

Zur stereoselektiven Synthese und Analytik von R,S- und S,R-N-[1-(Ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-alanin

On the Synthesis and Analysis of R,S- and S,R-N-[Ethoxycarbonyl]-3-phenylpropyl]-alanine

Jochen Lehmann*, Anja Radwansky und Christoph Thomas

Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn, An der Immenburg 4, D-53121 Bonn

Eingegangen am 25. März 1994

Die N-[1-(Ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]alanyl-Seitenkette ist in ihrer S,S-Konfiguration ein wesentlicher Bestandteil von handelsüblichen (Enalapril, Ramipril, Quinapril) oder in der Entwicklung befindlichen (z.B. Moexipril) ACE-Hemmern. Die Synthese und pharmakologische Prüfung von Stereoisomeren dieser S,S-konfigurierten ACE-Hemmer erfordert in jedem Falle die Vorabsynthese aller Stereoisomere der Titelverbindung 4. Wir berichten hiermit über die Darstellung von R,S- und S,R-4 und über analytische Methoden zur Bestimmung der Diastereomerenreinheit.

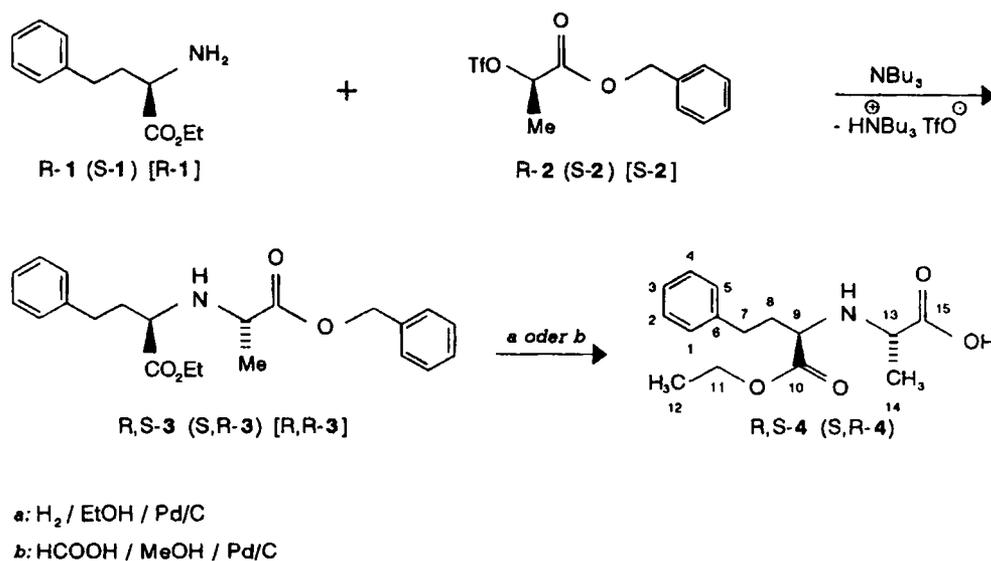
Urbach und Henning¹⁾ beschreiben die Synthese von 4 durch Umsetzung von S- bzw. R-Alanin-benzylester mit den Triflats von racemischen oder enantiomerenreinen 2-Hydroxy-4-phenyl-buttersäure-ethylestern, deuten in einer Patentanmeldung²⁾ aber auch die Möglichkeit zur Umkehrung dieser Rollenverteilung an. In Anlehnung daran setzen wir R-Homophenylalanin-ethylester (R-1) mit dem Triflat von R-Milchsäure-benzylester (R-2) um. Die Reaktion verläuft unter Inversion am chiralen Zentrum in 2 und liefert R,S-3, das zu R,S-4 debenzyliert werden konnte. Entsprechend führten S-1 und S-2 zu S,R-4.

Drei Methoden erwiesen sich als geeignet, die Diastereomerenreinheit von 4 zu beurteilen.

