

- [7] L. Delaude, P. Laszlo, *J. Org. Chem.* 55 (1990) 5260–5269.
[8] R. M. Barrer, H. Villiger, *Z. Kristallogr.* 128 (1969) 352.
[9] A. Botta, H.-J. Buysch, L. Puppe, EP-B 334097 (1989), Bayer AG (*Chem. Abstr.* 112 (1990) 138722 z.).
[10] A. Botta, H.-J. Buysch, L. Puppe, EP-B 423479 (1991), Bayer AG.
[11] Analog konnte auch *p*-Terphenyl (im Gegensatz zu den *o*- und *m*-Isomeren) in 97 % Selektivität zu 4,4'-Dichlor-*p*-terphenyl umgesetzt werden.
[12] Der Katalysator ist nach mehrfachem Einsatz ohne Aktivitätsminderung röntgenographisch unverändert.
[13] Die Annahme, daß die Katalyse tatsächlich im Innern des Zeoliths abläuft, wird dadurch erhärtet, daß auch ein an der äußeren Oberfläche trimethylsilylierter K-Zeolith L unvermindert Aktivität und Selektivität (96 %) aufweist.
[14] Dies ist in Einklang mit Befunden aus der Chlorierung in Gegenwart von Zeolithen der Y-Reihe, bei denen sich die mit höherer Acidität als nicht *p*-selektiv erwiesen [6d e.7].
[15] K.-H. Hellwege (Hrsg.): *Landolt-Börnstein, Band 1, 4. Teil, 6. Aufl.*, Springer, Berlin 1955, S. 523–525.
[16] Die Zeolithen wurden jeweils vor ihrer Verwendung 3 h bei 400 °C calciniert (Muffelofen).
[17] Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches wurde gaschromatographisch durch Vergleich mit authentischen Proben bestimmt.

Salzfreie Synthese von Azo- und Hydrazonfarbstoffen unter CO₂-Druck

Von Roderich Raue*, Alfred Brack und Karl H. Lange

Professor Karl Heinz Büchel zum 60. Geburtstag gewidmet

Wir stellen hier ein neues Verfahren zur Herstellung von Azofarbstoffen vor, bei dem die zur Diazotierung notwendige salpetrige Säure aus ihren Salzen oder Estern mit CO₂ bei einem Druck von 5 bis 65 bar freigesetzt wird. Die Menge der bei den bisherigen Herstellungsverfahren als Nebenprodukte anfallenden anorganischen und organischen Salze wird bei dieser Arbeitsweise erheblich vermindert. Dies ist unter ökologischen Gesichtspunkten von großer Bedeutung.

Azofarbstoffe können in einem zweistufigen oder einem einstufigen Verfahren hergestellt werden. Im ersten Fall wird in wäßriger saurer Lösung mit Natriumnitrit 1 ein Diazoniumsalz gebildet, das anschließend mit der Kupplungskomponente zur Reaktion gebracht wird^[1]. Im zweiten Fall wird durch Diazotierung in Gegenwart der Kupplungskomponente direkt das gewünschte Produkt erhalten^[2]. Als Nucleophile können dabei neben Arenen auch methylenaktive Verbindungen eingesetzt werden^[3,4].

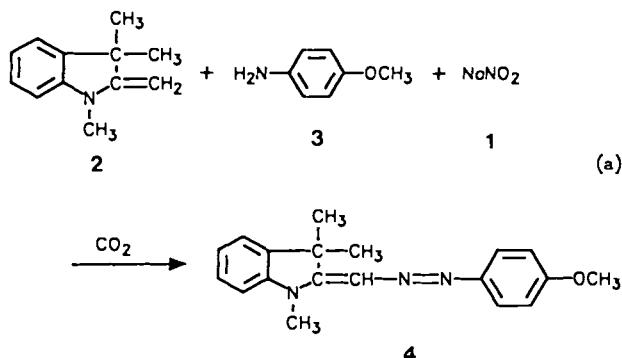
Ein Nachteil beider Verfahren sind die als Nebenprodukt anfallenden großen Mengen Salz aus der Neutralisation der verwendeten Säure. Erwünscht ist deshalb ein Verfahren, das die Bildung dieser Nebenprodukte vermeidet.

CO₂ ist ein inertes, gasförmiges Säureanhydrid, das sich mühevlos durch Änderung von Druck oder Temperatur aus dem Hydratationsgleichgewicht entfernen läßt. Unter Atmosphärendruck reagiert eine wäßrige Lösung von Kohlendioxid nur schwach sauer. Erwartungsgemäß führte deshalb das Einleiten eines kräftigen CO₂-Gasstromes in eine Mischung aus aromatischem Amin, Kupplungskomponente und wäßriger Natriumnitritlösung auch nicht in Spuren zur Bildung einer Azoverbindung.

