

**Vom Mandelmehl zur
stereoselektiven Synthese -
Enantioselektive Darstellung von
(S)-Benzofuran-2-yl-hydroxy-
acetonitril im Multigramm-Maßstab
und Bestimmung seiner absoluten
Konfiguration***

von Michael Krüger

Anleitender: Dipl. Chem. Ralf Harbort
Forschungsleiter: Prof. Dr. Franz Effenberger

(04. Februar – 14. März 2002)

*(Protokoll des Forschungspraktikums in der
Organischen Chemie)

Inhalt

1. Einleitung

- 1.1 Stereoselektive Synthese und Organische Chemie
- 1.2 Bedeutung von optisch aktiven Cyanhydrinen und ihre Folgechemie
- 1.3 (R)- bzw. (S)-konfigurierte Cyanhydrine durch entsprechende (R)- und (S)-Oxynitrilasen

2. Aufgabenstellung

- 2.1 Furanoide (S)-konfigurierte Cyanhydrine und ihre mögliche Folgechemie / Bedeutung
- 2.2 Retrosyntheseplanung

3. Eigene Ergebnisse

- 3.1 Umsetzung zu (S)-Benzofuran-2-yl-hydroxy-acetonitril und Folgechemie
- 3.2 Umsetzung zu (S)-Hydroxy-(5-methyl-furan-2-yl)-acetonitril und Folgechemie

4. Diskussion und Ausblick

5. Anhang

- 5.1 Experimenteller Teil
- 5.2 Analytik (NMR, GC, Elementaranalyse)

6. Literatur

1. Einleitung

1.1 Stereoselektive Synthese und Organische Chemie

Seit jeher ist es eines der Hauptanliegen der Organischen Chemie, Verbindungen, die in der Natur vorkommen zu synthetisieren.

Immer mehr neu isolierte Naturstoffe weisen indes ein oder mehrere Stereozentren, Kohlenstoffatome mit vier verschiedenen Liganden, auf, wobei diese Verbindungen zumeist nicht als racemisches Gemisch der beiden enantiomeren Verbindungen, sondern in enantiomerenreiner bzw. diastereomerenreiner Form vorliegen.

Darauf gründet das Interesse, vor allem der pharmazeutischen Industrie und der akademischen Forschung, möglichst günstige Synthesemöglichkeiten für optisch aktive Verbindungen zu finden, um diese auf die Synthese von pharmakologisch aktiven Naturstoffen zu übertragen.

Der Einsatzbereich optisch aktiver Substanzen beschränkt sich jedoch nicht allein auf die pharmazeutische Industrie, auch zur Synthese von beispielsweise Pestiziden, Vitaminen oder seltenen Aminosäuren, sind diese Substanzen in der Organischen Chemie wichtige Verbindungen geworden^{1,2}.

1.2 Bedeutung von optisch aktiven Cyanhydrinen und ihre Folgechemie

Die Synthese optisch aktiver Cyanhydrine im speziellen ermöglicht, aufgrund der Fülle der Möglichkeiten ihrer Folgechemie, die Darstellung einer Vielzahl von komplexeren, optisch aktiven Verbindungen.

Abb.1 zeigt einige Möglichkeiten der Umwandlung zu interessanten funktionellen Gruppen durch Cyanhydrine³.

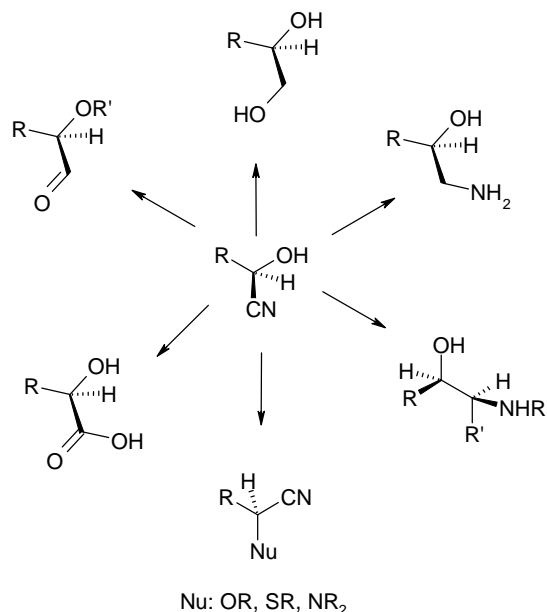


Abb.1 mögliche Folgechemie optisch aktiver Cyanhydrine

Viele, der aus optisch aktiven Cyanhydrinen einfach erhältlichen Substanzklassen, finden sich auch in der Natur als Struktureinheiten häufig wieder.

1.3 (R)- bzw. (S)-konfigurierte Cyanhydrine durch entsprechende (R)- und (S)-Oxynitrilase

Eine äußerst günstige Möglichkeit optisch aktive Cyanhydrine zu synthetisieren, besteht durch eine biokatalytische Addition von Blausäure an Aldehyde und Ketone, wobei als Katalysator die Enzyme (R)- bzw. (S)-Oxynitrilase verwendet werden¹⁻³.

Die (R)-Oxynitrilase kann beispielsweise leicht aus handelsüblichem Mandelmehl (*prunus amygdalus*) extrahiert werden, die (S)-Oxynitrilase aus Maniok (*manihot esculenta*).

In diesem, dem Forschungspraktikum zugrunde liegenden Fall, ist jedoch zu beachten, daß bei der Reaktion der Aldehyde zu den Cyanhydrinen mit der (R)-Oxynitrilase als Katalysator, das gebildete Stereozentrum, nach der Nomenklatur von Cahn-Ingold-Prelog, (S)-konfiguriert ist, genau wie bei Verwendung von (S)-Oxynitrilase das Stereozentrum eine (R)-Konfiguration aufweisen würde.

Dies hat seinen Ursprung darin, daß im Fall der furanoiden Systeme, am Kohlenstoff-Atom des furanoiden Systems, welches zum Stereozentrum benachbart liegt, ein Sauerstoff gebunden ist (Stereozentrum in 2-Position des furanoiden Systems). Das hat zur Folge, daß nach Cahn-Ingold-Prelog die Priorität dieses Kohlenstoff-Atoms über die Priorität des Cyanid-Kohlenstoffes ansteigt, und somit die entgegengesetzte Konfiguration vorliegt.

Die Vorteile der Cyanhydrin-Synthesen über die Biokatalyse mittels (R)-Oxynitrilase sind, daß sie keine teuren Katalysatoren oder chirale Auxiliare verwenden, sondern der Katalysator aus leicht erhältlichem und sehr günstigem Mandelmehl gewonnen werden kann. Auch sonst müssen keine weiteren, teuren Reagenzien eingesetzt werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß man auf sehr einfachem Wege im Multigramm-Maßstab, meist schon nach wenigen Stunden, enantiomerenreine Cyanhydrine erhält. Das Problem der eventuellen Abtrennung eines Metallkatalysators entfällt hierbei ebenfalls.

Demgegenüber steht als einziger Nachteil, daß nicht alle Substrate vom Enzym zur Umsetzung angenommen werden. Die Erforschung der Kriterien, die ein Substrat zur Umsetzung mit Oxynitrilase zu erfüllen hat, dauert derzeit noch an.

2. Aufgabenstellung

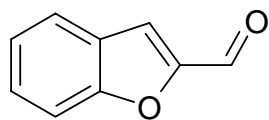
2.1 Furanoiden (S)-konfigurierte Cyanhydrine und ihre mögliche Folgechemie und Bedeutung

Die Aufgabenstellung dieses Forschungspraktikums war es, enantiomerenreine Cyanhydrine aus furanoiden Aldehyden in Gegenwart von Blausäure und (R)-Oxynitrilase als Katalysator zu synthetisieren.

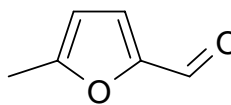
Das Hauptaugenmerk wurde dabei, aufgrund günstiger Folgechemie und interessanter Einsatzmöglichkeiten der Folgeprodukte, auf die Umsetzung von zwei Aldehyden gelegt:

a) Benzofuran-2-carbaldehyd (I) und

b) 5-Methyl-2-furfural (II)



(I)
Abb.2



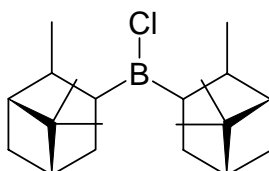
(II)
Abb.3

a) Enantioselektive Benzofuran-Derivate weisen eine vielseitige pharmakologische Aktivität auf⁴. Dabei spielen vor allem Aminoalkohole, die leicht durch Reduktion von Cyanhydrinen gewonnen werden können, eine wichtige Rolle, da sie sich als Enzym-Inhibitoren, Mittel gegen Hypertension (Bluthochdruck), und als β -Adrenoakzeptorblocker herausgestellt haben.

Speziell Bufuralol (III), ein Derivat des durch Reduktion des in diesem Forschungspraktikum hergestellten Benzofuran-cyanhydrin (VII) zugänglichen Aminoalkohols (V), zeigte bei der Behandlung von Hypertension erfolgreich Wirkung, ist ein starker, unselektiver β -Adrenorezeptorblocker und ein Inhibitor der Testosteron-6 β -hydroxylase.

Die bisherigen Synthesemethoden für diesen Aminoalkohol⁴ wiesen Enantiomerenüberschüsse von etwa 70% auf und waren nur über ein kompliziertes chirales Auxiliar (VI) möglich. Abb.5 beschreibt den bisherigen Syntheseweg zum Bufuralol (III).

Dieses Forschungspraktikum sollte zeigen, ob es mittels (R)-Oxynitrilase möglich ist, die Cyanhydrin-Vorstufe des selben Aminoalkohols wesentlich einfacher, schneller, günstiger, in großem Maßstab und mit deutlich höherem Enantiomerenüberschuß darzustellen. Abb.6 beschreibt den neuen, kürzeren und einfacheren Syntheseweg zum Bufuralol. Die Reduktion zum Bufuralol war nicht Gegenstand des Forschungspraktikums, jedoch sind analoge Reaktionen von optisch aktiven Cyanhydrinen zu optisch aktiven, t-Butyl-substituierten Aminoalkoholen literaturbekannt⁵.