1. NMR: In CDCl₃ (nicht [D₆]DMSO) zeigen ¹H-Spektren hinreichender Auflösung Dubletts für die Methylgruppe des Alanins (Tab. 1), die in Diastereomerenmischungen einwandfrei selektiv zu integrieren sind. In ¹³C-Spektren eignen sich hierfür die Signale für C-9 und C-14 (Tab. 2). Messungen mit exakten Gemischen von R,S-4 und S,S-4 führen bei diesen Signalen tatsächlich zu entspr. Integrationsverhältnissen, d.h. der Kern-Overhauser-Effekt ist für die genannten Atome annähernd gleichartig. Sowohl ¹H- als auch ¹³C-Spektren eignen sich somit zur Diastereomeren-Analytik innerhalb der Erfassungsgrenzen. Mit dieser Einschränkung erwiesen sich R,S- und S,R-4 nach Umkristallisation als diastereomerenrein.

2. HPLC: Wie der Originalausdruck eines Gemischchromatogramms (Abb. 1) zeigt, kann mit einer RP18-Säule (nähere Angaben s. Exp. Teil) S,S- von R,S-4 hinreichend getrennt und quantifiziert werden. Nach Umkristallisation wurden bei R,S- und S,R-4 keine begleitenden Diastereomerenpeaks gefunden.

3. GC: Auf der Stufe der Benzylester 3 ist eine GC-Analytik möglich. Um sie zu entwickeln, wurde auch R,R-3 nach Schema 1 dargestellt. Der R,R-3-Peak erscheint deutlich getrennt vom R,S-Peak. Abb. 2 zeigt das Originalchromatogramm einer definierten Mischung mit kleinem



Schema 1

Tab. 1: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von *R,S*-4 und *S,S*-4 (300 MHz, CDCl_3)

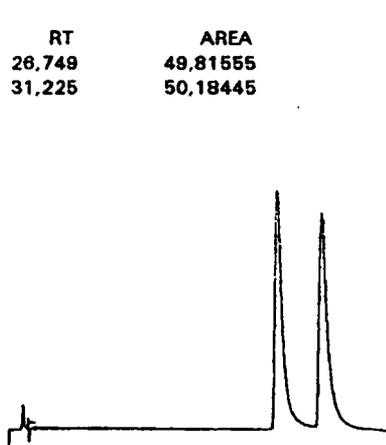
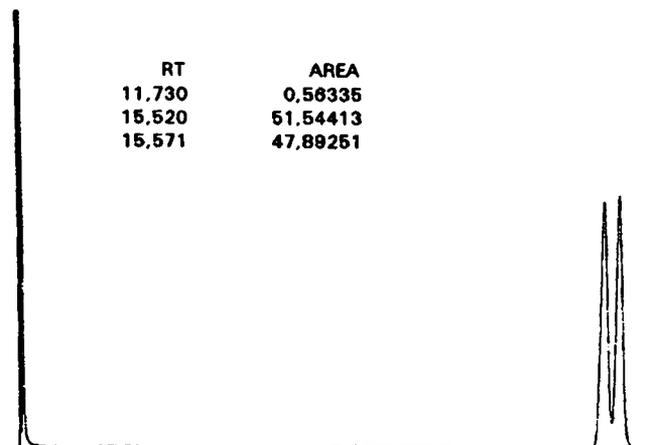
Verschiebung [ppm]		Multiplizität		Anzahl	Zuordnung	Kopplungs-konstanten	
R,S	S,S	R,S	S,S			R,S	S,S
7,30-7,15	7,29-7,10	m	m	5	aromat. H		
6,95-6,55	6,85-6,25	s, br.	s, br.	2	NH/OH		
4,170	4,201	2x dq	q	2	O-CH ₂ -Me	7,3*	7,1
3,615	3,547	t	t	1	CH ₂ -CH	6,3	6,4
3,438	3,390	q	q	1	CH-Me	7,1	7,0
2,733	2,696	2x dt	t	2	CH ₂ -CH ₂ -Ph	7,2 13,7	8,4
2,182	2,21-1,97	m	m	2	CH ₂ -CH ₂ -Ph		
1,432	1,458	d	d	3	CH-CH ₃	7,1	7,2
1,262	1,283	t	t	3	O-CH ₂ -CH ₃	7,2	7,2

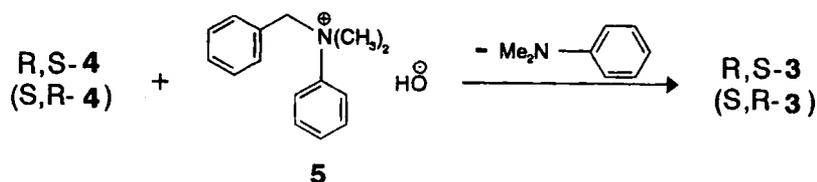
* geminale Kopplungskonstante nicht zu bestimmen.

