b	Hyd-II	> 99
(hydroxy)-3-phenylpropionsäure	(<i>R</i>)- 65a	(hydroxy)-3-phenyl-	(<i>R</i>)- 76a	Hyd-I	97
	(<i>R</i>)- 65b	propionsäure-OPac	(<i>R</i>)- 76b	Hyd-II	66
(hydroxy)-4-phenylbutansäure	(<i>R</i>)- 66a	(hydroxy)-4-phenyl-	(<i>R</i>)- 78a	Hyd-I	90
	(<i>R</i>)- 66b	butansäure-OPac	(<i>R</i>)- 78b	Hyd-II	73
(hydroxy)-hexansäure	(<i>R</i>)- 67a	(hydroxy)-	(<i>R</i>)- 80a	Hyd-I	> 99
	(<i>R</i>)- 67b	hexansäure-OPac	(<i>R</i>)- 80b	Hyd-II	82

a) nicht bestimmbar

Die Enantioselektivitäten der eingesetzten Hydantoinasen unterscheiden sich deutlich voneinander. Während Hydantoinase-I bei fast allen Verbindungen sehr gute (> 99 % ee) bis gute (90 % ee) Enantiomerenüberschüsse liefert, war unter Verwendung von Hydantoinase-2 nur im Fall der Verbindung (*R*)-**68b** und (*R*)-**74b** ein Enantiomerenüberschuß von 99 % ee zu erzielen. In allen anderen Verbindungen zeigt die Hydantoinase-2 eine geringere Enantioselektivität. Der geringe Enantiomerenüberschuß bei (*R*)-**70a-b** läßt sich auf die gleichzeitige chemische Hydrolyse dieses Substrates zurückführen. Für *O*-Carbamoyl-(*R*)-(*p*-Methoxy)-Mandelsäure- (*R*)-**72** konnte keine Enantiomerenreinheit bestimmt werden, die Enantiomeren ließen sich nicht trennen.

2.4.6.1 Bestimmung der Enantiomerenreinheiten der nicht hydrolysierten Edukte (Oxazolidin-2,4-dione)

Für die Bestimmung der Enantiomerenreinheiten der nicht umgesetzten Edukte wurden die nach der Hydrolyse in der Reaktionslösung verbliebenen Oxazolidin-2,4-dione mit Phenacylbromid umgesetzt. Bei dieser Reaktion erfolgt im organischen Lösungsmittel eine Substitution am Imidstickstoff (vgl. **Abb. 71**).

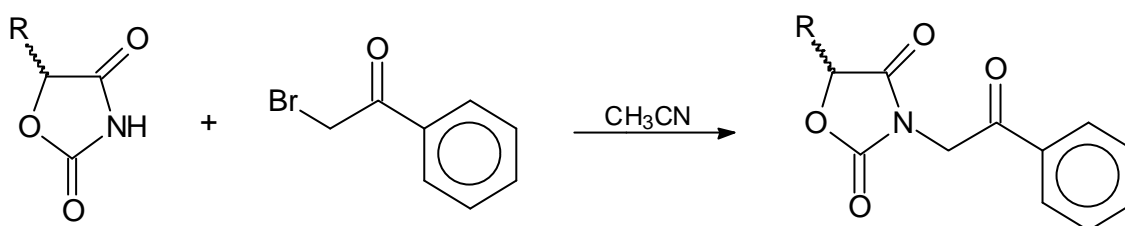


Abb. 71: Kupplung von Oxazolin-2,4-dion mit Phenacylbromid

Die auf diese Weise erhaltenen Derivate wurden mittels HPLC an einer Chiralphase (R,R-Whelk 01; OD-R) auf ihre Enantiomerenzusammensetzung hin überprüft. **Tab. 43** gibt die Ergebnisse wieder.

Tab. 43: Enantiomerenreinheiten der nicht umgesetzten Oxazolidin-2,4-dione nach Derivatisierung mit Phenacylbromid.

Edukt	Produkt	Enzym	[% ee]
Oxazolidin-2,4-dion	Oxazolidin-2,4-dion-OPac		
(<i>R,S</i>)-5-Phenyl-(±)- 49	(<i>R,S</i>)-5-Phenyl-OPac (±)- 69a (±)- 69b	Hyd-I Hyd-II	racemisch racemisch
(<i>R,S</i>)-5-(<i>p</i> -Chlorphenyl)-(±)- 50	(<i>R,S</i>)-5-(<i>p</i> -Chlorphenyl)-OPac (±)- 71a (±)- 71b	Hyd-I Hyd-II	racemisch racemisch
(<i>R,S</i>)-5-(<i>p</i> -Methoxyphenyl)-(±)- 52	(<i>R,S</i>)-5-(<i>p</i> -Methoxyphenyl)-OPac (±)- 73a (±)- 73b	Hyd-I Hyd-II	racemisch racemisch
(<i>R,S</i>)-5-(<i>p</i> -Methylphenyl)-(±)- 54	(<i>R,S</i>)-5-(<i>p</i> -Methylphenyl)-OPac (±)- 75a (±)- 75b	Hyd-I Hyd-II	racemisch racemisch
(<i>S</i>)-5-Benzyl-	(<i>S</i>)-5-Benzyl-OPac (<i>S</i>)- 77a	Hyd-I	88

Edukt	Produkt	Enzym	[% ee]
Oxazolidin-2,4-dion	Oxazolidin-2,4-dion-OPac		
(<i>S</i>)- 55	(<i>S</i>)- 77b	Hyd-II	38
(S)-5- b -Phenyl-ethyl-(<i>S</i>)- 56	(S)-5- b -Phenylethyl-OPac (<i>S</i>)- 79a	Hyd-I	81
	(<i>S</i>)- 79b	Hyd-II	65
(S)-5-Butyl-(<i>S</i>)- 57	(<i>R,S</i>)-5-Butyl-OPac (<i>S</i>)- 81a	Hyd-I	n.b. ^a
	(<i>S</i>)- 81b	Hyd-II	n.b. ^a

a) nicht bestimmbar

Verbindungen (\pm)-**49**-(\pm)-**54**, d.h. Moleküle mit benzylicher Bindung am Oxazolidin-Ring liegen ausschließlich als Racemate vor. Damit ist auch die Racemisierung dieser Oxazolidin-2,4-dione bei der Hydantoinase-katalysierten Hydrolyse klar erwiesen. Im Vergleich dazu zeigen die Verbindungen (*S*)-**77** und (*S*)-**79**, bei denen keine benzyliche Position vorliegt, einen Enantiomerentüberschuß von bis zu 88 % ee. Bei der Hydantoinase-katalysierten Hydrolyse von (\pm)-**55** und (\pm)-**56** wird daher eine typische, kinetische Racematspaltung, d. h. mit einer max. Ausbeute von 50% beobachtet.

2.4.7 Überführung der *O*-Carbamoyl-(*R*)-**a**-hydroxycarbonsäuren in (*R*)-**a**-Hydroxycarbonsäuren

Die durch Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse der Oxazolidin-2,4-dione synthetisierten *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxycarbonsäuren (*R*)-**59** bis (*R*)-**67** können als Urethane säurekatalysiert in die entsprechenden Hydroxycarbonsäuren überführt werden (vgl. **Abb. 72**).

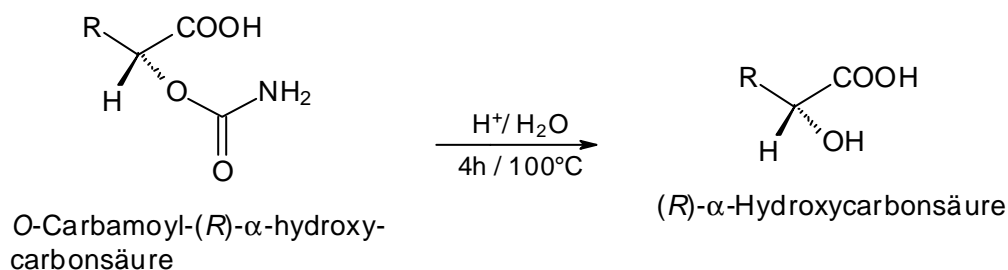


Abb. 72: Säurekatalysierte Hydrolyse der *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxycarbonsäuren (*R*)-**59**-**67** - Bildung von (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren.

Für diese Umsetzung reicht bereits die Säurestärke der Carboxyl-Gruppe der Edukte aus, so daß man nach 4 stündigem Erhitzen einer wäßrigen Lösung der *O*-Carbamoylate auf 100°C vollständige Hydrolyse zu den entsprechenden (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren beobachtet. Exemplarisch für die synthetisierten *O*-Carbamoylate (**R**)-59 bis (**R**)-67 wurde auf diese Weise *O*-Carbamoyl-(*R*)-mandelsäure (**R**)-59a,b in (*R*)-Mandelsäure (**R**)-82a,b überführt. Die Isolation der Produkte erfolgte durch Ansäuern der Reaktionslösung auf pH 1 und anschließender Extraktion der Hydroxycarbonsäure mit Essigester. Dabei wurde die (*R*)-Mandelsäure (**R**)-82a,b in reiner, kristalliner Form erhalten. **Tab. 44** gibt die erhaltenen Ausbeuten an (*R*)-Mandelsäure (**R**)-82a,b, die ermittelten Schmelzpunkte und spezifischen Drehwerte wieder.

Tab. 44: Ausbeute an (*R*)-Mandelsäure, sowie deren Schmelzpunkt und spezifischer Drehwert.

Enzym	Produkt (<i>R</i>)-Mandelsäure	Isolierte Ausbeute [%]	Schmelzpunkt [°C]	$[\alpha]_D^{20}$ (c=1, MeOH)
Hyd-I	(R)-82a	78	129-130	-157,5
Hyd-II	(R)-82b	81	128-130	-156.7

Auf diese Weise konnte (*R*)-Mandelsäure (**R**)-82b mit einer Ausbeute von bis zu 81% isoliert werden. Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit wurden jeweils ca. 10 mg davon durch Reaktion mit Diazomethan in die entsprechenden Methylester überführt und mittels HPLC (Chiralphase, Chiracel OD, Daicel) vermessen (vgl. **Tab. 45**).

Tab. 45: Enantiomerenreinheiten der synthetisierten Mandelsäuremethylester

Methylester der (<i>R</i>)-Mandelsäure	Zur Synthese verwendetes Enzym	Enantiomerenreinheit [%ee]
(<i>R</i>)-Mandelsäure (R)-83a	HYD-1	> 99
(<i>R</i>)-Mandelsäure (R)-83b	HYD-2	> 99

An diesem Beispiel konnte somit gezeigt werden, daß die durch Enzymkatalyse erhaltenen *O*-Carbamoylate durch säurekatalysierte Hydrolyse ohne Racemisierung in die α -Hydroxycarbonsäuren überführt werden können.

2.4.8 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeiten wurde geprüft, ob sich 5-substituierte Oxazolidin-2,4-dione als Substrate für D-Hydantoinasen eignen. Dazu wurden ausgehend von den entsprechenden Aldehyden die racemischen α -Hydroxycarbonsäuremethylester synthetisiert und diese durch Kondensation mit Guanidin in die entsprechenden Oxazolidin-2,4-dione (\pm)-**49** bis (\pm)-**58** überführt. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte für die enzymatischen Hydrolysen in Gegenwart der Hyd-I und Hyd-II ein pH-Wert-Optimum bei pH 6,5-7,0 ermittelt werden. Bei Verbindungen (\pm)-**49** bis (\pm)-**54**, die am C(5)-Kohlenstoffatom des Oxazolidin-2,4-dions eine benzyliche Position aufweisen, konnten chemische Ausbeuten von bis zu 92 % bei Enantiomerenreinheiten > 99 % ee erhalten werden. Demgegenüber konnten die Oxazolidin-2,4-dione (\pm)-**55** bis (\pm)-**57**, die keine benzyliche Position am C(5)-Atom des Ringes aufweisen, im Sinne kinetischer Racematspaltungen mit Ausbeuten von bis zu 49 % bei Enantiomerenreinheiten von bis zu 99 % ee gewonnen werden. Grundsätzlich beobachtet man bei Hydrolysen mit Hydantoinase-I im Vergleich zu Hydantoinase-II höhere Enantiomerenreinheiten.

Durch die Bestimmung der Enantiomerenreinheiten der nicht umgesetzten Substrate konnte gezeigt werden, daß die Oxazolidin-2,4-dione (\pm)-**49** bis (\pm)-**54** mit benzylicher Position am C(5)-Atom des Oxazolidinringes unter den Reaktionsbedingungen racemisieren. Dagegen werden bei den Verbindungen (\pm)-**55** bis (\pm)-**57** (mit nicht benzylicher Position) Enantiomerenreinheiten der Edukte von bis zu 88 % ee beobachtet. Dadurch kann eine Racemisierung dieser Substrate ausgeschlossen werden.

Durch enzymatische Hydrolyse in Gegenwart der Hyd-I und Hyd-II von 5-monosubstituierten Oxazolidin-2,4-dionen wurde gleichzeitig ein neuer Weg zu enantiomerenreinen α -Hydroxycarbonsäuren erschlossen.

2.4.9 D-Hydantoinase-katalysierte Hydrolysen von Hydantoinen und Oxazolidin-2,4-dionen: Ein Vergleich

Die D-Hydantoinase-katalysierten Hydrolysen von Hydantoinen zeigen ein pH-Optimum im alkalischen Bereich (pH 8,5-9,0), während die Hydrolysen der Oxazolidin-2,4-dione ein Optimum im neutralen pH-Bereich (pH6,5-7,0) aufweisen.

Oxazolidin-2,4-dione dissoziieren im Reaktionsmedium, da das Imid-Proton im Vergleich zu den Hydantoinen wesentlich acider ist. Daher liegen auch Oxazolidin-2,4-dione in wässrigen Medien zu > 95 % in ionisierter Form vor. Sehr wahrscheinlich sind darin die im Vergleich zu den Hydantoinen generell langen Reaktionszeiten der Oxazolidin-2,4-dione begründet. Es ist ja bekannt, daß ionische Strukturen von den Hydantoinasen nicht gern als Substrate akzeptiert werden. Somit können Gleichgewichtseinstellungen zwischen ionischen und nichtionischen Strukturen zum geschwindigkeitsbestimmenden Faktor werden.

3 Zusammenfassung

Enzyme katalysieren zahlreiche Transformationen natürlicher und synthetischer Substrate unter milden, energieneutralen und umweltfreundlichen Bedingungen. Besonders häufig werden in der organischen Synthese Esterhydrolasen, insbesondere Lipasen verwendet. Sie benötigen keine Kofaktoren, zeigen hohe große Substrattoleranz und sind in der Regel auch in organischen Lösungsmitteln stabil und aktiv. Nachwachsende Rohstoffe wie Fette, Öle und Proteine lassen sich vielfach zu interessanten, technischen Produkten kombinieren, die als Ergänzung und Alternative zum Chemierohstoff Erdöl eingesetzt werden können. Als attraktive Alternative zu klassischen, chemischen Übertragungen der Fettsäuren natürlicher Fette und Öle auf Aminosäuren und Proteinhydrolysaten bieten sich auch aus ökologischen und ökonomischen Gründen biotechnologische Syntheseverfahren an.

Wesentlichstes Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung selektiver, enzymkatalysierter Reaktionen zur einfachen und möglichst direkten Überführung von Fettsäuren und daraus herstellbarer Rohmaterialien (Fettsäureester) auf Aminosäuren und Aminosäurederivate. Die so erhältlichen Moleküle sind wertvolle, milde, anionische Tenside sowie Zusatzstoffe im Kosmetik- und Textilbereich. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines neuartigen Syntheseweges zu enantiomerenreinen (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren über D-Hydantoinase-katalysierte Hydrolyse von 5-substituierten Oxazolidin-2,4-dionen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich besonders Aminosäure-*t*-butylester als Substrate für lipase-katalysierte *N*-Acylierungen eignen. Von besonderer Bedeutung war hier die Auswahl des am besten geeigneten Biokatalysators (Lipase), da es in der Literatur bislang kein gutes Verfahren zur lipase-katalysierten Synthese von *N*-Acylaminosäuren gibt. In einer systematischen Studie wurden 48 Lipasen hinsichtlich ihrer Eignung zur *N*-Acylierung von Glycin-*t*-butylester **13j** untersucht. Als am besten geeignet erwies sich die Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435). Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden Lösungsmittel, Acyldonatoren, Substrat-Acyldonor Verhältnis, Temperaturabhängigkeit und das Enzym-Substrat Verhältnis systematisch variiert. Auch wurde die Enzymstabilität bestimmt. Auf der Basis der dabei erzielten Resultate konnte *N*-Lauroylglycin-*t*-butylester **14k** nach einer Reaktionszeit von vier Stunden mit einer Ausbeute von > 95 % erhalten werden (vgl. **Abb. 73**; Substrat-Acyldonor-

Verhältnis 1:21; Laurinsäuremethylester gleichzeitig Lösungsmittel und Acyldonor; 70°C; Enzym-Substrat-Verhältnis 1:10).

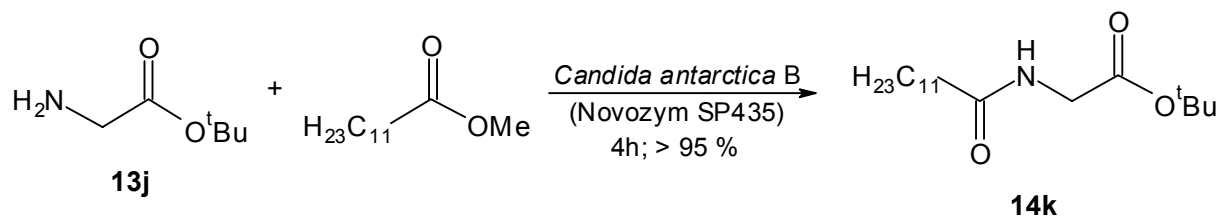


Abb. 73: Lipase-katalysierte Synthese von *N*-Lauroylglycin-*t*-butylester **14k**

Die hierbei sonst vielfach verwendeten Acyldonatoren für den irreversiblen Acyltransfer wie Fettsäurevinylester und Fettsäureanhydride konnten hier wegen Bildung von Schiff-Basen bzw. chemischer Acylierung nicht verwendet werden. Als besonders gut geeignet erwiesen sich auch Methoxyessigsäureester, bei denen die zehnfachen spezifischen Aktivitäten im Vergleich zu nicht aktivierten Estern beobachtet wurden. Im Hinblick auf eine technische Umsetzung und die damit verbundenen Kosten sind allerdings Fettsäuremethylester attraktiver. Neben den oben angeführten Acyldonatoren lassen sich bei dieser Methode auch Triglyceride sowie natürliche Fette und Öle als Acyldonatoren einsetzen.

Zur entsprechenden Anwendung des Verfahrens wurden zunächst die entsprechenden *t*-Butylester (\pm)-**13a-t** proteinogener und nicht proteinogener Aminosäuren synthetisiert und durch lipase-katalysierte Acylierung in die jeweiligen *N*-Acylaminosäure-*t*-butylester **16a-r**; **19a-l** überführt. Die Synthese von *N*-Caproylglycin-*t*-butylester **14e** in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) gelang so in präparativem Maßstab (150 mmol) mit einer sehr hohen Ausbeute von 94 % bei einer Reinheit von > 96 %. Durch die deutlichen Unterschiede der spezifischen Aktivität von Aminosäuren mit Aminofunktionen an einem primären Kohlenstoffatom (**13b,e,g,j,m,o**) im Vergleich zu solchen mit Aminofunktionen am sekundärem C-Atom konnten die acylierten Produkte **14a** und (**S**)-**20** selektiv mit Ausbeuten von 75 % bzw. 63 % aus einer Mischung unterschiedlicher proteinogener Aminosäure-*t*-butylester (**S**)-**13f,l,m,p,t** und **13j** erhalten werden (vgl. **Abb. 74**).

Damit besteht auch die Möglichkeit aus einem Gemisch proteinogener Aminosäure-*t*-butylester (aus z.B. Proteinhydrolysaten) selektiv die Aminosäuren Glycin und Lysin zu entfernen.

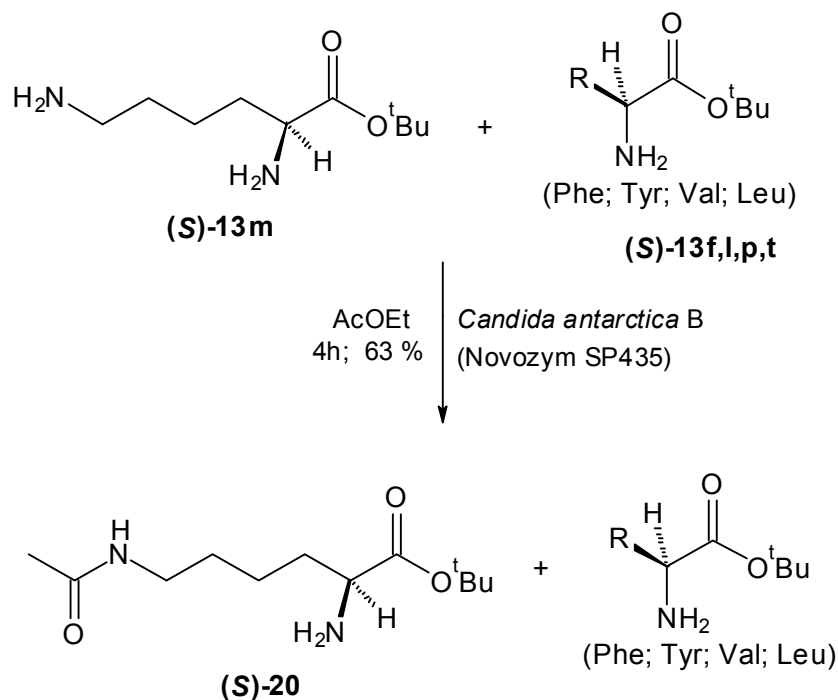


Abb. 74: Selektive Acylierung von L-Lys-OtBu **(S)-13m** aus einem Gemisch verschiedener L-Aminosäure-*t*-butylester.

Zur Überprüfung der Enantioselektivität der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) wurden sowohl racemische (\pm)-**13a,d,k-p,t** als auch enantiomerenreine (**R**)- bzw. (**S**)-**13a,l,p,t** Aminosäure-*t*-butylester einer enzymatischen Acylierung unterworfen. Die erhaltenen Ergebnisse belegen eindeutig, daß Novozym SP435 bezüglich α -Aminosäuren keine Enantioselektivität aufweist. Für die β -Aminosäure (\pm)-**13d** konnte eine hohe Enantiomerenreinheit (E=71) für das Produkt (**R**)-**17a** 93 % ee und 98 % ee für das verbleibende Edukt (**S**)-**18b** beobachtet werden (vgl. **Abb. 75**).

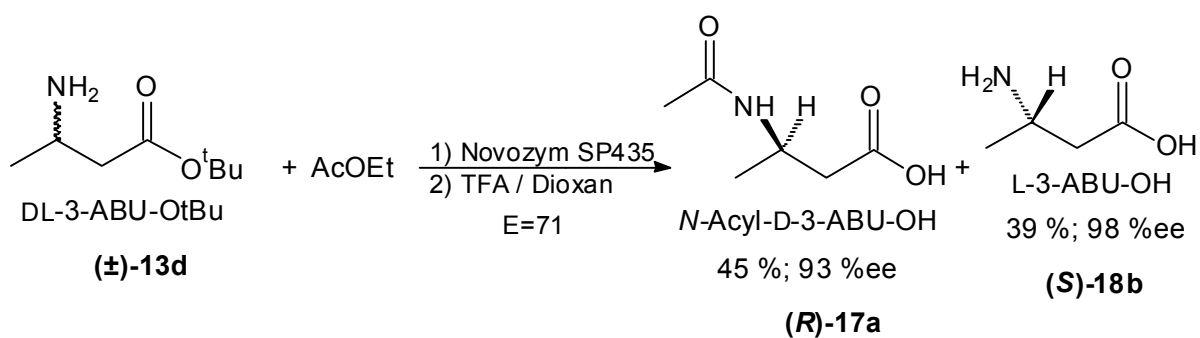


Abb. 75: Enantioselektive Acylierung von (\pm)-**13d**.

Hierbei wurde auch der Einfluß der Molekülstruktur näher untersucht und zwar insbesondere hinsichtlich des Einflusses vom Abstand der Carboxylgruppe zur acylierenden Aminogruppe. So zeigte Novozym SP435 bei β -Ala-OtBu **13b** die höchste Aktivität. Dagegen findet man bei α - **13j**, γ - **13e**, δ - (\pm)-**13o** und ε -Aminosäure-*t*-butylestern **13g**, (\pm)-**13m** eine geringere spezifische Aktivität der Lipase.

Da die lipase-katalysierte Acylierung von Aminosäure-*t*-butylestern eine interessante Alternative zu den bisher verwendeten chemischen Prozessen darstellt, wurde im Hinblick auf eine technische Umsetzung ein kontinuierliches Verfahren in einem Säulenreaktor entwickelt. Im Vergleich zum "Batch-Reaktor" entfällt ein Aufarbeitungsschritt, da mit equimolaren Mengen gearbeitet werden kann. Gleichzeitig wird durch die große Enzymmenge in der Säule die Reaktionszeit stark verringert, so daß nach 30 min bei einer Temperatur von 80°C bereits > 92 % zu **14d** umgesetzt sind. Aufgrund der einfachen Reaktionsführung und problemlosen Aufarbeitung ist die Methode für eine Nutzung im technischen Maßstab geeignet. Erste Experimente in dieser Richtung laufen bereits.

Auch die Eignung von Acylasen und Proteasen für die enzymatische Acylierung von Aminosäuren wurde untersucht. Leider erwiesen sich alle eingesetzten Acylasen sowie Proteasen zur enzymatischen Acylierung von Aminosäuren ungeeignet. Mit den Acylasen aus *Aspergillus* und *Hog kidney* wurden zwar acylierte Aminosäuren erhalten, allerdings in nur mäßigen Ausbeuten von bis zu 25 %. Durch die enzymatische Acylierung der Diaminosäuren L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure als Mono- und Diester in Gegenwart von Penicillin-Acylasen konnte der Einfluß freier Carboxylgruppen untersucht werden. So wurde mit L-Asp(OBzl)-OBzl und Phenyllessigsäureethylester eine Ausbeute von 64 % an (**S**)-**22a** erhalten. Beim Einsatz des Monoesters (L-Asp-OBzl) fiel die Ausbeute auf 18 % (**S**)-**21a** ab, während bei Verwendung von freier Asparaginsäure kein Umsatz zu beobachten war. Das bedeutet, daß auch die Penicillin-Acylasen für die Acylierung von nativen Aminosäuren ungeeignet sind. Aus diesem Grund wurde auch an Verfahren zur *N*-Acylierung freier Aminosäuren gearbeitet. Nur durch Arbeiten in organischen, unpolaren bzw. apolaren Lösungsmitteln lassen sich gute Produktausbeuten erzielen und Folgereaktionen wie Hydrolyse von Acyldonor und Produkt verhindern. Alle Versuche, derartige enzymatische Acylierungen in einer Suspension aus Aminosäure, Fettsäureester und Enzym in organischen, organisch-wässrigen und wässrigen Medien durchzuführen, waren erfolglos. Eine wesentliche Voraussetzung für die erfolgreiche lipase-katalysierte Acylierung von Aminosäuren war daher die Solubilisierung in organischen, aprotischen Lösungsmitteln.

Dieses Problem läßt sich durch die Bildung von Kontaktionenpaaren mittels nicht-nucleophiler Basen lösen. Durch Umsetzungen der Guanidinderivate TMG und TBD mit Aminosäuren (Ala, Gly, Leu, Phe, Phg, Val) konnten mittels NMR Aminosäure-Kontaktionenpaare (**S**)-**30a-f** nachgewiesen werden. In Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435) und TBD als Base gelang die lipase-katalysierte *N*-Acylierung verschiedener D- (**R**)-**31a,e,g** sowie L-Aminosäuren (**S**)-**31a-l** (vgl. **Abb. 76**). So konnte z. B. L-Phenylalanin mit Ausbeuten bis 71 % in das *N*-Caproyl-derivat (**S**)-**31g** überführt werden.

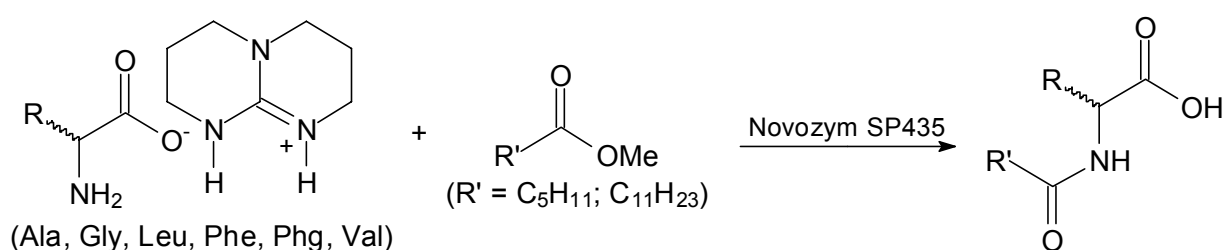


Abb. 76: Lipase-katalysierte Acylierung von Aminosäure-TBD-Kontaktionenpaaren.

Alternativ dazu konnte sich, auch im Hinblick auf eine technische Umsetzung, die Bildung von Kontaktionenpaaren an einem Anionenaustauscher (Amberlite A26) zur quasi-Solubilisierung eignen. Auf diese Weise konnten eine Reihe D- sowie L-Aminosäuren komplexiert ((**R**)-**32a,b,g,h**; (**S**)-**32a-h**) und erfolgreich mit Ausbeuten bis zu 61 % (**S**)-**33h** *N*-acyliert werden (vgl. **Abb. 77**).

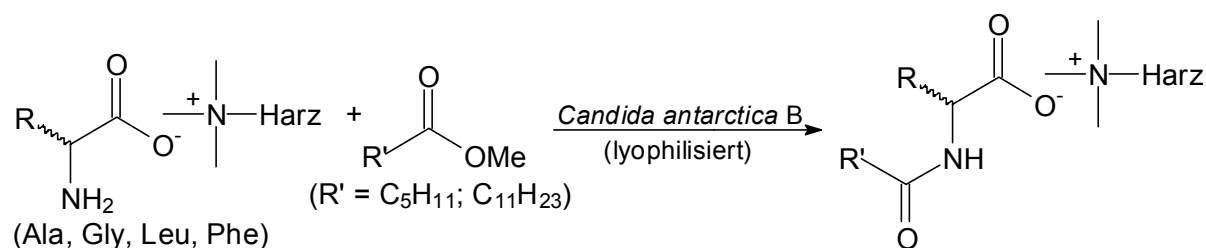


Abb. 77: Lipase-katalysierte Acylierung von an Ionenaustauscher gebundenen Aminosäuren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß durch diese Methode eine ganze Reihe unterschiedlicher *N*-Acylaminosäuren **31a-l**; **32a-h** in guten Ausbeuten hergestellt werden konnten. In allen Fällen wurden preiswerte, technisch verfügbare Acyldonatoren sowie natürliche Aminosäuren als Reaktionspartner eingesetzt. Für eine technische Nutzung,

erscheint die Solubilisierung von Aminosäuren an Ionenaustauschern als besonders interessant, da der Ionenaustauscher wiedergewonnen werden kann.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob sich 5-monosubstituierte Oxazolidin-2,4-dione als Substrate für D-Hydantoinasen eignen. Dies lag nahe, da die Molekülstrukturen von Hydantoinen und Oxazolidin-2,4-dionen sehr ähnlich sind. Durch enzymatische Hydrolyse von 5-monosubstituierten Oxazolidin-2,4-dionen konnte tatsächlich ein neuartiger Weg zu enantiomerenreinen (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren erschlossen werden. Die entsprechenden racemischen Oxazolidin-2,4-dione (\pm)-**49-58** wurden durch Kondensation der α -Hydroxycarbonsäuremethylester (\pm)-**41-48** mit Guanidin erhalten (vgl. **Abb. 78**).

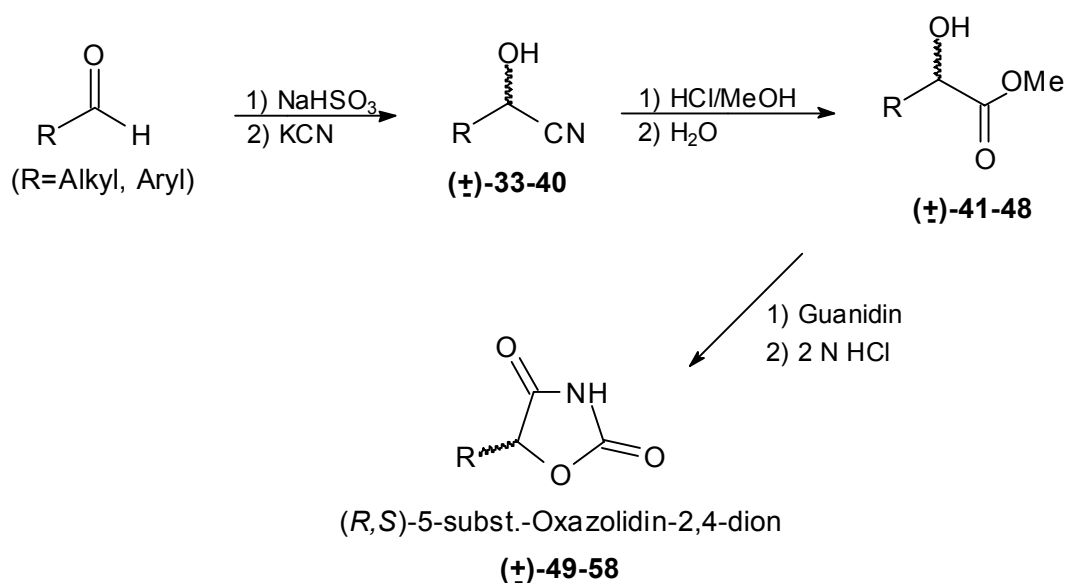


Abb. 78: Synthese 5-substituierter Oxazolidin-2,4-dione (\pm)-**49-58**.

Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen für diese enzymatischen Hydrolysen wurde ein pH-Optimum bei pH 6,5-7,0 ermittelt. Dies steht ganz im Gegensatz zu den Umsetzungen der entsprechenden Hydantoinen, bei denen durchweg die pH-Optima¹⁸⁰⁻¹⁸³ im alkalischen Bereich liegen (pH 8-8,5).

Beim Einsatz von (\pm)-**49-54** (mit einer benzylichen Position am C(5)-Kohlenstoffatom des Oxazolidin-2,4-dions) konnten bei Umsätzen von bis zu 92 % die entsprechenden (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren mit Enantiomerenreinheiten > 99 % ee erhalten werden. Damit ist auch bewiesen, daß diese Oxazolidin-2,4-dione (\pm)-**49-54** unter den Reaktionsbedingungen racemisieren. Die nicht umgesetzten Substrate sind ebenfalls racemisch (vgl. **Abb. 79**).

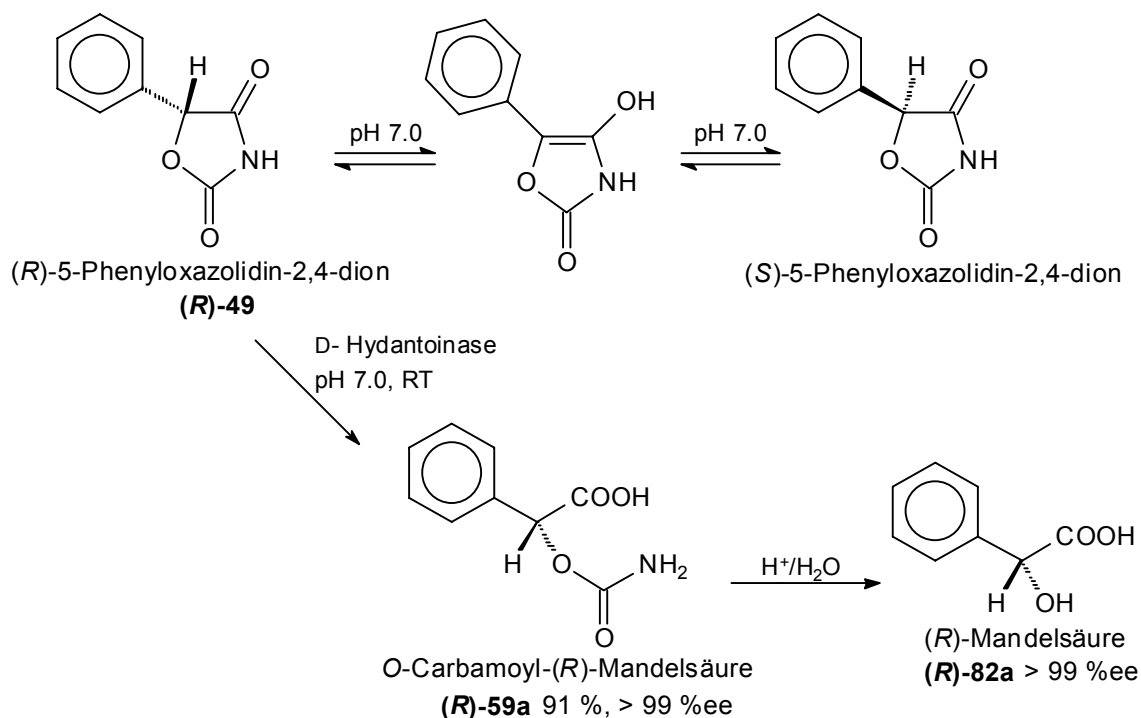


Abb. 79: Hydantoinase-katalysierte Synthese von α -Hydroxycarbonsäuren am Beispiel von (R) -Mandelsäure **(R)-82a**.

Dem gegenüber werden (\pm) -**55-57** (ohne benzyliche Position am C(5)-Kohlenstoffatom) im Sinne kinetischer Racematspaltungen mit Ausbeuten bis zu 49 % und Enantiomerenreinheiten von bis zu 99 %ee hydrolysiert. Hier sind auch die nicht umgesetzten Edukte (S) -**49-54**, optisch aktiv mit Enantiomerenreinheiten von bis zu 88 % ee. Hier findet offensichtlich keine Racemisierung statt.

Hydantoinasen katalysieren also die Hydrolyse von 5-monosubstituierten Oxazolidin-2,4-dionen und eröffnen damit einen neuen Weg zu enantiomerenreinen α -Hydroxycarbonsäuren. Aufgrund der niedrigen spezifischen Aktivitäten sind die erzielbaren Raum-Zeit-Ausbeuten noch zu niedrig für eine praktikable Synthese.

4 Experimenteller Teil

Allgemeines

Verwendete Geräte und Chemikalien

- ¹H-NMR-Spektren: a) WM 250 (250.13 MHz), b) Bruker WM 400 (400.13 MHz). Chemische Verschiebung in ppm gegen TMS als interner / externer Standard.
- ¹³C-NMR-Spektren: a) Bruker WM 250 (62.896 MHz), b) Bruker WM 400 (100.63 MHz). Chemische Verschiebung in ppm gegen TMS als interner / externer Standard.
- IR-Spektren: Perkin Elmer Infrared Spectrophotometer 397 und 1420 alle Angaben in Wellenzahlen [cm^{-1}] Intensitäten: ss=sehr stark, s=stark, m=mittel, w=wenig, sw=sehr wenig, sh=Schulter, sb=sehr breit, b=breit
- Massenspektren: Kratos MS 80 (EI: electron impact 70 eV)
- UV-Spektren UV-Visible Recording Spectrophotometer UV-160A, Firma: Shimadzu.
- Schmelzpunkte: Büchi 510 (Silikonbad), Aufheizrate $1^\circ\text{C}/\text{min}$, unkorrigiert. Mettler FP 61; Aufheizrate $2^\circ\text{C}/\text{min}$, unkorrigiert
- Drehwerte: Perkin Elmer Polarimeter 241, thermostatisierte Quarzküvetten, Probenvolumen 0.5 ml bzw. 1 ml, Länge 5 cm bzw. 10 cm, Lösungsmittel p.A. Qualität. Alle Bestimmungen erfolgten bei einer Temperatur von 20°C .
- Ultraschallbad: Sonorex Transistor, Typ RK 106, HF-Frequenz 35KHz, Fa. Bandelin

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel 60. F₂₅₄ auf Glasplatten, Schichtdicke 0.25 mm, Firma: Merck. Die Detektion erfolgte über das Bedampfen mit Iod, UV-Licht oder die angegebenen Sprühreagenzien.

Sprühreagenzien für die DC: Vanillin/Schwefelsäure: (zur Detektion von ungesättigten Fettsäuren, Alkoholen): 1 Gew.% Vanilin in konz. Schwefelsäure; Entwicklung nach dem Besprühen mit dem Heizluftfön.

Ninhydrin-Lösung: (zur Detektion primärer Amine): 60 mg Ninhydrin + 20 ml n-Butanol + 0.6 ml Eisessig. Entwicklung nach dem Besprühen durch Erhitzen auf ca. 150°C.

ANS-Reagenz^{184,185}: (zur Detektion von Carbonsäureestern,) 100 mg 8-Anilidonaphthalin-1-sulfonsäure Ammoniumsalz in 100 ml Wasser.

Präparative Normaldruck-

Flüssigkeits-Chromatographie: Kieselgel 60 mit 230-400 mesh der Fa. Merck.

Diazomethan-Generator: Diazal-Kit [Firma: Aldrich]; Diazomethan Generierung erfolgte in situ aus *N*-Nitroso-*N*-methyl-4-toluol-sulfonamid

HPLC-GERÄTE: a) L-6200 Intelligente Pumpe mit ternärem Niederdruckgradient; AS-2000 Autosampler; L-4000 UV-Detektor; D-2500 Integrator; L-7360 Säulenthermostat b) L-7100 Intelligente Pumpe mit ternärem Niederdruckgradient; L-7200 Autosampler; L-7400 UV-Detektor; D-7500 Integrator; [Merck-Hitachi] Streulichtdetektor [Varex (Maryland)]

HPLC-Säulen: OA-4100; Sumitomo Chemical Co, Osaka Japan

(R,R)-Welk; Merck; Darmstadt Deutschland

Chira-Sept; Merck; Darmstadt Deutschland

Chiralcel OD; Daicel Chemical Ind., LTD, Tokyo Japan

RP-18; RP-8 Merck; Darmstadt Deutschland

Enzymatische Hydrolysen:

a) Mikromaßstab: Umsetzungen erfolgten in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen mit Verschußkappe auf einem Eppendorfschüttler.

b) präparativer Maßstab (pH-Stat): Umsetzungen erfolgten an einem Autotitrator der Firma Radiometer in Copenhagen mit pH-Meter PHM 82, Titrator TTT 80, Autobürette ABU 80, pH-Stat-Modul REA 270, Titrigraph Modul REA 160 und Servograph REA 80.

GC:

Shimadzu Gaschromatograph GC-14A, On Column-Injektion und Split-Splitless-Injektion, Autosampler AOC-14 für 12 Proben, FID-Detektor, verwendete Säulen: SE 54; 25m ID: 0.32 mm; CS, D-52379 Langerwehe BPX5; 25m-0.25; SGE, D-64331 Weiterstadt

Verwendete Enzyme

Acylasen:

Acylase I aus *Aspergillus melleus*, (Fluka) Lyophilisat, Spezifische Aktivität 0.5U/mg (25°C, pH 7.0, *N*-Acetyl-L-methionin).

Acylase I aus *Aspergillus species*, (Sigma) Lyophilisat, Spezifische Aktivität 7U/mg (25°C, pH 7.0, *N*-Acetyl-L-methionin).

Acylase I aus *Hog kidney*, (Fluka) Lyophilisat, Spezifische Aktivität 15 U/mg (25°C, pH 7.0, *N*-Acetyl-L-methionin).

Acylase I aus *Aspergillus*, (Fluka) immobilisiert auf Eupergit C, Spezifische Aktivität 15 U/mg (25°C, pH 7.0, *N*-Acetyl-L-methionin).

Penicillin-Acylase, (Fluka) immobilisiert auf Eupergit C, Spezifische Aktivität 100 U/g (37°C, pH 7.6, Benzylpenicillin).

Penicillin-G-Acylase, (Fluka) immobilisiert auf Eupergit C, Spezifische Aktivität 150 U/g (37°C, pH 7.6, Benzylpenicillin).

Proteasen:

Subtilisin aus *Bacillus subtilis*, (Sigma) Lyophilisat, Spezifische Aktivität 10 U/mg (37°C, pH 7.5, Casein).

α -*Chymotrypsin* aus Rinderpankreas, (Sigma) Lyophilisat, Spezifische Aktivität 50 U/mg (25°C, pH 7.8, Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-4-NA)).

Papain aus *Carica papaya*, (Fluka) Lyophilisat, Spezifische Aktivität 3 U/mg (25°C, pH 6.2, BAEE).

Hydantoinasen:

D-Hydantoinase-1 aus einem thermophilen Organismus; Expression des Enzyms in *Escherichia coli* BMTU; BM-Ident.-No. 1544861; Suspension in 2,4 M NH₄SO₄-Lösung, Proteingehalt 14 mg/ml, Spezifische Aktivität: 120U/mg (1% (w/v) 5-(4-Hydroxyphenyl)hydantoin, 1mM MnCl₂, pH 8,5, 37°C).

D-Hydantoinase-1 immobilisiert, auf einem organischen Trägermaterial; aus einem thermophilen Organismus; Expression des Enzyms in *Escherichia coli* BMTU; BM-Ident.-No. 1582194-001; Spezifische Aktivität: 339 U/g (1% (w/v) 5-(4-Hydroxyphenyl)hydantoin, 1mM MnCl₂, pH 8,5, 37°C).

D-Hydantoinase-2 aus einem thermophilen Organismus; Expression des Enzyms in *Escherichia coli* BMTU; Suspension in 50 mM Tris HCl pH 7,6; Proteingehalt 55 mg/ml, Spezifische Aktivität: 220U/mg (1% (w/v) 5-Phenylhydantoin, 1mM MnCl₂, pH 8,5, 37°C).

Lipasen:

Nr.	Lipase aus:	Hersteller, Bezeichnung
1	<i>Alcaligines species</i>	Boehringer Mannheim, L-10, lyo
2	<i>Arthrobacter species</i>	Boehringer Mannheim
3	<i>Aspergillus niger</i>	Amano
4	<i>Aspergillus oryzae</i>	Boehringer Mannheim, 1600834

Nr.	Lipase aus:	Hersteller, Bezeichnung
5	<i>Aspergillus sojae</i>	Röhm, EL 47-88
6	<i>Burkholderia cepacia</i> (immobilisiert)	Boehringer Mannheim, L-1, c.-f., lyo
7	<i>Candida antarctica</i> Fraktion A, L-5	Boehringer Mannheim, c.-f., lyo
8	<i>Candida antarctica</i> Fraktion B, L-2	Boehringer Mannheim, c.-f., lyo
9	<i>Candida antarctica</i> Fraktion B, 2, L-2	Boehringer Mannheim, c.-f., C2, lyo
10	<i>Candida antarctica</i> Fraktion B	Novo, Novozym SP435
11	<i>Candida cylindracea</i>	Amano
12	<i>Candida cylindracea</i>	Boehringer Mannheim, 129046
13	<i>Candida cylindracea</i> (immobilisiert)	Amano
14	<i>Candida rugosa</i> (immobilisiert)	Boehringer Mannheim, L-3, c.-f., lyo
15	<i>Candida species</i>	Meito Sangyo, Lipase MY
16	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Toyo Yozo, Enzyme T-01
17	<i>Humicola</i>	Novo SP 523; PPW 3942
18	<i>Humicola lanuginosa</i>	Amano, Lipase CE
19	<i>Humicola species</i>	Boehringer Mannheim, L-8, lyo
20	Lipase 3A	Novo
21	Lipoproteinlipase	Amano
22	Lipoproteinlipase aus <i>Pseudomonas sp.</i>	Amano
23	Lipoproteinlipase aus <i>Pseudomonas sp.</i>	Boehringer Mannheim, 7344284
24	Lipoproteinlipase aus <i>Pseudomonas</i>	Amano, SAM III
25	Lipozym (<i>Mucor miehei</i>)	Novo
26	<i>Mucor javanicus</i>	Amano
27	<i>Mucor javanicus</i>	Röhm, EL 22-88
28	<i>Mucor miehei</i>	Fluka 46059
29	<i>Mucor miehei</i> (immobilisiert)	Boehringer Mannheim, L-9, c.-f., lyo
30	<i>Mucor miehei</i>	Novo, Lip SP 524
31	<i>Mucor miehei</i>	Gist-Brocades, Piccantase A
32	<i>Mucor miehei</i>	Novo, Lipase SP 225
33	<i>Pancreas</i>	Röhm, EL 136-88
34	<i>Porcine pancreas</i>	Boehringer Mannheim, L-7, lyo
35	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano
36	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Röhm, EL 237-87
37	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Röhm
38	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (immobilisiert)	Amano, Toyonite-200-P
39	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (immobilisiert)	Amano, Diatomeen Erde
40	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (immobilisiert)	Amano, Kieselgur
41	<i>Pseudomonas species</i>	Amano
42	<i>Pseudomonas species</i>	Boehringer Mannheim, L-6, lyo
43	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Boehringer Mannheim, 186791
44	<i>Rhizopus delemar</i>	Amano, Lipase D
45	<i>Rhizopus javanicus</i>	Amano, Lipase F-AP15
46	<i>Rhizopus niveus</i>	Amano, Lipase N
47	Schweinepankreas	Fluka 62300
48	Schweinepankreas PPL	Sigma, Lot 67F-0270

Sonstige verwendete Reagenzien und Chemikalien, deren Darstellung nicht beschrieben ist, wurden vom Chemikalien-Fachhandel bezogen.

4.1 Allgemeine Versuchsvorschriften

4.1.1 AVV 1: Gaschromatographie: Meßbedingungen

GC: Analyse von Aminosäureestern

Gaschromatograph: Shimadzu Gaschromatograph GC-14A; BPX5; Trägergas H₂, 100 kPa

Aufheizprogramm des Säulenofens: 40°C / 12 min isotherm, Aufheizrate 6°C / min, auf 320°C / 2min isotherm, Standarteinstellung wenn nicht anders angegeben. Injektor- und Detektor-Temperatur: 250°C. Bei Verwendung dieser Parameter waren die Signale der Aminosäure-*t*-butylester, der Acyldonatoren und der acylierten Produkte basislinien getrennt.

4.1.2 AVV 2: Freisetzung von Aminosäureestern aus Aminosäureestersalzen

10 mmol des entsprechenden Aminosäureestersalzes wurden mit 5 ml 5 % iger NaHCO₃ gelöst und die Lösung 3 mal mit jeweils 20 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden danach mit NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Abrotieren des Lösungsmittels erhält man die freien Aminosäureester je nach Polarität mit Ausbeuten zwischen 42-67 %.

4.1.3 AVV 3: Synthese von Aminosäure-Isopropylestern

Zu 200 ml abs. 2-Propanol wurden innerhalb von 2 Stunden bei – 4°C unter Rühren 54 ml frisch destilliertes SOCl₂ gegeben. Dann wurden 0,2 Mol der entsprechenden Aminosäure portionsweise hinzugefügt und die Mischungen bei Raumtemperatur bis zur völligen Auflösung der Aminosäuren gerührt. Danach wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und bis zur Trockene eingeeengt. Der enthaltene Feststoff wurde gemörsert und mit *t*-Butylmethylether bis zur Neutralität gewaschen. Die Ester sind teilweise hygroskopisch und wurden im Exsikkator über P₄O₁₀ getrocknet.

4.1.4 AVV 4: Synthese von Benzyloxycarbonyl- bzw. Dibenzylloxycarbonyl-Aminosäuren¹⁸⁶

In einem 100 ml Dreihalskolben versehen mit Tropftrichter und Innenthermometer werden 50 mmol der entsprechenden Aminosäure in 25 ml 1 M Natronlauge gelöst und im Eisbad auf 5°C gekühlt. Unter starkem Rühren werden 65 mmol (9,2 ml) Chlorameisensäurebenzylester

und anschließend 25 ml 2 M Natronlauge so zugetropft, daß die Innentemperatur der Reaktion nicht 10 °C übersteigt. Nach 20 min wird das Eisbad entfernt und die Mischung noch 40 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird mit 25 ml Diethylether extrahiert, um überschüssigen Chlorameisensäurebenzylester zu entfernen. Die wässrige Phase wird mit halbkonzentrierter HCl angesäuert und zweimal mit 90 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit verd. HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO₄ wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand aus Hexan/Ethylacetat umkristallisiert.

4.1.5 AVV 5: Synthese von Z-Aminosäure-*t*-butylestern

Unter einer Argonatmosphäre werden in einem 250 ml Dreihalskolben mit Septum 80 mmol (9,6 g) wasserfreies Magnesiumsulfat in 60 ml abs. CHCl₂ vorgelegt. Nach Zugabe von 20 mmol (1,1 ml) konz. Schwefelsäure wird die Reaktionsmischung 15 min gerührt. Mit einer Einwegspritze werden 10 mmol der entsprechenden Z-Aminosäure und 100 mmol (9,6 ml) *t*-Butanol in 5 ml abs. CHCl₂ zugegeben. Nach ca. 12-18 h unter starkem Rühren ist die Reaktion abgeschlossen. Die Lösung wird mit 150 ml 5 % iger NaHCO₃-Lösung versetzt und so lange gerührt, bis alles Magnesiumsulfat in Lösung gegangen ist. Die Phasen werden im Scheidetrichter getrennt und die organische Phase drei mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie gereinigt und im Hochvakuum getrocknet.

4.1.6 AVV 6: Entfernung der Z-Schutzgruppe durch Hydrierung

In einem 250 ml Dreihalskolben versehen mit Septum und Gaseinleitungsrohr, welches über einen Dreiwegehahn mit einer Vakuumpumpe und einer Gasbürette (Hydrierapparat) verbunden ist, werden 500 mg Palladium auf Aktivkohle (Gehalt: 10 %) in 150 ml Methanol vorgelegt. Unter kräftigem Rühren wird das Reaktionsgefäß mit Wasserstoff begast. Nach 30 min sind sowohl das Lösungsmittel als auch der Katalysator mit Wasserstoff gesättigt. Mit einer Einwegspritze werden 10 mmol des entsprechenden Z-Aminosäure-*t*-butylesters in 20 ml Methanol zugegeben. Nach 2-5 Stunden sind 10 mmol (224 ml) Wasserstoff verbraucht und die Reaktion ist abgeschlossen. Die Lösung wird über Celite filtriert und vom Katalysator befreit, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wird im Hochvakuum am Kugelrohr destilliert.

4.1.7 AVV 7: Lipase-katalysierte Acylierung von Aminosäure-*t*-butylestern

2 mmol des entsprechenden Aminosäure-*t*-butylesters werden in 40 mmol Fettsäuremethylester (Acyldonor und zugleich Lösungsmittel) gelöst und mit der Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SP 435) und 0,5g 3 Å-Molekularsieb im verschlossenen Glasgefäß bei 70°C und 400 U/min geschüttelt. In Zeitabständen von 10 min werden bis zur ersten Stunde jeweils 20 µl-Proben entnommen, mit 300 µl EE verdünnt und mittels GC analysiert. Aus der Steigung der daraus erhaltenen Produktkurve wird die spezifische Aktivität des Enzyms berechnet. Nach 60 min Reaktionszeit wird jede weitere Stunde eine Probe entnommen. Sofern im GC-Chromatogramm kein Edukt (bzw. keine Produktzunahme) mehr beobachtet worden ist, wird die Reaktionsmischung abfiltriert und der überschüssige Fettsäuremethylester im Ölpumpenvakuum entfernt. Gegebenenfalls erfolgt Produktaufreinigung durch Säulenchromatographie.

4.1.8 AVV 8: Bildung von Aminosäure-TBD-Kontaktionenpaaren

10 mmol Aminosäure und 10 mmol 1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en (TBD) werden in 40 ml Methanol suspendiert und 2h bei 50°C gerührt. Nachdem die Aminosäure ganz gelöst ist wird Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend werden im Ölpumpenvakuum die Produkte vollständig von Lösungsmittelresten befreit. Man erhält die Aminosäure-TBD-Kontaktionenpaare als farblose hygroskopische Feststoffe, die im Exikator über P₄O₁₀ gelagert werden.

4.1.9 AVV 9: Enzymatische Acylierungen von Aminosäure-TBD-Kontaktionenpaaren

3 mmol des entsprechenden Aminosäure-TBD-Kontaktionenpaares und 9 mmol Fettsäuremethylester werden in 10 ml Monoglyme gelöst, mit der Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SP 435) und 0,5g 3 Å-Molekularsieb versetzt und im verschlossenen Glasgefäß bei 70°C und 400 U/min geschüttelt. Nach der jeweils angegebenen Reaktionszeit wird vom Enzym filtriert und das Filtrat mit 2 N HCl sauer gestellt (pH 1-2). Die wässrige Phase wurde 3 mal mit 30 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO₄ wird das Ethylacetat am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt.

4.1.10 AVV 10: Enzymatische Acylierung von Aminosäuren am Ionenaustauscher

In einer Glassäule wird der Anionenaustauscher (Amberlite A26, in der Cl⁻-Form) mit der jeweiligen Aminosäure beladen, neutral gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Zur enzymatischen Acylierung wurden jeweils 1 g des mit der Aminosäure beladenen Ionenaustauschers in 4 ml Fettsäuremethylester (Acyldonor) suspendiert. Nach Zugabe von 100 mg der lyophilisierten Lipase aus *Candida antarctica* wurden die Ansätze bei 50°C im Schüttler (400 U/min) inkubiert. Nach 6 Tagen Reaktionszeit wurde der Ionenaustauscher abfiltriert mit Essigester/Methanol (1:1) gewaschen, im Hochvakuum getrocknet und ausgewogen. Zur Isolation der gebildeten acylierten Aminosäure wird mit 2 N HCl vom Ionenaustauscher eluiert. Die daraus erhaltene wässrige Phase wird 3 mal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

4.1.11 AVV 11: Synthese der Cyanhydrine

In einem Rundkolben versehen mit Rührer, Tropftrichter und Innenthermometer wird die berechnete Menge einer gesättigten Natriumbisulfitlösung auf 40°C temperiert. Dazu wird unter Rühren der frisch destillierte Aldehyd unverdünnt zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird noch weitere 30 Minuten gerührt. Die entstandene Alkalibisulfitverbindung fällt aus der Reaktionslösung als weißer kristalliner Niederschlag aus und wird abfiltriert und ohne weitere Reinigung umgesetzt. Man kühlt auf 0°C und trocknet unter kräftigem Rühren die equimolare Menge Kaliumcyanid, gelöst in der doppelten Menge Wasser zu. Nach 60 Minuten ist die Reaktion beendet und die org. Phase wird abgetrennt. Die wäßrige Phase wird drei- bis fünfmal (je nach Löslichkeit der Cyanhydrine) mit je 60 ml MTBE extrahiert. Die organische Phase wird mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält die Cyanhydrine als Öle oder kristalline Substanzen, die nach dem Trocknen im Hochvakuum nicht weiter aufgereinigt werden müssen.

4.1.12 AVV 12: Synthese racemischer α -Hydroxycarbonsäuremethylester

Im einem 500 ml Dreihalskolben werden 100 mmol des entsprechenden Cyanhydrins in 150 ml absolutiertem Diethylether unter Feuchtigkeitsausschluß gelöst und mit 3.9 g (150 mmol) getrocknetem Methanol versetzt. Nach dem Abkühlen auf 0°C wird unter starkem Rühren die Reaktionslösung mit trockenem HCl-Gas bis zur Sättigung (ca. 1 Stunde) versetzt. Die nach Kühlen auf 4°C über Nacht als weiße, kristalline Feststoffe ausgefallenen Iminoesterhydro-

chloride werden abgesaugt, mit wenig Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet (Ölpumpe).

Diese werden danach in wenig Wasser gelöst und 10 Minuten unter starkem Rühren zu den entsprechenden α -Hydroxycarbonsäuremethylestern hydrolysiert. Die wässrige Phase wird drei- bis fünfmal mit jeweils 50 ml MTBE extrahiert. Die Etherextrakte werden vereinigt, und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erhält man die α -Hydroxycarbonsäuremethylester als Öle oder als kristalline Feststoffe, die nicht weiter aufgereinigt werden müssen.

4.1.13 AVV 13: Synthese der Oxazolidin-2,4-dione

4.78 g (50 mmol) Guanidinhydrochlorid und 2.81 g (50 mmol) Kaliumhydroxid werden getrennt voneinander in der eben benötigten Menge Ethanol unter leichtem Erwärmen gelöst. Die beiden Lösungen werden dann unter Rühren vereinigt (Magnetrührer) und das ausgefallene Kaliumchlorid abfiltriert. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer auf ca. 1/3 des Ausgangsvolumens eingeeengt. Anschließend werden unter Rühren 50 mmol des entsprechenden α -Hydroxycarbonsäureesters, gelöst in der eben benötigten Menge Ethanol zugesetzt, woraufhin sich die Reaktionsmischung erwärmt. Nach ca. 24 h wird der ausgefallene farblose Feststoff abgesaugt, mit Wasser gewaschen und direkt weiter umgesetzt. Das so erhaltene Zwischenprodukt wird mit 2 N Salzsäure 2 h auf 70-90°C erhitzt. Nach dem Abkühlen scheidet sich das Oxazolidin-2,4-dion in Form von Kristallen oder als farbloses, kristallisierendes Öl ab. Die Kristalle werden abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und getrocknet.

4.1.14 AVV 14: Enzymatische Hydrolyse der Oxazolidin-2,4-dione-

Verfahrensoptimierung

In einem thermostatisierten 50 ml Dreihalskolben mit Magnetrührer werden jeweils 20 ml des angegebenen Puffers vorgelegt und die Mischungen auf 20°C temperiert. Nach Zugabe von 5 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ und 1 mmol (177mg) (*R,S*)-Phenyloxazolidin-2,4-dion wird am Autotitrator auf den jeweiligen pH-Wert gegentitriert. Anschließend werden 20 μl Hydantoinase 1 zugesetzt. Der Umsatz der Hydrolysen wird mittels HPLC-Analyse chromatographisch verfolgt. Die Aktivität wird aus der Anfangssteigung der Zeit-Umsatz-Kurve errechnet. Parallel dazu jeweils (zur Kontrolle der chemischen Hydrolyse) ein Ansatz ohne Enzym durchgeführt. Eine weitere Aufarbeitung der Ansätze erfolgte nicht.

4.1.15 AVV 15: Hydantoinase katalysierte Hydrolyse der Oxazolidin-2,4-dione

In einem 100 ml Dreihalskolben mit Argonzuleitung und Magnetrührer werden 80 ml Tris/HCl Puffer (pH 7,0; 0,1 M) vorgelegt und die Mischung 10 min mit Argon begast. Daraufhin werden 13 mg (1mM) $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ und 5mmol des jeweiligen Oxazolidin-2,4-dions zugefügt. Der pH-Wert der Lösung wird nun am Autotitrator mit 1 M Tris-Lösung auf genau 7,0 eingestellt bis das Substrat gelöst ist. Es wird dabei ca. 1 Äquivalent Tris verbraucht. Danach werden 200 μl Hydantoinase-1 bzw. 50 μl Hydantoinase-2 zugesetzt und die Mischungen für die Dauer der Reaktion (Überprüfung des Umsatzes mittels HPLC) mit Stickstoff begast.

Nach Abbruch der Reaktion wird über Celite abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und im Ölpumpenvakuum am Rotationsverdampfer ($\leq 45^\circ\text{C}$) auf ca. 20 ml eingeeengt. Der Rückstand wird mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH 1-2 angesäuert und die nach dem Abkühlen auf 0°C ausgefallenden Kristalle werden abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und getrocknet.

4.1.16 AVV 16: Synthese der Phenacyl ester bzw. 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-Oxazolidin-2,4-dione

In einem Rundkolben versehen mit Tropftrichter und Trockenrohr wird das Reaktionsgemisch der enzymatischen Hydrolyse, bestehend aus der entsprechenden *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxycarbonsäure und dem nicht hydrolysierten Oxazolidin-2,4-dion mit der 1,2 fachen molaren Menge Phenacylbromid und Triethylamin versetzt und die Mischung 1 Stunde bei 0°C in 20 ml abs. Acetonitril zur Reaktion gebracht. Danach wird noch 2 Stunden bei 55°C umgesetzt. Nach dem Einrotieren des Lösungsmittels wird das Rohprodukt in 40 ml Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wird mit jeweils 15 ml Wasser, ges. NaHCO_3 -Lösung und ges. NaCl -Lösung gewaschen. Daraufhin wird die organische Phase über MgSO_4 getrocknet, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und das so erhaltene Produktgemisch aus *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxycarbonsäurephenacyl ester und 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-Oxazolidin-2,4-dione über semi-präparative HPLC getrennt. Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit werden jeweils 10 μl einer Stammlösung (1 mg auf 1ml MeOH) mit Hilfe eines Autosamplers auf eine HPLC-Säule mit chiraler Phase gegeben.

4.1.17 AVV 17: (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren aus den *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren

In einem 10 ml Rundkolben mit Rückflußkühler wird ca. 0.5-1 mmol der entsprechenden *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -Hydroxycarbonsäure mit 2-3 ml Wasser versetzt und unter Rühren 4 h unter Rückfluß erhitzt (Magnetrührer). Nach dem Erkalten der Lösung wird mit 6 N Salzsäure auf pH 1 angesäuert und die α -Hydroxycarbonsäure kontinuierlich mit insgesamt 100 ml MTBE extrahiert. Die organische Phase wird daraufhin mit Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit (Rotationsverdampfer). Der Rückstand wird zur weiteren Reinigung aus dem jeweils angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert und anschließend getrocknet.

4.1.18 AVV 18: Synthese der (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuremethylester zur Bestimmung der Enantiomerenreinheiten der (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren

3 g DIAZALD werden in 30 ml Ethanol und 100 ml Diethylether in einer Spezialapparatur mit Tropftrichter und Destillationsbrücke (Diazald-Kit) vorgelegt und im Wasserbad auf 40°C erhitzt. 10 % ethanolische KOH wird langsam in das Reaktionsgemisch getropft. Das durch Zersetzung der *N*-Nitrosoverbindung gebildete Diazomethan wird mit Diethylether überdestilliert und in der Vorlage direkt mit der entsprechenden Probe (10 mg α -Hydroxycarbonsäure gelöst in 10 ml Diethylether) umgesetzt. In situ generiertes Diazomethan wird bis zum Bestehen bleiben einer leichten Gelbfärbung in der Vorlage zugetropft. Daraufhin wird die Probe am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und 10 μ l des so erhaltenen Esters in 1 ml Hexan / Isopropanol (95:5) gelöst. Der erhaltene Methylester wird chromatographisch untersucht (HPLC, chirale Phasen wie jeweils angegeben).

4.2 Synthese von *N*-Acylaminosäureestern

4.2.1 Synthese von *N*-Acylaminosäure-benzyl-, -ethyl-, methyl-, isopropylestern

4.2.1.1 Freisetzung von kommerziellen Aminosäureestern aus Aminosäureestersalzen

Die kommerziell erhaltenen Aminosäurebenzyl-, methyl- und ethylestersalze (Fluka; Bachem) wurden nach AVV 2 in die freien Aminosäureester überführt. Die Ansatzgrößen sowie die erhaltenen Ausbeuten sind in **Tab. 46** zusammengefasst. Die entsprechenden spektroskopischen Daten der kommerziellen Produkte sind Literatur bekannt.

Tab. 46: Freisetzung von kommerziellen Aminosäureestern aus Aminosäureestersalzen:
Ansatzgröße; Ausbeute; Reinheit; und Eigenschaften.

Edukt	Produkt	Ansatz [mmol]	Ausbeute [%]	Reinheit (GC)	Eigenschaft
DL-Ala-OBn* <i>p</i> -Ts	DL-Ala-OBn (±)-1a	15	60	97 %	gelbliches Öl
Gly-OBn* <i>p</i> -Ts	Gly-OBn 1b	15	44	95 %	gelbliches Öl
DL-Ile-OBn* <i>p</i> -Ts	DL-Ile-OBn (±)-1c	10	56	97 %	gelbliches Öl
DL-Leu-OBn* <i>p</i> -Ts	DL-Leu-OBn (±)-1d	10	53	96 %	gelbliches Öl
DL-Phe-OBn* <i>p</i> -Ts	DL-Phe-OBn (±)-1e	10	64	98 %	gelbliches Öl
DL-Val-OBn* <i>p</i> -Ts	DL-Val-OBn (±)-1f	10	52	95 %	gelbliches Öl
DL-Ala-OMe*HCl	DL-Ala-OMe (±)-4a	20	51	98 %	farbloses Öl
Gly-OMe*HCl	Gly-OMe 4b	20	48	- ^a	farbloses Öl
DL-Ile-OMe*HCl	DL-Ile-OMe (±)-4c	15	52	97 %	farbloses Öl
DL-Phe-OMe*HCl	DL-Phe-OMe (±)-4d	10	65	95 %	gelbliches Öl
DL-Phg-OMe*HCl	DL-Phg-OMe (±)-4e	10	61	96 %	gelbliches Öl
DL-Val-OMe*HCl	DL-Val-OMe (±)-4f	15	53	94 %	farbloses Öl
DL-Ala-OEt*HCl	DL-Ala-OEt (±)-5a	15	42	96 %	farbloses Öl
Gly-OEt*HCl	Gly-OEt 5b	15	46	- ^a	farbloses Öl
DL-Leu-OEt*HCl	DL-Leu-OEt (±)-5c	10	53	96 %	farbloses Öl
DL-Met-OEt*HCl	DL-Met-OEt (±)-5d	10	62	98 %	gelbliches Öl
DL-Phe-OEt*HCl	DL-Phe-OEt (±)-5e	10	64	98 %	gelbliches Öl

a) Mittels GC nicht nachweisbar. *p*-Ts *para*-Toluolsulfonsäure

4.2.2 Synthese von Aminosäureisopropylester-Hydrochloriden

4.2.2.1 Synthese von DL-Alanin-isopropylester-Hydrochlorid (**±**)-3a

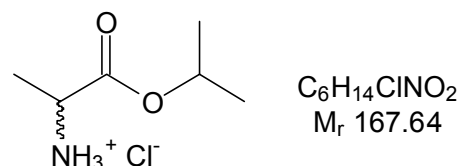
Nach AVV 3 wurden 200 ml abs. 2-Propanol bei -4°C unter Rühren mit 54 ml frisch destilliertem SOCl_2 und anschließend 17,8 g (0.2 mol) DL-Alanin versetzt. Der kristalline Feststoff wurde gemörsert und 4 mal mit je 250 ml MtBE unter pH-Wert-Kontrolle bis zur Neutralität gewaschen. Der sehr hygroskopische Ester kristallisierte in der Kälte aus, wurde abgesaugt und im Exikator über P_4O_{10} gelagert und getrocknet. Man erhielt 31,2 g (186 mmol); 93 %; gelbliche Kristalle.

