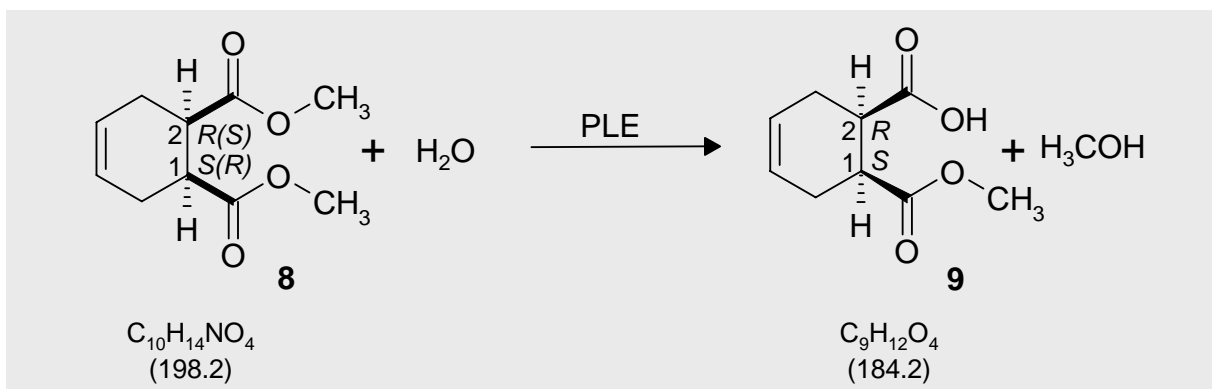


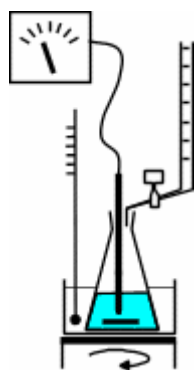
### 4.2.2.9 Enzymatische Hydrolyse von *meso-cis*-4-Cyclohexen-1,2-dicarbonsäuredimethylester (8) zu (1*S*,2*R*)-*cis*-4-Cyclohexen-1,2-dicarbonsäure-1-methylester (9) mit Schweineleberesterase



**Arbeitsmethoden:** Reaktion mit Enzymen, Drehwertbestimmung

#### Chemikalien

<i>cis</i> -4-Cyclohexen-1,2-dicarbonsäuredimethylester	Sdp. 80–81 °C/0.1 hPa, wird in <a href="#">Versuch 4.2.2.8</a> dargestellt.
Schweineleberesterase (PLE)	(E.C. 3.1.1.1), rohes Lyophilisat, Aktivität 27 kU/g. <sup>1</sup>
Essigsäureethylester	Sdp. 77 °C, Dampfdruck bei 20 °C: 97 hPa, $d = 0.90$ g/ml.
Kaliumdihydrogenphosphat	
Natronlauge (1 M)	Verursacht <b>Verätzungen</b> .



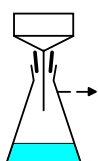
#### Durchführung

Vor Beginn **Betriebsanweisung** erstellen.

*Darstellung des Phosphatpuffers:* 10 mmol (1.36 g) Kaliumdihydrogenphosphat werden in 100 ml Wasser gelöst und mit 1 M Natronlauge auf *pH* 7.5 gebracht (Kontrolle mit *pH*-Meter).

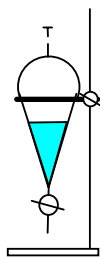
In einem eingespannten 250 ml Weithals-Erlenmeyerkolben mit Magnet-rührstab und *pH*-Elektrode werden 50 ml Phosphatpuffer *pH* 7.5 und 10.0 mmol (2.0 g) *cis*-4-Cyclohexen-1,2-dicarbonsäuredimethylester vorgelegt und unter Rühren auf 30 °C thermostatisiert. Anschließend werden 1000 U (37 mg bei 27 kU/g) PLE zugegeben und der *pH*-Wert durch Zugabe von 1 M Natronlauge aus einer Bürette auf *pH* 7.5 gehalten.<sup>2</sup> Die Reaktion ist beendet, wenn der *pH*-Wert der Reaktionsmischung konstant bleibt (Verbrauch NaOH: ca. 10 ml).

