

Fachhochschule Aachen, Campus Jülich

Fachbereich Chemie und Biotechnologie

Studiengang Angewandte Chemie



Bachelorarbeit

vorgelegt zur Erlangung des akademischen Grades Bachelor of Science.

Selektive Reduktion von bifunktionellen aromatischen Carbonylverbindungen

vorgelegt von Eugen Huber

Matrikel-Nr. 835583

angefertigt im Biokatalyselaboratorium der
Fachhochschule Aachen, Campus Jülich

Aachen, im Februar 2014

Diese Arbeit wurde betreut von

Referent: Prof. Dr. rer. nat. G. Jeromin

Korreferent: Prof. Dr. Petra Siegert

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit ohne Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Günter Erich Jeromin, der es mir ermöglicht hat an diesem interessanten Thema zu arbeiten, für die freundliche und engagierte Betreuung und die vielen hilfreichen Gespräche und Anregungen bedanken.

Ebenfalls gebührt mein Dank Frau Prof. Dr. Petra Siegert für die Übernahme des Koreferates.

Des Weiteren danke ich den Menschen, die mich während der Arbeit fachlich und technisch unterstützen. Ich bedanke mich bei:

- Herrn Dipl.-Chem. Günter Reißmann
- Frau Dipl.-Ing. Karin Witte
- Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Scherer
- Frau Dipl.-Ing. Susanne Berzen

Bei meinen Eltern möchte ich mich für das ermöglichte, interessante Studium und für die Unterstützung, die mir die Konzentration auf diese Arbeit möglich machte, in großem Maße bedanken. Zudem bedanke ich mich bei meinen Freunden, die mich während dieser Zeit unterstützten und begleiteten.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
2	Theoretischer Teil	2
2.1	Reduktion	2
2.1.2	Chemische Reduktion	2
2.1.3	Enzymatische Reduktion	2
2.1.4	Chiralidon R und Chiralidon S	4
3	Praktischer Teil	5
3.1	Reduktion von 4-Acetylbenzaldehyd	5
3.1.1	Umsetzung mit Chiralidon R	7
3.1.1.1	Ergebnisse	7
3.1.2	Umsetzung mit Chiralidon S	9
3.1.2.1	Ergebnisse	10
3.1.3	Diskussion	12
3.1.4	Enantioselektivität von Chiralidon R und S	13
3.1.5	Strukturaufklärung	16
3.2	Reduktion von 3-Acetylbenzaldehyd	21
3.2.1	Chiralidon R	22
3.2.1.1	Ergebnisse	22
3.2.2	Chiralidon S	24
3.2.2.1	Ergebnisse	24
3.2.3	Diskussion	26
3.2.4	Enantioselektivität von Chiralidon R und S	27
3.2.5	Strukturaufklärung	29
3.3	Reduktion von 2-Acetylbenzaldehyd	31
3.3.1	Chiralidon R	31
3.3.1.1	Ergebnisse	31
3.3.2	Chiralidon S	33
3.4	Reduktion von 1,4-Diacetylbenzol	34

3.4.1	Chiralidon R	34
3.4.1.1	Ergebnisse	34
3.4.2	Chiralidon S.....	36
3.4.3	Diskussion.....	38
3.4.4	Strukturaufklärung.....	39
3.5	Chemische Reduktion.....	41
3.5.1	1,4-Diacetylbenzol mit Natriumborhydrid	41
3.5.2	Reduktion der Benzaldehyde mit Natriumborhydrid.....	43
3.6	Konkurrenzreaktion von Benzaldehyd und Acetophenon	44
3.6.1	Chiralidon R	44
3.6.1.1	Ergebnisse	45
3.6.2	Chiralidon S.....	46
3.6.2.1	Ergebnisse	47
3.6.3	Diskussion.....	48
3.7	Optimierte Reaktionsbedingungen	48
3.7.1	Acetonnachweis	49
3.7.2	Ergebnisse	49
4	Experimenteller Teil	51
4.1	Vorschrift der enzymatischen Reduktion (Standardvorschrift)	51
4.2	Aufarbeitung der Proben für den Gaschromatographen	52
4.3	Aufarbeitung der Produkte	53
4.4	Analytik	54
4.4.1	Gaschromatographische Bestimmung 1	54
4.4.2	Gaschromatographische Bestimmung 2.....	55
4.4.3	HPLC Bestimmung.....	56
4.4.4	Bestimmung des Enantiomerenüberschusses.....	57
4.5	Chemische Reduktion.....	58
4.6	Derivatisierung mit MSTFA	59
4.7	Optimierte Reaktionsbedingungen	60
5	Anhang.....	62

5.1	Materialien	62
5.1.1	Geräte	62
5.1.2	Chemikalien	63
5.2	Literaturverzeichnis.....	64
5.3	Abbildungsverzeichnis	65
5.4	Tabellenverzeichnis	67
5.5	Abkürzungsverzeichnis	67

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Der Einsatz von Biokatalysatoren gewinnt in der organischen Synthese immer mehr an Bedeutung. Sie stellen eine wirtschaftliche und umweltverträgliche Alternative zu den bekannten Herstellungsverfahren dar. Durch Immobilisierung können Enzyme auch in mehrfach bzw. in kontinuierlichen Verfahren eingesetzt werden^[1].

Ziel dieser Arbeit ist die Reduktion von bifunktionellen aromatischen Carbonylverbindungen mit den vorliegenden Katalysatoren Chiraldon R und S. Es soll untersucht werden, ob eine Selektivität bezüglich den Ketonen oder den Aldehyden als Substituenten zu beobachten ist.

2 Theoretischer Teil

2.1 Reduktion

2.1.2 Chemische Reduktion

Die Reduktion von Ketonen und Aldehyden wird im Laboratorium häufig mit Hilfe von komplexen Hydriden, wie Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH_4) oder Natriumborhydrid (NaBH_4), durchgeführt, dabei werden Hydridionen (H^-) nucleophil auf das Carbonyl übertragen. Das Lithiumaluminiumhydrid ist ein stärkeres Reduktionsmittel als das Natriumborhydrid, da die Hydridionen schwächer an das Aluminium gebunden sind als am Bor. Bei tiefen Temperaturen reagiert das NaBH_4 bevorzugt mit dem Aldehyd. Bei den Ketonen ist der +I-Effekt des Alkylrestes die Elektronendichte am ketonischen Carbonylkohlenstoff erhöht und den nucleophilen Angriff der Hydridionen erschwert.

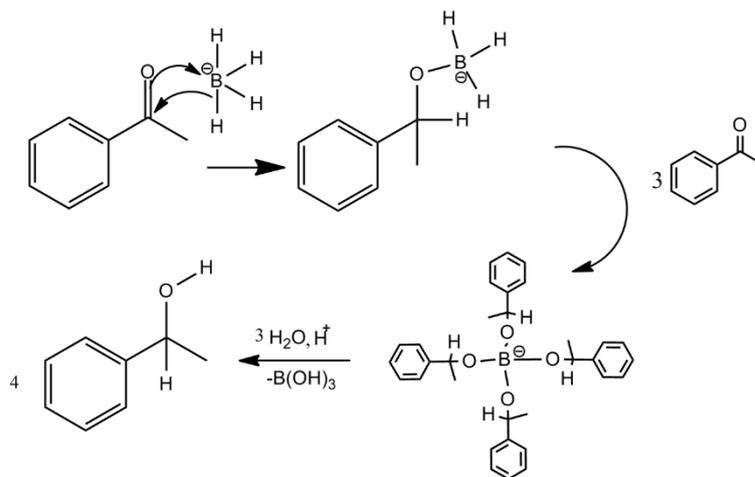


ABBILDUNG 1 REDUKTION VON ACETOPHENON MIT NATRIUMBORHYDRID

Die gängigste Methode zur Reduktion von Carbonylverbindung in der Industrie bildet elementarer Wasserstoff an Hydrierkatalysatoren wie Platin, Palladium oder Nickel^[2].

2.1.3 Enzymatische Reduktion

Enzyme nehmen eine entscheidende Rolle in vielen Stoffwechselprozessen von pflanzlichen sowie tierischen Organismen ein, indem sie zum Beispiel durch Katalyse Reaktionen bei moderaten Temperaturen erst ermöglichen oder die Einstellung von Gleichgewichten beschleunigen. Zusätzlich zu der biokatalytischen Eigenschaft besitzen Enzyme eine hohe Substratspezifität und Stereoselektivität. Einer dieser Biokatalysatoren ist die Alkoholdehydrogenase (ADH), die in Verbindung mit dem

Cofaktor Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) (Abb. 2) die reversible Umwandlung von Aldehyden zu Alkoholen bewirkt.

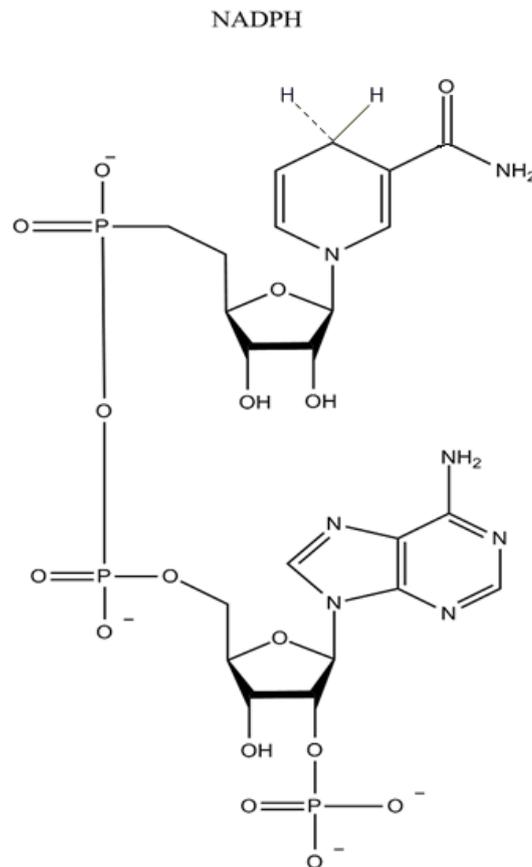


ABBILDUNG 2 NADPH

Analog zur Reduktion von Carbonylverbindungen mit komplexen Hydriden erfolgt bei der Reduktion mit der Kombination aus ADH und NADPH ein Angriff eines Hydridions am Carbonylkohlenstoff. Die Alkoholdehydrogenase besitzt am aktiven Zentrum ein Zn^{2+} -Ion, das in der Lage ist den Carbonylsauerstoff zu polarisieren. Gleichzeitig wird durch NADPH ein Hydridion bereitgestellt, das das entstandene Carbeniumion nucleophil angreift. Man erhält ein Alkoholat als Zwischenprodukt. In wässriger Lösung setzt sich das Alkoholat durch die Aufnahme eines Protons zum Alkohol um^{[2][3]}. Der Mechanismus ist in Abbildung 3 dargestellt.

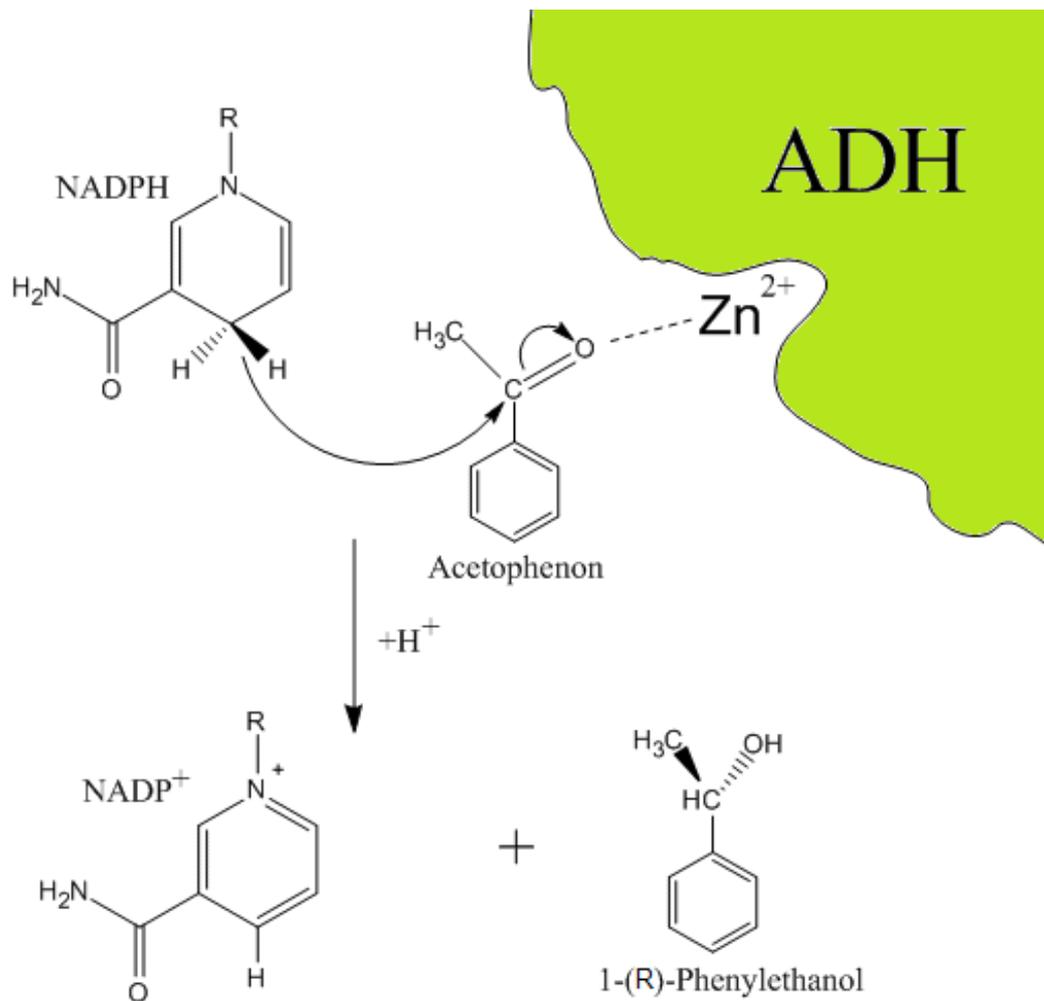


ABBILDUNG 3

MECHANISMUS DER ENZYMATISCHEN REDUKTION

2.1.4 Chiralidon R und Chiralidon S

Chiralidon ist ein „all-inclusive Katalysator“, entwickelt durch Prof. Dr. Jeromin. Es handelt sich dabei um mit dem Cofaktor NADP immobilisierte Alkoholdehydrogenasen. Die Immobilisierung erfolgt auf dem Superabsorber FAVOR® der Firma Evonic. Durch die Immobilisierung ergeben sich mehrere Vorteile. Zum Einen lässt sich das Enzym und der Cofaktor unter geringem Aufwand am Ende der Reaktion durch Filtration von der Reaktionslösung trennen. Der abgetrennte Katalysator kann aufgereinigt und erneut verwendet werden. Isopropanol dient sowohl als organisches Lösungsmittel als auch zur Regeneration des Cofaktors NADP zu NADPH. Im Überschuss eingesetzt, verschiebt das Isopropanol das Gleichgewicht bei der Reduktion von prochiralen Keton zu den chiralen Alkoholen. Die Cofaktorregeneration und die Möglichkeit der Wiederverwendung der Katalysatoren halten die Kosten gering. Die Reduktionen

werden bevorzugt in organischen Lösungsmitteln durchgeführt. So können viele Substrate, die in wässrigen Lösungen schwer löslich sind, umgesetzt werden. Die Herstellung von den Katalysatoren ist zudem einfach und billig. Die in dieser Arbeit verwendeten Katalysatoren sind Chiralidon R und Chiralidon S. Der Unterschied liegt in den eingesetzten Alkoholdehydrogenasen. Chiralidon R enthält eine Alkoholdehydrogenase, die aus dem *Lactobacillus brevis* gewonnen wird. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass prochirale Ketone mit Chiralidon R zu den entsprechenden R-Enantiomeren reduziert werden. Die im Chiralidon S enthaltene ADH von *Thermoanaerobacter sp.* katalysiert dieselben Ketone zu den S-Enantiomeren^{[5][6]}.

3 Praktischer Teil

3.1 Reduktion von 4-Acetylbenzaldehyd

Die Reduktion von 4-Acetylbenzaldehyd mit ADH in Kombination mit dem Coenzym NADPH kann zu fünf Produkten führen. Durch die Reduktion der Carbonylgruppe wird das 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd gebildet. Das Produkt besitzt ein chirales Zentrum, da das C-Atom, an dem die Hydroxygruppe sitzt, von vier unterschiedlichen Liganden umgeben ist. Deshalb können zwei Enantiomere, das 4-[(1S)-1-Hydroxyethyl]benzaldehyd (A) und 4-[(1R)-1-Hydroxyethyl]benzaldehyd (B), entstehen. Erfolgt der Angriff an der Aldehydgruppe des 4-Acetylbenzaldehydes erhält man 1-(4-Hydroxymethylphenyl)ethanon (C). In Folgereaktionen können 4-[(1S)-1-hydroxyethyl]benzaldehyd zu 1-(4-Hydroxymethylphenyl)ethanol (D), 4-[(1R)-1-hydroxyethyl]benzaldehyd zu (1R)-1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanol (E) und 1-(4-Hydroxymethylphenyl)ethanon ebenfalls zu D und E reduziert werden.

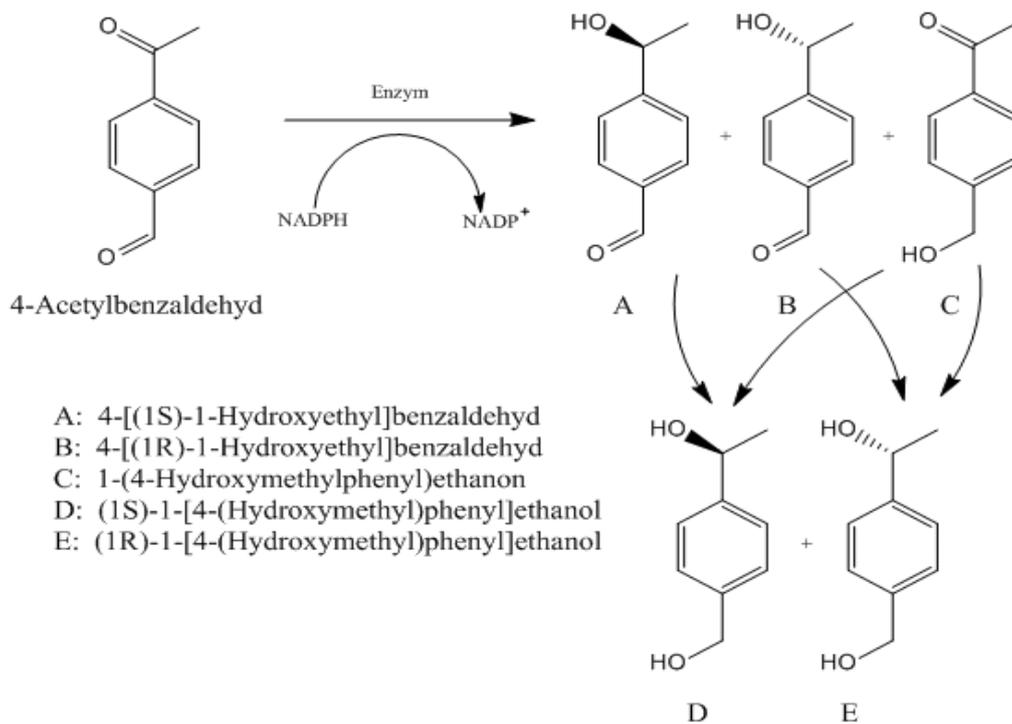


ABBILDUNG 4 PRODUKTE DER ENZYMATISCHEN REDUKTION VON 4-ACETYL BENZALDEHYD

In folgenden Versuchen wird 4-Acetylbenzaldehyd einmal mit Chiralidon R und einmal mit Chiralidon S bei gleichen Bedingungen umgesetzt. Der Verlauf der Reaktion wird mit Hilfe eines Gaschromatographen (Shimadzu GC-14A) mit einem FID-Detektor und einer polaren Säule (Optima FFAPplus) mit einer Polyethylenglycol-2-nitroterephthalsäureester-Phase verfolgt. Ziel des Experimentes besteht zunächst darin, zu untersuchen, welche Produkte bei der Reduktion mit Hilfe der jeweiligen Katalysatoren bevorzugt gebildet werden. Da die eingesetzte Säule nicht für die Trennung von Enantiomeren geeignet ist, wird erwartet, dass maximal vier Substanzen detektiert werden können (Abb.5).

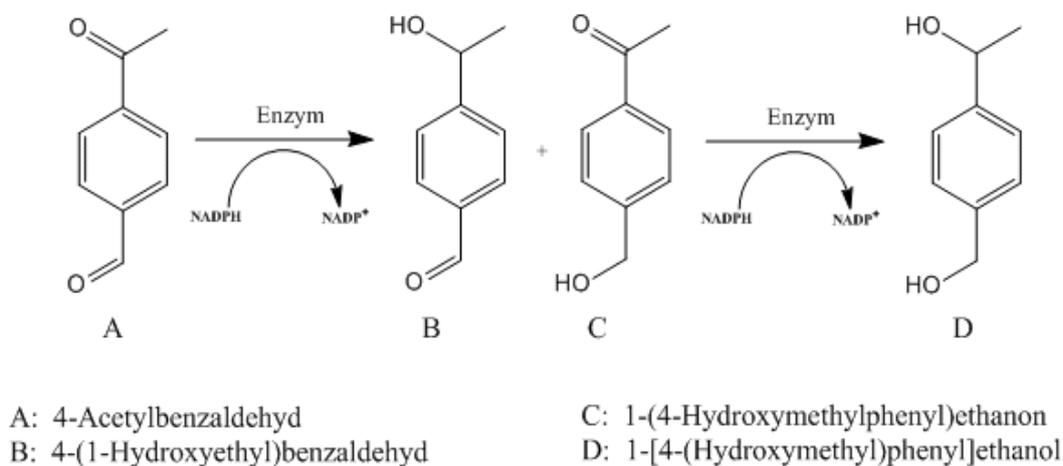


ABBILDUNG 5 REAKTIONSSCHEMA VON VERSUCH 3.1.1

Die Überprüfung der Enantioselektivität findet ebenfalls gaschromatographisch, unter Einsatz einer chiralen Säule (HYDRODEX γ -DIMON), statt.

3.1.1 Umsetzung mit Chiralidon R

Der 4-Acetylbenzaldehyd wird im Eluenten, einem Gemisch aus 2-Propanol und Wasser (Volumenverhältnis 9:1), gelöst. Die Umsetzung beginnt mit der Zugabe von Chiralidon R. Die Reaktion läuft bei Raumtemperatur und gleichmäßigem Rühren in einem geschlossenen Erlenmeyerkolben ab. Der Rührfisch wird an einem Fish-Clip® befestigt, sodass das Chiralidon nicht zerrieben wird. Im Kapitel 4.1 ist die detaillierte Durchführung beschrieben. Die Probenaufarbeitung für die GC-Messung ist unter (4.2.1) zu finden. Alle Chromatogramme sind bei identischen Parametern durchgeführt worden, welche im Kapitel 4.4 beschrieben sind.

Als Reinsubstanz steht nur das 4-Acetylbenzaldehyd zur Verfügung. Die Retentionszeit von 4-Acetylbenzaldehyd entspricht der Retentionszeit von Substanz A. Da für die Produkte keine Reinsubstanzen vorliegen, geht man zunächst von der Annahme aus, dass mit steigender Polarität der Substanzen, die Retentionszeiten auf der verwendeten polaren Säule größer werden. Somit ergibt sich die in Abbildung 5 dargestellte Einteilung der Produkte zu den jeweiligen Peaks. Um die Richtigkeit dieser Annahme zu prüfen, wird im Anschluss eine Strukturaufklärung mit Hilfe der H-NMR durchgeführt.