Schmp. $85-87^{\circ}\text{C}$

HPLC: RP-18, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 90/10, flow 0,5 ml/min, Streulichtdetektor. R_T : 6.7 min

DC: (HE /EE: 1:2):

$R_f = 0.18$



IR (KBr-Pressling, $[\text{cm}^{-1}]$):

$\nu =$ 3240-2740 (s, breit) [ν NH, charakteristisch für $-\text{NH}_3^+$]; 2610 (m), 1965 (w) [Ober- und Kombinationsschwingungen, charakteristisch für $-\text{NH}_3^+$]; 1745 (s) [ν C=O]; 1585 (m), 1510 (m) [δ NH_3^+]; 1460 (m), 1440 (m, sh) [$\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$]; 1250 (s) [ν C-O]; weitere

Banden bei 3680-3280 (s, breit), 2520 (m), 1385 (w), 1370 (vw), 1330 (w), 1210 (m), 1135 (w), 1115 (m), 980 (w), 905 (w), 840 (w), 755 (w) 620 (vw), 480 (vw).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 1.08 (d; 3H; $^3\text{J} = 6.8$ Hz; CH-CH_3); 1.18 (d; 6H; $^3\text{J} = 6.1$ Hz; $\text{CH-(CH}_3)_2$); 3.67 (m; 2H; $-\text{CH-NH}_3^+$); 4.94 (s; 1H; $\text{CH-(CH}_3)_2$); 8.58 (breit; 3H; NH_3^+).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 20.83 ($\text{CH}_3\text{-CH-}$); 21.45 ($\text{CH-(CH}_3)_2$); 52.48 (CH-NH-); 69.31 ($\text{CH-(CH}_3)_2$); 166.93 ($-\text{COO-}$).

4.2.2.2 Synthese von Glycin-isopropylester-Hydrochlorid 3b

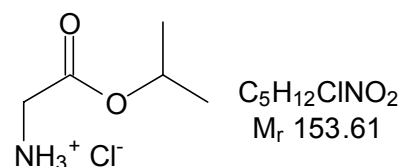
Nach AVV 3 wurden 200 ml abs. 2-Propanol bei -4°C unter Rühren mit 54 ml frisch destilliertem SOCl_2 und anschließend 15,0 g (0.2 mol) Glycin versetzt. Der kristalline Feststoff wurde gemörsert und 6 mal mit je 200 ml MtBE unter pH-Wert-Kontrolle bis zur Neutralität gewaschen. Der hygroskopische Ester wurde abgesaugt und im Exikator über P_4O_{10} getrocknet. Man erhielt 27,6 g (180 mmol); 90 %; farblose Kristalle.

Schmp. $97\text{-}99^\circ\text{C}$

HPLC: RP-18, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 90/10, flow 0,4 ml/min, Streulichtdetektor. R_T : 5.4 min

DC: (HE /EE: 1:2):

$R_f = 0.18$



IR (KBr-Pressling, cm^{-1}):

$\nu =$ 3280-3080 (m breit), 2960-2660 (s, breit) [ν NH, charakteristisch für $-\text{NH}_3^+$]; 2970 (s) [ν CH]; 2600 (m), 2040 (w) [Ober- und Kombinationsschwingungen, charakteristisch für $-\text{NH}_3^+$]; 1725 (s) [ν C=O]; 1590 (w), 1485 (m) [δ NH_3^+]; 1470 (m, sh), 1440 (m) [$\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$, δ CH_2]; 1260 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1570 (w, sh), 1490 (vw), 1460 (vw), 1230 (s), 1160 (m), 1145 (m), 1075 (w), 1040 (w), 950 (w), 930 (vw), 905 (w), 845 (vw), 825 (vw), 750 (w), 715 (vw).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO-d_6 [ppm]):

$\delta =$ 1,18 (d; 6H; $^3\text{J} = 6,1$ Hz; $\text{CH-(CH}_3)_2$); 3,63 (m; 2H; $-\text{CH}_2\text{-NH}_3^+$); 4,93 (s; 1H; $\text{CH-(CH}_3)_2$); 8,57 (breit; 3H; NH_3^+).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 21,4 ($\text{CH-(CH}_3)_2$); 39,6 ($\text{CH}_2\text{-NH}_3^+$); 69,4 ($\text{CH-(CH}_3)_2$); 166,9 (CH-COO-).

4.2.2.3 Synthese von DL-Isoleucin-isopropylester-Hydrochlorid (\pm)-3c

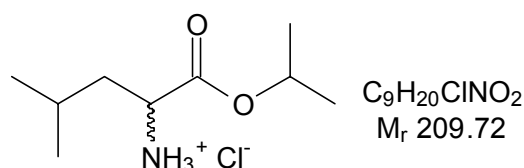
Nach AVV 3 wurden 100 ml abs. 2-Propanol bei -4°C unter Rühren mit 27 ml frisch destilliertem SOCl_2 und anschließend 13,1 g (0.1 mol) DL-Isoleucin versetzt. Der kristalline Feststoff wurde gemörsert und 4 mal mit je 250 ml MtBE unter pH-Wert-Kontrolle bis zur Neutralität gewaschen. Der sehr hygroskopische Ester kristallisierte in der Kälte aus, wurde abgesaugt und im Exikator über P_4O_{10} getrocknet. Man erhielt 18,0 g (86 mmol); 86 %; farblose Kristalle.

Schmp. $140\text{-}141^{\circ}\text{C}$

HPLC: RP-18, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 90/10, flow 0,5 ml/min, Streulichtdetektor. R_T : 7.4 min

DC: (HE /EE: 1:2):

$R_f = 0.22$



IR (KBr-Pressling, $[\text{cm}^{-1}]$):

$\nu =$ 3300-2700 (s, breit) [ν NH, charakteristisch für $-\text{NH}_3^+$]; 2980 (s), 2880 (s) [ν CH]; 2620 (m), 1960 (w) [Ober- und Kombinationsschwingungen, charakteristisch für $-\text{NH}_3^+$]; 1725 (vs) [ν C=O]; 1595 (m), 1495 (s) [δ NH_3^+]; 1470 (m), 1450 (m, sh), 1440 (m) [$\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$, δ CH_2]; 1280 (s), 1255 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1555 (m), 1405 (w, sh), 1380 (w), 1350 (w), 1170 (m), 1130 (w), 1095 (w), 1070 (w), 1045 (m), 1025 (w), 995 (w), 970 (w), 950 (m), 905 (m), 875 (w), 810 (vw), 795 (w), 770 (w).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO d_6 [ppm]):

$\delta =$ 0,81-0,98 (m; 6H; $\text{CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$); 1,19 (d; 6H; $^3J=6,0$ Hz; $\text{COO-CH-(CH}_3)_2$); 1,58-1,77 (m; 2H; $\text{CH}_2\text{-CH-}$); 3,74 (t; 1H; $^3J=7,0$ Hz; $\text{CH-CH}_2\text{-}$); 4,90-4,97 (m; 1H; $\text{CH-(CH}_3)_2$); 8,70 (breit; 3H; NH_3^+).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, DMSO d_6 [ppm]):

$\delta =$ 21,2 ($\text{COO-CH-(CH}_3)_2$); 21,4 ($\text{COO-CH-(CH}_3)_2$); 21,8 ($\text{CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$); 22,2 ($\text{CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$); 23,7 ($\text{CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$); 39,1 ($\text{CH}_2\text{-CH-}$); 50,5 ($\text{COO-CH-(CH}_3)_2$); 69,4 ($\text{CH-CH}_2\text{-}$); 169,1 (CH-COO-).

4.2.2.4 Synthese von DL-Phenylalanin-isopropylester-Hydrochlorid (\pm)-3d

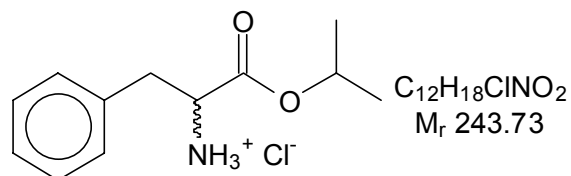
Nach AVV 3 wurden 100 ml abs. 2-Propanol bei -4°C unter Rühren mit 27 ml frisch destilliertem SOCl_2 und anschließend 16,5 g (0.1 mol) DL-Phenylalanin versetzt. Der kristalline Feststoff wurde gemörsert und 6 mal mit je 200 ml MtBE unter pH-Wert-Kontrolle bis zur Neutralität gewaschen. Der sehr hygroskopische Ester kristallisierte in der Kälte aus, wurde abgesaugt und im Exikator über P_4O_{10} getrocknet. Man erhielt 21,7 g (89 mmol); 89 %; gelbliche Kristalle.

Schmp. $> 220^{\circ}\text{C}$ (Zersetzung)

HPLC: RP-18, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 90/10, flow 0,5 ml/min, Streulichtdetektor. R_T : 8.1 min

DC: (HE /EE: 1:2):

$R_f = 0.29$

**IR (KBr-Pressling, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3260-2660 (s, breit) [ν NH, charakteristisch für $-NH_3^+$]; 2860 (s) [ν CH]; 2630 (m), 2000 (vw) [Ober- und Kombinationsschwingungen, charakteristisch für $-NH_3^+$]; 1750 (vs) [ν C=O]; 1590 (m), 1585 (m, sh) [δ NH_3^+ ; ν C=C]; 1500 (m) [δ NH, charakteristisch für $-NH_3^+$]; 1450 (m) [$\delta_{as}CH_3$, δ CH_2]; 1235 (s) [ν C-O]; 745 (m), 705 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1560 (w, sh), 1395 (w), 1355 (w), 1285 (m), 1265 (w), 1210 (m), 1200 (w), 1185 (w), 1140 (w), 1110 (w), 1085 (m), 1050 (w), 1030 (vw), 990 (w), 945 (w), 925 (w), 895 (vw), 870 (w), 810 (w), 765 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

$\delta =$ 1,02 (dd; 6H; $^3J = 6,10$ Hz; CH-($\underline{C}H_3$)₂); 3,00-3,25 (m; 2H; CH- $\underline{C}H_2$ -); 4,03-4,06 (m; 1H; $\underline{C}H$ - $\underline{C}H_2$ -); 4,77-4,84 (m; 1H; $\underline{C}H$ -($\underline{C}H_3$)₂); 7,21-7,29 (m; 5H; \underline{C}_6H_5 -); 8,84 (breit; 3H; NH_3^+).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

$\delta =$ 21,0 (COO-CH-($\underline{C}H_3$)₂); 21,3 (COO-CH-($\underline{C}H_3$)₂); 35,9 (CH- $\underline{C}H_2$ -); 53,2 ($\underline{C}H$ - NH_3^+); 69,3 ($\underline{C}H$ -($\underline{C}H_3$)₂); 127,0 (C(4) von \underline{C}_6H_5); 128,4 (C(3,5) von \underline{C}_6H_5); 129,4 (C(2,6) von \underline{C}_6H_5); 134,8 (C(1) von \underline{C}_6H_5); 168,3 (CH- $\underline{C}OO$ -).

4.2.2.5 Synthese von DL-Phenylglycin-isopropylester-Hydrochlorid (\pm)-3e

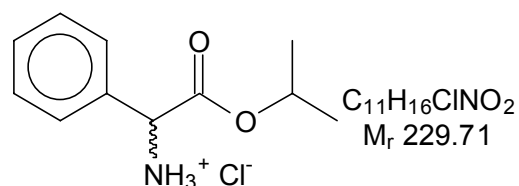
Nach AVV 3 wurden 100 ml abs. 2-Propanol bei $-4^\circ C$ unter Rühren mit 27 ml frisch destilliertem $SOCl_2$ und anschließend 15,1 g (0.1 mol) DL-Phenylglycin versetzt. Der kristalline Feststoff wurde gemörsert und 6 mal mit je 150 ml MtBE unter pH-Wert-Kontrolle bis zur Neutralität gewaschen. Der sehr hygroskopische Ester kristallisierte in der Kälte aus, wurde abgesaugt und im Exikator über P_4O_{10} getrocknet. Man erhielt 20,9 g (91 mmol); 91 %; gelbliche Kristalle.

Schmp. $194^\circ C$ (Zersetzung)

HPLC: RP-18, CH_3CN/H_2O , 90/10, flow 0,5 ml/min, Streulichtdetektor. R_T : 7.7 min

DC: (HE /EE: 1:2):

$R_f = 0.27$

**IR (KBr-Pressling, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3240-2660 (s, breit) [ν NH, charakteristisch für $-NH_3^+$]; 2960 (s) [ν CH]; 2630 (m), 2040 (w) [Ober- und Kombinationsschwingungen, charakteristisch für $-NH_3^+$]; 1740 (vs) [ν C=O]; 1590 (m), 1580 (m) [δ NH_3^+ ; ν C=C]; 1430 (m) [$\delta_{as}CH_3$]; 1250 (s) [ν

C-O]; 740 (m), 700 (m) [δ CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1495 (w), 1460 (w), 1385 (w), 1350 (w), 1335 (vw), 1315 (w), 1295 (w), 1280 (w), 1190 (m), 1140 (w), 1075 (vw), 1030 (w), 1000 (vw), 955 (w), 925 (vw), 885 (w), 835 (vw), 780 (w).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO d_6 [ppm]):

$\delta =$ 1,10 (dd; 6H; $^3\text{J} = 6,10$ Hz; CH-(CH₃)₂); 4,92-4,98 (m; 1H; CH-(CH₃)₂); 5,07 (2; 1H; CH-NH₃⁺); 7,36-7,50 (m; 5H; C₆H₅-); 9,19 (breit; 3H; NH₃⁺).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO d_6 [ppm]):

$\delta =$ 21,0 (COO-CH-(CH₃)₂); 21,3 (COO-CH-(CH₃)₂); 55,4 (CH-NH₃⁺); 69,9 (CH-(CH₃)₂); 128,1 (C(4) von -C₆H₅); 128,8 (C(3,5) von -C₆H₅); 129,3 (C(2,6) von -C₆H₅); 132,6 (C(1) von -C₆H₅); 167,6 (CH-COO-).

4.2.2.6 Freisetzung von Aminosäureisopropylestern aus Aminosäureester-Hydrochloriden (\pm)-6a-c

Die synthetisierten Aminosäureisopropylester-Hydrochloride wurden gemäß AVV 2 in die freien Aminosäureester überführt. Die Ansatzgrößen sowie die erhaltenen Ausbeuten sind in **Tab. 47** zusammengefasst.

Tab. 47: Freisetzung von Aminosäureisopropylester-Hydrochloriden: Ansatzgröße; Ausbeute; Reinheit; und Eigenschaften.

Edukt	Produkt	Ansatz [mmol]	Ausbeute [%]	Reinheit (GC)	Eigenschaft
DL-Ala-OiPr*HCl	DL-Ala-OiPr (\pm)- 6a	20	50	94 %	farbloses Öl
Gly-OiPr *HCl	Gly-OiPr 6b	20	51	96 %	farbloses Öl
DL-Ile-OiPr *HCl	DL-Ile-OiPr (\pm)- 6c	15	58	98 %	farbloses Öl
DL-Phe-OiPr *HCl	DL-Phe-OiPr (\pm)- 6d	15	67	95 %	gelbliches Öl
DL-Phg-OiPr *HCl	DL-Phg-OiPr (\pm)- 6e	15	61	96 %	gelbliches Öl

4.2.2.7 Enzymatische Acetylierung von Aminosäurebenzyl-, methyl-, ethyl und isopropylester

Die Lipase-katalysierte Acylierungen wurde in 4 ml Glasgefäßen mit jeweils 1 mmol Aminosäureester durchgeführt. Nach Zugabe von 3 ml Essigester (Acyldonor und zugleich Lösungsmittel) sowie 10 mg der Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SP 435) wurden die Ansätze bei 70°C mit 800U/min geschüttelt. Nach jeweils 1 Stunde wurden Proben von 20 μl entnommen und in den Gaschromatograph injiziert. Die folgenden analytischen Parameter wurden verwendet: Injektortemperatur 350°C; Detektortemperatur 350°C; Temperaturprogramm: 35°C (10' isotherm) bis 280°C (6°C/min, 5' isotherm). Die Reaktion wurde nach 24 Stunden durch abfiltrieren des Enzyms abgebrochen. Bei allen Reaktionen wurde neben dem abfiltrierten Enzym noch ein Feststoff mit 2 Produkten beobachtet, was sich auf die

Bildung von Diketopiperazin bzw. hydrolysierte Aminosäure zurückführen ließ. Die Umsätze und die Retentionszeiten sind in **Tab. 48** zusammengestellt.

Tab. 48: Lipase-katalysierte Acetylierung unterschiedlicher Aminosäureester: Umsatz und Retentionszeiten.

Edukt	Produkt	Umsatz [%]	Retentionszeit Edukt [min]	Retentionszeit Produkt [min]
DL-Ala-OBn	<i>N</i> -Acetyl-DL-Ala-OBn (±)- 2a	32	10,6	24,2
Gly-OBn	<i>N</i> -Acetyl-Gly-OBn 2b	36	9,5	23,4
DL-Ile-OBn	<i>N</i> -Acetyl-DL-Ile-OBn (±)- 2c	26	12,2	26,1
DL-Leu-OBn	<i>N</i> -Acetyl-DL-Leu-OBn (±)- 2d	26	12,3	26,5
DL-Phe-OBn	<i>N</i> -Acetyl-DL-Phe-OBn (±)- 2e	23	14,1	28,4
DL-Val-OBn	<i>N</i> -Acetyl-DL-Val-OBn (±)- 2f	- ^a	11,9	- ^a
DL-Ala-OMe	<i>N</i> -Acetyl-DL-Ala-OMe (±)- 7a	29	8,2	21,0
Gly-OMe	<i>N</i> -Acetyl-Gly-OMe 7b	32	- ^b	16,2
DL-Ile-OMe	<i>N</i> -Acetyl-DL-Ile-OMe (±)- 7c	21	10,8	22,3
DL-Phe-OMe	<i>N</i> -Acetyl-DL-Phe-OMe (±)- 7d	13	13,6	24,5
DL-Phg-OMe	<i>N</i> -Acetyl-DL-Phg-OMe (±)- 7e	14	12,4	23,7
DL-Val-OMe	<i>N</i> -Acetyl-DL-Val-OMe (±)- 7f	12	10,5	22,6
DL-Ala-OEt	<i>N</i> -Acetyl-DL-Ala-OEt (±)- 8a	30	8,7	18,9
Gly-OEt	<i>N</i> -Acetyl-Gly-OEt 8b	34	- ^b	16,9
DL-Leu-OEt	<i>N</i> -Acetyl-DL-Leu-OEt (±)- 8c	25	9,9	22,5
DL-Met-OEt	<i>N</i> -Acetyl-DL-Met-OEt (±)- 8d	27	9,0	22,4
DL-Phe-OEt	<i>N</i> -Acetyl-DL-Phe-OEt (±)- 8e	15	13,8	24,8
DL-Ala-OiPr	<i>N</i> -Acetyl-DL-Ala-OiPr (±)- 9a	37	9,0	19,5
Gly-OiPr	<i>N</i> -Acetyl-Gly-OiPr 9b	42	7,9	18,2
DL-Ile-OiPr	<i>N</i> -Acetyl-DL-Ile-OiPr (±)- 9c	26	13,1	23,3
DL-Phe-OiPr	<i>N</i> -Acetyl-DL-Phe-OiPr (±)- 9d	23	14,3	25,1
DL-Phg-OiPr	<i>N</i> -Acetyl-DL-Phg-OiPr (±)- 9e	21	13,6	24,5

a) keine Acylierung. b) Mittels GC nicht nachweisbar.

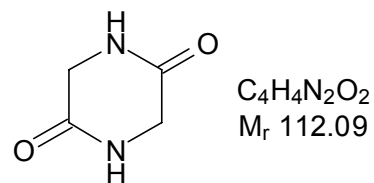
4.2.2.8 Bestimmung der Nebenprodukte bei der enzymatischen Acetylierung von Glycin-isopropylester

4,7 g (40 mmol) Glycin-isopropylester **6b** wurden mit 100 ml Essigester und 0,5g der Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SP 435) bei 70°C umgesetzt. Nach 24 h war kein Edukt im GC mehr zu beobachten und die Reaktion wurde durch abfiltrieren des Enzyms abgebrochen. Nach einrotieren des Essigesters erhielt man 2,9 g (18,0 mmol; 45%) *N*-Acetylglycin-isopropylester **9b** als farbloses Öl. Die Säulenfiltration des mit dem Enzym abfiltrierten Feststoffs ergab 0,9 g (12 mmol) Glycin sowie 0,54 g (4,7 mmol) 2,5-Piperazindion **10** (bestimmt durch NMR).

DC: Glycin (CHCl₃/EE/CH₃COOH/H₂O/ 4:4:1:1): $R_f = 0.25$

DC: 2,5-Piperazindion (CHCl₃/EE/CH₃COOH/H₂O/ 4:4:1:1): $R_f = 0.44$

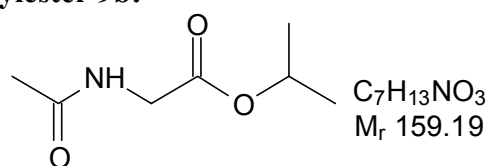
Schmp. > 250°C

Spektroskopische Daten von 2,5-Piperazindion 10: **1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):**

δ = 3,71 (s; 4H; 2 x $-CH_2-NH-$); 8,38 (breit; 2H; 2 x $-NH-$).

 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):

δ = 48,9 (CH_2-NH-); 170,2 ($CH_2-CO-NH-$).

Spektroskopische Daten von *N*-Acetylglycin-iso-propylester 9b: **1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):**

δ = 1,21 (d; 6H; $^3J = 6,0$ Hz; $CH-(CH_3)_2$); 2,15 (s; 3H; $CH_3-CO-NH-$); 3,89 (m; 2H; $-CH_2-NH-$); 4,95 (s; 1H; $CH-(CH_3)_2$).

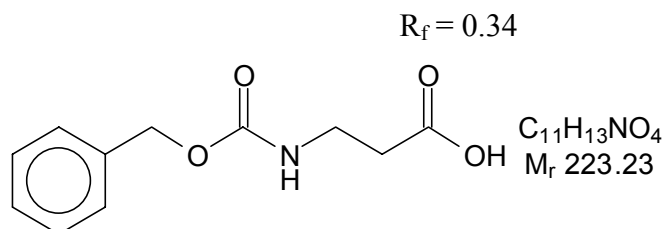
 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):

δ = 21,4 ($CH-(CH_3)_2$); 22,8 ($CH_3-CO-NH-$); 45,4 (CH_2-NH-); 69,2 ($CH-(CH_3)_2$); 168,7 ($CH-COO-$); 170,1 ($CH_3-CO-NH-$).

4.2.3 Synthese von *Z*-Aminosäuren**4.2.3.1 Synthese von *Z*- β -Alanin 11a**

Aus 8,91 g (100 mmol) β -Alanin ($M=89,1$) erhielt man nach der AVV 4 19,4 g (87 mmol) = 87% eines farblosen Öls.

DC: (HE /EE: 1:3):

 **1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):**

δ = 2,57 (m; 2H; CH_2-COOH); 3,88 (m; 2H; $NH-CH_2-$); 4,95 (s; 2H; $C_6H_5-CH_2-$); 7,33-7,42 (m; 5H; C_6H_5-); 7,89 (b; 1H; $NH-$).

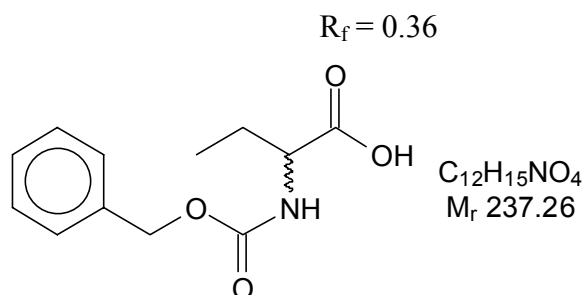
 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

δ = 34,2 (CH_2-COOH); 49,8 (CH_2-NH-); 65,4 ($C_6H_5-CH_2-$); 127,6 (C(4) von $-C_6H_5$); 127,7 (C(3,5) von $-C_6H_5$); 128,4 (C(2,6) von $-C_6H_5$); 137,2 (C(1) von $-C_6H_5$); 157,5 ($NH-CO-$); 172,3 ($COOH$).

4.2.3.2 Synthese von Z-DL-2-Aminobuttersäure (±)-11b

Aus 10,31 g (100 mmol) DL-2-Aminobuttersäure (M=103,12) erhielt man nach der AVV 4 20,9 g (88 mmol) = 88 % eines farblosen Öls.

DC: (HE /EE: 1:3):



1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 0,89 (t; 3H; $J = 7,2$ Hz; CH_2-CH_3); 1,62-1,88 (m; 2H; $-CH-CH_2-$); 4,02-4,11 (m; 1H; $CH-NH-$); 4,88 (s; 2H; $C_6H_5-CH_2-$); 7,30-7,39 (m; 5H; C_6H_5-); 7,75 (b; 1H; $NH-$).

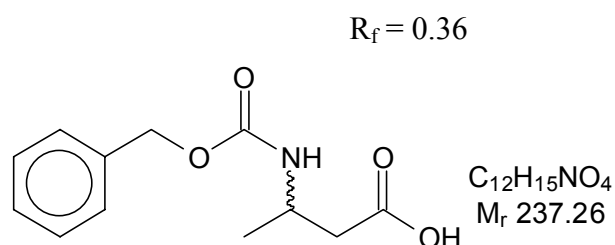
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 10,3 (CH_3-CH_2-); 24,1 ($CH-CH_2-$); 55,5 ($CH-NH-$); 62,9 ($C_6H_5-CH_2-$); 126,5 (C(4) von $-C_6H_5$); 128,3 (C(3,5) von $-C_6H_5$); 128,7 (C(2,6) von $-C_6H_5$); 142,5 (C(1) von $-C_6H_5$); 156,2 ($NH-CO-$); 172,1 ($COOH$).

4.2.3.3 Synthese von Z-DL-3-Aminobuttersäure (±)-11c

Aus 10,31 g (100 mmol) DL-3-Aminobuttersäure (M=103,12) erhielt man nach der AVV 4 20,4 g (86 mmol) = 86 % eines farblosen Öls.

DC: (HE /EE: 1:3):



1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 1,05 (d; 3H; $J = 6,8$ Hz; $CH-CH_3$); 2,22-2,45 (m; 2H; $-CH-CH_2-$); 3,82-3,89 (m; 1H; $-CH-CH_2-$); 4,97 (s; 2H; $C_6H_5-CH_2-$); 7,21-7,41 (m; 5H; C_6H_5-).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

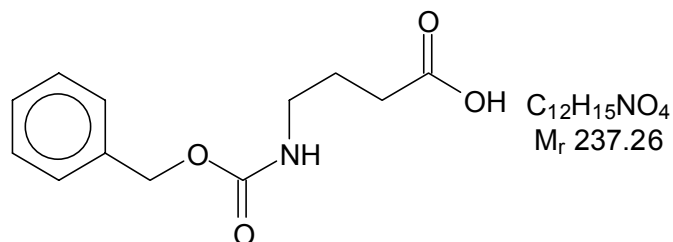
$\delta =$ 20,6 (CH_3-CH_2-); 40,9 ($CH-CH_2-$); 43,9 ($CH-CH_2-$); 65,2 ($C_6H_5-CH_2-$); 127,3 (C(4) von $-C_6H_5$); 128,2 (C(3,5) von $-C_6H_5$); 128,9 (C(2,6) von $-C_6H_5$); 137,3 (C(1) von $-C_6H_5$); 155,3 ($NH-CO-$); 172,5 ($COOH$).

4.2.3.4 Synthese von Z-4-Aminobuttersäure 11d

Aus 10,31 g (100 mmol) 4-Aminobuttersäure (M=103,12) erhielt man nach der AVV 4 20,2 g (85 mmol) = 85 % eines farblosen Öls.

DC: (HE /EE: 1:3):

$R_f = 0.36$

 **1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):**

δ = 1,60-1,65 (m; 2H; $-\underline{CH}_2-\underline{CH}_2-\text{COO}-$); 2,22 (t; 2H; $J=7,3$ Hz; $\underline{CH}_2-\underline{CH}_2-\text{COO}-$); 3,00-3,07 (m; 2H; $-\text{NH}-\underline{CH}_2-$); 5,00 (s; 2H; $\text{C}_6\text{H}_5-\underline{CH}_2-$); 7,23-7,39 (m; 5H; C_6H_5-).

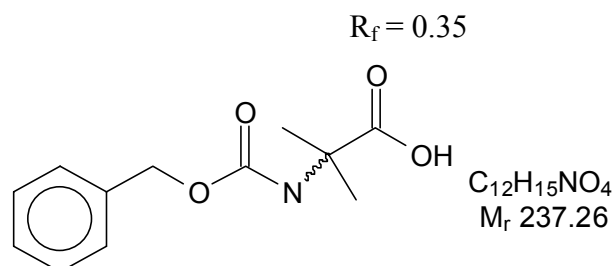
 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

δ = 24,2 ($-\underline{CH}_2-\underline{CH}_2-\text{COO}-$); 32,8 ($\underline{CH}_2-\underline{CH}_2-\text{COO}-$); 40,4 ($\text{NH}-\underline{CH}_2-$); 65,0 ($\text{C}_6\text{H}_5-\underline{CH}_2-$); 127,5 (C(4) von $-\underline{C}_6\text{H}_5$); 127,7 (C(3,5) von $-\underline{C}_6\text{H}_5$); 128,4 (C(2,6) von $-\underline{C}_6\text{H}_5$); 137,3 (C(1) von $-\underline{C}_6\text{H}_5$); 156,5 ($\text{NH}-\underline{CO}-$); 173,1 ($\underline{CH}_2-\underline{COOH}$).

4.2.3.5 Synthese von Z-DL- α -Aminoisobuttersäure (\pm)-11e

Aus 10,31 g (100 mmol) DL- α -Aminoisobuttersäure ($M=103,12$) erhielt man nach der AVV 4 20,9 g (88 mmol) = 88 % eines farblosen Öls.

DC: (HE /EE: 1:3):

 **1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):**

δ = 1,34 (s; 6H; $\text{C}-(\underline{CH}_3)_2$); 4,98 (s; 2H; $\text{C}_6\text{H}_5-\underline{CH}_2-$); 7,25-7,33 (m; 5H; C_6H_5-); 7,45 (b; 1H; $\text{NH}-\text{CO}$).

 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

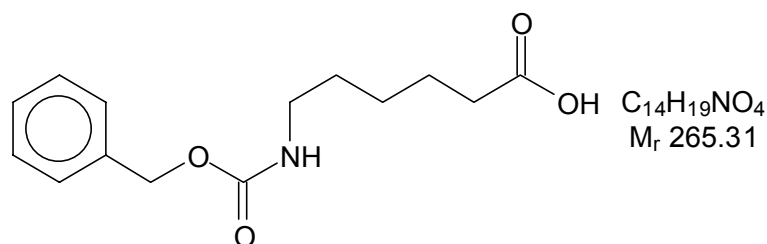
δ = 25,2 ($\text{C}-(\underline{CH}_3)_2$); 55,2 ($\underline{C}-(\underline{CH}_3)_2$); 65,1 ($\text{C}_6\text{H}_5-\underline{CH}_2-$); 127,6 (C(4) von $-\underline{C}_6\text{H}_5$); 128,1 (C(3,5) von $-\underline{C}_6\text{H}_5$); 128,3 (C(2,6) von $-\underline{C}_6\text{H}_5$); 137,1 (C(1) von $-\underline{C}_6\text{H}_5$); 155,0 ($\text{NH}-\underline{CO}-$); 175,8 (\underline{COOH}).

4.2.3.6 Synthese von Z-6-Aminohexansäure 11f

Aus 13,18 g (100 mmol) 6-Aminohexansäure ($M=131,18$) erhielt man nach der AVV 4 23,1 g (87 mmol) = 87 % eines farblosen Öls.

DC: (HE /EE: 1:3):

$R_f = 0.38$

 **1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):**

$\delta =$ 1,23-1,50 (m; 6H; $\underline{CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-COO-}$); 2,18 (t; 2H; $J=7,4$ Hz; CH_2-CH_2-COO-); 2,97-3,02 (m; 2H; $-NH-CH_2-$); 5,01 (s; 2H; $C_6H_5-CH_2-$); 7,29-7,38 (m; 5H; C_6H_5-).

 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

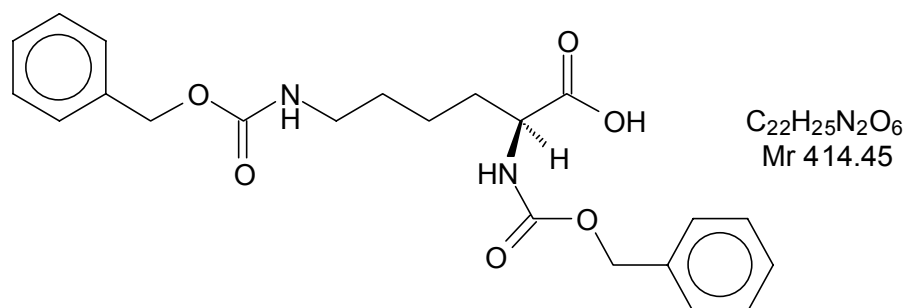
$\delta =$ 24,4 ($-CH_2-CH_2-CH_2-COOH$); 25,5 ($-CH_2-CH_2-CH_2-COOH$); 29,2 ($NH-CH_2-CH_2-$); 34,9 ($-CH_2-COOH$); 40,0 ($NH-CH_2-$); 65,1 ($C_6H_5-CH_2-$); 127,2 (C(4) von $-C_6H_5$); 127,8 (C(3,5) von $-C_6H_5$); 128,4 (C(2,6) von $-C_6H_5$); 137,7 (C(1) von $-C_6H_5$); 156,1 ($NH-CO-$); 172,9 (CH_2-COOH).

4.2.3.7 Synthese von Di-Z-Lysin (DL, L) (\pm)-11g, (S)-11g

Aus 7,31 g (50 mmol) DL-Lysin ($M=146,19$) erhielt man nach der AVV 4 14,92 g (36 mmol) = 72 % eines farblosen Öls. Aus 7,31 g (50 mmol) L-Lysin erhielt man nach der AVV 4 14,10 g (34 mmol) = 68 % eines farblosen Öls.

DC: (HE /EE: 1:2):

$R_f = 0.41$

 **1H -NMR (400.132 MHz, DMSO d_6 [ppm]):**

$\delta =$ 1,31-1,40 (m; 4H; $-CH-CH_2-CH_2-$); 1,57-1,68 (m; 2H; $-NH-CH_2-CH_2-$); 2,97-2,99 (m; 2H; $-NH-CH_2-CH_2-$); 3,90-3,95 (m; 1H; $-NH-CH-CH_2-$); 5,00 (s; 2H; $C_6H_5-CH_2-$); 5,04 (s; 2H; $C_6H_5-CH_2-$); 7,18-7,31 (b; 1H; $-NH-CH_2-$); 7,33-7,35 (m; 10H; 2 x C_6H_5); 7,49 (d; 1H; $J = 7,7$ Hz; $-NH-CH-$).

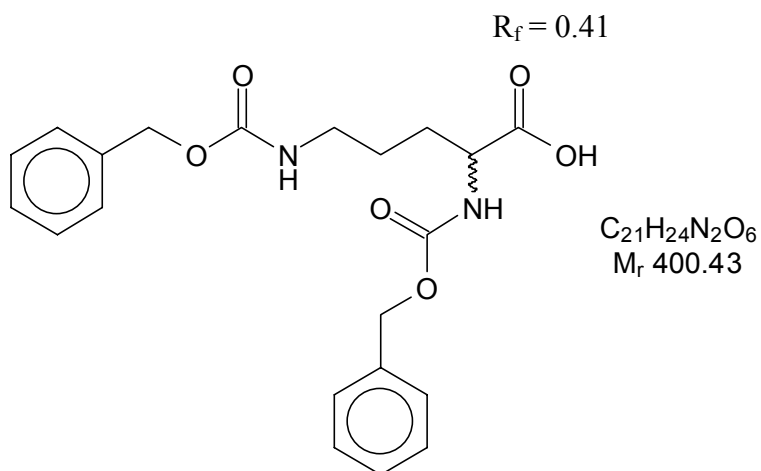
 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO d_6 [ppm]):

$\delta =$ 22,8 ($-CH-CH_2-CH_2-$); 28,9 ($-CH-CH_2-CH_2-$); 30,4 ($-NH-CH_2-CH_2-$); 40,0 ($-NH-CH_2-CH_2-$); 53,8 ($-NH-CH-CH_2-$); 65,1 ($C_6H_5-CH_2-$); 65,4 ($C_6H_5-CH_2-$); 127,6 (C(4) von $\epsilon-C_6H_5$); 127,7 (C(4) von $\alpha-C_6H_5$); 128,3 (C(3,5) von $\epsilon-C_6H_5$); 128,4 (C(3,5) von $\alpha-C_6H_5$); 128,6 (C(2,6) von α - und $\epsilon-C_6H_5$); 136,9 (C(1) von $\epsilon-C_6H_5$); 137,3 (C(1) von $\alpha-C_6H_5$); 156,1 (2 x $NH-COO-$); 173,9 ($-COOH$).

4.2.3.8 Synthese von Di-Z-DL-Ornithin (\pm)-11h

Aus 8,43 g (50 mmol) DL-Ornithin-monohydrochlorid ($M=168,62$) erhielt man nach der AVV 4 16,16g (37 mmol) = 74 % eines farblosen Öls.

DC: (HE /EE: 1:2):



1H -NMR (400.132 MHz, DMSO d_6 [ppm]):

$\delta =$ 1,41-1,57 (m; 4H; -CH-CH₂-CH₂-); 2,96-2,98 (m; 2H; -NH-CH₂-CH₂-); 3,84-3,88 (m; 1H; -NH-CH-CH₂-); 5,00 (s; 4H; 2 x C₆H₅-CH₂-); 6,77 (d; 1H; J = 7,5 Hz; -NH-CH-); 7,15-7,17 (b; 1H; -NH-CH₂-); 7,27-7,36 (m; 10H; 2 x C₆H₅).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO d_6 [ppm]):

$\delta =$ 25,9 (-CH-CH₂-CH₂-); 29,7 (-CH-CH₂-CH₂-); 40,3 (-NH-CH₂-CH₂-); 55,0 (-NH-CH-CH₂-); 65,1 (C₆H₅-CH₂-); 65,2 (C₆H₅-CH₂-); 127,6 (C(4) von δ -C₆H₅); 127,7 (C(4) von α -C₆H₅); 128,1 (C(3,5) von δ -C₆H₅); 128,3 (C(3,5) von α -C₆H₅); 128,5 (C(2,6) von α - und δ -C₆H₅); 137,2 (C(1) von δ -C₆H₅); 137,3 (C(1) von α -C₆H₅); 155,6 (δ -NH-COO-); 156,0 (α -NH-COO-); 170,3 (-COOH).

4.2.3.9 Weitere Synthesen von natürlichen Z-Aminosäuren (\pm)-11j-o

Die Z-Aminosäuren (\pm)-11j-o wurden nach der AVV 4 synthetisiert. Die Ansatzgrößen sowie die erhaltenen Ausbeuten sind in **Tab. 49** zusammengefasst. Die entsprechenden spektroskopischen Daten der synthetisierten Produkte sind Literatur (s. Literaturstellen **Tab. 49**) bekannt.

Tab. 49: Synthese von Z-Aminosäuren: Ansatzgröße; Ausbeute; Eigenschaften und Schmelzpunkte.

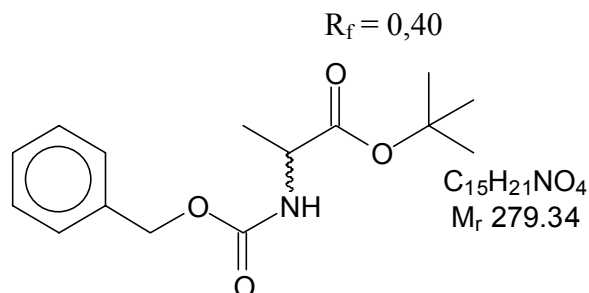
Produkt	Ansatz [mmol]	Ausbeute [%]	Eigenschaft	Schmp. [°C]
Z-L-Asp-OH ¹⁸⁷ (S)-11j	100	71	farblose Kristalle	109-111
Z-D-Ala-OH ¹⁸⁸ (R)-11k	50	83	farbloses Öl	-
Z-L-Glu-OH ¹⁸⁹ (S)-11l	100	69	farblose Kristalle	120-122
Z-D-Leu-OH ¹⁹⁰ (R)-11m	50	86	farbloses Öl	-
Z-D-Phe-OH ¹⁹¹ (R)-11n	50	89	farblose Kristalle	76-78
Z-L-Phg-OH ¹⁸⁸ (S)-11o	100	86	farblose Kristalle	130-132

4.2.4 Synthese von *Z*-Aminosäure-*t*-butylester

4.2.4.1 Synthese von *Z*-Alanin-*t*-butylester (DL; D; L) (\pm)-12a, (*R*)-12a, (*S*)-12a

Die Umsetzung von 6,70 g (30 mmol) *Z*-Alanin (DL- bzw. L) ($M=223,23$) mit 28,8 g (0,24 mol) $MgSO_4$, 3,3 ml konz. H_2SO_4 und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 5,61 bzw. 5,53 g (20,1 bzw. 19,8 mmol) = 67 % bzw. 66 % eines farblosen Öls. Aus 2,23 g (10 mmol) *Z*-D-Alanin (*R*)-11k erhielt man nach der AVV 5 1,98 g (7,1 mmol) = 71 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):



1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 1,41 (d; 3H; $J = 7,1$ Hz; $CH-CH_3$); 1,49 (s; 9H; $C-(CH_3)_3$); 4,21-4,37 (m; 1H; $CH-NH$); 5,15 (s; 2H; $C_6H_5-CH_2-$); 5,38-5,49 (b; 1H; $NH-$); 7,30-7,39 (m; 5H; C_6H_5-).

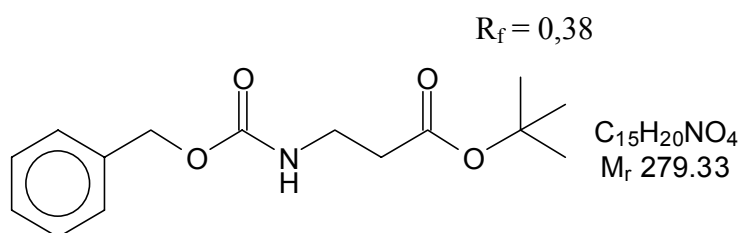
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 18,8 (CH_3-CH-); 27,8 ($C-(CH_3)_3$); 50,1 ($CH-NH-$); 66,7 ($C_6H_5-CH_2-$); 81,8 ($C-(CH_3)_3$); 128,0 (C(4) von $-C_6H_5$); 128,2 (C(3,5) von $-C_6H_5$); 128,4 (C(2,6) von $-C_6H_5$); 136,4 (C(1) von $-C_6H_5$); 155,5 ($NH-COO$); 172,1 ($-COO-$).

4.2.4.2 Synthese von *Z*- β -Alanin-*t*-butylester 12b

Die Umsetzung von 6,70 g (30 mmol) *Z*- β -Alanin 11a ($M=223,23$) mit 28,8 g (0,24mol) $MgSO_4$, 3,3 ml konz. H_2SO_4 und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 6,53 g (23,4 mmol) = 78 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):



1H -NMR (400.132 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):

$\delta =$ 1,41 (s; 9H; $C-(CH_3)_3$); 2,30-2,44 (m; 2H; CH_2-COO-); 3,79-3,86 (m; 2H; $NH-CH_2-$); 5,01 (s; 2H; $C_6H_5-CH_2-$); 7,20-7,38 (m; 5H; C_6H_5-).

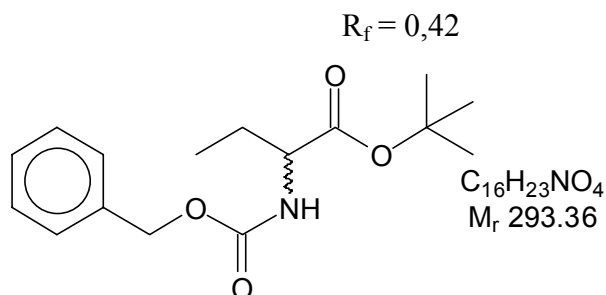
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):

$\delta =$ 27,3 ($C-(CH_3)_3$); 33,6 (CH_2-COO-); 44,5 (CH_2-NH-); 65,2 ($C_6H_5-CH_2-$); 80,4 ($C-(CH_3)_3$); 127,4 (C(4) von $-C_6H_5$); 127,5 (C(3,5) von $-C_6H_5$); 128,0 (C(2,6) von $-C_6H_5$); 136,6 (C(1) von $-C_6H_5$); 156,9 ($NH-CO-$); 171,2 ($CH-COO-$).

4.2.4.3 Synthese von *Z*-DL-2-Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-12c

Die Umsetzung von 7,12 g (30 mmol) *Z*-DL-2-Aminobuttersäure (\pm)-11b ($M=237,25$) mit 28,8 g (0,24mol) $MgSO_4$, 3,3 ml konz. H_2SO_4 und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 5,45 g (18,6 mmol) = 62 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):



1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 0,90 (t; 3H; $J = 7,1$ Hz; CH_2-CH_3); 1,32 (s; 9H; $C-(CH_3)_3$); 1,63-1,88 (m; 2H; $-CH-CH_2-$); 4,04-4,11 (m; 1H; $CH-NH-$); 4,90 (s; 2H; $C_6H_5-CH_2-$); 7,31-7,41 (m; 5H; C_6H_5-).

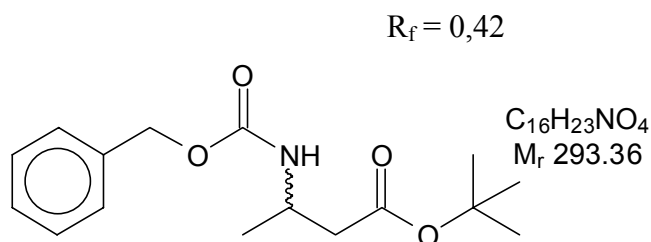
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 10,3 (CH_3-CH_2-); 24,1 ($CH-CH_2-$); 27,8 ($C-(CH_3)_3$); 56,4 ($CH-NH-$); 62,9 ($C_6H_5-CH_2-$); 79,9 ($C-(CH_3)_3$); 126,5 (C(4) von $-C_6H_5$); 128,3 (C(3,5) von $-C_6H_5$); 128,7 (C(2,6) von $-C_6H_5$); 142,5 (C(1) von $-C_6H_5$); 159,1 ($NH-CO-$); 170,2 ($COOH$).

4.2.4.3 Synthese von *Z*-DL-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-12d

Die Umsetzung von 7,12 g (30 mmol) *Z*-DL-2-Aminobuttersäure (\pm)-11c ($M=237,25$) mit 28,8 g (0,24mol) $MgSO_4$, 3,3 ml konz. H_2SO_4 und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 5,63 g (19,2 mmol) = 64 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):



1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 1,04 (d; 3H; $J = 6,7$ Hz; $CH-CH_3$); 1,34 (s; 9H; $C-(CH_3)_3$); 2,20-2,39 (m; 2H; $-CH-CH_2-$); 3,78-3,92 (m; 1H; $-CH-CH_2-$); 4,98 (s; 2H; $C_6H_5-CH_2-$); 7,16 (b; 1H; $CH-NH-$); 7,26-7,34 (m; 5H; C_6H_5-).

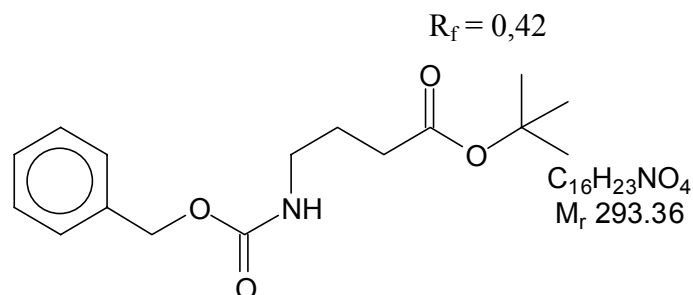
$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 20,6 (CH_3-CH_2-); 27,6 ($C-(CH_3)_3$); 42,1 ($CH-CH_2-$); 43,9 ($CH-CH_2-$); 65,0 ($C_6H_5-CH_2-$); 79,6 ($C-(CH_3)_3$); 127,6 (C(4) von $-C_6H_5$); 128,0 (C(3,5) von $-C_6H_5$); 128,7 (C(2,6) von $-C_6H_5$); 137,1 (C(1) von $-C_6H_5$); 155,1 ($NH-CO-$); 169,9 ($COO-$).

4.2.4.4 Synthese von Z-4-Aminobuttersäure-*t*-butylester 12e

Die Umsetzung von 7,12 g (30 mmol) Z-4-Aminobuttersäure **11d** (M=237,25) mit 28,8 g (0,24mol) MgSO₄, 3,3 ml konz. H₂SO₄ und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 5,89 g (20,1 mmol) = 67 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):



¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 1,39 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1,61-1,66 (m; 2H; -CH₂-CH₂-COO-); 2,19 (t; 2H; J=7,4 Hz; CH₂-CH₂-COO-); 3,00-3,04 (m; 2H; -NH-CH₂-); 5,01 (s; 2H; C₆H₅-CH₂-); 7,21-7,36 (m; 5H; C₆H₅-).

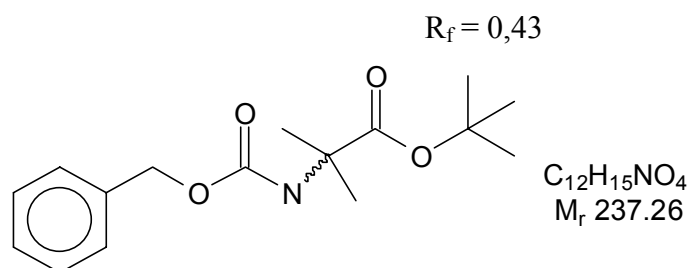
¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 24,9 (-CH₂-CH₂-COO-); 27,7 (C-(CH₃)₃); 32,0 (CH₂-CH₂-COO-); 40,1 (NH-CH₂-); 65,1 (C₆H₅-CH₂-); 79,4 (C-(CH₃)₃); 127,3 (C(4) von -C₆H₅); 127,6 (C(3,5) von -C₆H₅); 128,2 (C(2,6) von -C₆H₅); 137,2 (C(1) von -C₆H₅); 156,1 (NH-CO-); 171,8 (CH₂-COO-).

4.2.4.5 Synthese von Z-DL-α-Aminoisobuttersäure-*t*-butylester (±)-12f

Die Umsetzung von 7,12 g (30 mmol) Z-DL-α-Aminoisobuttersäure (±)-**11e** (M=237,25) mit 28,8 g (0,24mol) MgSO₄, 3,3 ml konz. H₂SO₄ und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 5,54 g (18,9 mmol) = 63 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):



¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 1,32 (s; 15H; C-(CH₃)₂ und C-(CH₃)₃); 4,99 (s; 2H; C₆H₅-CH₂-); 7,26-7,39 (m; 5H; C₆H₅-).

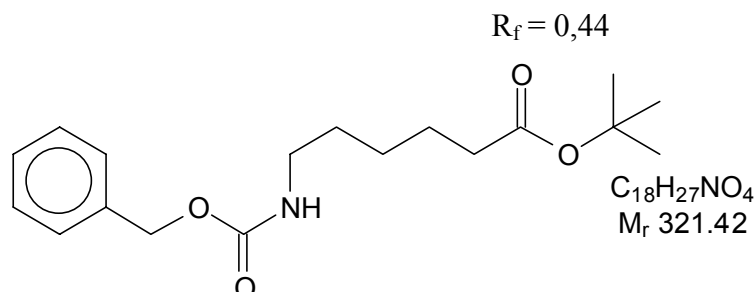
¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 25,3 (C-(CH₃)₂); 27,5 (C-(CH₃)₃); 55,5 (C-(CH₃)₂); 65,1 (C₆H₅-CH₂-); 79,9 (C-(CH₃)₃); 127,7 (C(4) von -C₆H₅); 128,2 (C(3,5) von -C₆H₅); 128,5 (C(2,6) von -C₆H₅); 137,3 (C(1) von -C₆H₅); 155,0 (NH-CO-); 172,0 (COO-).

4.2.4.7 Synthese von Z-6-Aminohexansäure-*t*-butylester 12g

Die Umsetzung von 7,96 g (30 mmol) Z-6-Aminohexansäure **11f** (M=265,31) mit 28,8 g (0,24 mol) MgSO₄, 3,3 ml konz. H₂SO₄ und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 7,04 g (21,9 mmol) = 73 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):



¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 1,22-1,49 (m; 6H; CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-); 1,39 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 2,17 (t; 2H; J=7,3 Hz; CH₂-CH₂-COO-); 2,97-2,99 (m; 2H; -NH-CH₂-); 5,00 (s; 2H; C₆H₅-CH₂-); 7,29-7,35 (m; 5H; C₆H₅-).

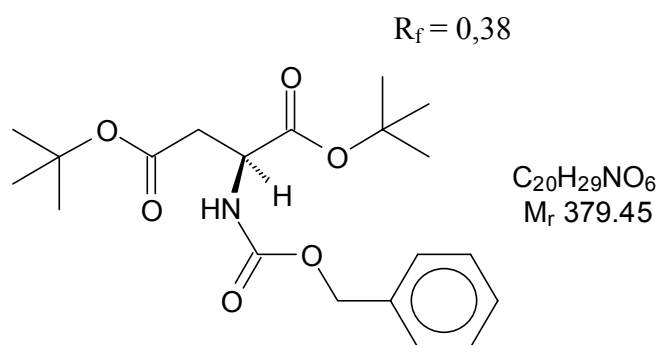
¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 24,2 (-CH₂-CH₂-CH₂-COO-); 25,6 (-CH₂-CH₂-CH₂-COO-); 27,7 (C-(CH₃)₃); 29,0 (NH-CH₂-CH₂-); 34,7 (-CH₂-COO-); 40,0 (NH-CH₂-); 65,0 (C₆H₅-CH₂-); 79,2 (C-(CH₃)₃); 127,0 (C(4) von -C₆H₅); 127,6 (C(3,5) von -C₆H₅); 128,2 (C(2,6) von -C₆H₅); 137,3 (C(1) von -C₆H₅); 156,0 (NH-CO-); 172,1 (CH₂-COO-).

4.2.4.8 Synthese von Z-L-Asparaginsäure-di-*t*-butylester (S)-12h

Die Umsetzung von 4,01 g (15 mmol) Z-L-Asparaginsäure (**S**)-**11j** (M=267,24) mit 28,8 g (0,24 mol) MgSO₄, 3,3 ml konz. H₂SO₄ und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 3,98 g (10,5 mmol) = 70 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):



¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 1,34 (s; 18H; 2 x C-(CH₃)₃); 2,46-2,52 (m; 2H; -NH-CH-CH₂-); 4,18-4,26 (m; 1H; CH-NH-); 5,00 (s; 2H; C₆H₅-CH₂-); 7,18-7,29 (m; 5H; C₆H₅-); 7,58 (b; 1H; CH-NH-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 27,7 (2 x C-(CH₃)₃); 37,2 (NH-CH-CH₂-); 51,2 (NH-CH-); 65,4 (C₆H₅-CH₂-); 80,3 ((2)C-(CH₃)₃); 80,9 ((1)C-(CH₃)₃); 127,6 (C(4) von -C₆H₅); 127,8 (C(3,5) von -C₆H₅);

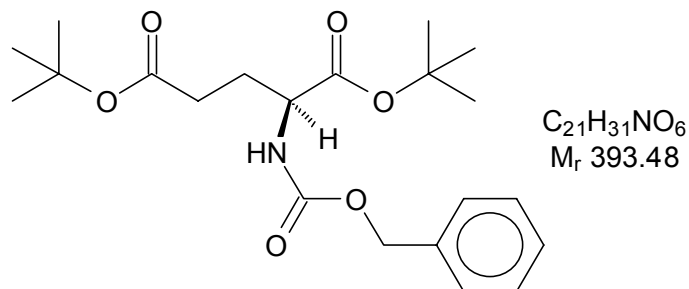
128,3 (C(2,6) von $-\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 136,9 (C(1) von $-\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 155,7 (NH- $\underline{\text{C}}\text{O}$ -); 169,0 (CH_2 - $\underline{\text{C}}\text{O}$ -); 169,9 (CH- $\underline{\text{C}}\text{O}$ -).

4.2.4.9 Synthese von Z-L-Glutaminsäure-di-*t*-butylester (S)-12i

Die Umsetzung von 4,22 g (15 mmol) Z-L-Glutaminsäure (S)-111 (M=281,27) mit 28.8 g (0,24mol) MgSO_4 , 3,3 ml konz. H_2SO_4 und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 4,01 g (10,2 mmol) = 68 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):

$R_f = 0,39$



$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO-d_6 [ppm]):

$\delta =$ 1,35 (s; 18H; 2 x C-($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃); 1,65-1,92 (m; 2H; -NH-CH- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -); 2,18-2,31 (m; 2H; -NH-CH- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -); 3,89-3,96 (m; 1H; $\underline{\text{C}}\text{H}$ -NH-); 5,00 (s; 2H; C_6H_5 - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -); 7,18-7,29 (m; 5H; C_6H_5 -); 7,58 (b; 1H; CH-NH-).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO-d_6 [ppm]):

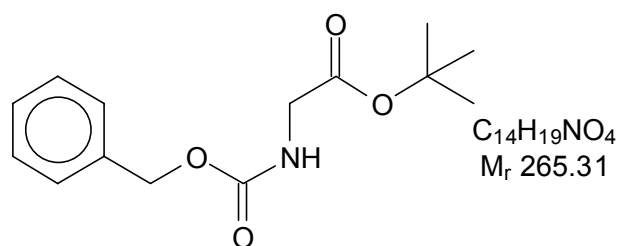
$\delta =$ 26,1 (NH-CH- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -); 27,7 (2 x C-($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃); 31,0 (NH-CH- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -); 53,6 (NH- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -); 65,4 (C_6H_5 - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -); 79,7 ((2)C-($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃); 80,6 ((1)C-($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃); 127,6 (C(4) von $-\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 127,7 (C(3,5) von $-\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 128,2 (C(2,6) von $-\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 136,9 (C(1) von $-\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 156,0 (NH- $\underline{\text{C}}\text{O}$ -); 171,1 (CH_2 - $\underline{\text{C}}\text{O}$ -); 171,4 (CH- $\underline{\text{C}}\text{O}$ -).

4.2.4.10 Synthese von Z-Glycin-*t*-butylester 12j

Die Umsetzung von 6,28 g (30 mmol) Z-Glycin (M=209,2) mit 28.8 g (0,24mol) MgSO_4 , 3,3 ml konz. H_2SO_4 und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 5,65 g (21,3 mmol) = 71 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):

$R_f = 0,36$



$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 1,48 (s; 9H; C-($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃); 3,30 (s; 2H; - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -); 5,00 (s; 2H; C_6H_5 - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -); 7,20-7,31 (m; 5H; C_6H_5 -).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

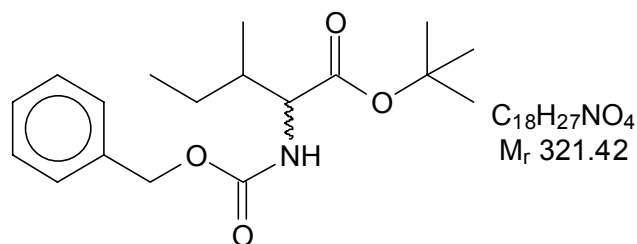
$\delta =$ 27,1 (C-($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃); 41,4 ($\underline{\text{C}}\text{H-NH-}$); 65,2 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$); 80,4 ($\underline{\text{C}}\text{-(CH}_3\text{)}_3$); 127,4 (C(4) von $\text{-}\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 127,5 (C(3,5) von $\text{-}\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 128,0 (C(2,6) von $\text{-}\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 136,6 (C(1) von $\text{-}\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 156,9 (NH- $\underline{\text{C}}\text{O-}$); 171,8 (CH- $\underline{\text{C}}\text{OO-}$).

4.2.4.11 Synthese von Z-Isoleucin-*t*-butylester (DL bzw. L) (\pm)-12k, (S)-12k

Die Umsetzung von 7,96 g (30 mmol) Z-Isoleucin (DL- bzw. L) (M=265,31) mit 28,8 g (0,24 mol) MgSO_4 , 3,3 ml konz. H_2SO_4 und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 6,27 bzw. 6,65 g (19,5 bzw. 20,7 mmol) = 65 % bzw. 69 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):

$R_f = 0,42$

 **^1H -NMR (400.132 MHz, CDCl_3 [ppm]):**

$\delta =$ 0,88-0,94 (Überlagerung eines Dubletts und Triplets; 6H; $\text{-CH-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$; $\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 1,18-1,25 (m; 2H; $\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$); 1,46 (s; 9H; C-($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃); 1,86 (m; 1H; $\text{-}\underline{\text{C}}\text{H-CH}_3$); 4,21 (m; 1H; $\underline{\text{C}}\text{H-NH-}$); 5,05 (s; 2H; $\text{C}_6\text{H}_5\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$); 7,22-7,38 (m; 5H; $\text{C}_6\text{H}_5\text{-}$); 7,90 (d, breit; 1H; $^3J=7,9$ Hz; CH-NH-).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

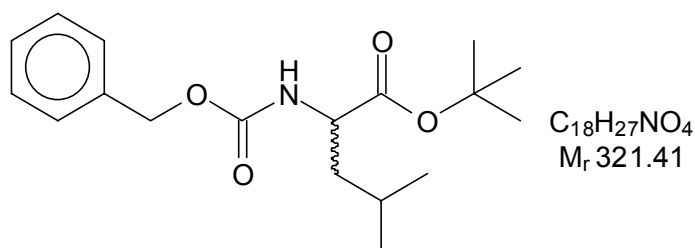
$\delta =$ 11,4 ($\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 14,6 ($\text{-CH-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 25,1 ($\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$); 27,6 (C-($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃); 37,3 ($\text{-}\underline{\text{C}}\text{H-CH}_3$); 48,2 ($\underline{\text{C}}\text{H-NH-}$); 66,3 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$); 81,1 ($\underline{\text{C}}\text{-(CH}_3\text{)}_3$); 126,9 (C(4) von $\text{-}\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 127,8 (C(3,5) von $\text{-}\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 128,5 (C(2,6) von $\text{-}\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 136,6 (C(1) von $\text{-}\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 156,3 (NH- $\underline{\text{C}}\text{O-}$); 172,1 (CH- $\underline{\text{C}}\text{OO-}$).

4.2.4.12 Synthese von Z-Leucin-*t*-butylester (DL; D; L) (\pm)-12l, (R)-12l, (S)-12l

Die Umsetzung von 7,96 g (30 mmol) Z-Leucin (DL- bzw. L) (M=265,31) mit 28,8 g (0,24 mol) MgSO_4 , 3,3 ml konz. H_2SO_4 und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 7,04 bzw. 7,23 g (21,9 bzw. 22,5 mmol) = 73 % bzw. 75 % eines farblosen Öls. Aus 2,65 g (10 mmol) Z-D-Leucin (R)-11m erhielt man nach der AVV 5 2,44 g (7,6 mmol) = 76 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):

$R_f = 0,39$



$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 0,95-1,03 (m; 6H; $(\text{CH}_3)_2\text{-CH-}$); 1,48 (s; 9H; $\text{C-}(\text{CH}_3)_3$); 1,67-1,75 (m; 1H; $-\text{CH-CH}_3$); 2,20-2,26 (m; 1H; $-\text{CH-CH}_2$); 4,38 (m; 1H; CH-NH-); 5,07 (s; 2H; $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$); 7,24-7,38 (m; 5H; C_6H_5); 7,44 (d, breit; 1H; $^3\text{J}=8,0$ Hz; CH-NH-).

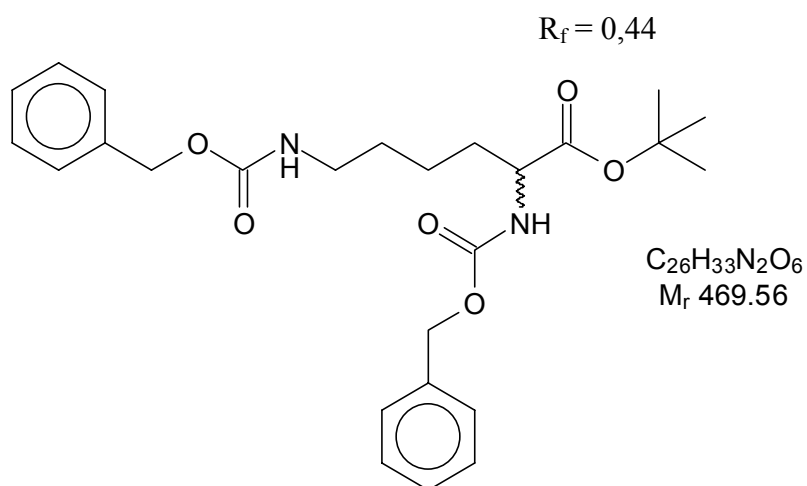
 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 22,1 ($(\text{CH}_3)_2\text{-CH-}$); 24,6 ($-\text{CH-CH}_3$); 27,7 ($\text{C-}(\text{CH}_3)_3$); 40,1 ($-\text{CH-CH}_2$); 52,7 (CH-NH-); 67,9 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$); 79,4 ($\text{C-}(\text{CH}_3)_3$); 126,8 (C(4) von $-\text{C}_6\text{H}_5$); 127,6 (C(3,5) von $-\text{C}_6\text{H}_5$); 128,4 (C(2,6) von $-\text{C}_6\text{H}_5$); 136,8 (C(1) von $-\text{C}_6\text{H}_5$); 156,1 (NH-CO-); 170,4 (CH-COO-).

4.2.4.13 Synthese von Di-Z-Lysin-*t*-butylester (DL bzw. L) (\pm)-12m, (S)-12m

Die Umsetzung von 12,44 g (30 mmol) Di-Z-Lysin (DL- (\pm)-11g bzw. L- (S)-11g) ($M=414,45$) mit 28,8 g (0,24 mol) MgSO_4 , 3,3 ml konz. H_2SO_4 und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 9,88 bzw. 10,16 g (21,0 bzw. 21,6 mmol) = 70 % bzw. 72 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):

 **$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, $\text{DMSO } d_6$ [ppm]):**

$\delta =$ 1,22-1,38 (m; 13H; 9H von $\text{C-}(\text{CH}_3)_3$; 4H von $-\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$); 1,55-1,63 (m; 2H; $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,95-3,00 (m; 2H; $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 3,83-3,86 (m; 1H; $-\text{NH-CH-CH}_2$); 5,00 (s; 4H; 2 x $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$); 7,17-7,25 (b; 1H; $-\text{NH-CH}_2$); 7,29-7,35 (m; 10H; 2 x C_6H_5); 7,51 (d; 1H; $\text{J} = 7,6$ Hz; $-\text{NH-CH-}$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, $\text{DMSO } d_6$ [ppm]):

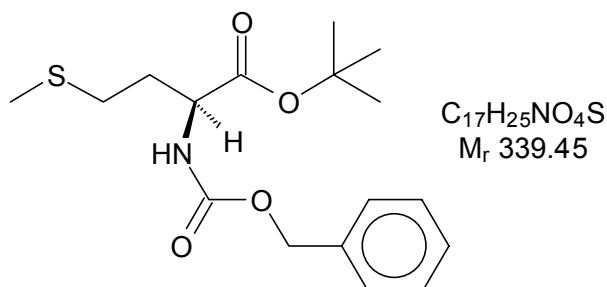
$\delta =$ 22,6 ($-\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$); 27,6 ($\text{C-}(\text{CH}_3)_3$); 28,9 ($-\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$); 30,4 ($-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 39,9 ($-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 54,5 ($-\text{NH-CH-CH}_2$); 65,0 ($\epsilon\text{-C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$); 65,3 ($\alpha\text{-C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$); 80,3 ($\text{C-}(\text{CH}_3)_3$); 127,6 (C(4) von $\epsilon\text{-C}_6\text{H}_5$); 127,7 (C(4) von $\alpha\text{-C}_6\text{H}_5$); 128,2 (C(3,5) von $\epsilon\text{-C}_6\text{H}_5$); 128,4 (C(3,5) von $\alpha\text{-C}_6\text{H}_5$); 128,6 (C(2,6) von α - und $\epsilon\text{-C}_6\text{H}_5$); 136,9 (C(1) von $\epsilon\text{-C}_6\text{H}_5$); 137,2 (C(1) von $\alpha\text{-C}_6\text{H}_5$); 156,0 (2 x NH-COO-); 171,5 ($-\text{COO-C}$).

4.2.4.14 Synthese von Z-L-Methionin-*t*-butylester (S)-12n

Die Umsetzung von 8,50 g (30 mmol) Z-L-Methionin (M=283,35) mit 28,8 g (0,24mol) MgSO₄, 3,3 ml konz. H₂SO₄ und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 7,74 g (22,8 mmol) = 76 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):

R_f = 0,38



¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

δ = 1,42 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1,86-1,90 (m; 2H; CH₂-CH₂-CH-); 2,14 (s; 3H; CH₃-S-); 2,60 (t; 2H; ³J=7,6 Hz; -S-CH₂-); 4,54 (m; 1H; CH-NH-); 5,01 (s; 2H; C₆H₅-CH₂-); 7,18-7,22 (m; 5H; C₆H₅-); 7,31 (d, breit; 1H; ³J=7,5 Hz; CH-NH-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

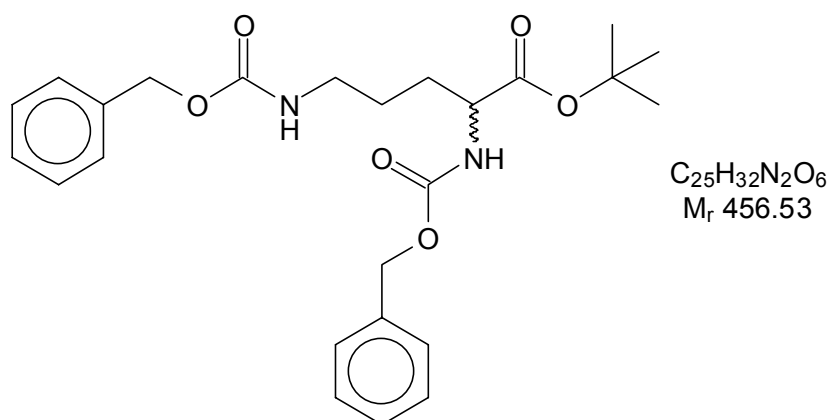
δ = 14,8 (CH₃-S-); 27,7 (C-(CH₃)₃); 28,7 (CH₂-CH₂-CH-); 29,4 (-S-CH₂-); 54,5 (CH-NH-); 68,2 (C₆H₅-CH₂-); 80,6 (C-(CH₃)₃); 126,9 (C(4) von -C₆H₅); 127,7 (C(3,5) von -C₆H₅); 128,5 (C(2,6) von -C₆H₅); 136,6 (C(1) von -C₆H₅); 156,8 (NH-CO-); 170,7 (CH-COO-).