Das uns bekannte Erscheinungsbild der Kohlensäure wird durch das scheinbare erste Dissoziationsgleichgewicht beschrieben, dessen pK 6.46 beträgt. Dieser pK-Wert setzt sich additiv aus dem des vorgelagerten Hydratationsgleichge-

wichts von CO₂ (pK = 3.16) und dem der wahren ersten Dissoziationsstufe der Kohlensäure (pK_a = 3.3) zusammen^[5]. Dieses vorgelagerte Hydratationsgleichgewicht sollte sich durch Anwendung von Druck in der Weise verschieben lassen, daß die wahre erste Dissoziationsstufe der Kohlensäure zur Diazotierung genutzt werden kann.

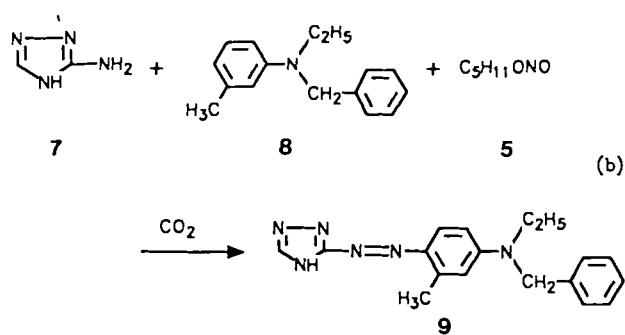
Zunächst wurde die einstufige Synthese des Hydrazonfarbstoffvorläufers 4 gemäß Gleichung (a) untersucht. Bei einem



Druck von 5 bar fand bereits eine merkliche Umsetzung statt, bei 30 bar betrug die Ausbeute über 80 %, und bei 50 bar war eine vollständige Umsetzung erreicht. Ausbeute und Produktreinheit lassen sich verbessern, wenn man Wasser/Methanol-Mischungen als Lösungsmittel verwendet, denn Methanol hat nicht nur ein höheres Lösungsvermögen für Amine und Kupplungskomponenten, sondern auch für CO₂^[6].

Da der Farbstoff nahezu salzfrei als Farbbase 4 erhalten wird, kann die Methylierung zum *N*-Alkyl-*N*-arylhyclazonfarbstoff unmittelbar angeschlossen werden. Anstelle von Natriumnitrit können auch Ester der salpetrigen Säure, beispielsweise Isoamylnitrit 5 oder Methylnitrit 6 verwendet werden, um die Bildung von Salzen völlig auszuschließen^[7].

Nach diesem Verfahren wurde eine große Zahl von Azofarbstoffen hergestellt. Von besonderem Interesse ist, daß bei diesem einstufigen Verfahren die Diazotierung und Kupplung heterocyclischer Amine mit tertiären aromatischen Aminen in quantitativer Ausbeute gelingt, denn normalerweise lassen sich heterocyclische Amine nur in konzentrierten Säuren mit Nitrosylschwefelsäure diazotieren. Nach unserem Verfahren erhält man beispielsweise aus 3-Amino-1,2,4-triazol 7, *N*-Benzyl-*N*-ethyl-3-methylanilin 8 und Isoamylnitrit 5 in einer Methanol/Wasser-Mischung unter einem CO₂-Druck von 53.5 bar quantitativ den Azofarbstoff 9^[7] [Gl. (b)].



Experimentelles

2,3-Dihydro-1,2,3-trimethylindol-2-ylidenemethanazo(4'-methoxybenzol) 4: 173 g (1 mol) 2,3-Dihydro-1,3,3-trimethyl-2-methylenindol 2, 123 g (1 mol) 4-Methoxyanilin 3 und eine Lösung von 73 g (1.06 mol) Natriumnitrit 1 in 300 mL Wasser werden in einem Druckgefäß vorgelegt und CO₂ bis zu einem

[*] Dr. R. Raue
B.-von-Suttnerstraße 48, W-5090 Leverkusen 1
Dr. A. Brack, Dr. K. H. Lange
Farbenforschung 1
Bayer AG
W-5090 Leverkusen

Druck von 50 bar eingeleitet. Die Temperatur steigt bis 35 °C an, und der Druck sinkt ab. Durch weiteres Einleiten von CO₂ wird ein Druck von 50 bar aufrechterhalten. Man läßt 3 h bei 35–40 °C röhren und entspannt anschließend das Druckgefäß bis auf Normaldruck. Das entweichende Kohlendioxid kann wieder verwendet werden. Die schwach alkalisch reagierende Suspension der Farbbase wird abgesaugt, neutral gewaschen und getrocknet. Man erhält 301.2 g (98 %) **4**. Fp = 147–150 °C, korrekte C,H,N-Analyse. MS (EI, 70 eV): *m/z* 307 (*M*⁺, 100 %), 185 (39 %), 159 (92 %). – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1585 (s), 1245 (s).