Tab. 2: $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von *R,S*-4 und *S,S*-4 (75,433 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$)

Atom [Nr.]	Verschiebung [ppm]		Atom [Nr.]	Verschiebung [ppm]	
	R,S-12	S,S-12		R,S-12	S,S-12
1/5	128,17*	128,15*	10	173,84	173,95
2/4	128,18*	128,19*	11	59,96	60,02
3	125,64	125,75	12	14,07	14,01
6	141,35	141,40	13	54,30	54,07
7	31,04	31,22	14	18,47	18,70
8	34,50	34,35	15	175,55	175,51
9	58,07	58,45			

* Zuordnung nicht eindeutig

Abb. 1: HPLC von *R,S*-4 + *S,S*-4 (1:1)Abb. 2: GC von 51,7% *R,R*-3 + 48,3% *R,S*-3



Schema 2

Nebenproduktpeak. Die Analyse 10 verschiedener R,S-/R,R-3-Mischungen zeigte, daß berechnete und gemessene Werte sehr gut auf einer Geraden korrelieren. Auch mit den Zielverbindungen 4 sollte eine gc Analytik nach Derivatisierung möglich sein. MSTFA führte zu gc zersetzlichen Produktgemischen, praktisch quantitativ und nebenproduktfrei verläuft dagegen eine Rebenzylierung mit N-Benzyl-N,N-dimethylanilinium-hydroxid (5) (Schema 2).

Diastereomeren- und Enantiomerenreinheit der Syntheseprodukte R,S- und S,R-4

Die empfindlichste Methode zur Beurteilung der Diastereomerenreinheit ist die GC der Benzylester. In ungereinigtem R,S-3 und S,R-3 wurden hierbei jeweils eine Verunreinigung durch 2.9% R,R/S,S-3 gefunden. Da alle käuflichen Edukte (Homophenylalanin, Milchsäure und Milchsäureester) laut Herstellerangaben ca. 1.5% des anderen Enantiomers enthalten, ist bei absol. Stereoselektivität rechnerisch ein Wert von 2.96% zu erwarten. Letztere wird somit bestätigt. Chromatographische Reinigung erniedrigt die diastereomere Verunreinigung auf < 1%. In umkristallisiertem R,S- bzw. S,R-4 wurden wie bereits erwähnt, durch HPLC und in NMR-Spektren keine diastereomeren Verunreinigungen gefunden.

Enantiomerengemische können bei der Synthese von 4 nur resultieren, wenn an den chiralen C-Atomen von 1 und 2 synchron eine Konfigurationumkehr erfolgt. Da sie nicht einmal an einem C-Atom beobachtet wird, ist dies auszuschließen und die in Schema 1 vorgestellte Synthese als streng diastereo- und enantioselektiv zu bezeichnen.

Wir danken der Firma Schwarz Pharma, Monheim, für finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung von S,S-4.

Experimenteller Teil

Allgemeine Angaben: Alle Lösungsmittel für Arbeiten unter Inertbedingungen wurden frisch destilliert und über Molsieb 4 Å getrocknet. IR: Perkin-Elmer 1420. ¹H- und ¹³C-NMR: Bruker WH 90 (90 MHz), Bruker XC 200 (200 MHz), Varian XL 300 (300 MHz). GC: Hewlett Packard HP 5890 Series II, 30 m x 0.25 mm Säule DB-5 (J&W Scientific), Trägergas H₂, FID, Integrator HP 3396 Series II, Temperaturprogramm: Injektor 200°C, Detektor 250°C, Starttemp. 50°C, 5 min, dann Gradient 20°C/min, Endtemp. 250°C, 5 min. HPLC: Consta Metric 3200 (LDC-Analytical) mit Spherisorb 5 ODS 2 in der Vor- (20 x 4 mm) und der Hauptsäule (250 x 4 mm), UV-Detektor Spectro Monitor 3200 (LDC-Analytical), Integrator HP 3396 Series II, Eluent: Phosphatpuffer pH 2.5 (11.46 g NaH₂PO₄ und 2.50 ml H₃PO₄ 85proz., Aqua bidest. ad 1000 ml), 2.0 mg Probe in 7.5 g Eluent gelöst, Probenmenge 20 µl, Flußrate: 1.4 ml/min, Säulentemp. 20-25°C.