3.1.1.1 Ergebnisse

In Abbildung 5 sind vier Chromatogramme abgebildet. Sie zeigen den zeitlichen Verlauf der Reaktion. Zur besseren Übersicht sind diese auf das Intervall mit den Retentionszeiten von ca. drei bis zehn Minuten beschränkt, sodass der Lösungsmittelpeak nicht dargestellt ist.

Produkt lässt sich erst nach sechs Tagen beobachten und ist mit 1,2 % am Versuchsende gering.

In der folgenden Abbildung 7 wurden die chromatographisch gemessenen Werte in Excel übertragen und graphisch dargestellt.

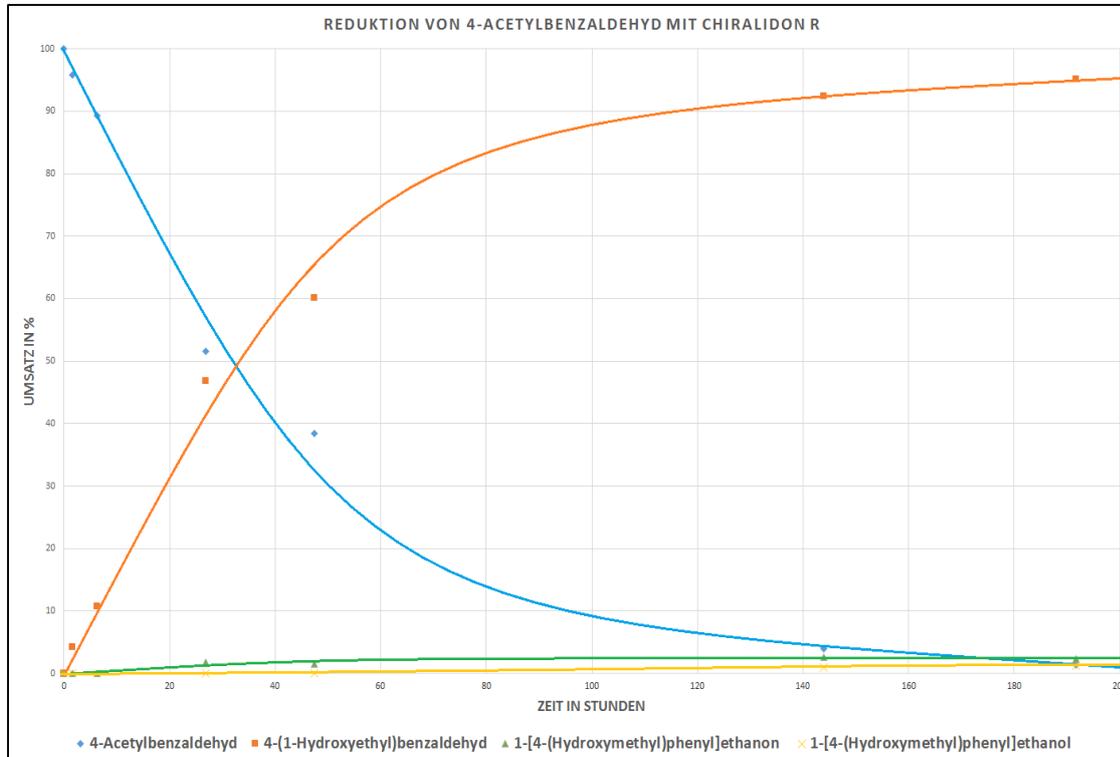


ABBILDUNG 7 REDUKTION VON 4-ACETYL BENZALDEHYD MIT CHIRALIDON R

Abbildung 7 ist zu entnehmen, dass die Umsetzung von 4-Acetylbenzaldehyd zum 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd eine Sättigungskurve beschreibt. Am Anfang der Reaktion wird ca. 1,8% an Substrat zum 4-(1-Hydroxyethyl)-benzaldehyd pro Stunde reduziert. Nach 20 Stunden flacht die Kurve mit zunehmender Zeit stetig ab und strebt einem Gleichgewichtszustand an, der nach ungefähr 160 Stunden erreicht ist. Eine Reduktion der Ketogruppe des 4-Acetylbenzaldehydes zum 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd erreicht nach 34 Stunden einen Umsatz 50%.

3.1.2 Umsetzung mit Chiralidon S

Der 4-Acetylbenzaldehyd wird im Eluenten, einem Gemisch aus 2-Propanol und Wasser (Volumenverhältnis 9:1), gelöst. Die Umsetzung beginnt mit der Zugabe von Chiralidon R. Die Reaktion läuft bei Raumtemperatur und gleichmäßigem Rühren in einem geschlossenen Erlenmeyerkolben ab. Der Rührfisch wird an einem Fish-Clip® befestigt, sodass das Chiralidon nicht zerrieben wird. Im Kapitel 4.1 ist die detaillierte

Durchführung beschrieben. Die Probenaufarbeitung für die GC-Messung ist unter (4.2.1) zu finden. Alle Chromatogramme sind bei identischen Parametern durchgeführt worden, welche im Kapitel 4.4 beschrieben sind.

3.1.2.1 Ergebnisse

In Abbildung 8 sind vier Chromatogramme abgebildet. Sie zeigen den zeitlichen Verlauf der Reaktion. Zur besseren Übersicht sind diese auf das Intervall mit den Retentionszeiten von ca. drei bis zehn Minuten beschränkt, sodass der Lösungsmittelpeak nicht dargestellt ist.

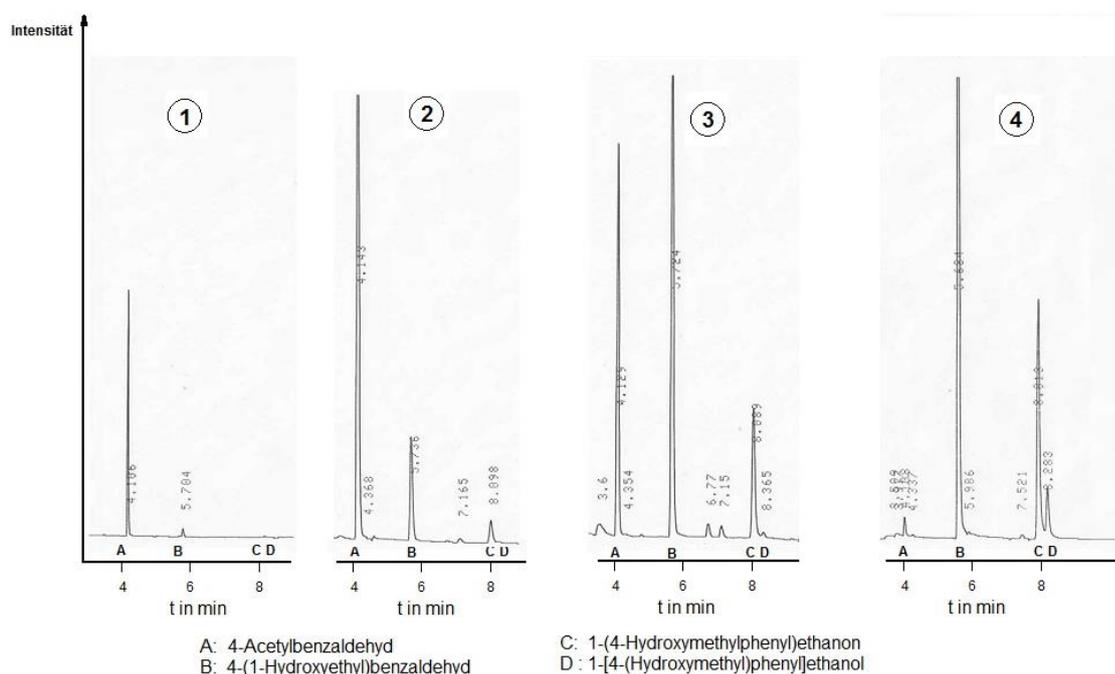


ABBILDUNG 8 GC-ERGEBNISSE ZU VERSUCH 3.1.2

Chromatogramm (1) zeigt den Stand der Reaktion nach 98 Minuten. Zu diesem Zeitpunkt sind 4,3% der Ketogruppen reduziert worden. Im nächsten Bild sind von Beginn der Reaktion 4 Stunden und 18 Minuten vergangen. 13,0 % an Substrat sind zum 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd und 3,4% zum 1-(4-Hydroxymethylphenyl)ethanon umgesetzt worden. Am nächsten Versuchstag (Chromatogramm (3)) und einer Reaktionszeit von 27 Stunden werden alle drei möglichen Reaktionsprodukte beobachten. A, B, C und D liegen in einem Peakflächenverhältnis von 32,6% A, 51,34% B, 16,0% C und 0,8% D vor. Chromatogramm (4) veranschaulicht die Peakflächenverhältnisse am Ende der Reaktion von der aufgearbeiteten Probe. Die gesamte Reaktionszeit beträgt acht Tage. Bei Reduktion von 4-Acetylbenzaldehyd mit Chiralidon S als Katalysator erzielt

man einen 98,5%igen Umsatz des Substrates. Die reduzierten Produkte bestehen zu 72,0% aus 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd, zu 22,9% aus 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon und zu 5,1% aus 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanol.

In der folgenden Abbildung 9 wurden die chromatographisch gemessenen Werte in Excel übertragen und graphisch dargestellt.

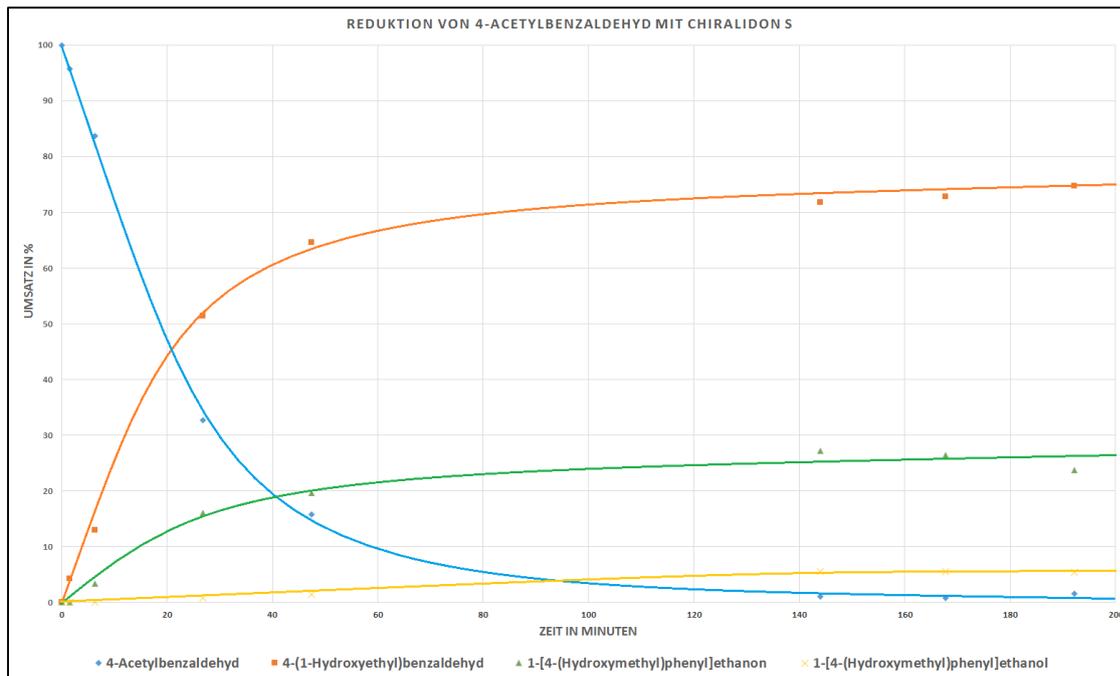


ABBILDUNG 9 REDUKTION VON 4-ACETYLBNZALDEHYD MIT CHIRALIDON S

Die Anfangsgeschwindigkeit zur Bildung von 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd beträgt 1,9% pro Stunde. Mit 0,6% pro Stunde wird das 4-Acetylbenzaldehyd innerhalb der ersten 20 Stunden zum 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon und mit 0,04% zum 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanol reduziert. Mit zunehmendem Verbrauch an Substrat nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit ab, was anhand der immer flacher werdenden Kurven zu beobachten ist. Nach 100 Stunden liegt die Substratkonzentration in Bezug zum Ausgangswert bei unter 5%. Das Verhältnis der Peakflächen bleibt ab diesem Zeitpunkt nahezu konstant bei ca. 70% 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd, 20% 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon und 5% 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanol.

3.1.3 Diskussion

Bei der Reduktion von 4-Acetylbenzaldehyd mit Chiralidon R und Chiralidon S sind deutliche Unterschiede bezüglich der Selektivität zu beobachten. Tabelle 1 veranschaulicht den Reaktionsstand nach 27 Stunden beider Versuche.

Substanz	Peakflächenverhältnis nach 27 Stunden in %	
	Chiralidon R	Chiralidon S
4-Acetylbenzaldehyd	51,5	32,6
4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd	46,8	51,3
1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon	1,7	16,0
1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanol	-	0,8

TABELLE 1 VERGLEICH CHIRALIDON R UND S

Mittels Chiralidon R wird bevorzugt die Ketogruppe mit einer Bildungsgeschwindigkeit von 1,8% 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd pro Stunde innerhalb der ersten 20 Stunden zum sekundären Alkohol reduziert. Die Aldehydgruppe wird kaum reduziert. Erst nach 27 Stunden lassen sich 1,7% 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon detektieren. Mit Chiralidon S wird nahezu die zehnfache Menge an 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon gebildet, während die Reduktion der Ketogruppe mit 1,9% 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd pro Stunde nur geringfügig schneller verläuft als beim Versuch mit Chiralidon R. Außerdem lässt sich feststellen, dass die Bildung des vollständig reduzierten Produktes erst zu beobachten ist, nachdem 1-[4-(Hydroxymethyl)-phenyl]ethanon im Reaktionsgemisch vorliegt. Das deutet darauf hin, dass auch bei der Folgereaktion die Reduktion der Ketogruppe vom Katalysator bevorzugt ist. Die folgende Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der jeweiligen Versuche am Ende der Reaktion. Die Pfeile stellen vereinfacht die Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Teilreaktion dar.

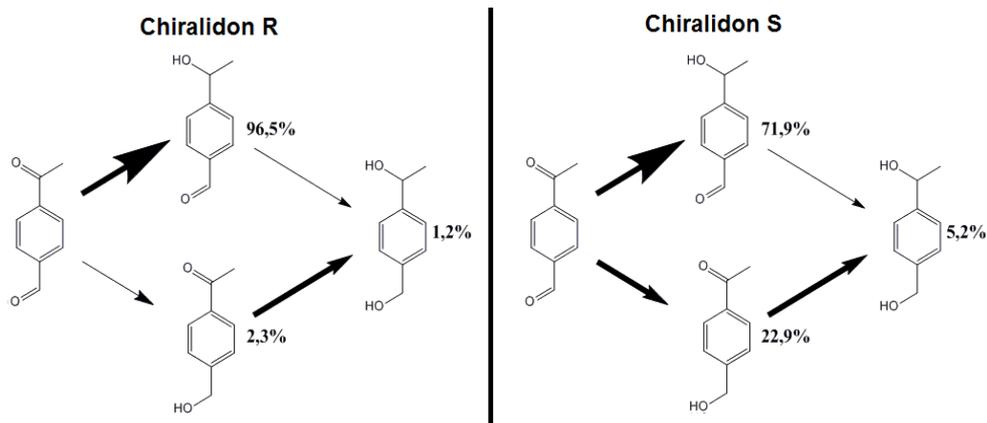


ABBILDUNG 10 SCHEMA DER KINETIK VON CHIRALIDON R UND S

3.1.4 Enantioselektivität von Chiralidon R und S

Gaschromatographie:

In diesem Abschnitt soll überprüft werden, ob mittels Chiralidon R 4-Acetylbenzaldehyd bevorzugt zum 4-[(1R)-1-Hydroxyethyl]benzaldehyd reduziert wird bzw. der Einsatz von Chiralidon S zum 4-[(1S)-1-Hydroxyethyl]benzaldehyd führt. Dafür steht ein Gaschromatograph mit einer chiralen Säule zur Verfügung.

Im ersten Schritt wird die verwendete chirale Säule auf ihr Trennvermögen untersucht. Ein Racemat aus (S)- und (R)-1-Phenylethanol gelöst in Dichlormethan wird in die GC gespritzt und man erhält das folgende Chromatogramm (Abb. 11).

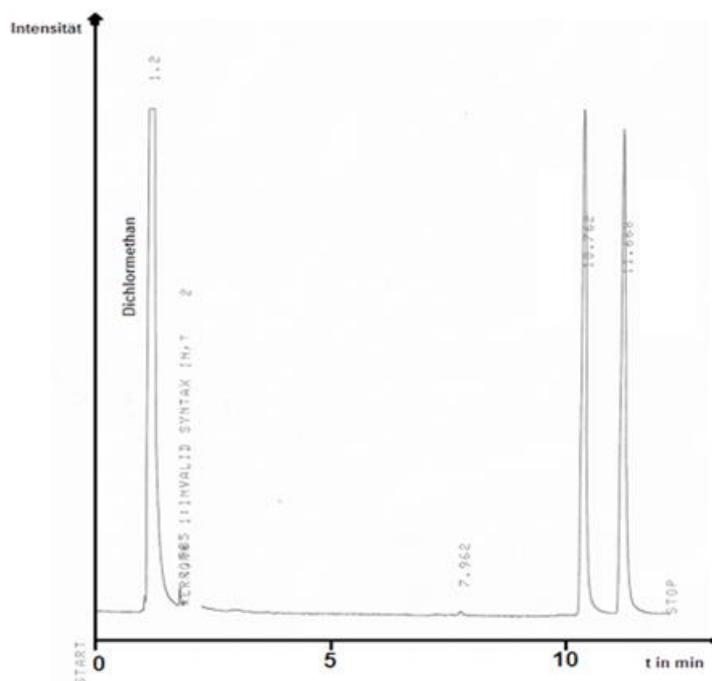


ABBILDUNG 11 RACEMAT AUS (S)- UND (R)-1-PHENYLETHANOL

Das Chromatogramm in Abbildung 11 zeigt eine deutliche Basislinientrennung der Enantiomere.

Als nächstes wird eine Lösung aus den aufgearbeiteten Produkten aus den Versuchen „Umsetzung mit Chiralidon R“ und „Umsetzung mit Chiralidon S“ in Dichlormethan im Verhältnis 1:1 hergestellt und eingespritzt. In Abbildung 12 ist das Ergebnis der GC-Messen dargestellt.

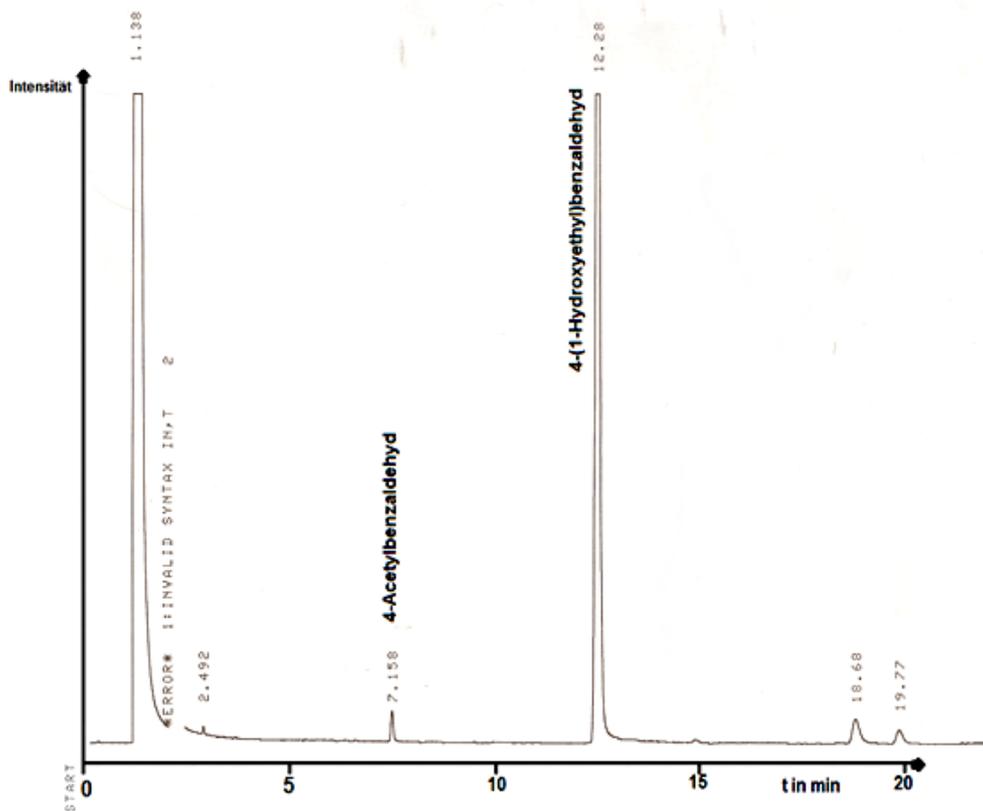


ABBILDUNG 12 GEMISCH AUS DEN PRODUKTEN VON KAPITEL 3.1.1 UND 3.1.2

Es lässt sich keine Trennung des 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd-Peaks erkennen. Das führt zu zwei möglichen Erklärungen. Entweder enthält das Gemisch 4-[(1R)-1-Hydroxyethyl]benzaldehyd und 4-[(1S)-1-Hydroxyethyl]benzaldehyd, lässt sich aber nicht mit der verwendeten Säule trennen oder beide Katalysatoren führen bei der Reduktion des Ketons zum selben Enantiomer. Es wurden mehrere Messungen des Gemisches mit unterschiedlichen Parametern durchgeführt. Abbildung 12 zeigt das Chromatogramm mit der niedrigsten Säulentemperatur an, die ein auswertbares Ergebnis liefern konnte. Tiefere Temperaturen führten dazu, dass die Substanzen nicht mehr detektiert werden konnten. Die Substanzen kondensierten auf der Säule, denn durch eine anschließende Erhöhung der Säulentemperatur konnte wieder

Peaks detektiert werden, die nur von der Säule kommen konnten, da keine weiteren Proben eingespritzt wurden.

Das Substrat wurde ebenfalls mit Natriumborhydrid reduziert (Kapitel 4.5). Bei der Reduktion von 4-Acetylbenzaldehyd mit Natriumborhydrid entsteht ein Racemat aus 4-[(1R)-1-Hydroxyethyl]benzaldehyd und 4-[(1S)-1-Hydroxyethyl]-benzaldehyd^[3]. Auch die Messung dieser Produkte ergab keine Trennung der Enantiomere und bestätigt damit, dass die Säule für die vorliegende Problemstellung ungeeignet ist.

Aus diesen Grund wurde eine Derivatisierung der Gemisches mit N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoacetamid (MSTFA) durchgeführt, dabei kommt es zur Veresterung der Hydroxgruppen (Abb. 13). Die Versuchsdurchführung ist unter Kapitel 4.6 zu finden.

