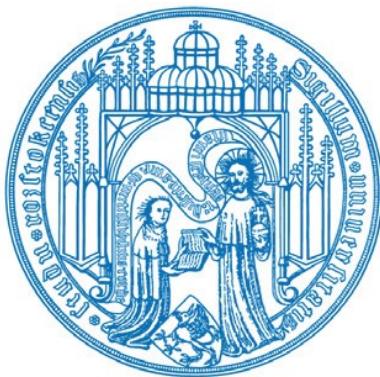


**Aufarbeitung von glycerol-basierten
Fermentationsbrühen und Synthese von
Serinolderivaten**

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock



vorgelegt von

Ulrike Jost

Rostock 2015

Gutachter:

1. Prof. Dr. Udo Kragl, Universität Rostock, Institut für Chemie
2. Prof. Dr. Christian Vogel, Universität Rostock, Institut für Chemie

Tag der Einreichung: 01. April 2015**Tag der Verteidigung:** 02. Juni 2015

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2011 bis November 2014 am Institut für Chemie der Universität Rostock unter Betreuung von Prof. Dr. Udo Kragl angefertigt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. Udo Kragl danken, für die Chance in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und für die Möglichkeit des Auslandsaufenthalts in Moskau.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Leonid O. Kononov und Alexander Zinin sowie der gesamten Arbeitsgruppe am Zelinsky Institut für Organische Chemie in Moskau bedanken, für die interessante und vielseitige Themenstellung sowie die ausgezeichnete Betreuung und Hilfestellung während meines Aufenthalts.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich den Partnern des MetaGlyc2-Projektes danken, insbesondere Prof. Alexander Steinbüchel und Dr. Björn Andreeßen für die Bereitstellung der Fermentationsbrühen und die ausführlichen und anregenden Diskussionen.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Dirk Michalik und Dr. Wolfgang Ruth bedanken, für die Möglichkeit an ihrem umfangreichen Wissen und Erfahrungen mit den Analysengeräten teilhaben zu dürfen, für die stets motivierenden Worte und Geduld sowie die vielen Stunden des Diskutierens.

Ein herzliches Dankeschön gilt der „NMR-Familie“, die alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit miterlebt hat und mir immer mit guten und aufmunternden Ratschlägen zur Seite stand.

Ich danke der TC Arbeitsgruppe für die stete Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e. V..

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich immer unterstützt und ein großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt haben.

Abstract

Aufarbeitung von glycerol-basierten Fermentationsbrühen und Synthese von Serinolderivaten (Deutsch)

Die Aufarbeitung von komplexen Reaktionsgemischen beziehungsweise Fermentationsbrühen ist in den letzten Jahren, besonders im Bereich der Biotechnologie, ein stark diskutiertes Thema. Die Herausforderungen der Isolierung einer wertvollen Verbindung polaren Charakters aus einer Fermentationsbrühe liegen zum einen in der selektiven Extraktion der Verbindung, die durch das Vorhandensein eines wässrigen Mediums mit zahlreichen, in ihren Eigenschaften zum Teil ähnlichen Inhaltsstoffen, erschwert wird, zum anderen in den gesteigerten Kosten, die aufgrund der Komplexität der Aufarbeitung oft höher sind als der Herstellungsprozess selbst. Deshalb besteht zur Kostenreduzierung ein großes Interesse an der Identifizierung von neuen und geeigneten Aufarbeitungsmethoden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Entwicklung einer entsprechenden Aufarbeitungsmethode zur Isolierung von Serinol aus einer glycerol-basierten Fermentationsbrühe gezeigt. Es werden dabei fünf Methoden vorgestellt und miteinander verglichen. Die Derivatisierung des Serinols mittels Diethylethoxymethylenmalonat stellte sich als die beste Methode heraus. Die Methode wurde soweit optimiert, dass aus der Fermentationsbrühe das Serinolderivat mit einer Ausbeute von 63 % isoliert werden konnte.

Außerdem wurden zur Erweiterung der Anwendungsbereiche des Serinols verschiedene chemische und enzymatische Synthesewege zur Herstellung von Serinolderivaten aufgezeigt. Die Glycosylierungsreaktionen von Serinol mittels eines neuen S-Glycosyldonors und Glucosepentaacetat werden beschrieben und diskutiert. Die Glycosylierungen wie auch die lipase-katalysierten Synthesen (*Candida antarctica* Lipase A) von langkettigen Serinolderivaten führen zu amphiphilen Verbindungen, die Anwendung in der Tensidchemie finden könnten.

Downstream Processing of glycerol-based fermentation broths and the synthesis of serinol derivatives (English)

In recent years the downstream processing of complex reaction mixtures and fermentation broths, respectively, is an often discussed issue, in particular in the field of biotechnology. The challenge in the isolation of value able polar compounds is the aqueous medium and the amount of similar ingredients of the fermentation broth. Furthermore, the reconditioning costs are often higher than the production costs. That is why one of the aims is to develop a method with reduced costs.

As a main part of this work the development of a downstream process for the isolation of serinol from a glycerol-based fermentation broth is presented. Five methods were introduced and compared. The derivatisation of serinol with diethyl ethoxymethylenemalonate was found to be the best method for the isolation. The strategy was optimized and 63 % of the serinol derivative could be isolated.

Moreover, the chemical and enzymatical syntheses for the production of serinol derivatives were shown. The glycosylation of serinol with a novel S-glycosyl donor and glucose pentaacetate as well as the enzyme-catalysed synthesis (*Candida antarctica* lipase A) of long chain serinol derivatives have been formed and were discussed.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Zielsetzung	4
3. Stand der Technik	6
3.1 Aufarbeitung komplexer Reaktionsgemische	6
3.2 Serinolderivate	9
4. Ergebnisse.....	13
4.1 Aufarbeitung der Fermentationsbrühe	13
4.1.1 Aufarbeitung der Fermentationsbrühe durch Peracetylierung.....	15
4.1.2 Aufarbeitung der Fermentationsbrühe durch die Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-1,3-oxazolidin-2-on	18
4.1.3 Isolierung des Serinols aus der Fermentationsbrühe mittels Guanidierung	22
4.1.4 Isolierung des Serinols durch Fällung mittels Salzsäure	25
4.1.5 Isolierung von Serinol aus einer glycerol-basierten Fermentationsbrühe mittels Derivatisierung und anschließender Extraktion	26
4.2 Serinol als Synthesebaustein in chemischen und enzymatischen Reaktionen.....	35
4.2.1 Chemische Synthese von Serinolderivaten.....	35
4.2.2 Synthese von Serinolderivaten auf enzymatisch katalysiertem Weg	58
5. Diskussion und Ausblick	61
6. Zusammenfassung	70
7. Experimenteller Teil	73
7.1 Aufarbeitung der Fermentationsbrühe	73
7.1.1 Synthesebedingungen	73
7.1.2 Analyse	78
7.2 Chemische Synthese von Serinolderivaten	81
7.2.1 Allgemeine Methoden	81
7.2.2 Synthese des Glycosyldonors	82
7.2.3 Synthese der Glycosylakzeptoren.....	84
7.2.4 Glycosylierungen.....	90

7.3	Enzymkatalysierte Synthese von Serinolderivaten	99
8.	Literaturverzeichnis	101
9.	Anhang	106
9.1	Fermentationsbrühenmedien	106
9.1.1	Komplexmedium.....	106
9.1.2	Basalmedium (BM) (Andres et al., 2004).....	106
9.1.3	Riesenbergs-Medium.....	107
9.1.4	Modified MSM (Kroll et al 2011).....	108
9.2	NMR-Spektren	109
9.2.1	Vergleich des 4-Hydroxymethyl-1,3-oxazolidin-2-ons.	109
9.2.2	Vergleich von reinem Glycerol in DMSO (blau) mit Glycerol aus der Fermentationbrühe (dunkelrot)	110
9.2.3	Ergänzung des Kapitels 4.2.1.3	111
9.3	Ergänzung zu Kapitel 4.1.3	113
9.4	Ergänzung zu Kapitel 4.1.4	114
9.5	Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion.....	114
9.6	Nebenprodukt: Bevv-Amin 11	115
9.7	Sprühtrockner	116
9.7.1	Ergänzung Kapitel 4.1: GCMS-Messungen.....	116
9.8	Chemikalienliste	120
9.9	Geräteliste.....	122

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
¹³ C-NMR	Kohlenstoff-Kernspinresonanz
¹ H-NMR	Protonen-Kernspinresonanz
Abb.	Abbildung
AgOTf	Silbertriflat
Becv-	2,2-Bis(ethoxycarbonyl)vinyl
BM	Basalmedium
CAL A	<i>candida antarctica</i> Lipase A
DC	Dünnschichtchromatogramm
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTBS	Di- <i>tert</i> -butylsilandiyl
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat. und andere)
g	Gramm
g/L	Gramm/Liter
GCMS	Gaschromatografie Massenspektrometrie (engl. <i>gas chromatography mass spectrometry</i>)
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
I ₂	Iod
J	Kopplungskonstante
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter

Abkürzungsverzeichnis

LCMS	Flüssigchromatografie Massenspektrometrie (engl. <i>liquid chromatography mass spectrometry</i>)
m/m	Masse/Masse
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
mL	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
MSM	Modifiziertes Salzmedium
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
N ₂	Stickstoff
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaHSO ₄	Natriumhydrogensulfat
NH ₄ OH	Ammoniumhydroxid
PPh ₃	Triphenylphosphin
ppm	parts per million
RT	Raumtemperatur
S _N	Nucleophile Substitution
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoracetyl-
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Darstellung von Biodiesel (Umesterung von Öl (z.B. Rapsöl) mit Methanol und beispielsweise Natriummethanolat)	1
Abb. 1-2 Verwertung und Anwendungen von Glycerol/Rohglycerol	2
Abb. 1-3 Zielstellung in schematischer Darstellung, Verwertung von Glycerol zu hochwertigen Glycerolderivaten	3
Abb. 3-1 Umsetzung von 2-Amino-propan-1,3-diol mit Triphosgen zu 4-(Hydroxymethyl)-1,3-oxazolidin-2-on [24]	11
Abb. 3-2 Desymmetrisierung von <i>N</i> -Boc-Serinol [48]	11
Abb. 4-1 Darstellung des Peracetylserinols 2	16
Abb. 4-2 Entschützung der Hydroxylfunktionen nach Zemplén [28]	16
Abb. 4-3 Schematische Darstellung der Isolierung von Serinol aus der Fermentationsbrühe durch Peracetylierung	17
Abb. 4-4 Darstellung des 4-(Hydroxymethyl)-1,3-oxazolidin-2-ons [24]	18
Abb. 4-5 ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO- d_6) des 4-(Hydroxymethyl)-1,3-oxazolidinons 4R,S, synthetisiert in Wasser	19
Abb. 4-6 Spaltung von 4-(Acylmethyl)-1,3-oxazolidin-2-on zu (S)-2-Amino-3-(hexadecyloxy)propan-1-ol [25]	20
Abb. 4-7 Lipasen-katalysierte Umesterung von Vinyl-n-octanoat 5	21
Abb. 4-8 Darstellung des Guanidinoserinols 8	22
Abb. 4-9 Chromatogramm und Massenspektrum des Guanidinoserinols 8 in Wasser	23
Abb. 4-10 Chromatogramm und Massenspektrum des Guanidinoserinols 8 in der Fermentationsbrühe	24
Abb. 4-11 Chromatogramme für das gefällte protonierte Serinol in der Fermentationsbrühe (unten Filtrat, oben Feststoff) sowie das Massenspektrum für das Filtrat	25
Abb. 4-12 Darstellung des 2,2-Bis(ethoxycarbonyl)vinyl-serinols (Becv-Serinol) 10 in Wasser oder Fermentationsbrühen	26
Abb. 4-13 Nebenprodukt: 2,2-Bis(ethoxycarbonyl)vinyl-amin 11	28
Abb. 4-14 Isolierung des Becv-Serinols aus der Fermentationsbrühe (Riesenbergsmedium [50]). Verschiedene Substratverhältnisse werden dargestellt.	29
Abb. 4-15 Ausschnitt eines ^1H -NMR-Spektrums einer Fermentationsbrühen-Probe (Basalmedium).	30
Abb. 4-16 Kristalle des Becv-Serinols isoliert aus der Fermentationsbrühe	30

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4-17 Reaktionsverlauf in Wasser: Vergleich der Bildung des Becv-Serinols, der Abnahme des Diethylethoxymethylenmalonats sowie der Bildung des Diethylmalonats.	31
Abb. 4-18 Reaktionsverlauf in der Fermentationsbrühe: Vergleich der Bildung des Becv-Serinols, der Abnahme des Diethylethoxymethylenmalonats und der Bildung des Diethylmalonats	32
Abb. 4-19 Abspaltung der 2,2-Bis(ethoxycarbonyl)vinyl-Gruppe mit Ethylen diamin.	32
Abb. 4-20 Entwicklung des Aufarbeitungsprozesses einer Fermentationsbrühe	33
Abb. 4-21 Struktur des <i>N</i> -Palmitoyl-1-(4',6'-di- <i>tert</i> -butylsilandiyl-2',3'-benzoyl-D-galactopyranosyl)-3-azidethoxyphenyl-serinols	35
Abb. 4-22 S-Glycosyldonor: Ethyl-4,6- <i>O</i> -Di- <i>tert</i> -butylsilandiyl-2,3-benzoyl-1-thio- β -D-galactopyranosid	36
Abb. 4-23 Darstellung des Glycosyldonors 18β	36
Abb. 4-24 Acylierung von Serinol mittels 1-(2-Thioxothiazolidin-3-yl)hexadecan-1-on 23 und <i>N</i> -Palmitoylsuccinimidylester 24	39
Abb. 4-25 Allgemeine Reaktionsgleichung für die Veretherung des TFA-Serinols mit Chloroethoxyphenol unter Mitsunobu-Bedingungen	40
Abb. 4-26 <i>N</i> -Palmitoyl- <i>O</i> -tosyl-serinol	41
Abb. 4-27 Strukturen der isolierten Nebenprodukte der Tosylierung des Palmitoylserinols	43
Abb. 4-28 Darstellung des Phthalimid-1-hydroxy-3-tosyl-serinols 33 und des Phthalimid-1,3-bistosyl-serinols 34	43
Abb. 4-29 Darstellung des Phthalimid- <i>O</i> -tosyl-serinols in DMF	45
Abb. 4-30 Darstellung des Phthalimid-1-hydroxy-3-azidethoxyphenyl-serinols im Zweiphasen-System	45
Abb. 4-31 Darstellung des Phthalimid-1-hydroxy-3-azidethoxyphenyl-serinols in DMSO	46
Abb. 4-32 Isoliertes Nebenprodukt bei der Alkylierung des Phthalimid-1-hydroxy-3-azidethoxyphenyl-serinols	47
Abb. 4-33 Glycosylierung des Ethyl-4,6- <i>O</i> -Di- <i>tert</i> -butylsilandiyl-2,3-benzoyl-1-thio- β -D-galactopyranosid mit dem Serinolderivat Phthalimid-1-hydroxy-3-azidethoxyphenyl-serinol	49
Abb. 4-34 1 H-NMR-Spektrum (300 MHz in CDCl_3) der Glycosylproduktmischung 41	51
Abb. 4-35 1 H-NMR-Spektren (500 MHz, in CDCl_3) der reinen Diastereomere 41 und 42	52
Abb. 4-36 Glycosylierung mit Phthalimid-1-hydroxy-3-azidethoxybenzyl-serinol 43R,S als Akzeptor	52

Abb. 4-37 Auftrennung des Isomerengemisches mittels präparativer HPLC nach der Gelchromatografie.	53
Abb. 4-38 Ausschnitt der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, in CDCl_3) (Aromaten- und Anomerenbereich) der Diastereomere 44 und 45 sowie der dazugehörigen Iodderivate 61 und 62	54
Abb. 4-39 Glycosylierung des Ethyl-4,6- <i>O</i> -Di- <i>tert</i> -butylsilandiyl-2,3-benzoyl-1-thio- β -D-galactopyranosids mit dem 2- <i>N</i> -(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)-4-hydroxymethyl-2,2-dimethyl-1,3-oxazolidins	55
Abb. 4-40 Glycosylierung des <i>N</i> -Palmitoylserinols 19	56
Abb. 4-41 Deacetylierung der Monoglycosylprodukte 47 und 48	57
Abb. 4-42 Glycosylierung des TFA-Serinols 20	57
Abb. 7-1 Temperaturprogramm	78
Abb. 7-2 GC-Chromatogramm der Fermentationsbrühe (<i>Shimwellia blattae</i> , Basalmedium). 100 μL der Fermentationsbrühe wurden zur Trockene eingeengt und mittels Trimethylsilylimidazol derivatisiert.	79
Abb. 7-3 Aufbau der Gelchromatografie. Moskau, Zelinsky Institut für Organische Synthese	81
Abb. 7-4 Aufgezeichnetes Chromatogramm der Glycosylproduktmischung	81
Abb. 9-1 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) des Glycosylprodukts 44	111
Abb. 9-2 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) des Glycosylprodukts 45	111
Abb. 9-3 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) des Iodderivats 61	112
Abb. 9-4 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) des Iodderivats 62	112
Abb. 9-5 Chromatogramm und Massenspektrum des Guanidinoserinols 8 in Wasser	113
Abb. 9-6 Chromatogramm und Massenspektrum des Guanidinoserinols 8 in der Fermentationsbrühe	113
Abb. 9-7 Darstellung der Chromatogramme für das gefällte protonierte Serinol in der Fermentationsbrühe (unten Filtrat, oben Feststoff) sowie das Massenspektrum für das Filtrat	114
Abb. 9-8 Sprühtrockner (Büchi)	116
Abb. 9-9 Totalionenchromatogramm, Massenspur des zweifach-derivatisierten Serinols sowie das Massenspektrum im Retentionsbereich von 6,45-8,43 min. Die Fermentationsbrühe wurde bei 90 °C versprüht.	117

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 9-10 Totalionenchromatogramm, Massenspur des zweifach-derivatisierten Serinols sowie das Massenspektrum im Retentionsbereich von 6,35-8,56 min. Die Fermentationsbrühe wurde bei 130 °C versprüht. 118
- Abb. 9-11 Totalionenchromatogramm, Massenspur des zweifach-derivatisierten Serinols sowie das Massenspektrum im Retentionsbereich von 6,90-8,84 min. Das Serinol wurde bei 90 °C versprüht. 119
- Abb. 9-12 Totalionenchromatogramm, Massenspur des zweifach-derivatisierten Serinols sowie das Massenspektrum bei einer Retentionszeit von 7,54 min. Das unbehandelte Serinol diente als Referenz. 120

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1 Überblick über die Projektpartner im Verbundprojekt Metaglyc 2 und deren Aufgaben	4
Tab. 2-2 Überblick über die Strategien zur Aufarbeitung der Fermentationsbrühen	5
Tab. 3-1 Struktur von Serinol sowie ausgewählte Lipidabkömmlinge	10
Tab. 4-1 Auflistung der Fermentationsmedien und den zur Fermentation genutzten Mikroorganismen	13
Tab. 4-2 Vertiefung der Tabelle 2-2: Überblick über die Strategien zur Aufarbeitung der Fermentationsbrühen	15
Tab. 4-3 Übersicht über die hergestellten aminogeschützten Serinolderivate 19-22R,S	38
Tab. 4-4 Vergleich der NMR-Daten der Verbindung 38 mit dem in der Literatur beschriebenen (R)-4-Hydroxymethyl-2-phenyloxazolidin [40]	48
Tab. 4-5 Vergleich der NMR-Daten (^1H -NMR (300 MHz), ^{13}C -NMR (75 MHz), CDCl_3) eines Galactoseceramidderivats aus der Literatur [42] mit dem isolierten Glycosylprodukt	49
Tab. 4-6 Vergleich der kalkulierten Massen der isolierten Fraktionen mit den berechneten Massen	50
Tab. 4-7 Vergleich der enzym-katalysierten Reaktionen zur Veresterung von Serinol in Acetonitril	59
Tab. 5-1 Überblick über die Methoden zur Aufarbeitung der Fermentationsbrühen	62
Tab. 5-2 Übersicht über die synthetisierten Verbindungen S-Glycosyldonor und Glycosylprodukte (Ausbeute und Aufarbeitung)	65
Tab. 5-3 Übersicht über die synthetisierten Glycosylprodukte mit Glucosepentaacetat als Donor	67
Tab. 5-4 Überblick über die lipasen-katalysierten Reaktionen	68
Tab. 6-1 Synthetisierte, neuartige Verbindungen	70
Tab. 6-2 Zusammenfassung der chemisch und enzymatisch hergestellten Serinolderivate	71
Tab. 7-1 Temperaturprogramm	79

1. Einleitung

Glycerol ist ein kleines organisches Molekül mit drei benachbarten (vicinalen) Hydroxylgruppen, weshalb es nach chemischer Nomenklatur als 1,2,3-Propantriol bezeichnet wird. Durch das Erhitzen von Fetten mit Basen wie Natriumhydroxid (Verseifung) kann das Glycerol isoliert werden. Seit 1940 wird Glycerol aus fossilen Brennstoffen über Propen und Epichlorhydrin hergestellt. Neben der klassischen organischen Synthese ist Glycerol ebenfalls ein Nebenprodukt bei der Biodieselherstellung, der Umesterung von Pflanzenöl mit Methanol (siehe Abbildung 1-1) [1]. Neben der alkalisch katalysierten Synthese wird in der Literatur ebenfalls die Synthese von Biodiesel (Fettsäuremethylester) und Glycerolcarbonat aus Kornöl mithilfe einer Lipase (Novozym 435[®]) und Dimethylcarbonat als Substrat und Reaktionsmedium beschrieben [2].

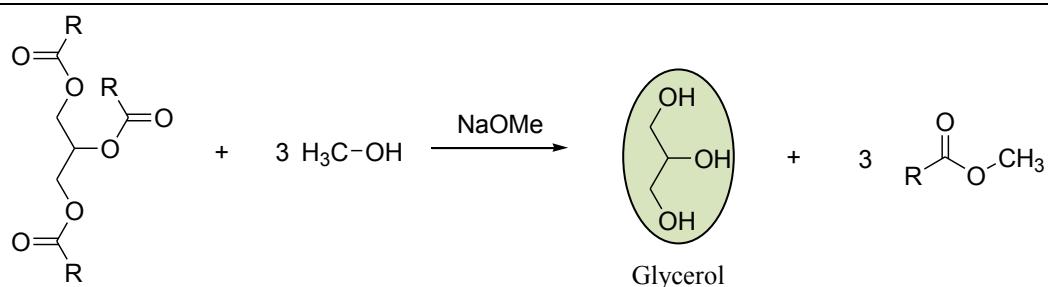


Abb. 1-1 Darstellung von Biodiesel (Umesterung von Öl (z.B. Rapsöl) mit Methanol und beispielsweise Natriummethanolat)

Der globale Glycerolmarkt 2005 betrug 800.000 Tonnen, wobei 400.000 Tonnen des Glycerols aus der Biodieselherstellung stammen. Im Jahr 2001 waren es noch 60.000 Tonnen Glycerol, welche aus der Biodieselherstellung stammen [1]. Bei der Biodieselproduktion werden ungefähr 10 % (m/m) Glycerol als wesentliches Nebenprodukt erhalten. Es wird vermutet, dass der Weltmarkt an Biodiesel bis 2016 auf 176,4 Mio. Tonnen ansteigt, was wiederum bedeutet, dass rund 17,6 Mio Tonnen Rohglycerol produziert werden. Die Produktion des Biodiesels ist verhältnismäßig teuer, weshalb die Nutzung des dabei anfallenden Rohglycerols von besonderem Interesse ist. Könnte das Rohglycerol wie das aufgereinigte Glycerol verwendet werden, wäre es möglich zum einen die höheren Produktionskosten des Biodiesels auszugleichen und zum anderen die Aufarbeitungskosten des Rohglycerols zu senken oder zu vermeiden [3]. Das Rohglycerol besitzt nach einigen Aufarbeitungsschritten nur eine Reinheit von ungefähr 60-88 %, wobei es sich bei den Verunreinigungen um Wasser, Fettsäuren, Salze und Methanol handelt [4].

Rohglycerol aus der Biodieselherstellung mit 55 % und 80 % Reinheit wurde zur Herstellung von Biomethan unter anaeroben Bedingungen im Labormaßstab verwendet und so erfolgreich Biogas hergestellt. Das Glycerol diente bei diesem Verfahren als einzige Kohlenstoffquelle. Jedoch mussten bei diesem Prozess zusätzlich Ammoniumchlorid und Kaliumdihydrogenphosphat als Nährstoffquelle für die Mikroorganismen zugefügt werden [5].

Vielseitige Anwendungen findet kommerziell erhältliches Glycerol in der Produktion von verschiedenen Chemikalien wie Polymeren und Brennstoffen. Das Glycerol kann beispielsweise durch Fermentation zu 1,3-Propandiol umgesetzt werden. 1,3-Propandiol ist dabei eine von zwei wichtigen Komponenten von Sonora und Corterrafasern (Polyester), welche als so genanntes „neues Nylon“ in Textilien und Teppichen verwendet werden [1].

In der Publikation von Asad-ur-Rehman *et al.* (2008) [6] wurde anstelle des handelsüblichen Glycerols das Rohglycerol durch Fermentation zu 1,3-Propandiol umgesetzt. Das Interesse an 1,3-Propandiol röhrt vor allem daher, dass es biologisch abbaubar sein soll [6].

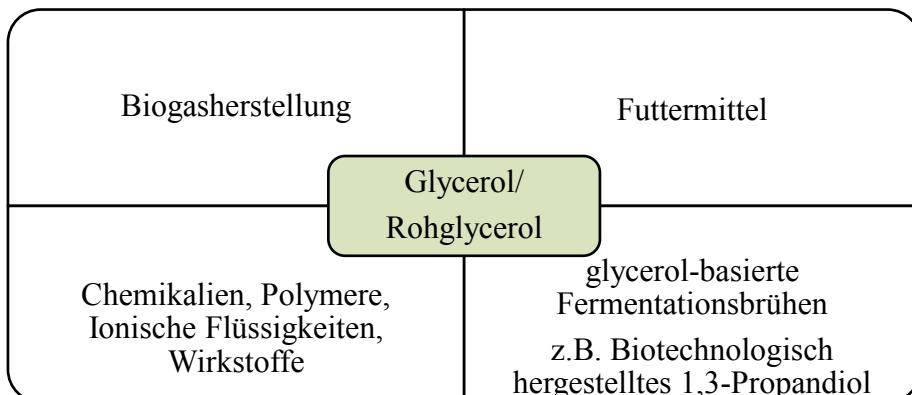


Abb. 1-2 Verwertung und Anwendungen von Glycerol/Rohglycerol

Ein weiteres Derivat des Glycerols ist das Serinol (2-Amino-1,3-propandiol), welches in Ceramiden und Ceramidanaloga den polaren Teil darstellt und sich durch eine Aminofunktion in 2-Position vom Glycerol unterscheidet. Serinol wird seit 1940 als Vorstufe für die Herstellung von synthetischen Antibiotika genutzt. Weitere Anwendung findet Serinol als Intermediat zur Herstellung von nicht-ionischen Kontrastmitteln für Röntgenuntersuchungen (z.B. Iopamidol) sowie bei der Synthese von pharmazeutischen und chemischen Sphingosinen und Ceramiden [57]. Weiterhin wird die Verwendung von Serinolderivaten zur Herstellung von Pharmazeutika zur Vorbeugung oder Behandlung von verschiedenen Schmerzarten in einer Patentanmeldung von Michaelis *et al.* (2004) beschrieben [7].

Das Serinol kann sowohl auf biotechnologischem als auch chemischem Weg erhalten werden. Andreeßen *et al.* (2012) [8] beschrieben dazu den biotechnologischen Weg der Serinolproduktion aus Glycerol durch rekombinante *E. coli*-Stämme [8]. Die chemische Synthese von Serinol durch die Substitutionsreaktion von einem 1,3-Dialkoxy-isopropylhalogenid mit NH₃ oder einem Amin wurde in einer Veröffentlichung von Felder *et al.* (1985) [9] erläutert [9].

Die Entwicklung von Glycerolderivaten bezieht sich nicht allein auf verschiedene Chemikalien oder Polymere, sondern auch auf die Synthese und Charakterisierung von Wirkstoffen im Einsatz gegen Krebszellen. Eine Vielzahl von Antikrebsmedikamenten bewirkt eine Erhöhung der Ceramideanzahl, die die Apoptose (Zelltod) der Tumorzellen induzieren. Aus diesem Grund wird nach neuen Ceramidanaloga gesucht, die durch ihre

Wasserlöslichkeit und schnelle pro-apoptotischen Mechanismen ein hohes therapeutisches Potential zur Krebsbehandlung zeigen sollen [10].

Die Verwertung von sowohl Glycerol als auch Rohglycerol ist ein hochaktuelles Forschungsgebiet, insbesondere aufgrund der immer weiter wachsenden Produktionsmengen durch die gesteigerte Biodieselherstellung. Der dadurch ständig sinkende Preis für Glycerol macht eine nachhaltige Verwertung dieses Rohstoffes zu höherwertigen Produkten attraktiv [63]. Dies bildet die wesentliche Motivation für die vorliegende Arbeit, die sich unter anderem mit der Verwertung von Glycerol beschäftigt, in der eine glycerol-basierte Fermentationsbrühe aufgearbeitet und das Glycerolderivat Serinol isoliert wird. Zusätzlich wird Serinol zu neuen hochwertigen Verbindungen, zum Beispiel langketigen Amiden oder glycolipid-ähnlichen Serinolderivaten, umgesetzt, um eine Wertsteigerung des Ausgangsstoffes Glycerol zu erreichen. Der wesentliche Ansatz zur Verbesserung der Wertschöpfungskette ist in der folgenden Abbildung 1-3 dargestellt. Durch die Isolierung von Serinol und dessen weitere Derivatisierung zu wertvolleren Verbindungen gewinnt das Glycerol als Nebenprodukt an Bedeutung. Dadurch wird die Biodieselherstellung aus nachwachsenden Rohstoffen durch die Erzeugung höherwertige Nebenprodukte effizienter und wirtschaftlicher gestaltet.

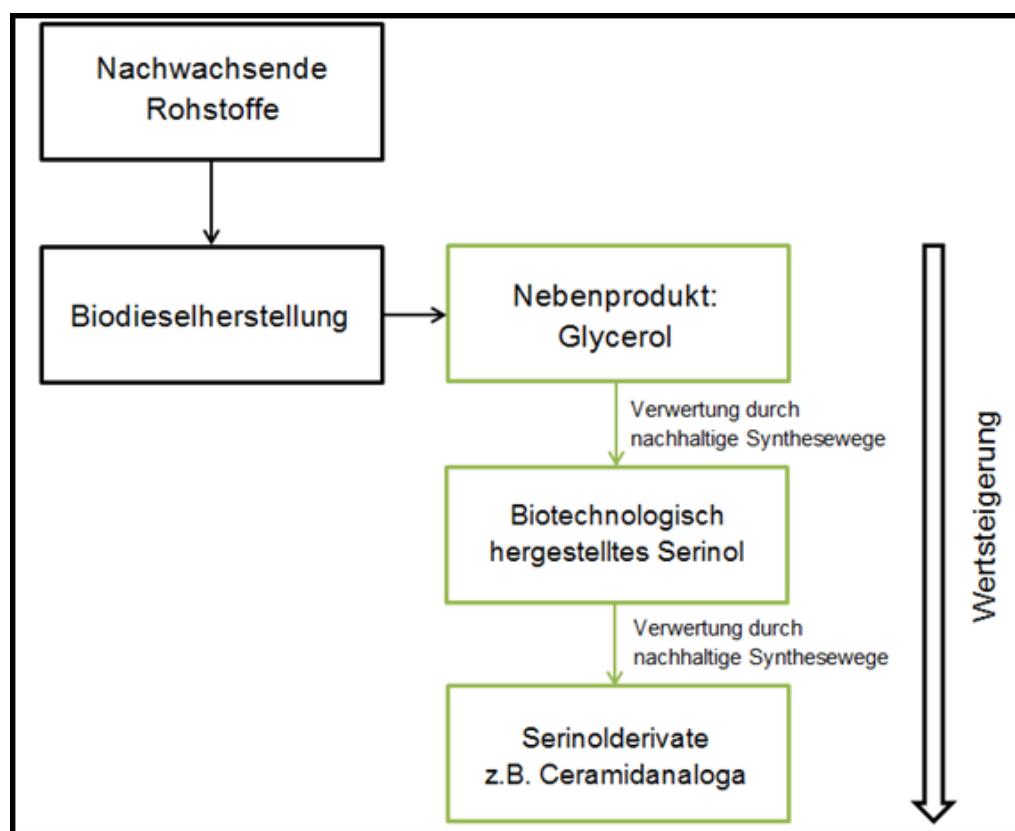


Abb. 1-3 Zielstellung in schematischer Darstellung, Verwertung von Glycerol zu hochwertigen Glycerolderivaten

2. Zielsetzung

Im Rahmen des Verbundprojektes MetaGlyc 2 wird zum einen die Synthese hochwertiger Glycerolderivate und zum anderen die Entwicklung und Optimierung der Enzyme angestrebt, die die Herstellung von Glycerol und Estern ausgehend von nachwachsenden Rohstoffen ermöglichen.

Das Projekt MetaGlyc 2 wird von der Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) gefördert. Die beteiligten Projektpartner sowie deren Ziele werden in der folgenden Tabelle 2-1 aufgeführt.

BASF	Universität Rostock	Leibniz- Institut für Katalyse e.V.	Universität Münster	Universität Greifswald/Montpellier SupAgro
Koordination Anwendungstest der Produkte	Aufarbeitung Fermentations- brühen, Synthese von Serinolderivaten	Synthese von Diglycerol und Polyglycerol	Biotechnologische Umsetzung von Glycerol zu Glycerinsäure und Serinol	Optimierung von <i>C. antarctica</i> Lipase A Optimierung von <i>C. parapsilosis</i> Lipase/Acyltransferase

Tab. 2-1 Überblick über die Projektpartner im Verbundprojekt Metaglyc 2 und deren Aufgaben

In diesem Projekt sollen insbesondere die Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen sowie deren Verwertung durch nachhaltige chemische und biotechnologische Strategien zur Herstellung der Zielmoleküle dienen. Im Projektteil A wird die Verwertung von Glycerol durch die Synthese von Glycerinsäure, Diglycerol sowie Serinol auf nachhaltigem Weg verfolgt. Die Projektpartner der Universität Greifswald und Montpellier SupAgro, Frankreich, optimieren im Rahmen des Teilprojektes B die Enzyme *C. antarctica* Lipase A und *C. parapsilosis* Lipase und Acyltransferase zur besseren Umesterung von natürlichen Ölen.

Wie bereits erwähnt, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit einerseits, neue bzw. optimierte Methoden zu finden, das biotechnologisch hergestellte Serinol aus der glycerol-basierten Fermentationsbrühe zu isolieren und andererseits, dieses Serinol zu neuen interessanten Derivaten umzusetzen.

Zur Aufarbeitung von Fermentationsbrühen sind bereits viele Untersuchungen und Studien durchgeführt worden. Jedoch wurde bisher noch keine Aufarbeitungsmethode von Serinol aus einer Fermentationsbrühe in der Literatur beschrieben. Unter diesem Aspekt wurden zur Aufarbeitung verschiedene Strategien verfolgt. In der Tabelle 2-2 sind unterschiedliche Ansätze zur Erreichung des geplanten Ziels angeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Herangehensweisen in Betracht gezogen. Der erste Ansatz war die Sprühtröcknung, die aufgrund des großen Wasseranteiles der Fermentationsbrühe als vielversprechend erschien. Die Sprühtröcknung bietet dabei die

Möglichkeit das überschüssige Wasser zu entfernen, indem die Fermentationsbrühe durch eine Düse in einem geheizten zylinderförmigen Glaskörper verdampft wird und die festen, trockenen Bestandteile in einem sogenannten Zyklon aufgefangen werden. Anschließend wird das Serinol aus den getrockneten Inhaltsstoffen extrahiert. Eine entsprechende Abbildung des Spühtrockners der Firma Büchi befindet sich im Anhang Kapitel 9.7.

Ein zweiter Ansatz wäre, Serinol zu protonieren und mittels Ionenaustauschchromatografie zu isolieren. Das positiv geladene Serinol würde bei dieser Methode an ein negativ geladenes Material adsorbieren und mittels einer Salzlösung, wie NaCl-Lösung, verdrängt und eluiert werden [61].

Aufarbeitung der Fermentationsbrühen

Derivatisierung	Sprühtrocknung	Alternativen
Reversible Reaktion und anschließende Extraktion		
Entfernung des Wassers und anschließende Reaktion	Wasserverdampfung und anschließende Extraktion des Produkts	Ionenaustauschchromatografie
Phasentransferkatalyse		

Tab. 2-2 Überblick über die Strategien zur Aufarbeitung der Fermentationsbrühen

Als dritte Herangehensweise wurde die Aufarbeitung der Fermentationsbrühe durch die Derivatisierung des Serinols gewählt. Bei dieser Methode wird dem Fermentationsüberstand nach Abschluss des Fermentationsprozesses ein geeignetes Derivatisierungsreagenz zugefügt, das enthaltene Serinol derivatisiert und anschließend isoliert.

Erwünscht sind insbesondere Derivatisierungsmethoden, welche direkt im wässrigen Medium durchgeführt werden können, sodass eine energieaufwendige Entfernung des Wassers vor der Reaktion umgangen werden kann. Nach einer erfolgreichen Isolierung des Serinolderivats aus dem Überstand der Fermentationsbrühe soll diese Verbindung dann zu neuen Serinolderivaten, wie Ceramidanaloga, glycolipid-ähnlichen Derivaten oder zu *building blocks* (Grundchemikalien) in der organischen Synthese, umgesetzt werden.

3. Stand der Technik

3.1 Aufarbeitung komplexer Reaktionsgemische

Die Aufarbeitung komplexer Reaktionsgemische erfolgt im Labormaßstab erfahrungsgemäß durch eine Kombination aus Extraktion, Säulenchromatografie, Destillation oder automatisiert durch beispielsweise Hochleistungsflüssigchromatografie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) mit nachgeschaltetem Fraktionssammler. Diese Verfahren gehören zu den thermischen Trennverfahren. Zu den thermischen Trennverfahren zählen neben der Extraktion und der Destillation ebenfalls die Rektifikation, Absorption sowie die Adsorption. Das folgende Kapitel gibt einen kurzen Überblick über die verwendeten Methoden zum Aufarbeiten von komplexen Reaktionsgemischen, insbesondere von Fermentationsbrühen. Unter Einbeziehung von entsprechenden Literaturquellen aus den letzten 30 Jahren soll somit die Möglichkeit gegeben werden, die hier vorliegende Arbeit in den Stand der Technik einordnen zu können.

Die Aufarbeitung von Fermentationbrühen sowie weiterer komplexer Gemische ist ein oft diskutiertes Thema auf dem Gebiet der Biotechnologie und der chemischen Industrie in den letzten Jahrzehnten. Das Bewusstsein für die Nutzung von „grünen“ und nachwachsenden Rohstoffen ist enorm gestiegen. Gründe hierfür liegen im stetigen Bevölkerungswachstum sowie in der Endlichkeit der fossilen Brennstoffe [11, 12].

In der Biotechnologie sind vor allem die Aufarbeitung von Reaktionsgemischen, wie Fermentationsbrühen, und die Isolierung der biotechnologisch hergestellten Produkte eine Herausforderung [13]. Aufgrund dieser Tatsache stellen die Isolierung bzw. die Aufarbeitung von beispielsweise Proteinen aus komplexen Reaktionsmischungen bis zu 80 % der Herstellungskosten dar [64]. Der Ausdruck des Downstream Processings hat sich hauptsächlich in der Biotechnologie durchgesetzt. Häufig wird dieser Begriff für alle Arten der Aufarbeitung sowie für die Aufarbeitungsprobleme der Synthesechemie benutzt. Strube *et al.* (2011) [14] erläutern in ihrer Forschungsarbeit, dass der typische Downstream Prozess eine Aneinanderreihung von verschiedenen Verfahren ist. Diese Verfahren dienen der Aufreinigung sowie der Konzentrierung komplexer Mischungen, wie beispielsweise Pflanzenextrakten und Fermentationsbrühen [14].

In dem folgenden Abschnitt werden einige Beispiele aus der Literatur hinsichtlich der Aufarbeitung komplexer Reaktionsmischungen aufgeführt.

Der Downstream Prozess zur Aufreinigung von Propan-1,3-diol aus einer glycerol-basierten Fermentationsbrühe wurde in der Veröffentlichung von Anand *et al.* (2011) [15] untersucht. Die Aufarbeitung erfolgte dabei durch eine Kombination aus Mikrofiltration, Aktivkohle-Adsorption, Vakuumdestillation sowie Säulenchromatografie. Dementsprechend wird mit einer Filtration durch Hohlfaserkartuschen begonnen, wodurch 98,7 % der Biomasse entfernt werden können. Es folgten dann mithilfe der Aktivkohle die Abtrennung weiterer löslicher Proteine und Farbstoffverunreinigungen, die Aufkonzentrierung der Fermentationsbrühe im Vakuum, wodurch die anorganischen Salze auskristallisieren, sowie anschließend die Säulenchromatografie mit Kieselgel als Füllmaterial. Amand *et al.* (2011) [15] gelang es mit dieser Methodensequenz 75,5% des 1,3-Propandiols zu isolieren [15].

Malinowski *et al.* (2000) [19] diskutieren ebenfalls die Aufarbeitung von Propan-1,3-diol durch die Anwendung einer Reaktivextraktion, eine Kombination aus reversibler Reaktion und parallel ablaufender Extraktion. Im Gegensatz zu der Methode von Anand *et al.* (2011) [15] kann bei der Reaktivextraktion auf die Abtrennung der Biomasse sowie der Proteine und Farbstoffverunreinigungen verzichtet werden. Malinowski *et al.* (2000) [19] setzten bei ihren Untersuchungen Propan-1,3-diol mit Acetaldehyd zu 2-Methyl-1,3-dioxan um und extrahierten simultan das Produkt durch die Verwendung eines geeigneten Extraktionsmittels in die organische Phase. Zur Gewinnung des Produktes mit einer Reinheit von 99 % waren aber anschließend noch weitere Reinigungsschritte nötig, wie die Entfernung der Säurerückstände mit Natriumcarbonat und eine darauffolgende Destillation [19].

Barski *et al.* (2012) [22] erläutern die Isolierung von Propan-1,3-diol und Butan-1-ol durch Adsorption, jeweils hergestellt durch Fermentation. Die Adsorption erfolgt mithilfe von modifiziertem Silicagel. Das Silicagel wurde mit hydrophilen oder hydrophoben langen Kohlenstoffketten derivatisiert. Diese Kohlenstoffketten können entweder Hydroxyl- oder Carboxylfunktionen enthalten oder sind vollständig fluoriert oder enthalten Etherbindungen. Das modifizierte Silicagel dient als stationäre Phase in der Festphasenextraktion. Die stationäre Phase (10 g) wird in eine Glassäule gefüllt und mit destilliertem Wasser aktiviert. Die Probe (3 mL Fermentationsbrühe mit 21 g Propan-1,3-diol/L) wird auf die Säule gegeben und mit Methanol bei Raumtemperatur eluiert. Für die Isolierung des Propandiols eignete sich am besten das hydrophil modifizierte Kieselgel, aber es wurde im methanolischen Eluat eine geringere Konzentration an Propandiol festgestellt. Das Propandiol wurde durch diese Methode nicht separiert sondern verdünnt. Im Gegensatz dazu konnte Butan-1-ol mit 83 g/L aufkonzentriert werden. Als stationäre Phase diente das RP-18 Material und zur weiteren Reinigung erfolgte eine anschließende Destillation (98 % Butan-1-ol) [22].

Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung hochwertiger Produkte aus Fermentationsbrühen bietet die Nutzung von Zwei-Phasen-Systemen. In der Literatur wird ein wässriges Zwei-Phasen-System beschrieben, welches die Isolierung von Propan-1,3-diol ermöglicht. In die Fermentationsbrühe werden festes Dikaliumhydrogenphosphat und Methanol gegeben, sodass sich zwei Phasen ausbilden (6,5-24 % (m/m) Methanol/18-35 % (m/m) K₂HPO₄). In der Arbeit wurden sowohl der Einfluss des pH-Wertes als auch das unterschiedliche Verhältnis zwischen Methanol und Phosphat untersucht. Zur Auswertung wurden sowohl die Ausbeute als auch der Verteilungskoeffizient des Propandiols genutzt. Mit einem Verteilungskoeffizienten von 38,3 %, einer Ausbeute von 98,1% und bei einem pH-Wert von 10,7 konnte das Propan-1,3-diol direkt aus der Fermentationsbrühe isoliert werden [23].

Die Aufarbeitung von Fermentationsbrühen ist nicht nur aus praktischer Sicht eine Herausforderung, sondern oftmals auch ein sehr energieintensiver Prozess, was zu höheren Aufarbeitungskosten führt. In einer weiteren Untersuchung wird die Isolierung von Butanol beschrieben. Bei der Butanolisolierung entsteht der Energieaufwand vor allem dadurch, dass die Fermentationsbrühe zu ihrem Siedepunkt erhitzt und das Wasser verdampft wird. Diesen Prozessschritt konnten Straathof *et al.* (2013) [16] vermeiden, da sie eine Methode der lipasen-katalysierten Veresterung des Butanols und anschließender Extraktion des Produktes entwickelten [16].

Liu *et al.* (2009) [17] erläuterten die Entfernung von Glycerol aus Biodiesel durch die Adsorption bei Raumtemperatur unter Verwendung verschiedener Adsorbermaterialien, beispielsweise Aktivkohle, Tonmineralien, natürlicher und synthetischer Zeolithe, wobei sich Aktivkohle als bestes Adsorptionsmaterial erwies. Die Adsorption kann durch die Modifikation der Oberfläche des Adsorptionsmaterials beeinflusst werden. So wird die Adsorption durch die Entfernung der funktionellen Gruppen von der Kohlenstoffoberfläche bei hohen Temperaturen unter N₂-Atmosphäre gesteigert und umgekehrt, durch einen höheren Grad der funktionellen Gruppen, erreicht durch Oxidation, verringert. Verglichen mit Wasser tendiert das Glycerol mehr dazu an hydrophoben Gruppen als an hydrophilen Kohlenstoffoberflächen zu adsorbieren [17].

In der Veröffentlichung von Watanabe *et al.* (1986) [18] wird die Anreicherung von einer unbekannten Substanz in Sojabohnenknoten, die sich an der Wurzel befinden, unmittelbar nach einer vorangegangenen Infektion der Bohnen durch den Wasserstoff aufnehmenden Erregerstamm *Bradyrhizobium japonicum* beschrieben. In einem späteren Nachweis mittels Elementaranalyse, IR-Spektroskopie, ¹³C-NMR-Spektroskopie, HPLC sowie GCMS-Messungen konnte diese Substanz als Serinol identifiziert werden. Bei diesem Prozess wurde 1 kg der Sojabohnen in 7,2 L heißem, 80%igen Ethanol homogenisiert und bei 80 °C für 1 h extrahiert, anschließend zentrifugiert und im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 1,5 L destilliertem Wasser wieder gelöst und nochmals 30 min zentrifugiert. Zur wässrigen Lösung wurde dann Amberlite IR-120B (H⁺-typ, Resinphase, 3 L) hinzugefügt und gerührt. Die Fraktion mit den entsprechenden Aminen sowie Aminosäuren wurde mit einer NH₄OH-Lösung vom Harz eluiert, im Vakuum getrocknet und wieder in destilliertem Wasser gelöst. Um die Aminosäuren von der gewünschten Substanz abzutrennen, wurden zwei verschiedene, hintereinander geschaltete Dowex-Säulen verwendet und das Produkt mittels NH₄OH-Lösung von der Säule eluiert, anschließend im Vakuum getrocknet und wieder in Methanol gelöst und durch Quarzwolle filtriert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurde ein gelber Sirup erhalten. Der Sirup wurde in HCl gelöst, anschließend wieder zur Trockene eingeengt und der Rückstand im sauren Ethanol umkristallisiert. Auf diese Weise konnten aus einem Kilogramm Sojabohnenknoten 73 mg des Serinol-Hydrochlorids isoliert werden.

Dai *et al.* (2008) [20] untersuchten ebenfalls den Aufarbeitungsprozess von Fermentationsbrühen. Eine viel genutzte Säure bei der Medikamenten- oder Pestizidenherstellung sowie bei Lebensmitteln ist die Brenztraubensäure. Diese kann durch Fermentation produziert werden. Da die Azidität der Brenztraubensäure stärker als die anderer Carbonsäuren ist, konnte die Sorption aus wässriger Lösung auf zwei Arten von schwach basischen Polymersorbentien, Tertiäramin D301R und Primäramin D392, untersucht werden, wobei verschiedene pH-Werte eingestellt und die Salzkonzentration (MgSO₄) variiert wurden. Dai *et al.* (2008) kamen zu dem Ergebnis, dass die Adsorption auf beiden Polymeren erfolgt ist, wobei die Adsorption vom pH-Wert und der Salzkonzentration der wässrigen Phase abhing. Außerdem konnte eine überladene Adsorption festgestellt werden, die sehr wahrscheinlich durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei Säuren zustande kommt. Die Einstellung des pH-Wertes der Lösung erwies sich als eine der wichtigsten Parameter. Die Gewinnung der Brenztraubensäure mit hoher Effizienz erfolgte bei pH 2. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Adsorption des primären Amins

deutlich wirksamer ist, da es im Vergleich zum tertiären Amin nicht so stark sterisch gehindert ist [20].

Zu den thermischen Trennverfahren gehören nicht nur die Destillation, Rektifikation oder Adsorption, sondern auch die Membranverfahren wie die Membranfiltration. Beispielsweise wird in der Literatur die Reinigung von Biodiesel unter Verwendung von Mikro- und Ultrafiltration beschrieben. Dazu wurde im Labormaßstab Biodiesel aus Sojabohnenöl hergestellt. Die Aufreinigung erfolgte zum einen durch das Waschen mit Wasser und zum anderen mit Mikro- und Ultrafiltration. Das Auswaschen der Seife und des restlichen Glycerols aus dem Biodiesel mit Wasser ist die herkömmliche Variante der Biodieselaufréinigung. Im Labormaßstab wurden drei Waschvorgänge bei 50 °C vorgenommen, bis das Waschwasser einen neutralen pH-Wert zeigte. Für die Membranfiltration wurden Mikrofiltrationsmembranen von 0,22 und 0,30 µm Porengröße sowie Ultrafiltrationsmembranen von 10 und 30 kDa verwendet. Die Untersuchungen zeigten, dass nur die 10 kDa-Membran für die Biodieselreinigung geeignet war. Außerdem wurde festgestellt, dass der Zusatz von Wasser die Entfernung des Glycerols aus dem Biodiesel begünstigt [21].

Die aufgeführten Methoden zur Isolierung wertvoller Verbindungen aus Fermentationsbrühen oder anderen komplexen Mischungen zeigen deutlich, welche Herausforderung die Aufarbeitungsproblematik darstellt. Um zu einem akzeptablen Ergebnis zu kommen, sind meistens viele aufeinander folgende Schritte notwendig, die den zeitlichen sowie finanziellen Aufwand erhöhen. Dies spiegelt sich letztendlich in den Gesamtkosten der auf diese Weise hergestellten Verbindungen wieder. Wie bereits erwähnt, nehmen diese bis zu 80 % der Kosten ein [64].

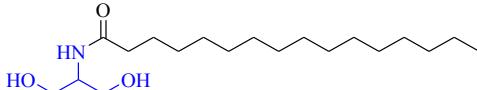
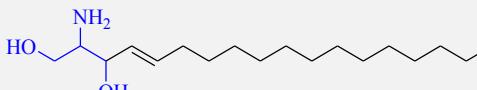
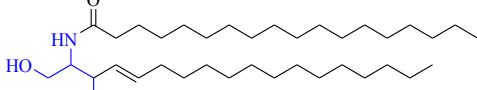
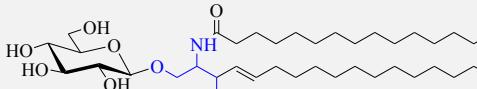
3.2 Serinolderivate

Serinol kann aufgrund seiner Polyfunktionalität auf verschiedene Weisen derivatisiert werden. Serinol besitzt eine Aminofunktion in 2-Position sowie zwei terminale Hydroxylfunktionen. Durch diese Polyfunktionalität besteht die Möglichkeit, Serinol als zentralen Baustein für die Synthese von Sphingosin- und Ceramidanaloga sowie glycolipid-ähnlichen Verbindungen einzusetzen. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über die Synthese, Derivatisierung und Verwendung von Serinol bzw. Serinolderivaten geben. Tabelle 3-1 zeigt die Struktur von Serinol sowie Beispiele für die Leitstruktur eines Amids, Ceramids, Sphingosins und Glycolipids.

Ceramide sind Lipide, genauer Sphingolipide, die aus einer Sphingoidbase bestehen, welche wiederum über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verknüpft ist. Ceramide spielen eine wichtige Rolle für die Barrierefunktion der Haut, sie befinden sich demnach in der obersten Schicht der Haut. Viele Untersuchungen wurden zur Rolle der Ceramide in der menschlichen Haut und ihrer Funktion unternommen [44, 45].

Es wird vermutet, dass eine Änderung des Ceramidegehalts mit zahlreichen Hauterkrankungen wie Neurodermitis einhergeht. Das Review von Markfessel und Brandt (2014) [45] gibt einen

Überblick über Struktur, Funktion sowie die Bedeutung von Ceramiden in der menschlichen Haut und wie diese in der Hautpflege genutzt werden können [44, 45].

Stoffklasse	Beispiel	Struktur
Aminoalkohol	2-Amino-propan-1,3-diol (Serinol)	
Amid	<i>N</i> -(Hexadecanoylamino)propan-1,3-diol (C16-Serinol)	
Sphingosin	Dihydrosphingosin	
Ceramid	<i>N</i> -Nonadecanoyl-dihydrosphingosin	
Glycolipid	Sphingoglycolipid	

Tab. 3-1 Struktur von Serinol sowie ausgewählte Lipidabkömmlinge

Milkereit *et al.* (2004) [46] beschäftigten sich mit der Synthese und den flüssigkristallinen Eigenschaften von Y-förmigen Glycoglycerolipiden. Es wurde der Syntheseweg von *N*-Palmitoyl-1,3-di-*O*- β -D-glucopyranosyl-2-deoxy-2-amino-*sn*-glycerol mit Serinol als Ausgangsstoff beschrieben. Das neue Glycoglycerolipid besteht aus zwei Zuckern, die über ein Amid miteinander verknüpft sind. Das Besondere dabei ist die Verknüpfung mit dem Amid. Das ursprünglich glycosyierte Glycerol ist über Esterbindungen mit den Fettsäuren verbunden und beeinflusst die flüssigkristallinen Eigenschaften. Bei den glycosylierten O-Acyl-glycerolderivaten führen neben der Art der Verknüpfung zwischen Alkylkette und Glycerolgruppe auch die Kettenlänge und die Art der Kette zu deutlichen Eigenschaftsunterschieden. Die Art der Alkylkette beeinflusst besonders den Schmelzpunkt. So führen ungesättigte Alkylketten in den Glycoglycerolipiden im Gegensatz zu gesättigten Verbindungen schon bei Umgebungstemperatur zur Flüssigkristallinität. Die Art der Verknüpfung hat dabei einen vernachlässigbaren Effekt auf den Schmelzpunkt. Beim *N*-Palmitoyl-1,3-di-*O*- β -D-glucopyranosyl-2-deoxy-2-amino-*sn*-glycerol wurde eine deutlich höhere Schmelztemperatur erwartet, jedoch hat das Palmitoylamid ein ungewöhnliches Schmelzverhalten, was auf ein komplexes Wasserstoffbrückennetz zurückzuführen ist. Bei Umgebungstemperatur befindet sich die Verbindung im Glaszustand [46].