S-(+)-Homophenylalanin-ethylester (S-1)

Darstellung des Hydrochlorids nach Lit.³⁾ aus 23.0 g (0.128 mol) S-(+)-Homophenylalanin und EtOH/HCl. Zur Freisetzung der Base wird in 800 ml Et₂O aufgeschlämmt, mit 200 ml einer ges. Na₂CO₃-Lösung, 1 x mit 200 ml, 2 x mit 50 ml Wasser gewaschen, die org. Phase über MgSO₄-Lösung, 1 x mit 200 ml, 2 x mit 50 ml Wasser gewaschen, die org. Phase über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingedampft: gelbliches Öl, das destillativ gereinigt werden kann und dann bei -20°C farblos kristallisiert. Ausb. 22.5 g (84.9%), Sdp._{0.02} 86°C, Schmp. -1°C. $[\alpha]_D^{23}$: +35.0 (c = 1.00 g/100 ml EtOH). IR (KBr, Film): 3370; 2970; 2920; 1730; 1720; 1490; 1450; 1250; 1180; 1025; 740; 695 cm⁻¹. ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.27 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₃), 1.4-1.7 (bs, 2H, NH₂), 2.18-1.73 (m, 2H, CH-CH₂), 2.72 (mc, 2H, CH₂Ph), 3.43 (mc, 1H, CH), 4.16 (q, J = 7 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 7.10-7.35 (m, 5H, Ph).

R-(-)-Homophenylalanin-ethylester (R-1)

Darstellung analog S-1. $[\alpha]_D^{23}$: -34.2 (c = 1.00 g/100 ml EtOH). Ausb. 89%. Alle anderen analytischen Daten wie S-1.

S-(-)-Milchsäure-benzylester

Variante a: Zur Darstellung des Natriumsalzes vereinigt man ges. Lösungen von 15.0 g (0.167 mol) S-Milchsäure in EtOH und 14.0 g (0.167 mol) NaHCO₃ in H₂O, dampft i. Vak. ein, schlämmt mit 50 ml DMF auf, dampft erneut ein und nimmt in 200 ml DMF auf. Diese Suspension versetzt man bei 80°C mit 19.9 ml (0.167 mol) Benzylbromid, erhitzt 1 h auf 100°C und filtriert nach Abkühlen vom NaBr ab. Das Filtrat wird eingedampft, in 300 ml Et₂O aufgenommen, erneut filtriert, eingedampft und der Rückstand destillativ gereinigt: 18.8 g (63%) farbloses Öl, das bei -20°C kristallin erstarrt. Sdp._{0.04} 79-80°C (Lit.⁴⁾; Sdp.₄ 134°C, Schmp. 16-17°C. $[\alpha]_D^{25}$: -14.3 (c = 2.030 g/100 ml CHCl₃), Lit.⁵⁾: $[\alpha]_D^{23}$: -13.5 (c = 2 g/100 ml CHCl₃). IR (KBr, Film): 3450; 2975; 1730; 1490; 1450; 1040; 950; 740 cm⁻¹. ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.42 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH₃), 2.84 (bs, 1H, OH), 4.31 (q, J = 7 Hz, 1H, CH), 5.20 (s, 2H, CH₂), 7.33 (s, 5H arom.).

Variante b: In einer Destillationsapparatur erhitzt man 59.1 g (0.50 mol) S-Milchsäureethylester und 54.1 g (0.50 mol) frisch destillierten Benzylalkohol auf 160°C und erhöht die Temp. innerhalb von 48 h auf 200°C, wobei EtOH langsam abdestilliert. Rohes Produkt geht bei Sdp.₁₅ 140-145°C über und wird dann wie oben redestilliert. Ausb. 52.8 g (59%).

