E. Kamandi *), A.W. Frahm und F. Zymalkowski

Die Synthese von β-Phenyl-isoserinen durch Ammonolyse von β-Phenyl-glycidestern, I.

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn, der Faculty of Science, Kabul University und dem Department of Medical Sciences, Bangkok.

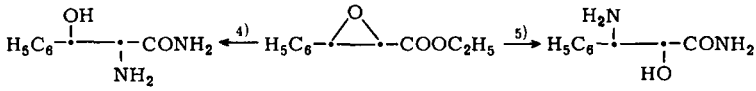
(Eingegangen am 26. März 1974).

Durch Ammonolyse von trans-Phenylglycidester entsteht in einer $S_{N}2$-Reaktion erythro-β-Phenyl-isoserin-amid, aus cis-β-Phenylglycidester die entsprechende threo-Verbindung. Da cis-β-Phenylglycidester in reiner Form schwer zugänglich sind, wurde für threo-β-Phenyl-isoserin eine zweite, eindeutig verlaufende Synthese entwickelt.

Synthesis of β-Phenyl-isoserines by Ammonolysis of β-Phenylglycidates, I.

Erythro-β-phenylisoserinamide is formed by ammonolysis of trans-ethyl-β-phenylglycidate; threo-β-phenylisoserine-amide is obtained in the same way from cis-ethyl-β-phenyl-glycidate. Since purification of the cis-glycidate is rather difficult, a second synthesis of threo-β-phenyl-isoserine has been developed.

L-threo-β-Phenylserin hemmt das Wachstum von Influenza-Viren[1)2)] und verkleinert die Absterberate tollwutinfizierter Ratten[3)]. *Martynow* und *Ol'man*[4)] berichten, daß die Ammonolyse von β-Phenyl-glycidester zum Amid des β-Phenylserins (**1**) führt, während *Fourneau* und *Billeter*[5)] auf die gleiche Weise β-Phenyl-iso-serinamid (**2**) erhalten haben wollen:



1 **2**

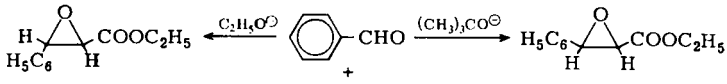
Auch sonst steckt die Literatur voller Widersprüche - unbestritten sind lediglich Hinweise, daß die Aminolyse des Oxiranrings eine $S_{N}2$-Reaktion ist und daß aus cis-Glycidestern threo-Verbindungen entstehen, aus trans-Glycidestern erythro-Verbindungen.

Ziel dieser Arbeit war nicht nur die Ausräumung der genannten Widersprüche, sondern vor allem die Suche nach eindeutig verlaufenden, selektiven Synthesen von threo- und erythro-β-Phenylserinen und -isoserinen. Ein Vergleich der Wirkungsstärken - ev. nach Spaltung in die optischen Isomere und Bestimmung der absoluten Konfiguration - sollte Einblicke in die sterischen Voraussetzungen gewähren, die innerhalb dieser Stoffklasse für eine viruzide Wirkung gegeben sein müssen.

* Teile der Dissertation von *E. Kamandi*, Bonn 1974.

1 L. Dickinson und M.J. Thompson, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy *12*, 66 (1957).
2 W.D. Kundin und M.L. Robbins, Virology *15*, 164 (1961).
3 M.W. Pons und W.S. Preston, Virology *15*, 164 (1961).
4 V.F. Martynow und G. Ol'man, J. allg. Chem. *27*, 1881 (1957); C.A. *52*, 4595a.
5 E. Fourneau und J.B. Billetier, Bull. Soc. Chim. France *7*, 593 (1940).