Eine Patentanmeldung aus dem Jahr 2009 mit dem Titel *Novel synthetic analogs of sphingolipids* beschreibt die Synthese unterschiedlich langer *N*-Alkanoylpropandiole und die anschließende Reduzierung mit Lithiumaluminiumhydrid. Die aufgeführten Ceramidanaloga besitzen eine antikanzerogene Wirkung und werden daher als pharmazeutisches Präparat für die Behandlung von Krebsarten, aber auch bei neurodegenerativen Störungen, Infektionskrankheiten und immunverbundenen Störungen eingesetzt [47].

In der Literatur wird nicht nur die Synthese neuer Amphiphile wie Ceramidanaloga beschrieben, sondern auch die Synthese neuer Amphiphile zur Verbesserung der Löslichkeit von beispielsweise Pharmaka oder Farbstoffen in Wasser. Plietker und Haag *et al.* [52] (2008) beschrieben die Synthese von Triblockamphiphilen, die einen unpolaren Diphenylkern besitzen. Dieser Kern wird umgeben von polaren Monoamino-polyglyceroldendrimeren. Verknüpft wird der unpolare Kern mit dem polaren Teil durch Amidbindungen. Als Ausgangsstoffe wird hier ebenfalls Serinol verwendet [52].

Neben der Synthese von Lipidanaloga kann Serinol aber auch zu Derivaten anderer Stoffklassen umgesetzt werden. Eine Patentanmeldung aus dem Jahr 2007 beschreibt die Herstellung und Untersuchung eines Oxazolidinons und seiner Oxazolidinonderivate. Diese Oxazolidinonderivate können für die Synthese von Pharmazeutika eingesetzt werden. Diese Synthese soll als eine Möglichkeit zur Aufarbeitung der Fermentationsbrühe genutzt werden. Da bei dieser Reaktion Wasser als Lösungsmittel eingesetzt wird, liegt die Überlegung nahe, dass dieselben Reaktionsbedingungen auch für die Isolierung des Serinols aus der Fermentationsbrühe geeignet sind [24].

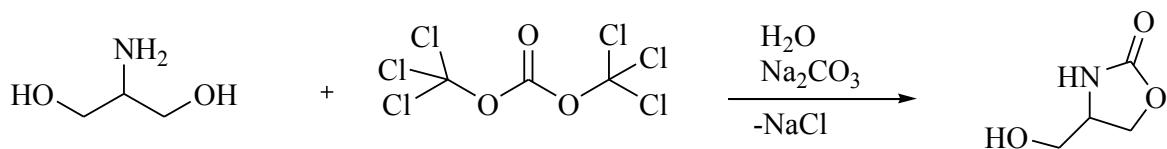


Abb. 3-1 Umsetzung von 2-Amino-propan-1,3-diol mit Triphosgen zu 4-(Hydroxymethyl)-1,3-oxazolidin-2-on [24]

In der Veröffentlichung von Neri *et al.* [48] wurde die Synthese von Oxazolidinonen durch enzymatische Desymmetrisierung von achiralen Diolen beschrieben. Die Desymmetrisierung von achiralen *N*-Boc-serinol wurde durch die enzymatische Acetylierung erreicht. Die nachfolgende Umsetzung zu einem Oxazolidinon konnte mit einem Enantiomerenüberschuss von 98 % erreicht werden. Diese Desymmetrisierung von achiralen Diolen mithilfe von Enzymen ist ein bekannter Prozess für die Bildung von enantiomeren Monoestern.

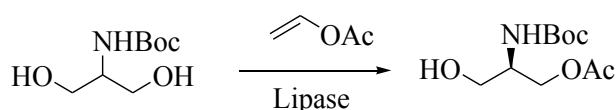


Abb. 3-2 Desymmetrisierung von *N*-Boc-Serinol [48]

Die Abbildung 3-2 zeigt die Desymmetrierung von *N*-Boc-Serinol mit Lipase (engl. *porcine pancreatic lipase*) im organischen Lösungsmittel und Vinylacetat als Acetylierungssubstrat. Das entstandene Monoacetat wurde nachfolgend chemisch zu einem enantiomerenreinen Oxazolidinon umgesetzt [48].

Jacobsen *et al.* (2013) [56] beschrieben ebenfalls die enzymatische Acetylierung eines Serinolderivats. Es wird die Acetylierung des Carboxybenzyl-serinols katalysiert durch die Scheinepankreaslipase (engl. *pig pancreatic lipase*) beschrieben. Die Untersuchungen zeigten, dass der Enantiomerenüberschuss der sich bildenden Monoacetate einerseits vom Enzym und anderseits vom Substratverhältnis sowie der Reaktionszeit abhängt. Das reine Enzympräparat bildet nur das 2(S)-Monoacetat. Ab einer Reaktionszeit von 85 min verändert sich der Enantiomerenüberschuss des Monoacetats und es wird ebenfalls das 2(R)-Monoacetat gebildet. Unter Verwendung des Vinylacetats sowohl als Lösungsmittel als auch als Acetyl donor wird auch das 2(R)-Monoacetat gebildet [56].

Serinol kann des Weiteren methyliert werden und so als Ausgangsstoff für neue pH-sensitive Kationenlipide genutzt oder auch bei der enzymatischen Herstellung von Cardiolipinanaloga eingesetzt werden [50, 51].

4. Ergebnisse

4.1 Aufarbeitung der Fermentationsbrühe

Im folgenden Kapitel werden die Vorgehensweise und die Resultate zur Isolierung von Serinol aus glycerol-basierten Fermentationsbrühen dargestellt.

Material

Die Proben der verschiedenen Fermentationsbrühen wurden von der Universität Münster zur Verfügung gestellt. Als Referenzmaterial für Testreaktionen sowie analytische Daten wurde kommerziell erhältliches Serinol von den Firmen VWR oder Sigma Aldrich verwendet.

In der folgenden Tabelle (Tab.4-1) werden die Fermentationsmedien und die verwendeten Mikroorganismen aufgelistet. Die Zusammensetzung der Fermentationsinhalte unterscheidet sich in der Spurenelementlösung sowie in der Vorgabe der Nährstofflösung. Beispielsweise wird beim Komplexmedium *Corn-steep-liquor* und im Basalmedium Hefeextrakt eingesetzt. Alle Medien enthalten Ammonium- sowie Phosphatsalze (Zusammensetzung der Fermentationsmedien siehe Anhang 9.1).

Rekombinante Mikroorganismen	Fermentationsmedien	Serinolgehalt [g/L]	Gehaltsbestimmung (Münster)
<i>Escherichia coli</i>	ZYP	2,0	MSTFA-Derivatisierung
	Mineralsalzmedium H16	2,0	GCMS
	Riesenbergs	2,4	(<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoracetamid)
	Modified MSM	nicht nachweisbar	
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Komplexmedium	2,4	Guanidierung mit <i>O</i> -Methylisoharnstoff-Hemisulfat
	Minimalmedium		
<i>Shimwellia blattae</i>	Basalmedium (BM)	7,0	Guanidierung mit <i>O</i> -Methylisoharnstoff-Hemisulfat

Tab. 4-1 Auflistung der Fermentationsmedien und der zur Fermentation genutzten Mikroorganismen

Der Serinolgehalt in den einzelnen Fermentationsüberständen variierte von nicht nachweisbar bis 7 g/L (siehe Tabelle 4-1). Die Gehaltsbestimmung von Serinol in den Fermentationsmedien erfolgte beim Projektpartner vom Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Münster. Der Gehalt wurde in den ersten Versuchen durch eine MSTFA-Derivatisierung der Proben und Vermessung mittels GCMS bestimmt. Dabei konnte der Serinolgehalt mit Hilfe dieser Derivatisierungsmethode aufgrund der stark schwankenden Werte nur qualitativ ermittelt werden. Infolgedessen wurde zur

Gehaltsbestimmung die Guanidierung des Serinols verwendet. Dabei wurden die Proben mit *O*-Methylisoharnstoff-Hemisulfat guanidiert und anschließend mittels HPLC (RI-Detektor) vermessen.

Strategie

Wie in der Zielsetzung bereits erwähnt und in der Tabelle 2-2 dargestellt, wurden drei Methoden in Erwägung gezogen. In Vorversuchen wurde die Methode der Sprühtrocknung untersucht. Dazu wurde 100 mL eines Fermentationsmediums (Riesenbergs-Medium, Serinolgehalt: 2,4 g/L) unter Zusatz von 2,5 g Kieselgur, bei 90 °C sowie 130 °C in den Verdampfungsraum des Sprühtrockners versprüht. Entgegen der Erwartung wurde die getrocknete Probe in der gesamten Anlage verteilt und nicht wie vorgesehen im Auffangbehälter gesammelt. Die versprühte Probe bildete an den Glaswänden eine dünne Schicht. Aufgrund der großen Verteilung der Probe mussten alle Glaskörper mit Methanol gespült werden. Alle polaren Substanzen, so auch Serinol, waren in Methanol löslich. Es blieb nach dem Spülen der Großteil der getrockneten Inhaltsstoffe an der Glaswandung haften. Das zum Spülen verwendete Methanol wurde im Rundkolben aufgefangen, alle unlöslichen Bestandteile filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Ein gelber sirupartiger Rückstand wurde erhalten.

Für die Analyse wurden 20 mg dieses Sirups entnommen, in 300 µL Pyridin gelöst, mit 20 µL BSTFA innerhalb 1 h bei 60 °C derivatisiert und mittels GCMS vermessen (GCMS-Parameter siehe Experimenteller Teil Kapitel 7.1.2). Die GCMS-Messungen bestätigten, dass das Serinol mittels Methanol von den Glaswänden gelöst werden konnte. In den Chromatogrammen war aber nicht nur ein Peak für das derivatisierte Serinol erkennbar sondern mehrere Peaks, die auf mehrere Verbindungen hinwiesen. Die Chromatogramme zeigten, dass das derivatisierte Serinol bei einer Retentionszeit von circa 7,53 min eluiert wurde. Im Massenspektrum sind die Peaks für das dreifach-derivatisierte bei 309,25 m/z und das zweifach-derivatisierte Serinol bei 237,19 m/z zu erkennen. Der Temperaturunterschied von 90 °C zu 130 °C bei der Versprühung hat laut vorliegender Datenlage keinen Einfluss auf die Proben zu haben. Beide Chromatogramme und Massenspektren sind nahezu identisch (Chromatogramme und Massenspektren siehe Anhang 9.7.1).

Zum Vergleich wurde ebenfalls reines Serinol unter gleichen Bedingungen versprüht. Hier zeigten die Chromatogramme ebenfalls mehrere Peaks und eine starke Fragmentierung im Massenspektrum (Chromatogramme und Massenspektren siehe Anhang 9.7.1).

Weiterhin wurde zusätzlich reines Serinol (ohne vorherige Sprühtrocknung) mittels BSTFA derivatisiert. Das derivatisierte Serinol wurde bei einer Retentionszeit von 7,54 min eluiert. In diesem Chromatogramm war nur ein einzelner Peak erkennbar. Auch das Massenspektrum zeigte weniger Fragmente.

Die GCMS-Messungen lassen schlussfolgern, dass das Serinol, sowohl rein als auch in der Fermentationsbrühe, unter den Bedingungen der Sprühtrocknung nicht stabil ist. Aus diesem Grund und der Tatsache, dass sich die getrocknete Fermentationsbrühe im gesamten Sprühtrockner verteilte, wodurch viel Methanol zum Spülen verbraucht wurde und es nur zu

einer geringen Abtrennung von Serinol kam, wurde diese Methode zur Aufarbeitung der Fermentationsbrühe nicht weiter in Betracht gezogen.

Eine weitere Alternative zur Aufarbeitung wäre die Ionenaustauschchromatografie. Es wurde sich aber im Laufe der Arbeit nur auf Derivatisierungsmethoden konzentriert.

Wie in Tabelle 4-2 angegeben, wurden innerhalb der Derivatisierung unterschiedliche Ansätze untersucht und optimiert.

Aufarbeitung der Fermentationsbrühen

Derivatisierung	Getestete Methoden
Reversible Reaktion und anschließende Extraktion	Einführung Bocv-Schutzgruppe
Entfernung des Wassers und anschließende Reaktion	Peracetylierung Guanidierung Hydrochloridfällung
Phasentransferkatalyse	Zyklisierung

Tab. 4-2 Vertiefung der Tabelle 2-2: Überblick über die Strategien zur Aufarbeitung der Fermentationsbrühen

Eine genauere Gegenüberstellung der Methoden und der erhaltenen Resultate ist im nachfolgenden Abschnitt angeführt.

4.1.1 Aufarbeitung der Fermentationsbrühe durch Peracetylierung

Peracetlierung von reinem Serinol

Serinol **1** mit den drei funktionellen Gruppen kann, wie aus der Kohlenhydratchemie bekannt durch unterschiedliche Schutzgruppentechniken derivatisiert werden. Eine sehr effektive Derivatisierungsmethode für Amino- und Hydroxylfunktionen ist die Acetylierung.

Serinol konnte mithilfe von Acetanhydrid und Pyridin vollständig acetyliert werden. Die hohe Hygroskopie von Serinol hat einen negativen Einfluss auf diese Reaktion. Serinol musste deshalb vor der Reaktion mit Pyridin im Vakuum codestilliert werden. Das Wasser wurde dadurch entfernt und die Bildung der Essigsäure unterbunden. In der Abbildung 4-1 ist die Reaktionsgleichung zur Peracetylierung dargestellt.

Zunächst wurde das Serinol mit Pyridin codestilliert, dann in absolutem Pyridin gelöst und anschließend bei 0 °C das Acetanhydrid hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur (24 °C) über Nacht gerührt.

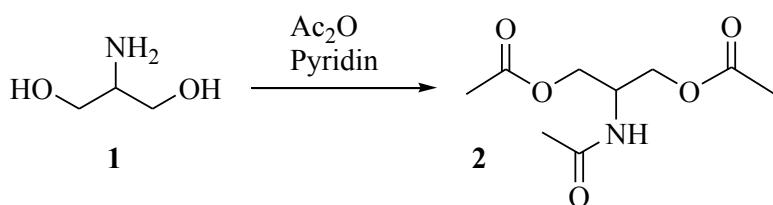


Abb. 4-1 Darstellung des Peracetylserinols **2**

Zur Reaktionslösung wurde Methanol zugegeben und die Mischung in einen Schütteltrichter mit Eiswasser überführt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann viermal mit NaHSO_4 -Lösung (Entfernung des Pyridins) und viermal mit NaHCO_3 -Lösung (Neutralisierung der Phase) und Reinstwasser gewaschen. Die organische Phase wurde mittels Filtration durch Baumwollwatte getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels kristallisierte das gewünschte Produkt **2** aus, welches mit einer Ausbeute von 72 % erhalten wurde. Um andere Serinolderivate herzustellen bzw. die Hydroxylfunktionen für andere Reaktionen zugänglich zu machen, sollten die Acetylgruppen der Hydroxylfunktionen unter Zemplén-Bedingungen entfernt werden [28].

Das Peracetylserinol wurde in Methanol gelöst und eine Spatelspitze Natriummethanolat zugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und anschließend mit einem geeigneten Ionenaustauscher (AmberliteTM) neutralisiert. Der Ionenaustauscher wurde vor der Verwendung mit Wasser und Methanol gewaschen und erst dann zur Lösung hinzugegeben. Dabei musste so viel Ionenaustauscher zugefügt werden, bis die Lösung neutral war (Lackmuspapier). Der Ionentauscher konnte anschließend durch Filtration abgetrennt werden. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und *N*-Acetylserinol **3** als weißer, kristalliner Feststoff mit einer Ausbeute von 75 % erhalten.

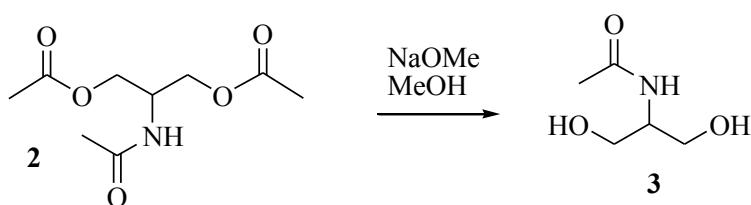


Abb. 4-2 Entschützung der Hydroxylfunktionen nach Zemplén [28]

Übertragung der Peracetylierungsmethode auf die Fermentationsbrühe

Für die nachfolgend erläuterte Methode wurde ein Komplexmedium (Zusammensetzung siehe Anhang 9.1) verwendet. Zur Fermentation wurde das *Corynebacterium glutamicum* genutzt. Aus 20 g/L Glycerol wurden während des Fermentierens 2,4 g/L Serinol erhalten.

Bevor das Serinol in der Fermentationsbrühe acetyliert werden konnte, musste sichergestellt sein, dass kein Wasser enthalten war. Dazu wurden 250 mL der Fermentationsbrühe im Vakuum eingeengt, bis ein dunkelbrauner sirupartiger Rückstand erhalten wurde (Abb. 4-3 A, B). 250 mL der Fermentationsbrühe enthielten ungefähr 225 mL Wasser und besaßen nach dem Einengen noch einen Wassergehalt von rund 14 % (Bestimmung des Wassergehalts durch Karl-Fischer-Titrator).

Der Hauptteil des Wassers wurde unter reduziertem Druck entfernt, wobei es zu einer starken Schaumbildung und zu Siedeverzügen der Fermentationsbrühe kam. Im Anschluss wurde der erhaltene Rückstand mit absolutem Pyridin versetzt und das restliche Wasser durch die Bildung eines Azeotrops unter reduziertem Druck entfernt. Der wasserfreie Rückstand wurde in Pyridin gelöst und mit einem 10-fachen Überschuss an Acetanhydrid, wie das Referenzmaterial (Kap. 4.1.1.1), acetyliert.

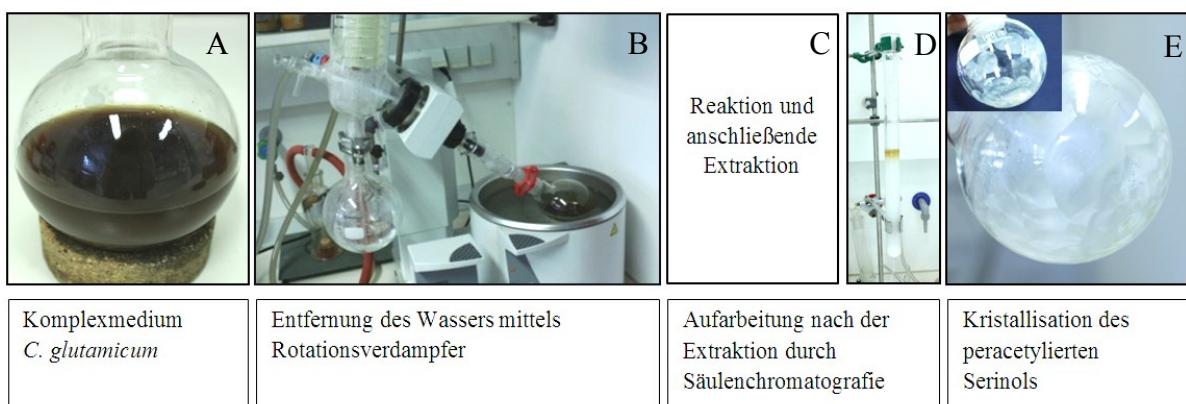


Abb. 4-3 Schematische Darstellung der Isolierung von Serinol aus der Fermentationsbrühe durch Peracetylierung

Nach der Extraktion mit Dichlormethan und den anschließenden Waschvorgängen wurde ein Gemisch aus acetyliertem Serinol und Glycerol sowie einigen unbestimmten Nebenprodukten erhalten. Das Rohprodukt wurde dann mithilfe der Säulenchromatografie aufgetrennt und die Verbindung **2** isoliert (Abb. 4-3 D, E). Die Ausbeuten lagen in einem Bereich von 10-18 %. Die Ursache für die geringen Ausbeuten stellte vor allem das im Überstand noch enthaltene Glycerol dar, welches bei der Fermentation nicht umgesetzt wurde. Die verbliebene Menge Glycerol wurde bei der Berechnung der Acetanhydridmenge nicht mitberücksichtigt. Ein 10-facher Überschuss an Acetanhydrid (ca. 19 mL) war zu gering, um sowohl das Glycerol (ca. 4,5 g auf 250 mL) als auch das Serinol (0,6 g auf 250 mL) zu acetylieren. Der Anteil an Acetanhydrid hätte demnach mindestens um einen Faktor 7,5 erhöht werden müssen. Außerdem ist es denkbar, dass das peracetylierte Serinol durch die Säulenchromatografie sich teilweise zersetzt hat. Durch die leicht saure Eigenschaft des verwendeten Kieselgels könnten die Acetylgruppen abgespalten werden, sodass die Verbindungen aufgrund der erhöhten Polarität nicht wie erwartet von der Säule eluiert werden, sondern dort verbleiben. Möglicherweise führt die Zugabe von Triethylamin zum Eluentensystem bei einer Wiederholung dieses Experiments zu einer besseren Isolierung. Die Abbildung 4-3 zeigt die schematische Isolierung von Serinol aus der Fermentationsbrühe durch Peracetylierung. Nach

der zuvor beschriebenen Methode können aus der tiefbraunen komplexen Mischung reine farblose Kristalle erhalten werden (195 mg, 14 %, peracetyliertes Serinol).

Die Methode der Peracetylierung ist für die Aufarbeitung der Fermentationsbrühe aus vielerlei Hinsicht nicht praktikabel. Es kam einerseits bei der Entfernung des Wassers unter reduziertem Druck zu einer starken Schaumbildung und zu Siedeverzügen, was sich nur durch eine verlangsamte Druckminderung vermeiden ließ und den Zeitaufwand zusätzlich erhöhte. Andererseits war die Ausbeute des peracetylierten Serinols sehr gering, da aufgrund der geringen Selektivität des Acetanhydrids nicht nur Serinol sondern auch Glycerol derivatisiert wurden. Bei einer Ausgangsmenge von 20 g/L Glycerol wurden 2,4 g/L Serinol erhalten, weshalb nach der Fermentation noch 17,6 g/L Glycerol enthalten sein können. Der Überschuss an Acetanhydrid muss also entsprechend der Menge Glycerol um einen Faktor 7,5 höher gewählt werden, wodurch wiederum die Kosten steigen.

4.1.2 Aufarbeitung der Fermentationsbrühe durch die Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-1,3-oxazolidin-2-on

In der Literatur wurde die Reaktivextraktion für die Isolierung von Propan-1,3-diol beschrieben [19]. Das Propan-1,3-diol wird dabei zu einem Dioxan umgesetzt und gleichzeitig mit einem geeigneten Lösungsmittel extrahiert. Von Vorteil bei dieser Methode ist nicht nur, dass die Reaktion direkt in Wasser stattfindet sondern auch, dass die Reaktion reversibel ist. Die Isolierung von Serinol aus der Fermentationsbrühe durch Zyklisierung soll im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

Anders als bei der Zyklisierung des Propan-1,3-diols kann Serinol durch eine 1,2-Verbrückung zu einem Oxazolidin oder Oxazolidinon umgesetzt werden. Eine Patentanmeldung aus dem Jahr 2007 beschreibt die Umsetzung von 2-Aminopropan-1,3-diol zu 4-(Hydroxymethyl)-1,3-oxazolidin-2-on **4R,S** mithilfe von Triphosgen [24]. Diese Reaktion wurde in Wasser durchgeführt, was ein wesentlicher Vorteil für die Aufarbeitung der Fermentationsbrühe darstellt und aus diesem Grund zur Zyklisierung des Serinols ausgewählt worden ist.

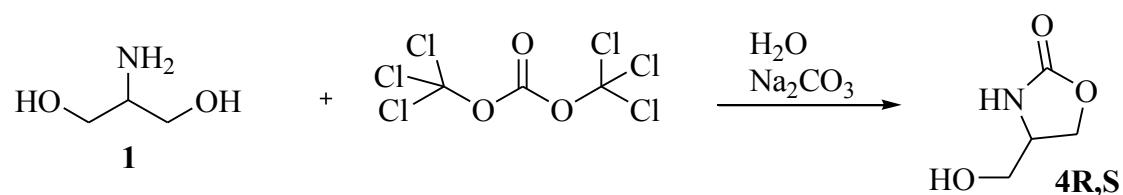


Abb. 4-4 Darstellung des 4-(Hydroxymethyl)-1,3-oxazolidin-2-ons [24]

Bei dieser Reaktion wurde das Serinol in Wasser gelöst und Natriumcarbonat zugegeben. Anschließend wurde das Triphosgen portionsweise zugefügt und die Lösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die wässrige Lösung mit Dichlormethan und mit 1 M Salzsäure gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurde Ethanol zur wässrigen

Phase gegeben und die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Als Rückstand wurde ein weißer Feststoff erhalten, der sich aus dem gewünschten Produkt und aus nicht umgesetztem Natriumcarbonat zusammensetzte. Der Feststoff wurde mit Ethanol versetzt und die Suspension zum Sieden gebracht. Die ethanolische Lösung wurde filtriert, das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und das Produkt im Vakuum getrocknet. Das 4-(Hydroxymethyl)-1,3-oxazolidin-2-on **4R,S** wurde mit einer Ausbeute von 60 % isoliert. Das dazugehörige NMR-Spektrum ist in der Abbildung 4-5 abgebildet.

Da diese Reaktion erfolgreich war, wurde sie anschließend mit der Fermentationsbrühe durchgeführt. Als Realprobe wurde das Riesenbergsmedium (verwendete Mikroorganismus: *Escherichia coli*) verwendet. Bei der Fermentation wurden ausgehend von 25 g/L Glycerol ca. 2,4 g/L Serinol erhalten.

Zur Isolierung des Serinols wurden dieselben Reaktionsbedingungen verwendet. Die NMR-Messungen zeigten, dass das verbrückte Serinolderivat gebildet worden ist (Anhang 9.2.1).

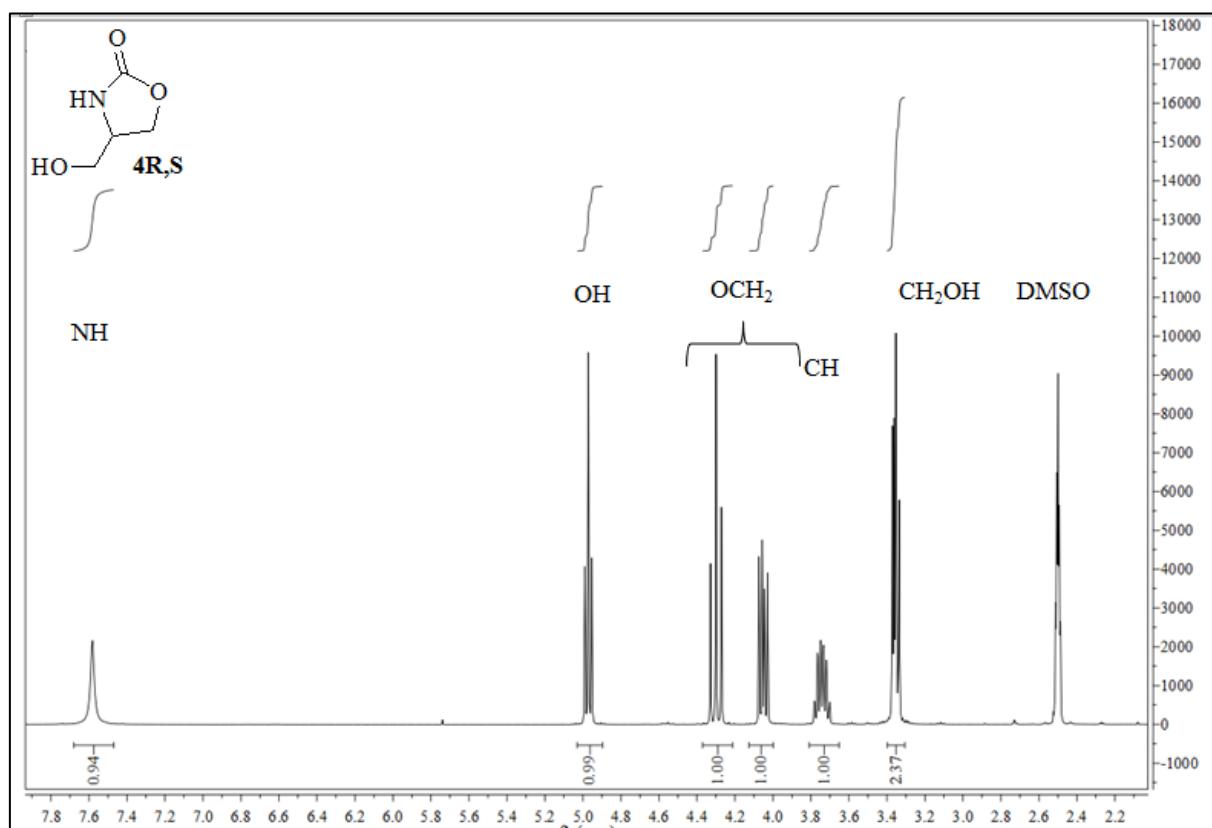


Abb. 4-5 ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-d_6) des 4-(Hydroxymethyl)-1,3-oxazolidinons **4R,S**, synthetisiert in Wasser

Beim Vergleich der beiden ^1H -NMR-Spektren des Referenzmaterials und der Realprobe, wird deutlich, dass Verbindung **4** sowohl in Wasser als auch in der Fermentationsbrühe gebildet wurde, jedoch nur in geringen Mengen (Siehe Anhang 9.2.1). Es ist neben den Signalen des 4-(Hydroxymethyl)-1,3-oxazolidin-2-ons ein zusätzliches Multiplett mit hoher Intensität vorhanden, das dem Glycerol zugeordnet wurde. Das Spektrum zum Vergleich des reinen Glycerols mit dem aus der Fermentationsbrühe ist im Anhang 9.2.2 dargestellt. Das Multiplett

der CH₂- sowie CH-Gruppen befindet sich in beiden Spektren im Verschiebungsbereich von 3,49 – 3,20 ppm. Das Integral dieses Multipletts ist nicht exakt 5, da sich bei einer Verschiebung von 3,30 ppm das Wassersignal (Lösungsmittel DMSO-d₆) befindet. Die Signale der Hydroxylfunktionen befinden sich im Referenzspektrum bei 4,48 – 4,33 ppm. Im Spektrum der Realprobe ist für die Hydroxylfunktionen ein breites Signal bei einer Verschiebung von 4,52 – 4,35 ppm zu beobachten.

Aufgrund der geringen Ausbeute im ersten Versuch wurde in einem weiteren Ansatz ein Überschuss an Natriumcarbonat und Triphosgen eingesetzt. Das NMR-Spektrum des neuen Reaktionsansatzes zeigte, dass die Intensität der Oxazolidinon-Signale ansteigt, somit also mehr des gewünschten Produktes in der Fermentationsbrühe gebildet worden ist. Jedoch sind die Polaritäten des Heterozyklus und des Glycerols so ähnlich, dass sie sich kaum auf dem Dünnschichtchromatogramm unterscheiden. Beide Verbindungen verfügen über eine oder mehrere freie Hydroxylfunktionen, weshalb die beiden Verbindungen polar sind und eine Trennung mittels Säulenchromatografie erschwert ist. Durch die Acetylierung der freien Hydroxylgruppen wird die Polarität verringert und gleichzeitig werden die Eigenschaften so verändert, dass die beiden Produkte mit der stationären Phase (Kieselgel) unterschiedlich stark wechselwirken und deshalb separiert werden können. Mithilfe der Acetylierung konnte nur das peracetylierte Glycerol in reiner Form, aber nicht der derivatisierte Heterozyklus isoliert werden.

Um das freie Serinol zu erhalten, musste die Verbindung **4R,S** gespalten werden. Ishii *et al.* (2011) [25] beschrieben die Spaltung eines Oxazolidinons mittels Lithiumhydroxid-Monohydrat und Ethanol als Lösungsmittel. Die folgende Abbildung 4-6 zeigt die Reaktionsgleichung der Spaltung.

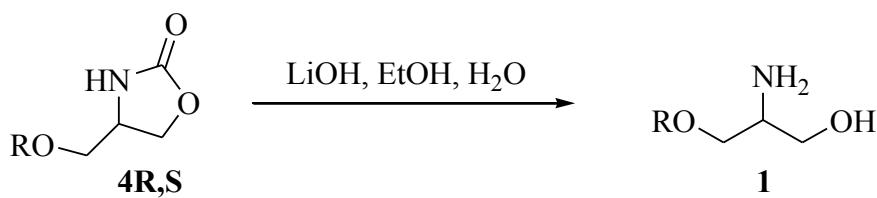


Abb. 4-6 Spaltung von 4-(Acylmethyl)-1,3-oxazolidin-2-on zu (S)-2-Amino-3-(hexadecyloxy)propan-1-ol [25]

Das Oxazolidinon und Lithiumhydroxid-Monohydrat wurden mit Ethanol versetzt und unter Rückfluss 1 h gerührt. Nach Abkühlung wurde die Reaktionslösung mit Wasser verdünnt und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Baumwollwatte getrocknet und der Überschuss des Lösungsmittels unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatografisch (Eluentensystem CH₂Cl₂:MeOH, 5:1) aufgearbeitet [25]. Mittels dieser Spaltungsmethode konnte Serinol nicht zurückgewonnen werden. Es erfolgte keine Umsetzung des Oxazolidinons.

Da Serinol gut in polaren Lösungsmitteln löslich ist, wird es wahrscheinlich in der wässrigen Phase verbleiben, was die Aufarbeitung erschwert. Um dieses Problem zu umgehen und um diese Methode für die Aufarbeitung der Fermentationsbrühe verwenden zu können, sollte die Hydroxylfunktion so funktionalisiert werden, dass die Polarität des Oxazolidinons verringert wird und die Verbindung durch Extraktion isoliert werden kann. Beispielsweise kann die Hydroxylfunktion durch Enzymkatalyse verestert werden. Die folgende Abbildung 4-7 zeigt die Umesterung von Vinyl-n-octanoat mithilfe einer Lipase.

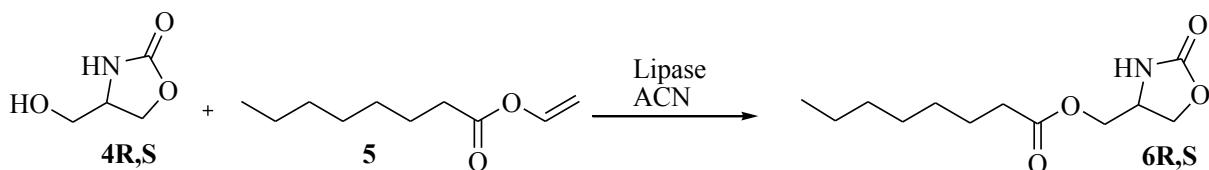


Abb. 4-7 Lipasen-katalysierte Umesterung von Vinyl-n-octanoat **5**

Das 4-(Hydroxymethyl)-1,3-oxazolidin-2-on wurde in Acetonitril gelöst und Vinyl-n-octanoat **5** im zehnfachen Überschuss zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 40 °C erwärmt und nach einer halben Stunde das Novozym 435® hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde 9 h bei 40 °C und weiter über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand bildete zwei Phasen aus, zum einen orangene Kristalle und zum anderen eine hellgelbe trübe, flüssige Phase. Die flüssige Phase wurde von den Kristallen mit einer Pasteurpipette entfernt und separat behandelt. Bei den Kristallen handelte es sich um den Ausgangsstoff (Oxazolidinon). Daraus wurde geschlussfolgert, dass sich mindestens 75 % des Ausgangsstoffes nicht umgesetzt hatten. Die flüssige Phase wurde chromatografisch aufgearbeitet. Es konnte eine kleine Menge der Verbindung **6R,S** mit einer isolierten Ausbeute von 15 % erhalten werden. Die Reaktion wurde ebenfalls im 8 mL Maßstab für ein Zweiphasensystem getestet. Die Idee des Zweiphasensystems war, dass der Heterozyklus im wässrigen Medium gebildet und dann durch die Lipase verestert wird. Durch die dadurch veränderte Polarität sollte das Produkt in die zweite, unpolare Phase übergehen. Die Phasen könnten anschließend getrennt und das Produkt nach der Entfernung des organischen Lösungsmittels erhalten werden. Für die Experimente im Zweiphasensystem wurde der Heterozyklus in Wasser gelöst, dann das MTBE mit gleichem Volumen zugegeben und anschließend auf 40 °C für 30 min temperiert. Danach wurde das Enzym hinzugegeben. Die Reaktionslösungen wurden für 48 h bei 40 °C im Thermoschüttler gemischt. Von allen Ansätzen wurden Proben entnommen und mittels Flüssigchromatografie Massenspektrometrie (engl. *liquid chromatography mass spectrometry*, LCMS) vermessen. Das gewünschte Produkt konnte nicht nachgewiesen werden. Die wässrigen Phasen verfärbten sich während der Reaktion dunkelbraun. Da diese Experimente schon im kleinen Maßstab und mit reinen Substanzen nicht erfolgreich waren, wurden die Reaktionsbedingungen auch nicht auf die Realproben übertragen. Für diese Aufarbeitungsmethode müsste das Glycerol während der Fermentation vollständig umgesetzt

werden und es müsste ein Zweiphasensystem gefunden werden, in dem entweder eine enzymatische oder eine chemische Umsetzung des zyklisierten Serinolderivates erfolgen kann. Außerdem war die Ausbeute der Referenzprobe in Wasser so gering, dass eine akzeptable Ausbeute in der Realprobe nicht zu erwarten war.

4.1.3 Isolierung des Serinols aus der Fermentationsbrühe mittels Guanidierung

Eine weitere Möglichkeit der Aufarbeitung ist die Derivatierung des Serinols in der Fermentationsbrühe mittels *O*-Methylisoharnstoff-Hemisulfat 7. Diese Idee der Aufarbeitung stammt von den Projektpartnern vom Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Münster, und wurde hier nur überprüft sowie zum Vergleich der verschiedenen Isolierungsmethoden herangezogen. Mittels dieser Methode kann im wässrigen Medium Guanidinoerinol erhalten werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass das Serinol zu einem mehrzähnigen Liganden umgesetzt wird und somit eine Entfernung der Guanidino-Gruppe nach der Isolierung nicht zwingend notwendig ist. Das isolierte Guanidino-Serinol könnte beispielsweise eingesetzt werden, um Kationen aus Wasser zu binden und so die Wasserhärte zu verringern. Die Guanidierung wird häufig auch als Derivatisierungsmethode in der Massenspektrometrie eingesetzt.

Für die Überprüfung dieser Methode wurden zwei Ansätze vorbereitet. Als erstes sollte die Referenzverbindung hergestellt werden. Dazu wurde Serinol in Wasser gelöst und *O*-Methylisoharnstoff-Hemisulfat wurde im achtfachen Überschuss zugegeben. Der pH-Wert wurde mithilfe einer Natriumhydroxidlösung auf pH 10 eingestellt und die Reaktionslösung entweder für eine Stunde bei 65 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Ethanol und 4 molare Salzsäure zugegeben, bis der pH-Wert von 1 erreicht war. Es fiel ein feiner weißer Niederschlag aus. Beim Niederschlag handelte es sich allerdings nicht um das Guanidinoserinol 8. Parallel wurde das gleiche Experiment für die Derivatisierung des Serinols in der Fermentationsbrühe durchgeführt. Es fiel ebenfalls ein beiger Niederschlag aus. Die Messungen mittels LCMS sowie NMR zeigten, dass es sich bei beiden erhaltenen Feststoffen, aus Testreaktion sowie Realprobe, nicht um das gewünschte Produkt handelte. Die Elementaranalyse zeigte, dass keine organischen Verbindungen enthalten waren. Bei dem Niederschlag handelte es sich um Natriumsulfat, welches als Nebenprodukt gebildet wird.

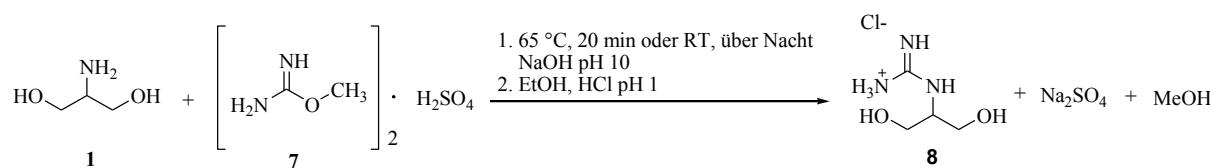


Abb. 4-8 Darstellung des Guanidinoserinols 8

Das gebildete Produkt **8** wurde demnach nicht ausgefällt, sondern verblieb im Filtrat. Die LCMS-Messungen bestätigten diese Vermutung. Die Parameter der LCMS-Messungen befinden sich im Experimentalteil 7.1.2. Sowohl das Chromatogramm als auch das Massenspektrum zeigen, dass das Guanidinoserinol gebildet wurde. Die zwei nachfolgenden Abbildungen (Abb. 4-9 und Abb. 4-10) zeigen die Chromatogramme und die Massenspektren der Guanidierung von Serinol in Wasser und in der Fermentationsbrühe. Zur besseren Übersicht wird in beiden Fällen nur ein Ausschnitt der Chromatogramme und Massenspektren gezeigt. Die komplette Darstellung der Abbildungen befindet sich im Anhang 9.3. Die Massenspur des Chromatogramms in Abbildung 4-9 zeigt einen sauberen Peak bei 2,72 min.

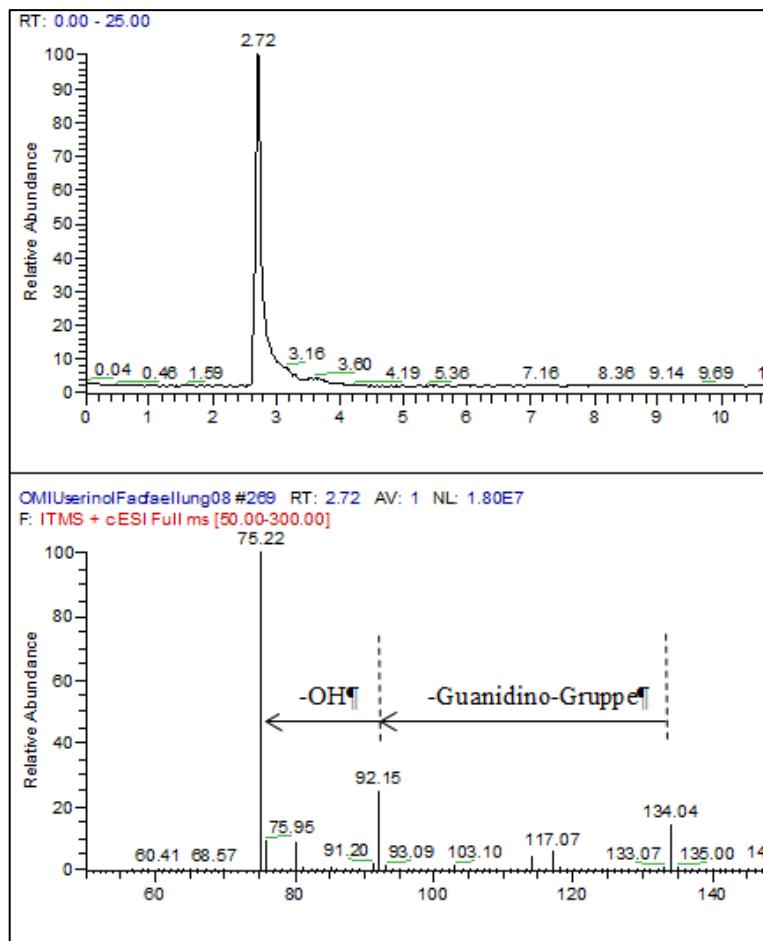


Abb. 4-9 Chromatogramm und Massenspektrum des Guanidinoserinols **8** in Wasser

Das Massenspektrum für diesen Peak zeigt die Masse des Guanidinoserinols von $[M+H]^+$ 134,04 m/z (positiver Scanmodus). Des Weiteren können zwei Fragmente identifiziert werden. Die Abspaltung der Guanidino-Gruppe führt zu einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 92,15 m/z und eine weitere Abspaltung einer Hydroxylgruppe führt zu einem Fragment von 75,22 m/z. Die Guanidierung in Wasser zeigt keine Verunreinigungen.

Die Abbildung 4-10 zeigt das Filtrat der Realprobe (komplette Darstellung des Chromatogramms und Massenspektrums siehe Anhang 9.3). Es ist ebenso ein Peak in der Massenspur des Chromatogramms zu erkennen, jedoch mit einem verstärkten Tailing und bei einer Retentionszeit von 2,81 min. Das dazugehörige Massenspektrum zeigt die Masse des

Ergebnisse

Guanidinoserinols bei 134,10 m/z sowie die Fragmente bei 92,28 und 75,47 m/z. Neben dem Serinolderivat **8** scheint ebenfalls noch nicht umgesetztes Serinol vorzuliegen. Das Natriumaddukt vom Serinol bei 114,16 m/z deutet darauf hin. Es ist denkbar, dass ein achtfacher Überschuss des *O*-Methylisoharnstoffs für die Guanidierung in der Fermentationsbrühe zu gering ist. Im Massenspektrum treten noch weitere Verbindungen oder Fragmente auf, die bei der Derivatisierung in Wasser nicht ersichtlich sind, weshalb sie sehr wahrscheinlich den Inhaltstoffen der Fermentationsbrühe zugeordnet werden können. Es sind Masse-zu-Ladungsverhältnisse m/z bei 60,41; 61,09; 80,41; 81,15; 117,18; 158,97 sowie 226,91 zu beobachten.

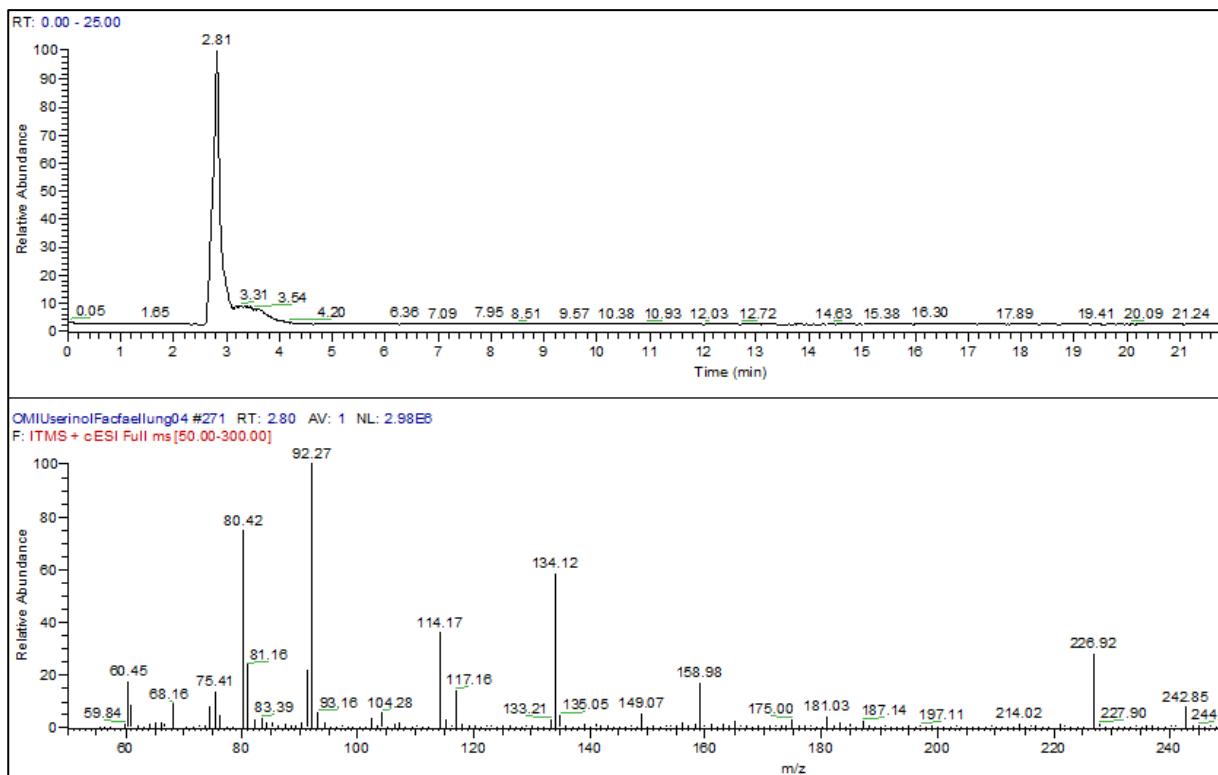


Abb. 4-10 Chromatogramm und Massenspektrum des Guanidinoserinols **8** in der Fermentationsbrühe

Nachdem das Natriumsulfat ausgefällt und durch die LCMS-Messungen festgestellt wurde, dass das Filtrat das Produkt **8** enthielt, wurde dieses unter reduziertem Druck aufkonzentriert und wieder mit Ethanol versetzt. Erneut wurde Natriumsulfat ausgefällt. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat bis zur Trockene eingeengt. Die NMR-Messungen mit dem Filtrat zeigten, dass das Guanidinoserinol isoliert worden war. Neben dem Produkt waren aber noch Natriumsulfat sowie bei der Realprobe Glycerol enthalten. Hier ergibt sich also die gleiche Problematik wie bei der Isolierung durch Zyklisierung. Die Trennung des Guanidinoserinols vom Glycerol wird aufgrund der sehr ähnlichen Polaritäten erschwert.

4.1.4 Isolierung des Serinols durch Fällung mittels Salzsäure

Es ist möglich, Serinol als Ammoniumsalz auszufällen. Diese Möglichkeit sollte ebenfalls für die Aufarbeitung der Fermentationsbrühe überprüft werden [27]. Dazu wurde ein pH-Wert von 1 in der Fermentationsbrühe mit HCl eingestellt und diese für 2 Stunden auf 40 °C erhitzt. Anschließend wurde das Wasser unter reduziertem Druck entfernt und Aceton zugegeben und die Lösung für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde im Anschluss filtriert. Es konnte mittels LCMS-Messungen sowohl in dem Filtrat als auch im braunen Rückstand das protonierte Serinol nachgewiesen werden. In dem Patent (1999) [27] konnte das Hydrochlorid des Serinols ohne weitere Probleme isoliert werden. Bei der Protonierung des Serinols in der Fermentationsbrühe muss zur weiteren Aufarbeitung das isolierte Rohprodukt mittels Ionenaustauschchromatografie aufgetrennt werden. Diese Methode wurde aber nicht weiter verfolgt und optimiert. Die Aufarbeitung sollte durch möglichst wenige Aufreinigungsschritte sowie ohne die aufwendige Entfernung des Wassers unter reduziertem Druck erfolgen.

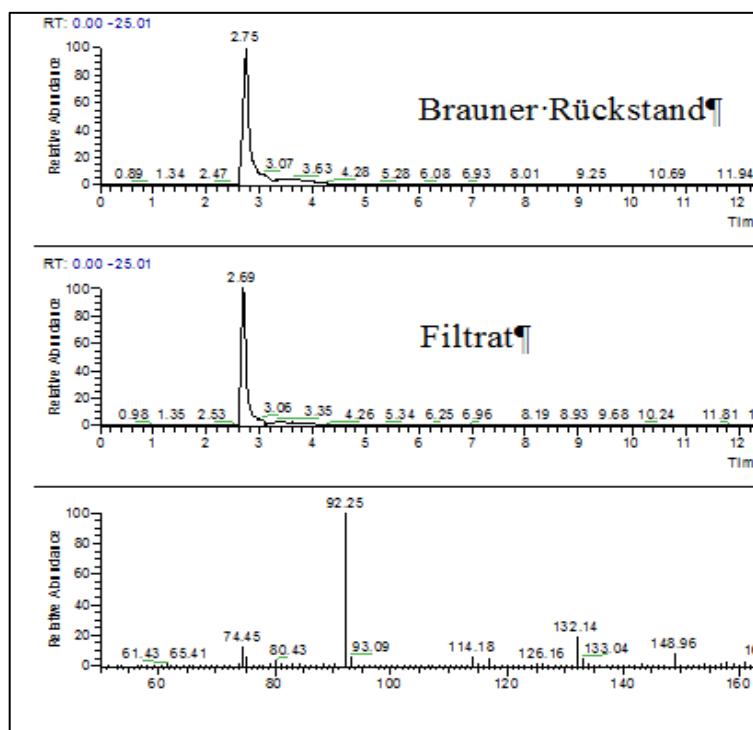


Abb. 4-11 Chromatogramme für das gefällte protonierte Serinol in der Fermentationsbrühe (unten Filtrat, oben Feststoff) sowie das Massenspektrum für das Filtrat

Die Abbildung 4-11 zeigt die Chromatogramme des Filtrats und des braunen Rückstandes. Die vollständige Darstellung befindet sich im Anhang 9.4.

Die Literaturergebnisse und die Chromatogramme zeigen, dass Serinol ausgefällt werden kann [27]. Zur Aufarbeitung der Fermentationsbrühe ist diese Methode aber nur in Kombination mit einer Ionenaustauschchromatografie oder einer anderen Auftrennung des Rohproduktes sinnvoll.

4.1.5 Isolierung von Serinol aus einer glycerol-basierten Fermentationsbrühe mittels Derivatisierung und anschließender Extraktion

In der Literatur [43] wurde die selektive Schützung von Aminen mithilfe von Diethylethoxymethylenmalonat **9** beschrieben. Die Einführung der Schutzgruppe erfolgt dabei wie folgt: Ein Äquivalent des zu schützenden Amins wird in Ethanol gelöst und 1,3 Äquivalente des Derivatisierungsreagenzes **9** werden zu der Reaktionslösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Reaktion wird das Ethanol unter reduziertem Druck entfernt und das gewünschte geschützte Amin wird mit einer Ausbeute von 77-79 % erhalten [43].

Diese Methode wurde zur Derivatisierung der Aminogruppe im Serinol genutzt. Die Reaktionsbedingungen sollten aber dahingehend verändert bzw. optimiert werden, dass sie auf das vorliegende Isolierungsproblem angewendet werden können.

Testreaktion in Wasser

Zunächst musste ein geeignetes Reaktionsmedium für die Testreaktionen gefunden werden. In der Literatur [43] wurde Ethanol verwendet. Da aber die Fermentationsbrühe ein wässriges Medium ist, wurde anstelle von Ethanol destilliertes Wasser eingesetzt. Für die Testreaktion wurde reines Serinol (1 eq) in Wasser gelöst und das Reagenz **9** (1,3 eq) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nachdem die Ausgangsstoffe vollständig umgesetzt waren, wurde das überschüssige Wasser unter reduziertem Druck entfernt, sodass das 2,2-Bis(ethoxycarbonyl)vinyl-serinol (Becv-Serinol) **10** als weißer Feststoff erhalten wurde (72 %).