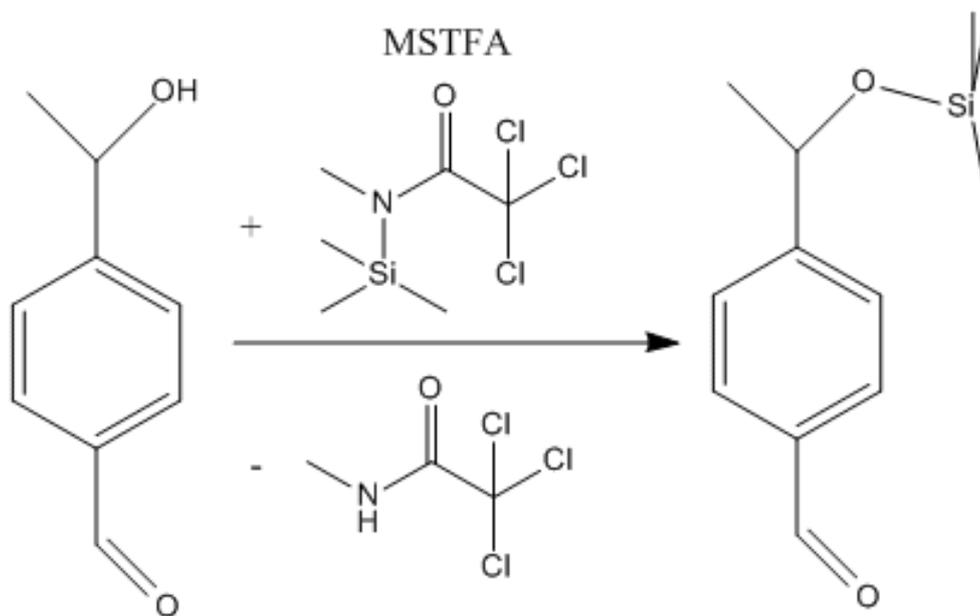


ABBILDUNG 13 DERIVATISIERUNG VON 4-(1-HYDROXYETHYL)BENZALDEHYD MIT MSTFA

Auch die Derivatisierung bewirkte keine Trennung der Enantiomere mit Hilfe der verwendeten Säule.

Im nächsten Schritt wird versucht die Enantiomertrennung mittels einer HPLC zu erreichen.

Flüssigkeitschromatographie:

Bei der Flüssigkeitschromatographie (**H**igh **P**ressure **L**iquid **C**hromatography = **HPLC**) liegt das zu trennen Gemisch in gelöster Form vor und wird über eine mit festen

Partikeln gepackte Chromatographiesäule getrennt. Aufgrund der hohen Bepackungsdichte sind hohe Drücke von 100 bis 300 bar nötig.

Die Trennung erfolgt mit Hilfe einer chiralen Säule. Als mobile Phase kommt ein Gemisch aus n-Heptan und Isopropanol zum Einsatz. Die genaue Versuchsdurchführung ist unter Kapitel 4.4.3 zu finden.

Analog zur gaschromatographischen Bestimmung wird die Trennleistung der Säule anhand von dem Racemat aus (S)- und (R)-1-Phenylethanol überprüft. Bereits bei dieser Messung lässt sich keine Trennung der chiralen Verbindungen erreichen (Abb. 14). So stellt sich auch die Messung der Produkte als Erfolglos heraus.

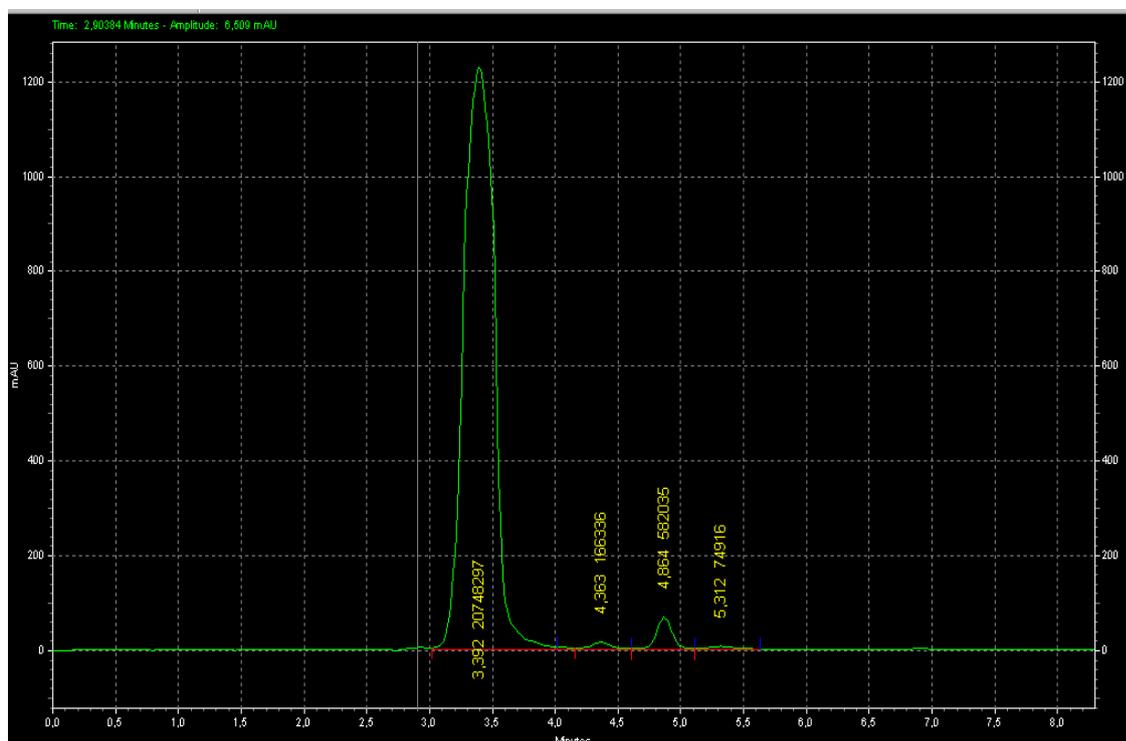


ABBILDUNG 14 RACEMAT AUS (S)- UND (R)-1-PHENYLETHANOL

3.1.5 Strukturaufklärung

Um die Peaks in den gaschromatographischen Messungen eindeutig einer Substanz zuordnen zu können, wird eine Strukturaufklärung mittels der H^1 -NMR (JEOL NMR SPECTROMETER, PMX 60si, 60 MHz) durchgeführt. Die Standardsubstanz für die Kalibrierung der chemischen Verschiebung ist Tetramethylsilan (TMS). Das folgende Spektrum wurde von dem Produkt der Umsetzung von 4-Acetylbenzaldehyd mit Chiralidon S aus Kapitel 3.1.2 aufgenommen.

Das in Abbildung 16 dargestellte Spektrum zeigt das Ergebnis der H^1 -NMR-Messung der Probe. Eine zuvor durchgeführte Messung mittels der GC zeigt, dass das 4-(1-

Hydroxyethyl)benzaldehyd und das 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon in einem Verhältnis von 3 zu 1 vorliegt. Die auswertbaren Peaks wurden markiert und farblich der jeweiligen Substanz zugeordnet. Protonen des Benzolrings (chemische Verschiebung zwischen 7 und 8 ppm) können nicht eindeutig unterschieden werden und somit nicht ausgewertet werden. In den Tabellen 2 und 3 sind die Ergebnisse der Auswertung aufgeführt.

Chemische Verschiebung			
4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd			
Proton	δ berechnet [ppm]	δ experimentell [ppm]	Multiplizität
a	1,2	1,4	2 : Dublett
b	4,7	4,7	4 : Quartett
c	7,33	--	--
d	7,76	--	--
e	~10	9,7	1 : Singulett
1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon			
a	2,5	2,5	1 : Singulett
b	7,9	--	--
c	7,5	--	--
d	4,5	4,6	3 : Triplett

TABELLE 2 CHEMISCHE VERSCHIEBUNG

Auswertung der Integrale			
4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd			
Proton	Höhe des Integrals in cm	Anzahl der Protonen	Berechnete Protonenanzahl
a	7,2	3	3,3
b	2,3	1	1,1
e	2,2	1	1
1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon			
a	3,8	3	3,2
d	2,4	2	2

TABELLE 3 AUSWERTUNG DER INTEGRALE

Als Erstes wurden die chemischen Verschiebungen der einzelnen Protonen berechnet^[7] und den experimentell ermittelten Werten gegenübergestellt (Tabelle 2). Da das System zur Berechnung der chemischen Verschiebung eine Näherung ist, erklärt es die geringen Unterschiede zwischen den berechneten und der am Spektrum abgelesenen Werten.

Die Höhe der Integrale ist proportional zur Anzahl der Protonen. Bestimmt man die Höhe des Intergrals für ein einzelnes Proton, zum Beispiel für das Proton der Aldehydgruppe von 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd (e), kann man die Anzahl der Protonen, die an den anderen Kohlenstoffatomen sitzen, bestimmen, indem man die

jeweiligen Höhen durch die des bestimmten Protons dividiert. Die Methylgruppe von 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd besitzt drei Protonen, berechnet werden 3,3 Protonen. Die Abweichung ist auf die Ungenauigkeit beim Messen der Höhe des Integrals zurückzuführen.

Mit Hilfe der chemischen Verschiebung und Protonenzahl konnten auf diese Weise die einzelnen Substituenten der vorliegenden Substanzen identifiziert werden.

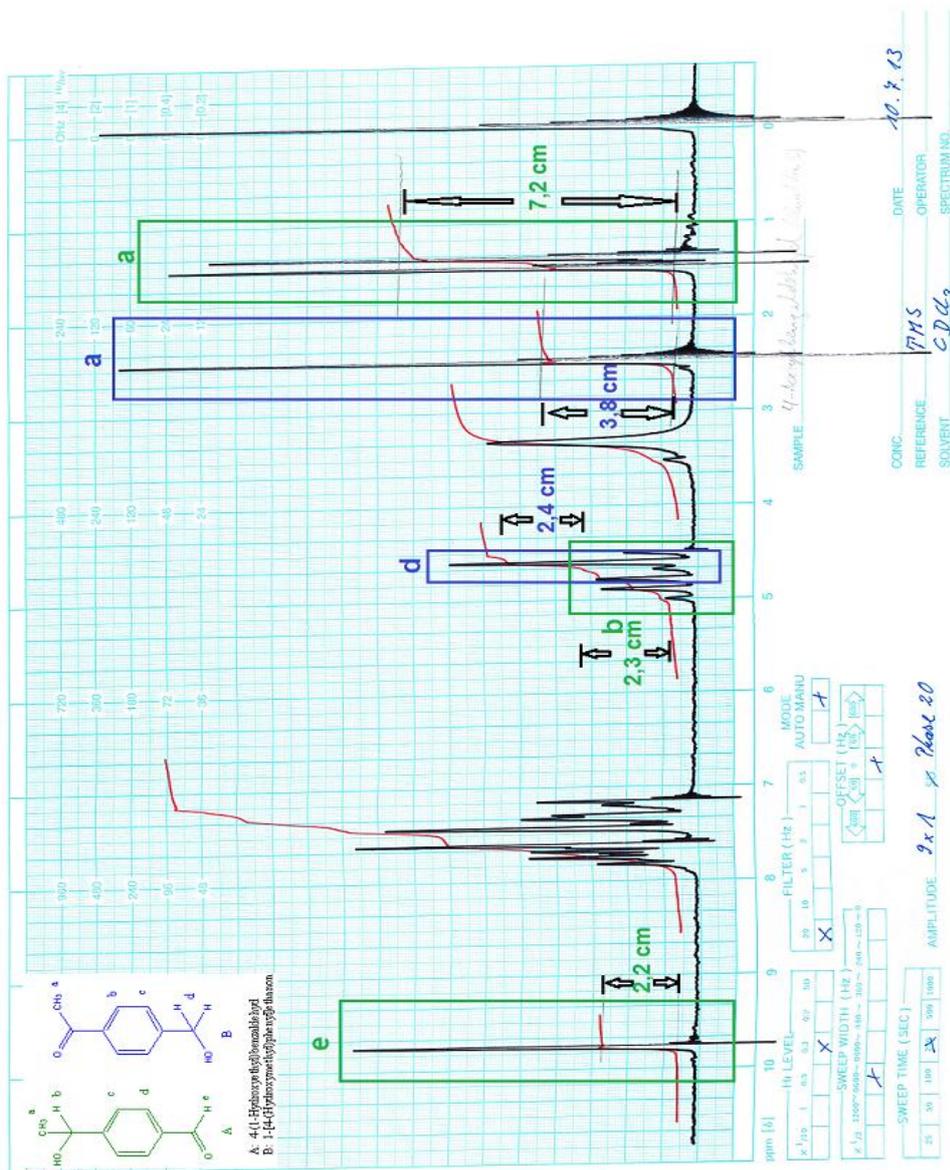


ABBILDUNG 15 ^1H -NMR SPEKTRUM VOM 4-ACETYL-BENZALDEHYD REDUZIERT MIT CHIRALIDON S

Als Nächstes wird ein ^1H -NMR-Spektrum von dem Produkt der chemischen Reduktion von 4-Acetylbenzaldehyd mit Natriumborhydrid aufgenommen. In Abbildung 17 die Chromatogramme der vorhergegangenen Messung (1) und der folgenden Messung (2) dargelegt. Es ist deutlich zu erkennen, dass Substanz B im Chromatogramm (2) nur im geringen Maße vorhanden ist (<0,1%). Der Anteil an C liegt bei 81,8%, von D

bei 16,6%. Somit ist davon auszugehen, dass keine Aldehydgruppe im H^1 -NMR-Spektrum zu erwarten ist, wenn die Zuordnung der Peaks zu den jeweiligen Substanzen korrekt ist.

Dies wird durch das Spektrum in Abbildung 18 bestätigt. Es wird kein Peak bei einer chemischen Verschiebung zwischen 9 und 11 ppm beobachtet.

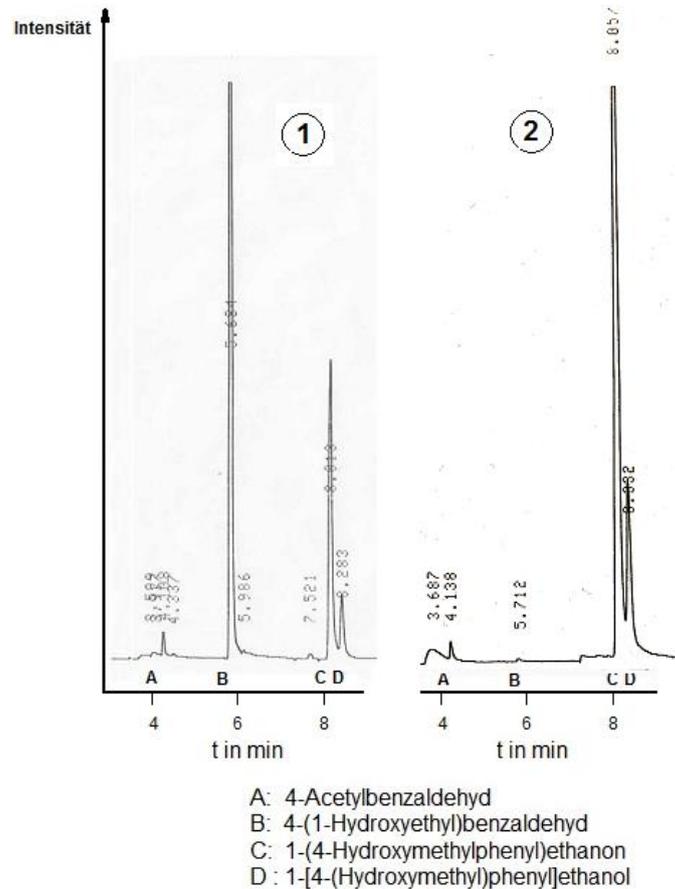


ABBILDUNG 16 4-ACETYLALDEHYD MIT CHIRALIDON S UND NATRIUMBORHYDRID

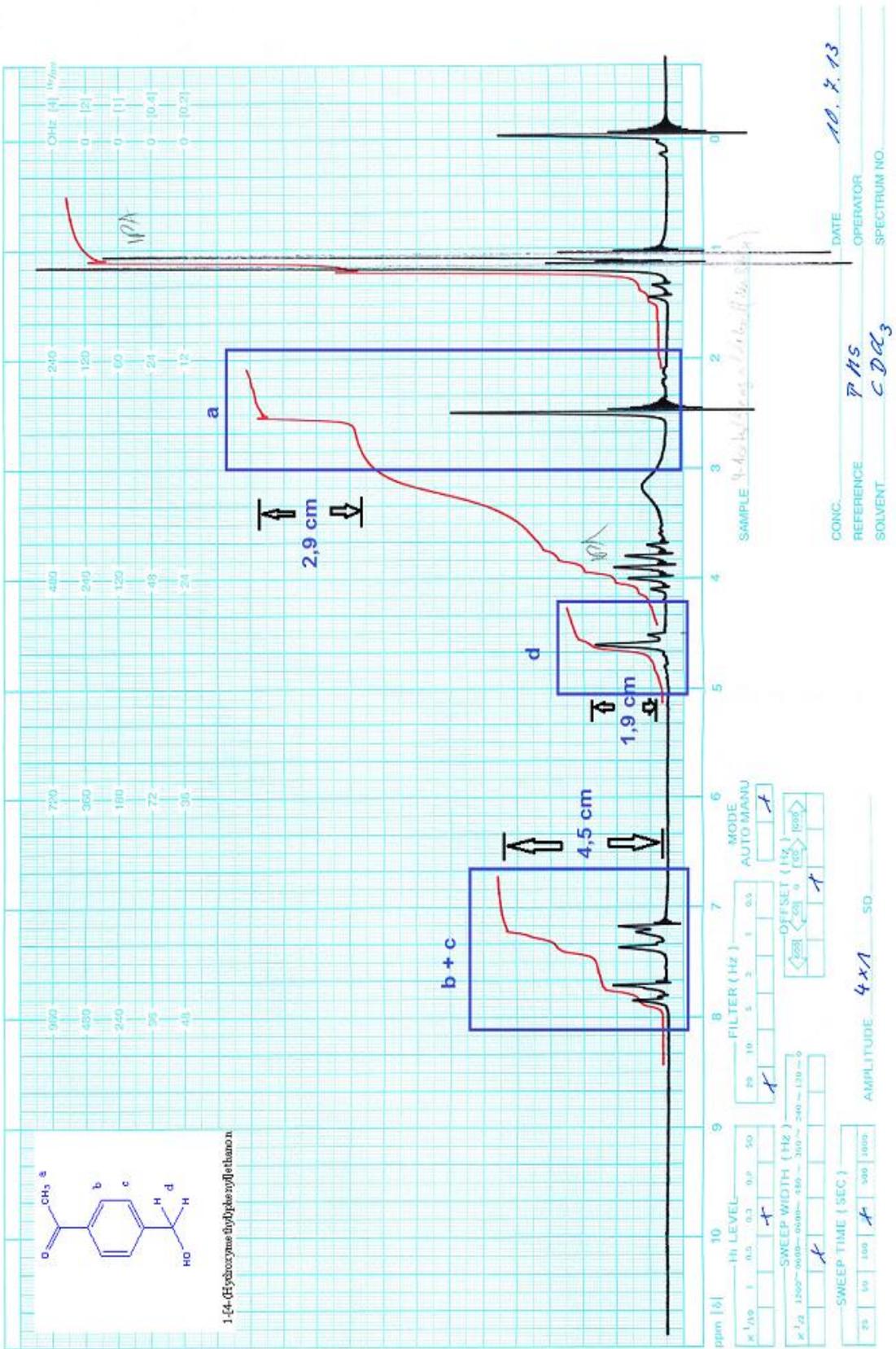


ABBILDUNG 17 ^1H -NMR SPEKTRUM VON 4-ACETYLALDEHYD REDUZIERT MIT NATRIUMBORHYDRID

Chemische Verschiebung			
1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon			
Proton	δ berechnet [ppm]	δ experimentell [ppm]	Multiplizität
a	2,5	2,5	1 : Singulett
b	7,9	--	--
c	7,5	--	--
d	4,5	4,6	3 : Triplett
Auswertung der Integrale			
1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon			
Proton	Höhe des Integrals in cm	Anzahl der Protonen	Berechnete Protonenanzahl
a	2,9	3	3,1
d	1,9	2	2
b+c	4,5	4	3,9

TABELLE 4 AUSWERTUNG DES H-NMR SPEKTRUMS VON ABBILDUNG 18

Proton a lässt sich der Methylgruppe und Proton d anhand der chemischen Verschiebung und der berechneten und erwarteten Protonenanzahl dem 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon zuordnen. Die chemische Verschiebung der Benzolprotonen kann man kaum zuordnen, da sich die Peaks von 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon mit den Peaks des vollständig reduzierten Substrats überlagern. Deswegen wird die Gesamthöhe des Integrals zwischen 7 und 8 ppm bestimmt. Diese beträgt 4,5 cm. Die Gesamthöhe wird mit dem Faktor 0,82 multipliziert, weil 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon 82% der gemessenen Probe ausmacht und berechnet mit diesem Wert die Anzahl der Benzolprotonen.

Durch die H^1 -NMR-Messungen konnten die Substanzen 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd und 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon eindeutig bestimmt und den Peaks der gaschromatographischen Messung zugeordnet werden.

3.2 Reduktion von 3-Acetylbenzaldehyd

In diesem Versuch soll betrachtet werden, wie sich die Stellung der Aldehydgruppe auf das Reaktionsverhalten auswirkt. Die Anzahl der Produkte durch die Reduktion von 3-Acetylbenzaldehyd ist identischen der Reduktion von 4-Acetylbenzaldehyd. Mögliche Reaktionen sind in Abbildung 19 veranschaulicht.

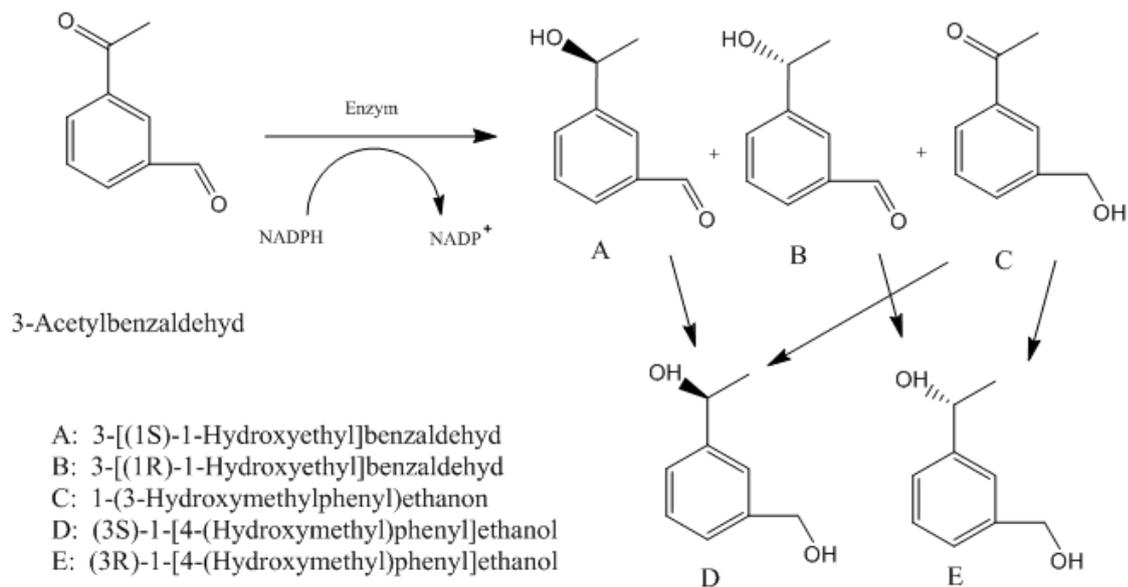


ABBILDUNG 18 PRODUKTE DER ENZYMATISCHEN REDUKTION VON 3-ACETYL-BENZALDEHYD

3.2.1 Chiralidon R

3-Acetylbenzaldehyd wird auf dieselbe Weise umgesetzt, wie das 4-Acetylbenzaldehyd. Im Kapitel 5.1 ist die detaillierte Durchführung beschrieben. Die Probenaufarbeitung ist unter (4.3) zu finden. Alle Chromatogramme sind bei identischen Parametern durchgeführt worden, welche im Kapitel 4.2.1 beschrieben sind.