4.2.4.15 Synthese von Di-Z-DL-Ornithin-*t*-butylester (±)-12o

Die Umsetzung von 12,08 g (30 mmol) Di-Z-DL-Ornithin (±)-11h (M=402,45) mit 28,8 g (0,24mol) MgSO₄, 3,3 ml konz. H₂SO₄ und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 10,32 g (22,6 mmol) = 75 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):

R_f = 0,43



¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

δ = 1,22-1,66 (m; 13H; 9H von C-(CH₃)₃; 4H von -CH-CH₂-CH₂-); 2,98-3,00 (m; 2H; -NH-CH₂-CH₂-); 3,85-3,88 (m; 1H; -NH-CH-CH₂-); 5,00 (s; 2H; δ-C₆H₅-CH₂-); 5,04

(s; 2H; α -C₆H₅-CH₂-); 7,20 (b; 1H; -NH-CH₂-); 7,30-7,35 (m; 10H; 2 x C₆H₅) 7,53 (d; 1H; J = 7,5 Hz; -NH-CH-);

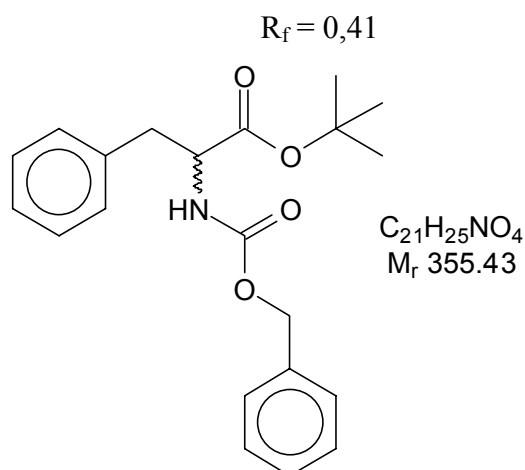
¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

δ = 25,7 (-CH-CH₂-CH₂-); 27,6 (C-(CH₃)₃); 28,1 (-CH-CH₂-CH₂-); 39,8 (-NH-CH₂-CH₂-); 54,4 (-NH-CH-CH₂-); 65,1 (δ -C₆H₅-CH₂-); 65,3 (α -C₆H₅-CH₂-); 80,4 (C-(CH₃)₃); 127,6 (C(4) von δ -C₆H₅); 127,9 (C(4) von α -C₆H₅); 128,2 (C(3,5) von δ -C₆H₅); 128,3 (C(3,5) von α -C₆H₅); 128,7 (C(2,6) von α - und δ -C₆H₅); 136,9 (C(1) von δ -C₆H₅); 137,2 (C(1) von α -C₆H₅); 156,0 (2 x NH-COO-); 171,4 (-COO-C).

4.2.4.16 Synthese von Z-Phenylalanin-*t*-butylester (DL; D; L) (\pm)-12p, (R)-12p, (S)-12p

Die Umsetzung von 8,99 g (30 mmol) Z-Phenylalanin (DL- bzw. L) (M=299,33) mit 28.8 g (0,24 mol) MgSO₄, 3,3 ml konz. H₂SO₄ und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 8,31 bzw. 7,99 g (23,4 bzw. 22,5 mmol) = 78 % bzw. 75 % eines farblosen Öls. Aus 2,99 g (10 mmol) Z-D-Phenylalanin (\pm)-11n erhielt man nach der AVV 5 2,77 g (7,8 mmol) = 78 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):



¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

δ = 1,45 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 3,12 (d; 2H; J=5,5 Hz CH-CH₂-); 4,58 (m; 1H; CH-CH₂-); 5,16 (s; 2H; C₆H₅-CH₂-); 7,19-7,42 (m; 10H; 2 x C₆H₅-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

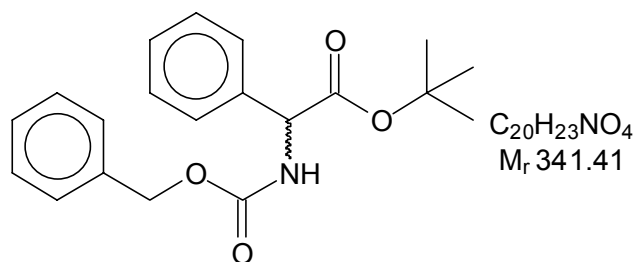
δ = 27,1 (C-(CH₃)₃); 38,4 (CH-CH₂-); 55,2 (CH-NH-); 65,4 (C₆H₅-CH₂-); 82,2 (C-(CH₃)₃); 126,9 (C(4) von -C₆H₅); 128,0; 128,3 (C(3,5) von -C₆H₅); 128,6; 128,9 (C(2,6) von -C₆H₅); 136,0; 136,4 (C(1) von -C₆H₅); 155,6 (NH-CO-); 170,5 (CH-COO-).

4.2.4.17 Synthese von Z-L-Phenylglycin-*t*-butylester (S)-12q

Die Umsetzung von 8,56 g (30 mmol) Z-L-Phenylglycin (S)-11o (M=285,33) mit 28.8 g (0,24 mol) MgSO₄, 3,3 ml konz. H₂SO₄ und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 7,88 g (23,1 mmol) = 77 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):

$R_f = 0,40$

 **1H -NMR (400.132 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):**

$\delta =$ 1,43 (s; 9H; C-($\underline{C}H_3$)₃); 4,44 (m; 1H; $\underline{C}H$ - C_6H_5); 5,06 (s; 2H; C_6H_5 - $\underline{C}H_2$ -); 7,22-7,41 (m; 10H; 2 x C_6H_5 -).

 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):

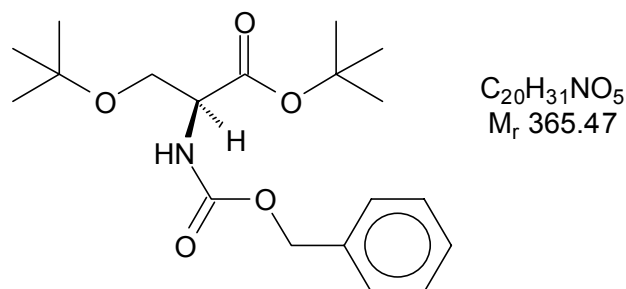
$\delta =$ 27,2 (C-($\underline{C}H_3$)₃); 55,6 ($\underline{C}H$ -NH-); 65,1 (C_6H_5 - $\underline{C}H_2$ -); 80,6 (C-($\underline{C}H_3$)₃); 126,9; 127,1 (C(4) von $-C_6H_5$); 128,1; 128,4 (C(3,5) von $-C_6H_5$); 128,6; 129,1 (C(2,6) von $-C_6H_5$); 136,4; 136,8 (C(1) von $-C_6H_5$); 156,2 (NH-CO-); 171,4 (CH-COO-).

4.2.4.18 Synthese von Z-O-t-Butyl-L-serin-t-butylester (S)-12r

Die Umsetzung von 7,18 g (30 mmol) Z-L-Serin (M=239,23) mit 28,8 g (0,24 mol) $MgSO_4$, 3,3 ml konz. H_2SO_4 und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 7,80 g (22,2 mmol) = 74 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):

$R_f = 0,43$

 **1H -NMR (400.132 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):**

$\delta =$ 1,14 (s; 9H; $-CH_2-O-C-(\underline{C}H_3)_3$); 1,47 (s; 9H; $COO-C-(\underline{C}H_3)_3$); 3,51-3,58 (m; 1H; $\underline{C}H$ - $\underline{C}H_2$ -); 3,75-3,83 (m; 1H; $\underline{C}H$ - $\underline{C}H_2$ -); 4,32-4,40 (m; 1H; $\underline{C}H$ - $\underline{C}H_2$ -); 5,13 (s; 2H; C_6H_5 - $\underline{C}H_2$ -); 5,57-5,65 (b; 1H; $-NH-CH$ -); 7,32-7,37 (m; 5H; C_6H_5 -).

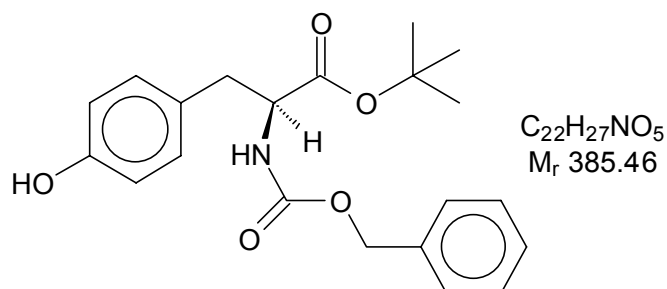
 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):

$\delta =$ 27,2 ($-CH_2-O-C-(\underline{C}H_3)_3$); 27,9 ($COO-C-(\underline{C}H_3)_3$); 54,9 ($\underline{C}H$ -NH-); 62,2 ($\underline{C}H$ - $\underline{C}H_2$ -); 66,7 (C_6H_5 - $\underline{C}H_2$ -); 72,9 ($-CH_2-O-C-(\underline{C}H_3)_3$); 81,6 (C-($\underline{C}H_3$)₃); 127,9 (C(4) von $-C_6H_5$); 128,4 (C(3,5) von $-C_6H_5$); 128,5 (C(2,6) von $-C_6H_5$); 136,4 (C(1) von $-C_6H_5$); 156,0 (NH-CO-); 169,5 (CH-COO-).

4.2.4.19 Synthese von Z-L-Tyrosin-t-butylester (S)-12s

Die Umsetzung von 9,46 g (30 mmol) Z-L-Tyrosin (M=315,33) mit 28,8 g (0,24 mol) $MgSO_4$, 3,3 ml konz. H_2SO_4 und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 8,58 g (23,1 mmol) = 77 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):

 $R_f = 0,39$  **1H -NMR (400.132 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):**

$\delta =$ 1,42 (s; 9H; C-(\underline{CH}_3)₃); 3,03 (d; 2H; $^3J=5,5$ Hz CH- \underline{CH}_2 -); 4,52 (m; 1H; \underline{CH} - \underline{CH}_2 -); 5,05 (s; 2H; C_6H_5 - \underline{CH}_2 -); 6,77 (d; 2H; $^3J=8,4$ Hz; $\underline{CH}=\underline{CHCOH}$); 6,96 (d; 2H; $^3J=8,4$ Hz; $\underline{CH}=\underline{CHCOH}$); 7,34 (breit; 1H; NH-).

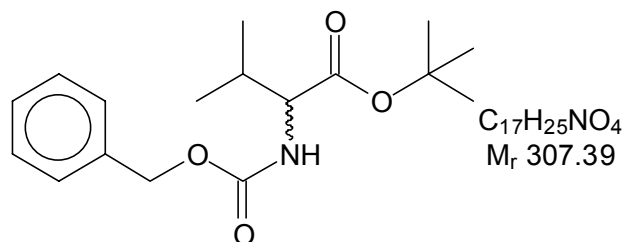
 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):

$\delta =$ 27,4 (C-(\underline{CH}_3)₃); 38,8 (CH- \underline{CH}_2 -); 55,3 (\underline{CH} -NH-); 65,2 (C_6H_5 - \underline{CH}_2 -); 82,1 (\underline{C} -(\underline{CH}_3)₃); 115,6 (C(3,5) von \underline{C}_6H_5OH); 126,9 (C(4) von \underline{C}_6H_5); 128,0 (C(3,5) von \underline{C}_6H_5); 128,6 (C(2,6) von \underline{C}_6H_5); 129,7 (C(2,6) von \underline{C}_6H_5OH); 136,4 (C(1) von \underline{C}_6H_5); 154,9 (C(4) von \underline{C}_6H_5OH); 155,7 (NH- \underline{CO} -); 170,8 (CH- \underline{COO} -).

4.2.4.20 Synthese von Z-Valin-*t*-butylester (DL; D; L) (±)-12t, (R)-12t, (S)-12t

Die Umsetzung von 7,54 g (30 mmol) Z-Valin (DL- bzw. L) ($M=251,28$) mit 28,8 g (0,24 mol) $MgSO_4$, 3,3 ml konz. H_2SO_4 und 28,8 ml (0,3 mol) *t*-BuOH ergab nach AVV 5 6,36 bzw. 6,45 g (20,7 bzw. 21,0 mmol) = 69 % bzw. 70 % eines farblosen Öls. Aus 2,51 g (10 mmol) Z-D-Valin erhielt man nach der AVV 5 2,18 g (7,1 mmol) = 71 % eines farblosen Öls.

DC: (HE / EE: 3:1):

 $R_f = 0,41$  **1H -NMR (400.132 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):**

$\delta =$ 0,88 (d; 3H; $J=6,0$ Hz; CH- \underline{CH}_3); 0,99 (d; 3H; $J=6,0$ Hz; CH- \underline{CH}_3); 1,43 (s; 9H; C-(\underline{CH}_3)₃); 1,89-2,43 (m; 1H; $-\underline{CH}-(\underline{CH}_3)_2$); 4,05-4,50 (m; 1H; \underline{CH} -NH-); 5,15 (s; 2H; C_6H_5 - \underline{CH}_2 -); 7,30-7,41 (m; 5H; C_6H_5 -).

 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):

$\delta =$ 17,9 (\underline{CH}_3 -CH-); 19,6 (\underline{CH}_3 -CH-); 27,0 (C-(\underline{CH}_3)₃); 31,9 ($-\underline{CH}-(\underline{CH}_3)_2$); 58,2 (\underline{CH} -NH-); 67,2 (C_6H_5 - \underline{CH}_2 -); 80,3 (\underline{C} -(\underline{CH}_3)₃); 126,5 (C(4) von \underline{C}_6H_5); 128,6 (C(3,5) von \underline{C}_6H_5); 128,9 (C(2,6) von \underline{C}_6H_5); 140,1 (C(1) von \underline{C}_6H_5); 158,2 (NH- \underline{CO} -); 170,1 (\underline{COO} -).

4.2.5 Synthese von Aminosäure-*t*-butylestern

4.2.5.1 Synthese von Alanin-*t*-butylester (DL; D; L) (\pm)-**13a**, (*R*)-**13a**, (*S*)-**13a**

Aus 4,19 g (15 mmol) *Z*-Alanin-*t*-butylester (DL- (\pm)-**12a** bzw. L- (*S*)-**12a**) ($M=279,23$) erhielt man nach der AVV 6 2,05 bzw. 2,00 g (14,1 bzw. 13,8 mmol) = 94 % (\pm)-**13a** bzw. 92 % (*S*)-**13a** als farbloses Öl. Aus 1,40 g (5 mmol) *Z*-D-Alanin-*t*-butylester (*R*)-**12a** erhielt man nach der AVV 6 2,05 bzw. 668 mg (4,6 mmol) = 92 % (*R*)-**13a** als farbloses Öl.

DC: (HE / EE: 1:2):

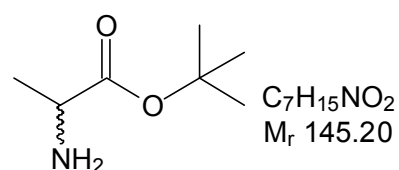
$R_f = 0,34$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 280°C/5min)

$R_t = 9.2$ min (98%)

Drehwert: L-Ala-OtBu*HCl $[\alpha]_D^{20} = + 6,0^\circ$ ($c=1,3$ H₂O)

Drehwert: D-Ala-OtBu*HCl $[\alpha]_D^{20} = - 6,0^\circ$ ($c=1,3$ H₂O)



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3380, 3310 (m, breit) [ν NH₂]; 2920, 2900 und 2860 (s, ν CH), 1745 (s) [ν C=O]; 1460 (m), 1440 (m, sh) [δ_{as} CH₃]; 1250 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1385 (w), 1370 (vw), 1330 (w), 1210 (m), 1135 (w), 1115 (m), 1000 (w), 980 (w), 905 (w), 840 (w), 755 (w) 620 (vw).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 1,11 (d; 3H; $J = 6,9$ Hz; CH-CH₃); 1,39 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 3,16-3,25 (m; 1H; CH-NH₂).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 20,8 (CH₃-CH-); 27,7 (C-(CH₃)₃); 50,1 (CH-NH₂); 79,7 (C-(CH₃)₃); 175,7 (-COO-).

4.2.5.2 Synthese von β -Alanin-*t*-butylester **13b**

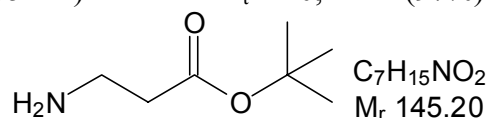
Aus 2,79 g (10 mmol) *Z*- β -Alanin-*t*-butylester **12b** ($M=279,23$) erhielt man nach der AVV 6 1,36 g (9,4 mmol) = 94 % **13b** als farbloses Öl.

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,36$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 280°C/5min)

$R_t = 10,4$ min (97%)



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3370, 3310 (m, breit) [ν NH₂]; 2950 (s) [ν CH]; 1740 (s) [ν C=O]; 1620 (s, sh), 1440 (m) [δ_{as} CH₃, δ CH₂]; 1235 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1510 (m, sh), 1360 (w), 1290 (w, sh), 1260 (m, sh), 1160 (vw), 1100 (w, sh), 1020 (w, sh), 980 (w, sh).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 1,18 (s; 9H; C-(CH_3)₃); 2,51-2,59 (m; 2H; $\text{CH}_2\text{-COO-}$); 3,16-3,22 (m; 2H; $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-}$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 27,4 (C-(CH_3)₃); 33,0 ($\text{CH}_2\text{-COO-}$); 41,9 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 81,2 (C-(CH_3)₃); 171,6 (CH-COO-).

4.2.5.3 Synthese von DL-2-Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-13c

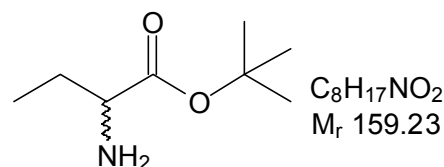
Aus 2,93 g (10 mmol) *Z*-DL-2-Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-12c ($M=293,25$) erhielt man nach der AVV 6 1,51 g (9,5 mmol) = 95 % (\pm)-13c als farbloses Öl.

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,35$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; 40°C/12min; 6°C/min; 280°C/5min)

$R_t = 16,3$ min (98%)

**IR (Film, cm^{-1}):**

$\nu =$ 3380, 3310 (m, breit) [ν NH_2]; 2930, 2910 und 2880 (s, ν CH), 1745 (vs) [ν C=O]; 1590 (m), 1460 (m, sh), 1440 (m) [$\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$, δ CH_2]; 1245 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1385 (w), 1355 (w), 1310 (m), 1290 (m,sh), 1180 (w), 1170 (w), 1135 (m), 1115 (w), 1005 (m), 965 (w), 900 (w), 860 (vw), 830 (vw), 805 (w), 785 (w), 760 (w), 650 (w).

 $^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO-d_6 [ppm]):

$\delta =$ 0,84 (t; 3H; $J = 7,2$ Hz; $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,40 (s; 9H; C-(CH_3)₃); 1,41-1,56 (m; 2H; $\text{-CH-CH}_2\text{-}$); 3,08-3,11 (m; 1H; CH-NH_2).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, DMSO-d_6 [ppm]):

$\delta =$ 9,9 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$); 27,6 ($\text{CH-CH}_2\text{-}$); 27,7 (C-(CH_3)₃); 64,5 (CH-NH_2); 79,5 (C-(CH_3)₃); 174,9 (-COO-).

4.2.5.4 Synthese von DL-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-13d

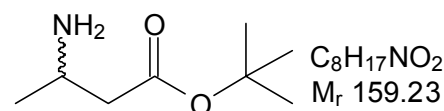
Aus 2,93 g (10 mmol) *Z*-DL-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-12d ($M=293,25$) erhielt man nach der AVV 6 1,48 g (9,3 mmol) = 93 % (\pm)-13d als farbloses Öl.

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,35$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; 40°C/12min; 6°C/min; 280°C/5min)

$R_t = 17,1$ min (97%)



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3380, 3310 (m, breit) [ν NH₂]; 2960 (s), 2910 (s, sh) [ν CH]; 1745 (vs) [ν C=O]; 1610 (m), 1440 (m) [δ as CH₃, δ CH₂]; 1235 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1535 (m, sh), 1395 (w), 1375 (vw, sh), 1355 (w), 1325 (w), 1300 (s), 1265 (s), 1220 (s), 1205 (s), 1160 (m), 1130 (m), 1115 (m), 1055 (m), 965 (vw), 920 (w), 885 (m), 855 (vw), 830 (m), 820 (w, sh), 785 (m), 720 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 1,06 (d; 3H; J = 6,8 Hz; CH-CH₃); 1,33 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 2,23-2,37 (m; 2H; -CH-CH₂-); 3,65-3,87 (m; 1H; -CH-CH₂-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 20,9 (CH₃-CH₂-); 27,7 (C-(CH₃)₃); 42,6 (CH-CH₂-); 44,3 (CH-CH₂-); 79,9 (C-(CH₃)₃); 171,2 (C=O).

4.2.5.5 Synthese von 4-Aminobuttersäure-*t*-butylester 13e

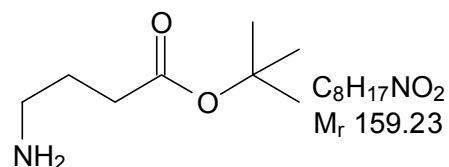
Aus 2,93 g (10 mmol) *Z*-4-Aminobuttersäure-*t*-butylester **12e** (M=293,25) erhielt man nach der AVV 6 1,53 g (9,6 mmol) = 96 % **13e** als farbloses Öl.

DC: (HE / EE: 1:2)

R_f = 0,36

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 280°C/5min)

R_t = 16,5 min (98%)

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3380, 3300 (m, breit) [ν NH₂]; 2930, 2910 [s, ν CH]; 1740 (vs) [ν C=O]; 1440 (m), 1420 (m) [δ as CH₃, δ CH₂]; 1270 (s), 1220 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1560 (m), 1390 (m), 1350 (m, sh), 1310 (m), 1150 (m), 1105 (m), 1080 (w), 1040 (w), 980 (w), 965 (w), 840 (w), 810 (w), 745 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 1,38 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1,54-1,58 (m; 2H; -CH₂-CH₂-COO-); 2,18 (t; 2H; J=7,3 Hz; CH₂-CH₂-COO-); 2,52-2,59 (m; 2H; H₂N-CH₂-).

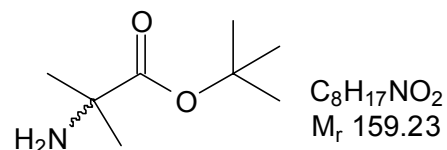
¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 25,5 (-CH₂-CH₂-COO-); 27,7 (C-(CH₃)₃); 32,3 (CH₂-CH₂-COO-); 40,5 (H₂N-CH₂-); 79,3 (C-(CH₃)₃); 172,2 (CH₂-COO-).

4.2.5.6 Synthese von DL- α -Aminoisobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-13f

Aus 2,93 g (10 mmol) *Z*-DL- α -Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-**12f** (M=293,25) erhielt man nach der AVV 6 1,50 g (9,4 mmol) = 94 % (\pm)-**13f** als farbloses Öl.

DC: (HE / EE: 1:2):

 $R_f = 0,35$ GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 280°C/5min) $R_t = 16,3 \text{ min (98\%)}$ **IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3380, 3310 (m, breit) [ν NH₂]; 2950 (s), 2920 (s, sh) [ν CH]; 1745 (s) [ν C=O]; 1465 (m), 1450 (m, sh), 1440 (m) [δ_{as} CH₃]; 1390 (w), 1365 (w) [δ_{s} CH₃]; 1240 (s), 1200 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1320 (m), 1180 (s, sh), 1085 (w), 1070 (vw, sh), 975 (w), 880 (m), 800 (vw), 775 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 1,13 (s; 6H; C-(CH₃)₂); 1,37 (s; 9H; C-(CH₃)₃).

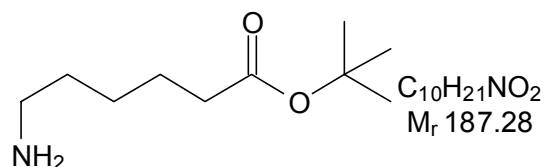
¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 25,6 (C-(CH₃)₂); 27,5 (C-(CH₃)₃); 54,4 (C-(CH₃)₂); 79,2 (C-(CH₃)₃); 176,6 (COO-).

4.2.5.7 Synthese von 6-Aminohexansäure-*t*-butylester 13g

Aus 3,21 g (10 mmol) *Z*-6-Aminohexansäure-*t*-butylester **12g** ($M=321,31$) erhielt man nach der AVV 6 1,78 g (9,5 mmol) = 95 % **13g** als farbloses Öl.

DC: (HE / EE: 1:2):

 $R_f = 0,39$ GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 280°C/5min) $R_t = 20,5 \text{ min (98\%)}$ **IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3380, 3300 (m, breit) [ν NH₂]; 2950 (s), 2890 (m) [ν CH]; 1745 (vs) [ν C=O]; 1460 (m), 1410 (w) [δ CH₂]; 1255 (s), 1240 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1605 (m), 1585 (m, sh), 1360 (w), 1300 (m), 1280 (m), 1165 (m), 1145 (w), 1100 (w), 1045 (w), 1010 (w), 960 (m), 940 (m), 865 (w), 770 (w), 750 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 1,25-1,49 (m; 6H; CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-); 1,39 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 2,16 (t; 2H; ³J=7,3 Hz; CH₂-CH₂-COO-); 2,59-2,63 (m; 2H; H₂N-CH₂-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 24,5 (-CH₂-CH₂-CH₂-COO-); 25,8 (-CH₂-CH₂-CH₂-COO-); 27,7 (C-(CH₃)₃); 32,7 (H₂N-CH₂-CH₂-); 34,7 (-CH₂-COO-); 41,3 (H₂N-CH₂-); 79,2 (C-(CH₃)₃); 172,1 (CH₂-COO-).

4.2.5.8 Synthese von L-Asparaginsäure-di-*t*-butylester (**S**)-13h

Aus 3,79 g (10 mmol) *Z*-L-Asparaginsäure-di-*t*-butylester (**S**)-12h (M=379,24) erhielt man nach der AVV 6 2,33 g (9,5 mmol) = 95 % (**S**)-13h als farbloses Öl.

DC: (HE / EE: 1:2):

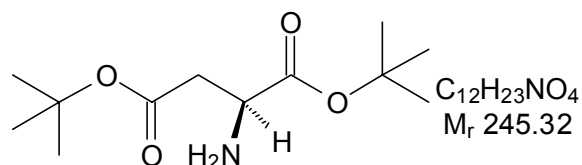
$R_f = 0,43$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 29,6$ min (98%)

Drehwert: L-Asp(*t*Bu)-OtBu *HCL

$[\alpha]_D^{20} = + 12,0^\circ$ (c=1,0 EtOH)



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3380, 3300 (m, breit) [ν NH₂]; 2960 (s), 2920 (s) [ν CH]; 1760 (s), 1715 (s) [ν C=O]; 1450 (m), 1440 (m), 1420 (m) [δ_{as} CH₃, δ CH₂]; 1390 (m) [δ_s CH₃]; 1225 (s), 1205 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1355 (m), 1290 (m), 1270 (m), 1185 (s), 1130 (m), 1105 (m), 1090 (m), 995 (m), 955 (w), 895 (w), 845 (m), 815 (m), 750 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 1,36 (s; 18H; 2 x C-(CH₃)₃); 2,32-2,49 (m; 2H; -NH-CH-CH₂-); 3,38-3,45 (m; 1H; CH-NH₂).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 27,6; 27,7 (2 x C-(CH₃)₃); 40,2 (H₂N-CH-CH₂-); 51,7 (H₂N-CH-); 79,9 ((2)C-(CH₃)₃); 80,0 ((1)C-(CH₃)₃); 169,9 (CH₂-COO-); 173,5 (CH-COO-).

4.2.5.9 Synthese von L-Glutaminsäure-di-*t*-butylester (**S**)-13i

Aus 3,93 g (10 mmol) *Z*-L-Glutaminsäure-di-*t*-butylester (**S**)-12i (M=393,27) erhielt man nach der AVV 6 2,49 g (9,6 mmol) = 96 % (**S**)-13i als farbloses Öl.

DC: (HE / EE: 1:2):

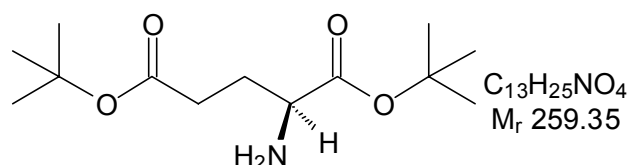
$R_f = 0,44$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 31,9$ min (97%)

Drehwert: L-Glu(*t*Bu)-OtBu *HCL

$[\alpha]_D^{20} = + 15,8^\circ$ (c=1,5 DMF)



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3380, 3300 (m, breit) [ν NH₂]; 2980 (s, sh), 2920 (s, sh) [ν CH]; 1745 (vs), 1735 (vs) [ν C=O]; 1455 (m), 1440 (m), 1425 (m) [δ_{as} CH₃, δ CH₂]; 1365 (m) [δ_s CH₃]; 1270 (s), 1225 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1560 (m), 1390 (w), 1350 (m), 1315 (s), 1200 (m), 1150 (s), 1110 (m), 1085 (m), 1050 (m), 1015 (w), 1005 (m), 980 (m), 965 (m), 885 (w), 845 (m), 810 (m), 750 (m), 700 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 1,36 (s; 18H; 2 x C-(CH₃)₃); 1,39-1,58 (m; 2H; -NH-CH-CH₂-); 2,19-2,25 (m; 2H; -NH-CH-CH₂-CH₂-); 3,10-3,14 (m; 1H; CH-NH₂).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 27,6; 27,7 (2 x C-(CH₃)₃); 29,8 (H₂N-CH-CH₂-); 31,2 (H₂N-CH-CH₂-CH₂-); 53,7 (H₂N-CH-); 79,4 ((2)C-(CH₃)₃); 79,8 ((1)C-(CH₃)₃); 171,9 (CH₂-COO-); 174,8 (CH-COO-).

4.2.5.10 Synthese von Glycin-*t*-butylester 13j

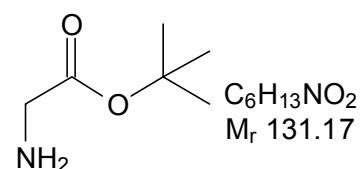
Aus 5,30 g (20 mmol) Z-Glycin-*t*-butylester **12j** (M=265,2) erhielt man nach der AVV 6 2,52 g (19,2 mmol) = 96 % **13j** als farbloses Öl.

DC: (HE / EE: 1:2):

R_f = 0,34

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 220°C/5min)

R_t = 8,2 min (99%)

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

ν = 3380, 3310 (m, breit) [ν NH₂]; 2890 (m) [ν CH]; 1740 (vs) [ν C=O]; 1470 (m), 1460 (m, sh), 1450 (m, sh), [δ_{as} CH₃, δ CH₂]; 1390 (m) [δ_s CH₃]; 1225 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1280 (m), 1260 (m), 1195 (m), 1180 (m), 1125 (s), 1080 (m), 980 (w), 930 (m), 905 (m), 830 (s, sh), 820 (s), 775 (m), 705 (w), 640 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

δ = 1,42 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 3,31 (s; 2H; -CH₂-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

δ = 27,6 (C-(CH₃)₃); 41,8 (CH-NH₂); 79,8 (C-(CH₃)₃); 173,9 (CH-COO-).

4.2.5.11 Synthese von Isoleucin-*t*-butylester (DL bzw. L) (±)-13k, (S)-13k

Aus 3,21g (10 mmol) Z-Isoleucin-*t*-butylester (DL- (±)-**12k** bzw. L- (**S**)-**12k**) (M=321,31) erhielt man nach der AVV 6 1,78 bzw. 1,76 g (9,5 bzw. 9,4 mmol) = 95 % (±)-**13k** bzw. 94 % (**S**)-**13k** als farbloses Öl.

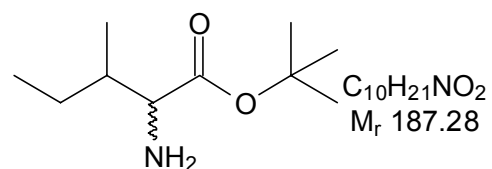
DC: (HE / EE: 1:2):

R_f = 0,41

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

R_t = 22,0 min (98%)

Drehwert: L-Ile-OtBu*HCl [α]_D²⁰ = + 30,6 (c=1,0 H₂O)



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3380, 3310 (m, breit) [ν NH₂]; 2960 (s), 2920 (s), 2880 (s) [ν CH]; 1725 (vs) [ν C=O]; 1470 (m), 1450 (m, sh), 1440 (m) [δ_{as} CH₃, δ CH₂]; 1280 (s), 1255 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1405 (w, sh), 1395 (w), 1310 (m), 1170 (m), 1130 (w), 1095 (w), 1070 (w), 1045 (m), 1025 (w), 995 (w), 970 (w), 950 (m), 905 (m), 875 (w), 810 (vw), 795 (w), 770 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 0,88-1,01 (Überlagerung eines Dubletts und Triplets; 6H; -CH-CH₃; -CH₂-CH₃); 1,15-1,20 (m; 2H; -CH₂-CH₃); 1,41 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1,74 (m; 1H; -CH-CH₃); 4,03 (m; 1H; CH-NH₂).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 11,8 (-CH₂-CH₃); 15,7 (-CH-CH₃); 24,8 (-CH₂-CH₃); 27,7 (C-(CH₃)₃); 35,6 (-CH-CH₃); 56,9 (CH-NH-); 79,98 (C-(CH₃)₃); 171,5 (CH-COO-).

4.2.5.12 Synthese von Leucin-*t*-butylester (DL; D; L) (±)-131, (R)-131, (S)-131

Aus 4,19 g (15 mmol) *Z*-Leucin-*t*-butylester (DL- (±)-**121** bzw. L- (**S**)-**121**) (M=321,31) erhielt man nach der AVV 6 2,05 bzw. 2,00 g (14,1 bzw. 13,8 mmol) = 96 % (±)-**131** bzw. 95 % (**S**)-**131** als farbloses Öl. Aus 1,40 g (5 mmol) *Z*-D-Leucin-*t*-butylester (**R**)-**121** erhielt man nach der AVV 6 2,05 bzw. 668 mg (4,6 mmol) = 92 % (**R**)-**131** als farbloses Öl.

DC: (HE / EE: 1:2)

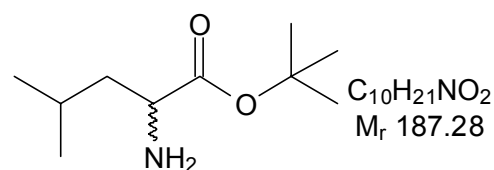
$R_f = 0,41$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 21,4$ min (97%)

Drehwert: L-Leu-OtBu*HCl $[\alpha]_D^{20} = + 20,8^\circ$ (c=2,0 EtOH)

Drehwert: D-Leu-OtBu*HCl $[\alpha]_D^{20} = - 20,7^\circ$ (c=2,0 EtOH)

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3360, 3290 (m, breit) [ν NH₂]; 2970 (s), 2910 (s), 2850 (s) [ν CH]; 1725 (s) [ν C=O]; 1470 (m, sh), 1440 (m) [δ_{as} CH₃, δ CH₂]; 1260 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1460 (vw), 1230 (s), 1160 (m), 1145 (m), 1075 (w), 1040 (w), 950 (w), 930 (vw), 905 (w), 845 (vw), 825 (vw), 750 (w), 715 (vw).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 0,90 (d; 6H; ³J = 7,0 Hz; -CH-(CH₃)₂); 1,18 (m; 2H; -CH-CH₂-CH); 1,42 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1,69-1,84 (m; 1H; -CH-(CH₃)₂); 3,27-3,35 (m; 1H; CH-NH₂).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 22,3 ((CH₃)₂-CH-); 25,2 (-CH-CH₃); 27,8 (C-(CH₃)₃); 44,9 (-CH-CH₂); 55,1 (CH-NH-); 81,6 (C-(CH₃)₃); 172,3 (CH-COO-).

4.2.5.13 Synthese von Lysin-*t*-butylester (DL bzw. L) (\pm)-13m, (S)-13m

Aus 9,41 g (20 mmol) Di-Z-Lysin-*t*-butylester (DL- (\pm)-12m bzw. L- (S)-12m) (M=470,45) erhielt man nach der AVV 6 3,81 g bzw. 3,79 (18,8 bzw. 18,7mmol) = 94 % (\pm)-13m bzw. 93 % (S)-13m als farbloses Öl.

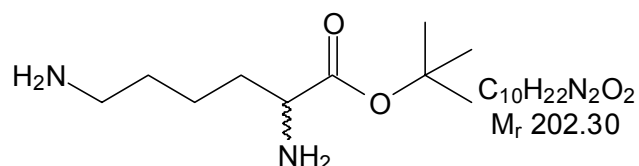
DC: (HE / EE: 1:1):

$R_f = 0,31$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 26,1$ min (96%)

Drehwert: L-Lys-OtBu*HCl $[\alpha]_D^{20} = + 7,2^\circ$ (c=1,5 H₂O)



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3380, 3310 (m, breit) [ν NH₃]; 2960 (s), 2940 (s), 2880 (s) [ν CH]; 1740 (vs) [ν C=O]; 1450 (m), 1440 (m) [δ_{as} CH₃, δ CH₂]; 1225 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1470 (w, sh), 1395 (w), 1330 (vw), 1290 (w), 1245 (s), 1160 (m), 1150 (m, sh), 1100 (w), 1040 (w), 1010 (m), 955 (w), 930 (m), 860 (w), 805 (vw), 760 (w), 740 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

$\delta =$ 1,24-1,39 (m; 13H; 9H von C-(CH₃)₃; 4H von -CH-CH₂-CH₂-); 1,52-1,64 (m; 2H; -NH₂-CH₂-CH₂-); 2,91-2,96 (m; 2H; -NH₂-CH₂-CH₂-); 3,80-3,84 (m; 1H; NH₂-CH-CH₂-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

$\delta =$ 22.8 (-CH-CH₂-CH₂-); 27.7 (C-(CH₃)₃); 28.9 (-CH-CH₂-CH₂-); 30.4 (NH₂-CH₂-CH₂-); 40.1 (NH₂-CH₂-CH₂-); 54.5 (NH₂-CH-CH₂-); 79.9 (C-(CH₃)₃); 173.2 (-COO-C).

4.2.5.14 Synthese von L-Methionin-*t*-butylester (S)-13n

Aus 3.39 g (10 mmol) Z-L-Methionin-*t*-butylester (S)-12n (M=339.35) erhielt man nach der AVV 6 1.93 g (9.4 mmol) = 94 % (S)-13n als farbloses Öl.

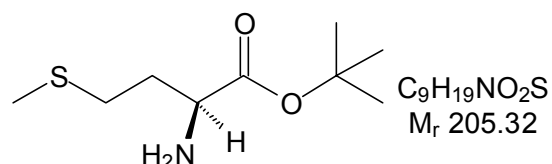
DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,36$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 17,8$ min (94%)

Drehwert: L-Met-OtBu*HCl $[\alpha]_D^{20} = + 9.1^\circ$ (c=1,0 H₂O)



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3380 (m, breit) [ν NH₃]; 2930 (s) [ν CH]; 1745 (vs) [ν C=O]; 1440 (m) [δ_{as} CH₃, δ CH₂]; 1235 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1620 (w, sh), 1375 (vw), 1285 (m), 1190 (w, sh), 1130 (w), 935 (vw), 830 (vw), 740 (vw).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

δ = 1,40 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1,94-1,98 (m; 2H; CH₂-CH₂-CH-); 2,09 (s; 3H; CH₃-S-); 2,81 (t; 2H; ³J=7,5 Hz; -S-CH₂-); 3,98 (m; 1H; CH-NH₂).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

δ = 16,4 (CH₃-S-); 27,8 (C-(CH₃)₃); 29,9 (CH₂-CH₂-CH-); 31,4 (-S-CH₂-); 55,1 (CH-NH-); 81,2 (C-(CH₃)₃); 171,4 (CH-COO-).

4.2.5.15 Synthese von DL-Ornithin-*t*-butylester (±)-13o

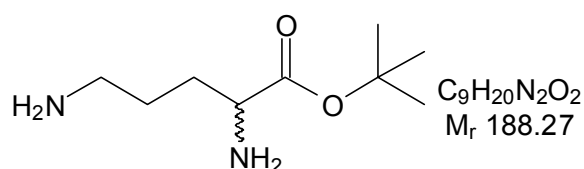
Aus 9,17g (20 mmol) DL-Ornithin-*t*-butylester (±)-12o (M=458,45) erhielt man nach der AVV 6 3,62g (19,0 mmol) = 95 % (±)-13o als farbloses Öl.

DC: (HE / EE: 1:1):

R_f = 0,32

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

R_t = 24,3 min (95%)

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

ν = 3380, 3310 (m, breit) [ν NH₂]; 2960 (s), 2940 (s), 2880 (s) [ν CH]; 1740 (vs) [ν C=O]; 1450 (m, sh) [δ_{as} CH₃, δ CH₂]; 1245 (m) [ν C-O]; weitere Banden bei 1390 (w), 1335 (w), 1285 (m), 1175 (w), 1140 (w), 1050 (w), 910 (w), 745 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

δ = 1,24-1,67 (m; 13H; 9H von C-(CH₃)₃; 4H von -CH-CH₂-CH₂-); 2,99-3,02 (m; 2H; NH₂-CH₂-CH₂-); 3,81-3,86 (m; 1H; NH₂-CH-CH₂-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

δ = 25,4 (-CH-CH₂-CH₂-); 27,7 (C-(CH₃)₃); 28,6 (-CH-CH₂-CH₂-); 40,2 (NH₂-CH₂-CH₂-); 54,4 (NH₂-CH-CH₂-); 79,8 (C-(CH₃)₃); 173,6 (-COO-C).

4.2.5.16 Synthese von Phenylalanin-*t*-butylester (DL; D; L) (±)-13p, (R)-13p, (S)-13p

Aus 5,33 g (15 mmol) Z-Phenylalanin-*t*-butylester (DL- (±)-12p bzw. L- (S)-12p) (M=355,33) erhielt man nach der AVV 6 3,16 bzw. 3,23 g (14,3 bzw. 14,6 mmol) = 95 % (±)-13p bzw. 97 % (S)-13p als farbloses Öl. Aus 1,78 g (5 mmol) Z-D-Phenylalanin-*t*-butylester (R)-12p erhielt man nach der AVV 6 2,05 bzw. 1,04 g (4,7 mmol) = 95 % (R)-13p als farbloses Öl.

DC: (HE / EE: 1:2):

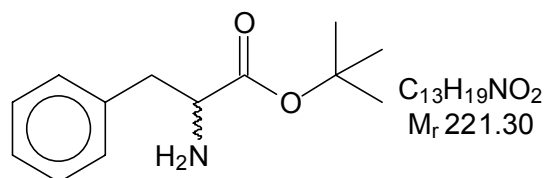
R_f = 0,43

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

R_t = 31,7 min (98%)

Drehwert: L-Phe-OtBu*HCl [α]_D²⁰ = + 15,0 (c=1,3 DMF)

Drehwert: D-Phe-OtBu*HCl [α]_D²⁰ = - 14,9 (c=1,3 DMF)

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3380 (m, breit) [v NH₂]; 3060, 3020 (m) [v C-H arom.], 2940, 2900, 2840 (s) [v C-H aliph.], 2860 (s) [v CH]; 1750 (vs) [v C=O]; 1585 (m, sh) [v C=C]; 1450 (m) [δ_{as} CH₃, δ CH₂]; 1235 (s) [v C-O]; 745 (m), 705 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für monosubst. Aromaten]; weitere Banden bei 1395 (w), 1355 (w), 1285 (m), 1265 (w), 1210 (m), 1200 (w), 1140 (w), 1110 (w), 1085 (m), 1050 (w), 1030 (vw), 990 (w), 925 (w), 870 (w), 810 (w), 765 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

$\delta =$ 1,30 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 2,76 (dd; 2H; $J_1=1,6$ Hz; $J_2=6,8$ Hz; CH-CH₂-); 3,42 (t; 1H; $^3J=6,8$ Hz; CH-CH₂-); 7,18-7,26 (m; 5H; C₆H₅-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

$\delta =$ 27,6 (C-(CH₃)₃); 41,1 (CH-CH₂-); 56,2 (CH-NH₂); 79,8 (C-(CH₃)₃); 126,2 (C(4) von -C₆H₅); 128,0; (C(3,5) von -C₆H₅); 129,3; (C(2,6) von -C₆H₅); 145,0 (C(1) von -C₆H₅); 174,3 (CH-COO-).

4.2.5.17 Synthese von L-Phenylglycin-*t*-butylester (S)-13q

Aus 3,41 g (10 mmol) *Z*-L-Phenylglycin-*t*-butylester (**S**)-12q ($M=341,33$) erhielt man nach der AVV 6 1,95 g (9,4 mmol) = 94 % (**S**)-13q als farblose Kristalle.

Schmp.: 222-224°C

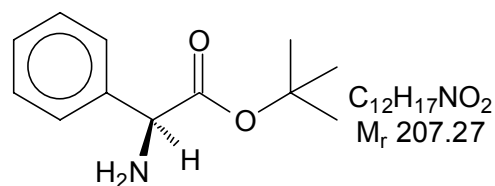
DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,44$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 29,4$ min (99%)

Drehwert: L-Phg-OtBu*HCl $[\alpha]_D^{20} = +109^\circ$ (c=2,0 MeOH)

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3380 (m, breit) [v NH₂]; 3040, 3020 (m) [v C-H arom.], 2960 (s) [v CH]; 1740 (vs) [v C=O]; 1590 (m), [v C=C]; 1430 (m) [δ_{as} CH₃]; 1250 (s) [v C-O]; 740 (m), 700 (m) [δ CH-out of plane, charakteristisch für monosubst. Aromaten]; weitere Banden bei 1495 (w), 1460 (w), 1350 (w), 1315 (w), 1280 (w), 1190 (m), 1140 (w), 1030 (w), 1000 (vw), 955 (w), 925 (vw), 885 (w), 835 (vw), 780 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 1.36 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 4.06 (m; 1H; CH-C₆H₅); 7.16-7.30 (m; 5H; C₆H₅-).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 27.7 (C-($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃); 55.1 ($\underline{\text{C}}\text{H-NH}_2$); 79.9 ($\underline{\text{C}}-(\text{CH}_3)_3$); 126.9 (C(4) von $-\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 128.5 (C(3,5) von $-\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 129.1 (C(2,6) von $-\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 137.2 (C(1) von $-\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 174.2 ($\underline{\text{C}}\text{H-COO-}$).

4.2.5.18 Synthese von *O*-*t*-Butyl-L-serin-*t*-butylester (S**)-13r**

Aus 3,51 g (10 mmol) *Z*-*O*-*t*-butyl-L-Serin-*t*-butylester (**S**)-12r (M=351,23) erhielt man nach der AVV 6 2,06 g (9,5 mmol) = 95 % (**S**)-13r als farbloses Öl.

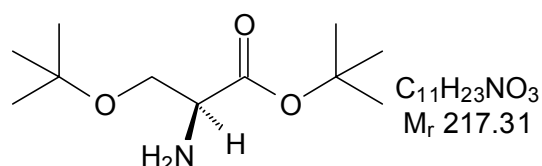
DC: (HE / EE: 1:1):

$R_f = 0,40$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 29,4$ min (98%)

Drehwert: L-Ser(tBu)-OtBu*HCl $[\alpha]_D^{20} = +3,6^\circ$ (c=1,0 EtOH)

**IR (Film, cm^{-1}):**

$\nu =$ 3380, 3310 (m, breit) [ν NH_2]; 2960 (s), 2940 (s), 2880 (s) [ν CH]; 1745 (vs) [ν C=O]; 1475 (m, sh), 1440 (m) [$\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$, δCH_2]; 1250 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1375 (w), 1335 (w), 1150 (w), 1130 (w), 1090 (w) 1040 (m), 975 (w), 905 (w), 845 (vw), 800 (w), 770 (w).

 ^1H -NMR (400.132 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 1.26 (s; 9H; $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 1.39 (s; 9H; $\text{COO}-\text{C}-(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 3.50-3.56 (m; 1H; $\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); 3.77-3.81 (m; 1H; $\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); 4.05-4.11 (m; 1H; $\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2-$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 27.6 ($-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 27.8 ($\text{COO}-\text{C}-(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 55.7 ($\underline{\text{C}}\text{H-NH}_2$); 64.1 ($\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); 72.7 ($-\text{CH}_2-\text{O}-\underline{\text{C}}-(\text{CH}_3)_3$); 79.9 ($\underline{\text{C}}-(\text{CH}_3)_3$); 172.8 ($\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{OO-}$).

4.2.5.19 Synthese von L-Tyrosin-*t*-butylester (S**)-13s**

Aus 3,71 g (10 mmol) *Z*-L-Tyrosin-*t*-butylester (**S**)-12s (M=371,33) erhielt man nach der AVV 6 2,28 g (9,6 mmol) = 96 % (**S**)-13s als farblose Kristalle.

Schmp.: 140-142°C

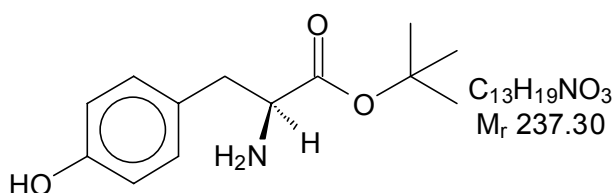
DC: (HE / EE: 1:1):

$R_f = 0,35$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 38,1$ min (97%)

Drehwert: L-Tyr-OtBu*HCl $[\alpha]_D^{20} = +4,1^\circ$ (c=1,0 H_2O)



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3380, 3310 (m, breit) [ν NH₂]; 3320 (s) [ν OH]; 3040, 3020 (m) [ν C-H arom.], 2960 (s), 2880 (vs) [ν CH]; 1745 (vs) [ν C=O]; 1590 (m) [ν C=C]; 1445 (m) [δ OH]; 1240 (s), 1225 (s) [ν C-O]; 840 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für parasubst. Aromaten]; weitere Banden bei 1570 (w, sh), 1350 (m), 1290 (m), 1270 (s), 1195 (s), 1175 (m), 1140 (m), 1115 (m), 1105 (m), 1055 (m), 990 (w), 960 (vw), 940 (w), 905 (w), 870 (w), 795 (vw), 730 (w), 715 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 1,44 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 2,56 (d; 2H; ³J=5,7 Hz CH-CH₂-); 3,83 (m; 1H; CH-CH₂-); 6,79 (d; 2H; ³J= 8,2 Hz; CH=CHCOH); 6,97 (d; 2H; ³J= 8,2 Hz; CH=CHCOH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 27,8 (C-(CH₃)₃); 36,3 (CH-CH₂-); 54,7 (CH-NH-); 80,2 (C-(CH₃)₃); 115,8 (C(3,5) von -C₆H₅OH); 129,7 (C(2,6) von -C₆H₅OH); 131,6 (C(1) von -C₆H₅OH); 154,6 (C(4) von -C₆H₅OH); 170,5 (CH-COO-).

4.2.5.20 Synthese von Valin-*t*-butylester (DL; D; L) (±)-13t, (R)-13t, (S)-13t

Aus 4,61 g (15 mmol) *Z*-Valin-*t*-butylester (DL- (±)-12t bzw. L- (S)-12t) (M=307,28) erhielt man nach der AVV 6 2,44 bzw. 2,48 g (14,1 bzw. 14,3 mmol) = 94 % (±)-13t bzw. 95 % (S)-13t als farbloses Öl. Aus 1,54 g (5 mmol) *Z*-D-Valin-*t*-butylester (R)-12t erhielt man nach der AVV 6 2,05 bzw. 814 mg (4,7 mmol) = 95 % (R)-13t als farbloses Öl.

DC: (HE / EE: 1:2):

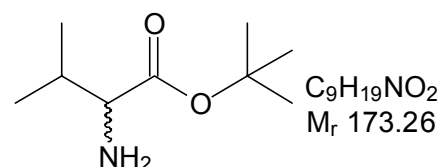
$R_f = 0,39$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 18,9$ min (98%)

Drehwert: L-Val-OtBu*HCl $[\alpha]_D^{20} = + 50,1^\circ$ (c=1,0 MeOH)

Drehwert: D-Val-OtBu*HCl $[\alpha]_D^{20} = - 49,9^\circ$ (c=1,0 MeOH)

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3380, 3310 (m, breit) [ν NH₂]; 2980 (s), 2960 (s) [ν CH]; 1750 (vs) [ν C=O]; 1440 (m) [δ_{as} CH₃]; 1380 (m) [δ_s CH₃]; 1260 (s) [ν C-O]; weitere Banden bei 1565 (m), 1400 (w), 1320 (vw), 1195 (m), 1175 (m), 1105 (m), 1065 (w), 1025 (m), 990 (m), 930 (w), 850 (w), 805 (w), 765 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

$\delta =$ 0,83 (t; 6H; CH-(CH₃)₂); 1,37 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1,95-1,97 (m; 1H; -CH-(CH₃)₂); 4,03 (q; 1H; J=5,9 Hz; CH-NH₂); 7,91 (b; 2H; CH-NH₂).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO d_6 [ppm]):

$\delta =$ 22,1 ($(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2\text{-CH-}$); 27,6 ($\text{C-}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 29,9 ($-\underline{\text{C}}\text{H-}(\text{CH}_3)_2$); 57,7 ($\underline{\text{C}}\text{H-NH}_2$); 80,3 ($\underline{\text{C}}\text{-}(\text{CH}_3)_3$); 170,8 ($-\underline{\text{C}}\text{OO-}$).

4.2.6 Optimierung der enzymatischen Acylierung von Aminosäure-*t*-butylestern

4.2.6.1 Enzymatische Acylierung von Gly-OtBu-Auswahl der Biokatalysatoren

Als Modellreaktion wurde die Lipase-katalysierte Acylierung von Gly-OtBu **13j** mit Essigsäureethylester als Acyldonor (zugleich Lösungsmittel) studiert. Dazu wurden jeweils 1 mmol **13j** mit 2 ml Essigester versetzt und die Reaktion bei 40°C im Schüttler (400 U/min) durch Zugabe von 5 mg Enzym (vgl. **Tab. 6**) gestartet. Zur Reaktionsverfolgung wurden bis zur ersten Stunde alle 10 min und danach jede weitere Stunde eine Probe entnommen. 20 μl des Reaktionsgemisches wurden dazu in 350 μl Schraubdeckelgläschen pipetiert, mit 300 μl Essigester versetzt und in den Gaschromatograph injiziert. Analytik nach AVV 1. Bei Verwendung dieser Parameter sind die Peaks des Eduktes (Gly-OtBu **13j**; $R_t = 8,2$ min), des Acyldonors (im Lösungsmittelpeak) und des Produktes (*N*-Acetyl-Gly-OtBu **14a**; $R_t=25,6$ min) voneinander getrennt, wie durch Coinjektionsexperimente nachgewiesen werden konnte. Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten (mU/mg) der Enzyme erfolgte aus der Zeit-Umsatz-Kurve nach einer Reaktionszeit von 60 min. In **Tab. 6** ist der Umsatz zur angegebenen Reaktionszeit und die entsprechende spezifische Aktivität aufgeführt.

4.2.6.2 Enzymatische Acylierung von Gly-OtBu **13j**-Lösungsmittelabhängigkeit

Als Modellreaktion wurde die enzymatische Acylierung von Glycin-*t*-butylester **13j** in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP 435) mit Essigsäureethylester als Acyldonor untersucht. Dazu wurden jeweils 1 mmol (136 μl **13j** mit 3 mmol (294 μl) Essigester versetzt und in 2 ml des jeweiligen Lösungsmittels gelöst. Nach Zugabe von 5 mg Enzym wurde die Reaktion bei 70°C im Schüttler (400 U/min) gestartet. Die analytischen Parameter wurden analog AVV 1 verwendet. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms im jeweiligen Lösungsmittel wurde innerhalb der ersten Stunde aus der Steigung der Zeit-Umsatz-Kurve berechnet. **Tab. 50** gibt die Umsätze und die spezifischen Aktivitäten des Enzyms im jeweiligen Lösungsmittel (Nummerierung analog **Tab. 8**) wieder.

Tab. 50: Einfluß des Lösungsmittels, Umsatz und spez. Aktivität von Novozym SP435

Nr.	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]	Nr.	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
1	24	325	14	54	720
2	41	862	15	19	521
3	13	104	16	51	688
4	35	671	17	53	698
5	26	615	18	55	739
6	-	-	19	32 ^b	- ^a
7	59 ^b	- ^a	20	56	754
8	58	767	21	28 ^b	- ^a

Nr.	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]	Nr.	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
9	38	511	22	11	42
10	99	1332	23	29	233
11	38 ^b	- ^a	24	37	295
12	16 ^b	- ^a	25	50	402
13	70	914			

a) spezifische Aktivität konnte mittels GC nicht bestimmt werden. b) Ausbeute nach Aufarbeitung der Reaktion.

4.2.6.3 Enzymatische Acylierung von Gly-OtBu **13j**-Einfluß des Acyldonors

Zur Optimierung der Acylierung hinsichtlich der Kettenlänge des Acyldonors wurde 1 mmol (136 µl) Gly-OtBu **13j** mit 3 mmol Acyldonor (Methylester) mit jeweils 3 ml Monoglyme gemischt. Nach Zugabe von 5 mg Novozym SP 435 wurde die Reaktion bei 70°C im Schüttler (400 U/min) gestartet. Die analytischen Parameter wurden analog AVV 1 verwendet. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms wurden wie in 4.2.6.1 durchgeführt. **Tab. 51** gibt die spezifischen Aktivitäten des Enzyms beim jeweiligen Acyldonor (Nummerierung analog **Tab. 9**), die eingesetzte Acyldonormenge sowie die Retentionszeiten des Acyldonors und des acylierten Produktes wieder.

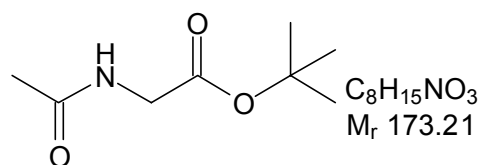
Tab. 51: Enzymatische Acylierung von Gly-OtBu **13j**-Einfluß der Acyldonorkettenlänge.

Nr.	C-Anzahl	Acyldonor (M _r / 3mmol)	Produkt	R _t Acyldonor	R _t N-Acyl-Gly-OtBu	Spez. Aktivität [mU/mg]
1	C-2	88,1 / 294µl	14a	- ^d	25,6	1332
2	C-3	102,1 / 344µl	14b	- ^d	27,5	1361
3	C-4	116,2 / 397µl	14c	- ^d	29,9	1490
4	C-5	130,2 / 447µl	14d	- ^d	33,0	1519
5	C-6	144,2 / 497µl	14e	15,2	34,3	1532
6	C-6 ^a	130,2 / 442 µl	14e-1	10,4	34,3	1592
7	C-7	158,2 / 545µl	14f	18,1	36,0	1412
8	C-8	172,3 / 596µl	14g	20,8	37,9	1216
9	C-9	186,3 / 645µl	14h	23,6	39,4	1187
10	C-10	200,3 / 695µl	14i	26,7	41,3	1110
11	C-11 ^a	200,3 / 690µl	14j	29,4	43,1	1021
12	C-12	228,4 / 795µl	14k	33,1	44,8	681
13	C-14	256,4 / 893µl	14l	38,7	48,5	497
14	C-16	284,5 / 994µl	14m	43,8	52,3	369
15	C-18	312,5 / 934mg	14n	50,2	56,2	276
16	C-18/1	296,5 / 1,02ml	14o	45,7	53,9	285
17	-	639,0 / 1,9g	14k-1	70,4	44,8	236
18	C-6 ^b	144,2 / 497µl	14c-2	15,2	34,3	1792
19	C-6 ^{ac}	130,2 / 442 µl	14c-3	10,4	34,3	1926

a) Hier wurde der Methylester eingesetzt. b) Zugabe von 200mg 4 Å Molekularsieb. c) Zugabe von 200mg 5 Å Molekularsieb d) Acyldonor eluiert mit dem Lösungsmittel.

Zur experimentellen Darstellung werden aus diesen Versuchen die spektroskopischen Daten von 5 unterschiedlich acylierten Glycin-*t*-butylestern aufgeführt.

4.2.6.4 Spektroskopische Daten von *N*-Acetylglycin-*t*-butylester 14a



IR (Film, cm^{-1}):

$\nu =$ 3300 (s, br., ν N-H Amid), 2990, 2840, und 2920 (s, ν C-H aliph.), 1750 (s, ν C=O), 1650 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1460 (m, δ C-H), 1410 (w), 1370 (m), 1190 (s, ν C-O), 1025 (m), 860 (w), 720 (w).

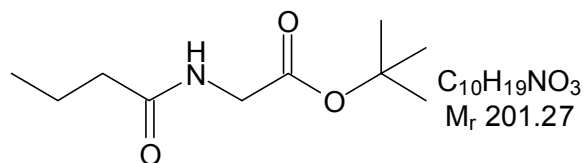
1H -NMR (400.132 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):

$\delta =$ 1.40 (s; 9H; C-(\underline{CH}_3)₃); 1.84 (s; 3H; CO- \underline{CH}_3); 3.68 (d; 2H; $^3J_{HH} = 5.9$ Hz, \underline{CH}_2 -NH-); 8.11 (b; 1H; \underline{NH} -).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):

$\delta =$ 26.13 (C-(\underline{CH}_3)₃); 27.65 (\underline{CH}_3 -CO); 41.21 (\underline{CH} -NH-); 80.40 (\underline{C} -(\underline{CH}_3)₃); 169.58 (\underline{CH} -COO-), 171.87(NH- \underline{CO} -).

4.2.6.5 Spektroskopische Daten von *N*-Butylglycin-*t*-butylester 14c



IR (Film, cm^{-1}):

$\nu =$ 3280 (s, br., ν N-H Amid), 2980, 2850, und 2915 (s, ν C-H aliph.), 1730 (s, ν C=O), 1650 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1450 (m, δ C-H), 1390 (w), 1360 (m), 1140 (s, ν C-O), 1025 (m), 840 (w), 730 (w).

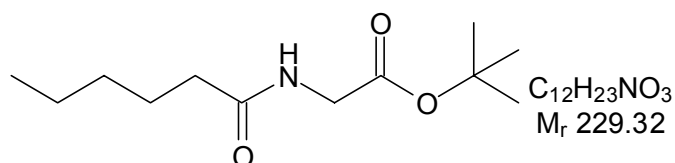
1H -NMR (400.132 MHz, CD_2Cl_2 [ppm]):

$\delta =$ 0.98 (t; 3 H; $^3J_{HH} = 6.9$ Hz; \underline{CH}_3 (4)); 1.42 (s; 9H; C-(\underline{CH}_3)₃); 1.68 (m; 2 H; \underline{CH}_2 (3)); 2.27 (t; 2 H; $^3J_{HH}=7.5$ Hz, \underline{CH}_2 (2)); 3.74 (d; 2H; $^3J_{HH} = 5.3$ Hz, \underline{CH}_2 -NH-), 7.86 (b; 1H; \underline{NH} -).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, CD_2Cl_2 [ppm]):

$\delta =$ 13.89 (\underline{CH}_3 (4)), 20.43 (\underline{CH}_2 (3)), 27.79 (C-(\underline{CH}_3)₃); 37.52 (\underline{CH}_2 (2)), 42.65 (\underline{CH} -NH-); 79.98 (\underline{C} -(\underline{CH}_3)₃); 170.17 (COOC), 173.11 (NH- \underline{CO}).

4.2.6.6 Spektroskopische Daten von *N*-Caproylglycin-*t*-butylester 14e



IR (Film, [cm⁻¹]):

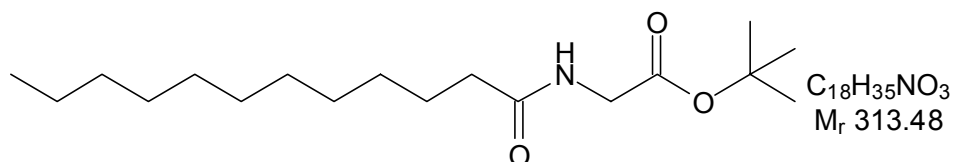
$\nu =$ 3290 (s, br., ν N-H Amid), 2980, 2845, und 2920 (s, ν C-H aliph.), 1740 (s, ν C=O), 1640 (s, ν Amid I), 1550 (s, ν Amid II), 1470 (m, δ C-H), 1410 (w), 1370 (m), 1190 (s, ν C-O), 1025 (m), 860 (w), 720 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 0.88 (t; 3 H; $^3J_{\text{HH}} = 6.87$ Hz; $\text{CH}_3(6)$); 1.31 (m; 4 H; $\text{CH}_2(5+4)$); 1.41 (s; 9H; C-(CH_3)₃); 1.67 (m; 2 H; $\text{CH}_2(3)$); 2.20 (t; 2 H; $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $\text{CH}_2(2)$); 3.72 (d; 2H; $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH-}$), 7.65 (b; 1H; NH-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 15.45 ($\text{C}(\text{CH}_3(6))$), 23.38 ($\text{C}(\text{CH}_2(5))$), 26.48 ($\text{C}(\text{CH}_2(4))$), 27.69 (C-($\text{C}(\text{CH}_3)_3$)); 32.42 ($\text{C}(\text{CH}_2(3))$), 36.76 ($\text{C}(\text{CH}_2(2))$), 41.68 ($\text{C}(\text{CH}_2\text{-NH})$), 79.81 (C-($\text{C}(\text{CH}_3)_3$)); 171.61 ($\text{C}(\text{COOC})$), 173.21 (NH-CO).

4.2.6.7 Spektroskopische Daten von *N*-Lauroylglycin-*t*-butylester 14k**IR (Film, [cm⁻¹]):**

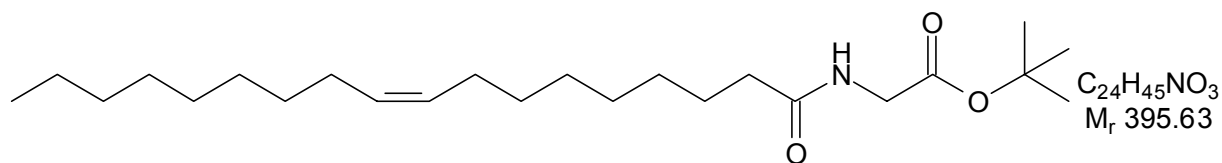
$\nu =$ 3280 (s, br., ν N-H Amid), 2990, 2840, und 2930 (s, ν C-H aliph.), 1745 (s, ν C=O), 1660 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1460 (m, δ C-H), 1410 (w), 1370 (m), 1190 (s, ν C-O), 1025 (m), 860 (w), 730 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 0.86 (t; 3 H; $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz; C(12) H_3); 1.21-1.36 (m; 16 H; C(4-11) H_2); 1.42 (s; 9H; C-(CH_3)₃); 1.58 (m; 2 H; C(3) H_2); 2.10 (t; 2 H; $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz; C(2) H_2); 3.83 (d; 2H; $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH-}$); 8.02 (b; 1H NH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 13.87 (C(12) H_3); 22.67 (C(11) H_2); 25.76 (C(10) H_2); 27.66 (C-($\text{C}(\text{CH}_3)_3$)); 29.20; 29.29; 29.39; 29.53; 29.60; (C(4-9) H_2); 31.89 (C(3) H_2); 35.67 (C(2) H_2); 41.78 (NH-C H_2); 79.76 (C-($\text{C}(\text{CH}_3)_3$)); 172.91 (-C COOC), 174.08 (NH-CO-).

4.2.6.8 Spektroskopische Daten von *N*-Oleoylglycin-*t*-butylester 14o

IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3300 (s, br., ν N-H Amid), 3060 (s, ν C-H olef), 2980, 2900 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1700 (s, ν C=O), 1640 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1460 (m, δ C-H), 1410 (m), 1390 (w), 1240 (m, ν C-O), 860 (w), 720 (w, CH₂-rock.), 670 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, CD₂Cl₂ [ppm]):

$\delta =$ 0.91 (t, 3H, ³J_(HH) = 6.6 Hz, C(18)H₃), 1.20-1.34 (m, 20H, C(Kette)H₂), 1.40 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1.65-1.68 (m, 2H, C(3)H₂), 2.04 (m, 2H, CH₂-CH=), 2.29 (t, 2H, ³J_(HH) = 7.9 Hz, C(3)H₂), 4.04 (d, 2H, ³J_(HH) = 5.2 Hz, NH-CH₂), 5.38 (m, 2H, CH=), 6.39 (b, 1H, NH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CD₂Cl₂ [ppm]):

$\delta =$ 13.87 (C(12)H₃); 22.67 (C(11)H₂); 25.76 (C(10)H₂); 27.66 (C-(CH₃)₃); 28.51, 28.54, 29.51, 29.58, 29.68, 29.87, 29.99, 30.09, 30.14, 32.27, (C(Kette)H₂), 31.68 (C(3)H₂); 35.67 (C(2)H₂); 41.93 (CH₂), 79,8 (C-(CH₃)₃); 130.08, 130.28 (CH=), 171.96 (COOC), 173.14 (CONH).

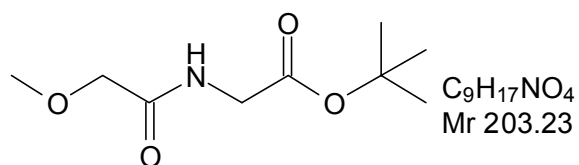
4.2.6.9 Enzymatische Acylierung von Gly-OtBu-Einsatz aktivierter Acyldonatoren

Für die Acylierung mittels aktivierter Acyldonatoren wurde 1 mmol (136 μ l) Gly-OtBu **13j** mit 3 mmol Acyldonor mit jeweils 3 ml Monoglyme gemischt. Nach Zugabe von 5 mg Novozym SP 435 wurde die Reaktion bei 70°C im Schüttler (400 U/min) gestartet. Die analytischen Parameter wurden analog AVV 1 verwendet. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms wurden wie in 4.2.6.1 durchgeführt. **Tab. 52** gibt die spezifischen Aktivitäten des Enzyms beim jeweiligen Acyldonor (Nummerierung analog **Tab. 10**), die eingesetzte Acyldonormenge sowie die Retentionszeiten des Acyldonors und des acylierten Produktes wieder.

Tab. 52: Enzymatische Acylierung von Gly-OtBu **13j**-Einsatz aktivierter Acyldonatoren.

Nr.	Acyldonor (M _r / 3mmol)	R _t Acyldonor	Produkt	R _t N-Acyl-Gly-OtBu	Spez. Aktivität [mU/mg]
1	116,1 / 396 μ l	- ^a	14c-1	29,9	1580
2	102,1 / 341 μ l	- ^a	14c	29,9	1490
3	219,5 / 514 μ l	22,0	14c-2	29,9	2876
4	170,1 / 449 μ l	- ^a	14c-3	29,9	3341
5	104,4 / 297 μ l	- ^a	15a	30,8	9140
6	132,2 / 409 μ l	- ^a	15a-1	30,8	8970

a) Acyldonor eluiert mit dem Lösungsmittel

4.2.6.10 Spektroskopische Daten von *N*-Methoxyacetyl-glycin-*t*-butylester 15a,15a1**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3300 (s, br., ν N-H Amid), 2970, 2920, und 2880 (s, ν C-H aliph.), 2820 (w, ν -OCH₃), 1740 (s, ν C=O), 1660 (s, ν Amid I), 1530 (s, ν Amid II), 1450 (m, δ C-H), 1390 (w), 1360 (m), 1150 (s, ν C-O), 1130 (s), 1025 (m), 830 (w), 720 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 1,41 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 3.36 (s; 3H; O-CH₃); 4.09 (d; 2H; ³J_{HH} = 5.9 Hz, OOC-CH₂-NH-), 4.57 (s, 2H, O-CH₂-CO), 8.04 (b; 1H; NH-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 27.63 (C-(CH₃)₃); 42.16 (CH-NH-); 52.86 (CH₃-O), 70.83 (O-CH₂-CO), 80.61 (C-(CH₃)₃); 169.86 (CH-COO-), 172.37 (NH-CO-).