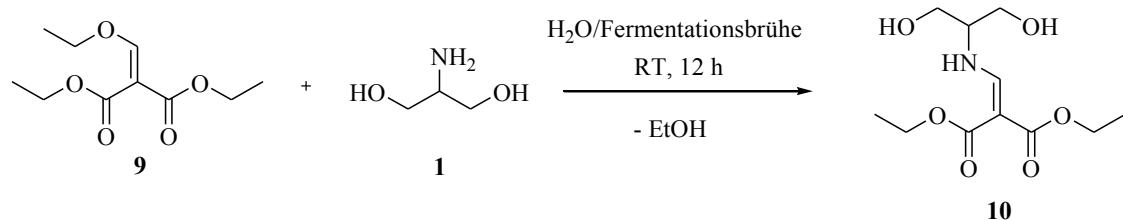


Abb. 4-12 Darstellung des 2,2-Bis(ethoxycarbonyl)vinyl-serinols (Becv-Serinol) **10** in Wasser oder Fermentationsbrühen

Bildung des Becv-Serinols in der Fermentationsbrühe und Optimierung der Reaktionsbedingungen

Da sich Wasser und das Fermentationsmedium deutlich unterscheiden, wurde die Bildung des Becv-Serinols in einem Fermentationsmedium untersucht. Diese Untersuchungen sollten sicherstellen, dass die Bildung des gewünschten Produktes **10** auch unter realen Bedingungen möglich ist. Dazu wurden zwei Ansätze mit dem Riesenbergsmedium, welches kein nachweisbares Serinol nach der Fermentation enthielt (Zusammensetzung siehe Anhang 9.1)

durchgeführt: Der erste Ansatz wurde mit den gleichen Bedingungen wie die Testreaktion in Wasser durchgeführt. Es wurde dazu reines Serinol (1 eq) in der Fermentationsbrühe gelöst und dann das Derivatisierungsreagenz **9** (1,3 eq) zugegeben. Dem zweiten Ansatz wurde Natriumcarbonat zugegeben, sodass sichergestellt wurde, dass die Reaktion unter basischen Bedingungen (pH ~ 9) abläuft und Serinol in seiner Aminoform vorliegt und nicht als Ammoniumsalz. Beide Reaktionsansätze wurden bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Diethylethoxymethylenmalonats wurde das Wasser im Vakuum entfernt und ein brauner Rückstand wurde erhalten. Der braune Rückstand enthielt neben dem Bevv-Serinol immer noch alle weiteren Inhaltstoffe der Fermentationsbrühe, also die Salze der Spurenelementlösung, der Pufferlösung und der Nährstofflösung (Hefeextrakt). Um das Serinolderivat **10** von den übrigen Substanzen abzutrennen, wurden beide Ansätze mit heißem Ethanol behandelt, sodass sich das Bevv-Serinol im Ethanol löste und ein Großteil der nichtlöslichen Komponenten abfiltriert werden konnten. Nach Aufkonzentrierung der erneut erhaltenen ethanolischen Lösung im Vakuum wurde wieder ein brauner Rückstand erhalten. Weitere Aufarbeitungsschritte zur Isolierung des Produktes **10** waren notwendig. Zur Separierung des gewünschten Produktes von den weiteren Inhaltenstoffen wurde die Säulenchromatografie mit Kieselgel als Säulenmaterial und Heptan-Ethylacetat als Eluentensystem verwendet. Diese so verwendete Methode ermöglichte die Isolierung sowohl von nicht umgesetztem Glycerol während der Fermentation als auch des geschützten Serinols. Die Ausbeute bei dieser Isolierungsmethode betrug 30-36 %. Im Vergleich zum Referenzmaterial konnten 50 % weniger Produkt isoliert werden. Der offensichtliche Nachteil dieser Methode war zum einen die zeit- sowie energieintensive Entfernung des Wassers nach Abschluss der Reaktion und zum anderen die niedrige Ausbeute. Um die Entfernung des Wassers und so auch die Behandlung mit heißem Ethanol und die anschließende Filtration zu vermeiden, musste ein geeignetes Extraktionsmittel für das Bevv-Serinol **10** gefunden werden. Das Produkt besitzt aufgrund seiner Hydroxylfunktionen eine hohe Polarität, weshalb es gut in polaren Lösungsmitteln löslich ist. Für die Extraktion musste ein Lösungsmittel gefunden werden, welches nicht mit Wasser mischbar, aber gleichzeitig polar genug ist, um das Serinolderivat zu isolieren. Für die Extraktionsversuche wurden zwei mittelpolare Lösungsmittel ausgewählt: Isopropylmethylketon und Ethylacetat. Zwei Ansätze wurden, wie oben beschrieben, vorbereitet. Nach vollständiger Umsetzung der Ausgangsstoffe wurde die wässrige Phase entweder mit Isopropylmethylketon oder Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Baumwollwatte getrocknet und das überschüssige Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Zur weiteren Aufarbeitung war eine Säulenchromatografie unumgänglich. Beide getesteten Lösungsmittel können zur Extraktion des Bevv-Serinols **10** genutzt werden. Das Isopropylmethylketon ist viskos, riecht unangenehm und hat einen hohen Siedepunkt von 92 °C. Das Verdampfen dieses Lösungsmittels nimmt folglich fast die gleiche Dauer in Anspruch wie beim Wasser. In den nachfolgenden Experimenten wurde Ethylacetat als Extraktionsmittel gewählt, da es zu den empfohlenen „grünen“ Lösungsmitteln (laut Astra Zeneca) [57] zählt, schnell unter reduziertem Druck entfernt und ausgezeichnet zur Extraktion von Verbindung **10** eingesetzt werden kann.

Um die Isolierung zu optimieren, sollte die Ausbeute erhöht werden. Die zur Kontrolle der Reaktion angefertigten Dünnschichtchromatogramme zeigten nach der Extraktion nur zwei Produkte (Ethylacetat:Heptan, 2:1, $R_F = 0,14$, $R_F = 0,53$). Beide Produkte wurden isoliert und mittels NMR- und LCMS-Messungen analysiert. Sowohl die NMR-Spektren als auch die Massenspektren zeigen, dass das Becl-Serinol **10** sowie 2,2-Bis(ethoxycarbonyl)vinyl-amin **11** als Nebenprodukt isoliert wurde.

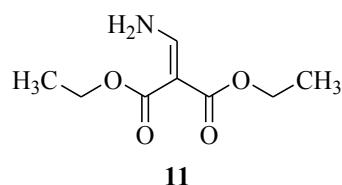


Abb. 4-13 Nebenprodukt: 2,2-Bis(ethoxycarbonyl)vinyl-amin **11**

Daraus wurde geschlussfolgert, dass das Verhältnis von Serinol zu Derivatisierungsreagenz **9** mit 1:1,3 nicht optimal ist. Der geringe Überschuss an Diethylethoxymethylenmalonat reicht nicht aus, um Serinol sowie andere Aminoverbindungen, die in der Fermentationsbrühe enthalten sind, zu derivatisieren. Das isolierte Nebenprodukt deutet daraufhin, dass das enthaltene Ammoniumsulfat bzw. in anderen Fermentationsbrühen andere Ammoniumsalze sowie möglicherweise das während des Fermentierens zugeführte Ammoniumhydroxid, ebenfalls derivatisiert werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass das Serinol während der Reaktion gespalten und dadurch das Nebenprodukt gebildet wird und die Ausbeute des eigentlichen Produktes **10** deshalb so gering ist. Die Ursache der Bildung der Verbindung **11** wurde durch zwei Experimente genauer untersucht. Es wurde ein Reaktionsansatz mit einem Substratverhältnis Serinol zu Diethylethoxymethylenmalonat von 5:1 vorbereitet. Alle Reaktionsschritte wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt. Wird das Becl-Amin ausgehend vom Serinol gebildet, müsste sich bei einem Serinolüberschuss die Ausbeute des Produktes **10** erhöhen. Es wurde eine Ausbeute von 36 % erreicht. Die Ausbeute liegt damit nur 5 % höher als bei einem Verhältnis von 1:1,3. Damit wurde die Bildung des Becl-Amins ausgehend vom Serinol ausgeschlossen. Wahrscheinlicher ist, dass die Verbindung **11** durch die Derivatisierung des Ammoniumsalzes oder Ammoniumhydroxids gebildet worden ist. Zur Überprüfung wurde Ammoniumchlorid in Wasser gelöst und das Reagenz **9** zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Verbindung **9** wurde nicht vollständig umgesetzt und es bildeten sich zwei Phasen. Die kleinere organische Phase verfärbte sich gelblich. Die wässrige Phase blieb unverändert. Von beiden Phasen wurden Proben genommen und mittels LCMS vermessen. Das Chromatogramm und Massenspektrum sind im Anhang Kapitel 9.6 abgebildet. Beide Phasen enthalten das Becl-Amin **11**. Das Amin wird demnach aus dem Ammoniumsalz und sehr wahrscheinlich aus der zugeführten Ammoniumhydroxid-Lösung gebildet.

In der Literatur ist die Bildung dieses Amins bekannt [58, 59, 60]. Mitchinson *et al.* [58] (2004) entwickelten beispielsweise einen selektiven Partialagonist, welcher in Tiermodellen als nicht sedierendes Anxiolytikum (Medikament, welches bei Angstzuständen eingesetzt wird) wirkt. Zur Herstellung dieses Agonisten wird das Becl-Amin durch Derivatisierung von

Ammoniak in Ethanol mit 100 % Ausbeute synthetisiert und weiter bis zum Pyrazolchinolin umgesetzt [58].

Aufgrund der großen Mengen an Ammoniumsalz in der Fermentationsbrühe muss auch das Derivatisierungsreagenz **9** entsprechend dosiert werden.

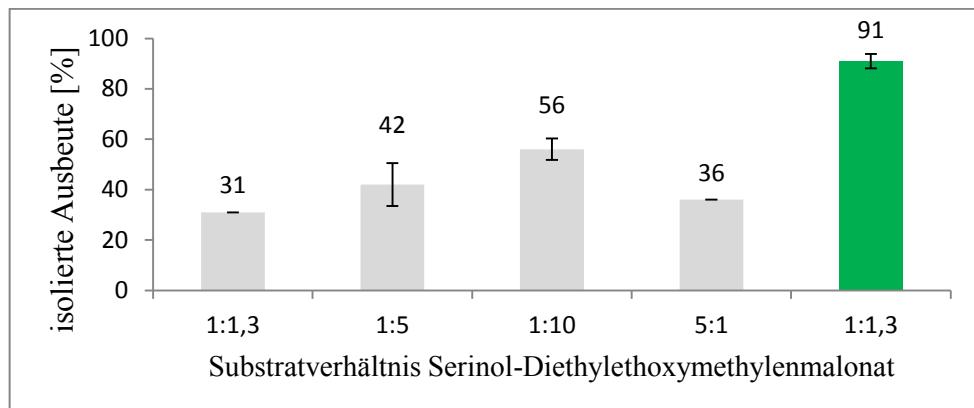


Abb. 4-14 Isolierung des Becv-Serinols aus der Fermentationsbrühe (Riesenbergsmedium [50]). Verschiedene Substratverhältnisse werden dargestellt.

Die hellgrau gekennzeichneten Säulen zeigen die Experimente in der Fermentationsbrühe und die grün hervorgehobene Säule zeigt die Referenzreaktion in Wasser.

Zur Optimierung des Substratverhältnisses wurde die Menge an Diethylethoxymethylenmalonat auf 5 und 10 Äquivalente erhöht. Die Erwartungen konnten bestätigt werden: eine Erhöhung des Derivatisierungsreagenzes führt zu einer Steigerung der Ausbeute. Das Diagramm zeigt die Erhöhung der Ausbeute (Abbildung 4-14). Die isolierte Ausbeute an Becv-Serinol konnte mit einem deutlichen Überschuss an Diethylethoxymethylenmalonat von ungefähr 31 % auf 56 % erhöht werden. Das Referenzmaterial, welches in Wasser und aus reinen Ausgangsstoffen sowie Ethylacetat als Extraktionsmittel hergestellt worden ist, konnte mit einer Ausbeute von 91 % isoliert werden. Alle nachfolgenden Reaktionen wurden mit einem Substratverhältnis von 1:5 durchgeführt, da es zu einer höheren Ausbeute im Vergleich zu 1:1,3 führt und niedrigere Kosten im Vergleich zu 1:10 verursacht.

Übertragung der optimierten Reaktionsbedingungen auf die Realprobe

Zur Anwendung der erfolgreich entwickelten Isolierungsmethode wurde das Basalmedium (Mikroorganismus: *Shimwellia blattae*) mit einem Serinolgehalt von 7 g/L Serinol verwendet.

Bevor der Isolierungsprozess durchgeführt wurde, wurde die Probe mittels LCMS, GCMS sowie NMR-Spektroskopie vermessen. Mit allen drei Methoden konnte Serinol in der Fermentationsbrühe nachgewiesen werden. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 4-15) ist ein Ausschnitt eines ¹H-NMR-Spektrums des Basalmediums abgebildet. Zu erkennen sind die Signale sowohl für Glycerol, welches nicht bei der Fermentation umgesetzt wurde, als auch

Ergebnisse

für Serinol. Die Signale für die CH₂-Protonen von Glycerol liegen im Bereich von 3,63-3,81 ppm und für die CH-Protonen im Bereich von 3,81-4,00 ppm. Die Signale für die CH-Spezies des Glycerols überlappen mit den Signalen der CH₂-Protonen des Serinols. Das CH-Signal vom Serinol liegt zwischen 3,49 und 3,58 ppm.

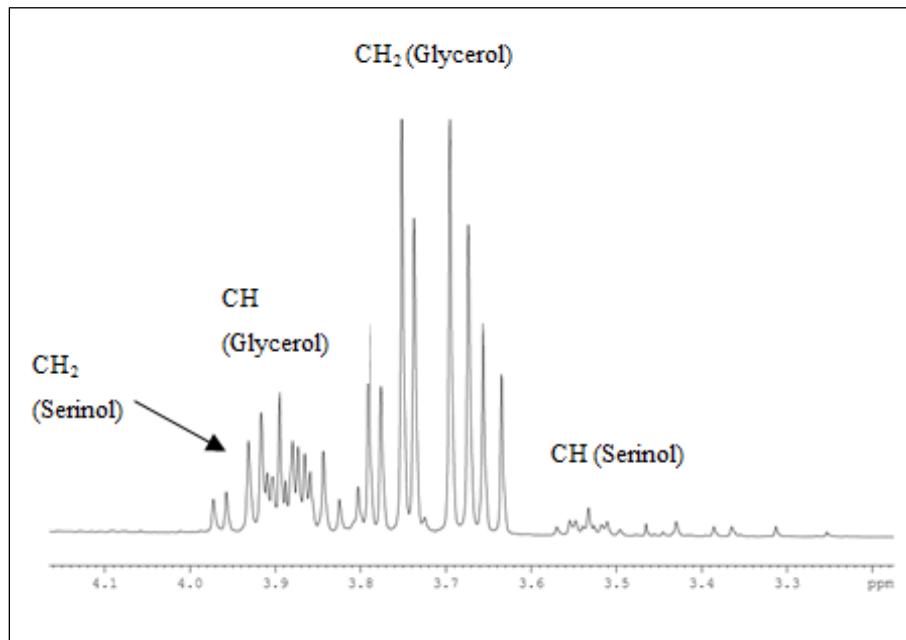


Abb. 4-15 Ausschnitt eines ¹H-NMR-Spektrums einer Fermentationsbrühen-Probe (Basalmedium).

Die Isolierung der Verbindung **1** aus der Fermentationsbrühe wurde auf gleiche Weise durchgeführt wie zuvor beschrieben. Bevor das Derivatisierungsreagenz **9** hinzugefügt wurde, wurde Natriumcarbonat in Portionen zugegeben, bis eine gesättigte Lösung entstand. Nach vollständiger Reaktion wurden beide Produkte **10** und **11** mit Ethylacetat extrahiert und mittels Säulenchromatografie getrennt. Das Becv-Serinol konnte mit einer isolierten Ausbeute von 63,4 % erhalten werden.

In Abbildung 4-16 sind die isolierten farblosen Kristalle des Produktes **10** dargestellt. Diese sind in Ethylacetat leicht löslich und kristallisieren nach der Entfernung des Lösungsmittels wieder aus.



Abb. 4-16 Kristalle des Becv-Serinols isoliert aus der Fermentationsbrühe

Die Abbildung 4-17 zeigt den Reaktionsverlauf der Becv-Serinol-Bildung in einem Intervall von 48 h. Die Bildung des geschützten Serinolderivats **10** beginnt sofort nach der Zugabe des Diethylethoxymethylenmalonats zu dem in Wasser gelösten Serinol. Die Konzentration des Becv-Serinols scheint über die 48 h konstant zu bleiben. Die Bildung des Diethylmalonats, welches ein Plateau ab 24 h erreicht, ist ebenfalls im Diagramm zu erkennen. Die ansteigende Bildung des Diethylmalonats kann durch die Hydrolyse des Produktes **10** verursacht worden sein. Das Reagenz **9** sinkt über 48 h, bis es fast vollständig umgesetzt ist.

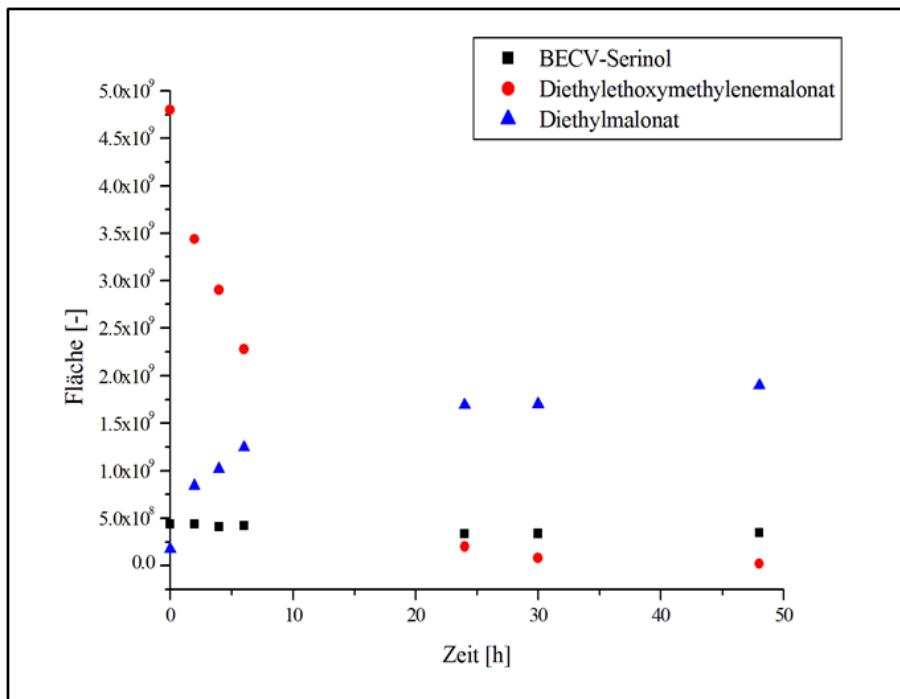


Abb. 4-17 Reaktionsverlauf in Wasser: Vergleich der Bildung des Becv-Serinols, der Abnahme des Diethylethoxymethylenmalonats sowie der Bildung des Diethylmalonats.

Im Vergleich zur Bildung des Becv-Serinols in der Fermentationsbrühe gab es nur geringe Unterschiede. Die Bildung des Produktes **10** und des Diethylmalonats beginnt ebenfalls sofort nach Zugabe des Diethylethoxymethylenmalonats. Die signifikante Abnahme dieses Reagenzes **9** findet in den ersten vier Stunden statt und erreicht dann einen relativ konstanten Wert. Die Umsetzung war aufgrund des fünffachen Überschusses des Derivatisierungsreagenzes **9** nicht vollständig (Substratverhältnis 1:5).

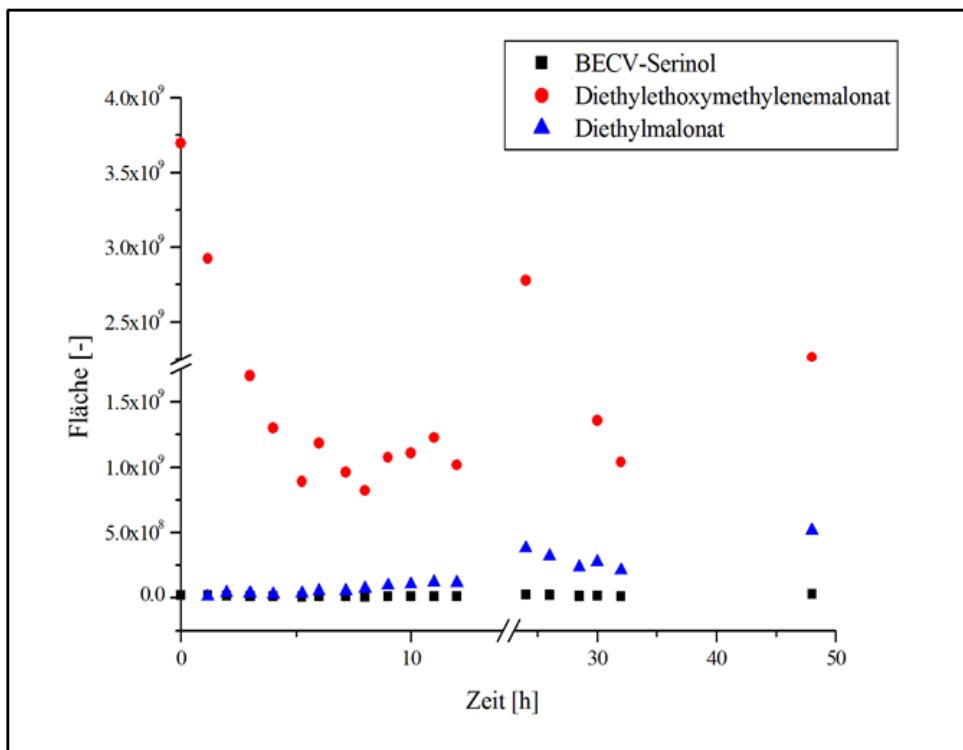


Abb. 4-18 Reaktionsverlauf in der Fermentationsbrühe: Vergleich der Bildung des Becv-Serinols, der Abnahme des Diethylethoxymethylenmalonats und der Bildung des Diethylmalonats

Abspaltung der 2,2-Bis(ethoxycarbonyl)vinyl-Schutzgruppe

Um das reine Serinol, ohne Aminoschutzgruppe, zu erhalten, muss die BECV-Gruppe entfernt werden. In der Literatur wurde die Abspaltung dieser Schutzgruppe durch Ethylendiamin beschrieben [43]. Dafür wird das Serinolderivat in Ethanol bei Raumtemperatur gelöst und das Ethylendiamin zugegeben. Die Reaktionslösung wird dann über Nacht gerührt. Das Ethylendiamin verdrängt die Schutzgruppe und bildet mono- sowie bis-substituierte Becv-aminoverbindungen **12** und **13** wie in Abbildung 4-19 dargestellt.

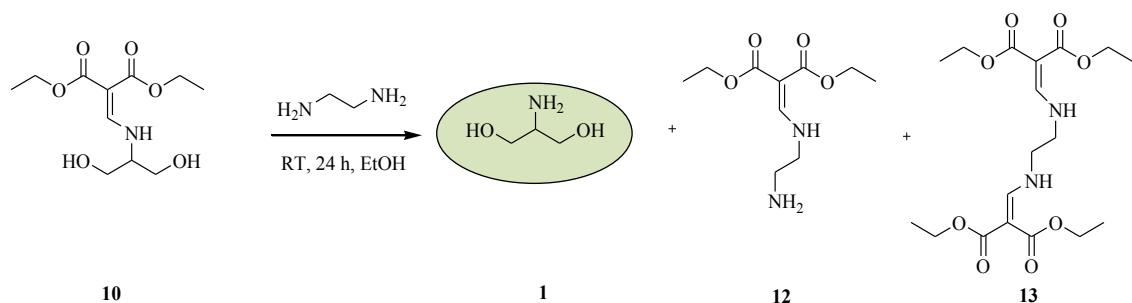


Abb. 4-19 Abspaltung der 2,2-Bis(ethoxycarbonyl)vinyl-Gruppe mit Ethylendiamin.

Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatografie kontrolliert und nach vollständiger Umsetzung des Ausgangsstoffes mit Wasser verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit

Ethylacetat extrahiert wie in der Literatur beschrieben [43]. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Aminen ist Serinol nicht in Ethylacetat löslich und verblieb in der wässrigen Phase. Reste des Ethyldiamins waren hier ebenfalls zu finden. Die meisten Nebenprodukte wurden durch das Extrahieren abgetrennt. Die Isolierung des Serinols erfolgte dann durch die Entfernung des Wassers im Vakuum. Anschließend wurde der erhaltene Rückstand mit Acetonitril versetzt und auf 45 °C erhitzt. Serinol war bei Raumtemperatur nicht in Acetonitril löslich, weshalb die Temperatur mithilfe eines Ölbad auf 45 °C erhöht wurde. Serinol ist bei 45 °C in Acetonitril löslich. Die Acetonitril-Lösung wurde abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt, sodass reines Serinol mit einer isolierten Ausbeute von 79 % (140 mg) erhalten wurde.

Die Abbildung 4-20 gibt einen Überblick über die entwickelte Methode, ausgehend von der ersten Testreaktion in Wasser bis hin zu der Übertragung der Reaktionsbedingungen auf die Fermentationsbrühe. Neben der organischen Synthese wurden auch die analytischen Methoden optimiert. Die GCMS- und LCMS-Messungen wurden für die Gehaltsbestimmung sowie Reaktionsverfolgung und die NMR-Spektroskopie zur Strukturaufklärung verwendet. Die GCMS- und LCMS- Parameter werden im Experimentellen Teil Kapitel 7.1.2 erläutert. Zur Bestimmung des Serinolgehalts stellte sich die Derivatisierung mittels Trimethylsilylimidazol und anschließende Vermessung mittels GCMS als die Methode der Wahl heraus. Der Vorteil der Derivatisierung war, dass nur die Hydroxylgruppen derivatisiert wurden und so eine Unterscheidung zwischen Serinol und Glycerol möglich war.

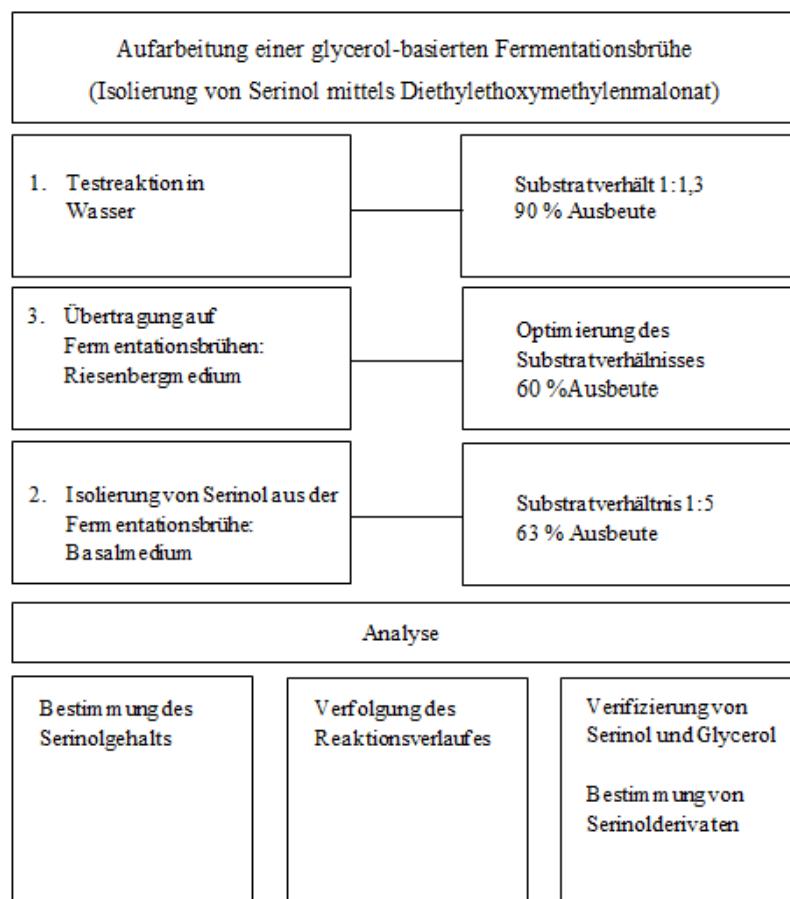


Abb. 4-20 Entwicklung des Aufarbeitungsprozesses einer Fermentationsbrühe

Diese, im Sinne der Aufgabenstellung, erfolgreiche Isolierung des Serinols durch eine geeignete Derivatisierung und damit die Aufarbeitung der Fermentationsbrühe wurde in diesem Kapitel 4.1.5 gezeigt und erläutert.

Hiermit ist es erstmals gelungen, Serinol in Form des Bevv-Serinols **10** in präparativer Menge aus einer glycerol-basierten Fermentationsbrühe zu isolieren.

7 g/L Serinol wurden ausgehend von 30 g/L Glycerol mit dem Bakterium *Shimwellia blattae* im Basalmedium erhalten. Zur Isolierung des Serinols wurden 50 mL (ca. 350 mg) dieses Fermentationsüberstandes zur Derivatisierung verwendet, wobei ein 5-facher Überschuss des Diethylethoxymethylenmalonats **9** (ca 3,9 mL) eingesetzt wurde. Es konnten 0,622 g (63,4 %) Bevv-Serinol **10** und 2,4 g des Bevv-Amins **11** isoliert werden.

Alle Aminoverbindungen, die in der Fermentationsbrühe (Serinol und Ammoniumsalze) erhalten waren, konnten derivatisiert und eine präparative Menge isoliert werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass mit der hier entwickelten Methode eine Vielzahl von weiteren Aminoalkoholen aus komplexen Medien isoliert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde nur im kleinen Maßstab die Isolierung des Serinols durchgeführt (50 mL-Ansätze). Die Derivatisierung von 7 g Serinol in einem Liter Fermentationsbrühe würde im Labormaßstab gerade noch im Bereich der Handhabbarkeit liegen. Bei einem Volumen von $V_{\text{Ferm.}} = 1 \text{ L}$ müsste ein Rundkolben von mindestens 2 L Fassungsvermögen und ein Schütteltrichter der gleichen Größe (2 L) verwendet werden. Die Menge des Derivatisierungsreagenzes **9** würde sich ebenfalls um die 20-fache Menge, von $V_{\text{Malonat 9}} = 3,9 \text{ mL}$ auf $V_{\text{Malonat 9}} = 78 \text{ mL}$, erhöhen.

Aufgrund der begrenzten Menge an Fermentationsprobe und der ebenfalls limitierten Zeit, wurde ein Up-Scaling dieser Art nicht durchgeführt.

Das erstmals synthetisierte Serinolderivat **10** kristallisiert in Form farbloser Kristalle aus. Das Derivat besitzt einen Schmelzpunktbereich von 92-94 C. Die Kristalle des BECV-Serinols besitzen eine sehr gute Löslichkeit in Ethylacetat und kristallisieren nach dem Einengen des Lösungsmittels immer wieder aus. Sie lassen sich aufgrund der guten Löslichkeit gut in nachfolgenden Reaktionen weiter umsetzen.

Der Vorteil dieser Reaktion ist vor allem die einfache Durchführung der Derivatisierung und der anschließenden Extraktion. Dadurch, dass das Serinol direkt im Fermentationsüberstand derivatisiert werden kann und das Wasser vorher nicht abgetrennt werden muss, kommt es zu einer deutlichen Zeittersparnis. Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist, dass durch die Extraktion mittels Ethylacetat selektiv beide derivatisierten Produkte **10** und **11** isoliert werden können. Das noch enthaltene Glycerol und die anderen Bestandteile der Brühe verbleiben in der wässrigen Phase.

Sowohl das Zielprodukt **10** als auch das isolierte Nebenprodukt **11** können als Ausgangsstoffe in der Synthesekemie eingesetzt werden. Denkbar wäre der Einsatz beider Verbindungen als Buildingblocks oder als Ausgangsstoffe für glycolipid-ähnliche Derivate oder Ceramidanaloga. Das Bevv-Amin ist in der Literatur bereits bekannt und wurde beispielsweise als Intermediat zur Diazepinderivat-Synthese eingesetzt [58, 59, 65].

4.2 Serinol als Synthesebaustein in chemischen und enzymatischen Reaktionen

Das polyfunktionelle Serinol kann auf rein chemischem oder auf biotechnologischem Wege derivatisiert werden. Im folgenden Kapitel wird auf die Möglichkeiten zur Glycosylierung von Serinol eingegangen. Der Fokus liegt dabei vor allem auf der Synthese von monoglycosylierten Serinolderivaten durch Glycosylierung mit Glucosepentaacetat und die Glycosylierung mit einem neuen S-Glycosyldonor.

4.2.1 Chemische Synthese von Serinolderivaten

Die Abbildung 4-21 zeigt die Struktur eines glycosylierten Serinolderivats **14**. Die dargestellte Zielverbindung bietet nach Abspaltung der Schutzgruppen mehrere Anwendungsmöglichkeiten. Beispielsweise können die Schutzgruppen des Galactosemoleküls entfernt und so die Polarität der Verbindung erhöht werden. Da die Aminogruppe durch eine langkettige Acylgruppe geschützt ist, wird ein amphiphiler Charakter erzeugt. Neben der Entschützung des Zuckerrestes könnte ebenfalls die Aminoschutzgruppe abgespalten oder die Azidogruppe könnte zu einer Aminofunktion umgesetzt werden. Durch diese Abspaltung beziehungsweise Derivatisierung würden neben den freien Hydroxylgruppen zwei weitere funktionelle Gruppen für eine anschließende Synthese zur Verfügung stehen.

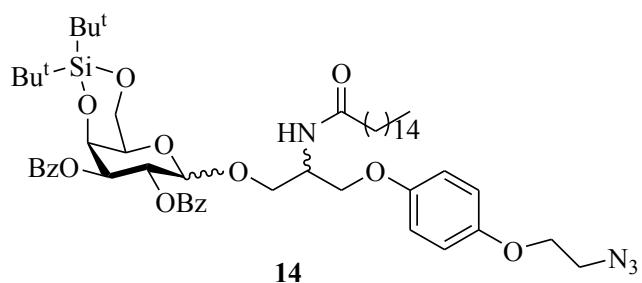


Abb. 4-21 Struktur des *N*-Palmitoyl-1-(4',6'-di-*tert*-butylsilyl-2',3'-benzoyl-D-galactopyranosyl)-3-azidethoxyphenyl-serinols

4.2.1.1 Synthese des Ethyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl-2,3-benzoyl-1-thio- β -D-galactopyranosids

In Abbildung 4-22 ist die Struktur des Glycosyldonors **18 β** dargestellt. Die Verbindung **18 β** kann über vier Syntheseschritte dargestellt werden. Ausgangsstoff der Donorsynthese ist das Galactosepentaacetat.

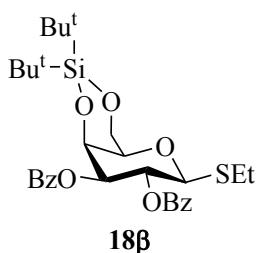


Abb. 4-22 S-Glycosyldonor: Ethyl-4,6-*O*-Di-*tert*-butylsilyl-2,3-benzoyl-1-thio- β -D-galactopyranosid

Zuerst wurde die S-Ethylgruppe mittels Ethylmercaptopan und Bortrifluoriddiethyletherat eingeführt, sodass Verbindung **15** erhalten wurde [29]. Nach der Einführung der S-Ethylgruppe wurden die Acetylschutzgruppen unter Zemplén-Bedingungen abgespalten [28]. Dazu wurden das Pentaacetat in Methanol gelöst und eine 1-molare Natriummethanolat-Lösung bei Raumtemperatur zugegeben, sodass eine alkalische Lösung entstand (mit Lackmuspapier überprüft). Nachdem die vollständige Entschützung der Hydroxylfunktionen erfolgte, wurde die Reaktionslösung mittels Ionenaustauscher (Dowex) neutralisiert. Nach dem Filtrieren des Ionenaustauschermaterials durch Baumwollwatte wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt, und das Produkt **16β** kristallisierte langsam aus. Das Ethyl-1-thio-2,3,4,6-tetra-hydroxy- β -D-galactopyranosid konnte mit einer Ausbeute von 98 % erhalten werden (Abb. 4-23, I). Der nächste Schritt ist die Einführung der Di-*tert*-butylsilyl-Gruppe (DTBS-Gruppe) zum Schutz der 4,6-Hydroxylgruppen. In der Literatur wurde beschrieben, dass die DTBS-Gruppe im S-Phenylglycosid zu einer α -selektiven Glycosylierung führt, obwohl die Nachbargruppe (C2) des anomeren Zentrums durch den sogenannten Nachbargruppeneffekt eine β -Konfiguration induzieren müsste [30]. Die sterische Hinderung der DTBS-Gruppe scheint diesen Effekt jedoch zu verhindern und führt deshalb zu einer α -selektiven Reaktion.

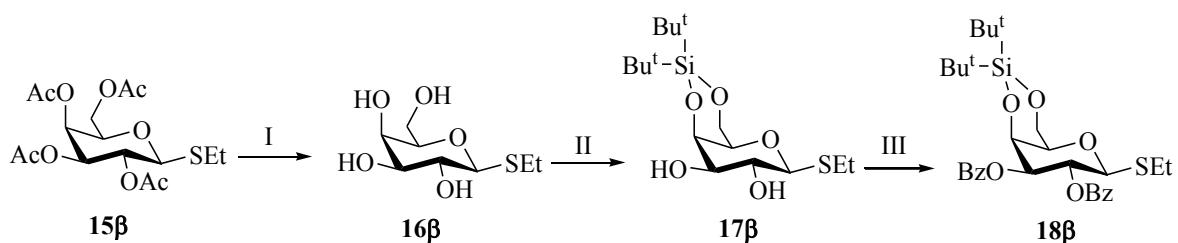


Abb. 4-23 Darstellung des Glycosyldonors **18β**

Zur Silylierung der 4,6-Hydroxygruppen wurde das Ethyl-1-thio-2,3,4,6-tetra-hydroxy- β -D-galactopyranosid im Vakuum getrocknet und anschließend in trockenem Dimethylformamid gelöst. Die Reaktionslösung wurde dann mit einem Aceton-Trockeneisbad auf -40 °C gekühlt. Nach der Einstellung der Temperatur wurde langsam das Di-*tert*-butylsilyl-

bis(trifluoromethansulfonat) zugegeben und für eine halbe Stunde bei -40 °C gerührt. Danach wurde Pyridin hinzugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 15 min gerührt. Das Produkt **17β** wurde nach Extraktion mit Diethylether und weiterer Aufreinigung mittels Säulenchromatografie mit einer Ausbeute von 78 % erhalten (Abb. 4-22, **II**) [53].

In der letzten Stufe wurden die 2,3-Hydroxylfunktionen mittels Benzoylierung geschützt (Abb. 4-23 **III**). Die Verbindung **17β** wurde dazu in frisch destilliertem trockenem Pyridin gelöst und die Reaktionslösung auf null Grad mit einem Eisbad gekühlt. Das Benzoylchlorid wurde in der Kälte zugegeben und die Reaktionslösung für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit Methanol quenched und anschließend das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wird mit Ethylacetat gelöst und mittels Kaliumsulfatlösung, Natriumcarbonatlösung und Wasser die organische Phase gewaschen. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatografie weiter gereinigt. Das Produkt **18β** konnte mit einer Ausbeute von 63 % isoliert werden.

In der Literatur werden S-Glycosyldonoren beschrieben, welche anstelle der S-Ethylgruppe entweder eine S-Phenyl- oder S-Tolylgruppe besitzen [42]. Die Substanz **18β** ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Sie wurde daher mittels NMR- und HRESIMS charakterisiert (vgl. Kapitel 7.2.2).

4.2.1.2 Synthese des Glycosylakzeptors

4.2.1.2.1 Einführung der Aminoschutzgruppe ins Serinol

Bevor Serinol zum Akzeptor umgesetzt wird, muss die Aminogruppe geschützt werden. Für die Einführung der Schutzgruppe steht eine Reihe von Derivatisierungsmöglichkeiten zur Verfügung. In der folgenden Tabelle (Tab. 4-3) sind die in der vorliegenden Arbeit synthetisierten aminogeschützten Serinolderivate **19-22R,S** dargestellt. Das Interesse lag vor allem beim *N*-Palmitoylserinol **19**. Diese Verbindung besitzt einen amphiphilen Charakter und kann bei der Synthese von glycolipidähnlichen Substanzen eingesetzt werden. Durch den amphiphilen Charakter, auch nach einer Glycosylierung (freie Hydroxylgruppen), besteht die Möglichkeit, diese Serinolderivate als Tenside einzusetzen. Die meisten aminogeschützten Serinolderivate konnten mit hohen Ausbeuten von ungefähr 80-97 % erhalten werden. Eine Ausnahme bildete das 2-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-hydroxymethyl-2,2-dimethyl-1,3-oxazolidin **22R,S**, welches lediglich mit einer Ausbeute von 30 % isoliert wurde. Bei der Synthese des Oxazolidins stehen zwei Ringreaktionen in Konkurrenz. Es wurde neben dem Fünfringisomer noch das Dioxan (**66**, siehe Exp. Teil) isoliert. Beide Isomere konnten mit fast gleicher Ausbeute isoliert werden.

Serinolderivative	Ausbeute
<p style="text-align: center;">19</p> <p style="text-align: center;">2-<i>N</i>-(Hexadecanoyl)-serinol (<i>N</i>-Palmitoylserinol)</p>	96-97%
<p style="text-align: center;">20</p> <p style="text-align: center;">2-<i>N</i>-(Trifluoroacetyl)-serinol (TFA-serinol)</p>	84 %
<p style="text-align: center;">21</p> <p style="text-align: center;">2-<i>N</i>-(tert-Butoxycarbonyl)-serinol (<i>N</i>-Boc-serinol)</p>	79 %
<p style="text-align: center;">22R,S</p> <p style="text-align: center;">2-<i>N</i>-(tert-Butoxycarbonyl)-4-hydroxymethyl-2,2-dimethyl-1,3-oxazolidin</p>	30 %

Tab. 4-3 Übersicht über die hergestellten aminogeschützten Serinolderivate **19-22R,S**

Zur Glycosylierung wird das derivatisierte Serinol als Glycosylakzeptor eingesetzt. Dazu wird die Aminogruppe des Serinols mittels 1-(2-Thioxothiazolidin-3-yl)hexadecan-1-on **23** oder *N*-Palmitoylsuccinimidylester **24** acyliert.

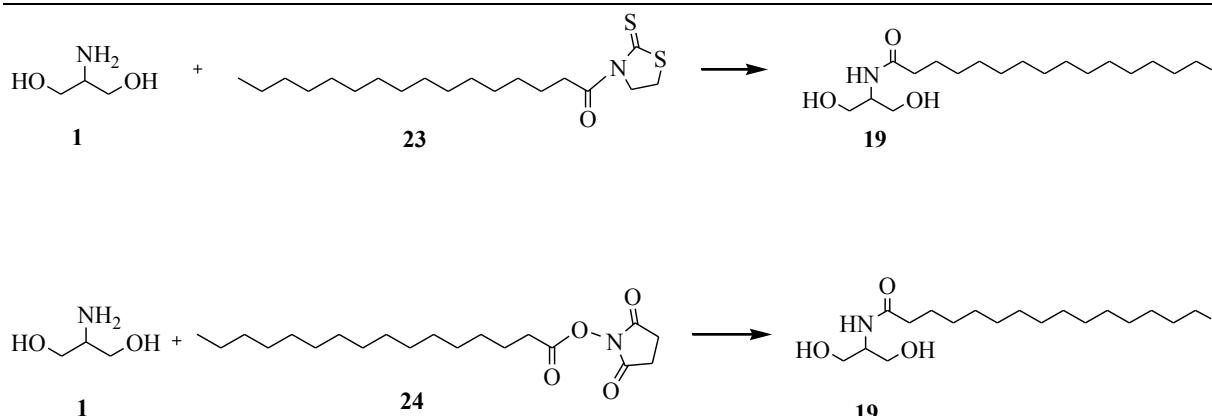


Abb. 4-24 Acylierung von Serinol mittels 1-(2-Thioxothiazolidin-3-yl)hexadecan-1-on **23** und *N*-Palmitoylsuccinimidylester **24**

Die Acylierung erfolgte jeweils in Dimethylformamid bei Raumtemperatur beziehungsweise bei 40 °C. Das Acylierungsreagenz löste sich in DMF jedoch nicht. Die Reaktionssuspension wurde dennoch über Nacht gerührt, wobei es bei einer Suspension blieb. Trotz der schlechten Löslichkeit wurde das Acylierungsreagenz fast vollständig zum gewünschten Produkt **19** umgesetzt. Nach dem Filtrieren und Waschen des Niederschlags mit Petroleumether und Wasser und im Fall der Acylierung mittels der Verbindung **23** mit 5 %iger KOH-Lösung, konnte das *N*-Palmitoylserinol mit einer Ausbeute von 96-97 % erhalten werden. Abbildung 4-24 zeigt die Reaktionsgleichungen der zwei verwendeten Acylierungsreaktionen. Beide Reaktionen waren vom Arbeitsaufwand und der Effektivität vergleichbar. Jedoch entstand bei der Acylierung mit 1-(2-Thioxothiazolidin-3-yl)hexadecan-1-on ein Nebenprodukt, das Thiomercapto-thiazolidinon, welches aber mit der 5 %igen KOH-Lösung herausgewaschen werden konnte.

Zur Synthese des Glycosylakzeptors stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Das aminogeschützte Serinol kann sowohl direkt verethert als auch über eine Tosylierung der Hydroxylgruppe und anschließende Alkylierung auf indirektem Wege zum gewünschten Akzeptor umgesetzt werden.

4.2.1.2.2 Direkte Alkylierung des aminogeschützten Serinols unter Mitsunobu-Bedingungen

Für die Alkylierung unter Mitsunobu-Bedingungen wurden als Ausgangsstoffe die Serinolderivate mit den unterschiedlichen Aminoschutzgruppen und das Chloroethoxyphenol **25** eingesetzt. In der folgenden Abbildung 4-25 ist die allgemeine Reaktionsgleichung der Veretherung dargestellt. Bei der Mitsunobu-Reaktion werden Triphenylphosphin (PPh_3) sowie Diethylazodicarboxylat (DEAD) oder Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) eingesetzt, die zu Beginn der Reaktion ein Zwitterion bilden. Dieses soll dann im Anschluss das Phenolderivat deprotonieren. Das Phosphorzentrum reagiert mit dem Alkohol (in diesem Fall Serinol), sodass der Phosphor oxidiert wird und sich das Triphenylphosphinoxid vorbildet

(gute Abgangsgruppe). Das deprotonierte Phenolderivat greift dann als Nucleophil an, wodurch das Triphenylphoshinoxid abgespalten wird und das gewünschte Produkt unter Inversion (S_N2 -Reaktion) entstehen sollte [54]. Der Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion ist im Anhang 9.5 schematisch dargestellt.

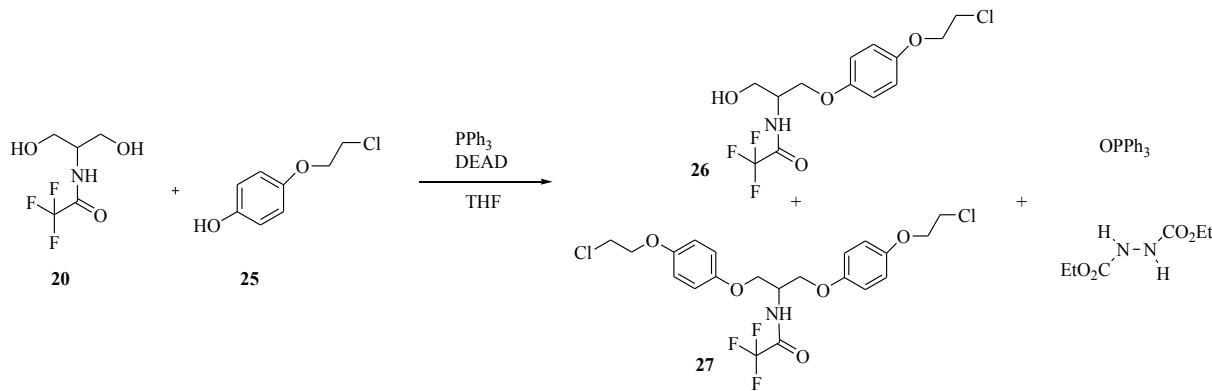


Abb. 4-25 Allgemeine Reaktionsgleichung für die Veretherung des TFA-Serinols mit Chloroethoxyphenol unter Mitsunobu-Bedingungen

Für die Durchführung der Mitsunobu-Reaktion wurden sowohl das entsprechende Serinolderivat **19**, **20** oder **22R,S** als auch das Triphenylphosphin im Vakuum getrocknet und anschließend in trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Anschließend wurde langsam und tropfenweise das DEAD zugegeben. Dieses verlor seine intensive gelbe Farbe bei Eintritt in die Reaktionslösung. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach der Kontrolle mittels DC konnte eine Umsetzung der Ausgangsstoffe festgestellt werden. Nach der Aufarbeitung wurden nur die Intermediate, Nebenprodukte sowie nicht abreaktierte Ausgangsstoffe isoliert. Da die Reaktion sehr langsam abzulaufen schien, wurde die Reaktion bei unterschiedlichen Temperaturen (RT , $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$) sowie unterschiedlichen Äquivalenten an PPh_3 und $DEAD$ bzw. $DIAD$ und verlängerter Reaktionslaufzeit durchgeführt. Keine Veränderung der Bedingungen führte zu der gewünschten Veretherung.

In der Literatur wurden Alkylierungen mittels Mitsunobu-Bedingungen für aliphatische Alkohole und Diole beschrieben [55]. Jedoch scheint die Reaktion durch die Anwesenheit der Aminofunktion des Serinols gehemmt zu sein. In einem weiteren Versuch wurde die Reihenfolge der Reaktionsschritte geändert. Es wurden alle Komponenten separat im Vakuum getrocknet. Dann wurde das Triphenylphosphin in trockenem THF gelöst und die Lösung wurde auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ heruntergekühlt. Das $DIAD$ wurde langsam und tropfenweise zu der Lösung gegeben. Die Reaktionslösung wurde 30 min bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, bis ein weißer Niederschlag gebildet wurde (Zwitterion). Zu dieser Reaktionslösung wurden langsam das in THF gelöste Serinolderivat und das Chloroethoxyphenol gegeben und die Reaktionsmischung wurde eine Stunde bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließend 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Das DC zeigte eine Reihe von Spots, wobei sowohl die Ausgangsstoffe als auch drei neue Verbindungen zu erkennen waren. Die Temperatur der Reaktionslösung wurde auf $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhöht und nach einer Stunde mittels DC kontrolliert, wobei keine Veränderungen festgestellt wurden. Nach

weiterem Rühren, 24h bei Raumtemperatur, wurde die Reaktionslösung aufgearbeitet. Nach der Säulenchromatografie wurden vier Fraktionen isoliert, wobei die ersten beiden dem DIAD und dem Phenolderivat **25** zugeordnet wurden. Die dritte Fraktion war eine Mischfraktion und die vierte das Hydrazinderivat, welches sich während der Mitsunobu-Reaktion bildet. Die Mischfraktion war eine Mischung aus dem Chloroethoxyphenol und dem Hydrazinderivat. Der Glycosylakzeptor **26** und das disubstituierte Produkt **27** konnten nicht isoliert werden. Diese Reaktion wurde ein weiteres Mal wiederholt mit dem Unterschied, dass zu dem entstandenen Niederschlag des Zwitterions erst das Chloroethoxyphenol hinzugegeben wurde und dann die Reaktionslösung für eine Stunde gerührt wurde, damit die Deprotonierung des Phenolderivats möglicherweise einfacher erfolgen konnte. Es konnte keine Veränderung auf dem DC festgestellt werden. Trotzdem wurde das Serinolderivat hinzugegeben und, wie bei der Reaktion zuvor, weiter verfahren. Diese Reaktion führte zu dem gleichen Ergebnis. Es konnten die Verbindungen **26** bzw. **27** nicht isoliert werden.

Da die direkte Alkylierung der Serinolderivate unter Mitsunobu-Bedingungen nicht erfolgreich war, wurde eine andere Alkylierungsmethode getestet. Im folgenden Kapitel wird die Synthese des Glycosylakzeptors über Tosylierung und anschließende Alkylierung ausführlich beschrieben.

4.2.1.2.3 Synthese des Glycosylakzeptors über die Tosylierung des *N*-Palmitoyl- sowie Phthalimidoserinols

Für die Tosylierung des Serinolderivats **19** wurden mehrere Reaktionsbedingungen getestet. Zunächst wurde ein Zweiphasensystem aus Kaliumhydroxidlösung und Dichlormethan gewählt [31].

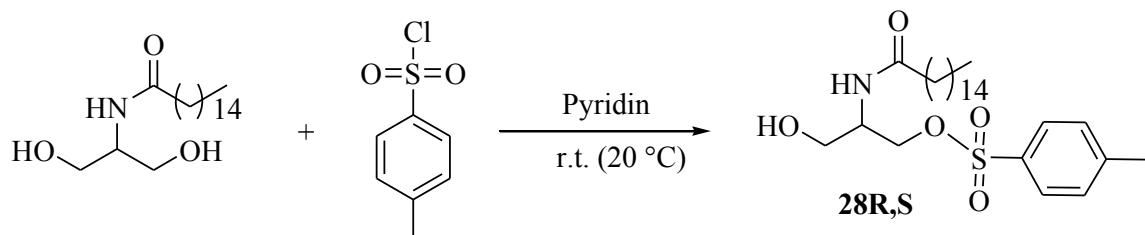


Abb. 4-26 *N*-Palmitoyl-*O*-tosyl-serinol

Das *N*-Palmitoylserinol wurde in diesen zwei Phasen bei Raumtemperatur gelöst und stark gerührt. Das Tosylchlorid wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung unter Rückfluss weitere drei Stunden gerührt. Zur Aufarbeitung wurden die beiden Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Nach der Trocknung und Entfernung des Lösungsmittels der vereinigten organischen Phasen wurde der Rückstand mittels Säulenchromatografie aufgetrennt. Es wurden zwei Fraktionen isoliert, wobei es sich um *N*-Palmitoyl-*O*-tosyl-serinol (Abb. 4-26) mit einer Ausbeute von 3 % sowie 2 % des nicht

umgesetzten Ausgangsstoffes **19** handelte. Die Löslichkeit des *N*-Palmitoylserinols ist sehr gering. Trotz der zwei Phasen unterschiedlicher Polarität wurde der Ausgangsstoff nicht vollständig gelöst. Da diese Bedingungen bei Raumtemperatur zu keiner Umsetzung und beim Erhitzen unter Rückfluss nur zu sehr geringen Ausbeuten führten, wurde Pyridin als Lösungsmittel benutzt und die weiteren Untersuchungen bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Ausgangsstoffe wurden zuerst drei Stunden separat im Vakuum getrocknet, dann zusammengegeben und für eine weitere Stunde im Vakuum getrocknet. Das Pyridin wurde über KOH frisch destilliert und über Molsieben gelagert. Nach der Vorbereitung wurden das Palmitoylserinol sowie das Tosylchlorid in Pyridin gelöst und die Lösung bei Raumtemperatur drei Stunden gerührt. Das Palmitoylserinol war in Pyridin vollständig löslich. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatografie verfolgt, wobei beobachtet werden konnte, dass das Tosylchlorid vollständig umgesetzt wurde, aber keine neuen Verbindungen unter UV-Licht oder I₂-Dampf sichtbar wurden. Das *N*-Palmitoylserinol war weder im UV-Licht noch im I₂-Dampf erkennbar. Eine Umsetzung zum gewünschten Produkt **28R,S** ließ sich daher dünnsschichtchromatografisch nicht beobachten. Ein weiteres Äquivalent des Tosylchlorids wurde zugegeben und die Reaktionslösung eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend in zwei Teile aufgeteilt. Die Hälfte der Lösung wurde in einen Schütteltrichter mit Wasser überführt und aufgearbeitet. Die andere Hälfte wurde bei Raumtemperatur weitere 72 h gerührt. Die Reaktionslösung zeigte auf dem Dünnschichtchromatogramm viele Spots, wobei es kompliziert war, die gewünschte Verbindung zu identifizieren. Zum Visualisieren der Spots wurde das DC in ein geschlossenes Glasgefäß gefüllt mit Chlorgas (Kaliumpermanganat und HCl) gestellt und anschließend mit Tolidinlösung entwickelt. Der aufgearbeitete Teil wurde zunächst mit Ethylacetat extrahiert und dann mittels Säulenchromatografie getrennt. Auch nach der Separierung enthielt das DC mehrere Spots. Sowohl das ¹H-NMR- als auch das ¹³C-NMR-Spektrum zeigten die gewünschte Verbindung **28**. Mittels dieser Methode konnten 17 % des *N*-Palmitoyl-*O*-tosyl-serinols isoliert werden. In der Literatur [32] wurde die Tosylierung von 1,2,3-(Trihydroxy)octadec-4-en beschrieben. Die Reaktion erfolgte bei -10 bis -15 °C in Pyridin. Dabei konnten in der Literatur Ausbeuten zwischen 67 und 75 % erhalten werden [32]. Die Tosylierung des *N*-Palmitoylserinols wurde daraufhin erneut bei -10 °C durchgeführt. Die Überlegung war, dass bei tieferen Temperaturen die Reaktion möglicherweise selektiver abläuft und die Zahl der Nebenprodukte reduziert wird. Die Ausgangsstoffe wurden wieder im Vakuum getrocknet und anschließend bei -10 °C gelöst, wobei das Serinolderivat **19** nicht vollständig in der Kälte löslich war. Anschließend wurde die Reaktionslösung 15 min bei -10 °C und dann 24 h bei Umgebungstemperatur (23 °C) gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Methanol gequencht, aufkonzentriert und mit Diethylether wieder gelöst. Die organische Phase wurde mit einer Natriumchloridlösung gewaschen und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand zeigte auf dem Dünnschichtchromatogramm viele Spots, sodass die Temperaturänderung nicht zur gewünschten Selektivität führte. Mittels Säulenchromatografie wurden vier Fraktionen isoliert. Die Säulenchromatografie wurde zweimal durchgeführt, da die erste nur zu einer geringen Auf trennung führte. Die Wiederholung führte einerseits zu einer besseren

Auf trennung und zum anderen zu einem hohen Masseverlust. Der Glycosylakzeptor **28** konnte mit einer Ausbeute von 25 % isoliert werden.