3.2.1.1 Ergebnisse

In Abbildung 20 sind zwei Chromatogramme abgebildet. Sie zeigen den Stand der Reaktion kurz nach Beginn und am Ende des Versuches. Zur besseren Übersicht sind diese auf das Intervall mit den Retentionszeiten von ca. drei bis zehn Minuten beschränkt, sodass der Lösungsmittelpeak nicht dargestellt ist.

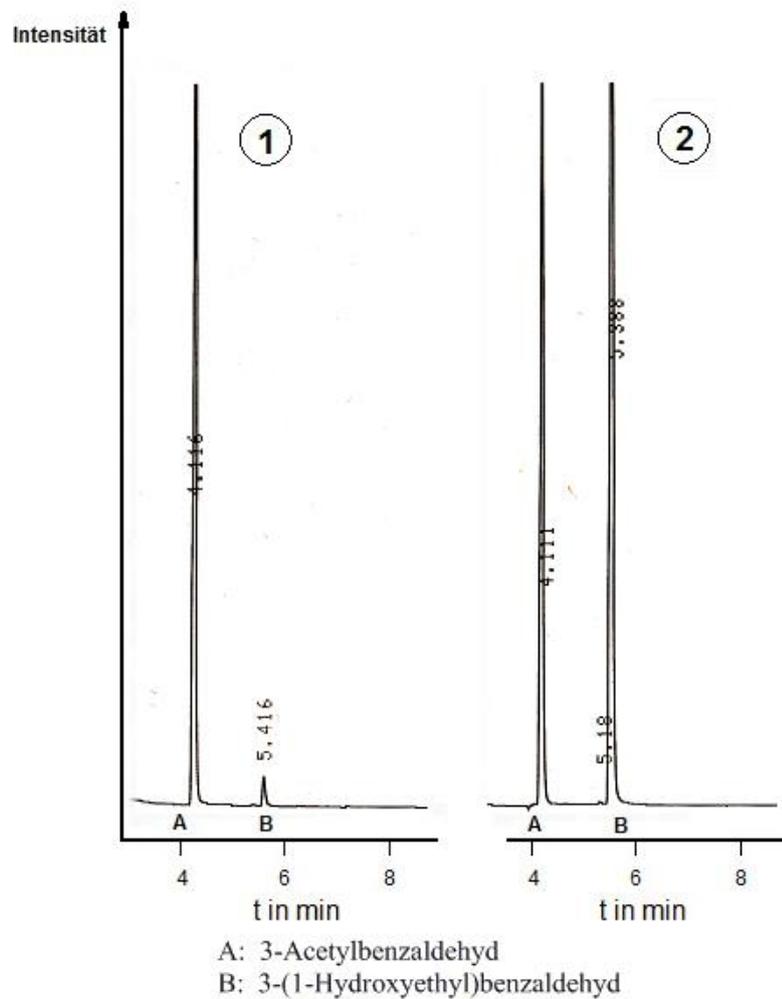


ABBILDUNG 19 GC-ERGEBNISSE VON VERSUCH 3.2.1

Im ersten Chromatogramm ist der Stand der Reaktion nach 166 Minuten zu erkennen. Es hat sich bereits 3-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd gebildet. Anhand des Verhältnisses der Peakflächen vom Substrat- und Produkt ergibt sich ein Umsatz von 3,1 %. Während der gesamten Reaktionsdauer ist keine Bildung weiterer Substanzen zu beobachten. Nach 15 Tagen haben sich 64,7% des Substrates zum 3-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd (Chromatogramm (2)) umgesetzt.

In der folgenden Abbildung 21 wurden die chromatographisch gemessenen Werte in Excel übertragen und graphisch dargestellt.

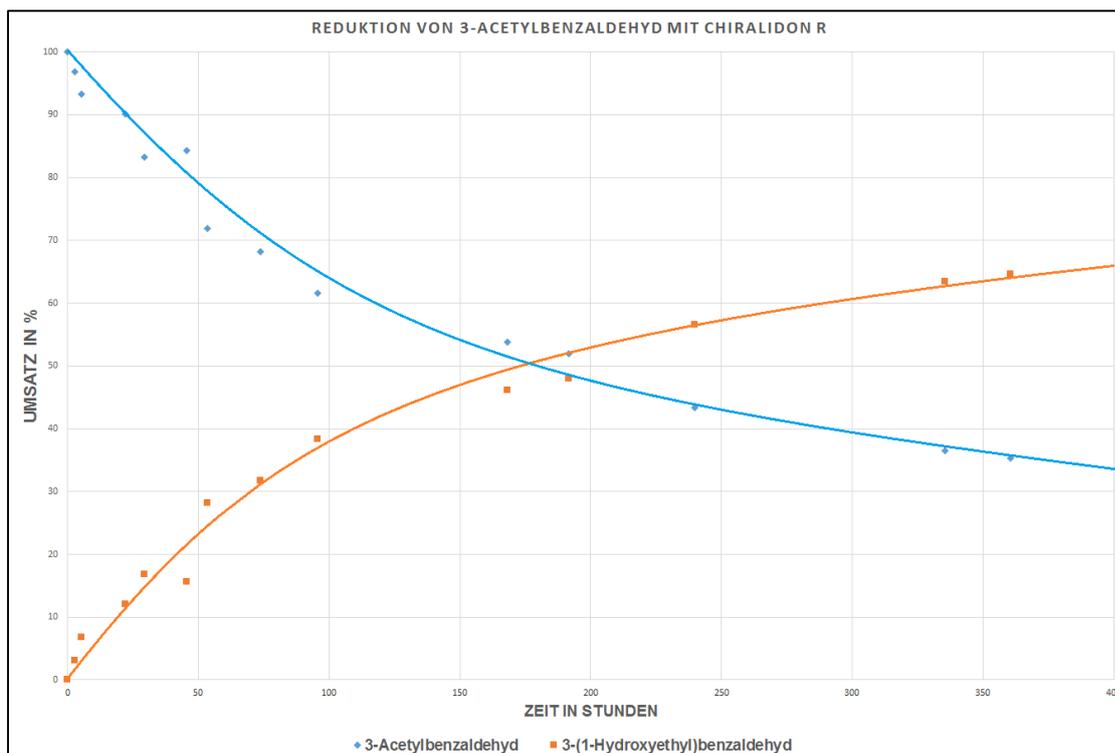


ABBILDUNG 20 REDUKTION VON 3-ACETYL-BENZALDEHYD MIT CHIRALIDON R

Am Anfang der Reaktion wird ca. 0,6% an Substrat zum 3-(1-Hydroxyethyl)-benzaldehyd pro Stunde reduziert. Nach acht Tagen wurden 48,0% der Ketogruppen reduziert. Eine Einstellung eines Gleichgewichtes ist auch nach 15 Tagen nicht erreicht.

3.2.2 Chiralidon S

Das 3-Acetylbenzaldehyd wird dieselbe Weise umgesetzt, wie das 4-Acetylbenzaldehyd. Im Kapitel 5.1 ist die detaillierte Durchführung beschrieben. Die Probenaufarbeitung ist unter (4.3) zu finden. Alle Chromatogramme sind bei identischen Parametern durchgeführt worden, welche im Kapitel 4.2.1 beschrieben sind.

3.2.2.1 Ergebnisse

In Abbildung 22 sind drei Chromatogramme abgebildet. Sie zeigen den zeitlichen Verlauf der Reaktion. Zur besseren Übersicht sind diese auf das Intervall mit den Retentionszeiten von ca. drei bis zehn Minuten beschränkt, sodass der Lösungsmittelpeak nicht dargestellt ist.

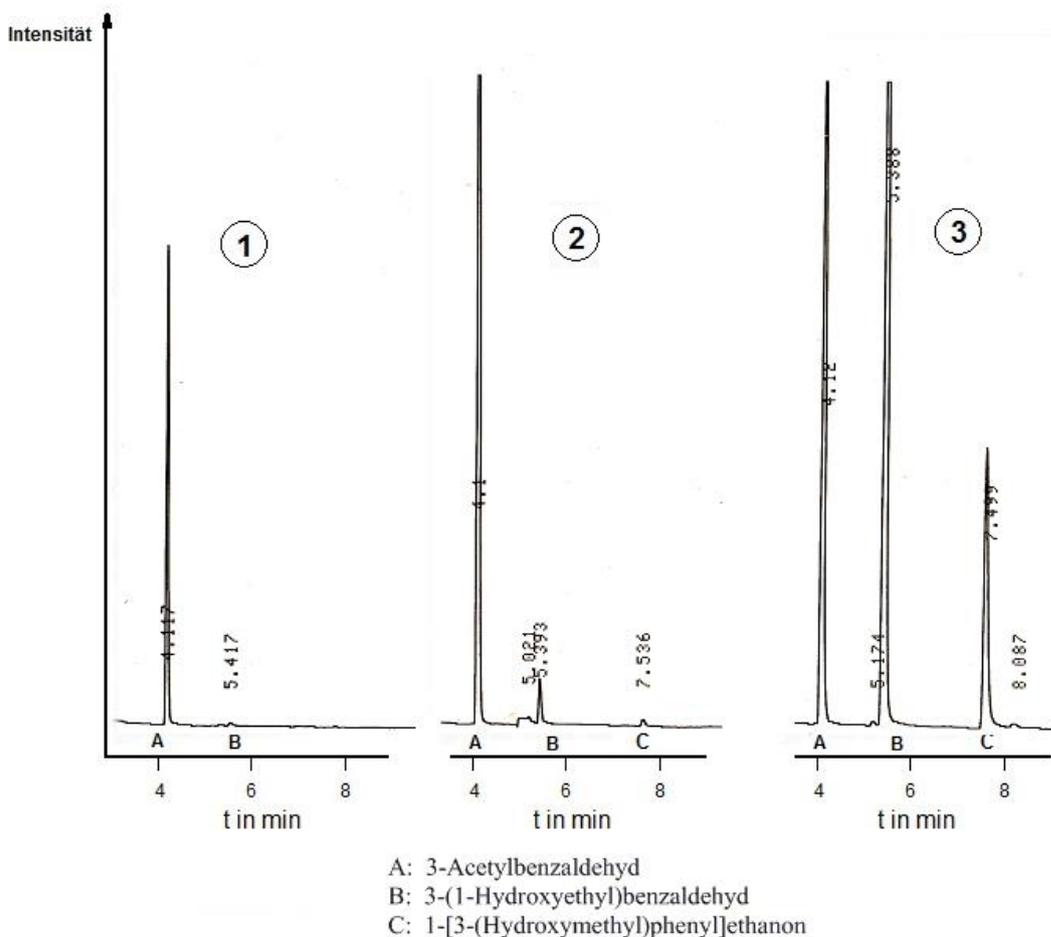


ABBILDUNG 21 GC-ERGEBNISSE VON VERSUCH 3.2.1

Nach 169 Minuten findet man 1,0% 3-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd in der Lösung (Chromatogramm (1)). Nach 319 Minuten sind es 3,4% 3-Acetylbenzaldehyd und zusätzlich wird 1-[3-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon (0,7%) zum ersten Mal detektiert (Chromatogramm (2)). Die Versuchsdauer beträgt wie beim Chiralidon R – Versuch 15 Tage. Das Ergebnis ist im dritten Chromatogramm zu sehen. Vom Substrat liegen nur 31,5% in der Lösung vor. Es hat sich 55,2% 3-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd und 15,1% 1-[3-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon gebildet.

In der folgenden Abbildung 23 wurden die chromatographisch gemessenen Werte in Excel übertragen und graphisch dargestellt.

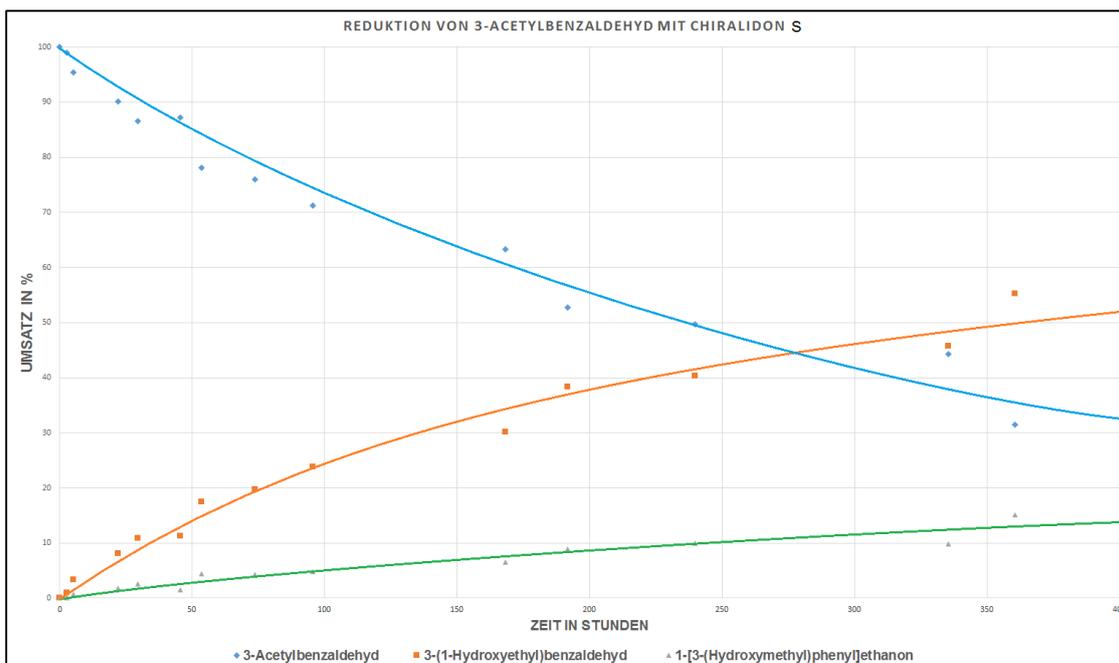


ABBILDUNG 22 REDUKTION VON 3-ACETYL BENZALDEHYD MIT CHIRALIDON S

Die Anfangreaktionsgeschwindigkeit zur Bildung von 3-(1-Hydroxyethyl)-benzaldehyd 0,38% pro Stunde und die von 1-[3-(Hydroxymethyl)-phenyl]ethanon 0,08% pro Stunde. Nach 240 Stunden sind 50% an Substrat zu 41% 3-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd und 9% 1-[3-(Hydroxymethyl)phenyl]-ethanon reduziert worden.

3.2.3 Diskussion

Auch bei der Reduktion von 3-Acetylbenzaldehyd wird das Keton durch den Katalysator Chiralidon R bevorzugt angegriffen. Es lässt sich keine Reduktion des Aldehydes feststellen. Jedoch ist die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich geringer als bei der Reduktion des parasubstituierten Aromaten. Ein Umsatz von 50% an 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd wird bereits nach 34 Stunden erreicht, während beim Umsatz von 3-Acetylbenzaldehyd für denselben Wert 190 Stunden benötigt werden.

Die Reaktion mit Chiralidon S ist wie im ersten Versuch weniger selektiv und die Geschwindigkeit der Reduktion liegt ebenfalls unter der des 4-Acetylbenzaldehyd mit Chiralidon S.

Eine mögliche Erklärung ist, dass der Reaktion aufgrund der nahen Lage der Substituenten sterisch gehindert ist.

3.2.4 Enantioselektivität von Chiralidon R und S

Es wird eine Lösung aus den aufgearbeiteten Produkten aus den Versuchen von 3.2.1 und 3.2.2 in Dichlormethan im Verhältnis 1:1 hergestellt und eingespritzt. In Abbildung 24 ist das Ergebnis der GC-Messen dargestellt.

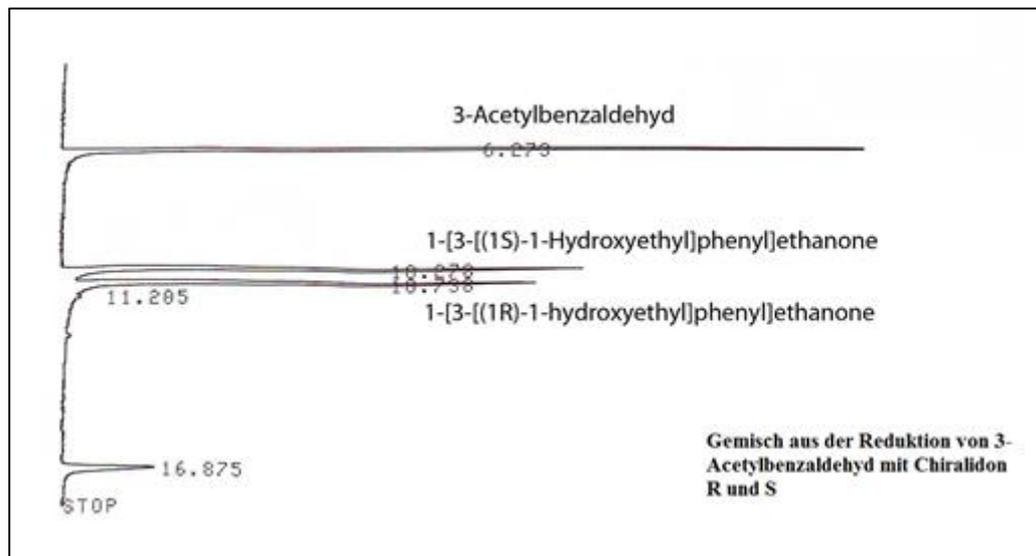


ABBILDUNG 23 GEMISCH AUS DEN PRODUKTEN VON VERSUCH 3.2.1 UND 3.2.2

Es ist eine Trennung der Enantiomere zu beobachten. Die Trennung erfolgt nicht bis zur Basislinie. Niedrigere Temperaturen der Säule resultieren erneut darin, dass die Substanzen wieder auf der Säule Kondensieren und nicht mehr detektiert werden können. Eine Derivatisierung mit MSTFA war erfolglos.

Als nächstes werden die Proben aus den beiden Versuchen einzeln gemessen und die erhaltenen Chromatogramme übereinandergelegt. Das führt zum selben Bild wie in Abbildung 24 und bestätigt damit, dass bei der Reduktion von 3-Acetylbenzaldehyd mit Chiralidon R und S unterschiedliche Enantiomere gebildet werden.

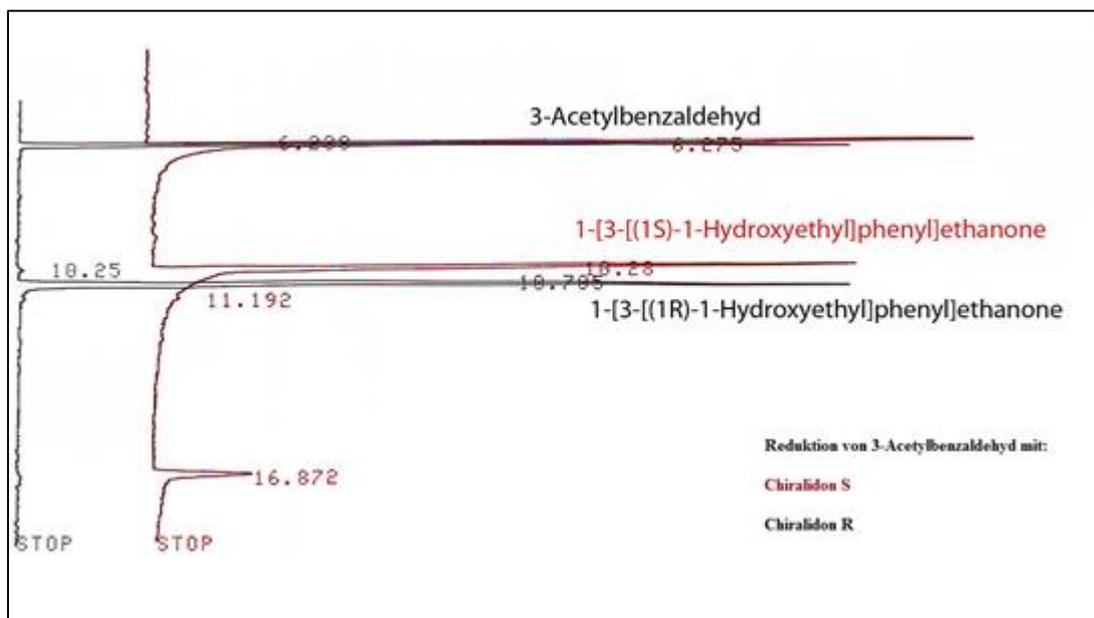


ABBILDUNG 24 PRODUKTE AUS VERSUCH 3.2.1 UND 3.2.2 EINZELN GEMESSEN

Das Ergebnis der Bestimmung des Enantiomerenüberschusses ist in Tabelle 4 zu sehen.

Enantiomerenüberschuss				
Edukt	Produkt	Peakfläche R-Enantiomer	Peakfläche S-Enantiomer	ee%
3-Acetylbenzaldehyd	3-[(1R)-1-Hydroxyethyl]benzaldehyd	6726	nicht integriert	>99 %
	3-[(1S)-1-Hydroxyethyl]benzaldehyd	nicht integriert	7296	>99 %

TABELLE 5 ERGEBNISSE ENANTIOMERENÜBERSCHUSS

Es sind jeweils Peaks sowohl vom R- als auch vom S-Enantiomer in beiden Chromatogrammen (Abb. 25) zu erkennen, die kleinen Peaks werden jedoch nicht integriert und der Enantiomerenüberschuss kann deswegen nur mit >99 % angegeben werden.

3.2.5 Strukturaufklärung

Am Tag der H-NMR-Messung stand noch keine Probe aus den Versuchen von Kapitel 3.2 zur Verfügung. Ein H¹-NMR-Spektrum konnte nur von dem Produkt der chemischen Reduktion von 3-Acetylbenzaldehyd mit Natriumborhydrid aufgenommen werden. Die Ergebnisse dieser Messung werden in der folgenden Tabelle 6 zusammengefasst.