4.2.6.11 Enzymatische Acylierung von Gly-OtBu 13j-Verhältnis von Substrat:Acyldonor

Für ein optimales Verhältnis zwischen Substrat und Acyldonor wurden unterschiedlich molare Mischungen von Gly-OtBu **13j** (1mmol; 136 μ l) und Capronsäuremethylester (M_r=130,2 g/mol) eingestellt. Für die Analyse wurden die Mischungen mit 5 mg Novozym SP 435 in 3 ml 2-Methyl-2-butanol bei 70°C im Schüttler (400U/min) einer enzymatischen Acylierung unterworfen. Zusätzlich wurde eine Reaktion ohne Lösungsmittel durchgeführt. Die analytischen Parameter wurden analog AVV 1 verwendet. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms wurden wie in 4.2.6.1 durchgeführt. **Tab. 53** gibt die spezifischen Aktivitäten des Enzyms beim jeweiligen molaren Mischungsverhältnis, den Umsatz nach 3 h Reaktionszeit sowie die eingesetzte Acyldonormenge wieder.

Tab. 53: Enzymatische Acylierung von Gly-OtBu **13j**-Verhältnis von Substrat:Acyldonor.

Substrat : Acyldonor Gly-OtBu : C ₆ -OMe	Capronsäuremethylester [μ l]	Spez. Aktivität [mU/mg]	Umsatz [%] nach 3 h
1 : 1	147	409	36
1 : 1,1	162	485	41
1 : 2	295	609	52
1 : 3	442	782	62
1 : 4	589	816	63
1 : 5	736	883	66
1 : 10	1473	886	69
Ohne Lösungsmittel 1:21	3000	2732	98

4.2.6.12 Enzymatische Acylierungen von Gly-OtBu 13j in reinem Acyldonor

Für die Analyse dieser Reaktionen ohne Lösungsmittel wurde Gly-OtBu **13j** (1mmol; 136 μ l) mit jeweils 20 mmol verschiedener Acyldonatoren gemischt und in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP 435) bei 70°C im Schüttler (400U/min) enzymatisch acyliert. Die analytischen Parameter wurden analog AVV 1 verwendet. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms wurden wie in 4.2.6.1 durchgeführt. **Tab. 54** gibt die spezifischen Aktivitäten des Enzyms beim jeweiligen Acyldonor, den Umsatz nach angegebener Reaktionszeit sowie die eingesetzte Acyldonormenge wieder.

Tab. 54: Enzymatische Acylierungen von Gly-OtBu **13j** in reinem Acyldonor.

Acyldonor-methylester	M _r / Acyldonormenge	C-Anzahl	Produkt	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
Essigsäure ^a -	88,1 / 1960 μ l	C-2	14a-1	3	96	2349
Propionsäure-	88,1 / 1920 μ l	C-3	14b-1	3	96	2576
Buttersäure-	102,1 / 2270 μ l	C-4	14c-4	3	96	2550
Valeriansäure-	116,2 / 2610 μ l	C-5	14d-1	3	96	2646
Capronsäure-	130,2 / 2945 μ l	C-6	14e-4	3	98	2732
Heptansäure-	144,2 / 3270 μ l	C-7	14f-1	3	95	2472
Caprylsäure-	158,2 / 3,6 ml	C-8	14g-1	3	95	2245
Nonansäure-	172,3 / 3,9ml	C-9	14h-1	4	94	2087
Caprinsäure-	186,3 / 4,2ml	C-10	14i-1	4	95	2095
Undecansäure-	200,3 / 4,6ml	C-11	14j-1	4	95	2048
Laurinsäure-	214,3 / 4,9ml	C-12	14k-2	4	95	2016
Myristinsäure-	242,4 / 5,6 ml	C-14	14l-1	5	97	1775
Palmitinsäure ^b -	270,5 / 5,4g	C-16	14m-1	6	96	1706
Stearinsäure ^b -	298,5 / 6,0g	C-18	14n-1	6	95	1292
Ölsäure-	296,5 / 6,8ml	C-18/1	14o-1	6	95	1260

a) Hier wurde der Ethylester eingesetzt. b) Die Reaktionsmischung ist bei 70°C flüssig.

4.2.6.13 Temperaturabhängigkeit und Enzymstabilität der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP 435)

Für den Einfluß der Temperatur auf die spezifische Aktivität des Enzyms wurde 1mmol (136 μ l) Gly-OtBu **13j** mit 3 ml (21 mmol) Capronsäuremethylester als Acyldonor (zugleich Lösungsmittel) gemischt. In Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP 435) wurde bei unterschiedlichen Temperaturen (25°C bis 100°C) im Schüttler (400U/min) das Substrat enzymatisch acyliert. Die analytischen Parameter wurden analog AVV 1 verwendet. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms wurden wie in 4.2.6.1 durchgeführt. **Tab. 55** gibt die spezifische Aktivität des Enzyms bei der jeweiligen Temperatur wieder.

Tab. 55: Temperaturabhängigkeit der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435).

Temperatur	25°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C	100°C
Spez. Aktivität [mU/mg]	230	702	1193	1644	2740	3225	3463	2245

Im Hinblick auf eine technische Anwendung wurde mit 1 mmol (136 μ l) Gly-OtBu **13j** und mit 3 ml (21 mmol) Capronsäuremethylester als Acyldonor (zugleich Lösungsmittel) die Enzymstabilität der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP 435) bei unterschiedlichen Temperaturen (60°C bis 90°C) im Schüttler (400U/min) untersucht. Die immobilisierte Lipase wurde dazu 5 mal je 24 h bei der jeweiligen Temperatur inkubiert, wobei für jede Reaktion die spezifische Aktivität des Enzyms (wie in 4.2.6.1) bestimmt wurde. Die analytischen Parameter wurden analog AVV 1 verwendet. **Tab. 56** gibt die spezifische Aktivität des Enzyms beim jeweiligen Versuch wieder. Zusätzlich ist der Stabilitätsverlust in % angegeben (bezogen auf Versuch 1).

Tab. 56: Enzymstabilität der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP435).

		Anzahl der Versuche				
		1	2	3	4	5
60°C	Spez. Aktivität [mU/mg]	1644	1611	1578	1545	1496
	Stabilitätsverlust [%]	100	98	96	94	91
70°C	Spez. Aktivität [mU/mg]	2740	2630	2576	2521	2437
	Stabilitätsverlust [%]	100	96	94	92	89
80°C	Spez. Aktivität [mU/mg]	3225	2806	2580	2451	2322
	Stabilitätsverlust [%]	100	87	80	76	72
90°C	Spez. Aktivität [mU/mg]	3463	2597	2147	1732	1524
	Stabilitätsverlust [%]	100	75	62	50	44

4.2.6.14 Enzymatische Acylierungen von Gly-OtBu **13j**-Einfluß der Enzymmenge

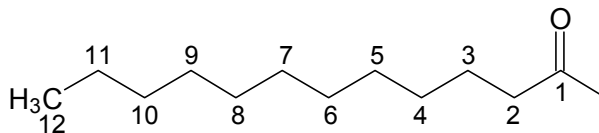
Für die Analysen wurde Gly-OtBu **13j** mit 3 ml (21 mmol) Capronsäuremethylester als Acyldonor (zugleich Lösungsmittel) in Gegenwart der Lipase aus *Candida antarctica* B (Novozym SP 435) bei 70°C im Schüttler (400U/min) acyliert. Für diese Bestimmungen wurden unterschiedliche Enzym-Substrat-Verhältnisse (bezogen auf mg Immobilisat) verwendet. Die analytischen Parameter wurden analog AVV 1 verwendet. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms wurden wie in 4.2.6.1 durchgeführt. **Tab. 57** gibt die spezifische Aktivität, den Umsatz nach 2 h Reaktionszeit, das Enzym-Substrat-Verhältnis und die jeweiligen eingewogenen Mengen an Enzym und Substrat wieder.

Tab. 57: Enzymatische Acylierungen von Gly-OtBu **13j**-Einfluß der Enzymmenge.

Enzym : Substrat-Verhältnis	Produkt	Enzym : Substrat-Einwaage [mg]	Umsatz [%]	Spez. Aktivität [mU/mg]
1 : 100	14e-5	10 : 1000	61	7530
1 : 50	14e-6	10 : 500	82	6180
1 : 20	14e-7	20 : 400	91	4820
1 : 10	14e-8	40 : 400	98	2890
1 : 5	14e-9	60 : 300	99	1470
1 : 3	14e-10	100 : 300	99	891

4.2.7 Synthese von *N*-Caproyl-aminosäure-*t*-butylestern

Allgemeine Hinweise zur Nummerierung der Kohlenstoffatome in den NMR-Spektren:
Die in Klammern angegebene Zahl bezeichnet die Kohlenstoffatome der Fettsäure-Acylkette.
Beispiel: Laurinsäure



Die übrigen Fettsäuren sind in analoger Weise nummeriert.

4.2.7.1 Synthese von *N*-Caproylalanin-*t*-butylester (DL; D; L) (\pm)-16a, (*R*)-16a, (*S*)-16a

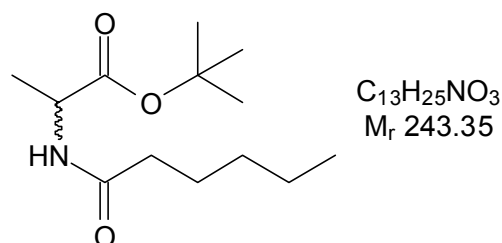
Aus 290mg (2,0 mmol) DL-Alanin-*t*-butylester (\pm)-13a ($M_r=145,20$) erhielt man nach AVV 7 und 48h Reaktionszeit 467mg (1,92 mmol) = 96% (\pm)-16a als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 108 mU/mg. Aus 290mg (2,0 mmol) D-Alanin-*t*-butylester (*R*)-13a erhielt man nach AVV 7 und 48h Reaktionszeit 477mg (1,96 mmol) = 98% (*R*)-16a als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 129 mU/mg. Aus 290mg (2,0 mmol) L-Alanin-*t*-butylester (*S*)-16a erhielt man nach AVV 7 und 48h Reaktionszeit 400mg (1,64 mmol) = 82% (*S*)-16a als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 42 mU/mg.

DC: (HE / EE: 2:1):

$R_f = 0,41$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 33,3$ min



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3290 (s, br., ν N-H Amid), 2920 und 2850 (s, ν C-H aliph.), 1745 (s, ν C=O), 1650 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1455 (m, δ C-H), 1380 (w), 1270 (w), 1210 (m), 1110 (m), 1060 (w), 850 (w), 725 (w, CH₂-rock.).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 0.90 (t; 3 H; $^3J_{HH} = 6,9$ Hz; CH₃(6)); 1.09 (d; 3H; $^3J_{HH} = 6,9$ Hz; CH-CH₃); 1.22-1.34 (m; 7H; CH₂(5+4), CH₃-CH); 1.40 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1.63 (m; 2 H; CH₂(3)); 2.22 (t; 2 H; $^3J_{HH}=7.5$ Hz, CH₂(2)); 3,78-3,89 (m; 1H; CH-NH-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 14.36 (CH₃(6)), 17.87 (CH₃-CH), 23.63 (CH₂(5)), 27.08 (CH₂(4)), 27.73 (C-(CH₃)₃); 32.34 (CH₂(3)), 36.72 (CH₂(2)), 52.15 (CH-NH-); 79.79 (C-(CH₃)₃); 173.57 (NH-CO), 175.17 (COOC).

4.2.7.2 Synthese von *N*-Caproylisoleucin-*t*-butylester (DL; L) (\pm)-**16b**, (*S*)-**16b**

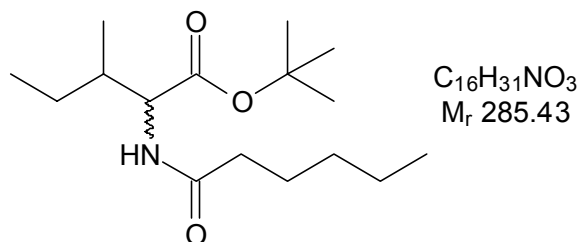
Aus 375mg (2,0 mmol) DL-Isoleucin-*t*-butylester (\pm)-**13k** ($M_r=187,28$) erhielt man nach AVV 7 und 120h Reaktionszeit 514mg (1,80 mmol) = 90% (\pm)-**16b** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 13 mU/mg. Aus 375mg (2,0 mmol) L-Isoleucin-*t*-butylester (*S*)-**13k** erhielt man nach AVV 7 und 136h Reaktionszeit 536mg (1,88 mmol) = 94% (\pm)-**16b** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 13 mU/mg.

DC: (HE / EE: 2:1):

$R_f = 0,45$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 36,4$ min



IR (Film, cm^{-1}):

$\nu =$ 3320 (s, br., v N-H Amid), 2960, 2920, 2840 (s, v C-H aliph.), 1700 (s, v C=O), 1620 (s, v Amid I), 1535 (s, v Amid II), 1460 (m, δ C-H), 1240 (m, v C-O), 1160 (w), 970 (w), 700 (w, CH_2 -rock.), 670 (w).

1H -NMR (400.132 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):

$\delta =$ 0.90 (t, 3H, $^3J_{(HH)} = 7.0$ Hz, C(6)H₃), 0.92-0.99 (m, 6H, CH-CH₂-CH₃; CH-CH₃), 1.21-1.30 (m, 6H, C(4-5)H₂, -CH₂-CH₃), 1.40 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1.66-1.88 (m, 3H, C(3)H₂, -CH-CH₃), 2.26 (t, 2H, C(2)H₂, $^3J_{(HH)} = 8.1$ Hz), 4.16 (m, 1H, CH-NH), 6.54 (d, 1H, $^3J_{(HH)} = 8.5$ Hz, NH).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, $CDCl_3$ [ppm]):

$\delta =$ 11.82 (CH-CH₂-CH₃), 14.99 (C(6)H₃), 15.74 (CH-CH₃), 22.93 C(5)H₂, 25.76 C(4)H₂, 25.68 (CH-CH₂-CH₃), 27.7 (C-(CH₃)₃); 32.24 (C(3)H₂), 36.85 (C(2)H₂), 37.13 (CH-CH₂-CH₃), 56.78 (CH-COOC), 79,74 (C-(CH₃)₃); 171.32 (-COOC), 173.14 (CONH).

4.2.7.3 Synthese von *N*-Caproylleucin-*t*-butylester (DL; D; L) (\pm)-**16c**, (*R*)-**16c**, (*S*)-**16c**

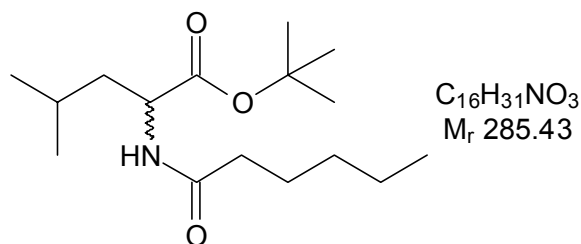
Aus 375mg (2,0 mmol) DL-Leucin-*t*-butylester (\pm)-**13l** ($M_r=187,28$) erhielt man nach AVV 7 und 120h Reaktionszeit 519mg (1,82 mmol) = 91% (\pm)-**16c** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 15 mU/mg. Aus 375mg (2,0 mmol) D-Leucin-*t*-butylester (*R*)-**13l** erhielt man nach AVV 7 und 144h Reaktionszeit 531mg (1,86 mmol) = 93% (*R*)-**16c** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 16 mU/mg. Aus 375mg (2,0 mmol) L-Leucin-*t*-butylester (*S*)-**13l** erhielt man nach AVV 7 und 144h Reaktionszeit 518mg (1,82 mmol) = 91% (*S*)-**16c** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 15 mU/mg.

DC: (HE / EE: 2:1):

$R_f = 0,46$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 35,6$ min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3260 (s, br., ν N-H Amid), 2920, 2900 und 2830 (s, ν C-H aliph.), 1735 (s, ν C=O), 1640 (s, ν Amid I), 1530 (s, ν Amid II), 1450 (m, δ C-H), 1430 (s), 1360 (s), 1190 (s, ν C-O), 1140 (m), 1030 (m), 990 (m), 725 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 0.82-0.96 (m; 9H; $\underline{C}H_3(6)$, $(\underline{C}H_3)_2-CH$); 1.19-1.36 (m; 4 H; $\underline{C}H_2(5+4)$); 1.41 (s; 9H; C- $(\underline{C}H_3)_3$); 1.52-1.75 (m; 5H; $\underline{C}H_2(3)$, $\underline{C}H-\underline{C}H_2-CH$); 2.21 (t; 2H; $^3J_{HH}=7.4$ Hz, $\underline{C}H_2(2)$); 3.96-4.23 (m; 1H; $\underline{C}H-NH$).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 14.58 ($\underline{C}H_3(6)$), 21.45 ($(\underline{C}H_3)_2-CH$), 23.03 ($(\underline{C}H_3)_2-CH$), 23.40 ($\underline{C}H_2(5)$), 26.21 ($(\underline{C}H_3)_2-\underline{C}H$), 26.61 ($\underline{C}H_2(4)$), 27.74 (C- $(\underline{C}H_3)_3$); 32,42 ($\underline{C}H_2(3)$), 36.45 ($\underline{C}H_2(2)$), 43.65 (CH- $\underline{C}H_2-CH$), 53.24 (CH- $\underline{C}H_2-CH$), 171.93 (NH- $\underline{C}O$), 172.37 ($\underline{C}OOC$).

4.2.7.4 Synthese von N-ε-Caproyllysine-t-butylester (DL; L) (±)-16d, (S)-16d

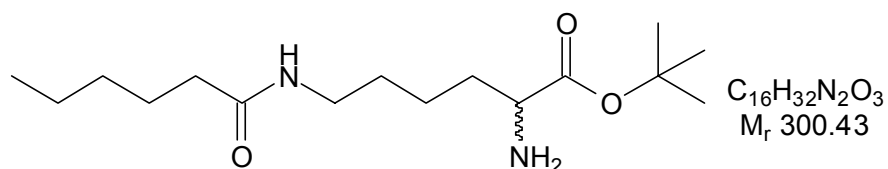
Aus 405mg (2,0 mmol) DL-Lysin-t-butylester (±)-**13m** ($M_r=202,30$) erhielt man nach AVV 7 und 4h Reaktionszeit 583mg (1,94 mmol) = 97% (±)-**16d** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 1442 mU/mg. Aus 444mg (2,0 mmol) L-Lysin-t-butylester (**S**)-**13m** erhielt man nach AVV 7 und 4h Reaktionszeit 583mg (1,94 mmol) = 97% (**S**)-**16d** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 1436 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:1):

$R_f = 0,33$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 38,7$ min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3300 (s, br., ν N-H Amid), 2980, 2900 und 2870 (s, ν C-H aliph.), 1760 (s, ν C=O), 1730 (s), 1710 (s), 1670 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1470 (s, δ C-H), 1410 (m), 1380 (s), 1290 (m), 1260 (m), 1190 (s, ν C-O), 1030 (w), 880 (w), 740 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, MeOH-d₄ [ppm]):

$\delta =$ 0.91 (t, 3H, $^3J_{(HH)} = 7.0$ Hz, C(6) \underline{H}_3), 1.29-1,40 (m, 17H, 4H von C(4-5) \underline{H}_2 , 4H von -CH- $\underline{C}H_2-\underline{C}H_2$, 9H von C- $(\underline{C}H_3)_3$); 1.53-1.61 (m, 2H, CH- $\underline{C}H_2$), 1.69 (m, 2H, C(3) \underline{H}_2),

2.50 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, C(2)H₂), 2.82-2.94 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂), 3.84-4.02 (m, 1H, H₂N-CH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, MeOH-*d*₄ [ppm]):

$\delta =$ 13.36 (C(6)H₃), 22.09 (CH-CH₂-CH₂), 22.31 (C(5)H₂); 26.07 (C(4)H₂), 27.66 (C-(CH₃)₃), 28.82 (CH₂-CH₂-NH), 31.72 (C(3)H₂), 32-58 (NH₂-CH₂-CH₂-), 34.43 (C(2)H₂); 41.63 (CH₂-NH), 54.60 (-NH₂-CH), 80.04 (C-(CH₃)₃); 171.60 (CONH), 172.27 (COOC).

4.2.7.5 Synthese von *N*_δ-Caproyl-DL-Ornithin-*t*-butylester (±)-16e

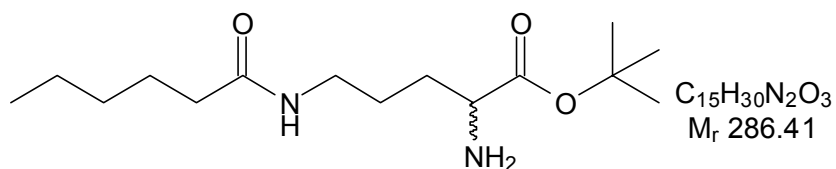
Aus 376mg (2,0 mmol) DL-Ornithin-*t*-butylester (±)-13o (*M*_r=188,27) erhielt man nach AVV 7 und 3h Reaktionszeit 556mg (1,94 mmol) = 97% (±)-16e als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 1906 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:1):

*R*_f = 0,32

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

*R*_t = 37,2 min



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3320 (s, br., v N-H Amid), 1670 (s, v C=O), 1630 (s, v Amid I), 1520 (s, v Amid II), 1285 (m), 1260 (m), 1230 (m), 1170 (s), 1020 (m), 980 (m), 860 (m), 750 (m).

^1H -NMR (400.132 MHz, DMSO *d*₆ [ppm]):

$\delta =$ 0.90 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, C(6)H₃), 1.24-1,48 (m, 17H, 4H von C(4-5)H₂, 4H von -CH-CH₂-CH₂, 9H von C-(CH₃)₃); 1.67 (m, 2H, C(3)H₂), 2.48 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, C(2)H₂), 2.87-2.95 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂), 3.82-3.93 (m, 1H, H₂N-CH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO *d*₆ [ppm]):

$\delta =$ 13.77 (C(6)H₃), 24.36 (CH-CH₂-CH₂), 22.31 (C(5)H₂); 26.07 (C(4)H₂), 27.76 (C-(CH₃)₃), 28.82 (CH₂-CH₂-NH), 31.72 (C(3)H₂), 34.43 (C(2)H₂); 40.23 (CH₂-NH), 54.60 (-NH₂-CH), 80.01 (C-(CH₃)₃); 172.22 (CONH), 173.21 (COOC).

4.2.7.6 Synthese von *N*-Caproylphenylalanin-*t*-butylester (DL; D; L) (±)-16f, (*R*)-16f, (*S*)-16f

Aus 443mg (2,0 mmol) DL-Phenylalanin-*t*-butylester (±)-13p (*M*_r=221,30) erhielt man nach AVV 7 und 144h Reaktionszeit 517mg (1,62 mmol) = 81% (±)-16f als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 8 mU/mg. Aus 443mg (2,0 mmol) D-Phenylalanin-*t*-butylester (*R*)-13p erhielt man nach AVV 7 und 144h Reaktionszeit 537mg (1,60 mmol) = 84% (*R*)-16f als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 7 mU/mg. Aus 443mg (2,0 mmol) L-Phenylalanin-*t*-

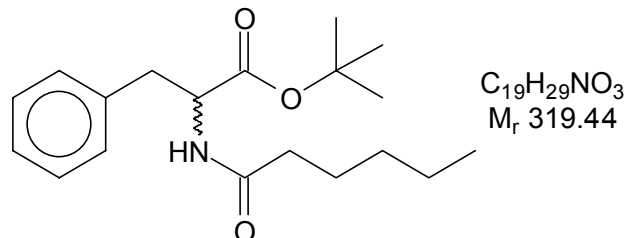
butylester (**S**)-**13p** erhielt man nach AVV 7 und 144h Reaktionszeit 511mg (1,60 mmol) = 80% (**S**)-**16f** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 7 mU/mg

DC: (HE / EE: 2:1):

$R_f = 0,48$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 42,8$ min



IR (Film, cm^{-1}):

$\nu =$ 3320 (s, br., ν N-H Amid), 3060 und 3040 (w, ν C-H arom.), 2940 und 2860 (s, ν C-H aliph.), 1740 (s, ν C=O), 1720 (w), 1650 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1425 (m, δ C-H), 1240 (m, ν C-O), 710 (m, CH_2 -rock.).

1H -NMR (400.132 MHz, DMSO d_6 [ppm]):

$\delta =$ 0.88 (t; 3 H; $^3J_{HH} = 7.3$ Hz; C(6) H_3); 1.12-1.33 (m; 4 H; C(4+5) H_2); 1.39 (s; 9H; C-(CH_3) $_3$); 1.46 (m; 2 H; C(3) H_2); 2.12 (t; 2 H; $^3J = 7.1$ Hz; C(2) H_2); 2.86 (dd; 1 H; $^3J_{HH} = 9.7$ Hz, $^3J_{HH} = 14.2$ Hz; CH_2 -CH); 3.20 (dd; 1 H; $^3J_{HH} = 5.1$ Hz, $^3J_{HH} = 13.7$ Hz; CH_2 -CH); 3.67 (t; 1H; $^3J = 6,8$ Hz; CH - CH_2 -), 7.16-7.28 (m; 5 H; $-C_6H_5$)

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, CD_3OD [ppm]):

$\delta =$ 14,21 ($C(6)H_3$), 23,37 ($C(5)H_2$); 26,54 ($C(4)H_2$); 27,6 (C-(CH_3) $_3$); 32,30 ($C(3)H_2$); 36,76 (C(2)H); 39,72 (CH_2 -CH); 55,43 (CH_2 -CH); 80.15 (C -(CH_3) $_3$); 127,73 (C(4) von $-C_6H_5$), 129,39 (C(3,5) von $-C_6H_5$), 130,22 (C(2,6) von $-C_6H_5$); 138,57 (C(1) von $-C_6H_5$), 173,89 (NH-CO), 174,23 (COOC).

4.2.7.7 Synthese von N-Caproylvalin-t-butylester (DL; D; L) (\pm)-**16g**, (**R**)-**16g**, (**S**)-**16g**

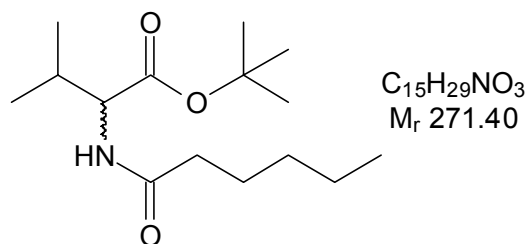
Aus 346mg (2,0 mmol) DL-Valin-t-butylester (\pm)-**13t** ($M_r=173,26$) erhielt man nach AVV 7 und 144h Reaktionszeit 488mg (1,80 mmol) = 90% (\pm)-**16g** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 13 mU/mg. Aus 346mg (2,0 mmol) D-Valin-t-butylester (**R**)-**13t** erhielt man nach AVV 7 und 144h Reaktionszeit 494mg (1,82 mmol) = 91% (**R**)-**16g** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 13 mU/mg. Aus 346mg (2,0 mmol) L-Valin-t-butylester (**S**)-**13t** erhielt man nach AVV 7 und 144h Reaktionszeit 488mg (1,80 mmol) = 90% (**S**)-**16g** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 12 mU/mg.

DC: (HE / EE: 2:1):

$R_f = 0,40$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 35,3$ min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3320 (s, br., ν N-H Amid), 2950, 2910 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1695 (s, ν C=O), 1615 (s, ν Amid I), 1545 (s, ν Amid II), 1460 (m, δ C-H), 1295 (m), 1245 (s, br., ν C-O), 1160 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

$\delta =$ 0.77-0.97 (m; 9H; $\underline{C}H_3(6)$, $(\underline{C}H_3)_2-CH$); 1.20-1.37 (m; 4H; $\underline{C}H_2(5+4)$); 1.40 (s; 9H; C- $(\underline{C}H_3)_3$); 1.57-1.73 (m; 2H; $\underline{C}H_2(3)$); 1.96-2.28 (m; 3H; $\underline{C}H_2(2)$, $(\underline{C}H_3)_2-CH$); 4.23-4.33 (m; 1H; $\underline{C}H-NH$), 7,82 (b; 2H; $CH-NH_2$).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

$\delta =$ 17.25 ($\underline{C}H_3(6)$), 22.56 ($(\underline{C}H_3)_2-CH$), 23.59 ($(\underline{C}H_3)_2-CH$), 23.41 ($\underline{C}H_2(5)$), 26.72 ($\underline{C}H_2(4)$), 27,6 (C- $\underline{C}H_3(3)$); 31.88 ($(\underline{C}H_3)_2-CH$), 32.49 ($\underline{C}H_2(3)$), 36.70 ($\underline{C}H_2(2)$), 57.86 (NH- $\underline{C}H$), 79.81 (C- $(\underline{C}H_3)_3$); 173.71 (NH- $\underline{C}O$), 174.48 ($\underline{C}OOC$).

4.2.7.8 Synthese von N-Caproyl-DL-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (±)-16h

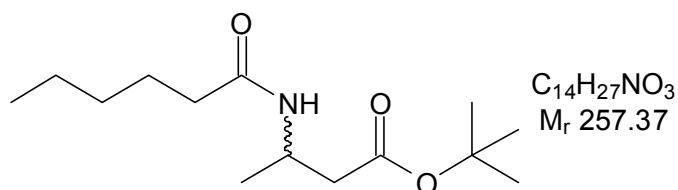
Aus 318mg (2,0 mmol) DL-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (±)-**13d** ($M_r=159,23$) erhielt man nach AVV 7 und 48h Reaktionszeit 319mg (1,24 mmol) = 62% (±)-**16h** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 58 mU/mg.

DC: (HE / EE: 2:1):

$R_f = 0,41$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 34,9$ min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3310 (s, br., ν N-H Amid), 2960, 2910 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1695 (s, ν C=O), 1605 (s, ν Amid I), 1545 (s, ν Amid II), 1460 (m, δ C-H), 1240 (s, br., ν C-O), 1150 (m), 1110 (m), 970 (w), 690 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 0.90-1.08 (m; 6H; $\underline{C}H_3(6)$, $CH-CH_3$); 1.24-1.37 (m; 13H; $\underline{C}H_2(5+4)$, C- $(\underline{C}H_3)_3$); 1.52-1.70 (m; 2H; $\underline{C}H_2(3)$); 1.93-2.29 (m; 4H; $\underline{C}H_2(2)$, - $CH-CH_2$ -); 3.89-3.96 (m; 1H; $\underline{C}H-NH$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 17.54 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3(6)$), 20.93 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH-}$); 23.41 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(5)$), 26.72 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(4)$), 27.73 ($\text{C-}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 32.49 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(3)$), 36.70 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(2)$), 41.55 ($\text{CH-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$); 44.69 ($\underline{\text{C}}\text{H-CH}_2\text{-}$); 57.86 ($\text{NH-}\underline{\text{C}}\text{H}$), 80.01 ($\underline{\text{C}}\text{-}(\text{CH}_3)_3$); 173.11 ($\text{NH-}\underline{\text{C}}\text{O}$), 174.35 ($\underline{\text{C}}\text{OOC}$).

4.2.7.9 Synthese von *N*-Caproyl- β -Alanin-*t*-butylester 16i

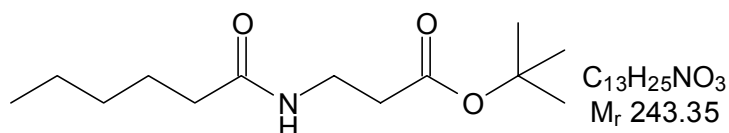
Aus 435mg (3,0 mmol) β -Alanin-*t*-butylester **13b** ($M_r=145,2$) erhielt man nach AVV 7 und 2 h Reaktionszeit 715mg (2,94 mmol) = 98% **16i** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 3016 mU/mg.

DC: (HE / EE: 2:1):

$R_f = 0,42$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 32,4$ min

**IR (Film, cm^{-1}):**

$\nu =$ 3410 und 3340 (s, br., ν N-H Amid), 2940, 2900 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1720 (s, ν C=O), 1680 (s, ν Amid I), 1635 (s), 1610 (s), 1580 (s, ν Amid II), 1460 (m, δ C-H), 1210 (m), 720 (w, $\text{CH}_2\text{-rock.}$).

 ^1H -NMR (400.132 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 0.91 (t; 3 H; $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz; $\underline{\text{C}}\text{H}_3(6)$); 1.19 (s; 9H; $\text{C-}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 1.24-1.36 (m; 4H; $\underline{\text{C}}\text{H}_2(5+4)$); 1.63 (m; 2 H; $\underline{\text{C}}\text{H}_2(3)$); 2.22 (t; 2 H; $^3J_{\text{HH}}=7.5$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}_2(2)$); 2,50-2,57 (m; 2H; $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-COO-}$); 3,45-3,56 (m; 2H; $\text{NH-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 14.38 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3(6)$), 23.63 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(5)$), 27.08 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(4)$), 27.48 ($\text{C-}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 32.34 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(3)$), 34.68 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-COO-}$); 36.72 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(2)$), 41.96 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-NH-}$); 80.88 ($\underline{\text{C}}\text{-}(\text{CH}_3)_3$); 172.54 ($\text{NH-}\underline{\text{C}}\text{O}$), 174.07 ($\underline{\text{C}}\text{OOC}$).

4.2.7.10 Synthese von *N*-Caproyl-4-Aminobuttersäure-*t*-butylester 16j

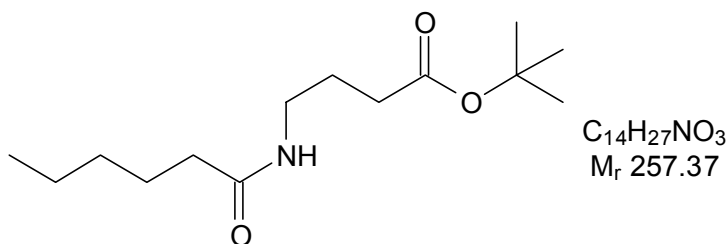
Aus 318mg (2,0 mmol) 4-Aminobuttersäure-*t*-butylester **13e** ($M_r=159,23$) erhielt man nach AVV 7 und 3 h Reaktionszeit 499mg (1,94 mmol) = 97% **16j** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 2267 mU/mg.

DC: (HE / EE: 2:1):

$R_f = 0,40$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 34,8$ min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3290 (s, br., ν N-H Amid), 2980 und 2900 (s, ν C-H aliph.), 1720 (s, ν C=O), 1630 (s, ν Amid I), 1525 (s, ν Amid II), 1450 (m, δ C-H), 1300 (m), 1210 (s, ν C-O), 1120 (m), 960 (m), 710 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 0.89 (t; 3 H; $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz; $\underline{\text{CH}}_3(6)$); 1.23-1.35 (m; 4H; $\underline{\text{CH}}_2(5+4)$); 1.38 (s; 9H; C-($\underline{\text{CH}}_3$)₃); 1,51-1,55 (m; 2H; $-\underline{\text{CH}}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{COO}-$); 1.65 (m; 2 H; $\underline{\text{CH}}_2(3)$); 2.14-2.25 (m; 4 H; $\underline{\text{CH}}_2(2)$, $\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{COO}-$); 3,41-3,52 (m; 2H; $\text{NH}-\underline{\text{CH}}_2-$).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 14.39 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3(6)$), 23.60 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(5)$), 25.46 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{COO}-$); 27.14 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(4)$), 27.68 (C-($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃); 32.44 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(3)$), 32.45 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COO}-$); 36.72 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(2)$), 41.08 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}-$); 80.11 (C-($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃); 172.26 (NH- $\underline{\text{C}}\text{O}$), 174.17 ($\underline{\text{C}}\text{OOC}$).

4.2.7.11 Synthese von N-Caproyl-6-Aminohexansäure-t-butylester 16k

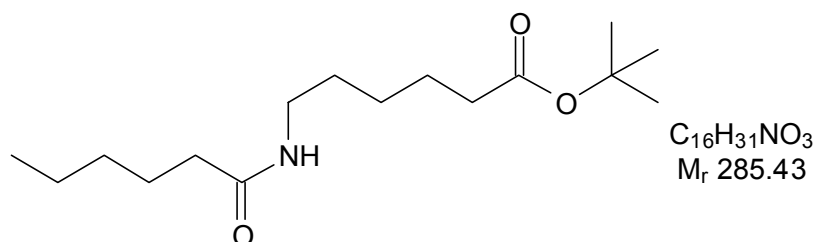
Aus 375mg (2,0 mmol) 6-Aminohexansäure-t-butylester **13g** (M_r=187,28) erhielt man nach AVV 7 und 3 h Reaktionszeit 554mg (1,94 mmol) = 98% **16k** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 1428 mU/mg.

DC: (HE / EE: 2:1):

R_f = 0,43

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

R_t = 36,7 min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3420 und 3300 (s, br., ν N-H Amid), 2920 und 2860 (s, ν C-H aliph.), 1710 (s, ν C=O), 1660 (s, ν Amid I), 1550 (s, ν Amid II), 1440 (m, δ C-H), 1290 (m), 1210 (w), 710 (w, CH_2 -rock.), 610 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 0.88 (t; 3 H; $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz; $\underline{\text{CH}}_3(6)$); 1.24-1.48 (m; 10H; $\underline{\text{CH}}_2(5+4)$, $\underline{\text{CH}}_2-\underline{\text{CH}}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-$); 1.39 (s; 9H; C-($\underline{\text{CH}}_3$)₃); 1.63 (m; 2 H; $\underline{\text{CH}}_2(3)$); 2.14-2.25 (m; 4 H; $\underline{\text{CH}}_2(2)$, $\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{COO}-$); 3.33-3.54 (m; 2H; $\text{NH}-\underline{\text{CH}}_2-$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 14.34 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3(6)$), 23.61 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(5)$), 24.42 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-$); 25.81 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-$); 27.12 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(4)$), 27.70 ($\text{C}-(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 32.41 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(3)$), 32.49 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COO}-$); 32.89 ($\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); 36.71 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(2)$), 41.34 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}-$); 80.05 ($\text{C}-(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 172.52 ($\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{O}$), 173.84 ($\underline{\text{C}}\text{OOC}$).

4.2.7.12 Synthese von *N*-Caproyl-DL-2-Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-16l

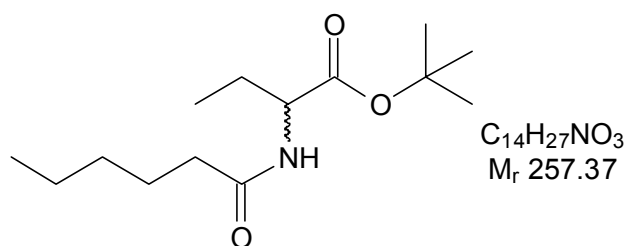
Aus 318mg (2,0 mmol) DL-2-Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-**13c** ($M_r=159,23$) erhielt man nach AVV 7 und 96h Reaktionszeit 500mg (1,94 mmol) = 97% (\pm)-**16l** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 27 mU/mg.

DC: (HE / EE: 2:1):

$R_f = 0,41$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 34,1$ min

**IR (Film, cm^{-1}):**

$\nu =$ 3360 (s, br., ν N-H Amid), 2860 (s, ν C-H aliph.), 1710 (s, ν C=O), 1650 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1470 (m, δ C-H), 1430 (m), 1390 (w), 1250 (m, ν C-O), 930 (m), 730 (w, CH_2 -rock.), 640 (m).

 ^1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 0.88-1.10 (m; 6H; $\underline{\text{C}}\text{H}_3(6)$, $\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 1.22-1.34 (m; 4H; $\underline{\text{C}}\text{H}_2(5+4)$), 1.39 (s; 9H; $\text{C}-(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 1.44-1.70 (m; 4H; $\underline{\text{C}}\text{H}_2(3)$, $-\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); 2.23 (t; 2H; $^3J_{\text{HH}}=7.5$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}_2(2)$); 4.02-4.13 (m; 1H; $\underline{\text{C}}\text{H}-\text{NH}$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 13.26 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); 17.54 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3(6)$), 23.41 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(5)$), 26.72 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(4)$), 27.51 ($\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); 27,71 ($\text{C}-(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 32.49 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(3)$), 36.70 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(2)$), 59.73 ($\underline{\text{C}}\text{H}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); 79,59 ($\text{C}-(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 173.21 ($\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{O}$), 174.65 ($\underline{\text{C}}\text{OOC}$).

4.2.7.13 Synthese von *N*-Caproyl-L-Asparaginsäure-di-*t*-butylester (*S*)-16m

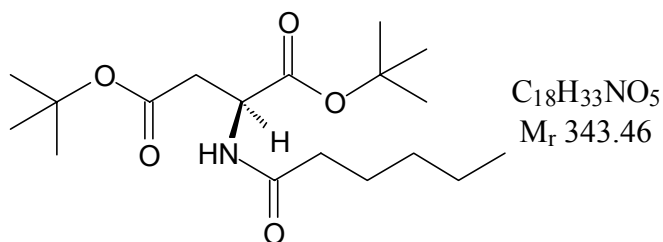
Aus 490mg (2,0 mmol) L-Asparaginsäure-di-*t*-butylester (**S**)-**13h** ($M_r=245,32$) erhielt man nach AVV 7 und 192h Reaktionszeit 625mg (1,82 mmol) = 91% (**S**)-**16m** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 8 mU/mg.

DC: (HE / EE: 2:1):

$R_f = 0,44$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 40,5$ min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3280 (s, br., ν N-H Amid), 2900 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1700 (s, ν C=O), 1650 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1430 (m), 1415 (m, δ C-H), 1390 (w), 1250 (m, ν C-O), 1180 (m), 930 (m), 890 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 0.90 (t; 3 H; ³J_{HH} = 6.9 Hz; CH₃(6)); 1.22-1.34 (m; 4H; CH₂(5+4)), 1.37 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1.40-1.45 (m; 2H; CH₂(3)); 2.23-2.44 (m; 4H; CH₂(2), NH-CH-CH₂-); 4.04-4.18 (m; 1H; CH-NH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 17.11 (C(6)H₃), 22.81 (C(5)H₂); 24.67 (C(4)H₂); 27.66 ((2)C-(CH₃)₃); 27.70 ((1)C-(CH₃)₃); 32.04 (C(3)H₂); 36.30 (C(2)H₂); 39.21 (NH-CH-CH₂-); 50.51 (HN-CH), 79.46 ((2)C-(CH₃)₃); 79.98 ((1)C-(CH₃)₃); 171.78 (COOC-); 172.21 (COOC-); 173.35 (CONH).

4.2.7.14 Synthese von N-Caproyl-L-Glutaminsäure-di-*t*-butylester (S)-16n

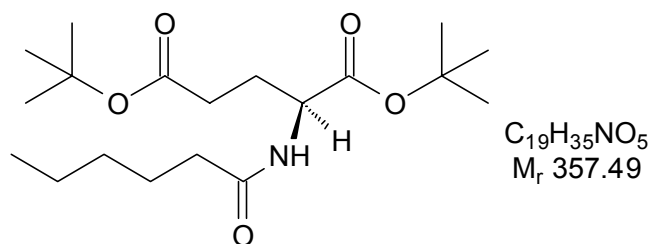
Aus 520mg (2,0 mmol) L-Glutaminsäure-di-*t*-butylester (S)-13i (M_r=259,35) erhielt man nach AVV 7 und 192h Reaktionszeit 643mg (1,80 mmol) = 90% (S)-16n als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 7 mU/mg.

DC: (HE / EE: 2:1):

R_f = 0,44

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

R_t = 42,0 min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3310 (s, br, ν N-H Amid), 2910, 2910 und 2840 (s, ν CH), 1720 (s, ν C=O), 1620 (s, ν C=O Amid I), 1540 (s, ν C=O Amid I), 1460 (m, ν CH₂), 1415 (s), 1220 (m), 1045 (m), 1035 (m), 720 (m), 620 (m).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 0.90 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0\text{Hz}$, C(6)H₃), 1.25-1.59 (m, 6H, C(4-5)H₂, -NH-CH-CH2-), 1.40 (s; 18H; 2 x C-(CH₃)₃); 1.65 (m, 2H, C(3)H₂), 2.21-2.51 (m, 4H, C(2)H₂, CH-CH2-CH2-), 4.31 (m, 1H, CH), 6.87 (b, 1H, NH).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 18.26 (C(6)H₃), 22.81 (C(5)H₂); 24.67 (C(4)H₂); 27.68 ((2)C-(CH₃)₃); 27.71 ((1)C-(CH₃)₃); 31.29 (NH-CH-CH2-CH₂-); 32.04 (C(3)H₂); 36.30 (C(2)H₂); 38.52 (NH-CH-CH₂-); 56.71 (HN-CH), 79.48 ((2)C-(CH₃)₃); 79.98 ((1)C-(CH₃)₃); 171.66 (COOC-); 172.40 (COOC-); 173.75 (CONH).

4.2.7.15 Synthese von *N*-Caproyl-L-Methionin-*t*-butylester (S**)-160**

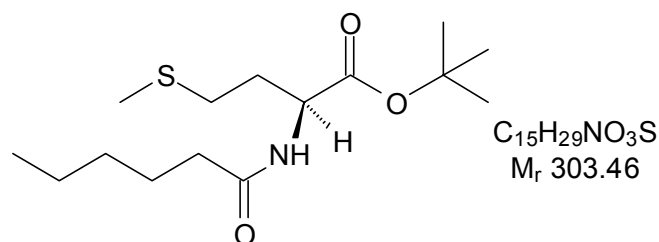
Aus 411mg (2,0 mmol) L-Methionin-*t*-butylester (**S**)-13n ($M_r=205,32$) erhielt man nach AVV 7 und 120h Reaktionszeit 571mg (1,88 mmol) = 94% (**S**)-160 als leicht gelbes Öl. Spezifische Aktivität = 20 mU/mg.

DC: (HE / EE: 2:1):

$R_f = 0,37$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 32,8$ min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3310 (s, ν N-H Amid), 2910 und 2860 (s, ν C-H aliph.), 1725 (s, ν C=O), 1660 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1480 (m, δ C-H), 1425 (m), 1280 (m), 1250 (m), 1220 (m), 720 (w, CH₂-rock.), 680 (m).

 $^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 0.90 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, C(6)H₃), 1.24-1,36 (m, 4H, C(4-5)H₂), 1.40 (s; 9H; C-(CH₃)₃), 1.66 (m, 2H, C(3)H₂), 1.93-1.98 (m; 2H; CH2-CH2-CH-); 2.15 (s, 3H, S-CH₃), 2.26 (m, 2H, CH₂-S), 2.60 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, C(2)H₂), 4.31 (m, 1H, CH-NH), 7.18 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, NH).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 17.34 (C(6)H₃), 16.69 (S-CH₃), 22.81 (C(5)H₂), 25.75 (C(4)H₂), 27.68 (C-(CH₃)₃), 29,9 (CH2-CH2-CH-); 31.42 (S-CH₂), 32.11 (C(3)H₂) 36.57 (C(2)H₂), 54.76 (CH), 80,13 (C-(CH₃)₃); 172.18 (COOC), 174.45 (CONH).

4.2.7.16 Synthese von *N*-Caproyl-L-Phenylglycin-*t*-butylester (**S**)-16p

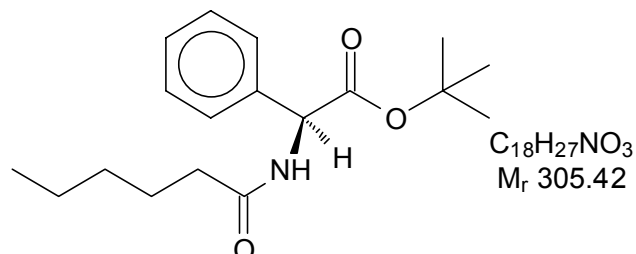
Aus 415mg (2,0 mmol) L-Phenylglycin-*t*-butylester (**S**)-13q ($M_r=207,27$) erhielt man nach AVV 7 und 192h Reaktionszeit 568mg (1,86 mmol) = 93% (**S**)-16p als leicht gelbes Öl. Spezifische Aktivität = 6 mU/mg.

DC: (HE / EE: 2:1):

$R_f = 0,45$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 34,1$ min



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3300 (s, br., ν N-H Amid), 3060 und 3020 (m, ν C-H arom.), 2960, 2900 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1700 (s, ν C=O), 1610 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1490 (s), 1460 (m, δ C-H), 1445 (m), 1260 (s), 1235 (m, ν C-O), 1185 (m), 1130 (m), 980 (m), 720 (m, CH₂-rock.), 690 (s).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 0.89 (t; 3H; ³J_{HH} = 6.9 Hz; CH₃(6)); 1.28-1.37 (m; 4H; CH₂(5+4)); 1.39 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1.59 (m; 2H; CH₂(3)); 2.25 (m; 2H; CH₂(2)); 4.86 (s; 1H; CH-NH) ; 7.24-7.43 (m; 5H; -C₆H₅).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 14.33 (C(6)H₃), 23.40 (C(5)H₂); 26.57 (C(4)H₂); 27.72 (C-(CH₃)₃); 32.43 (C(3)H₂); 36.54 (C(2)H); 56.21 (NH-CH); 127.89 (C(4) von -C₆H₅), 129.12 (C(3,5) von -C₆H₅), 129.86 (C(2,6) von -C₆H₅); 138.22 (C(1) von -C₆H₅), 171.25 (COOC), 173.98 (NH-CO).

4.2.7.17 Synthese von *N*-Caproyl-*O*-*t*-Butyl-L-Serin-*t*-butylester (**S**)-16q

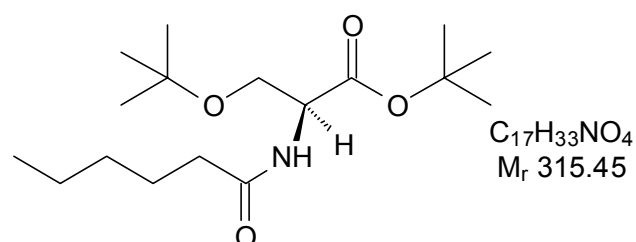
Aus 435mg (2,0 mmol) *O*-*t*-Butyl-L-Serin-*t*-butylester (**S**)-13r ($M_r=217,31$) erhielt man nach AVV 7 und 168h Reaktionszeit 600mg (1,90 mmol) = 95% (**S**)-16q als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 7 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:1):

$R_f = 0,38$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 38,1$ min



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3320 (s, br., ν N-H Amid), 2900 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1730 (s, ν C=O), 1610 (s, ν Amid I), 1525 (s, ν Amid II), 1460 (m), 1400 (m, δ C-H), 1345 (m), 1275 (m), 1230 (s, br. ν C-O), 1205 (m), 1190 (s), 1125 (m), 1070 (m), 1030 (m), 1000 (m), 790 (m), 720 (s, CH₂-rock.).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 0.88 (t, 3H, ³J_(HH) = 7.0 Hz, C(6)H₃), 1.26-1.38 (m, 13H, C(4-5)H₂, -O-C-(CH₃)₃), 1.40 (s; 9H; -COO-C-(CH₃)₃), 1.48-1.52 (m, 2H, C(3)H₂), 2.13 (t, 2H, ³J_(HH) = 7.5 Hz, C(2)H₂), 3.61-3.74 (m, 2H, CH-CH₂), 4.19 (m, 1H, CH), 7.60 (d, 1H, ³J_(HH) = 7.9 Hz, NH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 14.49 (C(6)H₃), 22.68 (C(5)H₂), 25.80 (C(4)H₂), 27.67 (-CH₂-O-C-(CH₃)₃), 27.91 (COO-C-(CH₃)₃), 31.90 (C(3)H₂), 35.67 (C(2)H₂), 57.42 (CH), 63.18 (CH-CH₂), 72.46 (-CH₂-O-C-(CH₃)₃), 80.02 (C-(CH₃)₃), 171.88 (COOC), 173.49 (CONH).

4.2.7.18 Synthese von *N*-Caproyl-L-Tyrosin-*t*-butylester (S**)-16r**

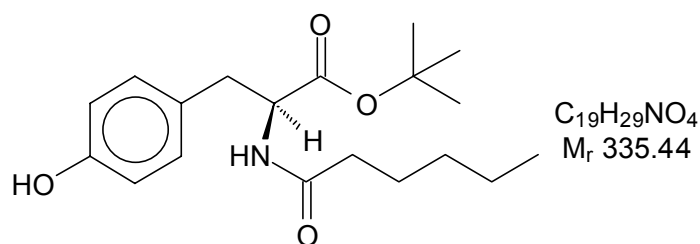
Aus 475mg (2,0 mmol) L-Tyrosin-*t*-butylester (**S**)-13s (M_r=237,30) erhielt man nach AVV 7 und 192h Reaktionszeit 617mg (1,84 mmol) = 92% (**S**)-16r als leicht gelbes Öl. Spezifische Aktivität = 5 mU/mg.

DC: (HE / EE: 2:1):

R_f = 0,41

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

R_t = 47,4 min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3400-2600 (s, br., ν O-H phenol), 3300 (s, br., ν N-H Amid), 3240 (s), 3020 (m, ν C-H arom.), 2940, 2900 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1700 (s, ν C=O), 1640 (s, ν Amid I), 1610 (m), 1600 (m), 1540 (s, ν Amid II), 1510 (s), 1500 (s), 1450 (m, δ C-H), 1370 (m), 1330 (m), 1270 (m), 1230 (m, ν C-O), 1130 (m), 915 (m), 840 (s), 820 (m), 730 (m), 720 (m), 665 (s), 620 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 0.90 (t, 3H, ³J_(HH) = 7.0 Hz, C(6)H₃), 1.25-1.34 (m, 4H, C(4-5)H₂), 1.41 (s; 9H; C-(CH₃)₃), 1.62 (m, 2H, C(3)H₂), 2.22 (t, 2H, ³J_(HH) = 7.9 Hz, C(2)H₂), 2,86 (d; 2H; ³J=5,7 Hz, CH-CH₂-); 4.95 (m, 1H, CH), 6.71 (d, 2H, ³J_(HH) = 8.3 Hz, CH=CH-COH), 6.94 (d, 2H, ³J_(HH) = 8.3Hz, CH=CH-COH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 17.44 ($\underline{\text{C}}(6)\text{H}_3$), 22.81 ($\underline{\text{C}}(5)\text{H}_2$), 25.71 ($\underline{\text{C}}(4)\text{H}_2$), 27.79 ($\text{C}-(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 32.04 ($\underline{\text{C}}(3)\text{H}_2$), 36.72 ($\underline{\text{C}}(2)\text{H}_2$), 37.12 ($\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 53.87 ($\underline{\text{C}}\text{H}$), 80,11 ($\underline{\text{C}}-(\text{CH}_3)_3$), 115.71 ($2\text{C}, \underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{OH}$), 127.14 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}$), 130.55 ($2\text{C}, \text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}=\text{)$, 155.37 ($\underline{\text{C}}\text{OH}$), 171.87 ($\underline{\text{C}}\text{OOC}$), 173.78 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$).

4.2.8 Enantioselektive Acylierung von DL-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-13d**4.2.8.1 Synthese von *N*-Acetyl-D-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (*R*)-17a**

Für die Enantiomerendifferenzierung wurde 795mg (5,0 mmol) DL-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-13d ($M_r=159,23$) mit 4ml Essigester nach AVV 7 umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 15 h und einem Umsatz von 47% (GC) an *N*-Acetyl-D-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (*R*)-17a ($R_t = 27,9$ min) wurde die Reaktion durch abfiltrieren des Enzyms abgebrochen und mittels GC die Enantiomerenreinheit bestimmt. Spezifische Aktivität = 52 mU/mg. Für den Erhalt des acetylierten Racemates wurde ein weiterer Ansatz bis zu einem Umsatz von 92% durchgeführt (168h).

GC-Trennbedingungen: (FS-Cyclodex Beta-I/P; 0,5bar H_2 Säulendruck; 60°C/5min isotherm; 1°C/min; 180°C).

$R_t = 36,35$ min *N*-Acetyl-D-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (96,5%) = 93 %ee

$R_t = 38,78$ min *N*-Acetyl-L-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (3,5%)

Zur Ausbeutebestimmung wurde der *t*-Butylester über eine kurze Kieselgelsäule filtriert (Eluent HE/EE 2:1) und das Lösungsmittel abrotiert. Es wurden 453mg (2,25 mmol) = 45% *N*-Acetyl-D-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (*R*)-17a als farbloses Öl erhalten.

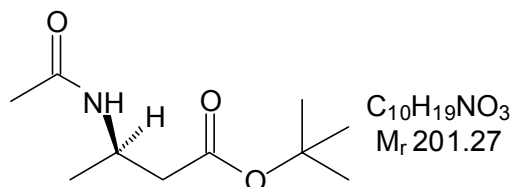
DC: (HE / EE: 2:1):

$R_f = 0,38$

Die weitere Elution der Kieselgelsäule mit Methanol führte zu 343mg (2,10 mmol) = 42% L-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (*S*)-13d. Für die Bestimmung der Enantioselektivität wurde der *t*-Butylester mit 1ml TFA in 10 ml Dioxan abgespalten. Man erhielt 216mg (2,10 mmol) = 42% L-3-Aminobuttersäure(*S*)-18a

Drehwert: L-3-ABU-OH

$[\alpha]_D^{20} = + 26,4^\circ$ ($c=0,48 \text{ H}_2\text{O}$) = 68% ee

**IR (Film, $[\text{cm}^{-1}]$):**

$\nu =$ 3315 (s, br, ν *N*-H Amid), 2920, 2900 und 2860 (s, ν CH), 1725 und 1680 (s, ν C=O), 1640 (s, ν C=O Amid I), 1580 (s), 1530 (s, ν C=O Amid I), 1410 (m, ν CH_2), 1265 (m, δ C-O), 1185 (s), 810 (w), 680 (w).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 1.09 (d; 3H; $J = 6.8$ Hz; CH-CH_3); 1.40 (s; 9H; $\text{C-(CH}_3)_3$); 1.79 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO}$),
2.25-2.39 (m; 2H; $-\text{CH-CH}_2-$); 3.90-3.98 (m; 1H; $-\text{CH-CH}_2-$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 20.56 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$ -); 27.65 ($\text{C-(CH}_3)_3$); 36.79 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 42.55 (CH-CH_2 -); 53.87 (CH-CH_2 -); 80.06 ($\text{C-(CH}_3)_3$); 172.41 (NH-CO), 175.28 (COOH).

4.2.8.2 Synthese von L-3-Aminobuttersäure (S)-18b

Für die Enantiomerendifferenzierung wurde 795mg (5,0 mmol) DL-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (\pm)-**13d** ($M_r=159,23$) mit 4ml Essigester nach AVV 7 umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 30 h und einem Umsatz von 55% (GC) an *N*-Acetyl-D-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (**R**)-**17b** ($R_t = 27,9$ min) wurde die Reaktion durch abfiltrieren des Enzyms abgebrochen und mittels GC die Enantiomerenreinheit von (**R**)-**17b** (78% ee) bestimmt (vgl. Kapitel 4.2.8.3). Spezifische Aktivität = 53 mU/mg. Für die Bestimmung der Enantioselektivität des verbleibenden Eduktes (L-3-Aminobuttersäure-*t*-butylester (**S**)-**18b**) wurde der *t*-Butylester mit 1ml TFA in 10 ml Dioxan abgespalten. Durch Extraktion mit Essigester und Trocknen über MgSO_4 konnte das acylierte Produkt 370mg (2,55 mmol) = 51% *N*-Acetyl-D-3-Aminobuttersäure (**R**)-**17b** abgetrennt werden. Aus der verbleibenden wässrigen Phase konnte nach Abziehen des Wassers im Hochvakuum 201mg (1,95 mmol) = 39% L-3-Aminobuttersäure (**S**)-**18b** erhalten werden.

4.2.8.3 Bestimmung der Enantiomerenreinheiten:

Die Bestimmung der Enantiomerenreinheiten der DL-3-Aminobuttersäure mittels HPLC erfolgte nach einer Methode von Lobell et al.¹⁹².(vgl. **Abb. 80**), allerdings mit einem neuartigen für die Fluoreszenzdetektion synthetisiertes diastereomeres Thioharnstoffderivat NGIT¹⁹³ (2, 3, 4, 6-Tetra-*O*-naphthoyl- β -D-gluco-pyranosyl-isothiocyanat).

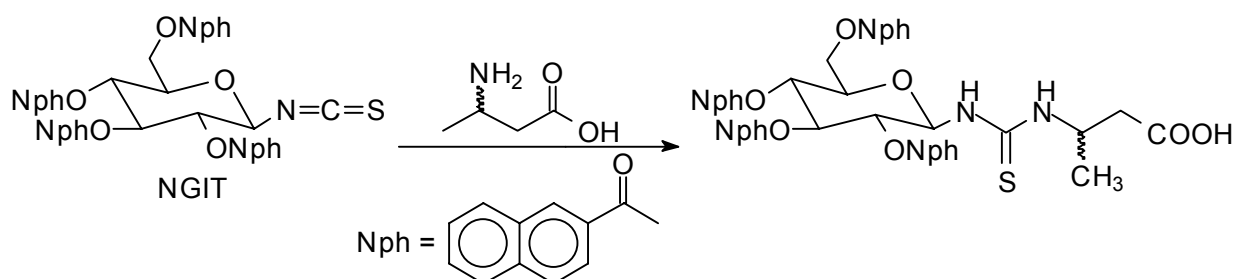


Abb. 80: Derivatisierung von DL-3-Aminobuttersäure mit NGIT.

Vorschrift:

5 mg der Aminosäure werden in 10 ml 50 %igem wässrigen Acetonitril, daß 0.055 ml Triethylamin enthält, aufgenommen. Zu 50 μl dieser Stammlösung werden 50 μl einer 0.66 %igen NGIT-Lösung in Acetonitril gegeben und 30 min geschüttelt. Anschließend wird die

Mischung mit Acetonitril auf 1 ml aufgefüllt. Zur Bestimmung werden 10 µl auf die Säule gegeben.

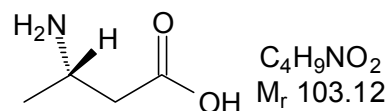
HPLC-Trennbedingungen: RP-18 (Lichrospher 100, 5µm); Gemisch: (Acetonitril mit 0,1% TFA / Wasser 80 : 20); Flow 0,8 ml/min; Fluoreszenz-Detektion Ex 300nm – Em 419 nm.

$R_t = 34,6$ min L-3-Aminobuttersäure (**S**)-**18b** (99%) = 98 %ee

$R_t = 37,2$ min D-3-Aminobuttersäure (1%)

Drehwert: L-3-ABU-OH (**S**)-**18b** $[\alpha]_D^{20} = +38,1^\circ$ (c=0,48 H₂O)

Schmp.: 190-192°C



IR (KBr-Pressling, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3400-2800 (s, br, ν OH Säure), 3015 (s, vb, NH₃⁺), 2910, 2900 und 2860 (s, ν CH_{aliph.}), 1630 und 1590 (s, ν C=O), 1515 (s, δ NH₃⁺), 1470, 1450, 1410 (m, ν CH₂), 720 (m) [CH₂-rock] weitere Banden bei 1400 (s), 1290 (m), 1185 (s), 810 (w), 920 (s), 680 (w), 650 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, D₂O/DCI [ppm]):

$\delta =$ 1.28 (d; 3H; J = 6.6 Hz; CH-CH₃); 2,56-2,71 (m; 2H; -CH-CH₂-); 4.08-4.13 (m; 1H; -CH-CH₂-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, D₂O/DCI [ppm]):

$\delta =$ 28.12 (CH₃-CH₂-); 44.47 (CH-CH₂-); 62.11 (CH-CH₂-); 176.35 (COOH).

4.2.9 Synthese von *N*-Lauroyl-L-Aminosäure-*t*-butylester

4.2.9.1 Synthese von *N*-Lauroyl-L-Alanin-*t*-butylester (**S**)-**19a**

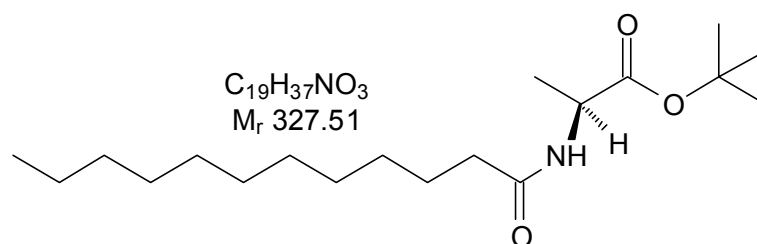
Aus 290mg (2,0 mmol) L-Alanin-*t*-butylester (**S**)-**13a** (M_r=145,20) erhielt man nach AVV 7 und 72h Reaktionszeit 596mg (1,82 mmol) = 91% (**S**)-**19a** als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 32 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,44$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 43,3$ min



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3323 (s) (ν N-H); 3079 (w) (ν N-H); 2956, 2920, 2851(m,s,s) (ν aliph. CH); 1706 (s) (ν C=O, COOC); 1646 (s) (ν C=O, Amid); 1537 (m) (δ N-H); 1470 (m) (δ C-H); 1246

(m) (v C-O); weitere Banden bei: 1417 (w); 1378 (w); 1331 (w); 1282 (w); 1221 (w); 1196 (w); 950, 929 (wb); 719 (w)

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 0,88 (t; 3 H; $J = 6,9\text{Hz}$; $\text{C}(12)\text{H}_3$); 1,2-1,36 (m; 16 H; $\text{C}(4-11)\text{H}_2$); 1,40 (s; 9H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1,45 (d; 3 H; $J = 7,63\text{Hz}$; $\text{CH}_3\text{-CH}$); 1,62 (m; 2 H; $\text{C}(3)\text{H}_2$); 2,25 (t; 2 H; $J = 7,6\text{ Hz}$; $\text{C}(1)\text{H}_2$); 4,59 (m; 1 H; $\text{CH}_3\text{-CH}$); 6,39 (d; 1H; $J = 7,1\text{ Hz}$; NH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 14,04 ($\text{C}(12)\text{H}_3$); 18,10 ($\text{CH}_3\text{-CH}$); 22,63 ($\text{C}(11)\text{H}_2$); 25,57 ($\text{C}(10)\text{H}_2$); 27,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 29,15; 29,26; 29,28; 29,43; 29,56; ($\text{C}(4-9)\text{H}_2$); 31,87 ($\text{C}(3)\text{H}_2$); 36,41 ($\text{C}(2)\text{H}_2$); 48,22 ($\text{CH}_3\text{-CH}$); 80,1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 171,13 (NH-CO-); 172,86 (-COOC)

4.2.9.2 Synthese von *N*-Lauroyl-L-Asparaginsäure-di-*t*-butylester (*S*)-19b

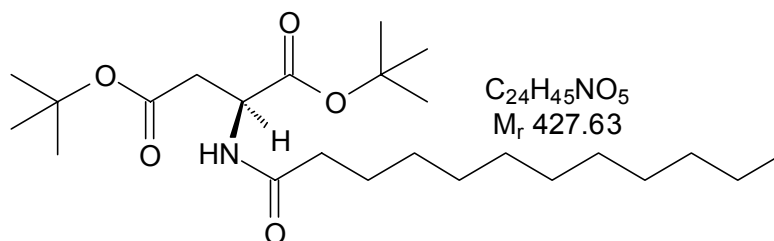
Aus 491mg (2,0 mmol) L-Asparagin-di-*t*-butylester (**S**)-13h ($M_r=245,32$) erhielt man nach AVV 7 und 216h Reaktionszeit 753mg (1,76 mmol) = 88% (**S**)-19b als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 6 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,39$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; $60^\circ\text{C}/5\text{min}$; $6^\circ\text{C}/\text{min}$; $340^\circ\text{C}/10\text{min}$)

$R_t = 37,9\text{ min}$



IR (Film, $[\text{cm}^{-1}]$):

$\nu =$ 3295 (s) (v N-H Amid); 2965, 2925, 2858 (s) (v aliph. C-H); 1694 (s) (v C=O, COOC); 1629 (s) (v C=O, Amid I); 1561 (s) (δ N-H, Amid II); 1467 (w) (δ CH_2); 1241 (mb) (v C-O); weitere Banden bei: 1169 (w); 665 (w); 552 (w)

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 0.92 (t, 3H, $\text{C}(12)\text{H}_3$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.0\text{ Hz}$), 1.29 (m, 16H, $\text{C}(4-11)\text{H}_2$), 1.41 (s; 18H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.66 (m, 2H, $\text{C}(3)\text{H}_2$), 2.25 (t, 2H, $\text{CH-CH}_2\text{-CO}$, $^3J_{(\text{HH})} = 8.2\text{ Hz}$), 2.97 (m, 2H, $\text{C}(2)\text{H}_2$), 4.91 (m, 1H, CH), 6.48 (d, 1H, NH , $^3J_{(\text{HH})} = 7.6\text{ Hz}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 14.21 ($\text{C}(12)\text{H}_3$), 22.81 ($\text{C}(11)\text{H}_2$); 25.67 ($\text{C}(10)\text{H}_2$); 27,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 29.31, 29.46, 29.62, 29.73 ($\text{C}(4-9)\text{H}_2$); 32.04 ($\text{C}(3)\text{H}_2$); 36.30 ($\text{C}(2)\text{H}_2$); 36.66 (CHCH_2), 48.51 (CH), 79.4 ((2) $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 79.8 ((1) $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 171.44 (COOC-); 171.76 (COOC-); 173.06 (CONH).

4.2.9.3 Synthese von *N*-Lauroyl-L-Glutaminsäure-di-*t*-butylester (**S**)-19c

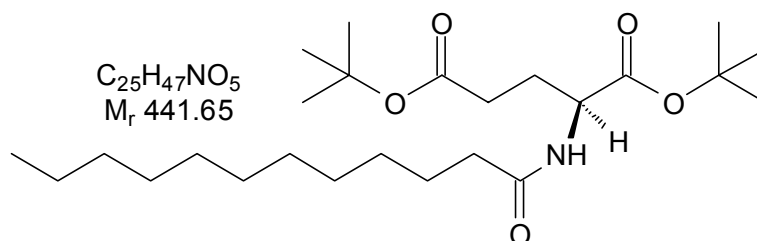
Aus 520mg (2,0 mmol) L-Glutaminsäure-di-*t*-butylester (**S**)-13i ($M_r=259,35$) erhielt man nach AVV 7 und 216h Reaktionszeit 760mg (1,72 mmol) = 86% (**S**)-19c als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 5 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,39$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 60°C/5min; 6°C/min; 340°C/10min)

$R_t = 39,6$ min



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3300 (s, br, ν N-H Amid), 2960, 2840 (s, ν CH), 1730 (s, ν C=O), 1650 (s, ν C=O Amid I), 1530 (s, ν C=O Amid II), 1410 (m, ν CH₂), 1240 (w), 1200 (w), 1030 (w), 720 (w, CH₂-rock.).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 0.91 (t, 3H, C(12)H₃, ³J_(HH) = 7.0Hz), 1.29 (m, 16H, C(4-11)H₂), 1.40 (s; 18H; C-(CH₃)₃); 1.65 (m, 2H, C(3)H₂), 2.08 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂-), 2.28 (m, 2H, C(2)H₂), 2.49 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂-), 4.62 (m, 1H, CH), 6.69 (b, 1H, NH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 14.03 (C(12)H₃), 22.62 (C(11)H₂); 25.53 (C(10)H₂); 26.81 (CH-CH₂), 29.18, 29.27, 29.44, 29.57, (C(4-9)H₂); 30.15 (CH-CH₂-CH₂), 31.86 (C(3)H₂); 36.37 (C(2)H₂); 79.6 ((2)C-(CH₃)₃); 80.2 ((1)C-(CH₃)₃); 174.28 (C=O), 174.35 (C=O), 174.54 (CONH).