1,2,4-Triazolyl-3-azo-4'-(*N'*-benzyl-*N'*-ethyl-3'-methylanilin) **9**: In einem Druckgefäß werden 16.8 g (0.2 mol) **7**, 45.0 g (0.2 mol) **8**, 30.4 g (0.26 mol) **5**, 80 mL Methanol und 40 mL Wasser zusammengegeben und CO₂ bis zu einem Druck von 53.5 bar eingeleitet. Der Autoklav wird auf 40 °C erwärmt und 3 h die Temperatur von 34–40 °C sowie durch weiteres Einleiten von CO₂ ein Druck von 50–55 bar aufrechterhalten. Danach läßt man das Reaktionsgefäß erkalten und entspannt auf Normaldruck. Das CO₂ wird zurückgewonnen und wiedereingesetzt. Man destilliert Methanol ab und bringt den Rückstand mit gesättigter Kochsalzlösung und etwas Salzsäure zur Kristallisation. Der Farbstoff wird durch Verrühren mit Dichlormethan weiter gereinigt und anschließend getrocknet. Ausbeute: 61.4 g (100 %) **9**. Fp = 80–94 °C, korrekte C,H,N-Analyse. – ¹H-NMR (CDCl₃, 270 MHz): δ = 1.25 (t, 3 H), 2.53 (s, 3 H), 3.53 (q, 2 H), 4.61 (s, 2 H), 6.52 (s, 1 H), 7.05–7.40 (mehrere m, 7 H), 7.78 (d, 1 H), 8.26 (s, 1 H). – MS (EI, 79 eV): *m/z* 320 (*M*⁺, 55 %), 265 (8 %), 250 (9 %), 229 (*M*⁺–C₂H₅, 26 %), 91 (100 %). – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3430 (s), 1595 (s), 1230 (s).

Eingegangen am 10. Juni 1991 [Z 4691]
Auf Wunsch der Autoren erst jetzt veröffentlicht

- [1] K. Hunger, P. Mischke, W. Rieper, R. Raue, *Ullmann's Encycl. Ind. Chem.*, Vol. A3 1985, 245–324.
- [2] J. W. Balon, DE-A 2 139 311 (1971), DuPont.
- [3] R. Raue, DBP 1083000 (1957), Bayer.
- [4] R. Raue, H.-P. Kühlthau, EP 42 556 (1980), Bayer.
- [5] H. R. Christen: *Grundlagen der allgemeinen und anorganischen Chemie*, 5. Aufl., Sauerländer, Aarau 1977, S. 526–527.
- [6] E. Hillenbrand, *Ullmann's Encycl. Tech. Chem.*, 4. Aufl., Band 14 1977, 569–581.
- [7] R. Raue, A. Brack, K. H. Lange, EP-A 91 103 165.5 (1990), Bayer.

Antikörper-katalysierte Hydrolyse glycosidischer Bindungen**

Von Jean-Louis Reymond, Kim D. Janda*
und Richard A. Lerner*

Monoklonale Antikörper gegen Übergangszustands-Analoga katalysieren eine Reihe von chemischen Reaktionen^[1], weshalb sie als Abzyme (*antibody enzymes*) bezeichnet werden. Die bisher bekannten Beispiele konzentrieren sich auf basenkatalysierte Transformationen mit negativ geladenen Übergangszuständen sowie, in geringerem Maße, auf elektrocyclische und Redoxreaktionen. Wir berichten hier über den ersten Antikörper, der die säureunterstützte Hydrolyse einer aktivierten glycosidischen Bindung katalysiert^[2].