Zwei Verbindungen der vier Fraktionen wurden ebenfalls mittels MS und $^1\text{H-NMR}$ analysiert. Es handelt sich sehr wahrscheinlich um Oxazolidinderivate (Abb. 4-27, Verbindung **29** und **30**). Möglicherweise ist die Reaktivität des Amids zu stark, sodass der Ausgangsstoff komplett umgesetzt wird, aber nicht selektiv zu dem gewünschten Produkt reagiert. Außerdem konnte bei keinem der Experimente das bis-tosyierte Serinolderivat nachgewiesen werden. Eigentlich wäre zu erwarten, dass dieses ebenfalls entsteht.

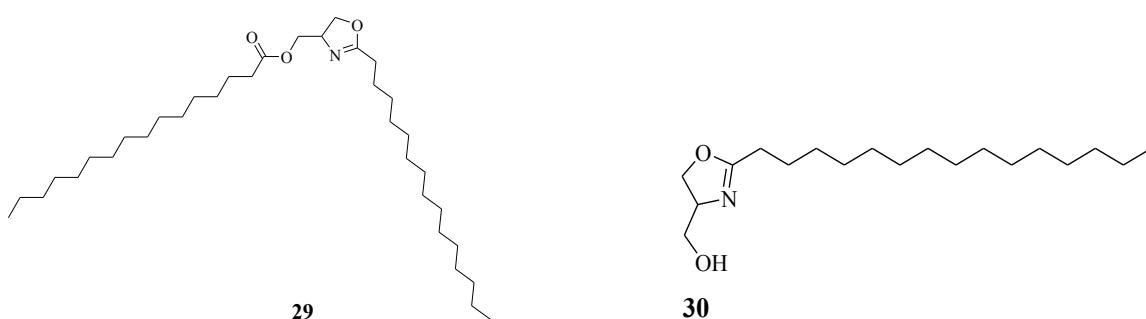


Abb. 4-27 Strukturen der isolierten Nebenprodukte der Tosylierung des Palmitoylserinols

Zur Synthese des Glycosylakzessors **36R,S** wurde nicht das Palmitoylserinol verwendet, sondern das Phthalimidserinol **31**, welches von Alexander Zinin (Mitarbeiter Zelinsky Institut für Organische Chemie, Moskau) zur Verfügung gestellt wurde.

Das Phthalimidserinol wurde zur Tosylierung in Pyridin bei Raumtemperatur gelöst und das Tosylchlorid hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 5 h bei Raumtemperatur gerührt und mittels DC kontrolliert.

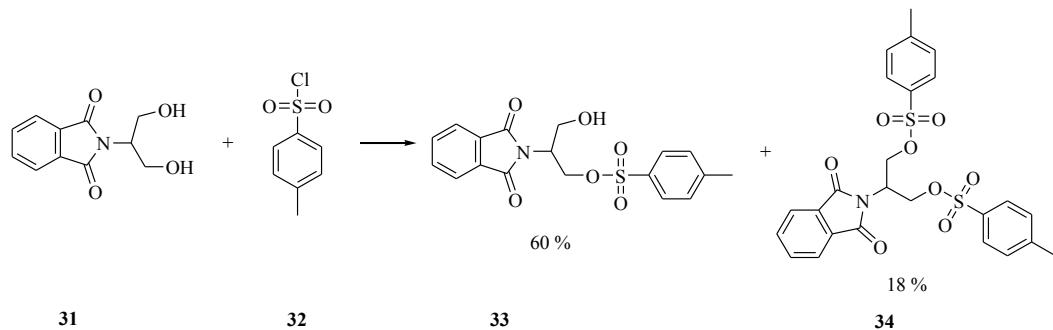


Abb. 4-28 Darstellung des Phthalimid-1-hydroxy-3-tosyl-serinols **33** und des Phthalimid-1,3-bistosyl-serinols **34**

Das Serinolderivat **31** wurde bei dieser Reaktion vollständig umgesetzt und es waren zwei neue Verbindungen auf dem DC zu beobachten (I_2 -Dampf). Beide Produkte konnten mittels Säulenchromatografie isoliert werden.

Bei den Produkten handelte es sich um das mono- sowie das bistosylierte Serinolderivat. Verbindung **33R,S** wurde mit einer Ausbeute von 60 % isoliert, das bis-substituierte Produkt **34** mit einer Ausbeute von 18 %. In Abbildung 4-28 ist die Reaktionsgleichung zur Tosylierung des Phthalimidserinols dargestellt. Bei der Synthese des Palmitoylserinols ist die Aminogruppe des Serinols auch nach der Acylierung (dann in Form eines Amids) für weitere Reaktionen zugänglich, sodass sich der stabile Oxazolidinring ohne weiteres bilden kann. Bei der Synthese des Phthalimidserinols wird diese Aminogruppe so derivatisiert, dass der Stickstoff vollständig „blockiert“ ist und so die Oxazolidinbildung vermieden wird.

4.2.1.2.4 Alkylierung des Phthalimid-1-hydroxy-3-tosyl-serinols **33R,S**

Nach der Tosylierung erfolgt die Alkylierung der geschützten Hydroxylfunktion. In der Literatur wurden viele Alkylierungsbedingungen beschrieben. Als Lösungsmittel dienen meistens Dimethylformamid, Acetonitril, Aceton, Tetrahydrofuran und Dimethylsulfoxid. Als Base werden häufig Natriumhydrid, Kaliumcarbonat oder Caesiumcarbonat eingesetzt. Außerdem beschreiben manche Arbeitsgruppen die Zugabe von Kronenethern zur Reaktion. [34, 35, 36, 37, 38].

Zur Alkylierung wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Methoden untersucht. Die basischen Reaktionsbedingungen bei der Alkylierung können zu einer Spaltung der Phthalimidgruppe führen. Durch eine Base könnte das Phthalanhydrid zu einem Phthalsäurederivat umgesetzt werden.

Dennoch wurde in einem ersten Versuch Natriumhydrid sowie DMF als Lösungsmittel gewählt (Abb. 4-29). Das Phenolderivat **35** und das Phthalimid-*O*-tosyl-serinol wurden separat im Vakuum getrocknet. Das Azidoethoxyphenol wurde dann in trockenem DMF gelöst und die Temperatur der Lösung mit einem Eisbad auf 0 °C gesenkt. Anschließend wurde das Natriumhydrid zugegeben und die Reaktionslösung für 15 min bei 0 °C gerührt.

Danach wurde das Serinolderivat **33R,S**, welches ebenfalls in DMF gelöst wurde, zu der Reaktionslösung zugegeben und diese über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnenschichtchromatografisch kontrolliert. Die Visualisierung mit Hilfe von UV-Licht sowie I_2 -Dampf ermöglichte die Verfolgung der Ausgangsstoffe nur begrenzt. Die Spots waren schwer zu erkennen. Für die Visualisierung der Produkte wurde eine Lösung aus PPh_3 (500 mg) und Phthaldialdehyd (250 mg) in 25 mL Methanol hergestellt. Zur Kontrolle der Dünnschichtchromatogramme wurden diese in die methanolische Lösung getaucht und anschließend über der Heizplatte erhitzt, es bildeten sich für alle Azidverbindungen deutlich braune Spots ab, die zudem unter UV-Licht gelb fluoreszieren [39]. Die Produktbildung konnte nicht beobachtet werden. Phthalimid-*O*-tosyl-serinol wurde

während der Reaktion vollständig umgesetzt, aber das gewünschte Produkt war nicht entstanden.

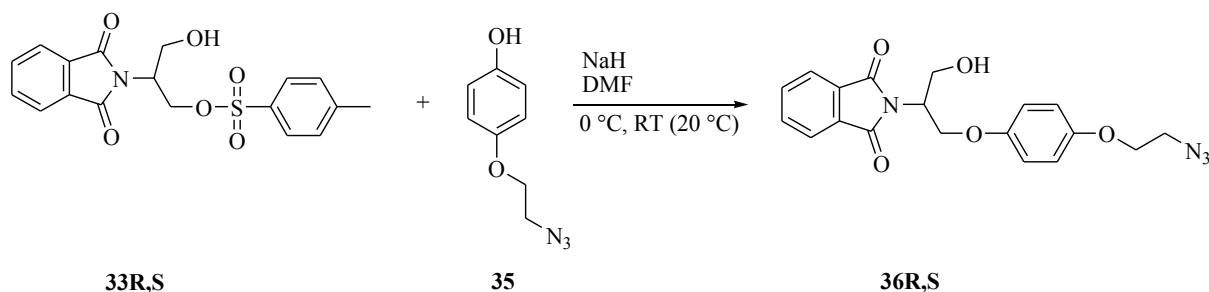


Abb. 4-29 Darstellung des Phthalimid-*O*-tosyl-serinols in DMF

Da das Produkt **36R,S** unter den beschriebenen Bedingungen nicht gebildet wurde, lässt sich vermuten, dass die Basizität zu groß war und die Phthalimidgruppe gespalten wurde. Es wurde deshalb die Umsetzung unter milderen Reaktionsbedingungen in Form eines Zweiphasensystems untersucht (Abb. 4-30). Das Phthalimid-*O*-tosyl-serinol sowie das Phenolderivat **35** wurden in einem System aus Kaliumcarbonatlösung (25 %) und Dichlormethan gelöst. Die Phasen wurden bei Raumtemperatur (18 °C) kräftig gerührt. Anschließend wurde Tetrabutylammoniumhydrogensulfat zugegeben und die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Die Kontrolle mittels DC zeigte keine Umsetzung der Ausgangsstoffe. Die Temperatur wurde auf 45 °C erhöht und das Reaktionsgemisch unter Rückfluss für zwei weitere Stunden gerührt.

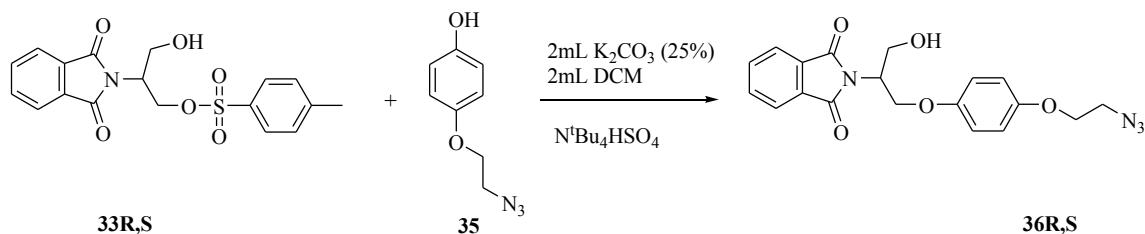


Abb. 4-30 Darstellung des Phthalimid-1-hydroxy-3-azidethoxyphenyl-serinols im Zweiphasen-System

Da auch hierbei keine Umsetzung erfolgte, wurde die Reaktionslösung wieder auf Raumtemperatur abgekühlt, eine weitere Portion des Tetrabutylammoniumhydrogensulfats zugegeben und die Mischung für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Diese Maßnahmen führten ebenfalls nicht zur gewünschten Reaktion. Schließlich wurde zur Erhöhung der Basizität eine KOH-Lösung zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Da der

gewünschte Glycosylakzeptor **36R,S** laut DC auch hierbei nicht gebildet wurde, wurde an dieser Stelle auf eine Aufarbeitung verzichtet.

Als weitere Variante wurde die Alkylierung des Phthalimid-O-tosyl-serinols in DMSO und bei Raumtemperatur durchgeführt (Abb. 4-31). Als Base und gleichzeitiges Alkylierungsreagenz wurde das Kaliumsalz des Azidoethoxyphenols (**37**) eingesetzt. Es wurden alle Komponenten im Vakuum getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur (18 °C) in DMSO gelöst und die Lösung über Nacht gerührt. Nach der Kontrolle der Reaktion mittels DC konnte festgestellt werden, dass sich die Ausgangsstoffe nicht umgesetzt hatten. Die Reaktionslösung wurde auf 30 °C erhitzt und für eine weitere Stunde gerührt. Nachdem die Kontrolle keine Änderung zeigte, wurde die Temperatur auf 40 °C erhöht und die Reaktionsmischung über Nacht bei dieser Temperatur gerührt. Das DC zeigte einen schwachen Spot für das gewünschte Produkt. Nach der Aufarbeitung wurden 71 % des nicht umgesetzten Phenolderivates **37** und eine Mischfraktion aus Verbindung **33R,S** und dem alkylierten Produkt **36R,S** isoliert.

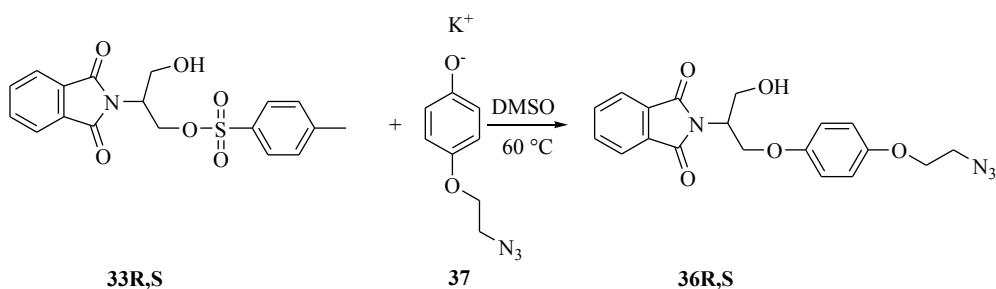
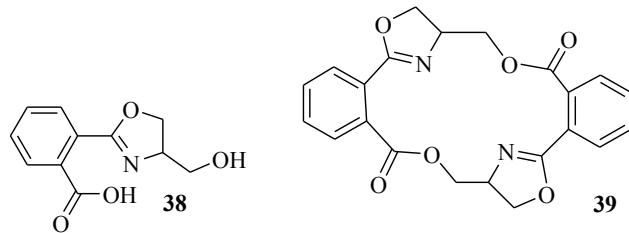


Abb. 4-31 Darstellung des Phthalimid-1-hydroxy-3-azidethoxyphenyl-serinols in DMSO

Da bei diesen Reaktionsbedingungen zum ersten Mal das Produkt gebildet und isoliert worden war, wurde das Experiment wiederholt. Aufgrund der geringen Umsetzung der Ausgangsstoffe wurde die Temperatur von Anfang an erhöht. Die Verbindung **33R,S** sowie das Phenolderivat **37** wurden in DMSO gelöst und die Lösung bei 60 °C über Nacht gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatografie beobachtet. Nach einer Stunde war das Phthalimid-O-tosyl-serinol bereits umgesetzt. Die Umsetzung des Phenolderivats **37** war nur schwer zu erkennen, da es in einem leichten Überschuss eingesetzt wurde und mit hoher Intensität auf dem DC sichtbar war.

Nach 24 h wurde die Reaktionsmischung mit Essigsäure versetzt und mit Ethylacetat extrahiert. Das Extrakt zeigte mehr als fünf Verbindungen, die durch die Säulenchromatografie aufgetrennt werden konnten. Als erste Fraktion wurde das reine Phenolderivat mit einer Ausbeute von 46 % erhalten. Höchstens 54 % dieses Ausgangsstoffes können umgesetzt worden sein. Der gewünschte Glycosylakzeptor konnte mit einer Ausbeute von 11 % isoliert werden.



Exakte Masse: 221,0688

Exakte Masse: 406,1165

Abb. 4-32 Isoliertes Nebenprodukt bei der Alkylierung des Phthalimid-1-hydroxy-3-azidethoxyphenyl-serinols

Interessanterweise konnte bei diesem Experiment auch ein weiteres Produkt **38** mit einer Ausbeute von 14 % isoliert werden.

Das Produkt **38** wurde mittels NMR-Spektroskopie ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) und Massenspektrometrie analysiert. Beide Messmethoden weisen auf ein Oxazolidinderivat hin.

Das Oxazolidin scheint dabei aber nicht hauptsächlich als Monomer **38**, sondern unter Abspaltung von zwei Molekülen Wasser, als ringförmiges Dimer **39** vorzuliegen. Die in der Abbildung 4-32 dargestellten Strukturen und deren kalkulierte Massen stimmen mit den MS-Messungen überein. Auch die NMR-Spektren weisen auf das Oxazolidinderivat **38** hin. In der Literatur [40] werden ähnliche Oxazolidine beschrieben, welche mit dem hier isolierten Produkt verglichen wurden [40]. In der folgenden Tabelle 4-4 sind die $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten des (R)-4-Hydroxymethyl-2-phenyloxazolidins **40** und des isolierten Benzoesäurederivats **38** aufgeführt.



	(R)-4-Hydroxymethyl-2-phenyloxazolin [40]	o-4-Hydroxymethyloxazolidino- benzoic acid
$^1\text{H-NMR}$ (δ , ppm)	3.68 (dd, $J = 11.4, 4.2$ Hz, 1H); 3.95 (dd, $J = 11.3, 3.6$ Hz, 1H); 4.36 (m, 1H); 4.53-4.40 (m, 2H), 4.68 (dd, $J = 11.4, 4.2$ Hz, 1H); 7.55-7.35 (m, 3H); 7.95 (m, 2H)	4.58-4.28 (m, 5H), 4.74 – 4.62 (m, 1H), 7.56 – 7.35 (m, 18H), 7.84 – 7.71 (m, 6H).
$^{13}\text{C-NMR}$ (δ , ppm)	63.8, 68.1, 69.2, 127.2, 128.1, 128.2, 131.3, 165.5	65.1, 66.7, 67.9, 124.0, 127.2, 128.8, 129.5, 131.0, 134.8, 162.1, 170.8

Tab. 4-4 Vergleich der NMR-Daten der Verbindung **38** mit dem in der Literatur beschriebenen (R)-4-Hydroxymethyl-2-phenyloxazolin [40]

Der Vergleich der NMR-Daten zeigt (vgl. Tab. 4-4), dass es sich um ein Oxazolidinderivat handelt. Die Abweichungen der chemischen Verschiebung kommen durch die zusätzliche Carboxylfunktion im isolierten Nebenprodukt **38** zustande. Der aromatische Teil im (R)-4-Hydroxymethyl-2-phenyloxazolidin hat keine weiteren Substituenten, weshalb sich einige aromatische Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum überlappen. Markant sind die Signale für den „Serinol-Teil“: Üblicherweise liegen die Signale für die zwei CH_2 -Gruppen des Serinols im ^{13}C -NMR-Spektrum bei 63 ppm und das Signal für die CH-Gruppe bei 53 ppm. Da Serinol symmetrisch ist, liegen die Signale der CH_2 -Spezies also übereinander. Bei dem isolierten Nebenprodukt ist dieses ausgeprägte Signalmuster nicht mehr zu erkennen. Die Signale der CH_2 - sowie CH-Spezies liegen nun alle separat mit 1 bis 2 ppm Unterschied vor. Dieses Signalmuster stimmt mit den Literaturdaten überein. Außerdem liegt das Signal für die $\text{N}=\text{C}-\text{O}$ -Spezies in etwa im gleichen Bereich wie bei dem (R)-4-Hydroxymethyl-2-phenyloxazolidin. Demnach kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei dem isolierten Nebenprodukt um ein Oxazolidinderivat handelt.

Die Synthese des Phthalimid-*O*-tosyl-serinols **36R,S** war mit DMSO und dem Kaliumsalz des Azidoethoxyphenols bei einer Temperatur von 60 °C erfolgreich und die Verbindung konnte deshalb für die Glycosylierungsreaktion eingesetzt werden.

4.2.1.3 Glycosylierungen

4.2.1.3.1 Glycosylierung unter der Verwendung eines S-Glycosyldonors

Der Glycosylakzeptor **36R,S** und der Glycosyldonor **18β** wurden zusammen und das Iodsuccinimid separat im Vakuum getrocknet. Dichlormethan wurde frisch vor der Glycosylierung destilliert und die Molekularsiebe wurden vier Stunden unter Erwärmung im Vakuum aktiviert. Der Donor **18β** und der Akzeptor **36R,S** wurden im trockenen Dichlormethan gelöst und die Molekularsiebe hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Temperatur mit Hilfe von Aceton und Trockeneis auf -60 °C heruntergekühlt. Das Iodsuccinimid sowie eine Spatelspitze Silbertriflat wurden in der Kälte zugegeben. Die Temperatur des Kältebades wurde langsam erhöht, bis ein Farbumschlag der Lösung erfolgte. Der Farbumschlag von hellem Beige zu einem intensiven Gelbton wurde bei einer Temperatur von -25 °C beobachtet. Diese Temperatur wurde weitere 30 min konstant gehalten und der Reaktionsverlauf mit Hilfe der Dünnschichtchromatografie verfolgt. Danach konnte die vollständige Umsetzung der Ausgangsstoffe festgestellt werden. Nach Abfiltrieren der Molekularsiebe und dem Waschen der Lösung mit Natriumthiosulfat und Natriumhydrogencarbonat im Verhältnis 1:1 wurde das überschüssige Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Gelchromatografie aufgetrennt (siehe Kapitel 7.1.2.3). Durch die Auftrennung wurden zwei Fraktionen erhalten. Neben dem gewünschten Glycosylprodukt **41** (Ausbeute 58 %) wurde auch das Hydrolyseprodukt isoliert. Die Abbildung 4-33 zeigt die beschriebene Glycosylierung.

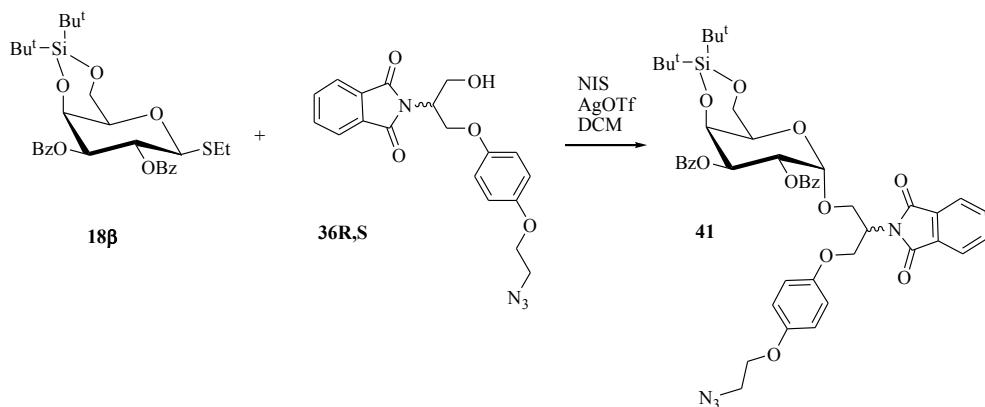
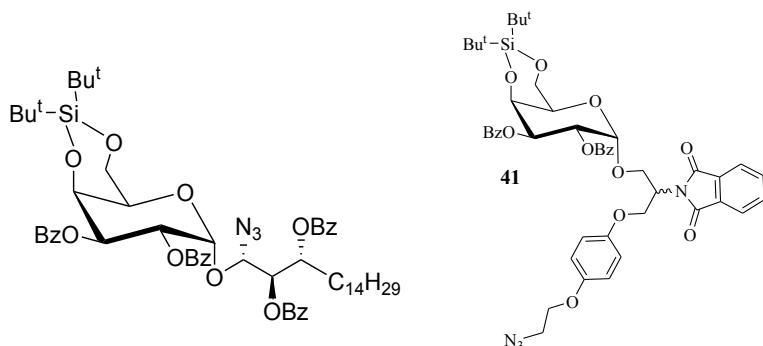


Abb. 4-33 Glycosylierung des Ethyl-4,6-*O*-Di-*tert*-butylsilyl-2,3-benzoyl-1-thio- β -D-galactopyranosid mit dem Serinolderivat Phthalimid-1-hydroxy-3-azidethoxyphenyl-serinol

Die NMR-Spektren und das Massenspektrum bestätigen die Bildung des Glycosylproduktes.



Galactoseceramidderivat [42]	Isolierte Verbindung	
¹H-NMR (δ, ppm)	5,80 (1H, dd, $^3J_{2,1} = 3,6$ Hz, H-2), 5,55 (1H, dd, $^3J_{3,2} = 10,6$ Hz, J _{3,4} = 2,8 Hz, H-3), 5,31 (1H, d, H-1), 4,87 (d, 1H, H-4)	5,76 (1H, dd, $^3J_{2,1} = 3,5$ Hz, $^3J_{2,3} = 10,8$ Hz, H-2), 5,49 (1H, dd, $^3J_{3,2} = 10,8$ Hz, $^3J_{3,4} = 1,6$ Hz, H-3); 5,39 (1H, m, H-1); 4,79 - 4,97 (m, H-4)
¹³C-NMR (δ, ppm)	98,5 (C-1);	97,4 (C-1), 96,7 (C-1) (2 Isomere)

Tab. 4-5 Vergleich der NMR-Daten (1 H-NMR (300 MHz), 13 C-NMR (75 MHz), $CDCl_3$) eines Galactoseceramidderivats aus der Literatur [42] mit dem isolierten Glycosylprodukt

In der Tabelle 4-5 wurden die NMR-Daten eines Galactoseceramidderivats aus der Literatur [42] mit dem gewünschten Glycosylprodukt **41** verglichen, wobei nur die zum Vergleich

relevanten Daten aufgeführt wurden. Für die isolierte Fraktion des Produktgemisches wurden im ^{13}C -NMR-Spektrum zwei Signale im Bereich der anomeren C-Atome (97,4 und 96,7 ppm) bestimmt, die auf ein Gemisch von mindestens zwei Isomeren hinweisen.

Die Tabelle 4-6 zeigt den Vergleich der berechneten Massen mit den durch HRESIMS ermittelten Massen des Glycosylproduktes **41** und des Hydrolyseproduktes **64** (siehe Struktur Experimenteller Teil Kapitel 7.2.4). Die gefundenen Massen bestätigen, dass die gewünschte Verbindung **41** gebildet worden ist (vgl. Tab. 4-6).

	Kalkulierte Masse [M+Na ⁺] m/z	Gefundene Masse [M+Na ⁺] m/z
Glycosylprodukt 41	915,3243	915,3233
Hydrolyseprodukt 64	551,2077	551,2064

Tab. 4-6 Vergleich der kalkulierten Massen der isolierten Fraktionen mit den berechneten Massen

Die Abbildung 4-34 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum des Isomerengemisches. Es ist zu erkennen, dass sich die Signale stark überlappen und die Auswertung dadurch erschwert wurde. Mit Hilfe der Literaturdaten [42] sowie der gemessenen 2D-Spektren konnten jedoch die Bereiche der chemischen Verschiebung ermittelt und den entsprechenden Gruppen zugeordnet werden (vgl. Tab. 4-5). Die Singulett-Signale der *tert*-Butyl-Protonen der DTBS-Gruppe befinden sich bei einer Verschiebung von 0,58-1,18 ppm. Die beiden Signale der CH₂-Protonen in Nachbarposition zur Azidgruppe sind jeweils zu einem Triplet aufgespalten und befinden sich bei 3,55 ppm. Die Intensitätsunterschiede zeigen, dass die beiden Isomere in dieser Mischung in einem Verhältnis von etwa 2:1 vorliegen. Die Signale der CH₂-Gruppen des Serinolteils sowie der OCH₂-Protonen des Phenolrestes befinden sich in einem Bereich von 4,00 und 4,49 ppm. Bei dem Multiplett bei 4,79-4,97 ppm handelt es sich um die Signale für das H-4-Proton des Zuckers sowie um das CH-Proton des Serinolteils. Die Vergrößerung der Abbildung 4-34 zeigt die Signale des anomeren H-Atoms bei 5,21-5,44 ppm sowie des H-3-Protons bei 5,44-5,58 ppm und des H-2-Protons bei 5,84-5,59 ppm. Die Aromatensignale befinden sich für den Phenolrest bei 6,60-6,86 ppm und für die Benzoyl- und Phthalimid-Spezies in einem Bereich von 7,09-8,14 ppm. Die ^{13}C -chemischen Verschiebungen der anomeren C-Atome befinden sich bei 97,4 und 96,7 ppm. Die kleinen Kopplungskonstanten J ($^3J_{1,2} = 3,5$ Hz) im ^1H -NMR-Spektrum deuten jeweils auf die α -Isomere hin. Die Bildung mehrerer Isomere lässt sich auf das asymmetrische C-Atom im Akzeptorteil und die Konfiguration am anomeren Zentrum des Galactoserestes zurückführen. Es können theoretisch vier Diastereomere entstehen. Es hat sich aber gezeigt, dass die Glycosylierung wie in der Literatur [30] beschrieben, α -selektiv abläuft, da keine Anzeichen für β -Isomere zu erkennen sind. Es können demnach nur zwei Diastereomere gebildet worden sein.

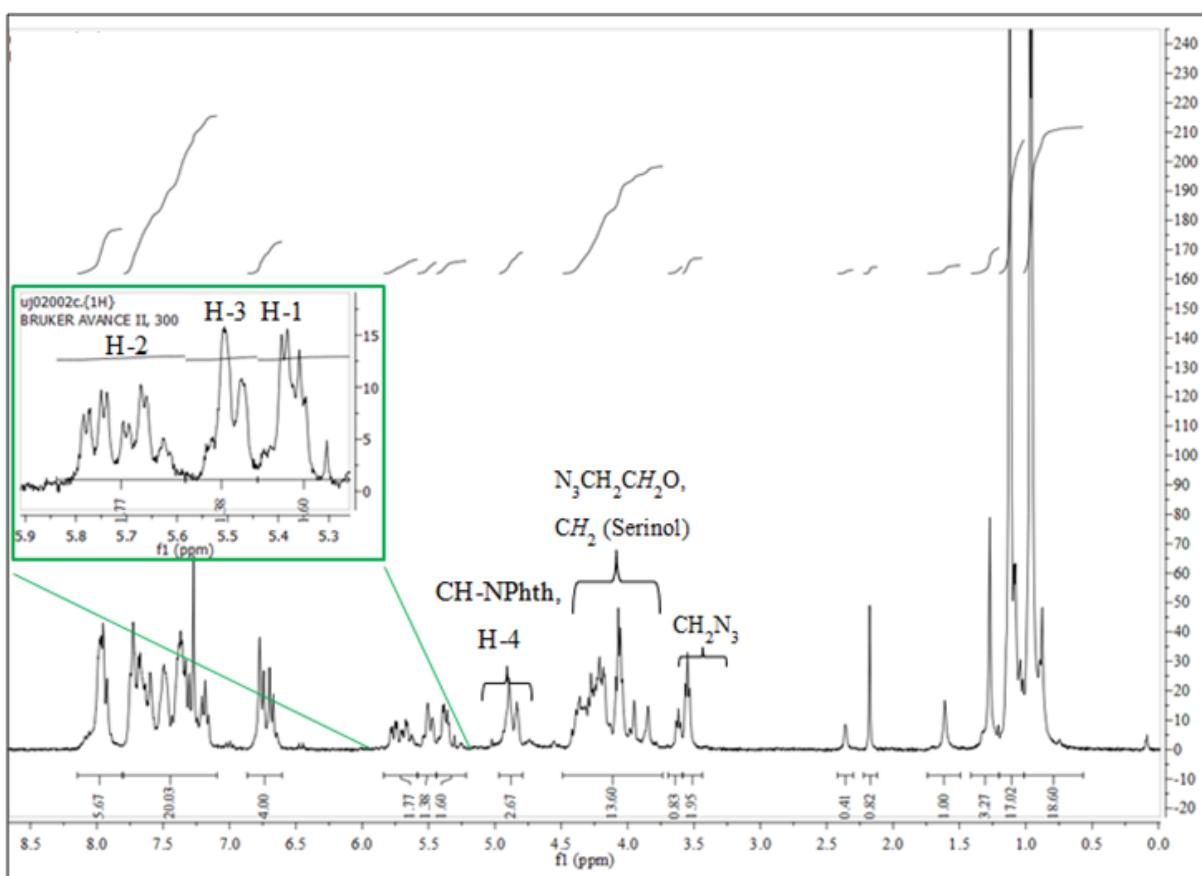


Abb. 4-34 ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz in CDCl_3) der Glycosylproduktmischung **41**

Die Abbildung 4-34 zeigt, dass für eine genauere Auswertung bzw. Charakterisierung des Glycosylprodukts **41** eine Auftrennung des Isomerengemisches notwendig war. Die Trennung der Isomere erfolgte mittels präparativer HPLC. Durch die HPLC-Auftrennung konnten zwei Diastereomere isoliert werden. Das ^1H -NMR-Spektrum dieser Diastereomere **41** und **42** ist in Abbildung 4-35 dargestellt. Zur besseren Übersicht wird nur ein Ausschnitt der ^1H -NMR-Spektren dargestellt (5,3-8,1 ppm). Im Unterschied zur Isomerenmischung ist hier nur noch ein Satz von Signalen erkennbar. Die Vergrößerung zeigt die Doppeldoublett-Signale der H-2- und H-3-Protonen sowie die Doublett-Signale für die anomeren H-Atome. Es sind nach der Auftrennung nicht nur diese Kopplungsaufspaltungen, sondern auch die Signale der Aromatenprotonen sichtbar. Die Aufspaltungen der Aromatensignale sind für beide Diastereomere gleich, aber sie unterscheiden sich in den NMR-chemischen Verschiebungen der Benzoyl-CH-Protonen. In einem Bereich von 6,71 – 6,83 ppm ist in beiden Spektren ein Multiplett mit der Intensität 4 zu erkennen. Diese Aufspaltung ist dem parasubstituierten Benzylring des Akzeptorteils zuzuordnen. Das Multiplett ergibt sich aus der Kopplung höherer Ordnung der CH-Protonen in *ortho*- und *meta*-Position, die annähernd die gleiche chemische Verschiebung haben.

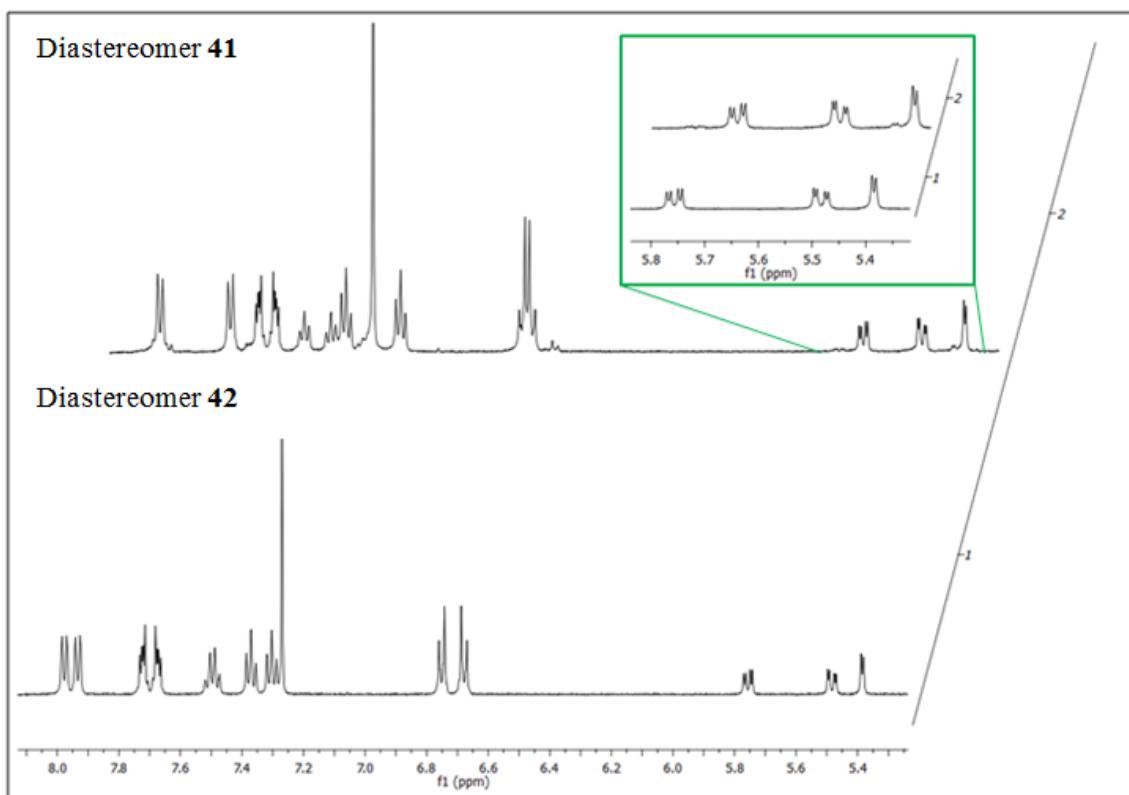


Abb. 4-35 ^1H -NMR-Spektren (500 MHz, in CDCl_3) der reinen Diastereomere **41** und **42**

Um das Konzept zu erweitern und die Diastereoselektivität zu überprüfen, wurde eine weitere Glycosylierung durchgeführt.

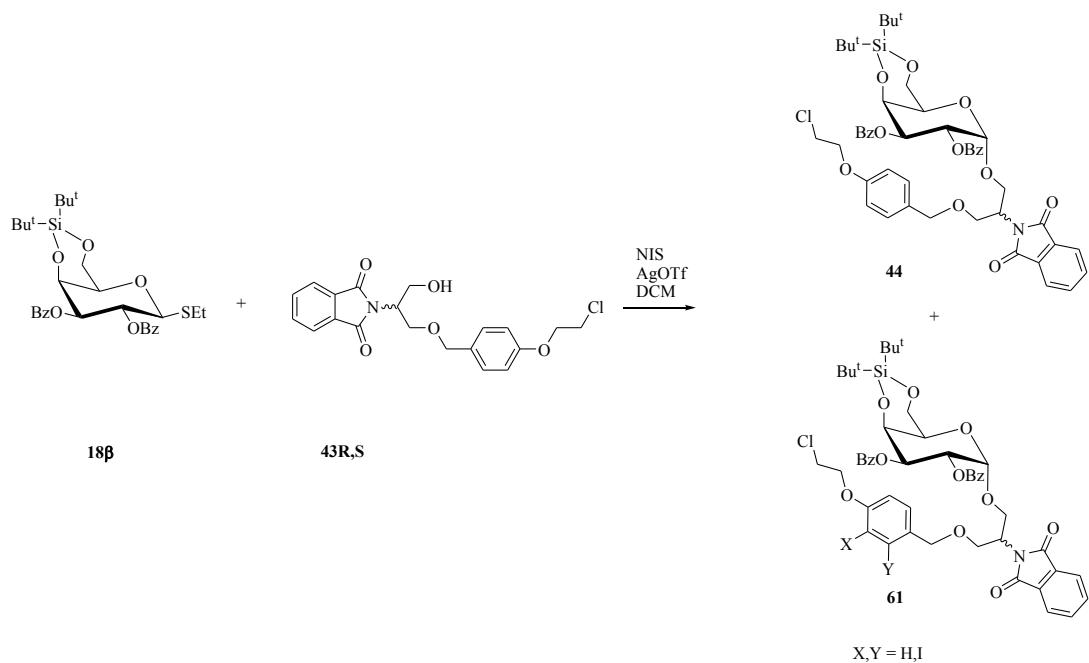


Abb. 4-36 Glycosylierung mit Phthalimid-1-hydroxy-3-azidethoxybenzyl-serinol **43R,S** als Akzeptor

Dafür wurde der Glycosylakzeptor **43R,S** mit einer zusätzlichen CH_2 -Einheit, ausgewählt. Dieser wurde von Alexander Zinin (Zelinsky Institut für Organische Chemie, Moskau) synthetisiert. In der Abbildung 4-36 ist die Reaktionsgleichung der Glycosylierung mittels Phthalimid-1-hydroxy-3-azidethoxybenzyl-serinol dargestellt.

Diese Glycosylierung wurde auf gleiche Weise durchgeführt wie zuvor bei Umsetzung zu der Verbindung **41** beschrieben. Alle Komponenten wurden im Vakuum getrocknet, das Dichlormethan vor der Verwendung frisch destilliert und die Molekularsiebe unter Erwärmung und im Vakuum aktiviert. Der Donor **18β** und der Akzeptor **43R,S** wurden in Dichlormethan gelöst, die Molekularsiebe hinzugegeben und die Reaktionsmischung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde diese auf $-60\text{ }^\circ\text{C}$ heruntergekühlt und das *N*-Iodsuccinimid sowie eine Spatelspitze AgOTf hinzugegeben.

Bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ erfolgte bei dieser Glycosylierung ebenfalls der Farbumschlag zu einem intensiven Gelbton. Die Kontrolle mittels Dünnschichtchromatogramm zeigte eine vollständige Umsetzung der Ausgangsstoffe. Die Aufarbeitung erfolgte ebenfalls in gleicher Weise wie bei der bereits beschriebenen Glycosylierung. Es wurden in einem ersten Schritt die Molekularsiebe abfiltriert, dann die organische Phase mittels Natriumthiosulfat und Natriumhydrogencarbonat im Verhältnis 1:1 gewaschen und danach das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Isolierung des Produktes erfolgte mittels Gelchromatografie (siehe Experimenteller, Teil Kapitel 7.1.2.3). Es wurden zwei Fraktionen isoliert, wobei die zweite Fraktion als das gewünschte Glycosylprodukt **44** mit einer Ausbeute von 71 % identifiziert wurde. Wie bei der ersten Glycosylierung ist ein Produktgemisch mehrerer Isomere erhalten worden. Die NMR-Spektren wie auch das Massenspektrum ($[\text{M}+\text{Na}^+]$ kalkuliert 922,2996 m/z ; gefunden 922,2953 m/z) zeigen, dass das gewünschte Glycosylprodukt **44** entstanden ist.

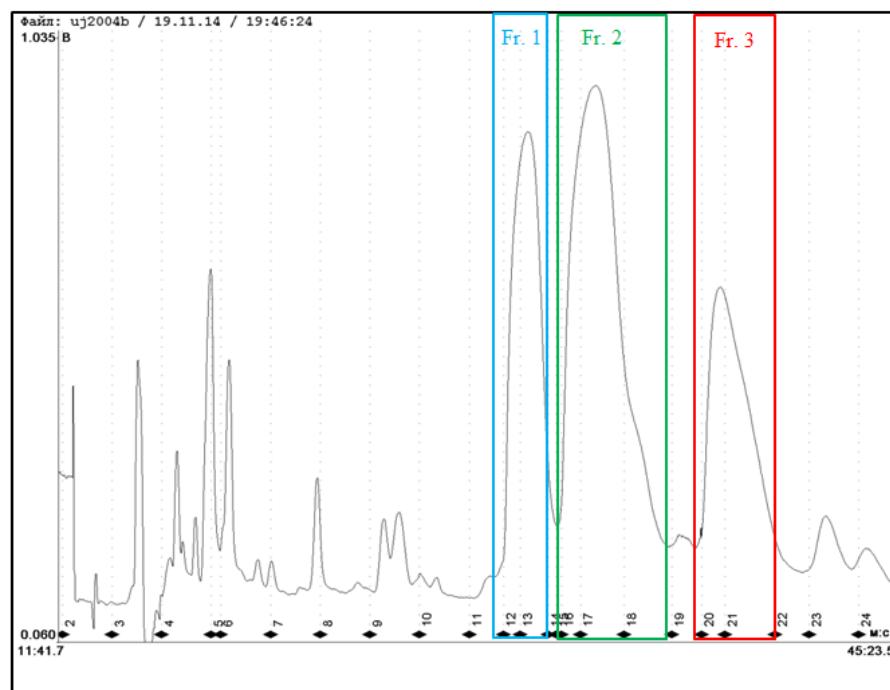


Abb. 4-37 Auf trennung des Isomerengemisches mittels präparativer HPLC nach der Gelchromatografie.

Durch die nachfolgende Auftrennung des Produktgemisches mittels präparativer HPLC wurden drei Fraktionen erhalten (Abb. 4-37). Die erste Fraktion enthielt das reine Glycosylprodukt, die zweite Fraktion war eine Mischfraktion und die dritte enthielt ein Iodderivat des Glycosylprodukts.

Die Abbildung 4-37 zeigt das UV-Chromatogramm der HPLC-Trennung. Die relevanten Fraktionen sind in der Abbildung farbig hervorgehoben. Das ^1H -NMR-Spektrum der ersten Fraktion (Abb. 4-37, blau) zeigt das reine Glycosylprodukt **44**. In Abbildung 4-38 sind aufgrund der Übersichtlichkeit nur der Aromatenbereich und der Bereich für das anomere H-Atom (5,3 ppm) dieses Diastereomers sowie der anderen isolierten Produkte dargestellt. Die kompletten ^1H -NMR-Spektren sind im Anhang Kapitel 9.2.3 abgebildet. Bei einer Verschiebung von 5,33 ppm befindet sich das Signal des anomeren H-Atoms mit einer Kopplungskonstante von $^3J_{1,2} = 3,7$ Hz. Diese kleine Kopplungskonstante weist erneut wie bei der zuvor beschriebenen Glycosylierung auf ein Isomer mit α -Konfiguration hin. Das Signal des anomeren C-Atoms befindet sich im ^{13}C -NMR-Spektrum bei einer chemischen Verschiebung von 96,5 ppm.

Die Mischfraktion (vgl. Abb. 4-37, grün) wurde ein weiteres Mal mittels HPLC aufgetrennt und es wurden zwei neue Fraktionen erhalten. Auf diese Weise konnten ein weiteres Diastereomer (**45**) sowie ein Iodderivat **61** isoliert werden (siehe Abbildung 4-38). Das Signal des anomeren H-Atoms des Diastereomers **45** befindet sich im ^1H -NMR-Spektrum bei 5,30 ppm und ist mit einer Kopplungskonstante von $^3J_{1,2} = 3,7$ Hz zum Dublett aufgespalten. Die gleiche Kopplungskonstante wurde auch für das Signal des anomeren Protons für das Iodderivat **61** ermittelt. Die Signale der anomeren C-Atome der Verbindungen **45** und **61** befinden sich jeweils bei 97,5 ppm und 96,6 ppm.

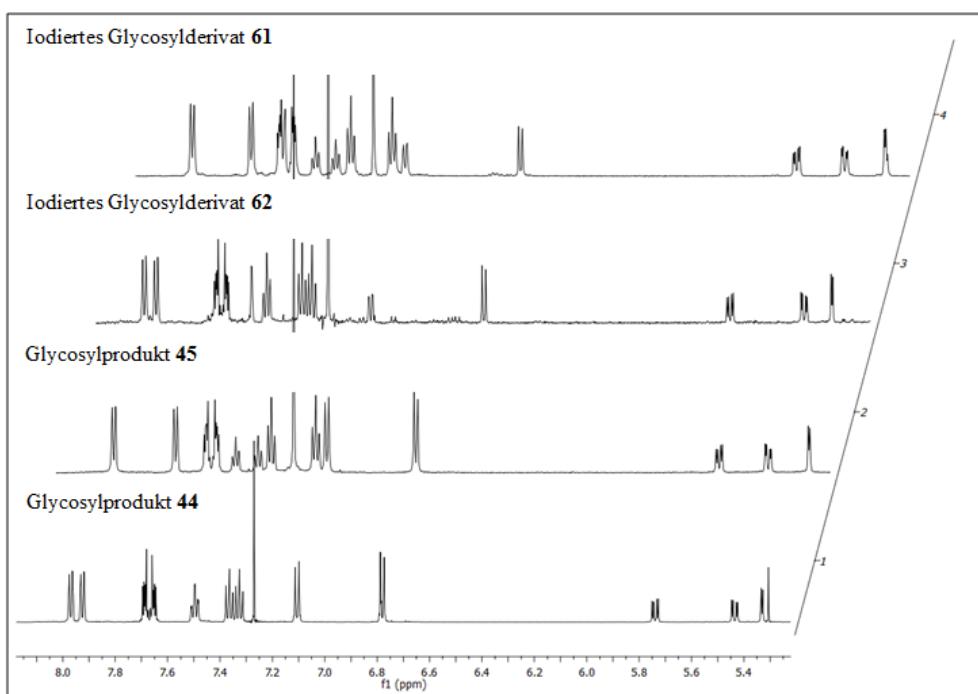


Abb. 4-38 Ausschnitt der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, in CDCl_3) (Aromaten- und Anomerenbereich) der Diastereomere **44** und **45** sowie der dazugehörigen Iodderivate **61** und **62**

Der Unterschied der beiden Diastereomere **44** und **45** wird in den ^1H -NMR- und ^{13}C -Spektren durch eine unterschiedliche Verschiebung der Signale deutlich. In den ^{13}C -NMR-Spektren zeigt sich jeweils ein eigener Satz von Signalen. Die Signale der anomeren C-Atom-Signale liegen jeweils bei 96,5 bzw. 97,5 ppm. Die Verbindung der dritten Fraktion der HPLC-Trennung wurde als ein zweites Iodderivat (**62**) identifiziert (Abb. 4-37, rot). Die Auswertung der NMR-Daten ergab, dass sich die Aromatenbereiche nicht nur in der Verschiebung unterscheiden, sondern auch, dass ein Aromatenproton weniger im Molekül enthalten ist. Die Integrale des parasubstituierten Benzylrings im Akzeptorteil deuten wie bei der Verbindung **61** auf eine Iodierung in *ortho*-Position hin. Durch diese Substitution sind in den ^1H -NMR-Spektren der iodierten Derivate **61** und **62** jeweils die Signale für zwei Dubletts ($^3J = 8,4$ Hz; $^4J = 1,8$ Hz) und ein Doppeldublett ($^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 1,8$ Hz) zu entnehmen, die durch die Kopplung über drei und vier Bindungen der CH-Protonen im Aromaten zustande kommen.

Die Glycosylierung des S-Glycosyldonors **18 β** mit dem nicht alkylierten Glycosylakzeptor **22R,S** zu **46** wurde ebenfalls durchgeführt (Abb. 4-39). Die Durchführung erfolgte auf gleicher Weise wie die zuvor beschriebenen Glycosylierungen. Der Farbumschlag erfolgte im Gegensatz zu den beiden anderen Reaktionen erst bei einer Temperatur von -10 °C. Zur Aufarbeitung wurde ebenfalls die Gelchromatografie eingesetzt. Das NMR-Spektrum zeigt, dass es sich um eine Mischung aus Isomeren handelt. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt Signale für mehrere anomere C-Atome bei 96,2, 96,8 sowie 97,2 ppm. Diese chemischen Verschiebungen liegen im gleichen ppm-Bereich, wie bei den zuvor beschriebenen Diastereomeren **41** und **42** bzw. **44** und **45**. Die Kopplungskonstanten $^3J_{1,2} = 3,4$ Hz des Signals für das anomere Proton im ^1H -NMR-Spektrum weisen erneut auf die Isomere mit α -Konfiguration hin. Das Produktgemisch **46** wurde mit einer Ausbeute von 30,3 % isoliert.

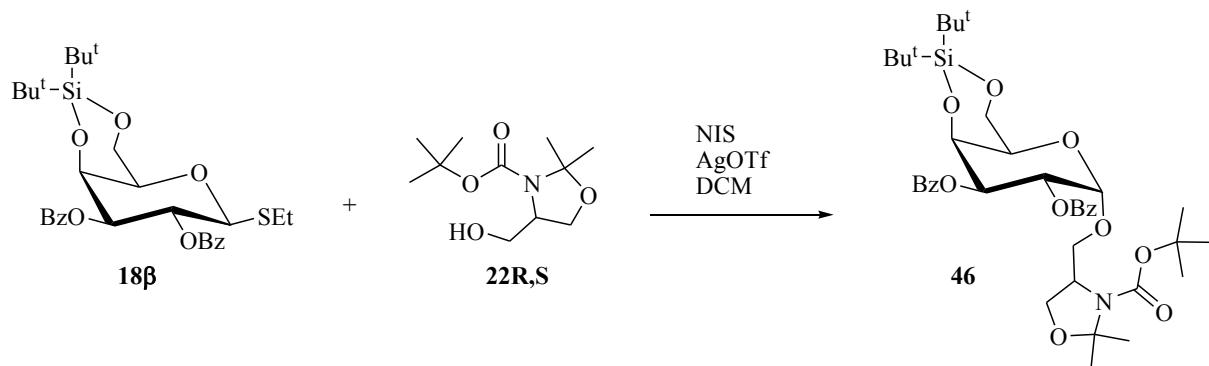


Abb. 4-39 Glycosylierung des Ethyl-4,6-*O*-Di-*tert*-butylsilyl-2,3-benzoyl-1-thio- β -D-galactopyranosids mit dem 2-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-hydroxymethyl-2,2-dimethyl-1,3-oxazolidins

4.2.1.3.2 Glycosylierungsreaktionen unter der Verwendung von *O*-Glycosyldonoren

Die Synthese von glycolipidähnlichen Verbindungen wurde ebenfalls untersucht und soll in diesem Kapitel erläutert werden.

Die Glycosylierung des *N*-Palmitoylserinols wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Das Glucosepentaacetat und das *N*-Palmitoylserinol wurden im Vakuum getrocknet und anschließend in frisch destilliertem Dichlormethan gelöst. Das Amid **19** mit amphiphilen Eigenschaften war nicht in Dichlormethan löslich. Ein Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan und Acetonitril sollte zu der gewünschten Löslichkeit führen. Aber erst nachdem ein Überschuss an Bortrifluoriddiethyletherat hinzugefügt worden war, löste sich das Amid vollständig auf. Das Verhältnis der Ausgangsstoffe wurde so gewählt, dass ein geringer Überschuss an *N*-Palmitoylserinol vorlag, damit vorwiegend das Monoglycosid gebildet wird. Bei dieser Glycosylierung wurden drei Produkte erhalten. Es wurden zwei mono-glycosyierte **47** und **48** sowie das bis-glycosyierte Serinolderivat **49** isoliert. Auf dem Dünnschichtchromatogramm war der Unterschied des bis-glycosyierten Produktes **49** zu dem mono-glycosyierten Produkt mit zusätzlicher Acetylgruppe **48** kaum erkennbar. Die Mobilität der beiden Verbindungen ist fast identisch. Um die Verbindungen zu trennen, wurde deshalb zunächst eine Gelchromatografie durchgeführt. Hierbei werden nach dem Größenausschlussprinzip die mono-glycosyierten Produkte vom bis-glycosyierten abgetrennt. Die Mischung der isolierten Monomere unterscheidet sich bei der Gelchromatografie nicht, da der Masseunterschied zu klein ist. Jedoch ist ihre Polarität sehr unterschiedlich und die Verbindungen lassen sich mittels Kieselgelchromatografie auftrennen. Da die Schutzgruppen nach der Glycosylierung abgespalten werden sollten, ist die Trennung der mono-glycosyierten Produkte nicht notwendig gewesen. Nach Abspaltung der Acetylgruppen wurde eine einzige Verbindung **50** erhalten. Bei dieser Art der direkten Glycosylierung konnten für die Monoglycosylprodukte Ausbeuten zwischen 18 und 40 % erreicht werden. Das Bisglycosylprodukt **49** ist trotz des Überschusses an Serinolderivat **19** noch mit einer Ausbeute von 4 % entstanden.