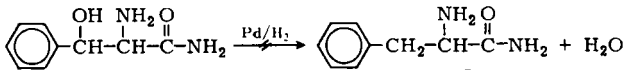
Synthetisiert man Glycidester nach der *Darzens*-Methode[6], entscheiden Lösungsmittel und Katalysator über den sterischen Verlauf der Reaktion: In Äthanol mit Natriumäthanolat als Katalysator werden reine trans-Glycidester 3[7] erhalten. Mit Kalium-tert.-butanolat in Dimethyl-formamid entstehen Gemische aus cis-4 und trans-Glycidester[8], in denen die cis-Form überwiegt, aber nur durch mehrfaches Fraktionieren abgetrennt werden kann. Das Trennergebnis läßt sich NMR-spektroskopisch verfolgen. Wie erhielten nach zehnfacher Fraktionierung eines solchen Gemisches cis-β-Phenylglycidsäure-äthylester in 97 proz. Reinheit. Nach der *Darzens*-Methode sind also trans-Phenylglycidester leicht, reine cis-Phenylglycidester nur bedingt zugänglich.



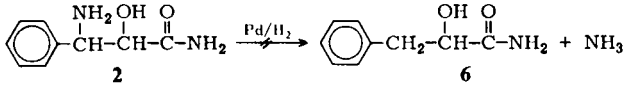
3 4

Die Ammonolyse von trans- und cis-β-Phenyl-glycidsäure-äthylester verläuft über die Zwischenstufe der Glycidsäureamide. Erhalten werden zwei diskrete β-Phenyl-hydroxy-aminopropionsäure-amide, die sich mit Bariumhydroxid verseifen lassen. Eine eindeutige Zuordnung zur Serin- oder Isoserin-Reihe auf Grund von NMR-Spektren ist ohne Vergleichsspektren weder bei den Amiden noch bei den Säuren möglich. Ebenso wenig erlauben die IR-Spektren oder Unterschiede im Verhalten bei spezifischen Farb- bzw. Komplexierungs-Reaktionen[9] eine sichere Entscheidung. Auch Abbaureaktionen haben die anfangs erwähnten Widersprüche nicht verhindern können, möglicherweise ist ihre Aussagekraft durch unbeabsichtigte Eliminierungs-Additionsreaktionen, Umlagerungen und Hydraminspaltungen geringer als angenommen.

Grundsätzlich hätte eine Unterscheidung zwischen Serin- und Isoserin-Struktur auch durch Hydrogenolyse mit Palladium/Wasserstoff möglich sein sollen:



1 5



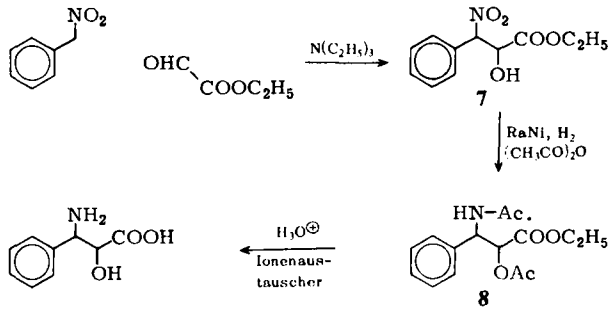
2 6

6 O. Bayer, Houben-Weyl, VII/1, 326–29 (1954).
7 M.S. Neumann und B.J. Magerlein, Org. Reactions *5*, 413–49 (1949).
8 L. Field und G. Caslile, J. Org. Chemistry *26*, 3170 (1961).
9 B. Kakac und Z.J. Vejdelek, Handbuch der Kolorimetrie Bd. III, S. 6–20, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1966.

Wie das Formelbild zeigt, sollte Phenylserinamid (**1**) das basische Phenylalaninamid (**5**) ergeben, Phenyl-iso-serinamid (**2**) das nicht mehr basische Phenylmilchsäureamid (**6**). Leider gelangen diese Hydrogenolysen weder mit den freien Verbindungen **1** und **2** noch mit ihren Acetylierungsprodukten, obwohl bei vielfach bewährten Versuchsbedingungen gearbeitet wurde. Bemerkenswert war lediglich, daß sich die aus trans-Phenylglycidester erhaltene erythro-Verbindung unter denselben Bedingungen O,N-diacetylieren ließ, unter denen die aus dem cis-Ester gewonnene threo-Verbindung nur N-monoacetyliert wurde.