(VI)
Abb.4

2.2 Retrosyntheseplanung

2.2.1 Retrosyntheseplan für die Umsetzung von Benzofuran-2-carbaldehyd

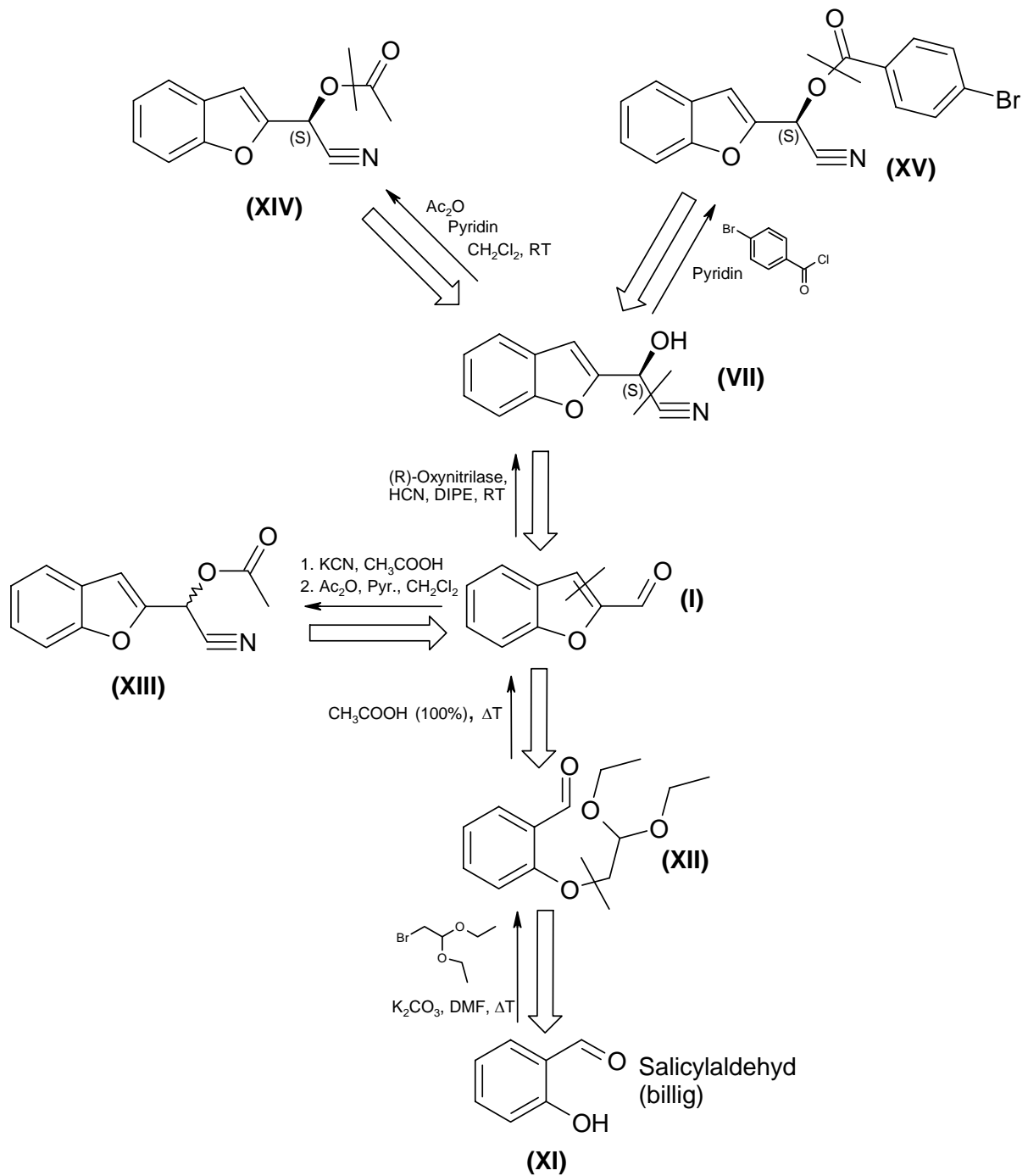


Abb.8 Retrosyntheseplan I

2.2.2 Retrosyntheseplan für die Umsetzung von 5-Methyl-2-furfural

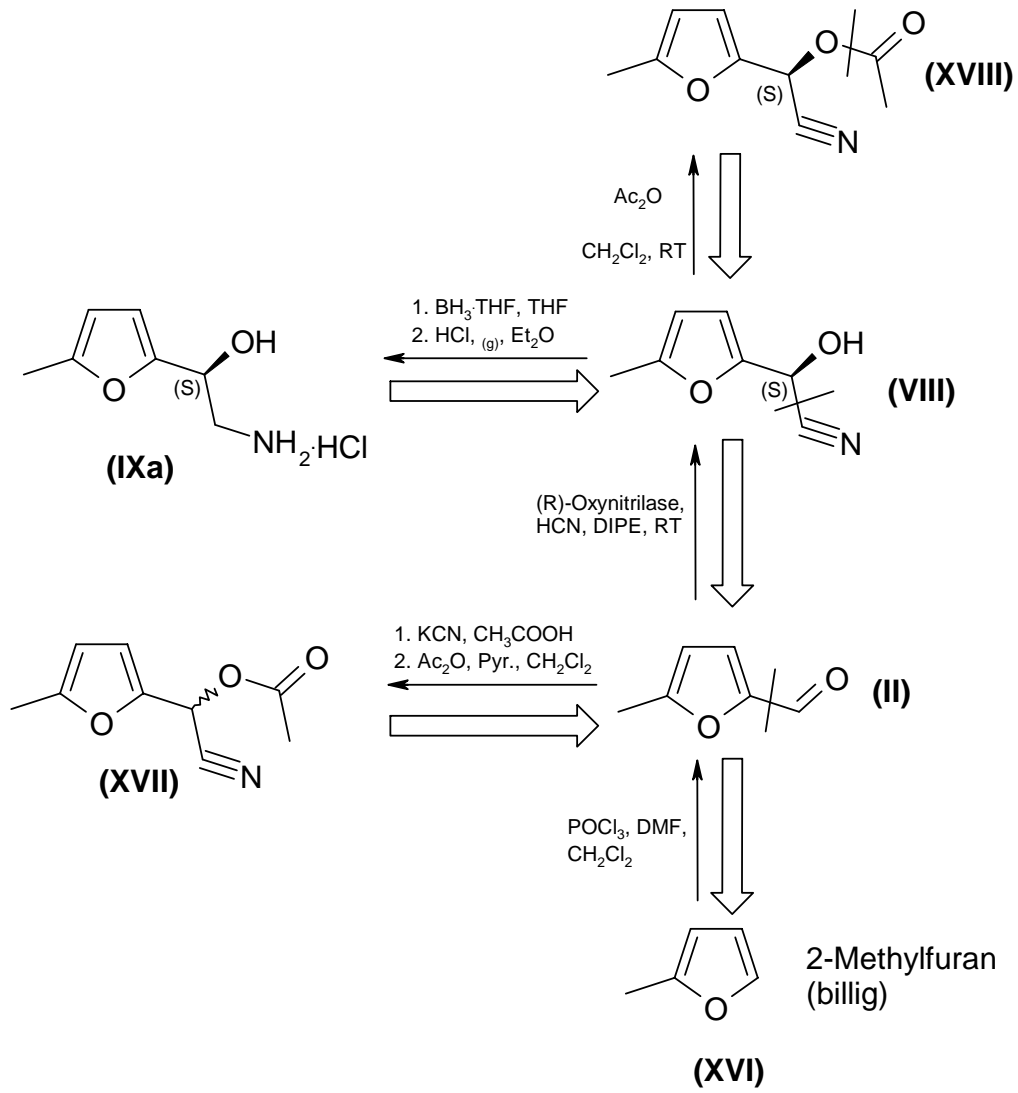


Abb.9 Retrosyntheseplan II

3. Eigene Ergebnisse

3.1 Umsetzung zu (S)-Benzofuran-2-yl-hydroxy-acetonitril und Folgechemie

3.1.1 Darstellung des Substrates für die enzymatische Umsetzung

Zunächst mußte für die Umsetzung zum optisch aktiven Cyanhydrin (S)-Benzofuran-2-yl-hydroxy-acetonitril (VII) das Substrat Benzofuran-2-carbaldehyd (I) dargestellt werden.

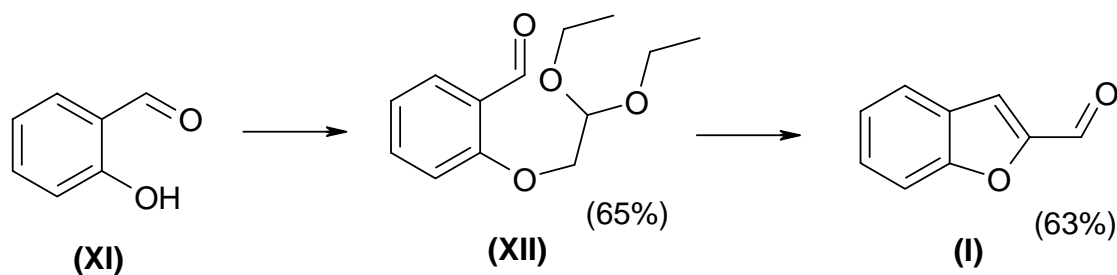


Abb.10

In einer, der Williamson'schen Ethersynthese ähnlichen Reaktion wurde zunächst der Salicylaldehyd (XI) an der Hydroxylfunktion mittels Bromacetaldehyddiethylacetal verethert. Das entstehende, bislang nicht literaturbekannte Produkt (XII) wurde als gelbe, viskose Flüssigkeit isoliert. Die Ausbeute lag dabei mit 65% über der literaturbekannten Ausbeute⁷ der Dimethoxy-Verbindung von 56%.

Im nächsten Schritt wurde nun mit Hilfe von Essigsäure der furanoide Cyclus unter Ausbildung einer Carbaldehydfunktion in 2-Position geschlossen. Nach Aufarbeitung und Isolierung lag eine gelbe Flüssigkeit (I), in Ausbeuten von 63% vor, gegenüber eines Literaturwertes⁷ von 89%. Jedoch erhielt man hier als Vorlauf in der Destillation eine klare Flüssigkeit, deren Charakterisierung ergab, daß es sich um Benzofuran handelte. Dies ist bemerkenswert, da das Benzofuran nicht als Edukt eingesetzt wurde, also während der Reaktion gebildet worden sein mußte.

3.1.2 Darstellung des racemischen Cyanhydrins (XIIIa) und der racemischen, acylierten Verbindung (XIII)

Um eine Kontrolle der Retentionszeiten in der gaschromatographischen Untersuchung zu haben, und um Enantiomerenüberschüsse und Umsatz zu bestimmen, mußte zunächst auf chemischem Wege ein racemisches Gemisch des Cyanhydrins Benzofuran-2-yl-hydroxy-acetonitril (XIIIa) hergestellt werden. Da die Substanzklasse der Cyanhydrine jedoch thermisch instabil ist, können diese nicht direkt als solche gaschromatographisch untersucht werden. Aus diesem Grund mußte anschließend eine Derivatisierung zum acylierten Cyanhydrin Essigsäure-benzofuran-2-yl-cyanomethylester (XIII) durchgeführt werden. Alle gaschromatographischen Untersuchungen beziehen sich daher nicht auf die Cyanhydrine, sondern ihre jeweiligen acylierten Verbindungen.

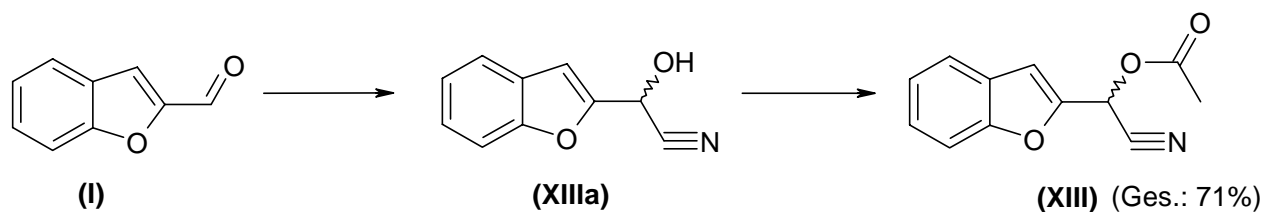


Abb.11

Die chemische, nicht stereoselektive Addition von Blausäure an Aldehyd erfolgte unter nichtwässriger, basischer Katalyse, mittels Pyridin. Blausäure mußte hierbei nicht in reiner Form eingesetzt werden, sondern konnte preiswert aus Kaliumcyanid und Essigsäure dargestellt werden. Nach wenigen Stunden konnte die Reaktion abgebrochen werden. Die hellgelbe Flüssigkeit (XIIIa) konnte ohne weitere Reinigung sofort weiter umgesetzt werden.