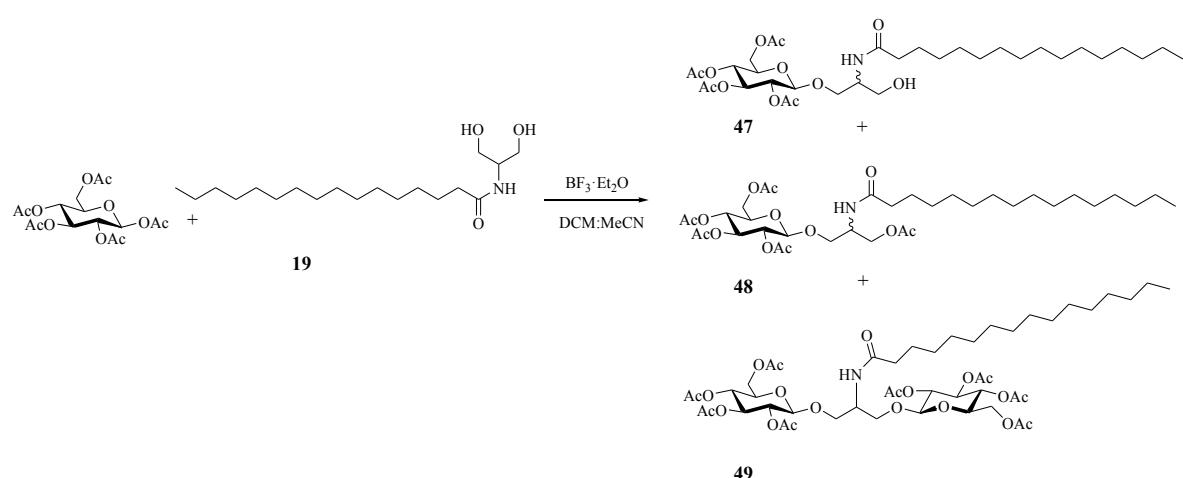


Abb. 4-40 Glycosylierung des *N*-Palmitoylserinols **19**

Da der Akzeptor ein Asymmetriezentrum enthält, bildete sich eine Produktmischung aus Diastereomeren. Die NMR-Spektren zeigen, dass es sich um die β -Isomere handelt ($^3J_{1,2} = 8,0$ Hz). In der Literatur wurde die Synthese des bis-glycosylierten Palmitoylserinols **49** in fünf Schritten beschrieben, wobei eine Ausbeute von 45 % erreicht wurde [46]. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Synthese der Glycosylierungsprodukte auf direktem Wege in maximal drei Schritten möglich ist.

Die Entschützung der Glycosylprodukte **47** und **48** erfolgte unter Zemplén-Bedingungen. Die beiden mono-glycosylierten Palmitoylserinolderivate wurden in einer geringen Menge Dichlormethan gelöst und dann mit Methanol sowie 1-molarer Natriummethanolat-Lösung versetzt. Nach vollständiger Umsetzung der Ausgangsstoffe wurde die Reaktion durch Einleiten von CO_2 gequencht und das Produkt mittels Butanol extrahiert.

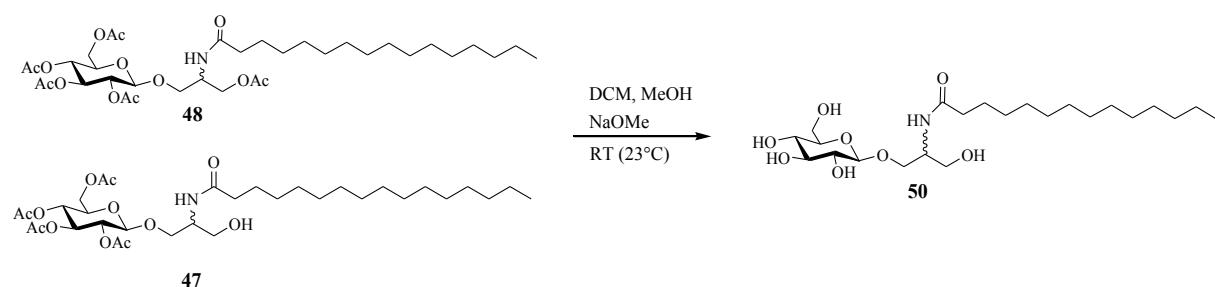


Abb. 4-41 Deacetylierung der Monoglycosylprodukte **47** und **48**

Das Lösungsmittel wurde anschließend unter reduziertem Druck entfernt und das entschützte Glycosylprodukt **50** konnte mit einer Ausbeute von 72 % isoliert werden.

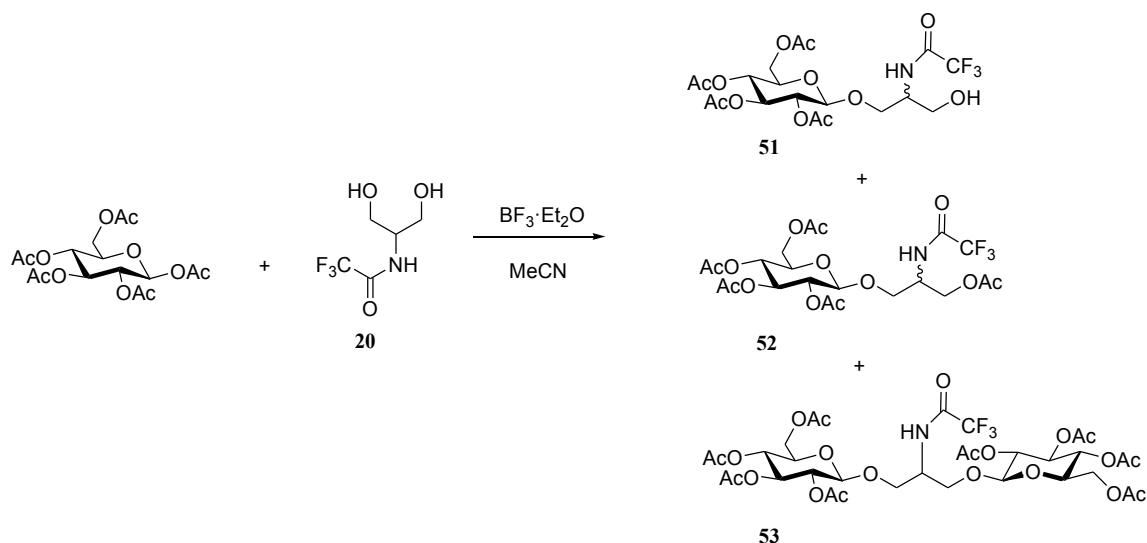


Abb. 4-42 Glycosylierung des TFA-Serinols **20**

Die gleiche Glycosylierung wie zu den Verbindungen **47**, **48** und **49** wurde ebenfalls mit dem TFA-Serinol durchgeführt (vgl. Abb. 4-42). Da sich das TFA-Serinol gut in Acetonitril löste, wurde nur ein zweifacher Überschuss an Bortrifluoriddiethyletherat eingesetzt. Auch bei dieser Glycosylierung sind drei Produkte entstanden. Die beiden Monoglycosylprodukte **51** und **52** sowie das Bisglycosylprodukt **53**. Alle drei Verbindungen besitzen eine Kopplungskonstante für das anomere H-Atom von $^3J_{1,2} = 7,9$ Hz. Es wurden also nur die β -Isomere erhalten. Die Ausbeuten lagen für die Monoglycosylprodukte zwischen 15-28 % und für das Bisglycosylprodukt bei 4-7 %.

4.2.2 Synthese von Serinolderivaten auf enzymatisch katalysiertem Weg

Serinolderivate können nicht nur auf rein chemischem Weg hergestellt werden, sondern auch durch enzymatisch katalysierte Reaktionen. Im folgenden Kapitel soll nur auf einige ausgewählte Reaktionen eingegangen werden, da diese Reaktionen ausführlich im Rahmen einer Masterarbeit erläutert wurden und gleichzeitig Bestandteil dieses Projektes sind [66].

Das Ziel der Durchführung der biokatalysierten Reaktionen war es, ebenfalls wie bei der rein chemischen Synthese, neue Serinolderivate herzustellen.

Das *N*-Acetylserinol, dessen Darstellung bereits in Kapitel 4.1.1.1 (Abb.4-2) erläutert wurde, kann durch eine lipasen-katalysierte Reaktion mit Vinyl-n-octanoat verestert werden. Dazu wurde das *N*-Acetylserinol in Acetonitril gelöst und das Vinyl-n-octanoat hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 40 °C gerührt. Nach einer halben Stunde Temperierungszeit wurde die Lipase (Novozym 435®) hinzugegeben und die Reaktionsmischung weitere 12 Stunden gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Enzym von der Reaktionslösung abgetrennt und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand enthielt eine Mischung aus *N*-Acetyl-mono-*O*-octanoyl-serinol und *N*-Acetyl- bis-*O*-octanoyl-serinol, welche durch die Aufarbeitung mittels Säulenchromatografie voneinander getrennt werden konnten. Der Diester **58** konnte als weißer, kristalliner Feststoff mit einer Ausbeute von 53 % erhalten werden (siehe Strukturen Kapitel 7.3). Der chirale Monoester **57R,S** wurde isoliert. Der Monoester reagiert durch einen Überschuss an Vinyloctanoat weiter zum Diester. Es war nun von Interesse, das Verhältnis der Ausgangsstoffe sowie die Reaktionszeit zu optimieren. Dadurch sollte sich das Verhältnis von Mono- und Diester beeinflussen lassen. Zur Untersuchung des Reaktionsverlaufes wurden LCMS-Messungen durchgeführt.

Zunächst wurde überprüft, ob die Veresterung des *N*-Acetylserinols nicht auch ohne Zugabe des Enzyms abläuft. Aus diesem Grund wurde ein Experiment ohne Lipase durchgeführt und die Reaktionsmischung wurde anschließend mithilfe der LCMS vermessen. Die Veresterung des Serinols konnte unter diesen Bedingungen nicht beobachtet werden.

Die LCMS-Untersuchungen des enzymatischen Reaktionsverlaufes zeigten deutlich, dass die Bildung des Diesters und des Monoesters nach 24 Stunden noch nicht abgeschlossen war. Aus diesem Grund wurden bei verlängerter Reaktionsdauer auf 48 Stunden noch zwei weitere Reaktionsansätze untersucht. Einerseits wurde mit Molekularsiebe getrocknetes Acetonitril und andererseits nicht getrocknetes Acetonitril als Lösungsmittel eingesetzt. Die

Untersuchungen zeigten, dass innerhalb von zwei Stunden nach Zugabe des Enzyms sowohl der Mono- als auch der Diester entstand. Der Monoester wurde jedoch ab der zweiten Stunde Reaktionszeit zum Diester umgesetzt und war nach circa sechs Stunden komplett abreagiert. Die LCMS-Messungen zeigten, dass ab 26 Stunden das Maximum der Diesterkonzentration erreicht war. Des Weiteren konnte aus den Messungen entnommen werden, dass der Einsatz von getrocknetem Acetonitril zu höheren Produktkonzentrationen führt, der zeitliche Verlauf der Reaktion aber völlig identisch ist.

Bei den beschriebenen Reaktionen wurde ein zehnfacher Überschuss an Vinyl-n-octanoat eingesetzt. Das führte einerseits dazu, dass genügend Substrat für die Bildung des Diesters zur Verfügung stand und die Reaktion nicht auf der Stufe des Monoesters stehen blieb und anderseits wurde das Vinyl-n-octanoat mit Wasser, welches zu ca. 1% in dem nicht getrockneten Acetonitril enthalten war, zu Octansäure hydrolysiert. Neben dem positiven Effekt des Wasserentzugs aus dem Reaktionssystem dieser Nebenreaktion musste die gebildete Octansäure durch säulenchromatografische Aufarbeitung entfernt werden. Des Weiteren konnte durch die LCMS-Messungen gezeigt werden, dass eine 100 %ige Umsetzung des *N*-Acetylserinols erreicht wurde. Neben der Veresterung des *N*-Acetylserinols wurden in der erwähnten Masterarbeit [66] noch weitere Serinolderivate, wie zum Beispiel das *N*-Boc-Serinol sowie das BECV-Serinol enzymatisch derivatisiert. Als Substrat wurden sowohl das Vinyl-n-octanoat als auch die Octansäure eingesetzt. Der Reaktionsverlauf, der Einfluss der Substratverhältnisse sowie der Einfluss des Wassergehalts im Lösungsmittel wurden untersucht. Die Mono- sowie die Diester konnten mit der LCMS nachgewiesen, jedoch nicht alle Produkte isoliert werden.

Substrat	Enzym	Resultat
Serinol + Vinyl-n-octanoat in Acetonitril	Novozym 435 [®] (= Cal B)	Keine Reaktion
<i>N</i> -Acetylserinol + Vinyl-n-octanoat in Acetonitril	Novozym 435 [®] (= Cal B)	Weiße Kristalle (67 %, 390 mg) <i>N</i> -Acetyl-mono- <i>O</i> -octanoyl-serinol (Monoester) (53 %, 456 mg) <i>N</i> -Acetyl- bis- <i>O</i> -octanoyl-serinol
Serinol + Vinyl-n-octanoat in Acetonitril	Cal A	Weiße, nadelförmige Kristalle (33 %), <i>N</i> -Octanoylserinol (C8-Serinol) 54
Serinol + Vinyl-n-laurat in Acetonitril	Cal A	Weißer Niederschlag (37 %), <i>N</i> -Lauroylserinol (C12-Serinol) 55

Tab. 4-7 Vergleich der enzym-katalysierten Reaktionen zur Veresterung von Serinol in Acetonitril

Ergebnisse

Die Tabelle 4-7 gibt einen Überblick über die untersuchten enzym-katalysierten Reaktionen. Sie zeigt, dass das Reaktionsverhalten des Novozym 435® (Cal B) sich deutlich von der Cal A unterscheidet. Während die Reaktion des Serinols und Vinyloctanoats mit dem Novozym 435® zu keinem Ergebnis bzw. Produkt führte, katalysierte die Cal A diese Reaktion, sodass das Serinol an der Aminofunktion acyliert wurde. Demnach konnte die Acylierung von Serinol nicht nur chemisch, sondern auch enzymatisch durchgeführt werden. Allerdings sollten bei den enzymatischen Synthesen die Ausbeuten noch optimiert werden, die im Vergleich zu den chemischen Synthesen (97 %, 687,5 mg, C16-Serinol) nur bei 33 (285 mg, C8-Serinol) und 37 % (54 mg, C12-Serinol) lagen.

5. Diskussion und Ausblick

Bisher werden in der Literatur zahlreiche Aufarbeitungsmethoden von glycerol-basierten Fermentationsbrühen beispielsweise zur Isolierung von 1,3-Propandiol, beschrieben [15, 22]. Jedoch wurde noch keine Methode zur Isolierung von Serinol aus einer Fermentationsbrühe aufgezeigt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einerseits Serinol aus einer glycerol-basierten Fermentationsbrühe zu isolieren und andererseits Serinol zu neuen Glycerolderivaten umzusetzen.

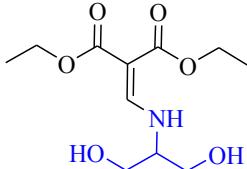
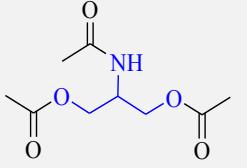
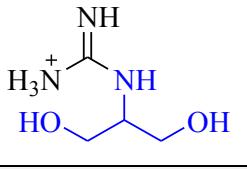
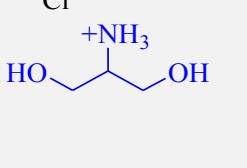
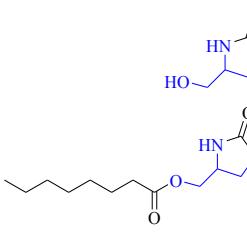
Die Strategien zur Erreichung des Ziels und die Ergebnisse wurden im vorangegangenen Kapitel 4 (Ergebnisse) erläutert und diskutiert. In diesem Kapitel sollen nun die einzelnen entwickelten Methoden und Synthesewege miteinander verglichen und diskutiert sowie Ansätze für weiterführende Arbeiten aufgezeigt werden.

Aufarbeitung

Wie bereits in Kapitel 4.1 erwähnt, wurden zur Aufarbeitung der Fermentationsbrühe fünf Derivatisierungsmethoden untersucht, da diese Methoden gegenüber den Alternativen wie der Sprühtröcknung und der Ionenaustauschchromatografie als effektiver eingeschätzt werden.

In der Weiterführung der Tabelle 4-2 (Tab. 5-1) werden die fünf untersuchten Methoden aufgeführt. Die getesteten Methoden unterscheiden sich in der Wahl des Derivatisierungsreagenzes und in der Durchführung der jeweiligen Derivatisierung. Zur Umsetzung des Serinols bestand zum einen die Möglichkeit, die Fermentationsbrühe bis zur Trockene einzubringen und dann den Rückstand zu derivatisieren (Peracetylierung, Guanidierung, Hydrochloridfällung). Zum anderen konnte die Derivatisierung direkt im Fermentationsmedium erfolgen und die gebildeten Derivate konnten anschließend durch Extraktion isoliert werden (Einführung der Bocv-Schutzgruppe). Bei der Anwendung des Zweiphasensystems bzw. der Phasentransferkatalyse sollte die Derivatisierung ebenfalls direkt in der Fermentationsbrühe erfolgen, aber das in der wässrigen Phase gebildete Derivat durch eine lipasen-katalysierte Reaktion so derivatisiert werden, dass es in der zweiten, organischen Phase löslich ist und dabei gleichzeitig extrahiert werden kann (Zyklisierung).

Die Tabelle 5-1 zeigt, dass sowohl bei der Peracetylierung als auch bei der Einführung der Bocv-Schutzgruppe eine präparative Menge des entsprechenden Serinolderivats isoliert werden konnte. Allerdings ist die Ausbeute des Peracetylserinols (14 %, 0,195 mg) gegenüber dem Bocv-Serinol (63,4 %, 0,622 g) deutlich geringer. Die Ursache für diesen Ausbeuteunterschied liegt darin, dass bei der Peracetylierung das während der Fermentation nicht umgesetzte Glycerol (ca. 17,6 g/L) ebenfalls acetyliert wird. Die zu diesem Zeitpunkt eingesetzte Menge an Acetanhydrid reichte jedoch nicht aus, um beide Verbindungen vollständig zu derivatisieren. Bei der Umsetzung zum Bocv-Serinol stört das noch vorhandene Glycerol dagegen nicht, da die verwendete Schutzgruppe selektiv nur die Aminofunktion derivatisiert.

Aufarbeitung der Fermentationsbrühen		
Getestete Methoden	Isolierte Ausbeute	Vorteile/Nachteile
Einführung Bevv-Schutzgruppe 	63,4 % (0,622 g)	Vorteile: <ul style="list-style-type: none"> • Direkte Derivatisierung • Isolierung farbloser Kristalle • Isolierung eines 2. Produktes 11 (2,4 g) • Glycerol stört bei der Aufarbeitung nicht
Peracetylierung 	14 % (0,195 g)	Vorteile: <ul style="list-style-type: none"> • Isolierung farbloser Kristalle Nachteile: <ul style="list-style-type: none"> • Derivatisierung erst nach Wasserentfernung • Glycerol stört bei Aufarbeitung, dadurch: • Großer Überschuss an Acetanhydrid • NAc-Gruppe schwer abzuspalten
Guanidierung 	Verbindung nicht isoliert	Vorteile: <ul style="list-style-type: none"> • Direkte Derivatisierung • Verbindung mittels LCMS nachweisbar • Geeignet im analytischen Maßstab Nachteile: <ul style="list-style-type: none"> • Verbindung konnte nicht isoliert werden • Glycerol stört bei der Aufarbeitung
Hydrochloridfällung 	Verbindung nicht isoliert	Vorteile: <ul style="list-style-type: none"> • Bildung des Serinol-Hydrochlorids mittels LCMS nachweisbar Nachteile: <ul style="list-style-type: none"> • Produkt kann nicht vollständig mit Aceton extrahiert werden • Viele Schritte, ohne dass andere Bestandteile abgetrennt werden
Zyklisierung 	15 % (41 mg) (nur in Acetonitril)	Vorteile: <ul style="list-style-type: none"> • Direkte Derivatisierung • Bildung des Oxazolidinons in der Realprobe mittels NMR nachweisbar Nachteile: <ul style="list-style-type: none"> • Glycerol stört bei der Isolierung • Nur peracetyliertes Glycerol isoliert • Veresterung der Hydroxylfunktion des Heterozyklus nur in Acetonitril erreicht

Tab. 5-1 Überblick über die Methoden zur Aufarbeitung der Fermentationsbrühen

Ein weiterer Vorteil der Einführung der Bevv-Schutzgruppe gegenüber der Peracetylierung ist, dass die Derivatisierung der Aminofunktion direkt im Fermentationsüberstand erfolgen

kann. Zur Peracetylierung des Serinols muss dagegen die Probe vollständig wasserfrei sein, weshalb bei dieser Methode mindestens ein Aufarbeitungsschritt mehr notwendig wird.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz zur Isolierung war die Guanidierung des Serinols. Eine interessante Eigenschaft des Guanidierungsproduktes ist die Komplexierung von Metallionen. Das Guanidinoseritol **8** wäre somit ein interessantes Additiv zur Wasserenthärtung gewesen. Bei dieser Methode kann die Bildung des gewünschten Produktes wie bei der Einführung der Bocv-Schutzgruppe ebenfalls direkt in der Fermentationsbrühe erfolgen. Allerdings gelang die Isolierung des Guanidinoseritols nicht, denn aufgrund der starken Polarität konnte das gebildete Derivat nicht in eine organische Phase extrahiert werden. Außerdem war neben dem gewünschten Produkt **8** auch noch Glycerol enthalten, was die Trennung aufgrund ähnlicher Polaritäten weiter erschwert. Die Guanidierung ist eine gute Methode, um Analyten zu derivatisieren und diese mittels GCMS oder LCMS zu vermessen. Zur Aufarbeitung von Fermentationsbrühen bzw. zur Isolierung präparativer Mengen ist diese Methode nicht geeignet.

Bei der Zyklisierung sollte ebenfalls wie bei der Guanidierung und der Einführung der Bocv-Schutzgruppe der Vorteil der direkten Derivatisierung genutzt werden. Seritol konnte direkt in der Fermentationsbrühe zu einem 4-Hydroxymethyl-1,3-oxazolidin-2-on umgesetzt werden. Allerdings war auch hier wie bei der Guanidierung die Abtrennung des Produktes vom Glycerol eine Herausforderung. Die Acetylierung beider Verbindungen führte nur zur Isolierung des peracetylierten Glycerols. Andererseits wurde versucht, ein geeignetes Zweisphasensystem zu finden, sodass die Zyklisierung in Wasser erfolgt, das Zyklisierungsprodukt mittels einer lipasen-katalysierten Reaktion zum 4-Octanoyl-1,3-oxazolidin-2-on derivatisiert und anschließend in eine organische Phase (Acetonitril) extrahiert wird. Die Veresterung unter Einsatz des Novozyms 435® verlief wenig erfolgreich. Es wurden 75 % des Ausgangsstoffes und nur 15 % des Produktes **6R,S** isoliert.

Die Fällung des Serinols als Hydrochlorid bietet im Gegensatz zu den anderen beschriebenen Methoden keine direkten Vorteile. Das Seritol wurde durch die Zugabe von HCl zur Fermentationsbrühe protoniert. Anschließend wurde das Wasser unter reduziertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mit Aceton versetzt und die Mischung drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt konnte sowohl im acetonhaltigen Filtrat als auch im Rückstand nachgewiesen werden. In all diesen Schritten erfolgte keine Abtrennung der anderen Bestandteile, sodass diese Methode nur in Kombination mit weiteren Aufarbeitungsschritten sinnvoll wäre.

Als beste Isolierungsmethode erwies sich eindeutig die Synthese des Bocv-Serinols. Einer der größten Vorteile, der in dieser Arbeit entwickelten Methode ist, dass das Seritol direkt in der Fermentationsbrühe ohne vorherige Entfernung des Wassers derivatisiert werden kann. Im Gegensatz zu den anderen vier Methoden lässt sich das gebildete Derivat durch Extraktion mit Ethylacetat isolieren. Bei dieser Methode stellt das Glycerol nicht wie bei der Peracetylierung, Guanidierung und Zyklisierung ein erschwerendes Hindernis dar.

Die Nutzung des Diethylethoxymethylenmalonats zur Schützung der Aminofunktion ist eine Schutzgruppentechnik, die in der vorliegenden Arbeit optimiert und auf die Fermentationsbrühe angepasst wurde, sodass das Seritol isoliert werden konnte. Diese

Schutzgruppentechnik wurde damit erstmals zur Aufarbeitung biotechnologischer Prozesse eingesetzt.

Mittels NMR- und LCMS-Messungen wurde der Reaktionsverlauf verfolgt. Des Weiteren konnte ein weiteres Produkt (**11**) isoliert werden, welches durch die Anwesenheit von Ammoniumsalzen gebildet wurde. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass sich diese Aufarbeitungsstrategie auf eine Reihe von Aminoverbindungen anwenden lassen sollte.

Neben der Optimierung der Fermentation im Hinblick auf eine bessere Umsetzung des Glycerols besteht für zukünftige Arbeiten ein großes Potential hinsichtlich der Optimierung der entwickelten Aufarbeitungsmethoden:

1. Optimierung der Peracetylierung: Berechnung der Acetanhydrid-Menge unter Berücksichtigung von sowohl Serinol als auch Glycerol
2. Entwicklung eines geeigneten Zweiphasensystems: Veresterung des Oxazolidinons mittels enzym-katalysierter Reaktion zur Extraktion des entstehenden Derivats in die organische Phase
3. Methode der Einführung des Boc-Schutzgruppe ist für eine Reihe von Aminoverbindungen geeignet: Untersuchung, ob diese Derivatisierung auch auf andere zu isolierende Aminoverbindungen aus komplexen Medien anwendbar ist

Bei einer besseren fermentativen Umsetzung des Glycerols könnten die hier diskutierten Aufarbeitungsmethoden ein deutlich besseres Ergebnis liefern und auch andere, nicht in Betracht gezogene Methoden in Frage kommen.

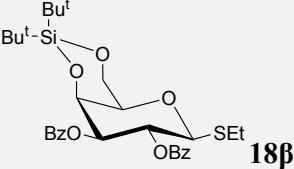
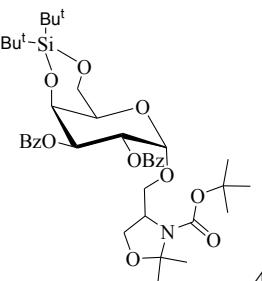
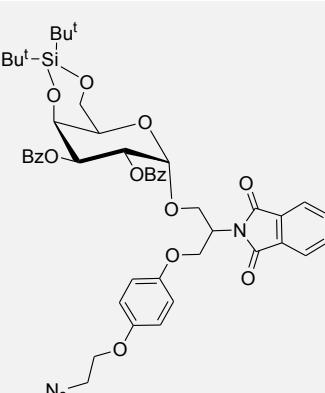
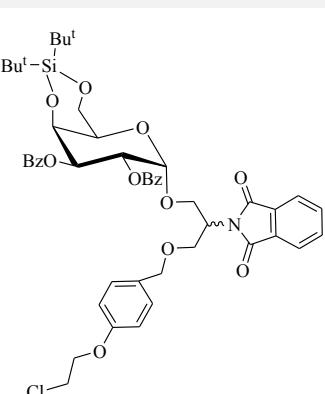
Chemische Synthesen

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten entsprechend der Aufgabenstellung Serinolderivate hergestellt werden. Serinolderivate können durch chemische oder enzym-katalysierte Reaktionen synthetisiert werden, wobei der Fokus in dieser Arbeit bei der rein chemischen Synthese lag.

Zur Synthese von Serinolderivaten wurde sowohl ein neuer S-Glycosyldonor als auch Glucosepentaacetat als O-Glycosyldonor eingesetzt. Bei den Glycosylierungsreaktionen diente Serinol als Akzeptor, wobei entweder nur die Aminofunktion durch geeignete Schutzgruppen (siehe Tab. 4-3) oder zusätzlich auch eine der Hydroxylfunktionen derivatisiert wurden (Synthese des Glycosylakzeptors **36R,S**).

Der Glycosylakzeptor **36R,S** wurde durch die Alkylierung des 2-Phthalimido-1-hydroxy-3-tosyl-serinols mit dem Kaliumsalz des Azidethoxyphenols mit einer Ausbeute von 10,5 % (27 mg) isoliert. Aufgrund der basischen Bedingungen der Alkylierung wurde eine N-CO-Bindung der Phthalimidgruppe gespalten und es konnten sich stabile Oxazolidinderivate bilden, weshalb nur eine geringe Ausbeute des Produktes erreicht wurde. Ein Nebenprodukt konnte mit einer Ausbeute von 13,5 % (19,9 mg) isoliert und als o-4-Hydroxymethyloxazolidin-benzoësäure identifiziert werden. Eine erfolgreiche Synthese des

Glycosylakzeptors **36R,S** konnte weder unter Verwendung von Mitsunobu-Bedingungen noch durch Alkylierung des Phthalimid-1-hydroxy-3-tosyl-serinols in Dimethylformamid mit Natriumhydrid oder im Zweiphasensystem erreicht werden.

Produkt	Isolierte Ausbeute	Aufarbeitung
 18β	63 % (190 mg)	Säulenchromatografie: (Petroleumether-Ethylacetat, 4:1)
 46	33 % (21 mg)	Gelchromatografie: ((50 x 2,5 cm Säule) Bio Beads S x 3 (200-400 mesh), Bio-Rad, Toluol)
 41	58 % (36,1 mg)	Gelchromatografie: ((50 x 2,5 cm Säule) Bio Beads S x 3 (200-400 mesh), Bio-Rad, Toluol) Präparative HPLC-Trennung: (Hexan-Ethylacetat/Isopropanol (99,5 %:0,5 %), 80:20) 2 Diastereomere
 44	71 % (74,4 mg)	Gelchromatografie: ((50 x 2,5 cm Säule) Bio Beads S x 3 (200-400 mesh), Bio-Rad, Toluol) Präparative HPLC-Trennung: (Hexan-Ethylacetat/Isopropanol (99,5 %:0,5 %), 80:20) 2 Diastereomere 2 Iodlderivate

Tab. 5-2 Übersicht über die synthetisierten Verbindungen S-Glycosyldonor und Glycosylprodukte (Ausbeute und Aufarbeitung)

Der S-Glycosyldonor **18β** wurde über vier Syntheseschritte synthetisiert. Dieser neue Glycosyldonor, Ethyl-4,6-*O*-Di-*tert*-butylsilandiyl-2,3-benzoyl-1-thio- β -D-galactopyranosid **18β**, wurde mit einer Ausbeute von 63 % (190 mg) erhalten.

Die Glycosylierungsreaktionen mit dem S-Glycosyldonor waren erfolgreich. Tabelle 5-2 zeigt den S-Glycosyldonor sowie die Glycosylprodukte. Es wurden Ausbeuten der Isomerengemische zwischen 33 und 71 % erreicht.

Zur Aufarbeitung der Glycosylprodukte wurde die Gelchromatografie mit Toluol als Eluent verwendet. Die Glycosylproduktgemische **41** und **44** wurden nach der Gelchromatografie mittels präparativer HPLC weiter aufgetrennt. Dabei konnten zwei reine Diastereomere **41** und **42** und zwei reine Diastereomere **44** und **45** sowie zwei Iodderivate **61** und **62** isoliert werden. Die Iodderivate wurden durch den Austausch eines Wasserstoffatoms des parasubstituierten Aromaten mit Iod gebildet, was durch das charakteristische Aufspaltungsmuster im ¹H-NMR-Spektrum sichtbar wird.

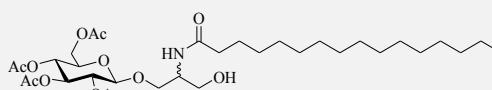
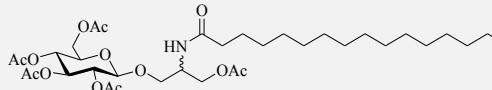
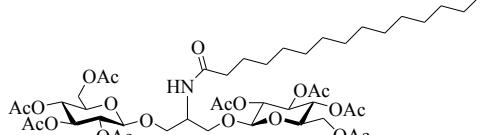
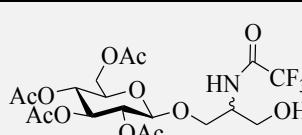
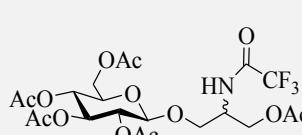
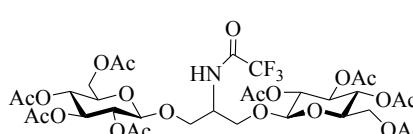
Bei allen drei durchgeführten Glycosylierungsreaktionen mittels des neuen S-Glycosyldonors **18β** wurden nur die α -Isomere erhalten, was mit den Literaturdaten übereinstimmt. Denn aufgrund der im Donorteil eingeführten Di-*tert*-butylsilandiylgruppe (DTBS-gruppe) laufen die Glycosylierungen nur α -selektiv ab, trotz des möglichen Nachbargruppeneffekts der Benzoylgruppe.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit O-Glycosylierungsreaktionen durchgeführt (siehe Tabelle 5-3). Im Gegensatz zu den S-Glycosylierungen wurden bei diesen Reaktionen nur die β -Isomere isoliert.

Es konnte gezeigt werden, dass die mono- und bis-glycosylierten *N*-Palmitoylserinolderivate in maximal drei Schritten hergestellt werden können, wobei die Ausbeuten in einem Bereich von 18-40 % lagen.

Die Glycosylierungen des *N*-Palmitoylserinols wurden aufgrund der schlechten Löslichkeit in Dichlormethan sowie in der Mischung Dichlormethan/Acetonitril erschwert. Unter der Verwendung von TFA-Serinol als Akzeptor stellte die Löslichkeit keine Probleme dar. Die Ausbeuten der TFA-Serinol-Glycosylierungen lagen in einem Bereich von 15-28 %.

Trotz eines Substratverhältnisses von Serinlderivat zum Glusosepentaacetat von 2:1 wurden kleine Mengen der disubstituierten Derivate mit einer Ausbeute von 4 % erhalten.

Produkt	Isolierte Ausbeute	Aufarbeitung
 47	18-40 % (19-25,5 mg)	Gelchromatografie: ((50 x 2.5 cm Säule) Bio Beads S x 3 (200-400 mesh), Bio-Rad, Toluol)
 48		
 49	4 % (6 mg)	
 51	15-28 % (43 mg)	Gelchromatografie: ((50 x 2.5 cm Säule) Bio Beads S x 3 (200-400 mesh), Bio-Rad, Toluol)
 52		
 53	4 % (16mg)	

Tab. 5-3 Übersicht über die synthetisierten Glycosylprodukte mit Glucosepentaacetat als Donor (Ausbeute und Aufarbeitung)

Enzymatische Synthesen

Neben den Glycosylierungsreaktionen wurden auch lipasen-katalysierte Reaktionen untersucht.

Bei der Verwendung des Novozyms 435® (Cal B) und der Cal A konnte ein deutlicher Unterschied im Reaktionsverhalten festgestellt werden. Während das Novozym 435® bei der Umsetzung von Serinol und Vinyl-n-octanoat in Acetonitril sehr wahrscheinlich zerstört wurde und es zu keiner Reaktion kam, katalysierte die Cal A die Acylierung der Aminofunktion im Serinol.

Wurde die Aminofunktion des Serinols dagegen geschützt, katalysierte das Novozym 435® nun auch die Veresterung der Hydroxylgruppen, sodass mit Vinyl-n-octanoat sowohl der Mono- als auch der Diester hergestellt und isoliert werden konnte.

Substrat	Enzym	Resultat
Serinol + Vinyl-n-octanoat in Acetonitril	Novozym 435® (= Cal B)	Keine Reaktion
<i>N</i> -Acetylserinol + Vinyl-n-octanoat in Acetonitril	Novozym 435® (= Cal B)	Weiße Kristalle (67 %, 390 mg) <i>N</i> -Acetyl-mono- <i>O</i> -octanoyl-serinol (Monoester) 57R,S (53 %, 456 mg) <i>N</i> -Acetyl-bis- <i>O</i> -octanoyl-serinol (Diester) 58
Serinol + Vinyl-n-octanoat in Acetonitril	Cal A	Weiße, nadelförmige Kristalle (33 %, 285 mg), <i>N</i> -Octanoylserinol (C8-Serinol) 54
Serinol + Vinyl-n-laurat in Acetonitril	Cal A	Weißer Niederschlag (37 %, 54 mg), <i>N</i> -Lauroylserinol (C12-Serinol) 55

Tab. 5-4 Überblick über die lipasen-katalysierten Reaktionen

Die Acylierung des Serinols kann demnach sowohl auf chemischem als auch enzymatischem Weg erfolgen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten und diskutierten Reaktionen könnten hinsichtlich ihrer Ausbeute noch weiter optimiert und hinsichtlich ihrer Anwendung untersucht und die Produkte weiter bzw. anders derivatisiert werden:

1. Abspaltung der Schutzgruppen:

- Durch die Abspaltung der Schutzgruppen könnten die Verbindungen **41** und **44** Anwendung in der Synthesechemie finden. Sowohl die funktionellen Gruppen des Galactoserestes als auch die Aminofunktion im Serinolteil bieten viele Derivatisierungsmöglichkeiten.
- Die Abspaltung der Acetylgruppen der mono- und bisglycosylierten *N*-Palmitoylserinolderivate würde ebenfalls die Möglichkeit bieten, die glycosylierten Derivate weiter zu derivatisieren. Aufgrund des amphiphilen

Charakters könnten diese Verbindungen auch Anwendung in der Tensidchemie finden.

6. Zusammenfassung

Die Aufarbeitung von glycerol-basierten Fermentationsbrühen insbesondere die Isolierung von Serinol, stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Außerdem wurden verschiedene Synthesemethoden zur Derivatisierung von Serinol auf chemischem und enzymatischem Weg untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Strategien und Ergebnisse zur Aufarbeitung glycerol-basierter Fermentationsbrühen erläutert und diskutiert. Dabei wurden drei Herangehensweisen in Betracht gezogen (vgl. Tabelle 2-2). Die Aufarbeitung mittels Derivatisierung, Sprühtröcknung und Ionenaustauschchromatografie wurde untersucht. Nach einigen Vorversuchen stellte sich die Derivatisierung als die geeignete Methode heraus. Innerhalb der zahlreichen Derivatisierungsmöglichkeiten wurden fünf Aufarbeitungsmethoden ausgewählt (siehe Tabelle 5-1), wobei sich die Einführung der Bevc-Schutzgruppe als die Methode der Wahl herausstellte. Aus 30 g/L Glycerol wurden im Basalmedium mit dem Bakterium *Shimwellia blattae* 7 g/L Serinol erzeugt. Die Ergebnisse der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Bevc-Schutzgruppen-Methode sind im Folgenden kurz dargestellt:

- 63,4 % (0,622 g) des Bevc-Serinols **10** wurden aus der Fermentationsbrühe isoliert.
- Bevc-Serinol **10** wurde erstmalig synthetisiert.
- Die Verbindung kristallisiert in Form großer farbloser Kristalle aus.
- sehr gute Löslichkeit der Substanz in polaren und mittelpolaren Lösungsmitteln wie Ethylacetat
- Die Bildung des Bevc-Serinols beginnt sofort nach der Zugabe des Derivatisierungsreagenzes
- Es wurde ein zweites Produkt isoliert: Bevc-Amin **11**.
- Mit dieser Methode könnte sehr wahrscheinlich eine Vielzahl von Aminoverbindungen aus komplexen Medien isoliert werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse der Glycosylierung von Serinol sowie die lipasen-katalysierten Reaktionen diskutiert. Es konnten vier neuartige Verbindungen, die in der Literatur bisher nicht beschrieben worden sind, synthetisiert und isoliert werden:

Produkt	Isolierte Ausbeute	
S-Glycosyldonor 18β	63 % (190 mg)	
Glycosylakzeptor 36R,S	10,5 % (27 mg)	
Glycosylprodukt 41	58 % (36,1 mg)	2 Diastereomere
Glycosylprodukt 44	71 % (74,4 mg)	2 Diastereomere, 2 Iodlderivate

Tab. 6-1 Synthetisierte, neuartige Verbindungen

Darüber hinaus wurden weitere Serinolderivate synthetisiert:

Synthese von Serinolderivaten			
chemische Synthesen		Enzym-katalysierte Synthesen	
Produkt	Isolierte Ausbeute	Produkt	Isolierte Ausbeute
<i>N</i> -Palmitoyl-1-hydroxy-3-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucosepyranosyl)-serinol 47	10 % (10 mg)	<i>N</i> -Acetyl-mono- <i>O</i> -octanoylserinol 57R,S	67 % (390 mg)
<i>N</i> -Palmitoyl-1-acetyl-3-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucosepyranosyl)-serinol 48	15 % (15,5 mg)	<i>N</i> -Acetyl-bis- <i>O</i> -octanoylserinol 58	53 % (456 mg)
<i>N</i> -Palmitoyl-1,3-bis-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucosepyranosyl)-serinol 49	4 % (6 mg)	<i>N</i> -Octanoylserinol 55	33 % (285 mg)
TFA-1-hydroxy-3-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucosepyranosyl)-serinol 51	6,9 % (19 mg)	<i>N</i> -Lauroylserinol 56	36,6 % (54 mg)
TFA-1-acetyl-3-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucosepyranosyl)-serinol 52	8,1 % (24 mg)		
TFA-1,3-bis-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucosepyranosyl)-serinol 53	4 % (16 mg)		

Tab. 6-2 Zusammenfassung der chemisch und enzymatisch hergestellten Serinolderivate

Fazit:

Es konnte erstmalig eine glycerol-basierte Fermentationsbrühe erfolgreich aufgearbeitet werden.

Aus einem Reaktionsansatz von 50 mL Basalmedium mit 0,350 g Serinol konnten 0,622 g (63,4 %) Becv-Serinol isoliert werden. Zusätzlich konnten unter anderem ein neuer Glycosyldonor und drei neuartige Serinolderivate (vgl. Tab. 6-1) dargestellt werden.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen einen möglichen Weg, Glycerol zu verarbeiten und aufzuwerten. Durch Fermentation wurde Glycerol im Basalmedium mit dem Bakterium *Shimwellia blattae* zu Serinol umgesetzt und in der vorliegenden Arbeit dieses aus dem Medium isoliert. Das Serinol wurde zusätzlich zu neuen hochwertigen Verbindungen, wie langketigen Amiden oder glycolipid-ähnlichen Serinolderivaten (vgl. Kapitel 4.2), umgesetzt.

Es wurde gezeigt, dass grundsätzlich eine Wertsteigerung des Glycerols durch die Kombination der Fermentation mit der Isolierung und der anschließenden Derivatisierung möglich ist.

Zusammenfassung

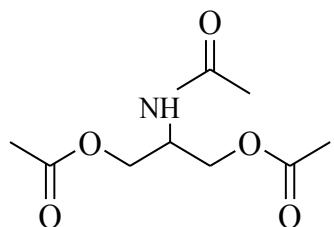
Im Hinblick auf noch höhere Ausbeuten und eine höhere Wirtschaftlichkeit müssten Optimierungen bei der fermentativen Umsetzung von Glycerol, der anschließenden Isolierung des Produktes sowie der synthetisierten Derivate erfolgen.

7. Experimenteller Teil

7.1 Aufarbeitung der Fermentationsbrühe

7.1.1 Synthesebedingungen

Peracetylserinol 2



Variante in Wasser

Das vom Serinol (0,012 mol, 1 g, 1 eq) aufgenommene Wasser wird mit abs. Pyridin codestilliert. Das Serinol wird dann in abs. Pyridin (5 mL) gelöst. Die Lösung wird mittels Eisbad auf 0 °C heruntergekühlt und das Acetanhydrid (0,033 mmol, 3,11 mL, 3 eq) wird zugegeben. Die Reaktionslösung röhrt über Nacht bei Raumtemperatur (23 °C). Die Reaktionslösung wird anschließend mit Methanol (100 µL) versetzt und eine halbe Stunde gerührt. Die Reaktionslösung wird in einen Schütteltrichter, gefüllt mit Eis, überführt und mit Dichlormethan (4 x 20 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen werden dann mit NaHSO₄ (3 x 20 mL), NaHCO₃ (3 x 20 mL) sowie einmal Wasser (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird durch Filtration durch Baumwollwatte getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wird das peracetylierte Serinol in Form farbloser Kristalle mit einer Ausbeute von 72 % (1,9 g) erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ_H: 7,97 (d, ³J = 7,9 Hz, 1H, NH), 4,26 – 4,10 (m, 1H, CH), 4,10 – 3,90 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,01 (s, 6H, 2 x COCH₃), 1,82 (s, 3H, NCOCH₃).

¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-d₆) δ_C: 170,2 (2 x COCH₃); 169,4 (NCOCH₃); 62,6 (2 x CH₂); 46,7 (CH); 22,5 (CH₃); 20,6 (2 x CH₃).

Variante in der Fermentationsbrühe

250 mL der Fermentationsbrühe (0,0066 mol, 0,6 g, 1 eq) werden unter reduziertem Druck zur Trockne eingeengt und anschließend im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wird dann in abs. Pyridin (50 mL) gelöst. Der Rückstand ist nicht vollständig löslich in Pyridin. Die Temperatur wird mittels Eisbad auf 0 °C gesenkt und das Acetanhydrid wird langsam (0,2 mol, 18,7 mL, 30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur (23 °C) gerührt. Die Reaktion wird mit Methanol (2 mL) gequencht und eine halbe Stunde gerührt. Die Reaktionslösung wird in einen Schütteltrichter, gefüllt mit Eis, überführt und mit Dichlormethan (4 x 20 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen werden dann mit NaHSO₄ (3 x 20 mL), NaHCO₃ (3 x 20 mL) sowie einmal Wasser (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird durch Filtration durch Baumwollwatte getrocknet und das

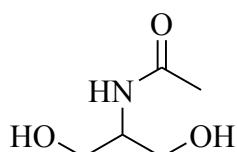
Experimenteller Teil

Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wird das peracetylierte Serinol in Form farbloser Kristalle mit einer Ausbeute von 13,6 % (195 mg) erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ_H: 7,97 (d, ³J = 7,9 Hz, 1H, NH), 4,26 – 4,10 (m, 1H, CH), 4,10 – 3,90 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,01 (s, 6H, 2 x COCH₃), 1,82 (s, 3H, NCOCH₃).

¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-d₆) δ_C: 170,2 (2 x COCH₃); 169,4 (NCOCH₃); 62,6 (2 x CH₂); 46,7 (CH); 22,5 (CH₃); 20,6 (2 x CH₃).

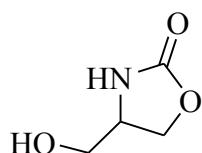
N-Acetylserinol 3



Das Peracetylserinol (0,008 mol, 1,75 g, 1 eq) wird in 20 mL gelöst. Zur Lösung wird eine Spatelspitze Natriummethanolat zugegeben und die Reaktionslösung für 2 h bei Raumtemperatur (24 °C) gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wird die Lösung mittels Ionenaustauscher neutralisiert. Der Ionenaustauscher wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wird in Form farbloser Kristalle mit einer Ausbeute von 75 % (0,8 g) erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ_H: 7,52 (d, ³J = 7,9 Hz, 1H, NH), 4,56 (s, 2H, OH), 3,76 – 3,58 (m, 1H, CH), 3,50 – 3,22 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,80 (s, 3H, CH₃).

4-Hydroxymethyl-1,3-oxazolidin-2-on 4R,S



Variante in Wasser

Serinol (1,04 g, 11,4 mmol, 3 eq) wird in 18 mL destilliertem Wasser gelöst und Natriumcarbonat (4,23 g, 11,4 mmol, 3 eq) wird zugegeben. Anschließend wird langsam das Triphosgen (1,13 g, 3,8 mmol, 1 eq) in Portionen zugegeben. Die Reaktion röhrt über Nacht bei Raumtemperatur (23°C). Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung mit Dichlormethan (2 x 10 mL) gewaschen. Im Anschluss wird dann 1 M HCl-Lösung sowie 20 mL Ethanol zugegeben, sodass ein weißer Niederschlag ausfällt. Das Lösungsmittel der wässrigen Phase wird unter reduziertem Druck entfernt. Der zurückbleibende weiße Feststoff wird mit heißem Ethanol extrahiert. Das Ethanol wird im Vakuum entfernt. Es werden farblose Kristalle des Produktes mit einer Ausbeute von 60 % erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ_H: 7,58 (s, 1H, NH), 4,97 (t, ³J = 5,5 Hz, 1H, OH), 4,30 (t, ³J = 8,5 Hz, 1H, CHH), 4,05 (dd, ³J = 8,5 Hz; ³J = 5,0 Hz, 1H, CHH) 3,81 – 3,65 (m, 1H, CH), 3,40 – 3,31 (m, 2H, CH₂OH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ_C: 159,0 (CO); 66,4 (OCH₂); 62,7(CH₂OH); 53,2(CH).

Variante in der Fermentationsbrühe

Zu 50 mL der Fermentationsbrühe (Basalmedium) wird das Natriumcarbonat (19,2 mmol, 2,03 g, 5 eq) gegeben. Anschließend wird das Triphosgen (6,4 mmol, 1,88 g, 1,65 eq) portionsweise zugegeben und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur (24 °C) über Nacht gerührt. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan (3 x 20 mL) gewaschen und mit 4 M HCl angesäuert. Ethanol wird zugegeben und die ethanolische Phase im Vakuum eingeengt. Der verbleibende beige Feststoff wird mit heißem Ethanol aufgenommen, filtriert, abgekühlt und getrocknet. 1,236 g Rohprodukt wurden erhalten. Im Rohprodukt ist sowohl das Glycerol als auch das 4-Hydroxymethyl-1,3-oxazolidin-2-on zu finden.

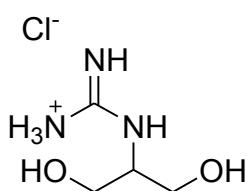
Zur Trennung von Glycerol und 4-Hydroxymethyl-1,3-oxazolidin-2-on wurde das Rohprodukt in Pyridin (5 mL) gelöst und 2 mL Acetanhydrid zugegeben. Die Reaktionslösung rührte für 2,5 h bei Raumtemperatur. Da die Umsetzung nicht vollständig war, wurden weitere 2 mL des Acetanhydrids zur Reaktionslösung gegeben. Nach 5 h wurde die Reaktion mit Methanol quenched und die Reaktionslösung in einen Schütteltrichter mit Eis überführt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (4 x 20 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit NaHSO₄-lsg. (3 x 20 mL) und NaHCO₃-Lsg. (3 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird durch Filtration durch Baumwollwatte getrocknet und der Überschuss des Lösungsmittels unter reduziertem Druck entfernt.

Es wurde eine Mischfraktion und eine reine Fraktion erhalten. Es konnte nur das peracetylierte Glycerol isoliert werden (420 mg).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 5,09 – 4,99 (m, 1H, CH), 4,11 (dd, ³J = 12,0 Hz, ³J = 4,3 Hz, 2H, CH₂), 3,97 (dd, ³J = 12,0 Hz, ³J = 5,9 Hz, 2H, CH₂), 1,89 (s, 3H, CH₃), 1,88 (s, 6H, 2 x CH₃),

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C: 169,9 (2 x CH₃); 169,5 (CH₃); 68,6 (CH); 61,8 (2 x CH₂); 20,3 (CH₃); 20,1(2 x CH₃).

Guanidinoserinol 8



Variante in Wasser

Serinol (2,2 mmol, 200 mg, 1 eq) und *O*-Methylisourea-Hemisulfat (13,2 mmol, 1,63 g, 6 eq) werden in 10 mL destillierten Wasser gelöst. Der pH-Wert der Reaktionslösung wird mit 2 M

NaOH-Lösung auf 10 eingestellt und für 20 min auf 65 °C erhitzt und dann über Nacht bei Raumtemperatur (23 °C) gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Natriumsulfat mit 4 M HCl in Ethanol gefällt. Nach der Filtration des Niederschlages wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit 20 mL Ethanol versetzt und der Niederschlag abfiltriert. Der farblose Sirup enthält immer noch ein Rest an Natriumsulfat und *O*-Methylisoharnstoff. Es wurde insgesamt 540 mg Natriumsulfat gefällt und 1,1 g Rohprodukt erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ_H: 4,11 – 3,87 (m, 13H, Edukt), 3,87 – 3,53 (m, 10H), 3,47 – 3,36 (m, 1H, NCH),

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O) δ_C: 162,8; 162,5; 60,6; 58,6; 57,4; 57,4; 55,5; 54,1.

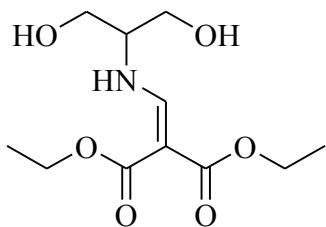
Variante in der Fermentationsbrühe

Zu 20 mL der Fermentationsbrühe (Basalmedium) wird das *O*-Methylisourea-Hemisulfatsalz (7,2 mmol, 0,889 g, 6 eq) gegeben. Der pH-Wert der Reaktionslösung wird mit 2 M NaOH-Lösung auf 10 eingestellt und für 20 min auf 65 °C erhitzt und dann über Nacht bei Raumtemperatur (23 °C) gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Natriumsulfat mit 4 M HCl in Ethanol gefällt. Nach der Filtration wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit 20 mL Ethanol versetzt und der Niederschlag abfiltriert. Der dunkelbraune Sirup enthält immer noch einen Rest an Natriumsulfat, Glycerol sowie *O*-Methylisoharnstoffe. Es wurde insgesamt 997 mg Natriumsulfat gefällt und 1,65 g Rohprodukt erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ_H: 3,99 (s, 7H, Edukt), 3,88 – 3,66 (m, 7H), 3,66 – 3,47 (m, 17H, Produkt/Glycerol), 3,47 – 3,35 (m, 1H),

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O) δ_C: 162,8; 72,0 (Glycerol); 62,5 (Glycerol); 58,6; 57,4; 57,4; 54,1; 16,8.

Becv-Serinol 10



Variante in Wasser

Serinol (0,01 mol, 1 g, 1 eq) wird in 50 mL destilliertem Wasser gelöst und anschließend wird das Diethylethoxymethylenmalonat (0,014 mol, 2,86 mL, 1,3 eq) zur Lösung gegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung der Ausgangsstoffe wird die Reaktionslösung in einen Schütteltrichter überführt und mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen werden

über Baumwollwatte getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wird das Produkt mit einer Ausbeute von 90 % (2,3 g) erhalten.

Variante in der Fermentationsbrühe

Zu einer Fermentationsbrühe, welche 350 mg Serinol enthält (0,004 mol, 1 eq), wird Natriumcarbonat zugegeben, bis die Lösung gesättigt ist. Anschließend wird Diethylethoxymethylenmalonat (0,019 mol, 3,877 mL, 5 eq) zugegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur (23 °C) gerührt. Nach vollständiger Umsetzung der Ausgangsstoffe wird die Reaktionslösung in einen Schütteltrichter überführt und mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen werden über Baumwollwatte getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Zur Aufarbeitung des Rohproduktes wird die Säulenchromatografie (Ethylacetat-Heptan, 2:1, 1:1, Ethylacetat-Methanol 9:1) verwendet. Der Überschuss des Lösungsmittels wird unter reduziertem Druck entfernt und farblose Kristalle werden erhalten. Das 2,2-(Bisethoxycarbonyl)vinyl-serinol wird mit einer Ausbeute von 63,4 % (0,662 g, $R_F = 1,4$, Ethylacetat-Heptan, 2:1) isoliert.