R-(-)-Milchsäure-benzylester

Analog der S-Verbindung nach Variante a aus handelsüblichem R-Natriumlactat, Ausb. 68%, oder Variante b, ausgehend von R-Milchsäure-isobutylester, Ausb. 39%. $[\alpha]_D^{24}$: +13.4 (c = 2.00 g/100 ml CHCl₃), Lit.⁵⁾: $[\alpha]_D^{20}$: +13.0 (c = 2 g/100 ml CHCl₃). Alle anderen analytischen Daten wie S-(+)-Milchsäure-benzylester.

N-[1(*S*)-(Ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-(*R*)-alanin-benzylester (*S,R*-3)

Zu 1.97 ml (24.4 mmol) Pyridin in 180 ml CH₂Cl₂ gibt man unter Argon bei -40°C 3.71 ml (22.1 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid (voluminöser Niederschlag) und dann nach 5 min 3.63 g (20.1 mmol) *S*-Milchsäure-benzylester. Nach 30 min Rühren bei ca. -35°C wird vom Salz abfiltriert. Zum Filtrat (enthält nahezu reines *S*-2) tropft man unter Argon bei -60°C rasch eine Lösung von 3.73 g (20.2 mmol) Tributylamin und 3.5 g (16.9 mmol) *S*-1 in 15 ml CH₂Cl₂. Man rührt noch 2 h bei -20°C, engt i. Vak. auf 20 ml ein, versetzt mit 40 ml *n*-Hexan und reduziert erneut i. Vak. auf ca. 30 ml, wobei ein gelb-kristalliner Niederschlag auftritt. Man fügt 100 ml *n*-Hexan zu, filtriert und dampft das Filtrat vollständig i. Vak. ein. Zurück bleibt ein Öl, das gc ca. 70% *R,S*-3 enthält und zur Darstellung von *R,S*-4 eingesetzt wird. Eine Probe reines *R,S*-3 erhält man sc über Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1) als farbloses Öl, das bei Tiefkühlung erstarrt. $[\alpha]_D^{26}$: +25.3 (*c* = 1.106 g/100 ml CHCl₃).- IR (NaCl, Film): 3330; 2975; 1730; 1490; 1450; 1150; 745; 695 cm⁻¹.- ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.25 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.32 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH-CH₃), 1.7-2.2 (m, 2H, CH-CH₂), 2.2 (bs, 1H, NH), 2.70 (t, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH₂Ph), 3.26 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, CH-CH₂), 3.39 (q, *J* = 7 Hz, 1H, CH-CH₃), 4.12 (2 x dq, *J* = 6.9/11.0 Hz, 2H, OCH₂-CH₃), 5.09/5.17 (2 x d, *J* = 12 Hz, 2H, OCH₂Ph), 7.10-7.32 (m, 5H, C-C-Ph), 7.34 (s, 5H, O-C-Ph).

N-[1(*R*)-(Ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-(*S*)-alanin-benzylester (*R,S*-3)

Darstellung analog *S,R*-3 aus *R*-1 und *R*-Milchsäurebenzylester. Auf Reinsolierung wurde verzichtet.

N-[1(*R*)-(Ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-(*R*)-alanin-benzylester (*R,R*-3)

Darstellung analog *S,R*-3 aus *R*-1 und *S*-Milchsäurebenzylester. $[\alpha]_D^{24}$: +13.4 (*c* = 0.744 g/100 ml CHCl₃).- IR weitgehend identisch mit *S,R*-3.- ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): Gut erkennbare Abweichungen vom Spektrum von *S,R*-3 nur bei den Signalen δ (ppm) = 3.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH-CH₃) und 3.32 (m, 1H, CH-CH₂).