Chemische Verschiebung			
1-[3-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon			
Proton	δ berechnet [ppm]	δ experimentell [ppm]	Multiplizität
a	2,5	2,6	1 : Singulett
b	7,9	--	--
c	7,8	--	--
d	7,4	--	--
e	7,5	--	--
f	4,5	4,6	1 : Singulett
1-[3-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanol			
a	1,2	1,5	2 : Dublett
b	2,8	--	--
c	7,3	--	--
d	7,1	--	--
e	7,4	--	--
f	7,1	--	--
g	2,6	2,5	1 : Singulett
Auswertung der Integrale			
1-[3-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon			
Proton	Höhe des Integrals in cm	Anzahl der Protonen	Berechnete Protonenanzahl
a	7,1	3	3,2
f	4,4	2	2
1-[3-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanol			
a	2,1	3	3,2
g	1,3	2	2

TABELLE 6 AUSWERTUNG DES H¹-NMR SPEKTRUMS VON ABILDUNG 26

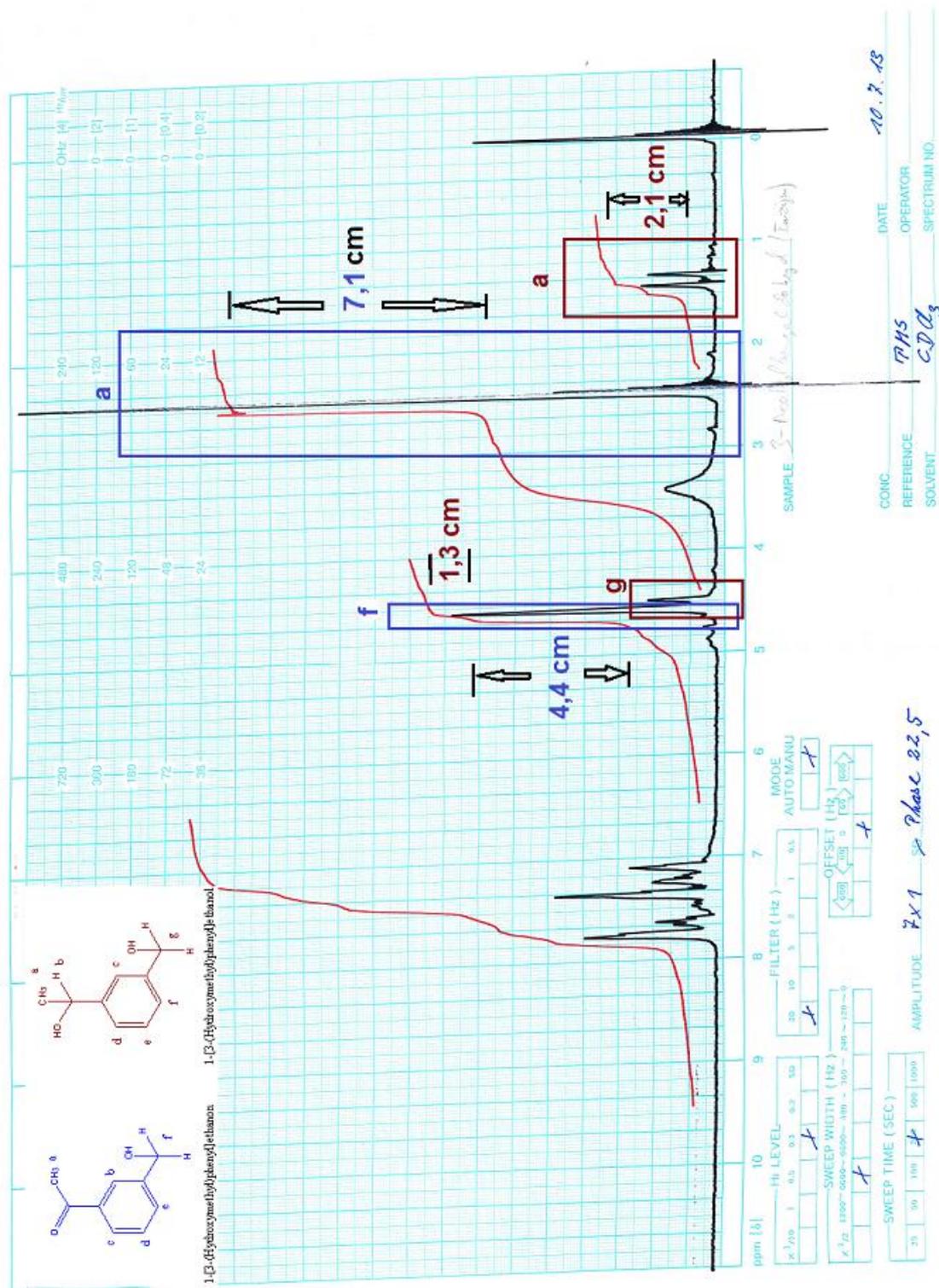


ABBILDUNG 25 ^1H -NMR SPEKTRUM VON 3-ACETYL BENZALDEHYD REDUZIERT MIT NATRIUMBORHYDRID

Durch die ^1H -NMR-Messungen konnten die Substanzen 1-[3-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon und 1-[3-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanol eindeutig bestimmt und den Peaks der gaschromatographischen Messung zugeordnet werden.

3.3 Reduktion von 2-Acetylbenzaldehyd

In diesem Versuch soll betrachtet werden, wie sich die Stellung der Aldehydgruppe auf das Reaktionsverhalten auswirkt. Die Anzahl der Produkte durch die Reduktion von 2-Acetylbenzaldehyd ist identischen der Reduktion von 4-Acetylbenzaldehyd. Mögliche Reaktionen sind in Abbildung veranschaulicht.

3.3.1 Chiralidon R

2-Acetylbenzaldehyd wird auf dieselbe Weise umgesetzt, wie das 4-Acetylbenzaldehyd. Im Kapitel 5.1 ist die detaillierte Durchführung beschrieben. Die Probenaufarbeitung ist unter 4.2 zu finden. Alle Chromatogramme sind bei identischen Parametern durchgeführt worden, welche im Kapitel 4.2.1 beschrieben sind.

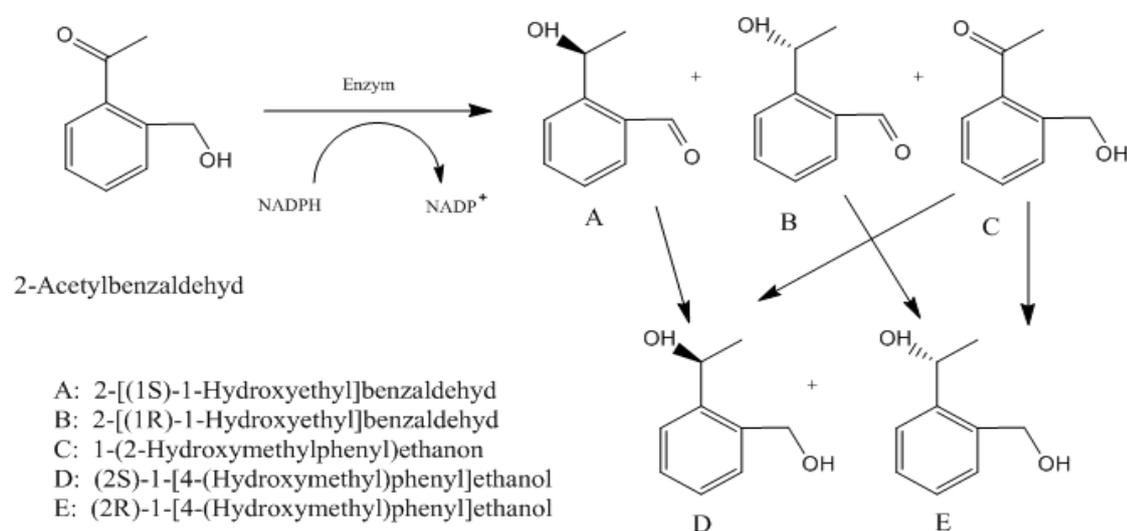


ABBILDUNG 26 PRODUKTE DER ENZYMATISCHEN REDUKTION VON 2-ACETYLBNZALDEHYD

3.3.1.1 Ergebnisse

Beobachtung:

Das verwendete 2-Acetylbenzaldehyd besitzt eine dunkel rote Farbe, während die para- und metasubstituierte Acetylbenzaldehyde weiß bis leicht gelblich gefärbt sind. Gelöst im Gemisch aus 2-Propanol und Wasser (Volumenverhältnis 9:1) färbt sich die Lösung zunächst rot. Nach der Zugabe des Katalysators nimmt die Lösung eine dunkel braune bis schwarze Farbe an.

Die Substanz scheint nicht rein zu sein. GC-Messungen der Reaktionslösung bestätigen diese Annahme. In Abbildung ist ein Beispielchromatogramm der

Umsetzung von 2-Acetylbenzaldehyd mit Chiralidon R zu sehen. Der rot markierte Bereich zeigt die Verunreinigung.

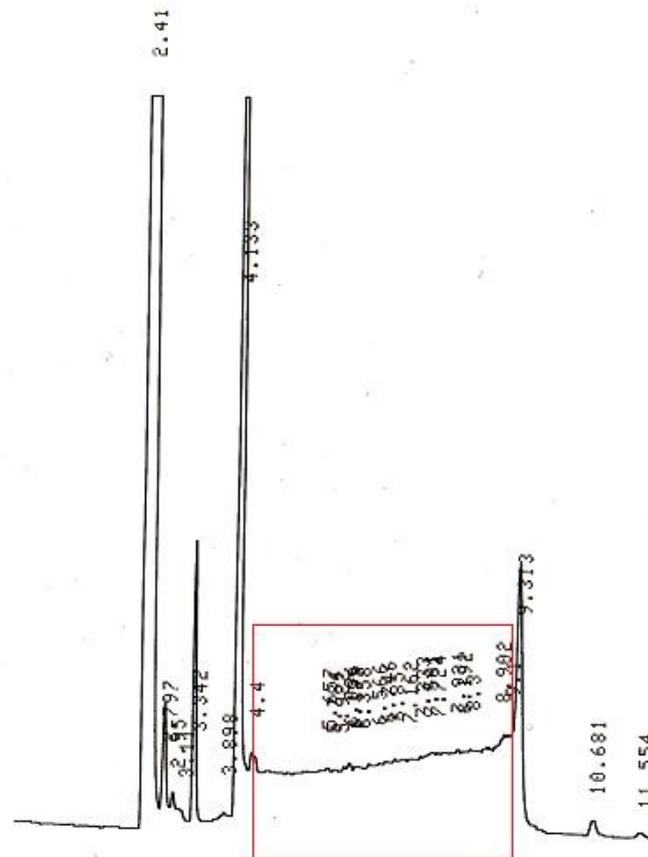


ABBILDUNG 27 UMSETZUNG VON 2-ACETYLBNZALDEHYD

Da Nebenreaktionen mit den unbekanntem Substanzen nicht auszuschließen sind und die gemessenen Peakflächen durch die Verunreinigung ungenau werden, wird der Versuch als nicht aussagekräftig eingestuft.

Außerdem kann, bis auf den Substratpeak, keine Zuordnung der anderen Peaks bestimmten Substanzen erfolgen, weil bereit das H¹-NMR-Spektrum des vorliegenden 2-Acetylbenzaldehydes nicht ausgewertet werden kann, da zu viele Störsignale detektiert werden (Abb. 29).

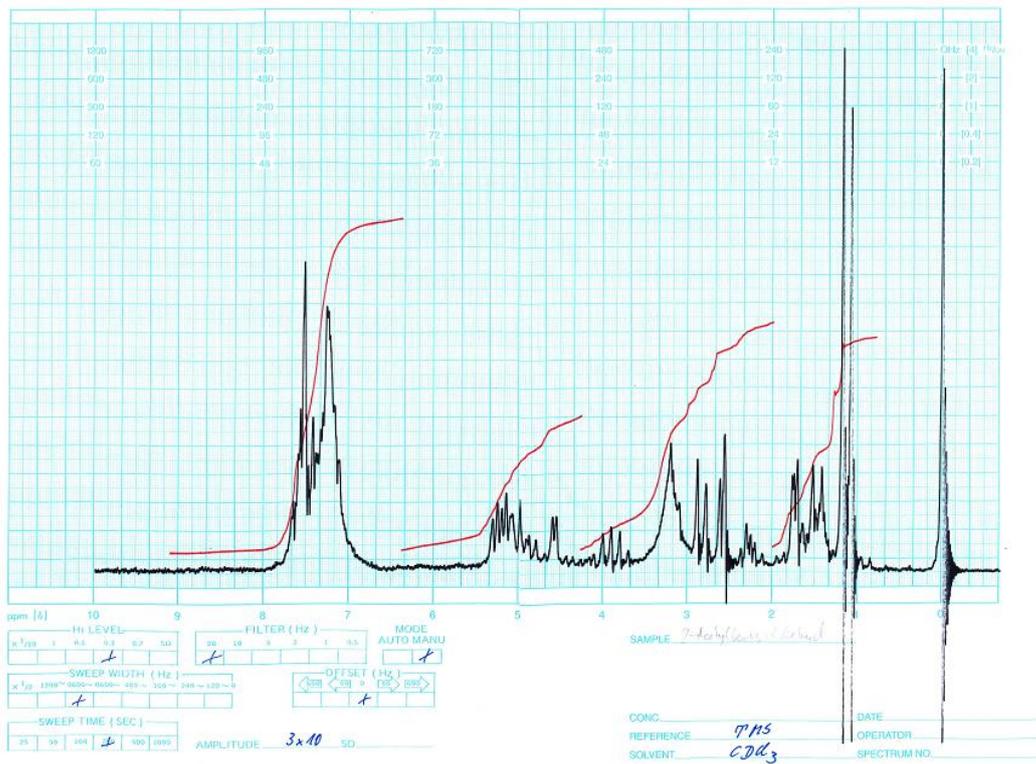


ABBILDUNG 28 H^1 -NMR-SPEKTRUM VON 2-ACETYLALDEHYD

3.3.2 Chiralidon S

Aufgrund der Verunreinigung des Substrates ist der Versuch nicht auswertbar.

3.4 Reduktion von 1,4-Diacetylbenzol

Das folgende Experiment soll zeigen, welchen Verlauf die Reaktion durch den Austausch der Aldehydgruppe durch eine zweite Acetylgruppe nimmt. Mögliche Reaktionen und Produkte sind in Abbildung 30 veranschaulicht.

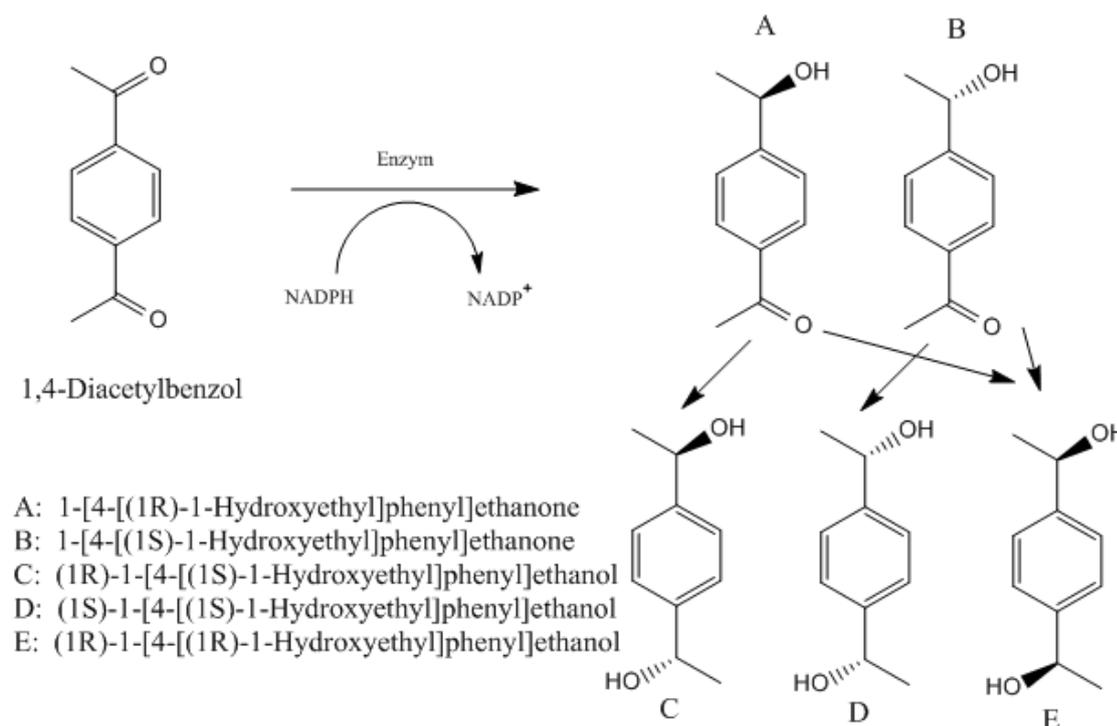


ABBILDUNG 29 PRODUKTE DER ENZYMATISCHEN REDUKTION VON 1,4-DIACETYLALDEHYD

3.4.1 Chiralidon R

1,4-Diacetylbenzaldehyd wird auf dieselbe Weise umgesetzt, wie das 4-Acetylbenzaldehyd. Im Kapitel 5.1 ist die detaillierte Durchführung beschrieben. Die Probenaufarbeitung ist unter 4.2 zu finden. Alle Chromatogramme sind bei identischen Parametern durchgeführt worden, welche im Kapitel 4.2.1 beschrieben sind.

3.4.1.1 Ergebnisse

In Abbildung 31 sind drei Chromatogramme abgebildet. Sie zeigen Verlauf der Reaktion. Zur besseren Übersicht sind diese auf das Intervall mit den Retentionszeiten von ca. drei bis zehn Minuten beschränkt, sodass der Lösungsmittelpeak nicht dargestellt ist.

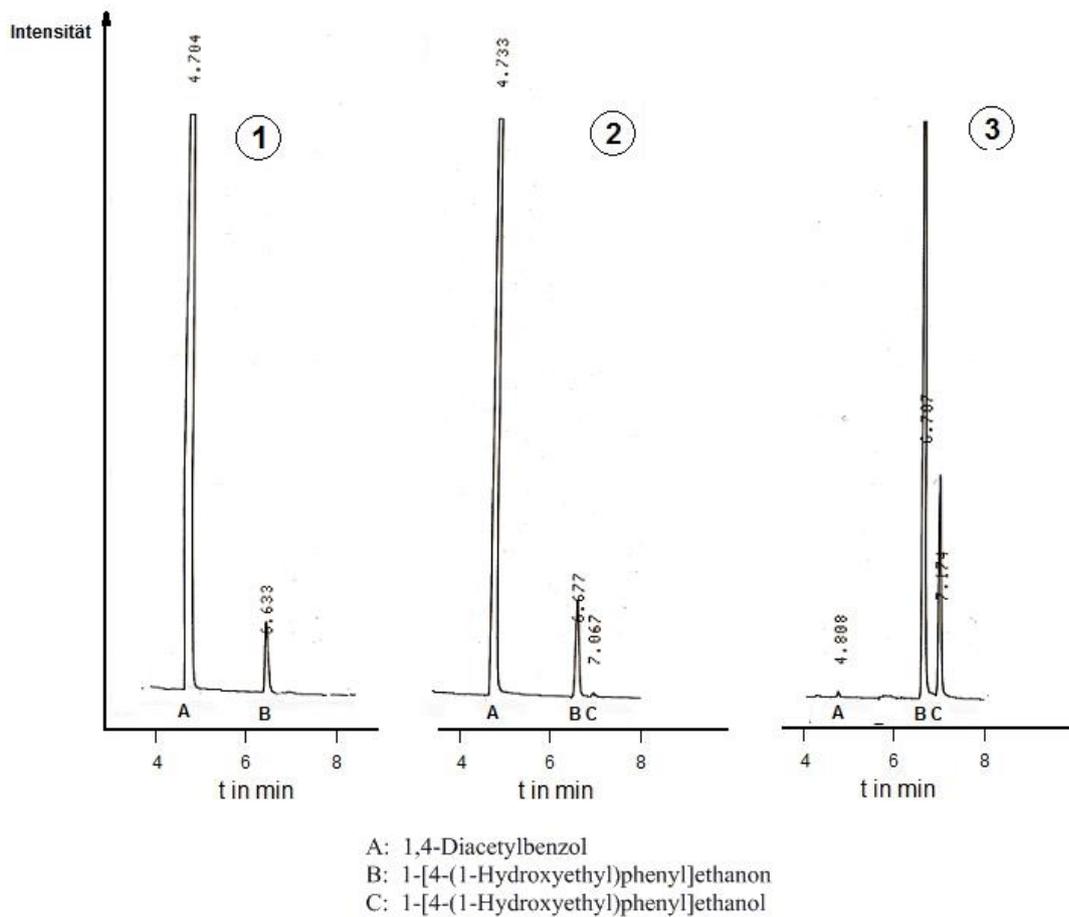


ABBILDUNG 30 GC-ERGEBNISSE VON VERSUCH 3.4.1

Nach 100 Minuten sind 3,7 % an Substrat zum 1-[4-(1-Hydroxyethyl)-phenyl]ethanon umgesetzt worden (Chromatogramm 1). Nach 146 Minuten lässt sich bereits das vollständig reduzierte Produkt, 1-[4-(1-Hydroxyethyl)-phenyl]ethanol, beobachten (Chromatogramm 2). A, B und C liegen in einem Verhältnis von 94,0% A, 5,7% B und 0,3% C vor. Das dritte Chromatogramm zeigt das Ergebnis des Versuches nach 14 Tagen Reaktionsdauer. Das 1,4-Diacetylbenzaldehyd ist nahezu vollständig reduziert worden. Es sind noch 0,3% an Substrat vorhanden. Das Produktgemisch besteht aus 81,5 % 1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanon und 18,2 % 1-[4-(1-Hydroxyethyl)-phenyl]ethanol.

In der folgenden Abbildung 32 wurden die chromatographisch gemessenen Werte in Excel übertragen und graphisch dargestellt.

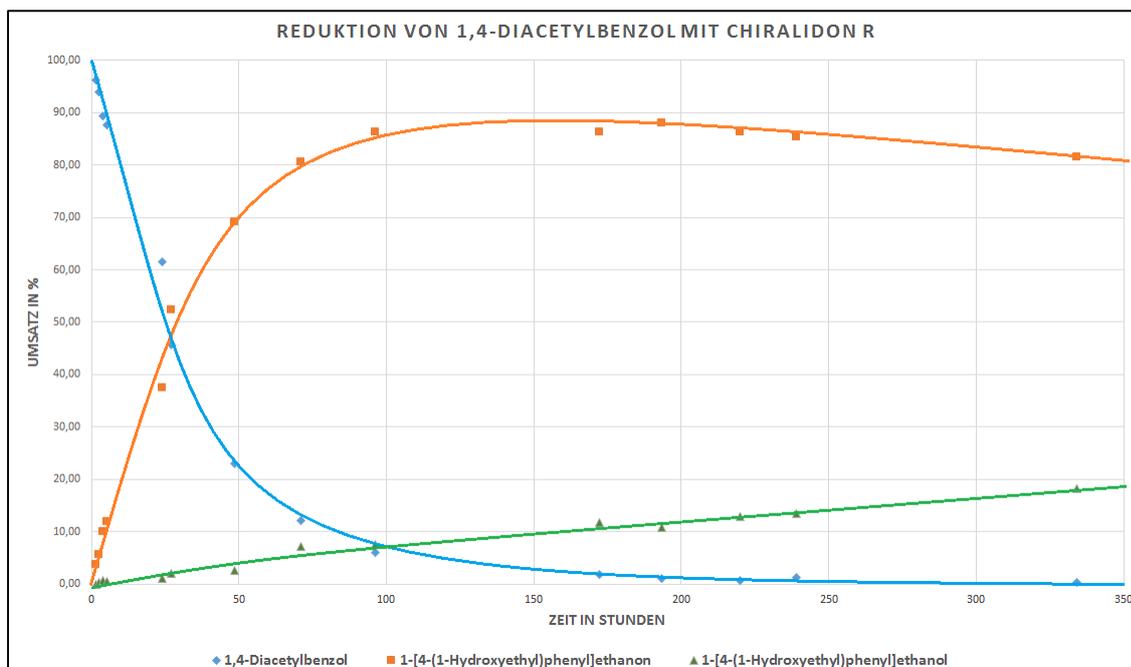


ABBILDUNG 31 REDUKTION VON 1,4-DIACETYL BENZOL MIT CHIRALIDON R

Die Anfangsgeschwindigkeit zur Bildung von 1-[4-(1-Hydroxyethyl)-phenyl]ethanon beträgt 2,4% pro Stunde. Mit 0,06% pro Stunde wird das 1-[4-(1-Hydroxyethyl)-phenyl]ethanol gebildet. Nach 190 Stunden sind nur noch 1,1% an Substrat übrig. Mit 88,1% hat das 1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]-ethanon ein Maximum. Im weiteren Verlauf der Reaktion nimmt die Menge von 1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanon stetig ab, da es zum 1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanol reduziert wird.