In der Folgereaktion wurde die Hydroxylfunktion des Cyanhydrins, wiederum durch basische, nichtwässrige Katalyse mit Pyridin, unter Verwendung von Essigsäureanhydrid derivatisiert. Dabei entstand die gewünschte Verbindung Essigsäure-benzofuran-2-yl-cyano-methylester (XIII), nach Umkristallisation in Diisopropylether, als weißer Feststoff, in Ausbeuten von 71%. Um zusätzliche Sicherheit bei der Charakterisierung der Substanz zu haben, wurde, da Essigsäure-benzofuran-2-yl-cyano-methylester sehr gut kristallisierte, eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abb.12

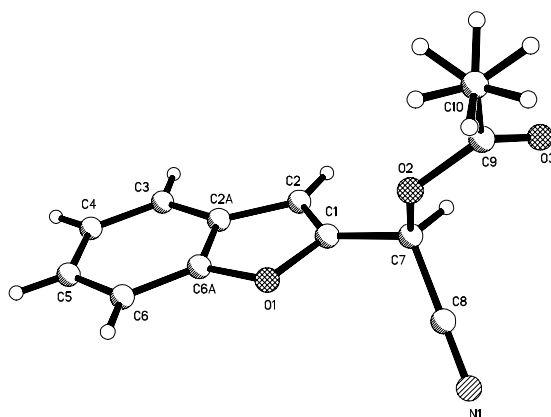
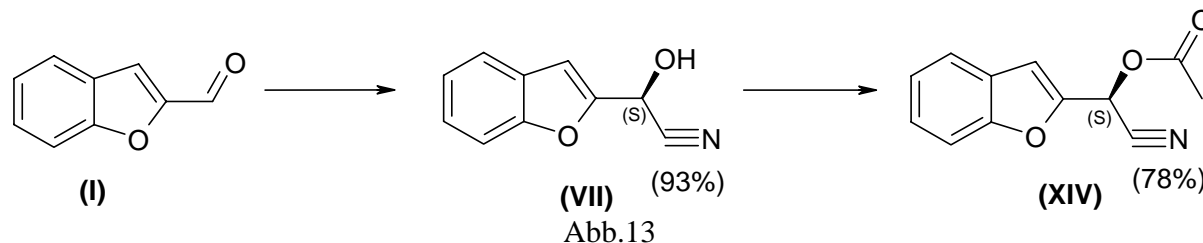


Abb.12 Röntgenstruktur von Essigsäure-benzofuran-2-yl-cyano-methylester (XIII)

Hier ist eine Fehlordnung der Methylgruppe festzustellen, dargestellt durch die regenschirmartig angeordneten Wasserstoffe.

3.1.3 Umsetzung von Benzofuran-2-carbaldehyd (I) mittels (R)-Oxynitrilase zum optisch aktiven Cyanhydrin (VII) und Weiterreaktion zur acylierten Verbindung (XIV), methodisch und im 2-Phasen-System



Da die gewünschte Verbindung (S)-Benzofuran-2-yl-hydroxy-acetonitril (VII) noch nicht zuvor synthetisiert wurde, mußte vor der Umsetzung im Multigramm-Maßstab durch das sogenannte 2-Phasensystem eine methodische Umsetzung im analytischen Maßstab durchgeführt werden. Hierbei mußte auch ermittelt werden, nach welcher Zeit die enzymatische Reaktion gestoppt werden mußte, um einen möglichst hohen Umsatz zu erreichen, der mit der Zeit ansteigt, aber trotzdem noch hohe Enantiomerenüberschüsse zu erhalten, die bedingt durch die chemische Addition geringer werden, je länger die Reaktion läuft. Parallel zur analytischen Umsetzung mußte daher auch eine Blindprobe angesetzt werden, deren einziger Unterschied zum Enzymansatz darin bestand, daß hier kein (R)-Oxynitrilase-Konzentrat verwendet wurde, sondern stattdessen nur eine Pufferlösung (Natriumacetatpuffer, pH=5.4) aufgegeben wurde. Ansonsten wurde die Blindprobe genauso wie der Enzymansatz behandelt.

Bei der methodischen Umsetzung in Diisopropylether gab man auf gequollene Zellulose ein Enzymkonzentrat der (R)-Oxynitrilase. Die Zellulose dient der Erhöhung der zur Reaktion zur Verfügung stehenden Oberfläche. In diesem Ansatz setzte man reine Blausäure ein, um die Reaktion zu starten. In bestimmten Zeitintervallen wurde jeweils eine kleine, definierte Probe entnommen. Nach Abtrennung von Blausäure und Lösungsmittel resultierte durch die Reaktion von (S)-Benzofuran-2-yl-hydroxy-acetonitril (VII) mit Essigsäureanhydrid, (S)-Essigsäurebenzofuran-2-yl-cyano-methylester (XIV). Somit konnte, da nun die Retentionszeiten des Eduktes (8.5min) und der beiden enantiomeren, acylierten Produkte aus dem racemischen Gemisch (12.0 und 12.4min) bekannt waren, die Proben hinsichtlich Umsatz und Enantiomerenüberschuß kontrolliert werden, und somit die optimale Reaktionszeit gefunden werden. Nach 3 Stunden und 45 Minuten enthielt die Probe laut Gaschromatogramm 97.3% des Enantiomers mit der Retentionszeit 12.0min und nur 1.1% des Eduktes, sowie 1.6% des anderen Enantiomers (Retentionszeit 12.4min). Das entspricht einem Umsatz von 99% und einem Enantiomerenüberschuß von 97%.

Die Blindprobe wies nach der selben Zeit einen chemischen Umsatz von 1.6% auf.

Auf dieser methodischen Umsetzung gründend, konnte nun mit Hilfe des 2-Phasensystems das optisch aktive Cyanhydrin auch in größerem Maßstab dargestellt werden.

Dazu verwendete man kein Enzymkonzentrat, sondern eine wäßrige Enzymlösung, auch wurde in diesem Maßstab keine reine Blausäure eingesetzt, sondern diese mit Natriumcyanid und ortho-Phosphorsäure freigesetzt und in Diisopropylether extrahiert. Da im Reaktionsgefäß eine wäßrige

Phase - die Enzymlösung - und eine organische Phase - der gelöste Aldehyd - vorliegen, war es notwendig, mit Hilfe eines KPG-Rührers die Reaktionsmischung kräftig zu rühren.

Nach 2 Stunden brach man die Reaktion ab, und entnahm eine Probe, um wiederum eine Acylierung vorzunehmen, damit die Reaktion bezüglich Umsatz und Enantiomerenüberschuß gaschromatographisch kontrolliert werden konnte.

Nach einer Acylierungszeit von 3 Stunden bei 60°C im Trockenschrank war laut Gaschromatogramm ein Umsatz von 97% und ein Enantiomerenüberschuß von 95% erhalten worden.

Wählte man anstatt einer Derivatisierungszeit von 3 Stunden nur eine Acylierungszeit von 2h15', erhielt man einen Enantiomerenüberschuß von 96%. Bei der Acylierung setzte also offensichtlich, begünstigt durch die Anwesenheit der Base Pyridin, eine Racemisierung in der Wärme ein. Auch der Umsatz stieg auf >99% an, was beweist, daß Abstriche beim Umsatz auch auf eine zu lange Acylierungszeit zurückzuführen sind.

Die Ausbeute bei dieser Umsetzung belief sich auf 93%.

Um weiteres optisch aktives Cyanhydrin (VII) zu erhalten, mußte der 2-Phasenansatz nochmals wiederholt werden. Dabei ließ man die Probe zur gaschromatographischen Kontrolle bei der Derivatisierung 4 Stunden im Trockenschrank, was wie erwartet zur Folge hatte, daß der Enantiomerenüberschuß auf 89% sank. Weitere Umsetzungen mit diesem Cyanhydrin wiesen jedoch deutlich höhere Enantiomerenüberschüsse auf, so daß die Racemisierung bei der Derivatisierung der kleinen Probe aufgetreten sein muß, nicht in der enzymatischen Umsetzung.

Nun konnte die acylierte, optisch aktive Verbindung (S)-Essigsäure-benzofuran-2-yl-cyanomethylester (XIV) auch in größerem Maßstab, zur Charakterisierung mittels Nuclear-Magnetic-Resonance (NMR), sowie Bestimmung ihres Drehwertes dargestellt werden.

Dies geschah, genau wie bei der racemischen Verbindung durch Essigsäureanhydrid und Pyridin, mit dem Unterschied, daß man nun auf den Katalysator N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP) verzichtete, da ansonsten eine Racemisierung der Verbindung einsetzte. Ohne DMAP erreichte man einen Enantiomerenüberschuß von 98%.

3.1.4 Darstellung von (S)-4-Brom-benzoylsäure-benzofuran-2-yl-cyano-methylester (XV) zur Bestimmung der absoluten Konfiguration.

Durch die bisherigen Untersuchungen war bewiesen worden, daß die enzymatische Umsetzung von Benzofuran-2-carbaldehyd (I) selektiv eines der beiden enantiomeren Benzofuran-2-yl-hydroxy-acetonitrile (VII) bildet. Jedoch war bislang noch offen, ob das gebildete Enantiomer (S)- oder (R)-Konfiguration besitzt. Bislang wurde angenommen, daß die (R)-Oxynitrilase, das (R)-Produkt, oder im Falle einer Prioritätsänderung nach Cahn-Ingold-Prelog durch ein Heteroatom wie im vorliegenden Fall (vgl. Kapitel 1.3), das (S)-Produkt bildet. Jedoch ist zumindest eine Ausnahme bekannt⁸. Bei der Umsetzung von 2-Methyl-cyclohexanon (XIX) wurde mit der (R)-Oxynitrilase das (S)-Produkt (XX) gebildet.

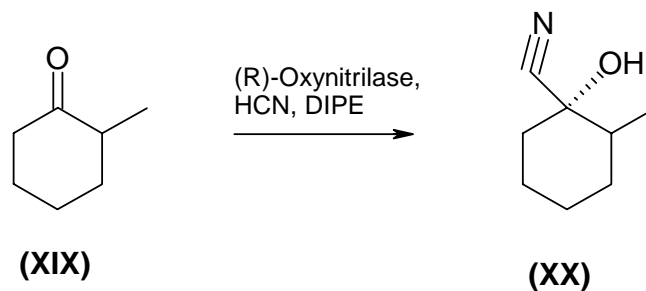


Abb.14

Somit wurde, um den Schweratomeffekt des Broms und die anomale Streuung auszunutzen, an der Hydroxylfunktion eine Derivatisierung mit p-Brombenzoylchlorid durchgeföhrt. Dadurch konnte die absolute Konfiguration bestimmt werden.

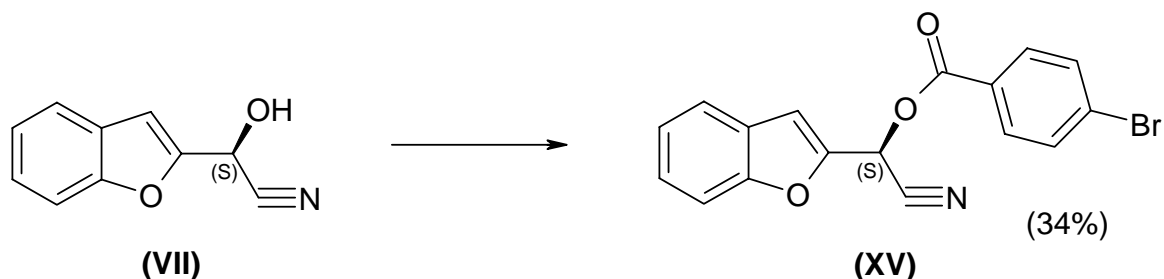


Abb.15

Dazu wurde in Gegenwart von p-Brombenzoylchlorid acyliert. Nach der Aufarbeitung konnte man in Diisopropylether kristallisieren, so daß Einkristalle resultierten, die zur Bestimmung der absoluten Konfiguration herangezogen werden konnten. Abb.16 zeigt, daß tatsächlich, wie angenommen, (S)-4-Brom-benzoylsäure-benzofuran-2-yl-cyano-methylester (XV) vorliegt, und somit auch das Enzym das (S)-konfigurierte Cyanhydrin (VII) enantioselektiv hergestellt haben muß.