Die Zuordnung unserer Ammonolyseprodukte mußte also durch unabhängige Synthese aller in Frage kommenden Reaktionsprodukte erfolgen. Wir erhielten:

1) threo-β-Phenyl-serin durch *Erlenmeyer*-Synthese in der Ausführung von *Shaw* und *Fox*[10],
2) erythro-β-Phenyl-serin durch die von *Pines* und *Kozlowski*[11] beschriebene Variante der *Erlenmeyer*-Synthese. In beiden Fällen ist die Serinstruktur durch die Synthese aus Glycin und Benzaldehyd abgesichert. Wir überzeugten uns davon, daß ein partieller, oxidativer Abbau Mandelsäure liefert[12].
3) threo- und erythro-β-Phenyl-isoserin entstehen in einer eindeutig verlaufenden Reaktionsfolge, wenn man von Phenylnitromethan und Glyoxylsäure-äthylester ausgeht. Unter Triäthylamin-Katalyse bildet sich zunächst das aldolartige Additionsprodukt β-Phenyl-β-nitro-α-hydroxy-propionsäureäthylester (**7**), das durch Raney-Nickel in Acetanhydrid zu β-Phenyl-β-acetamino-α-acetoxypropionsäureäthylester (**8**) hydriert wird. **8** wird mit verd. Salzsäure verseift; die Isolierung von β-Phenylisoserin aus dem Hydrochlorid erfolgt am besten über einen Ionenaustausch.

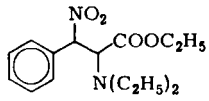


7 fällt als Isomerengemisch an, in dem die threo-Form mengenmäßig stark überwiegt; sie kann durch fraktionierte Kristallisation mühelos von der erythro-Form abgetrennt werden. Bei den anschließenden Reaktionsschritten bleibt die threo-Konfiguration er-

10 K.N.F. Shaw und S.W. Fox, J. Amer. chem. Soc. *75*, 3421 (1953).
11 S.H. Pines und M.A. Kozlowski, J. Org. Chemistry *37*, 292 (1972).
12 K. Vogler, Helv. Chim. Acta *33*, 2115 (1950).

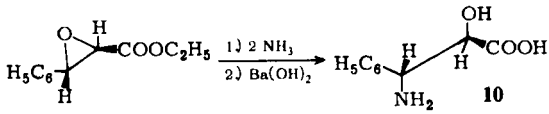
halten. Im übrigen macht auch die Trennung von threo- und erythro-β-Phenyl-isoserin (**10**) keine Schwierigkeiten; man kann also die ganze Synthese ebenso gut mit dem primär erhaltenen Isomerengemisch von 7 durchführen.

Katalysiert man die Umsetzung von Phenylnitromethan und Glyoxylsäure-äthylester mit Diäthylamin, entsteht anstelle von 7 die Mannichbase β-Phenyl-β-nitro-α-diäthylamino-propionsäure-äthylester (**9**):

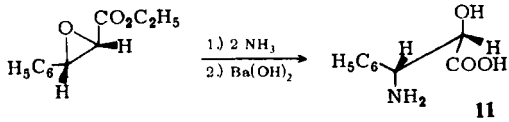


9

Im Besitz der vier Vergleichssubstanzen konnten wir nun auf mehrfache Weise eindeutig feststellen, daß durch Ammonolyse von trans-β-Phenylglycidsäure-äthylester und anschließende Verseifung erythro-β-Phenyl-isoserin (**10**) und aus dem cis-Ester entsprechend threo-β-Phenyl-isoserin (**11**) entsteht.