**Hinweis:** Der Versuch kann – abhängig von der Aktivität der Esterase – 6–8 Stunden dauern, er sollte deshalb gleich zu Beginn des Praktikumtages begonnen werden. Falls die Reaktion zum Ende des Praktikumstages noch nicht abgeschlossen ist, wird der *pH*-Wert auf 8 eingestellt und der Reaktionskolben verschlossen über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Der Versuch kann am nächsten Tag fortgesetzt werden.



#### Isolierung und Reinigung

Die Reaktionsmischung wird über einen kleinen, mit ca. 1 cm Celite beschichteten Büchnertrichter abgesaugt und mit wenig Wasser nachgewaschen. Das wässrige Filtrat wird 3 x mit 25 ml *tert*-Butylmethylether gewaschen (→ **E**<sub>1</sub>).<sup>3</sup> Die Wasserphase wird mit konz. Salzsäure auf *pH* 2–3



gebracht und dreimal mit je 50 ml *tert*-Butylmethylether extrahiert ( $\rightarrow E_2$ ). Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Absaugen vom Trockenmittel ( $\rightarrow E_3$ ) wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert ( $\rightarrow R_1$ ), Lösungsmittelreste bei vermindertem Druck entfernt; das ölige Produkt kristallisiert langsam im Eisbad. Eine weitere Reinigung ist nicht nötig. Ausbeute Reinprodukt (g, %)? Man bestimme den spezifischen Drehwert von **9** und berechne den Enantiomerenüberschuss (*ee*). Ausbeute an **9**: 75–85%, Schmp. 28 °C,  $[a]_D^{20} = +11.0^\circ$  ( $c = 1.0$ , Aceton).

<sup>1</sup> Die übliche Mengeneinheit bei Einsatz von Enzymen ist 1 U (Unit). Die Aktivität eines Substrats wird in U/g (Units per g) angegeben, was bei verschiedenen Enzymqualitäten eine Umrechnung ermöglicht und somit der Reproduzierbarkeit dient. Die hier verwendete Schweineleberesterase ist bei SIGMA erhältlich (Best.-Nr. E3019).

<sup>2</sup> Protokollieren Sie den Verbrauch in Abhängigkeit von der Zeit, graphische Darstellung!

<sup>3</sup> Was bewirkt dieser Reinigungsschritt?

### Hinweise zur Entsorgung (E), Recycling (R) der Lösungsmittel

**E**<sub>1</sub>: Organischer Extrakt  $\rightarrow$  Entsorgung (RH).

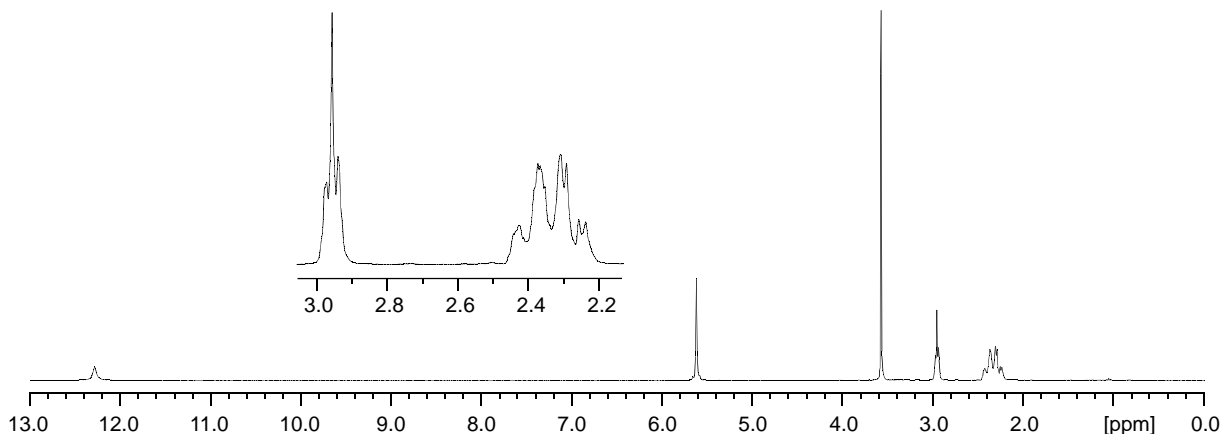
**E**<sub>2</sub>: Wässrige Phasen  $\rightarrow$  Entsorgung (H<sub>2</sub>O mit RHal/Halogenid).