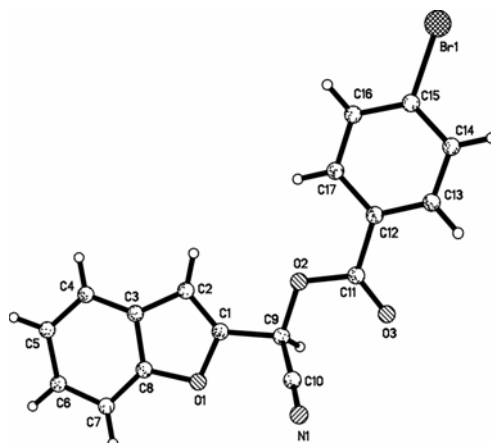


Abb.16 Röntgenstrukturanalyse der absoluten Konfiguration von (S)-4-Brom-benzoylsäure-benzofuran-2-yl-cyano-methylester (XV)

3.2 Umsetzung zu (S)-Hydroxy-(5-methyl-furan-2-yl)-acetonitril und Folgechemie

3.2.1 Darstellung des Substrates für die enzymatische Umsetzung

Zunächst mußte für die Umsetzung zum optisch aktiven Cyanhydrin (S)-Hydroxy-(5-methyl-furan-2-yl)-acetonitril (VIII) das Substrat 5-Methyl-2-furfural (II) dargestellt werden.

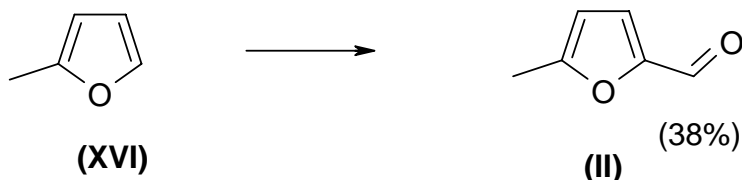


Abb.17

Dazu formylierte man das 2-Methylfuran (XVI) nach Vilsmyer-Haak (mit Phosphoroxytrichlorid und N,N-Dimethylformamid). Die schlechte Ausbeute von nur 38% an der blaßgelben Flüssigkeit (II), rührte daher, daß das 5-Methyl-2-furfural nur sehr schwer vom Edukt 2-Methylfuran zu trennen war, und daher 3 fraktionierte Destillationen nötig waren.

3.2.2 Darstellung des racemischen Cyanhydrins (XVIIa) und der racemischen, acylierten Verbindung (XVII)

Um eine Kontrolle der Retentionszeiten in der gaschromatographischen Untersuchung zu haben, und um Enantiomerenüberschüsse und Umsatz zu bestimmen, mußte zunächst, wie bei der bereits aufgeführten Umsetzung von Benzofuran-2-carbaldehyd, auf chemischem Wege ein racemisches Gemisch des Cyanhydrins Hydroxy-(5-methyl-furan-2-yl)-acetonitril (XVIIa) hergestellt werden. Da die Substanzklasse der Cyanhydrine, wie oben beschrieben, jedoch thermisch instabil ist, können diese nicht direkt als solche gaschromatographisch untersucht werden. Aus diesem Grund mußte anschließend eine Derivatisierung zum acylierten Cyanhydrin Essigsäure-cyano-(5-methyl-furan-2-yl)-methylester (XVII) durchgeführt werden.

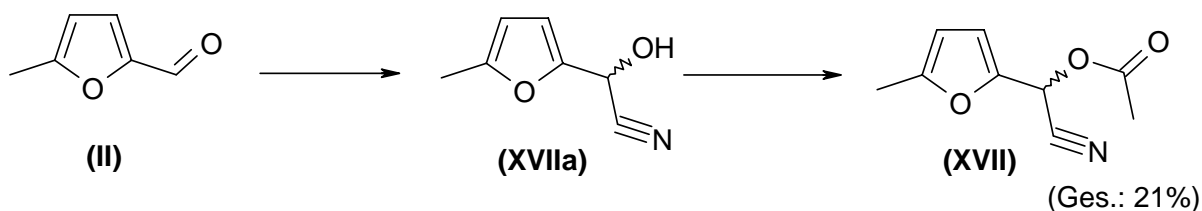


Abb.18

Die chemische, nicht stereoselektive Addition von Blausäure an Aldehyde führte man wiederum unter nichtwäßriger, basischer Katalyse, mittels Pyridin durch. Blausäure konnte, wie schon erwähnt, bequem aus Alkalicyanid und ortho-Phosphorsäure freigesetzt und mittels Diisopropylether extrahiert werden. Nach wenigen Stunden brach man die Reaktion ab. Die hellgelbe Flüssigkeit (XVIIa) wurde, ohne weitere Reinigung, sofort weiter umgesetzt.

In der Folgereaktion wurde die Hydroxylfunktion des Cyanhydrins (XVIIa), wiederum unter Verwendung von Essigsäureanhydrid derivatisiert. Dabei entstand die gewünschte Verbindung

Essigsäure-cyano-(5-methyl-furan-2-yl)-methylester (XVII), nach Aufarbeitung und Destillation, als hellgelbe, viskose Flüssigkeit, in Ausbeuten von 21%. Die schlechte Ausbeute rührte daher, daß bei der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes ein Teil des Produkts durch unsachgemäßes Arbeiten verloren gegangen war.

3.2.3 Umsetzung von 5-Methyl-2-furfural (II) mittels (R)-Oxynitrilase zum optisch aktiven Cyanhydrin (VIII) und Weiterreaktion zur acylierten Verbindung (XVIII) im 2-Phasen-System

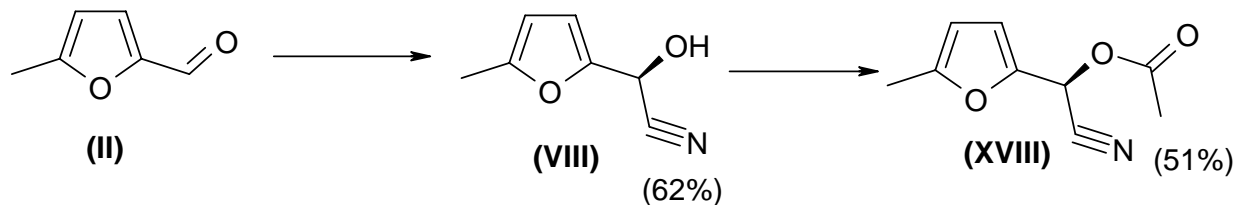


Abb.19

Eine analytische Untersuchung der enzymatischen Umsetzung von 5-Methyl-2-furfural (II) zu (S)-Hydroxy-(5-methyl-furan-2-yl)-acetonitril (VIII) war nicht mehr nötig, da diese bereits literaturbekannt war⁹. Somit wurde das Cyanhydrin sofort im Multigramm-Maßstab mittels 2-Phasensystem dargestellt.

Nach 1 Stunde und 30 Minuten brach man die Reaktion ab und entnahm eine kleine Probe, um wiederum eine Acylierung vorzunehmen, damit man die Reaktion bezüglich Umsatz und Enantiomerenüberschuß gaschromatographisch kontrollieren konnte.

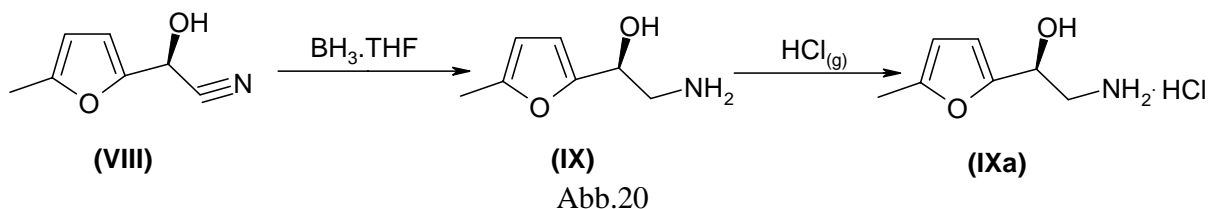
Nach einer Acylierungszeit von 3 Stunden bei 60°C im Trockenschrank erhielt man laut Gaschromatogramm einen Umsatz von 74%, gegenüber einem Literaturwert⁹ von 65% und einen Enantiomerenüberschuß von 98% (Literatur⁹: 95%)

Die Rohausbeute, inclusive 26% Aldehyd, bei dieser Umsetzung belief sich auf 83%.

Nun konnte die acylierte, optisch aktive Verbindung (S)-Essigsäure-cyano-(5-methyl-furan-2-yl)-methylester (XV) auch in größerem Maßstab, zur Charakterisierung mittels Nuclear-Magnetic-Resonance (NMR), sowie Bestimmung ihres Drehwertes dargestellt werden.

3.2.4 Darstellung des optisch aktiven Aminoalkohols 2-Amino-1-(5-methyl-furan-2-yl)-ethanol aus Hydroxy-(5-methyl-furan-2-yl)-acetonitril

Um den Aminoalkohol (IX) zu erhalten, der für die goldkatalysierte Phenol-Synthese⁶ benötigt wird, reduzierte man das optisch aktive Cyanhydrin (VIII) in $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ ¹⁰.



Hierbei setzte offensichtlich eine Reaktion ein, kenntlich durch aufsteigende Gasbläschen. Da der freie Aminoalkohol jedoch relativ instabil ist, sollte dieser als Amin-Hydrochlorid (IXa), zur besseren Handhabung und Isolierung, ausgefällt werden. Hierzu leitete man Chlorwasserstoffgas in den Reaktionsansatz. Hierbei färbte sich der Ansatz schwarz und kein Amin-Hydrochlorid fiel aus. Es ist somit anzunehmen, daß die Reduktion zum Aminoalkohol (IX) noch gelang, aber die Aufarbeitung mit Chlorwasserstoffgas eventuell zu einer Spaltung des furanoiden Systems führte. Das bedeutet auch, daß die Reduktion über eine andere Methode mit anderer Aufarbeitung durchaus vielversprechend sein dürfte.

4. Diskussion und Ausblick

In diesem Forschungspraktikum wurden erneut die großen Möglichkeiten, die die enzymatische Biokatalyse mittels Oxynitrilasen eröffnet, bestätigt.

In sehr kurzen Reaktionszeiten wurden mit einfachsten chemischen Techniken und sehr günstigen Edukten - handelsübliches Mandelmehl, o-Salicylaldehyd und 2-Methylfuran - optisch aktive Cyanhydrine gebildet, die mit Hilfe von einfachen Standardreaktionen als Folgechemie zu pharmakologisch aktiven Substanzen umgesetzt werden können. Dabei werden weder teure Katalysatoren benötigt, wie das bislang noch der Fall war¹¹, die später aufwendig wieder abgetrennt werden müssen, noch ist die Synthese auf analytische Maßstäbe beschränkt, sondern von den enantioselektiven Substanzen konnten jeweils mehrere Gramm hergestellt werden.

Der einzige erkennbare Nachteil der enzymatischen Biokatalyse, bestehend in der Selektivität des Enzyms bezüglich des Substrates, fiel in diesem Forschungspraktikum nicht ins Gewicht, da die furanoiden Substrate von der (R)-Oxynitrilase angenommen und umgesetzt wurden.

Im direkten Vergleich der Methode zur Synthese des stereoselektiven Benzofuranaminoalkohols (V) mittels chiralem Auxiliar⁴ und der hier durchgeführten Synthese der Vorstufe (S)-Benzofuran-2-yl-hydroxy-acetonitril (VII), die durch Reduktion zum selben Aminoalkohol reagiert, zeigt sich ein weiterer großer Vorteil der Biokatalyse, nämlich die hohe Enantioselektivität der Reaktion. Während die Enantiomerenüberschüsse im Falle der Methode über ein chirales Auxiliar bei 70% lagen, wurden mittels Biokatalyse Enantiomerenüberschüsse für das selbe Substrat von 95% und mehr erreicht.

Im Falle des (S)-Hydroxy-(5-methyl-furan-2-yl)-acetonitril (VIII) läßt sich nun, vorbehaltlich der Reduktion zum Aminoalkohol (IXa) (siehe Kapitel 3.2.4), klären, ob mittels Gold-Katalyse eine Reaktion zu substituierten, optisch aktiven Tetrahydroisochinolinsystemen stattfindet, was ein neues Kapitel im Zusammenwirken der Bio- und Metallkatalyse eröffnen würde.

Es wird, bezüglich des Benzofuransystems, sowohl die Auswirkung eines veränderten Heteroatoms bei der Umsetzung von Benzothiophen-2-carbaldehyd (XXI) zum entsprechenden Cyanhydrin, sowie auch die Auswirkung des Übergangs vom aromatischen System des Benzofuran-2-carbaldehyd (II) zum aliphatischen System des 4,5,6,7-Tetrahydrobenzofuran-2-carbaldehyd (XXII), erforscht werden.