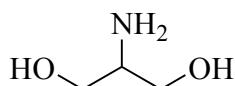
$M_p = 92-94 \text{ } ^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} : 9,20 (dd, $^3J = 14,5 \text{ Hz}$, $^3J = 7,8 \text{ Hz}$, 1H, NH), 8,04 (d, $^3J = 14,6 \text{ Hz}$, 1H, CH_{Olefin}), 4,96 (t, $^3J = 5,0 \text{ Hz}$, 2H, 2 x OH), 4,16 – 3,97 (m, 4H, 2 x CH_{2,Ethyl}), 3,64 – 3,37 (m, 4H, 2 x CH_{2,Serinol}), 1,30 – 0,91 (m, 6H, 2 x CH_{3,Ethyl}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} : 168,1 (CO); 165,3(CO); 159,7 (CH_{Olefin}); 87,9 (CCH_{Olefin}); 62, (CH_{Serinol}); 60,7 (CH_{2,Serinol}); 58,8 (CH_{2,Ethyl}); 58,6 (CH_{2,Ethyl}); 14,4 (CH_{3,Ethyl}); 14,3 (CH_{3,Ethyl})

Elementaranalyse: Kalkuliert: C: 50,57 H: 7,33 N: 5,36, gefunden: C: 50,53 H: 7,39 N: 5,46.

Abspaltung der Bevv-Gruppe

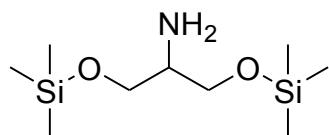


Das 2,2-(Bisethoxycarbonyl)vinyl-serinol (1,9 mmol, 500 mg, 1 eq) wird in 5mL Ethanol gelöst. Anschließend wird das Ethylen diamin (6,9 mmol, 465 μL , 3,6 eq) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 48 h bei Raumtemperatur (22 °C) gerührt. Die ethanolische Lösung wird mit Wasser (20 mL) verdünnt und mit Ethylacetat (3 x 5 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel der wässrigen Phase wird unter reduziertem Druck entfernt. Es wird ein brauner Rückstand erhalten. Der Rückstand wird mit 20 mL Acetonitril versetzt und auf 45 °C für 2 h erhitzt. Der Rückstand wird nicht vollständig gelöst. Die Acetonitrilphase wird dekantiert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wird das reine Serinol mit einer Ausbeute von 79 % (140 mg) erhalten.

7.1.2 Analyse

7.1.2.1 Bestimmung des Serinolgehalts in der Fermentationsbrühe mittels GCMS

Für die Bestimmung des Serinolgehalts in der Fermentationsbrühe wird die GCMS genutzt. Um Serinol in der Fermentationsbrühe zu bestimmen, wird es mittels Trimethylsilylimidazol derivatisiert.



Für die Derivatisierung wird 20 mg reines Serinol (98 %) in 500 μ L des Trimethylsilylimidazols in Pyridin gelöst und die Reaktionslösung für 1 h bei 60 °C gerührt. Für die Kalibrierung des Gerätes wird eine Verdünnungsreihe der Bis-*O*-(trimethylsilyl)serinollösung (g/L: 0,5; 1,0; 4,5; 9,0) hergestellt und mittels GCMS (ITQTM, Thermo Scientific) vermessen. Es wird folgendes Temperaturprogramm verwendet:

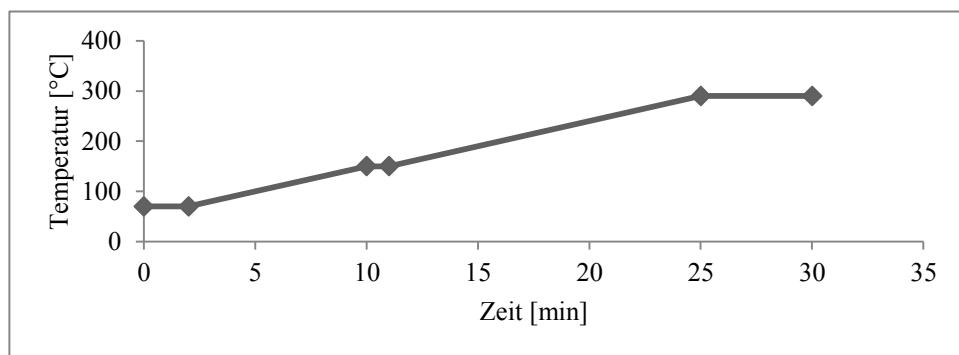


Abb. 7-1 Temperaturprogramm

Der Vorteil der Derivatisierung ist, dass nur die Hydroxylgruppen geschützt werden. Diese Tatsache ermöglicht die Unterscheidung von Serinol und Glycerol im Chromatogramm. Das Chromatogramm zeigt drei Peaks. Beim ersten Peak, der bei einer Retentionszeit von 6,90 min erscheint, handelt es sich um das Trimethylsilylimidazol. Das Bis-*O*-(trimethylsilyl)serinol wird bei einer Retentionszeit von 8,05 min und das Glycerolderivat bei 9,33 min (Abb. 6-2) eluiert. Der Vergleich des Referenzchromatogramms mit dem Chromatogramm der Fermentationsbrühe zeigt keine Unterschiede bei der Anzahl und der Retentionszeit der Peaks. Es wurde ein Serinolgehalt der Fermentationsbrühe (Basalmedium, *Shimwellia blattae*) von 7 g/L bestimmt.

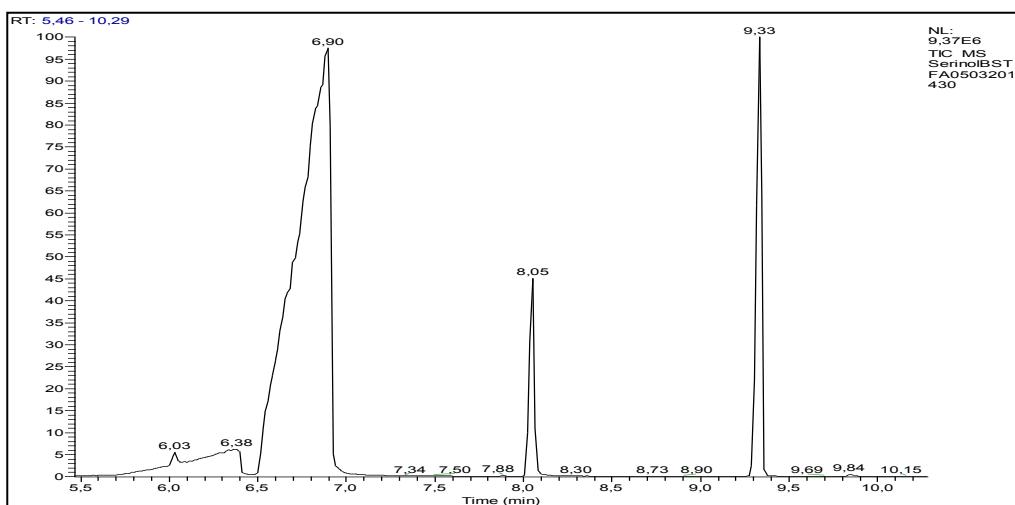
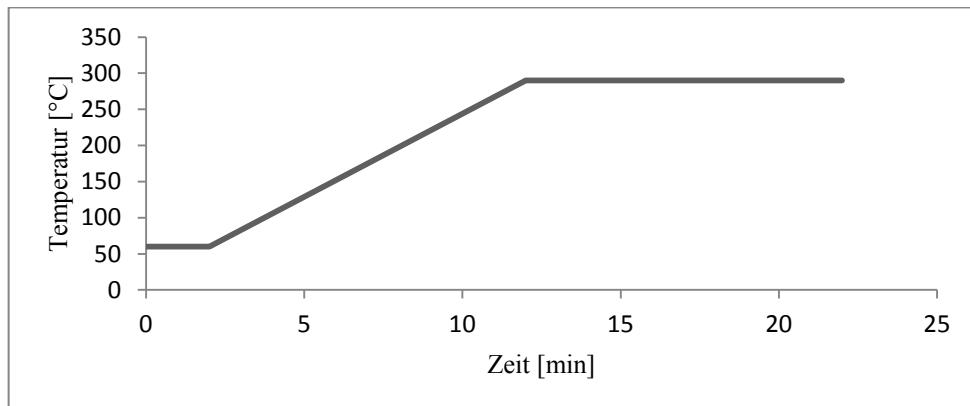


Abb. 7-2 GC-Chromatogramm der Fermentationsbrühe (*Shimwellia blattae*, Basalmedium). 100 µL der Fermentationsbrühe wurden zur Trockene eingeengt und mittels Trimethylsilylimidazol derivatisiert.

7.1.2.2 Nachweis von Serinol nach der Sprühtrocknung der Fermentationsbrühe

Bevor die Proben mittels GCMS vermessen wurden, wurde die Probe aus dem Sprühtrockner derivatisiert. Dazu wurden 10 - 20 mg Probe mit 300 µL abs. Pyridin und 20 µL BSTFA versetzt (1-mL-Vial). Die Reaktionslösung wurde 1h bei 60 °C im Thermoblock erhitzt. Zum Vermessen wurde die so derivatisierte Probe in ein GCMS-Vial mit Mikrolitereinsatz pipettiert und mit folgendem Temperaturprogramm vermessen:



Tab. 7-1 Temperaturprogramm

Es wurde die Splitless-Injektion und die TG5 MS-Säule bei dieser Methode verwendet.

Reaktionsverlauf des Becv-Serinols (LCMS)

Zur Messung des 2,2-Bis(ethoxycarbonyl)vinyl-serinols wurde die LCMS (Thermo Fisher Scientific, LTQ velos oder LTQTM) verwendet. Zur Auf trennung wurde eine Kinetex C18 Säule (150 x 3mm, 2,1 μ m (Phenomenex)) und eine Säulen temperatur von 35 °C verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 5 μ L und die Messlaufzeit 25 min. Die Proben werden im positiven und negativen Scanevent gemessen.

Es wird folgender Gradient für die Eluenten verwendet:

Zeit [min]	MeOH + 0,1 % Fac [%]	H ₂ O + 0,1 % Fac [%]	Fluss [μ L/min]
0,00	40	60	200
10,00	95	5	200
20,00	95	5	200
30,00	80	20	200
35,00	40	60	200
40,00	40	60	200

Dieselben LCMS-Parameter wurden auch zur Messung des Guanidinoserinols sowie des Serinol-Hydrochlorids verwendet.

7.1.2.3 Trennung der mono- und bisglycosylierten Serinolderivate mittels Größenauschlusschromatografie

Gelchromatografie

Die Abbildung 7-3 zeigt die verwendete Gelchromatografie anlage. Sie besteht aus einer 50 x 2,5 cm-Glassäule. Als stationäre Phase werden *Biobeads* S x 3 (200-400 mesh, Bio-Rad) verwendet. Als Eluent diente entgastes Toluol. Das Säulenmaterial wurde vor der Anwendung mit 40 mL entgastem Toluol gespült. Anschließend wurde die Probe aufgegeben und das Vorratsgefäß mit Toluol gefüllt. Nach weiteren 40 mL (Todvolumen) wurde die Probe eluiert und mittels Differential-Refraktometer der Firma Knauer und angeschlossenem Schreiber analysiert und aufgezeichnet. Die aufgetrennten Verbindungen wurden im angeschlossenen Fraktionssammler erfasst.



Abb. 7-3 Aufbau der Gelchromatografie. Moskau, Zelinsky Institut für Organische Synthese

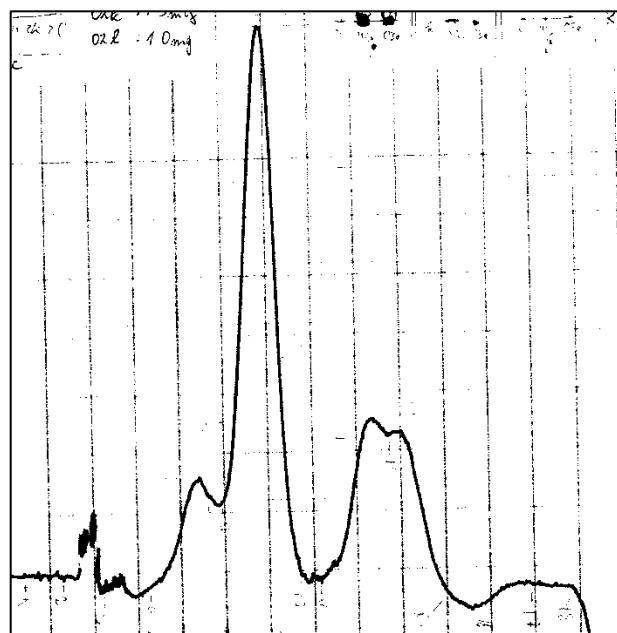


Abb. 7-4 Aufgezeichnetes Chromatogramm der Glycosylproduktmischung

7.2 Chemische Synthese von Serinolderivaten

7.2.1 Allgemeine Methoden

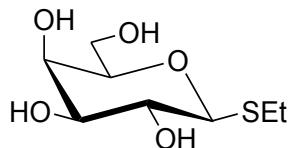
Alle Reaktionen, die empfindlich gegenüber Luft oder Feuchtigkeit sind, wurden unter Argonatmosphäre und mit wasserfreien Lösungsmitteln durchgeführt. Die Reaktionen wurden mit kommerziellen Reagenzien von Sigma Aldrich, Merck, Acros Organics und VWR durchgeführt und alle Lösungsmittel vor der Verwendung frisch destilliert. Kieselgel 60 (40-

63 µm, Merck) wurde für die Säulenchromatografie genutzt und die Dünnschichtchromatogramme auf Platten mit Kieselgel 60 auf Aluminiumfolie von Merck durchgeführt. Die Visualisierung der Zuckermolekülsspots wurde unter UV-Licht und durch Erhitzen nach Eintauchen in einer Mischung von 85 % wässriger Phosphorsäure in 95 % Ethanol in einem Verhältnis von 1:10 (v/v) realisiert. Alle anderen Verbindungen wurden durch Chlorgas und Toluidinlösung, I₂-Dampf sowie Moläbdatophosphorsäure in Ethanol visualisiert.

Die NMR-Spektren wurden auf einem Bruker AC-200 Instrument (200,13 und 50,32 MHz), einem Bruker AM-300 instrument (300,13 und 75,48 MHz) sowie auf den Geräten Bruker AVANCE 250, AVANCE 300 bzw. AVANCE 500 und 600 bei 20 °C aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen wurden auf die Lösungsmittelsignale von CDCl₃ (δ _H 7,27, δ _C 77,0), CHD₂OD (δ _H 3,31, δ _C 49,0) oder DMSO-d₆ (δ _H 2,5, δ _C 39,5). Hochauflösungsmassenspektrometrie (HRESIMS) im positiven Scanevent mit einem Bruker micro TOF II Massenspektrometer (Proben gelöst in MeCN oder MeOH) in Moskau durchgeführt. In Rostock wurden die Massenspektren mit der LTQTM oder velos pro (beide Anlagen von Thermo Scientific) im positiven und negativen Scanevent aufgenommen.

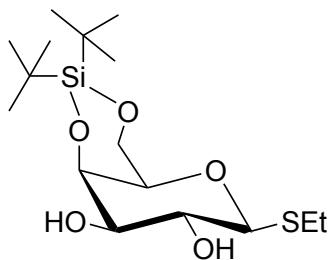
7.2.2 Synthese des Glycosyldonors

Ethyl-1-thio-2,3,4,6-tetra-hydroxy-β-D-galactopyranosid 16β



Ethyl-1-thio-2,3,4,6-tetra-acetyl-β-D-galactopyranosid (2,54 mmol, 1 g) wird in trockenem Methanol (10 mL) gelöst. 100 µL NaOMe werden hinzugefügt und die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur (21 °C) gerührt. Die Lösung wird durch die Zugabe von Ionenaustauscher (Dowex) neutralisiert und der Überschuss des Lösungsmittels unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet und es werden farblose Kristalle des gewünschten Produktes mit einer Ausbeute von 98,1 % (558,8 mg, R_F= 0,51 (DCM:MeOH, 9:1)) erhalten.

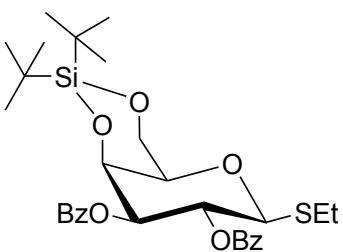
¹H-NMR (300 MHz, MeOD) δ _H: 4,26 (d, ³J_{1,2} = 9,3 Hz, 1H, H-1), 3,82 ('d', ³J_{4,3} = 3,0 Hz, 1H, H-4), 3,73 – 3,56 (m, 2H), 3,53 – 3,35 (m, 3H), 3,27 – 3,22 (m, 1H), 2,79 – 2,55 (m, 2H), 1,22 (t, ³J = 7,4 Hz, 3H, SCH₂CH₃).

Ethyl-4,6-*O*-Di-*tert*-butylsilyl-2,3-hydroxy-1-thio- β -D-galactopyranosid 17 β 

Ethyl-1-thio- β -D-galactopyranosid (0,89 mmol, 200 mg, 1 eq) wird in Vakuum getrocknet und in trockenem DMF (2 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wird dann mit einem Acetonitril/Trockeneisbad auf -40 °C gekühlt. Nach Einstellung der gewünschten Temperatur wird Di-*tert*-butylsilyl-bis-(trifluoromethansulfonat) (0,89 mmol, 0,288 mL, 1 eq) tropfenweise hinzugegeben. Die Lösung wird weitere 30 min bei -40 °C gerührt. Anschließend wird Pyridin (2,67 mmol, 0,216 mL, 3 eq) zugefügt und die Lösung weitere 15 min gerührt. Zum Aufarbeiten wird die Reaktionslösung in einen Schütteltrichter mit 50 mL Diethylether überführt und mit Wasser (2 x 20 mL) sowie einmal mit NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden nochmals mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es werden 411 mg Rohprodukt erhalten. Nach der Reinigung des Rohproduktes mittels Säulenchromatografie (Petroleumether-Ethylacetat, 1:10, 1:2, 1:1) und dem Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck werden farblose Kristalle erhalten (251,4 mg (77,5 %), R_F = 0,63 (PE:EE, 1:9), R_F = 0,34 (PE:EE, 1:2)).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 4,45 – 4,44 (dd, ³J_{4,5} = 1 Hz, ³J_{4,3} = 3,5 Hz, 1H, H-4), 4,27 (d, ³J_{6,5} = 1,9 Hz, 2H, H-6a,b), 4,31 (d, ³J_{1,2} = 9,6 Hz, 1H, H-1), 2,84, 3,68 ('t, ³J_{2,1} = 9,2 Hz, 1H, H-2), 3,58 – 3,44 (m, 2H, H-3, H-5), (d, ³J = 10,3 Hz, 1H, OH), 2,75 (m, ³J = 7,3 Hz, 3H, SCH₂CH₃, OH), 1,30 (t, ³J = 7,4 Hz, 3H, SCH₂CH₃), 2,40 (s, 1H), 1,04 (s, 18H, 6 x CH₃,tBu).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C: 86,2 (C-1); 75,4 (C-5); 75,0 (C-3); 72,7 (C-4); 70,7 (C-2); 67,1 (C-6); 27,5 (CH₃,tBu), 27,4 (CH₃,tBu), 27,23(CH₃,tBu), 24,7 (SCH₂CH₃); 15,1 (SCH₂CH₃).

Ethyl-4,6-*O*-Di-*tert*-butylsilyl-2,3-benzoyl-1-thio- β -D-galactopyranosid 18 β 

Ethyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl-2,3-hydroxy-1-thio- β -D-galactopyranosid (0,53 mmol, 143 mg, 1 eq) wird im Vakuum getrocknet und in 1 mL Pyridin unter Argon gelöst. Die Reaktionslösung wird mit Hilfe eines Eisbades auf 0 °C gekühlt. 100 μL von Benzoylchlorid (0,77 mmol, 107,52 mg, 2,4 eq) wird der Reaktionslösung zugegeben. Die Reaktionslösung wird für 3 h gerührt und mittels Dünnschichtchromatografie kontrolliert. Ist die Reaktion nach

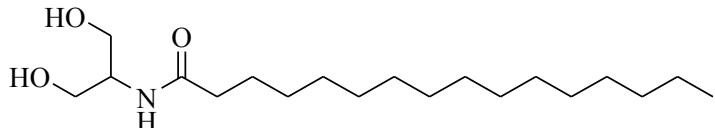
3 h nicht vollständig werden weitere 100 μ L Benzoylchlorid zugegeben, weitere 15 min gerührt und anschließend mit Methanol gequencht. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wird mit 20 mL Ethylacetat verdünnt und mit KHSO₄-lsg. (2 x 10 mL), NaHCO₃-lsg. (2 x 10 mL) sowie NaCl-lsg. (1 x 10 mL) extrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phase wird im Vakuum entfernt und ein farbloser Sirup wird erhalten. Zur Reinigung des Rohproduktes wird die Säulenchromatografie genutzt (Petroleumether-Ethylacetat, 4:1). Es wurde das reine Produkt **18 β** mit einer Ausbeute von 189,5 mg (62,5 %) ($R_F = 0,36$ (PE:EE, 6:1)) isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ _H: 8,08 – 7,94 (m, 4H, CH_{arom}, ortho), 7,57 – 7,45 (m, 2H, CH_{arom}, para), 7,45 – 7,32 (m, 4H, CH_{arom}, meta), 5,88 ('t', ³J_{2,1} = 10,0 Hz, 1H, H-2), 5,23 (dd, ³J_{3,2} = 9,8 Hz, ³J_{3,4} = 3,1 Hz, 1H, H-3), 4,92 (dd, ³J_{4,3} = 3,1 Hz, 1H, H-4), 4,69 (d, ³J_{1,2} = 10,0 Hz, 1H, H-1), 4,42 – 4,28 (m, 2H, H-6a,b), 3,68 ('s', 1H, H-5), 2,76 (q, ³J = 7,4 Hz, 2H, SCH₂CH₃), 2,17 (s, 1H), 1,24 (t, ³J = 7,4 Hz, 3H, SCH₂CH₃), 1,16 (s, 9H, CH₃, tBu), 0,97 (s, 9H, CH₃, tBu).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ _C: 14,8 (SCH₂CH₃); 24,5 (SCH₂CH₃); 27,4 (CH₃, tBu); 27,5 (CH₃, tBu); 67,2 (C-2); 67,9 (C-6); 70,4 (C-4); 75,4 (C-3); 75,5 (C-5); 84,1 (C-1); 128,3 (CH_{arom}, meta); 128,3 (CH_{arom}, meta); 129,7 (CH_{arom}, para); 133,0 (CH_{arom}, ortho); 133,2 (CH_{arom}, ortho); 165,4 (CO); 166,1 (CO).

7.2.3 Synthese der Glycosylakzeptoren

N-Palmitoylserinol 19



Variante 1

Das vom Serinol (1,1 mmol, 99,5 mg, 1 eq) aufgenommene Wasser wird mit Acetonitril codestilliert. Das Serinol wird dann im Vakuum getrocknet. Das *N*-(Hexadecanoyloxy)succinimid (1,41 mmol, 500 mg, 1,3 eq) wird zu dem Serinol gegeben und beide Verbindungen werden im Vakuum getrocknet. Nach dem Trocknen werden die Verbindungen in 5 mL trockenem DMF gelöst und Et₃N (1,41 mmol, 128 μ L, 1,3 eq) zugegeben. Es bildet sich eine Suspension, die über Nacht bei Raumtemperatur (22 °C) gerührt wird. Die Suspension löst sich auch nach 24 h nicht, weshalb die Reaktion auf 40 °C erwärmt und für weitere 3 h gerührt wird (Suspension bleibt erhalten). Die Reaktion wird gestoppt und der weiße Niederschlag filtriert. Anschließend wird der Feststoff mit 20 mL Petroleumether, 5 mL Ethylacetat und 10 mL Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wird das reine Produkt mit einer isolierten Ausbeute von 96,6 % erhalten.

Variante 2

Serinol (2,08 mmol, 189,23 mg, 1 eq) wird mit Acetonitril codestilliert und im Vakuum getrocknet. 1-(2-Thioxothiazolidin-3-yl)hexadecan-1-on (2,7 mmol, 1 g, 1,3 eq) wird zu dem Serinol gegeben und beide Verbindungen im Vakuum getrocknet. Nach dem Trocknen werden die Substanzen in trockenem DMF (10 mL) gelöst, wobei eine Suspension gebildet

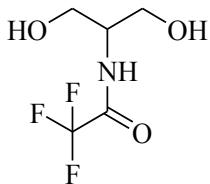
wird. Et₃N (2,8 mmol, 390 µL, 1,3 eq) wird zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird für eine Stunde auf 40 °C erwärmt, um eine vollständige Umsetzung zu garantieren. Die Reaktion wird gestoppt, der weiße Niederschlag filtriert und mit Petroleumether (10 mL) sowie KOH (20 mL 5 %) gewaschen. Der weiße Niederschlag wird im Vakuum getrocknet und 687,5 mg (97 %, R_F = 0,22, DCM:MeOH, 19:1) des Produktes werden erhalten. Das Produkt enthält kleine Verunreinigungen von Thiomercaptothiazolidin.

HRESIMS: Kalkulierte Masse 352,2828 *m/z*, Gefundene Masse 352,2816 *m/z* [M+Na]⁺.

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆) δ_H: 7,32 (d, ³J = 7,8 Hz, 1H, NH), 4,48 (t, ³J = 5,1 Hz, 2H, OH), 3,76 – 3,61 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 3,44 – 3,34 (m, 4H, CH₂CHCH₂), 2,06 (t, ³J = 7,3 Hz, 2H, α-CH₂), 1,52 – 1,42 (m, 2H, β-CH₂), 1,29 – 1,19 (m, 24H, 12 x CH₂), 0,86 (t, ³J = 6,3 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz; DMSO-d₆): δ_C 172,1 (CO); 60,3 (CH₂CHCH₂); 52,8 (CH₂CHCH₂); 35,5 (α-CH₂); 31,2 (CH₂,Alkylkette); 29,0 (CH₂,Alkylkette); 28,9 (CH₂,Alkylkette); 28,8 (CH₂,Alkylkette); 25,3(β-CH₂); 22,0 (CH₂,Alkylkette); 13,8 (CH₃,Alkylkette).

2-N-(Trifluoroacetyl)-serinol 20

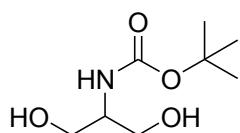


Serinol (5,5 mmol, 500 mg, 1 eq) wird in trockenem MeOH (5 mL) gelöst und Et₃N (0,0165 mol, 2,3 mL, 3 eq) sowie Ethyltrifluoroacetat (11,5 mmol, 1,4 mL, 2,1 eq) werden zugegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mittels Ionenaustrauscherchromatografie (Dowex® 50WX4, 200-400 mesh (Acros Organics)) mit Methanol als Eluent gereinigt. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt und ein farbloser Sirup mit einer isolierten Ausbeute von 866 mg (84 %) wird erhalten.

¹H-NMR (300 MHz; DMSO-d₆) δ_H: 8,85 (d, ³J = 8,1 Hz, 1H, NH), 4,45 (s, 2H, OH), 3,85 (m, 1H, CHNH), 3,5 (m, 4H, CH₂CHCH₂).

¹³C-NMR (75MHz, DMSO-d₆): δ_C: 156,6 (CO); 156,1 (CO); 117,9 (CF₃); 114,1 (CF₃); 59,8 (CH₂CHCH₂); 58,6 (CH₂CHCH₂); 54,6 (CH₂CHCH₂); 54,1 (CH₂CHCH₂).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-serinol 21



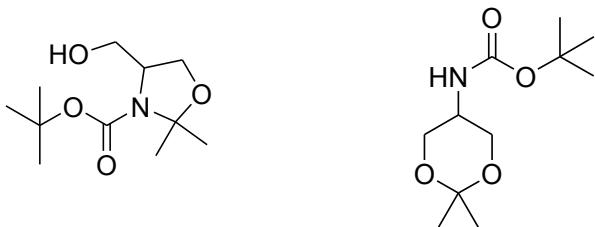
Serinol (10,9 mmol, 1 g) wird mit Acetonitril codestilliert und dann im Vakuum getrocknet. Nach dem Trocknen wird das Serinol in absolutem Ethanol (7 mL) gelöst und Di-*tert*-butyldicarbonat (13,08 mmol, 2,85 g) wird zugegeben. Rückstände des Di-*tert*-butyldicarbonats an den Gefäßwänden werden mittels abs. Ethanol abgespült. Die Reaktion wird über Nacht bei Raumtemperatur (23 °C) gerührt. Die DC-Kontrolle zeigt eine vollständige Umsetzung des Ausgangsstoffes. Der Überschuss des Lösungsmittels wird unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mit Ethylacetat (30 mL) verdünnt und mit Wasser (3 x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Baumwollwatte getrocknet. Es werden farblose Kristalle mit einer Ausbeute von 79 % (1,64 g) ($R_F = 0,46$, Petroleumether-Ethylacetat, 1:4) erhalten.

HRESIMS: Kalkulierte Masse 214,1055 m/z , gefundene Masse 214,1053 m/z [M+Na]⁺.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H : 5,37 (d, ³J = 7,3 Hz, 1H, NH), 3,83 – 3,59 (m, 5H, CH₂OH und CHN), 3,48 (br d, ³J = 12,2 Hz, 2H, 2 x OH), 1,44 (s, 9H, 3 x CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C : 156,4 (CO); 79,9(C(CH₃)₃); 62,8 (CH₂CHCH₂); 53,2 (CH₂CHCH₂); 28,3 (CH₃, tBu).

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-hydroxymethyl-2-dimethyl-1,3-oxazolidin 22R,S, N-(*tert*-butoxycarbonyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan 60



N-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-serinol (1,05 mmol, 200 mg, 1 eq) und *p*-Toluensulfonsäure-Monohydrat (0,026 mmol, 5 mg, 0,025 eq) werden im Vakuum für 2 h getrocknet. Nach dem Trocknen werden die Verbindungen in Toluol (3 mL) gelöst und 2,2-Dimethoxypropan (2,05 mmol, 0,252 mL, 1,95 eq) wird unter Argon zugegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei 40 °C gerührt. Die Reaktion wird gestoppt und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Ein farbloser Sirup wird erhalten (272 mg). Das DC zeigt eine Mischung aus zwei Verbindungen. Zum Trennen des Produktgemisches wird die Säulenchromatografie (Petroleumether-Ethylacetat, 4:1) genutzt. Das *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-hydroxymethyl-2-dimethyl-1,3-oxazolidin wird als farbloser Sirup mit einer Ausbeute von 30 %, (72,2 mg) ($R_F = 0,45$, Petroleumether-Ethylacetat, 1:1.) isoliert.

HRESIMS: Kalkulierte Masse 254,1368 m/z , gefundene Masse 254,1372 m/z [M+Na]⁺.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H : 4,19 – 3,49 (m, 5H, CHN, 2 x CH₂), 1,61 – 1,43 (m, 15H, 5 x CH₃, tBu).

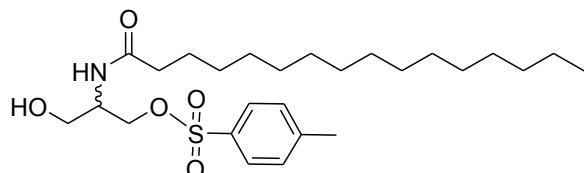
¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ_C : 151,78, 100,38, 100,32, 93,82, 93,29, 80,05, 79,73, 65,48, 60,55, 57,04, 56,80, 48,56, 28,52, 26,68, 24,95, 24,79, 24,49, 23,20.

Das Produkt **60** *N*-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan wird mit einer Ausbeute von 33,3 % (80,8 mg) ($R_F = 0,59$, Petroleumether-Ethylacetat, 1:1.) isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 5,44 (d, ³J = 5,7 Hz, 1H, NH), 4,09 (d, ³J = 11,7 Hz, 2H, CH₂), 3,69 (d, ³J = 12,0 Hz, 2H, CH₂), 3,60 – 3,50 (m, 1H, CH), 1,50 – 1,38 (m, 15H, CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C: 155,3; 98,4 ; 79,5 ; 63,9 ; 44,7 ; 28,4; 19,0.

Palmitoylamino-1-hydroxy-3-tosyl-serinol 28R,S

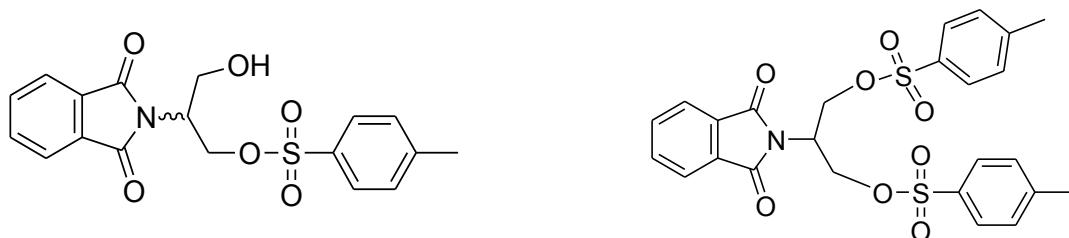


N-Palmitoylserinol (1,5 mmol, 500 mg, 1 eq) wird in 10 mL KOH (15 %) und 10 mL DCM gelöst und gerührt. Das Tosylchlorid (1,8 mmol, 346,18 mg, 1,2 eq) wird zu der gerührten Lösung gegeben und diese 3 h unter Rückfluss erhitzt. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Baumwollwatte getrocknet und der Überschuss des Lösungsmittels unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatografie (PE:EE, 2:1,) gereinigt. Es werden zwei Fraktionen erhalten: Bei Fraktion 1 handelt es sich um die gewünschte Verbindung (22,6 mg, 3,1 %, gefundene Masse 484,3079 [M+H⁺], R_F = 0,34 (PE:EE, 2:1, UV, I₂) und bei Fraktion 2 (11,3 mg, 1,6 %, R_F = 0,17 (PE:EE, 2:1, UV, I₂)) um eine Mischung von *N*-Palmitoylserinol und Mono-tosyierte Produkt.

Fraktion 1:

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 7,86 – 7,72 (m, 2H, CH_{arom}), 7,42 – 7,30 (m, 2H, CH_{arom}), 4,35 – 3,83 (m, 5H, CH₂CHCH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃, Ts), 2,22 (t, ³J = 7,6 Hz, 2H, α -CH₂), 1,65 – 1,47 (m, 2H, β -CH₂), 1,43 – 1,09 (m, 24H, 12 x CH₂, Alkylkette), 0,88 (t, ³J = 6,6 Hz, 3H, CH₃, Alkylkette).

Phthalimido-1-hydroxy-3-tosyl-serinol 33R,S und des Phthalimido-1,3-bis-tosyl-serinol 34



Das Phthalimidoserinol (0,500 g, 2,26 mmol, 1 eq) sowie das Tosylchlorid (0,496 g, 2,60 mmol, 1,15 eq) werden im Vakuum getrocknet. Beide Verbindungen werden in trockenem Pyridin (2 mL) gelöst und die Lösung bei Raumtemperatur (18 °C) gerührt. Die Reaktion wird mittels DC kontrolliert. Nach 2 h sind zwei Hauptprodukte sowie ein geringer Rückstand der beiden Ausgangsstoffe auf dem DC (DCM:MeOH, 9:1) sichtbar. Die Reaktionslösung wird weitere 3 h gerührt. Die Reaktion wird mit 100 µL destillierten Wasser

gequencht (15 min gerührt) und anschließend im Vakuum eingeengt. Der hellgelbe klare Sirup wird mit 70 mL Ethylacetat verdünnt und mit gesättigter KHSO_4 -lsg. (3 x 20 mL), Wasser (3 x 20 mL) sowie NaHCO_3 -lsg. (3 x 20 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels Säulenchromatografie (T:EE, 9:1, 8:1) gereinigt. Das 2-Phthalimid-1,3-bis-tosyl-serinol wird mit einer Ausbeute von 18,2 % (217,6 mg, $R_F = 0,51$, T:EE, 4:1) isoliert.

HRESIMS: Kalkulierte Masse 552,0763, gefundene Masse 552,0750 m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 7,81 – 7,70 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{arom, Phth}}$), 7,67 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{arom, Ts}}$), 7,23 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{arom, Ts}}$), 4,76 – 4,62 (m, 1H, CH_2CHCH_2), 4,52 – 4,24 (m, 4H, CH_2CHCH_2), 2,38 (s, 6H, CH_3, Ts).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 167,1 (CO); 145,2 (C_{arom}); 134,3 ($\text{CH}_{\text{arom, Phth}}$); 132,2 (C_{arom}); 131,3 (C_{arom}); 129,9 ($\text{CH}_{\text{arom, Ts}}$); 127,8 ($\text{CH}_{\text{arom, Ts}}$); 123,5 ($\text{CH}_{\text{arom, Phth}}$); 65,4 (CH_2CHCH_2); 49,0 (CH_2CHCH_2); 21,6 (CH_3, Ts).

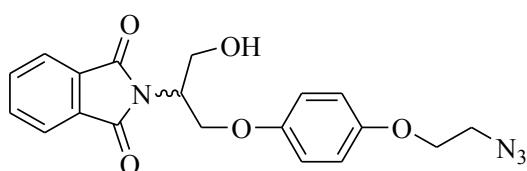
Das 2-Phthalimid-1-hydroxy-3-tosyl-serinol wird mit einer Ausbeute von 60,3 % (511,3 mg, $R_F = 0,16$, T:EE, 4:1) isoliert.

HRESIMS: Kalkulierte Masse 398,0674, gefundene Masse 398,0664 m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 7,86 – 7,72 (m, 4H, CH_{arom}), 7,72 – 7,64 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{arom,Ts}}$), 7,25 – 7,14 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{arom,Ts}}$), 4,70 – 4,53 (m, 2H, CHCHH), 4,46 – 4,34 (m, 1H, CHCHH), 4,06 – 3,90 (m, 2H, CH_2), 2,89 (dd, $^3J = 8,3$ Hz, $^3J = 4,5$ Hz, 1H, OH), 2,37 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 168,3 (CO); 144,9 (C_{arom}); 134,3 ($\text{CH}_{\text{arom, Phth}}$); 132,5 (C_{arom}); 131,5 (C_{arom}); 129,8 ($\text{CH}_{\text{arom, Ts}}$); 127,8 ($\text{CH}_{\text{arom, Ts}}$); 123,5 ($\text{CH}_{\text{arom, Phth}}$); 66,8 (CH_2CHCH_2); 61,1 (CH_2CHCH_2); 52,1 (CH_2CHCH_2); 21,6 (CH_3, Ts).

Phthalimid-1-hydroxy-3-azidethoxyphenyl-serinol 36R,S



Das Phthalimid-1-hydroxy-3-tosyl-serinol (0,67 mmol, 250 mg, 1 eq) und das Kaliumsalz des Azidoethoxyphenols (0,80 mmol, 173,6 mg, 1,2 eq) werden im Vakuum getrocknet. Nach dem Trocknen werden die Verbindungen in trockenem DMSO (3 mL) gelöst und die Lösung auf 60 °C erhitzt. Der Reaktionsverlauf wird mittels DC (DCM:MeOH, 9:1 und T:EE, 4:1) beobachtet. Nach einer Stunde ist das 2-Phthalimido-1-hydroxy-3-toluensulfonyl-propan vollständig umgesetzt. Das Kaliumsalz ist nicht vollständig umgesetzt. Die Spots für die Produkte sind schwer zu erkennen mittel UV und I_2 . Zur Visualisierung der Azidverbindungen wird eine Lösung aus PPh_3 (500 mg) und Phthaldialdehyd (250 mg) in 25 mL Methanol hergestellt. Das DC wird zur Entwicklung in diese vorbereitete Lösung

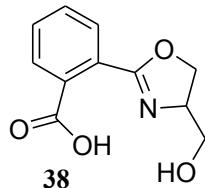
getaucht und anschließend mittels Heizplatte erhitzt. Die Azidoverbindungen erscheinen auf den DC-Platten als braune Spots und unter UV-Licht fluoreszieren sie gelblich. Die Reaktionslösung röhrt über Nacht bei 60 °C. Die Kontrolle mittel DC zeigt eine Mischung aus mehr als fünf Verbindungen. Zu der Reaktionslösung werden 400 µL Essigsäure gegeben und die DMSO-Phase mit Ethylacetat (4 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Verbindungen werden mittels Säulenchromatografie (T:EE, 9:1) getrennt. Bei der ersten isolierten Fraktion handelt es sich um das Kaliumsalz des Azidoethoxyphenols (80,2 mg, R_F = 0,71 (T:EE, 1:1)). Das gewünschte Produkt wird als zweite Fraktion (27 mg (10,5 %), R_F = 0,53 (T:EE, 1:1)).

HRESIMS: Kalkulierte Masse 405,1175, gefundene Masse [M+Na]⁺ 405,1169.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 7,94 – 7,66 (m, 4H, CH_{arom}, Phth), 6,80 ('s', 4H, CH_{arom}, Ph), 4,86 – 4,72 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 4,50 – 4,27 (m, 2H, CH₂CHCH₂), 4,25 – 3,99 (m, 4H, CH₂CHCH₂, N₃CH₂), 3,54 (t, ³J = 4,9 Hz, 2H, OCH₂), 3,07 (s, 1H, OH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C: 168,9 (CO); 152,9 (CO); 152,8 (CO); 134,2 (CH_{arom}, Phth); 123,5 (CH_{arom}, Phth); 115,9 (CH_{arom}, Ph); 115,6 (CH_{arom}, Ph); 65,9 (CH₂CHCH₂); 61,6 (CH₂CHCH₂); 52,9 (CH₂CHCH₂); 50,2 (N₃CH₂).

Neben dem Ausgangsstoff und dem Produkt kann ein Nebenprodukt (19,9 mg, (13,5 %), R_F = 0,27 (T:EE, 1:1)) isoliert werden, bei dem es sich um die o-4-Hydroxymethyloxazolino-benzoësäure **38** handelt.

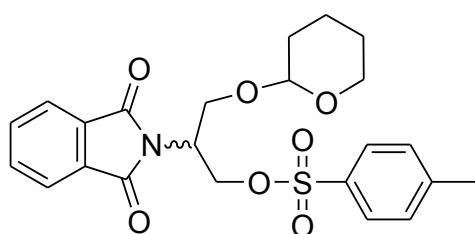


Kalkulierte Masse 221,0688 (**38**) und 406,1165 (**39**), gefundene Massen [M+H]⁺ 222,0761 und [M+H]⁺ 407,1226.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 7,84 – 7,71 (m, 1H), 7,56 – 7,35 (m, 3H), 4,74 – 4,62 (m, 1H, CH₂), 4,58 – 4,28 (m, 4H, CHCH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C: 65,1 (CH); 66,7 (CH₂); 67,9 (CH₂); 124,0 (CH_{arom}); 127,2 (CH_{arom}); 128,8 (CH_{arom}); 129,5 (CH_{arom}); 131,0 (CH_{arom}); 134,8 (CH_{arom}); 162,1 (NCO); 170,8 (CO).

Phthalimid-1-oxan-3-tosyl-serinol **63**



Phthalimido-1-hydroxy-3-tosyl-serinol (0,266 mmol, 100 mg, 1eq) wird im Vakuum für 30 min getrocknet. Nach dem Trocknen der Verbindung wird diese in trockenen Dichlormethan (1 mL) gelöst. Nach vollständigem Lösen wird das Dihydro-4*h*-pyran (0,31 mmol, 26,85 mg, 29 μ L, 1,2 eq) zu der Lösung bei Raumtemperatur (20 °C) und unter Argon gegeben. Tropfen des DHP, die am Trichter oder Kolbenwand haften, werden mit zusätzlichen 0,5 mL trockenem DCM nachgespült. Nach der Zugabe von 2 mg der p-Toluensulfonsäure erfolgt ein Farbumschlag von farblos zu blau. Nach 1 h wird die Reaktion mittels DC (T:EE, 4:1, R_F = 0,17 (2-Phthalimido-1-hydroxy-3-toluensulfonyl-propan)) kontrolliert. Es ist ein Spot für das gewünschte Produkt sichtbar bei R_F = 0,53 und ein kleiner Rückstand des Ausgangsstoffes. Nach weiteren 30 min werden nochmals 10 μ L des Dihydro-4*h*-pyrans zugegeben und für 30 min gerührt. Nach vollständiger Umsetzung der Ausgangsstoffe wird die Reaktion mit 200 μ L NaHCO₃-lsg. gequencht. Die Reaktionslösung wird mit 50 mL DCM verdünnt und mit Wasser (3 x 20mL) gewaschen. Die organische Phase wird im Vakuum aufkonzentriert, sodass das Rohprodukt mit einer isolierten Ausbeute von 125,6 mg (102,8 %) erhalten wird. Zur Reinigung wird die Säulenchromatografie genutzt, sodass das reine Produkt in Form von einem farblosen Sirup mit einer Ausbeute von 86,5 mg (71 %) isoliert wird.

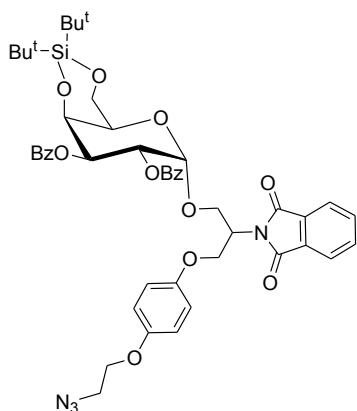
Kalkulierte Masse 482,1249 *m/z*, gefundene Masse 482,1244 *m/z* [M+Na]⁺.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H : 7.85 – 7.66 (m, 6H, CH_{arom, Phth}, CH_{arom, ortho, Ts}), 7.19 ('d', *J* = 7.9 Hz, 2H, CH_{arom, meta, Ts}), 4.81 – 4.61 (m, 2H, CHCHH), 4.61 – 4.50 (m, 1H, CH_{DHP}), 4.50 – 4.35 (m, 1H, CHH), 4.10 – 3.33 (m, 4H, CH₂, Serinol, CH₂, DHP), 2.36 (s, 3H, CH₃, Ts), 1.83 – 1.33 (m, 7H, CH₂, DHP).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C : 134,0 (CH_{arom, Phth}); 129,8 (CH_{arom, meta, Ts}); 127,9 (CH_{arom, ortho, Ts}); 123,3 (CH_{arom, Phth}); 98,7 (CH_{DHP}); 98,6(CH_{DHP}); 66,9 (CH₂, Serinol); 66,8 (CH₂, Serinol); 63,7 (CH₂, DHP); 63,6 (CH₂, DHP); 62,1 (CH₂, Serinol, CH₂, DHP); 50,3 (CH_{Serinol}) ; 50,0 (CH_{Serinol}); 30,3 (CH₂, DHP); 25,2 (CH₂, DHP); 25,2 (CH₂, DHP); 21,6 (CH₃, Ts); 19,1 (CH₂, DHP); 19,0 (CH₂, DHP).

7.2.4 Glycosylierungen

Phthalimido-1-(4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl-2,3-benzoyl- α -D-galactopyranose)-3-azidoethoxyphenyl-serinol 41



Ethyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilandiyl-1-thio-2,3-dibenzoyl- β -D-galactopyranosid (0,11 mmol, 50,44 mg, 1,6 eq) und das 2-Phthalimido-1-hydroxy-3-azidoethoxyphenyl-propan (0,07 mmol, 27 mg, 1eq) werden zusammen im Vakuum getrocknet. Das *N*-Iodosuccinimid (0,11 mmol, 24,74 mg, 1,6 eq) wird separat im Vakuum getrocknet. 100 mg der Molekularsiebe werden im Vakuum unter Heizen aktiviert. Alle Verbindungen werden für 4 h getrocknet. Das Dichlormethan wird frisch destilliert, bevor 1 mL zum Lösen des Donors und Akzeptors genutzt wird. Zu der Lösung werden sofort unter Argon die aktivierten Molsiebe gegeben und die Reaktionslösung 1 h gerührt. Anschließend wird die Reaktionstemperatur auf -60 °C mittels Aceton/Trockeneisbad heruntergekühlt. Das *N*-Iodosuccinimid (0,11 mmol, 24,74 mg, 1,6 eq) sowie eine kleine Menge des Silbertriflats (Spatelspitze) werden dann unter Argon zugegeben. Die Temperatur des Kältebads wird langsam erhöht. Bei einer Temperatur von -25 °C ist ein Farbumschlag der Lösung zu beobachten. Digequenchte Temperatur (-25 °C) wird 30 min konstant gehalten. Die Lösung verfärbt sich zu einem intensiven Gelb-Orangeton. Das DC zeigt die Umsetzung des Ausgangsstoffes (Petroleumether-Ethylacetat, 3:1; R_F = 0,24). Die Reaktion wird mit NaHCO₃-lsg. (100 μ L) gequencht und anschließend mit 20 mL DCM verdünnt und durch Baumwollwatte werden die Molekularsiebe abfiltriert. Die Reaktionslösung wird mit NaS₂O₃:NaHCO₃ (1:1, 10 mL) gewaschen, sodass eine farblose Lösung erhalten wird. Der Überschuss des Lösungsmittels wird unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Es wird ein Rohprodukt von 76 mg erhalten. Zur ersten Aufreinigung wird die Gelchromatografie mit Toluol als Eluent verwendet. Es wird ein Produktgemisch aus mehreren Isomeren mit einer Ausbeute von 36,1 mg (58 %) ($[M+Na^+]$ m/z kal. Masse 915,3243, gefundene Masse 915,3233) isoliert. Zum Trennen der Diastereomere wird eine präparative HPLC mit einem Eluenten aus Hexan-Ethylacetat/Isopropanol (99,5 %:0,5 %), 80:20 verwendet. Es wird ein Diastereomer und ein Iodidderivat des Glycosylprodukts erhalten.

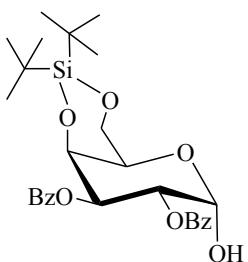
Diastereomer 41:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ _H: 7,97 (d, ³J = 7,6 Hz, 2H, CH_{arom}, ortho, benzoyl), 7,74 (d, ³J = 8,0 Hz, 2H, CH_{arom}, ortho, benzoyl), 7,69 – 7,55 (m, 4H, CH_{arom}, Phth), 7,50 (t, ³J = 7,3 Hz, 1H, CH_{arom}, para, benzoyl), 7,41 (t, ³J = 7,3 Hz, 1H, CH_{arom}, para, benzoyl), 7,36 (t, ³J = 7,8 Hz, 2H, CH_{arom}, meta, benzoyl), 7,19 (t, ³J = 7,7 Hz, 2H, CH_{arom}, meta, benzoyl), 6,78 (m, ³J = 9,2 Hz, 4H, CH_{arom,phenyl}), 5,68 (dd, ³J_{2,3} = 10,5 Hz, ³J_{2,1} = 3,6 Hz, 1H, H-2), 5,49 (dd, ³J_{3,2} = 10,5 Hz, ³J_{3,4} = 2,9 Hz, 1H, H-3), 5,35 (d, ³J_{1,2} = 3,6 Hz, 1H, H-1), 4,89 (d, ³J = 3,3 Hz, 2H, H-4 und CH_{Serinol}), 4,45 – 4,12 (m, 6H, CH₂CHCH₂, H-6_{a,b}, H-5), 4,08 (t, ³J = 5,0 Hz, 2H, CH_{2,phenyl}), 3,95 (s, 1H, zu H-6), 3,56 (t, ³J = 4,9 Hz, 2H, CH_{2, phenyl}), 1,12 (s, 9H, CH₃), 0,96 (s, 9H, CH₃).

Diastereomer 42:

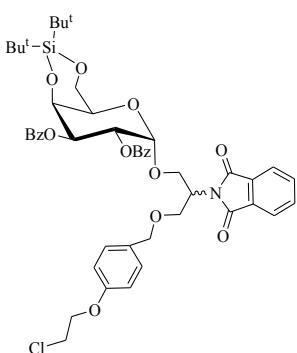
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ _H: 7,98 (d, ³J = 7,1 Hz, 2H, CH_{arom}, ortho, benzoyl), 7,93 (d, ³J = 7,1 Hz, 2H, CH_{arom}, ortho, benzoyl), 7,75 – 7,64 (m, 4H, CH_{arom}, Phth), 7,54 – 7,45 (m, 2H, CH_{arom}, para, benzoyl), 7,37 (t, ³J = 7,7 Hz, 2H, CH_{arom}, meta, benzoyl), 7,30 (d, ³J = 7,7 Hz, 2H, CH_{arom}, meta, benzoyl), 6,79 – 6,64 (m, 4H, CH_{arom,phenyl}), 5,76 (dd, ³J_{2,3} = 10,6 Hz, ³J_{2,1} = 3,7 Hz, 1H, H-2), 5,48 (dd, ³J_{3,2} = 10,6 Hz, ³J_{3,4} = 3,0 Hz, 1H, H-3), 5,38 (d, ³J_{1,2} = 3,7 Hz, 1H, H-1), 4,96 – 4,86 (m, 1H, CH_{Serinol}), 4,83 (d, ³J_{4,3} = 2,9 Hz, 1H, H-4), 4,44 – 4,32 (m, 1H), 4,30 – 4,02 (m, 7H), 3,84 (s, 1H), 3,55 (t, ³J = 5,0 Hz, 2H, CH_{2,phenyl}), 1,11 (s, 9H, CH₃), 0,95 (s, 9H, CH₃).