3.4.2 Chiralidon S

1,4-Diacetylbenzaldehyd wird auf dieselbe Weise umgesetzt, wie das 4-Acetylbenzaldehyd. Im Kapitel 5.1 ist die detaillierte Durchführung beschrieben. Die Probenaufarbeitung ist unter 4.2 zu finden. Alle Chromatogramme sind bei identischen Parametern durchgeführt worden, welche im Kapitel 4.2.1 beschrieben sind.

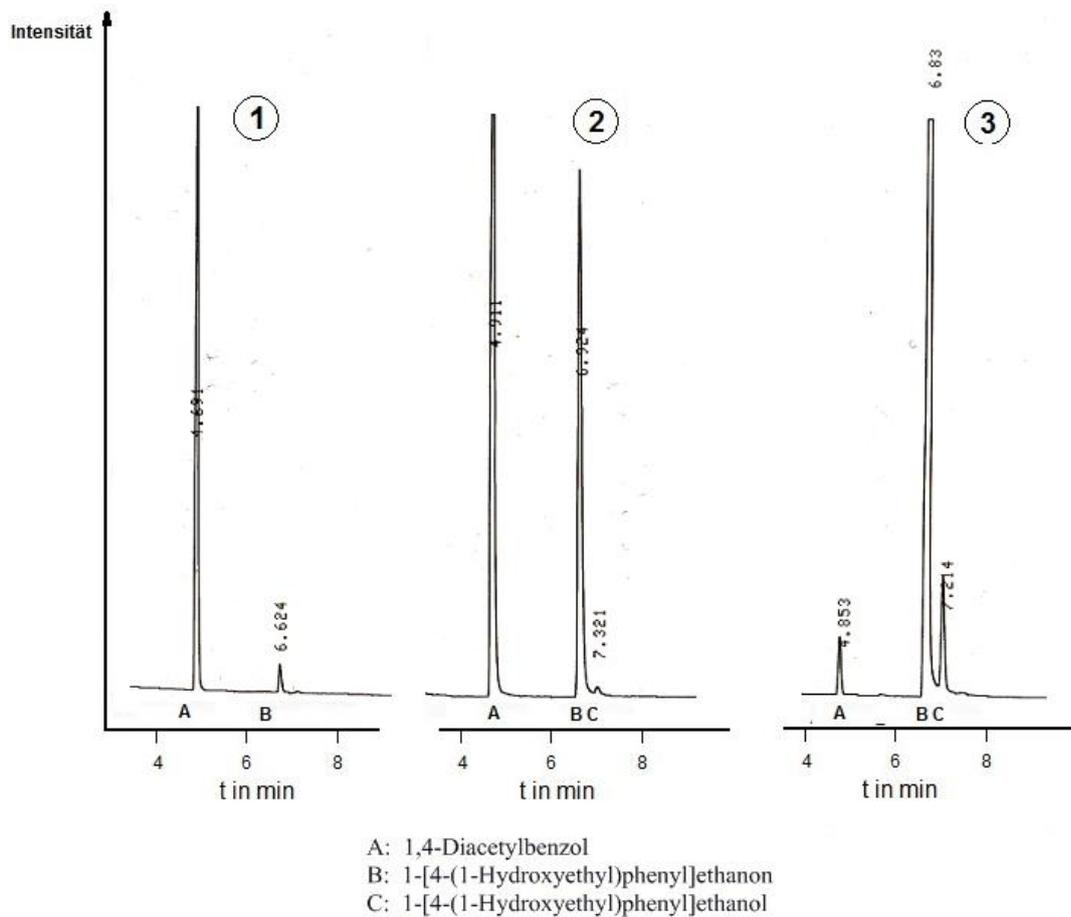


ABBILDUNG 32

GC-ERGEBNISSE VON VERSUCH 3.4.2

Nach 112 Minuten sind 4,2 % an Substrat zum 1-[4-(1-Hydroxyethyl)-phenyl]ethanon umgesetzt worden (Chromatogramm 1). Am ersten Versuchstag wird keine Bildung von 1-[4-(1-Hydroxyethyl)-phenyl]ethanol gemessen, erst nach 24 Stunden lässt sich das vollständig reduzierte Produkt beobachten (Chromatogramm 2). Das dritte Chromatogramm zeigt das Ergebnis des Versuches nach 14 Tagen Reaktionsdauer. 2,0% des 1,4-Diacetylbenzaldehydes sind am Versuchende vorhanden. Das Produktgemisch besteht aus 93,0 % 1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanon und 5,0% 1-[4-(1-Hydroxyethyl)-phenyl]ethanol.

In der folgenden Abbildung 34 wurden die chromatographisch gemessenen Werte in Excel übertragen und graphisch dargestellt.

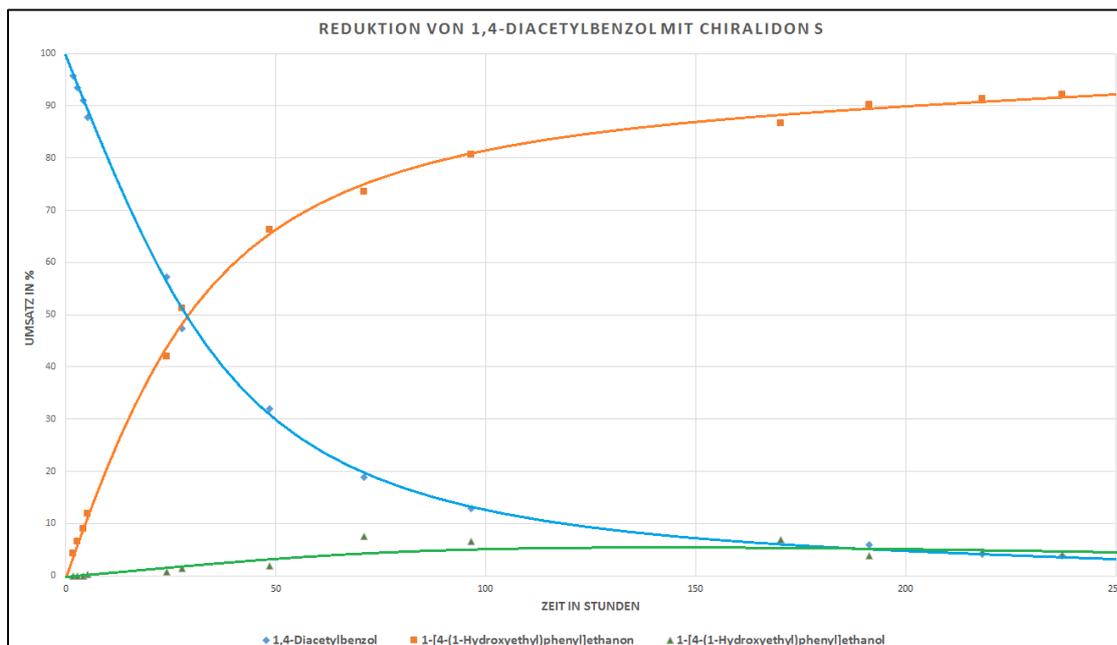


ABBILDUNG 33 REDUKTION VON 1,4-DIACETYL BENZOL MIT CHIRALIDON S

Die Anfangsgeschwindigkeit zur Bildung von 1-[4-(1-Hydroxyethyl)]-phenyl]ethanon beträgt 2,2% pro Stunde. Mit 0,02% pro Stunde wird das 1-[4-(1-Hydroxyethyl)]-phenyl]ethanol gebildet.

3.4.3 Diskussion

Der Unterschied in den Reaktionsgeschwindigkeiten zur Bildung von 1-[4-(1-Hydroxyethyl)]-phenyl]ethanon mit den Katalysatoren Chiralidon R (2,4%/Stunde) und Chiralidon S (2,2%/Stunden) ist gering, während das vollständig reduziert Produkt mit Chiralidon R um Faktor drei schneller gebildet wird (Chiralidon R: 0,06%/Stunde, Chiralidon S: 0,03%/Stunde). Das wird an der Menge an 1-[4-(1-Hydroxyethyl)]-phenyl]ethanol am Ende der jeweiligen Versuche deutlich. Mit Chiralidon umgesetztes 1,4-Diacetylbenzaldehydes enthält nach 14 Tagen Reaktionsdauer 18,2% 1-[4-(1-Hydroxyethyl)]-phenyl]ethanol, das mit Chiralidon S reduzierte Gemisch 5,0%. Das unterschiedliche Reduktionsverhalten der Katalysatoren deutet auf eine höhere Aktivität von Chiralidon R hin. Ob die Katalysatoren während der Lagerung verschieden schnell abbauen oder ob die Reduktion von 1-[4-(1-Hydroxyethyl)]-phenyl]ethanon durch Chiralidon S stärker sterisch gehindert ist, konnte nicht geklärt werden.

3.4.4 Strukturaufklärung

Das H^1 -NMR-Spektrum wurde von dem Produkt der chemischen Reduktion von 1,4-Diacetylbenzol mit Natriumborhydrid aufgenommen. Die Zusammensetzung der Probe wurde vorher gaschromatographisch ermittelt, sie beträgt 1,5% an Substanz A, 83,5% für B und 15,0% für C. Rechts ist das zugehörige Chromatogramm abgebildet. Die Ergebnisse dieser Messung werden in der folgenden Tabelle 6 zusammengefasst.

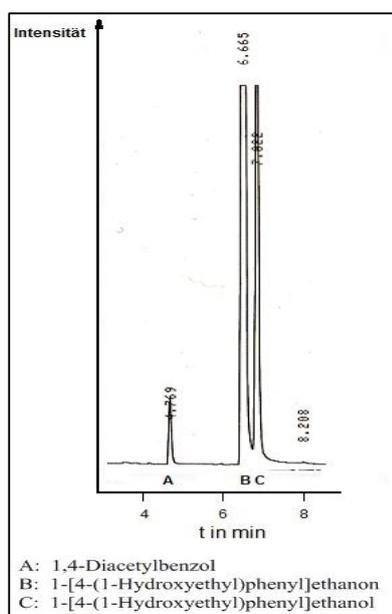


ABBILDUNG 34 CHEMISCHE REDUKTION VON 1,4-ACETYLBNZOL

Chemische Verschiebung			
1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanol			
Proton	δ berechnet [ppm]	δ experimentell [ppm]	Multiplizität
a	1,2	1,4	2 : Dublett
b	4,6	4,7	4 : Quartett
c	7,6	7,4	4 : Quartett
d	7,9	7,8	4 : Quartett
e	2,5	2,5	1 : Singulett
1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanol			
a	1,2	1,4	1 : Singulett
b	4,6	4,7	4 : Quartett
c	7,2	7,2	1 : Singulett
d	4,5	4,6	3 : Triplet
Auswertung der Integrale			
1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanol			
Proton	Höhe des Integrals in cm	Anzahl der Protonen	Berechnete Protonenanzahl
a + a	10,3	3 + 6	--
b + b	3,3	1 + 2	--
c + d	9,8	4	3,9
e	7,6	3	3
1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanol			
a + a	10,3	6 + 3	--
b + b	3,3	2 + 1	--
c	1,6	4	4

TABELLE 7 AUSWERTUNG DES H^1 -NMR SPEKTRUMS VON ABBILDUNG 36

Für die drei Protonen **e** von 1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanon erhält man eine Höhe des Integrals von 7,6 cm. Ein Proton von 1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanon hat somit eine Höhe von 2,5 cm im H^1 -NMR-Spektrum. Für die Höhe des Integrals der vier Benzolprotonen **c** von 1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanol ergibt ein Wert von 1,6 cm bzw. 0,4 cm für ein Proton. Bei den Peaks der Protonen **aa** kommt es zur Überlagerung, weshalb eine Zuordnung der integrierten Flächen zu den jeweiligen Protonen unmöglich ist. Die Gesamthöhe des Integrals resultiert aus drei **a**- und sechs **a**-Protonen und lässt sich mit $3 \cdot 2,5 \text{ cm} + 6 \cdot 0,4 \text{ cm}$ berechnen. Man erhält ein Wert von 9,9 cm, der nahe beim abgelesenen Wert von 10,3 cm liegt. Auch die Peaks von Proton **b** und der beiden Protonen **b** überlagern sich. Der berechnete Wert (3,3 cm) für die Gesamthöhe des Integrals entspricht dem gemessenen Wert. Außerdem lässt sich das Verhältnis der beiden Substanzen in der Probe anhand der unterschiedlichen Integralhöhen für ein Proton berechnen. Das Ergebnis sind 86% 1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanon (GC-Messung: 83,5%) und 14% 1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanol (GC-Messung: 15,2%). Die Abweichungen zwischen den H^1 -NMR- und GC-Werten sind damit zu erklären, dass das 1,4-Diacetylbenzaldehyd bei der Auswertung des H^1 -NMR-Spektrums nicht berücksichtigt wurde.

3.5 Chemische Reduktion

Ziel der folgenden Versuche besteht darin, die in den vorangegangenen Versuchen verwendeten Substrate chemisch zu reduzieren und anschließend die Ergebnisse zu vergleichen. Für die chemische Reduktion wird Natriumborhydrid verwendet.

3.5.1 1,4-Diacetylbenzol mit Natriumborhydrid

In Vorversuchen lässt sich mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie feststellen, dass bereits nach 15 Minuten kein Substrat mehr nachgewiesen werden kann und somit vollständig reduziert wurde. In Abbildung 37 ist der Reaktionsstand nach 15 und nach 30 Minuten dargestellt. Dabei wird jeweils links das Reaktionsgemisch und rechts das 1,4-Diacetylbenzaldehyd als Referenz aufgetragen. Als mobile Phase dient ein Gemisch aus n-Hexan und Essigsäureethylester im Volumenverhältnis von 10:3.

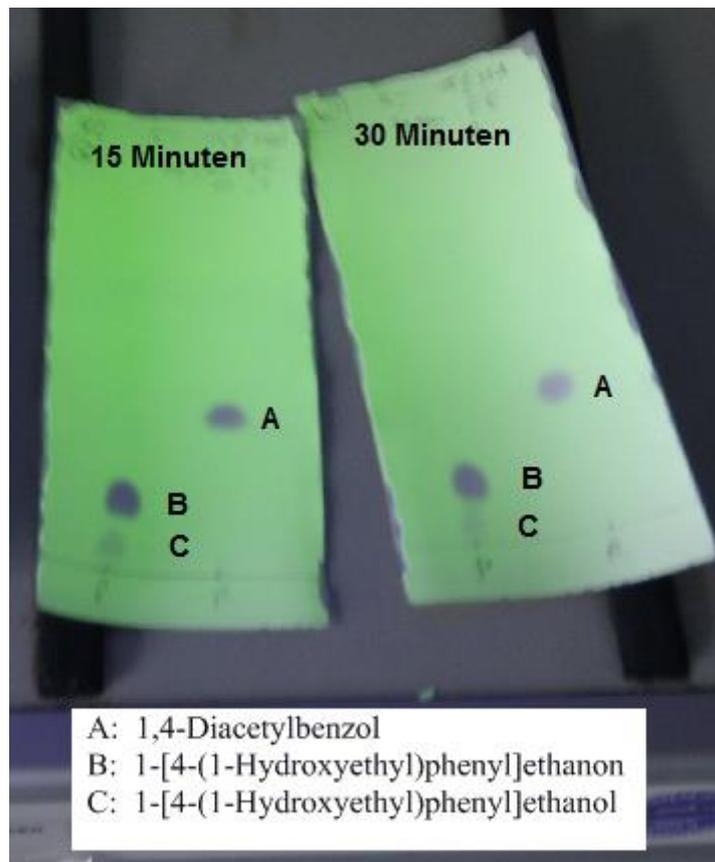
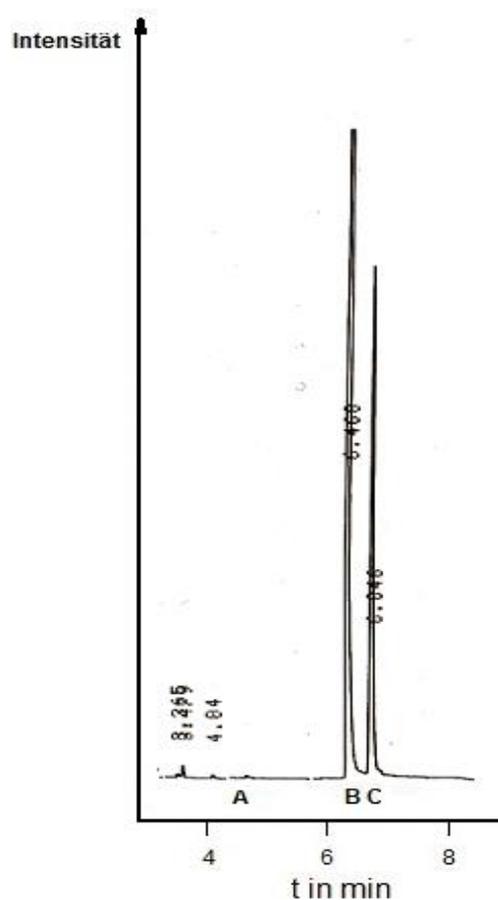


ABBILDUNG 36

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE: VORVERSUCH ZU 3.5.3

Im Kapitel 4.5 ist die detaillierte Durchführung für die Reduktion von 1,4-Diacetylbenzaldehyd mit Natriumborhydrid beschrieben.

Die Reaktionszeit beträgt 21 Minuten. Der Abbruch der Reaktion geschieht durch die Zugabe von 1 mL einer 10%igen HCl-Lösung (Kapitel 4.5). Nach einer anschließenden Aufarbeitung des Produktgemisches wird die Zusammensetzung der Probe gaschromatographisch ermittelt. Das Chromatogramm ist in Abbildung 38 dargestellt. Die Menge an Substrat ist so gering, dass sie mit Hilfe des Gaschromatographen nicht mehr erfasst werden kann. Das Verhältnis der gebildeten Produkte liegt bei 76,4% für das 1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanon und 23,6 % für das 1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanol.



A: 1,4-Diacetylbenzol
 B: 1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanon
 C: 1-[4-(1-Hydroxyethyl)phenyl]ethanol

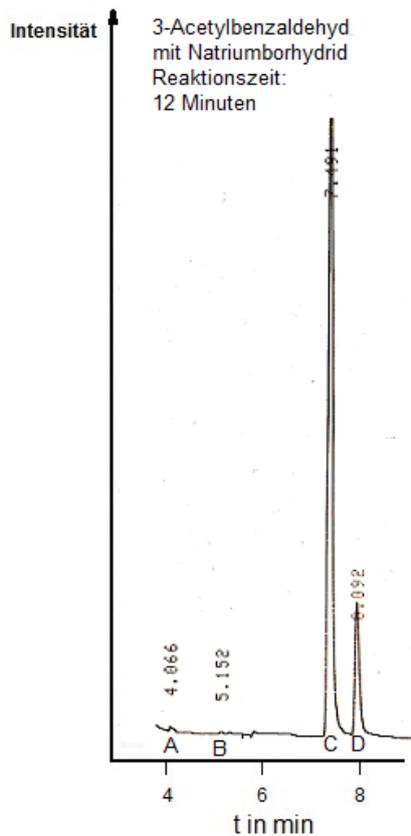
ABBILDUNG 37 UMSETZUNG VON 1,4-DIACETYLBNZOL MIT NATRIUMBORHYDRID

3.5.2 Reduktion der Benzaldehyde mit Natriumborhydrid

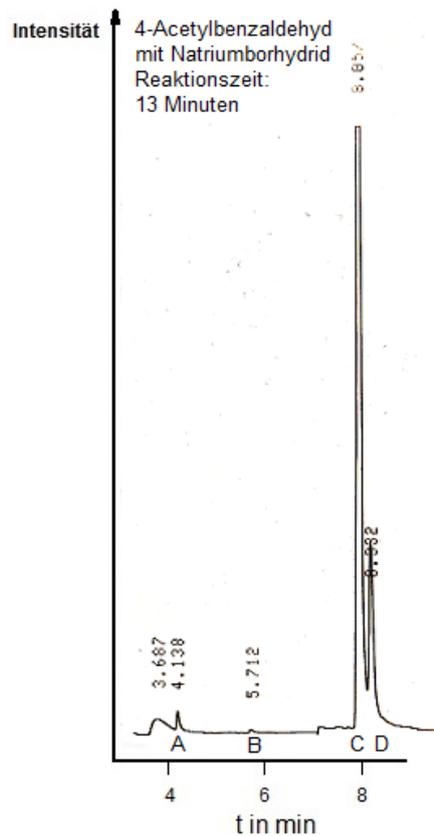
Im Kapitel 4.5 ist die detaillierte Durchführung für die Reduktion von 3-Acetylbenzaldehyd und 4-Acetylbenzaldehyd mit Natriumborhydrid beschrieben. Das 2-Acetylbenzaldehyd wird aufgrund der Verunreinigung nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse der Reduktion von 3-Acetylbenzaldehyd und 4-Acetylbenzaldehyd mit Natriumborhydrid sind in Abbildung 39 aufgeführt. Das Edukt wird bei beiden Versuchen innerhalb von 12 bzw. 13 Minuten nahezu vollständig reduziert. Es ist zu beobachten, dass durch das Natriumborhydrid hauptsächlich die Aldehydgruppe reduziert wird. Der Umsatz an 3-[1-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon beträgt 81,8 %, während der Umsatz an 4-[1-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon bei 83,9 % liegt. Die Anteile an 3-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd und 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd liegen unter 1%. Es ist wahrscheinlich, dass diese Produkte, sobald sie sich bilden, weiter zu

den vollständig reduzierten Produkten umgesetzt werden.



- A: 3-Acetylbenzaldehyd
- B: 3-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd
- C: 1-[3-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon
- D: 1-[3-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanol



- A: 4-Acetylbenzaldehyd
- B: 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd
- C: 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon
- D: 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanol

ABBILDUNG 38

REDUKTION: 3-ACETYLBNZALDEHYD UND 4-ACETYLBNZALDEHYD

3.6 Konkurrenzreaktion von Benzaldehyd und Acetophenon

In den Versuchen zur enzymatischen Reduktion der Acetylbenzaldehyde konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Katalysatoren unterschiedlich stark, aber bevorzugt, die Ketogruppe reduzieren. Dieses Verhalten soll im folgenden Versuch anhand von Benzaldehyd und Acetophenon untersucht werden.

3.6.1 Chiralidon R

Der Benzaldehyd und das Acetophenon wird im Stoffmengenverhältnis 1:1 im Eluenten, einem Gemisch aus 2-Propanol und Wasser (Volumenverhältnis 9:1), gelöst. Die Umsetzung beginnt mit der Zugabe von Chiralidon R. Die Reaktion läuft bei Raumtemperatur und gleichmäßigem Rühren in einem geschlossenen Erlenmeyerkolben ab. Der Rührfisch wird an einem Fish-Clip® befestigt, sodass das

Chiralidon nicht zerrieben wird. Im Kapitel 4.1 ist die detaillierte Durchführung beschrieben. Die Probenaufarbeitung für die GC-Messung ist unter (4.2) zu finden. Alle Chromatogramme sind bei identischen Parametern durchgeführt worden, welche im Kapitel 4.4 beschrieben sind.

3.6.1.1 Ergebnisse

In Abbildung 40 sind drei Chromatogramme abgebildet. Sie zeigen den zeitlichen Verlauf der Reaktion. Zur besseren Übersicht sind diese auf das Intervall mit den Retentionszeiten von ca. drei bis zehn Minuten beschränkt, sodass der Lösungsmittelpeak nicht dargestellt ist.

