

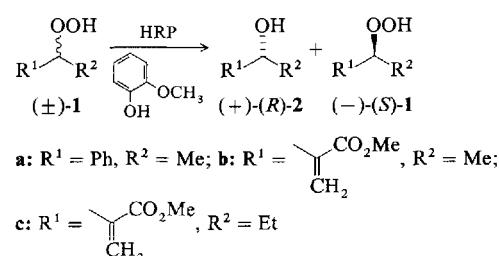
Enzym-katalysierte asymmetrische Synthese: die kinetische Racematspaltung von chiralen Hydroperoxiden durch enantioselektive Reduktion zu Alkoholen mit Meerrettichperoxidase **

Von Waldemar Adam*, Ute Hoch, Chantu R. Saha-Möller
und Peter Schreier

Professor Giuseppe Cilento zum 70. Geburtstag gewidmet

Enzym-katalysierte Reaktionen zur enantioselektiver Herstellung von organischen Verbindungen gewinnen zunehmend an Bedeutung^[1]. Peroxidasen, hämhaltige Enzyme, oxidieren zahlreiche Substrate unter Verwendung von Wasserstoffperoxid oder Hydroperoxiden als Oxidantien^[2]. Chlorperoxidase (CPO)^[3] aus *Caldariomyces fumago* bewirkt zum Beispiel die enantioselektive Oxidation (13–99 % ee^[3c]) von Sulfiden zu Sulfoxiden mit H_2O_2 oder $tBuOOH$. Diese Peroxidase ermöglicht auch die regio- und stereoselektive Halogenierung von Glycalen^[3c]. Vor kurzem wurde berichtet, daß CPO mit H_2O_2 als Oxidans sogar disubstituierte Alkene effizient und enantioselektiv epoxidiert^[4].

Für Meerrettichperoxidase (HRP) ist lediglich die asymmetrische Sulfoxidation von prochiralen Sulfiden, jedoch mit wesentlich niedrigeren Enantioselektivitäten (30–70 % ee), bekannt^[5]. Bei der CPO-katalysierten Sulfoxidation mit racemischen 1-Arylethylhydroperoxiden als Oxidantien hat man eine höhere Affinität für das (R)-Enantiomer beobachtet. Zusätzlich zu den optisch aktiven (R)-Sulfoxiden (13–99 % ee) sind auch die entsprechenden (R)-Alkohole (17–80 % ee) und sogar die (S)-Hydroperoxide (24–91 % ee) gleichzeitig erhalten worden^[3c]. Eine derartige Substratselektivität für HRP-katalysierte Umsetzungen ist bisher nicht bekannt. Wir berichten hier über die kinetische Racematspaltung von chiralen Hydroperoxiden durch enantioselektive Reduktion zu Alkoholen mit HRP (Sigma, Typ II, RZ 1.5–2.0) in Gegenwart von Guajacol (Schema 1). Es ist uns



Schema 1. HRP-katalysierte kinetische Racematspaltung von chiralen Hydroperoxiden.

gelungen, Hydroperoxide und gleichzeitig deren Alkohole in hoher optischer Reinheit (> 95 % ee) auf Enzym-katalysiertem Weg zu erhalten, wie die Ergebnisse in Tabelle 1 zeigen.

Zur Ermittlung günstiger Konzentrationsbereiche für die enzymatische Umsetzung der racemischen Hydroperoxide **1** wurden die kinetischen Parameter bestimmt (Tabelle 2). Bei konstanter Guajacolkonzentration wurden für jedes Hydroperoxid die K_M - und V_{max} -Werte gemessen. Wie aus den

Tabelle 1. Kinetische Racematspaltung chiraler Hydroperoxide (\pm)-**1** [a] mit Meerrettichperoxidase in Gegenwart von Guajacol [b].