10



11

Das erste Kriterium war die Übereinstimmung der Schmelzpunkte und Mischschmelzpunkte der korrespondierenden Substanzpaare. Eine zweite Zuordnungsmöglichkeit ergab die Papierchromatographie.Die Entwicklung erfolgte mit Butanol/Wasser/Aceton/konz. Ammoniak 4 : 3 : 1 : 1 (obere Phase), Anfärben mit Ninhydrin.

PC von:

threo-β-Phenylisoserin **11**	Rf-Wert:	0,58
erythro-β-Phenylisoserin **10**	Rf-Wert:	0,28
threo-β-Phenylisoserin **12**	Rf-Wert:	0,43
erythro-β-Phenyl-serin **13**	Rf-Wert:	0,28

Die beiden erythro-Verbindungen **10** und **13** lassen sich zwar in diesem System nicht trennen, können aber auf Grund unterschiedlicher Färbungen mit Ninhydrin

leicht zugeordnet werden, wenn sie in reiner Form vorliegen. Die durch Schmelzpunktvergleich getroffene Zuordnung wurde pc bestätigt.

Schließlich gelang auch noch eine NMR-spektroskopische Absicherung der Isoserinstruktur unserer Ammonolyseprodukte. In Abb. 1 sind die Spektren von erythro-β-Phenyl-serin (**13**) und erythro-β-Phenyl-isoserin (**10**) (aus trans-β-Phenyl-glycidsäure-äthylester), aufgenommen in deuterierter Trifluoressigsäure, skizziert.

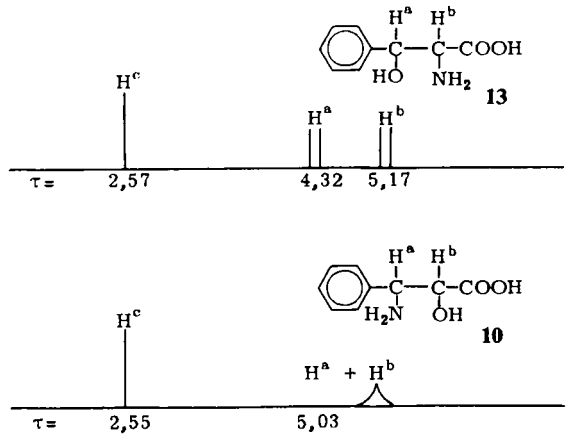


Abb. 1: NMR-Spektren von **13** und **10**

Während in **13** H^a (τ = 4,32) gegenüber H^b (τ = 5,17) deutlich nach tieferem Feld hin verschoben ist, was durch den größeren "deshielding effect" der OH-Gruppe im Vergleich zur Aminogruppe auch zu erwarten ist und zu zwei getrennt liegenden Dubletts der Koppelkonstante J = 4,5 Hz führt, erscheinen im Spektrum von **10** H^a und H^b gemeinsam singulettartig (bei τ =

Tab. 2: NMR-Signale von **10, 11, 12** und **13**

Proton	Lösungsm.	**11**	**10**	**12**	**13**
H^a		5,83	5,87	5,15	5,16
H^b	n/10	5,95		6,61	6,49
H^c	NaOD	2,67	2,70	2,61	2,65
J_{H^a/H^b}		4 Hz		5 Hz	6 Hz
H^a	CF_3COOD/D_2O		5,16	4,39	4,41
H^b		5,13	5,00	5,63	5,37
H^c		2,50	2,57	2,51	2,58
J_{H^a/H^b}			5 Hz	3 Hz	4 Hz