N-[1(*S*)-(Ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-(*R*)-alanin (*S,R*-4)

Variante a: In 60 ml einer Mischung von 10 ml Ameisensäure und 90 ml MeOH suspendiert man unter Argon 1 g Pd/C (20%). In den übrigen 40 ml löst man das aus 3.5 g (16.9 mmol) *S*-1 erhaltene ungereinigte *S,R*-3, rührt 2 h unter Argon, filtriert, dampft i. Vak. ein und entfernt verbleibende Ameisensäure azeotrop mit Toluol. Den öligen bis halbkristallinen Rückstand löst man in 20 ml EtOH, versetzt mit 20 ml Et₂O und läßt eine 1.

Fraktion bei -20°C auskristallisieren. Nach Absaugen wird die Mutterlauge eingeeengt, mit 3 ml EtOH/20 ml Et₂O versetzt und wieder zur Kristallisation kaltgestellt. Die vereinigten Rohprodukte kristallisiert man aus Ethylacetat, dann EtOH um. 2: 16 g (46%, ber. auf *S*-1) weißes Pulver. Schmp. 141-142°C.- $[\alpha]_D^{24}$: +25.7 (*c* = 0.979 g/100 ml MeOH).- IR (KBr): 1730; 1650; 1405; 1295; 1260; 1205; 1190 cm⁻¹.- NMR: s. Tab. 1; 2.

Variante b: Zu 2 ml Eisessig in 50 ml EtOH gibt man das aus 1.23 g (6 mmol) *S*-1 erhaltene ungereinigte *S,R*-3 und 0.30 g Pd/C (10%). In einer Parr-Apparatur hydriert man unter Rühren bei Raumtemp. 3 h bei 4 atm. (4.05 x 10⁵ Pa), filtriert vom Katalysator ab, dampft i. Vak. ein, entfernt anhaftende Essigsäure azeotrop mit Toluol und reinigt wie bei **Variante a**. Ausb. 0.68 g (40%, ber. auf *S*-1).

N-[1(*R*)-(Ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-(*S*)-alanin (*R,S*-4)

Darstellung wie *S,R*-4 aus *R,S*-3 nach Variante **a** oder **b**. Ausb. 44-48%, ber. auf *R*-1. Schmp. 142-143°C (Lit.¹): 128-130°C/136-137°C).- $[\alpha]_D^{24}$: -6.1 (*c* = 1.106 g/100 ml CHCl₃), Lit.²): $[\alpha]_D^{20}$: -25/-27.9 (*c* = 1 g/100 ml MeOH).

Analytische Benzilylierung von 4

Nach Lit.⁶) mischt man 5 g frisch destilliertes *N,N*-Dimethylamin mit 5 g Benzylchlorid, läßt mehrere Tage bei Raumtemp. stehen, saugt ab und wäscht mit trockenem Et₂O nach. 1.80 g des so gewonnenen *N*-Benzyl-*N,N*-dimethylaniliniumchlorids werden mit 1.80 g Silberoxid 2 h in 50 ml MeOH gerührt und dann filtriert. Diese ca. 0.15 molare Vorratslösung von *N*-Benzyl-*N,N*-dimethylaniliniumhydroxid kann bei -22°C über Molsieb gelagert werden. Zu 1.9 mg 4 gibt man 56 ml dieser Lösung, dampft i. Vak. ein, nimmt mit 1 ml Toluol auf, dampft wiederum ein. Diesen Rückstand löst man in 1.9 ml Toluol, erhitzt 1 h zum Sieden und untersucht gc nach Abkühlen.

Literatur

- 1 H. Urbach, R. Henning, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 1143-1146.
- 2 Hoechst AG (Erf. H. Urbach, R. Henning), Ger. Offen. DE 33 03 344 A 1 (1984); *Chem. Abstr.* **1985**, 102, 25029d.
- 3 A.L. Johnson, W.A. Price, P.C. Wong, R.F. Vavala, J.M. Stump, *J. Med. Chem.* **1988**, 44, 1596-1602.
- 4 R. Burns, D.T. Jones, P.D. Ritchie, *J. Chem. Soc.* **1935**, 400-406.
- 5 R.W. Feenstra, E.H.M. Stokkingreef, R.J.F. Nivard, H.C.J. Ottenheim, *Tetrahedron* **1988**, 44, 5583-5595.
- 6 B. Halpern, K. Williams, *Synthesis* **1974**, 10, 727-728.

[KPh628]