Nr.	Menge (\pm)- 1 [mmol]	(\pm)- 1 :HRP	t [min] [c]	ee [%]	
				(S)- 1	(R)- 2
1	1a 0.03	12000:1	5	>99	>99
2	1a 1.50	60000:1	120	>99	>99
3	1b 0.03	12000:1	5	97	>99
4	1b 1.50	60000:1	120	95	98
5	1c 0.03	21000:1	10	>99	>99
6	1c 1.50	12000:1	120	91	95

[a] Die Hydroperoxide wurden nach Literaturvorschriften hergestellt; (\pm)-**1a** [7a], (\pm)-**1b**, c [7b]. [b] Guajacol wurde in äquimolaren Mengen zu (\pm)-**1** zugesetzt. [c] Nach vollständigem Umsatz von Guajacol wurde die Reaktion abgebrochen.

Daten hervorgeht, sind diese Enzymparameter von den Substituenten R^1 und R^2 von **1** abhängig. Entsprechend wurden (\pm)-**1a** (0.03 mmol) in 5 mL 0.1 M Phosphatpuffer (pH 6) und (\pm)-**1b**, c (0.03 mmol) in 1 mL Pufferlösung umgesetzt. Da die Hydroperoxide (\pm)-**1a**–**c** mit Guajacol ohne HRP bei Raumtemperatur nicht reagieren (Kontrollversuch), wurde die Enzym-katalysierte kinetische Racematspaltung bei ca. 20 °C durchgeführt. Es ist bekannt, daß das stöchiometrische Verhältnis von Oxidans zu Substrat für die Peroxidase-katalysierte Oxidation von Phenolen 1:2 ist^[1a]. Deshalb wurden Guajacol und Hydroperoxid im Verhältnis 1:1 eingesetzt, um zu gewährleisten, daß maximal 50 % des eingesetzten Hydroperoxids umgesetzt werden. Die Ergebnisse in Tabelle 1 zeigen, daß Guajacol vollständig abreaktiert unter gleichzeitiger Bildung der nahezu enantiomerenreinen Hydroperoxide (S)-**1a**–**c** und deren Alkohole (R)-**2a**–**c**.

Tabelle 2. Kinetische Parameter [a] für die Meerrettichperoxidase-katalysierte Oxidation von Guajacol mit chiralen Hydroperoxiden (\pm)-**1**.

Substrat	K_M [mM]	V_{max} [b] [mmol mg ⁻¹ min ⁻¹]	V_{max}/K_M [L mg ⁻¹ min ⁻¹] × 10 ⁻³
Guajacol	0.2 ± 0.06	19.0 ± 0.1	95
(\pm)- 1a	0.6 ± 0.04	18.0 ± 0.1	30
(\pm)- 1b	37.2 ± 2.5	18.0 ± 0.6	0.48
(\pm)- 1c	63.0 ± 2.3	8.3 ± 0.4	0.13

[a] Die kinetischen Parameter für Guajacol wurden mit 1.25 mM Hydroperoxid (\pm)-**1a** bestimmt; für die Hydroperoxide (\pm)-**1a**–**c** wurde die Guajacolkonzentration auf 500 mM festgelegt. [b] Die Anfangsgeschwindigkeit wurde mittels Zunahme des Guajacol-Oxidationsprodukts ($\epsilon = 2.66 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [9] bei 470 nm in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 6) gemessen. V_{max} und K_M wurden mit den Dugleby-Programm auf einem IBM-Computer errechnet.

Die absolute Konfiguration der Verbindungen (S)-**1a** und (R)-**2a** wurde durch Vergleich der HPLC-Daten mit denen authentischer Verbindungen ermittelt^[3c, 6]. In Analogie zu diesen Ergebnissen sind die absoluten Konfigurationen von (S)-**1b**, c und (R)-**2b**, c zugeordnet worden. Der Enantiomerenüberschuß für die Hydroperoxide (S)-**1** und für die Alkohole (R)-**2** wurde auf einer Chiralcel OD-Säule aus den HPLC-Flächenverhältnissen der beiden Enantiomere bestimmt. Ein repräsentatives Chromatogramm ist in Abbildung 1 für Hydroperoxid **1b** und Alkohol **2b** wiedergegeben. Wie zu erkennen ist, spricht HRP bei diesen Beispielen selektiv auf die (+)-(R)-Hydroperoxide an, so daß als Folge der kinetischen Racematspaltung die (+)-(R)-Alkohole entstehen und die optisch reinen (–)-(S)-Hydroperoxide zurückbleiben. Diese Vermutung konnte mit einem Kontrollversuch bestätigt werden, in dem das Verhältnis von Guajacol zu racemischen Hydroperoxid 2:1 gewählt wurde;

[*] Prof. Dr. W. Adam, Dr. C. R. Saha-Möller

Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg
Am Hubland, D-97074 Würzburg

Lebensmittelchemikerin U. Hoch, Prof. Dr. P. Schreier

Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 347: Selektive Reaktionen Metallaktivierter Moleküle) und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Herrn Dipl.-Chem. M. Prein für die Bereitstellung des Hydroperoxids (\pm)-**1a**.