**E**<sub>3</sub>: Trockenmittel  $\rightarrow$  Entsorgung (Anorg. Feststoffe).

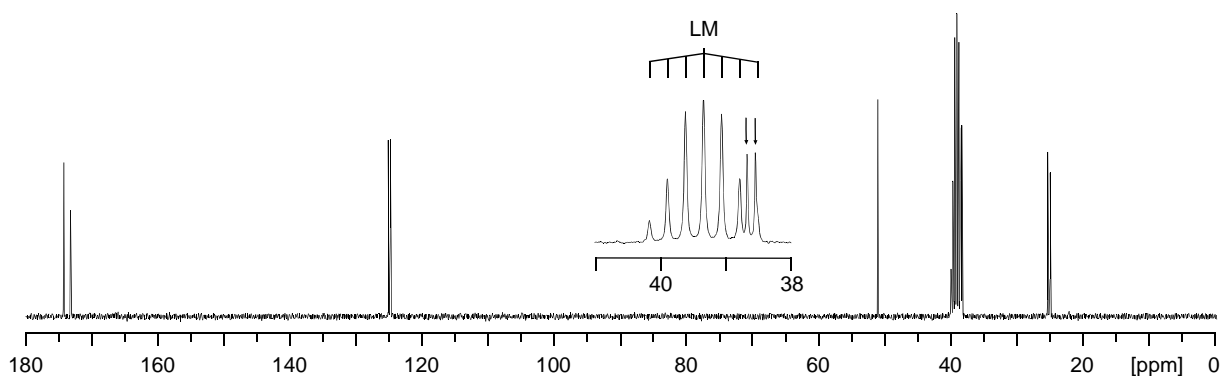
**R**<sub>1</sub>: abdestilliertes Lösungsmittel  $\rightarrow$  Recycling (*tert*-Butylmethylether).

### Auswertung des Versuchs

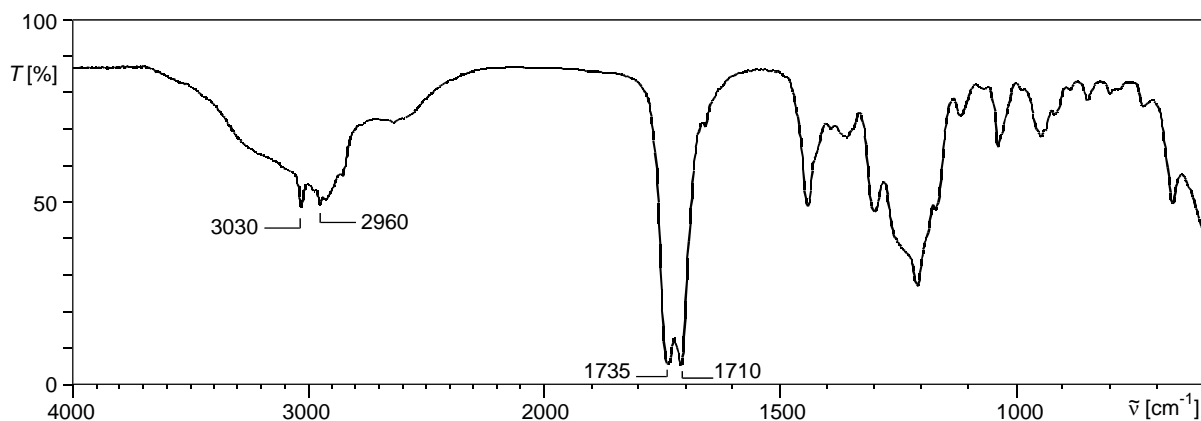
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **9** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 2.20$ – $2.47$  (4 H),  $2.90$ – $3.00$  (2 H),  $3.57$  (3 H),  $5.55$ – $5.67$  (2 H),  $12.28$  (1 H).