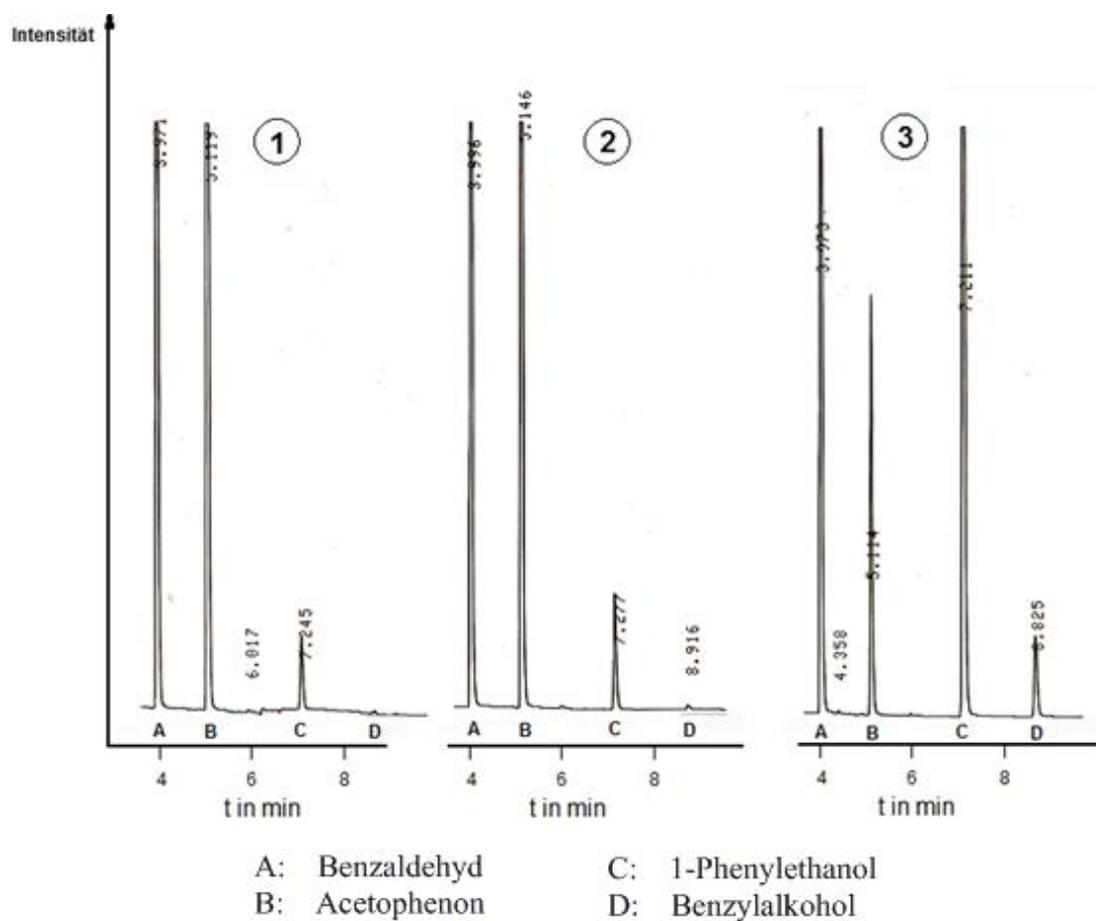


ABBILDUNG 39 KONKURRENZREAKTION BENZALDEHYD/ACETOPHENON MIT CHIRALIDON R

Im ersten Chromatogramm ist der Stand der Reaktion nach 127 Minuten zu erkennen. Von der ursprünglichen Menge an Acetophenon sind 4,6 % zum 1-Phenylethanol reduziert worden. Nach 178 Minuten wird Phenylmethanol (0,3 %) als Reduktionsprodukt von Benzaldehyd detektiert (Chromatogramm 2). Am Ende des Versuches wurden 92,8 % Acetophenon zum 1-Phenylethanol und 21,1 %

Benzaldehyd zum Benzylalkohol reduziert (Chromatogramm 3). Die Reaktionsdauer beträgt 16 Tage.

In der folgenden Abbildung 41 wurden die chromatographisch gemessenen Werte in Excel übertragen und graphisch dargestellt.

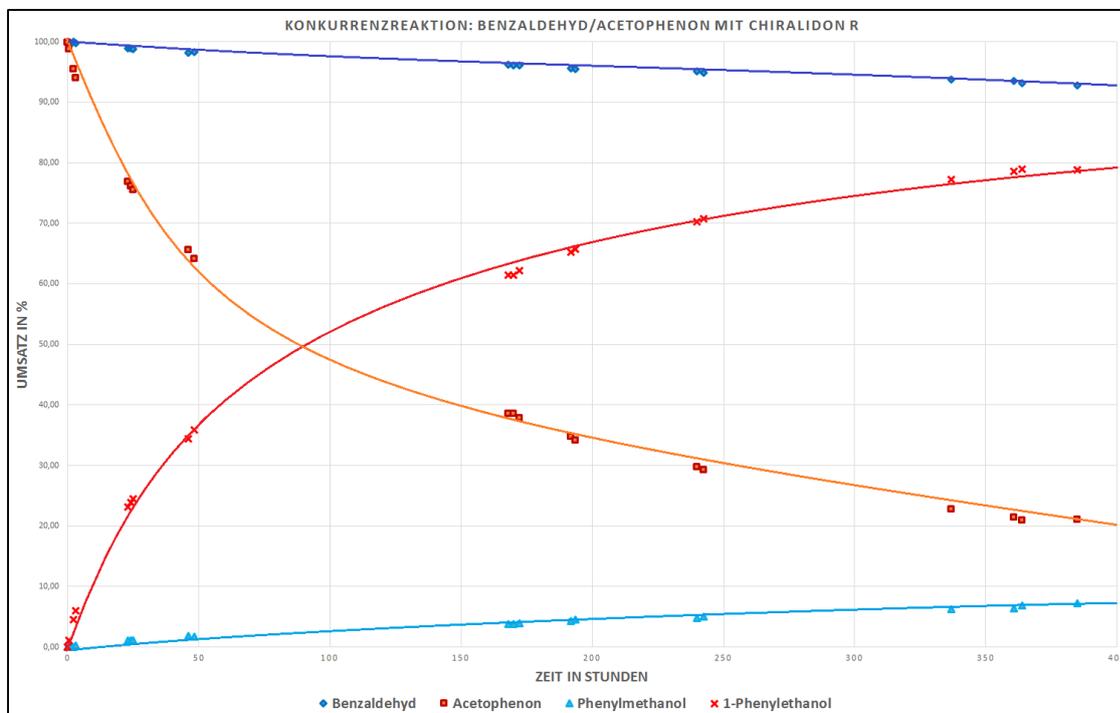


ABBILDUNG 40 VERLAUF DER KONKURRENZREAKTION BENZALDEHYD/ACETOPHENON MIT CHIRALIDON R

In Abbildung 41 ist der Unterschied zwischen der Reduktion von Acetophenon und der Reduktion von Benzaldehyd durch Chiralidon R zu erkennen. Der Katalysator ist deutlich selektiver gegenüber der Ketogruppe.

3.6.2 Chiralidon S

Der Benzaldehyd und das Acetophenon wird im Stoffmengenverhältnis 1:1 im Eluenten, einem Gemisch aus 2-Propanol und Wasser (Volumenverhältnis 9:1), gelöst. Die Umsetzung beginnt mit der Zugabe von Chiralidon S. Die Reaktion läuft bei Raumtemperatur und gleichmäßigem Rühren in einem geschlossenen Erlenmeyerkolben ab. Der Rührfisch wird an einem Fish-Clip® befestigt, sodass das Chiralidon nicht zerrieben wird. Im Kapitel 4.1 ist die detaillierte Durchführung beschrieben. Die Probenaufarbeitung für die GC-Messung ist unter (4.2) zu finden. Alle Chromatogramme sind bei identischen Parametern durchgeführt worden, welche im Kapitel 4.4 beschrieben sind.

3.6.2.1 Ergebnisse

In Abbildung 42 sind zwei Chromatogramme abgebildet. Sie zeigen den Beginn und das Ende der Reaktion. Zur besseren Übersicht sind diese auf das Intervall mit den Retentionszeiten von ca. drei bis zehn Minuten beschränkt, sodass der Lösungsmittelpeak nicht dargestellt ist.

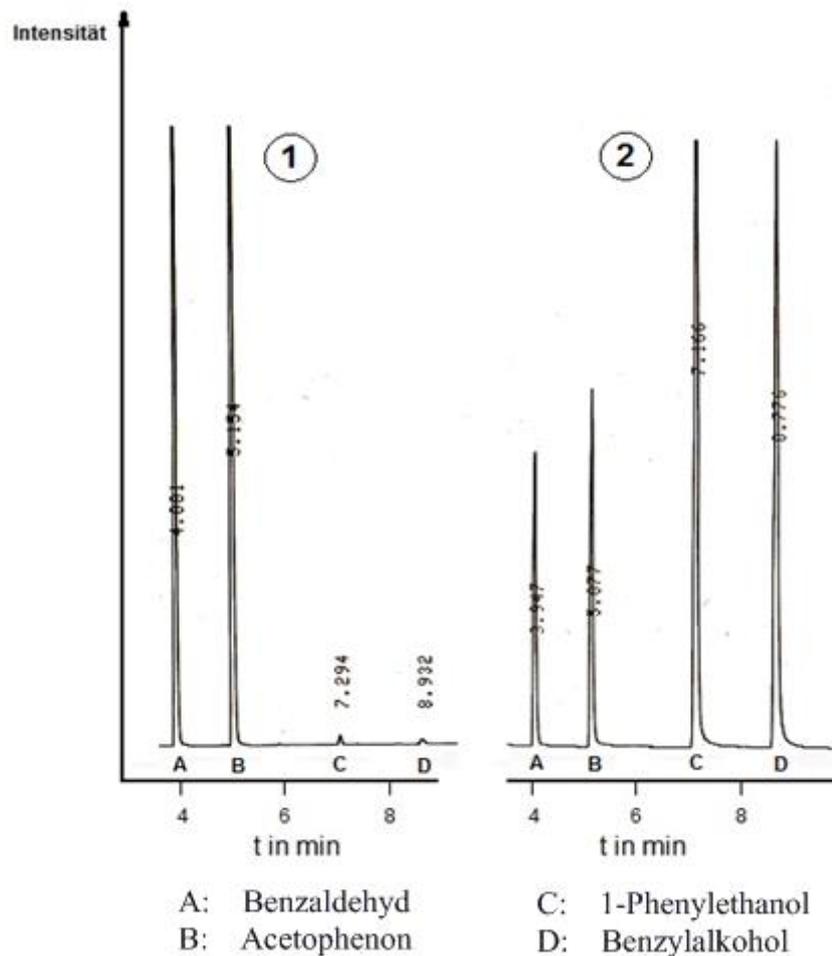


ABBILDUNG 41 KONKURRENZREAKTION BENZALDEHYD/ACETOPHENON MIT CHIRALIDON S

Bereits nach 28 Minuten Reaktionszeit sind die jeweiligen Produkte von Benzaldehyd und Acetophenon zu erkennen (Chromatogramm 1). Der Anteil an 1-Phenylethanol liegt bei 0,7% und der von Benzylalkohol bei 0,8% vor. Am Ende des Versuches wurden 76,4 % Acetophenon zum 1-Phenylethanol und 74,0 % Benzaldehyd zum Benzylalkohol reduziert (Chromatogramm 2). Die Reaktionsdauer beträgt 16 Tage.

In der folgenden Abbildung 43 wurden die chromatographisch gemessenen Werte in Excel übertragen und graphisch dargestellt.

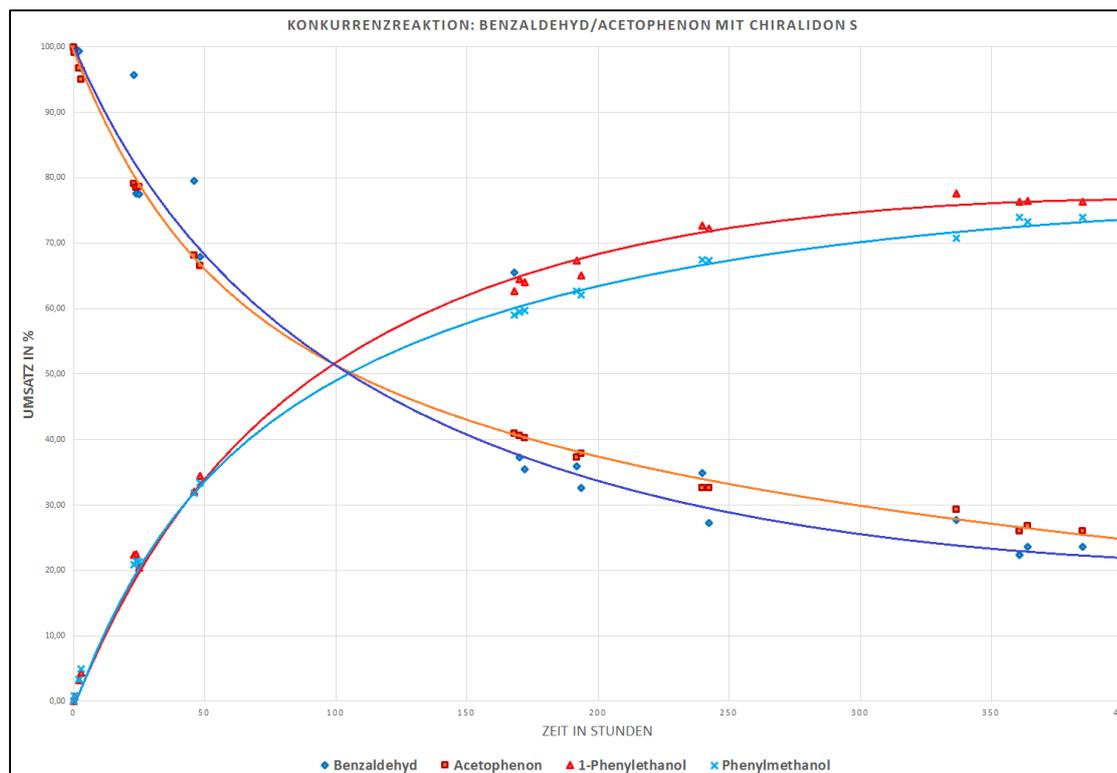


ABBILDUNG 42 VERLAUF DER KONKURRENZREAKTION BENZALDEHYD/ACETOPHENON MIT CHIRALIDON S

Chiralidon S reduziert sowohl Acetophenon als auch Benzaldehyd nahezu gleich schnell. Es ist nur eine geringe Bevorzugung von der Ketogruppe zu beobachten.

3.6.3 Diskussion

In den Versuchen 3.1 und 3.2 konnte festgestellt werden, dass Reaktionsgeschwindigkeit der Reduktion von Ketonen gegenüber den Aldehyden beim Chiralidon R signifikant höher ist als beim Chiralidon S. Dies wurde auch in diesem Versuch gezeigt. Die Reduktion von den Acetylbenzaldehyden im Vergleich zum Acetophenon/Benzaldehyd- Gemisch unter Verwendung von Chiralidon S zeigt einen deutlichen Unterschied. Während bei den Acetylbenzaldehyden die Ketogruppen schneller reduziert werden als die Aldehydgruppe, ist bei der Konkurrenzreaktion eine Bevorzugung kaum zu erkennen.

3.7 Optimierte Reaktionsbedingungen

Durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 30°C und den Entzug des Acetons aus der Lösung soll in diesem Versuch die Geschwindigkeit der Umsetzung von 4-

Acetylbenzaldehyd mit Chiralidon R gesteigert werden. Im Kapitel 4.7 ist die detaillierte Versuchsdurchführung beschrieben.

3.7.1 Acetonnachweis

Bei der Cofaktorregenerierung wird Isopropanol zu Aceton oxidiert. In den ersten beiden Stunden der Reaktion soll die Bildung des Acetons nachgewiesen werden. In dieser Zeit wird kein Vakuum angelegt. Die Vorlage wird durch eine Kältemischung gekühlt. An der Gefäßwand kann das gebildete Aceton kondensieren, anschließend mit Dichlormethan aufgenommen und gemessen werden. Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 43 (Chromatogramm 1) zu sehen. Zum Vergleich wird eine 1:50 Lösung aus Aceton und Dichlormethan gemessen (Chromatogramm 2). Die Retentionszeiten stimmen überein, was für die Bildung von Aceton spricht.

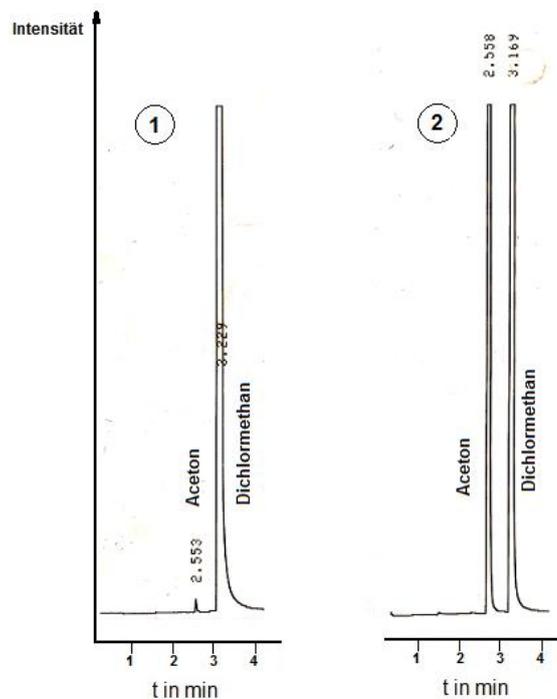


ABBILDUNG 43

NACHWEIS ACETON

3.7.2 Ergebnisse

In der folgenden Abbildung 44 wurden die chromatographisch gemessenen Werte in Excel übertragen und graphisch dargestellt.

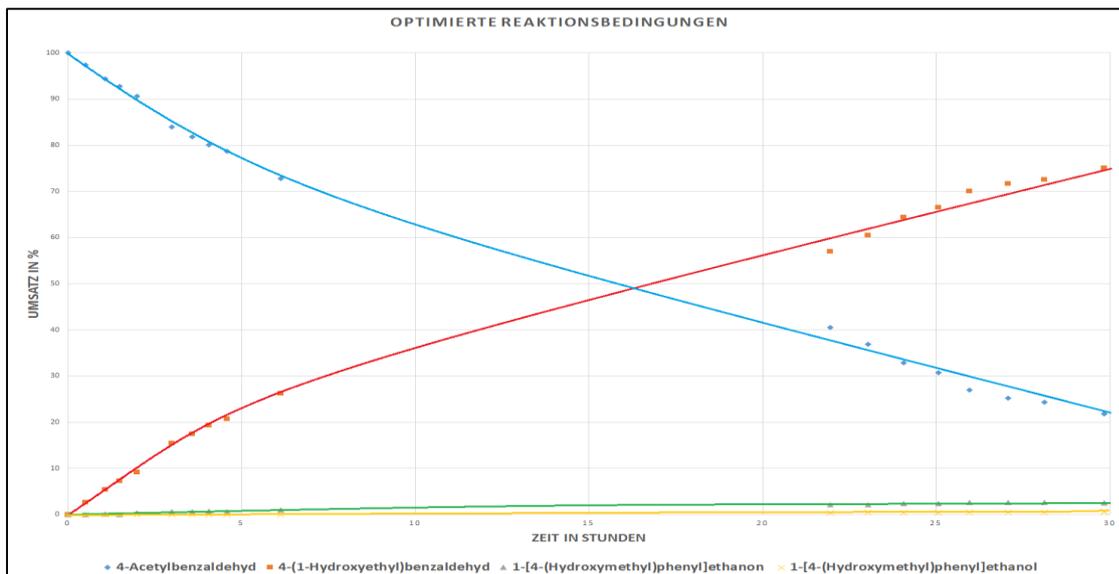


ABBILDUNG 44 VERLAUF REAKTION (VERSUCH: 3.7)

Nach 30 Stunden Reaktionszeit wird mit der Optimierung der Reaktionsbedingungen ein Umsatz an 4-(Hydroxyethyl)benzaldehyd von 75,0% erreicht. Außerdem enthält die Probe 2,5% 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanon und 0,6% 1-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]ethanol. Damit wurden 78,9% an Substrat reduziert. Stellt man die Reaktionsverläufe von Versuch 3.1.1 und 3.7 gegenüber, so erkennt man, dass die Umsetzung aufgrund der höheren Temperatur und durch das Verschieben des Gleichgewichtes durch das Entfernen des Acetons deutlich schneller abläuft. Der Unterschied der beiden Reaktionen ist in Abbildung 45 anhand von 4-Acetylbenzaldehyd und 4-(Hydroxyethyl)benzaldehyd dargestellt.

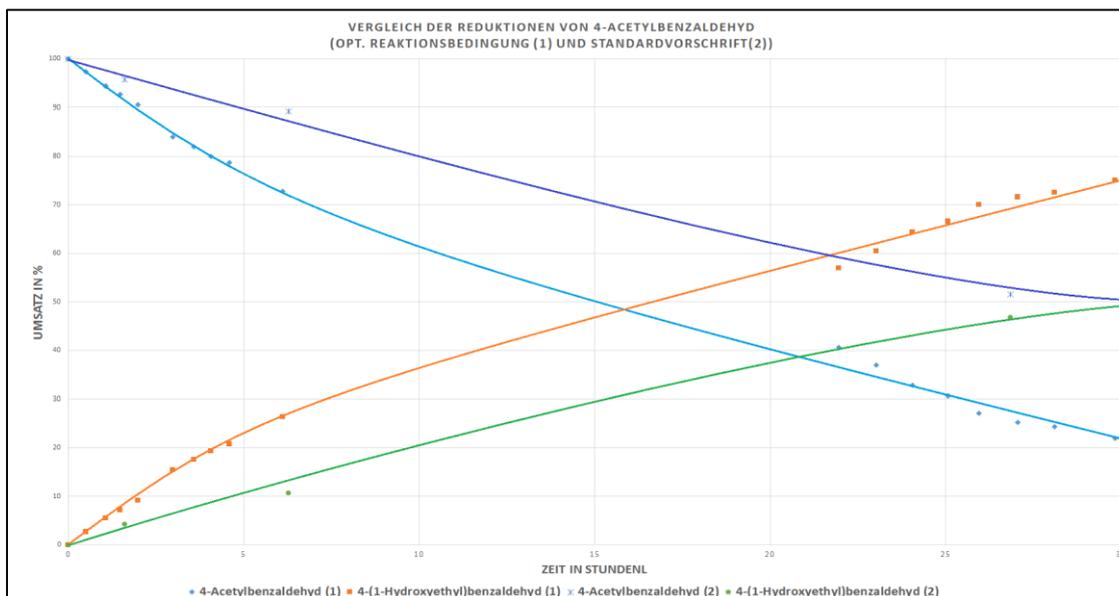


ABBILDUNG 45 GEGENÜBERSTELLUNG DER BEIDEN VERSUCHE

4 Experimenteller Teil

4.1 Vorschrift der enzymatischen Reduktion (Standardvorschrift)

Chemikalien:

Chiralidon R oder S	2 mmol Substrat
	2 g Katalysator (Chiralidon R oder S)
	20 mL i-Propanol/Wasser (9:1, v/v)

Geräteeinstellung:

Magnetrührplatte	300 U/min
------------------	-----------

Durchführung:

In einem 50 mL Erlenmeyerkolben werden 2 mmol Substrat vorgelegt und 20 mL eines Gemisches aus 2-Propanol und Wasser (Volumenverhältnis 9:1) hinzu pipettiert. Das Gemisch wird mittels einer Magnetrührplatte und einem am Clip-Fish[®] befestigten Magnetrührfisch solange gerührt, bis sich das Substrat vollständig gelöst hat. Anschließend werden 2,0 g Chiralidon S oder R eingewogen und in den Erlenmeyerkolben überführt. Die Reaktion läuft unter konstantem Rühren bei 300 U/min ab. Es werden stündlich eine Probe entnommen und nach der Vorschrift im Kapitel 4.2 für die GC-Messung aufgearbeitet. Am Ende des Versuches erfolgt eine Aufgearbeitet der Produkte (Kapitel 4.3).