Auch die Umsetzung von 6,7-Dihydro-benzo[b]thiophen-5-carbaldehyd (XXIII) ist bereits geplant.

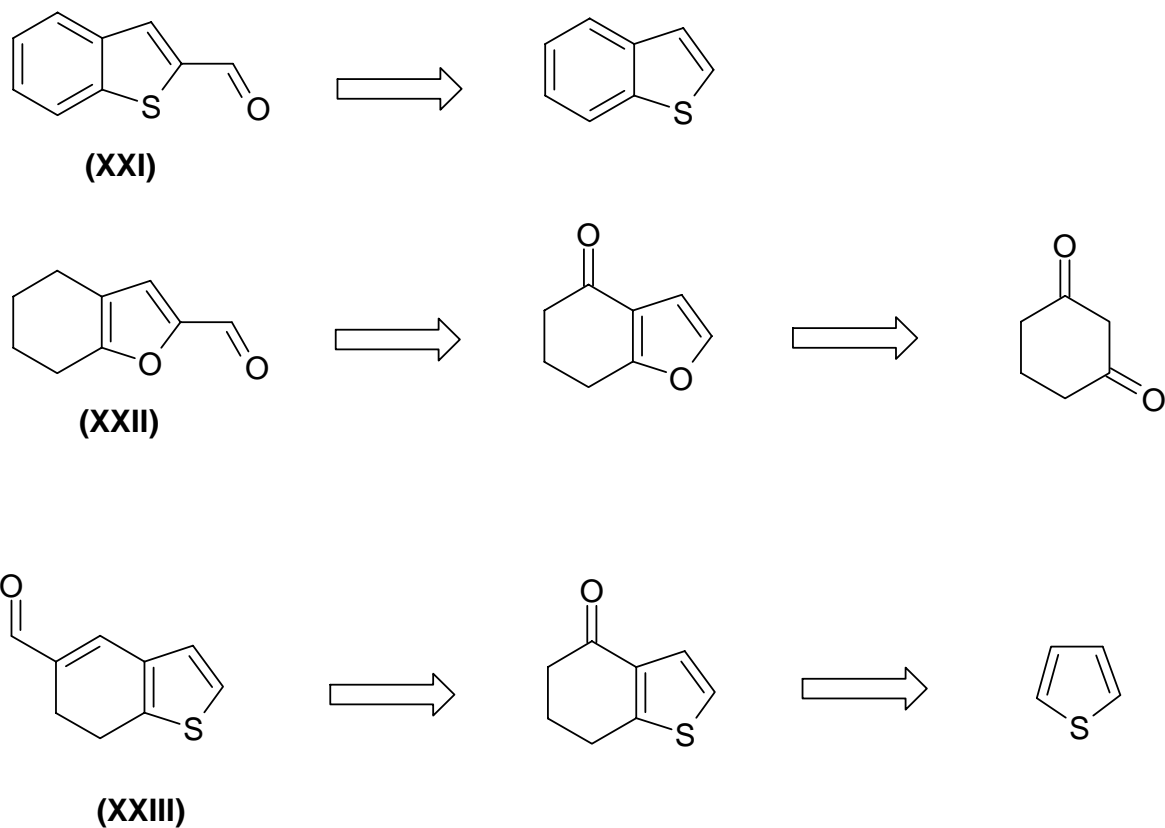


Abb.21

Diese Arbeiten könnten zu einer systematischen Erhebung über eine Vielzahl, dann leicht zugänglicher, optisch aktiver und pharmakologisch aktiver Substanzen führen.

5. Anhang

5.1 Experimenteller Teil

- Reagenzien

1) Lösungsmittel

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden nach literaturbekannten Methoden absolutiert und anschließend destilliert.

2) Pufferlösungen

0.02 M Natriumcitrat-Puffer mit pH 3.3:

2.10g (10mmol) Citronensäure-monohydrat werden in 500ml keimfreiem Wasser gelöst und mit konz. Natronlauge am pH-Meter auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.

0.02 M Natriumacetat-Puffer mit pH 5.4:

0.82g (10mmol) Natriumacetat werden in 500ml keimfreiem Wasser gelöst und mit Eisessig auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.

3) Trägermaterialien

Elcema-Cellulose (Degussa): P100PSC, Teilchengröße: 50-150µm, an der Oberfläche mit 2% amorpher Kieselsäure (Aerosil) gecoatet

4) Edukte

a) kommerziell erhaltene Edukte bekannter Herkunft

o-Salicylaldehyd, Bromacetaldehyddiethylacetal, N,N-Dimethylformamid (Acros Organics), p-Brombenzoylchlorid, 2-Methylfuran

b) kommerziell erhaltene Edukte unbekannter Herkunft

Kaliumcarbonat, Diethylether, Magnesiumsulfat, Essigsäure, Natriumhydrogencarbonat, Diisopropylether, Methylenchlorid, Essigsäureanhydrid, Pyridin, Kaliumcyanid, Salzsäure, Natriumchlorid, Phosphorsäure, Natriumcyanid, Phosphoroxotrichlorid, 1,2-Dichlorethan, Natriumcarbonat, N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP)

c) wasserfreie Blausäure (P.Kurtz in Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Vol. 8 (Ed.: E.Müller), 4th ed., Thieme, **1952**, 255-256)

Die Herstellung erfolgt durch Eintropfen einer konzentrierten Natriumcyanid-Lösung in 70%ige Schwefelsäure, der Eisen(II)sulfat (10g pro 700g H₂SO₄) zugesetzt ist, bei 80°C. Die Blausäure wird mit Stickstoff aus dem Reaktionsgefäß ausgetrieben und nach Passieren eines CaCl₂- und

P4O10- Trockenturms bei -11°C kondensiert. Die so erhaltene Blausäure wird im Anschluß destilliert und bei -78°C eingefroren.

d) Herstellung der (R)-Oxynitrilaselösung für die methodischen Untersuchungen im organischen Medium:

(R)-Hydroxynitril Lyase aus *Prunus amygdalus* ((R)-PaNHL)[E.C.4.1.2.10]: Die Isolierung erfolgte aus entfettetem Mandelmehl durch Affinitätschromatographie analog Hochuli (E.Hochuli, *Helv. Chim. Acta*, **1983**, 66, 489-493) und Mattiasson (R.Kaul, B.Mattiasson, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **1992**, 9, 294-302). Zur weiteren Reinigung wurde eine Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose angeschlossen (H.Lauble, K.Müller, H.Schindlin, S.Förster, F.Effenberger, *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, **1994**, 19, 343-347).

e) Herstellung der (R)-Oxynitrilaselösung für das Zweiphasensystem zur Synthese von Cyanhydrinen:

600g Süßmandelmehl (EUACO GmbH, 22291 Hamburg) werden 24h mit 2.4l Diisopropylether in einem 4l-Einhalskolben mittels eines KPG-Rührers intensiv gerührt. Nach dieser Zeit wird über einen Büchnertrichter abgesaugt und der entfettete Rückstand noch mit 300ml Diisopropylether nachgewaschen. Das so erhaltene Mandelmehl wird zur Entfernung von Diisopropyletherresten am Vakuum getrocknet.

100g entfettetes Mandelmehl werden mit 500ml Citratpuffer (pH 3.3, 2.1g Citronensäuremonohydrat) 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird vom Mandelmehl abzentrifugiert und bei der so erhaltenen Enzymlösung die Enzymaktivität nach der Methode von Bauer et.al. (M.Bauer, H.Griengl, W.Steiner, *Biotechnol. Bioeng.*, **1999**, 62, 20-29) bestimmt.

Die so erhaltene Lösung wurde direkt für die Synthesen im Zweiphasensystem eingesetzt.

- Geräte

1) ^1H -NMR-Spektren: Bruker AC 250 F (250 MHz)

^{13}C -NMR-Spektren: Bruker AC 250 F (62.9 MHz)

2) Drehwerte: Perkin-Elmer Polarimeter 241 LC mit thermostatisierbarer Glasküvette ($l = 10\text{cm}$)

3) Schmelzpunkt: Büchi SMP mit Silikonbad, alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert

4) pH-Werte: Metrohm Herisau Digital-pH-Meter E 500 mit Ag/AgCl-Elektrode

5) Gaschromatograph:

Hewlett Packard 5890 Series II mit HP 7673-Injektor

Detektor: FID, Temp.: 260°C

Split: 100:1

Trägergas: Wasserstoff

Säule: OV 1701, 20m x 0.32mm

Darstellungen

2-(2, 2-Diethoxyethoxy)-benzaldehyd⁷ (MK 5)

Ansatz:

Verbindung	Molmasse [g/mol]	Volumen Masse	Dichte [g/ml]	Stoffmenge [mmol]
o-Salicylaldehyd	122.12	50g	-	409.4
Bromacetaldehyd-acetal	197.07	110g	-	558.2
Kaliumcarbonat	138.20	36g	-	260.5
N,N-Dimethylformamid	73.10	500ml	0.94	6430

Durchführung:

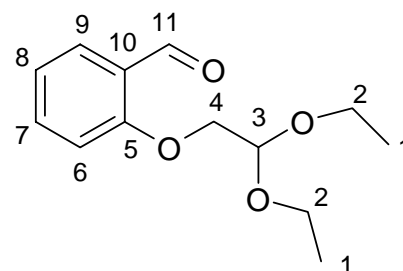
50g o-Salicylaldehyd (409.4mmol), 110g Bromacetaldehyddiethylacetal (558.2mol) und 36g Kaliumcarbonat (260.5mmol) werden in 500 ml wasserfreiem Dimethylformamid 2 Stunden lang auf 140°C erhitzt. Anschließend wird abfiltriert, die Hauptmenge an Dimethylformamid mittels Rotationsverdampfers abgezogen, der Rückstand auf Wasser gegossen und dreimal mit 100ml Diethylether extrahiert. Nun wird noch über Magnesiumsulfat getrocknet. Wiederum mittels Rotationsverdampfers das Lösungsmittel abgezogen und im Hochvakuum (Ölpumpe) über eine Vigreux-Kolonnen abdestilliert.

Ausbeute: 63.13g = 65% (gelbe, viskose Flüssigkeit)

Siedepunkt: 131°C / 1 mm Hg

Elementaranalyse: C₁₃H₁₈O₄ (238.28g/mol)

Ber.: C: 65.53% H: 7.61%
Gef.: C: 65.35% H: 7.79%



¹H-NMR (250.13MHz, CDCl₃): δ(ppm)= 1.25 (t, 6H, C-Atome 1), 3.7 (m, 4H, C-Atome 2), 4.12 (d, 2H, C-Atom 4), 4.89 (t, 1H, C-Atom 3), 7.00 (m, 2H, arom., unbest. C-Atome 6-9), 7.53 (m, 1H, arom., unbest. C-Atome 6-9, unbest. C-Atome 6-9), 7.82 (m, 1H, arom., unbest. C-Atome 6-9), 10.45 (s, 1H, C-Atom 11)

¹³C-NMR (62.90MHz, CDCl₃): δ(ppm)= 15.37 (CH₃), 63.13 (CH₂), 69.21 (CH₂), 100.47 (CH), 112.86 (CH), 121.12 (CH), 125.11 (C-4°), 128.27 (CH), 135.93 (CH), 161.00 (C-4°), 189.62 (CHO)

Benzofuran-2-carbaldehyd⁷ (MK 6)

Ansatz:

Verbindung	Molmasse [g/mol]	Volumen Masse	Dichte [g/ml]	Stoffmenge [mmol]
Diethoxyethoxybenzal.	238.28	63g	-	264.4
Essigsäure, 100%	60.05	195ml	1.04	3377

Durchführung:

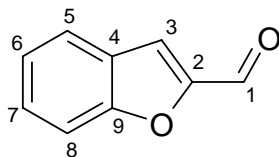
63g Diethoxyethoxybenzaldehyd (264.4mmol) in 195ml 100%-iger Essigsäure werden 72 Stunden unter Rückfluß und Magnetrührung erhitzt. Anschließend läßt man abkühlen und gießt die Reaktionsmischung vorsichtig unter Rührung in 500ml Wasser. Nun extrahiert man zweimal mit 100ml Diethylether und wäscht die vereinigten Etherphasen dreimal mit 100ml einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung und trocknet über Magnesiumsulfat. Abschließend wird mittels eines Rotationsverdampfers der Ether abgetrennt und das Produkt über eine Vigreux-Kolonne im Vakuum (Membranpumpe) abdestilliert.