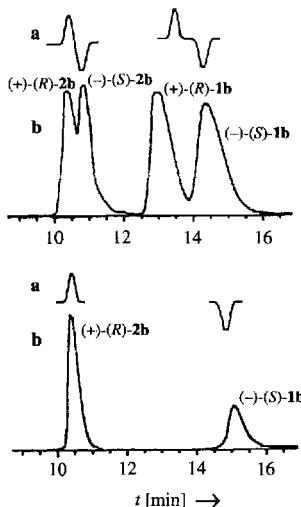


Abb. 1. HPLC-Chromatogramm der HRP-katalysierten Umsetzung von (±)-1b mit Guajacol. Oben: Racemische Vergleichsproben von Alkohol (±)-2b und Hydroperoxid (±)-1b. Unten: Reaktionsprodukte nach Racematspaltung von (±)-1b. Die polarimetrische Detektion mit ChiraLyser (a) ist über den UV-Signalen (b) (220 nm) angeordnet. Säule: Daicel-Chiralcel OD, 250 x 4 mm, Eluent: n-Hexan/Isopropylalkohol 90:10; Fluß: 0.6 mL min⁻¹.

d.h. es wurde ausreichend Guajacol zum vollständigen Umsatz des Hydroperoxids 1 eingesetzt. Auch unter diesen Bedingungen sind Alkohol und Hydroperoxid nahezu optisch rein (> 95% ee) erhalten worden. Eine solche Oxidans-Selektivität seitens HRP, in der ausschließlich das (+)-(R)-Enantiomer reduziert wird, ist unseres Wissens bisher nicht beobachtet worden^[1].

Für die synthetische Nutzung dieser neuartigen HRP-katalysierten enantioselektiven Reduktion von chiralen Hydroperoxiden zu den entsprechenden Alkoholen wurde diese enzymatische Reaktion auch in semipräparativem Maßstab durchgeführt. Wie die mit 50fachen Mengen an Hydroperoxid (±)-1 und Guajacol erhaltenen Ergebnisse zeigen (Tabelle 1, Einträge Nr. 2, 4 und 6), dient die HRP-katalysierte kinetische Racematspaltung tatsächlich der präparativen Herstellung von enantiomerenreinen Hydroperoxiden und deren Alkoholen. Nach üblicher Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung können Hydroperoxide (80–98%, bezogen auf 50% Umsatz) und die entsprechenden Alkohole (72–88%, bezogen auf 50% Umsatz) nahezu optisch rein in guten isolierten Ausbeuten gewonnen werden.

Die Meerrettichperoxidase ist also selektiv gegenüber (R)-Hydroperoxiden, so daß eine kinetische Racematspaltung von chiralen Hydroperoxiden durch die Reduktion zum Alkohol möglich ist. Diese Enzym-katalysierte Reduktion kann im präparativen Maßstab durchgeführt werden und liefert bequem optisch reine Alkohole und Hydroperoxide. Bisher war es auf nichtenzymatischem Weg umständlich, enantiomerenreine Hydroperoxide zu synthetisieren^[8].

Arbeitsvorschrift:

Für die präparativen Umsetzungen wurden 1.50 mmol Hydroperoxid (±)-1 und 1.50 mmol Guajacol in 10 mL 0.1 M Phosphatpuffer (pH 6) gelöst und danach HRP ($0.25-1.25 \times 10^{-4}$ mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur (20 °C) 2 h stehengelassen und anschließend mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer (20 °C/17 Torr) eingeengt. Hydroperoxid (S)-1 und Alkohol (R)-2 wurden säulenchromatographisch (Kieselgel 0.032–0.062 mesh) mit einem Petrolether/Ether-Gemisch (4:1) getrennt.