4.2.9.4 Synthese von *N*-Lauroyl-L-Isoleucin-*t*-butylester (**S**)-19d

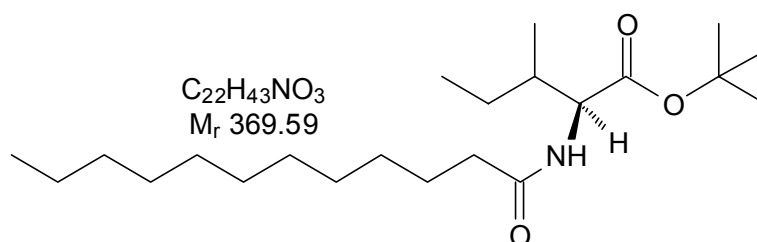
Aus 375mg (2,0 mmol) L-Isoleucin-*t*-butylester (**S**)-13k ($M_r=187,28$) erhielt man nach AVV 7 und 144h Reaktionszeit 673mg (1,82 mmol) = 91% (**S**)-19d als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 10 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:3):

$R_f = 0,36$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 47,1$ min



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3290 (s, br., ν N-H Amid), 2940, 2900 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1740 (s, ν C=O), 1640 (s, ν Amid I), 1530 (s, ν Amid II), 1460 (m, δ C-H), 1430 (m), 1370 (m), 1250 (m, ν C-O), 1200 (m), 1140 (m), 720 (w, CH₂-rock.).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 0.92 (t, 3H, C(12)H₃, ³J_(HH) = 7.0 Hz), 0.98 (m, 6H, CH-CH₂-CH₃; CH-CH₃), 1.30 (m, 16H, C(4-11)H₂), 1.39 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1.55 (2H, m, CH-CH₂-CH₃), 1.67 (m, 2H, C(3)H₂), 1.99 (m, 1H, CH-CH₂), 2.29 (t, 2H, C(2)H₂, ³J_(HH) = 8.1 Hz), 4.66 (m, 1H, CH-NH), 6.18 (d, 1H, NH, ³J_(HH) = 8.5 Hz).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 11.71 (CH-CH₂-CH₃), 14.21 (C(12)H₃), 15.54 (CH-CH₃), 22.85 C(11)H₂, 25.28 C(10)H₂, 25.86 (CH-CH₂-CH₃), 29.36, 29.46, 29.62, 31.06 (C(4-9)H₂); 32.04 (C(3)H₂) 36.81 (C(2)H₂), 37.85 (CH-CH₂-CH₃), 56.60 (CH-COOC), 80,05 (C-(CH₃)₃); 171.12 (-COOC), 175.51 (CONH).

4.2.9.5 Synthese von *N*-Lauroyl-L-Leucin-*t*-butylester (S**)-19e**

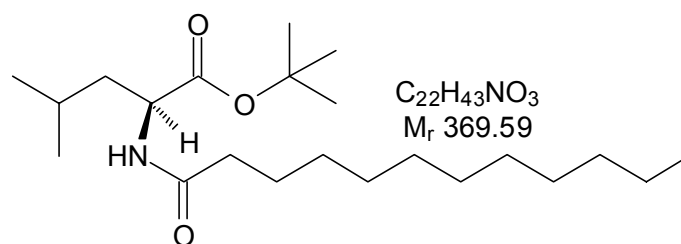
Aus 375mg (2,0 mmol) L-Leucin-*t*-butylester (**S**)-131 (M_r=187,28) erhielt man nach AVV 7 und 144h Reaktionszeit 687mg (1,86 mmol) = 93% (**S**)-19e als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 11 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:3):

R_f = 0,36

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

R_t = 45,5 min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3328 (s) (ν N-H); 2956, 2923, 2853 (s) (ν aliph. C-H); 1698 (s) (ν C=O, COOC); 1622 (s) (ν C=O, Amid I); 1558 (s) (δ N-H, Amid II); 1467 (w) (δ CH₂); 1238 (mb) (ν C-O); weitere Banden bei: 1169 (w); 665 (w); 552 (w)

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 0,88 (t; 3 H; J_{HH} = 6,8 Hz; C(12)H₃); 0,95-0,97 (m; 6 H; 2 x CH-CH₃); 1,23-1,41 (m; 16 H; C(4-9)H₂); 1,44 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1,56-1,74 (m; 5 H; C(10)H₂, C(11)H₂; CH-CH₃); 2,22-2,26 (m; 2 H; CH-CH₂); 4,60-4,64 (m; 1 H; CH-NH); 6,11 (d; 1H; J_{N,5} = 8,1 Hz; NH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 14,05 ($\underline{\text{C}}(12)\text{H}_3$); 21,89 (2 x $\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 22,64 ($\underline{\text{C}}(11)\text{H}_2$); 22,80 ($\underline{\text{C}}(10)\text{H}_2$); 24,90 ($\underline{\text{C}}(9)\text{H}_2$); 25,61 ($\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_3$); 27,62 ($\text{C}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 29,19; 29,29; 29,47; 29,58; ($\underline{\text{C}}(4-8)\text{H}_2$); 31,88 ($\underline{\text{C}}(3)\text{H}_2$); 36,48 ($\underline{\text{C}}(2)\text{H}_2$); 41,23 ($\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 50,88 ($\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2$); 79,82 ($\underline{\text{C}}-(\text{CH}_3)_3$); 171,24 ($\underline{\text{C}}\text{OOC}$); 174,12 ($\text{CO}-\text{NH}$).

4.2.9.6 Synthese von *N* ϵ -Lauroyl-L-Lysin-*t*-butylester (S**)-19f**

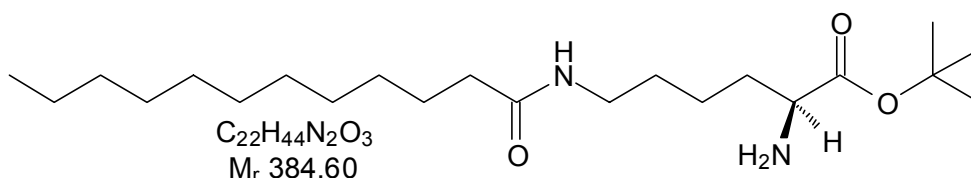
Aus 405mg (2,0 mmol) L-Lysin-di-*t*-butylester (**S**)-13m ($M_r=202,30$) erhielt man nach AVV 7 und 6h Reaktionszeit 731mg (1,90 mmol) = 95% (**S**)-19f als gelbliches Öl. Spezifische Aktivität = 1067 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:3):

$R_f = 0,34$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; 60°C/5min; 6°C/min; 340°C/10min)

$R_t = 36,2$ min

**IR (Film, $[\text{cm}^{-1}]$):**

$\nu =$ 3320 (s, br., ν N-H Amid), 1705 (s) (ν C=O, COOC); 1630 (s, ν C=O), 1580 (s, ν Amid I), 1525 (s, ν Amid II), 1410 (m), 1220 (s), 1170 (m), 980 (m), 940 (w), 870 (w), 820 (w), 670 (m).

 ^1H -NMR (400.132 MHz, $\text{MeOH}-d_4$ [ppm]):

$\delta =$ 0.88 (t, 3H, $^3J_{(\text{HH})} = 7.0$ Hz, $\underline{\text{C}}(12)\text{H}_3$), 1.27-1,38 (m, 20H, $\text{CH}-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $\underline{\text{C}}(4-11)\text{H}_2$); 1.42 (s; 9H; $\text{C}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 1.55 (m, 2H, $\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 1.67 (m, 2H, $\underline{\text{C}}(3)\text{H}_2$), 2.00 (m, 2H, $\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2$), 2.50 (t, 2H, $\underline{\text{C}}(2)\text{H}_2$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.0$ Hz), 3.36 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}$), 4.02 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, $\text{MeOH}-d_4$ [ppm]):

$\delta =$ 13.30 ($\underline{\text{C}}(12)\text{H}_3$), 22.09 ($\text{CH}-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 22.41 ($\underline{\text{C}}(11)\text{H}_2$); 26.07, 27.66, 28.82, 28.93, 29.10, 29.21, 29.36, 29.67 ($\underline{\text{C}}(10-4)\text{H}_2$, $\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$, $\text{C}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 31.72 ($\underline{\text{C}}(3)\text{H}_2$), 34.23 ($\underline{\text{C}}(2)\text{H}_2$); 40.33 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}$), 52.60 ($-\text{NH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}$), 80.12 ($\underline{\text{C}}-(\text{CH}_3)_3$); 170.60 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$), 172.57 ($\underline{\text{C}}\text{OOC}$).

4.2.9.7 Synthese von *N*-Lauroyl-L-Methionin-*t*-butylester (S**)-19g**

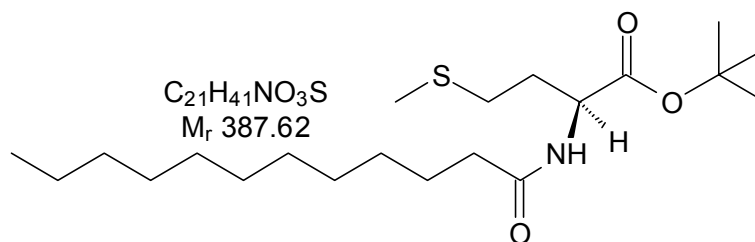
Aus 410mg (2,0 mmol) L-Methionin-*t*-butylester (**S**)-13n ($M_r=205,32$) erhielt man nach AVV 7 und 96h Reaktionszeit 687mg (1,84 mmol) = 92% (**S**)-19g als leicht gelbes Öl. Spezifische Aktivität = 15 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,43$

GC: (BPX-5; 100 kPa H_2 ; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 44,1$ min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3360 (s, ν N-H Amid), 2920 und 2850 (s, ν C-H aliph.), 1725 (s), 1700 (s, ν C=O), 1630 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1440 (m, δ C-H), 1270 (w), 1210 (s), 720 (w, CH₂-rock.), 660 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 0.91 (t, 3H, ³J_(HH) = 7.0 Hz, C(12)H₃), 1.28-1.39 (m, 16H, C(4-11)H₂), 1.42 (s; 9H; C-(CH₃)₃), 1.66 (m, 2H, C(3)H₂), 2.08 (m, 2H, CH-CH₂), 2.14 (s, 3H, S-CH₃), 2.26 (m, 2H, CH₂-S), 2.60 (t, 2H, C(2)H₂, ³J_(HH) = 7.6 Hz), 4.74 (m, 1H, CH-NH), 6.48 (d, 1H, NH, ³J_(HH) = 7.5 Hz).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 14.22 (C(12)H₃), 15.59 (S-CH₃), 22.81 (C(11)H₂), 25.75 (C(10)H₂), 27.66 (C-(CH₃)₃), 29.37, 29.46, 29.63, 29.75, 29.92, 30.21 (CH-CH₂, C(4-9)H₂), 31.37 (S-CH₂), 32.04 (C(3)H₂), 36.66 (C(2)H₂), 51.99 (CH), 79.87 (C-(CH₃)₃); 172.45 (COOC), 175.13 (CONH).

4.2.9.8 Synthese von N-Lauroyl-L-Phenylalanin-*t*-butylester (S)-19h

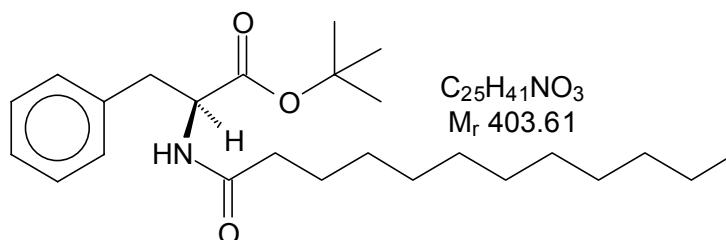
Aus 443mg (2,0 mmol) L-Phenylalanin-*t*-butylester (S)-13p (M_r=221,30) erhielt man nach AVV 7 und 216h Reaktionszeit 751mg (1,86 mmol) = 93% (S)-19h als gelbes Öl. Spezifische Aktivität = 5 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:2):

R_f = 0,48

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

R_t = 51,0 min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3290 (s, br., ν N-H Amid), 3060, 3040 und 3010 (w, ν C-H arom.), 2940 und 2820 (s, ν C-H aliph.), 1690 (s, ν C=O), 1640 (s, ν Amid I), 1535 (s, ν Amid II), 1450 (s, δ C-H), 1430 (s), 1370 (m), 1210 (s, ν C-O), 1170(m), 1080 (w), 1030 (w), 740 (w), 720 (m, CH₂-rock.), 690 (s).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 0.85 (t, 3H, $^3J_{(\text{HH})} = 7.0$ Hz, C(12)H₃), 1.24-1.30 (m, 16H, C(4-11)H₂), 1.34-1.38 (m, 2H, C(3)H₂), 1.40 (s; 9H; C-(CH₃)₃), 2.02 (t, 2H, $^3J_{(\text{HH})} = 7.3$ Hz, C(2)H₂), 2.83 (m, 1H, CH-CH₂) 3.04 (m, 1H, CH-CH₂), 4.43 (m, 1H, CH), 7.22-7.47 (m, 5H, C₆H₅), 8.02 (d, 1H, NH, $^3J_{(\text{HH})} = 7.6$ Hz).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 14.50 (C(12)H₃), 22.68 (C(11)H₂), 25.76 (C(10)H₂), 27.6 (C-(CH₃)₃), 29.05, 29.29, 29.38, 29.50, 29.60, 31.89 (C(3-9)H₂), 35.69 (C(2)H₂), 37.39 (CH-CH₂), 53.81 (CH), 80,02 (C-(CH₃)₃); 126.86 (C(4) von -C₆H₅), 128.64 (C(3,5) von -C₆H₅), 129.63 (C(2,6) von -C₆H₅), 138.38 (C(1) von -C₆H₅), 171.74 (C=OOC), 173.76 (CONH).

4.2.9.9 Synthese von *N*-Lauroyl-*L*-Phenylglycin-*t*-butylester (S**)-19i**

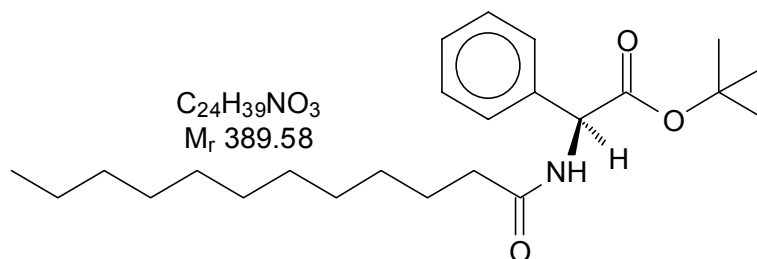
Aus 415mg (2,0 mmol) *L*-Phenylglycin-*t*-butylester (**S**)-13q ($M_r=207,27$) erhielt man nach AVV 7 und 216h Reaktionszeit 717mg (1,84 mmol) = 92% (**S**)-19i als gelbes Öl. Spezifische Aktivität = 5 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:2):

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_f = 0,46$

$R_t = 49,8$ min

**IR (Film, cm^{-1}):**

$\nu =$ 3330 (s, br., ν N-H Amid), 3040 und 3020 (m, ν C-H arom.), 2900 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1695 (s, ν C=O), 1650 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1490 (m), 1460 (m, δ C-H), 1410 (s), 1290 (m), 1270 (m), 1240 (m, ν C-O), 1220 (m), 1190 (m), 910 (m, br.), 720 (s, CH₂-rock.), 690 (m).

 $^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO-d_6 [ppm]):

$\delta =$ 0.86 (t, 3H, $^3J_{(\text{HH})} = 7.0$ Hz, C(12)H₃), 1.23-1,39 (m, 16H, C(4-11)H₂), 1.41 (s; 9H; C-(CH₃)₃), 1.48 (m, 2H, C(3)H₂), 2.18 (m, 2H, C(2)H₂), 5.35 (d, 1H, $^3J_{(\text{HH})} = 7.6$ Hz, CH), 7.37 (m, 5H, C₆H₅), 8.47 (d, 1H, $^3J_{(\text{HH})} = 7.6$ Hz, NH).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO-d_6 [ppm]):

$\delta =$ 14.50 (C(12)H₃), 22.69 (C(11)H₂), 25.83 (C(10)H₂), 27.8 (C-(CH₃)₃), 29.21, 29.30, 29.38, 29.56, 29.61, 31.90 (C(3-9)H₂), 35.43 (C(2)H₂), 56.73 (CH), 80,11 (C-(CH₃)₃); 128.18 (C(4) von -C₆H₅), 128.38 (C(3,5) von -C₆H₅), 129.02 (C(2,6) von -C₆H₅), 138.03 (C(1) von -C₆H₅), 171.56 (C=OOC), 172.70 (CONH).

4.2.9.10 Synthese von *N*-Lauroyl-*O*-*t*-butyl-L-Serin-*t*-butylester (**S**)-19j

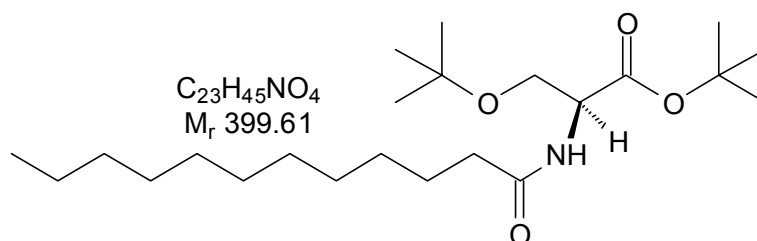
Aus 435mg (2,0 mmol) *O*-*t*-Butyl-L-Serin-*t*-butylester (**S**)-13r ($M_r=217,31$) erhielt man nach AVV 7 und 192h Reaktionszeit 719mg (1,80 mmol) = 90% (**S**)-19j als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 5 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:1):

$R_f = 0,41$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 47,5$ min



IR (Film, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3310 (s, br., ν N-H Amid), 2900 und 2835 (s, ν C-H aliph.), 1730 (s, ν C=O), 1700 (m), 1635 (s, ν Amid I) 1600 (m), 1520 (s, ν Amid II), 1400 (m), 1400 (m, δ C-H), 1340 (m), 1220 (m, br. ν C-O), 1190 (s), 1030 (m), 950 (w), 910 (m), 850 (m), 780 (m), 720 (s, CH₂-rock.) 630 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 0.85 (t, 3H, ³J_(HH) = 7.0 Hz, C(12)H₃), 1.24-1,37 (m, 25H, C(4-11)H₂, -O-C-(CH₃)₃), 1.42 (s; 9H; -COO-C-(CH₃)₃), 1.48 (m, 2H, C(3)H₂), 2.13 (t, 2H, ³J_(HH) = 7.5 Hz, C(2)H₂), 3.65 (m, 2H, CH-CH₂), 4.26 (m, 1H, CH), 7.82 (d, 1H, NH, ³J_(HH) = 7.9 Hz).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 14.49 (C(12)H₃), 22.68 (C(11)H₂), 25.80 (C(10)H₂), 27.6 (-CH₂-O-C-(CH₃)₃), 27.9 (COO-C-(CH₃)₃), 29.24, 29.30, 29.43, 29.56, 29.61, 29.63, 31.90 (C(3-9)H₂), 35.67 (C(2)H₂), 55.13 (CH), 62.06 (CH-CH₂), 72.43 (-CH₂-O-C-(CH₃)₃), 79.92 (C-(CH₃)₃), 171.96 (COOC), 172.89 (CONH).

4.2.9.11 Synthese von *N*-Lauroyl-L-Tyrosin-*t*-butylester (**S**)-19k

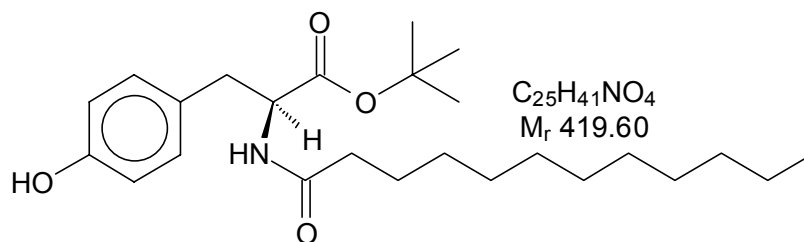
Aus 475mg (2,0 mmol) L-Tyrosin-*t*-butylester (**S**)-13s ($M_r=237,30$) erhielt man nach AVV 7 und 216h Reaktionszeit 760mg (1,64 mmol) = 82% (**S**)-19k als gelbes Öl. Spezifische Aktivität = 3 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,34$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 60°C/5min; 6°C/min; 340°C/10min)

$R_t = 42,3$ min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3500-3200 (s, br., ν O-H phenol), 3420 und 3310 (s, ν N-H Amid), 3040 und 3010 (C-H olef.), 2920 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1720 (s, ν C=O), 1650 (s, ν Amid I), 1620 (m), 1600 (m), 1530 (s, ν Amid II), 1520 (s), 1460 (s), 1450 (s), 1440 (m), 1420 (m, δ C-H), 1350 (m), 1310 (m), 1290 (m), 1220 (s, br. ν C-O), 1180 (m), 1060 (w), 1020 (w), 850 (w), 820 (w), 720 (w, CH₂-rock.), 660 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 0.91 (t, 3H, ³J_(HH) = 7.0 Hz, C(12)H₃), 1.28-1.38 (m, 16H, C(4-11)H₂), 1.40 (s; 9H; C-(CH₃)₃), 1.62 (m, 2H, C(3)H₂), 2.22 (t, 2H, ³J_(HH) = 7.9 Hz, C(2)H₂), 3.03 (m, 1H, CH-CH₂), 3.09 (m, 1H, CH-CH₂), 4.90 (m, 1H, CH), 6.05 (b, 1H, NH), 6.77 (d, 2H, CH=CH-COH, ³J_(HH) = 8.4 Hz), 6.96 (d, 2H, CH=CH-COH, ³J_(HH) = 8.4 Hz).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 14.23 (C(12)H₃), 22.81 (C(11)H₂), 25.71 (C(10)H₂), 27.76 (C-(CCH₃)₃), 29.32, 29.42, 29.47, 29.60, 29.74, 32.04 (C(3-9)H₂), 36.72 (C(2)H₂), 37.43 (CH-CH₂), 53.36 (CH), 80.08 (C-(CH₃)₃), 115.76 (2C, CH=COH), 127.07 (CH=C), 130.37 (2C, C=CH), 155.77 (COH), 171.57 (COOC), 173.54 (CONH).

4.2.9.12 Synthese von N-Lauroyl-L-Valin-*t*-butylester (S)-191

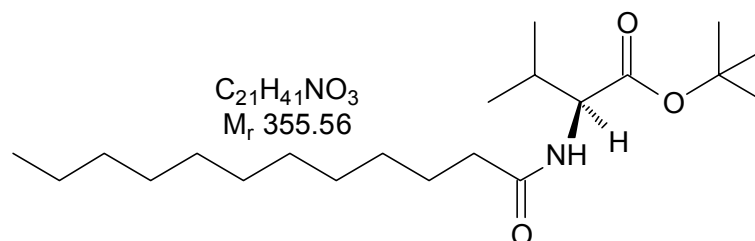
Aus 345mg (2,0 mmol) L-Valin-*t*-butylester (S)-13t (M_r=173,26) erhielt man nach AVV 7 und 144h Reaktionszeit 654mg (1,84 mmol) = 92% (S)-191 als farbloses Öl. Spezifische Aktivität = 9 mU/mg.

DC: (HE / EE: 1:3):

R_f = 0,37

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

R_t = 44,2 min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3300 (s, br., ν N-H Amid), 2940, 2900 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1685 (s, ν C=O, Ester), 1640 (s, ν Amid I), 1530 (s, ν Amid II), 1460 (m, δ C-H), 1430 (m), 1370 (m), 1305 (m), 1265 (m), 1200 (s, br., ν C-O), 1145 (m), 1020 (w), 720 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 0.88 (t; 3 H; $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz; C(12)H₃); 0.97 (m; 6 H; 2 x CH₃); 1.21-1.39 (m; 16 H; C(4-11)H₂); 1.41 (s; 9H; C-(CH₃)₃); 1.64 (m; 2 H; C(3)H₂); 2.18-2.34 (m; 3 H; C(2)H₂ CH-CH-NH); 4.59 (dd; 1 H; $^3J_{\text{HH}} = 4.58$ Hz; $J = 8.65$ Hz; CH-CH-NH); 6.21 (d; 1 H; $^3J_{\text{HH}} = 8.65$ Hz; NH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 14,05 (C(12)H₃); 17,68; 18,93 (2 x CH₃); 22,64 (C(11)H₂); 25,74 (C(10)H₂); 27,4 (C-(CH₃)₃); 29,20; 29,28; 29,29; 29,46; 29,57 (C(4-9)H₂); 31,02 (CH-CH-NH); 31,87 (C(3)H₂); 36,65 (C(2)H₂); 57,04 (CH-CH-NH); 79,87 (C-(CH₃)₃); 172,23 (CONH); 173,16 (COOCC)

4.2.10 Synthese von *N*-Acetylglycin-*t*-butylester (selektive Acetylierung) 14a-2

Dazu wurden 1 mmol (131mg) Gly-OtBu **13j**, 1 mmol (221mg) L-Phe-OtBu (**S**)-**13p**, 1 mmol (237mg) L-Tyr-OtBu (**S**)-**13s**, 1 mmol (187mg) L-Leu-OtBu (**S**)-**13l** und 1 mmol (173mg) L-Val-OtBu (**S**)-**13t** mit 4 ml Essigester (Acyldonor und zugleich Lösungsmittel) gemischt und in Gegenwart von 15mg Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SP 435) bei 70°C acyliert. Nach einer Reaktionszeit von 2,5 h (Umsatz >95% GC) wurde das Enzym abfiltriert und der überschüssige Essigester am Rotationsverdampfer entfernt. Zur Aufreinigung wurde der erhaltene Rückstand in einem Gemisch aus DE/HE 1:4 auf eine kurze Kieselgelsäule gegeben. Die Elution lieferte nach abrotieren des Lösungsmittels 130mg (0,75mmol) = 75 % an **14a-2** als farbloses Öl.

DC: (DE / HE: 1:4):

$R_f = 0,44$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 25,6$ min

Spektroskopische Daten vgl. **14a**

4.2.11 Synthese von *Nε*-Acetyl-L-lysin-*t*-butylester (selektive Acetylierung) (S)-20

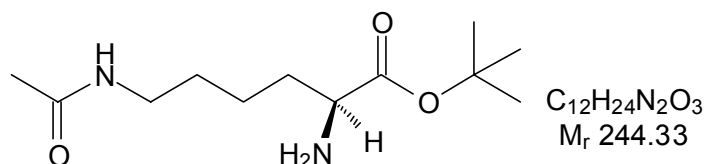
Dazu wurden 1 mmol (202mg) L-Lys-OtBu (**S**)-**13m**, 1 mmol (221mg) L-Phe-OtBu (**S**)-**13p**, 1 mmol (237mg) L-Tyr-OtBu (**S**)-**13s**, 1 mmol (187mg) L-Leu-OtBu (**S**)-**13l** und 1 mmol (173mg) L-Val-OtBu (**S**)-**13t** mit 4 ml Essigester (Acyldonor und zugleich Lösungsmittel) gemischt und in Gegenwart von 20mg Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SP 435) bei 70°C acyliert. Nach einer Reaktionszeit von 4 h (Umsatz >92% GC) wurde das Enzym abfiltriert und der überschüssige Essigester am Rotationsverdampfer entfernt. Zur Aufreinigung wurde der erhaltene Rückstand in einem Gemisch aus DE/HE/EE 1:4:0.5 auf eine kurze Kieselgelsäule gegeben. Die Elution lieferte nach abrotieren des Lösungsmittels 154mg (0,63mmol) = 63 % (**S**)-**20** als farbloses Öl.

DC: (DE/HE/EE: 1:4:0.5):

$R_f = 0,39$

GC: (BPX-5; 100 kPa H₂; 40°C/12min; 6°C/min; 300°C/5min)

$R_t = 33,4$ min

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3340 (s, br., ν N-H Amid), 1630 (s) (ν C=O, COOC);, 1590 (s, ν Amid I), 1510 (s, ν Amid II), 1400 (m), 1300 (w), 1160 (w), 1080 (w), 885 (w), 860 (w), 810 (w), 775 (w), 640 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

$\delta =$ 1.24-1.39 (m; 13H; 9H von C-(CH₃)₃; 4H von -CH-CH₂-CH₂-); 1.77-1.82 (m; 2H; -NH-CH₂-CH₂-); 2.12 (s, 3H, CH₃-CO); 3,23-3,27 (m; 2H; -NH-CH₂-CH₂-); 3.94-3.98 (m; 1H; NH₂-CH-CH₂-) 7.54 (b; 1 H; NH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO d₆ [ppm]):

$\delta =$ 21.6 (CH₃-CO), 22.9 (-CH-CH₂-CH₂-); 27.6 (C-(CH₃)₃); 28.9 (-CH-CH₂-CH₂-); 31.3 (NH-CH₂-CH₂-); 42.8 (NH-CH₂-CH₂-); 54.4 (NH₂-CH-CH₂-); 79.8 (C-(CH₃)₃); 171.7 (CO-NH), 173.2 (-COO-C).

4.2.12 Kontinuierliche enzymatische Acylierung von Gly-OtBu 13j in einem Säulenreaktor

Als Modellreaktion wurde die Acylierung von Gly-OtBu **13j** mit Capronsäuremethylester untersucht. Dazu wurden jeweils Substrat-Acyldonor-Mischungen im Verhältniss 1:10, 1:3 und 1:1 hergestellt und mittels einer Schlauchpumpe über die mit Novozym SP 435 beladene Säule gepumpt. Die enzymatischen Acylierungen wurden bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen und Flußraten durchgeführt (**Tab. 58**). Die bei den Reaktionen erhaltenen Umsätze bei der jeweiligen Temperatur können aus **Tab. 21** entnommen werden.

Tab. 58: Enzymatische Acylierung von Gly-OtBu **13j** in einem Säulenreaktor;;
Mischungsverhältnis, Reaktionszeit und Fluß.

Molverhältnis Substrat:Acyldonor	Mengenverhältnis Substrat:Acyldonor	Zeit [min] / Fluß [ml/min]		
		15 / 0,25	30 / 0,1	85 / 0,06
1:1	8ml:9,7ml	15 / 0,25	30 / 0,1	85 / 0,06
1:3	4ml:14,55ml			
1:10	1,52ml:18,44ml			

4.2.13 Acylase- und Protease-katalysierte Synthesen**4.2.13.1 Hydrolysen von N-Acylaminosäuren mit Acylasen**

Für die Analyse wurden jeweils 1 mmol N-Acylaminosäure in 10 ml 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.8 für *Hog Kidney* Acylase bzw 8.0 für *Aspergillus* Acylase) gelöst. Zu diesen Reaktionsmischungen wurden 10 mg der zu untersuchenden Acylase (*Hog Kidney*,

Aspergillus) gemischt und die entstandene Suspension bei Raumtemperatur gerührt. Der Umsatz wurde nach 2 bzw. 24 Stunden mittels HPLC bestimmt (vgl. **Tab. 23**).

HPLC: RP 8 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 30/70, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor: $R_t = 6,89$ min *N*-Ac-Gly-OH, $R_t = 9,58$ min *N*-Caproyl-Gly-OH

$R_t = 7,13$ min *N*-Ac-L-Ala-OH, $R_t = 10,62$ min *N*-Caproyl-L-Ala-OH

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor: $R_t = 7,69$ min *N*-Lauroyl-L-Ala-OH

4.2.13.2 Enzymatische Acylierung von L-Methionin

Für die Untersuchungen in organischen Medien wurden 3 mmol (448mg) L-Methionin mit 3 mmol (246mg) Natriumacetat in 10 ml DMF bzw. Dioxan suspendiert. Der Wasseranteil wurde mit 100, 200, 300 bzw. 400 µl zwischen 1% bis zu 4% eingestellt. Zu diesen Reaktionsmischungen wurden zur Enzymaktivierung 10 µM (1,5mg) ZnCl₂ sowie 10 mg der zu untersuchenden Acylase (*Hog Kidney*, *Aspergillus*, *Aspergillus mellus*, *Aspergillus species*) gemischt. Nach 24 und 48 Stunden Reaktionszeit bei 37°C wurden 100 µl Proben entnommen und mittels HPLC untersucht (Umsätze vgl. **Tab. 24**). Das Reaktionsprodukt *N*-Acetyl-L-methionin wurde durch Coinjektionsexperimente nachgewiesen.

HPLC: RP 8 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 25/75, flow 0,3 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor: $R_t = 7,24$ min *N*-Ac-L-Met-OH,

Für die Untersuchungen in Puffersystemen wurden 3 mmol (448mg) L-Methionin mit 3 mmol (246mg) Natriumacetat, 3 mmol (330mg) Natriumbutyrate, 3 mmol (414mg) Natriumcaprylate in 10 ml Natriumphosphat-Puffer (200 mM; pH 7.0) gelöst. Zu diesen Reaktionsmischungen wurden zur Enzymaktivierung 10 µM (1,5mg) ZnCl₂ sowie 10 mg der zu untersuchenden Acylase (*Hog Kidney*, *Aspergillus*, *Aspergillus mellus*, *Aspergillus species*) gemischt. Nach 24, 48 und 72 Stunden Reaktionszeit bei 37°C wurden 100 µl Proben entnommen und mittels HPLC untersucht (Umsätze vgl. **Tab. 25**). Die Reaktionsprodukte wurden durch Coinjektionsexperimente nachgewiesen.

HPLC: RP 8 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 25/75, flow 0,3 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor: $R_t = 7,24$ min *N*-Ac-L-Met-OH, $R_t = 10,37$ min *N*-Butyl-L-Met-OH

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 50/50, flow 0,3 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor: $R_t = 8,18$ min *N*-Caproyl-L-Met-OH

4.2.13.3 Penicillin Acylasen katalysierte Acylierung von Diaminosäure-mono- und diester

Für die Analysen wurden jeweils 3 mmol der Diaminosäureester (mono- bzw. diester) mit 6 mmol (956µl) Phenylacetyl-L-glutamat in 5ml eines Gemisches (60/40 v/v) aus Methanol und 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer (pH 8,0/20 mM Na₂HPO₄) gelöst. Zu diesen Reaktionsmischungen wurden 20 mg der zu untersuchenden immobilisierten Acylase (Penicillin Acylase, Penicillin G Acylase) zugesetzt. Nach jeweils 24-144 Stunden Reaktionszeit bei 25°C wurden 100 µl Proben entnommen und mittels HPLC untersucht (vgl.

Tab. 59). Bei Reaktionsansätzen mit freien Aminosäuren wurden keine Produkte beobachtet (vgl. **Tab. 26**).

Tab. 59: Acylierung von Diaminosäureester mit Phenyllessigsäureethylester in Gegenwart von immobilisierten Penicillin Acylasen.

Substrat / Menge [3 mmol]	Enzym	Produkt	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]
L-Asp-OBzl / 670mg	PGA	(S)-21a	48	18
	PA	(S)-21b	48	15
L-Asp(OBzl)-OBzl*p-Ts / 1,45g	PGA	(S)-22a	48	64
	PA	(S)-22b	48	58
L-Glu-OBzl / 712mg	PGA	(S)-23a	48	12
	PA	(S)-23b	48	9

HPLC: RP 18 Gradientenelution : A): MeCN (0,1% TFA); B): H₂O (0,1% TFA); flow 1,0 ml/min, Injektionsvol. 20µl, UV-Detektor 254 nm; Gradient: 20% bis 70% A in 25 min.

R_t = 7,26 min *N*-PhAc-L-Asp-OBzl, R_t = 7,59 min *N*-PhAc-L-Glu-OBzl,

4.2.13.4 Penicillin Acylasen katalysierte Synthese von *N*-PhAc-L-Asp(OBzl)-OBzl (**S**)-**22a**

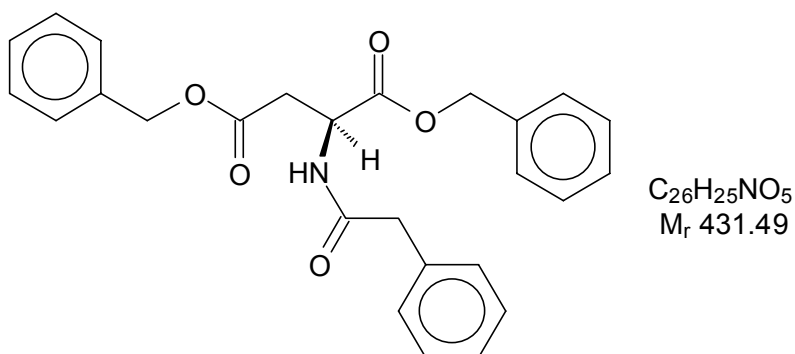
Dazu wurde die in **Tab. 59** beschriebene Reaktion nach 48 h Reaktionszeit vom Enzym filtriert, die wässrige Phase mit 2N Essigsäure angesäuert und dreimal mit Essigester extrahiert. Nach dem Trocknen über MgSO₄ wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie an Kieselgel (HE/EE: 2:1) gereinigt. So erhält man 1,37g (3,18mmol) 53% (**S**)-**22a** als farbloses Öl.

DC: (HE/EE: 2:1):

R_f = 0,36

HPLC: RP 18 Gradientenelution : A): MeCN (0,1% TFA); B): H₂O (0,1% TFA); flow 1,0 ml/min, Injektionsvol. 20µl, UV-Detektor 254 nm; Gradient: 20% bis 70% A in 25 min.

R_t = 15,87 min *N*-Phenylacetyl-L-Asp(OBzl)-OBzl



IR (Film, [cm⁻¹]):

ν = 3280 (s, br., ν N-H Amid), 3060 und 3020 (m, ν C-H arom.), 2940, 2900 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1730 (s, ν C=O), 1695 (s), 1630 (s, ν Amid I), 1530 (s, ν Amid II), 1440 (m, δ C-H), 1280 (m), 1200 (m), 690 (δ C=C arom.).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 2.16 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, HN-CH-CH_2), 3.58 (s, 2H, $\text{CO-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.01-4.07 (m, 1H, HN-CH-CH_2), 5.19 (s, 4H, 2 x $\text{CH}_2\text{-O-}$), 7.16-7.39 (m, 15H, 3 x C_6H_5).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 36.3 (HN-CH-CH_2), 39.8 ($\text{CO-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 52.6 (HN-CH), 67,5 ($-\text{CH}_2\text{-O}$), 68,9 ($-\text{CH}_2\text{-O}$), 126.9, 127.1 (C(4) von $-\text{C}_6\text{H}_5$), 127.8, 128.1, 128.5 (C(3,5) von $-\text{C}_6\text{H}_5$), 128.6, 129.1 (C(2,6) von $-\text{C}_6\text{H}_5$); 136.4; 136,8 (C(1) von $-\text{C}_6\text{H}_5$) alle Aromaten nicht vollständig aufgelöst 171,4 (CH-COO-), 172,0 ($\text{CH}_2\text{-COO-}$), 174.2 (NH-CO-).

4.2.13.5 Hydrolysen von *N*-Acylaminosäuren mit Proteasen

Für die Analyse wurden jeweils 1 mmol *N*-Acylaminosäure in 10 ml 0.1 M Phosphatpuffer (pH 6.5 für *Papain*, pH 8.0 für α -*Chymotrypsin* bzw 7.5 für *Subtilisin*) gelöst. Zu diesen Reaktionsmischungen wurden 10 mg der zu untersuchenden Protease (*Papain*, α -*Chymotrypsin*, *Subtilisin*) gemischt und die entstandene Suspension bei Raumtemperatur gerührt. Der Umsatz wurde 12, 24 bzw. 48 Stunden mittels HPLC bestimmt (vgl. **Tab. 27**).

HPLC: RP 8 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 30/70, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20 μ l, 45°C

Streulichtdetektor: $R_t = 6,89$ min *N*-Ac-Gly-OH, $R_t = 9,58$ min *N*-Caproyl-Gly-OH

$R_t = 7,13$ min *N*-Ac-L-Ala-OH, $R_t = 10,62$ min *N*-Caproyl-L-Ala-OH

$R_t = 7,58$ min *N*-Ac-L-Phe-OH

4.3 Lipasen-katalysierte Acylierung von freien Aminosäuren**4.3.1 Solubilisierung von Aminosäuren mit Phasentransferkatalysatoren**

Dazu wurde 10 mmol (1,65g) Tetrabutylammoniumchlorid mit 10 mmol (2,22g) Natriumlaurat in 30 ml Essigester gelöst und das Gemisch 2 mal mit Wasser extrahiert. Nach dem Trocknen über MgSO_4 und abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer konnte 3,13g (9,5mmol) 95% Tetrabutylammoniumlaurat (M_r 329,5) als gelbliches zähes Öl erhalten werden. Für die enzymatischen Acylierungen wurde nun 1 mmol Aminosäure mit 1 mmol (330mg) Tetrabutylammoniumlaurat in 4 ml 2-Methyl-2-butanol gelöst und durch Zugabe von 20 mg *Candida antarctica* (Novozym SP 435) die Reaktion bei 70°C im Schüttler (600U/min) gestartet. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt. Die folgende **Tab. 60** gibt die eingesetzten Aminosäuren, Retentionszeiten und die Umsätze (HPLC) nach 4 Tagen Reaktionszeit wieder.

Tab. 60: Lipase-katalysierte Acylierung von Aminosäuren-Phasentranspherkatalysator-Kontaktionenpaare; Umsatz, R_t .

Aminosäure / Einwaage	Produkt	Umsatz [%]	R_t^a [min]
Glycin / 75 mg	<i>N</i> -Lauroyl-Gly-OH 24	8	5.9
DL-Alanin / 89 mg	<i>N</i> -Lauroyl-DL-Ala-OH (±)-25	8	7.1
DL-Phenylalanin / 165 mg	<i>N</i> -Lauroyl-DL-Phe-OH (±)-26	17	7.6

a) HPLC: RP 18 MeCN/H₂O 95/5, flow 0.5 ml/min, 45°C Streulichtdetektor.

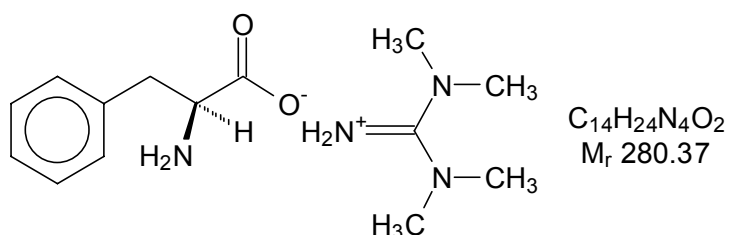
4.3.2 Solubilisierung von Aminosäuren mit TMG: NMR-Studien

Für diese Analysen wurde jeweils 1 mmol der entsprechenden Aminosäure mit 1 mmol (115 mg) TMG in verschiedenen deuterierten Lösungsmitteln suspendiert und 10 min bei 800 U/min geschüttelt. Danach wurde filtriert der Überstand mittels NMR analysiert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und ausgewogen. Die folgende **Tab. 61** gibt die eingesetzten Aminosäuren, die verwendeten Lösungsmittel, die Auswaage und die entsprechende Löslichkeit wieder.

Tab. 61: Solubilisierung von Aminosäuren mit TMG: NMR-Studien.

Aminosäure	Einwaage	Lösungsmittel	Auswaage	Löslichkeit im Verhältnis zu TMG [%]
Glycin	75mg	CD ₂ Cl ₂	75mg	unlöslich
		Methanol-d ₄	67mg	< 10
		Aceton-d ₆	74mg	unlöslich
		DMSO-d ₆	71mg	< 5
L-Phenylalanin	165mg	CD ₂ Cl ₂	157mg	< 5
		Methanol-d ₄	50mg	65-70
		Aceton-d ₆	158mg	< 5
		DMSO-d ₆	149mg	< 10
L-Tryptophan	204mg	CD ₂ Cl ₂	194mg	< 5
		Methanol-d ₄	82mg	55-60
		Aceton-d ₆	195mg	< 5
		DMSO-d ₆	194mg	< 5
L-Valin	117mg	CD ₂ Cl ₂	117mg	unlöslich
		Methanol-d ₄	88mg	20-25
		Aceton-d ₆	116	unlöslich
		DMSO-d ₆	111	< 5

4.3.2.1 Spektroskopische Daten von L-Phenylalanin-TMG-Kontaktionenpaar (S)-27a

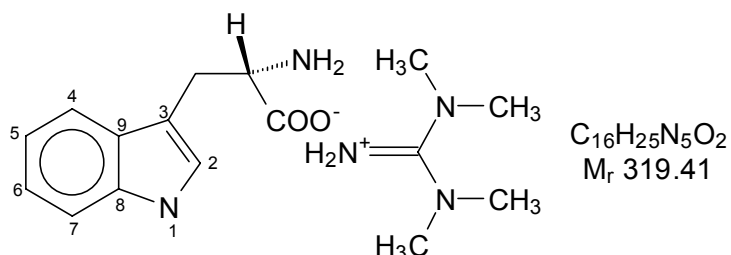


$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CD_3OD [ppm]):

$\delta =$ 2.72-2.81 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 2.93 (s, 12H, 2 x $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.09-3.17 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 3.42-3.49 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 7.21-7.32 (m, 5H, C_6H_5).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CD_3OD [ppm]):

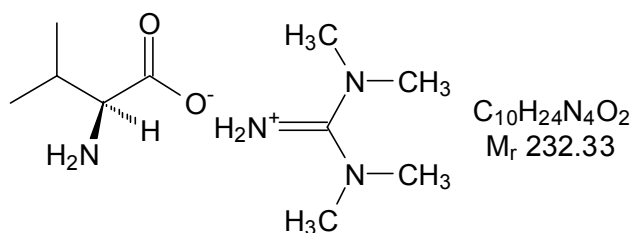
$\delta =$ 39.95 ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 42.66 ($\text{CH}_2\text{-CH}$), 58.91 ($\text{CH}_2\text{-CH}$), 127.38 (C(4) von $-\text{C}_6\text{H}_5$), 129.43 (C(3,5) von $-\text{C}_6\text{H}_5$), 130.49 (C(2,6) von $-\text{C}_6\text{H}_5$); 140.19 (C(1) von $-\text{C}_6\text{H}_5$), 163.23 ($\text{H}_2\text{N}=\text{C}(\text{N}_2(\text{CH}_3)_4)$), 180.69 (CH-COO-).

4.3.2.2 Spektroskopische Daten von L-Tryptophan-TMG-Kontaktionenpaar (S)-27b **$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CD_3OD [ppm]):**

$\delta =$ 2.76 (s, 12H, 2 x $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.86-2.98 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 3.29-3.37 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 3.52-3.61 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 6.92-7.01 (m, 1H $\text{CH}=\text{CH}(5)$), 7.03-7.10 (m, 1H $\text{CH}=\text{CH}(6)$), 7.13 (s, 1H, $\text{CH-NH}(2)$), 7.33 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7,9\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}(7)$), 7.67 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7,9\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}(4)$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CD_3OD [ppm]):

$\delta =$ 30.52 ($\text{CH}_2\text{-CH}$), 39.78 ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 58.04 (CH-NH_2), 112.36 ($\text{CH}(3)$), 112.51 ($\text{CH}(7)$), 119.64 ($\text{CH}(4)$), 122.33 ($\text{CH}(6)$), 124.63 ($\text{CH}(5)$), 129.08 ($\text{CH}(9)$), 138.22 ($\text{CH}(8)$), 163.12 ($\text{H}_2\text{N}=\text{C}(\text{N}_2(\text{CH}_3)_4)$), 181.71 (CH-COO-).

4.3.2.3 Spektroskopische Daten von L-Valin-TMG-Kontaktionenpaar (S)-27c **$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CD_3OD [ppm]):**

$\delta =$ 0.88 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6,9\text{ Hz}$; $\text{CH}_3\text{-CH}$), 0.96 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6,9\text{ Hz}$; $\text{CH}_3\text{-CH}$), 1.93-2.07 (m, 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$), 2.97 (s, 12H, 2 x $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.01 (m, 1H, CH-NH_2),

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CD_3OD [ppm]):

$\delta =$ 17.77 ($\text{CH}_3\text{-CH}$), 20.37 ($\text{CH}_3\text{-CH}$), 33.32 ($(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$), 39.99 ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 63.25 (CH-NH_2), 163.53 ($\text{H}_2\text{N}=\text{C}(\text{N}_2(\text{CH}_3)_4)$), 181.44 (CH-COO-).

4.3.2.4 Synthese von *N*-Caproyl-DL-Phenylalanin (TMG-Kontaktionenpaar) (\pm)-28

Dazu wurde 5 mmol (825 mg) DL-Phenylalanin mit 25 mmol (mg) TMG und 15 mmol (2.2ml) Capronsäuremethylester in 10 ml mono-Glyme gelöst. Nach Zugabe von 100 mg Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SP 435) wurde die Reaktion bei 70°C im Schüttler (600U/min) gestartet. Nach einer Reaktionszeit von 6 Tagen wurde vom Enzym abfiltriert und das Filtrat mit 2 N HCl extrahiert. Die wässrige Phase wurde 3 mal mit 30 ml Essigester ausgeschüttelt und nach dem Trocknen über MgSO₄ vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in wenig Essigester aufgenommen und mittels Säulenchromatographie (Eluent: Hexan : Essigester =1:4) gereinigt. Die Elution lieferte nach abrotieren des Lösungsmittels 290mg (1,1mmol) 22% (\pm)-28 als farblosen Feststoff.

Schmp.: 108-110°C

DC: (HE / EE: 1:4):

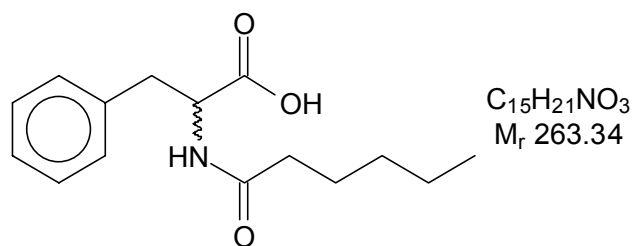
$R_f = 0,31$

Berechnet: C (68.42); H (8.04); N (5.32)

Gefunden: C (68.26); H (8.18); N (5.07)

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20 μ l, 45°C

Streulichtdetektor: $R_t = 4,87$ min *N*-Caproyl-DL-Phe-OH



IR (KBr-Pressling, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3400-2800 (s, br., ν O-H Säure), 3320 (s, br., ν N-H Amid), 3060 und 3020 (w, ν C-H arom.), 2920 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1705 (s, ν C=O), 1600 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1470 (m, δ C-H), 1240 (m, ν C-O), 1120(m), 1050 (m), 950(m), 830 (m), 750 (m, CH₂-rock.), 690 (s), 630(m).

¹H-NMR (400.132 MHz, CD₃OD [ppm]):

$\delta =$ 0.84 (t; 3 H; ³J_{HH} = 7.3 Hz; C(6)H₃); 1.10-1.30 (m; 4 H; C(4+5)H₂); 1.47 (m; 2 H; C(3) H₂); 2.12 (t; 2 H; ³J = 7.1 Hz; C(2)H₂); 2.92 (dd; 1 H; ³J_{HH} = 9.7 Hz, ³J_{HH} = 14.2 Hz; CH₂-CH); 3.20 (dd; 1 H; ³J_{HH} = 5.1 Hz, ³J_{HH} = 13,7 Hz; CH₂-CH); 4,66 (dd; 1 H; ³J_{HH} = 9.4 Hz, ³J_{HH} = 4.8 Hz; CH₂-CH); 7.14-7.28 (m; 5 H; -C₆H₅)

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CD₃OD [ppm]):

$\delta =$ 14,21 (C(6)H₃), 23,37 (C(5)H₂); 26,54 (C(4)H₂); 32,30 (C(3)H₂); 36,76 (C(2)H); 38,42 (CH₂-CH); 54,83 (CH₂-CH); 127,73 (C(4) von -C₆H₅), 129,39 (C(3,5) von -C₆H₅), 130,22 (C(2,6) von -C₆H₅); 138,57 (C(1) von -C₆H₅), 174,82 (NH-CO), 176,13 (COOH).

4.3.2.5 Synthese von Capronsäurebenzylamid aus DL-Phenylglycin-TMG-

Kontaktionenpaar 29

Dazu wurde 5 mmol (776 mg) DL-Phenylglycin mit 25 mmol (mg) TMG und 15 mmol (2,2ml) Capronsäuremethylester in 10 ml mono-Glyme gelöst. Nach Zugabe von 100 mg Lipase aus *Candida antarctica* (Novozym SP 435) wurde die Reaktion bei 70°C im Schüttler (600U/min) gestartet. Nach einer Reaktionszeit von 6 Tagen wurde vom Enzym abfiltriert und das Filtrat mit 2 N HCl extrahiert. Die wässrige Phase wurde 3 mal mit 30 ml Essigester ausgeschüttelt und nach dem Trocknen über MgSO₄ vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in wenig Essigester aufgenommen und mittels Säulenchromatographie (Eluent: Hexan : Essigester =1:2) gereinigt. Die Elution lieferte nach abrotieren des Lösungsmittels 472mg (2,3mmol) 46% **29** als farblosen Feststoff.

Schmp.: 53-55°C Lit.¹⁹⁴: 54-55°C

DC: (HE / EE: 1:2):

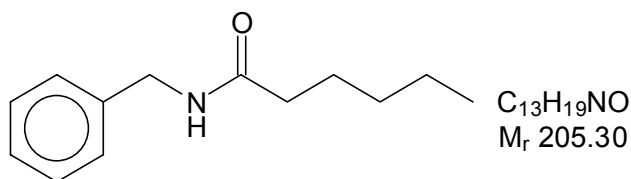
R_f = 0,42

Berechnet: C (76.06); H (9.33); N (6.82)

Gefunden: C (75.15); H (9.19); N (7.01)

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor: R_t = 15.57 min Capronsäurebenzylamid



IR (KBr-Pressling, [cm⁻¹]):

ν = 3300 (s, br., ν N-H Amid), 3060 und 3020 (m, ν C-H arom.), 2960, 2900 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1700 (s, ν C=O), 1610 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1490 (s), 1460 (m, δ C-H), 1445 (m), 1260 (s), 1235 (m, ν C-O), 1185 (m), 1130 (m), 980 (m), 720 (m, CH₂-rock.), 690 (s).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 0.84 (t; 3 H; ³J_{HH} = 7.0 Hz; C(6)H₃); 1.16-1.28 (m; 4 H; C(4+5)H₂); 1.47-1.54 (m; 2 H; C(3) H₂); 2.10 (t; 2 H; ³J = 7.5 Hz; C(2)H₂); 4.23 (d, 2H, ³J_{HH}=5.9 Hz, -CH₂-NH), 7.17-7.29 (m, 5H, C₆H₅), 8.23 (s,b, 1H, CH₂-NH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 13.75 (C(6)H₃), 21.76 (C(5)H₂); 24.93 (C(4)H₂); 30.85 (C(3)H₂); 35.27 (C(2)H); 41.93 (-CH₂-NH), 126.56 (C(4) von -C₆H₅), 127.08 (C(3,5) von -C₆H₅), 128.12 (C(2,6) von -C₆H₅); 139.71 (C(1) von -C₆H₅), 172,06 (NH-CO).

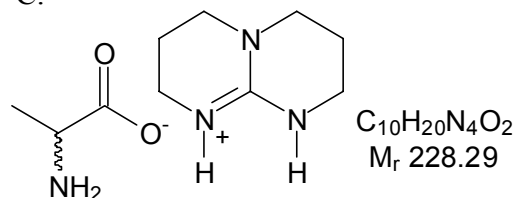
Ms (70eV):

m/z (%) = 205 (96.6) [M⁺], 176 (17.4) [M⁺-C₂H₅], 162 (56.6) [M⁺-C₃H₇], 134 (6.4) [M⁺-C₅H₁₁], 176 (4.6) [M⁺-O-C₅H₁₁], 106 (91.7) [M⁺-CO-C₅H₁₁], 91 (100) [H₃C-C₆H₅], 77 (16.4) [C₆H₅], typische Massenfragmente für Alkylketten: 99 (5.8), 71 (5.0), 43 (88.0), weitere 55 (9.7), 65 (20.3), 149 (94.0).

4.3.3 Bildung von Aminosäure-TBD-Kontaktionenpaaren

4.3.3.1 Synthese von D- bzw. L-Alanin-TBD-Kontaktionenpaar (*S*)-30a, (*R*)-30a

Aus 1.34g (15 mmol) D- bzw. L-Alanin erhielt man mit 2.09g (15 mmol) TBD nach AVV 8 3.43g (15 mmol, quantitativ) D- (*R*)-30a bzw. L-Alanin-TBD (*S*)-30a als farblose hykroskopische Kristalle mit einem Schmp. von 69-71°C.



¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

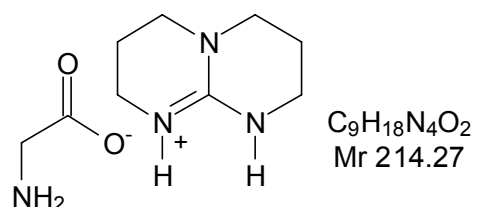
$\delta =$ 1.02 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, CH₃-CH), 1.72-1.85 (m, 4H, 2x NH-CH₂-CH₂), 2.94 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 13.7$ Hz, CH₃-CH-NH₂), 3.09 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, CH₂-N-CH₂), 3.20 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, 2x CH₂-NH-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 20.54 (CH₃-CH), 22.34 (NH-CH₂-CH₂), 37.07 (CH₂-N-CH₂), 46.04 (NH-CH₂-CH₂), 51.51 (CH₃-CH), 151.34 (N=C-N), 181.45 (COOH).

4.3.3.2 Synthese von Glycin-TBD-Kontaktionenpaar 30b

Aus 1.12g (15 mmol) Glycin erhielt man mit 2.09g (15 mmol) TBD nach AVV 8 3.21g (15 mmol, quantitativ) Glycin-TBD 30b als farblose hykroskopische Kristalle mit einem Schmp. von 57-59°C.



¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

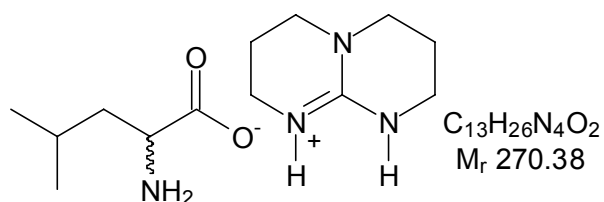
$\delta =$ 1.55-1.61 (m, 4H, 2x NH-CH₂-CH₂), 2.78 (s, 2H, -CH₂-NH₂), 2.81-3.34 (m, 8H, CH₂-N-CH₂, 2x CH₂-NH-).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 20.09 (NH-CH₂-CH₂), 36.69 (CH₂-N-CH₂), 45.31 (NH-CH₂-CH₂), 45.89 (NH₂-CH₂), 150.67 (N=C-N), 179.80 (COOH).

4.3.3.3 Synthese von D- bzw. L-Leucin-TBD-Kontaktionenpaar (*R*)-30c, (*S*)-30c

Aus 1.31g (10 mmol) D- bzw. L-Leucin erhielt man mit 1.39g (10 mmol) TBD nach AVV 8 2.70g (10 mmol, quantitativ) D- (*R*)-30c bzw. L-Leucin-TBD (*S*)-30c als farblose hykroskopische Kristalle mit einem Schmp. von 77-78°C.

 **$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):**

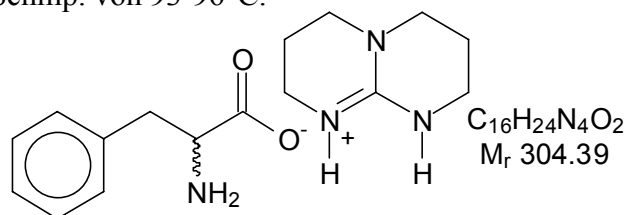
$\delta =$ 0.78 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2$), 0.82 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2$), 1.05-1.12 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2$), 1.34-1.40 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2$), 1.64-1.72 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2$), 1.74-1.85 (m, 4H, 2x $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.85 (q, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH-NH}_2$), 3.09 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$), 3.20 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, 2x $\text{CH}_2\text{-NH-}$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 20.50 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$), 21.79 ($\text{CH}_3\text{-CH}$), 23.47 ($\text{CH}_3\text{-CH}$), 24.44 ($\text{CH}_3\text{-CH}$), 36.99 (CH-CH_2), 45.59 ($\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$), 46.00 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$), 54.31 ($\text{NH}_2\text{-CH}$), 151.35 (N=C-N), 181.45 (COOH).

4.3.3.4 Synthese von D- bzw. L-Phenylalanin-TBD-Kontaktionenpaar (*R*)-30d, (*S*)-30d

Aus 1.65g (10 mmol) D- bzw. L-Phenylalanin erhielt man mit 1.39g (10 mmol) TBD nach AVV 8 3.04g (10 mmol, quantitativ) D- (*R*)-30d bzw. L-Phenylalanin-TBD (*S*)-30d als farblose hykroskopische Kristalle mit einem Schmp. von 93-96°C.

 **$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, Aceton- d_6 [ppm]):**

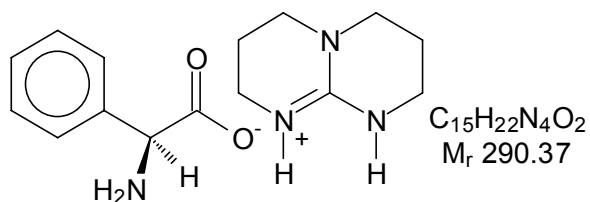
$\delta =$ 1.92-2.02 (m, 4H, 2x $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.53-2.59 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 2.87-2.92 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 3.14-3.32 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$, 2x $\text{CH}_2\text{-NH-}$), 4.01-4.05 (m, 1H, -CH-NH_2), 7.14-7.23 (m, 5H, C_6H_5).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, Aceton- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 22.32 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$), 38.75 ($\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$), 44.35 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$), 47.96 ($\text{NH}_2\text{-CH}$), 70.23 (CH-CH_2), 126.64 (C(4) von $\text{-C}_6\text{H}_5$), 127.01 (C(3,5) von $\text{-C}_6\text{H}_5$), 128.78 (C(2,6) von $\text{-C}_6\text{H}_5$); 142.27 (C(1) von $\text{-C}_6\text{H}_5$), 153.27 (N=C-N), 183.03 (COOH).

4.3.3.5 Synthese von L-Phenylglycin-TBD-Kontaktionenpaar (*S*)-30e

Aus 1.51g (10 mmol) L-Phenylglycin erhielt man mit 1.39g (10 mmol) TBD nach AVV 8 2.90g (10 mmol, quantitativ) L-Phenylglycin-TBD (*S*)-30e als farblose hykroskopische Kristalle mit einem Schmp. von 90-92°C.

 **$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, Aceton- d_6 [ppm]):**

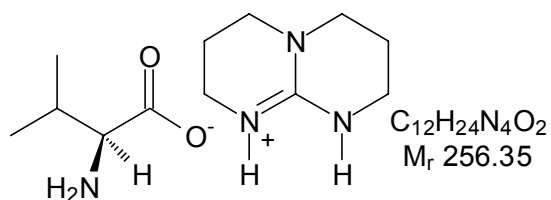
$\delta =$ 1.83-1.89 (m, 4H, 2x NH-CH $_2$ -CH $_2$), 3.11 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, CH $_2$ -N-CH $_2$), 3.23 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, 2x CH $_2$ -NH-), 4.20 (s, 1H, -CH-NH $_2$), 7.11-7.58 (m, 5H, C $_6$ H $_5$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, Aceton- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 22.29 (NH-CH $_2$ -CH $_2$), 38.77 (CH $_2$ -N-CH $_2$), 47.90 (NH-CH $_2$ -CH $_2$), 62.60 (NH $_2$ -CH), 127.08 (C(4) von -C $_6$ H $_5$), 128.45 (C(3,5) von -C $_6$ H $_5$), 128.95 (C(2,6) von -C $_6$ H $_5$); 147.72 (C(1) von -C $_6$ H $_5$), 153.18 (N=C-N), 180.28 (COOH).

4.3.3.6 Synthese von L-Valin-TBD-Kontaktionenpaar (S)-30f

Aus 1.17g (10 mmol) L-Valin erhielt man mit 1.39g (10 mmol) TBD nach AVV 8 2.56g (10 mmol, quantitativ) L-Valin-TBD (S)-30f als farblose hykroskopische Kristalle mit einem Schmp. von 74-76°C.

 **$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):**

$\delta =$ 0.69 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, CH $_3$ -CH-CH), 0.80 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, CH $_3$ -CH-CH $_2$), 1.79-1.87 (m, 5H, 2x NH-CH $_2$ -CH $_2$, CH $_3$ -CH-CH), 2.72 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.2$ Hz, CH-CH-NH $_2$), 3.09 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, CH $_2$ -N-CH $_2$), 3.20 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, 2x CH $_2$ -NH-).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 17.02 (CH $_3$ -CH), 20.19 (CH $_3$ -CH), 20.53 (CH $_3$ -CH), 31.66 (NH-CH $_2$ -CH $_2$), 37.04 (CH $_2$ -N-CH $_2$), 46.02 (NH-CH $_2$ -CH $_2$), 61.27 (NH $_2$ -CH), 151.34 (N=C-N), 180.21 (COOH).

4.3.4 Enzymatische Acylierungen von Aminosäure-TBD-Kontaktionenpaaren**4.3.4.1 Synthese von N-Caproyl-D- bzw. L-alanin (TBD-Komplexierung) (R)-31a, (S)-31a**

Aus 685 mg (3 mmol) L-Alanin-TBD-Kontaktionenpaar (S)-30a (M=228.29) erhielt man nach der AVV 9 mit Capronsäuremethylester als Acyldonor und 6 Tagen Reaktionszeit 315mg (1.68mmol) 56% (S)-31a als farbloser Feststoff. Aus 685 mg (3 mmol) D-Alanin-TBD-Kontaktionenpaar (R)-30a erhielt man nach der AVV 8 mit Capronsäuremethylester als

Acyldonor und 6 Tagen Reaktionszeit 331mg (1.77mmol) 59% **(R)-31a** als farbloser Feststoff. Säulenchromatographische Reinigung HE/EE 1:2.

Schmp.: 83-84°C

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,31$

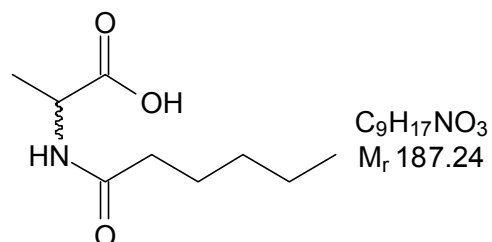
HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 90/10, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 7,96$ min

Drehwert: *N*-C₆-L-Ala-OH $[\alpha]_D^{20} = -4,4^\circ$ (c=1,0 EtOH)

Drehwert: *N*-C₆-D-Ala-OH $[\alpha]_D^{20} = +4,3^\circ$ (c=1,0 EtOH)



IR (KBr-Pressling, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3400-2600 (s, br., ν O-H Säure), 3320 (s, br., ν N-H Amid), 2980 (s, ν C-H aliph.), 1720 (s, ν C=O), 1650 (s, ν Amid I), 1550 (s, ν Amid II), 1470 (m, δ C-H), 1430 (s), 1250 (m, ν C-O) 1210 (m), 1180 (m), 1160 (m), 930 (m), 910 (m), 640(m).

¹H-NMR (400.132 MHz, CD₃OD [ppm]):

$\delta =$ 0.89 (t; 3 H; J = 6.87 Hz; $\underline{CH}_3(6)$); 1.25-1.39 (m; 7H; $\underline{CH}_2(5+4)$, \underline{CH}_3 -CH); 1.59 (m; 2 H; $\underline{CH}_2(3)$); 2.20 (t; 2 H; $^3J_{HH}=7.5$ Hz, $\underline{CH}_2(2)$); 4.36 (m; 1 H; \underline{CH} -NH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CD₃OD [ppm]):

$\delta =$ 14.24 ($\underline{CH}_3(6)$), 17.62 (\underline{CH}_3 -CH), 23.39 ($\underline{CH}_2(5)$), 26.53 ($\underline{CH}_2(4)$), 32.43 ($\underline{CH}_2(3)$), 36.70 ($\underline{CH}_2(2)$), 176.11 (NH- \underline{CO}), 176.17 (\underline{COOH}).

4.3.4.2 Synthese von *N*-Lauroyl-L-alanin (TBD-Komplexierung) **(S)-31b**

Aus 685 mg (3 mmol) L-Alanin-TBD-Kontaktionenpaar **(S)-30a** (M=228.29) erhielt man nach der AVV 8 mit Laurinsäuremethylester als Acyldonor und 10 Tagen Reaktionszeit 350mg (1.29mmol) 43% **(S)-31b** als farbloser Feststoff. Säulenchromatographische Reinigung HE/EE 1:1.

Schmp.: 103-105°C

DC: (HE / EE: 1:1):

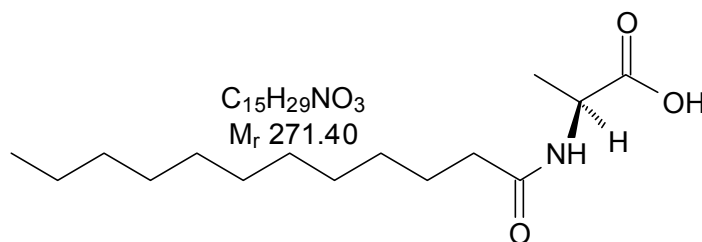
$R_f = 0.36$

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 7.16$ min

Drehwert: *N*-C₁₂-L-Ala-OH $[\alpha]_D^{20} = -4,2^\circ$ (c=1,0 EtOH)

**IR (KBr-Pressling, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3400-2800 (s, br., ν O-H Säure), 3120 (s, br., ν N-H Amid), 2920 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1700 (s, ν C=O), 1680 (s, ν Amid I), 1530 (s, ν Amid II), 1420 (m, δ C-H), 1380 (w), 1340 (w), 1250 (m, ν C-O), 920(w), 710 (w, CH₂-rock.).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 0.86 (t; 3 H; $^3J_{(HH)} = 7.0\text{Hz}$; C(12)H₃); 1.22-1.36 (m; 16 H; C(11-7)H₂); 1.45 (d; 3 H; $^3J_{(HH)} = 7.6\text{Hz}$; CH₃-CH); 1.64 (m; 2 H; C(3)H₂); 2.25 (t; 2 H; $^3J_{(HH)} = 7.5\text{ Hz}$; C(2)H₂); 4.18 (m; 1 H; CH₃-CH); 6.87 (d; 1H; $^3J_{(HH)} = 7.1\text{ Hz}$; NH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 14,04 (C(12)H₃); 18,10 (CH₃-CH); 22,63 (C(11)H₂); 25,57 (C(10)H₂); 29,15; 29,26; 29,28; 29,43; 29,56; (C(4-9)H₂); 31,87 (C(3)H₂); 36,41 (C(2)H₂); 48,22 (CH₃-CH); 174,19 (NH-CO-); 175,52 (-COOH)

4.3.4.3 Synthese von N-Caproylglycin (TBD-Komplexierung) 31c

Aus 643 mg (3 mmol) Glycin-TBD-Kontaktionenpaar **30b** (M=214.27) erhielt man nach der AVV 8 mit Capronsäuremethylester als Acyldonor und 6 Tagen Reaktionszeit 234mg (1.35mmol) 45% **31c** als farbloser Feststoff. Säulenchromatographische Reinigung HE/EE 1:2.