Ausbeute: 24.16g = 63% (gelbe Flüssigkeit)

Siedepunkt: 120°C / 15mbar

Elementaranalyse: C₉H₆O₂ (146.15g/mol)

Ber.: C: 73.97% H: 4.14%
 Gef.: C: 73.73% H: 4.04%



$^1\text{H-NMR}$ (250.13MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm})= 7.22$ (m, 1H, arom), 7.57 (m, 3H, arom.), 7.73 (m, 1H, arom), 9.85 (s, 1H, C-Atom 1)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.90MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm})= 112.68$ (CH), 117.86 (CH), 123.68 (CH), 124.21 (CH), 126.65 (C-4°), 129.22 (CH), 152.69 (C-4°), 156.24 (C-4°), 179.75 (CHO)

Benzofuran-2-yl-hydroxy-acetonitril, rac.⁹ (MK 20)

Ansatz:

Verbindung	Molmasse [g/mol]	Volumen Masse	Dichte [g/ml]	Stoffmenge [mmol]
Benzofurancarbaldehyd	146.15	5g	-	34.2
Essigsäure, 100%	60.05	17ml	1.04	294.4
Kaliumcyanid	65.12	6.68g	-	102.6

Durchführung:

Zu 5g des Benzofurancarbaldehyds (34.2mmol) in 17ml Essigsäure werden über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten 6.68g Kaliumcyanid (102.6mmol) in 17ml Wasser zugetropft. Anschließend rührt man noch 2 Stunden nach und gibt dann 45ml Wasser zu. Man extrahiert nun mit 50ml Diethylether dreimal, trocknet die organischen Phasen über Magnesiumsulfat und zieht den Ether mittels eines Rotationsverdampfers ab. Über einer Hochvakuumpumpe (Öldruckpumpe) werden noch eventuell vorhandene, flüchtigere Substanzen abgezogen. Das so erhaltene Rohprodukt wird direkt, ohne weitere Reinigung, zur acylierten Verbindung weiterverarbeitet, und als solche charakterisiert.

Rohausbeute: 5.4g = 91% (gelblicher Feststoff)

Essigsäure-benzofuran-2-yl-cyano-methylester, rac.¹² (MK 21)

Ansatz:

Verbindung	Molmasse [g/mol]	Volumen Masse	Dichte [g/ml]	Stoffmenge [mmol]
Benzofuranylhydroxyacetonitril , theoretisch	173.17	5.92g	-	34.2
Pyridin	79.10	5.5ml	0.978	68.4
Essigsäureanhydrid	102.09	6.5ml	1.082	68.4

Durchführung:

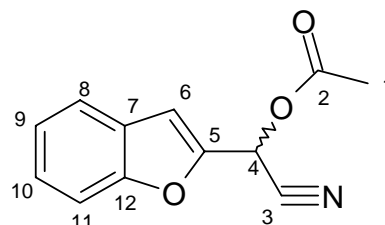
Das aus der vorherigen Reaktion gewonnene Rohprodukt (theoretisch 5.92g des Benzofuranyhydroxyacetonitril (34.2mmol)) wird in 50ml Methylenchlorid aufgenommen und mit 5.5ml Pyridin (68.4mmol), 6.5ml Essigsäureanhydrid (68.4mmol) und einer Spatelspitze N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP) versetzt. Diese Mischung läßt man über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Anschließend entfernt man das Methylenchlorid mittels eines Rotationsverdampfers, nimmt den Rückstand in Diethylether auf und wäscht mit jeweils 50ml-Portionen 10%-iger Salzsäure (dreimal), gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, gesättigter Kaliumdisulfatlösung (dreimal), wiederum gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (dreimal), und gesättigter Natriumchloridlösung. Die so gewaschene organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, der Ether abgetrennt und der so erhaltene gelbliche Feststoff in Diisopropylether umkristallisiert.

Ausbeute (für MK20+MK21): 4.96g = 71% (weißer Feststoff)

Schmelzpunkt: 55°C

Elementaranalyse: C₁₂H₉O₃N (215.21g/mol)

Ber.:	C: 66.97%	H: 4.27%	N: 6.51%
Gef.:	C: 66.97%	H: 4.22%	N: 6.43%



¹H-NMR (250.13MHz, (CD₃)₂CO): δ(ppm)= 2.21 (s, 3H, C-Atom 1), 6.90 (s, 1H, C-Atom 4), 7.27 (m, 1H, arom.), 7.37 (m, 1H, arom.), 7.45 (m, 1H, arom.), 7.61 (m, 1H, arom.), 7.72 (m, 1H, arom.)

¹³C-NMR (62.90MHz, (CD₃)₂CO): δ(ppm)= 20.22 (CH), 57.45 (CH), 109.78 (CH), 112.36 (CH), 115.26 (C-4°), 123.08 (CH), 124.59 (CH), 127.11 (CH), 128.09 (C-4°), 147.92 (C-4°), 156.40 (C-4°), 169.42 (C-4°)

(S)-Benzofuran-2-yl-hydroxy-acetonitril, methodisch¹³ (MK 15)

Ansatz:

Verbindung	Molmasse [g/mol]	Volumen Masse	Dichte [g/ml]	Stoffmenge [mmol]
Benzofurancarbaldehyd	146.15	0.292g	-	2
Diisopropylether	102.18	5ml	0.72	35.2
Blausäure	27.03	0.3ml	-	-

Durchführung:

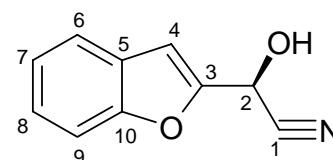
200mg gequollene Cellulose werden in ein 10ml Schnappdeckelglas eingewogen und mit 78µl (200 units) (R)-Oxynitrilase-Enzymkonzentrat gleichmäßig benetzt. Dann wird mit einer Lösung von 5ml abs. Diisopropylether und dem entsprechenden Aldehyd (2mmol) versetzt und startet unter Magnetrührung die Umsetzung sowie die Zeitnahme mit der Zugabe von 300µl wasserfreier Blausäure.

In regelmäßigen Abständen werden zur Kontrolle des Umsatzes und der Enantiomerenüberschüsse 400µl-Proben aus dem Reaktionsansatz entnommen, in einen 20ml Rundkolben pipettiert, die Blausäure am Rotationsverdampfer mit dem Großteil des Lösungsmittel abgezogen und mit 500µl abs. Methylenchlorid, 50µl Essigsäureanhydrid und 10µl abs. Pyridin versetzt. Die so erhaltene Mischung wird im Trockenschrank im verschlossenen Derivatisierungsgläschen bei 60°C innerhalb von 5 Stunden zum Acetat umgesetzt, der Ansatz auf eine Kieselgelsäule (Kieselgel 60.3 x 0.5cm) aufgegeben und mit 3ml abs. Methylenchlorid nacheluiert. Die so erhaltene Lösung wird direkt für die gaschromatographische Untersuchung eingesetzt. Hier wurden nach 1 Stunde und nach 3 Stunden 45 Minuten Proben entnommen.

Zur Bestimmung der Blindprobe wiegt man analog 200mg gequollene Cellulose in ein 10ml Schnappdeckelglas ein und benetzt diese mit 80µl Natriumacetatpuffer (0.02 M, pH = 5.4), überschichtet mit einer Lösung von 5ml abs. Diisopropylether und 2mmol des entsprechenden Aldehyds. Unter Rühren versetzt man mit 300µl wasserfreier Blausäure und verfolgt analog zur enzymatischen Reaktion die Umsetzung mittels Gaschromatographie.

Umsatz: nach 3h45': 99% Blindprobe: 1.6%

Enantiomerenüberschuß nach 3h45': 97%



¹H-NMR (250.13MHz, (CD₃)₂CO): δ(ppm)= 2.06 (s, 1H, C-Atom 2), 6.06 (s, 1H, C-Atom 4), 6.39 (s, breit, 1H, OH), 7.08 (m, 1H, arom.), 7.39 (m, 1H, arom.), 7.56 (m, 1H, arom.), 7.68 (m, 1H, arom.)

^{13}C -NMR (62.90MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): $\delta(\text{ppm}) = 57.97$ (CH), 106.60 (CH), 112.21 (CH), 118.51 ($\text{C}-4^\circ$), 122.77 (CH), 124.31 (CH), 126.39 (CH), 128.49 ($\text{C}-4^\circ$), 125.75 ($\text{C}-4^\circ$), 156.20 ($\text{C}-4^\circ$)

(S)-Benzofuran-2-yl-hydroxy-acetonitril, Zweiphasensystem (MK 24)

Ansatz:

Verbindung	Molmasse [g/mol]	Volumen Masse	Dichte [g/ml]	Stoffmenge [mmol]
Diisopropylether	102.18	150ml	0.72	1057
Phosphorsäure, 85%	97.99	10ml	1.68	171.4
Natriumcyanid	49.01	3.35g	-	68.4
Benzofurancarbaldehyd	146.15	5g	-	34.2

Durchführung:

Zu 100ml Diisopropylether und 10ml 85%-iger Phosphorsäure werden 3.35g Natriumcyanid (68.4mmol) ,in so wenig Wasser wie nötig gelöst, zugetropft.

In einen Dreihalskolben mit KPG-Rührer werden 5g des Benzofurancarbaldehyds (34.2mmol) in 50ml Diisopropylether und 100ml (6000 units) einer (R)-Oxynitrilase-Enzymlösung, gegeben. Nachdem die Zugabe der Natriumcyanidlösung zum Gemisch aus Diisopropylether/Phosphorsäure, wie oben beschrieben, beendet ist, trennt man die wäßrige Phase ab, und startet mit der Zugabe der organischen Phase in den Dreihalskolben die Reaktion und Zeitnahme.

Nach 2 Stunden wird die Reaktion abgebrochen. Dazu wird über einen Büchnertrichter an einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, mit Diisopropylether nachgespült, die wäßrige Phase abgetrennt und nochmals mit 50ml Diisopropylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer von Diisopropylether befreit. Abschließend werden noch an der Hochvakuumpumpe (Öldruckpumpe) eventuell vorhandene flüchtigere Substanzen abgezogen.

Eine kleine Probe wird mit 500 μl abs. Methylenchlorid, 80 μl Essigsäureanhydrid und 20 μl Pyridin versetzt, in ein Derivatisierungsgläschen überführt und 3 Stunden bei 60°C im Trockenschrank belassen, um eine gaschromatographische Überprüfung der Reaktion über die acylierte Verbindung vornehmen zu können.

Ausbeute: 5.5g = 93% (weißer Feststoff)

Umsatz: nach 2h: 97%

Enantiomerenüberschuß: nach 2h: 95%

(S)-Benzofuran-2-yl-hydroxy-acetonitril, Zweiphasensystem (MK 28)

Ansatz:

Verbindung	Molmasse [g/mol]	Volumen Masse	Dichte [g/ml]	Stoffmenge [mmol]
Diisopropylether	102.18	205ml	0.72	1445
Phosphorsäure, 85%	97.99	15ml	1.68	257.2
Natriumcyanid	49.01	5.70g	-	116.4
Benzofurancarbaldehyd	146.15	8.5g	-	58.2

Durchführung:

Zu 100ml Diisopropylether und 15ml 85%-iger Phosphorsäure werden 5.70g Natriumcyanid (116.4mmol) ,in so wenig Wasser wie nötig gelöst, zugetropft.