5,03). Dies ist dadurch zu erklären, daß in **10** durch den Tausch OH-gegen NH_2-Gruppe H^b leicht paramagnetisch und H^a diamagnetisch verschoben werden, was zu einer Überlagerung der Signale führt. Bei den Amiden von **13** und **10** ergibt sich das gleiche Bild. Somit ist die Isoserinstruktur der Ammonolyseprodukte von cis- und trans-β-Phenyl-glycidsäure-äthylester auch NMR-spektroskopisch bewiesen und überdies ein Anhaltspunkt gegeben, wie - zumindest bei Verbindungen mit primärer Aminogruppe - die β-Phenyl-serin- und -isoserin-Struktur NMR-spektroskopisch zu unterscheiden sind. Tab. 2 gibt eine vollständige Übersicht über die NMR-Signale der vier fraglichen Verbindungen. Wie daraus ersichtlich wird, fallen die Signale von H^a und H^b auch im Spektrum des threo-β-Phenyl-isoserins (**11**) zusammen oder liegen je nach Lösungsmittel eng benachbart.

Damit dürfte geklärt sein, was mehrfach behauptet, aber noch in jüngerer Zeit wiederholt bestritten wurde: Durch Ammonolyse von β-Phenylglycidestern entstehen Isoserine.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemie für die Unterstützung dieser Arbeit durch Sachbeihilfen.

Beschreibung der Versuche

Schmp. wurden mit dem Apparat nach *"Tottoli"* ermittelt und sind nicht korrigiert. Zur Aufnahme der NMR-Spektren diente ein Varian-A60-Spektrometer (TMS: $\tau = 10$).

Das N,N-Dimethylformamid für die Darstellung des cis-β-Phenylglycidsäureäthylesters wurde mit Benzol versetzt, destilliert, anschließend über Bariumoxid getrocknet und unter Stickstoff i. Vak. redestilliert.

cis-β-Phenylglycidsäureäthylester (**4**):

Zu einer Lösung von 0,3 mol Kalium-tert.-butylat in 300 ml Dimethylformamid wird bei 27° ein Gemisch aus 0,3 mol Benzaldehyd und 0,3 mol Chloressigsäureäthylester unter Rühren zugetropft. Nach üblicher Aufarbeitung und einmaliger Destillation liegt ein Gemisch aus 60 % cis- und 40 % trans-β-Phenylglycidsäureäthylester vor. (Integrationsverhältnis der beiden CH_3-Tripletts im NMR-Spektrum ($CDCl_3$)). Durch zehnmalige Fraktionierung über eine 75 cm-Vigreux-Kolonne wird cis-Glycidester in über 97 proz. Reinheit erhalten. $Sdp._{2,5}$: = 120–124°, n_D^{25} = 1,5163. (Lit.: [8], $Sdp._{0,7}$: = 78,5°, n_D^{25} = 1,5097).

threo-β-Phenyl-isoserinamid:

Eine Lösung von 10,0 g (0,05 mol) **4** in 150 ml abs. Äthanol wird bei -15° mit Ammoniak gesättigt und anschließend in einem Rührautoklaven 3 Std. auf 100° erhitzt. Nach Abstellen der Heizung wird noch 12 Std. weitergerührt, zur Trockne eingedampft und der feste Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Man erhält 9,0 g (96 %) threo-β-Phenyl-isoserinamid in farblosen Nadeln vom Schmp. 187–188°.

$C_9H_{12}N_2O_3$ (180,1); Ber.: C 60,01, H 6,67, N 15,55; Gef.: C 59,95, H 6,74, N 15,65.

threo-β-Phenyl-isoserin (11)

a) 1,0 g (5,6 mmol) threo-β-Phenyl-isoserinamid wird mit 1,77 g Bariumhydroxid-octahydrat in 10 ml Wasser 8 Std. unter Rückfluß gekocht. Die abgekühlte Reaktionslösung wird mit 0,55 g konz. Schwefelsäure versetzt, das abgeschiedene Bariumsulfat abfiltriert und die Mutterlauge auf 2/3 ihres Vol. eingeengt, worauf 11 in farblosen Nadeln auskristallisiert. Ausb.: 0,8 g (78 %), Schmp. 265°.