Schmp.: 88-90°C

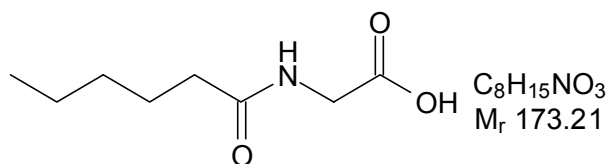
DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,28$

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 90/10, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20 μ l, 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 7,46\text{ min}$

**IR (KBr-Pressling, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3400-2700 (s, br., ν O-H Säure), 3300 (s, br., ν N-H Amid), 2980, 2900 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1700 (s, ν C=O), 1640 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1460 (m, δ C-H), 1410 (m), 1390 (w), 1240 (m, ν C-O), 860 (w), 720 (w, CH₂-rock.), 670 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, CD₃OD [ppm]):

$\delta =$ 0.89 (t; 3 H; $^3J_{HH} = 6.87\text{ Hz}$; CH₃(6)); 1.31 (m; 4 H; CH₂(5+4)); 1.61 (m; 2 H; CH₂(3)); 2.22 (t; 2 H; $^3J_{HH} = 7.5\text{ Hz}$, CH₂(2)); 3.87 (s; 2H; CH₂-NH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CD_3OD [ppm]):

$\delta =$ 14.23 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3(6)$), 23.38 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(5)$), 26.48 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(4)$), 32.42 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(3)$), 36.76 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2(2)$), 41.74 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-NH}$), 173.11 ($\text{NH-}\underline{\text{C}}\text{O}$), 176.77 ($\underline{\text{C}}\text{OOH}$).

4.3.4.4 Synthese von *N*-Lauroylglycin (TBD-Komplexierung) **31d**

Aus 643 mg (3 mmol) Glycin-TBD-Kontaktionenpaar **30b** ($M=214.27$) erhielt man nach der AVV 8 mit Laurinsäuremethylester als Acyldonor und 10 Tagen Reaktionszeit 309mg (1.20mmol) 40% **31d** als farbloser Feststoff. Säulenchromatographische Reinigung HE/EE 1:1.

Schmp.: 121-123°C

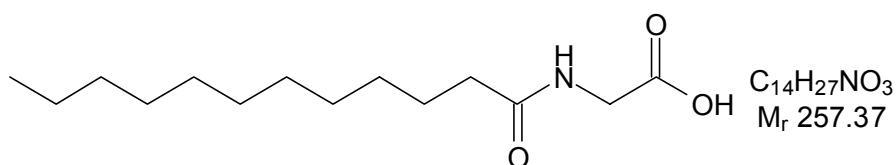
DC: (HE / EE: 1:1):

$R_f = 0.30$

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/ H_2O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20 μl , 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 6.25$ min

**IR (KBr-Pressling, cm^{-1}):**

$\nu =$ 3400-2600 (s, br., ν O-H Säure), 3300 (s, ν N-H Amid), 2960, 2900 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1690 (s, ν C=O), 1630 (s, ν Amid I), 1550 (s, ν Amid II), 1450 (m, δ C-H), 1235 (m), 1030 (m), 835 (m), 690 (m).

 ^1H -NMR (400.132 MHz, DMSO-d_6 [ppm]):

$\delta =$ 0.85 (t; 3 H; $^3J_{\text{HH}} = 7.0\text{Hz}$; $\text{C}(12)\underline{\text{H}}_3$); 1.24-1.34 (m; 16 H; $\text{C}(4-11)\underline{\text{H}}_2$); 1.47 (m; 2 H; $\text{C}(3)\underline{\text{H}}_2$); 2.10 (t; 2 H; $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz; $\text{C}(2)\underline{\text{H}}_2$); 3.70 (m; 1 H; $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-NH}$); 8.02 (d; 1H; $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz; $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO-d_6 [ppm]):

$\delta =$ 14.48 ($\underline{\text{C}}(12)\text{H}_3$); 22.67 ($\underline{\text{C}}(11)\text{H}_2$); 25.76 ($\underline{\text{C}}(10)\text{H}_2$); 29.20; 29.29; 29.39; 29.53; 29.60; ($\underline{\text{C}}(4-9)\text{H}_2$); 31.89 ($\underline{\text{C}}(3)\text{H}_2$); 35.67 ($\underline{\text{C}}(2)\text{H}_2$); 41.12 ($\text{NH-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 171.96 ($\underline{\text{C}}\text{OOH}$), 173.14 ($\text{NH-}\underline{\text{C}}\text{O}$).

4.3.4.5 Synthese von *N*-Caproyl-D- bzw. L-Leucin (TBD-Komplexierung) (*R*)-31e**, (*S*)-**31e****

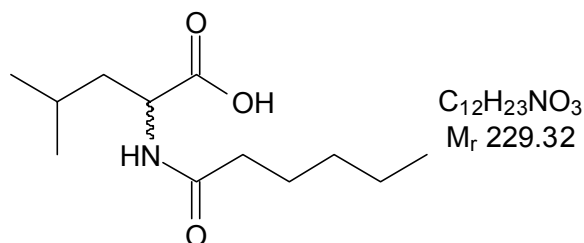
Aus 811 mg (3 mmol) L-Leucin-TBD-Kontaktionenpaar (*S*)-**30c** ($M=270.38$) erhielt man nach der AVV 8 mit Capronsäuremethylester als Acyldonor und 6 Tagen Reaktionszeit 365mg (1.59mmol) 53% (*S*)-**31e** als farbloser Feststoff. Aus 811 mg (3 mmol) D-Leucin-TBD-Kontaktionenpaar (*R*)-**30c** erhielt man nach der AVV 8 mit Capronsäuremethylester als Acyldonor und 6 Tagen Reaktionszeit 371mg (1.62mmol) 54% (*R*)-**31e** als farbloser Feststoff. Säulenchromatographische Reinigung HE/EE 1:2.

Schmp.: 104-106°C

DC: (HE / EE: 1:2):

 $R_f = 0,34$ HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 90/10, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

 $R_t = 8,51 \text{ min}$ Drehwert: *N*-C₆-L-Leu-OH $[\alpha]_D^{20} = -14,8^\circ$ (c=1.5 MeOH)Drehwert: *N*-C₆-D-Leu-OH $[\alpha]_D^{20} = +14,8^\circ$ (c=1.5 MeOH)**IR (KBr-Pressling, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3400-2600 (s, br., ν O-H Säure), 3330 (s, br., ν N-H Amid), 2950, 2910 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1720 (s, ν C=O), 1640 (s, ν Amid I), 1520 (s, ν Amid II), 1460 (m, δ C-H), 1420 (s), 1260 (m, ν C-O), 1160 (m), 960 (w), 920 (w) 700(w), 660 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, CD₃OD [ppm]):

$\delta =$ 0.80-0.95 (m; 9H; $\underline{CH}_3(6)$, $(\underline{CH}_3)_2\text{-CH}$); 1.20-1.35 (m; 4 H; $\underline{CH}_2(5+4)$); 1.50-1.75 (m; 5H; $\underline{CH}_2(3)$, $\underline{CH}\text{-}\underline{CH}_2\text{-CH}$); 2.21 (t; 2H; $^3J_{\text{HH}}=7.4 \text{ Hz}$, $\underline{CH}_2(2)$); 4.35-4.45 (m; 1H; $\underline{CH}\text{-NH}$).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CD₃OD [ppm]):

$\delta =$ 14.25 ($\underline{CH}_3(6)$), 21.75 ($(\underline{CH}_3)_2\text{-CH}$), 23.37 ($(\underline{CH}_3)_2\text{-CH}$), 23.40 ($\underline{CH}_2(5)$), 26.09 ($(\underline{CH}_3)_2\text{-CH}$), 26.63 ($\underline{CH}_2(4)$), 32,44 ($\underline{CH}_2(3)$), 36.75 ($\underline{CH}_2(2)$), 41.60 ($\underline{CH}\text{-}\underline{CH}_2\text{-CH}$), 51.95 ($\underline{CH}\text{-CH}_2\text{-CH}$), 176.13 ($\underline{NH}\text{-CO}$), 176.38 (\underline{COOH}).

4.3.4.6 Synthese von *N*-Lauroyl-L-leucin (TBD-Komplexierung) (*S*)-31f

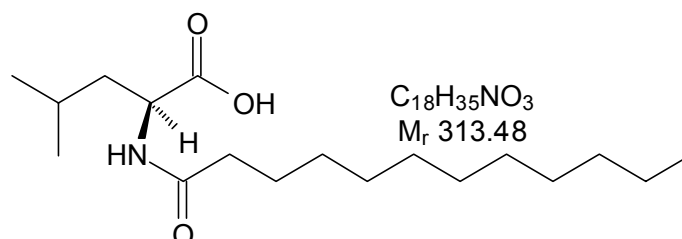
Aus 811 mg (3 mmol) L-Leucin-TBD-Kontaktionenpaar (**S**)-30c ($M=270.37$) erhielt man nach der AVV 8 mit Laurinsäuremethylester als Acyldonor und 10 Tagen Reaktionszeit 451mg (1.44mmol) 48% (**S**)-31f als farbloser Feststoff. Säulenchromatographische Reinigung HE/EE 1:1.

Schmp.: 107-109°C

DC: (HE / EE: 1:1):

 $R_f = 0.35$ HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

 $R_t = 7.38 \text{ min}$ Drehwert: *N*-C₁₂-L-Leu-OH $[\alpha]_D^{20} = -16,1^\circ$ (c=1,0 EtOH)

IR (KBr-Pressling, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3400-2600 (s, br., ν O-H Säure), 3320 (s, br., ν N-H Amid), 2960, 2940 und 2860 (s, ν C-H aliph.), 1680 (s, ν C=O), 1620 (s, ν Amid I), 1550 (s, ν Amid II), 1470 (m, δ C-H), 1370 (s), 1250 (m, ν C-O), 720 (m), 700 (m), 660 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 0.83 (t; 3H; $J_{\text{HH}} = 6.5$ Hz; C(12)H₃); 0.87-0.98 (m; 6H; 2 x CH-CH₃); 1.23-1.42 (m; 16H; C(4-9)H₂); 1.48-1.56 (m; 5H; C(10)H₂, C(11)H₂); 1.59-1.61 (m; 1H; CH-(CH₃)₂); 2.08-2.17 (m; 2H; CH-CH₂); 4.22-4.26 (m; 1H; CH-NH); 6.94 (d; 1H; $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz; NH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 14.46 (C(12)H₃); 21.78 (2 x CH-CH₃); 22.68 (C(11)H₂); 23.43 (CH-CH₃); 24.92 (C(10)H₂); 25.85 (C(9)H₂); 29.13; 29.30; 29.36; 29.59; (C(4-8)H₂); 31.72 (C(3)H₂); 31.89 (C(2)H₂); 35.66 (CH-CH₂); 50.60 (CH-CH₂); 172.80 (COOH); 174.82 (CNH).

MS (EI):

m/z (%) = 313 (5.14) [M⁺], 269 (4.37) [M⁺ -CO₂], 268 (6.28) [M⁺ -CHO₂], 257 (21.11) [M⁺ -C₄H₈], 186 (6.87) [M⁺ -C₉H₁₉ γ -Spaltung], 173 (53.97) [M⁺ -C₁₀H₂₀ Mc Lafferty Spaltung], 158 (6.03) [M⁺ -C₁₁H₂₃ α -Spaltung], 142 (4.49) [185 -CO₂], 132 (17.89) [Aminosäure-fragment], 130 (11.50) [186- C₄H₈], 129 (13.71) [173 -CO₂], 117 (93.43) [173 -C₄H₈], typische Massenfragmente für Alkylketten: 127 (7.61), 113 (7.40), 99 (15.83), 85 (16.94), 71 (20.47), 57 (51.66), 43 (85.94).

4.3.4.7 Synthese von N-Caproyl-D- bzw. L-Phenylalanin (TBD-Komplexierung) (R)-31g, (S)-31g

Aus 913mg (3 mmol) L-Phenylalanin-TBD-Kontaktionenpaar (**S**)-**30d** (M=304.39) erhielt man nach der AVV 8 mit Capronsäuremethylester als Acyldonor und 6 Tagen Reaktionszeit 561mg (2.13mmol) 71% (**S**)-**31g** als farbloser Feststoff. Aus 913mg (3 mmol) D-Phenylalanin-TBD-Kontaktionenpaar (**R**)-**30d** erhielt man nach der AVV 8 mit Capronsäuremethylester als Acyldonor und 6 Tagen Reaktionszeit 371mg (1.62mmol) 54% (**R**)-**31g** als farbloser Feststoff. Säulenchromatographische Reinigung HE/EE 1:2.

Schmp.: 109-110°C

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,40$

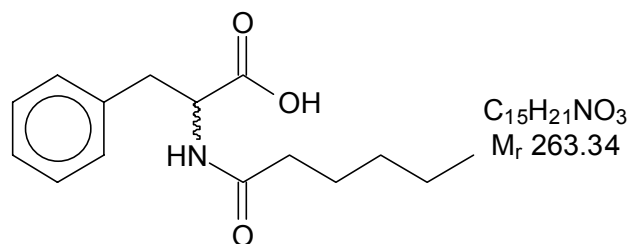
HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20 μ l, 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 4,87$ min

Drehwert: N-C₆-L-Phe-OH $[\alpha]_D^{20} = -29.1^\circ$ (c=4.0 EtOH)

Drehwert: N-C₆-D-Phe-OH $[\alpha]_D^{20} = +29.0^\circ$ (c=4.0 EtOH)



Spektroskopische Daten vgl. (±)-29

4.3.4.8 Synthese von *N*-Lauroyl-*L*-Phenylalanin (TBD-Komplexierung) (*S*)-31h

Aus 913 mg (3 mmol) *L*-Phenylalanin-TBD-Kontaktionenpaar (**S**)-30d ($M=304.39$) erhielt man nach der AVV 8 mit Laurinsäuremethylester als Acyldonor und 10 Tagen Reaktionszeit 646mg (1.86mmol) 62% (**S**)-31h als farbloser Feststoff. Säulenchromatographische Reinigung HE/EE 1:1.

Schmp.: 99-101°C

DC: (HE / EE: 1:1):

$R_f = 0.42$

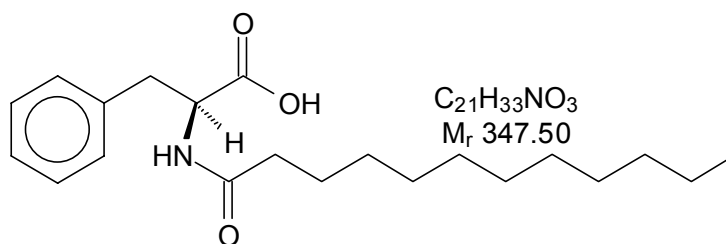
HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 7.74$ min

Drehwert: *N*-C₁₂-*L*-Phe-OH

$[\alpha]_D^{20} = -19.8^\circ$ ($c=1,0$ EtOH)



IR (KBr-Pressling, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3400-2800 (s, br., ν O-H Säure), 3320 (s, br., ν N-H Amid), 3060 und 3020 (w, ν C-H arom.), 2920 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1705 (s, ν C=O), 1600 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1470 (m, δ C-H), 1240 (m, ν C-O), 1120(m), 1050 (m), 950(m), 830 (m), 750 (m, CH₂-rock.), 690 (s), 630(m).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 0.86 (t, 3H, $^3J_{(HH)} = 7.0$ Hz, C(12)H₃), 1.22-1.31 (m, 16H, C(4-11)H₂), 1.34-1.39 (m, 2H, C(3)H₂), 2.05 (t, 2H, $^3J_{(HH)} = 7.3$ Hz, C(2)H₂), 2.81-2.84 (m, 1H, CH-CH₂) 3.06 (m, 1H, CH-CH₂), 4.20 (m, 1H, CH), 7.26-7.49 (m, 5H, C₆H₅), 8.18 (d, 1H, NH, $^3J_{(HH)} = 7.6$ Hz).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 14.61 (C(12)H₃), 22.64 (C(11)H₂), 25.52 (C(10)H₂), 29.15, 29.27, 29.35, 29.48, 29.57, 31.86 (C(3-9)H₂), 35.71 (C(2)H₂), 37.43 (CH-CH₂), 54.76 (CH), 126.95 (C(4) von -C₆H₅), 128.54 (C(3,5) von -C₆H₅), 129.73 (C(2,6) von -C₆H₅), 138.38 (C(1) von -C₆H₅), 172.86 (COOH), 174.39 (CONH).

4.3.4.9 Synthese von *N*-Caproyl-L-Phenylglycin (TBD-Komplexierung) (**S**)-**31i**

Aus 871 mg (3 mmol) L-Phenylglycin-TBD-Kontaktionenpaar (**S**)-**30e** (M=290.37) erhielt man nach der AVV 8 mit Capronsäuremethylester als Acyldonor und 6 Tagen Reaktionszeit 494mg (1.98mmol) 66% (**S**)-**31i** als farbloser Feststoff. Säulenchromatographische Reinigung HE/EE 1:2.

Schmp.: 112-114°C

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0.39$

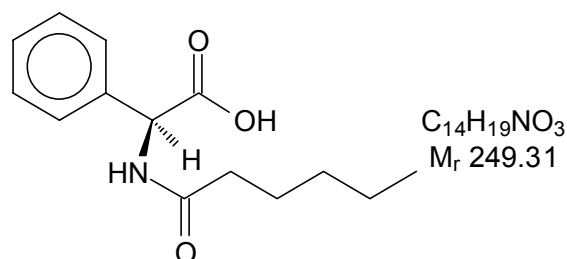
HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 4.59$ min

Drehwert: *N*-C₆-L-Phg-OH

$[\alpha]_D^{20} = -12.6^\circ$ (c=1,0 CHCl₃)



IR (KBr-Pressling, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3400-2800 (s, br., ν O-H Säure), 3310 (s, br., ν N-H Amid), 3080 und 3040 (m, ν C-H arom.), 2960, 2940 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1705 (s, ν C=O), 1620 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1500 (m), 1460 (m, δ C-H), 1270 (s), 1240 (m, ν C-O), 1200 (m), 1135 (w), 730 (m, CH₂-rock.), 700 (s), 680 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, CD₃OD [ppm]):

$\delta =$ 0.87 (t; 3H; ³J_{HH} = 6.9 Hz; CH₃(6)); 1.28-1.37 (m; 4H; CH₂(5+4)); 1.59 (m; 2H; CH₂(3)); 2.25 (m; 2H; CH₂(2)); 5.43 (s; 1H; CH-NH); 7.27-7.42 (m; 5H; -C₆H₅).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CD₃OD [ppm]):

$\delta =$ 14,24 (C(6)H₃), 23,40 (C(5)H₂); 26,57 (C(4)H₂); 32,43 (C(3)H₂); 36,54 (C(2)H); 58,09 (NH-CH); 128,78 (C(4) von -C₆H₅), 129,32 (C(3,5) von -C₆H₅), 129,75 (C(2,6) von -C₆H₅); 138,19 (C(1) von -C₆H₅), 173,74 (NH-CO), 175,91 (COOH).

4.3.4.10 Synthese von *N*-Lauroyl-L-Phenylglycin (TBD-Komplexierung) (**S**)-**31j**

Aus 871 mg (3 mmol) L-Phenylglycin-TBD-Kontaktionenpaar (**S**)-**30e** (M=290.37) erhielt man nach der AVV 8 mit Laurinsäuremethylester als Acyldonor und 10 Tagen Reaktionszeit 601mg (1.80mmol) 60% (**S**)-**31j** als farbloser Feststoff. Säulenchromatographische Reinigung HE/EE 1:1.

Schmp.: 101-103°C

DC: (HE / EE: 1:1):

$R_f = 0.41$

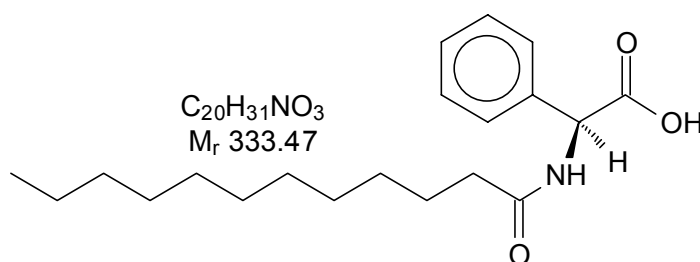
HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 6.25$ min

Drehwert: *N*-C₁₂-L-Phg-OH

$[\alpha]_D^{20} = +15.5^\circ$ (c=1,0 CHCl₃)

**IR (KBr-Pressling, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3400-2400 (s, br., ν O-H Säure), 3360 (s, br., ν N-H Amid), 3060 und 3030 (m, ν C-H arom.), 2970, 2950 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1690 (s, ν C=O), 1595 (s, ν Amid I), 1490 (s, ν Amid II), 1410 (m), 1320 (m), 1280 (m), 1230 (s, ν C-O), 1170 (s), 1060 (m), 990 (m), 920 (m), 870 (w), 850 (w), 790 (s), 650 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 0.93 (t, 3H, $^3J_{(HH)} = 7.1$ Hz, C(12)H₃), 1.28-1.39 (m, 16H, C(4-11)H₂), 1.61 (m, 2H, C(3)H₂), 2.26 (m, 2H, C(2)H₂), 5.61 (d, 1H, $^3J_{(HH)} = 7.1$ Hz, CH), 6.76 (d, 1H, $^3J_{(HH)} = 7.1$ Hz, NH), 7.37-7.49 (m, 5H, C₆H₅).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

$\delta =$ 14.24 (C(12)H₃), 22.83 (C(11)H₂), 25.69 (C(10)H₂), 29.29, 29.41, 29.48, 29.61, 29.75, 32.06 (C(3-9)H₂), 36.46 (C(2)H₂), 56.61 (CH), 127.49 (C(4) von -C₆H₅), 128.72 (C(3,5) von -C₆H₅), 129.07 (C(2,6) von -C₆H₅), 136.37 (C(1) von -C₆H₅), 173.68 (COOH), 173.95 (CONH).

4.3.4.11 Synthese von N-Caproyl-L-Valin (TBD-Komplexierung) (S)-31k

Aus 769 mg (3 mmol) L-Valin-TBD-Kontaktionenpaar (**S**)-**30f** (M=256.35) erhielt man nach der AVV 8 mit Capronsäuremethylester als Acyldonor und 6 Tagen Reaktionszeit 329mg (1.53mmol) 51% (**S**)-**31k** als farbloser Feststoff. Säulenchromatographische Reinigung HE/EE 1:2.

Schmp.: 107-109°C

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0.35$

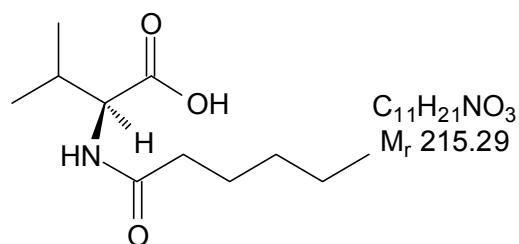
HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 90/10, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20 μ l, 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 8.42$ min

Drehwert: N-C₆-L-Val-OH

$[\alpha]_D^{20} = \pm 10.8^\circ$ (c=1,0 CHCl₃)

**IR (KBr-Pressling, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3400-2600 (s, br., ν O-H Säure), 3320 (s, br., ν N-H Amid), 2950, 2910 und 2840 (s, ν C-H aliph.), 1695 (s, ν C=O), 1615 (s, ν Amid I), 1540 (s, ν Amid II), 1460 (m, δ C-H), 1245 (s, br., ν C-O), 1230 (s), 1170 (m), 1120 (w), 960 (w), 700 (w), 670 (w).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CD_3OD [ppm]):

$\delta =$ 0,77-0,97 (m; 9H; $\text{CH}_3(6)$, $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$); 1,20-1,37 (m; 4H; $\text{CH}_2(5+4)$); 1,52-1,65 (m; 2H; $\text{CH}_2(3)$); 2,06-2,28 (m; 3H; $\text{CH}_2(2)$, $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$); 4,23-4,33 (m; 1H; CH-NH).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CD_3OD [ppm]):

$\delta =$ 14.25 ($\text{CCH}_3(6)$), 18.38 ($(\text{CCH}_3)_2\text{-CH}$), 19.59 ($(\text{CCH}_3)_2\text{-CH}$), 23.41 ($\text{CCH}_2(5)$), 26.72 ($\text{CCH}_2(4)$), 31.60 ($(\text{CCH}_3)_2\text{-CH}$), 32,49 ($\text{CCH}_2(3)$), 36.70 ($\text{CCH}_2(2)$), 58.96 (NH-CH), 174.92 (NH-CO), 176.52 (COOH).

4.3.4.12 Synthese von *N*-Lauroyl-L-Valin (TBD-Komplexierung) (S**)-311**

Aus 769 mg (3 mmol) L-Valin-TBD-Kontaktionenpaar (**S**)-30f ($M=256.35$) erhielt man nach der AVV 8 mit Laurinsäuremethylester als Acyldonor und 10 Tagen Reaktionszeit 601mg (1.26mmol) 42% (**S**)-311 als farbloser Feststoff. Säulenchromatographische Reinigung HE/EE 1:1.

Schmp.: 104-106°C

DC: (HE / EE: 1:1):

$R_f = 0.38$

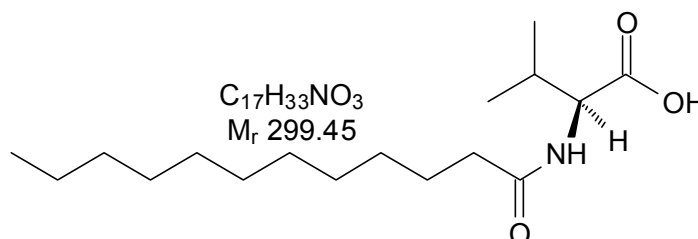
HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20 μ l, 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 6.58$ min

Drehwert: *N*-C₁₂-L-Val-OH

$[\alpha]_D^{20} = -10,3^\circ$ (c=2,0 Aceton)

**IR (KBr-Pressling, cm^{-1}):**

$\nu =$ 3400-2600 (s, br., v O-H Säure), 3310 (s, br., v N-H Amid), 2940, 2900 und 2840 (s, v C-H aliph.), 1695 (s, v C=O), 1615 (s, v Amid I), 1540 (s, v Amid II), 1460 (m, δ C-H), 1365 (w), 1290 (m), 1240 (s, br., v C-O), 1230 (m), 1180 (m), 1110 (w), 660 (w).

 $^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 0.91 (t; 3 H; $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz; C(12) $\underline{\text{H}}_3$); 0.99-1.02 (m; 6 H; 2 x CH_3); 1.29-1.37 (m; 16 H; C(4-11) $\underline{\text{H}}_2$); 1.66 (m; 2 H; C(3) $\underline{\text{H}}_2$); 2.28-2.35 (m; 3 H; C(2) $\underline{\text{H}}_2$ CH-CH-NH); 4.62 (m; 1H; CH-CH-NH); 6.24 (d; 1H; $^3J_{\text{HH}} = 8.65$ Hz; $\underline{\text{NH}}$) 10.83 (s, br., 1H, COOH).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 14.48 ($\text{C}(12)\text{H}_3$); 18.11; 19.36 (2 x CH_3); 23.07 ($\text{C}(11)\text{H}_2$); 26.17 ($\text{C}(10)\text{H}_2$); 29.63, 29.72, 29.88, 30.00 ($\text{C}(4-9)\text{H}_2$); 31.47 (CH-CH-NH); 32.01 ($\text{C}(3)\text{H}_2$); 37.08 ($\text{C}(2)\text{H}_2$); 57.48 (CH-CH-NH); 174.67 (COOH), 175.64 (CONH).

4.3.5 Enzymatische Acylierungen von Aminosäuren an Ionenaustauschern

4.3.5.1 Enzymatische Acylierung von Aminosäuren am Ionenaustauscher:

Lipasenscreening

Als Modellreaktion wurde 12 g Ionenaustauscher (Amberlite A26, Cl-Form) mit 3,9 g (52 mmol) Glycin beladen (bestimmte Kapazität 4,3 mmol/g) und nach AVV 10 in 4 ml Capronsäuremethylester (Acyldonor) suspendiert. Nach Zugabe von 50 mg der jeweiligen lyophilisierten Lipase wurden die Ansätze bei 50°C im Schüttler (600 U/min) inkubiert und nach Reaktionszeiten von 4-6 Tagen nach AVV 10 aufgearbeitet. Die **Tab. 62** gibt die eingesetzten Lipasen, Einwaagen und Auswaagen an Ionenaustauscher, Reaktionszeit und Ausbeuten wieder.

Tab. 62: Enzymatische Acylierung von Aminosäuren am Ionenaustauscher: Lipasenscreening.

Lipase	Einwaage an A 26	Reaktionszeit [d]	Auswaage an A 26	Ausbeute [%]
<i>Alcaligines species</i>	0.996g	4	1.085g	12
<i>Aspergillus oryzae</i>	1.003g	6	1.033g	<5
<i>Candida antarctica</i> B	1.005g	4	1.392g	52
<i>Candida cylindracea</i>	1.001g	6	1.008g	- ^a
<i>Candida species</i>	0.994g	4	1.076g	11
<i>Mucor miehei</i>	0.995g	4	1.062g	9
<i>Porcine pancreas</i>	1.001g	6	1.061g	8
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1.006g	4	1.073g	9
<i>Pseudomonas species</i>	0.997g	4	1.034g	<5
<i>Rhizopus javanicus</i>	1.002g	6	1.031g	<5

a) kein Produkt beobachtet

4.3.5.2 Synthese von *N*-Caproyl-L-alanin (Ionenaustauscher) (**S**)-32a

Für die Analyse wurde 5 g Ionenaustauscher (Amberlite A26, Cl-Form) mit 1,9 g (21 mmol) L-Alanin beladen (bestimmte Kapazität 4,2 mmol/g). Nach AVV 10 wurde 1.003g in 4 ml Capronsäuremethylester (Acyldonor) suspendiert und 1.372g (47%) ausgewogen. Man erhielt nach Elution 312 mg (1.67 mmol) (**S**)-32a als farbloser Feststoff.

Schmp.: 83-84°C

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,31$

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 90/10, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 7,96$ min

Drehwert: *N*-C₆-L-Ala-OH $[\alpha]_D^{20} = -4.3^\circ$ (c=1,0 EtOH)

Spektroskopische Daten vgl. (**S**)-31a

4.3.5.3 Synthese von *N*-Caproyl-D-alanin (Ionenaustauscher) (**R**)-32a

Für die Analyse wurde 5 g Ionentauscher (Amberlite A26, Cl⁻-Form) mit 1,9 g (21 mmol) D-Alanin beladen (bestimmte Kapazität 4,3 mmol/g). Nach AVV 10 wurde 1.001g in 4 ml Capronsäuremethylester (Acyldonor) suspendiert und 1.363g (45%) ausgewogen. Man erhielt nach Elution 304 mg (1.62 mmol) (**R**)-32a als farbloser Feststoff.

Schmp.: 82-84°C

DC: (HE / EE: 1:2):

R_f = 0,31

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 90/10, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

R_t = 7,96 min

Drehwert: *N*-C₆-D-Ala-OH $[\alpha]_D^{20} = + 4,3^\circ$ (c=1,0 EtOH)

Spektroskopische Daten vgl. (**R**)-31a

4.3.5.4 Synthese von *N*-Lauroyl-L-alanin (Ionenaustauscher) (**S**)-32b

Für die Analyse wurde 5 g Ionentauscher (Amberlite A26, Cl⁻-Form) mit 1,9 g (21 mmol) L-Alanin beladen (bestimmte Kapazität 4,2 mmol/g). Nach AVV 10 wurde 1.000g in 4 ml Laurinsäuremethylester (Acyldonor) suspendiert und 1.502g (44%) ausgewogen. Man erhielt nach Elution 428 mg (1.58 mmol) (**S**)-32b als farbloser Feststoff.

Schmp.: 104-105°C

DC: (HE / EE: 1:1):

R_f = 0.36

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

R_t = 7.16 min

Drehwert: *N*-C₁₂-L-Ala-OH $[\alpha]_D^{20} = - 4,3^\circ$ (c=1,0 EtOH)

Spektroskopische Daten vgl. (**S**)-31b

4.3.5.5 Synthese von *N*-Lauroyl-D-alanin (Ionenaustauscher) (**R**)-32b

Für die Analyse wurde 5 g Ionentauscher (Amberlite A26, Cl⁻-Form) mit 1,9 g (21 mmol) D-Alanin beladen (bestimmte Kapazität 4,3 mmol/g). Nach AVV 10 wurde 1.003g in 4 ml Laurinsäuremethylester (Acyldonor) suspendiert und 1.550g (48%) ausgewogen. Man erhielt nach Elution 457 mg (1.68 mmol) (**R**)-32b als farbloser Feststoff.

Schmp.: 103-104°C

DC: (HE / EE: 1:1):

R_f = 0.36

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

R_t = 7.16 min

Drehwert: *N*-C₁₂-L-Ala-OH $[\alpha]_D^{20} = + 4,2^\circ$ (c=1,0 EtOH)

Spektroskopische Daten vgl. (**S**)-31b

4.3.5.6 Synthese von *N*-Caproylglycin (Ionenaustauscher) 32c

Für die Analyse wurde 12 g Ionentauscher (Amberlite A26, Cl⁻-Form) mit 3,9 g (52 mmol) Glycin beladen (bestimmte Kapazität 4,3 mmol/g). Nach AVV 10 wurde 0.998g in 4 ml

Laurinsäuremethylester (Acyldonor) suspendiert und 1.385g (52%) abgewogen. Man erhielt nach Elution 314 mg (1.81 mmol) **32c** als farbloser Feststoff.

Schmp.: 89-91°C

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,28$

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 90/10, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 7,46$ min

Spektroskopische Daten vgl. **31c**

4.3.5.7 Synthese von *N*-Lauroylglycin (Ionenaustauscher) **32d**

Für die Analyse wurde 12 g Ionenaustauscher (Amberlite A26, Cl⁻-Form) mit 3,9 g (52 mmol) Glycin beladen (bestimmte Kapazität 4,3 mmol/g). Nach AVV 10 wurde 1.001g in 4 ml Laurinsäuremethylester (Acyldonor) suspendiert und 1.610g (55%) abgewogen. Man erhielt nach Elution 563 mg (2.18 mmol) **32d** als farbloser Feststoff.

Schmp.: 121-122°C

DC: (HE / EE: 1:1):

$R_f = 0,30$

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 6,25$ min

Spektroskopische Daten vgl. **31d**

4.3.5.8 Synthese von *N*-Caproyl-L-leucin (Ionenaustauscher) (*S*)-**32e**

Für die Analyse wurde 3 g Ionenaustauscher (Amberlite A26, Cl⁻-Form) mit 1,7 g (13 mmol) L-Leucin beladen (bestimmte Kapazität 4,4 mmol/g). Nach AVV 10 wurde 0.999g in 4 ml Capronsäuremethylester (Acyldonor) suspendiert und 1.382g (38%) abgewogen. Man erhielt nach Elution 281 mg (1.22 mmol) (*S*)-**32e** als farbloser Feststoff.

Schmp.: 103-105°C

DC: (HE / EE: 1:2):

$R_f = 0,34$

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 90/10, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 8,51$ min

Drehwert: *N*-C₆-L-Leu-OH $[\alpha]_D^{20} = -14,8^\circ$ (c=1.5 MeOH)

Spektroskopische Daten vgl. (*S*)-**31e**

4.3.5.9 Synthese von *N*-Lauroyl-L-leucin (Ionenaustauscher) (*S*)-**32f**

Für die Analyse wurde 3 g Ionenaustauscher (Amberlite A26, Cl⁻-Form) mit 1,7 g (13 mmol) L-Leucin beladen (bestimmte Kapazität 4,4 mmol/g). Nach AVV 10 wurde 1.002g in 4 ml Laurinsäuremethylester (Acyldonor) suspendiert und 1.623g (45%) abgewogen. Man erhielt nach Elution 532 mg (1.70 mmol) (*S*)-**32f** als farbloser Feststoff.

Schmp.: 104-106°C

DC: (HE / EE: 1:1):

$R_f = 0,35$

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

$R_t = 7,38$ min

Drehwert: *N*-C₁₂-L-Leu-OH $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -15,8^{\circ}$ (c=1,0 EtOH)

Spektroskopische Daten vgl. **(S)-32f**

4.3.5.10 Synthese von *N*-Caproyl-L-phenylalanin (Ionenaustauscher) **(S)-32g**

Für die Analyse wurde 5 g Ionentauscher (Amberlite A26, Cl⁻-Form) mit 3,6 g (21 mmol) L-Phenylalanin beladen (bestimmte Kapazität 4,3 mmol/g). Nach AVV 10 wurde 1.000g in 4 ml Capronsäuremethylester (Acyldonor) suspendiert und 1.634g (56%) ausgewogen. Man erhielt nach Elution 546 mg (2.07 mmol) **(S)-32g** als farbloser Feststoff.

Schmp.: 109-111°C

DC: (HE / EE: 1:2):

R_f = 0,40

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

R_t = 4,87 min

Drehwert: *N*-C₆-L-Phe-OH $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -19,9^{\circ}$ (c=1.0 EtOH)

Spektroskopische Daten vgl. **(S)-31g**

4.3.5.11 Synthese von *N*-Caproyl-D-phenylalanin (Ionenaustauscher) **(R)-32g**

Für die Analyse wurde 3 g Ionentauscher (Amberlite A26, Cl⁻-Form) mit 2,2 g (13 mmol) D-Phenylalanin beladen (bestimmte Kapazität 4,4 mmol/g). Nach AVV 10 wurde 1.001g in 4 ml Capronsäuremethylester (Acyldonor) suspendiert und 1.638g (55%) ausgewogen. Man erhielt nach Elution 526 mg (1.99 mmol) **(R)-32g** als farbloser Feststoff.

Schmp.: 108-110°C

DC: (HE / EE: 1:2):

R_f = 0,40

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

R_t = 4,87 min

Drehwert: *N*-C₆-D-Phe-OH $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +19,8^{\circ}$ (c=1.0 EtOH)

Spektroskopische Daten vgl. **(R)-31g**

4.3.5.12 Synthese von *N*-Lauroyl-L-phenylalanin (Ionenaustauscher) **(S)-32h**

Für die Analyse wurde 5 g Ionentauscher (Amberlite A26, Cl⁻-Form) mit 3,6 g (21 mmol) L-Phenylalanin beladen (bestimmte Kapazität 4,3 mmol/g). Nach AVV 10 wurde 0.999g in 4 ml Laurinsäuremethylester (Acyldonor) suspendiert und 1.910g (61%) ausgewogen. Man erhielt nach Elution 841 mg (2.42 mmol) **(S)-32h** als farbloser Feststoff.

Schmp.: 99-101°C

DC: (HE / EE: 1:1):

R_f = 0.42

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20µl, 45°C

Streulichtdetektor:

R_t = 7.74 min

Drehwert: *N*-C₁₂-L-Phe-OH $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +20,0^{\circ}$ (c=1,0 EtOH)

Spektroskopische Daten vgl. **(S)-31h**

4.3.5.13 Synthese von *N*-Lauroyl-D-phenylalanin (Ionenaustauscher) (*R*)-32h

Für die Analyse wurde 3 g Ionenaustauscher (Amberlite A26, Cl⁻-Form) mit 2,2 g (13 mmol) D-Phenylalanin beladen (bestimmte Kapazität 4,4 mmol/g). Nach AVV 10 wurde 0,998 g in 4 ml Laurinsäuremethylester (Acyldonor) suspendiert und 1,808 g (53%) ausgewogen. Man erhielt nach Elution 724 mg (2,08 mmol) (*R*)-32h als farbloser Feststoff.

Schmp.: 97-99°C

DC: (HE / EE: 1:1):

R_f = 0.42

HPLC: RP 18 MeCN(0,1% TFA)/H₂O 95/5, flow 0,5 ml/min, Injektionsvol. 20 µl, 45°C

Streulichtdetektor:

R_t = 7.74 min

Drehwert: *N*-C₁₂-D-Phe-OH $[\alpha]_D^{20} = -19.7^\circ$ (c=1,0 EtOH)

Spektroskopische Daten vgl. (*S*)-31h

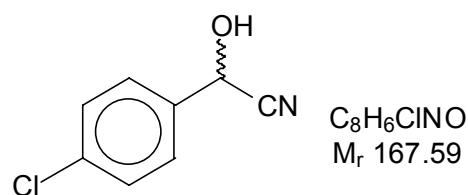
4.4 D-Hydantoinase-katalysierte Synthesen von (*R*)-α-

Hydroxycarbonsäuren

4.4.1 Synthese der Cyanhydrine (±)-33-(±)-40

4.4.1.1 Synthese von (*R,S*)-*p*-Chlormandelsäurenitril (±)-33

Die Umsetzung von 21,06 g (0,15 mol) *p*-Chlorbenzaldehyd mit 150 ml gesättigter Natriumbisulfit-Lösung (≈0,3 mol) und 39,08 g (0,6 mol) Kaliumcyanid (in 75 ml Wasser) ergab nach Extraktion mit MtBE gemäß der AVV 11, 21,99 g von (131 mmol); 87 %; gelbes Öl.



IR (Film, [cm⁻¹]):

ν = 3400 (s, sb) [ν OH]; 3090 (w), 3070 (w) [ν CH_{arom.}]; 2980 (w), 2900 (w) [ν CH_{aliph.}]; 2250 (m) [ν C≡N]; 1600 (m), 1490 (s) [ν C=C_{arom.}]; 1090 (s) [ν C-O]; 840 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,4-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1910 (m); 1785 (w); 1695 (w); 1410 (s); 1240 (w); 1190 (m); 1040 (m); 1015 (w); 925 (m); 790 (m); 725 (w); 675 (vw).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

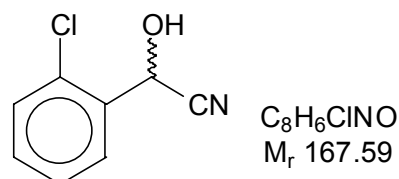
δ = 5,43 (d; 1H; HO-CH-CN; J = 6,1 Hz); 6,75 (d; 1H; HO-CH-CN; J = 6,2 Hz); 7,18-7,63 (m; 4H; C₆H₄).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 62,8 (HO-CH-CN); 113,7 (HO-CH-CN); 126,1 (C(3,5) von C₆H₄); 126,6 (C(1) von C₆H₄); 129,3 (C(2,6) von C₆H₄); 136,4 (C(4) von C₆H₄).

4.4.1.2 Synthese von (R,S)-*o*-Chlormandelsäurenitril (\pm)-34

Die Umsetzung von 21.06 g (0.15 mol) *o*-Chlorbenzaldehyd mit 150 ml gesättigter Natriumbisulfit-Lösung (\approx 0.3 mol) und 39.08 g (0.6 mol) Kaliumcyanid (in 75 ml Wasser) ergab nach Extraktion mit MtBE gemäß der AVV 11, 21.23 g von (126 mmol); 84 %; farbloser Feststoff, Schmp.: 66-68°C.

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3400 (s, sb) [ν OH]; 3090 (w), 3070 (w) [ν CH_{arom.}]; 2980 (w), 2900 (w) [ν CH_{aliph.}]; 2255 (m) [ν C \equiv N]; 1600 (m), 1490 (s) [ν C=C arom.]; 1060 (s) [ν C-O]; 770 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,2-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1910 (m); 1785 (w); 1695 (w); 1410 (s); 1240 (w); 1190 (m); 1040 (m); 1015 (w); 925 (m); 790 (m); 725 (w); 675 (vw).

 ^1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

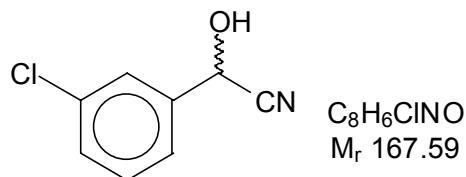
$\delta =$ 5,22 (d; 1H; HO-CH-CN; J = 6,4 Hz); 6,46 (d; 1H; HO-CH-CN; J = 6,6 Hz); 7,06-7,73 (m; 4H; C₆H₄).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 62,1 (HO-CH-CN); 119,3 (HO-CH-CN); 126,8 (C(5) von C₆H₄); 127,5 (C(6) von C₆H₄); 129,1 (C(4) von C₆H₄); 129,9 (C(3) von C₆H₄); 132,2 (C(2) von C₆H₄); 139,9 (C(1) von C₆H₄);.

4.4.1.3 Synthese von (R,S)-*m*-Chlormandelsäurenitril (\pm)-35

Die Umsetzung von 21.06 g (0.15 mol) *m*-Chlorbenzaldehyd mit 150 ml gesättigter Natriumbisulfit-Lösung (\approx 0.3 mol) und 39.08 g (0.6 mol) Kaliumcyanid (in 75 ml Wasser) ergab nach Extraktion mit MtBE gemäß der AVV 11, 19,46 g (116 mmol); 77 %; gelbes Öl.

**IR (Film, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3400 (s, sb) [ν OH]; 3090 (w), 3070 (w) [ν CH_{arom.}]; 2980 (w), 2900 (w) [ν CH_{aliph.}]; 2245 (m) [ν C \equiv N]; 1600 (m), 1490 (s) [ν C=C arom.]; 1110 (s) [ν C-O]; 710 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,3-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1910 (m);

1785 (w); 1695 (w); 1410 (s); 1240 (w); 1190 (m); 1040 (m); 1015 (w); 925 (m); 790 (m); 725 (w); 675 (vw).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

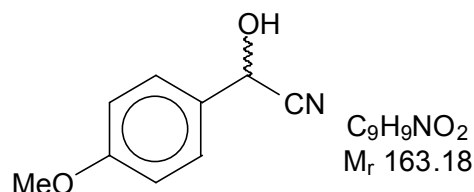
$\delta =$ 5,18 (d; 1H; HO-CH-CN; J = 6,0 Hz); 5,92 (d; 1H; HO-CH-CN; J = 6,0 Hz); 7,10-7,54 (m; 4H; C₆H₄).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 63,5 (HO-CH-CN); 117,2 (HO-CH-CN); 140,8 (C(1) von C₆H₄); 134,6 (C(3) von C₆H₄); 130,0 (C(5) von C₆H₄); 127,9 (C(4) von C₆H₄); 125,5 (C(2) von C₆H₄); 124,0 (C(4) von C₆H₄).

4.4.1.4 Synthese von (*R,S*)-*p*-Methoxymandelsäurenitril (\pm)-36

Die Umsetzung von 20.43 g (0.15 mol) *p*-Methoxybenzaldehyd mit 150 ml gesättigter Natriumbisulfit-Lösung (\approx 0.3 mol) und 39.08 g (0.6 mol) Kaliumcyanid (in 75 ml Wasser) ergab nach Extraktion mit MtBE gemäß der AVV 11, 19.58 g (120 mmol); 80 %; gelbliches Öl.



IR (Film, cm^{-1}):

$\nu =$ 3450 (s, vb) [ν OH]; 3010 (w) [ν CH_{arom.}]; 2970 (m), 2940 (m) [ν CH_{aliph.}]; 2250 (m) [ν C \equiv N]; 1615 (s), 1520 (s) [ν C=C_{arom.}]; 1260 (s) [ν C-O_{arylalloyl}]; 835 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,4-Disubstituiert] weitere Banden bei 1180 (s), 1120 (m), 1035 (s), 930 (m).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

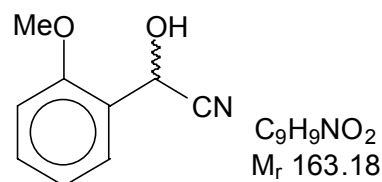
$\delta =$ 3,77 (s; 3H; O-CH₃); 5,64 (d; 1H; HO-CH-CN; J = 6,2 Hz); 6,86 (d; 1H; HO-CH-CN; J = 6,4 Hz); 6,98 (d; 2H; C(3,5) von C₆H₄; J = 8,8 Hz); 7,40 (d; 2H; C(2,6) von C₆H₄; J = 8,7 Hz).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 55,8 (C₆H₄-OCH₃); 62,0 (HO-CH-CN); 114,6 (C(3,5) von C₆H₄); 121,3 (HO-CH-CN); 128,5 (C(2,6) von C₆H₄); 130,0 (C(1) von C₆H₄); 160,24 (C(4) von C₆H₄)

4.4.1.5 Synthese von (*R,S*)-*o*-Methoxymandelsäurenitril (\pm)-37

Die Umsetzung von 20.43 g (0.15 mol) *o*-Methoxybenzaldehyd mit 150 ml gesättigter Natriumbisulfit-Lösung (\approx 0.3 mol) und 39.08 g (0.6 mol) Kaliumcyanid (in 75 ml Wasser) ergab nach Extraktion mit MtBE gemäß der AVV 11, 20,07 g (123 mmol); 82 %; gelblicher Feststoff mit Schmp.: 77-78°C.

**IR (Film, $[cm^{-1}]$):**

$\nu =$ 3400 (s, vb) [ν OH]; 3010 (w) [ν CH_{arom.}]; 2970 (m), 2940 (m) [ν CH_{aliph.}]; 2255 (m) [ν C \equiv N]; 1615 (s), 1520 (s) [ν C=C_{arom.}]; 1050 (s) [ν C-O_{arylalloyl}]; 780 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,2-Disubstituiert] weitere Banden bei 1180 (s), 1120 (m), 1035 (s), 930 (m);.

 1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

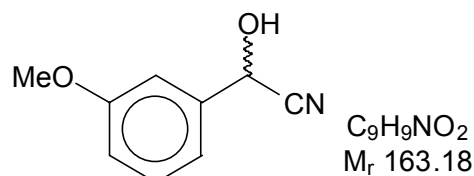
$\delta =$ 3,81 (s; 3H; O-CH₃); 5,53 (d; 1H; HO-CH-CN; J = 6,1 Hz); 6,65 (d; 1H; HO-CH-CN; J = 6,2 Hz); 6,98-7,48 (m; 4H; C₆H₄).

 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 55,7 (C₆H₄-OCH₃); 61,1 (HO-CH-CN); 111,8 (C(3) von C₆H₄); 119,4 (HO-CH-CN); 121,3 (C(5) von C₆H₄); 128,2 (C(4) von C₆H₄); 129,0 (C(6) von C₆H₄); 129,6 (C(1) von C₆H₄); 157,1 (C(2) von C₆H₄).

4.4.1.6 Synthese von (R,S)-p-Methylmandelsäurenitril (±)-38

Die Umsetzung von 18.02 g (0.15 mol) *p*-Methylbenzaldehyd mit 150 ml gesättigter Natriumbisulfit-Lösung (\approx 0.3 mol) und 39.08 g (0.6 mol) Kaliumcyanid (in 75 ml Wasser) ergab nach Extraktion mit MtBE gemäß der AVV 11, 18.54 g (126 mmol); 84 %; gelbliches Öl.

**IR (Film, $[cm^{-1}]$):**

$\nu =$ 3445 (s, vb) [ν OH]; 3015 (w) [ν CH_{arom.}]; 2980 (m), 2940 (m) [ν CH_{aliph.}]; 2255 (m) [ν C \equiv N]; 1615 (s), 1530 (s) [ν C=C_{arom.}]; 835 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,4-Disubstituiert] weitere Banden bei 1185 (s), 1120 (m), 1035 (s), 1010 (m), 985 (s), 930 (m).

 1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

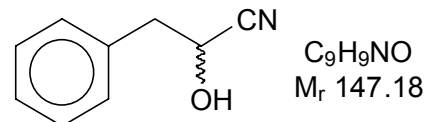
$\delta =$ 2,48 (s; 3H; C₆H₄-CH₃); 3,17 (d; 1H; HO-CH-CN; J = 6,6 Hz); 5,67 (d; 1H; HO-CH-CN; J = 6,5 Hz); 7,27-7,64 (m; 4H; C₆H₄).

 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 18,8 (C₆H₄-CH₃); 61,9 (HO-CH-CN); 118,9 (HO-CH-CN); 126,9 (C(2,6) von C₆H₄); 127,2 (C(3,5) von C₆H₄); 130,1; (C(1) von C₆H₄); (C(4) von C₆H₄).

4.4.1.7 Synthese von (*R,S*)-2-Phenylethylcyanhydrin (\pm)-39

Die Umsetzung von 18.02 g (0.15 mol) Phenylethanal mit 150 ml gesättigter Natriumbisulfid-Lösung (≈ 0.3 mol) und 39.08 g (0.6 mol) Kaliumcyanid (in 75 ml Wasser) ergab nach Extraktion mit MtBE gemäß der AVV 11, 20.52 g (140 mmol); 93 %; farbloses Öl.



IR (Film, $[cm^{-1}]$):

$\nu =$ 3420 (s,vb) [ν OH]; 3090 (w), 3060 (w), 3030 (m) [ν CH_{arom.}]; 2930 (m) [ν CH_{aliph.}]; 2250 (m) [ν C \equiv N]; 1605 (m), 1500 (s) [ν C=C_{arom.}]; 745 (s) [δ CH, out of plane, monosubstituierter Aromat]; 700 (s) [δ C=C out of plane, monosubstituierter Aromat]; weitere Banden bei 1080 (s), 1065 (s) 1020 (m), 1035 (s), 920 (m).

1H -NMR (400.132 MHz, DMSO-*d*₆ [ppm]):

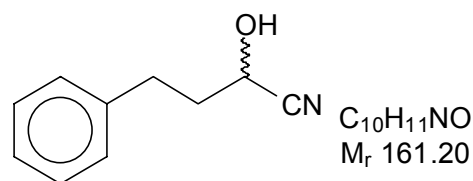
$\delta =$ 3,00 (m; 2H; CH₂-CH); 4,72 (m; 1H; CH₂-CH); 6,49 (d; 1H; HO-CH-CN; J = 6,4 Hz); 7,3 (s; 5H; C₆H₅).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO-*d*₆ [ppm]):

$\delta =$ 41,5 (CH₂-CH); 61,9 (OH-CH-CN); 121,5 (HO-CH-CN); 127,5 (C(4) von C₆H₅); 128,8 (C(2,6) von C₆H₅); 130,2 (C(3,5) von C₆H₅); 136,3 (C(1) von C₆H₅).

4.4.1.8 Synthese von (*RS*)-3-Phenylpropylcyanhydrin (\pm)-40

Die Umsetzung von 20.13 g (0.15 mol) 3-Phenylpropionaldehyd (Hydrozimtaldehyd) mit 150 ml gesättigter Natriumbisulfid-Lösung (≈ 0.3 mol) und 39.08 g (0.6 mol) Kaliumcyanid (in 75 ml Wasser) ergab nach Extraktion mit MtBE gemäß der AVV 11, 22.71 g (141 mmol); 94 %; farbloses Öl.



IR (Film, $[cm^{-1}]$):

$\nu =$ 3430 (s, vb) [von]; 3080 (w), 3060 (m), 3020 (m) [ν CH_{arom.}]; 2930 (m,b), 2860 (m) [ν CH_{aliph.}]; 2250 (m) [ν C \equiv N]; 1600 (m), 1495 (s) [ν C=C_{arom.}]; 750 (s) [δ CH out of plane, monosubstituierter Aromat]; 700 (s) [δ C=C out of plane, monosubstituierter Aromat]; weitere Banden bei 1450 (s), 1270 (s) 1120 (m), 1035 (s), 940 (m).

1H -NMR (400.132 MHz, DMSO-*d*₆ [ppm]):

$\delta =$ 1,97-2,02 (m; 2H; CH₂-CH₂-CH); 2,70-2,74 (m; 2H; CH₂-CH₂-CH); 4,46 (m; 1H; CH₂-CH); 6,42 (d; HO-CH-CN; J = 6,1 Hz); 7,17-7,31 (m; 5H; C₆H₅).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO-*d*₆ [ppm]):

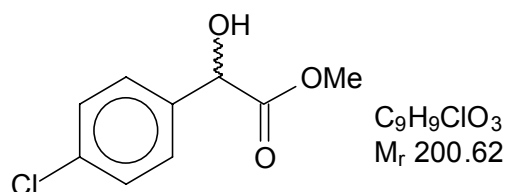
$\delta =$ 30,9 (CH₂-CH₂-CH); 37,1 (CH₂-CH₂-CH); 59,99 (HO-CH-CN); 121,8 (HO-CH-CN); 126,9 (C(4) von C₆H₅); 128,8 (C(2,6) von C₆H₅); 128,9 (C(3,5) von C₆H₅); 141,0 (C(1) von C₆H₅).

4.4.2 Synthese der racemischen α -Hydroxycarbonsäuremethylester (\pm)-41-(\pm)-48

4.4.2.1 Synthese von (*R,S*)-*p*-Chlormandelsäuremethylester (\pm)-41

Die Umsetzung von 16.86 g (0.1 mol) von (*R,S*)-*p*-Chlormandelsäurenitril (\pm)-33 mit 3.9 g (0.15 mol) Methanol (abs.) in 150 ml mit HCl gesättigtem Diethylether abs. ergab 22.42 g (95 mmol) (*R,S*)- α -Hydroxy-(*p*-chlorphenylacet)imidomethylesterhydrochlorid (95 % farblose Kristalle Schmp.-Zers. 122°C).

Die Hydrolyse von 22.42 g (0.95 mol) Imidoester in 150 ml Wasser ergab gemäß AVV 12 18.64 g (93 mmol); 97 %; farblose Kristalle mit einem Schmp. von 57-59°C.



IR (KBr, [cm⁻¹]):

ν = 3340 (s,b) [ν OH]; 3090 (w), 3040 (w) [ν CH_{arom.}]; 2960 (w), 2930 (w), 2860 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1740 (s,b) [ν C=O]; 1590 (w), 1490 (m) [ν C=C arom.]; 1090 (s) [ν C-O]; 830 (m) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,4-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1440 (m); 1410 (m); 1290 (w,sh); 1260 (m); 1220 (m); 1200 (w,sh); 1110 (w); 1010 (w); 980 (w); 810 (w); 770 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 3,61 (s; 3H; O-CH₃); 5,17 (d; 1H; CH-OH; J = 5,3 Hz); 6,18 (d; 1H; CH-OH; J = 5,3 Hz); 7,40-7,44 (m; 4H; C₆H₄).

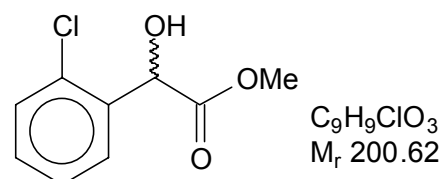
¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 52,5 (O-CH₃); 72,3 (CH-OH); 128,8 (C(3,5) von C₆H₄); 129,1 (C(2,6) von C₆H₄); 133,1 (C(4) von C₆H₄); 139,2 (C(1) von C₆H₄); 173,3 (CO-O-CH₃).

4.4.2.2 Synthese von (*R,S*)-*o*-Chlormandelsäuremethylester (\pm)-42

Die Umsetzung von 16,86 g (0,1 mol) von (*R,S*)-*o*-Chlormandelsäurenitril (\pm)-34 mit 3,9 g (0.15 mol) Methanol (abs.) in 150 ml mit HCl gesättigtem Diethylether abs. ergab 21,71 g (92 mmol) (*R,S*)- α -Hydroxy-(*o*-chlorphenylacet)imidomethylesterhydrochlorid (92 % farblose Kristalle mit einer Schmp.-Zers. 124°C).

Die Hydrolyse von 21,71 g (0,92 mol) Imidoester in 150 ml Wasser ergab gemäß AVV 12 17,25 g (86 mmol); 93 %; farblose Kristalle; Schmp.: 50-52°C.



IR (KBr, [cm⁻¹]):

ν = 3310 (s,b) [ν OH]; 3090 (w), 3040 (w) [ν CH_{arom.}]; 2960 (w), 2930 (w), 2860 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1750 (s,b) [ν C=O]; 1590 (w), 1490 (m) [ν C=C arom.]; 1090 (s) [ν C-O];

770 (m) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,2-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1440 (m); 1410 (m); 1290 (w,sh); 1260 (m); 1220 (m); 1190 (w,sh); 1130 (w); 1020 (w); 980 (w); 810 (w); 780 (w).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 3,77 (s; 3H; O- $\underline{\text{CH}}_3$); 5,11 (d; 1H; $\underline{\text{C}}\text{H-OH}$; J = 5,5 Hz); 6,02 (d; 1H; $\text{C}\underline{\text{H}}\text{-OH}$; J = 5,5 Hz); 7,06-7,73 (m; 4H; C_6H_4).

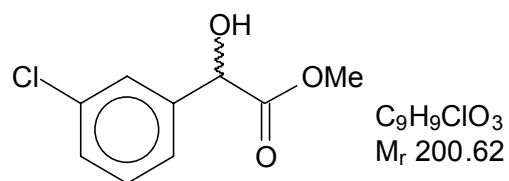
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 52,3 (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 72,4 ($\underline{\text{C}}\text{H-OH}$); 126,8 (C(5) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 127,5 (C(6) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 129,1 (C(4) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 129,4 (C(3) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 132,2 (C(2) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 139,9 (C(1) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 173,6 ($\underline{\text{C}}\text{O-O-CH}_3$).

4.4.2.3 Synthese von (*R,S*)-*m*-Chlormandelsäuremethylester (\pm)-43

Die Umsetzung von 16,86 g (0,1 mol) von (*R,S*)-*m*-Chlormandelsäurenitril (\pm)-35 mit 3,9 g (0,15 mol) Methanol (abs.) in 150 ml mit HCl gesättigtem Diethylether abs. ergab 22,32 g (94 mmol) (*R,S*)- α -Hydroxy-(*m*-chlorphenylacet)imidomethylesterhydrochlorid (94 % farblose Kristalle; Schmp._{Zers.} 124°C).

Die Hydrolyse von 22,32 g (0,94 mol) Imidoester in 150 ml Wasser ergab gemäß AVV 12 17,96 g (89 mmol); 96 %; farblose Kristalle; Schmp.: 45-46°C.



IR (KBr, $[\text{cm}^{-1}]$):

$\nu =$ 3300 (s,b) [ν OH]; 3090 (w), 3040 (w) [ν CH_{arom.}]; 2960 (w), 2930 (w), 2860 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1730 (s,b) [ν C=O]; 1590 (w), 1490 (m) [ν C=C_{arom.}]; 1105 (s) [ν C-O]; 710 (m) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,3-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1440 (m); 1410 (m); 1290 (w,sh); 1260 (m); 1220 (m); 1210 (w,sh); 1100 (w); 1010 (w); 980 (w); 810 (w); 760 (w).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 3,70 (s; 3H; O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 5,04 (d; 1H; $\underline{\text{C}}\text{H-OH}$; J = 5,3 Hz); 5,87 (d; 1H; $\text{C}\underline{\text{H}}\text{-OH}$; J = 5,3 Hz); 7,10-7,52 (m; 4H; C_6H_4).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

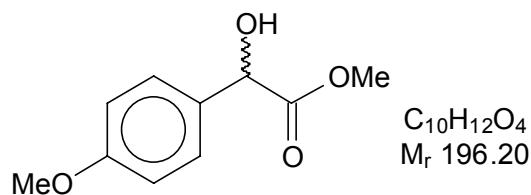
$\delta =$ 52,3 (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 73,2 ($\underline{\text{C}}\text{H-OH}$); 124,0 (C(6) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 125,5 (C(2) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 127,9 (C(4) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 130,5 (C(5) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 134,6 (C(3) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 140,8 (C(1) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 173,6 ($\underline{\text{C}}\text{O-O-CH}_3$).

4.4.2.4 Synthese von (*R,S*)-*p*-Methoxymandelsäuremethylester (\pm)-44

Die Umsetzung von 16,31 g (0,1 mol) von *p*-Methoxymandelsäurenitril (\pm)-36 mit 3,9 g (0,15 mol) Methanol (abs.) in 150 ml mit HCl gesättigtem Diethylether abs. ergab 21,29 g (93

mmol) (*R,S*)- α -Hydroxy-(*p*-methoxyphenyl)acetimidomethylesterhydrochlorid (93 % farblose Kristalle; Schmp._{zers.} 155-157°C).

Die Hydrolyse von 23.15 g (0.1 mol) Imidoester in 150 ml Wasser ergab gemäß AVV 12 17.84 g (91 mmol); 91 %; farblose Kristalle; Schmp.: 49-51°C.



IR (KBr, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3355 (s,b) [v OH]; 3080 (w), 3045 (w) [v CH_{arom.}]; 2970 (w), 2950 (w), 2865 (w) [v CH_{aliph.}]; 1745 (s,b) [v C=O]; 1590 (w), 1490 (m) [v C=C arom.]; 1090 (s) [v C-O] 840 (m) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,4-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1465 (m); 1415 (m); 1280 (w,sh); 1270 (m); 1220 (m); 1210 (w,sh); 1130 (w); 1030 (w); 980 (w); 810 (w); 770 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 3,59 (s; 3H; CO-O-CH₃); 3,74 (s; 3H; C₆H₄-O-CH₃); 5,08 (d; 1H; CH-OH; J = 6,0 Hz); 5,91 (s; breit; 1H; CH-OH); 6,90 (d; 2H; C₆H₄; J = 8,7 Hz); 7,31 (d; 2H; C₆H₄; J = 8,6 Hz).

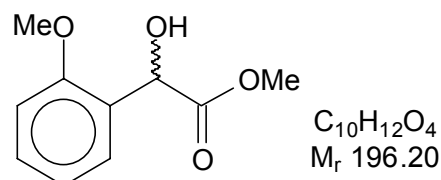
¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 52,5 (CO-O-CH₃); 55,5 (C₆H₄-O-CH₃); 69,9 (CH-OH); 111,2 (C(3,5) von C₆H₄); 128,5 (C(1) von C₆H₄); 132,3 (C(2,6) von C₆H₄); 159,6 (C(4) von C₆H₄); 173,9 (CO-O-CH₃).

4.4.2.5 Synthese von (*R,S*)-*o*-Methoxymandelsäuremethylester (\pm)-45

Die Umsetzung von 16.31 g (0.1 mol) von *o*-Methoxymandelsäurenitril (\pm)-37 mit 3.9 g (0.15 mol) Methanol (abs.) in 150 ml mit HCl gesättigtem Diethylether abs. ergab 20.07 g (88 mmol) (*R,S*)- α -Hydroxy-(*o*-methoxyphenyl)acetimidomethylesterhydrochlorid (88 % farblose Kristalle Schmp._{zers.} 153-154°C).

Die Hydrolyse von 20,07 g (0.88 mol) Imidoester in 150 ml Wasser ergab gemäß AVV 12, 16.41 g (84 mmol); 95 %; farblose Kristalle; Schmp. von 44-47°C.



IR (KBr, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3310 (s,b) [v OH]; 3080 (w), 3045 (w) [v CH_{arom.}]; 2970 (w), 2950 (w), 2865 (w) [v CH_{aliph.}]; 1750 (s,b) [v C=O]; 1590 (w), 1490 (m) [v C=C arom.]; 1045 (s) [v C-O] 765 (m) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,2-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1465 (m); 1415 (m); 1270 (w,sh); 1270 (m); 1220 (m); 1220 (w,sh); 1130 (w); 1030 (w); 980 (w); 810 (w); 760 (w).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 3,75 (s; 3H; CO-O- $\underline{\text{CH}}_3$); 3,81 (s; 3H; C_6H_4 -O- $\underline{\text{CH}}_3$); 5,14 (d; 1H; $\underline{\text{C}}\text{H-OH}$; $J = 6,0$ Hz); 5,32 (s; breit; 1H; CH-OH); 6,98 - 7,48 (m; 4H; C_6H_4).

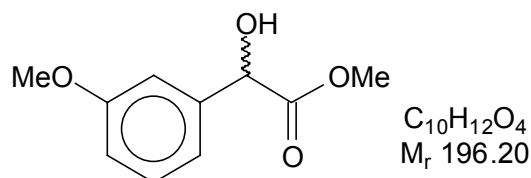
 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 52,3 (CO-O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 55,8 (C_6H_4 -O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 72,4 ($\underline{\text{C}}\text{H-OH}$); 111,8 (C(3) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 121,3 (C(5) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 127,5 (C(1) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 128,2 (C(4) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 130,3 (C(6) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 157,9 (C(2) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 173,6 ($\underline{\text{C}}\text{O-O-CH}_3$).

4.4.2.6 Synthese von (*R,S*)-*p*-Methylmandelsäuremethylester (\pm)-46

Die Umsetzung von 14.71 g (0.1 mol) von *p*-Methylmandelsäurenitril (\pm)-38 mit 3.9 g (0.15 mol) Methanol (abs.) in 150 ml mit HCl gesättigtem Diethylether abs. ergab , 20.39 g (95 mmol) (*R,S*)- α -Hydroxy-*p*-methylphenylacetimidomethylesterhydrochlorid (95 % farblose Kristalle Schmp.-Zers. 95-96°C).

Die Hydrolyse von 21.47 g (0.1 mol) Imidoester in 150 ml Wasser ergab gemäß AVV 12 13.68 g (76 mmol); 76 %; gelbliches Öl.

**IR (KBr, $[\text{cm}^{-1}]$):**

$\nu =$ 3460 (w), 3320 (s), 3260 (m) [ν NH, ν OH]; 3060 (w), 3020 (w) [ν $\text{CH}_{\text{arom.}}$]; 2960 (w), 2920 (w) [ν $\text{CH}_{\text{aliph.}}$]; 1670 (s,vb) [ν $\text{HN}=\text{C}$]; 1580 (m), 1550 (m), 1500 (m) [ν $\text{C}=\text{C}$ arom.]; 1460 (m) [δ CH_2]; 1090 (s) [ν C-O]; 760 (s), 710 (m)); [δ CH-out of plane, charakteristisch für Monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1410 (w), 1300 (m), 1240 (w), 1180 (m), 1120 (m), 1070 (s), 980 (w); 900 (w); 870 (w); 740 (m).

 $^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 2,34 (s; 3H; C- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 3,61 (s; 3H; O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 5,30 (d; 1H; $\underline{\text{C}}\text{H-OH}$; $J = 4,8$ Hz); 5,93 (d; 1H; CH-OH ; $J = 4,8$ Hz); 7,17-7,34 (m; 4H; C_6H_4).

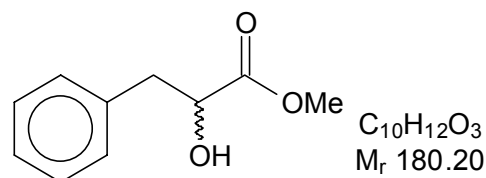
 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 19,4 (C- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 52,3 (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 70,6 (HO- $\underline{\text{C}}\text{H}$); 127,7 (C(3,5) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 130,9 (C(2,6) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 136,3 (C(1) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 138,6 (C(4) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 173,8 (CO-O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

4.4.2.7 Synthese von (*R,S*)- α -Hydroxy-(3-phenyl)-propionsäuremethylester (\pm)-47

Die Umsetzung von 14.72 g (0.1 mol) von (*R,S*)-2-Phenylethylcyanhydrin (\pm)-39 mit 3.9 g (0.15 mol) Methanol abs. in 150 ml mit HCl gesättigtem Diethylether abs. ergab 20.49 g (95 mmol) (*R,S*)- α -Hydroxy-4-phenylpropylimidomethylesterhydrochlorid (95 % farblose Kristalle Schmp.-Zers. 89-90°C).