4.2 Aufarbeitung der Proben für den Gaschromatographen

Chemikalien:

VE-Wasser	0,5 ml
Dichlormethan	1 mL
Calciumchlorid	
	20 mL i-Propanol/Wasser (9:1, v/v)

Geräte:

Zentrifuge	13000 U/min
------------	-------------

Durchführung:

Man entnimmt 200 μ L Probe mittels einer Eppendorf Pipette und überführt sie in eine 2 mL Microtube. Anschließend werden 0,5 mL VE-Wasser und 1 mL Dichlormethan hinzu pipettiert (es bilden sich zwei Phasen). Der Behälter wird verschlossen und kräftig geschüttelt, dabei geht das Substrat in die organische und das i-Propanol in die wässrige Phase über. Das lässt man fünf Minuten ruhen, sodass sich beide Phasen erneut trennen. Die obere, wässrige Phase wird mittels einer Eppendorf Pipette aufgenommen und verworfen. Zu der organischen Phase wird ein bis zwei Spatelspitzen Calciumchlorid zugegeben und nach Verschließen des Microtubes erneut kräftig geschüttelt. Dabei sollte man beobachten, ob das Calciumchlorid Flocken bildet. Ist das gesamte Trocknungsmittel verklumpt, gibt man solange Calciumchlorid hinzu, bis eine Flockung erkennbar ist. Damit stellt man sicher, dass das gesamte Wasser gebunden worden ist, welches die Säule schädigen kann. Das Gemisch wird zehn Minuten ruhen gelassen, damit sich der Feststoff absetzen kann. Schließlich werden 200 μ L vorsichtig entnommen (möglichst kein Feststoff aufnehmen), in eine weitere Microtube überführt und für zwei Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Der obere Teil der zentrifugierten Lösung kann jetzt in die GC eingespritzt werden.

4.3 Aufarbeitung der Produkte

Chemikalien:

VE-Wasser	3 mal 10 ml
Diethylether	20 mL
Calciumchlorid	

Durchführung:

Die Probe wird zunächst abgenutscht, um sie vom dem Katalysator zu trennen. Die Lösung wird in ein Scheidetrichter überführt, mit 20 mL Diethylether versetzt und geschüttelt. Anschließend werden 10 mL VE-Wasser zugegeben und erneut kräftig geschüttelt. Es bilden sich zwei Phasen. Die untere Phase wird verworfen. Die organische Phase wird zwei weitere Male mit je 10 mL gewaschen. Die gewaschene organische Phase wird in ein verschließbares Gefäß gegeben und mit Calciumchlorid über Nacht im Kühlschrank getrocknet. Die Probe wird abfiltriert und im Rotationsverdampfer bei 80°C und einem Druck von 200 mbar eingeengt. Schließlich wird die Probe in einem evakuierten Exsikkator für mindestens 24 Stunden getrocknet. In einem Verhältnis von 1:50 in Dichlormethan gelöst, kann die Probe in den Gaschromatographen eingespritzt werden.

4.4 Analytik

4.4.1 Gaschromatographische Bestimmung 1

Geräte:

Gaschromatograph	Shimadzu, GC-14B
Integrator	Shimadzu, C-R5A Chromatopac
GC-Spritze	Hamilton 7000.5 KH 0,5 µL
Säule	Macherey-Nagel, OPTIMA FFAPlus

Parameter des Gaschromatographen:

Injektortemperatur	250 °C
Detektortemperatur	250 °C
Säulentemperatur	240 °C
Carrier 1 N ₂	0,5 bar
Carrier 2 N ₂	0,5 bar
Wasserstoff	0,6 bar
Druckluft	0,5 bar
Split	1:30
Einspritzmenge	0,02 µL

Durchführung:

Am Gaschromatographen werden die oben aufgelisteten Parameter eingestellt. Es wird mit der ersten Messung solange gewartet, bis eine stabile Basislinie am Integrator zu erkennen ist. Vor der Messung der Proben wird das jeweilige Substrat im Verhältnis 1:50 in Dichlormethan gelöst und die Retentionszeit bestimmt. Anschließend werden die Proben der einzelnen Ansätze eingespritzt. Die Chromatogramme werden mit der Versuchsbezeichnung, einer fortlaufenden Nummer und dem aktuellem Datum beschriftet.

4.4.2 Gaschromatographische Bestimmung 2

Die folgenden Parameter gelten für die Konkurrenzreaktion von Acetophenon und Benzaldehyd.

Geräte:

Gaschromatograph	Shimadzu, GC-14B
Integrator	Shimadzu, C-R5A Chromatopac
GC-Spritze	Hamilton 7000.5 KH 0,5 µL
Säule	Macherey-Nagel, OPTIMA FFAPplus

Parameter des Gaschromatographen:

Injektortemperatur	250 °C
Detektortemperatur	250 °C
Säulentemperatur	150 °C
Carrier 1 N ₂	0,5 bar
Carrier 2 N ₂	0,5 bar
Wasserstoff	0,6 bar
Druckluft	0,5 bar
Split	1:30
Einspritzmenge	0,02 µL

Durchführung:

Die Durchführung erfolgt analog zum Kapitel 4.4.1

4.4.3 HPLC Bestimmung

Geräte:

HPLC	Shimadzu, LC-10AT
System Controller	Shimadzu, SCL-10A
Detektor	Shimadzu, SPD-M10A
Auto Injektor	Shimadzu, SIL-10A
Entgaser	GASTORR 154
Säule	Whelk-O1 (S,S)

Parameter des Gaschromatographen:

Injektortemperatur	250 °C
Detektortemperatur	250 °C
Säulentemperatur	240 °C
Carrier 1 N ₂	0,5 bar
Carrier 2 N ₂	0,5 bar
Wasserstoff	0,6 bar
Druckluft	0,5 bar
Split	1:30
Einspritzmenge	0,02 µL

Durchführung:

Am Gaschromatographen werden die oben aufgelisteten Parameter eingestellt. Es wird mit der ersten Messung solange gewartet, bis eine stabile Basislinie am der Integrator zu erkennen ist. Vor der Messung der Proben wird das jeweilige Substrat im Verhältnis 1:50 in Dichlormethan gelöst und die Retentionszeit bestimmt. Anschließend werden die Proben der einzelnen Ansätze eingespritzt. Die Chromatogramme werden mit der Versuchsbezeichnung, einer fortlaufenden Nummer und dem aktuellem Datum beschriftet.

4.4.4 Bestimmung des Enantiomerenüberschusses

Chemikalien:

Produkt der Reduktion mit 20 µL Probe, 1 mL Dichlormethan

Chiralidon R:

Produkt der Reduktion mit 20 µL Probe, 1 mL Dichlormethan

Chiralidon S:

Gemisch aus beiden Proben je 10 µL Probe, 1 mL Dichlormethan

Geräte:

Gaschromatograph Shimadzu, GC-14A

Integrator Shimadzu, C-R6A Chromatopac

GC-Spritze Hamilton 7000.5 KH 0,5 µL

Säule Macherey-Nagel, HYDRODEX γ-DIMON

Parameter des Gaschromatographen:

Injektortemperatur 250 °C

Detektortemperatur 250 °C

Säulentemperatur 175 °C

Carrier 1 He₂ 0,5 bar

Carrier 2 He₂ 1,5 bar

Wasserstoff 0,6 bar

Druckluft 0,5 bar

Split 1:30

Einspritzmenge 0,02 µL

Durchführung:

Am Gaschromatographen werden die oben aufgelisteten Parameter eingestellt. Es wird mit der ersten Messung solange gewartet, bis eine stabile Basislinie am der Integrator zu erkennen ist. Die Produkte der jeweiligen Reduktionen mit Chiralidon R und S werden zunächst einzeln gemessen. Anschließend wird ein Gemisch aus beiden Proben erstellt. Diese Gemisch wird dreimal gemessen und mit den Einzelmessungen verglichen.

4.5 Chemische Reduktion

Chemikalien:

2 mmol Acetylbenzaldehyd oder

Diacetylbenzol

1 mmol Natriumborhydrid

20 mL i-Propanol

10%ige HCl-Lösung

Geräteeinstellung:

Magnetrührplatte 300 U/min

Durchführung:

In einem 50 mL Erlenmeyerkolben werden 2 mmol des entsprechenden Acetylbenzaldehyds oder Diacetylbenzols vorgelegt und 20 mL 2-Propanol hinzu pipettiert. Das Gemisch wird mittels einer Magnetrührplatte und einem am Clip-Fish® befestigten Magnetrührfisch solange gerührt, bis sich das Substrat vollständig gelöst hat. Anschließend werde 1 mmol Natriumborhydrid in den Erlenmeyerkolben überführt. Die Reaktion läuft unter konstantem Rühren bei 300 U/min ab. Nach 10 Minuten wird 1 mL einer 10 %igen HCl-Lösung versetzt und anschließend mit Hilfe eines Scheidetrichters 3 mal mit je 10 ml VE-Wasser gewaschen. Die gewaschene organische Phase wird in ein verschließbares Gefäß gegeben und mit Calciumchlorid

über Nacht im Kühlschrank getrocknet. Die Probe wird abfiltriert und im Rotationsverdampfer bei 80°C und einem Druck von 200 mbar eingeeengt. Schließlich wird die Probe in einem evakuierten Exsikkator für mindestens 24 Stunden getrocknet. In einem Verhältnis von 1:50 in Dichlormethan gelöst, kann die Probe in den Gaschromatographen eingespritzt werden.

4.6 Derivatisierung mit MSTFA

Chemikalien:

10-15 mg Probe

0,8 mL Dichlormethan

0,2 mL MSTFA

10%ige HCl-Lösung

Durchführung:

Zwischen 10 und 15 mg Probe werden in 0,8 mL Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung werden 0,2 mL MSTFA zugegeben und mittels einen Magnetrührfisches und einer Magnetrührplatte zwei Stunden gerührt. Die Lösung kann anschließend direkt in den Gaschromatographen eingespritzt werden.

4.7 Optimierte Reaktionsbedingungen

Chemikalien:

Chiralidon R oder S	2 mmol 4-Acetylbenzaldehyd
	2 g Katalysator (Chiralidon R oder S)
	20 mL i-Propanol/Wasser (9:1, v/v)

Parameter:

Ölbad	30°C
Druck	350 mbar
Kältemischung	-10°C

Durchführung:

Der Aufbau der Versuchsapparatur ist in Abbildung 46 dargestellt. In einem 50 mL Zweihalskolben werden 2 mmol 4-Acetylbenzaldehyd vorgelegt und 20 mL eines Gemisches aus 2-Propanol und Wasser (Volumenverhältnis 9:1) hinzu pipettiert. Das Gemisch wird mittels einer Magnetrührplatte und einem am Clip-Fish® befestigten Magnetrührfisch solange gerührt, bis sich das Substrat vollständig gelöst hat. Anschließend werden 2,0 g Chiralidon R eingewogen und in den Kolben überführt. Die Reaktion läuft unter konstantem Rühren ab. Das Ölbad wird auf 30°C temperiert. In den ersten beiden Stunden wird ohne Vakuum gearbeitet. Die Vorlage wird durch eine Kältemischung gekühlt. Nach zwei Stunden wird die Vorlage von der Apparatur getrennt und es werden zügig 1 mL Dichlormethan hinzu pipettiert. Der Kolben wird geschwenkt, damit möglichst das gesamte Kondensat von dem Dichlormethan aufgenommen wird. Die Lösung in der Vorlage kann direkt gaschromatographisch gemessen werden. Anschließend wird in der Apparatur mit Hilfe einer Vakuumpumpe ein Druck von 350 mbar erzeugt. Am ersten Versuchstag werden alle 30 Minuten Proben gezogen und mit der GC gemessen. Am zweiten Tag wird der Umsatz stündlich bestimmt.

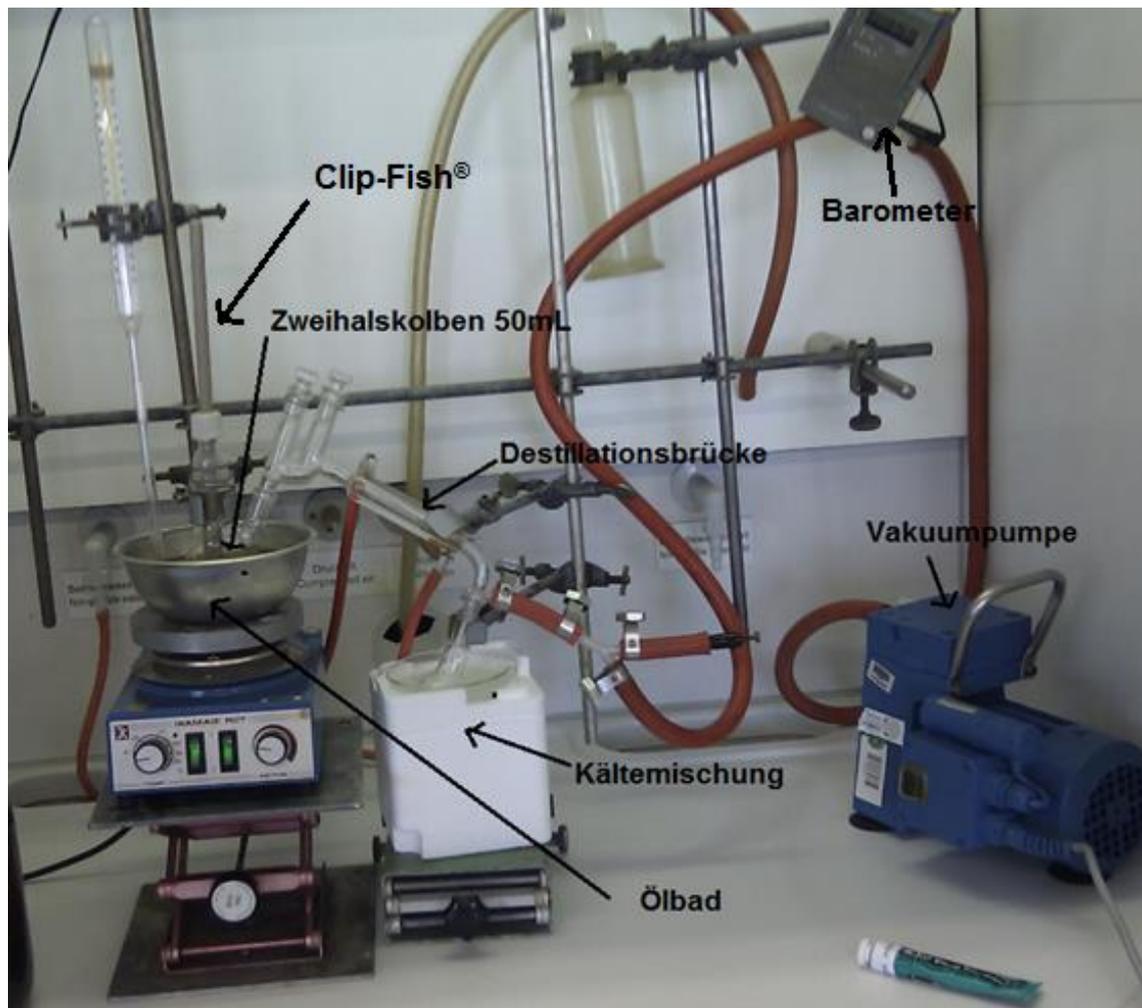


ABBILDUNG 46

APPARATUR ZUM VERSUCH 4.7

5 Anhang

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller	Modell
Gaschromatograph	Shimadzu	GC-14B
Integrator	Shimadzu	C-R5A Chromatopac
GC-Spritze	Hamilton	7000.5 KH 0,5 µL
Säule	Macherey-Nagel	OPTIMA FFAPplus
Gaschromatograph	Shimadzu	GC-14A
Integrator	Shimadzu	C-R6A Chromatopac
Säule	Macherey-Nagel	HYDRODEX γ-DIMON
H ¹ -NMR	JEOL NMR SPEKTROMETER	PMX 60si (60MHz)
HPLC	Shimadzu	LC-10AT
System Controller	Shimadzu	SCL-10A
Detektor	Shimadzu	SPD-M10A
Auto Injektor	Shimadzu	SIL-10A
Entgaser	GASTORR	154
Vakuummembranpumpe	Vacuubrand	1,7 m ³ /h
Rotationsverdampfer	Büchi	Rotavapor-R3
Zentrifuge	Heraeus	Biofuge Pico
UV-Lampe	Desaga	MinUVIS

5.1.2 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Reinheit
2-Acetylbenzaldehyd	ALDRICH	95%
3-Acetylbenzaldehyd	ALDRICH	95%
4-Acetylbenzaldehyd	ALDRICH	97%
1,4-Diacetylbenzol	ALDRICH	99%
Acetophenon	Fluka	99,0%
Benzaldehyd	Fluka	99,0%
n-Heptan	AppliChem	95%
Dichlormethan	PESTINORM	99,90%
(±)-1-Phenylethanol	Fluka	96,0%
MSTFA	CS-Chromatographie Servie GmbH	
i-Propanol	AnalaR NORMAPUR	99.7%
Calciumchlorid wasserfrei		
VE-Wasser		

5.2 Literaturverzeichnis

- [1] Klaus Buchholz. Biokatalysatoren und Enzymtechnologie
1997 WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim

- [2] David Nelson; Michael Cox. Lehninger Biochemie 4. Auflage
2009 Springer- Verlag, Berlin Heidelberg

- [3] Jeromin, Günter Erich und Bertau, Martin. Bioorganikum 1. Auflage
2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

- [4] Becker, Heinz. Organikum, 22. Auflage, 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH,
Weinheim

- [5] Jeromin, Günter Erich. Immobilisierung von Alkoholdehydrogenasen
und deren Coenzyme sowie Verwendung des Immobilisats
Veröffentlichungsnummer: DE102008038326 A1, 25. Febr. 2010

- [6] Jeromin, Günter Erich. Biotechnology Letters 31: 1717-1721,
Superabsorbed alcohol dehydrogenase- a new catalyst for
asymmetric reductions; Springer Science+Business Media B.V.; 2009

- [7] Schmich, Peter. Molekülspektroskopie Skript, Teil 4: NMR-Spektroskopie
2012 FH-Aachen

5.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Reduktion von Acethophenon mit Natriumborhydrid	2
Abbildung 2	NADPH	3
Abbildung 3	Mechanismus der enzymatischen Reduktion	4
Abbildung 4	Produkte der enzymatischen Reduktion von 4-Acetylbenzaldehyd 6	
Abbildung 5	Reaktionsschema von versuch 3.1.1	6
Abbildung 6	GC-Ergebnisse von Versuch 3.1.1	8
Abbildung 7	Reduktion von 4-Acetylbenzaldehyd mit Chiralidon R	9
Abbildung 8	GC-Ergebnisse zu Versuch 3.1.2	10
Abbildung 9	Reduktion von 4-Acetylbenzaldehyd mit Chiralidon S	11
Abbildung 10	Schema der Kinetik von Chiralidon R und S	13
Abbildung 11	Racemat aus (S)- und (R)-1-Phenylethanol	13
Abbildung 12	Gemisch aus den Produkten von Kapitel 3.1.1 und 3.1.2	14
Abbildung 13	Derivatisierung von 4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyd mit MSTFA15	
Abbildung 14	Racemat aus (S)- und (R)-1-Phenylethanol	16
Abbildung 15	H ¹ -NMR Spektrum vom 4-Acetylbenzaldehyd reduziert mit Chiralidon S	18
Abbildung 16	4-Acetylbenzaldehyd mit Chiralidon s und Natriumborhydrid ..	19
Abbildung 17	H ¹ -NMR Spektrum von 4-Acetylbenzaldehyd reduziert mit Natriumborhydrid	20
Abbildung 18	Produkte der enzymatischen Reduktion von 3-Acetylbenzaldehyd	22
Abbildung 19	GC-Ergebnisse von Versuch 3.2.1	23
Abbildung 20	Reduktion von 3-Acetylbenzaldehyd mit Chiralidon R	24
Abbildung 21	GC-Ergebnisse von Versuch 3.2.1	25
Abbildung 22	Reduktion von 3-Acetylbenzaldehyd mit Chiralidon S	26
Abbildung 23	Gemisch aus den Produkten von Versuch 3.2.1 und 3.2.2	27
Abbildung 24	Produkte aus Versuch 3.2.1 und 3.2.2 einzeln gemessen	28
Abbildung 25	H ¹ -NMR Spektrum von 3-Acetylbenzaldehyd reduziert mit Natriumborhydrid	30
Abbildung 26	Produkte der enzymatischen Reduktion von 2-Acetylbenzaldehyd	31
Abbildung 27	Umsetzung von 2-Acetylbenzaldehyd	32
Abbildung 28	H ¹ -NMR-spektrum von 2-Acetylbenzaldehyd	33

Abbildung 29	Produkte der enzymatischen Reduktion von 1,4-Diacetylbenzaldehyd	
	34	
Abbildung 30	GC-Ergebnisse von Versuch 3.4.1	35
Abbildung 31	Reduktion von 1,4-Diacetylbenzol mit Chiralidon R.....	36
Abbildung 32	GC-Ergebnisse von Versuch 3.4.2	37
Abbildung 33	Reduktion von 1,4-Diacetylbenzol mit Chiralidon S	38
Abbildung 34	chemische Reduktion von 1,4-acetylbenzol.....	39
Abbildung 35	H ¹ -NMR Spektrum von 1,4-Diacetylbenzol reduziert mit Natriumborhydrid.....	40
Abbildung 36	Dünnschichtchromatographie: Vorversuch zu 3.5.3	42
Abbildung 37	Umsetzung von 1,4-Diacetylbenzol mit Natriumborhydrid	43
Abbildung 38	Reduktion: 3-Acetylbenzaldehyd und 4-Acetylbenzaldehyd ...	44
Abbildung 39	Konkurrenzreaktion Benzaldehyd/Acetophenon mit Chiralidon R	45
Abbildung 40	Verlauf der Konkurrenzreaktion Benzaldehyd/Acetophenon mit Chiralidon R	46
Abbildung 41	Konkurrenzreaktion Benzaldehyd/Acetophenon mit Chiralidon S	47
Abbildung 42	Verlauf der Konkurrenzreaktion Benzaldehyd/Acetophenon mit Chiralidon S	48
Abbildung 43	Nachweis Aceton	49
Abbildung 44	Verlauf Reaktion (versuch: 3.7)	50
Abbildung 45	Gegenüberstellung der beiden Versuche	50
Abbildung 46	Apparatur zum Versuch 4.7	61

5.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Vergleich Chiralidon R und S	12
Tabelle 2 Chemische Verschiebung	17
Tabelle 3 Auswertung der Integrale	17
Tabelle 4 Auswertung des H-NMR Spektrums von Abbildung 18.....	21
Tabelle 5 Ergebnisse Enantiomerenüberschuss.....	28
Tabelle 6 Auswertung des H-NMR Spektrums von Abbildung 26.....	29
Tabelle 7 Auswertung des H-NMR Spektrums von Abbildung 36.....	39

5.5 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
ADH	Alkoholdehydrogenase