$C_9H_{11}NO_3$ (181,1); Ber.: C 59,66, H 6,07, N 7,73. Gef.: C 59,21, H 6,09, N 7,58.

b) 0,7 g (2,4 mmol) threo-β-Phenyl-β-acetamino-α-acetoxy-propionsäureäthylester (8, threo-Form) werden mit 7 ml 10 proz. Salzsäure 14 Std. bei Raumtemp. belassen und anschließend 30 Min. zum Sieden erhitzt, wobei eine klare Lösung entsteht. Es wird zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit 10 ml Wasser versetzt und erneut eingedampft.Nach Aufnahme in verd. Essigsäure wird die freie Aminosäure mit Hilfe eines Anionenaustauschers (DEAE Sephadex A-25) isoliert und aus Wasser/Aceton umkristallisiert. Ausb.: 410 mg (95 %), Schmp.: 265°. Der Mischschmp. mit dem nach a) gewonnenen Produkt zeigt keine Depression.

threo-β-Phenyl-β-nitro-α-hydroxypropionsäureäthylester (7), *(threo-Form)*

10,0 g (0,07 mol) Phenylnitromethan, 9,0 g (0,15 mol) Glyoxylsäureäthylester und 1,0 g (0,02 mol) Kaliumhydroxid werden in 20 ml abs. Äthanol gelöst, 60 Min. auf 60° erwärmt und anschließend bei Raumtemp. stehen gelassen. Nach 24 Std. wird von einer geringen Menge eines farblosen Niederschlags abfiltriert, das Filtrat eingedampft, der zähflüssige Rückstand in Chloroform aufgenommen und über eine Kieselgelsäule filtriert. Nach dem Einengen werden 15,7 g (90 %) des Produktes in gelben Kristallen erhalten. Der Schmp. einer zweimal aus Diisopropyläther/Petroläther umkristallisierten Probe liegt bei 89–91°.

$C_{11}H_{13}NO_5$ (239,2). Ber.: C 55,64, H 5,44, N 5,85. Gef.: C 55,63, H 5,56, N 5,75.

threo-β-Phenyl-β-acetamino-α-acetoxy-propionsäure-äthylester (8), *(threo-Form):*

7,0 g (0,03 mol) threo-β-Phenyl-β-nitro-α-hydroxypropionsäure-äthylester (7) werden langsam und unter Schütteln zu einem Gemisch von 0,85 ml Pyridin und 40 ml Acetanhydrid gegeben und mit Raney-Nickel bei 25–30 atü und 80–90° bis zur Beendigung der Wasserstoffaufnahme hydriert. Danach wird der Katalysator abfiltriert, überschüssiges Acetanhydrid abgezogen, der Rückstand in Chloroform gelöst und über eine Säule von 250 g Kieselgel filtriert. Nach Abdampfen des Chloroforms hinterbleibt ein flüssiger Rückstand, der sofort in 50 ml Äther aufgenommen, dann tropfenweise mit Petroläther bis zur beginnenden Trübung versetzt und im Kühlschrank aufbewahrt wird. Die nach 14 Std. ausgefallenen Kristalle werden abgesaugt, die Mutterlauge eingedampft, die verbleibende Flüssigkeit in Diisopropyläther aufgenommen und erneut in den Kühlschrank gestellt. Eine erneute kristalline Abscheidung wird mit der ersten vereinigt; die Gesamtausbeute beträgt 6,5 g (75 %), Schmp. 127–128°.

$C_{15}H_{19}NO_5$ (293,3). Ber.: C 61,43, H 6,48, N 4,74 O 27,30. Gef.: C 61,80, H 6,43, N 4,77, O 27,23.

erythro-β-Phenyl-isoserinamid

a) Analog threo-β-Phenyl-isoserinamid aus 5 g (0,025 mol) trans-β-Phenylglycidsäureäthylester in 80 ml Äthanol. Man erhält 3,5 g (82 %) erythro-β-Phenyl-isoserinamid vom Schmp. 188–191° (Lit.:[5] 198–200°).*)

b) Die identische Substanz erhält man bei Nacharbeiten der Vorschrift von *Martynow* und *Ol'man*[4] (von den Autoren irrtümlicherweise als β-Phenylserinamid, Schmp. 188–190°, bezeichnet).