Die Hydrolyse von 21.56 g (0.1 mol) Imidoester in 150 ml Wasser ergab gemäß AVV 12 17.11 g (95 mmol); 95 %; farbloses Öl.

**IR (KBr, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3470 (s,vb) [ν OH]; 3080 (w), 3060 (m), 3030 (m), [ν CH_{arom.}]; 2950 (s), 2850 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1740 (s,b) [ν C=O]; 1600 (m) [ν C=C_{arom.}]; 1220 (s,vb) [ν C-O]; 750 (s), 700 (s) [δ C-H, out of plane, charakteristisch für Monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1500 (s), 1450 (s), 1100 (s).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 2,83 (d,d; 1H; A-Teil eines ABMX-Spinsystems; CH₂-CH-OH; JAB = 13,7 Hz; JAM = 8,1 Hz); 2,96 (d,d; 1H; B-Teil eines ABMX-Spinsystems; CH₂-CH-OH; AB = 13,7 Hz; JBM = 5,0 Hz); 3,61 (s; 3H; O-CH₃); 4,23-4,28 (d,d,d; 1H; CH₂-CH-OH; nicht aufgelöst); 5,52 (d; 1H; CH₂-CH-OH; J = 6,2 Hz); 7,18-7,29 (m; 5H; C₆H₅).

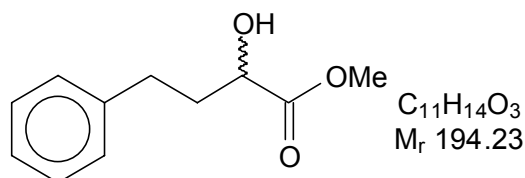
¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 40,2 (CH₂-CH-OH); 51,9 (O-CH₃); 71,9 (CH₂-CH-OH); 127,0 (C(4) von C₆H₅); 128,6 (C(2,6) von C₆H₅); 129,9 (C(3,5) von C₆H₅); 138,3 (C(1) von C₆H₅); 174,5 (CO-O-CH₃).

4.4.2.8 Synthese von (R,S)- α -Hydroxy-(4-phenyl)-butansäuremethylester (\pm)-48

Die Umsetzung von 16.12 g (0.1 mol) von (R,S)-3-Phenylpropylcyanhydrin (\pm)-40 mit 3.9 g (0.15 mol) Methanol (abs.) in 150 ml mit HCl gesättigtem Diethylether abs. ergab 21.33 g (93 mmol) (R,S)- α -Hydroxy-(4-phenylbutyl)-imidomethylesterhydrochlorid (93 % farblose Kristalle Schmp._{zers.} 147-150°C).

Die Hydrolyse von 22.94 g (0.1 mol) Imidoester in 150 ml Wasser ergab gemäß AVV 12 18.05 g (93 mmol); 93 %; farbloses Öl.

**IR (KBr, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3460 (s,vb) [ν OH]; 3090 (w), 3065 (w), 3030 (m) [ν CH_{arom.}]; 2957 (m), 2930 (w), 2865 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1740 (s,b) [ν C=O]; 1608 (m), 1498 (m) [ν C=C_{arom.}]; 1455 (m), 1440 (m) [δ CH_{aliph.}]; 1220 (s,b) [ν C-O]; 745 (m) [δ CH out of plane, monosubstituierter Aromat]; weitere Banden bei 1100 (m), 990 (m), 935 (s)

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

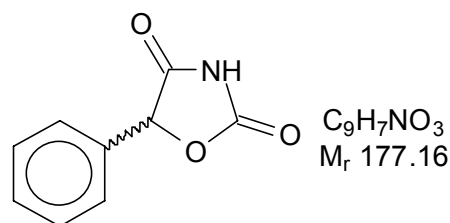
$\delta =$ 1,79-1,94 (m; 2H; CH₂-CH₂-CH-OH); 2,65 (d,d; 2H; CH₂-CH₂-CH-OH; J = 8,1 Hz; J = 7,6 Hz); 3,62 (s; 3H; O-CH₃); 3,99-4,04 (m; 1H; CH₂-CH-OH); 5,45 (d; 1H; CH₂-CH-OH; J = 6,0 Hz); 7,15-7,29 (m; 5H; C₆H₅).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 31,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-CH-OH}$); 36,3 ($\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH-OH}$); 52,0 ($\text{O-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 69,7 ($\underline{\text{C}}\text{H-OH}$); 126,4 ($\text{C}(4)$ von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 128,89 ($\text{C}(2,6)$ von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 128,92 ($\text{C}(3,5)$ von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 142,0; 175,1 ($\underline{\text{C}}\text{O-O-CH}_3$).

4.4.3 Synthese der Oxazolidin-2,4-dione (\pm)-49-(\pm)-58**4.4.3.1 Synthese von (*R,S*)-5-Phenyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-49**

Die Umsetzung von 10.00 g (60 mmol) (*R,S*)-Mandelsäuremethylester mit einer aus 5.73 g (60 mmol) Guanidinhydrochlorid und 3.37 g (60 mmol) Kaliumhydroxid dargestellten ethanolischen Guanidinlösung ergab nach anschließendem Erhitzen des Zwischenproduktes mit 100 ml 2 N Salzsäure gemäß der AVV 13 4.41 g (25 mmol); 42 % farblose, nadelförmige Kristalle; Schmp.: 104-106°C (Lit.¹⁹⁵: 105°C).

**IR (KBr, [cm^{-1}]):**

$\nu =$ 3300 (s, b) [NH]; 3060 (w) [$\text{CH}_{\text{arom.}}$]; 2930 (w) [CH]; 1820 (s) [C=O in 2-Pos.]; 1735 (vs, b) [C=O in 4-Pos.]; 1495 (m) [C=Carom.]; 1155 (s) [C-O]; 760 (s), 690 (s) [CH-out of plane , charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1530 (w), 1455 (m), 1385 (s), 1335 (s), 1300 (m), 1275 (m), 1195 (w), 1075 (w), 1050 (m), 1015 (m), 955 (w), 920 (m), 845 (w), 745 (m), 730 (m), 720 (m), 610 (m)

 ^1H -NMR (400,132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

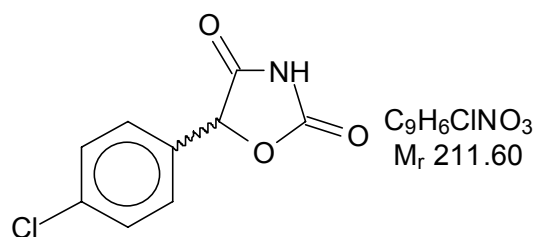
$\delta =$ 6.05 (s; 1 H; $\underline{\text{C}}\text{H-O}$); 7.35-7.55 (m; 5 H; C_6H_5); 12.20 (s; 1 H; $\underline{\text{N}}\text{H}$)

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 81.1 ($\underline{\text{C}}\text{H-O}$); 126.8, 129.0 ($\text{C}(2,3,5,6)$ von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 129.6, 132.8 ($\text{C}(1,4)$ von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 155.7 ($\text{O-}\underline{\text{C}}\text{O-NH}$); 173.6 ($\text{CH-}\underline{\text{C}}\text{O}$)

4.4.3.2 Synthese von (*R,S*)-5-*p*-Chlorphenyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-50

Die Umsetzung von 9.98 g (50 mmol) (*R,S*)-*p*-Chlormandelsäuremethylester (\pm)-41 mit einer aus 4.78 g (50 mmol) Guanidinhydrochlorid und 2.81 g (50 mmol) Kaliumhydroxid dargestellten ethanolischen Guanidinlösung ergab nach anschließendem Erhitzen des Zwischenproduktes mit 100 ml 2 N Salzsäure gemäß der AVV 13 4.02 g (19 mmol); 38 %; farblose, nadelförmige Kristalle; Schmp.: 151-153°C (Lit.¹⁹⁵: 153°C).

**IR (KBr, cm^{-1}):**

$\nu =$ 3240 (s,b) [ν NH]; 3090 [ν CH_{arom.}]; 2940 [ν CH_{aliph.}]; 1810 (s) [ν C=O in 2 Pos]; 1720 (s) [ν C=O in 4 Pos.]; 1600 (w), 1500 (m) [ν C=C arom.]; 1170 (s) [ν C-O]; 820 (m) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,4-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1390 (s); 1290 (m); 1090 (m); 1010 (s); 930 (m); 760 (m); 730 (w); 700 (w).

 1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

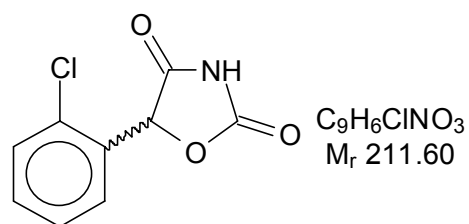
$\delta =$ 6,06 (s; 1H; O-CH-CO); 7,44 (d; 2H; C₆H₄; J = 8,6 Hz); 7,51 (d; 2H; C₆H₄; J = 8,5 Hz); 12,12 (s; 1H; CO-NH-CO).

 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 80,8 (O-CH-CO); 129,2 (C(3,5) von C₆H₄); 129,6 (C(2,6) von C₆H₄); 132,3 (C(4) von C₆H₄); 134,8 (C(1) von C₆H₄); 156,0 (CH-O-CO); 173,7 (CH-CO-NH).

4.4.3.3 Synthese von (R,S)-5-o-Chlorphenylloxazolidin-2,4-dion (±)-51

Die Umsetzung von 9.98 g (50 mmol) (R,S)-o-Chlormandelsäuremethylester (±)-42 mit einer aus 4.78 g (50 mmol) Guanidinhydrochlorid und 2.81 g (50 mmol) Kaliumhydroxid dargestellten ethanolischen Guanidinlösung ergab nach anschließendem Erhitzen des Zwischenproduktes mit 100 ml 2 N Salzsäure gemäß der AVV 13 4.86 g (23 mmol); 46 %; farblose, nadelförmige Kristalle; Schmp.: 105-107°C (Lit.¹⁹⁵:106-108°C).

**IR (KBr, cm^{-1}):**

$\nu =$ 3290 (s,b) [ν NH]; 3090 [ν CH_{arom.}]; 2940 [ν CH_{aliph.}]; 1760 (s) [ν C=O in 2 Pos]; 1710 (s) [ν C=O in 4 Pos.]; 1600 (w), 1500 (m) [ν C=C arom.]; 1080 (s) [ν C-O]; 770 (m) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,2-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1380 (s); 1270 (m); 1090 (m); 1010 (s); 930 (m); 760 (m); 750 (w); 710 (w).

 1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

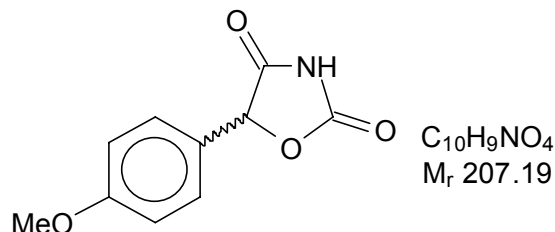
$\delta =$ 6,28 (s; 1H; O-CH-CO); 7,06-7,73 (m; 4H; C₆H₄); 12,01 (s; 1H; CO-NH-CO).

 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 71,2 (O-CH-CO); 126,8 (C(5) von C₆H₄); 127,5 (C(6) von C₆H₄); 129,1 (C(4) von C₆H₄); 129,4 (C(3) von C₆H₄); 132,2 (C(1) von C₆H₄); 139,9 (C(1) von C₆H₄); 158,1 (CH-O-CO); 169,5 (CH-CO-NH).

4.4.3.4 Synthese von (*R,S*)-5-*p*-Methoxyphenyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-52

Die Umsetzung von 9.81 g (50 mmol) (*R,S*)-*p*-Methoxymandelsäuremethylester (\pm)-44 mit einer aus 4.78 g (50 mmol) Guanidinhydrochlorid und 2.81 g (50 mmol) Kaliumhydroxid dargestellten ethanolischen Guanidinlösung ergab nach anschließendem Erhitzen des Zwischenproduktes mit 100 ml 2 N Salzsäure gemäß der AVV 13 4.22 g (21 mmol); 41 % farblose, nadelförmiger Kristalle; Schmp.: 137-138°C (Lit.¹⁹⁶: 135-136°C).



IR (KBr, cm^{-1}):

$\nu =$ 3260 (s,b) [ν NH]; 3080 (w), 3060 (w) [ν CH_{arom.}]; 2980 (w), 2940 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1820 (s) [ν C=O in 2 Pos.]; 1730 (s,b) [ν C=O in 4 Pos.]; 1590 (m), 1510 (m) [ν C=C arom.]; 1140 (s) [ν C-O]; 830 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,4-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1405 (s); 1380 (m); 1300 (m); 1080 (m); 1050 (w); 100 (s); 940 (m); 740 (m); 720 (w); 690 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

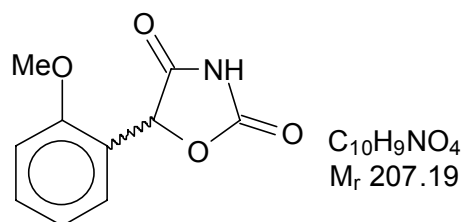
$\delta =$ 3,77 (s; 3H; O-CH₃); 5,97 (s; 1H; O-CH-CO); 7,00 (d; 2H; C₆H₄; J = 8,7 Hz); 7,33 (d; 2H; C₆H₄; J = 8,6 Hz); 12,05 (s; 1H; CO-NH-CO).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 55,8 (O-CH₃); 81,7 (O-CH-CO); 115,2 (C(3,5) von C₆H₄); 125,3 (C(1) von C₆H₄); 129,3 (C(2,6) von C₆H₄); 156,2 (CH-O-CO); 160,8 (C(4) von C₆H₄); 174,3 (CH-CO-NH).

4.4.3.5 Synthese von (*R,S*)-5-*o*-Methoxyphenyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-53

Die Umsetzung von 9.81 g (50 mmol) (*R,S*)-*o*-Methoxymandelsäuremethylester (\pm)-45 mit einer aus 4.78 g (50 mmol) Guanidinhydrochlorid und 2.81 g (50 mmol) Kaliumhydroxid dargestellten ethanolischen Guanidinlösung ergab nach anschließendem Erhitzen des Zwischenproduktes mit 100 ml 2 N Salzsäure gemäß der AVV 13 4.53 g (23 mmol); 44 %; farblose, nadelförmige Kristalle; Schmp.: 176-178°C (Lit.¹⁹⁵: 175-177°C).



IR (KBr, cm^{-1}):

$\nu =$ 3300 (s,b) [ν NH]; 3080 (w), 3060 (w) [ν CH_{arom.}]; 2980 (w), 2940 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1750 (s) [ν C=O in 2 Pos.]; 1690 (s,b) [ν C=O in 4 Pos.]; 1580 (m), 1510 (m) [ν C=C arom.]; 1140 (s) [ν C-O]; 770 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,2-

Disubstituiert]; weitere Banden bei 1405 (s); 1380 (m); 1310 (m); 1080 (m); 1050 (w); 100 (s); 940 (m); 750 (m); 710 (w); 690 (w).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

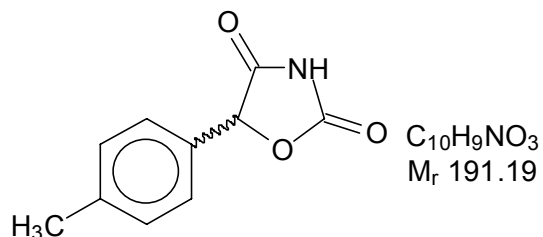
$\delta =$ 3,81 (s; 3H; O- $\underline{\text{CH}}_3$); 5,62 (s; 1H; O- $\underline{\text{CH}}-\text{CO}$); 6,98-7,49 (m; 4H; $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 12,01 (s; 1H; CO- $\underline{\text{NH}}-\text{CO}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 55,7 (O- $\underline{\text{CH}}_3$); 72,3 (O- $\underline{\text{CH}}-\text{CO}$); 111,8 (C(3) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 121,3 (C(5) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 128,2 (C(4) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 129,0 (C(6) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 129,6 (C(1) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 157,1 (CH-O- $\underline{\text{CO}}$); 159,3 (C(4) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 169,8 (CH- $\underline{\text{CO}}-\text{NH}$).

4.4.3.6 Synthese von (*R,S*)-5-*p*-Methylphenyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-54

Die Umsetzung von 9.00 g (50 mmol) (*R,S*)-*p*-Methylmandelsäuremethylester (\pm)-46 mit einer aus 4.78 g (50 mmol) Guanidinhydrochlorid und 2.81 g (50 mmol) Kaliumhydroxid dargestellten ethanolischen Guanidinlösung ergab nach anschließendem Erhitzen des Zwischenproduktes mit 100 ml 2 N Salzsäure gemäß der AVV 13 4.01 g (22 mmol); 42 %; farblose, nadelförmige Kristalle; Schmp.: 127-128°C (Lit.¹⁹⁵: 127-129°C).



IR (KBr, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3320 (s,b) [ν NH]; 3050 (w), 3020 (w) [ν CH_{arom.}]; 2960 (w), 2940 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1820 (s) [ν C=O in 2 Pos.]; 1750 (s,b) [ν C=O in 4 Pos.]; 1600 (m), 1550 (m), 1500 (m) [ν C=C arom.]; 1140 (s) [ν C-O]; 830 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,4- Disubstituiert]; weitere Banden bei 1450 (m); 1400 (s); 1300 (m); 1250 (m); 1075 (m); 1010 (s); 925 (m); 750 (m); 740 (w); 710 (w).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 2,31 (s; 3H; C- $\underline{\text{CH}}_3$); 5,98 (s; 1H; O- $\underline{\text{CH}}-\text{CO}$); 7,24 (d; 2H; $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$; J = 8,8 Hz); 7,28 (d; 2H; $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$; J = 8,7 Hz); 8,19-8,81 (breit; 1H; CO- $\underline{\text{NH}}-\text{CO}$).

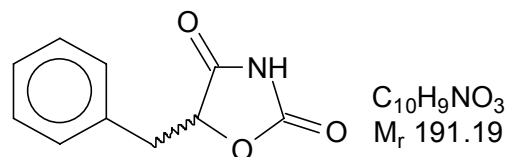
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 20,9 (C- $\underline{\text{CH}}_3$); 92,4 (O- $\underline{\text{CH}}-\text{CO}$); 129,7 (C(2,3,5,6) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 130,6 (C(4) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 132,9 (C(1) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_4$); 157,3 (O- $\underline{\text{CO}}-\text{NH}$); 170,6 (NH- $\underline{\text{CO}}-\text{CH}$).

4.4.3.7 Synthese von (*R,S*)-5-Benzoyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-55

Die Umsetzung von 9.00 g (50 mmol) (*R,S*)- α -Hydroxy-(3-phenyl)-propionsäuremethylester (\pm)-47 mit einer aus 4.78 g (50 mmol) Guanidinhydrochlorid und 2.81 g (50 mmol) Kaliumhydroxid dargestellten ethanolischen Guanidinlösung ergab nach anschließendem

Erhitzen des Zwischenproduktes mit 100 ml 2N Salzsäure gemäß der AVV 13 2.58 g (13 mmol); 27 % farblose, nadelförmige Kristalle; Schmp.: 104-106°C (Lit.¹⁹⁷:105°C).



IR (KBr, cm^{-1}):

$\nu =$ 3320 (s,b) [ν NH]; 3090 (w), 3060 (w), 3030 (w) [ν CH_{arom.}]; 2960 (w), 2930 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1830 (s), 1725 (s,b) [ν C=O]; 1610 (m), 1530 (m), 1500 (m) [ν C=C arom.]; 1460 (m) [δ CH₂]; 1160 (s) [ν C-O]; 770 (s), 700 (s)); [δ CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1440 (w); 1400 (s); 1340 (s); 1310 (w); 1090 (s); 1080 (s); 1010 (m); 980 (m); 950 (m); 870 (m); 750 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

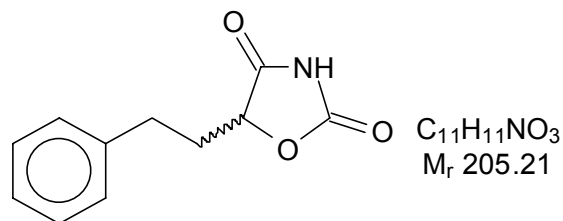
$\delta =$ 3,08 (A-Teil eines ABX-Spinsystems; 1H; CH₂-CH; JAB = 14,7 Hz; JAX = 6,6 Hz); 3,21 (B-Teil eines ABX-Spinsystems; 1H; CH₂-CH; JAB = 14,7 Hz; JBX = 4,3 Hz); 5,25 (X-Teil eines ABX-Spinsystems; 1H; CH₂-CH; JAX = 6,6 Hz; JBX = 4,3 Hz); 7,20-7,35 (m; 5H; C₆H₅); 11,7 (s; 1H; CO-NH-CO).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 36,2 (CH₂-CH); 80,9 (O-CH-CO); 127,6 (C(4) von C₆H₅); 128,9 (C(2,6) von C₆H₅); 129,9 (C(3,5) von C₆H₅); 135,3 (C(1) von C₆H₅); 156,0 (CH-O-CO); 174,9 (CH-CO-NH).

4.4.3.8 Synthese von (R,S)-5-β-Phenylethylloxazolidin-2,4-dion (±)-56

Die Umsetzung von 9.70 g (50 mmol) (R,S)-α-Hydroxy-(4-phenyl)-butansäuremethylester (±)-48 mit einer aus 4.78 g (50 mmol) Guanidinhydrochlorid und 2.81 g (50 mmol) Kaliumhydroxid dargestellten ethanolischen Guanidinlösung ergab nach anschließendem Erhitzen des Zwischenproduktes mit 100 ml 2 N Salzsäure gemäß der AVV 13 2.57 g (13 mmol); 25 %; farblose, nadelförmige Kristalle; Schmp.: 92-93°C.



IR (KBr, cm^{-1}):

$\nu =$ 3200 (s,b) [ν NH]; 3100 (w), 3040 (w) [ν CH_{arom.}]; 2960 (w), 2940 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1830 (s) [ν C=O in 2 Pos.]; 1750 (s,b) [ν C=O in 4 Pos.]; 1610 (w), 1540 (w), 1500 (m) [ν C=C arom.]; 1460 (m) [δ CH]; 1170 (s) [ν C-O]; 750 (s), 700 (s)); [δ CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1400(s), 1330 (m); 1200 (m); 1100 (m); 1060 (m); 1040 (m); 1000 (m); 900 (m); 790 (m); 640 (m); 620 (m).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

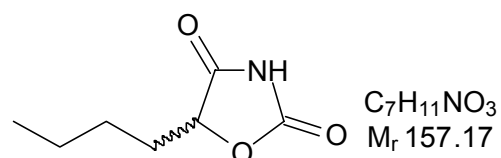
$\delta =$ 1,83-2,11 (m; 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}$); 2,64 (d,d; 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}$); $J_1 = 7,7$ Hz; $J_2 = 8,2$ Hz); 4,63 (d,d; 1H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}$; $J_1 = 4,4$ Hz; $J_2 = 7,5$ Hz); 7,17-7,31 (m; 5H; C_6H_5); 8,32 (breit; 1H; CO-NH-CO).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 30,9 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}$); 33,0 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}$); 81,6 (O-CH-CO); 126,7 (C(4) von C_6H_5); 128,9 (C(2,6) von C_6H_5); 129,0 (C(3,5) von C_6H_5); 141,2 (C(1) von C_6H_5); 177,1 (CH-O-CO); 188,8 (CH-CO-NH).

4.4.3.9 Synthese von (*R,S*)-5-*n*-Butyl-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-57

Die Umsetzung von 10.00 g (62 mmol) (*R,S*)- α -Hydroxyhexansäureethylester mit einer aus 5.96 g (62 mmol) Guanidinhydrochlorid und 3.51 g (62 mmol) Kaliumhydroxid dargestellten ethanolischen Guanidinlösung ergab nach anschließendem Erhitzen des Zwischenproduktes mit 35 ml 2 N Salzsäure gemäß der AVV 13 2.44 g (16 mmol); 25 %; farblose Kristalle; Schmp.: 76-77°C (Lit.¹⁹⁸:75°C).

**IR (KBr, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3180 (s), 3100 (s) [NH]; 2960 (s), 2930 (s), 2870 (m) [s,as CH_2 , CH_3]; 1825 (s) [C=O in 2-Pos.]; 1740 (vs, b) [C=O in 4-Pos.]; 1470 (m), 1460 (m, sh) 1435 (m) [as CH_3 , CH_2]; 1175 (s) [C-O]; weitere Banden bei 2760 (m), 1390 (s), 1330 (s), 1215 (w), 1135 (m), 1080 (m), 1060 (w), 1020 (m), 1000 (s), 945 (m), 900 (m), 875 (m), 800 (m), 770 (m), 740 (m), 680 (m), 635 (w), 615 (m), 460 (w), 450 (m)

 $^1\text{H-NMR}$ (400,132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

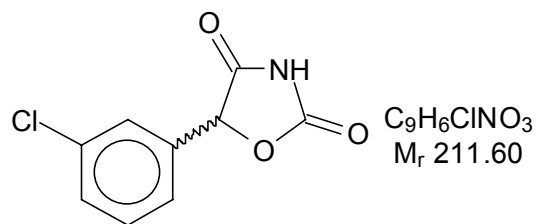
$\delta =$ 0.87 (t; 3 H; $J = 7.0$ Hz; CH_3); 1.15-1.50 (m; 4 H; $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$); 1.55-1.90 (m; 2 H; $\text{CH}_2\text{-CH-}$); 4.95 (dd; 1 H; $J_1 = 4.7$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz; $\text{CH}_2\text{-CH-}$); 11.84 (s; 1 H; CO-NH-CO)

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100,625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 13.7 (CH_3); 21.7 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 25.9 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 29.7 ($\text{CH}_2\text{-CH}$); 80.2 ($\text{CH}_2\text{-CH}$); 155.8 (O-CO-NH); 175.2 (CH-CO-NH).

4.4.3.10 Synthese von (*R,S*)-5-*m*-Chlorphenyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-58

Die Umsetzung von 9.98 g (50 mmol) (*R,S*)-*m*-Chlormandelsäuremethylester (\pm)-43 mit einer aus 4.78 g (50 mmol) Guanidinhydrochlorid und 2.81 g (50 mmol) Kaliumhydroxid dargestellten ethanolischen Guanidinlösung ergab nach anschließendem Erhitzen des Zwischenproduktes mit 100 ml 2 N Salzsäure gemäß der AVV 13 4.57 g (22 mmol); 43 %; farblose, nadelförmige Kristalle; Schmp.: 142-143°C (Lit.¹⁹⁵:142-144°C).

**IR (KBr, cm^{-1}):**

$\nu =$ 3300 (s,b) [ν NH]; 3090 [ν CH_{arom.}]; 2940 [ν CH_{aliph.}]; 1740 (s) [ν C=O in 2 Pos]; 1660 (s) [ν C=O in 4 Pos.]; 1600 (w), 1570 (m) [ν C=C arom.]; 1090 (s) [ν C-O]; 710 (m) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,3-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1380 (s); 1270 (m); 1090 (m); 1030 (s); 930 (m); 760 (m); 740 (w); 700 (w).

 1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 6,12 (s; 1H; O-CH-CO); 7,10-7,52 (m; 4H; C₆H₄); 12,13 (s; 1H; CO-NH-CO).

 $^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 70,9 (O-CH-CO); 124,0 (C(6) von C₆H₄); 125,5 (C(2) von C₆H₄); 127,9 (C(4) von C₆H₄); 130,0 (C(5) von C₆H₄); 134,6 (C(3) von C₆H₄); 140,8 (C(1) von C₆H₄); 158,0 (CH-O-CO); 169,7 (CH-CO-NH).

4.4.4 Synthese der O-Carbamoyl-(R)- α -Hydroxycarbonsäuren**4.4.4.1 Synthese von O-Carbamoyl-(R)-mandelsäure (R)-59a, (R)-59b**

a) unter Verwendung der Hydantoinase-1

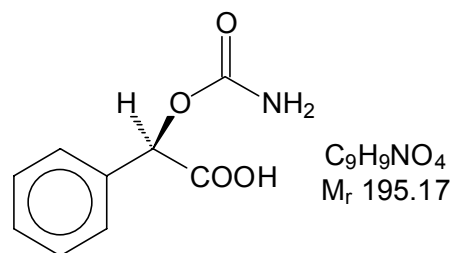
Bei der Umsetzung von 0,885 g (5 mmol) (\pm)-5-Phenylloxazolidin-2,4-dion (\pm)-49 nach AVV 15 erhielt man nach 186 Stunden Reaktionszeit 778 mg eines farblosen Feststoffes, welcher noch ca. 10% Edukt (HPLC) enthält. Es wurden folgende Retentionszeiten bestimmt: O-Carbamoyl-(R)-mandelsäure (R)-59 [5,0 min]; Phenylloxazolidin-2,4-dion (\pm)-49 [6,9 min]; Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 μ M) 250 mm * 3 mm, mobile Phase; Acetonitril / Wasser / Trifluoressigsäure = 70/30/0,1, Flussrate = 0,5 ml/min, Detektionswellenlänge: 254 nm.

100 mg des Feststoffes wurde mittels semi-präparativer HPLC unter gleichen Bedingungen s.o. getrennt: Säule LiChrospher 100 RP-18 (10 μ M) 250 mm * 10 mm. Man erhielt 76 mg (R)-59a farblose Kristalle; Schmp._{Zers.}: 160-161°C; $[\alpha]_D^{20}$ -155,3° (c1; MeOH).

b) unter Verwendung der Hydantoinase-2

Bei der Umsetzung von 0,885 g (5 mmol) (\pm)-5-Phenylloxazolidin-2,4-dion (\pm)-49 nach AVV 15, erhielt man nach 186 Stunden Reaktionszeit 823 mg eines farblosen Feststoffes, welcher noch ca. 7% Edukt (HPLC) enthält.

100 mg des Feststoffes wurden analog dem oben beschriebenen Verfahren mittels semi-präparativer HPLC getrennt. Man erhielt 74 mg (R)-59b farblose Kristalle; $[\alpha]_D^{20}$ -154,1° (c1; MeOH).

**IR (KBr, [cm⁻¹]):**

$\nu =$ 3470 (s), 3300 (m, b) [NH]; 2850 (m, vb), 2550 (m, vb) [OH_{bond.}]; 1730 (vs), 1675 (s) [C=O]; 1590 (s) [Amid II]; 1080 (s) [C-O]; 940 (m, b) [OH out of plane]; 740 (s), 700 (s) [CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1415 (s), 1340 (m), 1305 (m), 1265 (s), 1235 (s) 1185 (m), 1110 (w), 1010 (w), 975 (m), 870 (w), 790 (m), 655 (m), 625 (m), 575 (m, b), 500 (m)

¹H-NMR (250.130 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 5.67 (s; 1 H; CH-O); 6.50-6.80 (breit; 1 H; NH₂); 6.80-7.15 (breit; 1 H; NH₂); 7.40-7.55 (m; 5 H; C₆H₅); 13.00 (s; 1 H; COOH)

¹³C{¹H}-NMR (62.896 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 73.8 (CH-O); 127.7, 128.6 (C(2,3,5,6) von C₆H₅); 128.8 (C(4) von C₆H₅); 135.2 (C(1) von C₆H₅); 155.9 (O-CO-NH₂); 170.9 (COOH)

4.4.4.2 Synthese von O-Carbamoyl-(R)-p-chlormandelsäure (R)-60a, (R)-60b

a) unter Verwendung der Hydantoinase-1

Bei der Umsetzung von 1,0573 g (5 mmol) (*R,S*)-(*p*-Chlorphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**50** nach AVV 15 erhielt man nach 164 Stunden Reaktionszeit 1,042 g eines farblosen Feststoffes, welcher noch ca. 17% Edukt (HPLC) enthielt. Es wurden folgende Retentionszeiten bestimmt: *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-chlormandelsäure (**R**)-**60** [5,9 min]; (*R,S*)-(*p*-Chlorphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**50** [8,8 min]; Säule; LiChrospher 100 RP-18 (5 μ M) 250 mm * 3 mm, Mobile Phase; Acetonitril / Wasser / Trifluoressigsäure = 70/30/0,1, Flussrate = 0,5 ml/min, Detektionswellenlänge: 254 nm.

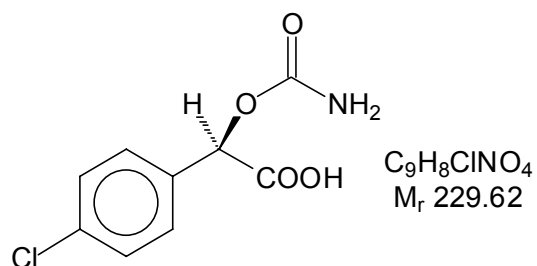
100 mg des Feststoffes wurde mittels semi-präparativer HPLC unter gleichen Bedingungen s.o. getrennt: Säule LiChrospher 100 RP-18 (10 μ M) 250 mm * 10 mm. Man erhielt 78 mg (**R**)-**60a** farblose Kristalle; Schmp._{Zers.} von 181-184°C; $[\alpha]_D^{20}$ -130,7° (c1; MeOH). Der Anteil an chemischer Hydrolyse nach 164 Stunden Reaktionszeit betrug danach 4,1 % (bestimmt aus Reaktionsansatz ohne Enzym).

b) unter Verwendung der Hydantoinase-2

Bei der Umsetzung von 1,0573 g (5 mmol) (*R,S*)-(*p*-Chlorphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**50** nach der AVV 15 erhielt man nach 263 Stunden Reaktionszeit 1,031 g eines farblosen Feststoffes, welcher noch ca. 16% Edukt (HPLC) enthielt.

100 mg des Feststoffes wurden analog dem oben beschriebenen Verfahren mittels semi-präparativer HPLC getrennt. Man erhielt 72 mg (**R**)-**60b** farblose Kristalle; $[\alpha]_D^{20}$ -101,9° (c1;

MeOH). Der Anteil an chemischer Hydrolyse nach 263 Stunden Reaktionszeit betrug 7,6 % (bestimmt aus Reaktionsansatz ohne Enzym).



IR (KBr, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3410 (s,b), 3200 (m,b) [ν NH]; 2510 (m,vb) [ν OHbond]; 1750 (s), 1725 (vs) [ν C=O] 1495 (m) [Amid II]; 1090 (s) [ν C-O] 760 (s), [CH-out of plane, charakteristisch für 1,4-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1590 (m,b); 1400 (s); 1260 (m); 1225 (m); 815 (w); 705 (m).

¹H-NMR (250.133 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 5,69 (s; 1H; O-CH-COOH); 6,55-7,01 (breit; 2H; H₂N-CO); 7,43-7,50 (m; 4H; C₆H₄); 12,51-13,15 (breit; 1H; COOH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 73,5 (O-CH-COOH); 129,3 (C(3,5) von C₆H₄); 129,9 (C(2,6) von C₆H₄); 133,9 (C(4) von C₆H₄); 138,3 (C(1) von C₆H₄); 156,2 (H₂N-CO-O); 171,1 (CH-COOH).

4.4.4.3 Synthese von O-Carbamoyl-(R)-o-chlormandelsäure (R)-61a, (R)-61b

a) unter Verwendung der Hydantoinase-1

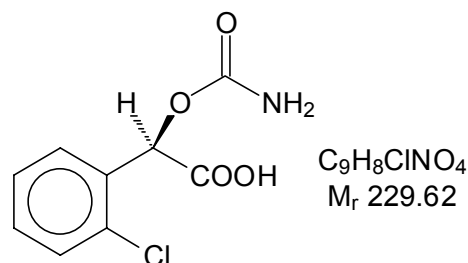
Bei der Umsetzung von 1,0573 g (5 mmol) (R,S)-(o-Chlorphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-51 nach AVV 15 erhielt man nach 787 Stunden Reaktionszeit 982 mg eines farblosen Feststoffs, welcher noch ca. 58% Edukt (HPLC) enthält. Es wurden folgende Retentionszeiten bestimmt: O-Carbamoyl-(R)-o-chlormandelsäure (R)-61 [5,2 min]; (R,S)-(o-Chlorphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-51 [7,2 min]; Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 μ M) 250 mm * 3 mm, Mobile Phase; Acetonitril / Wasser / Trifluoressigsäure = 70/30/0,1, Flussrate = 0,5 ml/min, Detektionswellenlänge: 254 nm.

200 mg des Feststoffes wurde mittels semi-präparativer HPLC unter gleichen Bedingungen (s.o.) getrennt: Säule LiChrospher 100 RP-18 (10 μ M) 250 mm * 10 mm. Man erhielt 69 mg (R)-61a farblose Kristalle; Schmp.zers. 158-161°C; [α]_D²⁰ -29,8° (c1; MeOH). Der Anteil an chemischer Hydrolyse nach 787 Stunden Reaktionszeit betrug 10,7 % (bestimmt aus Reaktionsansatz ohne Enzym).

b) unter Verwendung der Hydantoinase-2

Bei der Umsetzung von 1,0573 g (5 mmol) (R,S)-(o-Chlorphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-51 nach der AVV 15 erhielt man nach 832 Stunden Reaktionszeit 956 mg eines farblosen Feststoffs, welcher noch ca. 65% Edukt (HPLC) enthält.

200 mg des Feststoffes wurden analog dem oben beschriebenen Verfahren mittels semi-präparativer HPLC getrennt. Man erhielt 69 mg (**R**)-**61b** farblose Kristalle; $[\alpha]_D^{20}$ $-17,5^\circ$ (c1; MeOH). Der Anteil an chemischer Hydrolyse nach 832 Stunden Reaktionszeit betrug 11,1 % (bestimmt aus Reaktionsansatz ohne Enzym).



IR (KBr, [cm⁻¹]):

ν = 3360 (s,b), 3200 (m,b) [ν NH]; 2510 (m,vb) [ν OHbond]; 1730 (s), 1670 (vs) [ν C=O]; 1620 (m) [Amid II]; 1080 (s) [ν C-O]; 960 (m, b) [OH out of plane]; 770 (s), [CH-out of plane, charakteristisch für 1,2-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1580 (m,b); 1410 (s); 1320 (m); 1250 (m); 820 (w); 760 (s), 710 (m).

¹H-NMR (250.133 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 5,55 (s; 1H; O-CH-COOH); 6,18-6,46 (breit; 2H; H₂N-CO); 7,06-7,37 (m; 4H; C₆H₄); 11,65-12,83 (breit; 1H; COOH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 79,4 (O-CH-COOH); 126,8 (C(5) von C₆H₄); 127,6 (C(6) von C₆H₄); 129,1 (C(4) von C₆H₄); 129,4 (C(3) von C₆H₄); 132,2 (C(2) von C₆H₄); 139,9 (C(1) von C₆H₄); 157,6 (H₂N-CO-O); 173,5 (CH-COOH).

4.4.4.4 Synthese von *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-methoxymandelsäure (**R**)-**62a**, (**R**)-**62b**

a) unter Verwendung der Hydantoinase-1

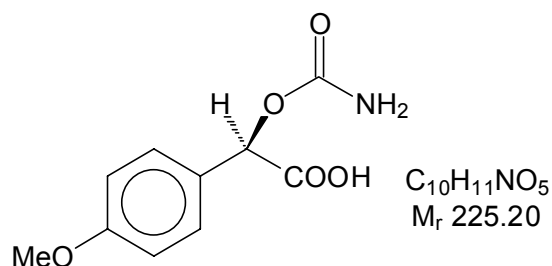
Bei der Umsetzung von 1,035 g (5 mmol) (*R,S*)-(*p*-Methoxyphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**52** nach AVV 15 erhielt man nach 280 Stunden Reaktionszeit 951 mg eines farblosen Feststoffes, welcher noch ca. 15% Edukt (HPLC) enthielt. Es wurden folgende Retentionszeiten bestimmt: *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-methoxymandelsäure (**R**)-**62** [5,1 min]; (*R,S*)-(*p*-Methoxyphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**52** [7,0 min]; Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 μ M) 250 mm * 3 mm, Mobile Phase; Acetonitril / Wasser / Trifluoressigsäure = 70/30/0,1, Flussrate = 0,5 ml/min, Detektionswellenlänge: 254 nm.

100 mg des Feststoffes wurde mittels semi-präparativer HPLC unter gleichen Bedingungen (s.o.) getrennt: Säule LiChrospher 100 RP-18 (10 μ M) 250 mm * 10 mm. Man erhielt 73 mg (**R**)-**62a** farblose Kristalle; Schmp.-Zers. 174-177°C; $[\alpha]_D^{20}$ $-164,3^\circ$ (c1; MeOH). Der Anteil an chemischer Hydrolyse nach 280 Stunden Reaktionszeit betrug 4,3 % (bestimmt aus Reaktionsansatz ohne Enzym).

b) unter Verwendung der Hydantoinase-2

Bei der Umsetzung von 1,035 g (5 mmol) (*R,S*)-(*p*-Methoxyphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**52** nach der AVV 15 erhielt man nach 450 Stunden Reaktionszeit 943 mg eines farblosen Feststoffs, welcher noch ca. 19% Edukt (HPLC) enthielt.

100 mg des Feststoffes wurden analog dem oben beschriebenen Verfahren mittels semi-präparativer HPLC getrennt. Man erhielt 67 mg (**R**)-**62b** farblose Kristalle; $[\alpha]_D^{20}$ -153,9° (c1; MeOH). Der Anteil an chemischer Hydrolyse nach 450 Stunden Reaktionszeit betrug 6,8 % (bestimmt aus Reaktionsansatz ohne Enzym).



IR (KBr, cm^{-1}):

$\nu =$ 3450 (s,b), 3305 (m,b) [ν NH]; 3000 (m) [ν CH_{arom.}]; 2920 (m) [ν CH_{aliph.}]; 2560 (m,vb) [ν OH_{bond}]; 1745 (s), 1725 (vs) [ν C=O]; 1520 (s) [Amid II]; 1085 (s) [ν C-O]; 770 (s), [CH-out of plane, charakteristisch für 1,2-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1615 (m); 1410 (s); 1275 (m); 1260 (m); 1035 (m); 825 (m).

1H -NMR (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 3,75 (s; 3H; CH₃-O-C); 5,59 (s; 1H; O-CH-COOH); 6,56-6,84 (breit; 2H; H₂N-CO); 7,31-7,37 (m; 4H; C₆H₄); 12,38-12,96 (breit; 1H; COOH).

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 55,8 (CH₃-O-C); 73,9 (O-CH-COOH); 114,5 (C(3,5) von C₆H₄); 129,6 (C(2,6) von C₆H₄); 131,9 (C(1) von C₆H₄); 156,5 (C(4) von C₆H₄); 160,7 (H₂N-CO-O); 174,3 (CH-COOH).

4.4.4.5 Synthese von *O*-Carbamoyl-(*R*)-*o*-methoxymandelsäure (**R**)-**63a**, (**R**)-**63b**

a) unter Verwendung der Hydantoinase-1

Bei der Umsetzung von 1,035 g (5 mmol) (*R,S*)-(*o*-Methoxyphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**53** nach AVV 15 erhielt man nach 832 Stunden Reaktionszeit 943 mg eines farblosen Feststoffs, welcher noch ca. 80% Edukt (HPLC) enthielt. Es wurden folgende Retentionszeiten bestimmt: *O*-Carbamoyl-(*R*)-*o*-methoxymandelsäure (**R**)-**63** [4,9 min]; (*R,S*)-(*o*-Methoxyphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**53** [6,2 min]; Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 μ M) 250 mm * 3 mm, Mobile Phase; Acetonitril / Wasser / Trifluoressigsäure = 70/30/0,1, Flussrate = 0,5 ml/min, Detektionswellenlänge: 254 nm.

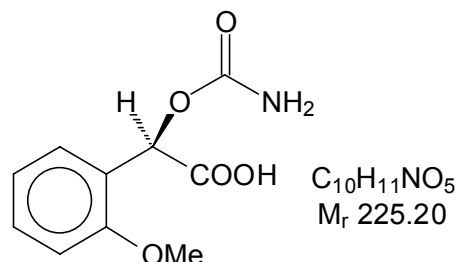
500 mg des Feststoffes wurde mittels semi-präparativer HPLC unter gleichen Bedingungen (s.o.) getrennt: Säule LiChrospher 100 RP-18 (10 μ M) 250 mm * 10 mm. Man erhielt 86 mg (**R**)-**63a** farblose Kristalle; Schmp._{Z.ers.} 185-188°C; $[\alpha]_D^{20}$ -21,3° (c1; MeOH). Der Anteil an

chemischer Hydrolyse nach 832 Stunden Reaktionszeit betrug 5,9 % (bestimmt aus Reaktionsansatz ohne Enzym).

b) unter Verwendung der Hydantoinase-2

Bei der Umsetzung von 1,035 g (5 mmol) (*R,S*)-(*o*-Methoxyphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**53** nach AVV 15 erhielt man nach 814 Stunden Reaktionszeit 943 mg eines farblosen Feststoffs, welcher noch ca. 95% Edukt (HPLC) enthielt.

Aufgrund der geringen Umsetzung die nur auf die chemische Hydrolyse zurückzuführen ist wurde keine HPLC-Trennung vorgenommen. Der Anteil an chemischer Hydrolyse nach 814 Stunden Reaktionszeit betrug 5,8 % (bestimmt aus Reaktionsansatz ohne Enzym).



IR (KBr, [cm⁻¹]):

ν = 3430 (s,b), 3220 (m,b) [ν NH]; 3010 (m) [ν CH_{arom.}]; 2950 (m) [ν CH_{aliph.}]; 2540 (m,vb) [ν OH_{bond}]; 1730 (s), 1670 (vs) [ν C=O]; 1615 (s) [Amid II]; 1045 (s) [ν C-O]; 765 (s), [CH-out of plane, charakteristisch für 1,2-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1630 (m); 1420 (s); 1270 (m); 1250 (m); 1030 (m); 820 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 3,81 (s; 3H; CH₃-O-C); 5,55 (s; 1H; O-CH-COOH); 6,14-6,72 (breit; 2H; H₂N-CO); 6,98-7,48 (m; 4H; C₆H₄); 11,56-12,67 (breit; 1H; COOH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 55,7 (C-CH₃-O-C); 79,4 (O-CH-COOH); 111,8 (C(3) von C₆H₄); 121,3 (C(5) von C₆H₄); 128,2 (C(4) von C₆H₄); 129,0 (C(6) von C₆H₄); 129,6 (C(1) von C₆H₄); 157,1 (C(2) von C₆H₄); 157,7 (H₂N-CO-O); 173,6 (CH-COOH).

4.4.4.6 Synthese von *O*-Carbamoyl-*(R)*-*p*-methylmandelsäure (*R*)-**64a**, (*R*)-**64b**

a) unter Verwendung der Hydantoinase-1

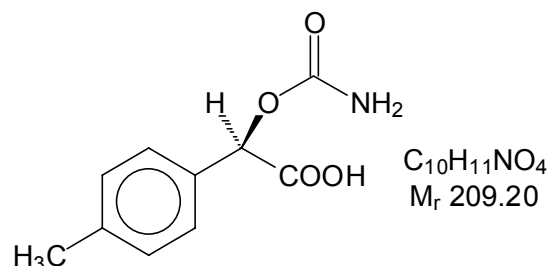
Bei der Umsetzung von 0,955 g (5 mmol) (*R,S*)-(*p*-Methylphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**54** nach AVV 15 erhielt man nach 262 Stunden Reaktionszeit 918 mg eines farblosen Feststoffs, welcher noch ca. 24% Edukt (HPLC) enthielt. Es wurden folgende Retentionszeiten bestimmt: *O*-Carbamoyl-*(R)*-*p*-methylmandelsäure (*R*)-**64** [5,5 min]; (*R,S*)-(*p*-Methylphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**54** [8,0 min]; Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 μ M) 250 mm * 3 mm, Mobile Phase; Acetonitril / Wasser / Trifluoressigsäure = 70/30/0,1, Flussrate = 0,5 ml/min, Detektionswellenlänge: 254 nm.

150 mg des Feststoffes wurde mittels semi-präparativer HPLC unter gleichen Bedingungen s.o. getrennt: Säule LiChrospher 100 RP-18 (10 μ M) 250 mm * 10 mm. Man erhielt 96 mg (*R*)-**64a** farblose Kristalle; Schmp._{Zers.} 186-189°C [α]_D²⁰ -153,8° (c1; MeOH).

b) unter Verwendung der Hydantoinase-2

Bei der Umsetzung von 0,955 g (5 mmol) (*R,S*)-(*p*-Methylphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**54** nach AVV 15 erhielt man nach 354 Stunden Reaktionszeit 879 mg eines farblosen Feststoffs, welcher noch ca. 28% Edukt (HPLC) enthält.

150 mg des Feststoffes wurden analog dem oben beschriebenen Verfahren mittels semi-präparativer HPLC getrennt. Man erhielt 83 mg (**R**)-**64b** farblose Kristalle; $[\alpha]_D^{20}$ -151,5° (c1; MeOH).



IR (KBr, cm^{-1}):

$\nu =$ 3390 (s,b) 3230 (m,b) [ν NH]; 3050 (w), 3020 (w) [ν CH_{arom.}]; 2960 (w), 2940 (w) [ν CH_{aliph.}]; 2510 (m,vb) [ν OHbond]; 1730 (s), 1670 (vs) [ν C=O] 1420 (m) [Amid II] 1600 (m), 1550 (m), 1500 (m) [ν C=C arom.]; 1140 (s) [ν C-O]; 830 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,4-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1450 (m); 1400 (s); 1300 (m); 1250 (m); 1075 (m); 1010 (s); 925 (m); 750 (m); 740 (w); 710 (w).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 2,29 (s; 3H; C-CH₃); 5,62 (s; 1H; O-CH-CO); 6,5-6,9 (breit; 2H; CO-NH₂) 7,27 (d; 2H; C₆H₄; J = 8,8 Hz); 7,33 (d, 2H; C₆H₄; J = 8,8 Hz);

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 21,1 (C-CH₃); 79,4 (O-CH-CO); 127,6 (C(2,6) von C₆H₄); 129,3 (C(3,5) von C₆H₄); 135,4 (C(1) von C₆H₄); 136,6 (C(4) von C₆H₄); 157,6 (O-CO-NH); 173,5 (NH-CO-CH).

4.4.4.7 Synthese von *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyphenylpropionsäure (**R**)-**65a**, (**R**)-**65b**

a) unter Verwendung der Hydantoinase-1

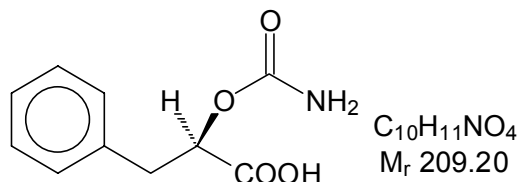
Bei der Umsetzung von 0,955 g (5 mmol) (*R,S*)-5-Benzyloxazolidin-2,4-dion nach (\pm)-**55** AVV 15 erhielt man nach 402 Stunden Reaktionszeit 932 mg eines farblosen Feststoffs, welcher noch ca. 52% Edukt (HPLC) enthält. Es wurden folgende Retentionszeiten bestimmt: *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyphenylpropionsäure (**R**)-**65** [5,4 min]; (*R,S*)-Benzyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-**55** [7,9 min]; Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 μM) 250 mm * 3 mm, Mobile Phase; Acetonitril / Wasser / Trifluoressigsäure = 70/30/0,1, Flussrate = 0,5 ml/min, Detektionswellenlänge: 254 nm.

200 mg des Feststoffes wurde mittels semi-präparativer HPLC unter gleichen Bedingungen (s.o.) getrennt: Säule LiChrospher 100 RP-18 (10 μM) 250 mm * 10 mm. Man erhielt 77 mg (**R**)-**65a** farblose Kristalle; Schmp._{Zers.} 147-150°C; ($[\alpha]_D^{20}$ -127,6° (c1; MeOH).

b) unter Verwendung der Hydantoinase-2

Bei der Umsetzung von 0,955 g (5 mmol) (*R,S*)-5-Benzyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-**55** nach AVV 15 erhielt man nach 480 Stunden Reaktionszeit 934 mg eines farblosen Feststoffs, welcher noch ca. 73% Edukt (HPLC) enthält.

300 mg des Feststoffes wurden analog dem oben beschriebenen Verfahren mittels semi-präparativer HPLC getrennt. Man erhielt 81 mg (*R*)-**65b** farblose Kristalle; $[\alpha]_D^{20}$ -98,2° (c1; MeOH).



IR (KBr, $[\text{cm}^{-1}]$):

$\nu =$ 3470 (s), 3360 (m,b), 3320 (m,b) [ν NH]; 3030 (w) [ν CH_{arom.}]; 2930 (m) [ν CH_{aliph.}]; 2520 (m,vb) [ν OH_{bond}]; 1780 (s), 1745 (s,b) [ν C=O]; 1580 (m) [Amid II]; 1090 (s) [ν C-O]; 760 (m,b), 700 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1405 (s); 1270 (m); 1230 (m); 1205 (m); 735 (w).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 2,96 (A-Teil eines ABX-Spinsystems; 1H; $\text{CH}_2\text{-CH}$; J_{AB} = 14,3 Hz; J_{AX} = 8,8 Hz); 3,08 (B-Teil eines ABX-Spinsystems; 1H; $\text{CH}_2\text{-CH}$; J_{AB} = 14,3 Hz; J_{BX} = 4,1 Hz); 4,93 (X-Teil eines ABX-Spinsystems; 1H; $\text{CH}_2\text{-CH}$; J_{AX} = 8,8 Hz; J_{BX} = 4,1 Hz); 6,37-6,83 (breit; 2H; $\text{H}_2\text{N-CO}$); 7,21-7,31 (m; 5H; C_6H_5); 12,41-12,97 (breit; 1H; COOH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 37,4 (C- $\text{CH}_2\text{-CH}$); 72,7 (O- CH-COOH); 127,1 (C(4) von C_6H_5); 128,8 (C(2,3,5,6) von C_6H_5); 137,5 (C(1) von C_6H_5); 156,5 ($\text{H}_2\text{N-CO-O}$); 172,2 (CH-COOH).

4.4.4.8 Synthese von *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyphenylbutansäure (*R*)-**66a**, (*R*)-**66b**

a) unter Verwendung der Hydantoinase-1

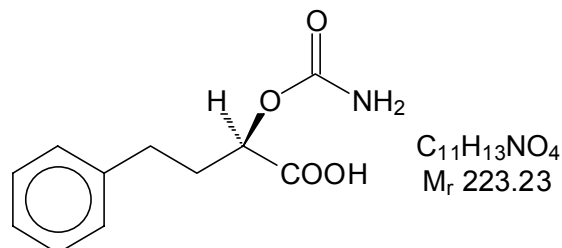
Bei der Umsetzung von 1,025 g (5 mmol) (*R,S*)-5- β -Phenylethyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-**56** nach AVV 15 erhielt man nach 385 Stunden Reaktionszeit 973 mg eines farblosen Feststoffs, welcher noch ca. 51% Edukt (HPLC) enthält. Es wurden folgende Retentionszeiten bestimmt: *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyphenylbutansäure (*R*)-**66** [6,1 min]; (*R,S*)-5-(β -Phenylethyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**56** [9,2 min]; Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 μM) 250 mm * 3 mm, Mobile Phase; Acetonitril / Wasser / Trifluoressigsäure = 70/30/0,1, Flussrate = 0,5 ml/min, Detektionswellenlänge: 254 nm.

200 mg des Feststoffes wurde mittels semi-präparativer HPLC unter gleichen Bedingungen (s.o.) getrennt: Säule LiChrospher 100 RP-18 (10 μM) 250 mm * 10 mm. Man erhielt 89 mg (*R*)-**66a** farblose Kristalle; Schmp._{Zers.} 138-141°C $[\alpha]_D^{20} = -119,5^\circ$ (c1; MeOH).

b) unter Verwendung der Hydantoinase-2

Bei der Umsetzung von 1,025 g (5 mmol) (*R,S*)-5-(β -Phenylethyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**56** nach AVV 15 erhielt man nach 447 Stunden Reaktionszeit 961 mg eines farblosen Feststoffs, welcher noch ca. 53% Edukt (HPLC) enthält.

200 mg des Feststoffes wurden analog dem oben beschriebenen Verfahren mittels semi-präparativer HPLC getrennt. Man erhielt 83 mg (*R*)-**66b** farblose Kristalle; $[\alpha]_D^{20}$ -96,1° (c1; MeOH).



IR (KBr, [cm⁻¹]):

ν = 3455 (s), 3425 (m), 3310 (m,b) [ν NH]; 3020 (m) [ν CH_{arom.}]; 2920 (m) [ν CH_{aliph.}]; 2540 (m,vb) [ν OH_{bond.}]; 1720 (vs), 1675 (s) [ν C=O]; 1590 (s) [Amid II]; 1090 (s) [ν C-O]; 945 (m,b) [δ OH out of plane]; 780 (m), 700 (s); [δ CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierte Aromaten]; weitere Banden bei 1410 (s); 1245 (s); 1185 (w); 905 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 1,94-2,12 (m; 2H; C-CH₂-CH₂); 2,49-2,72 (m; 2H; C-CH₂-CH₂); 4,62 (dd; 1H; CH₂-CH-CO; J₁ = 4,5 Hz; J₂ = 8,4 Hz); 6,64-6,82 (breit; 2H; CO-NH₂); 7,17-7,30 (m; 5H; C₆H₅).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 31,4 (C-CH₂-CH₂-CH); 32,2 (C-CH₂-CH₂-CH); 71,2 (O-CH-COOH); 126,6 (C(4) von C₆H₅); 128,9 (C(2,3,5,6) von C₆H₅); 141,3 (C(1) von C₆H₅); 156,3 (H₂N-CO-O); 172,9 (CH-COOH).

4.4.4.9 Synthese von *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyhexansäure (*R*)-**67a**, (*R*)-**67b**

a) unter Verwendung der Hydantoinase-1

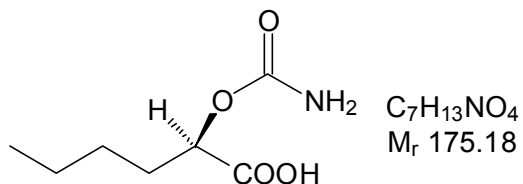
Bei der Umsetzung von 0,785 g (5 mmol) (*R,S*)-5-Butyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-**57** nach AVV 15 erhielt man nach 450 Stunden Reaktionszeit 634 mg eines farblosen Feststoffs, welcher noch ca. 52% Edukt (HPLC) enthält. Es wurden folgende Retentionszeiten bestimmt: *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyhexansäure (*R*)-**67** [5,4 min]; (*R,S*)-5-Butyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-**57** [(\pm)-**X**] [8,0 min]; Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 μ M) 250 mm * 3 mm, Mobile Phase; Acetonitril / Wasser / Trifluoressigsäure = 70/30/0,1, Flussrate = 0,5 ml/min, Detektionswellenlänge: 210 nm.

200 mg des Feststoffes wurde mittels semi-präparativer HPLC unter gleichen Bedingungen (s.o.) getrennt: Säule LiChrospher 100 RP-18 (10 μ M) 250 mm * 10 mm. Man erhielt 83 mg (*R*)-**67a** farblose Kristalle; Schmp._{Zers.} 118-121°C; $[\alpha]_D^{20}$ -138,7° (c1; MeOH).

b) unter Verwendung der Hydantoinase-2

Bei der Umsetzung von 0,785 g (5 mmol) (*R,S*)-5-Butyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-**57** nach AVV 15 erhielt man nach 450 Stunden Reaktionszeit 686 mg eines farblosen Feststoffs, welcher noch ca. 65% Edukt (HPLC) enthielt.

200 mg des Feststoffes wurden analog dem oben beschriebenen Verfahren mittels semi-präparativer HPLC getrennt. Man erhielt 61 mg (**R**)-**67b** farblose Kristalle; $[\alpha]_D^{20}$ -106,5° (c1; MeOH).



IR (KBr, [cm⁻¹]):

ν = 3460 (s), 3320 (m, b) [NH]; 2960 (s), 2940 (s), 2870 (m) [_{s,as} CH₂, CH₃]; 1740 (vs), 1665 (vs) [C=O]; 1595 (m) [Amid II]; 1465 (m, sh) [_{as} CH₃, CH₂]; 1140 (s) [C-O]; weitere Banden bei 1425 (s), 1330 (m), 1230 (s), 1210 (s), 1115 (m), 1095 (m), 1065 (w), 890 (w), 790 (w), 730 (w), 610 (w), 560 (m, b)

¹H-NMR (250.130 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 0.86 (t, 3 H; J= 7.0 Hz; CH₃); 1.10-1.45 (m; 4 H; CH₃-(CH₂)₂-); 1.50-1.85 (m; 2 H; CH₂-CH-); 4.64 (dd; 1 H; J₁= 5.2 Hz, J₂= 7.5 Hz; CH₂-CH-); 6.30-6.65 (breit; 1 H; NH₂); 6.65-6.95 (breit; 1 H; NH₂); 12.0-13.0 (s; 1 H; COOH)

¹³C{¹H}-NMR (62.896 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 13.8 (CH₃); 21.8 (CH₃-CH₂); 27.0 (CH₃-CH₂-CH₂); 30.6 (CH₂-CH); 71.3 (CH₂-CH); 156.3 (O-CO-NH₂); 172.5 (CH-COOH)

4.4.5 Synthese von *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxycarbonsäurephenacyl-ester und 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-oxazolidin-2,4-dione

4.4.5.1 Synthese von *O*-Carbamoyl-(*R*)-mandelsäurephenacyl-ester (*R*)-**68** und 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-phenyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-**69**

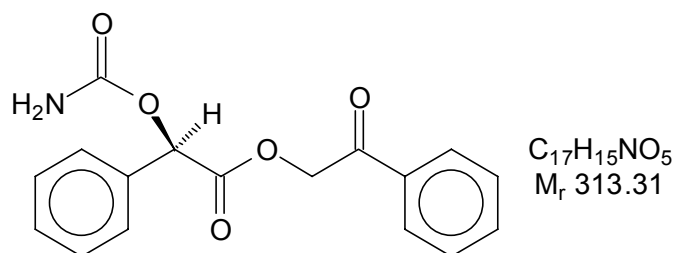
a) nach Hydrolyse mit Hydantoinase 1

Die Umsetzung von 600 mg (3,1 mmol) des Hydrolyserückstandes (90% *O*-Carbamoyl-(*R*)-mandelsäure (*R*)-**59a** und 10 % 5-Phenyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-**49** mit 736 mg (3,7 mmol) Phenacylbromid (199,05 g/mol) und 374 mg (515 μ l, 3,7 mmol) Triethylamin (101,19 g/mol, d=0,726) nach AVV 16 ergab 844 mg (2,7 mmol); 87 % (*R*)-**68a**, (\pm)-**69a** als farblose Kristalle.

b) nach Hydrolyse mit Hydantoinase 2

Die Umsetzung von 600 mg (3,1 mmol) des Hydrolyserückstandes (90% *O*-Carbamoyl-*(R)*-mandelsäure (**R**)-**59b** und 7 % Phenylloxazolidin-2,4-dion (\pm)-**49** mit 736 mg (3,7 mmol) Phenacylbromid (199,05 g/mol) und 374 mg (515 μ l, 3,7 mmol) Triethylamin (101,19 g/mol, $d=0,726$) nach der AVV 16 ergab 825 mg (2,6 mmol); 85 % (**R**)-**68b**, (\pm)-**69b** als farblose Kristalle.

4.4.5.1.1 *O*-Carbamoyl-*(R)*-mandelsäurephenacylester (**R**)-**68**:



IR (KBr, $[\text{cm}^{-1}]$):

$\nu =$ 3470 (s), 3300 (m, b) [NH]; 2850 (m, vb), 1730 (vs), 1710 (s), 1675 (s) [C=O]; 1590 (s) [Amid II]; 1080 (s) [C-O]; 940 (m, b) [OH out of plane]; 740 (s), 710 (s) [CH-out of plane, charakteristisch für Monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1415 (s), 1340 (m), 1305 (m), 1265 (s), 1235 (s), 1185 (m), 1110 (w), 1010 (w), 975 (m), 870 (w), 790 (m), 655 (m), 625 (m), 575 (m, b), 500 (m)

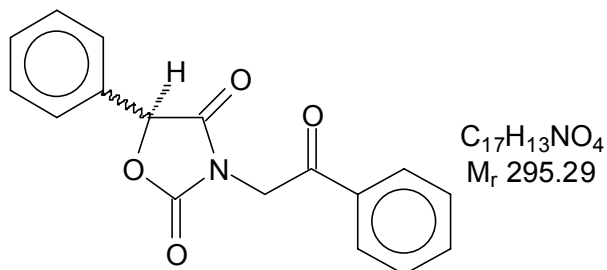
$^1\text{H-NMR}$ (250.130 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 5,40 (d; 1H; $J=16,1$ Hz; $\underline{\text{CH}}_2$); 5,51 (d; 1H; $J=16,1$ Hz; $\underline{\text{CH}}_2$); 5,67 (s; 1 H; $\underline{\text{CH}}\text{-O}$); 6,50-6,96 (breit; 2 H; $\underline{\text{NH}}_2$); 7,24-7,76 (m; 8 H; $\text{C}_6\underline{\text{H}}_5$); 7,88 (d; 2H; $J=7,2$ Hz; $\text{C}_6\underline{\text{H}}_5$);

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (62.896 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 66,4 ($\underline{\text{CH}}_2$); 73,3 ($\underline{\text{CH}}\text{-O}$); 126,9 (C(4) von $\alpha\text{-C}_6\underline{\text{H}}_5$); 127,4 (C(2, 6) von $\alpha\text{-C}_6\underline{\text{H}}_5$); 128,4 (C(3,5) von $\alpha\text{-C}_6\underline{\text{H}}_5$); 135,4 (C(1) von $\alpha\text{-C}_6\underline{\text{H}}_5$); 128,1 (C(2,6) von Ester- $\text{C}_6\underline{\text{H}}_5$); 128,6 (C(3,5) von Ester- $\text{C}_6\underline{\text{H}}_5$); 132,7 (C(4) von Ester- $\text{C}_6\underline{\text{H}}_5$); 134,7 (C(1) von Ester- $\text{C}_6\underline{\text{H}}_5$); 156,4 (O-CO-NH $_2$); 167,8 (CH-COO); 191,4 (CH $_2$ -CO- $\text{C}_6\underline{\text{H}}_5$);

4.4.5.1.2 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-phenylloxazolidin-2,4-dion (\pm)-**69**:



IR (KBr, $[\text{cm}^{-1}]$):

$\nu =$ 3050 (w) [CH $_{\text{arom}}$.]; 2960 (w) [CH]; 1820 (s) [C=O in 2-Pos.]; 1735 (vs, b) [C=O in 4-Pos.]; 1695 (s) [C=O]; 1585 (m) [C=C $_{\text{arom}}$.]; 1155 (s) [C-O]; 760 (s), 710 (s) [CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei

1530 (w), 1455 (m), 1385 (s), 1335 (s), 1300 (m), 1275 (m), 1195 (w), 1075 (w), 1050 (m), 1015 (m), 955 (w), 920 (m), 845 (w), 745 (m), 730 (m), 720 (m), 610 (m)

$^1\text{H-NMR}$ (400,132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 3.94 (s; 2 H; CH_2); 6.05 (s; 1 H; CH-O); 7.37-7.64 (m; 8 H; C_6H_5); 7,72-7,91 (m; 2 H; C_6H_5)

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 52,3 (CH_2); 79,5 (CH-O); 126,8 (C(2,6) von $\text{CH-C}_6\text{H}_5$); 126,9 (C(4) von $\text{CH-C}_6\text{H}_5$); 128,5 (C(3,5) von $\text{CH-C}_6\text{H}_5$); 140,8 (C(1) von $\text{CH-C}_6\text{H}_5$); 128,1 (C(2,6) von $\text{CO-C}_6\text{H}_5$); 128,7 (C(3,5) von $\text{CO-C}_6\text{H}_5$); 132,8 (C(4) von $\text{CO-C}_6\text{H}_5$); 134,5 (C(1) von $\text{CO-C}_6\text{H}_5$); 155,7 (O-CO-NH); 173,5 (CH-CO); 190,5 ($\text{CH}_2\text{-CO-C}_6\text{H}_5$)

4.4.5.2 Synthese von *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-chlormandelsäurephenacylester (*R*)-70 und 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-(*p*-chlorophenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-71

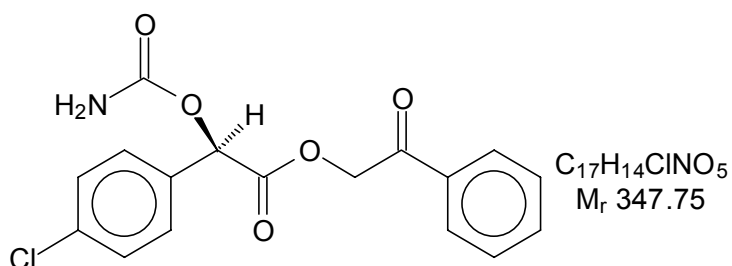
a) nach Hydrolyse mit Hydantoinase 1

Die Umsetzung von 800 mg (3,5 mmol) des Hydrolyserückstandes (83 % *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-chlormandelsäure (**R**)-60a und 17 % 5-(*p*-Chlorphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-50 mit 835 mg (4,2 mmol) Phenacylbromid (199,05 g/mol) und 424 mg (585 μl , 4,2 mmol) Triethylamin (101,19 g/mol, $d=0,726$) nach AVV 16 ergab 1,00 g (2,9 mmol); 83 % (**R**)-70a, (\pm)-71a als farblose Kristalle.

b) nach Hydrolyse mit Hydantoinase 2

Die Umsetzung von 800 mg (3,5 mmol) des Hydrolyserückstandes (83 % *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-chlormandelsäure (**R**)-60b und 17 % 5-(*p*-Chlorphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-50 mit 835 mg (4,2 mmol) Phenacylbromid (199,05 g/mol) und 424 mg (585 μl , 4,2 mmol) Triethylamin (101,19 g/mol, $d=0,726$) nach AVV 16 ergab 1,01 g (2,9 mmol); 84 % (**R**)-70b, (\pm)-71b als farblose Kristalle.

4.4.5.2.1 *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-chlormandelsäurephenacylester (*R*)-70:



IR (KBr, $[\text{cm}^{-1}]$):

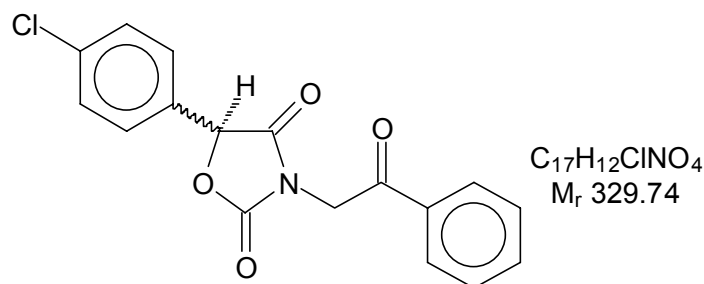
$\nu =$ 3360 (s,b), 3180 (m,b) [ν NH]; 3070 (w) [$\text{CH}_{\text{arom.}}$]; 2950 (w) [CH]; 1750 (s), 1730 (s) 1680 (vs) [ν C=O] 1490 (m) [Amid II]; 1090 (s) [ν C-O] 830 (s), [CH-out of plane , charakteristisch für 1,2-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1580 (m,b); 1420 (s); 1260 (m); 1225 (m); 815 (w); 705 (m).