In einen Dreihalskolben mit KPG-Rührer werden 8.5g des Benzofurancarbaldehyds (58.2mmol) in 80ml Diisopropylether und 100ml (6000 units) einer (R)-Oxynitrilase-Enzymlösung, gegeben. Nachdem die Zugabe der Natriumcyanidlösung zum Gemisch aus Diisopropylether/Phosphorsäure, wie oben beschrieben, beendet ist, trennt man die wäßrige Phase ab, und startet mit der Zugabe der organischen Phase in den Dreihalskolben die Reaktion und Zeitnahme.

Nach 2 Stunden wird die Reaktion abgebrochen. Dazu wird über einen Büchnertrichter an einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, mit Diisopropylether nachgespült, die wäßrige Phase abgetrennt und nochmals mit 50ml Diisopropylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer von Diisopropylether befreit. Abschließend werden noch an der Hochvakuumpumpe (Öldruckpumpe) eventuell vorhandene flüchtigere Substanzen abgezogen.

Eine kleine Probe wird acyliert, um auch hier eine gaschromatographische Überprüfung der Reaktion vornehmen zu können. Dazu wird mit 500µl abs. Methylenchlorid, 80µl Essigsäureanhydrid und 20µl Pyridin versetzt. Diese Mischung wird in ein Derivatisierungsgläschen überführt und 4 Stunden bei 60°C im Trockenschrank belassen.

Ausbeute: 7.0g = 69% (weißer Feststoff)

Umsatz: >99%

Enantiomerenüberschuß: 89%

Drehwert: $[\alpha]_{D20}$: +40.1° (c=1, CHCl₃)

(S)-Essigsäure-benzofuran-2-yl-cyano-methylester¹² (MK 32)

Ansatz:

Verbindung	Molmasse [g/mol]	Volumen Masse	Dichte [g/ml]	Stoffmenge [mmol]
(S)-Benzofuranylhydroxyacetonitril	173.17	2g	-	11.5
Pyridin	79.10	1.8ml	0.987	23.0
Essigsäureanhydrid	102.09	2.2ml	1.082	23.0

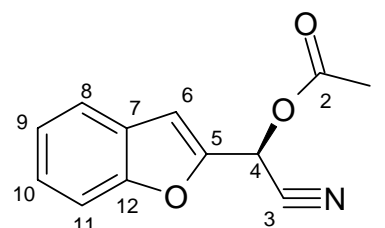
Durchführung:

2g (S)-Benzofuranylhydroxyacetonitril (11.5mmol) werden in 50ml Methylenchlorid aufgenommen und mit 1.8ml Pyridin (23.0mmol) und 2.2ml Essigsäureanhydrid (23.0mmol) versetzt. Diese Mischung läßt man über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Anschließend entfernt man das Methylenchlorid mittels eines Rotationsverdampfers, nimmt den Rückstand in Diethylether auf und wäscht mit jeweils 50ml-Portionen 10%-iger Salzsäure (dreimal), gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, gesättigter Kaliumdisulfatlösung (dreimal), wiederum gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (dreimal), und gesättigter Natriumchloridlösung. Die so gewaschene organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und der Ether abrotiert. Der Rückstand bleibt eine gelbe, hochviskose Flüssigkeit, da noch 5% des Benzofurancarbaldehyds enthalten sind.

Rohausbeute (incl. 5% Aldehyd): 2.02g = 82%
entspricht Ausbeute an reiner Substanz von 1.92g = 78%

Enantiomerenüberschuß: 98%

Drehwert: $[\alpha]_{D20}$: -36.7° (c=1, CHCl₃)



¹H-NMR (250.13MHz, CDCl₃): δ (ppm)= 2.19 (s, 3H, C-Atom 1), 6.61 (s, 1H, C-Atom 4), 7.05 (s, 1H, arom.), 7.28 (m, 1H, arom.), 7.38 (m, 1H, arom.), 7.50 (m, 1H, arom.), 7.60 (m, 1H, arom.)

¹³C-NMR (62.90MHz, CDCl₃): δ (ppm)= 20.28 (CH₃), 56.34 (CH), 109.02 (CH), 111.79 (CH), 113.93 (C-4°), 122.03 (CH), 123.72 (CH), 126.29 (CH), 126.91 (C-4°), 146.21 (C-4°), 155.61 (C-4°), 168.64 (C-4°)

(S)-4-Brom-benzoylsäure-benzofuran-2-yl-cyano-methylester¹⁴ (MK 30)

Ansatz:

Verbindung	Molmasse [g/mol]	Volumen Masse	Dichte [g/ml]	Stoffmenge [mmol]
(S)-Benzofuranylhydroxyacetonitril	173.17	2g	-	11.5
p-Brombenzoylchlorid	219.46	3.03g	-	13.8
Pyridin	79.10	1.1ml	0.987	13.8

Durchführung:

Zu 2g (S)-Benzofuranylhydroxyacetonitril (11.5mmol) in 50ml Methylenchlorid werden 3.03g p-Brombenzoylchlorid (13.8mmol) und 1.1ml Pyridin (13.8mmol) zugegeben. Anschließend wurde mit jeweils 50ml Portionen 10%-iger Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (dreimal) und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, sowie über Magnesiumsulfat getrocknet und das Methylenchlorid am Rotationsverdampfer entfernt. Um noch eventuell vorhandene p-Brombenzoesäure zu entfernen wurde mit Diisopropylether trituiert und anschließend in Diisopropylether umkristallisiert.

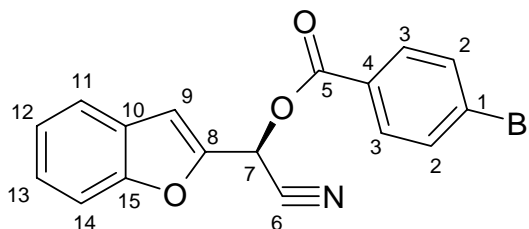
Ausbeute: 1.Fraktion: 0.42g = 10.7% (weißer bis blaßgelber Feststoff)
2.Fraktion: 0.44g = 11.2% (weißer Feststoff)
3.Fraktion: 0.45g = 11.5% (weißer Feststoff)

Schmelzpunkt: 78°C

Drehwert: $[\alpha]_{D20}$: +30.3° (c=1, CHCl₃)

Elementaranalyse: C₁₇H₁₀O₃NBr (341.36g/mol)

Ber.: C: 57.33% H: 2.83% N: 3.93% Br: 22.43%
Gef.: C: 57.11% H: 2.91% N: 3.84% Br: 22.80%



¹H-NMR (250.13MHz, CDCl₃): δ (ppm)= 6.86 (s, 1H, C-Atom 7), 7.15 (s, 1H, arom., C-Atom 9), 7.30 (m, 1H, arom.), 7.40 (m, 1H, arom.), 7.52 (m, 1H, arom.), 7.59 (m, 1H, arom.), 7.63 (m, 1H, arom.), 7.66 (m, 1H, arom.), 7.92 (m, 1H, arom.), 7.95 (m, 1H, arom.)

^{13}C -NMR (62.90MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 57.01$ (CH), 109.39 (CH), 111.87 (CH), 113.81 (C-4°), 122.07 (CH), 123.78 (CH), 126.40 (CH), 126.60 (C-4°), 126.89 (C-4°), 129.73 (C-4°), 131.64 (CH), 132.12 (CH), 146.03 (C-4°), 155.71 (C-4°), 163.74 (C-4°)

5-Methyl-furan-2-carbaldehyd¹⁵ (MK 33)

Ansatz:

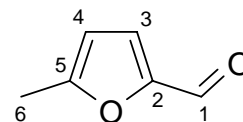
Verbindung	Molmasse [g/mol]	Volumen Masse	Dichte [g/ml]	Stoffmenge [mmol]
N,N-Dimethylformamid	73.10	54ml	0.94	700
Phosphoroxytrichlorid	153.33	107g	-	700
2-Methylfuran	82.10	50.5g	-	700
Natriumcarbonat	105.99	185g	-	1750
1,2-Dichlorethan	98.96	400ml	1.24	5012

Durchführung:

Zu einer Mischung aus 54ml Dimethylformamid (700mmol), 107g frisch destilliertem Phosphoroxytrichlorid und 400ml 1,2-Dichlorethan, die 20 Minuten bei 0°C gehalten wird (Eiskühlung), werden 50.5g 2-Methylfuran (700mmol) so langsam zugegeben, daß die Temperatur unter 20°C verbleibt. Anschließend wird noch 1 Stunde bei 0°C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt (stets mittels KPG-Rührer). Nun wird in 600ml Eiswasser gegossen, mit einer Lösung aus 185g Natriumcarbonat (1750mmol) in Wasser neutralisiert und wiederum über Nacht stehengelassen. Die Phasen werden getrennt, die wäßrige Phase mit 3 x 200ml-Portionen Diethylether extrahiert, die organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel mittels eines Rotationsverdampfers entfernt und das Produkt insgesamt dreimal fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 29g = 38% (blaßgelbe Flüssigkeit)

Siedepunkt: 69°C / 10 mm Hg



^1H -NMR (250.13MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 2.42$ (s, 3H, C-Atom 6), 6.26 (d, 1H, arom.), 7.18 (d, 1H, arom.), 9.50 (s, 1H, C-Atom 1)

^{13}C -NMR (62.90MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 14.05$ (CH_3), 109.57 (CH), 123.98 (CH, breit), 151.92 (C-4°), 159.84 (C-4°), 176.87 (CHO)

Hydroxy-(5-methyl-furan-2-yl)-acetonitril, rac.⁹ (MK 18)

Ansatz:

Verbindung	Molmasse [g/mol]	Volumen Masse	Dichte [g/ml]	Stoffmenge [mmol]
5-Methylfuran-2-carbaldehyd	110.11	8.21g	-	74.6
Essigsäure, 100%	60.05	37ml	1.04	640.8
Kaliumcyanid	65.12	14.57g	-	223.7

Durchführung:

Zu 8.21g des 5-Methylfuran-2-carbaldehyds (74.6mmol) in 37ml Essigsäure werden über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten 14.5g Kaliumcyanid (223.7mmol) in 37ml Wasser zugetropft. Anschließend rührt man noch 3 Stunden und gibt dann 100ml Wasser zu. Man extrahiert nun mit 50ml Diethylether dreimal, trocknet die organischen Phasen über Magnesiumsulfat und zieht den Ether mittels eines Rotationsverdampfers ab. Mittels einer Hochvakuumpumpe (Öldruckpumpe) werden noch eventuell vorhandene, flüchtigere Substanzen abgezogen. Das so erhaltene Rohprodukt wird direkt, ohne weitere Reinigung, zur acylierten Verbindung weiterverarbeitet, und als solche charakterisiert.

Rohausbeute: 9.2g = 90% (hellgelbe Flüssigkeit)

Essigsäure-cyano-(5-methyl-furan-2-yl)-methylester, rac.¹² (MK 19)

Ansatz:

Verbindung	Molmasse [g/mol]	Volumen Masse	Dichte [g/ml]	Stoffmenge [mmol]
Hydroxymethylfuranacetonitril, theoretisch	137.14	10.23g	-	74.6
Pyridin	79.10	12.1ml	0.978	149.2
Essigsäureanhydrid	102.09	14.1ml	1.082	149.2

Durchführung:

Das aus der vorherigen Reaktion gewonnene Rohprodukt (theoretisch 10.23g des Hydroxymethylfuranacetonitrils (74.6mmol)) wird in 50ml Methylenchlorid aufgenommen und mit 12.1ml Pyridin (149.2mmol), 14.1ml Essigsäureanhydrid (149.2mmol) und einer Spatelspitze N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP) versetzt. Diese Mischung läßt man über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Anschließend entfernt man das Methylenchlorid mittels eines Rotationsverdampfers, nimmt den Rückstand in Diethylether auf und wäscht mit jeweils 50ml-Portionen 10%-iger Salzsäure (dreimal), gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, gesättigter Kaliumdisulfidlösung (dreimal), wiederum gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (dreimal), und gesättigter Natriumchloridlösung. Die so gewaschene organische Phase wird über

Magnesiumsulfat getrocknet, der Ether abrotiert und die so erhaltene gelbe Flüssigkeit über eine Vigreux-Kolonnen im Vakuum (Membranpumpe) abdestilliert.