Hydrolyseprodukt **64**:



HRESIMS: kalkulierte Masse: 551.2077 m/z , gefundene Masse: 551.2064 m/z $[M+Na]^+$

Phthalimid-1-(4,6-*O*-di-*tert*-butylsilanediyl-2,3-benzoyl- α -D-galactopyranosyl)-3-chloroethoxybenzyl-serinol 44



Ethyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilanediyl-1-thio-2,3-dibenzoyl- β -D-galactopyranosid (0,185 mmol, 85 mg, 1,6 eq) und 2-Phthalimido-1-hydroxy-3-azidoethoxybenzyl-serinol (0,116 mmol, 45 mg, 1eq) werden zusammen im Vakuum getrocknet. Das *N*-Iodosuccinimid (0,185 mmol, 41,6 mg, 1,6 eq) wird separat im Vakuum getrocknet. 100 mg Molekularsiebe werden im Vakuum unter Heizen aktiviert. Alle Verbindungen werden 4 h getrocknet. Das Dichlormethan wird frisch distilliert bevor 1 mL zum Lösen des Donors als auch Akzeptors genutzt wird. Zu der Lösung werden sofort unter Argon die aktivierte Molsiebe gegeben und die Reaktionslösung wird 1 h gerührt. Anschließend wird die Lösung auf -60 °C mittels Aceton/Trockeneisbad gekühlt. Das *N*-Iodosuccinimid (0,11 mmol, 24,74 mg, 1,6 eq) sowie eine kleine Menge des Silbertriflats (Spatelspitze) werden dann unter Argon zugegeben. Die Temperatur des Kältebads wird langsam erhöht. Bei einer Temperatur von -25 °C ist ein Farbumschlag der Lösung zu beobachten. Die Temperatur (-25 °C) wird 30 min konstant gehalten. Die Lösung verfärbt sich zu einem intensiven Gelb-Orangeton. Das DC zeigt die Umsetzung des Ausgangsstoffes (Petroleumether-Ethylacetat, 3:1; $R_F = 0,48$). Die Reaktion wird mit NaHCO_3 (100 μL) gequenched und nach Verdünnen der Lösung mit 20 mL DCM werden die Molekularsiebe durch Baumwollwatte abfiltriert. Die Reaktionslösung wird mit $\text{NaS}_2\text{O}_3:\text{NaHCO}_3$ (1:1, 10 mL) gewaschen, sodass eine farblose Lösung erhalten wird. Der Überschuss des Lösungsmittels wird unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Es wird ein Rohprodukt von 119,2 mg erhalten. Zur ersten Aufreinigung wird die Gelchromatografie mit Toluol als Eluent verwendet. Es wird ein Produktgemisch aus mehreren Isomeren mit einer Ausbeute von 74,4 mg (71,2%), ($[M+Na]^+$ m/z kal. Masse 922,2996, gefundene Masse 922,2953) erhalten. Zum Trennen der Diastereomere wird eine präparative HPLC mit einem Eluenten aus Hexan-Ethylacetat/Isopropanol (99,5%:0,5%),

80:20 verwendet. Es wurden drei Fraktionen isoliert. Die erste Fraktion enthielt ein Diastereomer des reinen Glycosylprodukts **44**:

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H: 7,99 – 7,90 (m, 4H, CH_{arom}, benzoyl, ortho), 7,72 – 7,62 (m, 4H, CH_{arom}, Phth), 7,52 – 7,47 (m, 2H, CH_{arom}, benzoyl, para), 7,39 – 7,30 (m, 4H, CH_{arom}, benzoyl, meta), 7,14 – 7,07 (m, 2H, CH_{arom}, phenyl), 6,80 – 6,76 (m, 2H, CH_{arom}, phenyl), 5,74 (dd, ³J_{2,1} = 10,5 Hz, ³J_{2,3} = 3,7 Hz, 1H, H-2), 5,44 (dd, ³J_{3,2} = 10,5 Hz, ³J_{3,4} = 3,2 Hz, 1H, H-3), 5,33 (d, ³J_{1,2} = 3,7 Hz, 1H, H-1), 4,81 ('d', ³J_{4,3} = 3,2 Hz, 1H, H-4), 4,80 – 4,74 (m, 1H, CH_{Serinol}), 4,39 (d, ³J = 11,7 Hz, 1H, CHH_{benzyl}), 4,28 (d, ³J = 11,7 Hz, 1H, CHH_{benzyl}), 4,24 – 4,10 (m, 5H, CH₂CHCHH, CH₂CH₂, benzyl), 3,93 (dd, ³J = 10,6 Hz, ³J = 6,3 Hz, 1H, CH₂CHCHH), 3,87 (dd, ³J_{6a,6b} = 10,1 Hz, ³J_{6,5} = 8,4 Hz, 1H, H-6_{a,b}), 3,82 – 3,80 ('s', 1H, H-5), 3,79 – 3,72 (m, 3H, CH₂CH₂, benzyl, H-6_{a,b}), 1,11 (s, 9H, CH₃, tBu), 0,94 (s, 9H, CH₃, tBu).

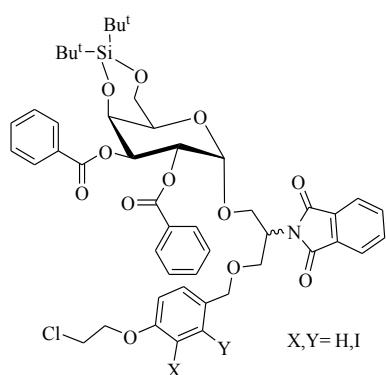
¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ_C: 168,2; 165,9; 133,9; 133,0; 131,7, 130,6; 129,8; 129,7; 129,3; 128,3; 128,3; 123,2; 114,6; 96,5 (C-1); 72,4; 71,0; 71,0; 68,3; 68,0; 67,3; 66,8; 66,8; 65,2; 50,0 (CH_{Serinol}); 41,8 (CH₂, benzyl); 27,5 (CH₃, tBu); 27,2 (CH₃, tBu).

Die zweite Fraktion ist eine Mischfraktion und wird ein zweites Mal mittels HPLC-Trennung fraktioniert: Es wird ein zweites Diastereomer **45** und ein Iodderivat **61** erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H: 7,96 (d, ³J = 7,5 Hz, 2H, CH_{arom}, benzoyl, ortho), 7,72 (d, ³J = 7,5 Hz, 2H, CH_{arom}, benzoyl, ortho), 7,63 – 7,53 (m, 4H, m, 4H, CH_{arom}, Phth), 7,49 (t, ³J = 7,4 Hz, 1H, CH_{arom}, benzoyl, para), 7,41 (t, ³J = 7,4 Hz, 1H, CH_{arom}, benzoyl, para), 7,36 (t, ³J = 7,7 Hz, 2H, CH_{arom}, benzoyl, meta), 7,19 (t, ³J = 7,8 Hz, 2H, CH_{arom}, benzoyl, meta), 7,14 (d, ³J = 8,5 Hz, 2H, CH_{arom}, phenyl), 6,80 (d, ³J = 8,5 Hz, 2H, CH_{arom}, phenyl), 5,65 (dd, ³J_{2,3} = 10,5 Hz, ³J_{2,1} = 3,7 Hz, 1H, H-2), 5,46 (dd, ³J_{3,2} = 10,5 Hz, ³J_{3,4} = 3,0 Hz, 1H, H-3), 5,30 (d, ³J_{1,2} = 3,7 Hz, 1H, H-1), 4,86 ('d', ³J_{4,3} = 2,9 Hz, 1H, H-4), 4,79 – 4,70 (m, 1H, CH_{Serinol}), 4,38 (dd, ³J = 44,6 Hz, ³J = 11,7 Hz, 2H, CH₂, benzyl), 4,27 (dd, ³J = 39,9 Hz, ³J = 11,8 Hz, 2H, CH₂, Serinol), 4,19 (t, ³J = 5,9 Hz, 2H, CH₂CH₂, benzyl), 4,13 ('t', ³J = 9,9 Hz, 1H, CHH_{Serinol}), 4,04 (dd, ³J = 10,4 Hz, ³J = 5,4 Hz, 1H, CHH_{Serinol}), 3,91 (s, 1H, H-5), 3,86 – 3,70 (m, 4H, H-6_{a,b}, CH₂CH₂, benzyl), 1,11 (s, 9H, CH₃, tBu), 0,95 (s, 9H, CH₃, tBu).

¹³C-Dept135-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ_C: 133,8 (CH_{arom}, Phth); 133,0 (CH_{arom}, benzoyl, para); 132,9 (CH_{arom}, benzoyl, para); 129,7 (CH_{arom}, benzoyl, ortho); 129,6 (CH_{arom}, benzoyl, ortho); 129,3 (CH_{arom}, benzyl); 128,3 (CH_{arom}, benzoyl, meta); 128,3 (CH_{arom}, benzoyl, meta); 123,1 (CH_{arom}, Phth); 114,6 (CH_{arom}, benzyl); 97,38 (C-1); 72,5 (CH₂, benzyl); 71,0 (C-3); 71,0 (C-4); 68,6 (C-2); 68,0 (CH₂CH₂, benzyl); 67,2 (CH₂); 67,0 (CH₂), 66,9 (CH₂), 65,7 (CH₂, Serinol), 50,8 (CH_{Serinol}), 41,8 (CH₂, benzyl), 27,5 (CH₃, tBu), 27,3 (CH₃, tBu).

Iodderivat **61**:



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H: 7,97 (d, ³J = 7,3 Hz, 2H, CH_{arom}, benzoyl, ortho), 7,93 (d, ³J = 7,2 Hz, 2H, CH_{arom}, benzoyl, ortho), 7,75 – 7,62 (m, 4H, CH_{arom}, Phth), 7,50 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH_{arom}, benzoyl, para), 7,37 (t, ³J = 7,8 Hz, 2H, CH_{arom}, benzoyl, meta), 7,33 (t, ³J = 7,8 Hz, 2H, CH_{arom}, benzoyl, meta), 7,10 (dd, ³J = 8,4 Hz, ⁵J = 1,8 Hz, 1H, CH_{arom}, benzyl), 6,68 (d, ³J = 8,4 Hz, 1H, CH_{arom}, benzyl), 5,74 (dd, ³J_{2,3} = 10,5 Hz, ³J_{2,1} = 3,7 Hz, 1H, H-2), 5,45 (dd, ³J_{3,2} = 10,5 Hz, ³J_{3,4} = 3 Hz, 1H, H-3), 5,35 (d, ³J_{1,2} = 3,7 Hz, 1H, H-1), 4,82 (d, ³J = 3,0 Hz, 1H, H-1), 4,79 – 4,74 (m, 1H, CH_{Serinol}), 4,34 (d, ³J = 11,9 Hz, 1H, CH₂, benzyl), 4,28 – 4,09 (m, 6H, CH₂, benzyl, CH₂CHCHH_{Serinol}, CH₂CH₂, benzyl), 3,94 (dd, ³J = 10, 6 Hz, 6,5 Hz, 1H, CH₂CHCHH_{Serinol}), 3,91-3,85 (m, 1H, H-6_{a,b}) 3,85 – 3,78 (m, 3H, CH₂CH₂, benzyl, H-5), 3,72 (dd, ³J_{6,5} = 10,1 Hz, ³J_{6a,6b} = 5,5 Hz, 1H, H-6_{a,b}), 1,10 (s, 9H, CH₃, tBu), 0,94 (s, 9H, CH₃, tBu).

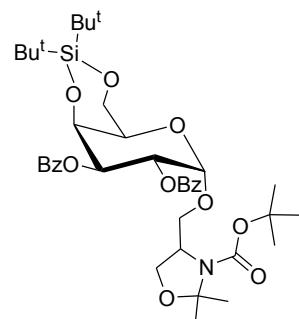
¹³C-Dept135-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ_C: 134,0 (CH_{arom}, Phth); 133,1 (CH_{arom}, benzoyl, para); 129,8 (CH_{arom}, benzoyl, ortho); 129,7 CH_{arom}, benzoyl, ortho); 129,0 (CH_{arom}, benzyl); 128,4 (CH_{arom}, benzoyl, meta); 123,3 (CH_{arom}, Phth); 112,4 (CH_{arom}, benzyl); 96,6 (C-1); 71,5 (CH₂, benzyl); 71,0 (CH₂, benzyl); 70,9 (C-3, C-4); 69,4 (CH₂CH₂, benzyl); 68,4 (C-2); 67,3 (CH₂CH₂, benzyl, C-5, C-6); 67,1; 66,8; 65,2 (CH₂, Serinol); 49,9 (CH_{Serinol}); 27,5 (CH₃, tBu); 27,3 (CH₃, tBu).

Die dritte Fraktion wird als ein anderes Iodderivat **62** des gewünschten Produktes **44** identifiziert.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_H: 7,98 – 7,94 (d, ³J = 7,8 Hz, 2H, CH_{arom}, benzoyl, ortho), 7,76 – 7,71 (d, ³J = 7,8 Hz, 2H, CH_{arom}, benzoyl, ortho), 7,65 – 7,55 (m, 4H, CH_{arom}, Phth), 7,49 (t, ³J = 7,4 Hz, 1H, CH_{arom}, benzoyl, para), 7,41 (t, ³J = 7,5 Hz, 1H, CH_{arom}, benzoyl, para), 7,35 (t, ³J = 7,8 Hz, 2H, CH_{arom}, benzoyl, meta), 7,20 (t, ³J = 7,8 Hz, 2H, CH_{arom}, benzoyl, meta), 7,17 – 7,13 (dd, ³J = 8,4 Hz, ³J = 1,8 Hz, 1H, CH_{arom}, benzyl), 6,71 (d, ³J = 8,4 Hz, 1H, CH_{arom}, benzyl), 5,66 (dd, ³J_{2,3} = 10,5 Hz, ³J_{2,1} = 3,7 Hz, 1H, H-2), 5,47 (dd, ³J_{3,2} = 10,5 Hz, ³J_{3,4} = 3,0 Hz, 1H, H-3), 5,31 (d, ³J_{1,2} = 3,7 Hz, 1H, H-1), 4,88 ('d', ³J = 3,0 Hz, 1H, H-4), 4,80 – 4,70 (m, 1H, CH_{Serinol}), 4,40 – 4,16 (m, 6H, CH₂, benzyl, CH₂CHCHH_{Serinol}, CH₂CH₂, benzyl), 4,13 (t, ³J = 9,8 Hz, 1H, CH₂CHCHH_{Serinol}), 4,05 (dd, ³J = 10,4, 5,6 Hz, 1H, CH₂CHCHH_{Serinol}), 3,92 (s, 1H, H-5), 3,90 – 3,82 (m, 3H, CH₂CH₂, benzyl, H-6_{a,b}), 3,77 – 3,72 (dd, ³J_{6,5} = 10,1 Hz, ³J_{6a,6b} = 5,5 Hz, 1H, H-6_{a,b}), 1,11 (s, 9H, CH₃, tBu), 0,95 (s, 9H, CH₃, tBu).

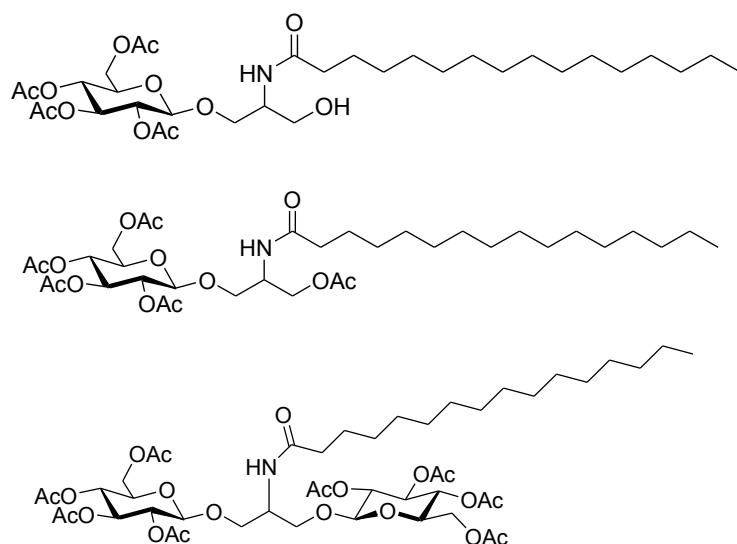
¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ_C: 168,2 (CO); 166,0 (CO); 139,0; 133,8; 133,0; 132,9; 131,5; 129,6; 129,6; 129,0; 128,3; 128,2; 123,2; 112,5; 97,4 (C-1); 71,6 (CH₂, benzyl); 71,0 (C-3); 70,9 (C-4); 69,4 (CH₂CH₂, benzyl); 68,6 (C-2); 67,2; 66,9 (H-6, H-5); 65,7 (CH₂, Serinol); 50,7 (CH_{Serinol}); 41,4 (CH₂CH₂, benzyl); 27,5 (CH₃, tBu); 27,2 (CH₃, tBu).

N-(tert-Butoxycarbonyl)-4-(4,6-O-di-tert-butyldisilanediyl-2,3-dibenzoyl- β -D-galactopyranosyl)-methyl-2-dimethyl-1,3-dioxazolidin 46



Ethyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilanediyl-1-thio-2,3-dibenzoyl- β -D-galactopyranosid (0,17 mmol, 78,3 mg, 1,6 eq) und *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-hydroxymethyl-2-dimethyl-1,3-dioxazolidin (0,11 mmol, 25 mg, 1 eq) werden zusammen im Vakuum getrocknet. Das *N*-Iodosuccinimid (0,17 mmol, 38,2 mg, 1,6 eq) wird separat im Vakuum getrocknet. 200 mg Molekularsiebe werden im Vakuum unter Heizen aktiviert. Alle Verbindungen werden 4 h getrocknet. Das Dichlormethan wird frisch destilliert bevor 1 mL zum Lösen des Donors und Akzeptors genutzt wird. Zu der Lösung werden sofort unter Argon die aktivierten Molsiebe gegeben und die Reaktionslösung wird 1 h gerührt. Anschließend wird die Reaktionstemperatur auf -60 °C mittels Aceton/Trockeneisbad heruntergekühlt. Das *N*-Iodosuccinimid (0,17 mmol, 38,2 mg, 1,6 eq) sowie eine kleine Menge des Silbertriflats (Spatelspitze) werden dann unter Argon zugegeben. Die Temperatur des Kältebads wird langsam erhöht. Bei einer Temperatur von -25 °C ist ein Farbumschlag der Lösung zu beobachten. Die Temperatur (-10 °C) wird 30 min konstant gehalten. Die Lösung verfärbt sich zu einem intensiven Gelb-Orangeton. Das DC zeigt die Umsetzung des Ausgangsstoffes (Petroleumether-Ethylacetat, 3:1; R_F = 0,48). Die Reaktion wird mit NaHCO₃ (100 μ L) quenched und nach Verdünnen der Lösung mit 20 mL DCM werden die Molekularsiebe durch Baumwollwatte abfiltriert. Die Reaktionslösung wird mit NaS₂O₃:NaHCO₃ (1:1, 10 mL) gewaschen, sodass eine farblose Lösung erhalten wird. Der Überschuss des Lösungsmittels wird unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Es wird ein Rohprodukt von 119,2 mg erhalten. Zur Aufreinigung wird die Gelchromatografie mit Toluol als Eluent verwendet. Es werden zwei Fraktionen isoliert (a 13 mg und b 20,9 mg). Die zweite Fraktion enthielt das gewünschte Produkt **46** (33 %, 20,9 mg). Es handelte sich allerdings um ein Produktgemisch aus mehreren Isomeren.

***N*-Palmitoyl-1-hydroxy-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucosepyranosyl)serinol 47, *N*-Palmitoyl-1-acetyl-3-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucosepyranosyl)serinol 48, *N*-Palmitoyl-1,3-bis-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucosepyranosyl)serinol 49**



β -D-Glucosepentaacetat (60 mg, 0,15 mmol, 0,5 eq) und 2-(Hexadecanoylamino)-1,3-propandiol (100 mg, 0,30 mmol, 1 eq) werden im Vakuum getrocknet und in trockenem Dichlormethan (1 mL) und trockenem Acetonitril (1 mL) gelöst. Es bildet sich eine

Suspension. Anschließend wird $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (19 μL , 0,15 mmol, 0,5 eq) zugegeben. Die Reaktion wird über Nacht bei Raumtemperatur (17 °C) gerührt. Die Kontrolle mittels DC (Petroleumether-Ethylacetat, 1:1). zeigt keine Umsetzung des β -D-Glucosepentaacetats. Die Reaktionslösung wird auf 40 °C erhitzt und eine weitere Portion $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (19 μL , 0,15 mmol, 0,5 eq) wird zugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei 40 °C gerührt und dann mit 100 μL NaHCO_3 -lsg. gequencht. Die Reaktionslösung wird mit 10 mL Dichlormethan verdünnt und mit NaHCO_3 -lsg. (2 x 5 mL) sowie Wasser (2 x 5 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Gelchromatografie ((50 x 2,5 cm Säule) Biobeads S x 3 (200-400 mesh, Bio-Rad)) mit Toluol als Eluent aufgetrennt. Es werden drei Fraktionen erhalten: 2-N-(hexadecanoylamino)-1,3-bis-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosepyranosyl)serinol, 2-N-(hexadecanoylamino)-1-acetyl-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosepyranosyl)serinol sowie das 2-N-(Hexadecanoylamino)-1-hydroxy-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosepyranosyl)-serinol erhalten. Die beiden monoglycosylierten Produkte **47** und **48** werden mittels Säulenchromatografie (Kieselgel) aufgetrennt. Es wird ein farbloser Sirup des *N*-Palmitoyl-1-hydroxy-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucose)-serinols mit einer Aubeute von 10 % (10 mg, $R_F = 0,25$, Petroleumether-Ethylacetat, 1:4) erhalten. Es handelt sich um ein Diastereomerengemisch.

HRESIMS: Kalkulierte Masse 682,3778 m/z , gefundene 682,3773 m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 6,08 (d, $^3J = 7,6$ Hz, 1H, NH), 6,02 (d, $^3J = 7,6$ Hz, 1H, NH), 5,22 (^1t , $^3J_{3,4} = 9,5$ Hz, 2H, 2 x H-3), 5,06 (t, $^3J_{4,3} = 9,5$ Hz, 2H, 2 x H-4), 5,03 – 4,94 (m, 2H, 2 x H-2), 4,52 (2 x d, $^3J_{1,2} = 8,0$ Hz, 2H, H-1), 4,31 – 4,11 (m, 4H), 4,11 – 3,99 (m, 2H, CHN), 3,96 – 3,51 (m, 12H), 2,19 (t, $^3J = 7,1$ Hz, 4H, 2 x α -CH₂), 2,10 (s, 6H, CH₃, Acetyl), 2,06 (s, 6H, CH₃, Acetyl), 2,04 (s, 6H, CH₃, Acetyl), 2,01 (s, 6H, CH₃, Acetyl), 1,69 – 1,55 (m, 4H, 2 x β -CH₂), 1,39 – 1,18 (m, 48H, CH₂, Alkylkette), 0,88 (t, $^3J = 6,6$ Hz, 6H, 2 x CH₃, Alkylkette).

Das *N*-Palmitoyl-1-acetyl-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosepyranosyl)serinol wird mit einer Ausbeute von 14,7 % (15,5 mg, $R_F = 0,60$, Petroleumether-Ethylacetat, 1:4) isoliert.

HRESIMS: Kalkulierte Masse 724,3884 m/z , gefundene Masse 724,3857 m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 5,85 (d, $^3J = 8,4$ Hz, 1H, NH), 5,77 (d, $^3J = 8,4$ Hz, 1H, NH), 5,21 (^1t , $^3J_{3,4} = 9,5$ Hz, 2H, H-3), 5,12 – 4,93 (m, 4H, H-4, H-2), 4,50 (2 x d, $^3J_{1,2} = 7,9$ Hz, 2H; H-1), 4,42 – 4,04 (m, 11H), 3,95 – 3,56 (m, 7H), 2,23 – 2,11 (m, 4H, α -CH₂), 2,09 (s, 6H, CH₃, Acetyl), 2,06 (s, 12H, CH₃, Acetyl), 2,02 (d, $J = 3,0$ Hz, 6H, CH₃, Acetyl), 2,01 (s, 6H, CH₃, Acetyl), 1,61 (m, 4H, β -CH₂), 1,39 – 1,18 (m, 48H, CH₂, Alkyl), 0,88 (t, $^3J = 6,6$ Hz, 6H, CH₃, Alkylkette).

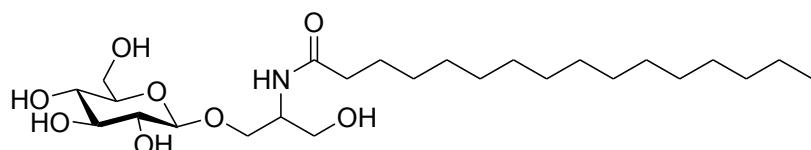
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 173,0 (CO); 172,9 (CO); 170,9 (CO); 170,7 (CO); 170,6 (CO); 170,5 (CO); 170,1 (CO); 169,4 (CO); 169,4 (CO); 100,9 (C-1); 100,9 (C-1); 72,5 (C-3); 72,0 ; 72,0; 71,3 (C-2); 71,1 (C-2); 68,5 (C-4); 68,3 (C-4); 68,2; 63,2; 62,5 (CH₂, Serinol); 61,8 (CH₂, Serinol); 47,8 (CH₂, Serinol); 47,5 (CH₂, Serinol); 36,7 (α -CH₂); 36,7 (α -CH₂); 31,9 (CH₂); 29,7 (CH₂); 29,6 (CH₂); 29,5 (CH₂); 29,3 (CH₂); 29,3 (CH₂); 25,6(β -CH₂); 22,7 (CH₃, Acetyl); 20,7 (CH₃, Acetyl); 20,7 (CH₃, Acetyl); 20,5 (CH₃, Acetyl); 14,1 (CH₃, Alkylkette).

Das *N*-Palmitoyl-1,3-bis-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosepyranosyl)serinol wird mit einer Ausbeute von 4 % (6 mg, $R_F = 0,82$, Petroleumether-Ethylacetat, 1:4) isoliert.

HRESIMS: Kalkulierte Masse 1012,4729 m/z , gefundene Masse 1012,4722 m/z [M+Na]⁺.

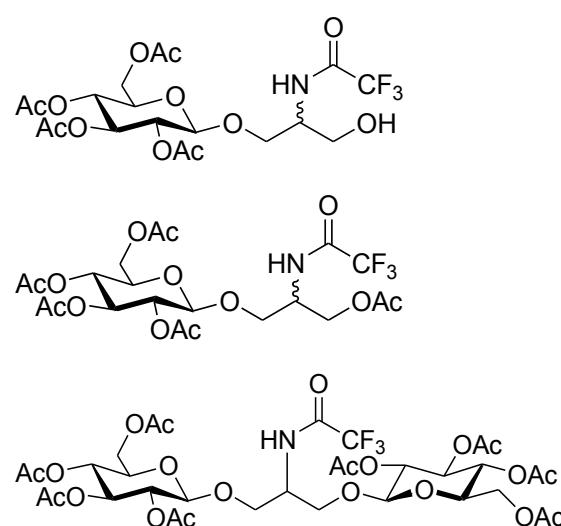
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ _H: 5,83 (d, J = 8,2 Hz, 1H, NH), 5,27 – 5,15 (m, 2H, H-3), 5,14 – 4,92 (m, 4H, 2 x H-4, 2 x H-2), 4,51 (d, $^3J_{H,2}$ = 8,0 Hz, 2H, H-1), 4,35 – 4,10 (m, 5H, H-6, CHN), 3,85 – 3,48 (m, 6H, H-5, CH₂, Serinol), 2,10 (s, 6H, CH₃, Acetyl), 2,07 (s, 3H, CH₃, Acetyl), 2,05 (s, 3H, CH₃, Acetyl), 2,04 (s, 3H, CH₃, Acetyl), 2,03 (s, 3H, CH₃, Acetyl), 2,02 (s, 3H, CH₃, Acetyl), 2,01 (s, 3H, CH₃, Acetyl), 1,60 (br m, 2H, β -CH₂), 1,32 – 1,22 (m, 24H, CH₂), 0,89 (t, 3J = 6,7 Hz, 3H, CH₃, Alkylkette).

N-Palmitoyl-1-hydroxy-3-(2,3,4,6-tetra-hydroxy- β -D-glucopyranosyl)serinol 50



N-Palmitoyl-1-hydroxy-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)serinol (0,015 mmol, 10 mg) wird in Methanol (1,5 mL) und Dichlormethan (0,5 mL) gelöst. Nach dem Lösen wird Natriummethanolat (1 M, 30 μ L) zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur (23 °C) gerührt. Die Reaktion wird mit CO₂ gequenched und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mit frisch destilliertem Butanol (10 mL) wieder gelöst und mit Wasser gewaschen (5 mL). Das Lösungsmittel wird entfernt und ein farbloser Sirup wird erhalten. HRESIMS: Kalkulierte Masse 514,3356, gefundene Masse 514,3338 m/z [M+Na]⁺.

2N-(Trifluoroacetyl)-1-hydroxy-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)serinol 51, 2N-(Trifluoroacetyl)-1-acetyl-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)serinol 52, 2N-(Trifluoroacetyl)-1,3-bis-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)serinol 53



β -D-Glucosepentaacetat (206,9 mg, 0,53 mmol, 1 eq) und TFA-Serinol (100 mg, 0,53 mmol, 1 eq) werden im Vakuum getrocknet und dann in trockenem Acetonitril (1 mL) unter Argon gelöst. Anschließend wird $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (134 μL , 1,06 mmol, 2 eq) unter Argon zugegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur (20 °C) gerührt. Die Reaktion wird dann mit 100 μL NaHCO_3 -lsg. gequencht und mit 10 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wird mit NaHCO_3 (2x5 mL) und Wasser (2x5 mL) gewaschen. Das DC zeigt mehrere Produkte. Zum Trennen der Produkte wird die Gelchromatografie ((50 x 2,5 cm Säule) Bio Beads S x 3 (200-400 mesh, Bio-Rad)) mit Toluol als Eluent verwendet. Anschließend wird durch eine Säulenchromatografie mit Kieselgel (Petroleumether-Ethylacetat, 1:2) eine weitere Trennung erzielt. Es werden 2N-(Trifluoroacetyl)-1,3-bis-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosepyranosyl)serinol, 2N-(Trifluoroacetyl)-1-hydroxy-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosepyranosyl)serinol sowie 2N-(Trifluoroacetyl)-1-acetyl-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosepyranosyl)serinol isoliert.

Das 2N-(Trifluoroacetyl)-1,3-bis(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosepyranosyl)serinol wird mit einer Ausbeute von 3,5 % (16 mg) ($R_F = 0,66$, Petroleumether-Ethylacetat, 1:4) erhalten.

HRESIMS: Kalkulierte Masse 870,2256, gefundene Masse m/z 870,2200 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 6,83 (d, $^3J = 7,8$ Hz, 1H, NH), 5,27 – 5,16 (m, 2H, 2 x H-3), 5,14 – 4,93 (m, 4H, 2 x H-4, 2 x H-2), 4,53 (d, $^3J_{1,2} = 7,9$ Hz, 2H, 2 x H-1), 4,31 – 4,20 (m, 4H, 2 x H-6_{a,b}, 2 x CHN), 4,19 – 4,09 (m, 2H, 2 x H-6_{a,b}), 3,98 – 3,62 (m, 6H, 2 x H-5, 2 x CH_2 , Serinol), 2,10 (s, 3H, CH_3 , Acetyl), 2,09 (s, 3H, CH_3 , Acetyl), 2,07 (s, 3H, CH_3 , Acetyl), 2,04 (s, 3H, CH_3 , Acetyl), 2,03 (s, 6H, 2 x CH_3 , Acetyl), 2,01 (s, 3H, CH_3 , Acetyl), 2,01 (s, 3H, CH_3 , Acetyl).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 170,6 (CO); 170,5 (CO); 170,1 (CO); 170,1 (CO); 169,4 (CO); 169,31 (CO); 157,2 (CF_3); 156,7 (CF_3); 101,2 (C-1); 100,8 (C-1); 72,6; 72,4 (C-3); 72,2 ; 72,1; 71,3 (C-5); 71,1 (C-2); 68,3; 68,1 (C-4); 67,6 (CH_2 , Serinol); 67,0 ((CH_2 , Serinol); 61,8 (C-6); 61,6; 49,3 ($\text{CH}_{\text{Serino}}$); 20,5 (CH_3 , Acetyl).

Das 2N-(Trifluoroacetyl)-1-hydroxy-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosepyranosyl)serinol wird mit einer Ausbeute von 6,9 % (18,9 mg) ($R_F = 0,58$, Petroleumether-Ethylacetat, 1:4) erhalten.

HRESIMS: Kalkulierte Masse 540,1305, gefundene Masse m/z 540,1300 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 7,03 (d, $^3J = 7,5$ Hz, 1H, NH), 6,96 (d, $^3J = 7,2$ Hz, 1H, NH), 5,27 – 5,16 (m, 2H, H-3), 5,11 – 4,92 (m, 4H, H-4, H-2), 4,53 (2 x d, $^3J_{1,2} = 7,9$ Hz, $^3J_{1,2} = 7,9$ Hz, 2H, H-1), 4,29 – 3,99 (m, 6H, 2 x H-6a,b, 2 x CHN), 3,93 – 3,62 (m, 10H, 2 x H-5, 2 x CH_2CHCH_2), 2,09 (s, 6H, 2 x CH_3 , Acetyl), 2,06 (s, 3H, CH_3 , Acetyl), 2,04 (s, 3H, CH_3 , Acetyl), 2,03 (s, 6H, 2 x CH_3 , Acetyl), 2,01 (s, 6H, 2 x CH_3 , Acetyl).

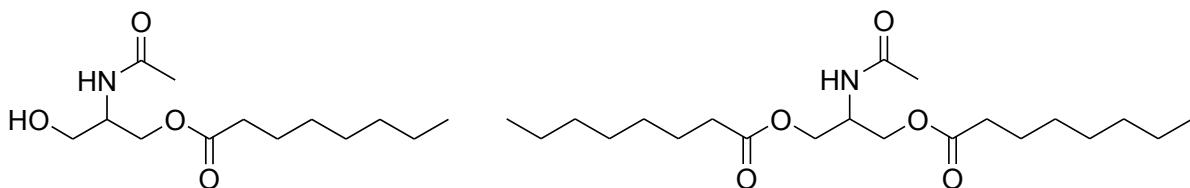
Das 2N-(Trifluoroacetyl)-1-acetyl-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucosepyranosyl)-serinol wird mit einer Ausbeute von 8.08 % (23,8 mg) ($R_F = 0,70$, Petroleumether-Ethylacetat, 1:4).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 6,93 (d, $^3J = 7,8$ Hz, 1H, NH), 6,82 (d, $^3J = 7,8$ Hz, 1H, NH), 5,22 (t, $^3J_{3,4} = 9,5$ Hz, 2H, 2 x H-3), 5,14 – 4,93 (m, 4H, 2 x H-4, 2 x H-2), 4,53 (dd, $^3J_{1,2} = 7,9$ Hz, $^3J_{1,2} = 7,9$ Hz, 2H, 2 x H-1), 4,45 – 4,10 (m, 6H, 2 x H-6a,b, 2 x CHN), 4,02 – 3,66 (m, 10H, 2 x H-5, 2 x CH_2CHCH_2), 2,09 (s, 3H, CH_3 , Acetyl), 2,09 (s, 3H, CH_3 , Acetyl), 2,08 (s, 3H, CH_3 , Acetyl), 2,07 (s, 3H, CH_3 , Acetyl), 2,06 (s, 3H, CH_3 , Acetyl), 2,04 (s, 3H, CH_3 , Acetyl), 2,03 (s, 6H, 2 x CH_3 , Acetyl), 2,01 (s, 6H, 2 x CH_3 , Acetyl).

7.3 Enzymkatalysierte Synthese von Serinolderivaten

Die enzymkatalysierten Reaktionen wurden entweder in Rundkolben oder in 8-mL-Vails durchgeführt. Die Reaktionslösungen wurden dann entweder im Wasserbad oder im Thermoschüttler bei 40 °C gerührt bzw. geschüttelt. Das Enzym wurde erst nach einer Temperierungszeit von 30 min zugefügt.

N-Acetyl-*O*-mono-octanoyl-serinol 57*R,S*, *N*-Acetyl-*O*-bis-octanoyl-serinol 58



N-Acetylserinol (4,5 mmol, 600 mg, 1eq) wird in 20 mL Acetonitril gelöst und das Vinyl-n-octanoat (15,5 mmol, 3 mL, 3,4 eq) zugegeben. Die Reaktionslösung wird auf 40 °C erwärmt und für 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Dann wird das Novozym 435® (10 mg) zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Das Lyophilisat wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatografie (Ethylacetat) aufgearbeitet. Der Diester konnte mit einer Ausbeute von 52,5 % (456 mg) erhalten werden. Der Monoester wurde mit kleinen Verunreinigungen mit einer Ausbeute von 66,8 % (390 mg) isoliert.

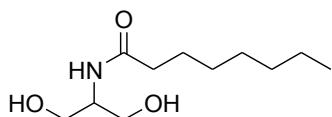
Diester:

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ_H: 7,96 (d, ³J = 8,0 Hz, 1H, NH), 4,26 – 4,10 (m, 1H, CH_{Serinol}), 4,10 – 3,91 (m, 4H, 2 x CH₂, Serinol), 2,28 (t, ³J = 7,3 Hz, 4H, 2 x α-CH₂), 1,81 (s, 3H, CH₃, Acetyl), 1,61 – 1,38 (m, 4H, 2 x β-CH₂), 1,34 – 1,13 (m, 16H, 8 x CH₂), 0,85 (t, ³J = 6,6 Hz, 6H, 2 x CH₃, Alkylkette).

Monoester:

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ_H: 7,74 (d, ³J = 7,4 Hz, 1H, NH), 4,80 (t, ³J = 5,1 Hz, 1H, OH), 4,15 – 4,00 (m, 1H, CH_{Serinol}), 4,00 – 3,83 (m, 2H, CH₂, Serinol), 3,50 – 3,22 (m, 3H, CH₂, Serinol, H₂O), 2,27 (t, ³J = 7,4 Hz, 2H, α-CH₂), 1,80 (s, 3H, CH₃, Acetyl), 1,57 – 1,42 (m, 2H, β-CH₂), 1,35 – 1,14 (m, 8H, 4 x CH₂), 0,85 (t, ³J = 6,7 Hz, 3H, CH₃, Alkylkette).

N-Octanoylserinol 55



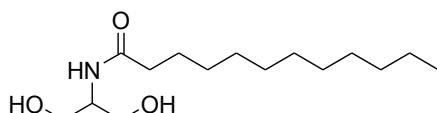
Serinol (4 mmol, 364,44 mg, 1 eq) und Vinyl-n-octanoat (0,04 mol, 7,740 mL, 10 eq) werden in 10 mL Acetonitril gelöst. Die Reaktionslösung wird auf 40 °C erwärmt und für 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Dann wird die Cal A (10 mg) zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Nachdem sich die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt hat,

fallen nadelförmige Kristalle aus. Es wird das 2*N*-Octanoylamino-1,3-propandiol mit einer Ausbeute von 33 % (285 mg) isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ_H: 7,34 (d, ³J = 8,0 Hz, 1H, NH), 4,50 (s, 2H, 2 x OH), 3,79 – 3,58 (m, 1H, CH), 3,54 – 3,36 (m, 4H, 2 x CH₂, Serinol), 2,06 (t, ³J = 7,4 Hz, 2H, α -CH₂), 1,59 – 1,37 (m, 2H, β -CH₂), 1,34 – 1,13 (m, 8H, 4 x CH₂), 0,85 (t, ³J = 6,7 Hz, 3H, CH₃, Alkylkette).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ_C: 172,1 (CO); 60,2 (2x CH₂, Serinol); 52,6 (CH_{Serinol}); 35,4 (CH₂); 31,1 (CH₂); 28,6 (CH₂); 28,4 (CH₂); 25,3 (CH₂); 22,0 (CH₂); 13,8 (CH₃).

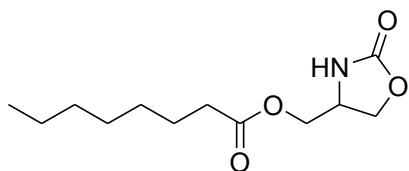
N-Lauroylserinol 56



Serinol (0,53 mmol, 48,7 mg, 1 eq) und Vinyl-n-octanoat (5 mol, 1040 µL, 10 eq) werden in 4 mL Acetonitril gelöst. Die Reaktionslösung wird auf 40 °C erwärmt und 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Dann wird die Cal A (2,5 mg) zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Nach dem sich die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt hat, fallen nadelförmige Kristalle aus. Es wird das 2*N*-Lauroylserinol mit einer Ausbeute von 36,6 % (54 mg) isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ_C: 7,41 (d, ³J = 8,0 Hz, 1H, NH), 4,55 (t, ³J = 5,5 Hz, 2H, 2 x OH), 3,75 – 3,62 (m, 1H, CH_{Serinol}), 3,41 – 3,34 (m, 4H, 2 x CH₂, Serinol), 2,06 (t, ³J = 7,4 Hz, 2H, α -CH₂), 1,54 – 1,38 (m, 2H, β -CH₂), 1,35 – 1,11 (m, 16H, 8 x CH₂), 0,85 (t, ³J = 6,7 Hz, 3H, CH₃, Alkylkette).

4-Octanoyl-1,3-oxazolidin-2-on 6R,S



4-Hydroxymethyl-1,3-oxazolidin-2-on (10,5 mmol, 1,223 mg, 1 eq) und Vinyl-n-octanoat (31,6 mmol, 6 mL, 3 eq) werden in 40 mL Acetonitril gelöst. Die Reaktionslösung wird auf 40 °C erwärmt und für 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Dann wird das Novozym 435® (9,5 mg, 0,0078 eq) zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Nachdem sich die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt hat, wird das Lyophilisat abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wird eine orange flüssige Phase sowie eine feste Phase erhalten. Beide Phasen werden getrennt und separat säulenchromatografisch (Ethylacetat:Heptan, 5:1) aufgearbeitet. Der Feststoff wurde als Ausgangsstoff identifiziert. Nach Aufreinigung der flüssigen Phase werden 15 % (41 mg) des 4-Octanoyl-1,3-oxazolidin-2-ons isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,81 (s, 1H), 4,44 – 4,27 (m, 1H), 4,16 – 3,89 (m, 4H), 2,31 (t, ³J = 7,4 Hz, 2H), 1,61 – 1,43 (m, 2H), 1,25 (s, 8H), 0,86 (t, ³J = 6,7 Hz, 3H).

8. Literaturverzeichnis

- [1] Pagliaro M., Ciriminna R., Kimura H., Rossi M., Pina C. D.; *From glycerol to value-added products*; Angew. Chem. Int. Ed. **2007**, 46, 4434 – 4440
- [2] Min J. Y., Lee E. Y.; *Lipase-catalyzed simultaneous biosynthesis of biodiesel and glycerol carbonate from corn oil in dimethyl carbonate*; Biotechnol Lett, **2011**, 33, 1789–1796
- [3] Yang F., A Hanna M., R. Sun; *Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production*; Biotechnology for Biofuels **2012**, 5, 13
- [4] Dietz D., Zeng A.-P.; *Efficient production of 1,3-propanediol from fermentation of crude glycerol with mixed cultures in a simple medium*; Bioprocess Biosyst Eng **2014**, 37, 225–233
- [5] Hutňan M., Kolesárová N., Bodík I.; *Anaerobic digestion of crude glycerol as sole substrate in mixed reactor*; Environmental Technology **2013**, 34, 13-14, 2179-2187
- [6] Asad-ur-Rehman, Wijesekara R.G S., Nomura N., Sato S., Matsumura M.; *Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by Clostridium butyricum*; J Chem Technol Biotechnol, **2008**, 83, 1072–1080
- [7] Michaelis M., Geisslinger G., Scholich K.; *2-Amino-1,3-propanediol compounds for the treatment of various pain*; US**2004/0248988A1**
- [8] Andreeßen B., Steinbüchel A.; *Biotechnological conversion of glycerol to 2-amino-1,3-propanediol (serinol) in recombinant Escherichia coli*; Appl Microbiol Biotechnol, **2012**, 93:357–365
- [9] Felder E., Vitale R. S., Bianchi S., Bollinger H.; *Process for the preparation of serinol and of serinol derivatives, and products obtained therefore*; **1985/4503252**
- [10] Bieberich E., Hub B., Silvaa J., MacKinnona S., Yua R. K., Fillmorec H., Broaddusc W. C., Ottenbrite R. M.; *Synthesis and characterization of novel ceramide analogs for induction of apoptosis in human cancer cells*; Cancer Letters, **2002**, 181, 55–64
- [11] Cameron D. C., Altaras N. E., Hoffman M. L., Shaw A. J.; *Metabolic Engineering of Propanediol Pathways*; Biotechnol. Prog. **1998**, 14, 116-125
- [12] Dubey K. K., Jawed A., Haque S.; *Enhanced extraction of 3-demethylated colchicine from fermentation broth of Bacillus megaterium: Optimization of process parameters by statistical experimental design*; Eng. Life Sci., **2011**, 11, No. 6, 598–606
- [13] Tippkötter N., Al-Kaidy H., Wollny S., Ulber R.; *Functionalized Magnetizable Particles for Downstream Processing in Single-Use Systems*; Chemie Ingenieur Technik, **2013**, 85, No. 1-2, 76-86
- [14] Strube J., Grote F., Josch J. P., Ditz R.; *Process Development and Design of Downstream Processes*; Chemie Ingenieur Technik **2011**, 83, No. 7, 1044–1065

- [15] Anand P., Saxena R. K., Marwah R. G.; *A novel downstream process for 1,3-propanediol from glycerol-based fermentation*; Appl Microbiol Biotechnol, **2011**, 90:1267–1276
- [16] van den Berg C., Heeres A. S., van der Wielen L. A. M., Straathof A. J. J.; *Simultaneous Clostridial Fermentation, Lipase-Catalyzed Esterification, and Ester Extraction to Enrich Diesel with Butyl Butyrate*; Biotechnology and Bioengineering, **2013**, Vol. 110, No. 1, 137-142
- [17] Liu S., Adhikari S. R. M. S., Fernando S.; *Adsorption of glycerol from biodiesel washwaters*; Environmental Technology, **2009**, Vol. 30, No. 5, 505–510
- [18] Minamisawa K., Watanabe H.; *Serinol (2-Amino-1,3-propanediol) and 3-Amino-1,2-propanediol in Soybean Nodules*; Plant Cell Physiol., **1986**, 27(6), 1109-1116
- [19] Malinowski J. J.; *Reactive Extraction for Downstream Separation of 1,3-Propanediol*; Biotechnol. Prog. **2000**, 16, 76-79
- [20] Huang S., Qin W., Youyuan Dai; *Recovery of pyruvic acid with weakly basic polymeric sorbents*; J Chem Technol Biotechnol, **2008**, 83, 683–687
- [21] Alves M. J., Nascimento S. M., Pereira I. G., Martins M. I., Cardoso V. L, Reis M.; *Biodiesel purification using micro and ultrafiltration membranes*; Renewable Energy **2013**, 58, 15-20
- [22] Barski P., Kowalczyk J., A. Lindstaedt, J. Puzewicz-Barska, Dariusz Witt; *Evaluation of solid phase extraction for downstream separation of propane-1,3-diol and butan-1-ol from fermentation broth*; Process Biochemistry **2012**, 47, 1005–1010
- [23] Li Z., Teng H., Xiu Z.; *Extraction of 1,3-propanediol from glycerol-based fermentation broths with methanol/phosphate aqueous two-phase system*; Process Biochemistry **2011** 46, 586–591
- [24] Celanire S., Quere L., Denonne F.; *Compounds comprising a lactam or lactam derivative moiety, processing for making them, and their use*; WO2007/048595 A1
- [25] Sugiyama S., Ishida A., Tsuchida M., Ishii K.; *Total synthesis of (R)-(-)-actisonitrile via O-alkylation of optically active 4-hydroxymethyloxazolidin-2-one derivative*; Tetrahedron: Asymmetry **2011** 22, 1918–1923
- [26] Frommeyer M., Bergander K., Steinbüchl A.; *Guanidination of soluble lysine-rich cyanophycin yields a homoarginine-containing polyamide*; Appl. Environ. Microbiol. **2014**, 80(8), 2381
- [27] Nardi A.; Villa M.; *Process for the preparation of 2-amino-1,3-propanediol*; US Patent 5922917 **1999**
- [28] Zemplén G., Kunz A., *Studien über Amygdalin, III: Über l-Amygdalinsäure*, European Journal of Inorganic Chemistry **1924**, 57, 1194-1200
- [29] Kramer S., Nolting B., Ott A.-J., Vogel C.; *Synthesis of Homogalacturonan Fragments*; J. Carbohydrate Chemistry **2000** 19(7), 891-921

- [30] Imamura A., Kimura A., Ando H., Ishida H., Kiso M., *Extended Applications of Di-tert-butylsilylene-Directed α -Predominant Galactosylation Compatible with C2-Participating Groups toward the Assembly of Various Glycosides*; Chem. Eur. J. **2006**, 12, 8862–8870
- [31] Schulz M., Christoffers J.; *An Unprecedented Ring Transformation of a 4-(Aminomethyl)oxazoline Derivative to a 4-(Hydroxymethyl)imidazoline*; Synthesis **2014**, 46, 0081–0086
- [32] Tarnowski A., Retz O., Bär T., Schmidt R. R.; *Synthesis of Sphingosine-1-phosphonate and Homosphingosine-1-phosphonate*; Eur. J. Org. Chem. **2005**, 1129–1141
- [33] Sundermann T., Arnsmann M., Schwarzkopf J., Hanekamp W. and Lehr M.; *Convergent and enantioselective syntheses of cytosolic phospholipase A2a inhibiting N-(1-indazol-1-ylpropan-2-yl)carbamates*; Org. Biomol. Chem. **2014**, 12, 4021–4030
- [34] Lee I., Choe Y. S., Choi J. Y., Lee K.-H., Kim B.-T.; *Synthesis and Evaluation of 18F-Labeled Styryltriazole and Resveratrol Derivatives for β -Amyloid Plaque Imaging*; J. Med. Chem. **2012**, 55, 883–892
- [35] Smith G., Glaser M., Perumal M., Nguyen Q.-D., Shan B., Årstad E., Aboagye E. O.; *Design, Synthesis, and Biological Characterization of a Caspase 3/7 Selective Isatin Labeled with 2-[18F]fluoroethylazide*; J. Med. Chem. **2008**, 51, 8057–8067
- [36] Apparu M., Tiba Y. B., Leo P.-M., Hamman S., Coulombeau C.; *Determination of the enantiomeric purity and the configuration of β -aminoalcohols using (R)-2-fluorophenylacetic acid (AFPA) and fluorine-19 NMR: application to β -blockers*; Tetrahedron: Asymmetry **2000** 2885±2898
- [37] Hanson R. N., Hua E., Hendricks J. A., Labaree D., Hochberg R. B.; *Synthesis and evaluation of 11b-(4-Substituted phenyl) estradiol analogs: Transition from estrogen receptor agonists to antagonists*; Bioorganic & Medicinal Chemistry **2012**, 20 3768–3780
- [38] Dack K. N., Mills, J. E., Skerratt S. E.; *Pyrrolidines*; US 2010/0120793 A1 **2010**
- [39] Erfahrung durch Alexander Zinin, Zelinsky Institut für Organische Chemie, Moskau
- [40] Meyers, A. J., Schmidt W., McKennon; *Asymmetric Addition to Chiral Aromatic and Unsaturated Oxazolines Using a Novel Chiral Auxiliary*; Synthesis **1992**, 250-262
- [41] Veerapen N., Brigl M., Garg S., Cerundolo V., Cox L.R., Brenner M.B., Besra G.S.; *Synthesis and biological activity of α -galactosyl ceramide KRN7000 and galactosyl ($al \rightarrow 2$) galactosyl ceramide*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **2009**, 19 4288–4291

- [42] Kimura A. , Imamura A., Ando H., Ishida H., Kiso M.; *A Novel Synthetic Route to a-Galactosyl Ceramides and iGb3 Using DTBS-Directed α -Selective Galactosylation*; **SYNLETT** **2006**, No. 15, 2379–2382
- [43] Ilangovan A., Kumar R. G.; *2,2-Bis(ethoxycarbonyl)vinyl (BECV) as a versatile amine protecting group for selective functional-group transformations*; **Chem. Eur. J.** **2010**, 16, 2938–2943
- [44] Shin J.-H., Shon J.C., Lee K., Kim S., Park C. S., Choi E. H., Lee C. H., Lee H. S., Liu K.-H., *A lipidomic platform establishment for structural identification of skin ceramides with non-hydroxyacyl chains*, **Anal Bioanal Chem** **2014**, 406, 1917–1932
- [45] Meckfessel M. H., Brandt S.; *The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products*; **J Am Acad Dermatol** **2014**, Vol. 71, No. 1, 177–183
- [46] Milkereit G., Garamus V.M., Veermans K., Willumeit R., Vill V., *Synthesis and mesogenic properties of a Y-shaped glyco-glycero-lipid*; **Chemistry and Physics of Lipids** **2004**, 131, 51–61
- [47] Dagan A., Slavin S., Gatt S., Zahavi J.; *Novel synthetic analogs of sphingolipids*; **WO2009/060457 (A1)**
- [48] Neri. C., Williams J. M. J.; *Preparation of 2-oxazolidinones by enzymatic desymmetrisation*; **Tetrahedron: Asymmetry** **2002**, 13, 2197–2199
- [49] Riesenbeck D., Schulz V., Knorre W.A., Pohl H.-D., Korz D., Sanders E.A., Roß A., Deckwer W.-D.; *High cell density cultivation of Escherichia coli at controlled specific growth rate*; **Journal of Biotechnology** **1991**, 20, 17–28
- [50] Chen H., Zhang H., Thor D., Rahimian R., Guo X.; *Novel pH-sensitive cationic lipids with linear ortho ester linkers for gene delivery*; **European Journal of Medicinal Chemistry** **2012**, 52, 159–172
- [51] Müller A. O., Mrestani-Klaus C., Schmidt J., Ulbrich-Hofmann R., Dippe M.; *New cardiolipin analogs synthesized by phospholipase D-catalyzed transphosphatidylation*; **Chemistry and Physics of Lipids** **2012**, 165, 787–793
- [52] Wyszogrodzka M., Möws K., KamLage S., Wodzinska J., Plietker B., Haag R.; *New Approaches Towards Monoamino Polyglycerol Dendrons and Dendritic Triblock Amphiphiles*; **Eur. J. Org. Chem.** **2008**, 53–63
- [53] Gold H. Boot R. G., Aerts J. M. F. G., Overkleef H. S., Codée J. D. C., van der Marel G. A.; *A Concise Synthesis of Globotriaosylsphingosine*; **Eur. J. Org. Chem.** **2011**, 1652–1663
- [54] Mundy B. P., Ellerd M. G., Jr. Favaloro F. G.; *Name reactions and reagents in organic synthesis*; Second Edition, Wiley Interscience, **2005**, ISBN 0-471-22854-0
- [55] Tei T., Sato Y., Hagiya K., Tai A., Okuyama T., Sugimura T.; *“Chiral Perturbation Factor” Approach Reveals Importance of Entropy Term in Stereocontrol of the 2,4-Pentanediol-Tethered Reaction*; **J. Org. Chem.** **2002**, 67, 6593–6598

- [56] Jacobsen E. E., Lie A., Frigstada M. M. H., el-Behairyb M. F., Ljonesa T., Wohlgemuthc R., Anthonsen T.; *Desymmetrization of cbz-serinol catalyzed by crude pig pancreatic lipase reveals action of lipases with opposite enantioselectivity*; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **2013**, 85– 86, 134– 139
- [57] Prat D., Hayler J., Wells A.; *A survey of solvent selection guides*; Green Chem. **2014**, 16, 4546–4551
- [58] Mitchinson A., Atack J. R., Blurton P., Carling R. W., Castro J. L., Curley K. S., Russell M.G. N., Marshall G., McKernan R. M., Moore K. W., Narquizian R., Smith A., Street L. J., Thompson S.-A., Wafford K.; *2,5-Dihydropyrazolo[4,3c]-pyridin-3-ones: functionally selective benzodiazepine binding site ligands on the GABAA receptor*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **2004**, 14, 3441–3444
- [59] Gomez-Sanchez A.; Sempere; J. Bellanato E.; *Vibrational Spectroscopy and Conformations of Z-Alkoxy carbonyl-3-aminoacrylic Esters*; J. Chem. Soc. **1981**, Perkin Trans. 2, 561-570
- [60] Nishiwaki N., Matsushima K., Chatani M., Tamura M., Ariga M.; *New Reactivity of Nitropyrimidinone: Ring Transformation and N-C Transfer Reactions*; Synlett **2004**, No. 4, 703–707
- [61] Cammann K.; *Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren, Anwendung, Qualitätssicherung*; Heidelberg : Berlin, Akad. Verl. **2001**, ISBN 3-8274-0057
- [62] Hong Y. K., Hong W. H., Han D. H.; *Application of Reactive Extraction to Recovery of Carboxylic Acids*; Biotechnol. Bioprocess Eng. **2001**, 6, 386-394
- [63] <http://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten/preise-und-kosten/preise-glycerin-1.html>; Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR); Grafik: *Preise Glycerin*, 3 Jahre
- [64] Mönster A., Pastor A., Beutel S., Scheper T.; *Anwendung der Membranadsorbentechnologie zur Aufarbeitung und Isolierung von Enzymen*; Chemie Ingenieur Technik **2009**, 8, 81
- [65] Nishiwaki N., Matsushima K., Chatani M., Tamura M., Ariga M.; *New Reactivity of Nitropyrimidinone: Ring Transformation and N-C Transfer Reactions*; SYNLETT **2004**, 4, 0703–0707
- [66] Dahse S., *Masterarbeit: Enzymatische Synthese von Serinolderivaten*, Universität Rostock, **2013**

9. Anhang

9.1 Fermentationsbrühenmedien

9.1.1 Komplexmedium

Medienzusammensetzung

Zitronensäure	0,2 g/L
MgSO₄ 7 H₂O	0,3 g/L
H₃PO₄ (85%)	4,8 g/L
MnSO₄	64 mg/L
FeSO₄ 7 H₂O	40 mg/L
Corn steep liquor	97 g/L
GLycerol	20 g/L
Biotin	2 mg/L