<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **9** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 25.21 (CH<sub>2</sub>), 25.57 (CH<sub>2</sub>), 38.54 (CH), 38.66 (CH), 51.26 (CH<sub>3</sub>), 124.89 (CH), 125.20 (CH), 173.23 (C), 174.23 (C).

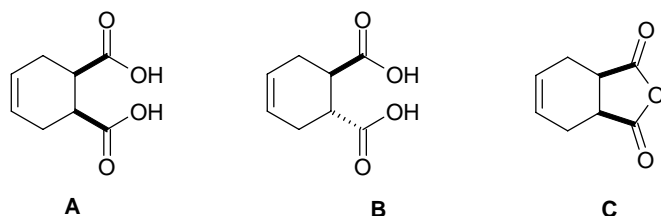


**IR-Spektrum von 9 (KBr):**



\* Formulieren Sie den zu **9** führenden Reaktionsmechanismus.

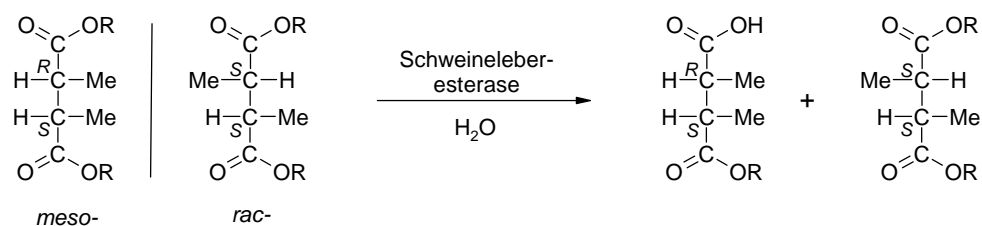
**Weitere denkbare Reaktionsprodukte:**



- \* Mit welchen spektroskopischen Daten lassen sich **A–C** ausschließen?
- \* Diskutieren Sie die denkbaren Reaktionsmechanismen.

**Literatur, allgemeine Anwendbarkeit der Methode**

Literatur, auf der dieser Versuch beruht: [1]. Schweineleberesterase (Pig Liver Esterase, PLE) kann zur stereoselektiven Hydrolyse einer Vielzahl von Estern eingesetzt werden.<sup>[2–4]</sup> Esterasen sind Enzyme (biologische Katalysatoren), die aus pflanzlichen und tierischen Organismen bzw. Organen (z.B. Schweineleber) isoliert werden können. Sie katalysieren die Hydrolyse von Carbonsäureestern, mit chiralen Estern reagieren sie enantioselektiv:



- [1] H.-J. Gais, K.L. Lukas, W.A. Ball, S. Braun, H.J. Lindner, *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 687–716.
- [2] L.M. Zhu, M.C. Tedford, *Tetrahedron*, **1990**, 46, 6587–6611.
- [3] M. Ohno, M. Otsuka, *Org. React.* **1989**, 37, 1–55.
- [4] C.-H. Wong, G.M. Whitesides, “Enzymes in Synthetic Organic Chemistry” Pergamon Verlag, **1994**.