$^1\text{H-NMR}$ (250.133 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 5,42 (d; 1H; $J = 16,0$ Hz; CH_2); 5,48 (d; 1H; $J = 16,0$ Hz; CH_2); 5,71 (s; 1H; O-CH-COO); 6,55-7,01 (breit; 2H; $\text{H}_2\text{N-CO}$); 7,28-7,56 (m; 7H; C_6H_4); 7,90 (d; 2H; $J = 7,2$ Hz; C_6H_5);

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 65,8 (CH_2); 73,7 (CH-O); 127,8 (C(2,6) von $\alpha\text{-C}_6\text{H}_5$); 128,5 (C(3,5) von $\alpha\text{-C}_6\text{H}_5$); 133,1 (C(4) von $\alpha\text{-C}_6\text{H}_5$); 140,7 (C(1) von $\alpha\text{-C}_6\text{H}_5$); 128,0 (C(2, 6) von Ester- C_6H_5); 128,4 (C(3, 5) von Ester- C_6H_5); 132,6 (C(4) von Ester- C_6H_5); 134,7 (C(1) von Ester- C_6H_5); 156,2 (O-CO-NH $_2$); 171,0 (CH-COO); 191,2 ($\text{CH}_2\text{-CO-C}_6\text{H}_5$);

4.4.5.2.2 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-(*p*-chlorophenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-71:**IR (KBr, [cm^{-1}]):**

$\nu =$ 3080 [ν CH_{arom.}]; 2960, 2940 [ν CH_{aliph.}]; 1810 (s) [ν C=O in 2 Pos] 1720 (s) [ν C=O in 4 Pos.]; 1700(s) [C=O] 1600 (w), 1580 (m) [ν C=C arom.]; 1170 (s) [ν C-O]; 835 (m) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,4-Disubstituiert]; 700 (s) [CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1390 (s); 1290 (m); 1090 (m); 1010 (s); 930 (m); 760 (m); 730 (w); 700 (w).

 $^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 3,92 (s; 2H; CH_2); 6,04 (s; 1H; O-CH-CO); 7,28-7,63 (m; 7H; C_6H_4); 7,82-7,94 (m; 2H; CO- C_6H_4).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 52,8 (CH_2); 80,2 (O-CH-O); 127,7 (C(2,6) von CH- C_6H_5); 128,5 (C(3,5) von CH- C_6H_5); 133,2 (C(4) von CH- C_6H_5); 140,8 (C(1) von CH- C_6H_5); 128,0 (C(2,6) von CO- C_6H_5); 128,5 (C(3,5) von CO- C_6H_5); 132,6 (C(4) von CO- C_6H_5); 134,5 (C(1) von CO- C_6H_5); 156,1 (O-CO-NH); 173,6 (CH-CO); 190,1 ($\text{CH}_2\text{-CO-C}_6\text{H}_5$);

4.4.5.3 Synthese von *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-methoxymandelsäurephenacylester (*R*)-72 und 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-(*p*-methoxyphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-73

a) nach Hydrolyse mit Hydantoinase 1

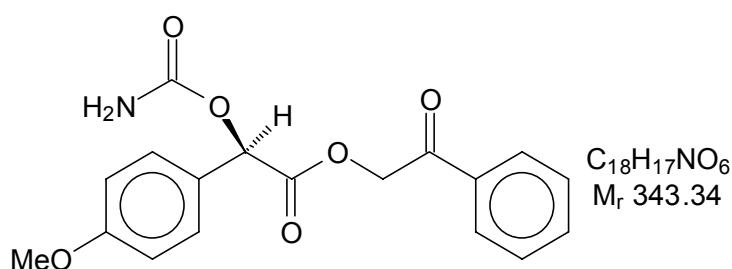
Die Umsetzung von 700 mg (3,1 mmol) des Hydrolyserückstandes (85 % *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-methoxymandelsäure (**R**)-62a und 15 % 5-(*p*-Methoxyphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-52

mit 736 mg (3,7 mmol) Phenacylbromid (199,05 g/mol) und 374 mg (515 μ l, 3,7 mmol) Triethylamin (101,19 g/mol, $d=0,726$) nach AVV 16 ergab 857 mg (2,5 mmol); 81 % **(R)-72a**, (\pm)-**73a** als farblose Kristalle.

b) nach Hydrolyse mit Hydantoinase 2

Die Umsetzung von 700 mg (3,1 mmol) des Hydrolyserückstandes (85 % *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-methoxymandelsäure **(R)-62b** und 15 % 5-(*p*-Methoxyphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**52** mit 736 mg (3,7 mmol) Phenacylbromid (199,05 g/mol) und 374 mg (515 μ l, 3,7 mmol) Triethylamin (101,19 g/mol, $d=0,726$) nach AVV 16 ergab 889 mg (2,6 mmol); 84 % **(R)-72b** (\pm)-**73b** als farblose Kristalle.

4.4.5.3.1 *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-methoxymandelsäurephenacylester **(R)-72**:



IR (KBr, cm^{-1}):

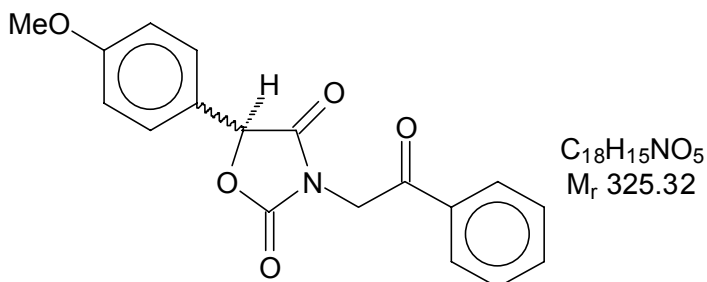
$\nu =$ 3420 (s,b), 3330 (m,b) [ν NH]; 3090 (m) [ν CH_{arom.}]; 2920 (m) [ν CH_{aliph.}]; 1750 (s), 1730 (s), 1710 (vs) [ν C=O]; 1510 (s) [Amid II]; 1085 (s) [ν C-O]; 830 (s), [CH-out of plane, charakteristisch für 1,4-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1615 (m); 1410 (s); 1275 (m); 1260 (m); 1035 (m); 810 (m) 760 (s).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-*d*₆ [ppm]):

$\delta =$ 3,77 (s; 3H; CH₃-O-C); 5,43 (d; 1H; J= 16,0 Hz; CH₂); 5,49 (d; 1H; J= 16,0 Hz; CH₂); 5,61 (s; 1H; O-CH-COO); 6,56-6,84 (breit; 2H; H₂N-CO); 6,93-7,17 (m; 4H; C₆H₄); 7,38 (t; 2H; J= 7,1 Hz; J= 7,2 Hz C₆H₅); 7,46 (d; 1H; J= 7,2 Hz; C₆H₅); 7,90 (d; 2H; J= 7,1 Hz; C₆H₅);

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-*d*₆ [ppm]):

$\delta =$ 55,8 (CH₃-O-C); 66,2 (CH₂); 73,9 (CH-O); 113,7 (C(3,5) von α -C₆H₅); 128,0 (C(2,6) von α -C₆H₅); 133,5 (C(1) von α -C₆H₅); 158,6 (C(4) von α -C₆H₅); 128,1 (C(2, 6) von Ester-C₆H₅); 128,6 (C(3, 5) von Ester-C₆H₅); 132,7 (C(4) von Ester-C₆H₅); 134,7 (C(1) von Ester-C₆H₅); 160,5 (O-CO-NH₂); 173,8 (CH-COO); 191,4 (CH₂-CO-C₆H₅);

4.4.5.4 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-(*p*-methoxyphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (±)-73:IR (KBr, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3080 (w), 3060 (w) [ν CH_{arom.}]; 2980 (w), 2940 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1820 (s) [ν C=O in 2 Pos.]; 1730 (s,b) [ν C=O in 4 Pos.]; 1690 (s) [C=O]; 1590 (m), 1510 (m) [ν C=C arom.]; 1140 (s) [ν C-O]; 830 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,4-Disubstituiert]; 710 (s) [CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1405 (s); 1380 (m); 1300 (m); 1080 (m); 1050 (w); 100 (s); 940 (m); 740 (m); 720 (w); 690 (w).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 3,61 (s; 3H; O-CH₃); 3,95 (s; 2H; CH₂); 5,95 (s; 1H; O-CH-CO); 7,09-7,34 (m; 7H; C₆H₄); 7,86-7,91 (m; 2H; C₆H₄).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 52,8 (CH₂); 56,3 (O-CH₃); 81,3 (O-CH-O); 113,7 (C(3,5) von CH-C₆H₅); 128,0 (C(2,6) von CH-C₆H₅); 133,5 (C(1) von CH-C₆H₅); 158,7 (C(4) von CH-C₆H₅); 128,1 (C(2,6) von CO-C₆H₅); 128,6 (C(3,5) von CO-C₆H₅); 132,6 (C(4) von CO-C₆H₅); 134,4 (C(1) von CO-C₆H₅); 156,6 (O-CO-NH); 174,7 (CH-CO); 190,3 (CH₂-CO-C₆H₅).

4.4.5.5 Synthese von *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-methylmandelsäurephenacyl-ester (*R*)-74 und 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-(*p*-methylphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (±)-75

a) nach Hydrolyse mit Hydantoinase 1

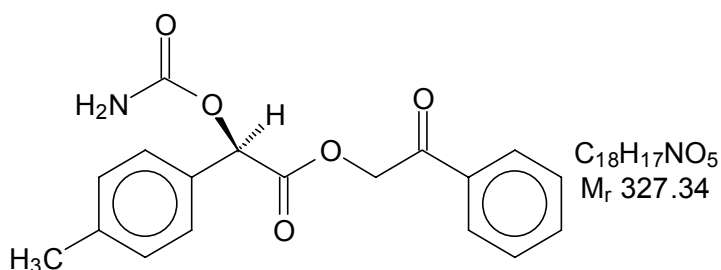
Die Umsetzung von 600 mg (2,9 mmol) des Hydrolyserückstandes (76 % *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-methylmandelsäure (*R*)-64a und 24 % 5-(*p*-Methylphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (±)-54 mit 696 mg (3,5 mmol) Phenacylbromid (199,05 g/mol) und 354 mg (487 μ l, 3,5 mmol) Triethylamin (101,19 g/mol, $d=0,726$) nach AVV 16 ergab 850 mg (2,6 mmol); 89 % (*R*)-74a, (±)-75a als farblose Kristalle.

b) nach Hydrolyse mit Hydantoinase 2

Die Umsetzung von 600 mg (2,9 mmol) des Hydrolyserückstandes (72 % *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-methylmandelsäure (*R*)-64b und 28 % 5-(*p*-Methylphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (±)-54 mit 696 mg (3,5 mmol) Phenacylbromid (199,05 g/mol) und 354 mg (487 μ l, 3,5 mmol)

Triethylamin (101,19 g/mol, $d=0,726$) nach der AVV 16 ergab 859 mg (2,6 mmol); 90 % (**R**)-**74b**, (\pm)-**75b** als farblose Kristalle.

4.4.5.6 *O*-Carbamoyl-(*R*)-*p*-methylmandelsäurephenacylester (**R**)-**74**:



IR (KBr, $[\text{cm}^{-1}]$):

$\nu =$ 3360 (s,b) 3170 (m,b) [ν NH]; 3050 (w), 3020 (w) [ν CH_{arom.}]; 2960 (w), 2940 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1780 (s), 1730 (s), 1680 (vs) [ν C=O] 1660 (m) [Amid II] 1600 (m), 1550 (m), 1500 (m) [ν C=C arom.]; 1140 (s) [ν C-O]; 830 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,4-Disubstituiert]; weitere Banden bei 1450 (m); 1420 (s); 1400 (s); 1300 (m); 1250 (m); 1075 (m); 1010 (s); 925 (m); 750 (m); 740 (w); 710 (w).

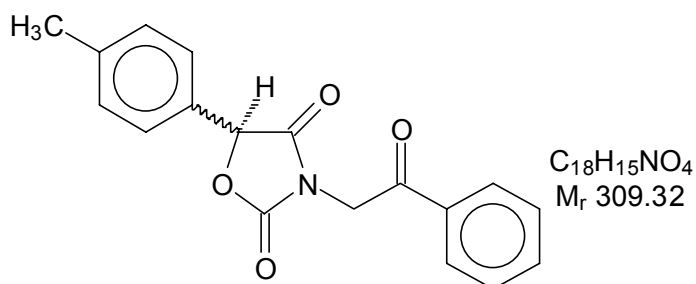
$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 2,24 (s; 3H; C-CH₃); 5,41 (d; 1H; $J = 16,1$ Hz; CH₂); 5,47 (d; 1H; $J = 16,1$ Hz; CH₂); 5,62 (s; 1H; O-CH-COO); 6,56-6,84 (breit; 2H; H₂N-CO); 6,93-7,17 (m; 4H; C₆H₄); 7,27 (d; 2H; C₆H₄; $J = 8,8$ Hz); 7,33 (d; 2H; C₆H₄; $J = 8,8$ Hz); 7,38 (t; 2H; $J = 7,1$ Hz; $J = 7,2$ Hz C₆H₅); 7,46 (d; 1H; $J = 7,2$ Hz; C₆H₅); 7,90 (d; 2H; $J = 7,1$ Hz; C₆H₅).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 21,1 (C-CH₃); 66,3 (CH₂); 79,1 (O-CH-CO); 127,3 (C(2,6) von α -C₆H₅); 129,3 (C(3,5) von α -C₆H₅); 135,4 (C(1) von α -C₆H₅); 136,6 (C(4) von α -C₆H₅); 128,1 (C(2, 6) von Ester-C₆H₅); 128,7 (C(3, 5) von Ester-C₆H₅); 132,6 (C(4) von Ester-C₆H₅); 134,8 (C(1) von Ester-C₆H₅); 157,6 (O-CO-NH₂); 169,8 (CH-COO); 191,6 (CH₂-CO-C₆H₅).

4.4.5.6.1 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-(*p*-methylphenyl)-oxazolidin-2,4-dion (\pm)-**75**:



IR (KBr, $[\text{cm}^{-1}]$):

$\nu =$ 3060 (w), 3030 (w) [ν CH_{arom.}]; 2960 (w), 2940 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1820 (s) [ν C=O in 2 Pos.]; 1750 (s,b) [ν C=O in 4 Pos.]; 1695 (s) [C=O] 1600 (m), 1550 (m), 1510 (m)

[v C=C arom.]; 1140 (s) [v C-O]; 830 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für 1,4-Disubstituiert]; 705 (s) [CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1450 (m); 1400 (s); 1300 (m); 1250 (m); 1075 (m); 1010 (s); 925 (m); 750 (m); 740 (w); 710 (w).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 2,31 (s; 3H; C- $\underline{\text{CH}}_3$); 3,94 (s; 2H; $\underline{\text{CH}}_2$); 5,97 (s; 1H; O- $\underline{\text{CH}}$ -CO); 7,12-7,38 (m; 7H; C_6H_4); 7,85-7,92 (m; 2H; C_6H_4).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 21,3 (C- $\underline{\text{CH}}_3$); 52,4 ($\underline{\text{CH}}_2$); 84,2 (O- $\underline{\text{CH}}$ -O); 127,3 (C(2,6) von CH- $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 129,3 (C(3,5) von CH- $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 136,6 (C(4) von CH- $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 140,8 (C(1) von CH- $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 128,3 (C(2,6) von CO- $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 128,5 (C(3,5) von CO- $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 132,9 (C(4) von CO- $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 134,0 (C(1) von CO- $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 157,0 (O- $\underline{\text{CO}}$ -NH); 172,3 (CH- $\underline{\text{CO}}$); 190,0 ($\underline{\text{CO}}$ - $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$);

4.4.5.7 Synthese von *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyphenylpropionsäurephenacylester

(*R*)-76 und 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-benzyloxazolidin-2,4-dion (\pm)-77

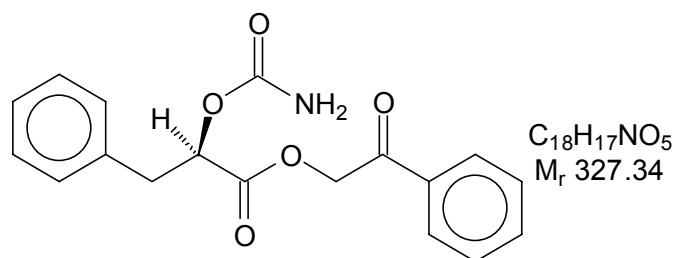
a) nach Hydrolyse mit Hydantoinase 1

Die Umsetzung von 600 mg (2,9 mmol) des Hydrolyserückstandes 48 % *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyphenylpropionsäure (**R**)-65a und 52 % 5-Benzyloxazolidin-2,4-dion (**S**)-55 mit 696 mg (3,5 mmol) Phenacylbromid (199,05 g/mol) und 354 mg (487 μl , 3,5 mmol) Triethylamin (101,19 g/mol, $d=0,726$) nach AVV 16 ergab 831 mg (2,5 mmol); 87 % (**R**)-76a, (**S**)-77a als farblose Kristalle.

b) nach Hydrolyse mit Hydantoinase 2

Die Umsetzung von 600 mg (2,9 mmol) des Hydrolyserückstandes 27 % *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyphenylpropionsäure (**R**)-65b und 73 % 5-Benzyloxazolidin-2,4-dion (**S**)-55 mit 696 mg (3,5 mmol) Phenacylbromid (199,05 g/mol) und 354 mg (487 μl , 3,5 mmol) Triethylamin (101,19 g/mol, $d=0,726$) nach AVV 16 ergab 840 mg (2,6 mmol); 88 % (**R**)-76b, (**S**)-77b als farblose Kristalle.

4.4.5.7.1 *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyphenylpropionsäurephenacylester (*R*)-76:



IR (KBr, $[\text{cm}^{-1}]$):

$\nu =$ 3360 (m,b), 3190 (m,b) [v NH]; 3030 (w) [v CH_{arom}]; 2970 (m) 2930 (m) [v CH_{aliph}]; 1760 (s), 1730 (s,b) 1710 (s,b) [v C=O]; 1630 (m) [Amid II]; 1090 (s) [v

C-O]; 760 (m,b), 740 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1430 (s); 1280 (m); 1250 (m); 1205 (m); 1160 (m); 735 (w).

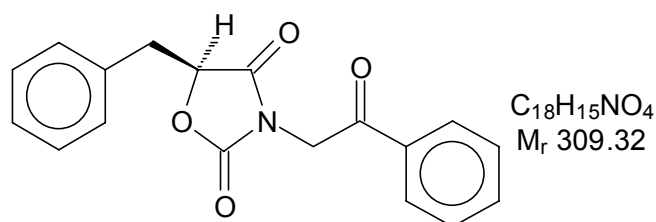
$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

δ = 3,02 (A-Teil eines ABX-Spinsystems; 1H; $\text{CH}_2\text{-CH}$; $J_{\text{AB}} = 14,4$ Hz; $J_{\text{AX}} = 8,6$ Hz); 3,11 (B-Teil eines ABX-Spinsystems; 1H; $\text{CH}_2\text{-CH}$; $J_{\text{AB}} = 14,4$ Hz; $J_{\text{BX}} = 4,3$ Hz); 4,91 (X-Teil eines ABX-Spinsystems; 1H; $\text{CH}_2\text{-CH}$; $J_{\text{AX}} = 8,6$ Hz; $J_{\text{BX}} = 4,3$ Hz); 5,41 (d; 1H; $J = 16,1$ Hz; CH_2); 5,47 (d; 1H; $J = 16,1$ Hz; CH_2); 6,37-6,83 (breit; 2H; $\text{H}_2\text{N-CO}$); 7,21-7,33 (m; 8H; C_6H_5); 7,90 (d; 2H; $J = 7,1$ Hz; C_6H_5).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

δ = 36,5 (C- $\text{CH}_2\text{-CH}$); 66,4 (CH_2); 73,9 (O- CH-COO); 126,9 (C(4) von $\alpha\text{-C}_6\text{H}_5$); 128,2 (C(2,6) von $\alpha\text{-C}_6\text{H}_5$); 128,7 (C(3,5) von $\alpha\text{-C}_6\text{H}_5$); 137,5 (C(1) von $\alpha\text{-C}_6\text{H}_5$); 128,2 (C(2, 6) von Ester- C_6H_5); 128,6 (C(3, 5) von Ester- C_6H_5); 132,7 (C(4) von Ester- C_6H_5); 134,7 (C(1) von Ester- C_6H_5); 156,9 (O- CO-NH_2); 167,4 (CH- COO); 191,4 ($\text{CH}_2\text{-CO-C}_6\text{H}_5$).

4.4.5.7.2 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-(S)-5-benzyloxazolidin-2,4-dion (S)-77:



ν = 3090 (w), 3030 (w) [ν CH_{arom.}]; 2960 (w), 2910 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1815 (s) [ν C=O in 2 Pos.]; 1745 (s,b) [ν C=O in 4 Pos.]; 1690 (s) [ν C=O]; 1610 (m), 1550 (m), [ν C=C arom.]; 1460 (m) [δ CH₂]; 1160 (s) [ν C-O]; 770 (s), 700 (s)); [δ CH-out of plane, charakteristisch für Monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1440 (w); 1400 (s); 1340 (s); 1310 (w); 1090 (s); 1080 (s); 1010 (m); 980 (m); 950 (m); 870 (m); 750 (m).

$^1\text{H-NMR}$ (400.132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

δ = 2,96 (A-Teil eines ABX-Spinsystems; 1H; $\text{CH}_2\text{-CH}$; $J_{\text{AB}} = 14,6$ Hz; $J_{\text{AX}} = 6,7$ Hz); 3,17 (B-Teil eines ABX-Spinsystems; 1H; $\text{CH}_2\text{-CH}$; $J_{\text{BA}} = 14,6$ Hz; $J_{\text{BX}} = 4,4$ Hz); 3,95 (s; 2H; CH_2); 5,06 (X-Teil eines ABX-Spinsystems; 1H; $\text{CH}_2\text{-CH}$; $J_{\text{AX}} = 6,7$ Hz; $J_{\text{BX}} = 4,4$ Hz); 7,20-7,53 (m; 8H; C_6H_5); 7,86-7,93 (m; 2H; C_6H_4).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

δ = 36,5 ($\text{CH}_2\text{-CH}$); 52,6 (CH_2); 80,1 (O- CH-O); 126,9 (C(4) von $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$); 128,5 (C(2,6) von $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$); 128,7 (C(3,5) von $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$); 137,5 (C(1) von $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$); 128,0 (C(2,6) von $\text{CO-C}_6\text{H}_5$); 128,6 (C(3,5) von $\text{CO-C}_6\text{H}_5$); 133,0 (C(4) von $\text{CO-C}_6\text{H}_5$); 134,2 (C(1) von $\text{CO-C}_6\text{H}_5$); 156,2 (O- CO-NH); 174,1 (CH- CO); 190,3 ($\text{CH}_2\text{-CO-C}_6\text{H}_5$);

4.4.5.8 Synthese von *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyphenylbutansäurephenacylester (*R*)-78 und 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-(*S*)-5-phenylethylloxazolidin-2,4-dion (*S*)-79

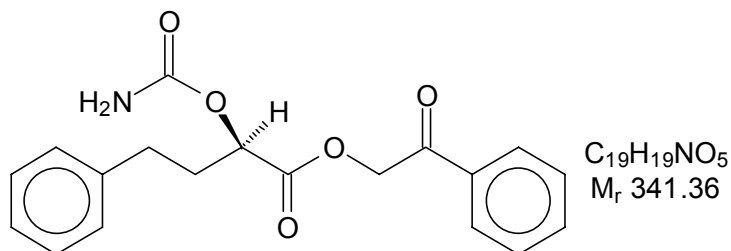
a) nach Hydrolyse mit Hydantoinase 1

Die Umsetzung von 650 mg (2,9 mmol) des Hydrolyserückstandes (49 % *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyphenylbutansäure (**R**)-66a und 51 % 5-(β -Phenylethyl)-oxazolidin-2,4-dion (**S**)-56 mit 696 mg (3,5 mmol) Phenacylbromid (199,05 g/mol) und 354 mg (487 μ l, 3,5 mmol) Triethylamin (101,19 g/mol, $d=0,726$) nach der AVV 16 ergab 887 mg (2,6 mmol); 91 % (**R**)-78a, (**S**)-79a als farblose Kristalle.

b) nach Hydrolyse mit Hydantoinase 2

Die Umsetzung von 650 mg (2,9 mmol) des Hydrolyserückstandes (47 % *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyphenylbutansäure (**R**)-66b und 53 % 5-(β -Phenylethyl)-oxazolidin-2,4-dion (**S**)-56 mit 696 mg (3,5 mmol) Phenacylbromid (199,05 g/mol) und 354 mg (487 μ l, 3,5 mmol) Triethylamin (101,19 g/mol, $d=0,726$) nach der AVV 16 ergab 877 mg (2,6 mmol); 90 % (**R**)-78b, (**S**)-79b als farblose Kristalle.

4.4.5.8.1 *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyphenylbutansäurephenacylester (*R*)-78:



IR (KBr, [cm⁻¹]):

ν = 3400 (s), 3425 (m), 3310 (m,b) [ν NH]; 3030 (w) [ν CH_{arom.}]; 2970 (m) 2940 (m) [ν CH_{aliph.}]; 1760 (s), 1730 (s,b) 1710 (s,b) [ν C=O]; 1630 (m) [Amid II]; 1090 (s) [ν C-O]; 760 (m,b), 730 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1460 (s); 1270 (m); 1240 (m); 1210 (m); 1180 (m); 735 (w).

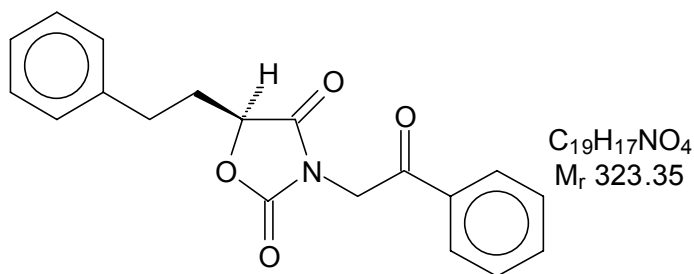
¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 1,86-2,09 (m; 2H; C-CH₂-CH₂); 2,56-2,73 (m; 2H; C-CH₂-CH₂); 4,79 (dd; 1H; CH₂-CH-CO; J₁ = 4,6 Hz; J₂ = 8,5 Hz); 5,41 (d; 1H; J = 16,0 Hz; CH₂); 5,47 (d; 1H; J = 16,0 Hz; CH₂); 6,66-6,80 (breit; 2H; CO-NH₂); 7,18-7,36 (m; 8H; C₆H₅) 7,92 (d; 2H; J = 7,0 Hz; C₆H₅).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

δ = 32,3 (C-CH₂-CH₂-CH); 34,4 (C-CH₂-CH₂-CH); 66,4 (CH₂); 71,8 (O-CH-COO); 126,7 (C(4) von α -C₆H₅); 128,3 (C(2,6) von α -C₆H₅); 128,6 (C(3,5) von α -C₆H₅); 142,4 (C(1) von α -C₆H₅); 128,1 (C(2, 6) von Ester-C₆H₅); 128,6 (C(3, 5) von Ester-C₆H₅); 132,8 (C(4) von Ester-C₆H₅); 134,6 (C(1) von Ester-C₆H₅); 156,8 (H₂N-CO-O); 169,8 (CH-COO); 191,2 (CH₂-CO-C₆H₅).

4.4.5.9 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-(S)-5-phenylethylloxazolidin-2,4-dion (S)-79:



IR (KBr, [cm⁻¹]):

$\nu =$ 3080 (w), 3030 (w) [ν CH_{arom.}]; 2970 (w), 2930 (w) [ν CH_{aliph.}]; 1830 (s) [ν C=O in 2 Pos.]; 1750 (s,b) [ν C=O in 4 Pos.]; 1695 (s) [ν C=O]; 1610 (w), 1540 (w), 1500 (m) [ν C=C arom.]; 1460 (m) [δ CH]; 1170 (s) [ν C-O]; 760 (s), 720 (s); [δ CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1400(s), 1330 (m); 1200 (m); 1100 (m); 1060 (m); 1040 (m); 1000 (m); 900 (m); 790 (m); 640 (m); 620 (m).

¹H-NMR (400.132 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 2,30-2,36 (m; 2H; CH₂-CH₂-CH); 2,90-2,99 (m; 2H; CH₂-CH₂-CH); 3,92 (s; 2H; CH₂); 4,93-4,96 (d,d; 1H; CH₂-CH₂-CH; J₁ = 4,6 Hz; J₂ = 8,1 Hz); 7,11-7,39 (m; 8H; C₆H₅); 7,84-7,91 (m; 2H; C₆H₅).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 31,7 (CH₂-CH₂-CH); 33,8 (CH₂-CH₂-CH); 52,4 (CH₂); 80,9 (O-CH-O); 126,8 (C(4) von CH₂-C₆H₅); 128,3 (C(2,6) von CH₂-C₆H₅); 128,6 (C(3,5) von CH₂-C₆H₅); 142,5 (C(1) von CH₂-C₆H₅); 128,1 (C(2,6) von CO-C₆H₅); 128,7 (C(3,5) von CO-C₆H₅); 132,7 (C(4) von CO-C₆H₅); 134,4 (C(1) von CO-C₆H₅); 159,0 (O-CO-NH); 176,7 (CH-CO); 191,6 (CH₂-CO-C₆H₅).

4.4.5.10 Synthese von O-Carbamoyl-(R)- α -hydroxyhexansäurephenacyl ester (R)-80 und 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-(S)-5-butyloxazolidin-2,4-dion (R)-81

a) nach Hydrolyse mit Hydantoinase 1

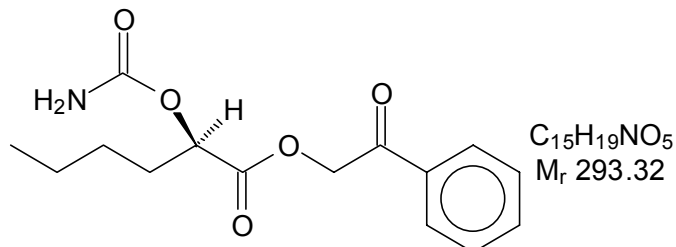
Die Umsetzung von 400 mg (2,3 mmol) des Hydrolyserückstandes (49 % O-Carbamoyl-(R)- α -hydroxyhexansäure (R)-67a und 51 % (S)-5-Butyloxazolidin-2,4-dion (S)-57 mit 557 mg (2,8 mmol) Phenacylbromid (199,05 g/mol) und 283 mg (390 μ l, 2,8 mmol) Triethylamin (101,19 g/mol, d=0,726) nach AVV 16 ergab 527 mg (1,8 mmol); 78 % (R)-80a, (S)-81a als farblose Kristalle.

b) nach Hydrolyse mit Hydantoinase 2

Die Umsetzung von 400 mg (2,3 mmol) des Hydrolyserückstandes (35 % O-Carbamoyl-(R)- α -hydroxyhexansäure (R)-67b und 65 % (R,S)-5-Butyloxazolidin-2,4-dion (S)-57 mit 557 mg (2,8 mmol) Phenacylbromid (199,05 g/mol) und 283 mg (390 μ l, 2,8 mmol) Triethylamin

(101,19 g/mol, $d=0,726$) nach der AVV 16 ergab 513 mg (1,7 mmol); 76 % (**R**)-**80b**, (**S**)-**81b** als farblose Kristalle.

4.4.5.10.1 *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxyhexansäurephenylester (**R**)-**80**:



IR (KBr, cm^{-1}):

$\nu =$ 3340 (s), 3170 (m, b) [NH]; 3040 (w) [ν CH_{arom.}]; 2970 (s), 2940 (s), 2870 (m) [_{s,as} CH₂, CH₃]; 1750 (vs), 1730 (vs), 1680 (vs) [C=O]; 1620 (m) [Amid II]; 1465 (m, sh) [as, CH₃, CH₂]; 1140 (s) [C-O]; 760 (s), 700 (s); [δ CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1425 (s), 1330 (m), 1230 (s), 1210 (s), 1115 (m), 1095 (m), 1065 (w), 890 (w), 790 (w), 730 (w), 610 (w), 560 (m, b).

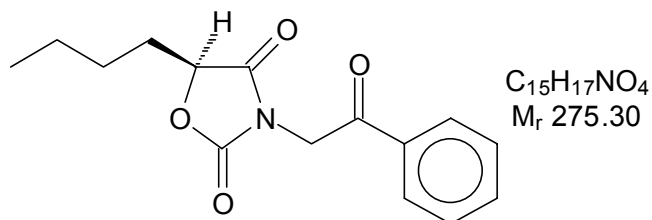
¹H-NMR (250.130 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 0.90 (t, 3 H; $J = 7.0$ Hz; CH₃); 1.11-1.47 (m; 4 H; CH₃-(CH₂)₂-); 1.53-1.85 (m; 2 H; CH₂-CH-); 4.66 (dd; 1 H; $J = 5.7$ Hz, $J = 7.3$ Hz; CH₂-CH-); 5.41 (d; 1H; $J = 16,1$ Hz; CH₂); 5,47 (d; 1H; $J = 16,1$ Hz; CH₂); 6.38-6.65 (breit; 2 H; NH₂); 7,38 (t; 2H; $J = 7,1$ Hz; C₆H₅); 7,46 (d; 1H; $J = 7,1$ Hz; C₆H₅); 7,90 (d; 2H; $J = 7,1$ Hz; C₆H₅).

¹³C{¹H}-NMR (62.896 MHz, DMSO-d₆ [ppm]):

$\delta =$ 14,1 (CH₃); 22,7 (CH₃-CH₂); 28,1 (CH₃-CH₂-CH₂); 34,4 (CH₂-CH); 66,2 (CH₂); 73,5 (CH₂-CH); 128,3 (C(2, 6) von C₆H₅); 128,5 (C(3, 5) von C₆H₅); 132,8 (C(4) von C₆H₅); 134,6 (C(1) von C₆H₅); (CH-COO); 156,2 (O-CO-NH₂); 167,4 (CH-COO); 191,0 (CH₂-CO-C₆H₅).

4.4.5.10.2 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-(S)-5-butyloxazolidin-2,4-dion (**R**)-**81**:



IR (KBr, cm^{-1}):

$\nu =$ 3030 (w) [ν CH_{arom.}]; 2960 (s), 2930 (s), 2870 (m) [_{s,as} CH₂, CH₃]; 1825 (s) [C=O in 2-Pos.]; 1740 (vs, b) [C=O in 4-Pos.]; 1700 (s) [ν C=O]; 1470 (m), 1460 (m, sh) 1435 (m) [as, CH₃, CH₂]; 1175 (s) [C-O]; 750 (s), 690 (s) [δ CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 2760 (m),

1390 (s), 1330 (s), 1215 (w), 1135 (m), 1080 (m), 1060 (w), 1020 (m), 1000 (s), 945 (m), 900 (m), 875 (m), 800 (m), 770 (m), 680 (m), 635 (w), 615 (m).

$^1\text{H-NMR}$ (400,132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 0.91 (t; 3 H; $J = 6,9$ Hz; CH_3); 1.19-1.52 (m; 4 H; CH_3 - $(\text{CH}_2)_2$ -); 1.69-1.90 (m; 2 H; CH_2 -CH-); 3.96 (s; 2H; CH_2); 4.92 (dd; 1 H; $J_1 = 4.7$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz; CH_2 - CH -); 7,46 (t; 2H; $J = 7,0$ Hz; C_6H_5); 7,59 (d; 1H; $J = 7,0$ Hz; C_6H_5); 7,90 (d; 2H; $J = 7,0$ Hz; C_6H_5).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 14,1 (CH_3); 22,7 (CH_3 - CH_2); 28,1 (CH_3 - CH_2 - CH_2); 31,6 (CH_2 -CH); 52,1 (CH_2 -CO); 80,8 (CH_2 - CH); 128,1 (C(2,6) von CO- C_6H_5); 128,7 (C(3,5) von CO- C_6H_5); 132,7 (C(4) von CO- C_6H_5); 134,4 (C(1) von CO- C_6H_5); 154,8 (O-CO-NH) 174,5 (CH-CO); 190,2 (CH_2 -CO- C_6H_5).

4.4.6 Semipräparative Trennung der *O*-Carbamoyl-(*R*)- α -hydroxysäurephenacylester und 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-oxazolidin-2,4-dione

Die Trennung der Phenacylverbindungen erfolgte mittels einer semi-präparativen HPLC. Säule: LiChrospher Si 60 10mm (250 mm * 10 mm). Die folgende **Tab. 63** gibt die Laufmittelzusammensetzung, Detektionswellenlänge, Flußgeschwindigkeit und die Retentionszeit der einzelnen Verbindungen wieder.

Tab. 63: Semipräparative HPLC- Trennung von *O*-Carbamoyl-(*R*)-säure-OPac und 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-oxazolidin-2,4-dionen: Bedingungen.

Substanz	Laufmittel- gemisch n-Hexan: IPA	Detektions- wellenlänge [nm] / Fluß [ml/min]	Retentionszeit [min]
a) <i>O</i> -Carbamoyl-(<i>R</i>)- b) 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-			
a) Mandelsäure-OPac (<i>R</i>)-68 b) Phenyloxazolidin (\pm)-69	85 / 15	254 / 4,5	16,8 8,7
a) <i>p</i> -Chlormandelsäure-OPac (<i>R</i>)-70 b) <i>p</i> -Chlorphenyloxazolidin (\pm)-71	85 / 15	254 / 4,5	18,9 9,0
a) <i>p</i> -Methoxymandelsäure-OPac (<i>R</i>)-72 b) <i>p</i> -Methoxyphenyloxazolidin (\pm)-73	80 / 20	254 / 4,5	17,4 8,8
a) <i>p</i> -Methylmandelsäure-OPac (<i>R</i>)-74 b) <i>p</i> -Methylphenyloxazolidin (\pm)-75	80 / 20	254 / 4,5	18,5 10,0
a) Hydroxyphenylpropionsäure-OPac (<i>R</i>)-76 b) Benzyloxazolidin (<i>S</i>)-77	85 / 15	242 / 4,5	18,9 8,6
a) Hydroxyphenylbutansäure-OPac (<i>R</i>)-78 b) Phenylethyloxazolidin (<i>S</i>)-79	85 / 15	242 / 6	17,5 8,6
a) Hydroxyhexansäure-OPac (<i>R</i>)-80 b) Butyloxazolidin (<i>S</i>)-81	85 / 15	230 / 4,5	15,8 7,5

OPac = 3-(2-Oxo-2-phenylethyl); IPA = Isopropylalkohol

4.4.7 Bestimmung der Enantiomerenreinheiten

Die Enantiomerenreinheiten der synthetisierten Verbindungen wurden mittels HPLC durch Trennung auf verschiedenen Chiralphasen (Chiracel OD[Daicel, Japan]; (R,R; S,S)-Welk; [Merck, Deutschland]) bestimmt. In **Tab. 64** und **Tab. 65** sind und die gemessenen optischen Reinheiten zusammengefaßt.

Tab. 64: Bestimmung der Enantiomerenreinheiten von *O*-Carbamoyl-(*R*)-säure-OPac: Bedingungen.

Substrat	Laufmittel n-Hexan: IPA Säule	Detektion bei Wellen- länge [nm] Fluß [ml/min]	Retentionszeit des Enantiomeren		Enantiomeren- überschuß [% ee]
			<i>R</i> - [min]	<i>S</i> - [min]	
-mandelsäure-OPac Hyd-1; (R)- 68a Hyd-2; (R)- 68b	90:10 + 1% ES <i>R,R</i> -Welk	242 1,0	46,4	41,2	>99 >99
- <i>p</i> -chlormandelsäure-OPac Hyd-1; (R)- 70a Hyd-2; (R)- 70b	90/10 + 1% ES <i>R,R</i> -Welk	242 1,0	39,6	45,1	79 64
- <i>p</i> -methylmandelsäure-OPac Hyd-1; (R)- 74a Hyd-2; (R)- 74b	90/10 + 2% ES <i>R,R</i> -Welk	242 1,0	44,8	69,2	>99 >99
- α -hydroxyphenylpropion- säure-OPac Hyd-1; (R)- 76a Hyd-2; (R)- 76b	90/10 + 1% ES <i>R,R</i> -Welk	242 1,0	33,2	44,1	97 66
- α -hydroxyphenyl- butansäure-OPac Hyd-1; (R)- 78a Hyd-2; (R)- 78b	AcN:H ₂ O 40:60 OD- <i>R</i>	242 1,0	22,5	25,6	90 73
- α -hydroxyhexansäure-OPac Hyd-1; (R)- 80a Hyd-2; (R)- 80b	90/10 + 1% ES <i>R,R</i> -Welk	242 1,0	29,5	20,1	>99 82

IPA = Isopropylalkohol; ES = Essigsäure; AcN = Acetonitril; OPac = 3-(2-Oxo-2-phenylethyl).

Tab. 65: Bestimmung der Enantiomerenreinheiten von 3-(2-Oxo-2-phenylethyl)-5-oxazolidin-2,4-dionen: Bedingungen.

Substrat	Laufmittel n-Hexan: IPA Säule	Detektion bei Wellen- länge [nm] Fluß [ml/min]	Retentionszeit des Enantiomeren		Enantiomeren- überschuß [% ee]
			<i>R</i> - [min]	<i>S</i> - [min]	
Phenyloxazolidin-2,4-dion Hyd-1; (\pm)- 69a Hyd-2; (\pm)- 69b	90:10 + 1% ES <i>R,R</i> -Welk	242 1,0	40,1	58,8	racemisch racemisch

<i>p</i> -Chlorphenyloxazolidin-2,4-dion Hyd-1; (±)- 71a Hyd-2; (±)- 71b	90:10 + 1% ES <i>R,R</i> -Welk	242 1,0	48,5	33,1	racemisch racemisch
<i>p</i> -Methoxyphenyloxazolidin-2,4-dion Hyd-1; (±)- 73a Hyd-2; (±)- 73b	AcN:H ₂ O 40:60 OD-R	242 0,5	38,2	50,6	racemisch racemisch
<i>p</i> -methylphenyloxazolidin-2,4-dion Hyd-1; (±)- 75a Hyd-2; (±)- 75b	90:10 2% ES <i>R,R</i> -Welk	242 1,0	50,4	40,6	racemisch racemisch
Benzyloxazolidin-2,4-dion Hyd-1; (S)- 77a Hyd-2; (S)- 77b	90:10 + 1% ES <i>R,R</i> -Welk	242 1,0	36,9	32,1	88 38
Phenylethyloxazolidin-2,4-dion Hyd-1; (S)- 79a Hyd-2; (S)- 79b	AcN:H ₂ O 70:30 OD-R	242 0,5	18,4	15,0	81 65

IPA = Isopropylalkohol; ES = Essigsäure; AcN = Acetonitril

4.4.8 Synthese von (*R*)-Mandelsäure (*R*)-**82a**, (*R*)-**82b**

Bei der Umsetzung von 200 mg (1.0 mmol) *O*-Carbamoyl-(*R*)-mandelsäure (**R**)-**59a**, synthetisiert unter Verwendung von Hyd-I, erhielt man nach AVV 17 nach Umkristallisation aus 10 ml Hexan/MtBE (1:3) 122 mg (0.8 mmol) = 78% (**R**)-**82a** farbloser Kristalle.

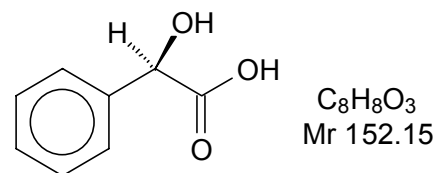
Schmp.: 129-130°C

Drehwert: (*R*)-Mandelsäure (**R**)-**82a** $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -157.5^{\circ}$ (c=1.0 MeOH)

Bei der Umsetzung von 200 mg (1.0 mmol) *O*-Carbamoyl-(*R*)-mandelsäure (**R**)-**59b**, synthetisiert unter Verwendung von Hyd-II, erhielt man nach AVV 17 nach Umkristallisation aus 10 ml Hexan/MtBE (1:3) 127 mg (0.8 mmol) = 81% (**R**)-**82b** farbloser Kristalle.

Schmp.: 128-130°C

Drehwert: (*R*)-Mandelsäure (**R**)-**82b** $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -156.7^{\circ}$ (c=1.0 MeOH)



IR (KBr, cm^{-1}):

$\nu =$ 3400 (s) [ν OH_{free}]; 3020 (w) [CH_{arom.}]; 2960 (w) [CH]; 2610 (m, vb) [ν OH_{bond}]; 1735 (vs, b) 1495 (w) [C=Carom.]; 1255 (s) [δ C-O]; 760 (s), 710 (s) [CH-out of plane, charakteristisch für monosubstituierten Aromaten]; weitere Banden bei 1510 (w), 1435 (m), 1375 (s), 1330 (s), 1305 (m), 1275 (m), 1195 (w), 1075 (w), 1050 (m), 1015 (m), 955 (w), 920 (m), 845 (w), 745 (m).

$^1\text{H-NMR}$ (400,132 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 5.05 (s; 1H; $\underline{\text{C}}\text{H-COOH}$); 5.15-5.90 (b; 1H; $\text{CH-O}\underline{\text{H}}$); 7.17-7.54 (m; 5H; $\text{C}_6\underline{\text{H}}_5$); 11.9-12.8 (b; 1H; $\text{COO}\underline{\text{H}}$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,625 MHz, DMSO- d_6 [ppm]):

$\delta =$ 72.8 ($\underline{\text{C}}\text{H-O}$); 126,7 (C(2,6) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 127.9 (C(4) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 128.3 (C(3,5) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 140.3 (C(1) von $\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$); 177.5 ($\underline{\text{C}}\text{OOH}$).

4.4.8.1 Bestimmung der Enantiomerenreinheiten von (*R*)-Mandelsäure (*R*)-82a, (*R*)-82b

Nach AVV 18 wurden die Methylester von (*R*)-82a und (*R*)-82b synthetisiert und danach durch HPLC auf einer chiralen Säule (Chiracel OD [Daicel, Japan]) die Enantiomerenreinheiten bestimmt. **Tab. 66** gibt die HPLC-Bedingungen und die gemessenen optischen Reinheiten wieder.

Tab. 66: HPLC-Bedingungen und Enantiomerenreinheiten von (*R*)-Mandelsäuremethylester

(R)-Mandelsäuremethylester	Laufmittel n-Hexan: IPA	Detektion bei Wellenlänge [nm] Fluß [ml/min]	Retentionszeit des Enantiomeren		Enantiomeren- überschuß [% ee]
			<i>R</i> - [min]	<i>S</i> - [min]	
Hyd-I ^a ; (<i>R</i>)-83a	85:15	254	8.50	6.10	>99
Hyd-II; (<i>R</i>)-83b		1.0	8.48		>99

a) zur Hydrolyse verwendetes Enzym

5 Literatur

- ¹ W. Umbach, *Perspektiven nachwachsender Rohstoffe in der Chemie* (Ed. H. Eierdanz), VCH, Weinheim, **1996**, pp. XXIX.
- ² M. Berger, M. Schneider, *Biotechnology Letters* **1991**, *13*, 333-338.
- ² M. Berger, M. Schneider, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 955-960.
- ³ M. Berger, K. Laumen, M. Schneider, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 961-965.
- ⁴ M. Berger, M. Schneider, *Biotechnology Letters* **1991**, *13*, 333-338.
- ⁵ C. Waldinger, M. Schneider, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 1513-1519.
- ⁶ A. Gennadios, C.L. Weller, R.F. Testin, *Cereal Chem.* **1993**, *70*, 426-429.
- ⁷ K. Schäfer, J. Wirsching, H. Höcker, *Fett/Lipid* **1997**, *6*, 217-222.
- ⁸ U. Biermann, W. Fried, S. Lang, W. Lühs, G. Machmüller, J.O. Metzger, M. Rüschen. Klaas, H.J.Schäfer, M.P. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2206-2224.
- ⁹ M. Biermann, K. Schmid, P. Schulz, *Starch/Stärke* **1993**, *45*, 281-288.
- ¹⁰ A. Albrecht, U. Rau, F. Wagner, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *46*, 67-73.
- ¹¹ R.D. Schmidt, R. Veger, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1694-1720.
- ¹² H.J. Kuiper, P. Kolster, J.C. Kok, J.M. Vereijken, in: *Gluten Proteins*, Association of Cereal Research, Detmold, Germany, **1993**, pp. 647-655.
- ¹³ A.Sander, E. Eilers, A. Heilemann, E. von Kries, *Fett/Lipid* **1997**, *6*, 115-120.
- ¹⁴ H.-P. Wetzels, R. Neumann, K. Haage, *Tenside Surf. Det.* **1994**, *31*, 286-293.
- ¹⁵ S.H. Shapiro, *Surface-Active Derivates, Soaps and Detergents*, Chap. 5, Marcel Dekker, Inc. New York, **1968**, pp. 105 ff.
- ¹⁶ J. Beger, R. Neumann, A. Seibt, *Tenside Surf. Det.* **1986**, *23*, 156-159.
- ¹⁷ C. Berger, P. Gacon, Givaudan-Lavirotte, WO 9221318 A1 921210; **1993**.
- ¹⁸ H.G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, G. Thieme Verlag, **1985**, S. 34f.
- ¹⁹ G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2312-2341.
- ²⁰ R.G. Jensen, F.A. DeJong, R.M. Clark, *Lipids*, **1983**, *3*, 239-252.
- ²¹ F. Theil, *Enzyme in der organischen Synthese*, Spektrum Akad. Verlag **1997**, S. 17-70.
- ²² L. Brady, A.M. Brzozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, J.P. Christiansen, L. Huge-Jensen, B. Norskov, L. Thim, U. Menge, *Nature* **1990**, *343*, 767-770.
- ²³ F.K. Winkler, A. D'Arcy, W. Hunziker, *Nature* **1990**, *343*, 771-774.

- 24 A.M. Brzozowski, U. Derewenda, Z.S. Derewenda, G.G. Dodson, D.M. Lawson J.P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Huges-Jensen, S.A. Patkar, L.Thim, *Nature* **1991**, *351*, 491-494.
- 25 D. Blow, *Nature* **1991**, *351*, 444-447.
- 26 M.E.M. Noble, A. Cleasby, L.N. Johnson, L.G.J. Frenken, M.R. Egmond, *FEBS Lett.* **1993**, *331*, 123-128.
- 27 J. Uppenberg, M.T. Patkar, S. Hansen, A. Jones, *Structur* **1994**, *2*, 293-296.
- 28 S. Brenner, *Nature* **1988**, *334*, 528-530.
- 29 M. Cygler, J.D. Schrag, F. Ergan, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1992**, *10*, 143-184.
- 30 P.R. Carey, P. Tonge, *J. Chem. Soc. Rev.* **1990**, *19*, 293-307.
- 31 K.-E. Jaeger, S. Ransac, B.W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel, O. Misset, *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, *15*, 29-63.
- 32 D.R. Corey, C.S. Craik, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1784-1788.
- 33 J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* **1991**, *253*, 872-879.
- 34 A.A. Kossiakoff, S.A. Spencer, *Biochemistry*, **1981**, *20*, 6462-6468.
- 35 P. Carter, J.A. Well, *Proteins: Struc. Func. Genet.* **1990**, *7*, 335-339.
- 36 R.J. Kazlauskas, *Trends Biotechnol.* **1994**, *12*, 464-472.
- 37 C.-S. Chen, C.J. Sih, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 695-708.
- 38 F. Theil, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2203-2227.
- 39 E. Schoffers, A. Golebiowski, C.R. Johnson, *Tetrahydron* **1996**, *52*, 3769-3826.
- 40 E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, A. Manzocchi, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1071-1140.
- 41 G.G. Haraldson, *The application of lipases in organic synthesis*, Supplement B (S. Patai Ed.), John Wiley & Sons, **1992**, Vol. 2, pp. 1395-1473.
- 42 M.C.R. Fransen, H. Jongejan, H. Kooijman, A.L. Spek, M. Camacho, *Tetrahydron: Asymmetry* **1996**, *7*, 497-510.
- 43 P. Andersch, M.P. Schneider, *Tetrahydr. Asym.* **1993**, *4*, 2135-2138, und D.G. Drueckhammer, W.J. Hennen, R.L. Pederson, C.F. Barbas, C.M. Grautheron, T. Kracht, C.-H. Wong, *Synthesis* **1991**, 499-505.
- 44 H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1131-1134.
- 45 M. Lobell, M.P. Schneider, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 1713-1716.
- 46 J.H. Kastle, A.S. Loevenhart, *Amer. J. Chem.* **1900**, *24*, 491-493.

- 47 B. Steffen, S. Ziermann, S. Lang, F. Wagner, *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 773-776.
- 48 B. Cambou, A.M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **1984**, *26*, 1449-1452.
- 49 M.H. Coleman, A.R. MacRae (Unilever NV), DE-B 2705608, **1977** [*Chem. Abstr.* **1977**, *87*, 166366].
- 50 T. Matsuo, N. Sawamura, Y. Hashimoto, W. Hasida (Fuji Oil Co.), EP-B 0035883A2, **1982** [*Chem. Abstr.* **1982**, *96*, 4958y].
- 51 P. Eigtved, T.T. Hansen, C.A. Miller, *Proceedings-World Conference on Biotechnology for the Fats and Oils Industry, Hamburg 1987* (T. Applewhite, Ed.), Amer. Oil Chem. Soc, Champaign **1988**, p.134.
- 52 G. Kirchner, M. Scollar, A.M. Klibanov, *J. Amer. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072-7076.
- 53 M. Mischnitz, U. Pöschl, K. Faber, *Biotechnol. Lett.* **1991**, *13*, 653-661.
- 54 Y.-F. Wang, J.J. Lalonde, M. Momongan, D.E. Bergbreiter, C.H. Wong, *J. Amer. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7200-7204.
- 55 B.M. Morgan, D.R. Dodds, A. Zaks, D.R. Andrews, R. Klesse, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7736-7743.
- 56 Produktinformation zu Geliderm 3000 (acyliertes Proteinhydrolysat), DGF Stoess AG.
- 57 V. Gotor, E. Menendez, Z. Mouloungui, A. Gaset, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 2453-2456 und S. Puertas, R. Brieva, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 4007-4014.
- 58 L.T. Kanerva, P. Csomos, O. Sundholm, G. Bernath, F. Fulop, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1705-1716.
- 59 K.E. Jaeger, K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M.T. Reetz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *46*, 99-105.
- 60 D. Montet, F. Servat, M. Pina, J. Graille, P. Galzy, A. Arnaud, H. Ledon, L. Marcou, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *67*, 771-774.
- 61 L.E. Iglesias, V.M. Sanchez, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2675-2677.
- 62 F. Balkenhohl, K.H. Ditrich, W.E. Ladner, *J. Prakt. Chem.* **1997**, 339-340 und F. Balkenhohl, B. Hauer, W. Ladner, W. Pressler, Germ. Pat. DE 4332738 A1, **1997**.
- 63 M.T. Reetz, K. Schimossek, *Chimia* **1996**, *50*, 668-669.
- 64 C. Syldatk et al. in K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme catalysis in organic synthesis*, VCH, Weinheim, **1995**, pp. 409-431.

- 65 F. Theil, *Enzyme in der organischen Synthese*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 91-94.
- 66 R. M. Fink, R. E. Cline, H. M. G. Koch, *Fed. Proc.* **1954**, *13*, 207-208.
- 67 O.H. Gaebler, A.K. Keltch, *J. Biol. Chem.* **1926**, *70*, 763-764.
- 68 F. Bernheim, M. L. C. Bernheim, *J. Biol. Chem.* **1946**, *163*, 683-685.
- 69 D. P. Wallach, S. Grisolia, *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 277-288.
- 70 T. C. Butler, W. J. Wandell, *Neurology* **1958**, *8*, 106-112.
- 71 R. Tsugawa, S. Okumura, T. Ito, N. Katsuga, *Agric. Biol. Chem.* **1966**, *30*, 27-34.
- 72 K.H. Dudley, D.L. Bius, *J. Heterocycl. Chem.* **1973**, *10*, 173-180.
- 73 F. Cecere, G. Galli, F. Morisi, *FEBS Lett.* **1975**, *57*, 192-194.
- 74 D. Dinelli, F. Morisi, D. Zaccardelli, US. Pat. 3964970, **1976**.
- 75 F. Cecere, G. Galli, G. Della Penna, B. Rappuoli, US. Pat. 4065353, **1977**.
- 76 L. Degen, A. Viglia, E. Fascetti, E. Perricone, US. Pat. 4111749, **1978**.
- 77 K. Sano, K. Yokozeki, C. Eguchi, T. Kagawa, I. Noda, K. Mitsugi, *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 819-825.
- 78 C. Sylдатк, V. Mackowiak, H. Hoeke, C. Gross, G. Dombach, F. Wagner, *J. Biotechnol.* **1990**, *14*, 345-362.
- 79 A. Morin, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 208-214.
- 80 J. Ogawa, S. Shimizu, *J. Mol. Catal. B* **1997**, *2*, 163-176.
- 81 G-J. Kim, H-S Kim, *Biochemistry* **1998**, *330*, 295-302.
- 82 C. Sylдатк, O. May, J. Altenbuchner, R. Mattes, M. Siemann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 293-309.
- 83 D. Völkel, F. Wagner, *Ann. NY. Acad. Sci.* **1995**, *750*, 1-9.
- 84 E. Jabri, M. B. Carr, R. P. Hausinger, P. A. Karplus, *Science* **1995**, *268*, 998-1004.
- 85 U. Widmer, *Synthesis* **1983**, 135-136.
- 86 S. C. Bergmeier, A. A. Cobás, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2369-2376.
- 87 V. F. Pozdnev, *J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1988**, *58*, 592-597.
- 88 S.-S. Wang, B. F. Gisin, D. P. Winter, R. Makofske, I. D. Kulesha, C. Tzougraki, J. Meienhofer, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1286-1290.
- 89 A. Armstrong, I. Brackenridge, R. F. W. Jackson, J. M. Kirk, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2483-2484.
- 90 S. Kim, J. I. Lee, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 1712-1716.
- 91 T. Kamijo, H. Harada, K. Iizuka, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 5044-5047.

- 92 M. K. Dhaon, R. K. Olsen, K. Ramasamy, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1962-1965.
- 93 J. M. Khurana, P. K. Sahoo, G. C. Maikap, *Synth. Commun.* **1990**, *20*, 2267-2271.
- 94 A. Meißner, P. Gockel, H. Vahrenkamp., *Chem. Ber.* **1994**, *127*, 1235-1241.
- 95 R. Roeske, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 1251-1253.
- 96 S. W. Wright, D. L. Hageman, A. S. Wright, L. D. McClure, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7345-7348.
- 97 Y. Tsai-Lung, L. Chun-Chen, U. Biing-Jiun, *Tetrahydron* **1997**, *53*, 11141-11152.
- 98 E. Taschner, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1961**, *646*, 134-136.
- 99 K. Shuji, T. Akira, W. Eiji, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2875-2883.
- 100 I. Nobuo, S. Takayuki, Y. Shun-Ichi, *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 3064-3069.
- 101 F.S. Gibson, S.C. Bergmeier, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3216-3218.
- 102 E. Schroeder, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1965**, *688*, 250-264.
- 103 H. Kunz, G. Schaumlöffel, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1985**, *9*, 1784-1793.
- 104 A. Albanese, D. Corcella, F. Landini, D. Maia, A. Penso, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1997**, 247-250.
- 105 F.M. Callahan et al., *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 201-207.
- 106 P.M. Hardy, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1974**, 796-802.
- 107 F. Björkling, S.E. Godtfredsen, O.Kirk, *J.Chem. Soc.Chem.Comm.* **1989**, 934-935.
- 108 S. Bloomer, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Enzyme Microb.Technol.* **1992**, *14*, 546-552.
- 109 L. Kvittingen, B.J. Sjursnes, T. Anthonsen, P. Haling, *Tetrahydron* **1992**, *48*, 2793-2802.
- 110 A. Uemura, K. Nozaki, J.-I. Yamashita, M. Yasumoto, *Tetrahydron Lett.* **1989**, *30*, 3817-3819.
- 111 J.B.West, J. Scholten, N.J. Stoliwich, J.L. Hogg, A.I Scott., C.-H. Wong *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3709-3712.
- 112 K.A. Babiak, J.S. Ng, J.H. Dygos, C-L. Weyker, Y.-F. Wang, C.-H. Wong., *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3377-3381.
- 113 V. Gotor, R. Pulido, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **1991**, 491-494.
- 114 H. Frykman, N. Ohrner, T. Norin, K. Hult, *Tetrahydron Lett.* **1993**, *34*, 1367-1369.
- 115 F. Theil, S. Ballschun, H. Schick, M. Haupt, B. Hafner, S. Schwarz, *Synthesis* **1992**, 895-899.

- 116 E. M. Anderson, K. M. Larsson, O. Kirk, *Biokatalysis and Biotransformation* **1998**, *16*, 181-204.
- 117 H. Held-Hansen, M. Ishii, S. Patkar, T. Hansen, P. Eigtved, *ACS Symp. Ser. (Biocatal. Agric. Biotechnol.)* **1989**, *389*, 158-172.
- 118 F. Björkling, S.E. Godtfresdsen, O. Kirk, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 934-935.
- 119 M. Arroyo, J.V. Sinisterra, *J.Org. Chem.* 1994, *59*, 4410-4417.
- 120 T. Maugard, M. Remaud-Simeon, D. Petre, P. Monsan, *J. Mol. Catal., B: Enzyme* **1998**, *5*, 13-17.
- 121 H. Sundram, A. Golebiowski, C.R. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6975-6976.
- 122 C. Orrenius, N. Öhrner, D. Rotticci, A. Mattson, K. Hult, T. Norin, *Tetrahydron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1217-1220.
- 123 M.J. Garcia, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 2199-2210.
- 124 M.J. Garcia, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6935-6940.
- 125 S. G. Davies, D.R Fenwick, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, *11*, 1109-1110.
- 126 K.Schäfer, H. Höcker, *Melliand Textilberichte* **1996**, *77*, 402-406.
- 127 K. D. Hasenklever, *DWI Reports* **1993**, *111*, 465-469.
- 128 J. P. Greenstein, M. Winitz, *Chemistry of the Amino Acids* Wiley: New York, NY, **1961**, pp. 1753-1789.
- 129 I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, T. Mori, Y. Matsuo, *Proceed. Ivth Ferment. Symp. Soc. Ferment. Technol. Osaka* **1972**, 383-389.
- 130 A. S. Bommarius, in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Ed. K. Drauz, H. Waldmann), VCH, Weinheim, **1995**, pp. 393.
- 131 H. K. Chenault, J. Dahmer, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6354-6364.
- 132 C. H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Chemistry* Oxford: Pergamon Press, **1994**, pp. 42-43.
- 133 I. Grenzen, H.-G. Löffler, F. Schneider, *Z. Naturforsch.* **1980**, *35c*, 544-550.
- 134 A. Ferjancic-Biagini, T. Giardina, M. Reynier, A. Puigserver, *Biokatalysis and Biotransformation* **1997**, *15*, 313-323.
- 135 K. Yokoigawa, E. Sato, N. Esaki, K. Soda, *Appl. Microbiol Biotechnol.* **1994**, *42*, 287-289.
- 136 J. Kosáry, CS. Sisak, B. Szajani, L. Boross, *Biokatalysis* **1994**, *11*, 329-337.

- 137 E. Baldaro, C. Fuganti, S. Servi, A. Tagliano, M. Terreni, *NATO ASI Ser., Microbial Reagents in Organic Synthesis* Kluwer Academic Publishers, **1992**, pp.175-188.
- 138 A. M. Azevedo, L. P. Fonseca, D. M. F. Prazeres, *Biocatalysis and Biotransformation* **1999**, *17*, 401-415.
- 139 M. Nettekoven, M. Psiorz, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1425-1428.
- 140 V. A. Soloshonok, N. A. Kokina, A. V. Rybakova, I. P. Shishkina, S. V. Galushko, A. E. Sorochinsky, V. P. Kukhar, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1601-1610.
- 141 A. Pessina, P. Luthi, P. L. Luisi, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 631-641.
- 142 A. Romeo, G. Lucente, D. Rossie, G. Zanotti, *Tetrahedron Lett.* **1971**, *21*, 1799-1802.
- 143 C. Fuganti, P. Grasselli, S. Servi, A. Lazzarini, P. J. Casati, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 538-544.
- 144 H. Waldmann, D. Sebastian, *Chem. Rev.* **1994**, 911-937.
- 145 I. B. Stoineva, B. P. Galunsky, V. S. Lozanov, I. P. Ivanov, D. D. Petkov, *Tetrahydron* **1992**, *48*, 1115-1118.
- 146 R. Didziapetris, B. Drabnig, V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, V. Svedas, *FEBS Lett.* **1991**, *287*, 31-33.
- 147 F. Brtnik, T. Barth, K. Jost, *Collect. Czech. Chem. C.* **1981**, *46*, 1983-1989.
- 148 A. Pessina, P. Lüthi, J. Prenosil, Y. Zhang, L. Luisi, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 631-641.
- 149 C. Ebert, P. Linda, L. Gardossi, *Tetrahydron Lett.* **1996**, *37*, 9377-9380.
- 150 M. G. Kim, S. B. Lee, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **1996**, *1*, 71-80.
- 151 L. D. Martin, C. Ebert, G. Garau, L. Gardossi, P. Linda, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **1999**, *6*, 437-445.
- 152 M. Fite, M. Capellas, M. D. Benaiges, G. Caminal, P. Clapes, G. Alvaro, *Biocatalysis and Biotransformation* **1997**, *14*, 317-332.
- 153 P. Aldercreutz, *Enzymatic reactions in organic media*, (Ed. A.M.P. Koskinen, A.M. Klibanov), London: Blackie Academic and Professional, **1996**, pp. 9-42.
- 154 R. W. Holley, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2552-2553.
- 155 C. Meyers, J.D. Glass, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 2193-2196.
- 156 T. Maugard, M. Remaud-Simeon, D. Petre, P. Monsan, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **1998**, *5*, 13-17.
- 157 P. K. Smith, A. C. Taylor, E. R. B. Smith, *J. Biol. Chem.* **1938**, *122*, 109-116.
- 158 S. Miyamoto, C. L. A. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **1931**, *90*, 165-169.

- 159 B. B. Owen, *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 24-30.
- 160 C. L. A. Schmidt, W. K. Appleman, P. L. Kirk, *J. Biol. Chem.* **1930**, *85*, 137-141.
- 161 R. Schwesinger, *Chimia* **1985**, *39*, 269-272.
- 162 F. Hibbert, G. Simpson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1987**, *16*, 243-246.
- 163 A. Warburton, *J. Chem. Soc.* **1951**, 2492-2495.
- 164 H.P. Hall, *J. Amer. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5445-5451.
- 165 K.T. Leffek, P. Pruszyński, K. Thanapaalasingham, *Can. J. Chem.* **1989**, *67*, 590-595.
- 166 V.G. Yashunskii, V.V. Ogorodnikova, L.E. Kholodov, *Chem. Heterocycl. Compd.* **1980**, 941-944.
- 167 K.C. Chu, D.J. Cram, *J. Amer. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 3521-3531.
- 168 A.F. McKay, M.E. Kreling, *Can. J. Chem.* **1957**, *35*, 1438-1441.
- 169 S. Nakamori, K. Yokozeki, K. Mitsugi, C. Eguchi, H. Iwagami, U.S. Pat. 4211840, **1980**.
- 170 H. Takahashi, S. Takahashi, T. Ohashi, K. Yoneda, K. Wanatabe, Jap. Pat. 62 25990, **1987**.
- 171 F. Cecere, W. Marconi, F. Morisi, B. Rappuoli, Germ. Pat. DE 2615594 A1, **1978**.
- 172 R. Grifantini, C. Pratesi, G. Galli, G. Grandi, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9326-9331.
- 173 Produkt Information, Boehringer Mannheim Biocatalysts, Version 14.12.94.
- 174 O. Keil, *Diplomarbeit* **1994**, Universität Wuppertal.
- 175 St. Müller, *Diplomarbeit* **1996**, Universität Wuppertal.
- 176 K.H. Dudley, T.C. Butler, D.L. Bius, *Drug Metab. Disp.* **1974**, *2*, 103-112.
- 177 W. Traube, R. Ascher, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1913**, *46*, 2077-2084.
- 178 P. Tinapp, *Chem. Ber.* **1971**, *104*, 2266-2267.
- 179 W. F. Barthel, J. Leon, S. A. Hall, *Ind. Eng. Chem.* **1953**, *45*, 485-489.
- 180 F. Cecere, W. Marconi, F. Morisi, B. Rappuoli, Germ. Pat. DE 2615594 A1, **1978**.
- 181 K. Yokozeki, K. Kubota, *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 721.
- 182 H. Takahashi, S. Takahashi, T. Ohashi, K. Yoneda, K. Watanabe, Jap. Pat. 6225990, **1987**.
- 183 O. Keil, M. P. Schneider, J. P. Rasor, *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 1257-1260.
- 184 C. Gitler, *Anal. Biochem.* **1972**, *50*, 324-325.
- 185 H. Jork, W. Funk, W. Fischer, H. Wimmer, *Dünnschicht-Chromatographie*, Band 1a, Merk/VCH, Weinheim, **1998**.
- 186 M. Bergmann, L. Zervas, *Chem. Ber.* **1932**, *65*, 1192-1196.

-
- 187 A.M. Castano, A.M. Echavarren, *Tetrahydron* **1992**, *48*, 3377-3384.
- 188 C.J. Moody, P.T. Gallagher, A.P. Lighfoot, A.M. Slawin, *J. Org Chem.* **1999**, *64*, 4419-4425.
- 189 J. Altman, M. Wilchek, R. Lipp, W. Schunack, *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 2069-2076.
- 190 J.A. Pearson, P.R. Bruhn, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 7092-7097.
- 191 C.H. Kwon, M.T. Iqbal, J.N. Wurlpel, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1845-1849.
- 192 M. Lobell, *Dissertation*, Universität Wuppertal 1994; M.P. Schneider, M. Lobell, *J. Chromatogr.* **1993**, *633*, 287-291.
- 193 St. Müller, J.Dönike, H-J. Altenbach, M.P. Schneider Manuskript in Vorbereitung.
- 194 M. Ueda, N. Kawabaraski, Y. Imai, *Synthesis* **1982**, *11*, 933-935.
- 195 R Shnur, M Morville, *J. Med. Chem.* **1989**, *29*, 5, 770-778.
- 196 Clark-Lewis King, *J. Chem. Soc.* **1951**, 3077-3079.
- 197 W. Stadlbauer, T. Kappe, *Monatsh. Chem.* **1985**, *116*, 1005-1016.
- 198 T. Hayashi, M. Ogasawara, T. Senda, *Yakugaku Zasshi* **1969**, *89*, 272-277.