9.1.2 Basalmedium (BM) (Andres et al., 2004)

Medienzusammensetzung

K₂HPO₄	14 g
KH₂PO₄	6 g
(NH₄)₂SO₄	3 g
MgSO₄ 7 H₂O	0,2 g
Hefeextrakt	0,67 g
Cystein-HCl	0,2 g
SL4 (Pfennig und Lippert, 1966)	1 mL

H₂O bidest	ad 1000 mL
pH 7,5 (HCl)	
EDTA	500 mg
FeSO₄ 7 H₂O	200 mg
ZnSO⁴ 7 H₂O	10 mg
MnCl₂ 4 H₂O	3 mg
H₃BO₃	30 mg
CoCl₂ 6 H₂O	20 mg
CuCl₂ 2 H₂O	1 mg
NiCl₂ 6 H₂O	2 mg
Na₂MoO₄ 2 H₂O	3 mg
H₂O bidest	ad 1000 mL

9.1.3 Riesenbergs-Medium

Medienzusammensetzung

Glucose (glycerol)	25,0 (30,0*) g (1021,0**) g	795,0
KH₂PO₄	13,3 g	
(NH₄)₂HPO₄	4,0 g	
MgSO₄ 7 H₂O	1,2 g (6 mL 1 M MgSO ₄) 20,0 g (16,6x) (81 mL 1 M)	

	MgSO ₄)
Zitronensäure	1,7 g
EDTA	8,4 mg
	13,0 mg (1,5x)
CoCl₂ 6 H₂O	2,5 mg
	4,0 mg (1,6x)
MnCl₂ 4 H₂O	15,0 mg
	23,5 mg (1,56x)
CuCl₂ 2 H₂O	1,5 mg
	2,5 mg (1,5x)
H₃BO₃	3,0 mg
	5,0 mg (1,66x)
Na₂MoO₄ 2 H₂O	2,5 mg
	4,0 mg (1,6x)
Zn(CH₃COO)₂ 2 H₂O	13,0 mg
	16,0 mg (1,23x)
Fe(III)zitrat	100,0 mg
	40,0 mg (0,4x)
Thiamin HCl	4,5 mg
Antischaum SPI	9 mL

9.1.4 Modified MSM (Kroll et al 2011)

Medienzusammensetzung

Glycerol/Gluconat	20,0 g/L (2,0 %)
Na₂HPO₄ 2 H₂O	4,5 g/L
KH₂PO₄	1,5 g/L

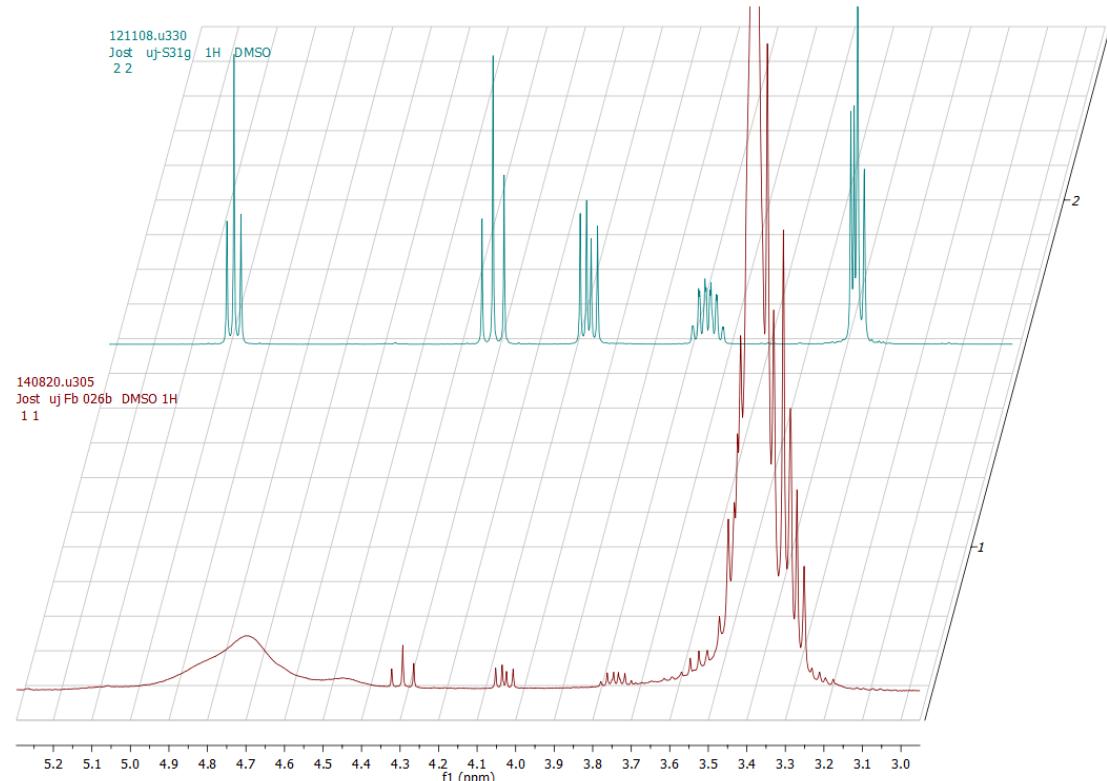
NH₄Cl	4,0 g/L
Ammoniumeisenzitrat	1,0 mg/L

Spurenelementlösung SEL (SL6-Lösung (Pfennig 1974) 0,1 mL/l)

MgSO₄ 7 H₂O	0,6 g/L
CaCl₂ 2 H₂O	0,15 g/L
SEL	1,0 mL/L
Vitaminlösung	1,0 mL/L

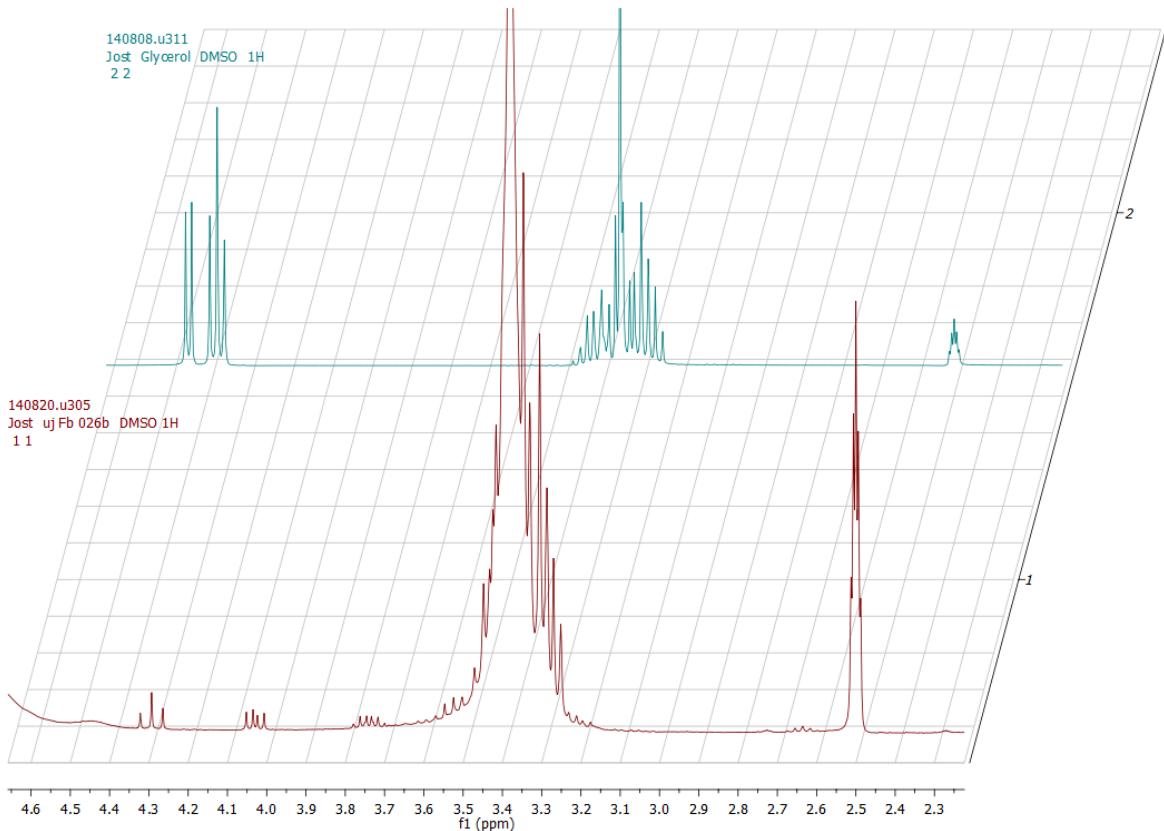
9.2 NMR-Spektren

9.2.1 Vergleich des 4-Hydroxymethyl-1,3-oxazolidin-2-ons.



Das Referenzmaterial (Reaktion in Wasser) ist im Spektrum blau abgebildet und die Synthese in der Fermentationsbrühe in dunkelrot.

9.2.2 Vergleich von reinem Glycerol in DMSO (blau) mit Glycerol aus der Fermentationbrühe (dunkelrot)



9.2.3 Ergänzung des Kapitels 4.2.1.3

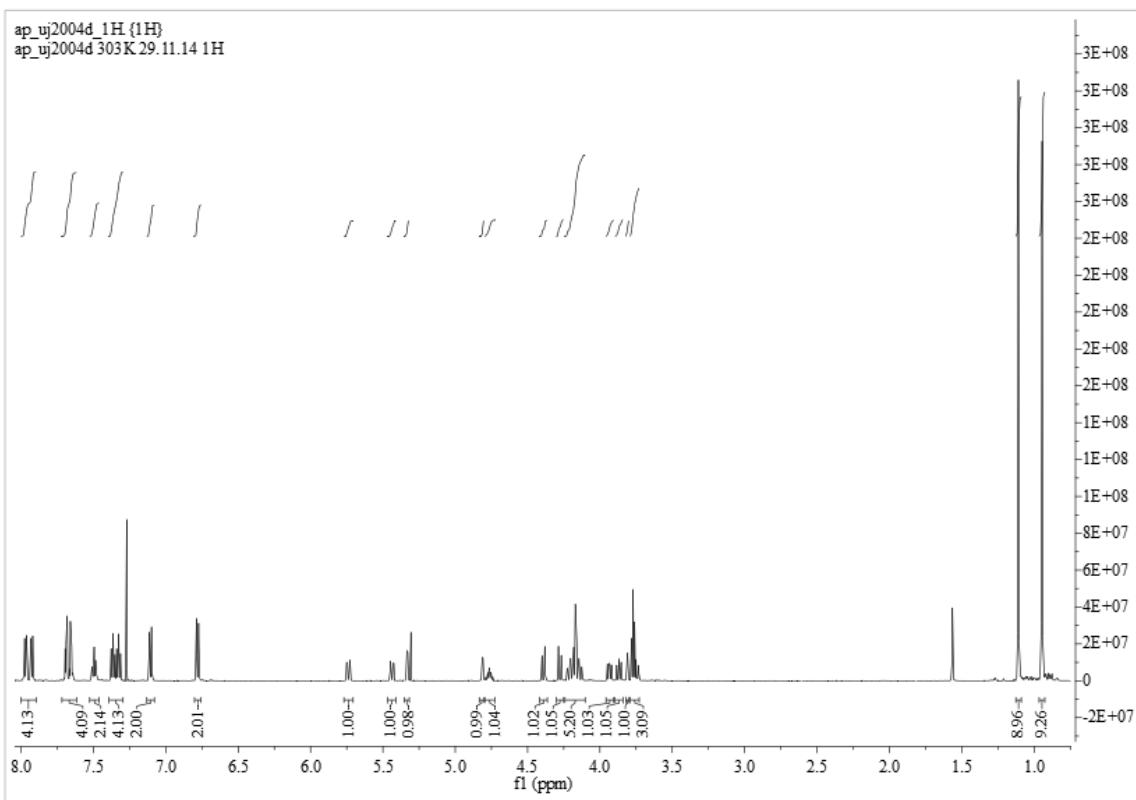


Abb. 9-1 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) des Glycosylprodukts 44

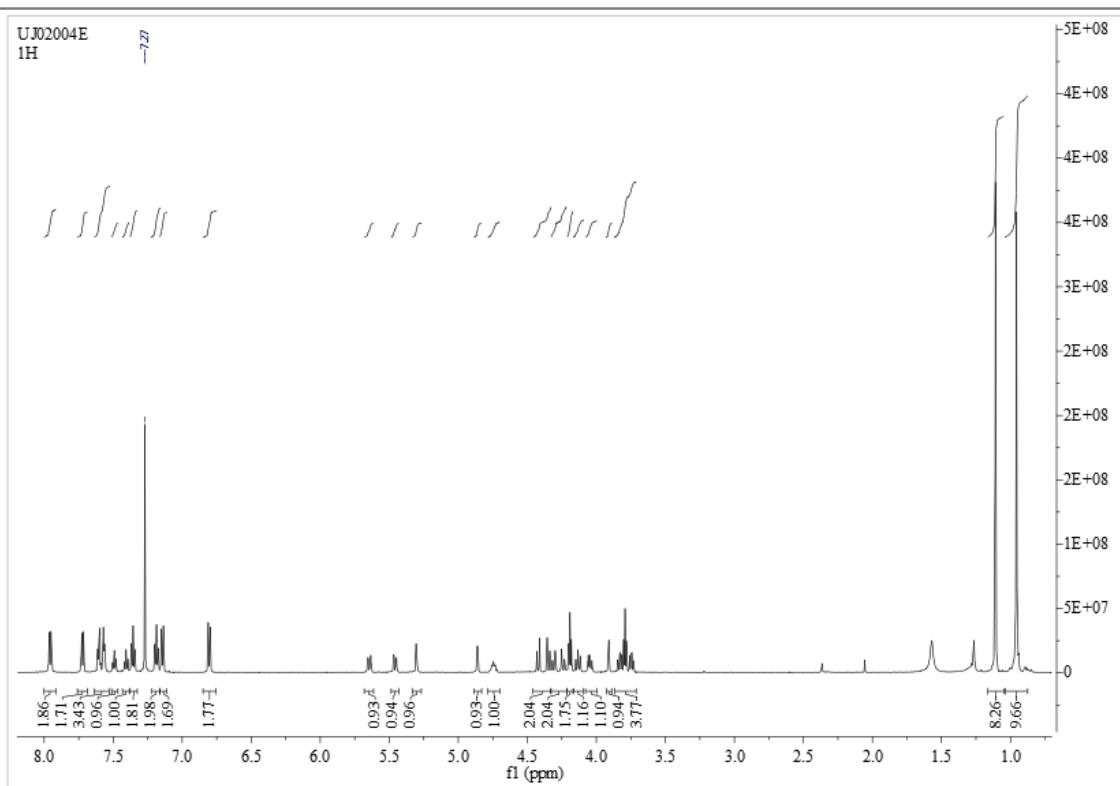


Abb. 9-2 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) des Glycosylprodukts 45

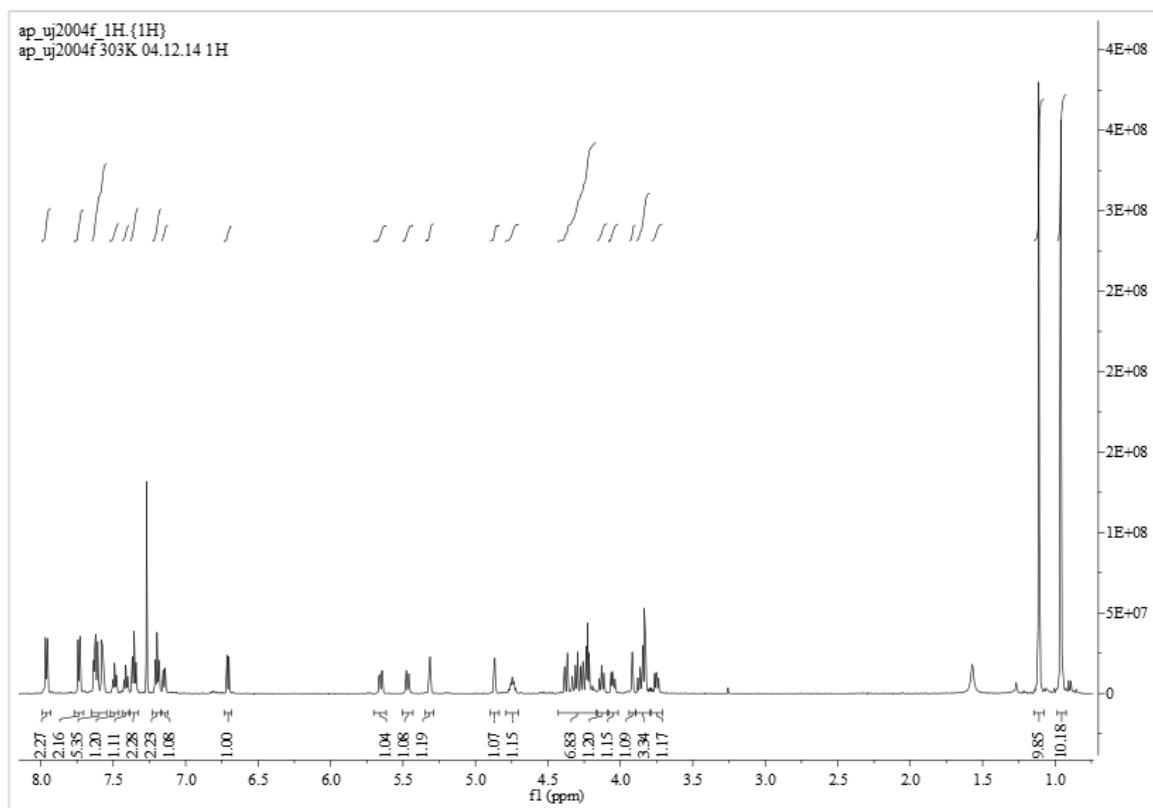


Abb. 9-3 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) des Iodderivats **61**

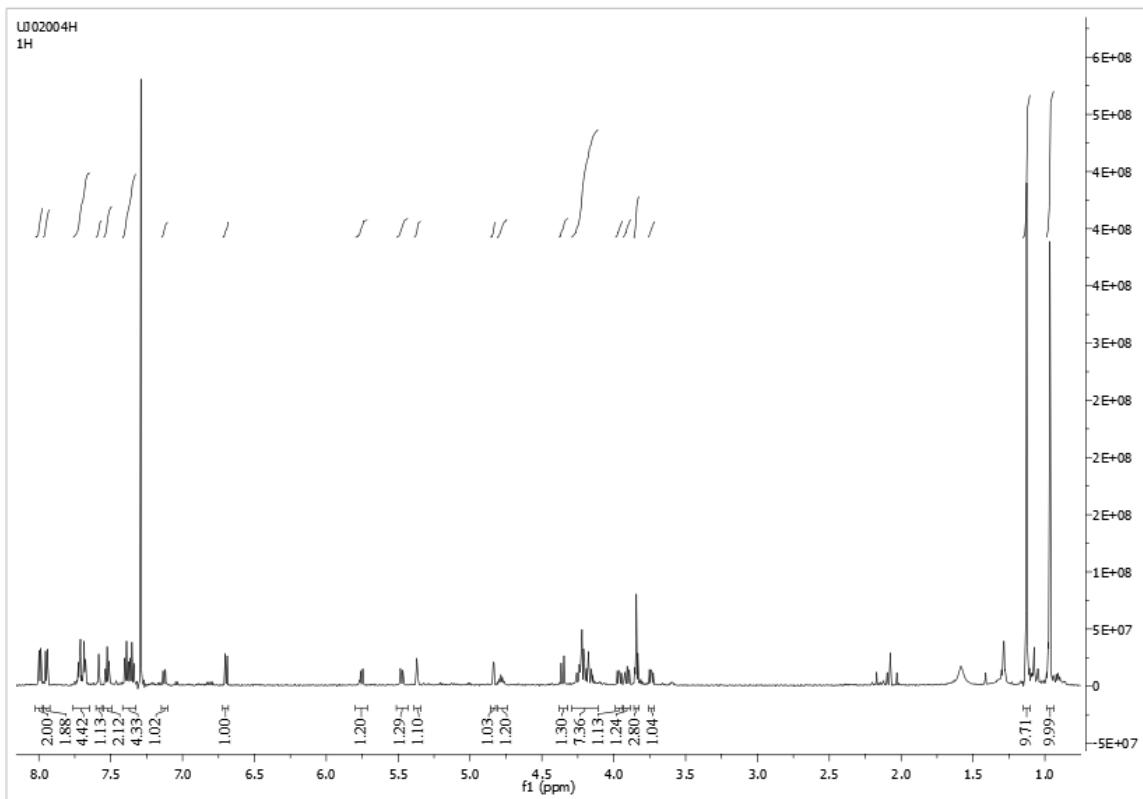


Abb. 9-4 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl_3) des Iodderivats **62**

9.3 Ergänzung zu Kapitel 4.1.3

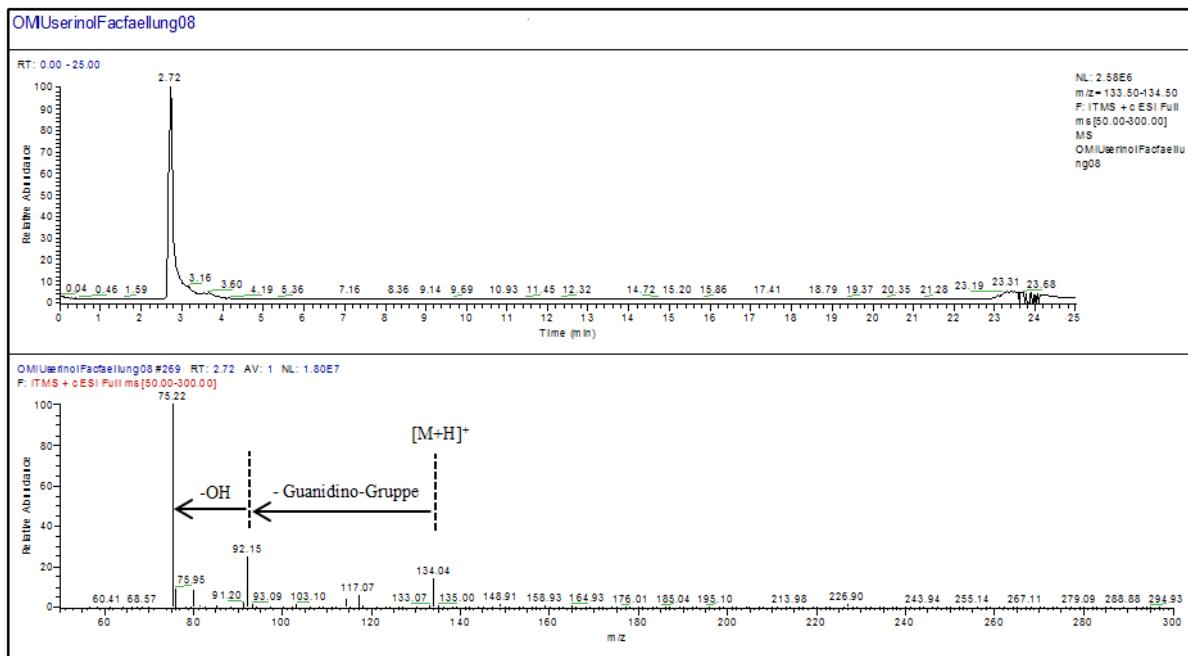


Abb. 9-5 Chromatogramm und Massenspektrum des Guanidinoserinols **8** in Wasser

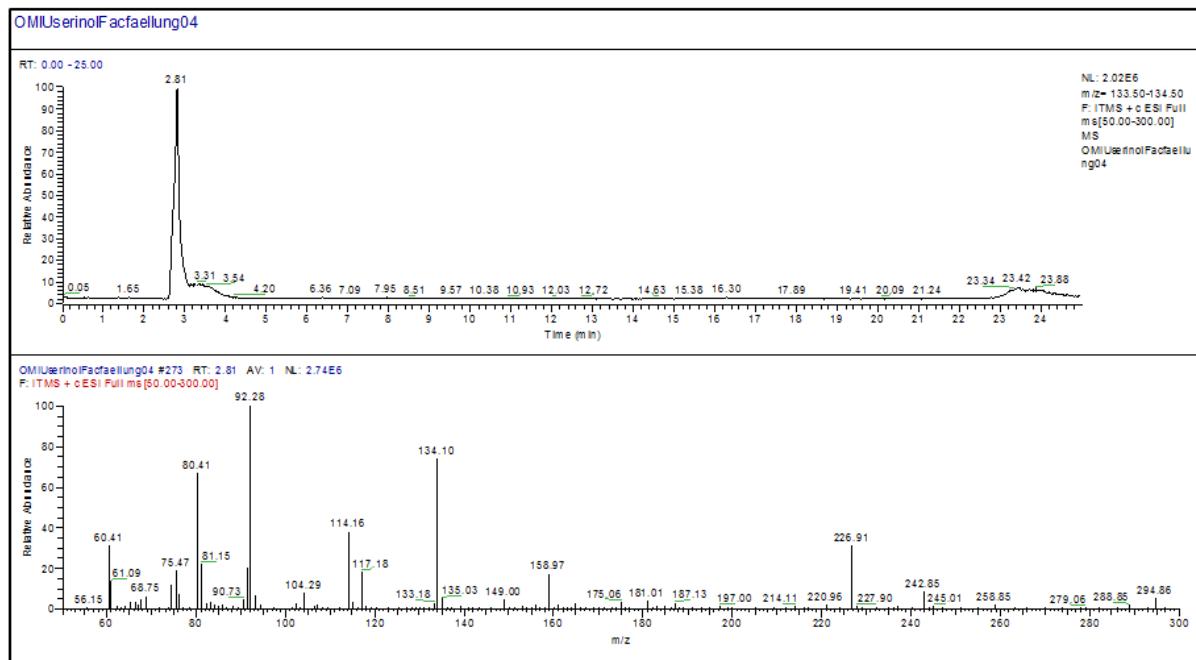


Abb. 9-6 Chromatogramm und Massenspektrum des Guanidinoserinols **8** in der Fermentationsbrühe

9.4 Ergänzung zu Kapitel 4.1.4

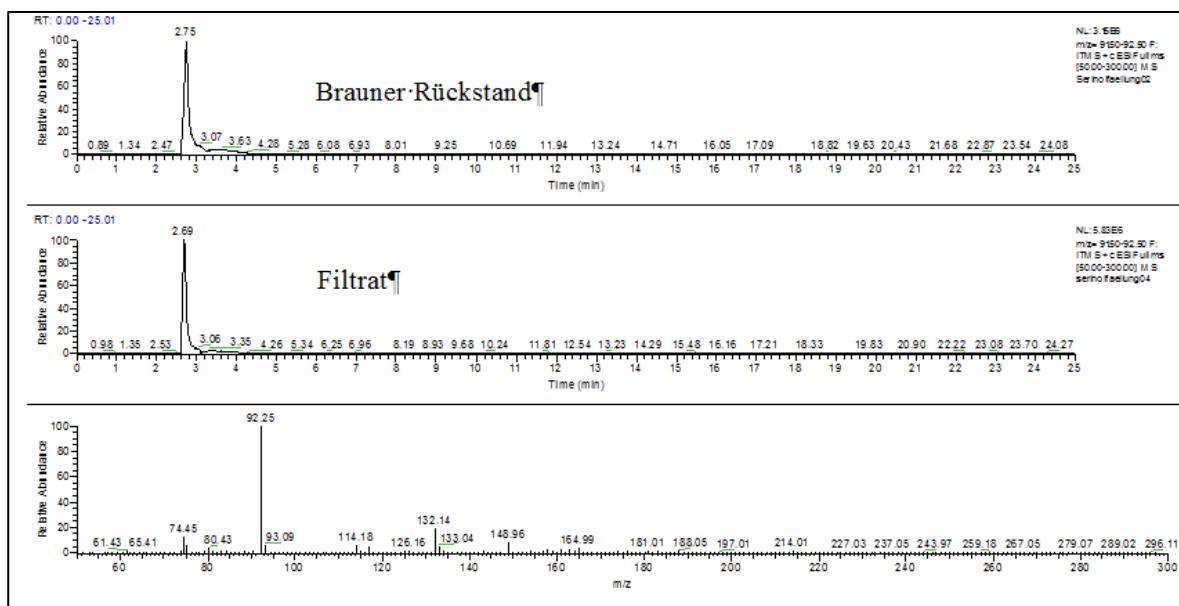
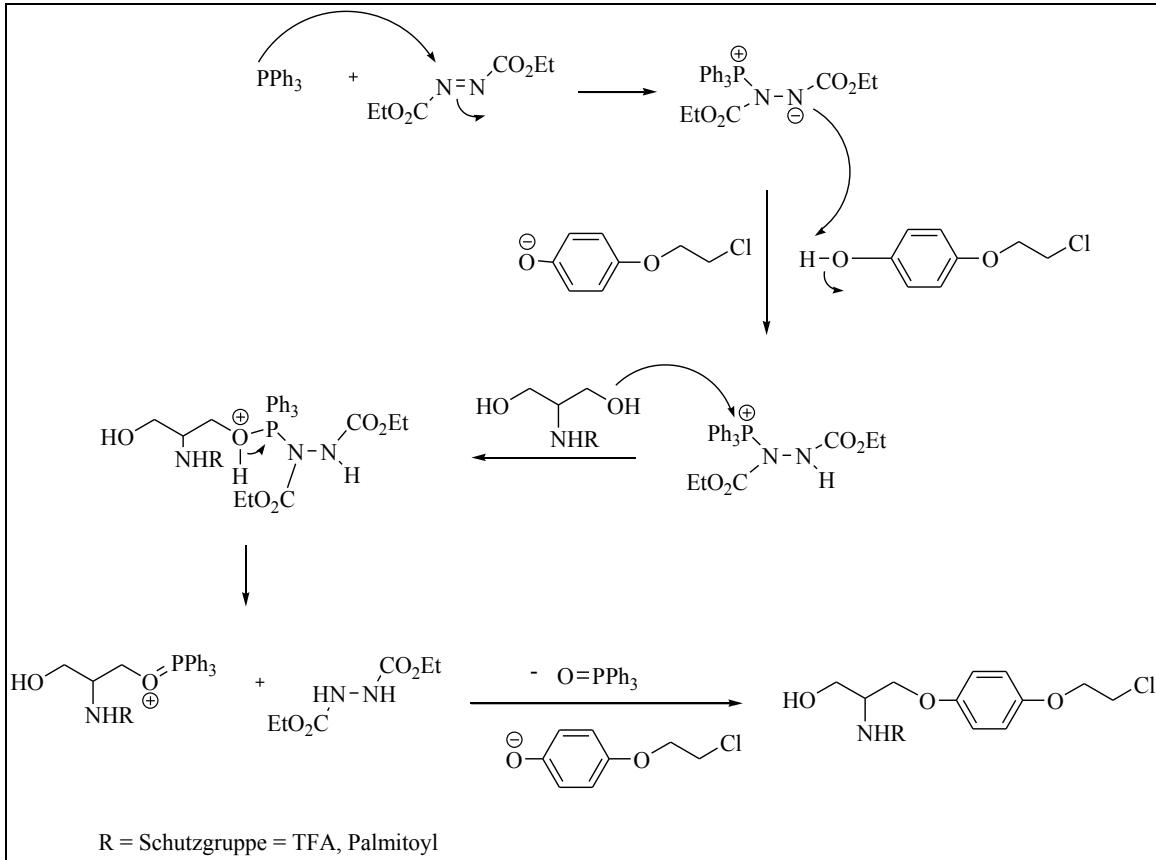
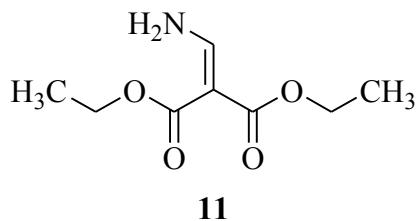


Abb. 9-7 Darstellung der Chromatogramme für das gefällte protonierte Serinol in der Fermentationsbrühe (unten Filtrat, oben Feststoff) sowie das Massenspektrum für das Filtrat

9.5 Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion



9.6 Nebenprodukt: Becv-Amin 11

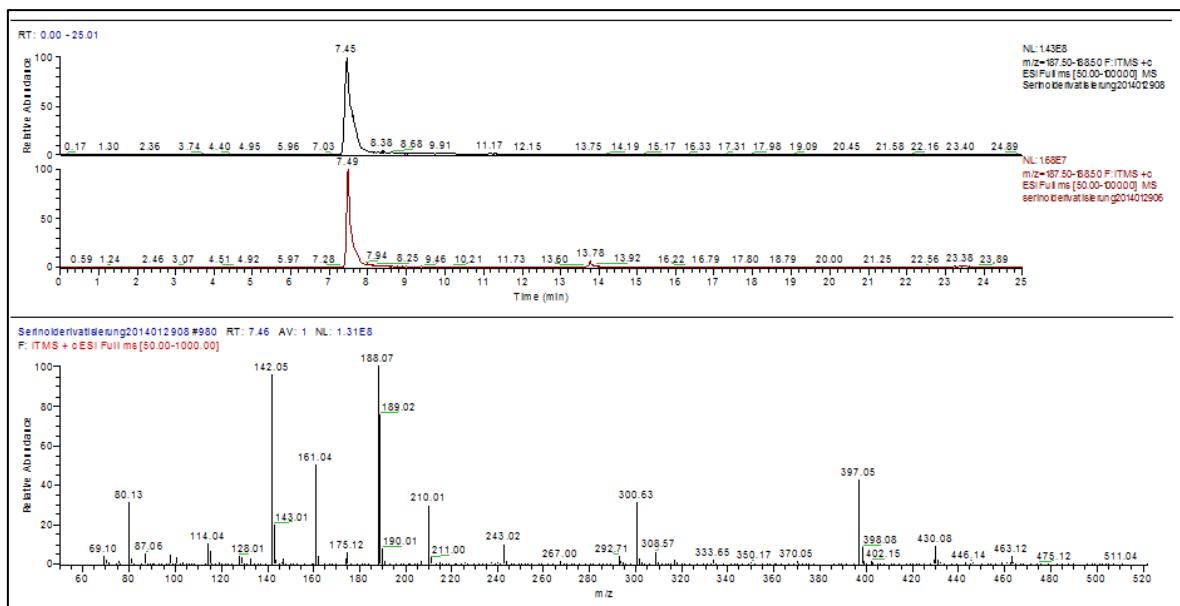


¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 8,95 – 8,28 (m, 1H, NHH), 8,10 (dd, *J* = 8,6; *J* = 15,4 Hz, 1H, CHolefin), 6,44 (s, 1H, NHH), 4,22 (q, ³*J* = 7,1 Hz, 2H, CH₂, Ethyl), 4,14 (q, ³*J* = 7,1 Hz, 2H, CH₂, Ethyl), 1,30 (t, ³*J* = 7,1 Hz, 3H, CH₃, Ethyl), 1,25 (t, ³*J* = 7,1 Hz, 3H, CH₃, Ethyl).

Überprüfung Becv-Amin-Bildung:

LCMS-Parameter siehe Kapitel 7.1.2. Das Vinyl-n-octanoat und das Wasser bilden ein Zweiphasensystem. Es werden jeweils 100 µL der organischen sowie der wässrigen Phase entnommen und mit 900 µL H₂O_{reinst} verdünnt. Beide Proben werden vermessen. Das Chromatogramm zeigt die Massenspur der jeweiligen Phase. Das Produkt **11** wird bei ca. 7,45 min eluiert.

Das Massenspektrum zeigt das typische Frakmentierungsmuster des Becv-Amins. Es sind die Masse m/z 188,07 sowie das Natriumaddukt m/z 210,01 zu erkennen. Außerdem ist auch nach der Abspaltung von einem Molekül Ethanol das entsprechende Fragment bei m/z 142,05 zu sehen.



9.7 Sprühtröckner



Abb. 9-8 Sprühtröckner (Büchi)

9.7.1 Ergänzung Kapitel 4.1: GCMS-Messungen

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Chromatogramme und Massenspektren der mittels Sprühtröcknung getrockneten Fermentationsproben. Zum Vergleich wurde ebenfalls reines Serinol versprüht und vermessen sowie unbehandeltes Serinol. Die GCMS-Parameter sind im Experimentellen Teil im Kapitel 7.1.2 dargestellt.

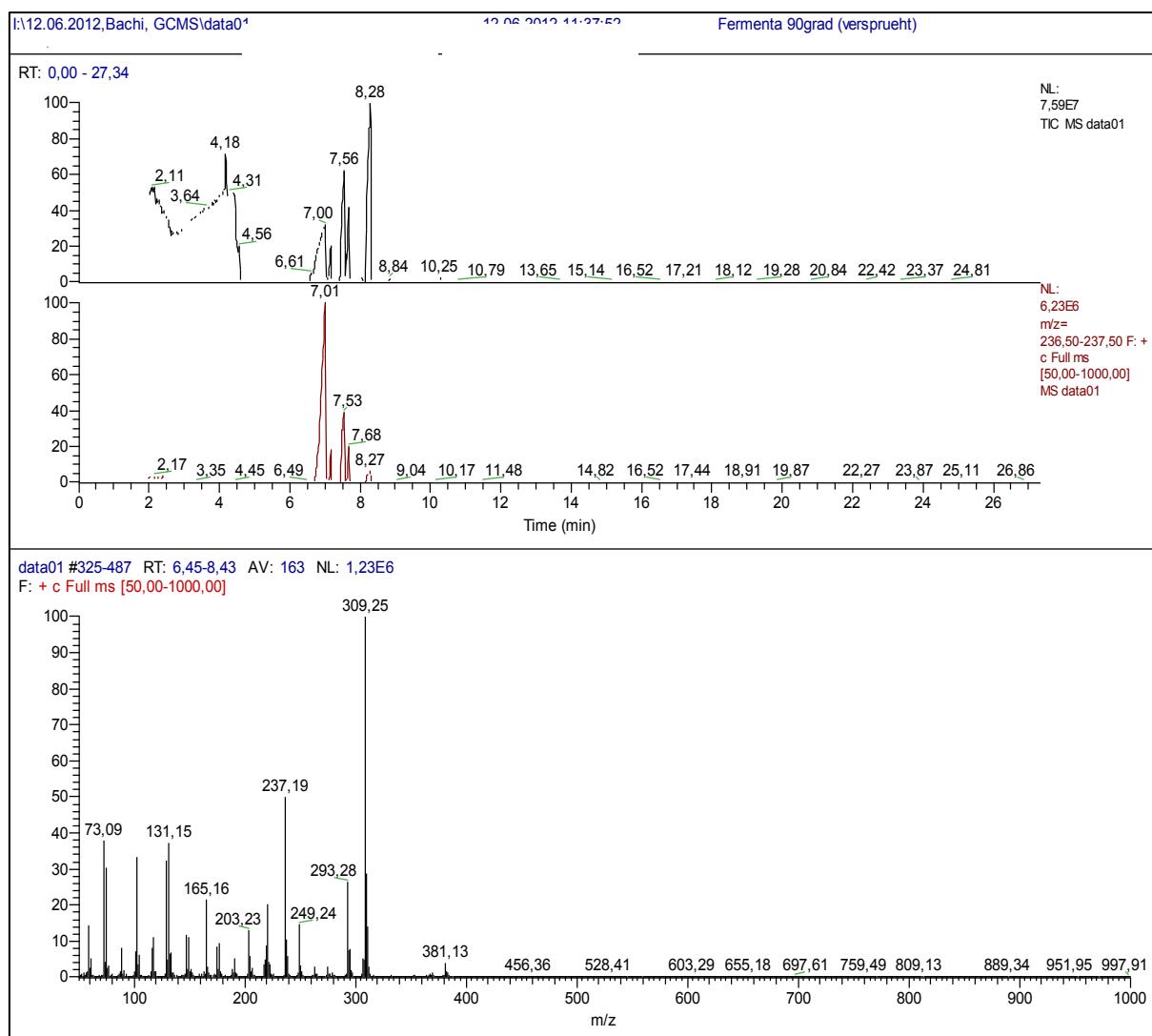


Abb. 9-9 Totalionenchromatogramm, Massenspur des zweifach-derivatisierten Serinols sowie das Massenspektrum im Retentionsbereich von 6,45-8,43 min. Die Fermentationsbrühe wurde bei 90 °C versprüht.

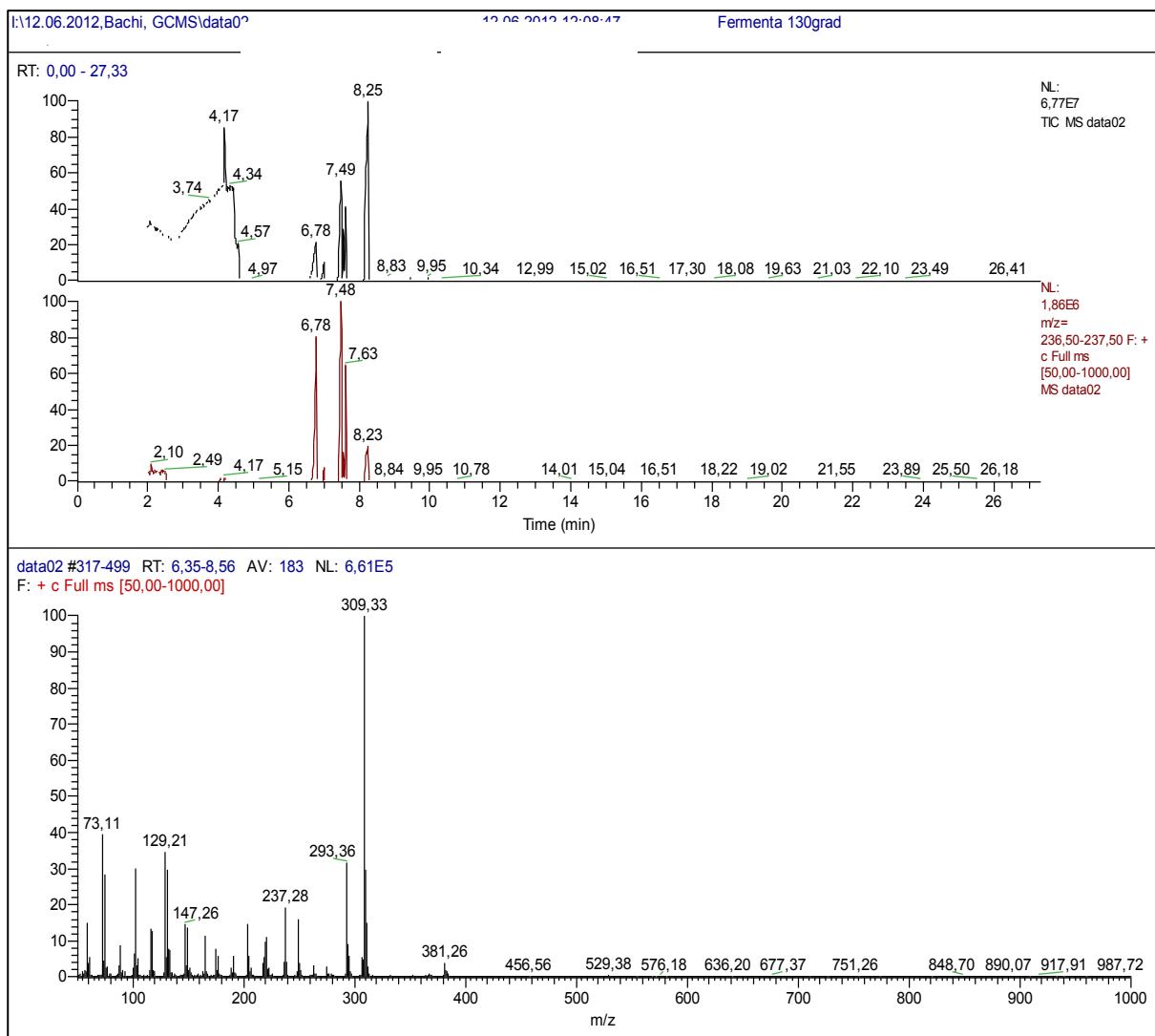


Abb. 9-10 Totalionenchromatogramm, Massenspur des zweifach-derivatisierten Serinols sowie das Massenspektrum im Retentionsbereich von 6,35-8,56 min. Die Fermentationsbrühe wurde bei 130 °C versprüht.

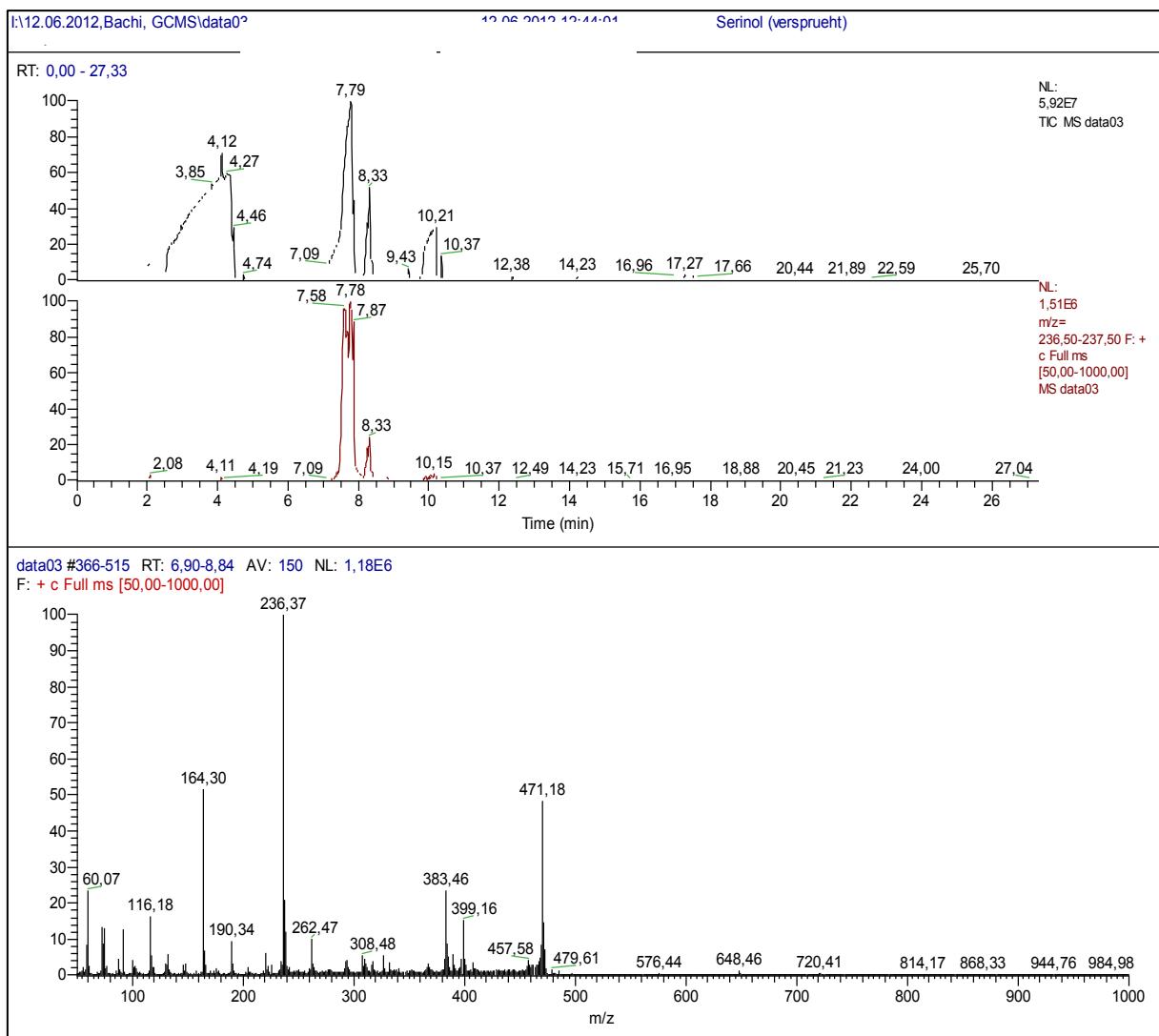


Abb. 9-11 Totalionenchromatogramm, Massenspur des zweifach-derivatisierten Serinols sowie das Massenspektrum im Retentionsbereich von 6,90-8,84 min. Das Serinol wurde bei 90 °C versprüht.

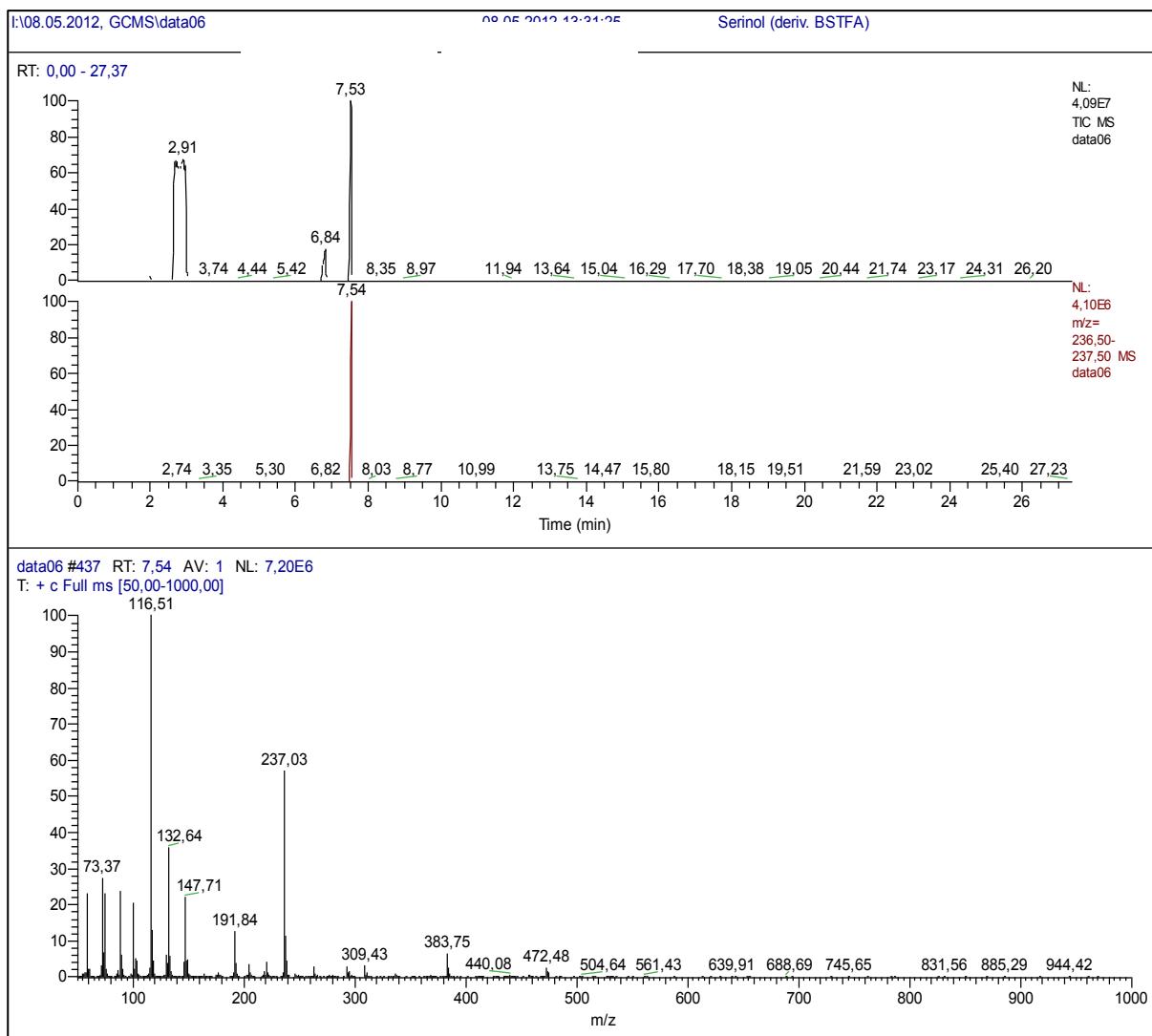


Abb. 9-12 Totalionenchromatogramm, Massenspur des zweifach-derivatisierten Serinols sowie das Massenspektrum bei einer Retentionszeit von 7,54 min. Das unbehandelte Serinol diente als Referenz.

9.8 Chemikalienliste

Chemikalien	Bezeichnung	Hersteller
Ethanol	Absolute Baker HPLC Analyzed Lot. No.: 0822709004	Merck
Methanol	Baker HPLC Analysed Lot. No.	Merck

Wasser mit 0,1 %**Ameisensäure**

**TLC silica gel 60 F254 plates,
25 aluminum sheets, 20x20 cm**

ALDO International

**Silica gel 60 for column
chromatography, 40-63 µm, 5
kg**

ALDO International

Serinol 98% Galakhim/ ALDO
International

Ethyltrifluoracetat Galakhim

N-Hydroxysuccinimid Galakhim

Diethylazodicarboxylat Galakhim

Triphenylphosphin Acros

18-Krone-6 Galakhim

Di-*tert*-butyldicarbonat ALDO International

2,2-Dimethoxypropan 98% ALDO International

**(1*S*)-(+)-10-
Camphersulfonsäure** Galakhim

Acetylchlorid Galakhim

Trifluoroessigsäure ALDO International

β-D-Galactosepentaacetat Galakhim

β-D-Galactosepentaacetat 98% Aldrich
Lot # STBC9543V

β-D-Glucosepentaacetat Galakhim

N-Iodsuccinimid 98% ALDO International

Trifluormethansulfonsäure ALDO International

**Acetonitril gradient grade, for
HPLC** Galakhim

Calciumhydrid 0-20 mm grain
size, up to 15% powder ca.
93% ALDO International

Dichlormethan, anhydrous	99,8%	ALDO International
N,N-Dimethylformamid	99%	ALDO International
Molecularsiebe 3Å	8-12 mesh	ALDO International
Molecularsiebe 4Å	8-12 mesh	ALDO International
Pyridin	Pyridine, for analysis ACS, 99+%	ALDO International
4-Methoxyphenol	Purum, 98%, (HPLC) Lot # BCBK2171V	Fluka Analytical
Tetramethylammoniumchlorid	Reagent grade, 98% Lot # MKBP7478V	Sigma-Aldrich
4-Phenoxyphenol	99% Lot # 00523MRV	Aldrich
Tetrabutylammonium- hydrogensulfat	97% Lot # BCBL2458V	Sigma-Aldrich
Ethyltrifluoracetat	99% Lot # MKBL2224V	Aldrich
Di-tert-butylsilylbis(trifluor- methansulfonat)	97% Lot #SHBC8351V	Aldrich

9.9 Geräteliste

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Pipetten	Research 0,5-10µL, 10- 100µL, 100-1000µL, 100- 5000µL	Eppendorf
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf
LCMS	Baujahr	
Pumpen	MS Pump Plus-Finnigan Surveyer	Thermo Scientific
Autosampler	Plus-Finnigan Surveyer	Thermo Scientific
UV-Detektor	PDA-Plus-Finnigan Surveyer	Thermo Scientific
MS-Detektor	Finnigan LTQ	Thermo Scientific
Säule	Kinetex C18 (150 x 3mm, 2,1µm)	Phenomenex
Säulenofen		
Software	Xcalibur	Thermo Scientific
LCMS	Baujahr	

Pumpen	MS Pump Plus-Finnigan Surveyer	Thermo Scientific
Autosampler	Plus-Finnigan Surveyer	Thermo Scientific
UV-Detektor	PDA-Plus-Finnigan Surveyer	Thermo Scientific
MS-Detektor	Finnigan LTQ-velos pro	Thermo Scentific
Säule	Kinetex C18 (150 x 3mm, 2,1µm)	Phenomenex
Säulenofen		
Software	Xcalibur	Thermo Scientific
GCMS	ITQ 1100	
Trace GC Ultra		
Autosampler Tri Plus		
Säule		

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den

Unterschrift