Für diese Untersuchung wählten wir die Hydrolyse des Aryloxytetrahydropyrans **1** aus. Obwohl dieses Acetal sehr viel labiler ist als ein echtes Glycosid, bietet es ein prototypisches Modell für eine glycosidische Bindung^[3a, b]. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sowohl der spontanen als auch der säurekatalysierten Spaltung ist die heterolytische Spaltung der exocyclischen Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung^[3c]. Aufgrund stereoelektronischer Effekte ist die Reaktionsgeschwindigkeit konformationsabhängig, wobei das

Sesselkonformer mit dem Aryloxyrest in axialer Stellung die labilere Form ist (Abb. 1)^[3d]. Eine detaillierte semiempirische Berechnung der Geometrie des Übergangszustands ergab, daß die exocyclische C-O-Bindung 1.8–2.2 Å lang ist^[4]. Wir folgerten, daß Piperidinium-Ionen wie **2** oder **3** mit einer Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung von ca. 1.5 Å Länge akzeptable Analoga für den vorgeschlagenen kationischen Übergangszustand der säurekatalysierten Spaltung von **1** sein könnten, vorausgesetzt, daß der benzylike Substituent am Stickstoff in die axiale Position gezwungen werden kann. Dies wurde durch Substitution der 3-Position von **2** und **3** erreicht, wobei die Antigene **4**–**6** entstanden. Zusätzlich wurde damit eine gute Möglichkeit für die Hapten-Immobilisierung an einem Carrierprotein geschaffen (Abb. 1).

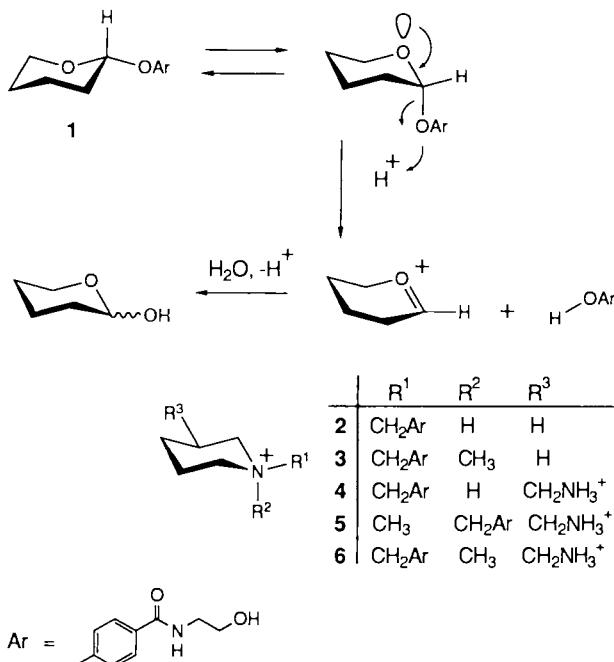


Abb. 1. Oben: Mechanismus der hydrolytischen Spaltung von 2-Aryloxytetrahydropyranen. Unten: Übergangszustands-Analoga.

Das Hapten **4** wurde, ausgehend von 3-Hydroxymethylpiperidin und 4-Chlormethyl-*N*-(2-hydroxyethyl)benzamid, in acht Stufen synthetisiert^[5]. Auf ähnliche Weise wurde ein 1:1-Gemisch der diastereomeren Haptene **5** und **6**, ausgehend von 3-Hydroxymethyl-*N*-methylpiperidin, erhalten. **5** und **6** wurden durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) getrennt^[6a], ihre relativen Konfigurationen wurden anhand des ¹H-NMR-Spektrums von **5** bestimmt^[6b]. Um Immunogenität zu gewährleisten, wurden **4**–**6** mit einem Verbindungsstück verknüpft (5-[2,5-Dioxo-1-pyrrolidinyl]oxy)-5-oxopentanoylchlorid, EtiPr₂N, Dimethylformamid (DMF), –30 °C) und diese aktivierte Haptene an die Carrierproteine Rinderserumalbumin (BSA) und Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KLH) gekuppelt. Balb/c-Mäuse wurden mit den KLH-Konjugaten immunisiert und die Antikörper nach Standardvorschriften erzeugt^[7]. Die monoklonalen Antikörper wurden von Ascites-Flüssigkeit über eine Anionenaustauschchromatographie gereinigt (es wurden 16 Antikörper aus der Immunisierung mit **4**, 26 aus der mit **5** und 3 aus der mit **6** erhalten) und gegen Substrat **1** auf die Bildung von 4-Hydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)benzamid^[8] getestet. Zwei aus der Immunisierung mit Hapten **5** hervorgegangene monoklonale Antikörper zeigten katalytische Eigenschaften. Nach Affinitätschromatogra-

[*] Prof. K. D. Janda, Prof. R. A. Lerner, Dr. J.-L. Reymond

Departments of Molecular Biology and Chemistry

The Scripps Research Institute

10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde vom US National Institute of Health (GM 43858, K. D. J.) und dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der Wissenschaften (Postdoc-Stipendium für J.-L. R.) gefördert.