* Der in der Lit. [5] angegebene Schmp. von 198–200° konnte nicht reproduziert werden.

erythro-β-Phenyl-isoserin (10)

a) 1,0 g (5,6 mmol) erythro-β-Phenyl-isoserinamid wird mit 1,77 g Bariumhydroxid-octahydrat in 10 ml Wasser 8 Std. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen versetzt man mit der berechneten Menge (0,55 g) konz. Schwefelsäure, filtriert das gebildete Bariumsulfat ab und engt das Filtrat auf 2/3 seines Vol. ein. 10 kristallisiert in der Kälte aus. Ausb.: 0,86 g (83 %), Schmp.: 205–208°.

$C_9H_{11}NO_3$ (181,1). Ber.: C 59,66, H 6,08, N 7,73. Gef.: C 59,46, H 6,18, N 7,70.

b) Nach Einengen der bei der Darstellung von threo-β-Phenyl-β-nitro-α-hydroxypropionsäure-äthylester 7 verbleibende Mutterlauge erhält man 1,3 g eines Gemisches, das zu etwa 90 % die erythro-Form von 7 enthält und analog hydriert und verseift wird. Anschließend läßt sich durch fraktionierte Kristallisation aus Wasser/Aceton das erythro-Isomer isolieren. Ausb.: 0,625 g (84 %). Der Mischschmp. mit dem nach a) gewonnenen Produkt zeigt keine Depression.

threo-β-Phenyl-β-nitro-α-diäthylaminopropionsäureäthylester (9)

4,0 g (0,03 mol) Phenylnitromethan werden mit 2,8 g (0,03 mol) Glyoxylsäureäthylester versetzt, nach Zugabe von 0,5 ml Diäthylamin in 8 ml Äthanol gelöst und zunächst 36 Std. im Kühlschrank, anschließend 24 Std. bei Raumtemp. aufbewahrt. Das kristalline Produkt kristallisiert man mehrmals aus Methanol um. 1,2 g (14,6 %) in farblosen Nadeln vom Schmp. 125°.

$C_{15}H_{22}N_2O_4$ (294,3). Ber.: C 61,22 H 7,48, N 9,52. Gef.: C 61,09 H 7,56, N 9,47.

Anschrift: Prof. Dr. F. Zymalkowski, 53 Bonn 1, Kreuzbergweg 26 [Ph 420]

Kurzmitteilungen

S. Ebel, B. Dobmeier, M. Fick und H. Kußmaul

Quantitative Dünnschichtchromatographie: in situ-Remissionsmessungen von Phenothiazinen

Phenothiazine spielen im modernen Arzneischatz als Psychopharmaka aber auch als Antitussiva und Antihistaminica eine bedeutende Rolle. Die Dosierung liegt bei hochwirksamen Vertretern dieser Substanzklasse oftmals unter 1 mg/Tablette, bis zu einigen mg/dosis. Zur Bestimmung in pharmazeutischen Zubereitungen eignet sich daher im besonderen Maße die direkte quantitative Remissionsmessung auf der Dünnschichtplatte. Hierbei werden eine Reihe von Eichflecken und die zu untersuchende Zubereitung nach Extraktion aufgetragen und entwickelt. Die Auswertung erfolgt aus der registrierten Remissionsgrad-Ortskurve über den quadratischen Zusammenhang zwischen Peakfläche und Konzentration[1] oder im on line-Betrieb mit der Gerätekombination: ZEISS-DC-Fotometer/INFOTRO-

1 W. Tausch, Messtechnik *80*, 38 (1972).