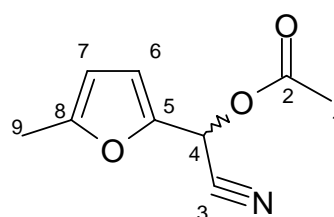
Ausbeute (für MK18+MK19): 2.74g = 21% (hellgelbe, viskose Flüssigkeit)

Siedepunkt: 118°C / 15mbar

Elementaranalyse: C₉H₉O₃N (179.18g/mol)

Ber.: C: 60.33% H: 5.06% N: 7.82%

Gef.: C: 60.25% H: 5.13% N: 7.72%



¹H-NMR (250.13MHz, (CD₃)₂CO): δ(ppm)= 2.15 (s, 3H, C-Atom 1), 2.33 (s, 3H, C-Atom 9), 6.15 (s, 1H, C-Atom 4), 6.60 (d, 1H, arom.), 6.65 (d, 1H, arom.)

¹³C-NMR (62.90MHz, (CD₃)₂CO): δ(ppm)= 13.46 (CH₃), 20.26 (CH₃), 56.83 (CH), 108.11 (CH), 114.47 (CH), 115.58 (C-4°), 143.70 (C-4°), 156.04 (C-4°), 169.51 (C-4°)

(S)-Hydroxy-(5-methyl-furan-2-yl)-acetonitril (MK 34)

Ansatz:

Verbindung	Molmasse [g/mol]	Volumen Masse	Dichte [g/ml]	Stoffmenge [mmol]
5-Methylfuran-2-carbaldehyd	110.11	10g	-	90.8
Diisopropylether	102.18	250ml	0.72	1762
Natriumcyanid	49.01	8.90g	-	181.6
Phosphorsäure, 85%	97.99	15ml	1.68	257.2

Durchführung:

Zu 150ml Diisopropylether und 15ml 85%-iger Phosphorsäure werden 8.90g Natriumcyanid (181.6mmol) in so wenig Wasser wie nötig gelöst, zugegeben.

In einen Dreihalskolben mit KPG-Rührer werden 10g des 5-Methylfuran-2-carbaldehyds (90.8mmol) in 100ml Diisopropylether und 100ml (6000 units) einer (R)-Oxynitrilase-Enzymlösung, gegeben. Nachdem die Zugabe der Natriumcyanidlösung zum Gemisch aus Diisopropylether/Phosphorsäure, wie oben beschrieben, beendet ist, trennt man die wässrige Phase ab, und startet mit der Zugabe der organischen Phase in den Dreihalskolben die Reaktion und Zeitnahme.

Nach 1 Stunde 30 Minuten wird die Reaktion abgebrochen. Dazu wird über einen Büchnertrichter an einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, mit Diisopropylether nachgespült, die wäßrige Phase abgetrennt und nochmals mit Diisopropylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer von Diisopropylether befreit. Abschließend werden noch an der Hochvakuumpumpe (Öldruckpumpe) eventuell vorhandene flüchtigere Substanzen abgezogen.

Eine kleine Probe wird acyliert, um auch hier eine gaschromatographische Überprüfung der Reaktion vornehmen zu können. Dazu wird mit 500µl abs. Methylenchlorid, 80µl Essigsäureanhydrid und 20µl Pyridin versetzt. Diese Mischung wird in ein Derivatisierungsgläschen überführt und 3 Stunden bei 60°C im Trockenschrank belassen.

Rohausbeute (enthält 25.7% Aldehyd): 10.3g = 83% (hellgelbe Flüssigkeit)
entspricht Ausbeute an reiner Substanz von 7.6g = 62%

Umsatz: 74%

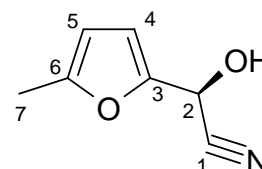
vgl.: Lit-Umsatz⁹: 65%

Enantiomerenüberschuß: 98%

vgl. Lit-Enantiomerenüberschuß⁹: 95%

Drehwert: $[\alpha]_{D20}$: +49.8° (c=1, CHCl₃)

vgl. Lit.-Drehwert⁹: $[\alpha]_{D20}$: +45° (c=1, CHCl₃)



¹H-NMR (250.13MHz, CDCl₃): δ (ppm)= 2.30 (s, 3H, C-Atom 7), 4.16 (s, breit, 1H, OH), 5.50 (s, 1H, C-Atom 2), 5.99 (d, 1H, arom.), 6.45 (d, 1H, arom.)

¹³C-NMR (62.90MHz, CDCl₃): δ (ppm)= 13.55 (CH₃), 56.94 (CH), 106.88 (CH), 111.06 (CH), 117.28 (C-4°), 145.90 (C-4°), 154.47 (C-4°)

(S)-Essigsäure-cyano-(5-methyl-furan-2-yl)-methylester¹² (MK 35)

Ansatz:

Verbindung	Molmasse [g/mol]	Volumen Masse	Dichte [g/ml]	Stoffmenge [mmol]
(S)-Hydroxymethylfuranacetonitril	137.14	2g	-	14.6
Essigsäureanhydrid	102.09	2.8ml	1.082	29.2
Pyridin	79.10	2.4ml	0.978	29.2

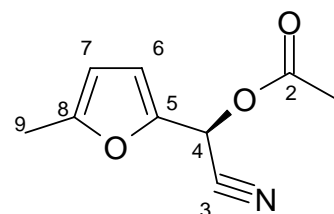
Durchführung:

2g (S)-Hydroxymethylfuranacetonitril (14.6mmol) werden in 50ml Methylenchlorid aufgenommen und mit 2.4ml Pyridin (29.2mmol) und 2.8ml Essigsäureanhydrid (29.2mmol) versetzt. Diese Mischung läßt man über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Anschließend entfernt man das Methylenchlorid mittels eines Rotationsverdampfers, nimmt den Rückstand in Diethylether auf und wäscht mit jeweils 50ml-Portionen 10%-iger Salzsäure (dreimal), gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, gesättigter Kaliumdisulfidlösung (dreimal), wiederum gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (dreimal), und gesättigter Natriumchloridlösung. Die so gewaschene organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und der Ether abrotiert. Der gelbe Rückstand wird über eine Vigreux-Kolonne im Vakuum (Membranpumpe) abdestilliert.

Ausbeute: 1.32g = 51% (klare, viskose Flüssigkeit)

Enantiomerenüberschuß: 99%

Drehwert: $[\alpha]_{D20}$: -29.8° (c=1, CHCl₃)



¹H-NMR (250.13MHz, CDCl₃): δ (ppm)= 2.16 (s, 3H, C-Atom 1), 2.33 (s, 3H, C-Atom 9), 6.03 (m, 1H, arom.), 6.40 (s, 1H, C-Atom 4), 6.56 (m, 1H, arom.)

¹³C-NMR (62.90MHz, CDCl₃): δ (ppm)= 13.61 (CH₃), 20.39 (CH₃), 55.86 (CH), 107.24 (CH), 113.73 (CH), 114.38 (C-4°), 142.16 (C-4°), 155.43 (C-4°), 168.86 (C-4°)

5.2 Analytik

MK5 (2-(2,2-Diethoxyethoxy-)benzaldehyd)

- ¹³C
- DEPT135
- ¹H
- Elementaranalyse

MK6 (Vorlauf; Benzofuran)

- ¹³C
- DEPT135
- ¹H

MK6 (Benzofuran-2-carbaldehyd)

- ¹³C
- DEPT135
- ¹H
- Vergleichs-NMR ¹³C & ¹H
- Elementaranalyse
- Gaschromatogramm

MK13 (5-Methyl-2-furfural, kommerziell)

- Gaschromatogramm

MK15 ((S)-Benzofuran-2-yl-hydroxyacetonitril, methodisch)

- ¹³C
- DEPT135
- ¹H
- Gaschromatogramm nach 1h
- Gaschromatogramm nach 1h, Blindprobe
- Gaschromatogramm nach 3h45'
- Gaschromatogramm nach 3h45', Blindprobe

MK19 (Essigsäure-cyano-(5-methyl-furan-2-yl)-methylester))

- ¹³C
- DEPT135
- ¹H
- Elementaranalyse
- Gaschromatogramme

MK21 (Essigsäure-benzofuran-2-yl-cyano-methylester)

- ¹³C
- DEPT135
- ¹H
- Elementaranalyse
- Gaschromatogramme

MK24 ((S)-Benzofuran-2-yl-hydroxyacetonitril, 2-Phasensystem)
-Gaschromatogramme

MK28 ((S)-Benzofuran-2-yl-hydroxyacetonitril, 2-Phasensystem)
-Gaschromatogramm

MK30 (4-Brom-benzoylsäure-benzofuran-2-yl-cyano-methylester)
-¹³C
-DEPT135
-¹H
-Elementaranalyse

MK32 (Essigsäure-benzofuran-2-yl-cyano-methylester)
-¹³C
-DEPT135
-¹H
-Gaschromatogramm

MK33 (5-Methyl-2-furfural)
-¹³C
-DEPT135
-¹H
-Vergleichs-NMR ¹³C & ¹H
-Gaschromatogramm

MK34 (Hydroxy-(5-methyl-furan-2-yl)-acetonitril)
-¹³C
-DEPT135
-¹H
-Gaschromatogramm

MK35 (Essigsäure-cyano-(5-methyl-furan-2-yl)-methylester)
-¹³C
-DEPT135
-¹H
-Gaschromatogramme

6. Literatur

1. J. Brussee, A. van der Gen, *Stereoselective Biocatalysis*, Marcel Dekker Inc., New York-Basel, **2000**, 289-320
2. F. Effenberger, *Stereoselective Biocatalysis*, Marcel Dekker Inc., New York-Basel, **2000**, 321-342
3. R. Gregory, *Chem. Rev.*, 99, **1999**, 3649-3682
4. M. Zaidlewicz, A. Chechlowska, A. Prewysz-Kwinto, A. Wojtczak, *Heterocycles*, 55, **2001**, 569-577
5. F. Effenberger, J. Jäger, *J.Org.Chem.*, 62, **1997**, 3867-3873
6. S. Hashmi, T. Frost, J. Bats, *Organic Lett.*, 3, **2001**, 3769-3771
7. H. Langhals, S. Pust; *Chem.Ber.*, 118, **1985**, 4674
8. C. Kobler, *Vorläufige Ergebnisse der Dissertation*, Universität Stuttgart, **2002**
9. E. Smitskamp-Wilms, J. Brussee, A. van der Geen, G. van Scharrenburg, J. Slothaak; *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 110, **1991**, 209-215
10. R. Harbort, *Vorläufige Ergebnisse der Dissertation*, Universität Stuttgart, **2002**
11. M. Burk, W. Hems, D. Herzberg, C. Malan, A. Zanotti-Gerosa, *Organic Lett.*, 2, **2000**, 4173-4176
12. H. Bühler; *Dissertation, Optimierung der (S)-Hydroxynitril Lyase aus Manihot esculenta durch gezielte Mutationen*, *179*, **2000**, Universität Stuttgart
13. R. Harbort; *Arbeitsbericht No.1, Materialien zur ersten Synthese von (3E)(2R)-1-Aminotridec-3-en-2-ol. Marine Naturstoffe durch Biokatalyse*, **2001**, *13*
14. H. Bühler; *Dissertation, Optimierung der (S)-Hydroxynitril Lyase aus Manihot esculenta durch gezielte Mutationen*, *162-163*, **1999**, Universität Stuttgart
15. V. Traynelis, J. Miskel, J. Sowa; *J. Org. Chem.*, 22, **1957**, 1269-1270