Eingegangen am 7. September 1993 [Z 6346]

- [1] a) H. L. Holland, *Organic Synthesis with Oxidative Enzymes*, VCH, New York, 1992; b) S. M. Roberts, K. Wiggins, G. Casly, *Preparative Biotransformations: Whole Cell and Isolated Enzymes in Organic Synthesis*, Wiley, Chichester, 1992.
- [2] J. H. Dawson, *Science* **1988**, *240*, 433–439.
- [3] a) S. Colonna, N. Gaggero, A. Manfredi, L. Casella, M. Gullotti, G. Carrea, P. Pasta, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10465–10468; b) S. Colonna, N. Gaggero, L. Casella, G. Carrea, P. Pasta, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 95–106; c) H. Fu, H. Kondo, Y. Ichikawa, G. C. Loo, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7265–7270.
- [4] E. J. Allain, L. P. Hager, Li Deng, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4415–4416.
- [5] a) S. Colonna, N. Gaggero, G. Carrea, P. Pasta, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 357–358; b) R. Z. Harris, S. L. Newmyer, P. R. Ortiz de Montellano, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 1637–1645.
- [6] A. Kunath, E. Höft, H.-J. Hamann, J. Wagner, *J. Chromatogr.* **1991**, *588*, 352–355.
- [7] a) A. G. Davies, R. V. Foster, A. M. White, *J. Chem. Soc.* **1953**, 1541–1547; b) W. Adam, A. Griesbeck, *Synthesis* **1986**, 1050–1051.
- [8] a) P. Dussault, N. A. Porter, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6276–6277; b) P. Dussault, I. Q. Lee, S. Kreifels, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4087–4089.
- [9] J. Pütter, R. Becker, *Methods Enzym. Anal. 3rd Ed. 1983–1986*, **1983**, *3*, 286–293.

Die erste Struktur eines lithiierten Cyanamids; Synthese von $(\text{PhNCNLi} \cdot \text{HMPA})_n$ durch Extrusion von N_2 und S aus 5-Phenylamino-1,2,3,4-thiatriazol mit Li-Reagentien und HMPA **

Von David R. Armstrong, F. Adele Banbury, Ian Cragg-Hine, Matthew G. Davidson, Francis S. Mair, Ehmke Pohl, Paul R. Raithby und Ronald Snaith*

Wir beschrieben kürzlich die Reaktion von festem $\text{Ba}(\text{OH})_2$ mit in Toluol gelöstem Aminothiatriazol AH ($\text{R} = \text{Naphthyl}$) und Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPA)^[1], bei der nicht der erwartete Aquakomplex $(\text{A}_2\text{Ba} \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot x\text{HMPA})^{[2]}$, sondern das Thioxotetraazol-derivat $(\text{B}_2\text{Ba} \cdot 3\text{HMPA})$, das Produkt einer Umlagerung, in



AH

BH

60% Ausbeute entstand. Diese Umlagerung ist schon länger bekannt^[3] wie auch die Tatsache, daß Verbindungen des Typs AH mit wässriger NaOH im Überschuß auf zwei unter-

[*] Dr. R. Snaith, F. A. Banbury, I. Cragg-Hine, M. G. Davidson, Dr. F. S. Mair, Dr. P. R. Raithby
University Chemical Laboratory
Lensfield Road, GB-Cambridge, CB2 1EW (Großbritannien)
Dr. D. R. Armstrong
Department of Pure and Applied Chemistry
University of Strathclyde, GB-Glasgow, G1 1XL (Großbritannien)
E. Pohl
Institut für Anorganische Chemie der Universität
Tammstraße 4, D-37077 Göttingen

[**] Diese Arbeit wurde vom Science and Engineering Research Council (F. A. B., I. C.-H., M. G. D.), von Associated Octel (I. C.-H., M. G. D., F. S. M.) sowie dem Queens' College (F. S. M.) und dem St. John's College, Cambridge, (M. G. D.) gefördert. Wir danken Professor G. M. Sheldrick, Universität Göttingen, für die Aufnahme der Kristallstruktur.